REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE HADJ LAKHDAR-BATNA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE CHIMIE

Thèse de Doctorat 3ème Cycle

SPECIALITE : Chimie Organique

OPTION : Chimie des Substances Naturelles d'Intérêt Biologique

Présentée par: **KHOUNI LYES**

Thème

Métabolites secondaires de *Ononis pusilla* L. (Leguminosae)

Soutenue le 21/04/2016

JURY

Hamada HABA	**Prof. - Université de Batna**	**Président**
Mohammed BENKHALED	**Prof. - Université de Batna**	**Rapporteur**
Ammar DIBI	**Prof. - Université de Batna**	**Examinateur**
Salah AKKAL	**Prof. - Université de Constantine**	**Examinateur**
Abdelhamid BENKOUIDER	**M.C.A - Université de Batna**	**Examinateur**
Belgacem LEGSEIR	**Prof. - Université de Annaba**	**Examinateur**

2015-2016

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE HADJ LAKHDAR-BATNA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE CHIMIE

Thèse de Doctorat 3ème Cycle

SPECIALITE : Chimie Organique

OPTION : Chimie des Substances Naturelles d'Intérêt Biologique

Présentée par: **KHOUNI LYES**

Thème

Métabolites secondaires de *Ononis pusilla* L. (Leguminosae)

Soutenue le 21/04/2016

JURY

Hamada HABA	**Prof. - Université de Batna**	**Président**
Mohammed BENKHALED	**Prof. - Université de Batna**	**Rapporteur**
Ammar DIBI	**Prof. - Université de Batna**	**Examinateur**
Salah AKKAL	**Prof. - Université de Constantine**	**Examinateur**
Abdelhamid BENKOUIDER	**M.C.A - Université de Batna**	**Examinateur**
Belgacem LEGSEIR	**Prof. - Université de Annaba**	**Examinateur**

2015-2016

Remerciements

Ce travail de recherche a été réalisé au Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (LCCE) de la Faculté des Sciences de l'Université de Batna, sous la direction du Professeur BENKHALED Mohammed. Je tiens à le remercier pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir permis de préparer mon Doctorat de troisième cycle dans les meilleures conditions. Je le remercier également pour tous ses efforts et ses encouragements et pour le soutien qu'il m'a témoigné tout au long de cette étude.

Je tiens particulièrement à remercier Monsieur le professeur Hamada HABA de l'université de Batna, pour m'avoir également suivi dans l'accomplissement de ce travail et pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

J'aimerais remercier vivement Monsieur le Professeur Ammar DIBI de l'université de Batna, Monsieur le Professeur Salah AKKAL de l'université de Constantine, Monsieur le Professeur Belgacem LEGSEIR de l'université de Annaba et Monsieur Abdelhamid BENKOUIDER Maître de Conférences à l'Université de Batna pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Abreviations et symboles

APG	angiosperm Phylogeny Group
C	concentration
CC	chromatographie sur colonne ouverte
CCE	chromatographie sur couche épaisse
CCM	chromatographie sur couche mince
CLHP	chromatographie liquide haute performance
COSY H-H	correlated spectroscopy
d	doublet
dd	doublet de doublets
1D	monodimensionnel
2D	bidimensionnel
DEPT	distortionless enhancement by polarisation transfer
ESI	spectrométrie de masse par inisation douce
F	fraction
g	gramme
h	heure
HMBC	heteronuclear multiple bonding connectivity
HSQC	heteronuclear single quantum connectivity
HR	haute résolution
Hz	Hertz
IR	infra-rouge
m	multiplet
mg	milligramme
MHz	MégaHertz
ml	millilitre
MS/MS	mass spectroscopy / mass spectroscopy
m/z	masse/charge d'un ion
nd	non déterminé
nm	nanomètre
ppm	partie par million
quint	quintuplet

RMN ^{13}C	résonance magnétique nucléaire du carbone 13
RMN ^{1}H	résonance magnétique nucléaire du proton
s	singulet
sF	sous-fraction
t	triplet
tR	Temps de rétention
uma	unité de masse atomique
UV	ultra-violet
VLC	chromatographie liquide sous vide
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
J	constante de couplage exprimée en Hz
δ	déplacement chimique exprimé en ppm
$[\alpha]_D$	pouvoir rotatoire

Sommaire

Introduction …… 1

CHAPITRE I : PRESENTATION DU GENRE *ONONIS* (FABACEAE)

I.1. Famille Fabaceae…..…… 3
I.2. Genre *Ononis*…… 5
I.3. Usage traditionnel et propriétés biologiques…… 5
I.4. Travaux antérieurs réalisés sur le genre *Ononis*……... 6
I.4.1. Produits isolés de *Ononis natrix*…… 6
I.4.2. Produits isolés de *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*…….. 8
I.4.3. Produits isolés de *Ononis speciosa*…… 10
I.4.4. Produits isolés de *Ononis angustissima*……. 11
I.4.5. Produits isolés de *Ononis serrata*…….. 11
I.4.6. Produits isolés de *Ononis vaginalis*……... 12
I.4.7. Produits isolés de *Ononis spinosa*……..... 12

CHAPITRE II : ETUDE DES FLAVONOIDES ET DERIVES DE L'ACIDE ANTHRANILIQUE

II.1. Flavonoïdes.…… 14
II.1.1. Structures chimiques et classification……..….. 14
II.1.2. Biosynthèse des flavonoïdes…….…… 16
II.1.3. Isoflavonoïdes…….…….. 17
II.1.4. Biosynthèse des Isoflavonoïdes…….……... 19
II.1.5. Propriétés biologiques des flavonoïdes……. 19
II.2. Dérivés de l'acide anthranilique……..... 21
II.2.1. Biosynthèse de l'acide anthranilique……. 21
II.2.2. Synthèse de l'acide anthranilique…….. 22
II.2.3. Alcaloïdes dérivés de l’acide anthranilique…….. 22
II.2.4. Autres dérivés naturels de l'acide anthranilique……... 24
II.2.5. Propriétés biologiques des dérivés de l’acide anthranilique……. 25

CHAPITRE III : ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'ESPECE *ONONIS PUSILLA*

III.1. Aspect botanique……...…… 28

III.2. Travaux antérieurs sur l'espèce *Ononis pusilla*…… 28

III.3. Extraction ……. 29

III.4. Séparation et purification…….. 30

III.5. Détermination structurale des produits obtenus…… 32

III.5.1. Elucidation structurale du composé **1**…….. 32

III.5.2. Elucidation structurale du composé **2**…….. 41

III.5.3. Elucidation structurale du composé **3**……..... 45

III.5.4. Elucidation structurale du composé **4**…….. 48

III.5.5. Elucidation structurale du composé **5**…….. 53

III.5.6. Elucidation structurale du composé **6**……..... 61

III.5.7. Elucidation structurale du composé **7**……..... 69

III.5.8. Elucidation structurale du composé **8**……..... 74

III.5.9. Elucidation structurale du composé **9**…….. 78

III.5.10. Elucidation structurale du composé **10**…….. 82

Conclusion ……..…… 87

CHAPITRE IV : PARTIE EXPERIMENTALE

IV.1. Matériel et méthodes……..…… 90

IV.1.1. Récolte du matériel végétal……. 90

IV.1.2. Techniques analytiques de séparation …… 90

IV.1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)……. 90

IV.1.3. Techniques préparatives de séparation…….. 90

IV.1.3.1. Chromatographie sur couche épaisse (CCE)……. 90

IV.1.3.2. Chromatographie liquide sous vide (VLC)……... 90

IV.1.3.3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)……. 91

IV.1.3.4. Chromatographie liquide semi-préparative à haute pression…… 91

IV.1.4. Méthodes physicochimiques……... 91

IV.1.4.1. Spectrométrie de masse……. 91

IV.1.4.2. Spectrométrie de RMN…….. 91

IV.1.4.3. Spectrométrie UV…….. 91
IV.1.4.4. Spectrométrie IR……... 92
IV.1.4.5. Pouvoir rotatoire…… 92
IV.2. Extraction…….. 92
IV.3. Etude de l'extrait d'acétate d'éthyle……. 92
IV.3.1. Fractionnement…… 92
IV.3.2. Purification…….. 93
IV.3.2.1. Purification de la fraction F9……. 93
IV.3.2.2. Purification de la fraction F6……. 95
IV.3.2.3. Purification de la fraction F7……. 95
IV.3.3. Hydrolyse alcaline des composés **1**, **2** et **3**…….. 96
IV.4. Composés isolés de l'espèce *Ononis pusilla*……. 97

Références bibliographiques ……..… 100

INTRODUCTION

Les plantes médicinales ont été, depuis la nuit des temps, l'arsenal thérapeutique de l'homme. Elles connaissent en ce moment un intérêt considérable de la part du public et des chercheurs. Les raisons sont multiples. Dans les pays sous-développés, voire en voie de développement, c'est le moyen le plus utilisé de se faire guérir. Tandis que dans les pays développés, les plantes représentent une source importante pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour de futurs agents thérapeutiques.

Les plantes produisent un grand nombre de métabolites secondaires, avec une large gamme de propriétés pharmacologiques et toxicologiques. Actuellement, si on évalue environ 500 000 espèces végétales dans le monde, un nombre relativement infime a été étudié sur le plan chimique ou pharmacologique [1]. Cette riche biodiversité mérite d'être valorisée car elle renferme une diversité chimique et structurale très importante et offre aux chercheurs une multitude de sujets de recherche, en particulier pour accéder à des molécules dotées de propriétés biologiques intéressantes.

C'est dans cette perspective que notre laboratoire a engagé un programme de recherche justement destiné à la valorisation de la flore locale, par la découverte éventuelle de principes actifs nouveaux.

Le travail qui m'a été confie rentre dans ce cadre et a pour objectif l'investigation chimique d'une plante Fabaceae appartenant au genre *Ononis* : *O. pusilla* [2]. Notre choix est dicté par l'utilisation, relativement importante en médecine traditionnelle, des plantes du genre *Ononis* pour guérir diverses maladies. On citera l'ictère, les troubles des voies urinaires, la nécrose, l'herpès et autres maladies plus graves comme le cancer de la peau [3-5]. Ce choix est aussi dicté par la richesse remarquable des plantes de la famille Fabaceae et plus particulièrement celles du genre *Ononis*, en métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique comme les résorcinols alkylés décrits comme inhibiteurs de la glycérol-3-phosphate déhydrogénase, les dérivés de l'acide anthranilique, les flavonoïdes, les isocoumarines et autres pétocarpanes pour ne citer que ceux là.

Une motivation supplémentaire quant à l'étude chimique de l'espèce *O. pusilla*, tient du fait que cette dernière a fait l'objet d'une seule étude phytochimique. Cette étude a juste détecté la présence de stérols et d'un triterpène nommé onocérine [6].

Notre travail de recherche sera présenté en quatre chapitres :

- Le premier chapitre reporte une étude bibliographique traitant de la systématique de la famille Leguminosae (Fabaceae), la présentation du genre *Ononis*, l'usage des plantes du genre en question en thérapeutique traditionnelle ainsi que leurs propriétés biologiques. Il est également reporté les études chimiques antérieures réalisées sur les espèces de ce genre.

- Le deuxième chapitre est consacré à l'étude des flavonoides et acides anthraniliques, classes de métabolites secondaires largement rencontrés dans le genre *Ononis*.

- Le troisième chapitre est consacré aux résultats personnels obtenus dans le cadre de cette investigation chimique des parties aériennes de la plante *Ononis pusilla*. Cette partie décrit l'isolement, la purification et la caractérisation structurale des métabolites secondaires isolés.

- Le quatrième chapitre reprend les travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de ce travail.

CHAPITRE I

PRESENTATION DU GENRE ONONIS

(FABACEAE)

I.1. Famille Fabaceae

La famille Fabaceae (ou Leguminosae) constitue la troisième plus grande famille des angiospermes en nombre d'espèces après les familles Orchidaceae et Asteraceae [7]. Les plantes qui forment cette famille sont distribuées à travers le monde et se localisent principalement dans les zones tropicales et tempérées. Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées pour la consommation humaine en raison de leur huile et leurs fibres. Elles sont aussi utilisées comme combustible pour leur bois et remèdes en médecine traditionnelle [8].

La famille Fabaceae renferme 745 genres et plus de 19500 espèces, réparties entre trois sous-familles : Papilionoideae (Faboideae), Caesalpinioideae et Mimosoideae [9]. La sous-famille Papilionoideae est la plus importante car elle inclut plus des deux tiers des espèces légumineuses [8]. La position systématique de cette famille est présentée dans le tableau ci-dessous.

Classification	**APGII (1998)**
Règne :	Plantae
Embranchement :	Spermatophyta
Sous embranchement :	Angiospermae
Classe :	Eudicotyledonae
Sous-classe :	Rosidae
Ordre :	Eurosidae I
Sous-ordre :	Fabales
Famille :	**Fabaceae (Leguminosae)**
Sous-famille :	Faboideae
	Mimosoideae
	Caesalpinoideae

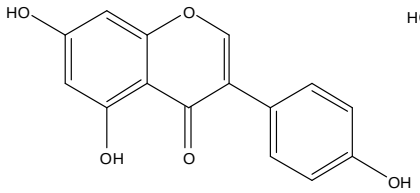
Tableau I-1 : Phylogénie de la famille Fabaceae (Leguminosae)

Les légumineuses sont souvent caractérisées par un métabolisme azoté élevé, du fait de leur capacité à fixer l'azote atmosphérique via la symbiose légumineuses-*rhizobium*. Ceci permet aux plantes de cette famille (la plupart des Papilionoideae et Mimosoideae, 25% de Caesalpinoideae) d'obtenir des taux élevés en azote au niveau de leurs racines en fonction de

la demande de leur métabolisme [8,9]. Elles produisent des métabolites secondaires azotés plus que les autres familles de plantes. Ces métabolites comprennent des alcaloïdes, amines, acides aminés non protéiques, glycosides cyanogéniques et peptides. Elles produisent aussi des composés non azotés comme les composés phénoliques (phénylpropanoïdes, flavonoïdes, anthocyanes, tanins et coumarines) et terpéniques (triterpènes et stéroïdes) [9].

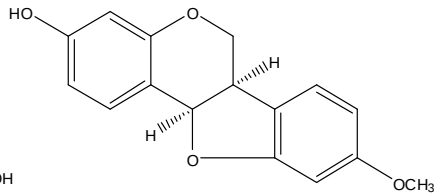
Voici quelques exemples de molécules des principales classes de métabolites secondaires rencontrés au sein de la famille Fabaceae.

Isoflavanes



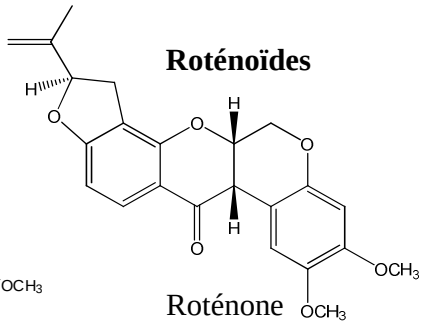
Génistéine

Ptérocarpanes



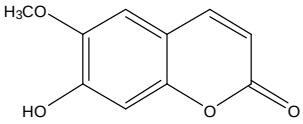
Médicarpine

Roténoïdes



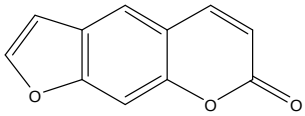
Roténone

Coumarines



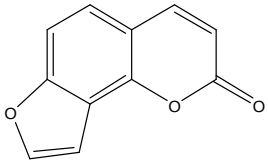
Scopolétine

Furanocoumarines



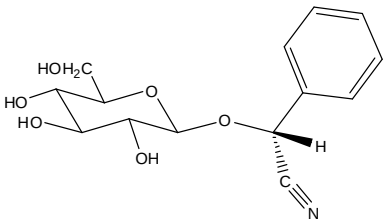
Psoralène

Furocoumarines



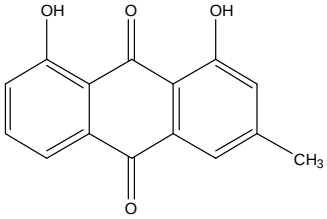
Angélicine

Glucosides cyanogéniques



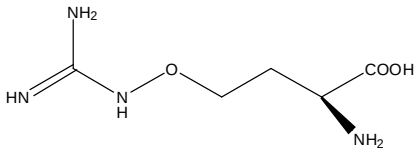
Prunasine

Anthraquinones



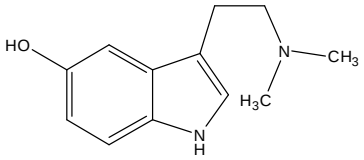
Chrysophanol

Acides aminés non protéiques



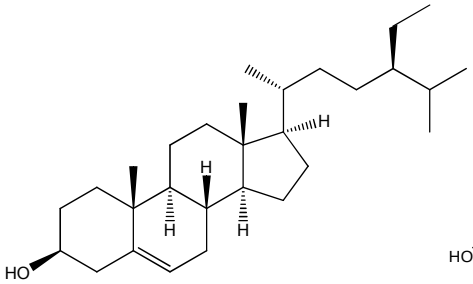
L-canavanine

Alcaloïdes indoliques



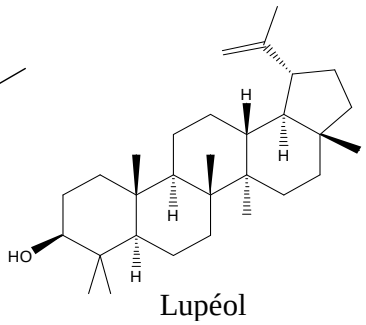
Bufoténine

Triterpènes stéroïdiques



β-Sitostérol

Triterpènes pentacycliques



Lupéol

I.2. Genre *Ononis*

Le genre *Ononis* appartient à la tribu des trifolieae qui constitue une des 31 tribus relevant de la sous-famille Papilionoideae. Ce genre qui compte environ 75 espèces, est largement distribué dans la région méditerranéenne, les îles Canaries, l'Europe et l'Asie centrale [2]. En Algérie, on rencontre principalement les espèces suivantes [10] :

- *O. cenisia* (L.)
- *O. fruticosa* (L.)
- *O. spinosa* (L.)
- *O. hispida* (Desf.)
- *O. aragonensis* (Asso.)
- *O. minutissima* (L.)
- ***O. pusilla* (L.)**
- *O. serotina* (Pomel.)
- *O. natrix* (L.)
- *O. ornithopodioides* (L.)
- *O. biflora* (Desf.)
- *O. sicula* (Guss.)
- *O. antennata* (Pomel.)
- *O. pubescens* (L.)
- *O. viscosa* (L.)
- *O. incisa* (Coss.)
- *O. laxiflora* (Desf.)
- *O. reclinata* (L.)
- *O. pendula* (Desf.)
- *O. euphrasiaefolia* (Desf.)
- *O. variegata* (L.)
- *O. alopecuroides* (L.)
- *O. alba* (Poiret.)
- *O. crinita* (Pomel.)
- *O. avellana* (Pomel.)
- *O. rosea* (Dur.)
- *O. villosissima* (Desf.)
- *O. serrata* (Forsk.)
- *O. hirta* (Desf.)
- *O. mitissima* (L.)
- *O. cephalantha* (Pomel.)
- *O. diffusa* (Ten.)
- *O. cossoniana* (Boiss.)

I.3. Usage traditionnel et propriétés biologiques

La recherche bibliographique menée sur les espèces du genre *Ononis* montre qu'elles ont des propriétés thérapeutiques intéressantes et sont utilisées en médecine traditionnelle pour guérir diverses maladies comme le traitement de l'ictère, les troubles des voies urinaires, l'herpès et les maladies de la peau [3-5].

Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance pharmacologique :

- *O*nonis *spinosa* : cette plante est connue depuis longtemps pour son action diurétique. La racine est efficace contre la goutte et diverses affections de l'appareil urinaire et prévient la formation de calculs rénaux et biliaires [11].
- *Ononis natrix* : les racines et les fleurs sous forme d'infusion, sont utilisées pour le traitement de certains troubles de l'appareil urinaire [3].
- *Ononis hirta* : les parties aériennes de la plante sont employées pour traiter les boutons de fièvre, l'herpès et le cancer de la peau [5].

- *Ononis sicula* : les parties aériennes de cette espèce sont utilisées contre les cancers de la peau [5].
- *Ononis arvensis* : Ses parties aériennes sont utilisées pour traiter les infections des voies urinaires et les maladies de la peau [12].

Les études pharmacologiques réalisées sur les extraits de plantes ou de composants appartenant au genre *Ononis* ont montré diverses propriétés : antibactérienne et antimicrobienne [13,14], diurétique, analgésique et anti-inflammatoire [15, 16], antioxydante [12] et antiproliférative [5].

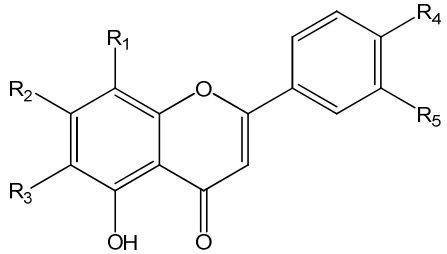
I.4. Travaux antérieurs réalisés sur le genre *Ononis*

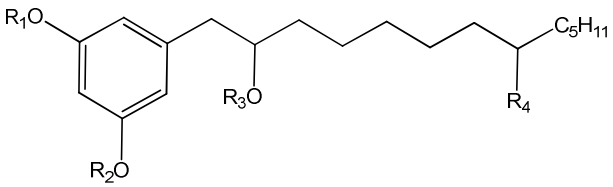
Les investigations chimiques réalisées sur le genre *Ononis* ont mis en évidence la présence de flavonoïdes et isoflavonoïdes [4,17-19], de dérivés du résorcinol [17,20] et de l'acide anthranilique [4,21,22], isocoumarines et dihydroisocoumarines [4,22-24], ptérocarpanes [17,25], stérols, triterpenoïdes [6] et de lactones aromatiques [26].

Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples de produits isolés à partir des plantes relevant de ce genre.

I.4.1. Produits isolés de *Ononis natrix*

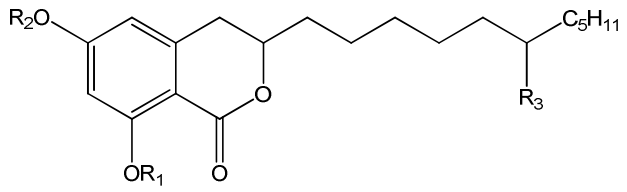
Les études phytochimiques portant sur les parties aériennes de *O. natrix* ont montré la présence de flavonoïdes (**1**–**8**), de dérivés du résorcinol (**9**–**16**), de dihydroisocoumarines (**17**–**22**) et de dérivés de l'acide anthranilique (**23**–**24**) [4,23,27].

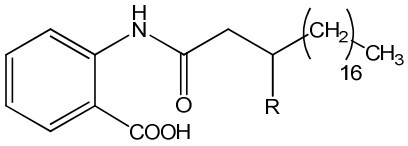




1 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = OMe$
2 $R_1 = R_4 = R_5 = OMe$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$
3 $R_1 = R_5 = H$, $R_2 = R_3 = OMe$, $R_4 = OH$
4 $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = OMe$, $R_2 = OH$
5 $R_1 = R_3 = R_5 = H$, $R_2 = Me$, $R_4 = OH$
6 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = OMe$, $R_5 = OH$
7 $R_1 = R_2 = R_3 = OMe$, $R_4 = OH$, $R_5 = H$
8 $R_1 = R_5 = H$, $R_2 = R_4 = OH$, $R_3 = OMe$

9 $R_1 = Me$, $R_2 = H$, $R_3 = Ac$, $R_4 = O=$
10 $R_1 = Me$, $R_2 = H$, $R_3 = Ac$, $R_4 = OH$
11 $R_1 = Me$, $R_2 = R_3 = H$, $R_4 = O=$
12 $R_1 = Me$, $R_2 = R_3 = H$, $R_4 = OH$
13 $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = Ac$, $R_4 = O=$
14 $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = Ac$, $R_4 = OH$
15 $R_1 = R_2 = R_3 = H$, $R_4 = O=$
16 $R_1 = R_2 = R_3 = H$, $R_4 = OH$





17 $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = Me$
18 $R_1 = R_2 = R_3 = H$
19 $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = O$═
20 $R_1 = R_2 = H$, $R_3 = OH$
21 $R_1 = H$, $R_2 = Me$, $R_3 = O$═
22 $R_1 = H$, $R_2 = Me$, $R_3 = OH$

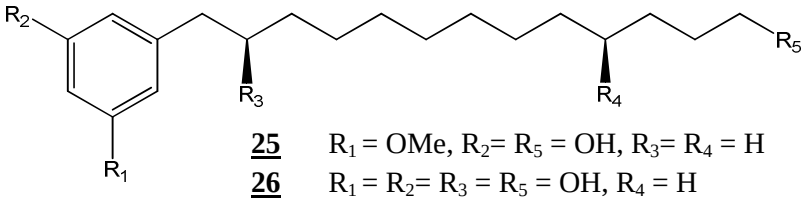
23 R = H
24 R = OH

1	5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentaméthoxyflavone
2	5,7-dihydroxy-8,3',4'-triméthoxyflavone
3	5,4'-dihydroxy-6,7-diméthoxyflavone (Cirsimaritine)
4	5,7-dihydroxy-6,8,3',4'-tétraméthoxyflavone (Hyménoxine)
5	5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavone (Genkwanine)
6	5,3'-dihydroxy-6,7,8,4'-tétraméthoxyflavone
7	5,4′-dihydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone (Xanthomicrol)
8	5,7,4'-trihydroxy-6-méthoxyflavone (Hispiduline)
9	1-*O*-méthyl-5-(2-acétoxy-8-oxotridecyl) résorcinol
10	1-*O*-méthyl-5-(2-acétoxy-8-hydroxytridecyl) résorcinol
11	1-*O*-méthyl-5-(2-hydroxy-8-oxotridecyl) résorcinol
12	1-*O*-méthyl-5-(2-8-dihydroxytridecyl) résorcinol
13	5-(2-acétoxy-8-oxotridecyl) résorcinol
14	5-(2-acétoxy-8-hydroxytridecyl) résorcinol
15	5-(2-hydroxy-8-oxotridecyl) résorcinol
16	5-(2,8-dihydroxytridecyl) résorcinol
17	(3*R*)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-undecyl-3,4-dihydroisocoumarine
18	(3*R*)-6,8-dihydroxy-3-undecyl-3,4-dihydroisocoumarine
19	(3*R*)-6,8-dihydroxy-3-(6-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine
20	(3*R*)-6,8-dihydroxy-3-(6-hydroxyundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine
21	(3*R*)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(6-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine
22	(3*R*)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(6-hydroxyundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine
23	acide *N*-arachidylanthranilique
24	acide *N*-β-hydroxyarachidylanthranilique

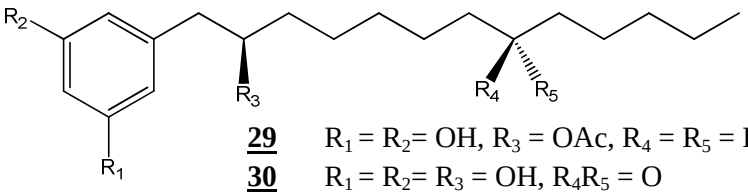
Tableau I-2 : Produits isolés de *Ononis natrix*

I.4.2. Produits isolés de *Ononis viscosa subsp. breviflora*

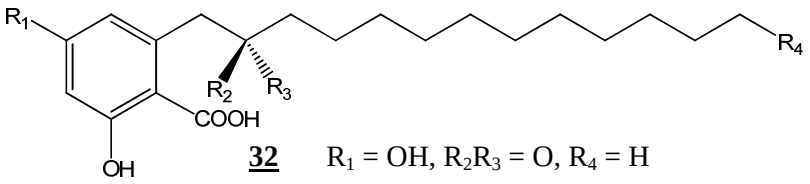
Les études phytochimiques effectuées sur cette espèce ont permis d'isoler sept dérivés du résorcinol (**25**–**31**), quatre acides phénoliques (**32**–**35**), cinq dihydroisocoumarines (**36**–**40**), quatre ptérocarpanes (**41**–**44**) et un dérivé de l'acide anthranilique (**45**) [22,25].



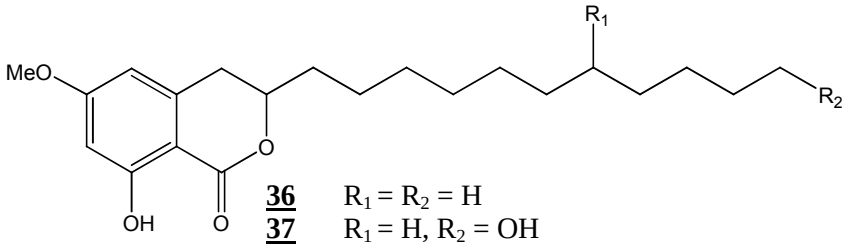
25 R_1 = OMe, R_2= R_5 = OH, R_3= R_4 = H
26 R_1 = R_2= R_3 = R_5 = OH, R_4 = H
27 R_1 = OMe, R_2= R_5 = OH, R_3 = OAc, R_4 = H
28 R_1 = OMe, R_2= R_4 = OH, R_3 = R_5 = H



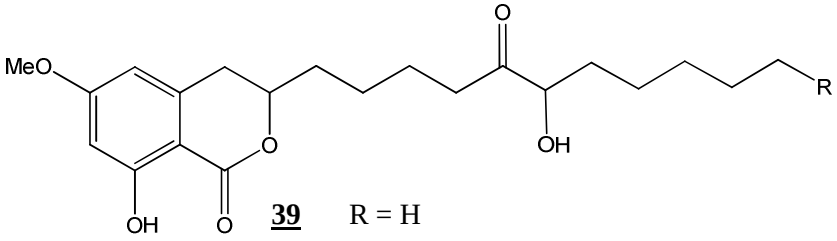
29 R_1 = R_2= OH, R_3 = OAc, R_4 = R_5 = H
30 R_1 = R_2= R_3 = OH, R_4R_5 = O
31 R_1 = R_3= R_5 = OH, R_2 = OMe, R_4 = H



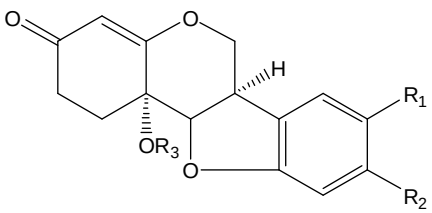
32 R_1 = OH, R_2R_3 = O, R_4 = H
33 R_1 = OH, R_2 = OAc, R_3 = R_4 = H
34 R_1 = R_4 = OH, R_2 = OAc, R_3 = H
35 R_1 = OMe, R_2R_3 = O, R_4 = OH



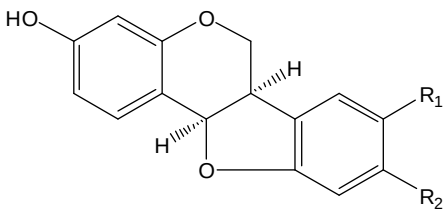
36 R_1 = R_2 = H
37 R_1 = H, R_2 = OH
38 R_1 = O═, R_2 = H



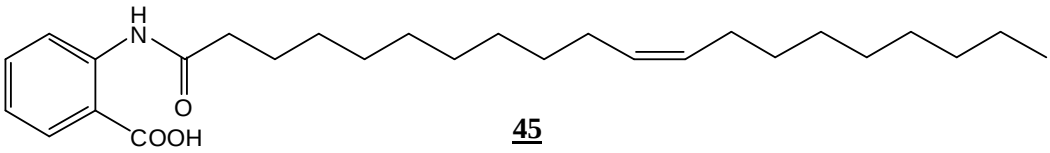
39 R = H
40 R = C_2H_5



41 R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = H
42 R_1 R_2 = OCH_2O, R_3 = H



43 R_1 = H, R_2 = OMe
44 R_1 R_2 = OCH_2O



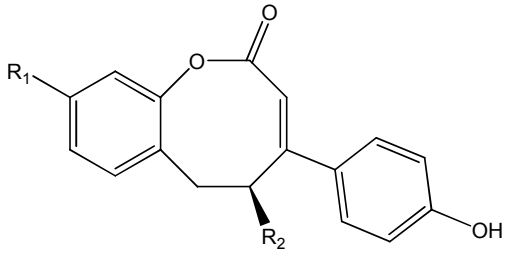
45

25	1-*O*-méthyl-5-(13-hydroxytridecyl) résorcinol
26	5-(2,13-dihydroxytridecyl) résorcinol
27	1-*O*-méthyl-5-(2-acétoxy-13-hydroxytridecyl) résorcinol
28	1-*O*-méthyl-5-(10-hydroxytridecy1) résorcinol
29	5-(2-acétoxytrideyl) résorcinol
30	5-(2-hydroxy-8-oxotridecyl) résorcinol
31	1-*O*-méthyl-5-(2,8-dihydroxytridecyl) résorcinol
32	acide 2,4-dihydroxy-6-(2-oxotridecyl) benzoïque
33	acide 2,4-dihydroxy-6-(2-acétoxytridecyl) benzoïque
34	acide 2,4-dihydroxy-6-(13-hydroxy-2-acétoxytridecyl) benzoïque
35	acide 2-hydroxy-4-méthoxy-6-(13-hydroxy-2-oxotridecyl) benzoïque
36	(3*R*)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-undecyl-3,4-dihydroisocoumarine
37	(3*R*)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(11-hydroxyundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine
38	(3*S*)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(7-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine
39	(3*R*)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(6-hydroxy-5-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine
40	(3*R*)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(6-hydroxy-5-oxotridecyl)-3,4-dihydroisocoumarine
41	11b-hydroxy-11b, 1-dihydromédicarpine
42	11b-hydroxy-11b, 1-dihydromaakiaine
43	médicarpine
44	maakiaine
45	acide *N* 13'-docosénoylanthranilique

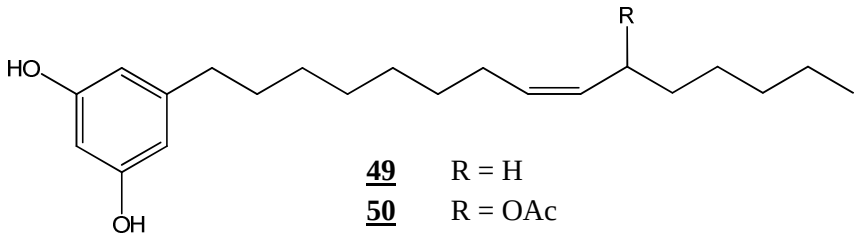
Tableau I-3 : Produits isolés de *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*

I.4.3. Produits isolés de *Ononis speciosa*

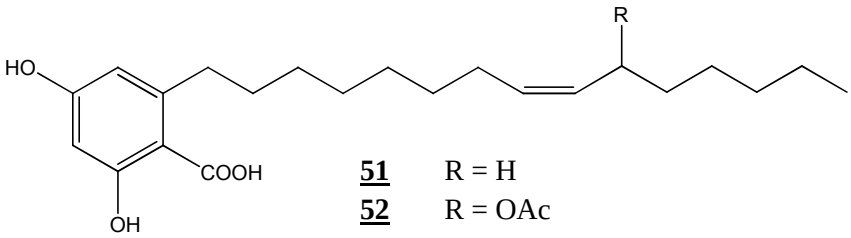
L'espèce *O. speciosa* renferme des composés connus comme l'ononitol, l'acide salicylique, les flavonoïdes (quercétine, penduletine, formononétine), les lactones aromatiques (**46**–**48**) et les dérivés du résorcinol (**49**–**52**) [20,26].



46 $R_1 = R_2 = OH$
47 $R_1 = OH$, $R_2 = OGlu$
48 $R_1 = OGlu$, $R_2 = OH$



49 R = H
50 R = OAc



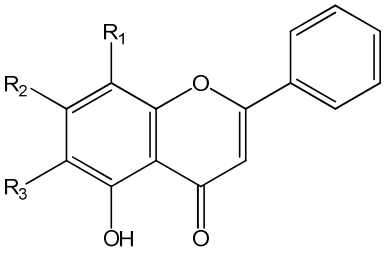
51 R = H
52 R = OAc

46	spécionine
47	spécionine 5-*O*-β-D-glucopyranoside
48	spécionine 9-*O*-β-D-glucopyranoside
49	5-(pentadec-8Z-ényl) résorcinol (Cardol monoène)
50	5-(10-acétoxy-pentadec-8Z-ényl) résorcinol
51	acide 2,4-dihydroxy-6-(pentadec-8Z-ényl) benzoïque
52	acide 2,4-dihydroxy-6-(10-acétoxy-pentadec-8Z-ényl) benzoïque

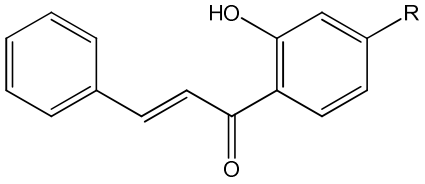
Tableau I-4 : Produits isolés de *Ononis speciosa*

I.4.4. Produits isolés de *Ononis angustissima*

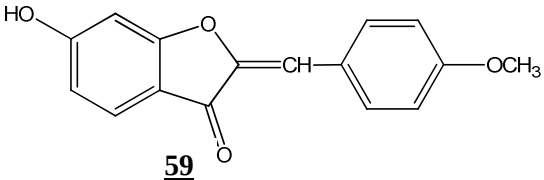
Les études effectuées sur *Ononis angustissima* ont permis d'isoler sept flavonoïdes, se répartissant en cinq flavones (**53**–**56**), deux chalcones (**57**–**58**) et une de type aurone (**59**) [28,29].



53 $R_1 = R_2 = R_3 = OMe$
54 $R_1 = H, R_2 = R_3 = OMe$
55 $R_1 = H, R_2 = OMe, R_3 = OH$
56 $R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$



57 R = OH
58 R = H



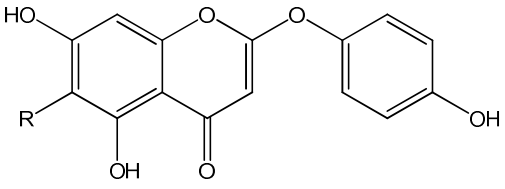
59

53	5-hydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone (alnétine)
54	5-hydroxy-6,7-diméthoxyflavone (6,7-di-*O*-methylbaicaleine)
55	5,6-dihydroxy-7-méthoxyflavone (neglétéine)
56	5,7-dihydroxyflavone (chrysine)
57	2',4'-dihydroxychalcone
58	2'-hydroxychalcone
59	6-hydroxy-4'-méthoxyaurone

Tableau I-5 : Produits isolés de *Ononis angustissima*

I.4.5. Produits isolés de *Ononis serrata*

De cette espèce, ont été isolés neuf flavonoïdes dont deux sont des composés naturels rares (**60**–**61**) [30].



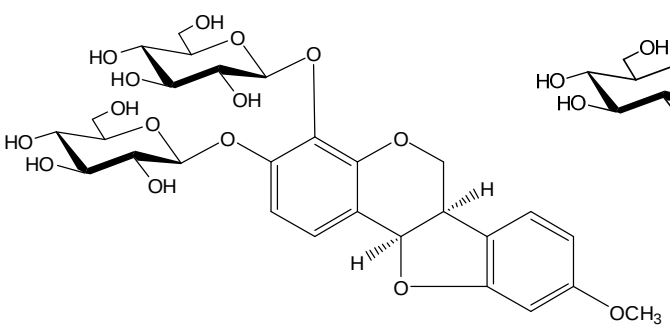
60 R = OMe
61 R = H

60	2-(*p*-hydroxyphénoxy)-6-méthoxy-5,7-dihydroxy-chromone (Capillarisine)
61	2-(*p*-hydroxyphénoxy)-5,7-dihydroxy-chromone (6-Déméthoxycapillarisine)

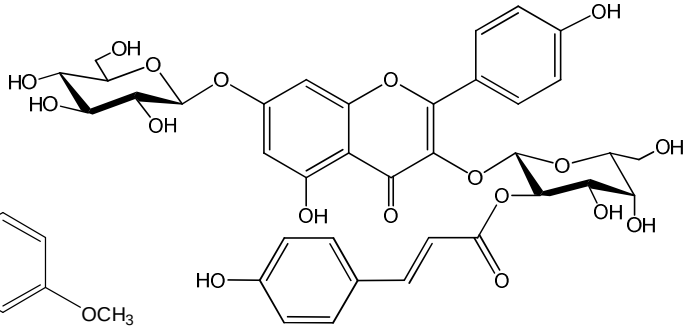
Tableau I-6 : Produits isolés de *Ononis serrata*

I.4.6. Produits isolés de *Ononis vaginalis*

Deux flavonoïdes (**62**–**63**) ont été isolés de cette espèce qui possède des propriétés antibiotiques et antivirales [31].



62



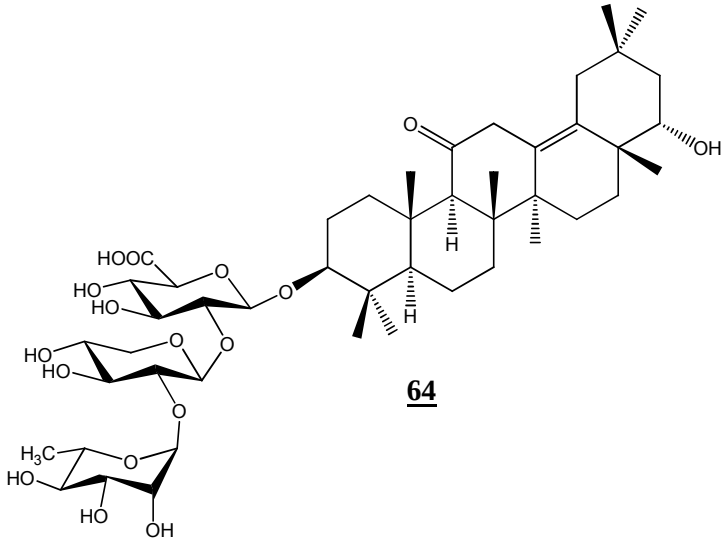
63

62	3,4-di-*O*-β -D-glucopyranosyl-4-hydroxymedicarpine
63	3-*O*-[2-*O*-(*E*)-p-coumaroyl-β-D-galactopyranosyl]-7-*O*-β-D-glucopyranosylkaempférol

Tableau I-7 : Produits isolés de *Ononis vaginalis*

I.4.7. Produits isolés de *Ononis spinosa*

Les études phytochimiques mises en œuvre sur cette espèce ont montré la présence d'isoflavonoïdes (daidzéine, génistéine, ononine, formononétine) et d'une nouvelle saponine triterpénique (**64**) [19,31].



64

64	3-*O*-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-β-D-glucuronopyranosyl]-3β ,22α-dihydroxyoléane-13-ène-11-one

Tableau I-8 : Produits isolés de *Ononis spinosa*

Les données bibliographiques relatives au genre *Ononis* atteste bien de la grande diversité de son métabolisme secondaire. Il est important de souligner que la présence de chaînes aliphatiques est très commune dans ce genre. On citera notamment les dérivés du résorcinol, les acides phénoliques, les dihydroisocoumarines ainsi que les dérivés de l'acide anthranilique.

CHAPITRE II

ETUDE DES FLAVONOIDES ET DERIVES DE L'ACIDE ANTHRANILIQUE

II.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent un groupe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ils sont considérés comme des pigments quasi-universels des végétaux. Actuellement, plus de 9000 flavonoïdes ont été isolés et caractérisés [32]. On les trouve fréquemment et avec une plus grande diversité structurale chez les angiospermes. Ils sont localisés dans divers organes : feuilles, fleurs, fruits et racines [33].

Le terme "flavonoïde" désigne une vaste gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont caractérisés par un squelette de base constitué de quinze atomes de carbone, comportant deux cycles benzéniques A et B reliés entre eux par une chaîne à trois atomes de carbone et forment généralement un hétérocycle oxygéné C (Figure II-1) [34].

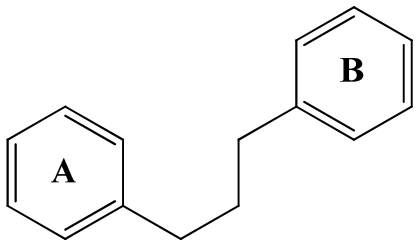
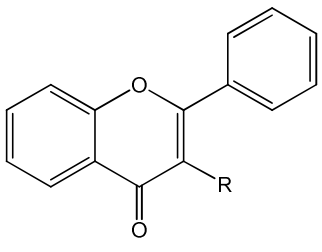


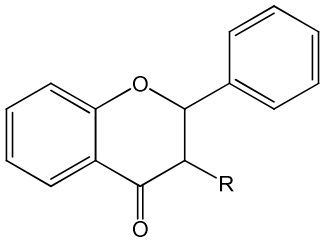
Figure II-1 : Squelette de base des flavonoïdes

II.1.1. Structures chimiques et classification

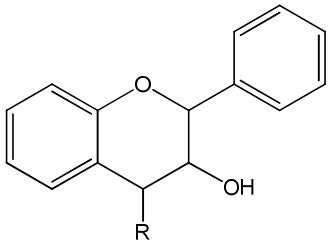
Les flavonoïdes peuvent être regroupés selon le degré d'oxydation du cycle pyranique central en une douzaine de classes : flavones, flavonols, dihydroflavonols, flavanones, flavan-3-ols, flavan-3,4-diols, isoflavones, anthocyanes, proanthocyanes, aurones et chalcones [35].



R=H : flavone
R=OH : flavonol



R=H : flavonone
R=OH : dihydroflavonol



R=H : flavan-3-ol
R=OH : flavan-3,4-diol

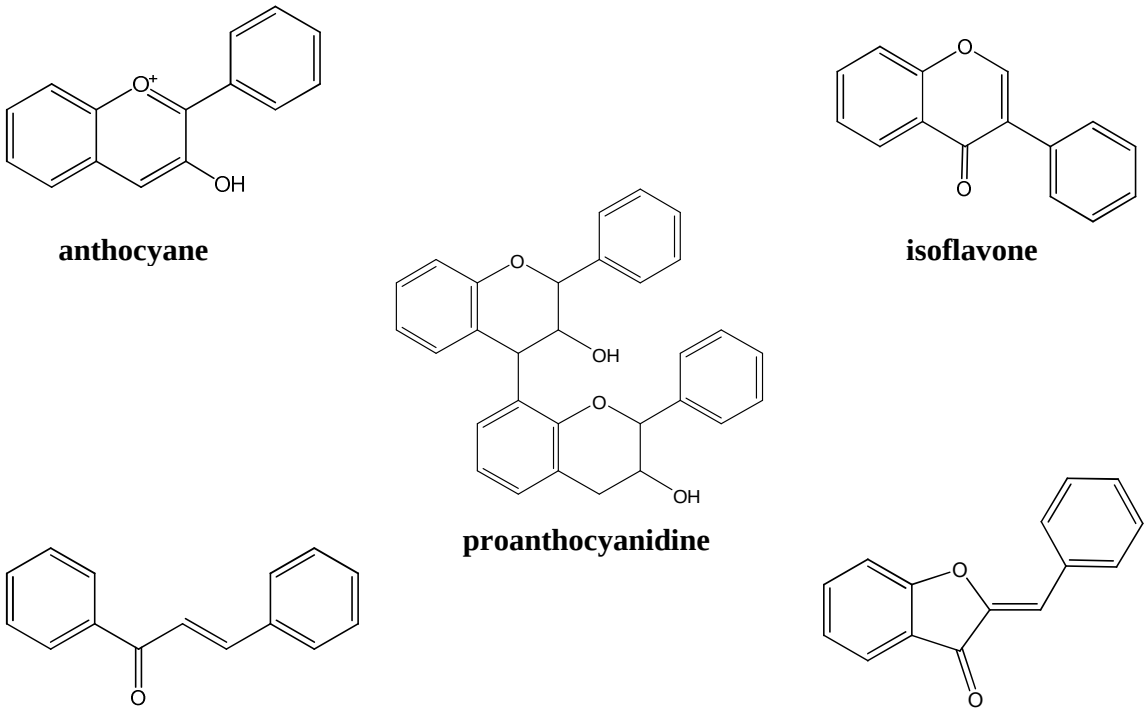
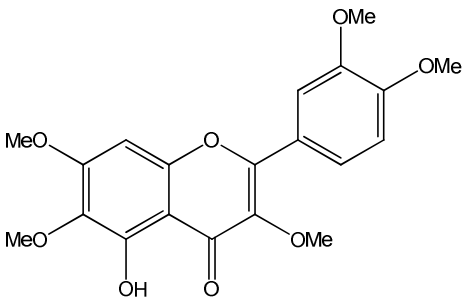
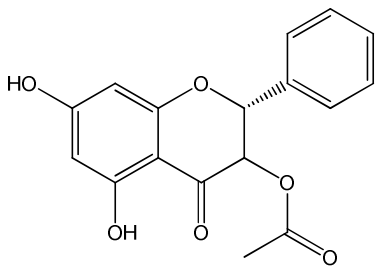


Figure II-2 : Structure de différentes classes des flavonoïdes

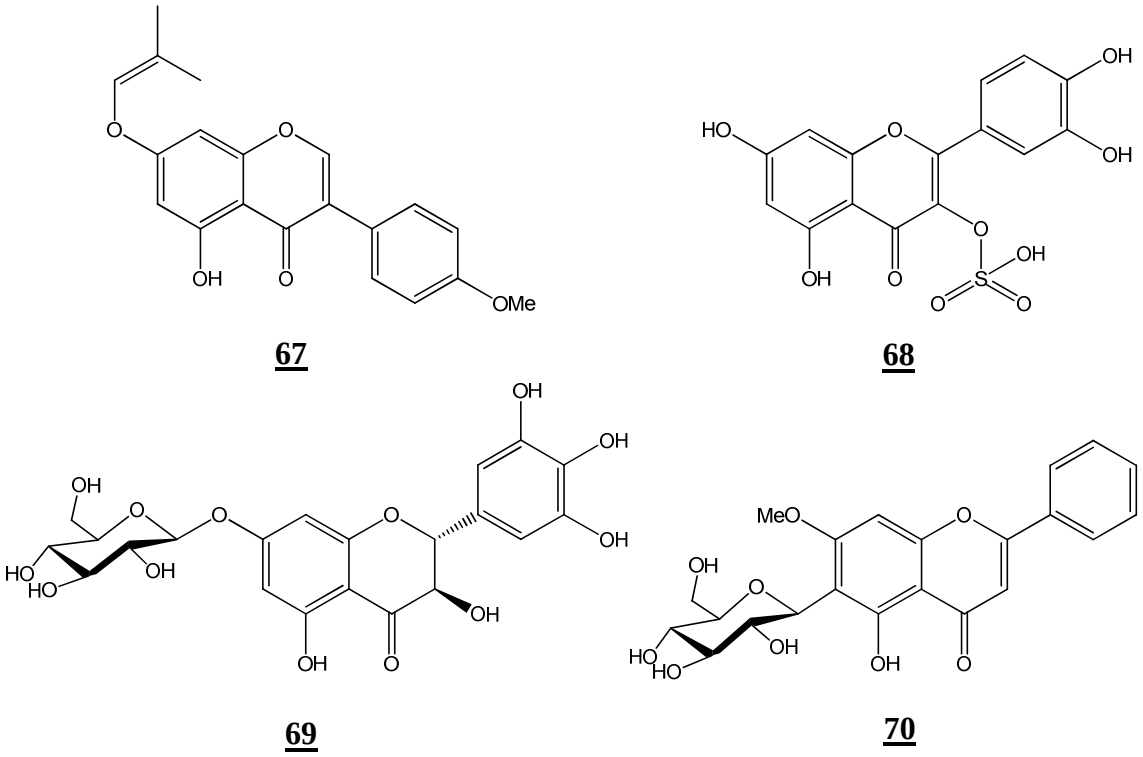
Les flavonoïdes sont souvent hydroxylés en positions 3, 5, 7, 3', 4' et/ou 5'. Un ou plusieurs de ces groupes hydroxyles sont fréquemment méthylés (**65**), acétylés (**66**), prénylés (**67**) ou sulfatés (**68**). Dans les plantes, les flavonoïdes peuvent être présents sous les deux formes, *C*- ou *O*-glycosylés. La forme *O*-glycoside (**69**) est la plus fréquente et s'effectue par la liaison entre un hydroxyle du squelette flavonique et un hydroxyle du sucre (glucose, rhamnose, galactose, arabinose,…etc). Pour ce qui est de la forme *C*-glycoside (**70**), la liaison se fait directement avec un carbone de la génine, généralement en C-6 ou C-8 [36].



65



66



67 **68**

69 **70**

II.1.2. Biosynthèse des flavonoïdes

Les flavonoïdes admettent tous une origine biosynthétique commune. Ils résultent de la condensation de 3 unités de malonyl-CoA et d'un acide cinnamique activé. Cette condensation catalysée par l'enzyme chalcone synthétase (CHS), conduit à un précurseur appelé chalcone (Figure II-3) [37].

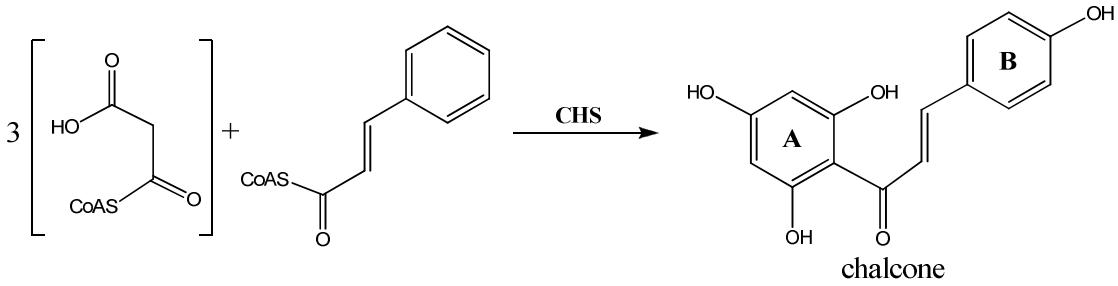
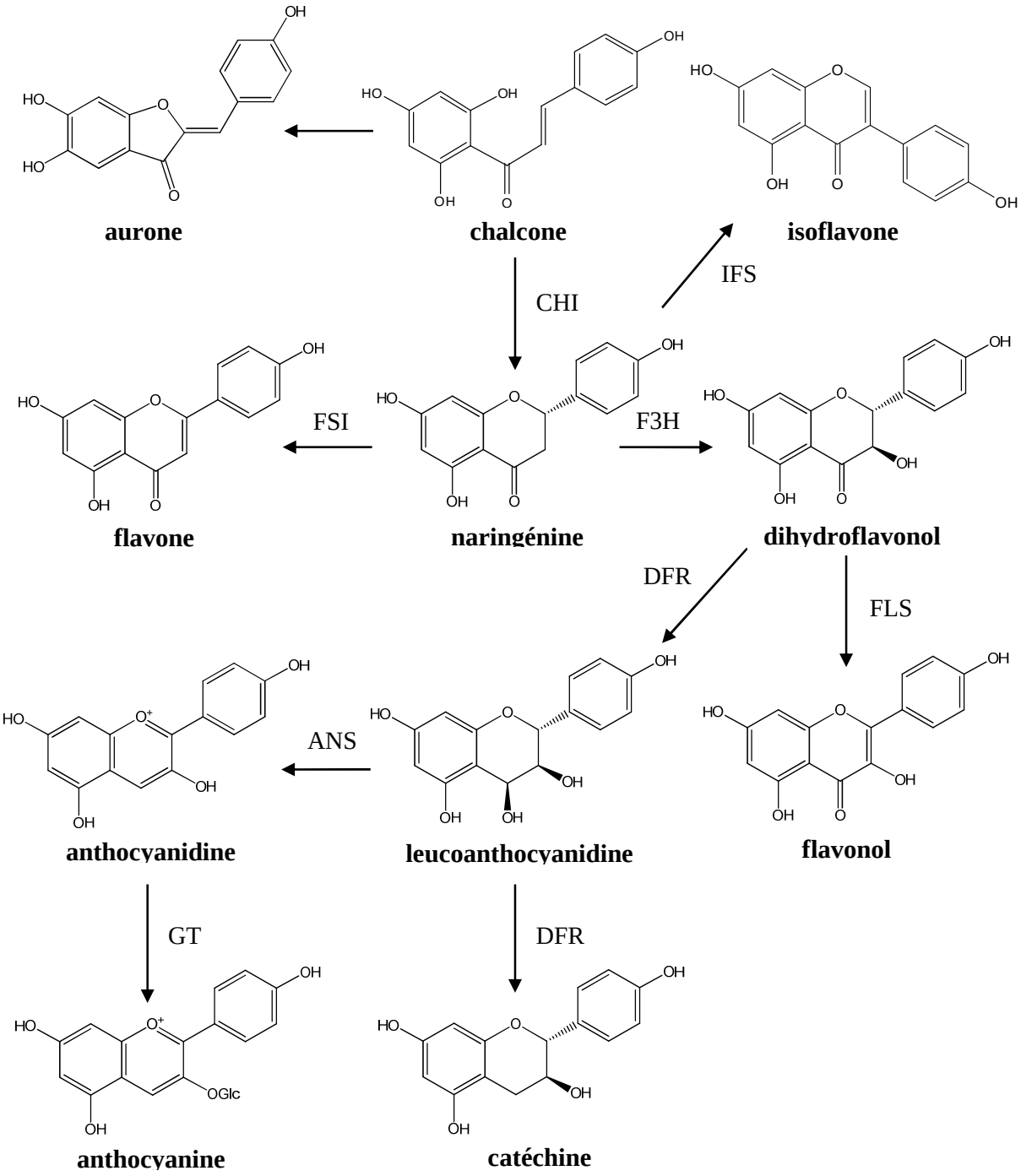


Figure II-3 : Formation de la chalcone

La chalcone se transforme en 2*S*-flavanone (la naringénine), par une réaction stéréospécifique catalysée par l'enzyme chalconeisomérase (CHI). La naringénine va être ensuite métabolisée par une série d'enzymes pour former les différentes classes de flavonoïdes (Figure II.4) [37].



CHI :	chalconeisomérase	**DFR** :	dihydroflavonol réductase
FSI :	flavonesynthases	**FLS** :	flavonolsynthase
F3H :	flavanone-3-hydroxylase	**ANS** :	anthocyanidine synthase
IFS :	isoflavone synthase	**GT** :	glycosyltransferase

Figure II-4 : Schéma biosynthétique des flavonoïdes

II.1.3. Isoflavonoïdes

Les isoflavonoïdes diffèrent des autres flavonoïdes par la position du cycle B en C-3 au lieu de C-2, formant un squelette de base 1,2-diphénylpropane. Ces composés sont presque spécifiques de la famille Fabaceae [38]. Cette spécificité est liée à la présence dans cette famille de l'enzyme responsable du réarrangement du 2-phénylchromone (flavanone) en 3-phénylchromone (isoflavone) [39]. Ils peuvent être classés selon le degré d'oxydation et l'existence ou non, d'hétérocycles supplémentaires en plusieurs sous classes : isoflavones, isoflavanones, isoflavanes, isoflavanols, isoflav-3-ènes, coumaronochromones, coumestanes, 3-arylcoumarines, roténoïdes, ptérocarpanes, 2-arylbenzofurane, α-méthyldéoxybenzoine [40] (Figure II-5).

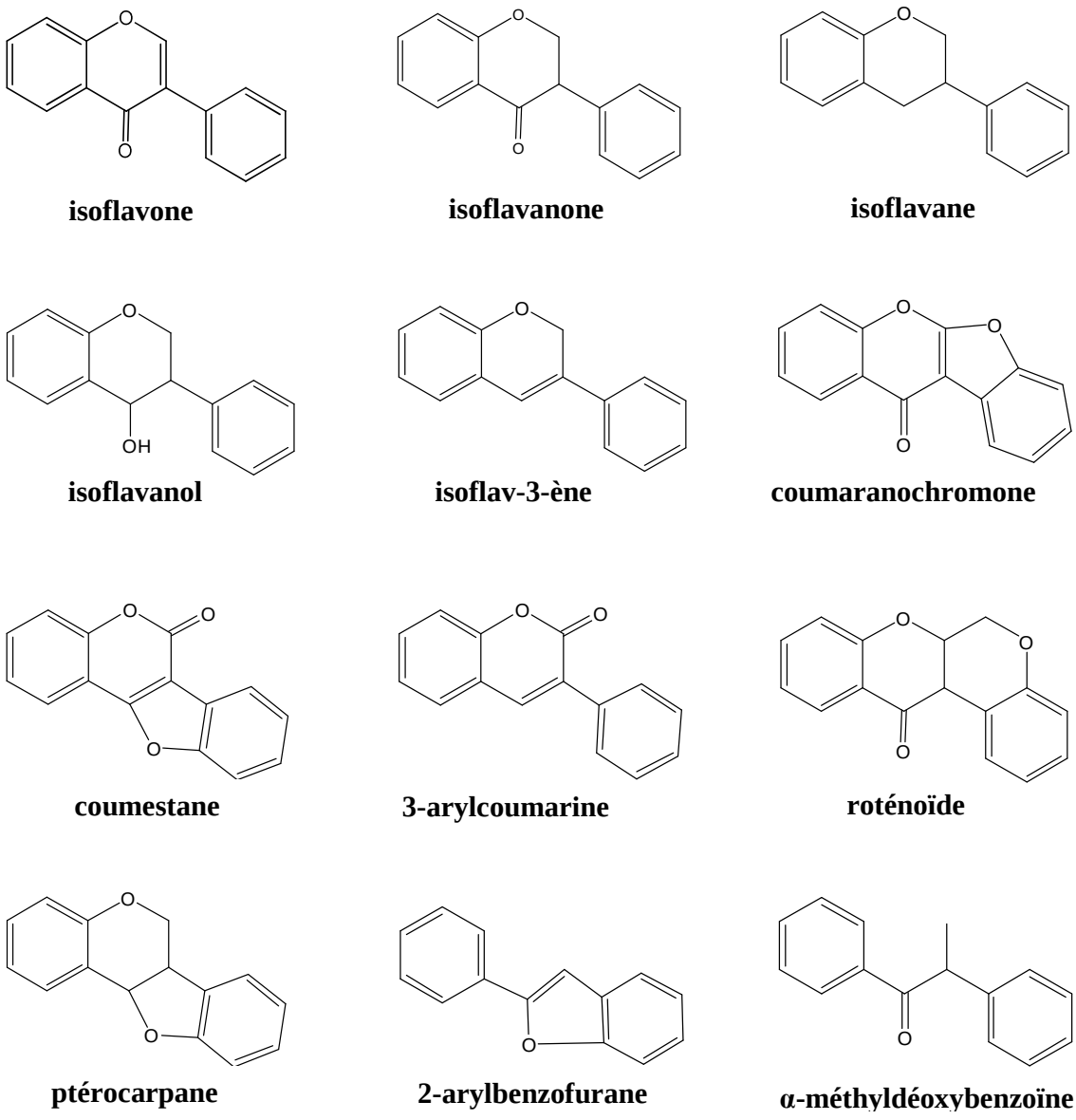


Figure II-5 : Structure des différentes sous classes d'isoflavonoïdes

II.1.4. Biosynthèse des Isoflavonoïdes

L'étape clé dans la biosynthèse des isoflavonoïdes est la migration du cycle B de la flavanone (naringénine **71** ou liquiritigénine **72**) du carbone C-2 à C-3. Cette étape est catalysée par une isoflavone synthase (IFS). Une hydroxylation en C-2 par la 2-hydroxyisoflavanone synthase (2HIS) suivie d'une réaction de déshydratation spontanée ou catalysée par la 2-hydroxyisoflavanone déhydratase (2HID) aboutit à l'isoflavone (**75**) [41, 42]. La figure suivante illustre la voie biosynthétique des isoflavonoides.

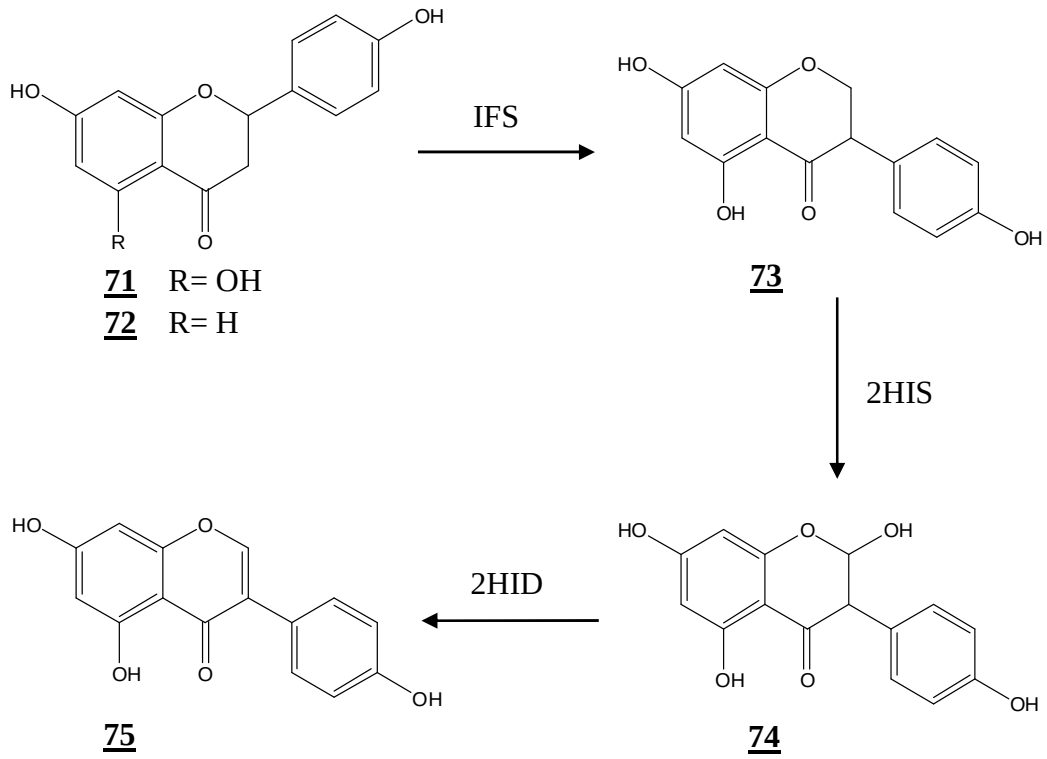


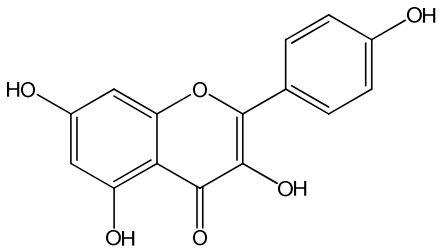
Figure II-6 : Biosynthèse des isoflavonoïdes

II.1.5. Propriétés biologiques des flavonoïdes

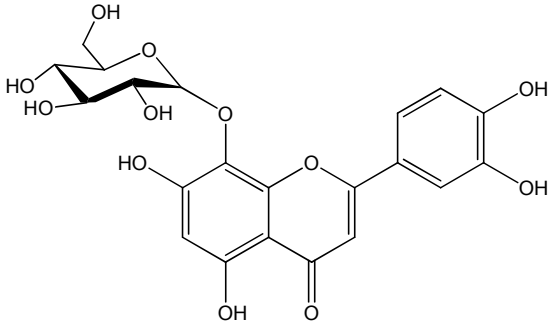
Les flavonoïdes sont des produits naturels couramment et quotidiennement consommés sous forme de fruits, légumes et boissons telles que le café et le thé [43]. Ils sont connus pour diverses propriétés biologiques [44]. La propriété la mieux décrite est leur activité antioxydante ainsi que leur capacité à piéger les radicaux libres : radicaux hydroxyles ($OH^{\bullet}$), anions superoxydes ($O_2^{\bullet -}$) et radicaux peroxylipidiques [45].

Les flavonoïdes sont des inhibiteurs enzymatiques à l'égard de l'aldose réductase [46], la xanthine oxydase [47], la phosphodiestérase [48], Ca^{2+} ATPase [49], de même que les enzymes de l'inflammation (cyclooxygénase et lipoxygénase) qui sont impliqués dans la libération de l'acide arachidonique [50,51].

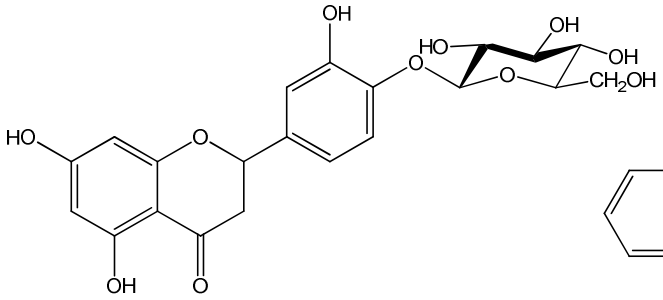
Les flavonoïdes sont également connus pour leurs diverses activités : antiallergique (**76**) [52], anti-ulcérogène (**77**) [53] antibactérienne, antifongique et antivirale (**78**, **79**) [54,55], anti-tumorale (**80**) et anti-VIH (**81**) [56].



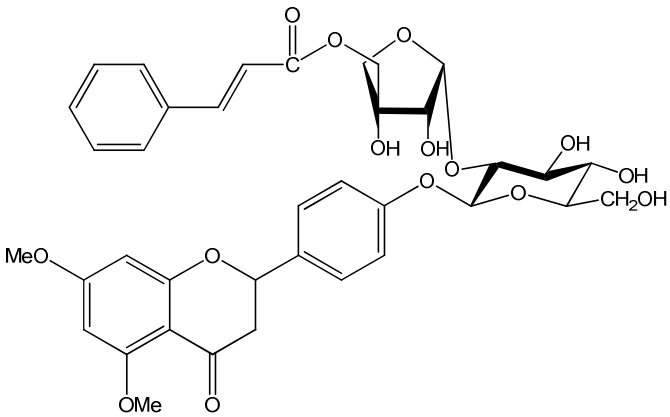
76 kaempférol



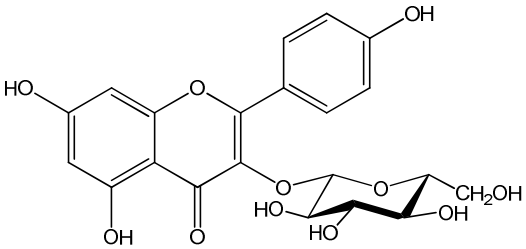
77 hypolaétine-8-*O*-glucopyranoside



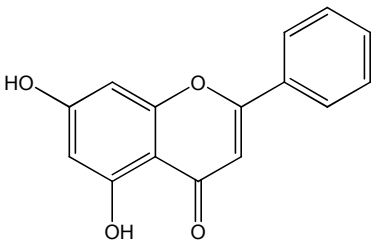
78 5,7,3'-trihydroxyflavanone-4'-*O*-glucopyranoside



79 5,7-diméthoxyflavanone-4'-*O*-[2"-*O*-(5'"-*O*-cinnamoyl)-apiofuranosyl]-glucopyranoside



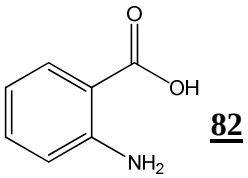
80 kaempférol-3-*O*-glucopyranoside



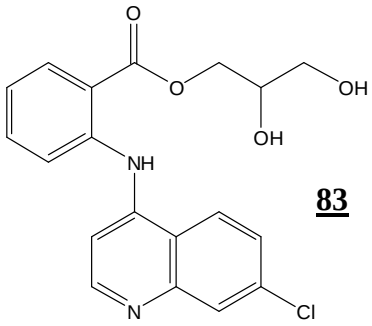
81 Chrysine

II.2. Dérivés de l'acide anthranilique

L'acide anthranilique ou acide 2-aminobenzoïque (**82**) est un acide aminé qui joue un rôle important dans les processus biologiques et chimiques. Il est à l'origine de certains groupes d'alcaloïdes (quinazolines, quinoléines, acridones) et le précurseur du L-tryptophane, l'un des acides aminés essentiels de l'alimentation humaine [57]. Son pouvoir à stimuler la sécrétion de lait chez les mammifères femelles, lui a valu le nom de "Vitamine L1" [58]. Il est également largement utilisé comme matière première dans la synthèse de médicaments et autres composés biologiquement actifs. On citera pour l'exemple l'anti-inflammatoire non stéroïdien connu sous le nom de glafénine (**83**) [59].



82



83

II.2.1. Biosynthèse de l'acide anthranilique

La biosynthèse de l'acide anthranilique se fait à partir de l'acide shikimique, qui se transforme sous l'action de certains enzymes en acide chorismique. Une réaction de substitution nucléophile de ce dernier avec le groupement amide de la glutamine, suivie d'une réaction d'élimination de l'acide pyruvique, conduit à l'acide anthranilique (Figure II-7) [57,60].

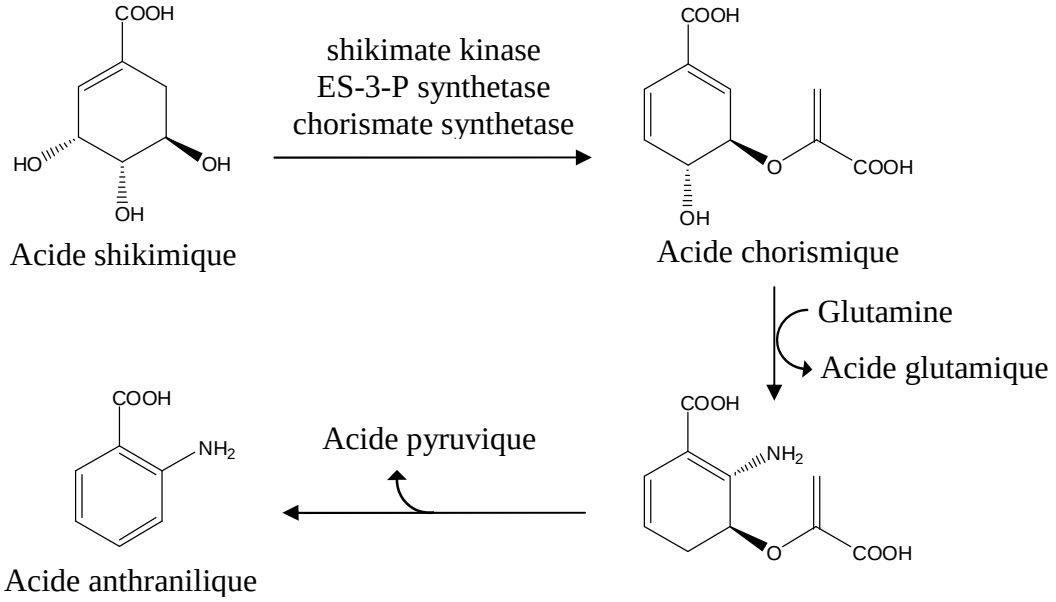


Figure II-7 : Biosynthèse de l'acide anthranilique

II.2.2. Synthèse de l'acide anthranilique

La synthèse industrielle (Figure II-8) de l'acide anthranilique est basée sur l'oxydation du *o*-xylène au moyen de l'oxyde de vanadium donnant d'abord l'anhydride phtalique. Ce dernier est ouvert par l'ammoniac pour former le phtalimide, qui traité avec de l'hypochlorite de sodium dans un milieu alcalin pour induire le réarrangement de Hoffman, conduit à l'acide anthranilique [61].

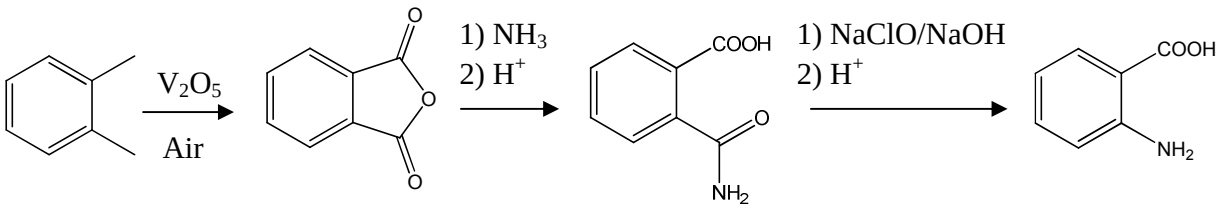
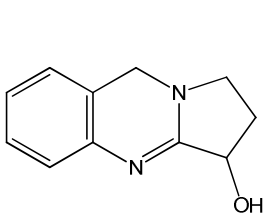


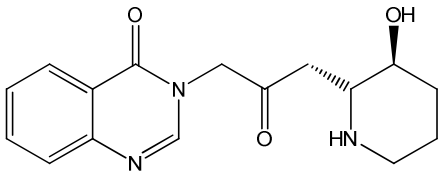
Figure II-8 : Synthèse de l'acide anthranilique

II.2.3. Alcaloïdes dérivés de l'acide anthranilique

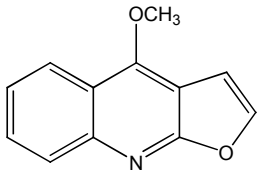
L'acide anthranilique contribue à l'élaboration de quinazolines (**84**, **85**), de quinoléines (**86, 87**) et d'acridones (**88**, **89**), alcaloïdes principalement rencontrés dans les plantes de la famille Rutaceae [57,62].



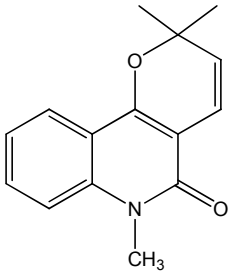
84 vasicine



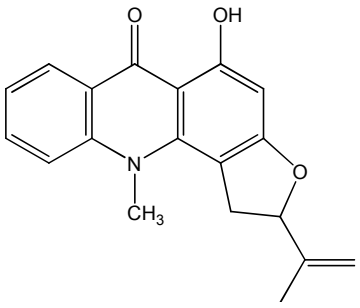
85 fébrifugine



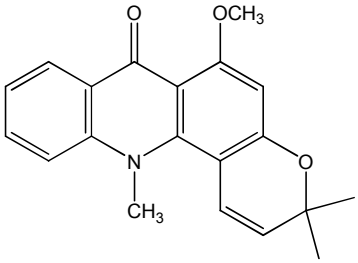
86 dictamnine



87 *N*-méthylflindersine



88 rutacridone



89 acronycine

Figure II-9 : Structure de quelques alcaloïdes dérivés de l'acide anthranilique

Les alcaloïdes quinoléiques comme la dictamnine sont produits par la condensation de l'acide anthranilique (sous forme d'anthraniloyl-CoA) avec une unité de malonyl-CoA pour former le système cyclique quinoléin-2-one (**90**). L'addition du 3,3-diméthylallyle en position C-3 donne le 3-(3,3-diméthylallyl)-4-hydroxyquinoléin-2-one (**91**). L'époxydation de la chaîne latérale (**92**) suivie d'une réaction de cyclisation entre le groupement carbonyle et le carbone C-2' conduit au 2'-isopropyl-2',3'-dihydrofuroquinoléines (**93**). La perte du groupement isopropyle permet d'accéder aux dérivés furoquinoléines (**95**) [62].

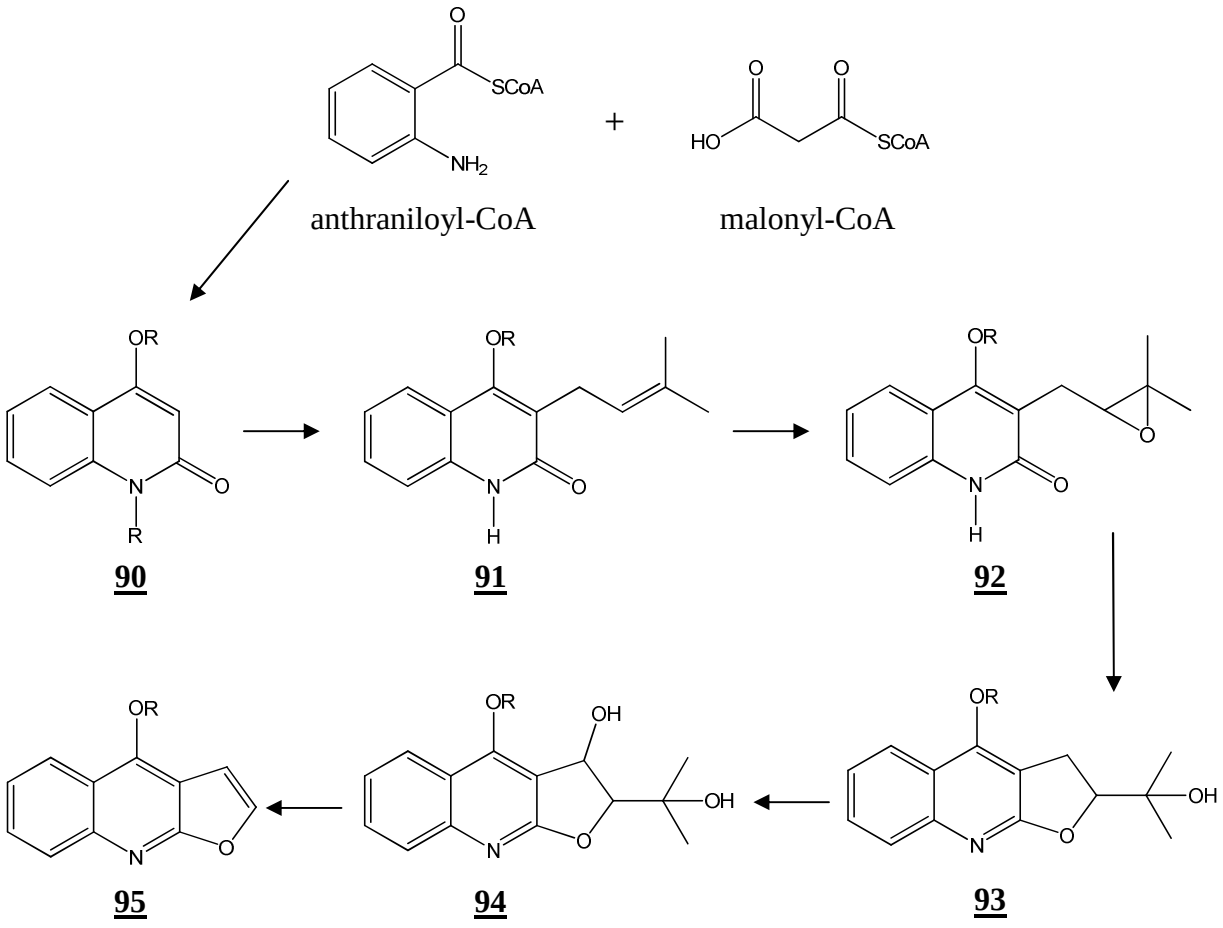


Figure II-10 : Biosynthèse de quelques quinoléines dérivées de l'acide anthranilique

Les alcaloïdes de type acridone sont formés par la combinaison entre le *N*-méthyl-anthraniloyl-CoA et trois unité de malonyl-CoA pour former le 1,3-dihydroxy-*N*-méthylacridone (**97**), qui va être ensuite transformé par des réactions de prénylation et de cyclisation en furo- et pyranoacridones plus complexes (Figure II-11) [62].

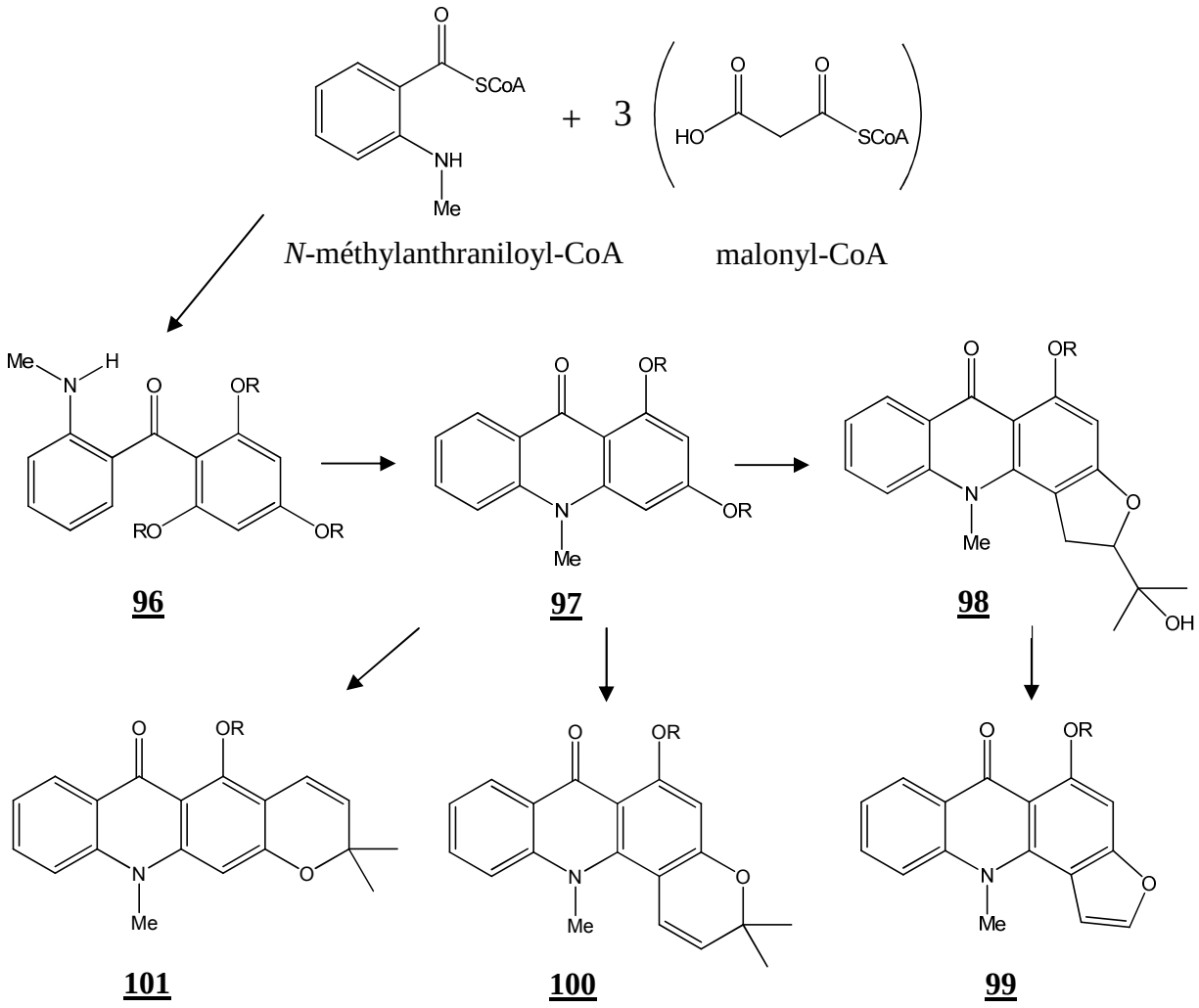
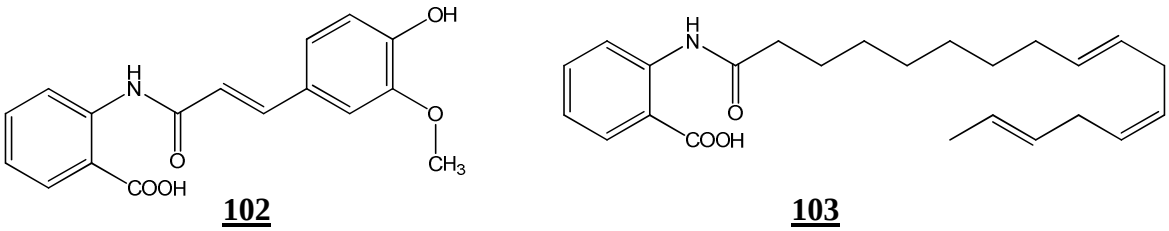


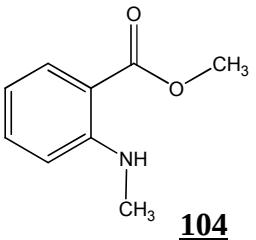
Figure II-11 : Biosynthése de quelques acridones dérivées de l'acide anthranilique

II.2.4. Autres dérivés naturels de l'acide anthranilique

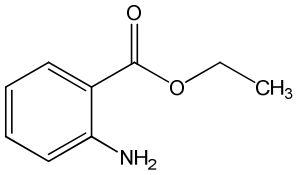
Les dérivés naturels de l'acide anthranilique peuvent se présenter sous d'autres formes, comme les dérivés *N*-acylés (**102**, **103**) rencontrés dans l'avoine et certaines espèces des genres *Inula*, *Geijera* et *Ononis* [4, 63-65].



Ils se présentent également sous formes *N*- et/ou *O*-alkylé, comme le méthyl-*N*-méthylanthranilate (**104**) qui contribue à l'odeur de la mandarine et le *N*-éthyle anthranilate (**105**) rencontré dans le vin [66,67].



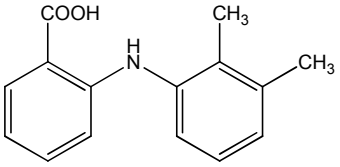
104



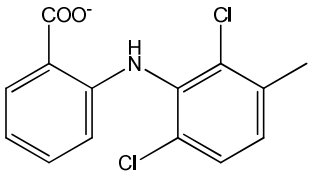
105

II.2.5. Propriétés biologiques des dérivés de l'acide anthranilique

Les dérivés de l'acide anthranilique présentent diverses activités biologiques et pharmacologiques. Ils constituent un groupe important d'agents anti-inflammatoires non-stéroïdiens. On citera pour cela, l'acide méfénamique (**106**) et le méclofénamate (**107**), médicaments utilisés pour le traitement de divers troubles inflammatoires [68].

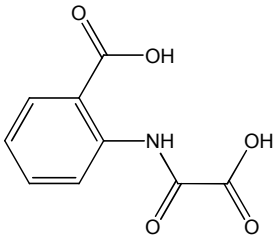


106



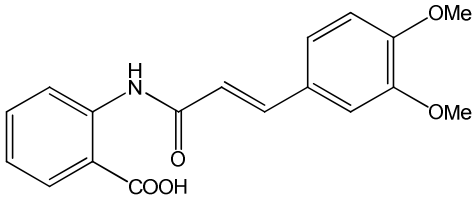
107

L'acide 2-(oxalylamino)-benzoïque (**108**) est un inhibiteur des protéine-tyrosine phosphatases, une classe d'enzymes qui constituent des cibles thérapeutiques intéressantes dans plusieurs maladies telles que le diabète, le cancer et l'inflammation [69,70].



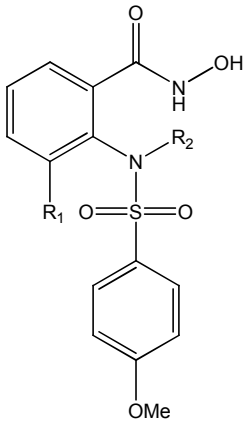
108

L’acide *N*-(3',4'-dimethoxycinnamonyl) anthranilique (**109**) est un médicament connu sous le nom Tranilast. Initialement développé en tant que médicament anti-allergique, il a montré un grand pouvoir inhibiteur de l'angiogenèse [71].



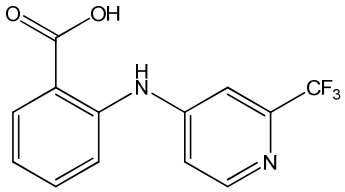
109

Les acides anthranilalte hydroxamiques (**110**) sont des inhibiteurs de métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui sont des enzymes jouant un rôle dans la modification de la matrice extracellulaire et impliqués dans l'étiologie de diverses maladies comme la polyarthrite rhumatoïde et le cancer [72].



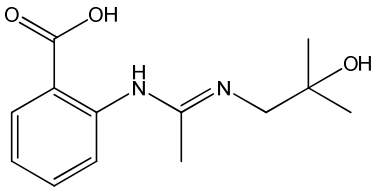
110

L’acide *N*-(2-(trifluoromethyl) pyridin-4-yl) anthranilique (**111**) a été évalué comme agent anti-cancer [73].

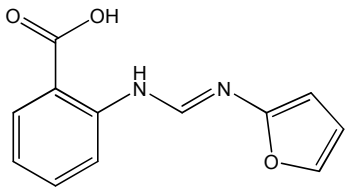


111

Les dérivés de l'acide anthranilique **112** et **113**, isolés à partir de la souche bactérienne *Penicillium paneum* SD-44 et connus sous le nom de pénipacides, présentent une activité inhibitrice contre la lignée cellulaire RKO (cancer du côlon) [74].



112



113

CHAPITRE III

ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'ESPECE

ONONIS PUSILLA

III.1. Aspect botanique

L'espèce *O. pusilla* est une plante vivace de 8-25 cm, entièrement velue et glanduleuse. Les feuilles sont constituées de trois folioles pétiolées. Les fleurs jaunes possèdent un calice à divisions largement triangulaires. Gousse ovale-rhomboïdale, pubescente et noirâtre. Cette espèce est très commune dans les régions désertiques de l'Algérie [10].

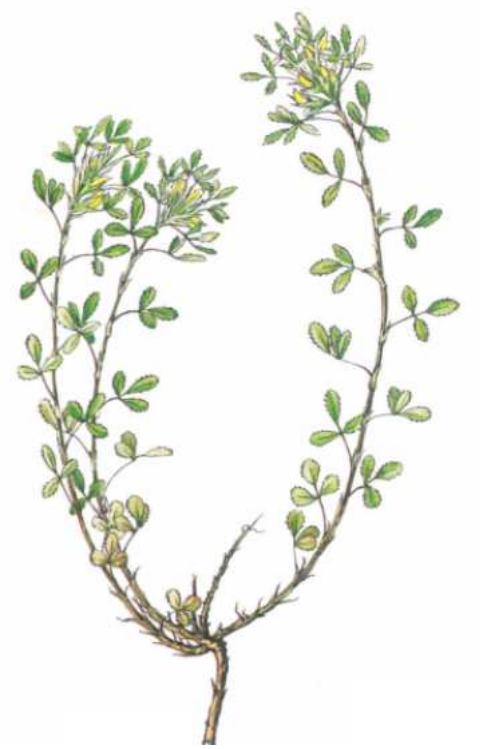
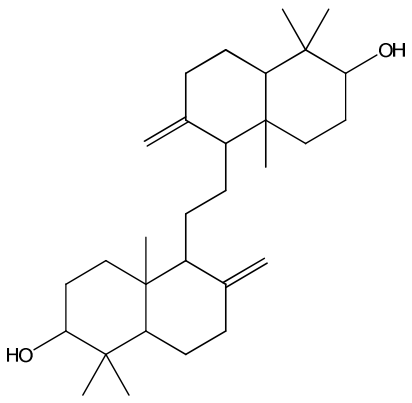


Figure III-1 : L'espèce *Ononis pusilla* L. [75]

III.2. Travaux antérieurs sur l'espèce *Ononis pusilla*

L'espèce *O. pusilla* a fait l'objet d'une seule étude phytochimique, Cette étude a juste détecté la présence de stérols et d'un triterpène nommé α-onocérine [6].



α-onocérine

III.3. Extraction

Les parties aériennes sèches de *Ononis pusilla* (m = 800 g) ont été broyées et mises à macérer dans un mélange EtOH/H_2O à 70%, durant 48 h. Après filtration et concentration sous vide, l'extrait aqueux est dilué avec 500 ml d'eau distillée puis soumis à une extraction liquide-liquide successivement avec l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. Les trois phases organiques récupérées sont séchées avec du Na_2SO_4 anhydre puis filtrées et concentrées à sec pour donner 3,25 g de l'extrait éthéropétrolique, 20 g de l'extrait d'acétate d'éthyle et 28,5 g de l'extrait butanolique.

La chromatographie sur couche mince effectuée sur les trois extraits a montré que l'extrait d'acétate d'éthyle est le plus fourni en métabolites secondaires. Cet extrait a été retenu comme sujet d'étude.

Le protocole d'extraction de *Ononis pusilla* est résumé dans la Figure III-2.

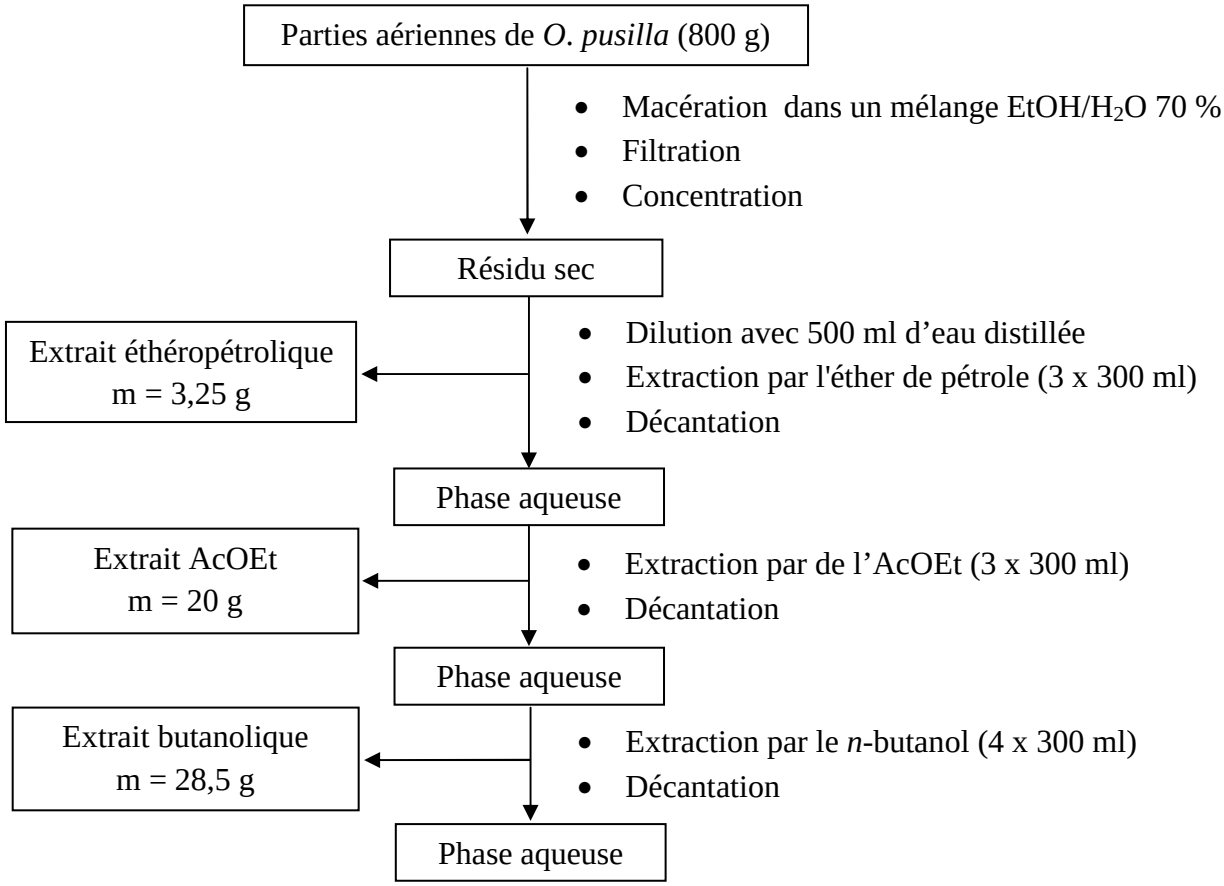


Figure III-2: Protocole d'extraction de *O. pusilla.*

III.4. Séparation et purification

Le fractionnement de 7 grammes de l'extrait d'acétate d'éthyle, a été effectué par VLC (*Chromatographie Liquide sous Vide) en utilisant la silice* RP-18 comme phase stationnaire. L'élution est réalisée par un gradient eau/méthanol (80/20, 60/40, 40/60, 20/80 et 0/100). Des fractions de 100 millilitres ont été collectées à chaque fois pour être par la suite regroupées en fonction de leur profil CCM en 10 fractions (F1 à F10).

La fraction F9 (2,8 g) a subi une chromatographie sur une colonne de gel de silice normale en utilisant comme éluant le mélange $CHCl_3$/MeOH à différents gradients (100/00 à 80/20), permettant d'obtenir 18 sous-fractions (sF1 à sF18). La sous-fraction 13 de masse 25 mg a subi une séparation en phase inverse sur une colonne HPLC *semi-préparative* avec un mélange H_2O/MeCN (80/20 à 00/100), aboutissant à l'isolement des trois composés **1** (3 mg), **2** (3,4 mg) et **3** (3,6 mg).

La chromatographie sur une colonne de gel de silice de la sous-fraction 2 (280 mg) par un mélange hexane/acétate d'éthyle (100/00 à 60/40), a permis d'obtenir le composé **4** (3,4 mg).

La précipitation des sous-fractions sF3 (137 mg) et sF5 (40 mg) dans $CHCl_3$ a donné respectivement les composés **8** (6 mg) et **9** (13,6 mg).

La sous-fraction sF17 (30 mg) a subi une purification sur colonne de Sephadex LH-20 dans le méthanol, donnant le composé **10** (4 mg).

La fraction F6 (120 mg) a été chromatographiée sur une colonne de *polyamide avec le mélange t*oluène/MeOH comme système d'élution. Ceci a permis d'obtenir 9 sous-fractions (sF'1 à sF'9). Une chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice normale (CCE) réalisée sur la sous-fraction sF'9 (19 mg) dans un mélange $CHCl_3$/MeOH (4:1) a abouti à l'isolement du composé **5** (4,4 mg).

La fraction F7 (1,46 g) a également subi une séparation sur colonne de *polyamide* dans le même système d'élution que la fraction F6, permettant d'obtenir 16 sous fractions (sF"1 à sF"16). La filtration sur une colonne de Sephadex LH-20 de la sous fraction sF"14, dans le méthanol, a permis d'obtenir le composé **6** (3,8 mg). La précipitation dans MeOH de la sous-fraction sF"3 (208 mg) a permis de récupérer à l'état pur le composé **7** (6 mg).

Le protocole de purification de ces composés isolés de l'extrait AcOEt de *Ononis pusilla* est récapitulé dans la figure III-3 ci-dessous.

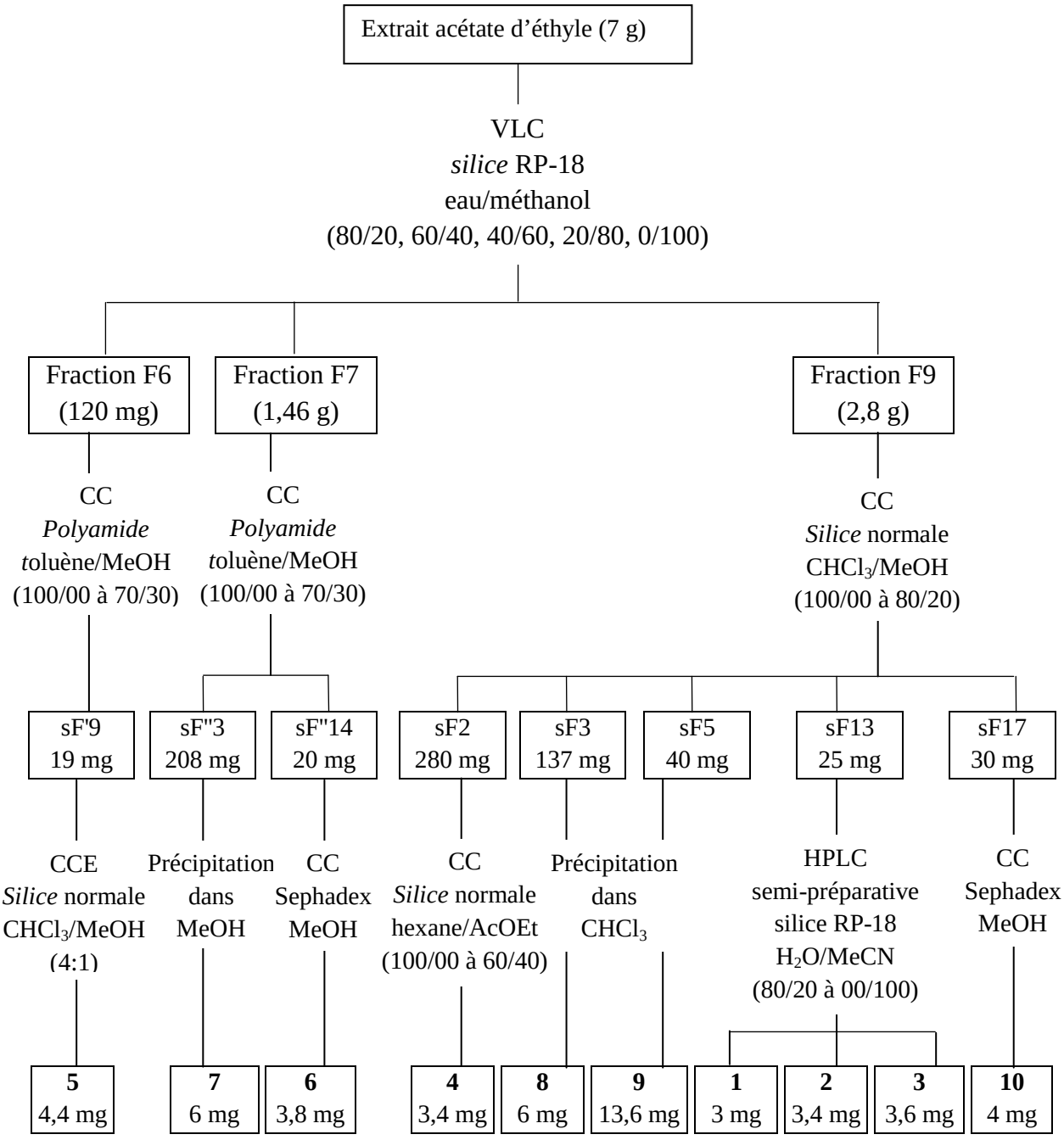
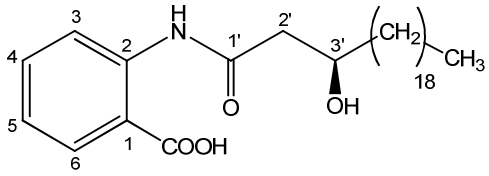


Figure III-3: Protocole de purification des composés isolés de l'extrait AcOEt de *Ononis pusilla*

III.5. Détermination structurale des produits obtenus

III.5.1. Elucidation structurale du composé 1



Acide *N*-(*R*)-3'-hydroxydocosanoylanthranilique

Le composé **1** se présente sous forme d'une poudre amorphe blanche. Son spectre de masse à haute résolution (HRESIMS) enregistré en mode négatif (Figure III-4) exhibe un pic d'ion pseudomoléculaire à *m/z* 474,3602 $[M-H]^-$, suggérant une masse moléculaire impaire égale à 475 uma et correspondant à une formule brute en $C_{29}H_{49}NO_4$ (calc. $C_{29}H_{48}NO_4$, 474,3589).

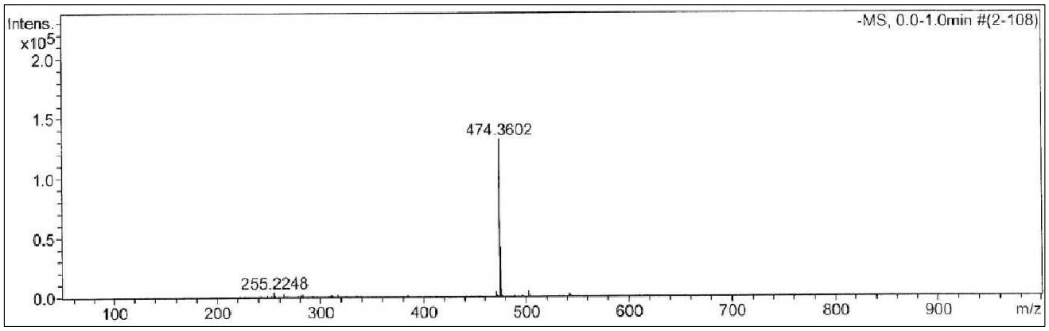


Figure III-4: Spectre HRESIMS (mode négatif) du composé **1**

Le spectre IR (Figure III-5) montre notamment des bandes d'absorption à 1610 cm^{-1} (C=C aromatiques), 1655 cm^{-1} (C=O), 2916, 2849 cm^{-1} (C–H Sp^3), 3403 cm^{-1} (OH).

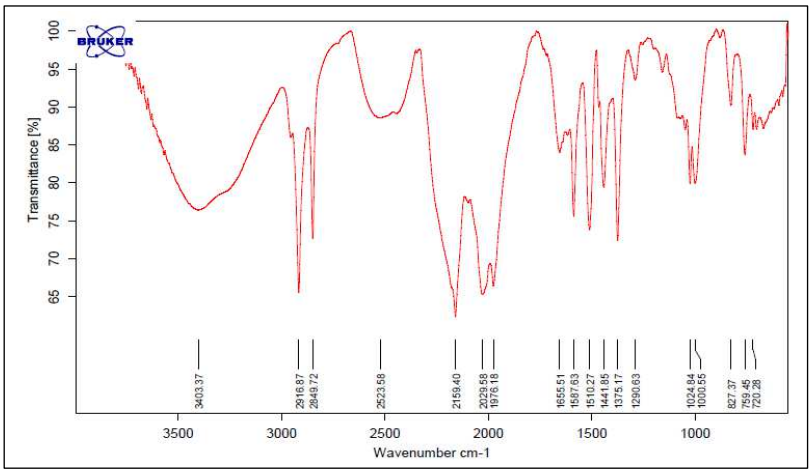


Figure III-5: Spectre IR du composé **1**

Le spectre UV (MeOH) présente des maxima d'absorption aux longueurs d'ondes 210, 252 et 300 nm.

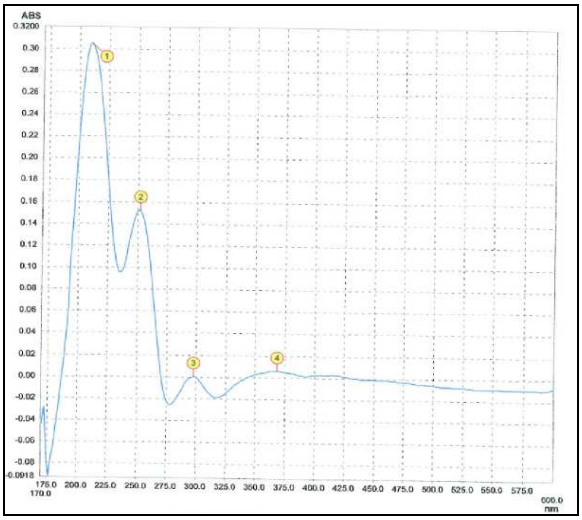


Figure III-6: Spectre UV du composé **1**

Le spectre RMN ^{1}H (Figure III-7) enregistré dans le DMSO-*d6* présente :

- quatre signaux à 8,44 (*d*, *J* = 8,0 Hz; 1H), 7,94 (*d*, *J* = 8,0 Hz; 1H), 7,20 (*t*, *J* = 8,0 Hz ; 1H) et 6,89 ppm (*t*, *J* = 8,0 Hz; 1H) attestant de la présence d'un noyau aromatique. La multiplicité des signaux ainsi que les valeurs de constantes de couplage suggère que ce dernier est orthodisubstitué.
- Un signal à 0,85 ppm sous forme de triplet (*J* = 7,0 Hz) et d'intégration 3H, indiquant la présence d'un groupement méthyle.

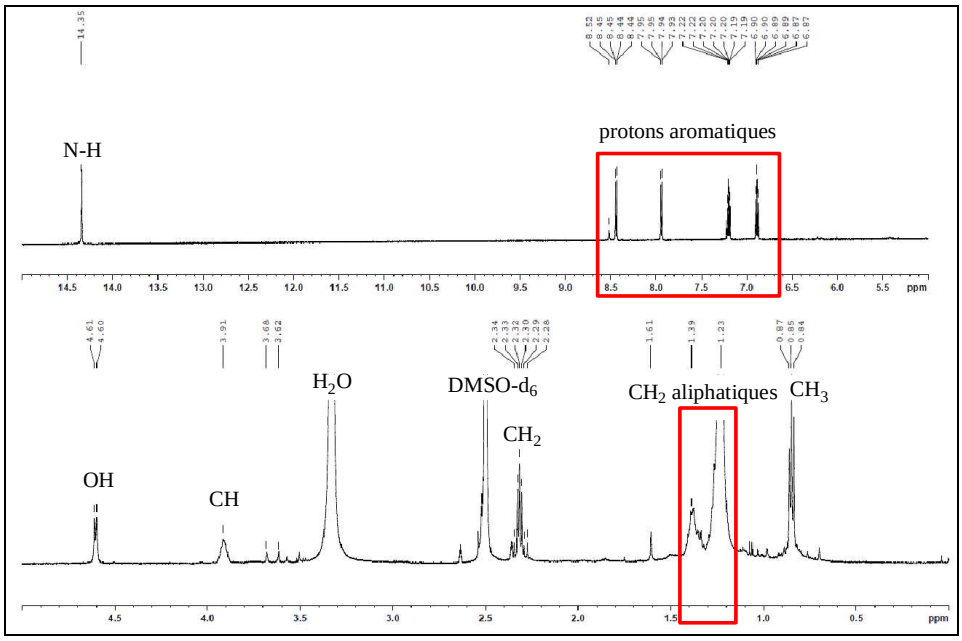


Figure III-7: Spectre RMN ^{1}H du composé **1** (500 MHz, DMSO-d_6)

– un massif allant de 1,1 à 1,4 ppm, traduisant la présence d'une longue chaîne aliphatique. Ce constat est confirmé par expérience HSQC (Figure III-8) qui montre clairement des corrélations entre ces protons constituant le massif et des carbones secondaires à δ_C 22,2-37,1.

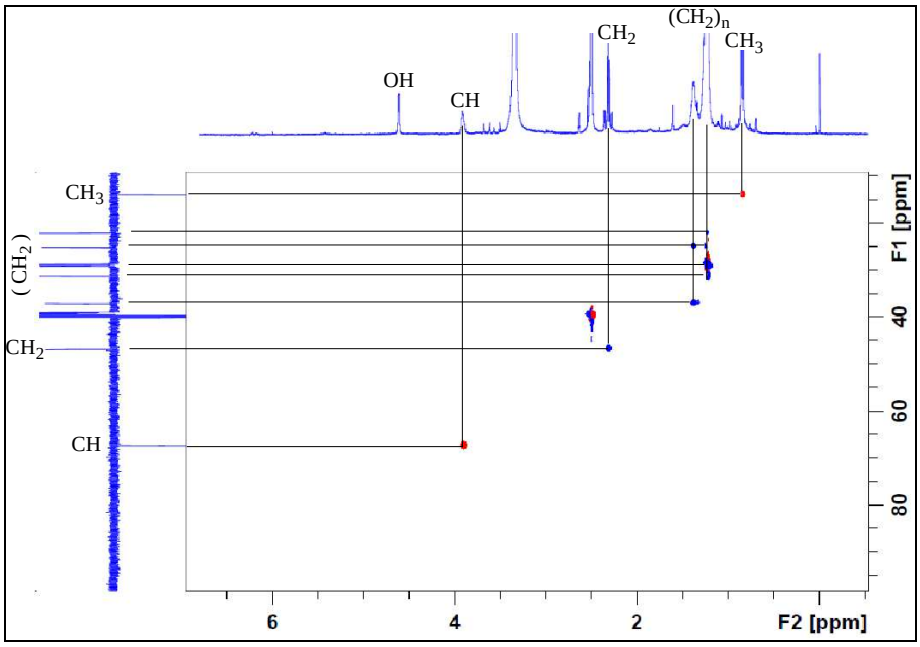


Figure III-8: Spectre HSQC mettant en évidence la chaine aliphatique du composé **1**

– Un signal multiplet d'intégration deux protons résonant à 2,31 ppm. Leur corrélation hétéronucléaire C-H observée sur le spectre HSQC (Figure III-8) avec un carbone résonant à 46,7 ppm indique qu'ils font partie d'un groupement méthylénique CH_2 lié à un groupement déblindant au vu de leur valeur de déplacement chimique.
– Un signal multiplet d'intégration un proton résonant à 3,91 ppm. Sa corrélation HSQC (Figure III-8) avec un carbone sortant à 67,5 ppm indique qu'il fait partie d'un groupement méthine.
– Un signal à 4,60 ppm (*d*, *J* = 5,5 Hz; 1H) ne montrant aucune corrélation HSQC et attribuable à un groupement OH.
– Un signal singulet fortement déblindé à 14,35 ppm, très caractéristique d'un proton de groupement amide secondaire. Ceci est confirmé par HMBC (Figure III-9) qui exhibe clairement une corrélation entre ce proton et un groupement carbonyle résonant à 169,2 ppm.

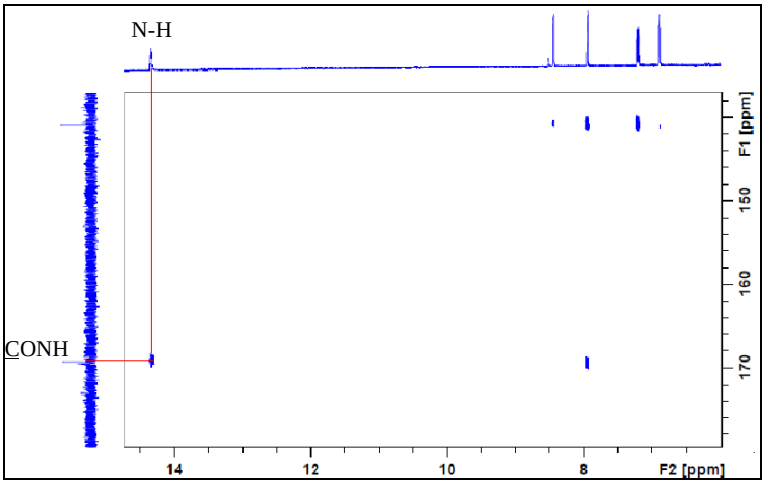


Figure III-9: Partie du spectre HMBC du composé **1**

Le spectre RMN ^{13}C en *J* modulé (Figure III-10) confirme clairement cette analyse à travers les signaux correspondant à 4 CH aromatiques (δ_C 118,1-131,1), 2 carbones quaternaires aromatiques (125,3-140,9 ppm), aux CH_2 aliphatiques (25,2-37,1 ppm), à un groupement méthyle (δ_C 14,0) et enfin à un carbone de carbonyle du groupement amide (δ_C 169,2).

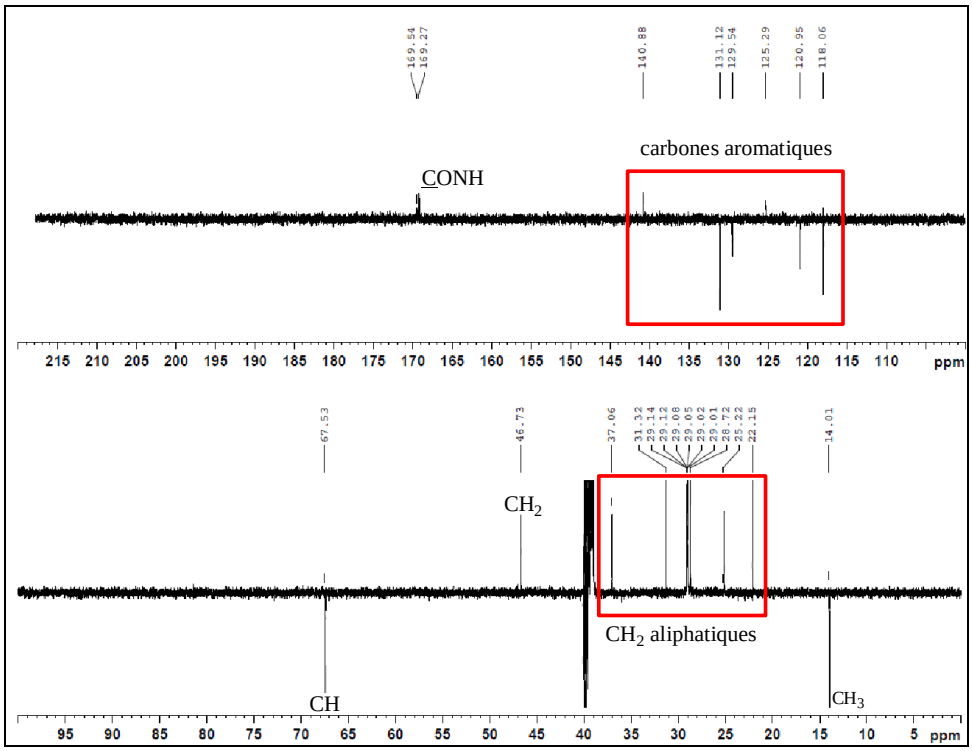


Figure III-10: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **1** (125 MHz, DMSO-d_6)

En plus, le spectre RMN ^{13}C (Figure III-10) indique également la présence d'un second carbone quaternaire de type carbonyle sortant à 169,5 ppm.

Tous ces éléments montrent clairement que notre composé est de nature aromatique avec un squelette benzénique orthodisubstitué, porteur d'un groupement amide et d'une longue chaine aliphatique. Il reste à alors à identifier la nature exacte des deux ortho-substituants.

Pour cela, l'expérience de corrélation hétéronucléaire longue distance (HMBC) a été le bon outil. En effet, le spectre HMBC (Figure III-12) qui montre clairement deux taches de corrélation entre le proton N-H du groupement amide identifié à 14,35 ppm et deux carbones aromatiques repérés à δ_C 118,1 et 125,3 indique que l'atome d'azote est directement attaché au noyau aromatique. Par ailleurs, la corrélation observée entre le proton aromatique sortant à 7,94 ppm (*d*, *J* = 8,0 Hz) et le second carbonyle repéré à 169,5 ppm attribuable à celui d'un acide carboxylique montre que ce dernier est le second orthosubstituant. Ceci permet de suggérer pour le composé **1** la structure partielle suivante (Figure III-11) :

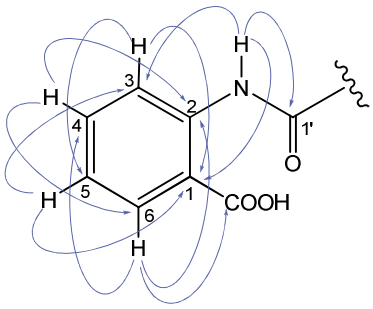


Figure III-11 : Structure partielle et corrélations HMBC observées pour le composé **1**

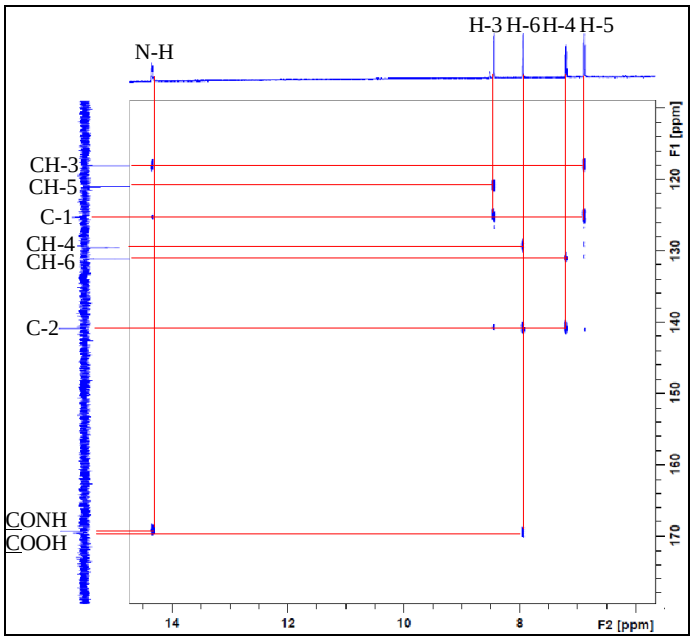
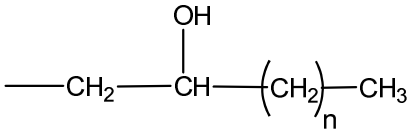


Figure III-12 : Partie du spectre HMBC du composé **1**

L'analyse COSY H-H (Figure III-13) confirme la nature benzénique de notre composé porteur de deux orthosubstituants, par l'observation des corrélations attendues entre les quatre protons aromatiques 8,44 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz) , 7,94 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz), 7,20 (1H, *t*, *J* = 8,0 Hz) et 6,89 ppm (1H, *t*, *J* = 8,0 Hz). Cette analyse met également en évidence la présence de deux systèmes de spins. L'un implique les protons du groupement CH_2 (δ_H 2,31, *m*), le proton du groupement CH (δ_H 3,91, *m*) et le proton du groupement OH (δ_H 4,60, *d*, *J* = 5,5 Hz), permettant d'identifier un premier enchainement CH_2-CHOH. L'autre implique le proton du même groupement CH, les protons CH_2 aliphatiques (δ_H 1,1–1,4) et les protons CH_3 (δ_H 0,85, *t*, *J* = 7,0 Hz), permettant de constituer le second enchainement la chaîne latérale CHOH-$(CH_2)_n$-CH_3. Ces deux enchainements forment donc la longue chaine aliphatique représentée par la figure suivante :



La longueur de cette chaine aliphatique est confirmée par le spectre MS/MS (Figure III-14) du composé **1**. Ce dernier présente clairement un fragment à *m/z* = 177 $[M-298]^-$ correspondant à la perte de $[CH_3(CH_2)_{18}CH_2OH]$.

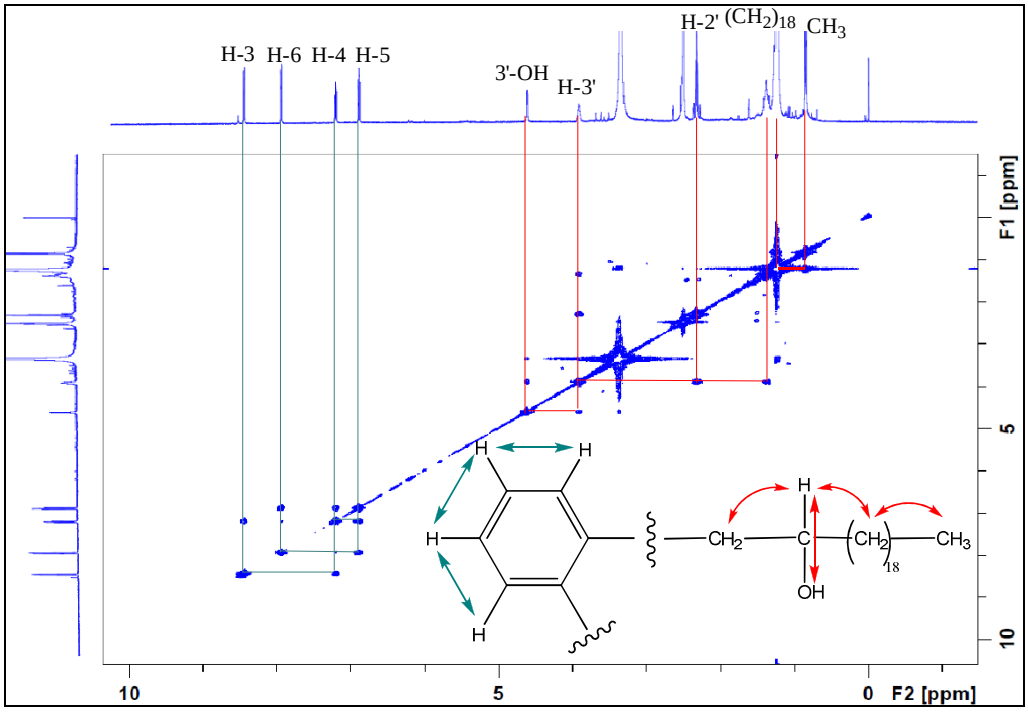


Figure III-13 : Spectre COSY H-H du composé **1** (500 MHz, DMSO-d_6)

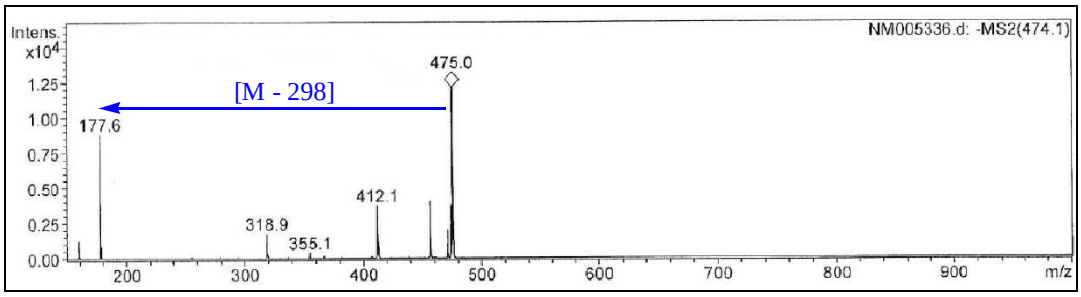
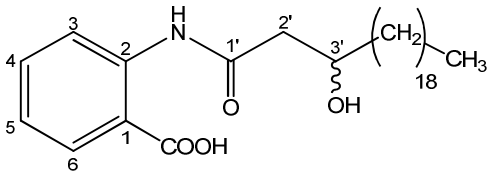


Figure III-14 : Spectre MS-MS du composé **1**

Cette analyse spectrale permet d'assigner sans ambigüité pour le composé **1**, la structure plane suivante :



La position précise du groupement OH en C-3' est attestée par les corrélations observées en HMBC (Figure III-15) entre les protons du groupement CH_2-2' (δ_H 2,31) situé en α de la fonction amide au vu de sa valeur de déplacement chimique et les carbones C-3' (δ_C 67,5) et C-1' (δ_C 169,2).

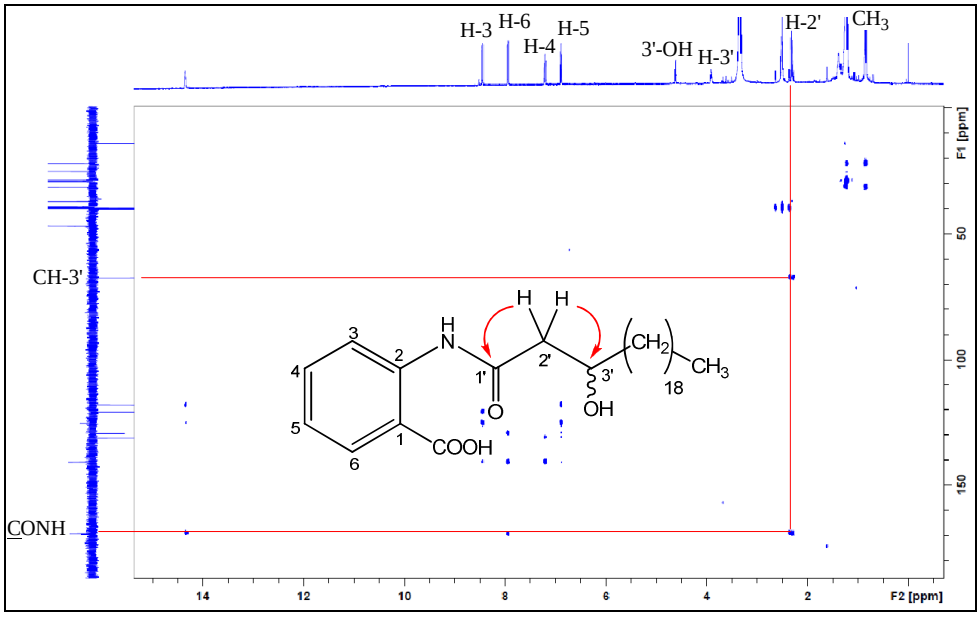
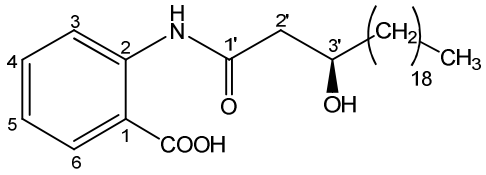


Figure III-15 : Spectre HMBC du composé **1**

La stéréochimie au niveau du carbone C-3' a été établie par la mesure du pouvoir rotatoire de l'acide gras obtenu après hydrolyse alcaline du composé **1**. La valeur négative de ce pouvoir rotatoire [$[\alpha]_D^{22}$: –12 (C=0,25 g/100ml, MeOH)] comparée aux données de la littérature [76,77] plaide pour une configuration *R*. Cette donnée supplémentaire permet d'assigner sans ambigüité pour le composé **1**, dérivé de l'acide anthranilique, la structure nouvelle suivante :



Acide *N*-(*R*)-3'-hydroxydocosanoylanthranilique

Ce composé nouveau fait partie des dérivés de l'acide anthranilique, métabolites secondaires largement répandus dans le genre *Ononis* et connus pour leurs diverses propriétés biologiques et pharmacologiques. On citera les propriétés anti-inflammatoire, anti-allergique et anticancéreuse. Ce sont également de bons inhibiteurs enzymatiques [68-74].

Les figures (Figures III-16 et III-17) et tableau (Tableau III-1) suivants reproduisent les déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^{1}H et ^{13}C (dans le DMSO-*d6*) pour le composé **1**.

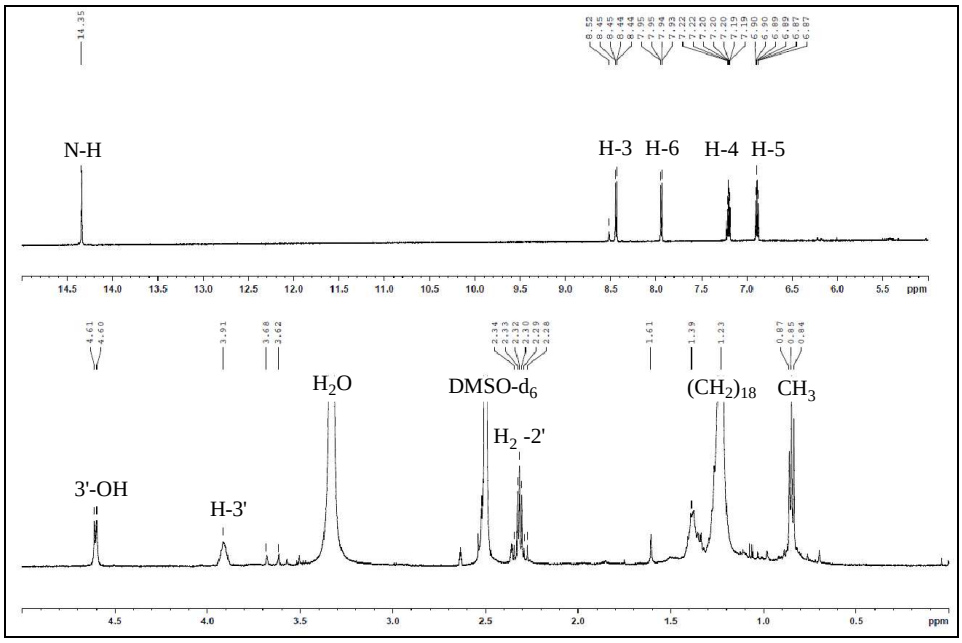


Figure III-16 : Spectre RMN ^{1}H du composé **1**

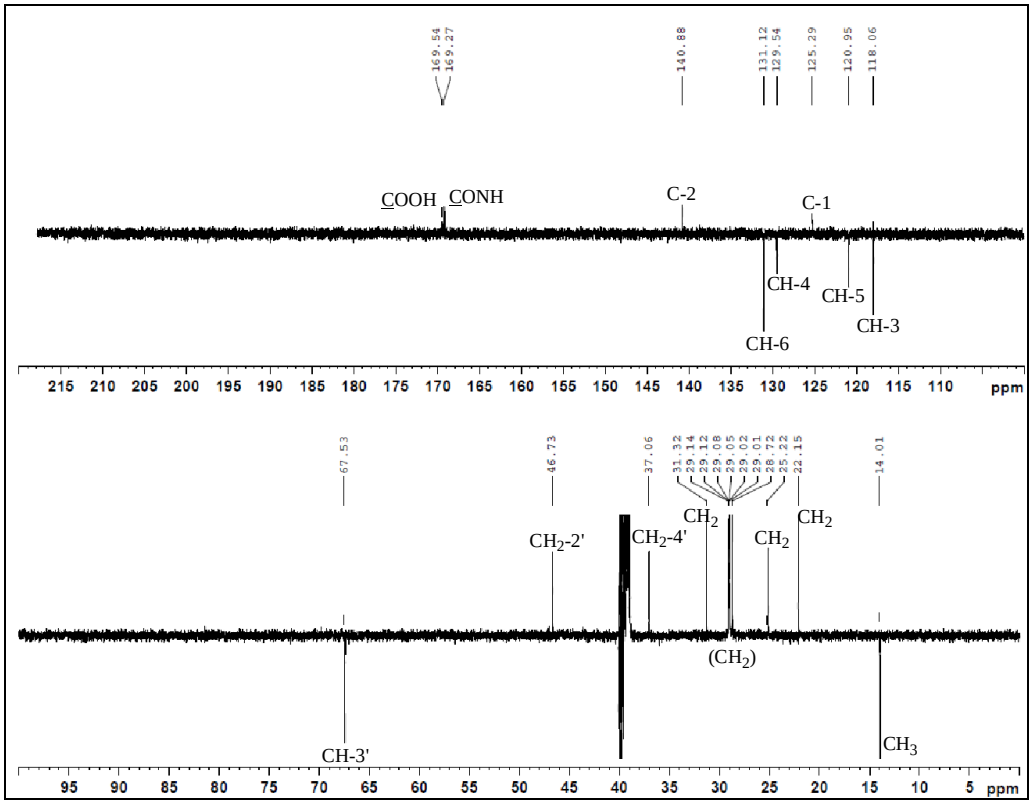
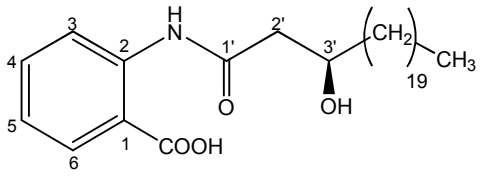


Figure III-17 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **1**

Tableau III-1 : Déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^{1}H et ^{13}C

Positions	δ_C	δ_H *m* (*J* en Hz)
1	125,3	-
2	140,9	-
3	118,1	8,44 *d* (8,0)
4	129,5	7,20 *t* (8,0)
5	120,9	6,89 *t* (8,0)
6	131,1	7,94 *d* (8,0)
1'	169,2	-
2'	46,7	2,31 *m*
3'	67,5	3,91 *m*
4'	37,1	~ 1,3
OH-3'	-	4,60 *d* (5,5)
$(CH_2)_{n-1}$	31,3–22,2	1,1–1,4 *m*
CH_3	14,0	0,85 *t* (7,0)
-HN-	-	14,35 *s*
COOH	169,5	-

III.5.2. Elucidation structurale du composé 2



Acide *N*-(*R*)-3'-hydroxytricosanoylanthranilique

Le composé **2** visible en UV (254 nm) se présente, comme le composé **1**, sous forme d'une poudre amorphe blanche.

La totale similitude de ses spectres IR (Figure III-18) et UV (Figure III-19) avec ceux du composé **1** discuté précédemment permet d'affirmer que le composé **2** est également un dérivé de l'acide anthranilique.

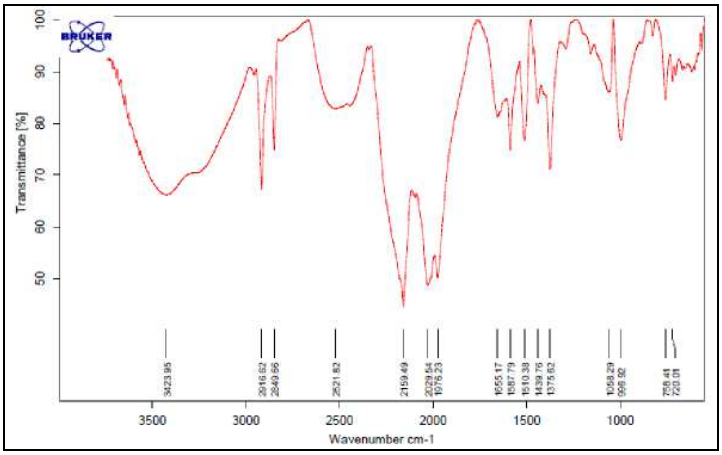


Figure III-18 : Spectre IR du composé **2**

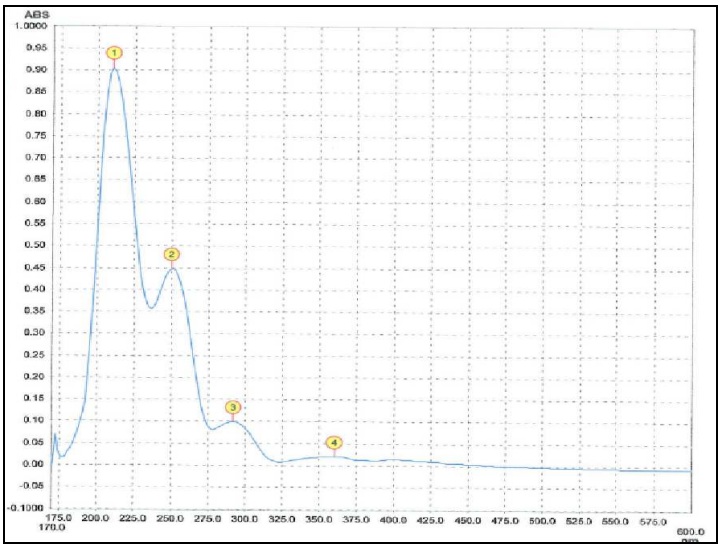


Figure III-19 : Spectre UV du composé **2**

Les spectres RMN ^{1}H (Figure III-20) et ^{13}C DEPT (Figure III-21) enregistrés dans le DMSO-d_6 de ce composé confirme leur totale ressemblance avec ceux du composé **1**. Ils permettent de retrouver tous les signaux des protons et carbones constituant le composé **2**. On reconnait :

- le signal du proton du groupement amide secondaire résonant à 14,46 ppm.
- les signaux des quatre protons aromatiques résonant à δ_H 8,44 (*d*, *J* = 8,0 Hz; 1H), 7,94 (*d*, *J* = 8,0 Hz; 1H), 7,19 (*t*, *J* = 8,0 Hz; 1H) et 6,88 (*t*, *J* = 8,0 Hz; 1H).
- les signaux des six carbones aromatiques repérés à δ_c 125,3 (C-1), 140,9 (C-2), 118,0 (C-3), 129,5 (C-4), 120,9 (C-5), 131,1 (C-6).
- les signaux des protons et carbone du groupement méthyle résonant δ_H 0,85 (3H, *t*, *J* = 7,0 Hz)/δ_C 13,9.
- les signaux correspondant aux groupements CH_2 aliphatiques résonant à δ_H 1,1-1,4/ δ_C 22,1-37,1.
- les signaux du groupement CH_2 en position α de l'amide sortant à δ_H 2,31 (*m*, 2H)/ δ_C 46,8.
- les signaux du groupement CH hydroxylé situé en position β de l'amide résonant à δ_H 3,92 (*m*, 1H)/ δ_C 67,5.
- le signal du proton du groupement OH du groupement hydroxyméthine repéré à δ_H 4,58 (*d*, *J* = 5,5 Hz; 1H).

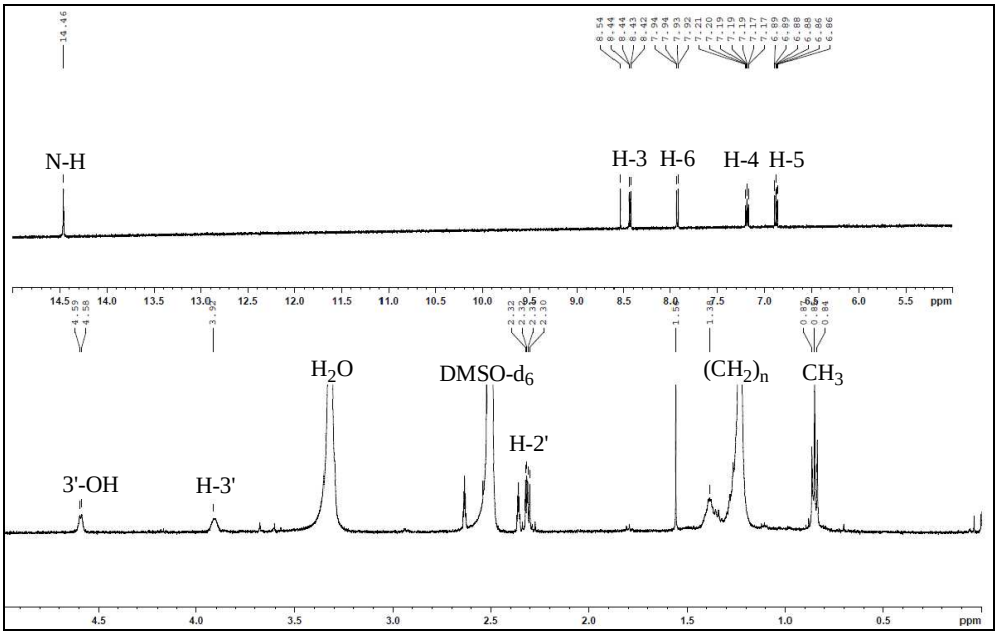


Figure III-20 : Spectre RMN ^{1}H du composé **2** (500 MHz, DMSO-d_6)

Le spectre RMN ^{13}C montre également la présence des deux carbonyles des fonctions amide et acide carboxylique à 169,2 et 169,5 ppm.

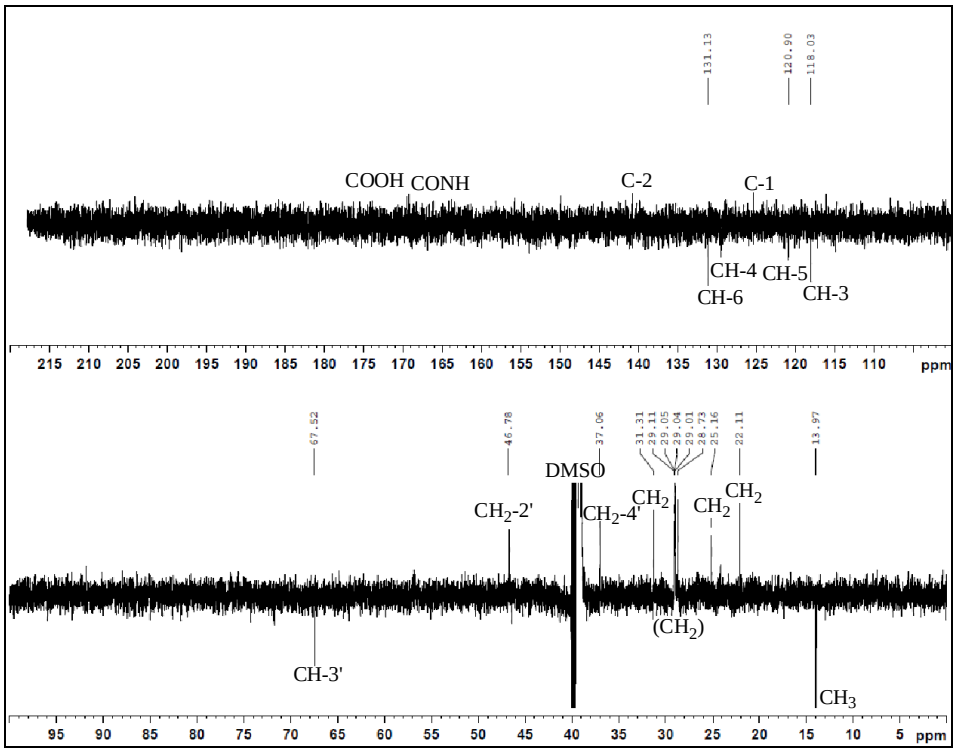


Figure III-21 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **2** (125 MHz, DMSO-d_6)

Le spectre de masse à haute résolution (HRESIMS) enregistré en mode négatif (Figure III-22), montre un pic d'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à *m/z* 488,3736, soit une masse moléculaire égale à 489 uma et correspondant à une formule brute en $C_{30}H_{51}NO_4$ (calc. $C_{30}H_{50}NO_4$, 488,3745). La différence de 14 uma par rapport au composé **1,** laisse suggérer que la structure du composé **2** ne diffère de celle de **1** que par la présence d'un groupement méthylène supplémentaire au niveau de la chaîne grasse. Cette dernière est donc de structure $HNCO-CH_2-CHOH-(CH_2)_{19}-CH_3$ au lieu de $HNCO-CH_2-CHOH-(CH_2)_{18}-CH_3$ pour le composé **1**.

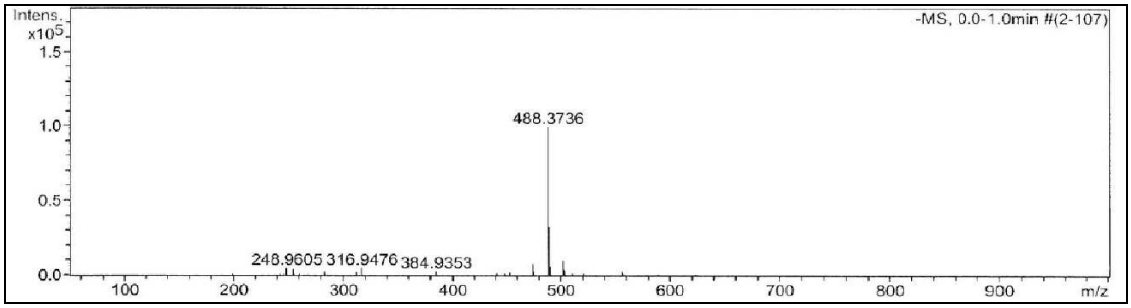


Figure III-22 : Spectre HRESIMS (mode négatif) du composé **2**

La présence d'un groupement méthylène supplémentaire sur la chaîne latérale comparativement au composé **1**, est confirmée par le spectre MS/MS (Figure III-23) qui montre un fragment à *m/z* = 177 $[M-312]^-$ correspondant à la perte de $[CH_3(CH_2)_{19}CH_2OH]$.

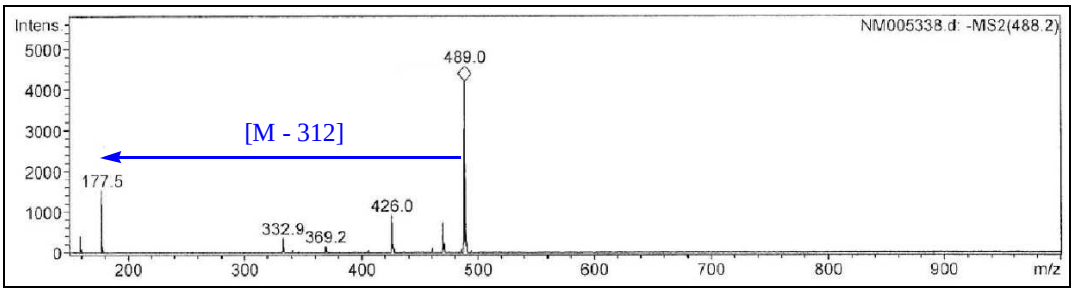
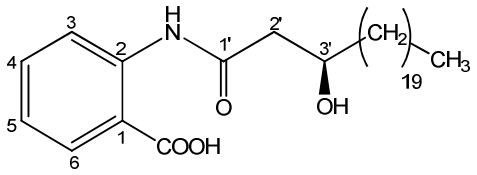


Figure III-23 : Spectre MS-MS du composé **2**

Toutes ces données spectrales (Tableau III-2) confirmées par analyses HSQC, HMBC et COSY H-H ainsi que la valeur négative du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{22}$: –3 (C=0,28 g/100ml, MeOH) déterminée après hydrolyse alcaline comparaison avec les données de la littérature [76,77], ont permis d'établir sans ambigüité pour le nouveau composé (**2**) la structure nouvelle suivante :

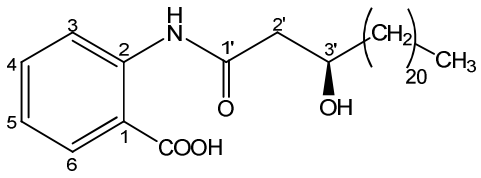


Acide *N*-(*R*)-3'-hydroxytricosanoylanthranilique

Tableau III-2 : Déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^1H et ^{13}C

Positions	δ_C	δ_H *m* (*J* en Hz)
1	125,3	-
2	140,9	-
3	118,0	8,44 *d* (8,0)
4	129,5	7,19 *t* (8,0)
5	120,9	6,88 *t* (8,0)
6	131,1	7,94 *d* (8,0)
1'	169,2	-
2'	46,7	2,31 *m*
3'	67,5	3,92 *m*
4'	37,1	~ 1,3
OH-3'	-	4,58 *d* (5,5)
$(CH_2)_{n-1}$	31,3–22,1	1,1–1,4 *m*
CH_3	13,9	0,85 *t* (7,0)
-HN-	-	14,46 *s*
COOH	169,5	-

III.5.3. Elucidation structurale du composé 3



Acide *N*-(*R*)-3'-hydroxytétracosanoylanthranilique

Le composé **3** se présente également, comme les composés **1** et **2**, sous forme d'une poudre amorphe blanche. Toutes les données spectrales de ce composé obtenues après analyse des spectres RMN ^{1}H (Figure III-24), ^{13}C (Figure III-25) et confirmées par expériences HSQC, HMBC et COSY H-H, se sont avérées totalement identiques à celles des composés **1** et **2**.

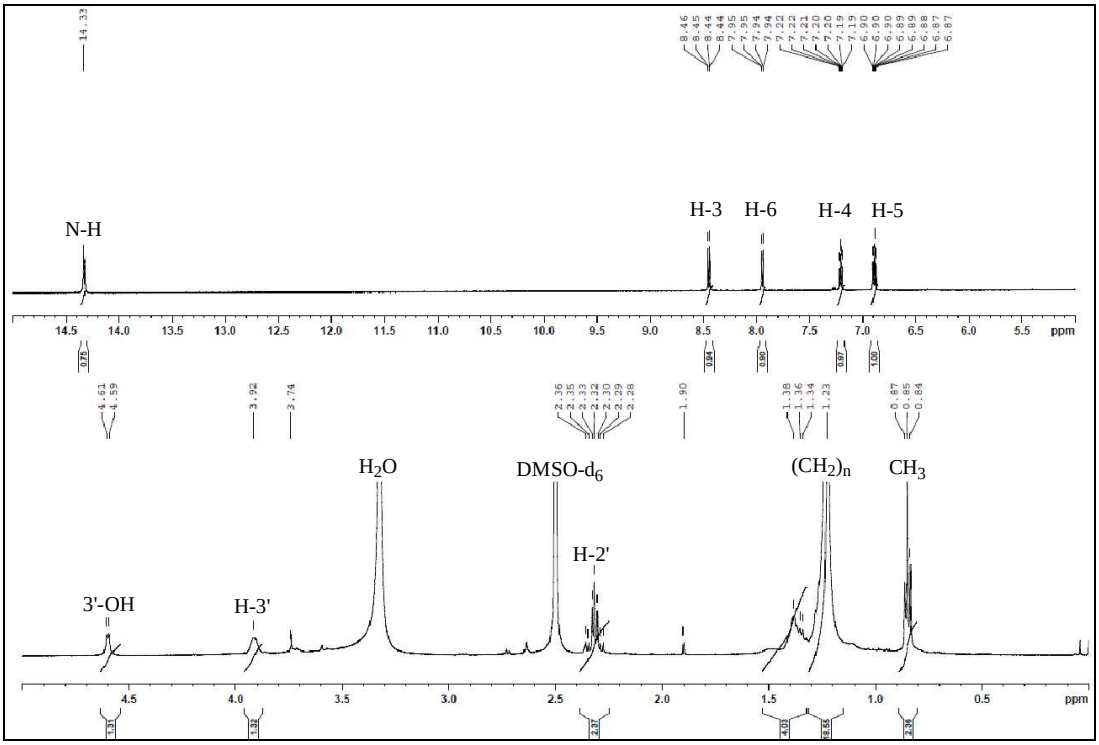


Figure III-24 : Spectre RMN ^{1}H du composé **3** (500 MHz, DMSO-d_6)

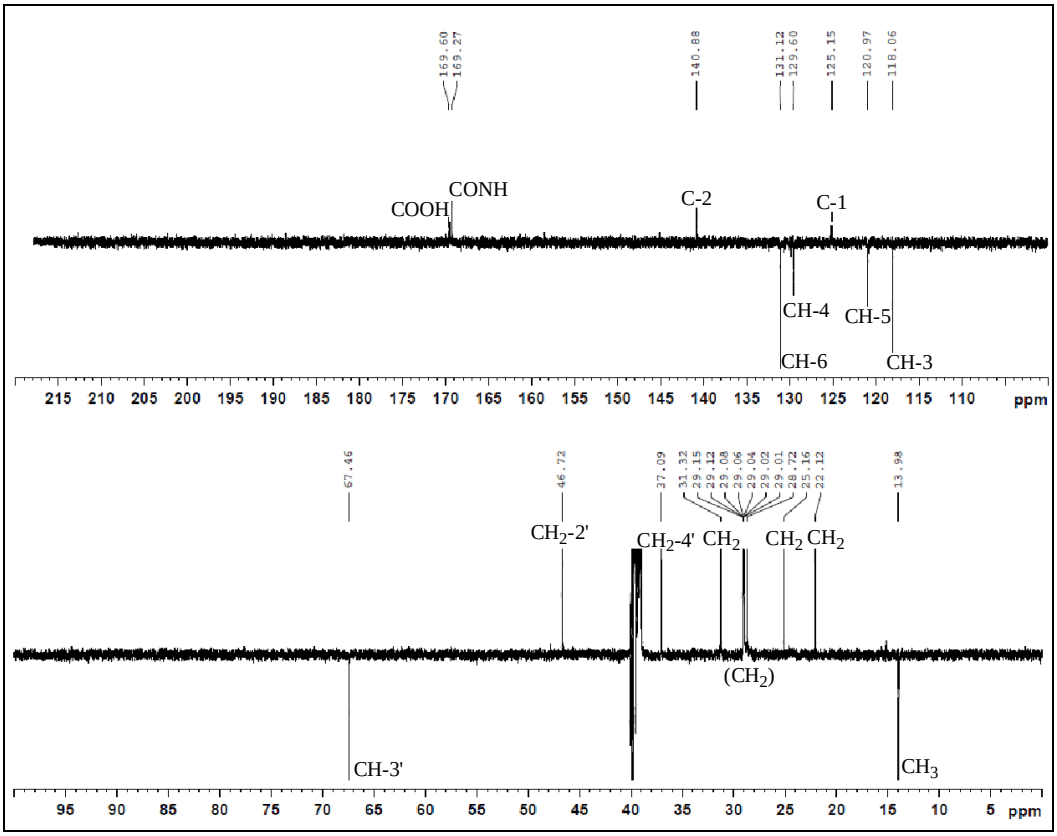


Figure III-25 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **3** (125 MHz, DMSO-d_6)

La différence se situerait donc au niveau de la longueur des groupements CH_2 aliphatiques comme il a été constaté pour les composés **1** et **2**. Ceci est confirmé par spectrométrie de masse qui permet de relever une différence de 14 uma par rapport au composé **2**, suggérant ainsi la présence d'un groupement méthylène supplémentaire au niveau de la chaîne latérale. En effet, le spectre HRESIMS (Figure III-26) obtenu en mode négatif présente un pic d'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à *m/z* 502,3892, soit une masse moléculaire égale 503 uma et correspondant à une formule brute $C_{31}H_{53}NO_4$ (calc. $C_{31}H_{52}NO_4$, 502,3902).

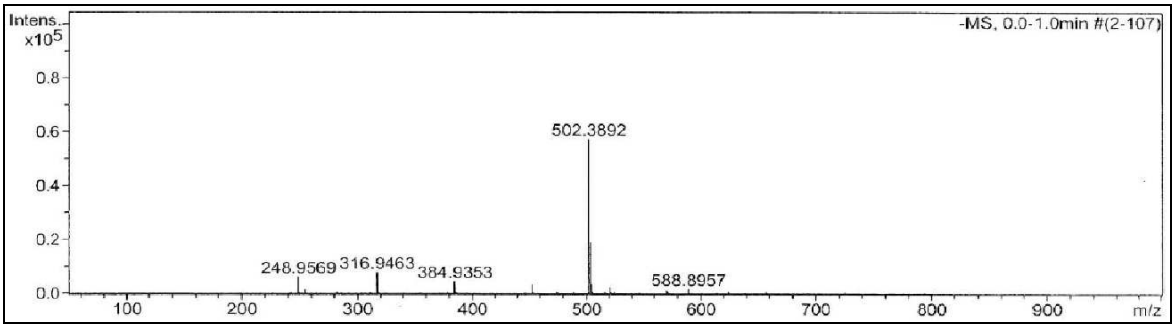


Figure III-26 : Spectre HRESIMS (mode négatif) du composé **3**

La présence de deux méthylènes supplémentaires au niveau de la chaîne latérale par rapport au composé **1** et d'un seul comparativement au composé **2**, est confirmée par le spectre MS/MS (Figure III-27) qui exhibe un fragment à *m/z* = 177 $[M-326]^-$ correspondant à la perte de l'enchainement $[CH_3(CH_2)_{20}CH_2OH]$.

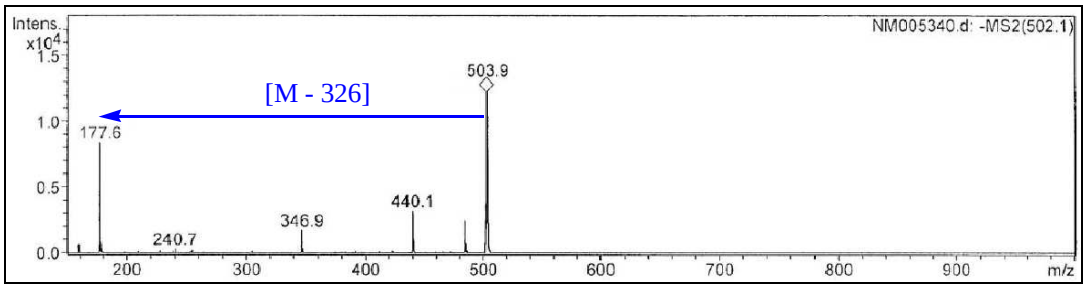
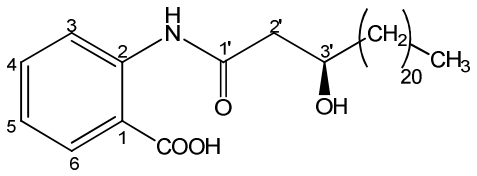


Figure III-27 : Spectre MS-MS du composé **3**

Toutes ces données spectrales (Tableau III-3) ainsi que la valeur négative du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{22}$: – 8 (C=0,30 g/100ml, MeOH) déterminée après hydrolyse alcaline et comparaison avec les données de la littérature [76,77], ont permis de proposer pour le nouveau composé **3** la structure nouvelle suivante :

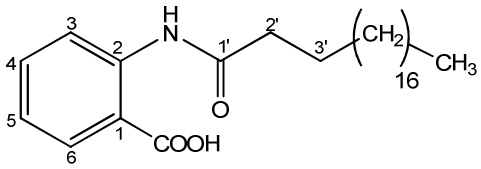


Acide *N*-(*R*)-3'-hydroxytétracosanoylanthranilique

Tableau III-3 : Déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^1H et ^{13}C

Positions	δ_C	δ_H *m* (*J* in Hz)
1	125,2	-
2	140,9	-
3	118,1	8,44 *d* (8,0)
4	129,6	7,20 *t* (8,0)
5	120,9	6,89 *t* (8,0)
6	131,1	7,94 *d* (8,0)
1'	169,2	-
2'	46,7	2,31 *m*
3'	67,5	3,92 *m*
4'	37,1	~ 1,3
OH-3'	-	4,60 *d* (5,5)
$(CH_2)_{n-1}$	31,3–22,1	1,1–1,4 *m*
CH_3	14,0	0,85 *t* (7,0)
-HN-	-	14,33 *s*
COOH	169,6	-

III.5.4. Elucidation structurale du composé 4



Acide *N*-icosanoylanthranilique

Le composé **4** se présente aussi sous forme d'une poudre amorphe blanche. Son spectre de masse ESI, enregistré en modes négatif (Figure III-28) et positif (Figure III-29), exhibe des pics d'ions pseudomoléculaires à *m/z* = 430 $[M-H]^-$ et 454 $[M+Na]^+$ respectivement. Ces derniers qui impliquent une masse moléculaire égale à 431 uma correspondant à une formule brute en $C_{27}H_{45}NO_3$, permet de suggérer que le composé **4** est également un dérivé de l'acide anthranilique à structure voisine des trois métabolites secondaires discutés précédemment.

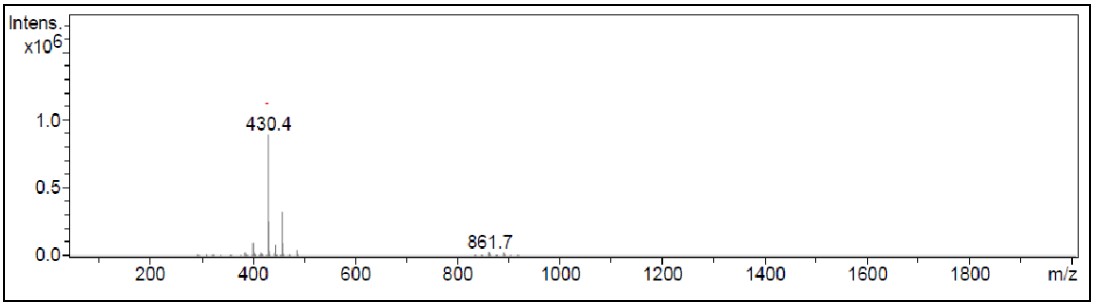


Figure III-28 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé **4**

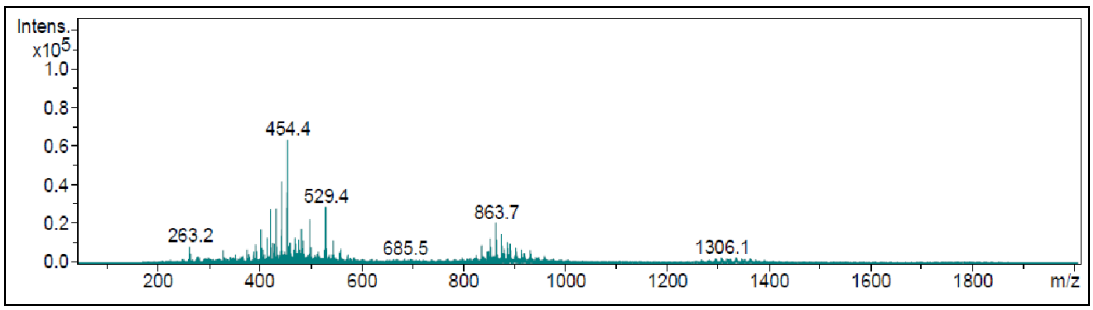


Figure III-29 : Spectre de masse ESI (mode positif) du composé **4**

Cette similitude est confirmée par le spectre RMN ^1H enregistré dans $CDCl_3$ (Figure III-30) qui permet de reconnaitre quasiment tous les signaux des protons observés pour les composés **1**, **2** et **3**. On identifie les quatre protons aromatiques H-3 (δ_H 8,78, *d*, *J* = 7,5 Hz), H-4 (δ_H 7,61, *t*, *J* = 7,5 Hz), H-5 (δ_H 7,13, *t*, *J* = 7,5 Hz) et H-6 (δ_H 8,13, *d*, *J* = 7,5 Hz). On

reconnait également les signaux des protons de la chaine lipidique, à savoir les protons H-2' (2H, δ_H 2,47, *t*, *J* = 7,0 Hz), les protons de la chaine CH_2 aliphatique ainsi que ceux du groupement méthyle (3H, δ_H 0,90, *t*, *J* = 6,5 Hz). La différence notable consiste en la disparition des signaux correspondant aux protons du groupement hydroxyméthine en C-3', H-3' (δ_H 3,91) et OH-3' et l'apparition d'un nouveau signal d'intégration 2 H résonant sous forme de quintuplet (*J* = 7,0 Hz) à δ_H 1,77, permettant de suggérer que le groupement CHOH-3' a laissé la place à un groupement CH_2-3'. La valeur de déplacement chimique et la multiplicité des signaux des protons constituant ce groupement, vont dans le sens de cette hypothèse.

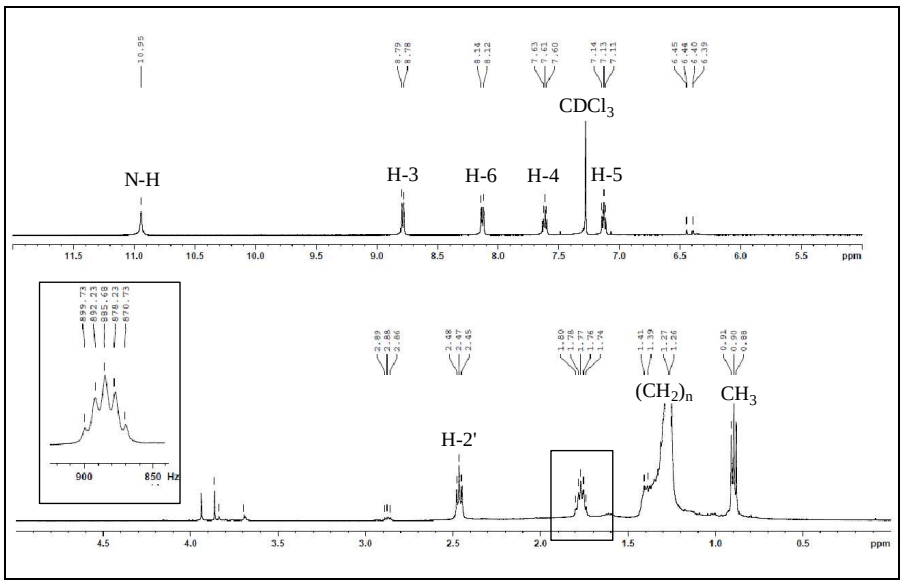


Figure III-30 : Spectre RMN ^{1}H du composé **4** (500 MHz, $CDCl_3$)

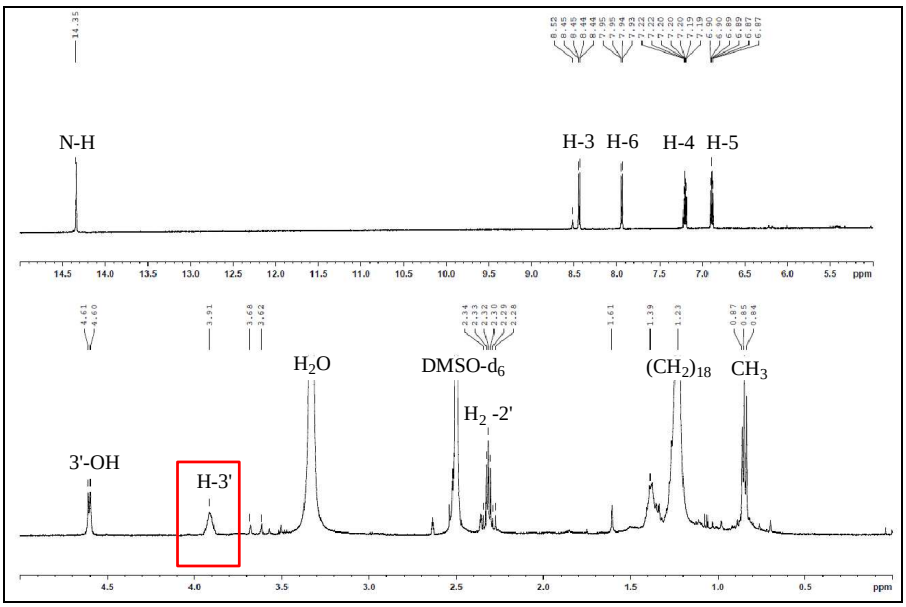


Figure III-31 : Spectre RMN ^{1}H du composé **1**

Le spectre RMN ^{13}C en *J* modulé (Figure III-32) qui permet de reconnaitre la quasi-totalité des signaux observés pour les composés **1**, **2** et **3**, montre également la disparition du signal du carbone C-3' (δ_C 67,5) du groupement CHOH-3'.

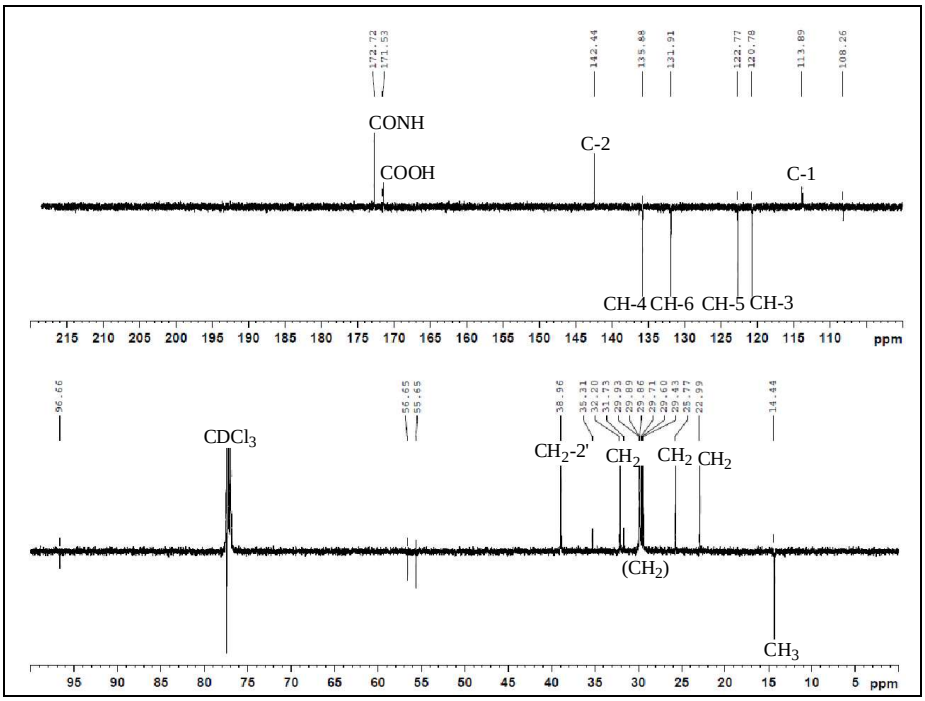


Figure III-32 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **4** (125 MHz, $CDCl_3$)

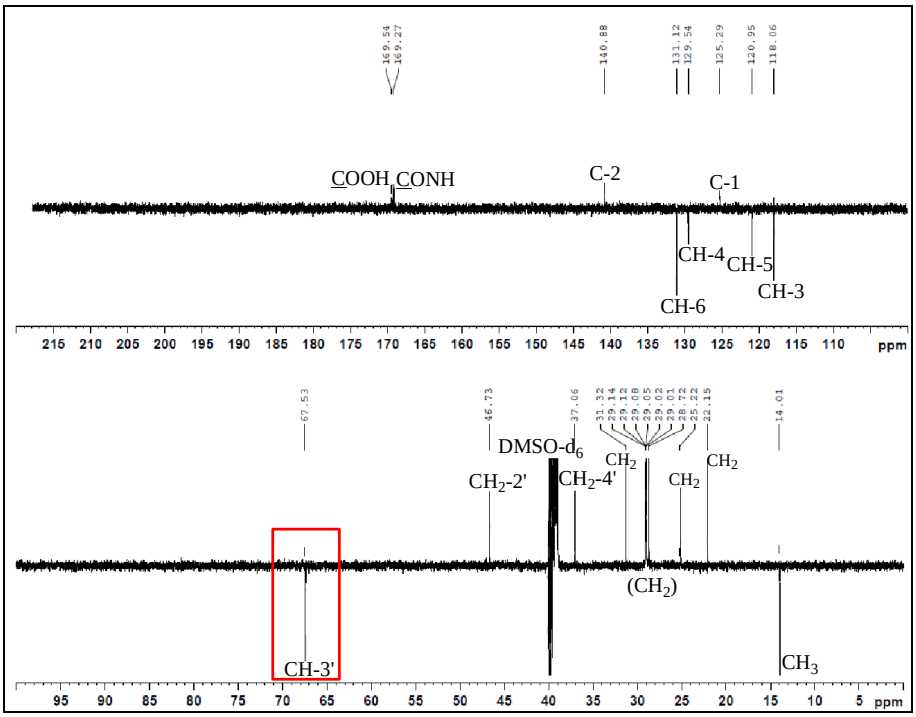


Figure III-33 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **1**

La corrélation observée sur le spectre HSQC (Figure III-34) entre le nouveau signal des protons résonant à δ_H 1,77 (*quint*, *J* = 7,0 Hz; 2H) et un carbone repéré à 25,8 ppm indique qu'ils font partie d'un groupement méthylénique CH_2.

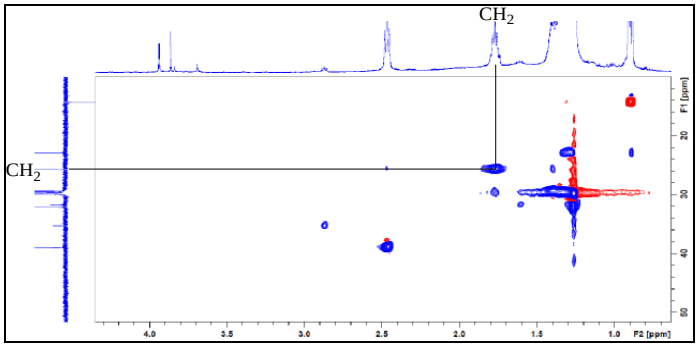


Figure III-34 : Spectre HSQC mettant en évidence le nouveau groupement CH_2 (composé **4**)

Le spectre COSY H-H (Figure III-35), montre la présence d'un système de spins impliquant les protons du groupement CH_2-2' situé en α de l'amide et résonant à δ_H 2,47 (*t*, *J* = 7,0 Hz; 2H), les protons du nouveau groupement CH_2 résonant à δ_H 1,77 (*quint*, *J* = 7,0 Hz; 2H) et les protons des autres groupements CH_2 aliphatiques sortant à δ_H 1,2-1,4. Cette analyse traduit la présence effective d'un méthylène CH_2-3' à la place du groupement hydroxyméthine CHOH-3'.

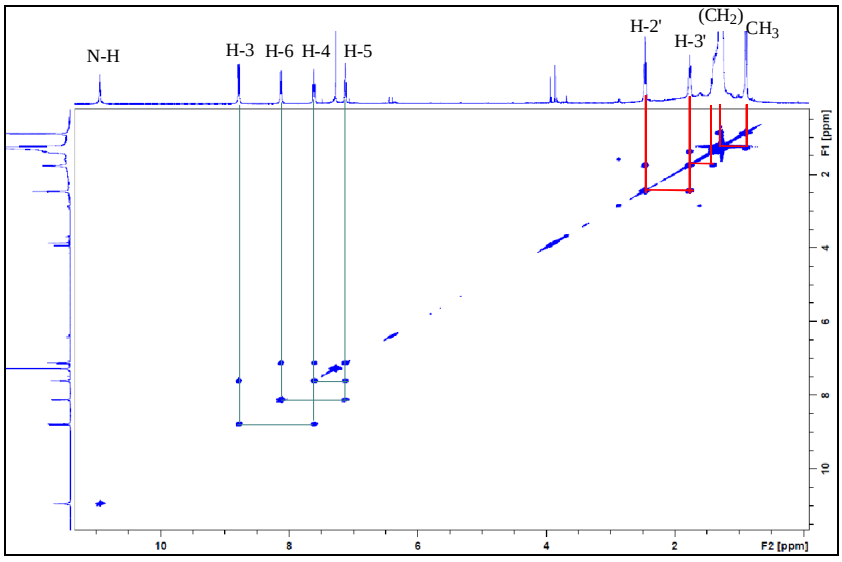


Figure III-35 : Spectre COSY H-H du composé **4** (500 MHz, $CDCl_3$)

La présence d'un groupement CH_2 en position C-3' au lieu du groupement hydroxyméthine (composés **1**, **2** et **3**), est également confirmée par les corrélations observées en HMBC (Figure III-36) entre les protons de ce groupement (δ_H 1,77) et les deux carbones sortant à δ_C 172,7 (CONH) et 38,9 (C-2').

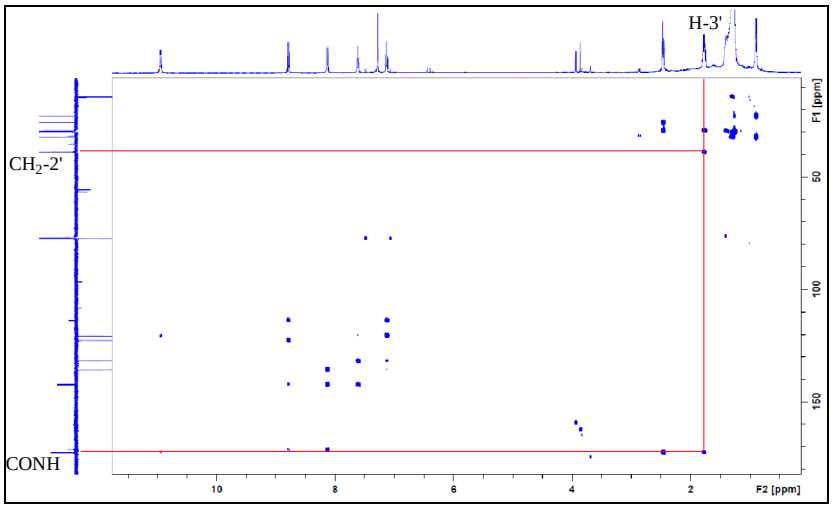
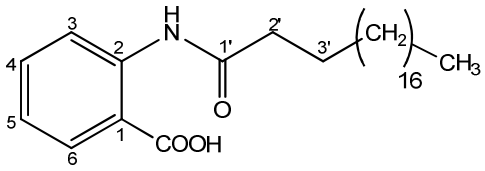


Figure III-36 : Spectre HMBC du composé **4** ($CDCl_3$)

L'ensemble de ces données spectrales (Tableau III-4) établi par analyses COSY H-H, HMBC et HSQC, la spectrométrie de masse qui a permis de déterminer la longueur de la chaine aliphatique, en plus des données de la littérature, nous autorise à proposer pour le composé **4** la structure suivante :



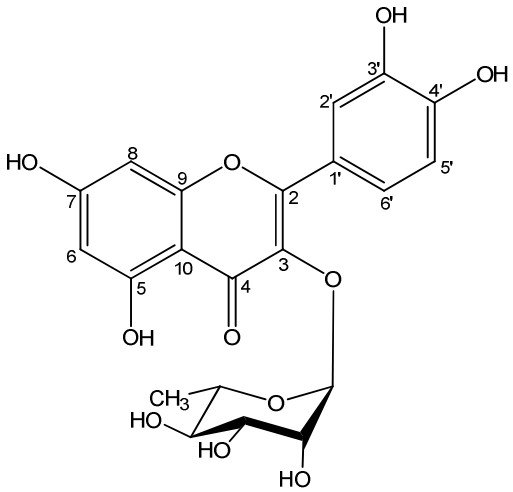
Acide *N*-icosanoylanthranilique

Ce composé a été isolé antérieurement d'une autre espèce du genre *Ononis*, *O. natrix* [78].

Tableau III-4 : Déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^{1}H et ^{13}C

Positions	δ_C	δ_H *m* (*J* en Hz)
1	113,9	-
2	142,4	-
3	120,8	8,78 *d* (7,5)
4	135,9	7,61 *t* (7,5)
5	122,8	7,13 *t* (7,5)
6	131,9	8,13 *d* (7,5)
1'	172,7	-
2'	38,9	2,47 *t* (7,0)
3'	25,8	1,77 *quint* (7,0)
$(CH_2)_{16}$	32,2–22,9	1,2–1,4 *m*
CH_3	14,4	0,90 *t* (6,5)
-HN-	-	10,95 *s*
COOH	171,5	-

III.5.5. Elucidation structurale du composé 5



Quercétine 3-*O*-α-rhamnopyranoside (quercitrine)

Le composé **5** visible en UV (254 nm), se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Sa couleur jaune après analyse CCM et révélation à l'acide sulfurique oriente vers un composé à structure flavonoïdique.

Son spectre de masse ESI enregistré en modes négatif (Figure III-37) et positif (Figure III-38), montre respectivement des pics d'ions pseudomoléculaires à *m/z* = 447 $[M-H]^-$ et 471 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 448 uma correspondant à une formule brute en $C_{21}H_{20}O_{11}$.

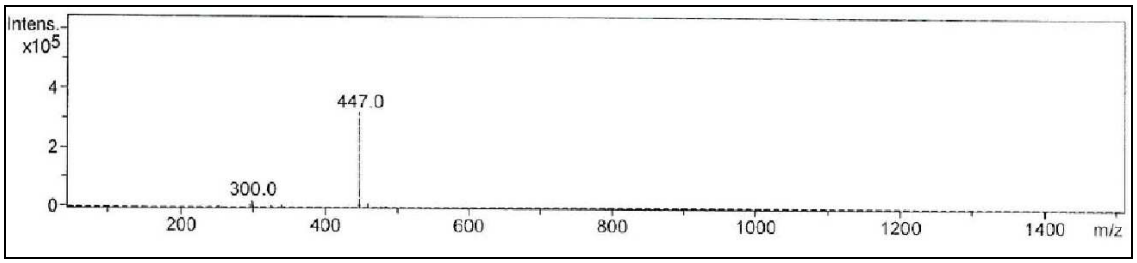


Figure III-37 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé **5**

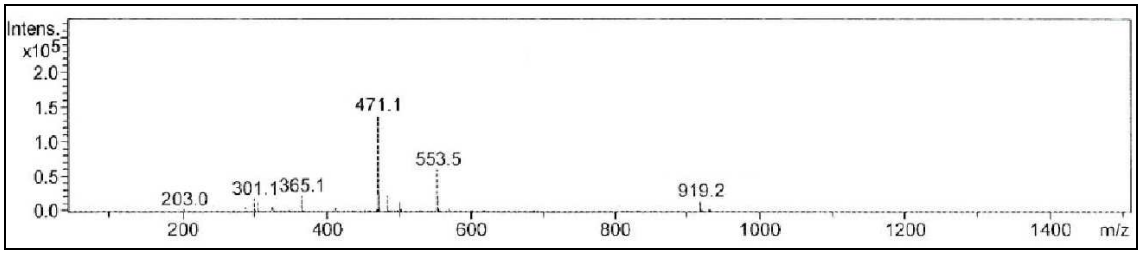


Figure III-38 : Spectre de masse ESI (mode positif) du composé **5**

Le spectre RMN ^{1}H (Figure III-39) du composé **5** enregistré dans CD_3OD montre des signaux à δ_H 6,20-7,34 de protons aromatiques. De plus, l'observation d'un signal doublet de proton anomère à δ_H 5,35 (1H, *J* = 1,5 Hz) et de signaux sortant entre 3,35 et 4,22 ppm, indique la présence d'une unité osidique. Ceci permet de suggérer que le composé **5** est un flavonoïde glycosylé.

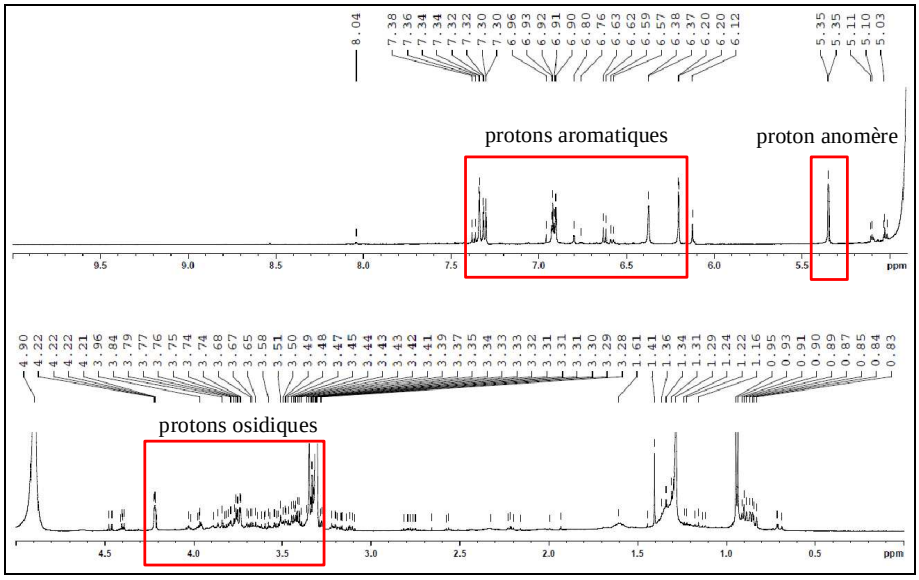


Figure III-39 : Spectre RMN ^{1}H du composé **5** (500 MHz, CD_3OD)

Une analyse approfondie du spectre RMN ^{1}H (Figure III-40) met en évidence la présence de deux signaux de deux protons aromatiques à δ_H 6,20 (1H, *d*, *J* = 1,7 Hz) et 6,37 (1H, *d*, *J* = 1,7 Hz), attribués respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7. Sur le spectre, apparaissent également trois signaux à δ_H 7,34 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz), 7,31 (1H, *dd*, *J* = 8,3 Hz, *J* = 2,0 Hz) et 6,91 (1H, *d*, *J* = 8,3 Hz) formant un système ABX et attribués respectivement aux protons H-2', H-6' et H-5' du cycle B du flavonoïde.

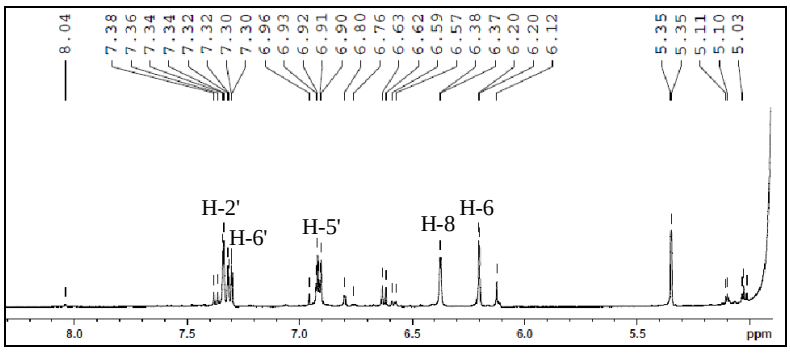


Figure III-40 : Spectre RMN ^{1}H de la partie génine du composé **5** (CD_3OD)

Il apparait ainsi que notre composé est un flavonoïde substitué en C-5, C-7, C-3' et C-4'. Ce dernier est porteur d'une unité osidique dont il reste à établir la nature et le point de branchement.

Le spectre RMN ^{13}C en *J* modulé (Figure III-41) confirme la nature flavonoïdique du composé à travers les signaux correspondant à dix carbones quaternaires (δ_C 106,0-179,8) dont un groupement carbonyle (δ_C 179,8 ppm) et cinq CH aromatiques (δ_C 94,8-122,9). Les signaux restant sont attribués aux carbones de l'unité osidique (δ_C 72-103,6).

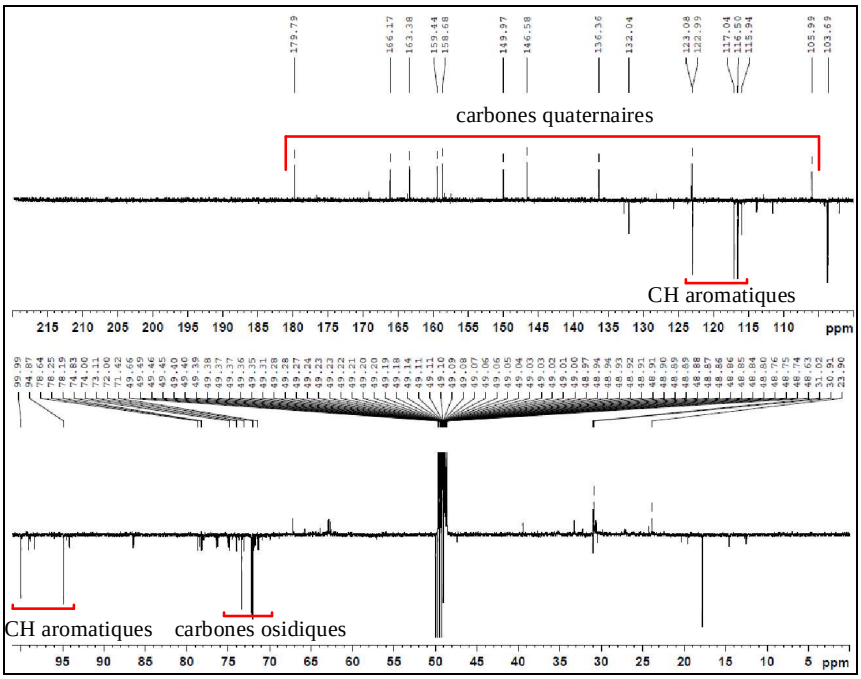


Figure III-41 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **5** (125 MHz, CD_3OD)

L'identification de la génine à un flavonol, plus précisément à la quercétine, a été établie sur la base de la valeur de déplacement chimique très caractéristique du carbone C-2 de l'ordre de 159 ppm, déduite par analyse HMBC (Figure III-42) qui montre les corrélations entre les protons H-2'/H-6' du cycle B et ce carbone. Le signal carbone observé à δ_C 136,3 est attribué au carbone C-3.

Par ailleurs, la comparaison de ces données spectrales avec celles de la littérature laisse suggérer que le groupement OH en C-3 du flavonol est substitué. En effet, il est établi que les carbones C-3 et C-2 sont à 137,2 et 147,9 ppm respectivement si le carbone C-3 est porteur d'un OH libre, et à 135,2, 158,7 ppm dans le cas contraire [79,80]. Ceci est confirmé par expérience HMBC (Figure III-42) qui montre clairement la corrélation entre le proton anomère de l'unité osidique sortant à δ_H 5,35 (1H, J = 1,5 Hz) et le carbone C-3 de la génine.

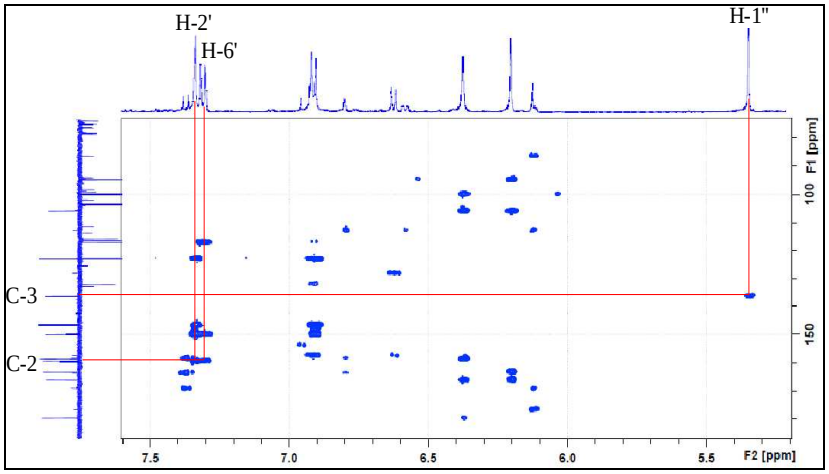


Figure III-42 : Spectre HMBC de la partie génine du composé **5** (CD_3OD)

Le spectre COSY H-H (Figure III-43) permet d'identifier l'unité osidique à travers les taches de corrélations entre :

- le proton anomérique H-1" (δ_H 5,35, *d*, *J* = 1,5 Hz) et le proton H-2" résonant à 4,22 ppm (1H, *dd*, *J* = 3,2, 1,5 Hz).
- le proton H-2" et le proton H-3" résonant à 3,75 ppm (1H, *dd*, *J* = 9,5, 3,3 Hz).
- le proton H-3" et le proton H-4" résonant à 3,35 ppm (1H, *t*, *J* = 9,5 Hz).
- le proton H-4" et le proton H-5" résonant à 3,42 ppm (1H, *m*).
- le proton H-5" et les protons de groupement méthyle H-6" résonant à 0,94 ppm (3H, *d*, *J* = 6,1Hz).

L'ensemble de ces correlations indique qu'il s'agit d'un rhamnose de configuration α ($J_{1"-2"}$ = 1,5 Hz).

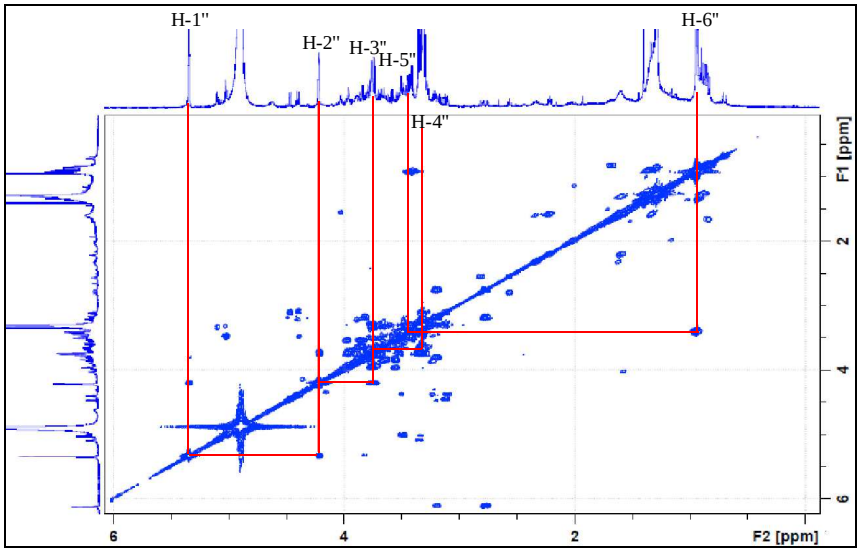


Figure III-43 : Spectre COSY H-H de la partie osidique du composé **5** (CD_3OD)

L'analyse du spectre HSQC permet de caractériser les carbones méthine du squelette quercétine (Figure III-44) et tous les carbones du rhamnose (Figure III-45).

Pour le squelette quercétine, on observe les couplages entre :

- le proton H-6 (δ_H 6,20) et le carbone C-6 résonant à δ_C 99,9.
- le proton H-8 (δ_H 6,37) et le carbone C-8 résonant à δ_C 94,8.
- le proton H-2' (δ_H 7,34) et le carbone C-2' résonant à δ_C 117,0.
- le proton H-5' (δ_H 6,91) et le carbone C-5' résonant à δ_C 116,5.
- le proton H-6' (δ_H 7,31) et le carbone C-6' résonant à δ_C 122,9.

Pour la partie osidique, on observe les couplages entre :

- le proton H-1" (δ_H 5,35) et le carbone C-1" résonant à δ_C 103,6.
- le proton H-2" (δ_H 4,22) et le carbone C-2" résonant à δ_C 72.
- le proton H-3" (δ_H 3,75) et le carbone C-3" résonant à δ_C 72,3.
- le proton H-4" (δ_H 3,35) et le carbone C-4" résonant à δ_C 73,4.
- le proton H-5" (δ_H 3,42) et le carbone C-5" résonant à δ_C 72,1.
- les protons H-6" (δ_H 0,94) et le carbone C-6" résonant à δ_C 17,8.

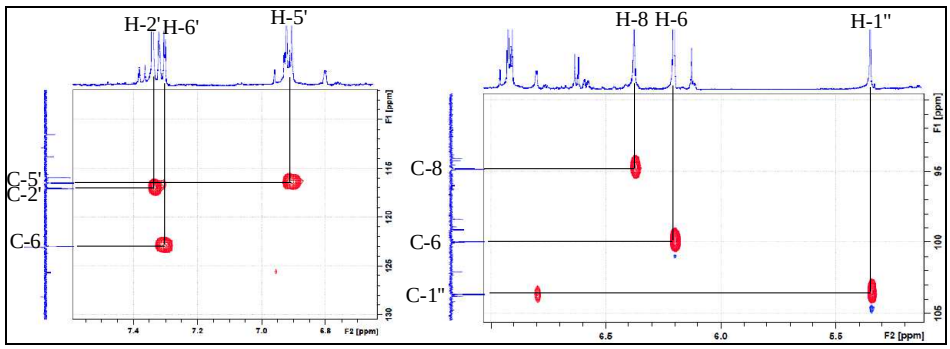


Figure III-44 : Spectre HSQC de la partie génine du composé **5** (CD_3OD)

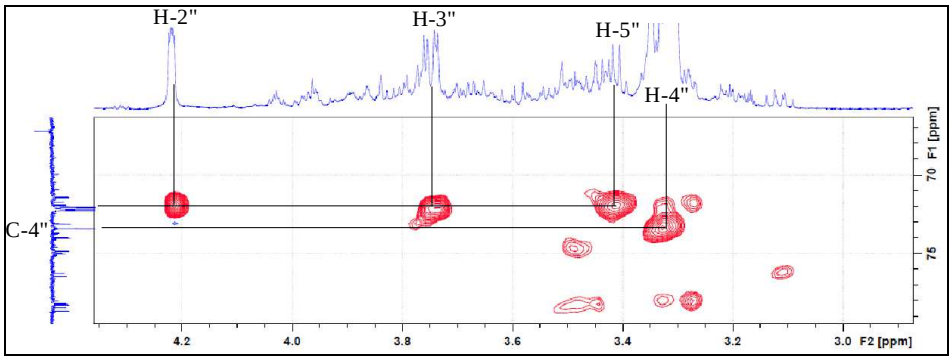


Figure III-45 : Spectre HSQC de la partie osidique du composé **5** (CD_3OD)

L'expérience HMBC (Figures III-46 à III-48) permet de caractériser les carbones du squelette quercétine par l'observation de leur couplage en J_2 et J_3. Cette expérience montre les couplages entre :

- Les protons H-6/H-8 et un carbone oxygéné résonant à δ_C 166,1 (C-7) ainsi qu'un carbone quaternaire à δ_C 106 (C-10).
- Le proton H-6 et un carbone résonant à δ_C 163,4 (C-5).
- Le proton H-8 et un carbone résonant à δ_C 158,7 (C-9).
- Le proton H-6 et un carbone résonant à δ_C 94,8 (C-8).
- Le proton H-8 et un carbone résonant à δ_C 99,9 (C-6).
- Les protons H-2'/H-6' et un carbone résonant à δ_C 159,4 (C-2).
- Les protons H-2'/H-5'/H-6' et un carbone résonant à δ_C 149,9 (C-4').
- Les protons H-2'/H-5' et les carbones résonant à δ_C 146,6 (C-3') et 123,1 (C-1').

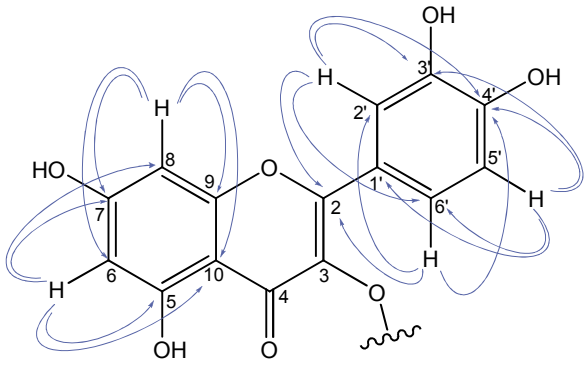


Figure III-46 : Corrélations HMBC observées pour le composé **5** (partie génine)

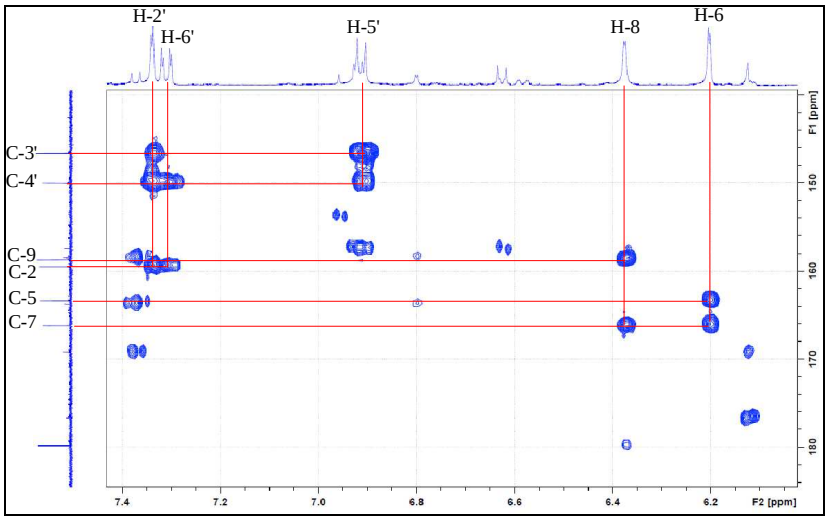


Figure III-47 : Spectre HMBC partiel du composé **5** (partie génine)

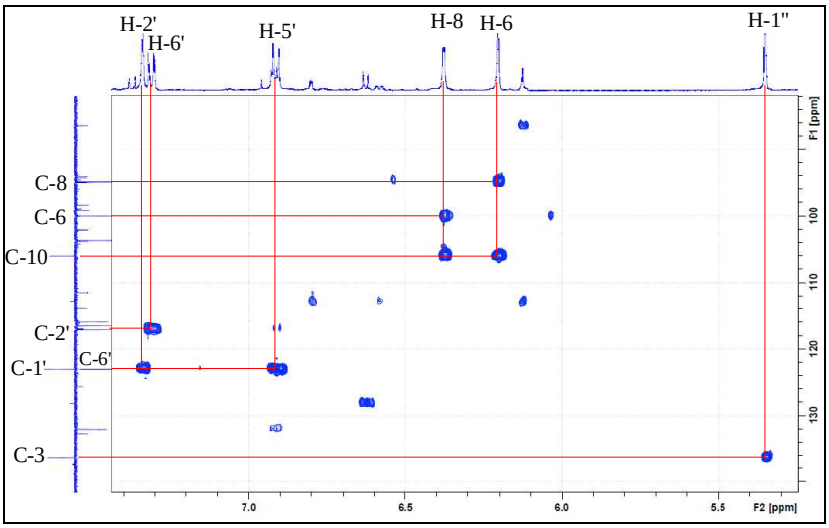


Figure III-48 : Spectre HMBC partiel du composé **5** (partie génine)

L'analyse combinée des spectres COSY H-H, HSQC et HMBC permet d'assigner tous les signaux des carbones de la molécule (Figure III-49).

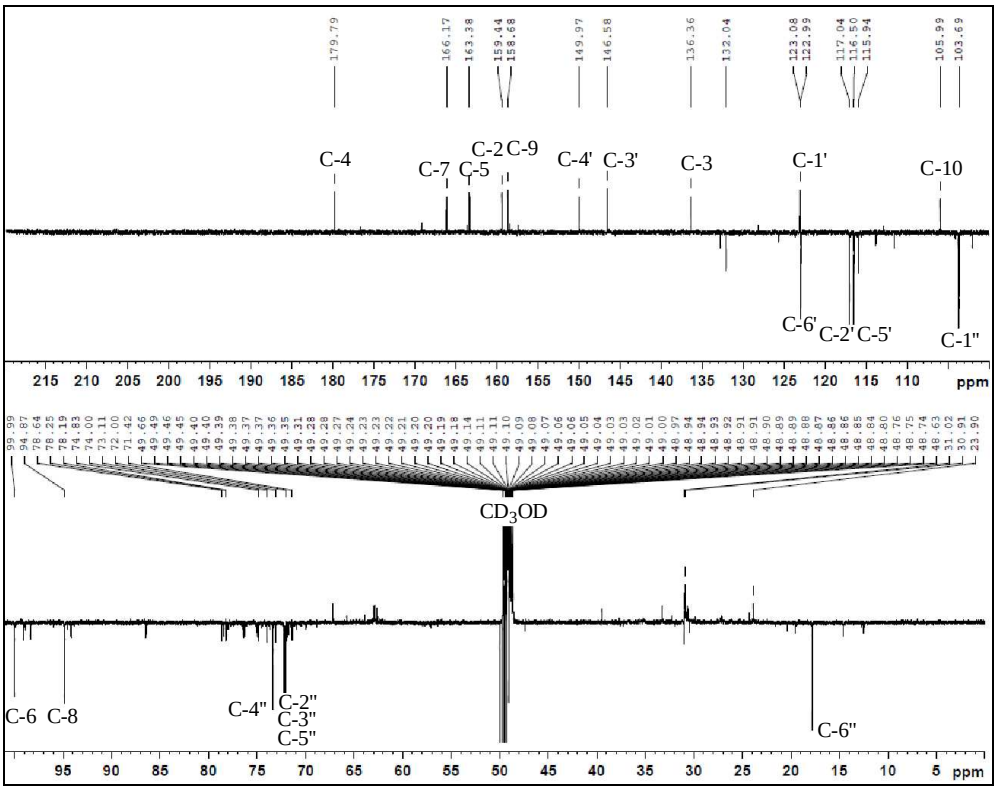
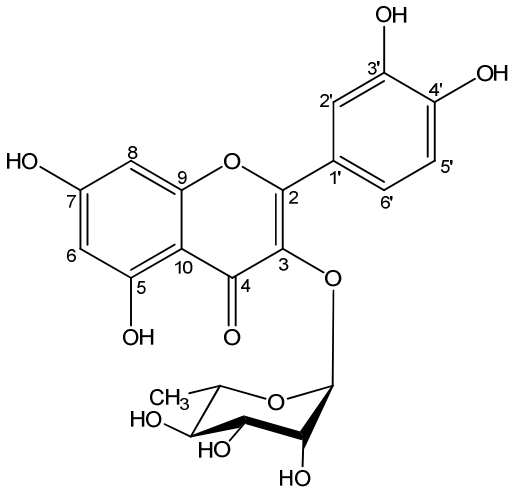


Figure III-49 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **5** (125 MHz, CD_3OD)

L'ensemble de ces données spectrales (Tableau III-5) établies par RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, HMBC, COSY H-H et HSQC, ainsi que la comparaison avec les données de la littérature, permettent à proposer pour le composé **5** la structure suivante :



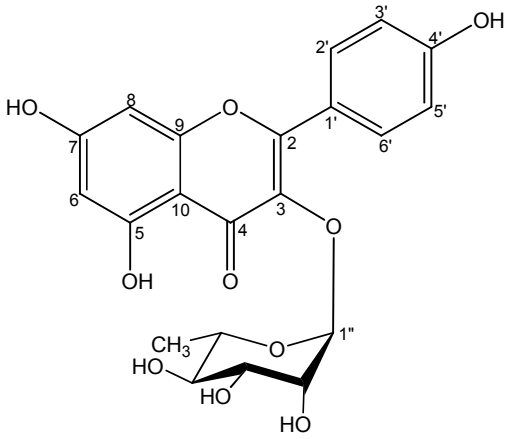
Quercétine 3-*O*-α-rhamnopyranoside (quercitrine)

Ce composé a été isolé antérieurement de plusieurs espèces de la famille Fabaceae comme *Lotus corniculatus* [81], *Ceratonia siliqua* [82], *Daniellia oliveri* [83]. Il est cité pour la première fois dans le genre *Ononis*.

Tableau III-5 : Déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^{1}H et ^{13}C

Positions	δ_C	δ_H *m* (*J* en Hz)
2	159,4	-
3	136,3	-
4	179,8	-
5	163,4	-
6	99,9	6,20 *d* (1,7)
7	166,1	-
8	94,8	6,37 *d* (1,7)
9	158,7	-
10	106,0	-
1'	123,1	-
2'	117,0	7,34 *d* (2,0)
3'	146,6	-
4'	149,9	-
5'	116,5	6,91 *d* (8,3)
6'	122,9	7,31 *dd* (8,3, 2,0)
1"	103,6	5,35 *d* (1,5)
2"	72,0	4,22 *dd* (3,2, 1,5)
3"	72,3	3,75 *dd* (9,5, 3,3)
4"	73,4	3,35 *t* (9,5)
5"	72,1	3,42 *m*
6"	17,8	0,94 *d* (6,1)

III.5.6. Elucidation structurale du composé 6



Kaempférol 3-*O*-α-rhamnopyranoside (afzeline)

Le composé **6** visible en UV (254 nm) se présente, comme le composé **5**, sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Sa couleur jaune après analyse CCM et révélation à l'acide sulfurique oriente vers un composé à structure flavonoïdique.

Son spectre de masse ESI enregistré en modes négatif (Figure III-50) et positif (Figure III-51), montre respectivement des pics d'ions pseudomoléculaires à *m/z* = 431 $[M-H]^-$ et 455 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 432 uma, correspondant à une formule brute en $C_{21}H_{20}O_{10}$.

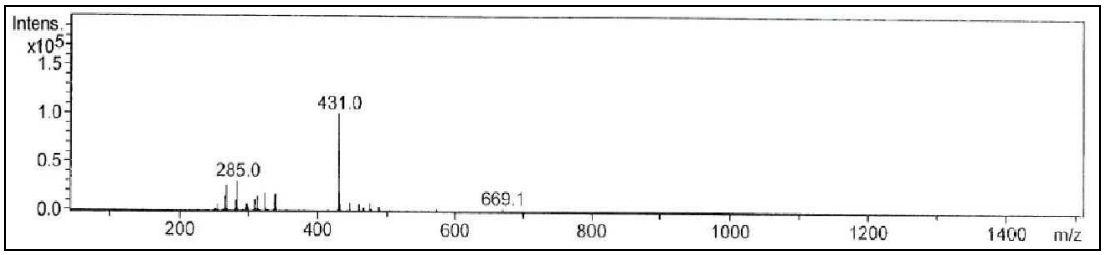


Figure III-50 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé **6**

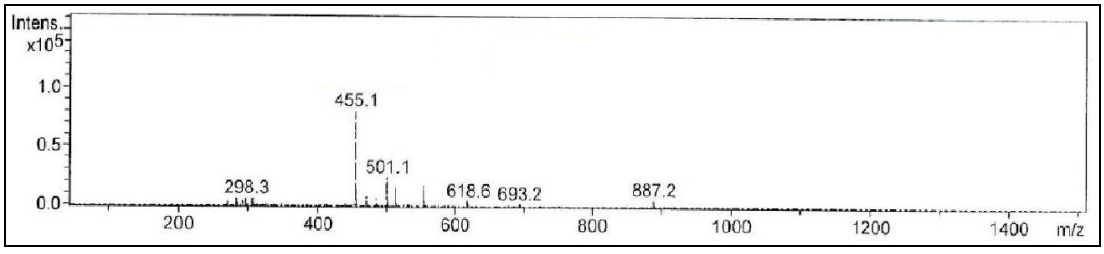


Figure III-51 : Spectre de masse ESI (mode positif) du composé **6**

Le spectre RMN ^{1}H (Figure III-52) du composé **6** enregistré dans CD_3OD montre des signaux de protons aromatiques résonant à δ_H 6,20-7,77. De plus, l'observation d'un signal doublet de proton anomère à δ_H 5,38 (1H, *J* = 1,6 Hz) et de signaux sortant entre 3,33 et 4,22 ppm, indique la présence d'une unité osidique. Ceci permet de suggérer que ce composé est également un flavonoïde glycosylé.

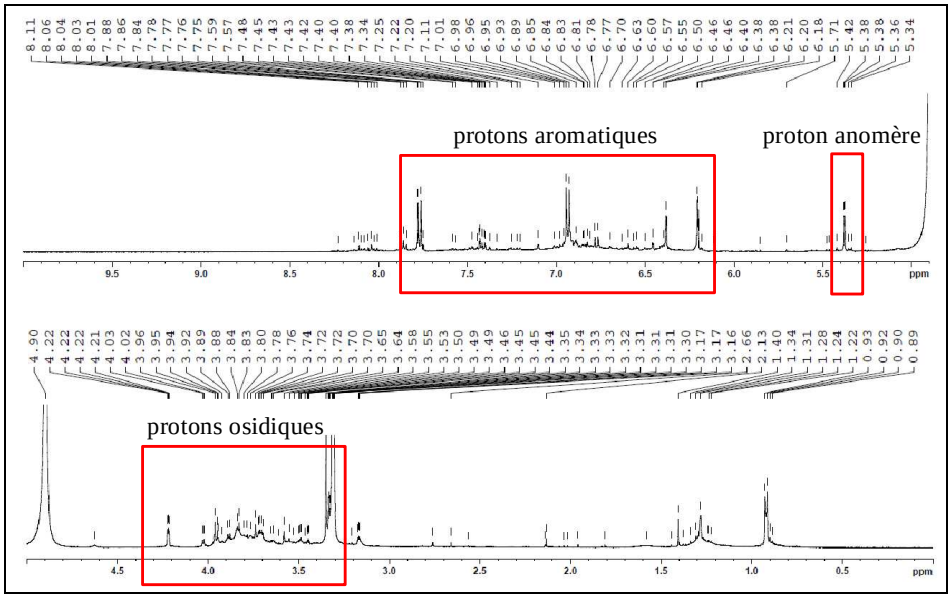


Figure III-52 : Spectre RMN ^{1}H du composé **6** (500 MHz, CD_3OD)

Le spectre RMN ^{1}H (Figure III-53) montre également la présence de deux protons aromatiques à δ_H 6,20 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz) et 6,38 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz), attribués respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7. Le spectre montre également deux signaux à δ_H 6,94 et 7,77 d'intégration 2H chacun, et ayant la même constante de couplage (*J* = 8,8 Hz), attribués respectivement aux protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6' du cycle B.

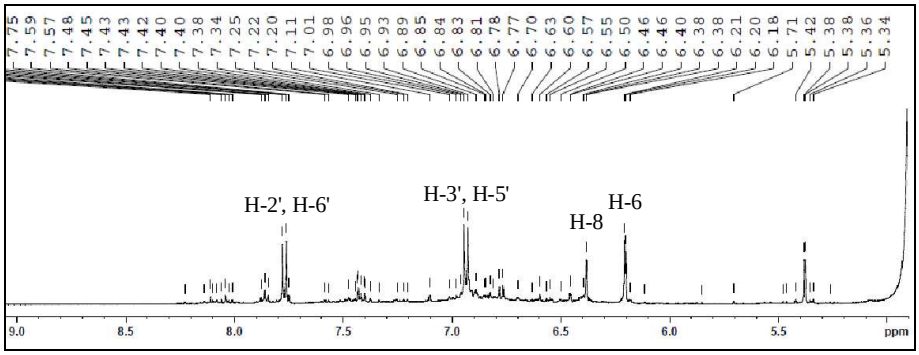


Figure III-53 : Spectre RMN ^{1}H de la partie génine du composé **6** (CD_3OD)

L'identification de la génine à un flavonoïde substitué en C-5, C-7 et C-4' est confirmée par le spectre RMN ^{13}C en *J* modulé (Figure III-54) qui exhibe des signaux correspondant à neuf carbones quaternaires (δ_C 106,0-179,7) dont un groupement carbonyle (δ_C 179,7) et six CH aromatiques (δ_C 94,8-132,0). Les autres signaux correspondent aux carbones de l'unité osidique.

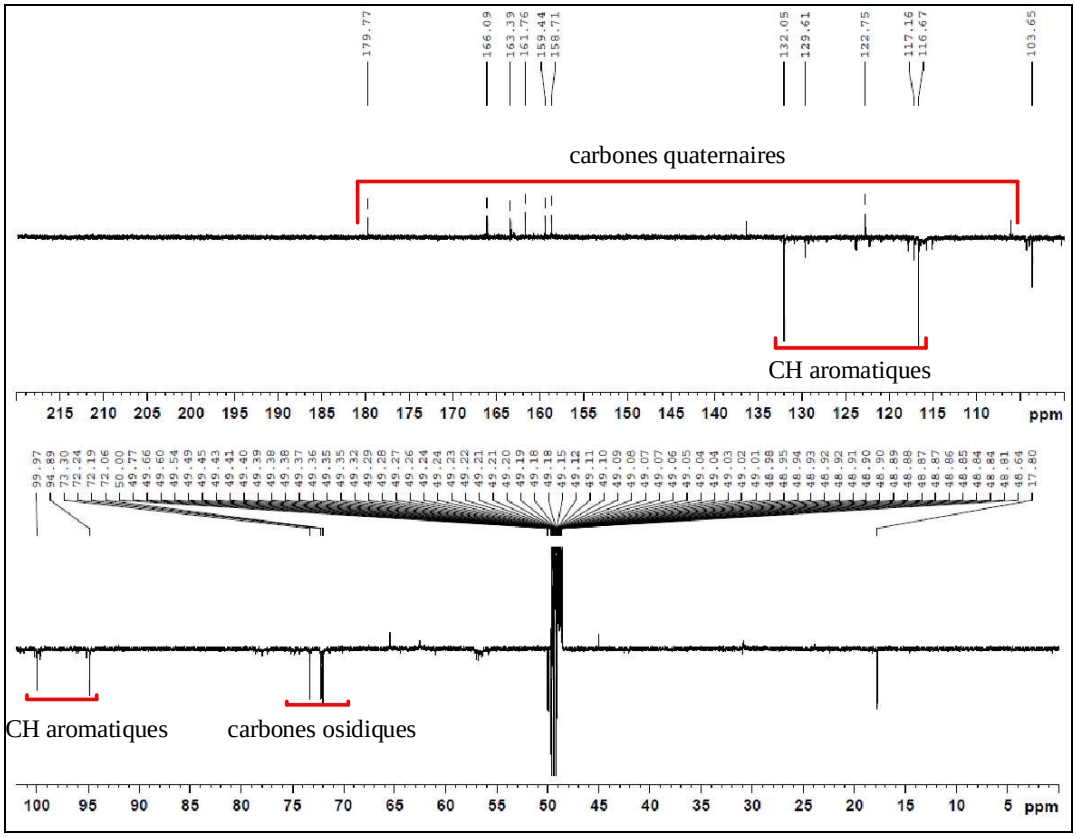


Figure III-54 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **6** (125 MHz, CD_3OD)

Les valeurs de déplacement chimique attribuées aux carbones C-2 (δ_C 159,4) et C-3 (δ_C 136,0), comparables à celles observées dans le cas du composé **5**, indique clairement que le composé **6** est également un flavonol, plus précisément le kaempférol porteur d'une unité osidique en position C-3. Ceci est confirmé par analyse HMBC (Figure III-55) qui met en évidence les corrélations entre les protons H-2'/H-6' du cycle B et le carbone C-2 d'une part, et entre le proton anomère de l'unité osidique sortant δ_H 5,38 (1H, *d*, *J* = 1,6 Hz) et le carbone C-3 de la génine.

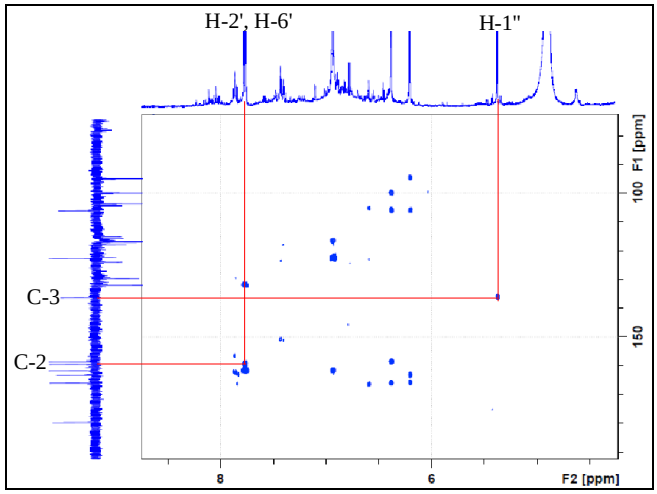


Figure III-55 : Spectre HMBC de la partie génine du composé **6** (CD_3OD)

L'unité osidique est identifiée au moyen de l'expérience COSY H-H (Figure III-56). A partir du proton anomère H-1" résonant à 5,38 ppm (*d*, *J* = 1,6 Hz), il est observé les couplages H-1"/H-2" (δ_H 4,22, *dd*, *J* = 3,2, 1,7 Hz), H-2"/H-3" (δ_H 3,71, *dd*, *J* = 9,2, 3,3 Hz), H-3"/H-4" (δ_H 3,35, *nd*), H-4"/H-5" (δ_H 3,36, *nd*) et enfin H-5"/CH_3-6" (δ_H 0,93, 3H, *d*, *J* = 5,7 Hz). Ces corrélations traduisent la présence d'un déoxyhexose. Les valeurs de constantes de couplage permettent d'identifier rhamnose de configuration α ($J_{1"-2"}$ = 1,6 Hz).

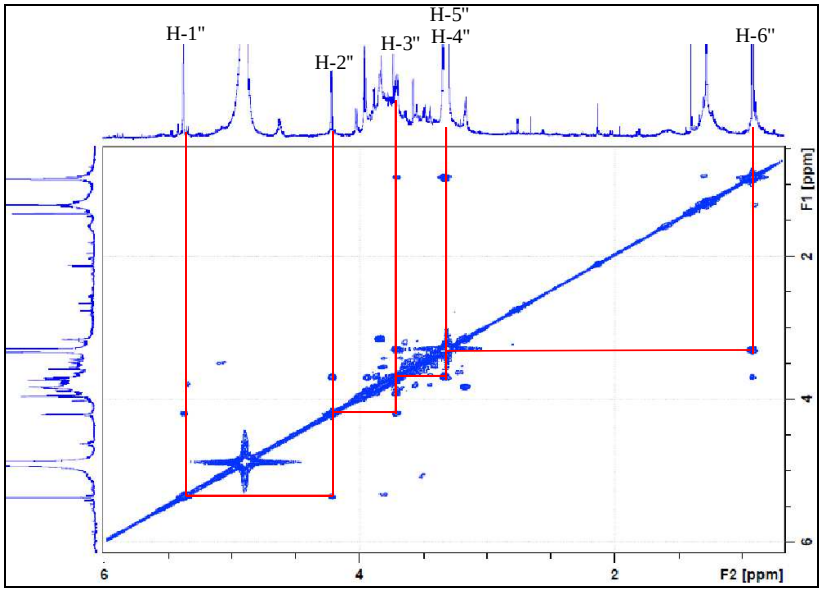


Figure III-56 : Spectre COSY H-H de la partie osidique du composé **6** (CD_3OD)

Le spectre HSQC (Figure III-57) permet de caractériser les carbones CH du squelette kaempférol : C-6 (δ_C 99,9), C-8 (δ_C 94,8), C-3' et C-5' (δ_C 116,6), C-2' et C-6' (δ_C 132,0).

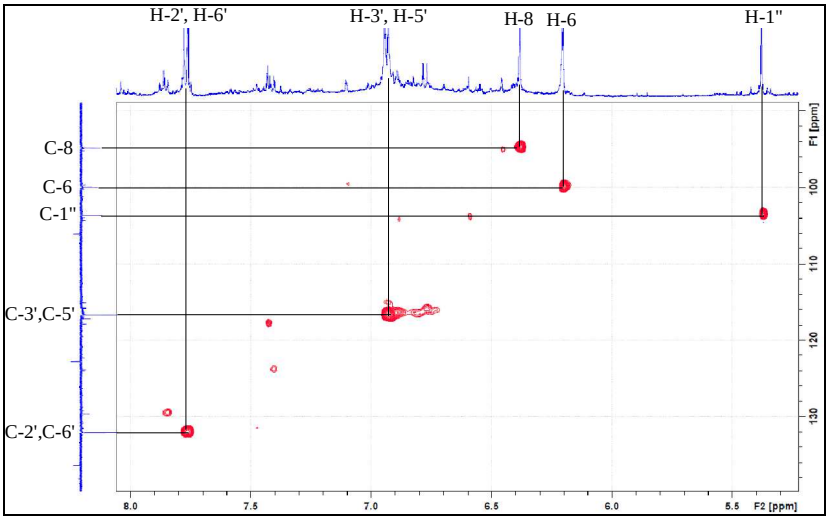


Figure III-57 : Spectre HSQC de la partie génine du composé **6** (CD_3OD)

Le spectre HSQC (Figure III-58) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones du rhamnose : C-1" (δ_C 103,6), C-2" (δ_C 72,0), C-3" (δ_C 72,2), C-4" (δ_C 73,3), C-5" (δ_C 72,1) et C-6" (δ_C 17,8).

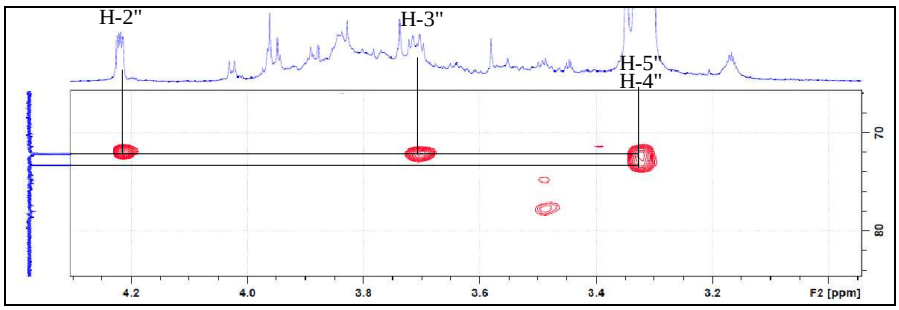


Figure III-58 : Spectre HSQC de la partie osidique du composé **6** (CD_3OD)

L'expérience HMBC (Figures III-59 à III-61) permet de caractériser les carbones du squelette kaempférol à travers les corrélations entre :

- Les protons H-6/H-8 et deux carbones, l'un oxygéné repéré à δ_C 166,0 (C-7) et l'autre quaternaire à δ_C 106,0 (C-10).
- Le proton H-6 et deux carbones, l'un quaternaire et l'autre CH sortant respectivement à δ_C 163,3 (C-5) et δ_C 94,8 (C-8).
- Le proton H-8 et deux carbones résonant à 158,7 (C-9) et 99,9 ppm (C-6).
- Les protons H-2'/H-6' et les carbones quaternaires repérés à δ_C 159,4 (C-2) et 161,7 (C-4').
- Les protons H-3'/H-5' et les carbones quaternaires C-1' (δ_C 122,7) et C-4' (δ_C 161,7).

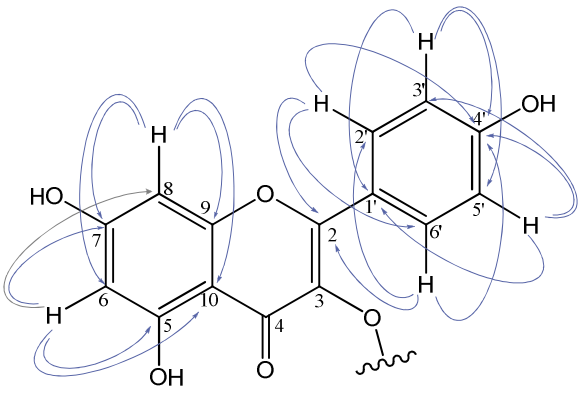


Figure III-59 : Corrélations HMBC observées pour le composé **6** (partie génine)

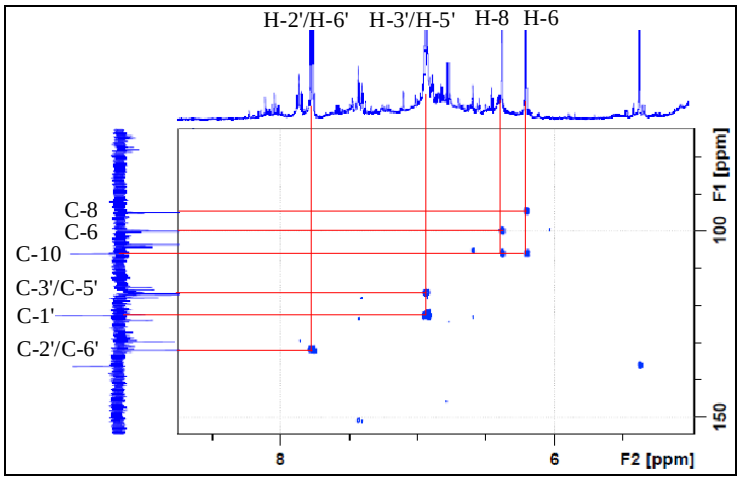


Figure III-60 : Spectre HMBC partiel du composé **6** (partie génine)

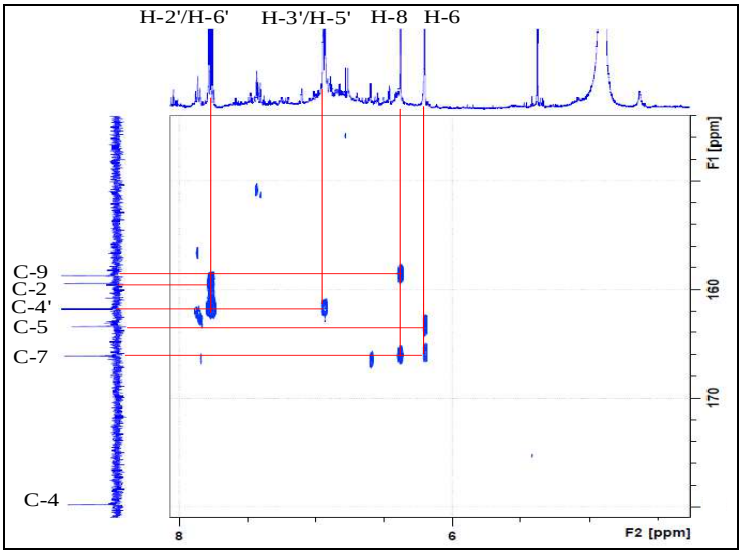


Figure III-61 : Spectre HMBC partiel du composé **6** (partie génine)

L’analyse combinée des spectres COSY H-H, HSQC et HMBC a permis d’assigner tous les signaux des carbones de la molécule (Figure III-62).

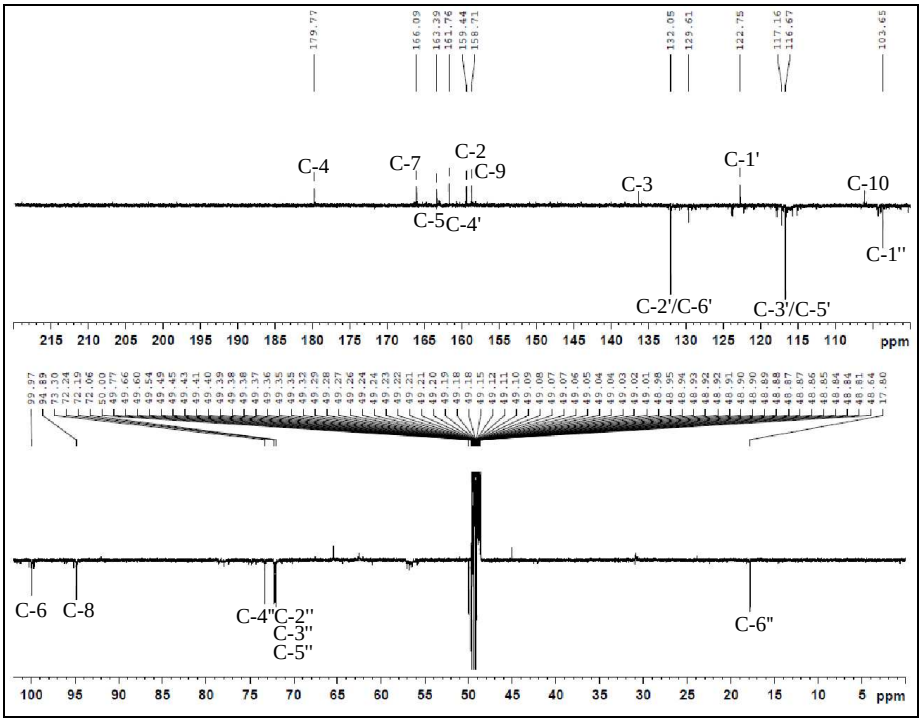
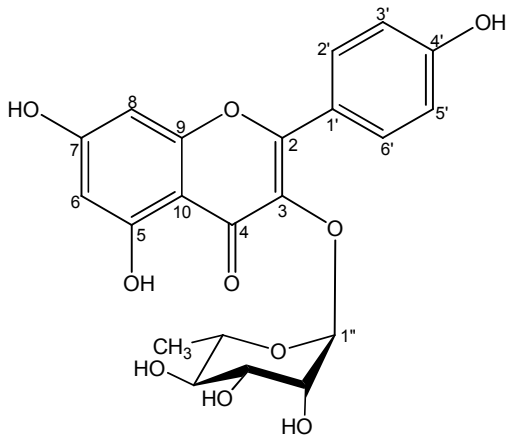


Figure III-62 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **6** (125 MHz, CD_3OD)

L’ensemble de ces données spectrales (Tableau III-6) établi par RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, HMBC, COSY H-H et HSQC, ainsi que la comparaison avec les données de la littérature, permettent à proposer sans ambiguïté pour le composé **6**, la structure suivante :



Kaempférol 3-*O*-α-rhamnopyranoside (afzeline)

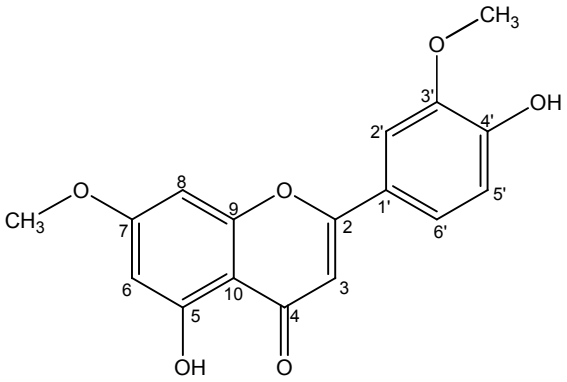
Ce composé connu sous le nom de afzeline a été initialement isolé de *Afzelia africana* (Fabaceae) [84]. Il a été rencontré dans d'autres espèces de la famille Fabaceae comme *Calliandra haematocephala* [85], *Bauhinia malabarica* [86], *Millettia barteri* [87]. Il est identifié pour la première fois dans le genre *Ononis*.

Le tableau suivant reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones qui constituent le composé.

Tableau III-6 : Déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^{1}H et ^{13}C

Positions	δ_C	δ_H *m* (*J* en Hz)
2	159,4	-
3	136,0	-
4	179,7	-
5	163,3	-
6	99,9	6,20 *d* (2,0)
7	166,0	-
8	94,8	6,38 *d* (2,0)
9	158,7	-
10	106,0	-
1'	122,7	-
2'	132,0	7,77 *d* (8,8)
3'	116,6	6,94 *d* (8,8)
4'	161,7	-
5'	116,6	6,94 *d* (8,8)
6'	132,0	7,77 *d* (8,8)
1"	103,6	5,38 *d* (1,6)
2"	72,0	4,22 *dd* (3,2, 1,7)
3"	72,2	3,71 *dd* (9,2, 3,3)
4"	73,3	3,35 *nd*
5"	72,1	3,36 *nd*
6"	17,8	0,93 *d* (5,7)

III.5.7. Elucidation structurale du composé 7



5,4'-dihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone (velutine)

Le composé **7**, visible en UV (254 nm), se présente comme les composés **5** et **6** décrits précédemment, sous forme d'une poudre jaune. Sa couleur jaune après analyse CCM et révélation à l'acide sulfurique renseigne sur sa nature flavonoïdique. Son spectre de masse ESI enregistré en mode négatif (Figure III-63), montre un pic d'ion pseudomoléculaire à *m/z* = 313 $[M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 314 uma correspondant à une formule brute en $C_{17}H_{14}O_6$.

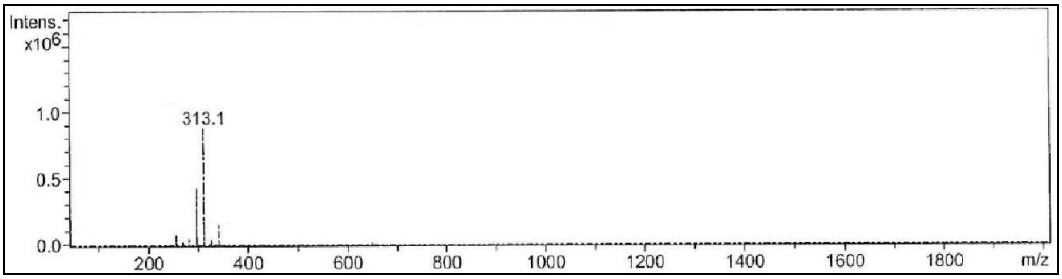


Figure III-63 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé **7**

Son spectre RMN ^1H (Figure III-64) enregistré dans le mélange $CDCl_3/CD_3OD$ permet de retrouver globalement les signaux des protons de la génine du composé **5**. En effet, il est observé :

- deux signaux à δ_H 6,32 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz) et 6,51 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz) attribués respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7.
- trois signaux à δ_H 7,34 (1H, *d*, *J* = 2,2 Hz), 6,93 (1H, *d*, *J* = 8,4 Hz) et 7,43 (1H, *dd*, *J* = 8,4 Hz, *J* = 2,2 Hz), formant un système ABX, attribués respectivement aux protons H-2', H-5' et H-6' du cycle B du flavonoïde.

La différence réside en l'apparition d'un signal singulet supplémentaire d'intégration 1H résonant à δ_H 6,54 (1H, *s*) attribuable au proton H-3 d'une flavone.

Le spectre montre également la présence de deux singulets d'intégration 3H chacun à δ_H 3,95 et 3,86, correspondant à deux groupements méthoxyles.

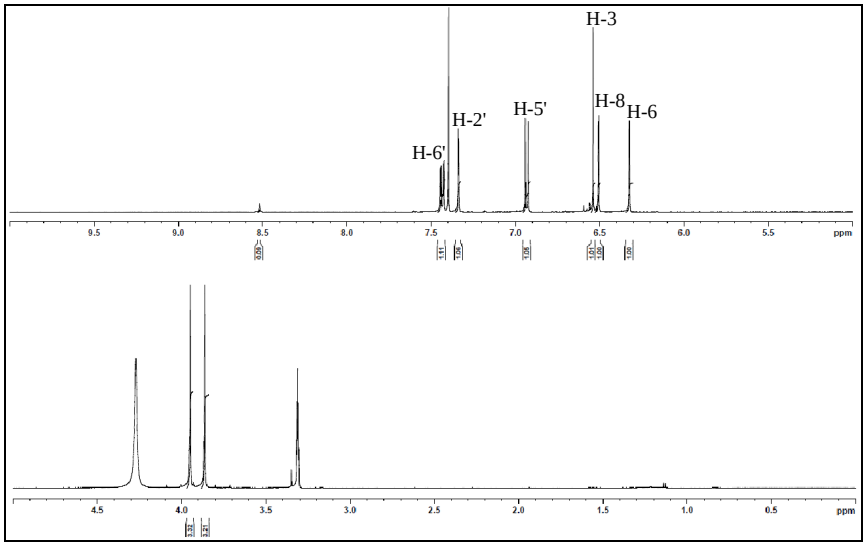


Figure III-64 : Spectre RMN ^{1}H du composé **7** (500 MHz, $CDCl_3$ + CD_3OD)

Le spectre RMN ^{13}C en *J* modulé (Figure III-65) montre les signaux correspondant à neuf carbones quaternaires (δ_C 105,7-183,1) dont un groupement carbonyle (δ_C 183,1), six CH aromatiques (δ_C 93,1-121,2). Le signal du carbone résonant à δ_C 104,1 est très caractéristique du carbone C-3 d'une flavone. Les deux signaux de carbones résonant à δ_C 56,2 et 56,4 atteste de la présence de deux groupements OCH_3.

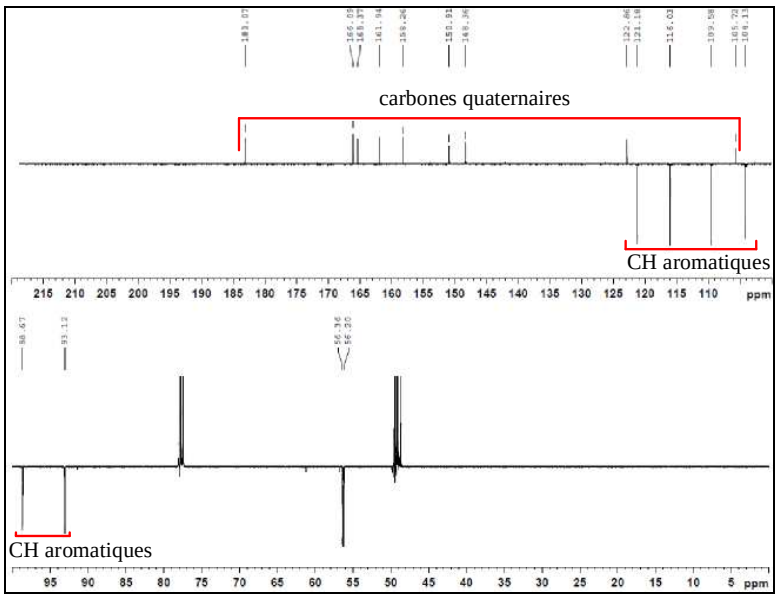


Figure III-65 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **7** (125 MHz, $CDCl_3$ + CD_3OD)

L'expérience de corrélation COSY H-H (Figure III-66) montre les corrélations attendues entre les protons H-6/H-8 du cycle A et met aussi en évidence un système de spins constitué par les protons H-5', H-6' et H-2' du cycle B.

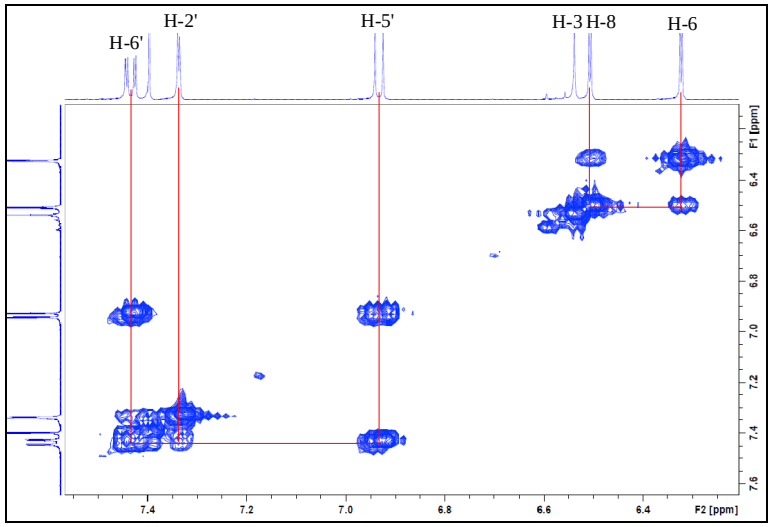


Figure III-66 : Spectre COSY H-H du composé **7** ($CDCl_3$ + CD_3OD)

L'analyse du spectre HSQC (Figure III-67) du composé **7** confirme son caractère flavonique du composé à travers la correlation H-3 (δ_H 6,54 *s*)/C-3 (δ_C 104,1). Elle permet de caractériser les autres carbones CH: C-6 (δ_C 98,6), C-8 (δ_C 93,1), C-2' (δ_C 109,6), C-5' (δ_C 116,0) et C-6' (δ_C 121,2).

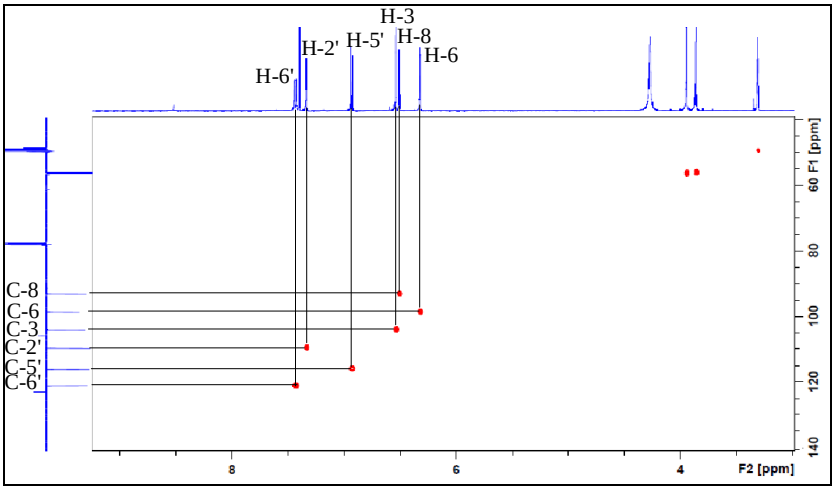


Figure III-67 : Spectre HSQC du composé **7** ($CDCl_3$ + CD_3OD)

L'expérience HMBC (Figures III-68 à III-70) a permis d'identifier tous les carbones quaternaires du composé **7** à travers les différents couplages longue distance J_{C-H} : C-2 (δ_C 165,4), C-4 (δ_C 183,1), C-5 (δ_C 161,9), C-7 (δ_C 166,1), C-9 (δ_C 158,3), C-10 (δ_C 105,7), C-1' (δ_C 122,9), C-3' (δ_C 148,4), C-4' (δ_C 150,9).

La position des groupements méthoxyles en C-7 et C-3' (Figures III-66 à III-68) est confirmée par les corrélations OCH_3 (3H, δ_H 3,86, *s*)/ C-7 (δ_C 166,1) et OCH_3 (3H, δ_H 3,95, *s*)/ C-3' (δ_C 148,4).

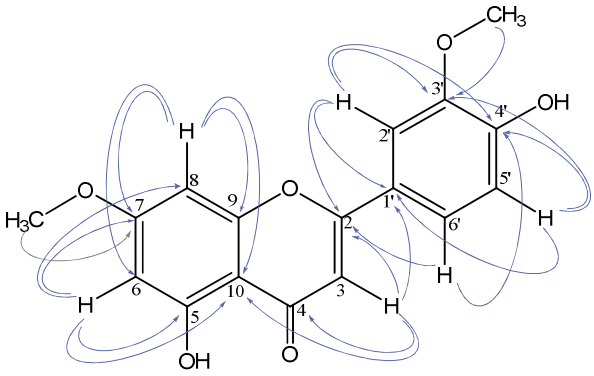


Figure III-68 : Corrélations HMBC observées pour le composé **7**

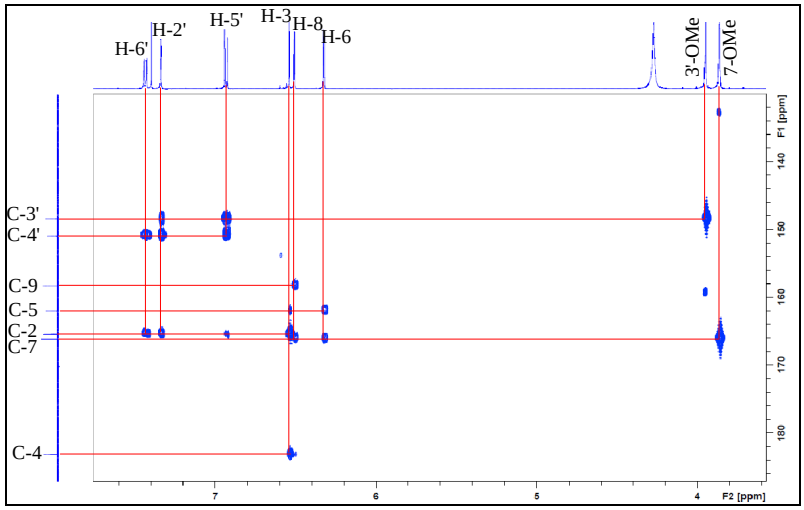


Figure III-69 : Spectre HMBC partiel du composé **7** ($CDCl_3$ + CD_3OD)

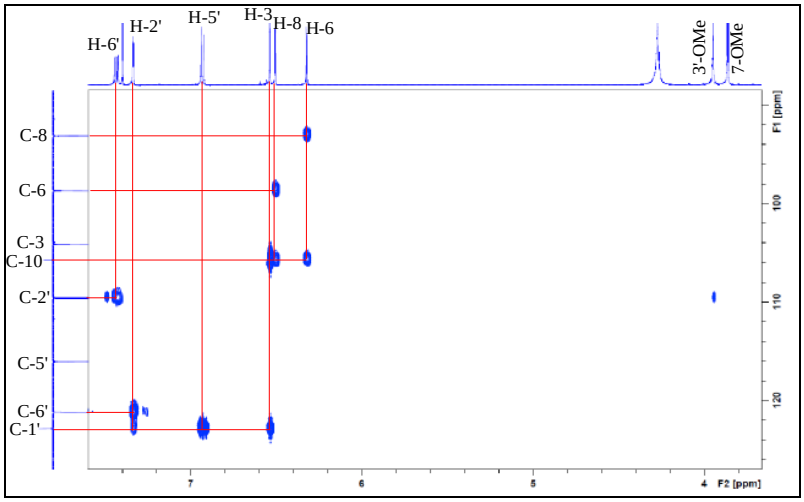


Figure III-70 : Spectre HMBC partiel du composé **7** ($CDCl_3$ + CD_3OD)

L'analyse combinée des spectres COSY H-H, HSQC et HMBC permet d'assigner tous les signaux des carbones de la molécule (Figure III-71).

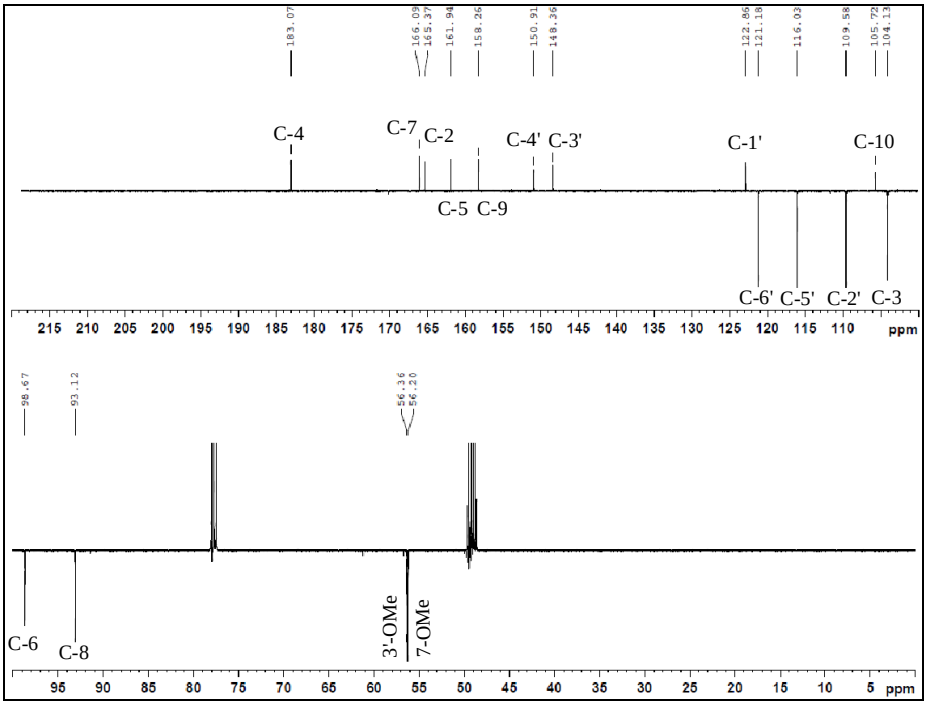
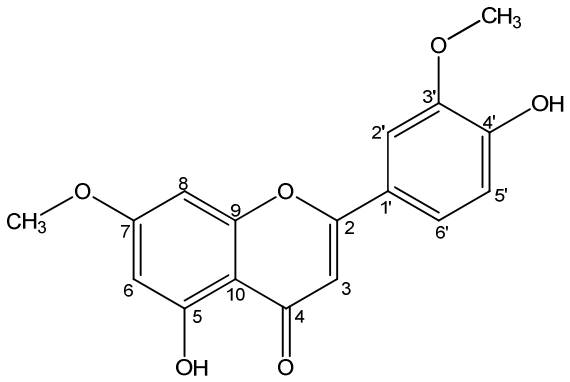


Figure III-71 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **7** (125 MHz, $CDCl_3$ + CD_3OD)

Toutes ces données spectrales (Tableau III-7) établies par RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, HMBC, COSY H-H et HSQC, ainsi que par comparaison avec les données de la littérature, permettent de proposer pour le composé **7** la structure suivante :



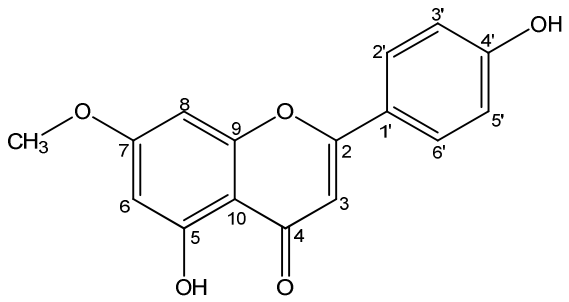
5,4'-dihydroxy-7,3'-dimethoxyflavone (velutine)

Ce composé connu sous le nom de velutine a été rencontrée dans certaines espèces de genre *Ononis* : *O. natrix, O. spinosa, O. tridentata* [18].

Tableau III-7 : Déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^{1}H et ^{13}C

Positions	δ_C	δ_H *m* (*J* en Hz)
2	165,4	-
3	104,1	6,54 *s*
4	183,1	-
5	161,9	-
6	98,6	6,32 *d* (2,0)
7	166,1	-
8	93,1	6,51 *d* (2,0)
9	158,3	-
10	105,7	-
1'	122,9	-
2'	109,6	7,34 *d* (2,2)
3'	148,4	-
4'	150,9	-
5'	116,0	6,93 *d* (8,4)
6'	121,2	7,43 *dd* (8,4, 2,2)
7-OMe	56,2	3,86 *s*
3'-OMe	56,4	3,95 *s*

III.5.8. Elucidation structurale du composé 8



5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavone (genkwanine)

Le composé **8**, visible en UV (254 nm), se présente comme les composés **5**, **6** et **7** décrits précédemment, sous forme d'une poudre jaune. Sa couleur jaune obtenue après analyse CCM et révélation à l'acide sulfurique plaide également pour un composé à structure flavonoïdique.

Son spectre de masse ESI enregistré en mode négatif (Figure III-72), montre un pic d'ion pseudomoléculaire à *m/z* = 283 $[M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 284 uma correspondant à une formule brute en $C_{16}H_{12}O_5$.

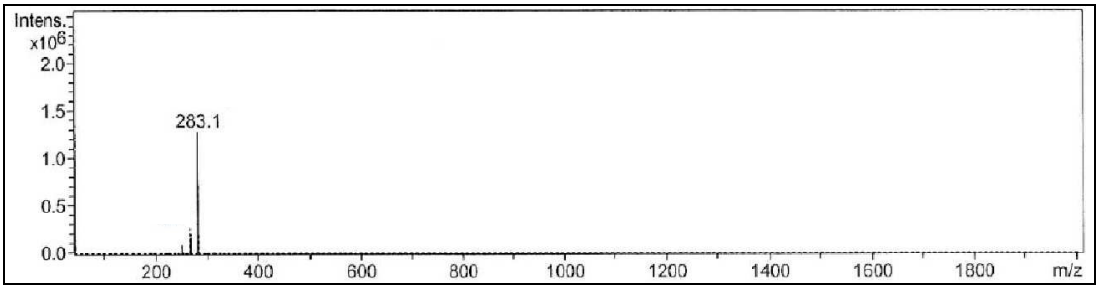


Figure III-72 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé **8**

Le spectre RMN ^{1}H du composé **8** (Figure III-73) présente des similitudes structurales avec celui du composé **7**. En effet, nous retrouvons les signaux des protons aromatiques H-6 et H-8 du cycle A résonant respectivement à δ_H 6,37 (1H, *d*, *J* = 2,3 Hz) et 6,77 (1H, *d*, *J* = 2,3 Hz), le signal caractéristique du proton H-3 du noyau flavone à δ_H 6,85 (1H, *s*), deux autres signaux d'intégration 2H chacun à δ_H 6,93 et 7,96 et ayant la même constante de couplage (*J* = 8,8 Hz) attribués respectivement aux protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6' du cycle B. Enfin, il est observé également un signal singulet d'intégration 3H à δ_H 3,86, correspondant à un groupement méthoxyle. Ceci permet de suggérer que le composé **8** est une flavone substituée en C-5, C-7 et C-4'.

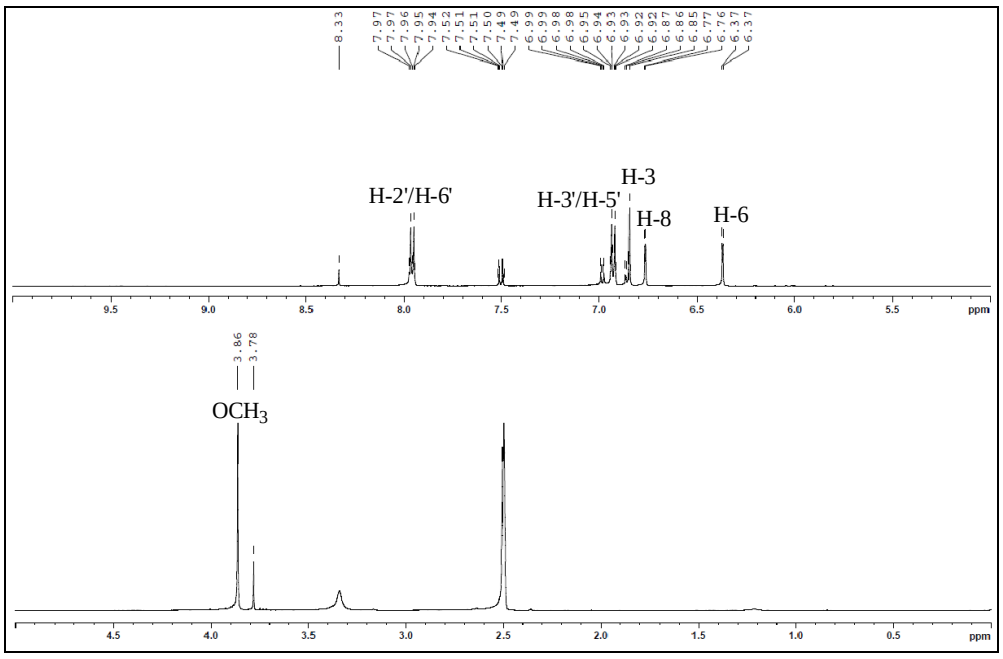


Figure III-73 : Spectre RMN ^{1}H du composé **8** (500 MHz, DMSO-d_6)

L'analyse conjointe des spectres HSQC et HMBC du composé **8** ainsi que la comparaison avec les données établies pour le composé **7**, permettent d'attribuer tous les signaux des carbones de la molécule (Figure III-74).

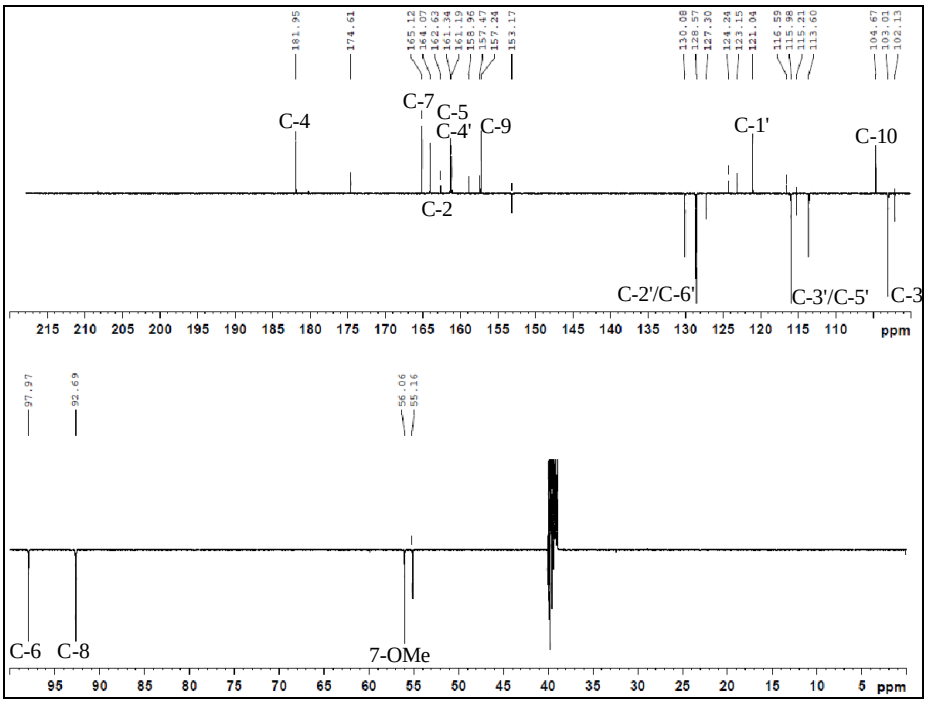


Figure III-74 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **8** (125 MHz, DMSO-d_6)

La position du groupement méthoxyle en C-7 a été déterminée grâce à la corrélation observée sur le spectre HMBC (Figure III-75) entre les protons de ce dernier (δ_H 3,86) et le carbone C-7 (δ_C 165,1).

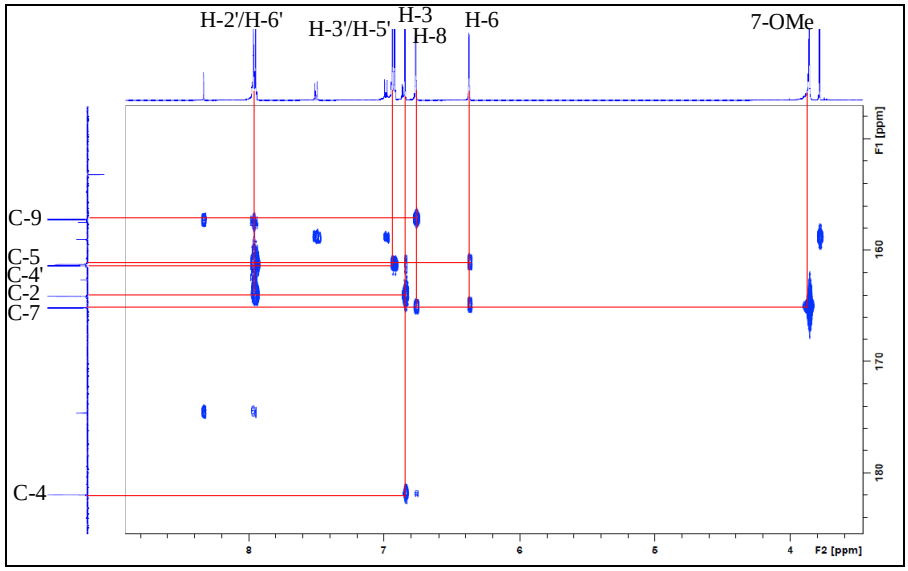
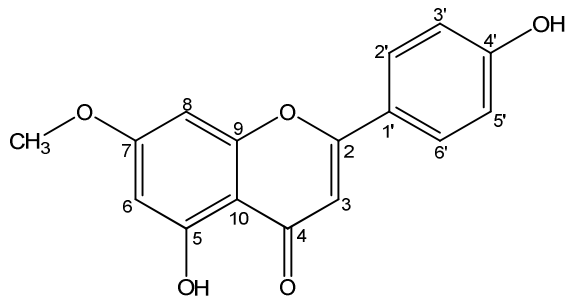


Figure III-75 : Spectre HMBC partiel du composé **8** (DMSO-d_6)

Toutes ces données spectrales (Tableau III-8) ainsi que la comparaison avec les données de la littérature, permettent à proposer pour le composé **8** la structure suivante :



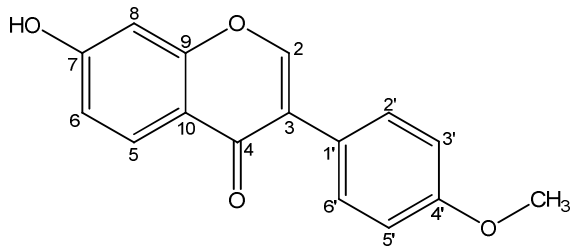
5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavone (genkwanine)

Ce composé, connu sous le nom de genkwanine, a été antérieurement isolé de plusieurs espèces du genre *Ononis*. On citera *O. fruticosa, O. rotundifolia* et *O. spinosa* [18]. Il a été rencontré également dans d'autres espèces de la famille Fabaceae comme *Sophora interrupta* et *Genista quadriflora* Munby [88,89].

Tableau III-8 : Déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^{1}H et ^{13}C

Positions	δ_C	δ_H *m* (*J* en Hz)
2	164,1	-
3	103,0	6,85 *s*
4	181,9	-
5	161,2	-
6	97,9	6,37 *d* (2,3)
7	165,1	-
8	92,7	6,77 *d* (2,3)
9	157,2	-
10	104,7	-
1'	121,0	-
2'	128,6	7,96 *d* (8,8)
3'	115,9	6,93 *d* (8,8)
4'	161,3	-
5'	115,9	6,93 *d* (8,8)
6'	128,6	7,96 *d* (8,8)
7-OMe	56,1	3,86 *s*

III.5.9. Elucidation structurale du composé 9



7-hydroxy-4'-methoxyisoflavone (formononétine)

Le composé **9** visible en UV (254 nm), se présente sous forme d'une poudre blanche. Son spectre de masse ESI enregistré en mode négatif (Figure III-76), montre un pic d'ion pseudomoléculaire à *m/z* = 267 $[M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 268 uma, correspondant à une formule brute en $C_{16}H_{12}O_4$.

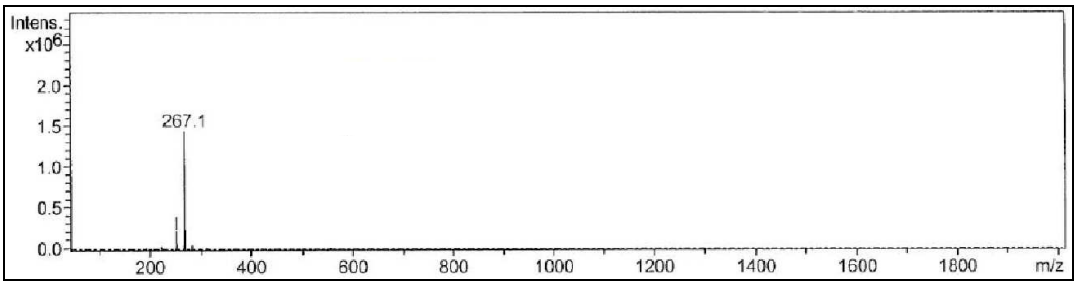


Figure III-76 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé **9**

Le spectre RMN ^1H (Figure III-77) du composé **9** enregistré dans le mélange $CDCl_3/CD_3OD$ présente :

- un singulet à δ_H 7,93, très caractéristique du proton H-2 d'un isoflavone.
- deux signaux d'intégration 2H chacun à δ_H 6,93 et 7,43, et ayant la même constante de couplage (*J*= 8,8 Hz), attribués respectivement aux protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6' du cycle B.
- trois signaux formant un système ABX et résonant à δ_H 8,05 (1H, *d*, *J* = 8,8 Hz), 6,89 (1H, *dd*, *J* = 8,8, 2,3 Hz) et 6,81 (1H, *d*, *J* = 2,3 Hz), attribuables respectivement aux protons H-5, H-6 et H-8 du cycle A substitué en C-7.
- un signal singulet à δ_H 3,81 d'intégration 3H attestant de la présence d'un groupement méthoxyle.

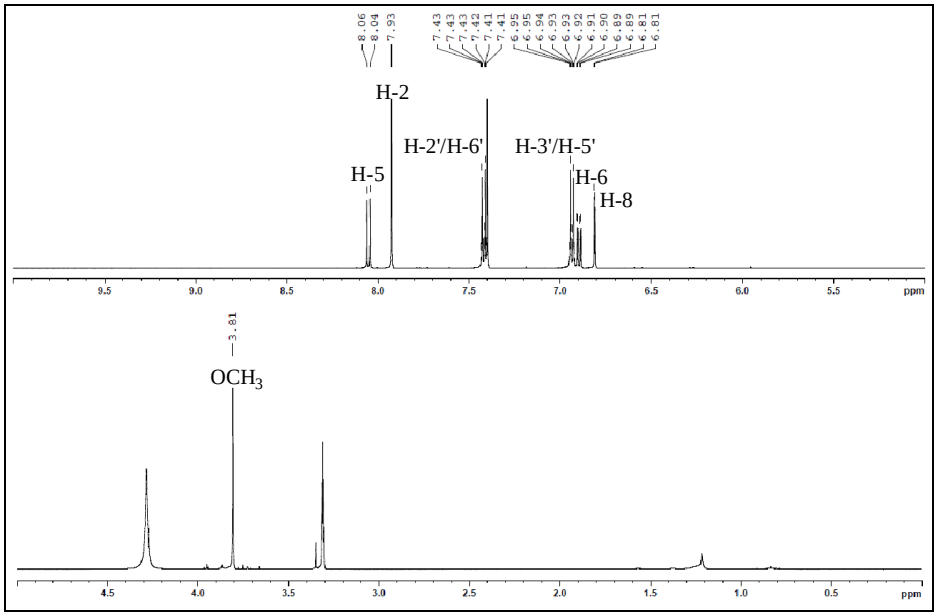
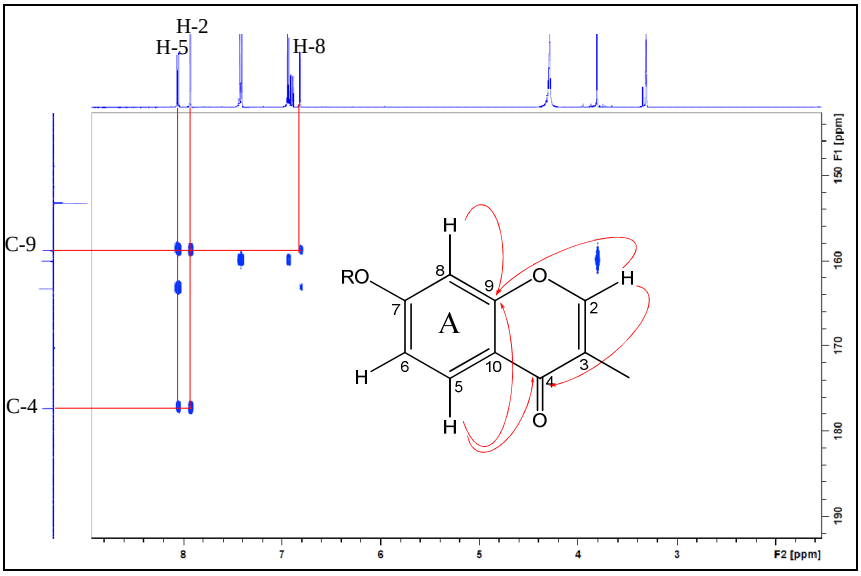


Figure III-77 : Spectre RMN ^{1}H du composé **9** (500 MHz, $CDCl_3$ + CD_3OD)

L'identification du composé **9** à une isoflavone est confirmée par le spectre HMBC (Figure III-78) qui montre la corrélation entre le proton H-2 à δ_H 7,93 et un carbone quaternaire oxygéné (δ_C 158,8) attribué à C-9 du fait de ses corrélations avec les protons H-5 et H-8 du cycle A.

Par ailleurs, le signal attribué au proton H-5 (δ_H 8,05, *d*, *J* = 8,8 Hz) est confirmée par sa corrélation HMBC avec le carbonyle à δ_C 177,3 (C-4), attestant que le système ABX est bel et bien le fait des protons H-5/H-6/H-8 et que le carbone C-7 est porteur d'un substituant.



Figures III-78 : Spectre HMBC partiel du composé **9** ($CDCl_3$ + CD_3OD)

Le spectre HMBC (Figure III-79) montre également les corrélations entre les quatre protons du cycle B et un carbone quaternaire oxygéné résonant à δ_C 159,9 (C-4'). Ce dernier corrélant avec les protons du groupement méthoxyle (δ_H 3,81) indique que ce groupement est positionné en C-4'.

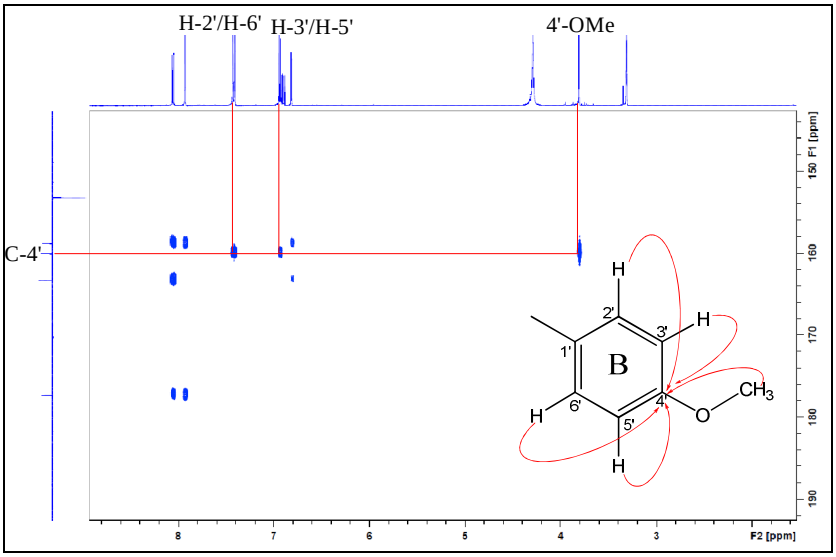


Figure III-79 : Spectre HMBC partiel du composé **9** ($CDCl_3$ + CD_3OD)

L'analyse combinée des spectres HSQC et HMBC permet de déterminer les déplacements chimiques de tous les carbones de la molécule (Figure III-80).

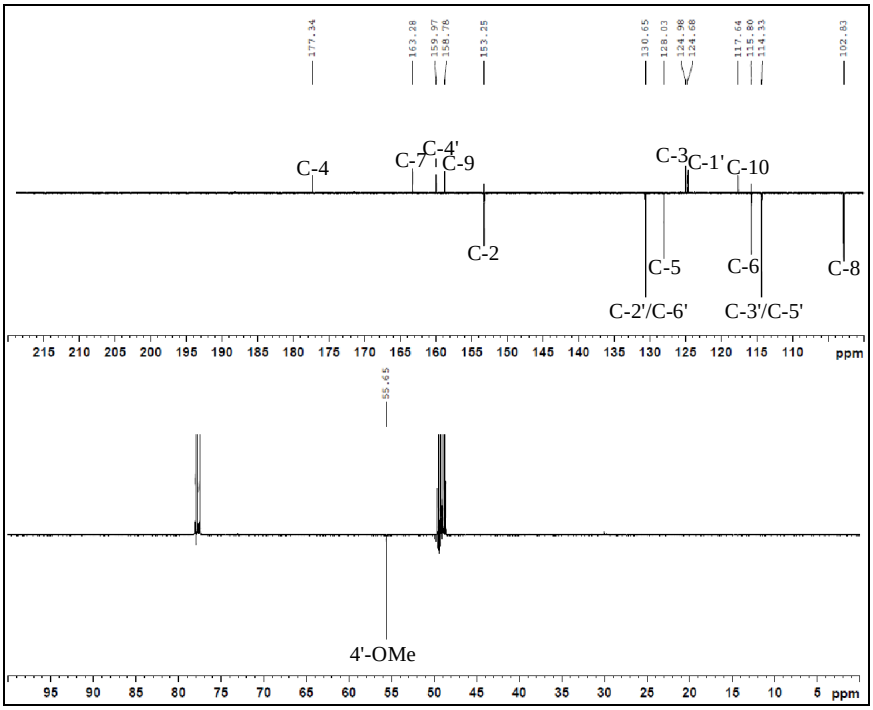
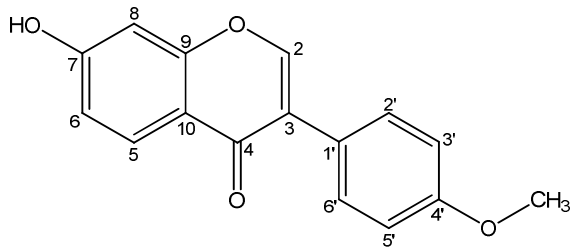


Figure III-80 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **9**

Toutes ces données spectrales (Tableau III-9) ainsi que la comparaison avec les données de la littérature permettent d'attribuer sans ambiguïté pour ce composé, la structure suivante:



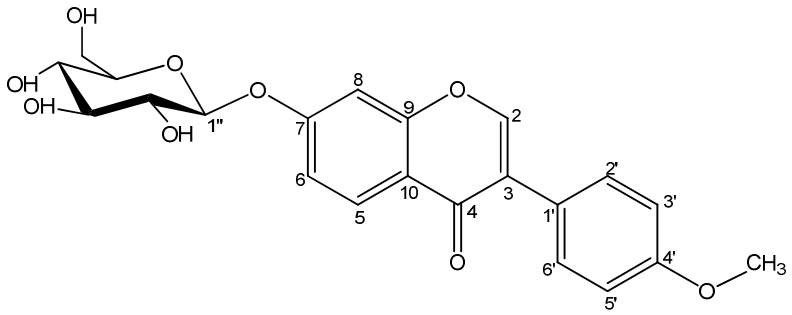
7-hydroxy-4'-methoxyisoflavone (formononétine)

Ce composé appelé formononétine, a été rencontré dans deux espèces du genre *Ononis* : *O. spinosa* et *O. speciosa* [19,20]. Il a été rencontré également dans certaines espèces de la famille Fabaceae comme *Caragana tangutica* et *Andira inermis* [90,91].

Tableau III-9 : Déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^{1}H et ^{13}C

Positions	δ_C	δ_H *m* (*J* en Hz)
2	153,2	7,93 *s*
3	124,9	-
4	177,3	-
5	128,0	8,05 *d* (8,8)
6	115,8	6,89 *dd* (8,8, 2,3)
7	163,3	-
8	102,8	6,81 *d* (2,3)
9	158,8	-
10	117,6	-
1'	124,7	-
2'	130,6	7,43 *d* (8,8)
3'	114,3	6,93 *d* (8,8)
4'	159,9	-
5'	114,3	6,93 *d* (8,8)
6'	130,6	7,43 *d* (8,8)
4'-OMe	55,6	3,81 *s*

III.5.10. Elucidation structurale du composé 10



4'-methoxyisoflavone 7-*O*-β-D-glucopyranoside (ononine)

Le composé **10**, visible en UV (254 nm), se présente comme le composé **9**, sous forme d'une poudre blanche. Son spectre de masse ESI (Figure III-81), enregistré en mode positif, montre un pic d'ion pseudomoléculaire à *m/z* = 453 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 430 uma, correspondant à une formule brute en $C_{22}H_{22}O_9$.

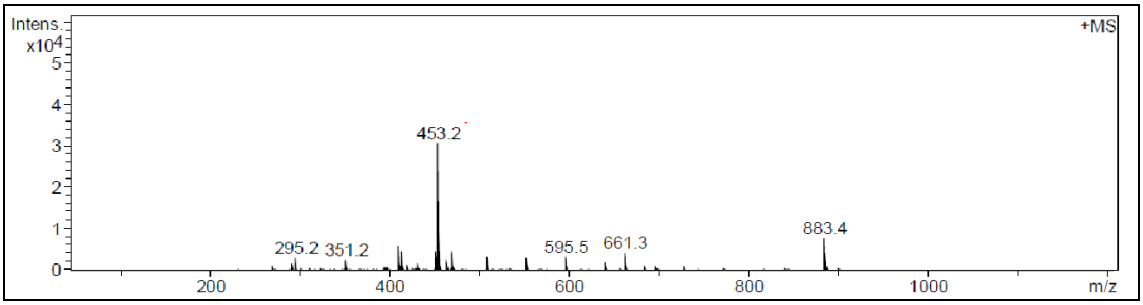


Figure III-81 : Spectre de masse ESI (mode positif) du composé **10**

Le spectre RMN ^1H (Figure III-82) du composé **10** enregistré dans le CD_3OD, présente beaucoup de similitudes avec celui du composé **9**. En effet, on observe les signaux caractéristiques des protons H-2 (δ_H 8,24, 1H, *s*), H-3'/H-5' (δ_H 7,00, 2H, *d*, *J* = 8,8 Hz), H-2'/ H-6' (δ_H 7,49, 2H, *d*, *J* = 8,8 Hz), H-5 (δ_H 8,15, 1H, *d*, *J* = 8,8 Hz), H-6 (δ_H 7,22, 1H, *dd*, *J* = 8,8 Hz, *J* = 2,3 Hz), H-8 (δ_H 7,26, 1H, *d*, *J* = 2,3 Hz), en plus du signal des protons méthoxyliques (δ_H 3,83, 3H, *s*). La différence notable réside en l'apparition de signaux supplémentaires dans la zone entre 3,41 et 3,93 ppm et d'un signal de proton anomérique à δ_H 5,11 (1H, *d*, 7,0 Hz), indiquant la présence d'une unité osidique.

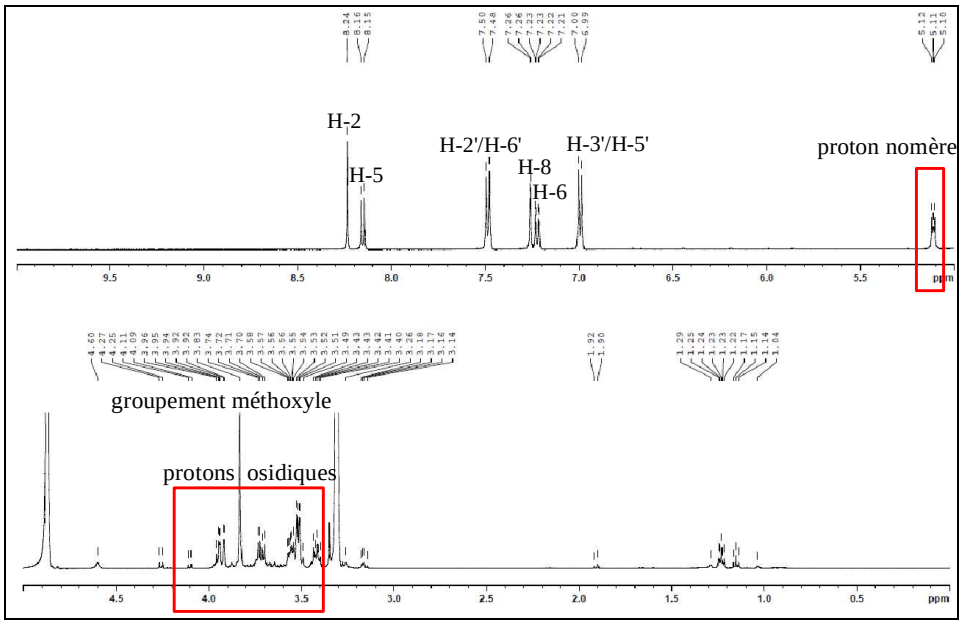


Figure III-82 : Spectre RMN ^{1}H du composé **10** (500 MHz, CD_3OD)

Le spectre RMN du ^{13}C (Figure III-83) montre clairement tous les signaux des carbones de l'isoflavone discutée précédemment. Il confirme également la présence d'une unité osidique à travers les signaux sortant dans la zone allant de 62,6 à 101,9 ppm ainsi que celui correspondant au carbone anomère résonant à δ_C 101,9 ppm (C-1").

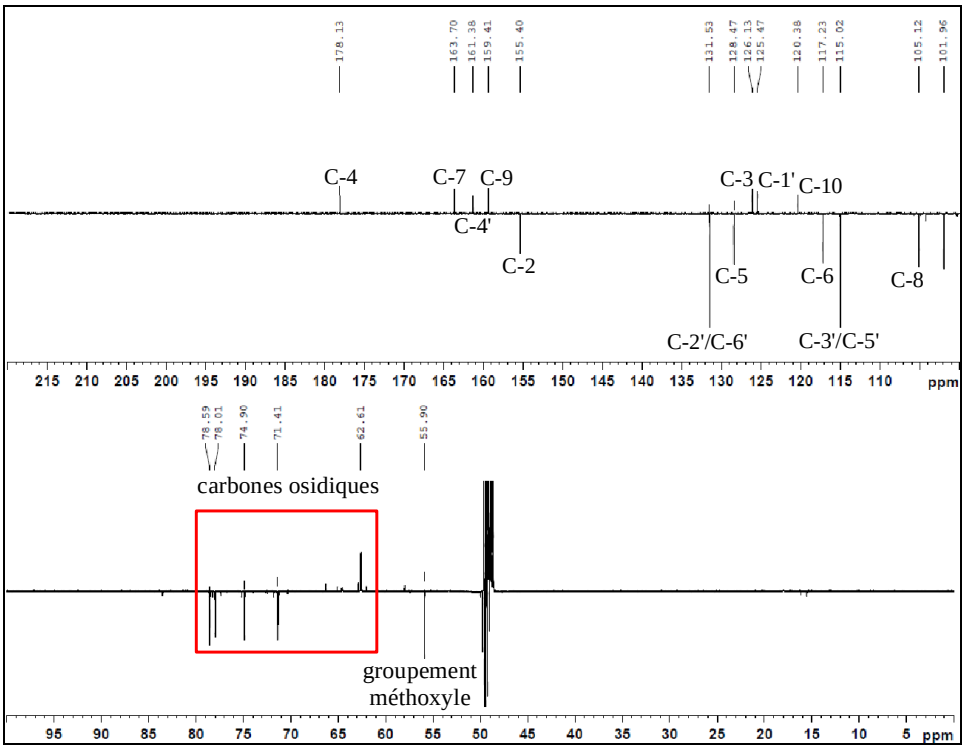


Figure III-83 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **10** (125 MHz, CD_3OD)

Le spectre COSY H-H (Figure III-84) permet d'identifier l'unité osidique à travers les taches de corrélation H-1" (δ_H 5,11, 1H, *d*, 7,0 Hz)/H-2" (δ_H 3,52, 1H, *t*, 9,0 Hz). H-2"/H-3" (δ_H 3,50, 1H, *t*, 9,0 Hz), H-3"/H-4" (δ_H 3,42, 1H, *t*, 9,0 Hz), H-4"/H-5" (δ_H 3,56, 1H, *m*), H-5"/H-6"b (δ_H 3,71, 1H, *dd*, *J* = 12,8, 5,7 Hz), H-6"b/H-6"a (δ_H 3,93, 1H, *dd*, *J* =12,3, 2,4 Hz). Ces données permettent d'identifier un glucose de configuration β ($J_{H1"-H2"}$ = 7,0 Hz).

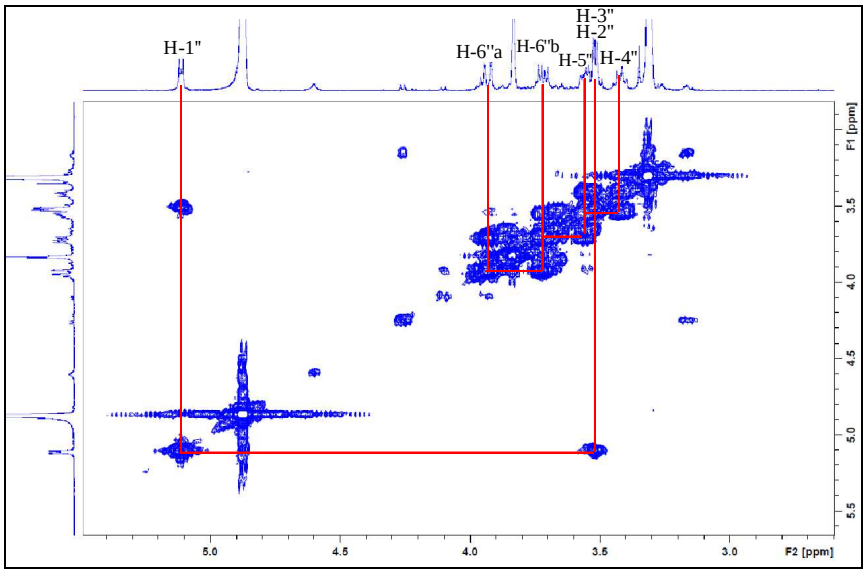


Figure III-84 : Spectre COSY H-H de la partie osidique du composé **10**

Le spectre HSQC (Figure III-85) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones du glucose : C-1" (δ_C 101,9), C-2" (δ_C 74,9), C-3" (δ_C 78,0), C-4" (δ_C 71,4), C-5" (δ_C 78,6), C-6" (δ_C 62,6).

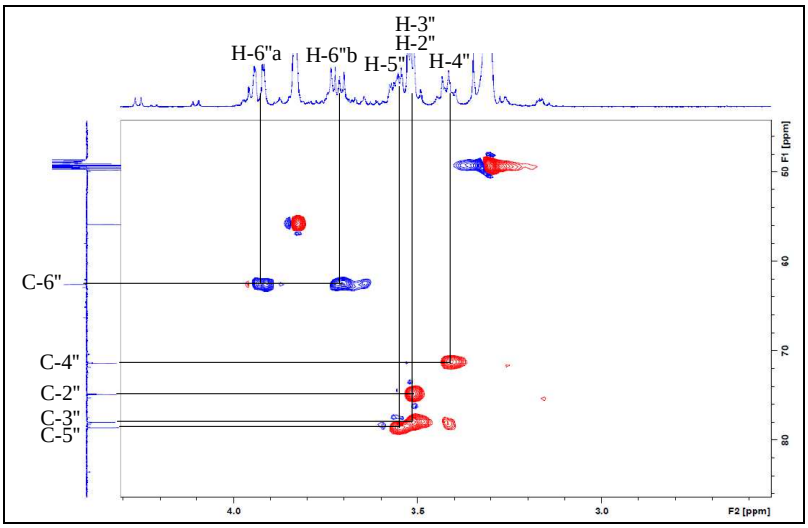


Figure III-85 : Spectre HSQC de la partie osidique du composé **10**

Le spectre HMBC (Figure III-86) montre les corrélations entre :

- le proton anomère H-1" du glucose et le carbone C-7 (163,7 ppm), indiquant que le sucre est positionné en C-7.
- les protons du groupement méthoxyle et le carbone C-4' (161,4 ppm), confirmant que le groupe méthoxyle est localisé en C-4'.

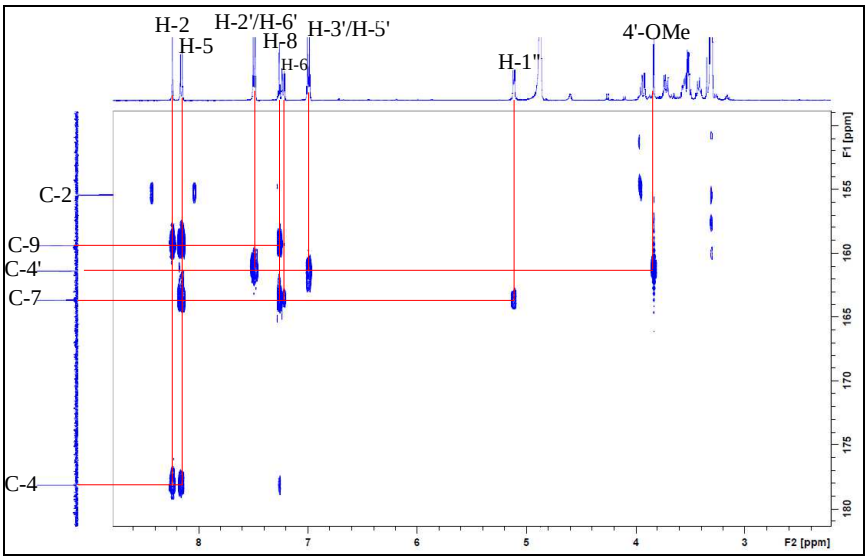
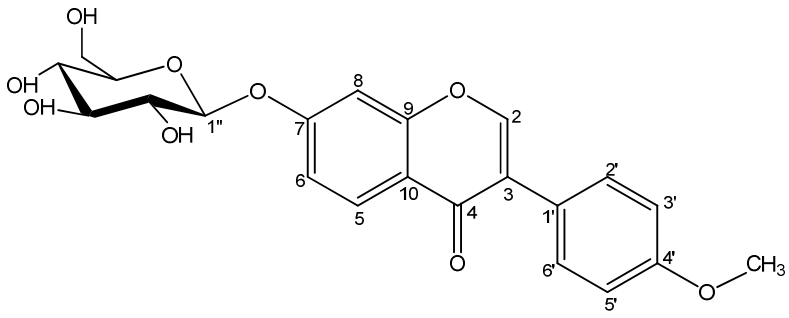


Figure III-86 : Spectre HMBC partiel du composé **10** (CD_3OD)

Toutes ces données spectrales (Tableau III-10) établies par RMN ^{1}H, RMN ^{13}C, HMBC, COSY H-H, HSQC ainsi que la comparaison avec les données de la littérature, permettent à proposer sans ambiguïté pour le composé **10,** la structure suivante :



4'-methoxyisoflavone 7-*O*-β-D-glucopyranoside (ononine)

Ce composé appelé ononine a été identifié dans certaines espèces du genre *Ononis* comme *O. arvensis* et *O. spinosa* subsp. *leiosperma* [92,93]. Il a été isolé dans espèces de la

famille Fabaceae comme *Caragana arborescens* [94], *Maackia amurensis* [95], *Thermopsis alterniflora* [96].

Tableau 10 : Déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^{1}H et ^{13}C

Positions	δ_C	δ_H *m* (*J* en Hz)
2	155,4	8,24 *s*
3	126,1	-
4	178,1	-
5	128,5	8,15 *d* (8,8)
6	117,2	7,22 *dd* (8,8, 2,3)
7	163,7	-
8	105,1	7,26 *d* (2,3)
9	159,4	-
10	120,4	-
1'	125,5	-
2'	131,5	7,49 *d* (8,8)
3'	115,0	7,00 *d* (8,8)
4'	161,4	-
5'	115,0	7,00 *d* (8,8)
6'	131,5	7,49 *d* (8,8)
4'-OMe	55,9	3,83 *s*
1"	101,9	5,11 *d* (7,0)
2"	74,9	3,52 *t* (9,0)
3"	78,0	3,50 *t* (9,0)
4"	71,4	3,42 *t* (9,0)
5"	78,6	3,56 *m*
6"	62,6	3,71 *dd* (12,8, 5,7) 3,93 *dd* (12,3, 2,4)

CONCLUSION

Conclusion

Le travail de recherche qui m'a été confié a pour but principal la connaissance de la composition chimique de l'espèce *Ononis pusilla*, plante locale poussant dans la région des Aurès et appartenant à la famille Fabaceae (Léguminosae). Cette connaissance passe évidemment par l'extraction et l'identification des métabolites que recélerait cette plante dont le genre est connu pour sa richesse en divers métabolites secondaires d'intérêt biologique comme les dérivés de l'acide anthranilique, les dérivés du résorcinol, les pétocarpanes sans oublier les flavonoïdes et autres isocoumarines.

Cette étude qui a porté sur l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de *Ononis pusilla*, a permis d'isoler 10 composés naturels dont trois dérivés de l'acide anthranilique se sont avérés nouveaux. Ces composés se répartissent en :

- quatre dérivés de l'acide anthranilique :
  - acide *N*-(*R*)-3'-hydroxydocosanoylanthranilique (**1**) (nouveau)
  - acide *N*-(*R*)-3'-hydroxytricosanoylanthranilique (**2**) (nouveau)
  - acide *N*-(*R*)-3'-hydroxytétracosanoylanthranilique (**3**) (nouveau)
  - acide *N*-icosanoylanthranilique (**4**)
- six flavonoïdes :
  - quercitrine (**5**)
  - afzeline (**6**)
  - velutine (**7**)
  - genkwanine (**8**)
  - formononétine (**9**)
  - ononine (**10**)

L'isolement et la purification de ces métabolites secondaires ont été effectués par l'utilisation de différentes méthodes chromatographiques (VLC, CC, CCE et HPLC) sur divers supports (silice normale, silice RP-18, Polyamide SC6, Sephadex LH-20).

Leur détermination structurale a été réalisée grâce à la combinaison des différentes méthodes spectroscopiques incluant la RMN 1D (^{1}H, ^{13}C *J*-modulé), la RMN 2D (COSY H-H, HSQC et HMBC), la spectrométrie de masse, la spectroscopie UV et IR, en plus de la mesure du pouvoir rotatoire et la comparaison avec les données de la littérature.

La configuration absolue des trois nouveaux dérivés de l'acide anthranilique a été établie par la comparaison de la valeur du pouvoir rotatoire de l'acide gras obtenu après hydrolyse alcaline, avec les données de la littérature.

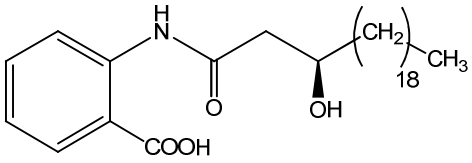
La composition chimique de l'espèce étudiée est en parfait accord avec celle des plantes du genre *Ononis*. Elle confirme la prépondérance de flavonoides comme la genkwanine, velutine et ononine rencontrés dans bon nombre d'espèces du genre comme *O. spinosa*, *O. speciosa* and *O. natrix*. Les dérivés de l'acide anthranilique sont également très présents car ils ont été également mis en évidence dans beaucoup d'espèces du genre *Ononis*. On citera *O. natrix* et *O.* visco*sa*.

Il est important de signaler que c'est la seconde fois qu'il a été relevé la présence de la présence de dérivés de l'acide anthranilique hydroxylés sur la chaine lipidique, plus précisément en β de la fonction amide. Cependant, la première citation n'établit pas la configuration absolue de l'unique molécule isolée.

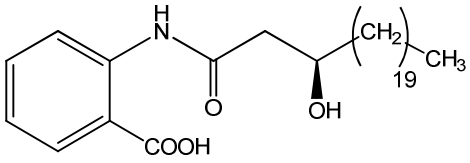
Au vu des intéressantes propriétés biologiques des dérivés de l'acide anthranilique, des tests biologiques sur nos trois dérivés nouveaux sont envisagés.

Les structures des produits isolés de l'espèce *Ononis pusilla* sont représentées ci-après.

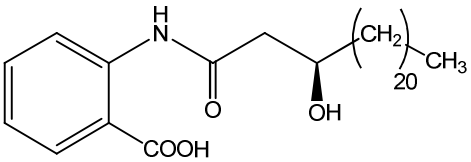
- **Dérivés de l'acide anthranilique**



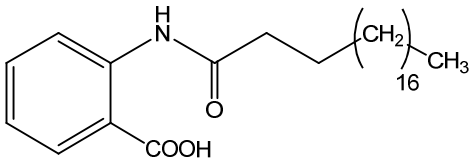
(**1**)



(**2**)

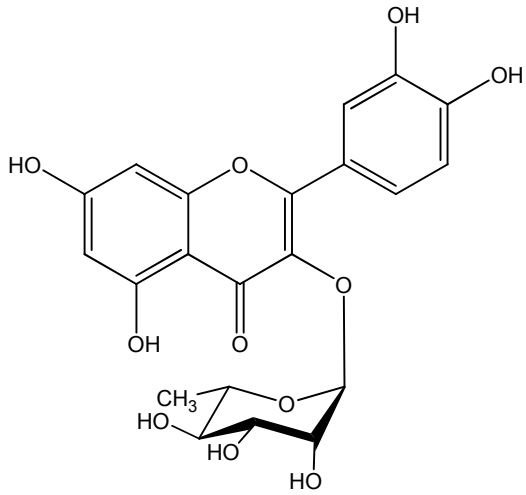


(**3**)

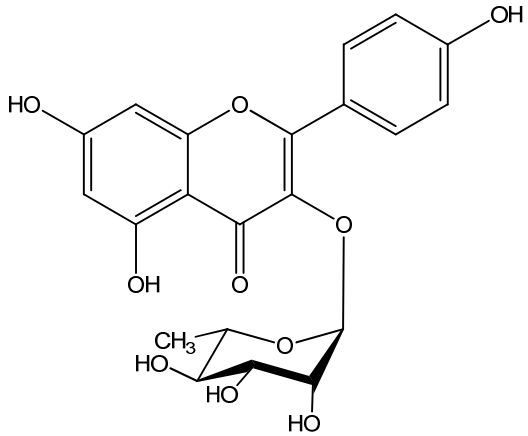


(**4**)

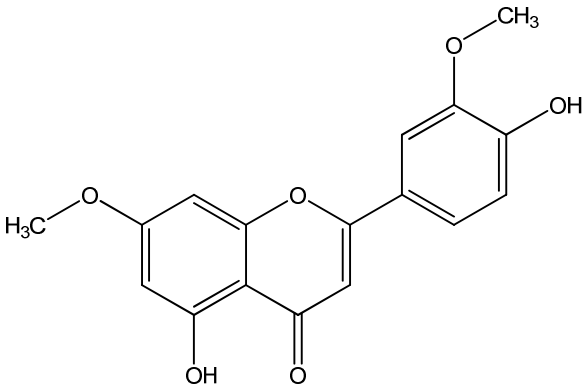
➢ **Flavonoïdes**



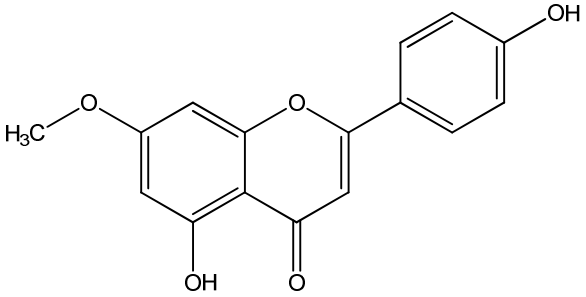
(**5**)



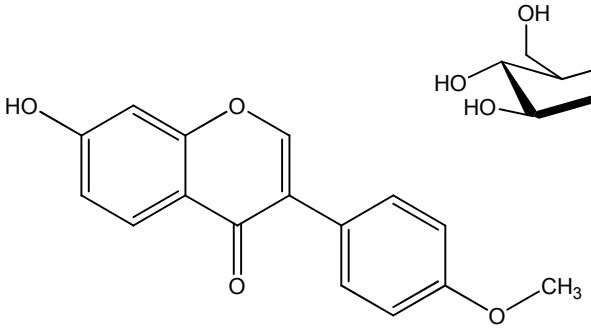
(**6**)



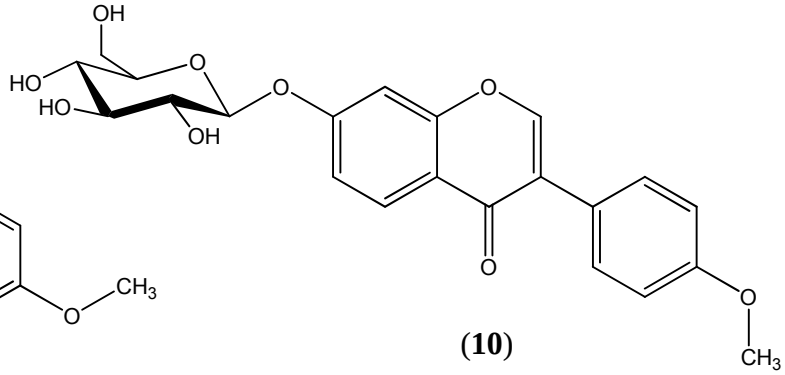
(**7**)



(**8**)



(**9**)



(**10**)

CHAPITRE IV

PARTIE EXPERIMENTALE

IV.1. Matériel et méthodes

IV.1.1. Récolte du matériel végétal

La plante a été récoltée au mois de mai de l'année 2009, dans la région de Batna. L'identification botanique a été réalisée par le Professeur Bachir OUDJEHIH, du Département d'Agronomie de l'Institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques relevant de l'Université de Batna.

IV.1.2. Techniques analytiques de séparation

IV.1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Ces analyses sont réalisées essentiellement en phase normale avec des plaques de silice Kieselgel 60 F_{254} sur feuille d'aluminium (Merck). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre contenant l'éluant approprié. La phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

Certaines analyses ont été effectuées en phase inverse avec des plaques de silice RP-18 sur feuille d'aluminium (Merck). Les systèmes de solvants utilisés sont constitués principalement de mélanges méthanol/eau.

Après développement, les plaques ont été observées à la lumière du jour, et sous lampe UV à 254 et 366 nm avant révélation par l'acide sulfurique, puis chauffées avec un sèche-cheveux jusqu'à apparition de taches de diverses couleurs en fonction du type de composés.

IV.1.3. Techniques préparatives de séparation

IV.1.3.1. Chromatographie sur couche épaisse (CCE)

Ce type de séparation est utilisé sur des plaques en verre recouvertes de silice (Silicagel 60 F_{254}, Merck). L'échantillon à séparer est solubilisé dans le solvant adéquat et ensuite déposé sur la plaque à l'aide d'une micropipette. Le développement a été effectué dans des cuves en verre.

IV.1.3.2. Chromatographie liquide sous vide (VLC)

La chromatographie liquide sous vide est une technique rapide et peu coûteuse, utilisée pour une séparation grossier des extraits bruts. Cette technique a été effectuée en phase inverse (silice RP-18) dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n° 4.

IV.1.3.3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Les chromatographies sur colonnes ouvertes ont été réalisées avec plusieurs types de phases stationnaires dans des colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à séparer.

Les phases stationnaires utilisées ont été du gel de silice 60 (230-400 Mesh), polyamide SC6 et le sephadex LH-20. La quantité de phase stationnaire a été adaptée à la quantité et à la nature de l'échantillon à séparer. Le choix des conditions d'élution, le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions sont effectués sur la base d'analyses par CCM.

IV.1.3.4. Chromatographie liquide semi-préparative à haute pression

La chromatographie liquide semi-préparative à haute pression est une technique largement répandue pour les étapes finales de purification. Dans ce présent travail, cette technique a été employée afin de séparer et purifier les composés **1**, **2** et **3**. La séparation a été réalisée en phase inverse sur une colonne (XTerra RP-18, 19 x 250 mm, 5 μm) éluée par un mélange de solvant MeCN-H_2O en mode gradient et avec un débit fixé à 25 ml/min.

IV.1.4. Méthodes physicochimiques

IV.1.4.1. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse HRESI ont été enregistrés en mode négatif sur un spectromètre BrukerMicrOTOF.

Les spectres de masse ESI et MS/MS ont été enregistrés en modes positifs et négatifs sur un spectromètre Bruker Esquire-LC.

IV.1.4.2. Spectrométrie de RMN

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés sur un appareil de type Bruker Avance II à 500 MHz (RMN ^{1}H) et 125 MHz (RMN ^{13}C), Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés $CDCl_3$, CD_3OD et DMSO-*d*6.

IV.1.4.3. Spectrométrie UV

Les spectres UV des composés isolés ont été enregistrés dans MeOH à l'aide d'un spectrophotomètre UV MC^2 Safas.

IV.1.4.4. Spectrométrie IR

Les spectres infra-rouge ont été réalisés au moyen d'un spectrophotomètre Bruker Tensor 27 FT-IR sur des pastilles de KBr.

IV.1.4.5. Pouvoir rotatoire

La mesure du pouvoir rotatoire des acides gras obtenus après hydrolyse alcaline des composés **1**, **2** et **3** a été réalisée dans MeOH sur un polarimètre Perkin-Elmer 341. La source de lumière utilisée est la raie D du sodium (589 nm) dans une cuve de 10 cm et de volume 1 ml à température ambiante.

IV.2. Extraction

Les parties aériennes sèches de *Ononis pusilla* (m = 800 g) ont été broyées et mises à macérer dans un mélange EtOH/H_2O (70/30) durant 48h sous agitation. Cette macération est répétée deux fois (2 x 8 l) avec un renouvellement du solvant. Après filtration et concentration sous vide à température de 35 °C, l'extrait aqueux est dilué avec 500 ml d'eau distillée puis soumise à une extraction liquide-liquide successivement avec l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. Les trois phases organiques récupérées sont séchées avec du Na_2SO_4 anhydre puis filtrées et concentrées à sec pour donner 3,25 g de l'extrait éthéropétrolique, 20 g de l'extrait d'acétate d'éthyle et 28,5 g de l'extrait butanolique.

IV.3. Etude de l'extrait d'acétate d'éthyle

IV.3.1. Fractionnement

7 grammes de l'extrait d'acétate d'éthyle, ont été soumis à un fractionnement grossier au moyen d'une chromatographie liquide sous vide (VLC) utilisant comme phase stationnaire le gel de silice RP-18 (50 g). L'élution est réalisée par le mélange eau/méthanol à différents gradients (80/20, 60/40, 40/60, 20/80, 0/100). Des fractions de 100 ml ont été collectées à chaque fois et examinées par chromatographie sur couche mince (CCM) pour être par la suite regroupées en 10 fractions.

Le fractionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle des parties aériennes de *Ononis pusilla* est récapitulé dans le tableau suivant (Tableau IV-1).

Eluant colonne		Fractions	Poids en mg
Eau/Méthanol	80-20	F1	15
	80-20		
	80-20		
	60-40	F2	20
	60-40	F3	44
	60-40	F4	50
	60-40		
	40-60	F5	130
	40-60		
	40-60	F6	120
	40-60		
	20-80	F7	1460
	20-80		
	20-80		
	20-80	F8	146
Méthanol	100		
	100	F9	2820
	100		
	100	F10	640

Tableau IV-1 : Fractrionnement de l'extrait d'acétate d'éthyle.

IV.3.2. Purification

IV.3.2.1. Purification de la fraction F9

La fraction **9** (2,8 g) a été chromatographiée sur colonne de gel de silice en phase normale, éluée par un mélange $CHCl_3$/MeOH (100/0 – 80/20). Des fractions de 10 ml ont été recueillies et examinées par CCM pour être finalement regroupées en 18 sous-fractions (sF1 à sF18). Le tableau suivant (Tableau IV-2) rassemble les différentes sous-fractions obtenues.

Eluant colonne		Sous-fractions	Poids en mg
$CHCl_3$/MeOH	100-0	sF1	360
	99-1	sF2	280
	97-3	sF3	137
		sF4	72
		sF5	40
		sF6	69
		sF7	80
	95-5	sF8	94
		sF9	61
		sF10	70
		sF11	34
	93-7	sF12	150
		sF13	25
	90-10	sF14	134
		sF15	222
		sF16	119
	80-20	sF17	30
		sF18	18

Tableau IV-2 : Rassemblement des sous fractions de F9

La sous-fraction 13 (25 mg) a subi une séparation en phase inverse sur une colonne HPLC *semi-préparative* avec un gradient H_2O/ MeCN (80/20 – 00/100) et un débit fixé à 25 ml/min, elle a permis d'obtenir les trois composés **1** (tR = 9,920 min, m = 3 mg), **2** (tR = 10,193 min, m = 3,4 mg) et **3** (tR = 10,647 min, m = 3,6 mg).

La sous-fraction 2 (280 mg) a été reprise sur une colonne de gel de silice normale, éluée par le hexane/acétate d'éthyle (100/00 – 60/40) permis d'obtenir le composé **4** (3,4 mg).

Les sous-fractions 3 (137 mg) et 5 (40 mg) ont donné des précipités dans $CHCl_3$, qui sont les deux composés **8** (6 mg) et **9** (13,6 mg) respectivement.

La sous-fraction 17 (30 mg) a subi une purification sur colonne de Sephadex LH-20 dans le méthanol, permis d'obtenir le composé **10** (4 mg).

IV.3.2.2. Purification de la fraction F6

La fraction 6 (120 mg) a été chromatographiée sur colonne de *polyamide* SC6, éluée par un mélange Toluène/MeOH (100/00 – 70/30). Ceci a permis d'obtenir 9 sous-fractions (Tableau IV-3).

Eluant colonne		**Sous-fractions**	**Poids en mg**
Toluène/MeOH	100-0	sF'1	6,3
	99-1	sF'2	11,4
		sF'3	3,8
	99-3	sF'4	4
		sF'5	8,4
	95-5	sF'6	10,5
	90-10	sF'7	11,2
	80-20	sF'8	10
	70-30	sF'9	19

Tableau IV-3 : Rassemblement des sous fractions de F6

La dernière sous-fraction 9 (19 mg) a été soumise à une purification sur plaque préparative de gel silice normale, éluée par $CHCl_3$/MeOH (4:1) pour donner le composé **5** (4,4 mg).

IV.3.2.3. Purification de la fraction F7

La fraction 7 (1,46 g) a subi une séparation sur colonne de *polyamide* éluée par un mélange Toluène/MeOH (100/00 – 70/30), permettant d'obtenir 16 sous-fractions (sF"1 à sF"16).

Eluant colonne		Sous-fractions	Poids en mg
Toluène/MeOH	100-0	sF"1	27
		sF"2	120
		sF"3	208
	99-1	sF"4	159
		sF"5	131
		sF"6	37
		sF"7	40
	97-3	sF"8	149
	95-5	sF"9	105
	93-7	sF"10	38
		sF"11	71
	90-10	sF"12	47
	80-20	sF"13	62
		sF"14	20
	70-30	sF"15	86
		sF"16	32

Tableau IV-4 : Rassemblement des sous fractions de F7

La sous-fraction 14 (20 mg) a été purifiée sur colonne de Sephadex LH-20 dans le méthanol, pour donner le composé **6** (3,8 mg).

La précipitation dans MeOH de la sous-fraction 3 (208 mg) a permis d'obtenir le composé **7** (6 mg).

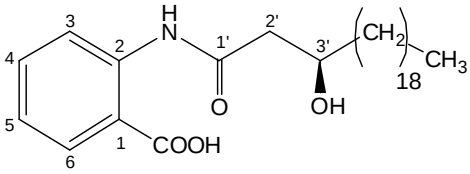
IV.3.3. Hydrolyse alcaline des composés 1, 2 et 3

Afin de déterminer la configuration absolue des trois acides anthraniliques nouveaux, ils sont soumis à une hydrolyse alcaline dans des solutions éthanoliques de KOH (20 %). Les mélanges sont mis sous agitation pendant 5 heures dans une température ambiante. Le pH a été ajusté à 2-3 par l'addition de HCl (1N). Les solutions sont extraites à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont séchées sur Na_2SO_4 puis filtrées. L'évaporation à sec du solvant a

permis de récupérer les acides gras correspondants. La comparaison des pouvoirs rotatoire de ces derniers avec les données de la littérature, permet de déduire qu'ils sont tous de configuration (*R)*.

IV.4. Composés isolés de l'espèce *Ononis pusilla*

Composé 1



Aspect : Poudre amorphe blanche

Nom : Acide *N*-(*R*)-3'-hydroxydocosanoylanthranilique

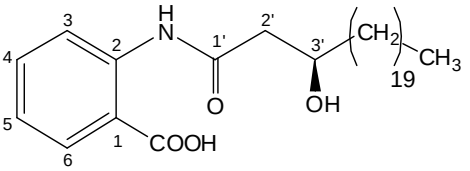
Formule : $C_{29}H_{49}NO_4$

HRESIMS : *m/z* = 474,3602 $[M-H]^-$ (calc. $C_{29}H_{48}NO_4$, 474,3589)

MS/MS : *m/z* = 177 $[M-298]^-$

RMN ^1H et ^{13}C : Voir tableau III-1

Composé 2



Aspect : Poudre amorphe blanche

Nom : Acide *N*-(*R*)-3'-hydroxytricosanoylanthranilique

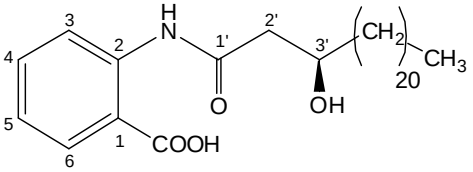
Formule : $C_{30}H_{51}NO_4$

HRESIMS : *m/z* = 488,3736 $[M-H]^-$ (calc. $C_{30}H_{50}NO_4$, 488,3745)

MS/MS : *m/z* = 177 $[M-312]^-$

RMN ^1H et ^{13}C : Voir tableau III-2

Composé 3



Aspect : Poudre amorphe blanche

Nom : Acide *N*-(*R*)-3'-hydroxytétracosanoylanthranilique

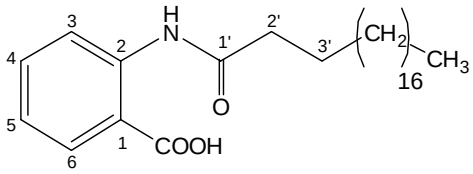
Formule : $C_{31}H_{53}NO_4$

HRESIMS : *m/z* = 502,3892 $[M-H]^-$ (calc. $C_{31}H_{52}NO_4$, 502,3902)

MS/MS : *m/z* = 177 $[M-326]^-$

RMN ^1H et ^{13}C : Voir tableau III-3

Composé 4



Aspect : Poudre amorphe blanche

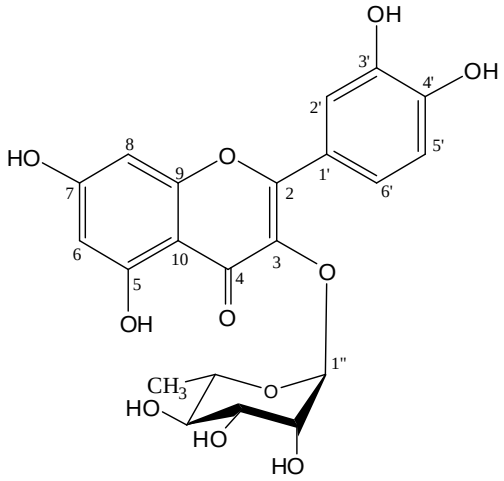
Nom : Acide *N*-icosanoylanthranilique

Formule : $C_{27}H_{45}NO_3$

ESI : *m/z* = 430 $[M-H]^-$, 454 $[M+Na]^+$

RMN ^1H et ^{13}C : Voir tableau III-4

Composé 5



Aspect : Poudre jaune

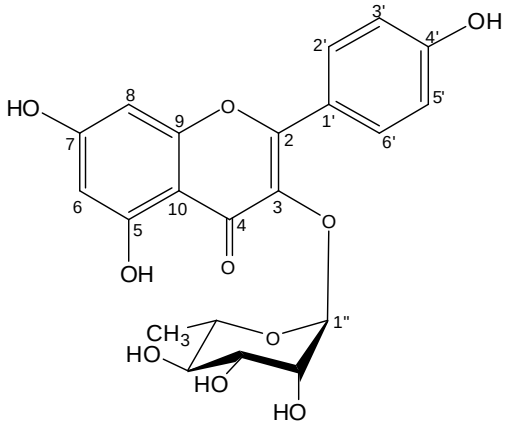
Nom : Quercitrine

Formule : $C_{21}H_{20}O_{11}$

ESI : *m/z* = 447 $[M-H]^-$, 471 $[M+Na]^+$

RMN ^1H et ^{13}C : Voir tableau III-5

Composé 6



Aspect : Poudre jaune

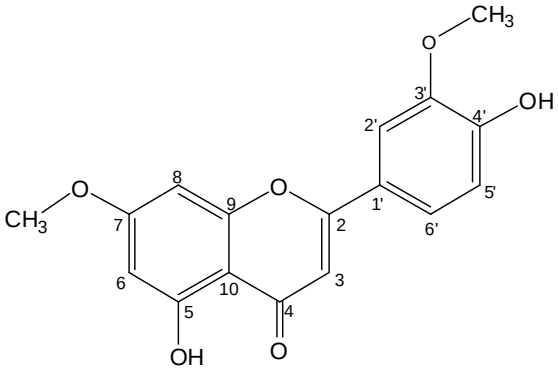
Nom : Afzeline

Formule : $C_{21}H_{20}O_{10}$

ESI : *m/z* = 431 $[M-H]^-$, 455 $[M+Na]^+$

RMN ^1H et ^{13}C : Voir tableau III-6

Composé 7



Aspect : Poudre jaune

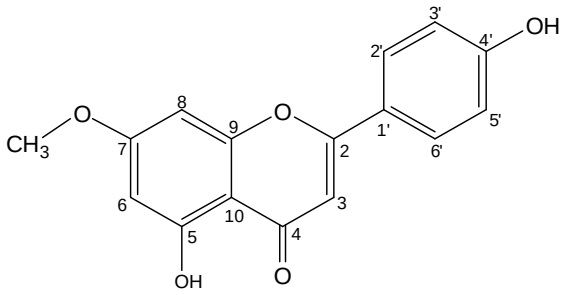
Nom : Velutine

Formule : $C_{17}H_{14}O_6$

ESI : *m/z* = 313 $[M-H]^-$

RMN ^1H et ^{13}C : Voir tableau III-7

Composé 8



Aspect : Poudre jaune

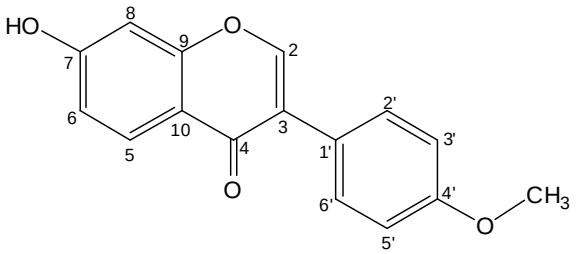
Nom : Genkwanine

Formule : $C_{16}H_{12}O_5$

ESI : *m/z* = 283 $[M-H]^-$

RMN ^1H et ^{13}C : Voir tableau III-8

Composé 9



Aspect : Poudre blanche

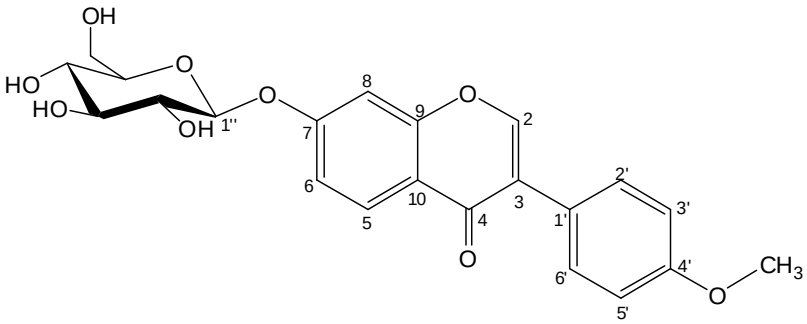
Nom : Formononétine

Formule : $C_{16}H_{12}O_4$

ESI : *m/z* = 267 $[M-H]^-$

RMN ^1H et ^{13}C : Voir tableau III-9

Composé 10



Aspect : Poudre blanche

Nom : Ononine

Formule : $C_{22}H_{22}O_9$

ESI : *m/z* = 453 $[M-H]^-$

RMN ^1H et ^{13}C : Voir tableau III-10

RÉFÉRENCES

Références bibliographiques

[1] Strobel, G. A., 2002. Microbial gifts from rain forests. Canadian Journal of Plant Pathology. 24, 14–20.

[2] Willis, J. C., 1973. A dictionary of the flowering plants and ferns, 8th Ed. Cambridge University Press.

[3] Bellakhdar, J., 1997. La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle. Ibis Press, Paris, France.

[4] Nawasreh, M., Abu Zarga, M., Sabri, S., Al-Khalil, S., Bomeister, E., Zeller, C-P., Atta-Ur-Rahman., 2004. A new anthranilic acid derivative from *Ononis natrix* of Jordanian origin. Alex. J. Pharm. Sci. 18, 165–170.

[5] Talib, W. H., Mahasneh, A. M., 2010. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. Sci. Pharm. 78, 33–45.

[6] Rowan, M. G., Dean, P. D. G., 1972. α-Onocerin and sterol content of twelve species of *Ononis*. Phytochemistry 11, 3263–3265.

[7] Doyle, J. J., Luckow, M. A., 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. Plant. Physiol. 131, 900–910.

[8] Wojciechowski, M. F., Lavin, M., Sanderson, M. J., 2004. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *MATK* gene resolves many well-supported subclades within the family. Am. J. Bot. 91, 1846–1862.

[9] Wink, M., 2013. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). S. AFR. J. BOT. 89, 164–175.

[10] Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol. 1–2. CNRS, Paris, France.

[11] Iserin, P., 2001. Encyclopédie des plantes médicinales. édition Larousse, Paris, 241.

[12] Al-Qudah, M. A., Al-Ghoul, A. M., Trawenh, I. N., Al-Jaber, H. I., Al Shboul, T. M., Abu Zarga, M. H., Abu orabi, S. T., 2014. Antioxidant Activity and chemical composition of essential oils from Jordanian *Ononis Natrix* L. and *Ononis Sicula* Guss. Journal of Biologically Active Products from Nature 4, 52–61.

[13] Mahasneh, A. M., El-Oqlah, A. A., 1999. Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. J. Ethnopharmacol. 64, 271–276.

[14] Elamrani, A., Benaissa, B., 2010. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Ononis natrix* from Morocco. J. ESSENT. OIL. BEAR. PL. 13, 477–488.

[15] Bolle, P., Faccendini, P., Bello, U., Panzironi, C., Tita, B., 1993. *Ononis spinosa* L.: Pharmacological effect of ethanol extract. Pharmacol. Res. 27, 27–28.

[16] Yilmaz, B. S., Özbek, H., Çitoğlu, G. S., Uğraş, S., Bayram, İ., Erdoğan, E., 2006. Analgesic and hepatotoxic effects of *Ononis spinosa* L. Phytother. Res. 20, 500–503.

[17] Barrero, A. F., Herrador, M. M., Arteaga, P., Rodriguez-Garcia, I., Garcia-Moreno, M., 1997. Resorcinol derivatives and flavonoids of *Ononis natrix* subsp. *ramosissima*. J. Nat. Prod. 60, 65–68.

[18] Wollenweber, E., Dörr, M., Rivera, D., Roitman, J. N., 2003. Externally accumulated flavonoids in three Mediterranean *Ononis* species. Z. Naturforsch. 58c, 771–775.

[19] Benedec, D., Vlase, L., Oniga, I., Toiu, A., Tămaş, M., Tiperciuc, B., 2012. Isoflavonoids from *Glycyrrhiza sp*. and *Ononis spinosa.* Farmacia 60, 615–620.

[20] Barrero, A. F., Sanchez, J. F., Barron, A., Corrales, F., Rodriguez, I., 1989. Resorcinol derivatives and other components of *Ononis speciosa*. Phytochemistry 28, 161–164.

[21] Barrero, A. F., Sanchez, J. F, Rodriguez, I., 1990. *N*-Δ^{13}-Docosenoylanthranilic acid and alkylresorcinols from *Ononis natrix* subsp. *hispanica.* Phytochemistry 29,1967–1969.

[22] Barrero, A. F., Cabrera, E., Rodriguez, I., Fernandez-Gallego, E. M., 1994. Resorcinol derivatives and other components from *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*. Phytochemistry 36, 189–194.

[23] San Feliciano, A., Miguel Del Corral, J. M., Caňedo, L. M., Medarde, M., 1990. 3,4-Dihydroisocoumarins from *Ononis natrix*. Phytochemistry 29, 945–948.

[24] Barrero, A. F., Cabrera, E., Rodriguez, I., Planelles, F., 1994. Alkylresorcinols and isocoumarins from *Ononis pubescens*. Phytochemistry 35, 493–498.

[25] Barrero, A. F., Cabrera, E., Rodriguez Garcia, I., 1998. Pterocarpans from *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*. Phytochemistry 48, 187–190.

[26] Barrero, A. F., Sanchez, J. F., Barron, A., Rodriguez, I., 1989. Specionin and speciosides A and B: new aromatic lactones from *Ononis speciosa*. J. Nat. Prod. 52, 1334–1337.

[27] Cañedo, L. M., Miguel del Corral, J. M., San Feliciano, A., 1997. 5-Alkylresorcinols from *Ononis natrix*. Phytochemistry 44, 1559–1563.

[28] Bouheroum, M., Zaiter, L., Benayache, S., Benayache, F., Bermejo, J. B., Leon, F., Garcia, V., 2009. Four flavonoids from the aerial part of *ononis angustissima* species. Chem. Nat. Compd. 45, 874–875.

[29] Mezrag, A., Bouheroum, M., Beghidja, N., Khalfaoui, A., Zaiter, L., Benayache, S., Benayache, F., 2013. More flavonoids from the ethyl acetate extract of *ononis angustissima* species. Chem. Nat. Compd. 49, 749–750.

[30] Amer, M. E., Kassem, F. F., Abdelkader, M. S., 2004. Rare 2-Phenoxychromones from *Ononis serrata* growing in Egypt. Nat. Prod. Sci. 10, 1–3.

[31] Shaker, K. H., Dockendorff, K., Bernhardt, M., Seifert, K., 2004. A new triterpenoid saponin from *ononis spinosa* and two new flavonoid glycosides from *ononis vaginalis*. Z. Naturforsch. 59b, 124–128.

[32] Ferrer, J. L., Austin, M. B., Stewart Jr, C., Noel, J. P., 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. Plant Physiology and Biochemistry. 46, 356–370.

[33] Harborne, J. B., 1977. Flavonoids and the Evolution of the Angiosperms. Biochem. Syst. Ecol. 5, 7–22.

[34] Erdman, J. W., Balentine, D., Arab, L., Beecher, G., Dwyer, J. T., Folts, J., Harnly, J., Hollman, P., Keen, C. L., Mazza, G., Messina, M., Scalbert, A., Vita, J., Williamson, G., Burrowes, J., 2007. Flavonoids and Heart Health: Proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop. J. Nutr. 137, 718S–737S.

[35] Forkmann, G., Heller, W., 1999. Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 1. Elsevier Science, Amsterdam, 713–748.

[36] De Rijke E., Out, P., Niessen, W. M. A., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, U. A. T., 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. Journal of Chromatography A 1112, 31–63.

[37] Winkel-Shirley, B., 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. Plant. Physiol. 126, 485–493.

[38] Lapčik, O., 2007. Isoflavonoids in non-leguminous taxa: A rarity or a rule?. Phytochemistry 68, 2909–2916.

[39] Bruneton, J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie des plantes médicinales, 3ème édition, Ed. TEC &DOC, Paris, 347-351.

[40] Iwashina, T., 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. J. Plant. Res. 113, 287–299.

[41] Dixon, R. A., Steele, C. L., 1999. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. Trends. Plant. Sci. 4, 394–400.

[42] Veitch, N. C., 2007. Isoflavonoids of the Leguminosae. Nat. Prod. Rep. 24, 417–464.

[43] Carlo, G. D., Mascolo, N., lzzo, A. A., Capasso, F., 1999. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life. Sci. 65, 337–353.

[44] Agrawal, A. D., 2011. Pharmacological activities of flavonoids : a review. Int. J. pharm. Sci. nanotech 4, 1394–1398.

[45] Bors, W., Michel, C., Stettmaier, K., 1997. Antioxidant effects of flavonoids. BioFactors 6, 399–402.

[46] Jäger, W., Zembschl, B., Wolschann, P., Pittenauer, E., Senderowicz, A. M., Sausville, E. A., Sedlacek, H. H., Graf, J., Thalhammer, T., 1998. Metabolism of the anticancer drug flavopiridol, a new inhibitor of cyclin dependent kinases, in rat liver. Life. Sci. 62, 1861–1873.

[47] Koch, H. P., Jäger, W., Groh, U., Plank, G., 1992. In vitro inhibition of adenosine deaminase by flavonoids and related compounds. New insight into the mechanism of action of plant phenolics. Methods. Find. Exp. Clin. Pharmacol. 14, 413–417.

[48] Alcaraz, M. J., Ferrandiz, M. L., 1987. Modification of arachidonic metabolism by flavonoids. J. Ethnopharmacol. 21, 209–229.

[49] Scevola, D., Barbarini, G., Grosso, A., Bona, S., Perissoud, D., 1984. Flavonoids and hepatic cyclic monophosphates in liver injury. Boll Ist Sieroter Milan 63, 77–82.

[50] Varma, S. D., Kinoshita, J. H., 1976. Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases. Biochem. Pharmacol. 25, 2505–2510.

[51] Baumann, J., Bruchhausen, F.V., Wurm, G., 1980. Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation. Prostaglandins 20, 627–639.

[52] Kawai, M., Hirano, T., Higa, S., Arimitsu, J., Maruta, M., Kuwahara, Y., Ohkawara, T., Hagihara, K., Yamadori, T., Shima, Y., Ogata, A., Kawase, I., Tanaka, T., 2007. Flavonoids and Related Compounds as Anti-Allergic Substances. Allergol. Int. 56, 113–123.

[53] Villar, A., Gasco, M. A., Alcaraz, M. J., 1984. Anti-inflammatory and anti-ulcer properties of hypolaetin-8-glucoside, a novel plant flavonoid. J. Pharm. Pharmacol. 36, 820–823.

[54] Orhan, D. D., Özçelik, B., Özgen, S., Ergun, F., 2010. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. Microbiol. Res. 165, 496–504.

[55] Kaul, T. N., Middleton, E., Ogra, P. L., 1985. Antiviral Effect of Flavonoids on Human Viruses. J. Med. Virol. l5, 71–79.

[56] Wang, H.K., Xia, Y., Yang, Z.Y., Natschke, S.L., Lee, K.H., 1998. Recent advances in the discovery and development of flavonoids and their analogues as antitumor and anti-HIV agents. Adv. Exp. Med. Biol. 439, 191–225.

[57] Funayama, S., Cordell, G. A., 2014. Alkaloids : A Treasury of Poisons and Medicines. Academic Press. 163–180.

[58] Zapała, L., Kalembkiewicz, J., Sitarz-Palczak, E., 2009. Studies on equilibrium of anthranilic acid in aqueous solutions and in two-phase systems: Aromatic solvent–water. Biophys. Chem. 140, 91–98.

[59] Wiklund, P., Bergman, J., 2004. Alkylation and acylation of basic salts of anthranilic acid. Tetrahedron. Lett. 45, 969–972.

[60] Dardenne, G. A., Larsen, P. O., Wieczorkowska, E., 1975. Biosynthesis of p-aminophenylalanine: part of a general scheme for the biosynthesis of chorisimic acid derivatives. Biochim. Biophys. Acta. 381, 416–423.

[61] Wiklund, P., Bergman, J., 2006. The Chemistry of Anthranilic Acid. Curr. Org. Synth. 3, 379–402.

[62] Silva, M. F. G. F., Fernandes, J.B., Forim, M. R., Vieira, P.C., Sá, I. C. G., 2013. Alkaloids Derived from Anthranilic Acid: Quinoline, Acridone, and Quinazoline. Natural Products, 715–859.

[63] Bratt, K., Sunnerheim, K., Bryngelsson, S., Fagerlund, A., Engman, L., Andersson, R. E., Dimberg, L. H., 2003. Avenanthramides in Oats (*Avena sativa* L.) and Structure-Antioxidant Activity Relationships. J. Agric. Food Chem. 51, 594–600.

[64] Qin, J. J., Jin, H. Z., Fu, J. J., Hu, X. J., Zhu, Y., Shen, Y. H., Yan, S. K., Zhang, W. D., 2008. Anthranilic acid derivatives from *Inula japonica*. Chinese. Chem. Lett. 19, 556–558.

[65] Shou, Q., Banbury, L. K., Maccarone, A. T., Renshaw, D. E., Mon, H., Griesser, S., Griesser, H. J., Blanksby, S. J., Smith, J. E., Wohlmuth, H., 2014. Antibacterial anthranilic acid derivatives from *Geijera parviflora*. Fitoterapia 93, 62–66.

[66] Harborne, J. B., 1993. Introduction to ecological biochemistry. 4 Ed. Academic Press, London.

[67] Moio, L., Etievant, P. X., 1995. Ethyl Anthranilate, Ethyl Cinnamate, 2,3-Dihydrocinnamate, and MethylAnthranilate : Four Important Odorants Identified in Pinot noir Wines of Burgundy. Am. J. Enol. Vitic. 46, 392–398.

[68] Asif, M., 2014. Study of Anthranylic Acid Derivatives: Mefenamic Acid and Its Various Analogues. American Journal of Medicine Studies 2, 24–30.

[69] Andersen, H. S., Iversen, L. F., Jeppesen, C. B., Branner, S., Norris, K., Rasmussen, H. B., Møller, K. B., Møller, N. P. H. J., 2000. 2-(Oxalylamino)-Benzoic Acid Is a General, Competitive Inhibitor of Protein-tyrosine Phosphatases. J. biol. Chem. 275, 7101–7108.

[70] Andersen, H. S., Olsen, O. H., Iversen, L. F., Sørensen, A. L. P., Mortensen, S. B., Christensen, M. S., Branner, S., Hansen, T. K., Lau, J. F., Jeppesen, L., Moran, E. J., Su, J., Bakir, F., Judge, L., Shahbaz, M., Collins, T., Vo, T., Newman, M. J., Ripka, W. C., Møller, N. P. H., 2002. Discovery and SAR of a Novel Selective and Orally Bioavailable Nonpeptide Classical Competitive Inhibitor Class of Protein-Tyrosine Phosphatase 1B. J. Med. Chem. 45, 4443–4459.

[71] Ogita, H., Isobe, Y., Takaku, H., Sekine, R., Goto, Y., Misawa, S., Hayashi, H., 2002. Synthesis and Structure–Activity Relationship of Diarylamide Derivatives as Selective Inhibitors of the Proliferation of Human Endothelial Cells. Bioorg. Med. Chem. 10, 3473–3480.

[72] Levin, J. I., Du, M. T., DiJoseph, J. F., Killar, L. M., Sung, A., Walter, T., Sharr, M. A., Roth, C. E., Moy, F. J., Powers, R., Jin, G., Cowling, R., Skotnicki, J. S., 2001. The Discovery of Anthranilic Acid-Based MMP Inhibitors. Part 1: SAR of the 3-Position. Bioorg. Med. Chem. Lett. 11, 235–238.

[73] Cocco, M. T., Congiu, C., Lilliu, V., Onnis, V., 2004. Synthesis of new *N*-(2-(trifluoromethyl)pyridin-4-yl) anthranilic acid derivatives and their evaluation as anticancer agents. Bioorg. Med. Chem. Lett. 14, 5787–5791.

[74] Li, C-S., Li, X-M., Gao, S-S., Lu, Y-H., Wang, B-G., 2013. Cytotoxic Anthranilic Acid Derivatives from Deep Sea Sediment-Derived Fungus *Penicillium paneum* SD-44. Mar. Drugs. 11, 3068–3076.

[75] Bonnier, G., Douin, R., 1990. La Grande Flore En Couleurs De Gaston Bonnier, Vol. 1. Belin, Paris, France.

[76] Huang, G., Hollingsworth, R.I., 1998. An efficient synthesis of (R)-3-hydroxytetradecanoic acid. Tetrahedron Asymmetry 9, 4113–4115.

[77] Matsuyama, K., Ikunaka, M., 1999. A practical enantioselective synthesis of (S)-3-hydroxytetradecanoic acid. Tetrahedron Asymmetry 10, 2945–2950.

[78] Al-Khalil, S., Masalmeh, A., Abdalla, S., Tosa, H., Iinuma, M., 1995. *N*-Arachidylanthranilic acid, a new derivative from *Ononis natrix*. J. Nat. Prod. 58, 760–763.

[79] Güvenalp, Z., Demirezer, L. Ö., 2005. Flavonol glycosides from *Asperula arvensis* L. Turk. J. Chem. 29, 163–169.

[80] Dudek-makuch, M., Matławska, I., 2011. Flavonoids from the flowers of *Aesculus hippocastanum*. Acta. Pol. Pharm. 68, 403–408.

[81] Reynaud, J., Jay, M., Raynaud, J., 1982. Flavonoid glycosides of *lotus corniculatus* (Leguminosae). Phytochemistry 21, 2604–2605.

[82] Gohar, A., Gedara, S. R., Baraka, H. N., 2009. New acylated flavonol glycoside from *Ceratonia siliqua* L. seeds. J. Med. Plants. Res. 3, 424–428.

[83] Ahmadu, A. A., Haruna, A. K., Garba, M., Sule, M., Pateh, U., Ebeshi, B., Sarker, S., 2004. Flavonoid glycosides from the leaves of *Daniellia oliveri*. Nig. J. Nat. Prod. and Med. 8, 67-68.

[84] King, F. E., Acheson, R. M., 1950. Afzelin (Koempferol-3-rhamnoside) a, new glycoside isolated from Doussié. J. Chem. Soc. 168–170.

[85] Moharram, F. A., Marzouk, M. S. A., Ibrahim, M. T., Mabry, T. J., 2006. Antioxidant galloylated flavonol glycosides from *Calliandra haematocephala*. Nat. Prod. Res. 20, 927–934.

[86] Kaewamatawong, R., Kitajima, M., Kogure, N., Takayama, H., 2008, Flavonols from *Bauhinia malabarica*. J. Nat. Med. 62, 364–365.

[87] Havyarimana, L., Ndendoung, S. T., Tamokou, J., Atchadé A.T., Tanyi, J.M., 2012. Chemical constituents of *Millettia barteri* and their antimicrobial and antioxidant activities. Pharm. Biol. 50, 141-146.

[88] Aluru Rammohan, A., Munikishore, R., Gunasekar, D., Deville, A., Bodo, B., 2015. A new di-C-prenylated coumarin from *Sophora interrupta*. Nat. Prod. Res. 29, 82–85.

[89] Boukaabache, R., Boubekri, N., Boumaza, O., Mekkiou, R., Seghiri, R., Sarri, D., Zama, D., Benayache, F., Benayache, S., 2013. Phytochemical study of ethyl acetate extract and antioxidant activity of *Genista quadriflora* Munby (Fabaceae). Der Pharmacia Lettre 5, 56–59.

[90] Niu, X., Li, Y-M., Hu, H., Liu, X., Qi, L., 2013. Chemical constituents from *Caragana tangutica*. Biochem. Sys. Ecol. 51, 288–290.

[91] Kraft, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Gupta, M. P., Bienzle, U., Eich, E., 2000. Antiplasmodial activity of isoflavones from *Andira inermis*. J. Ethnopharmacol. 73, 131–135.

[92] Kovalev, V. N., Borisov, M. I., Spiridonov, V. N., 1974. Phenolic compounds of *Ononis arvensis*. I. Chem. Nat. Compd. 10, 820–821.

[93] Kırmızıgül, S., Gören, N., Yang, S-W., Cordell, G. A., Bozok-Johansson, C., 1997. Spinonin, a novel glycoside from *Ononis spinosa* subsp. *leiosperma*. J.Nat. Prod. 60, 378–381.

[94] Olennikov, D. N., Tankhaeva, L. M., Partilkhaev, V. V., 2013. Chemical Investigation of *Caragana arborescens* Shoots. Nat. Prod. Commun. 8, 1–2.

[95] Komissarenko, A. N., Kovalev, V. N., Komissarenko, N. F., 1994. Isoflavonoids of the bark and leaves of *Maackia amurensis*. Chem. Nat. Compd. 30, 264–265.

[96] Yuldashev, M. P., Batirov, É. K., Vdovin, A. D., Malikov, V. M., Yagudaev, M. R., 1989. Flavonoids of *Thermopsis alterniflora*. Chem. Nat. Compd. 25, 303–308.

ملخص

يعتمد هذا العمل على الدراسة الفيتوكيميائية لنبتة تسمى *Ononis pusilla*، وهي نبتة محلية تنمو في منطقة باتنة و تنتمي لعائلة fabaceae (leguminosae).

هذه الدراسة التي تركزت أساسا على مستخلص AcOEt للأجزاء الهوائية للنبتة، سمحت بعزل عن طريق مختلف التقنيات الكروماتوغرافية (VLC, CC, CCE, HPLC) لعشر مركبات من الأيض الثانوي و تتكون من 4 مشتقات لحمض الأنثرانيليك ثلاثة منها جديدة بالإضافة إلى 6 من فلافونويدات.

تم تحديد البنية الكيميائية لهذه المركبات باستعمال مختلف طرق التحليل الميطافية بما فيه ميطافية الرنين المغناطيسي بجميع انواعها، ميطافية الكتلة، الأشعة الفوق بنفسجية وتحت الحمراء، بالإضافة إلى قياس زاوية التدويرالنوعي و المقارنة مع الدراسات الفيتوكيميائية السابقة.

وجود مشتقات حمض الأنثرانيليك وفلافونويدات في النبتة المدروسة يتوافق مع التركيبة الكيميائية للنباتات من جنس *Ononis*.

الكلمات المفتاحية: *Ononis pusilla*، Fabaceae، مشتقات حمض الأنثرانيليك، فلافونيدات.

Résumé

Ce travail de recherche est consacré à l'étude phytochimique de l'espèce *Ononis pusilla*, plante locale poussant dans la région de Batna et appartenant à la famille Fabaceae (Leguminosae).

Cette étude qui a porté essentiellement sur l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de la plante en question, a permis d'isoler par les différentes méthodes chromatographiques (VLC, CC, CCE et HPLC) de 10 métabolites secondaires constitués de 4 dérivés de l'acide anthranilique dont trois se sont avérés nouveaux et 6 flavonoïdes.

L'identification de ces métabolites secondaires a été réalisée grâce à la combinaison des différentes méthodes spectroscopiques incluant RMN 1D (^{1}H, ^{13}C *J*-modulé) et 2D (COSY H-H, HSQC et HMBC), la spectrométrie de masse, la spectroscopie UV et IR, en plus de la mesure du pouvoir rotatoire et la comparaison avec les données de la littérature.

La composition chimique de l'espèce étudiée mettant en évidence la présence de dérivés de l'acide anthranilique et de flavonoïdes, est en parfait accord avec celle des plantes du genre *Ononis*.

Mots clés : *Ononis pusilla*, Fabaceae, Dérivés de l'acide anthranilique, Flavonoïdes, RMN.