

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



UNIVERSITE EL HADJ LAKHDAR-BATNA



FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE

# THESE

Présentée par

ABDESSEMED Dalila

Pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences

Spécialité : CHIMIE

*Thème*

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE *GLADIOLUS SEGETUM***

## JURY

Aberkane Med Cherif	M.C.	Université de Batna	Président
Dibi Ammar	Prof.	Université de Batna	Rapporteur
Malek Rasoul Yassine El Hilou	Prof.	U.O.E.Bouaghi	Examineur
Ladjel Segni	Prof.	Université de Ouargla	Examineur
Regainia Zine	Prof.	Université d'Annaba	Examineur
Haba Hamada	M.C.	Université de Batna	Examineur

## REMERCIEMENTS

Au Professeur **DIBI AMAR** à qui j'adresse toute ma reconnaissance, ma gratitude pour sa disponibilité, son attention, le soutien qu'il m'a témoigné tout au long de ce travail placé sous sa direction.

A Monsieur **Haba Hamada** maître de conférences à l'Université de Batna, je lui exprime toute mon amitié et ma profonde reconnaissance pour son soutien et pour avoir accepté de faire partie du jury.

J'exprime aussi ma reconnaissance à monsieur **Aberkane Med Cherif** maître de conférences à l'Université de Batna pour avoir accepté de présider le jury.

A Monsieur **M. R. Yassine El Hilou** Professeur à l'U.O.E. Bouaghi, à Monsieur **Ladjel Segni** Professeur à l'université de Ouargla, à Monsieur **Regainia Zine** professeur à l'université d'Annaba qui ont répondu à notre appel et qui ont bien voulu examiner et juger ce travail.

A monsieur **Max Henry** Professeur à la faculté de pharmacie de Nancy, qui m'a chaleureusement accueilli dans son **LABORATOIRE** et a suivi minutieusement mon travail, je lui exprime toute ma reconnaissance pour le savoir qu'il m'a transmis, les conseils, son sens de **générosité** et sa disponibilité.

A monsieur **R. E. Duval**, Professeur à l'université de Nancy (UMR CNRS7565), à qui j'adresse toute ma reconnaissance, ma gratitude pour tout les travaux réalisés sur l'activité biologique du glaïeul

A Madame le Professeur **D. Laurin-Maatar** et Monsieur **Y. Chapleur** directeur de l'UMR CNRS7565 pour mon intégration dans leur équipe de recherche.

A Monsieur **François Dupire** pour les analyses de Spectrométrie effectuées

Au **MESRS** pour m'avoir octroyé une bourse qui m'a permise d'effectuer ces travaux de recherche.

## LISTE D'ABREVIATIONS

### SOLVANTS ET REACTIFS :

Ac <sub>2</sub> O	: anhydride acétique
AcOEt	: acétate d'éthyle
AcOH	: acide acétique
AlCl <sub>3</sub>	: Chlorure d'aluminium
BuOH	: butanol
CD <sub>3</sub> OD	: méthanol deutérié
CHCl <sub>3</sub>	: chloroforme
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	: diméthylsulfoxyde deutéré
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: acide sulfurique
isoPro	: isopropanol
KOH	: hydroxyde de potassium
Me <sub>2</sub> CO- <i>d</i> <sub>6</sub>	: acétone deutéré
MeCN	: acétonitrile
MeCOEt	: méthyléthylcétone
MeOH	: méthanol
MeONa	: Méthanolate de sodium
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	: oxyde de phosphore
TFA	: acide trifluoroacétique

### TECHNIQUES DE CHROMATOGRAPHIE :

CC	: Chromatographie sur colonne ouverte
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
HPCL	: Chromatographie Liquide Haute Performance
BPLC	: Chromatographie Liquide Basse Performance
DCCC	: Chromatographie liquide à gouttelettes à contre courant
L	: litre
ml	: millilitre
min	: minute
Rdt	: Rendement
R <sub>f</sub>	: Rapport frontal
R <sub>p</sub>	: Phase inverse
SiO <sub>2</sub>	: silice normale 60F
<i>tr</i>	: temps de rétention

### DETERMINATION STRUCTURALE:

Ax	: axial
COSY	: Correlated Spectroscopy
D <sub>2</sub> O	: eau deutérée
<i>d</i>	: doublet
<i>dd</i>	: doublet de doublets
<i>ddd</i>	: doublet de doublets de doublets
<i>dl</i>	: doublet large
<i>dq</i>	: doublet de quadruplets
<i>dt</i>	: doublet de triplets
<i>eq</i>	: équatorial
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity

HSQC	: Heteronuclear Single Quantum Connectivity
HMQC	: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
$J$ (Hz)	: constante de couplage exprimée en Hertz
$m$	: multiplet
nOe	: effet Overhauser nucléaire (nuclear Overhauser effect)
NOESY	: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ppm	: parties par million
$q$	: quadruplet
RMN	: Résonance Magnétique Nucléaire
RMN $^{13}\text{C}$	: Résonance Magnétique Nucléaire du carbone
RMN $^1\text{H}$	: Résonance Magnétique Nucléaire du proton
ROESY	: Rotating Overhauser Effect Spectroscopy
$s$	: singulet
$sl$	: singulet large
$t$	: triplet
$td$	: triplet de doublets
TOCSY	: Total Correlation Spectroscopy
$w_{1/2}$	: largeur spectrale à mi-hauteur
$\delta$	: déplacement chimique exprimé en ppm
ESI	: Electrospray Ionization (ionisation par électrospray)
HR-ESI-MS	: High resolution ESI mass spectrometry)
SM FAB	: Spectrométrie de masse FAB (Fast Atom Bombardment) avec source d'ionisation par bombardement d'atomes rapides)
$m/z$	: masse/charge électrique
SM	: Spectrométrie de Masse
$uma$	: unité de masse atomique
IR	: Infra-Rouge
UV	: Ultra-Violet
$\lambda_{\text{max}}$	: longueur d'onde maximale
$[\alpha]^D$	: Pouvoir rotatoire spécifique

### ACTIVITE BIOLOGIQUE :

CMB	: Concentration Minimale bactéricide
CMI	: Concentration Minimale Inhibitrice
DH <sub>100</sub>	: Dose Hémolitique minimale pour 100% d'hémolyse
DH <sub>50</sub>	: Dose Hémolitique minimale pour 50% d'hémolyse
IC50	: Concentration permettant d'inhiber 50% du signal de référence
CC50	: Concentration Cytotoxique à 50 % du signal de référence
LC100	: Lethal Concentration à 100% (Concentration létale à 100%)
LDH	: Lactate déshydrogénase
LC50	: Létal Concentration à 50% (Concentration létale à 50%)
Cellules MRC-5	: fibroblastes embryonnaires de poumon humain

# TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I - Rappels bibliographiques	
I- 1 Présentation Des Iridaceae.....	5
I-2 Classement .....	6
I-3 Utilisation en médecine traditionnelle.....	7
I-4 Présentation du genre <i>Gladiolus</i> .....	7
I-5 Classification du <i>Gladiolus segetum</i> .....	8
I-6 Description botanique .....	8
I-7 Principaux métabolites secondaires.....	9
I-7-1 Genre <i>Iris</i> .....	9
I-7-2 Genre <i>Crocus</i> .....	13
I-7-3 Genre <i>Gladiolus</i> .....	17
I-8 Travaux antérieurs sur l'espèce <i>Gladiolus segetum</i> .....	18
Chapitre II	
II-1. Présentation des saponosides .....	21
II-2. Propriétés biologiques et pharmacologiques.....	21
II- 3. Structure des saponosides .....	22
II-3-1. Génines stéroïdiques .....	22
II-3-2. Génines triterpéniques.....	24
II-3-3. Structure des hétérosides.....	25

II-3-3-1. La partie osidique.....	25
II -4 Méthodes d'analyse de saponines.....	28
II-4 Tests de détection des saponines.....	28
II-4-1 Détection histochimique.....	28
II-4-1-1 Hémolyse.....	28
II-4-1-2 coloratios spécifiques.....	28
II-4-2 Détection physicochimique.....	29
II-4-2-1 L'indice de mousse.....	29
II-4-2-2 L'indice hémolytique.....	28
II-4-2-3 Réactions colorées.....	30
II-5 Détermination structurale.....	30
II-5-1 Méthodes chimiques.....	31
II-5-2 Méthodes spectroscopiques.....	31
II-5-2-1. RMN.....	31
II-5-2-2 Spectrométrie de masse.....	35
II-5-3 détermination de structure.....	36
II-4-3-3 COSY H-H ... ..	31
II-4-3-4 TOCSY .....	31
II-4-3-5 ROSEY.....	32
II-4-3-6 NOESY.....	32
II-4-3-7 HSQC.....	32
II-4-3-8 HMBC.....	32

**CHAPITRE III-- Extraction, isolement et élucidation structurale**

III- 1 Matériel végétal.....	38
III- 2 Extraction et purification des deux saponines : saponine 1 et saponine 2.....	38
III- 3 Elucidation structurale de saponine1 (composé 1) et saponine 2 (composé 2).....	39
III- 3-1 Identification de la génine.....	39
III- 3- 2 Détermination structurale des chaines osidiques.....	40
III- 3- 3 Identification de saponine 1 (composé 1).....	41
III- 3-4 Identification de Saponine 2 (2).....	48
III- 4 Extraction et purification des produits obtenus par DCCC.....	57
III- 4-1 Etude de la fraction 1.....	60
III-4-2 Détermination de la structure d'antraquinone 1 (composé 3).....	60
III -4-3 Détermination de la structure d'antraquinone 2 (composé 4).....	67
III- 4-4 Détermination de la structure d'Anthraquinone 3 (composé 5):.....	73
III- 4-5 Détermination de la structure d'Anthraquinone 4 (composé 6):.....	74
III-5 Elucidation structurale de saponine 3 (composé 7), saponine 4 (composé 8) et l'acide quinovique (composé 9).....	76
III-5-1 Identification de l'acide quinovique. (Composé 9).....	76
III-5- 2 Elucidation structurale de saponine3 (composé7) et saponine 4 (composé 8)....	80
III-5- 2-1Détermination de la structure de saponine 3 (composé 7).....	80
III-5-2-2 Détermination de la structure de saponine 4 (composé 8).....	84
III-6 Elucidation structurale du composé 10, composé 11 et composé 12.....	89
III-6- 1 Introduction.....	89
III-6- 2 Elucidation structurale du composé 10.....	89

<b>III-6- 3 Elucidation structurale du composé 11.....</b>	<b>93</b>
<b>III-6- 4 Elucidation structurale du composé 12.....</b>	<b>97</b>
<b>III-7 Elucidation structurale du Daucostérol (13) et du <math>\beta</math>-sitostérol (14) de l'acide bétulinique (15), l'ergostérol (16), le stigmastérol (17), le cholestérol (18) et l'acide ursolique (19). .....</b>	<b>99</b>
<b>III- 8 Extraction et purification du dérivé benzofuranique (composé 20).....</b>	<b>100</b>
<b>CHAPITRE IV</b>	
<b>IV- 1 Activités biologiques.....</b>	<b>107</b>
<b>IV-2 Résultats.....</b>	<b>107</b>
<b>IV-3 Discussions.....</b>	<b>113</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>117</b>
<b>CHAPITRE V</b>	
<b>V - PARTIE EXPERIMENTALE.....</b>	<b>118</b>
<b>V- 1 Matériels et méthodes.....</b>	<b>119</b>
<b>V- 1-1 Activité biologique.....</b>	<b>119</b>
<b>V- 1-1-2 Cellules MRC-5.....</b>	<b>119</b>
<b>V- 1-1-3 Teste au Rouge Neutre.....</b>	<b>119</b>
<b>V- 1-1-4 Lactate déshydrogénase.....</b>	<b>119</b>
<b>V- 1-2 Méthodes chromatographiques analytiques.....</b>	<b>120</b>
<b>V- 1-2-1 Chromatographie liquide à basse pression (BPLC).....</b>	<b>120</b>
<b>V- 1-2-2 Chromatographie sur colonne ouverte (CC).....</b>	<b>120</b>
<b>V- 1-2-3 Chromatographie liquide haute performance semi-préparative (HPLC semi-prép.).....</b>	<b>121</b>
<b>V- 1-2-4 Chromatographie sur couche mince (CCM).....</b>	<b>121</b>

V- 1-2-4 Chromatographie liquide à gouttelettes à contre courant. (DCCC).....	122
V- 1-3 Méthodes physico-chimiques.....	122
V- 1-3-1 Hydrolyse acide.....	122
V- 1-3-2 Pouvoir rotatoire.....	123
V- 1-3- 3 Spectre de masse.....	123
V- 1-3-4 Spectre infrarouge.....	123
V- 1-3-5 Spectre ultra-violet.....	123
V- 1-3-6 Spectre de résonance magnétique nucléaire.....	123
V- 2 Matériel végétal, extraction et purification.....	123
V- 2-1 Schéma d'extraction des saponines 1 et 2.....	124
V- 2-2 Schéma d'extraction par soxhlet.....	125
V- 2-3 Schéma de purification par DCCC.....	126
V- 2-4 Schéma d'extraction et de purification du dérivé benzofuranique.....	127
V- 3 Détermination structurale.....	128
V- 3 – 1 Saponine 1 (1).....	128
V- 3 – 2 Saponine 2 (2).....	128
V- 3 – 3 Anthraquinone 1(3).....	129
V- 3 – 4 Anthraquinone 2 (4).....	129
V- 3 – 5 Anthraquinone 3 (5).....	130
V- 3 – 6 Anthraquinone 4 (6).....	130
V- 3 – 7 Saponine 3 (7).....	131
V- 3 – 8 Saponine 4 (8).....	132
V- 3 – 9 Acide quinovique (9).....	132
V- 3 – 10 Flavonoïde 1 : (10).....	133
V- 3 – 11 Flavonoïde 2 : (11).....	133
V- 3 – 12 Flavonoïde 3: kaempférol. (12).....	134

<b>V- 3 – 13 Daucostérol (13)</b> .....	<b>134</b>
<b>V- 3 – 14- <math>\beta</math>-sitosterol (14)</b> .....	<b>135</b>
<b>V- 3 – 15 Acide bétulinique (15)</b> .....	<b>135</b>
<b>V- 3 – 16 Acide ursolique (19)</b> .....	<b>135</b>
<b>V- 3 – 16 Ergostérol (16), Stigmastérol (17), Cholestérol (18)</b> .....	<b>136</b>
<b>V- 3-5 Dérivé benzofuranique (20)</b> .....	<b>137</b>
<b>VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>139</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Détection des saponines : réactions colorées.....	30
Tableau 2 : Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H (DMSO d <sub>6</sub> , 600MHz), et <sup>13</sup> C (DMSO d <sub>6</sub> , 125 MHz) (de saponine 1) composé 1 (δ ppm) .....	47
Tableau 3 : Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H (DMSO d <sub>6</sub> , 600MHz), et <sup>13</sup> C (DMSO d <sub>6</sub> , 125 MHz) de (saponine 2) composé 2 (δ ppm).....	56
Tableau 4 : Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz), et <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz) (Anthraquinones 1 et 2) composés 3 et 4. (δ ppm).....	66
Tableau 5 : Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz), et <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz) (Anthraquinones 3 et 4) composés 5 et 6 (δ ppm) .....	75
Tableau 6 : Déplacements chimiques du <sup>13</sup> C (CD <sub>3</sub> OD, 100MHz) et du <sup>1</sup> H (CD <sub>3</sub> OD ,400MHz) des composés 7, 8 (saponine 3 et 4) et 9 (acide quinovique.....	87
Tableau 7 : Déplacements chimiques du <sup>13</sup> C et du <sup>1</sup> H (Flavonoïdes) des composés 10 et 11 .....	98
Tableau 8 : Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> (CDCl <sub>3</sub> , 300MHz), et <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz) (dérivé benzofuranique) du composé 20 (δ ppm).....	105

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Représentation géographique des iridacées dans le monde.....	6
Figure 2 : Commune d'Ouyoun El Assafir.....	38
Figure 3 : Schéma d'extraction de saponine 1 et 2 .....	39
Figure 4 : Spectre RMN <sup>1</sup> H de la saponine 1.....	37
Figure 5 : Spectre RMN <sup>13</sup> C de la saponine 1.....	38
Figure 6 : Spectre HMBC de la partie aglycone .....	40
Figure 7 : Spectre de masse ESI en mode négatif de saponine1.....	42
Figure 8 : HSQC-TOCSY partie osidique de la saponine 1.....	43
Figure 9 : Spectre HMBC de la partie osidique de la saponine 1.....	45
Figure 10 : Spectre ROESY de la partie osidique de la saponine 1.....	46
Figure11 : Spectre de masse ESI en mode négatif de saponine 2.....	48
Figure 12 : Spectre RMN <sup>1</sup> H de la saponine 2.....	49
Figure 13 : Spectre RMN <sup>13</sup> C de la saponine 2.....	50
Figure 14 : Spectre HSQC-TOCSY partie osidique de la saponine 2.....	53
Figure 15 : Spectre HMBC partie osidique de la saponine 2.....	54
Figure 16 : Spectre ROESY de la partie osidique de la saponine 2.....	55
Figure 17 : Schéma d'extraction par soxhlet .....	58
Figure 18 : Schéma de purification de purification par DCCC.....	59
Figure 19 : Spectre de masse ESI en mode négatif de anthraquinone 1.....	61
Figure 20 : Spectre RMN <sup>1</sup> H d'anthraquinone 1.....	62
Figure 21 : Spectre RMN <sup>13</sup> C d'anthraquinone 1.....	63
Figure 22 : Spectre ROESY de anthraquinone 1.....	64
Figure 23 Spectre HMBC d'Anthraquinone 1 .....	64
Figure 24 : Spectre de masse ESI en mode négatif de anthraquinone 2.....	67

Figure 25 : Spectre RMN <sup>1</sup> H d'anthraquinone 2.....	70
Figure 26 : Spectre RMN <sup>13</sup> C d'anthraquinone 2.....	71
Figure 27 : Spectre ROESY de anthraquinone 2.....	72
Figure 28 : Spectre HMBC d'Anthraquinone 2 .....	72
Figure 29 : Spectre de masse ESI en mode positif d' anthraquinone 3.....	73
Figure 30 : Spectre de masse ESI en mode positif d' anthraquinone 4.....	74
Figure 31 : Spectre RMN <sup>13</sup> C de l'acide quinovique (CD <sub>3</sub> OD).....	78
Figure32 : Spectre RMN <sup>1</sup> H de l'acide quinovique (CD <sub>3</sub> OD).....	79
Figure33 : Spectre RMN du <sup>1</sup> H de saponine 3 (CD <sub>3</sub> OD).....	81
Figure34 : Spectre RMN du <sup>13</sup> C de saponine 3 (CD <sub>3</sub> OD).....	82
Figure 35 : Spectre HMQC de la saponine 3.....	83
Figure 36 : Spectre HMBC partie osidique de la saponine 3.....	83
Figure 37 : Spectre RMN du <sup>13</sup> C de saponine 4 (CD <sub>3</sub> OD).....	85
Figure 38 : Spectre RMN du <sup>1</sup> H de saponine 4 (CD <sub>3</sub> OD).....	86
Figure39 : Spectre RMN du <sup>13</sup> C du composé 10 (CD <sub>3</sub> OD).....	90
Figure 40 : Spectre RMN du <sup>1</sup> H du composé 10 (CD <sub>3</sub> OD).....	91
Figure 41 : Spectre RMN du <sup>13</sup> C de du composé 11 (CD <sub>3</sub> OD).....	94
Figure 42 : Spectre RMN du <sup>1</sup> H du composé 11 (CD <sub>3</sub> OD).....	95
Figure 43 : Schéma d'extraction et de purification du dérivé benzofuranique....	100
Figure 44 : Spectre de masse ESI en mode positif du dérivé benzofuranique.....	101
Figure 45 : Spectre HMBC du dérivé benzofuranique.....	101
Figure 46 : Spectre RMN du <sup>13</sup> C du dérivé benzofuranique (CD <sub>3</sub> OD).....	103
Figure 47 : Spectre RMN du <sup>1</sup> H du dérivé benzofuranique (CD <sub>3</sub> OD).....	104
Figure 48. Cytotoxicité de la fraction 1 en fonction de différentes concentrations (mg/ml) après 24d'exposition.....	108
Figure 49. Cytotoxicité de la Fr 2 en fonction de différentes concentrations (mg/ml) après 24h d'exposition. ....	109

<b>Figure 50. Cytotoxicité de la Fr 3 en fonction de différentes concentrations</b>	
(mg/ml) après 24h d'exposition.....	<b>109</b>
<b>Figure 51. Cytotoxicité de la Fr 4 en fonction de différentes concentrations</b>	
(mg/ml) après 24h d'exposition.....	<b>110</b>
<b>Figure 52. Cytotoxicité de la Fr 5 en fonction de différentes concentrations</b>	
(mg/ml) après 24h d'exposition.....	<b>110</b>
<b>Figure 53. Cytotoxicité de la Fr 6 en fonction de différentes concentrations</b>	
(mg/ml) après 24h d'exposition.....	<b>111</b>
<b>Figure 54. Cytotoxicité de la Fr 7 en fonction de différentes concentrations.</b>	
(mg/ml) après 24h d'exposition.....	<b>111</b>
<b>Figure 55. Cytotoxicité de la Fr 8 en fonction de différentes concentrations</b>	
(mg/ml) après 24h d'exposition.....	<b>112</b>
<b>Figure 56. Cytotoxicité de la Fr 9 en fonction de différentes concentrations</b>	
(mg/ml) après 24h d'exposition.....	<b>112</b>
<b>Figure 57 : Cytotoxicité des neuf fractions à (1 mg/ml) isolés à partir</b>	
<b>de l'extrait MeOH sur les cellules MRC-5.....</b>	<b>113</b>

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

En présence d'affections dont l'origine n'a pu être déterminée, il faut toujours penser à la possibilité d'une intoxication. L'apparition de symptômes semblables chez un grand nombre d'animaux à la fois, doit attirer l'attention, particulièrement si ces symptômes se manifestent dans les heures qui suivent un repas ou un changement d'alimentation. Il faut rechercher alors les aliments que l'animal a pu absorber et qui sont susceptibles de contenir des produits toxiques, si toutefois l'examen détaillé de l'animal malade donne une base solide de suspicion d'une intoxication.

Les ruminants au pâturage et ceux qui reçoivent du fourrage vert ou du foin peuvent ingérer des plantes toxiques proprement dites (aristoloche, mélilot, prêle...) ou encore des plantes qui provoquent après une alimentation prolongée, une dégénérescence hépatique (papilionacées, mercuriales, plantes acides, certaines composées...). Les plantes renfermant des alcaloïdes (datura, belladone, jusquiame noire, cigüe, vérate...) sont généralement évitées par le bétail. D'autres végétaux sont mis en cause dans les intoxications chez les bovins lors de la mise des bêtes sur les champs au printemps. C'est le cas du *Gladiolus segetum*, connu jusqu'à ce jour comme plante ornementale et ne présentant aucune toxicité.

L'étude décrivant la toxicité du glaïeul envers les ruminants (vaches et moutons) a été effectuée au niveau de Mérouana (Batna) (figure 2) (Alloui N., 1999). Durant quatre années d'observations, nous avons constaté qu'après ingestion de cette plante 75 % des bovins présentaient des signes d'intoxication. En générale toutes les bêtes qui ont consommé du glaïeul en grande quantité meurent après 72 heures. La confirmation de l'ingestion du glaïeul en grande quantité est effectuée après autopsie du rumen et du feuillet. On observe un engouement du feuillet ; celui-ci est dur comme un caillou. Ceci est dû à la présence de fibres ligneuses entre les lames du feuillet. Parfois on observe une congestion de l'intestin grêle. Les reins sont très volumineux (x2) et congestionnés (néphrite toxique). La présence d'anurie, la constipation et les tremblements sont très spécifiques. Les œdèmes perianales et perivulvaires sont le résultat de la néphrite toxique. Dans la plus part des autres intoxications il y a présence de gastroentérites, de vomissements, d'incoordination motrice et parfois de paralysie des membres. Tous les animaux ayant présenté les symptômes décrits meurent après quelques jours. Tous les traitements sont illusoire et décevants.

Dans ce cadre, notre travail est porté sur l'investigation phytochimique du *Gladiolus segetum* dans le but de déterminer les molécules présentant une activité biologique (toxique ou mortelle). Nous avons isolé des anthraquinones, des saponosides, des dérivés

flavonoïdiques, des triterpènes et des phytostérols. L'isolement et l'identification de ces composés étaient basés sur l'utilisation d'une combinaison de méthodes chromatographiques (CCM, DCCC, BPLC, HPLC ...) et de techniques physicochimiques et spectroscopiques, telles que l'ultraviolet, l'infrarouge, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire, (techniques monodimensionnelles ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et bidimensionnelles (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC))

L'étude de l'activité biologique a été effectuée en collaboration avec l'équipe du Dr R. E. Duval (UMR CNRS 7565 Université de Nancy), afin d'évaluer la cytotoxicité de différents extraits (chloroformique, à l'acétate d'éthyle, méthanolique), de neuf fractions obtenues par fractionnement de l'extrait méthanolique et de deux molécules que nous avons isolées, saponine 1 et saponine 2, vis-à-vis de fibroblastes humains MRC 5.

# **CHAPITRE I**

## **Rappels bibliographiques**

III. 1. 24. *Sagittaria*.



137. C. *Sagittaria palustris* Gaertn. D. *Sagittaria imbricata* L.  
Sumpf-Sagittary. Dappelfelrige Sagittary.

## I- 1 PRESENTATION DES IRIDACEAE

La famille des **Iridacées** est une famille de plantes monocotylédones. Elle comprend environ 1750 espèces réparties en 78 (Walter, 2002). Sont des plantes herbacées, rhizomateuses, à cornes, bulbeuses ou à racines épaissies des régions tempérées à tropicales. Les iridacées sont rarement dépourvues de chlorophylle ; constituées de styloïdes (grands cristaux prismatiques) d'oxalate de calcium présents dans les gaines de faisceaux conducteurs. Sont très riches en tannins et/ou de terpénoïdes variés. Les différentes espèces qui composent cette famille sont constituées de feuilles alternes, distiques, généralement équitantes (perpendiculaires à la tige), et à limbe unifacial, caulinaires ou basilaires, simples, entières, à nervation parallèle, en gaine à la base ; en général les stipules sont absentes. Les inflorescences sont bien déterminées, se présentent en cyme scorpenidé souvent modifiée, parfois réduites à une fleur solitaire terminale. La famille est actuellement divisée en quatre sous-familles : Isophysidoideae, Nivenioideae, Iridioideae, Ixi oideae. La sous famille **Isophysidoideae** contient le seul genre *Isophysis*, de la Tasmanie. La sous famille **Nivenioideae** contient six genres d'Afrique du Sud, l'Australie et Madagascar : *Klattia*, *Nivenia* et *Witsenia* ainsi que la seule saprophyte (*Geosiris*). Les sous famille **Iridioideae et Ixi oideae** contiennent la majorité des genres Iridaceae entre autre les genres *Iris*, *Moraea*, *Bobartia*, *Dietes*, *Ferraria*. *Ixia*, *Gladiolus*, *Crocus*, *Freesia* et *Watsonia* qui se propagent autour du bassin méditerranéen. (Walter, 2002), (Leister, 2000).

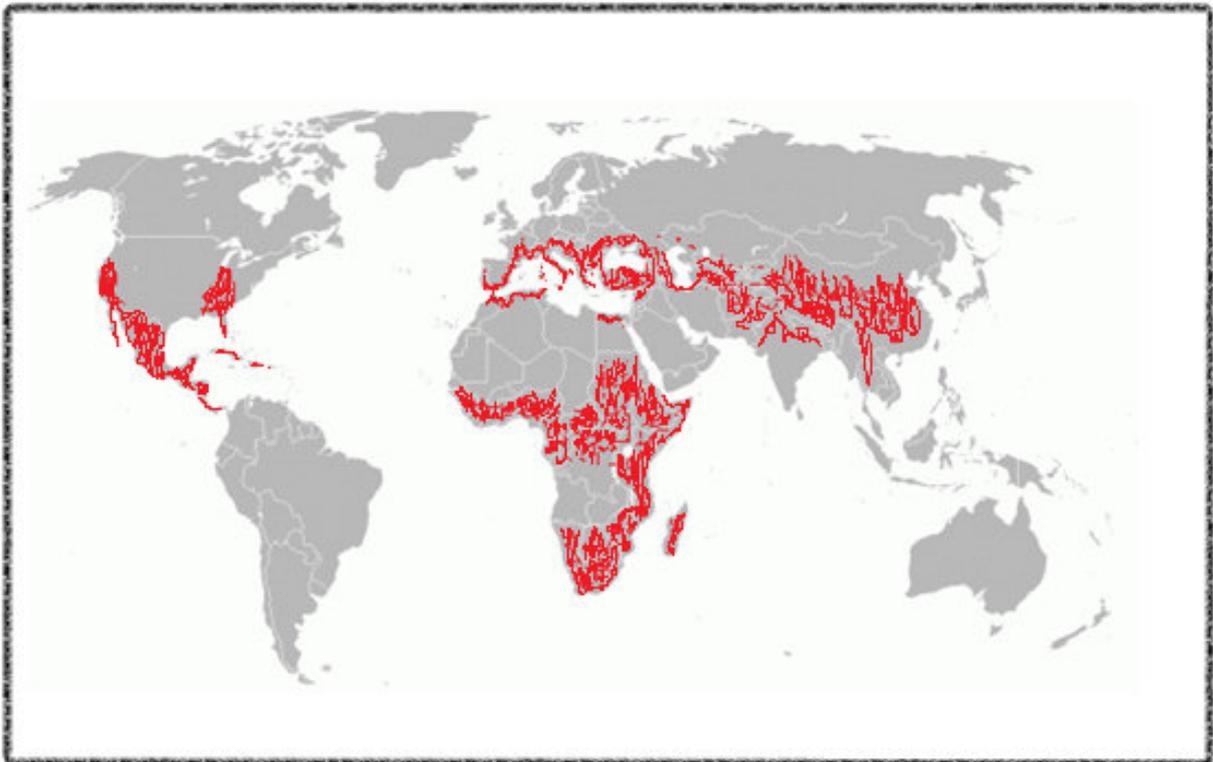
**Distribution géographique :** C'est une famille cosmopolite mais qui manque dans les régions froides et le nord de l'Eurasie . Elle se propage dans les régions tropicales, le Madagascar l'Afrique centrale, l'Afrique du sud, l'Afrique de l'est, le bassin méditerranéen, l'Eurasie, l'Amérique centrale (Figure 1).

**Distribution En Algérie :** On rencontre les espèces suivantes : l'*Iris planifolia*, 'Kikout' en arabe ; floraison octobre- février. Assez commun dans le Tell jusqu'en haute montagne ; plutôt rare sur les Hauts Plateaux. Pousse dans les rocailles, pâturages, clairières des forêts. L'*Iris unguicularis*, 'Kenouet el Oucif' ; floraison décembre-avril. Commun dans le Tell algéro-constantinois jusqu'à environ 1600 m d'altitude, pousse dans la broussaille, les rocailles et la garrigue. Le *Romulea bulbocodium*, 'Zhitout' ; floraison janvier-avril. Commun dans le Tell surtout en basse montagne, se propage dans les pâturages, rocailles, terrains sablonneux. L'*Iris Sisyrinchium*, 'Cheraïq' ; floraison février-mai. Commun dans le

Tell et sur les hauts plateaux, pousse dans les pâturages sablonneux ou rocailleux, talus, bord des chemins. Le *Gladiolus segetum*, « Sif er rorab en arabe, thagastourth en chaoui » ; floraison février-mai. Commun dans le Tell et sur les Hauts Plateaux, se propage dans les champs de cultures et champs de blé. *L'Iris pseudoacorus*, 'Souçane el asfeur' ; floraison mai-juin. Assez commun dans le Tell, se propage au bord des eaux et les marais (Beniston, 1984).

**Principaux genres :** *Gladiolus* (255spp), *Iris* (250), *Moraea* (125), *Sisyrinchium* (100), *Romulea* (90), *Crocus* (80), *Geissorhiza* (80), *Babiana* (65) et *Hesperantha* (65).

**Intérêt économique :** Le safran est constitué des stigmates de *Crocus sativus*. De nombreux genres, incluant *Crocus*, *Tigridia*, *Freesia*, *Iris*, *Ixia*, *Romulea*, *Neomarica*, *Moraea*, *Nemastylis*, *Belamcanda*, *Sisyrinchium*, *Gladiolus* (le glaieul), *Crocospia* et *Trimezia*, sont cultivés pour l'ornement.



**Figure 1. Représentation géographique des iridaceae dans le monde**

**I-2 Classement :** les analyses cladistiques basées sur la morphologie et sur les séquences *rbcl* confirment le monophylétisme des Iridaceae. La position phylogénétique des Iridaceae est quelque peu incertaine. Les caractères morphologiques rattachent la famille aux Liliales, alors

que les séquences *rbcl*. la range dans les Asparagales .L'ADN chloroplastique place la famille dans les Asparagales et c'est pour cette raison que la famille a été classée comme membre primitif de cet ordre (Goldblatt, 1990), (Rudall, 1994), (Chase, 1995a), (Walter, 2002), (Stevenson, 1995) .

### **I-3 Utilisation en médecine traditionnelle (Africamuseum)**

*Gladiolus dalenii*, utilisé en Afrique du sud (Venda), *exploitation du bulbe* pour le traitement des blessures sous forme de poudre, en macération pour instillation oculaire et auriculaire. En Afrique de l'est (Mozambique) pour le traitement de la diarrhée, de la dysenterie et du choléra. Au Madagasca sous forme de pommade pour le traitement des abcès. En Afrique du sud (zones Zulu, Xhosa et Sotho) pour le traitement des maux de tête et lumbago. En Afrique centrale (Burundi occidental) exploitation des tiges, en macération dans l'eau, voix orale, tiges en décoction pour lavement. En Afrique centrale (République Démocratique du Congo (ex. Zaïre) (Rusizi, Kivu) en médecine vétérinaire, pour traitement de la stérilité, tubercule épiluché, mixture dans le vagin. Pour le traitement du rhume, tubercule pilé, jus, en instillation nasale.

*Gladiolus psittacinus* en Afrique centrale (Rwanda) pour le traitement de la toux, consommation du bulbe écrasé par voix orale.

*Sisyrinchium angustifolium* utilisé en Amérique du nord pour le traitement de la constipation et l'ulcère gastrique en infusion dans l'eau des racines et des feuilles.

*Crocus sativus* L. Utilisé contre la scarlatine, la variole, les rhumes, l'insomnie, la dépression, l'asthme et les tumeurs, le paludisme, rhumatismes arthritiques et les maladies de la peau.

*Iris domestica* (L.) (*Belamcanda chinensis* L.) Utilisé dans la médecine traditionnelle chinoise (séché) dans le traitement de la laryngite aiguë, angine aiguë, œdème de la glotte, la toux, le paludisme, et l'empoisonnement de la flèche.

*Gladiolus segetum* L. (bulbe) utilisé en Afrique du nord (sud est de l'Algérie) pour le traitement de l'ulcère gastrique et la stérilité.

### **I-4 Présentation du genre *Gladiolus*.**

Le genre *Gladiolus* compte plus de 250 espèces. Ceux sont des plantes vivaces à cormes qui sont maintenant largement utilisées comme plantes ornementales en massifs ou pour la production de fleurs coupées. La plupart des espèces sont originaires d'Afrique du Sud, mais on trouve aussi certaines espèces à l'état sauvage en Eurasie autour du bassin méditerranéen et en Afrique de l'Est. On compte environ 10 espèces en Eurasie contre 150 en Afrique du Sud et 76 en Afrique tropicale. *Gladiolus* qui signifie « petit glaive » en latin fait référence à la forme des feuilles. Ces dernières sont surmontées par une inflorescence en épi. Suivant les espèces la taille de la plante est variable. On peut rencontrer les espèces suivantes:

*Gladiolus borneti* ; *Gladiolus communis* - glaïeul commun ; *Gladiolus dubius* - glaïeul douteux ; *Gladiolus glaucus* ; *Gladiolus illyricus* - glaïeul d'Illyrie ; *Gladiolus imbricatus* - glaïeul imbriqué ; *Gladiolus italicus* - glaïeul des moissons ou glaïeul d'Italie ; *Gladiolus palustris* - glaïeul des marais. (Beniston, 1984), (Bonier, 1911)

#### **I-5 Classification du *Gladiolus segetum*** (Sif er rorab en arabe, Thagastourth en chaoui)

*Gladiolus segetum* Ker-Gawl connu sous le nom de *Gladiolus italicus* P. Mill (glaïeul d'Italie ou glaïeul des moissons) est une plante vivace, angiosperme monocotylédone appartenant à l'ordre des Asparagales ou des liliales suivant la classification, à la famille des iridacées (Iridaceae) et au genre glaïeul (*Gladiolus*) (Beniston, 1984), (Bonnier, 1911).

1. Règne : Plantea
2. Phylum : Magnoliophyta
3. Classe : Liliopsida
4. Ordre : Asparagales
5. Famille : Iridaceae
6. Genre : *Gladiolus*
7. Espece : *Gladiolus segetum*

#### **I-6 Description botanique du *Gladiolus segetum***

- Hauteur : 40 à 80 cm.
- Tige dressée, robuste, avec 3 à 5 feuilles.
- Feuilles longuement atténuées en pointe aiguë au sommet et disposées sur 2 rangs.
- Fleurs pourpres ou roses au nombre de 5 à 10, disposées en grappe lâche. Chaque fleur est munie de 2 bractées inégales, de 6 divisions dressées inégales et presque disposées en 2 lèvres

soudées en tube court à la base. Anthères plus longues que les filets. Stigmates étroits, régulièrement rétrécis jusqu'à la base.

- Fruits : capsules obovales, membraneuses à 3 angles arrondis, presque globuleuses. Graines non ailées.

- Plante vivace munie d'un bulbe solide, se propageant par de nombreuses bulbilles issues de ce dernier dont l'enveloppe présente des fibres dans le haut en un réseau à mailles ovales.

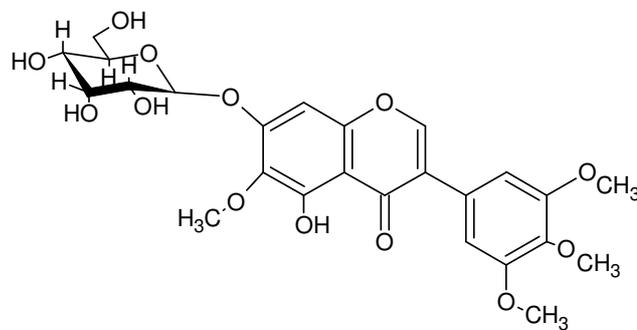
Habitat : Bord des chemins, cultures

## I-7 Principaux métabolites secondaires de la famille des iridaceae

La famille des iridaceae a fait l'objet de fructueuses recherches suite aux différentes applications en médecine traditionnelle des différentes espèces la composant. Les genres les plus investis sont le *crocus* et l'*iris*.

### I-7-1 Genre *Iris* :

- Gamal A. Mohamed et al (Gamal, 2013) ont isolé à partir de l'extrait à l'acétate d'éthyle (rhizome) de *Iris germanica*, un iso flavonoïde (Isoflavone) : Iridine S ou « 5-hydroxy-6,3',4',5'-tetramethoxy-7-O-beta-D-gluco-pyranosyl isoflavone **1** »



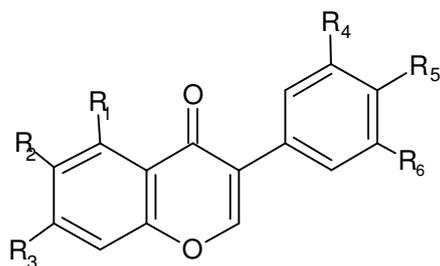
**1**

- Ali A. et al (Ali, 1983) ont isolé à partir de l'extrait à l'acétate d'éthyle de l'*Iris germanica* trois iso flavonoïdes en plus de l'irigenine **2**, l'irisolidone **3** et **4** l'iridine :

Le composé **5** est : **5,3'-dihydroxy-4',5'- dimethoxy-6,7 methylenedioxyisoflavone.**

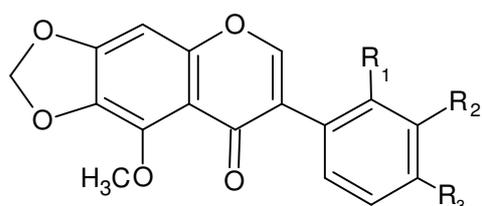
Le composé **6** est : **irisolidone 7-glucoside (5- hydroxy-6,4'-dimethoxyisoflavone 7-O-glucoside).**

Le composé **7** est : **5,3 –dihydroxyisoflavone 7-O-glucoside**



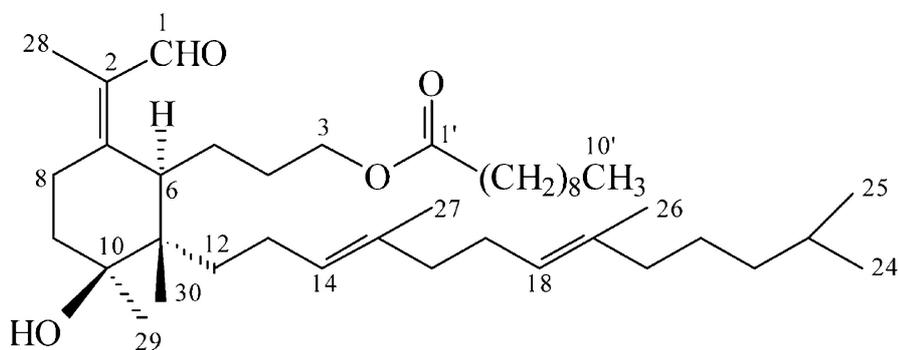
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
<b>2</b> irigenine	OH	OMe	OH	OH	OMe	OMe
<b>3</b> irisolidone	OH	OMe	OH	H	OMe	H
<b>4</b> iridine	OH	OMe	OGlc	OH	OMe	OMe
<b>5</b>	OH	-O-CH <sub>2</sub> -O-		OH	OMe	OMe
<b>6</b>	OH	OMe	OGlc	H	OMe	H
<b>7</b>	OH	H	OGlc	OH	OMe	OMe

- Cornelia et al. ont isolé des iso flavonoïdes à partir de l'extrait méthanolique de *Iris germanica* le composé **8** et à partir de l'extrait au dichloromethane les composés **9, 10, 11, 12** et **13**. (Cornelia, 2011)



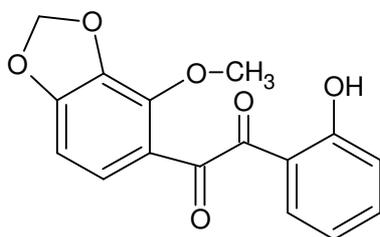
<b>8</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = H, R <sub>2</sub> = OGlc <sup>6</sup> -Glc
<b>9</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = H, R <sub>2</sub> = OGlc
<b>10</b>	R <sub>1</sub> = OMe, R <sub>2</sub> = OGlc, R <sub>3</sub> = H
<b>11</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>3</sub> = H, R <sub>2</sub> = OH
<b>12</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = OMe, R <sub>3</sub> = H
<b>13</b>	R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = OMe

- Ilkay Orhan et al. (Ilkay, 2002) ont isolé à parti de l'extrait à l'éther de pétrole de *Iris germanica* un triterpène ester monocyclique: **Iristectorone K (14)**



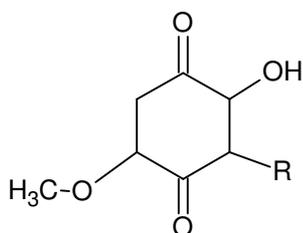
**14**

- A partir de l'extrait chloroformique de l' *Iris tenuifolia* Muhammad Iqbal Choudhary et al. (Muhammad, 2008) ont isolé une isoflavone : Tenuifodione **15**



**15**

- A partir de l'extrait à l'hexane de l'*Iris kumaonensis*, Umar Mahmood et al (Umar, 2002) ont isolé les composés suivants :



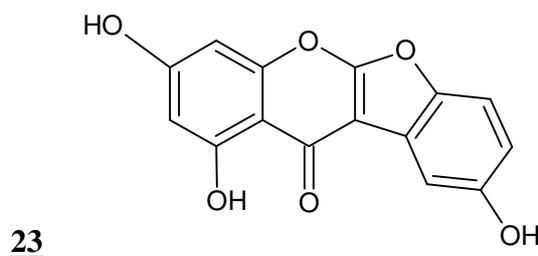
<b><u>16</u></b>	R = C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>
<b><u>17</u></b>	R = C <sub>17</sub> H <sub>35</sub>
<b><u>18</u></b>	R = C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>
<b><u>19</u></b>	R = C <sub>19</sub> H <sub>39</sub>
<b><u>20</u></b>	R = C <sub>20</sub> H <sub>41</sub>
<b><u>21</u></b>	R = C <sub>21</sub> H <sub>43</sub>
<b><u>22</u></b>	R = C <sub>22</sub> H <sub>45</sub>

Les 7 composés : **16** (irisoquin-A), **17** (irisoquin-B), **18** (irisoquin), **19** (irisoquin-C), **20** (irisoquin-D), **21** (irisoquin-E) et **22** (irisoquin-F) suivent la nomenclature suivante :

- Irisoquin-A **16** : (2-hydroxy-3-hexadecyl- 5-methoxy-1,4-benzoquinone)  
 Irisoquin-B **17** : (2-hydroxy-3-heptadecyl- 5-methoxy, 1,4-benzoquinone)  
 Irisoquin **18** : (2-hydroxy-3-octadecyl- 5-methoxy-1,4-benzoquinone )  
 Irisoquin-C **19** : (2-hydroxy-3- nonadecyl-5-methoxy-1,4-benzoquinone )  
 Irisoquin-D **20** : (2-hydroxy- 3-eicosanyl-5-methoxy-1,4-benzoquinone )  
 Irisoquin-E **21**: (2-hydroxy- 3-docosanyl-5-methoxy-1,4-benzoquinone)  
 Irisoquin-F **22**: (2-hydroxy- 3-docosanyl-5-methoxy-1,4-benzoquinone)

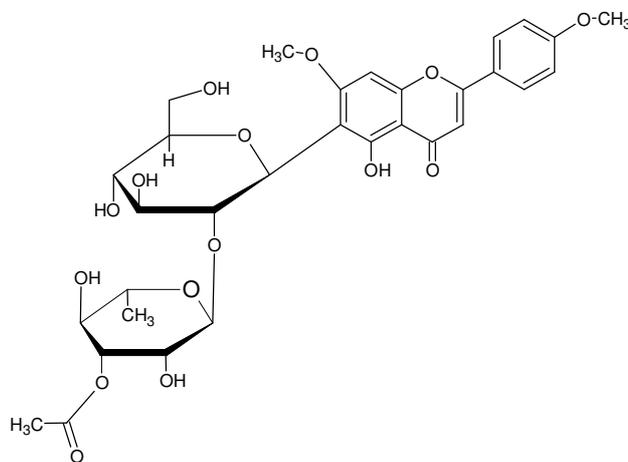
- A partir de l'extrait acétate d'éthyle de l'*Iris bungei* Maxim. Pan Shu et al (Pan, 2009) ont isolé une coumaronochromone : « irisbungin » **23**

5, 7,5'-trihydroxy-coumaronochromone



- A partir de l'extrait à l'acétate d'éthyle des feuilles de l' *Iris tectorum* Maxim., Yuhan Ma et al. ont isolé une flavone C-glycosylée dont la cytotoxicité envers des cellules cancéreuses humaine a été déterminé avec une valeur de IC<sub>50</sub> de 63 µM (Yhan, 2012).

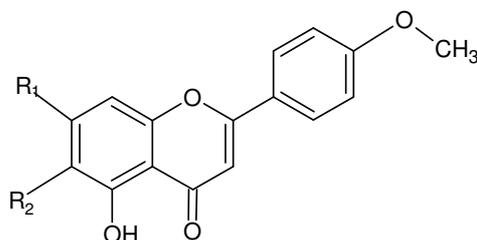
« 5-hydroxyl- 7,4', -diméthoxyflavone-6-C-[O-(α-L-3''-acetylrrhamnopyranosyl)- 1→2-β-D-glucopyranoside] » **24**



- A partir de l'extrait éthanolique de l'*Iris lactea* var. *chinensis*, Wen Juan Shen et al. (Wen, 2008) ont isolé deux C-glycosylflavones :

5-hydroxy-4'-methoxyflavone-7-O-(β-D-2''',4''''-diacetylramnopyranosyl)-6-C-[O-(α-L-6''''-acetyl-glucopyranosyl)-1 → 2-β-D-glucopyranoside] (**irislactine A**) 25

5-hydroxy-4',7-dimethoxyflavone-6-C-[O-(α-L-2''',3''''-diacetylramno-pyranosyl)-1 → 2-β-D-glucopyranoside] (**irislactine B**). 26



**Irislactine A** 25 : R<sub>1</sub> = -2,4-diacéthyle-β-D-rhamnosyle

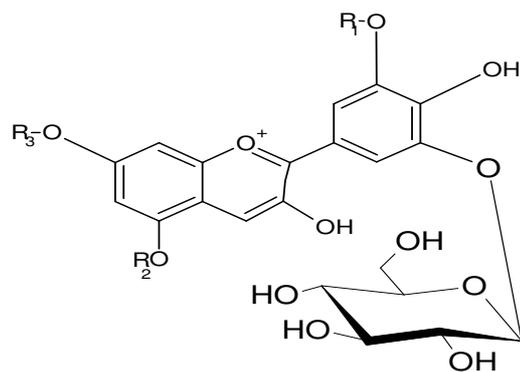
R<sub>2</sub> = -6-acéthyle-α-L-glucosyle-1→2-O-β-D-glucosyle

**Irislactine B** 26 : R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>

R<sub>2</sub> = -2,3-diacéthyle-α-L-rhamnosyle-1→2-O-β-D-glucosyle

### I-7-2 Genre *Crocus*

- Rikke N. et al. ont isolé à partir d'un extrait aqueux à 50% de CH<sub>3</sub>CN des fleurs du *Crocus antalyensis* plusieurs anthocyanins (Rikke, 1999a):



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<u>27</u>	H	(6-O-malonyl)-	β-D-glucopyranoside(B) H
<u>28</u>	H	H	β-D-glucopyranoside(B)
<u>29</u>	CH <sub>3</sub>	H	β-D-glucopyranoside(B)
<u>30</u>	H	β-D-glucopyranoside(B)	H
<u>31</u>	CH <sub>3</sub>	β-D-glucopyranoside(B)	H

27 delphinidin 3-O-(β-D-glucopyranoside)-5-O-(6-O-malonyl-β-D-glucopyranoside)

28 delphinidin 3,7-di-O-(β-D-glucopyranoside)

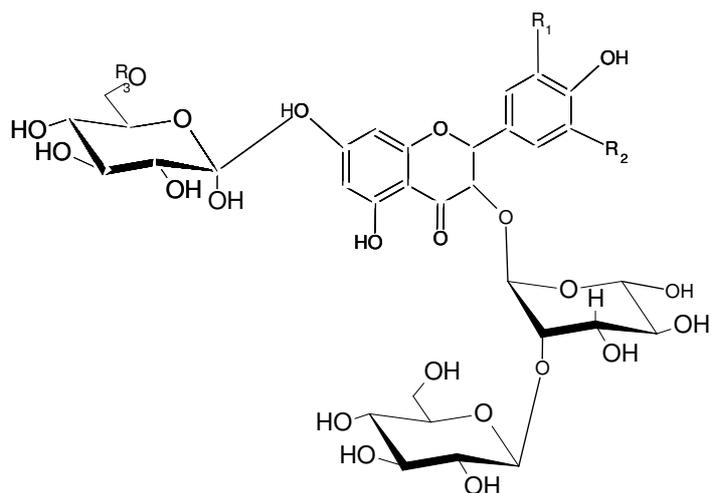
29 petunidin 3,7- di-O-(β-D-glucopyranoside)

30 delphinidin 3,5-di-O-(β-D-glucopyranoside)

31 petunidin 3,5- di-O-(β-D-glucopyranoside)

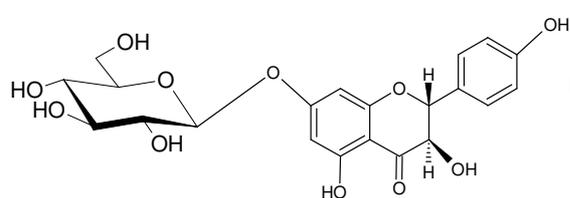
Rikke Nürbñka et al. ont isolé à de deux *Crocus chrysanthus-biflorus*, "Eye-catcher" et "Spring Pearl" des flavonoïdes (Rikke, 1999b):

R<sub>1</sub> R<sub>2</sub> R<sub>3</sub>

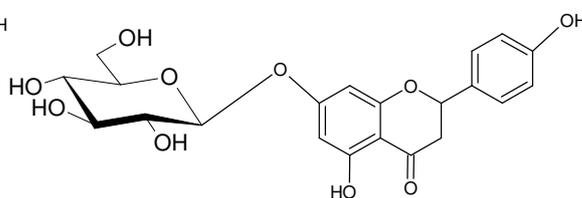


<b><u>32</u></b>	H	H	H
<b><u>33</u></b>	OH	H	H
<b><u>34</u></b>	OH	OH	H
<b><u>35</u></b>	H	H	malonyl
<b><u>36</u></b>	H	H	acetyl

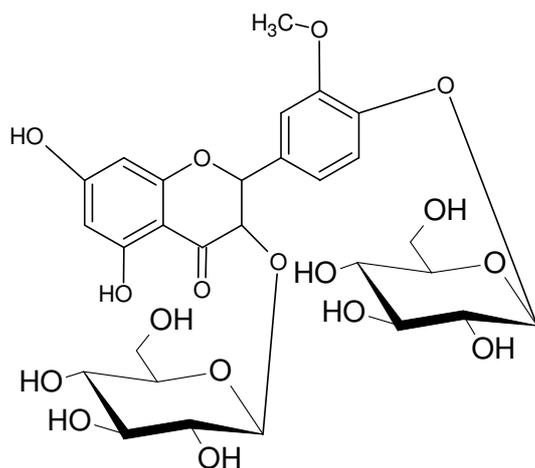
- **32** Kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-(2-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl) rhamnopyranoside-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (1)
- **33** Quercetin 3-O- $\alpha$ -L-(2-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl) rhamnopyranoside-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (2)
- **34** Myricetin 3-O- $\alpha$ -L-(2-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl) rhamnopyranoside-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (3)
- **35** 3-O- $\alpha$ -L-(2-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl) rhamnopyranoside-7-O- $\beta$ -D-(6-O-malonyl) glucopyranoside (4)
- **36** Kaempferol 3-O- $\alpha$ -L-(2-O- $\beta$ -D- glucopyranosyl) rhamnopyranoside-7-O- $\beta$ -D-(6-O-acetyl) glucopyranoside (5)



**37**



**39**



**38**

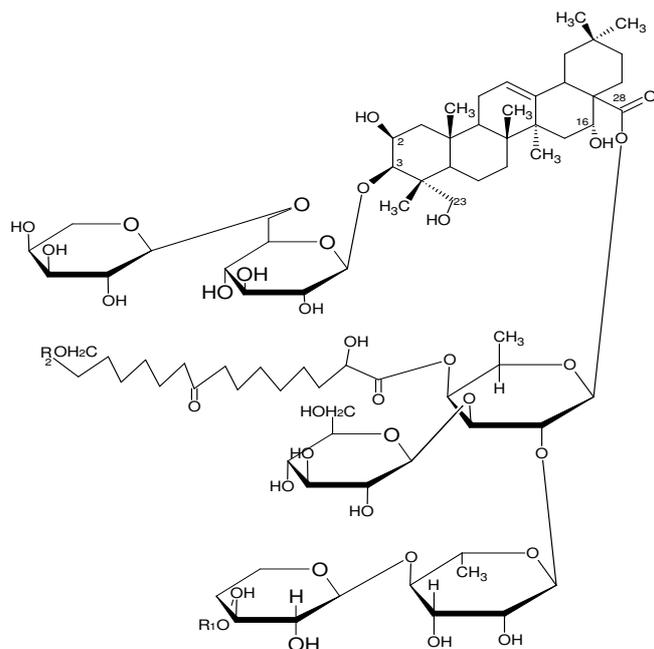
- **37** Dihydrokaempferol 7-O-β-D-glucopyranoside (6)
- **38** Isorhamnetin 3,4'-di-O-β-D-glucopyranoside (7)
- **39** Apigenin 7-O-β-D-glucopyranoside (8)

- Yoshihisa A. et al ont isolé à partir de l'extrait méthanolique des cormes (bulbe) de *Crocsmia masoniorum* trois saponines triterpéniques (Yoshihisa, 1994).

**40 Manoside A :** 3- O-[ α- L- arabinopyranosyl-(1 →6)-β-D-glucopyranosyl]-28-O-[β-D-apiofuranosyl-(1→4)- β-D-xylopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl]-(β-D-glucopyranosyl)-(2-hydroxy-9-oxo- 16-α-L-rhamnopyranosyloxyhexadecanoyl) – β – fucopyranosyl } polgalacic acid

**41 Masonoside B:** 3-O-[α-arabinopyranosyl- (1→6)-β-D-glucopyranosyl]-28-O-[β-D-apiofuranosyl-(1→4)-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-α-L-rhamnopyranosyl]-(β-D-glucopyranosyl)-(2,16-dihydroxy-9-oxohexadecanoyl)-β-D-fucopyranosyl}-polygalacic acid

**42 Masonoside C:** 3-O-[α-L-arabinopyranosyl- (1→6)-β-D-glucopyranosyl]-28-O-[β-D-xylopyranosyl-( 1→4)-α-L-rhamnopyranosyl]-(β-D-glucopyranosyl)-(2,16-dihydroxy-9-oxohexadecanoyl)-β-D-fucopyranosyl}- polygalacic acid.



**40** masonoside A  $R_1 =$  apiofuranose  $R_2 =$  Rhamnose

**41** masonoside B  $R_1 =$  apiofuranose  $R_2 =$  H

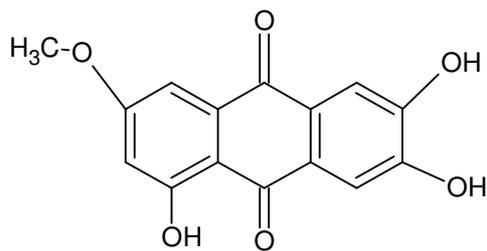
**42** masonside C  $R_1 =$  H  $R_2 =$  H

### I-7-3 Genre *Gladiolus*

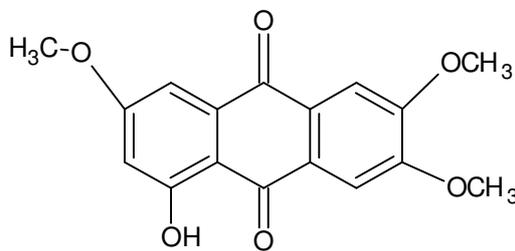
- Ding-Yong Wang et al. ont isolé à partir de l'extrait à l'acétate d'éthyle du *Gladiolus gandavensis* des anthraquinones (Ding, 2003):

**43** 1, 6,7-trihydroxy-3-methoxyanthraquinone (1)

**44** 1, 3,6-trihydroxy-8-methyl-anthraquinone (1a)



**43**

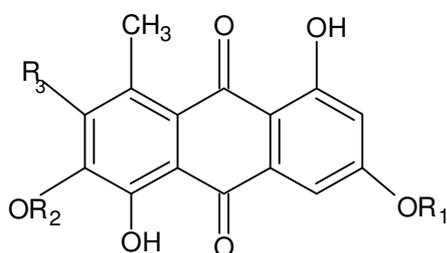


**44**

- Dieudonne Ngamga et al. Ont isolé à partir de l'extrait chloroformique du *Gladiolus psittacinus* des anthraquinones qui sont (Dieudonne, 2007) :

**45** 1, 6,7-trihydroxy-3-methoxy-8-methyl-anthraquinone (1)

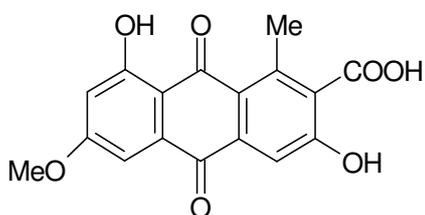
**46** 1-hydroxy-3, 6,7-trimethoxy-8-methyl-anthraquinone (2)



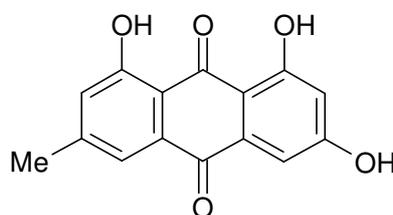
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>45</b>	CH <sub>3</sub>	H	OH
<b>46</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>47</b>	H	H	H
<b>48</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
<b>49</b>	CH <sub>3</sub>	H	H
<b>50</b>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	COOH

### I-8 Travaux anterieurs sur l'espece *Gladiolus segetum*

- A. ALI et al. ont isolé à partir de l'extrait méthanolique les anthraquinones suivantes (Ali, 1989):



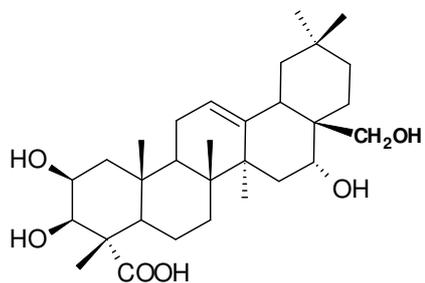
**51**



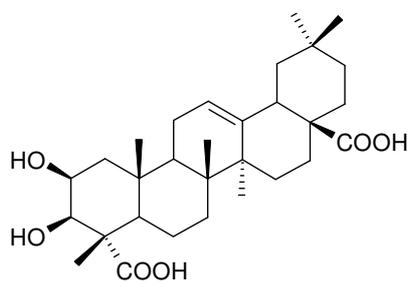
**52**

- **51** 3,8-dihydroxy-6-methoxy-1-methylantraquinone-2-acide carboxylique
- **52** 1, 3, 8-trihydroxy-6- methylantraquinone

- M.A. El-Shanawany et al ont isolé à partir de l'extrait à l'acétate d'éthyle, un triterpène pentacyclique ainsi que l'acide médicagénique (El-Shanawany, 2009).



**53**



**54**

- **53** 2 $\beta$ , 3 $\beta$ , 16 $\alpha$ , 28-tetrahydroxy-olean-12-ene-23-acide carboxilique
- **54** Acide médicagénique

**CHAPITRE II**  
**Etudes des saponosides**

## II-1. Présentation des saponosides

Les saponosides sont caractérisés par leurs propriétés tensio-actives : ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes. Ce pouvoir aphrogène est dû au caractère amphiphile des molécules: elles possèdent à la fois un pôle lipophile (la génine) et un pôle hydrophile (la partie osidique), cette dualité leur conférant une activité tensioactive puissante. C'est d'ailleurs sur leur tensio-activité qu'est fondé l'utilisation multiséculaire de certaines drogues qui en renferment : la saponaire (*Saponaria officinalis*) en Europe, *Quillaya saponaria* en Amérique du sud, *Sapindus sp.* en Asie., riches en ces composés, leur valut l'appellation de saponosides. La plupart des saponosides présentent également des propriétés hémolytiques ichtyotoxiques (toxicité à l'égard des animaux à sang froid, principalement les poissons. Certains saponosides sont des matières premières destinées à l'hémisynthèse de molécules médicamenteuses stéroïdiques. Plusieurs drogues à saponosides sont utilisées par l'industrie pharmaceutique pour l'obtention de formes galéniques, d'autres ont des applications en phytothérapie. L'industrie des cosmétiques exploite notamment leurs propriétés détergentes. (Bruneton, 1993)

## II-2. Propriétés biologiques et pharmacologiques

Les saponosides sont habituellement hémolytiques. Cette propriété est attribuée à leur interaction avec les stérols de la membrane érythrocytaire. L'interaction induit une augmentation de la perméabilité membranaire et un mouvement des ions : le sodium et l'eau entrent, le potassium fuit, la membrane éclate, permettant ainsi la fuite de l'hémoglobine. Les monodesmosidiques sont beaucoup plus hémolytiques que les bidesmosidiques et l'activité décroît lorsque la chaîne osidique s'allonge. Bon nombre de saponosides assurent la défense du végétal contre l'attaque microbienne ou fongique : cas du lierre, de l'avoine et de la luzerne. Certains sont actifs sur des virus tels que la glycyrrhizine, saponosides de *Anagallis arvensis* L. ou du souci, cyclamine. Certains sont cytotoxiques ( $\alpha$ -hédérine, astragaloside), voire même antitumoraux *in vivo* : tubeimoside 1 de *Bolbostemma paniculatum* (Maxim) Franquet (Cucurbitaceae), saponosides de *Crocasmia sp.* (Iridaceae). D'autres molécules, inhibent la formation de tumeurs. Des propriétés molluscicides (activité très importante, elle est fréquemment de l'ordre de 1 mg/l, est le fait des seuls monodesmosidiques) ont également été démontrées pour certains saponosides isolés de plantes telles *Phytolacca dodecandra*, intéressantes dans la lutte contre les mollusques vecteurs des schistosomiasis. De nombreuses autres activités biologiques ont été démontrées (antivirales, antitumorales,

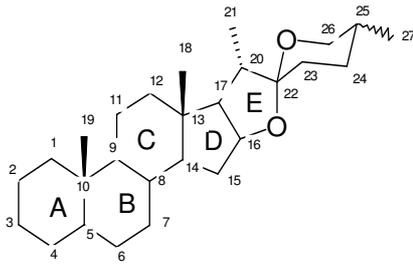
veinotoniques, cicatrisantes, anti-inflammatoires..), justifiant l'utilisation de certaines saponosides en thérapeutique. En phlébologie (traitement de l'insuffisance veineuse) et en proctologie (traitement de la crise hémorroïdaires), des saponosides aux propriétés anti-inflammatoires et anti-œdémateuses sont utilisés : l'escine, extrait total des saponosides isolés de graines du marronnier d'Inde (*Asculus hippocastanum*), les ruscogénines, isolés des rhizomes du petit houx (*Ruscus aculeatus*) et l'acide glycyrrhétique isolé de la réglisse (*Glycyrrhiza glabra*). Ce dernier est également utilisé dans le traitement des manifestations inflammatoires cutanées. Le Lierre (*Hedera helix*) et le polygala de Virginie (*Polygala senega*), riches en saponosides sont employés comme antitussifs en phytothérapie. En dermatologie, l'ETCA, extrait tiré en saponosides de l'Hydrocotyle (*Centella asiatica*), commercialisé sous le nom de madécassol, est utilisé pour ses propriétés cicatrisantes dans le traitement d'appoint des ulcérations cutanées et des brûlures légères. Le souci (*Calendula officinalis*) est lui aussi largement utilisé, dans différentes spécialisés, comme adoucissant et cicatrisant, enfin, les racines de Ginseng (*Panax ginseng*) sont riches en saponosides adaptogènes employés comme antiasthénique. En dehors des potentialités pharmacologiques des saponosides, on note qu'ils retiennent aussi l'attention pour les propriétés édulcorantes. On connaît celle de la réglisse et de la glycyrrhizine, largement utilisées dans la formulation de boissons ou de confiseries. (Bruneton, 1993).

### **II-3. Structures de saponosides**

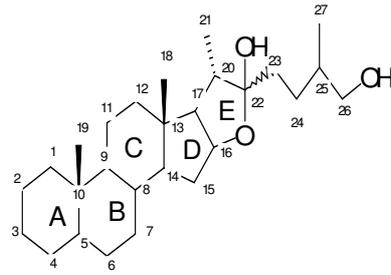
Les saponosides peuvent être classés selon la nature de la génine (Bruneton, 1993) :

#### **II-3-1. Génines stéroïdiques, (présentes chez les Angiospermes Monocotylédones)**

Elles possèdent un squelette hexacyclique à 27 atomes de carbones (spirostane) (**55**) ou pentacyclique (furostane) (**56**), ce dernier n'existant qu'à l'état hétérosidique dans la plante fraîche et résultant de l'engagement de l'hydroxyle en 26 dans une liaison osidique dont l'hydrolyse conduit spontanément au dérivé spirostanique.



**55** spirostane

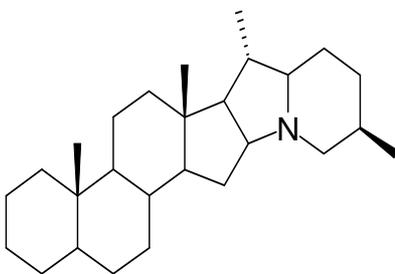


**56** furostane

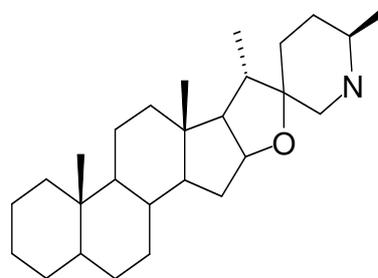
On distingue deux séries dans le squelette spirostanique en fonction de la configuration du C-25 ; néosapogénine (25-S) et isosapogénine (25-R). Certains saponosides possèdent une double liaison en 5 (6), si elle est absente, les cycles A/B sont fusionnés en trans ou cis. La présence d'un hydroxyle en 3, de configuration  $\beta$ , est constante, mais d'autres positions peuvent être hydroxylées : C-1, C-2, C-5, C-6, C-12, C15. (Hostettmann, 1995), (Bruneton, 1993).

Ces génines stéroïdiques sont presque exclusivement présentes chez les Angiospermes Monocotylédones (Liliaceae, Dioscoreaceae, Amaryllidaceae...) et très rarement chez les Dicotylédones (Fabaceae, Ranunculaceae..). Certaines de ces génines, en particulier la diosgénine extraite des tubercules de *Dioscorea sp.* sont utilisées dans l'industrie pharmaceutique pour l'hémisynthèse et des corticoïdes.

Une autre classe de génines stéroïdiques existe, celle des amines stéroïdiques, qui comprend deux squelettes : le solanidane (**57**) et le spirosolane (**58**). Cependant, la présence de l'atome d'azote les rapprochant de la classe des alcaloïdes, ces génines sont généralement rattachées à cette classe plutôt qu'aux saponosides.



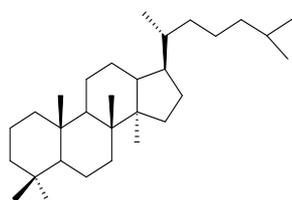
**57** -Solanidane



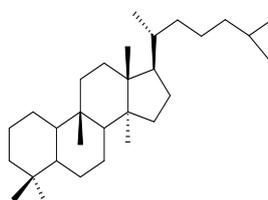
**58**- spirosolane

### II-3-2. Génines triterpéniques (présentes chez les Angiospermes Dicotylédones)

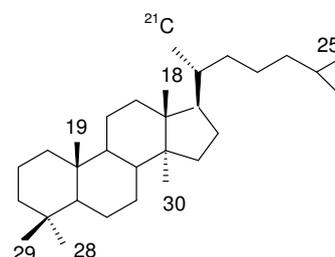
Les sapoggénines triterpéniques, comme la majorité des triterpénoïdes, possèdent un squelette à 30 carbones et sont issues de la cyclisation de l'époxy-2,3-squalène. Cette cyclisation conduit en premier lieu aux molécules tétracycliques (dammarane **59**, cucurbitane **60**, lanostane **61**) puis aux molécules pentacycliques (oléanane **62**, ursane **63**, lupane **64**, friedlane **65**, hopane **66**, taraxastane **67**). Les génines triterpéniques pentacycliques sont les plus nombreuses : les oléananes, ou dérivés de la  $\beta$ -amyrine, largement majoritaires, les ursanes ou dérivés de l' $\alpha$ -amyrine et les lupanes. Plus de 50 % saponosides connus se rattachent au type  $\beta$ -amyrine, en particulier à l'acide oléanolique (l'oléan-12-ène).



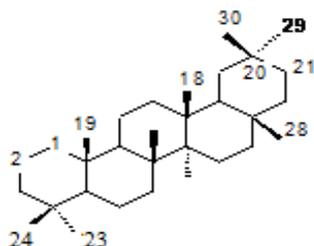
**59. damaranre**



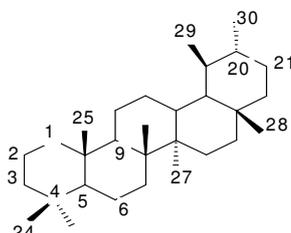
**60. cucurbitane**



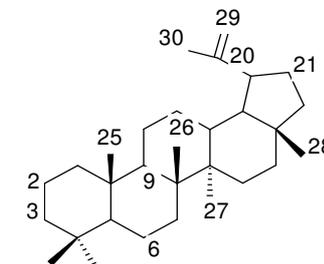
**61. Lanostane**



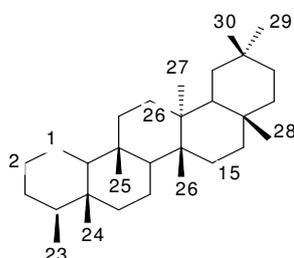
**62. oléanane**



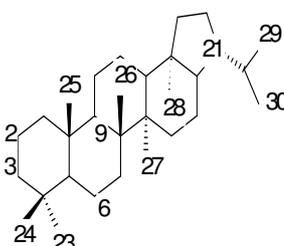
**63. ursane**



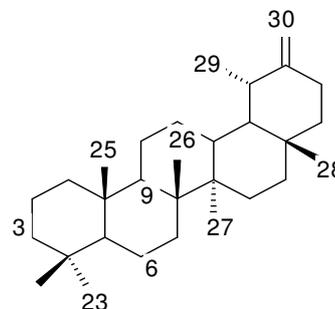
**64. lupane**



**65. Friedelane**



**66. hopane**

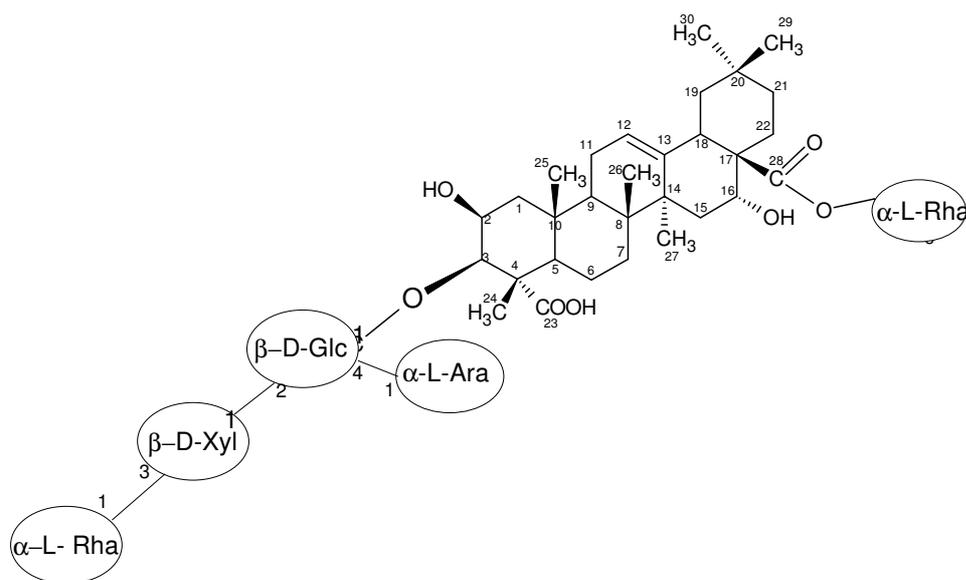


**67. taraxastane**

Les éléments structuraux qui caractérisent ces séries sont : l'existence d'une insaturation en 12(13) ; l'oxydation fréquente des carbones des méthyles en C23 et C28 , mais aussi en C30 (hydroxyméthyle, aldéhyde, carboxyle) ; l'oxydation d'un plus ou moins grand nombre de carbones cycliques : C-2, C-3, C-7, C-11, C-15, C-16, C-19, C-21, C-22. L'oxydation de l'un de ces hydroxylesen cétone n'est pas rare (surtout en 11) et la polyfonctionnalisation peut entraîner, par éthérisation interne ou lactonisation à la formation de cycles supplémentaires.

### II-3-3. Structure des hétérosides

Des chaînes osidiques se greffent sur ces **génines** pour former les hétérosides ou saponosides. Des acides organiques peuvent également estérifier l'aglycone ou les sucres. Les oses constitutifs des saponosides sont banals : D-glucose(Glc), D-galactose (Gal), L-arabinose (Ara), L-rhamnose (Rha), D-xylose (Xyl), D-fucose (Fuc) et au moins chez les saponosides triterpéniques, acide D-glucuronique (Glc-A). Généralement, la partie sucrée de l'hétéroside est constituée par un ou deux oligosides, linéaires ou ramifiés.



La molécule peut compter jusqu'à 11 oses (3 à 5 le plus souvent). Les oses et oligosides peuvent être liés à la génine par une liaison de type éther ou par une liaison de type ester et, selon que la molécule compte un ou deux chaînons saccharidiques, on dit qu'il s'agit d'un mono- ou d'un bidesmoside.

**Monodesmosides** : l'éthérisation (la formation de la liaison osidique) implique, la fonction réductrice de l'oligoside et l'hydroxyle secondaire présent en position C-3 : on parle alors de *monodesmoside*.

**Bidesmosides** : fréquemment, la molécule comporte, en plus de l'ose ou de l'oligoside fixé en C-3, une deuxième chaîne osidique liée à la génine par une liaison ester le carboxyle en C-28 des génines triterpéniques : on parle alors de *bidesmoside*.

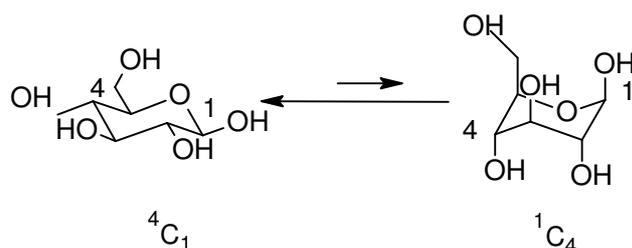
### II-3-3-1. La partie osidique

Les oses sont des composés carbonylés hydroxylés classés en deux séries : D et L, selon que la configuration du C-5 (ou carbone pénultième) présente celle du D-glycéraldéhyde ou celle du L-glycéraldéhyde. La grande majorité des oses naturels appartiennent à la série D (exceptions : L-rhamnose, L-arabinose, L-fucose). La fonction aldéhydique ou cétonique conduit à la formation d'une liaison hémiacétalique intramoléculaire avec l'oxygène porté par le C-5 (cycle oxane) ou parfois le C-4 (cycle oxolane). Ces oses existent sous forme d'un mélange en équilibre ou interviennent, de manière prépondérante, des hémiacétals cyclique. Pour les hexoses et leurs dérivés, le cycle formé est généralement à six liaisons (pyranoses) et parfois à cinq liaisons (furanoses). Cette hémiacétalisation conduit à la transformation du carbone carboxylique en un nouveau stéréocentre, dénommé anomère, et aboutit ainsi à deux diastéréoisomères, différant par la configuration anomérique. Pour la série D, une configuration absolue S correspond à un ose cyclique de type  $\alpha$  et celle de configuration R, de type  $\beta$ . Cette règle s'inverse pour la série L ( $S = \beta$  et  $R = \alpha$ ). La représentation de la forme  $\beta$  d'un D-ose correspond à celle où l'hydroxyle anomérique se trouve au dessus du plan cyclique lorsque le cycle hémiacétalique est orienté avec l'oxygène du cycle en arrière et le carbone anomère sur le côté droit, la forme  $\alpha$  est celle où l'hydroxyle anomérique se situe en dessous du plan. Pour la série L, la représentation est donc inversée. En solution, les formes  $\alpha$  et  $\beta$  des oses réalisent un équilibre interconversionnel. Ce phénomène modifiant le pouvoir rotatoire est appelé la mutarotation (passage de la forme  $\alpha$  vers la forme  $\beta$  et vice versa).

### Conformation des oses

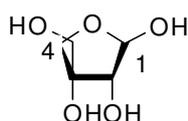
Les carbones du cycle étant de nature  $sp^3$ , celui-ci ne peut être plan et adopte des conformations variables : chaise, bateau, demi-chaise,...La conformation privilégiée est toujours celle qui est la plus stable, dans le cas des pyranoses, la conformation chaise présentant les interactions minimales est favorisée. Cette conformation chaise existe sous

deux formes :  ${}^4C_1$  et  ${}^1C_4$ . La plus stable étant celle où le maximum de substituants hydroxyles et hydroxyméthyles se trouvent en position équatoriale, exerçant ainsi un minimum de forces de répulsion mutuelle, en tenant compte de l'effet anomérique. C'est la configuration des carbones porteurs de ces hydroxyles qui détermine la conformation la plus stable. Dans le cas du D-glucopyranose, c'est l'anomère  $\beta$  qui prédomine dans les solutions de glucose à l'équilibre et la conformation privilégiée est  ${}^4C_1$ , tous les substituants sont équatoriaux.

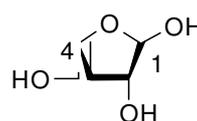


### Conformation du $\beta$ -D-glucopyranose

Les principaux oses présents dans les saponosides sont : les hexoses : D- glucopyranose, D-galactopyranose. Les 6- désoxy-hexoses : L-rhamnopyranose, D-fucopyranose. les acides uroniques : acide D- glucuronopyranosique, acide D-galacturonopyranosique. Les pentoses : D-xylopyranose, L-arabinopyranose. Quelques- uns sont sous forme furanique, comme le D-apiofuranose et le L-arabinofuranose.



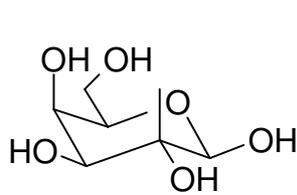
**D -apiofuranose**



**L-arabinofuranose**

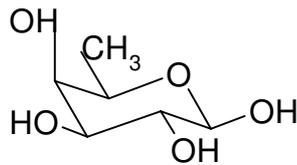
Des sucres acylés sont également rencontrés, et dans les organismes marins, des sucres méthylés ou sulphatés ne sont pas rares.

Les hexoses, portant un substituant en 5 sont bloqués dans une des deux conformations où le substituant 5 est équatorial. Ainsi, le  $\beta$ -D-glucopyranose est sous la conformation  ${}^4C_1$ , de même le  $\beta$ -D-galactopyranose, le  $\beta$ -D-fucopyranose, l'acide  $\beta$ -D-glucuronopyranosique et l'acide  $\beta$ -D-galacturonopyranosique sont sous cette même conformation. En revanche, le  $\alpha$ -L-rhamnopyranose est sous la conformation  ${}^1C_4$ .<sup>6</sup>



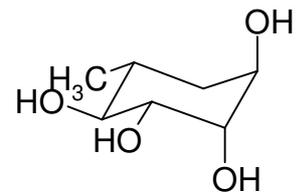
${}^4C_1$

**$\beta$ -D-galactopyranose**



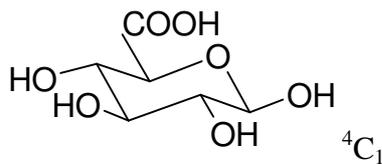
${}^4C_1$

**$\beta$ -D-fucopyranose**



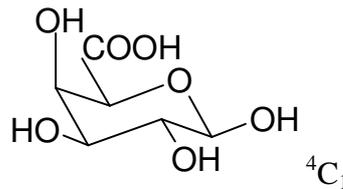
${}^1C_4$

**$\alpha$ -L-rhamnopyranose**



${}^4C_1$

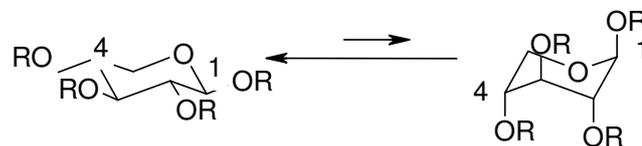
**acide  $\beta$ -D-glucuronopyranosique**



${}^4C_1$

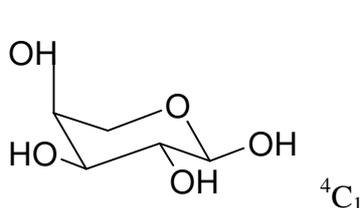
**acide  $\beta$ -D-galacturonopyranosique**

Les pentoses, ne possédant pas de substituant en position 5, peuvent s'interconvertir en conformation  ${}^4C_1$  ou  ${}^1C_4$  en fonction de leur substituant et de la force de l'effet anomérique qui peuvent placer tous les hydroxyles en position axiale et privilégier la forme  ${}^1C_4$

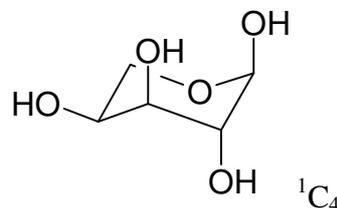


### Conformation du : $\beta$ -D-xylopyranose

Pour l' $\alpha$ -L-arabinose, il existe un équilibre entre les deux conformations,  ${}^4C_1$  et  ${}^1C_4$ .



${}^4C_1$



${}^1C_4$

### Conformation du l' $\alpha$ -L-arabinopyranose

### **II-3-3-2. Les acides organiques**

Différents acides organiques peuvent estérifier les fonctions hydroxyles libres des sucres ou de la génine. Quelques exemples :

Acide acétique, acide isobutyrique, acide 3-méthyl butyrique (acide isovalérique), acide angélique, acide tiglique, acide benzoïque, acide cinnamique, acide ferrulique.

### **II-4- Tests de détection des saponines**

#### **II-4-1 Détection histochimique.**

On pratique une coupe de la plante, on la place sur une lame de microscope en vue d'examen et on procède aux expériences suivantes :

##### **II-4-1-1 Hémolyse**

Hémolyse d'une suspension de sang dans la gélatine. Après un certain temps de contact de cette suspension avec la coupe on observe s'il a eu décoloration de la gélatine par suite d'hémolyse à la surface de contact avec la coupe.

##### **II-4-1-2 Coloration spécifiques**

Coloration spécifiques par traitement avec  $H_2SO_4$  concentré ou par adsorption sélective de colorants (bleu de méthylène ou violet de gentiane). Après ces traitements, l'apparition ou non de zones colorées sur la coupe permet de conclure à la présence ou à l'absence de saponines. Toutefois ces réactions ne sont pas spécifiques puisqu'on sait que d'autres composés peuvent présenter des caractéristiques voisines (Greene, 1878), (Conrad, 1913).

#### **II-4-2 Détection physicochimique.**

Pour ce type de détection, il est nécessaire de procéder d'abord à une extraction sommaire des saponines avec de l'eau ou de l'alcool, solvants dans lesquels elles sont généralement solubles. On effectue ensuite plusieurs mesures sur l'extrait.

##### **II-4-2-1 L'indice de mousse**

Une solution aqueuse de saponines est obtenue en agitant à chaud 1 gr de poudre dans 100 ml d'eau distillée. Après filtration, cette solution est répartie dans 10 tubes à essai de 16 cm de haut et de 1.6 cm de diamètre à raison de 1, 2, 3...10 ml successivement. Le volume de tubes

est ajusté à 10 ml avec de l'eau distillée. Les tubes sont agités pendant 15 secondes dans le sens vertical et laissés au repos. Au bout de 15 mn on mesure la hauteur de la mousse. Si la hauteur de mousse est inférieure à 1 cm dans tous les tubes, l'indice est inférieur à 100. Si la hauteur de mousse est supérieure à 1 cm dans tous les tubes, l'indice est supérieur à 1 000. Si la hauteur de mousse est de 1 cm dans l'un des tubes, la dilution de la drogue dans ce tube est l'indice de mousse cherché. Si, par exemple, il s'agit du quatrième tube renfermant 4 mL de décocté à 1 pour cent, soit 0,04 g de drogue, l'indice est :

$$IM = 10 \times 1 / 0,04 = 250$$

On considère qu'un indice de mousse noté IM supérieur à 100 est suffisant pour entreprendre l'étude des saponines d'un extrait (Pharmacopée Française, 1976).

#### **II-4-2-2 L'indice hémolytique**

Il est défini comme le nombre de millilitres d'une suspension d'érythrocytes entièrement hémolysée par l'extrait aqueux d'un gramme de la matière première contenant les saponines. On le détermine en comparant les résultats obtenus pour un extrait préparé dans les conditions décrites ci-dessous à celui d'une saponine de référence qui possède un pouvoir hémolytique de 30 000 (Pharmacopée Européenne, 1971).

Dans 13 tubes à essai contenant des quantités croissantes d'extrait pour un volume de 1 ml en tenant compte de la dilution, on ajoute 1 ml d'une suspension de sang de bœuf à 2 % et 24 h après, on observe quels sont les tubes où une hémolyse totale s'est produite. Après plusieurs essais de dilution, on calcule la quantité minimale de préparation qui provoque une hémolyse totale. L'usage d'une référence permet d'éliminer l'effet des variations individuelles de sang de bœuf utilisé.

#### **II-4-2-3 Réactions colorées**

La détection des saponines est possible grâce aux réactions colorées que fournit l'aglycone de la saponine avec de nombreux réactifs : il suffit de mélanger dans un tube à essai une solution alcoolique diluée d'extrait avec le réactif pour voir apparaître une coloration caractéristique. Nous avons rassemblé les réactifs couramment utilisés dans le tableau ci-dessous. Si le réactif le plus pratique semble être une solution diluée d'acide sulfurique, la réaction de Liebermann-Buchard est le test le plus employé. On peut rendre ce test quantitatif si on le pratique sur des tubes à concentrations différentes d'extrait en évaluant la quantité minimale d'extrait faisant apparaître la coloration. L'emploi de quelques uns de ces réactifs a été abandonné à cause des

vapeurs toxiques qu'ils dégagent au cours du chauffage des plaques, c'est le cas notamment du réactif de Noller.

**Tableau 1 : Détection des saponines : réactions colorées.**

Réactifs (solvants)	Conditions (1)	Structures révélées		
		Triterpènes		stéroïdes
		Amyrines	lupéol	
H <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> 10 à 30 % (H <sub>2</sub> O ou ETOH)	5mn- 90°C	Rose pourpre	marron	Jaune orangé vert
1 ml AC <sub>2</sub> O+2gttes H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2ml CHCl <sub>3</sub> ) (2)	1mn-100°C	Rose Mauve violet	Jaune orange	vert
30g SbCl <sub>3</sub> (70 ml CHCl <sub>3</sub> )	5 mn-100°C	Rose-cerise	Jaune orange	Rose violacé jaune
1% SnCl <sub>2</sub> (SOCl <sub>2</sub> )(3)	1mn-85-90°C	Violet Bleu-violet	brun	-
1ml anisaldehyde+2mlH <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (97ml CH <sub>3</sub> COOH)	1mn-100°C	Rouge violacé	Jaune -brun	Jaune, vert
25% Ac.phosphotungstique	1-2 mn 115/118°)	Rose -cerise	Jaune-brun	-
1% Ac.phosphomolybdique	5 mn-80/90°C	Rouge sur fond bleu	-	Jaune sur fond bleu

(1) Chauffage à l'étuve

(2) Réactif de Lieberman-Buchard

(3) Réactif de Noller

## II-5 Détermination structurale d'un saponoside

La détermination de la structure d'un saponoside est basée sur quelques techniques, telles que l'hydrolyse acide qui permet de connaître la nature des différents monosaccharides liés à l'aglycone, la spectrométrie de masse permet la détection et l'identification du saponoside par mesure de sa masse, la spectroscopie RMN permet de déterminer la nature et la position des groupements liés à l'aglycone, de déterminer le nombre et la configuration des carbones anomériques impliqués dans chaque liaison glycosidique et de déterminer le séquençage des

chaines osidiques et les points de fixation de ces chaines sur la génine. Ces différentes techniques sont décrites ci-dessous.

### **II-5-1 Méthodes chimiques**

L'hydrolyse alcaline conduit à la rupture des liaisons esters (fonction ester en C-28 de la génine). Ceci permet d'obtenir des monodesmosides à partir de saponines bidesmosidiques.

L'hydrolyse acide permet de rompre toutes les liaisons O-glycosidiques (en position 3 et en position 28) et de séparer l'aglycone des sucres. Ces derniers sont identifiés par CCM ou CGP. L'aglycone est identifié par CCM par comparaison avec des échantillons authentiques et par des méthodes spectrales (Hostettmann, 1995).

### **II-5-2 Méthodes spectroscopiques**

La détermination de structure se fait à l'aide d'analyses des spectres issus de la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN) du  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  monodimensionnelles et pluridimensionnelles et de la spectrométrie de masse.

#### **II-5-2-1 RMN**

La résonance magnétique nucléaire est une méthode de résolution de structure qui s'applique à des molécules en solution. Son principe est l'observation des interactions magnétiques entre noyaux voisins. La RMN fournit des spectres dont les pics sont attribués aux différents noyaux, ce qui établit la correspondance entre le spectre et la structure chimique

#### **Le phénomène de résonance magnétique nucléaire**

La RMN s'applique à des atomes possédant un spin nucléaire ( $I$ ) non nul, c'est-à-dire dont le noyau se comporte comme un dipôle magnétique. Le spin nucléaire est une caractéristique quantique intrinsèque du noyau comme sa masse et sa charge, il peut prendre des valeurs entières ou demi-entières : 0, 1/2, 1 et 3/2 pour les noyaux les plus courants.

0 pour  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$  ;

1/2 pour  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$  ;

1 pour  $^2\text{H}$  (deutérium),  $^{14}\text{N}$  ;

3/2 pour  $^{11}\text{B}$ ,  $^{23}\text{Na}$ ,  $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{37}\text{Cl}$

## **Les interactions noyaux-électrons : le déplacement chimique**

Tous les protons constitutifs d'une molécule ne ressentent pas l'effet du champ magnétique de la même façon : la révolution des électrons sur leurs orbitales atomiques crée un champ électromagnétique perturbateur qui va modifier la valeur du champ local perçu par le noyau. Cet effet est connu sous le nom de déplacement chimique, noté  $\delta$ , est exprimé en ppm (parties- par- million). Il est généralement mesuré par rapport à la fréquence de résonance  $\nu_{\text{ref}}$  d'une substance de référence qui peut être les résonnances caractéristique des noyaux résiduels du solvant utilisé pour l'étude.

Pour l'étude des saponines, des difficultés sont rencontrées au niveau de l'attribution des résonnances des sucres, résultent du fait que les noyaux du  $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$ , non anomériques, sont portés par des fonctions similaires (alcool primaire et secondaire). Ils sont nombreux et résonnent sur une plage très étroite allant de 3 à 4,2 ppm pour les noyaux  $^1\text{H}$  et de 51 à 86 ppm pour les noyaux  $^{13}\text{C}$ , de nombreux chevauchements sont observés.

Les protons et carbones anomériques et les protons éthyléniques de la génine (les protons anomères osidiques sont sous la forme de doublets ou singulets élargis,) sont beaucoup moins nombreux et résonnent à plus bas champ sous l'influence de la liaison glycosidique (La glycosylation entraîne un déblindage de 5 à 10 ppm par rapport aux carbones dont les OH sont libres). On les trouve entre 4,3 et 5,9 ppm pour les noyaux  $^1\text{H}$  et 90 et 112 ppm pour les noyaux  $^{13}\text{C}$ .

Les déplacements chimiques des  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de la génine (les protons de la génine, en particulier les méthyles situés en jonction de cycle se présentant sous la forme de singulets fins ou de doublets.) sont facilement identifiables. La majorité se situe entre 1 et 2,5 ppm pour les  $^1\text{H}$  et entre 10 et 55 pour les  $^{13}\text{C}$ .

## **Les interactions noyaux-noyaux :**

**Les interactions indirectes ou couplages scalaires :** sont des interactions entre spins séparés par au plus trois liaison chimiques. Dans le cas d'interactions inter-protons, les couplages scalaires deviennent quasiment inobservables au-delà de trois liaisons. . Le couplage scalaire est mesuré par la constante de couplage scalaire J, on mesure généralement deux types de constantes de couplage : homonucléaires ( $^3\text{J}$ ) et hétéronucléaires ( $^1\text{J}$ ). il n'est pas possible de mesurer les couplages  $^{13}\text{C}-^{13}\text{C}$  à cause de l'abondance naturelle du noyau  $^{13}\text{C}$ . En revanche, les couplages  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$  ( $^1\text{J}$ ) à une liaison permettent de déterminer la configuration anomérique

du sucre. Les couplages  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  longue distance permettent de déterminer l'enchaînement des sucres.

### **Les interactions directes ou couplages dipolaires : effet Overhauser nucléaire**

Le couplage dipolaire est l'interaction directe qui s'exerce à travers l'espace entre deux particules qui possèdent un moment magnétique. L'expérience bidimensionnelle (2D) de NOESY, une des expériences fondamentale pour la détermination de la structure tridimensionnelle permet la mesure des effets nOe dans le cas des molécules complexes, elle permet de déceler les interactions dipolaires, à travers l'espace, entre les protons voisins.

### **Les expériences multidimensionnelles**

Ont permis d'accéder à la détermination de la structure de molécules de plus en plus importantes. Les spectres à deux dimensions (2D) donnent plus d'informations que les spectres classiques à une dimension et sont particulièrement utiles pour déterminer la structure d'une molécule, particulièrement celles qui sont trop complexes à étudier à l'aide de la spectroscopie 1D

#### **- COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ (Correlated spectroscopy)**

L'analyse de cette expérience permet, à partir de protons anomériques des sucres de connaître les déplacements chimiques des protons osidiques et de l'ordre de grandeur des constantes de couplages interprotoné. L'analyse du spectre COSY H-H, permet à partir des protons anomériques des sucres, de repérer les protons H-2 (corrélation H-1/H-2), H-3 (corrélation H-2/H-3) et ainsi de suite. Son analyse permet de connaître les déplacements chimiques des protons osidiques et l'ordre de grandeur des constantes de couplages et donc de déduire la nature de chaque unité osidique qui constitue la saponine.

#### **- TOCSY (Total Correlation Spectroscopy)**

Cette expérience permet de relier tous les protons couplés mutuellement dans un même système de spins. Elle permet aussi de s'assurer des corrélations des protons établies par COSY H-H. Cette recherche s'effectue à partir de groupements isolés et caractéristiques tels que les protons anomériques ou les méthyles des désoxyhexoses, ou les méthylènes des pentoses.

#### **- ROSEY (Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy)**

Cette expérience est utilisée pour déterminer l'enchaînement des sucres et leurs points de fixation sur la génine. Elle consiste aussi à déterminer la configuration spatiale de certains groupements par la mise en évidence des effets Overhauser entre protons proches dans l'espace. Les corrélations intra sucres permettent de confirmer la structure des unités osidiques (protons axiaux ou équatoriaux) et d'établir leur conformation.

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

Cette expérience permet d'établir les corrélations entre cycles et ainsi déterminer l'enchaînement des unités sucre. Elle est peu utilisable pour des polysaccharides complexes du fait des recouvrements empêchant de discerner les effets nOe intra-cycles des effets nOe inter-cycles. (utilisée pour les molécules de haut poids moléculaire tel que les protéines) (Gunther, 1996).

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

Cette expérience met en évidence les couplages directs  $^1J$  C-H entre carbone et proton liés. Elle permet, à partir du spectre proton, d'attribuer la majorité des carbones protonés de la saponine.

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

C'est une technique importante car elle permet de détecter les couplages hétéronucléaires à longue distance  $^2J$  C-H et  $^3J$  C-H à travers un hétéroatome ou un carbone quaternaire. Grâce à l'expérience HMBC, on peut attribuer pratiquement la totalité des carbones de la génine, ainsi que le séquençage des chaînes osidiques et les points de fixation de ces chaînes sur la génine. L'expérience HMBC est le seul moyen pour déterminer la fixation des chaînes osidiques sur des fonctions acides de la génine ou d'acide glucuronique, ou d'acides organiques.

## **II-5-2-2 Spectrométrie de masse**

La spectrométrie de masse (en anglais, mass spectrometry ou MS) est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Elle est utilisée dans pratiquement tous les domaines

scientifiques : physique, astrophysique, chimie en phase gazeuse, chimie organique, dosages, biologie, médecine...

#### **II-5-2-2-1 Principe de la SM FAB (ionisation par bombardement d'atomes rapides)**

Elle permet d'analyser des molécules non vaporisables sous vide (grosses molécules biologiques). L'ionisation est effectuée par expulsion en phase vapeur des ions contenus dans un échantillon liquide suite à un bombardement d'atomes rapides (Ar ou Xe). Les molécules ainsi ionisées n'ont pas beaucoup d'énergie interne, la fragmentation est donc faible mais l'ion moléculaire est facilement reconnaissable et la masse moléculaire est facile à déterminer. L'échantillon est mélangé en solution à une matrice liquide non volatile (glycérol, thioglycérine, alcool m-nitrobenzylique). Un faisceau à haute énergie (de l'ordre de 4 à 10 keV) d'atomes neutres (Ar ou Xe) est envoyé sur l'échantillon et la matrice dans la chambre de collision causant ainsi les phénomènes de désorption et d'ionisation. Les ions préexistants en solution sont expulsés en phase gazeuse et accélérés vers l'analyseur.

#### **II-5-2-2-2 Principe de la SM ESI (ionisation par électronébulisation (électrospray))**

Son principe est le suivant : à pression atmosphérique, les gouttelettes de solutés sont formées à l'extrémité d'une fine capillaire portée à un potentiel élevé. Le champ électrique intense leur confère une densité de charge importante. Sous l'effet de ce champ et grâce à l'assistance éventuelle d'un courant d'air coaxial, l'effluent liquide est transformé en nuage de fines gouttelettes (spray) chargées suivant le mode d'ionisation. Sous l'effet d'un second courant d'air chauffé, les gouttelettes s'évaporent progressivement. Leur densité de charge devenant trop importante, les gouttelettes explosent en libérant des microgouttelettes constituées de molécules protonées ou déprotonées de l'analyte, porteuses d'un nombre de charges variable. Les ions ainsi formés sont ensuite guidés à l'aide de potentiels électriques appliqués sur deux cônes d'échantillonnage successifs faisant office de barrières avec les parties en aval maintenues sous un vide poussé ( $<10^{-5}$  Torr). Durant ce parcours à pression élevée, les ions subissent de multiples collisions avec les molécules de gaz et de solvant, ce qui complète leur désolvatation. En faisant varier les potentiels électriques appliqués dans la source il est possible de provoquer des fragmentations plus ou moins importantes. L'avantage de cette méthode d'ionisation comme pour l'APCI est l'obtention d'ions multichargés, pour les macromolécules, polymères. Elle permet d'autre part de générer une ionisation "douce" : des ions moléculaires sont formés en majorité.

## **CHAPITRE III**

### **Extraction, isolement et élucidation structurale**

### III- 1 Matériel végétal

La plante *Gladiolus ségétum* a été récoltée à une quinzaine de kilomètres de la ville de Batna, au voisinage de la commune d'Ouyoun El Assafir (figure 2). L'identification a été effectuée par le Pr Dr Bachir Oudjehih, du département des Sciences Agronomique de l'Université de Batna ou un spécimen (183DAUB2004) a été déposé. Les parties aériennes (parties consommées par le bétail) séchées (à l'ombre) et broyées constituent la drogue à partir de laquelle nous avons isolé nos composés.



Figure 2 : Carte MAP de la Wilaya de Batna

### III- 2 Extraction et purification des deux saponines : saponine 1(composé 1) et saponine 2 (composé 2)

Les parties aériennes sont traitées selon le schéma classique d'extraction (Figure 3). La poudre est extraite par des solvants de polarité croissante, éther de pétrole, chloroforme et méthanol. Notre étude a été portée sur l'extrait méthanolique car il présente la plus grande cytotoxicité. Après filtration est concentration à sec, l'extrait est dissous dans un mélange de solvants  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  43 :37 :20. Ce mélange après filtration (filtre  $0.2\mu\text{m}$ ) est soumis en BPLC pour fractionnement, 115 fractions de 10ml chacune ont été recueillies et analysées par CCM. Toutes les fractions contenant les même composés sont rassemblés puis concentrés. Cinq fractions ont été obtenues. Les fractions Fr-3 (26-40) et Fr-4 (41-80) contenant respectivement saponine 1 et saponine 2 sont concentrées puis soumises en HPLC pour purification.

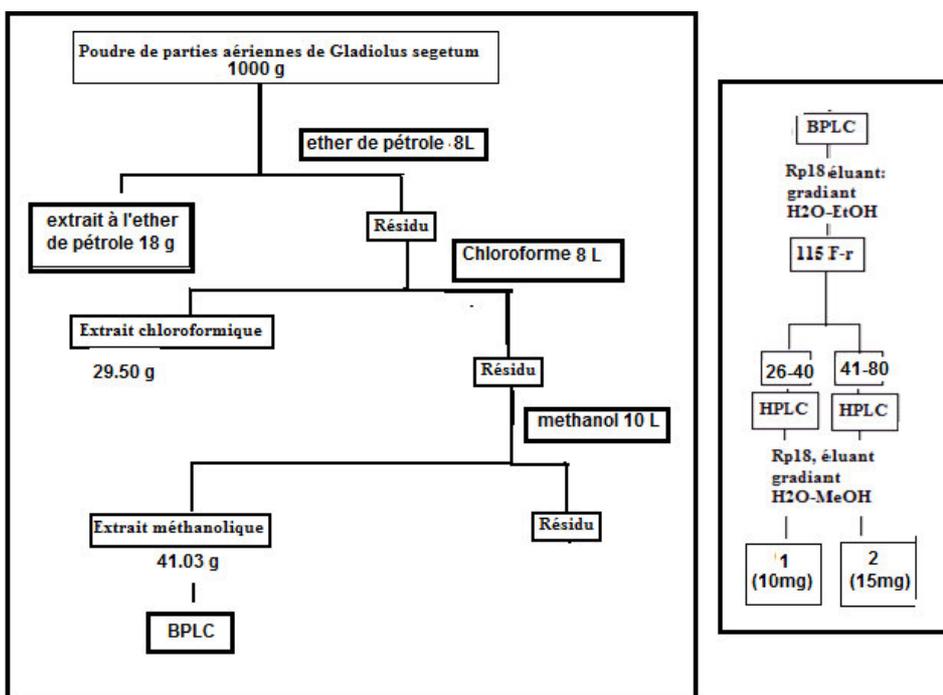
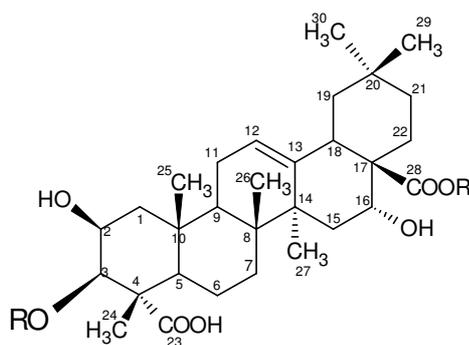


Figure 3 : Schéma d'extraction des saponines 1 et 2 (C1 et C2)

### III- 3 Elucidation structurale de saponine1 (composé 1) et saponine 2 (composé 2).

#### III- 3-1 Identification de la génine



L'hydrolyse acide de ces deux saponines a donné la même génine identifiée sur CCM dans le système de solvant (2) [HCCl3 / MeOH (9 : 1)]

L'analyse des spectres de RMN : RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , HMBC et HSQC-TOCSY nous a permis d'attribuer les signaux de la génine en comparaison avec ceux de la littérature (El-Shannawany, 2009), (Besson, 1989), (Bock, 1983).

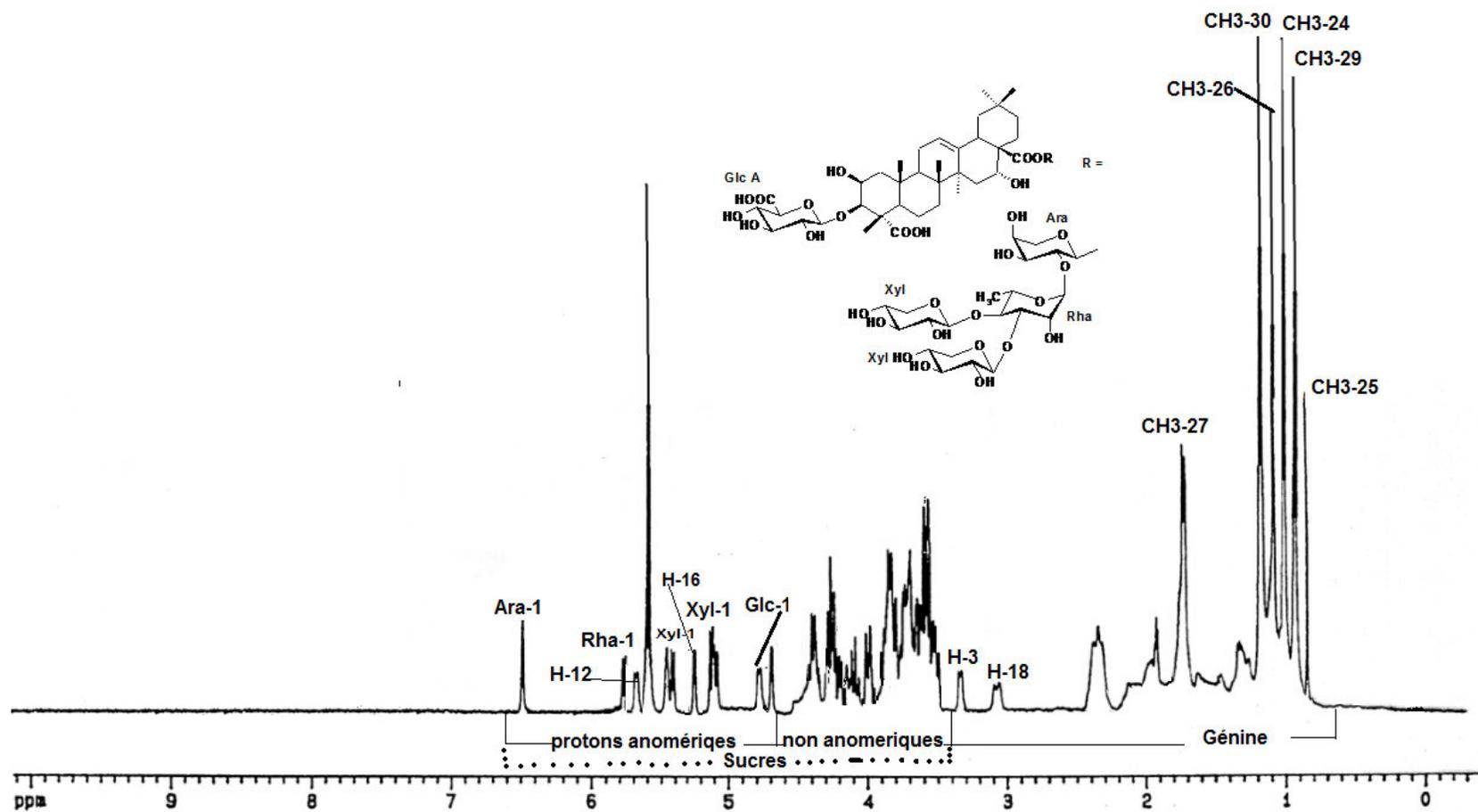


Figure 4 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 1(saponine 1) ( $\text{DMSO } d_6$ , 600 MHz)

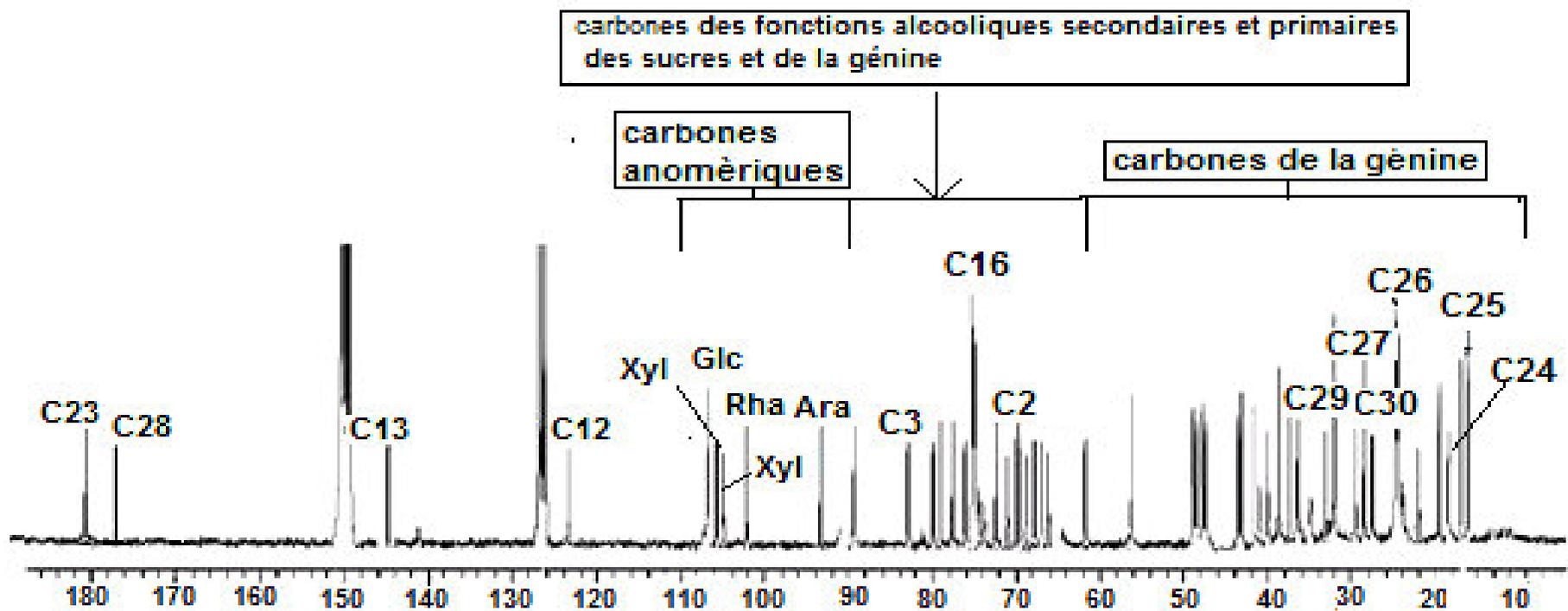


Figure 5 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé 1 (saponine1) (DMSO  $d_6$ , 125 MHz).

### **Spectre de RMN $^1\text{H}$ :**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (figure 4) de saponine1, enregistré dans du DMSO  $d_6$  à 600 MHz, nous permet d'observer 6 signaux singulets entre 0,84 et 1,75 ppm correspondant à 6 méthyles tertiaires et un signal d'un proton oléfinique résonnant à 5,65 ppm correspondant au proton H-12 indiquant la présence d'une saponine triterpénique.

### **Spectre RMN $^{13}\text{C}$ :**

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (figure 5) enregistré dans du DMSO  $d_6$  à 125 MHz confirme la présence d'un triterpène, nous permet de distinguer 6 signaux méthyliques et deux signaux apparaissant à 123.0 et 145.0 ppm correspondant aux déplacements des carbones éthyléniques de la double liaison  $\Delta$  12, 13. Par comparaison à l'acide médicagénique, nous constatons en plus des signaux des deux fonctions acides apparaissant à 181.0 (C-23) et à 177.0 (C-28) et le signal de la fonction CHOH (C-2) à  $\delta$  70.0 ppm, nous distinguons un signal apparaissant à  $\delta$  74.5 ppm correspondant à une fonction hydroxyle au niveau du C-16. Ceci est vérifié par le déplacement du C-15 à  $\delta$  37.0 ppm au lieu de 28.1 ppm (génine libre) et à la corrélation C16/H16 (74.5 ppm/5.25 ppm) observée dans le spectre HSQC-TOCSY.

Le signal du carbonyle C-28 apparaissant à 177.0 ppm au lieu de 180.1 ppm dans l'acide médicagénique est déplacé vers les champs forts, indique une substitution à ce niveau par des sucres (liaison ester). Le signal du carbone C-3 apparaissant à 89.9 ppm au lieu de 85.9 ppm (génine libre) indique aussi la substitution à ce niveau par des sucres (liaison glycosidique). A partir de ces deux déplacements on peut conclure que cette saponine est bidesmodique (El-Shannawany, 2009), (Bock, 1983), (Besson, 1989).

### **Spectre HMBC :**

A partir du spectre HMBC (figure 6), on peut attribuer la totalité des carbones de la génine grâce au couplage hétéronucléaires à longue distance à partir des protons des méthyles de la génine. On peut observer les corrélations suivantes :

CH3-25 ( $\delta$  0,84)  $\rightarrow$  C-4 ( $\delta$  40,9), C-5 ( $\delta$  56,0), C-9 ( $\delta$  47,0), C-10 ( $\delta$  38,0)

CH3-29 ( $\delta$  0,98)  $\rightarrow$  C-19 ( $\delta$  47,9), C-21 ( $\delta$  36,1), C-22 ( $\delta$  31,7), C-30 ( $\delta$  27,5).

CH3-24 ( $\delta$  1,00)  $\rightarrow$  C-3 ( $\delta$  89,9), C-4 ( $\delta$  40,9), C-5 ( $\delta$  56,0).

CH3-26 ( $\delta$  1,05)  $\rightarrow$  C-7 ( $\delta$  33,0), C-8 ( $\delta$  41,0), C-9 ( $\delta$  47,5), C-14 ( $\delta$  4,9).

CH3-30 ( $\delta$  1,15)  $\rightarrow$  C-21 ( $\delta$  36,1), C-19 ( $\delta$  47,9), C-29 ( $\delta$  34,5)

CH3-27 ( $\delta$  1,75)  $\rightarrow$  C-8 ( $\delta$  41,0), C-14 ( $\delta$  42,9), C-15 ( $\delta$  37,0)

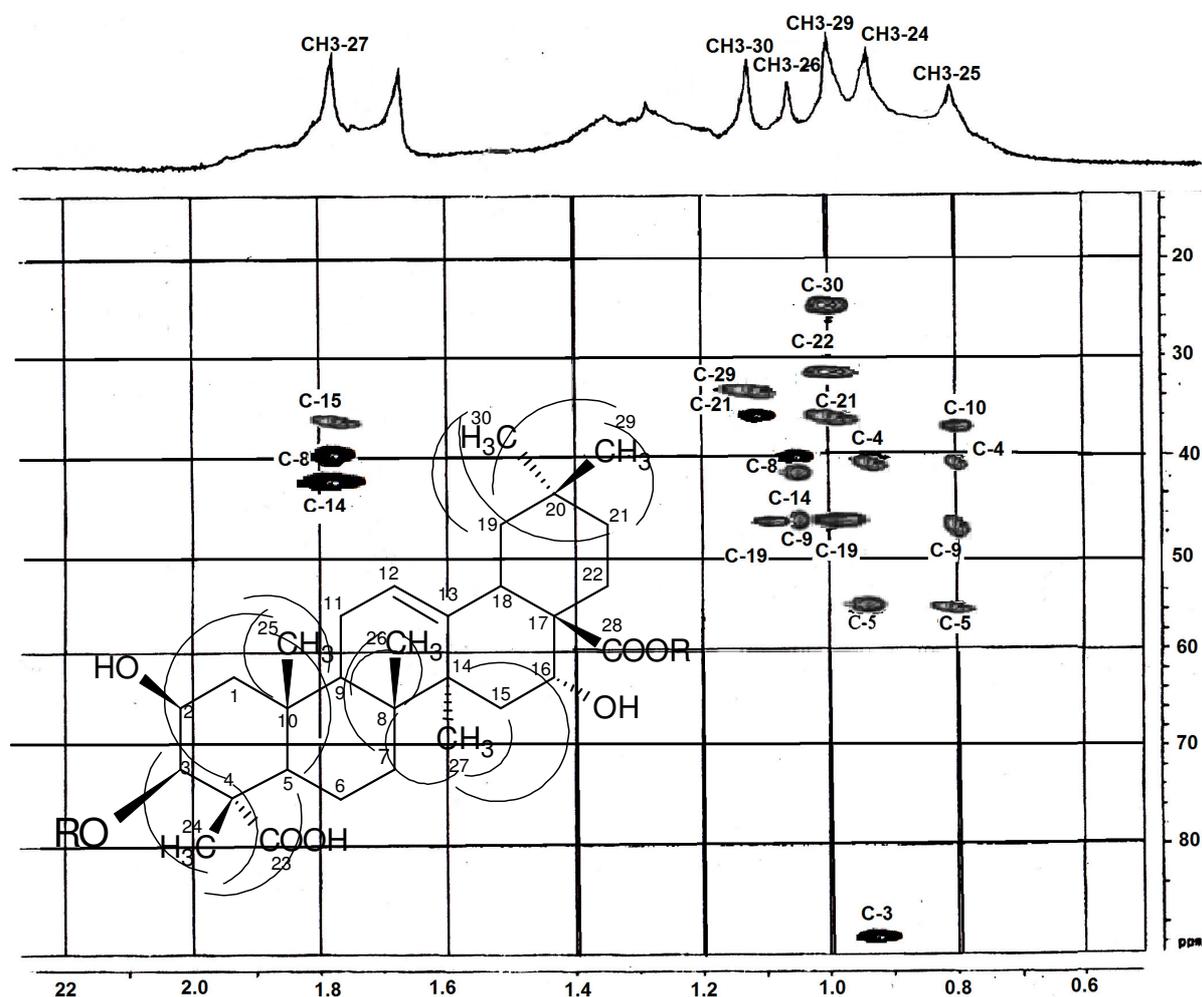


Figure 6 : Spectre HMBC de la partie aglycone (DMSO  $d_6$ )

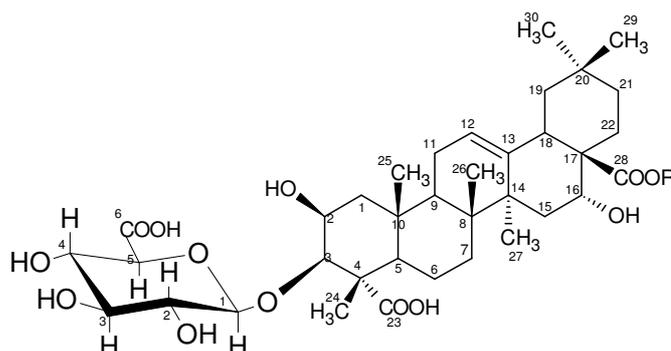
### III- 3- 2 Elucidation structurale des chaines osidiques

#### Identification du sucre en position 3 :

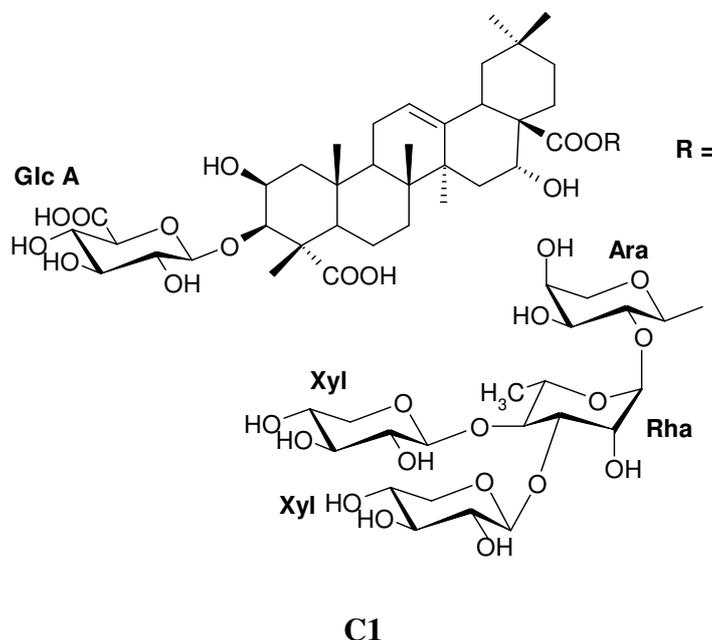
- L'expérience HSQC-TOCSY (Figure 8) permet de caractériser les protons anomériques. Nous distinguons une corrélation entre un proton anomérique résonant à  $\delta$  4,78 ppm ( $J=7,5$ ), avec un carbone anomérique à 107.0 ppm. L'interprétation de cette tache de corrélations nous oriente vers une unité osidique courante au sein des saponines le  $\beta$ - D- glucuronopyranoïque. (Bock, 1983), (Besson, 1989).

- Nous observons sur le spectre ROESY (Figure 9) une tache de corrélation entre le proton anomérique  $\delta_{H-1}$  4,78 ppm (d, J= 7,5 Hz) correspondant à ce sucre et  $\delta_{H-3}$  3,30 ppm de la génine.

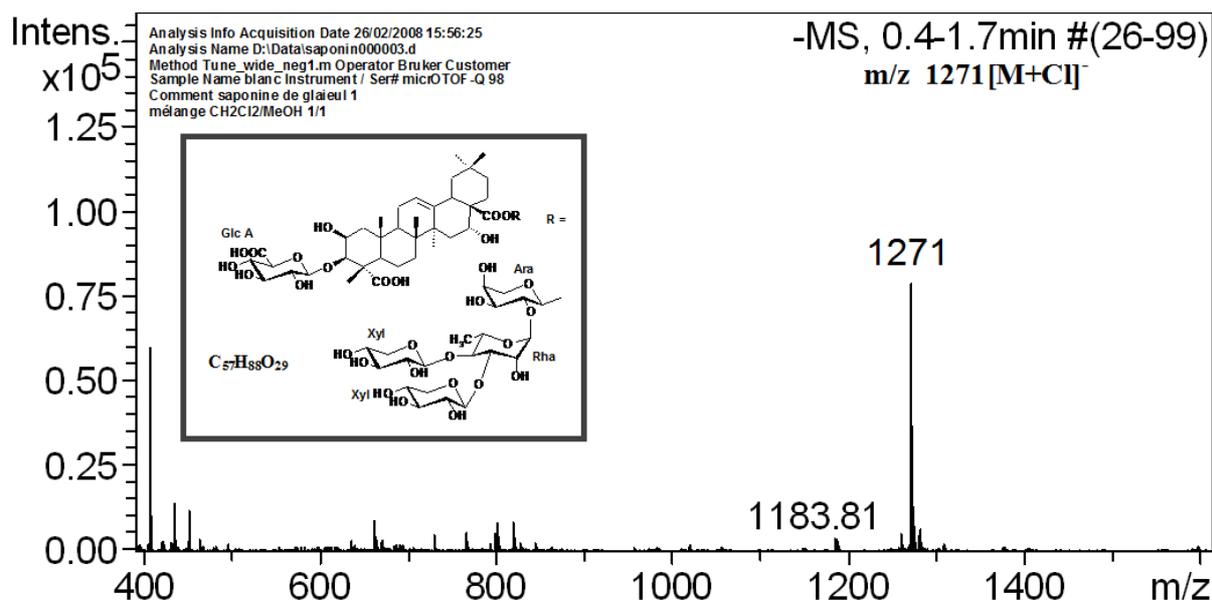
En conclusion ces résultats nous ont permis d'établir la structure de la prosapogénine suivante, commune aux composés 1 et 2. Il nous reste à déterminer la chaîne des sucres en position 28 pour chaque saponine.



### III- 3- 3 Identification du composé 1 (C1)



Sur le spectre HR-ESIMS (figure 7) enregistré en mode positif, est repéré un pic d'ion pseudo moléculaire à  $m/z$  (1259  $[M+Na]^+$ , et en mode négatif un pic d'ion pseudo moléculaire à  $m/z$  1271  $[M+Cl]^-$  correspondant à une masse moléculaire de 1236 et à la formule brute  $C_{57}H_{88}O_{29}$ .



**Figure 7 : Spectre de masse ESI en mode négatif du composé 1**

**Caractérisation des sucres :** L'hydrolyse acide du composé 1 a permis de déterminer la nature des sucres liés à la génine, qui sont l'acide glucuronique, le xylose, le rhamnose et l'arabinose identifiés par CCM en comparaison avec des témoins. L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 1 indique la présence de cinq unités osidiques par des signaux de protons anomériques résonnant à :  $\delta$ 6, 48 (s), 5,75 (s), 5,45 (d,  $j=7,4$  Hz), 5,10 (d,  $J= 7,6$  Hz) et 4,78 (d,  $J= 7,5\text{Hz}$ ). L'identification de ces cinq unités osidiques a été confirmée par des corrélations observées sur le spectre HSQC-TOCSY (Figure 8) avec cinq carbones anomériques à  $\delta$  94,5, 102,0, 106,0, 106,7 et 107,0 ppm respectivement. Cette expérience met en évidence les couplages directs  $^1\text{J}$  C-H entre carbone et proton liés. Elle nous permet d'identifier la nature des sucres à partir des protons anomériques. Nous distinguons dans la zone des sucres, trois signaux de protons anomériques sous forme de doublets, 5,45 (d,  $j=7,4$  Hz), 5,10 (d,  $J= 7,6$  Hz) et 4,78 (d,  $J= 7,5\text{Hz}$ ) ; dont les constantes de couplages  $J^{1,2}$  sont supérieures à 7 Hz ce qui indique que les protons anomeres sont axiaux donc de configuration  $\beta$  (Bock, 1983). Nous distinguons deux autres signaux sous formes de singulet résonnant à :  $\delta$ 6, 48 (s), 5,75 (s) ppm, prouvent que ces protons sont équatoriaux donc de configuration  $\alpha$ . Donc à partir de l'analyse du spectre HSQC-TOCSY et de la littérature, on peut identifier ces sucres à : un  $\beta$ -D-glucopyranose terminal à 4,78 ppm (d,  $J= 7,5\text{Hz}$ ), deux  $\beta$ -D-xylose à 5,45 ppm (d,  $j=7,4$  Hz), 5,10 ppm (d,  $J= 7,6$  Hz), un  $\alpha$ -L-arabinose à  $\delta$ 6, 48 ppm et un  $\alpha$ -L-rhamnose à 5,75 ppm.

## Attributions des protons

L'interprétation des taches de corrélation observées sur le spectre ROSEY (figure 10) à partir de chaque proton anomère, permettent de repérer les protons de chaque sucre. Considérons le cas du xylose, dont le proton anomère résonne à 5.45 ppm. À partir de ce signal on peut distinguer une tache à 3.36 ppm représentant la corrélation entre cet anomère et le proton H-5, même chose pour le proton H-2 résonnant à 3.95 ppm, le proton H-3 résonnant à 4.40 ppm et le proton H-4 résonnant à 4.04 ppm.

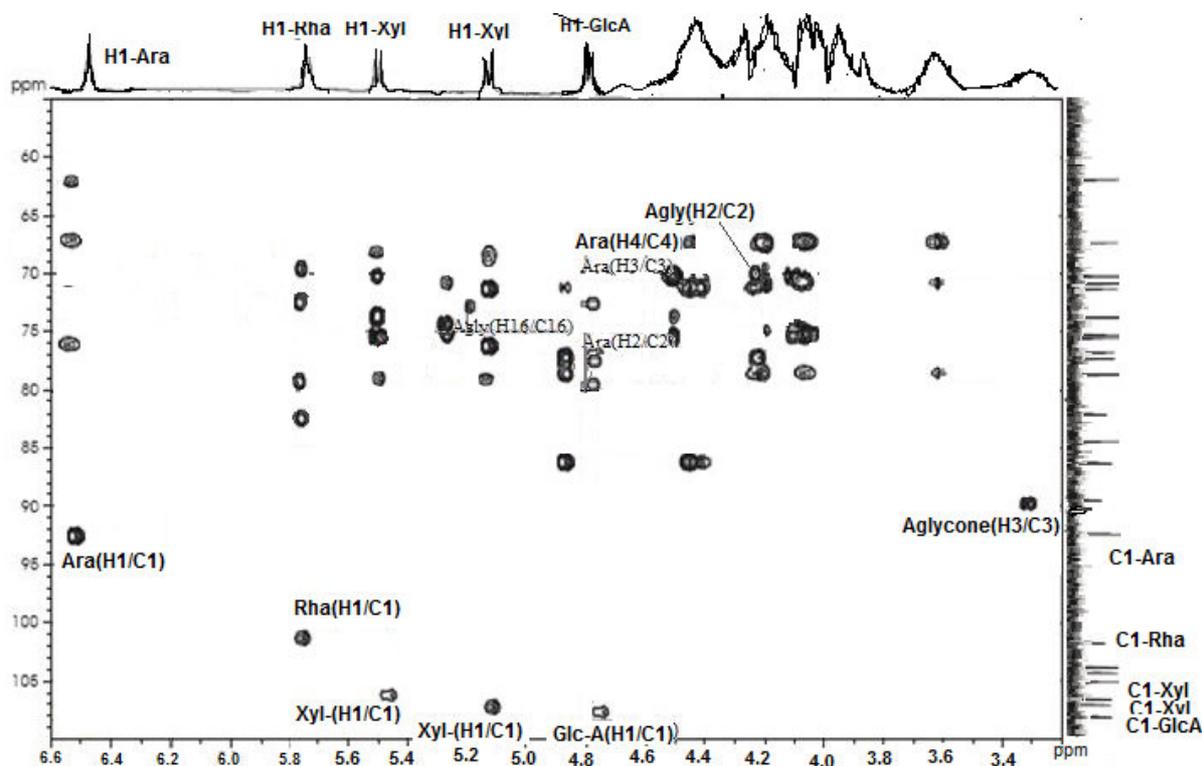


Figure 8 : HSQC-TOCSY partie osidique du composé 1(DMSO  $d_6$ )

**Séquençage des sucres** : l'expérience HMBC est une technique qui sert à déterminer le séquençage des chaînes osidiques et le point de fixation de ces chaînes sur la génine. A partir de l'analyse du spectre HMBC (Figure 9) nous observons les corrélations suivantes

$\delta_{H-1}$  6.48 ppm (Arabinose) et  $\delta_{C-28}$  177.0 ppm (génine),

$\delta_{H-1}$  5.75 ppm (Rhamnose) et  $\delta_{C-2}$  76.0 ppm (Arabinose),

$\delta_{H-1}$  5.10 ppm (Xylose) et  $\delta_{C-3}$  82.3 ppm (Rhamnose),

$\delta_{H-1}$  5.45 ppm (Xylose) et  $\delta_{C-4}$  79.0 ppm (Rhamnose)

Ces corrélations sont vérifiées à partir du spectre ROSEY (Figure 10) utilisé pour déterminer l'enchaînement des sucres et leurs points de fixation sur la génine. Nous observons les corrélations suivantes :

Entre  $\delta_{H-1}$  5.10 ppm (Xylose) et  $\delta_{H-3}$  4.48 pm (Rhamnose),

Entre  $\delta_{H-1}$  5.45 ppm (Xylose) et  $\delta_{H-4}$  4.12 ppm (Rhamnose),

Entre  $\delta_{H-1}$  5.75 ppm (Rhamnose) et  $\delta_{H-2}$  4.50 ppm (Arabinose).

Ces résultats nous ont permis d'établir le séquençage suivant : 28-O-  $\beta$ -xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\beta$  - xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranoside.

A partir de nos résultats et de données de la littérature [38-40] nous avons attribuer à la saponine 1, isolée pour la première fois , la structure suivante : 2  $\beta$ , 16 $\alpha$ , Dihydroxy-3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl-olean-12-ene-23-oic-28-O-  $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\beta$  -D-xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranoside

Ou bien

16 $\alpha$  hydroxy, 3-O- $\beta$  -D-glucuronopyranosyl acid medicagenic -28-O-  $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\beta$  -D- xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranoside

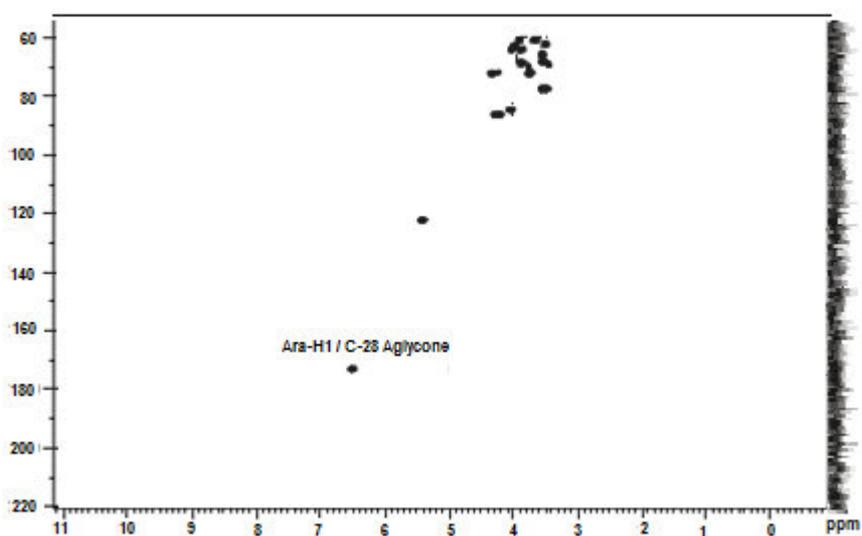
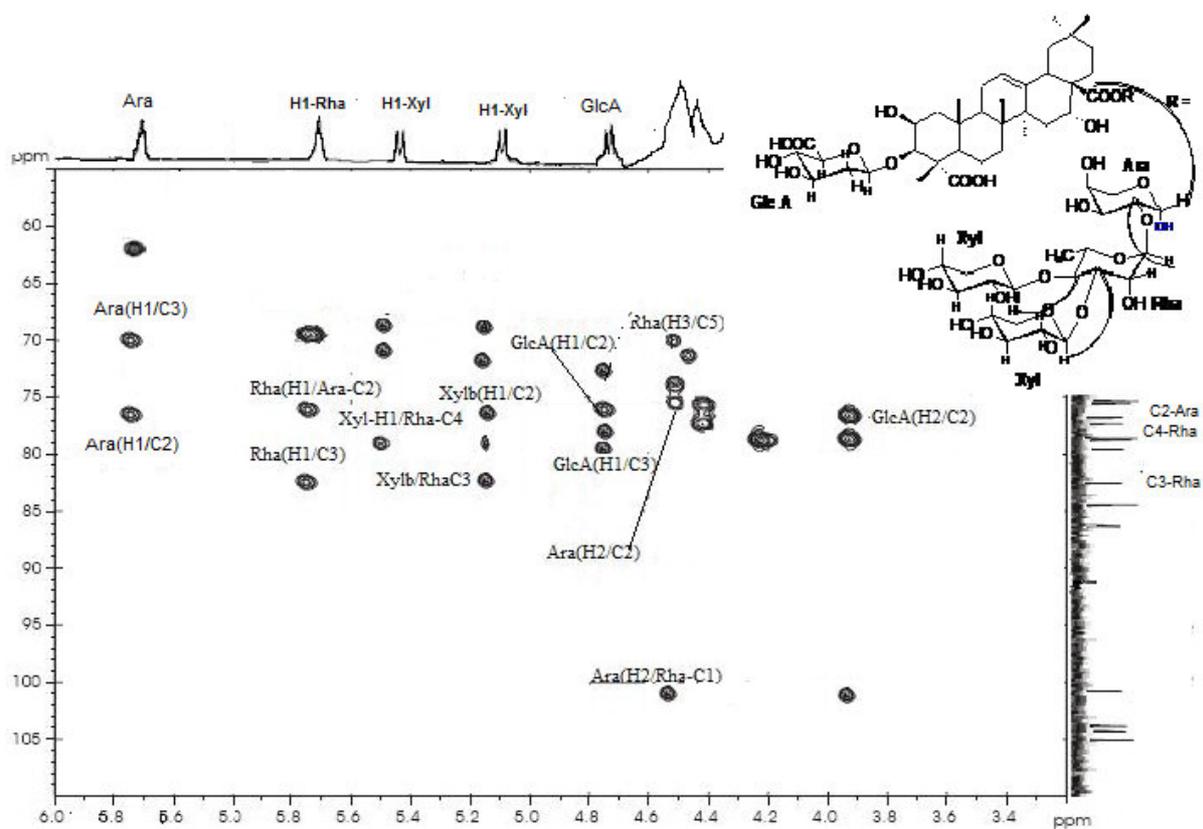


Figure 9 : Spectre HMBC de la partie osidique du composé 1(DMSO d<sub>6</sub>)

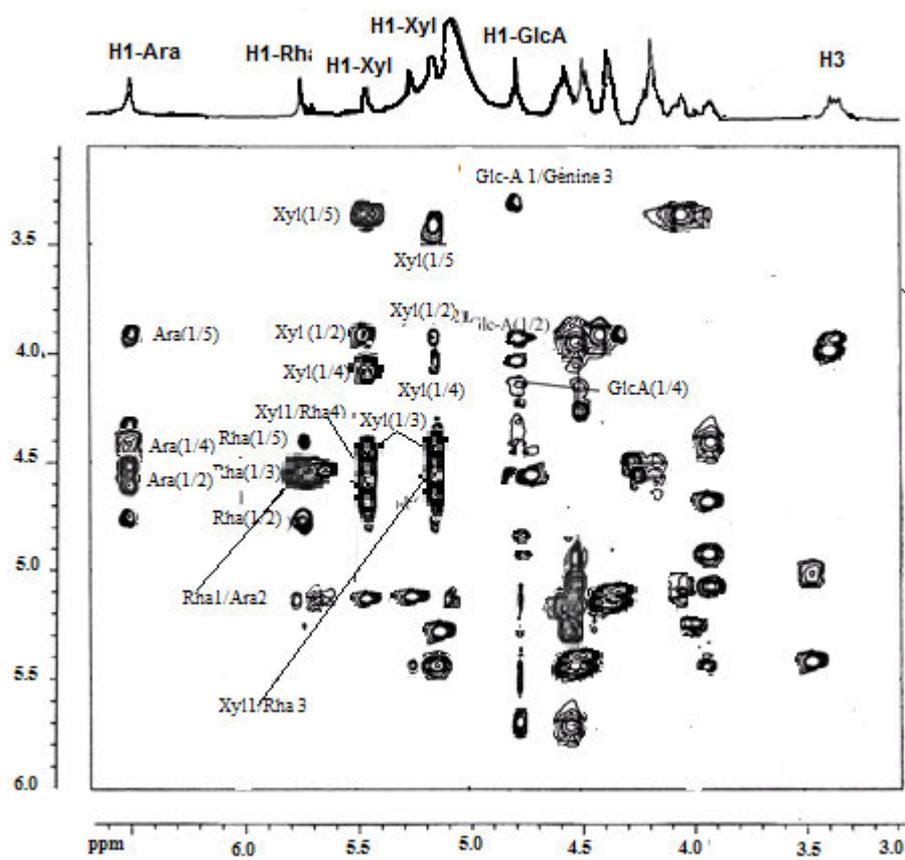


Figure 10 : Spectre ROESY de la partie osidique du composé 1 (DMSO  $d_6$ )

**Tableau 2 : Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H (DMSO d<sub>6</sub>, 600MHz), et <sup>13</sup>C (DMSO d<sub>6</sub>, 125 MHz) du composé 1 (δ ppm).**

Position	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J Hz)	Position	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J Hz)
Aglycone			Sucres		
1	40.2	-	Glc-A1 (C-3)	<u>107.0</u>	<u>4.78</u> (d 7.5)
2	70.0	4.42 (m)	2	76.0	3.93 (m)
3	<u>89.9</u>	3.30 (d, 3.7)	3	79.8	4.10 (m)
4	40.9	.	4	72.5	4.20 (t, 9.3)
5	56.0	0.80 (m)	5	77.0	4.30 (d, 9.4)
6	18.5	-	6	170.0	-
7	33.0	-	Sucres(C-28)		
8	41.0	-	Ara-1	<u>94.5</u>	<u>6.48</u> (sl)
9	47.0	1.40 (m)	2	<u>76.0</u>	<u>4.50</u> (dd, 9.1, 7.4)
10	38.0	-	3	70.0	4.35 (dd, 9.0, 3.3)
11	24.7	-	4	67.0	4.45 (m)
12	123.0	5.65 (m)	5	62.0	3.90 (m)
13	145.0	-			4.50 (m)
14	42.9	-	Rha-1	<u>102.0</u>	<u>5.75</u> (s)
15	37.0	-	2	71.5	4.65 (m)
16	74.5	5.25 (m)	3	<u>82.3</u>	4.51 (m)
17	50.4	-	4	<u>79.0</u>	4.60 (t, 9.2)
18	42.1	2.83 (d, 4.2)	5	<u>69.0</u>	4.45 (m)
19	47.9	-	6	19.0	1.70 (d 6.0)
20	30.8	-	Xyl-1	<u>106.0</u>	5.45 (d 7.4)
21	36.1	-	2	76.1	3.95 (dd, 9.0, 8.3)
22	31.7	-	3	79.0	4.40 (t, 9.0)
23	181.0	-	4	71.6	4.04 (m)
24	17.9	1.00 (s)	5	67.8	3.36 (m)
25	16.5	0.84 (s)			4.10 (m)
26	18.5	1.05 (s)	Xyl-1	106.7	5.10 (d 7.6)
27	28.1	1.75 (s)	2	76.0	3.91 (t, 8.5)
28	<u>177.0</u>		3	79.0	4.40 (m)
29	34.5	0.98 (s)	4	72.0	4.10 (m)
30	25.7	1.15 (s)	5	68.0	3.40 (t, 10.9)
					4.05 (m)

### III- 3-5 Identification du composé 2 (C2)

Sur le spectre HR ESIMS enregistré en mode positif, est repéré un ion pseudomoléculaire à  $m/z$  1127  $[M+Na]^+$ , et en mode négatif un ion pseudo moléculaire à  $m/z$  1139 $[M+Cl]^-$  correspondant à une masse moléculaire de 1104 et à la formule brute  $C_{52}H_{80}O_{25}$

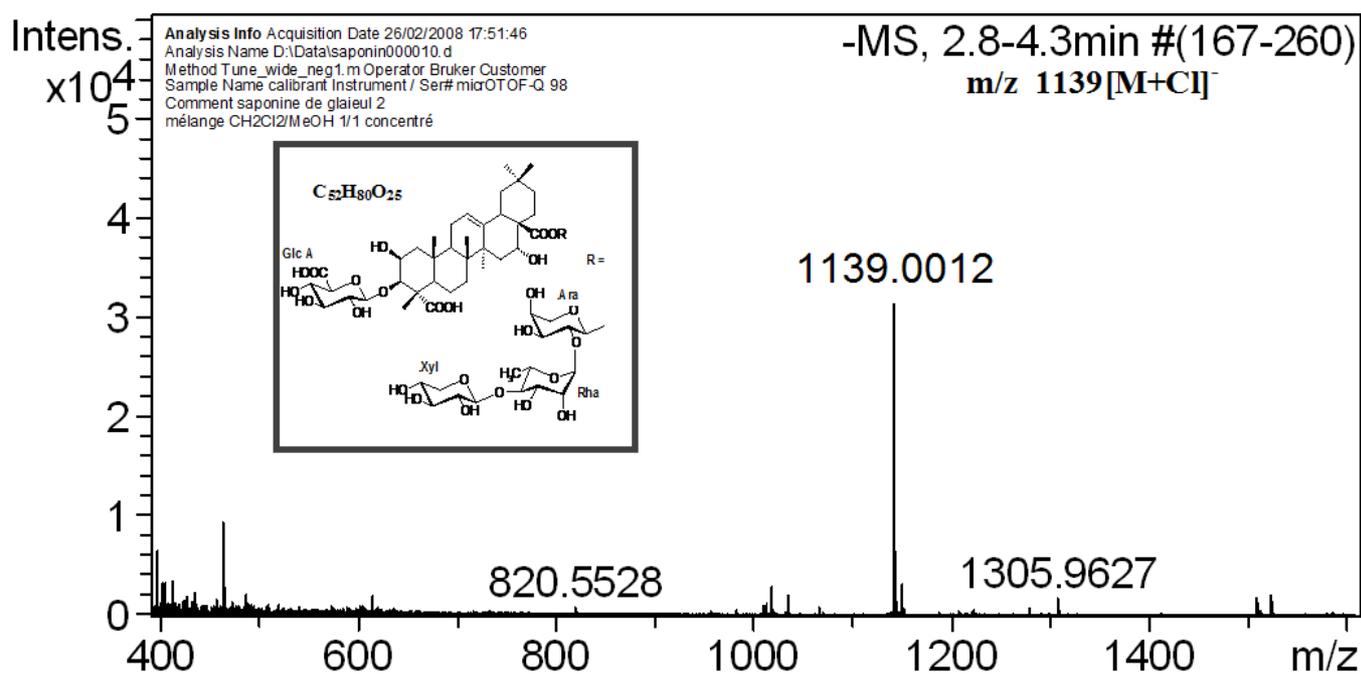


Figure 11 : Spectre de masse ESI en mode négatif du composé 2 (DMSO  $d_6$ )

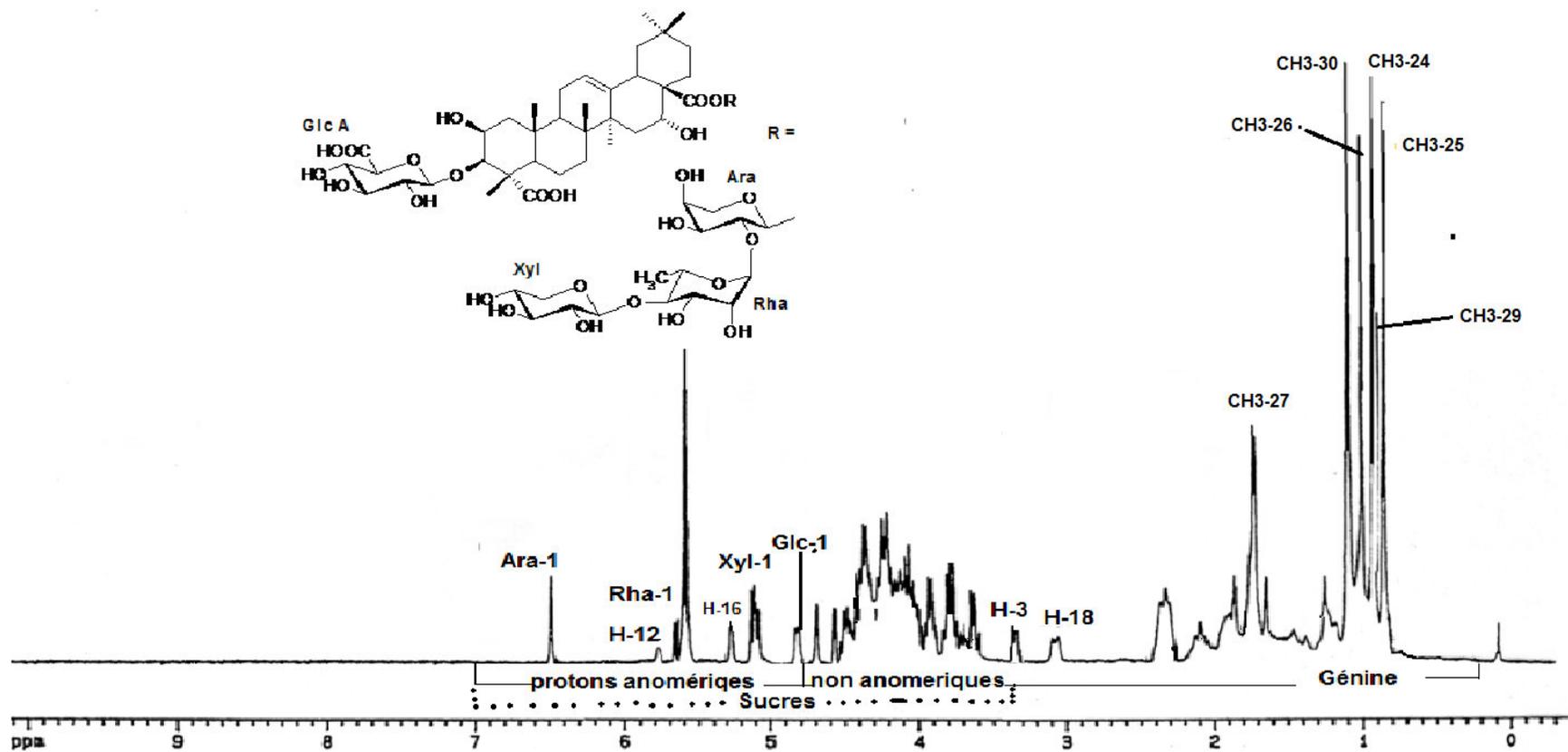


Figure 12 : Spectre RMN <sup>1</sup>H (saponine 2) du composé 2 (DMSO d<sub>6</sub>, 600MHz), (δ ppm).

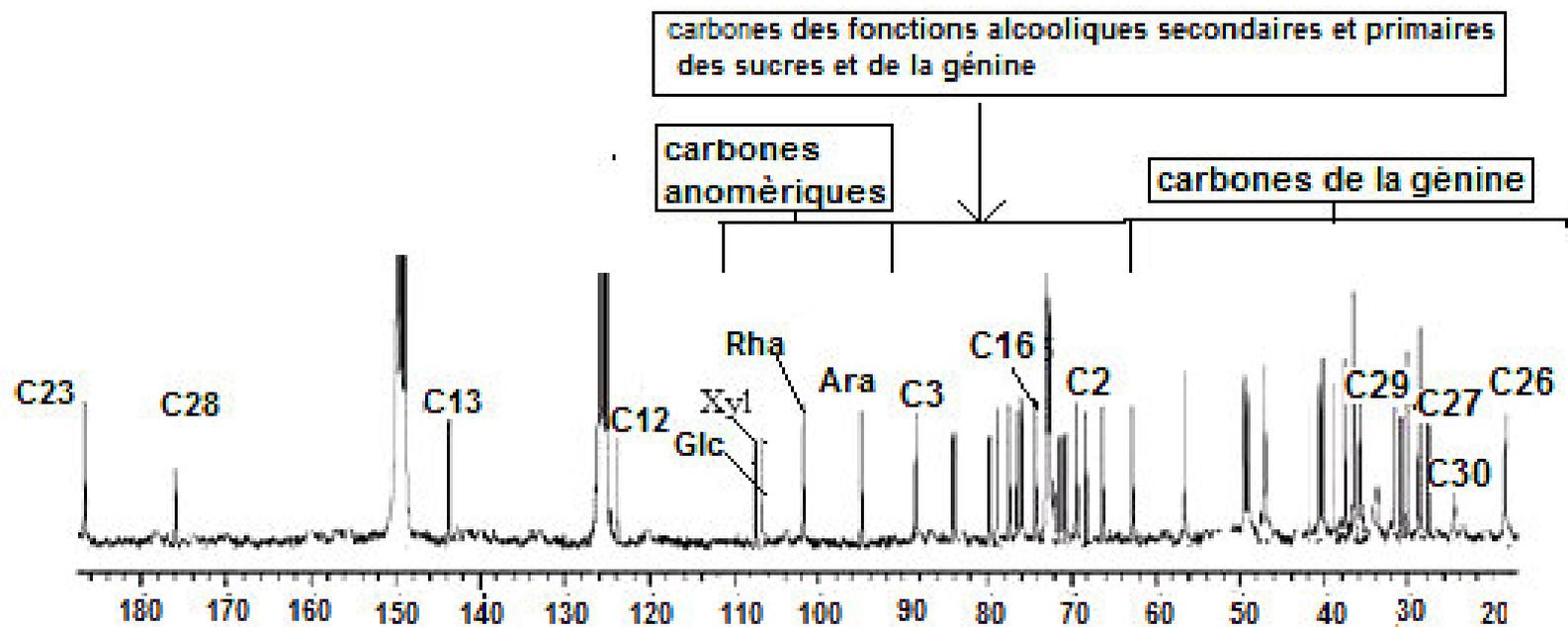


Figure 13 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (saponine 2) composé 2 ( $\text{DMSO } d_6$ , 125 MHz), ( $\delta$  ppm).

**Nature des sucres :** L'hydrolyse acide du composé 2 libère l'acide glucuronique, du xylose, du rhamnose, et l'arabinose, identifiés par CCM en comparaison avec des témoins. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé 2 (figure 12) enregistré dans  $\text{DMSO } d_6$  à 600MHz présente 4 protons anomériques résonnant chacun à :  $\delta$ 6,48 (s), 5,65 (s), 5,12 (d,  $j=7,4$  Hz), et 4,81 (d,  $J=7,5\text{Hz}$ ) et donnant des corrélations observées dans le spectre HSQC-TOCSY (Figure. 14) avec quatre carbones anomériques à  $\delta$  95,8, 102,0, 107,7 et 107,4 ppm respectivement. Cette expérience met en évidence les couplages directs  $^1J$  C-H entre carbone et proton liés. Elle nous permet d'identifier la nature des sucres à partir des protons anomériques. Nous distinguons dans la zone des sucres, deux signaux de protons anomériques sous forme de doublets, 5,12 (d,  $J=7,5$  Hz) et 4.81 (d,  $J=7,5\text{Hz}$ ) ; dont les constantes de couplages  $J^{1,2}$  sont supérieures à 7 Hz, ce qui indique que les protons anomies sont axiaux donc de configuration  $\beta$ . Nous distinguons deux autres signaux sous formes de singulet résonnant à :  $\delta$ 6, 48 (s), 5,65 (s) ppm, prouvent que ces protons sont équatoriaux donc de configuration  $\alpha$ . Donc à partir de l'analyse du spectre HSQC-TOCSY et de la littérature, on peut identifier ces sucres à : un  $\beta$  glucuropyranose à 4.81 ppm (d,  $J=7,5\text{Hz}$ ), un  $\beta$  xylose à 5,12 ppm (d,  $J=7,5$  Hz), un  $\alpha$  arabinose à  $\delta$ 6, 48 ppm (s) et un  $\alpha$  rhamnose à 5,65 ppm (s) (Bock, 1983), (Besson1989).

#### **Attributions des protons et des carbones.**

L'interprétation des taches de corrélation observées sur le spectre ROSEY (figure15) à partir de chaque anomère, permettent de repérer les protons de chaque sucre. Considérons le cas du xylose (a) dont l'anomère résonne à 5,25 ppm, à partir de ce signal on peut distinguer une tache à 3,42 ppm représentant la corrélation entre cet anomère et le proton H-5, même chose pour le proton H-2 résonnant à 4,02ppm, le proton H-3 résonnant à 4,08 ppm et le proton H-4 résonnant à 4,15 ppm. L'expérience HSQC-TOCSY (figure13) permet d'attribuer les signaux des carbones anomériques à partir de chaque proton anomère. Les déplacements des différents protons et carbone sont portés dans le tableau 3.

**Séquençage des sucres :** l'expérience HMBC est une technique qui sert à déterminer le séquençage des chaines osidiques et le point de fixation de ces chaines sur la génine.à partir de l'analyse du spectre HMBC (Figure 14) nous observons les corrélations suivantes

$\delta_{\text{H-1}}$  6, 48 (Arabinose) et  $\delta_{\text{C-28}}$  176, 0 (génine),

$\delta_{\text{H-1}}$  5, 65 (Rhamnose) et  $\delta_{\text{C-2}}$  76, 0 (Arabinose),

$\delta_{H-1}$  5, 12 (Xylose) et  $\delta_{C-4}$  84, 5 (Rhamnose),

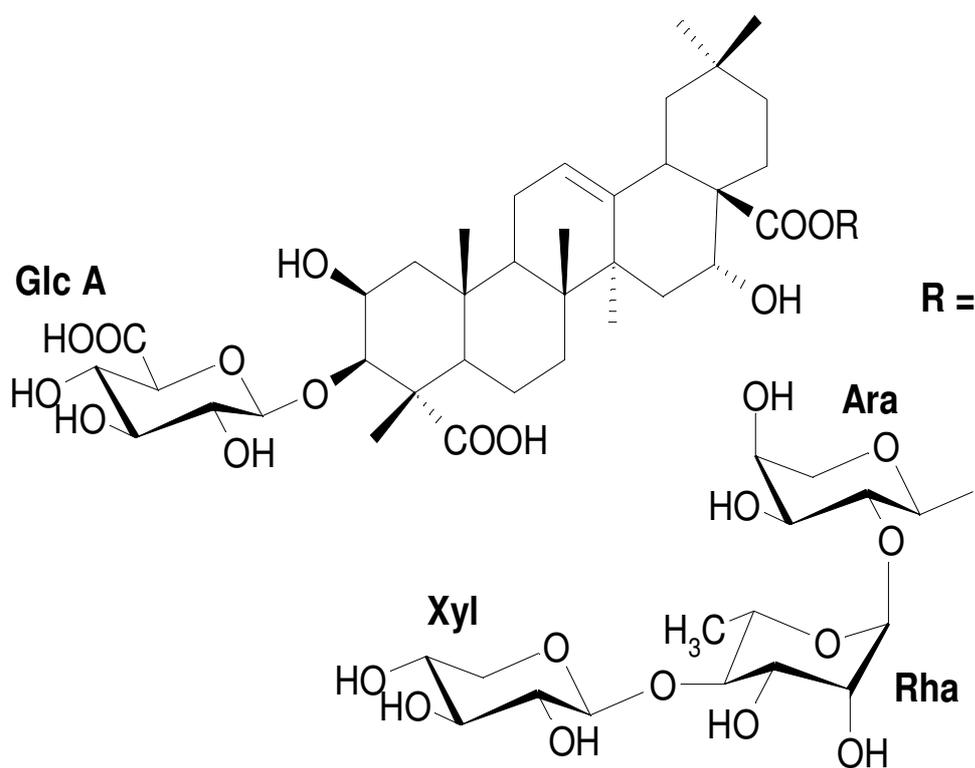
Ces corrélations sont vérifiées à partir du spectre ROSEY (Figure 15) utilisé pour déterminer l'enchaînement des sucres et leurs points de fixation sur la génine. Nous observons les corrélations suivantes :

Entre  $\delta_{H-1}$  5,12 (Xylose) et  $\delta_{H-4}$  4,32 (Rhamnose),

Entre  $\delta_{H-1}$  5,65 (Rhamnose) et  $\delta_{H-2}$  4,55 (Arabinose).

A partir de nos résultats et de données de la littérature (Bock, 1983), (Besson1989), (Gaidi, 2000), nous avons attribué à saponine 2, isolée pour la première fois, la structure suivante :

16 $\alpha$  hydroxy, 3-O- $\beta$  -D-glucuronopyranosyl acide medicagenique -28-O-  $\beta$ -D-xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4) -  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranoside



C2

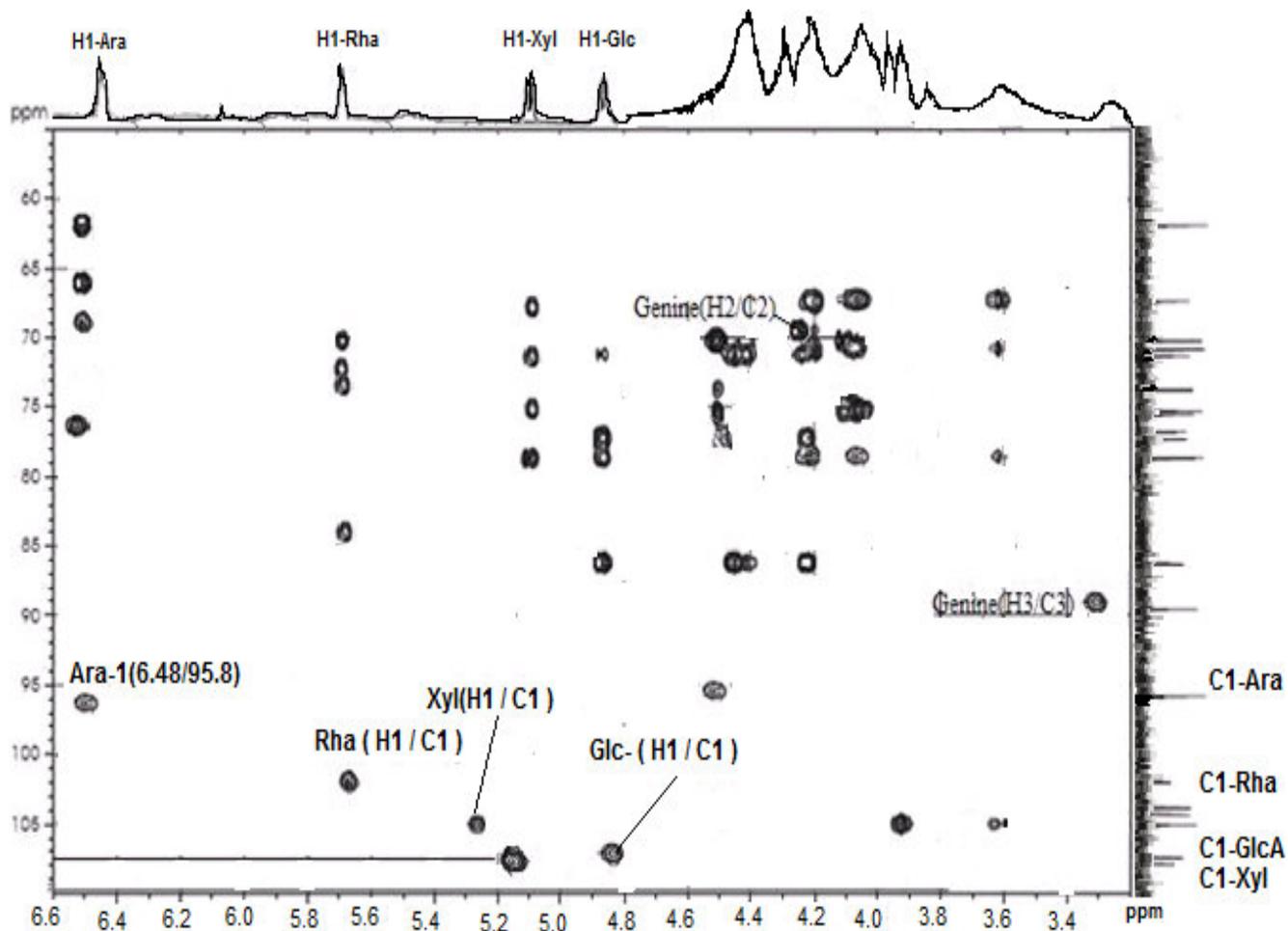


Figure 14 : Spectre HSQC-TOCSY partie osidique du composé 2 (DMSO  $d_6$ )

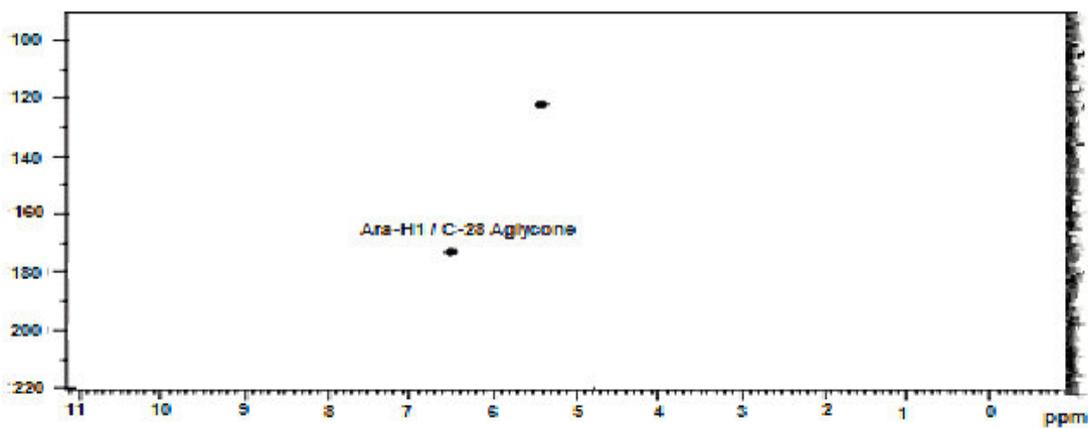
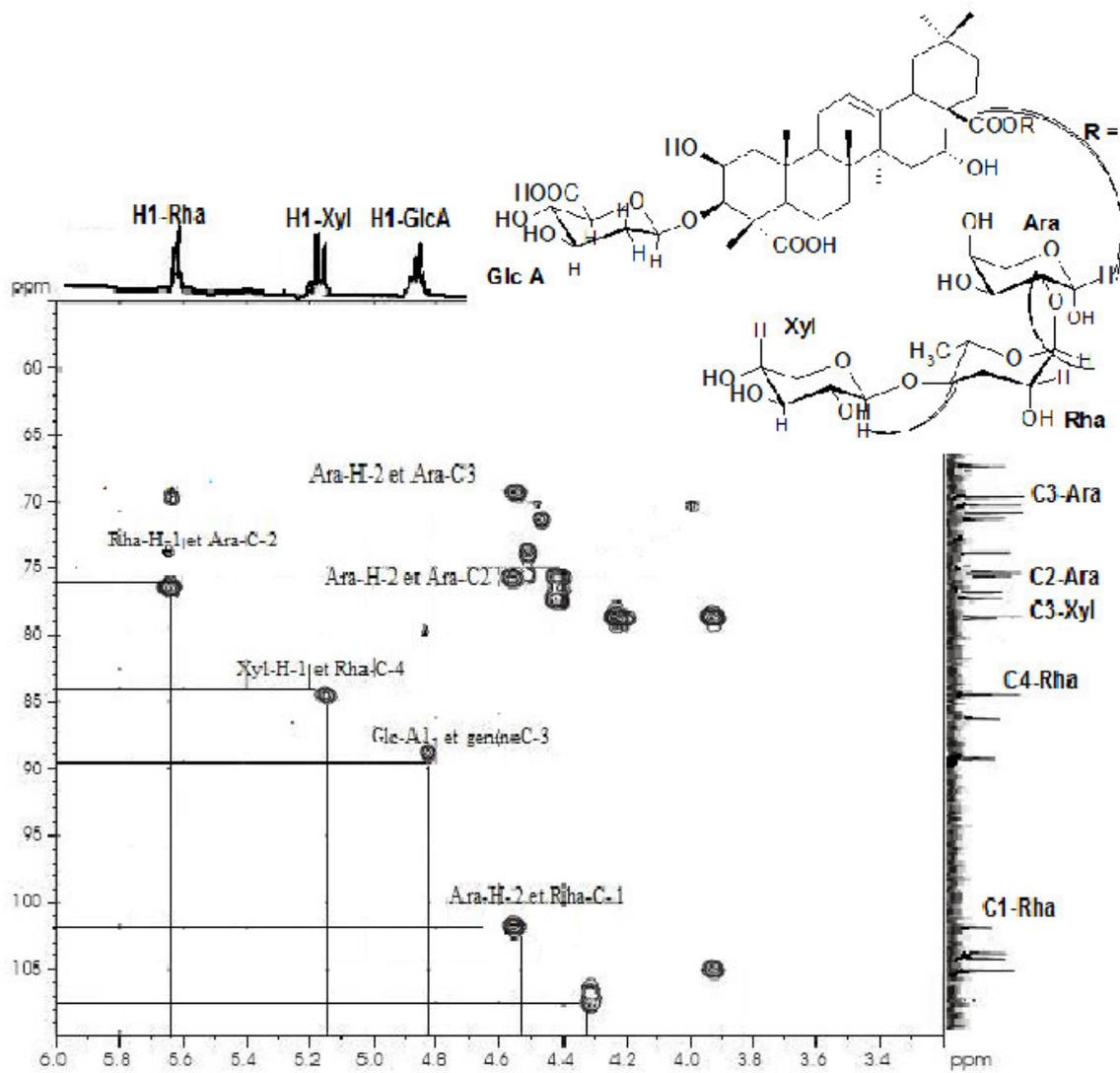


Figure15 : Spectre HMBC partie osidique du composé 2 (DMSO  $d_6$ )

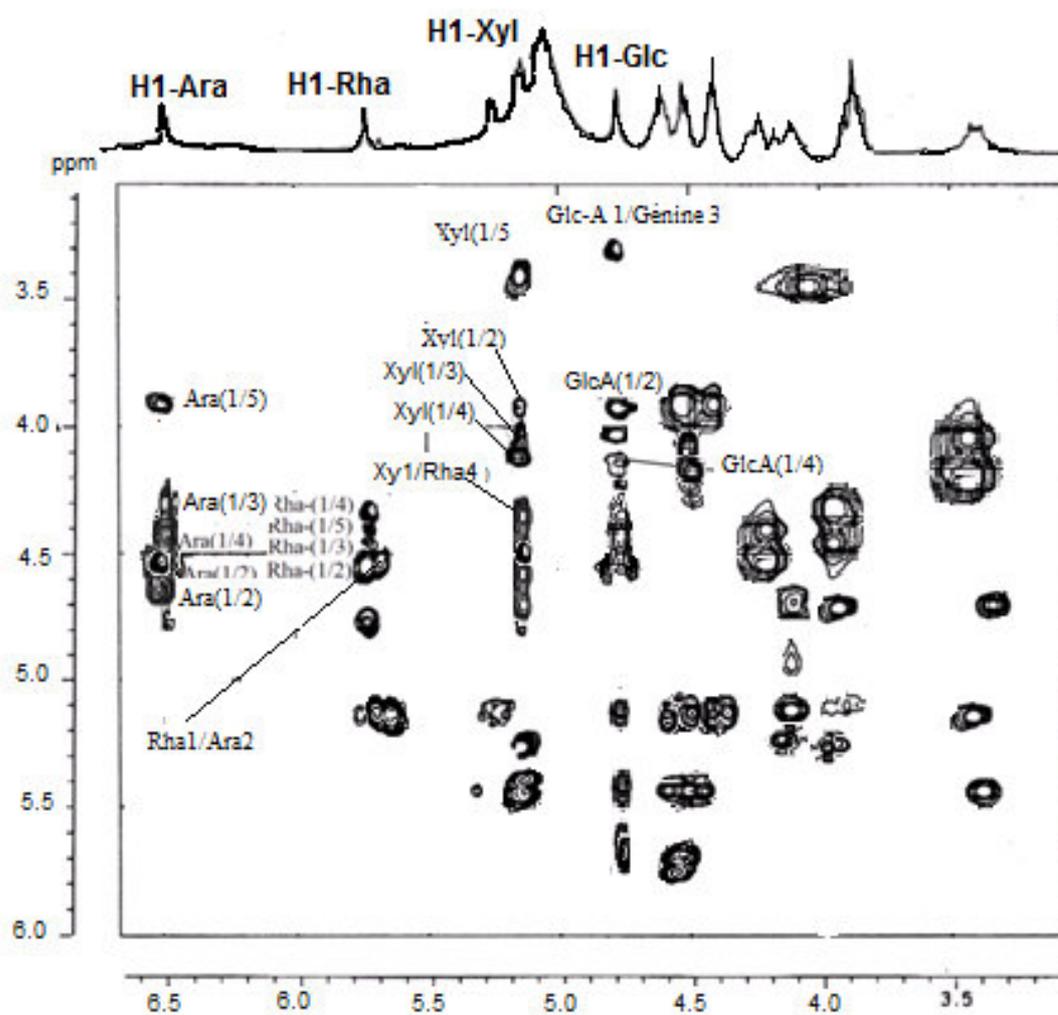


Figure 16 : Spectre ROESY de la partie osidique du composé 2 (DMSO  $d_6$ )

**Tableau 3 : Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H (DMSO d<sub>6</sub>, 600MHz), et <sup>13</sup>C (DMSO d<sub>6</sub>, 125 MHz) du composé 2 (δ ppm).**

Position	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J Hz)	Position	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J Hz)
Aglycone			Sucres		
1	39.9	-	Glc-A1 (C-3)	<u>107.4</u>	<u>4.81</u> (d 7.5)
2	69.3	4.74 (m)	2	76.0	3.99 (m)
3	<u>89.9</u>	3.31(d, 3.7)	3	79.3	4.25 (t,9.0)
4	40.2	-	4	73.4	4.48 (m)
5	56.1	0.78 (m)	5	76.8	4.35 (m)
6	18.5	-	6	170.0	-
7	33.6	-	Sucres (C-28)		
8	39.3	-	Ara-1	<u>95.8</u>	<u>6.48</u> (sl)
9	47.6	1.40 (m)	2	<u>76.0</u>	4.55 (m)
10	37.6	-	3	69.7	4.35 (m)
11	24.9	-	4	66.2	4.37 (m)
12	124.0	5.48 (m)	5	63.2	3.99 (m)
					4.52 (m)
13	144.8	-	Rha-1	<u>102.0</u>	<u>5.65</u> (s)
14	41.1	-	2	72.6	4.52 (dd, 9.5m)
15	36.1	-	3	73.1	4.48 (m)
16	74.5	5.25 (m)	4	<u>84.5</u>	4.32 (t, 9.7)
17	50.4	-	5	69.5	4.35 (m)
18	49.1	3.11 (m)	6	19.2	1.68 (d 6.0)
19	47.2	-	Xyl-1	<u>107.7</u>	<u>5.12</u> (d 7.5)
20	30.8	-	2	76.8	4.02 (dd, 8.2)
21	36.1	-	3	79.0	4.08 (t, 9.2)
22	32.2	-	4	71.8	4.15 (m)

23	<u>180.7</u>	-		5	68.2	3.48 (t, 12.3)
						4.10 (m)
24	17.8	0.94	(s)			
25	15.0	0.86	(s)			
26	18.4	1.00	(s)			
27	28.3	1.79	(s)			
28	<u>176.1</u>	-				
29	33.8	0.88	(s)			
30	24.1	1.04	(s)			

### III- 4 Extraction et purification des produits obtenus par DCCC.

Les parties aériennes sont traitées selon le schéma classique d'extraction (Figure.17). La poudre est extraite par des solvants de polarité croissante, hexane, chloroforme, acétate d'éthyle et méthanol. Notre étude a été portée sur l'extrait méthanolique car il présentait la plus grande cytotoxicité. Après filtration est concentration à sec, l'extrait est dissous dans un mélange de solvants  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  43 :37 :20. Ce mélange après filtration (filtre  $0.2\mu\text{m}$ ) est soumis en DCCC pour fractionnement, 3x(140) fractions de 10ml chacune ont été recueillies et analysées par CCM. Toutes les fractions contenant les même composés sont rassemblés puis concentrés. Neuf fractions ont été obtenues (fig.18). La purification des composés fait intervenir différentes méthodes chromatographiques : chromatographie sous pression atmosphérique, chromatographie liquide à basse pression BPLC chromatographie liquide haute pression HPLC. Les supports utilisés sont : silice en phase normale, silice en phase inverse RP 18.

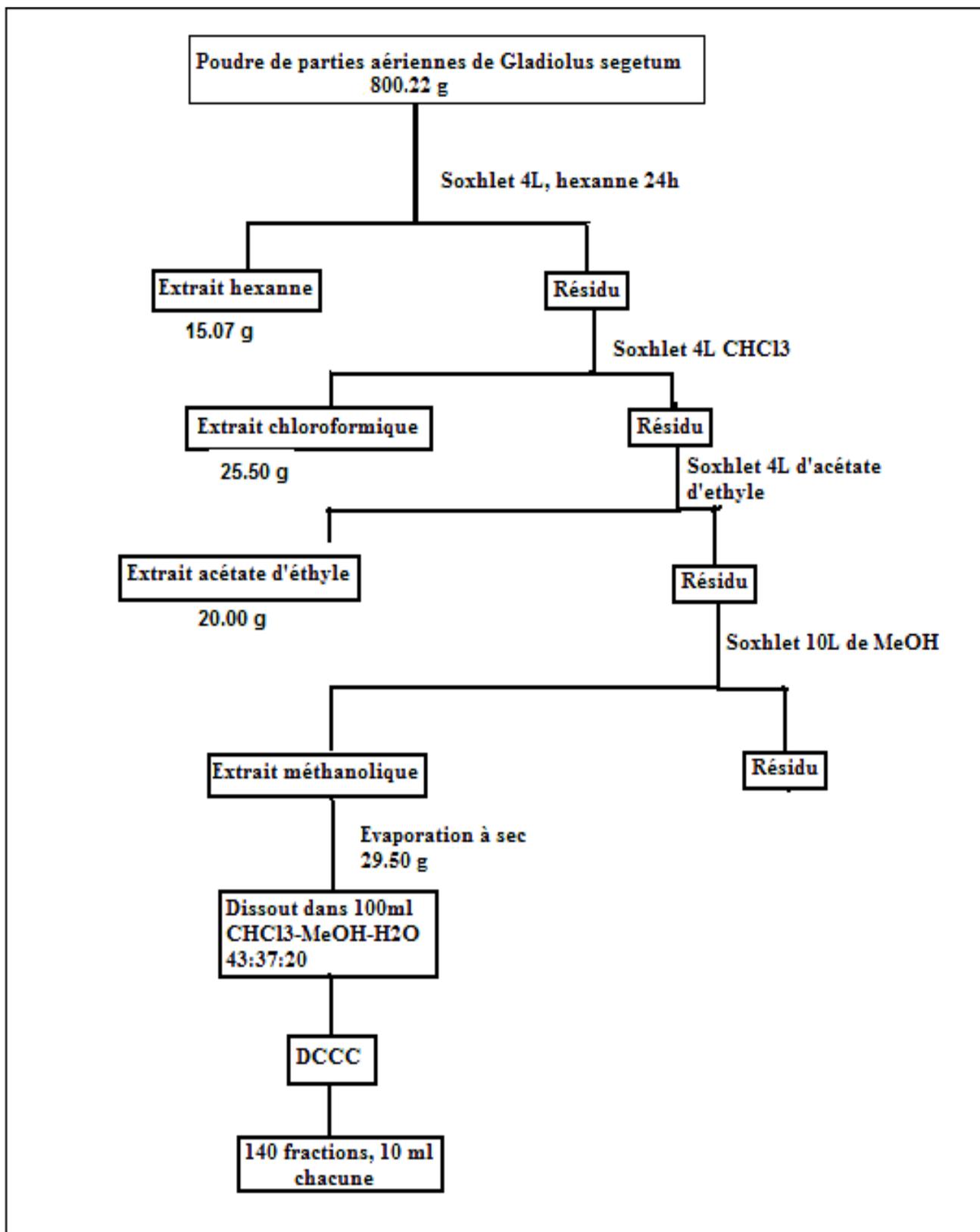


Figure 17 : Schéma d'extraction par soxhlet

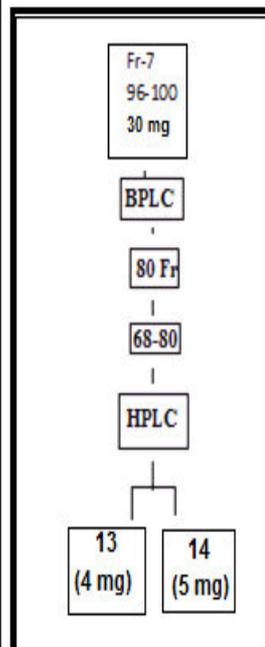
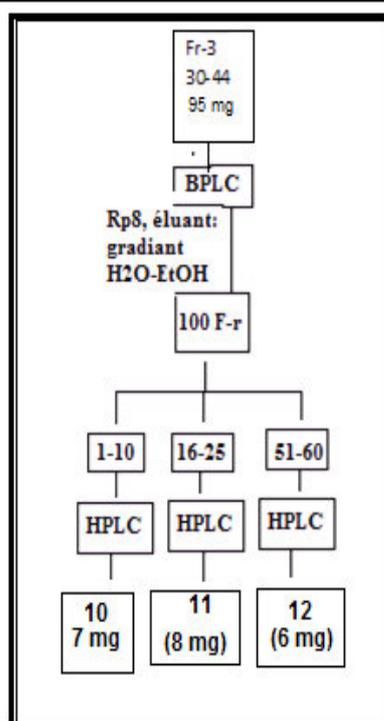
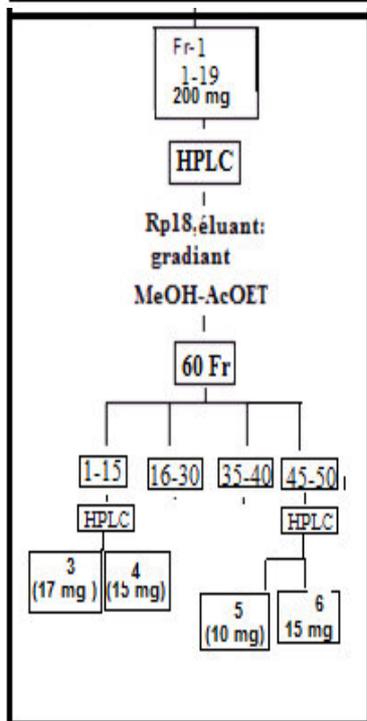
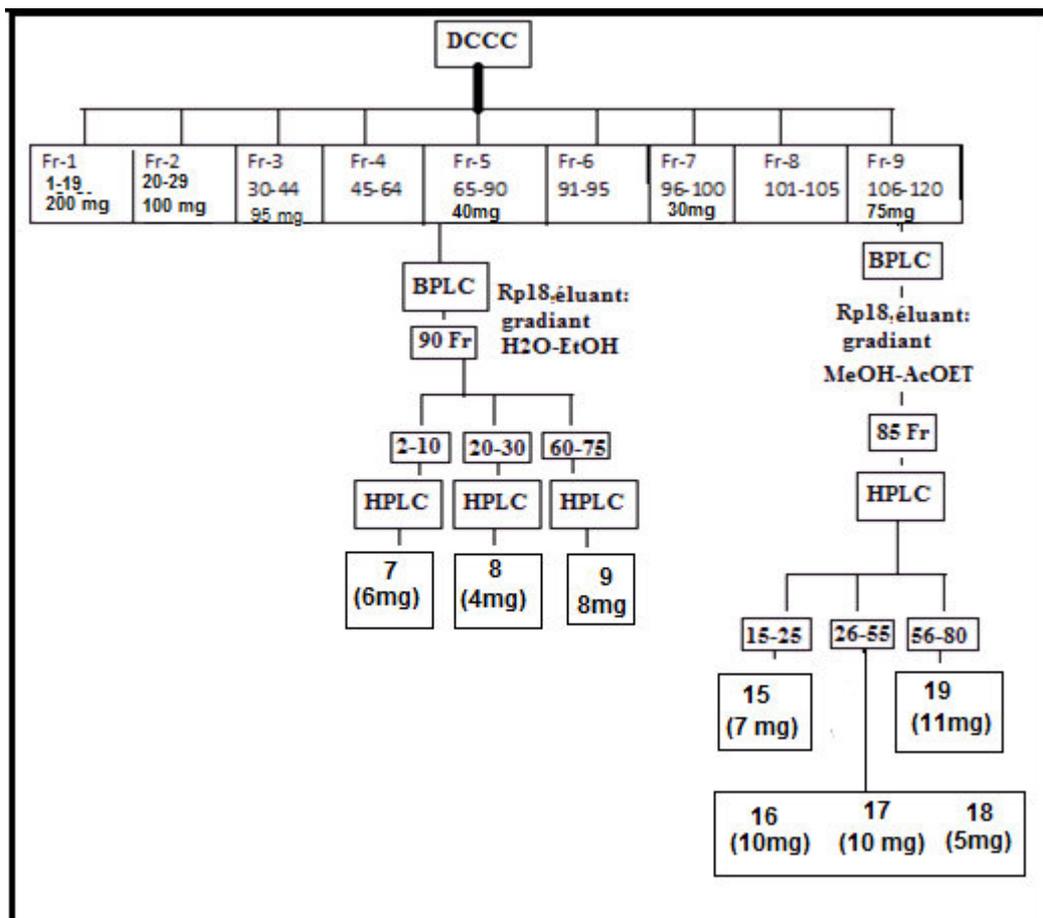


Figure 18 : Schéma de purification par DCCC

### III- 4-1 Etude de la fraction 1

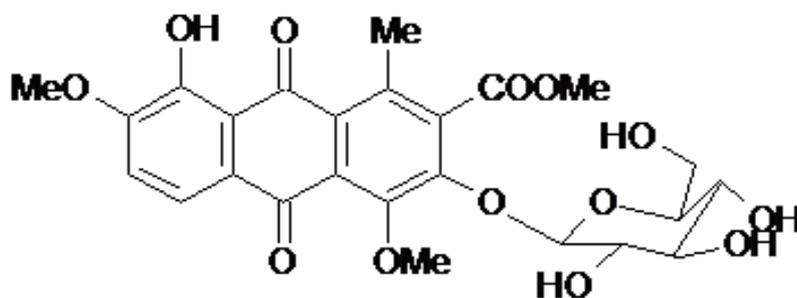
L'étude de la fraction 1 (1 -19) a conduit à l'isolement de quatre anthraquinones

#### Elucidation structurale des anthraquinones

Parmi les quatre anthraquinones isolées, deux sont de structures nouvelles Methyl 8-hydroxy-4, 7-dimethoxy-1-methyl-9, 10-dioxo-3-(beta-D-glucopyranosyloxy)-9,10-dihydroanthracene-2-carboxylate (**C3**), Methyl 3-methoxy-1-methyl-9,10-dioxo-8-(beta-D-glucopyranosyloxy)-9,10-dihydroanthracene-2-carboxylate (**C4**) et deux de structures connues 3, 8-dihydroxy-6-methoxy-1-methylanthraquinone-2-carboxylic acid (**C5**) [25] ,et 1-hydroxy-3, 6, 7-trimethoxy-8-methylanthraquinone (**C6**) [37].

La fraction F1 : (Fractions 1-19, (200 mg) de couleur orange) a été soumise en HPLC préparative (silice en phase inverse RP 18.) en utilisant un gradient de solvant : méthanol (solvant A) et acétate d'éthyle (solvant B) selon le protocole suivant : 0-10 min, 30% B; 10-20 min, 35% B; 20-28 min, 45% B; 28-36 min, 50% B; 36-46 min, 60% B; 46-54 min, 70% B; 54-64 min, 80% B; 64-72 min, 100% B (à une vitesse d'écoulement de 10 ml min<sup>-1</sup> et à température ambiante de 25 ± 2°C) 60 fractions de 10 ml chacune ont été collectées, les fractions contenant les composés identiques ont été regroupés pour donner 5 fractions A-E. Les composés 3(17 mg) et 4(15 mg) ont été isolé de la Fraction A (1-15). Les composés 5 (10 mg) et 6 (15 mg) sont obtenus à partir de la fraction D (45-50).

#### III-4-2 Détermination de la structure composé 3 (C3)

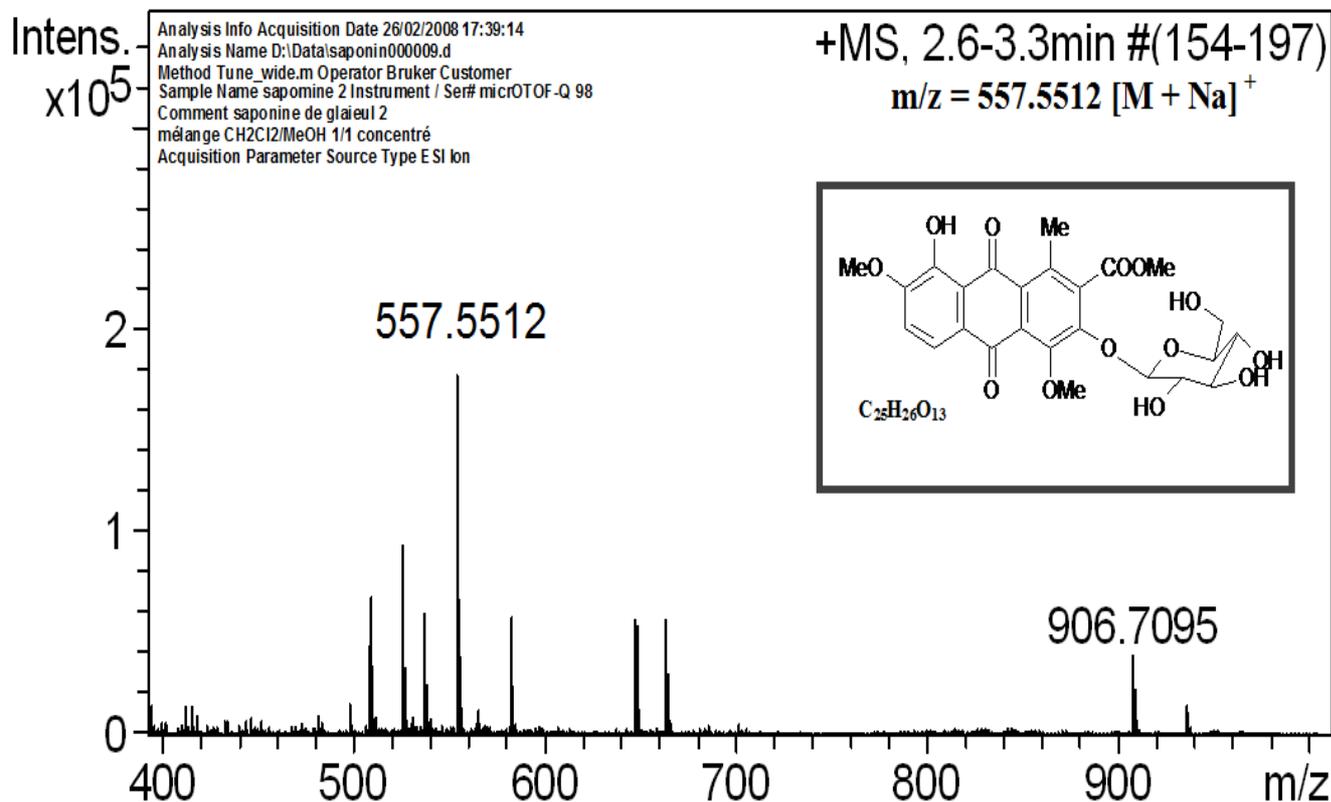


C3

Composé 3 se présente sous forme de poudre orange amorphe.

**Caractéristiques** : Point de fusion : 140-142°,  $[\alpha]_D^{25} + 284^\circ$  (c 0.08 MeOH)

**HR ESIMS** présente un pic pseudo moléculaire à :  $m/z = 557.5512$   $[M + Na]^+$  correspondant à la formule brute  $C_{25}H_{26}O_{13}$



**Figure 19 : Spectre de masse ESI en mode positif du composé 3 ( anthraquinone 1)**

**UV** : Le spectre UV(MeOH), présente quatre maximums d'absorption  $\lambda_{max}$  : 220, 275, 315 et 420 nm.

**IR** : Le spectre IR présente des bandes d'absorption caractéristiques des groupements hydroxyles phénoliques à  $3337\text{cm}^{-1}$ , une fonction ester à 1720, un carbonyle libre à  $1665\text{cm}^{-1}$ , carbonyle liée à  $1636\text{cm}^{-1}$  et des noyaux aromatiques à 1591, 1503 et  $1447\text{cm}^{-1}$

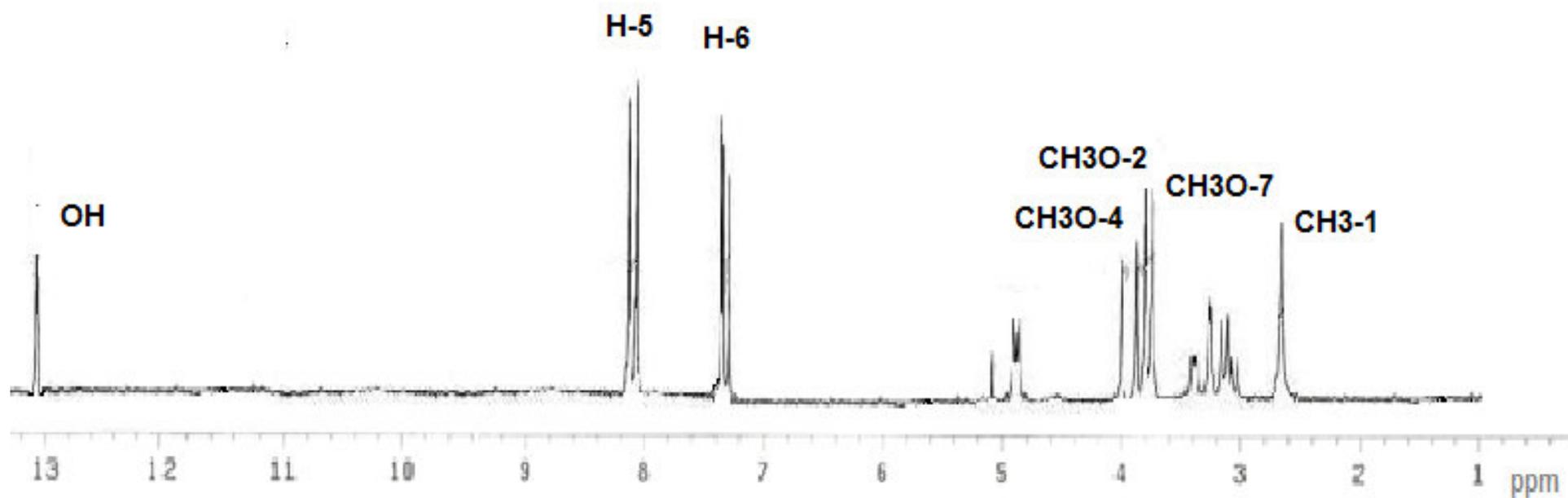


Figure 20 : Spectre RMN <sup>1</sup> H (anthraquinone 1) du composé 3 (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz), (δ ppm).

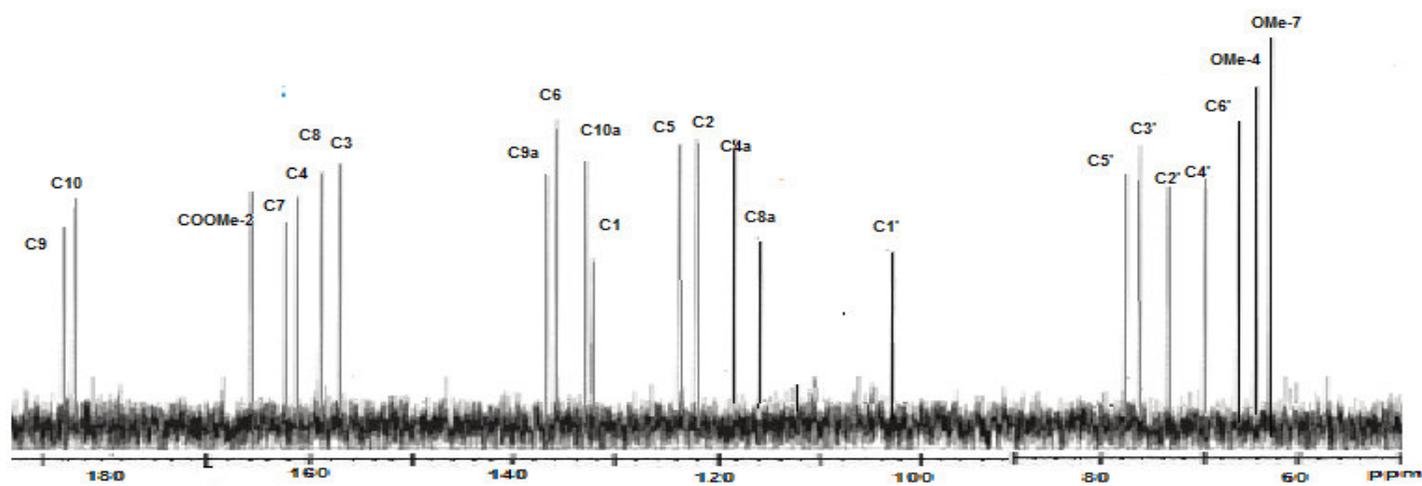


Figure 21 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (anthraquinone 1) du composé 3 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) ( $\delta$  ppm)

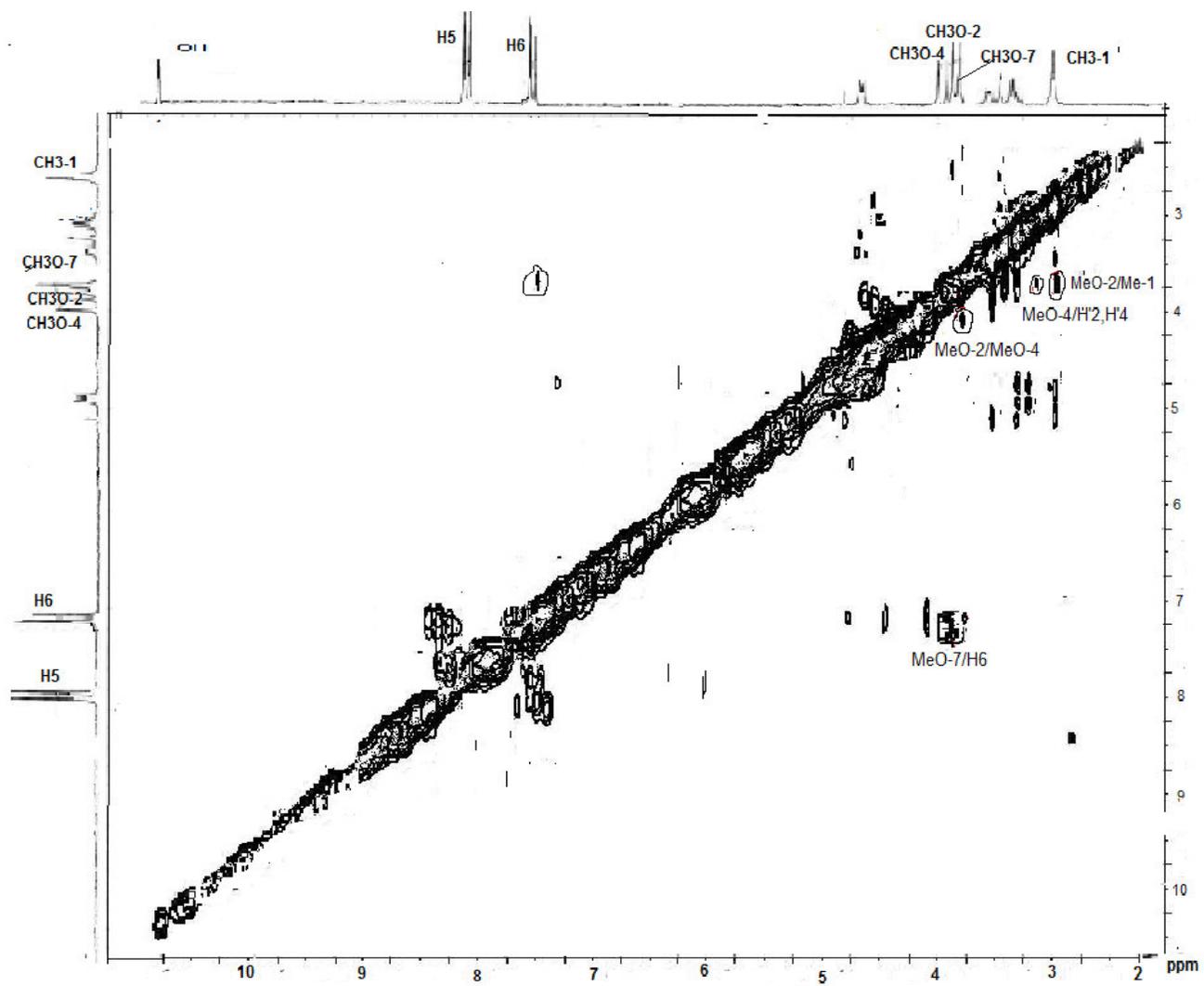
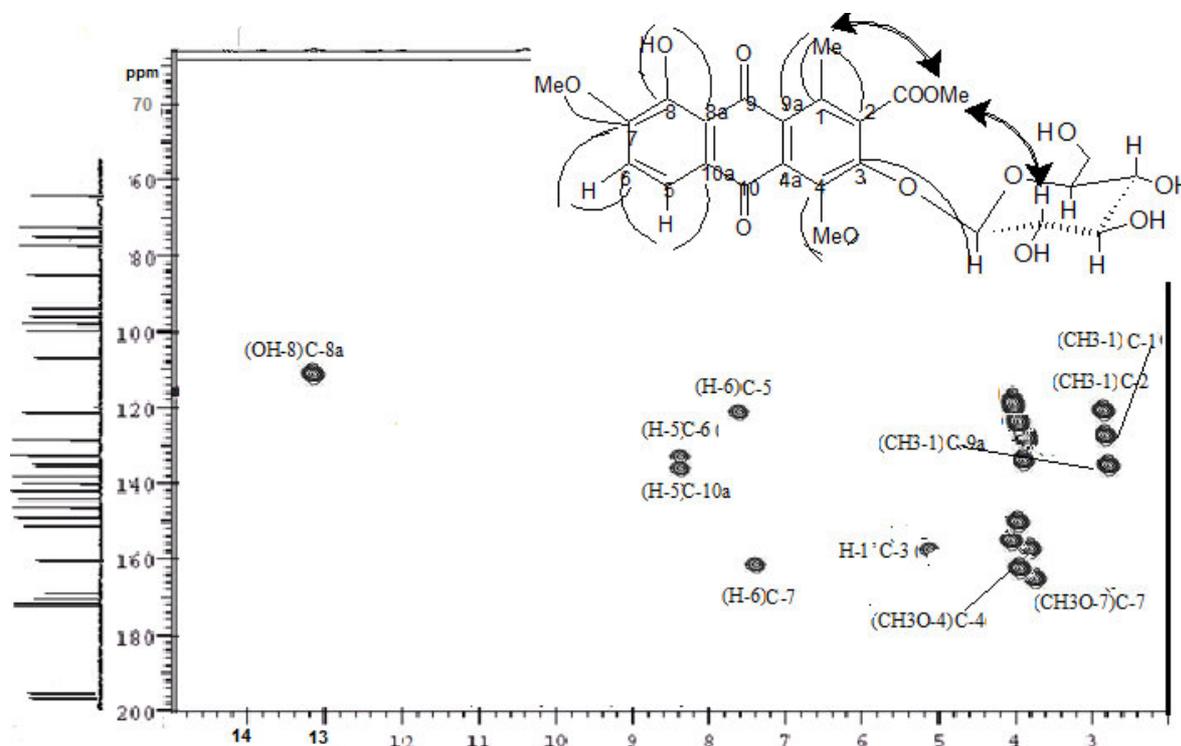


Figure 22 : Spectre ROESY du composé 3 ( $\text{CDCl}_3$ )



**Figure 23** : Spectre HMBC du composé 3 (CDCl<sub>3</sub>)

corrélation HMBC:   
 corrélation ROESY: 

**RMN** : L'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H (figure 20) enregistré dans CDCl<sub>3</sub> à 300MHz, révèle la présence d'un singulet à δ 13,17ppm (1H, s, 8-OH) correspondant à un groupement hydroxyle lié, deux protons aromatiques résonnant à δ 8,05(1H, d, J= 8Hz, H-5) et δ 7,30(1H, d, J= 8 Hz, H-6). L'expérience HMBC (Fig.23) permet de visualiser des corrélations (couplages 2J<sub>H-C</sub>) justifiant la position de ces signaux : La corrélation du proton H-5 et les carbones C-6 et C-10a : 8,05 (H-5) →C-6 (136,0), C-10a (132,3). La corrélation du groupement OH-8 et le carbone C-8a : 13,17 (OH-8) → C-8a (116,9) confirme la position du groupement OH en position C-80. Des signaux attribuables à un méthyle et trois groupements methoxy sont observés à δ 2,67(C1), 3,94 (C7), 3,96(C2) et 3,98(C4). Ces attributions sont confirmées par les corrélations suivantes :

$\delta$  2,67 (CH3-1)  $\rightarrow$  C-9a ( $\delta$  137,4), C-1 ( $\delta$  132,3), C-2 ( $\delta$  125,3).

La position du methoxy (3.94) en position C-7 et confirmée par la corrélation :

(CH3O-7) (3,94)  $\rightarrow$  C-7 ( $\delta$  162,4),

La position du méthoxy (3.98) en position C-4 et confirmée par les corrélations :

(CH3O-4)  $\delta$  3,98  $\rightarrow$  C-4( $\delta$  160,6).

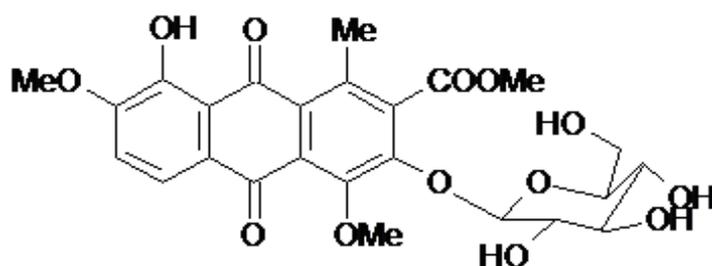
La position du méthoxy (3.96) en position C-2 et confirmée par les corrélations observées sur le spectre ROESY, visualisant les couplages dipolaires entre les protons proches dans l'espace  $\delta$  3,96 (CH3O-2)  $\rightarrow$   $\delta$  2,67 (CH3-1),  $\delta$  3.98 (CH3O-4),  $\delta$  3,00 (H'-2 glucose) et  $\delta$  3.04 (H'-4 glucose)

Par ailleurs, le spectre RMN  $^1\text{H}$  indique des signaux résonnant entre  $\delta$  3,00 et  $\delta$  5,09 correspondant à un sucre, incluant un proton anomérique à  $\delta$  5,09 (1H, d,  $j=7,5$  Hz) et le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (figure 21) enregistré dans  $\text{CDCl}_3$  à 75 MHz, indique des signaux entre  $\delta$  103,5 et 61,8 ppm. L'hydrolyse à 5% d'acide chlorhydrique libère un sucre le glucose. L'identification du sucre a été réalisée en comparant celui-ci avec un témoin sur CCM.

L'expérience HMBC (Figure. 23) permet de visualiser une corrélation entre H-1' ( $\delta$  5,09) et C-3 ( $\delta$  158,5), ce qui indique la connexion du sucre en position C-3 de l'antraquinone.

A partir de ces résultats et des données de la littérature, nous avons attribué à ce composé, la structure suivante (Ding, 2003), (Dieudonne, 2007), (Ali, 1989) :

Methyl 8-hydroxy-4, 7-dimethoxy-1-methyl-9, 10-dioxo-3-(beta-D-glucopyranosyloxy)-9,10-dihydroanthracene-2-carboxylate, qui est isolée pour la première fois.



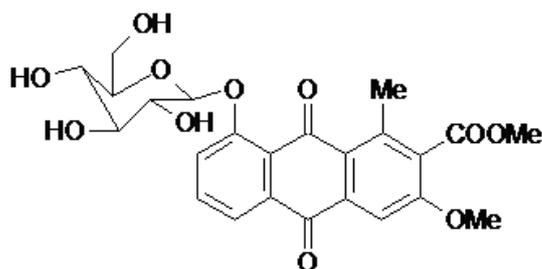
C3

**Tableau 4 : Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz), et <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) des composés 3 et 4. (δ ppm, J Hz)**

Produit Position	Composé 3		Composé 4	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (J Hz)
1	132.3	-	137.5	-
2	122.3	-	124.7	-
3	158.5	-	162.4	-
4	160.6	-	107.5	7.62 (s)
4a	118.0	-	132.0	-
5	125.4	8.05 (d, 8.0)	120.0	7.73 (d, 8.0)
6	136.0	7.30 (d, 8.0)	135.8	7.66 (t, 8.0)
7	162.4	-	118.8	7.84 (d, 8.0)
8	159.9	-	155.5	-
8a	116.9	-	110.2	-
9	189.0	-	189.7	-
9a	137.4	-	141.5	-
10	188.9	-	182.4	-
10a	132.3	-	131.2	-
8-OH		13.17 (s)		-
3-OMe		-	56.5	3.98 (s)
4-OMe	61.6	3.98 (s)	-	-
7-OMe	61.2	3.94 (s)	-	-
2-COOMe	166.9	3.96 (s)	167.5	3.85 (s)
1-Me	-	2.67 (s)		2.37 (s)
1'	103.5	5.09 (d, 7.5)	103.8	5.10 (d, 7.5)
2'	74.5	3.00 (m)	74.4	3.01 (m)
3'	76.2	3.20 (m)	76.8	3.20 (m)
4'	70.1	3.04 (m)	70.1	3.04 (m)

5'	77.9	3.13	(m)	77.9	3.12	(m)
6'	61.8	3.68	(m)	61.8	3.68	(m)
		3.44	(m)		3.43	(m)

### III -4-3 Détermination de la structure du composé 4 (C4)

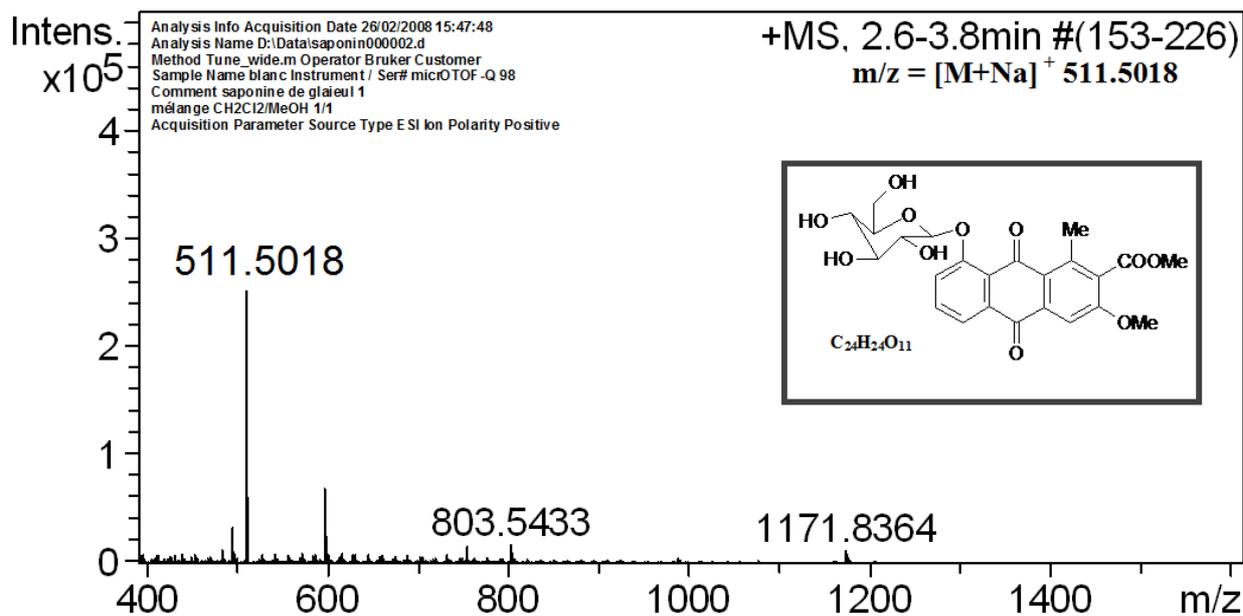


**C4**

Le composé 4 se présente sous forme de poudre orange amorphe.

**Caractéristiques** : Point de fusion : 150-152°C,  $[\alpha]_D^{25}$  : 274° (c 0.08 MeOH)

**HR ESIMS** présente un pic de l'ion pseudomoléculaire à :  $m/z$   $[M+Na]^+$  511,5018 correspondant à la formule brute  $C_{24}H_{24}O_{11}$



**Figure 23 : Spectre de masse ESI en mode positif du composé 4**

**UV** : Le spectre UV (MeOH), présente quatre maximums d'absorption  $\lambda_{\max}$  : 224, 280, 289 et 412 nm.

**IR** : Le spectre IR présente des bandes d'absorption caractéristiques des groupements hydroxyyles à  $3386\text{ cm}^{-1}$ , une fonction ester à  $1730\text{ cm}^{-1}$ , un carbonyle libre à  $1666\text{ cm}^{-1}$  et des noyaux aromatiques à  $1589, 1504$  et  $1449\text{ cm}^{-1}$

**RMN** : L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  (figure 25) enregistré dans  $\text{CDCl}_3$  à 300MHz, révèle la présence de signaux correspondant à quatre protons aromatiques :  $\delta$  7,84 (d, 1H,  $J= 8\text{ Hz}$ , H-7), 7,73 (d, 1H,  $J= 8\text{ Hz}$ , H-5),  $\delta$  7,66(t, 1H,  $J= 8\text{ Hz}$ , H-6) et  $\delta$  7,62(s, 1H, H-4). L'analyse du spectre HMBC (Figure 28) permet de visualiser des corrélations (couplages  $2J_{\text{H-C}}$ ) tel que :

H-5 (7, 73)  $\rightarrow$  C-6 (135,8), C-10a (131,2)

H-6 (7, 66)  $\rightarrow$  C-7 (118,8), C-5 (132,5),

H-7 (7, 84)  $\rightarrow$  C-6 (135,8), C-8 (165,6)

H-4 (7,62)  $\rightarrow$  C-4a (132,5), C-3 (162,4)

Un signal à  $\delta$  2,37 attribuable au groupement méthyle en position C-1, ceci est confirmé par les corrélations : CH3-1 ( $\delta$  2,37)  $\rightarrow$  C-9a ( $\delta$  141,5), C-1 ( $\delta$  137,5), C-2 ( $\delta$  124,7).

La position du méthoxy  $\delta$  3,98 en position C-3 est confirmée par la corrélation :

$\delta$  3,98 (MeO-3)  $\rightarrow$  C-3( $\delta$  162,4).

La position du méthoxy  $\delta$  (3,85) en position C-2 est confirmée par les corrélations observées sur le spectre ROESY, visualisant les couplages dipolaires entre les protons proches dans l'espace

$\delta$  3,85 (MeO-2)  $\rightarrow$   $\delta$  2,37 (CH3-1) et  $\delta$  3,98 (MeO-3)

Par ailleurs, le spectre RMN  $^1\text{H}$  indique des signaux résonnant entre  $\delta$  3,01 et  $\delta$  5,10 correspondant à un sucre, incluant un proton anomérique à  $\delta$  5,10 (1H, d,  $J=75\text{ Hz}$ ) et le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (figure 26) enregistré dans  $\text{CDCl}_3$  à 75MHz, indique des signaux entre  $\delta$  103,8 et 61,8. L'hydrolyse à 5% à l'acide chlorhydrique libère un sucre le glucose. L'identification du sucre a été réalisée en comparant celui-ci avec un témoin sur CCM.

L'expérience HMBC (Figure 28) permet de visualiser une corrélation entre le proton anomérique H-1' ( $\delta$  5.10) et le carbone en position C-8 ( $\delta$  155.5), ce qui indique la connexion du sucre en position C-8 de l'antraquinone.

A partir de ces résultats et des données de la littérature, nous avons attribué au composé 4, la structure suivante (Ding, 2003), (Dieudonne, 2007), (Ali, 1989) :

Methyl 3-methoxy-1-methyl-9,10-dioxo-8-( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-9,10-dihydroanthracene-2-carboxylate. Le composé 4 est un nouveau produit naturel.

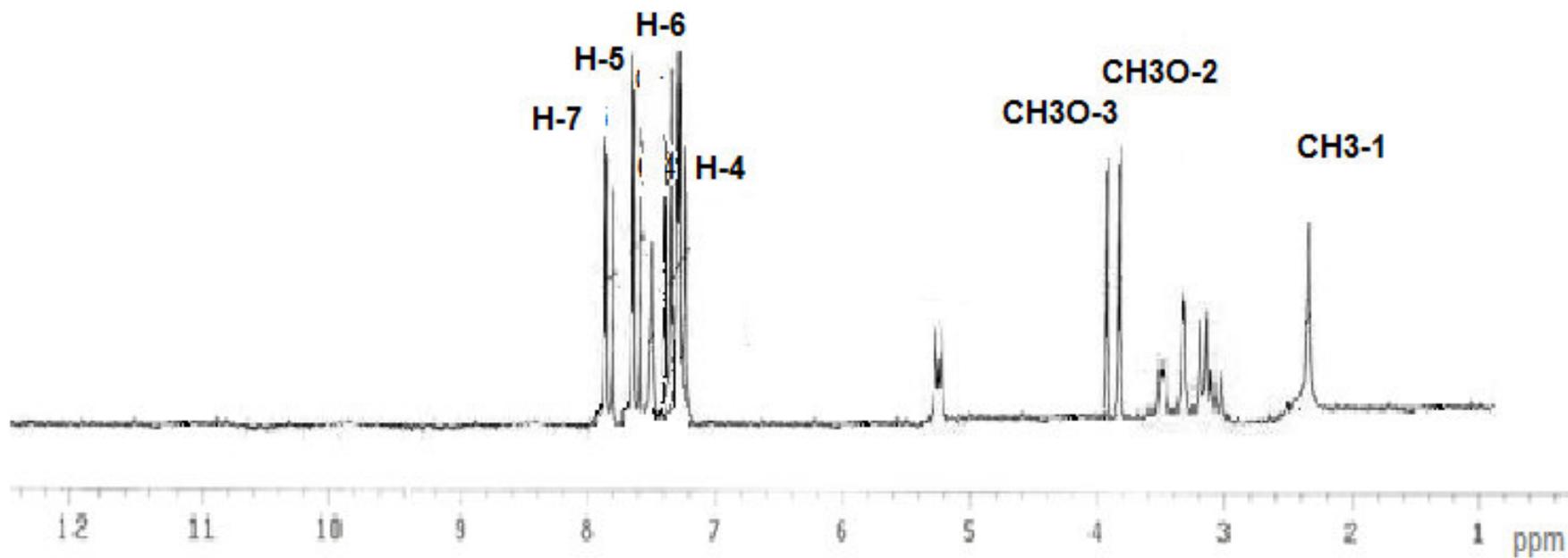


Figure 25 : Spectre RMN <sup>1</sup> H (anthraquinone 2) du composé 4 (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz), (δ ppm)

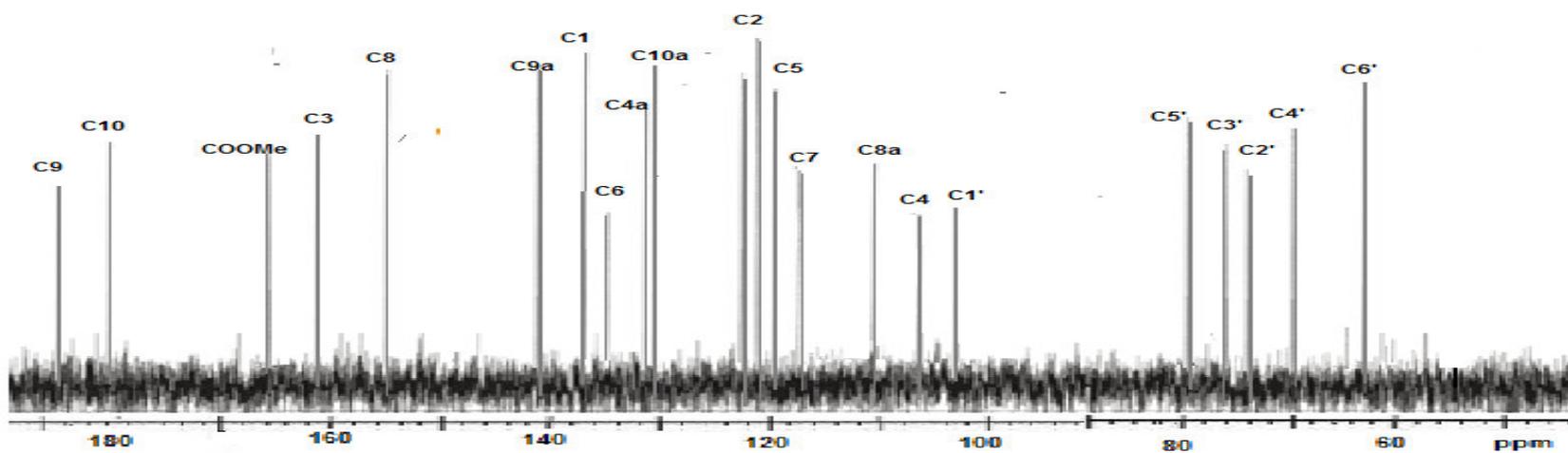


Figure 26 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (anthraquinone 2) composé 4 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) ( $\delta$  ppm).

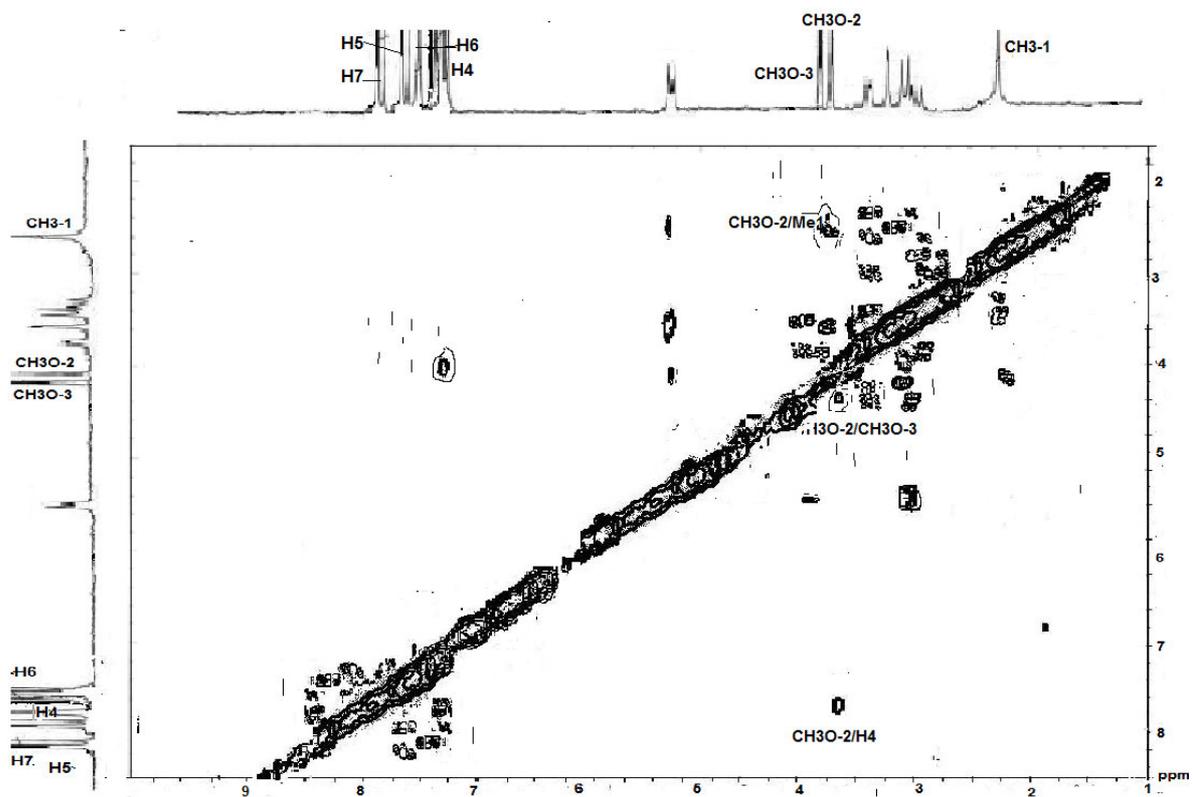


Figure 27 : Spectre ROESY du composé 4

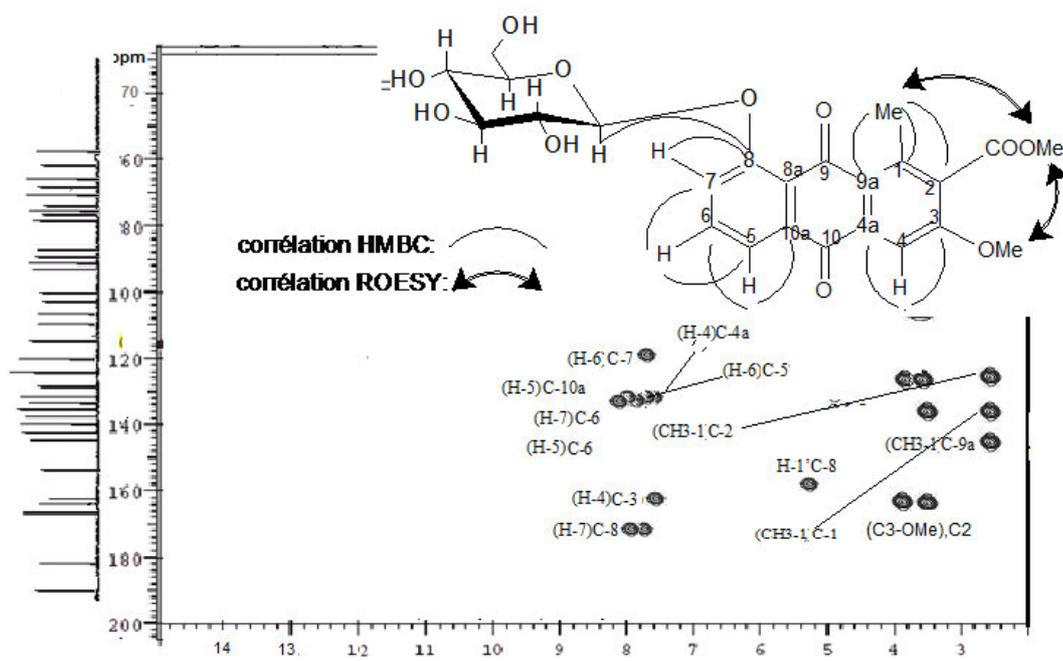


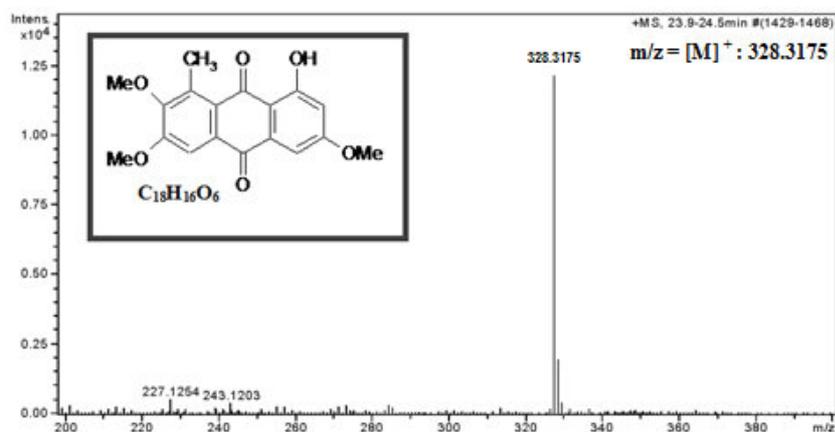
Figure 28 : Spectre HMBC du composé 4

### III- 4-4 Détermination de la structure du composé 5 (C5):

Le composé 5 se présente sous forme de poudre orange amorphe.

**Caractéristiques :** Point de fusion : 273-275 °C

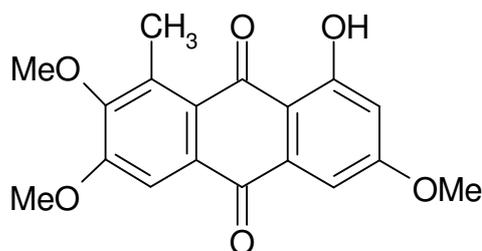
**SM FAB** (spectrométrie de masse FAB (Fast Atom Bombardement) avec source d'ionisation par bombardement d'atomes rapides) présente un pic moléculaire à :  $m/z = [M]^+$  : 328,3175 correspondant à la formule brute  $C_{18}H_{16}O_6$



**Figure 29 : Spectre de masse SM FAB du composé 5**

**UV:** Le spectre UV (MeOH), présente quatre maximums d'absorption  $\lambda_{max}$  : 220, 288, 300 et 400 nm.

**IR :** Le spectre IR (KBr): présente des bandes d'absorption caractéristiques des groupements hydroxyles phénoliques à  $3380\text{cm}^{-1}$ , des liaisons C-H à 2950 et 2850, des fonctions carbonyles à 1622 et 1620 et des noyaux aromatiques à 1570 et  $1400\text{cm}^{-1}$



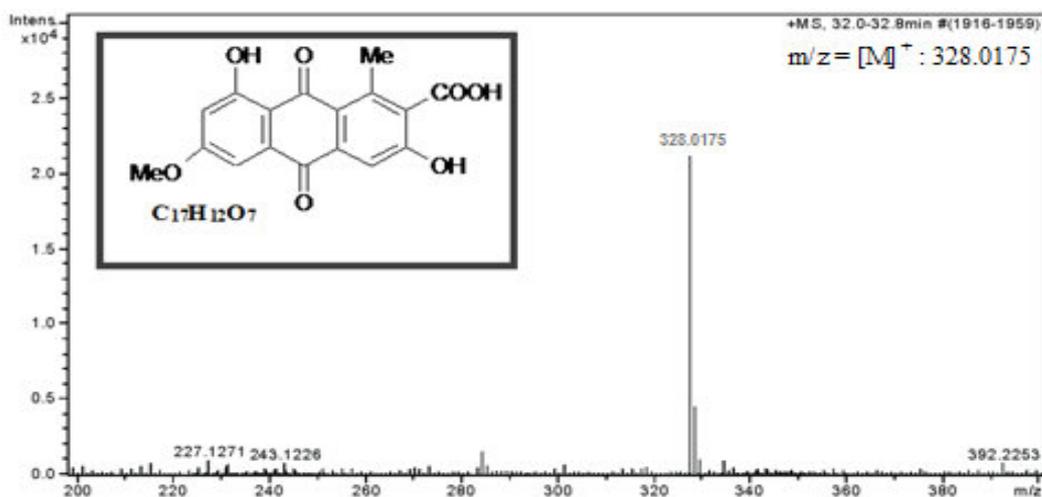
1-hydroxy-3, 6, 7-trimethoxy-8-methylantraquinone **C5**

### III- 4-5 Détermination de la structure du composé 6 (C6):

Le composé 6 se présente sous forme de poudre orange amorphe.

**Caractéristiques :** Point de fusion : 238-240°

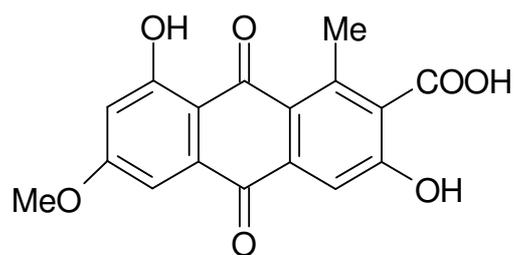
**SM FAB** présente un pic moléculaire à :  $m/z = [M]^+$  : 328,0175 correspondant à la formule brute  $C_{17}H_{12}O_7$



**Figure 30 : Spectre de masse SM FAB du composé 6**

**UV :** Le spectre UV (MeOH), présente quatre maximums d'absorption  $\lambda_{max}$  : 226, 283, 320 et 429 nm.

**IR :** Le spectre IR (KBr): présente des bandes d'absorption caractéristiques des groupements hydroxyles aromatiques à 3385 et 3325  $cm^{-1}$ , des fonctions hydroxyles carboxyliques à 3300 et 2850  $cm^{-1}$ , des fonctions acides à 2600  $cm^{-1}$ , des fonctions carbonyles à 1722, 1700 et 1623  $cm^{-1}$  et des noyaux aromatiques à 1570 et 1500  $cm^{-1}$ .



3, 8-dihydroxy-6-methoxy-1-methylanthraquinone-2-carboxylic acid **C6**

A partir de ces résultats et des données de la littérature (Tableau 5), nous avons attribué, les structures suivantes : 1-hydroxy-3, 6, 7-trimethoxy-8-methylanthraquinone au composé **5** et 3, 8-dihydroxy-6-methoxy-1-methylanthraquinone-2-carboxylique acide au composé **6** (Ngamga, 2007), (Ali, 1989).

**Tableau 5 : Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz), et <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) des composés 5 et 6. (δ ppm)**

position	Composé 5		Composé 6	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (m, J Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (m, J Hz)
1	162.2	-	138.8	-
2	106.0	6.80 (d, 2.5)	132.8	-
3	164.5	-	158.5	-
4	107.5	7.00 (d, 2.5)	109.1	7.65 (s)
4a	136.5	-	134.0	-
5	109.0	7.70 (s)	110.0	7.15 (d, 2.5)
6	155.5	-	163.5	-
7	154.5	-	112.5	6.75 (d, 2.5)
8	120.5	-	162.2	-
8a	129.0	-	114.5	-
9	186.0	-	188.0	-
9a	113.8	-	116.8	-

10	183.3	-		182.0	-	
10a	133.2	-		130.2	-	
1-OH	-	13.85	(s)	-	-	
3-OH	-	-	-	-	7.80	(s)
8-OH	-	-	-	-	13.18	(s)
3-OMe	55.0	3.85	(s)	-	-	
6-OMe	55.5	3.81	(s)	55.5	3.88	(s)
7-OMe	60.4	3.80	(s)			
2-COOH	-	-	-	168	-	
1-Me	-	-	-	19.7	2.65	(s)
8-Me	18.1	2.60	(s)	-	-	

### III-5 Elucidation structurale du composé 7 (**C7**), du composé 8 (**C8**) et le composé 9 (acide quinovique) (**C9**)

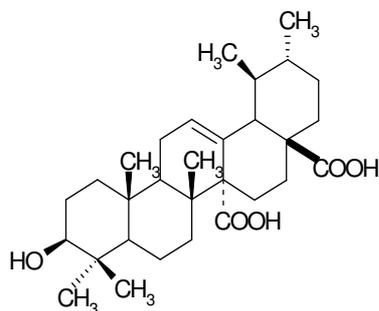
#### III-5-1 Identification de l'acide quinovique. (Composé 9)

L'étude de la fraction 5 (65-90) a conduit à l'isolement de l'acide quinovique **C9** et deux saponines, composé 7 et composé 8. Les deux composés **C7** et **C8** ont la même génine.

La fraction 5 a été soumise en BPLC, 90 fractions de 10 ml chacune ont été collectées. Les fractions contenant le composé 7 (2-10), le composé 8 (20-30) et le composé 9 (60-75) sont purifiées par HPLC.

**Identification de le génine** : la génine a été identifiée par CCM en comparaison avec un témoin et par comparaison de nos résultats avec la littérature (Yepez, 1991), (Aquino, 1999b), (Lamidi, 1995), (Tableau 6). Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  sont présentés dans les figures 31 et 32. L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  enregistré dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 400MHz, révèle la présence de 6 singlets entre 0.82 et 1.24 ppm correspondant à 6 méthyles, permettant de confirmer la présence d'un triterpène. Un proton oléfinique résonnant à  $\delta$  5,61 ppm correspondant au proton H-12. Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  enregistré dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 100MHz,, nous permet de distinguer les deux signaux à 129,30 et 134,00 ppm correspondent à ceux des carbonés

éthyléniques de la double liaison  $\Delta_{12,13}$  et les signaux à 179,20 et 182,20 correspondant aux deux fonctions acides ( $C_{27}$ ,  $C_{28}$ ).



**Structure de l'acide quinique C9**

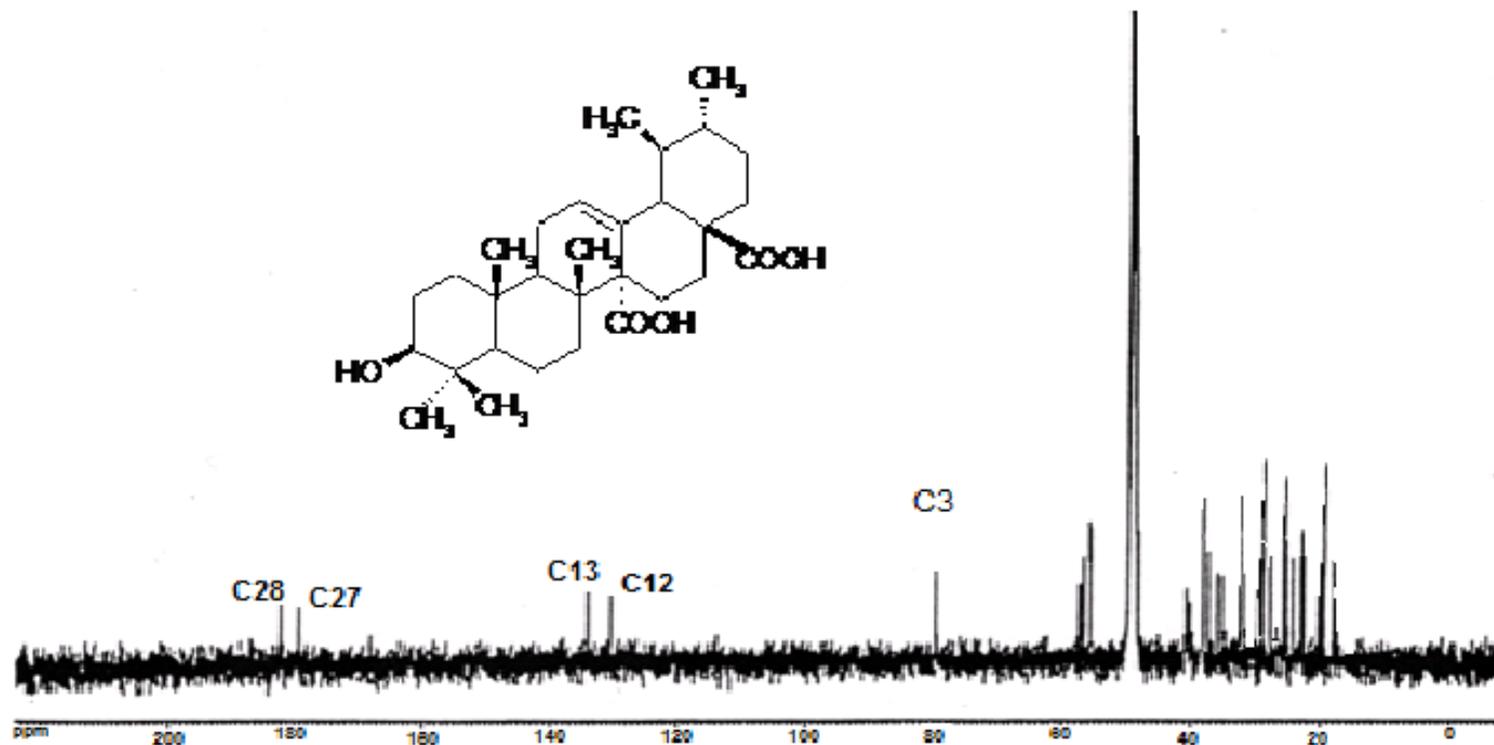


Figure 31 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (acide quinoïque) du composé 9 (CD<sub>3</sub>OD ,100MHz).

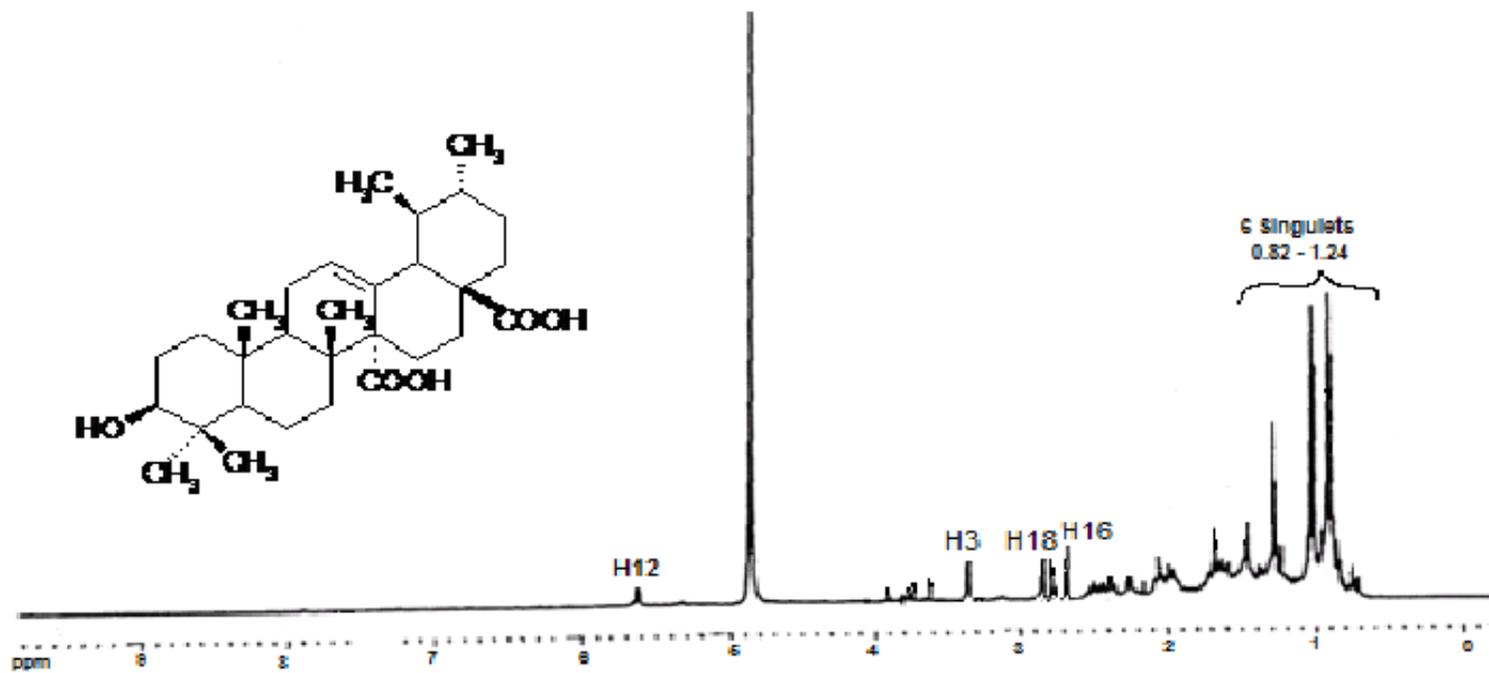
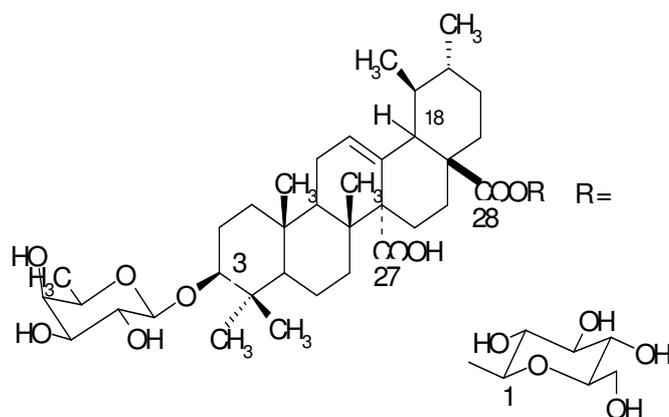


Figure 32 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (acide quinique) composé 9 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400MHz) .

### III-5- 2 Elucidation structurale du composé 7 et du composé 8.

Les saponosides isolés possèdent la même génine, l'acide quinovique.

#### III-5- 2-1 Détermination de la structure du composé 7. C7



#### 3-O- $\beta$ -D-fucopyranosyl-acide quinovique-(28 $\rightarrow$ 1) $\beta$ -D-glucopyranosyl ester

La structure de la génine a été identifiée par RMN du  $^{13}\text{C}$  et du  $^1\text{H}$  (Tableau 6). Il s'agit de l'acide quinovique.

On constate deux doublets à  $\delta=4,20\text{ppm}$  et  $5,40\text{ppm}$ , caractérisent deux protons anomériques ce qui justifie la présence de deux sucres. Les signaux observés sur les spectres RMN du  $^{13}\text{C}$  et du  $^1\text{H}$  ont permis d'identifier les sucres comme étant  $\beta$ -D-fucopyranose et le  $\beta$ -D-glucopyranose.

Le spectre RMN du  $^{13}\text{C}$  (figure 34) enregistré dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à  $100\text{MHz}$ , nous révèle un signal apparaissant à  $91,3\text{ ppm}$ , attribué au C-3 de la génine, déplacé vers les champs faibles par rapport à la génine seule ( $79,70\text{ ppm}$ ) ce qui confirme la présence de sucre sur ce carbone.

A partir du spectre HMQC (figure 35), nous observons deux corrélations entre le C-3 ( $\delta = 91,30\text{ ppm}$ ) et le H-3 ( $\delta = 3,14\text{ ppm}$ ) de la génine et le C-1 ( $\delta = 107,00\text{ ppm}$ ) et le H-1 ( $\delta = 4,20\text{ ppm}$ ) du sucre. A partir du spectre HMBC (figure 36), nous observons une corrélation, entre le H-1 ( $\delta = 4,20\text{ ppm}$ ) du sucre et le C-3 de la génine ( $\delta = 91,30\text{ ppm}$ ), ceci a permis d'identifier ce sucre au  $\beta$ -D-fucopyranose.

Le spectre HMBC (fig 36) révèle une corrélation entre le C-28 ( $\delta = 178,00\text{ ppm}$ ) de la fonction acide, et le proton H-1 ( $\delta = 5,40\text{ ppm}$ ) du sucre. Ces résultats indiquent une estérification du groupement carboxyle C-28 par une unité de  $\beta$ -D-glucopyranose.

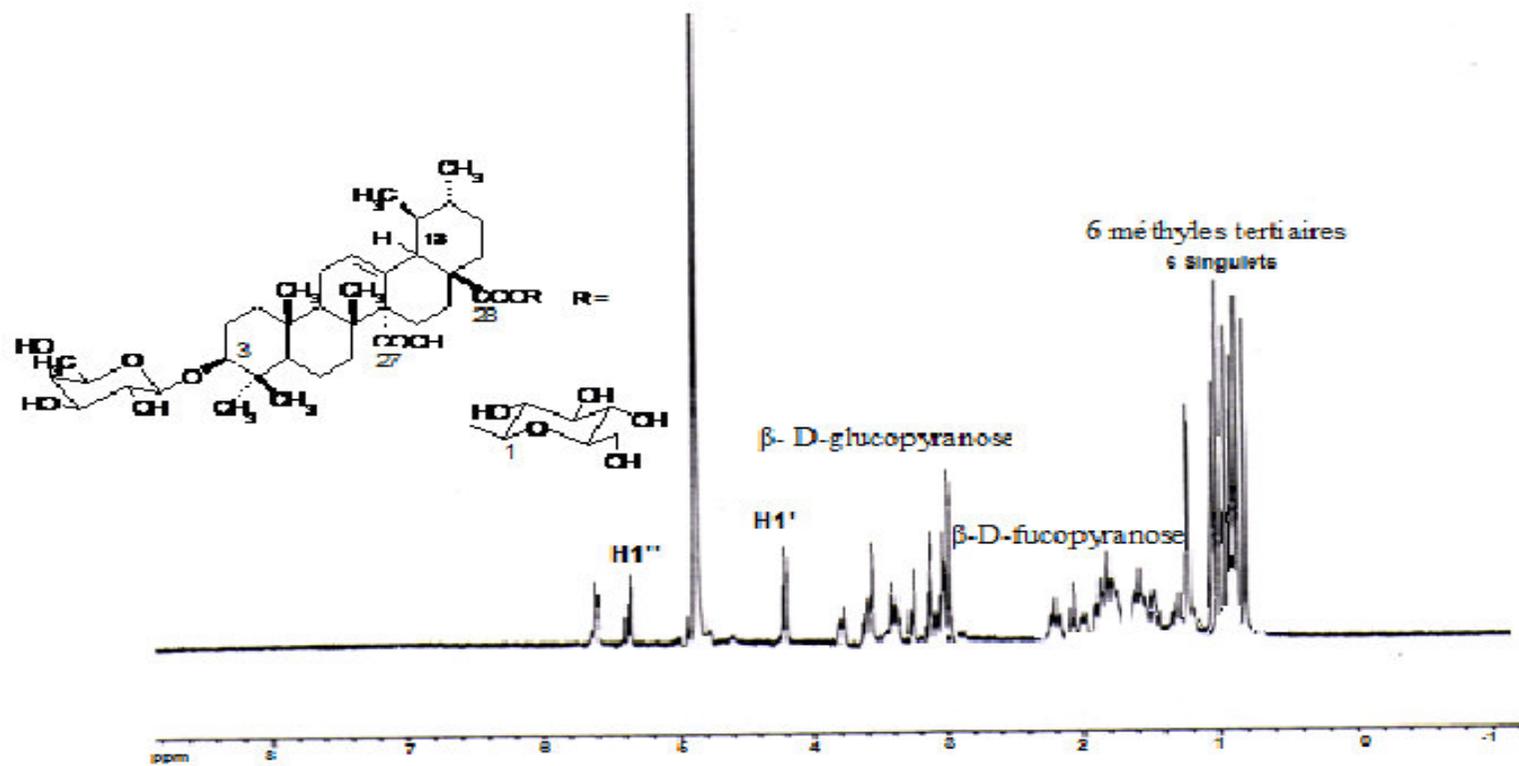


Figure33 : Spectre RMN du <sup>1</sup>H (saponine 3) du composé 7 (CD<sub>3</sub>OD ,400MHz)

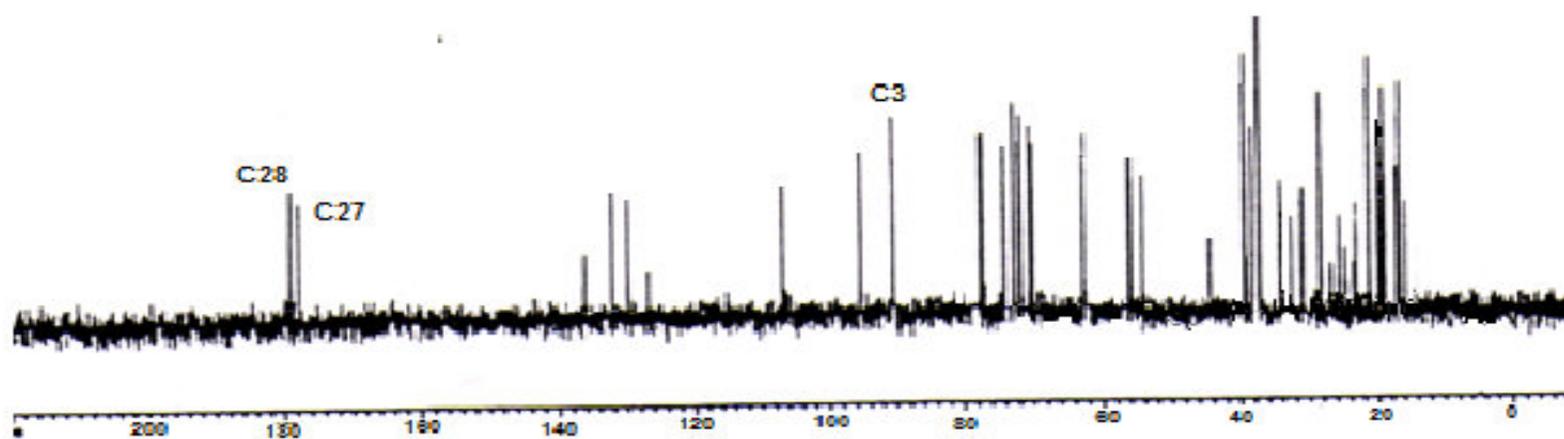


Figure34 : Spectre RMN du  $^{13}\text{C}$  (saponine 3) du composé 7 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100MHz)

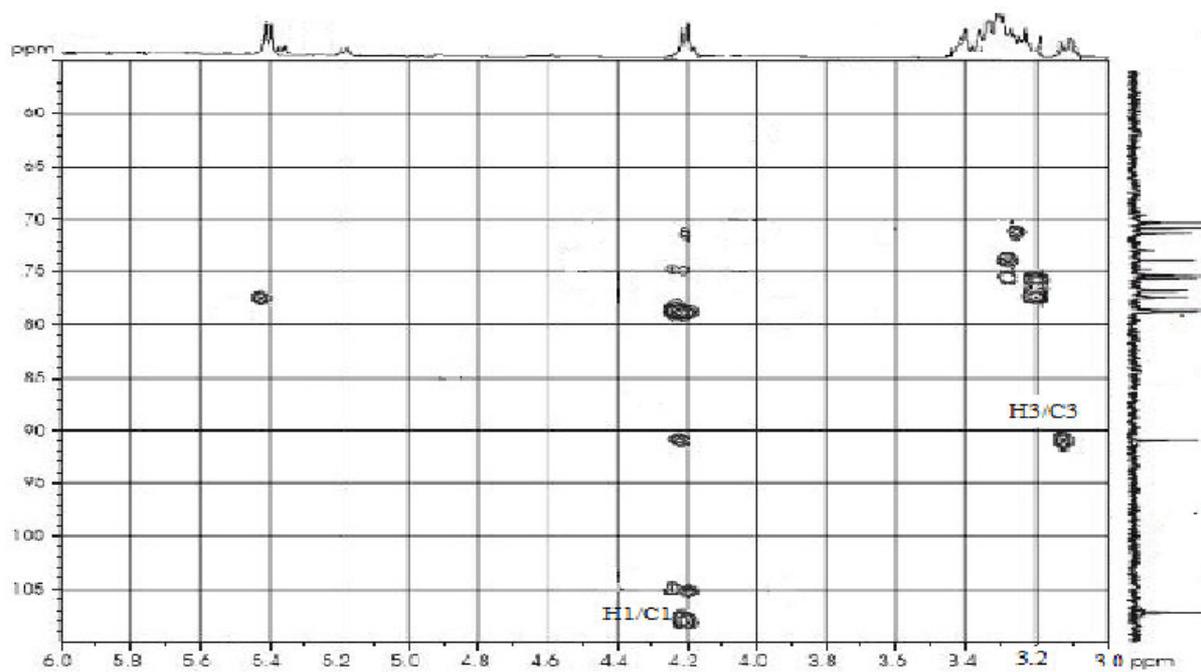


Figure 35 : Spectre HMQC du composé 7 (CD<sub>3</sub>OD)

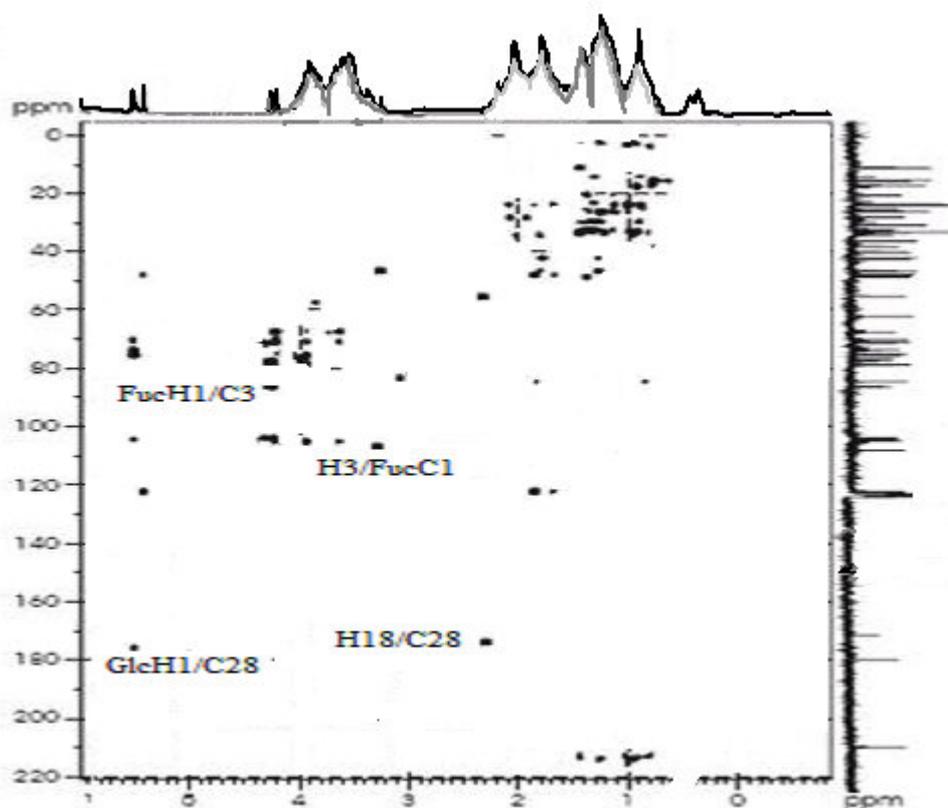


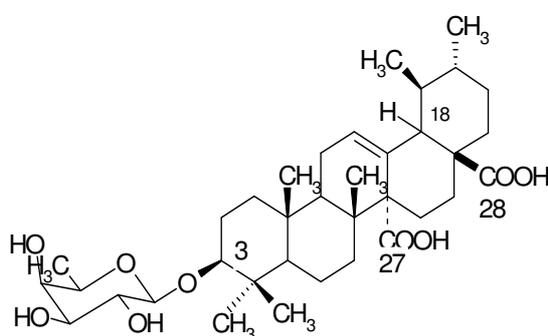
Figure 36 : Spectre HMBC partie osidique du composé 7 (CD<sub>3</sub>OD)

L'ensemble de ces données et ceux de la littérature ont permis d'établir la structure de la saponine 3 à : l'acide quinovique 3-O-β-D-fucopyranosyl (28→1) β-D-glucopyranosyl ester, isolé pour la première fois de l'espèce *Gladiolus segetum* (Lamidi, 1995).

**Caractéristiques** : Point de fusion : 230°,  $[\alpha]_D^{25}$  : +15.30°, (c 2.5 MeOH), Rf (système 1) = 0.32

**HR ESIMS** présente un pic pseudomoléculaire à :  $m/z = [M-H]^-$  793 d'où la masse est de 794 correspondant à la formule brute  $C_{42}H_{66}O_{14}$

### III-5-2-2 Détermination de la structure composé 8 (C8).



**acide quinovique 3-O-β-fucopyranoside**

Le composé 8 se présente sous forme de poudre blanche amorphe.

**Caractéristiques** :  $[\alpha]_D^{25}$  (C=2.5 ; MeOH) = +51°, Point de fusion : 217°, Rf (système 2) = 0.53.

**HR ESIMS** présente un pic pseudomoléculaire à :  $m/z = [M-H]^-$  631 d'où la masse est de 632 à laquelle correspond la formule brute de  $C_{36}H_{56}O_9$

### RMN

La structure de la génine a été identifiée par RMN du  $^{13}C$  et du  $^1H$  (Tableau 6) à l'acide quinovique.

A partir du spectre RMN  $^1H$  (Figure 36) enregistré dans  $CD_3OD$  à 400MHz, nous observons un seul doublet à  $\delta=4,22$  ppm, caractérisant un proton anomérique. Ce qui justifie la présence d'un seul sucre. Les signaux observés sur les spectres du RMN du  $^{13}C$  et du  $^1H$ , (Tableau 6) ont permis d'identifier le sucre comme étant le β-D-fucopyranose.

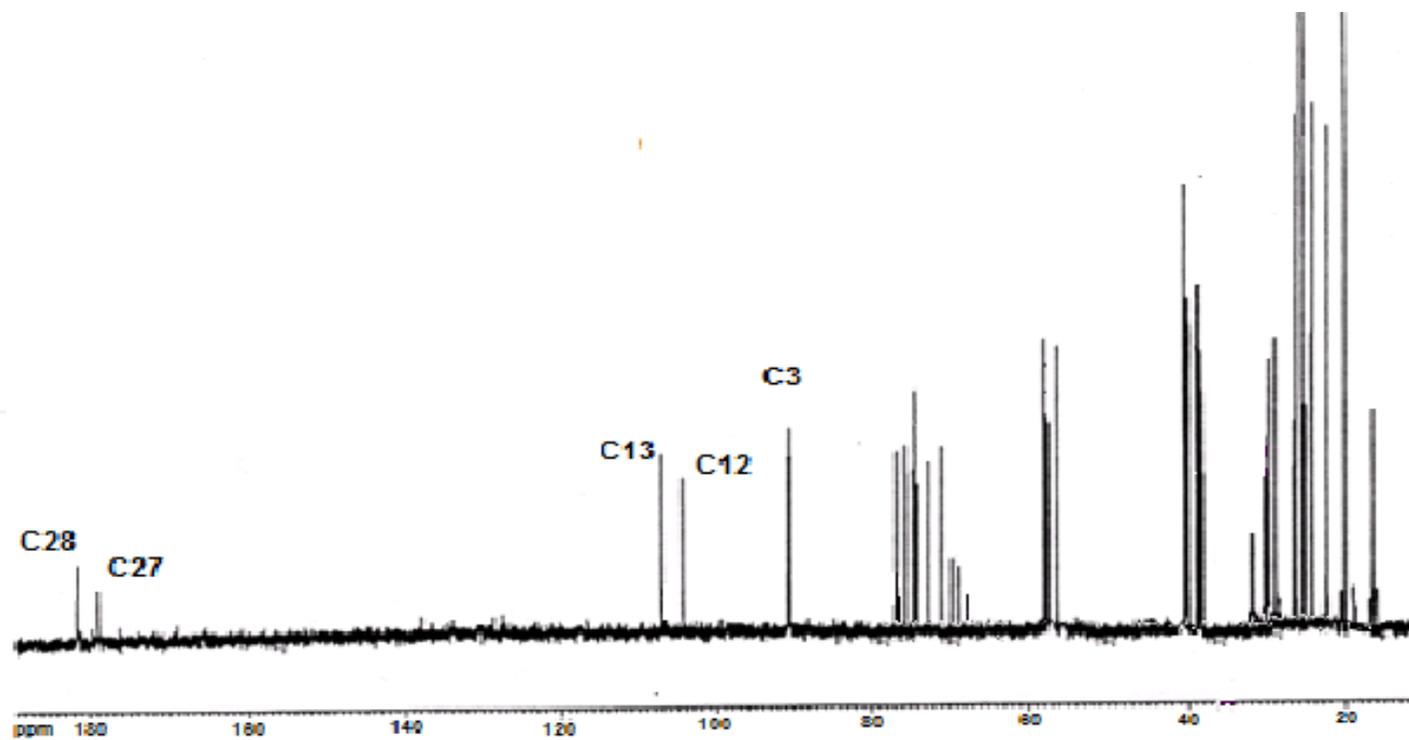


Figure 37 : Spectre RMN du  $^{13}\text{C}$  (saponine 4) du composé 8 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100MHz) .

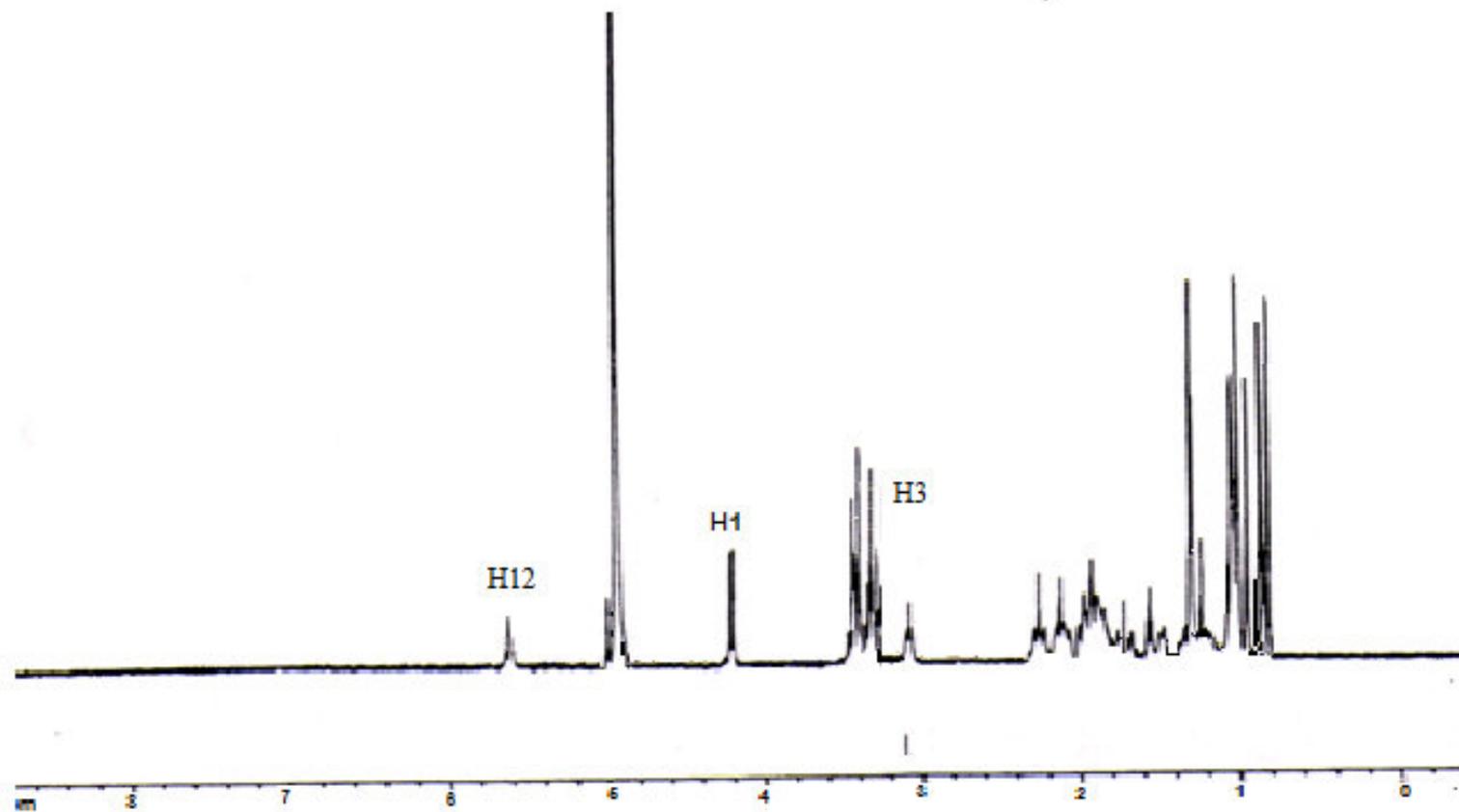


Figure 38 : Spectre RMN du  $^1\text{H}$  (saponine 4) du composé 8 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400MHz)

Le spectre RMN du  $^{13}\text{C}$  (figure 37) enregistré dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 100MHz, nous révèle un signal apparaissant à 90,67 ppm, attribué au C-3 de la génine, déplacé vers les champs faibles par rapport à la génine seule (79,70 ppm) ce qui confirme la présence de sucre sur ce carbone. Nous observons également deux signaux apparaissant à  $\delta=179,07$  ppm et  $\delta = 181,60$  ppm qui correspondent à la résonance des carbones C-27; C-28 porteurs des deux fonctions acides libres non estérifiées, par comparaison à la génine seule (acide médicagénique). A partir de ces résultats et des données de la littérature, nous pouvons attribuer au composé 8 la structure suivante : **acide quinovique 3-O- $\beta$ -fucopyranoside**, isolée pour la première fois de l'espèce *Gladiolus segetum* (Lamidi, 1995).

**Tableau 6 : Déplacements chimiques du  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100MHz) et du  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400MHz) du composé 7 (C7), du composé 8 (C8), de l'acide quinovique (C9). ( $\delta$  en ppm)**

Composé position	Composé9			Composé7			Composé8		
	H	(m J Hz)	C	C	H	(m J Hz)	C	H	(m J Hz)
1	0.88	(d, 12.7)	39.8	39.9	0.99	(m)	39.9	0.86	(m)
2	1.97	(m)	27.0	27.1	1.62	(m)	27.0	2.01	(m)
3	3.30	(dd, 3.8, 11.1)	79.7	91.3	3.14	(dd, 3.3, 10.6)	90.6	3.12	(dd, 3.8, 11.8)
4	-		40.1	40.4	-		40.4	-	
5	0.77	(m)	56.7	56.9	0.79	(m)	56.9	0.75	(m)
6	1.39	(m)	19.3	19.4	1.54	(m)	19.3	1.49	(m)
7	1.32	(d, 6.45)	37.5	37.6	1.29	(m)	37.8	1.30	(m)
8	-		40.7	40.8	-		40.7	-	
9	2.74	(dd, 5.1, 11.3)	48.0	48.9	1.68	(m)	48.0	-	
10	-		38.0	37.9	-		38.0	-	
11	2.14	(m)	24.0	24.7	2.01	(m)	23.9	2.00	(m)
12	5.61	(s)	129.4	129.5	5.60	(s)	130.4	5.62	(s)
13	-		134.0	132.9	-		133.9	-	
14	-		57.3	57.0	-		57.3	-	
15	1.80	(m)	26.4	26.0	1.78	(m)	26.5	1.79	(m)
16	2.64	(m)	26.1	25.7	1.80	(m)	25.7	-	

17	-		49.7	49.8	-		49.6	-	
18	2.82	(s)	55.6	55.3	2.29	(s)	55.5	2.82	(s)
19	1.69	(m)	40.2	40.0	1.70	(m)	40.1	1.70	(m)
20	1.33	(d)	38.3	38.3	1.35	(d)	38.3	1.34	(d)
21	1.39	(m)	31.3	31.0	1.40	(m)	31.2	2.09	(m)
22	2.01	(m)	38.0	37.0	1.81	(m)	37.6	2.01	(m)
23	1.15	(s)	19.1	19.8	0.83	(s)	19.2	0.87	(s)
24	1.08	(s)	28.6	28.6	1.04	(s)	28.5	1.01	(s)
25	1.00	(s)	16.4	16.8	0.94	(s)	16.9	0.96	(s)
26	0.94	(s)	18.2	18.0	0.85	(s)	18.2	0.82	(s)
27	-		179.2	179.0	-		179.1	-	
28	-		182.2	178.0	-		181.6	-	
29	1.24	(s)	16.2	17.0	0.93	(s)	17.1	0.90	1(s)
30	0.82	(d, 6.2)	21.5	21.5	1.19	(d, 6.9)	21.5	1.17	(d, 6.6)
				Sucre en C-3			Sucre en C-3		
				Fucose			Fucose		
1				107.0	4.20	(d, 7.2)	107.0	4.22	(d, 7.2)
2				73.0	3.45	(t, 8.4)	73.2	3.46	(t, 8.2)
3				75.3	3.40	(dd, 9.5, 3.5)	75.2	3.41	(dd, 9.0, 3.1)
4				72.8	3.44	(m)	73.0	3.45	(m)
5				71.6	3.33	(m)	71.6	3.35	(m)
6				17.0	1.25	(d, 5.8)	17.1	1.25	(d, 5.8)
				Sucre en C-28					
				Glucose					
1				95.7	5.40	(d, 7.7)			
2				73.3	3.30	(t, 8,4)			
3				78.4	3.38	(t, 8,9)			
4				71.1	3.34	(dd, 9,6-8,9)			

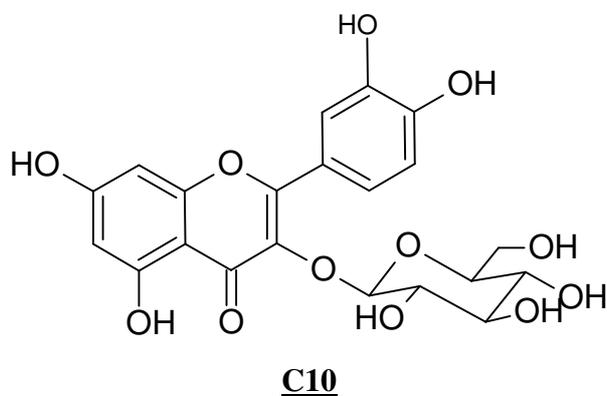
5		78.6	3.33 (dd, 9,6-4,9)	
6		62.5	3.67 (dd, 11, 94,9) 3.79 (dd, 12, 12,9)	

### III-6 Elucidation structurale du composé 10, composé 11 et composé 12.

#### III-6- 1 Introduction

L'étude de la fraction 3 (30-44) a conduit à l'isolement de trois flavonoïdes : l'isoquercitroside (composé **10**), de l'astragaloside (composé **11**) et du Kaempférol (composé **12**). La fraction 3 a été soumise à une BPLC, 100 fractions de 10 ml chacune, ont été collectées. Les fractions contenant le composé **10** (1-10), le composé **11** (16-25) et le composé **12** (51-70) sont purifiées par HPLC. L'analyse par CCM de la fraction 3 révèle la présence de trois spots, jaunes au visible.

#### III-6- 2 Elucidation structurale du composé 10 (C10)



Le spectre UV, effectué dans le méthanol, présente deux bandes d'absorption à 265 et 360 nm, qui est en accord avec les bandes d'absorption des flavonols (Yayli, 2001).

Le spectre IR présente des bandes d'absorption caractéristiques des groupements hydroxyles à 3000-3400  $\text{cm}^{-1}$  et carbonyle à 1620  $\text{cm}^{-1}$ .

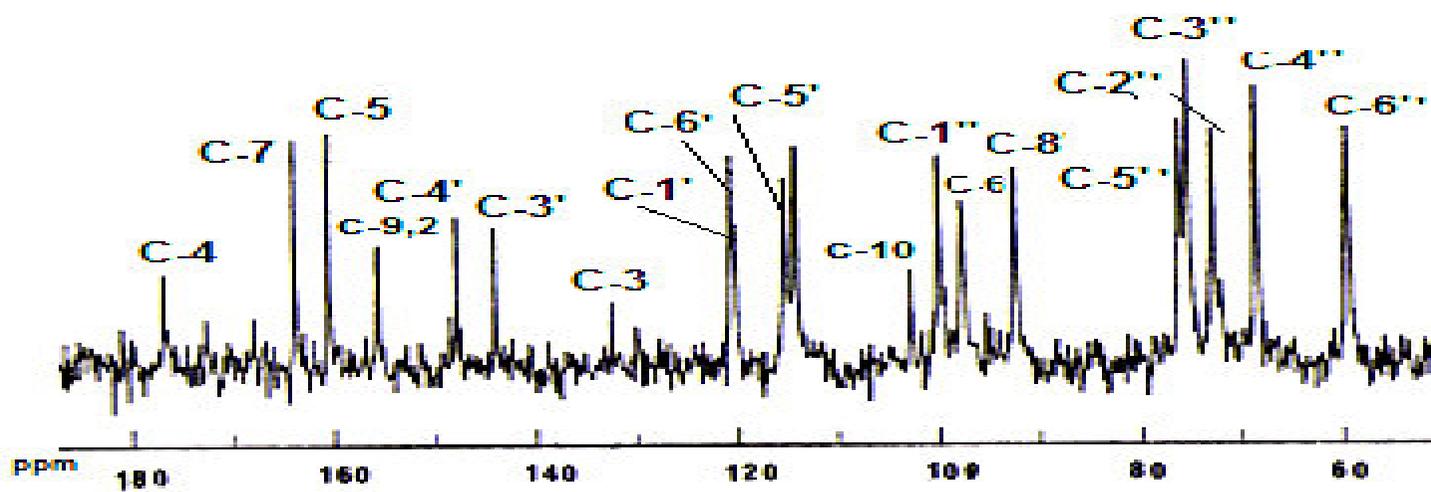


Figure39 : Spectre RMN du  $^{13}\text{C}$  du composé 10 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100MHz) ( $\delta$  en ppm).

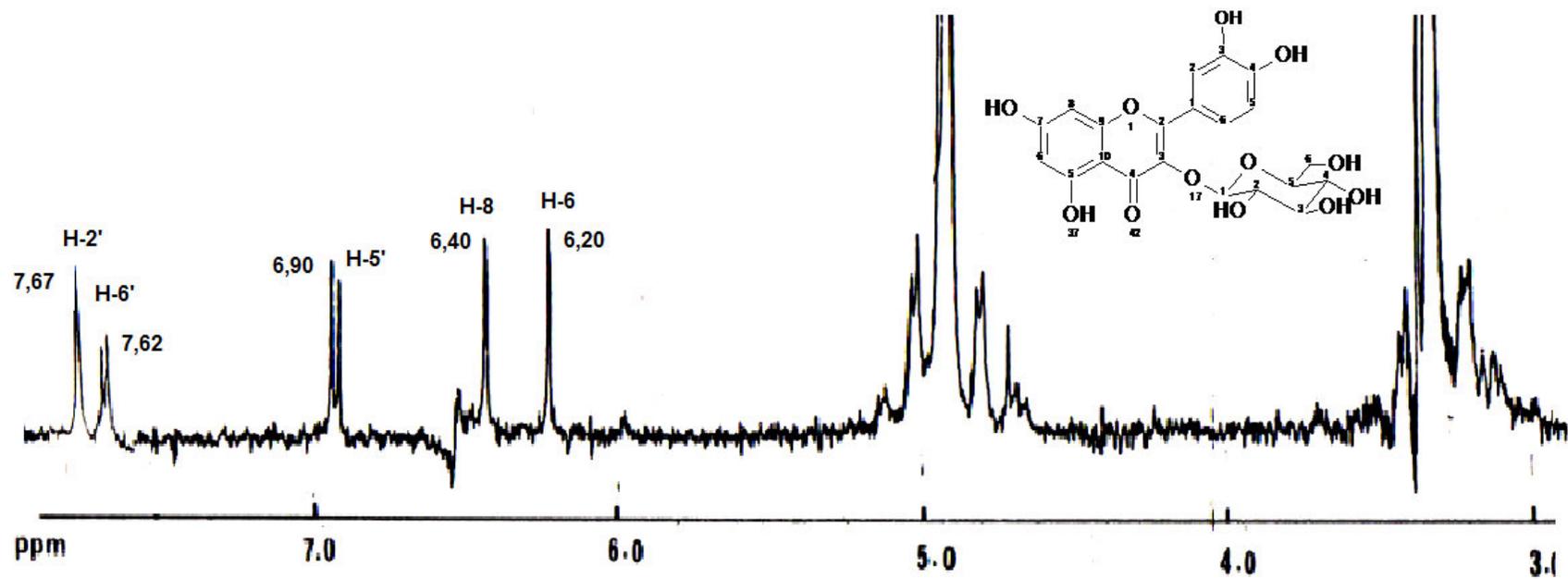


Figure 40 : Spectre RMN du  $^1\text{H}$  du composé 10 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400MHz) ( $\delta$  en ppm).

Le spectre RMN de  $^1\text{H}$  (fig. 40) enregistré dans du  $\text{CD}_3\text{OD}$ , à 400 MHz, nous permet d'observer deux doublets apparaissant, à 6,20 et 6,40 ppm,  $J=2,5$  Hz, caractéristiques des protons en position 6 et 8 des dérivés flavoniques substitués en 5 et 7. Un système AMX correspondant à deux protons en ortho sur un noyau benzénique apparaissant à 6.90 et 7.62 ppm,  $J= 8.5$  Hz, le deuxième proton subissant lui même un couplage avec un proton en méta,  $J'= 2.5$  Hz ; le signal correspondant à ce dernier apparaît à 7.67 ppm,  $J=2.5$  Hz.

Le spectre RMN de  $^{13}\text{C}$  (fig. 39) enregistré à 100 MHz, présente un signal à 175,70 ppm, du au carbone en position 4(C=O). Les signaux à 162,70, 159,5 et 143,00 ppm sont attribuables respectivement aux carbones hydroxylés en position 7, 5 et 3'.

Le signal à 146,70 ppm est attribuable au carbone en 4', qui est déplacé de 12 ppm vers les champs forts, sous l'influence de l'hydroxyle en 3'. Cette influence s'exerce sur les carbones en 2' et 6', plus fortement dans le cas du carbone 2' (carbone en ortho) (113,40 ppm) que dans le cas du carbone en 6' (para) (119,72)

Les signaux 154,60ppm sont dus aux carbones 2 et 9(quaternaires).

Un signal apparaissant 132.65 ppm est attribuable au carbone en position 3 (glucosylation de l'hydroxyle en 3). La glucosylation de cet hydroxyle a un effet sur le signal du carbone 2 (154,60) ppm), qui se traduit par un déplacement d'environ 9ppm vers les champs faibles.

Le signal à 119,60ppm et le signal à 114,64 ppm sont attribuables respectivement aux carbones en 1' et 5'.

L'effet de l'hydroxylation en position 7 sur les déplacements des carbones en positions 6 et 8 (ortho), fait apparaître les signaux à 97,00 et 91,70 ppm, respectivement.

Le signal à 99,30 ppm est attribuable au C-1'' du glucose lié au C-3 la génine.

## **Hydrolyse**

Quelques mg de produit sont chauffés dans un tube scellé avec quelque ml d'acide trifluoroacétique 2N pendant 45 mn à 120° C. Le refroidissement du contenu du tube provoque la formation d'un précipité. Le précipité est recueilli par filtration et le résidu de la phase aqueuse obtenu par évaporation sous pression réduite est conservé pour l'identification des sucres.

## **Analyse chromatographique**

Identification de la génine : l'examen de la génine, obtenue par hydrolyse, est effectué en présence du quercétol dans les conditions suivantes :

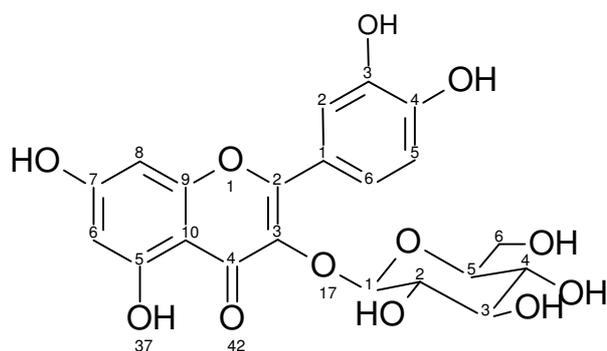
CCM sur silice : chloroforme / méthanol (9/ 1/ v/v)

Les résultats de l'examen en CCM confirment que la génine est bien le quercétol.

### Identification du sucre

L'hydrolyse acide a permis la libération d'un seul sucre identifié au glucose, par comparaison sur CCM à un authentique témoin.

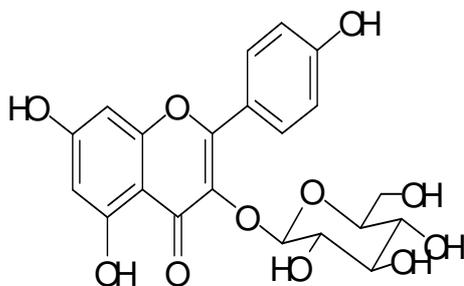
Conclusion : A partir de ces résultats et des données de la littérature, nous pouvons conclure que le composé 10 est le 3-O- $\beta$ -glucosylquercétol, isolé pour la première fois de l'espèce *Gladiolus segetum*.



**C10**

Formule brute :  $C_{21}H_{20}O_{12}$

### III-6- 3 Elucidation structurale du composé 11 (C11)



**C11**

Le spectre UV, dans le méthanol, présente deux bandes d'absorption à 272 et 358 nm qui est en accord avec les maximums d'absorption des flavonols (Yayli, 2001).

Le spectre IR présente à  $3250\text{ cm}^{-1}$  la bande d'absorption caractéristique des groupements hydroxyles et à  $1650\text{ cm}^{-1}$  celle du groupement carbonyle de l'hétérocycle central.

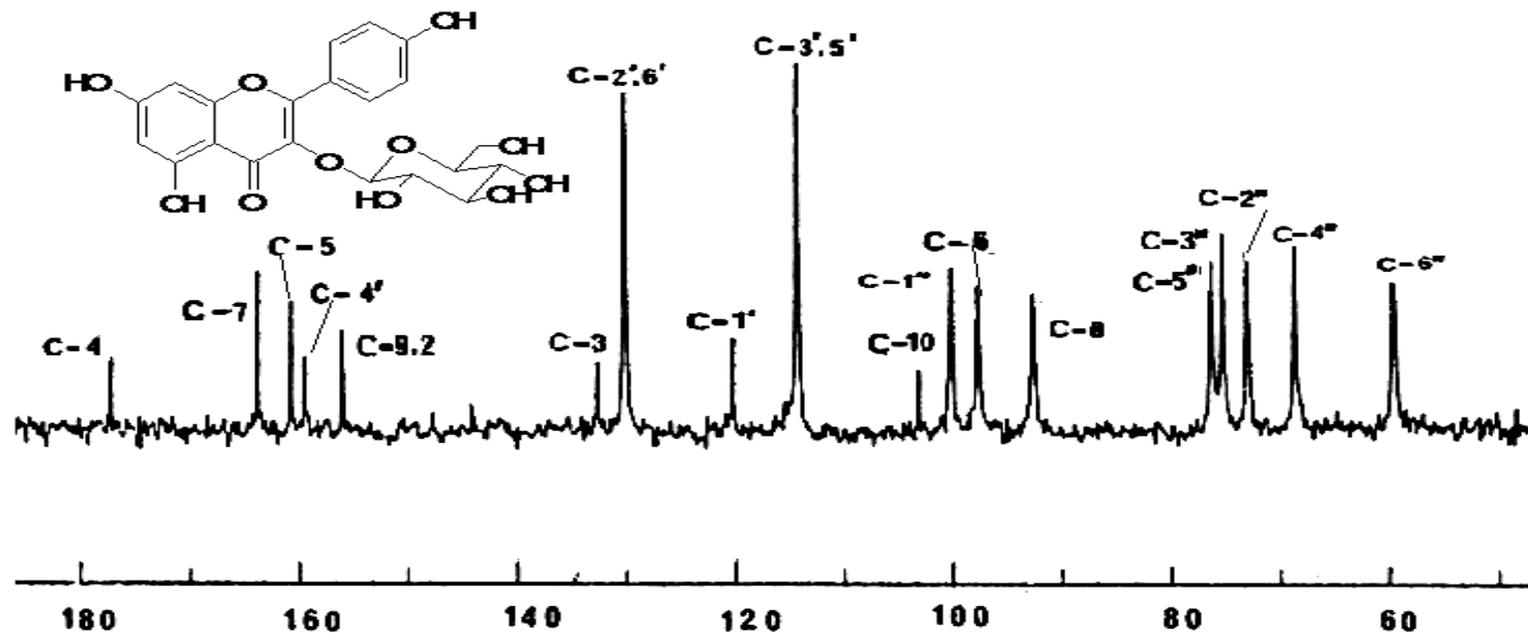


Figure 41 : Spectre RMN du <sup>13</sup>C du composé 11 (CD<sub>3</sub>OD, 100MHz) (δ en ppm).

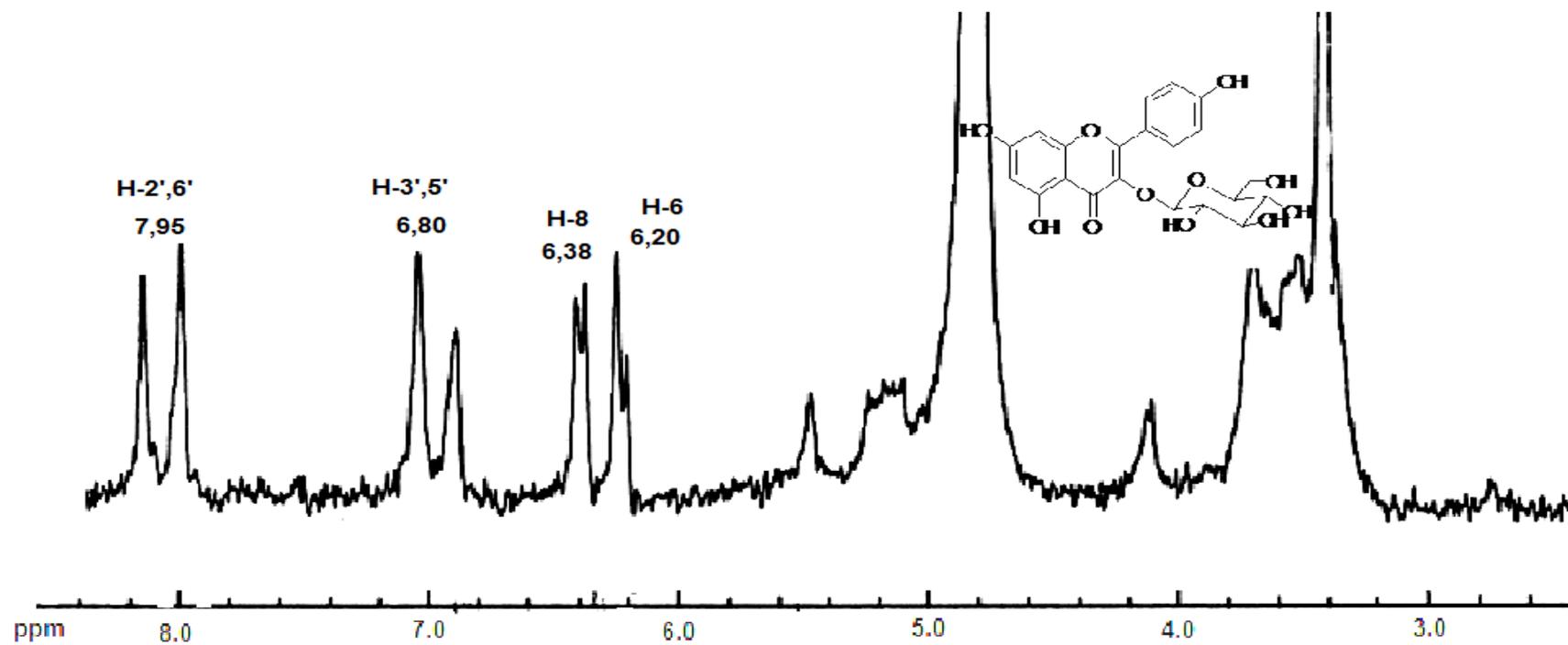


Figure 42 : Spectre RMN du  $^1\text{H}$  du composé 11( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400MHz) ( $\delta$  en ppm).

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (fig. 42) enregistré dans du  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 400 MHz, révèle la présence de deux doublets apparaissant à 6.80 et 7.95 ppm, caractéristique du couplage en ortho ( $J=8.5$  Hz) d'un noyau aromatique monosubstitué en 4'. Le signal à 6.80 ppm est dû à la résonance des deux protons en 3' et 5', celui-ci est déplacé vers les champs forts à cause de l'hydroxylation du carbone en 4', par rapport au signal à 7.95 ppm dû à la résonance des protons en 2' et 6'. Nous observons également deux doublets résonnant à 6.20 et 6.38 ppm, caractéristique du couplage méta ( $J= 2.5$  Hz), sont attribuables respectivement aux protons en position 6 et 8. À partir des données de ce spectre nous pouvons déduire que le composé 11 est substitué en 3, 5, 7, et 4'.

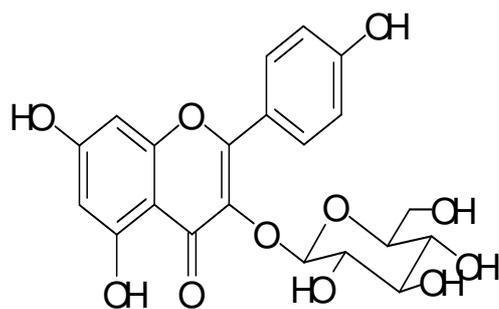
Le spectre de RMN  $^{13}\text{C}$  (fig. 41) enregistré dans du  $\text{CD}_3\text{OD}$  à 100 MHz, nous permet d'observer un signal à 175.83 ppm, dû à la résonance du carbone en C-4 ( $\text{C}=\text{O}$ ) ; ainsi que des signaux apparaissant à 162,50, 159,46 et 158,48 ppm, dus respectivement aux carbones hydroxylés en position 7, 5 et 4'. L'effet de la substitution en position 3 (déblindage) dans le cas des flavonols se traduit par le déplacement du signal du carbone en position 2 vers les champs faibles, et sa superposition avec le signal du carbone 9 à 154,77 ppm. Les signaux de faible intensité à 131,58, 119,23 et 102,25 ppm (carbones quaternaires) sont respectivement attribuables aux carbones en 3, 1' et 10. Les signaux à forte intensité apparaissant à 129,15 et 113,32 ppm, sont dus à la résonance des carbones en position 2', 6' et 3', 5'. Ceci confirme que le cycle est monosubstitué en position 4'. Le signal à 99,32 ppm est attribuable au C-1'' du glucose lié au C-3 du kaempférol. Enfin, les deux signaux à 96,89 et 91,84 sont respectivement attribuables aux carbones en positions 6 et 8 (Markham, 1978), (Lallemand, 1977).

### **Hydrolyse, examens chromatographiques**

Conditions opératoires identiques à celles du composé 10. L'examen en CCM de la génine en présence d'un témoin de kaempférol dans le système chloroforme / méthanol/ (9/1/ v/v) confirme l'identité de la génine et du kaempférol.

Le sucre est identifié au glucose.

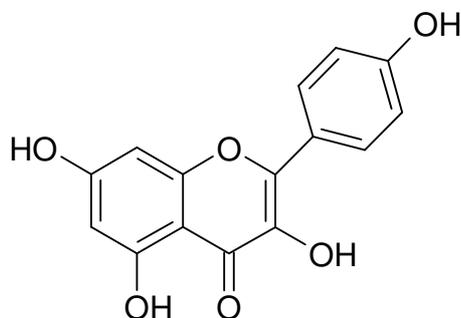
**Conclusion** : à partir de nos résultats et des données de la littérature, nous avons identifié le composé 2 au 3-O- $\beta$ -glucosylkaempférol, isolé pour la première fois de l'espèce *Gladiolus segetum*.



**C11**

**Formule brute : C<sub>21</sub> H<sub>20</sub> O<sub>11</sub>**

#### **III-6- 4 Elucidation structurale du composé 12 (C12)**



**C12**

Le spectre UV, dans le méthanol, présente deux maximums d'absorption à 270 et 350 nm qui est en accord avec les maximums d'absorption des flavonols (Yayli, 2001).

Le spectre IR présente à 3250 cm<sup>-1</sup> la bande d'absorption caractéristique des groupements hydroxyles et à 1620 cm<sup>-1</sup> celle du groupement carbonyle.

#### **Analyse chromatographique**

L'examen en CCM du composé 12 en présence d'un témoin de kaempférol dans le système chloroforme / méthanol (9/1) confirme l'identité de ce composé au kaempférol, isolé pour la première fois de l'espèce *Gladiolus segetum*.

**Tableau7 : Déplacements chimiques du <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100MHz) et du <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD ,400MHz) de composés 11 et 12. (δ en ppm)**

Aglycone	Composé 11			Composé 12		
	δ C	δH	(m, J Hz)	δC	δH	(m, J Hz)
1			-			-
2	154.60		-	154.8		-
3	132.65		-	131.6		-
4	175.70		-	175.8		-
5	159.5	7.62	d (8.5)	159.5		-
6	97.0	6.20	d (2.5)	96.8	6.20	d (2.5)
7	162.7	6.90	d (8.5)	162.5		-
8	91.7	6.40	d (2.5)	91.8	6.38	d (2.5)
9	154.5		-	154.8		-
10	102.0		-	102.2		-
1'	119.6		-	119.2		-
2'	113.4	7.67	d (2.5)	129.2	7.95	d (8.5)
3'	143.0		-	113.3	6.80	d (8.5, 2.5)
4'	146.7		-	158.2		-
5'	114.4	6.90	d (8.5)	113.3	6.80	d (8.5, 2.5)
6'	119.7	7.62	dd (8.5, 2.5)	129.2	7.95	d (8.5)
<b>Sucres</b>						
1	99.3	4.89	d (7.7)	99.3	3.93	d (7.8)
2	72.2	3.43	m	72.3	3.43	m
3	74.6	3.45	m	74.6	3.45	m
4	71.6	3.46	m	71.7	3.46	m
5	75.6	3.40	m	75.5	3.40	m
6	59.1	3.89	dd (2.2 ,12)	58.9	3.88	dd (2.6, 12)
		3.69	dd <sup>98</sup> (5.4, 12)		3.70	dd (4.6, 12)

### III-7 Elucidation structurale du Daucostérol (composé 13) et du $\beta$ -sitostérol (composé 14) de l'acide bétulinique (composé 15), l'ergostérol (composé 16), le stigmastérol (composé 17), le cholestérol (composé 18) et l'acide ursolique (composé 19).

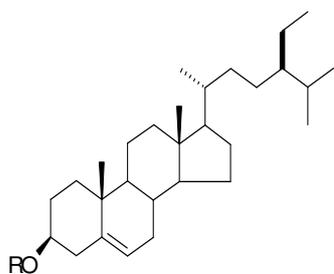
L'étude de la fraction 7 (96-100) a conduit à l'isolement du daucostérol et le sitostérol, la fraction 7 a été soumise à une BPLC, 80 fractions de 10 ml chaque, ont été collectées. Les fractions contenant les composés **13** et **14** (68-80), sont rassemblées puis purifiées par HPLC semi-préparative.

L'analyse par CCM de la fraction 7 révèle la présence des deux composés colorés en rose-violet. Le daucostérol se présente sous forme de poudre beige amorphe, Le  $\beta$ -sitostérol se présente sous forme de cristaux fins.

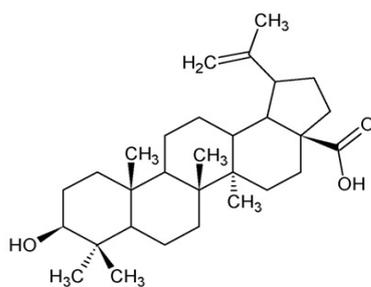
L'étude de la fraction 9 (106-108) a conduit à l'isolement de 5 composés. Après soumission de cette fraction en BPLC (chromatographie basse performance), nous avons obtenus trois fractions. L'acide bétulinique (**15**) a été isolé de la F-2 (15-25), l'ergostérol (**16**), le stigmastérol (**17**) et le cholestérol (**18**) de la F-3 (26-55) et l'acide ursolique (**19**) de la F-4(56-80).

L'analyse par CCM de la fraction 9 révèle la présence de plusieurs composés colorés en rose-violet (système 2.) L'acide bétulinique et l'acide ursolique se présentent sous forme de poudre blanche amorphe. L'ergostérol, le stigmastérol, le cholestérol ont été isolés sous forme de cristaux.

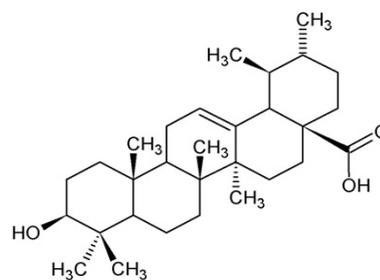
L'examen en CCM de ces composés en présence de témoins dans le système (2) chloroforme / méthanol/ (9/1) et les données de la littérature, comparées à nos résultats confirme l'identité de ces molécules.



C14 R=H  $\beta$ -sitostérol

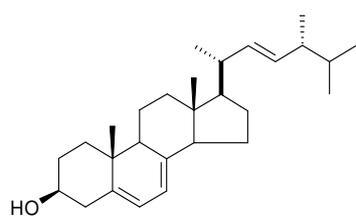


C15 acide bétulinique

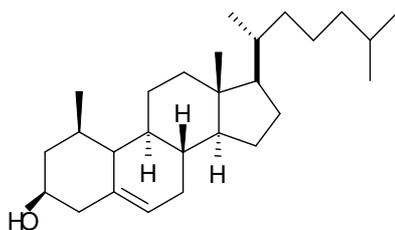


C19 acide ursolique

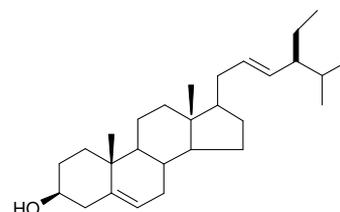
C13 R= glucose, daucostérol



C16 ergostérol



C17 cholestérol



C18 stigmastérol

### III- 8 Extraction et purification du dérivé benzofuranique, composé 20 (C20):

Les parties aériennes sont traitées selon le schéma classique d'extraction (Fig.43). La poudre est extraite par des solvants de polarité croissante, hexane, chloroforme et acétate d'éthyle. Après filtration est concentration à sec l'extrait à l'acétate d'éthyle est soumis en CC pour fractionnement. L'élution a été effectuée dans un premier temps par de l'hexane suivit d'un gradient de solvants acétate d'éthyle/méthanol (100/0, 0/100). Toutes les fractions contenant les mêmes composés, sont rassemblées puis concentrées. Six fractions ont été obtenues. Le dérivé benzofuranique a été isolé de la Fr-2, après purification sur CC à l'aide d'un gradient de solvants CHCl<sub>3</sub>/MeOH.

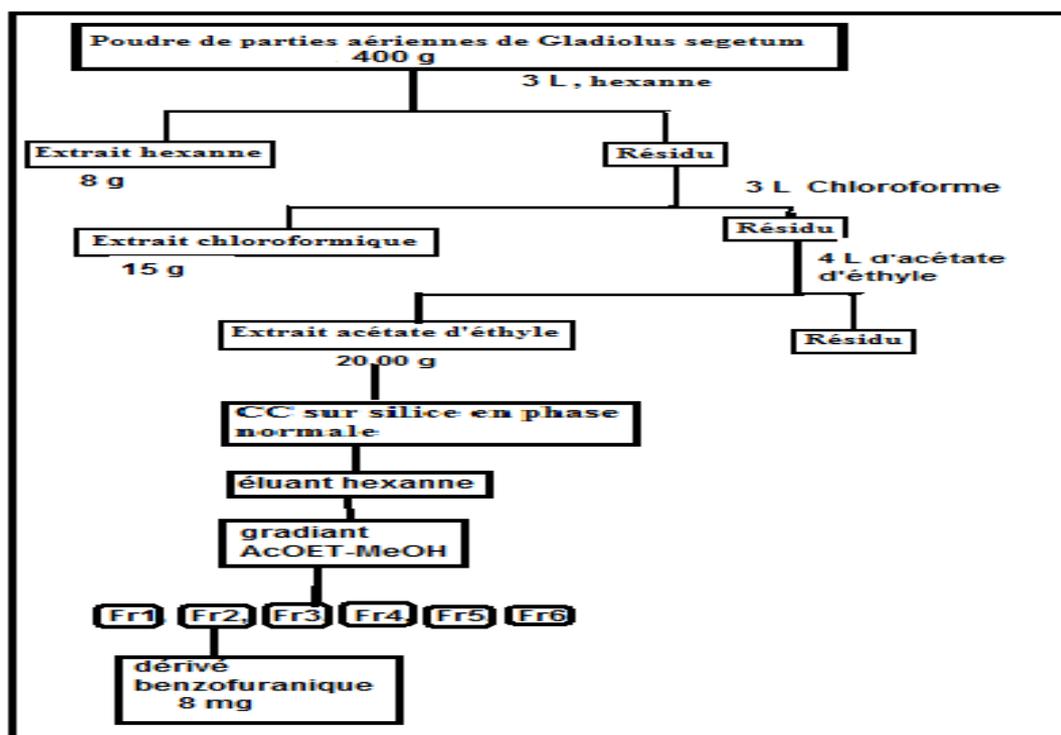


Figure 43 : Schéma d'extraction et de purification du dérivé benzofuranique

## Elucidation structurale :

Se présente sous forme de fines aiguilles jaune pale.

**Caractéristiques :** Point de fusion : 160–162°C ; Pouvoir rotatoire :  $[\alpha]_D^{25}$  (C=0.1 ; MeOH) = + 25.5°

**HR ESIMS** présente un pic moléculaire à :  $m/z = [M+Na]^+$  : 263.3501 correspondant à la formule brute  $C_{11}H_{12}O_6$

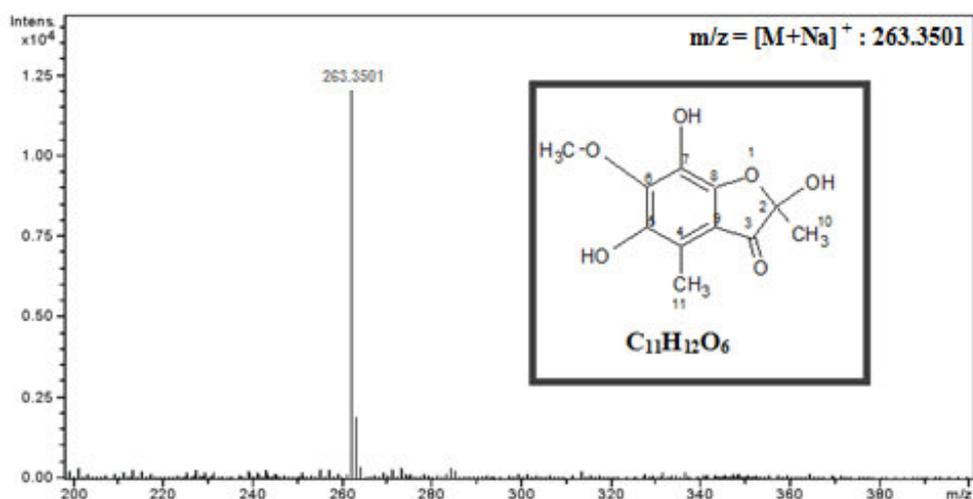


Figure 44 : Spectre de masse ESI en mode positif du dérivé benzofuranique **C20**

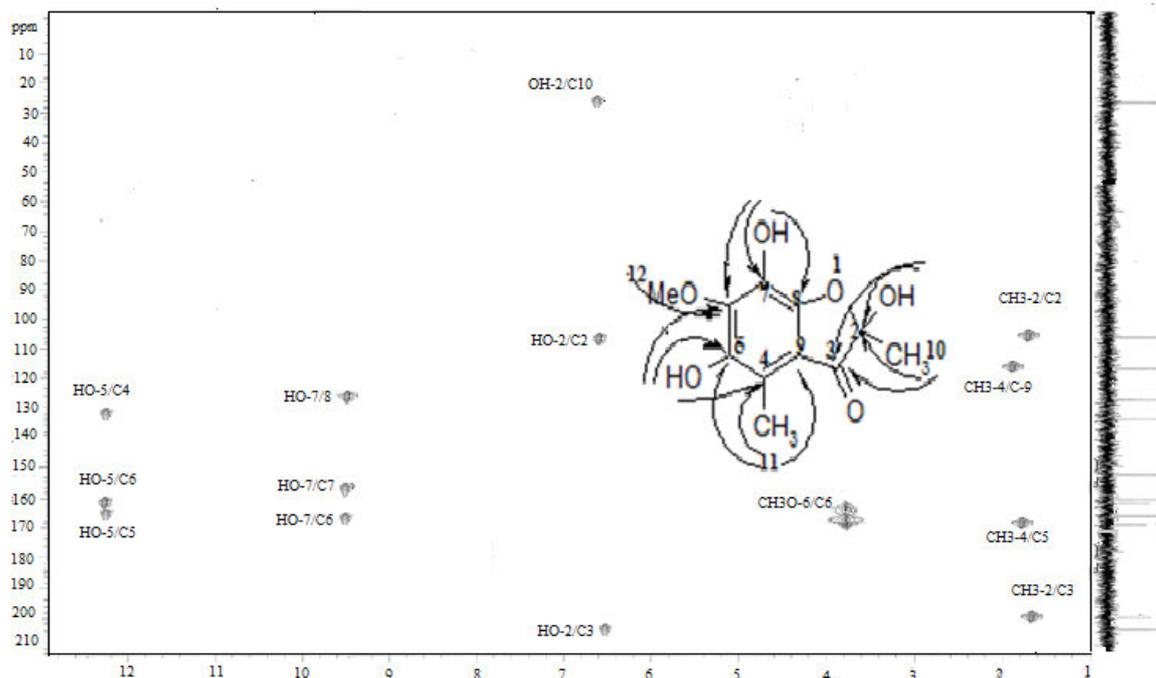
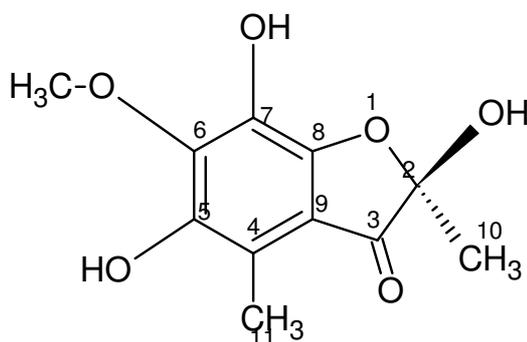


Figure 45 : Spectre HMBC du dérivé benzofuranique ( $CDCl_3$ )

**UV** : Le spectre UV (MeOH), présente quatre maximums d'absorption  $\lambda_{\max}$  : 230, 275, 340, 420 nm;

**IR** : Le spectre IR (KBr): présente des bandes d'absorption caractéristiques des groupements hydroxyles phénoliques à 3337, 3200 et 3000  $\text{cm}^{-1}$ , liaisons C-O à 1720  $\text{cm}^{-1}$ , des fonctions carbonyle à 1665  $\text{cm}^{-1}$ , des noyaux aromatiques à 1630, 1594 et 1420  $\text{cm}^{-1}$ , des liaisons C-O-C à 1088, d'un alcool tertiaire à 1180  $\text{cm}^{-1}$ .



**(R) 2, 5, 7-trihydroxy-2, 4-dimethyl-6-methoxy-1- benzofuran-3-one. C20**

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  (figure 47) enregistré dans du  $\text{CDCl}_3$  à 300 MHz, révèle la présence de deux groupement hydroxyle (phénolique) à  $\delta$  12,2 et  $\delta$  9,22 ppm. Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  enregistré dans du  $\text{CDCl}_3$  à 75 MHz, indique la présence d'un groupement carbonyle à  $\delta$  201,4 ppm ainsi que la présence de signaux correspondant à 10 carbones attribués à deux groupements méthyle  $\delta$  22,4 et 17,4, un groupement methoxy à  $\delta$  61,2, six carbones aromatiques à  $\delta$  120, 116, 162,5, 132,3, 150 et 165,4, et un carbone quaternaire à  $\delta$  105,1. À partir de ces valeurs on peut déduire que ce composé comprend un noyau benzénique, une fonction cétone et une fonction hemiacetal  $\delta$  105,1 (Serkerov, 1978), (Shing, 2013), (Nema, 2010).

L'expérience HMBC (figure 45) permet de visualiser les corrélations (couplages  $^2\text{J}_{\text{H-C}}$  et  $^3\text{J}_{\text{H-C}}$ ):

9,22 (OH-7)  $\rightarrow$  C-6 (162,5), C-7 (150,0) et C-8 (120)

6,50 (OH-2)  $\rightarrow$  C-2 (105,1), C-3 (201,4) et C-10 (22,4)

12,2 (OH-5) →C-4 (132,3), C-5 (165,4), et C-6 (162,5)

Ces corrélations justifient la position de ces groupements hydroxyles.

Les signaux attribués aux groupements méthyle et méthoxy sont observés à 1,53 (C-10), 1,60 (C-11) et 3,94 (C-12).

Le signal à  $\delta$  1,53 est attribué à un proton du groupement méthyle en position (C-2). Cette attribution est vérifiée à partir des corrélations HMBC entre ce proton et les carbones C-3 ( $\delta$ 201, 1) et C-2 (105,2).

La corrélation HMBC entre les signaux à  $\delta$  3,94 (CH<sub>3</sub>O) et 162,5 (C-6), situe le groupement méthoxy en position C-6.

Le signal à  $\delta$  1.60 est attribué à un proton appartenant au groupement méthyle en position C-4. Ces attributions sont confirmées à partir des corrélations HMBC entre ce proton en position C-4 et les carbones C-9 ( $\delta$  116,0) et C-5 ( $\delta$  165,4).

A partir des résultats spectraux, de la valeur du pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D^{25} = + 25.5^\circ$ , C= 0.1mg/100 ml dans du MeOH) et en comparaison avec les données de la littérature, nous avons pu attribuer à ce composé, la structure suivante : **(R) 2, 5, 7-trihydroxy-2, 4-diméthyl-6-méthoxy-1- benzofuran-3-one**, isolé pour la première fois.

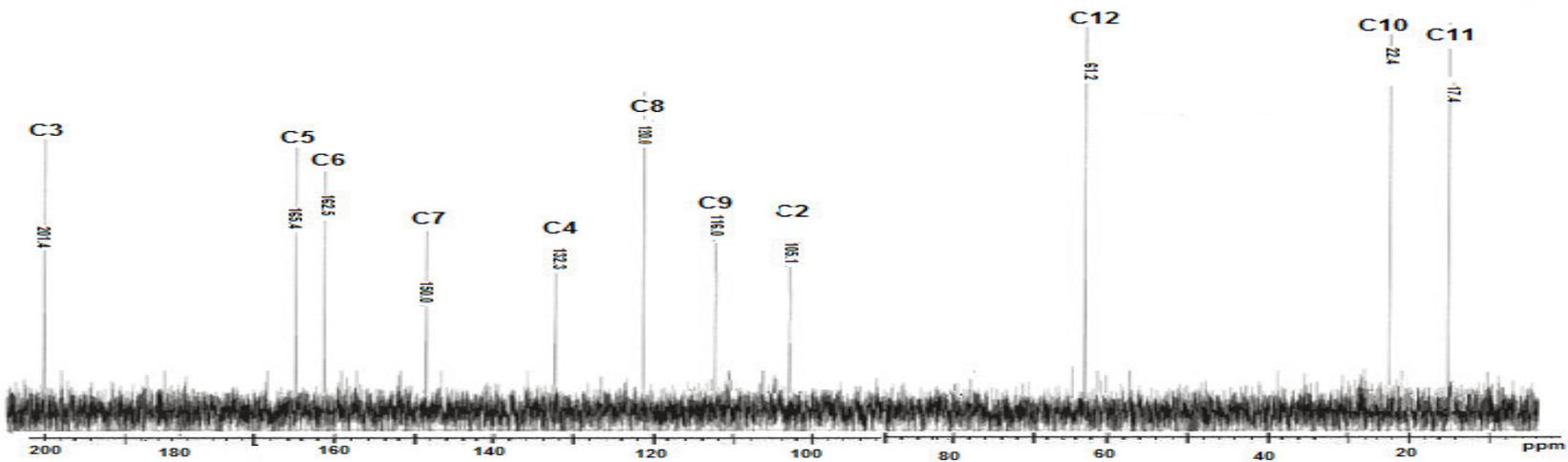


Figure 46 : Spectre RMN du <sup>13</sup>C du dérivé benzofuranique C20, (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) (δ ppm)

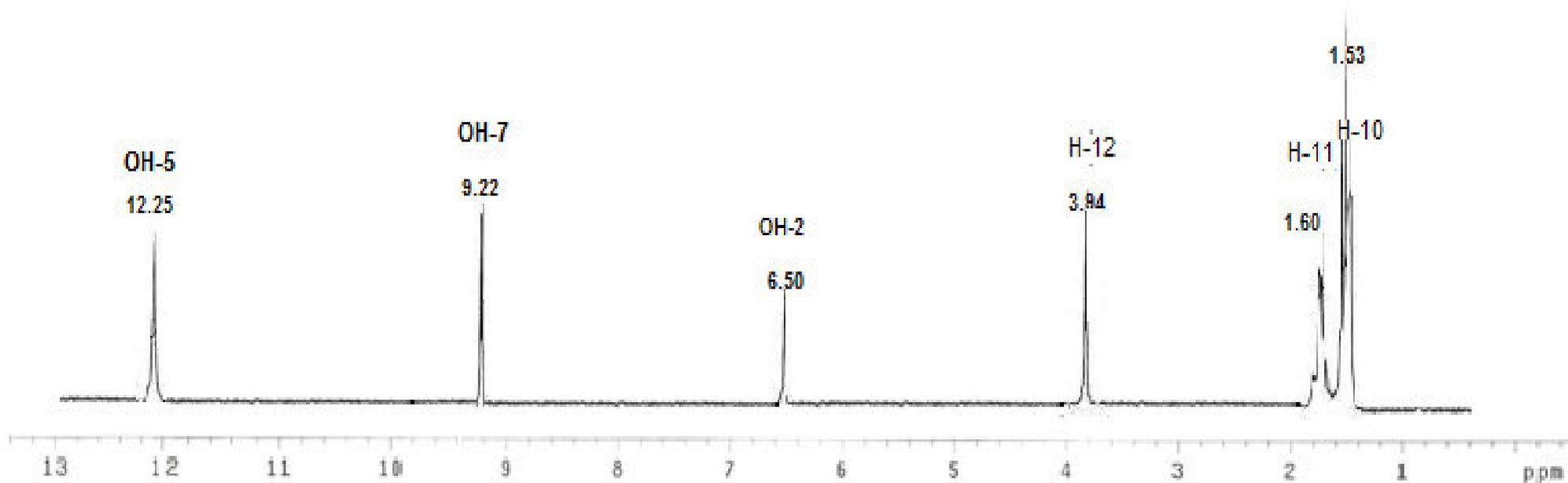


Figure 47 : Spectre RMN du  $^1\text{H}$  du dérivé benzofuranique C20 ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz ( $\delta$  ppm)).

**Tableau 8 : Déplacements chimiques RMN <sup>1</sup> (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz), et <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) du dérivé benzofuranique C20 (δ ppm)**

Composé 20			
position	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR (m, J Hz)	HMBC
1	-	-	
2	105.1	-	H-10, OH-2
3	201.4	-	H-10, OH-2
4	132.3	-	H-11, OH-5
5	165.4	-	H-11, OH-5, H-12
6	162.5.	-	H-12, OH-5, OH-7
7	150.0	-	H-12, OH-7
8	120.0	-	OH-7
9	116.0	-	H-11
10	22.4	1.53 (s)	OH-2
11	17.4	1.60( s)	-
12	61.2	3.94 (s)	-
2-OH	-	6.50 (s)	-
5-OH	-	12.2 (s)	-
7-OH	-	9.22 (s)	-

**CHAPITRE IV**  
**Activités biologiques**

#### IV- 1 Activités biologiques

Le but de notre étude est de déterminer la cytotoxicité éventuelle du *Gladiolus segetum* vis-à-vis de fibroblastes humains MRC-5. Les tests ont été réalisés d'une part, sur l'extrait chloroformique, l'extrait à l'acétate d'éthyle, l'extrait méthanolique et sur deux molécules que nous avons isolés, saponine 1 et saponine 2, en utilisant la technique du Rouge Neutre et d'autre part sur les neuf fractions obtenues par fractionnement de l'extrait MeOH par DCCC en utilisant la technique LDH (Grare, 2007), (Borenfreund, 1985).

#### IV-2-Résultats

Pour les différents extraits et les deux molécules isolées, les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous, sont exprimés à l'aide de  $CC_{50}$ .

Les  $CC_{50}$  (Concentration Cytotoxique à 50 % ; concentration pour laquelle la mortalité des cellules mesurée par la libération d'un colorant vital, est inférieure de 50% par rapport à un témoin cellulaire non traité) sont :

Composés/extraits	$CC_{50}$ Value, (mg/ml)
Extrait MeOH	< 4
Extrait AcOET	4
Extrait $CHCl_3$	5
Molécule 1	< 5
Molécule 2	< 5

Pour les neuf fractions, les résultats sont exprimés par une courbe représentant le pourcentage de toxicité en fonction de différentes concentrations (mg/ml) après 24h d'exposition (figures 46-54).

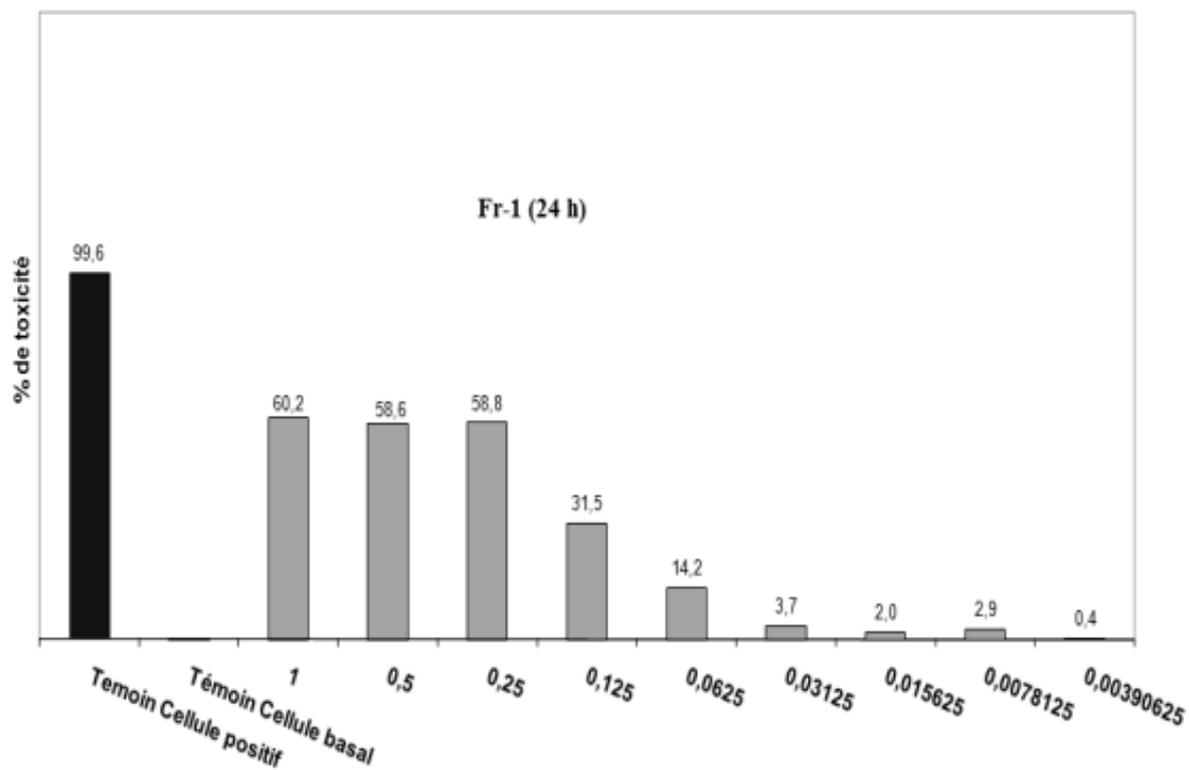


Figure 48. Cytotoxicité de la fraction 1 en fonction de différentes concentrations (mg/ml) après 24h d'exposition.

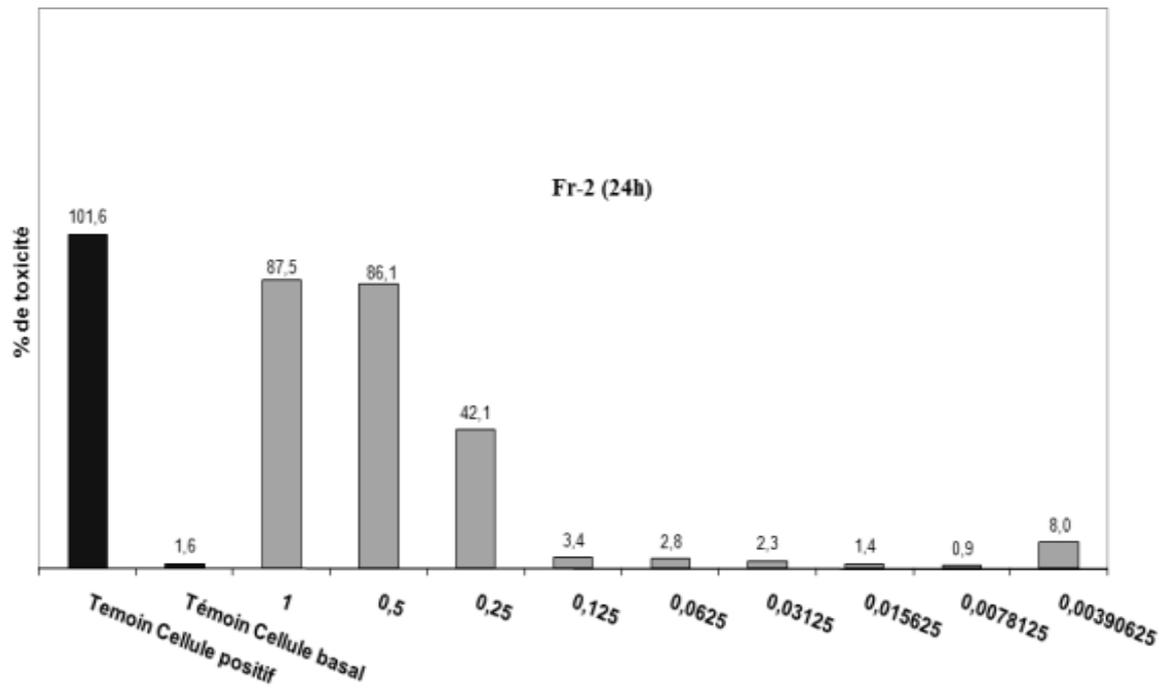


Figure 49. Cytotoxicité de la Fr 2 en fonction de différentes concentrations (mg/ml) après 24h d'exposition.

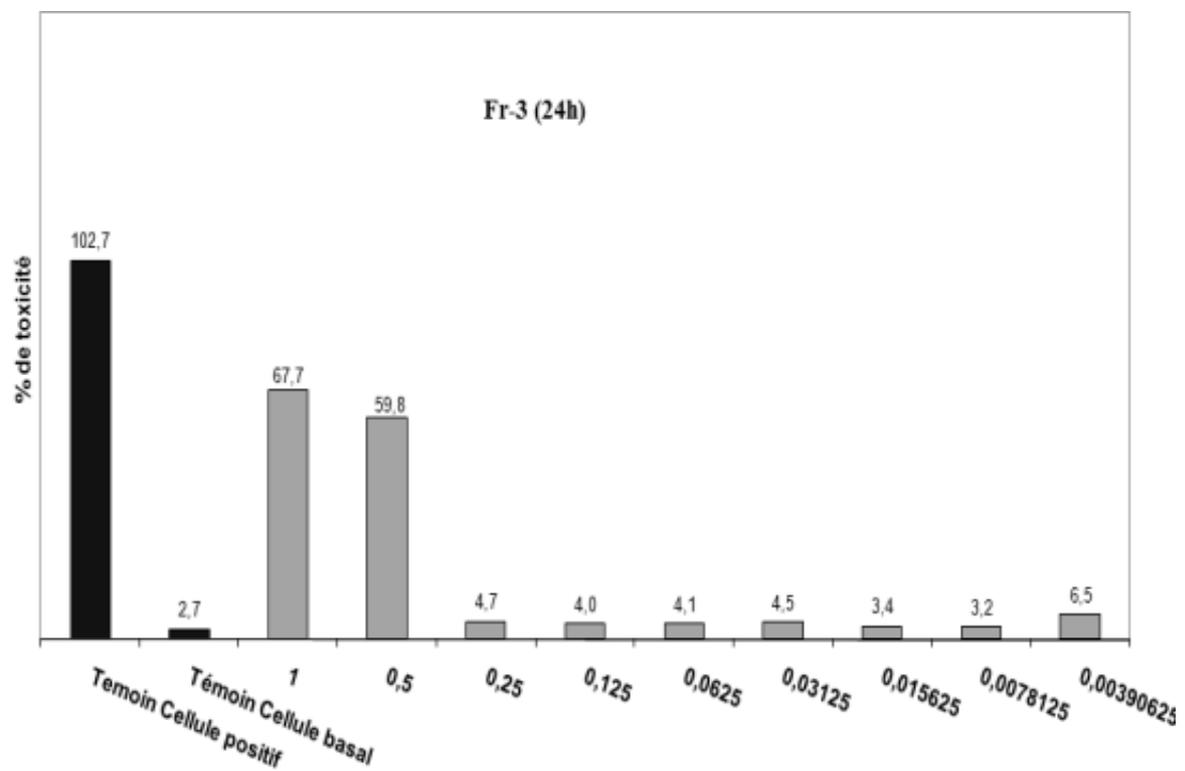


Figure 50. Cytotoxicité de la Fr 3 en fonction de différentes concentrations (mg/ml) après 24h d'exposition

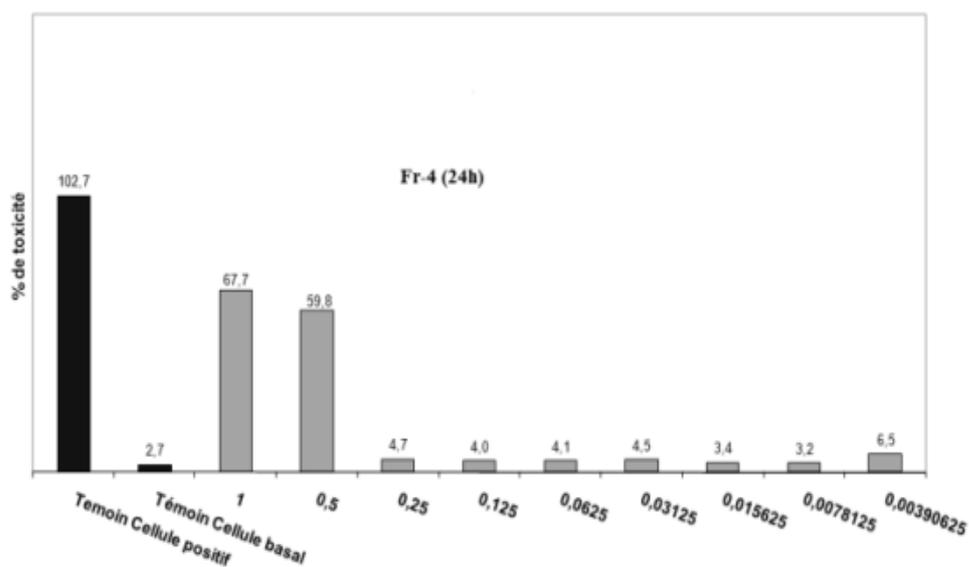


Figure 51. Cytotoxicité de la Fr 4 en fonction de différentes concentrations (mg/ml) après 24h d'exposition

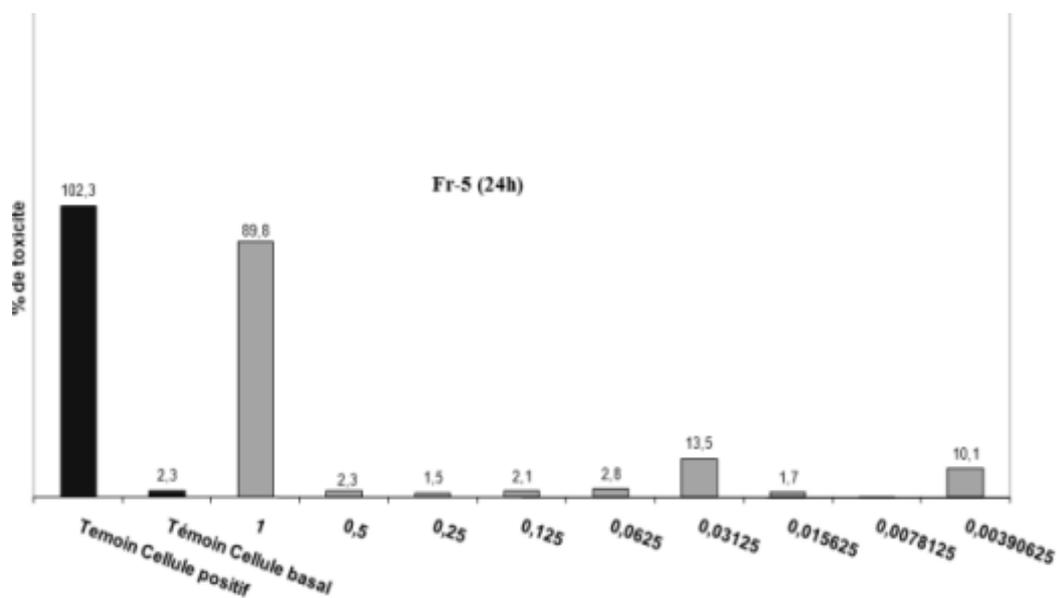


Figure 52. Cytotoxicité de la Fr 5 en fonction de différentes concentrations (mg/ml) après 24h d'exposition

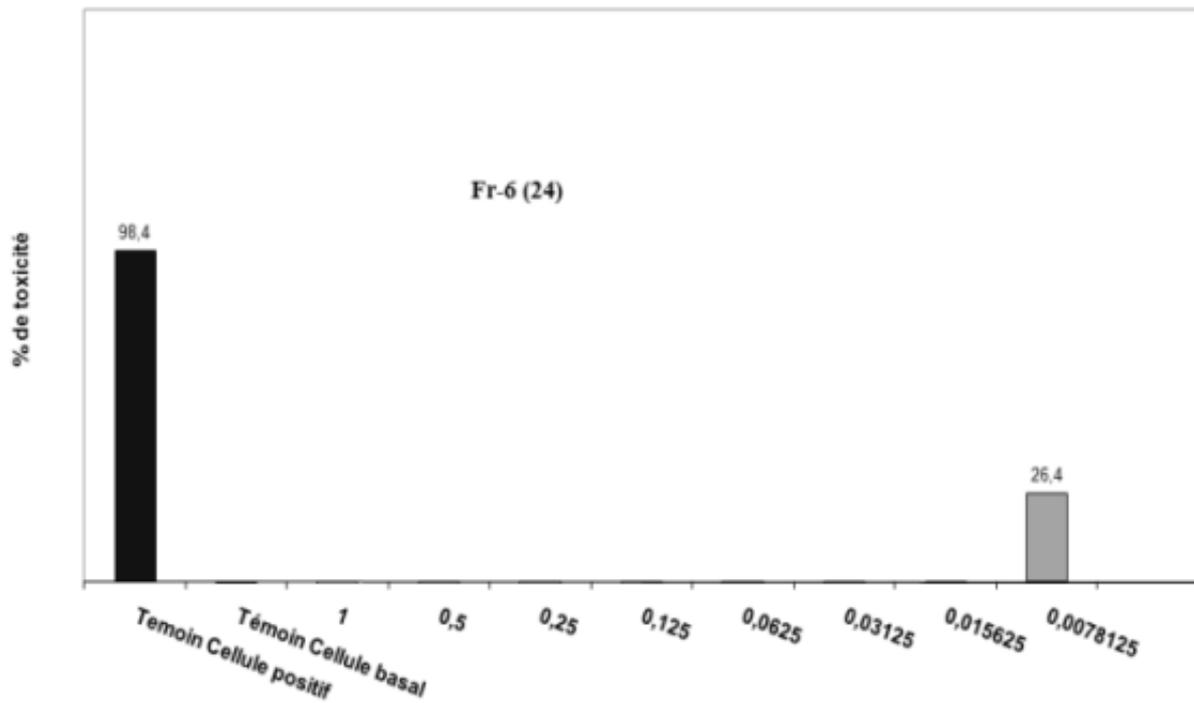


Figure 53. Cytotoxicité de la Fr 6 en fonction de différentes concentrations (mg/ml) après 24h d'exposition

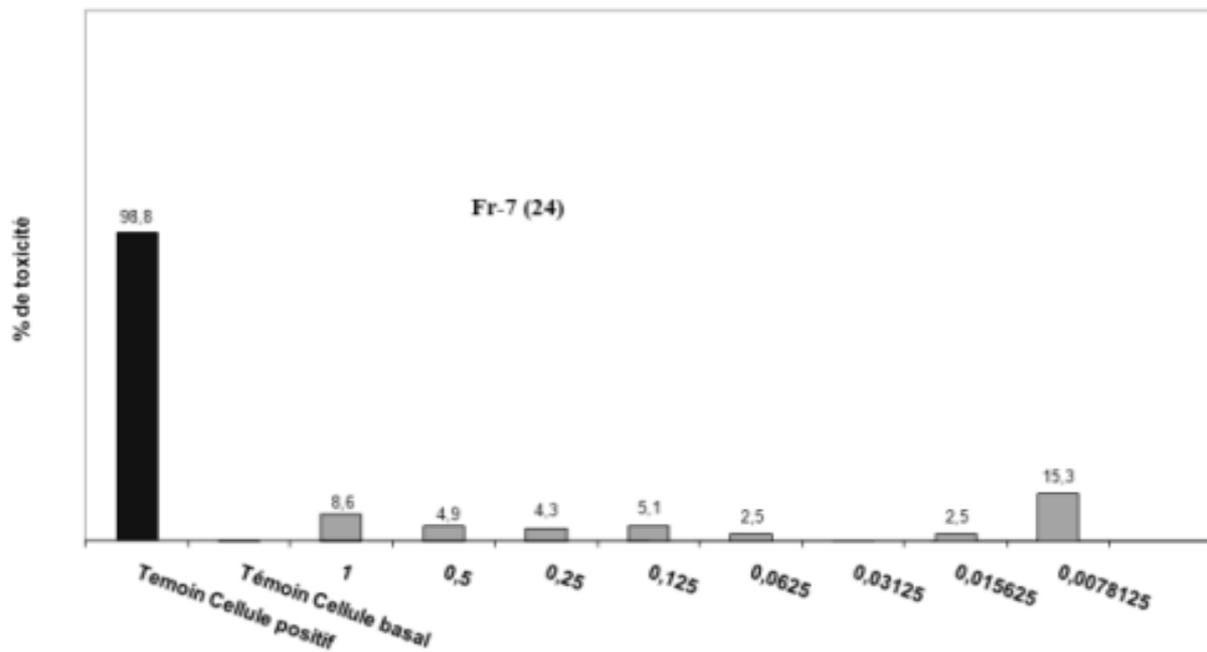


Figure 54. Cytotoxicité de la Fr 7 en fonction de différentes concentrations (mg/ml) après 24h d'exposition

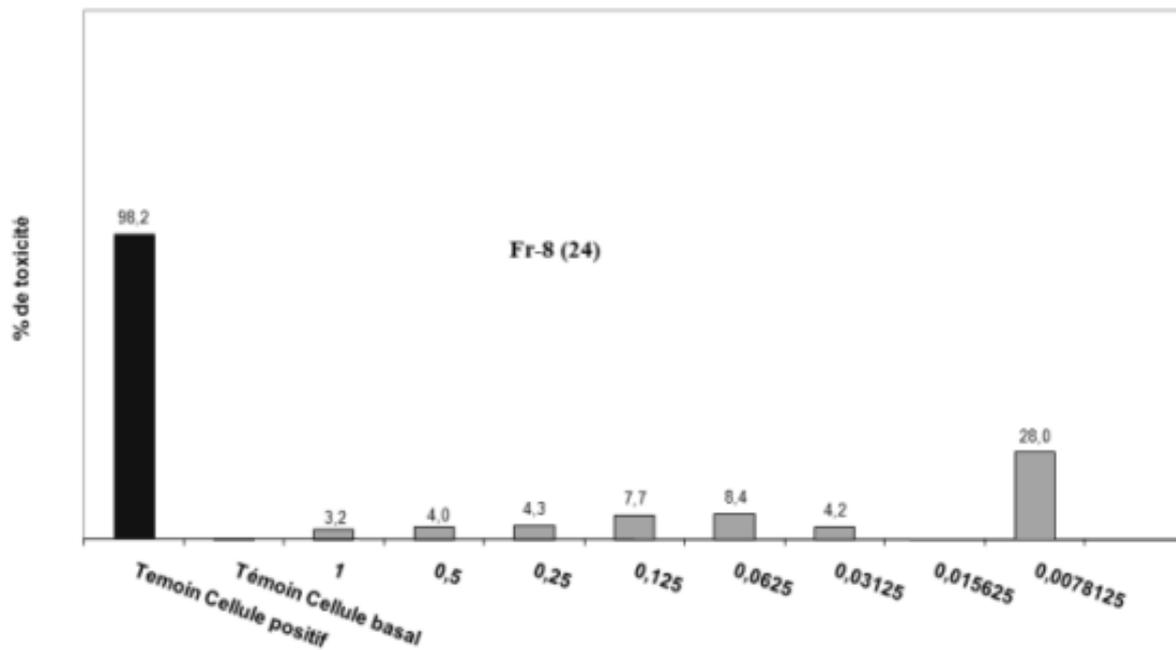


Figure 55. Cytotoxicité de la Fr 8 en fonction de différentes concentrations (mg/ml) après 24h d'exposition

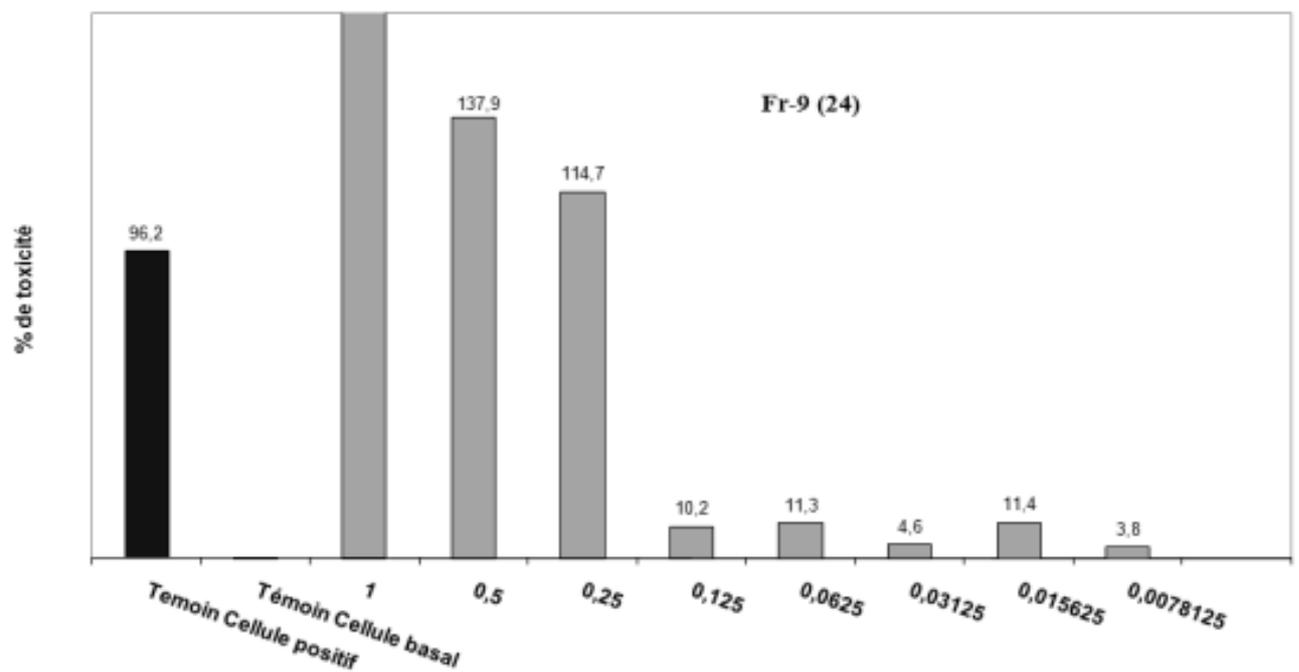
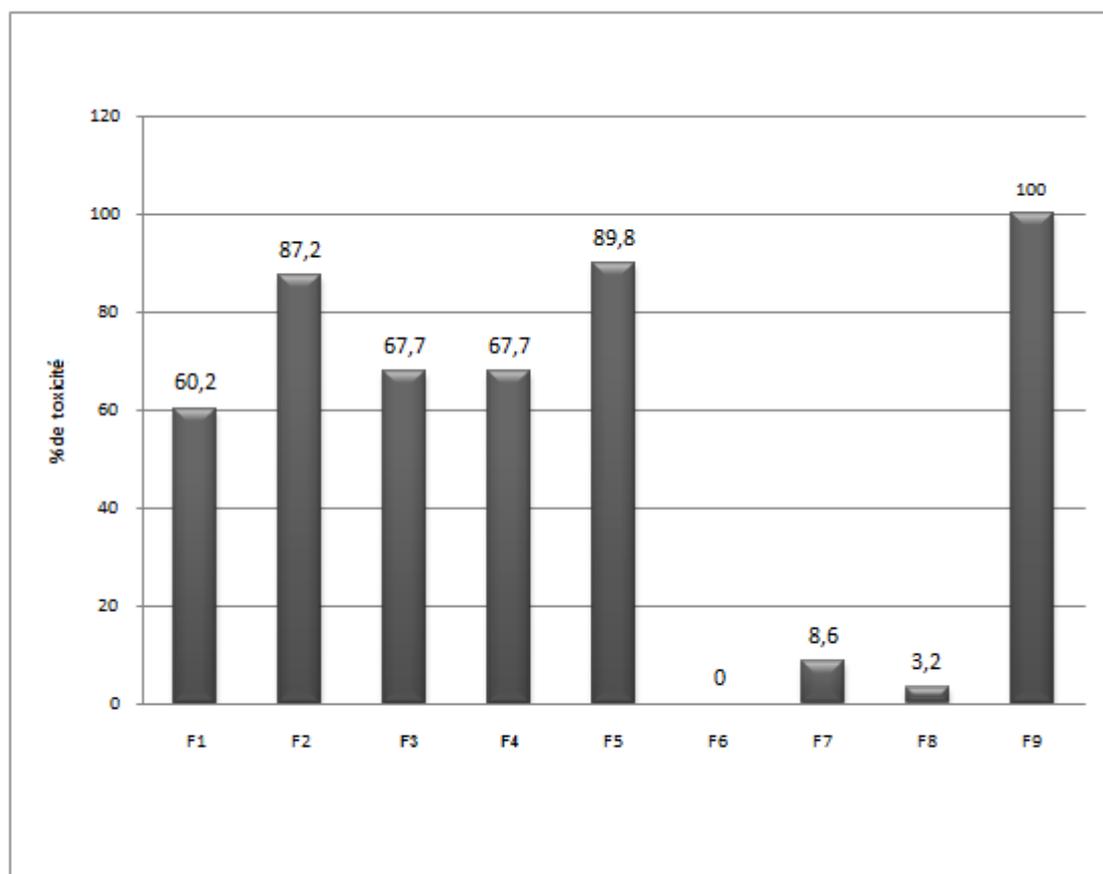


Figure 56. Cytotoxicité de la Fr 9 en fonction de différentes concentrations (mg/ml) après 24h d'exposition

La figure 55 regroupe le % de toxicité de chaque fraction à une concentration de 1 mg / ml.



**Figure 57 : Cytotoxicité des neuf fractions à (1 mg/ml) isolés à partir de l'extrait MeOH sur les cellules MRC-5**

### IV-3 Discussions

La F-1, présente une toxicité de 60.2 %. A partir de cette fraction nous avons isolé des anthraquinones. Les glycosides d'anthraquinones sont connus par leurs différentes activités biologiques, cytotoxicités envers les cellules cancéreuses (Isao, 1992), (Chi-Huang, 2005), (Bo, 1992), (Kamiya, 2010), effet inhibiteur, antifongique, antibiotique et anti-inflammatoires (Hrevé, 2006), (Hong, 2008), (Mishra, 2010).

A partir de la fraction F-5 qui présentent une toxicité de 89.8 %, nous avons isolé des saponosides triterpéniques. L'activité biologique des saponosides est fonction de la structure de la chaîne sucrée modulant son intensité. Pour les saponosides monodesmosidiques dont la chaîne osidique est en position 3, l'activité hémolytique augmente avec le nombre de sucres et est maximale pour quatre unités osidiques (Voutquenne, 2001), (Takechi, 1992).

Les monodesmosides on une activité plus élevée: pouvoir hémolytique (Pinkas, 1972), (Defago, 1977), toxicité (Marston, 1991a), antiparasitaires (Majester, 1991), (Julien, 1985), (Chen, 1978), antifongique (Othani, 1992 ; 1983), (Flavel, 1992), antibactérienne (Lemos, 1992), (Chandel, 1980), (Mhato, 1988), (Agarwel, 1974), antivirale (Amoros, 1987), (Simoes, 1998), (Aquino, 1989), anti tumorale (Hostettmann, 1987), (Konoshima, 1992), anti-inflammatoire (Loggia, 1990), (Paris, 1981), (Yepez, 1991), (Takgi, 1980).

A partir de la F-3 nous avons isolé des flavonoïdes. Les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (Prix Nobel, 1937), chercheur de l'Université de Szeged (Hongrie), qui a constaté que les symptômes hémorragiques du scorbut, liés à la fragilité ou l'hyperperméabilité des vaisseaux, étaient guéris par des extraits de paprika ou de jus de citron, riches en vitamine C et flavonoïdes. Cette action a été appelée propriété vitaminique P (P étant la première lettre du mot perméabilité). A partir des années quatre-vingts les propriétés des flavonoïdes sont largement étudiées dans le domaine médical où on leur reconnaît des activités inhibitrices : inhibition enzymatique sur l'activité de la xanthine oxydase et par conséquent, peuvent faire régresser la maladie de la goutte (Hanasaki, 1994), (Cos, 1998), (Yoshimura, 2008). Inhibition de la cyclooxygénase et la lipooxygénase, responsables de la production des radicaux libres et d'inflammations (Landolfi, 1984), (Atta-ur-Rahman, 2003). Egalement l'inhibition de la production de leucotriènes (Ranjit, 2008), (Gurbuz, 2009), (Di Carlo, 1999), d'ou la réduction de l'ulcère et la protection des cellules gastriques. La réduction des dommages gastro-intestinaux, en inhibant la production du PAF (Platelet Activating Factor) qui est un agent ulcérogène potentiel (Lamyaa, 2008), (Izzo, 1996). Activités antiallergiques, inhibition d'enzymes, telles que l'AMP cyclique phosphodiesterase et ATPase Ca<sup>2+</sup>-dépendante, responsables de la libération de l'histamine et d'autres substances endogènes qui causent l'asthme (Di Carlo, 1999),. Activité anti-tumorale (Izzo, 1996), inhibition de la croissance cellulaire en empêchant certaines phases du cycle cellulaire et en bloquant les sites récepteurs des hormones (Larocca, 1994), (Makimura, 1993). Réduction du diabète en inhibant l'enzyme aldose réductase (Chaudhary, 1983), (Ong, 1997 ; 2000). Les effets antiviraux des flavonoïdes ont été également démontrés (Chu, 1992). Certains flavonoïdes peuvent entraver

l'athérosclérose et par conséquent réduisent le risque des maladies cardiovasculaires (Hertog, 1993), (Carotenuto, 1996). Activité anti-obésité (Yaji, 2009). De graves intoxications ont été portées suite à une consommation sans limite et à grande concentration de ces composés sous forme de compléments alimentaires (Skibola, 2008).

La fraction neuf présente une toxicité totale de 100%. A partir de cette fraction nous avons isolé l'acide bétulinique, le stigmastérol, l'ergostérol, le cholestérol et l'acide ursolique. Beaucoup de travaux ont démontré différentes activités biologiques se reportant à l'acide bétulinique (AB) et l'acide ursolique (AU). En 2008, pour la première fois, des travaux sur la toxicité de ces deux acides ont été portés par R.E. Duval et al (Fontenay, 2008). L'acide bétulinique présente une  $CC_{50}$  inférieure à 1 mg/L sur les cellules HaCat et de 2.73 mg/L sur les cellules MRC-5 et un effet inhibiteur  $IC_{50}$  inférieure à 1 mg/L sur les cellules HaCat et les cellules MRC-5. Pour l'AU les  $CC_{50}$  sont de 4.2 et 7.2 mg/L respectivement pour les cellules HaCat et les cellules MRC-5 et les  $IC_{50}$  sont de 5.1 et 11.3 mg/L pour les cellules HaCat et les cellules MRC-5 respectivement. La présence des autres composés le stigmastérol, l'ergostérol, le cholestérol dans cette fraction doit être aussi considéré.

Nous pouvons conclure que en plus du grand pouvoir hémolytique des saponosides, celles – ci sont pourvues d'un effet de surface pouvant modifier la perméabilité membranaire des cellules entraînant ainsi la destruction des cellules, vient s'ajouter l'effet inhibiteur de l'AU et l'AB et des anthraquinones envers les bactéries du tube digestif, une parésie s'installe en particulier dans le rumen (constatation d'un excès de fibres ligneuses). Les contractions du réseau deviennent très rares et faibles. Le bovin n'arrive pas à brasser. Après autopsie, on observe un engouement du feuillet ; celui-ci est dur comme un caillou (Lamidi, 2005), (Armach, 1999), (Gaidi, 2002).

## **CONCLUSION**

L'étude phytochimique des feuilles, tiges et fleurs du *Gladiolus segetum* (parties aériennes, consommées par le bétail) a permis d'isoler 20 composés dont 5 sont de structures nouvelles : Quatre anthraquinones, Methyl 8-hydroxy-4, 7-dimethoxy-1-methyl-9, 10-dioxo-3-(beta-D-glucopyranosyloxy)-9,10-dihydroanthracene-2-carboxylate (**3**), Methyl 3-methoxy-1-methyl-9,10-dioxo-8-(beta-D-glucopyranosyloxy)-9,10-dihydroanthracene-2-carboxylate (**4**), 1-hydroxy-3, 6, 7-trimethoxy-8-methylanthraquinone à anthraquinone (**5**) et 3, 8-dihydroxy-6-methoxy-1-methylanthraquinone-2-carboxylic acid à anthraquinone (**6**). Un dérivé benzofuranique (R) 2, 5, 6-trihydroxy-2, 4-dimethyl-6-methoxy-1-benzofuran-3-one (**20**). Quatre saponosides, 16 $\alpha$  hydroxy, 3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl acide medicagenic -28-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)-[ $\beta$ -D-xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranoside (**1**), 16 $\alpha$  hydroxy, 3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl acide medicagenic -28-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranoside (**2**), acide quinovique 3-O- $\beta$ -D-fucopyranosyl (28 $\rightarrow$ 1)  $\beta$ -D-glucopyranosyl ester (**7**), acide quinovique 3-O- $\beta$ -fucopyranoside (**8**), l'acide quinovique (**9**). Des dérivés flavonoïdiques : le 3-O- $\beta$ -glucosylquercétol, le 3-O- $\beta$ -glucosylkaempférol et le kaempférol. Trois triterpènes : l'acide quinovique, l'acide bétulinique et l'acide ursolique.

Cinq stéroïdes : le daucaustérol, le  $\beta$ -sitostérol, le stigmastérol, l'ergostérol et le cholestérol.

La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques (CCM, DCCC, HPLC, BPLC)

La détermination structurale a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques incluant la spectroscopie ultraviolette (UV), la spectroscopie de masse (SM) et la spectroscopie de résonance magnétique (RMN). Pour la spectroscopie RMN, les techniques monodimensionnelles ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et bidimensionnelles (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC) auxquelles nous avons fait appel, nous ont permis de réaliser la détermination de la plupart des composés.

Dans la partie biologique de notre travail, nous avons étudié la cytotoxicité de l'extrait chloroformique, l'extrait à l'acétate d'éthyle, l'extrait méthanolique, neuf fractions obtenues par fractionnement de l'extrait méthanolique et de deux molécules que nous avons isolés, saponine 1 et saponine 2, vis-à-vis de fibroblastes humains MRC 5. Les résultats obtenus ont confirmé l'activité des saponosides, de l'acide bétulinique et l'acide ursolique ainsi que la validation scientifique de l'usage traditionnel du *Gladiolus segetum* dans le traitement de l'ulcère gastrique, effets cicatrisant, anti-inflammatoires des saponines et antiulcéreux des flavonoïdes.

**CHAPITRE V**  
**PARTIE EXPERIMENTALE**

## **V- 1 Matériels et méthodes**

### **V- 1-1 Activité biologique**

#### **V- 1-1-2 Cellules MRC-5**

Les cellules MRC-5, utilisées pour nos expérimentations, sont des fibroblastes embryonnaires de poumon humain (Institute Bio Mérieux, Lyon, France). Ces cellules sontensemencées à  $1 \times 10^5$  cellules/cm<sup>2</sup> et cultivées dans des plaques de culture cellulaire COSTAR de 96 puits dans du Milieu Essentiel Minimum (MEM, 41090, Invitrogen, France) additionné à 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (FBS, Invitrogen 10270, lot 40Q5150K). Ces cultures sont maintenues sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub> et une température de 37°C. La numération des cellules viables est ensuite déterminée par la méthode d'exclusion au bleu trypan. Pour chacun des tests, les cellules sontensemencées 48 heures avant leur exposition à la drogue à tester. Après 24 heures d'exposition en présence de drogue, la cytotoxicité est évaluée.

#### **V- 1-1-3 Teste au Rouge Neutre**

Les testes sont évalués selon la méthode de Grare et Borenfreund. Les testes sont effectués dans 100 µl de milieu de culture dans des plaques de culture cellulaire COSTAR de 96 puits (831835, Sarstedt, France). Après 24 heures d'incubation le milieu de culture est enlevé, les cellules sont lavées une fois avec du PBS ; ensuite 200 µl MEM sont ajoutés (MEM, 51200, Invitrogen) contenant 50 µl de rouge neutre, les plaques sont incubées durant 3 heures, ensuite les cellules sont rincées trois fois avec du PBS et lysées avec 200 µl d'une solution à 1% d'acide acétique et 50% d'éthanol pour évaluer quantitativement le stockage de teinture à l'intérieur de lysosomes cellulaire. Les cellules sont incubées durant 20 mn sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub> et une température de 37°C. Après la migration du rouge neutre l'absorbance est mesurée à 540 nm (ELISA, Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, France).

#### **V- 1-1-4 Lactate déshydrogénase (LDH)**

La procédure de détection à partir de LDH (Cyto-tox 96 kit non-radioactive cytotoxicity assay, Promega G1780) est conforme aux instructions du fabricant. Brièvement, des plaques de culture cellulaire de 96 puits sont centrifugées à 3000 rpm pendant 10 minutes. Ensuite 50  $\mu$  L de chaque échantillon sont transféré aux plaques de culture cellulaire de 96 puits (Greiner, 650161). La mixture fraîchement préparé est ajoutée à chacun des puits et est incubé durant 30 minutes dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 540 nm (ELISA, Multiskan EX, Thermo Electron Corporation, France).

## **V- 1-2 Méthodes chromatographiques analytiques**

### **V- 1-2-1 Chromatographie liquide à basse pression (BPLC)**

La chromatographie liquide à basse pression (BPLC) est réalisée à l'aide d'une pompe Duramat CFG, Germany, sur colonnes de chromatographie basse pression en verre Büchi remplies soit avec de la silice SDS 60 Å 6-35  $\mu$ m (SDS, Peypin) en phase normale (préalablement activée quelques heures à l'étuve à 110 °C), soit avec de la silice en phase inverse de type Lichroprep RP-18, 40-63  $\mu$ m (Merck, Germany). L'échantillon est introduit sous forme liquide. Les systèmes d'élution utilisés sont généralement des mélanges binaires dans des proportions variables au cours de l'élution. La colonne est éluée avec un débit d'environ 20 mL/min et la pression est en moyenne de 1- 2 bars. Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

### **V- 1-2-2 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)**

Pour les chromatographies sur colonnes ouvertes, plusieurs types de phases ont été mis en œuvre dans des colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée. Pour les chromatographies d'adsorption, la phase stationnaire utilisée est la silice en phase normale SDS 60 Å 70-200  $\mu$ m (SDS, Peypin) préalablement activée quelques heures à l'étuve à 110 °C. L'élution est réalisée par simple gravité. La quantité de silice utilisée est généralement 30 à 50 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. L'extrait à fractionner est adsorbé sur une quantité de silice correspondant à environ 2 fois sa masse et le dépôt de l'extrait a lieu

sous forme solide. Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

### **V- 1-2-3 Chromatographie liquide haute performance semi-préparative (HPLC semi-prép.)**

Le système HPLC semi-préparative est constitué de deux pompes Model 510 pumps (Waters Associates), Rheodyne injector Model 7010 à 2 ml sample loop, Lambda Max Model 481 LC (Waters Associates) spectrophotomètre, la détection UV est fixée à 210 nm, d'un enregistreur et d'un collecteur de fractions. La séparation a été réalisée sur une colonne RP18 (10 µm, 10 x 500 mm). Les systèmes d'élution utilisés sont généralement des mélanges binaires dans des proportions variables au cours de l'élution. Le débit est d'environ 20 ml/min.

### **V- 1-2-4 Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Utilisées à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications, les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis. Les analyses sur couche mince sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium Silicagel 60 F254 (Merck). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. Cette phase mobile est constituée d'un mélange binaire, ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée. Dans notre cas, les systèmes de solvants pour les différentes classes de composés sont les suivants (les proportions sont données en volume et ils sont classés par polarité croissante) :

- Système 1: HCCl3 / MeOH / H2O (70: 30: 1)
- Système 2 : HCCl3 / MeOH (9 : 1)

L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 366 nm), avant et, dans certains cas, après révélation par les réactifs appropriés. L'utilisation de différents réactifs permet de rassembler judicieusement les fractions récoltées suites aux différentes chromatographies

Les réactifs utilisés pour le présent travail sont les suivants :

- **Réactif de Neu ou NP/PEG (Révélateur des flavonoïdes).**

Préparer une solution A composée de 1 g d'acide amino-2-éthylidiphénylborique et de 100 ml de méthanol et une solution B composée de 5 g de PEG 4000 et de 100 ml d'éthanol. Pulvériser un mélange de 10 ml de solution A et 8 ml de solution B. Chauffer la plaque de

CCM à 110 °C pendant 2 minutes environ. Observés en lumière UV à 366 nm, les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescentes jaunes, vertes ou orange.

- **Réactif de Liebermann et Burchard (Réactif des stérols, stéroïdes et triterpènes).**

Préparer juste avant emploi, une solution de 0.5 ml d'anisaldéhyde, 1 ml d'acide sulfurique concentré et 50 ml d'acide acétique glaciale. Après pulvérisation, chauffer la plaque de CCM à 110°C pendant 10 minutes. Les composés révélés apparaissent sous forme de taches roses, violet.

**V- 1-2-4 Chromatographie liquide à gouttelettes à contre courant. DCCC**

La DCCC (Model DCC-300-G2, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan) est équipée de 72 colonnes en verres (60 cm) (2 mm id), connectées en séries par l'intermédiaire de capillaires en téflon. Cette technique est caractérisée par le passage continu de gouttelettes de la phase mobile au travers de la phase stationnaire liquide immiscible. Le soluté se partage en continu entre les deux phases. Dans un premier temps nous remplissons le système avec la phase stationnaire, ensuite nous injectons l'échantillon à analyser (celui-ci doit être dissout soit dans la phase supérieure, soit dans la phase inférieure ou dans le mélange des deux) suivis de l'injection de la phase mobile.

Pour notre travail nous avons utilisé le mode ascendant (la phase mobile est introduite par le bas) avec le mélange  $\text{HCCl}_3$  -MeOH - $\text{H}_2\text{O}$  (43 : 37 : 20). (La phase inférieure est utilisée comme phase stationnaire, la phase supérieure est utilisée comme phase mobile)

**V- 1-3 Méthodes physico-chimiques**

**V- 1-3-1 Hydrolyse acide**

Quelques mg de produit sont chauffés dans un tube scellée avec quelque ml d'acide trifluoroacétique 2N pendant 45 mn à 120° C. le refroidissement du contenu du tube provoque la formation d'un précipité. Le précipité est recueilli par filtration et le résidu de la phase aqueuse obtenu par évaporation sous pression réduite est conservé pour l'identification des sucres.

Analyse chromatographique :

Identification de la génine : l'examen de la génine, obtenue par hydrolyse, est effectué en présence de témoins par CCM sur silice.

Identification du sucre :

Le résidu provenant de la phase aqueuse de l'hydrolysate est étudié par CCM sur silice en présence de témoins.

### **V- 1-3-2 Pouvoir rotatoire**

Le pouvoir rotatoire a été mesuré sur un polarimètre de type Perkin-Elmer 241 à la longueur d'onde de la raie D du sodium ( $\lambda = 589$  nm) dans une cuve de 10 cm à température ambiante. Le pouvoir rotatoire spécifique  $[\alpha]_D$ , exprimé en degré, est calculé à partir de la formule suivante :

$$[\alpha]_D = 1000. \alpha / l. c$$

( $\alpha$  : angle de rotation, en degré, lu sur le polarimètre,  $l$  : longueur, en dm, de la cuve de mesure,  $c$  : concentration de la molécule en solution en g/L)

### **V- 1-3- 3 Spectre de masse :**

Les spectres de masses sont effectués sur un spectromètre de masse HR-ESI-MS (High résolution ESI mass spectrometry) Q-TOF 98 micro instrument (Bruker Customer) with an electrospray source (eV=600V, 190°C, flow of injection 5 $\mu$ l min<sup>-1</sup>)

### **V- 1-3-4 Spectre infrarouge:**

Les spectres IR sont enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer 281.

### **V- 1-3-5 Spectres ultra-violet :**

Les spectres UV sont enregistrés sur un spectrophotomètre Hewlett-Packard HP-845 UV-VIS.

### **V- 1-3-6 Spectres de résonance magnétique nucléaire :**

Selon la quantité de produit à analyser et la résolution souhaitée, les spectres de RMN du proton sont effectués à 600, 400 et 300 MHz et du carbone à 75, 100 et 125 MHz. Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés : pyridine deutérée (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N), du CD<sub>3</sub>OD ou du diméthylsulfoxyde deutérié (DMSO d<sub>6</sub>) sur un spectromètre Bruker Avance DRX.

## **V- 2 Matériel végétal, extraction et purification**

### **V- 2-1 Schéma d'extraction des saponines 1 et 2**

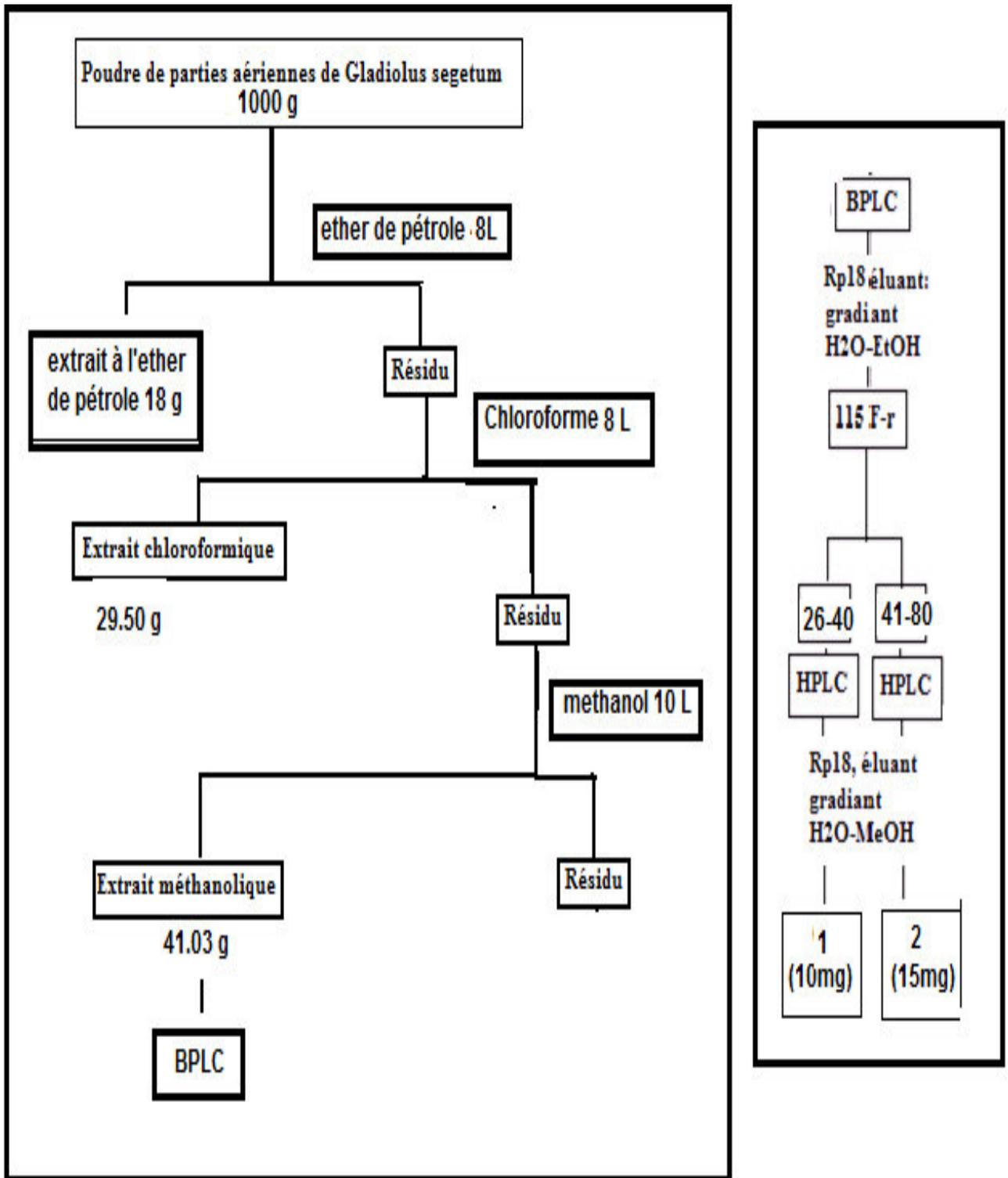


Figure 2 : Schéma d'extraction des saponines 1 et 2

## V- 2-2 Schéma d'extraction par soxhlet

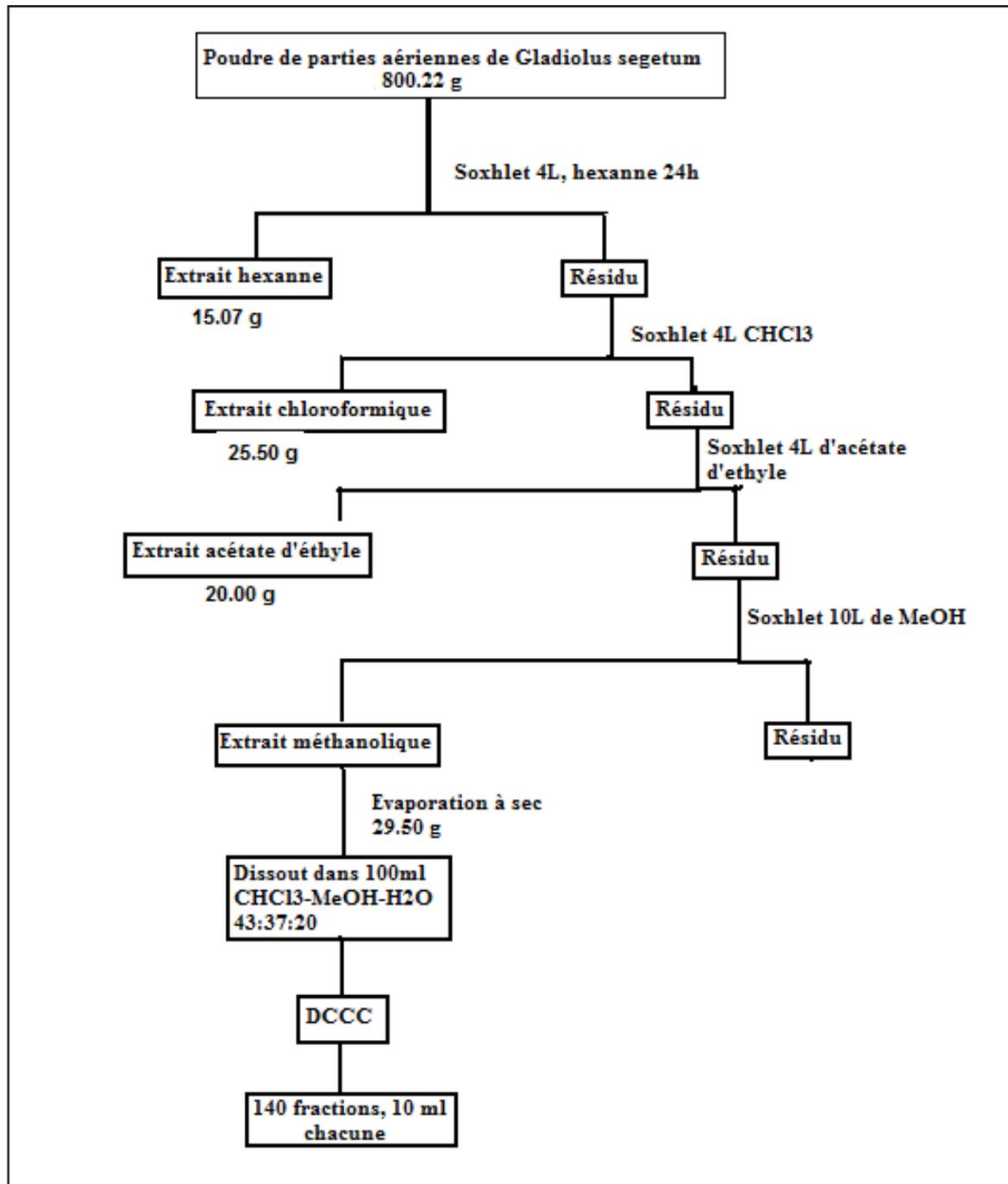


Figure 16 : Schéma d'extraction par soxhlet

### V- 2-3 Schéma de purification par DCCC

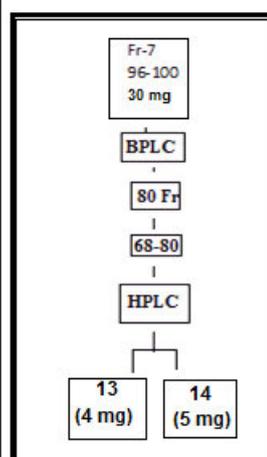
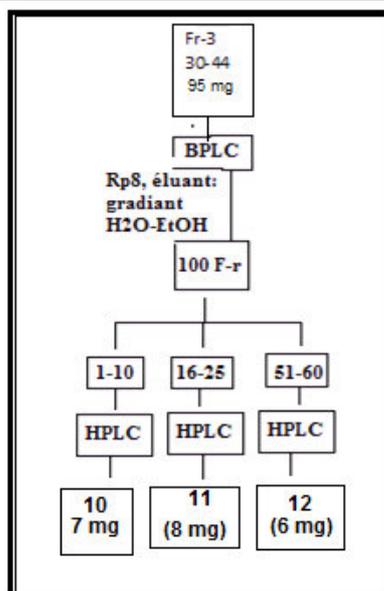
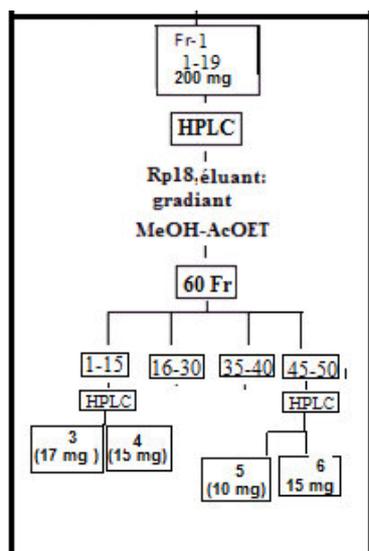
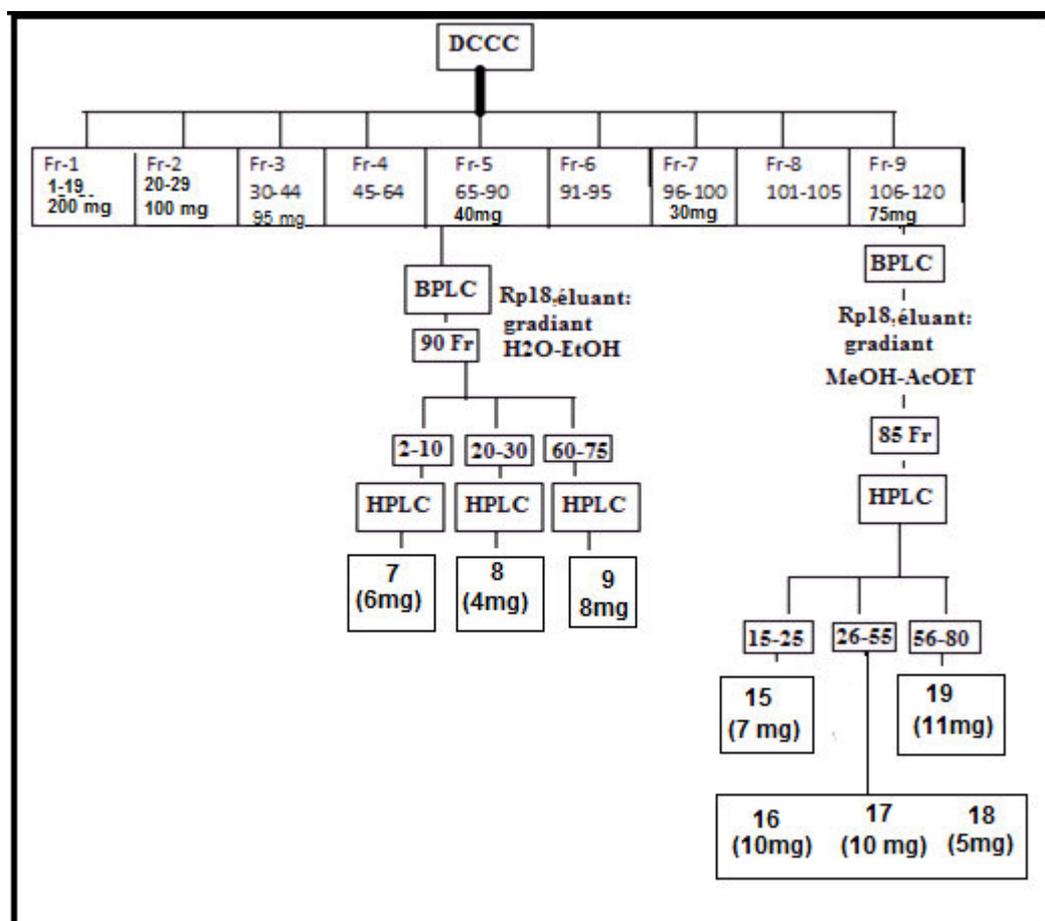


Figure 17 : Schéma de purification de purification par DCCC

V- 2-4 Schéma d'extraction et de purification du dérivé benzofuranique

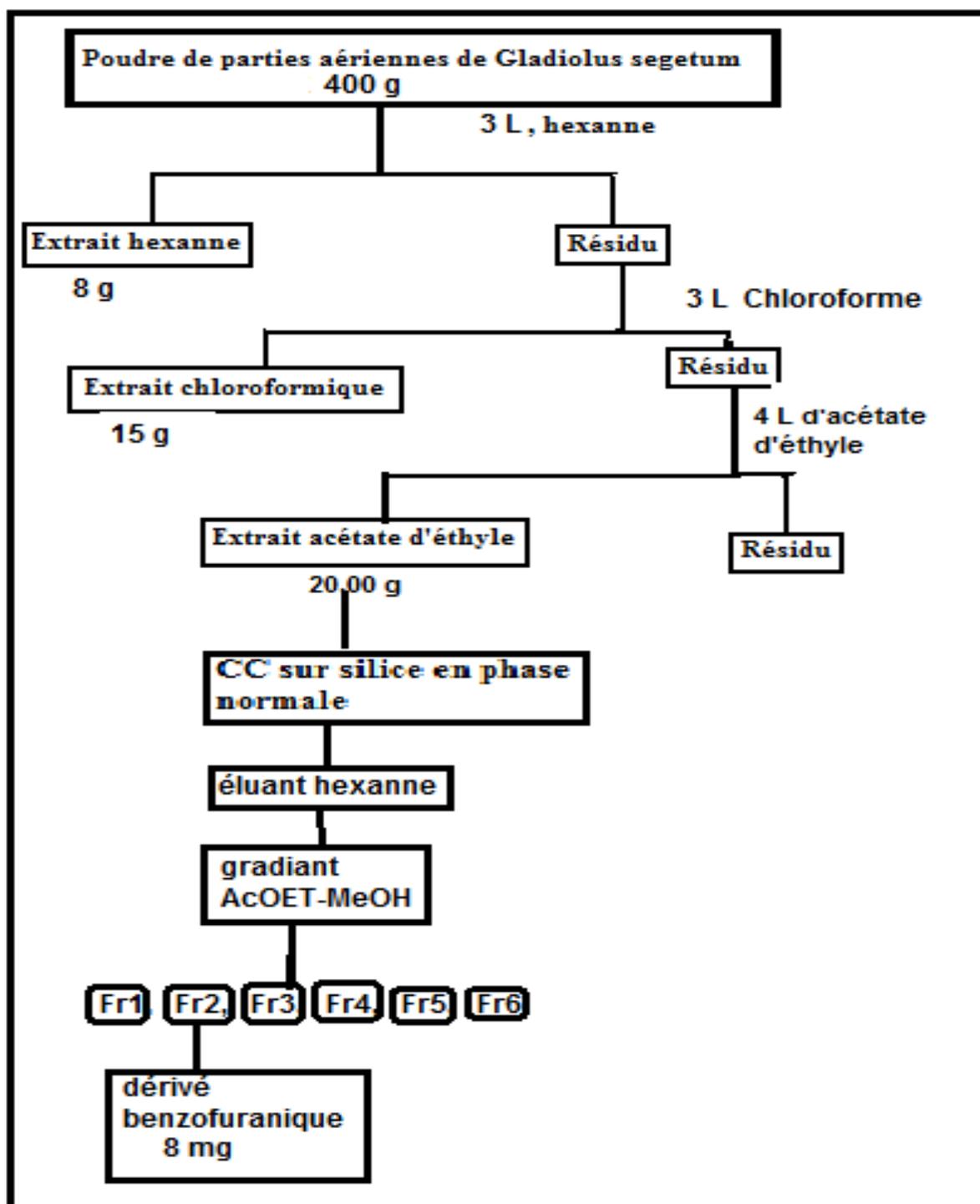
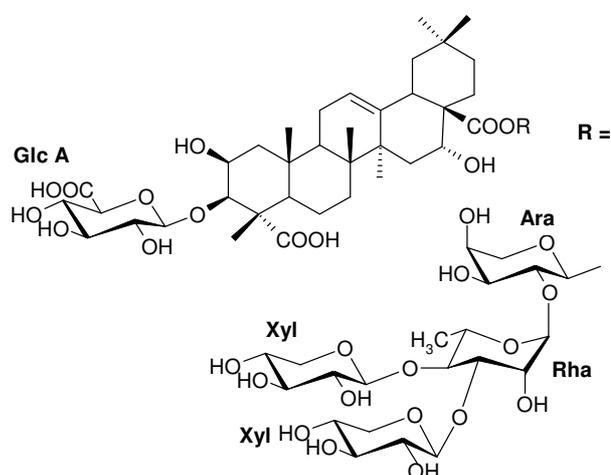


Figure 40 : Schéma d'extraction et de purification du dérivé benzofuranique

## V- 3 Détermination structurale

### V- 3 – 1 composé 1 (C1)



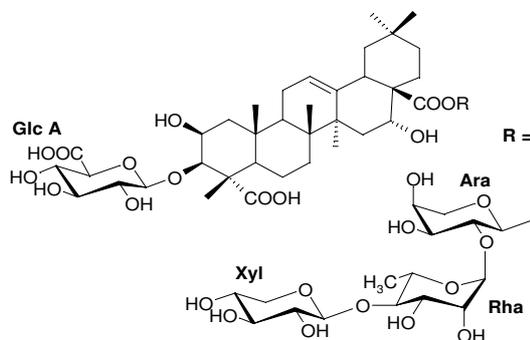
2  $\beta$ , 16 $\alpha$ , Dihydroxy-3-O- $\beta$ - glucuronopyranosyl-olean-12-ene-23-oic-28-O-  $\beta$ -D-xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3) – [ $\beta$  -D- xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranoside

**Formule brute :** C<sub>57</sub>H<sub>88</sub>O<sub>29</sub>.

**Sur le spectre HR ESIMS** enregistré en mode positif, est repéré un ion moléculaire à  $m/z$  1259 [M+Na]<sup>+</sup>, et en mode négatif un ion moléculaire à  $m/z$  1271[M+Cl]<sup>-</sup> correspondant à une masse moléculaire de 1236.

RMN <sup>1</sup>H (DMSO d<sub>6</sub>, 600 MHz), RMN <sup>13</sup>C (DMSO d<sub>6</sub>, 125 MHz).Tableau 2

### V- 3 – 2 Composé 2 (C2)



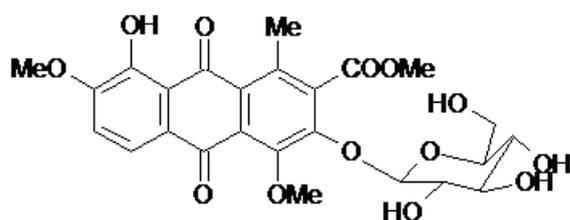
16 $\alpha$  hydroxy, 3-O- $\beta$  -D-glucuronopyranosyl acide medicagenic -28-O-  $\beta$ -D-xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4) –  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopyranoside

**Formule brute** C<sub>52</sub>H<sub>80</sub>O<sub>25</sub>

Sur le spectre HR ESIMS enregistré en mode positif, est repéré un ion moléculaire à  $m/z$  1127 [M+Na]<sup>+</sup>, et en mode négatif un ion moléculaire à  $m/z$  1139[M+Cl]<sup>-</sup> correspondant à une masse moléculaire de 1104.

RMN <sup>1</sup>H (DMSO d<sub>6</sub>, 600MHz), RMN <sup>13</sup>C (DMSO d<sub>6</sub>, 125MHz).Tableau 4.

### V- 3 – 3 Anthraquinone 1( C3)



Methyl 8-hydroxy-4,7-dimethoxy-1-methyl-9,10-dioxo-3-(beta-D-glucopyranosyloxy)-9,10-dihydroanthracene-2-carboxylate

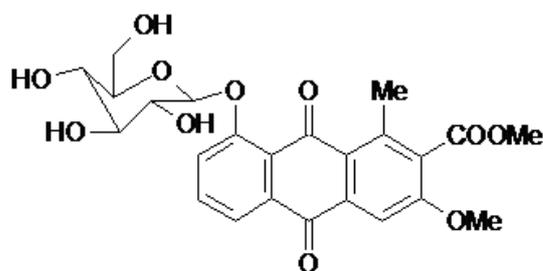
**Formule brute** : C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>O<sub>13</sub>

**Caractéristiques** : Point de fusion : 140-142°, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> : 284° (c 0.08 MeOH)

**HR ESIMS** présente un pic moléculaire à :  $m/z$  = [M+Na]<sup>+</sup> 557.5512 correspondant à une masse de 534.

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz), et <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz). Tableau 4.

### V- 3 – 4 Anthraquinone 2 ( C4)



Methyl 3-methoxy-1-methyl-9,10-dioxo-8-(beta-D-glucopyranosyloxy)-9,10-dihydroanthracene-2-carboxylate.

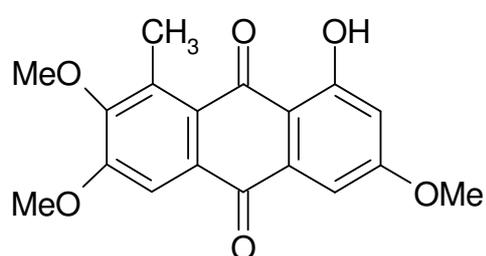
**Formule brute :** C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub>

**Caractéristiques :** Point de fusion : 150-152°C, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> : 274° (c 0.08 MeOH)

**HR ESIMS** présente un pic moléculaire à :  $m/z = [M+Na]^+$  511.5018 correspondant à la formule brute C<sub>24</sub>H<sub>24</sub>O<sub>11</sub>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz), et <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz). Tableau 4

### V- 3 – 5 Anthraquinone 3 (C5)



1-hydroxy-3, 6, 7-trimethoxy-8-methylantraquinone

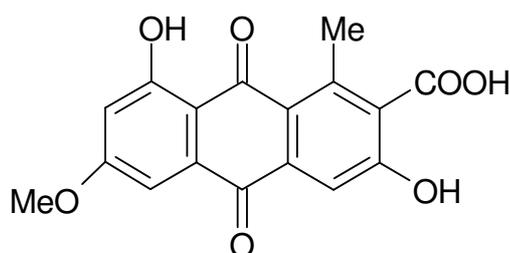
**Formule brute :** C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>

**Caractéristiques :** Point de fusion : 273-275 °C

**SM FAB** présente un pic moléculaire à :  $m/z = [M]^+$  : 328.3175 correspondant à la formule brute C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz), et <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz). Tableau 5.

### V- 3 – 6 Anthraquinone 4 (C6)



3, 8-dihydroxy-6-methoxy-1-methylantraquinone-2-carboxylic acid

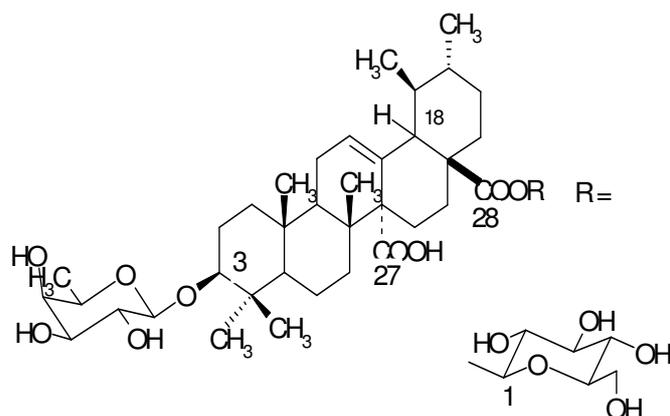
**Formule brute:** C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>

**Caractéristiques :** Point de fusion : 238-240°

**SM FAB** présente un pic moléculaire à :  $m/z = [M]^+$  : 328.0175 correspondant à la formule brute C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>

RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300MHz), et <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz). Tableau 5.

### V- 3 – 7 Composé 7 (C7)



#### acide quinovique 3-O-β-D-fucopyranosyl (28→1) β-D-glucopyranosyl ester

**Formule brute** C<sub>42</sub>H<sub>66</sub>O<sub>14</sub>

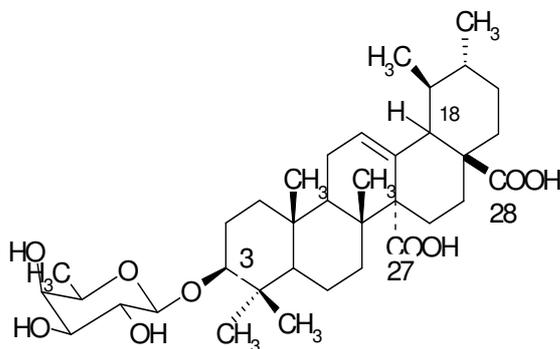
Sur le spectre HR ESIMS enregistré un pic moléculaire à :  $m/z = [M-H]^-$  793 d'où la masse est de 794 correspondant à la formule brute C<sub>42</sub>H<sub>66</sub>O<sub>14</sub>

RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400MHz), RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100MHz). Tableau N°6

**Caractéristiques :** -Pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{25}$  (C=2.5 ; MeOH) = +15.30°, Point de fusion : 230°, R<sub>f</sub> (système 1) =0.32

#### 3-O-β-D-fucopyranosyl-acide quinovique-(28→1) β-D-glucopyranosyl ester

### V 3 – 8 Composé 8 (C8).



#### Acide quinique 3-O-β-fucopyranoside

**Formule brute** C<sub>36</sub>H<sub>56</sub>O<sub>9</sub>

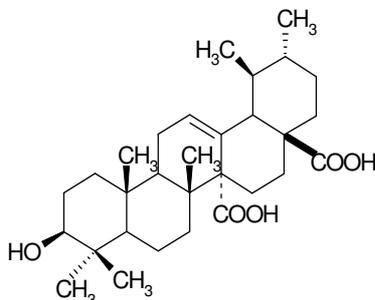
**HR ESIMS** présente un pic moléculaire à :  $m/z = [M-H]^-$  631 d'où la masse est de 632 à laquelle correspond la formule brute de C<sub>36</sub>H<sub>56</sub>O<sub>9</sub>

RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400MHz), RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100MHz). Tableau N°6

**Caractéristiques** : Pouvoir rotatoire :  $[\alpha]_D^{25}$  (C=2.5 ; MeOH) = +51°, Point de fusion : 217°

R<sub>f</sub> (système 1) = 0.53

### V- 3 – 9 Acide quinique (C9)



**Formule brute** C<sub>30</sub>H<sub>46</sub>O<sub>5</sub>

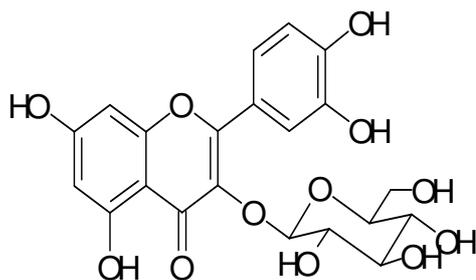
Sur le spectre **HR ESIMS** enregistré un pic moléculaire à :  $m/z = [M-H]^-$  485 d'où la masse

est de 486

RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz), RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100MHz).Tableau N°6

**Caractéristiques** : Rf (système 1) =0.80

**V 3 – 10- composé 10 (C10),**



### 3-O-β-glucosylquercétol

**Formule brute** : C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>

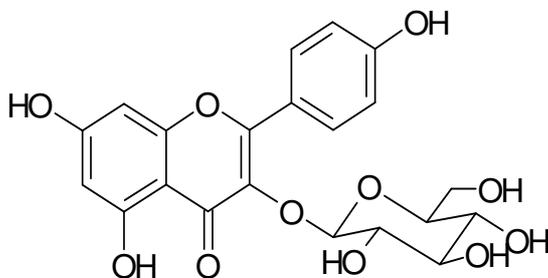
Sur le spectre **HR ESIMS** enregistré un pic moléculaire à :  $m/z = [M+H]^+ 465.2459$  d'où la masse est de 464

RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD 400MHz), RMN <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD 100MHz).Tableau N°7

**Caractéristiques** : Pouvoir rotatoire :  $[\alpha]_D^{25}$  (C=2.5 ; MeOH) = -56°, Point de fusion : 183°C

Rf (système 1) =0.16

**V 3 – 11 composés 11 (C11)**



### 3-O-β-glucosylkaempférol

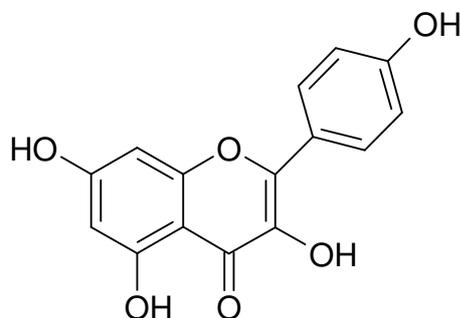
**Formule brute** : C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>

Sur le spectre **HR ESIMS** enregistré un pic moléculaire à :  $m/z = [M+H]^+ 449.1287$  d'où la masse est de 448

RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$  400 MHz), RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100MHz). Tableau N°7

**Caractéristiques** : Pouvoir rotatoire :  $[\alpha]_D^{25}$  (C=0.1 ; EtOH) =  $-56^\circ$  , Point de fusion : 170-173°C, Rf (système 1) =0.32

### V- 3 – 12. Composé 12: kaempférol. (C12)



**Formule brute** :  $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$  (M=286)

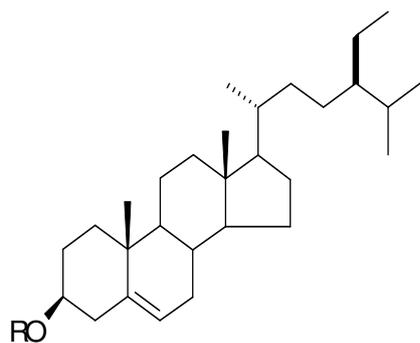
**Caractéristiques** : Point de fusion : 275-277°C, Rf (système 1) =0.52

### V- 3 – 13. Daucostérol, composé 13(C13)

**Formule brute** :  $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$

**HR ESIMS** présente un pic moléculaire à :  $m/z = [M+H]^+ 577$  d'où la masse est de 576

**Caractéristiques** : -Point de fusion : 285-287°, Rf (système 1) =0.32



R: glucose (13)

R: H (14)

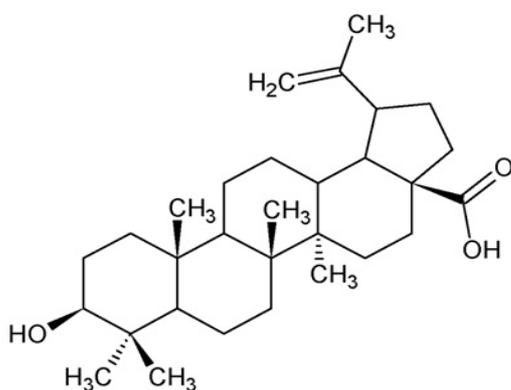
### V- 3 – 14. $\beta$ -sitosterol (C14)

**Formule brute :**  $C_{29}H_{50}O$

**SM FAB** présente un pic pseudomoléculaire à :  $m/z = [M]^+ 414$

**Caractéristiques :** -Point de fusion :  $137-139^\circ$ ,  $R_f$  (système 1) = 0.50,

### V- 3 – 15. Acide bétulinique (C15)

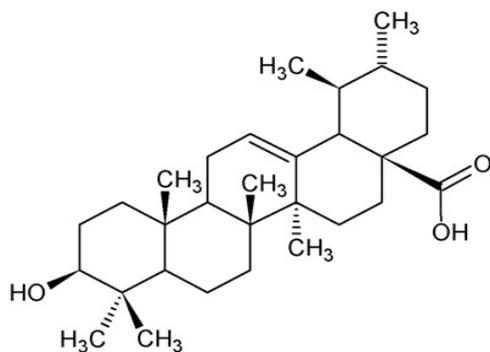


**Formule brute :**  $C_{30}H_{34}O_3$

**SM FAB** présente un pic moléculaire à :  $m/z = [M]^+ 442$  d'où la masse est de 442

**Caractéristiques :**  $R_f$  (système 2) = 0.32

### V- 3 – 16. Acide ursolique (C19)



Formule brute :  $C_{30}H_{49}O_3$

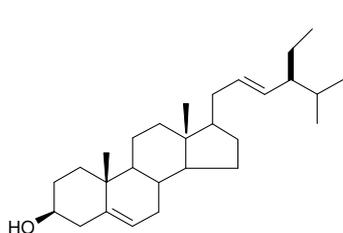
HR ESIMS présente un pic moléculaire à :  $m/z = [M+H]^+ 458.0215$  d'où la masse est de 457

Caractéristiques :  $R_f$  (système 2) = 0.55

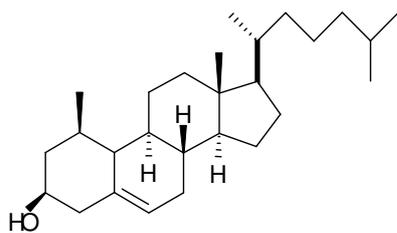
### V- 3 – 17: Ergostérol (C16), Stigmastérol (C18), Cholestérol (C17).

Ces composés ont été isolés sous forme de cristaux.

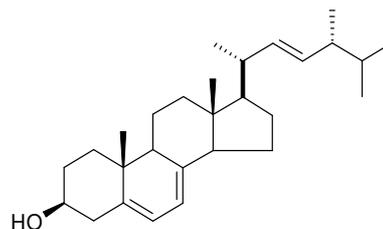
L'examen en CCM de ces trois composés en présence de témoins dans le système chloroforme / méthanol/ (9/1) confirme l'identité de ces composés



Stigmastérol (C18)

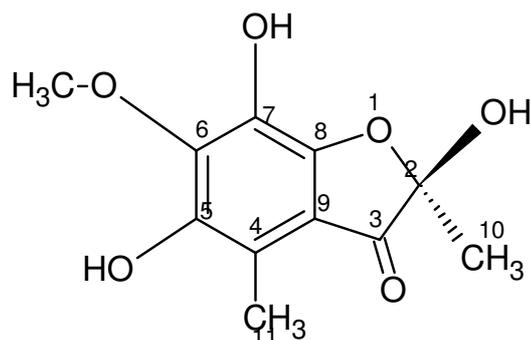


Cholesterol (C17)



Ergosterol (C16)

### V- 3-18 Dérivé benzofuranique (composé 20) (C20):



**(R) 2, 5, 6-trihydroxy-2, 4-dimethyl-6-methoxy-1- benzofuran-3-one.**

**Formule brute :**  $C_{11}H_{12}O_6$

**Caractéristiques :** Point de fusion : 160–162°C, Pouvoir rotatoire :  $[\alpha]_D^{25}$  (C=0.1 ; MeOH) = + 25.5°)

**HR ESIMS** présente un pic pseudomoléculaire à :  $m/z = [M+Na]^+ = 263.3501$  correspondant à la formule brute  $C_{24}H_{24}O_{11}$

RMN  $^1H$  ( $CD_3COCD_3$ , 300MHz), et  $^{13}C$  ( $CD_3COCD_3$ , 75 MHz). Tableau 8.

## **Bibliographie**

- Adnan J. Al-Rehaily, Omar A. Albishi, Mahmoud M. El-Olemy and Jaber S. Mossa, Flavonoids and terpenoids from *Helichrysum forskahlia* *Phytochemistry* **2008**, 69, 9, 1910-1914.
- Africamuseum, Banque de Données Prélude.  
[http://www.africamuseum.be/collections/external/prelude/view\\_plant](http://www.africamuseum.be/collections/external/prelude/view_plant)
- Agarwel S.K., Rastogi R.P. Triterpenoid saponins and their genins. *Phytochemistry*, **1974**, 13, 2623-2645.
- Aquino R., De Simone F., Pizza C., Conti C., and Stein M.L Plants metabolites: structure and in vitro antiviral activity of Quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. *J. Nat. Prod.*, **1989b**, 52, 4, 679-685.
- Ali A. A., Abdallah O. M., W. Steglich, anthraquinone derivatives from *Gladiolus segetum*, *Phytochemistry*, **1989**, 28, 1, 281-282.
- Ali A. A., El-emary n. A., El-moghazi M. A., Darwish F. M. and Frahm A. W. Three isoflavonoids from *Iris germanica*. *Phytochemistry*, **1983**, 22 (9), 2061-2063,
- Alloui N., *Effet de l'ingestion accidentel du glaïeul par les ruminants dans la région de Merouana (Batna)* XIIème Congrès Vétérinaire National, Alger 25-26 nov.1999
- Amoros M. and Girre R.L. Structure of two antiviral triterpene saponins from *Anagallis arvensis*. *Phytochemistry*, **1987**, 26 (3), 787-791.
- Armach C.N, Mackie A.R., Roy C.P.K., Osbourn A.E., Bowyer P., Ladha S., The membrane permeabilizing effect of avenacin A-1 involves the reorganization of bilayer cholesterol. *Biophys J*, **1999**, 76, 281-290
- Atta-ur- Rahman, Nasim S., Baig I., Jali S., Orhan I., Sener B. and. Iqbal Choudhary M., Anti-inflammatory isoflavonoids from the rhizomes of *Iris germanica*, *Journal of Ethnopharmacology* **2003**, 86, 2-3, 177-180
- Beniston N.T., Beniston W.S., *Fleurs d'Algérie* (Entreprise nationale du livre, Alger, 1984)
- Besson, V., RMN multiimpulsionnelle et détermination de structures de saponines Thèse de doctorat, Université de Reims Champagne Ardenne, **1989**.
- Bo I. K., Murai Y., Soediro I., Soetarno S. and Sastrodihardjo S. Cytotoxic Anyhraquinones from *Rheum ulmatum*. *Phytochemistry*, **1992**, 31, 3, 1063-1065.
- Bock, K., Pedersen, Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of monosaccharide, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1983**, 41, 27-66

- Bonnier G., Flore complète de France Suisse et Belgique, Tome onzième (Orlhac Ed., Paris, 1911)
- Borenfreund, E., Puerner, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters* **1985**, 24, 119-124.
- Bracke, M.; Vyncke, B.; Opdenakker, G.; Foidart, J.M.; De Pestel, G.; Mareel, M. Effect of catechins and citrus flavonoids on invasion in vitro. *Clin Exp Metastasis*. **1991**, 9:13-25.
- Bruneton, J. Pharmacognosie-Phytochimie-Plantes médicinales, 2eme édition. Paris : Lavoisier, 1993, 537-571.
- Carotenuto A., De Feo V., Fattorusso E., Lanzotti V., Magno-S. and C. Cicala, The flavonoids of *Allium ursinum*, *Phytochemistry*, **1996**, 41, 2, 531-536.
- Chandel R.S. et Rastogi R.P., Triterpenoid saponins and sapogenins 1973-1978. *Phytochemistry*, **1980**, 19, 1889-1908.
- Chase et al. 1995a. Molecular systematic of Liliaceae in Monocotyledons: *Systematics and evolution*, (eds.), 109-107. Royal Botanic Garden, Kew.
- Chaudhry, P.S.; Cabrera, J.; Juliani, H.R.; Varma, S.D. Inhibition of human lens aldose reductase by flavonoids, sulindac and indomethacin. *Biochem Pharmacol*. **1983**, 32:1995.
- Chen W.H. and Wu D.G. Hua Hsuch Pao, (CA: 90, 138052). Study on sapogenin of *Shima argentea* Pritz. **1978**, 36, 229-232.
- Chi-Huang T., Shen-Jeu W. and Chun-Nan L., "Design, synthesis and cytotoxic effect of hydroxy- and 3-alkylaminopropoxy-9, 10-anthraquinone derivatives *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2005**, 13, 3439.
- Chu, S.C.; Hsieh, Y.S.; Lin, J.Y. Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. *J Nat Prod*. **1992**, 55: 179-183
- Conrad, Thèse Pharmacie, Paris, 1913.
- Cornelia S., Melanie Q., Matthias H., Olivier P. Profiling of isoflavonoids in *Iris germanica* rhizome extracts by microprobe NMR and HPLC-PDA-MS analysis. *Fitoterapia*, **2011**, 82, 1021-1026.
- Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J.P.; Cimanga, K.; Van-Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, A.J.; Vanden Berghe, D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod*. **1998**, 61: 71-76.

- Defago G. Rôle des saponines dans la résistance des plantes aux maladies fongiques. *Ber. Schweiz Bot. Ges.*, **1977**, 87, 79-132.
- Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A.A.; Capasso, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Review. *Life Sci.* **1999**, 65: 337-53.33:1525-1530.
- Dieudonne N., Maurice D. A., Pierre T. Merhatibeb B., Berhanu M. A., Two new anthraquinones from *Gladiolus psittacinus*, *Biochemical Systematics and Ecology*, **2007**, 35,709-713.
- Ding-Yong W., QI Y. E, Bo-Gang L. and Guo-Lin Z., A new anthraquinone from *Gladiolus Gandavensis*, *Natural Product Research*, **2003**, 17,5, 365–368.
- Elias R. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Contribution à l'étude des saponosides de la feuille de lierre grimpant *Hedera helix*. Marseille **1989**.
- El-Shanawany M.A., Hassanean H.A., Mohamed M.H., Nafady A.M., A new oleanene triterpene from *Gladiolus segetum* Ker-Gawl, *Natural Product Research*, 2009, 23,7, 613-616.
- Expert - Faune et flore de l'Indre, mozilla Firefox
- Favel A, Steinmetz M.D., Ollivier E., Elias R., Regli P. and Balansard G. Screening of Triterpenoid Saponins for Antifungal Activity of Triterpenoid saponins. *Planta Med.*, 58, **1992**, (suppl 1) A635- A636.
- Favel A, Steinmetz M.D., Ollivier E., Elias R. and Balansard G. In vitro Antifungal Activity of Triterpenoid saponins. *Planta Med.*, **1994**, 50, 51-53.
- Fontenay S., Grare M, Mayer J., Finance C., Duval R.E, *Journal of Ethnopharmacology* **2008**, 120, 272.
- Gamal A. Mohamed,B, Sabrin R.M. Ibrahim , Samir A. Ross D,E., New ceramides and isoflavone from the Egyptian Iris germanica L. rhizomes. *Phytochemistry Letters*, **2013**, 6, 340–344.
- Goldblatt, P. 1990. Phylogeny and classification of iridaceae, *Ann. Missouri Bot. Gard.* 77: 607-627.
- Grare, M., Mourer, M., Fontanay, S., Regnouf-de-Vains, J.B., Finance, C., Duval, R.E. In vitro activity of par-guanidinoethylcalix[4]arene against susceptible and antibiotic-resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2007**, 60, 575-581.
- Greene, Amer. Journ. Pharm., 1878, 50; 250 et 405.

- Gunther H. La spectroscopie de RMN: principes de base, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 en chimie. Paris: Masson, 1996.
- Gurbuz I., Yesilada E. and Ito S., An anti-ulcerogenic flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. *Journal of Ethnopharmacology* ,**2009**, 121, Issue 3, 30 360-365.
- Hanasaki, Y.; Ogawa, S.; Fukui, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, 16: 845-850.
- Hassanean H.A., El-Hamouly M.M.A., El- Moghazy S.A. and Bishay D.W. 14-decarboxyquinovic and quinovic acid glycosides from *Zygophyllum album*. *Phytochemistry*, **1993**, 33, 3, 669-670.
- Hertog, M.G.; Feskens, E.J.; Hollman, P.C.; Katan, M.B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet.* **1993**, 342:1007-1011.
- Herve Poumale M. P., Bonaventure Ngadjui T., Helmke E. and. Laatsch H, “New anthraquinones from a marine Streptomyces sp. - isolation, structure determination and biological activities”, *Zeitschrift fuer Naturforschung, B: Chemical Sciences*, **2006**, 61, 1450.
- Hong X.C., Khaled A.S. and Mirko S., “New antibiotic with typical plant anthraquinones structure obtained studying terrestrial and marine Streptomyces”. *World J. Microbiol Biotechnol.* **2008**, 24, 419.
- Hostettmann K. et Lea P.J. Biologically Active Natural Products. Clarendon press, Oxford, **1987**, 65-68.
- Hostettmann, K, Marston, A. Saponins, chemistry and pharmacology of natural's products. Cambridge: University press; **1995**; 18-121.
- Ilkay O., Bilge S., Toshihiro H., Yoshinori A., Mensure O., Filiz A., Iristectorone K, a novel monocyclic triterpene ester from *Iris germanica* rhizomes growing in Turkey. *Fitoterapia*, **2002**, 73, 316-319.
- Isao K., Yoshihirio M., Iwang S., Soediro S. and Soelaksono S., “Cytotoxic anthraquinones from *Rheum Pulmatum*”. *Phytochemistry*, **31**, 1992, 1063.
- Izzo, A.A. PAF and the digestive tract. A review. *J Pharm Pharmacol.* **1996**, 48: 1103- 11.

- Julien J., Gasquet M., Maillard C., Balansard G. and Timon David P. Extracts of the Ivy plant, *Hedera helix*, and their anthelmintic activity on liver fluke. *Planta Med.*, **1985**, 50, 445-446.
- Kamiya K., Hamabe W., Tokuyama S., Hirano K., Satake T., Kumamoto-Yonezawa Y., Yoshida H. and Mizushima Y., Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B- and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation. *Food Chemistry*. **2010**, 118, 3, 725-730.
- Kasai R, Yamasaki K, Tanaka O. Saponins in: Naturally Occuring Glycosides. Ed Raphael Ikan Chichester : John Wiley et Sons; 1999 : 295-310
- Konoshima T., Kokumai M., Kozuka M., Tokuda H., Nishino H. and Iwashimo A. Antitumor promoting activities of a fromosin and soyasaponin I isolated from *Wistaria brachybotrys*. *J. Nat. Prod.*, **1992**, 55, 1776-1778.
- Lallemand J.Y. et Duteil M., <sup>13</sup>C NMR Spectra of quercetin and rutin, *Organic Magnetic Resonance*, **1977**, 9, 179.
- Lamidi M., E. Ollivier, R. Faure, L. Debrauwer, L. Nze-Ekekang, G. Balansard, Quinovic acid glycosides from *Nauclea diderrichii*, *Phytochemistry*, **1995**, 38, 209–212.
- Lamidi M., DiGiorgio C., Delmas F., Favel A., Eyele Mve-Mba C., Rondi M.L., Ollivier E., Nze-Ekekang L., Balansard G., In vitro cytotoxic, antileishmanial and antifungal activities of ethnopharmacologically selected Gabonese plants. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, 102, 185–190.
- Lamyaa F. Ibrahim, Salwa A. Kawashty, Ali M. El-Hagrassy, Mahmoud I. Nassar and Tom J. Mabry, A new kaempferol triglycoside from *Fagonia taeckholmiana*: cytotoxic activity of its extracts *Carbohydrate Research*. **2008**, 343, Issue 1, 155-158.
- Landolfi, R.; Mower, R.L.; Steiner, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. Structure-activity relations. *Biochem Pharmacol*. **1984**, 33:1525-1530.
- Larocca, L.M.; Giustacchini, M.; Maggiano, N.; Ranelletti, F.O.; Piantelli, M.; Alcini, E.; Capelli, A. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type II estrogen binding sites in primary human transitional cell carcinomas. *J Urol*. **1994**, 152: 1029-1033.
- Leistner, O.A. (Ed) 2000 Seed plants of southern Africa: families and genera. *Strelitzia* 10. NBI. Pretoria.

- Lemos T.L.G., Mendes A.L., Sousa M.P. and Braz-Filho R. New saponin from *Sapindus saponaria*. *Fitoterapia*, LXIII (6), **1992**, 515-517.
- Loggia R.D., Becker H., Issac O. et Tubaro A. Topic anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* extracts. *Plant. Med.*, **1990**, 56, 658.
- Mahato S.B., Sarkar H. et Poddar G. Triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, **1988**, 27 (10), 3037-3067.
- Majester-Savornin, Elias R., Diaz-Lanza A.M., Balansard G., Gsquet M. and Delmas F. Saponins of the ivy plant, *Hedera helix* and their leishmanicidal activity. *Planta Med.*, **1991**, 57, 260-262.
- Makimura, M.; Hirasawa, M.; Kobayashi, K.; Indo, J.; Sakanaka, S.; Taguchi, T.; Otake, S. Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. *J Periodontol.* **1993**, 64: 630-636.
- Manguro L.O.A., Ugi, I., Lemmen P., Hermann R., *Phytochemistry*, **2003**, 64, 891-896.
- Markham K.R., Marbry T.J., *Phytochemistry* **1968**, 7, 1197-1200.
- Markham K.R., Marbry T.J., *Tetrahedron*, **1978**, 34, 1389.
- Marston A. and Hostettmann K. in methods in plantBiochemistry, 6, ed. Hostettmann k. Assays for molluscicidal cercaricidal schistosomicidal and pscicidal activities. *Academic Press.London*, **1991a**, 153-178.
- Massiot G, Lavaud C. Structural elucidation of saponins. In: Atta-ur-Rahman, editor. Structure and chemistry (part C): Studies in Natural Products Chemistry Vol. 15. Elsevier: Amsterdam, **1995**, 187-224.
- Mishra B. B., Kishore N., Tiwari V. K., Singh D. D., Tripathi V., A novel antifungal anthraquinone from seeds of *Aegle marmelos* Correa(family Rutaceae) *Fitoterapia* **2010**, 81, 104–107.
- Nema R.K., Ramawat K.G., *J.Chem. Pharm. Res.***2010**, 2(2), 610-617.
- Ngamga D., Awouafack M.D, Tane P., Bezabih M., Abegaz B.M., *Biochem.Syst.Eco,l* **2007**, 35, 709.
- Ong, K.C.; Khoo, H.E. Biological Effects of Myricetin. *General Pharmacol.* **1997**, 29: 121-126.196.
- Ong, K.C.; Khoo, H.E. Effects of myricetin on glycemia and glycogen metabolism in diabetic rats. *Life Sci.* **2000**, 67: 1695-1705.

- Orhan, E. Küpeli, S. Terzioğlu and E. Yesilada, Bioassay-guided isolation of kaempferol-3-O-β-d-galactoside with anti-inflammatory and antinociceptive activity from the aerial part of *Calluna vulgaris* L., *Journal of Ethnopharmacology* **2007**, 114, 1, 32-37.
- Othani K., Mavi S., Hostettmann K. Molluscicidal and antifungal triterpenoid saponins from the leaves of *Rapanea melanophloeos*. *Phytochemistry*, **1983**, 33 (1), 83-86.
- Othani k. and Hostettmann K. Molluscicidal and antifungal triterpenoid saponins from the leaves of *Rapanea melanophloeos*. *Planta Med.*, **1992**, 58, A708.
- Pharmacopée Européenne, Ed. Maisonneuve, T. II, 1971, 45-48
- Pharmacopée Française, IX° Ed., T. II, 1976, 306-307
- Pan Shu, Min Jian Q., Wen Juan S., Gang Wu, A new coumaronochromone and phenolic constituents from the leaves of *Iris bungei* Maxim. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2009**, 37, 20–23.
- Paris M. et Hurabielle M. Masson, Paris, Tome 1 (1981). Abrégé de matière Médicale.
- Pinkas M., Trotin F. et Bezanger-Beauquesnes L. Les saponosides. *Prod.Prob.Pharm.* **1972**, 27, 187-198
- Ranajit K. Sutradhar A.K.M. Matior Rahman , Mesbah U. Ahmad and Sitesh C. Bachar Bioactive flavones of *Sida cordifolia*, *Phytochemistry Letters* ,**2008**, 1, Issue 4, 179-182.
- Rikke N., Tadao K., Further anthocyanins from flowers of *Crocus antalyensis* (Iridaceae), *Phytochemistry*, **1999**, 50, 325-328.
- Rikke N., Jens K. N., Tadao K., Flavonoids from flowers of two *Crocus chrysanthus-biflorus* cultivars: "Eye-catcher" and "Spring Pearl" (Iridaceae), *Phytochemistry*, **1999**, 51,1139-1146.
- Rudall, P. 1994, Anatomy and systematic of Iridaceae, *Bot. J. Linnean Soc.* 114: 1-21.
- Serkerov S.V., Aleskerova A.N., *Chemistry of Natural Compounds*, **1978**, 14, 59-61.
- Scutt, A.; Meghji, S.; Canniff, J.P.; Harvey, W. Stabilisation of collagen by betel nut polyphenols as a mechanism in oral submucous fibrosis. *Experientia*. **1987**, 43: 391-393.
- Shing A., Miki S., Ayaka H., Naoki M.; *PLOS ONE.*, **2013**, 8, 1-11.
- Skibola C.F., Smith M.T, Free Radical, *Biology & Medicine*. **2000**, 29, 375.

- Simoes C.M.O., Amoros M., Schenkel E.P., Shin- Kim J.S., Rücker G. et Girre L. Preliminary studies of antiviral activity of triterpenoid saponins: relationship between their chemical structure and antiviral activity. *Planta Med.*, **1990**, 56, 652.
- Stevenson, D. W. and H. Lecomte. 1995. Cladistic analysis of monocot. Families. In *Monocotyledons: Systematics and evolution*, 543-578. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Takechi M, Tanaka Y. Structure-activity relationships of synthetic methyl oleanolate glycosides. *Phytochemistry* **1992**; 31: 3789-3791.
- Takgi K., Park E. H. et Kato H. Antiinflammatory activities of hederagenin and crude saponin isolated from *Sapindus mukurossi* Gaertn. *Chem.Pharm. Bull.*, **1980**, 28 (4), 1183-1188.
- Umar M., Vijay K. K., Leopold J., Alkylated benzoquinones from *Iris kumaonensis*. *Phytochemistry*, **2002**, 61, 923–926.
- Voutquenne L., Saponines et activités hémolytiques. Saponines et glycosides de cinq espèces de Sapindaceae. *Ann Pharm Fr*, **2001**, 59 : 407-414.
- Walter S. J., Christopher S.C., Elizabeth A.K., Peter S., Botanique systématique, 1ere edition, De Boeck Université s.a. **2002**, Paris.
- Wen Juan S., Min Jian Q., Pan S., Chao Feng Z., Two new C-glycosylflavones from the leaves of *Iris lactea* var. *chinensis*, *Chinese Chemical Letters*, **2008**, 19, 821–824.
- Wikipédia l'encyclopédie libre [http://fr.wikipedia.org/wiki/Glaieul\\_des\\_moissons](http://fr.wikipedia.org/wiki/Glaieul_des_moissons)
- Yayli N., H.Seymen, C.Baltaci. *Phytochemistry*, **2001**, 58, 607-610.
- Yopez P.A.M., Lock de Ugaz O., Alvarez A.C.M., De Feo V., Aquino R., De Simone F. and Pizza C. Quinovic acid glycosides from *Uncaria guianensis*. *Phytochemistry*, **1991**, 30, 5, 1635-1637.
- Yoshihisa A. A, Masako I. and Tsutomu F., Acylated saponin masonosides A-C, from the corms of *Crocasmia masoniorum*. *Phytochemistry*, **1994**, 35, 3, 751-164.
- Yoshimura M., Ito H., Miyashita K., Hatano T., Taniguchi S., Amakura Y. and Yoshida T., , Antioxydant Flavonolglucuronides and C-glucosidic ellagitannins from *Melaleuca squarrosa* *Phytochemistry*. **2008**, 69, 18, 3062-3069.
- Yuhan M., Huan L., Binbin L., Guokai W., Minjian Q., C-glycosylflavones from the leaves of *Iris tectorum* Maxim., *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **2012**; 2, 6, 598–601.
- Yuji T., Nakagawaa K, Tatsumasa M., Mitsuaki K., Shinichi Y., Toshihiro A., Hideyuki I., Shuji I., *Obesity Research & Clinical Practice*, **2009**, 3, 169.

## Résumé

*Gladiolus segetum* (Iridaceae) connu sous le nom de glaïeul des moissons, appelé par les éleveurs de la région « *Sif er rorab* ». Pousse dans les champs de blé, commun dans le Tell et sur les hauts plateaux en Algérie. C'est une plante ornementale, utilisée dans le sud Algérien en médecine traditionnelle, pour le traitement de l'ulcère gastrique, mélangée à d'autres plantes. Par contre c'est une plante toxique, mortelle pour le bétail. Durant quatre années d'observation, nous avons constaté qu'après ingestion de cette plante 75 % des bovins présentaient des signes d'intoxication. En générale toutes les bêtes qui ont en consommé en grande quantité meurent après 72 heures. La phytochimie et l'activité biologique de cette plante n'ont pas fait l'objet de recherche approfondie. Le but de notre étude est de déterminer la structure des composés toxiques et de confirmer ou infirmer l'usage traditionnel du *Gladiolus segetum* dans le traitement de l'ulcère gastrique. Ce travail a porté sur l'isolement de composés et leur purification, basés sur l'utilisation d'une combinaison de méthodes chromatographiques (CCM ,DCCC , BPLC , HPLC ....) et leur détermination structurale grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques, telles que l'ultraviolet, l'infrarouge, la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire, (techniques monodimensionnelles ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) et bidimensionnelles (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC) ont permis d'isoler vingt composés dont cinq nouveaux : Quatre anthraquinones, un dérivé benzofuranique, quatre saponosides, trois dérivés flavonoïdiques , trois triterpènes et cinq stéroïdes. Dans la partie biologique de notre travail, nous avons étudié la cytotoxicité de l'extrait chloroformique, l'extrait à l'acétate d'éthyle, l'extrait méthanolique, neuf fractions obtenues par fractionnement de l'extrait méthanolique et de deux molécules que nous avons isolés, saponine 1 et saponine 2, vis-à-vis de fibroblastes humains MRC 5. A partir de nos résultats et de résultats bibliographiques nous pouvons confirmer la toxicité, l'effet inhibiteur et valider l'usage traditionnel du *Gladiolus segetum* dans le traitement de l'ulcère gastrique.

## Mots-clés français / French Keywords

Plante médicinale ; Origine végétale ; Isolement ; Analyse structurale ; Saponine ; Glycoside ; Triterpène ; Iridaceae ; Flavonoïde ; Activité biologique ; Cytotoxicité ; Antifongique ; In vitro ; Monocotylédones ; Angiospermae ; anti-inflammatoire ; inhibiteur, antifongique, antibiotique.

## **Abstract**

*Gladiolus segetum*, (Iridaceae) called “Sif er rorab”, is a beautiful ornamental plant; which had been used in Southern Algeria as a traditional medicine to treat antiulceric in association with other known plants. However, it is a toxic plant, lethal for livestock, growing in wheat fields and cultures. It is wide spread in high plains in Algeria. During four years of observation we noticed that after ingestion of this plant, 75 % of the cattle presented signs of poisoning. Generally all the animals which consumed the gladiolus die after 72 hours. The phytochemistry and biological activity of this plant have not been extensively investigated. The aim of our study is to elucidate the structure of the toxic compounds responsible for the lethal effect of this plant

This work concerned the phytochemical study together with the evaluation of its cytotoxic effect toward MRC-5 cells. The extraction and purification of the different constituents, based on the use of a combination of chromatographic methods, and their structural determination, performed by physicochemical and spectroscopic methods, such as ultraviolet, mass and nuclear magnetic resonance spectrometry's, allowed us to isolate four anthraquinones, an benzofuran, four saponosids, three flavonoid derivates; three steroidal derivates: daucostérol, stigmastérol, ergosterol,  $\beta$ - sitosterol and cholesterol, and three triterpens . The results of the biological assays showed cytotoxic effect toward MRC-5 cells.

## **Mots-clés anglais / English Keywords**

Medicinal plant ; Plant origin ; Isolation ; Structural analysis ; Saponin ; Glycoside ; Anthraquinones; Triterpene ; Iridaceae ; Flavonoids ; Biological activity ; Cytotoxicity; In vitro ; Monocotyledons ; Angiospermae ; anti-inflammatory; inhibitor, antifungal, antibiotic.

## ملخص

يعتمد هذا العمل على الدراسة الفيتوكيميائية للنوع جلاديو لاس سجتيم الذي ينتمي إلى عائلة ايريداسيا  
لقد تم في هذا البحث على فصل عدد من المركبات وتم التعرف على التركيب الكيميائي اعتمادا على التحليل الطيفية  
والكروماتوغرافية ومطيافية الرنين المغناطيسي ومطيافية الكتلة  
وقد تم تقويم فعالية بعض الأجزاء ضد خطوط خلايا MRC-5

## الكلمات المفتاحية

الفيتوكيمياء . جلاديو لاس . تحاليل طيفية. الرنين المغناطيسي. مطيافية الكتلة . فعالية حيوية