



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE EL HADJ LAKHDAR-BATNA 1
FACULTE DES SCIENCES DE LA MATIERE
DEPARTEMENT DE CHIMIE



THESE DE DOCTORAT
SPECIALITE
CHIMIE ORGANIQUE

Présentée par :

M^{me} BOUREZZANE Sawsen

Thème :

**Métabolites secondaires de *Astragalus monspessulanus* L.
et *Hedysarum carnosum* (Fabaceae)**

Soutenue le 21/06/2018

Devant le JURY

Hamada HABA	Pr, Université de Batna 1	Président
Mohammed BENKHALED	Pr, Université de Batna 1	Rapporteur
Salah AKKAL	Pr, Université de Constantine 1	Examineur
Djebbar ATMANI	Pr, Université de Béjaia	Examineur
Ammar DIBI	Pr, Université de Batna 1	Examineur
Fatma BITAM	MCA, Université de Batna 2	Examinatrice

Année Universitaire : 2017-2018

Remerciements

Avant tout, merci à Dieu tout puissant qui a permis que je sois ce que je suis aujourd'hui. Car l'homme propose mais Dieu dispose. Seigneur, veille toujours diriger mes pas.

Cette thèse de doctorat a été réalisée au sein du Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (LCCE) de la Faculté des Sciences de la Matière de l'Université de Batna 1, sous la direction du Professeur BENKHALED Mohammed. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et profonde gratitude pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de faire évoluer ce sujet dans les meilleures conditions. Je tiens à le remercier pour l'honneur qu'il m'a fait en m'encourageant, m'orientant et me soutenant, ainsi que pour sa patience avec moi tout au long de l'élaboration de ce mémoire.

Mes vifs remerciements vont à Monsieur Hamada HABA Professeur à l'Université de Batna 1, pour m'avoir également suivi, orienté dans l'accomplissement de ce travail et fait profiter de ses grandes compétences dans le domaine des substances naturelles, et également pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse.

J'adresse également tous mes remerciements à Messieurs les Professeurs Ammar DIBI, Salah AKKAL et Djebbar ATMANI, ainsi qu'au Docteur Fatma BITAM pour avoir accepté d'examiner et de juger ce travail de thèse.

Je remercie le Docteur Christophe Long, du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles CNRS-Pierre Fabre, pour la réalisation des spectres de RMN et masse.

Je tiens enfin à redire le plaisir que j'ai eu à travailler au sein du laboratoire LCCE, et j'en remercie ici tous les membres. Toutes les personnes m'ayant permis de mener à bien ce travail sont assurées de ma gratitude. Un merci du cœur tout particulier à tous mes collègues de l'Université de Batna 1.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes parents, sources constantes d'encouragement, de soutien, de confiance et d'affection. Un grand merci pour m'avoir permis de réaliser mes longues études et pour tous leurs sacrifices consentis. Sans vous, je n'aurais jamais pu aller jusqu'au bout.

A mon Mari, pour tes précieux conseils et surtout ta patience pendant toute la durée de ce travail.

A mes très chères enfants **Jana, Roudaina** et **Ahmed Nassif** que j'adore

A ma chère sœur Awatef, un merci à vous, pour ton encouragement et ton soutien, souvent discret, mais toujours efficace.

Un merci à vous, mes **chères frères Naim, Rabi et Mouhcen**;
pour avoir partagé tous ces moments avec moi, pour m'avoir réconforté mais aussi pour votre soutien de tous les instants.

A ma tante Meriem, merci pour ton aide constant et votre soutien et affection

A ma famille pour leurs encouragements

Abréviations

AcOEt	Acétate d'éthyle
ACN	Acétonitrile
Arab	Arabinose
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CCE	Chromatographie sur Couche Epaisse
CHCl₃	Chloroforme
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
CDCl₃	Chloroforme deutéré
CD₃OD	Méthanol deutéré
CHI	Chalcone isomérase
CHS	Chalcone synthase
CLMP	Chromatographie Liquide Moyenne Pression
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CLV	Chromatographie Liquide sous Vide
COSY H-H	Correlated spectroscopy
COX-1	Cyclo-oxygénase 1
<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
DEPT	Distortionless enhancement by polarisation transfer
DMSO	diméthylsulfoxyde
DMSO-<i>d</i>₆	diméthylsulfoxyde deutéré
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
EC₅₀	Concentration efficace médiane
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EP	Ether de pétrole
ESI	Electrospray Spray Ionisation
EtOH	Ethanol
FHT	Flavanone-3-hydroxylase
FLS	Flavonol-synthase

<i>J</i>	Constante de couplage exprimée en Hz
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation
IC₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
IFS	Isoflavone synthase
gal	Galactose
glc	Glucose
gluc	Acide glucuronique
<i>m</i>	Multiplet
MeOH	Méthanol
MS	Mass spectrometry
<i>m/z</i>	Masse/Charge d'un ion
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -butanol
<i>nd</i>	Non déterminée
R	Radical
rha	Rhamnose
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMN ¹³C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
RMN ¹H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RP-18	Silice greffée en C-18 (Reverse Phase-18)
<i>s</i>	Singulet
<i>sl</i>	Singulet large
SEM	Standard Error of Mean
SiO₂	Gel de silice normale
<i>t</i>	Triplet
uma	Unité de masse atomique
Xyl	Xylose
δ	Déplacement chimique exprimé en ppm

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I - Rappels bibliographiques	3
Partie I	
I.1 Présentation de la famille Fabaceae.....	3
I.1.1 Généralités.....	3
I.1.2 Description botanique.....	3
I.1.3 Intérêt de la famille Fabaceae.....	4
I.2 Présentation du genre <i>Astragalus</i>	4
I.2.1 Généralités.....	4
I.2.2 Description botanique du genre <i>Astragalus</i>	5
I.2.3 Toxicité des plantes du genre <i>Astragalus</i>	5
I.2.3.1 Astragales toxiques.....	5
I.2.3.2 Astragales non toxiques.....	6
I.3 Usage traditionnel et propriétés biologiques du genre <i>Astragalus</i>	7
I.3.1 Utilisation en médecine traditionnelle.....	7
I.3.2 Activités biologiques.....	7
I.4 Autres intérêts.....	8
I.5 Etudes phytochimiques antérieures sur le genre <i>Astragalus</i>	8
- Flavones.....	8
- Flavanones.....	10
- Isoflavones.....	11
- Chalcones.....	12
- Flavanes.....	12
- Ptérocarpanes.....	13
- Saponines à squelette cycloartane.....	13
- Saponines à squelette oléanane.....	17
- Stérols.....	20
- Carbohydrates.....	20
- Autres composés.....	21
Partie II	22
II.1 Présentation du genre <i>Hedysarum</i>	22
II.1.1 Généralités.....	22
II.1.2 Description botanique du genre <i>Hedysarum</i>	22
II.2 Usage traditionnel et propriétés biologiques des plantes du genre <i>Hedysarum</i>	22
II.2.1 Utilisation en médecine traditionnelle.....	22

II.2.2 Activités biologiques.....	22
II.3 Autres intérêts du genre <i>Hedysarum</i>	23
II.4 Etudes phytochimiques antérieures sur le genre <i>Hedysarum</i>	23
- Flavones.....	23
- Flavanones.....	25
- Isoflavanones.....	25
- Chalcones.....	26
- Flavanols.....	27
- Xanthones.....	27
- Ptérocarpanes.....	27
- Triterpénoïdes.....	28
- Coumarines.....	29
- Lignanes.....	29
- Alcaloïdes.....	29
- Stéroïdes.....	30
- Carbohydrates.....	30
- Composés gras.....	30
- Benzofuranes.....	31
- Autres composés.....	31

**Chapitre II-Généralités sur les composés phénoliques
et les dérivés terpéniques**

II.1 Composés phénoliques.....	32
II.1.1 Définition.....	32
II.1.2 Classification.....	32
II.1.2.1 Acides phénoliques.....	32
II.1.2.2 Lignanes.....	33
II.1.2.3 Flavonoïdes.....	34
II.1.2.3.1 Définition.....	34
II.1.2.3.2 Classification.....	35
II.1.2.3.2.1 Flavonoïdes au sens strict.....	36
A. Flavones, flavonols.....	36
B. Flavanones et dihydroflavonols.....	37
C. Chalcones et dérivés.....	39
D. Aurones et dérivés.....	40
II.1.2.3.2.2 Isoflavonoïdes.....	40
A. Définition.....	40
B. Classification.....	40

• Isoflavones.....	41
• Isoflavanes.....	42
• Coumestanes.....	42
C. Biosynthèse des isoflavonoïdes.....	43
II.1.2.3.3 Biosynthèse des flavonoïdes.....	44
II.1.2.3.4 Propriétés pharmacologiques.....	45
II.2 Triterpènes.....	46
II.2.1 Définition.....	46
II.2.2 Classification.....	46
II.2.2.1 Triterpènes stéroïdiques.....	46
II.2.2.2 Triterpènes pentacycliques.....	46
II.2.3 Biosynthèse des triterpènes.....	47
II.2.4 Propriétés pharmacologiques des triterpènes.....	50
II.3 Saponines.....	50
II.3.1 Définition.....	50
II.3. Classification.....	50
II.3.2.1 Saponines stéroïdiques.....	50
II.3.2.2 Saponines triterpéniques.....	51
II.3.2.3 Sucres.....	52
II.3.3 Propriétés pharmacologiques des saponines.....	52
Chapitre III-Etude phytochimique de l'espèce <i>Astragalus monspessulanus</i> L.	
III.1 Rappels botaniques.....	53
III.1.1 Généralités.....	53
III.1.2 Description botanique.....	53
III.1.3 Classification systématique.....	53
III.2 Toxicité.....	54
III.3 Propriétés pharmacologiques.....	54
III.4 Résultats et discussions.....	54
III.4.1 Extraction.....	54
III.4.2 Séparation et purification.....	55
III.4.3 Caractérisation des produits obtenus à partir de l'extrait <i>n</i> -BuOH.....	57
III.4.3.1 Identification structurale du composé AM1.....	58
III.4.3.2 Identification structurale du composé AM2.....	66
III.4.3.3 Identification structurale du composé AM3.....	74
III.4.3.4 Identification structurale du composé AM4.....	82
III.4.3.5 Identification structurale du composé AM5.....	87

III.4.3.6 Identification structurale du composé AM6.....	95
III.4.3.7 Identification structurale des composés AM7 et AM7'.....	103
III.4.3.8 Identification structurale du composé AM8.....	111
III.4.3.9 Identification structurale du composé AM9.....	123
III.4.3.10 Identification structurale du composé AM10.....	134
III.5 Conclusion.....	138

Chapitre IV- Etude phytochimique de l'espèce *Hedysarum carnosum* Desf.

IV.1 Rappels bibliographiques.....	140
IV.1.1 Généralités.....	140
IV.1.2 Description botanique.....	140
IV.1.3 Classification systématique.....	140
IV.1.4 Intérêt de <i>Hedysarum carnosum</i> Desf.....	141
IV.2 Résultats et discussions.....	141
IV.2.1 Extraction.....	141
IV.2.2 Séparation et purification.....	142
IV.2.3 Caractérisation des produits obtenus.....	143
IV.2.3.1 Identification structurale du composé HC1.....	143
IV.2.3.2 Identification structurale du composé HC2.....	149
IV.2.3.3 Identification structurale du composé HC3.....	154
IV.2.3.4 Identification structurale du composé HC4.....	158
IV.2.3.5 Identification structurale du composé HC5.....	161
IV.2.3.6 Identification structurale du composé HC6.....	165
IV.2.3.7 Identification structurale du composé HC7.....	168
IV.2.3.8 Identification structurale du composé HC8.....	171
IV.2.3.9 Identification structurale du composé HC9.....	177
IV.2.3.10 Identification structurale du composé HC10.....	181
IV.2.3.11 Identification structurale du composé HC11.....	186
IV.2.3.13 Identification structurale du composé HC12.....	188
IV.3 Conclusion.....	193

Chapitre V-Activité antioxydante

V.1 Introduction.....	195
V.2 Evaluation de l'activité antioxydante.....	195
V.2.1 Mesure du pouvoir antiradicalaire par le test DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyle).....	195
V.2.1.1 Principe.....	195
V.2.1.2 Mode opératoire.....	196
V.2.1.3 Résultats.....	197

V.2.2 Pouvoir chélateur du Fer.....	198
V.2.2.1 Principe.....	198
V.2.2.2 Mode opératoire.....	199
V.2.2.3 Résultats.....	199
V.3 Conclusion.....	201
Conclusion générale	202
Chapitre VI-Partie expérimentale	
VI.1 Matériel végétal.....	207
VI.1.1 Récolte des plantes <i>Astragalus monspessulanus</i> et <i>Hedysarum carnosum</i>	207
VI.1.2 Techniques préparatives de séparation.....	207
VI.1.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM).....	207
VI.1.2.2 Chromatographie sur Couche Epaisse (CCE).....	207
VI.1.2.3 Chromatographie liquide sous vide (CLV).....	207
VI.1.2.4 Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC).....	208
VI.1.2.5 Chromatographie liquide moyenne pression (CLMP).....	208
VI.1.2.6 Chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	208
VI.1.3 Chimie structurale.....	209
VI.1.3.1 Pouvoir rotatoire.....	209
VI.1.3.2 Spectrométrie de masse.....	209
VI.1.3.3 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	209
VI.2 Etude phytochimique de l'espèce <i>Astragalus monspessulanus</i> L.	210
VI.2.1 Extraction.....	210
VI.2.2 Fractionnement et purification de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	210
VI.2.3 Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle.....	213
VI.2.4 Composés isolés de l'espèce <i>Astragalus monspessulanus</i> L.	215
VI.2.5 Constantes physiques et données spectrales des composés isolés.....	215
VI.3 Etude phytochimique de l'espèce <i>Hedysarum carnosum</i>	219
VI.3.1 Extraction.....	219
VI.3.2 Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle.....	219
VI.3.3 Composés isolés de l'espèce <i>Hedysarum carnosum</i> Desf.....	223
Références bibliographiques	227

Introduction

INTRODUCTION

Au travers des âges, les plantes ont toujours occupé une place prépondérante dans la vie de l'homme. Toutes les civilisations connues ont utilisé les plantes pour se nourrir, se défendre, se vêtir ou se soigner. L'utilisation thérapeutique des extraordinaires vertus des plantes pour le traitement de toutes les maladies de l'homme est très ancienne et a évolué avec l'histoire et le développement de l'humanité. Les connaissances empiriques accumulées ont permis aux différentes civilisations de prendre les plantes comme source essentielle de médicaments. Ainsi, jusqu'au début du 20^{ème} siècle, presque tous les médicaments étaient à base de plantes [1].

Aujourd'hui, la recherche de nouveaux agents pharmacologiques actifs via le screening de sources naturelles, a abouti à la découverte d'un grand nombre de médicaments utiles jouant un rôle majeur dans le traitement de nombreuses maladies humaines [2]. La recherche de nouvelles molécules médicamenteuses d'origine naturelle est basée sur les études phytochimiques et pharmacologiques. De ce fait, la valorisation des ressources naturelles est une préoccupation qui devient de plus en plus importante dans de nombreux pays dont l'Algérie [3].

En effet, notre pays dispose de plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques dont 15 % endémiques, restent très peu explorées tant sur le plan phytochimique que sur le plan pharmacologique [4]. La valorisation des plantes médicinales de la flore nationale sera d'un grand apport pour l'industrie pharmaceutique algérienne et aura un impact économique certain.

Inscrit dans ce contexte, ce travail de thèse qui rentre dans le programme de recherche de notre laboratoire visant à valoriser la flore locale, par la découverte de principes actifs nouveaux, est centré sur la connaissance de la composition chimique de deux plantes Fabaceae poussant dans les régions arides et semi-arides de l'Algérie. La famille Fabaceae est connue par sa richesse en divers métabolites secondaires tels que les saponosides et les flavonoïdes. Ce travail est renforcé par l'évaluation du potentiel antioxydant des deux espèces.

Nous nous sommes intéressés à l'investigation chimique de deux plantes Fabaceae : *Astragalus monspessulanus* L. et *Hedysarum carnosum* DESF. Cet intérêt s'explique par la richesse des plantes du genre *Astragalus* en métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique, comme les saponosides, les flavonoïdes et les polysaccharides. Le genre *Hedysarum* est également riche en flavonoïdes.

Ce manuscrit est présenté comme suit :

Le premier chapitre est consacré à un rappel sur les caractéristiques botaniques de la famille Fabaceae et des genres *Astragalus* et *Hedysarum*. Les principales études phytochimiques antérieures relatives aux espèces appartenant à ces deux genres seront exposées.

Dans le deuxième chapitre, nous décrivons quelques métabolites secondaires très présents dans les genres *Astragalus* et *Hedysarum*, leurs intérêts biologiques et la biosynthèse de certains d'entre eux.

Le troisième chapitre est consacré à la description botanique de l'espèce *Astragalus monspessulanus*, la purification et la caractérisation des molécules obtenues lors de son investigation phytochimique.

Le quatrième chapitre concerne la description botanique de l'espèce *Hedysarum carnosum*, la purification et la caractérisation des molécules obtenues lors de son étude phytochimique.

Le cinquième chapitre est consacré à l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits des deux plantes.

Enfin, le sixième et dernier chapitre constituant la partie expérimentale, sera consacré à la présentation des techniques chromatographiques et d'analyse structurales mises en œuvre.

Chapitre I-
Rappels bibliographiques

Partie I

I.1 Présentation de la famille Fabaceae

I.1.1 Généralités

La famille Fabaceae (de faba signifiant fève) appelée aussi Leguminosea (Légumineuses) compte parmi les plus grandes familles des dicotylédones [6]. Elle regroupe 770 genres et plus de 19500 espèces [7], la plaçant en seconde position derrière la famille Poaceae (Gramineae), en terme de diversité [8].

I.1.2 Description botanique

La famille Fabaceae, aussi appelée couramment Légumineuses (*Leguminosae*), comprennent des plantes herbacées, des arbres, des arbustes ou des lianes, à feuilles habituellement composées, souvent trifoliolées, rarement simples, généralement avec des stipules. Beaucoup sont grimpantes et possèdent des feuilles ou des parties de feuilles modifiées en vrilles [6]. L'ovaire est formé d'un seul carpelle qui se transforme en un fruit d'un type particulier, appelé autrefois légume et que l'on désigne actuellement sous le nom de gousse. C'est un fruit sec, déhiscent par deux fentes longitudinales. En général, la gousse est allongée, longuement saillante hors du calice persistant à sa base [5]. Les fleurs, pentamères avec 10 étamines ou parfois plus, ressemblent souvent à des papillons [6]. Les caractères floraux permettent de distinguer trois sous-familles assez différentes entre elles, que sont :

- **Mimoseae** : la corolle est régulière, formée de 4 à 5 pétales et les étamines sont très nombreuses et libres entre elles. Ce groupe comprend des genres tous tropicaux. Cette sous-famille n'est représentée au Sahara que par le genre *Acacia*.
- **Césalpinieae** : la corolle est irrégulière et comprend 5 pétales dont les deux inférieurs plus grands recouvrent partiellement par leurs bords les deux latéraux. Les étamines sont généralement au nombre de 10 et libres entre elles jusqu'à leur base. Cette sous-famille comprend des genres tous tropicaux ou subtropicaux et n'est représentée au Sahara que par le seul genre *Cassia*.
- **Papilionaceae** : la corolle est plus nettement irrégulière avec les deux pétales inférieurs soudés en une pièce unique dite *carène* qui enveloppe les étamines et le pistil. Cette carène est en partie recouverte par les pétales latéraux; appelés *ails*, eux-mêmes surmontés par le pétale qui porte le nom d'étendard. L'ensemble de cette corolle présente souvent un aspect rappelant un peu celui d'un papillon, d'où le nom

de papilionaceae. Les étamines sont au nombre de 10. Cette sous-famille est la plus importante des Légumineuses car elle compte plus de 300 genres, dont une vingtaine dans la flore saharienne [5].

Les plantes Mimoseae et Cesalpinieae sont le plus souvent des arbres, tandis que chez les papilionacées le port arborescent est relativement exceptionnel. Les feuilles sont rarement simples, presque toujours formées de plusieurs folioles (généralement au nombre de trois) [5].

I.1.3 Intérêt de la famille Fabaceae

C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales [6].

De nombreuses légumineuses constituent, en effet, une source majeure de protéines et d'huiles végétales [9] et sont largement cultivées sur l'ensemble de la planète. On citera par exemple le haricot (*Phaseolus vulgaris*), le soja (*Glycine max*), le pois (*Pisum sativum*), le pois chiche (*Cicer arietinum*), la fève (*Vicia faba*), le niébé qui est une variété de haricot très courante en Afrique, la lentille (*Lens esculenta*), la cacahuète (*Arachis hypogea*). De ce fait, les légumineuses sont parmi les plantes les plus étudiées [10,11]. De plus, certaines espèces de cette famille peuvent contracter une symbiose avec une bactérie du genre *Rhizobium*, permettant ainsi un accès privilégié à l'azote de l'air. Par cette symbiose, ces espèces s'affranchissent de la teneur en azote dans le sol et par voie de conséquence, s'adaptent à des sols très pauvres et très dégradés [12].

Les espèces spontanées d'intérêt pastoral et fourrager, dont justement les légumineuses, occupent une importante place dans la flore algérienne. La valorisation de ces ressources phylogénétiques passe par leur introduction au niveau des milieux dégradés (jachères, parcours, steppe, etc.) et des terres réservées aux cultures fourragères. Dans ce sens et afin d'utiliser de façon adéquate ce matériel végétal adapté et réduire les risques d'échecs, plusieurs études de distribution des espèces de *Medicago* [13-15], *Scorpiurus* [16,17] et *Hedysarum* [18,19] ont été effectuées au niveau national.

I.2 Présentation du genre *Astragalus*

I.2.1 Généralités

Le mot *Astragalus* dérive du mot astragale, d'origine grecque désignant l'os de la cheville ou plus exactement l'un des os de l'articulation tibiotarsienne. La dénomination d'astragale vient de la ressemblance du bruit des graines séchées de la plante avec celui de l'os, quand elles tombent sur une surface solide [20].

Le genre *Astragalus* est le plus important de la famille Fabaceae [5]. Il comprend environ 3000 espèces [21,22] et plus de 250 taxons [22] distribués dans les régions tempérées de l'hémisphère nord [23,24]. La plupart se trouvant dans les régions arides des pays d'Orient comme l'Iran et la Turquie. Ces deux pays sont considérés comme les plus grands centres de diversité de ce genre [5,24]. L'Iran est riche de presque 850 espèces [25-28] tandis que la Turquie possède 445 espèces dont 210 sont endémiques [28-30]. Une cinquantaine d'espèces se rencontre en Afrique du Nord dont une quinzaine au Sahara [5].

I.2.2 Description botanique du genre *Astragalus*

Les plantes de ce genre sont des herbes annuelles et pérennes ou de petits arbustes [31]. Elles se répartissent en trois séries nommées I, II et III se définissant comme suit :

Série I : elle se divise en deux classes A et B.

- **Classe A** : les plantes appartenant à cette classe sont caractérisées par de grandes fleurs jaunes et des gousses droites, épaisses, renflées qui dépassent un centimètre de diamètre comme l'espèce *Astragalus armatus* Lam.

- **Classe B** : ses plantes sont caractérisées par des fleurs de teinte variable et des gousses étroites, droites ou fortement arquées ne dépassant pas cinq millimètres de diamètre. On citera les espèces *Astragalus caprinus* L., *A. gombo* Coss. & Dur., *A. gombiformis* Pomel., *A. akkensis* Coss. et *A. pseudotrigonus* Batt. & Trab.

Série II : les plantes de cette série sont caractérisées par une gousse arquée en demi-cercle et d'épaisseur régulière comme *Astragalus gyzensis* Del., *A. corrugatus* Bertol., *A. eremophilus* Boiss., *A. geniorum* Maire et *A. mareoticus* Del.

Série III : les plantes appartenant à cette série sont caractérisées par une gousse droite ou peu arquée, plus ou moins dilatée. On relève pour l'exemple *Astragalus sinaicus* Boiss., *A. cruciatus* Link., *A. vogelii* (Webb.) Hetch. et *A. tenuifolius* Desf. [5].

I.2.3 Toxicité des plantes du genre *Astragalus*

Les espèces du genre *Astragalus* sont partagées entre espèces toxiques et espèces non toxiques [32-35].

I.2.3.1 Astragales toxiques

Le genre *Astragalus* comprend de nombreuses espèces toxiques identifiées dans le monde entier depuis une centaine d'années [36]. L'intoxication due à ces dernières a été décrite pour la

première fois chez le mouton en 1873 à l'ouest des Etats Unis [37] puis dans d'autres pays du monde tels que le Canada, l'Australie, l'Espagne, le Maroc et autres [38-40]. Aux Etats Unis, il a été constaté que les espèces toxiques du genre *Astragalus* occupaient le premier rang dans les pertes annuelles causées par les intoxications d'origine végétale. Ces pertes sont estimées à 107 millions de dollars par an dans les années 70 [41].

Selon la nature du principe toxique dominant et le type d'intoxication qu'elles provoquent, elles sont classées en trois catégories [42]:

- Les astragales accumulatrices de Sélénium
- Les astragales synthétisant des produits nitrés
- Les astragales renfermant des alcaloïdes indolizidiques

Les espèces toxiques accumulatrices de produits nitrés [43] sont : *Astragalus hamosus*, *A. solandri* (var. *solandri* et var. *bubaloceras*), *A. stella*, *A. sesameus*, *A. boeticus*, *A. echinatus* et *A. gombo*.

A. lusitanicus est rapportée comme une espèce vénéneuse, hautement toxique [40,44]. Poussant dans plusieurs pays méditerranéens [45-47], elle est responsable de fréquentes mortalités de bétail, causant ainsi des dégâts économiques importants, notamment par la mortalité qu'elle engendre chez les petits ruminants [33,48,49].

A. cruciatus Link. est rapportée comme toxique aussi. Elle entraîne, lorsqu'elle est broutée en excès par les chameaux, une maladie appelée "Asaydal" par les nomades du Sahara occidental. Elle se traduit par une intoxication qui se manifeste par des troubles digestifs, accompagnés de désordres nerveux et de congestion cérébrale. La plante est plus toxique à l'état sec car elle engendre chez le cheptel une maladie souvent mortelle appelée "L-gergar" et dont les symptômes rappellent ceux de "Asaydal". Il semble que le principe actif soit localisé principalement dans les graines. Les composés soupçonnés renferment des atomes d'azote et de sélénium [50].

I.2.3.2 Astragales non toxiques

La majorité des astragales ne sont pas toxiques. Certaines sont utilisées pour l'alimentation du bétail. *Astragalus nuttalianus* et *A. cicer* rencontrées respectivement dans le Sud-Ouest et à l'Ouest des Etats Unis sont très appréciées par le bétail [42].

I.3 Usage traditionnel et propriétés biologiques du genre *Astragalus*

I.3.1 Utilisation en médecine traditionnelle

Les plantes du genre *Astragalus* sont fréquemment citées dans les pharmacopées traditionnelles, comme l'atteste la littérature héritée des chinois [51,52]. Une place particulière est accordée aux racines séchées de quelques espèces du genre *Astragalus* nommées Astragali Radix incluant *A. membranaceus* (Fisch.) d'origine asiatique. Astragali Radix, d'une grande importance en médecine traditionnelle chinoise, est utilisé pour traiter les morsures d'animaux, les poisons, les maladies de l'œil, les blessures, les brûlures, la néphrite, le diabète, l'hypertension, la cirrhose, les maladies de la gorge, la leucémie et le cancer de l'utérus [53-55]. Il augmente la résistance immunitaire et permet au corps de résister au froid. Etant un vasodilatateur, il diminue les sueurs excessives. Il a aussi des propriétés antimicrobienne, anti-inflammatoire, diurétique et tonique [56,57].

Certaines espèces sont connues pour leurs propriétés hépatoprotective, immunostimulante, cardiovasculaire et antivirale [31,58,59] comme *A. kahiricus* [60].

L'infusion des feuilles de l'espèce *A. caprinus*, plante pérenne endémique d'Afrique du Nord, est prescrite en médecine traditionnelle tunisienne, pour traiter les hémorroïdes [61]. *A. gombiformis* est utilisée, toujours en médecine traditionnelle tunisienne, comme antidote contre les morsures de serpents et de scorpions [62].

Dans la médecine traditionnelle turque, certaines espèces sont utilisées pour traiter la leucémie (*A. oleifolius*) [63], ainsi que les cicatrises des plaies [64,65].

I.3.2 Activités biologiques

Les plantes du genre *Astragalus* sont connues pour leur richesse en polysaccharides, saponines et flavonoïdes, métabolites secondaires possédant diverses et intéressantes activités biologiques [66]. Les polysaccharides sont dotés de propriétés antitumorales en améliorant l'immunité *in vitro* et *in vivo* [67,68]. Des études biologiques ont confirmé que les triterpènes glycosylés à squelette cycloartane et oléananes isolés de certaines espèces de ce genre (*A. trojanus*), sont dotés d'activités immunostimulante [64,65,69], anti-protazoale [70,71], antivirale [72], cytotoxique [73], cardiotonique [74] et adjuvante comme *A. oleifolius* DC. et *A. trojanus* Stev. [75]. Ils favorisent aussi la cicatrises des plaies [76]. D'autres études ont révélé que les cycloartanes exercent d'autres activités biologiques : anti-inflammatoire, analgésique, diurétique, hypotensive et sédative [64]. Une étude biologique réalisée sur les extraits et les flavonoïdes de *A. adsurgens* a montré une cytotoxicité contre la leucémie de la

ligne cellulaire HL-60 et l'hépatome de la ligne cellulaire SMMC-7721. Certains flavonoïdes ont montré aussi une activité antibactérienne [77].

I.4 Autres intérêts

Le fourrage reste l'usage le plus commun du genre *Astragalus* (*A. cicer* L.). D'un point de vue écologique, ce genre permet de lutter contre l'érosion des sols tout en améliorant leur qualité [78].

Les astragales ont des propriétés nutritionnelles et cosmétiques. Elles sont utilisées aussi comme substituants du café et du thé [79] comme les feuilles de *A. glycyphyllos* [80]. En Turquie, de nombreuses espèces ont été exploitées dans la production de la gomme adragante à usage alimentaire et pharmaceutique [81].

I.5 Etudes phytochimiques antérieures sur le genre *Astragalus*

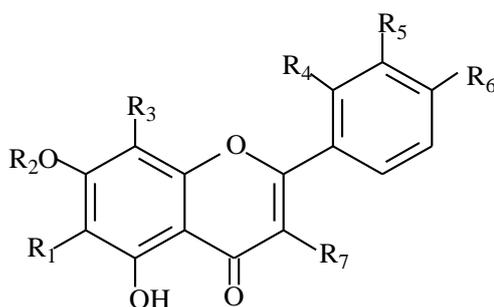
Une recherche bibliographique réalisée sur les espèces du genre *Astragalus*, montre qu'elles ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques. Différents métabolites secondaires ont été identifiés dans ce genre, particulièrement les polyphénols (flavonoïdes) et les dérivés triterpéniques (saponines). Le tableau I.1 rassemble les différents métabolites secondaires isolés de plantes de ce genre.

Tableau I.1: Composés isolés du genre *Astragalus*

➤ Flavones

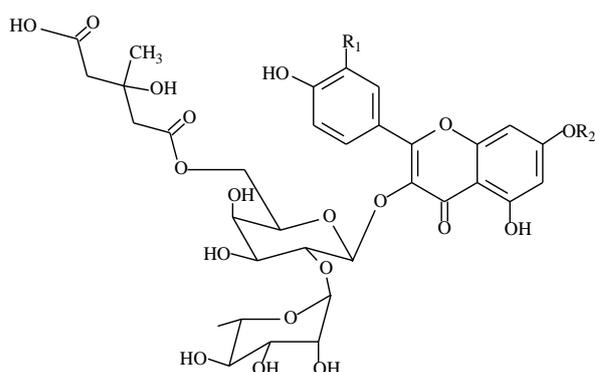
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>A. annularis</i>	Parties aériennes	Isorhamnétine 3- <i>O</i> -rutinoside (Narcissine) (1) Isorhamnétine 3- <i>O</i> -glucoside (2)	[82]
<i>A. cruciatus</i>	Plante entière	Kaempférol 3- <i>O</i> -rutinoside (Nicotiflorine) (3) Kaempférol 3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1→4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1→6)- β -D-glucopyranoside (4) 5, 7, 2'-trihydroxyflavone (5)	[83]
<i>A. corniculatus</i>	Parties aériennes	Quercétine (6) Quercétine 3- <i>O</i> -rutinoside (Rutine) (7) Quercétine 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (8) Kaempférol (9) Isorhamnétine (10) Quercétine 3- <i>O</i> -galactoside (11) Apigénine 8- <i>C</i> -glucoside (Vitexine) (12) Lutéoline 8- <i>C</i> -glucoside (Orientine) (13) Eriodyctiol 7- <i>O</i> -glucoside (14)	[84]

<i>A. asper</i>	Parties aériennes	Kaempférol 3-glucoside (Astragaline) (15)	[85]
<i>A. verrucosus</i>	Parties aériennes	Kaempférol 3- <i>O</i> -robinobioside (16) Quercétine 3- <i>O</i> -robinobioside (17) Apigénine (18)	[23]
<i>A. shikokianus</i>	Parties aériennes	Kaempférol 3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopyranosyl-7- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside (astrasikokioside I) (19) Kaempférol 3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl-7- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside (20) Kaempférol 3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranosyl-7- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside (robinine) (21)	[86]
<i>A. gombiformis</i>	Parties aériennes	7-méthylkaempférol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside (22) 7-méthylquercétine-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside (23) 7-méthylquercétine-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranoside (24) Kaempférol 3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[6- <i>O</i> -(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)- β -D-galactopyranoside] (25) 7-méthylkaempférol-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[6- <i>O</i> -(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)- β -D-galactopyranoside] (26) 7-méthylquercétine-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[6- <i>O</i> -(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)- β -D-galactopyranoside] (27)	[87]
<i>A. caprinus</i>	Feuilles et racines	Kaempférol 3- <i>O</i> -{[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)] [β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)]}- β -D-galactopyranosyl (28)	[61]

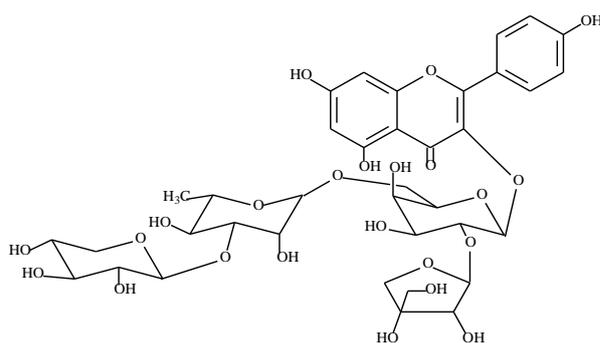


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
(1)	H	H	H	H	OCH ₃	OH	rha ¹⁻⁶ glc
(2)	H	H	H	H	OCH ₃	OH	glc
(3)	H	H	H	H	H	OH	rha ¹⁻⁶ glc
(4)	H	H	H	H	H	OH	rha ¹⁻⁴ rha ¹⁻⁶ glc
(5)	H	H	H	OH	H	H	H
(6)	H	H	H	H	OH	OH	OH

(7)	H	H	H	H	OH	OH	rha ¹⁻⁶ glc
(8)	H	H	H	H	OH	OH	glc
(9)	H	H	H	H	H	OH	H
(10)	H	H	H	H	OCH ₃	OH	H
(11)	H	H	H	H	OH	OH	gal
(12)	H	H	glc	H	H	OH	H
(13)	H	H	glc	H	OH	OH	H
(14)	H	glc	H	H	OH	OH	H
(15)	H	H	H	H	H	OH	glc
(16)	H	H	H	H	H	OH	rha ¹⁻⁶ gal
(17)	H	H	H	H	OH	OH	rha ¹⁻⁶ gal
(18)	H	H	H	H	H	OH	H
(19)	H	rha	H	H	H	OH	rha ¹⁻⁶ [rha ¹⁻²]gal
(20)	H	rha	H	H	H	OH	rha ¹⁻² gal
(21)	H	rha	H	H	H	OH	rha ¹⁻⁶ gal
(22)	H	CH ₃	H	H	H	OH	rha ¹⁻² gal
(23)	H	CH ₃	H	H	OH	OH	rha ¹⁻² gal
(24)	H	CH ₃	H	H	OH	OH	gal



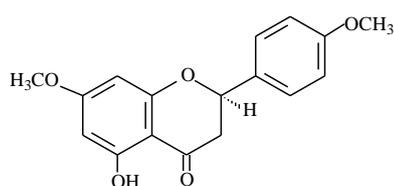
	R ₁	R ₂
(25)	H	H
(26)	H	CH ₃
(27)	OH	CH ₃



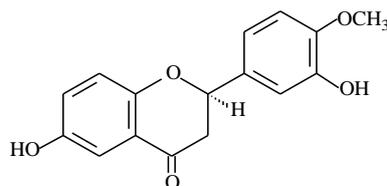
(28)

➤ **Flavanones**

Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>A. adsurgens</i>	Plante entière	2, 3-dihydro-5-hydroxy-4', 7-diméthoxyflavanone (29) 2, 3-dihydro-6, 3'-dihydroxy-4'-méthoxyflavanone (30)	[74]



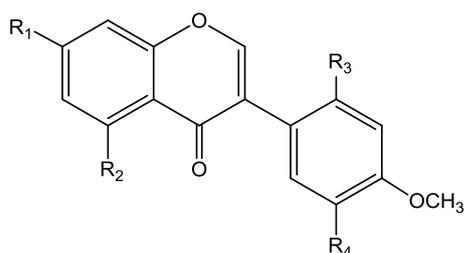
(29)



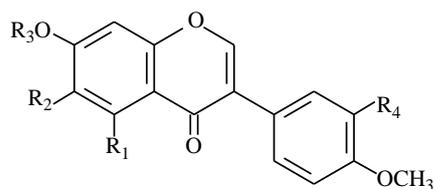
(30)

➤ Isoflavones

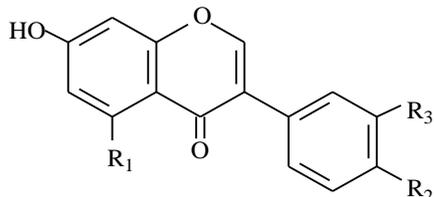
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>A. adsurgens</i>	Plante entière	5, 7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavone (31) 7, 4'-diméthoxyisoflavone (32) 5, 7, 2'-trihydroxy-4'-méthoxyisoflavone (33) 7, 3'-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavone (34)	[77]
<i>A. verrucosus</i>	Parties aériennes	calycosine (35), ononine (36), daidzéine (37), génistéine (38), pratenseine (39), pseudobaptigénine (40)	[23]



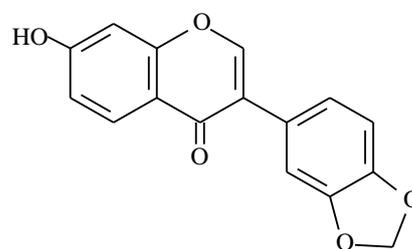
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(31)	OH	OH	H	H
(32)	OCH ₃	H	H	H
(33)	OH	OH	OH	H
(34)	OH	H	H	OH



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(35)	H	H	H	OH
(36)	H	H	glc	H



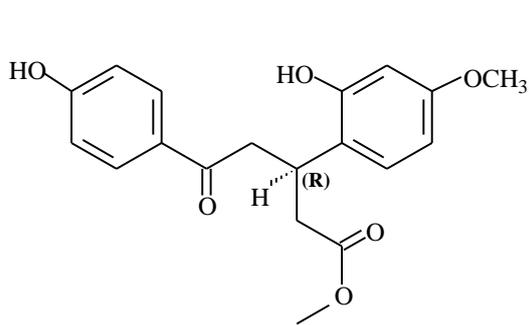
	R ₁	R ₂	R ₃
(37)	H	OH	H
(38)	OH	OH	H
(39)	OH	OCH ₃	OH



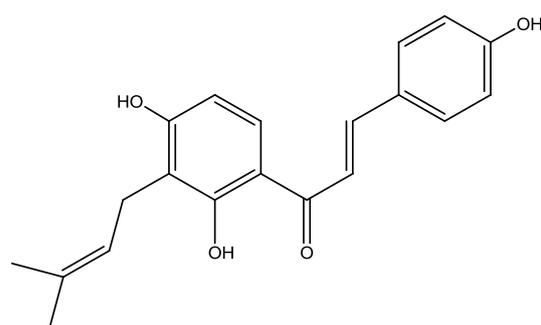
(40)

➤ **Chalcones**

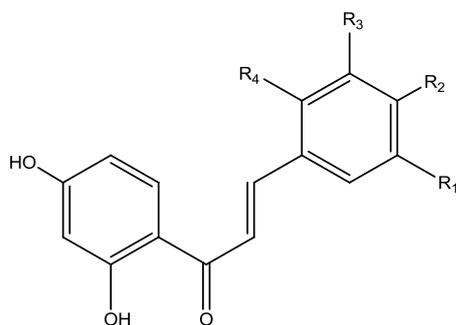
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>A. adsurgens</i>	Plante entière	Astradurnine (41), 4, 2', 4'-trihydroxy-3'-prenylchalcone (42) 2', 4'-dihydroxy-3,4-diméthoxychalcone (43) 4, 2', 4'-trihydroxychalcone (44) 2', 4'-dihydroxy-2, 3-diméthoxychalcone (45) 2', 4'-dihydroxy-4-méthoxychalcone (isoliquiritigénine 4-méthyl éther) (46), 2', 4'-dihydroxy-4-méthoxychalcone (47)	[77]



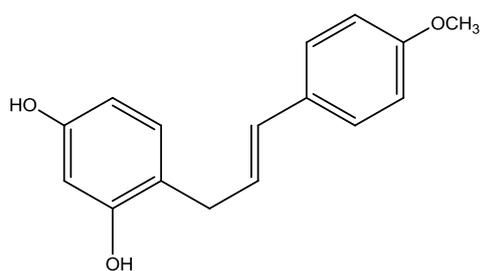
(41)



(42)



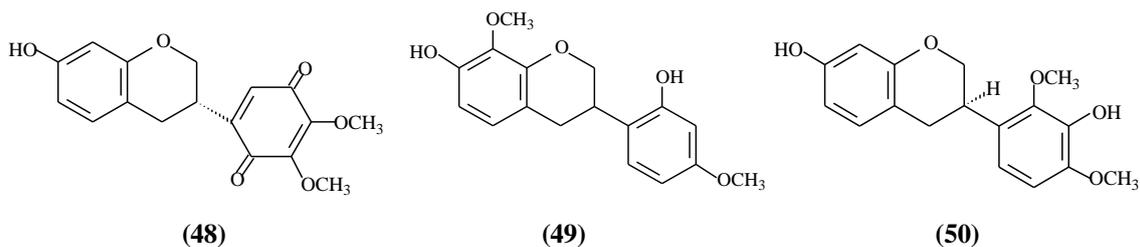
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(43)	OCH ₃	OCH ₃	H	H
(44)	H	OH	H	H
(45)	H	H	OCH ₃	OCH ₃
(46)	H	OCH ₃	H	H



(47)

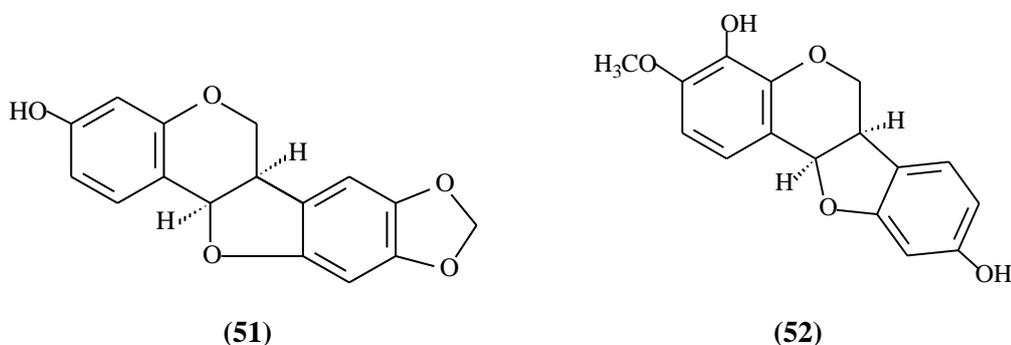
➤ **Flavanes**

Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>A. depressus</i>	Racines	Pendulone (48)	[88]
<i>A. trimestris</i>	Parties aériennes	8-méthoxyvestitol (49)	[82]
<i>A. adsurgens</i>	Plante entière	(3R)-7, 3'-dihydroxy-2', 4'-diméthoxyisoflavane [(R)-mucronulatol] (50)	[77]



➤ Ptérocarpanes

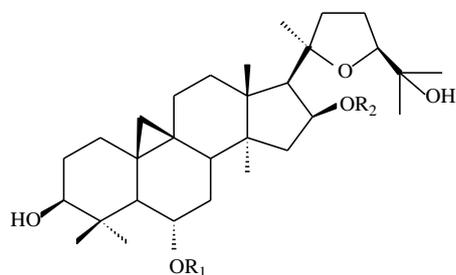
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>A. verrucosus</i>	Parties aériennes	Maackiaine (51)	[23]
<i>A. adsurgens</i>	Plante entière	Melilotocarpane B (52)	[77]



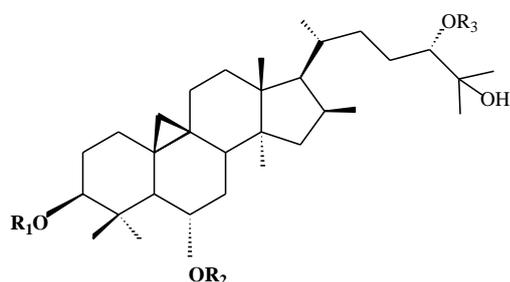
➤ Saponines à squelette cycloartane

Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>A. hareftae</i>	Plante entière	16- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β , 6 α , 16 β , 25-tetrahydroxy-20(<i>R</i>), 24(<i>S</i>)-époxy-cycloartane (53), cycloastragenol (54) brachyoside B (55), oleifolioside B (56) 3,6-di- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl-3 β , 6 α , 16 β , 24(<i>S</i>), 25-pentahydroxycycloartane (57), 3, 6, 24-tri- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl-3 β , 6 α , 16 β , 24(<i>S</i>), 25-pentahydroxycycloartane (58) cyclocanthoside E (59), macrophyllsaponine B (60) astragaloside IV (61), trojanoside B (62)	[89]
<i>A. trojanus</i>	Parties aériennes	Trojanoside B (63)	[90]
<i>A. hamosus</i>	Parties aériennes	Peregrinoside I (64)	[91]
<i>A. depressus</i>	Racines	Cyclogaleginoside A (65), astrasieversianin II (66) astrasieversianin IV (67), astrasieversianin VIII (68) astrasieversianin VI (69), astrasieversianin XIV (70)	[88]
<i>A. sieversianus</i>	Racines	Astrasieversianine X (71)	[92]
<i>A. campylosema</i>	Racines	3- <i>O</i> -[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-3 β , 6 α , 16 β ,	[93]

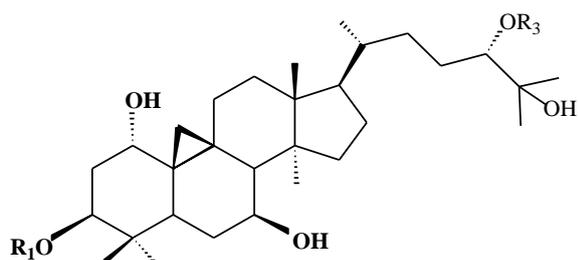
		23 α , 25-pentahydroxy-20(R), 24(S)-époxy-cycloartane (72) 3-O-[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-16-O-hydroxyacetoxy-23-O-acetoxy-3 β , 6 α , 25-trihydroxy-20(R), 24(S)-époxy-cycloartane (73) 3-O-[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-25-O- β -D-glucopyranosyl-3 β , 6 α , 16 β , 25-tetrahydroxy-20(R), 24(S)-époxy-cycloartane (74) 3-O-[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-3 β , 6 α , 23 α , 25-tetrahydroxy-20(R), 24(R)-16 β , 24; 20, 24-diépoxy-cycloartane (75) 3-O- β -D-xylopyranosyl-3 β , 6 α , 16 β , 25-tetrahydroxy-20(R), 25(S)-époxy-cycloartane (76)	
<i>A. caprinus</i>	Feuilles et racines	3-O-(β -D-xylopyranosyl)-24-O-(β -D-glucopyranosyl)-20, 25-époxy-cycloartane-3 β , 6 α , 16 β , 24 α -tétrol (77)	[61]
<i>A. verrucosus</i>	Parties aériennes	Astraverrucine VII (78), cycloaraloside D (peregrinoside II) (79) cycloaraloside C (astrailienine A) (80)	[94]
	Parties aériennes	astraverrucine I (cycloaraloside A) (81), astraverrucine IV (82)	[95]
<i>A. oleifolius</i>	Tiges	Oleifolioside A (83)	[70]
<i>A. kahiricus</i>	Parties aériennes	Kahiricoside II (84), kahiricoside III (85), kahiricoside IV (86)	[73]
<i>A. leucocephalus</i>	Plante entière	Astragalone (87), astragalene (88), sieversigenine (89)	[96]
<i>A. gombo</i>	Parties aériennes	Gomboside A (90), B (91), C (92), D (93), E (94), F (95)	[97]



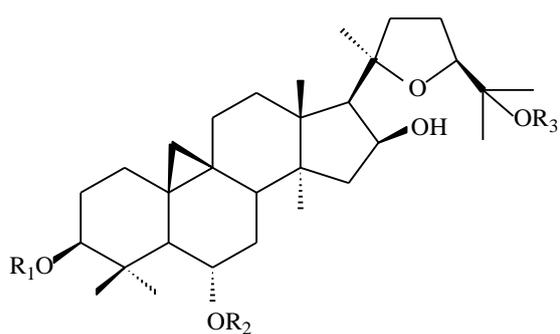
	R ₁	R ₂
(53)	H	glc
(54)	H	H
(55)	glc	H



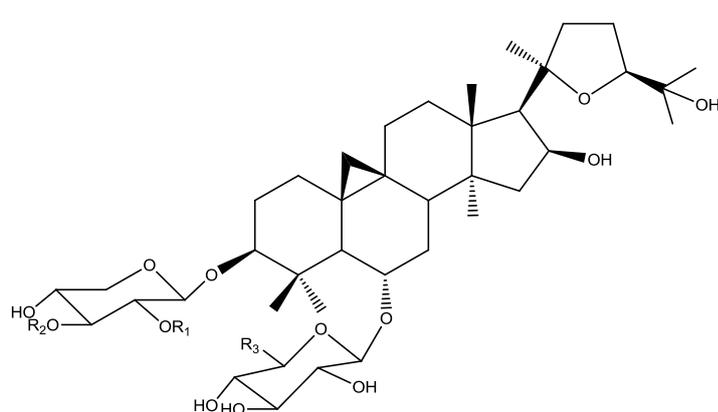
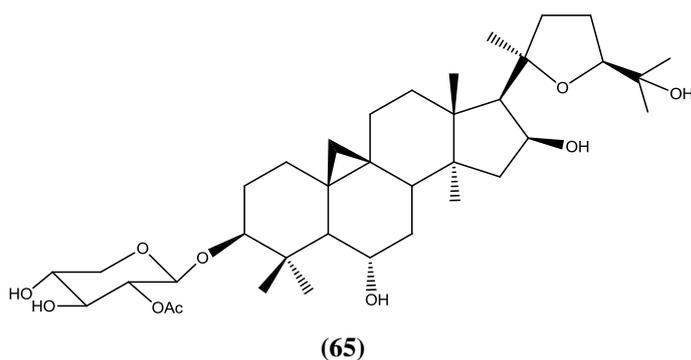
	R ₁	R ₂	R ₃
(56)	arab ¹⁻² xyl	glc	H
(57)	xyl	xyl	H
(58)	xyl	xyl	xyl
(59)	xyl	glc	H



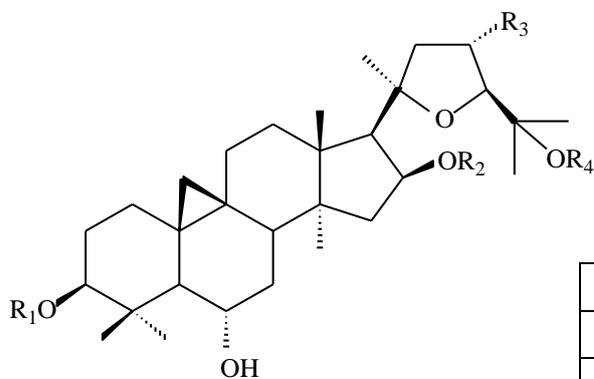
	R ₁	R ₂
(60)	rha	xyl



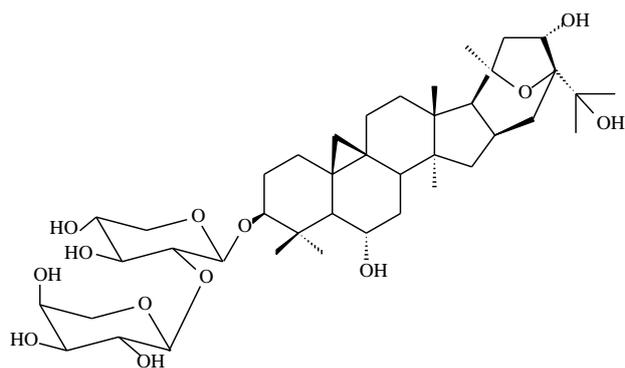
	R_1	R_2	R_3
(61)	xyl	glc	H
(62)	glc	glc	glc
(63)	rha ¹⁻⁴ glc	H	H
(64)	Ac ¹⁻² xyl	H	H



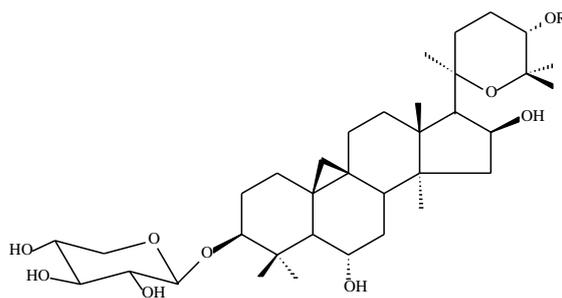
	R_1	R_2	R_3
(66)	Ac	Ac	H
(67)	Ac	Ac	CH ₂ OH
(68)	Ac	H	CH ₂ OH
(69)	Ac	H	H
(70)	H	H	CH ₂ OH
(71)	H	H	H



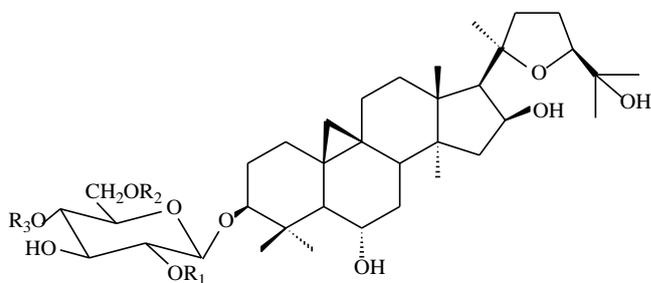
	R_1	R_2	R_3	R_4
(72)	arab ¹⁻² xyl	H	OH	H
(73)	arab ¹⁻² xyl	COCH ₂ OH	OCOCH ₃	H
(74)	arab ¹⁻² xyl	H	H	Glc



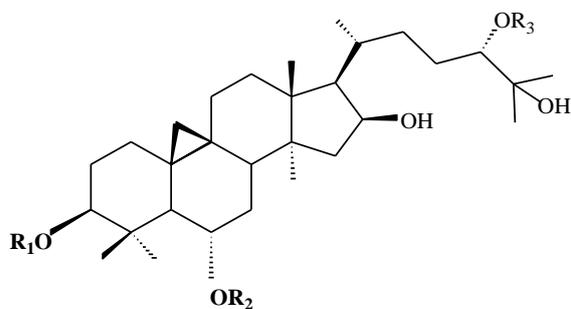
(75)



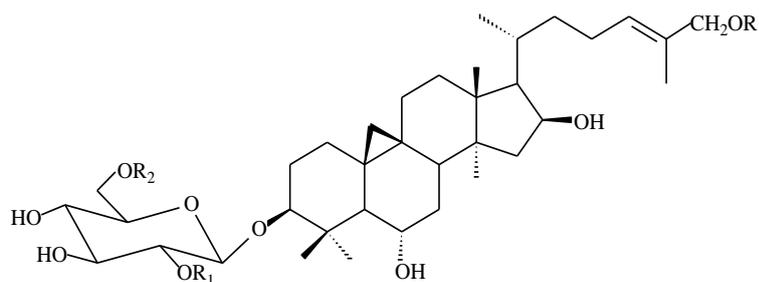
	R
(76)	H
(77)	glc



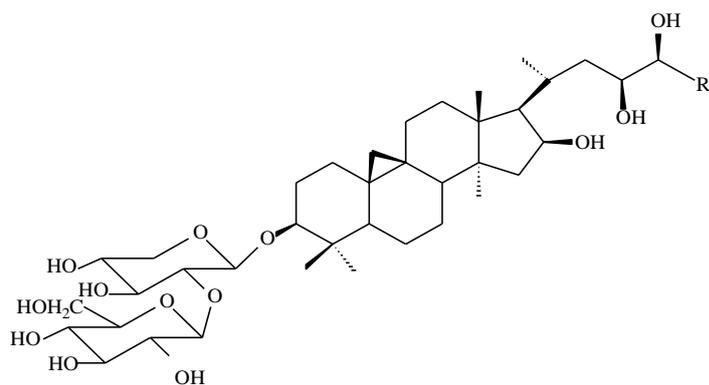
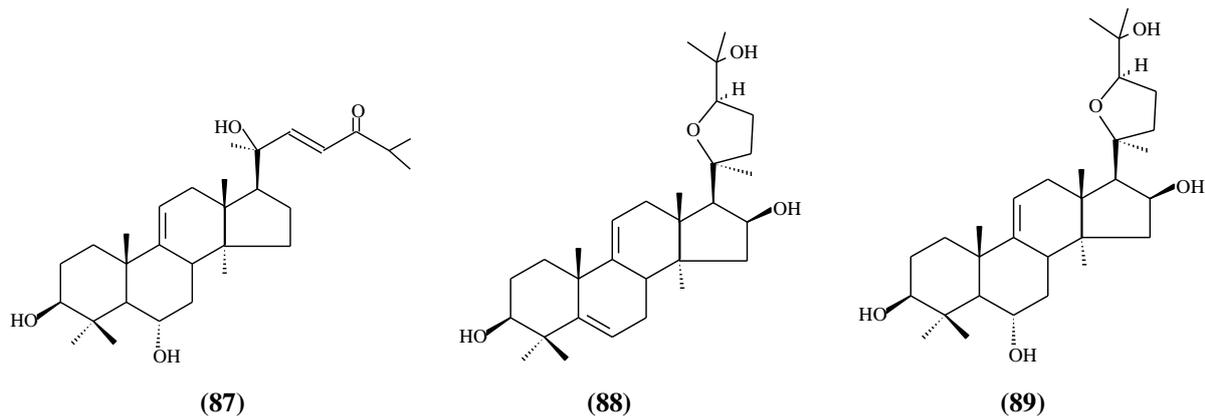
	R ₁	R ₂	R ₃
(78)	H	Ac	H
(79)	rha	H	H
(80)	apiose	H	H
(81)	H	H	H
(82)	H	H	rha



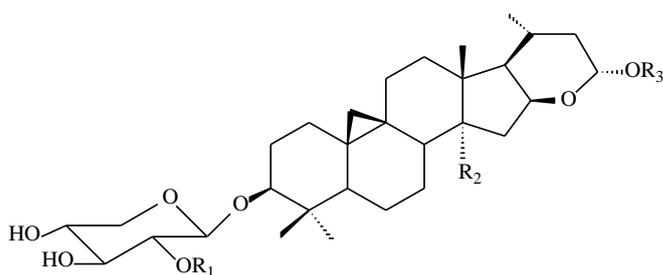
	R ₁	R ₂	R ₃
(83)	arab ¹⁻² xyl	xyl	H



	R	R ₁	R ₂
(84)	H	H	H
(85)	H	Ac	H
(86)	H	H	Ac



	R
(90)	(CH ₃) ₂ C(OH)
(91)	(CH ₃)C=CH ₂

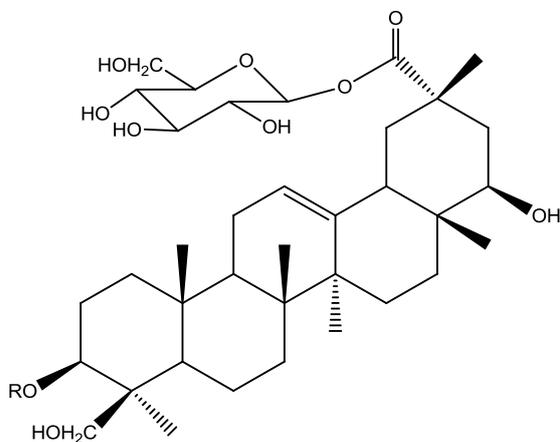
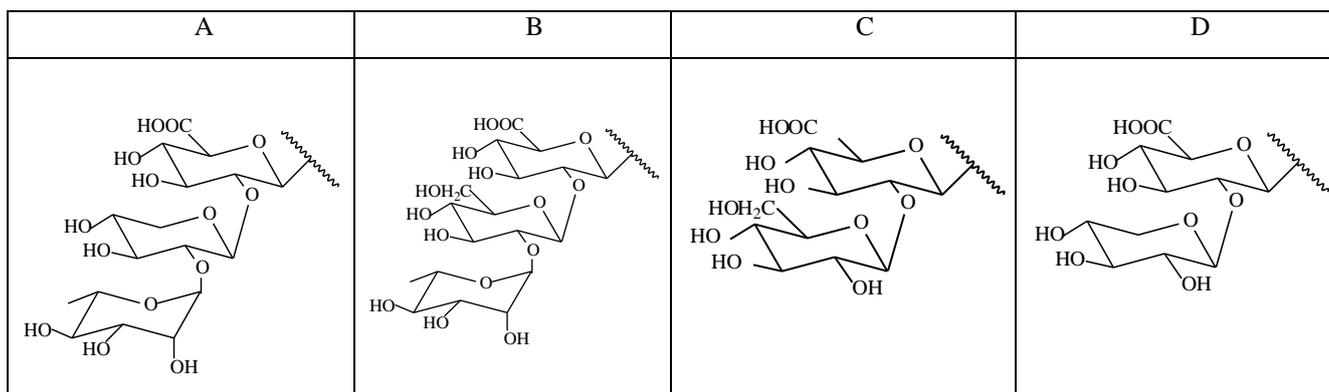


	R ₁	R ₂	R ₃
(92)	H	OAc	CH ₃
(93)	H	OAc	(CH ₂) ₃ CH ₃
(94)	glc	OAc	CH ₃
(95)	glc	H	CH ₃

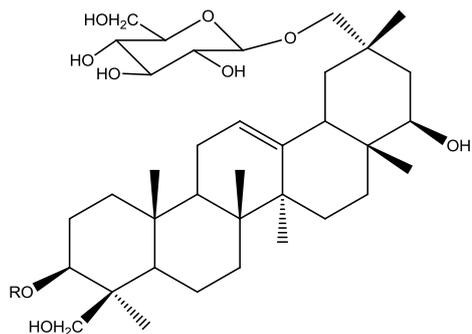
➤ Saponines à squelette oléane

Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>A. tauricolus</i>	Plante entière	acide 3- <i>O</i> -[α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- β -D-xylopyranosyl-(1→2)- β -D-glucuronopyranosyl]-29- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β , 22 β , 24-trihydroxyoléan-12-èn-29-oïque (96) acide 3- <i>O</i> -[β -D-glucopyranosyl-(1→2)- β -D-glucuronopyranosyl]-29- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β , 22 β , 24-trihydroxyoléan-12-èn-29-oïque (97) acide 3- <i>O</i> -[β -D-xylopyranosyl-(1→2)- β -D-glucuronopyranosyl]-29- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β , 22 β , 24-trihydroxyoléan-12-èn-29-oïque (98) 3- <i>O</i> -[α -L-rhamnopyranosyl-(1→2)- β -D-glucopyranosyl-(1→2)- β -D-glucuronopyranosyl]-29- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β , 22 β , 24, 29-tetrahydroxyoléan-12-ène (99)	[98]

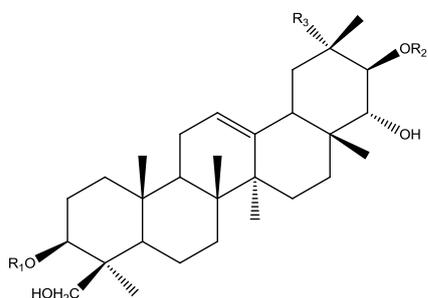
		<p>3-<i>O</i>-[α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-xylopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucuronopyranosyl]-21-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl-3β, 21β, 22α, 24-tetrahydroxyoléan-12-ène (100)</p> <p>3-<i>O</i>-[α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucuronopyranosyl]-21-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl-3β, 21β, 22α, 24-tetrahydroxyoléan-12-ène (101)</p> <p>3-<i>O</i>-[α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucuronopyranosyl]-3β, 21β, 22α, 24, 29-pentahydroxyoléan-12-ène (102)</p> <p>3-<i>O</i>-[α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-xylopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucuronopyranosyl]-22-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl-3β, 22β, 24-trihydroxyoléan-12-ène (103)</p> <p>acide 3-<i>O</i>-[α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucuronopyranosyl]-3β,24-dihydroxyoléan-12-ène-22-oxo-29-oïque(104)</p> <p>azukisaponine V (105), wistariasaponine B2 (106)</p> <p>wistariasaponine D (107), 3-<i>O</i>-β-D-glucuronopyranosyl-soyasapogenine B (108)</p> <p>azukisaponine II (109)</p>	
--	--	---	--



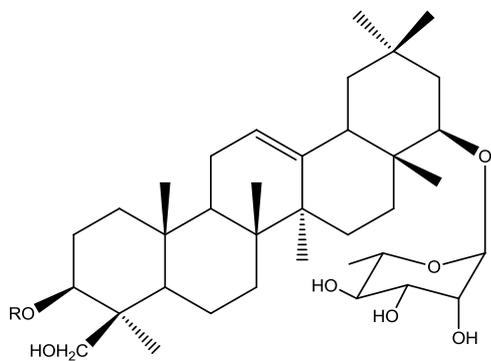
	R
(96)	A
(97)	C
(98)	D



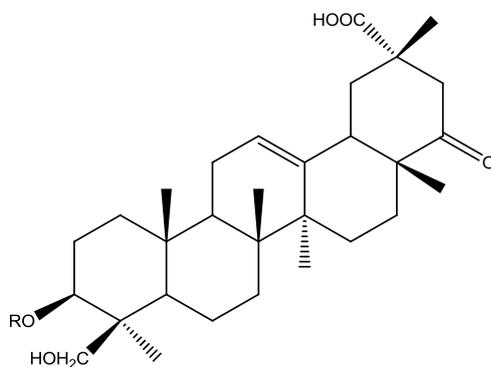
	R
(99)	B



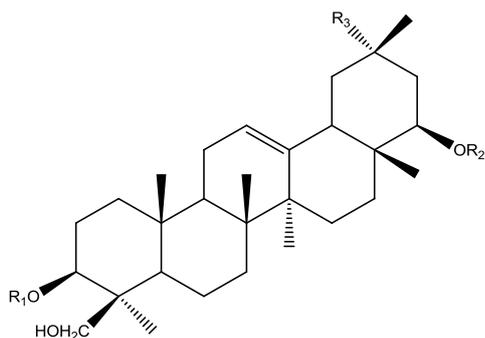
	R₁	R₂	R₃
(100)	A		CH₃
(101)	B		CH₃
(102)	B	H	CH₂OH



	R
(103)	A



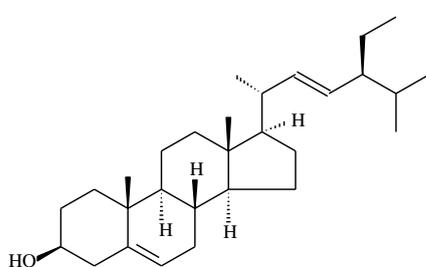
	R
(104)	A



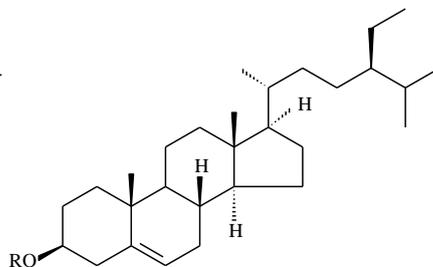
	R ₁	R ₂	R ₃
(105)	rha ¹⁻² glc ¹⁻² gluc	H	CH ₃
(106)	glc ¹⁻² gluc	H	CH ₃
(107)	rha ¹⁻² gal ¹⁻² gluc	H	CH ₃
(108)	xyl ¹⁻² glc ¹⁻² gluc	H	CH ₃
(109)	rha ¹⁻² xyl ¹⁻² gluc	H	CH ₃

➤ Stérols

Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>A. trimestris</i>	Parties aériennes	Stigmastérol (110)	[82]
<i>A. sieversianus</i>	Racines	β-sitostérol (111), daucostérol (112)	[99]



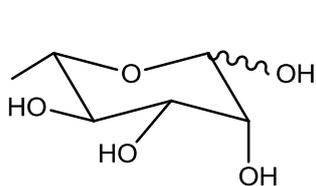
(110)



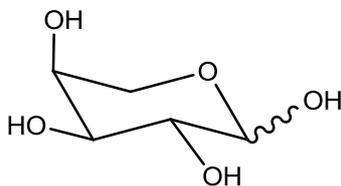
	R
111	H
112	glc

➤ Carbohydrates

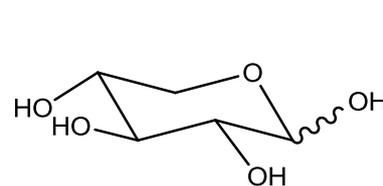
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>A. submitis</i>	Racines et folioles	Rhamnose (113), arabinose (114)	[100]
<i>A. paucillis</i>		Xylose (115)	
<i>A. sciureus</i>		Galactose (116), glucose (117)	



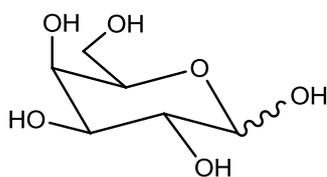
(113)



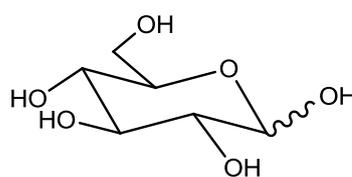
(114)



(115)



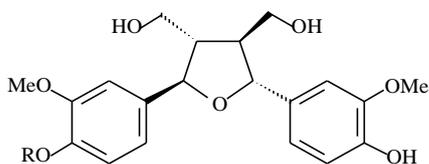
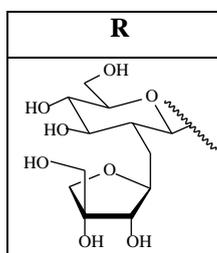
(116)



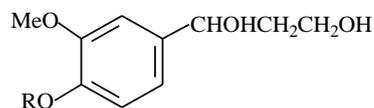
(117)

➤ Autres composés

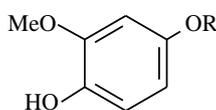
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>A. zahlbruckneri</i>	Racines	(+)-neo-olivil 4- <i>O</i> - β -apiofuranosyl-(1-2)- β -glucopyranoside (118) 7,8-dihydro-7-hydroxyconiferyl alcool 4- <i>O</i> - β -apiofuranosyl-(1-2)- β -glucopyranoside (119) 2-méthoxyphenol-4- <i>O</i> - β -apiofuranosyl-(1-2)- β -glucopyranoside (120) 3-hydroxy-5-méthoxyphenol-2- <i>O</i> - β -apiofuranosyl-(1-2)- β -glucopyranoside (121)	[101]
<i>A. membranace</i>	Racines	Emodine (122), gentisine (123)	[102]
<i>A. asper</i>	Parties aériennes	Acide chlorogénique (124), acide cafféique (125)	[85]



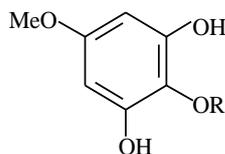
(118)



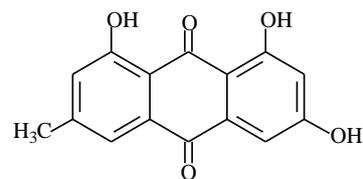
(119)



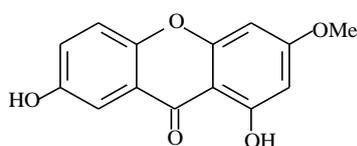
(120)



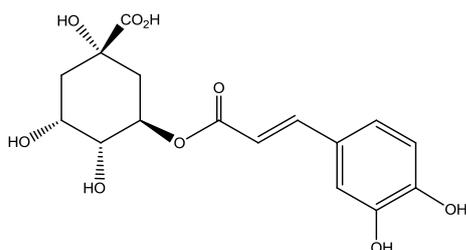
(121)



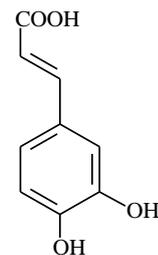
(122)



(123)



(124)



(125)

Partie II

II.1 Présentation du genre *Hedysarum*

II.1.1 Généralités

Les plantes du genre *Hedysarum*, appartenant à la sous famille Papilionaceae, sont très répandues dans le monde. Elles poussent sur des sols variés et dans des conditions climatiques différentes, présentant ainsi une grande diversité. Elles sont rencontrées à l'état naturel dans tout le bassin méditerranéen, particulièrement en Afrique du Nord [103]. En Algérie, le genre *Hedysarum* comporte une dizaine d'espèces dont certaines sont endémiques, comme *H. carnosum*, objet de notre étude [19,104].

II.1.2 Description botanique du genre *Hedysarum*

Ce genre comprend des plantes annuelles ou pérennes avec des feuilles imparipennées à deux stipules latérales. Il est caractérisé par [5,104] :

- des gousses aplaties divisées en articles, droites ou un peu arquées, sans échancrures et recouvertes d'aspérités en forme de petites épines.
- un calice en cloche, à 5 dents égales ou inégales.
- des pétales à onglet très court.
- une carène obliquement tronquée ou arquée vers l'extrémité.
- des étamines diadelphes (9-1), à tube fendu en dessus.

II.2 Usage traditionnel et propriétés biologiques des plantes du genre *Hedysarum*

II.2.1 Utilisation en médecine traditionnelle

Les plantes du genre *Hedysarum* ont été utilisées en médecine traditionnelle chinoise et cela depuis des siècles. Plusieurs espèces ont été employées pour leurs effets immunostimulants et pour améliorer l'énergie du corps. On citera *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz., *H. limprichtii* Hlbr., *H. vicioider* Turcz. var. *Taipeicum* Hand.-Mazz. Liu et *H. mithianum*. Les racines de l'espèce *H. polybotrys* appelées "Hongqi" ou "Radix Hedysari" et occupant une place importante dans la pharmacopée chinoise, sont très utilisées pour leurs activités diurétiques et pour favoriser la régénération des tissus [105].

II.2.2 Activités biologiques

Une recherche documentaire a montré que les espèces du genre *Hedysarum* n'ont pas été investiguée sur le plan biologique. La seule référence concerne l'espèce *H. polybotrys* très riche en polysaccharides. Cette dernière possède des effets antiâges, antioxydant, anti-tumoral,

analgésique, anti-inflammatoire, antiviral et antidiabétique [106-108]. Elle a aussi des effets contre l'hypoxie cérébrale et cardiaque [109]. Elle disposerait d'un grand potentiel d'utilisation dans l'alimentation moderne saine et la cosmétique végétale [106,107].

II.3 Autres intérêts du genre *Hedysarum*

Les espèces du genre *Hedysarum* font partie des légumineuses fourragères présentant de nombreux avantages qui justifient leur utilisation dans l'amélioration des parcours et des productions de fourrages. Elles sont particulièrement indiquées en Algérie où le déficit fourrager est important, les risques d'érosion des sols considérables, et où la pauvreté de ces derniers en matière organique est grande [19]. Dans ce contexte, elles sont appelées à jouer un rôle fondamental dans la production fourragère et pastorale ainsi que dans d'autres domaines comme l'apiculture [110,111], la protection des sols contre l'érosion grâce à leur capacité à améliorer la fertilité des sols par fixation de l'azote atmosphérique [103]. Elles peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les zones arides et semi-arides, ainsi que dans la mise en valeur des terres [110,111].

II.4 Etudes phytochimiques antérieures sur le genre *Hedysarum*

Les études phytochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces du genre *Hedysarum* certifient leur richesse en métabolites secondaires de grande diversité structurale. Au cours de ces dernières décennies, des métabolites secondaires ont été isolés de ce genre par différentes méthodes chromatographiques [107,112]. Les structures chimiques de ces composés comprennent des flavonoïdes, triterpènes et saponines, coumarines, lignanes, composés azotés, stérols, carbohydrates, acides gras, benzofuranes et autres polysaccharides [113].

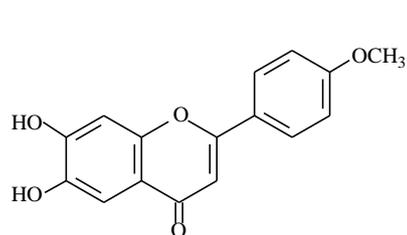
Les flavonoïdes restent toutefois le groupe le plus important des métabolites secondaires du genre *Hedysarum* [114]. Différents types (flavones, flavanones, isoflavones, chalcones, flavanols, xanthones et ptérocarpanes) ont été identifiés. Les flavones sont les plus prédominants dans le genre.

Tableau I.2: Composés isolés du genre *Hedysarum*

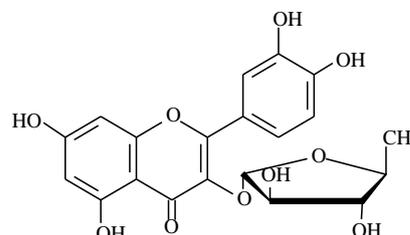
➤ Flavones

Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. multijugum</i>	Racines	Isorhamnétine 3-O-rutinoside (Narcissine) (1) Apigénine (18)	[115]

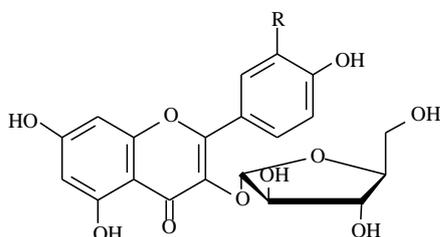
<i>H. scoparium</i>	Racines	5, 7-dihydroxy-4'-méthoxyflavone (126)	[116]
<i>H. gmelinii</i>	/	Quercétine 3- α -L-rhamnofuranoside (127) quercétine 3- α -L-arabinofuranoside (Avicularine) (128)	[117]
<i>H. setigerum</i>	Parties aériennes	Quercétine (6) quercétine 3-O-rutinoside (Rutine) (7) kaempférol-3-O- α -L-arabinofuranoside (129) 3-O-méthylkaempférol (130), quercitrine (131) neobudofficide (132) Isorhamnétine (10), rhoifoline (133), linarine (134), diosmine (135)	[118] [119]
<i>H. sericeum</i> <i>H. caucasicum</i>	Graines /	Kaempférol (9) Isoquercitrine (136), hyperoside (137)	[120]



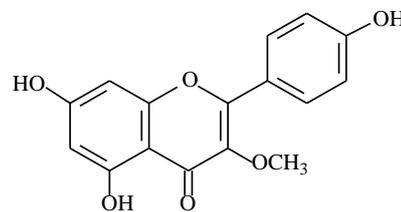
(126)



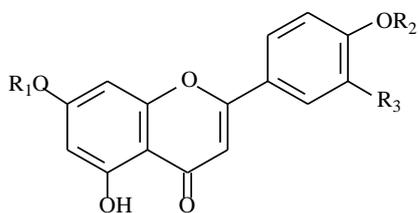
(127)



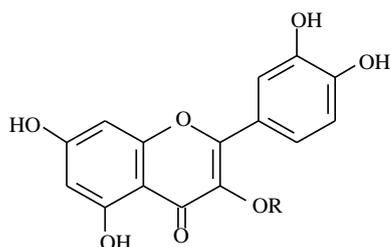
	R
(128)	OH
(129)	H



(130)



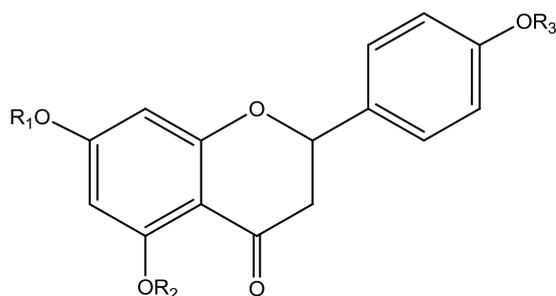
	R ₁	R ₂	R ₃
(132)	rha ¹⁻⁶ [rha ¹⁻²]glc	CH ₃	H
(133)	rha ¹⁻² glc	H	H
(134)	rha ¹⁻⁶ glc	CH ₃	H
(135)	rha ¹⁻⁶ glc	CH ₃	OH



	R
(131)	rha
(136)	glc
(137)	gal

➤ Flavanones

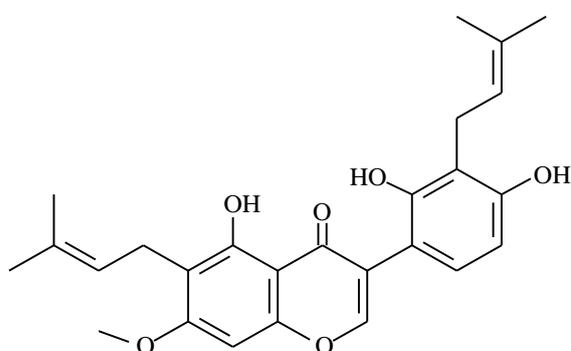
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. multijugum</i>	Racines	Naringénine-5, 7-di- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (138)	[115]
Radix Hedysari	Racines	Naringine (139) Naringénine (140)	[121,122] [123]



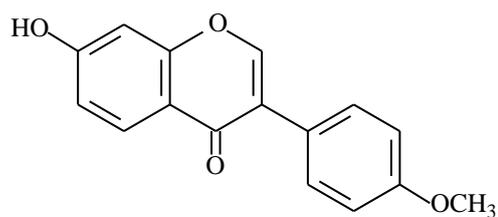
	R ₁	R ₂	R ₃
(138)	glc	glc	H
(139)	rha ¹⁻² glc	H	H
(140)	H	H	H

➤ Isoflavones

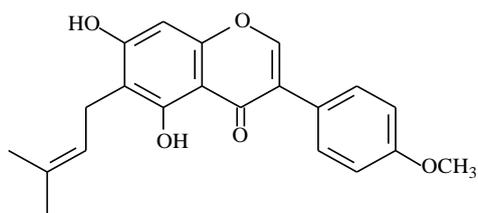
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. multijugum</i>	Racines	Kanzonol K (141)	[124]
	Racines	5, 7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavone (31), formononetine (142)	[125]
	Racines	Ononine (36)	[123,126]
	Racines	5, 7-dihydroxy-6- <i>C</i> -prenyl-4'-méthoxy-isoflavone (gancaonine A) (143)	[124,127]
	Racines	Sissotrine (144)	[115,124]
<i>H. semenovii</i>	/	Calycosine (35), calycosine-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (145), afromosine (146), afromosine-7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (147)	[128]
<i>H. theinum</i>	Racines	6''- <i>O</i> -acétylononine (148), 8-hydroxydaidzéine (149)	[112]
<i>H. scoparium</i>	Racines	Osajine 4'-méthyl éther (150), warangalone 4'-méthyle éther (151) 5-hydroxy-4'-méthoxy-6-prenyl-2''-hydroxyisopropylfurano [4, 5 : 8, 7]-isoflavone (152)	[116]



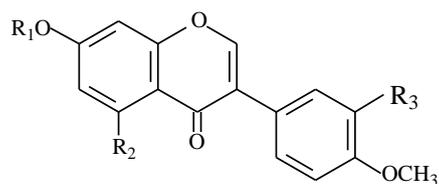
(141)



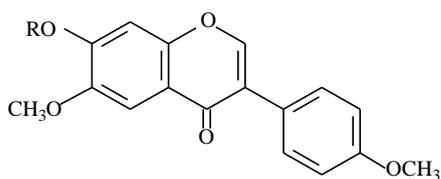
(142)



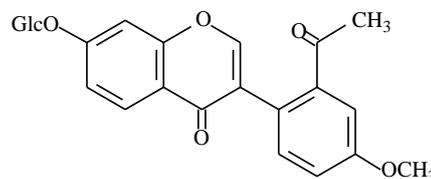
(143)



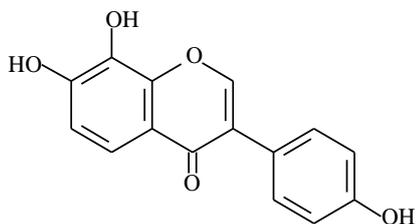
	R ₁	R ₂	R ₃
(144)	H	OH	H
(145)	glc	H	OH



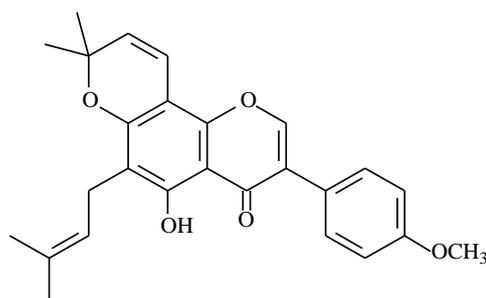
	R
(146)	H
(147)	glc



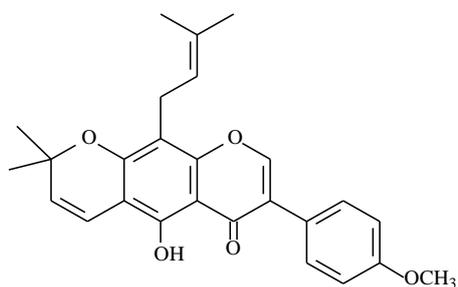
(148)



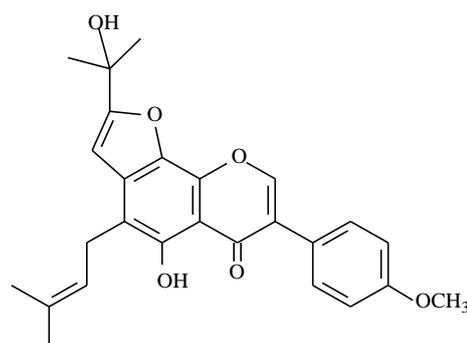
(149)



(150)



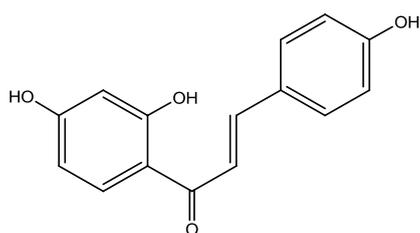
(151)



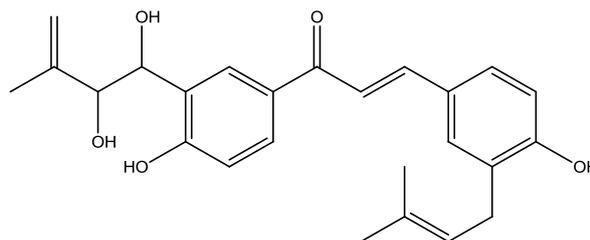
(152)

➤ Chalcones

Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. polybotrys</i>	Racines	Isoliquiritigénine (153)	[126,129]
<i>H. gmelinii</i>	Racines	Paratocarpine E (154)	[130]



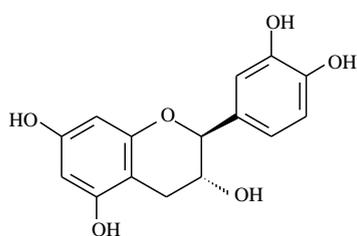
(153)



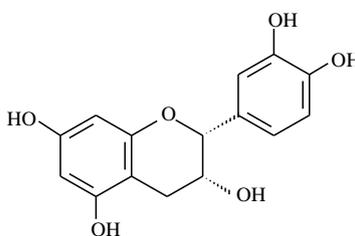
(154)

➤ **Flavanols**

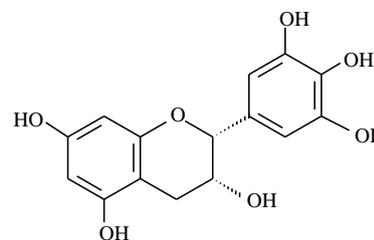
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. theinum</i>	Racines	(-)-catéchine (155), (-)-épicatéchine (156)	[112]
<i>H. kirghisorum</i>	Racines	(-)-épigallocatechine (157)	[131,132]



(155)



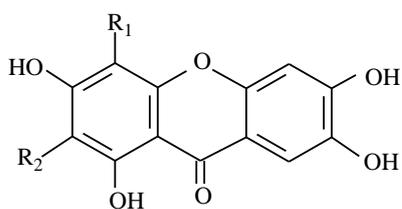
(156)



(157)

➤ **Xanthones**

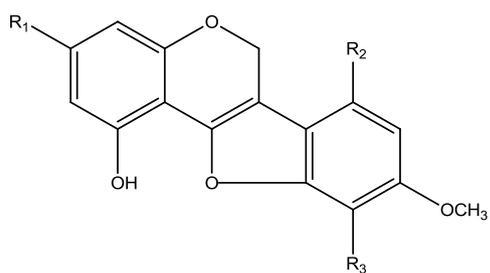
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. alpinum</i>	/	Mangiférine (158), isomangiférine (159)	[133]



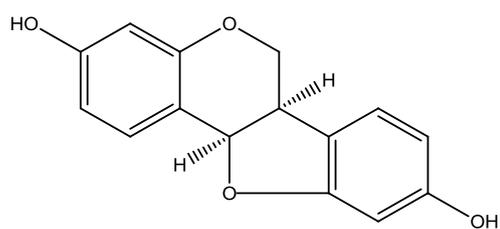
	R ₁	R ₂
(158)	H	glc
(159)	glc	H

➤ **Ptérocarpanes**

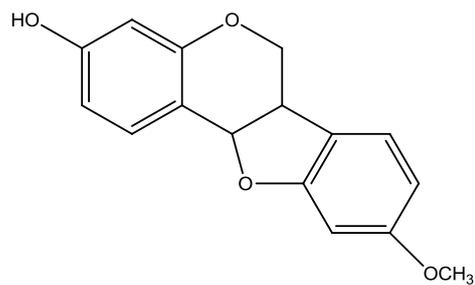
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. multijugum</i>	Racines	Hedysarime pterocarpène A (160)	[124]
	Racines	Hedysarime pterocarpène B (161)	[124,134]
<i>H. polybotrys</i>	Racines	(-)-médicarpine (162)	[113,123]
	Racines	(-)-3-hydroxy-9-méthoxy pterocarpène (163)	[135,129]



	R ₁	R ₂	R ₃
(160)	OCH ₃	OH	H
(161)	OH	H	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂



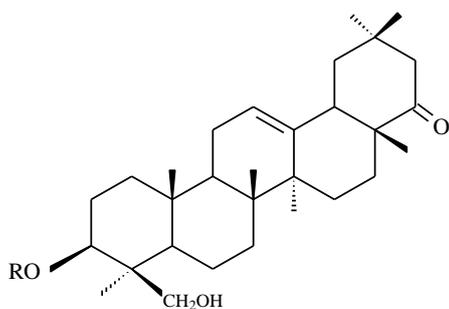
(162)



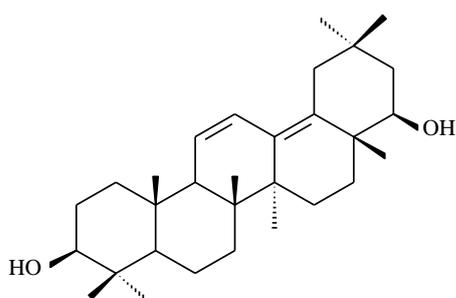
(163)

➤ Triterpénoïdes

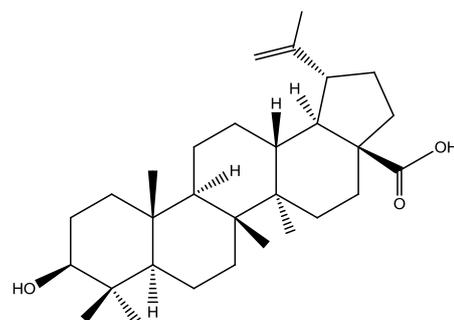
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. polybotrys</i>	Racines	Déhydrosoyasaponine I (164)	[107,136]
<i>H. gmelinii</i>	Racines	Soyasapogénol (165), squasapogénol (166)	[137]
<i>H. multijugum</i>	/	Acide bétulinique (167)	[125]



	R
(164)	rha ¹⁻² gal ¹⁻² gluc
(165)	H



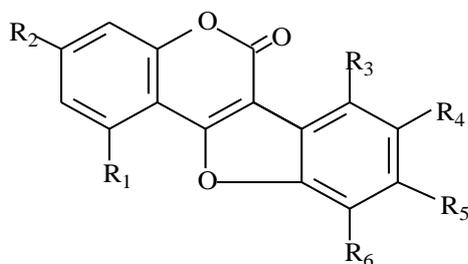
(166)



(167)

➤ Coumarines

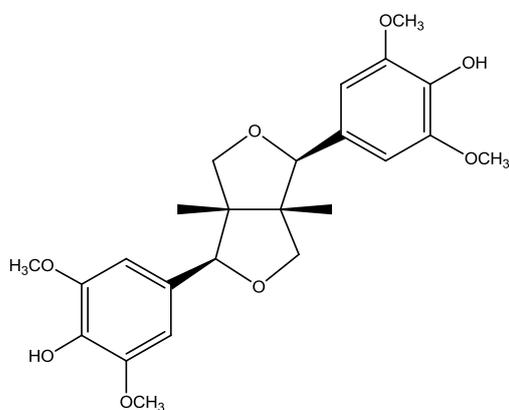
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. multijugum</i>	Racines	Aureol (168), hedysarimcoumestane A (169), Hedysarimcoumestane B (170), hedysarimcoumestane D (171)	[124,138]
	Racines	Hedysarimcoumestane C (172), 1, 3, 9-triméthoxycoumestane (173)	[138]



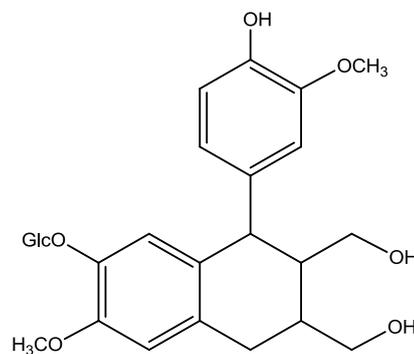
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
(168)	OH	OH	H	H	OH	H
(169)	OH	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H
(170)	OH	OH	H	H	OCH ₃	H
(171)	OH	OH	H	H	OCH ₃	CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂
(172)	Oglc	OH	H	H	OH	H
(173)	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H

➤ Lignanes

Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. polybotrys</i>	Racines	(+) syringarésinol (174)	[129]
<i>H. setigerum</i>	Parties aériennes	(+)-isolaricirésinyl-9'-O-β-D-glucopyranoside (175)	[139]



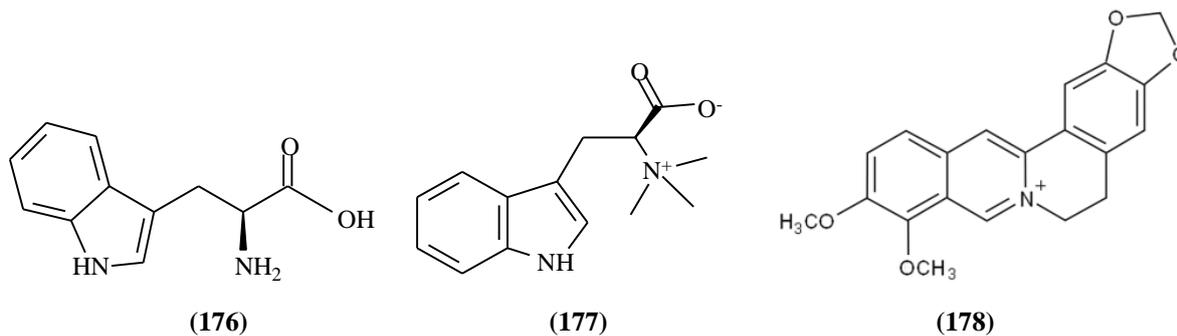
(174)



(175)

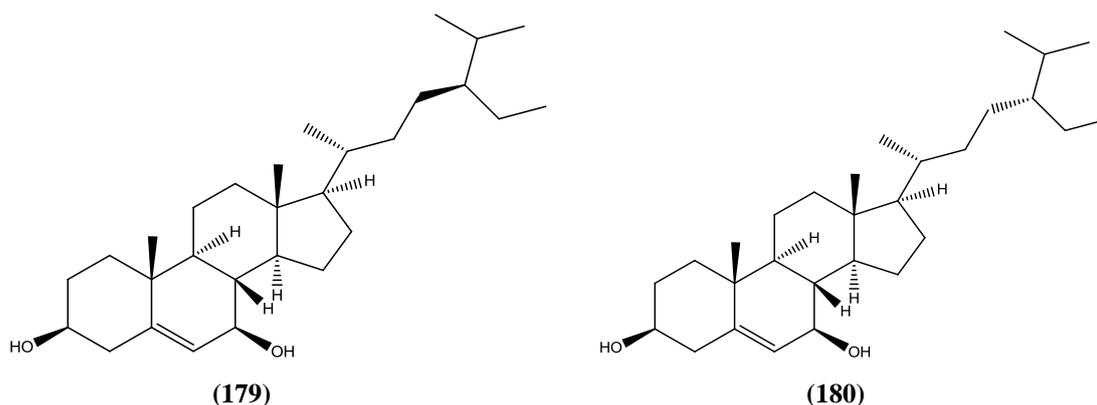
➤ Alcaloïdes

Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. polybctrys</i>	Racines	Tryptophane (176), hypaphorine (177)	[121]
<i>H. setigerum</i>	Parties aériennes	Berbérine (178)	[139]



➤ Stérols

Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. multijugum</i>	Racines	Stigmastérol (110)	[127]
<i>H. polybotrys</i>	Racines	β -sitostérol (111), daucostérol (112)	[129,135]
<i>H. scoparium</i>	Racines	7β -hydroxysitostérol (179), 7α -hydroxysitostérol (180)	[116]

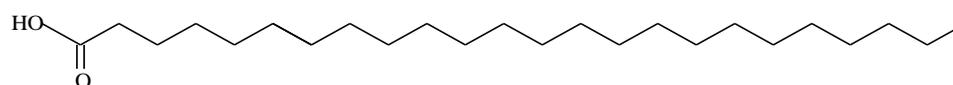


➤ Carbohydrates

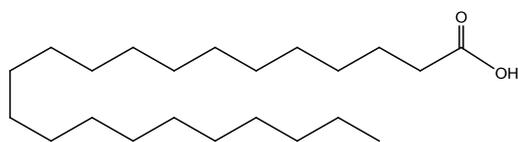
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. polybotrys</i>	Racines	Rhamnose (113), arabinose (114), xylose (115), Galactose (116), glucose (117)	[140,141]

➤ Composés gras

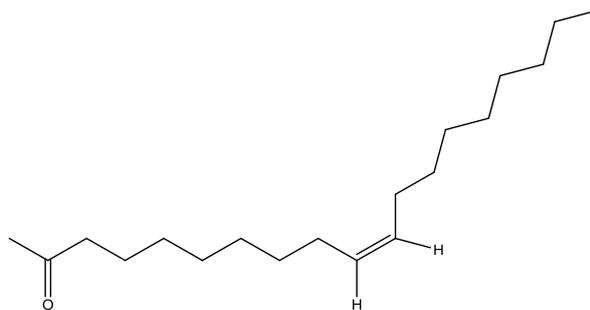
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. theinum</i>	Racines	Acide η -tétracosanoïque (181), acide béhénique (182), acide oléique (183)	[142]



(181)



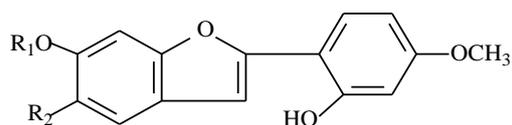
(182)



(183)

➤ Benzofuranes

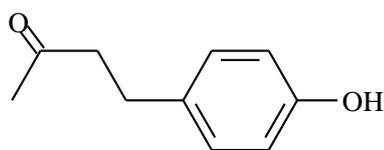
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. polybotrys</i>	Racines	5-hydroxy-2-(2-hydroxy-4-méthoxyphenyl)-6-méthoxybenzofurane (184) 6-hydroxy-2-(2-hydroxy-4-méthoxyphenyl)-benzofurane (185)	[143]



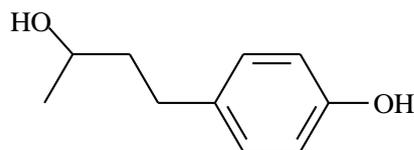
	R ₁	R ₂
(184)	CH ₃	OH
(185)	H	H

➤ Autres composés

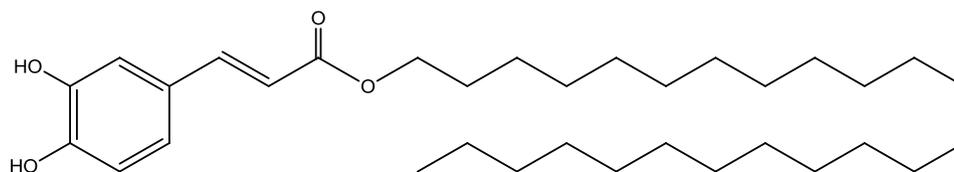
Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
<i>H. theinum</i>	Racines	Raspberry kétone (186), rhododendrol (187)	[112, 142]
<i>H. multijugum</i>	Racines	Acide caféïque tetracosyl ester (188)	[127]



(186)



(187)



(188)

Chapitre II- Généralités sur
les composés phénoliques et
les dérivés terpéniques

II.1 Composés phénoliques

II.1.1 Définition

Les composés phénoliques ou polyphénols correspondent à un vaste ensemble de molécules qui ont toutes en commun un noyau benzénique portant un ou plusieurs hydroxyles libres ou engagés dans une autre fonction. Ce sont des molécules issues du métabolisme secondaire, ubiquitaires du règne végétal et notamment des angiospermes [144]. Ils interviennent dans différents aspects de la vie de la plante et sont ainsi impliqués dans sa physiologie (lignification, interactions symbiotiques...), dans ses mécanismes de défense (interactions biotiques et abiotiques) ou encore dans la coloration des fleurs. Par ailleurs, ils sont bénéfiques pour l'homme vis-à-vis de certaines maladies par leur action sur le métabolisme humain et par leur propriété antioxydante [144].

II.1.2 Classification

D'un point de vue biosynthétique, les composés phénoliques peuvent être engendrés par deux voies métaboliques : la voie du shikimate, la plus courante, conduisant entre autre à la formation des acides phénoliques, lignanes et flavonoïdes; et la voie des polyacétates qui est à l'origine de composés polycycliques tels que les coumarines, les xanthones et les quinones [145].

Toutes les classes de composés phénoliques comportent un grand nombre de structures différentes en fonction du nombre et de la position des groupements hydroxyles sur le squelette de base. Ces structures peuvent également être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées...) [146].

II.1.2.1 Acides phénoliques

Les acides phénoliques font partie des formes les plus simples des composés phénoliques et se séparent en deux grands groupes distincts que sont les acides hydroxybenzoïques (C₆-C₁) et les acides hydroxycinnamiques (C₆-C₃) [147]. Les rôles des acidophénols dans la plante sont divers. Ils interviennent comme substrats en amont des voies de biosynthèse des flavonoïdes et des lignines et sont impliqués dans les processus physiologiques tels que la germination, la floraison ou la croissance [148], ainsi que dans la régulation de la voie de biosynthèse des composés phénoliques [149,150]. On leur attribue une fonction antioxydante permettant de réguler la sénescence cellulaire en neutralisant les radicaux libres de l'organisme [151].

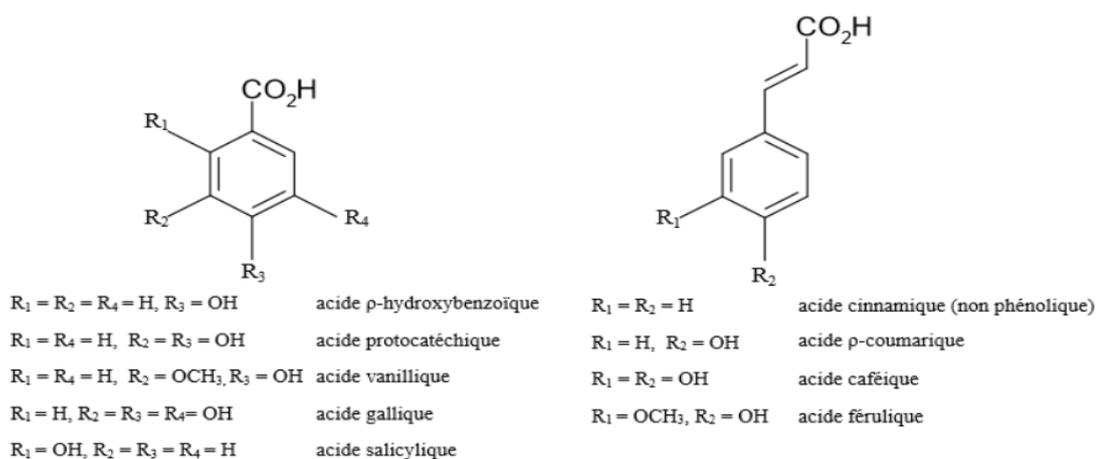


Figure II.1: Structure des acides hydrobenzoïques et hydrocinnamiques libres [152]

II.1.2.2 Lignanes

Les plantes élaborent les lignanes par dimérisation oxydante de deux unités d'alcool coniférique. Quand cette dimérisation implique une liaison oxydante au niveau des carbones β des chaînes latérales propényles de deux unités d'alcool coniférique liées, formant la liaison C_8-C_8 , les métabolites résultants portent le nom de lignane (Figure II.2) [153]. Le terme néolignane est employé pour définir tous les autres types de liaison, lorsqu'il n'y a pas de liaison C-C directe entre les unités C_6-C_3 (couplages 8-1', 8-5', 8-7', 7-1', 1-5',...). Quand la liaison entre les deux unités implique une liaison éther (x-O-y), le composé est appelé oxynéolignane [153,154].

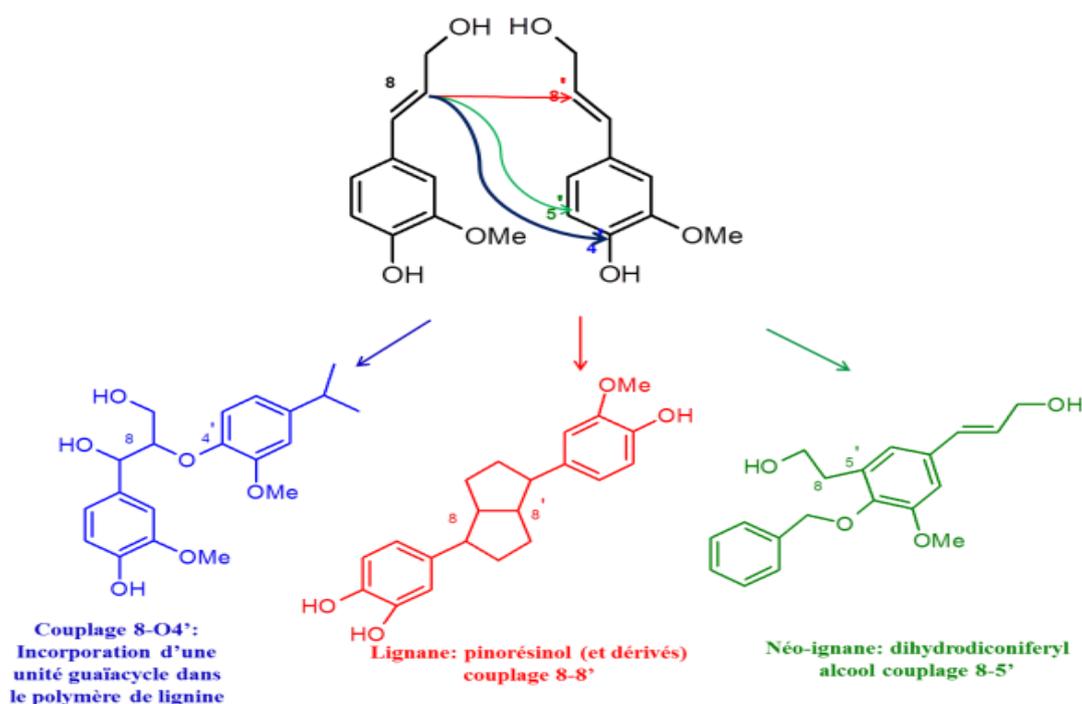
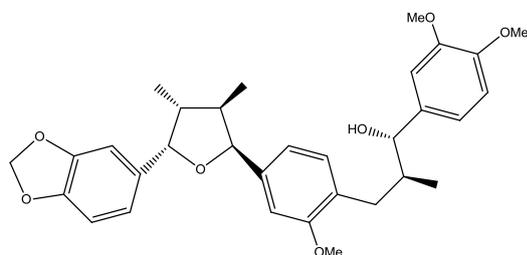
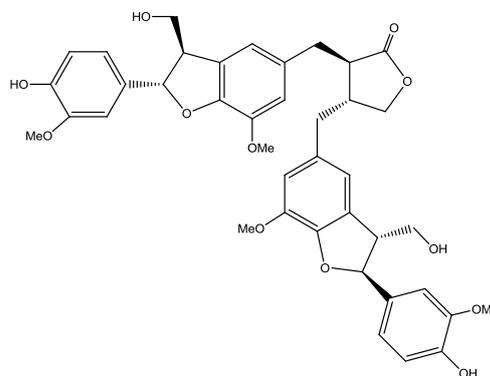


Figure II.2 : Principaux dérivés issus de couplages oxydatifs de l'alcool coniférique

Il existe d'autres types de lignanes tels que les sesquinéolignanes ayant trois unités C₆-C₃ (sauceméol D) et les dinéolignanes contenant quatre unités C₆-C₃ (lappaol F) [153,154].

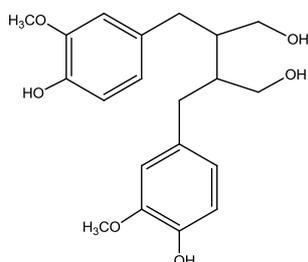


Sauceméol D

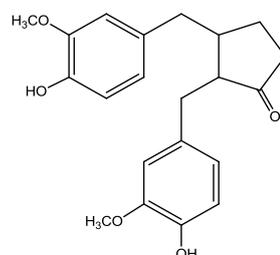


Lappaol F

Les lignanes interviennent dans les mécanismes de défense de la plante [155]. Ce sont des composés phénoliques bioactifs, non-nutritifs et non caloriques. On les trouve en plus forte concentration dans le lin et les graines de sésame, et en faible concentration dans les fruits et les légumes [156]. Le sécoisolaricirésinol et le matairésinol constituent les principaux lignanes d'origine végétale [157]. Ces deux molécules peuvent être converties par la flore intestinale en entérolignanes, qui eux possèdent une activité œstrogénique [158].



Sécoisolaricirésinol



Matairésinol

II.1.2.3 Flavonoïdes

II.1.2.3.1 Définition

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires fréquemment décrits au sein de la famille Fabaceae. Ce sont des métabolites secondaires de plantes dont on aurait à l'heure actuelle caractérisé près de 6500 représentants différents, et leur nombre ne cesse d'accroître. Contrairement aux flavonoïdes présents dans les fleurs, dont ils confèrent leur couleur, les flavonoïdes présents dans les feuilles, sont masqués par la présence de chlorophylle [155].

La structure d'un flavonoïde s'organise toujours autour d'un squelette 1,3-diphénylpropane C₆-C₃-C₆ (Figure II.3), décrit par une nomenclature spécifique. Les deux cycles benzéniques sont nommés A et B. Le chaînon propyle C₃ peut être complété par une fonction éther formant ainsi un cycle central, appelé cycle C [159-161].

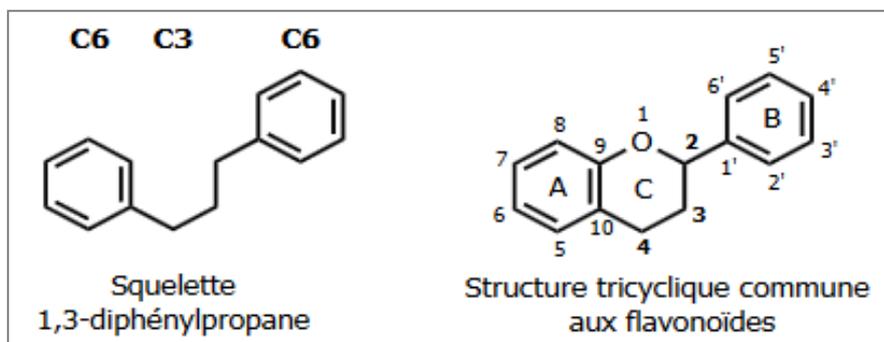


Figure II.3: Structures des flavonoïdes à enchaînement C₆-C₃-C₆

Ces composés sont largement répandus dans les fruits, les légumes, les jus de fruits, le cacao et le thé [162,163]. Dans la plante, les flavonoïdes sont très souvent présents sous forme glycosidique. On parle alors d'hétérosides constitués d'une partie phénolique aglycone ou génine associée à une ou plusieurs unités osidiques. La liaison glycosidique pouvant être de type C-O-C ou de type C-C. D'autres types de liaisons se retrouvent fréquemment chez les flavonoïdes comme les sulfatations ou prénylations [144,145]. La nature des sucres liés à la génine ainsi que leur position sur le cycle sont variables. Il apparaît que la quercétine glycosylée est l'hétéroside le plus rencontré chez les végétaux [164].

II.1.2.3.2 Classification

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, du degré d'hydroxylation et de méthylation, du degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle C, c'est-à-dire la présence de double liaison C₂-C₃, du groupe 3-O et la fonction 4-oxo [165,166]. En se basant sur leur squelette, les principales classes de flavonoïdes sont les flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, auronnes, isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, ptérocarpanes, coumaronochromones, 3-arylcoumarines, coumestanes, roténoïdes etc. [167].

Deux types de structures se distinguent: celui des flavonoïdes au sens strict dont le noyau aromatique B se trouve sur le carbone C₂ et celui des isoflavonoïdes, isomères des flavonoïdes, portant le noyau aromatique B sur le carbone C₃ [168,169].

II.1.2.3.2.1 Flavonoïdes au sens strict

Ce groupe comprend les flavones, flavanols, flavanes, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, aurones et chalcones (Figure II.4) [169].

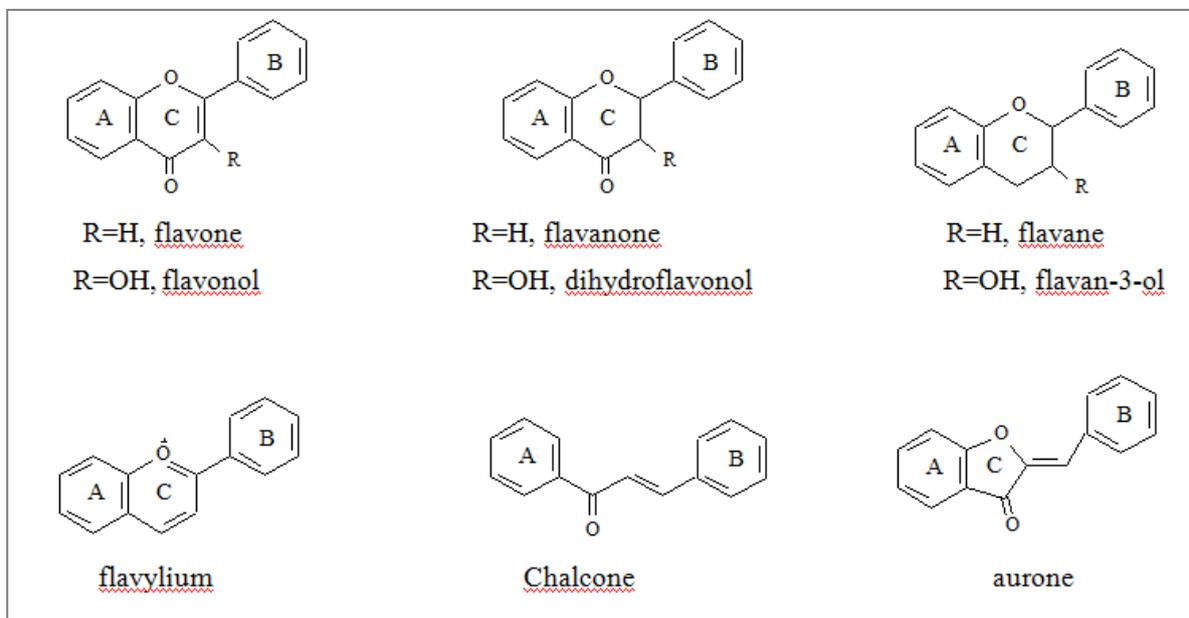
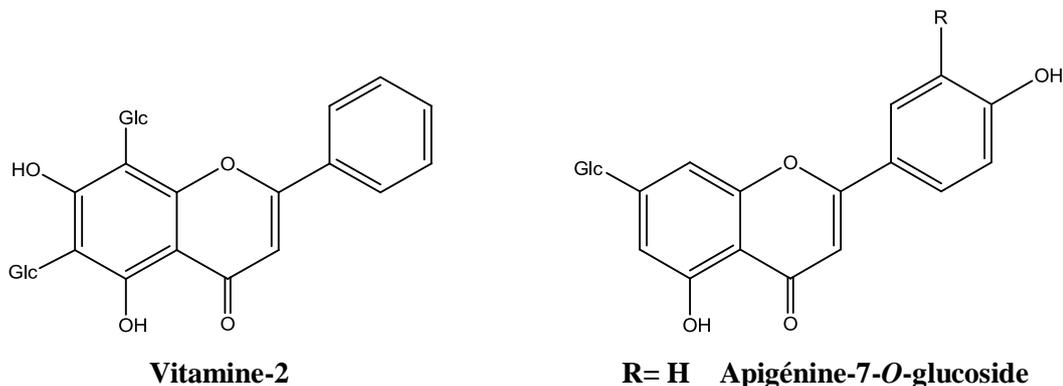


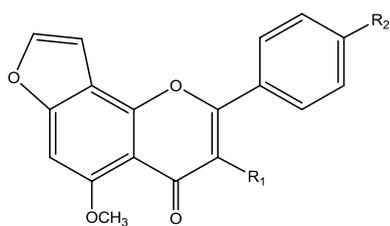
Figure II.4: Structure des différentes sous-classes de flavonoïdes au sens strict

A. Flavones, flavonols

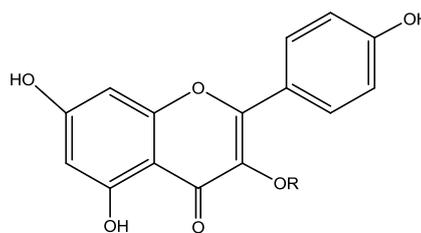
Le cycle A de ces deux types de molécules est substitué par deux hydroxyles phénoliques en C5 et C7. Ces hydroxyles peuvent être libres ou estérifiés. D'autre part, le cycle B peut être substitué en C4' ou di-substitué en C3' et C4' par des groupements OH ou méthoxyles (OCH₃) [170]. Les flavones possèdent en plus une double liaison entre les carbones C2 et C3 du cycle C [171]. Les flavonols sont des dérivés hydroxylés des flavones. Ils sont caractérisés par la présence d'un groupement OH en C3 [169,170].

Notons que les flavones et les flavonols se rencontrent également sous forme glycosylée (C-glycosyl ou O-glycosyl flavonoïdes) [169].





$R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{H}$ Karanjiine

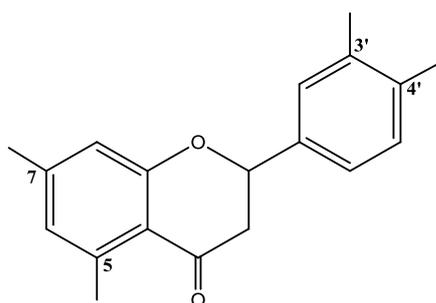


$R = \text{Gal}$ Hypéroside

Figure II.5: Exemples de flavones et flavonols naturels

B. Flavanones et dihydroflavanols

Les flavanones sont caractérisées par l'absence de double liaison entre les carbones C_2 et C_3 , ainsi que par la présence de centres d'asymétrie. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et flavonols [172]. Ces flavanoïdes sont responsables de l'amertume de certains agrumes tels que les pamplemousses, les citrons et les oranges. Ces derniers représentent les seules sources importantes de flavanones [169]. Les quatre flavanones les plus abondantes sont la naringénine, l'hésperitine, l'ériodictyol et l'isosakuranétine [173].



Composés	Positions			
	5	7	3'	4'
Naringénine	OH	OH	H	OH
Hésperitine	OH	OH	OH	OCH ₃
Eriodictyol	OH	OH	OH	OH
Isosakuranétine	OH	OH	H	OCH ₃

Figure II.6: Structure générale des principales flavanones

Les flavanones sont synthétisées à partir des chalcones, par une chalcone isomérase sous forme de 2*S*-flavanones. La réaction s'effectue spontanément en milieu alcalin (Figure II.14) [174]. Environ 350 flavanones aglycones et une centaine de flavanones glycosylées sont décrites dans de nombreuses familles. Beaucoup de flavanones aglycones sont retrouvées à l'état libre dans les écorces, les racines, les écorces de racine, notamment au sein de la famille Fabaceae [175]. Leurs activités biologiques ont été particulièrement étudiées. Ainsi on leur attribue des propriétés antioxydantes [176], antimicrobiennes, anticancéreuses [177] et antipaludiques avec un intérêt particulier pour les dérivés *C*-alkylés. Parmi les flavanones

naturelles antiplasmodiales, des flavanones prénylées relativement actives ont été isolées des feuilles de *Artemisia indica* [178].

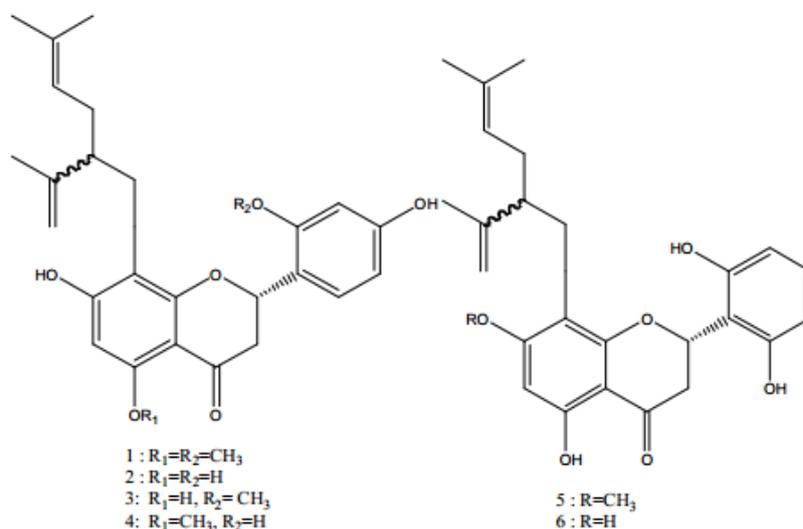
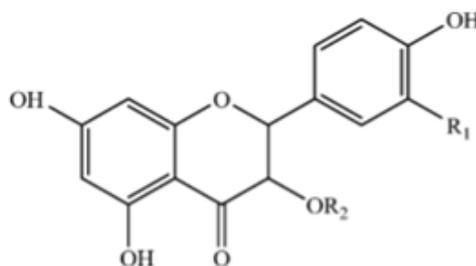


Figure II.7: Flavanones prénylées isolées des feuilles de *Artemisia indica*

Les dihydroflavonols se caractérisent par un groupement hydroxylé sur l'hétérocycle central C, créant ainsi un centre stéréogène supplémentaire en position 3, comparativement aux flavanones [179]. Ces composés sont rencontrés sous forme simple (taxifoline) et sous forme glycosylée (astilbine) [180].

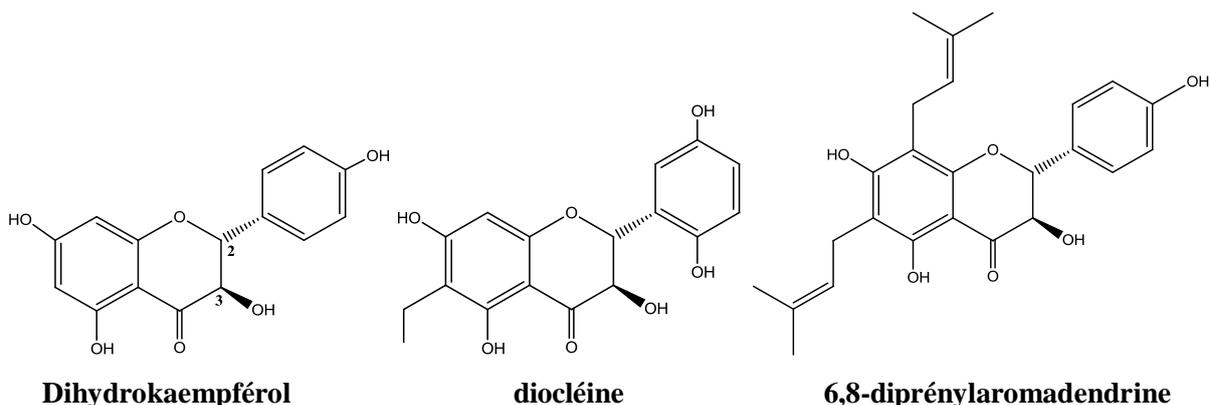


R₁= OH ; R₂= H: Taxifoline

R₁= H ; R₂= Rhamnose : Astilbine

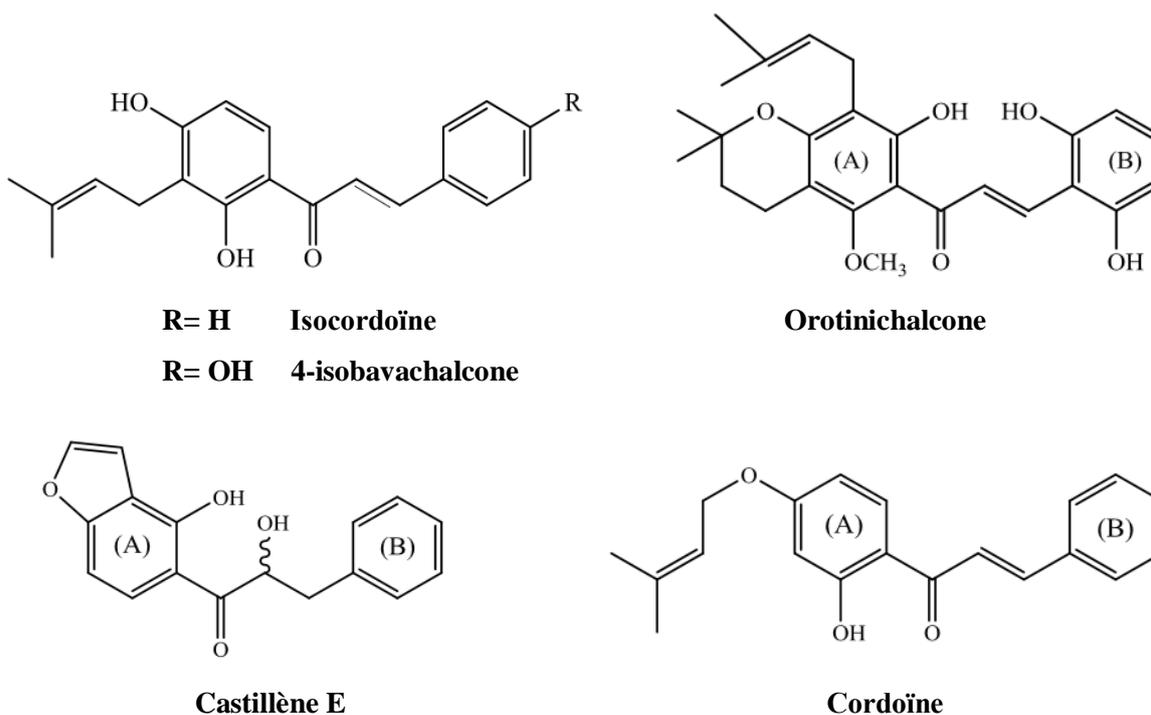
Par rapport à d'autres sous-classes de flavonoïdes, les dihydroflavonols sont moins fréquents dans le règne végétal. Par exemple, le dihydrokaempférol est contenu dans le péricarpe et l'endocarpe du raisin (après hydrolyse du sucre en position 3), mais en quantité moins importante que la flavanone correspondante, la naringénine [181]. La 2',5,5'-trihydroxy-6,7-diméthoxyflavanone, appelée diocléine, est le constituant majoritaire des

racines de *Dioclea grandiflora* (Leguminosae), plante utilisée sous forme d'infusion pour le traitement de problèmes de prostate et de calculs rénaux et reconnue pour avoir des effets sur le système nerveux et donc une activité analgésique [182,183]. Le dihydroflavonol 6,8-diprénylaromadendrine est le composé le plus abondant de l'espèce *Monotes africanus* (Dipterocarpaceae). Il manifeste *in vitro* des propriétés anti-HIV [184].



C. Chalcones et dérivés

Les chalcones sont des flavonoïdes ne comportant pas d'hétérocycle C. Ils sont prénylés le plus souvent sur le noyau A tandis que le noyau B reste peu ou pas substitué (isocordoïne, 4-isobavachalcone). Cette prénylation peut être cyclique de type pyrano (orotinichalcone) ou furano (castillène E). Certaines d'entre-elles présentent une *O*-prénylation linéaire (cordoïne) [185].



D. Aurones et dérivés

Les aurones sont des isomères structuraux des flavones. Ils ont une structure proche mais différente de la plupart des autres flavonoïdes. Ces molécules dérivent de la chalcone. En effet dans le cas des aurones, la chalcone se ferme en formant un cycle à 5 atomes, alors qu'elle forme un cycle de 6 atomes pour les autres flavonoïdes [185]. La figure II.8 reporte des exemples de quelques aurones isolées de plantes Fabaceae [186].

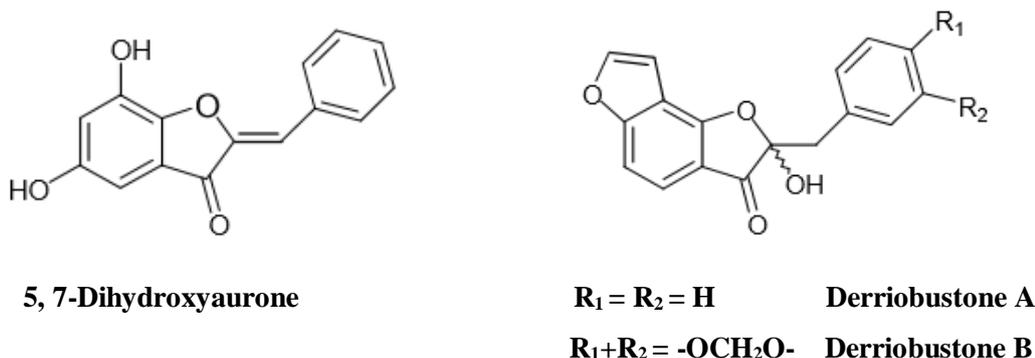


Figure II.8: Exemples de quelques aurones isolées de plantes Fabaceae

II.1.2.3.2.2 Isoflavonoïdes

A. Définition

Les isoflavonoïdes constituent une grande et très diversifiée sous-classe de flavonoïdes [168]. Ils diffèrent des autres flavonoïdes par la position du cycle B qui, dans le cas des isoflavonoïdes, est attaché en position 3 (en 2 pour les autres flavonoïdes), formant un squelette de base 1,2-diphénylpropane.

Les isoflavonoïdes se présentent majoritairement sous forme glycosylée [187]. Contrairement aux flavonoïdes, composés ubiquitaires dans le règne végétal, les isoflavonoïdes sont quasi-exclusivement présents chez les plantes relevant de la famille Fabaceae. En effet, 85% d'entre eux ont été isolés de cette famille [175]. Cependant, Il apparait qu'au moins 225 isoflavonoïdes décrits ont été isolés de plantes n'appartenant pas à cette dernière, mais à 59 autres familles [188].

B. Classification

Les isoflavonoïdes peuvent être classés en une douzaine de types structuraux différenciés par leur degré d'oxydation et par l'existence d'hétérocycles complémentaires. Dans tous les types, on peut noter la fréquence élevée des dérivés isoprénylés et, par voie de conséquence, des structures furaniques, dihydrofuraniques et pyraniques. Assez souvent, les isoflavonoïdes possèdent un cycle supplémentaire, qui en règle générale, provient de la

cyclisation d'un dérivé 2'-hydroxylé. C'est le cas des ptérocarpanes et de leurs dérivés ptérocarpènes et 6a-hydroxyptérocarpanes, ainsi que celui des coumaronochromones. Certains composés polycycliques possèdent un carbone supplémentaire : c'est le cas des roténoïdes issus de la cyclisation oxydative du 2'-méthoxyisoflavone.

Un autre groupe se caractérise par la perte d'un carbone. Il s'agit des 2-arylbenzofuranes qui ne sont biosynthétiquement ni des néolignanes, ni des produits de cyclisation d'un stilbène, mais des isoflavonoïdes formés probablement par la perte du carbone C₆ d'un coumestane [189].

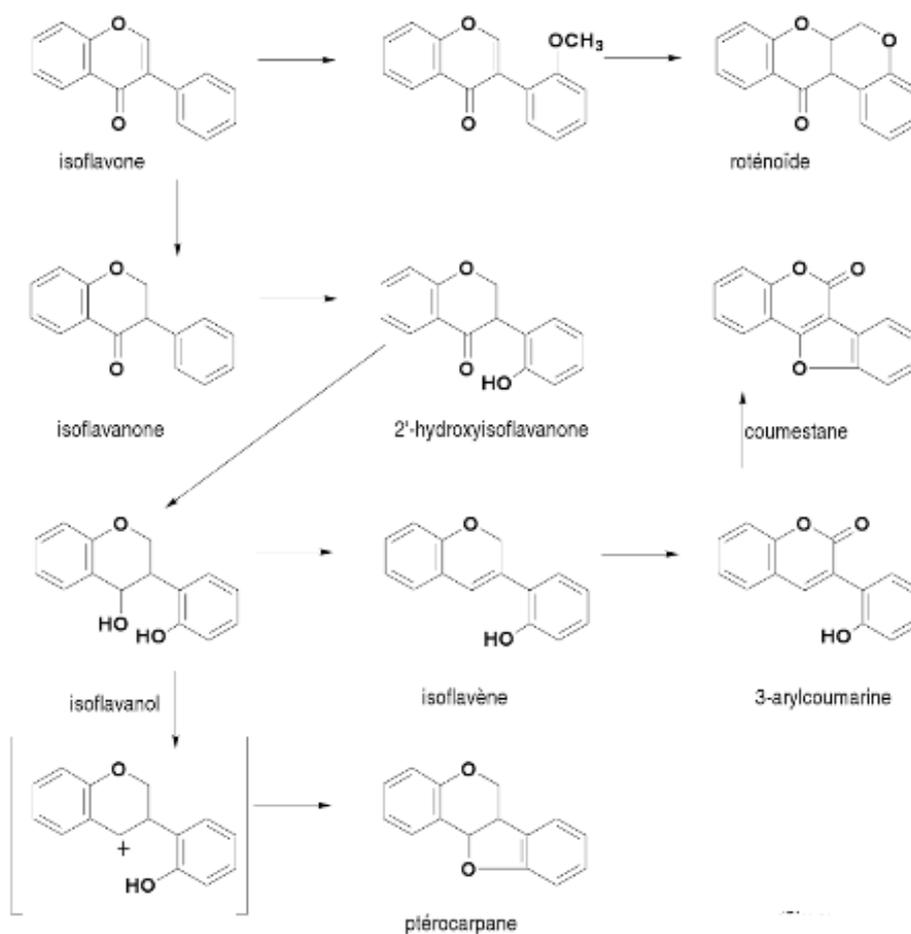


Figure II.9: Principaux types d'isoflavonoïdes et interconversions [189]

- **Isoflavones**

Ce sont les composés les plus fréquents des isoflavonoïdes [189]. Les isoflavones non glycosylées sont les plus largement répandues chez les végétaux, contrairement aux isoflavones glycosylées qui sont plus rares [190]. Chez les légumineuses (plantes Fabaceae), la majorité des isoflavonoïdes isolés sont des isoflavones [188]. Les principales sont la

génistéine et son précurseur méthylé en 4', la biochanine A, la daïdzéine et son précurseur méthylé en 4', la formononétine, ainsi que la glycitéine [173].

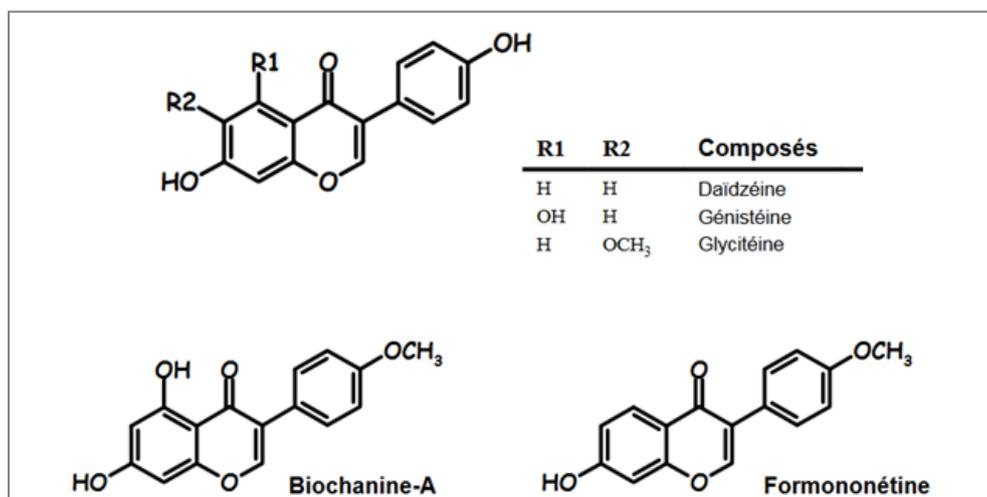
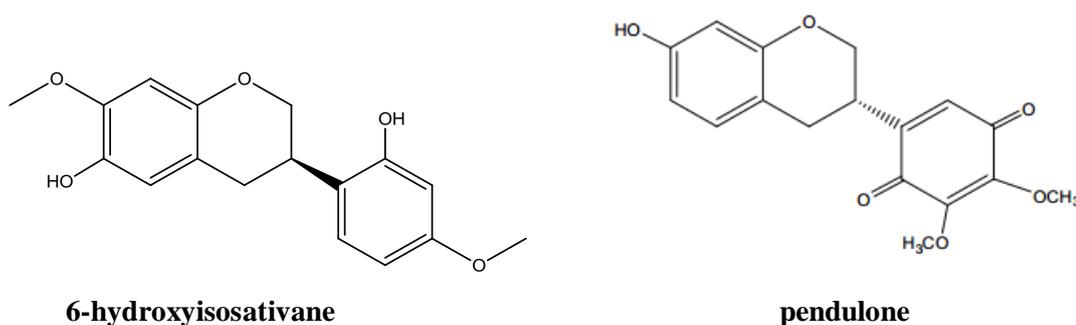


Figure II.10: Structures chimiques de quelques isoflavones

• **Isoflavanes**

La classe des isoflavanes ne diffère des isoflavones que par le degré d'oxydation et de saturation du cycle central. Parmi les isoflavanes répertoriés dans la famille Fabaceae, on distingue le 6-hydroxyisositivane, isolé de l'espèce *Derris robusta* [191] ainsi que le pendulone identifié dans le genre *Astragalus* comme *A. depressus* [88]. Ce dernier composé suscite un grand intérêt en raison de ses activités antitumorale et antileishmaniose jugées très prometteuses [97].



• **Coumestanes**

Les coumestanes sont des isoflavonoïdes possédant une structure coumarinique induite par l'oxydation d'un isoflav-3-ène. C'est le cas des 3-arylcoumarines (= isoflav-3-én-2-ones) et des produits issus de la cyclisation de la 2'-hydroxy-3-aryl-coumarine [189]. Les coumestanes sont isolés principalement à partir de plantes Fabaceae. Les jeunes pousses de trèfle (genre *Trifolium*) et de luzerne (genre *Medicago*) représentent la source essentielle de

ces composés alors qu'ils ne sont présents qu'en faible concentration chez les pois et les haricots [192].

Dans les plantes, les coumestanes apparaissent lors d'une attaque fongique ou bactérienne, ce qui leur confère le rôle de phytoalexine [193].

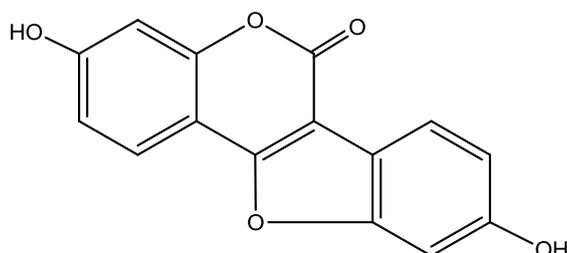


Figure II.11: Structure chimique d'une coumestane : le coumestrol

C. Biosynthèse des isoflavonoïdes

La présence quasi-exclusive des isoflavonoïdes chez les plantes Fabaceae peut s'expliquer par le fait que l'on retrouverait uniquement au sein de cette famille l'isoflavone synthase (IFS), enzyme clé dans la synthèse des isoflavonoïdes. Le terme IFS est utilisé pour décrire la réaction de migration du groupement aryle (Figure II.12), couplée à une 2-hydroxylation catalysée par la 2-hydroxyisoflavanone synthase (2HIS), ainsi que la réaction de déshydratation qui est soit spontanée, soit catalysée par la 2-hydroxyisoflavanone déshydratase (2HID) [194,195]. Néanmoins, le gène codant pour l'IFS a été également identifié dans la canne à sucre (*Beta vulgaris*, Chenopodiaceae) [188].

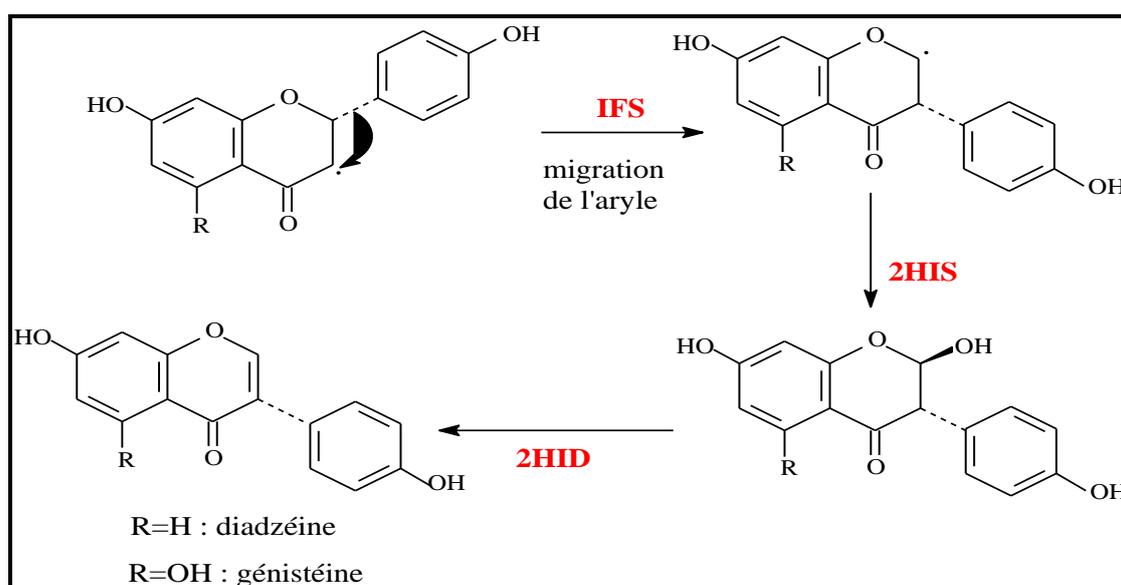


Figure II.12: Biosynthèse des isoflavonoïdes

II.1.2.3.3 Biosynthèse des flavonoïdes

Le motif chalcone est important puisqu'il ouvre la voie à la biosynthèse des flavonoïdes, avec la formation du squelette diphenylpropane C₆-C₃-C₆. Dans le schéma présenté ci-dessous (Figure II.13), une chalcone est obtenue par action d'une enzyme, la chalconesynthase (CHS) qui engendre une séquence réactionnelle de décarboxylation, condensation, cyclisation intramoléculaire et aromatisation entre un ester CoA de *p*-coumaroyl et trois molécules d'ester CoA de malonyle [179,196].

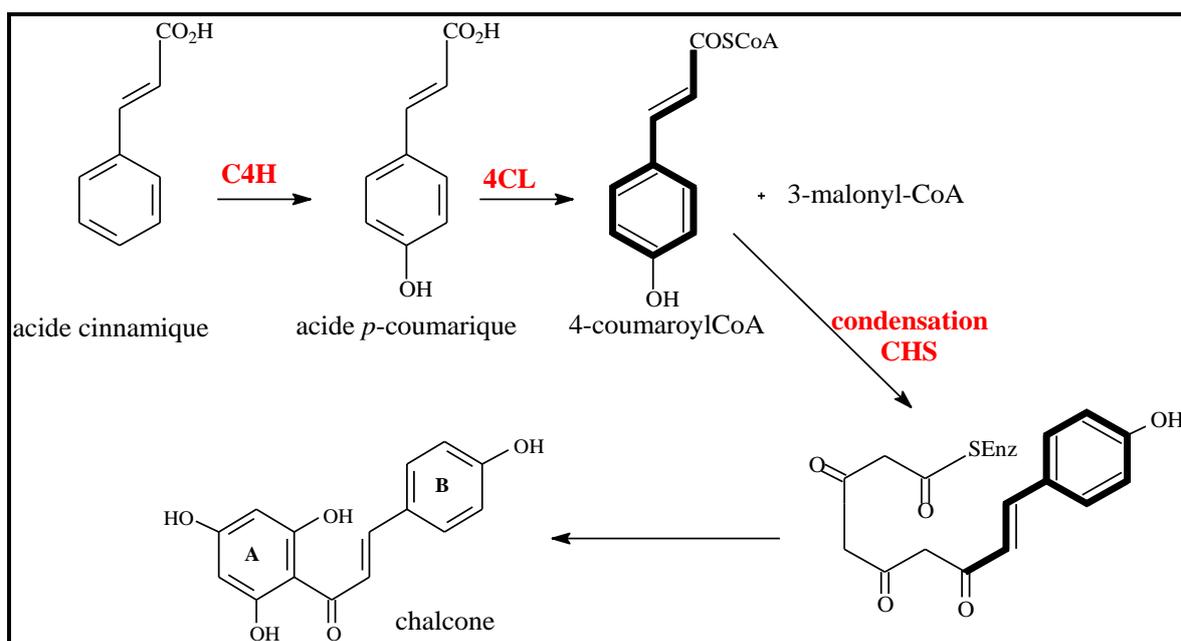


Figure II.13: Formation de la chalcone à partir des acides cinnamiques [197]

Les différentes classes de flavonoïdes sont biosynthétisées à partir d'une chalcone. La chalcone nouvellement formée donne une 2*S*-flavanone (la naringénine) à l'issue d'une transformation stéréospécifique catalysée par une chalconeisomérase (CHI) [174]. La naringénine est au centre de la synthèse de différentes classes de flavonoïdes par l'action d'enzymes diverses. Les flavonesynthases (FSI) introduisent une double liaison en 2,3 pour donner une flavone. La flavanone-3-hydroxylase (FHT) catalyse l'hydroxylation en position 3 d'une 2*S*-flavanone pour donner un (2*R*,3*R*)-dihydroflavonol. Le dihydroflavonol peut ensuite être transformé en flavonol par la flavonolsynthase (FLS) (Figure II.14) [197].

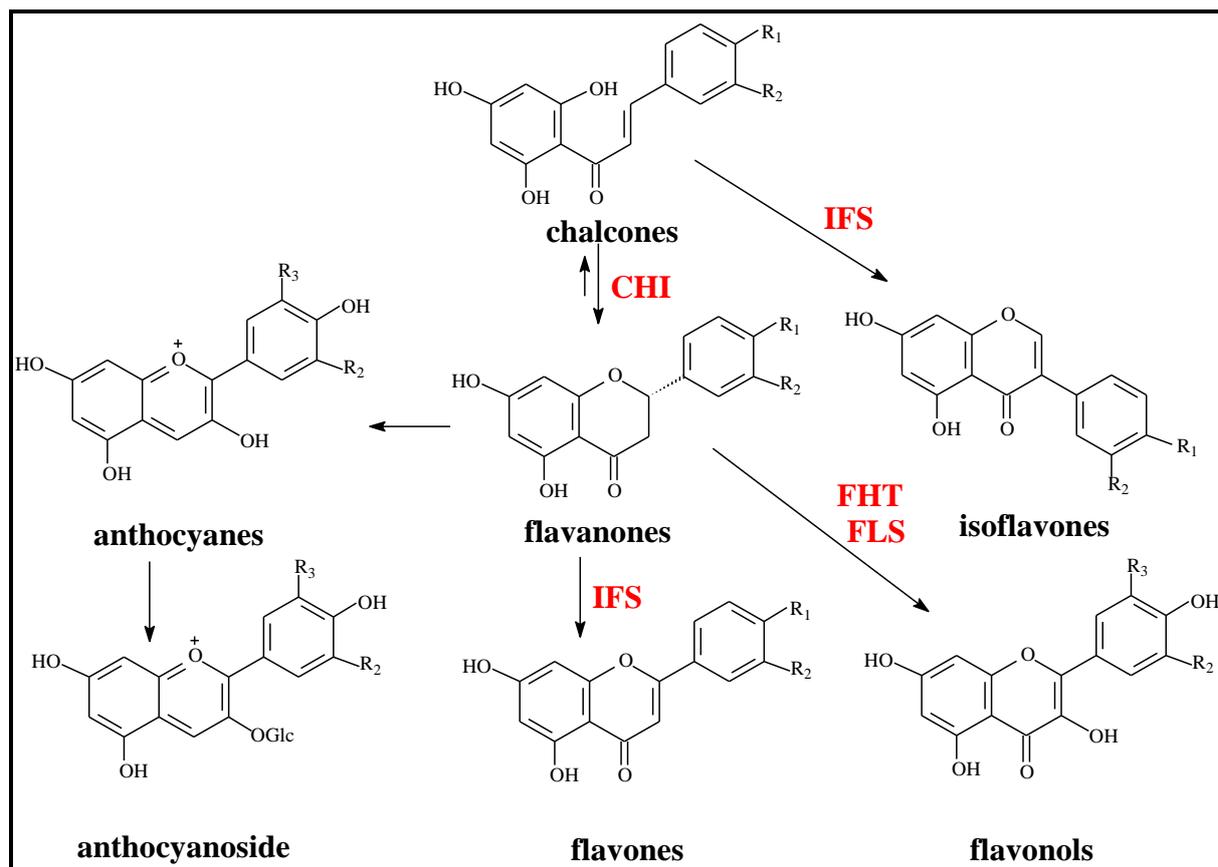


Figure II.14: Schéma récapitulatif de la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes

II.1.2.3.4 Propriétés pharmacologiques

Les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques, antifongiques et antibactériennes. Elles ont également des propriétés spasmolytiques permettant une relaxation des muscles lisses. De plus, en éliminant les espèces oxygénées telles que les anions superoxydes (O_2^-), ainsi que les radicaux hydroxyles et peroxydes, et en réduisant la peroxydation des lipides, les flavonoïdes jouent un rôle d'antioxydants. D'autre part, ils peuvent agir sur le système vasculaire en limitant l'agrégation des plaquettes, tout en présentant des propriétés antitumorales par induction de l'apoptose et par inhibition à la fois de la multiplication des cellules cancérogènes et la prolifération des lymphocytes T [198, 199]. Parmi les flavonoïdes les plus actifs sur les cellules tumorales, la quercétine et la catéchine, très abondantes dans les aliments, sont très citées [200,201]. Par ailleurs, les flavonoïdes ont déjà été utilisés pour le traitement des cataractes d'origine diabétique du fait qu'ils inhibent l'aldose réductase [202,203].

II.2 Triterpènes

II.2.1 Définition

Les triterpènes sont un groupe très diversifié de produits d'origine naturelle largement présents chez les plantes [204]. Au moins, 4000 composés triterpéniques avec des squelettes hydrocarbonés différents sont répertoriés [205]. Ils existent souvent chez les plantes sous forme de saponines qui comprennent les aglycones représentés par des triterpènes hydrophobes appelés sapogénines et un ou plusieurs résidu(s) osidique(s) hydrophile(s) [206].

Ce sont des composés en C-30 issus de la cyclisation du 3*S*-2,3-époxyqualène, ou plus rarement du squalène lui-même [168,207,208]. Ils sont très souvent hydroxylés en position C-3 du fait de l'ouverture de l'époxyde [209]. Les triterpènes présentent une très forte unité structurale. Les différences majeures sont d'ordre stéréochimique, ayant trait à la conformation adoptée par l'époxyqualène avant la cyclisation initiale [168,207,208].

II.2.2 Classification

Les triterpènes peuvent être classés en deux catégories, les triterpènes stéroïdiques et les triterpènes pentacycliques [210].

II.2.2.1 Triterpènes stéroïdiques

Ces composés sont naturellement présents dans la fraction lipidique des plantes. Leur structure générale est composée de 4 cycles dont les trois premiers sont à 6 chaînons et le dernier à 5 [185].

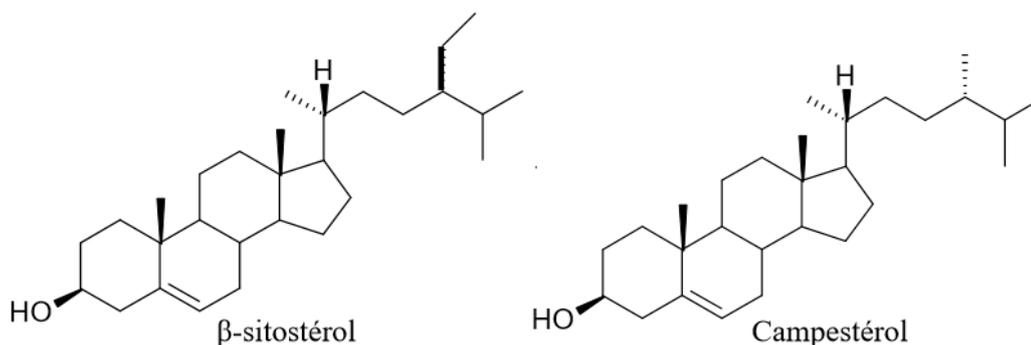


Figure II.15: Exemples de triterpènes stéroïdiques

II.2.2.2 Triterpènes pentacycliques

Ce sont des molécules composées de 3 motifs terpéniques (soit six motifs isopréniques) agencés soit en 5 cycles à 6 carbones, soit en 4 cycles à 6 carbones et 1 cycle à 5 carbones. Les éléments structuraux de ce groupe sont caractérisés par [211] :

- l'agencement des cycles
- la position des groupes méthyles substitués
- la présence et la position des insaturations
- les isoméries dues aux configurations chaise/bateau, *R* ou *S*, α ou β
- la présence de groupes fonctionnels (-OH, C=O, COOH)

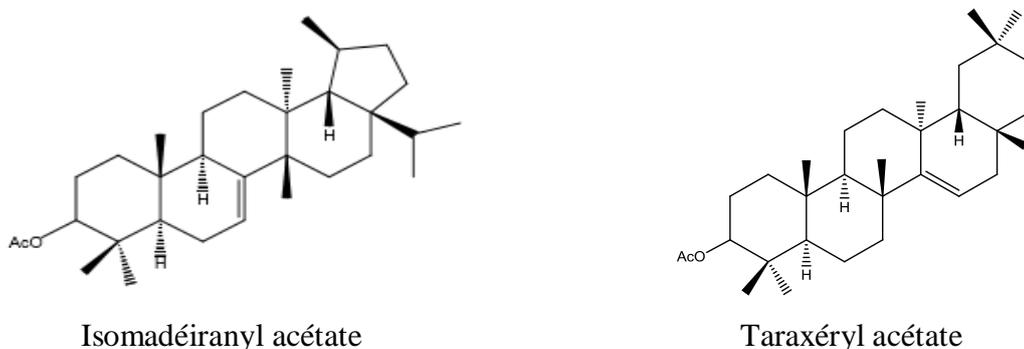


Figure II.16: Triterpènes pentacycliques

II.2.3 Biosynthèse des triterpènes

Les organismes végétaux ont la possibilité de cycliser l'époxysqualène qui conduit spécifiquement aussi bien aux triterpènes tétracycliques libres, qu'aux saponosides à génine triterpénique pentacyclique ou aux triterpènes modifiés [170,208].

Le couplage queue-à-queue de deux unités en C-15, farnésylpyrophosphate (FPP) suivi d'une oxydation permet l'élaboration de l'époxysqualène (Figure II.17), précurseur des triterpènes et des stéroïdes [170,207,208].

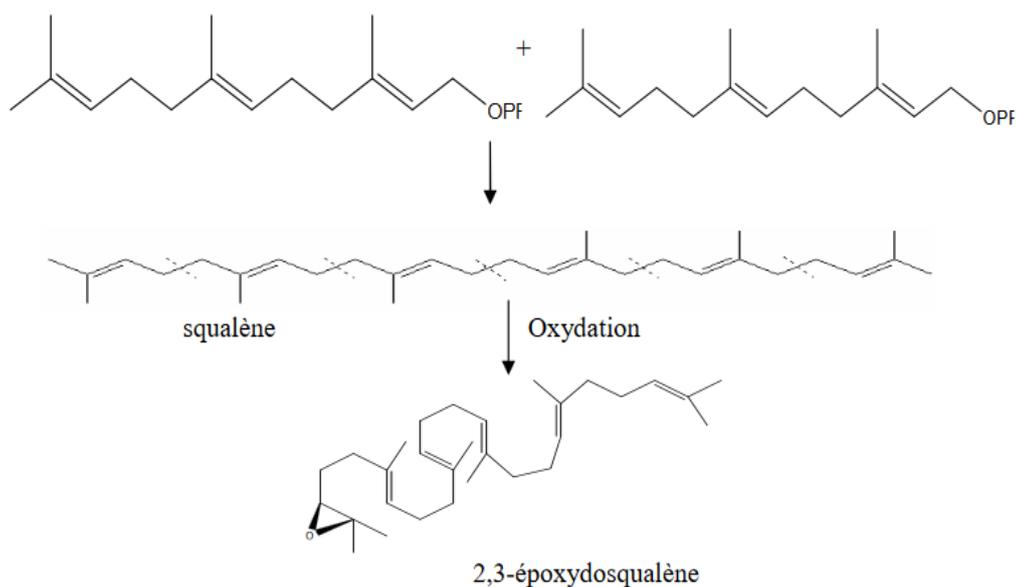
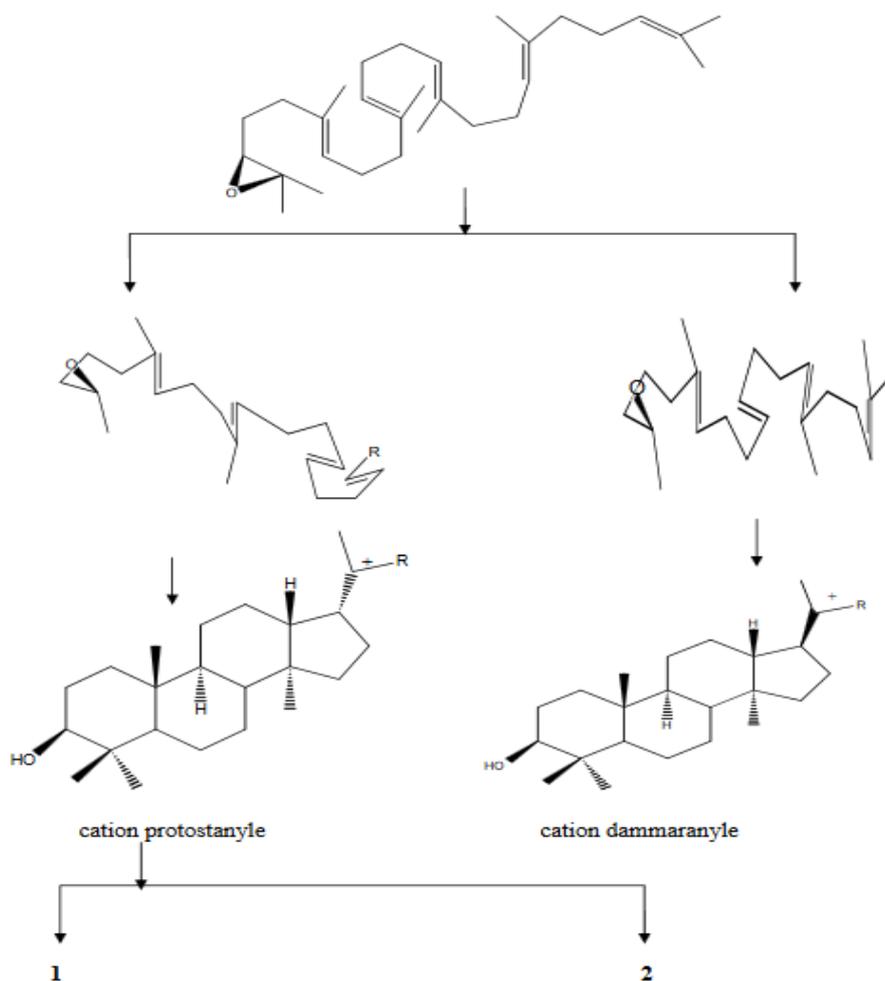


Figure II.17: Formation de l'époxy Squalène

L'ouverture de l'époxyde amorce la cyclisation. L'enzyme responsable de cette cyclisation stabilise la conformation du polyisoprène de telle sorte que les impératifs stéréoélectroniques soient respectés. C'est de la conformation initiale de l'époxysqualène sur la surface de l'enzyme (Figure II.18) que dépend l'orientation de la biosynthèse vers les triterpènes tétra- et pentacycliques et les stéroïdes [168,207,208].

Si l'époxysqualène est dans une conformation chaise-bateau-chaise-bateau, la cyclisation conduit à un cation protostanyle précurseur des cycloartanes, des lanostanes et des cucurbitanes.

Si l'époxysqualène adopte la conformation chaise-chaise-chaise-bateau, la cyclisation aboutit à un autre cation appelé dammaranyle. Ce dernier peut évoluer afin de donner naissance aux triterpènes tétracycliques à squelette euphane et tirucallane. Le plus souvent, il conduit aux triterpènes pentacycliques de type oléanane, ursane, lupane, multiflorane, taraxérane, taraxastane,...etc [168,207].



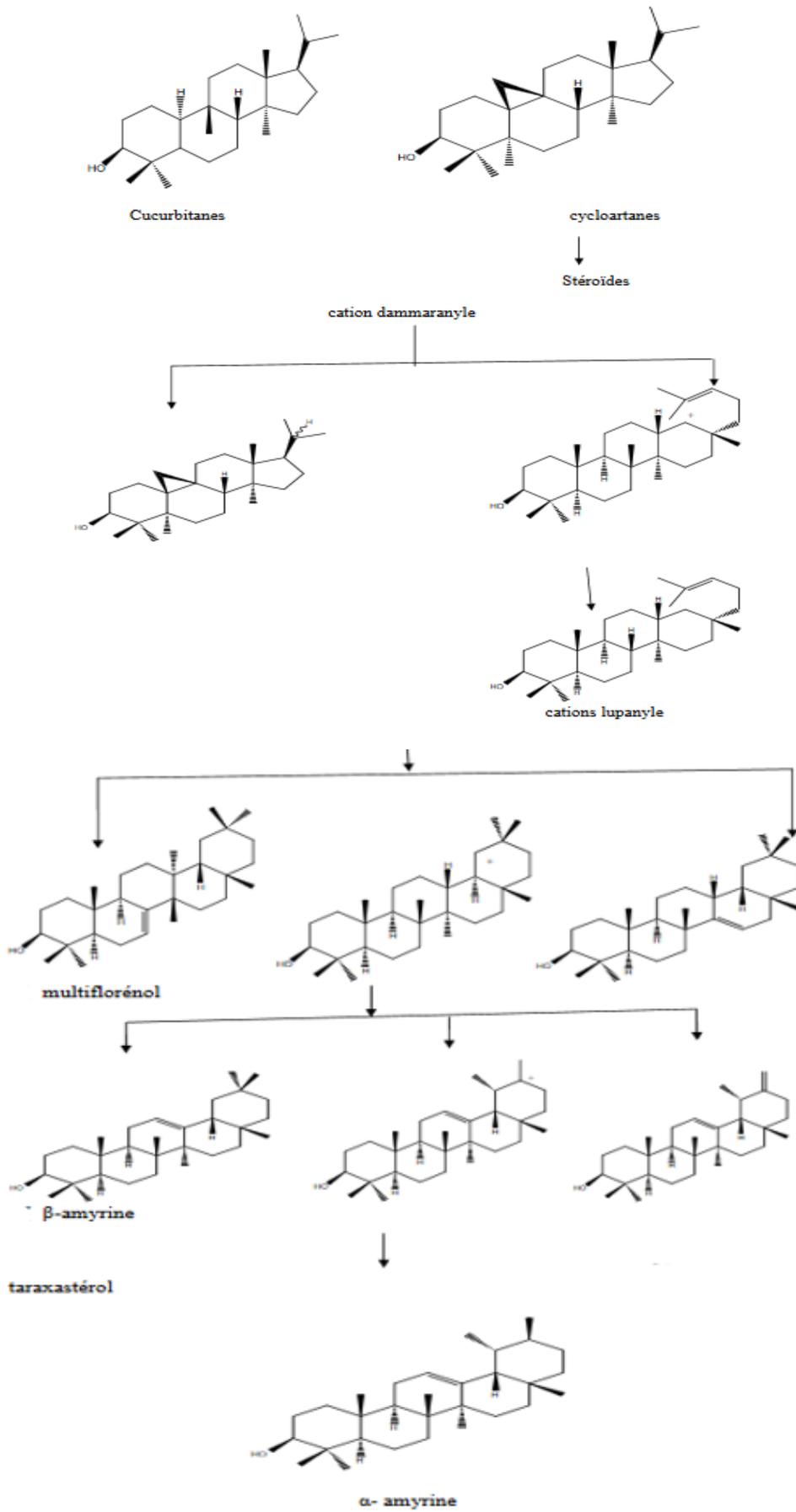


Figure II.18: Biosynthèse des triterpènes

II.2.4 Propriétés pharmacologiques des triterpènes

La grande diversité structurale des métabolites secondaires triterpéniques conduit à une grande diversité en terme d'activité biologique [212]. Il est donc difficile de cerner l'activité de tous ces métabolites. Par conséquent, nous avons choisi de citer quelques propriétés pharmacologiques [168,207]. Ces composés manifestent entre autres :

- des potentialités thérapeutiques certaines avec des propriétés cytostatiques, anti-inflammatoires, analgésiques, insecticides, molluscicides,...etc.
- un intérêt considérable dans le secteur de l'industrie pharmaceutique, particulièrement la production de médicaments stéroïdiques ayant des propriétés contraceptives, anabolisantes, antiinflammatoires,...etc.

II.3 Saponines

II.3.1 Définition

Le nom saponine dérive du mot latin "sapo", qui signifie savon, du fait que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Ils se composent d'aglycones non polaires liés à un ou plusieurs sucres. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires explique leur comportement moussant en solution aqueuse [146].

Les saponines constituent une importante classe de métabolites secondaires d'origine végétale et animale, de masse moléculaire entre 600 à 2000 Daltons et de structure complexe [213].

II.3.2 Classification

Selon que le groupe génine est un triterpène ou un stérol, on a les saponines stéroïdiques et les saponines triterpéniques dérivant biosynthétiquement de l'oxyde de squalène [146].

II.3.2.1 Saponines stéroïdiques

Les saponines stéroïdiques se rencontrent presque exclusivement dans les monocotylédones angiospermes [213]. La structure de leur aglycone dérive exclusivement de la structure du stérane (Figure II.19) et comprend 27 atomes de carbone [214].

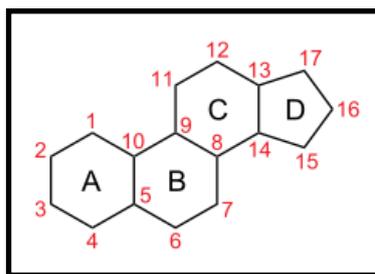


Figure II.19: structure du stérane

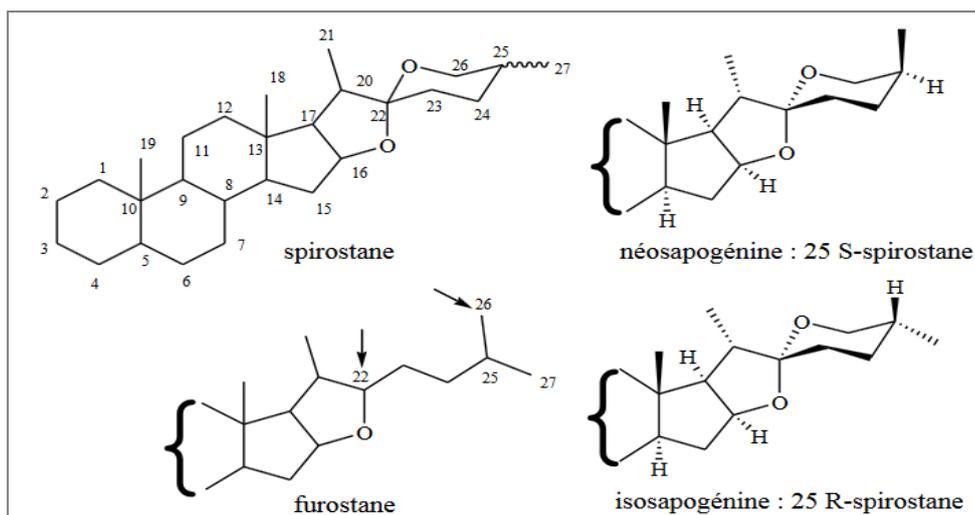


Figure II.20: Squelettes et configurations des génines stéroïdiques des saponosides

II.3.2.2 Saponines triterpéniques

Les saponines triterpéniques sont les plus communes. On les rencontre chez les dicotylédones angiospermes [213]. Comme la majorité des triterpénoïdes, les sapogénines triterpéniques sont issues de la cyclisation du (3*S*)-2,3-époxy-2,3-dihydrosqualène [189]. Leur aglycone possède surtout une structure de base pentacyclique, plus rarement tétracyclique [214]. L'oléanane, l'ursane et le lupane sont les squelettes les plus communs. A plus de 50%, les saponines connues peuvent être attribuées à l'oléanane, plus précisément à l'acide oléanolique et l'hédéragénine (Figure II.21) [189].

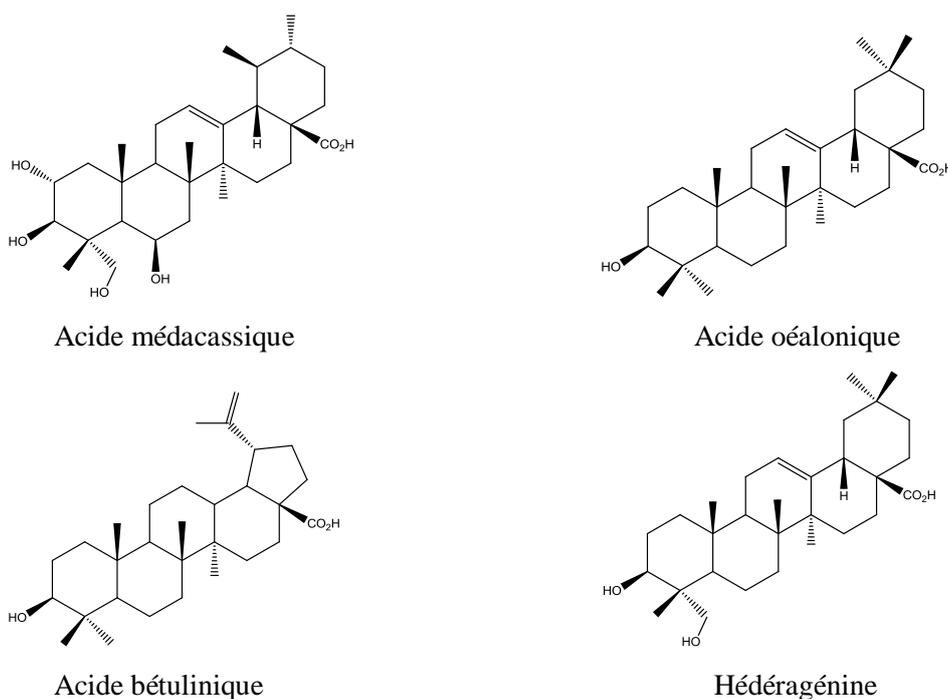


Figure II.21: Exemple de génines triterpéniques

II.3.2.3 Sucres

Les sucres constituent la partie hydrophile des saponines. Elles peuvent être constituées d'une ou plusieurs chaînes osidiques (linéaires ou ramifiées) à des positions différentes sur l'aglycone. Les saponines aussi bien stéroïdiques que triterpéniques sont souvent des saponines monodesmosidiques en C3, et cela par la fixation d'une unique chaîne de sucres. Les saponines bidesmosidiques sont rencontrées parmi les saponines triterpéniques de type oléane avec une fixation en C3 et C28, et pour les saponines stéroïdiques de type furostane avec une fixation en C3 et C26.

La Figure II.22 regroupe les sucres les plus fréquemment rencontrés dans les saponines [189].

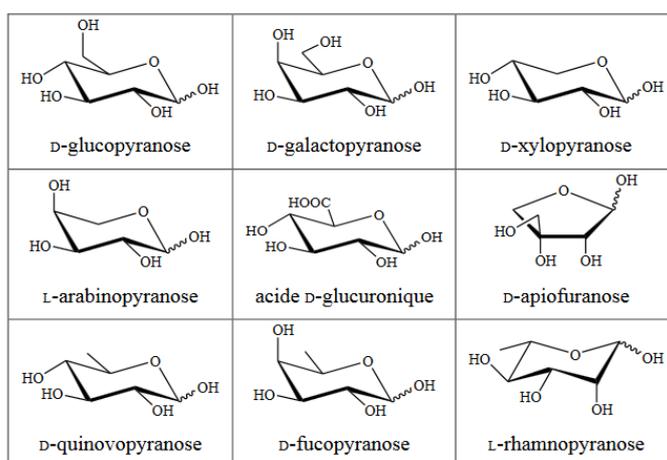


Figure II.22: Principaux sucres constitutifs rencontrés dans les saponines

II.3.3 Propriétés pharmacologiques des saponines

Les saponines sont considérées comme responsables de nombreuses propriétés pharmacologiques [213]. Elles formeraient les principaux constituants de plusieurs remèdes issus des plantes. Elles ont été recherchées par l'industrie pharmaceutique parce qu'elles constituent le point de départ de l'hémi-synthèse des médicaments stéroïdiens [215]. Elles sont considérées comme des éléments clés dans la pharmacopée traditionnelle chinoise et responsables de la plupart des effets biologiques observés [216]. Les saponines possèdent des propriétés : expectorante, anti-inflammatoire, vasoprotectrice, hypocholestérolémique, immunomodulatoire, hypoglycémique, molluscicide, antifongique, antiparasite...

Une autre application importante des saponines réside dans leur utilisation comme adjuvants dans la production des vaccins. Quelques sapogénines stéroïdiques sont des matières premières importantes utilisées dans la production des hormones stéroïdiques dans l'industrie pharmaceutique [213].

Chapitre III- Etude
phytochimique de l'espèce
Astragalus monspessulanus L.

III.1 Rappels botaniques

III.1.1 Généralités

La plante *Astragalus monspessulanus* L. est plus communément appelée "Astragale de Montpellier" [217]. Elle est connue sous les noms vernaculaires : "Sella" et "Djilban el Maaza" [104]. Cette espèce est assez commune dans les forêts claires et les pâturages de la région des Aurès, Tell, dans la région méditerranéenne et aussi en Europe. Les moutons apprécient cette espèce [218].

III.1.2 Description botanique

Il s'agit d'une plante herbacée vivace [219] et acaule de taille 10 à 20 cm [104], plus ou moins couchée, à tige courte. Elle croît dans les pelouses sèches et les rochers et fleurit en avril jusqu'à juillet [219]. Les feuilles imparipennées ont de nombreuses folioles (de 10 à 20 paires). Les fleurs papilionacées sont de 2 à 3 cm de long, purpurines ou violacées en tête plus ou moins allongées sur un pédoncule au moins aussi long que les feuilles. Les gousses de 25-35 x 3-4 mm sont arquées-linéaires. Le calice tubuleux en cloche, possède 5 dents subégales ou très inégales [104].



Figure III.1: Espèce *Astragalus monspessulanus* L. [219]

III.1.3 Classification systématique

La plante *Astragalus monspessulanus* L. est classée sur le plan botanique comme suit :

- **Règne** : Plantae
- **Sous Règne** : Tracheobionta
- **Division** : Angiosperma
- **Classe** : Dicotylédones

- **Sous-classe** : Rosidae
- **Ordre** : Fabales
- **Famille** : Leguminosae (Fabaceae)
- **Genre** : *Astragalus*
- **Espèce** : *Astragalus monspessulanus* L.

III.2 Toxicité

L'espèce *Astragalus monspessulanus* L. est dénombrée parmi les espèces non toxiques [220].

III.3 Propriétés pharmacologiques

Un travail biologique a montré que l'ensemble de saponines isolées de l'extrait *n*-BuOH de *Astragalus monspessulanus* L., est doté d'une activité cytotoxique sur HepG2 hépatocellulaire [24]. Un autre travail réalisé sur la même espèce a révélé que l'extrait *t*-BuOH contenant des flavonoïdes et des flavoalkaloïdes exerce une activité antioxydante et cytoprotectrice prometteuse [221].

III.4 Résultats et discussions

III.4.1 Extraction

Le matériel végétal constitué des parties aériennes (1000 g) de la plante *Astragalus monspessulanus* L. préalablement séchées et broyées, est mis à macérer dans un mélange EtOH/H₂O dans les proportions 70/30 (3 x 10 L) et cela pendant trois jours à température ambiante. Après filtration et évaporation non à sec des solvants, l'extrait aqueux subit une extraction liquide-liquide par l'éther de pétrole (400 ml, 3 fois). Après décantation et évaporation à sec, 8,3 g de l'extrait EP ont été obtenus. L'extrait aqueux est ensuite mis à macérer dans l'acétate d'éthyle (3 x 400 ml). Après filtration et évaporation du solvant, 12,1 g de l'extrait acétate d'éthyle ont été obtenus. L'extrait aqueux est mis à macérer de nouveau dans le *n*-butanol (3 x 400 ml). La filtration et l'évaporation totale du solvant ont donné 15,33 g de l'extrait butanolique.

Le schéma ci-dessous récapitule les différentes étapes de l'extraction (Figure III.2).

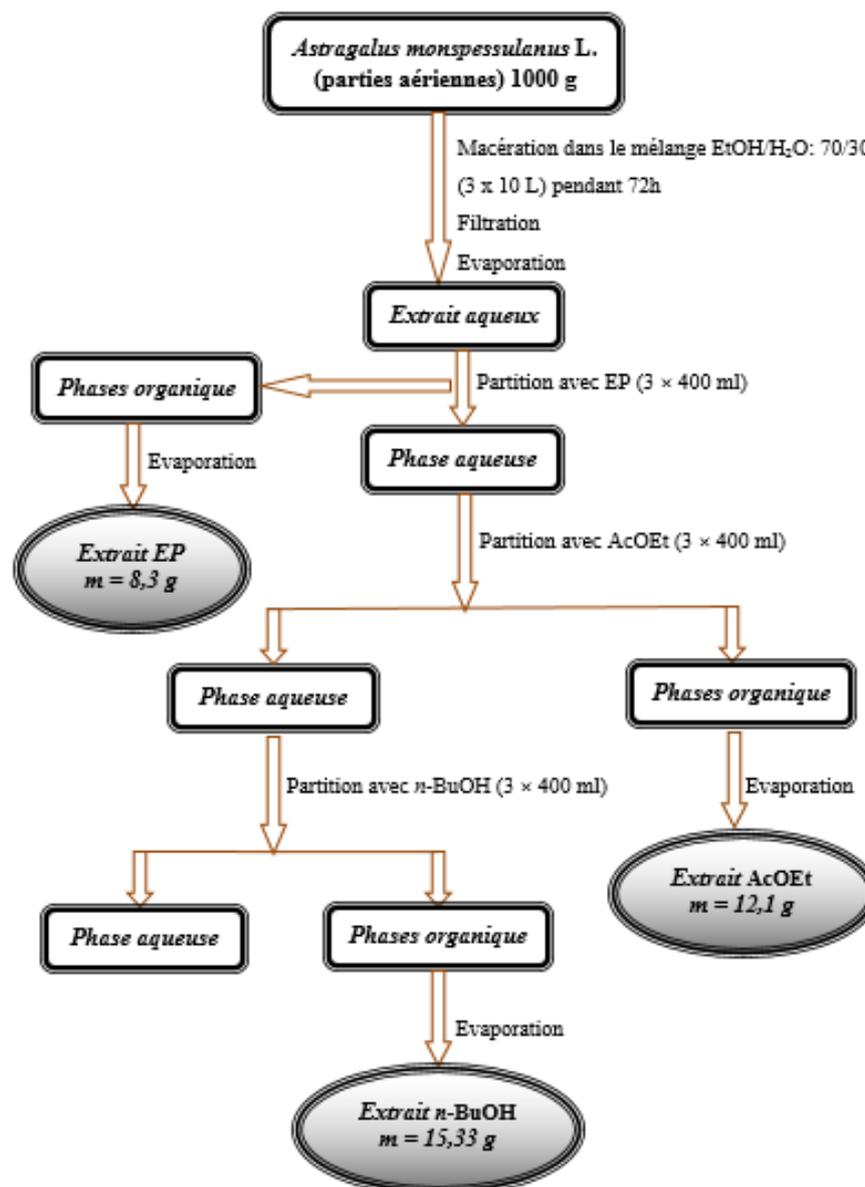


Figure III.2: Schéma d'extraction des parties aériennes de la plante *Astragalus monspessulanus* L.

III.4.2 Séparation et purification

Les CCM des trois extraits visualisés sous lumière UV à 254 et 366 nm puis pulvérisées par H₂SO₄/AcOH/H₂O dans les proportions 25/25/50, montrent la richesse des extraits acétate d'éthyle et butanolique en métabolites secondaires.

L'extrait AcOEt (7 g) est initialement soumis à un fractionnement par chromatographie liquide sous vide (CLV) sur gel de silice greffée en C-18 (phase inverse) en utilisant le système de solvants H₂O/MeOH allant de 80/20 à 0/100 (Figure III.3), donnant 9 fractions de 100 ml.

Ainsi 7 g de l'extrait butanolique ont été fractionnés grossièrement par une chromatographie liquide sous vide (CLV) sur gel de silice greffée en C-18 (phase inverse) avec les gradients d'éluion H₂O/MeOH allant de 80/20 à 0/100. Cette étape préliminaire s'est soldée principalement par l'obtention de 15 fractions de 100 ml (Figure III.4).

Les fractions résultantes, au niveau des deux extraits, ont été ensuite analysées par chromatographie sur couche mince en utilisant différents systèmes de solvants. Les fractions présentant des profils identiques ont été réunies puis traitées individuellement en combinant différentes techniques chromatographiques :

- chromatographie sur colonne de gel de silice normale, polyamide et Sephadex LH-20.
- chromatographie sur plaques préparatives (CCE)
- chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

Treize composés ont été ainsi isolés dont dix composés isolés de l'extrait *n*-BuOH et trois de l'extrait AcOEt.

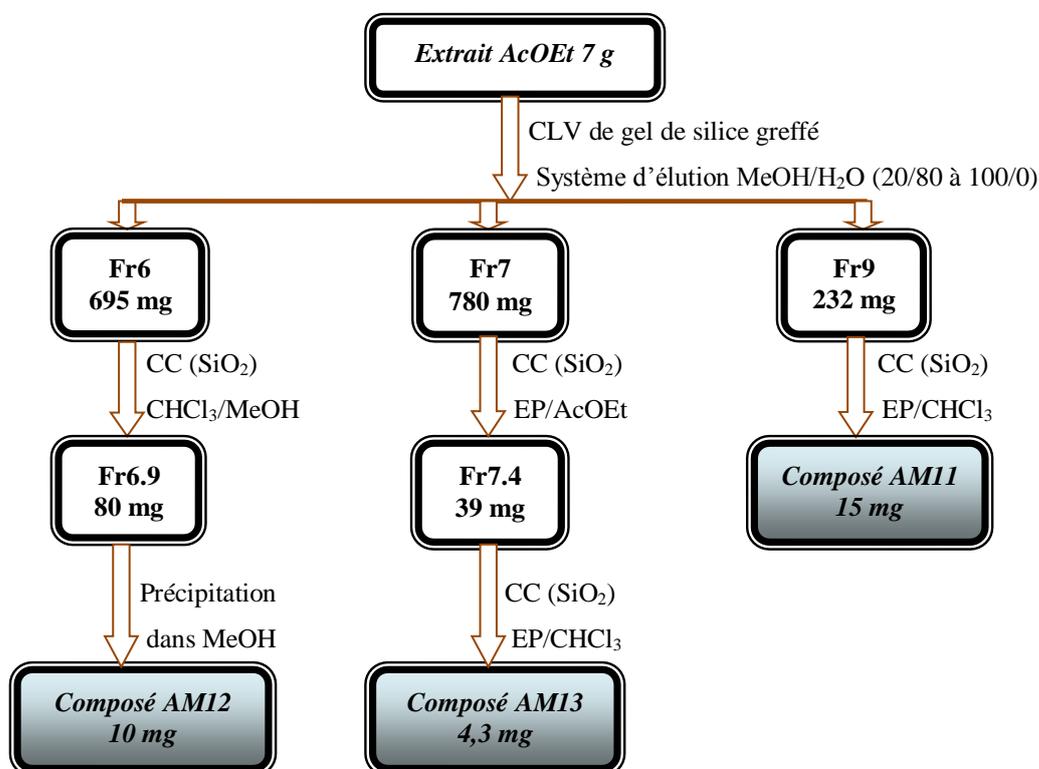


Figure III.3: Schéma de purification des produits de l'extrait AcOEt de la plante *Astragalus monspessulanus* L.

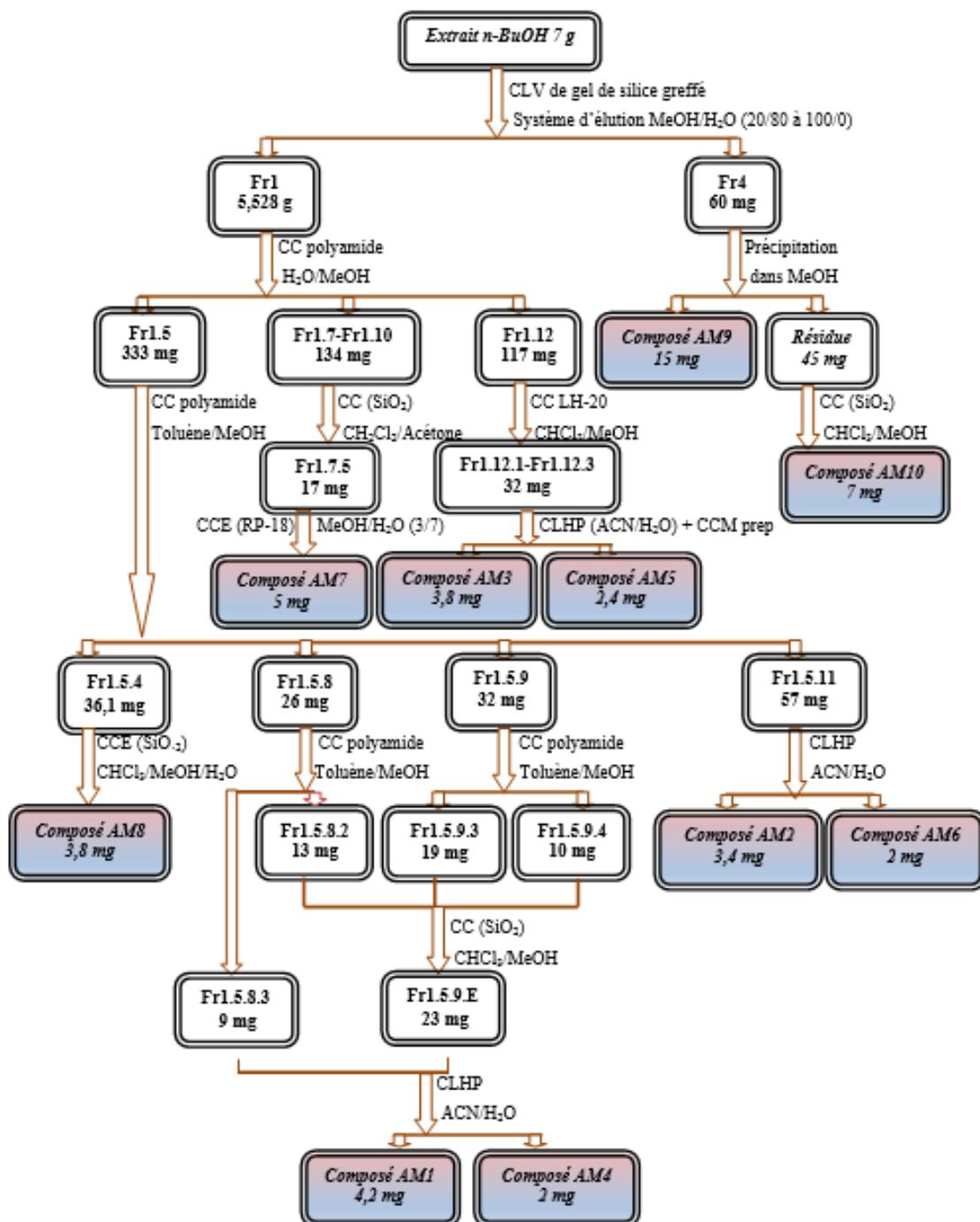
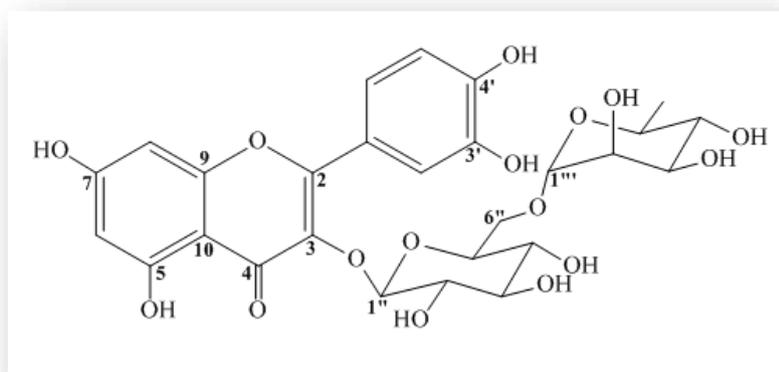


Figure III.4: Schéma de purification des produits de l'extrait *n*-BuOH de la plante *Astragalus monspessulanus* L.

III.4.3 Caractérisation des produits obtenus à partir de l'extrait *n*-BuOH

Les produits isolés ont été caractérisés par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D du proton et du carbone, RMN 2D conjuguant les expériences COSY H-H, HSQC et HMBC, la spectrométrie de masse ESI-MS, en plus de la comparaison avec les données de la littérature.

III.4.3.1 Identification structurale du composé AM1

Quercétine 3-*O*-rutinoside (AM1)

Le composé AM1, visible en UV sous 254 nm, se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Sa coloration jaune après révélation par une solution de vanilline sulfurique et chauffage, oriente d'emblée vers un composé à structure flavonoïdique.

Son spectre de masse ESI (Figure III.5), enregistré en mode positif, montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 633,1$ $[M+Na]^+$, correspondant à une masse moléculaire égale à 610 uma et une formule brute en $C_{27}H_{30}O_{16}$.

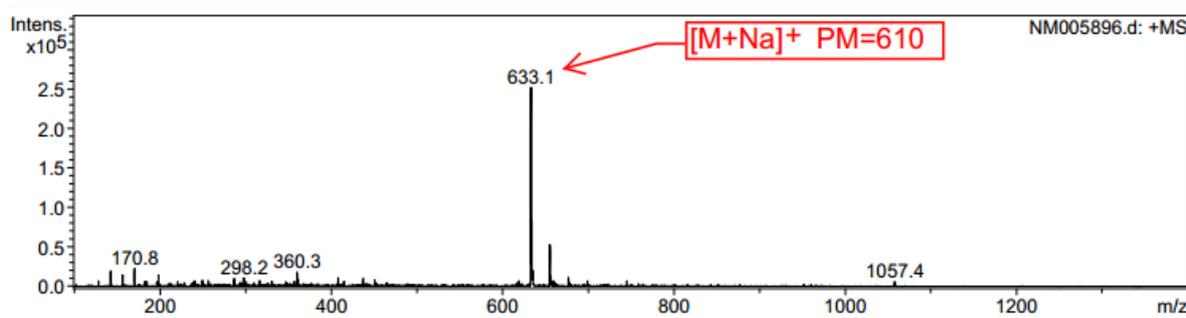


Figure III.5: Spectre de masse ESI⁺ du composé AM1

Le spectre RMN 1H (Figure III.6) enregistré dans MeOD qui montre des signaux caractéristiques de protons aromatiques résonant entre 6,20 et 7,70 ppm et osidiques entre 3,2 et 5,2 ppm, laissent suggérer que le composé est un flavonoïde glycosylé. Il met aussi en évidence la présence d'un groupement méthyle à travers un signal doublet à δ_H 1,12 (3H, *d*, *J* = 6,2 Hz).

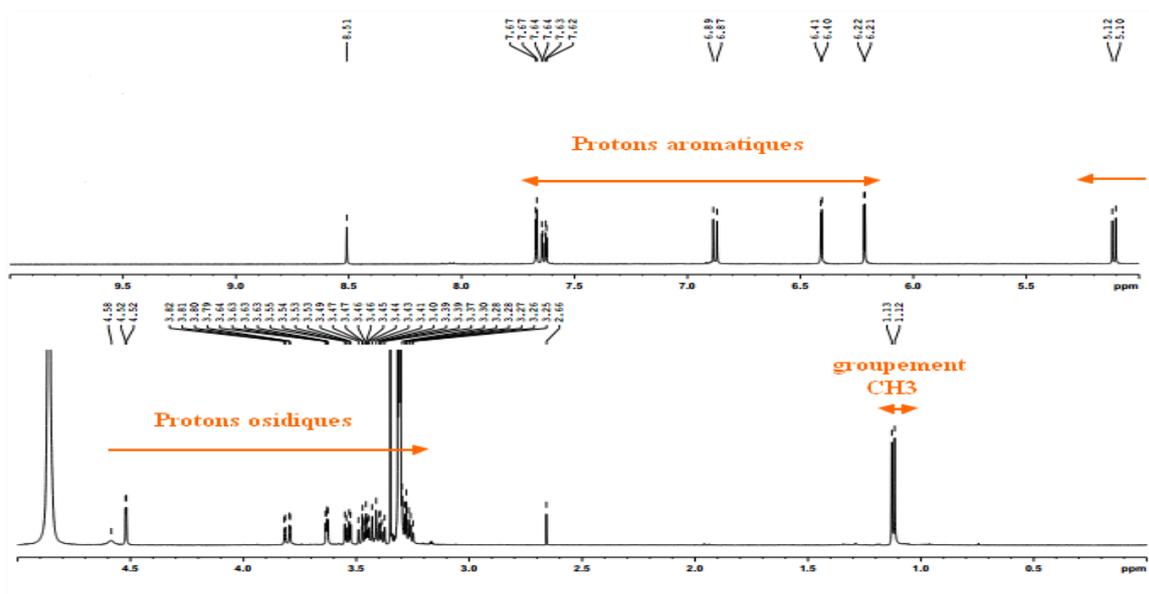


Figure III.6: Spectre RMN ^1H du composé AM1

Le spectre RMN ^1H (Figure III.7) présente :

- ✓ deux signaux de deux protons aromatiques à δ_{H} 6,21 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) et 6,40 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz), attribués respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7. Ceci est confirmé par expérience COSY H-H (Figure III.8).
- ✓ trois signaux déblindés résonant à δ_{H} 7,67 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz), 7,63 (1H, *dd*, $J = 8,5 ; 2,1$ Hz) et 6,87 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz), attribuables respectivement aux protons H-2', H-6' et H-5' du cycle B disubstitué en positions 3' et 4' comme le montre également l'expérience COSY H-H (Figure III.8).

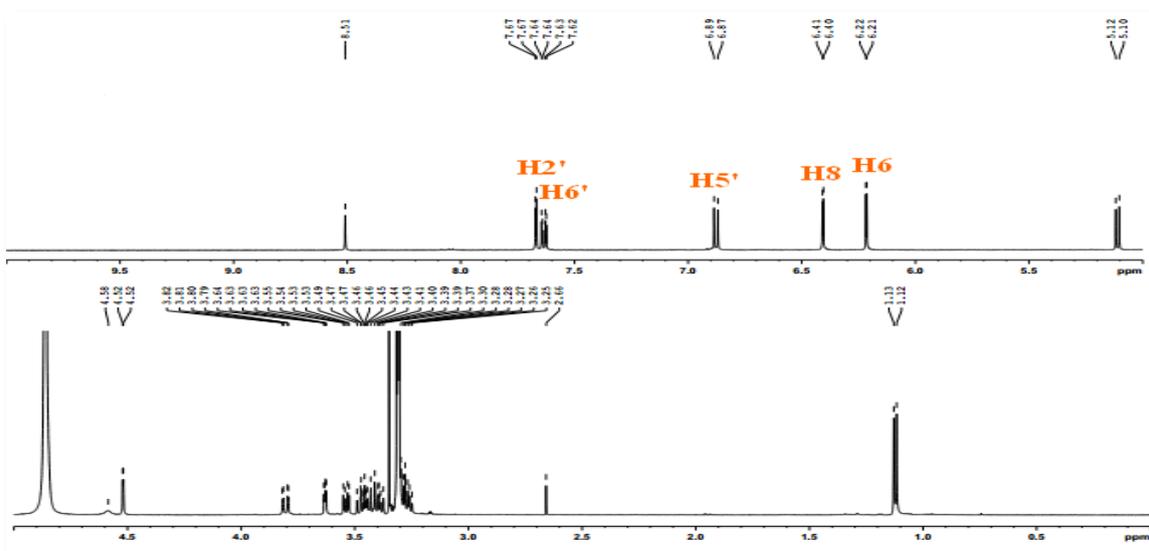


Figure III.7: Spectre RMN ^1H du composé AM1

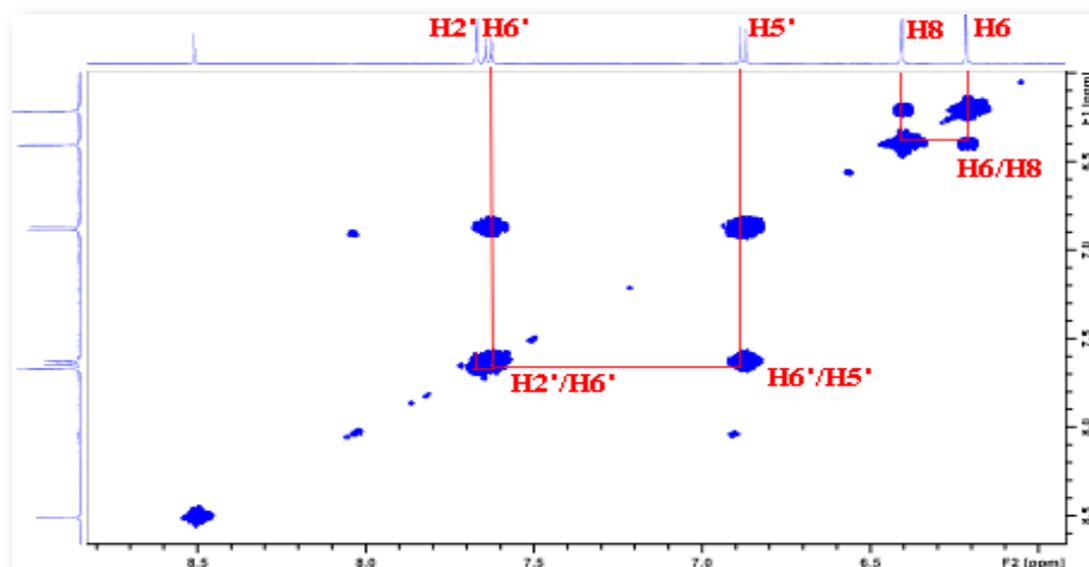


Figure III.8: Spectre COSY H-H du composé AM1

- ✓ plusieurs signaux de protons osidiques sortant dans l'intervalle 3,25-3,85 ppm. L'observation de deux signaux d'intégration 1H chacun à δ_H 4,52 (H-1''', $d, J = 1,5$ Hz) et 5,11 (H-1'', $d, J = 7,9$ Hz) très caractéristiques de protons anomères de sucre, traduit la présence de deux unités osidiques. En outre, la présence d'un groupement méthyle à δ_H 1,12 ($d, J = 6,2$ Hz) et la constante de couplage du premier proton anomère cité (H-1''', $d, J = 1,5$ Hz) autorisent à avancer l'hypothèse qu'une des deux unités osidiques est un rhamnose de configuration α .

A partir des protons cités précédemment, l'expérience hétéronucléaire HSQC permet d'identifier les carbones qui les portent (Figure III.9). Ces derniers sont repérés à δ_C 100,1 (C-6), 95,0 (C-8), 117,8 (C-2'), 123,7 (C-6'), 116,2 (C-5'), 104,9 (C-1'') et 102,6 (C-1''').

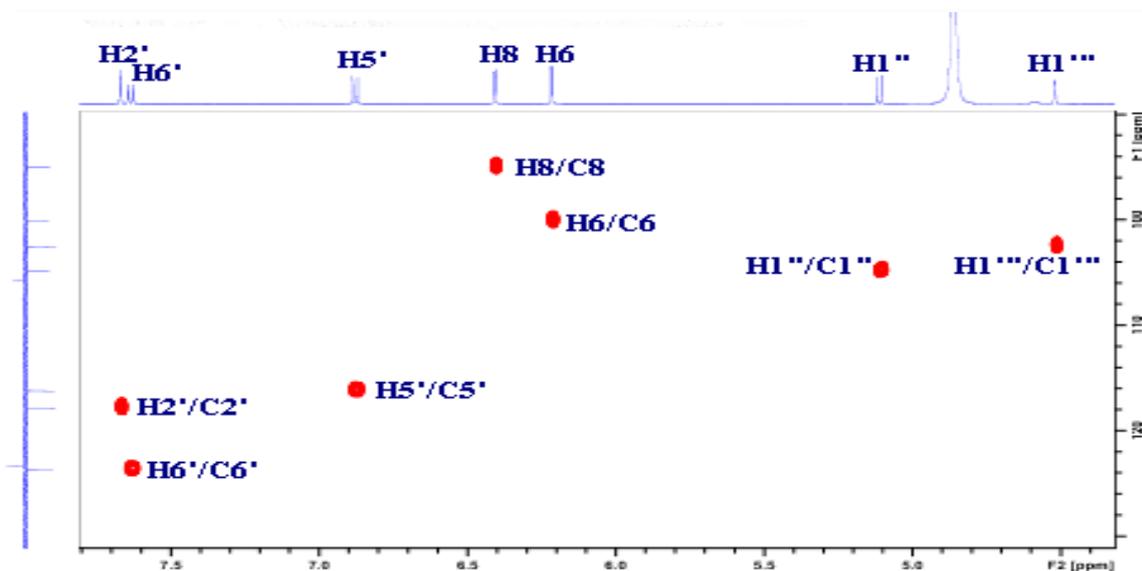


Figure III.9: Spectre HSQC du composé AM1

A l'issue de cette première analyse, il apparait que le composé AM1 est un flavonoïde disubstitué sur les cycles A et B. Il est aussi porteur de deux unités osidiques dont il reste à identifier et confirmer leur nature ainsi que leur point de branchement sur l'aglycone qu'il faut aussi identifier.

Identification de la partie aglycone

L'identification de la génine à un flavonol, plus précisément une quercétine glycosylée en C-3, a été établie sur la base de la valeur de déplacement chimique très caractéristique du carbone C-2 égale à 159,5 ppm, déduite par analyse HMBC qui montre clairement une corrélation entre les protons H-2'/H-6' du cycle B et ce carbone.

L'analyse du spectre HMBC (Figure III.10) permet de visualiser les corrélations entre :

- ✓ le proton H-5' (δ_H 6,88) du cycle B et trois carbones quaternaires résonant à δ_C 123,3, 146,0 et 149,9 attribuables respectivement aux carbones C-1', C-3' et C-4'. Ces deux derniers sont oxygénés.
- ✓ les protons H-2' (δ_H 7,67)/H-6' (δ_H 7,63) et le carbone quaternaire oxygéné C-4' (δ_C 149,9).
- ✓ le proton H-8 (δ_H 6,40) et trois carbones quaternaires à δ_C 105,8, 158,7 et 166,3 attribuables respectivement aux carbones C-10, C-9 et C-7. Ces deux derniers sont oxygénés.
- ✓ le proton H-6 (δ_H 6,21) et deux carbones quaternaires oxygénés à δ_C 163,2 et 166,3, ne pouvant être que C-5 et C-7.

Le spectre HMBC permet d'observer également les couplages H-6/C-8, H-5'/C-3', H-2'/C-6' et H-6'/C-2'.

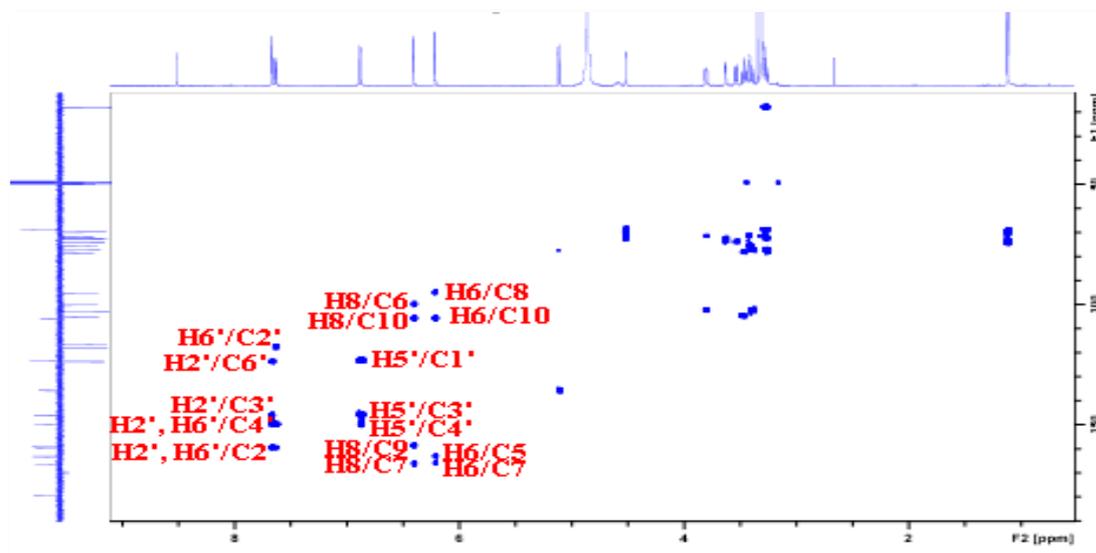
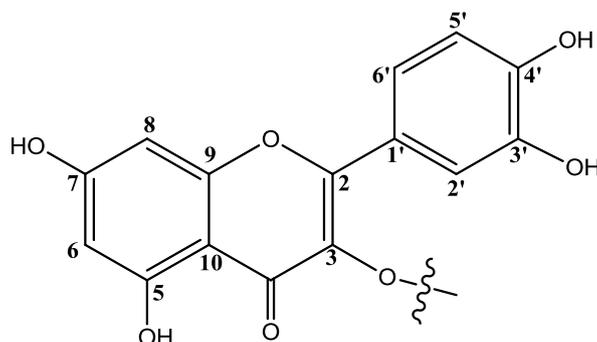


Figure III.10: Spectre HMBC de la partie aglycone du composé AM1

Le signal résonant à δ_C 135,7 attribuable au carbone C-3 est confirmé par HMBC du fait de sa corrélation longue distance avec le proton anomère (δ_H 5,11) d'une unité osidique. Le signal apparaissant à 179,6 ppm est attribué au carbone du carbonyle (C-4).

Toutes ces données spectrales permettent d'identifier l'aglycone comme étant la quercétine glycosylée en C-3 [218].



Identification de la partie osidique

L'analyse RMN 1H a montré l'existence de deux unités osidiques par l'observation de deux signaux de protons anomères à δ_H 5,11 (*d*, $J = 7,9$ Hz, H-1'') et δ_H 4,52 (*d*, $J = 1,5$ Hz, H-1'''). Les carbones anomères sont repérés à δ_C 104,9 (C-1'') et 102,6 (C-1''') sur le spectre HSQC (Figure III.11).

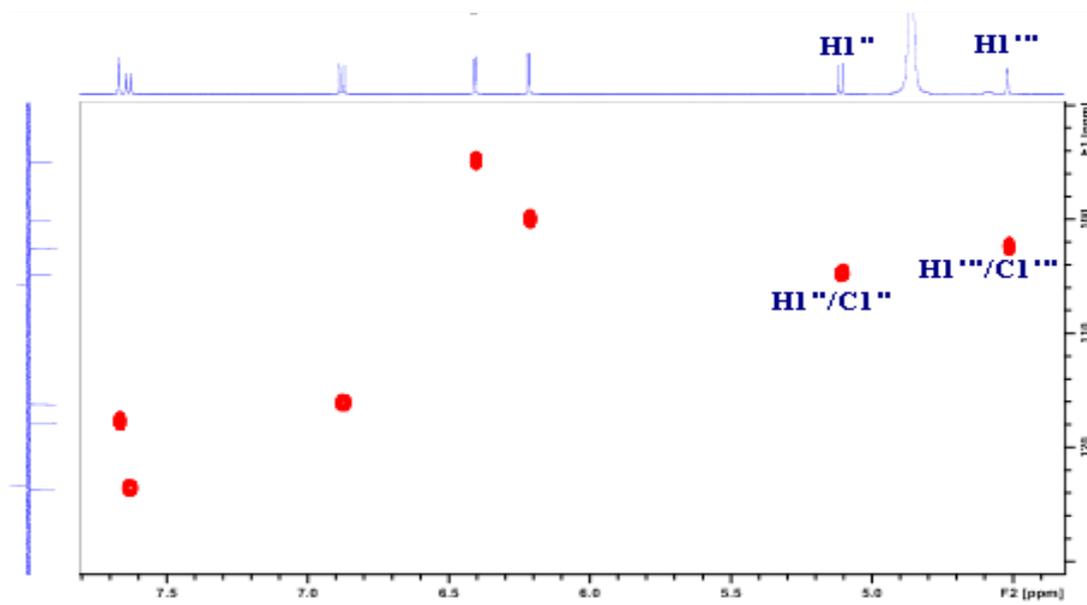


Figure III.11: Spectre HSQC montrant les protons et carbones anomères

A partir du proton anomère nommé H-1'' (δ_H 5,11), l'analyse du spectre COSY H-H (Figure III.12) permet d'identifier un système de spins à sept protons d'un hexose, à travers les couplages H-1''/H-2'' (δ_H 3,46, *t*, $J = 7,9$ Hz, H-2''), H-2''/H-3'' (δ_H 3,41, *t*, $J = 7,9$ Hz, H-

3"), H-3"/H-4" (δ_H 3,25, *dd*, 9,3/7,9), H-4"/H-5" (δ_H 3,30, *ddd*, 9,3/4,7/1,9), H-5"/H-6" (δ_H 3,81, *dd*, $J = 11,0 ; 4,7$ Hz, H-6"a / δ_H 3,37, *dd*, $J = 11,0 ; 1,9$ Hz, H-6"b). Toutes ces données permettent d'identifier cet hexose à un β -D-glucose ($J_{1-2} = 7,9$ Hz).

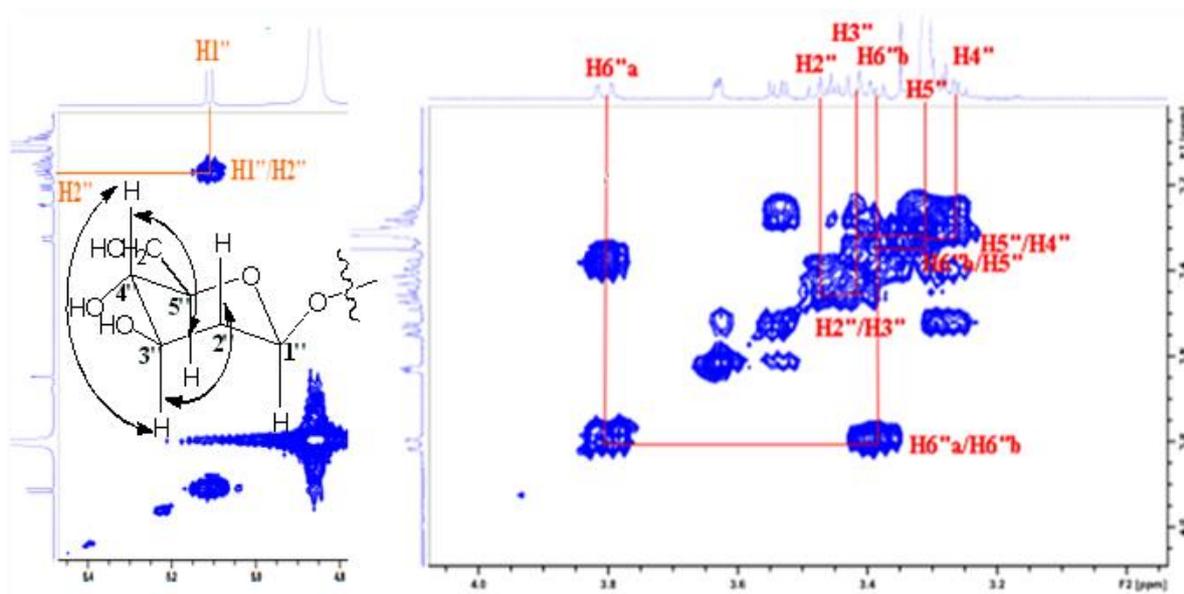


Figure III.12: Spectre COSY H-H du β -D-glucose

A partir du deuxième proton anomère H-1''' (δ_H 4,52), le spectre COSY H-H (Figure III.13) montre un système de spins à huit protons d'un rhamnose au vu des couplages H-1'''/H-2''' [δ_H 3,63 (*dd*, $J = 3,4 ; 1,5$ Hz)], H-2'''/H-3''' [δ_H 3,53 (*dd*, $J = 9,2 ; 3,4$ Hz)], H-3'''/H-4''' [δ_H 3,28 (*t*, $J = 9,2$ Hz)], H-4'''/H-5''' [δ_H 3,44 (*m*)] et H-5'''/H-3-6''' [δ_H 1,12 (*d*, $J = 6,2$ Hz)]. La valeur de la constante de couplage $J_{1''-2''} = 1,5$ Hz indique qu'il s'agit d'un α -L-rhamnose.

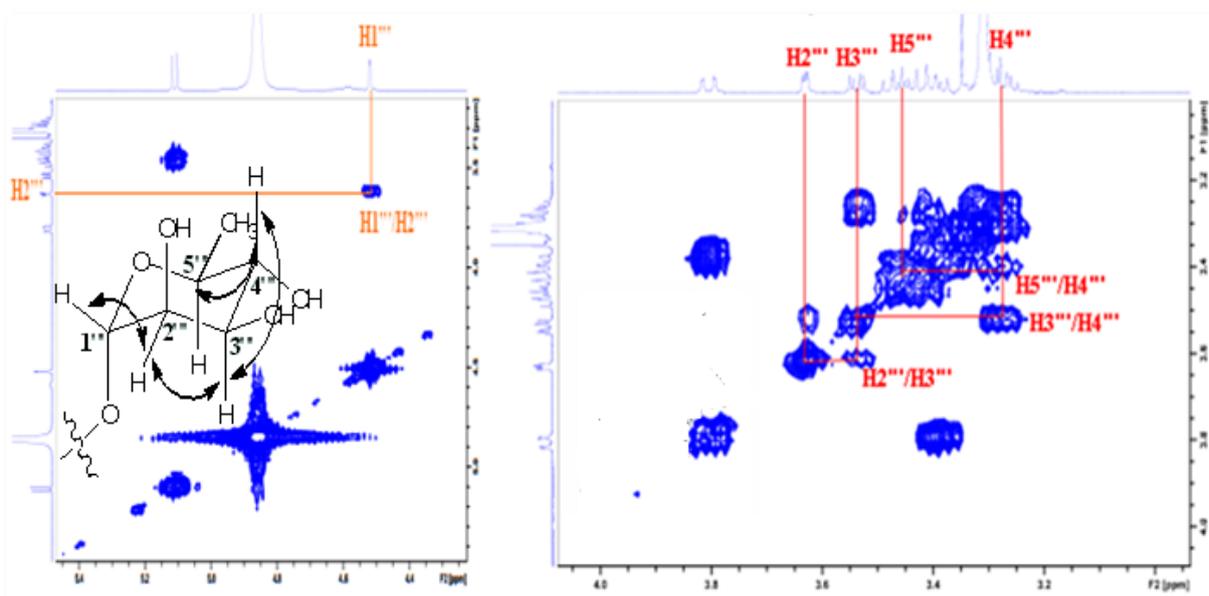


Figure III.13: Spectre COSY H-H du α -L-rhamnose

L'expérience HSQC (Figure III.14) a permis d'assigner les déplacements chimiques de tous les carbones des deux unités osidiques.

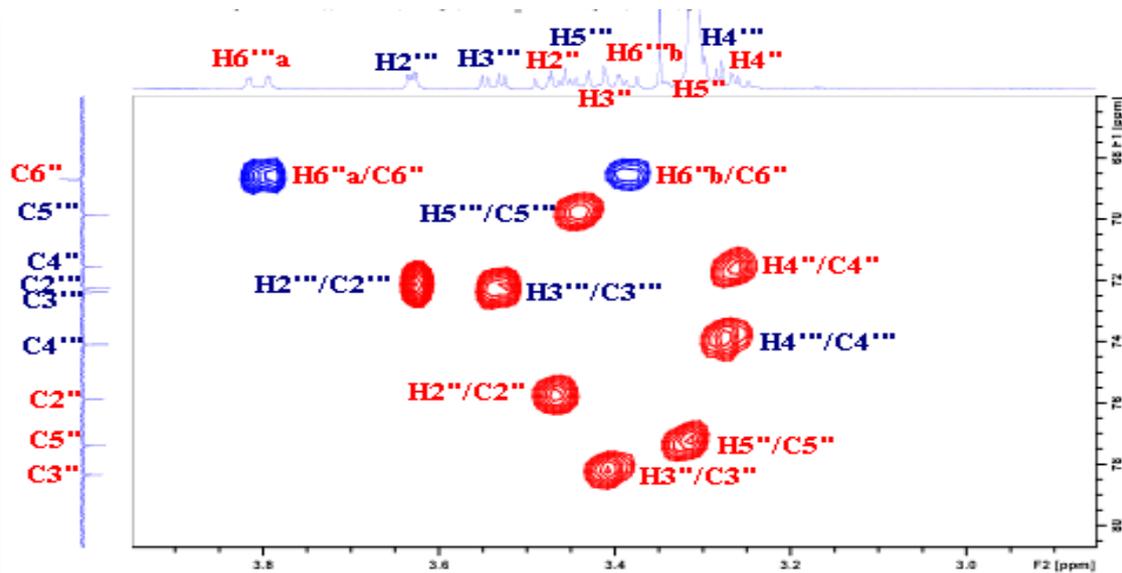


Figure III.14: Spectre HSQC de la partie osidique du composé AM1

Les sites de fixation des deux oses ont été confirmés par expérience HMBC (Figure III.15) qui montre les corrélations entre :

- ✓ le proton anomère H-1'' (δ_H 5,11) du glucose et le carbone C-3 (135,8 ppm) de la génine.
- ✓ le proton anomère H-1''' (δ_H 4,52) du rhamnose et le carbone C-6'' (68,7 ppm) du glucose.

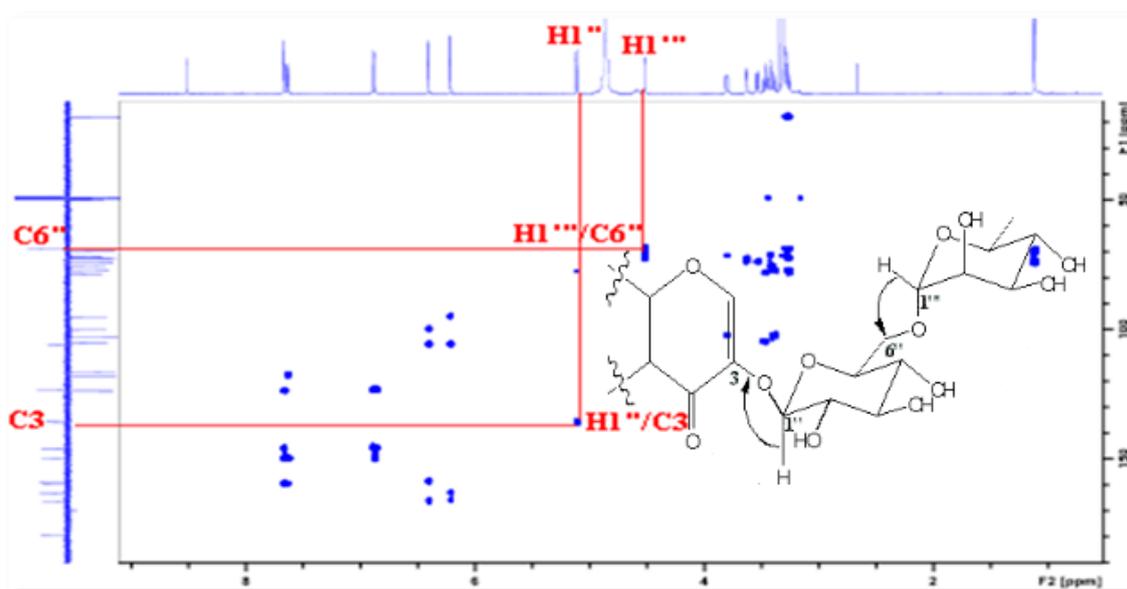
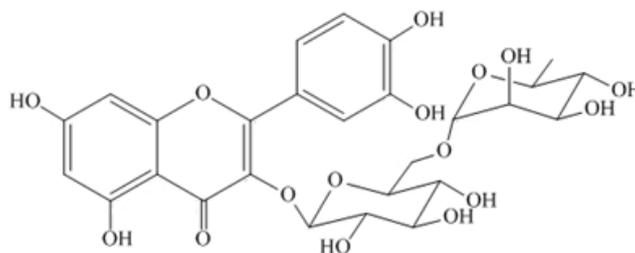


Figure III.15: Spectre HMBC montrant le branchement des sucres (composé AM1)

Toute cette analyse spectrale permet d'assigner sans ambiguïté pour ce flavonoïde, la structure suivante : quercétine 3-*O*-(6- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside.



Ce composé est connu sous le nom de rutine (quercétine-3-*O*-rutinoside). Il a été rencontré dans les plantes du genre *Astragalus* comme *A. corniculatus* Quim [84], *A. monspessulanus* L. poussant en Bulgarie [221] et *A. hamosus* [222].

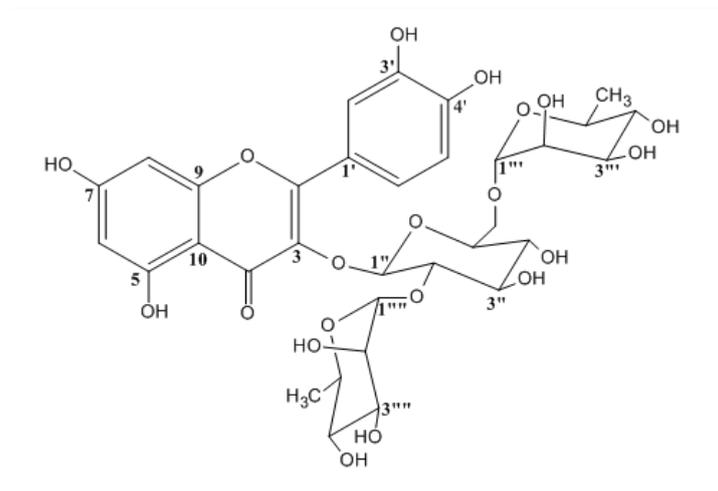
Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III.1.

Tableau III.1: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé AM1 dans MeOD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
2	159,5	/
3	135,8	/
4	179,6	/
5	163,2	/
6	100,1	6,21 (<i>d</i> , 2,1)
7	166,3	/
8	95,0	6,40 (<i>d</i> , 2,1)
9	158,7	/
10	105,8	/
1'	123,3	/
2'	117,8	7,67 (<i>d</i> , 2,1)
3'	146,0	/
4'	149,9	/
5'	116,2	6,88 (<i>d</i> , 8,5)
6'	123,7	7,63 (<i>dd</i> , 8,5 / 2,1)
1''	104,9	5,11 (<i>d</i> , 7,9)
2''	75,9	3,46 (<i>t</i> , 7,9)
3''	78,3	3,41 (<i>t</i> , 7,9)
4''	71,5	3,25 (<i>dd</i> , 9,3 / 7,9)
5''	77,4	3,30 (<i>ddd</i> , 9,3 / 4,7 / 1,9)
6''	68,7	3,81 (<i>dd</i> , 11,0 / 4,7) 3,37 (<i>dd</i> , 11,0 / 1,9)
1'''	102,6	4,52 (<i>d</i> , 1,5)
2'''	72,3	3,63 (<i>dd</i> , 3,4 / 1,5)

3'''	72,4	3,53(<i>dd</i> , 9,2 / 3,4)
4'''	74,1	3,28 (<i>t</i> , 9,2)
5'''	69,9	3,44 (<i>m</i>)
6'''	18,0	1,12 (<i>d</i> , 6,2)

III.4.3.2 Identification structurale du composé AM2



Quercétine 3-*O*-(2,6- α -L-dirhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (AM2)

Le composé AM2, visible en UV (254 nm), se présente sous forme d'aiguilles de couleur jaune pâle. Il est soluble dans le méthanol. La tache jaune qu'elle présente en CCM, après révélation par une solution de vanilline sulfurique et chauffage, oriente également vers un composé à structure flavonoïdique.

Le spectre de masse ESI⁺ (Figure III.16) du composé AM2 montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 779,3$ [M+Na]⁺, soit une masse moléculaire égale à 756 uma correspondant à une formule brute en C₃₃H₄₀O₂₀.

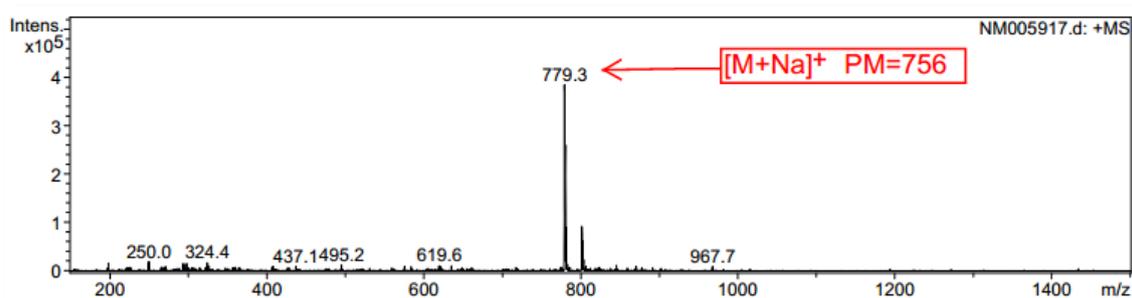


Figure III.16: Spectre de masse ESI⁺ du composé AM2

Les spectres RMN ¹H et COSY H-H (Figures III.17 et III.18) enregistrés dans MeOD montrent beaucoup de similitudes avec celui du composé AM1, notamment au niveau de l'aglycone (quercétine). En effet, on identifie aisément les protons :

- ✓ H-6 et H-8 repérés respectivement à 6,19 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) et 6,37 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz).
- ✓ H-2', H-6' et H-5' sortant respectivement à 7,62 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz), δ_H 7,60 (1H, *dd*, $J = 8,1 ; 2,1$ Hz) et 6,87 (1H, *d*, $J = 8,1$ Hz).

Le spectre RMN ^1H (Figure III.17) met aussi en évidence la présence de deux groupements méthyles à travers deux signaux doublets à δ_H 1,00 (3H, *d*, $J = 5,6$ Hz) et δ_H 1,08 (3H, *d*, $J = 5,9$ Hz).

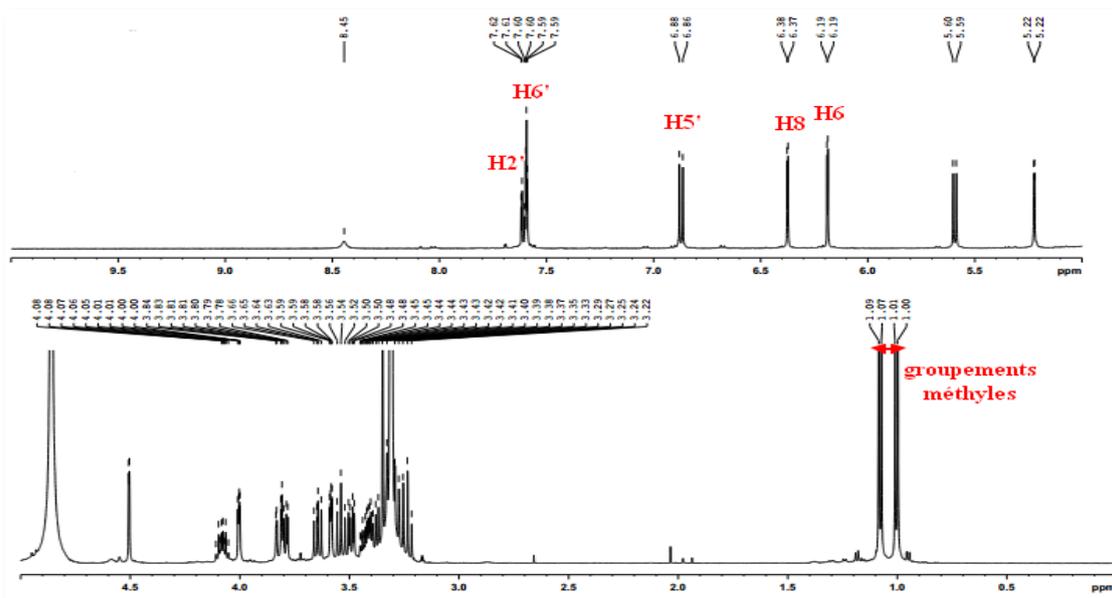


Figure III.17: Spectre RMN ^1H du composé AM2

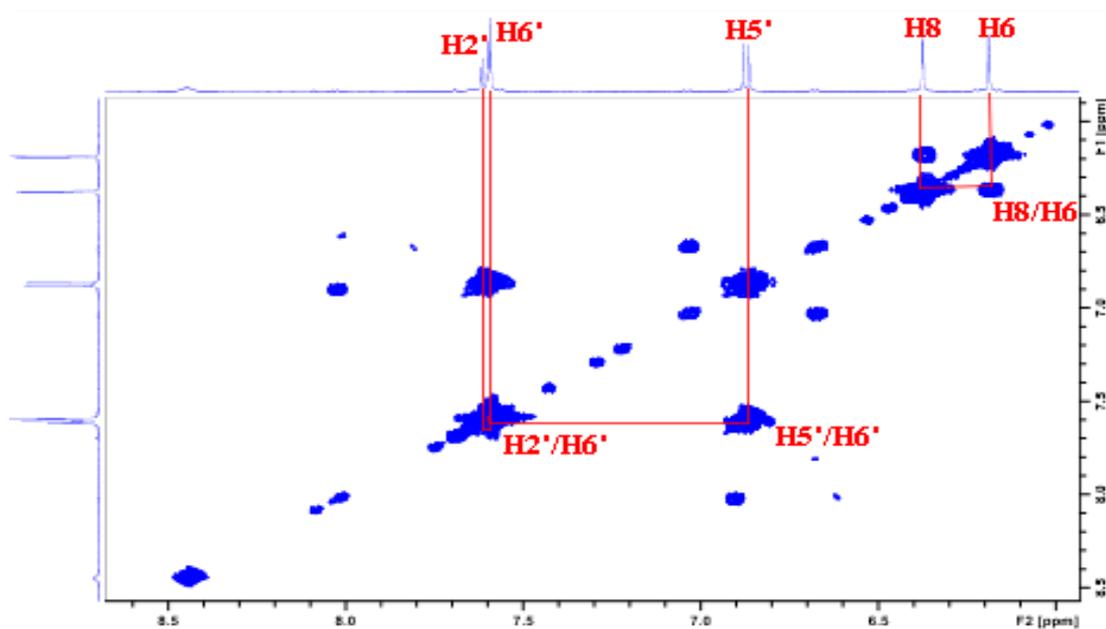


Figure III.18: Spectre COSY H-H du composé AM2

Par ailleurs, l'observation de plusieurs signaux dans l'intervalle 3,22-4,10 ppm ainsi que trois signaux d'intégration 1H chacun à δ_H 4,50 (H-1''', $d, J = 1,6$ Hz), 5,22 (H-1'', $d, J = 1,6$ Hz) et 5,59 (H-1', $d, J = 7,8$ Hz) caractéristiques de protons anomères, établit la présence de trois unités osidiques. La valeur de constante de couplage des deux premiers protons ($d, J = 1,6$ Hz) et la présence de deux groupements méthyles ($d, J = 5,9$ Hz) observés sur le spectre RMN 1H autorisent clairement à suggérer que deux unités osidiques sont des rhamnopyranoses de configuration α .

A partir des protons cités précédemment, l'expérience hétéronucléaire HSQC permet d'identifier les carbones qui les portent (Figure III.19). Ces derniers sont repérés à δ_C 99,9 (C-6), 94,8 (C-8), 117,5 (C-2'), 123,7 (C-6'), 116,2 (C-5'), 100,6 (C-1''), 102,8 (C-1'''), 102,4 (C-1''), 17,6 (C-6'') et 17,9 (C-6''').

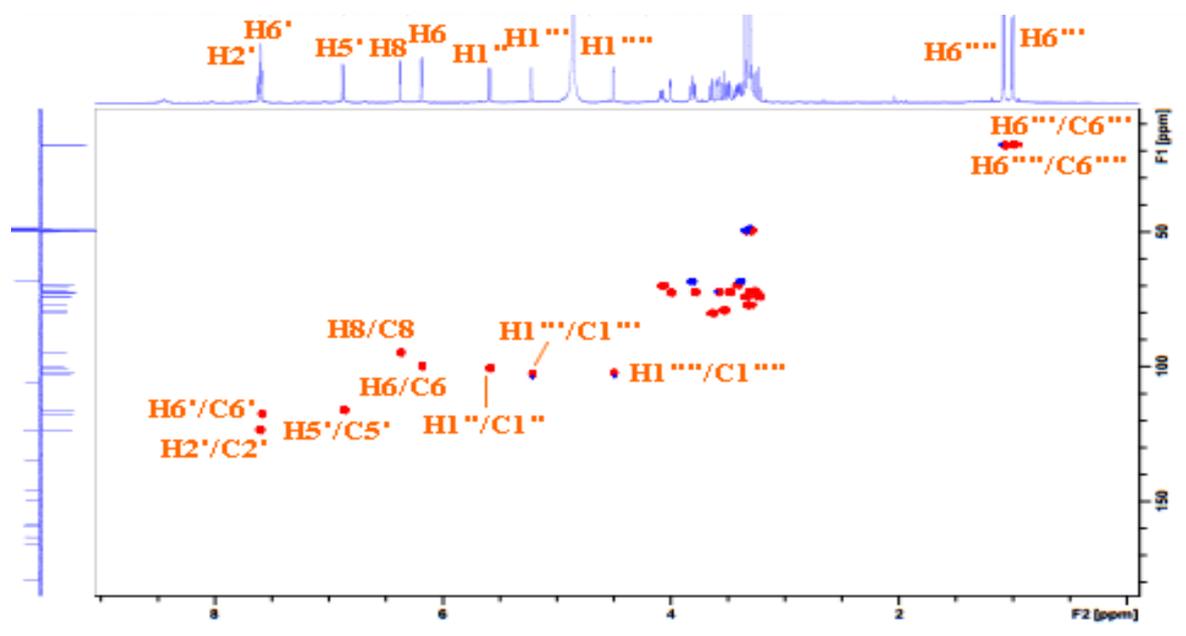


Figure III.19: Spectre HSQC du composé AM2

Identification de la partie aglycone

L'identification de la génine à une quercétine glycosylée en C-3, a été confirmée sur la base de la valeur de déplacement chimique très caractéristique du carbone C-2 égale à 159,1 ppm, déduite par analyse HMBC qui montre clairement une corrélation entre les protons H-2'/H-6' du cycle B et ce carbone.

L'analyse du spectre HMBC (Figure III.20) permet de retrouver toutes les corrélations observées pour le composé AM1.

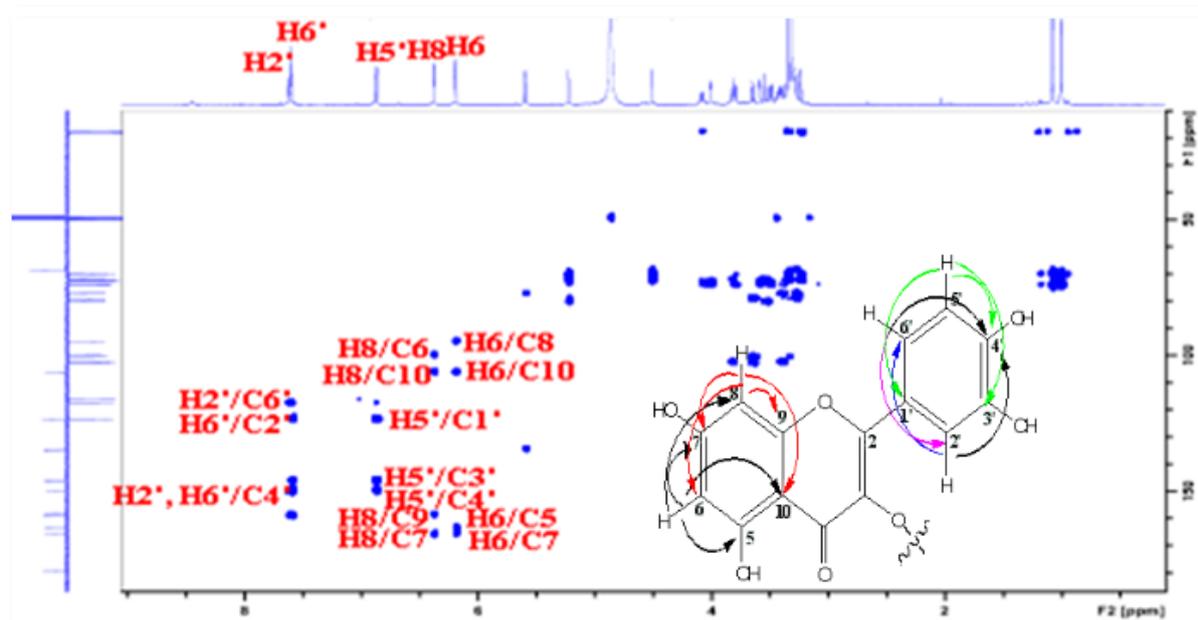
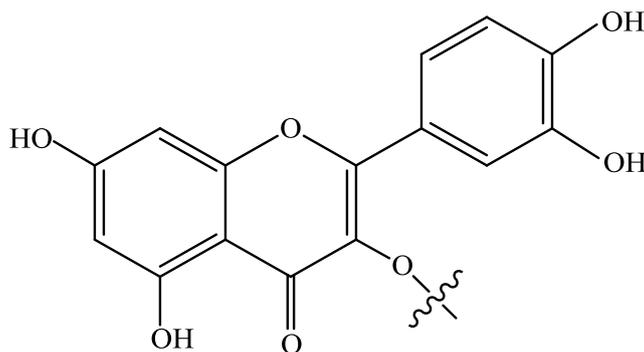


Figure III.20: Spectre HMBC de la partie aglycone du composé AM2

Le signal résonant à δ_c 134,6 attribuable au carbone C-3 est confirmé du fait de sa corrélation longue distance avec le proton anomère H-1'' (δ_H 5,59) d'une unité osidique. Le signal apparaissant à 179,5 ppm est attribué au carbone du carbonyle (C-4).

Toutes ces données spectrales ainsi que la comparaison avec celles de la littérature [223] permettent d'identifier l'aglycone comme étant la quercétine porteuse d'au moins une unité osidique en C-3.



Identification de la partie osidique

L'analyse RMN 1H a montré l'existence de trois unités osidiques par l'observation de trois signaux de protons anomères à δ_H 5,59 (*d*, $J = 7,8$ Hz, H-1''), 5,22 (*d*, $J = 1,6$ Hz, H-1''') et 4,50 (*d*, $J = 1,6$ Hz, H-1''''). Leurs carbones sont repérés à δ_c 100,6 (C-1''), 102,8 (C-1''') et 102,4 (C-1''') sur le spectre HSQC (Figure III.21).

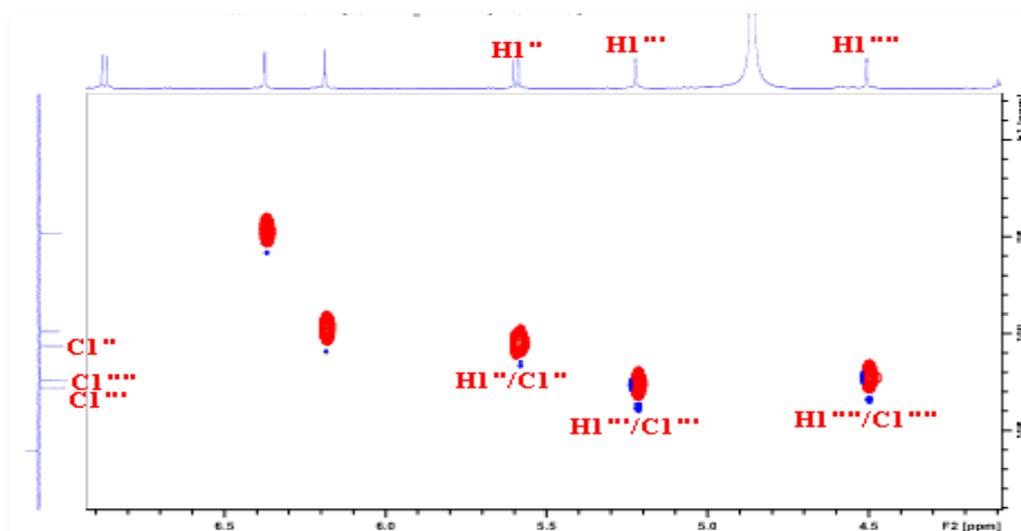


Figure III.21: Spectre HSQC montrant les protons et carbones anomères (AM2)

A partir du proton anomère nommé H-1'' (δ_H 5,59), l'analyse du spectre COSY H-H (Figure III.22) permet d'identifier un système de spins à sept protons d'un hexose, et cela à travers les couplages H-1''/H-2'' (δ_H 3,63, *dd*, $J = 8,8 ; 7,8$ Hz.), H-2''/H-3'' (δ_H 3,54, *t*, $J = 8,8$ Hz.), H-3''/H-4'' (δ_H 3,28, *m*), H-4''/H-5'' (δ_H 3,33, *m*), H-5''/H-6'' (δ_H 3,38, *m*, H-6''a / δ_H 3,83, *dd*, $J = 11,5 ; 1,6$ Hz, H-6''b). Ces données permettent d'identifier un β -D-glucose ($J_{1,2} = 7,8$ Hz).

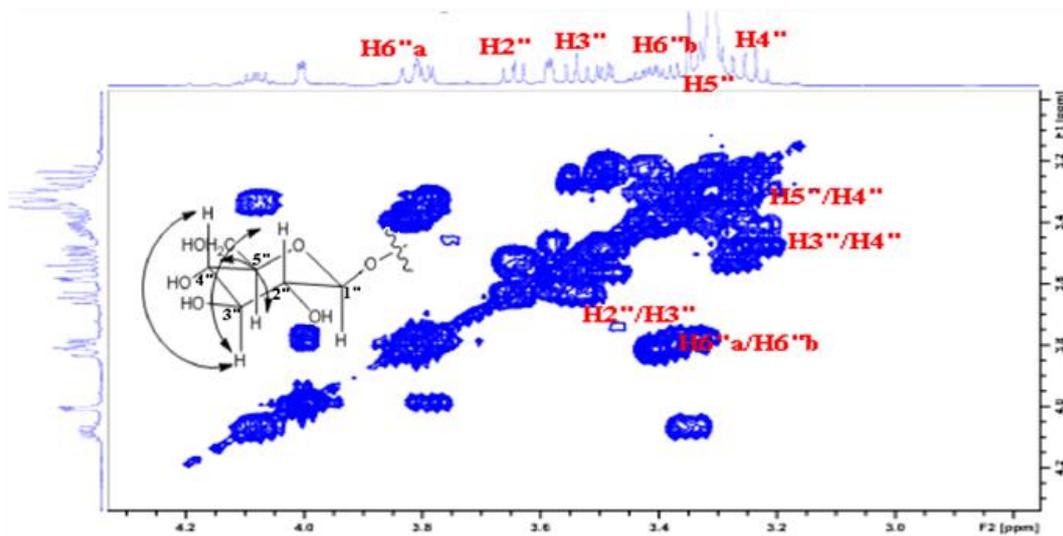


Figure III.22: Spectre COSY H-H du β -D-glucose (AM2)

A partir du deuxième proton anomère H-1''' (δ_H 5,22), la même analyse (Figure III.23) montre un système de spins à huit protons d'un rhamnose au vu des couplages H-1'''/H-2''' [δ_H 4,01 (*dd*, $J = 3,8 ; 1,6$ Hz)], H-2'''/H-3''' [δ_H 3,81 (*dd*, $J = 9,8 ; 3,8$ Hz)], H-3'''/H-4''' [δ_H 3,32 (*m*)], H-4'''/H-5''' [δ_H 3,43 (*m*)] et H-5'''/H-6''' [δ_H 1,00 (*d*, $J = 5,6$ Hz)]. La valeur de la constante de couplage $J_{1''',2'''} = 1,6$ Hz indique qu'il s'agit d'un α -L-rhamnose.

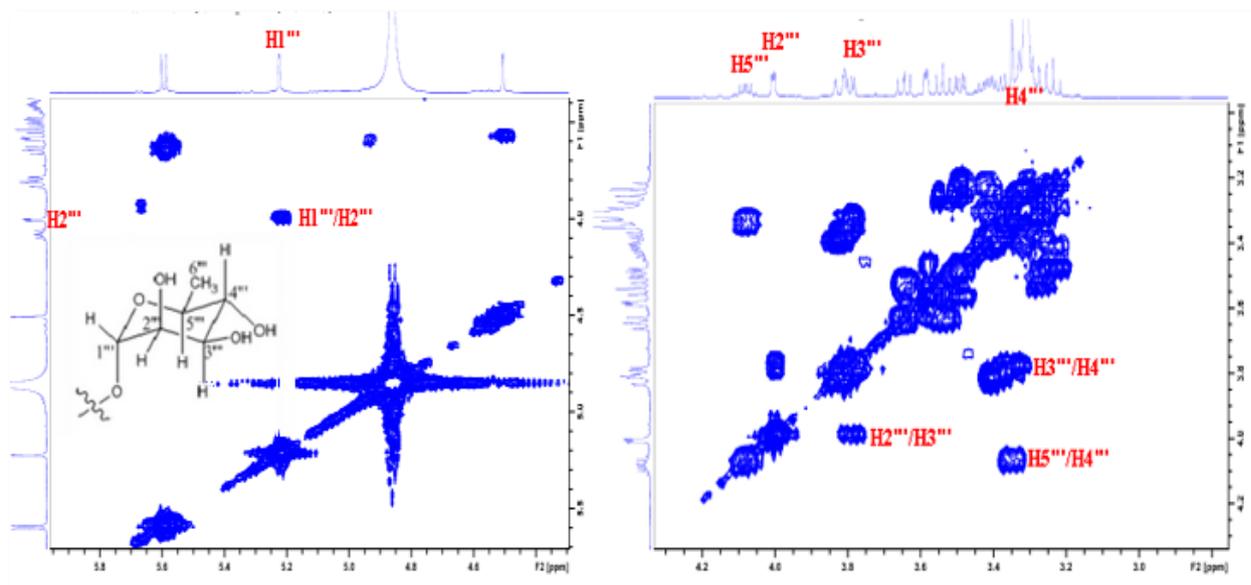


Figure III.23: Spectre COSY H-H du α -L-rhamnose (AM2)

Partant du troisième proton anomère H-1''' (δ_H 4,50), on identifie un autre rhamnopyranose au vu des couplages H-1'''/H-2''' [δ_H 3,58 (*dd*, $J = 3,4; 1,6$ Hz)], H-2'''/H-3''' [δ_H 3,50 (*dd*, $J = 9,4; 3,4$ Hz)], H-3'''/H-4''' [δ_H 3,24 (*t*, $J = 9,4$ Hz)], H-4'''/H-5''' [δ_H 4,07 (*m*)] et H-5'''/H3-6''' [δ_H 1,08 (*d*, $J = 5,9$ Hz)]. La valeur de la constante de couplage $J_{1'''-2'''} = 1,6$ Hz indique qu'il s'agit d'un α -L-rhamnose.

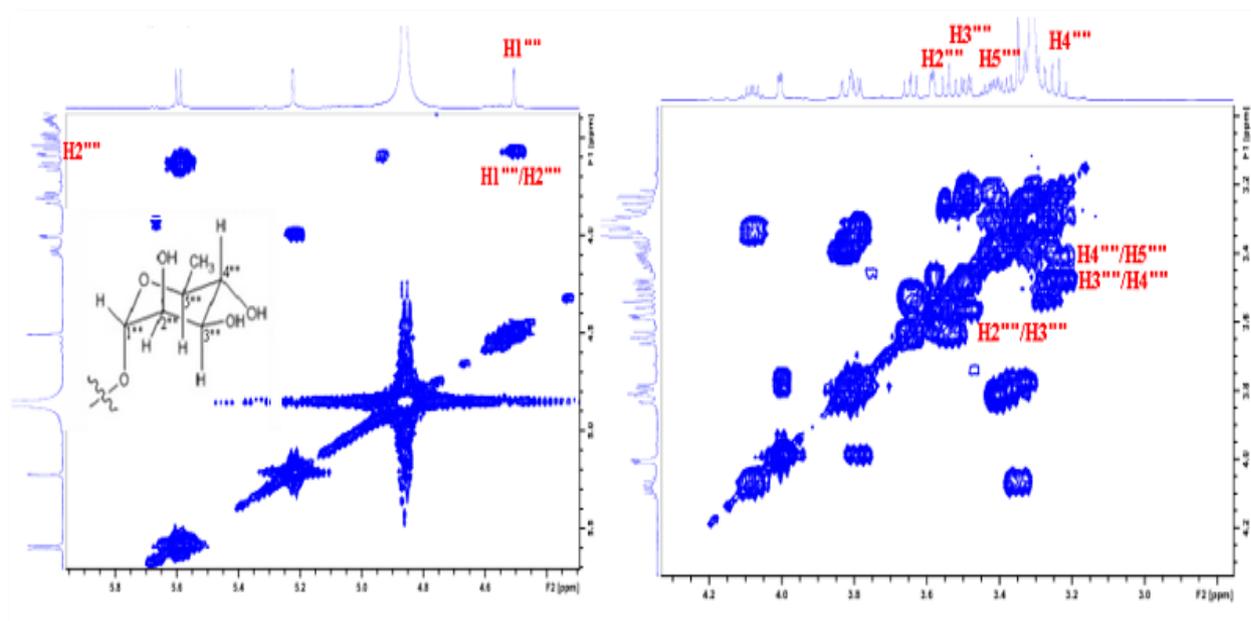


Figure III.24: Spectre COSY H-H du α -L-rhamnose

L'expérience HSQC (Figure III.25) a permis d'assigner les déplacements chimiques de tous les carbones des trois unités osidiques.

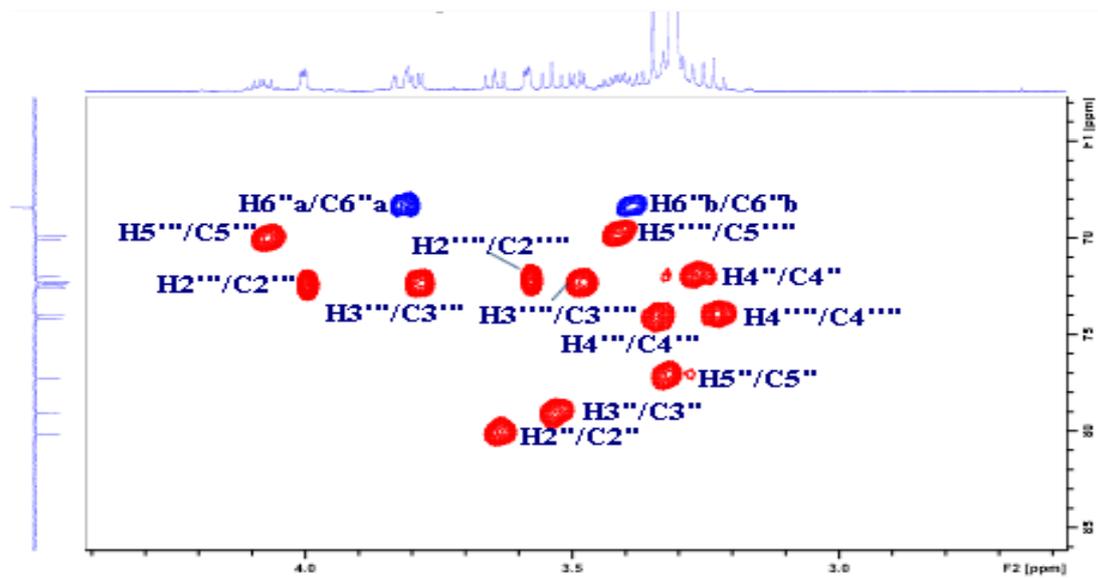


Figure III.25: Spectre HSQC de la partie osidique du composé AM2

La séquence et les sites de fixation des trois oses ont été déterminés par expérience HMBC (Figure III.26) qui illustre la nature monodesmosidique du composé, et cela à travers les corrélations entre :

- ✓ le proton anomère H-1'' (δ_H 5,59) du glucose et le carbone C-3 (134,6 ppm) de la génine.
- ✓ le proton anomère H-1''' (δ_H 5,22) du rhamnose et le carbone C-2'' (80,2 ppm) du glucose.
- ✓ le proton anomère H-1'''' (δ_H 4,50) du rhamnose et le carbone C-6'' (68,4 ppm) du glucose.

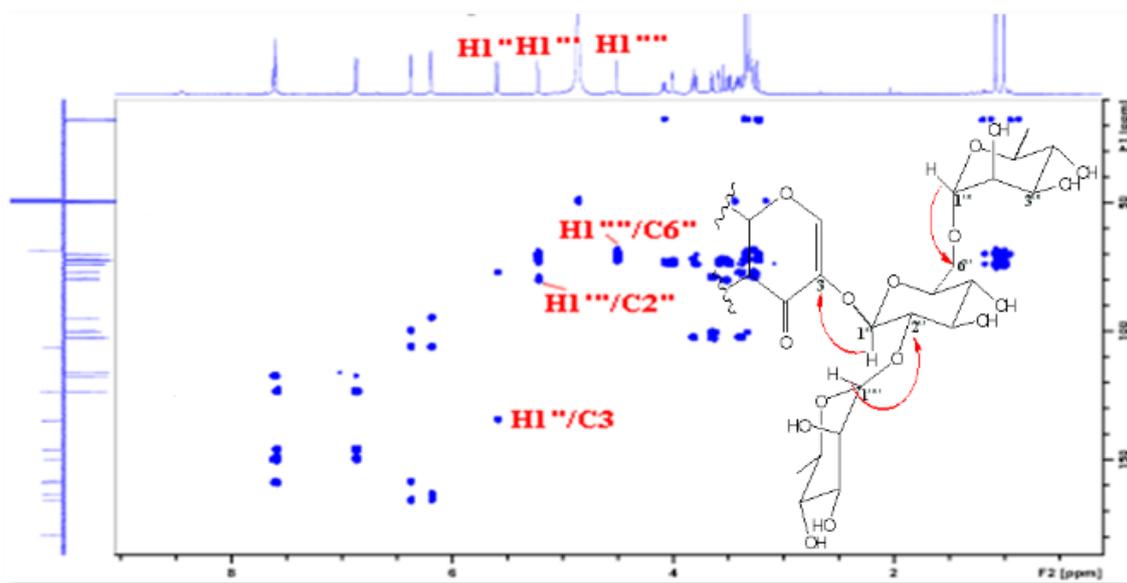
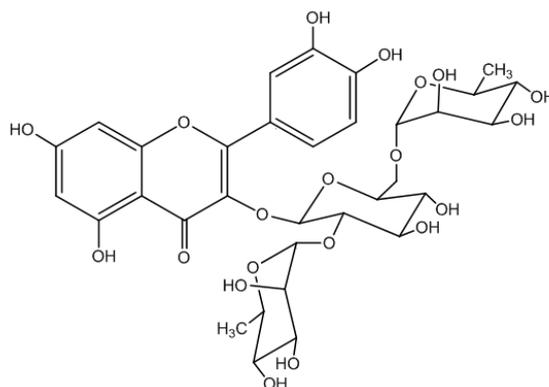


Figure III.26: Spectre HMBC montrant le branchement des sucres (Composé AM2)

Toute cette analyse spectrale permet d'assigner sans ambiguïté pour ce flavonoïde, la structure suivante : quercétine 3-O-(2, 6- α -L-dirhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside.



Ce composé connu sous le nom de Manghasline a été reporté précédemment dans les espèces *Ribes rubrum* (Grossulariaceae) [223], *Glycine max* (Fabaceae) [224] et originellement de *Cerbera manghas* (Apocynaceae) [225]. Il est identifié pour la première fois dans le genre *Astragalus*.

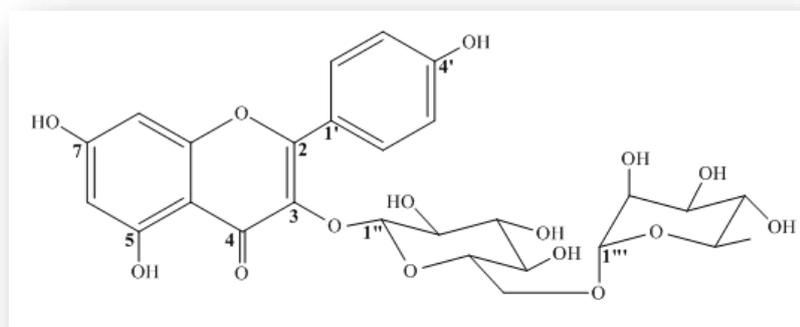
Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III.2.

Tableau III.2: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé AM2 dans MeOD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
2	159,1	/
3	134,6	/
4	179,5	/
5	163,3	/
6	99,9	6,19 (<i>d</i> , 2,1)
7	165,8	/
8	94,8	6,37 (<i>d</i> , 2,1)
9	158,6	/
10	106,1	/
1'	123,6	/
2'	117,5	7,62 (<i>d</i> , 2,1)
3'	146,1	/
4'	149,7	/
5'	116,2	6,87 (<i>d</i> , 8,1)
6'	123,7	7,60 (<i>dd</i> , 8,1 / 2,1)
1''	100,6	5,59 (<i>d</i> , 7,8)
2''	80,2	3,63 (<i>dd</i> , 8,8 / 7,8)
3''	79,1	3,54 (<i>t</i> , 8,8)
4''	72,0	3,28 (<i>m</i>)
5''	77,3	3,33 (<i>m</i>)
6''	68,4	3,38 (<i>m</i>)

		3,83 (dd, 11,5 / 1,6)
1'''	102,8	5,22 (d, 1,6)
2'''	72,4	4,01 (dd, 3,8 / 1,6)
3'''	72,3	3,81 (dd, 9,8 / 3,8)
4'''	74,2	3,32 (m)
5'''	70,1	3,43 (m)
6'''	17,6	1,00 (d, 5,6)
1''''	102,4	4,50 (d, 1,6)
2''''	72,5	3,58 (dd, 3,4 / 1,6)
3''''	72,4	3,50 (dd, 9,4 / 3,4)
4''''	74,0	3,24 (t, 9,4)
5''''	69,9	4,07 (m)
6''''	17,9	1,08 (d, 5,9)

III.4.3.3 Identification structurale du composé AM3



Kaempférol 3-O-rutinoside (AM3)

Le composé AM3, visible en UV (254 nm), se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Sa coloration jaune, après révélation par une solution de vanilline sulfurique et chauffage, traduit la nature flavonoïdique du composé.

Le spectre de masse ESI (Figure III.27) de ce composé, enregistré en mode négatif, montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 592,9$ $[M-H]^-$, correspondant à une masse moléculaire de 594 uma et une formule brute en $C_{27}H_{30}O_{15}$.

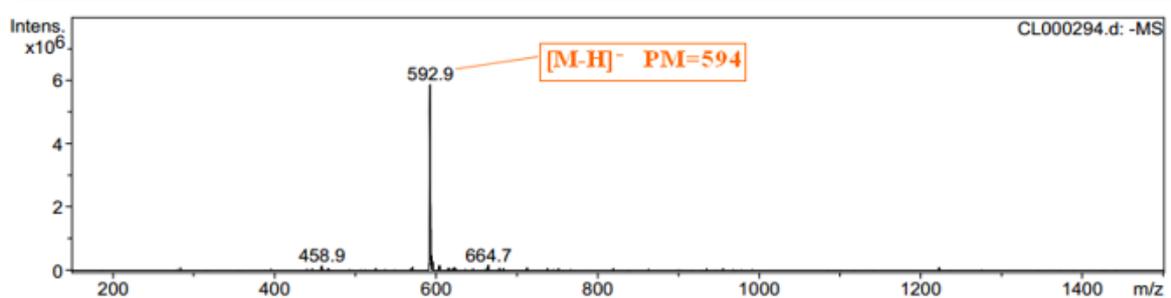


Figure III.27: Spectre de masse ESI⁻ du composé AM3

Le spectre RMN ^1H (Figures III.28) du composé AM3 enregistré dans MeOD montre des signaux de protons aromatiques résonant entre 6,1 et 8,1 ppm et osidiques entre 3,1 et 5,2 ppm, très caractéristiques d'un flavonoïde glycosylé. Ce spectre met aussi en évidence la présence d'un groupement méthyle à travers un signal doublet à δ_{H} 1,12 (3H, *d*, $J = 6,2$ Hz).

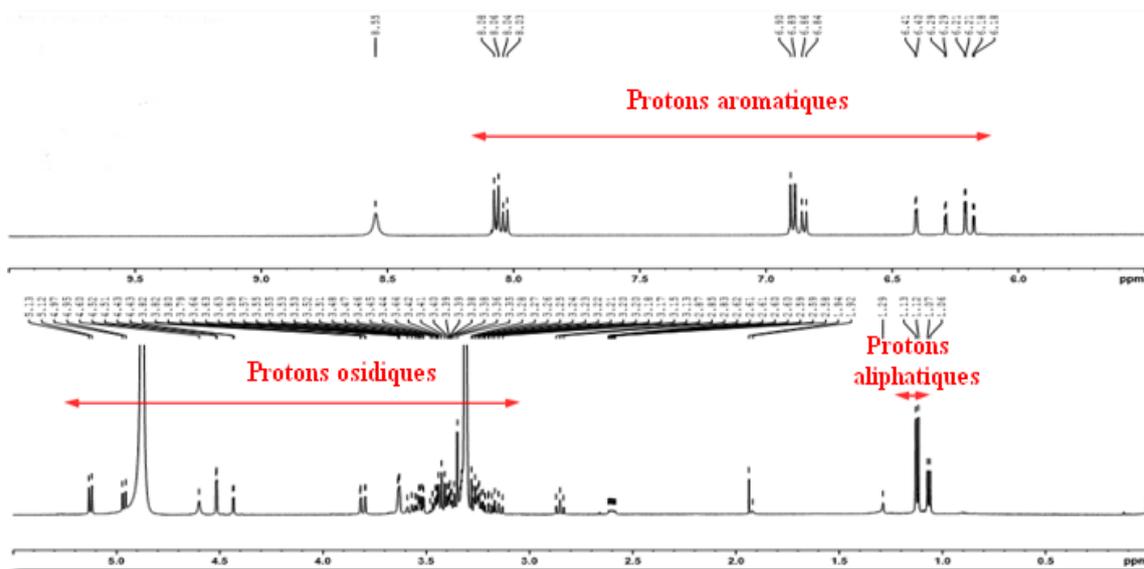


Figure III.28: Spectre RMN ^1H des composés AM3

Le spectre RMN ^1H (Figure III.29) du composé AM3 présente :

- deux signaux à δ_{H} 6,21 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) et δ_{H} 6,40 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) attribuables respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A du flavonoïde substitué en positions 5 et 7.
- deux signaux déblindés s'intégrant pour deux protons chacun sous forme de deux doublets résonant à δ_{H} 8,07 (2H, *d*, $J = 7,9$ Hz) et 6,89 (2H, *d*, $J = 7,9$ Hz), attribuables aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' du cycle B parasubstitué.

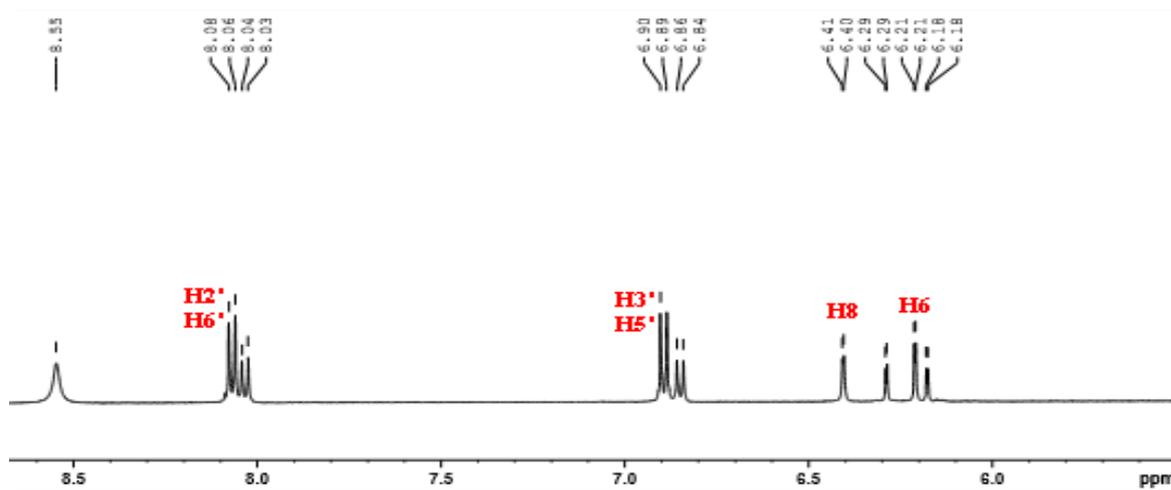
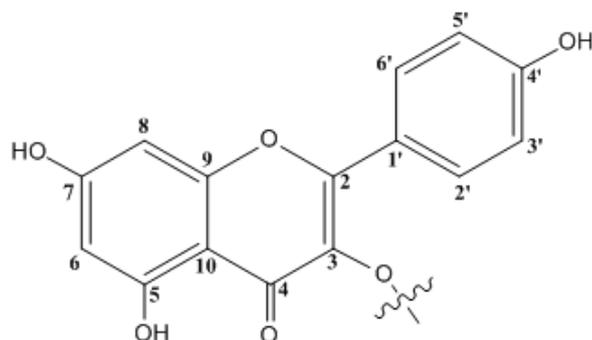


Figure III.29: Spectre RMN ^1H du composé AM3

Ces attributions confirmées par analyse COSY H-H (Figure III.30) suggèrent que le composé AM3 est un flavonol mais de type kaempférol.



Kaempférol

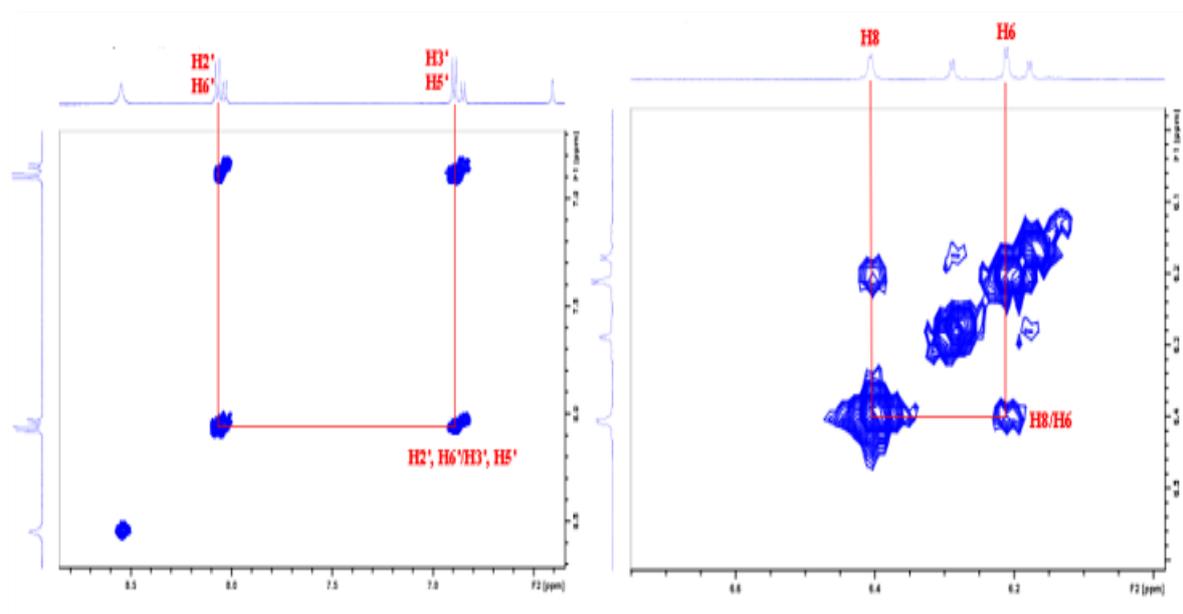


Figure III.30: Spectre COSY H-H du composé AM3

L'observation de plusieurs signaux dans l'intervalle 2,58-3,82 ppm ainsi que deux signaux d'intégration 1H chacun à δ_H 4,51 (d , $J = 1,4$ Hz) et 5,12 (d , $J = 7,6$ Hz), établit la présence de deux unités osidiques. La présence d'un groupement méthyle (d , $J = 6,4$ Hz) observé sur le spectre RMN ^1H et la constante de couplage du premier proton anomère (d , $J = 1,4$ Hz) suggèrent clairement qu'une des deux unités osidiques est un rhamnopyranose.

A partir des protons identifiés précédemment, l'expérience hétéronucléaire HSQC permet d'identifier les carbones qui les portent (Figure III.31). Ils sont repérés à δ_C 100,3 (C-6), 95,1 (C-8), 132,6 (C-2', C-6'), 116,3 (C-3', C-5'), 104,8 (C-1'') et 102,6 (C-1''').

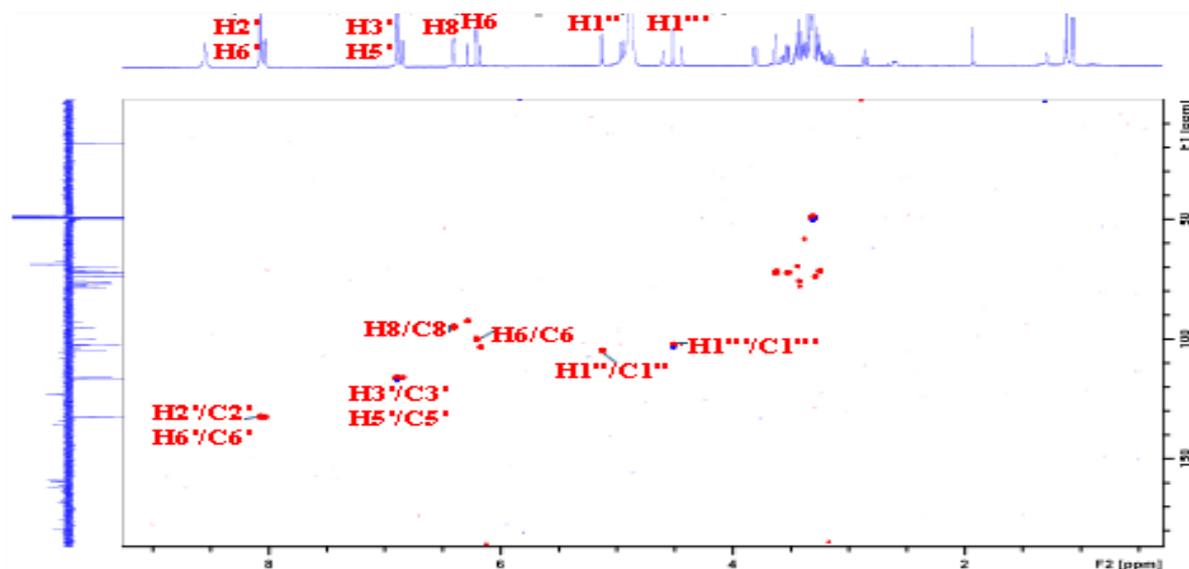


Figure III.31: Spectre HSQC du composé AM3

A l'issue de cette première analyse, il apparaît que le composé AM3, comme les composés décrits plus haut, est un flavonol de type kaempférol porteur de deux unités osidiques dont il reste à identifier et confirmer leur nature ainsi que leur point de branchement sur l'aglycone qui est aussi à identifier.

Identification de la partie aglycone

L'identification de la génine à un flavonol, plus précisément un kaempférol glycosylé en C-3, a été confirmée sur la base de la valeur de déplacement chimique très caractéristique du carbone C-2 égale à 159,7 ppm, déduite par analyse HMBC (Figure III.32) qui montre clairement une corrélation entre les protons H-2'/H-6' du cycle B et ce carbone. Elle montre aussi les corrélations entre :

- les protons H-3'/H-5' du cycle B et deux carbones quaternaires résonant à δ_C 122,9 et 161,6 attribuables respectivement aux carbones C-1' et C-4' oxygéné.
- les protons H-2'/H-6' et le carbone quaternaire C-4'.
- le proton H-8 (δ_H 6,40) et deux carbones quaternaires à δ_C 105,7 et 158,8 attribuables respectivement aux carbones C-10 et C-9 oxygéné.
- le proton H-6 (δ_H 6,15) et deux carbones quaternaires oxygénés à δ_C 163,0 et 166,0, ne pouvant être que C-5 et C-7.

Le même spectre (Figure III.32) permet de visualiser également les corrélations longue distance H-6/C-8, H-3'/C-5', H-5'/C-3', H-2'/C-6' et H-6'/C-2'.

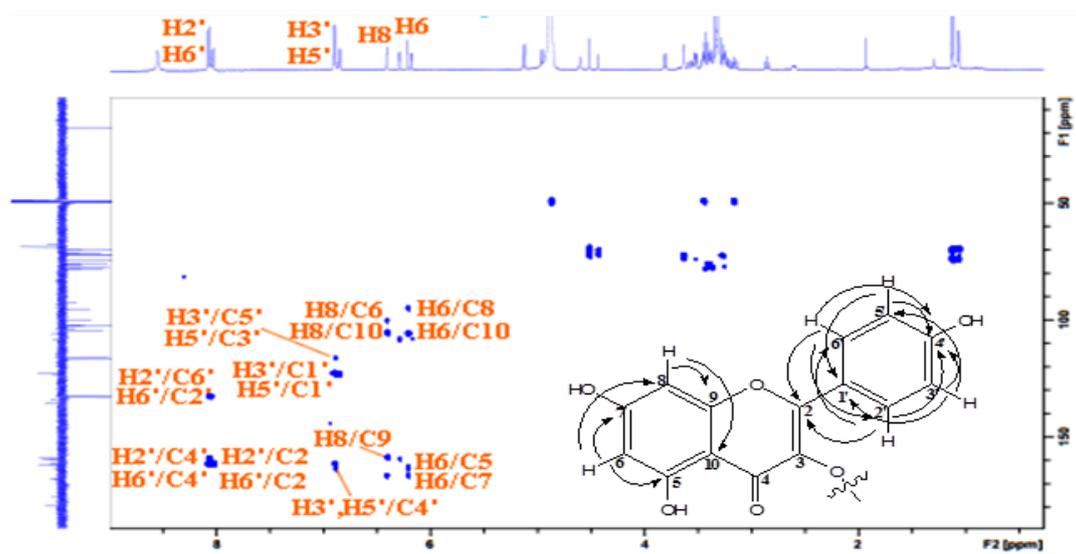


Figure III.32: Spectre HMBC de la partie aglycone du composé AM3

Le signal du carbone résonant à δ_C 135,7 est attribuable au carbone C-3 de la génine. La valeur de déplacement chimique de ce carbone confirme la glycosylation en cette position [219]. Le signal apparaissant à 179,6 ppm est attribué au carbone du carbonyle (C-4).

Identification de la partie osidique

Cette identification est évidemment effectuée au moyen de l'expérience COSY H-H. Partant du premier proton anomère nommé H-1'' [δ_H 5,12 (*d*, $J = 7,6$ Hz)], un système de spins à sept protons d'un hexose est visualisé à travers les corrélations (Figure III.33) : H-1''/H-2'' [δ_H 3,43 (*m*)], H-2''/H-3'' [δ_H 3,42 (*m*)], H-3''/H-4'' [δ_H 3,25 (*m*)], H-4''/H-5'' [δ_H 3,34 (*m*)] et H-5''/H-6'' [δ_H 3,38 (*m*, H-6''a) / δ_H 3,80 (*dd*, $J = 11,6 ; 1,8$ Hz, H-6''b)].

Ces données sont typiques d'un glucopyranose de configuration β ($J_{1''-2''} = 7,6$ Hz).

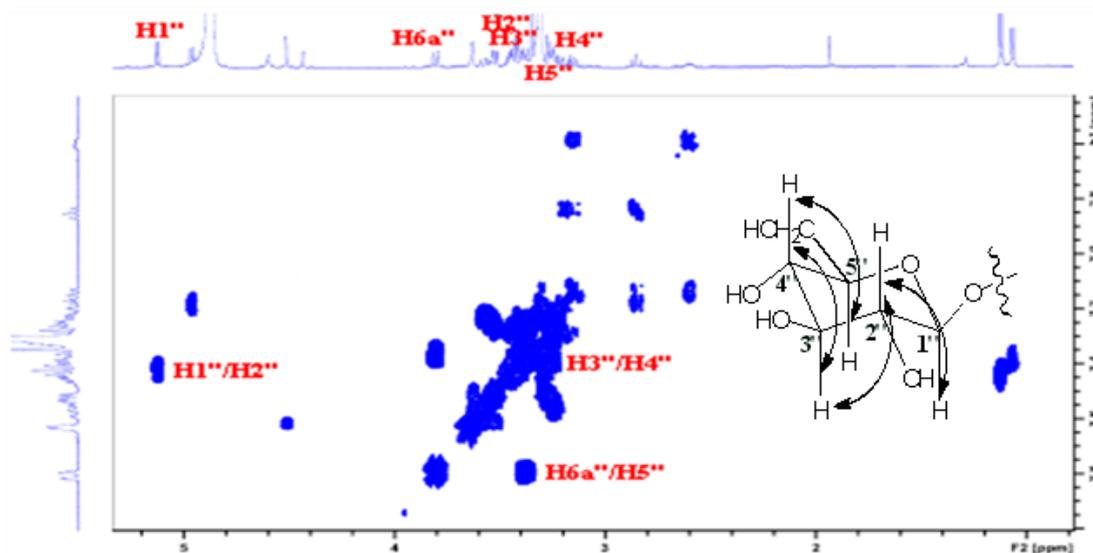


Figure III.33: Spectre COSY H-H identifiant le β -D-glucose (AM3)

Partant du second proton anomère H-1''' [δ_{H} 4,51 (*d*, $J = 1,4$ Hz)], on identifie sur le spectre COSY H-H (Figures III.34 et III.35) un autre système de spins à huit protons d'un déoxyhexose, et cela à travers les couplages H-1'''/H-2''' (δ_{H} 3,63, *dd*, $J = 3,2; 1,5$ Hz), H-2'''/H-3''' (δ_{H} 3,53, *dd*, $J = 9,5; 3,2$ Hz), H-3'''/H-4''' (δ_{H} 3,29, *t*, $J = 9,5$ Hz), H-4'''/H-5''' (δ_{H} 3,46, *dq*, $J = 9,5; 6,4$ Hz) et enfin H-5'''/CH₃-6''' (δ_{H} 1,12, *d*, $J = 6,4$ Hz). Cette dernière corrélation en plus de la valeur de la constante de couplage $J_{1'''\text{-}2'''} = 1,4$ Hz permettent d'identifier un α -L-rhamnose.

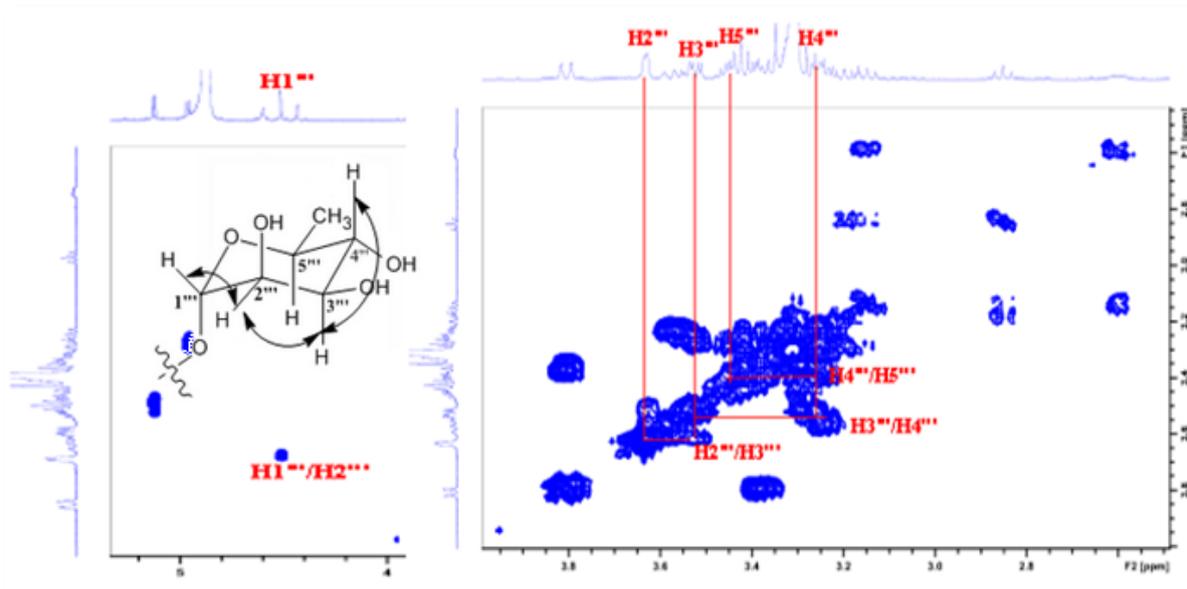


Figure III.34: Spectre COSY H-H identifiant le α -L-rhamnose (AM3)

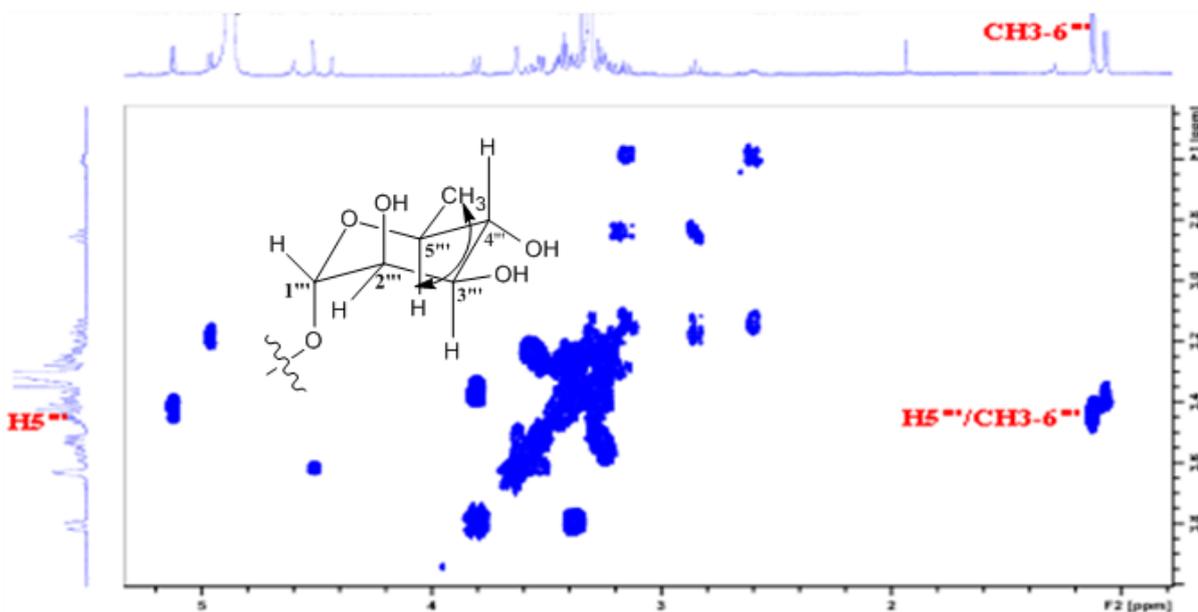


Figure III.35: Spectre COSY H-H identifiant le α -L-rhamnose (AM3)

Les carbones de ces deux unités osidiques ont été caractérisés par expérience HSQC (Figure III.36).

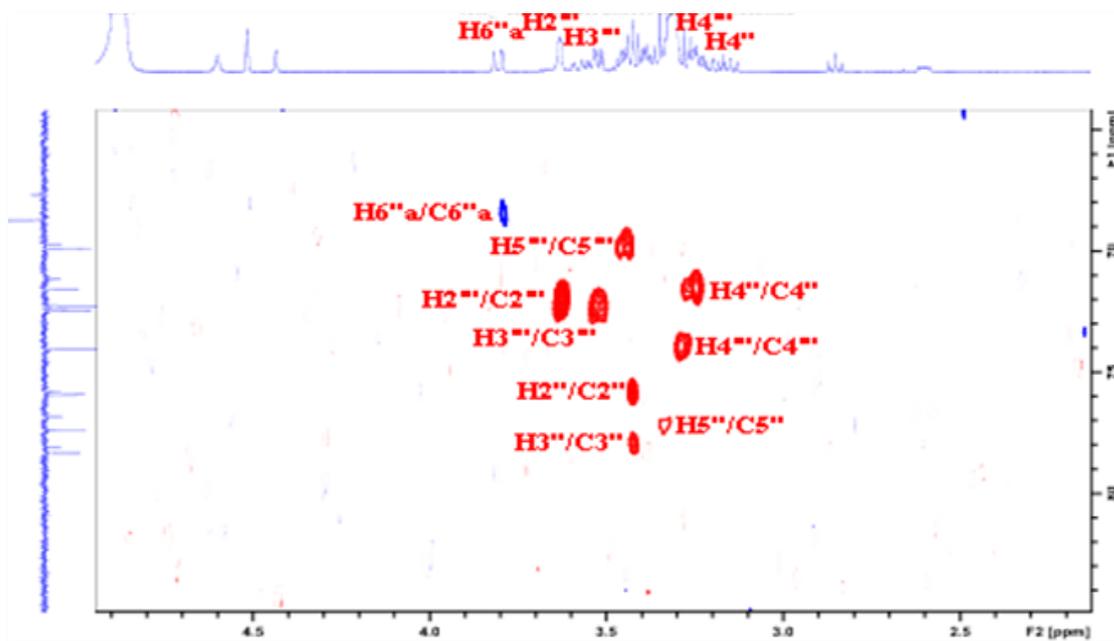


Figure III.36: Spectre HSQC de la partie osidique du composé AM3

Les corrélations HMBC H-1''' (rhamnose)/C-6'' (glucose) et H-1'' (glucose)/C-3 (génine) (Figure III.37), montrent que ces deux unités osidiques forment en C-3 l'enchaînement [α -L-rhamnopyranosyl-(1-6)- β -D-glucopyranoside].

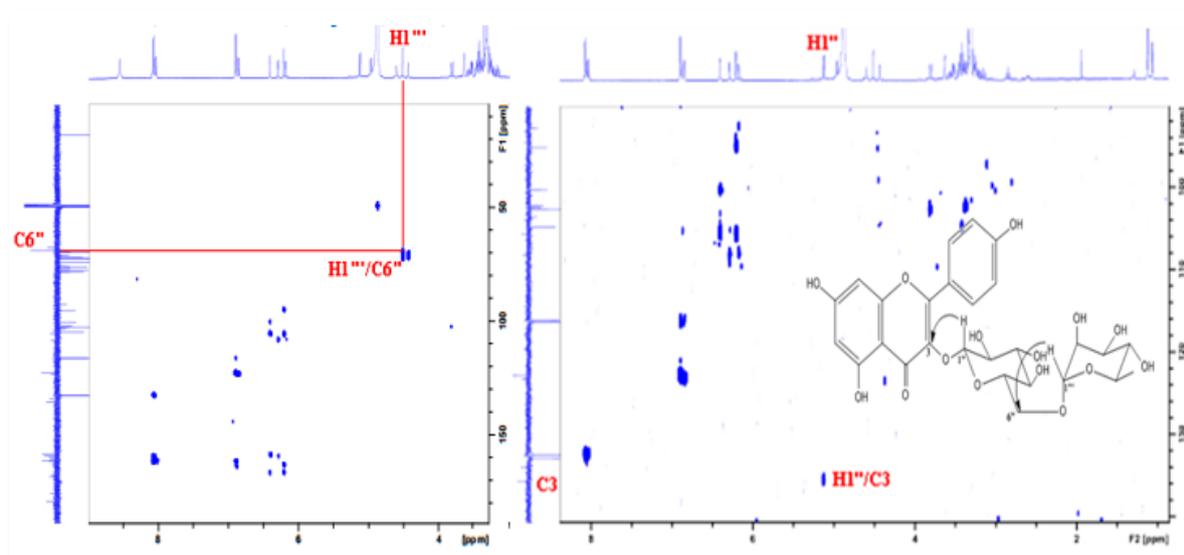
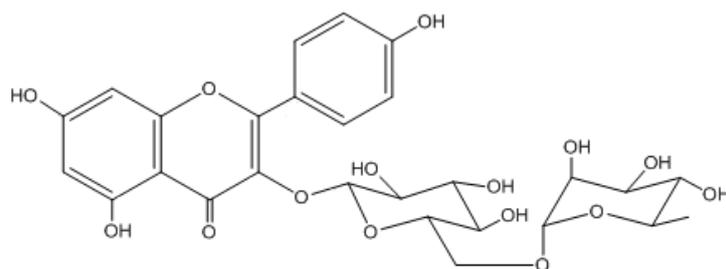


Figure III.37: Spectre HMBC mettant en évidence la séquence des sucres (AM3)

Ainsi, à la lumière de toutes ces données spectroscopiques, le composé AM3 est identifié sans ambiguïté au kaempférol 3-O-(6- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside.



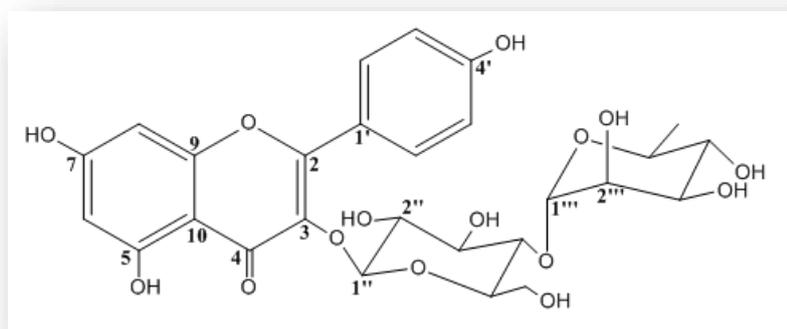
Ce composé, appelé aussi kaempférol 3-*O*-rutinoside ou nicotiflorine, a été isolé antérieurement de l'espèce *A. cruciatus* Link. [83], *A. icmadophilus* Hand.-Mazz. [226], *A. verrucosus* Moris [23], *A. dasyanthus* Pall. [227] et *A. corniculatus* Bieb. [228].

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III.3.

Tableau III.3: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé AM3 dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
2	159,7	/
3	135,7	/
4	179,6	/
5	163,0	/
6	100,3	6,21 (<i>d</i> , 2,0)
7	166,0	/
8	95,1	6,40 (<i>d</i> , 2,0)
9	158,8	/
10	105,7	/
1'	122,9	/
2'	132,6	8,06 (<i>d</i> , 7,9)
3'	116,3	6,89 (<i>d</i> , 7,9)
4'	161,6	/
5'	116,3	6,89 (<i>d</i> , 7,9)
6'	132,6	8,06 (<i>d</i> , 7,9)
1''	104,8	5,12 (<i>d</i> , 7,6)
2''	75,9	3,43 (<i>m</i>)
3''	78,3	3,42 (<i>m</i>)
4''	71,6	3,25 (<i>m</i>)
5''	77,4	3,34 (<i>m</i>)
6''	68,7	3,80 (<i>dd</i> , 11,6 / 1,8) 3,38 (<i>m</i>)
1'''	102,6	4,51 (<i>d</i> , 1,4)
2'''	72,2	3,63 (<i>dd</i> , 3,2 / 1,4)
3'''	72,4	3,53 (<i>dd</i> , 9,5 / 3,2)
4'''	74,0	3,29 (<i>t</i> , 9,5)
5'''	69,9	3,46 (<i>dq</i> , 9,5 / 6,4)
6'''	18,1	1,12 (<i>d</i> , 6,4)

III.4.3.4 Identification structurale du composé AM4

**kaempférol 3-O-(4- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (AM4)**

Ce composé, visible également en UV (254 nm), est obtenu sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. La coloration jaune après révélation par une solution de vanilline sulfurique et chauffage laisse supposer aussi qu'il s'agit d'un flavonoïde

Le spectre de masse ESI (Figure III.38) de ce composé, enregistré en mode positif, montre comme pour le composé AM3, un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 617$ $[M+Na]^+$, correspondant à une masse moléculaire de 594 uma et une formule brute en $C_{27}H_{30}O_{15}$.

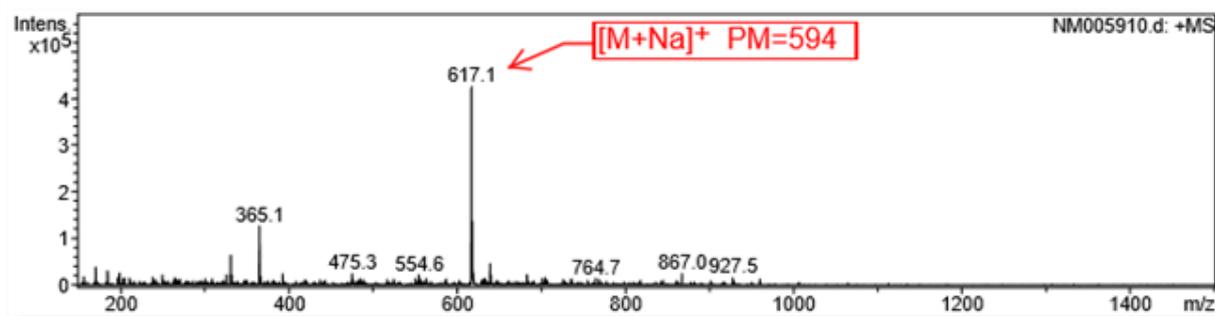


Figure III.38: Spectre de masse ESI⁺ du composé AM4

L'analyse conjointe des spectres RMN 1H , DEPTQ, COSY H-H, HSQC et HMBC indiquent clairement que le composé AM4, de la masse moléculaire égale à celle du composé AM3, est un kaempférol porteur en C-3 de deux unités osidiques, constituées d'un rhamnose et d'un glucose. On reconnaît aisément sur le spectre proton (Figure III.39) les signaux correspondant aux protons :

- ✓ H-2'/H-6' résonant à δ_H 8,04 (2H, *d*, $J = 9,1$ Hz), H-3'/H-5' à δ_H 6,88 (2H, *d*, $J = 9,1$ Hz), H-6 et H-8 à δ_H 6,15 (1H, *sl*) et δ_H 6,34 (1H, *sl*) respectivement, d'une génine kaempférol.

- ✓ H-1'' et H-1''' résonant à δ_H 5,73 (*d*, $J = 7,7$ Hz) et 5,23 (*d*, $J = 1,6$ Hz) correspondant respectivement aux protons anomères du β -D-glucose et α -L-rhamnose. La nature de ces deux unités osidiques ainsi que leur site de branchement sur la génine ont été confirmés par les expériences COSY H-H (Figure III.41) et HMBC (Figure III.45).

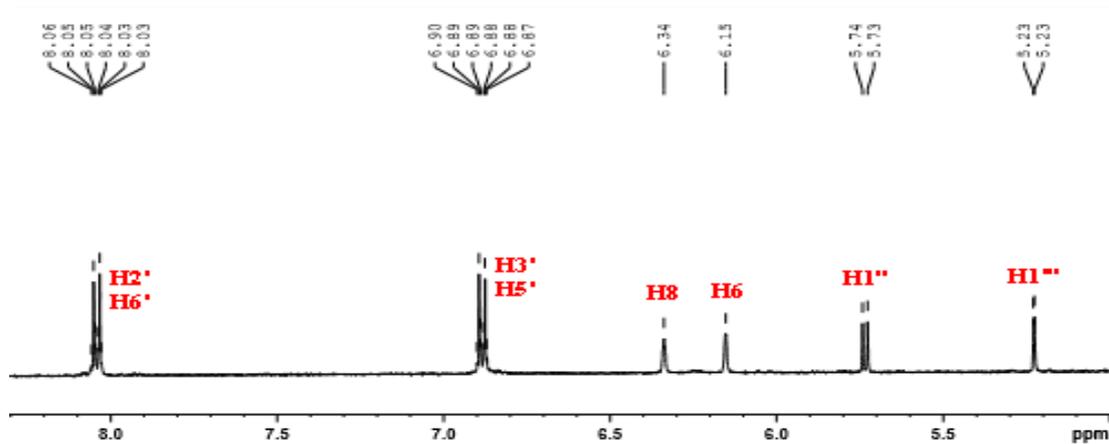


Figure III.39: Spectre RMN ^1H du composé AM4

Le spectre RMN DEPTQ (Figure III.40) met en évidence les signaux attribuables aux carbones de la partie aglycone : CH aromatiques à 132,2 (C-2'/C-6'), 116,3 (C-3'/C-5'), 101,0 (C-6) et 94,6 ppm (C-8).

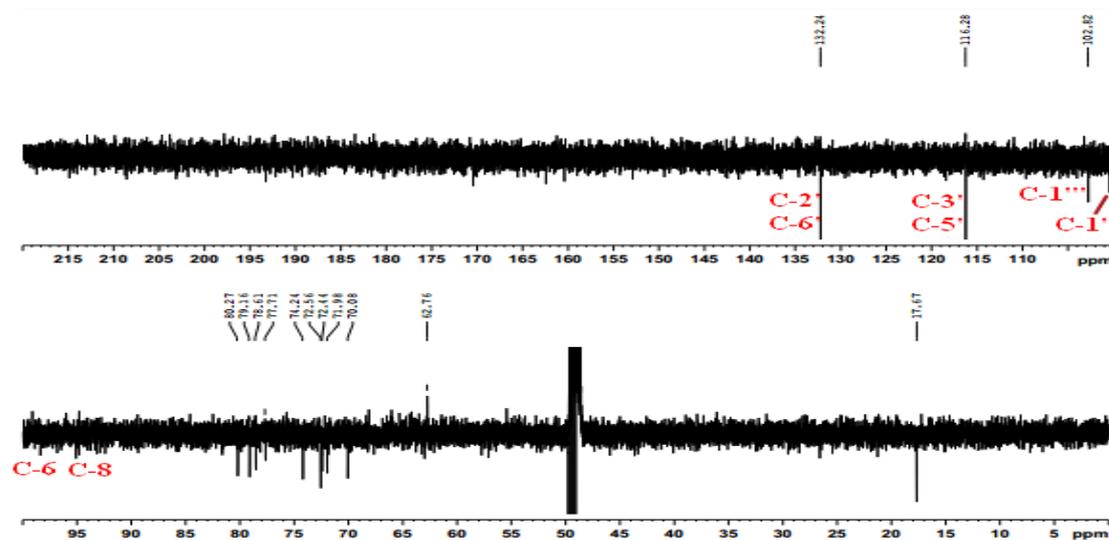


Figure III.40: Spectre RMN DEPTQ du composé AM4

Identification de la partie osidique

L'identification de la chaîne osidique est établie au moyen de l'expérience COSY H-H. Partant du premier proton anomère H-1'' [δ_H 5,73 (*d*, $J = 7,7$ Hz)], un système de spins à sept protons d'un hexose est visualisé à travers les corrélations (Figure III.41) H-1''/H-2'' [δ_H 3,61 (*dd*, $J = 9,1; 7,7$ Hz)], H-2''/H-3'' [δ_H 3,55 (*t*, $J = 9,1$ Hz)], H-3''/H-4'' [δ_H 3,28 (*t*, $J = 9,1$ Hz)],

H-4"/H-5" [δ_H 3,20 (*ddd*, 9,1; 6,2 ; 2,2 Hz)], H-5"/H₂-6" [δ_H 3,50 (*dd*, $J = 12,0$; 6,2 Hz, H-6"a)/ δ_H 3,72 (*dd*, $J = 12,0$; 2,2 Hz, H-6"b)]. Les grandes valeurs de constante de couplage indiquent clairement que l'hexose est un glucose de configuration β ($J_{1''-2''} = 7,7$ Hz).

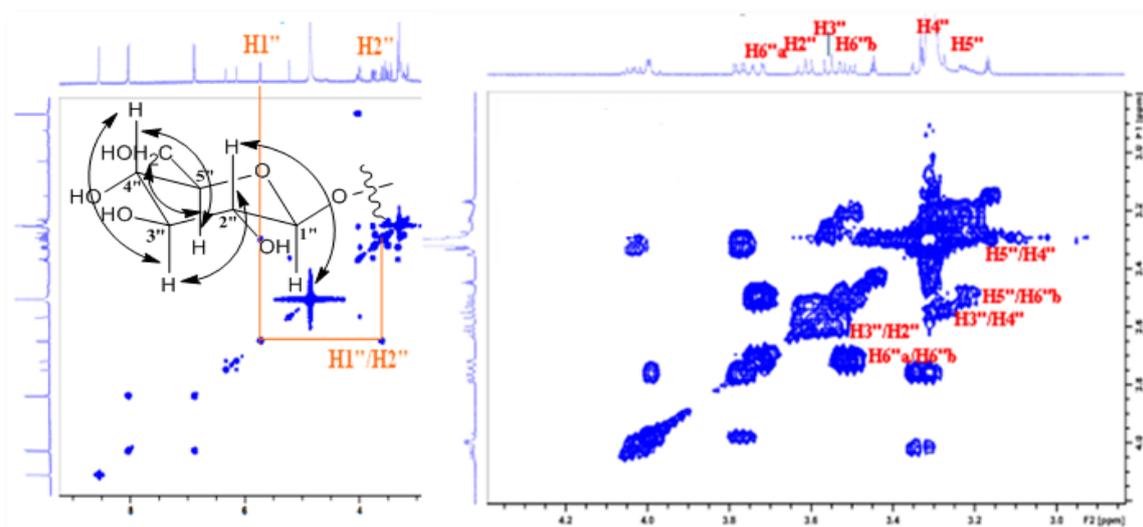


Figure III.41: Spectre COSY H-H identifiant le β -D-glucose

Partant du deuxième proton anomère H-1''' [δ_H 5,23 (*d*, $J = 1,6$ Hz)], il est aisément détectable sur le spectre COSY H-H (Figures III.42 et III.43) un système de spins à huit protons d'un déoxyhexose, et cela à travers les couplages H-1'''/H-2''' (δ_H 3,99, *dd*, $J = 3,4$; 1,6 Hz), H-2'''/H-3''' (δ_H 3,77, *dd*, $J = 9,2$; 3,4 Hz), H-3'''/ H-4''' (δ_H 3,33, *t*, $J = 9,2$ Hz), H-4'''/H-5''' (δ_H 4,02, *dq*, 9,2; 6,4 Hz) et enfin H-5'''/CH₃-6''' (δ_H 0,95, *d*, $J = 6,4$ Hz). Cette dernière corrélation en plus de la valeur de la constante de couplage $J_{1'''-2'''} = 1,5$ Hz permettent d'identifier un α -L-rhamnose.

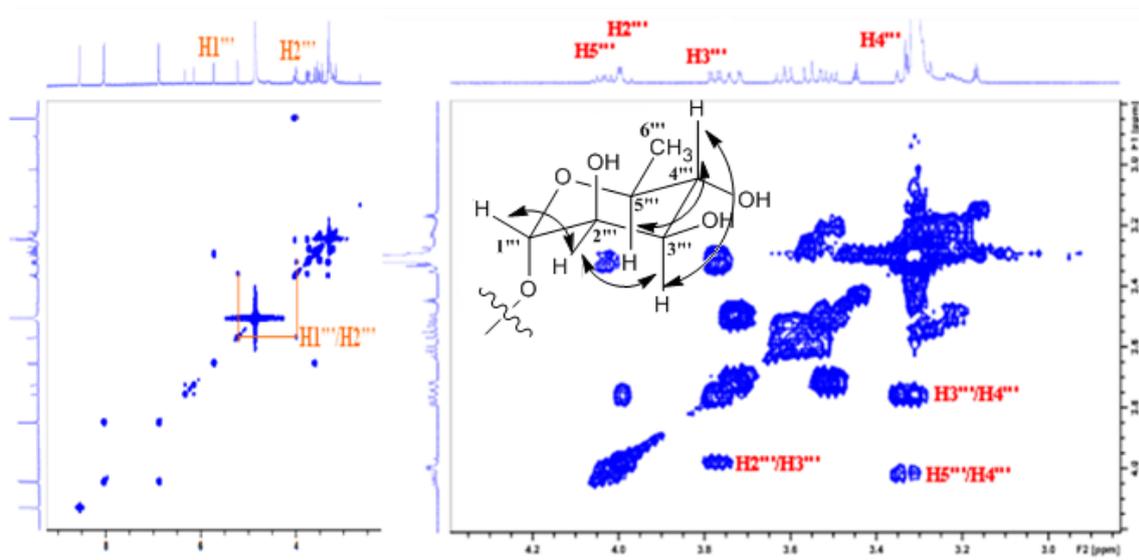


Figure III.42: Spectre COSY H-H identifiant le α -L-rhamnose (AM4)

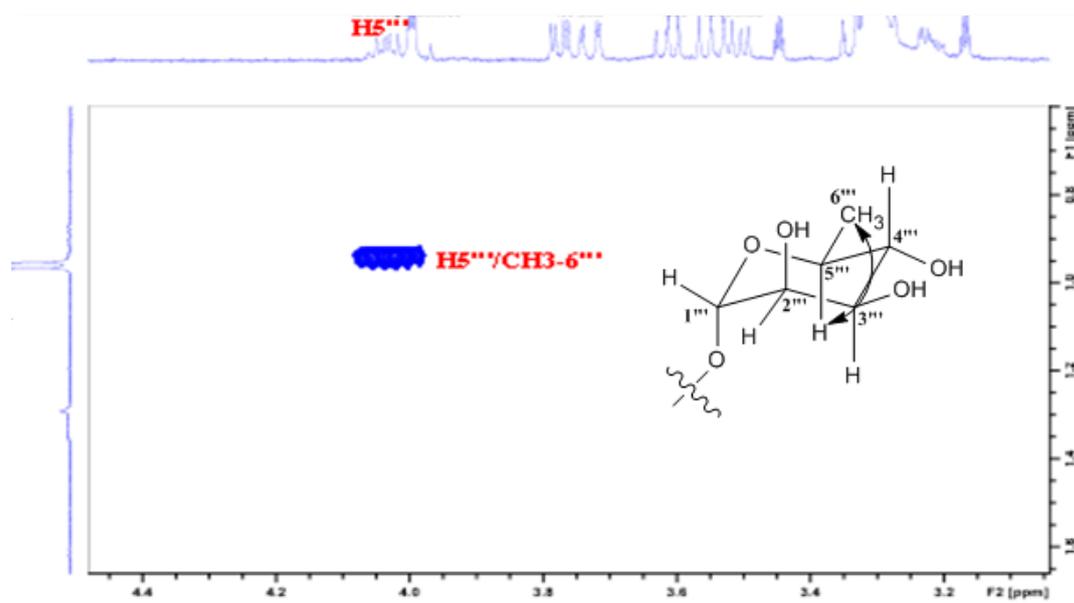


Figure III.43: Spectre COSY H-H identifiant le α -L-rhamnose (AM4)

Les carbones de ces deux unités osidiques ont été assignés par expérience HSQC (Figure III.44).

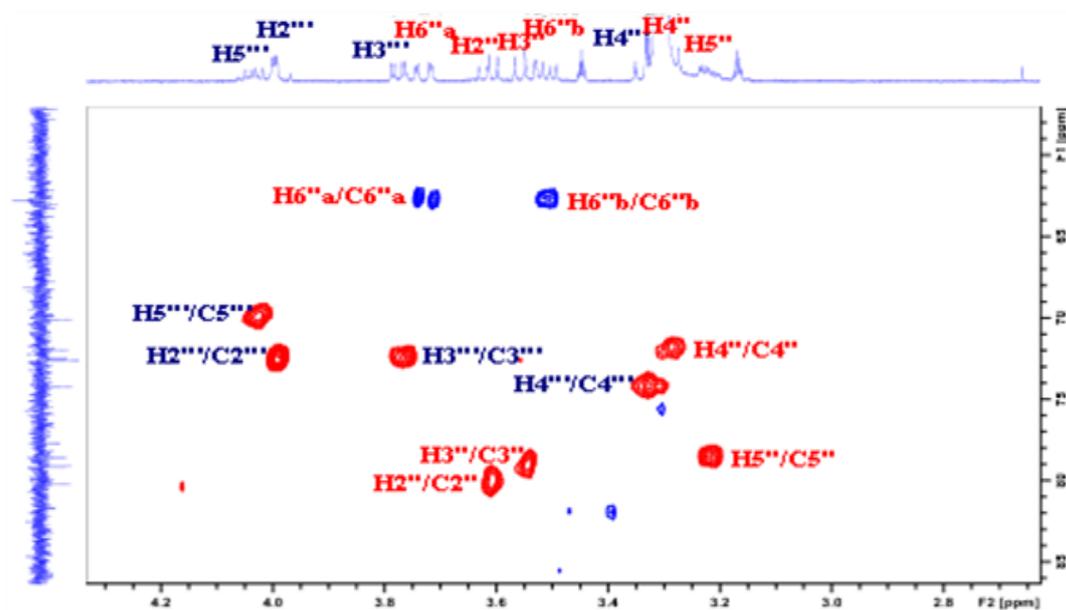


Figure III.44: Spectre HSQC de la partie osidique du composé AM4

La différence notable entre le composé AM4 et AM3 consiste en l'apparition sur le spectre HMBC (Figure III.45), d'un couplage longue distance entre le signal du proton anomère H-1''' du rhamnose à δ_H 5,23 ppm (1H, *t*, $J = 1,6$ Hz) et le signal du carbone C-4'' du glucose repéré à δ_C 71,9 ppm, mettant en évidence l'enchaînement [α -L-rhamnopyranosyl-(1-4)- β -D-glucopyranoside].

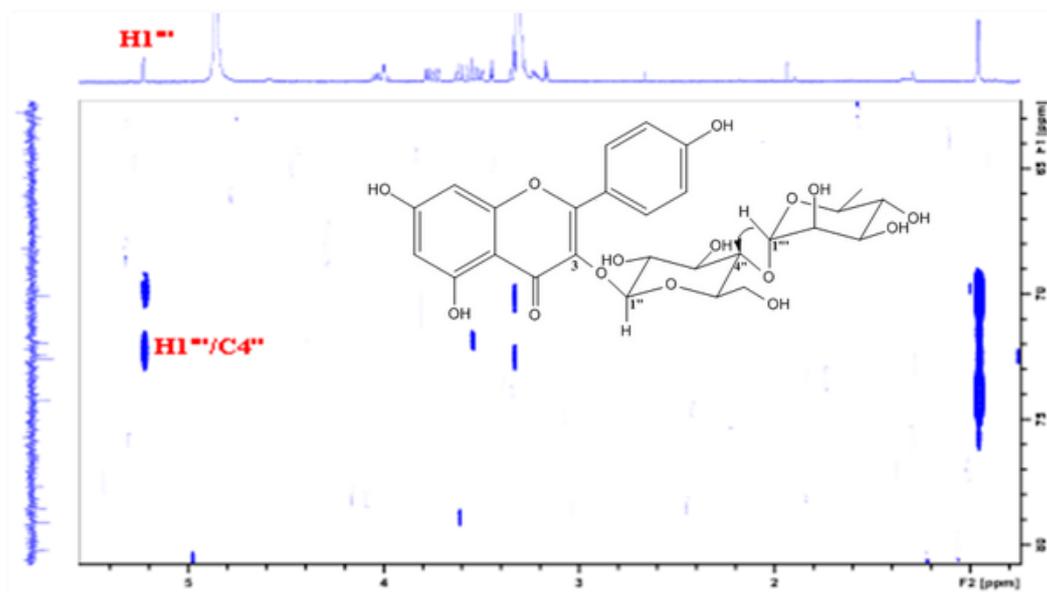
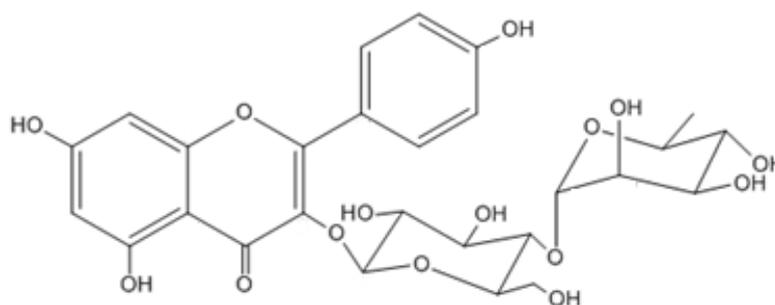


Figure III.45: Spectre HMBC mettant en évidence la séquence des sucres (AM4)

Les corrélations HMBC H-1''' (rhamnose)/C-4'' (glucose) et H-1'' (glucose)/C-3 (génine), montrent que ces deux unités osidiques forment en C-3 l'enchaînement [α -L-rhamnopyranosyl-(1-4)- β -D-glucopyranoside].

Toutes ces données spectroscopiques permettent d'identifier le composé AM4 au kaempférol 3-O-(4- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside.



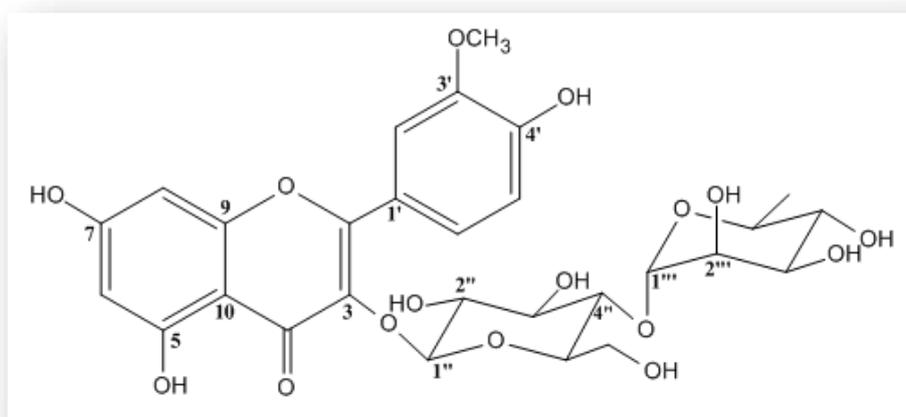
Ce composé a été isolé antérieurement des espèces *Oxandra sessiliflora* (Annonaceae) [218] et *Accacia pennata* (Mimosaceae). Il est doté d'une activité inhibitrice du COX-1 [229]. Il est décrit pour la première fois dans le genre *Astragalus*.

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III.4 ci-dessous.

Tableau III.4: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé AM4 dans MeOD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
2	158,5	/
3	134,4	/
4	179,4	/
5	163,2	/
6	101,0	6,15 (<i>sl</i>)
7	165,6	/
8	94,6	6,34 (<i>sl</i>)
9	158,4	/
10	105,9	/
1'	123,1	/
2'	132,2	8,04 (<i>d</i> , 9,1)
3'	116,3	6,88 (<i>d</i> , 9,1)
4'	161,6	/
5'	116,3	6,88 (<i>d</i> , 9,1)
6'	132,2	8,04 (<i>d</i> , 9,1)
1''	100,3	5,73 (<i>d</i> , 7,7)
2''	80,3	3,61 (<i>dd</i> , 9,1 / 7,7)
3''	79,2	3,55 (<i>t</i> , 9,1)
4''	71,9	3,28 (<i>t</i> , 9,1)
5''	78,6	3,20 (<i>ddd</i> , 9,1 / 6,2 / 2,2)
6''	62,8	3,50 (<i>dd</i> , 12,0 / 6,2) 3,72 (<i>dd</i> , 12,0 / 2,2)
1'''	102,8	5,23 (<i>d</i> , 1,6)
2'''	72,6	3,99 (<i>dd</i> , 3,4 / 1,6)
3'''	72,4	3,77 (<i>dd</i> , 9,2 / 3,4)
4'''	74,2	3,33 (<i>t</i> , 9,2)
5'''	70,1	4,02 (<i>dq</i> , 9,2 / 6,4)
6'''	17,7	0,95 (<i>d</i> , 6,4)

III.4.3.5 Identification structurale du composé AM5



Isorhamnétine 3-*O*-(4-*O*- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (AM5)

Le composé AM5, visible en UV (254 nm), se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Sa coloration jaune, après révélation par une solution de vanilline sulfurique et chauffage, oriente vers un composé à structure flavonoïdique.

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III.46) de ce composé, enregistré en mode positif, montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 647$ $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 624 uma correspondant à une formule brute en $C_{28}H_{32}O_{16}$.

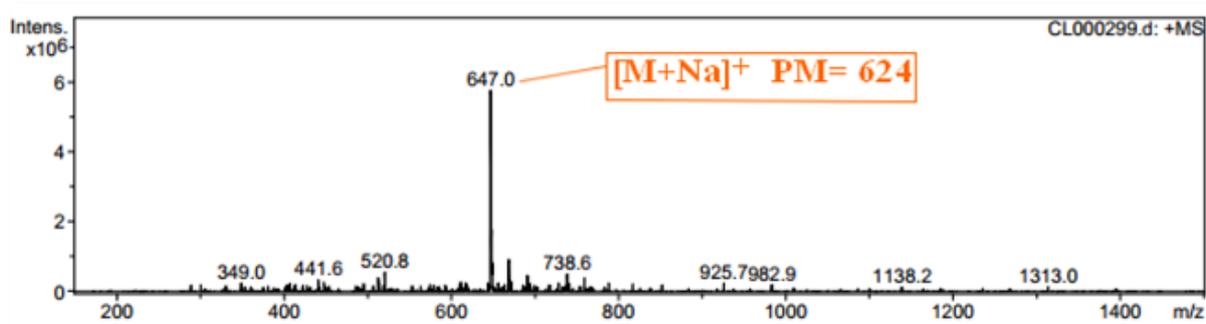


Figure III.46: Spectre de masse ESI⁺ du composé AM5

Son spectre RMN 1H (Figures III.47) enregistré dans MeOD montre des signaux de protons aromatiques résonant entre 6,19 et 8,0 ppm, et osidiques entre 3,10 et 5,30 ppm, suggérant que le composé AM5 est un flavonoïde glycosylé. Ce spectre met aussi en évidence la présence de protons aliphatiques repérés à 1,09 ppm.

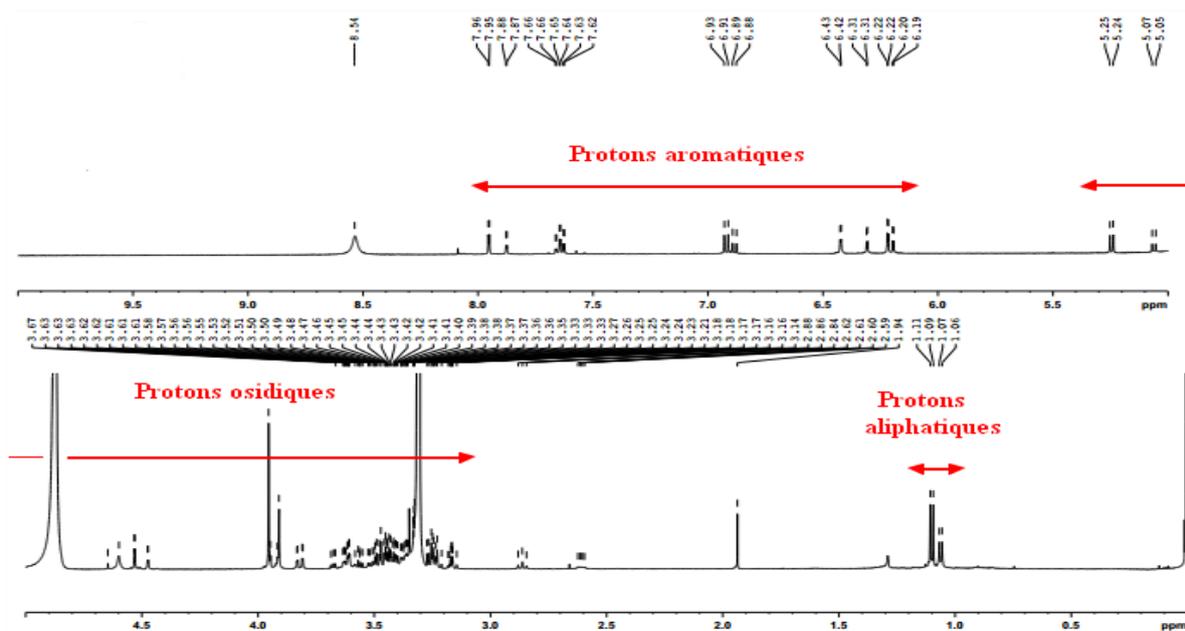


Figure III.47: Spectre RMN 1H du composé AM5

Le spectre RMN ^1H (Figure III.48) du composé AM5 présente :

- ✓ deux signaux à δ_{H} 6,20 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) et δ_{H} 6,42 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) attribuables respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde substitué en positions 5 et 7. Ceci est confirmé par expérience COSY H-H (Figure III.49).
- ✓ trois signaux déblindés résonant à δ_{H} 7,95 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz), δ_{H} 7,64 (1H, *dd*, $J = 8,6$; 2,1 Hz) et 6,92 (1H, *d*, $J = 8,6$ Hz), attribuables respectivement aux protons H-2', H-6' et H-5' du cycle B disubstitué en positions 3' et 4' comme le montre l'expérience COSY H-H (Figure III.49).
- ✓ un signal résonant à δ_{H} 3,95 (3H, *s*) attribuable aux protons d'un groupement méthoxyle.

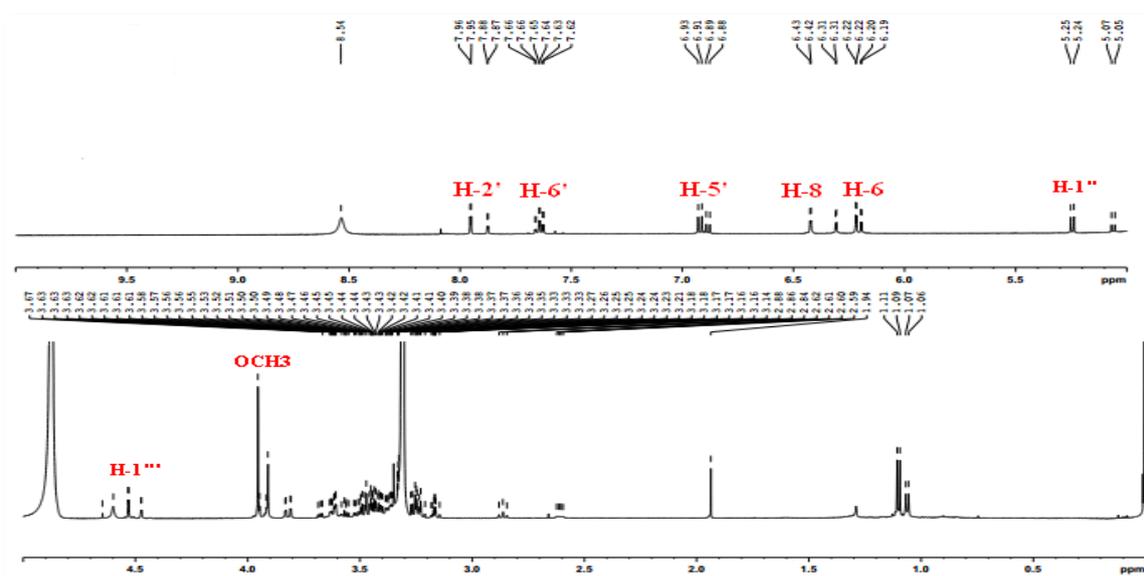


Figure III.48: Spectre RMN ^1H du composé AM5

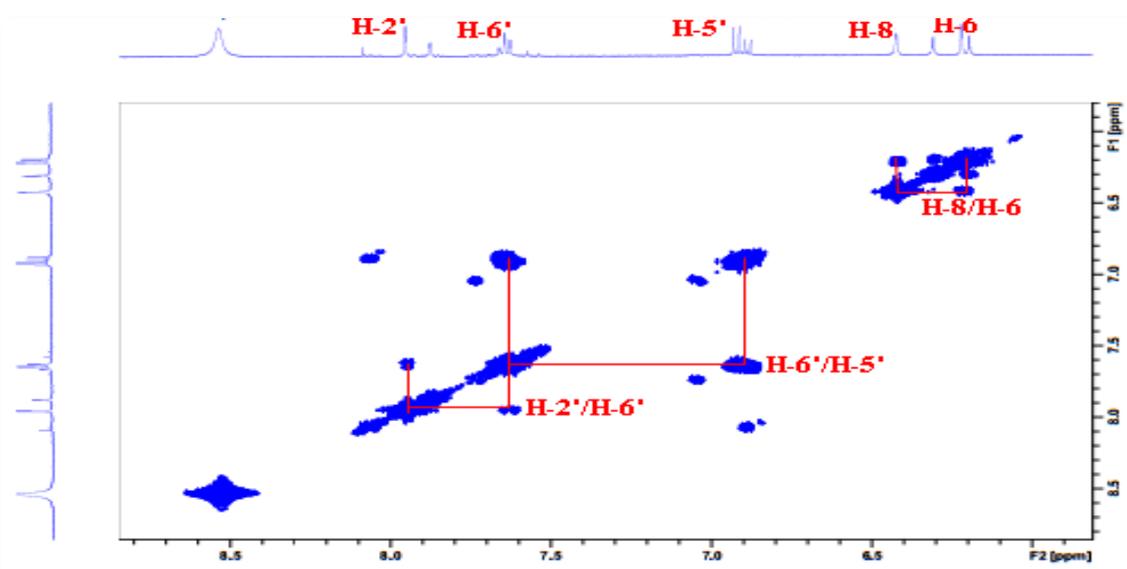


Figure III.49: Spectre COSY H-H du composé AM5

- plusieurs signaux dans l'intervalle 3,10-3,85 ppm ainsi que deux signaux d'intégration 1H chacun à δ_H 4,52 ($d, J = 1,5$ Hz) et 5,25 ($d, J = 7,3$ Hz), établissant la présence de deux unités osidiques. La présence d'un groupement méthyle à δ_H 1,09 ($d, J = 6,2$ Hz) observé sur le spectre RMN 1H et la constante de couplage du premier proton anomère à δ_H 4,52 ($d, J = 1,5$ Hz) suggère qu'une des deux unités osidiques est un rhamnose de configuration α .

A partir des protons cités précédemment, l'expérience hétéronucléaire HSQC (Figure III.50) permet d'identifier les carbones qui les portent. Ces derniers sont repérés à δ_C 100,5 (C-6), 95,4 (C-8), 115,1 (C-2'), 124,5 (C-6'), 116,7 (C-5'), 104,9 (C-1''), 103,1 (C-1''') et 57,3 (OCH₃).

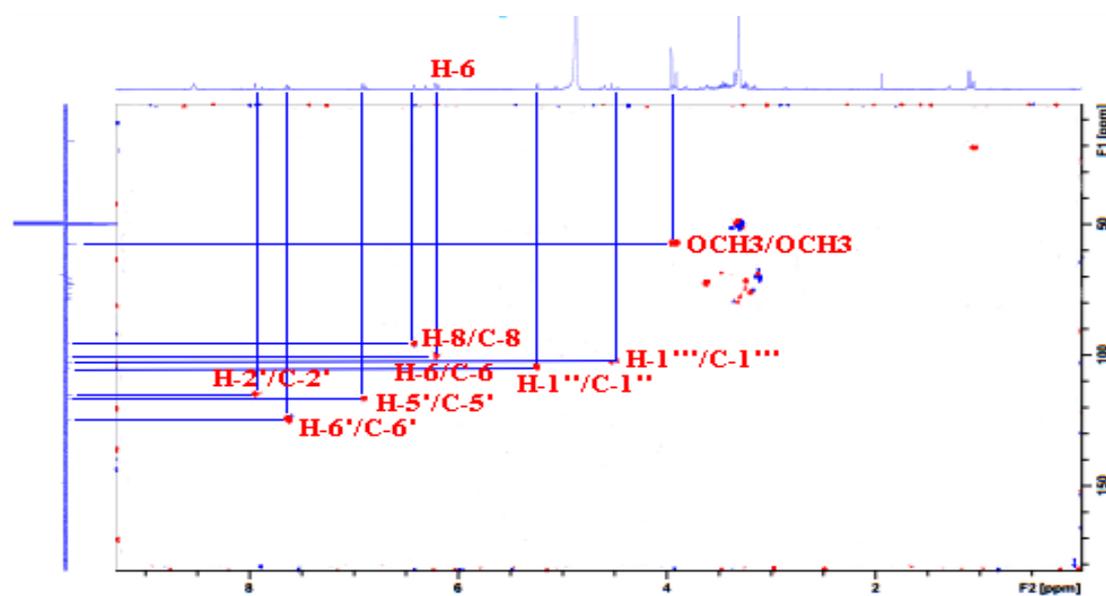


Figure III.50: Spectre HSQC du composé AM5

A l'issue de cette première analyse, il apparaît que le composé AM5 est un flavonoïde disubstitué sur les deux cycles A et B. Il est aussi porteur de deux unités osidiques dont une est probablement un rhamnopyranose.

Identification de la partie aglycone

L'identification de la génine à un flavonol de type isorhamnétine glycosylé en C-3, est déduite de la valeur de déplacement chimique très caractéristique du carbone C-2 égale à 159,0 ppm. Ce dernier est identifié par analyse HMBC (Figure III.51) suite à sa corrélation avec le proton H-2' du cycle B de l'aglycone et ce carbone.

L'analyse du spectre HMBC (Figure III.51) permet aussi de visualiser les corrélations entre:

- le proton H-5' (δ_H 6,92) du cycle B et trois carbones quaternaires résonant à δ_C 123,0, 145,9 et 148,9 attribuables respectivement aux carbones C-1', C-3' et C-4'. Ces deux derniers sont oxygénés.
- les protons H-2' (δ_H 7,95)/H-6' (δ_H 7,64) et le carbone quaternaire oxygéné C-4' (δ_C 148,9).
- le proton H-8 (δ_H 6,42) et trois carbones quaternaires à δ_C 105,6, 158,5 et 166,1 attribuables respectivement au carbone C-10 et les carbones oxygénés C-9 et C-7.
- le proton H-6 (δ_H 6,20) et deux carbones quaternaires oxygénés à δ_C 163,0 et 166,1, ne pouvant être que C-5 et C-7.
- les protons OCH₃ (δ_H 3,95) et un carbone quaternaire à δ_C 45,9 attribuable au carbone C-3'.

Le spectre HMBC permet d'observer également les couplages H-6/C-10, H-2'/C-6' et H-6'/C-2'.

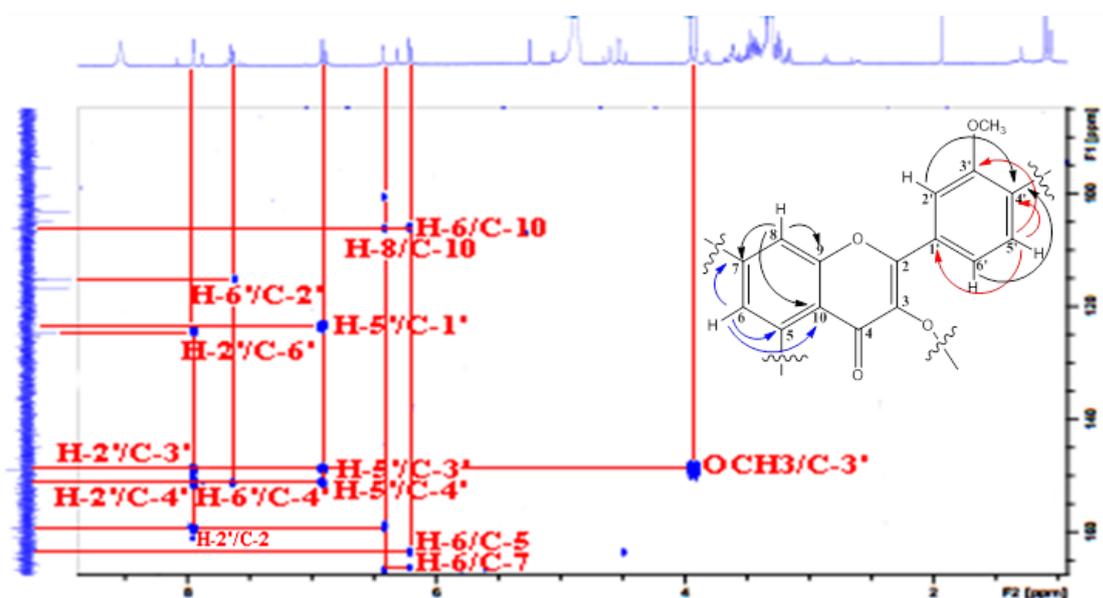
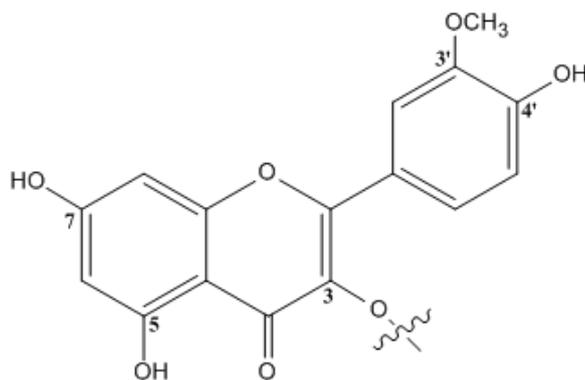


Figure III.51: Spectre HMBC de la partie aglycone du composé AM5

Le signal résonant à δ_C 135,7 attribuable au carbone C-3 est confirmé par HMBC du fait de sa corrélation longue distance avec le proton anomère nommé H-1'' (δ_H 5,25, *d*, $J = 7,3$ Hz) d'une unité osidique. La valeur de déplacement chimique de ce carbone confirme la glycosylation en cette position du flavonol. Le signal apparaissant à 179,5 ppm est attribué au carbone C-4 d'un carbonyle.

Toutes ces données spectrales permettent d'identifier l'aglycone comme étant l'isorhamnétine glycosylé en C-3 [82].

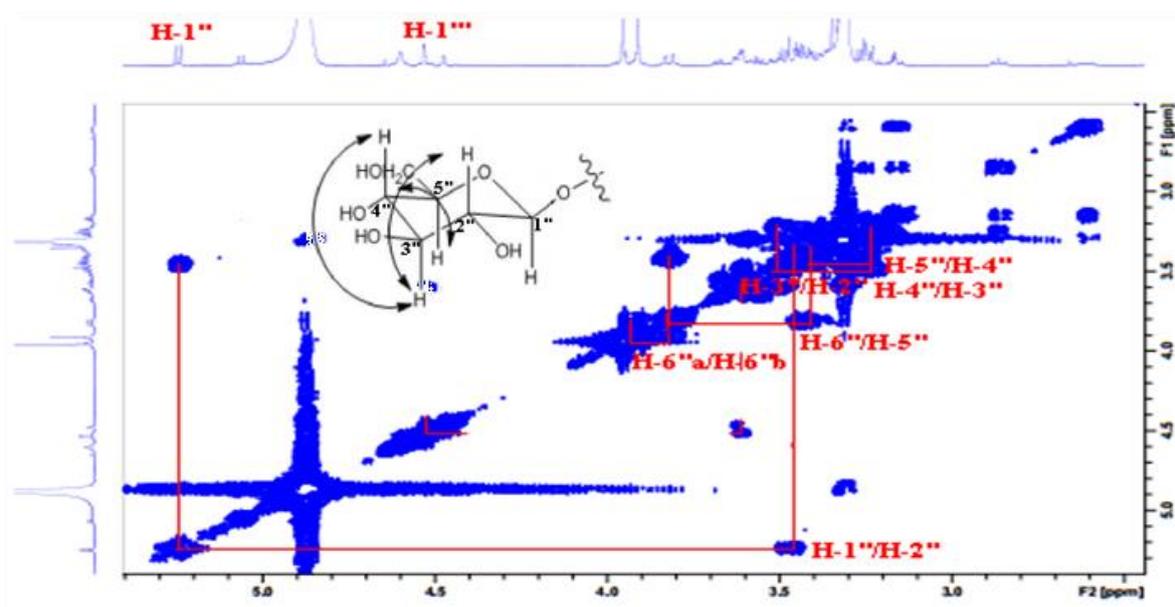


Isorhamnétine

Identification de la partie osidique

L'analyse RMN ^1H a montré l'existence de deux unités osidiques par la mise en évidence de deux signaux de protons anomères à δ_{H} 5,25 (*d*, $J = 7,3$ Hz, H-1'') et δ_{H} 4,52 (*d*, $J = 1,5$ Hz, H-1'''). Les carbones qui les portent sont repérés à δ_{C} 104,9 (C-1'') et 103,1 (C-1''') sur le spectre HSQC (Figure III.50).

A partir du proton anomère nommé H-1'' (δ_{H} 5,25), l'analyse du spectre COSY H-H (Figure III.52) permet d'identifier un glucose de configuration β ($J_{1-2} = 7,3$ Hz), et cela à travers les couplages H-1''/H-2'' (δ_{H} 3,46, *t*, $J = 7,3$ Hz, H-2''), H-2''/H-3'' (δ_{H} 3,40, *t*, $J = 7,3$ Hz, H-3''), H-3''/H-4'' (δ_{H} 3,27, *dd*, 9,3 ; 7,3 Hz), H-4''/H-5'' (δ_{H} 3,41, *ddd*, 9,3 ; 4,7 ; 1,3 Hz), H-5''/H-6'' (δ_{H} 3,80, *dd*, $J = 10,8$; 1,3 Hz, H-6''a / δ_{H} 3,92, *dd*, $J = 10,8$; 4,7 Hz, H-6''b).

Figure III.52: Spectre COSY H-H du β -D-glucose (AM5)

A partir du deuxième proton anomère H-1''' (δ_H 4,52), l'analyse du spectre COSY H-H (Figure III.53) identifie un α -L-rhamnose ($J_{1''-2''} = 1,5$ Hz) au vu des couplages H-1'''/H-2''' [δ_H 3,61 (*dd*, $J = 3,4; 1,5$ Hz)], H-2'''/H-3''' [δ_H 3,48 (*dd*, $J = 9,8; 3,4$ Hz)], H-3'''/H-4''' [δ_H 3,22 (*t*, $J = 9,8$ Hz)], H-4'''/H-5''' [δ_H 3,42 (*m*)] et H-5'''/H-6''' [δ_H 1,09 (*d*, $J = 6,2$ Hz)].

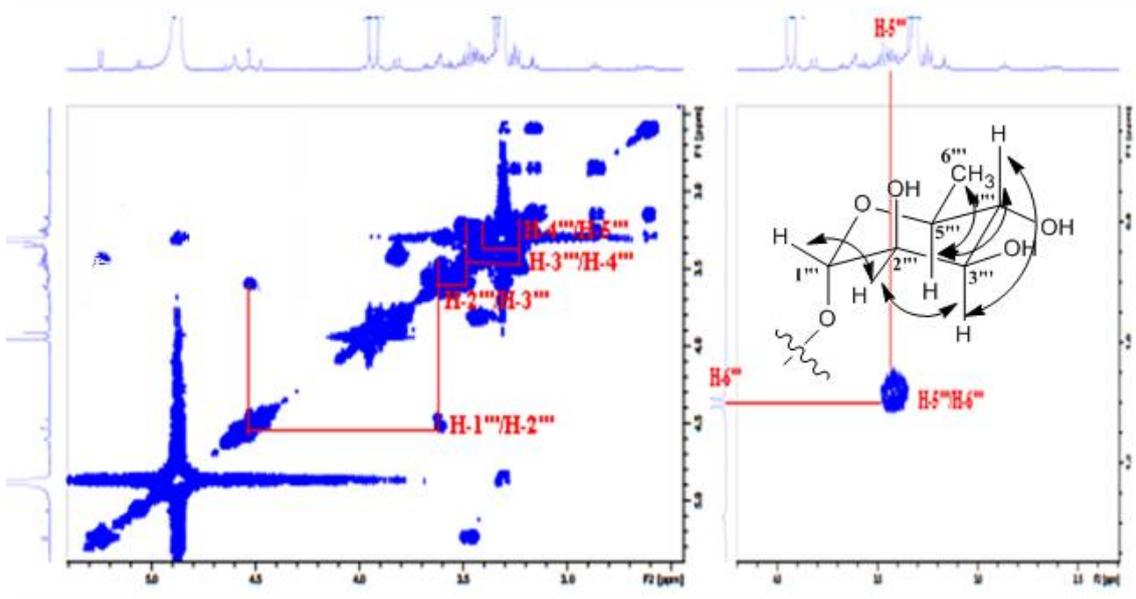


Figure III.53: Spectre COSY H-H du α -L-rhamnose (AM5)

La séquence et les sites de fixation des deux oses ont été déterminés par expérience HMBC (Figure III.54) qui montre les corrélations entre :

- le proton anomère H-1'' (δ_H 5,25) du glucose et le carbone C-3 (135,6 ppm) de la génine.
- le proton anomère H-1''' (δ_H 4,52) du rhamnose et le carbone C-4'' (72,2 ppm) du glucose.

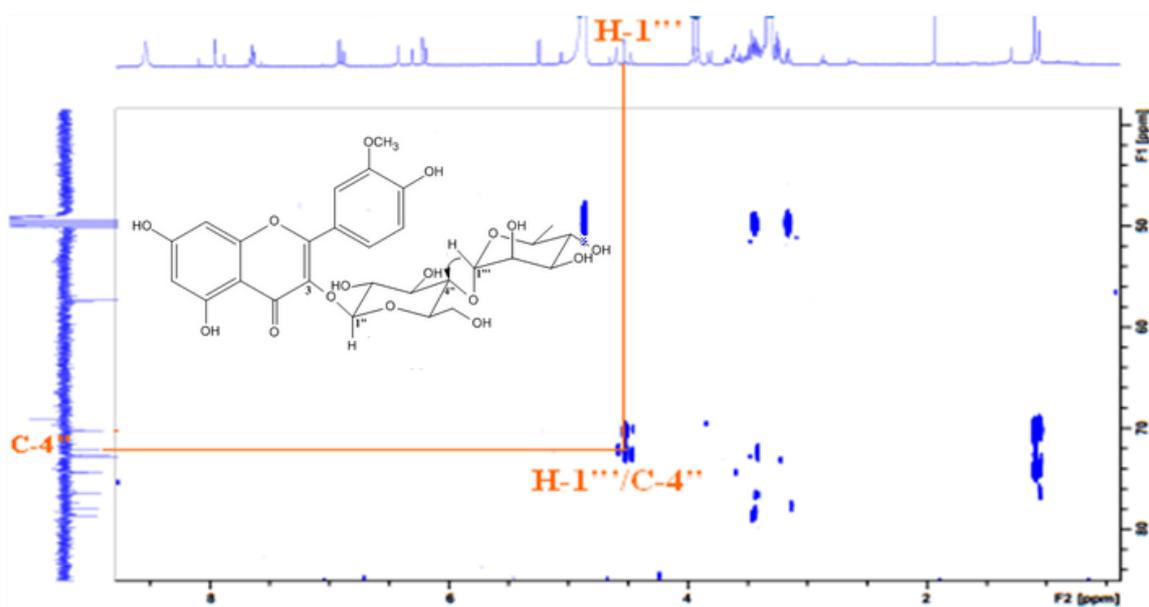
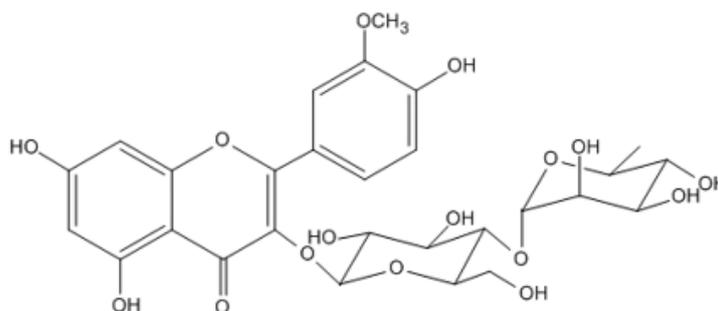


Figure III.54: Spectre HMBC montrant le branchement des sucres (AM5)

Toute cette analyse spectrale permet d'assigner sans ambiguïté pour ce flavonoïde, la structure suivante: isorhamnétine 3-*O*-(4-*O*- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (Calendoside III).



Ce composé isolé originellement de l'espèce *Calendula officinalis* (Asteraceae) [230], d'où le nom de calendoside III qu'on lui a attribué, est cité ici pour la première fois dans une plante Fabaceae.

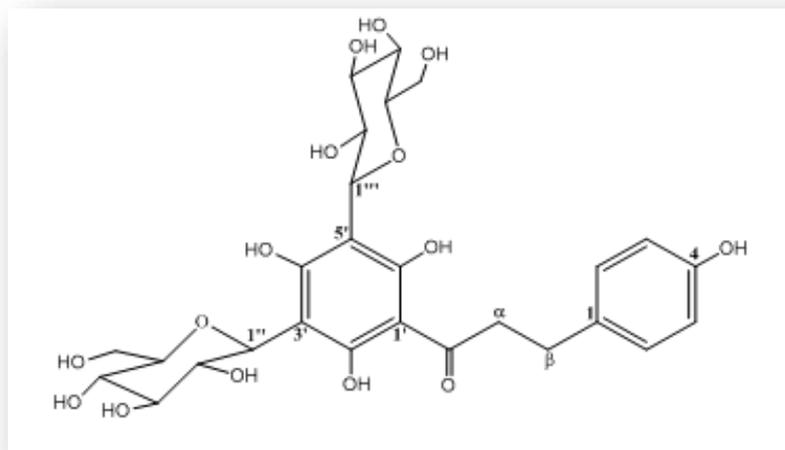
Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III.5 ci-dessous.

Tableau III.5: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du Composé AM5 dans MeOD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
2	159,0	/
3	135,6	/
4	179,5	/
5	163,0	/
6	100,5	6,20 (<i>d</i> , 2,1)
7	166,1	/
8	95,4	6,42 (<i>d</i> , 2,1)
9	158,5	/
10	105,6	/
1'	123,0	/
2'	115,1	7,95 (<i>d</i> , 2,1)
3'	145,9	/
4'	148,9	/
5'	116,6	6,92 (<i>d</i> , 8,6)
6'	124,5	7,64 (<i>dd</i> , 8,6 / 2,1)
4'-OCH ₃	57,3	3,95 (<i>s</i>)
1''	104,9	5,25 (<i>d</i> , 7,3)
2''	76,4	3,46 (<i>t</i> , 7,3)
3''	78,7	3,40 (<i>t</i> , 7,3)
4''	72,2	3,27 (<i>dd</i> , 9,3 / 7,3)
5''	77,9	3,41 (<i>ddd</i> , 9,3 / 4,7 / 1,3)
6''	69,0	3,92 (<i>dd</i> , 10,8 / 4,7) 3,80 (<i>dd</i> , 10,8 / 1,3)

1'''	103,1	4,52 (<i>d</i> , 1,5)
2'''	72,8	3,61 (<i>dd</i> , 3,4 / 1,5)
3'''	72,6	3,48 (<i>dd</i> , 9,8 / 3,4)
4'''	74,3	3,22 (<i>t</i> , 9,8)
5'''	70,3	3,42 (<i>m</i>)
6'''	18,4	1,09 (<i>d</i> , 6,2)

III.4.3.6 Identification structurale du composé AM6



3', 5'-di-C- β -D-glucopyranosylphlorétine (AM6)

Le composé AM6, visible en UV (254 nm), se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Sa coloration jaune, après révélation par une solution de vanilline sulfurique et chauffage, atteste de sa nature flavonoïdique.

Son spectre de masse ESI⁻ (Figure III.55), exhibe un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z = 596,8 [M-H]⁻ suggérant une masse moléculaire égale à 598 uma et une formule brute en C₂₇H₃₄O₁₅.

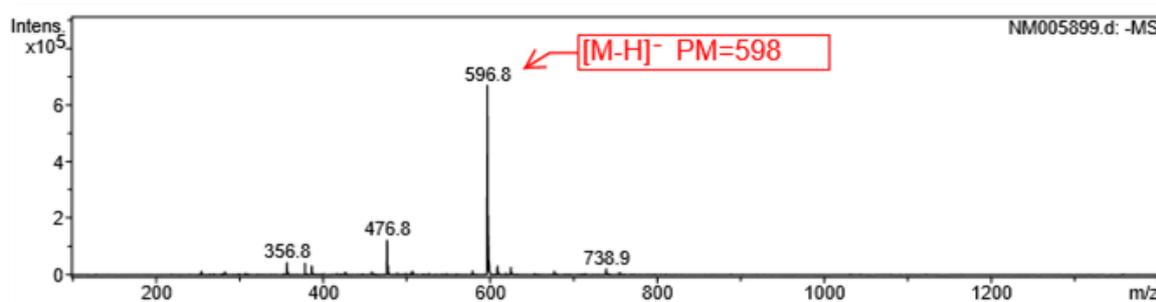


Figure III.55: Spectre de masse ESI⁻ du composé AM6

Le spectre RMN ¹H (Figure III.56), enregistré dans MeOD, traduit le caractère aromatique du composé, à travers les signaux résonant entre 6,60 et 7,10 ppm. Il est

également observé de nombreux signaux de protons osidiques entre 3,3 et 5,0 ppm, de protons anomères repérés à 4,94 ppm (2H, *d*, 9,4 Hz) indiquant l'existence de deux unités osidiques, et de protons aliphatiques dans l'intervalle 2,8-3,4 ppm.

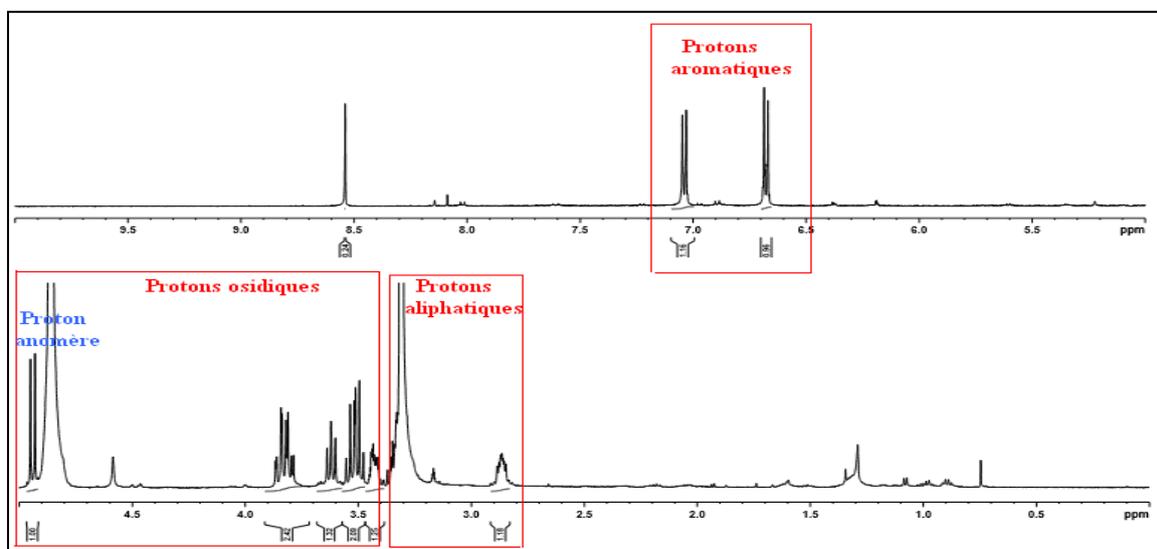


Figure III.56: Spectre RMN ^1H du composé AM6

Le spectre RMN DEPTQ (Figure III.57) de ce composé présente des signaux de carbones aromatiques à δ_{C} 207,2 (C), 156,6 (C), 134,1 (C), 130,6 (CH) et 116,3 (CH). Les signaux CH résonant entre 71 et 105 ppm sont attribuables aux carbones osidiques. Les signaux sortant à 31,3 et 48 ppm correspondent à des carbones méthyléniques.

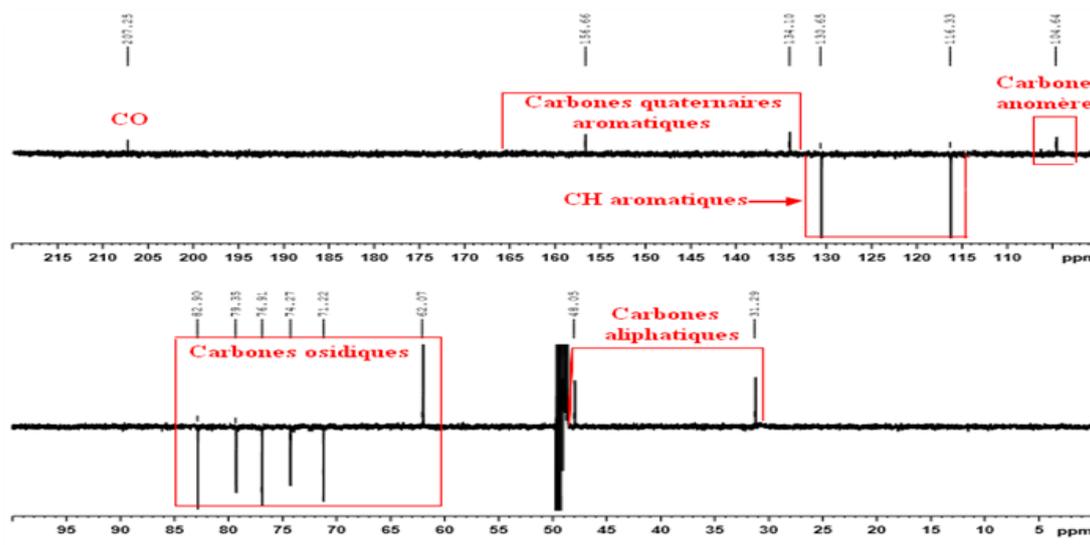


Figure III.57: Spectre RMN DEPTQ du composé AM6

L'élucidation structurale de ce composé est initié par l'analyse du spectre RMN ^1H (Figure III.58) qui exhibe des signaux de quatre protons à δ_{H} 6,67 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz) et δ_{H} 7,04 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz), caractéristiques aux protons H-3/H-5 et H-2/H-6 d'un noyau

aromatique parasubstitué, comme le montre également l'expérience COSY H-H (Figure III.59).

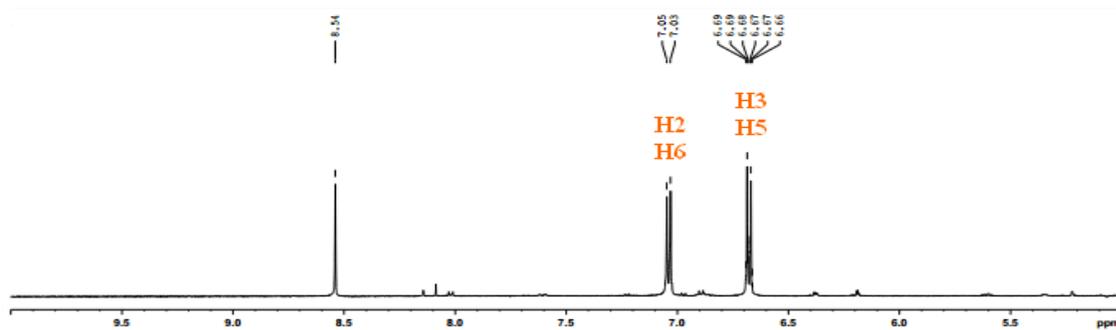


Figure III.58: Spectre RMN ^1H du composé AM6

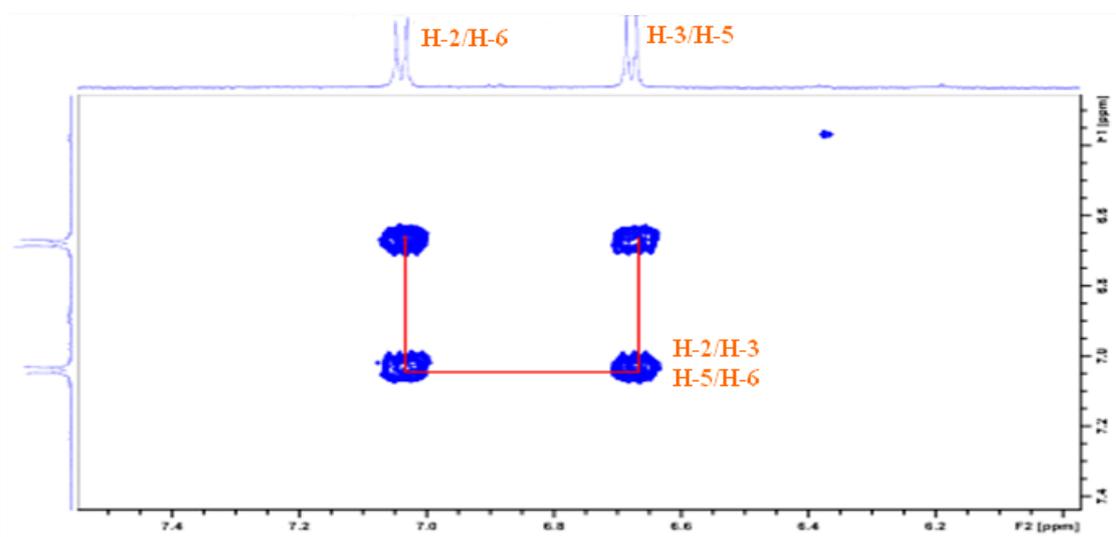


Figure III.59: Spectre COSY H-H du composé AM6

L'expérience HSQC a permis d'assigner les déplacements chimiques des carbones (δ_{C} 116,3 et 130,6) qui les portent (Figure III.60).

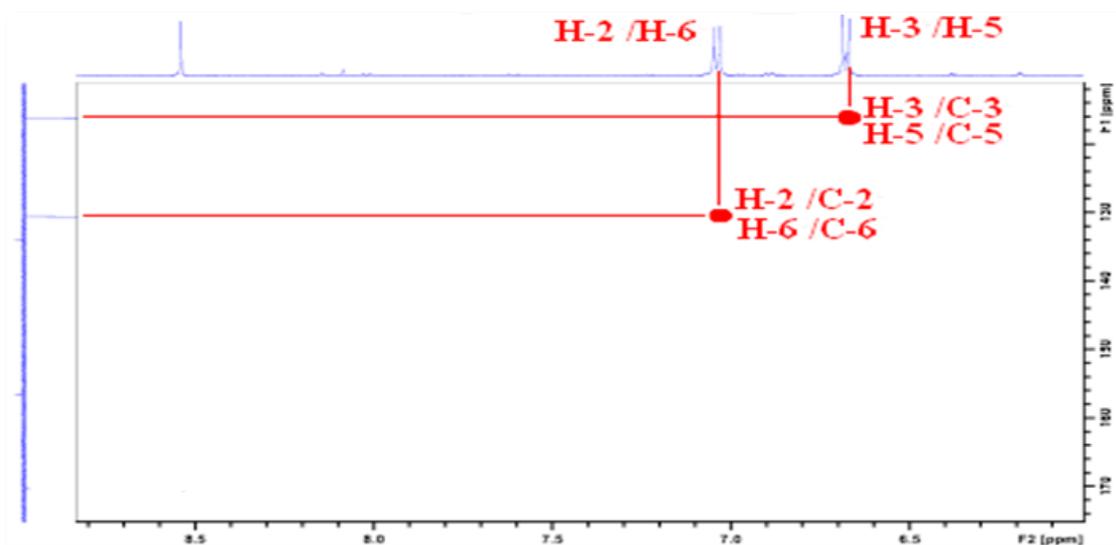


Figure III.60: Spectre HSQC du composé AM6

L'analyse du spectre HMBC (Figure III.61) permet d'identifier les autres carbones de ce cycle aromatique et cela par l'observation des corrélations hétéronucléaires longue distance entre :

- ✓ les protons H-3/H-5 et un carbone quaternaire à 134,1 ppm qui s'accorde à C-1.
- ✓ les protons H-2/H-6 et un carbone quaternaire oxygéné repéré à 156,6 ppm, correspondant au carbone C-4.

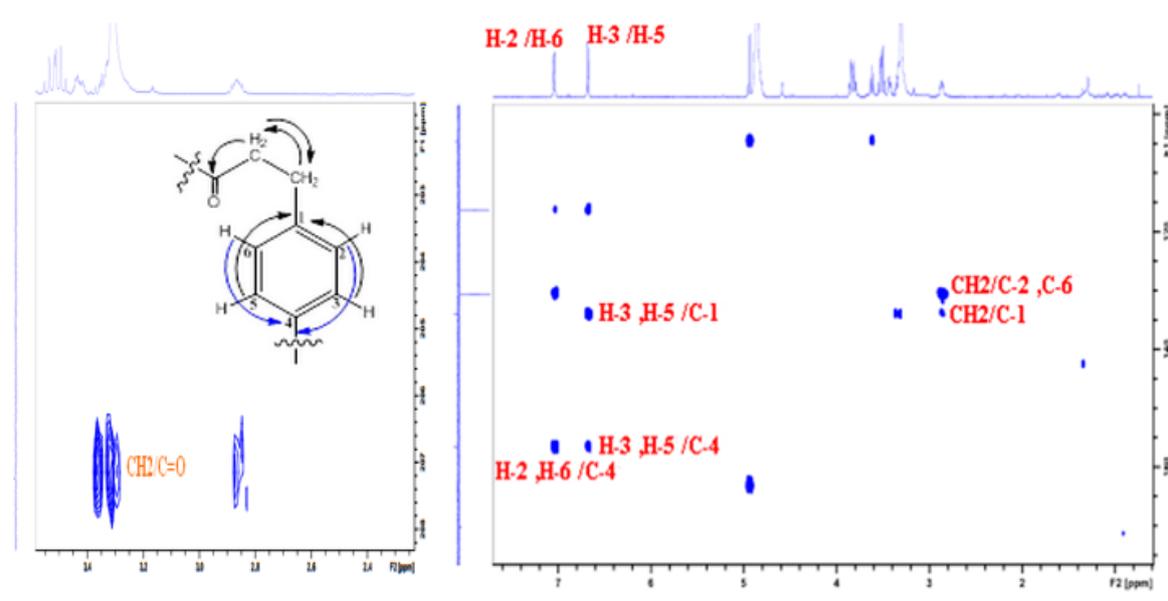


Figure III.61: Spectre HMBC du composé AM6

L'expérience COSY H-H (Figure III.62) met en évidence un système de spin à 4 protons de deux groupements méthylènes sortant à δ_H 2,86 (2H, *m*) et 3,34 (2H, *m*), confortant la présence d'une chaîne aliphatique.

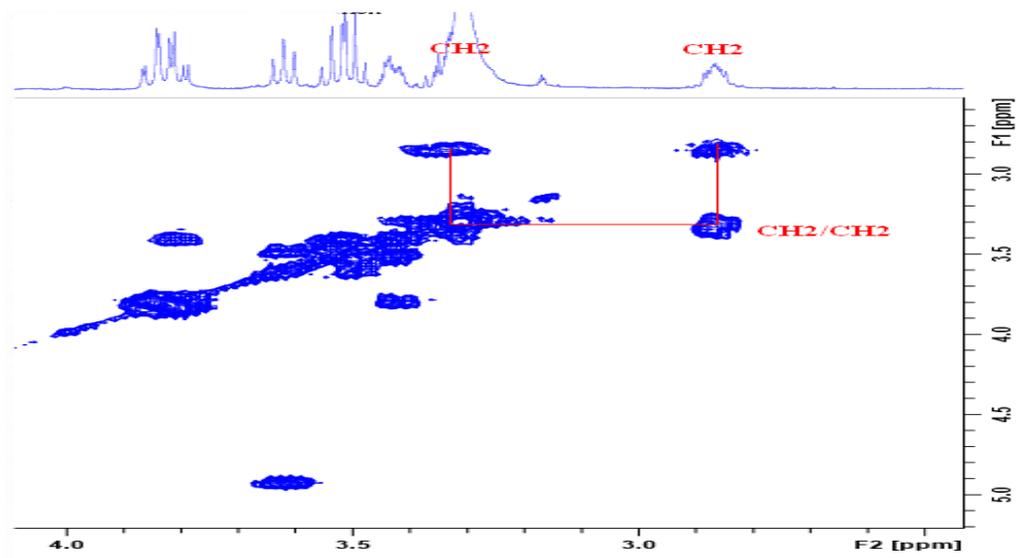
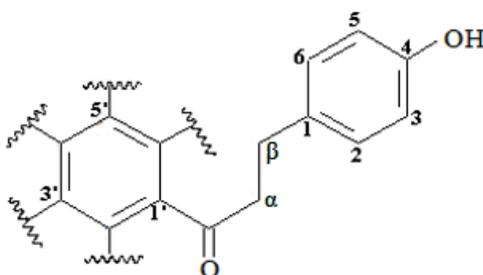


Figure III.62: Spectre COSY H-H de la zone aliphatique du composé AM6

Le spectre HMBC (Figure III.61) met en évidence les corrélations entre :

- ✓ les protons d'un méthylène (δ_{H} 2,86) et les carbones C-2/C-6, ainsi que le carbone quaternaire C-1 (δ_{C} 134,1), impliquant que le noyau aromatique para substitué est porteur de la chaîne aliphatique.
- ✓ les protons du second méthylène (δ_{H} 3,34 ppm) et un carbone quaternaire sortant à δ_{C} 207,2 ppm, attribuable au carbone d'un carbonyle.

Les signaux de carbones résonant à 207,2 (C=O), 48,0 (C- α) et 31,3 (C- β) attestant de la présence d'une chaîne aliphatique COCH₂CH₂-Ar, en plus des données spectrales énoncées plus haut, mènent à la conclusion que nous sommes en présence d'un flavonoïde, plus précisément une dihydrochalcone de type phlorétine [231]. Cette dernière constitue la génine de notre composé qui comporte deux unités osidiques.



Identification de la partie osidique

L'analyse RMN ¹H a montré l'existence de deux unités osidiques par l'observation d'un signal d'intégration 2H de deux protons anomères équivalents à δ_{H} 4,94 (*d*, $J = 9,4$ Hz, H-1'', H-1'''). Les carbones qui les portent sont repérés à δ_{C} 76,9 (C-1'' et C-1''') sur le spectre HSQC (Figure III.63). Le signal à champ fort de ces carbones anomères est typique d'une C-glycosylation [232].

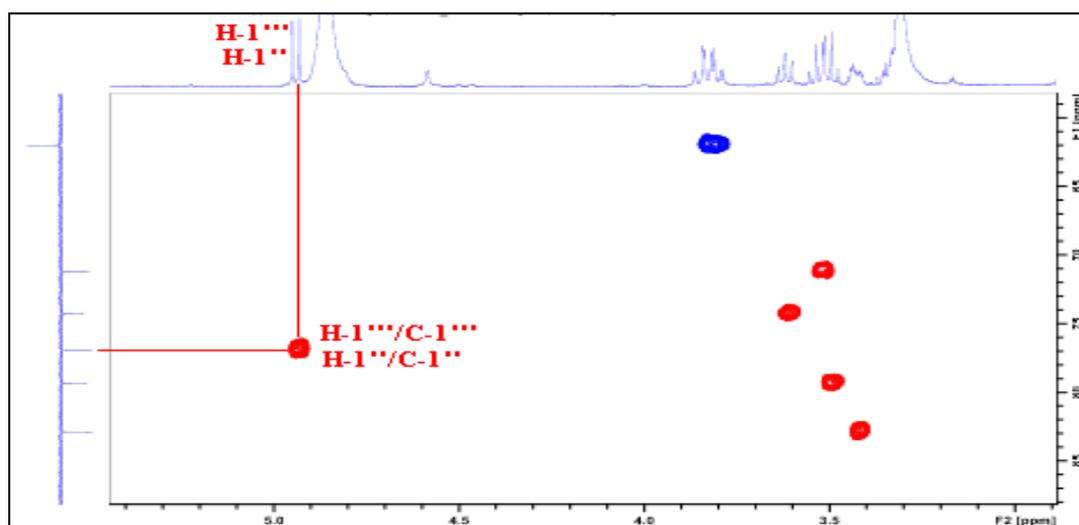


Figure III.63: Spectre HSQC montrant les protons et carbones anomères

L'identification des unités osidiques repose essentiellement sur l'expérience COSY H-H (Figure III.64) qui montre clairement la présence d'un système de spins à sept protons d'un hexose. En effet, partant du signal des deux protons anomères H-1''/H-1''' résonnant à δ_H 4,94 (*d*, $J = 9,4$ Hz) cités précédemment, il est observé les couplages H-1''/H-2'' (3,62 ppm, *t*, $J = 9,4$ Hz), H-2''/H-3'' (3,51 ppm, *t*, $J = 9,4$ Hz), H-3''/H-4'' (3,53 ppm, *t*, $J = 9,4$; Hz), H-4''/H-5'' (3,42 ppm, *m*), H-5''/H-6'' (3,82 ppm, *dd*, $J = 12,5$; 2,0 Hz, H-6''^a / 3,86 ppm, *dd*, $J = 12,5$; 2,0 Hz, H-6''^b). Les grandes valeurs de constantes de couplage permettent d'identifier un β -D-glucose ($J_{1''-2''} = 9,4$ Hz).

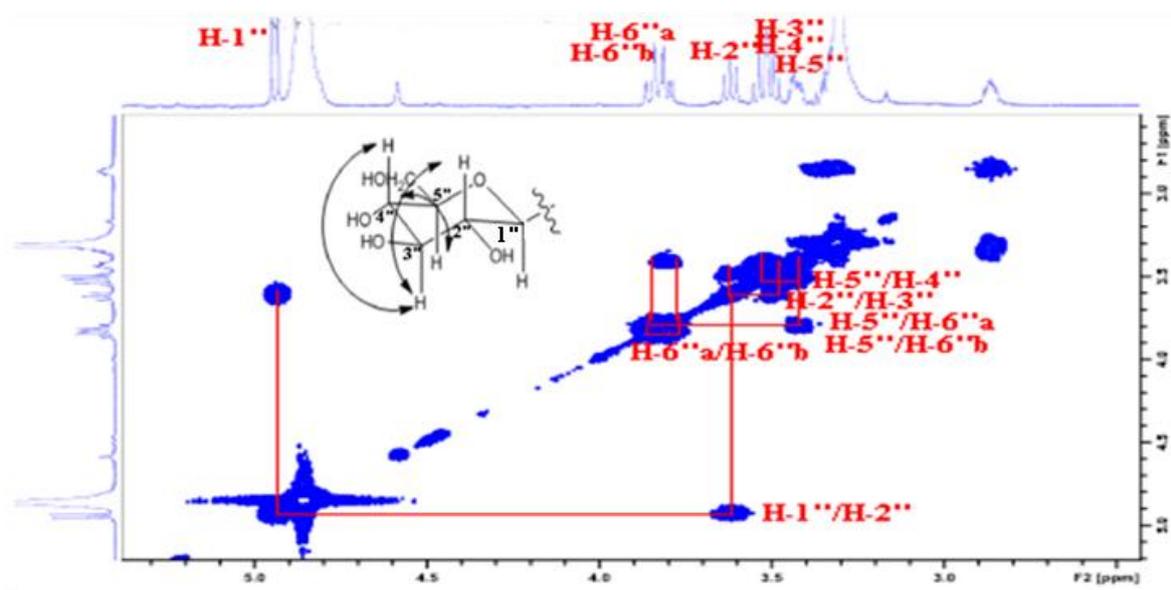


Figure III.64: Spectre COSY H-H du β -D-glucose

L'expérience HSQC (Figure III.65) a permis d'assigner les déplacements chimiques de tous leurs carbones.

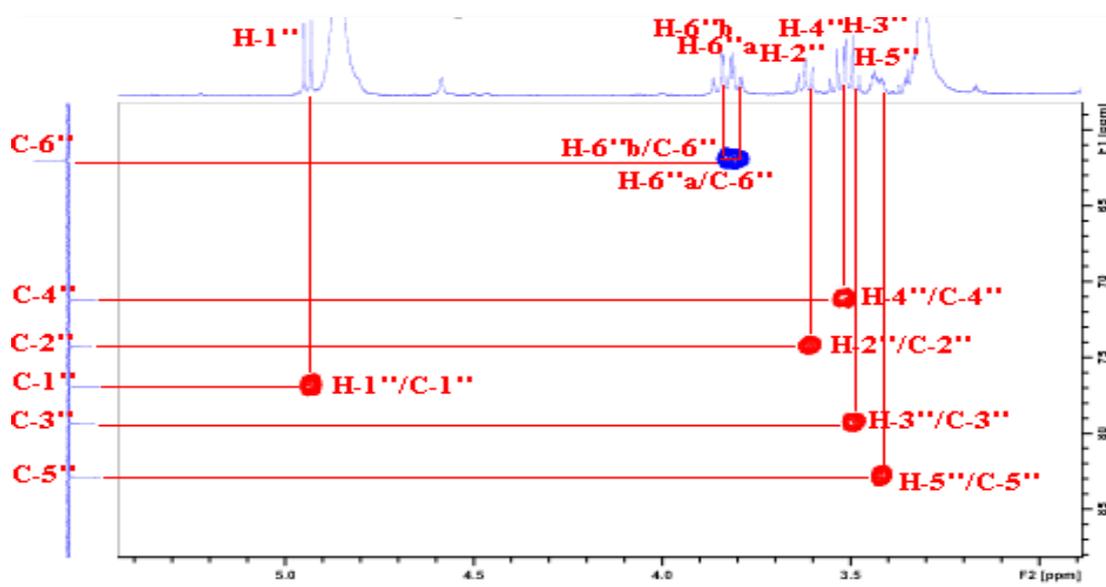


Figure III.65: Spectre HSQC de la partie osidique du composé AM6

La fixation des deux oses a été déterminée par expérience HMBC (Figure III.66) qui montre les corrélations entre :

- ✓ le proton anomère H-1'' (δ_H 4,94) du glucose et le carbone C-3' (104,6 ppm) du cycle A de la dihydrochalcone.
- ✓ le proton anomère H-1''' (δ_H 4,94) du deuxième glucose et le carbone C-5' (104,6 ppm) du même cycle aromatique.

L'équivalence des déplacements chimiques des carbones C-3' et C-5' du cycle A est significative de leur environnement chimique strictement identique. Le cycle A est donc de type 2,4,6-trihydroxyphenyl.

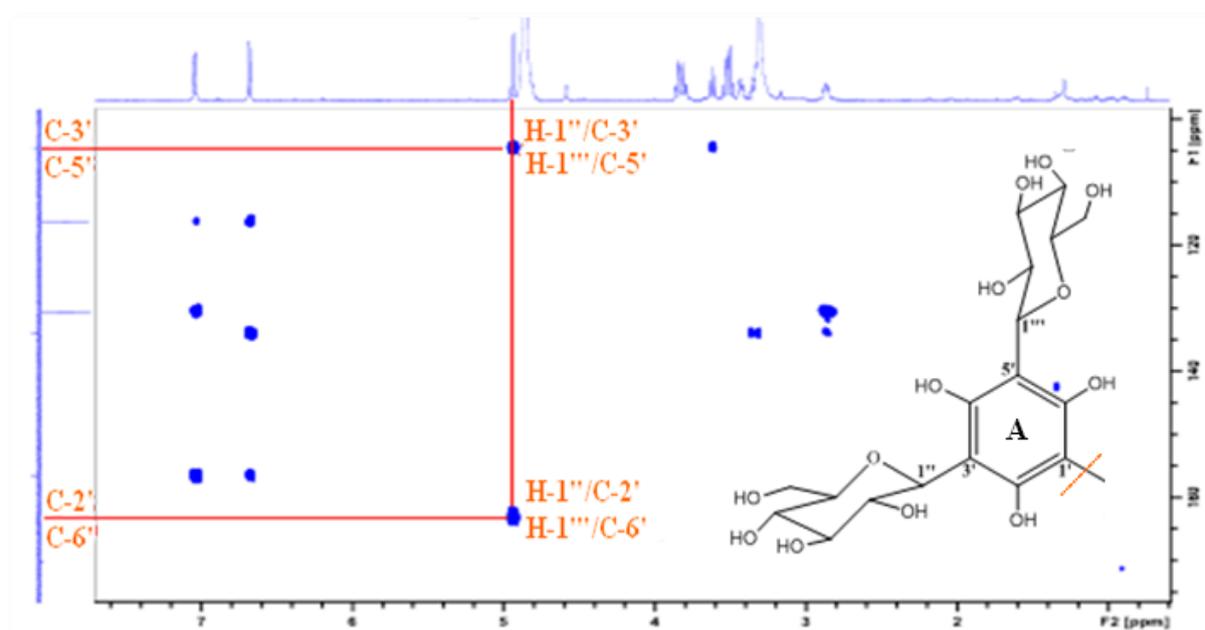
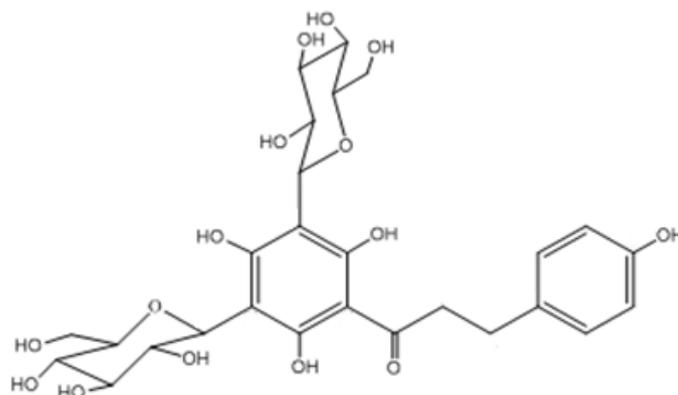


Figure III.66: Spectre HMBC mettant en évidence la fixation des sucres

Toute cette analyse spectrale permet d'assigner sans ambiguïté pour cette dihydrochalcone, la structure suivante: 3', 5'-di-C- β -D-glucopyranosylphlorétine.



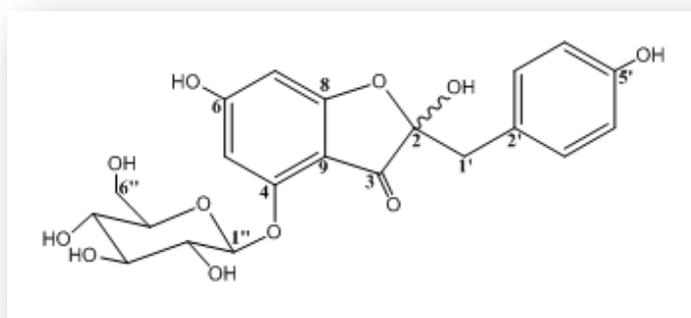
Ce composé est antérieurement identifié au sein de plantes Fabaceae comme *Cyclopia subternata* (Fabaceae). Il contribuerait à l'activité antioxydante de cette dernière [233]. Il est isolé pour la première fois dans le genre *Astragalus*. Il a été surtout rencontré dans les genres *Fortunella* (*F. Crassifolia*, *F. japonica*, *F. margarita*, *F. polyandra* et *F. Hindsii*) et *Citrus* (*C. modurensis* et *C. halimii*) appartenant à la famille Rutaceae [234].

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III.6.

Tableau III.6: Déplacements chimiques RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) du composé AM6 dans MeOD

Position	δ_c (ppm)	δ_H (ppm) (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
1	134,1	/
2	130,6	7,04, (<i>d</i> , 8,5)
3	116,3	6,67 (<i>d</i> , 8,5)
4	156,6	/
5	116,3	6,67 (<i>d</i> , 8,5)
6	130,6	7,04 (<i>d</i> , 8,5)
β	31,3	2,86 (<i>m</i>)
α	48,0	3,34 (<i>m</i>)
C=O	207,2	/
1'	106,2	/
2'	162,2	/
3'	104,6	/
4'	163,1	/
5'	104,6	/
6'	162,2	/
1''	76,9	4,94 (<i>d</i> , 9,4)
2''	74,3	3,62 (<i>t</i> , 9,4)
3''	79,3	3,51 (<i>t</i> , 9,4)
4''	71,2	3,53 (<i>t</i> , 9,4)
5''	82,9	3,42 (<i>m</i>)
6''	62,1	3,82 (<i>dd</i> , 12,5 / 2,0) 3,86 (<i>dd</i> , 12,5 / 2,0)
1'''	76,9	4,94 (<i>d</i> , 9,4)
2'''	74,3	3,62 (<i>t</i> , 9,4)
3'''	79,3	3,51 (<i>t</i> , 9,4)
4'''	71,2	3,53 (<i>t</i> , 9,4)
5'''	82,9	3,42 (<i>m</i>)
6'''	62,1	3,82, (<i>dd</i> , 12,5 / 2,0) 3,86 (<i>dd</i> , 12,5 / 2,0)

III.4.3.7 Identification structurale des composés AM7 et AM7'



Hovetrichoside C (AM7 et AM7')

Le spectre de masse ESI⁻ (Figure III.67) de ce composé, montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 448,8$ $[M-H]^-$ correspondant à une masse moléculaire de 450 uma et une formule brute en $C_{21}H_{22}O_{11}$.

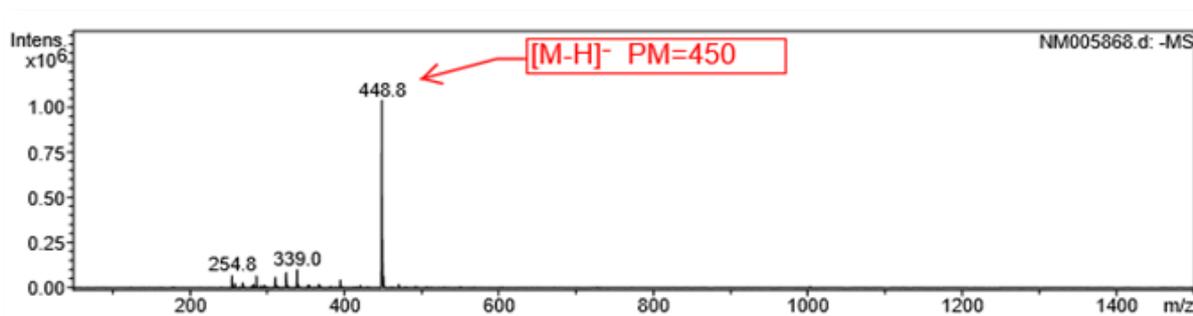


Figure III.67: Spectre de masse ESI⁻ des composés AM7 et AM7'

Son spectre RMN ¹H (Figure III.68) enregistré dans DMSO-*d*₆, présente des signaux dans les deux zones, aromatique et osidique. Les valeurs d'intégration de ces signaux rendent compte d'un nombre double de protons comparativement à celui établi par la formule brute, suggérant ainsi la présence de deux composés isomères, voire stéréoisomères.

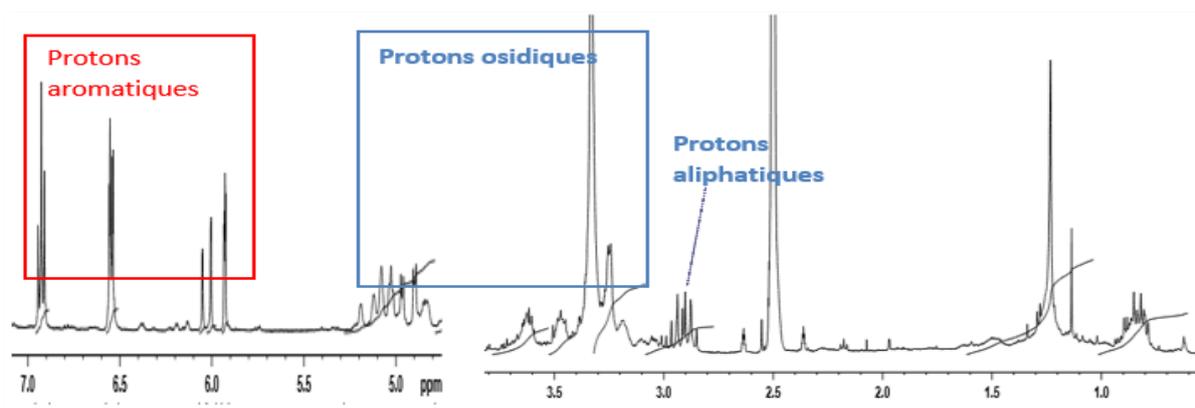


Figure III.68: Spectre RMN ¹H des composés AM7 et AM7'

Le spectre RMN ^1H (Figure III.69) montre quatre signaux doublets de protons aromatiques nommés H-7 et H-5 résonant à δ_{H} 5,93, 6,00 et 6,05 avec une valeur de constante de couplage $J = 1,8$ Hz. Cette valeur indiquant la présence de protons méta-couplés, conduit à distribuer ces derniers sur un cycle nommé A pour les deux composés

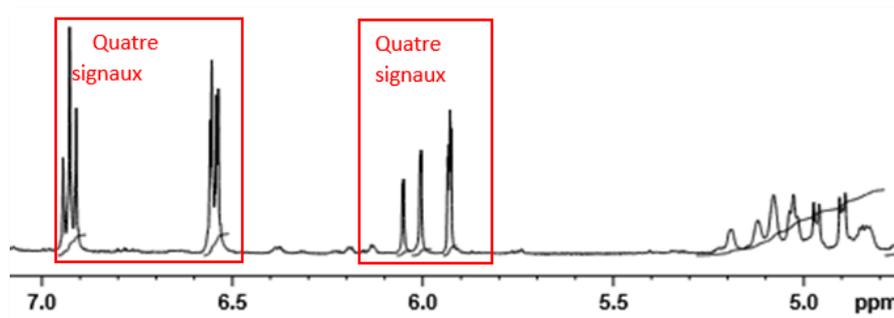


Figure III.69: Spectre RMN ^1H des protons aromatiques des composés AM7 et AM7'

Les carbones qui les portent sont visualisés sur le spectre HSQC (Figure III.70) à travers les corrélations :

- H-5 (δ_{H} 6,00, d , $J = 1,8$ Hz)/C-5 (δ_{C} 95,2) et H-7 (δ_{H} 5,93, d , $J = 1,8$ Hz)/C-7 (δ_{C} 91,5) pour le composé AM7.
- H-5 (δ_{H} 6,05, d , $J = 1,8$ Hz)/C-5 (δ_{C} 95,7) et H-7 (δ_{H} 5,93, d , $J = 1,8$ Hz)/C-7 (δ_{C} 91,7) pour le composé AM7'.

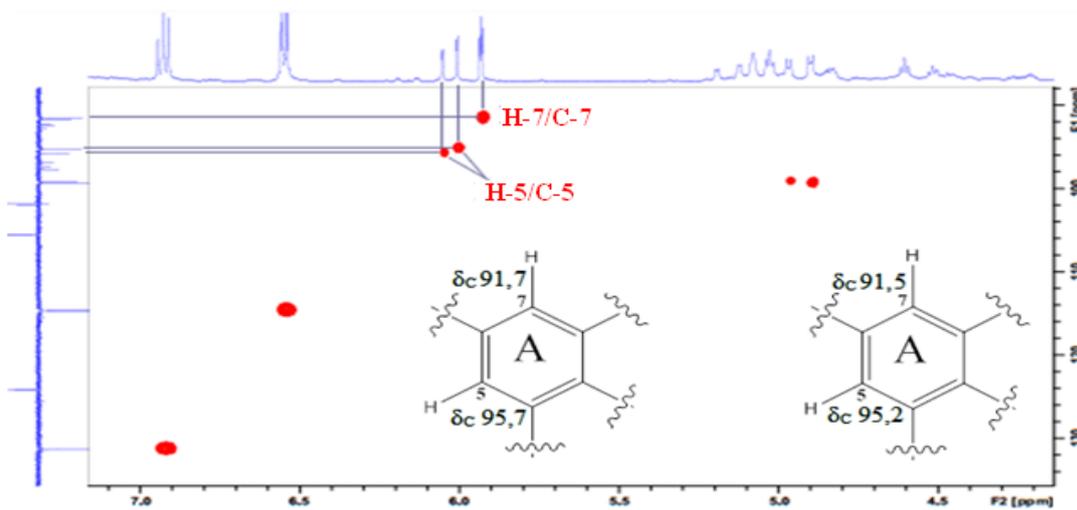


Figure III.70: Spectre HSQC des composés AM7 et AM7'

Les autres carbones quaternaires de ce cycle 4,6,8,9-tétrasubstitué sont localisés à travers les corrélations HMBC (Figure III.71) observées entre:

- le proton H-5 (δ_{H} 6,00 et 6,05) et les carbones oxygénés C-4 (δ_{C} 156,7), C-6 (δ_{C} 168,4), ainsi que le carbone quaternaire C-9 (δ_{C} 101,9).

- le proton H-7 (δ_H 5,93) et le carbone quaternaire C-9, ainsi que les carbones oxygénés C-8 (δ_C 171,9) et C-6.

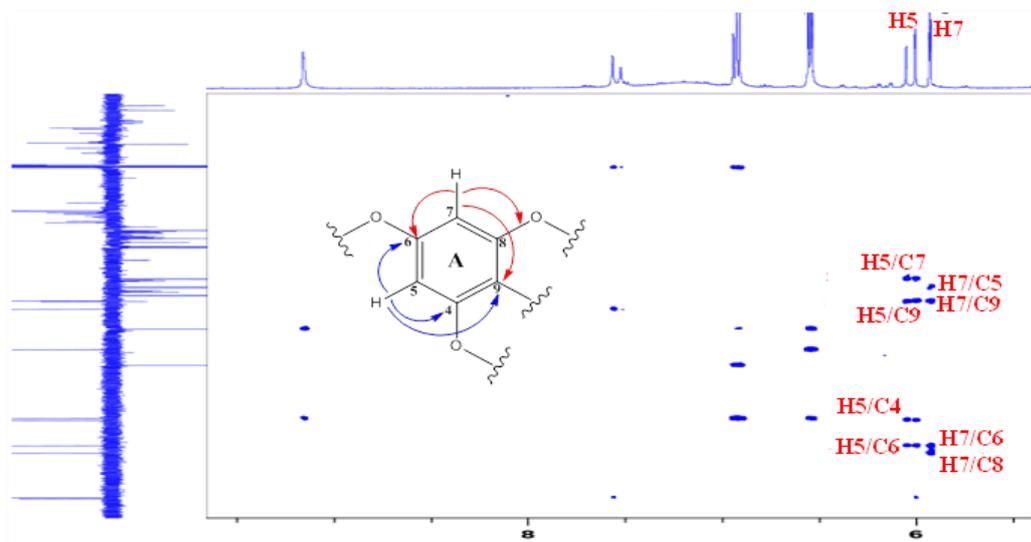


Figure III.71: Spectre HMBC montrant les protons aromatiques du cycle A des composés AM7 et AM7'

D'autres signaux doublets observés, sur le spectre RMN 1H (Figure III.69), correspondent à des protons aromatiques nommés H-4'/H-6' et H-3'/H-7' apparaissant respectivement à δ_H 6,55 (2H, *d*, $J = 7,1$ Hz) et 6,92 (2H, *d*, $J = 7,1$ Hz), illustrent la présence d'un second noyau aromatique parasubstitué nommé B.

L'expérience hétéronucléaire HSQC permet d'identifier les carbones qui les portent (Figure III.72), à travers les couplages H-3'/H-7' (δ_H 6,92)/C-3'/C-7' (δ_C 131,3) et H-4'/H-6' (δ_H 6,55)/C-4'/C-6' (δ_C 114,7).

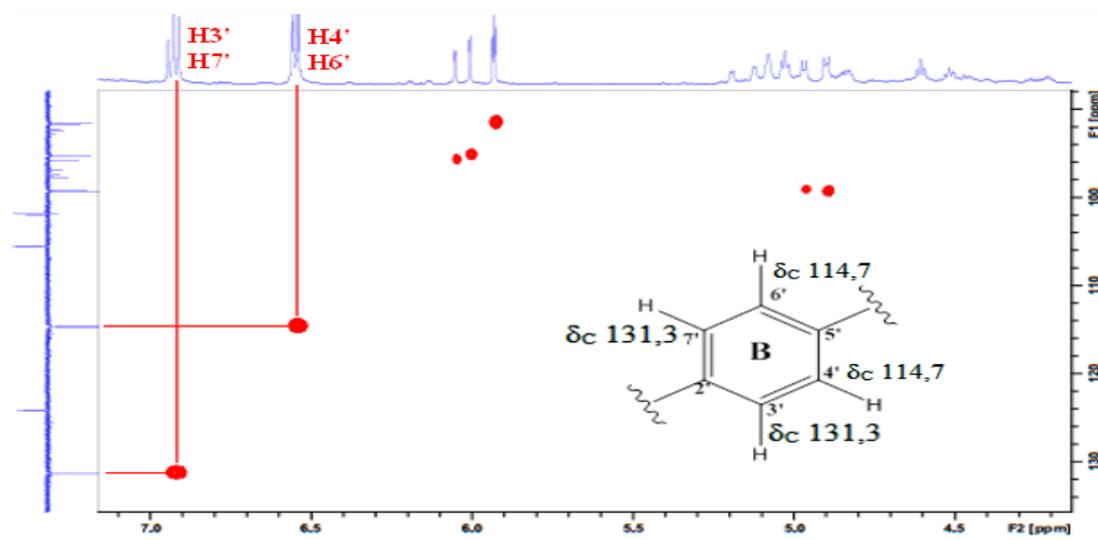


Figure III.72: Spectre HSQC montrant les protons aromatiques du cycle B des composés AM7 et AM7'

En raison de leurs corrélations HMBC (Figure III.73), les carbones quaternaires du cycle B des deux composés, ont été assignés à travers les corrélations longue distance H-3'/H-7' (δ_H 6,92) et le carbone oxygéné C-5' (δ_C 155,9), H-4'/H-6' (δ_H 6,55) et le carbone quaternaire C-2' (δ_C 124,1). Sur le même spectre, il est également observé un autre couplage H-3'/H-7' (δ_H 6,92) avec un groupement CH_2 à δ_C 40,4, s'accordant sur le spectre HSQC (Figure III.74) à un signal multiplet résonant à δ_H 2,90.

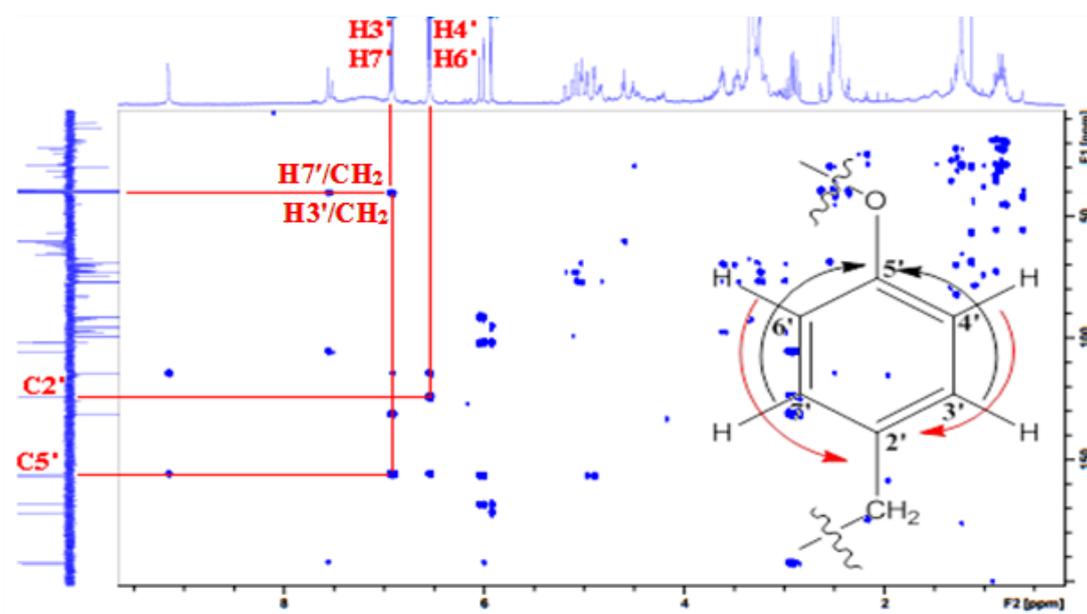


Figure III.73: Spectre HMBC des protons aromatiques du cycle B des composés AM7 et AM7'

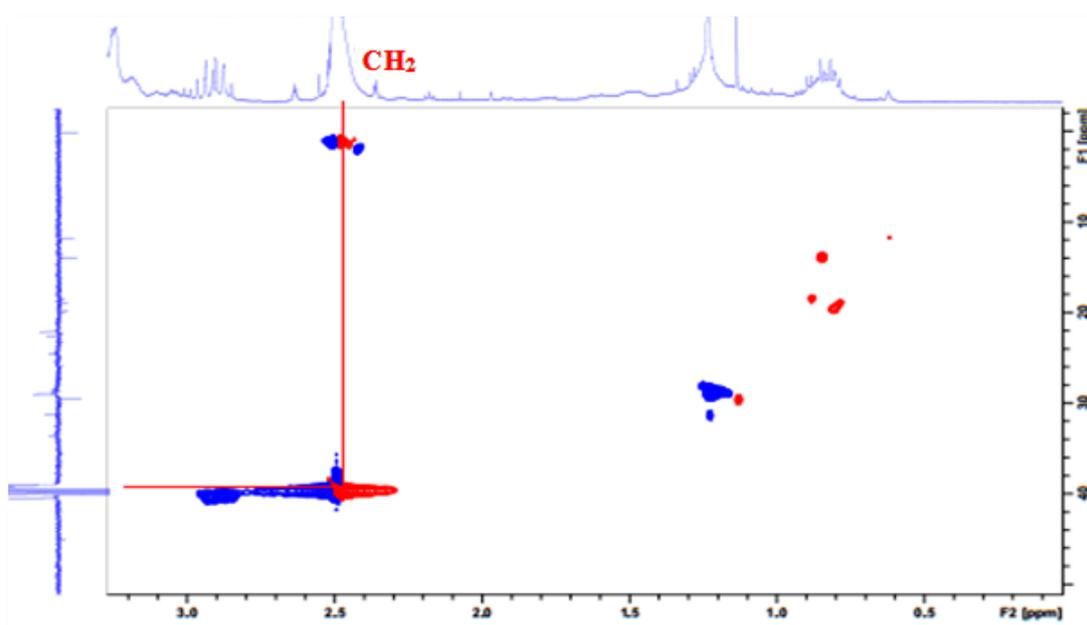


Figure III.74: Spectre HSQC des protons aliphatiques des composés AM7 et AM7'

Ces protons méthyléniques CH₂ (δ_H 2,90) montrent en HMBC (Figure III.75) un couplage avec un carbone quaternaire oxygéné repéré à 105,5 ppm, typique du carbone C-2 d'un cycle oxolane nommé C [235].

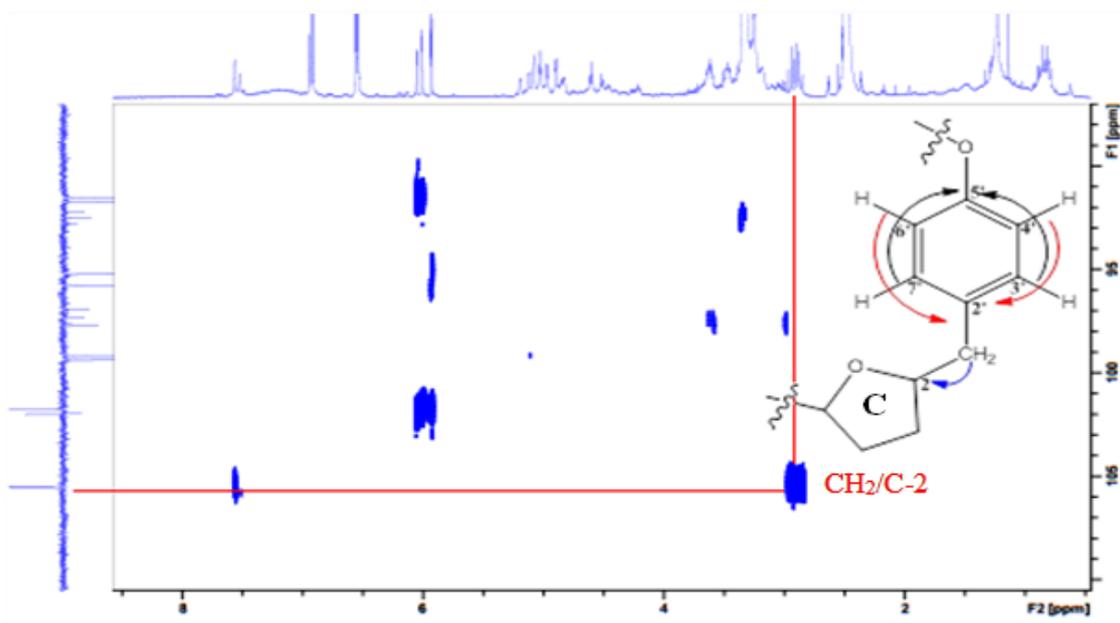


Figure III.75: Spectre HMBC des protons aliphatiques des composés

AM7 et AM7'

Les signaux restants localisés dans la zone déblindée et sortant à δ_C 192,7 et 192,4 sont clairement assignés aux carbones de carbonyle (Figure III.76) des deux isomères.

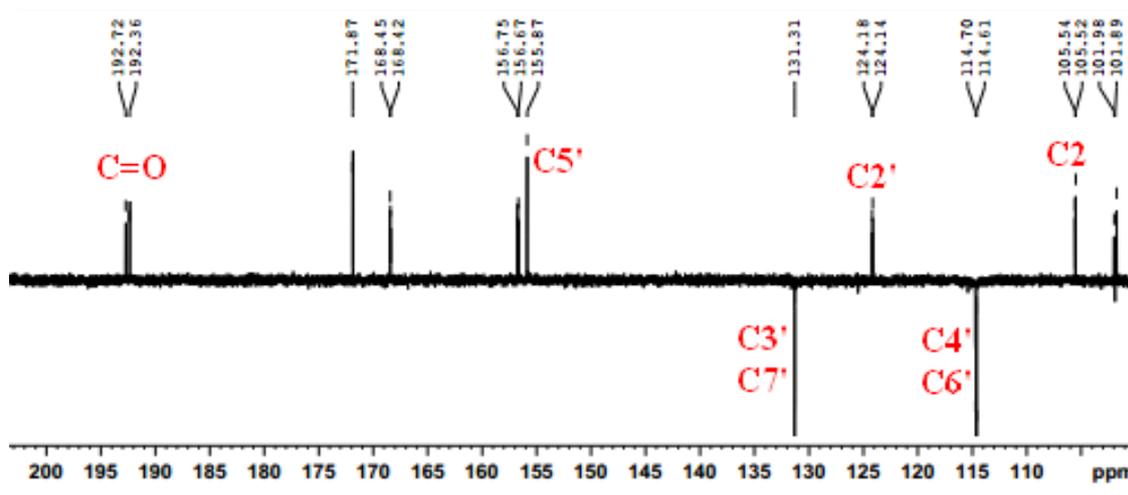


Figure III.76: Spectre RMN DEPTQ des composés AM7 et AM7'

Tous ces éléments structuraux montrent clairement que nos deux composés sont constitués dans leur partie génine, d'un squelette de type auronol identifié à la maesopsine. Sa structure qui donne lieu à deux formes énantiomères dues à la réversibilité de la forme

hémiacétalique au niveau du carbone chiral C-2 [235], explique parfaitement la coexistence des deux produits isomères AM7 et AM7' (Figure III.77).

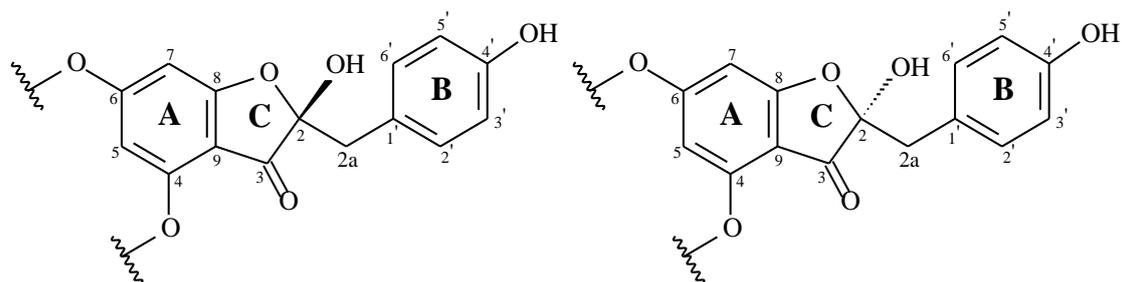


Figure III.77: Structures de l'aglycone des composés AM7 et AM7'

Le spectre HSQC (Figure III.78) de ce mélange montre la présence de deux corrélations, l'une entre un carbone sortant à δ_C 99,4 et un proton doublet à δ_H 4,90 (H-1'', $d, J = 8,2$ Hz), l'autre entre un carbone à δ_C 99,2 et un proton doublet à δ_H 4,98 (H-1'', $d, J = 8,2$ Hz). Ces protons sont caractéristiques de deux protons anomères de sucres.

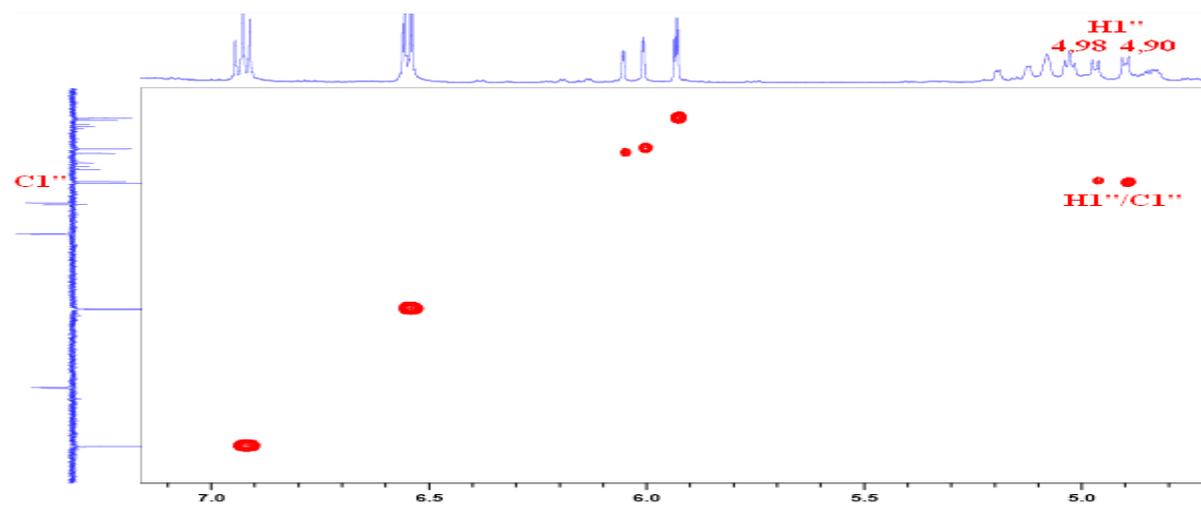


Figure III.78: Spectre HSQC illustrant la partie osidique des composés AM7 et AM7'

Les protons osidiques sont accordés sur le spectre HSQC aux carbones C-2'' (δ_C 72,9), C-3'' (δ_C 76,7), C-4'' (δ_C 69,3), C-5'' (δ_C 77,2), C-6'' (δ_C 60,4) pour le composé AM7 et C-2'' (δ_C 73,0), C-3'' (δ_C 76,7), C-4'' (δ_C 69,2), C-5'' (δ_C 77,1) et C-6'' (δ_C 60,3) pour le composé AM7', identifiant un hexose.

Identification de la partie osidique

Cette identification est évidemment effectuée au moyen de l'expérience COSY H-H. Partant des protons anomères H-1'' [δ_H 4,90, 4,98 ($d, J = 8,2$ Hz)], un système de spins à sept protons d'un hexose est visualisé à travers les corrélations H-1''/H-2'' [δ_H 3,24 (m)], H-2''/H-3''

$[\delta_{\text{H}} 3,19 (m)]$, H-3''/H-4'' $[\delta_{\text{H}} 3,17 (m)]$, H-4''/H-5'' $[\delta_{\text{H}} 3,25 (m)]$ et enfin H-5''/H-2-6'' $[\delta_{\text{H}} 3,47 (m, \text{H-6''a}) / \delta_{\text{H}} 3,61 (m, \text{H-6''b})]$ (Figure III.79).

Cette analyse permet d'identifier un glucose de configuration β ($J_{1''-2''} = 8,2 \text{ Hz}$).

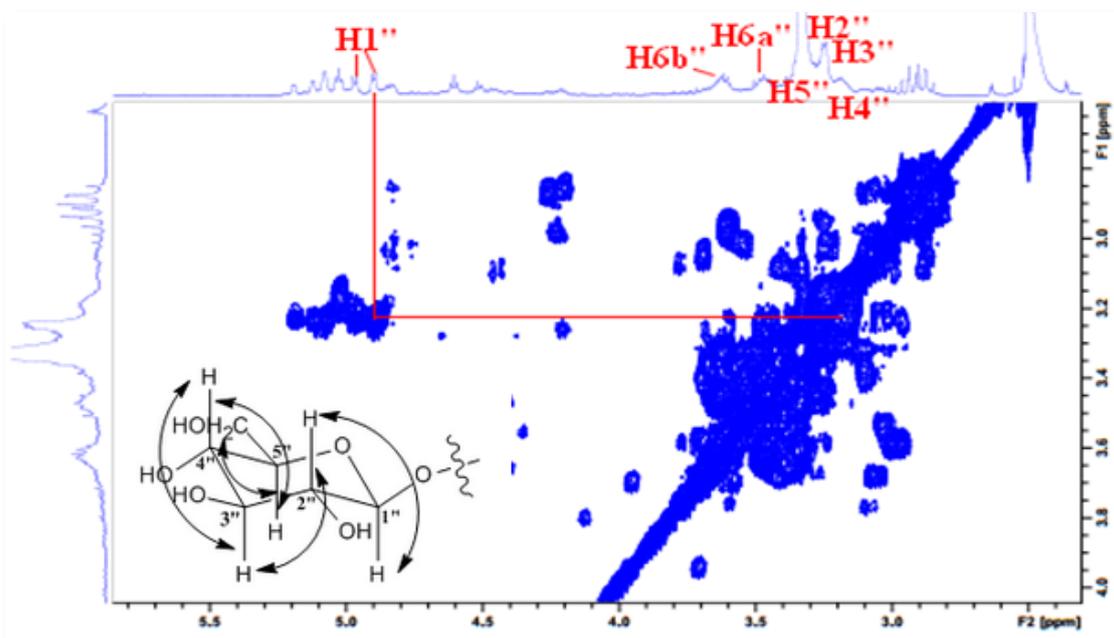


Figure III.79: Spectre COSY H-H identifiant le β -D-glucose

Le point de branchement de ces glucoses sur la génine, en l'occurrence la maesopsine, est localisé en position C-4 des deux composés AM7 et AM7' suite à l'observation d'une corrélation HMBC (Figure III.80) entre le carbone C-4 et les protons anomères H-1'' ($\delta_{\text{H}} 4,90$ et 4,98).

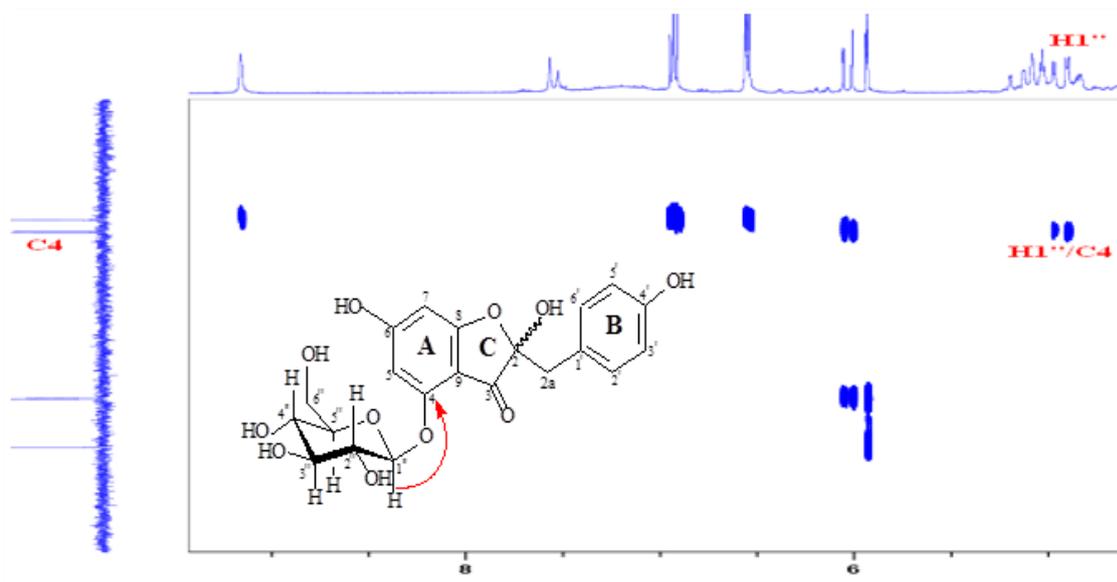
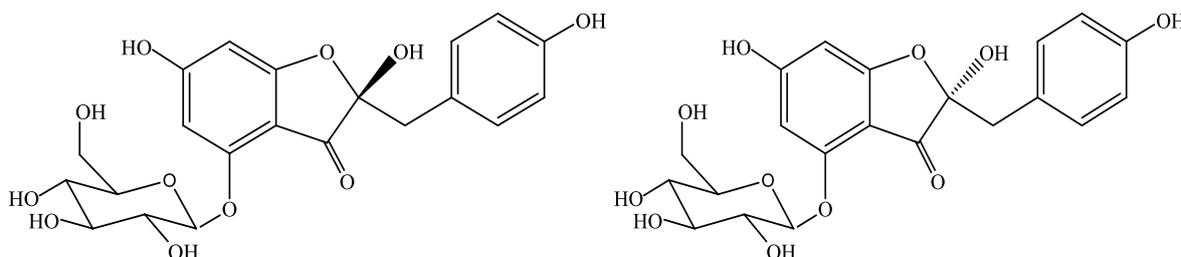


Figure III.80: Spectre HMBC montrant le point de branchement du glucose des composés AM7 et AM7'

En raison de la présence de ces unités osidiques, les composés AM7 et AM7' sont identifiés comme étant une paire diastéréoisomérique (2α -OH et 2β -OH) de proportion 3:2, établie par les intensités relatives de certains signaux RMN ^1H éclatés comme les protons anomères H-1" (δ_{H} 4,90 et 4,98) et H-5 (δ_{H} 6,00 et 6,05).

La comparaison de ces données spectroscopiques avec celles reportées dans la littérature, permet d'identifier les composés AM7 et AM7' comme étant 2-épimère de maesopsine-4-*O*- β -glucopyranoside, connu sous le nom de Hovetrichoside C [235] et isolé originellement de l'espèce *Hovenia trichocarea* appartenant à la famille Rhamnaceae [235]. Il a été rencontré dans les espèces *Punica granatum* (Punicaceae) [236] et *Sonneratia ovata* (Sonneratiaceae) [237]. Bien que les auronos soient présents au sein des plantes Fabaceae, à l'exemple le genre *Medicago*, il apparaît que l'hovetrichoside C est décrit ici pour la première fois dans le genre *Astragalus*.



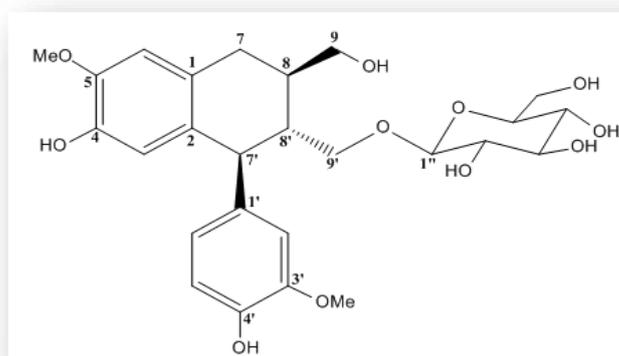
Les déplacements chimiques des protons et carbones des composés AM7 et AM7' sont réunis dans le tableau III.7.

Tableau III.7: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) des composés AM7 et AM7' dans $\text{DMSO-}d_6$

		AM7 (Majeur)		AM7' (Mineur)	
Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))	Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
2	105,5	/	2	105,5	/
3	192,4	/	3	192,7	/
4	156,7	/	4	156,7	/
5	95,2	6,00 (<i>d</i> , 1,8)	5	95,7	6,05 (<i>d</i> , 1,8)
6	168,4	/	6	168,4	/
7	91,5	5,93 (<i>d</i> , 1,8)	7	91,7	5,93 (<i>d</i> , 1,8)
8	171,9	/	8	171,9	/
9	101,9	/	9	101,9	/
1'	40,4	2,90 (<i>m</i>)	1'	40,4	2,90 (<i>m</i>)
2'	124,1	/	2'	124,1	/
3'	131,3	6,92 (<i>d</i> , 7,1)	3'	131,3	6,92 (<i>d</i> , 7,1)
4'	114,7	6,55 (<i>d</i> , 7,1)	4'	114,7	6,55 (<i>d</i> , 7,1)
5'	155,9	/	5'	155,9	/

6'	114,7	6,55 (d, 7,1)	6'	114,7	6,55 (d, 7,1)
7'	131,3	6,92 (d, 7,1)	7'	131,3	6,92 (d, 7,1)
1''	99,4	4,90 (d, 8,2)	1''	99,2	4,98 (d, 8,2)
2''	72,9	3,24 (m)	2''	73,0	3,24 (m)
3''	76,7	3,19 (m)	3''	76,7	3,19 (m)
4''	69,3	3,17 (m)	4''	69,2	3,17 (m)
5''	77,2	3,25 (m)	5''	77,1	3,25 (m)
6''	60,4	3,47 (m)	6''	60,3	3,47 (m)
		3,61 (m)			3,61 (m)

III.4.3.8 Identification structurale du composé AM8



Isolaricirésinol 9'-O-β-D-glucopyranoside (AM8)

Le composé AM8 est isolé sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Il présente sur CCM une tache visible à 254 et 366 nm, se révélant bleue après pulvérisation par une solution acide puis chauffage à 100 °C.

Son spectre de masse ESI⁺ (Figure III.81) exhibe un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 545,3$ $[M+Na]^+$ correspondant à une masse moléculaire égale à 522 uma et une formule brute en $C_{26}H_{34}O_{11}$.

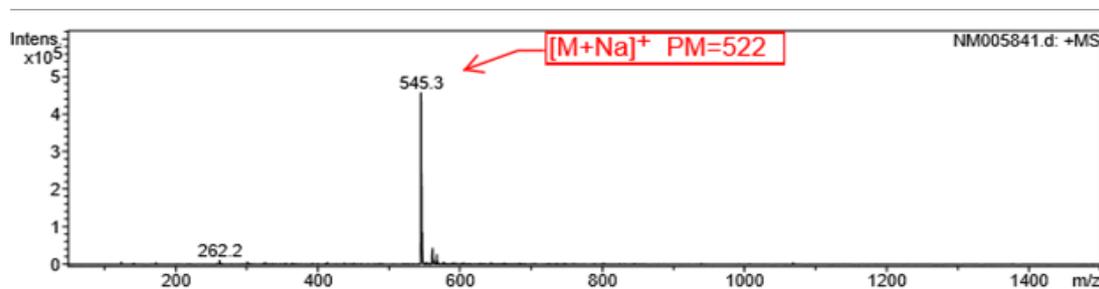


Figure III.81: Spectre de masse ESI⁺ du composé AM8

Le spectre RMN ¹H de ce composé (Figure III.82) révèle l'existence de trois types de protons, aromatiques résonant entre 6,00 et 6,80 ppm, osidiques entre 2,9 et 4 ppm et aliphatiques entre 1,7 et 4,1 ppm.

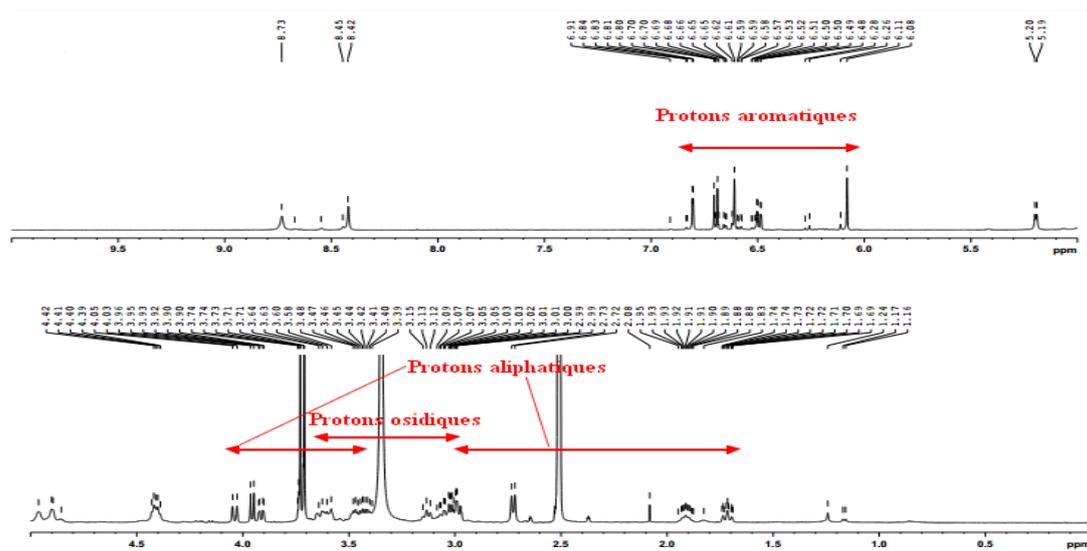


Figure III.82: Spectre RMN ^1H du composé AM8

Au niveau de la zone aromatique, il est observé cinq signaux d'intégration 1H chacun et s'étalant de 6,00 à 6,80 ppm (Figure III.82). Ces signaux traduisant la présence de deux cycles aromatiques nommés A et B, sont constitués de :

- deux singulets sortant à 6,08 et 6,61 ppm
- deux doublets repérés à 6,68 ($J = 8,2$ Hz) et 6,80 ppm ($J = 1,8$ Hz)
- un doublet de doublet ($J = 8,2 ; 1,8$ Hz) localisé à 6,50 ppm

Le cycle A présente un système ABX qui implique le proton H-2' à δ_{H} 6,80 ($d, J = 1,8$ Hz) couplant en méta avec le proton H-6' (δ_{H} 6,50) comme le confirme le spectre COSY H-H (Figure III.83). Le proton repéré à 6,68 ppm et nommé H-5' ($d, J = 8,2$ Hz) montre un couplage ortho avec H-6' (6,50 ppm, $dd, J = 8,2 ; 1,8$ Hz).

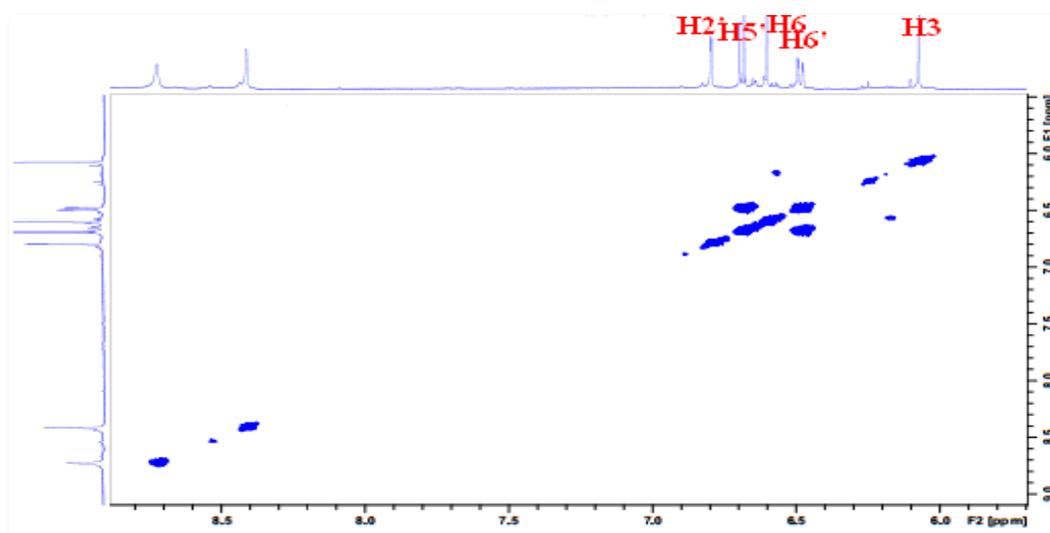


Figure III.83: Spectre COSY H-H montrant les protons du cycle A du composé AM8

Le cycle B est constitué de deux protons se présentant sur le spectre RMN ^1H (Figure III.82) sous forme de deux singulets visualisés à δ_{H} 6,08 et 6,61 ppm. L'absence de couplage sur le spectre COSY H-H (Figure III.83) confirme une position *para* pour ces protons attribués aux protons H-3 et H-6 du cycle B (Figure III.84).

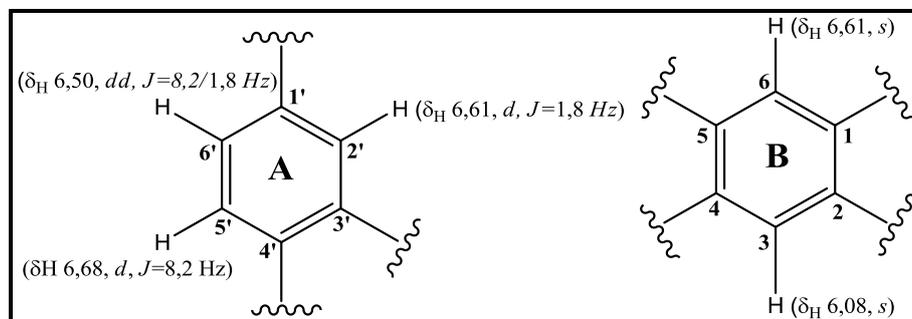


Figure III.84: Cycles aromatiques du composé AM8

L'analyse du spectre HSQC (Figure III.85) permet d'assigner les déplacements chimiques des carbones C-2' (δ_{C} 113,9), C-5' (δ_{C} 115,5) et C-6' (δ_{C} 121,1) pour le cycle A et C-6 (δ_{C} 111,8) et C-3 (δ_{C} 116,2) pour le cycle B.

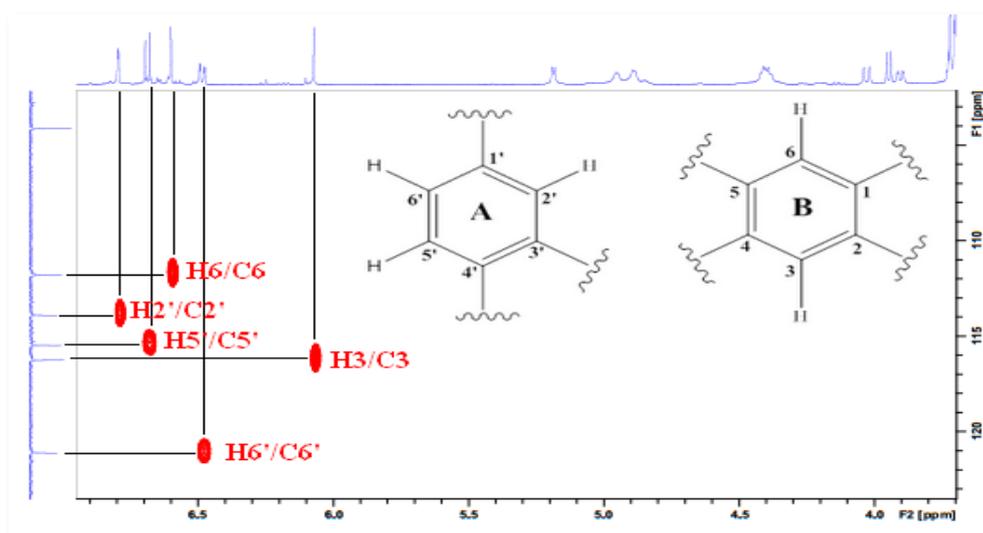


Figure III.85: Spectre HSQC du composé AM8

Les informations tirées du spectre HMBC (Figure III.86) permettent de distinguer tous les carbones de chaque cycle aromatique à travers les corrélations H/C en 2J et 3J . Pour le noyau aromatique A, le spectre montre des couplages en 3J entre :

- ✓ le proton H-2' et le carbone oxygéné C-4' (δ_{C} 144,5) et le méthine CH-6' (δ_{C} 121,1).
- ✓ le proton H-5' et le carbone quaternaire C-1' (δ_{C} 136,9) ainsi que le carbone oxygéné C-3' (δ_{C} 147,1).
- ✓ le proton H-6' et les carbones C-2' (δ_{C} 113,9) et C-4'.

Il montre aussi des couplages en 2J et 3J entre les protons H-6/H-3 et les carbones quaternaires C-1 (δ_c 132,7), C-5 (δ_c 144,5), C-4 (δ_c 144,0) et C-2 (δ_c 127,0) (Figures III.86 et III.87).

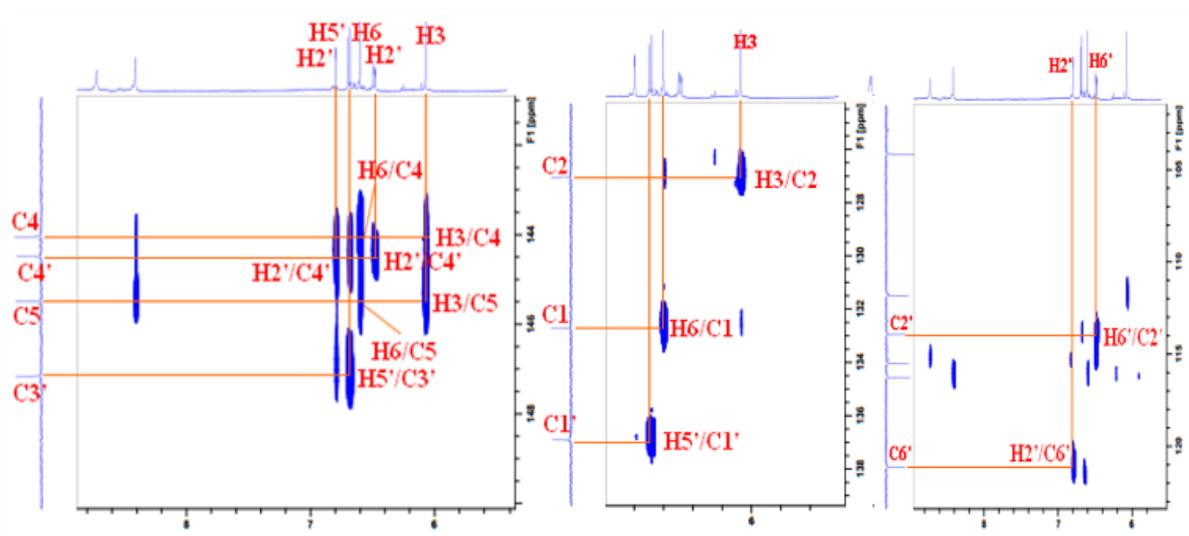


Figure III.86: Spectre HMBC des cycles aromatiques du composé AM8

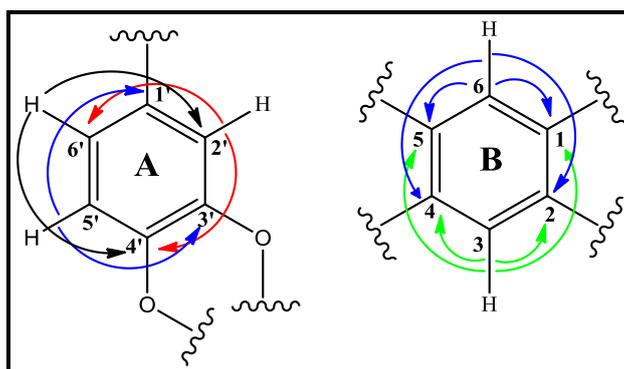


Figure III.87: Corrélations HMBC des cycles aromatiques du composé AM8

Dans le but de déterminer la substitution au niveau de ces noyaux aromatiques, l'analyse du spectre RMN 1H du composé révèle la présence de :

- ✓ un signal singulet d'intégration 6H sortant à 3,71 ppm, lié selon le spectre HSQC (Figure III.88) aux signaux de carbones méthoxyliques résonant à 55,5 et 55,6 ppm.
- ✓ un signal doublet d'intégration 2H résonant à 2,72 ppm, attribuable à un groupement méthylène et dont le carbone est repéré à 32,5 ppm selon l'expérience HSQC.
- ✓ quatre signaux d'intégration 1H chacun et résonant à δ_H 2,96 (*m*), 3,90 (*dd*, $J = 9,8 ; 1,9$ Hz), 3,45 (*m*) et 3,57 (*m*). Ces derniers constituent deux groupements CH_2 selon le spectre HSQC. Les deux carbones CH_2 sont repérés à δ_c 62,8 et 67,6. Les valeurs de déplacement indiquent qu'ils sont oxydés.

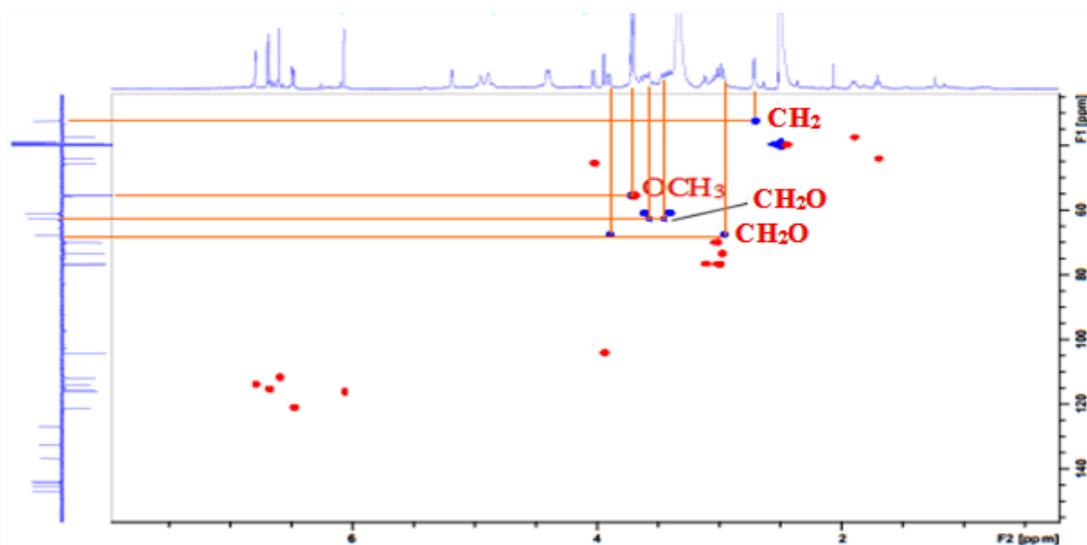


Figure III.88: Spectre HSQC du composé AM8

Le branchement de ces groupements sur les cycles A et B est mis en évidence par les corrélations visualisées sur le spectre HMBC (Figure III.89) entre les protons OCH₃ (3,71 ppm) et le carbone C-3' (δ_C 147,1) du cycle A, de même qu'entre les protons du deuxième groupement méthoxyle (3,71 ppm) et le carbone C-5 (δ_C 145,5) du cycle B.

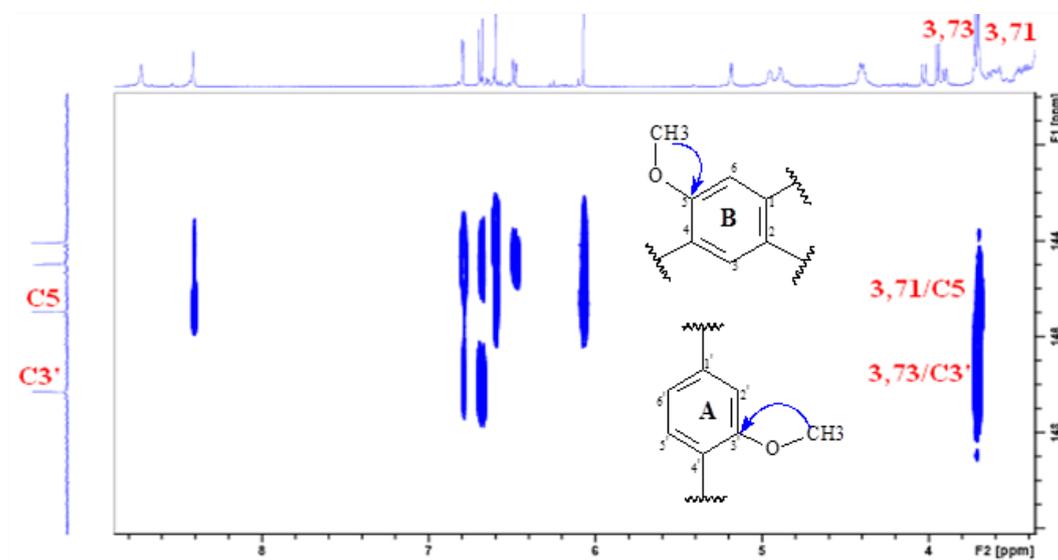
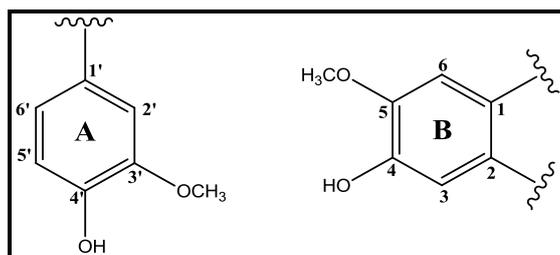


Figure III.89: Spectre HMBC illustrant la position des groupements méthoxyliques (Composé AM8)

Les substituants attachés aux carbones C-4 (δ_C 144,0) et C-4' (δ_C 144,5) sont identifiés comme étant des groupements hydroxyles, suite au déblindage de leurs déplacements chimiques et de l'absence des corrélations sur le spectre HMBC avec d'autres protons à l'exception de celles citées précédemment.



Le substituant lié au carbone C-1' du cycle A est déterminé par les corrélations en 3J observées sur le spectre HMBC (Figure III.90) entre les protons aromatiques H-2' et H-6' et un carbone aliphatique résonnant à δ_C 45,5 attribué au carbone C-7'.

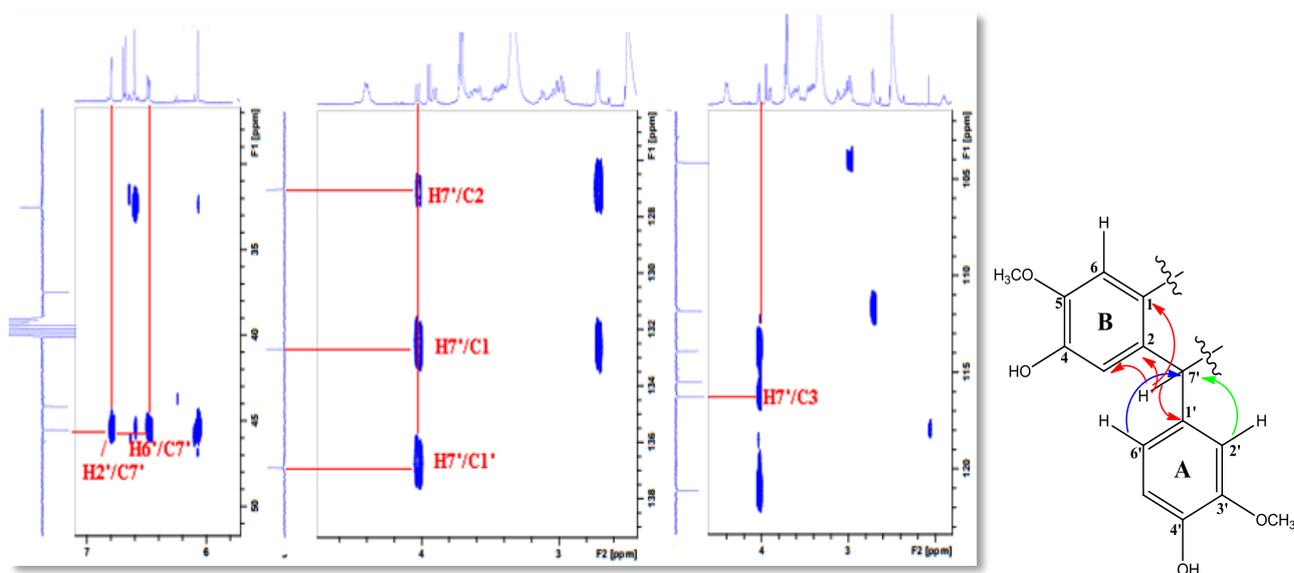


Figure III.90: Spectre HMBC du composé AM8

Ce dernier montre sur le spectre HSQC (Figure III.91) une tache de corrélation avec le proton repéré à δ_H 4,03 (H-7').

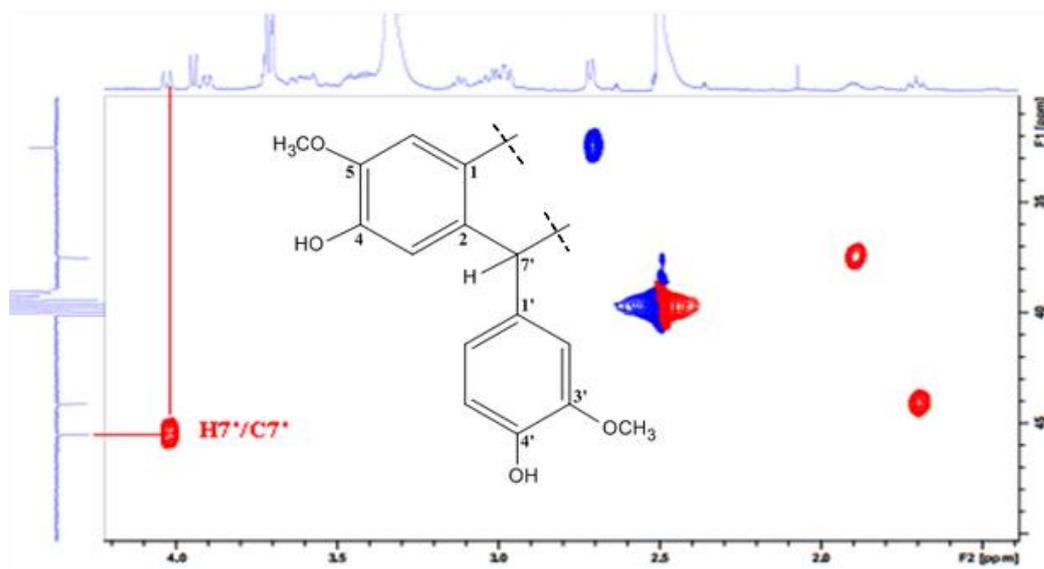


Figure III.91: Spectre HSQC du composé AM8

Cette connectivité se trouve confirmée par la corrélation observée sur le spectre HMBC (Figures III.90) du proton H-7' avec le carbone C-1' (δ_C 136,9) du cycle A.

Le proton H-7' présente également, sur le spectre HMBC (Figure III.90), d'autres corrélations avec les carbones quaternaires aromatiques C-1 (δ_C 127,0), C-3 (δ_C 116,2) et C-2 (δ_C 132,7) conduisant à suggérer son attachement au carbone quaternaire C-2 du cycle B.

L'exploitation de toutes ces données, par comparaison à celle de la littérature, laisse suggérer l'existence d'un squelette de nature lignanique pour ce composé [237].

Le substituant lié au carbone C-1 du cycle B est identifié par l'analyse du spectre HMBC à travers la corrélation du proton H-6 (δ_H 6,61) avec le groupement CH₂ (δ_C 32,5) identifié précédemment et attribué à 7-CH₂. Ses protons localisés à δ_C 2,72 selon l'expérience HSQC (Figure III.92) couplent en HMBC (Figure III.93) avec C-1 (δ_C 127,0), C-2 (δ_C 132,7) et C-6 (δ_C 111,8), confirmant la liaison du groupement méthylène 7-CH₂ au carbone C-1 du cycle B.

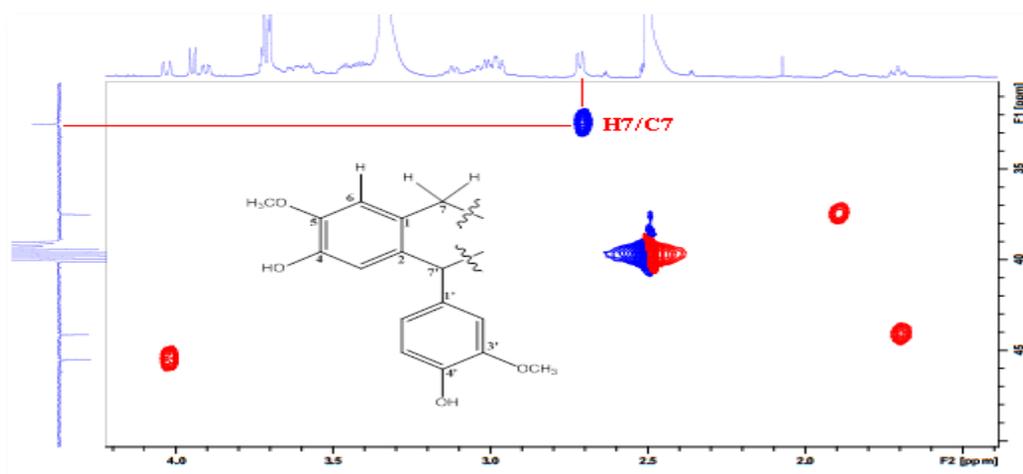


Figure III.92: Spectre HSQC du composé AM8

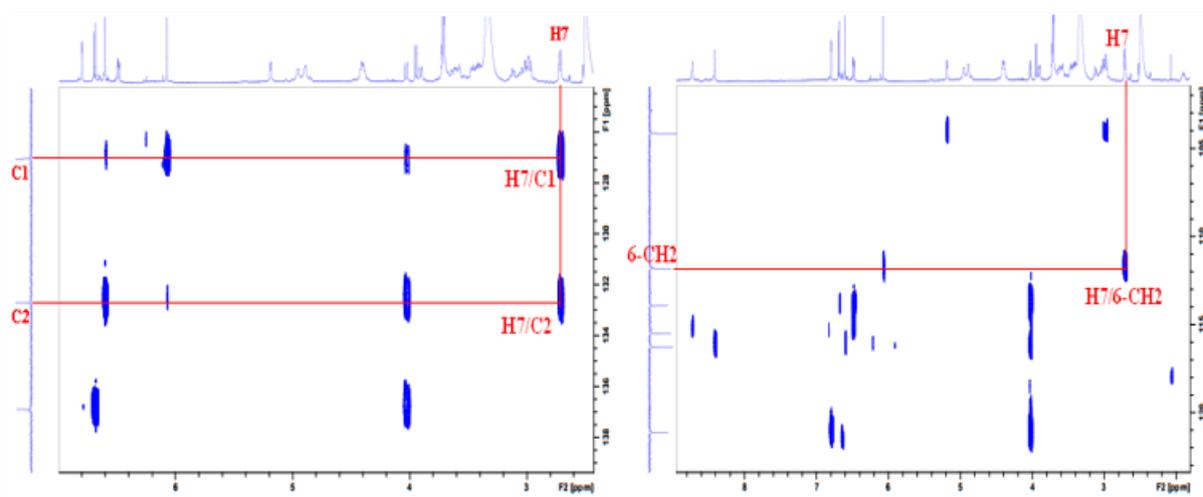
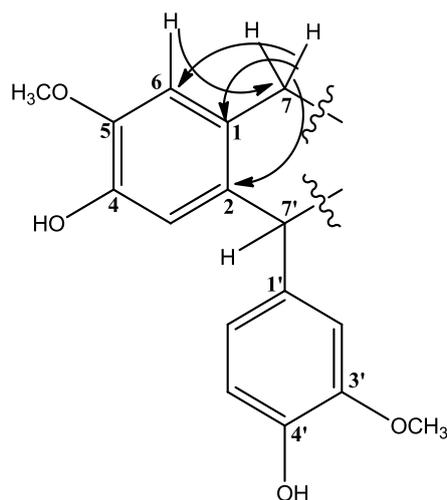
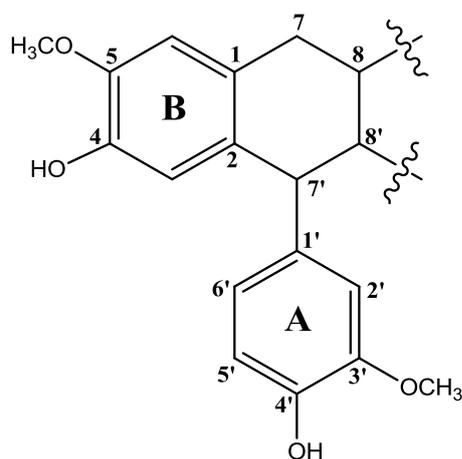


Figure III.93: Corrélations HMBC du groupement CH₂ aliphatique (Composé AM8)



L'identification de tous les substituants des groupements aromatiques A et B montre bien que ce dernier est un lignane de type aryltétraline [235].



La présence du cycle aliphatique à 6 chaînons collé au cycle A est confirmée par expérience COSY H-H et HMBC.

En effet, l'analyse COSY H-H (Figure III.94) montre deux systèmes de spins à quatre protons chacun constituant l'enchaînement $-7'\text{CH}-8'\text{CH}-9'\text{CH}_2\text{O}-$ à travers les couplages H-7' ($\delta_{\text{H}} 4,03$, *d*, $J = 10,7$ Hz)/H-8' ($\delta_{\text{H}} 1,72$, *t*, $J = 10,4$ Hz)/ H-9'a ($\delta_{\text{H}} 2,96$, *m*) et H-9'b ($\delta_{\text{H}} 3,90$, *dd*, $J = 9,8$; $6,7$ Hz) et H-9a/H-9b, et l'enchaînement $-7\text{CH}-8\text{CH}-9\text{CH}_2\text{O}-$ au vu des couplages H-7 ($\delta_{\text{H}} 2,70-2,72$, *m*)/H-8 ($\delta_{\text{H}} 1,91$, *m*)/ H-9a ($\delta_{\text{H}} 3,45$, *m*) et H-9b ($\delta_{\text{H}} 3,57$, *m*). Le même spectre montre également un couplage H8/H8'.

L'expérience HSQC permet de repérer les carbones C-8' ($\delta_{\text{C}} 44,1$) et C-8 ($\delta_{\text{C}} 37,5$), ainsi que les carbones oxygénés C-9' ($\delta_{\text{C}} 67,6$) et C-9 ($\delta_{\text{C}} 62,8$). La valeur de déplacement chimique du carbone C-9 suggère qu'il est porteur d'un groupement hydroxyle libre.

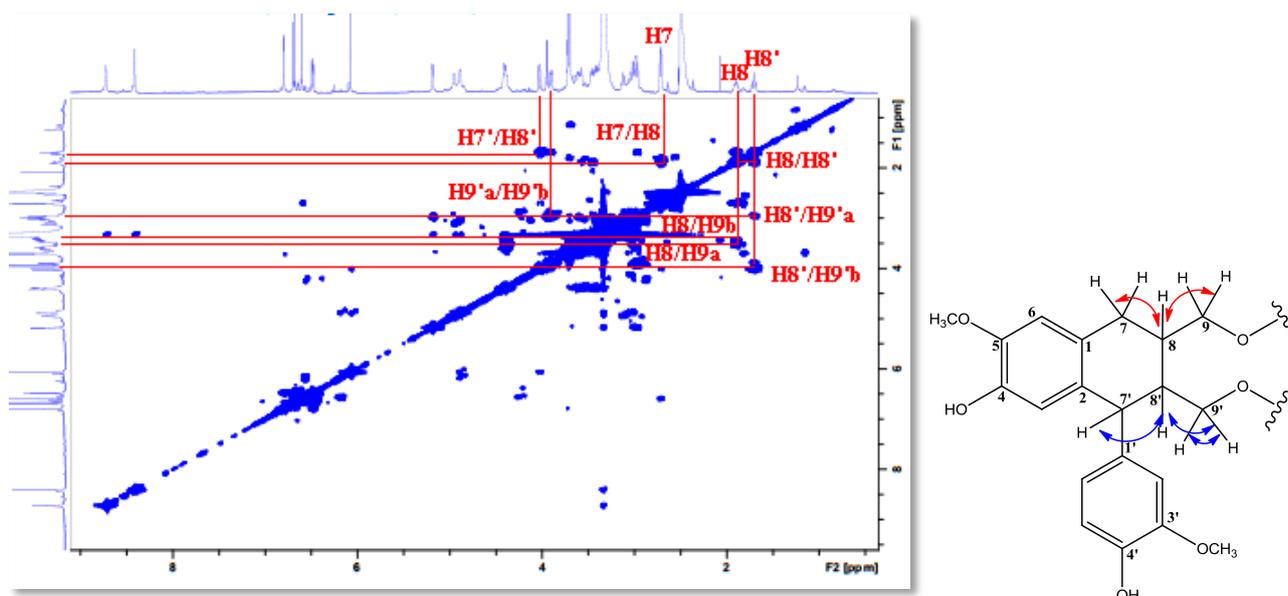


Figure III.94: Corrélations COSY H-H des protons aliphatiques du composé AM8

Ces deux enchainements $-7\text{CH}-8\text{CH}-9\text{CH}_2\text{O}-$ et $-7\text{CH}-8\text{CH}-9\text{CH}_2\text{OH}-$ sont confirmés par HMBC (Figure III.95) qui montrent des couplages hétéronucléaires H-7 ($\delta_{\text{H}} 2,72$)/C-8 ($\delta_{\text{C}} 37,5$) et H-7/C-9 ($\delta_{\text{C}} 62,9$), de même que les couplages H-7' ($\delta_{\text{H}} 4,03$)/C-8' ($\delta_{\text{C}} 44,1$) et H-7'/C-9' ($\delta_{\text{C}} 67,6$).

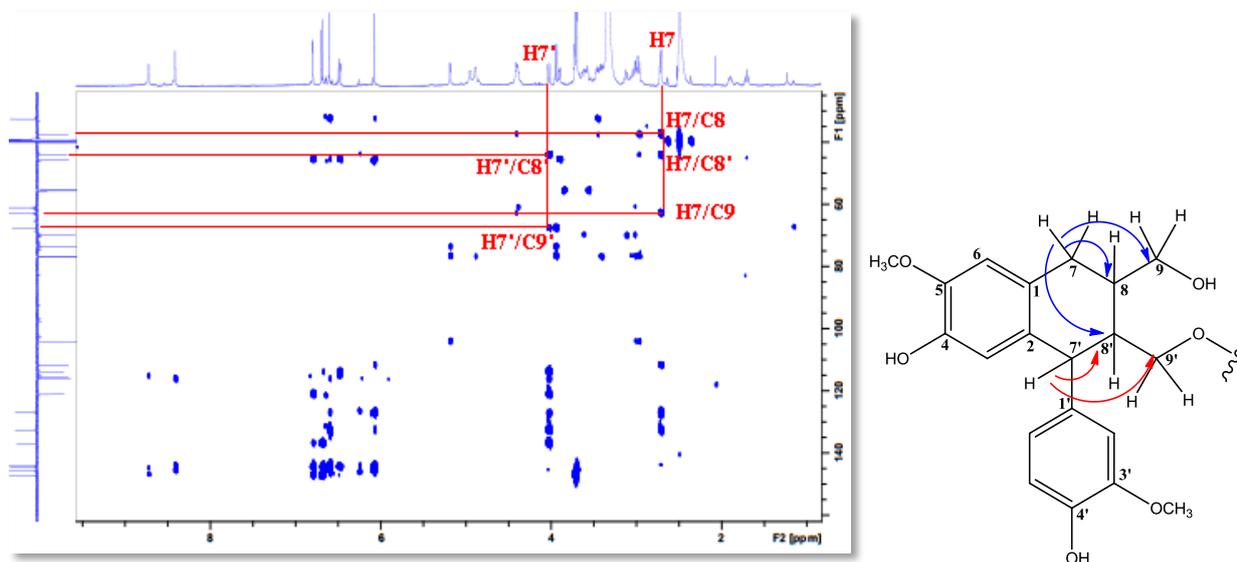
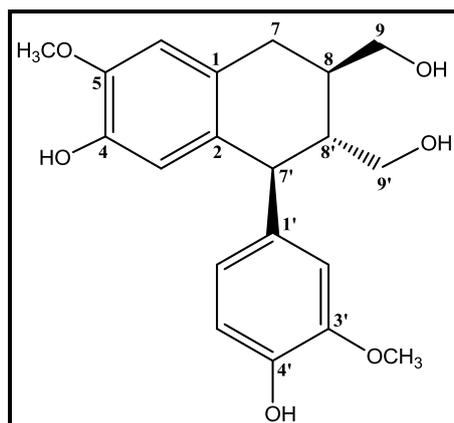


Figure III.95: Spectre HMBC montrant les protons aliphatiques du composé AM8

Toutes ces données spectrales, en plus de l'analyse des constantes de couplage, notamment au niveau des protons H7'/H-8' ($J_{7'-8'} = 10,5$ Hz) et H8/H-8' ($J_{8-8'} = 10,4$ Hz), permettent d'identifier notre composé, dans sa partie non osidique, à un lignane nommé isolaricirésinol [240].



Isolaricirésinol

L'observation de plusieurs signaux dans l'intervalle 2,9-4 ppm ainsi qu'un signal d'intégration 1H à δ_H 3,95 (*d*, $J = 7,8$ Hz) d'un proton anomère porté par un carbone à δ_C 104,1 selon le spectre HSQC, établit la présence d'une unité osidique dont il reste à identifier.

Son identification est effectuée au moyen de l'expérience COSY H-H (Figure III.96). Partant du proton anomère H-1'' [δ_H 3,95 (*d*, $J = 7,8$ Hz)], un système de spins à sept protons d'un hexose est visualisé à travers les couplages: H-1''/H-2'' [δ_H 2,97 (*t*, $J = 7,8$ Hz)], H-2''/H-3'' [δ_H 3,13 (*t*, $J = 7,8$ Hz)], H-3''/H-4'' [δ_H 3,03 (*dd*, $J = 9,3 ; 7,8$ Hz)], H-4''/H-5'' [δ_H 3,01 (*ddd*, $J = 9,3 ; 4,7 ; 2,6$ Hz)] et enfin H-5''/H-6'' [δ_H 3,41 (*dd*, $J = 11,7 ; 2,6$ Hz, H-6''a) / δ_H 3,63 (*dd*, $J = 11,7 ; 4,7$ Hz, H-6''b)].

La grande valeur de constante de couplage $J_{3''-4''}$, de l'ordre de 7,8 Hz, traduisant une position axiale pour les protons H-3'' et H-4'', indique clairement que l'hexose est un glucose de configuration β ($J_{1''-2''} = 7,8$ Hz).

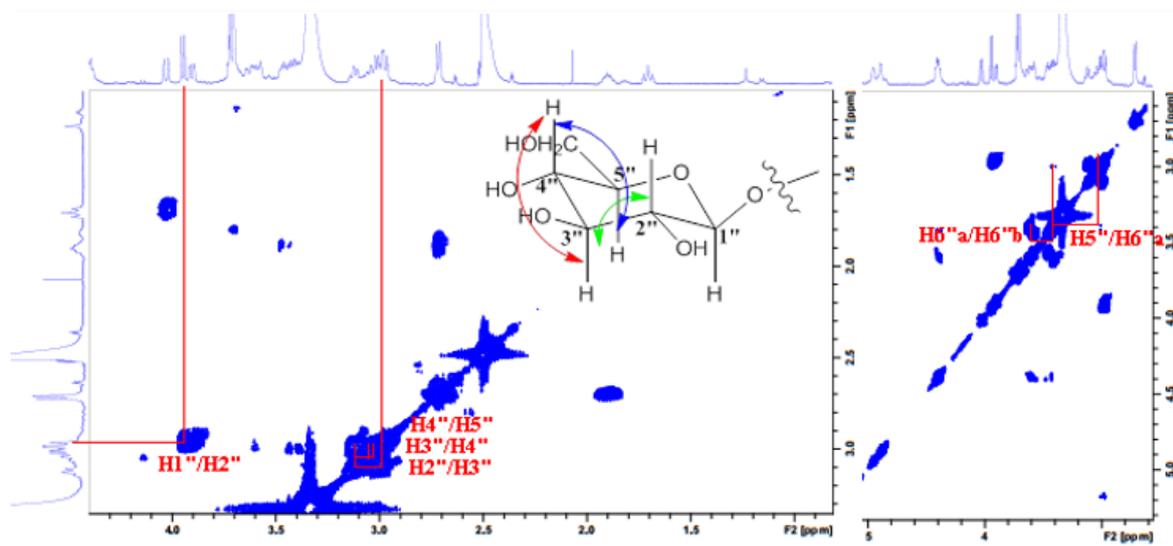


Figure III.96: Spectre COSY H-H identifiant le β -D-glucose

Les carbones de cette unité osidique ont été caractérisés par expérience HSQC (Figure III.97).

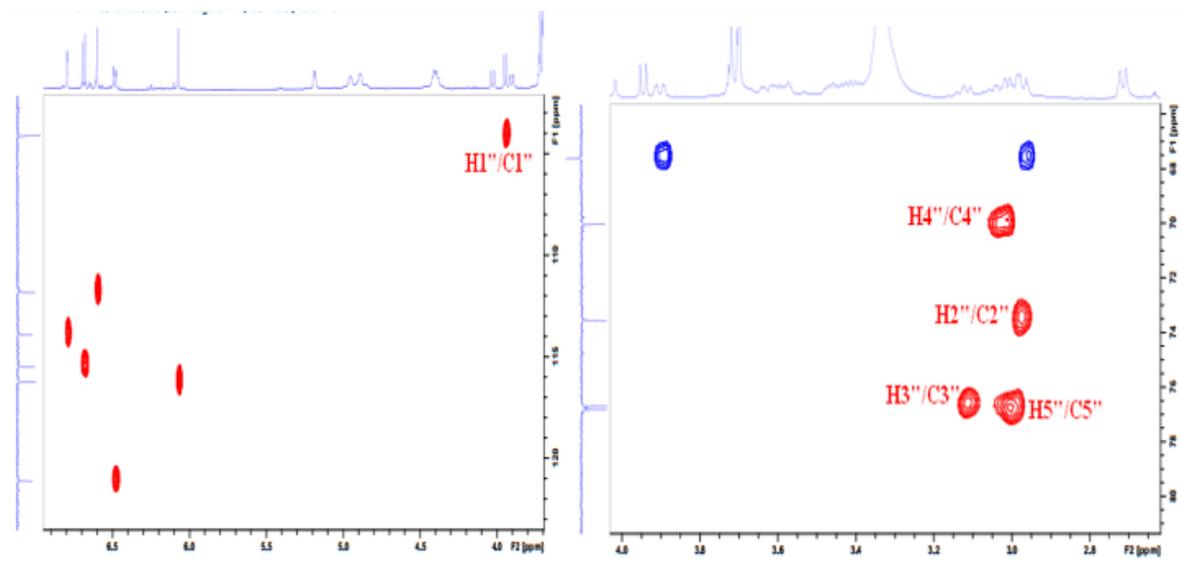


Figure III.97: Spectre HSQC de la partie osidique

Le point de branchement est confirmé par expérience HMBC (Figure III.98). En effet cette dernière montre un couplage entre le proton anomère du glucose résonnant à 3,95 ppm et le carbone C-9' (67,6 ppm) de la génine.

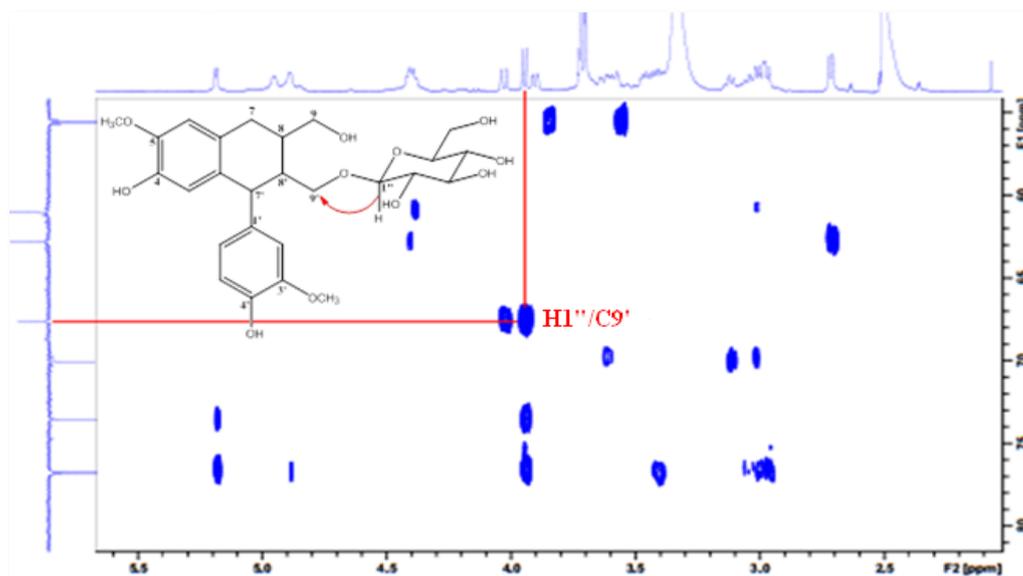
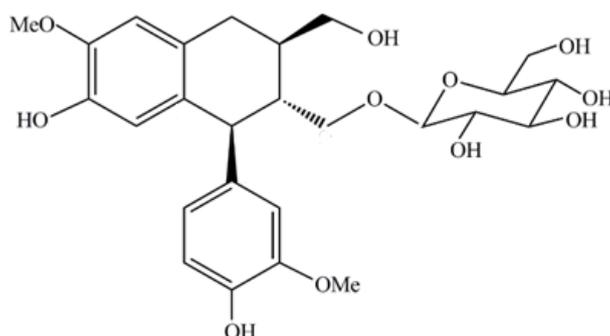


Figure III.98: Spectre HMBC du composé AM8

Toutes ces données spectrales, en plus la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D +16$ ($c = 0,9$ g/mL, MeOH/CH₂Cl₂ (1/0,5)), se sont avérés identiques à celle d'un lignane nommé: Isolaricirésinol 9'-O-β-D-glucopyranoside.



Ce composé est reporté pour la première fois dans le genre *Astragalus*. Il a été isolé antérieurement des espèces *Pedicularis densispica* (Scrophulariaceae) [237], *Pelargonium reniforme* CURT. (Geraniaceae) [241], *Populus nigra* (Salicaceae) [242] et *Stemmadenia minima* (Apocynaceae) [243]. Il apparait aussi qu'il est isolé pour la première fois dans la famille Fabaceae.

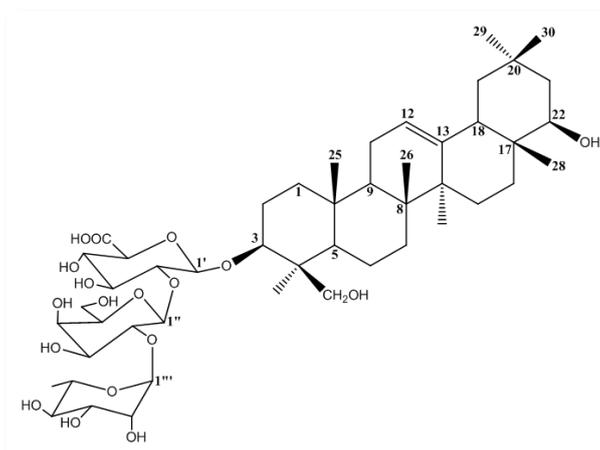
Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III.8.

Tableau III.8: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé AM8 dans $\text{DMSO-}d_6$

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
1	127,0	/
2	132,7	/
3	116,2	6,08 (<i>s</i>)
4	144,0	/
5	145,5	/
6	111,8	6,61 (<i>s</i>)
7	32,5	2,70-2,72 (<i>m</i>)
8	37,5	1,91 (<i>m</i>)
9	62,8	3,45 (<i>m</i>) 3,57 (<i>m</i>)
1'	136,9	/
2'	113,9	6,80 (<i>d</i> , 1,8)
3'	147,1	/
4'	144,5	/
5'	115,5	6,68 (<i>d</i> , 8,2)
6'	121,1	6,50 (<i>dd</i> , 8,2 / 1,8)
7'	45,5	4,03 (<i>d</i> , 10,7)
8'	44,1	1,72 (<i>t</i> , 10,4)
9'	67,6	2,96 (<i>m</i>) 3,90 (<i>dd</i> , 9,8 / 6,7)
3'-OMe	55,6	3,71 (<i>s</i>)
5'-OMe	55,5	3,71 (<i>s</i>)
1''	104,1	3,95 (<i>d</i> , 7,8)

2''	73,3	2,97 (t, 7,8)
3''	76,7	3,13 (t, 7,8)
4''	70,0	3,03 (dd, 9,3 / 7,8)
5''	76,8	3,01 (ddd, 9,3 / 4,7 / 2,6)
6''	61,0	3,41 (dd, 11,7 / 2,6) 3,63 (dd, 11,7 / 4,7)

III.4.3.9 Identification structurale du composé AM9



3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-galactopyranosyl-(1-2)- β -D-glucuronopyranosyl]-3 β , 22 β , 24-trihydroxyoléan-12-ène (AM9)

Le spectre de masse ESI⁺ (Figure III.99) de ce composé présente un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 965$ [M+Na]⁺, soit une masse moléculaire égale à 942 uma correspondant à une formule brute en C₄₈H₇₈O₁₈.

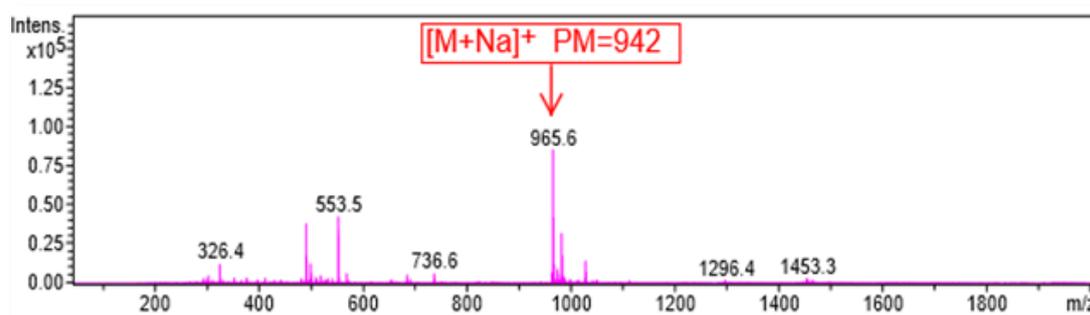
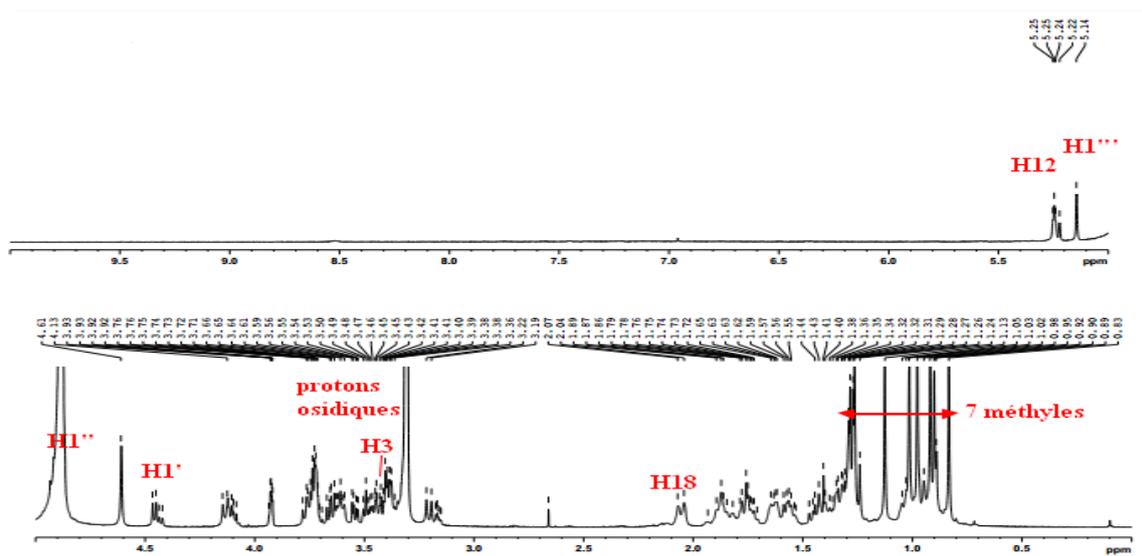
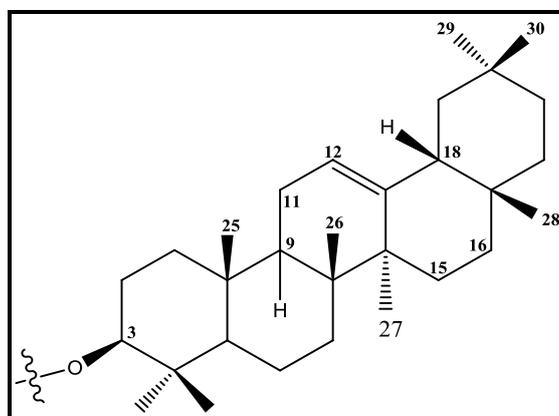


Figure III.99: Spectre masse ESI⁺ du composé AM9

Son spectre RMN ¹H (Figure III.100), enregistré dans MeOD, permet d'identifier une génine triterpénique à squelette oléanane insaturée en 12-13, et cela par l'observation de :

- sept signaux à champ fort résonant à δ_H 0,83 (3H, s, H-28), 0,89 (3H, s, H-25), 0,92 (3H, s, H-30), 0,98 (3H, s, H-26), 1,03 (3H, s, H-29), 1,13 (3H, s, H-27) et 1,24 (3H, s, H-23), attestant de la présence de sept groupements méthyles.

- un signal résonant à δ_H 3,40 (1H, *dd*, $J_{ax-ax} = 10,3$, $J_{ax-eq} = 3,5$ Hz) d'un proton porté par un carbone oxyméthine H-3 α axial d'un triterpène.
- un signal de proton éthylénique à δ_H 5,25 (*t*, $J = 3,3$ Hz) caractéristique du proton H-12 du squelette oléanène.
- un signal à δ_H 2,07 (*d*, $J = 14,7$ Hz) attribuable au proton H-18 du triterpène.

Figure III.100: Spectre RMN 1H du composé AM9Figure III.101: Squelette Δ -12 oléanène

La nature glycosidique du composé est attestée par l'observation de plusieurs signaux entre 3,3 et 4,2 ppm et de deux signaux doublets à δ_H 4,45 (1H, *d*, $J = 7,9$ Hz) et 5,14 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz) caractéristiques de protons anomères de deux sucres. Cependant, la densité des signaux dans cet intervalle ppm laisse suggérer la présence de plus de deux unités osidiques. Ceci sera confirmé par l'expérience COSY H-H (Figure III.102) qui met en évidence la présence d'une troisième unité osidique à travers le signal (enveloppé par le pic de l'eau) de proton anomère et sortant à δ_H 4,87 (1H, *d*, $J = 7,5$ Hz).

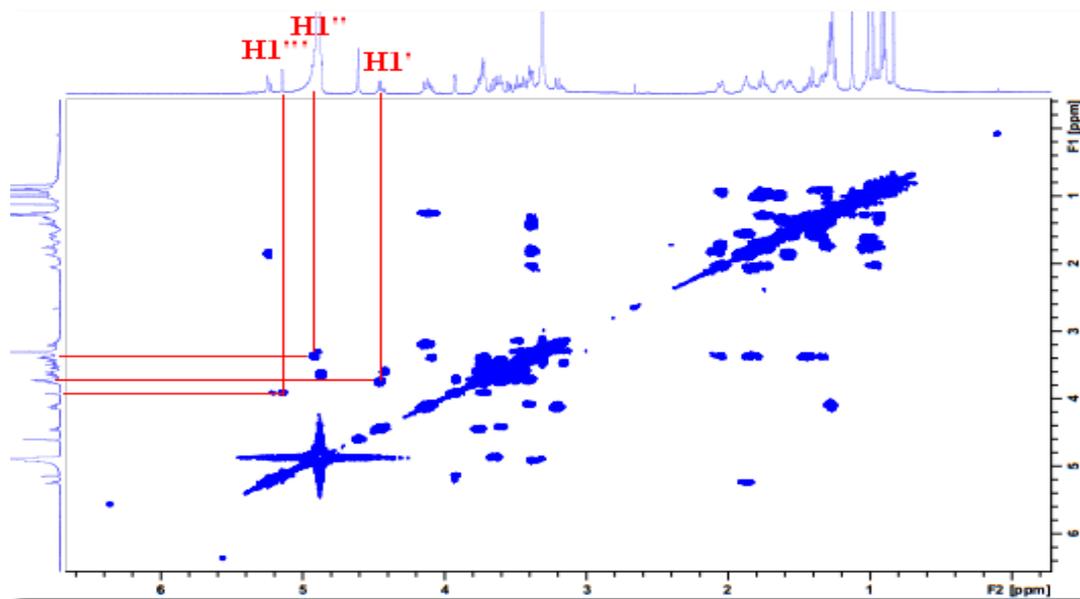


Figure III.102: Spectre COSY H-H mettant en évidence les 3 protons anomères (AM9)

Le spectre RMN DEPTQ (Figure III.103) confirme la nature du composé, c'est à dire une saponine triterpénique à squelette Δ -12 oléanène. Il est observé les signaux de carbones intrinsèques aux sept groupements méthyles repérés entre 16,6 et 29,2 ppm, aux deux carbones éthyléniques C-12 et C-13 à δ_H 123,8 et 145,4 et enfin au carbone C-3 détecté à 92,7 ppm. La valeur de déplacement chimique de ce dernier est très révélatrice d'une glycosylation en cette position.

La nature osidique du composé est également attestée par les trois signaux de carbones anomères sortant à 102,4, 102,5 et 105,7 ppm et de carbones osidiques sortant entre 62,3 et 78,5 ppm.

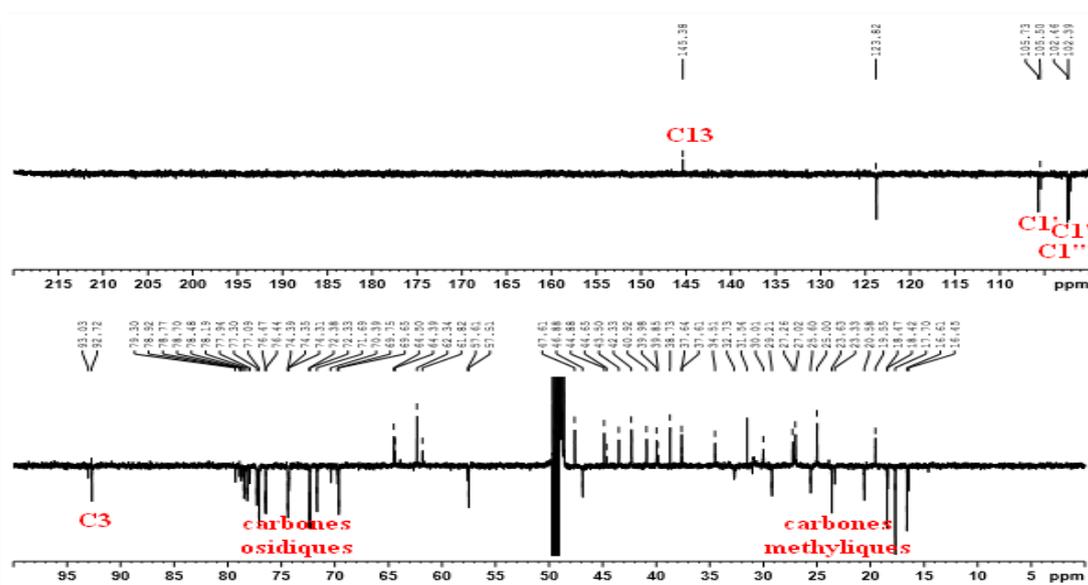


Figure III.103: Spectre RMN DEPTQ du composé AM9

L'élucidation structurale du composé AM9 sera présentée en deux parties distinctes: l'une consacrée à l'identification de la génine et l'autre à la partie osidique.

Identification de la génine

La présence uniquement de sept méthyles implique évidemment l'oxydation d'un des huit méthyles constituant le squelette oléanane. La présence de signaux de deux protons résonant à δ_H 3,22 ($d, J = 11,3$ Hz) et 4,13 ppm ($d, J = 11,3$ Hz) observée sur le spectre RMN 1H laisse suggérer que le carbone oxydé est inclus dans un groupement CH_2OH . Son carbone est repéré sur le spectre HSQC à δ_C 64,5 ppm (Figure III.104).

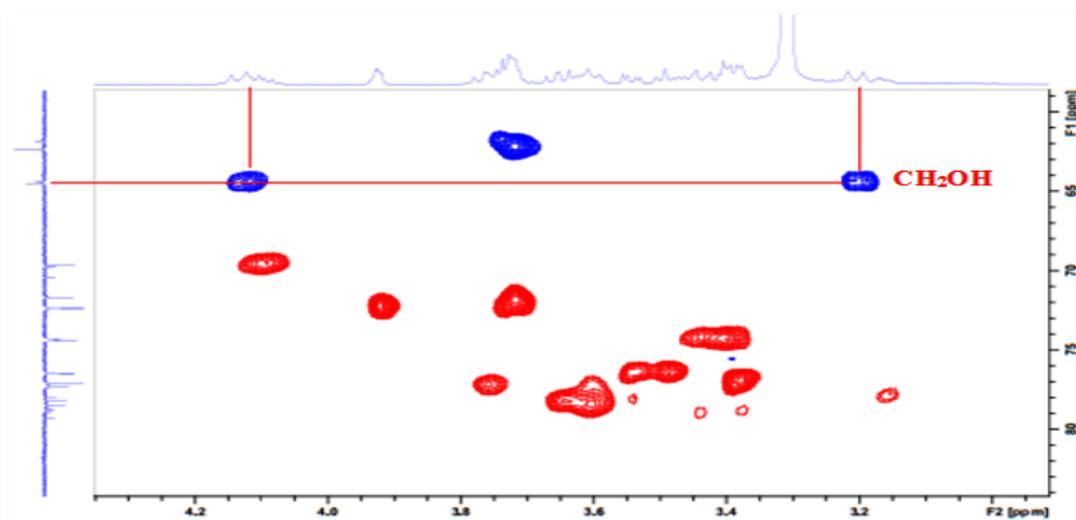


Figure III.104: Spectre HSQC du composé AM9

L'expérience HMBC (Figures III.105 et III.106) permet d'attribuer une bonne partie des carbones de la génine par observation de leurs couplages en 2J et 3J avec les protons méthyliques. Ainsi :

- les protons CH_3 -23 résonant à 1,24 ppm sont les seuls à corrélérer avec le carbone quaternaire C-4 (δ_C 44,9) identifié du fait de son couplage HMBC avec le proton H-3 (δ_H 3,40), le carbone C-24 du groupement CH_2OH (δ_C 64,5) et le carbone C-5 (δ_C 57,5). Ce dernier corrèle aussi avec les protons méthyliques CH_3 -25 (δ_H 0,89), eux-mêmes couplant avec les carbones C-1 (δ_C 39,8), C-10 (δ_C 37,6) et C-9 (δ_C 47,9). Le proton de ce dernier résonant à 1,57 ppm selon l'analyse HSQC, montre sur le spectre COSY H-H (Figure III.107), un couplage avec les protons H_2 -11 repérés à 1,87 ppm, eux-mêmes corrélant avec le proton éthylénique résonant à 5,25 ppm. La localisation de la double liaison en C12-C13 est confirmée par HMBC qui met en évidence les couplages longue distance entre le proton H-11 (δ_H 1,87) et le carbone éthylénique sortant à 123,8 ppm (C-12).

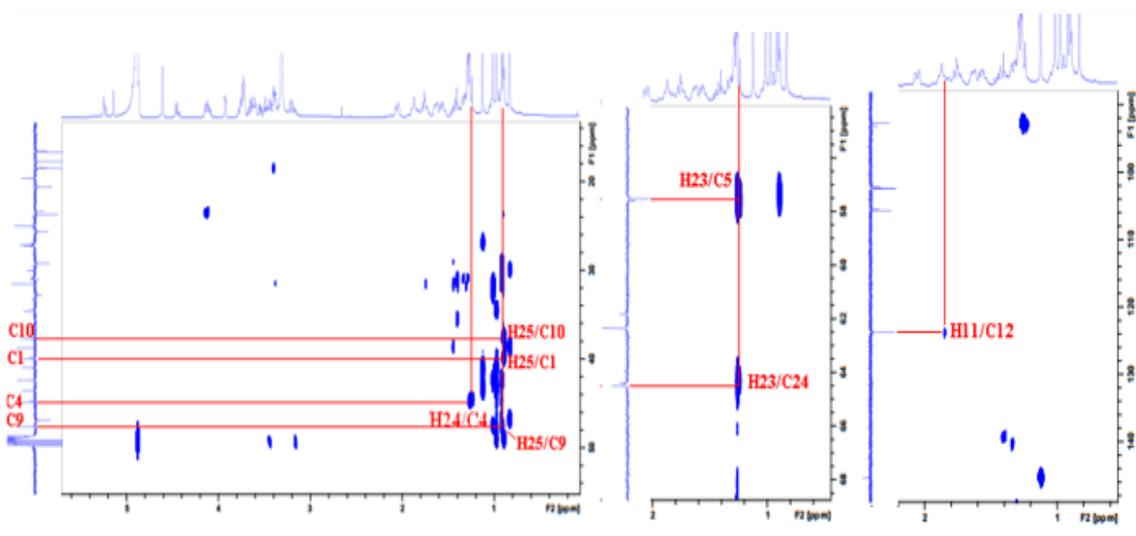


Figure III.105: Spectre HMBC du composé AM9

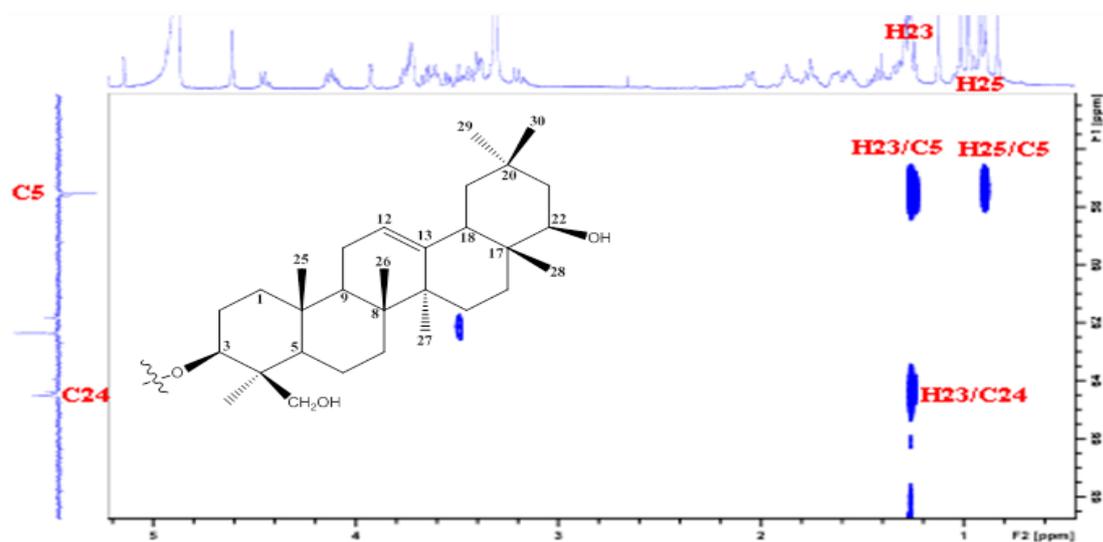


Figure III.106: Spectre HMBC du composé AM9

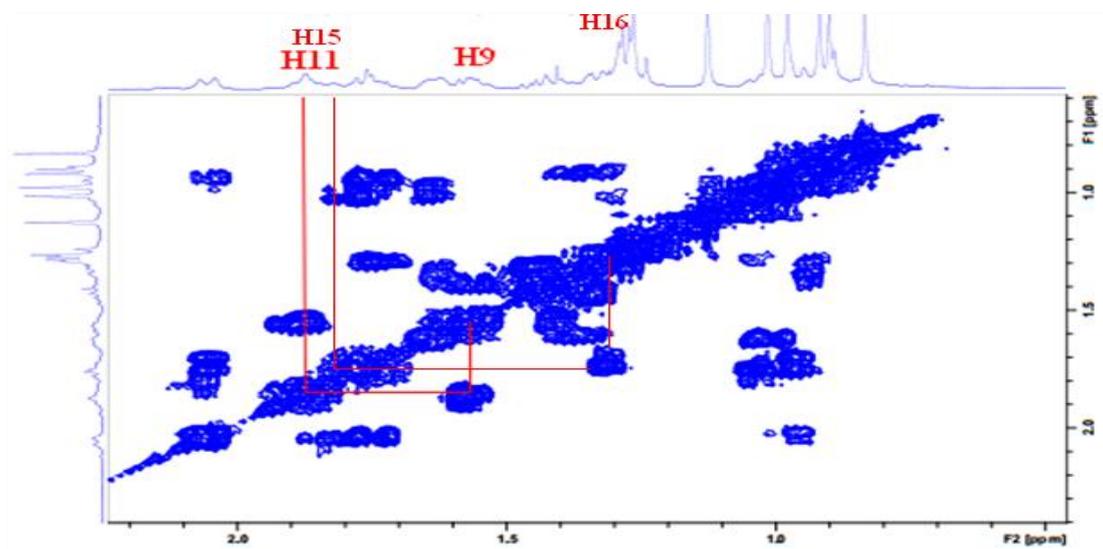


Figure III.107: Spectre COSY H-H du composé AM9

- Les protons méthyliques CH₃-26 repérés à 0,98 ppm couplent avec le carbone C-9 déjà identifié, le carbone méthylénique C-7 (δ_C 34,5) et les carbones quaternaires C-8 (δ_C 40,9) et C-14 (δ_C 43,5). Ces deux derniers corrélient avec les protons méthyliques (δ_H 1,13) du groupement CH₃-27. Ces derniers corrélient avec le carbone méthylénique CH₂-15 (27,3 ppm) et le carbone quaternaire oléfinique C-13 (δ_C 145,4).
- Les protons H₂-15 localisés par analyse du spectre HSQC (Figure III.108) à δ_H 1,86 montrent sur le spectre COSY H-H (Figure III.107) des couplages avec deux protons sortant à δ_H 1,29 attribuables aux protons géminés H₂-16. Leur carbone est repéré à δ_C 30,0 (C-16) par expérience HSQC (Figure III.108). Ce dernier corrélie en HMBC avec les protons du groupement méthylique Me-28 (δ_H 0,83), eux-mêmes couplant avec le carbone méthine C-18 (δ_C 46,9), le carbone quaternaire C-17 (δ_C 38,7) et un carbone oxygéné (C-22) repéré à δ_C 77,1.
- Les protons des deux derniers groupements méthyles Me-29 (1,03 ppm) et Me-30 (0,92 ppm) corrélient avec les carbones méthyléniques C-19 (δ_C 47,6) et C-21 (δ_C 42,3), ainsi que le carbone quaternaire C-20 (δ_C 31,5). Leurs carbones respectifs sont localisés sur le spectre HSQC à 29,2 et 32,7 ppm (Figure III.108).
- Les protons H-5 (δ_H 0,93), H₂-7 (δ_H 1,42; 1,54), H₂-19 (δ_H 0,95; 1,75), H₂-21 (δ_H 1,32; 1,44) sont assignés également par expérience HSQC (Figure III.108).

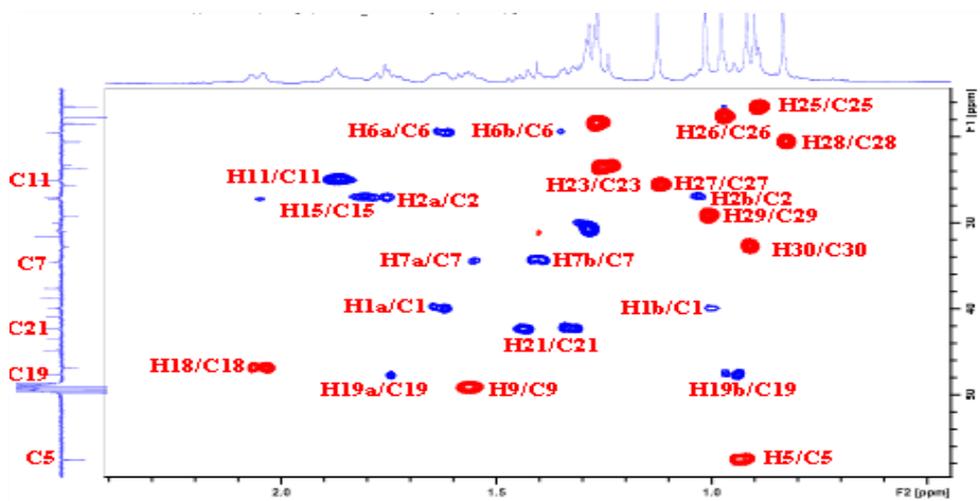


Figure III.108: Spectre HSQC de la génine du composé AM9

Les autres carbones et protons de la génine sont identifiés par analyse des deux expériences HSQC et COSY H-H. Ainsi, les protons H₂-6 (δ_H 1,36; 1,63) et H₂-2 (δ_H 1,04; 1,76) sont identifiés sur le spectre COSY H-H (Figure III.109), en raison des corrélations qu'ils présentent respectivement, avec les protons H₂-7 et H₂-1. Leurs carbones sont repérés à δ_C 19,5 (C-6) et δ_C 27,0 (C-2).

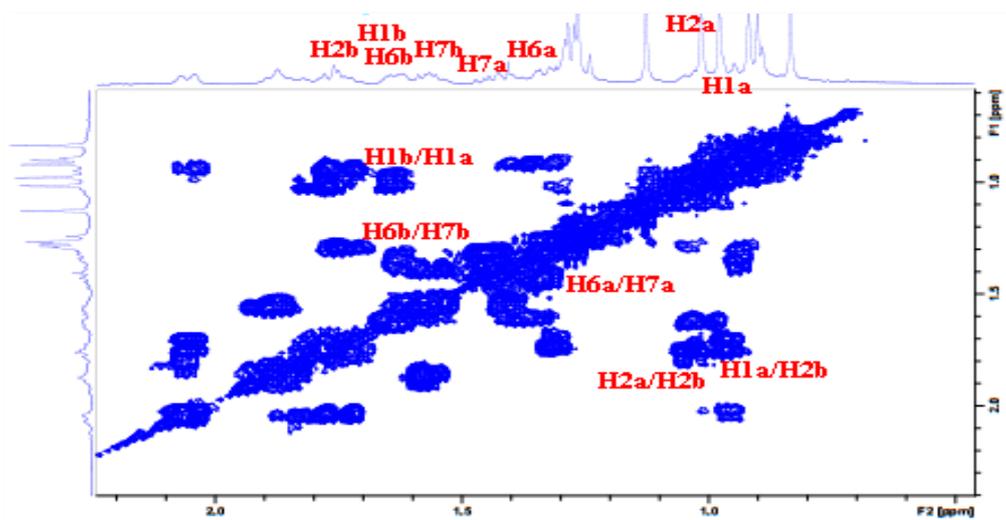


Figure III.109: Spectre COSY H-H de l'aglycone du composé AM9

L'analyse combinée des expériences COSY H-H, HMBC et HSQC qui a permis de caractériser tous les protons et carbones, a abouti à l'établissement de la structure de la génine.

La stéréochimie au niveau de la génine est établie par analyse des valeurs de constantes de couplage. Ainsi le proton H-3 (δ_H 3,40) a une stéréochimie α -axiale du fait de la valeur de la constante de couplage $^3J_{3ax-2ax} = 10,3$ Hz. La grande constante de couplage $^3J_{18ax-19ax} = 14,7$ Hz définit la stéréochimie β -axiale du proton H-18 (δ_H 2,07).

Identification de la partie osidique

L'analyse RMN 1H a montré l'existence de trois unités osidiques par l'observation de trois signaux de protons anomères à δ_H 4,45 (d , $J = 7,9$ Hz, H-1'), 4,87 (d , $J = 7,5$ Hz, H-1'') et 5,14 (d , $J = 1,9$ Hz, H-1'''). Les carbones anomères sont repérés à δ_C 105,7 (C-1'), 102,4 (C-1'') et 102,5 (C-1''') sur le spectre HSQC (Figure III.110).

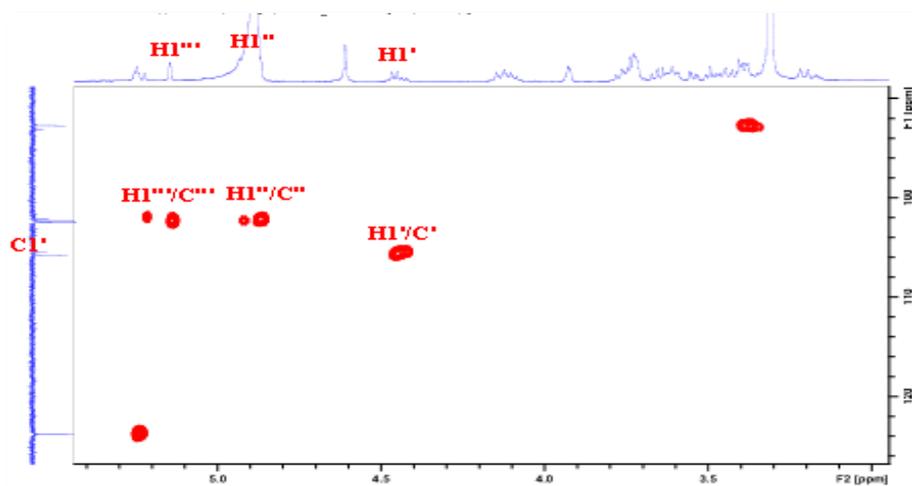


Figure III.110: Spectre HSQC montrant les protons et carbones anomères (AM9)

A partir du proton anomère nommé H-1' (δ_H 4,45), l'analyse du spectre COSY H-H (Figure III.111) permet d'identifier un système de spins à cinq protons typique de l'acide β -D-glucuronopyranoïque, à travers les couplages H-1' ($J_{1'-2'} = 7,9$ Hz)/H-2' (δ_H 3,76, *d*, $J = 7,9$ Hz), H-2'/H-3' (δ_H 3,64, *dd*, $J = 9,4; 7,9$ Hz), H-3'/H-4' (δ_H 3,46, *t*, $J = 9,4$ Hz), H-4'/H-5' (δ_H 3,61, *d*, $J = 7,9$ Hz). Ceci permet d'identifier cette unité osidique à l'acide glucuronique.

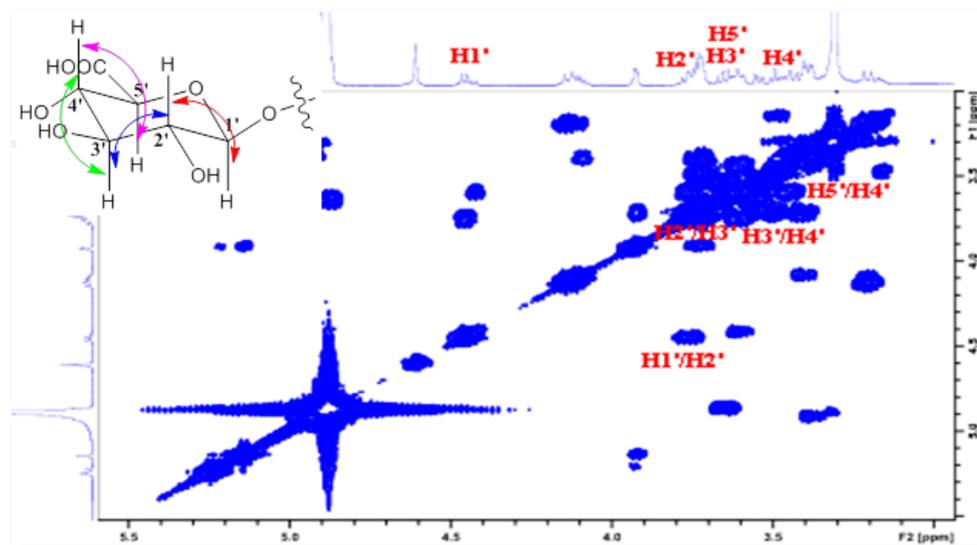


Figure III.111: Spectre COSY H-H identifiant l'acide β -D-glucuronique (AM9)

L'analyse du spectre COSY H-H (Figures III.112) met également en évidence un système de spins à sept protons d'un hexose dont le proton anomère est détecté à δ_H 4,87 (*d*, $J = 7,5$ Hz, H-1''). Ce système est établi du fait des corrélations H-1''/H-2'' (δ_H 3,62, *dd*, $J = 9,5; 7,5$ Hz), H-2''/H-3'' (δ_H 3,54, *dd*, $J = 9,5; 3,1$ Hz), H-3''/H-4'' (δ_H 3,74, *d*, $J = 3,1$ Hz), H-4''/H-5'' (δ_H 3,48, *m*), H-5''/H-6'' (δ_H 3,72, *m*). La faible valeur de la constante de couplage $J_{3''-4''}$ égale à 3,1 Hz permet d'identifier cet hexose à un galactose de configuration β ($J_{1''-2''} = 7,5$ Hz).

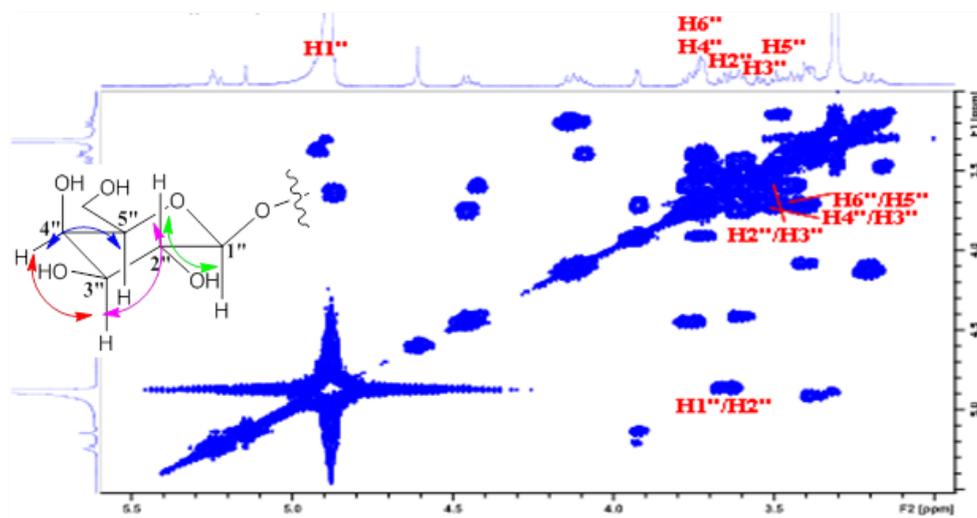


Figure III.112: Spectre COSY H-H du β -D-galactose (AM9)

La séquence et les sites de fixation des différents oses ont été déterminés par expérience HMBC (Figure III.115) qui montre les corrélations entre :

- ✓ le proton anomère H-1' (δ_H 4,45) de l'acide glucuronique et le carbone C-3 (92,7 ppm) de la génine.
- ✓ le proton anomère H-1'' (δ_H 4,90) du galactose et le carbone C-2' (77,3 ppm) de l'acide glucuronique.
- ✓ le proton anomère H-1''' (δ_H 5,14) du rhamnose et le carbone C-2'' (78,5 ppm) du galactose.

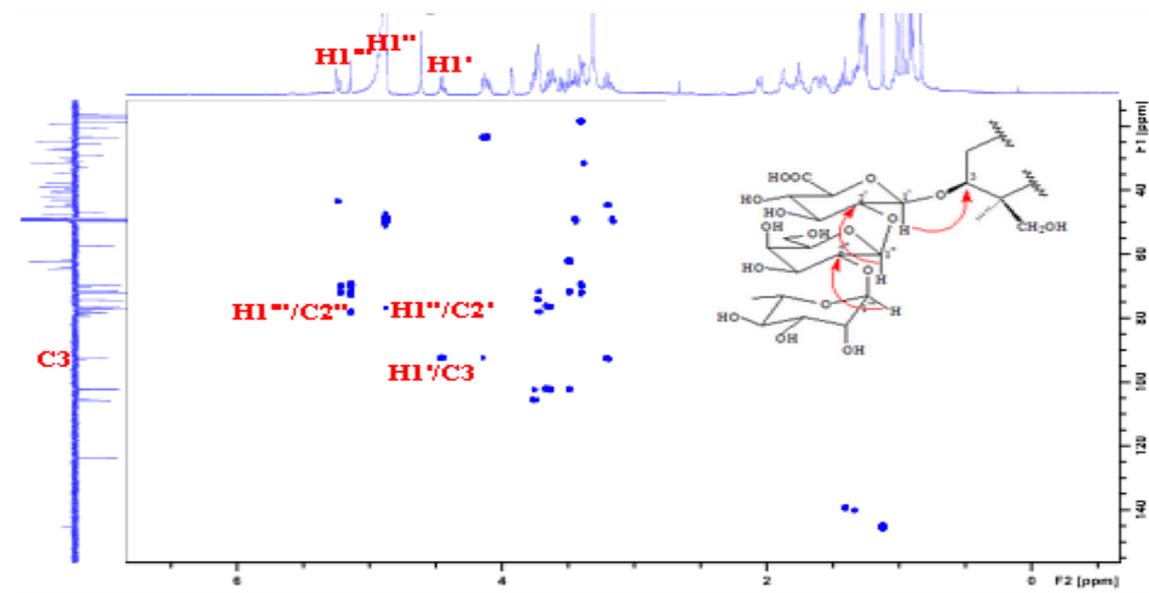
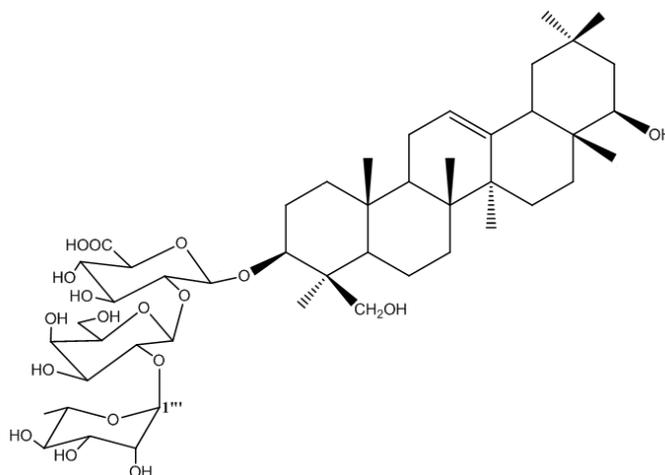


Figure III.115: Spectre HMBC montrant le branchement des sucres (composé AM9)

Toute cette analyse spectrale permet d'assigner sans ambiguïté pour cette saponine monodesmosidique, la structure suivante: 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-galactopyranosyl-(1-2)- β -D-glucuronopyranosyl]-3 β , 22 β , 24-trihydroxyoléan-12-ène.



Le composé AM9 s'est avéré identique à la soyasaponine I, isolée originellement des graines de soja (*Glycine max* Merrill) [244] et de beaucoup d'autres espèces du genre *Astragalus* comme *A. trimestris* [82], *A. shikokianus* [86], *A. depressus* [88], *A. cryopterus* [245] et *A. membranaceus* [246]. Il est rencontré dans bon nombre de genres appartenant à la famille Fabaceae comme *Hedysarum* [107,121,125,136], *Melilotus* [247], *Lupinus* [248] et *Wistaria* [249].

Cette large distribution a fait que ce composé est utilisé comme marqueur chimiotaxonomique de la famille Fabaceae et aussi du genre *Astragalus*.

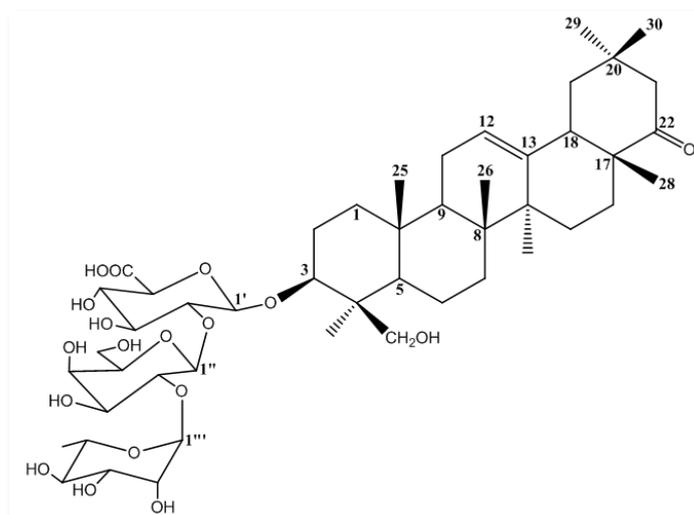
Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III.9.

Tableau III.9: Déplacements chimiques RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) du composé AM9 dans DMSO-*d*₆

Position	δ _C (ppm)	δ _H (ppm), (m, J (Hz))
1	39,8	1,01 (m) 1,65 (m)
2	27,0	1,04 (m) 1,76 (m)
3	92,7	3,40 (dd, 10,3 / 3,5)
4	44,9	/
5	57,5	0,93 (m)
6	19,5	1,36 (m) 1,63 (m)
7	34,5	1,42 (m) 1,54 (m)
8	40,9	/
9	47,9	1,57 (m)
10	37,6	/
11	25,0	1,87 (m)
12	123,8	5,25 (t, 3,3)
13	145,4	/
14	43,5	/
15	27,3	1,86 (m)
16	30,0	1,29 (m)
17	38,7	/
18	46,9	2,07 (d, 14,7)
19	47,6	0,95 (m) 1,75 (m)
20	31,5	/
21	42,3	1,44 (m) 1,32 (m)
22	77,1	3,37 (dd, 5,1 / 3,5)
23	23,6	1,24 (s)
24	64,5	3,22 (d, 11,3) 4,13 (d, 11,3)

25	16,6	0,89 (s)
26	17,7	0,98 (s)
27	25,6	1,13 (s)
28	20,6	0,83 (s)
29	29,2	1,03 (s)
30	32,7	0,92 (s)
1'	105,7	4,45 (d, 7,9)
2'	77,3	3,76 (d, 7,9)
3'	78,2	3,64 (dd, 9,4 / 7,9)
4'	74,3	3,46 (t, 9,4)
5'	77,3	3,61 (d, 7,9)
COOH	175,6	/
1''	102,4	4,87 (d, 7,5)
2''	78,5	3,62 (dd, 9,5 / 7,5)
3''	76,4	3,54 (dd, 9,5 / 3,1)
4''	72,3	3,74 (d, 3,1)
5''	76,5	3,48 (m)
6''	62,3	3,72 (m)
1'''	102,5	5,14 (d, 1,9)
2'''	72,3	3,92 (dd, 3,5/1,9)
3'''	71,7	3,72 (dd, 9,6 / 3,5)
4'''	74,4	3,42 (t, 9,6)
5'''	69,6	4,12 (m)
6'''	18,5	1,27 (d, 8,6)

III.4.3.10 Identification structurale du composé AM10



3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-galactopyranosyl-(1-2)- β -D-glucuronopyranosyl]- 3 β , 24-dihydroxyléan-12-ène-22-one (AM10)

Le spectre de masse ESI⁺ du composé AM10 (Figure III.116) montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 963$ [M+Na]⁺, soit une masse moléculaire égale à 940 uma correspondant à une formule brute en C₄₈H₇₆O₁₈.

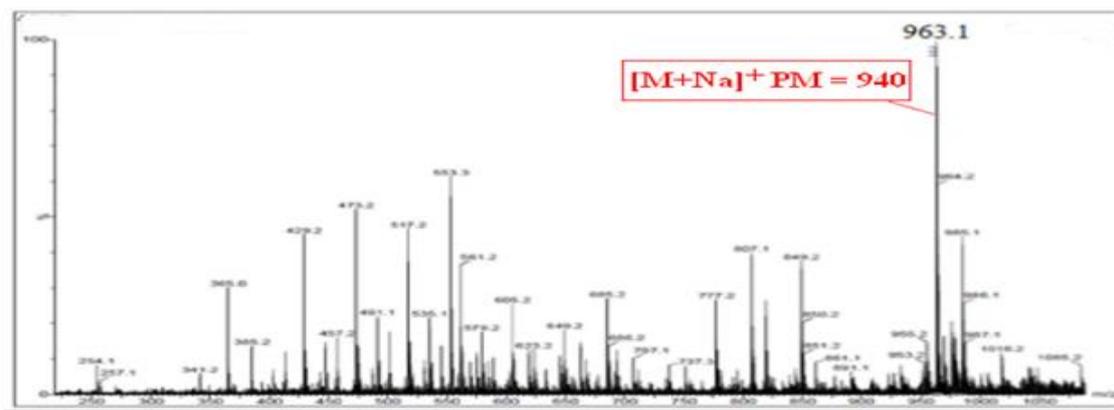


Figure III.116: Spectre masse ESI⁺ du composé AM10

Le spectre RMN ¹H (Figure III.117) montre une totale similitude avec le composé AM9 (Figure III.118) décrit précédemment. Toutefois sa masse moléculaire de moins 2 uma comparativement au composé AM9 (soyasaponine I) de masse moléculaire égale à 942 uma, traduit l'absence de deux hydrogènes au niveau du composé AM10.

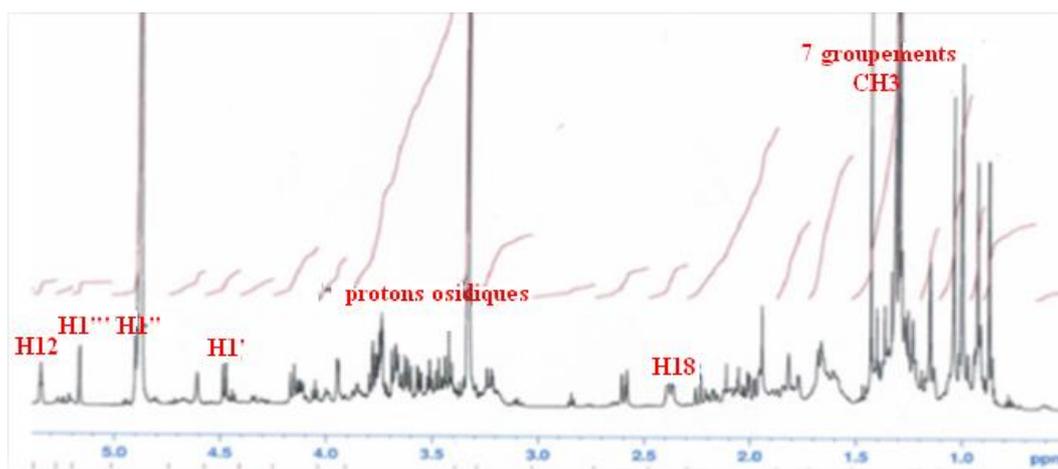


Figure III.117: Spectre RMN ¹H du composé AM10

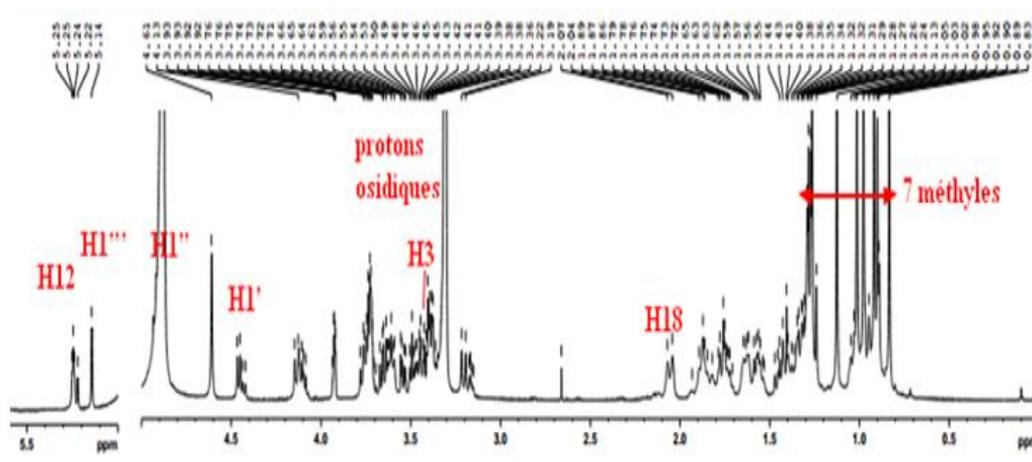


Figure III.118: Spectre RMN ¹H du composé AM9

Cette différence ne peut être liée qu'à l'oxydation du groupement hydroxyméthine CHOH en carbonyle au niveau de C-22, par comparaison avec le composé AM9. Ceci est conforté par l'observation sur le spectre RMN ^{13}C (Figures III.119 et III.120) d'un signal à δC 218,3 caractéristique d'un carbonyle d'une cétone.

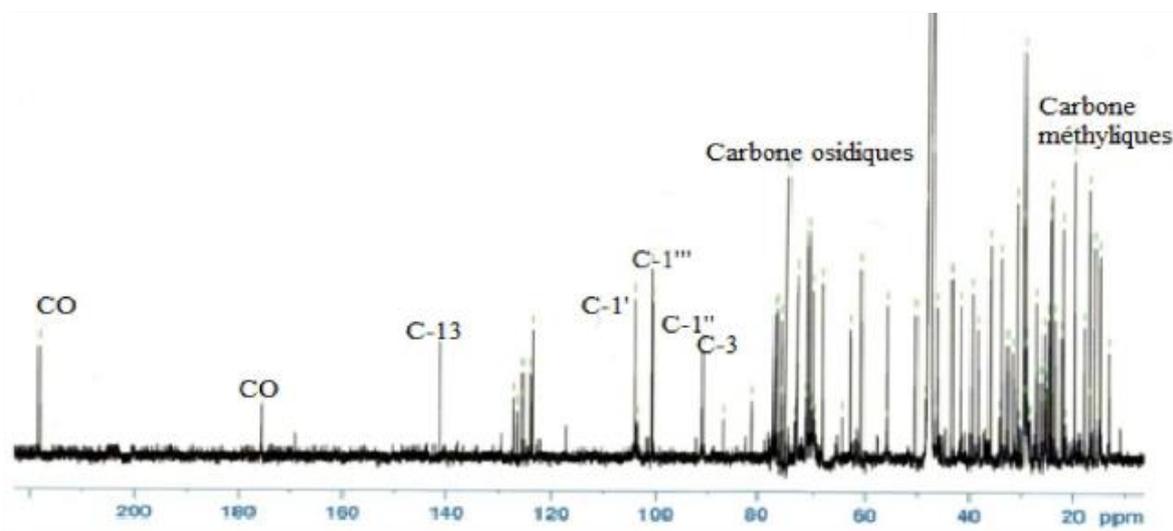


Figure III.119: Spectre RMN ^{13}C du composé 10

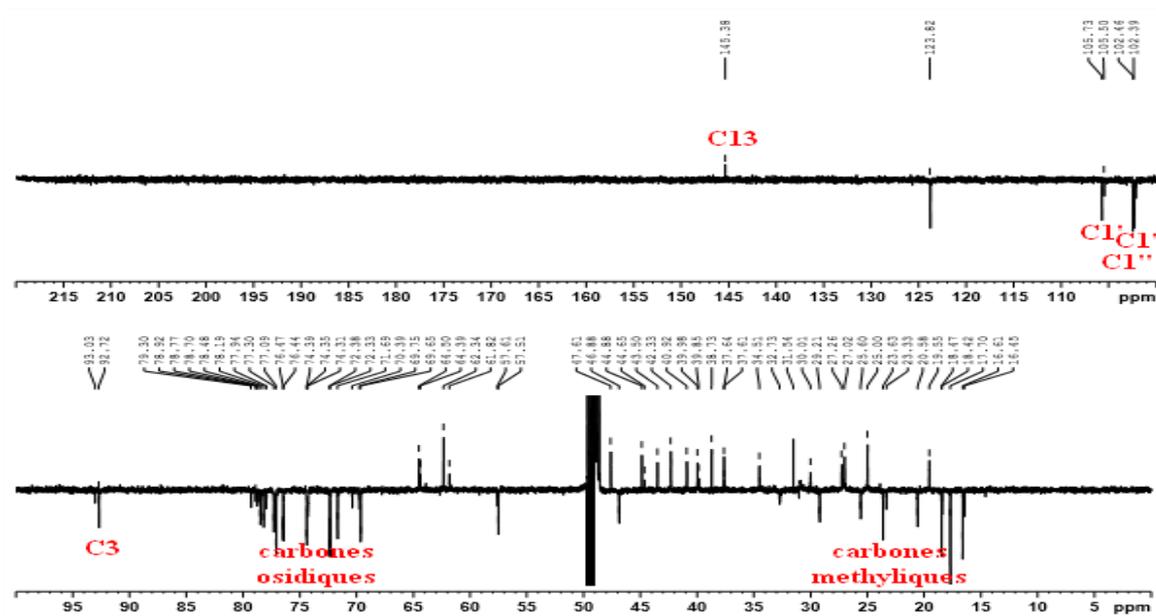


Figure III.120: Spectre RMN DEPT du composé AM9

Il apparaît clairement que le composé AM10 est identique à la déhydrosoyasaponine I. Cette dernière isolée et identifiée au sein même du laboratoire à partir de l'espèce *Astragalus depressus*, a servi comme échantillon témoin [88], en plus la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_{\text{D}} -3,3^{\circ}$ ($c = 0,36$; MeOH).

C'est la seconde citation de cette saponine dans le genre. Elle est reportée dans un grand nombre d'espèces appartenant à divers genres de la famille Fabaceae. On citera *Medicago sativa* [250], *Pisum sativum* L. [251], *Desmodium adscendens* [252] et *Hedysarum polybotrys* [107,136].

Tableau III.10: Déplacements chimiques RMN ¹H (600 MHz) et ¹³C (150 MHz) du composé AM10 dans CD₃OD

Position	δ _C (ppm)	δ _H (ppm) (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
1	38,3	1,03-1,66 (<i>m</i>)
2	24,8	1,8 (<i>m</i>) 1,13 (<i>m</i>)
3	91,0	3,42 (<i>dd</i> , 10,3 / 4,5)
4	43,3	/
5	55,9	0,96 (<i>m</i>)
6	18,0	1,39-1,66 (<i>m</i>)
7	32,6	1,40-1,68 (<i>m</i>)
8	39,4	/
9	47,3	1,64 (<i>m</i>)
10	36,1	/
11	23,5	1,92 (<i>m</i>)
12	123,7	5,35 (<i>t</i> , 3,5)
13	141,4	/
14	41,6	/
15	25,7	1,33-1,85 (<i>m</i>)
16	27,0	1,12-2,17 (<i>m</i>)
17	48,0	/
18	47,6	2,37 (<i>dd</i> , 13,8 / 3,8)
19	46,2	1,34 (<i>m</i>) 2,23 (<i>t</i> , 13,8)
20	33,7	/
21	50,3	1,99 (<i>m</i>) 2,59 (<i>m</i>)
22	218,3	/
23	22,0	1,29 (<i>s</i>)
24	62,9	3,23 (<i>d</i> , 11,5) 4,16 (<i>d</i> , 11,5)
25	14,9	0,92 (<i>s</i>)
26	15,9	1,00 (<i>s</i>)
27	16,9	1,30 (<i>s</i>)
28	19,7	1,01 (<i>s</i>)
29	30,8	1,03 (<i>s</i>)
30	24,2	0,87 (<i>s</i>)
1'	104,1	4,48 (<i>d</i> , 8,3)
2'	75,8	3,78 (<i>d</i> , 8,3)
3'	76,9	3,62 (<i>dd</i> , 9,2 / 8,3)

4'	72,8	3,46 (t, 9,2)
5'	75,8	3,61 (d, 9,2)
COOH	175,6	/
1''	100,7	4,90 (d, 7,5)
2''	77,8	3,66 (dd, 9,6 / 7,5)
3''	74,9	3,56 (dd, 9,6 / 3,5)
4''	70,8	3,74 (nd)
5''	75,7	3,51 (m)
6''	60,8	3,76 (m) 3,72 (m)
1'''	100,9	5,15 (d, 1,6)
2'''	70,8	3,94 (dd, 3,3 / 1,6)
3'''	70,3	3,73 (nd)
4'''	72,8	3,42 (t, 9,6)
5'''	68,1	4,12 (m)
6'''	16,9	1,30 (d, 8,6)

III.5 Conclusion

L'étude phytochimique réalisée sur les parties aériennes de la plante *Astragalus monspessulanus* L. appartenant à la famille Fabaceae et poussant dans les régions semi-arides de l'Algérie, nous a permis d'isoler et de caractériser treize produits naturels appartenant à différentes classes de métabolites secondaires constitués de huit composés phénoliques dont sept flavonoïdes et un lignane, deux saponines tritépéniques, deux phytostérols et un tritépénoïde. Ces métabolites se répartissent comme suit:

- Sept flavonoïdes :
 - Quercétine 3-*O*-rutinoside (Rutine)
 - Quercétine 3-*O*-(2, 6- α -L-dirhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside
 - Kaempférol 3-*O*-rutinoside (Nicotiflorine)
 - Kaempférol 3-*O*-(4- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside
 - Isorhamnétine 3-*O*-(4- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (Calendoside III)
 - 3', 5'-di-*C*- β -D-glucopyranosylphlorétine
 - Hovetrichoside C
- Un lignane :
 - Isolaricirésinol 9'-*O*- β -D-glucopyranoside
- Deux saponines :
 - Soyasaponine I
 - Déhydrosoyasaponine I
- Deux stérols

- β -sitostérol
- Daucostérol (β -sitostérol-3-*O*-glucoside)
- Un triterpénoïde
- Lupéol

Les composés phénoliques suivants : quercétine 3-*O*-(2,6- α -L-dirhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside, kaempférol 3-*O*-(4- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside, isorhamnétine 3-*O*-(4- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (Calendoside III), 3',5'-di-*C*- β -D-glucopyranosylphlorétine, hovetrichoside C et isolaricirésinol 9'-*O*- β -D-glucopyranoside sont décrits pour la première fois dans le genre *Astragalus*.

La soyasaponine I, largement distribuée au sein de la famille Fabaceae, est considérée comme marqueur chimiotaxonomique à la fois de la famille Fabaceae et du genre *Astragalus*.

La déhydrosoyasaponine I a été isolée pour la deuxième fois dans le genre *Astragalus*.

Il apparaît aussi que les composés : kaempférol 3-*O*-(4- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside, isorhamnétine 3-*O*-(4- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (Calendoside III), hovetrichoside C et isolaricirésinol 9'-*O*- β -D-glucopyranoside sont reportés pour la première fois dans les plantes Fabaceae.

Chapitre IV- Etude
phytochimique de l'espèce
***Hedysarum carnosum* DESF.**

IV.1 Rappels bibliographiques

IV.1.1 Généralités

Hedysarum carnosum Desf. est une plante endémique de l'Afrique du Nord. Elle se rencontre essentiellement dans les régions peu arrosées et d'altitude moyenne [19]. En Algérie, cette espèce est signalée dans la région prédésertique constantinoise et au pied de l'Aurès, surtout à El Kantara aux environs de Biskra. Elle est rare dans les pâturages arides (Est de Touggourt). Elle est connue vulgairement sous le nom de "Hazlai" [104].

IV.1.2 Description botanique

C'est une plante glabre à feuilles un peu charnues et des fleurs de 12 à 14 mm, pourprées, en grappe denses s'allongeant à la fructification. Elle possède des gousses à articles presque carrés [104] (Figure IV.1).



Figure IV.1: Espèce *Hedysarum carnosum* Desf.

IV.1.3 Classification systématique

Selon Quezel et Santa (1962) ainsi que Greuter (1989), la plante *Hedysarum carnosum* Desf. est classée comme suit :

- **Règne** : Plantae
- **Division** : Angiosperma
- **Classe** : Dicotylédones
- **Ordre** : Fabales
- **Famille** : Fabaceae (Leguminosea)
- **Genre** : *Hedysarum*
- **Espèce** : *Hedysarum carnosum* DESF.

IV.1.4 Intérêt de *Hedysarum carnosum* Desf.

L'espèce *Hedysarum carnosum* DESF. est une légumineuse pastorale bien représentée dans les parcours naturels. Elle présente des modes de germination et de développement bien adaptés aux variations des conditions du milieu aride [253]. La pharmacopée en général ne reconnaît, pour cette plante essentiellement fourragère, aucune utilisation thérapeutique traditionnelle.

IV.2 Résultats et discussions

IV.2.1 Extraction

1500 g de la plante entière de *Hedysarum carnosum* DESF., préalablement séchés et pulvérisés, sont mis à macérer dans un mélange MeOH/H₂O : 80/20 (15 litres x 2) pendant 72 h à température ambiante. Le mélange est ensuite filtré et concentré non à sec. Un volume de 500 ml de la phase aqueuse résultante subit une extraction liquide-liquide, d'abord par l'éther de pétrole (150 ml, 5 fois) puis l'acétate d'éthyle (150 ml, 5 fois) et enfin le *n*-butanol (150 ml, 5 fois). L'évaporation à sec des phases organiques a permis de recueillir 7 g pour l'extrait étheropétrolique, 5 g pour l'extrait acétate d'éthyle et 30 g pour l'extrait butanolique (Figure IV.2).

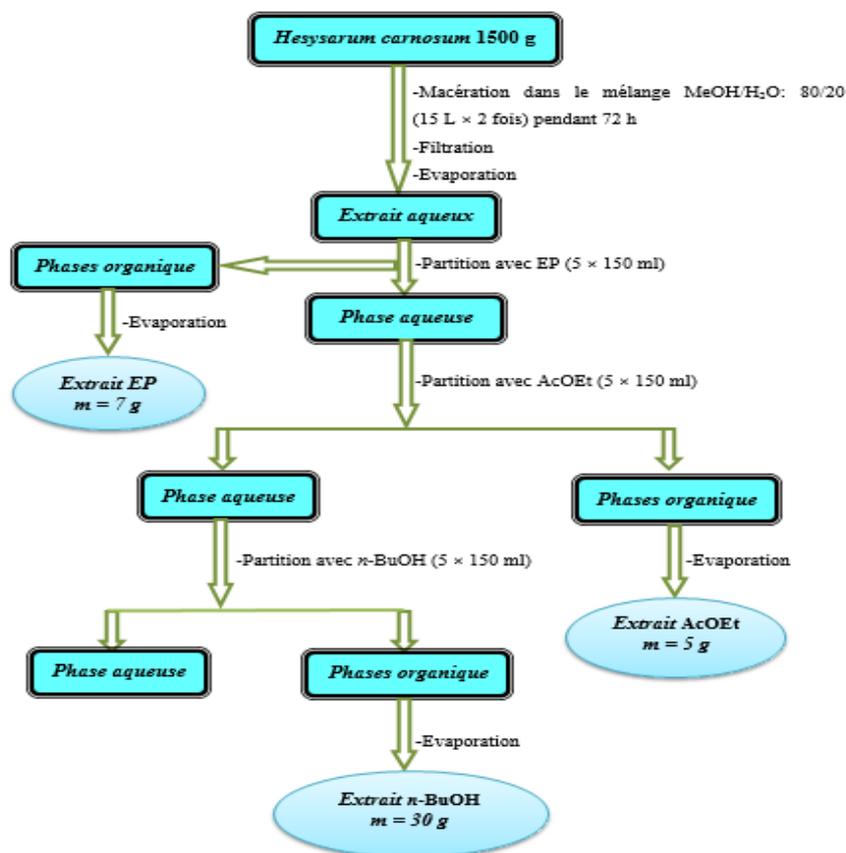


Figure IV.2: Schéma d'extraction de la plante *Hedysarum carnosum* DESF.

IV.2.2 Séparation et purification

Les CCM réalisées sur les trois extraits visualisées sous lumière UV à 254 et 366 nm puis pulvérisées par H₂SO₄/AcOH/H₂O dans les proportions (25/25/50), montrent la richesse de l'extrait acétate d'éthyle en métabolites secondaires.

Cet extrait (5 g) a été fractionné par une chromatographie liquide sous vide (CLV) sur gel de silice en phase normale en utilisant un gradient d'éluant CHCl₃/CH₃OH allant de 0/100 à 100/0 (tableau VI.3). Cette étape de fractionnement nous a permis de recueillir 10 fractions majoritaires (Fr1-Fr10).

Après analyse des fractions obtenues par chromatographie sur couche mince en utilisant des systèmes de solvants convenables, les fractions présentant des profils identiques en CCM ont été réunies. Pour la purification de ces fractions résultantes, plusieurs étapes de séparation ont été nécessaires, en combinant différentes techniques chromatographiques : chromatographie sur colonnes de gel de silice normale et Sephadex LH-20 (CC), chromatographie liquide moyenne pression (CLMP), chromatographie liquide à haute performance (CLHP) et plaques préparatives (CCE)), pour donner 12 composés connus.

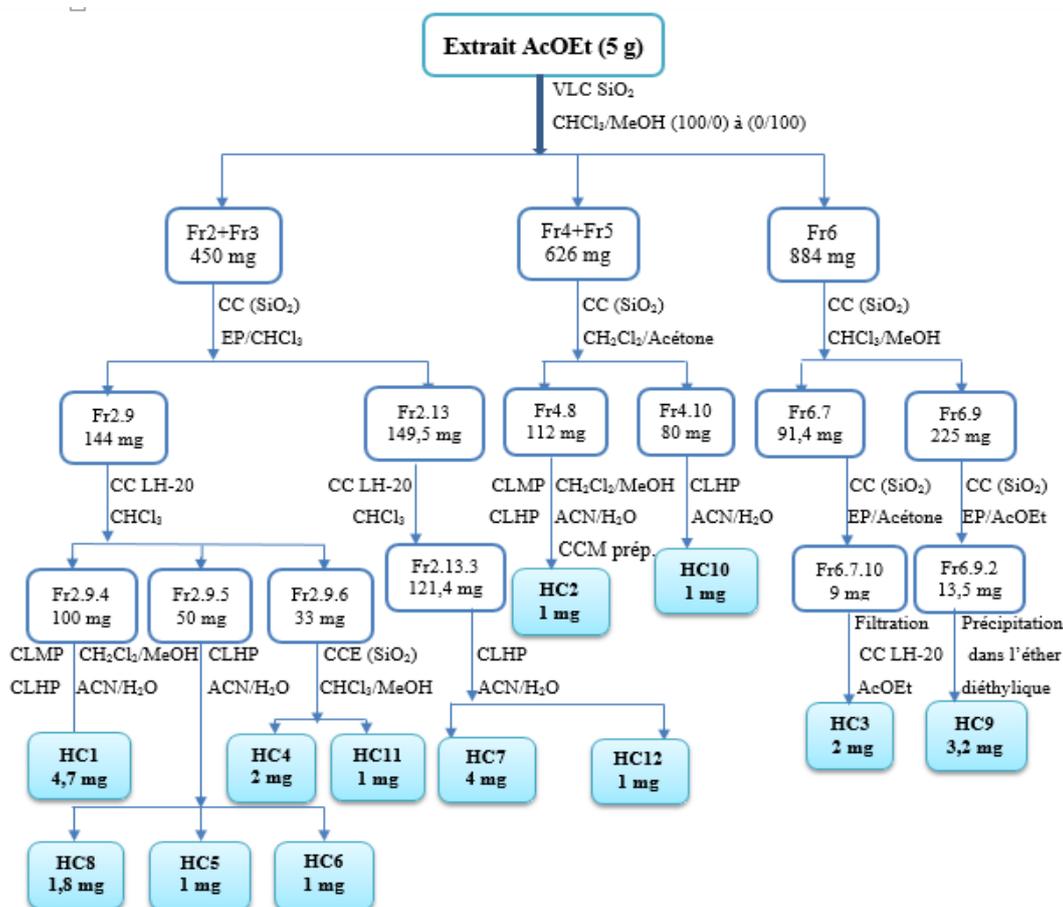
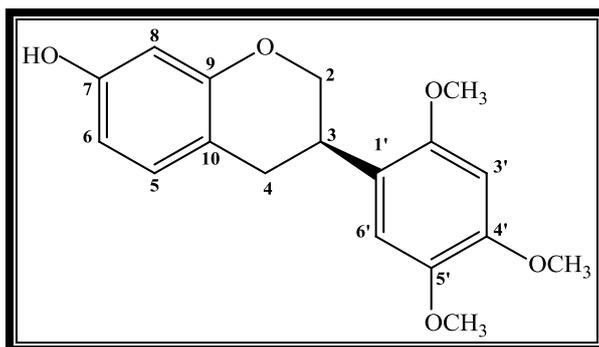


Figure IV.3: Schéma de purification des produits de l'extrait AcOEt de *Hedysarum carnosum*

IV.2.3 Caractérisation des produits obtenus

Les produits isolés ont été caractérisés par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D du proton et carbone, RMN 2D conjuguant les expériences COSY H-H, HSQC et HMBC, la spectrométrie de masse ESI, en plus du pouvoir rotatoire et la comparaison avec les données de la littérature.

IV.2.3.1 Identification structurale du composé HC1



7-hydroxy-2', 4', 5'-triméthoxyisoflavane (HC1)

Le spectre de masse ESI⁺ (Figure IV.4) de ce composé fait apparaître deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 338,9$ $[M+Na]^+$ et $m/z = 655$ $[2M+Na]^+$ donnant une masse moléculaire de 316 uma et correspondant à une formule brute en $C_{18}H_{20}O_5$.

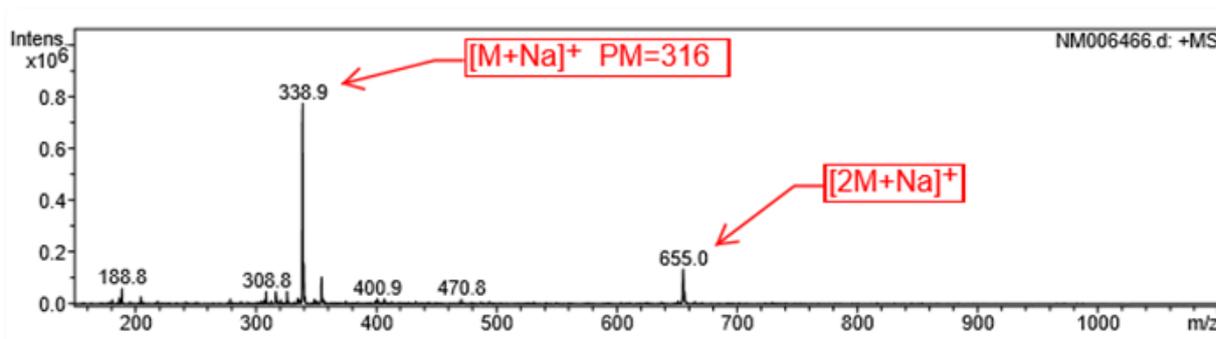


Figure IV.4: Spectre de masse ESI⁺ du composé HC1

Son spectre RMN ¹H (Figure IV.5) enregistré dans DMSO-*d*₆, montre des signaux de protons aromatiques résonant entre 6 et 7 ppm et aliphatiques entre 2,6 et 4,2 ppm, suggérant que ce composé est de nature phénolique. Ce spectre met aussi en évidence la présence de trois groupements OCH₃ à travers deux singulets, le premier d'intégration 3H résonant à δ_H 3,66 et le deuxième d'intégration 6H à δ_H 4,04.

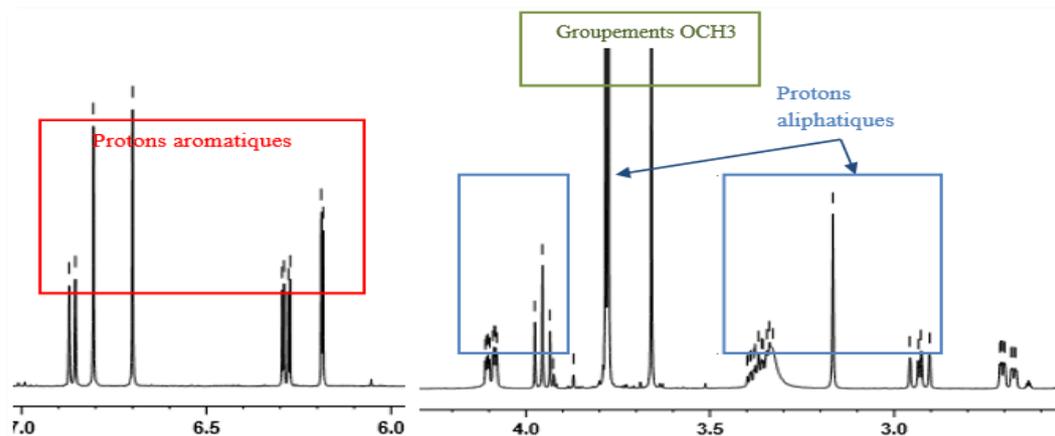


Figure IV.5: Spectre RMN ^1H du composé HC1

La présence d'un noyau aromatique trisubstitué est attestée par l'observation d'un système ABX constitué par les signaux de trois protons nommés H-5, H-6 et H-8 sortant respectivement à δ_{H} 6,86 (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz), 6,28 (1H, *dd*, $J = 8,2 ; 2,5$ Hz) et 6,18 (1H, *d*, $J = 2,5$ Hz) (Figure IV.6).

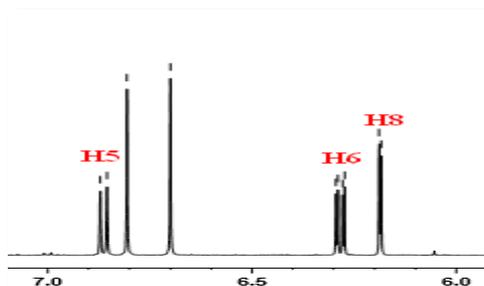


Figure IV.6: Spectre RMN ^1H du composé HC1

La présence d'un tel système est confirmée par expérience COSY H-H (Figure IV.7).

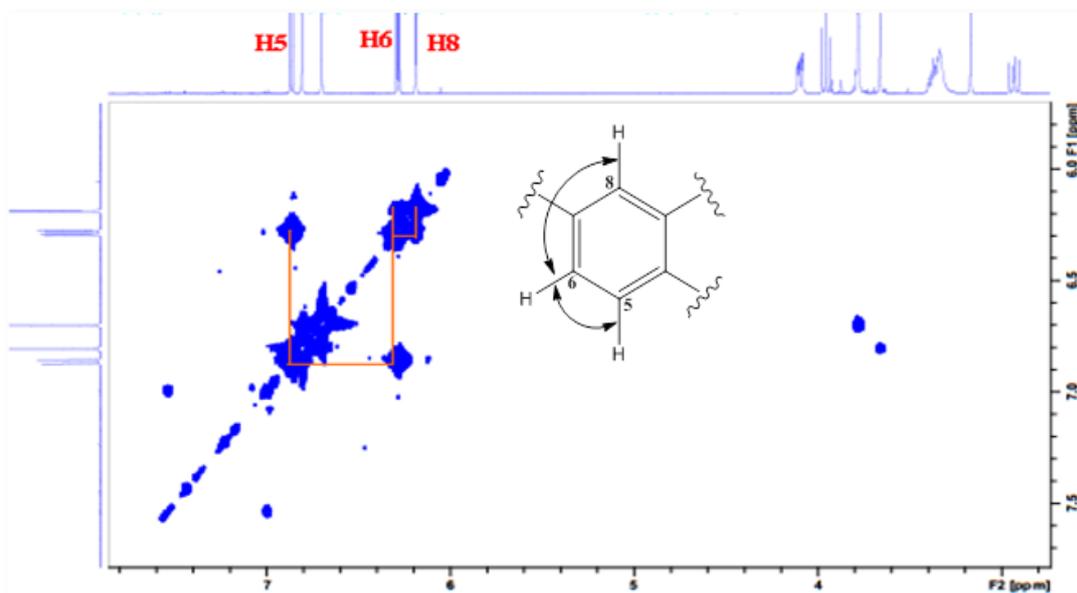


Figure IV.7: Spectre COSY H-H du composé HC1

Les carbones qui les portent sont repérés respectivement à δ_C 130,0, 108,0 et 102,5 ppm, selon le spectre HSQC (Figure IV.8).

Il est observé aussi deux signaux singulets d'intégration 1H chacun à δ_H 6,70 et 6,81, suggérant la présence d'un second noyau aromatique tétrasubstitué avec les 2 protons nommés H-3' et H-6', positionnés en para. Les carbones qui les portent sont localisés respectivement à δ_C 98,6 ppm 112,6 ppm (Figure IV.8).

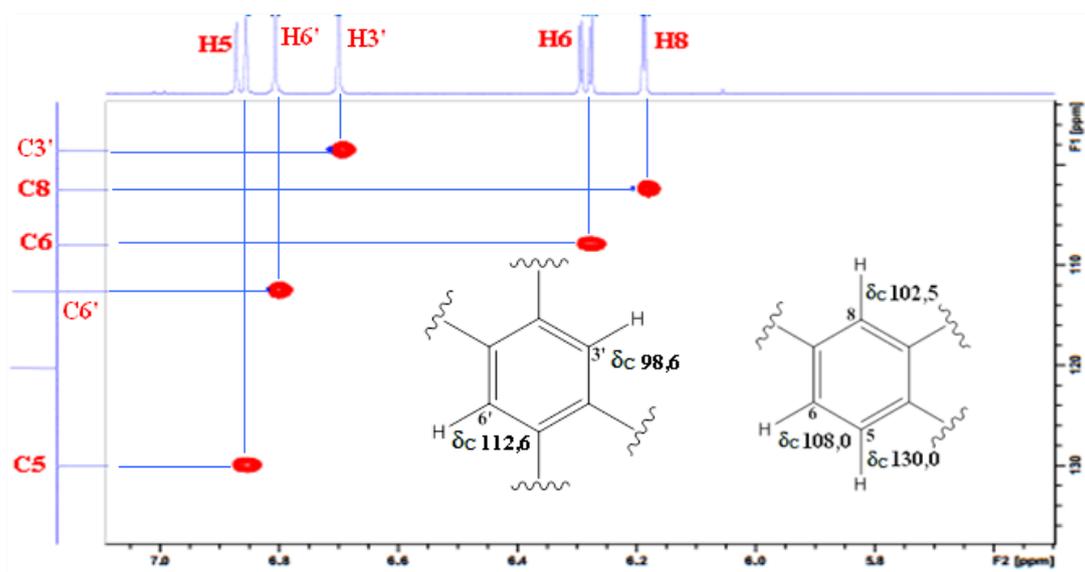
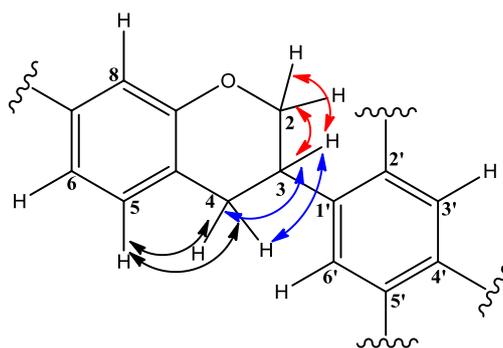


Figure IV.8: Spectre HSQC du composé HC1

La nature isoflavanique du composé est supportée en partie par le spectre COSY H-H (Figure IV.9). Partant du proton situé à δ_H 6,86 ppm (H-5) pris comme proton espion, on met en évidence les couplages entre ce dernier et deux protons géminés de nature aliphatique, repérés à δ_H 2,93 (*dd*, $J = 15,5 ; 10,2$ Hz, H-4a), 2,70 (*ddd*, $J = 15,5 ; 5,5 ; 1,6$ Hz, H-4b). A partir de ces derniers, on identifie un système de spins à cinq protons, à travers les couplages H₂-4/H-3 (δ_H 3,37, *m*), H-3/H-2a (δ_H 4,09, *ddd*, $J = 10,3 ; 3,5 ; 1,8$ Hz) et H-3/H-2b (δ_H 3,94, *t*, $J = 10,3$ Hz). Les valeurs de résonance des carbones qui les portent, établies par HSQC (Figure IV.10), à δ_C 69,2 (C-2), 31,1 (C-3) et 30,0 (C-4), sont typiques d'un squelette isoflavane [254].



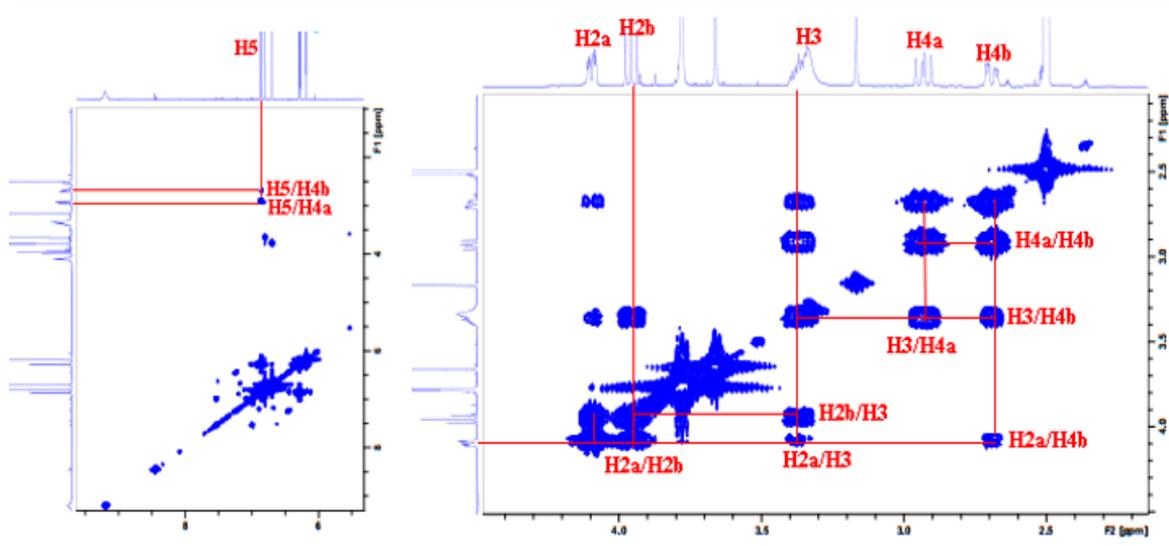


Figure IV.9: Spectre COSY H-H du composé HC1

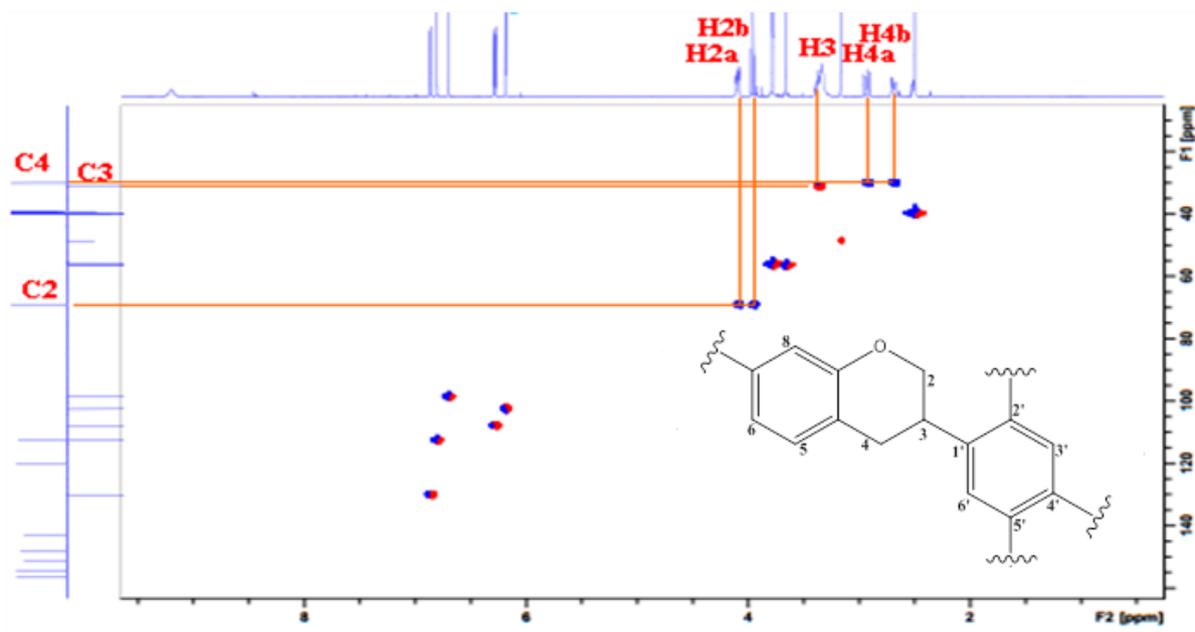


Figure IV.10: Spectre HSQC du composé HC1

Le spectre HMBC (Figure IV.11) exhibe les corrélations attendues entre :

- ✓ le proton H-5 (δ_H 6,86) et le carbone C-4 (δ_C 30,0) et deux carbones aromatiques quaternaires oxydés résonant à 154,5 ppm (C-9) et 156,5 ppm (C-7).
- ✓ le proton H-8 (δ_H 6,28) et le carbone C-6 (δ_C 108,0), et trois carbones aromatiques quaternaires résonant à δ_C 112,6, 154,5 et 156,5 attribuables respectivement aux carbones C-10, C-9 et C-7.

- ✓ les protons H₂-2 (δ_{H} 4,09 ; 3,94) et les carbones C-3 (δ_{C} 31,1), C-4 (δ_{C} 30,0) ainsi qu'un carbone quaternaire à 154,5 ppm (C-9).
- ✓ le proton H-3 (δ_{H} 3,37) et les carbones C-6' (δ_{C} 112,6), C-2 (δ_{C} 69,2), C-4 (δ_{C} 30,0) et deux carbones aromatiques quaternaires résonant respectivement à δ_{C} 151,2 (C-2') et 120,3 (C-1').

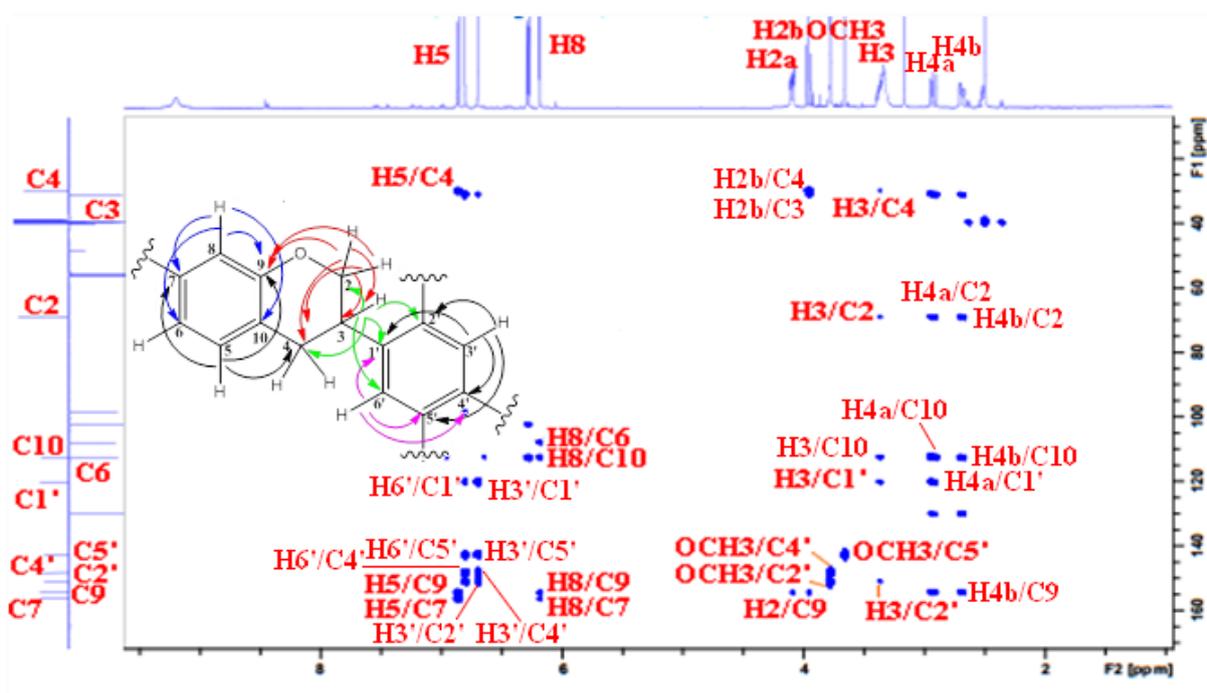
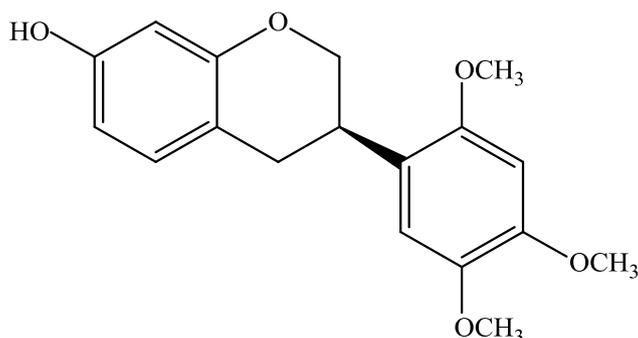


Figure IV.11: Spectre HMBC du composé HC1

La localisation des groupements méthoxyles est déterminée grâce au spectre HMBC (Figure IV.11). La position en C-2' (151,2 ppm) du groupement OCH₃ sortant à δ_{H} 3,78, est attestée par le couplage qu'il présente avec ce carbone. Les deux autres groupements (δ_{H} 3,78 et 3,66) sont positionnés en 4' et 5' du fait la corrélation de leurs protons avec les carbones C-4' (148,3 ppm) et C-5' (142,8 ppm). Ces derniers ont été identifiés sur la base de leurs corrélations longue distance avec les protons H-3' (δ_{H} 6,70) et H-6' (δ_{H} 6,81).

L'ensemble de toutes ces données spectrales, la valeur de la constant de couplage H-3/H-4 ($J = 10,2$ Hz), la mesure du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_{\text{D}} = -10,5^{\circ}$, $c = 0,40$, MeOH) et la comparaison avec les données de la littérature, permettent d'assigner, pour le composé HC1, la structure suivante: (3*R*)-7-hydroxy-2', 4', 5'-triméthoxyisoflavane.



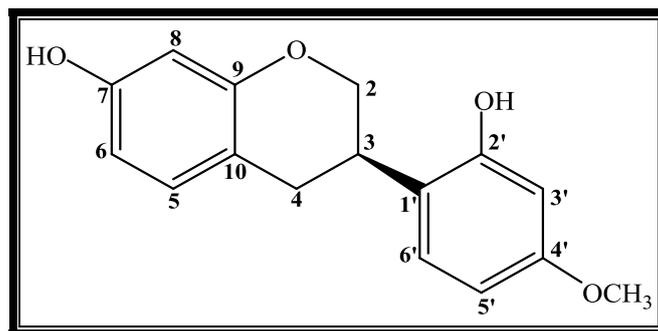
Ce composé appelé aussi (-)-5'-méthoxysativane est reporté pour la première fois dans le genre *Hedysarum*. Il a été isolé originellement de la luzerne ou "alfalfa" (*Medicago sativa*, Fabaceae) [254].

Tous les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau IV.1 ci-dessous.

Tableau IV.1: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé HC1 dans $\text{DMSO-}d_6$

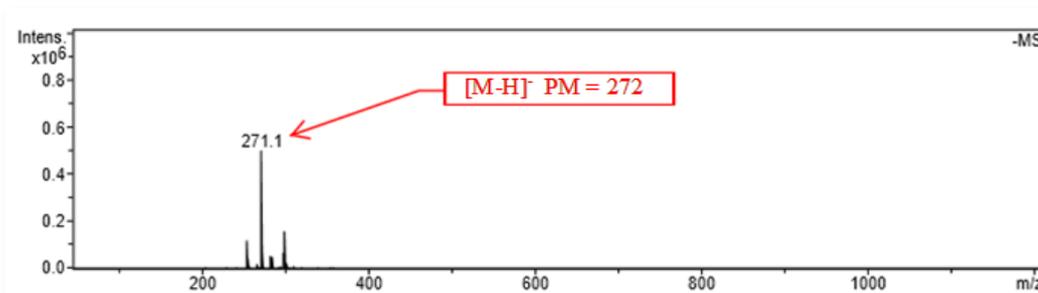
Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
2	69,2	3,94 (<i>t</i> , 10,3) 4,09 (<i>ddd</i> , 10,3 / 3,5 / 1,8)
3	31,1	3,37 (<i>m</i>)
4	30,0	2,70 (<i>ddd</i> , 15,5 / 5,5 / 1,6) 2,93 (<i>dd</i> , 15,5 / 10,2)
5	130,0	6,86 (<i>d</i> , 8,2)
6	108,0	6,28 (<i>dd</i> , 8,2 / 2,5)
7	156,5	/
8	102,5	6,18 (<i>d</i> , 2,5)
9	154,5	/
10	112,6	/
1'	120,3	/
2'	151,2	/
3'	98,6	6,70 (<i>s</i>)
4'	148,3	/
5'	142,8	/
6'	112,6	6,81 (<i>s</i>)
5'-OCH ₃	55,9	3,66 (<i>s</i>)
2'-OCH ₃	56,4	3,78 (<i>s</i>)
4'-OCH ₃	56,5	3,78 (<i>s</i>)

IV.2.3.2 Identification structurale du composé HC2

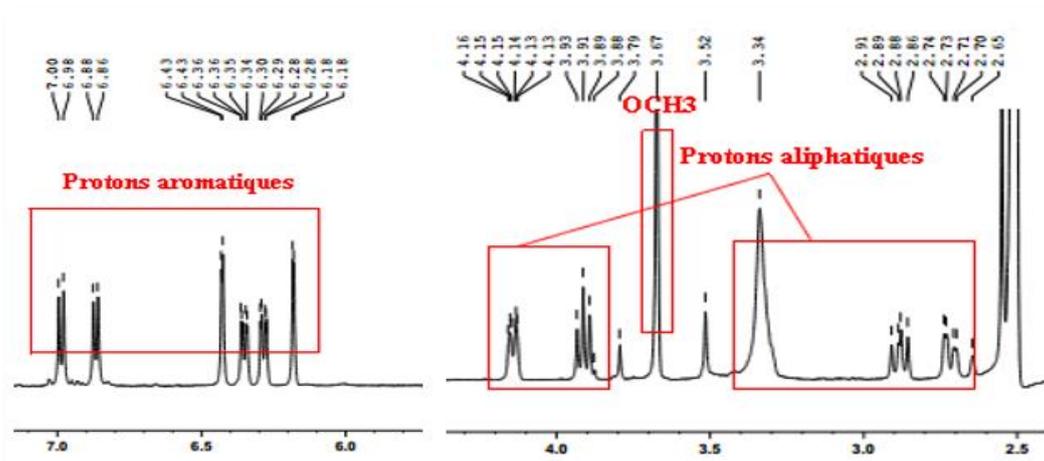


(-)-Vestitol (HC2)

Le spectre de masse ESI⁻ du composé HC2 (Figure IV.12) montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 271,1$ $[M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 272 correspondant à une formule brute en $C_{16}H_{16}O_4$.

Figure IV.12: Spectre de masse ESI⁻ du composé HC2

Son spectre RMN ¹H (Figure IV.13), enregistré dans DMSO-*d*₆, montre beaucoup de similitudes avec le composé HC1 décrit précédemment (Figure IV.14). L'observation, ici de signaux de protons aromatiques résonant entre 6 et 7 ppm et aliphatiques entre 2,6 et 4,2 ppm, détermine son caractère isoflavanique. Cependant, ce spectre met en évidence la présence d'un seul groupement OCH₃ à travers un singulet résonant à δ_H 3,67, au lieu de trois pour le composé HC1.

Figure IV.13: Spectre RMN ¹H du composé HC2

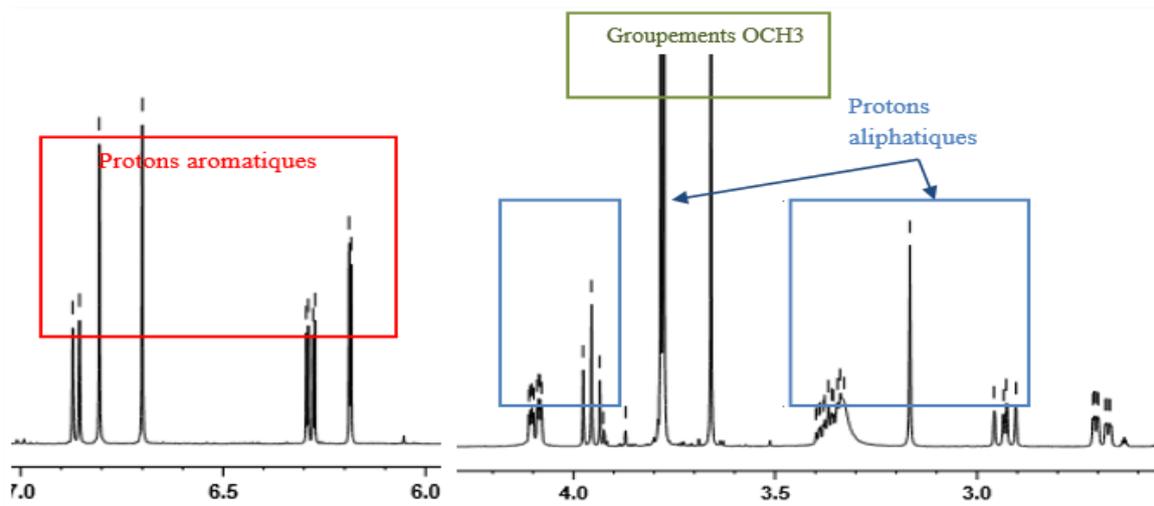


Figure IV.14: Spectre RMN ^1H du composé HC1

Cette similitude conjuguée à la différence de masse de 44 uma entre les deux composés permet d'avancer que le composé HC2 a la structure de HC1 mais dépourvue d'un groupement OCH_3 et ayant un groupement OH au lieu de OCH_3 .

L'expérience COSY H-H (Figure IV.15) qui montre la présence de deux systèmes ABX correspondant à deux noyaux aromatiques trisubstitués, l'un à travers les signaux à δ_{H} 6,87 (1H, *d*, $J = 7,9$ Hz), δ_{H} 6,28 (1H, *dd*, $J = 7,9 ; 1,9$ Hz) et δ_{H} 6,18 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz), l'autre à travers les signaux à δ_{H} 6,99 (1H, *d*, $J = 8,5$ Hz), δ_{H} 6,35 (1H, *dd*, $J = 8,5 ; 2,6$ Hz) et δ_{H} 6,43 (1H, *d*, $J = 2,6$ Hz), conforte cette hypothèse.

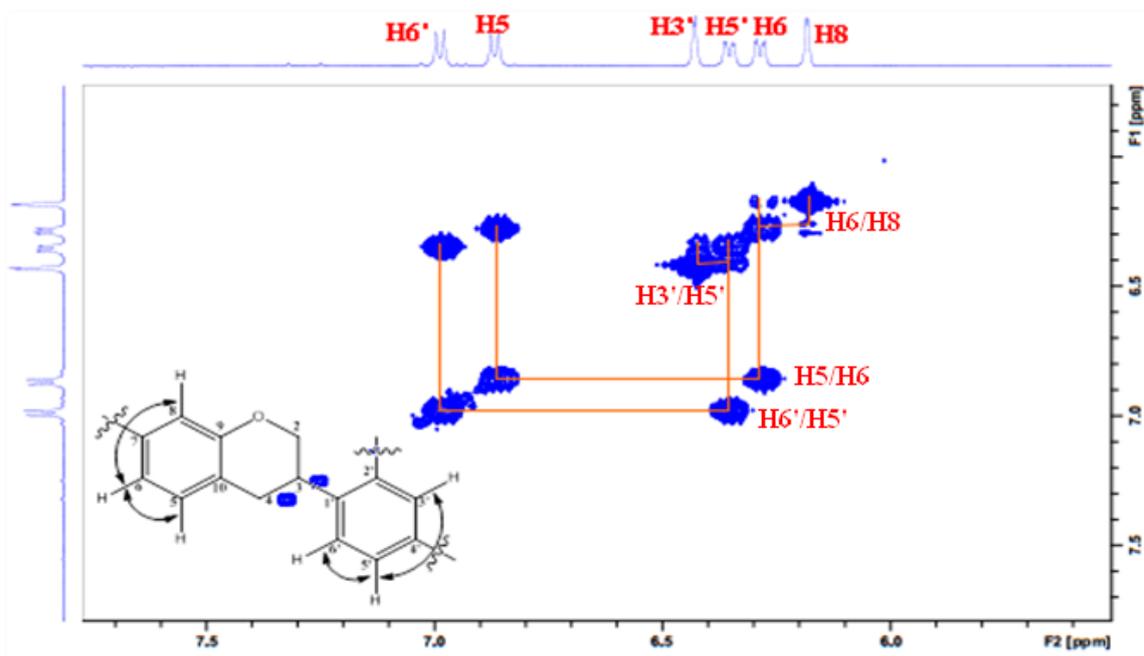
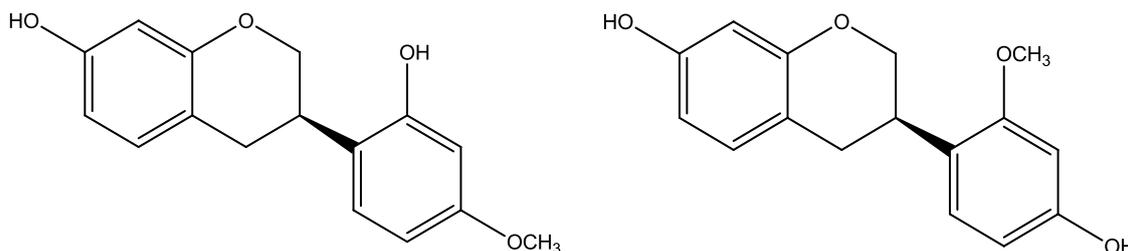


Figure IV.15: Spectre COSY H-H du composé HC2

Cette analyse permet de suggérer, pour le composé HC2, une des structures suivantes :



Le spectre COSY H-H (Figure IV.16) permet de reconnaître tous les protons constituant le cycle C aliphatique, à travers les couplages H-4a (δ_H 2,88, *dd*, $J = 15,5 ; 10,2$ Hz)/H-3 (δ_H 3,34, *m*), H-4b (δ_H 2,71, *ddd*, $J = 15,5 ; 4,9 ; 1,6$ Hz)/H-4a, H-3/H-2a (δ_H 4,14, *ddd*, $J = 10,5 ; 3,3 ; 1,8$ Hz), H-3/H-2b (δ_H 3,91, *t*, $J = 10,5$ Hz).

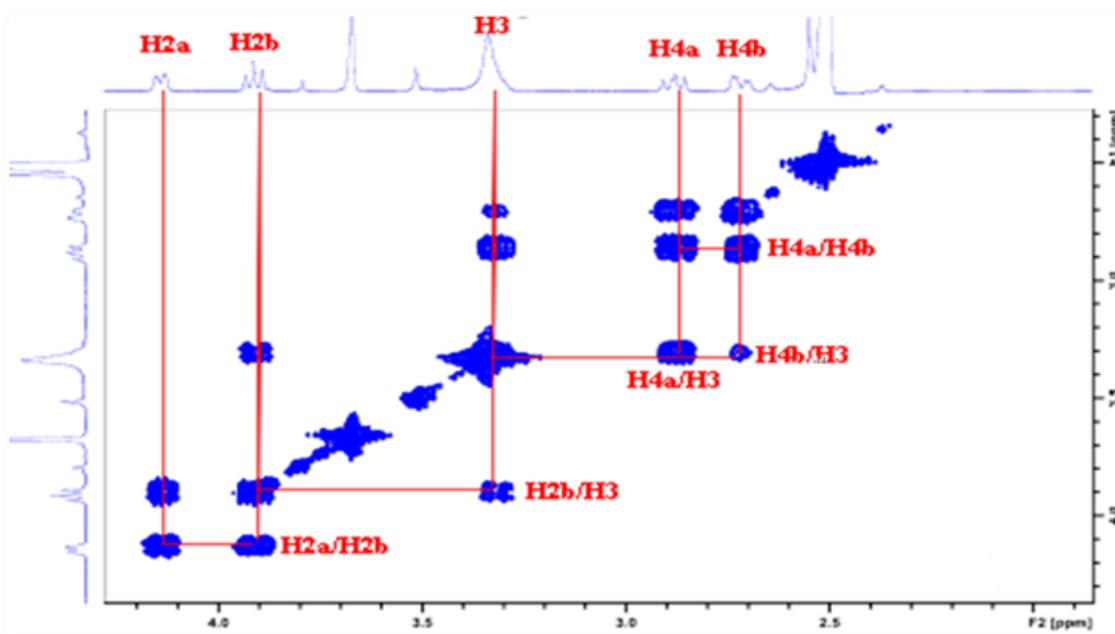
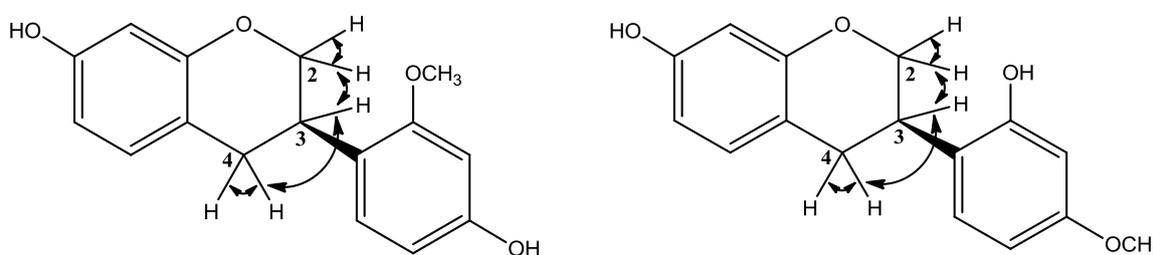


Figure IV.16: Spectre COSY H-H du composé HC2

L'expérience HSQC (Figure IV.17) permet de retrouver tous les carbones portant les protons aromatiques et aliphatiques.

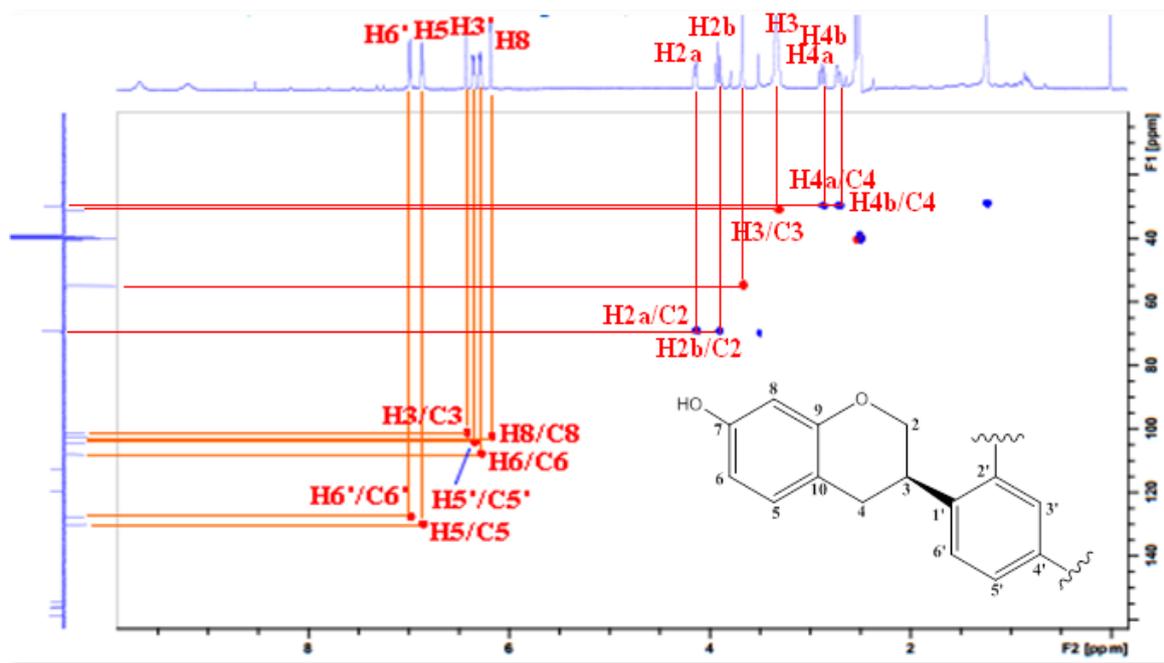


Figure IV.17: Spectre HSQC identifiant les carbones du composé HC2

Le spectre HMBC (Figure IV.18) permet de retrouver toutes les corrélations attendues, particulièrement au niveau des cycles A et C identiques à celles observées pour le composé HC1. Elle a permis également de déterminer la position du groupement OCH_3 au niveau du cycle B, à travers la corrélation longue distance entre les protons de ce dernier (δ_{H} 3,67) et le carbone quaternaire C-4' (δ_{H} 158,8), lui-même identifié sur la base de son couplage avec le proton H-5' (δ_{H} 6,35).

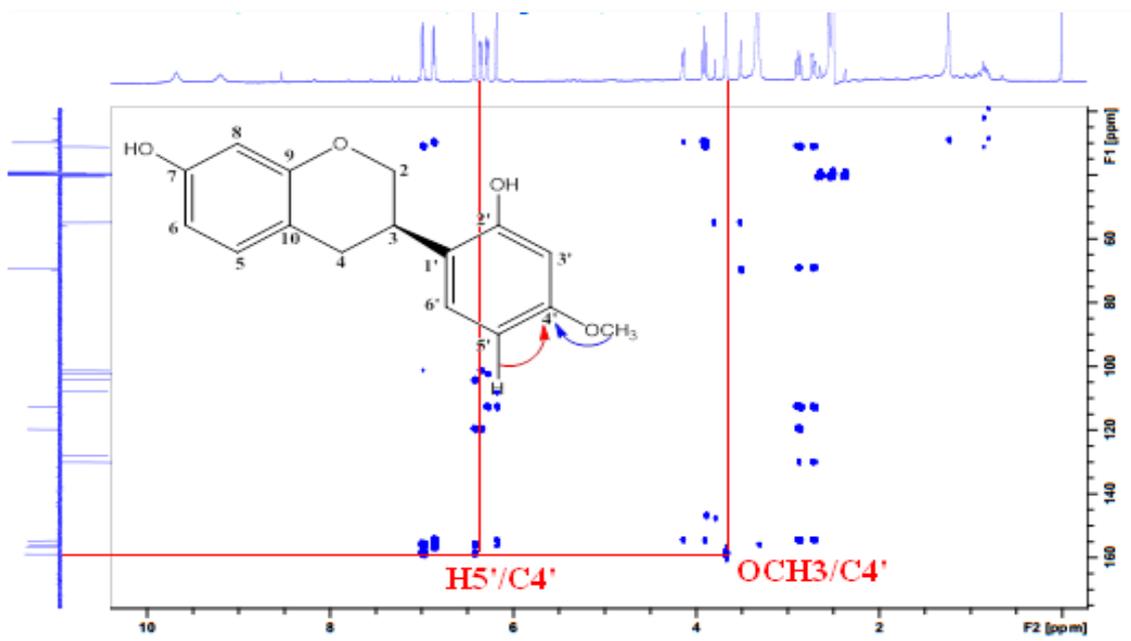
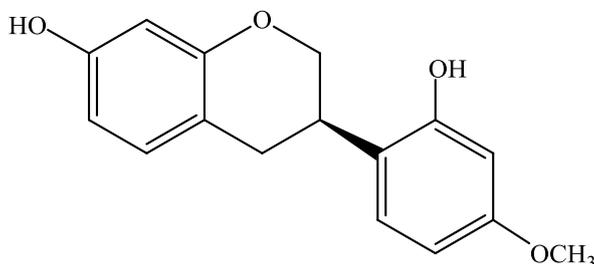


Figure IV.18: Spectre HMBC du composé HC2

L'ensemble de toutes ces données spectrales, la valeur de la constante de couplage H-3/H-4 ($J = 10,2$), la mesure du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D -20,6^\circ$, $c = 0,05$, MeOH) et la comparaison avec les données de la littérature [142], permettent d'assigner pour le composé HC2, la structure suivante: [(3*R*)-(2-hydroxy-4-méthoxyphenyl)-chroman-7-ol].



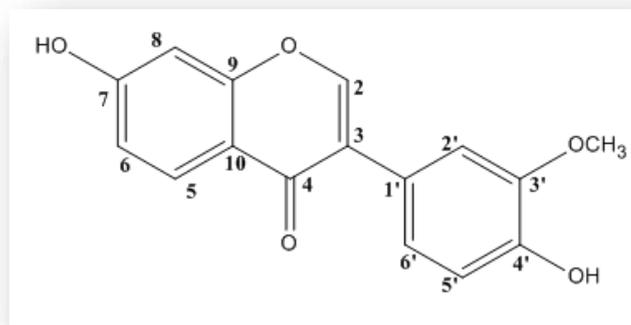
Ce composé, connu sous le nom de (-)-Vestitol, est doté d'une forte activité antibactérienne [255] et antioxydante [256]. Il a été rencontré dans les espèces du genre *Hedysarum* comme *H. theinum* [142] et *H. polybotrys* [143] et de la famille Fabaceae comme *Dalbergia odorifera* [255].

Le tableau IV.2 reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé HC2.

Tableau IV.2: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé HC2 dans DMSO- d_6

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
2	69,2	3,91 (<i>t</i> , 10,5) 4,14 (<i>ddd</i> , 10,5 / 3,3 / 1,8)
3	31,1	3,34 (<i>m</i>)
4	29,8	2,71 (<i>ddd</i> , 15,5 / 4,9 / 1,6) 2,88 (<i>dd</i> , 15,5 / 10,2)
5	130,1	6,87 (<i>d</i> , 7,9)
6	107,9	6,28 (<i>dd</i> , 7,9 / 1,9)
7	156,5	/
8	102,5	6,18 (<i>d</i> , 1,9)
9	154,6	/
10	112,8	/
1'	119,7	/
2'	155,9	/
3'	101,3	6,43 (<i>d</i> , 2,6)
4'	158,8	/
5'	104,3	6,35 (<i>dd</i> , 8,5 / 2,6)
6'	127,7	6,99 (<i>d</i> , 8,5)
4'-OCH ₃	54,9	3,67 (<i>s</i>)

IV.2.3.3 Identification structurale du composé HC3

**7, 4'-dihydroxy-3'-méthoxyisoflavone (HC3)**

Le spectre de masse ESI⁺ (Figure IV.19) de ce composé indique la présence de deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 284,8$ [M+H]⁺ et $m/z = 306,8$ [M+Na]⁺ correspondant à une masse moléculaire de 284 uma et une formule brute en C₁₆H₁₂O₅.

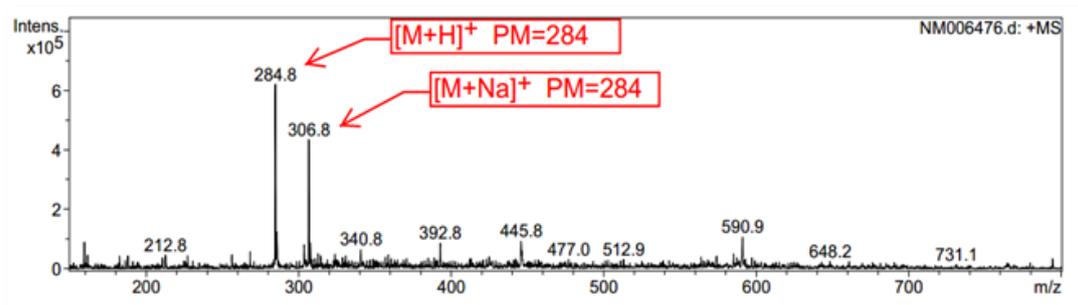


Figure IV.19: Spectre de masse ESI⁺ du composé HC3

Son spectre RMN ¹H (Figure IV.20) qui traduit un caractère phénolique pour le composé, voire flavonoïdique, présente :

- ✓ trois signaux d'intégration 1H chacun résonant à δ_H 7,04 (*sl*), 6,95 (*d*, $J = 9,1$ Hz) et 6,93 (*d*, $J = 9,1$ Hz), attribuables respectivement aux protons H-2', H-5' et H-6' du cycle B.
- ✓ trois signaux formant un système ABX résonant à δ_H 7,96 (1H, *d*, $J = 9,1$ Hz), 6,94 (1H, *dd*, $J = 9,1 ; 1,8$ Hz) et 6,86 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz), attribuables respectivement aux protons H-5, H-6 et H-8 du cycle A substitué en C-7.
- ✓ un signal singulet résonant à δ_H 8,29, très caractéristique du proton H-2 d'une isoflavone.
- ✓ un signal singulet résonant à δ_H 3,79 d'intégration 3H attestant de la présence d'un groupement méthoxyle.

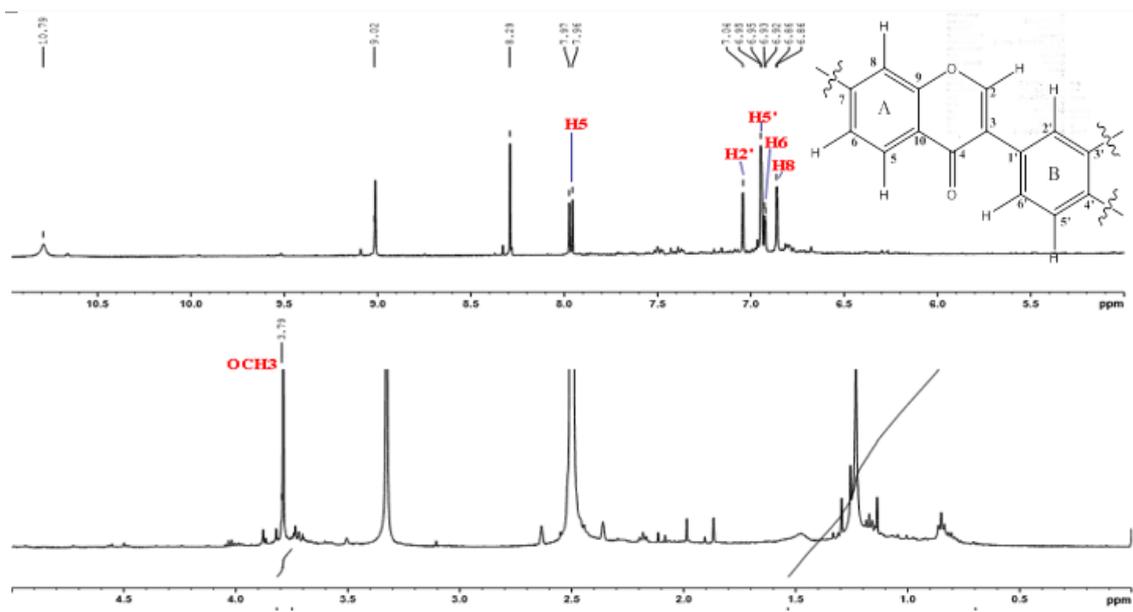
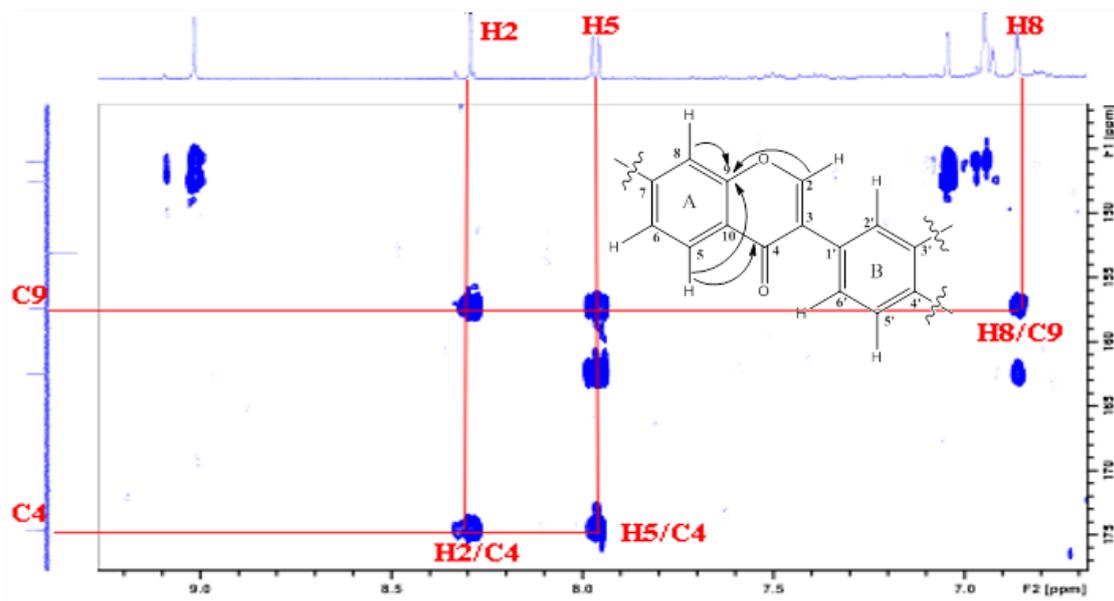


Figure IV.20: Spectre RMN ^1H du composé HC3

Le caractère isoflavonique du composé est confirmée par le spectre HMBC (Figure IV.21) qui montre la corrélation entre le proton H-2 à δ_{H} 8,29 et un carbone quaternaire oxygéné (δ_{C} 157,4) attribué à C-9 au vu de ses couplages avec les protons H-5 (δ_{H} 7,96, d , $J = 9,1$ Hz) et H-8 (δ_{H} 6,86, d , $J = 1,8$ Hz) du cycle A de l'isoflavone.

Par ailleurs, le signal attribué au proton H-5 est confirmée par sa corrélation HMBC avec le carbone carbonyle à δ_{C} 174,6 (C-4), attestant que le système ABX revient aux protons H-5/H-6/H-8 et que le carbone C-7 est porteur d'un substituant.



Figures IV.21: Spectre HMBC partiel du composé HC3

Le spectre HMBC (Figure IV.22) montre également les corrélations entre les trois protons H-2' (δ_H 7,04, *sl*), H-5' (δ_H 6,95, *d*, $J = 1,8$ Hz) et H-6' (δ_H 6,93, *d*, $J = 1,8$ Hz) du cycle B et deux carbones quaternaires oxygénés résonant à δ_C 146,0 (C-4') et δ_C 147,5 (C-3'). Ce dernier qui présente un couplage avec les protons du groupement méthoxyle (δ_H 3,79) indique que ce groupement est positionné en C-3', impliquant que les carbone C-7 et C-4' sont porteurs de groupements hydroxyles.

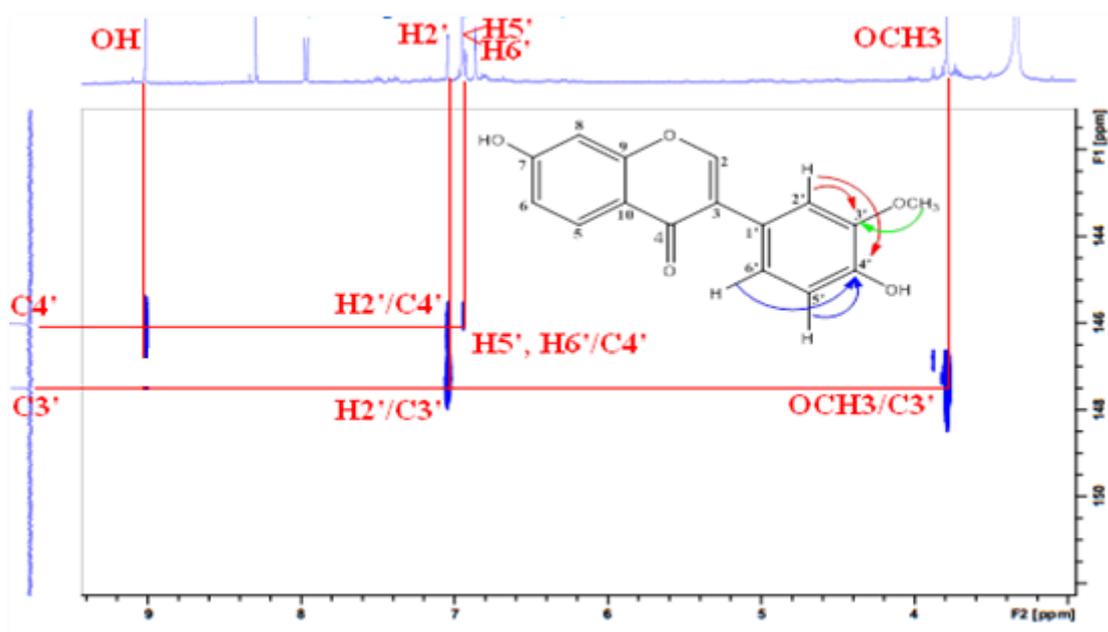


Figure IV.22: Spectre HMBC partiel du composé HC3

L'analyse combinée des spectres HSQC et HMBC permet de déterminer les déplacements chimiques de tous les carbones de la molécule (Figure IV.23).

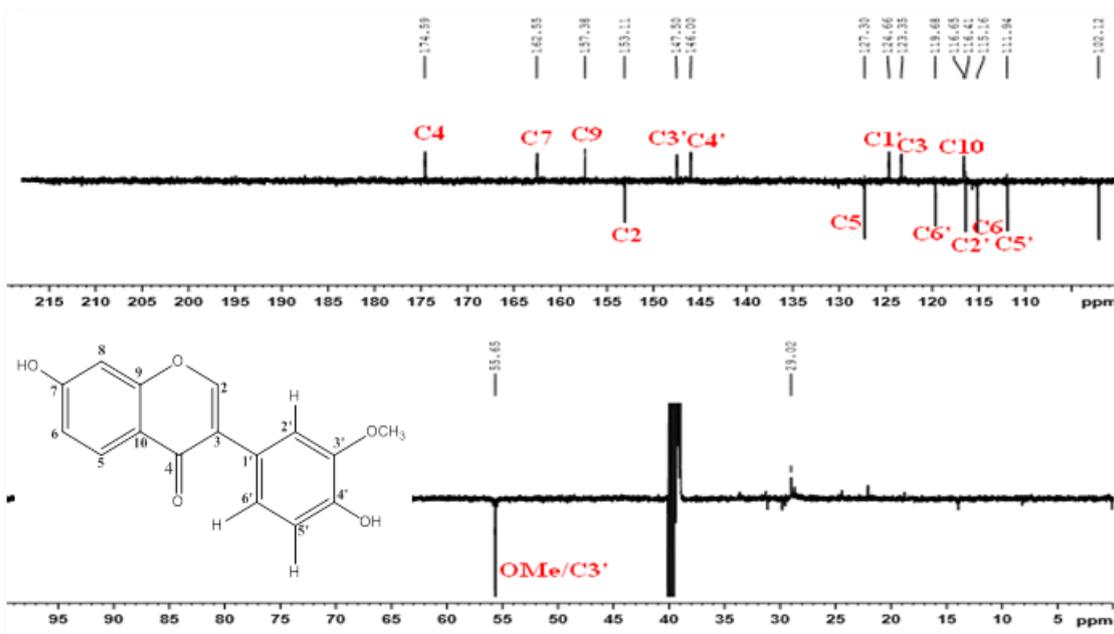
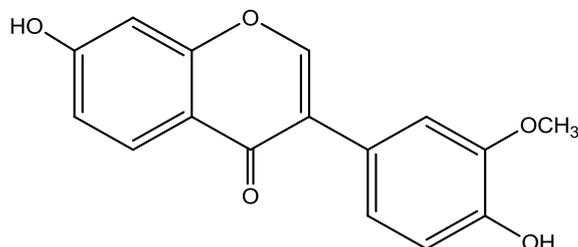


Figure IV.23: Spectre RMN DEPTQ du composé HC3

Toutes ces données spectrales (Tableau IV.3), ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [257], permettent d'attribuer sans ambiguïté pour le composé, la structure suivante : 7, 4'-dihydroxy-3'-méthoxyisoflavone.



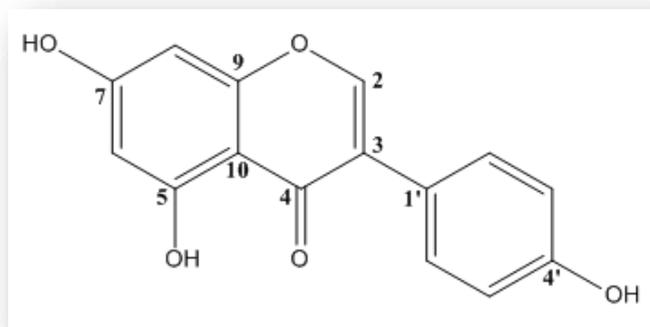
Ce composé, appelé aussi 3'-méthoxydaïdzéine, est décrit pour la première fois dans le genre *Hedysarum*. Antérieurement, il a été rencontré dans certaines espèces de la famille Fabaceae comme *Dalbergia odorifera* I. [257], *Caragana changduensis* [258] et *Pueraria lobata* [259]. Il est doté d'une activité antioxydante appréciable [239].

Le tableau IV.3 englobe tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé HC3.

Tableau IV.3: Déplacements chimiques RMN ¹H (500 MHz) et ¹³C (125 MHz) du composé HC3 dans DMSO

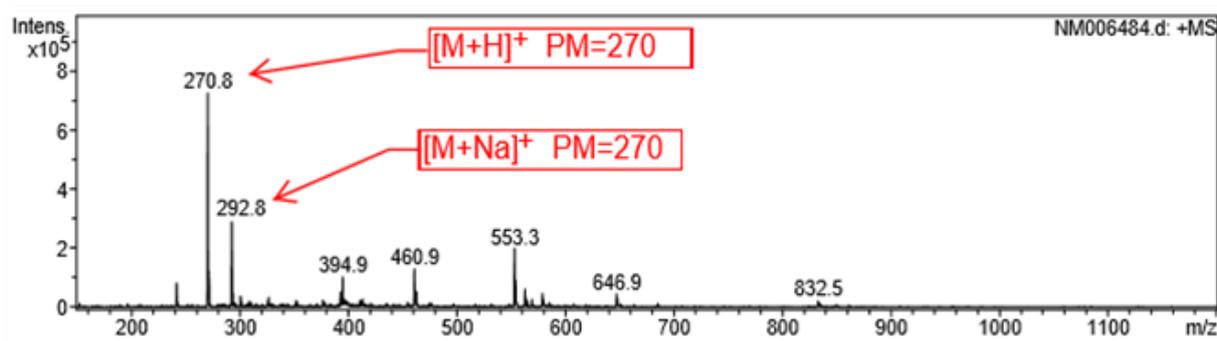
Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
2	153,1	8,29 (<i>s</i>)
3	123,3	/
4	174,6	/
5	127,3	7,96 (<i>d</i> , 9,1)
6	115,1	6,94 (<i>dd</i> , 9,1 / 1,8)
7	162,5	/
8	102,1	6,86 (<i>d</i> , 1,8)
9	157,4	/
10	116,6	/
1'	124,6	/
2'	116,4	7,04 (<i>sl</i>)
3'	147,5	/
4'	146,0	/
5'	111,9	6,95 (<i>d</i> , 1,8)
6'	119,7	6,93 (<i>d</i> , 1,8)
3'-OCH ₃	55,6	3,79 (<i>s</i>)

IV.2.3.4 Identification structurale du composé HC4



Genistéine (HC4)

Le spectre de masse ESI⁺ (Figure IV.24) de ce composé indique la présence de deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 270,8$ [M+H]⁺ et $m/z = 292,8$ [M+Na]⁺ correspondant à une masse moléculaire de 270 uma et une formule brute en C₁₅H₁₀O₅.

Figure IV.24: Spectre de masse ESI⁺ du composé HC4

Le spectre RMN ¹H (Figure IV.25) du composé HC4, enregistré dans le DMSO, est très similaire à celui du composé décrit précédemment. Il est identifié :

- ✓ un signal singulet résonant à δ_H 8,33 (1H, *s*), très caractéristique du proton H-2 d'une isoflavone.
- ✓ deux signaux résonant à δ_H 7,37 (2H, *d*, $J = 9,1$ Hz) et 6,81 (2H, *d*, $J = 9,1$ Hz), attribués respectivement aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' du cycle B parasubstitué en C-4'.
- ✓ deux signaux résonant à δ_H 6,39 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz) et 6,22 (1H, *d*, $J = 1,9$ Hz), attribuables respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A substitué en C-5 et C-7.

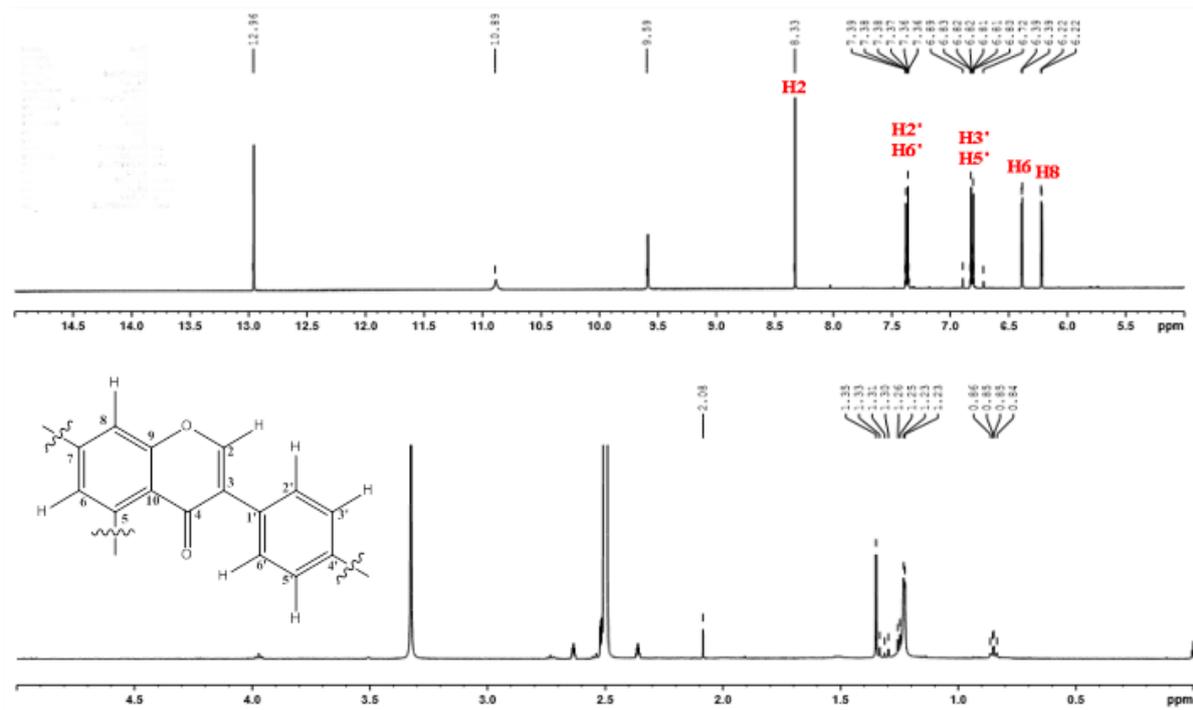
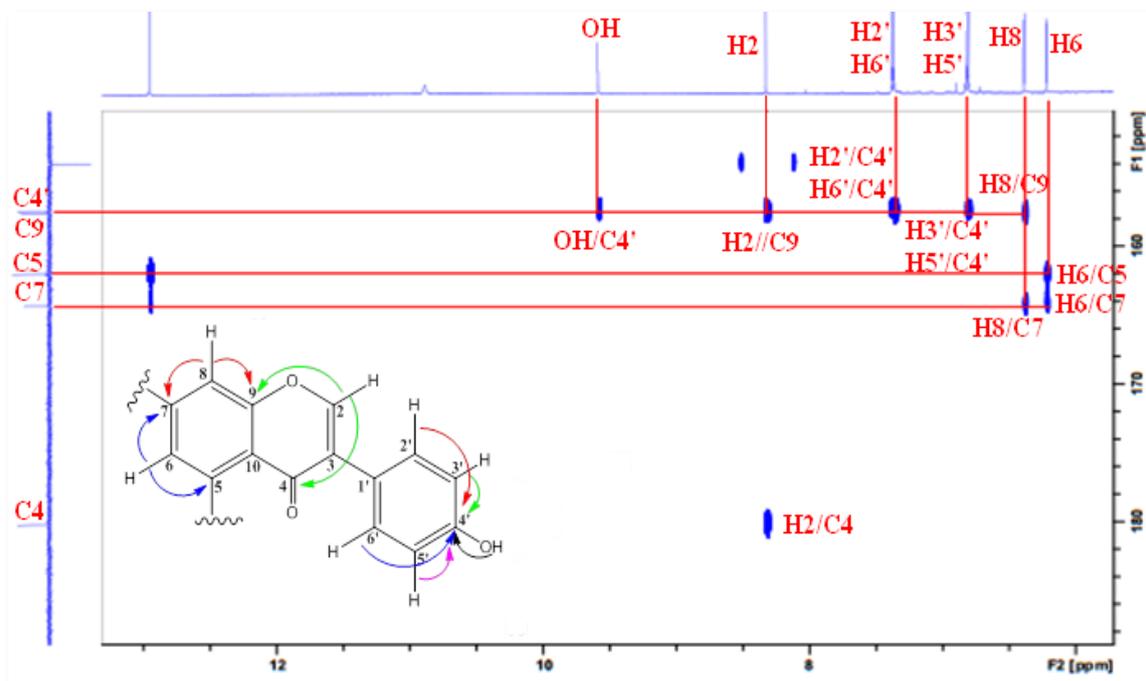


Figure IV.25: Spectre RMN ¹H du composé HC4

Comme pour le composé HC3, le spectre HMBC (Figure IV.26) confirme la nature isoflavonique du composé HC4 à travers les corrélations H-2 (δ_H 8,33)/C-9 (δ_C 157,6)/C-4 (δ_C 180,2), H-8 (δ_H 6,22, *d*, *J* = 1,9 Hz)/C-7 (δ_C 164,3)/C-9 et H-6 (δ_H 6,39, *d*, *J* = 1,9 Hz)/C-5 (δ_C 162,0)/C-7.



Figures IV.26: Spectre HMBC partiel du composé HC4

Le spectre HMBC (Figure IV.26) montre également les corrélations entre les quatre protons du cycle B et un carbone quaternaire oxygéné résonant à δ_C 157,4 (C-4'). Ce dernier corrélant avec un proton (δ_H 9,59) de groupement hydroxyle indique que ce groupement est positionné en C-4'.

L'analyse combinée des spectres HSQC et HMBC permet de déterminer les déplacements chimiques de tous les carbones de la molécule (Figure IV.27).

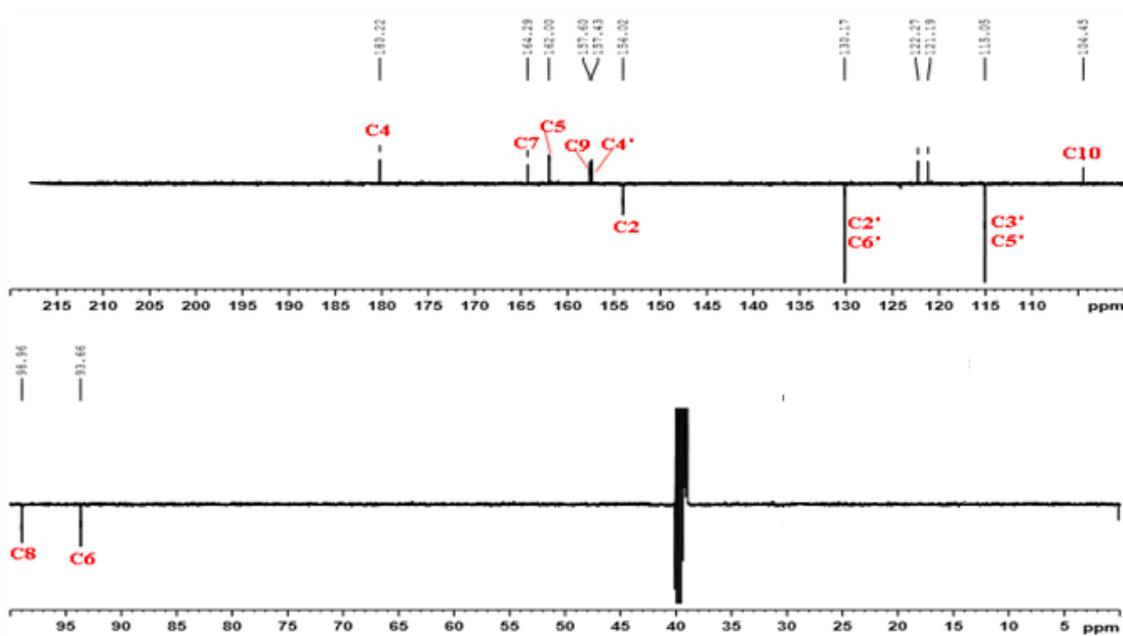
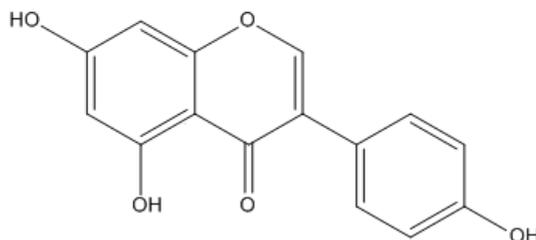


Figure IV.27: Spectre RMN DEPT du composé HC4

Toutes ces données spectrales permettent d'identifier ce composé au 4', 5, 7-trihydroxyisoflavone.



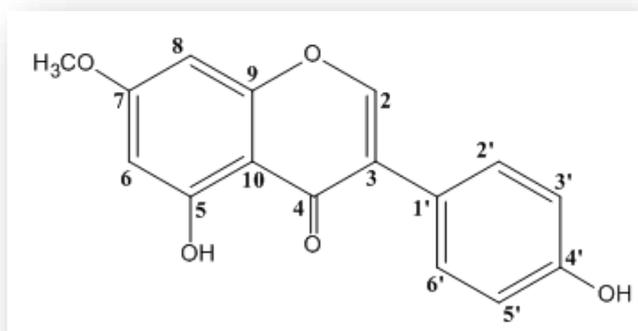
Ce composé, connu sous le nom de genistéine, est isolé pour la première fois dans le genre *Hedysarum*. Il a été précédemment isolé de *Millettia nitida* var. *hirsutissima* appartenant à la famille Fabaceae [260]. Ce composé est doté d'une activité antituberculaire [261].

Le tableau IV.4 englobe tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé HC4.

Tableau IV.4: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé HC4 dans DMSO

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
2	154,0	8,33 (<i>s</i>)
3	121,2	/
4	180,2	/
5	162,0	/
6	93,6	6,39 (<i>d</i> , 1,9)
7	164,3	/
8	98,9	6,22 (<i>d</i> , 1,9)
9	157,6	/
10	104,4	/
1'	122,3	/
2'	130,2	7,37 (<i>d</i> , 9,1)
3'	115,0	6,81 (<i>d</i> , 9,1)
4'	157,4	/
5'	115,0	6,81 (<i>d</i> , 9,1)
6'	130,2	7,37 (<i>d</i> , 9,1)

IV.2.3.5 Identification structurale du composé HC5



Prunétine (HC5)

Le spectre de masse ESI⁻ de ce composé (Figure IV.28) donne un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 282,5$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ correspondant à une masse moléculaire de 284 uma et une formule brute en $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$.

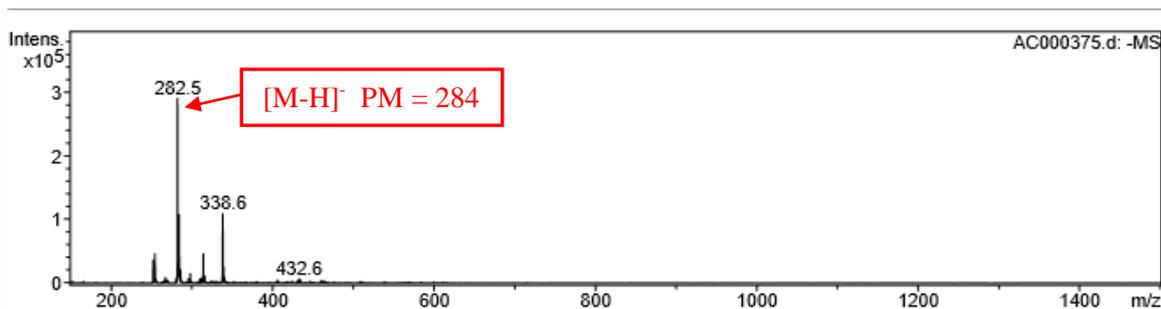


Figure IV.28: Spectre de masse ESI⁻ du composé HC5

Son spectre RMN ^1H (Figure IV.29) enregistré dans $\text{DMSO-}d_6$ montre d'emblée que ce composé est de structure quasi-identique à celle du composé HC4. On reconnaît :

- ✓ le signal singulet résonant à δ_{H} 8,41, très caractéristique du proton H-2 d'une isoflavone.
- ✓ les deux signaux d'intégration 2H chacun résonant à δ_{H} 7,38 et 6,82, attribués respectivement aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' du cycle B.
- ✓ les deux signaux résonant à δ_{H} 6,40 (1H, *sl*) et 6,60 (1H, *sl*), correspondant respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A substitué en C-5 et C-7.

La seule différence réside en la présence d'un signal de protons OCH_3 (3H, *d*, δ_{H} 3,98). Une différence de 14 uma entre les deux composés, constatée sur le spectre de masse, suggérerait qu'un groupement OCH_3 a pris la place d'un groupement OH, au niveau du composé HC5.

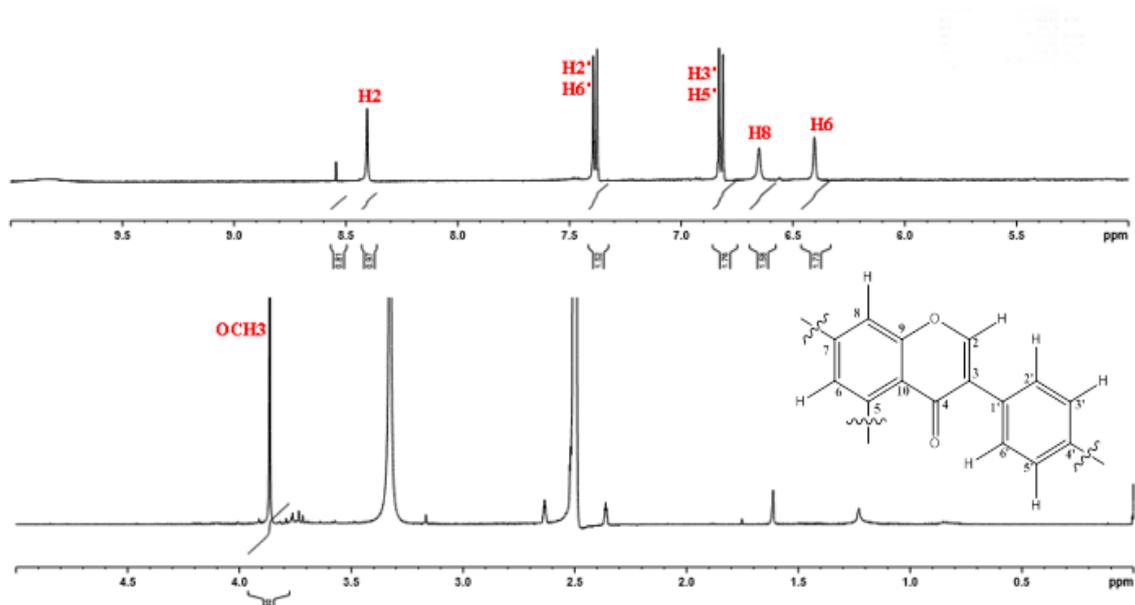
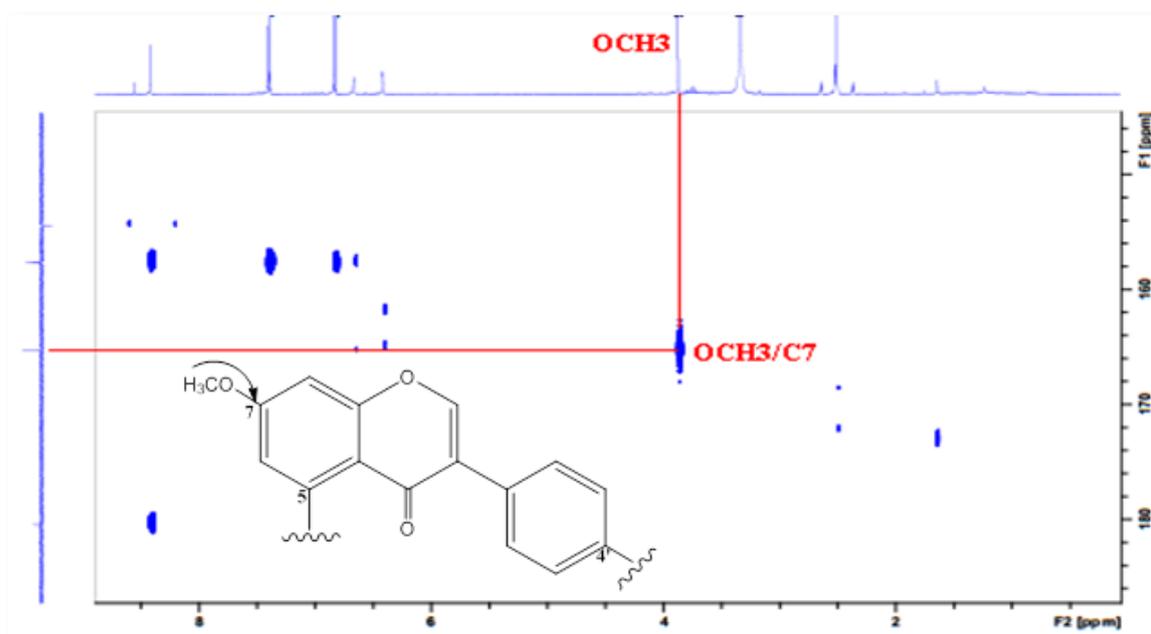


Figure IV.29: Spectre RMN ^1H du composé HC5

Le spectre HMBC permet de retrouver toutes les corrélations observées pour ce composé. L'observation sur le même spectre (Figure IV.30) d'un couplage longue distance OCH_3 (δ_{H} 3,98)/ C-7 (δ_{C} 165,2) confirme que le groupement méthoxyle est positionné en C-7.



Figures IV.30: Spectre HMBC partiel du composé HC5

L'analyse combinée des spectres HSQC et HMBC permet de déterminer les déplacements chimiques de tous les carbones de la molécule (Figure IV.31).

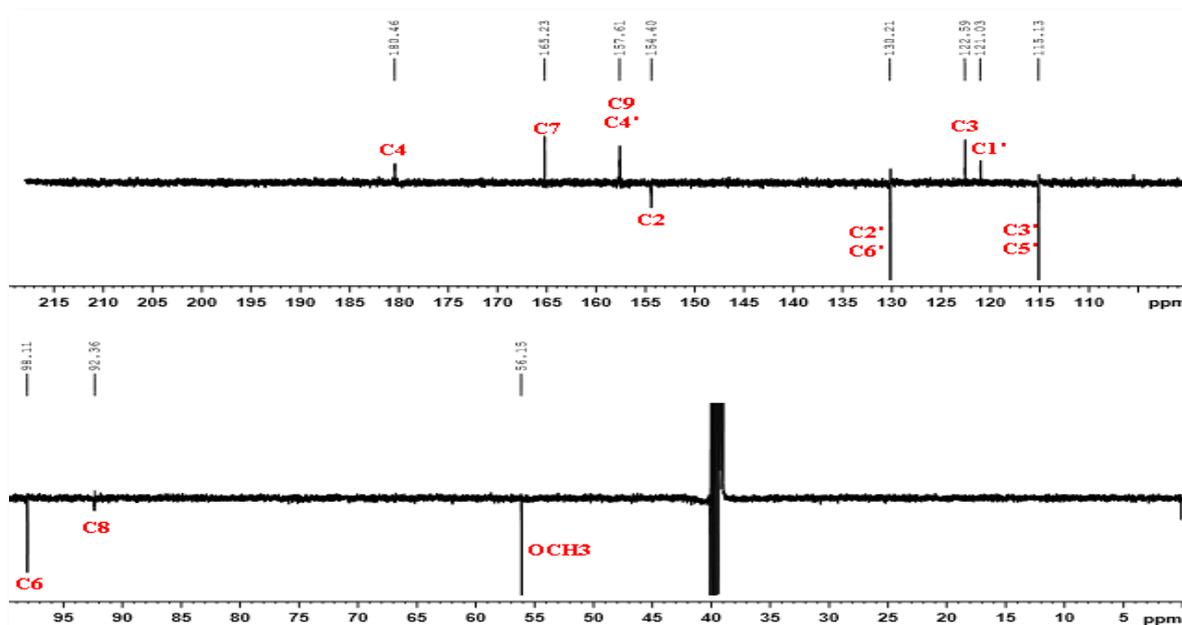
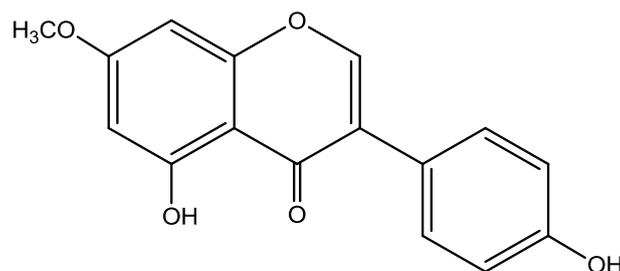


Figure IV.31: Spectre RMN DEPT du composé HC5

Toutes ces données spectrales permettent d'attribuer sans ambiguïté au composé HC5, la structure suivante: 5, 4'-dihydroxy-7-méthoxyisoflavone.



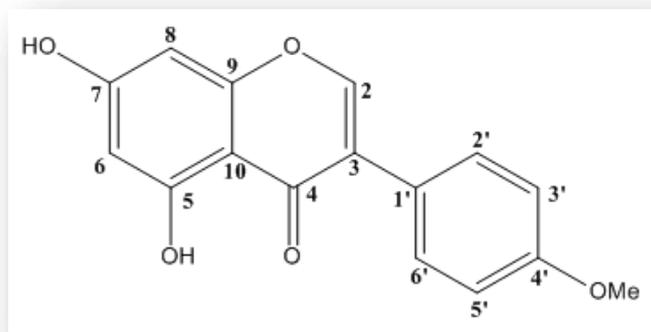
Ce composé, appelé communément prunétine, est isolé également pour la première fois dans le genre *Hedysarum*. Il a été rencontré dans certaines espèces de la famille Fabaceae comme *Millettia nitida* var. *hirsutissima* [260], *Millettia dorwardi* Coll. et Hemsl [262], *Cladrastis platycarpa* [263], *Dalbergia spinosa* [264] et *Dalbergia sympathetica* (Dennst.) [265]. Ce composé est doté d'une activité antituberculaire [261] et anti-inflammatoire [266].

Le tableau IV.5 englobe tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé HC5.

Tableau IV.5: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé HC5 dans $\text{DMSO-}d_6$

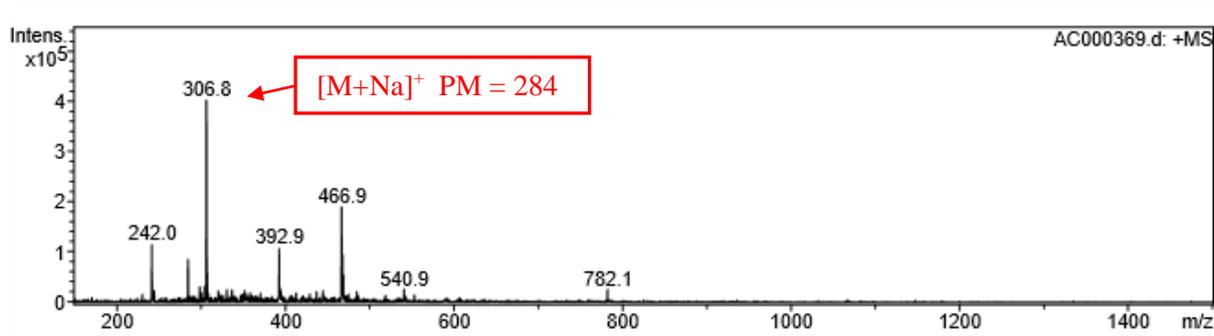
Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
2	154,4	8,41 (<i>s</i>)
3	122,6	/
4	180,5	/
5	161,7	/
6	98,1	6,40 (<i>sl</i>)
7	165,2	/
8	92,4	6,65 (<i>sl</i>)
9	157,6	/
10	105,4	/
1'	121,0	/
2'	130,2	7,38 (<i>d</i> , 8,8)
3'	115,1	6,82 (<i>d</i> , 8,8)
4'	157,6	/
5'	115,1	6,82 (<i>d</i> , 8,8)
6'	130,2	7,38 (<i>d</i> , 8,8)
7-OMe	56,1	3,98 (<i>s</i>)

IV.2.3.6 Identification structurale du composé HC6



Biochanine A (HC6)

Le spectre de masse ESI⁺ du composé HC6 (Figure IV.32), présente un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 306,8$ $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire de 284 uma, correspondant à la formule moléculaire C₁₆H₁₂O₅.

Figure IV.32: Spectre de masse ESI⁺ du composé HC6

Son spectre RMN ¹H (Figure IV.33) enregistré dans le DMSO-*d*₆ présente :

- un signal singulet résonant à δ_H 8,17, très caractéristique du proton H-2 d'une isoflavone.
- deux signaux d'intégration 2H chacun résonant à δ_H 7,47 (*d*, 8,8 = Hz) et 6,97 (*d*, *J* = 8,8 Hz), attribués respectivement aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' du cycle B parasubstitué.
- deux signaux résonant à δ_H 5,95 (1H, *sl*) et 6,08 (1H, *sl*), attribuables respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A substitué en C-5 et C-7.
- un signal singulet résonant à δ_H 3,78 d'intégration 3H attestant la présence d'un groupement méthoxyle.

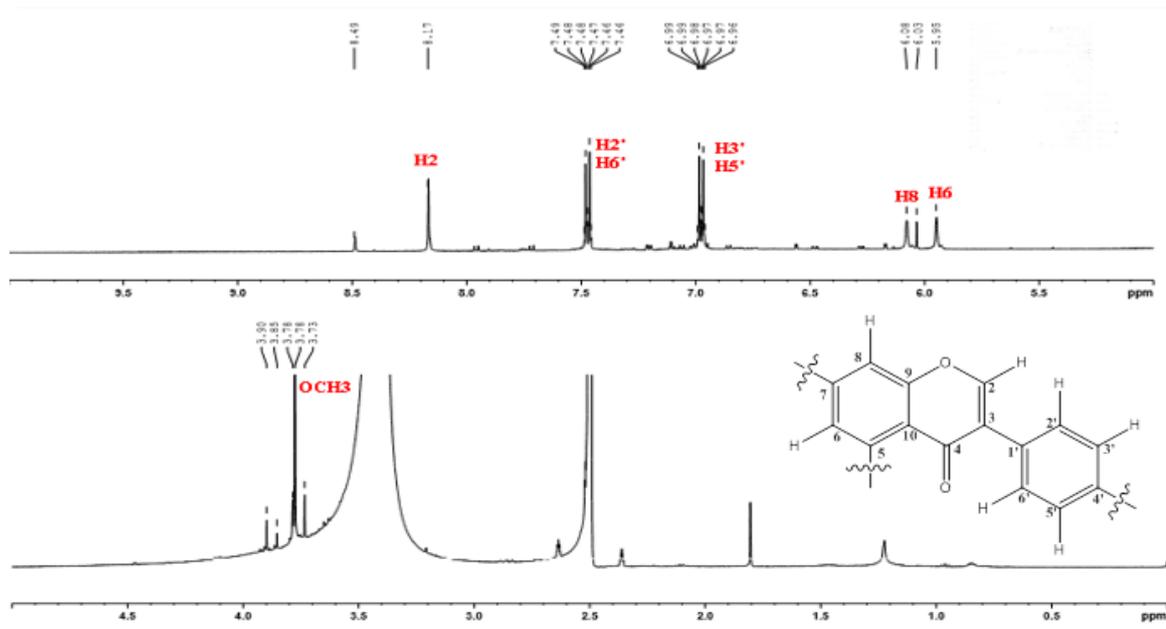


Figure IV.33: Spectre RMN ^1H du composé HC6

L'analyse de ce spectre conjuguée à celle du spectre de masse qui montre une masse moléculaire égale à celle du composé HC5 décrit précédemment, indique que ces deux produits sont des isomères de position.

La localisation du groupement OCH_3 en C-4' est attestée par le spectre HMBC (Figure IV.34) qui montre une corrélation entre les protons du groupement méthoxy (δ_{H} 3,78) et le carbone quaternaire oxygéné résonant à δ_{C} 159,0 (C-4'), impliquant ainsi que les carbones C-7 et C-5 sont porteurs de groupements OH.

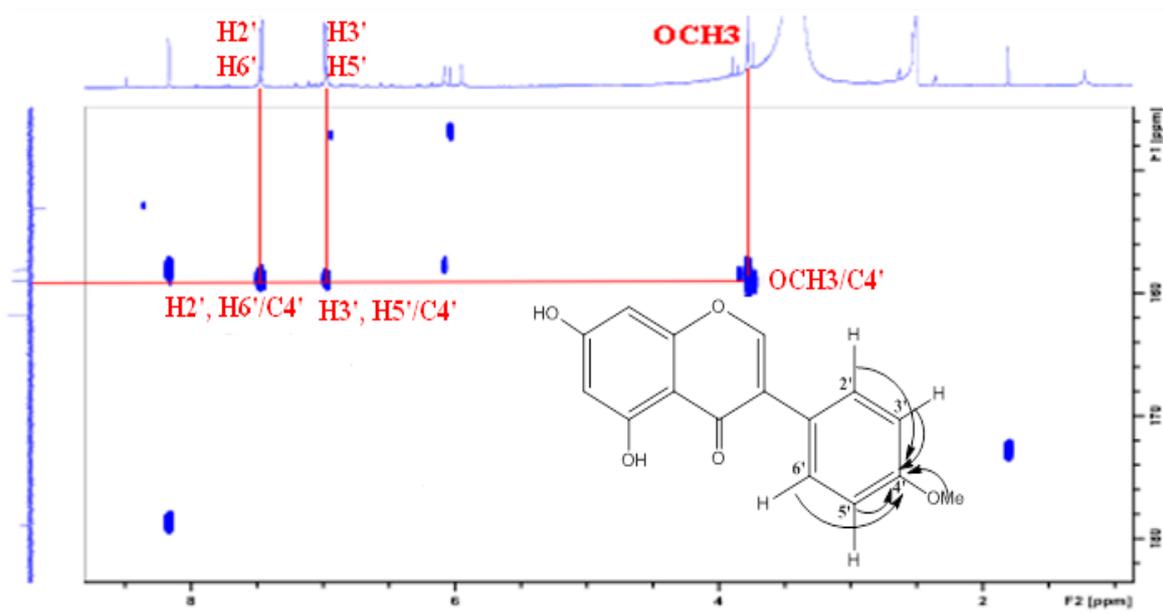


Figure IV.34: Spectre HMBC partiel du composé HC6

L'analyse combinée des spectres HSQC et HMBC permet de déterminer les déplacements chimiques de tous les carbones de la molécule (Figure IV.35).

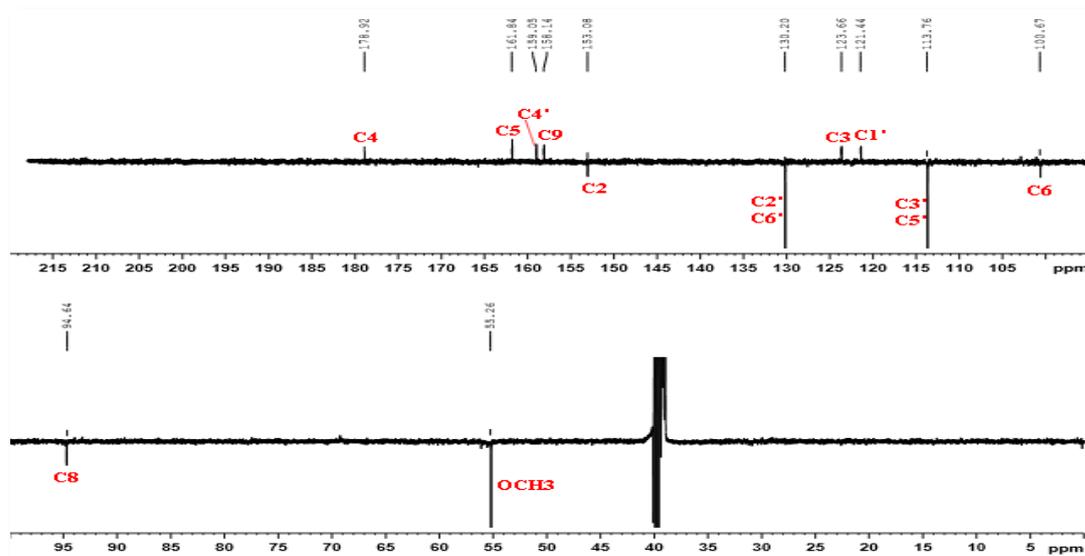
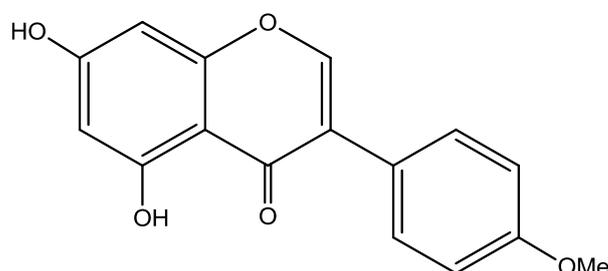


Figure IV.35: Spectre RMN DEPT du composé HC6

Toutes ces données spectrales permettent d'attribuer sans ambiguïté au composé HC6 la structure suivante : 5, 7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavone.



Cette isoflavone connue est appelée biochanine A. Elle a été isolée pour la première fois dans le genre *Hedysarum*. Elle a été rencontrée également dans certaines espèces de la famille Fabaceae comme *Dalbergia olivari* [267].

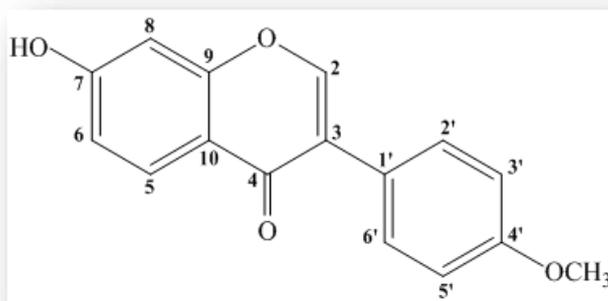
Le tableau IV.6 reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé HC6.

Tableau IV.6: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé HC6 dans $\text{DMSO-}d_6$

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
2	153,1	8,17 (<i>s</i>)
3	123,7	/
4	178,9	/

5	161,8	/
6	100,7	5,95 (sl)
7	165,1	/
8	94,6	6,08 (sl)
9	158,1	/
10	102,8	/
1'	121,4	/
2'	130,2	7,47 (d, 8,8)
3'	113,8	6,97 (d, 8,8)
4'	159,0	/
5'	113,8	6,97 (d, 8,8)
6'	130,2	7,47 (d, 8,8)
4'-OMe	55,3	3,78 (s)

IV.2.3.7 Identification structurale du composé HC7



Formononétine (HC7)

Le spectre de masse ESI⁺ du composé HC7 (Figure IV.36) permet d'observer un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 290,8$ $[M+Na]^+$ et $m/z = 558,9$ $[2M+Na]^+$, ce qui donne une masse moléculaire de 268 uma correspondant à une formule brute en $C_{16}H_{12}O_4$.

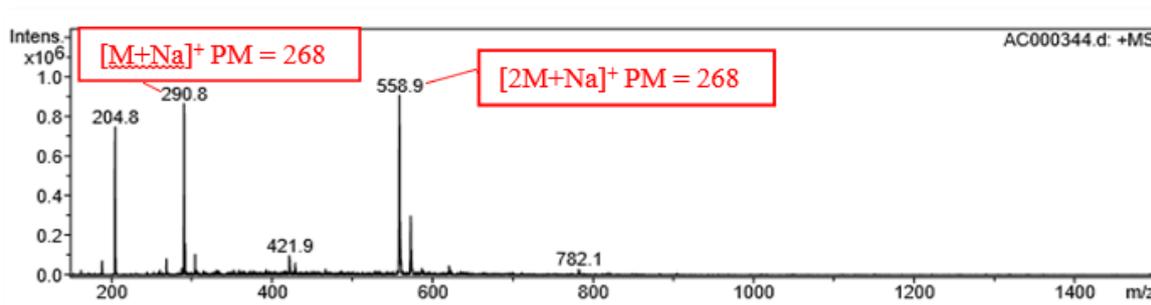


Figure IV.36: Spectre de masse ESI⁺ du composé HC7

Son spectre RMN ¹H (Figure IV.37), enregistré dans DMSO-*d*₆, montre d'emblée que ce composé a une structure quasi-identique à celle du composé HC6. On reconnaît le signal singulet résonant à δ_H 8,32 du proton H-2 d'une isoflavone, les deux signaux d'intégration 2H chacun résonant à δ_H 7,50 et 6,98, attribués respectivement aux protons H-2'/H-6' (δ_H 7,50, *d*,

$J = 7,2 \text{ Hz}$) et H-3'/H-5' ($\delta_{\text{H}} 6,98$, $J = 7,2 \text{ Hz}$) du cycle B parasubstitué, ainsi que le signal singulet résonant à $\delta_{\text{H}} 3,97$ d'intégration 3H attestant la présence d'un groupement méthoxyle.

Cependant, l'observation de trois signaux formant un système ABX, au lieu d'un système AX constaté pour le composé HC6, résonant à $\delta_{\text{H}} 7,94$ (1H, d , $J = 8,5 \text{ Hz}$), $6,91$ (1H, dd , $J = 8,5 ; 2,1 \text{ Hz}$) et $6,83$ (1H, d , $J = 2,1 \text{ Hz}$), attribuables respectivement aux protons H-5, H-6 et H-8 du cycle A substitué en C-7, suggère la perte du groupement OH en C-5. Cette perte est confirmée par la différence de moins 16 uma constatée sur le spectre de masse de ce composé, comparativement à celui du composé HC6.

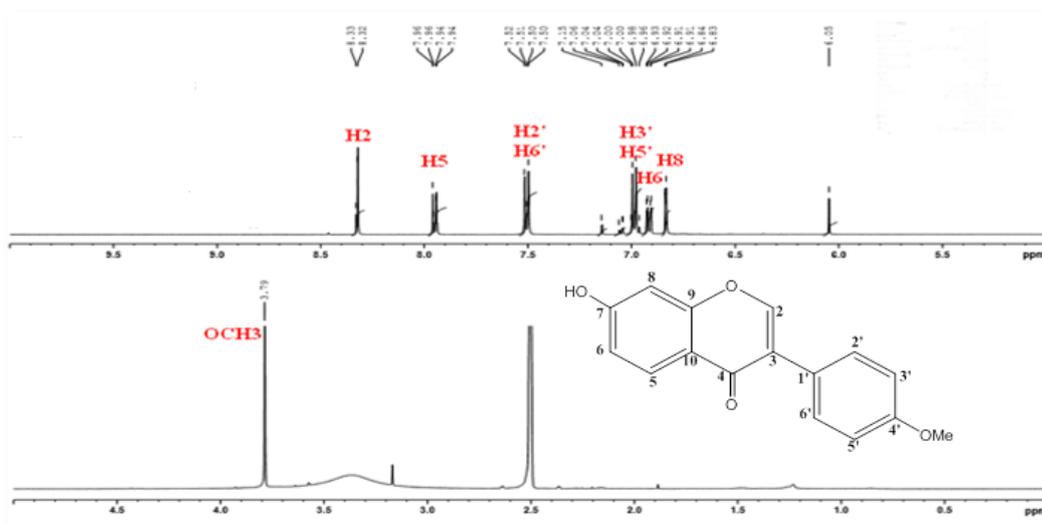


Figure IV.37: Spectre RMN ^1H du composé HC7

Le spectre HMBC permet de retrouver toutes les corrélations observées pour le composé précédent. L'observation sur le même spectre (Figure IV.38) d'un couplage longue distance OCH_3 ($\delta_{\text{H}} 3,79$)/C-4' ($\delta_{\text{C}} 158,9$) confirme que le groupement méthoxyle est positionné en C-4'.

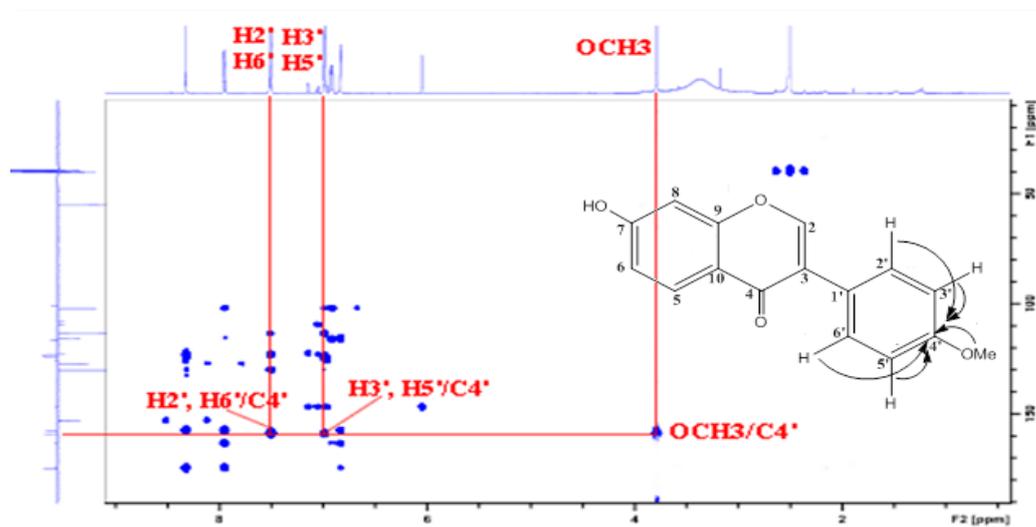


Figure IV.38: Spectre HMBC partiel du composé HC7

L'analyse combinée des spectres HSQC et HMBC a permis de caractériser tous les carbones de la molécule (Figure IV.39).

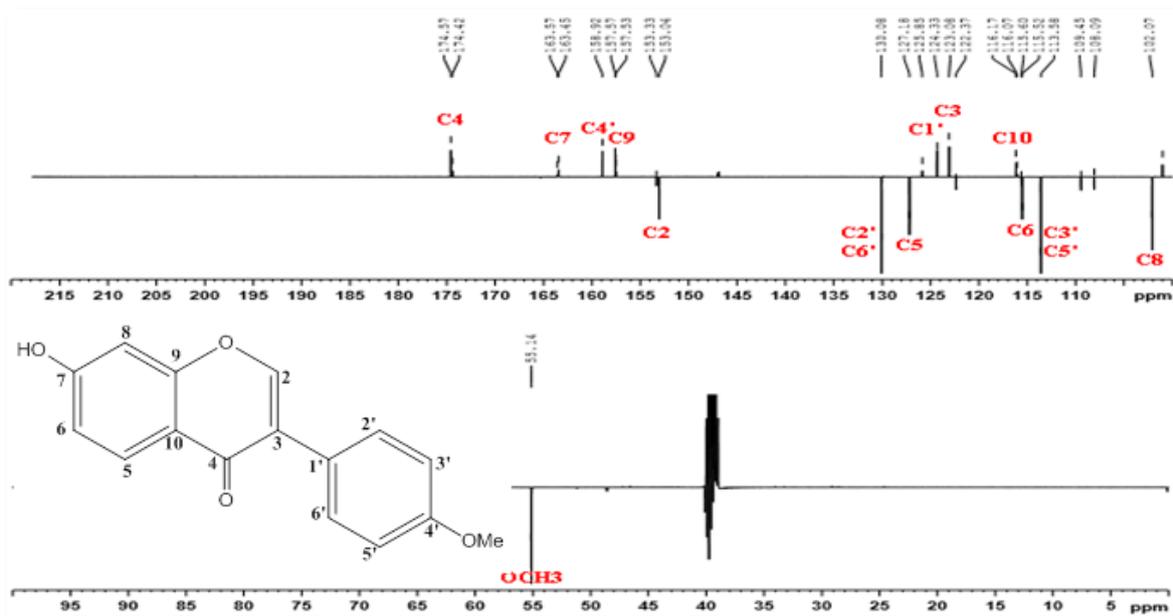
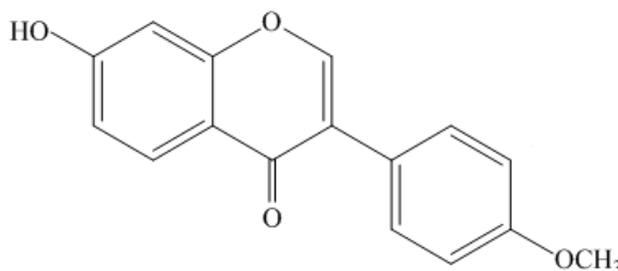


Figure IV.39: Spectre RMN DEPT du composé HC7

Toutes ces données spectrales permettent d'attribuer sans ambiguïté au composé HC7 la structure suivante : 7-hydroxy-4'-méthoxyisoflavone.



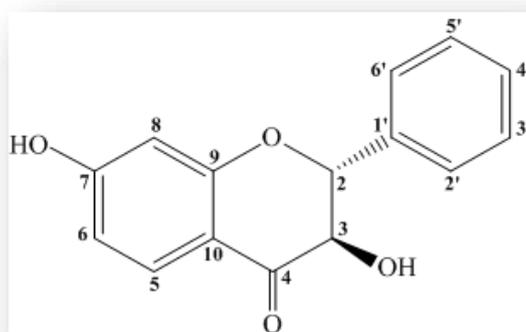
Ce composé connu sous le nom de formononétine, a été rencontré dans le genre *Hedysarum* comme *H. theinum* [112], *H. polybotrys* [121, 123], *H. multijugum* [125], *H. semenovii* [128], *H. kirghisorum* [131, 132] et *H. austros ibiricum* [268]. Il a été rencontré également dans certaines espèces de la famille Fabaceae comme *Ononis angustissima* L. [269].

Le tableau IV.7 englobe tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé HC7.

Tableau IV.7: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé HC7 dans $\text{DMSO-}d_6$

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
2	153,0	8,32 (<i>s</i>)
3	123,1	/
4	174,6	/
5	127,2	7,94 (<i>d</i> , 8,5)
6	115,5	6,91 (<i>dd</i> , 8,5 / 2,1)
7	163,4	/
8	102,1	6,83 (<i>d</i> , 2,1)
9	157,6	/
10	116,1	/
1'	124,3	/
2'	130,1	7,50 (<i>d</i> , 7,2)
3'	113,6	6,98 (<i>d</i> , 7,2)
4'	158,9	/
5'	113,6	6,98 (<i>d</i> , 7,2)
6'	130,1	7,50 (<i>d</i> , 7,2)
4'-OMe	55,1	3,97 (<i>s</i>)

IV.2.3.8 Identification structurale du composé HC8



(2*R*,3*R*)-3, 7-dihydroxyflavanone (HC8)

Le spectre de masse ESI, enregistré en mode positif, révèle un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 278,8$ $[M+Na]^+$ (Figure IV.40), soit une masse moléculaire de 256 uma correspondant à une formule brute en $C_{15}H_{12}O_4$.

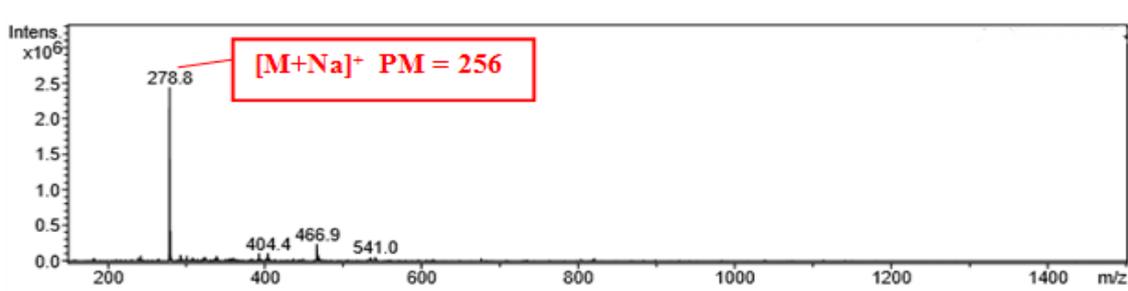


Figure IV.40: Spectre de masse ESI⁺ du composé HC8

Le spectre RMN ^1H (Figure IV.41) qui illustre le caractère flavonoïdique du composé, révèle la présence de protons aromatiques et aliphatiques.

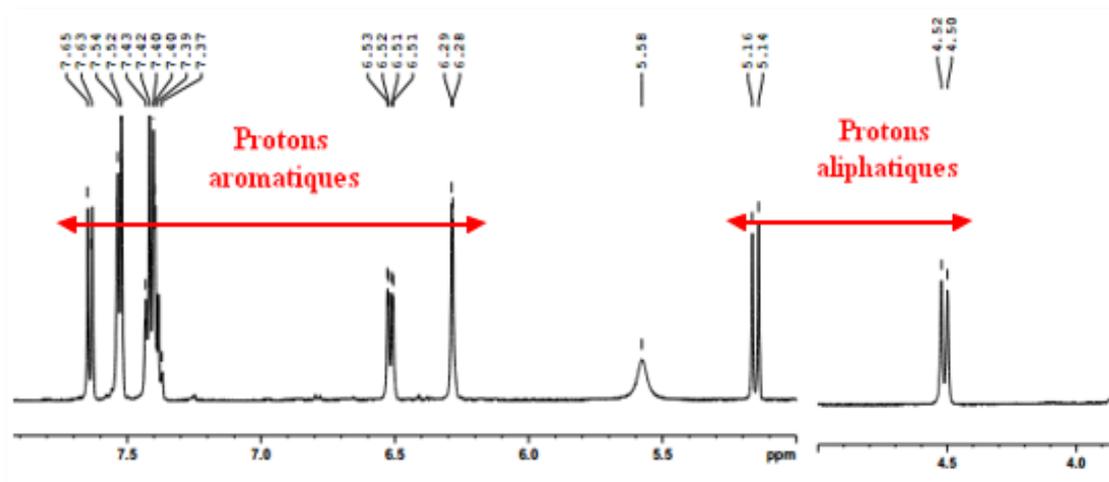


Figure IV.41: Spectre RMN ^1H du composé HC8

Le spectre RMN DEPTQ (Figure IV.42) indique l'existence de 15 atomes de carbone se répartissant en dix CH et cinq carbones quaternaires dont un apparaissant à δ_{C} 192,1 d'un carbone carbonyle.

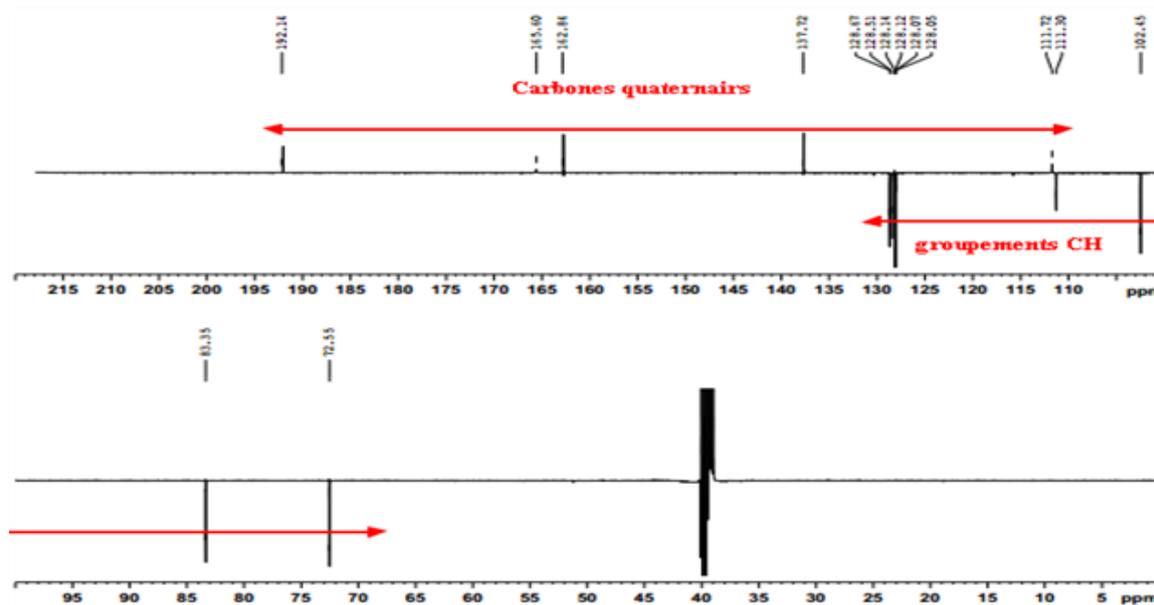


Figure IV.42: Spectre RMN DEPTQ du composé HC8

Les signaux de protons aromatiques, d'intégration 1H chacun, sont attribués aux protons H-5 (δ_{H} 7,63, *d*, $J = 8,1$ Hz), H-6 (δ_{H} 6,52, *dd*, $J = 8,1; 2,1$ Hz) et H-8 (δ_{H} 6,28, *d*, $J = 2,1$ Hz) du cycle A, ainsi qu'aux protons H-2'/H-6' (δ_{H} 7,53, *dd*, $J = 8,3; 1,6$ Hz) et H-3'/H-5'/H-4' (δ_{H} 7,37-7,43, *m*) du cycle B d'un flavonoïde (Figure IV.43).

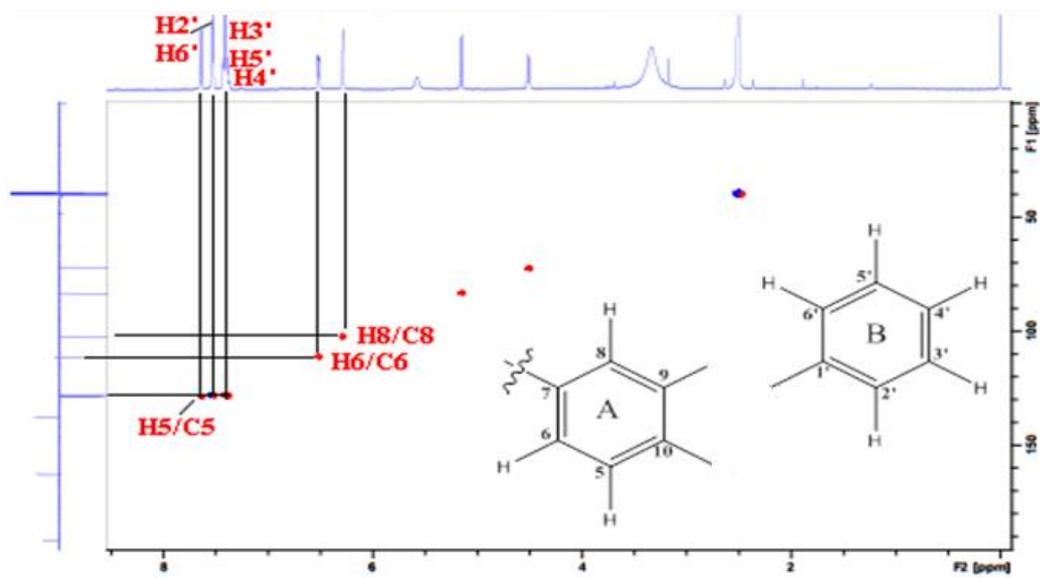


Figure IV.45: Spectre HSQC du composé HC8

L'expérience HMBC (Figure IV.46) du composé permet d'assigner tous les carbones de ces deux cycles aromatiques A et B, suite aux corrélations longue distance observées entre le proton H-6 et les carbones C-8 (δ_c 102,4) et C-10 (δ_c 111,7), le proton H-8 et les carbones C-6 (δ_c 111,3), C-7 (δ_c 165,6), C-9 (δ_c 155,9), C-10 et C-4 (δ_c 192,1), le proton H-5 et les carbones C-9, C-7 et C-4, les protons H-2'/H-6' et les carbones C-1' (δ_c 137,7), C-3'/C-5' (δ_c 128,5) et C-4' (δ_c 128,7).

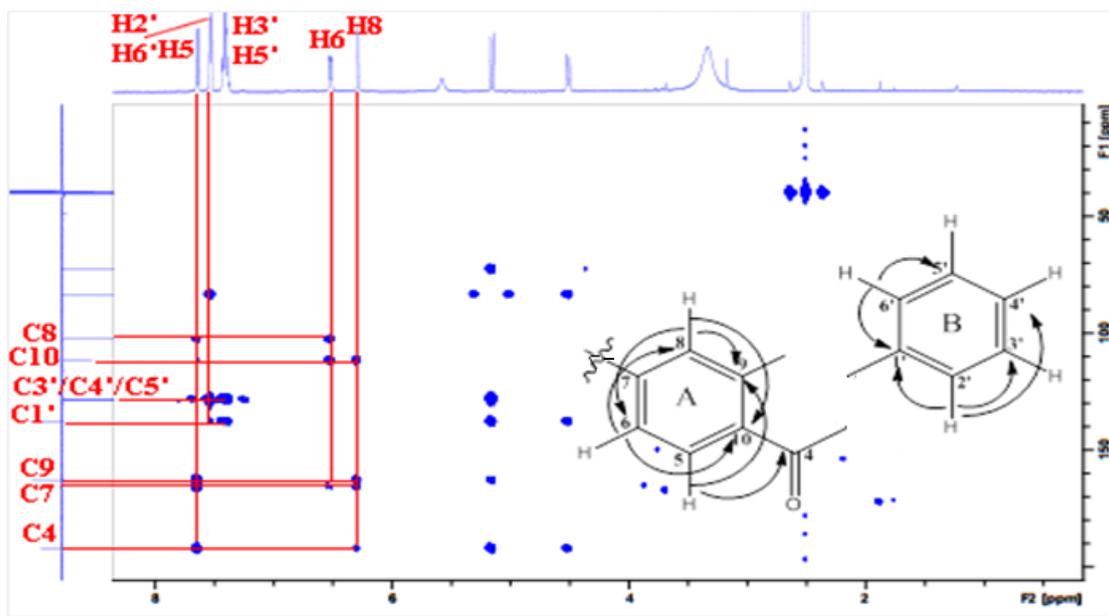


Figure IV.46: Spectre HMBC du composé HC8

La valeur de déplacement chimique du carbone C-7 (δ_c 165,6) du cycle A indique sa substitution par un groupement hydroxyle libre.

Pour la zone aliphatique, les spectres RMN ^1H et COSY H-H (Figure IV.47) montrent un système de spins de type $-\text{CHO}-\text{CH}(\text{OH})-$ constitué par les protons H-2 (δ_{H} 5,14, *d*, $J = 11,5$ Hz) et H-3 (δ_{H} 4,50, *d*, $J = 11,5$ Hz). La valeur de la constante de couplage de l'ordre de 11,5 indique leur position transdiaxiale.

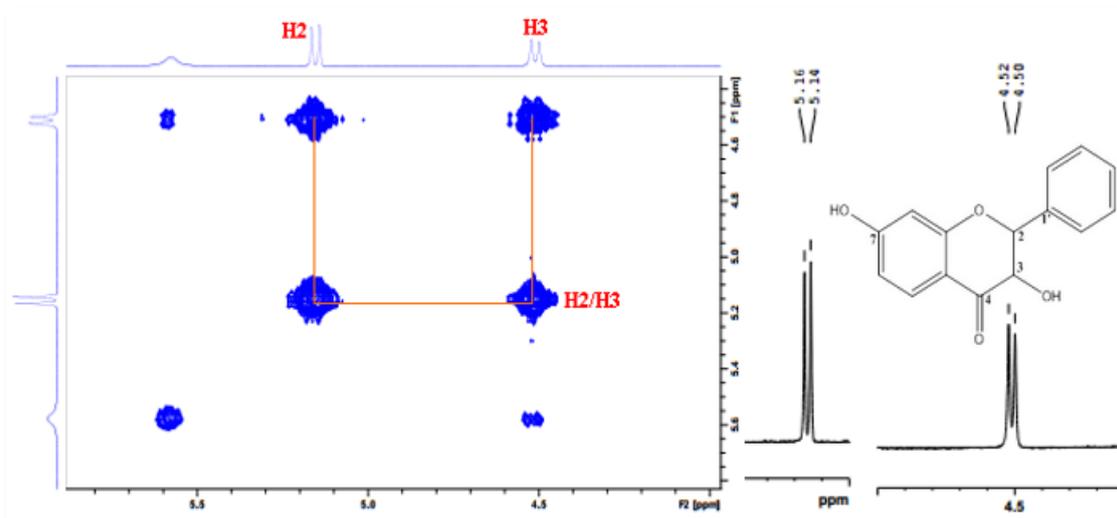


Figure IV.47: Spectres RMN ^1H et COSY H-H exhibant les protons aliphatiques du composé HC8

Le spectre HMBC (Figure IV.48) confirme que la chaîne $-\text{CHO}-\text{CH}(\text{OH})-$ fait partie du cycle C d'un flavonol et cela par l'observation de corrélations longue distance entre:

- le proton H-2 et le carbone C-9 du cycle A, les carbones C-1'/C-2'/C-6' du cycle B et les carbones aliphatiques C-3 (δ_{C} 72,5)/C-4 (δ_{C} 192,1) du cycle C.
- le proton H-3 et le carbone C-1' du cycle B et les carbones C-2 (δ_{C} 83,3)/C-4.

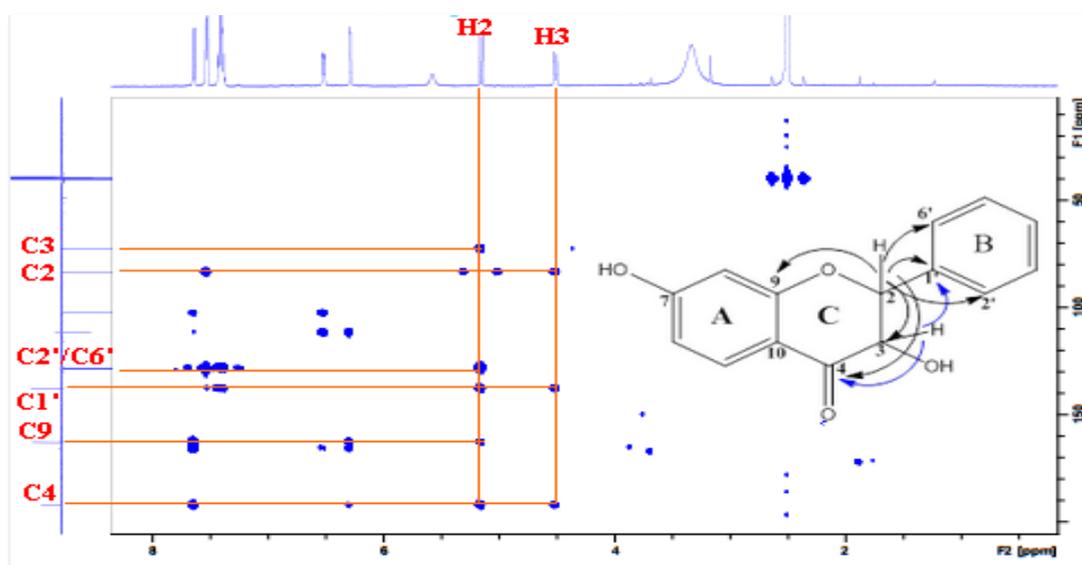
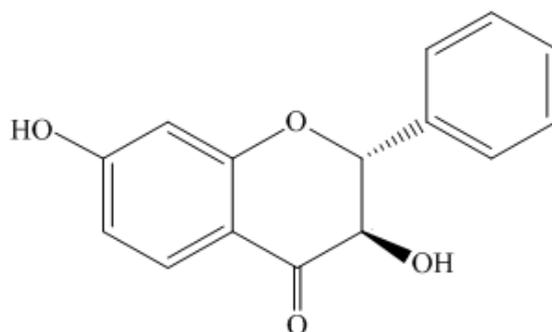


Figure IV.48: Spectre HMBC des protons aliphatiques du composé HC8

L'ensemble des données spectrales accumulées, leur comparaison avec celles reportées dans la littérature [270] ainsi que la mesure du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D -8,3^\circ$, $c = 0,13$, MeOH), montrent bien que le présent composé n'est autre que le (2*R*,3*R*)-3,7-dihydroxyflavanone, rencontré dans certaines espèces de la famille Fabaceae comme *Adenocarpus cincinnatus* [270] et *Virgilia oroboides* [271]. Il est à signaler que cette molécule est identifiée pour la première fois dans le genre *Hedysarum*.

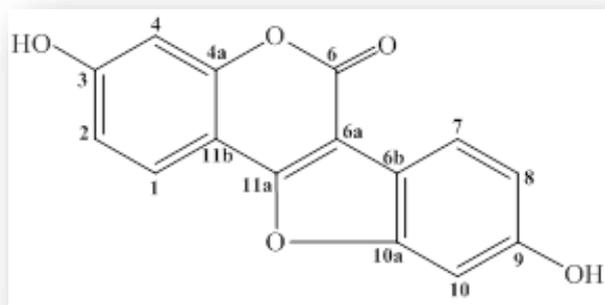


Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé HC8 sont regroupés dans le tableau IV.8.

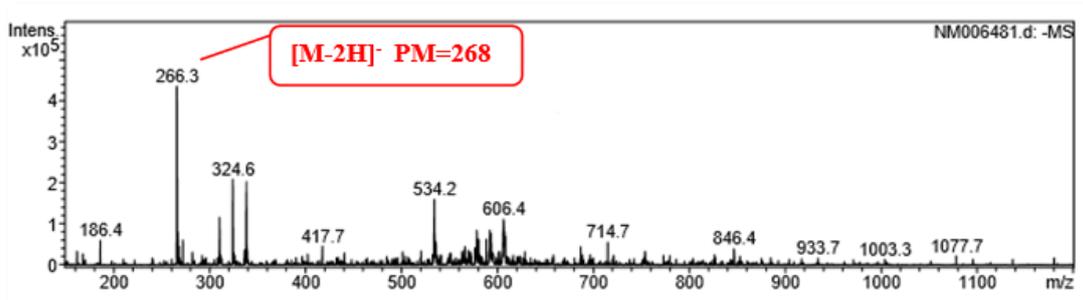
Tableau IV.8: Données RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé HC8 dans DMSO- d_6

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
2	83,3	5,14 (<i>d</i> , 11,5)
3	72,5	4,50 (<i>d</i> , 11,5)
4	192,1	/
5	128,7	7,63 (<i>d</i> , 8,1)
6	111,3	6,51 (<i>dd</i> , 8,1 / 2,1)
7	165,6	/
8	102,4	6,28 (<i>d</i> , 2,1)
9	155,9	/
10	111,7	/
1'	137,7	/
2'	128,1	7,53 (<i>dd</i> , 8,3 / 1,6)
3'	128,5	7,37-7,43 (<i>m</i>)
4'	128,7	7,37-7,43 (<i>m</i>)
5'	128,5	7,37-7,43 (<i>m</i>)
6'	128,1	7,53 (<i>dd</i> , 8,3 / 1,6)

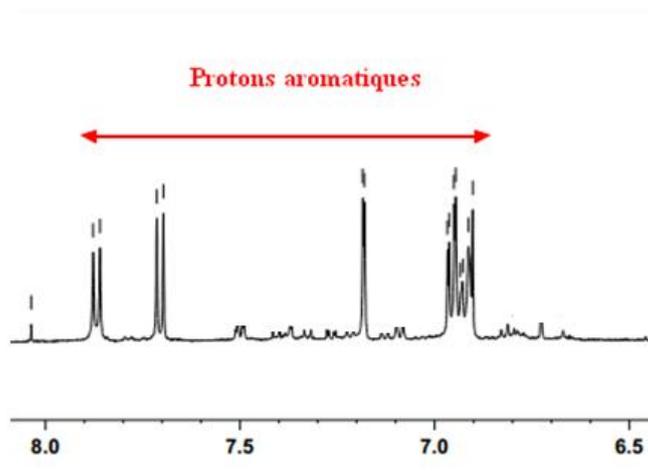
IV.2.3.9 Identification structurale du composé HC9

**3,9-dihydroxycoumestane (HC9)**

Le spectre de masse ESI⁻ (Figure IV.49) du composé HC9, présente un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 266,3$ $[M-2H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 268 uma et correspondant à une formule brute en $C_{15}H_8O_5$.

**Figure IV.49: Spectre de masse ESI⁻ du composé HC9**

Son spectre RMN 1H (Figure IV.50) enregistré dans $DMSO-d_6$, montre des signaux de protons aromatiques résonant entre 6,85 et 7,90 ppm, suggérant que ce composé est également de nature phénolique.

**Figure IV.50: Spectre RMN 1H du composé HC9**

La présence d'un noyau aromatique trisubstitué (cycle A) est attestée par l'observation d'un système ABX constitué par les signaux de trois protons nommés H-1, H-2 et H-4 sortant respectivement à δ_H 7,71 (1H, *d*, $J = 8,6$ Hz), 6,95 (1H, *dd*, $J = 8,6 ; 2,1$ Hz), et 7,18 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) (Figure IV.51) et confirmée par expérience COSY H-H (Figure IV.52). D'autre part, les corrélations observées sur le même spectre (Figure IV.52) entre les protons aromatiques nommés H-7, H-8 et H-10 apparaissant respectivement à δ_H 7,87 (1H, *d*, $J = 8,6$ Hz), 6,93 (1H, *m*) et 6,91 (1H, *m*) confirment l'existence d'un deuxième noyau aromatique trisubstitué (cycle B).

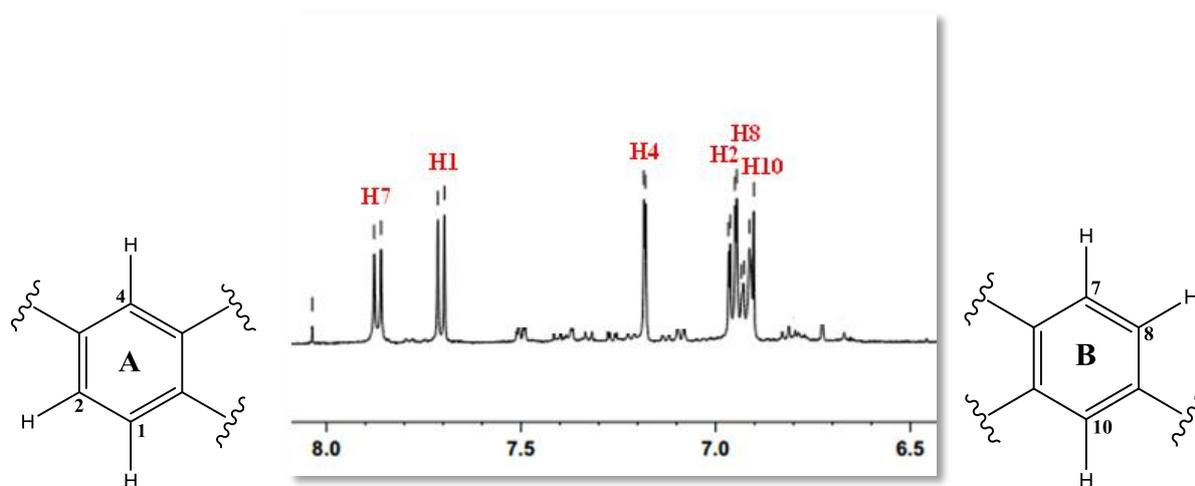


Figure IV.51: Spectre RMN ^1H du composé HC9

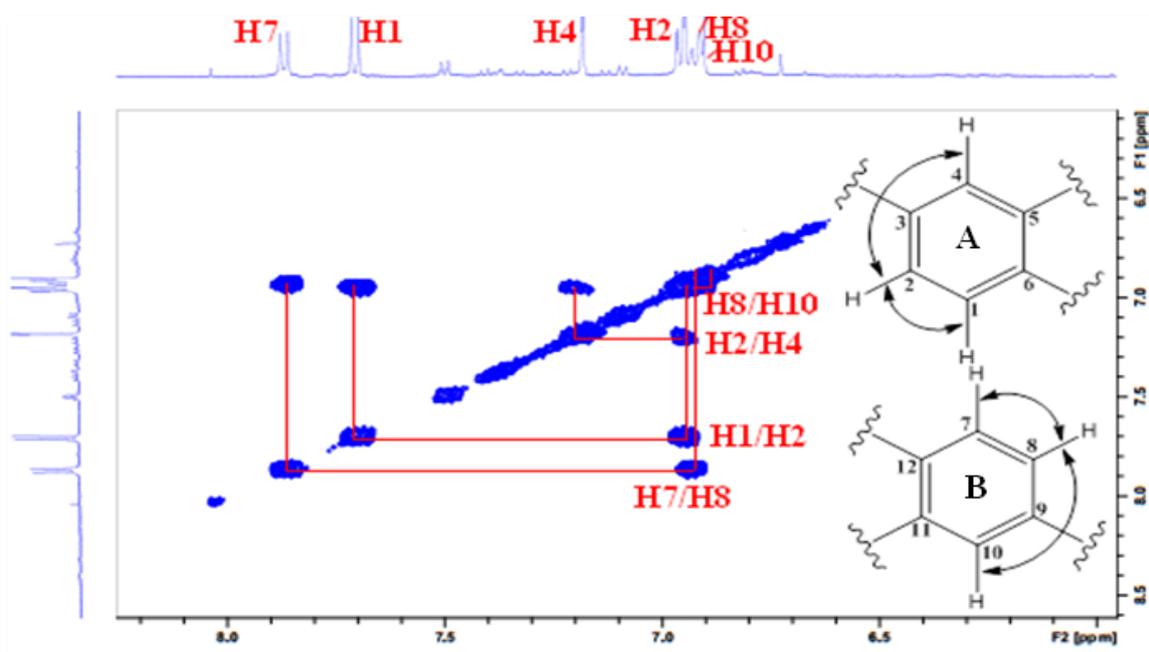


Figure IV.52: Spectre COSY H-H du composé HC9

Les carbones qui les portent sont repérés sur le spectre HSQC (Figure IV.53) à 120,7 (C-1), 114,1 (C-2), 98,7 (C-4), 122,8 (C-7), 124,1 (C-8) et 103,2 ppm (C-10).

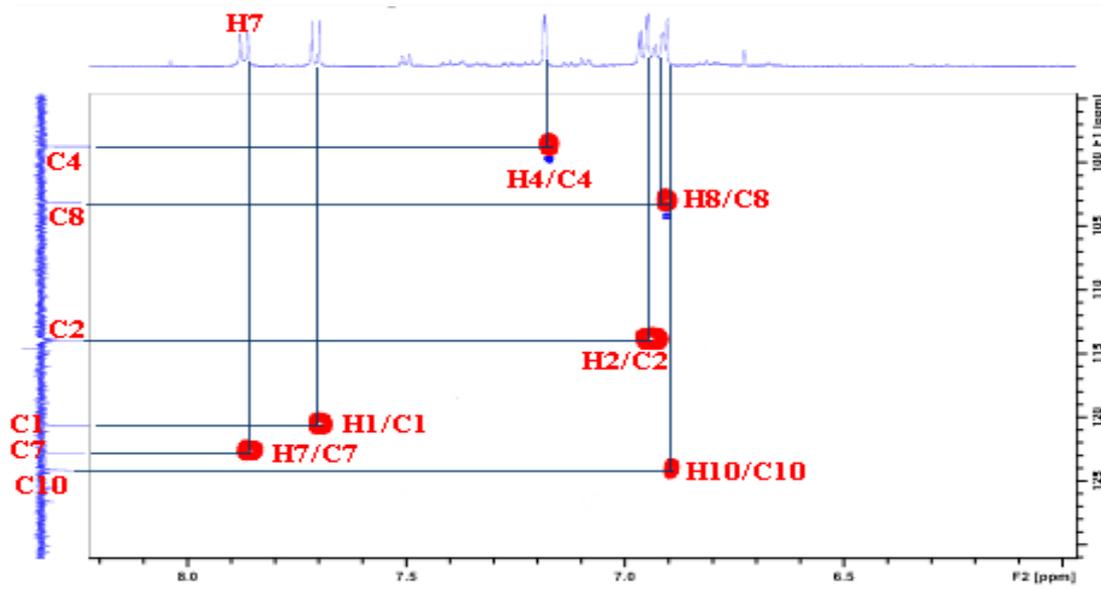
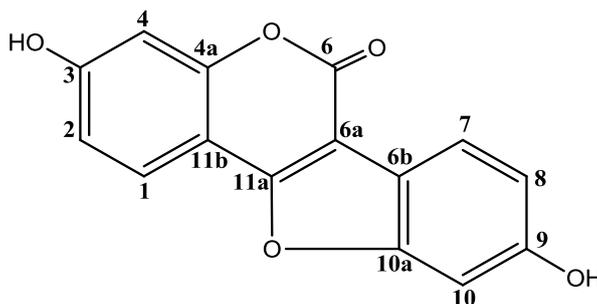


Figure IV.53: Spectre HSQC du composé HC9

L'analyse combinée des spectres HSQC et HMBC qui ont permis de déterminer tous les carbones de la molécule (Figures IV.54 et IV.55), à l'exception d'un carbone carbonyle (δ_c 172,8) qui ne présente aucune corrélation HMBC, confrontée aux données de la littérature [138], nous oriente vers un composé à squelette coumestane, précisément 3, 9-dihydroxy coumestane.



Le spectre HMBC (Figure IV.54) exhibe les corrélations attendues pour cette structure, particulièrement entre :

- ✓ le proton H-1 (δ_H 7,71 ppm) et les carbones quaternaires oxygénés C-11a (δ_C 155,9 ppm), C-4a (δ_C 157,1) et C-3 (δ_C 157,7 ppm).
- ✓ le proton H-7 (δ_H 7,87) et deux carbones aromatiques quaternaires résonant à 154,9 et 159,8 ppm, attribuables respectivement à C-10a et C-9 oxygénés.

- ✓ le proton H-4 (δ_H 7,18 ppm) et le carbone C-2 (δ_C 114,1) ainsi que deux carbones aromatiques quaternaires résonant à 114,8 et 157,1 ppm attribuables respectivement aux carbones C-11b et C-4a.
- ✓ le proton H-2 (δ_H 6,95 ppm) et deux carbones aromatiques résonant respectivement à δ_C 98,7 (C-4) et 114,8 (C-11b).

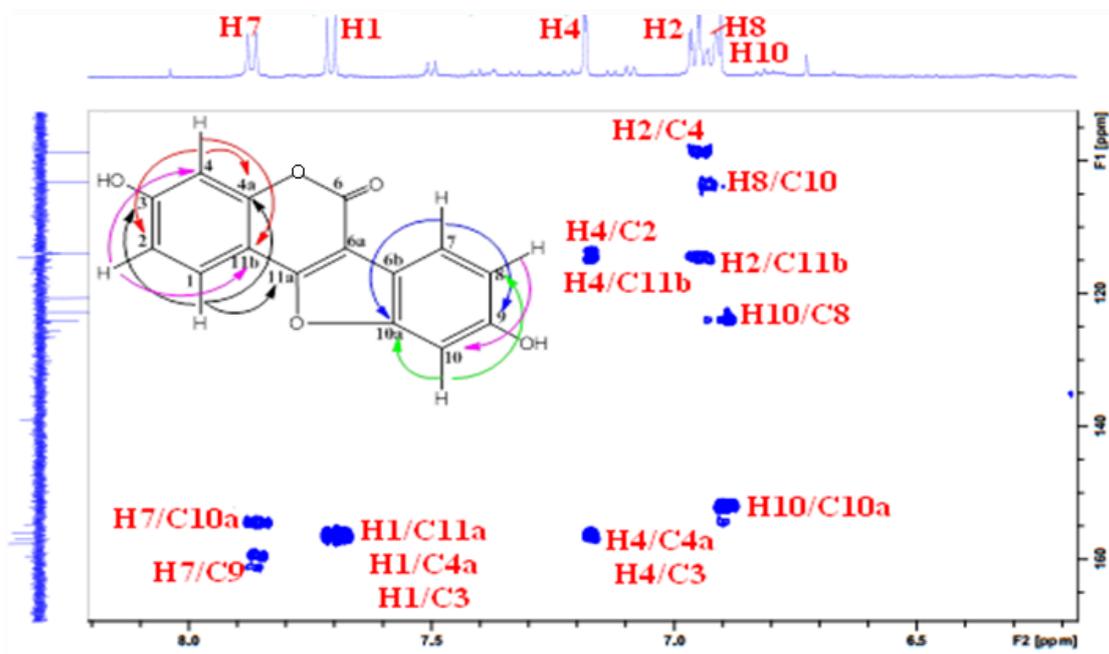


Figure IV.54: Spectre HMBC du composé HC9

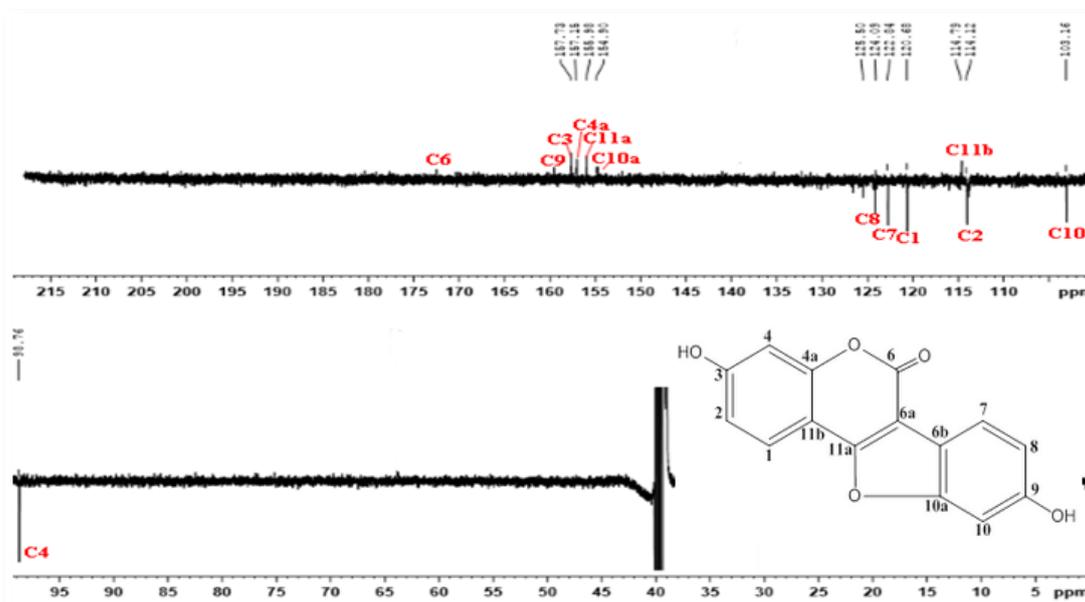


Figure IV.55: Spectre RMN DEPTQ du composé HC9

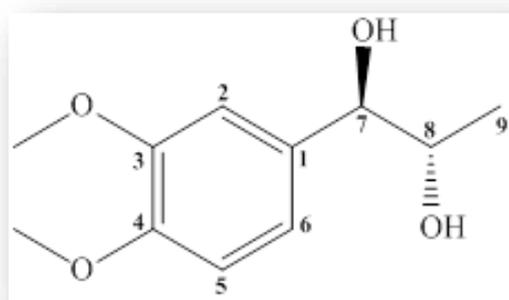
Ce composé a été antérieurement isolé de l'espèce *Hedysarum gmelinii* [134]. C'est sa seconde citation dans le genre.

Tous les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau IV.9 ci-dessous.

Tableau IV.9: Données RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé HC9 dans DMSO- d_6

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
1	120,7	7,71 (<i>d</i> , 8,6)
2	114,1	6,95 (<i>dd</i> , 8,6 / 2,1)
3	157,7	
4	98,7	7,17 (<i>d</i> , 2,1)
4a	157,1	/
6	172,8	/
6a	101,2	/
6b	114,2	/
7	122,8	7,87 (<i>d</i> , 8,6)
8	124,1	6,93 (<i>m</i>)
9	159,8	/
10	103,2	6,91 (<i>m</i>)
10a	154,9	/
11a	155,9	/
11b	114,8	/

IV.2.3.10 Identification structurale du composé HC10



Erythro-1-(3, 4-diméthoxyphenyl) propane-1, 2-diol (HC10)

Le spectre de masse ESI⁺ (Figure IV.56) du composé HC10 montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 234,8$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ correspondant à une masse moléculaire de 212 uma et une formule brute en $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_4$.

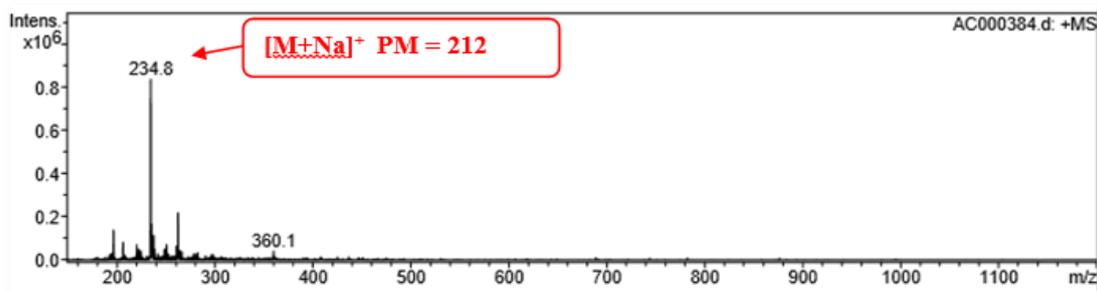


Figure IV.56: Spectre de masse ESI⁺ du composé HC10

Son spectre RMN ¹H (Figure IV.57) enregistré dans DMSO-*d*₆, présente :

- trois signaux de protons formant un système ABX à δ_H 6,92 (1H, *s*), 6,85 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz) et 6,80 ppm (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz) attestant de la présence d'un noyau aromatique trisubstitué.
- un signal doublet à δ_H 0,97 ppm ($J = 6,4$ Hz) et d'intégration 3H, d'un groupement méthyle.
- deux signaux d'intégration 1H chacun résonant à δ_H 4,28 (*d*, 4,2 Hz) et 3,62 (*m*), corrélant sur le spectre HSQC avec deux carbones sortant respectivement à δ_C 76,7 et 70,6 attribuables à deux groupements CH.
- un signal singulet d'intégration 6H à δ_H 3,72 et montrant des corrélations sur le spectre HSQC avec deux carbones résonnant à δ_C 55,3 et 55,5, attribuables à deux groupements OCH₃.
- deux signaux résonant sous forme de singulet large à δ_H 4,41 et 5,07, ne montrant aucune corrélation HSQC, attribuables à deux groupements OH.

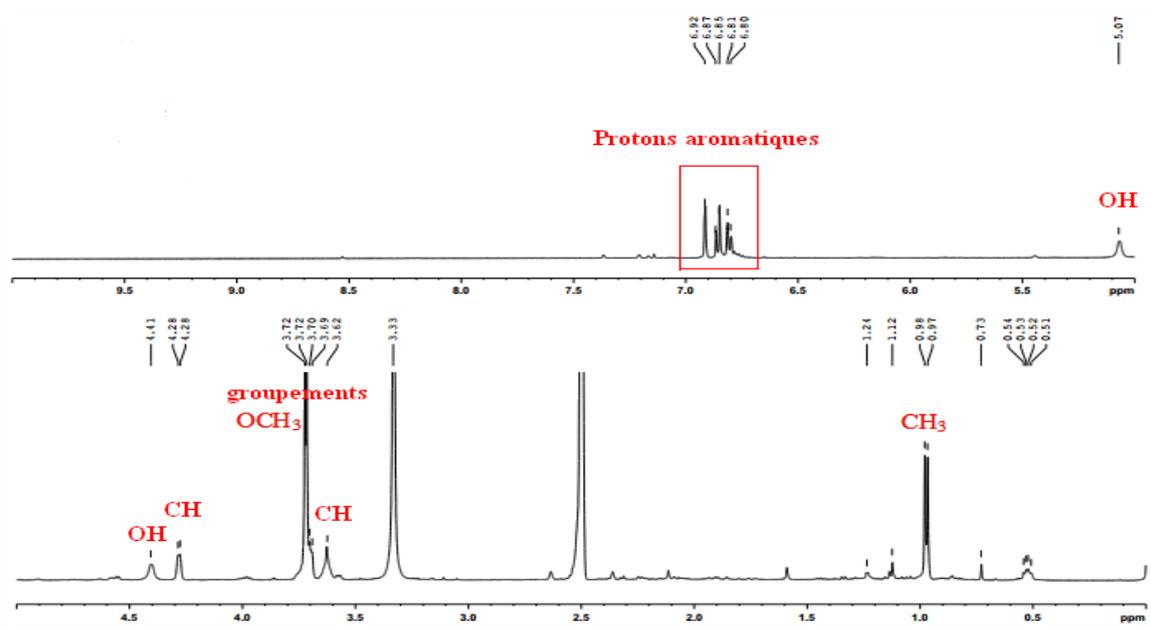


Figure IV.57: Spectre RMN ¹H du composé HC10

Le spectre RMN DEPTQ (Figure IV.58) confirme clairement cette analyse à travers les signaux correspondant à 3 CH aromatiques (δ_c 110,6 ; 111,1 et 118,9), 3 carbones quaternaires aromatiques (δ_c 136,2 ; 148,1 et 147,5), 2 groupements CH aliphatiques (δ_c 76,7 et 70,6), un groupement méthylique (δ_c 18,4) et enfin aux deux groupements méthoxyles (δ_c 55,5 et 55,3).

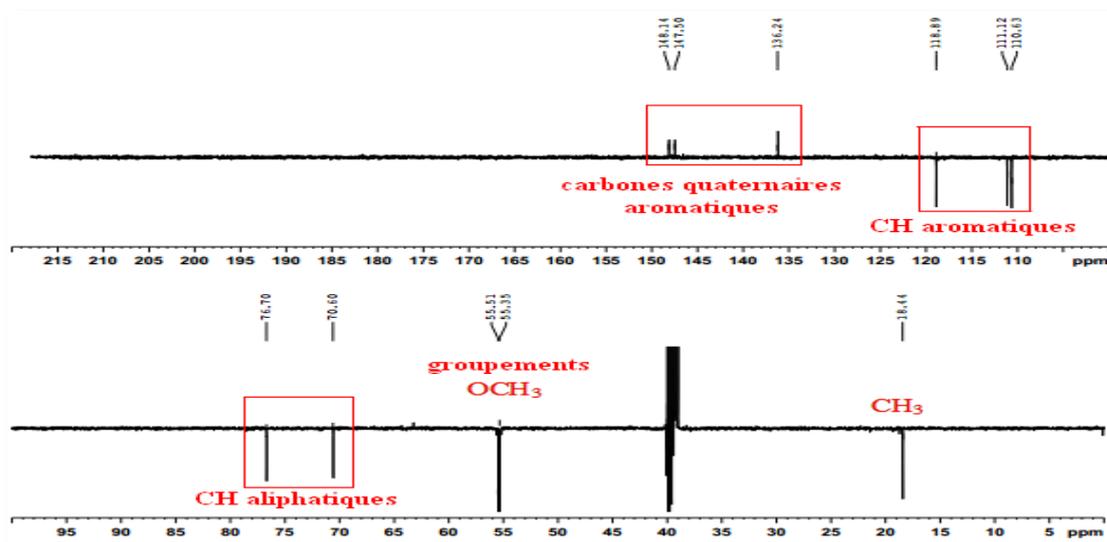


Figure IV.58: Spectre RMN DEPTQ du composé HC10

Tous ces éléments montrent clairement que notre composé est de nature aromatique avec un squelette benzénique trisubstitué, porteur d'une chaîne aliphatique. Il reste à alors à identifier la nature exacte des trois substituants.

Le spectre HMBC (Figure IV.59) présente deux taches de corrélation entre les protons des groupements OCH_3 identifiés à δ_H 3,72 et deux carbones aromatiques repérés à δ_c 147,5 et 148,1, attestant que ces groupements sont directement attachés au noyau aromatique en C-3 et C-4 respectivement.

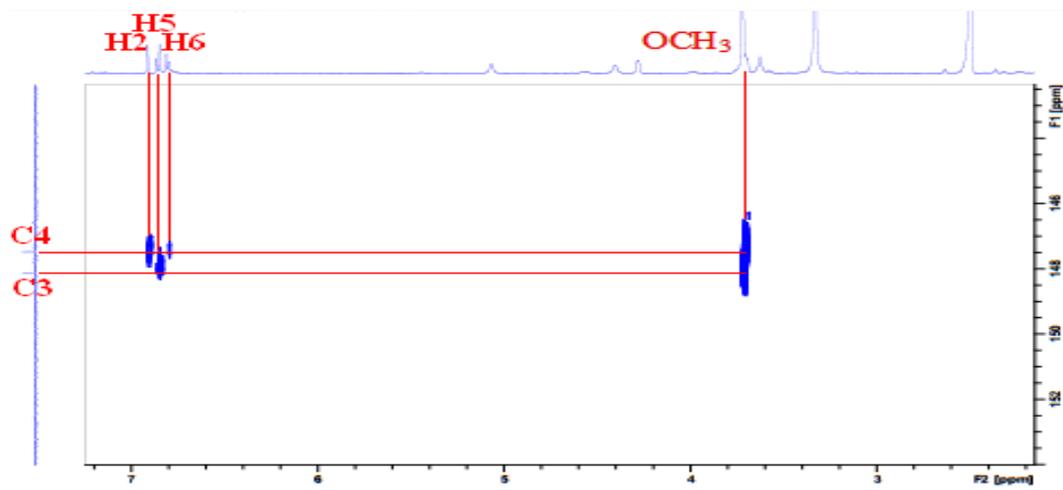


Figure IV.59: Spectre HMBC partiel du composé HC10

Par ailleurs, les corrélations observées entre le proton aromatique sortant à δ_H 6,92 (*sl*, H-2) et le carbone repéré à δ_C 147,5 (C-4) et entre le proton aromatique sortant à δ_H 6,85 ppm (*d*, 8,4 Hz, H-5) et le carbone repéré à δ_C 148,1 (C-3), permettent de suggérer pour ce composé la structure partielle ci-dessous.

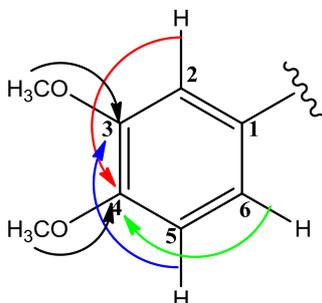


Figure IV.60: Structure partielle et corrélations HMBC observées pour le composé HC10

L'analyse COSY H-H (Figure IV.61) confirme la nature benzénique de notre composé, par l'observation de corrélations attendues entre les deux protons aromatiques sortant à 6,85 (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz) et 6,80 ppm (1H, *d*, $J = 8,4$ Hz). Cette analyse met également en évidence la présence d'un système de spins impliquant le proton du groupement OH (δ_H 5,07, *sl*), le proton du groupement CH (δ_H 4,28, *d*, $J = 4,2$ Hz), le proton du groupement CH (δ_H 3,62, *m*) et les protons du groupement CH₃ (δ_H 0,97, *d*, $J = 6,4$ Hz). Le proton du groupement CH (δ_H 3,62, *m*) corrèle avec un proton du groupement OH (δ_H 4,41, *sl*), permettant d'identifier l'enchaînement CHOH-CHOH-CH₃.

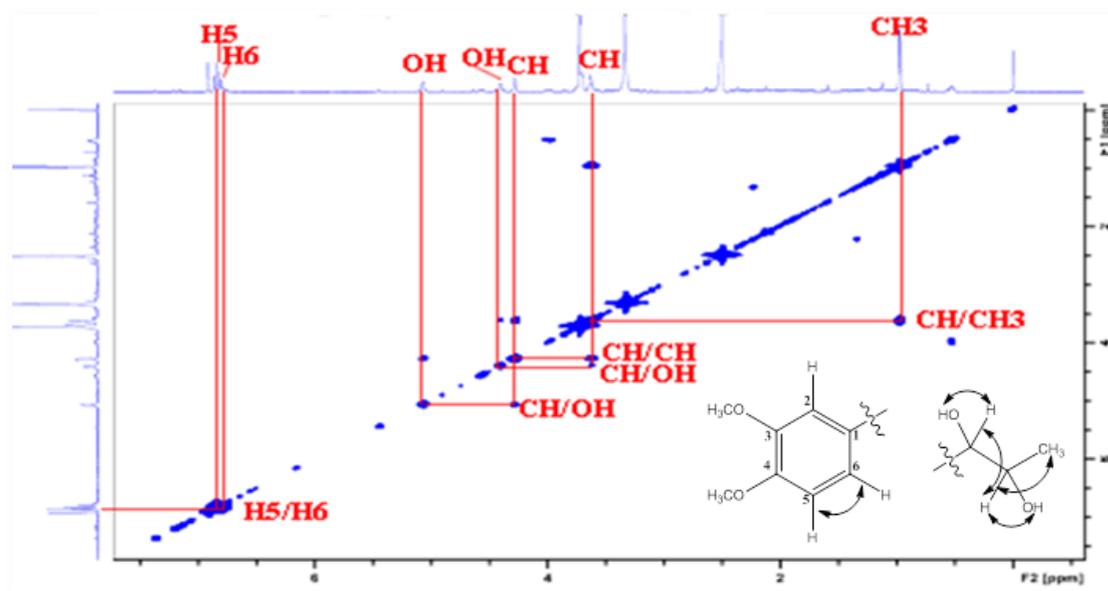
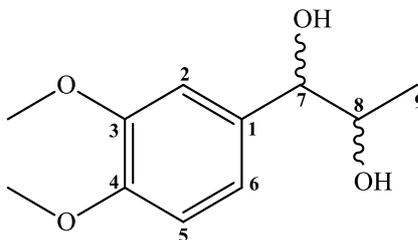
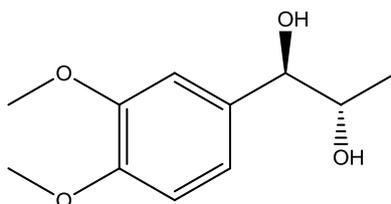


Figure IV.61: Spectre COSY H-H du composé HC10

Cette analyse spectrale permet d'assigner sans ambiguïté pour le composé HC10, la structure plane suivante:



La stéréochimie au niveau des carbones C-7 et C-8 a été établie par la mesure du pouvoir rotatoire. La valeur négative de ce pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} -36,0^\circ$ ($c = 0,4$, MeOH) comparée aux données de la littérature [272] plaide pour une configuration (*R,S*). Cette donnée supplémentaire permet d'assigner sans ambiguïté pour le composé HC10, la structure suivante: *érythro*-1-(3, 4-diméthoxyphenyl) propane-1, 2-diol.



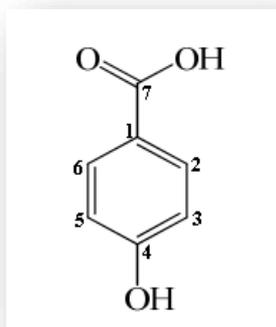
Ce composé est isolé pour la première fois dans le genre *Hedysarum*. Il a été rencontré dans bon nombre d'espèces dont *Chloranthus elatior* appartenant à la famille Chloranthaceae [273].

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé HC10 sont réunis dans le tableau IV.10.

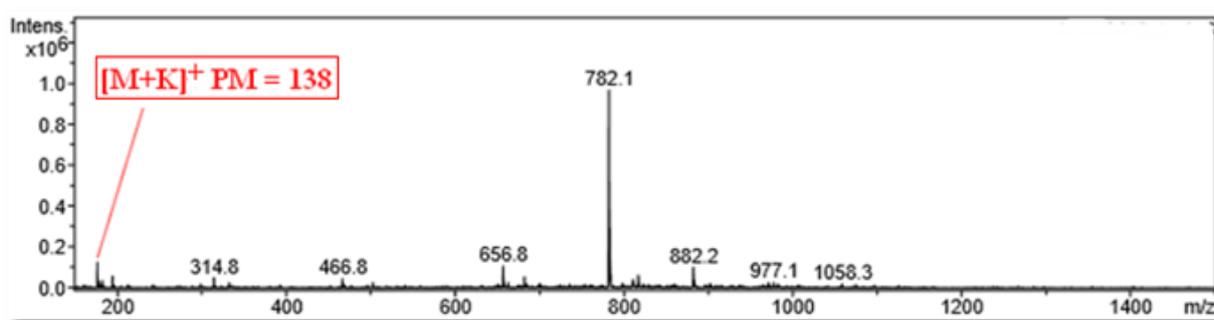
Tableau IV.10: Données RMN ^1H (500 MHz) et DEPTQ (125 MHz) du composé HC10 dans DMSO- d_6

Position	δ_C (ppm)	δ_H (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
1	136,2	/
2	110,6	6,92 (<i>sl</i>)
3	148,1	/
4	147,5	/
5	111,1	6,85 (<i>d</i> , 8,4)
6	118,9	6,80 (<i>d</i> , 8,4)
7	76,7	4,28 (<i>d</i> , 4,2)
8	70,6	3,62 (<i>m</i>)
9	18,4	0,97 (<i>d</i> , 6,4)
3-OCH ₃	55,5	3,72 (<i>s</i>)
4-OCH ₃	55,3	3,72 (<i>s</i>)

IV.2.3.11 Identification structurale du composé HC11

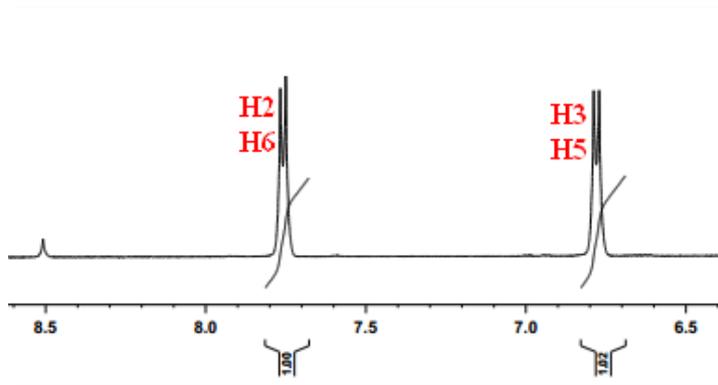
Acide *p*-hydroxybenzoïque (HC11)

Le spectre de masse ESI⁺ (Figure IV.62) du composé HC11 montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 177$ $[M+K]^+$ et $m/z = 314,8$ $[2M+K]^+$ correspondant à une masse moléculaire de 138 uma et une formule brute en $C_7H_6O_3$.

Figure IV.62: Spectre de masse ESI⁺ du composé HC11

Son spectre RMN ¹H (Figure IV.63), d'une grande simplicité, montre qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique para-substitué est caractérisé par :

- un doublet ($J = 8,7$ Hz) d'intégration 2H à δ_H 6,78 attribuable à H-3 et H-5.
- un second doublet ($J = 8,7$ Hz) d'intégration 2H à δ_H 7,70 attribuable à H-2 et H-6.

Figure IV.63: Spectres RMN ¹H du composé HC11

Les carbones de ces protons sont visualisés à δ_c 131,5 (C-2/C-6) et δ_c 114,9 (C-3/C-5). (Figure IV.64).

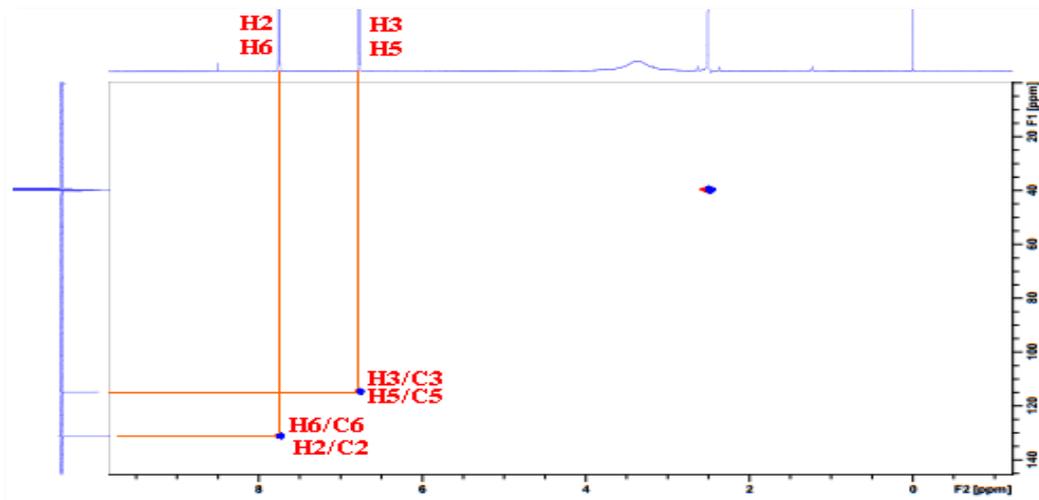
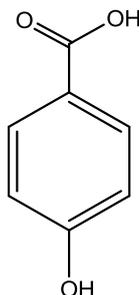


Figure IV.64: Spectres HSQC du composé HC11

La masse moléculaire et les valeurs de déplacements chimiques de ces carbones et protons, comparés avec les données de la littérature [274], permettent d'identifier le composé HC11 à l'acide *p*-hydroxybenzoïque.



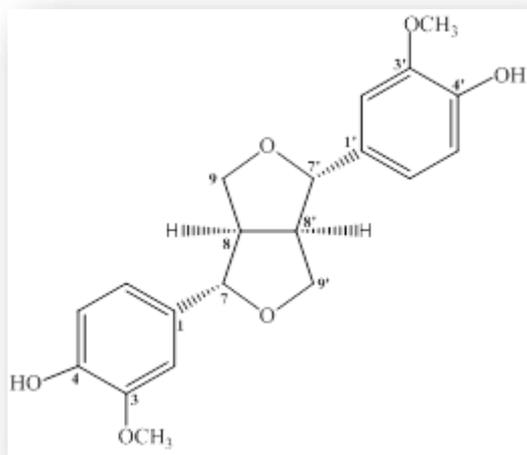
Ce composé a été déjà isolé de l'espèce *Hedysarum setigerum* [139].

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé HC11 sont réunis dans le tableau IV.11.

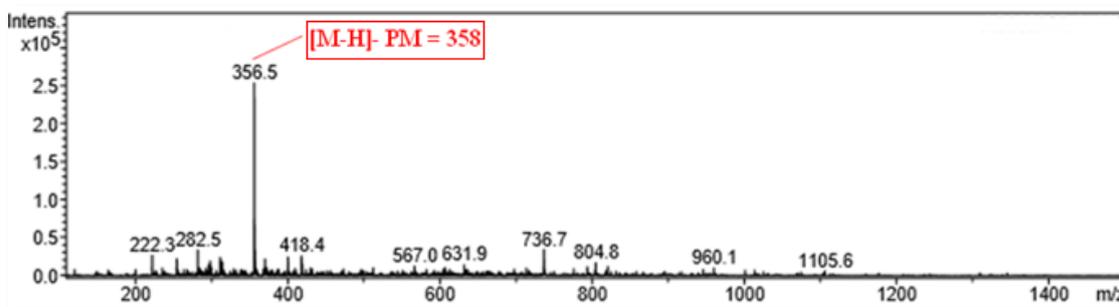
Tableau IV.11: Déplacements chimiques RMN ^1H (500 MHz) et ^{13}C (125 MHz) du composé HC11 dans $\text{DMSO-}d_6$

Position	δ_c (ppm)	δ_H (ppm), (<i>m</i> , <i>J</i> (Hz))
1	124,0	/
2	131,5	7,70 (<i>d</i> , 8,7)
3	114,9	6,78 (<i>d</i> , 8,7)
4	163,0	/
5	114,9	6,78 (<i>d</i> , 8,7)
6	131,5	7,70 (<i>d</i> , 8,7)
7	170,0	/

IV.2.3.13 Identification structurale du composé HC12

**(+)- Pinorésinol (HC12)**

Le spectre de masse ESI⁻ (Figures IV.65) de ce composé indique un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 357$ $[M-H]^-$, soit une masse moléculaire de 358 uma et une formule brute en $C_{20}H_{22}O_6$.

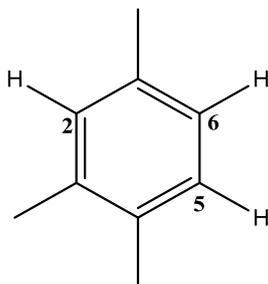
**Figure IV.65: Spectre de masse ESI⁻ du composé HC12**

Le spectre RMN ¹H (Figure IV.66) de ce composé, enregistré dans DMSO-*d*₆, permet de repérer:

- un signal singulet à 8,53 ppm s'intégrant pour 1H, attribuable à un groupement OH.
- un signal doublet s'intégrant pour 1H résonant à 6,89 ppm ($J = 1,5$ Hz) caractéristique d'un proton aromatique nommé H-2.
- un signal doublet s'intégrant pour 1H à 6,74 ppm ($J = 7,9$ Hz) caractéristique d'un proton aromatique nommé H-5. La valeur de 7,9 Hz indique un couplage ortho.

- un signal doublet dédoublé d'intégration 1H à 6,75 ppm ($J = 1,5 ; 7,9$ Hz) attribuable à un proton aromatique nommé H-6. Ce dernier couple donc, au regard des valeurs des constantes de couplage, avec le proton résonant à 6,75 ppm (couplage ortho) et le proton résonant à 6,89 ppm (couplage méta).

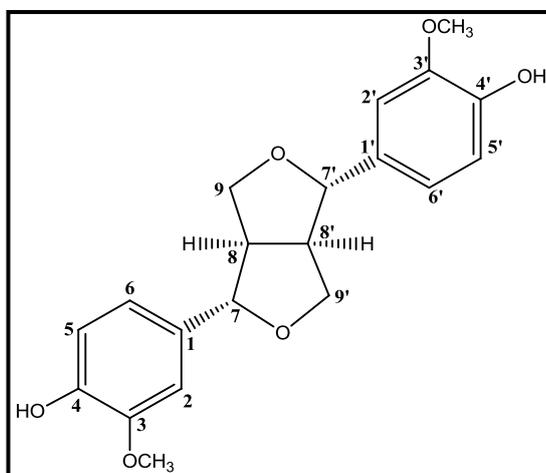
Ceci montre que ces protons forment un noyau aromatique trisubstitué.



Le spectre RMN ^1H (Figure IV.66) montre également la présence de :

- un signal singulet à 3,78 ppm d'intégration 3H, correspondant à un groupement méthoxyle.
- un signal doublet d'intégration 1H à 4,60 ppm ($J = 3,8$ Hz) d'un proton oxygéné nommé H-7.
- deux signaux d'intégration 1H chacun résonant à 4,12 ppm ($ddd, J = 8,6 ; 6,3 ; 2,3$ Hz) et 3,72 ppm (m) de protons nommés respectivement H-9a et H-9b.
- un signal multiplet d'intégration 1H résonant à 3,04 ppm de proton nommé H-8.

L'ensemble de ces données (déplacements chimiques des différents protons et constantes de couplage), et la valeur de masse moléculaire, nous orientent vers une molécule à squelette furanique nommé pinorésinol [275].



Pinorésinol

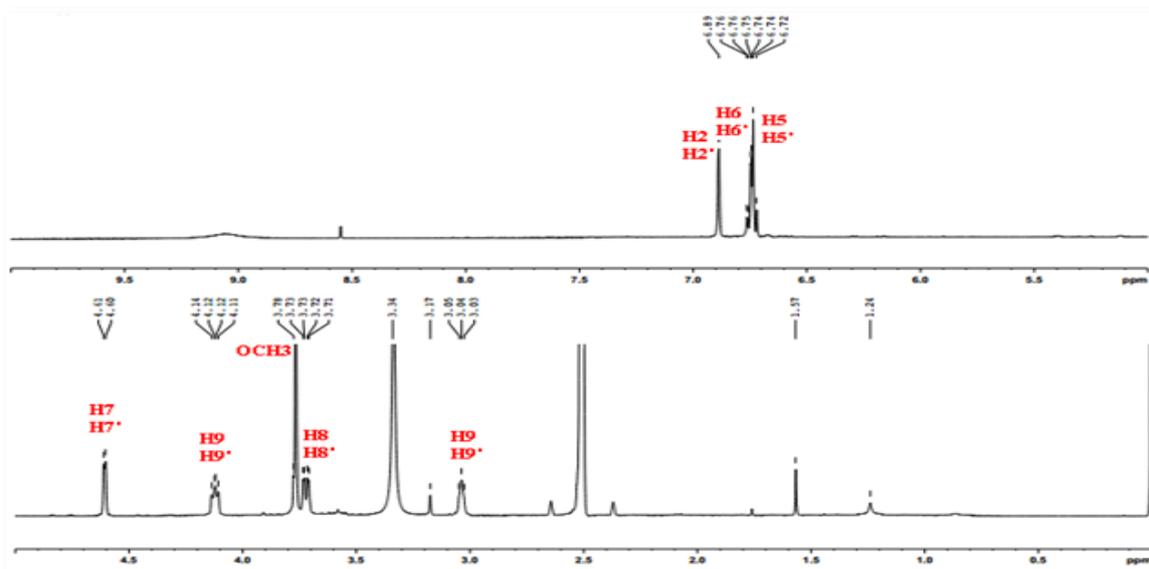


Figure IV.66: Spectre RMN ^1H du composé HC12

L'expérience COSY H-H (Figure IV.67) permet de relier tous les protons à travers leurs taches de corrélations. Ainsi, la présence du système furanique est confirmée par les corrélations observées entre les deux protons résonant à 3,04 ppm (H-8 et H-8') et les protons résonant à 3,72 ppm (H-9b et H-9'b), 4,12 ppm (H-9a et H-9'a) et 4,60 ppm (H-7 et H-7').

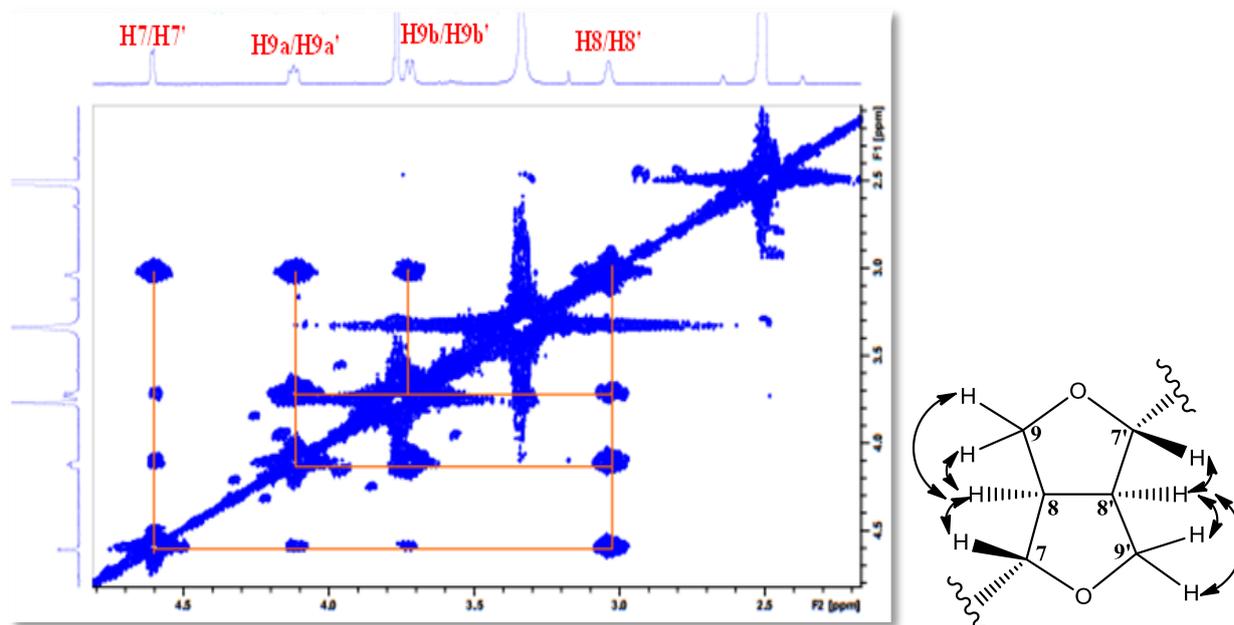


Figure IV.67: Spectre COSY H-H du composé HC12

L'expérience HSQC (Figure IV.68) permet de mettre en évidence les corrélations entre les protons et les carbones qui les portent à δ_c 118,6 ppm (C-6/C-6'), 115,1 (C-5/C-5'), 110,4 (C-2/C-2'), 85,1 (C-7/C-7'), 70,9 (C-9/C-9') et 53,5 (C-8/C-8').

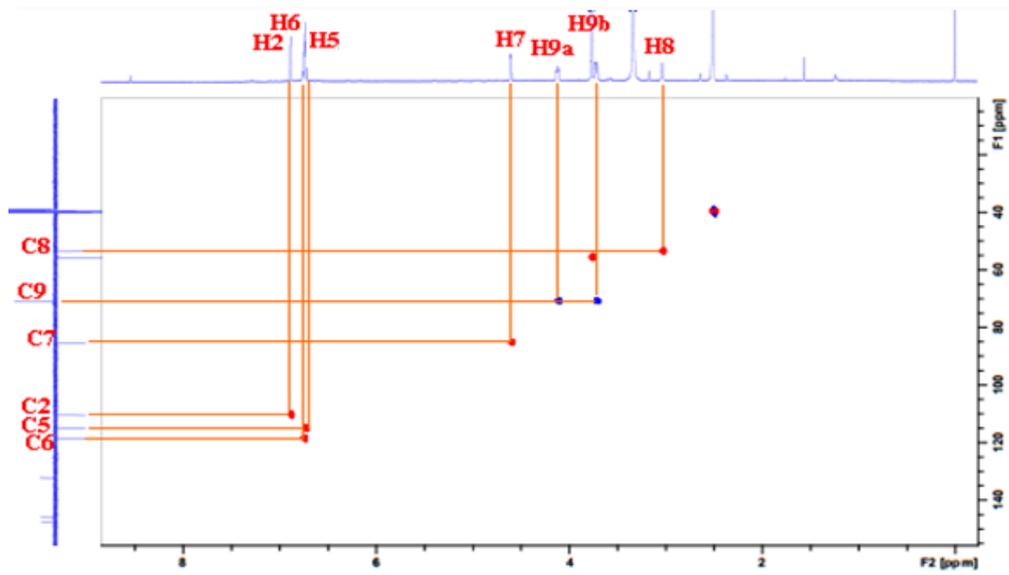


Figure IV.68: Spectre HSQC du composé HC12

Le spectre HMBC (Figure IV.69) montre des taches de corrélations entre H-7/H-7' (δ_H 4,60) et les deux carbones aromatiques C-2/C-2' (δ_C 110,4) et C-6/C-6' (C-118,6), ce qui confirme que les deux noyaux aromatiques substituent chacun un noyau furane.

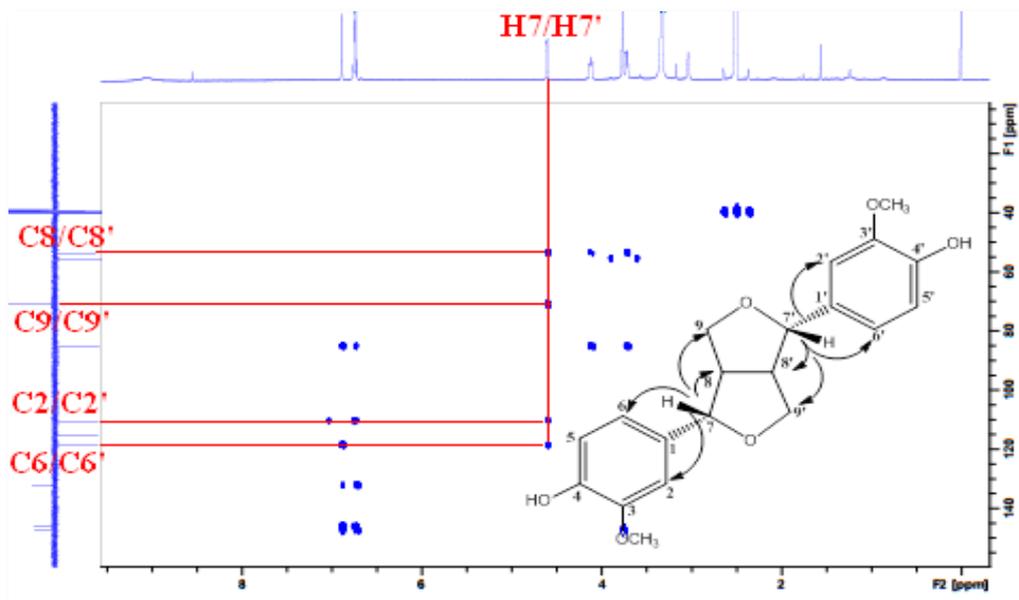
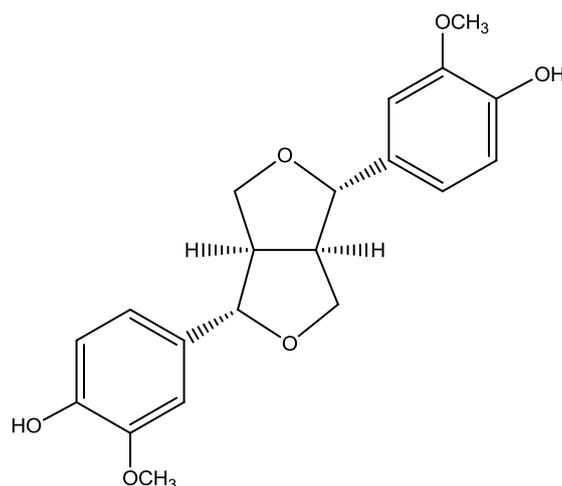


Figure IV.69: Spectre HMBC du composé HC12

Toute cette analyse alliée aux déplacements chimiques des protons et carbones assignés par analyse conjointe des spectres RMN 1D et 2D, la mesure du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D +56,0^\circ$, $c = 0,02$, MeOH) et la comparaison avec les données de la littérature [275] confirme bien que ce composé correspondant au 4,4'-dihydroxy-3,3'-diméthoxy-7,9':7',9 diépoxygignane, ou pinorésinol.



Il est à signaler que cette molécule est identifiée pour la première fois dans le genre *Hedysarum*. Elle a été antérieurement isolée de l'espèce *Pholidota leveilleana* de la famille Orchidaceae [276].

Le tableau (IV.12) englobe tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé HC12.

Tableau IV.12: Déplacements chimiques en RMN ^1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz) du composé HC12 dans DMSO- d_6

Position	δ_c (ppm)	δ_H (ppm), (m, J (Hz))
1	132,1	/
2	110,4	6,89 (d, 1,5)
3	147,5	/
4	145,9	/
5	115,1	6,74 (d, 7,9)
6	118,6	6,75 (dd, 7,9 / 1,5)
7	85,1	4,60 (d, 3,8)
8	53,5	3,04 (m)
9	70,9	4,12 (ddd, 8,6 / 6,3 / 2,3) 3,72 (m)
1'	132,1	/
2'	110,4	6,89 (sl)
3'	147,5	/
4'	145,9	/
5'	115,1	6,75 (d, 7,9)
6'	118,6	6,74 (dd, 7,9 / 1,5)
7'	85,1	4,60 (d, 3,8)
8'	53,5	3,04 (m)
9'	70,9	4,12 (ddd, 8,6 / 6,3 / 2,3) 3,72 (m)
OH	/	8,53 (s)
3', 3-OCH ₃	55,6	3,78 (s)

IV.3 Conclusion

Ce travail présente une étude phytochimique réalisée sur l'espèce *Hedysarum carnosum*. Cette plante endémique Nord-Africaine appartenant à la famille Fabaceae et poussant dans les régions peu arrosées et d'altitude moyenne, possède un intérêt pastoral très important.

Au cours de cette étude 12 composés ont été isolés et identifiés. Ils se répartissent en :

- Deux isoflavanes :
 - 7-hydroxy-2', 4', 5'-triméthoxyisoflavane (5'-méthoxysativane)
 - (-)-Vestitol
- Cinq isoflavones
 - 7, 4'-dihydroxy-3'-méthoxyisoflavone (3'-méthoxydaïdzéine)
 - 4', 5, 7-trihydroxy-isoflavone (genistéine)
 - 5, 4'-dihydroxy-7-méthoxyisoflavone (prunétine)
 - 5, 7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavone (biochanine A)
 - 7-hydroxy-4'-méthoxyisoflavone (formononétine)
- Une flavanone
 - (2*R*,3*R*)-3, 7-dihydroxyflavanone
- Un coumestane
 - 3, 9-dihydroxy coumestane
- Un glycol
 - *Erythro*-1-(3, 4-diméthoxyphenyl) propane-1, 2-diol
- Un dérivé d'acide benzoïque
 - Acide *p*-hydroxybenzoïque
- Un lignane
 - (+)-Pinorésinol

Il est à noter que tous ces composés sont décrits pour la première fois dans l'espèce *Hedysarum carnosum* DESF.

Cette investigation qui a nettement contribué à la connaissance de la composition chimique de la plante *Hedysarum carnosum* montre que les composés phénoliques, notamment les flavonoïdes, demeurent les constituants dominants du genre *Hedysarum*. Huit sont identifiés pour la première fois dans ce genre. Il s'agit de :

- ❖ 7-hydroxy-2', 4', 5'-triméthoxyisoflavane (5'-méthoxysativane)
- ❖ 7, 4'-dihydroxy-3'-méthoxyisoflavone (3'-méthoxydaïdzéine)
- ❖ 4', 5, 7-trihydroxy-isoflavone (génistéine)
- ❖ 5, 4'-dihydroxy-7-méthoxyisoflavone (prunétine)
- ❖ 5, 7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavone (biochanine A)
- ❖ (2*R*,3*R*)-3, 7-dihydroxyflavanone
- ❖ *Erythro*-1-(3, 4-diméthoxyphenyl) propane-1,2-diol
- ❖ (+)-Pinorésinol

Il paraît que les composés *érythro*-1-(3, 4-diméthoxyphenyl) propane-1, 2-diol et (+)-pinorésinol sont reportés pour la première fois dans la famille Fabaceae.

Chapitre V-
Activité Antioxydante

V.1. Introduction

Les antioxydants constituent un ensemble de molécules qui, à faible concentration et en présence du substrat oxydable, retardent ou empêchent le processus d'oxydation, régulant ainsi l'équilibre redox cellulaire [277].

La capacité antioxydante des molécules peut être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique. L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* d'extraits naturels passe par différentes méthodes. Ces dernières impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que celui des radicaux libres ou des complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs [278], par transfert d'atome d'hydrogène ou par transfert d'électron. Les méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène consistent à mesurer la capacité globale d'un antioxydant à réprimer les radicaux libres par donation d'un atome d'hydrogène, tandis que les méthodes basées sur le transfert d'électron évaluent la capacité d'un antioxydant à transférer un électron qui réduira n'importe quel composé incluant les métaux, les carbonyles et les radicaux. Ainsi, compte tenu des différents facteurs impliqués, tels que les propriétés physicochimiques des molécules, le type de test employé ou l'état d'oxydation des substrats, il est recommandé d'utiliser au moins deux tests pour confirmer une activité antioxydante [278,279].

V.2. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante de l'extrait butanolique de la plante *Astragalus monspessulanus* L., de même que celle de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *Hedysarum carnosum* DESF., a été évaluée *in vitro* par l'utilisation de deux tests chimiques différents: le test évaluant le piégeage des radicaux libres et employant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle sous sa forme radicalaire (DPPH \cdot), impliquant les transferts d'atome d'hydrogène et d'électron, et le test déterminant le pouvoir chélatant des métaux (Ferrozine).

V.2.1. Mesure du pouvoir antiradicalaire par le test DPPH \cdot (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)

V.2.1.1. Principe

Le DPPH est un radical libre stable, de couleur violette quand il est en solution. Il présente une absorbance caractéristique dans un intervalle compris entre 512 et 517 nm. La couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl hydrazine de

couleur jaune, par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (Figure VI.1) [280].

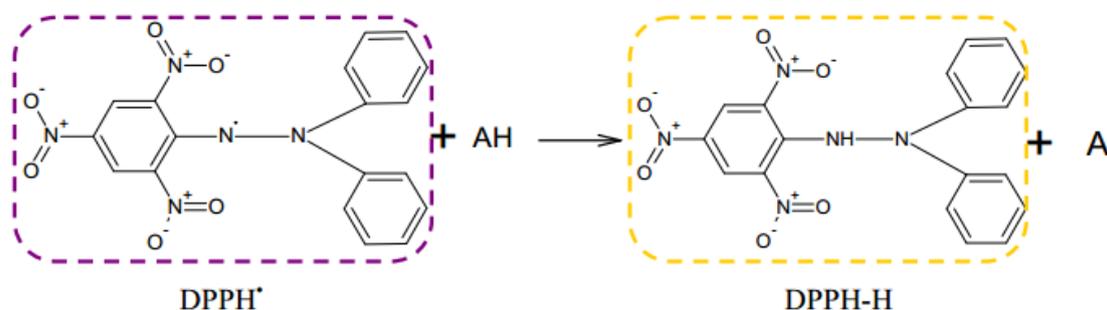


Figure V.1: Mécanisme réactionnel intervenant lors du test DPPH· entre l'espèce radicalaire DPPH· et un antioxydant (AH)

V.2.1.2. Mode opératoire

Le test de DPPH est réalisé selon la méthode décrite par Saeed et collaborateurs [281]. 3 ml de solution méthanolique de DPPH (2,5%) sont ajoutés à 100 µl de la solution d'extrait à différentes concentrations. Le mélange est vigoureusement agité, puis les tubes sont incubés à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 minutes. Le blanc est représenté par le méthanol. Le témoin négatif est composé de 3 ml de la solution méthanolique de DPPH et 3 ml de méthanol. Le témoin positif est représenté par une solution méthanolique d'un antioxydant standard: l'acide ascorbique. La longueur d'onde d'absorption maximale a été préalablement déterminée. Toutes les lectures sont effectuées à 517 nm.

La réduction du DPPH· en DPPH-H induit une perte de sa couleur violette qui peut être suivie à 517 nm. La capacité antioxydante de nos échantillons a été exprimée en pourcentage d'inhibition du radical DPPH· selon l'équation :

$$\% \text{ inhibition} = \left[\frac{A_{\text{blanc}} - A_{\text{échantillon}}}{A_{\text{blanc}}} \right]_{t=30 \text{ min}} \times 100$$

- A_{blanc} : correspond à l'absorbance du blanc après 30 min

- $A_{\text{échantillon}}$: correspond à l'absorbance de l'échantillon après 30 min

L'IC₅₀, paramètre utilisé pour estimer l'activité antioxydante, exprime la concentration d'antioxydant requise pour diminuer 50% du radical DPPH dans le milieu. La valeur la plus faible de l'IC₅₀ correspond à l'activité antiradicalaire la plus importante [282]. Pour chaque test d'activité antioxydante réalisé in vitro, une concentration inhibitrice (IC₅₀) est calculée.

Les valeurs des IC₅₀ sont calculées à partir de la courbe [% inhibition = f (concentration)] en utilisant le logiciel Excel. Chaque concentration est testée en 3 répétitions [283].

V.2.1.3. Résultats

L'activité antioxydante des extraits de plantes *Astragalus monspessulanus* et *Hedysarum carnosum*, ainsi que celle de l'acide ascorbique utilisé comme témoin vis-à-vis du radical DPPH a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction de ce radical. Les résultats du test scavenger sont représentés dans les figures V.2, V.3 et V.4 qui suivent.

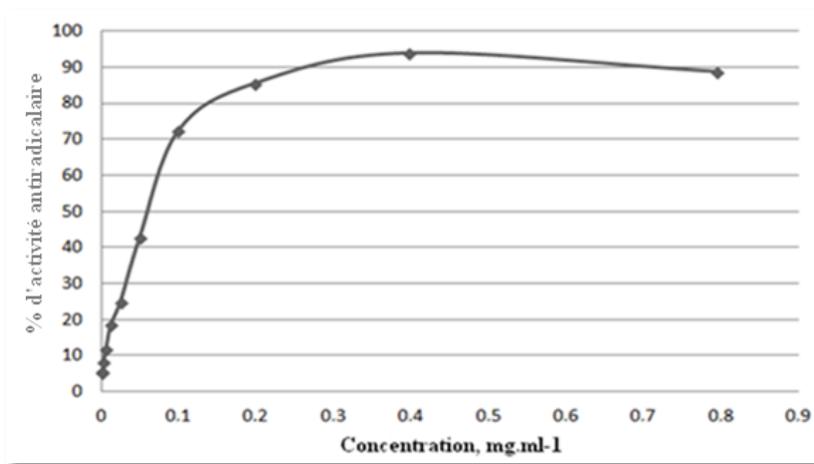


Figure V.2: Activité antiradicalaire de l'extrait butanolique de *Astragalus monspessulanus* par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM ($n=3$)

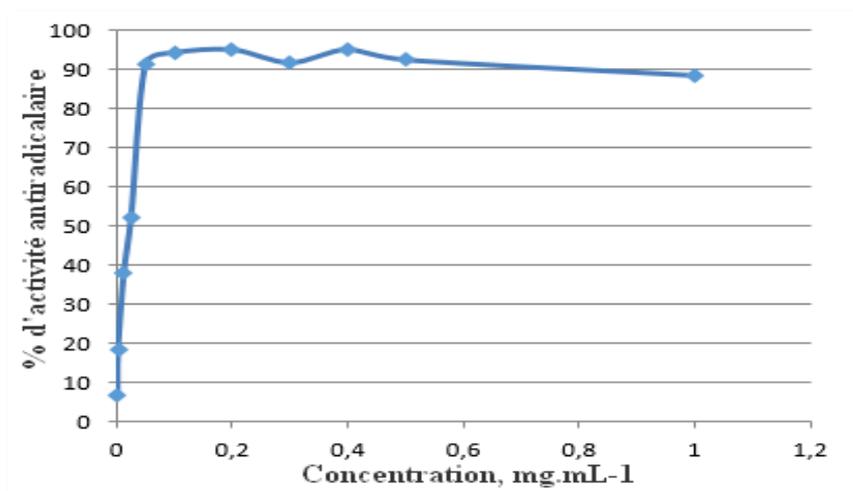


Figure V.3: Activité antiradicalaire de l'extrait acétate d'éthyle de *Hedysarum carnosum* par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM ($n=3$)

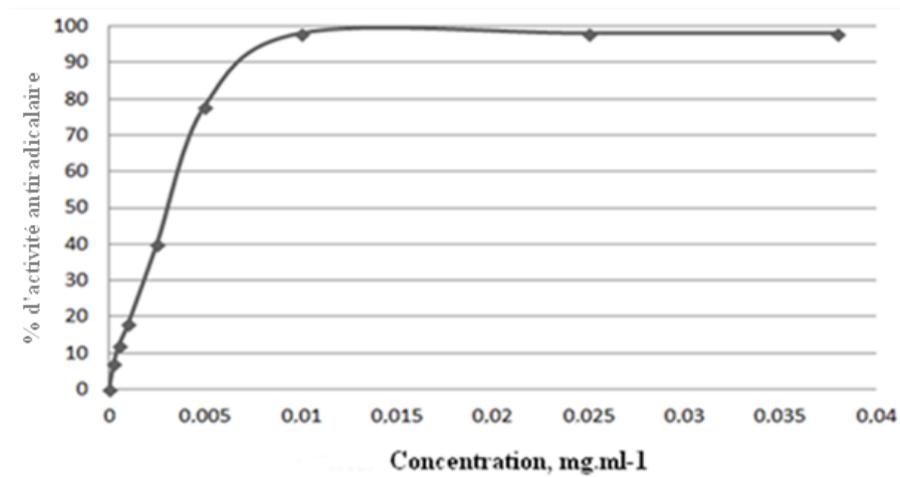


Figure V.4: Activité antiradicalaire du standard (acide ascorbique) par la méthode de piégeage du radical libre DPPH. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM ($n=3$)

L'activité anti radicalaire de nos extraits est exprimée en IC_{50} . Plus cette concentration est faible, plus l'effet antioxydant est très élevé [284].

L'extrait butanolique de l'espèce *Astragalus monspessulanus* présente une activité modérée avec une $IC_{50} = 63,60 \pm 0,01436 \mu\text{g/ml}$, en l'occurrence l'acide ascorbique ($IC_{50} = 3,15 \mu\text{g/ml}$). Par contre, l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Hedysarum carnosum* ne montre pas d'activité anti-radicalaire.

Les résultats obtenus pour ces deux plantes ne présentent pas une corrélation linéaire entre la teneur en flavonoïdes et l'activité antiradicalaire.

V.2.2. Pouvoir chélateur du Fer

V.2.2.1. Principe

Pour évaluer *in vitro* le pouvoir chélateur d'un extrait donné, le composé stabilisant le plus utilisé est la ferrozine [285]. En effet, la ferrozine forme avec le fer libre présent dans un milieu réactionnel, un complexe [ferrozine- Fe^{2+}] de couleur violette intense. La quantification de ce complexe par spectrophotométrie à 562 nm dans un milieu de concentration connue en fer renseigne sur la quantité de fer non chélaté et donc sur la capacité des extraits à piéger cet élément. Plus la coloration de la solution contenant l'extrait testé est claire, plus le pouvoir chélateur de l'extrait est important.

La capacité des extraits à se lier avec Fe^{2+} en présence de la ferrozine, a été comparée à celle de l'EDTA, fort agent chélateur [286].

V.2.2.2. Mode opératoire

Une aliquote de 500 µl de l'extrait butanolique de *Astragalus monspessulanus* est ajoutée à 100 µl de FeCl₂, 4H₂O (0,6 mM) et 900 µl de MeOH. Après une agitation vigoureuse et un repos de 5 min, 0,1 ml de ferrozine (5 mM) est ajouté [287]. Le mélange est laissé au repos pendant 10 min à température ambiante. L'absorbance est mesurée à 562 nm contre le MeOH blanc (sans ferrozine). Dans le but de comparer les résultats, l'EDTA a été utilisé comme standard de référence.

Une absorbance faible indique une activité de chélation de fer élevée. Le pouvoir chélateur du fer est estimé selon l'équation ci-dessous :

$$\text{Activité chélatrice (\%)} = [(Ac - At) / Ac] \times 100$$

Ac: absorbance du contrôle

At: Absorbance du test

La concentration effective (EC₅₀) qui chélate 50 % de Fe²⁺ a été calculée. Tous les dosages des différents tests de l'activité antioxydante ont été réalisés en triplicata (3 répétitions pour chaque concentration).

V.2.2.3 Résultats

Dans cette étude, l'activité de chélation du fer ferreux a été mesurée par l'inhibition de la formation de complexe [Fe²⁺-ferrozine] après incubation des extraits avec le Fe²⁺.

La ferrozine peut quantitativement former des complexes avec Fe²⁺ résiduel dans un milieu réactionnel. Cependant, en présence d'agents chélatants, la formation du complexe est perturbée de telle sorte que sa couleur se trouve réduite. Par conséquent, la mesure de la réduction de la couleur, permet l'estimation de l'activité de chélation de l'agent chélatant coexistant [288]. Ainsi, les valeurs d'EC₅₀ faibles correspondent à une activité antioxydante forte.

Les résultats de la détermination de l'activité antioxydante des deux extraits à l'aide de la méthode du pouvoir chélateur du fer, montrent une faible activité de l'extrait butanolique de l'espèce *Astragalus monspessulanus*, avec une EC₅₀ = 2.0876 ± 0.4363 mg/ml comparé à L'EDTA (EC₅₀ = 0.529 ± 0.031 µg/mL). Il n'a pas été possible de calculer la valeur d'EC₅₀ pour l'extrait acétate d'éthyle de la plante *Hedysarum carnosum*, dans la mesure où le pourcentage d'inhibition ne dépasse pas 30% (Figures VI.5, VI.6 et VI.7).

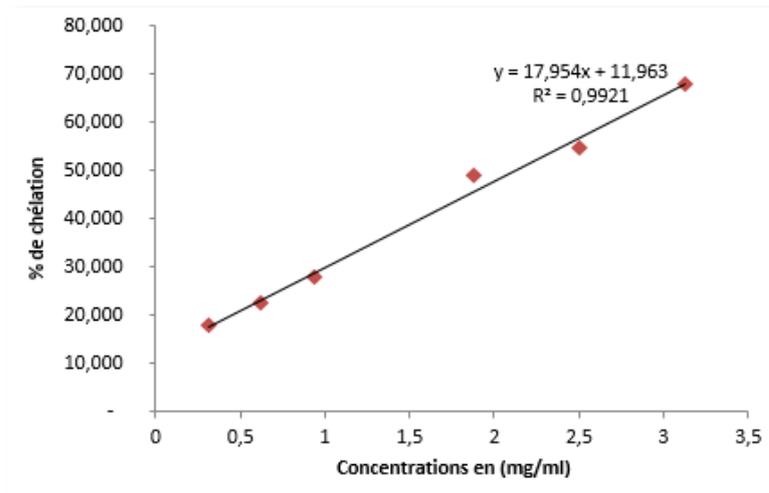


Figure V.5: Pouvoir chélateur du fer de l'extrait butanolique de *Astragalus monspessulanus*. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM ($n=3$)

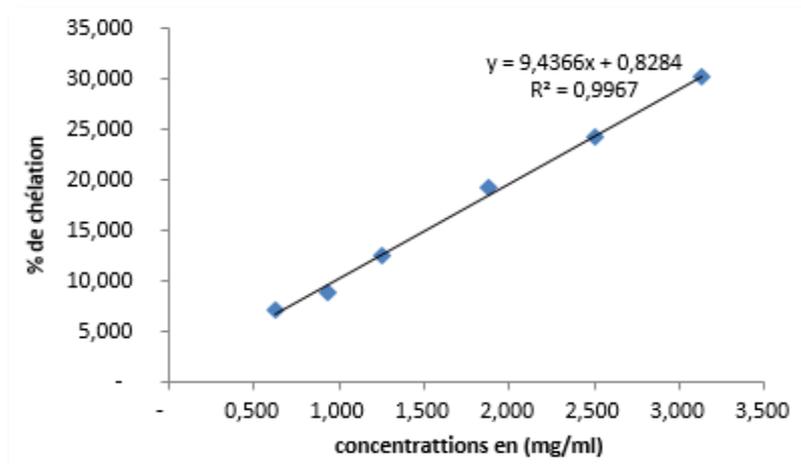


Figure V.6: Pouvoir chélateur du fer de l'extrait acétate d'éthyle de *Hedysarum carnosum*. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM ($n=3$)

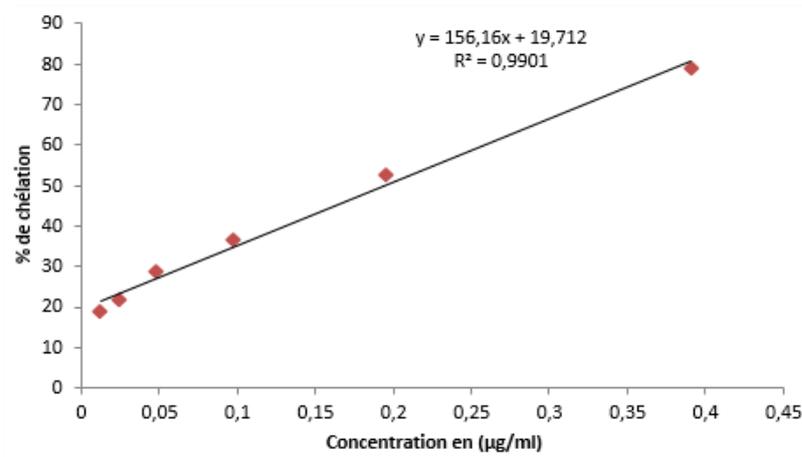


Figure V.7: Pouvoir chélateur du fer de l'EDTA. Les valeurs représentent les moyennes \pm SEM ($n=3$)

V.3 Conclusion

L'activité antioxydante des extraits butanolique de *Astragalus monspessulanus* L. et acétate d'éthyle de *Hedysarum carnosum* DESF., a été étudiée par deux tests : le radical libre DPPH et l'activité chélatante.

D'après les résultats du test scavenger de DPPH, nous avons constaté que l'extrait butanolique de la plante *Astragalus monspessulanus* a une activité antioxydante modérée avec une $IC_{50} = 63.60 \pm 0.01436 \mu\text{g/mL}$. Cette activité pourrait être attribuée à la présence des composés phénoliques comme 3', 5'-di-C-glucopyranosylphlorétine [233]. Cependant, l'extrait acétate d'éthyle de *Hedysarum carnosum* ne possède pas d'activité inhibitrice contre le radical DPPH.

La chélation de métaux est un moyen très important dans l'évaluation de l'activité antioxydante puisqu'elle montre une activité indirecte sur les radicaux libres en agissant sur un facteur provoquant leur production. Le test de l'activité chélatante de l'extrait butanolique de *Astragalus monspessulanus* a montré une faible activité antioxydante ($EC_{50} = 2.0876 \pm 0.4363 \text{ mg/ml}$). Ceci peut être expliqué par la nature des composés chimiques présents dans l'extrait. L'extrait acétate d'éthyle de la plante *Hedysarum carnosum* a révélé une inefficacité chélatante du fer.

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

Ce travail a porté sur l'étude phytochimique de deux plantes appartenant à la famille Fabaceae, à savoir *Astragalus monspessulanus* L. et *Hedysarum carnosum* DESF. Les plantes de cette famille sont riches en diverses classes de métabolites secondaires aux propriétés pharmacologiques intéressantes comme les flavonoïdes connus pour leurs activités antioxydantes notamment, et les saponosides.

L'investigation phytochimique qui a porté sur les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique de l'espèce *Astragalus monspessulanus*, a permis d'identifier 13 composés constitués de 2 saponines tritérpéniques, 8 composés phénoliques dont 7 flavonoïdes glycolsylés et un lignane, en plus de deux phytostérols et un terpénoïde communs au monde végétal. Six composés ont été décrits (quercétine 3-*O*-(2,6- α -L-dirhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside, kaempférol 3-*O*-(4- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside, isorhamnétine 3-*O*-(4- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (Calendoside III), 3', 5'-di-*C*- β -D-glucopyranosylphlorétine, hovetrichoside C et isolaricirésinol 9'-*O*- β -D-glucopyranoside) pour la première fois dans le genre *Astragalus*.

L'étude chimique de l'extrait acétate d'éthyle de *Hedysarum carnosum*, a aussi permis l'isolement de 12 composés phénoliques se répartissant en neuf flavonoïdes (2 isoflavanes, 5 isoflavones, 1 flavanone, 1 coumestane), un glycol, un dérivé d'acide benzoïque et un lignane. Huit composés ont été isolés (7-hydroxy-2', 4', 5'-triméthoxyisoflavane (5'-méthoxysativane), 7,4'-dihydroxy-3'-méthoxyisoflavone (3'-méthoxydaïdzéine), 4',5,7-trihydroxy-isoflavone (genistéine), 5,4'-dihydroxy-7-méthoxyisoflavone (prunétine), 5,7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavone (biochanine A), (2*R*,3*R*)-3,7-dihydroxyflavanone, *Erythro*-1-(3,4-diméthoxyphenyl) propane-1,2-diol et (+)-pinorésinol) pour la première fois dans le genre *Hedysarum*.

L'isolement de ces métabolites secondaires est rendu possible par l'exploitation de différentes techniques chromatographiques, en l'occurrence :

- La chromatographie liquide sous vide (CLV) de silice greffée en C-18 et SiO₂.
- La chromatographie sur colonne de gel de silice normale.
- La chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20.
- La chromatographie sur plaques préparatives en phases normale et inverse.
- La chromatographie liquide moyenne pression CLMP.
- La chromatographie liquide haute performance CLHP.

L'identification et la caractérisation des composés isolés ont été effectuées grâce à la combinaison de méthodes d'analyse spectroscopiques impliquant la RMN 1D (^1H , ^{13}C *J*-modulé et DEPT), la RMN 2D (COSY H-H, HSQC et HMBC), la spectrométrie de masse ESI, la mesure des pouvoirs rotatoires et la comparaison avec les données de la littérature.

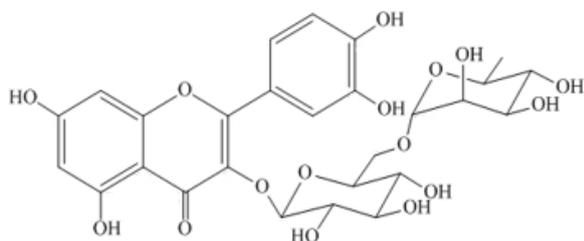
La riche composition chimique en composés phénoliques des deux plantes en question, plaiderait pour une évaluation de leurs propriétés antioxydantes, particulièrement.

Ainsi l'évaluation *in vitro* du potentiel antioxydant a révélé que l'extrait *n*-butanol de la plante *Astragalus monspessulanus* L. possède une activité antioxydante modérée avec une $IC_{50} = 63.60 \pm 0.01436 \mu\text{g/mL}$, et cela par l'utilisation du test scavenger de DPPH. Cependant, l'extrait acétate d'éthyle de *Hedysarum carnosum* ne montre pas d'activité inhibitrice contre le radical DPPH. Le test de l'activité chélatante de l'extrait butanolique de *Astragalus monspessulanus* a montré une faible activité antioxydante ($EC_{50} = 2.0876 \pm 0.4363 \text{ mg/ml}$). L'extrait acétate d'éthyle de la plante *Hedysarum carnosum* a révélé une inefficacité chélatante du fer. Ceci peut être expliqué par la nature des composés chimiques présents dans les extraits.

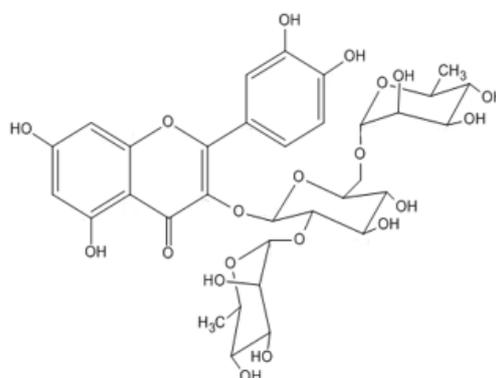
Ainsi, des études complémentaires restent souhaitables pour approfondir les résultats obtenus et déterminer les principes actifs au niveau des extraits.

D'autres perspectives pourraient être également envisagées par la recherche de nouvelles molécules ainsi que d'autres activités biologiques.

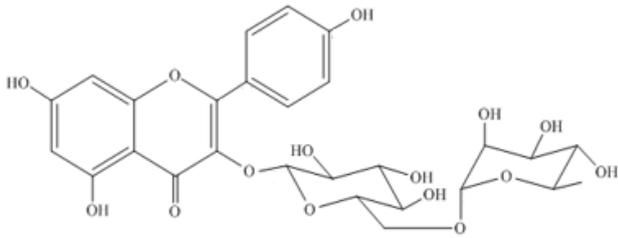
▪ *Astragalus monspessulanus* L.



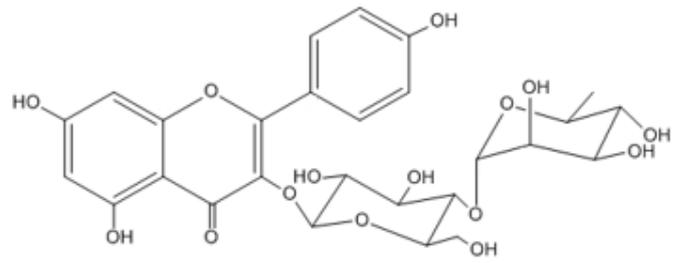
Quercétine 3-*O*-rutinoside (AM1)



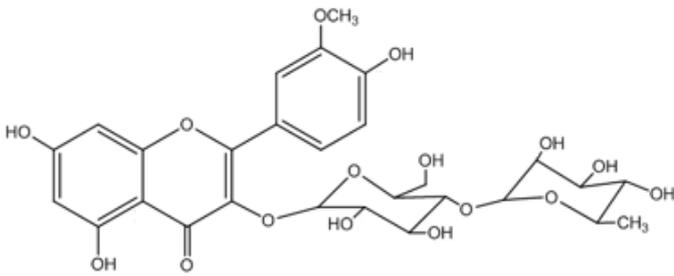
Quercétine 3-*O*-(2,6- α -L-dirhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (AM2)



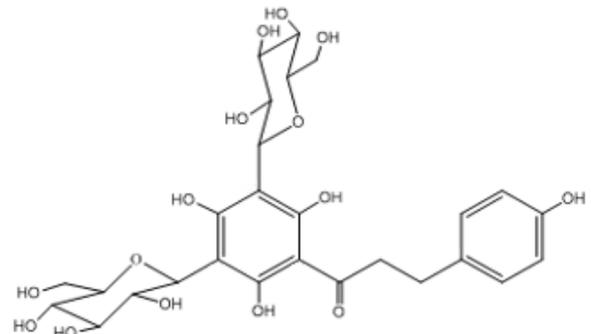
Kaempférol 3-O-rutinoside (AM3)



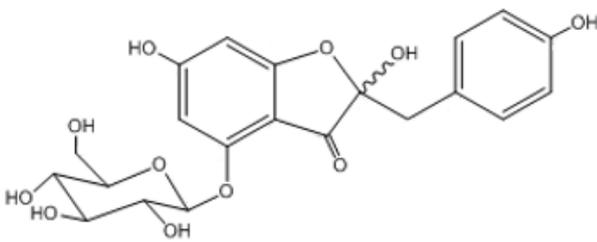
kaempférol 3-O-(4- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (AM4)



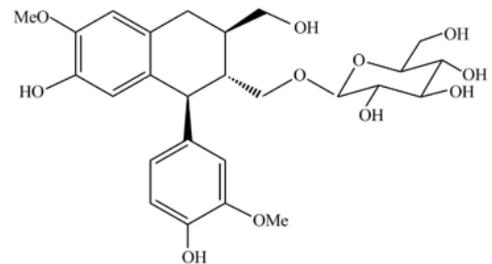
Isorhamnétine 3-O-(4-O- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside) (Calendoside III) (AM5)



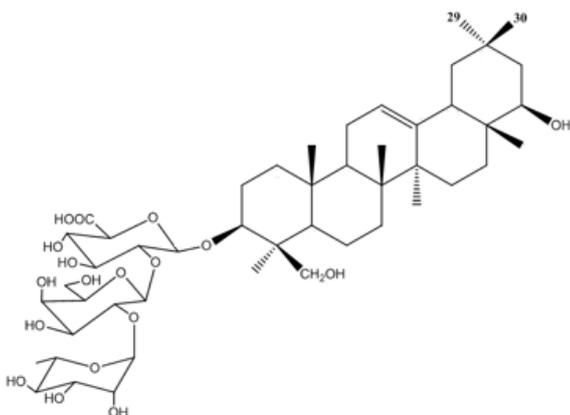
3', 5'-di-C- β -D-glucopyranosylphlorétine (AM6)



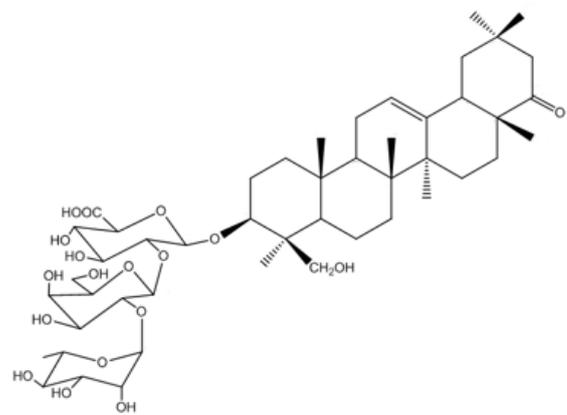
Hovetrichoside C (AM7 et AM7')



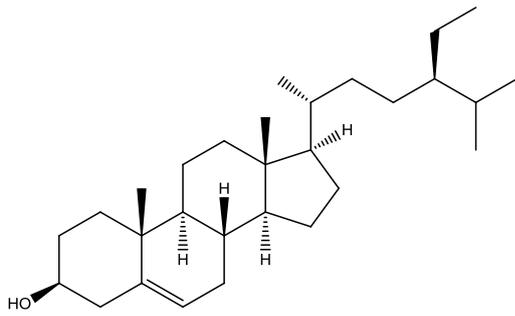
Isolaricirésinol 9'-O- β -D-glucopyranoside (AM8)



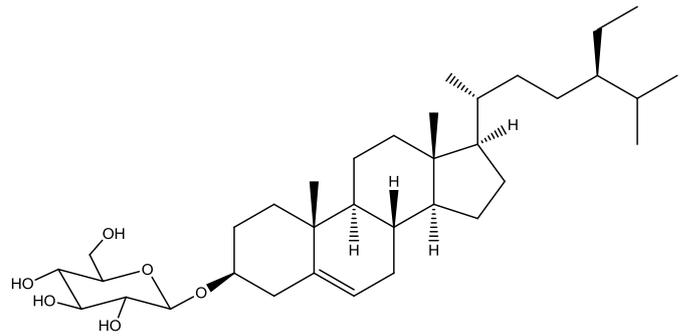
Soyasaponine I (AM9)



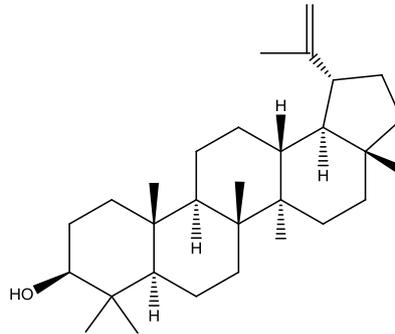
Déhydrosoyasaponine I (AM10)



***β*-sitostérol (AM11)**

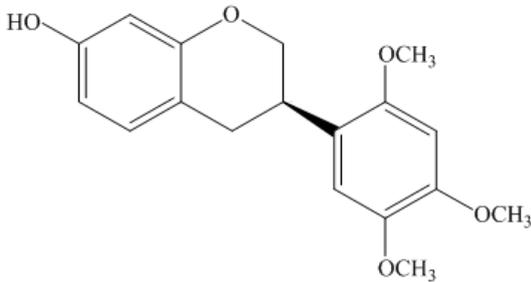


***β*-sitostérol-3-O-glucoside (AM12)**

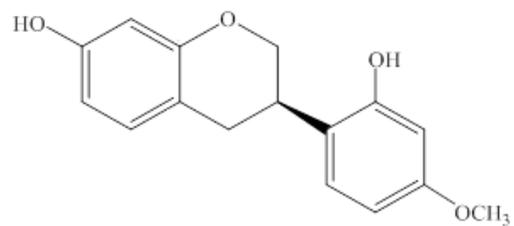


Lupéol (AM13)

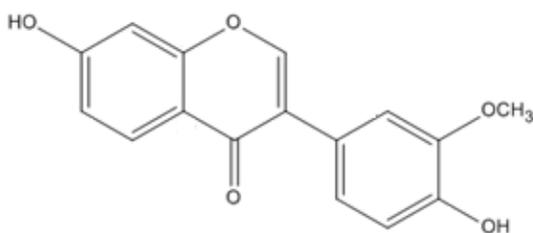
▪ ***Hedysarum carnosum* DESF.**



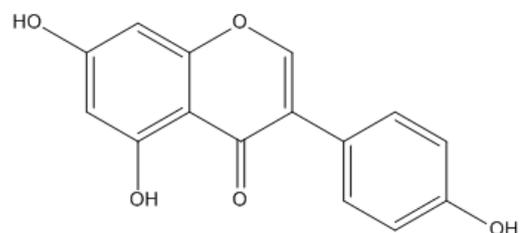
7-Hydroxy-2', 4', 5'-triméthoxyisoflavane (HC1)



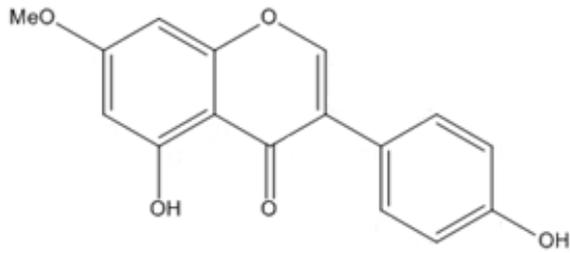
(-)-Vestitol (HC2)



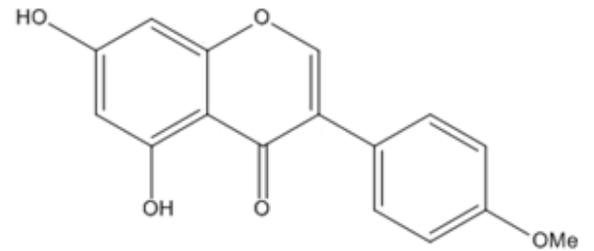
**7, 4'-dihydroxy-3'-méthoxyisoflavone
(3'-méthoxydaïdzéine) (HC3)**



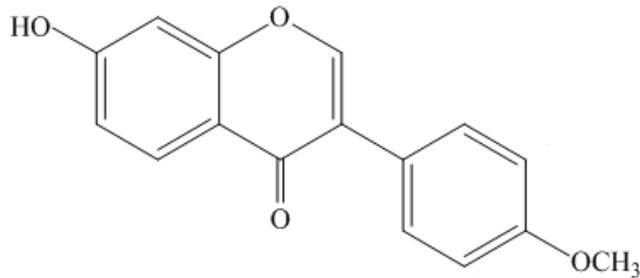
Genistéine (HC4)



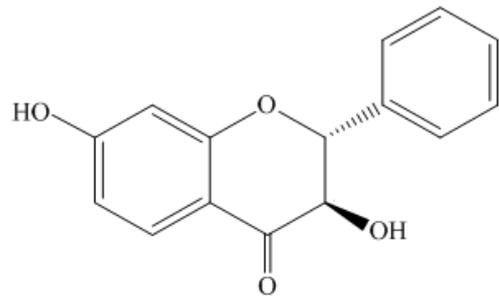
Prunétine (HC5)



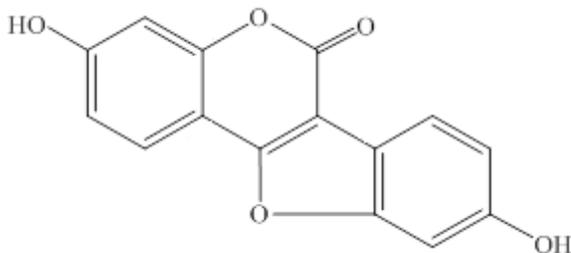
Biochanine A (HC6)



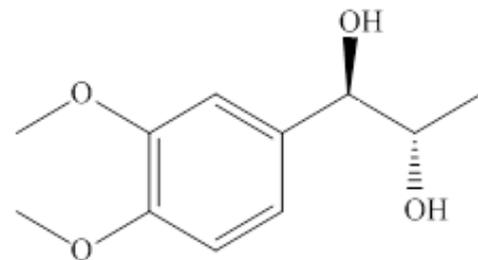
Formononétine (HC7)



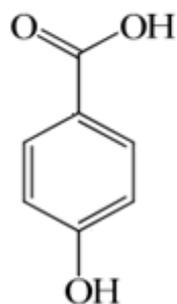
(2R,3R)-3,7-dihydroxyflavanone (HC8)



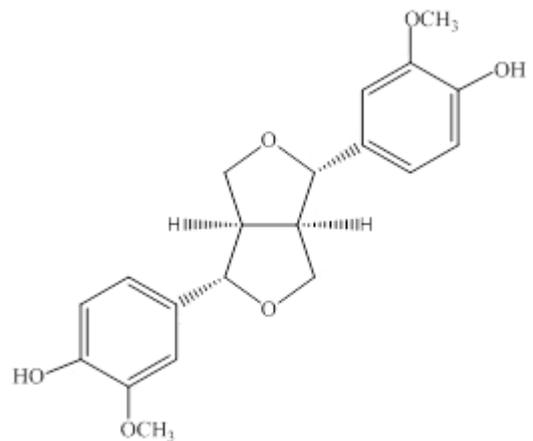
3,9-dihydroxycoumestane (HC9)



Erythro-1-(3,4-diméthoxyphenyl)
propane-1,2-diol (HC10)



Acide *p*-hydroxybenzoïque (HC11)



(+)-Pinorésinol (HC12)

Chapitre VI-
Partie expérimentale

VI.1 Matériel végétal

L'identification botanique des plantes étudiées a été réalisée par Monsieur le Professeur Bachir OUDJEHIH, Professeur à l'Institut des Sciences Vétérinaires de l'Université de Batna 1. Pour chaque récolte, le matériel végétal est conservé et laissé sécher à l'abri de la lumière et de l'humidité.

VI.1.1 Récolte des plantes *Astragalus monspessulanus* et *Hedysarum carnosum*

La récolte de la plante *Astragalus monspessulanus* L. a été effectuée au mois de juin 2012 aux environs de la ville d'Arris, à 60 kms au Sud de Batna.

La récolte de la plante *Hedysarum carnosum* DESF. a été effectuée au mois de juin 2014 du côté de la ville d'El Kantara, à 50 kms au Sud-ouest de Biskra.

VI.1.2 Techniques préparatives de séparation**VI.1.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)**

Elle est utilisée à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications. Ainsi les analyses sur couche mince (CCM) permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis. Elles sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck® 250 µm (20 × 20 cm). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié qui constitue la phase mobile. Cette dernière est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée. L'observation des CCM s'effectue en lumière visible et sous UV (254 et 365 nm), avant et dans certains cas, après révélation par un mélange d'acides (acide sulfurique 25 % et acide acétique 25%) et d'eau (50 %) ou par vanilline sulfurique. Cela permet de rassembler judicieusement les fractions récoltées suite aux différentes séparations chromatographiques.

VI.1.2.2 Chromatographie sur Couche Epaisse (CCE)

Les purifications par CCE préparatives ont été réalisées sur des plaques en verre recouvertes de silice en phase normale [Kieselgel60 F₂₅₄, Merck® 250 µm (20 × 20 cm)] ou en phase inverse [RP-18 F_{254S}, Merck® 200 µm (20 × 20 cm)].

VI.1.2.3 Chromatographie liquide sous vide (CLV)

La chromatographie liquide sous vide (CLV) est une technique rapide permettant de réaliser une première séparation d'extraits bruts. La silice (en phase normale) [Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck® 250 µm (20 × 20 cm)] ou la silice greffée (phase inverse) [RP-18 F_{254S},

Merck®200 µm (20 × 20 cm)] est conditionnée dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté N° 4. Le volume de silice utilisé correspond à 10 fois le poids de l'échantillon.

VI.1.2.4 Chromatographie liquide 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 Kieselgel Merck (70-230 mesh). La quantité de silice utilisée est généralement 40 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée. L'élution est réalisée par simple gravitation. 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 de dépôt solide (enrobage). Les chromatographies d'exclusion sont réalisées sur gel de Sephadex LH-20. Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

VI.1.2.5 Chromatographie liquide moyenne pression (CLMP)

Cette technique repose sur l'adsorption spécifique des composés sur la phase stationnaire, notamment en fonction de leur polarité. Les interactions entre les différentes phases permettent alors d'avoir un temps de rétention qui est spécifique de chaque composé, et ainsi de pouvoir les séparer dans un mélange. La chromatographie est réalisée sous moyenne pression (20 bars).

Cette chromatographie est réalisée grâce à une colonne pré- packée de silice C18 (phase inverse : colonne apolaire). La taille et le diamètre de la colonne sont déterminés en fonction de la masse et du degré de pureté de l'échantillon. L'extrait à fractionner est dissout dans le premier mélange de solvants puis injecté dans la colonne. L'élution se fait par des mélanges de solvants successifs. Les fractions sont recueillies par un collecteur, puis évaporées pour être analysées par CCM.

VI.1.2.6 Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

La purification par chromatographie liquide haute performance (CLHP) a été effectuée sur un appareil du laboratoire *CNRS-Pierre Fabre* de Toulouse (France). L'appareil est constitué d'une chaîne chromatographique Dionex, pilotée par le logiciel Chromeleon version 6.01. La chaîne est équipée d'une pompe P580 A quaternaire avec dégazeur intégré, d'un

passer d'échantillon ASI 100, d'un détecteur UV/Visible à barrette de diodes UVD 170S/340S et d'une colonne thermostatée par un four STH 585. La colonne employée est une colonne CLHP préparative X-Terra RP18 (19 x 250 mm) et (30 x 100 mm), 0,45 μm . Les conditions d'élution sont :

- Mode : gradient
- Système de solvants : ACN/H₂O
- Débit = 25 ml/min
- Température = 25 °C
- Détection : 250 et 280 nm

VI.1.3 Chimie structurale

VI.1.3.1 Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire des composés a été déterminé au moyen d'un polarimètre de type Perkin-Elmer 401 à 20-25°C. La mesure a été réalisée dans une cuve de 1 ml et d'une longueur de 10 cm, en utilisant la raie D du sodium (589 nm) comme source lumineuse. Le solvant de solubilisation ainsi que la concentration de l'échantillon sont indiqués dans chaque cas. La valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D$) est exprimée en degrés.

VI.1.3.2 Spectrométrie de masse

Les spectres de masse à basse résolution et en mode électrospray (ESI-MS) sont enregistrés sur un spectromètre à trappe d'ions "Thermo LCQ Advantage".

VI.1.3.3 Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été enregistrés au laboratoire *CNRS-Pierre Fabre* de Toulouse sur un spectromètre Brüker DRX à 500 MHz pour ¹H et 125 MHz pour ¹³C. Les solvants deutérés sont utilisés selon la solubilité des composés. Les données sont traitées à l'aide du logiciel WIN-NMR.

Les échantillons ont été solubilisés par les solvants deutérés appropriés (DMSO-*d*₆, DMSO, MeOD, ...) dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre.

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) alors que les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

Les programmes de séquences impulsions standards fournis par Brüker ont été utilisés pour chaque type d'analyse.

VI.2 Etude phytochimique de l'espèce *Astragalus monspessulanus* L.

VI.2.1 Extraction

Les parties aériennes (1000 g) de l'espèce *A. monspessulanus* L. préalablement séchées et pulvérisées, sont mises en macération dans l'éthanol à 70 % (10 litres, 3 fois) pendant 72 h à la température ambiante. Le mélange est ensuite filtré et concentré. La phase hydro-alcoolique résultante subit une extraction liquide-liquide, d'abord par l'éther de pétrole (400 ml, 3 fois) puis l'acétate d'éthyle (400 ml, 3 fois) et enfin le *n*-butanol (400 ml, 3 fois). L'évaporation à sec des phases organiques a permis de recueillir les masses suivantes: 8,3 g pour l'extrait étheropétrolique, 12,1 g pour l'extrait AcOEt et 15,3 g pour l'extrait butanolique. Les CCM réalisées sur les trois extraits dans différents systèmes de solvants, mettent en relief la richesse des extraits acétate d'éthyle et butanolique en métabolites secondaires.

VI.2.2 Fractionnement et purification de l'extrait *n*-butanol

7 g de l'extrait butanolique ont été fractionnés grossièrement par une chromatographie liquide sous vide (CLV) de gel de silice greffée en C-18 (phase inverse) dans un mélange H₂O/MeOH à différents gradients (80/20 à 0/100). Cette étape s'est soldée principalement par l'obtention de 15 fractions de 100 ml. Après analyse des fractions obtenues par chromatographie sur couche mince en utilisant des systèmes de solvants appropriés, les fractions présentant des profils identiques sur CCM ont été réunies et ensuite traitées individuellement en combinant différentes techniques chromatographiques.

Tableau VI.1: Fractionnement de l'extrait *n*-butanol

Eluant colonne		Fractions	Eluant CCM	Poids en mg
H ₂ O/MeOH	80-20	Fr1	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 7/3/0,5	5528
	60-40	Fr2		594
	40-60	Fr3		137,1
	40-60	Fr4		60,4
	20-80	Fr5		104,2
	20-80	Fr6		79,2
	20-80	Fr7		40,1
MeOH	100	Fr8	CHCl ₃ /MeOH 8/2	217
	100	Fr9		353,6
CHCl ₃ /MeOH	50-50	Fr10		88,3
	50-50	Fr11		14,8

La fraction Fr₁ (5,528 g) est mise à chromatographier sur une colonne de polyamide. L'élution réalisée dans un mélange H₂O/MeOH (100/0 à 0/100) a conduit à 16 sous-fractions (Fr₁₋₁ à Fr₁₋₁₆). La chromatographie sur une colonne de polyamide de la sous-fraction Fr₁₋₅ (333 mg) dans le mélange toluène/MeOH (95/5 à 0/100) a abouti au recueil de 12 sous-fractions (Fr₁₋₅₋₁ à Fr₁₋₅₋₁₂). La sous-fraction Fr₁₋₅₋₁₁ (57 mg) a subi une purification par CLHP préparative au moyen d'un gradient de solvants ACN/H₂O (5/95, 50/50, 100/0), puis une repurification sur CCM préparative avec l'éluant AcOEt/Acide formique/Acide acétique/H₂O (100:11:11:26). Enfin les produits obtenus ont été repassés encore une fois sur CLHP préparative, ce qui a permis d'isoler les produits **AM2** (3,4 mg) et **AM6** (2 mg).

AcOEt /Ac formique/Ac acétique/H₂O
(100/11/11/26)

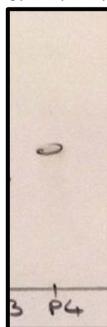


Figure VI.1 : CCM en phase normale du composé AM6

La purification de la sous-fraction Fr₁₋₅₋₄ (36,1 mg) sur plaque préparative de silice normale dans un mélange CHCl₃/MeOH/H₂O (8/2/0,2), a abouti à l'isolement du composé **AM8** (3,8 mg).

CHCl₃/CH₃OH/ H₂O
(8/2/0,2)



Figure VI.2 : CCM en phase normale du composé AM8

Les sous-fractions Fr₁₋₅₋₈ (26 mg) et Fr₁₋₅₋₉ (32 mg) ont subi des chromatographies sur colonne de polyamide. L'élution menée dans un système toluène/MeOH (10/90 à 0/100), a permis de recueillir quatre autres sous-fractions (Fr₁₋₅₋₈₋₁ à Fr₁₋₅₋₈₋₄) pour Fr₁₋₅₋₈ et 5 sous-

fractions (Fr₁₋₅₋₉₋₁ à Fr₁₋₅₋₉₋₅) pour Fr₁₋₅₋₉. Les sous-fractions Fr₁₋₅₋₈₋₂ (13 mg), Fr₁₋₅₋₉₋₃ (19 mg) et Fr₁₋₅₋₉₋₄ (10 mg) rassemblées sont mises à chromatographier sur une colonne de silice normale. L'élution effectuée dans un mélange CHCl₃/MeOH (95/5 à 0/100) a conduit à 6 sous-fractions (Fr_{1-5-9-A} à Fr_{1-5-9-F}). Les sous-fractions Fr_{1-5-9-E} (23 mg) et Fr₁₋₅₋₈₋₃ (9 mg) réunies ont subi une purification par CLHP préparative au moyen d'un gradient de solvants ACN/H₂O (5/95, 50/50, 100/0), puis une repurification sur CCM préparative avec l'éluant AcOEt/Acide formique/Acide acétique/H₂O (100/11/11/26). Les produits obtenus repassés sur CLHP préparative, ont permis d'obtenir les produits **AM1** (4,2 mg) et **AM4** (2 mg).

AcOEt/Ac formique/Ac acétique/H₂O
(100/11/11/26)

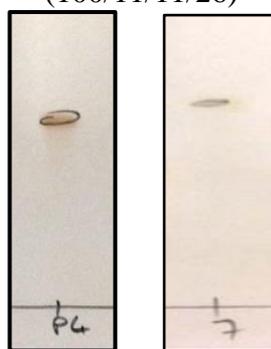


Figure VI.3 : CCM en phase normale des composés AM1 et AM4

Les sous-fractions Fr₁₋₇, Fr₁₋₈, Fr₁₋₉ et Fr₁₋₁₀ regroupées (134 mg), sont soumises à une chromatographie sur colonne de gel de silice dans un mélange CH₂Cl₂/Acétone (100/0 à 0/100), suivie d'une purification sur plaque préparative de silice greffée (RP-18) dans un mélange MeOH/H₂O (3/7), conduisant à l'isolement du composé **AM7** (5 mg).

CHCl₃/CH₃OH/H₂O
(7/3/0,5)



Figure VI.4 : CCM en phase normale du composé AM7

La sous-fraction Fr₁₋₁₂ (117 mg) soumise à une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 dans CHCl₃/MeOH (90:10), a permis de recueillir 4 sous-fractions (F₁₋₁₂₋₁ à F₁₋₁₂₋₄). Les trois premières (F₁₋₁₂₋₁ à F₁₋₁₂₋₃) rassemblées, d'un poids de 32 mg, sont soumises

à une purification qui a débuté par CLHP préparative dans un mélange ACN/H₂O (5/95, 50/50, 100/0, 5/95), puis une repurification sur CCM préparative avec l'éluant AcOEt/Ac formique/Ac acétique/H₂O (100/11/11/26). Les produits obtenus ont été repassés sur CLHP préparative, ce qui a abouti aux produits **AM3** (3,8 mg) et **AM5** (2,4 mg).

Le composé **AM9** (15 mg) a été obtenu par précipitation de la fraction Fr₄ (60 mg) dans MeOH. Le filtrat recueilli a été soumis à une chromatographie sur une colonne de gel de silice éluée avec un gradient de solvants CHCl₃/MeOH (100:0 à 80:20), donnant le composé **AM10** (7 mg).

CHCl₃/CH₃OH/H₂O
(6/4/0,7)



Figure VI.5 : CCM en phase normale du composé **AM9**

VI.2.3 Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle

7 g de l'extrait acétate d'éthyle ont été fractionnés par une chromatographie liquide sous vide (CLV) de gel de silice greffée en C-18 (phase inverse) avec les gradients d'éluion H₂O/MeOH (80:20 à 0:100). Après analyse des fractions obtenues par chromatographie sur couche mince en utilisant différents systèmes de solvants, les fractions présentant des profils identiques en CCM ont été réunies. Cette étape (Tableau VI.2) s'est soldée par l'obtention de 9 fractions (Fr₁- Fr₉).

Tableau VI.2: Fractionnement de l'extrait AcOEt

Eluant colonne		Fractions	Eluant CCM	Poids en mg
H ₂ O/MeOH	80-20	Fr1	CHCl ₃ /MeOH 80/20	1525
	80-20	Fr2		99,5
	60-40	Fr3		212,2
	40-60	Fr4		227,7
	20-80	Fr5		68

MeOH	100	Fr6	CHCl ₃ /MeOH 93/7	695
	100	Fr7		782,7
	100	Fr8		304
MeOH/CHCl ₃	50-50	Fr9		232

La fraction Fr₉ (232 mg) chromatographiée sur colonne de gel de silice et éluee avec un gradient de solvants EP/CHCl₃ (100:0 à 70:30), a conduit à l'isolement du composé **AM11** (15 mg).

EP/AcOEt (80/20)



Figure VI.6 : CCM en phase normale du composé AM11

La fraction Fr₆ (695 mg) a été subdivisée en 9 sous-fractions (Fr₆₋₁-Fr₆₋₉), suite à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale éluee avec un gradient de solvants CHCl₃/MeOH (100:0 à 70:30). 10 mg du composé **AM12** ont été obtenus par précipitation de la sous-fraction Fr₆₋₉ dans MeOH.

CHCl₃/CH₃OH (80/20)



Figure VI.7 : CCM en phase normale du composé AM12

La fraction Fr₇ (780 mg) soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice et éluee dans un système EP/EtOAc (100:0 à 0:100), est subdivisée en 10 sous-fractions (Fr₇₋₁-

Fr₇₋₁₀). La sous-fraction Fr₇₋₄ (39 mg) est mise à chromatographier sur une colonne de gel de silice normale. L'élution effectuée au moyen d'un gradient de solvants EP/CHCl₃ (100:0 à 15:85) a permis d'isoler le composé **AM13** (4,3 mg).

EP/AcOEt (85/15)



Figure VI.8 : CCM en phase normale du composé AM13

VI.2.4 Composés isolés de l'espèce *Astragalus monspessulanus* L.

L'étude phytochimique des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol des parties aériennes de *Astragalus monspessulanus* L. appartenant à la famille Fabaceae connue pour sa richesse en flavonoïdes et saponines, a abouti à l'isolement et la caractérisation de 13 produits naturels constitués de sept flavonoïdes (AM1, AM2, AM3, AM4, AM5, AM6 et AM7), un lignane (AM8), deux saponosides triterpéniques à squelette oléanane (AM9 et AM10), deux phytostérols (AM11 et AM12) et un triterpénoïde (AM13). Les composés AM2, AM4, AM5, AM6, AM7 et AM8 ont été isolés pour la première fois dans le genre *Astragalus*.

VI.2.5 Constantes physiques et données spectrales des composés isolés

VI.2.4.1 Composé AM1 :

Quercétine-3-*O*-rutinoside (rutine)

Formule brute : C₂₇H₃₀O₁₆

Masse moléculaire : 610 uma

Aspect : poudre jaune verte

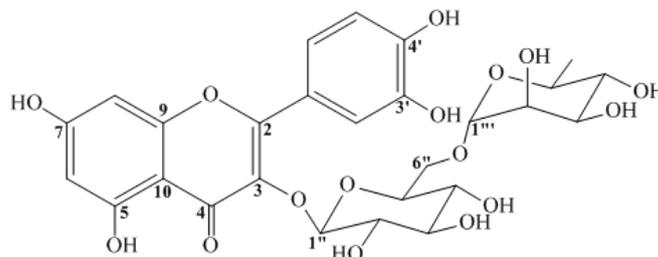
[α]_D+13,8° (*c* = 0,2 ; MeOH)

R_t = 15,300 min

MS : ESI (mode positif) *m/z* = 633 [M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans MeOD (Tableau III.1, pages 65-66)



VI.2.4.2 Composé AM2 :

Quercétine-3-*O*-(2,6- α -L-dirhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (Manghasline)

Formule brute : C₃₃H₄₀O₂₀

Masse moléculaire : 756 uma

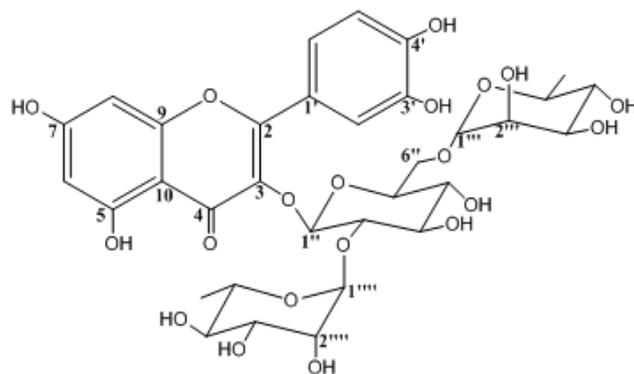
Aspect : aiguilles couleur jaune pale

R_t = 14,653 min

MS: ESI (mode positif) m/z = 779 [M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans MeOD (Tableau III.2, pages 73-74)

**VI.2.4.3 Composé AM3 :**

kaempférol-3-*O*-rutinoside (Nicotiflorine)

Formule brute : C₂₇H₃₀O₁₅

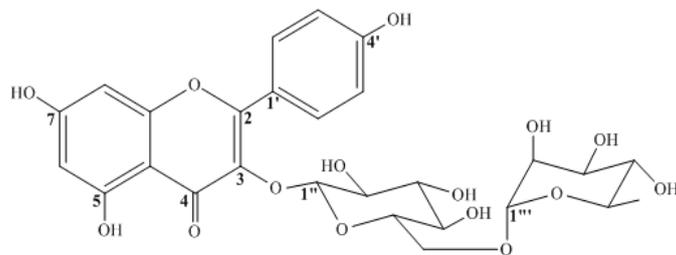
Masse moléculaire : 594 uma

Aspect : poudre jaune

MS : ESI (mode positif) m/z = 617 [M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans CH₃OD (Tableau III.3, pages 81-82)



VI.2.4.4 Composé AM4 : kaempférol 3-*O*-(4- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside

Formule brute : C₂₇H₃₀O₁₅

Masse moléculaire : 594 uma

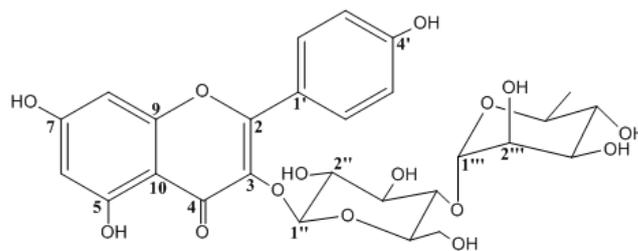
Aspect : poudre jaune

R_t = 16,623 min

MS : ESI (mode positif) m/z = 617 [M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans CH₃OD (Tableau III.4, page 87)

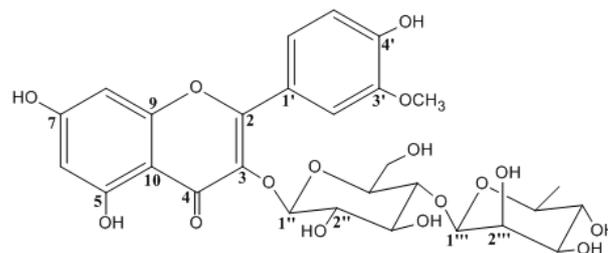
**VI.2.4.5 Composé AM5 :**

Isorhamnétine 3-*O*-(4- α -L-rhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside (Calendoside III)

Formule brute : C₂₈H₃₂O₁₆

Masse moléculaire: 624 uma

Aspect : poudre jaune



MS : ESI (mode positif) $m/z = 647 [M+Na]^+$
 RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz)
 dans CH_3OD (Tableau III.5, page 95)

VI.2.4.6 Composé AM6 :

3', 5'-di-C- β -D-glucopyranosylphlorétine

Formule brute : $C_{27}H_{34}O_{15}$

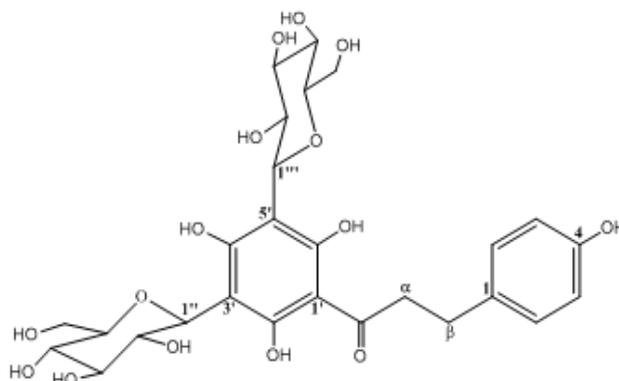
Masse moléculaire : 598 uma

Aspect : poudre jaune

$[\alpha]_D +83,6^\circ$ ($c = 1,0$; MeOH)

$R_t = 14,230$ min

MS : ESI (mode positif) $m/z = 621,2 [M+Na]^+$
 RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz)
 dans MeOD (Tableau III.6, page 103)



VI.2.4.7 Composés AM7 et AM7' :

Hovetrichoside C

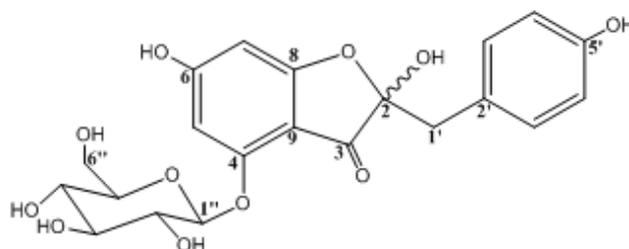
Formule brute : $C_{21}H_{22}O_{11}$

Masse moléculaire : 450 uma

Aspect : poudre amorphe

$[\alpha]_D -54,3^\circ$ ($c = 1,8$; MeOH)

MS : ESI (mode positif) $m/z = 473 [M+Na]^+$
 RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz)
 dans $DMSO-d_6$ (Tableau III.7, page 111)



VI.2.4.8 Composé AM8 :

Isolaricirésinol 9'-O- β -D-glucopyranoside

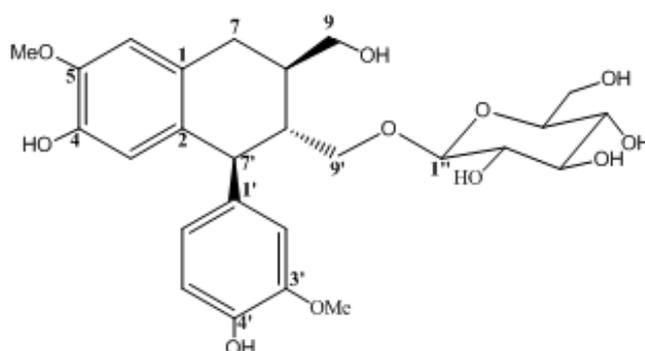
Formule brute : $C_{26}H_{34}O_{11}$

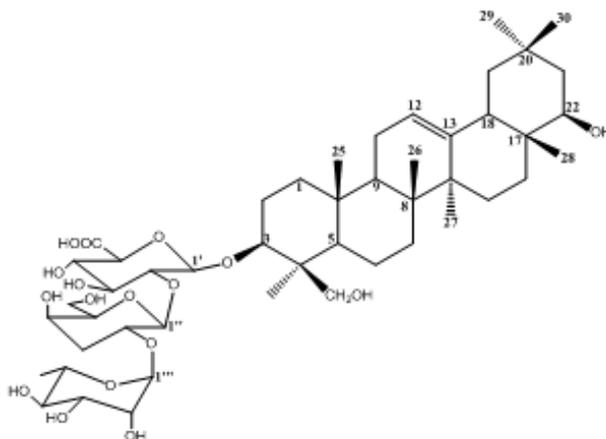
Masse moléculaire : 522 uma

Aspect : poudre blanche

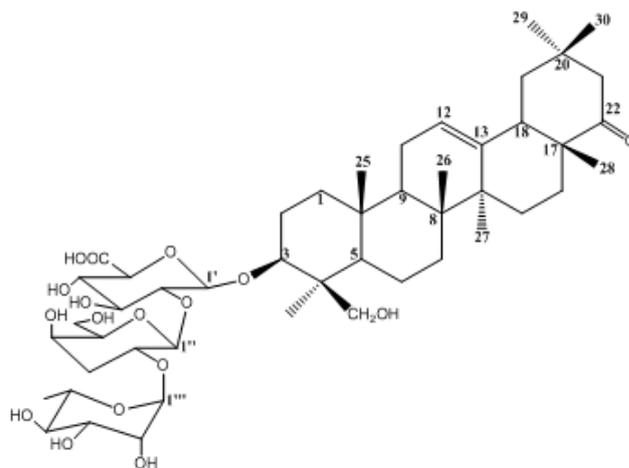
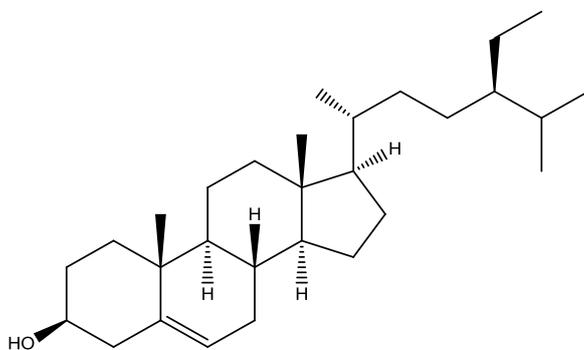
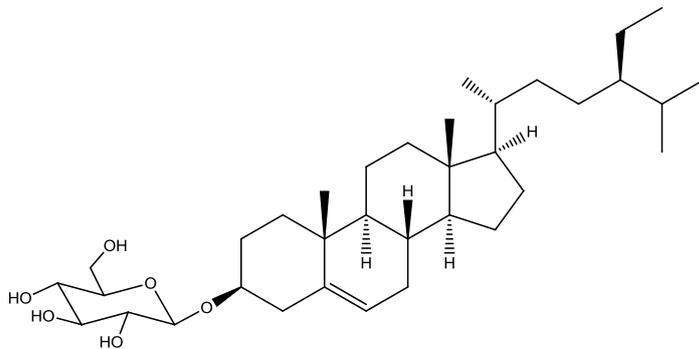
$[\alpha]_D^{20} +47,6^\circ$ ($c = 0,04$; MeOH)

MS : ESI (mode positif) $m/z = 545,3 [M+Na]^+$
 RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz)
 dans $DMSO-d_6$ (Tableau III.8, pages 123-124)



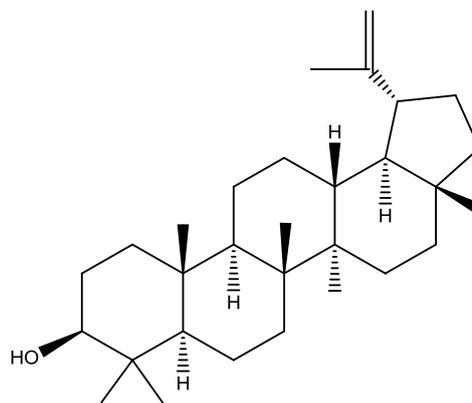
VI.2.4.9 Composé AM9 : Soyasaponine I**Formule brute** : C₄₈H₇₈O₁₈**Masse moléculaire** : 942 uma**Aspect** : poudre blanche**[α]_D^{-3,3°}** (*c* = 0,36 ; MeOH)**MS** : ESI (mode positif) *m/z* = 965 [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)
dans CH₃OD (Tableau III.9, pages 135-136)**VI.2.4.10 Composé AM10 :**

Déhydrosoyasaponine I

Formule brute : C₄₈H₇₆O₁₈**Aspect** : poudre blanche**Masse moléculaire** : 940 uma**[α]_D^{-15,2°}** (*c* = 0,23 ; MeOH)**MS** : ESI (mode positif) *m/z* = 963 [M+Na]⁺RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz)
dans CD₃OD (Tableau III.10, pages 139-140)**VI.2.4.11 Composé AM11 : β-sitostérol****Formule brute** : C₂₉H₅₀O**Masse moléculaire** : 414uma**Aspect** : poudre blanche**[α]_D^{-30°}** (*c* = 0,8 ; CHCl₃)**MS** : ESI (mode positif) *m/z* = 437 [M+Na]⁺**VI.2.4.12 Composé AM12 :**β-sitostérol-3-*O*-glucoside (Daucostérol)**Formule brute** : C₃₅H₆₀O₆**Masse moléculaire** : 576 uma**Aspect** : poudre blanche**[α]_D^{-41,5°}** (*c* = 0,4 ; MeOH)**MS** : ESI (mode positif) *m/z* = 599 [M+Na]⁺

VI.2.4.13 Composé AM13 :

Lup-20(29)-èn-3-ol (Lupéol)

Formule brute : C₃₀H₅₀O**Masse moléculaire :** 426 uma**Aspect :** poudre blanche**[α]_D** +26,4° (*c* = 0,4 ; CHCl₃)**MS :** ESI (mode positif) *m/z* = 449 [M+Na]⁺**VI.3 Etude phytochimique de l'espèce *Hedysarum carnosum* Desf.****VI.3.1 Extraction**

La plante entière (1500 g) de *Hedysarum carnosum* réduite en poudre est soumise à une double macération dans un mélange MeOH/H₂O à 80% (2 x 15 litres) pendant 72 h à la température ambiante. Après filtration et évaporation du solvant, la phase aqueuse résultante (500 ml) subit une extraction liquide-liquide, par EP (150 ml, 5 fois) puis AcOEt (150 ml, 5 fois) et enfin le *n*-BuOH (150 ml, 5 fois). L'évaporation à sec des solutions organiques a permis de recueillir les masses suivantes: 7 g pour l'extrait éthéro-pétrolique, 5 g pour l'extrait acétate d'éthyle et 30 g pour l'extrait butanolique. Les CCM effectuées sur les trois extraits dans plusieurs systèmes de solvants révèlent la richesse de l'extrait acétate d'éthyle en produits.

VI.3.2 Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle

5 g de l'extrait acétate d'éthyle de la plante entière *Hedysarum carnosum* ont été soumis à une chromatographie liquide sous vide (CLV), en utilisant comme phase stationnaire le gel de silice normale. L'élution est réalisée initialement par le chloroforme dont on augmente la polarité par addition de méthanol (100:0 à 0:100). A l'issue de ce fractionnement, 10 fractions ont été recueillies (F1-F10). Le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de cette plante est présenté dans le tableau VI.3.

Tableau VI.3: Fractionnement de l'extrait AcOEt

Eluant colonne		Fractions	Eluant CCM	Poids en mg
	100	Fr1	CHCl ₃ /MeOH 98/2	18,6
	100	Fr2		303,2
	99-1	Fr3		148,1
	99-1	Fr4		228,8

CHCl ₃ /MeOH	97-3	Fr5	CHCl ₃ /MeOH 9/1	397,8
	95-5	Fr6		884,7
	93-7	Fr7		417,1
	90-10	Fr8		345,7
	80-20	Fr9		1399,1
MeOH	100	Fr10		391,6

Les fractions Fr₂ et Fr₃ rassemblées (450 mg) ont subi une chromatographie sur une colonne de gel de silice en phase normale dans le mélange EP/CHCl₃ (100:0 à 0:100), pour donner 10 sous fractions (Fr_{2.1} à Fr_{2.10}).

La sous-fraction Fr_{2.9} (144 mg) a subi une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 dans CHCl₃, conduisant à 7 sous fractions (F_{2.9.1} à F_{2.9.7}).

La purification de la sous fraction F_{2.9.4} (40 mg) est initiée par CLMP éluee par un gradient de solvants CH₂Cl₂/CH₃OH (100:0, 95:05, 80:20), suivie d'une repurification par CLHP préparative au moyen d'un système de solvants ACN/H₂O (20/80, 55/45, 100/00), ce qui a conduit au produit **HC1** (4,7 mg).

La purification de la sous-fraction Fr_{2.9.6} (33 mg) sur plaque préparative de silice normale dans un mélange CHCl₃/MeOH (97/3), a abouti à l'isolement de **HC4** (2 mg) obtenu pur et HC6 (2,7 mg). Ce dernier a subi une ultime purification par CLHP au moyen d'un gradient de solvants ACN/H₂O (10/90, 75/25, 100/00) produisant le composé **HC11** (1 mg).

CHCl₃/CH₃OH (90:10)



Figure VI.9 : CCM en phase normale du composé HC4

La purification de la sous-fraction Fr_{2.9.5} (50 mg) par CLHP préparative éluee par un gradient de solvants ACN/H₂O (10:90, 80:20, 100:00), a permis d'obtenir 3 produits: **HC5** (1 mg), **HC6** (1 mg) et **HC8** (1,8 mg).

La sous-fraction Fr_{2.13} (149,5 mg) a subi une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 éluée par CHCl₃, conduisant à 5 sous fractions (F_{2.13.1} à F_{2.13.5}).

La sous fraction F_{2.13.3} (121,4 mg) a été soumise à une flash silice éluée par un couple de solvants CH₂Cl₂/CH₃OH (100:00, 80:20, 00:100), puis purifiée par CLHP préparative éluée par un système de solvants ACN/H₂O (10:90, 63:37, 100:00, 10:90), aboutissant au produit **HC7** (4 mg). Une fraction isolée de la flashe silice a été purifiée par CLHP préparative éluée par un gradient de solvants ACN/H₂O (25:75, 72:28, 100:00, 25 :75), permettant à l'isolement du composé **HC12** (1 mg).

Les fractions Fr₄ et Fr₅ réunies (626 mg) sont chromatographiées sur une colonne de gel de silice normale. L'élution menée dans un mélange CH₂Cl₂/Acétone (100:0 à 0:100), a permis de collecter 12 sous-fractions (Fr_{4.1} à Fr_{4.12}).

La purification de la sous-fraction Fr_{4.8} (112 mg) est initiée par une CLMP éluée par un gradient de solvants CH₂Cl₂/CH₃OH (100:0, 95:05, 80:20), suivie d'une repurification par CLHP préparative au moyen d'un gradient de solvants ACN/H₂O (20/80, 55/45, 100/00). Les produits obtenus ont été purifiés sur CCM préparative, en utilisant le couple CH₂Cl₂/MeOH (80:20), ce qui a abouti à l'isolement du composé **HC2** (1 mg).

CH₂Cl₂/CH₃OH (95:5)



Figure VI.10 : CCM en phase normale du composé HC2

La sous-fraction Fr_{4.10} (80 mg) a subi une chromatographie sur flash silice éluée par un couple de solvants CH₂Cl₂/CH₃OH (100:00, 80:20, 00:100), puis une repurification par CLHP préparative. L'élution menée dans un mélange ACN/H₂O (10:90, 75:25, 100:0), a permis d'isoler le composé **HC10** (1 mg).

La fraction Fr₆ (884 mg) est mise à chromatographier sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution est réalisée par le mélange CHCl₃/MeOH (100:0 à 95:5). Les

fractions recueillies sont rassemblées selon l'analyse CCM en phase normale (éluant: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 95/5), donnant 12 sous fractions (Fr_{6.1} à Fr_{6.12}).

La sous fraction Fr_{6.7} (91,4 mg) soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale éluée par un système de solvants EP/Acétone (100:0 à 85:15), a permis d'obtenir 10 sous fractions (Fr_{6.7.1} à Fr_{6.7.10}). La sous fraction F_{6.7.10} (9 mg) soumise à une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 dans AcOEt, a permis d'obtenir le composé **HC3** (2 mg) à l'état pur.

$\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (90:10)



Figure VI.11 : CCM en phase normale du composé HC3

La sous fraction Fr_{6.9} (225 mg) a été fractionnée sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'éluion réalisée dans un système de solvants EP/AcOEt (10:90 à 50:50), a conduit à 7 sous fractions (Fr_{6.9.1} à Fr_{6.9.7}). La précipitation de la sous fraction Fr_{6.9.2} (13,5 mg) dans l'éther diéthylique, a donné le composé **HC9** (3,2 mg).

$\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:20)



Figure VI.12 : CCM en phase inverse du composé HC9

VI.3.3 Composés isolés de l'espèce *Hedysarum carnosum* DESF.

VI.3.3.1 Composé HC1 :

(-)-5'-Méthoxysativane

Formule brute : C₁₈H₂₀O₅

Masse moléculaire : 316 uma

[α]_D -10,5° (*c* = 0,40 g/100 ml ; MeOH)

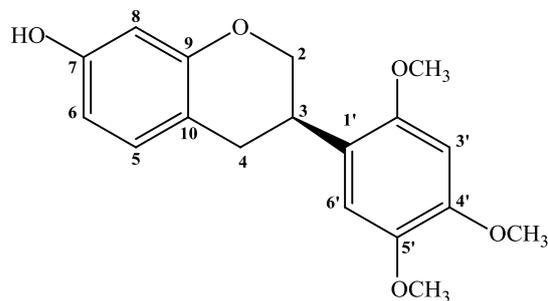
R_t = 23,607 min

MS : ESI (mode positif) *m/z* = 338,9 [M+Na]⁺

m/z = 655,0 [2M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans DMSO-*d*₆ (Tableau IV.1, page 151)



VI.3.3.2 Composé HC2 : (-)-Vestitol

Formule brute : C₁₆H₁₆O₄

Masse moléculaire : 272 uma

Aspect : granulés colorés

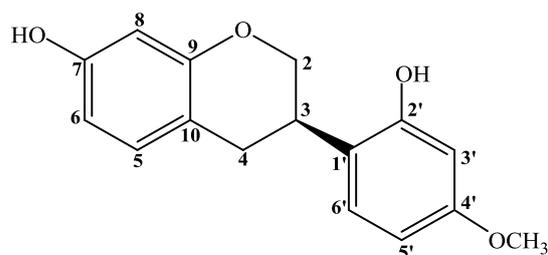
[α]_D -20,6° (*c* = 0,58 ; MeOH)

Point de fusion : 156°C

MS : ESI (mode négatif) *m/z* = 271,1 [M-H]⁻

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans DMSO-*d*₆ (Tableau IV.2, page 157)



VI.3.3.3 Composé HC3 : 7,4'-dihydroxy-3'-méthoxyisoflavane (3'-méthoxydaïdzéine)

Formule brute: C₁₆H₁₂O₅

Masse moléculaire: 284 uma

Aspect : aiguilles couleur jaune pale

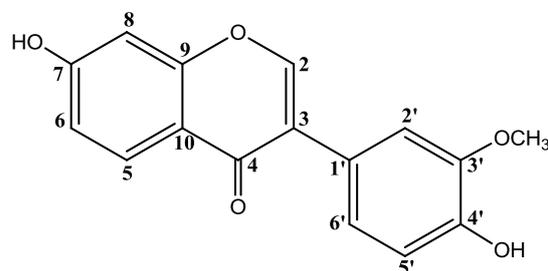
Point de fusion : 250-252°

MS : ESI (mode positif) *m/z* = 306,8 [M+Na]⁺

m/z = 284,8 [M+H]⁺

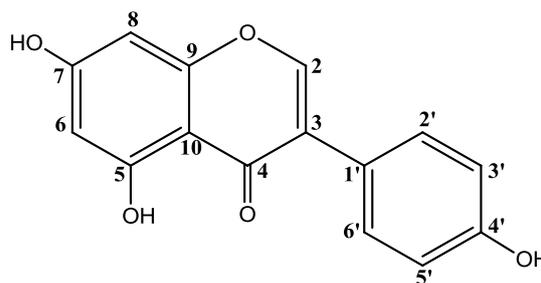
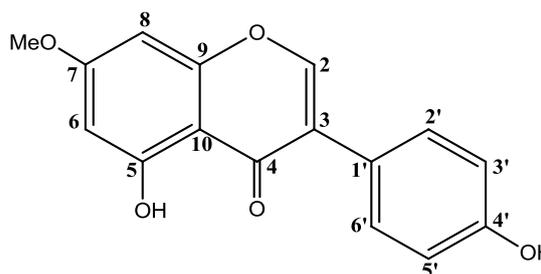
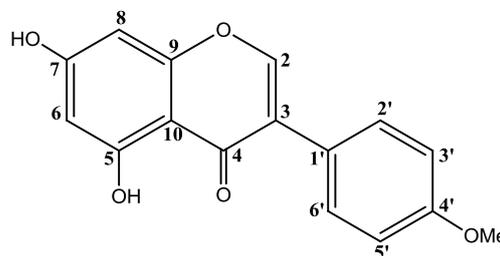
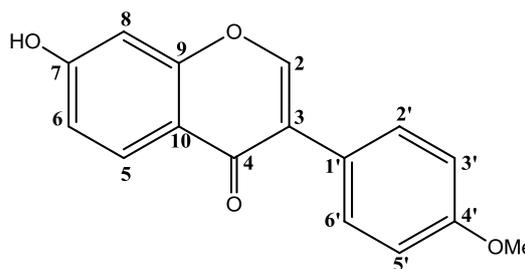
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

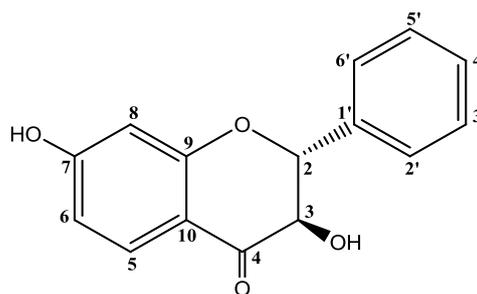
dans DMSO (Tableau IV.3, page 161)



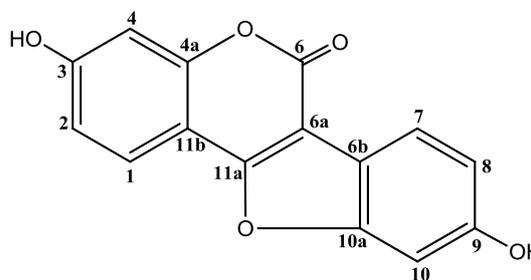
VI.3.3.4 Composé HC4 : Genistéine**Formule brute** : C₁₅H₁₀O₅**Masse moléculaire** : 270 uma**MS** : ESI (mode positif) $m/z = 292,8$ [M+Na]⁺ $m/z = 270,8$ [M+H]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans DMSO (Tableau IV.4, page 164)

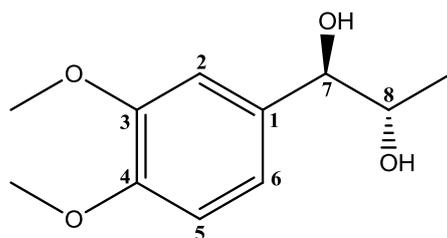
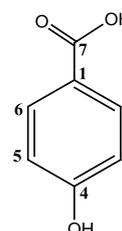
**VI.3.3.5 Composé HC5 : Prunétine****Formule brute** : C₁₆H₁₂O₅**Masse moléculaire** : 284 uma**Aspect** : aiguilles de couleur jaune pale**Point de fusion** : 238-239°C**R_t** = 9,280 min**MS** : ESI (mode positif) $m/z = 306,8$ [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)dans DMSO-*d*₆ (Tableau IV.5, page 168)**VI.3.3.6 Composé HC6 : 5,7-dihydroxy-4'-méthoxy-isoflavone (Biochanine A)****Formule brute** : C₁₆H₁₂O₅**Masse moléculaire** : 284 uma**Aspect** : aiguilles incolores**Point de fusion** : 215-216°C**R_t** = 9,729 min**MS** : ESI (mode positif) $m/z = 306,8$ [M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)dans DMSO-*d*₆ (Tableau IV.6, page 171)**VI.3.3.7 Composé HC7 : Formononétine****Formule brute** : C₁₆H₁₂O₄**Masse moléculaire** : 268 uma**R_t** = 7,970 min**MS** : ESI (mode positif) $m/z = 558,9$ [2M+Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)dans DMSO-*d*₆ (Tableau IV.7, page 174)

VI.3.3.8 Composé HC8 :(2*R*,3*R*)-3,7-dihydroxyflavanone**Formule brute :** C₁₅H₁₂O₄**Masse moléculaire :** 256 uma**[α]_D** -8,3° (*c* = 0,1 ; MeOH)**R_t** = 6,546 min**MS :** ESI (mode positif) *m/z* = 278,8 [M+Na]⁺(mode négatif) *m/z* = 254,5 [M-H]⁻RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)dans DMSO-*d*₆ (Tableau IV.8, page 180)**VI.3.3.9 Composé HC9 :**

3,9 dihydroxycoumestane (coumestrol)

Formule brute : C₁₅H₈O₅**Masse moléculaire :** 268 uma**Aspect :** solide jaune**MS :** ESI (mode positif) *m/z* = 268,8 [M+H]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)dans DMSO-*d*₆ (Tableau IV.9, page 184)**VI.3.3.10 Composé HC10 :** *Erythro*-1-(3,4-

diméthoxy phenyl) propane-1,2-diol

Formule brute : C₁₁H₁₆O₄**Masse moléculaire :** 212 uma**[α]_D** -36,0° (*c* = 0,04 ; MeOH)**R_t** = 1,816 min**MS :** ESI (mode positif) *m/z* = 234,8 [M+Na]⁺(mode négatif) *m/z* = 210,4 [M-H]⁻RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)dans DMSO-*d*₆ (Tableau IV.10, page 189)**VI.3.3.11 Composé HC11 :**Acide *p*-hydroxybenzoïque**Formule brute :** C₇H₆O₃**Masse moléculaire :** 138 uma**Aspect :** poudre blanche

$R_t = 3,063$ min

MS : ESI (mode positif) $m/z = 176,7$ $[M+K]^+$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz)

dans DMSO- d_6 (Tableau IV.11, page 191)

VI.3.3.13 Composé HC12 : (+)-pinorésinol

Formule brute : $C_{20}H_{22}O_6$

Masse moléculaire : 358 uma

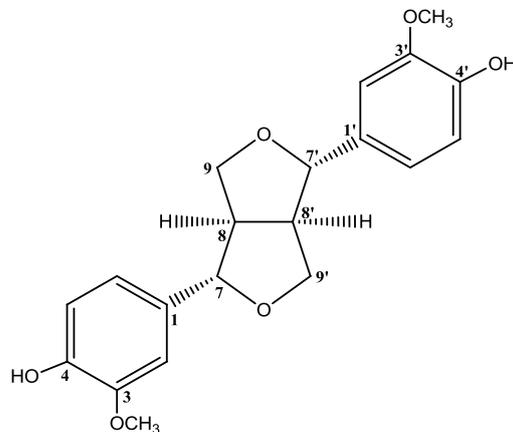
$[\alpha]_D +56,0^\circ$ ($c = 0,02$; MeOH)

$R_t = 5,694$ min

MS : ESI (mode positif) $m/z = 380,9$ $[M+Na]^+$

RMN 1H (500 MHz) et RMN ^{13}C (125 MHz)

dans DMSO- d_6 (Tableau IV.12, pages 196-197)



Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Waridel P., (2003). Investigation phytochimique des plantes aquatiques *Potamogeton pectinatus* L., *P. lucens* L., *P. perfoliatus* L. et *P. crispus* L. (Potamogetonaceae). Thèse de doctorat, Lausanne.
- [2] Gurib-Fakim A., (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 1-93.
- [3] Muanda N. F., Koné D., Dicko A., (2009). Phytochemical composition and antioxydant capacity of three malian medecinal plant parts, 3, 147–160.
- [4] Dupont F., Guignard G. L., (2007). Abrèges botanique systématique moléculaire. 14^{ème} édition révisée, Masson.
- [5] Ozenda, P., (1991). Flore et végétation du Sahara. In: CNRS (2^{ème} Ed.), Paris, France.
- [6] Fernand W., (1967). Fleurs du bassin méditerranéen. Paris VI éd.
- [7] Lewis G. P., Schrire B. D., Mackinder B. A., Rico L., Clark R., (2013). A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context: A tool for collections management and taxon sampling. *S. African J. Bot*, 89, 76–84.
- [8] Polhill R. M., Raven P. H., Stirton C. H., (1981). Evolution and systematic of Leguminous. In: *Advances in legume Systematics*.
- [9] Graham P. H., Vance C. P., (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol*. 131, 872–877.
- [10] Patriarca E. J, Tatè R., Ferraioli S., Iaccarino M., (2004). Organogenesis of legume root nodules. *Int Rev Cytol*, 234, 201–262.
- [11] Stacey G., Libault M., Brechenmacher L., Wan J., May G. D., (2006). Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol.*, 9, 110–121.
- [12] Wathman F., (1967). Fleurs du bassin méditerranéen. Paris VI édition.
- [13] Abdelguerfi A., Chapot J. Y., Conesa A. P., (1988a). Contribution à l'étude de la répartition des luzernes spontanées en Algérie, selon certains facteurs du milieu. *Fourrages*, 113, 89–106.
- [14] Abdelguerfi A., Chapot J. Y., Conesa A. P., Roseau R., (1988b). Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Medicago* en Algérie. I. Répartition des espèces en fonction des facteurs du milieu. *Ann. Insf. Naf. Agron*. El Harrach, 12, 304–328.
- [15] Abdelguerfi A., Guittonneau G. G., (1989). Morphologie, écologie et répartition de *Medicago heferocarpa* Spach (*M. lesinsii* Small) en Algérie, espèce méditerranéenne du complexe *M. murex* Willd. *Candollea*, 44, 422–433.
- [16] Bensalem K., Abdelguerfi A., Abdelguerfi-Berrekia R., (1988). Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Scorpiurus* L. en Algérie. I. Répartition des espèces en fonction des facteurs du milieu. *Ann. Inst. Nat. Agron*. El Harrach, 12, 219–303.

- [17] Bensalem K., Abdelguerfi A., Abdelguerfi-Berrekia R., (1990). Relations du genre *Scorpiurus* L. avec certains facteurs du milieu en Algérie. *Fourrages*, 124, 407–419.
- [18] Abdelguerfi-Berrekia R., Abdelguerfi A., Bounaga N., Guittonneau G. G., (1988). Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Hedysarum* L. en Algérie. *Ann. Insf. Nat Agron.* El Harrach, 12, 191–219
- [19] Abdelguerfi-Berrekia R., Abdelguerfi A., Bounaga N., Guittonneau G. G., (1991). Répartition des espèces spontanées du genre *Hedysarum* selon certains facteurs du milieu en Algérie. *Fourrages*, 126, 187–207.
- [20] James L. F., Hartely W. J., Van Kampen K. R., (1981). Syndromes of *Astragalus* poisoning in livestock. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 178, 146–150.
- [21] Lock j., Simpson k., (1991). Legumes of West Asia, a Check-List. Royal Botanic Gardens, Kew, p. 263.
- [22] Podlech D., (2008). The genus *Astragalus* L. (Fabaceae) in Europe with exclusion of the former Soviet Union. *Feddes Repertor*, 119, 310–387.
- [23] Pistelli L., Giachi I., Lepori E., Bertoli A., (2003). Further saponins and flavonoids from *Astragalus verrucosus* Moris. *Pharm. Biol.*, 41, 568–572.
- [24] Braktov V., Kondeva-burdina M., Simeonova R., Tzankova V., Krasteva I., (2014). Phytochemical evaluation and effect of saponins' mixture isolated from *Astragalus monspessulanus* on HepG2 Cell line. *European Journal of Medicinal Plants*, 4, 522–527.
- [25] Maasoumi A. A., (1998). Old World Check-List of *Astragalus*. Research Institute of Forests and Rangelands, Tehran: 1–617.
- [26] Ghahremaninejad F., (2004a). Value of trichome characteristics for the separation of bifurcating hairy *Astragalus* L. (Fabaceae) at the sectional level. *Turkish Journal of Botany*, 28, 241–245.
- [27] Ghahremaninejad F., Bagheri A., (2009). *Astragalus andabadensis* (Fabaceae), a new species of *Astragalus* sect. *Incani* from Zanjan province, Iran. *Iranian Journal of Botany*, 15, 175–177.
- [28] Chamberlain D. F., Matthews V. A., (1969). *Astragalus* L. In: Davis, P.H. (ed.), *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, 3, 49–254.
- [29] Akan H., Civelek S., (2001). *Astragalus aytatchii* (Fabaceae), a new species from Anatolia, Turkey. *Ann. Bot. Fenn.*, 38, 167–170.
- [30] Duman H., Aka H., (2003). New Species of *Astragalus* (sect. *Alpecuroidei*: Leguminosae) from Turkey. *Bot. J. Linn. Soc.*, 143, 201–205.
- [31] Rios L. J., Waterman G. P., (1997). A review of the pharmacology and toxicology of *Astragalus*. *Phytotherapy Res.*, 11, 411–418.
- [32] Elmellouli F., (2001). Contribution à l'étude des plantes médicinales, toxiques et pastorales de la région de El Heri (Province de Khenifra). Thèse Doctorat. Vét. IAV Hassan II - Rabat - Maroc.

- [33] Kabta M., (1990). Les plantes toxiques et les intoxications qu'elles provoquent dans le Maroc pré désertique et désertique. Thèse Doctorat. Vet. E. N. V. Toulouse.
- [34] Mzibra M., (1999). Contribution à l'étude des plantes toxiques dans la région d'Azrou. Thèse Doctorat. Vét., IAV. Hassan II, Rabat Maroc.
- [35] Sader R., (1994). Contribution à l'étude des principales plantes toxiques chez les animaux domestiques dans le Maroc oriental. Thèse Doctorat. Vét., IAV. Hassan II. Rabat - Maroc.
- [36] James L. F., Hartely W. J., Van Kampen K. R., (1981). Syndromes of *Astragalus* poisoning in livestock. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 178, 146–150.
- [37] James L. F., (1972). a) Effect of locoweed on fetal development, preliminary study in sheep. *Am. J. Vet. Res.*, 33, 835–840.
- [38] Marsk C. D., (1908). The locoweed disease of the plains. Bureau of plant industry. *Us. Dept. agric. Bull.*, 121, 37–40.
- [39] Marsk C. D., Clawson A. B., (1920). *Astragalus tetrapterus*, a new poisonous plant of Utah and Nevada. *Us. Dept. Agric. Circ.*, 81, 86–89.
- [40] El Hamidi M., Leipold H. W., (1989). Poisoning of sheep by *Astragalus lusitanicus* in Morocco. Field and experimental studies. *J. Vet. Med. Assoc.*, 36, 115–121.
- [41] Nielson D. B., (1978). The economic impact of poisonous plants on the range livestock industry in the 17 western states. *J. Range Mana*, 31, 325–328.
- [42] James L. F., Shupe J. L., (1986). Selenium accumulators. In current Veterinary Therapy, Food animal practice 2 (Edited By Howard J.L.). Philadelphia, USA, WB Saunders, p. 394.
- [43] Williams M. C., (1981). Nitro-compound in foreign species of *Astragalus*. *Weed. Sci.*, 29, 261–269.
- [44] Essamadi K., (1992). *Astragalus lusitanicus*: contribution à l'étude des propriétés toxicologiques et du principe toxique. Thèse Doctorat Es-Sciences. Spécialité Biochimie. Faculté des Sciences - Rabat - Maroc.
- [45] Tarazona J. V., Sanz F., (1987). Aliphatic nitro compounds in *Astragalus lusitanicus* Lam. *Vet. Hum. Toxicol.*, 29, 437–439.
- [46] Tarazona J. V., Sanz F., (1989). Toxicity of fractions obtained from the legume species *Astragalus lusitanicus* Lam. *Toxican*, 28, 235–237.
- [47] Rodriguez F. S., Roman A. G., Salvego M. R. M., Miranda F. I., (1990). Effect of *Astragalus lusitanicus* Lam. In experimental subchronic neurotoxicity of lambs. *Vet. Hum. Toxicol.*, 32, 551–554.
- [48] Abdennebi E. H., Ouazzani N., Lamnaouer D., (1998). Clinical and analytical studies of sheep dosed with various preparations of *Astragalus lusitanicus*. *Vet. Hum. Toxicol.*, 40, 327–331.
- [49] Abdennebi E. H., Lamnaouer D., (1999). Investigations on the toxic principle of *Astragalus lusitanicus* Lam. *Actes Inst. Agron. Vet.*, 19, 205–210.

- [50] Bellekhdar J., (1997). La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, Ibis Press.
- [51] Avunduk S., Mitaine-Offer A. C., Alankus-Caliskan O., Miyamoto T., Senol S. G., Lacaille-Dubois M. A., (2008). Triterpene glycosides from the roots of *Astragalus flavescens*. *J. Nat. Prod.*, 71, 141–145.
- [52] Choudhary M. I., Jan S., Abbaskhan A., Musharraf S. G., Samreen, Sattar S. A., Atta-ur-Rahman., (2008). Cycloartane triterpenoids from *Astragalus bicuspic*. *J. Nat. Prod.*, 71, 1557–1560.
- [53] Tang W., Eisenbrand G., (1992). Chinese drugs of plant origin; Springer-Verlag Ed.: 191–197.
- [54] Lev E., (2002). Reconstructed materia of the Medieval and Ottoman Al-sham. *J. Ethnopharmacol.*, 80, 167–179.
- [55] Cakilcioğlu U., Türkoğlu I., (2010). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazığ-Turkey). *J. Ethnopharmacol.*, 132, 165–175.
- [56] Fathiazad F., Khosropanah M. K., Movafeghi A., (2010). Cycloartane-type glycosides from the roots of *Astragalus caspicus* Bieb. *Nat. Prod. Res.* 24, 1069–1078.
- [57] Iserin P., (2001). Encyclopédie des plantes médicinales, identification, préparation, soins. Edition Larousse/VUEF, Paris, pp 68.
- [58] Linnek J., Mitaine-Offer A. C., Miyamoto T., Tanaka C., Paululat, T., Avunduk, S., Alankus-Caliskan O., Lacaille-Dubois M. A., (2011). Cycloartane glycosides from three species of *Astragalus* (Fabaceae). *Helv. Chim. Acta.*, 94, 230–237.
- [59] Verotta L., El-Sebakhy N. A., (2001). Studies in natural products chemistry. *Bioactive Natural Products*, 25, 179–234.
- [60] Allam R. M., Selim D. A., Ghoneim A. I., Radwan M. M., Nofal S. M., Khalifa A. E., Sharaf O. A., Toaima S. M., Asaad A. M., El-Sebakhy N. A., (2013). Hepatoprotective effects of *Astragalus kahiricus* root extract against ethanol-induced liver apoptosis in rats. *Chin J Nat Med.*, 11, 354–61.
- [61] Semmar N., Fenet B., Lacaille-Dubois M. A., Gluchoff-Fiasson K., Chemli R., Jay M., (2001). Two new glycosides from *Astragalus caprinus*. *J. Nat. Prod.*, 64, 656–658.
- [62] El Rhaffari L., Zaid A., (2002). Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet) : Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Des sources du savoir aux médicaments du futur, in : 4^{ème} Colloque Européen d’Ethnopharmacologie, 1, 293–318.
- [63] Yesilada E., Bedir E., Çalış I., Takaishi Y., Ohmoto Y., (2005). Effects of triterpene saponins from *Astragalus*. Species on *in vitro* cytokine release. *J. Ethnopharmacol.*, 96, 71–77.
- [64] Çalış İ., Yürüker A., Tas-demir D., Wright A. D., Sticher O., Luo Y. D., Pezzuto J. M., (1997). Cycloartane triterpene glycosides from the roots of *Astragalus melanophrurius*. *Planta Med.*, 63, 183–186.
- [65] Bedir E., Pugh N., Çalış İ., Pasco D. S., Khan I. A., (2000). Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus* species. *Biol. Pharm. Bull.*, 23, 834–837.
- [66] Polat E., Alankuş-Çalışkan Ö., Perrone A., Piacente S., Bedir E., (2009). Cycloartane type glycosides from *Astragalus amblolapis*. *Phytochemistry*, 70, 628–634.

- [67] Simee D. F., Verbiscar A. J., (1995). Effects of plant derived polysaccharides and toxicology of *Astragalus*. *Phytother. Res*, 11, 411–418.
- [68] Liu X., Wang M., Wu H., Zhao X., Li H., (1994). Isolation of astragalin and its immunological activities. *Nat. Prod. Res. Dev.*, 6, 23–31.
- [69] Yeşilada E., Bedir E., Çalış İ., Takaishi Y., Ohmoto Y., (2005). Effects of triterpene saponins from *Astragalus* species on *in vitro* cytokine release. *J. Ethnopharmacol.*, 96, 71–77.
- [70] Özipek M., Dönmez A. A., Çalış İ., Brun R., Rüedi P., Tasdemir D., (2005). Leishmanicidal cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus oleifolius*. *Phytochemistry*, 66, 1168–1173.
- [71] Isaev M. I., Gorovits M. B., Abubakirov, N. K., (1989). Progress in the chemistry of the cycloartanes. *Khim. Prir. Soedin*, 25, 131–147.
- [72] Gariboldi P., Verotta L., Nicasastro G., Tatò M., El-Sebakhy N. A., Asaad A. M., Abdallah R. M., Toaima S. M., (1995). Cycloartane triterpene glycosides from *Astragalus trigonus*. *Phytochemistry*, 40, 1755–1760.
- [73] Radwan M. M., El-Sebakhy N. A., Asaad A. M., Toaima S. M., Kingston D. G. I., (2004). Kahircosides II-V, Cycloartane Glycosides from an Egyptian Collection of *Astragalus kahiricus*. *Phytochemistry*, 65, 2909–2913.
- [74] Khushbraktova Z. A., Agzamova M. A., Syrov N. V., Radchenko N. V., Mirsalikhova N. M., Umarova F. T., (1994). Influence of cycloartanes from plants of the genus *Astragalus* and their synthetic analogs on the contractive function of the myocardium and the activity of Na, K-ATPase, *Khim. Prir. Soedin.*, 4, 510–514.
- [75] Nalbantsoy A., Nesil T., Erden S., Çalış İ., Bedir E., (2011). Adjuvant effects of *Astragalus* saponins macrophyllsaponin B and astragaloside VII. *J. Ethnopharmacol.*, 134, 897–903.
- [76] Sevimli-Gür C., Onbaşlar İ., Atilla P., Genç R., Çakar N., Deliloğlu-Gürhan İ., Bedir E., (2011). In vitro growth stimulatory and in vivo wound healing studies on cycloartane-type saponins of *Astragalus* genus. *J. Ethnopharmacol.*, 134, 844–850.
- [77] Jia C., ya L., Li-Qiong Y., Yan-Zhong L., Zhi-Biao N., Kun G., (2012). Biological activities of flavonoids from pathogenic-infected *Astragalus adsurgens*. *Food Chemistry*, 131, 546–551.
- [78] Williams M. C., (1981). Nitro compounds in foreign species of *Astragalus*. *Weed Sci.*, 9, 261–269.
- [79] Ibrahim L. F., Marzouk M. M., Hussein S. R., Kawashty S. A., Mahmoud K., Saleh N. A. M., (2013). Flavonoid constituents and biological screening of *Astragalus bombycinus* Boiss. *Nat. Prod. Res.*, 27, 386–393.
- [80] Motta F., (1962). In *Nel mondo della Natura-Encyclopedia di Scienze Naturali*; Motta. F. Ed., p. 222–224.
- [81] Çalış İ., Sticher O., (1996). Triterpene saponins from plants of the flora of Turkey. In: Waller, C. R., Yamasaki, K. (Eds.), *Saponins used in traditional medicine advances in experimental medicine and biology*. Plenum, New York, 404, 485–500.

- [82] El-Hawiet A. M., Toaima S. M., Asaad A. M., Radwan M. M., El-Sebakhy N. A., (2010). Chemical constituents from *Astragalus annularis* Forssk. and *A. trimestris* L., Fabaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20, 860–865.
- [83] Benchadi W., Haba H., Lavaud C., Harakat D., Benkhaled M., (2013). Secondary Metabolites of *Astragalus cruciatus* Link. and their chemotaxonomic significance. *Rec. Nat. Prod.*, 7, 105–113.
- [84] Krasteva I., Nikolov S., (2008). Flavonoids in *Astragalus corniculatus* *Quim. Nova*, 31, 59–60.
- [85] Guzhva N. N., (2010). Flavonoids and hydroxycinnamic acids from *Astragalus asper*. *Chem. Nat. Compd.*, 46, 303–304.
- [86] Yahara S., Kihyouma M., Kohoda H., (2000). Flavonoid glycosides and saponins from *Astragalus shikokianus*. *Phytochemistry*, 53, 469–471.
- [87] Montoro P., Tayeb H., Masullo M., Mari A., Douki W., Piacente S., (2013). LC-ESI-MS qualitative determination of phenolic constituents in different parts of wild and cultivated *Astragalus gombiformis*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72, 89–98.
- [88] Maamria L., Haba H., Lavaud C., Harakat D., Benkhaled M., (2015). An isoflavane and saponins from *Astragalus depressus* L. *J. Serb. Chem. Soc.*, 80, 137–142
- [89] Horo I., Bedir , Masullo M., Piacente S., Özgökçe F., Alankuş-Çalışkan Ö., (2012). Saponins from *Astragalus hareftae* (NAB.) SIRJ. *Phytochemistry*, 84, 147–153.
- [90] Bedir E., Çalış İ., Aquino R., Piacente S., Pizza C., (1999). Trojanoside H: a cycloartane-type glycoside from the aerial parts of *Astragalus trojanus*. *Phytochemistry*, 51, 1017–1020.
- [91] Verotta L., Guerrini M., El-Sebakhy N. A., Assad A. M., Toaima S. M., Radwan M. M., Luo Y. D., Pezzuto J. M., (2002). Cycloartane and oleanane saponins from Egyptian *Astragalus* spp. as modulators of lymphocyte proliferation. *Planta Med.*, 68, 986–994.
- [92] Gan L., Han X., Chen y., (1986). The chemical investigation of *Astragalus sieversianus*. *Phytochemistry*, 25, 1437–1441
- [93] Çalış İ., Dönmez A. A., Perrone A., Pizza C., Piacente S., (2008). Cycloartane glycosides from *Astragalus campylosema* Boiss. ssp. *Campylosema*. *Phytochemistry*, 69, 2634–2638.
- [94] Pistelli L., Pardossi S., Flamini G., Bertoli A., Manunta A., (1997). Three cycloastragenol glucosides from *Astragalus verrucosus*. *Phytochemistry*, 45, 585–587.
- [95] Pistelli L., Pardossi S., Bertoli A., Potenza D., (1998). Cycloastragenol glycosides from *Astragalus verrucosus*. *Phytochemistry*, 49, 2467–2471.
- [96] Rao Jayaprakash Y., Ramakrishna Reddy Ch., Gangadhar N., Krupadanam G. L. D., (2009). Phytochemical investigation of the whole plant of *Astragalus leucocephalus*. *Indian Journal of Chemistry*, 48B, 1329–1332.
- [97] Maamria L., Long C., Haba H., Lavaud C., Cannac A., Benkhaled M., (2015). Cycloartanes glycosides from *Astragalus gombo*. *Phytochemistry Letters*, 11, 286–291.
- [98] Gülcemal D., Masullo M., Napolitano A., Karayıldırım T., Bedir E., Alankuş Çalışkan Ö., Piacente S., (2013). Oleanane glycosides from *Astragalus tauricolus*: Isolation and structural

elucidation based on a preliminary liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry profiling. *Phytochemistry*, 86, 184–194.

[99] Iskenderov D. A., Keneshov B. M., Isaev M. I., (2008). Triterpene glycosides from *Astragalus* and their genins. LXXVI. Glycosides from *Astragalus sieversianus*. *Chem. Nat. Compd.*, 44, 319–323.

[100] Niknam V., Salehi Lisar Y., (2004). Chemical composition of *Astragalus*: carbohydrates and mucilage content. *Pak. J. Bot.*, 36, 381–388.

[101] Çalış İ., Gazar H. A., Piacente S., Pizza C., (2001). Secondary metabolites from the roots of *Astragalus zahlbruckneri*. *J. Nat. Prod.*, 64, 1179–1182.

[102] Zheng S., Wang Z., (2011). Chemical constituents of the roots of *Astragalus membranace* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) hisao. *Shanghai Zhongyiyao Daxue Xuebao*, 25, 89–94.

[103] Hannachi-Salhi A., Combes D., Baatout H., Boussaid M., Marrakchi M., Trififarah N., (2004). Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. *IPGRI-FAO*, 130, 65–72.

[104] Quezel P., Santa S., (1962). Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1. Paris.

[105] National Pharmacopoeia Committee, (2010). Chinese Pharmacopoeia, China Medical Science and Technology Press; p. 142.

[106] Chen D. Z., (1999). Flora reipublicae popularis sinicae. *Beijing: Science Press*, 42, 180.

[107] Liu Y., Zhang Q. Y., Zhao Y. Y., Wang B., Hai L. Q., Ying Y. P., Chen H. B., (2007). Saponins from the roots of *Hedysarum polybotrys*. *Biochem Syst Ecol*, 35, 389–391.

[108] Quan J. X., (1997). The pharmacological research on Hedysari. *LiShizhen Med Materia Medica Res*, 8, 178–180.

[109] Huang Z. L., Cui Z. M., Ren Y., Zhang J., (1987). Pharmacological effects on HPS complexes. *J Gansu College of Trad Chin Med*, 3, 40–43.

[110] Abdelguerfi-Berrekia R., Abdelguerfi A., (1986). Valorisation des ressources phytogénétiques locales d'intérêt fourrager dans l'aménagement des zones de montagnes, *Ann. Inst. Nat. Agro. El-Harrach*, 10, 1–11.

[111] Abdelguerfi A., Abdelguerfi-Berrekia R., (1987). Réflexions sur la valorisation de quelques espèces fourragères adaptées aux zones arides et semi-arides", *Ann. Inst. Nat. Agro. El-Harrach*, 11, 1–10.

[112] Nechepurenko I. V., Polovinka M. P., Komarova N. I., Korchagina D. V., Salakhutdinov N. F., Nechepurenko S. B., (2008). Low-molecular-weight phenolic compounds from *Hedysarum theinum* roots. *Chem Nat Compd*, 44, 31–34.

[113] Dang Z. L., Liu X. H., Zhao A. N., Liang J. D., Liang J., Liu Z. H., Feng S. L., (2013). Chemical structural features and primary molecular conformation of polysaccharide HPS4-1A from *Hedysarum polybotrys*. *Zhongcaoyao*, 44, 141–146.

- [114] Dong Y., Tang D., Zhang N., Li Y., Zhang C., Li L., Li M., (2013). Phytochemicals and biological studies of plants in genus *Hedysarum*. *Chemistry Central Journal*, 7, 124.
- [115] Wang W., Liang H., Wang B., Tu G. Z., Chen H. B., Zhao Y. Y., (2005). A new natural product from the roots of *Hedysarum multijugum*. *J Peking University (Health Sciences)*, 37, 532–535.
- [116] Chen S. G., (2007). Master's thesis. Studies on the chemical constituents of *Hedysarum scoparium* and *Inula Hupehensis*: Lanzhou University.
- [117] Glyzina G. S., Komissarenko N. F., (1967). The flavonoïds of *Hedysarum gmelini*. *Khim Prir Soedin*, 3, 116.
- [118] Neretina O. V., Gromova A. S., Lutskii V. I., Semenov A. A., Ushakov I. A., Makar'eva T. N., Owen N. L., (2004). Secondary metabolites from *Hedysarum setigerum*. *Chem Nat Compd*, 40, 91–92.
- [119] Neretina O. V., Fedorov S. V., Gromova A. S., Lutskii V. I., El'kin Y. N., (2002). Flavonoïds of *Hedysarum setigerum*. *Chem Nat Compd*, 38, 194–195.
- [120] Alaniya M. D., (1983). Flavonoïds of *Hedysarum sericeum* and *H. caucasicum*. *Plenum publishing corporation*, 19, 612–613.
- [121] Liu Y., Zhang Z., Zhang Q. Y., Pu X. P., Zhao Y. Y., (2010). Study on chemical constituents and antioxidative activity of Radix Hedysari. *China Pharm*, 24, 543–549.
- [122] Liu Y., Zhao Y. Y., Chen H. B., Wang B., Zhang Q. Y., (2010). Chemical analysis of the principal flavonoids of Radix Hedysari by HPLC. *Nat Prod Commun*, 5, 541–544.
- [123] Liu Y., Chen H. B., Zhao Y. Y., Wang B., Zhang Q. Y., Zhang L., Tu P. F., (2006). Quantification and stability studies on the flavonoids of Radix Hedysari. *J. Agr. Food. Chem.*, 54, 6634–6639.
- [124] Yang M., Wang W., Sun J. H., Zhao Y. Y., Liang H., Guo D. A., (2007). Characterization of phenolic compounds in the crude extract of *Hedysarum multijugum* by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrum*, 21, 3833–3841.
- [125] Wang W., Chen H. B., Wang W. M., Zhao Y. Y., (2002). Studies on flavonoid constituents of *Hedysarum multijugum*. *Acta Pharm Sinica*, 37, 196–198.
- [126] Hai L. Q., Zhang Q. Y., Liang H., Zhao Y. Y., Du N. S., (2003). Studies on chemical constituents of *Hedysarum polybotrys*. *Acta Pharm Sinica*, 38, 592–595.
- [127] Wang W., Chen W., Chen H. B., Liu J. Q., Zhao Y. Y., (2001). Study on chemical constituents of *Hedysarum multijugum*. *J Peking University (Health Sciences)*, 33, 205–208.
- [128] Liu Y., Hai L. Q., Zhao Y. Y., (2009). Isoflavonoids from *Hedysarum semenovii*. *Chin Pharm J*, 44, 1533–1535.
- [129] Li Y. Z., Huang J., Guo H. C., Ren B., (2009). Chemical constituents from *Hedysarum polybotrys* and their antitumor activities. *Chin Trad Herb Drugs*, 40, 1195–1198.

- [130] Liu Y., Chen H. B., Qiao L., Zhao Y. Y., (2005). Two new isoprenyl chalcones from *Hedysarum gmelinii*. *J Asian Nat Prod Res*, 7, 723–727.
- [131] Liu Y., Zhao Y. Y., Tu G. Z., Chen H. B., (2005). Flavonoids of the roots of *Hedysarum kirghisorum*. *Biochem Syst Ecol*, 33, 809–812.
- [132] Liu Y., Chen H. B., Tu G. Z., Zhao Y. Y., (2004). Studies on the constituents from the *Hedysarum kirghisorum*. In Medicinal Plant Research and Traditional Chinese Medicine Modernization-Fourth National Symposium on Medicinal Botany and Herbal Medicine, 167–169.
- [133] Rybachenko A. I., Kvivut B. A., Georgievkii V. P., (1976). Fluoro densitometric determination of mangiferin and isomangiferin in *Hedysarum flavescens* and *H. alpinum*. *Chem Nat Compd*, 12, 395–396.
- [134] Wang W., An D. G., Chen H. B., Tu G. Z., Zhao Y. Y., (2003). Two new pterocarpenes from *Hedysarum multijugum*. *J Asian Nat Prod Res*, 5, 31–34.
- [135] Liu Y., Yang J. S., (2005). Studies on chemical constituents isolated from *Hedysarum polybotrys*. *Chin Pharm J*, 40, 1215–1216.
- [136] Liu Y., Zhang Q. Y., Chen H. B., Wang B., An D. G., Zhao Y. Y., (2006). Structural determination of saponins from *Hedysarum polybotrys*. *Magn Reson Chem*, 44, 1128–1130.
- [137] Liu Y., Ma X. X., Chen H. B., Tu G. Z., He J. M., Zhao Y. Y., (2005). Chemical constituents of *Hedysarum gmelinii*. *J Chin Pharm Sci*, 14, 75–78.
- [138] Wang W., Zhao Y. Y., Liang H., Jia Q., Chen H. B., (2006). Coumestans from *Hedysarum multijugum*. *J Nat Prod*, 69, 876–880.
- [139] Neretina O. V., Gromova A. S., Lutskii V. I., Semenov A. A., Ushakov I. A., Dmitrenok P. S., Oven N. L., (2004). Isolariciresinol glucoside, berberine, and phenolic acid from the aerial part of *Hedysarum setigerum*. *Chem Nat Compd*, 40, 609–610.
- [140] Ma D., Feng S. L., Zhao L. G., Liu X. H., Li B., Li X. D., Hu F. D., (2008). Purification of the radix Hedysari polysaccharide and determination of its constitution. *Chin JAMP*, 25, 177–179.
- [141] Hikino H., Funayama S., Endo K., (1976). Hypotensive principle of *Astragalus* and *Hedysarum* roots. *Planta Med*, 30, 297–302.
- [142] Nechepurenko I. V., Polovinka N. P., Sal'nikova O. I., Pokrovskii L. M., Komarova N. I., Salakhutdinov N. F., Nechepurenko S. B., (2007). Components of the ethyl acetate extract of *Hedysarum theinum* roots. *Chem Nat Compd*, 43, 5–9.
- [143] Miyase T., Fukushima S., Akiyama Y., (1984). Studies on the constituents of *Hedysarum polybotrys* Hand-Mazz. *Chem Pharm Bull*, 32, 3267–3270.
- [144] Gutzeit D., Winterhalter P., Jerz, G., (2007). Application of preparative high-speed counter-current chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for a fast screening and fractionation of polyphenols. *Journal of Chromatography A*, 1172, 40–46.

- [145] Toribio A., (2007). Développement de nouvelles approches méthodologiques en Chromatographie de Partage Centrifuge en vue de la purification de molécules d'intérêt. Thèse Doctorat - Reims: Université de Reims Champagne-Ardenne.
- [146] Manach C., Scalbert A., Morand C., Jiménez L., (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727–747.
- [147] Chemat F., Lucchesi M. E., Smadja J., Favretto L., Colnaghi G., Visinoni F., (2006). Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. *Analytica Chimica Acta*, 555, 157–160.
- [148] Weidner S, Paprocka J., (1996). Phenolic acids and dormancy in oat (*Avena sativa* L.) and rye (*Secale cereale* L.) caryopses. *Acta Physiologiae Plantarum*, 18, 277–286.
- [149] Loake G. J., Faktor O., Lamb C. J., Dixon R. A., (1991). Combination of H-box [CCTACC(N)7CT] and Gbox (CACGTG) cis elements is necessary for feed-forward stimulation of a chalcone synthase promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate *p*-coumaric acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89, 9230–9234.
- [150] Blount J. W., Korth K. L., Masoud S. A., Rasmussen S., Lamb C., Dixon R. A., (2000). Altering expression of cinnamic acid 4-hydroxylase in transgenic plants provides evidence for a feedback loop at the entry point into the phenylpropanoid pathway. *Plant Physiology*, 122, 107–116.
- [151] Iiyama K., Lam T. B-T., Stone B. A., (1994). Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiology*, 104, 315–320.
- [152] Arimboor R., Kumar K. S., Arumughan C., (2008). Simultaneous estimation of phenolic acids in sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) using RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47, 31–38
- [153] Stalikas C. D., (2007). Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30, 3268–3295.
- [154] Bruneton J., (2016). Pharmacognosie- Phytochimie, Plantes médicinales. 5^{ème} Edition, Paris.
- [155] Harborne J. B., Williams C. A., (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481–504.
- [156] Peterson J., Dwyer J., Adlercreutz H., Scalbert A., Jacques P., Mc Cullough M. L., (2010). Dietary lignans: physiology and potential for cardiovascular disease risk reduction. *Nutr. Rev.*, 68, 571–603.
- [157] Axelson M., Sjovall J., Gustafsson B. E., Setchell K. D., (1982). Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants. *Nature*, 298, 659–660.
- [158] Setchell K. D., Lawson A. M., Borriello S. P., Harkness R., Gordon H., Morgan D. M., Kirk D. N., Adlercreutz H., Anderson L. C., Axelson M., (1981). Lignan formation in man-microbial involvement and possible roles in relation to cancer. *Lancet*, 2, 4–7.
- [159] Williams C. A., Grayer R. J., (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep.*, 21, 539-73.

- [160] Harborne J. B., Williams C. A., (2001). Anthocyanins and other flavonoids. *Nat Prod Rep.*, 18, 310–33.
- [161] Li X. C., Jacob M. R., Pasco D. S., El Sohly H. N., Nimrod A. C., Walker L. A., Clark A. M., (2001). Phenolic compounds from *Miconia myriantha* inhibiting *Candida* aspartic proteases. *J. Nat. Prod.*, 64, 1282–1285.
- [162] De Lourdes Mata Bilbao M., Andrés-Lacueva C., Jáuregui O., Lamuela-Raventós R. M., (2007). Determination of flavonoids in a citrus fruit extract by LC–DAD and LC–MS. *Food Chemistry*, 101, 1742–1747.
- [163] Heim K. E., Tagliaferro A. R., Bobilya D. J., (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13, 572–584.
- [164] Hollman P. C. H., Gaag M. V. D., Mengelers M. J. B., Van Trijp J. M. P., De Vries J. H. M., Katan M. B., (1996). Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radical Biology and Medicine*, 21, 703–707.
- [165] Yao L. H., Jiang Y. M., SHI J., Tomas-Barberan F. A., Datta N., Singanusong R., Chen S. S., (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant. Food Hum. Nutr.*, 59, 113–122.
- [166] Tsimogiannins D. I., Oreopoulou V., (2006). The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech.* 7, 140–146.
- [167] Harborne J. B., (1988). The flavonoids, advances in research since 1980. Ed. Chapman et Hall. London.
- [168] Bruneton J., (1999). Pharmacognosie- Phytochimie, Plantes médicinales. 3^{ème} Edition, Paris.
- [169] Sarni-Manchado P., Cheynier V., (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Tec & Doc éditions. France.
- [170] Morreel K., Goeminne G., Storme V., Sterck L., Ralph J., Coppieters W., Breyne P., Steenackers M., Georges M., Messens E., Boerjan W., (2006). Genetical metabolomics of flavonoid biosynthesis in *Populus*: a case study. *Plant J.*, 47, 224–37.
- [171] Macheix J. J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., (2005). Les composés phénoliques des végétaux ; Presses polytechniques et universitaires romandes : Lausanne, 39–54.
- [172] Ono E., Hatayama M., Isono Y., Sato T., Watanabe R., Yonekura-Sakakibara K., Fukuchi Mizutani M., Tanaka Y., Kusumi T., Nishino T., Nakayama T., (2006). Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles. *Plant J.*, 45, 133–43.
- [173] Vergne S., (2007). Les isoflavones de soja : leur biodisponibilité chez l'Homme et leurs effets sur la différenciation d'une lignée ostéoblastique humaine. Thèse Doctorat, Université Bordeaux 1, France.
- [174] Fowler Z. L., Koffas M. A. G., (2009). Biosynthesis and biotechnological production of flavanones: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 799–808.

- [175] Iwashina T., (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113, 287–299.
- [176] Stevens J. F., Miranda C. L., Frei B., Buhler D. R., (2003). Inhibition of peroxynitrite-mediated LDL oxidation by prenylated flavonoids: the alpha, beta-unsaturated keto functionality of 2'-hydroxychalcones as a novel antioxidant pharmacophore. *Chem Res Toxicol*, 16, 1277–1286.
- [177] Kofujita H., Yaguchi M., Doi N., Suzuki K., (2004). A novel cytotoxic prenylated flavonoid from the root of *Morus alba*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 73, 113–116.
- [178] Kim Y. C., Kim H. S., Wataya Y., Sohn D. H., Kang T. H., Kim M. S., Kim Y. M., Lee G. M., Chang J. D., Park H., (2004). Antimalarial Activity of Lavandulyl Flavanones Isolated from the Roots of *Sophora flavescens*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27, 748–750.
- [179] Davies K. M., Schwinn K. E., (2006). Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications; O. M. Andersen & K. R. Markham: CRC Press: Boca Raton, 154–156.
- [180] Collin S., Crouzet J., (2011). Polyphénols et procédés. Tec & Doc éditions. France.
- [181] Macheix J. J., Fleuriet A., Billot J., Jay-Allemand C., (1990). Fruit phenolics ; CRC Press : Boca Raton, p. 78.
- [182] Batista J. S., Almeida R. N., Bhattacharyya J., (1995). Analgesic effect of *Dioclea grandiflora* constituents in rodents. *J. Ethnopharmacol*, 45, 207–210.
- [183] Bhattacharyya J., Batista J. S., Almeida R. N., (1995). Dioclein, a flavanone from the roots of *Dioclea grandiflora*. *Phytochemistry*, 38, 277–278.
- [184] Bruno M., Savona G., Lamartina L., Lentini F., (1985). New flavonoids from *Bonannia graeca* (L.) Halacsy. *Heterocycles*, 23, 1147–1153.
- [185] Muanda F. N., (2010). Identification de polyphénols, évaluation de leur activité antioxydante et étude de leurs propriétés biologiques. Thèse Doctorat, Université Paul Verlaine-Metz, France.
- [186] Lawson A. M., (2006). Etude phytochimique d'une Fabacée tropicale, *Lonchocarpus Nicou*, évaluation biologique préliminaire. Thèse Doctorat, Université de Limoges, France.
- [187] Anderson R. L., Wolf W. J., (1995). Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. *J Nutr*, 125, 581S–588S.
- [188] Lapcik O., (2007). Isoflavonoids in non-leguminous taxa: a rarity or a rule? *Phytochemistry*, 68, 2909–2916.
- [189] Bruneton J., (2009). Pharmacognosie- Phytochimie, Plantes médicinales. 4^{ème} Edition, Paris.
- [190] Prokudina E.A., Havlíček L., Al-Maharik N., Lapčík O., Strnad M., Gruz J., (2012). Rapid UPLC–ESI–MS/MS method for the analysis of isoflavonoids and other phenylpropanoids. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26, 36–42.
- [191] Guo-Zhu W., Mei-Fen M., Xiang-Mei L., Fu-Cai R., Fei W., (2016). Derrisoflavones H–K and One Isoflavan Derivative from *Derris robusta*. *Nat. Prod. Bioprospect*. 6, 111–116.

- [192] Macheix J. J., Fleuriet A., Jay-Allemand C., (2005). Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. Presses polytechniques et universitaires romandes, p. 159.
- [193] Le Bars J., Le Bars P., (1987). Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Bull Assoc Anc El Inst Pasteur, 4ème trimestre, 3–15.
- [194] Dixon R. A., Steele C. L., (1999). Flavonoids and isoflavonoids -a gold mine for metabolic engineering. *Trends in Plant Science*, 4, 394–400.
- [195] Veitch N. C., (2006). Isoflavonoids of the Leguminosae. *Natural Product Reports*, 24, 417–464.
- [196] Thuy T. T., Porzel A., Ripperger H., Sung T. V., Adam G., (1998). Chalcones and ecdysteroids from *Vitex leptobotrys*. *Phytochemistry*, 49, 2603–2605.
- [197] Winkel-Shirley B., (2001). Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 126, 485–493.
- [198] Harborne J. B., Williams C. A., (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481–504
- [199] Aron P., Kennedy J., (2008). Flavan-3-ols: nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52, 79–104.
- [200] Pietta P. G., (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, 63, 1035–1042.
- [201] Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Endo Y, Tamaki N, Sanbe T, Murakami J, Yamamoto T, Morita M., (2009). Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *J. Periodontol.*, 80, 1799–1808.
- [202] Goodarzi M.T., Zal F., Malakooti M., Safari M.R., Sadeghian S., (2006). Inhibitory activity of flavonoids on the lens aldose reductase of healthy and diabetic rats. *Acta Med. Iran.*, 44, 41–45
- [203] Ouali K., Trea F., Toumi L., Bairi A., Maurel D., Guellati M. A., (2007). L'héspéridine, un antioxydant flavonoïde qui diminue le stress oxydatif et prévient les malformations fœtales au cours du diabète gestationnel expérimental. *Phytothér.*, 5, 204–209.
- [204] Vincken J. P, Heng L., de Groot A., Gruppen H., (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68, 275–297.
- [205] Patočka J., (2003). Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. *Journal of Applied Biomedicine*, 1, 7–12.
- [206] Sawai S., Saito K., (2011). Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. *Frontiers in Plant Science*, 2, 1–8.
- [207] Manitto P., (1981). Biosynthesis of natural products. New York: John Wiley.
- [208] Dey P. M., Harborne J. B., (1991). Methods in plant biochemistry. Volume 7, Terpenoids. San Diego: Academic press.
- [209] Thimmappa R., Geisler K., Louveau T., O'Maille P., Osbourn A., (2014). Triterpene Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 65, 225–57.

- [210] Touafek O., (2010). Etude phytochimique de plantes médicinales du nord et du sud Algériens. Thèse Doctorat. Université de Mentouri-Constantine.
- [211] Meyer S., Rebb C., Bosdeveix R., (2008). Botanique : biologie et physiologie végétales, Ed Maloine.
- [212] Buddhan S., Sivakumara R., Dhandapania N., Ganesana B., Anandan R., (2007). Protective effect of dietary squalene supplementation on mitochondrial function in liver of aged rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 76, 349–355.
- [213] Sparg S. G., Light M. E., Van Staden J., (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219–243.
- [214] Bruneton J., (1993). Pharmacognosie- Phytochimie, Plantes médicinales. 2^{ème} Edition, Paris.
- [215] Estrada A., Katselis G. S., Laarveld B., Barl B., (2000). Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 23, 27–43.
- [216] Liu Z. Q., Luo X. Y., Sun Y. X., Chen Y. P., Wang Z. C., (2002b). Can ginsenosides protect human erythrocytes against free-radical-induced hemolysis? *Biochim.Biophys.Acta*, 1572, 58–66.
- [217] Rameau J. C., Mansion D., Dumé G., (2008). Flore forestière française : guide écologique illustré. Montagnes, p. 2245.
- [218] Elcilene A. de Sousa, Armenio A. C. A. da Silva, Alberto J. Cavalheiro, João Henrique G. Lagoc, Mariana H. Chaves., (2014). A New Flavonoid derivative from leaves of *Oxandra sessiliflora* R. E. Fries. *J. Braz. Chem. Soc.*, 25, 704–708.
- [219] Reille M., (2016). Garrigue 2 et Midi : Plantes herbacées, p. 92.
- [220] Raynaud C., (1982). Eléments pour une flore pratique du Maroc, légumineuses, tribu des galega. Ecole Nationale Forestière des Ingénieurs. Salé. Maroc.
- [221] Krasteva I., Bratkov V., Bucar F., Kunert O., Kollroser M., Kondeva-Burdina M., Ionkova I., (2015). Flavoalkaloids and flavonoids from *Astragalus monspessulanus*. *J. Nat. Prod.*, 78, 2565–2571.
- [222] Ionkova I., (1995). In vitro cultures and formation of secondary metabolites in *Astragalus*. In: Y.P.S. Bajaj, editor. Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicine and Aromatic Plants: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- [223] Schwarz B., Hofmann T., (2007). Sensory-guided decomposition of red currant juice (*Ribes rubrum*) and structure determination of key astringent compounds. *J. Agric. Food chem.*, 55, 1394–1404.
- [224] BATTERY B. R., BUZELL R. I., (1975). Soybean flavonol glycosides: identification and biochemical genetics. *Canadian Journal of Botany*, 53, 219–224.
- [225] Sakushima A., Hisada S., Ogihara Y., Nushiba S., (1980). Studies on the constituents of Apocynaceae plants. Gas chromatography-mass spectrometric determination of new flavonoid triglycosides from the leaves of *Cerbera manghas* L. *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 1219–1223.

- [226] Horo I., Bedir E., Perrone A., Özgökçe F., Piacente S., Alankuş-Çalışkan Ö., (2010). Triterpene glycosides from *Astragalus icmadophilus*. *Phytochemistry*, 71, 956-963.
- [227] Khoron'ko A. T., Glyzin V. I., (1973). Flavonoids of *Astragalus dasyanthus*, *Chem. Nat. Comp.*, 9 (3), 403.
- [228] Krasteva I., Nikolova I., Danchev N., Nikolov S., (2004). Phytochemical analysis of ethyl acetate extract from *Astragalus corniculatus* Bieb. and brain antihypoxic activity. *Acta Pharm.*, 54,151–156.
- [229] Dongmo A. B., Milyamoto T., Yoshikawa K., Arihara S., Lacaille-Dubois M., (2007). Flavonoids from *Acacia pennata* and their cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) inhibitory activities. *Planta Med.* 73, 1202.
- [230] Olennikov D. N., Kashchenko N. I., (2014). Calendosides I–IV, new quercetin and isorhamnetin rhamnoglucosides from *Calendula officinalis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 50, 633–637.
- [231] Qin X., Xing Y. F., Zhou Z., Yao Y., (2015). Dihydrochalcone compounds isolated from Crabapple leaves showed anticancer effects on human cancer cell lines. *Molecules*, 20, 21193–21203.
- [232] Alvarez L., Delgado G., (1999). C- and O-Glycosyl-a-hydroxydihydrochalcones from *Eysenhardtia polystachya*. *Phytochemistry*, 50, 681–687.
- [233] Kokotkiewicz A., Luczkiewicz M., Sowinski P., Glod D., Gorynski K., Bucinski A., (2012). Isolation and structure elucidation of phenolic compounds from *Cyclopia subternata* Vogel (honeybush) intact plant and in vitro cultures. *Food Chemistry*, 133, 1373–1382.
- [234] Ogawaa K., Kawasaki A., Omura M., Yoshida T., Ikoma Y., Yano M., (2001). 3', 5'-Di-C- β -glucopyranosylphloretin, a flavonoid characteristic of the genus *Fortunella*. *Phytochemistry*, 57, 737–742.
- [235] Yoshikawa K., Eiko K., Mimura N., Kondo Y., Arihara S., (1998). Hovetrichosides C-G, Five New Glycosides of Two Auronols, Two Neolignans, and a Phenylpropanoid from the Bark of *Hovenia trichocarea*. *J. Nat. Prod.*, 61, 786-790.
- [236] Yuan T., Wan C., Ma H., Seeram N. P., (2013). New Phenolics from the Flowers of *Punica granatum* and their in vitro α -glucosidase inhibitory activities. *Planta Med*, 79, 1674–1679.
- [237] Wu S. B., Wen Y., Li X. W., Zhao Y., Zhao Z., Hu J. F., (2009). Chemical constituents from the fruits of *Sonneratia caseolaris* and *Sonneratia ovata* (Sonneratiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 1–5.
- [238] Zeng Chu H. B., G. Z., Zhu M. J., He W. J., Zhang Y. M., Tan N. H., (2011). Chemical Constituents of *Pedicularis densispica* Franch. *Z. Naturforsch.* 66b, 641-646.
- [239] Vasilev N. P., Ionkova I. I., (2006). Isolation and Structure Elucidation of Aryltetralin Lignans from *Linum tauricum* ssp. *Bulgaricum*. *Pharmacognosy Magazine*, 2, 172-177.

- [240] Schwartz H., Sontag G., (2006). Determination of secoisolariciresinol, lariciresinol and isolariciresinol in plant foods by high performance liquid chromatography coupled with coulometric electrode array detection. *Journal of Chromatography B*, 838, 78–85.
- [241] Latte´ K. P., Kaloga M., Schäfer A., Kolodziej H., (2008). An ellagitannin, *n*-butyl gallate, two aryltetralin lignans, and an unprecedented diterpene ester from *Pelargonium reniforme*. *Phytochemistry*, 69, 820–826.
- [242] Thieme, H., Benecke, R., (1969). Isolierung und Konstitution saufklärung eines Cyclolignan glucosids aus den Blättern von *Populus nigra*. L. *Pharmazie*, 24, 567–572.
- [243] Achenbach H., Löwel M., Waibel R., Gupta M., Solis P., (1992). New lignan glucosides from *Stemmadenia minima*. *Planta Med.*, 58, 270–272.
- [244] Kitagawa I., Yoshikawa M., Yosioka I., (1976). Saponin and Sapogenol. XIII. Structures of Three Soybean Saponins: Soyasaponin I, Soyasaponin II, and Soyasaponin III. *Chem. Pharm. Bull.* 24, 121–129.
- [245] Wang H. K., He K., Xu H. X., Zhang Z. L., Wang Y. F., Kikuchi T., Tezuka Y., (1990). The structure of astrachryosid A and the study of 2D-NMR on astrasieversianin XV and 7, 2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxy-isoflavane-7-O-.beta.-D-glycoside. *Yaouxue Xuebao*, 25, 445–450 (in Japanese).
- [246] Kitagawa I., Wang H. K., Yoshikawa M., (1983). Saponin and sapogenol. XXXVII. Chemical constituents of astragali radix, the root of *Astragalus membranaceus* Bunge. 4. Astragalosides VII and VIII. *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 716–722.
- [247] Hirakawa T., Okawa M., Kinjo J., Nohara T., (2000). A New Oleanene Glucuronide Obtained from the Aerial Parts of *Melilotus officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.*, 48, 286–287.
- [248] Woldemichael G. M., Wink M., (2002). Triterpene glycosides of *Lupinus angustifolius*. *Phytochemistry*, 60, 323–327.
- [249] Konoshima T., Kokumai M., Kozuka M., Tokuda H., Nishino H., Iwahima A., (1992). Anti-Tumor-Promoting Activities of Afromosin and Soyasaponin I Isolated from *Wistaria brachybotrys*. *J. Nat. Prod.*, 55, 1776–1778.
- [250] Kitagawa I., Taniyama T., Murakami T., Yoshihara M., Yoshikawa M., (1988). Saponin and sapogenol. XLVI. On the constituents in aerial part of American alfalfa, *Medicago sativa* L. The structure of dehydrosoyasaponin I. *Yakugaku Zasshi*, 108, 547–554.
- [251] Taylor W. G., Fields P. G., Sutherland D. H., (2004). Insecticidal Components from Field Pea Extracts: Soyasaponins and Lysolecithins. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7484–7490.
- [252] Irie-N'guessan A. G., Kouakou-Siransy N. G., Leblais V., Champy P., Kablan B. J., (2010). Effet antispasmodique induit par les fractions chromatographiques de trois plantes antiasthmatiques de côte d'ivoire. *J. sci. pharm. biol.*, 11, 13–20.

- [253] Ben Fadhel N., Zaouali Y., Boussaid M., (2000). Aptitudes de deux légumineuses pastorales *Hedysarum carnosum* et *Argyrolobium uniflorum*. *Jaub. et Spach.* à la réhabilitation des parcours en milieu aride de la Tunisie. *CIHEAM, Cahiers Options Méditerranéennes*, 45, 95–98.
- [254] Miller R.W., Spence G. F., (1989). (-)-5'-Methoxysativan, a new isoflavan from alfalfa. *Journal of Natural Products*, 52, 634–636.
- [255] Xiabo Z., Wenli M., Mingfu G., Wenjian Z., Hongjin B., Haofu D., (2011). Antibacterial Activity of the Flavonoids from *Dalbergia odorifera* on *Ralstonia solanacearum*. *Molecules*, 16, 9775–9782.
- [256] Wang W., Weng X., Cheng D., (2000). Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. *Food Chemistry*, 71, 45–49.
- [257] Yahara S., Ogata T., Saijo R., Konishi R., Yamahara J., Miyahara K., Nohara T., (1989). Isoflavan and related compounds from *Dalbergia odorifera* I. *Chem. Pharm. Bull.* 37, 979–987.
- [258] Sun X., He C., Yang X., Guo L., Li X., (2015). Isoflavones and pterocarpan from *Caragana changduensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61, 516–519.
- [259] Hirakura K., Morita M., Nakajima K., Sugama K., Takagi K., Niitsu K., Ikeya Y., Maruno M., Okad M., (1997). Phenolic glucosides from the root of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry*, 46, 921–928.
- [260] Liao X. L., Luo J. G., Kong L. Y., (2013). Flavonoids from *Millettia nitida* var. *hirsutissima* with their anticoagulative activities and inhibitory effects on NO production. *J Nat Med.*, 67, 856–861.
- [261] Chen L. W., Cheng M. J., Peng C. F., Chen I. S., (2010). Secondary Metabolites and Antimycobacterial Activities from the Roots of *Ficus nervosa*. *Chemistry & Biodiversity*, 7, 1814–1821.
- [262] Chen K., Tang H., Wu B., Li S., Peng A., Ye H., Chen L., (2015). Phytochemical investigation of *Millettia dorwardi* Coll. Et Hemsl. *Biochemical Systematics and Ecology*, 60, 24–27.
- [263] Mizuno M., TAN T., Katsuragawa M., Saito H., Iinuma M., (1990). A new pterocarpan from the heartwood of *Cladrastis platycarpa*. *Journal of Natural Products*, 33, 498–499.
- [264] Narayanan V., Nagarajan N. S., (1988). Two isoflavone galactosides from *Dalbergia spinosa*. *Phytochemistry*, 27, 2364–2365.
- [265] Nagarajan N. S., Sethuraman M. G., Manoj C. N., Rao R. P., (2006). Dalsympathetin – a new isoflavone gentiobioside from *Dalbergia sympathetica* (Dennst.) *Natural Product Research*, 20, 195–200.
- [266] Wong S. L., Chang H. S., Wang G. J., Chiang M. Y., Huang H. Y., Chen C. H., Tsai S. C., Lin C. H., Chen I. S., (2011). Secondary metabolites from the roots of *Neolitsea daibuensis* and their anti-inflammatory activity. *J. Nat. Prod.*, 74, 2489–2496.
- [267] Ito C., Itoigawa M., Kanematsu T., Ruangrunsi N., Mukainaka T., Tokuda H., Nishino H., Furukawa H., (2003). Isoflavonoids from *Dalbergia olivari*. *Phytochemistry*, 64, 1265–1268.

- [268] Xu J. J., Hai L. Q., Wang X. Q., Chang J. M., Zhang X., (2005). Chemical constituents of *Hedysarum austrosibiricum*. *Fedtsch Huaxi Yaoxue Zazhi*, 20, 214–215.
- [269] Ghribi L., Waffo-Téguo P., Cluzet S., Marchal A., Marques J., Mérillon J. M., Ben Jannet H., (2015). Isolation and structure elucidation of bioactive compounds from the roots of the Tunisian *Ononis angustissima* L. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 3825–3830.
- [270] Rueda D. C., Mieri M. D., Hering S., Hamburger M., (2014). HPLC-Based Activity Profiling for GABAA Receptor Modulators in *Adenocarpus cincinnatus*. *J. Nat. Prod.*, 77, 640–649.
- [271] Malan E., Swinny E., (1990). Flavonoids and isoflavonoids from the heartwood of *Virgilia oroboides*. *Phytochemistry*, 29, 3307–3309.
- [272] Takeshita M., Sato T., (1989). Synthesis of Optically Active 1-Phenyl-1, 2-propanediol by Use of Baker's Yeast. *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 1085-1086.
- [273] Wang F., Zhou D. S., Wei G. Z., Ren F. C., Liu J. K., (2012). Chlorantholides A–F, eudesmane-type sesquiterpene lactones from *Chloranthus Elatior*. *Phytochemistry*, 77, 312–317.
- [274] Nurettin Y., Nuri Y., Asu U., Serpil O., Vildan A., (2003). Chemical Constituents of *Campanula lactiflora*. *Turk J Chem*, 27, 749–755.
- [275] Vermes B., Seligmann O., Wagner H., (1991). Synthesis of Biologically Active Tetrahydrofurofuranlignan-(syringin, pinoresinol)-mono- and bis-glucosides. *Phytochemistry*, 30, 3087–3089.
- [276] Yuan Z. P., Zhong Y. J., Su X. H., Li C. Y., Du H. J., Wen Y. Y., Li Y. F., Liang B., (2013). Chemical constituents of *Pholidota leveilleana*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 49, 148–151.
- [277] Aruoma O. L., (1996). Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 1617–1625.
- [278] Prior R. L., Wu X., Schaich K., (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290–4302.
- [279] Frankel E. N., Meyer A. S., (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925–1941.
- [280] Sanchez-Moreno C., (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Int. J. of Foods Sci. Tech.* 8, 121–137.
- [281] Saeed N., Khan M.R., Shabbir M., (2012). Antioxidant activity, total phenolic and total flavonoid contents of whole plant extracts *Torilis leptophylla* L. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12, 221–232.
- [282] Beidjord A., (2014). Évaluation de l'activité antioxydante des huiles essentielles d'*Ammoides Verticillata* de la région de Tlemcen. Mémoire de master, Université d'Abou Bekr Bel Kaïd – Tlemcen.

- [283] Baali N., (2017). Effet hépatoprotecteur d'extraits polyphénoliques de *Cynara cardunculus*, *Genista quadriflora* Munby et *Teucrium polium gerii* Maire sur le dysfonctionnement mitochondrial induit par le paracétamol. Thèse Doctorat, Université Frères Mentouri – Constantine.
- [284] Boumerfeg S., Baghiani A., Djarmouni M., Ameni D., Adjadj M., Belkhiri F., Charef N., Khennouf S., Arrar L., (2012). Inhibitory activity on xanthine oxidase and antioxidant properties of *Teucrium polium* L. extracts. *Chinese Medicine*, 3, 30–41.
- [285] Zhao H., Dong J., Lu J., Chen J., Li Y., Shan L., (2006). Effect of extraction solvents mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7277–7286.
- [286] Rainha N., Lima E., Baptista J., Rodrigues C., (2011). Antioxidant properties, total phenolic, total carotenoid and chlorophyll content of anatomical parts of *Hypericum foliosum*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 1930-1940.
- [287] Decker E. A., Welch B., (1990). Role of ferritin as lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1136, 674–677.
- [288] Kaur G., Alam M. S., Jabbar Z., Javed K., Athar M., (2006). Evaluation of antioxidant activity of *Cassia siamea* flowers. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 340–348.

Résumé

Le présent travail concerne une étude phytochimique de deux plantes poussant dans les régions semi-arides d'Algérie et appartenant à la famille Fabaceae : *Astragalus monspessulanus* L. et *Hedysarum carnosum* DESF.. Les travaux d'extraction et de séparation par diverses méthodes chromatographiques (CLV, CCM, CC, CLMP et CLHP), mis en œuvre pour les deux espèces, nous ont permis d'isoler pas moins de 25 métabolites secondaires appartenant principalement à deux grandes classes de composés chimiques, que sont les composés phénoliques principalement flavonoïdiques et triterpéniques. Leur identification a été réalisée grâce aux techniques d'analyses spectroscopiques (RMN multi impulsionsnelle et spectrométrie de masse), la mesure des pouvoirs rotatoires et la comparaison avec les données de la littérature.

L'étude phytochimique portée sur les parties aériennes de l'espèce *A. monspessulanus* L. a permis d'isoler et d'identifier 13 composés. Dix composés isolés de l'extrait *n*-butanolique se répartissent en sept flavonoïdes (5 de type flavonols *O*-glycosylés, une chalcone et une aurone), un lignane et deux saponines triterpéniques à squelette oléanane. La saponine connue sous le nom de soyasaponine I est considérée comme marqueur chimiotaxonomique du genre *Astragalus* et de la famille Fabaceae. Ainsi, trois composés ont été isolés de l'extrait acétate d'éthyle de cette espèce. Il s'agit de deux phytostérols et un triterpénoïde. La composition chimique de l'espèce *A. monspessulanus* L. est en parfait accord avec celle du genre *Astragalus*. En effet, ce travail a montré encore une fois que les flavonoïdes et les saponosides triterpéniques sont les constituants dominants du genre *Astragalus*.

Pour ce qui est de la plante *Hedysarum carnosum* DESF., 12 autres métabolites secondaires ont été isolés de l'extrait acétate d'éthyle. Ils se répartissent en huit flavonoïdes (7 isoflavonoïdes et une flavanone), un coumestane, un glycol, un dérivé d'acide benzoïque et un lignane. Ce travail montre que les flavonoïdes, notamment les isoflavonoïdes, demeurent les constituants dominants du genre *Hedysarum*.

L'extrait *n*-butanolique de l'espèce *Astragalus monspessulanus* L. a manifesté une activité antioxydante modérée vis-à-vis du DPPH. Ce potentiel antioxydant pourrait être lié aux composés phénoliques, particulièrement les flavonoïdes. En effet, les flavonoïdes sont considérés comme la classe d'antioxydants la plus importante de la plante.

Il est à souligner que l'extrait acétate d'éthyle de *Hedysarum carnosum* DESF. n'a pas montré une activité inhibitrice contre le radical DPPH.

Mots clés : Fabaceae, *Astragalus monspessulanus* L., *Hedysarum carnosum* DESF., Flavonoïdes, lignanes, saponines, RMN 1D et 2D, activité antioxydante.

Abstract

This work carried out the phytochemical study of two plants growing in semiarid regions of Algeria and belonging to the family Fabaceae: *Astragalus monspessulanus* L. and *Hedysarum carnosum* DESF. Our work of extraction and separation of the two species, by chromatographic methods (VLC, TLC, CC, HMLC and HPLC), led to the isolation and characterization, by spectroscopic methods (NMR, Mass spectrometry), measurement of the optical rotation $[\alpha]_D$ and by comparison with literature data, of 25 secondary metabolites belonging mainly to two big classes of chemical compounds polyphenols and triterpenes.

The phytochemical study of the aerial parts of *A. monspessulanus* L. lead to the isolation and characterization of 13 known compounds. Ten compounds were isolated from the *n*-butanol extract including seven flavonoids (5 with flavonols *O*-glycosides skelton, one chalcone and one aurone), one lignan and two oleananes-type triterpene glycosides. The soyasaponine I oleanane is used as a chemotaxonomic marker for the genus *Astragalus*. In addition, three secondary metabolites were isolated from the ethyl acetate extract of this species including two phytosterols and one triterpenoid. The chemical composition of the species *A. monspessulanus* L. is in full agreement with the plants of the genus *Astragalus*. In fact, this study revealed that flavonoids and saponins are the major constituents of this genus.

Twelve other known secondary metabolites were isolated from the ethyl acetate extract of the second plant *Hedysarum carnosum* DESF. consisting of eight flavonoids, with 7 isoflavonoids and one flavanon, one coumestan, one glycol, one benzoic acid derivative and one lignan. This study showed that flavonoids, in particular isoflavonoids, remain the dominant constituents of the genus *Hedysarum*.

The *n*-butanol extract of *Astragalus monspessulanus* L. showed a moderate antioxidant activity against DPPH. Thus, the antioxidant capacity is correlated to phenolic composition of the corresponding extract, especially flavonoids. In fact, the flavonoid class is the most important plant antioxidant. However, the ethyl acetate extract of *Hedysarum carnosum* DESF. did not show any chelating activity of DPPH.

Keywords: Fabaceae, *Astragalus monspessulanus* L., *Hedysarum carnosum* DESF., Flavonoids, lignan, Saponins, NMR 1D and 2D, antioxidant activity.

ملخص

يخص هذا العمل الدراسة الفيتوكيميائية لنبتين من الجزائر *Astragalus monspessulanus* L. و *Hedysarum carnosum* DESF. من عائلة Fabaceae. وقد سمحت هذه الدراسة بعزل وتحديد بنية 25 مركب طبيعي وذلك باستعمال الطرق الكروماتوغرافية (HPLC, MPLC, CLV, CCM, CC) و باستعمال طرق التحليل الطيفي كمطيافية الرنين المغناطيسي النووي بجميع أنواعها، مطيافية الكتلة، حساب زاوية التدوير النوعي و المقارنة مع الدراسات السابقة. تنتمي المركبات المعزولة إلى نوعين من الأيضات الثانوية الفينولية و التريتاربيينية.

تم عزل 13 مركب طبيعي معروف من الأجزاء الهوائية للنبته *Astragalus monspessulanus* L. 10 مركبات من مستخلص *n*-BuOH منها 7 فلافونويدات (5 منها ذات هيكل فلافونول جليكوزيلي، شالكون واحد و أوران واحد)، لينيان و 2 صابونينات ذات هيكل أوليانان. الأوليان المعروف باسم soyasaponine I يعتبر من المركبات المحددة للصف *Astragalus*. بالإضافة إلى ذلك، 3 مركبات أخرى تم عزلها من مستخلص *éthyle acétate* منها 2 فيتوستيرول و تريتاربان واحد. هذا ما يتفق مع الدراسات السابقة لنباتات هذا الجنس اتفاقا تاما، حيث أن الفلافونويدات و الصابونينات تعتبر المكونات النموذجية لهذا الجنس.

بالنسبة للنبته *Hedysarum carnosum* DESF. فقد تم عزل 12 مركب طبيعي آخر معروف من المستخلص *éthyle acétate*، منها 8 فلافونويدات تتضمن 7 أيزوفلافونويد و فلافانون، كومستان، جليكول، مشتق حمض بنزويكي و لينيان. تبين هذه الدراسة أن الفلافونويدات، وبالأخص الإيزوفلافونويدات، تبقى المكونات الغالبة للجنس *Hedysarum*. لقد أظهر مستخلص *n*-BuOH للنبته *Astragalus monspessulanus* L. فعالية ضد أكسدة معتدلة اتجاه DPPH. هذه الفعالية راجعة إلى المركبات الفينولية لهذا المستخلص، خاصة الفلافونويدات. في الحقيقة، تعتبر الفلافونويدات من أهم المواد المضادة للأكسدة في النباتات. في حين لم يظهر المستخلص *éthyle acétate* للنبته *Hedysarum carnosum* DESF. أي فعالية مثبتة اتجاه DPPH.

الكلمات المفتاحية: *Fabaceae*، *Astragalus monspessulanus* L.، *Hedysarum carnosum* DESF.

الفلافونويدات، اللينيانات، الصابونينات، مطيافية الرنين المغناطيسي، الفعالية المضادة للأكسدة.



J. Serb. Chem. Soc. 83 (1) 31–38 (2018)
JSCS–5056

SHORT COMMUNICATION

Chemical composition and antioxidant activity of *Astragalus monspessulanus* L. growing in semiarid areas of Algeria

SAWSEN BOUREZZANE¹, HAMADA HABA¹, CHRISTOPHE LONG² and
MOHAMMED BENKHALED^{1*}

¹Laboratory of Chemistry and Environmental Chemistry (L.C.C.E), Department of Chemistry,
Faculty of Sciences, Batna-1 University, Algeria and ²USR 3388 CNRS-Pierre Fabre, 3
Avenue Hubert Curien BP 13562, 31035 Toulouse, France

(Received 12 December 2016, revised 19 June, accepted 3 July 2017)

Abstract: This paper reports a phytochemical study of the aerial parts of *Astragalus monspessulanus* L. growing in Algeria. It deals with the isolation and structure elucidation of 13 known compounds. From the *n*-butanol extract, seven flavonoids 1–7, two saponins and one lignan were isolated. In addition, two phytosterols and one triterpenoid were isolated from the ethyl acetate extract. The structures of all the isolated products were determined by using 1D and 2D-NMR techniques, measurement of optical rotation, mass spectrometry ESI-MS and by comparison with literature data. Furthermore, the antioxidant activity of the *n*-butanol extract of the aerial parts of *Astragalus monspessulanus* L. was investigated using the DPPH radical scavenging and ferrous ion chelating assays. The *n*-butanol extract showed low ($EC_{50} = 2.09 \pm 0.434$ mg mL⁻¹) to moderate ($IC_{50} = 63.60 \pm 0.01$ µg mL⁻¹) antioxidant activities depending on the test method.

Keywords: Fabaceae; *Astragalus monspessulanus* L.; flavonoids; lignan; saponins; NMR; antioxidant activity.

INTRODUCTION

Astragalus is the largest genus in the Fabaceae family comprising over 3000 species of flowering plants.¹ Many of these species are famed in traditional medicine as anti-perspirants, diuretics as well as tonics and for the treatment of nephritis, diabetes, leukemia and uterine cancer. Previous phytochemical investigations on *Astragalus* genus revealed the presence of saponins, polysaccharides, phenolics and alkaloids.^{2–5}

In continuation of on-going studies on the constituents of *Astragalus* species,^{6–8} a phytochemical study on *Astragalus monspessulanus* L. was realized.

* Corresponding author. E-mail: mbenkhaled@yahoo.fr
<https://doi.org/10.2298/JSC161212085B>

This plant is very common in semi-arid land and the Tell Atlas Mountains in Algeria.⁹ Very recently, a phytochemical investigation on *A. monspessulanus* L., growing in Bulgaria reported the isolation of flavoalkaloids and flavonoids, with hepatoprotective and antioxidant activities.¹⁰ A previous biochemical study performed on this plant revealed that a mixture of non-identified saponins exhibited a cytotoxic effect on HepG2 cell line, at the highest concentration of 4 mg mL⁻¹ after 48 and 72 h.¹¹

The aim of the present study was to examine the chemical composition of *A. monspessulanus* species (aerial parts) and to evaluate its antioxidant activity.

In the current work, 13 compounds were isolated from the ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *A. monspessulanus* L. (Fig. 1). Thus, this study focused on the phytochemistry of this species, structure determination of the isolated compounds and the antioxidant activity of the *n*-BuOH extract using DPPH radical scavenging and ferrous ion chelating assays.

EXPERIMENTAL

General

¹H- and ¹³C-NMR spectra were recorded on a Bruker Avance II spectrometer (Bruker, France) equipped with a cryoprobe (500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C) in MeOD or DMSO-*d*₆ solution and a Bruker Avance spectrometer (600 MHz for ¹H and 150 MHz for ¹³C) in CD₃OD. 1D and 2D NMR experiments (COSY, HSQC and HMBC) were used to assign the individual ¹H and ¹³C resonances. ESI-MS spectra were obtained on a Bruker ion trap Esquire LC. Column chromatography (CC) was performed using silica gel Merck Kieselgel 60 (70–230 mesh), Merck Lobar Lichroprep RP-18 (40 μm×63 μm), Polyamide SC6 and Sephadex LH-20. Column fractions were monitored by TLC; individual TLC plates were performed on silica gel plates Kieselgel 60 F₂₅₄S (Merck, Darmstadt, Germany) or RP-18 plates and visualized by spraying with 50 % sulfuric acid reagent or vanillin sulfuric acid then heating. A pre-packed C₁₈ reversed-phase column (XTerra RP-18, 19×250, 30×100 and 4.6×100 mm, 0.45 μm) was used for preparative HPLC with binary gradient elution (solvent A: H₂O and solvent B: MeCN) at 25 °C, a flow rate of 25 mL min⁻¹ and the chromatogram was monitored at 250 and 280 nm. Absorption measurements were performed on a Sedico VIS7220G UV–Vis spectrophotometer (Sedico, Cyprus).

Plant material

The aerial parts of *Astragalus monspessulanus* L. were collected in June 2012 near Batna-Aures (Algeria), and identified by Prof. Bachir Oudjehih of the Agronomic Institute of the University of Batna-1, where a voucher specimen was deposited (No. 745/LCCE).

Extraction and isolation

Powdered air-dried material of *A. monspessulanus* (1000 g) was extracted three times with EtOH/H₂O (70/30, 10 L) each for 3 days at room temperature. After filtration and evaporation, the crude extract suspended in H₂O was partitioned successively with petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol to give three different polar parts. Evaporation to dryness yielded the following extracts: petroleum ether (8.3 g), ethyl acetate (12.1 g), and *n*-butanol (15.33 g).

The *n*-butanol extract (7 g) was submitted to vacuum liquid chromatography (VLC) on RP-18, using a gradient of H₂O/MeOH (80:20 to 0:100) as eluent to obtain 15 fractions (Fr₁–Fr₁₅). Further chromatographic separation and purification using CC, TLC, HPLC and precipitation on fractions Fr₁ (5.53 g) and Fr₄ (60 mg) allowed the isolation of 10 compounds (**1**–**10**).

The ethyl acetate extract (7 g) was subjected to RP-18 vacuum liquid chromatography (VLC) using a gradient system of H₂O/MeOH (80:20 to 0:100) to afford 9 fractions (Fr₁–Fr₉). Fractions Fr₉ (232 mg), Fr₆ (695 mg) and Fr₇ (780 mg) were chromatographed on successive silica gel CC followed by precipitation to provide 3 compounds (**11**–**13**).

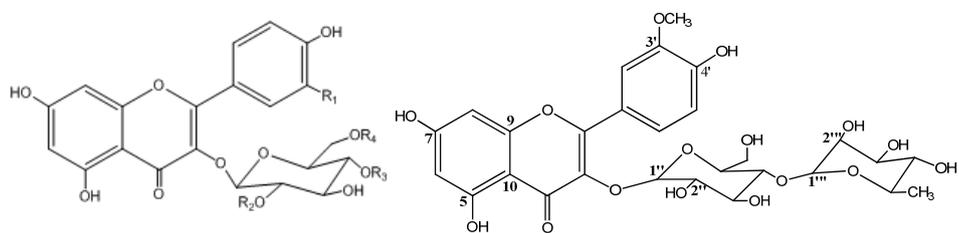
Details of the isolation and purification procedures are given in the Supplementary material to this paper, along with the analytical and spectral data of the compounds.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, 13 known compounds were isolated, including seven flavonoids, identified as kaempferol 3-*O*-rutinoside (nicotiflorin, **1**),¹² isorhamnetin 3-*O*-(4-*O*- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside) (calendoside III, **2**),¹³ quercetin 3-*O*-rutinoside (rutin, **3**),¹² kaempferol 3-*O*-(4-*O*- α -L-rhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside) (**4**),¹⁴ quercetin 3-*O*-(2,6- α -L-dirhamnopyranosyl- β -D-glucopyranoside) (**5**),¹⁵ 3',5'-di-*C*- β -D-glucopyranosylphloretin (**6**) and hove-trichoside C (**8**),^{16,17} one lignan, *i.e.*, isolariciresinol 9'-*O*- β -D-glucopyranoside (**7**),¹⁸ two saponins, *i.e.*, soyasaponin I (**9**) and dehydrosoyasaponin I (**10**),^{19,20} two sterols, *i.e.*, β -sitosterol (**11**) and β -sitosterol 3-*O*-glucoside (**12**),²¹ and one triterpenoid, *i.e.*, lupeol (**13**).²² Their structures were elucidated by extensive spectroscopic methods including 1D (¹H and ¹³C) and 2D NMR (COSY, HSQC and HMBC) experiments as well as ESI-MS analysis (see Supplementary material) and by comparison with those reported in literature (Fig. 1).

Although the presence of flavonoids as dominant compounds was observed in the same species from the flora of Bulgaria,¹⁰ only quercetin 3-*O*-rutinoside (rutin, **3**) is common. This compound was previously reported in the *Astragalus* genus, such as in *A. corniculatus*.²³ The present study reports for the first time the isolation and identification of the triterpenic saponins **9** and **10** in *A. monspessulanus* L. Triterpenic saponins are the major constituents of the *Astragalus* genus, besides flavonoids and polysaccharides.²⁴ Soyasaponin I (**9**) was previously isolated from many *Astragalus* species.^{7,19,25} However, this is only the second report of the occurrence of dehydrosoyasaponin I (**10**) in this genus.⁷

According to the literature data, this is also the first occurrence of the compounds **2**–**8** in the genus *Astragalus*. Calendoside III (**2**) was identified in *Calendula officinalis* L. (Asteraceae).¹³ Compound **4** was reported in *Oxandra sessiliflora* (Annonaceae) and *Acacia pennata* Willd (Mimosaceae).^{14,26} Compound **5**, called manghaslin, was previously isolated from *Glycine max* (Fabaceae).²⁷ It was first found in *Cerbera manghas* (Apocynaceae).²⁸ Compound **6** is present in the Fabaceae family, such as in *Cyclopia subternata*, and could contribute to the antioxidant activity of this species.²⁹

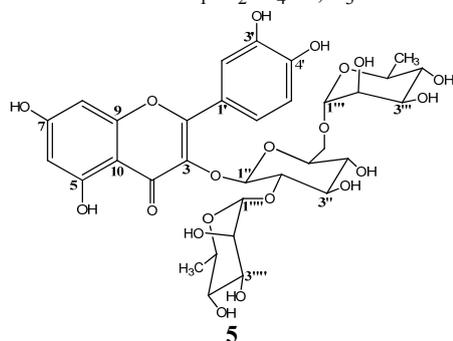


1 $R_1=R_2=R_3=H$, $R_4=Rha$

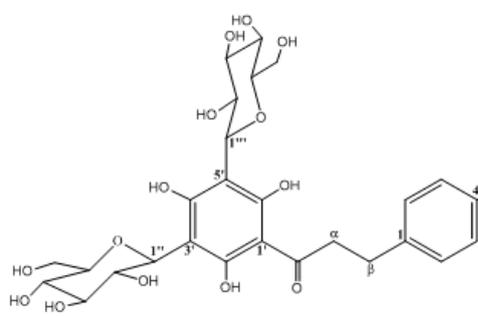
3 $R_1=OH$, $R_2=R_3=H$, $R_4=Rha$

4 $R_1=R_2=R_4=H$, $R_3=Rha$

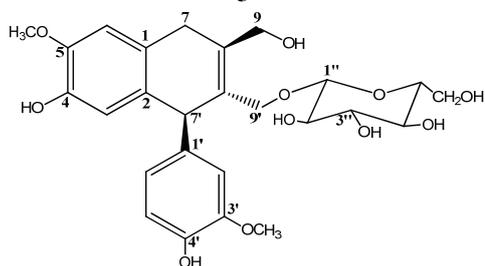
2



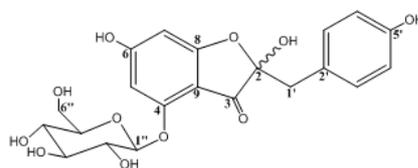
5



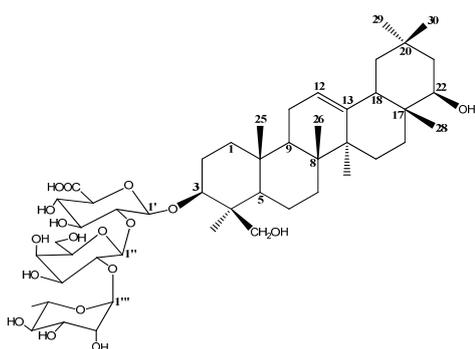
6



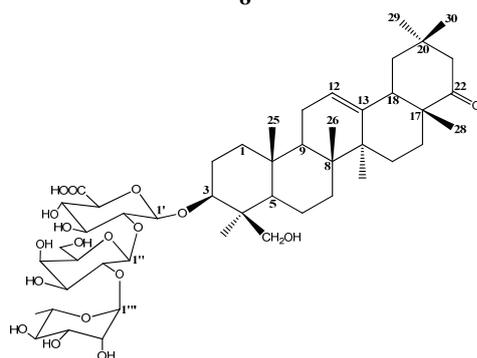
7



8



9



10

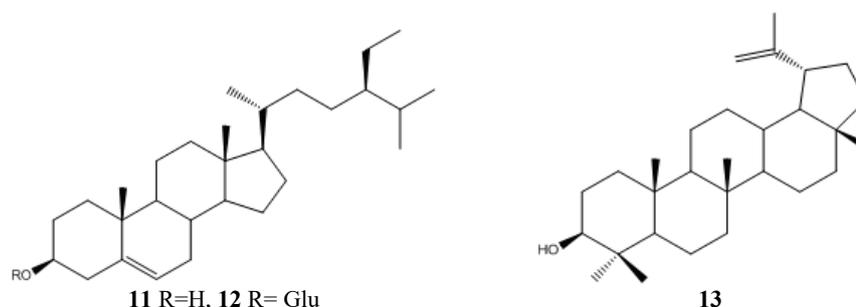


Fig. 1. Chemical structures of compounds 1–13 isolated from *Astragalus monspessulanus* L.

Compound 7 was isolated from *Pelargonium reniforme* (Geraniaceae) and *Pedicularis densispica* (Scrophulariaceae).^{18,30} Hovetrichoside C (8) was previously obtained from *Hovenia trichocarea* (Rhamnaceae) and *Punica granatum* (Punicaceae).^{17,31}

Nicotiflorin (1) is common in the *Astragalus* genus. It has been detected in several *Astragalus* species, such as *A. verrucosus* Moris,³ *A. icmadophilus* Hand.-Mazz.³² and *A. cruciatus* Link.⁶

Antioxidant activity

In this study, the antioxidant activity of the *n*-butanol extract of *A. monspessulanus* was assessed *in vitro* using two different methods, *i.e.*, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and ferrous ion chelating activities. The crude extract possessed a moderate scavenging effect ($IC_{50} = 63.60 \pm 0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$, Supplementary material, Fig. S-4) in a dose-dependent manner compared to ascorbic acid as a standard ($IC_{50} = 3.15 \mu\text{g mL}^{-1}$). This antioxidant activity may be due to the presence of phenolic compounds, such as 3'-5'-di-*C*- β -D-glucopyranosylphloretin (6), which is known for its interesting antioxidant activities.²⁹

The results of the ferrous ion chelating activity (Supplementary material, Fig. S-6) revealed that the *n*-butanol extract of *A. monspessulanus* possesses a low metal chelating activity ($EC_{50} = 2.09 \pm 0.44 \text{ mg mL}^{-1}$) compared to EDTA as a standard ($EC_{50} = 0.529 \pm 0.031 \mu\text{g mL}^{-1}$). This low activity could be explained by the nature of chemical compounds in the extract. Many studies reported that the metal chelating ability of phenolic compounds is linked to their unique phenolic structure and the number and location of hydroxyl groups.^{33,34}

CONCLUSIONS

In conclusion, 13 known compounds were isolated from the ethyl acetate and *n*-BuOH extracts of the aerial parts of *Astragalus monspessulanus*. According to literature data, the isolated compounds 2–8 are identified for the first time in *Astragalus* genus, and compounds 1, 9 and 10 in the species. Our report con-

firmly that saponins and flavonoids are the major constituents of the *Astragalus* genus. Interestingly, this investigation highlights a significant difference between flavonoids reported in the present study and those isolated from *A. monspessulanus* of Bulgarian origin, except compound **3** (rutin) which is common. It is worth noting that it is the first report of saponins and lignans in *A. monspessulanus*. Indeed, the accumulation of **9** (soyasaponin I) is a generic trait of the genus *Astragalus*. This compound is used as a chemotaxonomic marker for this genus and the Fabaceae family.³⁵

Data from the presented results revealed that the *n*-butanol extract of *A. monspessulanus* acts as an antioxidant agent. Thus, the antioxidant capacity is correlated to the phenolic composition of the corresponding extract, including flavonoids and lignan.³⁶ In fact, the flavonoid class is the most important plant antioxidant.³⁷

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Details of the isolation and purification procedures, along with the analytical and spectral data of the compounds, are available electronically from <http://www.shd.org.rs/JSCS/>, or from the corresponding author on request.

Acknowledgements. We are thankful to the Algerian Minister of Higher Education and Scientific Research for providing a research grant. We are also grateful to USR 3388 CNRS-Pierre Fabre, Toulouse, France for providing research facilities and technical support.

ИЗВОД

ХЕМИЈСКИ САСТАВ И АНТИОКСИДАТИВНА АКТИВНОСТ ЕКСТРАКТА ИЗОЛОВАНИХ ИЗ *Astragalus monspessulanus* L. КОЈИ РАСТУ У ПОЛУСУВИМ ОБЛАСТИМА АЛЖИРА

SAWSEN BOUREZZANE¹, HAMADA HABA¹, CHRISTOPHE LONG² и MOHAMMED BENKHALED¹

¹Laboratory of Chemistry and Environmental Chemistry (L.C.C.E), Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Batna-1 University, Algeria и ²USR 3388 CNRS-Pierre Fabre, 3 Avenue Hubert Curien BP 13562, 31035 Toulouse, France

У раду је приказано фитохемијско испитивање надземних делова биљке *Astragalus monspessulanus* L. која расте у Алжиру. Описано је изоловање и утврђивање структуре 13 познатих једињења. Из *n*-бутанолног екстракта изоловано је седам флавоноида (1–7), два сапонина и један лигнан. Такође, два фитостерола и један тритерпен од изолованих су из етил-ацетатног екстракта. Структуре свих изолованих једињења одређене су применом 1D- и 2D-NMR спектроскопије, мерењем оптичке ротације, ESI-MS масеном спектрометријом и поређењем са подацима из литературе. Осим тога, испитана је антиоксидативна активност *n*-бутанолног екстракта надземних делова *A. monspessulanus* L. Применом DPPH хватача радикала и гвожђе(II) теста, испитивани *n*-бутанолни екстракт показује ниску ($EC_{50} = 2,09 \pm 0,44 \text{ mg mL}^{-1}$) до умерену ($IC_{50} = 63,60 \pm 0,01 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) антиоксидативну активност у зависности од примењеног модела за тестирање.

(Примљено 12. децембра 2016, ревидирано 19. јуна, прихваћено 3. јула 2017)

REFERENCES

1. V. H. Heywood, *Flowering plants of the world*, Oxford University Press, London, 1978

2. M. I. Choudhary, S. Jan, A. Abbaskhan, S. G. Mucharraf, S. A. Samreen Sattar, *J. Nat. Prod.* **71** (2008) 1557
3. L. Pistelli, I. Giachi, E. Lepori, A. Bertoli, *Pharm. Biol.* **41** (2003) 568
4. J. Echeverria, S. M. Espinoza, H. M. Niemeyer, *Nat. Prod. Res.* **31** (2017) 89
5. K. Guo, X. He, D. Lu, Y. Zhang, X. Li, Z. Yan, B. Qin, *Nat. Prod. Res.* **31** (2017) 314
6. W. Benchadi, H. Haba, C. Lavaud, D. Harakat, M. Benkhaled, *Rec. Nat. Prod.* **7** (2013) 105
7. L. Maamria, H. Haba, C. Lavaud, D. Harakat, M. Benkhaled, *J. Serb. Chem. Soc.* **80** (2015) 137
8. L. Maamria, C. Long, H. Haba, C. Lavaud, M. Benkhaled, *Phytochem. Lett., B* **11** (2015) 286
9. P. Quezel, S. Santa, *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Vol. 1–2, CNRS, Paris, 1963
10. I. Krasteva, V. Bratkov, F. Bucar, O. Kunert, M. Kollhoser, M. Kondeva-Burdina, I. Ionkova, *J. Nat. Prod.* **78** (2015) 2565
11. V. Bratkov, M. Kondeva-Burdina, R. Simeonova, V. Tzankova, I. Krasteva, *Eur. J. Med. Plants* **4** (2014) 522
12. K. Kazuma, N. Noda, M. Suzuki, *Phytochemistry* **62** (2003) 229
13. D. N. Olennikov, N. I. Kashchenko, *Chem. Nat. Compd.* **50** (2014) 633
14. E. A. De Sousa, A. A. C. A. Da Silva, A. J. Cavalheiro, J. H. G. Lago, M. H. Chaves, *J. Braz. Chem. Soc.* **25** (2014) 704
15. B. Schwarz, T. Hofmann, *J. Agric. Food Chem.* **55** (2007) 1394
16. K. Ogawa, A. Kawasaki, M. Omura, T. Yoshida, Y. Ikoma, M. Yano, *Phytochemistry* **57** (2001) 737
17. K. Yoshikawa, K. Eiko, N. Mimura, Y. Kondo, S. Arihara, *J. Nat. Prod.* **61** (1998) 786
18. K. P. Latté, M. Kaloga, M. Schäfer, H. Kolodziej, *Phytochemistry* **69** (2008) 820
19. A. M. El-Hawiet, S. M. Toaima, A. M. Asaad, M. M. Radwan, N. A. El-Sebakhy, *Braz. J. Pharmacogn.* **20** (2010) 860
20. H. Miyao, Y. Sakai, T. Takeshita, J. Kinjo, T. Nohara, *Chem. Pharm. Bull.* **44** (1996) 1222
21. D. N. Olennikov, L. M. Tankhaeva, V. V. Partilkaev, A. V. Rokhin, *Braz. J. Pharmacogn.* **22** (2012) 490
22. J. Anaya, M. C. Caballero, M. Grande, J. J. Navarro, I. Tapia, J. F. Almeida, *Phytochemistry* **28** (1989) 2206
23. I. Krasteva, S. Nikolov, *Quim. Nova* **31** (2008) 59
24. L. J. Rios, G. P. Waterman, *Phytother. Res.* **11** (1997) 411
25. S. Yahara, M. Kihjyouma, H. Kohoda, *Phytochemistry* **53** (1990) 469
26. A. B. Dongmo, T. Milyamoto, K. Yoshikawa, S. Arihara, M. A. Lacaille-Dubois, *Planta Med.* **73** (2007) 1202
27. B. R. Buttery, R. I. Buzell, *Can. J. Bot.* **53** (1975) 219
28. A. Sakushima, S. Hisada, Y. Ogihara, S. Nushiba, *Chem. Pharm. Bull.* **28** (1980) 1223
29. A. Kokotkiewicz, M. Luczkiewicz, P. Sowinski, D. Glod, K. Gorynski, A. Bucinski, *Food Chem.* **133** (2012) 1373
30. H. B. Chu, G. Z. Zeng, M. J. Zhu, W. J. He, Y. M. Zhang, N. H. Tan, *Z. Naturforsch., B: J. Chem. Sci.* **66** (2011) 641
31. T. Yuan, C. Wan, H. Ma, N. P. Seeram, *Planta Med.* **79** (2013) 1674
32. I. Horo, E. Bedir, A. Perrone, F. Özgökçe, S. Piacente, Ö. Alankuş-Çalışkan, *Phytochemistry* **71** (2010) 956

33. I. F. Cheng, K. Breen, *Biomaterials* **13** (2000) 7
34. J. Santoso, Y. Yoshie-Stark, T. Suzuki, *Fish. Sci. (Tokyo, Jpn.)* **70** (2004) 183
35. W. Oleszek, A. Stochmal, *Phytochemistry* **61** (2002) 165
36. L. Bravo, *Nutr. Rev.* **56** (1998) 317
37. J. V. Higdon, B. Frei, *Crit. Rev. Food Sci.* **43** (2003) 89.