

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Hadj Lakhdar - BATNA 1
Faculté des Sciences de la Matière
Département de Chimie



THÈSE

En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat

Présentée par :

BENCHADI WASSILA

Thème

Constituants chimiques des espèces
***Helianthemum hirtum ssp. ruficomum* (Cistaceae)**
et *Onobrychis crista-galli* (Fabaceae)

Spécialité : Chimie organique

Soutenue le : 01 /10 / 2020

Devant le jury :

Président :	HABA Hamada	Professeur	Université Batna-1
Rapporteur :	BENKHALED Mohammed	Professeur	Université Batna-1
Examineurs :	DIBI Ammar	Professeur	Université Batna-1
	AKKAL Salah	Professeur	Université Constantine-1
	ATMANI Djebbar	Professeur	Université Béjaïa
	BITAM Fatma	Professeur	Université Batna-2

2019-2020

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (LCCE) de la Faculté de Sciences de la Matière de l'Université de Batna-1.

C'est ainsi qu'à travers ce mémoire, j'offre tout d'abord mes remerciements les plus sincères et chaleureux, au Professeur **BENKHALED Mohammed**, mon directeur de thèse. Je le remercie pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire de recherche et de m'avoir guidée dans la conduite de ce travail et pour toutes les heures qu'il a consacrées à diriger cette recherche. Sa grande connaissance dans le domaine, ainsi que son expérience, ont joué un rôle important dans la conception de ce travail. Il m'a fait bénéficier de ses conseils et compétences.

Je suis très redevable et je ne trouve pas les mots pour exprimer mes plus vifs remerciements et ma profonde gratitude envers le Professeur **HABA Hamada** de l'Université de Batna-1 pour m'avoir également suivi. Ses multiples conseils m'ont aidé à surmonter beaucoup de difficultés. Je le remercie chaleureusement pour sa pédagogie, sa patience, sa disponibilité et son dévouement et ses encouragements sans aucune limite. Je le remercie également pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse de Doctorat.

Je remercie évidemment l'ensemble des membres de jury, Monsieur le Professeur **ATMANI Djebbar** de l'Université de Béjaïa, Monsieur le Professeur **AKKAL Salah** de l'Université de Constantine-1 et Monsieur le professeur **DIBI Ammar** de l'Université de Batna-1 et mademoiselle le Professeur **BITAM Fatma** de l'Université de Batna-2 pour avoir accepté de faire partie du jury de cette 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 voudrais remercier Monsieur le Professeur **WOLFENDER Jean-Luc**, directeur du Centre Médical Universitaire de l'Université de Lausanne, Genève (Suisse) pour m'avoir accueillie dans son équipe, pour m'avoir fait confiance, m'avoir permis de réaliser ce travail

dans de meilleures conditions tout en me laissant une grande liberté, m'avoir soutenue et donnée l'opportunité inestimable d'apprendre de nouvelles techniques en relation avec ce travail.

Je remercie profondément Madame le Docteur **MARCOURT Laurence** pour sa grande disponibilité, ses encouragements, ses aides, son accompagnement et pour sa gentillesse à mon égard lors de mon séjour, pour la réalisation des spectres de RMN et masse.

A Monsieur le Docteur **EMERSON Ferreira Queiroz** pour son apport en phytochimie et ses suggestions. Je remercie aussi toute l'équipe du Centre Médical Universitaire (Genève, Université de Lausanne), qui a contribué au succès de mon stage.

La partie d'évaluation biologique a été effectuée au Centre de Recherche en Biotechnologie de Constantine (CRBT). Pour cela, je remercie Monsieur le Docteur **BENSOUICI Chawki** pour son accueil, son orientation et ses conseils durant le stage au CRBT.

Il m'est agréable d'adresser mes sincères remerciements à tous ceux qui m'ont apporté de près comme de loin, aide et conseils lors de l'élaboration de cette thèse tout au long de ces années de doctorat et à toutes mes proches fidèles amies de longue date qui sont présentes et ont partagé avec moi les moments difficiles.

Ce travail est l'aboutissement d'un dur labeur et de beaucoup de sacrifices, Mes forts remerciements à ma famille et surtout mes parents pour leur soutien moral ininterrompu, leur confiance inébranlable, pour la qualité de l'éducation qu'ils m'ont conférée et d'une façon toute particulière à ma mère, qui m'a toujours encouragée et poussée tout au long de mes études.

La réalisation d'une thèse de Doctorat n'aurait pu aboutir sans l'aide d'un grand nombre de personnes. Que me pardonnent celles que j'oublie ici.

Dédicaces

Je dédie cette thèse à :

Mes très chers parents, qui m'auront permis de poursuivre mes études jusqu'à aujourd'hui. Chaque ligne de cette thèse, chaque mot et chaque lettre vous exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et la fierté d'être mes parents. Je leur dédie mes réussites passées et à venir.

*Je la dédie particulièrement à l'être le plus cher à mes yeux, à **Mama**, Qui m'a accompagnée par ses prières, sa douceur, sa confiance, sa gentillesse, sa tendresse, son amour, me portant et me guidant tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Puisse Dieu lui prêter longue vie et beaucoup de santé et de bonheur dans les deux vies.*

A mes chers et adorables frères et ma sœur

*Un immense merci à mon unique sœur **Soraya** pour m'avoir remonté le moral et encouragé à ne pas laisser tomber. Ton soutien a été précieux et merci d'avoir été présente dans mes moments de doutes.*

*A mes frères **Rafik** et **Youcef**. Pour tous les soutiens et encouragements qu'ils apportent.*

Je vous aime très profondément et je vous remercie de tout mon cœur d'être ce que vous êtes.

A tous les gens qui m'aiment

Merci pour tout

Wassila

Abréviations

EtOH	: Ethanol
EP	: Ether de Pétrole
AcOEt	: Acétate d'Ethyle
<i>n</i>-BuOH	: <i>n</i> -Butanol
CHCl₃	: Chloroforme
MeOH	: Méthanol
CH₂Cl₂	: Dichlorométhane
CDCl₃	: Chloroforme deutéré
CD₃OD	: Méthanol deutéré
MeOD	: Méthanol deutéré
DMSO	: DiMéthylSulfOxyde
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince
CC	: Chromatographie sur Colonne
VLC	: Chromatographie Liquide sous Vide
SiO₂	: Gel de silice normale
C-18	: dimethyl octadecyl silane (phase inverse)
CLMP	: Chromatographie Liquide Moyenne Pression
CLHP	: Chromatographie Liquide Haute Performance
UHPLC	: Ultra-High-Performance Liquid Chromatography
SPE	: Solid Phase Extraction
UV(DAD)-ELSD	: UltraViolet Diode Array Detector- Evaporative Light Scattering Detector
<i>d</i>	: doublet
<i>dd</i>	: doublet de doublets
<i>ddd</i>	: doublet de doublets de doublets
<i>q</i>	: quadruplet
<i>ddt</i>	: doublet de doublets de triplets
<i>t</i>	: triplet
<i>s</i>	: singulet
<i>m</i>	: multiplet
<i>nd</i>	: non déterminé
Cq	: Carbone quaternaire

Gal	: Galactose
Glc	: Glucose
Rha	: Rhamnose
OMe	: Méthoxyl
RMN ¹H	: Résonance Magnétique Nucléaire du proton
RMN ¹³C	: Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
COSY H-H	: Correlated Spectroscopy
HSQC	: Heteronuclear Single Quantum Connectivity
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DEPTQ	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer including the detection of Quaternary nuclei
TOCSY	: Total Correlation Spectroscopy
SM- ESI	: Spectrométrie de Masse par Electro Spray
SM- ESI-HR	: Spectrométrie de Masse par Electro Spray Haute Résolution
TOF	: Time Of Flight
δ	: Déplacement chimique exprimé en ppm
J	: Constante de couplage exprimée en Hz
m/z	: masse/charge d'un ion
uma	: unité de masse atomique
ppm	: partie par million
UV	: UltraViolet
R	: Radical
F	: Fraction
t_R	: temps de rétention
SEM	: Standard Error of Mean
A	: Absorbance
IC₅₀	: Concentration Inhibitrice à 50%
DPPH	: 1,1-DiPhenyl-2-PicrylHydrazyl
ABTS	: 2,2'-Azinobis-(3-ethylBenzoThiazoline-6-Sulfonique)
BHA	: ButylHydroxyAnisole
BHT	: ButylHydroxyToluene
CUPRAC	: Cupric Reducing Antioxidant Capacity

GAE	: Equivalent d'Acide Gallique
EQ	: Equivalent Quercétine
%I	: Equivalent d'inhibition
g	: gramme
µg	: microgramme
µl	: microlitre
L	: Litre
mg	: milligramme
ml	: millilitre
%	: pourcentage
nm	: nanomètre
°C	: degré Celsius
λ	: longueur d'onde exprimée en nm

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Aspects botaniques et études antérieures	
I-1- Présentation du genre <i>Helianthemum</i>	3
I-1-1- Propriétés biologiques et thérapeutiques du genre <i>Helianthemum</i>	3
I-1-1-1- Usages traditionnels.....	3
I-1-1-2- Activités biologiques.....	4
I-1-2- Espèce <i>Helianthemum hirtum</i> ssp. <i>ruficomum</i> (Viv.) Maire.....	5
I-1-2-1- Description botanique.....	5
I-1-2-2- Classification botanique.....	5
I-1-2-3- Etudes chimiques antérieures sur le genre <i>Helianthemum</i>	7
I-2- Présentation du genre <i>Onobrychis</i>	12
I-2-1- Distribution.....	12
I-2-2- Classification systématique	13
I-2-3- Activités biologiques reconnues	13
I-2-4- Espèce <i>Onobrychis crista-galli</i> (L.) Lam.....	14
I-2-4-1- Description botanique.....	14
I-2-4-2- Distribution.....	15
I-2-4-3- Classification.....	15
I-2-4-4- Etudes chimiques antérieures sur le genre <i>Onobrychis</i>	16
I-2-4-5- Différentes classes de métabolites secondaires isolées à partir du genre <i>Onobrychis</i>	16

Chapitre II : Etude phytochimique de l'espèce *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.) Maire

II-1- Etude phytochimique de l'espèce <i>Helianthemum hirtum</i> ssp. <i>ruficomum</i> (Viv.) Maire...	23
II-1-1- Extraction.....	23
II-1-2- Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle.....	24
II-1-3- Fractionnement et purification de l'extrait <i>n</i> -butanolique.....	25
II-1-4- Détermination structurale des composés obtenus HH (1-11)	26
II-4-1- Détermination structurale du composé HH1	26
II-4-2- Détermination structurale du composé HH2	42
II-4-3- Détermination structurale du composé HH3	50
II-4-4- Détermination structurale du composé HH4	54
II-4-5- Détermination structurale du composé HH5	64
II-4-6- Détermination structurale du composé HH6	68
II-4-7- Détermination structurale du composé HH7	73
II-4-8- Détermination structurale du composé HH8	80
II-4-9- Détermination structurale du composé HH9	85
II-4-10- Détermination structurale du composé HH10	90
II-4-11- Détermination structurale du composé HH11	92
II-1-5- Conclusion.....	94

Chapitre III : Etude phytochimique de l'espèce *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.

III-1- Etude phytochimique de l'espèce <i>Onobrychis crista-galli</i> (L.) Lam.	
III-1-1- Extraction.....	96
III-1-2- Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle.....	97
III-1-3- Fractionnement et purification de l'extrait <i>n</i> -butanolique.....	98
III-1-4- Détermination structurale des composés obtenus OC (1-15)	98

III-4-1- Détermination structurale du composé OC1	99
III-4-2- Détermination structurale du composé OC2	105
III-4-3- Détermination structurale du composé OC3	110
III-4-4- Détermination structurale du composé OC4	114
III-4-5- Détermination structurale du composé OC5+ OC6	118
III-4-6- Détermination structurale du composé OC7	118
III-4-7- Détermination structurale du composé OC8	123
III-4-8- Détermination structurale du composé OC9	131
III-4-9- Détermination structurale du composé OC10	133
III-4-10- Détermination structurale du composé OC11	136
III-4-11- Détermination structurale du composé OC12	138
III-4-12- Détermination structurale du composé OC13	141
III-4-13- Détermination structurale du composé OC14	143
III-4-14- Détermination structurale du composé OC15	145
III-1-5- Conclusion.....	146

Chapitre IV : Activités biologiques

IV- Introduction.....	147
IV-1- Dosage des polyphénols totaux.....	147
IV-1-1- Préparation des extraits.....	147
IV-1-2- Détermination de la teneur totale en composés phénoliques.....	147
IV-1-2-1- Procédure expérimentale.....	147
IV-1-3- Détermination de la teneur totale en flavonoïdes.....	148
IV-1-3-1- Procédure expérimentale.....	148
IV-2- Evaluation de l'activité antioxydante.....	148
IV-2-1- Test de piégeage du radical libre DPPH.....	149
IV-2-1-1- Procédure expérimentale.....	149

IV-2-2- Test de piégeage du radical ABTS ⁺	149
IV-2-2-1- Procédure expérimentale.....	150
IV-2-3- Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	150
IV-2-3-1- Procédure expérimentale.....	150
IV-2-4- Test de piégeage du radical superoxyde O ₂ ^{•-} par la méthode DMSO alcalin.....	151
IV-2-4-1- Procédure expérimentale.....	151
IV-2-5- Test de blanchissement du β -carotène.....	151
IV-2-5-1- Procédure expérimentale.....	151
IV-3-Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i> par inhibition de la dénaturation des protéines.....	152
IV-3-1- Procédure expérimentale.....	152
IV-4- Analyse statistique.....	152
IV-5- Résultats.....	152
IV-5-1- Dosage des phénols totaux.....	152
IV-5-2- Dosage des flavonoïdes.....	153
IV-5-3- Activité antioxydante.....	155
IV-5-3-1- Activité antiradicalaire au DPPH	155
IV-5-3-2- Activité de piégeage de l'ABTS (ou anti-ABTS).....	159
IV-5-3-3- Activité antiréductrice de l'ion cuprique (CUPRAC)	162
IV-5-3-4- Test superoxyde DMSO alcalin.....	165
IV-5-3-5- Test de blanchissement du β -carotène	167
IV-5-3-6- Synthèse des résultats pour l'activité antioxydante	169
IV-5-4- Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	169
IV-6-Conclusion.....	171
Conclusion générale.....	172

Chapitre V : Partie expérimentale

V-1- Matériel et méthodes.....	179
V-1-1- Récolte des plantes.....	179
V-1-2- Méthodes analytiques et préparatives de séparation.....	179
V-1-2-1- Chromatographie sur couche mince (CCM).....	179
V-1-2-2- Chromatographie liquide sous vide (VLC).....	179
V-1-2-3- Chromatographie sur colonne ouverte (CC).....	179
V-1-2-4- Chromatographie liquide moyenne pression (CLMP).....	180
V-1-2-5- Chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	181
V-1-3- Chimie structurale	181
V-1-3-1- Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$	181
V-1-3-2- Spectrométrie de masse.....	181
V-1-3-3- Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	182
V-1-4- Etude de l'espèce <i>Helianthemum hirtum</i> ssp. <i>ruficomum</i>	182
V-1-4-1- Extraction.....	182
V-1-4-2- Fractionnement et purification de l'extrait d'acétate d'éthyle	182
V-1-4-3- Fractionnement et purification de l'extrait <i>n</i> -butanolique.....	184
V-1-4-4- Composés isolés de l'espèce <i>Helianthemum hirtum</i> ssp. <i>ruficomum</i>	186
V-1-5- Etude de l'espèce <i>Onobrychis crista-galli</i> (L.) Lam.....	190
V-1-5-1- Extraction.....	190
V-1-5-2- Fractionnement et purification de l'extrait d'acétate d'éthyle	191
V-1-5-3- Fractionnement et purification de l'extrait <i>n</i> -butanolique.....	191
V-1-5-4- Composés isolés de l'espèce <i>Onobrychis crista-galli</i> (L.) Lam.....	193
Référence bibliographiques.....	199

Résumé

Abstract

ملخص



Introduction

INTRODUCTION

Les plantes dont les études et usages ont prospéré au fil des siècles, sont devenues par la force des choses une source précieuse et inaltérable de découverte de nouveaux principes actifs. Leur usage thérapeutique traditionnel est connu depuis fort longtemps [1]. Beaucoup de métabolites secondaires d'origine végétale, issus de toutes les classes de substances naturelles, sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs [2]. Pour l'exemple, les composés polyphénoliques ont été et font encore l'objet de nombreuses recherches scientifiques à travers le monde en raison de leur diversité structurale et le large éventail de propriétés biologiques qu'ils recèlent. Ils constituent l'une des principales classes de métabolites secondaires, la plus abondante et la plus distribuée du règne végétal. Ils sont valorisés dans les domaines de la phytothérapie, des industries agroalimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques [3]. Les conseils quant à une consommation humaine de polyphénols sont étroitement liés à leurs importantes propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires [4].

Par sa situation géographique, l'Algérie dispose d'un ensemble d'espèces aussi importantes que variées et qui méritent d'être valorisées, par la découverte de principes actifs originaux. La recherche de nouvelles substances bioactives d'origine naturelle semble être l'un des axes prioritaires au cours de ces dernières années. Le travail de recherche qui m'a été confié rentre justement dans cette perspective, constituant une contribution à la valorisation de la flore locale. Il consiste en une investigation chimique et évaluation biologique de deux plantes nommées *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.) Maire et *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam., appartenant respectivement aux familles Cistaceae et Fabaceae.

Les plantes des genres *Helianthemum* et *Onobrychis*, à travers les investigations chimiques antérieures, ont montré une richesse remarquable en métabolites secondaires d'intérêt biologique, notamment les composés polyphénoliques comme les flavonoïdes.

Notre étude englobe deux aspects principaux. Le premier est l'étude phytochimique des deux plantes citées, visant donc à identifier leurs constituants chimiques ainsi que l'estimation spectrophotométrique des composés phénoliques. Le second aspect est consacré à une évaluation *in vitro* de leurs activités antioxydante et anti-inflammatoire.

Ce travail est exposé en cinq chapitres :

- ▣ Le **premier chapitre** représente une recherche bibliographique incluant :
 - la description botanique des genres *Helianthemum* et *Onobrychis*.
 - les propriétés biologiques reportées sur les deux genres.
 - la présentation botanique des deux espèces *Helianthemum hirtum* ssp *.ruficomum* (Var.) Maire et *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.
 - les études chimiques antérieures réalisées sur les deux genres *Helianthemum* et *Onobrychis*.

- ▣ Les **second et troisième** chapitres sont dédiés aux résultats personnels obtenus dans la détermination structurale des métabolites secondaires isolés à l'issue de notre investigation phytochimique des deux plantes citées.

- ▣ Le **quatrième chapitre** comprend :
 - la détermination des teneurs en composés phénoliques (phénols totaux et flavonoïdes) des deux plantes.
 - des généralités de quelques méthodes employées pour évaluer *in vitro* les activités antioxydante et anti-inflammatoire.
 - une évaluation de l'activité antioxydante des deux plantes et de l'activité anti-inflammatoire des différents extraits de *O. crista-galli*.

- ▣ Le **cinquième chapitre** constituant la partie expérimentale, regroupe :
 - les techniques de séparation analytiques et préparatives mises en œuvre.
 - les méthodes physico-chimiques de détermination structurale utilisées.
 - les protocoles d'extraction, de séparation et de fractionnement des extraits.
 - l'isolement et la purification des produits.



Chapitre I

I-1- Présentation du genre *Helianthemum*

Le genre *Helianthemum* est constitué d'environ quatre vingt espèces se répartissant en majorité dans le bassin méditerranéen. Toutefois, certaines d'entre elles ont une distribution plus excentrique, les unes vers l'Asie centrale comme *H. songaricum* (Schrank), les autres vers le nord de l'Europe comme *H. nummularium* (L.) Mill et *H. oelandicum* [5]. Les plantes de ce genre appelées communément hélianthèmes sont des arbustes souvent très petits, à feuilles opposées ou rarement alternes, à fleurs jaunes ou jaunâtres (dans les espèces sahariennes) portant 5 sépales dont deux plus petits, 5 pétales qui tombent très vite après la floraison, de nombreuses étamines et un ovaire formé de 3 carpelles soudés et coiffé d'un style unique coudé [6, 7].

I-1-1- Propriétés biologiques et thérapeutiques du genre *Helianthemum***I-1-1-1- Usages traditionnels**

Les feuilles et les fleurs de différentes espèces du genre sont utilisées en raison de leurs diverses propriétés thérapeutiques : anti-inflammatoire, anti-ulcéreuse, cicatrisante, antiparasitaire, antimicrobienne, analgésique, cytotoxique et vasodilatatrice [8]. Les parties entières des plantes de ce genre sont ingérées en décoction et infusion pour les problèmes gastro-intestinaux. Elles sont également appliquées, en cataplasme et onguent, sur les plaies ou les brûlures infectées [8]. Les feuilles des espèces *H. cinereum*, *H. apenninum*, *H. marifolium* et *H. syriacum*, sont utilisées dans les préparations médicinales traditionnelles, pour combattre différentes affections dont les brûlures, la cicatrisation des plaies, les maux d'estomac, la diarrhée et la gastro-entérite. Les taxons *H. cinereum*, *H. rotundifolium* et *H. syriacum* sont largement préconisés en infusion connue sous le nom de "thé de montagne" [8]. Le tableau I-1 suivant reproduit les espèces utilisées en médecine populaire.

Tableau I-1: Usages traditionnels de quelques espèces du genre *Helianthemum*

Espèce	Parties utilisées	Indications thérapeutiques traditionnelles
<i>H. violaceum</i> <i>H. cinereum</i>	fleurs, feuilles	-Brûlures -Troubles digestifs -Hémorroïdes -Antiseptique

		-Anti-inflammatoire
<i>H. syriacum</i> <i>H. squamatum</i>	aériennes et fleurs	-Maux d'estomac -Diarrhée -Fièvre
<i>H. oelandicum</i>	aériennes	-Brûlures -Problèmes respiratoires
<i>H. apenninum</i>	aériennes	-Brûlures
<i>H. marifolium</i> <i>H. asperum</i>	aériennes et fleurs	-Brûlures -Antiseptique -Contusion
<i>H. glomeratum</i>	aériennes	-Maux d'estomac -Diarrhée -Douleurs abdominales -Anti-dysentérique
<i>H. nummularium</i>	branches	-Diarrhée

I-1-1-2- Activités biologiques

Les métabolites secondaires isolés des espèces du genre *Helianthemum*, comme les flavonoïdes et autres composés phénoliques, sont dotés d'activités biologiques intéressantes. Ainsi, les flavonols nommés astragaline, tiliroside, quercétine et isoquercétrine, principaux composés isolés de *H. glomeratum* montrent des activités anti-allergique, anti-inflammatoire, anti-agrégation plaquettaire, antitumorale, anti-amibienne, antibactérienne, antidiarrhéique et antiprotozoaire, en plus d'un comportement anti-oxydant [8, 9]. Les tanins dérivés de l'acide ellagique ou ellagitanins, isolés dans l'espèce *H. cinereum*, ont révélé diverses activités : antioxydante, antitumorale, antiathérosclérose, anti-inflammatoire, antibactérienne, anti-hépatotoxique, antispétique et antivirale [8].

L'acide ellagique également très présent dans *H. nummularium*, a montré des activités anti-oxydante, hépatoprotectrice, anti-inflammatoire, anti-proliférative ainsi que des effets sur l'apoptose du cycle cellulaire [8]. L'acide gallique détecté dans l'espèce *H. nummularium* s'est révélé antifongique, antiviral, antidiabétique, cytotoxique et

antioxydant [8]. Les caroténoïdes comme α et β -carotène, zéaxanthine, cryptoxanine et lutéine, isolés de *H. nummularium*, présentent des activités antioxydante et anti-tumorale, en plus du rôle important qu'ils jouent dans la nutrition et la santé [10].

I-1-2- Espèce *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.) Maire

I-1-2-1- Description botanique de la plante

L'espèce nommée *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.) Maire, objet de cette étude, possède plusieurs synonymes [6, 11] :

- *H. desertorum* Willk.
- *H. eremophilum* Pomel.
- *H. hirtum* var. *deserti* Coss.
- *H. desiderii* Sennen.
- *H. ruficomum* (Viv.) Speng.

Cette espèce est assez fréquente dans les lieux rocaillieux et ensoleillés. Sa souche est ligneuse, ses tige dressées ou peu étalées, ses feuilles oblongues ou à peine ovales en dessous, roulées en dessous par leur bord, velues en dessous, hérissées en dessus de poils qui naissent disposés en étoiles sur des très petits tubercules, les calices sont très poilus, à poils blancs, nombreux, serrés, un peu étalés, les pétales sont jaunes (Figure I-1) [6, 11].

Elle est largement distribuée dans le Sahara septentrional et les régions pré-désertiques du Maroc et d'Algérie [6].

I-1-2-2- Classification botanique

La classification botanique du *H. hirtum* selon GBIF Backbone taxonomy [12] se présente comme suit :

- ✓ **Règne** : Plantae
- ✓ **Sous-règne** : Tracheobionta
- ✓ **Division** : Magnoliophyta
- ✓ **Classe** : Dicotylédones
- ✓ **Sous-classe** : Dilleniidae
- ✓ **Ordre** : Malvales
- ✓ **Famille** : Cistaceae

- ✓ Genre : *Helianthemum*
✓ Espèce : *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.) Maire



Figure I-1: *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.) Maire

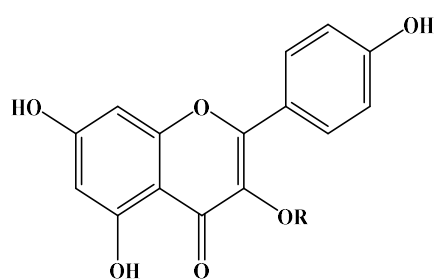
I-1-2-3- Etudes chimiques antérieures sur le genre *Helianthemum*

Les études chimiques antérieures réalisées sur certaines espèces du genre *Helianthemum*, ont abouti à l'isolement et à la caractérisation de nombreux métabolites secondaires. Les plus dominants sont les flavonoïdes en général et les composés terpéniques.

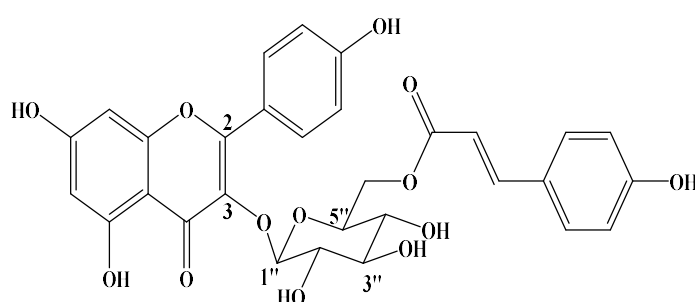
Tableau I-2 : Composés isolés du genre *Helianthemum*

Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Références
<i>H. glomeratum</i>	aériennes	kaempférol (1), astragaline (2), tiliroside (3) quercétine (4), isoquercétine (5) (-)-épicatéchine (6), kaempférol-3- <i>O</i> -(3'', 6''- di- <i>O-E-p</i> -coumaroyl)- β -D-glucopyranoside (7)	[13, 14, 15]
	racines	(-)-épigallocatechine gallate (8) (-)-épigallocatechine (9)	[16]
<i>H. nummularium</i>	/	α et β -carotène (10) et (11), zéaxanthine (12) cryptoxanthine (13), lutéine (14) acide gallique (15), ellagique (16)	[10]
<i>H. almeriensis</i>	/	tanins	[17]
<i>H. kahiricum</i> Del	aériennes	huiles essentielles	[18]
<i>H. ordosicum</i>	tiges	7-phényl-pyrazino[1,2-a] azépine (17) épicatéchine (6), catéchine (18) épigallocatechine (9), gallocatechine (19) gallocatechine-(4 α →8)-épigallocatechine (20)	[19]
<i>H. sessiliflorum</i>	aériennes	1- <i>O</i> -acétyl prinsépiol (21) 1 α -hydroxypinorésinol (22) (+)-cycloolivil (23), acide benzoïque (24) acide <i>p</i> -hydroxy benzoïque (25) acide protocatechique (26) acide vanillique (27), (-)acide pinéllique (28) acide gallique (15), (-)épicatéchine (6)	[20]

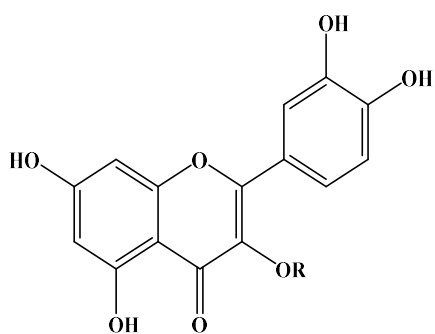
		(-)-catéchine (18), (-)-épigallocatechine (9) (-)-gallocatechine (19), astragaline (2) tiliroside (3), quercitrine (29) isoquercétine (5), myricitrine (30) β -sitostérol (31), daucostérol (32)	
<i>H. canum</i>	aériennes	huiles essentielles	[21]



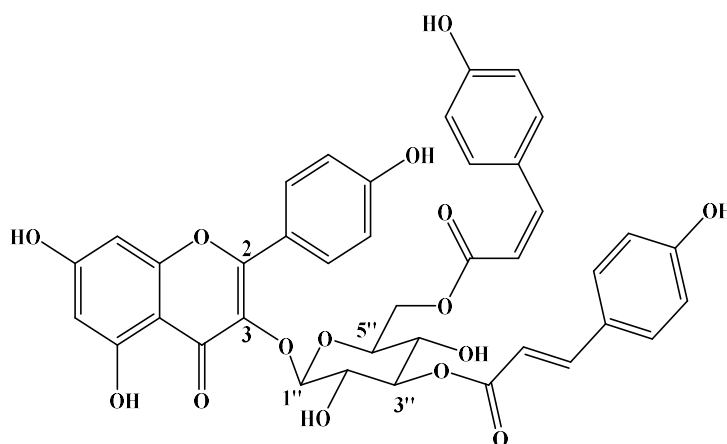
1 R=H
2 R=Glu



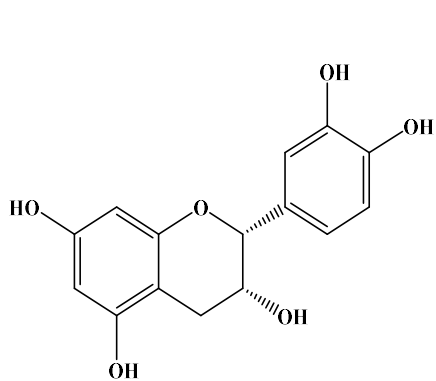
3



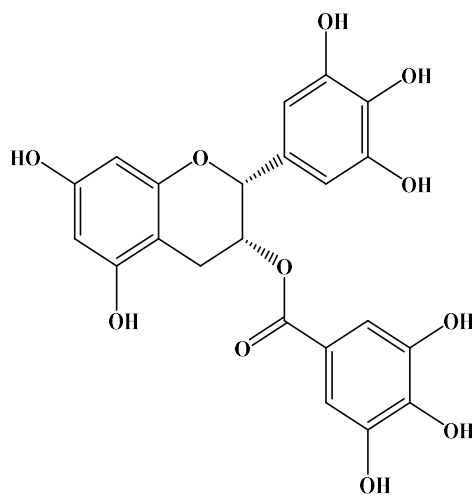
4 R=H
5 R=Glu



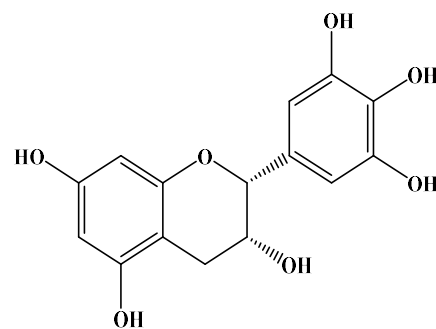
7



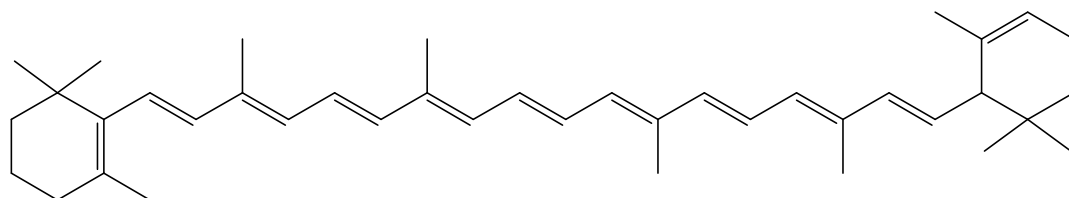
6



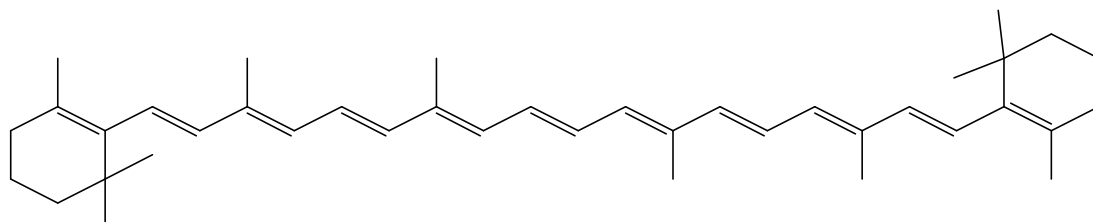
8



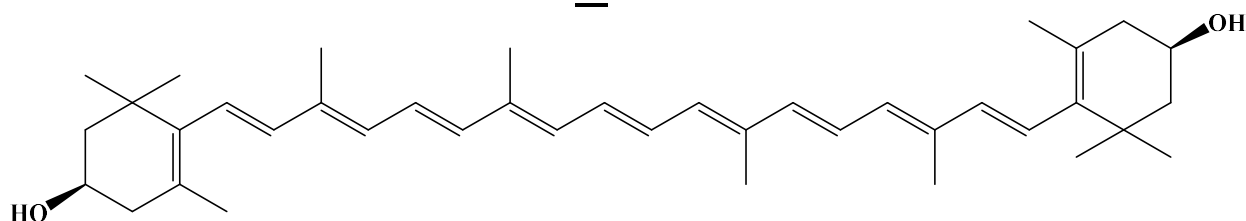
9



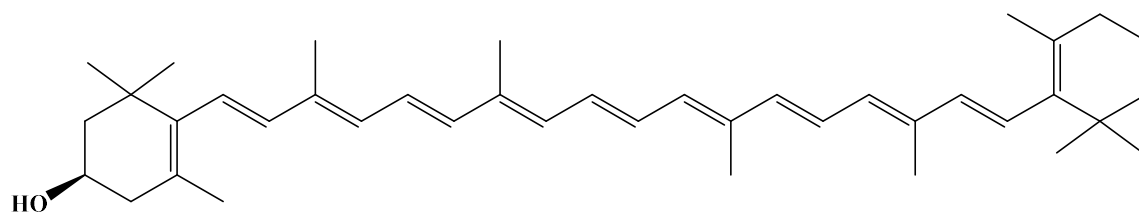
10



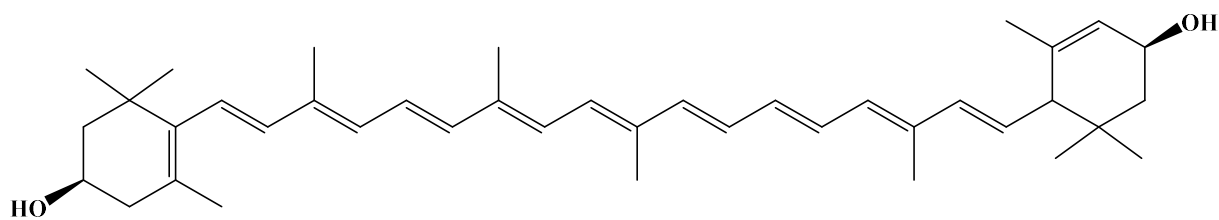
11



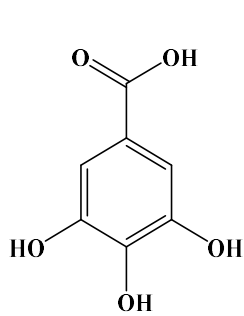
12



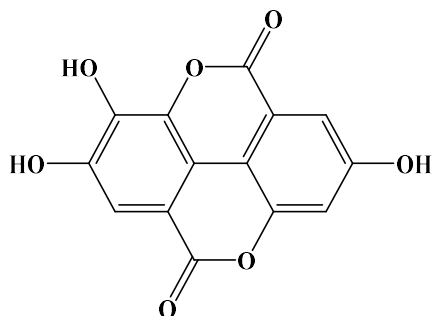
13



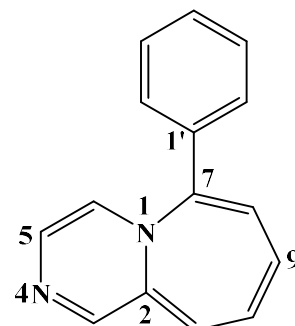
14



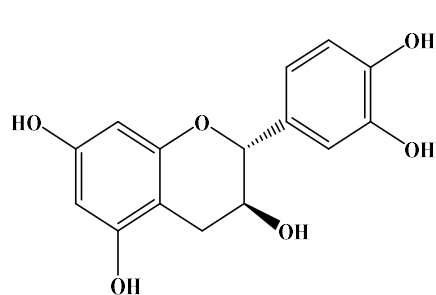
15



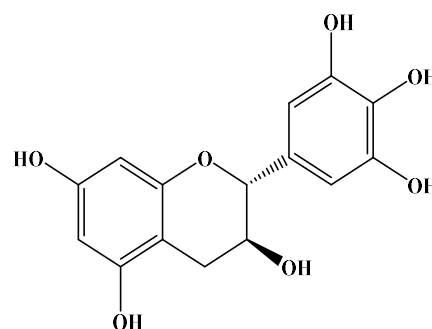
16



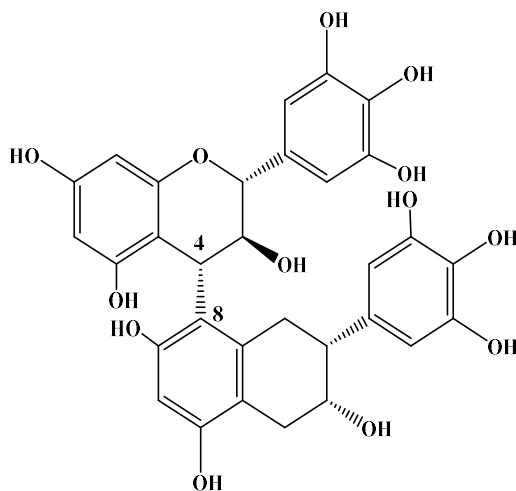
17



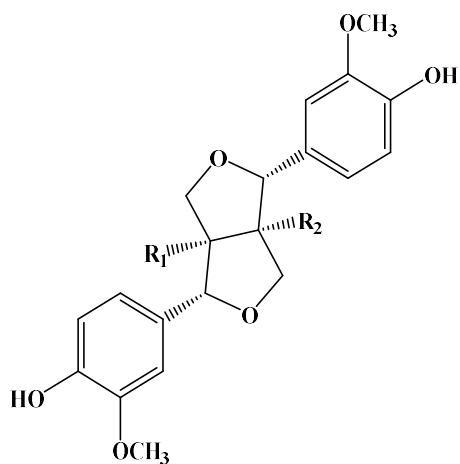
18



19

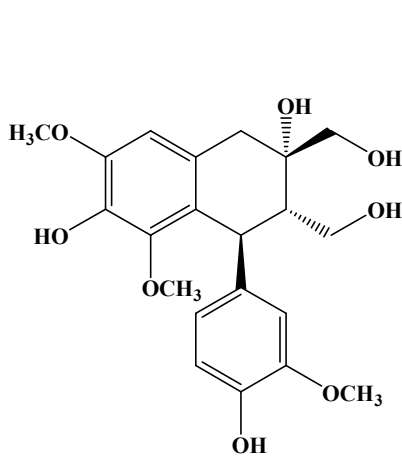


20

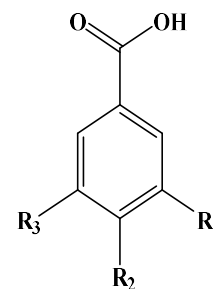


21 $R_1=OCOCH_3$; $R_2=OH$

22 $R_1=OH$; $R_2=H$



23

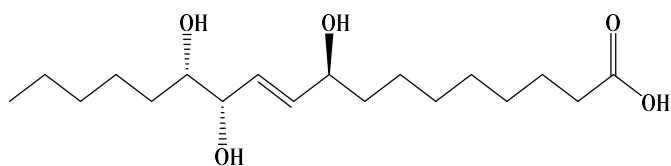


24 $R_1=H$; $R_2=H$; $R_3=H$

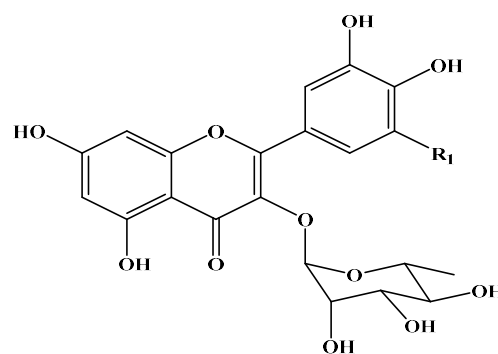
25 $R_1=H$; $R_2=OH$; $R_3=H$

26 $R_1=OH$; $R_2=OH$; $R_3=H$

27 $R_1=OCH_3$; $R_2=OH$; $R_3=H$

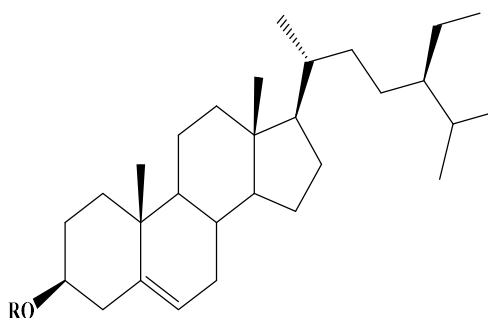


28



29 $R_1=H$

30 $R_1=OH$



31 $R=H$

32 $R=Glc$

I-2- Présentation du genre *Onobrychis*

Les plantes du genre *Onobrychis* sont herbacées, annuelles ou bisannuelles. Elles possèdent les caractères communs suivants: calices à 5 dents subégales ou l'inférieur plus petit, carène obtuse ou tronquée, gousse dépassant le calice, hémisphérique, orbiculaire ou tordue en spirale, non articulée, indéhiscente à 1-2 graines [11]. Les feuilles sont imparipennées et les fleurs réunies en inflorescence multiflores. Ces dernières en général purpurines violacées ou rose pale, possèdent d'autres caractères distinctifs avec les plantes du genre *Hedysarum* (Fabaceae). Les plantes du genre *Onobrychis* ont des fleurs à ailes rudimentaires, excepté *O. saxatilis* (L.) Lam., qui a des ailes développées comme celles du genre *Hedysarum* (L.). Leurs fruits sont dentés-spinescents, à l'exception toujours de l'espèce *O. saxatilis* qui a des fruits inermes identiques à ceux des espèces *Hedysarum* mais monospermes. Ceux du genre *Hedysarum* sont polyspermes [22].

I-2-1- Distribution

Les plantes du genre *Onobrychis* qui est rangé dans la tribu des lotées, sont originaires du sud de l'Europe, de l'Afrique du Nord et d'Asie occidentale [23].

Le genre *Onobrychis* est représenté en Algérie par quelques espèces annuelles ou pérennes, rencontrées sur 63 sites dans le Nord de l'Algérie, dans les jachères au niveau des prairies naturelles [24].

Ces espèces se répartissent comme suit [11] :

1. Deux espèces annuelles
 - *Onobrychis caput-galli* (Lamk)
 - *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.
2. Quatre espèces vivaces
 - *Onobrychis pallasii* (Willd) M.B.
 - *Onobrychis alba* (W. et K.) Desv.
 - *Onobrychis viciifolia* (Scop.)
 - *Onobrychis argentea* (Boiss.)

I-2-2- Classification systématique

Selon Cronquist, le genre *Onobrychis* est classé comme suit [25] :

- ✓ Règne : Plantae
- ✓ Sous-règne : Tracheobionta
- ✓ Division : Magnoliophyta
- ✓ Classe : Magnoliopsida
- ✓ Sous-classe : Rosidae
- ✓ Ordre : Fabales
- ✓ Famille : Fabaceae
- ✓ Genre : *Onobrychis*

I-2-3- Activités biologiques reconnues

Le genre *Onobrychis* contient plus de 160 espèces dont certaines sont cultivées pour servir de fourrage comme *Onobrychis viciifolia*, espèce la plus exploitée dans ce but [26].

La présence de proanthocyanidines (tannins condensés) leur confère diverses propriétés bénéfiques, comme celles de protéger les protéines contre l'hydrolyse [27]. Ce genre possède également des propriétés biologiques et pharmacologiques. Le tableau I-2 suivant en résume certaines d'entre elles.

Tableau I-2 : Activités biologiques de quelques espèces du genre *Onobrychis*

Espèces	Activités biologiques	Référence
<i>O. viciifolia</i>	-Activité antioxydante -Activité enzymatique	[28, 29]
<i>O. ebenoides</i>	-Activité inhibitrice de croissance contre les cellules MCF-7 (Michigan Cancer Foundation - 7) -Activité cytotoxique -Activité antifongique	[26, 30, 31]

	-Activité antiplasmodiale -Activité anti-HIV, activité oestrogénique et cytotoxique contre certaines cellules cancéreuses - Activité anti oestrogénique	
<i>O. oxydonta</i>	-Activité antibactérienne -Activité antitumorale	[32]
<i>O. hypargyrea</i>	-Activité antioxydante - Activité anticholinestérase - Activité de la tyrosinase - Activité de l'alpha amylase - Activité de l'alpha glucosidase	[33]
<i>O. armena</i>	-Activité antioxydante	[34]
<i>O. altissima</i>	-Activité antimicrobienne	[35]
<i>O. sosnovskyi</i> <i>O. viciifoli</i> <i>O. melanotricha</i>	-Activité antioxydante	[36]
<i>O. argyrea</i>	- Activité antioxydante - Activité anticholinestérase - Activité de la tyrosinase - Activité de l'α- amylase et de l'α- glucosidase	[37]

I-2-4- Espèce *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.

I-2-4-1- Description botanique

Cette espèce est annuelle (Figure I-2). Les folioles de ses feuilles sont plus courtes, obtuses et souvent échancrées. Les épis ne sont composés que de 5 ou 4 fleurs, les pétales

sont presque égaux entre eux, et les légumes beaucoup plus grands sont chargés sur le dos d'une espèce de crête formée par des lames dentées et épineuses [38].



Figure I-2 : *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.

I-2-4-2- Distribution

Onobrychis crista-galli (L.) Lam., se rencontre surtout dans les régions à faible pluviométrie, à l'étage bioclimatique semi aride [24]. Elle est rencontrée en Algérie dans les forêts et broussailles du Tell algéro-constantinois. Elle est rare dans le Tell oranais [11].

I-2-4-3- Classification de *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.

L'espèce *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam., est classée botaniquement comme suit :

- ✓ Règne : Plantae
- ✓ Division : Magnoliophyta
- ✓ Classe : Equisetopsida
- ✓ Sous-classe : Magnoliidae
- ✓ Super-ordre : Rosanae

- ✓ **Ordre** : Fabales
- ✓ **Famille** : Fabaceae
- ✓ **Genre** : *Onobrychis*
- ✓ **Espèce** : *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.

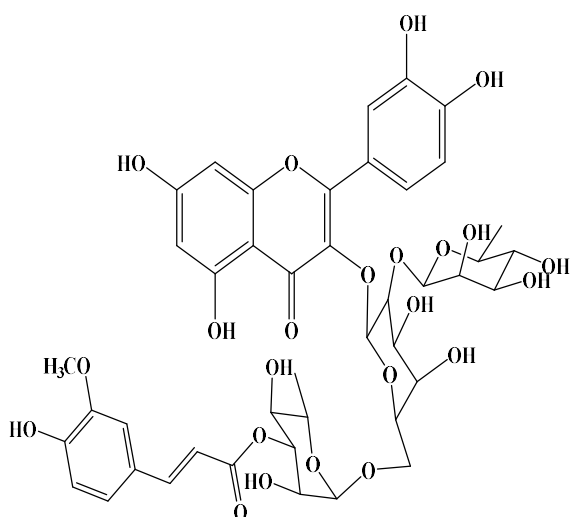
I-2-4-4- Etudes chimiques antérieures sur le genre *Onobrychis*

Les études phytochimiques antérieures relatives aux plantes du genre *Onobrychis* sont limitées et concernent principalement l'espèce *O. viciifolia* en raison de son importance économique. Cette légumineuse fourragère contient un large éventail de composés polyphénoliques : phénoliques glycosides, acides phénoliques, acides hydroxycinnamiques, dihydroflavonols, flavones, flavanols, flavonols, flavanones, arylbenzofuranes, composés aminés, carbohydrates et proanthocyanidines [28, 37, 39-48].

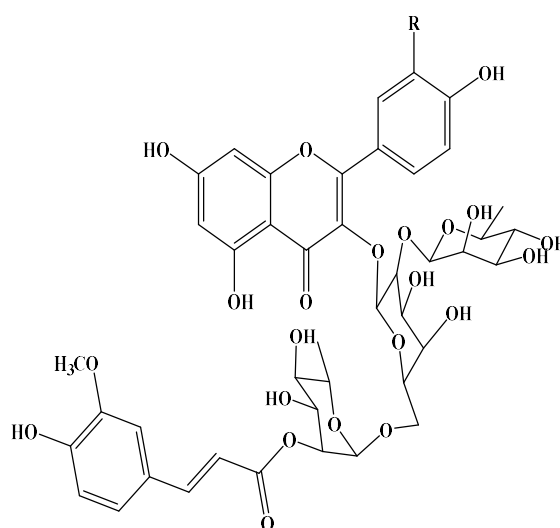
Des composés à squelette ebenfurane ont été isolés dans l'espèce *O. ebenoides* [30, 49].

I-2-4-3- Différentes classes de métabolites secondaires isolés à partir du genre *Onobrychis*

❖ Flavonols glycosides acylés

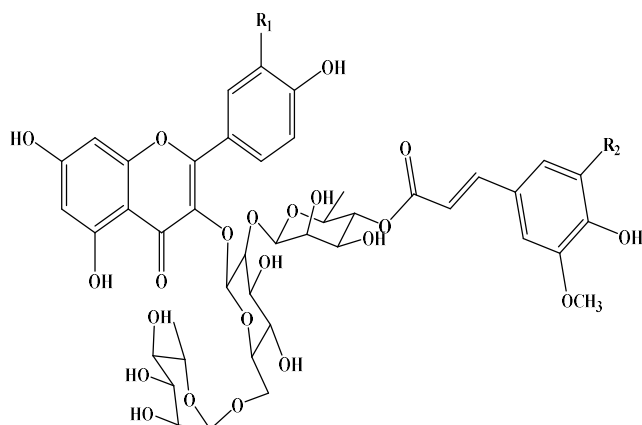


1
Quercétine 3-*O*- α -rhamnopyranosyl-(1''' \rightarrow 2'')
[(3''''-*O*-E-féruoyl)- α -rhamnopyranosyl-
(1'''' \rightarrow 6'')]- β -galactopyranoside



2 R=OH (Quercétine 3-*O*- α -rhamnopyranosyl-
(1''' \rightarrow 2'')[(2''''-*O*-E-féruoyl)- α -rhamnopyranosyl-
(1'''' \rightarrow 6'')]- β -galactopyranoside)

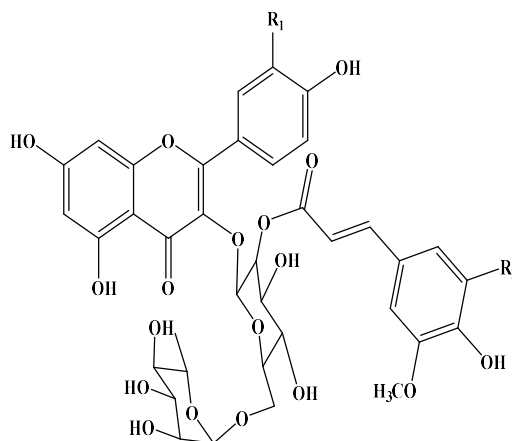
3 R=H (Kaempférol 3-*O*- α -rhamnopyranosyl-
(1''' \rightarrow 2'') [(2''''-*O*-E-féruoyl)- α -rhamnopyranosyl-
(1'''' \rightarrow 6'')]- β -galactopyranoside)



4 $R_1=OH$; $R_2=H$ (Quercétine 3-*O*-(4'''-*O*-*E*-fêruloyl)- α -rhamnopyranosyl-(1''' \rightarrow 2''))[α -rhamnopyranosyl-(1'''' \rightarrow 6'')]- β -glucopyranoside)

5 $R_1=OH$; $R_2=OCH_3$ (Quercétine 3-*O*-(4'''-*O*-*E*-sinapoyl)- α -rhamnopyranosyl-(1''' \rightarrow 2''))[α -rhamnopyranosyl-(1'''' \rightarrow 6'')]- β -glucopyranoside)

6 $R_1=R_2=H$ (Kaempférol 3-*O*-(4'''-*O*-*E*-fêruloyl)- α -rhamnopyranosyl-(1''' \rightarrow 2''))[α -rhamnopyranosyl-(1'''' \rightarrow 6'')]- β -glucopyranoside)



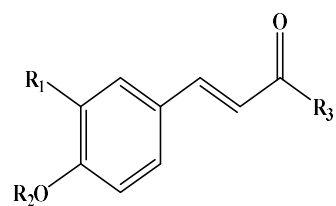
7 $R_1=OH$; $R_2=OCH_3$ (Quercétine 3-*O*- α -rhamnopyranosyl-(1''' \rightarrow 6''))-[(2''-*O*-*E*-sinapoyl)- β -glucopyranoside])

8 $R_1=OH$; $R_2=H$ (Quercétine 3-*O*- α -rhamnopyranosyl-(1''' \rightarrow 6''))-[(2''-*O*-*E*-fêruloyl)- β -glucopyranoside])

9 $R_1=H$; $R_2=OCH_3$ (Kaempférol 3-*O*- α -rhamnopyranosyl-(1''' \rightarrow 6''))-[(2''-*O*-*E*-sinapoyl)- β -glucopyranoside])

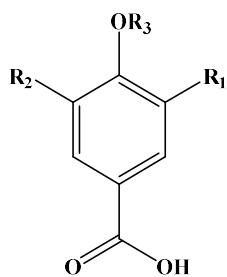
10 $R_1=R_2=H$ (Kaempférol 3-*O*- α -rhamnopyranosyl-(1''' \rightarrow 6''))-[(2''-*O*-*E*-fêruloyl)- β -glucopyranoside])

❖ Polyphénols



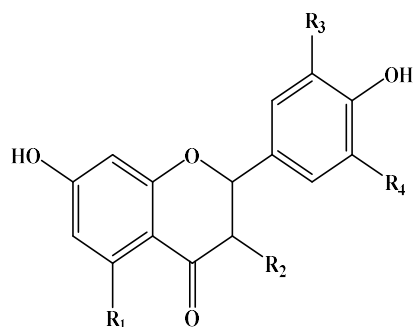
A
Acide hydroxycinnamique

Type	R ₁	R ₂	R ₃	Composés
A	H	H	OH	Acide <i>p</i> -coumarique
A	OCH ₃	H	OH	Acide fêrulique
A	OH	H	OH	Acide cafféique
A	H	Glc	OH	Cis(Trans) Acide- <i>p</i> -coumarique 4- <i>O</i> -glucoside
A	H	Acide malique	H	Acide trans- <i>p</i> -coumarique 4- <i>O</i> -malate
A	OH	H	3-hydroxy tyrosine	Cafféoyl-DOPA
A	OCH ₃	Glc	OH	Acide 4-glucoside fêrulique
A	OCH ₃	H	Glc	Trans-fêruloyl glucose
A	OCH ₃	H	Acide quinique	Acide cis-4-Fêruloylquinique



B (Acide hydroxy benzoïque)

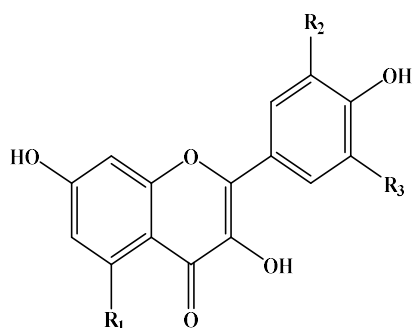
Type	R ₁	R ₂	R ₃	Composés
B	H	H	H	Acide <i>p</i> -hydroxy benzoïque
B	OH	H	H	Acide protocatechuique
B	OCH ₃	H	Glc	Acide gallique
B	OH	OH	H	Acide vanillique 4- <i>O</i> -glucoside



C (Flavanones)

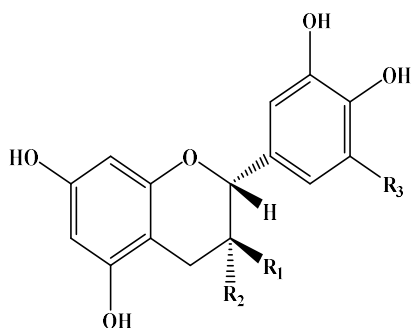
D (Dihydroflavonols)

Type	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Composés
C	OH	H	H	H	Naringénine
C	OH	H	OH	H	Eriodictyol
C	OH	H	OH	OH	Pentahydroxyflavanone
C	H	H	H	H	Liquiritigénine
C	H	H	OH	H	Butine
D	OH	OH	H	H	Dihydrokaempférol
D	OH	OH	OH	H	Dihydroquercétine
D	OH	OH	OH	OH	Dihydromyricétine
D	H	OH	H	H	Garbanzole
D	H	OH	OH	H	Dihydrofisétine



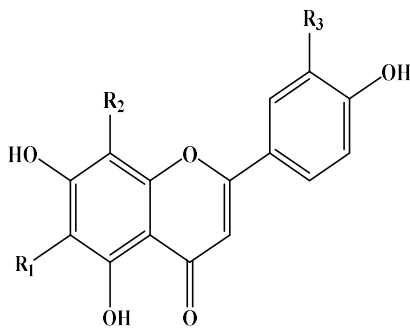
E (Flavonols)

Type	R ₁	R ₂	R ₃	Composés
E	OH	H	H	Kaempférol
E	OH	OH	H	Quercétine
E	OH	OH	OH	Myricétine
E	H	H	H	5-déoxykaempférol
E	H	OH	H	Fisétine
E	OH	OCH ₃	H	Isorhamnétine



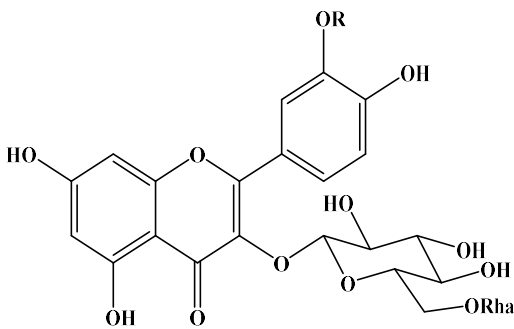
F (Flavanols)

Type	R ₁	R ₂	R ₃	Composés
F	H	OH	H	Epicatéchine
F	OH	H	H	Catéchine
F	H	OH	OH	Epigallocatechine
F	OH	H	OH	Gallocatechine



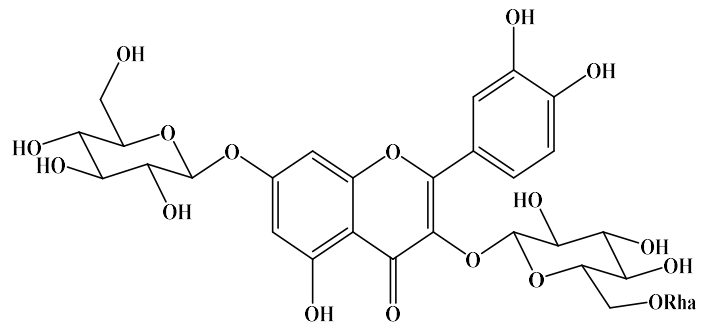
G (Flavones)

Type	R ₁	R ₂	R ₃	Composés
G	H	H	H	Apigénine
G	H	Glc	H	Vitexine
G	Glc	H	H	Isovitexine
G	H	Glc	OH	Orientine



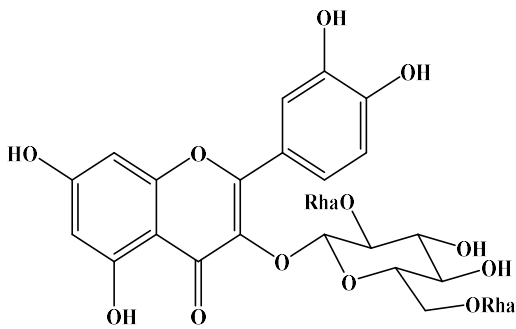
1 R=H

2 R=CH₃ (Isorhamnétine 3-O-rutinoside)



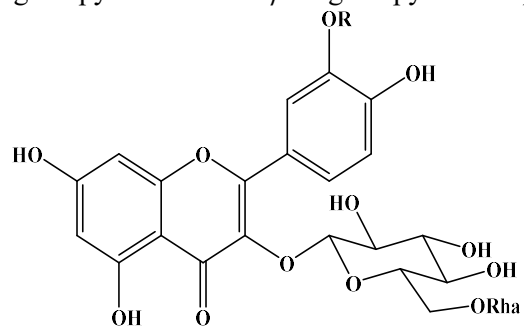
3

(Quercétine 3-O-(6''-O- α -L-rhamnopyransoyl)- β -D-glucopyranoside-7-O- β -D-glucopyranoside)



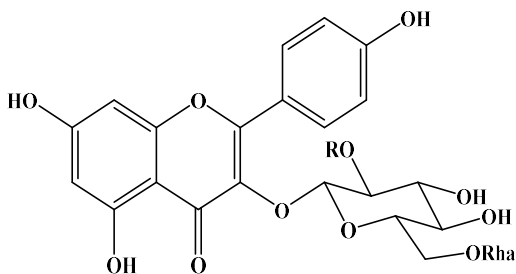
4

(Quercétine 3-O-(2'',6''-di-O- α -L-rhamnopyransoyl)- β -D-glucopyranoside)



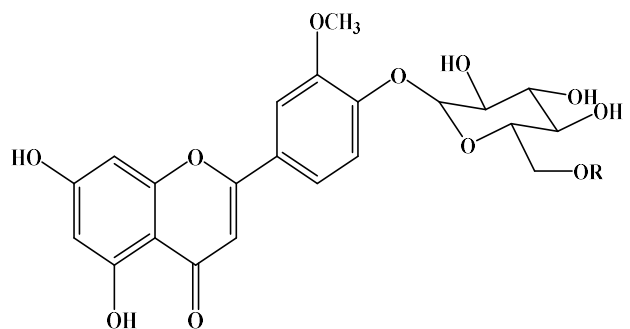
5

(Myricétine-3-rutinoside)



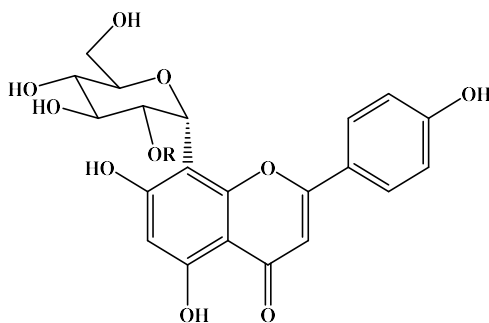
6 R=H

7 R=Rha (Kaempférol 3-O-(2'',6''-di-O- α -L-rhamnopyransoyl)- β -D-glucopyranoside)



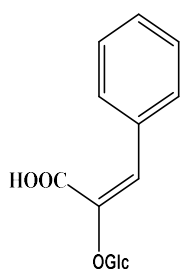
8 R=H (Chrysoériol 4'-O- β -D-glucopyranoside)

9 R=COCH₃ (Chrysoériol 4'-O-(6''-O-acetyl)- β -D-glucopyranoside)



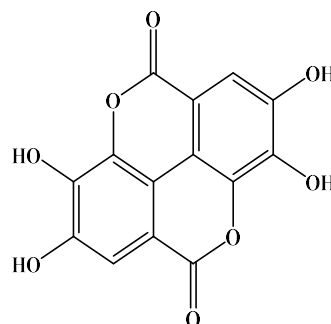
10 R=H (Vitexine)

11 R=Rha (Vitexine 2''-O- α -L-rhamnopyranside)



2

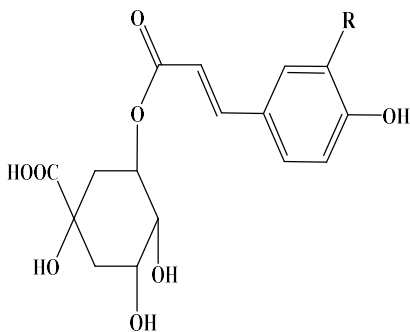
(Acide 8- β -glucopyranosyloxycinnamique)



3

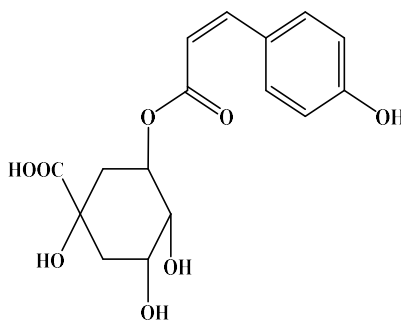
(Acide ellagique)

❖ Phénoliques glycosides



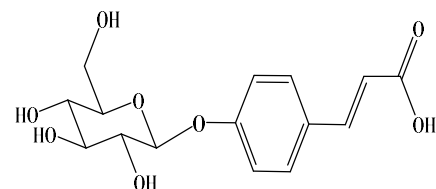
1 R=OH

2 R=H (Acide 5-*p*-trans coumaroyl quinique)



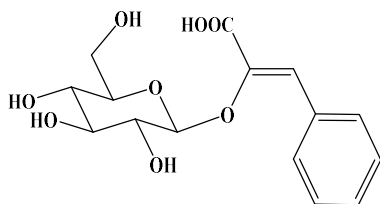
3

(acide 5-*p*-cis-coumaroyl quinique)



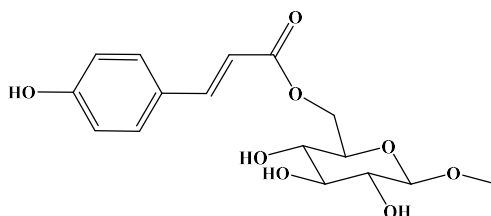
4

(Acide 4-*O*- β -D-glucopyranosyl-*p*-trans-coumarique)



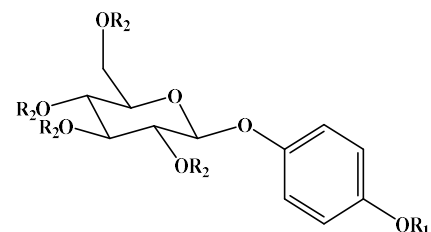
5

(Acide (Z)-8- β -D-glucopyranosyl oxy cinnamique)



6

(Méthyl 6-*O*-*p*-trans-coumaroyl- β -D-glucopyranoside)

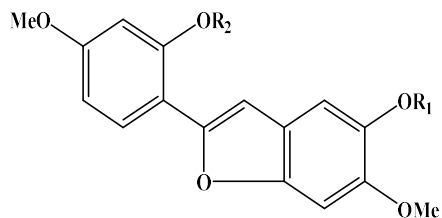


7 R₁=R₂=H (Arbutine)

8 R₁=R₂=Ac (1,2',3',4',6'-penta-*O*-acetylarbutine)

9 R₁=Me; R₂=Ac (2',3',4',6'-tetra-*O*-acetyl-1-*O*-méthylarbutine)

❖ Aryl benzofuranes

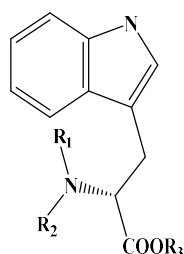


1 $R_1=R_2=H$ (Sainfurane)

2 $R_1=H$; $R_2=Me$ (Méthylsainfurane)

3 $R_1=R_2=Ac$

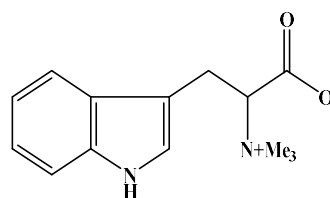
❖ Composé aminés



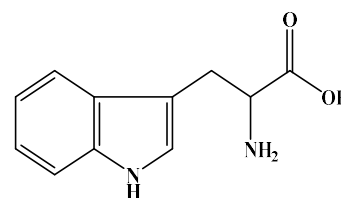
1 $R_1=R_2=R_3=H$ (L-Tryptophan)

2 $R_1=Ac$; $R_2=H$; $R_3=Me$

3 $R_1=Ac$; $R_2=R_3=Me$

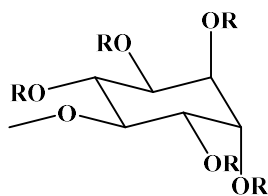


4
(Hypaphorine)



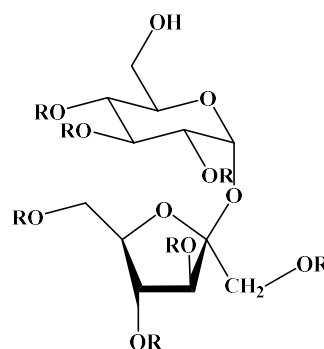
5

❖ Carbohydrates



1 $R=H$ (Pinitol)

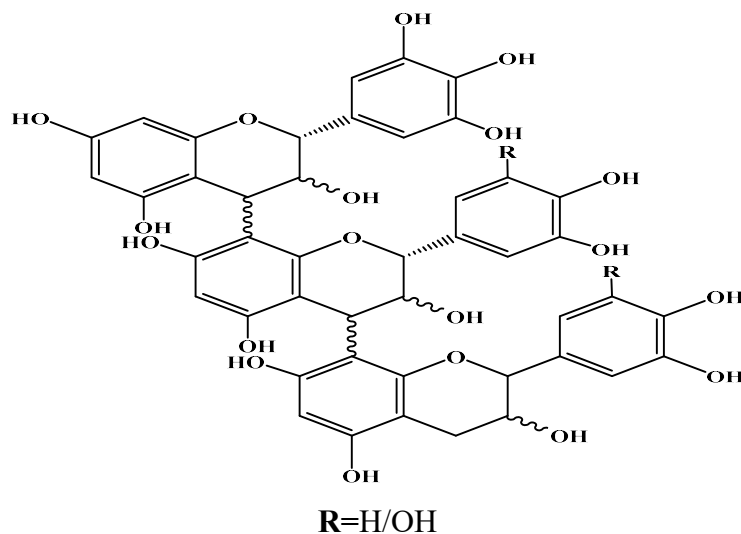
2 $R=Ac$



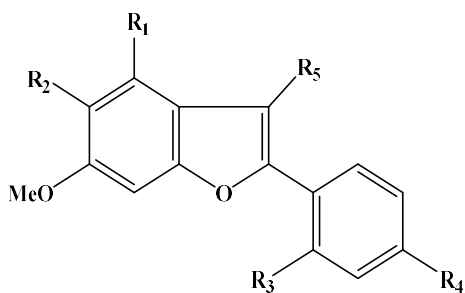
1 $R=H$ (Sucrose)

2 $R=Ac$

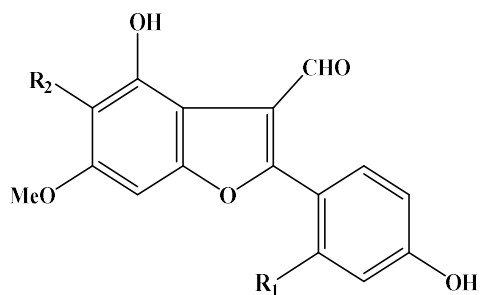
❖ Proanthocyanidines



❖ Ebenfuranes



	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5
<u>1</u>	H	OH	OH	OH	H
<u>2</u>	OH	CHO	OH	OH	CHO
<u>3</u>	OH		OH	OH	CHO
<u>4</u>	H	OCOCH ₃	OCOCH ₃	OCOCH ₃	H
<u>5</u>	OCOCH ₃	H	OCOCH ₃	OCOCH ₃	CHO
<u>6</u>	OCOCH ₃		OCOCH ₃	OCOCH ₃	CHO



	R_1	R_2	Composés
<u>1</u>	OMe		Ebenfurane IV
<u>2</u>	OH		Ebenfurane III
<u>3</u>	OH		Ebenfurane V
<u>4</u>	OMe		Ebenfurane VI
<u>5</u>	OH		Ebenfurane VII
<u>6</u>	OMe		Ebenfurane VIII
<u>7</u>	OH	H	Ebenfurane II



Chapitre II

II-1- Etude phytochimique de l'espèce *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.)

Maire

II-1-1- Extraction

1 Kg des parties aériennes de l'espèce *Helianthemum hirtum*, préalablement séché et broyé, a subi une double macération (2 x 10 l) dans un mélange EtOH-H₂O (70:30) pendant 72 h. Après évaporation non à sec, une phase aqueuse de 500 ml a été obtenue. La phase aqueuse est ensuite extraite successivement par l'éther de pétrole (400 ml x 3), l'acétate d'éthyle (400 ml x 3) et le *n*-butanol (400 ml x 5). Les phases organiques obtenues sont filtrées puis concentrées à sec sous pression réduite, donnant trois extraits : 4,43 g de l'extrait éther de pétrole, 4,9 g de l'extrait acétate d'éthyle et 32,7 g de l'extrait *n*-butanol. Les différentes étapes d'extraction sont résumées dans la figure II-1.

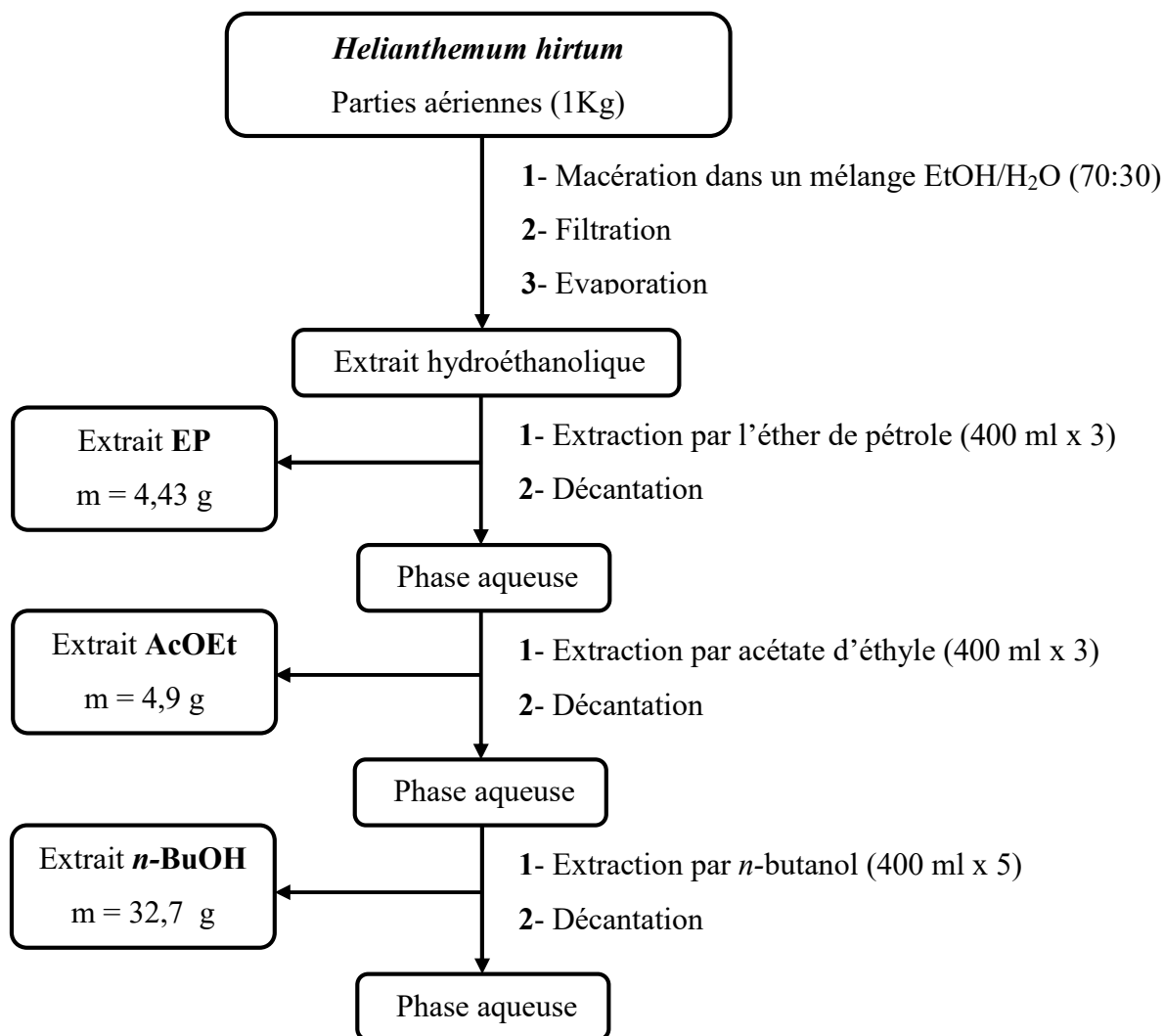


Figure II-1 : Schéma d'extraction des parties aériennes de l'espèce *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.) Maire

Le profil chromatographique sur CCM des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique, mettant en évidence leur richesse en métabolites secondaires, a déterminé notre choix quant à l'investigation chimique de ces deux extraits.

II-1-2- Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle

4,9 g de l'extrait acétate d'éthyle, sont fractionnés par chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice en phase normale comme phase stationnaire. L'élution réalisée par des gradients de solvants EP/AcOEt (100-0 à 0-100) et AcOEt/MeOH (0-100 à 100-0), a permis de récolter neuf fractions (1-9).

La purification des fractions sélectionnées (3, 6 et 7) sur la base de leur profil chromatographique, a abouti à l'isolement de huit composés (Figure II-2).

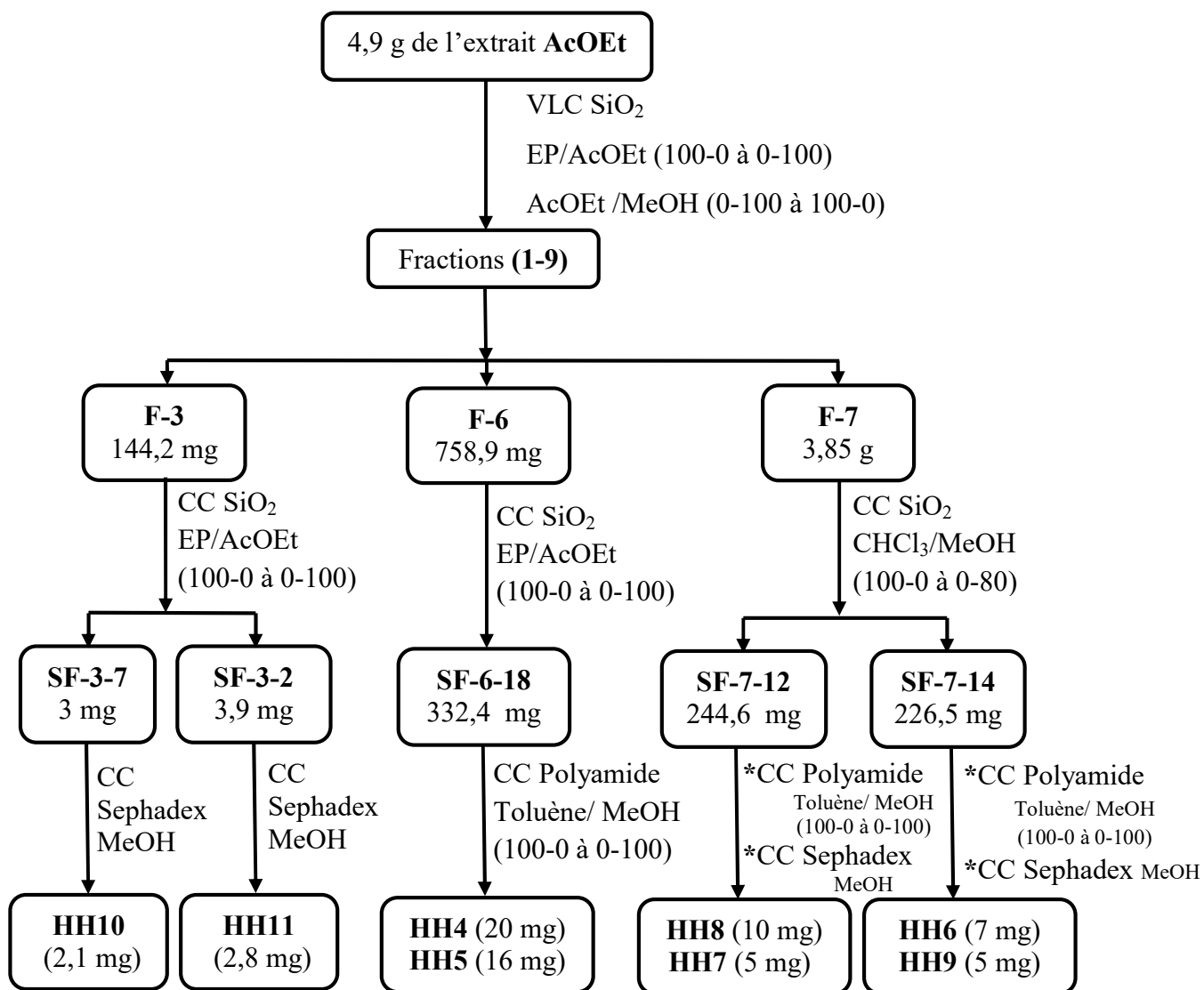


Figure II-2 : Schéma de fractionnement et purification de l'extrait AcOEt de l'espèce *Helianthemum hirtum ssp. ruficomum* (Viv.) Maire

II-1-3- Fractionnement et purification de l'extrait *n*-butanolique

L'extrait *n*-butanolique (20 g) a subi un premier fractionnement par chromatographie sur une colonne de polyamide SC6 en utilisant un système d'éluion eau/méthanol (100:0 à 0:100), donnant 15 fractions (**F1-F15**).

Une chromatographie sur une colonne de polyamide SC6 suivie d'une chromatographie semi-préparative en phase inverse de la fraction **F-8**, a permis d'obtenir les trois composés **HH1-HH3** (Figure II-3).

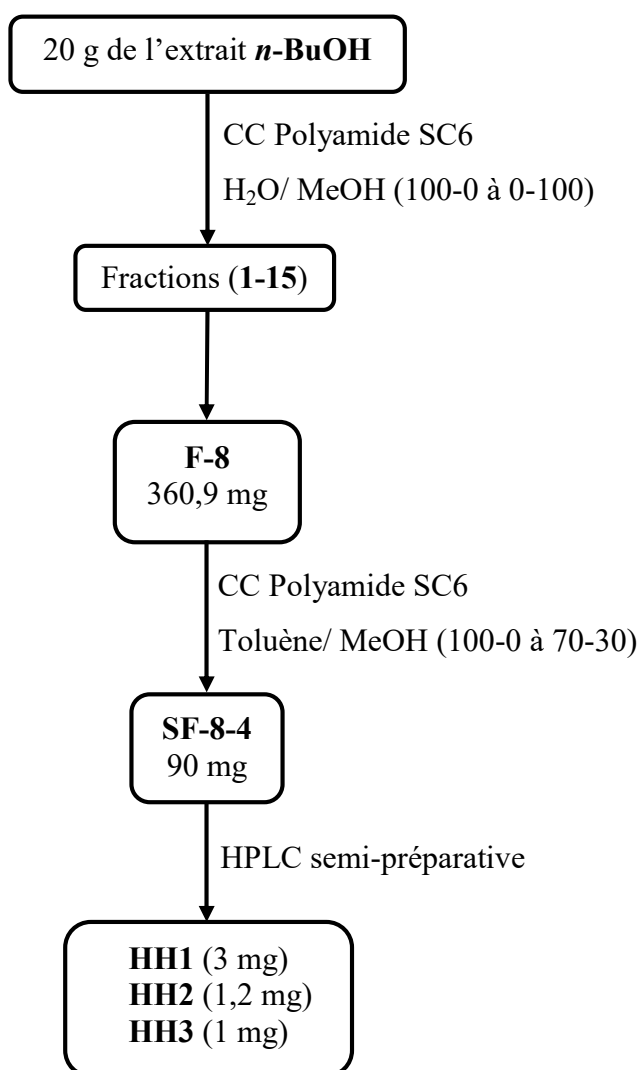
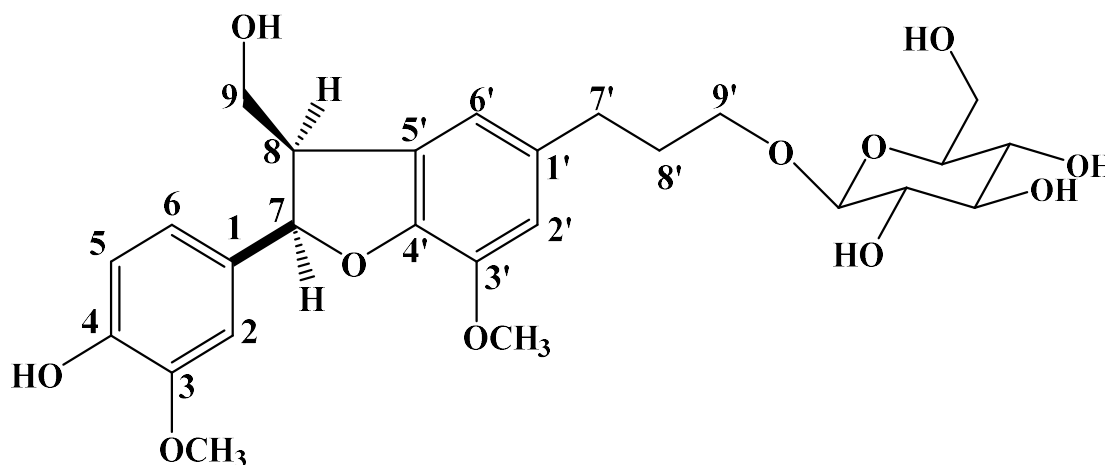


Figure II-3 : Schéma de fractionnement et purification de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.) Maire

II-1-4- Détermination structurale des composés obtenus HH (1-11)

L'élucidation structurale de tous les composés obtenus (1-11) a été faite par la combinaison des techniques spectroscopiques RMN 1D des protons et carbones, RMN 2D (COSY H-H, TOCSY, HSQC, DEPTQ et HMBC), spectrométrie de masse ESI-MS, la mesure du pouvoir rotatoire ainsi que par comparaison avec les données de la littérature.

II-1-4-1- Détermination structurale du composé HH1



(7*R*, 8*R*)-7,8 dihydro-9'-hydroxyl-3'-méthoxyl-8-hydroxyméthyl-7-(4-hydroxy-3-méthoxyphenyl)-1'-benzofuranpropanol 9'-*O*-β-D-glucopyranoside

Le spectre de masse ESI du composé **HH1**, enregistré en modes négatif et positif (Figures II-4 et II-5), exhibe respectivement des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 520,7$ $[M-H]^-$ et 545 $[M+Na]^+$, déterminant une masse moléculaire de 522 uma et une formule brute en $C_{26}H_{34}O_{11}$.

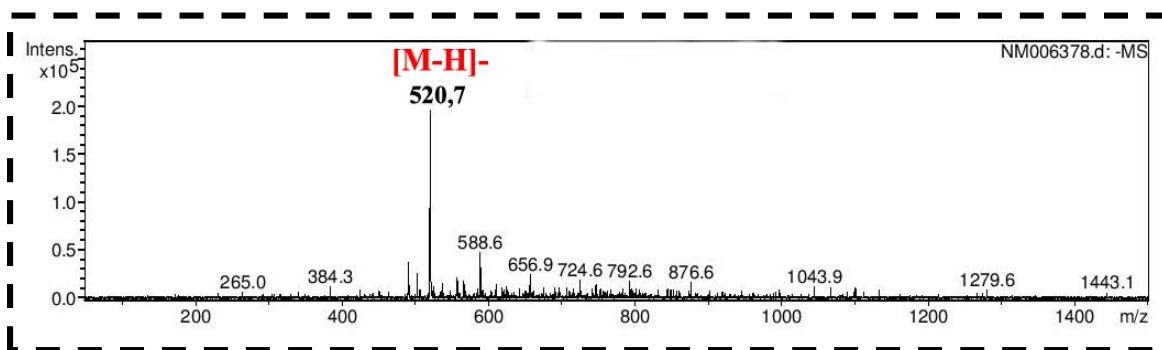


Figure II-4 : Spectre ESI (mode négatif) du composé HH1

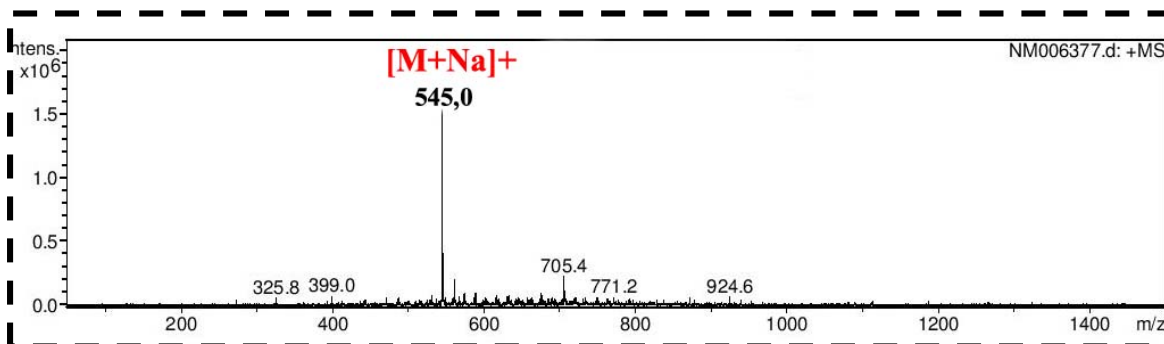


Figure II-5 : Spectre ESI (mode positif) du composé HH1

Le spectre RMN ^1H de ce composé (Figure II-6) montre les signaux caractéristiques de :

- protons aromatiques résonant entre 6,76 et 6,95 ppm.
- protons osidiques sortant entre 3,18 et 3,25 ppm.
- proton anomère repéré à 4,25 ppm (1H, *d*, 7,5 Hz), attestant de la présence d'une unité osidique.
- protons aliphatiques sortant dans l'intervalle 1,91-2,7 ppm et δ_{H} 5,49.

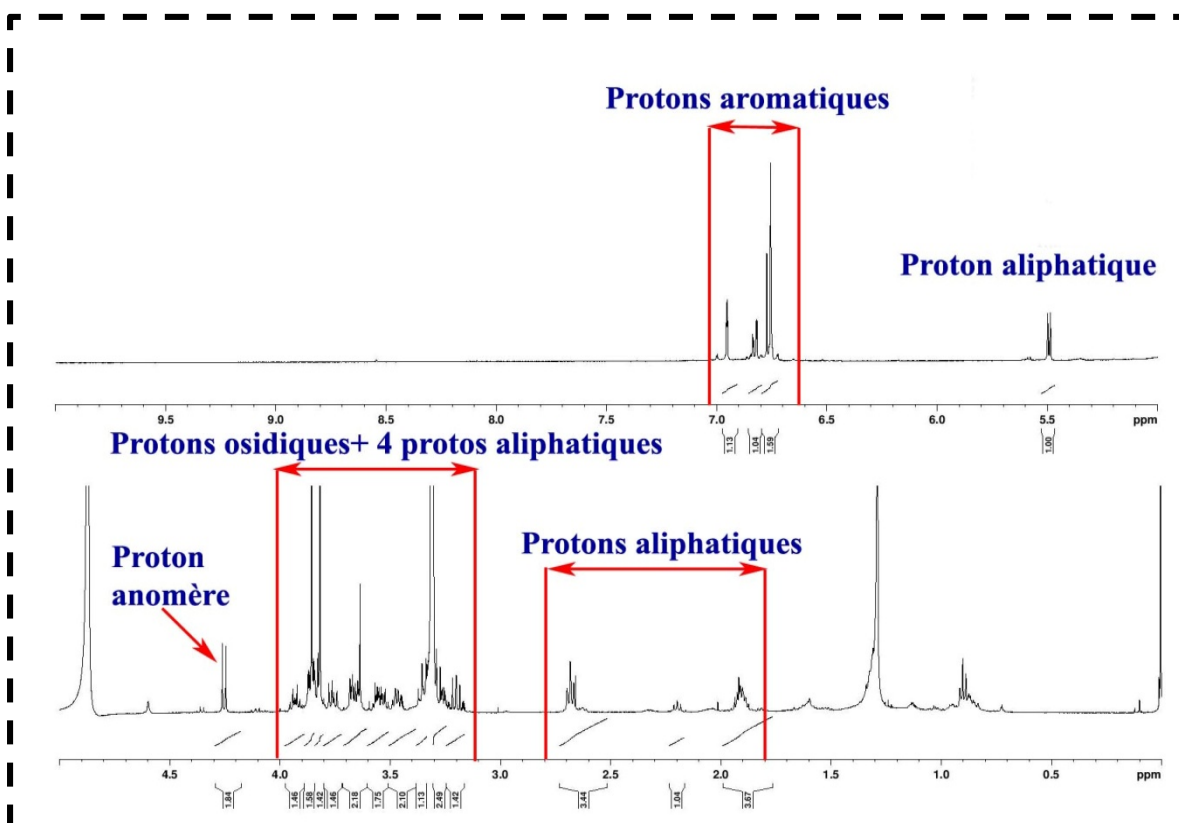


Figure II-6 : Spectre RMN ^1H du composé HH1

Partant de la zone des protons aromatiques, le spectre RMN ^1H (Figure II-7) exhibe cinq signaux d'intégration 1H entre 6,76 et 6,95 ppm. Ces signaux indiquant la présence de deux noyaux aromatiques nommés A et B, sont constitués de :

- Un signal détecté à 6,82 ppm (*dd*, $J = 1,9; 8,1$ Hz).
- Deux signaux doublets résonant à 6,76 ($J = 8,3$ Hz) et 6,95 ppm ($J = 1,9$ Hz).
- deux signaux singulets repérés à 6,76 et 6,77 ppm.

Le cycle A forme un système ABX. Le proton nommé H-2 sortant à δ_{H} 6,95 sous forme d'un doublet ($J = 1,9$ Hz) couple en méta avec le proton H-6 repéré à δ_{H} 6,82 (*dd*, $J = 1,9; 8,1$ Hz) (Figure II-7). Ce dernier couple en ortho avec le proton H-5 sortant à 6,76 ppm (*d*, $J = 8,3$ Hz), comme le confirme le spectre COSY H-H (Figure II-8) à travers la corrélation H-5/H-6.

Le cycle aromatique B est constitué de deux protons singulets H-2' et H-6', repérés à δ_{H} 6,76 et 6,77 (Figure II-7), indiquant un couplage méta, confirme COSY H-H (Figure II-8).

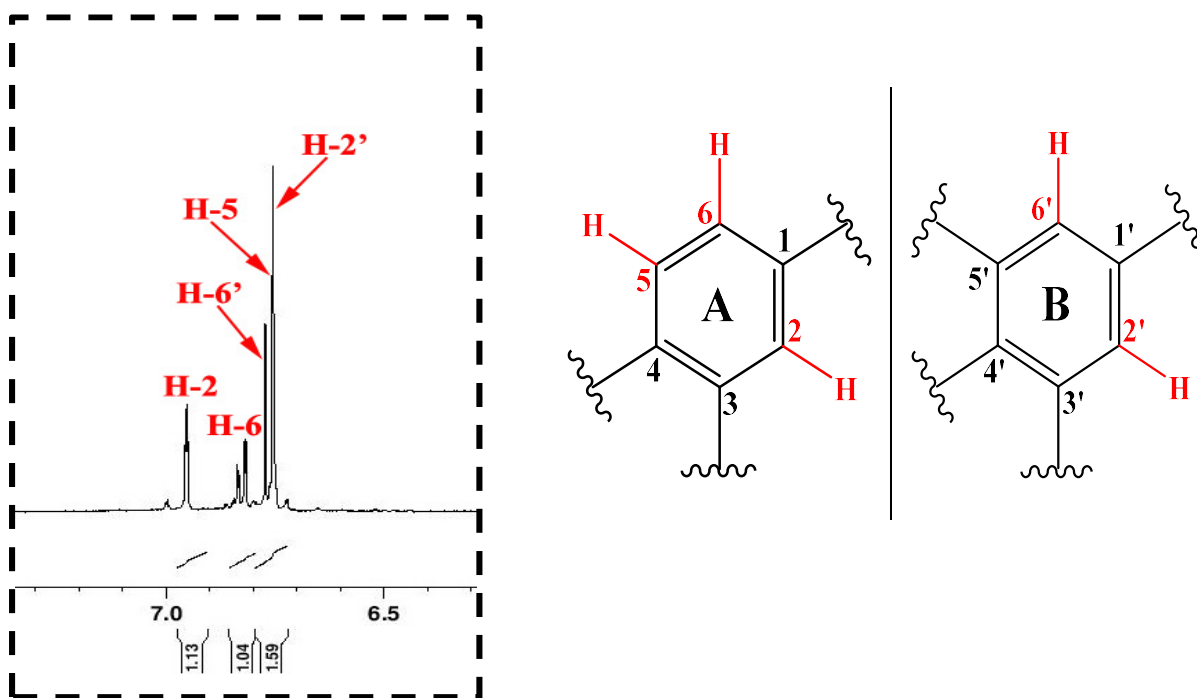


Figure II-7 : Spectre RMN ^1H des protons aromatiques du composé HH1

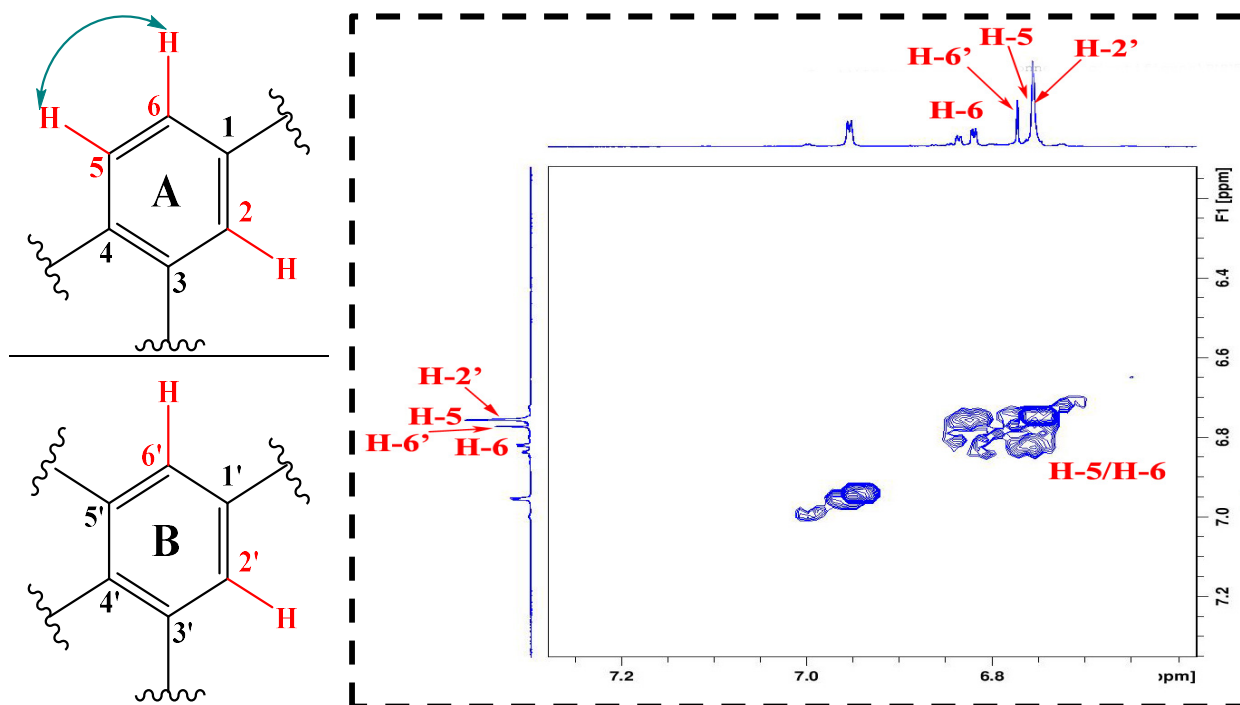


Figure II-8 : Spectre COSY H-H des protons aromatiques des cycles A et B (composé HH1)

L'analyse du spectre HSQC *J*-modulé (Figure II-9) permet d'identifier les carbones C-2 (110,6 ppm), C-5 (116,2 ppm) et C-6 (119,8 ppm) du cycle A, C-2' (114,3 ppm) et C-6' (118,2 ppm) du cycle B.

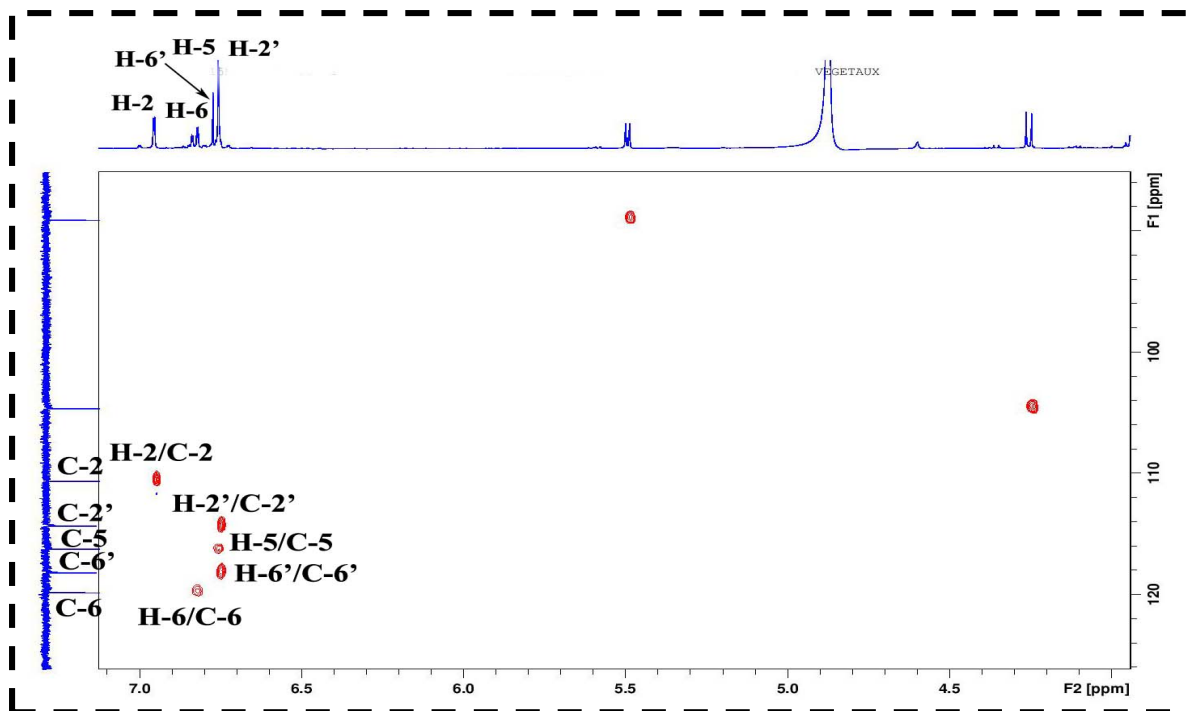


Figure II-9 : Spectre HSQC de la partie aromatique du composé HH1

L'attribution des carbones des cycles A et B est effectuée par analyse des couplages hétéronucléaires longue distance en 2J et 3J . En effet, le spectre HMBC (Figure II-10) permet de visualiser les couplages (Figure II-11) entre :

- ▣ Le proton H-2 et les carbones aromatiques oxygénés C-3 (δ_C 149,2), C-4 (δ_C 147,6) et le carbone C-6 (δ_C 119,8) déjà identifié.
- ▣ Le proton H-5 et le carbone aromatique quaternaire C-1 (δ_C 134,9) et les carbones aromatiques oxygénés C-3 (δ_C 149,2) et C-4 (δ_C 147,6).
- ▣ Le proton H-6 et le carbone C-2 (δ_C 110,6) déjà identifié, ainsi que le carbone aromatique oxygéné C-4 (δ_C 147,6).

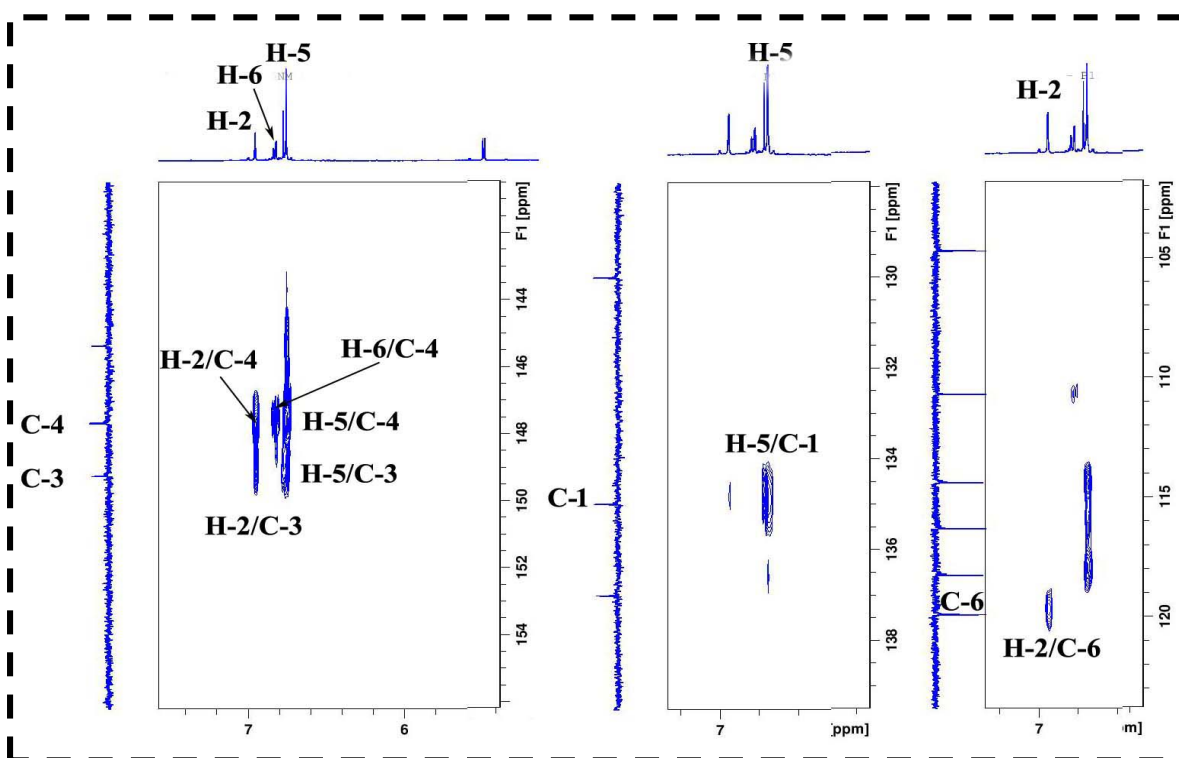


Figure II-10 : Spectre HMBC du cycle A du composé HH1

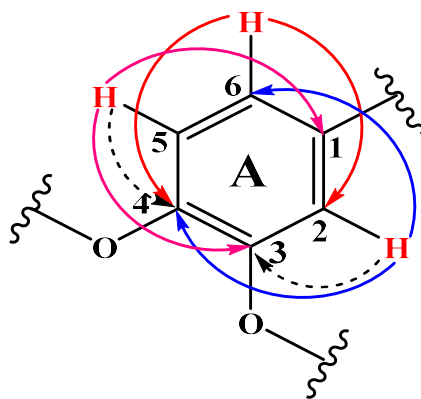


Figure II-11 : Corrélations HMBC du cycle A

Pour le cycle aromatique B, le même spectre (Figure II-12) montre des couplages entre :

- ▣ Le proton H-2' et les carbones aromatiques oxygénés C-4' (δ_C 147,6), C-3' (δ_C 145,4) et le carbone C-6' (δ_C 118,2).
- ▣ Le proton H-6' et le carbone C-2' (δ_C 114,3) ainsi que le carbone aromatique oxygéné C-4' (δ_C 147,6).

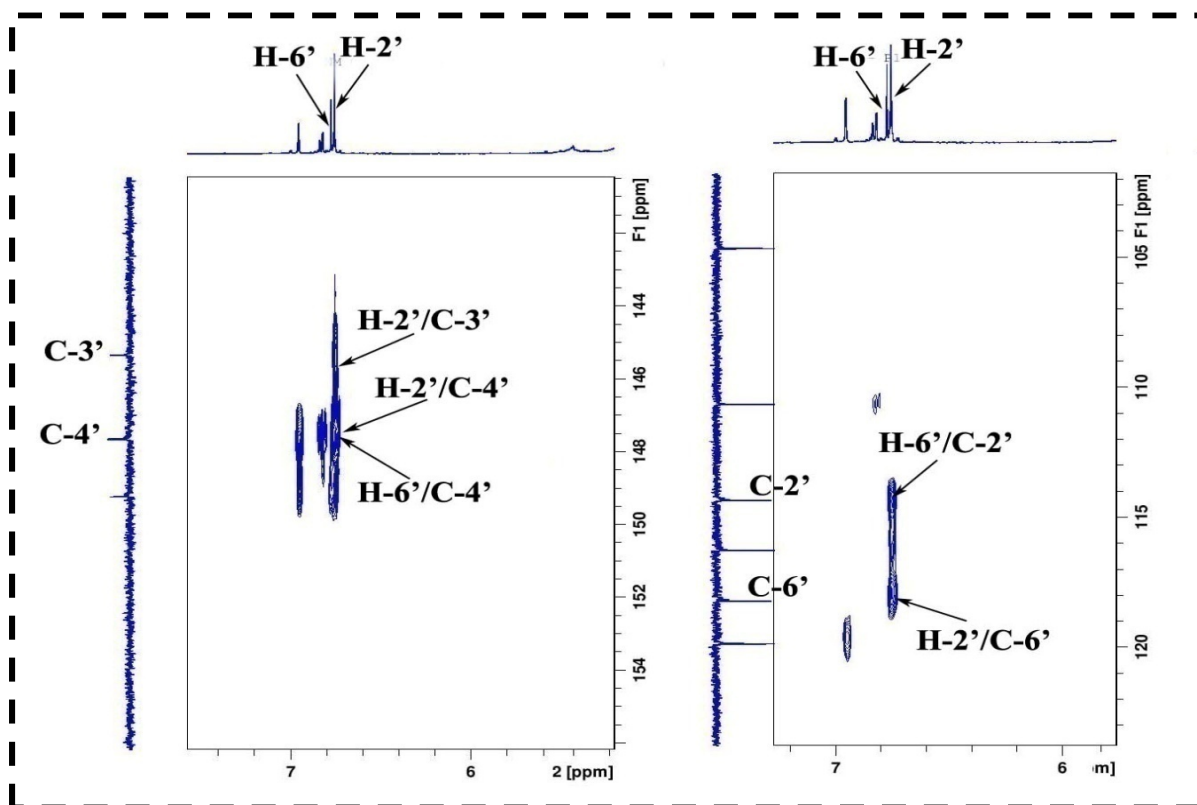


Figure II-12 : Spectre HMBC du cycle B du composé HH1

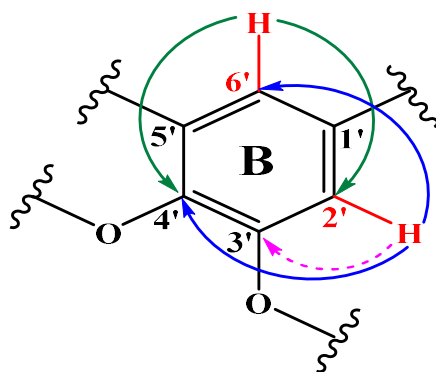


Figure II-13 : Corrélations HMBC du cycle B

A ce stade d'analyse, tous les protons et carbones des cycles aromatique A et B sont caractérisés.

Le spectre RMN ^1H du composé **HH1** montre également la présence de :

- ⊙ Deux signaux singulets d'intégration 3H chacun localisés à 3,78 et 3,83 ppm, attestant de la présence de deux groupements OCH_3 et dont les carbones résonnent à 55,5 et 56,9 ppm selon le spectre HSQC (Figure II-14).
- ⊙ un signal doublet d'intégration 1H sortant à 5,49 ppm, attribuable à un groupement méthine. Le carbone qui le porte est détecté à 89,1 ppm sur le spectre HSQC (Figure II-14). Sa valeur de déplacement chimique indique qu'il est lié à un groupement déblindant.
- ⊙ un signal multiplet d'intégration 1H résonant à 3,45 ppm, attribuable à un autre groupement méthine. Son carbone est repéré à 55,6 ppm sur le spectre HSQC (Figure II-14).

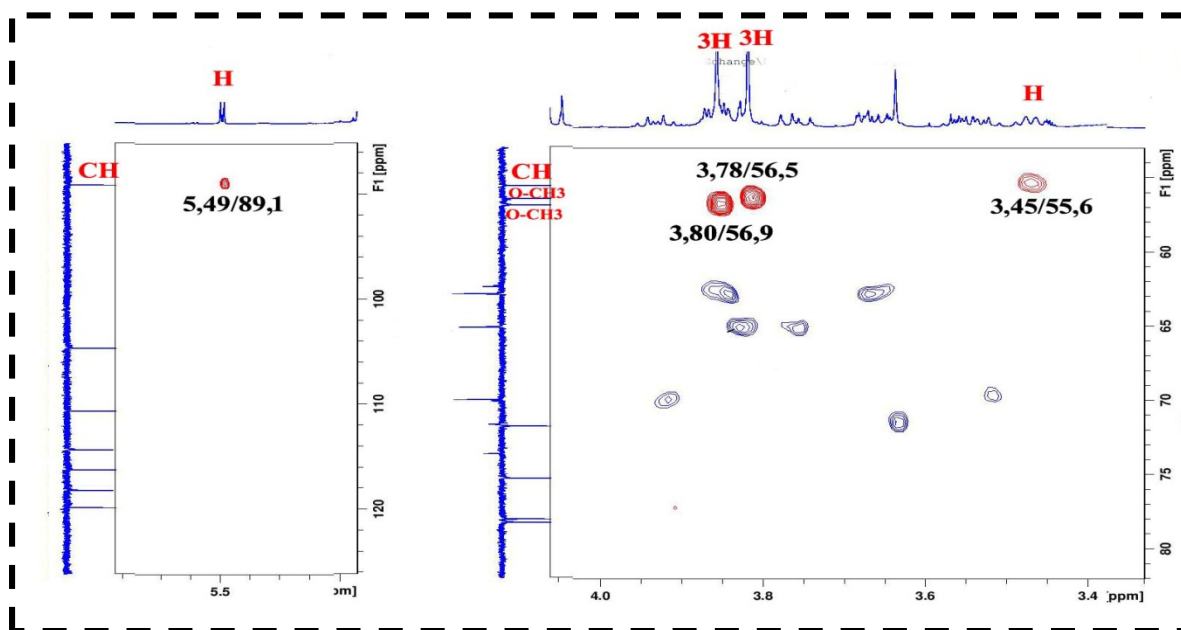


Figure II-14 : Spectre HSQC du composé **HH1**

La localisation des groupements méthoxyles sur les cycles A et B est établie par l'analyse du spectre HMBC (Figure II-15) qui montre des taches de corrélation entre les protons OCH_3 repérés à 3,78 ppm et le carbone C-3 (δ_{C} 149,2) du cycle A, et entre les

protons du deuxième groupement OCH_3 détectés à 3,83 ppm et le carbone C-3' (δ_{C} 145,4) du cycle B.

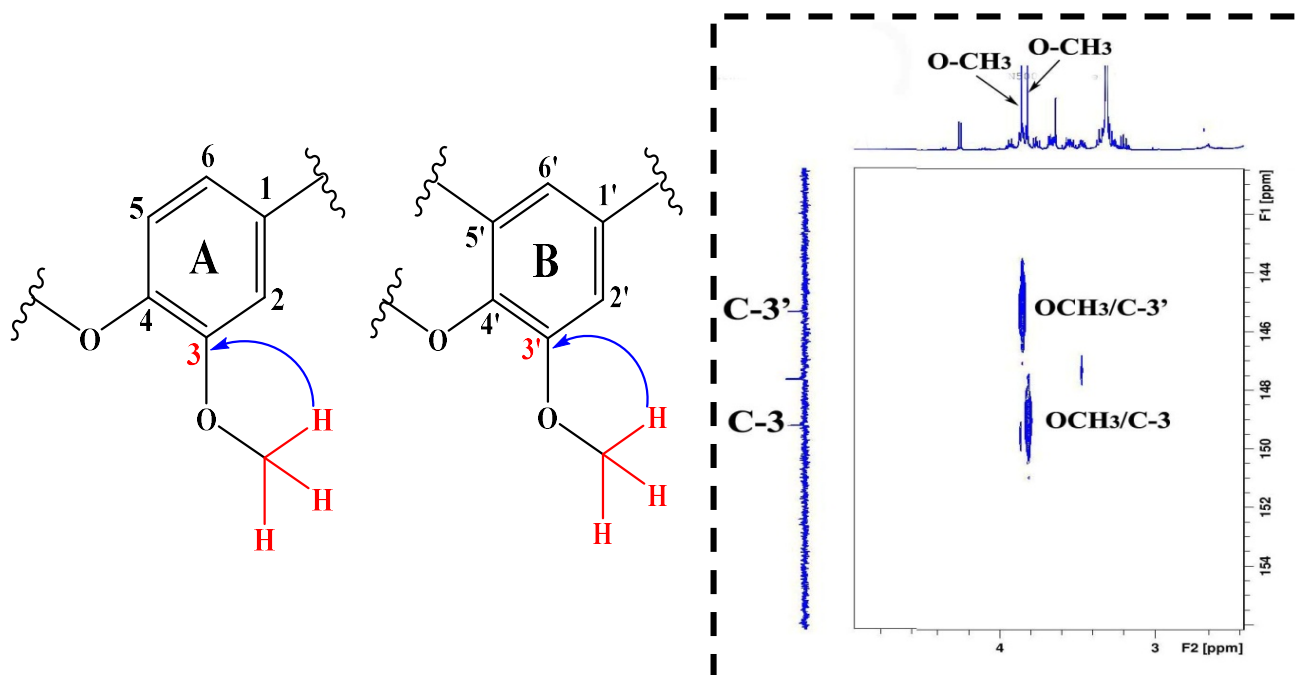
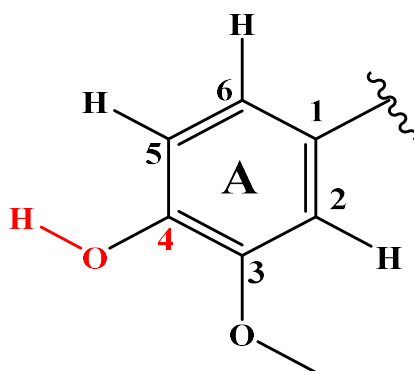


Figure II-15 : Spectre HMBC montrant le branchement des groupements méthoxyles du composé HH1

L'absence des corrélations du carbone C-4 (δ_{C} 147,6) sur le spectre HMBC avec d'autres protons, et le déblindage de leur déplacement chimique, suggère que le carbone quaternaire C-4 est substitué par un groupement hydroxyle.



A partir des protons H-2 et H-6 du cycle A attribués précédemment, le spectre HMBC montre les corrélations hétéronucléaires longue distance en $^3J_{\text{H/C}}$ entre ces derniers et un carbone oxygéné nommé C-7 sortant à 89,6 ppm (Figures II-16 et II-17), porteur d'un proton H-7 (5,49 ppm) selon l'expérience HSQC (Figure II-18).

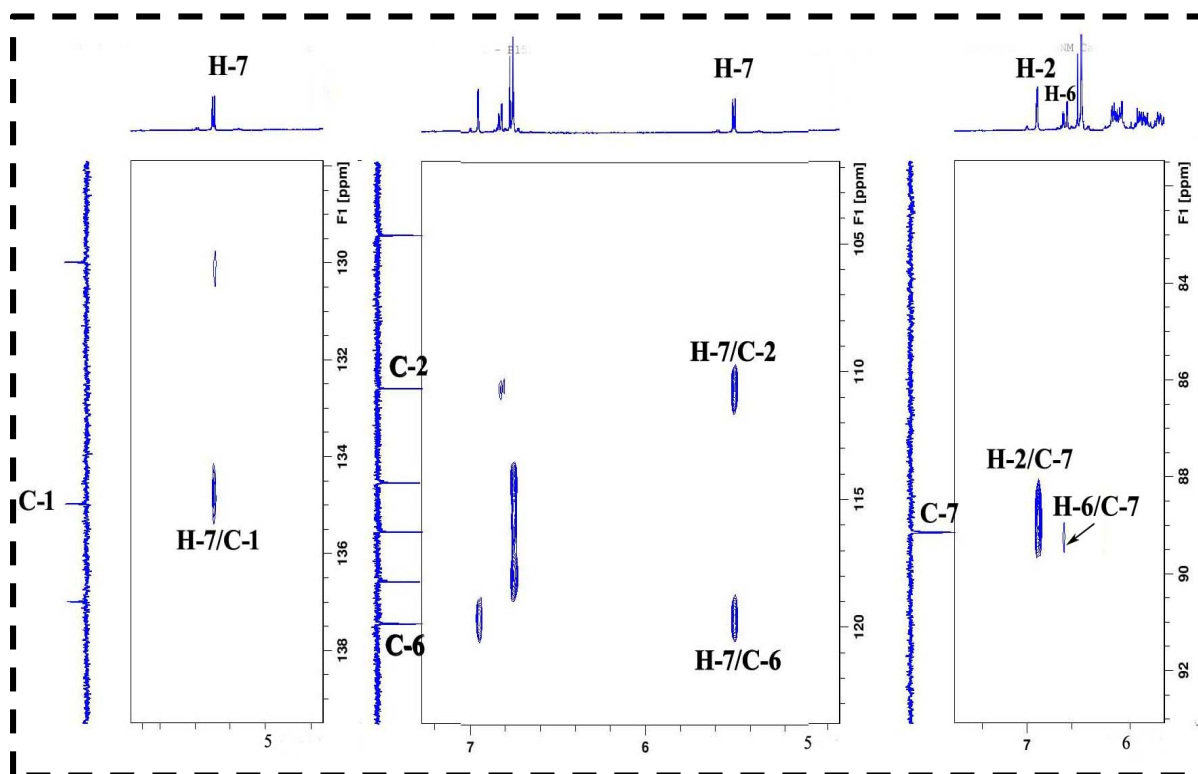


Figure II-16 : Spectre HMBC du composé HH1

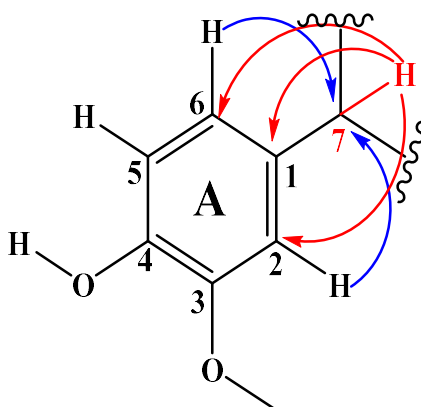


Figure II-17 : Corrélations partielles HMBC

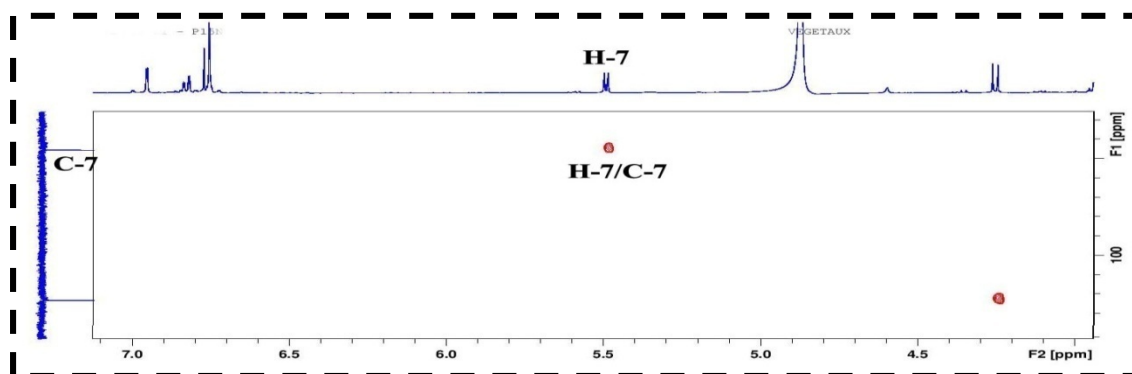


Figure II-18 : Spectre HSQC partiel du composé HH1

Le proton H-7 (5,49 ppm) présente en HMBC des corrélations avec le carbone quaternaire oxygéné C-4' (167,6 ppm) du cycle B (Figure II-19), indiquant que les carbones C-7 (89,1 ppm) et C-4' sont séparés par un atome d'oxygène.

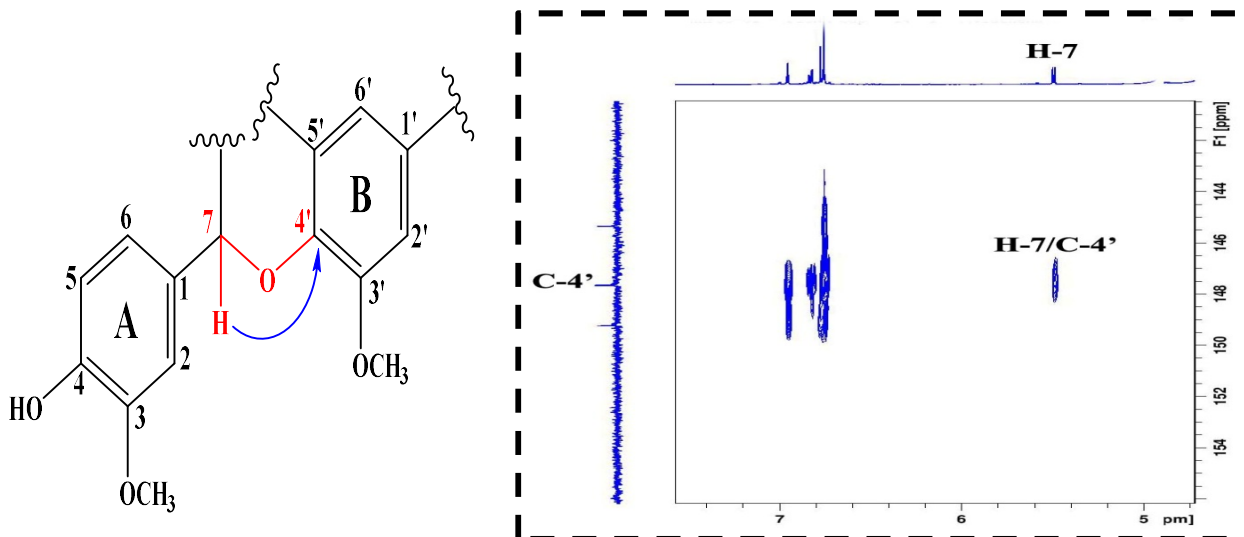


Figure II-19 : Spectre HMBC du composé HH1

Le spectre COSY H-H montre une corrélation entre le proton H-7 et un proton sortant à δ_H 3,45 (H-8, *m*) (Figure II-20). Le carbone C-8 qui le porte est repéré à 55,6 ppm sur le spectre HSQC.

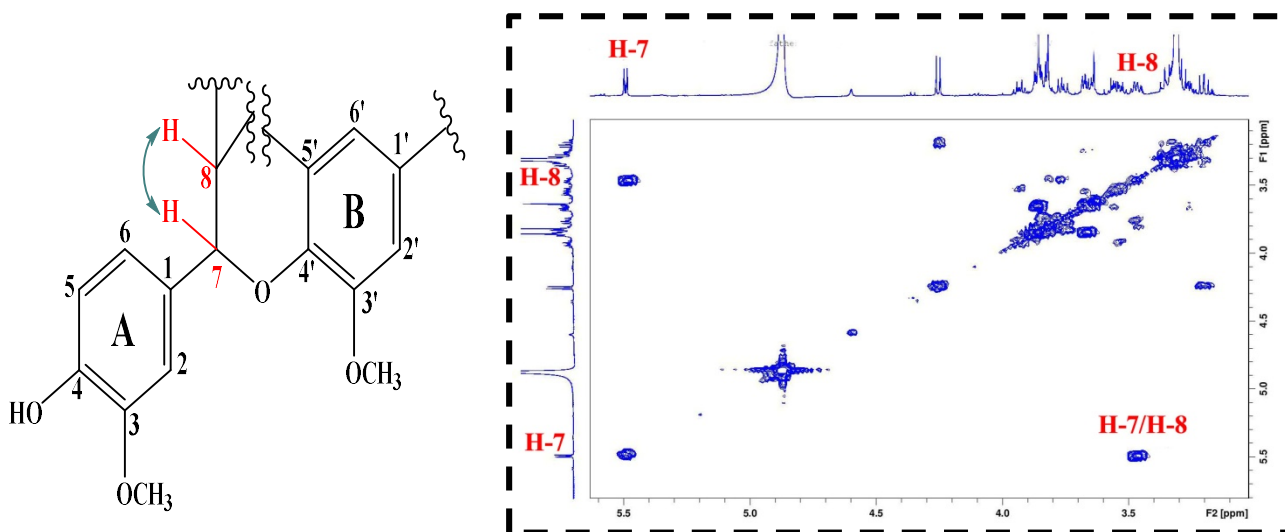


Figure II-20 : Spectre COSY H-H du composé HH1

Enfin, la corrélation HMBC H-8/C-5' (δ_C 130,0) du cycle B permet d'identifier un cycle furanique lié à ce cycle et substituant le cycle A en C-1 via le carbone C-7 du noyau furane (Figure II-21).

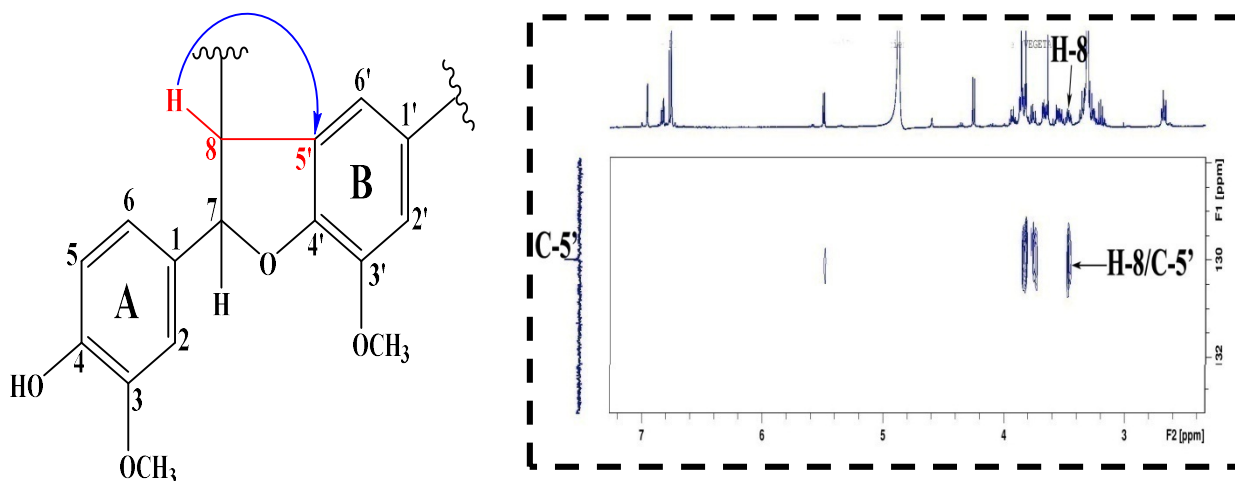


Figure II-21 : Spectre HMBC du composé HH1

Cette analyse montre clairement que notre composé est un néolignane substitué en C-8 du furane et C-1' du cycle B, et porteur d'une unité osidique. Il incombe de déterminer la nature de ces substituants. Ceci est réalisé principalement au moyen de l'expérience COSY H-H. Cette dernière (Figure II-22) permet d'identifier un groupement CH_2OH substituant le noyau furane en C-8 à travers les couplages entre le proton H-8 (1H, δ_{H} 3,45, *m*) du furane et deux protons repérés à δ_{H} 3,75 (H-9a, *m*) et 3,84 (H-9b, *m*) portés par le carbone C-9. Ce dernier sort à δ_{C} 65,1 selon l'expérience HSQC.

La présence d'un groupement OH est confirmée par HMBC (Figure II-23) qui n'indique aucune corrélation supplémentaire (outre les carbones C-8, C-7, C-5' préalablement identifiés).

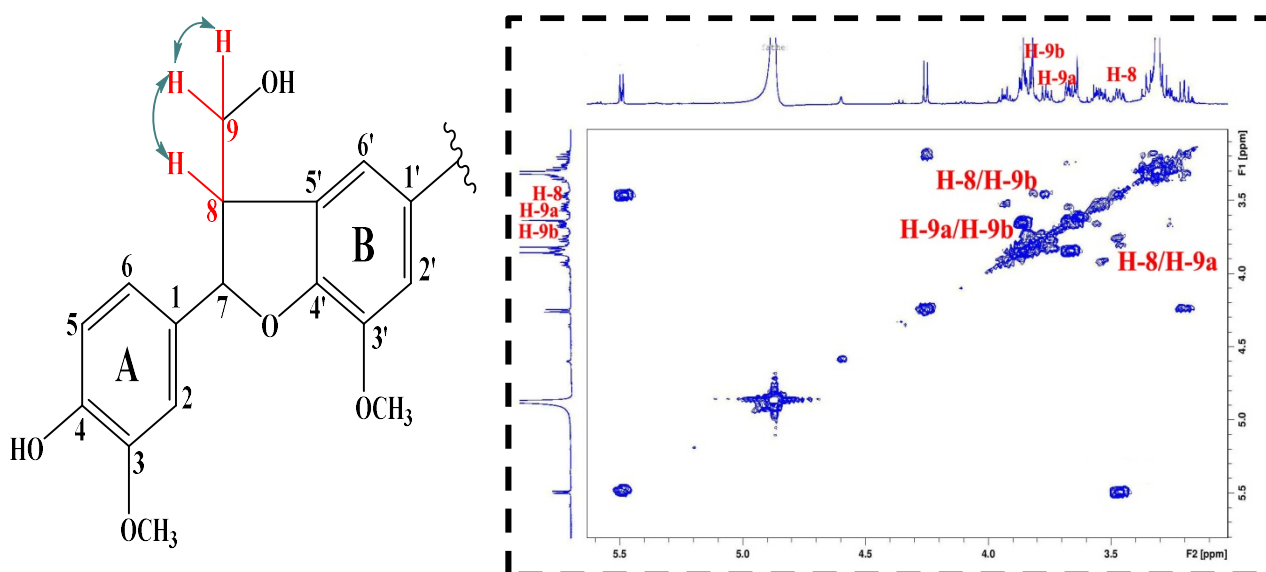


Figure II-22 : Spectre COSY H-H des protons aliphatiques du composé HH1

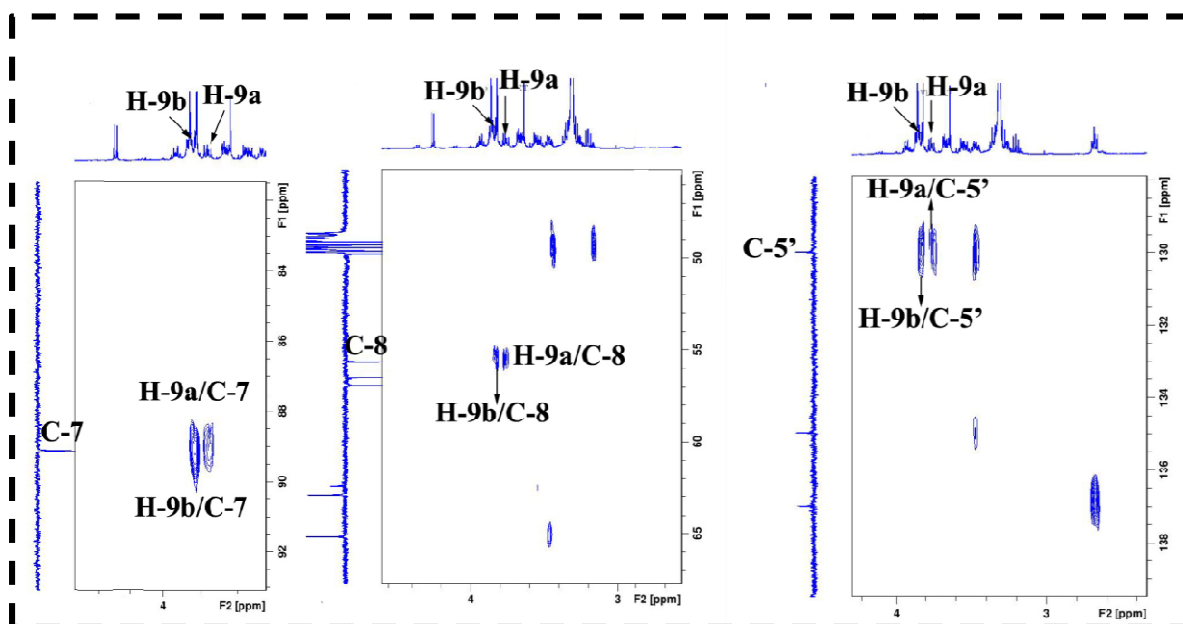


Figure II-23 : Spectre HMBC du composé HH1

Partant du signal de proton aliphatique nommé H-7' (2H, δ_H 2,65, *t*, $J = 7,5$ Hz), la même analyse (Figure II-24) met en évidence la présence d'un enchainement $-^7\text{CH}_2-^8\text{CH}_2-^9\text{CH}_2\text{O}-$, au vu des couplages homonucléaires H-7'/H-8' (2H, δ_H 1,91, *m*)/ H-9'a (1H, δ_H 3,52, *m*)/H-9'b (1H, δ_H 3,93, *m*). Le carbone oxygéné C-9' sort à 70,0 ppm selon l'analyse HMBC (Figure II-29).

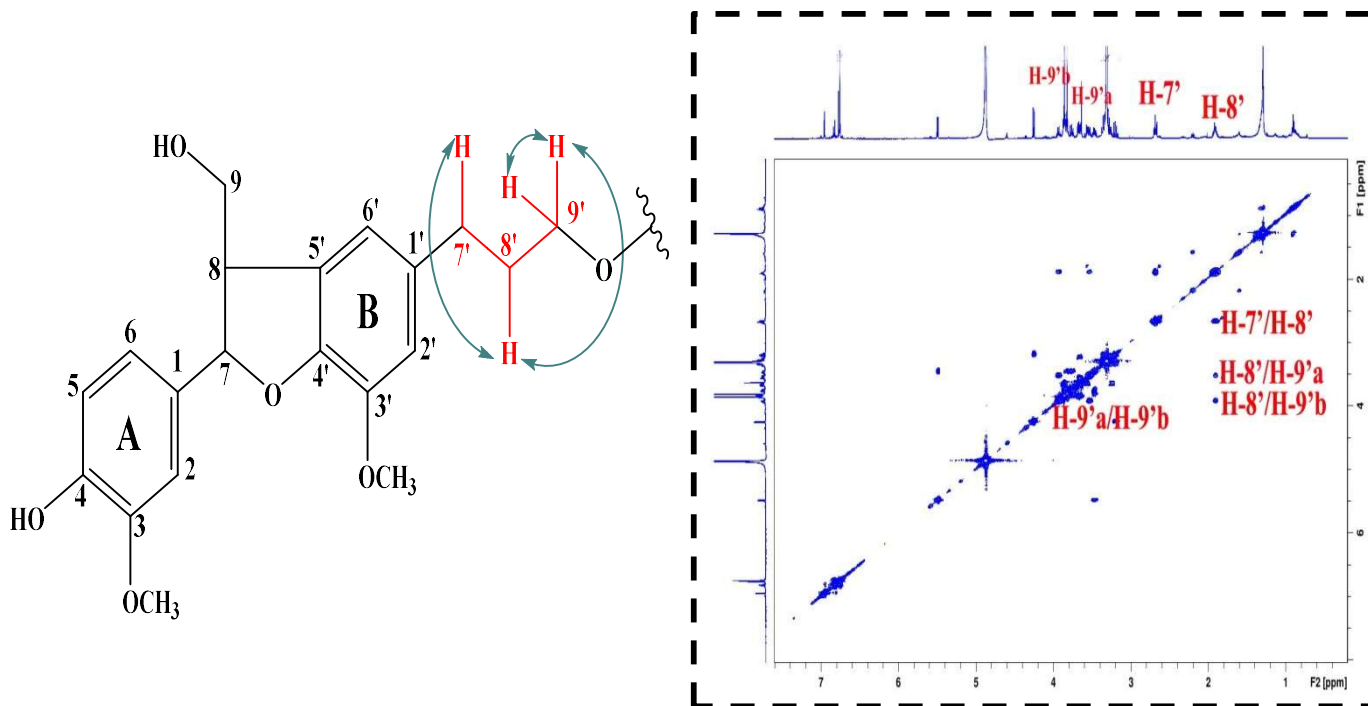


Figure II-24 : Spectre COSY H-H des protons aliphatiques du composé HH1

L'expérience HMBC indique clairement que cet enchainement substitue le cycle aromatique B en C-1' au regard du couplage hétéronucléaire H-7'/C-1' (δ_C 137,0). Elle montre (Figures II-25 et II-26) également les corrélations entre les protons H-2' (δ_H 6,76, s)/H-6' (δ_H 6,77, s) du cycle B et le carbone du groupement 7CH_2 (δ_C 33,0).

D'autres corrélations (Figure II-25) entre les protons H-7' et les carbones aromatiques C-1' (δ_C 137,0), C-2' (δ_C 114,3) et C-6' (δ_C 118,2) sont observées, confirmant l'attachement de l'enchainement au carbone quaternaire C-1' du cycle B.

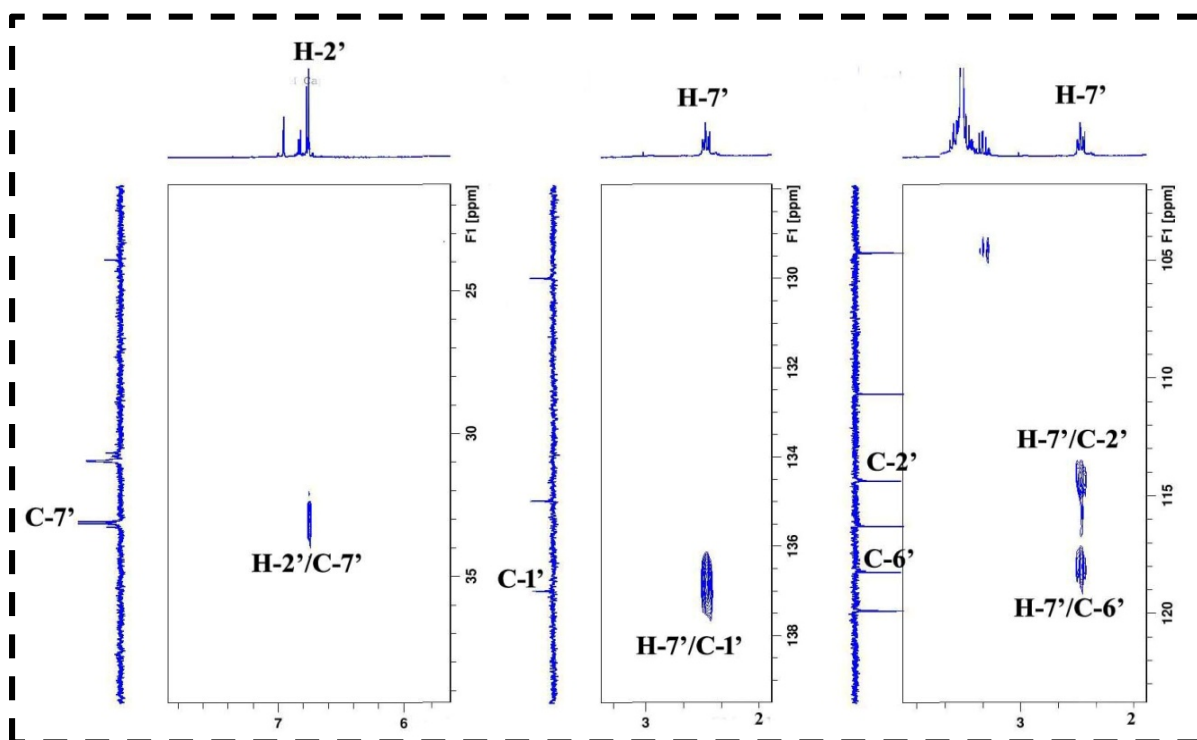


Figure II-25 : Spectre HMBC du composé HH1

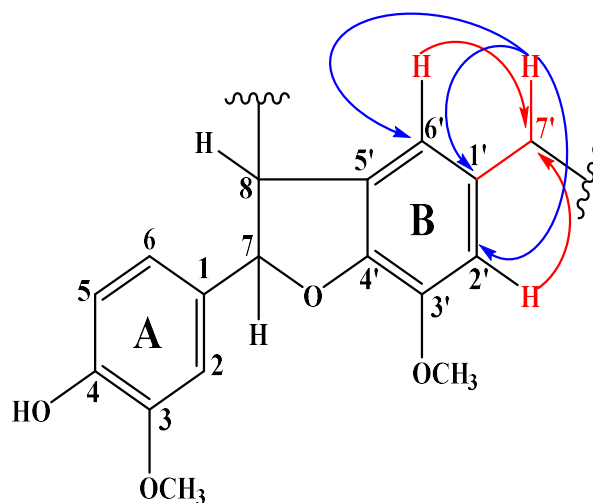


Figure II-26 : Corrélations HMBC du composé HH1

L'unité osidique est identifiée par les corrélations visualisées sur le spectre COSY H-H (Figure II-27). A partir du signal du proton anomère H-1'' résonant à 4,25 ppm (d , $J = 7,5$ Hz), il est mis en évidence les couplages H-1''/H-2'' (δ_H 3,18, dd , $J = 7,8; 9,5$ Hz), H-2''/H-3'' (δ_H 3,35, t , $J = 8,5$ Hz), H-3''/H-4'' (δ_H 3,28, t , $J = 8,1$ Hz), H-4''/H-5'' (δ_H 3,26, m) et H-5''/H-6''b (δ_H 3,85, dd , $J = 2,6; 11,5$ Hz), H-6''b/H-6''a (δ_H 3,67, m). L'ensemble de ces corrélations traduit la présence d'un glucose de configuration β ($J_{1''-2''} = 7,5$ Hz).

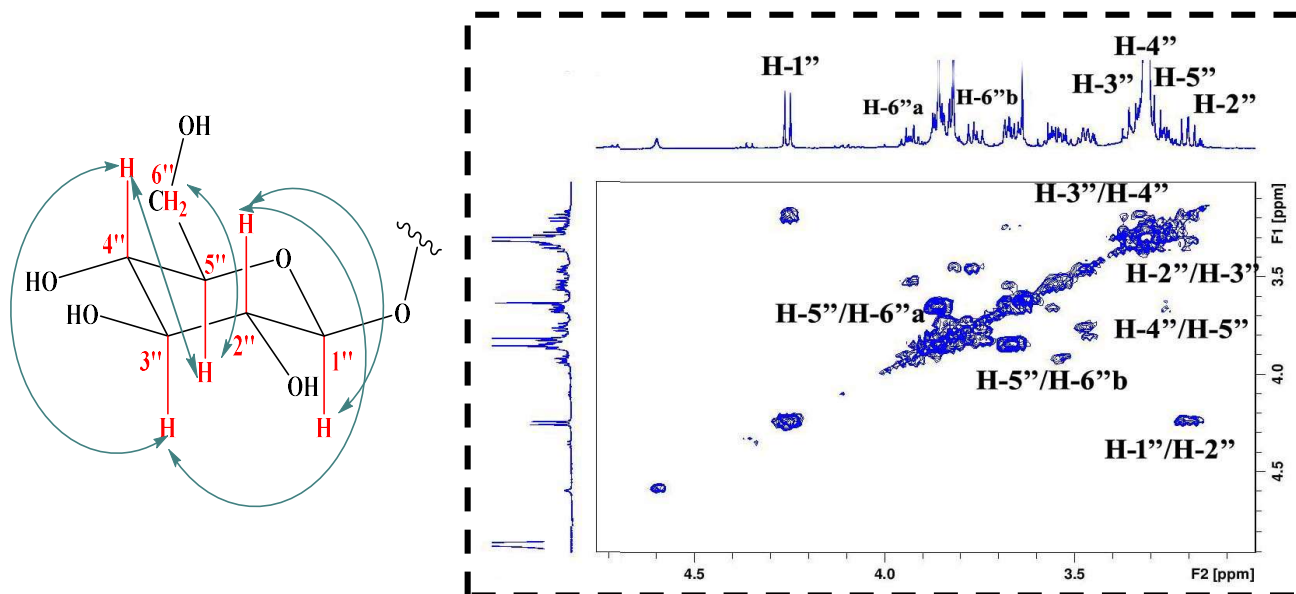


Figure II-27 : Spectre COSY H-H du β -D-glucose du composé HH1

L'analyse du spectre HSQC (Figure II-28) permet d'assigner les déplacements chimiques de tous ses carbones : 104,7 (C-1''), 75,3 (C-2''), 78,3 (C-3''), 71,8 (C-4''), 78,0 (C-5'') et 62,9 (C-6'').

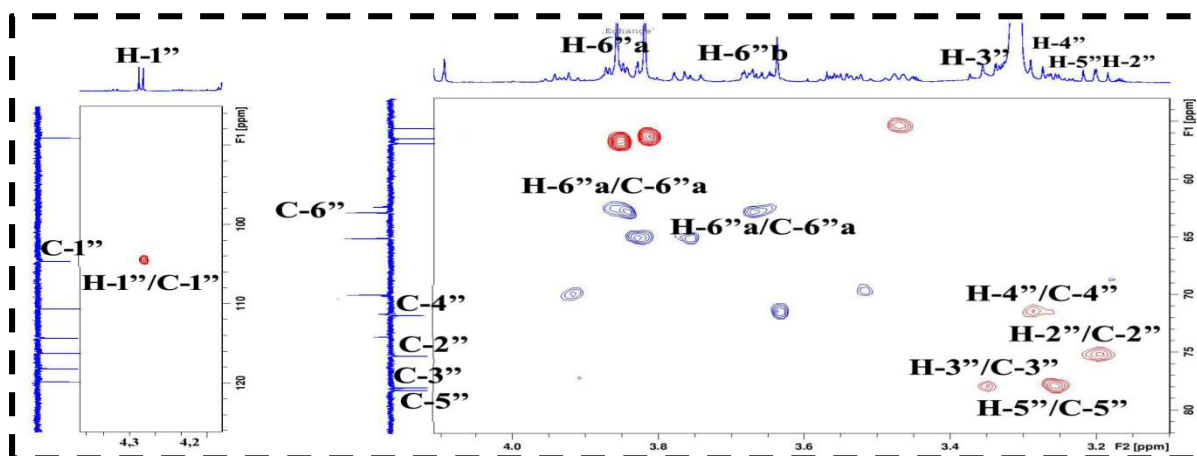


Figure II-28 : Spectre HSQC du β -D-glucose du composé HH1

Le point de branchement du β -D-glucose en C-9' est établi suite à l'analyse du spectre HMBC (Figure II-29) qui présente un couplage entre le proton anomérique H-1'' et le carbone C-9' (δ_C 70,0).

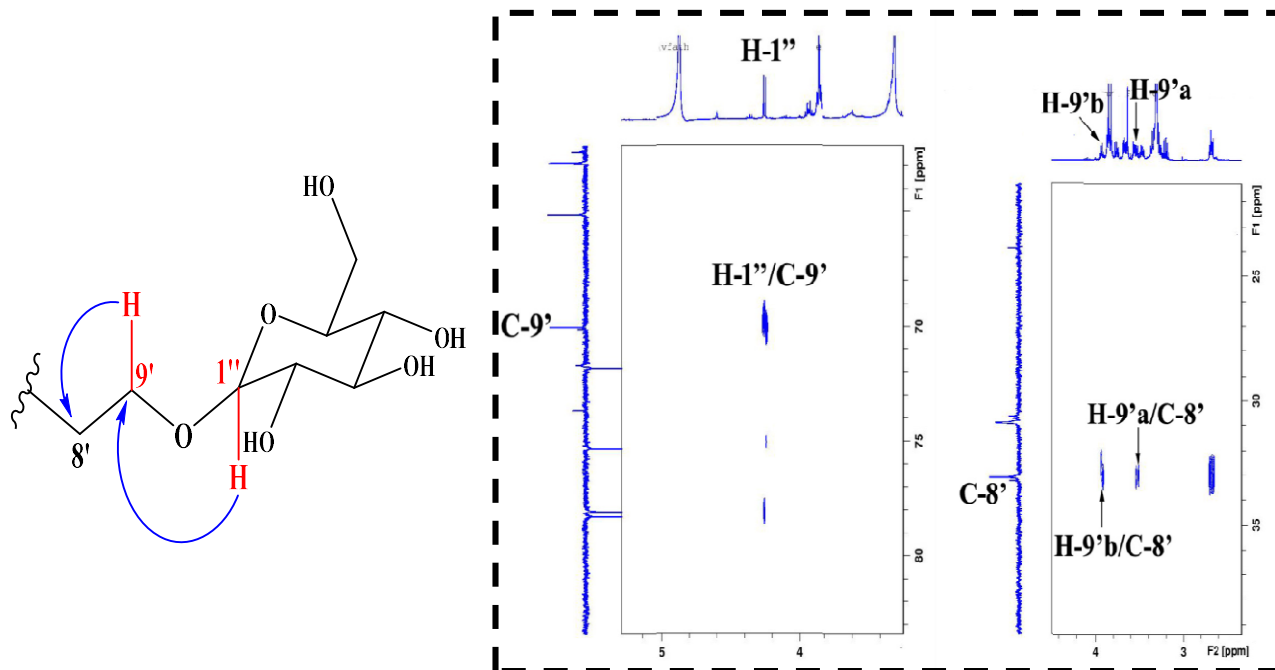
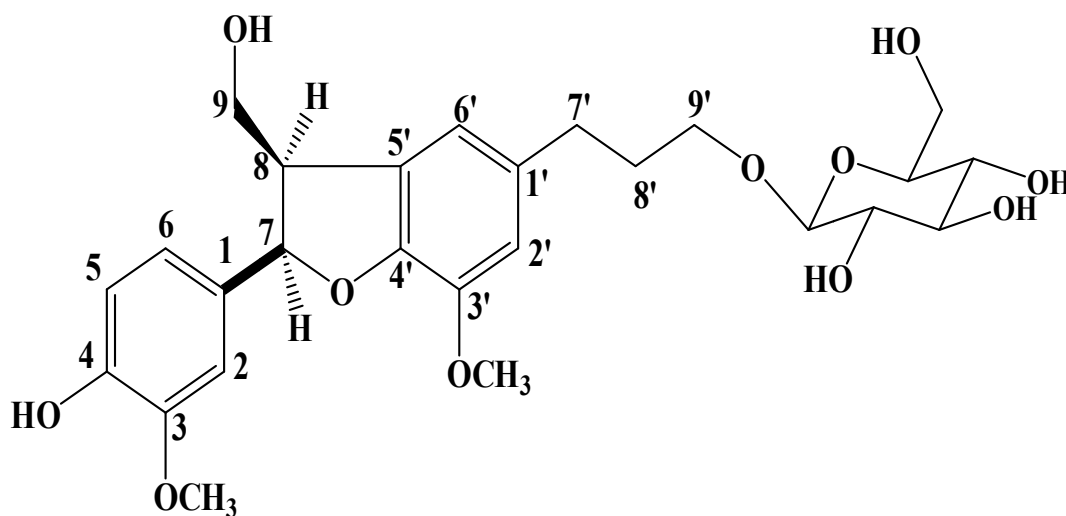


Figure II- 29 : Spectre HMBC localisant le β -D-glucose

En se basant sur toutes ces données spectroscopiques et la valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = -45$ ($C = 3,33 \times 10^{-4} \text{ g/cm}^3$, MeOH), le composé **HH1** est identifié sans ambiguïté au (7*R*,8*R*)-7,8-dihydro-9'-hydroxyl-3'-méthoxyl-8-hydroxyméthyl-7-(4-hydroxy-3-méthoxy phényl-1'-benzo-furanpropanol-9'-*O*- β -D-glucopyranoside.



Ce composé, appartenant à la classe des néolignanes glucosides, a été isolé originellement de l'espèce *Acer truncatum* appartenant à la famille Aceraceae [50]. Il a été détecté pour la première fois au sein de la famille Cistaceae.

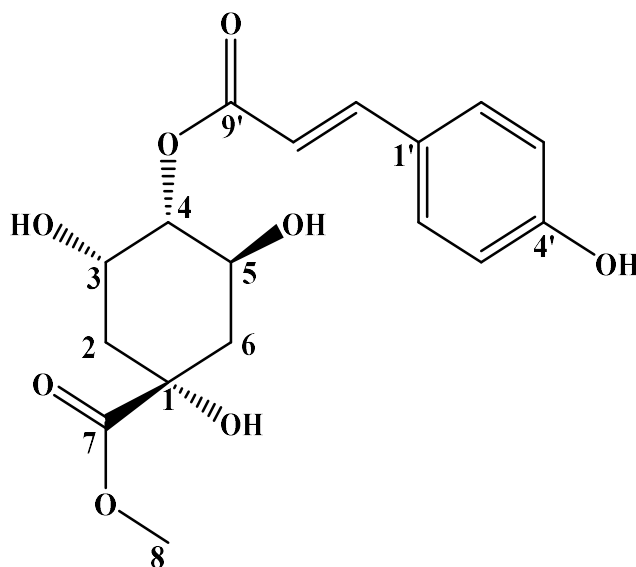
Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **HH1** sont réunis dans le tableau II-1.

Tableau II-1 : Données RMN ¹H et ¹³C du composé HH1 (MeOD)

Position	RMN ¹ H δ_H (m, J en Hz)	RMN ¹³ C δ_C (ppm)
1	-	134,9
2	6,95 (d, 1,9)	110,6
3	-	149,2
4	-	147,6
5	6,76 (d, 8,3)	116,2
6	6,82 (dd, 1,9; 8,1)	119,8
7	5,49 (d, 6,4)	89,1
8	3,45 (m)	55,6
9	3,75 (m)	65,1
	3,84 (m)	
1'	-	137,0
2'	6,76 (s)	114,3
3'	-	145,4
4'	-	147,6
5'	-	130,0
6'	6,77 (s)	118,2
7'	2,65 (t, 7,5)	33,0

8'	1,91 (<i>m</i>)	33,1
9'	3,52 (<i>m</i>)	70,0
	3,93 (<i>m</i>)	
1''	4,25 (<i>d</i> , 7,5)	104,7
2''	4,25 (<i>dd</i> , 7,8; 9,5)	75,30
3''	3,35 (<i>t</i> , 8,5)	78,31
4''	3,28 (<i>t</i> , 8,1)	71,8
5''	3,26 (<i>m</i>)	78,0
6''	3,67 (<i>m</i>)	62,9
	4,85 (<i>dd</i> , 2,6; 11,5)	
3-OMe	3,78 (<i>s</i>)	56,51
3'-OMe	3,78 (<i>s</i>)	56,9

II-1-4-2-Détermination structurale du composé HH2



Acide 4-*O-p*-coumaryl quinique méthyl ester (Méthyl 4-*O*-coumarylquinate)

Le spectre de masse ESI du composé **HH2** enregistré en modes négatif (Figure II-30) et positif (Figure II-31) présente des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 350,6$ [M-

H], $m/z = 374,9$ $[M+Na]^+$ et $m/z = 727$ $[2M+Na]^+$. Ceci correspond à une masse moléculaire égale à 352 uma et une formule brute en $C_{17}H_{20}O_8$.

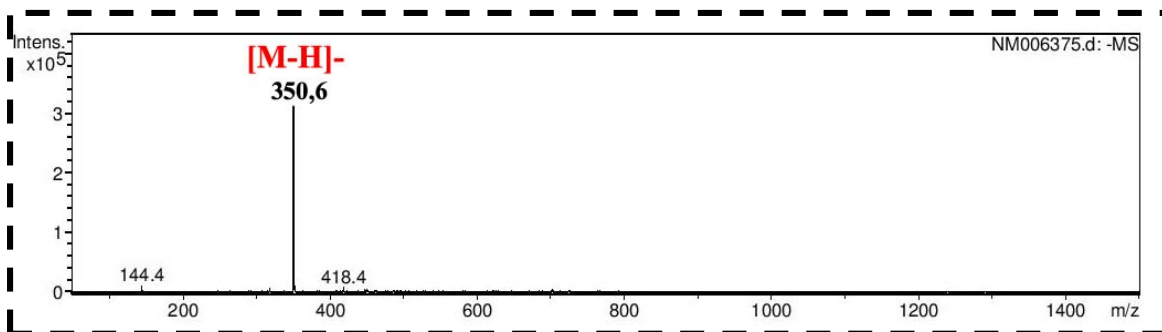


Figure II-30 : Spectre ESI (mode négatif) du composé HH2

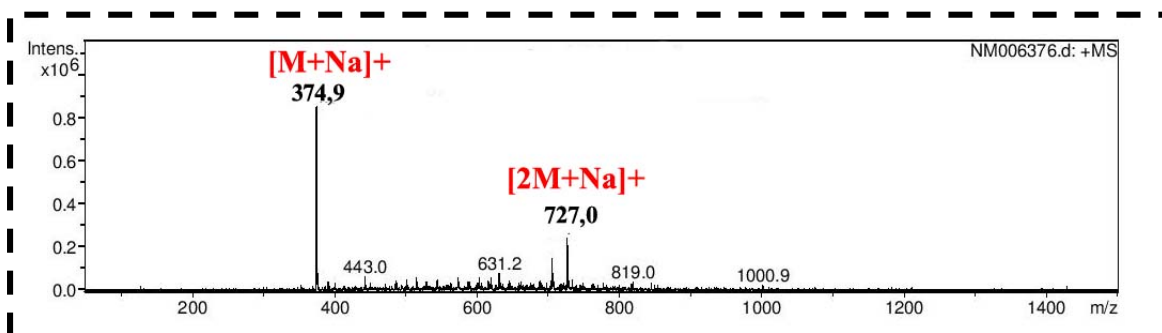


Figure II-31 : Spectre ESI (mode positif) du composé HH2

L'analyse du spectre RMN 1H (Figure II-32) de ce composé **HH2** présente :

- ▣ deux signaux à 7,42 (2H, *d*, $J = 8,6$ Hz) et 6,89 ppm (2H, *d*, $J = 8,7$ Hz) attestant de la présence d'un noyau aromatique. La multiplicité des signaux ainsi que les valeurs de constantes de couplage suggèrent que ce dernier est para disubstitué (positions 1' et 4').
- ▣ deux signaux d'intégration 1H chacun à δ_H 6,42 (*d*, $J = 15,7$ Hz) et 7,69 (*d*, $J = 16,5$ Hz) mettant en évidence la présence d'un groupement éthylénique de configuration *trans*.

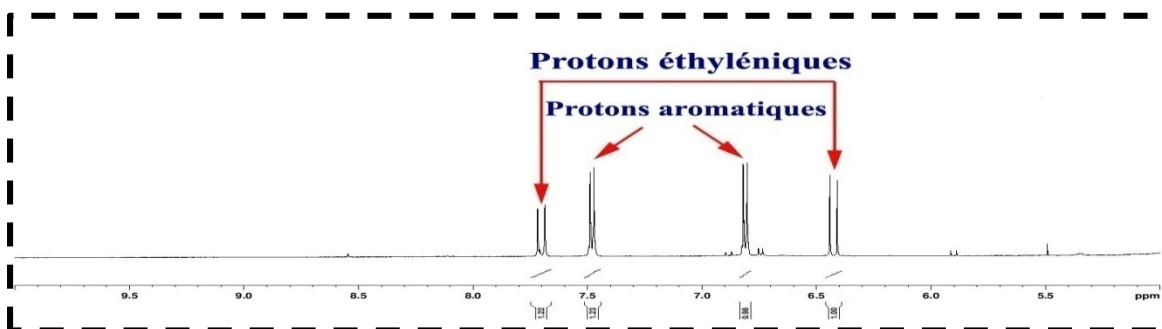


Figure II-32 : Spectre RMN 1H du composé HH2

Le spectre RMN ^{13}C DEPTQ (Figure II-33) confirme cette analyse à travers les signaux correspondant à :

- ◆ 4 CH aromatiques (δ_{C} 117,0-131,3).
- ◆ 2 carbones quaternaires aromatiques, l'un (C-1') à 127,4 ppm et l'autre oxygéné (C-4') à 161,5 ppm.
- ◆ 2 CH éthylénique (115,6 et 146,9 ppm).
- ◆ un carbone de carbonyle d'ester (δ_{C} 169,1).

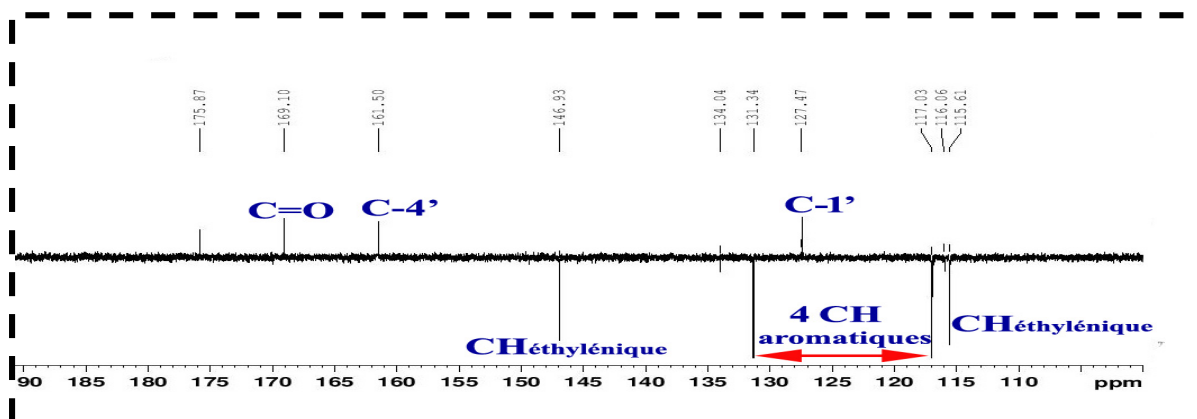


Figure II-33 : Spectre RMN ^{13}C DEPTQ du composé HH2

Le spectre COSY H-H (Figure II-34) montre les corrélations attendues entre les quatre protons aromatiques H-3'/H-5' et H-2'/H-6', ainsi que les protons éthyléniques nommés H-7'/H-8'.

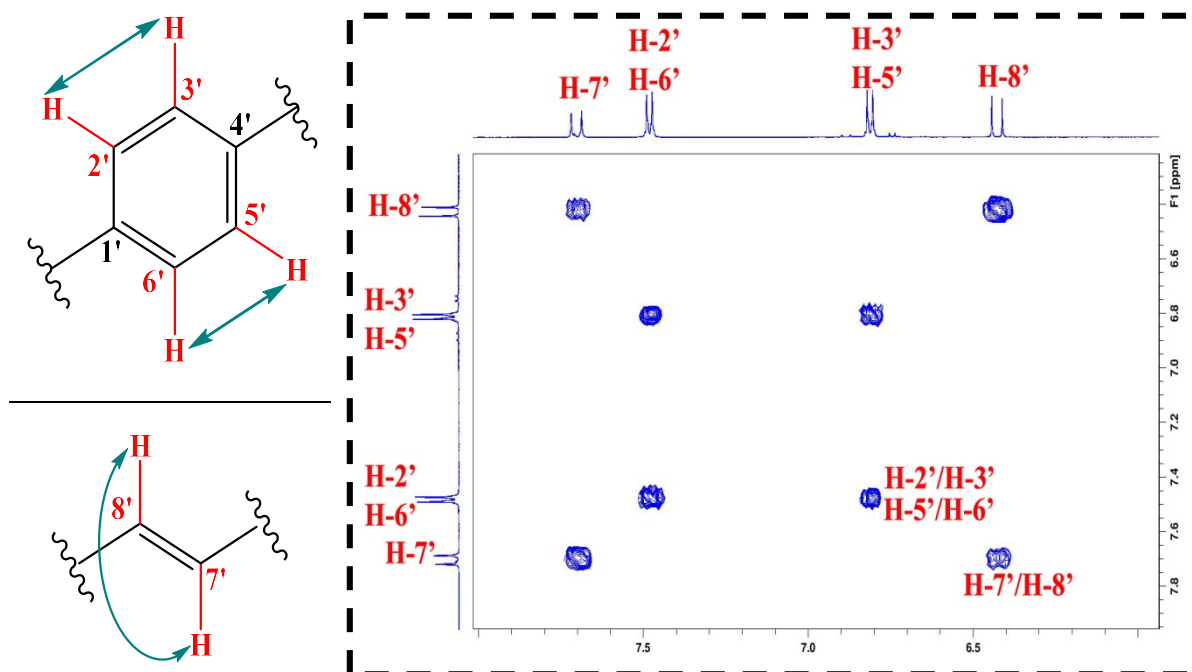


Figure II-34 : Spectre COSY H-H du composé HH2

Le spectre HMBC (Figures II-35 et II-36) présente les couplages entre :

- ⊙ le proton éthylénique H-7' (7,69 ppm) et les carbones aromatiques C-2'/C-6' (131,3 ppm) d'une part et le carbone éthylénique C-8' (115,6 ppm) d'autre part.
- ⊙ les protons H-7'/H-8' et le carbone du carbonyle d'ester (δ_C 169,1) permettant de lier la double liaison à la fonction carbonyle (C-9').
- ⊙ le proton éthylénique H-8' (6,42 ppm) et le carbone quaternaire aromatique repéré à δ_C 127,4 et identifié à C-1', indiquant l'attachement de la double liaison en cette position.

Le déplacement chimique de l'autre carbone quaternaire aromatique C-4' (161,5 ppm) et l'absence de corrélations autres que celles observées avec les protons aromatiques (H-2', H-3', H-5' et H-6') nous autorise à le lier à un groupement hydroxyle.

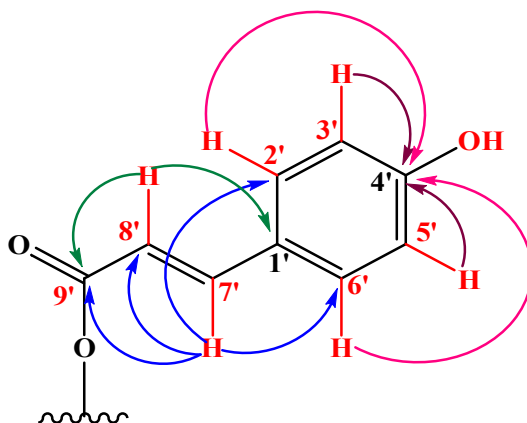


Figure II-35 : Structure partielle et corrélations HMBC observées du composé HH2

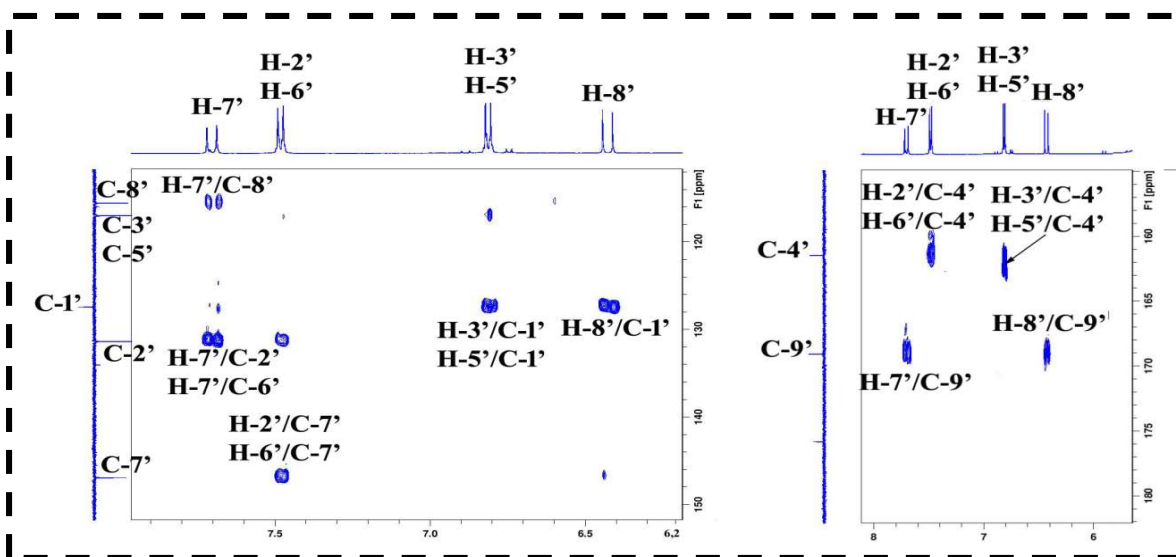
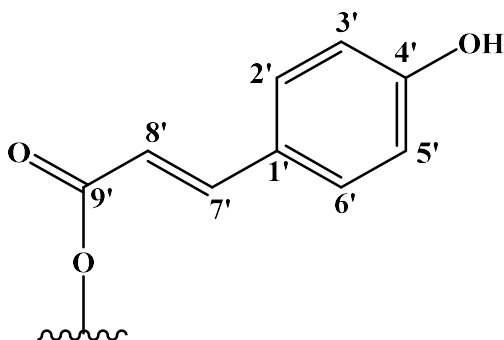


Figure II-36 : Spectre HMBC du composé HH2

Toutes ces données spectroscopiques permettent de déduire la présence d'un dérivé de l'acide cinnamique.



Il reste à identifier la nature du substituant attaché au carbone carbonyle d'ester C-9'. A cet effet, le spectre RMN ^1H (Figure II-37) montre :

- ☐ un signal multiplet à 2,07 ppm de deux protons aliphatiques portés par un même carbone détecté à 42,3 ppm sur le spectre HSQC (Figure II-38), suggérant qu'ils font partie d'un groupement méthylénique CH_2 .
- ☐ un autre signal multiplet à 2,15 ppm de deux autres protons méthyléniques substituant un carbone repéré à 38,6 ppm selon l'analyse HSQC.
- ☐ un signal multiplet (1H, δ_{H} 4,25) d'un proton porté par un carbone oxygéné sortant à 65,9 ppm selon l'expérience HSQC.
- ☐ un signal multiplet (1H, δ_{H} 4,28) d'un autre proton substituant sur le spectre HSQC (Figure II-38) un carbone oxygéné localisé à 69,2 ppm.
- ☐ un signal doublet de doublets (1H, 4,82 ppm, $J = 8,4; 2,8$ Hz), d'un proton méthine lié à un carbone oxygéné résonant à δ_{C} 78,7 selon le spectre HSQC. Sa valeur de déplacement chimique indique qu'il est porteur d'un groupement acylant.
- ☐ un signal singulet d'intégration 3H à δ_{H} 3,75 d'un groupement méthoxyle. Son carbone est assigné à δ_{C} 53,1 selon l'analyse HSQC.

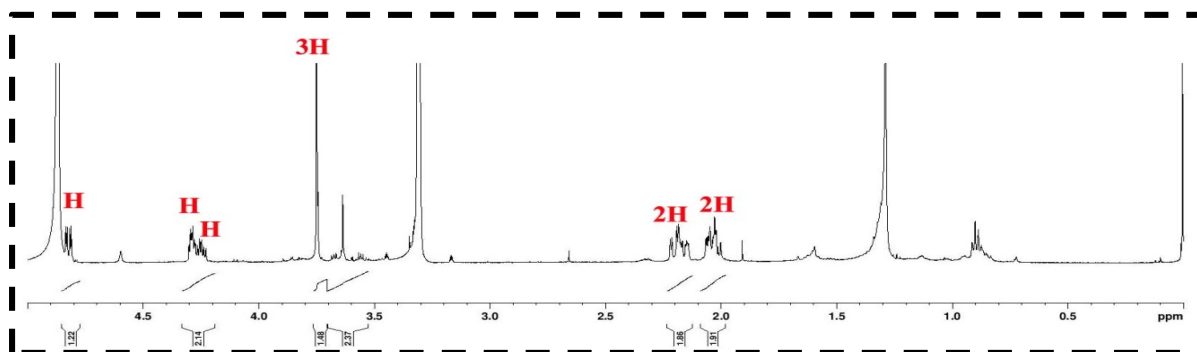


Figure II-37 : Spectre RMN ^1H du composé HH2

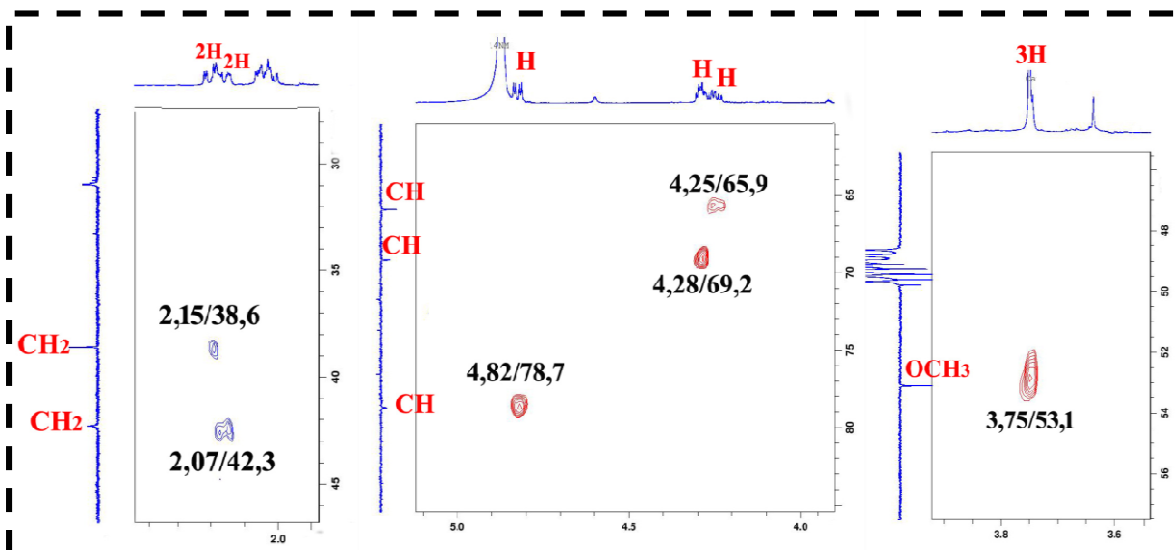


Figure II-38 : Spectre HSQC du composé HH2

Le spectre COSY H-H (Figure II-39) montre clairement que ces protons font partie d'un même système de spins à sept protons d'un cycle à 6 chaînons, illustré par l'enchaînement suivant :

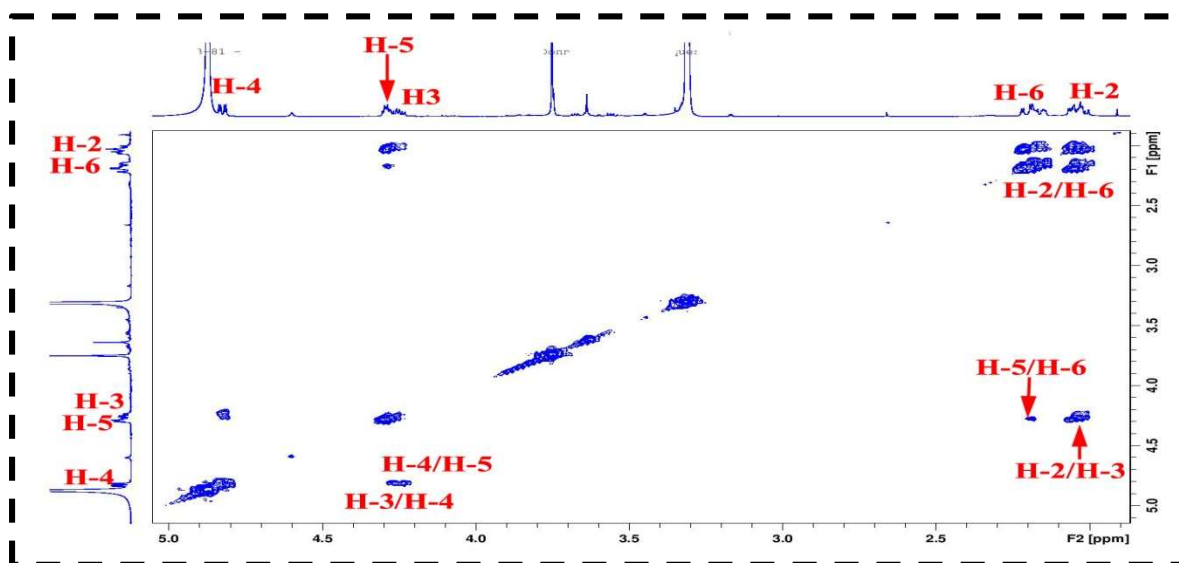
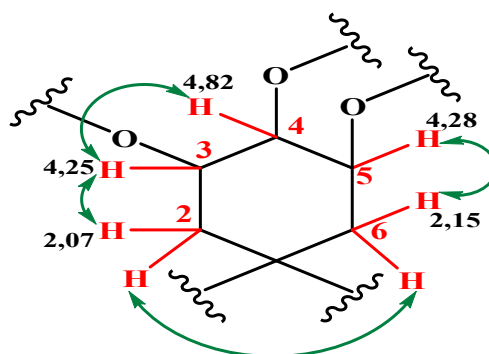


Figure II-39 : Spectre COSY H-H du composé HH2

Les protons nommés H-2 et H-6 détectés respectivement à 2,07 et 2,15 ppm présentent des corrélations en 3J sur le spectre HMBC (Figure II-40) avec un même carbone quaternaire oxygéné C-1 résonnant à δ_C 76,6, indiquant leur attachement à ce dernier et confirmant la présence du cycle à 6 chaînons.

Toutes ces constatations, en plus du couplage observé sur le même spectre entre le proton H-2 (δ_H 2,07) et un carbone de carbonyle repéré à 175,8 ppm (C-7), lui-même corrélant avec les protons OCH₃, en plus de la comparaison avec les données de la littérature, permettent d'identifier l'acide quinique estérifié par un groupement méthyle.

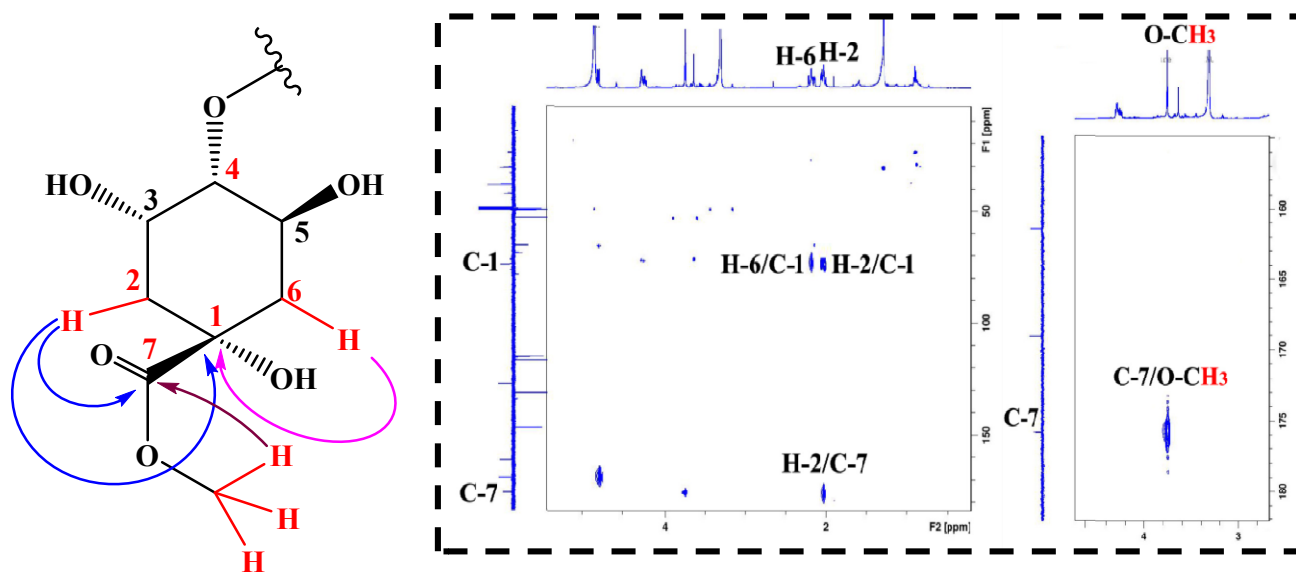


Figure II-40 : Spectre HMBC du composé HH2

L'analyse du spectre HMBC (Figure II-41) permet de relier les deux entités et cela par l'observation d'une tache de corrélation entre le proton H-4 (δ_H 4,82) et le carbonyle d'ester à δ_C 169,1 de l'acide cinnamique, permettant d'attacher ce dernier à l'hydroxyle en position 4 de l'acide quinique.

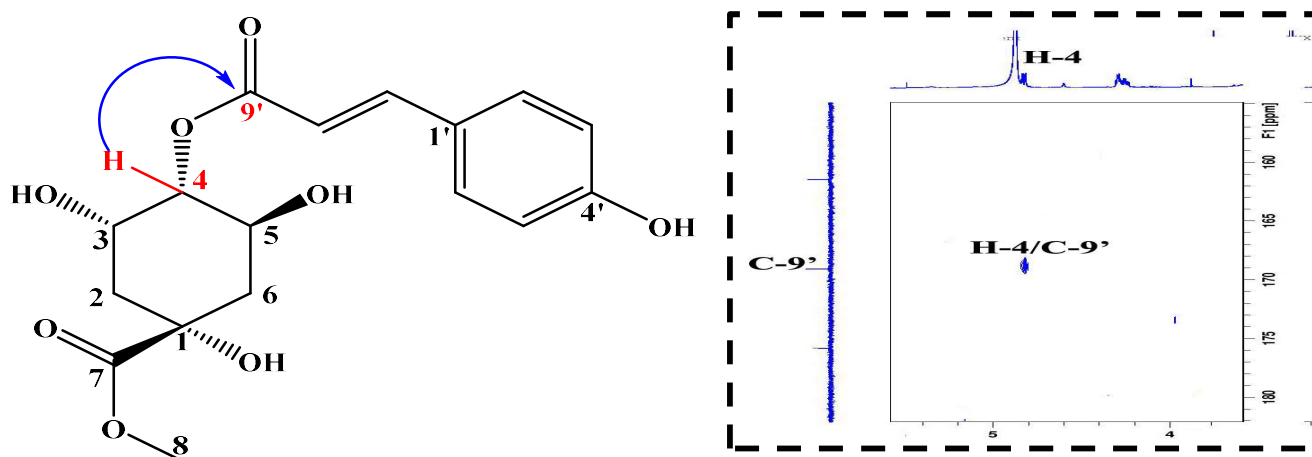
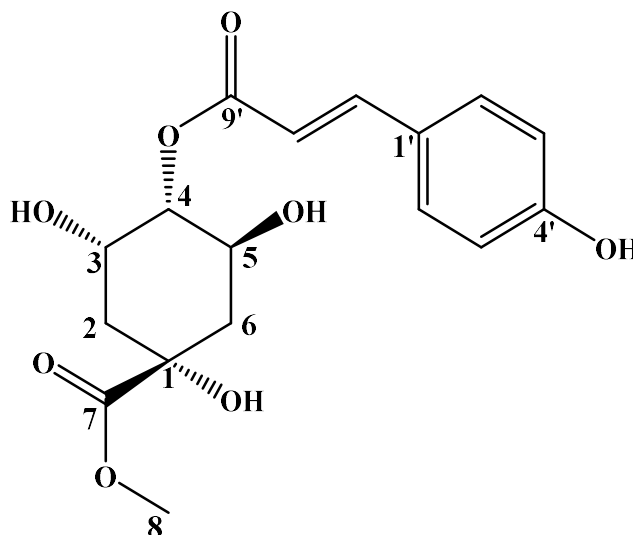


Figure II-41 : Spectre HMBC du composé HH2

L'ensemble de ces données spectroscopiques ainsi que la mesure du pouvoir rotatoire [α]_D = -19, C = 4,17x10⁻⁴ g/cm³), permettent d'assigner pour le composé **HH2** la structure suivante :



Acide 4-*O-p*-coumaryl quinique méthyl ester (Méthyl 4-*O*-coumarylquinat)

Ce composé isolé originellement de *Vittaria anguste-elongata* (Vittariaceae) [51], est identifié pour la première fois dans la famille Cistaceae.

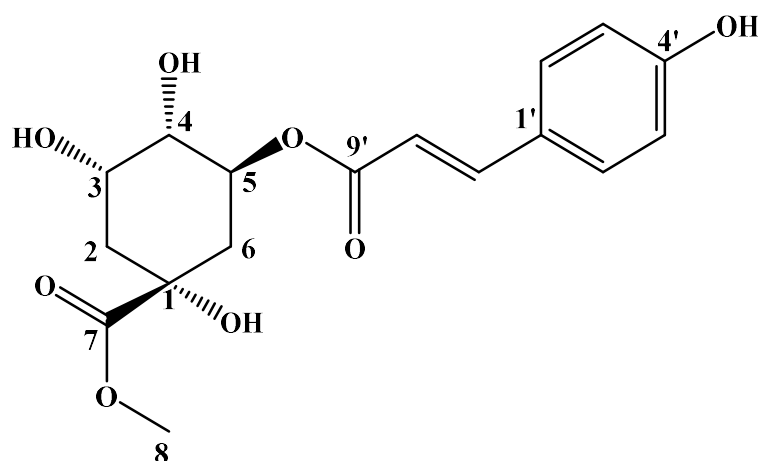
Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **HH2** sont rassemblés dans le tableau II-2.

Tableau II-2 : Données RMN ¹H et ¹³C du composé HH2 (MeOD)

Position	RMN ¹ H δ_H (m, J en Hz)	RMN ¹³ C δ_C (ppm)
1	-	76,6
2	2,07 (m)	42,3
3	4,25 (m)	65,9
4	4,82 (dd, 2,8; 8,4)	78,7
5	4,28 (m)	69,2
6	2,15 (m)	38,6

7	-	175,8
8	3,75 (s)	53,1
1'	-	127,0
2'	7,42 (d, 8,6)	131,3
3'	6,81 (d, 8,7)	117,0
4'	-	161,5
5'	6,81 (d, 8,7)	117,0
6'	7,42 (d, 8,6)	131,3
7'	7,69 (d, 16,5)	146,9
8'	6,42 (d, 15,7)	115,6
9'	-	169,1

II-1-4-3- Détermination structurale du composé HH3



Acide 5-*O*-*p*-coumaryl quinique méthyl ester (Méthyl 5-*O*-coumarylquinatate)

Le spectre de masse ESI du composé **HH3** enregistré en modes négatif (Figure II-42) et positif (Figure II-43) montrent des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 350,6$ $[M-H]^-$, $m/z = 374,9$ $[M+Na]^+$ et $m/z = 727$ $[2M+Na]^+$, indiquant que la molécule possède une masse de 352 uma et une formule brute en $C_{17}H_{20}O_8$.

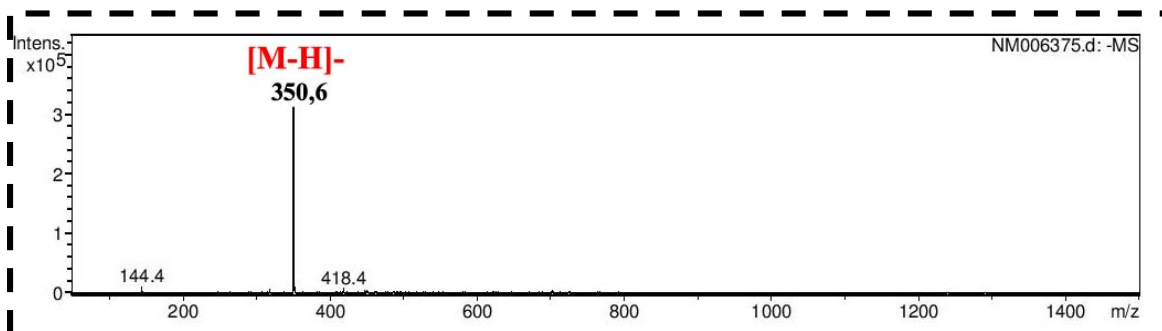


Figure II-42 : Spectre ESI (mode négatif) du composé HH3

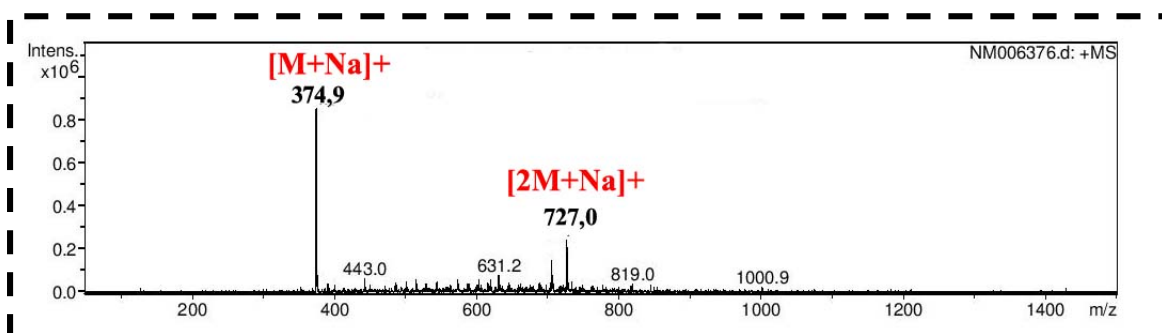
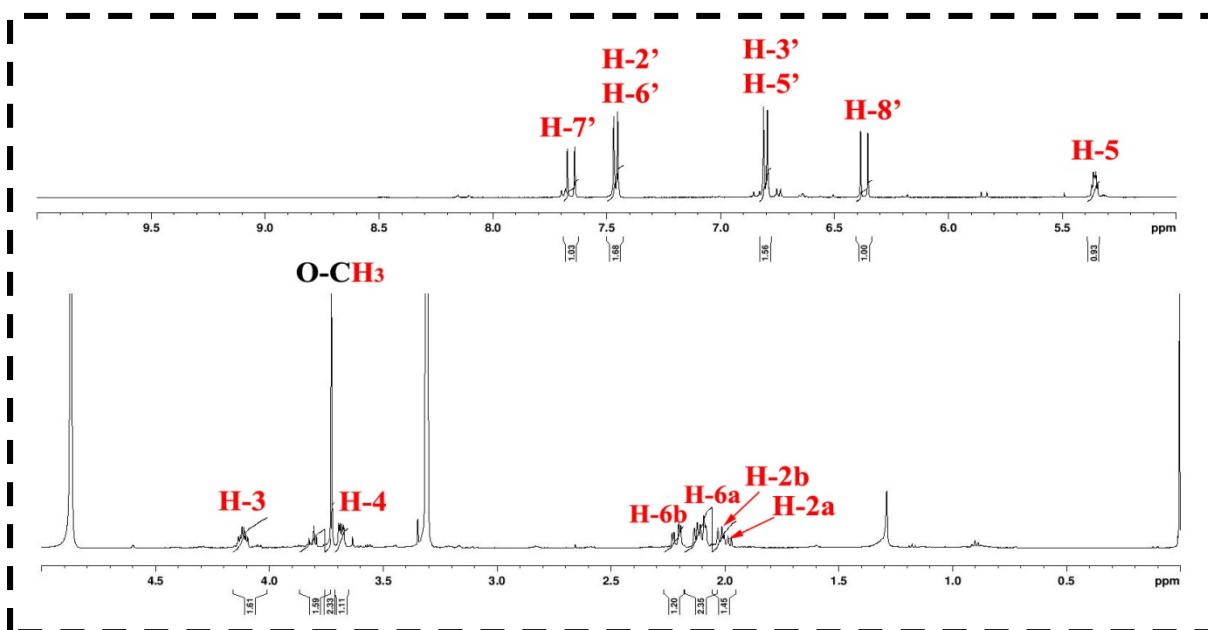


Figure II-43 : Spectre ESI (mode positif) du composé HH3

Toutes les données spectrales de ce composé **HH3** obtenues après analyse combinée des spectres RMN ¹H (Figure II-44), ¹³C DEPTQ (Figure II-45) et confirmées par les expériences HSQC, HMBC et COSY H-H, se sont avérées totalement identiques à celles du composé **HH3** élucidé précédemment.

Figure II-44 : Spectre RMN ¹H du composé HH3

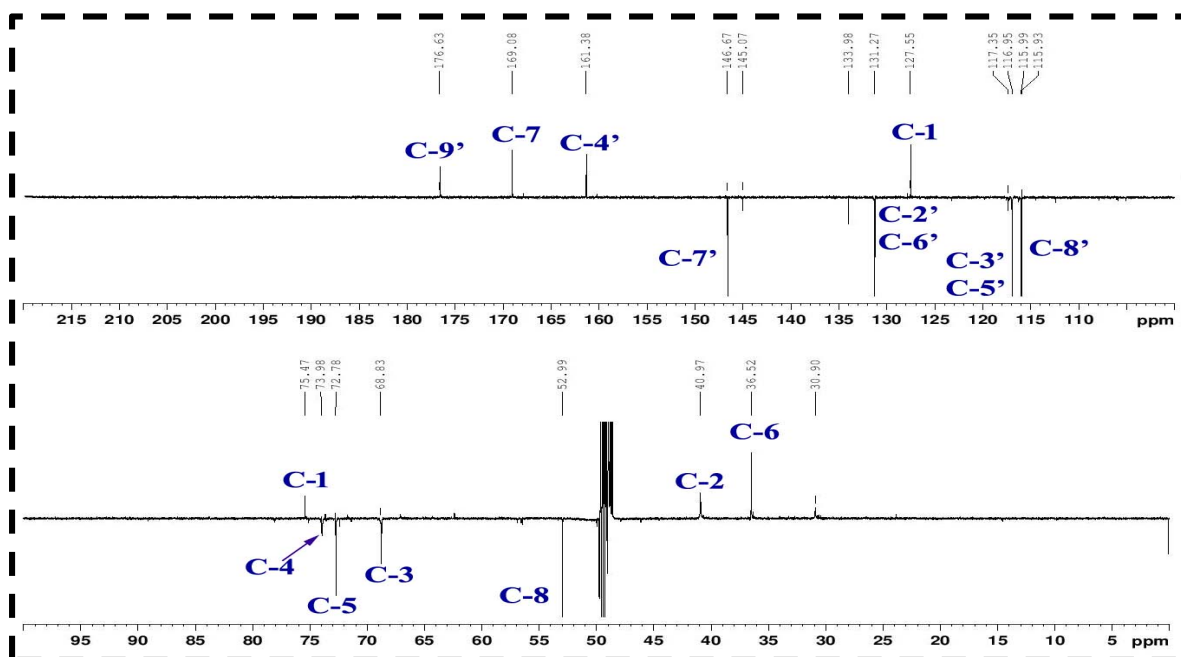


Figure II-45 : Spectre ^{13}C DEPTQ du composé HH3

La seule différence réside principalement au niveau des déplacements chimiques des protons H-5 (δ_{H} 5,36) et H-4 (δ_{H} 3,68) comparées à ceux des mêmes protons du composé **HH2**, suggérant cette fois l'attachement du groupement trans cinnamoyle en position 5 de l'acide quinique, impliquant que les composés **HH2** et **HH3** sont des isomères.

Le point de branchement des deux unités est confirmé par HMBC (Figure II-46) qui montre une tache de corrélation entre le proton H-5 de l'acide quinique et le carbone carbonyle C-9' (δ_{C} 169,0) de l'acide cinnamique.

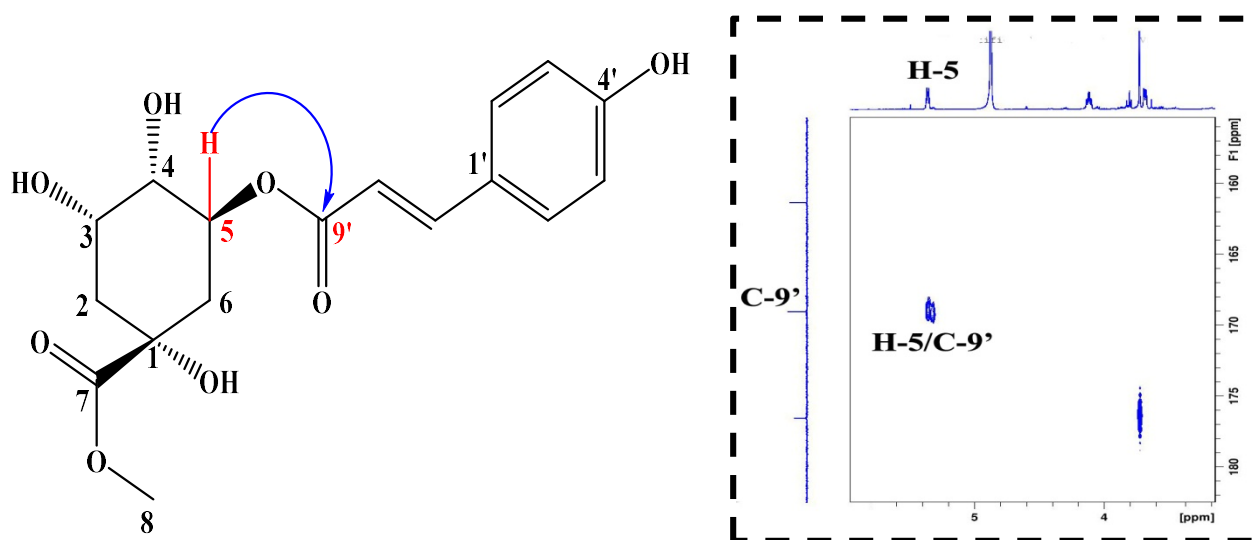
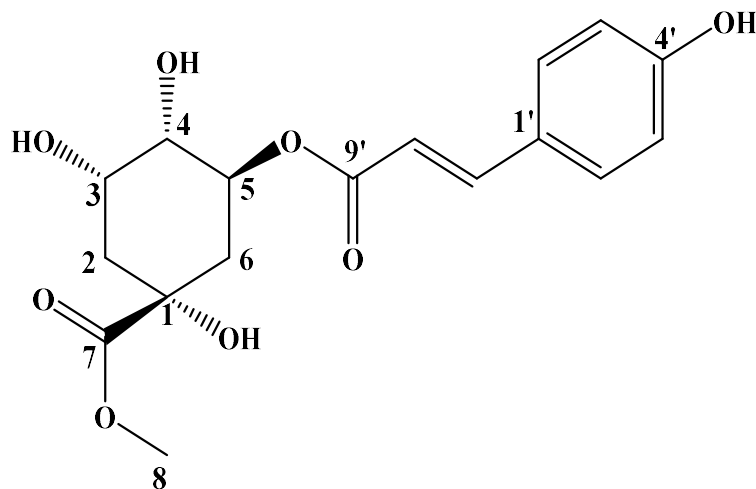


Figure II-46 : Spectre HMBC du composé HH3

Ces données spectrales (Tableau II-3), en plus de la valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = -8,6$ ($C = 2,33 \times 10^{-3}$ g/cm³, MeOH), conduisent à attribuer pour ce composé la structure suivante :



Acide 5-*O*-*p*-coumaryl quinique méthyl ester (Méthyl 5-*O*-coumarylquiniate)

Ce dernier a été isolé antérieurement de l'espèce *Cistus laurifolius* (Cistaceae) [52].

Il apparaît ainsi que ce composé a été décrit pour la première fois dans le genre *Helianthemum*.

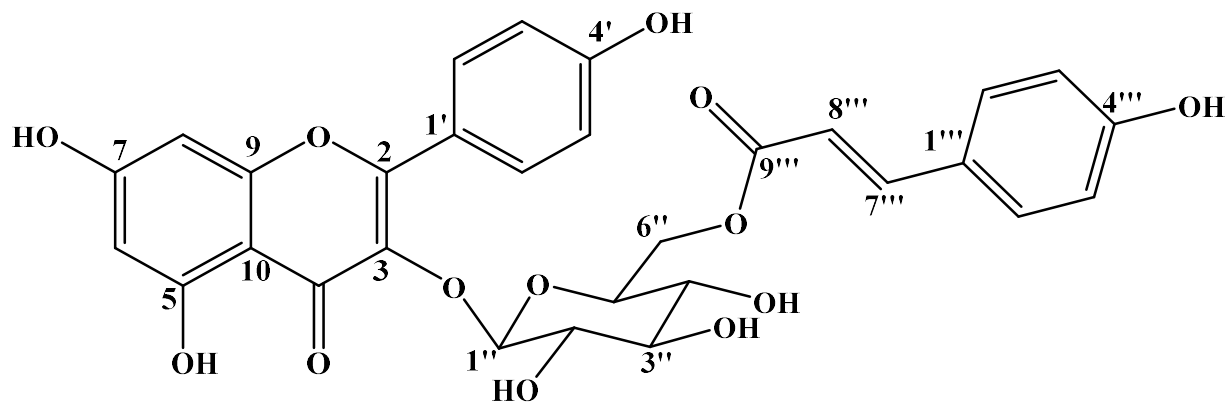
Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **HH3** sont regroupés dans le tableau II-3.

Tableau II-3 : Données RMN ¹H et ¹³C du composé HH3 (MeOD)

Position	RMN ¹ H δ_H (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	RMN ¹³ C δ_C (ppm)
1	-	75,4
2	2,03 (<i>m</i>)	40,9
	2,09 (<i>m</i>)	
3	4,11 (<i>m</i>)	68,83
4	3,68 (<i>dd</i> , 3; 7,7)	73,9
5	5,36 (<i>m</i>)	72,7
6	2,11 (<i>m</i>)	36,5

	2,21 (<i>dd</i> , 3,3; 13,8)	
7	-	176,6
8	3,73 (<i>s</i>)	52,9
1'	-	127,5
2'	7,46 (<i>d</i> , 8,4)	131,2
3'	6,80 (<i>d</i> , 8,1)	116,9
4'	-	161,3
5'	6,80 (<i>d</i> , 8,1)	116,9
6'	7,46 (<i>d</i> , 8,4)	131,2
7'	7,66 (<i>d</i> , 15,9)	146,6
8'	6,27 (<i>d</i> , 15,8)	115,9
9'	-	169,0

II-1-4-4- Détermination structurale du composé HH4



3-O-[6''-O- *trans-p*-coumaryl]-β-D-glucopyranosyl]-kaempférol (Tiliroside)

Le composé **HH4**, visible à la lumière UV à 254 nm, a été obtenu sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Sa couleur jaune après analyse CCM et révélation par une solution acide puis chauffage à 100 °C, oriente vers un composé à structure flavonoïdique.

Le spectre de masse ESI enregistré en mode négatif présente (Figure II-47) un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 593,1$ $[M-H]^-$, soit à une masse moléculaire de 594 uma correspondant à une formule brute en $C_{30}H_{26}O_{13}$.

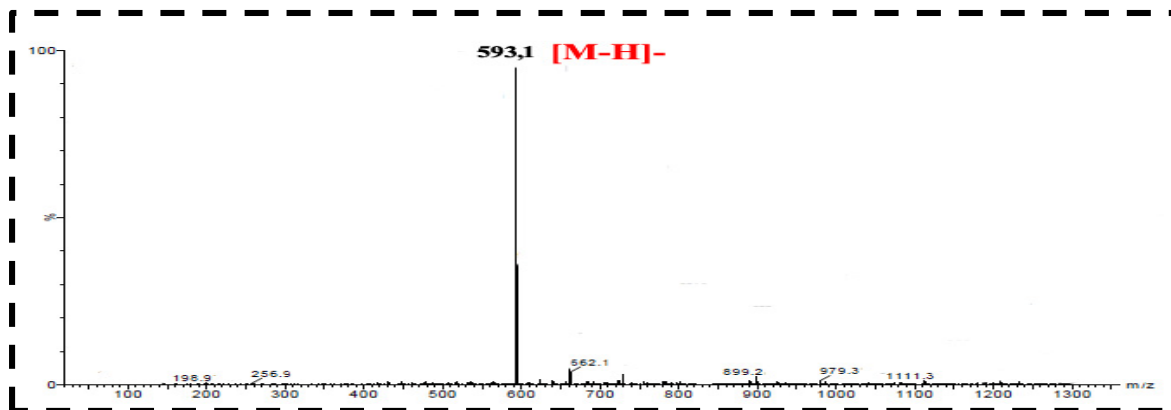


Figure II-47 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé HH4

Le spectre RMN 1H (Figure II-48) de ce composé enregistré dans CD_3OD qui montre :

- ⊙ des signaux dans l'intervalle 6,05-8,20 ppm très caractéristiques de protons aromatiques d'un flavonoïde.
- ⊙ de signaux se situant entre 3,33-5,25 ppm des protons osidiques.
- ⊙ un signal doublet résonnant à 5,25 ppm (1H, d , $J = 7,8$ Hz) d'un proton anomère.

Et indiquant la présence d'une unité osidique, laisse supposer que le composé **HH4** est un flavonoïde glycosylé.

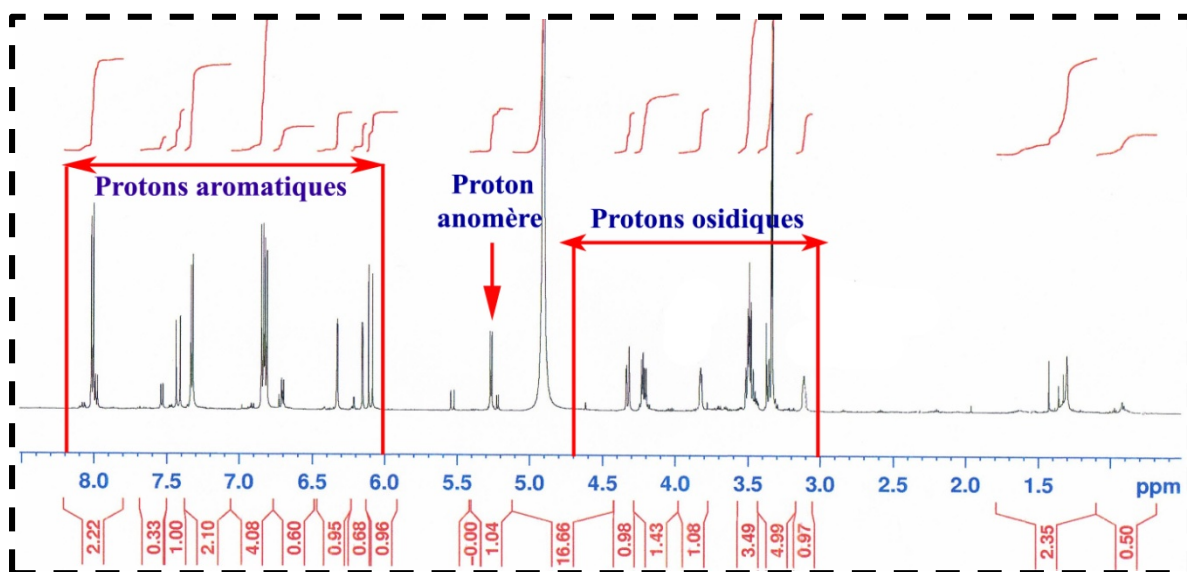


Figure II-48 : Spectre RMN 1H du composé HH4

L'analyse détaillée de même spectre (Figure II-49) montre la présence de :

- ▣ deux signaux résonant sous forme de doublet à δ_H 6,16 (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz) et δ_H 6,33 (1H, *d*, $J = 1,7$ Hz), attribués aux protons H-6 et H-8 du cycle A du flavonoïde substitué en positions 5 et 7.
- ▣ deux signaux doublets s'intégrant pour deux protons chacun repérés à δ_H 8,07 (2H, *d*, $J = 8,9$ Hz) et 6,85 (2H, *d*, $J = 8,9$ Hz) caractéristique des protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' du cycle B para substitué.

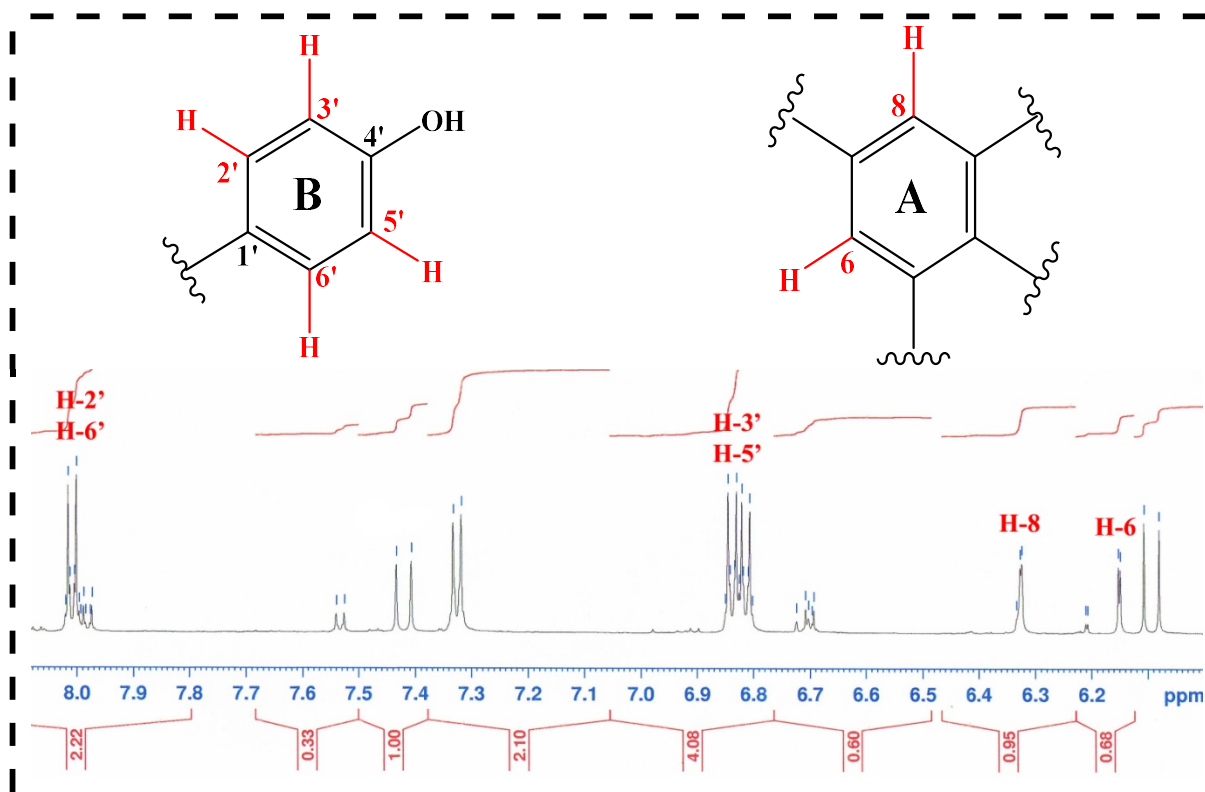


Figure II-49 : Spectre RMN ^1H de la partie génine du composé HH4

Le spectre RMN ^1H (Figure II-50) révèle aussi d'autres signaux correspondant à :

- ◆ 4 protons aromatiques repérés à δ_H 7,34 (2H, *d*, $J = 7,8$ Hz) et 6,83 (2H, *d*, $J = 8$ Hz), suggérant la présence d'un autre noyau aromatique parasubstitué.
- ◆ deux signaux doublets d'intégrations 1H chacun à δ_H 7,43 (1H, *d*, $J = 15,9$ Hz) et 6,10 (1H, *d*, $J = 15,9$ Hz) caractéristiques de deux protons oléfiniques. La valeur de leur constante de couplage de l'ordre de 15,9 Hz, indique qu'ils sont en position trans.

Cette analyse permet de suggérer la présence d'un groupement acylant de type *trans-p*-coumaroyle. Cette acylation est confirmée par l'observation d'un signal du carbone d'un carbonyle à 167,4 ppm (C-9''').

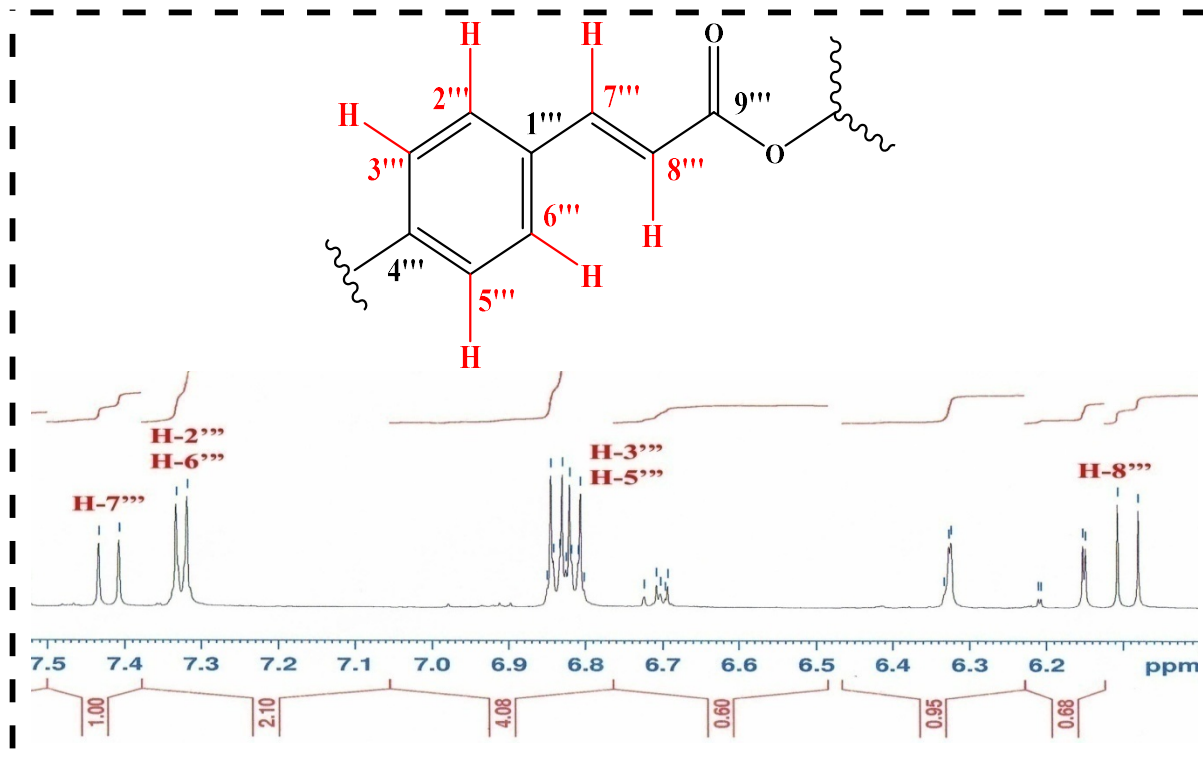


Figure II-50 : Spectre RMN ^1H du groupement *trans-p*-coumaroyle du composé HH4

L'expérience COSY H-H permet d'observer les corrélations entre tous les protons aromatiques du groupement acylant (Figure II-51).

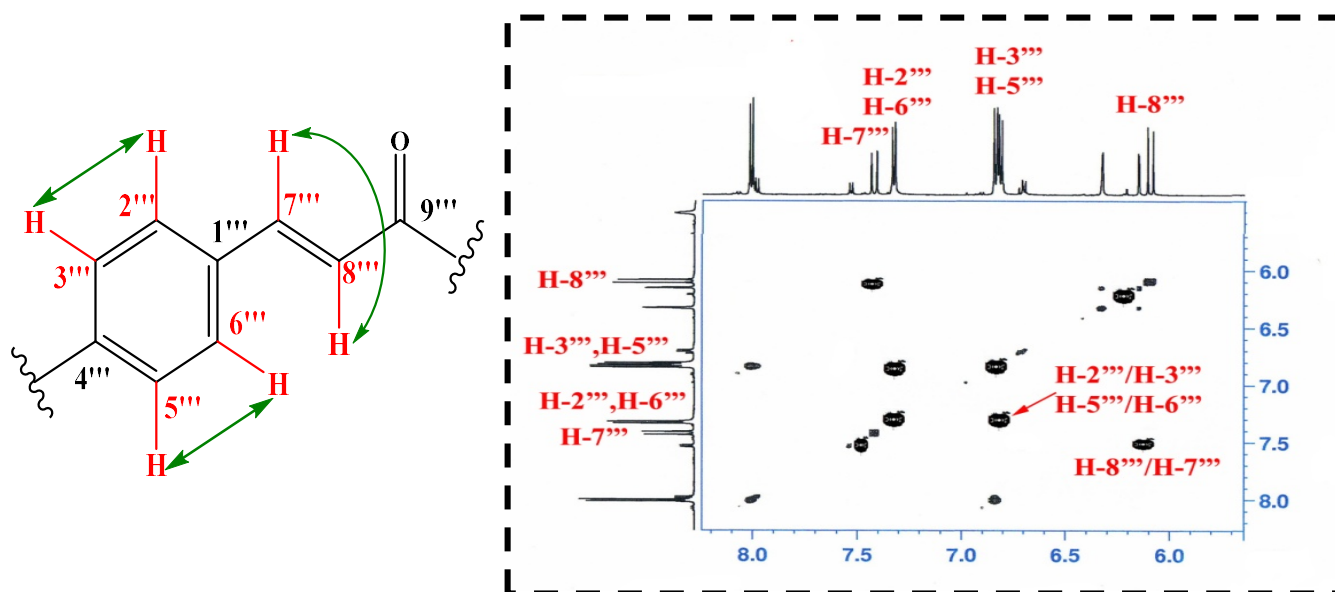


Figure II-51 : Spectre COSY H-H du groupement *trans-p*-coumaroyle (composé HH4)

La corrélation observée sur le spectre HMBC (Figure II-52) entre les protons H-2'''/H-6''' et un carbone quaternaire aromatique résonnant à 159,8 ppm (C-4'''), suggère que ce dernier est porteur d'un groupement OH libre.

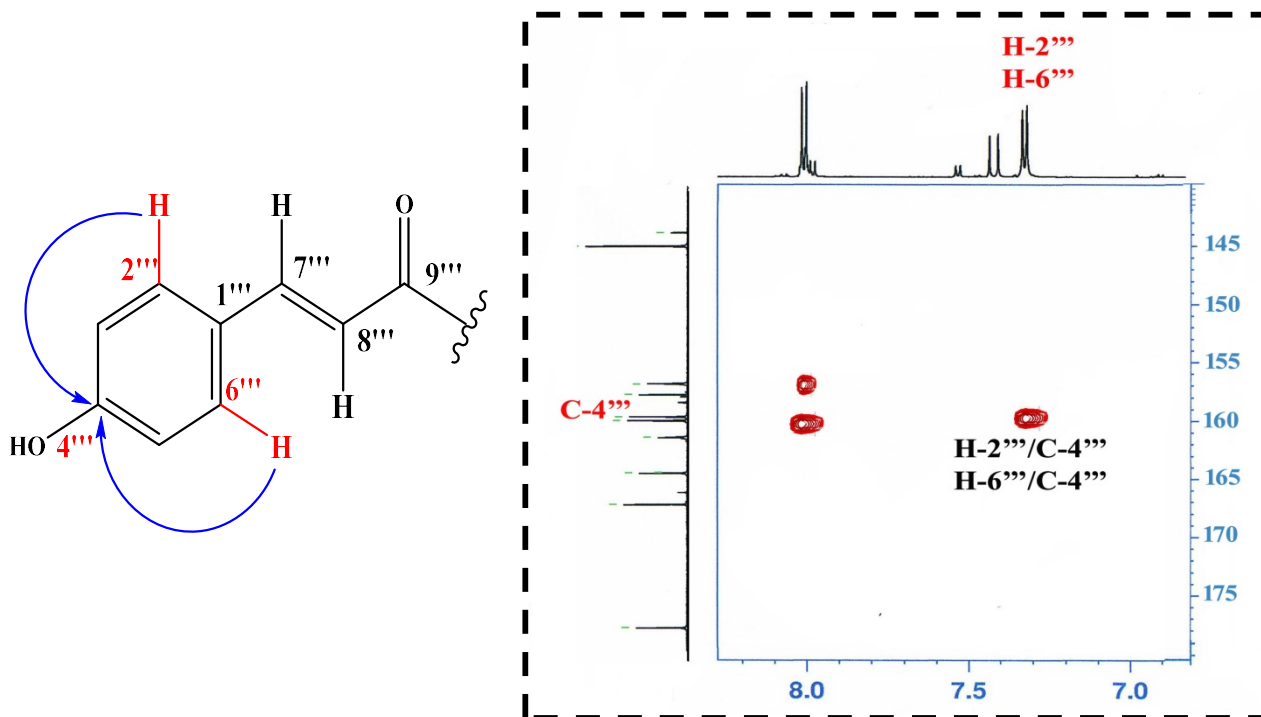


Figure II-52 : Spectre HMBC du groupement *trans-p*-coumaroyle du composé HH4

A ce stade, il apparaît que le composé **HH4** est une génine flavonoïdique disubstituée sur le cycle A et parasubstituée sur le cycle B, porteuse d'une unité osidique et d'un groupement aromatique de type *trans-p*-coumaroyle.

L'identification de la génine à un flavonol, plus précisément au kaempférol, a été établie sur la base de la valeur de déplacement chimique caractéristique du carbone C-2 de l'ordre de 157,7 ppm, déduite par analyse HMBC (Figure II-53) qui montre clairement une corrélation entre les protons H-2'/H-6' du cycle B et ce carbone.

Le signal du carbone observé à 133,7 ppm est attribué au carbone C-3 porteur d'une unité osidique, Ceci est confirmé par le spectre HMBC (Figure II-53) qui montre un couplage hétéronucléaire longue distance entre le proton anomère à δ_H 5,25 (1H, *d*, $J = 7,4$ Hz, H-1'') et ce dernier.

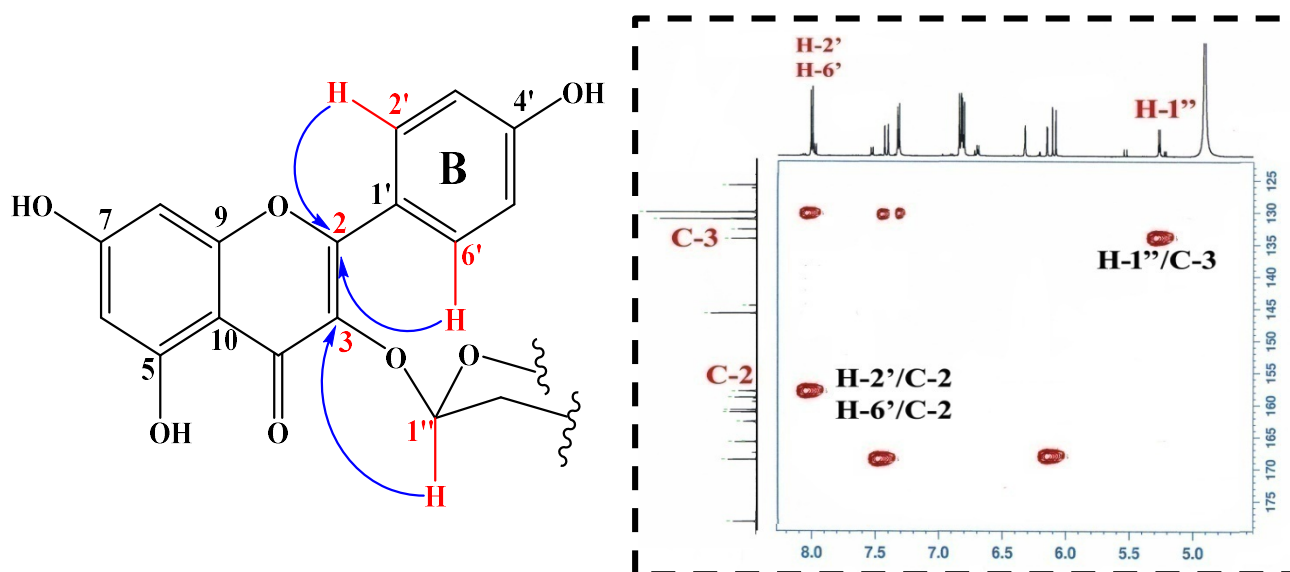


Figure II-53 : Corrélations HMBC du composé HH4

L'unité osidique est identifiée par analyse COSY H-H (Figure II-54). En effet, cette dernière met en évidence la présence d'un hexose à travers les corrélations H-1''/H-2'' (δ_{H} 3,50, *t*, $J = 7,4$ Hz), H-2''/H-3'' (δ_{H} 3,52, *t*, $J = 7,4$ Hz), H-3''/H-4'' (δ_{H} 3,34, *dd*, 7,4; 9,4), H-4''/H-5'' (δ_{H} 3,52, *m*), H-5''/H-6'' (δ_{H} 4,22, *dd*, $J = 6,5; 11,8$ Hz, H-6''b)/ δ_{H} 4,33, *dd*, $J = 2,2; 11,8$ Hz, H-6''a).

Les grandes taches de corrélation impliquant de grandes valeurs de constantes de couplage indiquent qu'il s'agit d'un glucose de configuration β ($J_{1''-2''} = 7,4$ Hz).

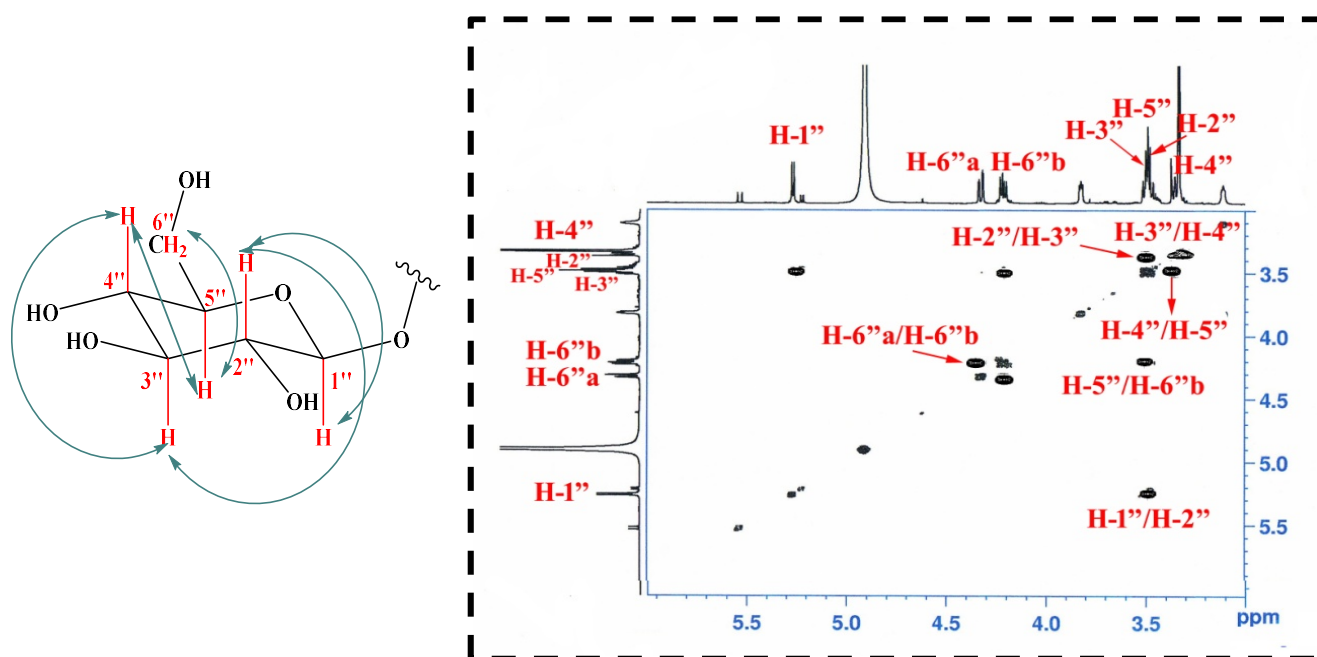


Figure II-54 : Spectre COSY H-H de la partie osidique du composé HH4

Par ailleurs, le déblindage important des protons H-6''a et H-6''b traduit une acylation à ce niveau (C-6'') par le groupement *trans-p*-coumaroyle.

Ceci est confirmé par HMBC (Figure II-55) qui montre un couplage entre ces protons et le carbonyle résonnant à 167,4 ppm (C-9'''), lui-même couplant avec deux protons oléfinique de configuration *trans* à 7,43 (1H, *d*, $J = 15,9$ Hz, H-7''') et 6,10 (1H, *d*, $J = 15,9$ Hz, H-8''').

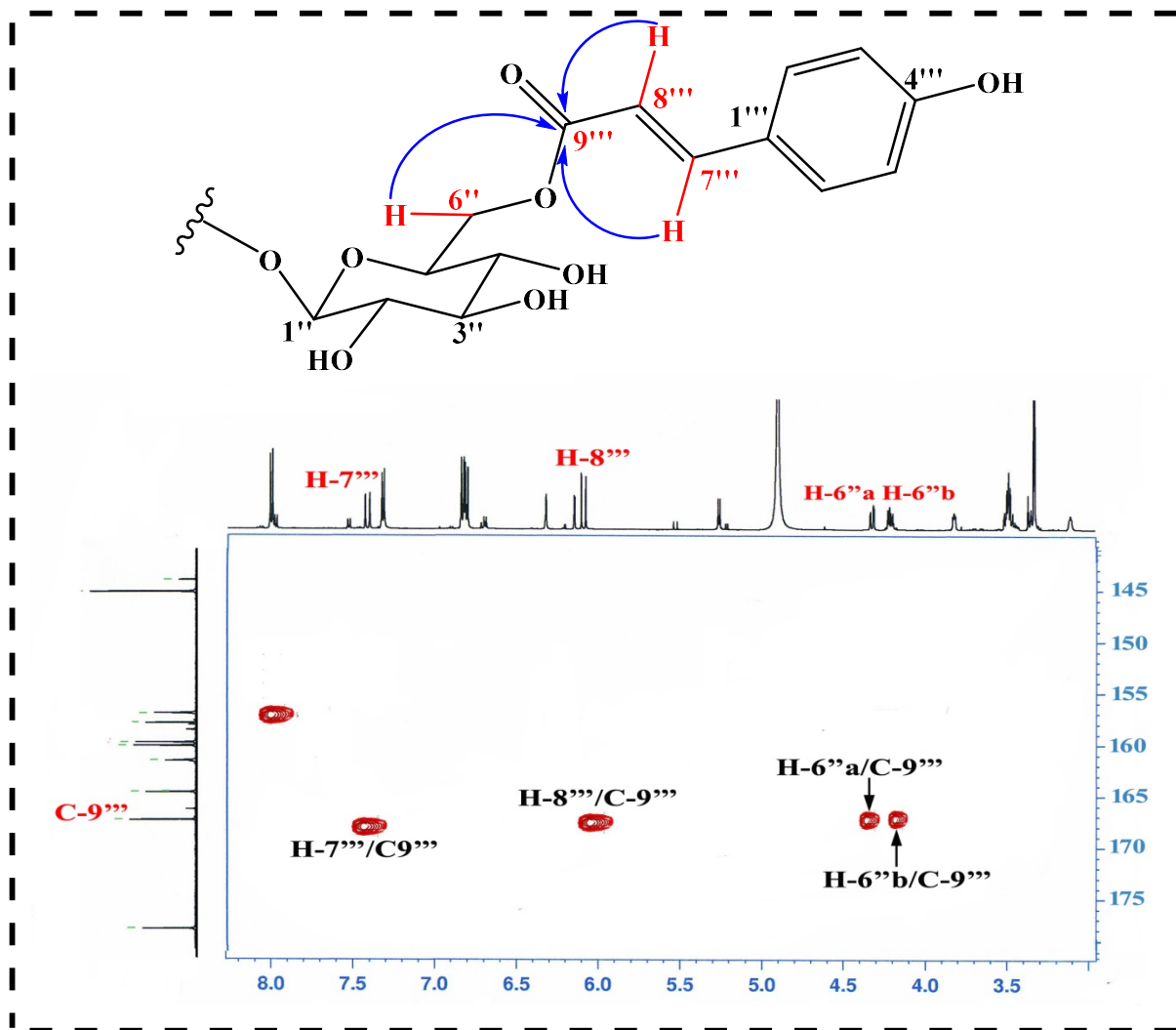


Figure II-55 : Spectre HMBC de la partie osidique et du groupement acylant du composé HH4

L'analyse des spectres HSQC (Figures II-56 et II-57) et HMBC (Figure II-58) permet de caractériser tous les carbones de la molécule.

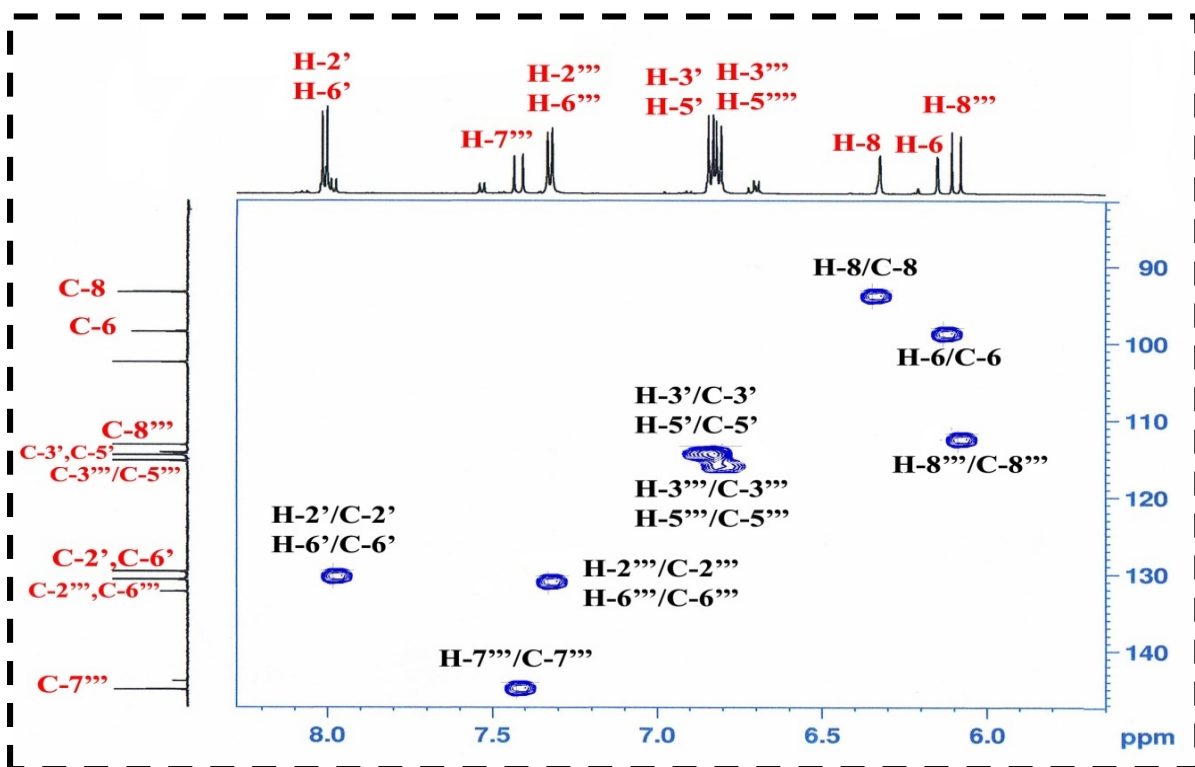


Figure II-56 : Spectre HSQC du groupement *trans-p*-coumaroyle et kaempférol du composé HH4

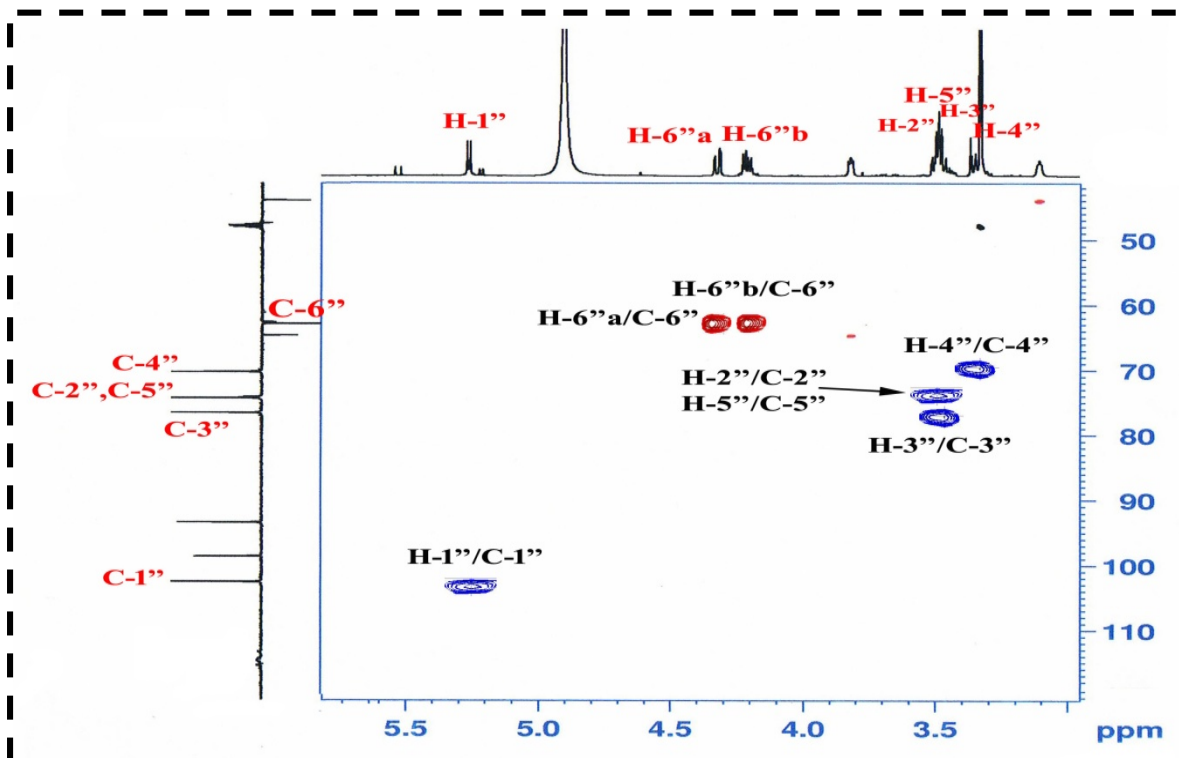


Figure II-57 : Spectre HSQC de la partie osidique du composé HH4

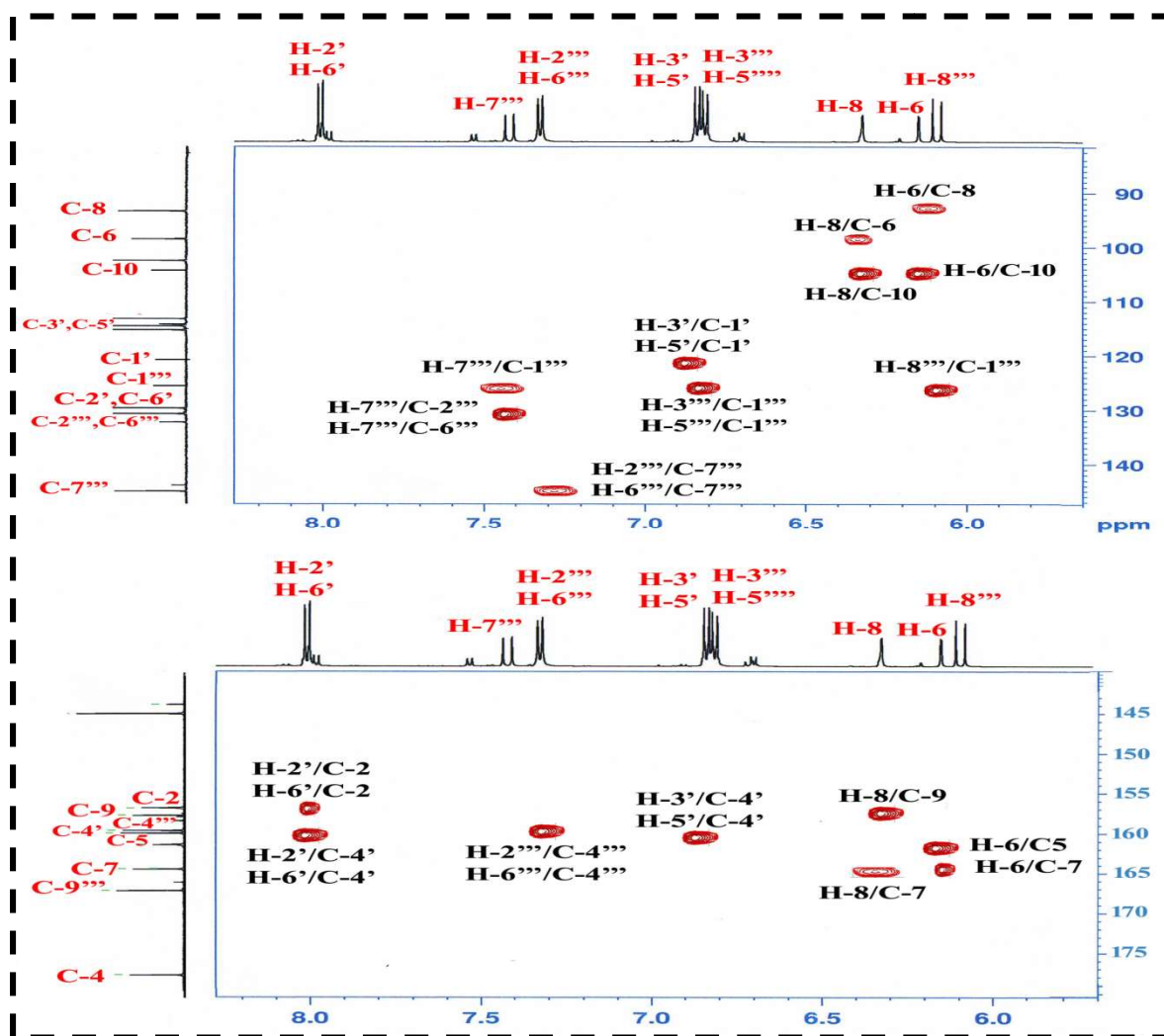
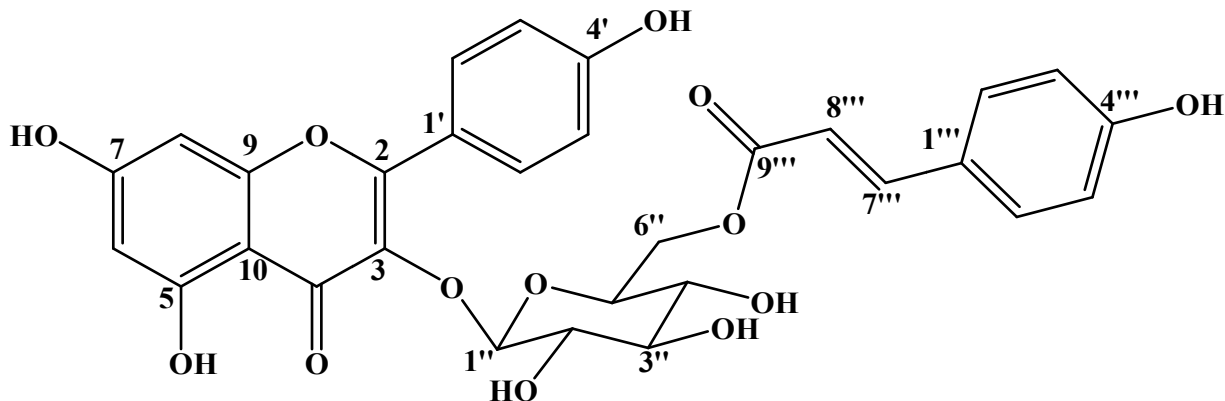


Figure II-58 : Spectre HMBC du groupement *trans-p*-coumaroyle et kaempférol du composé HH4

L'ensemble de ces données spectrales a permis d'identifier le composé HH4 au 3-*O*-[6''-*O*-*trans-p*-coumaryle)- β -D-glucopyranosyl]-kaempférol, appelé tiliroside [53]. Il a été antérieurement isolé des espèces du genre *Helianthemum* comme *H. glomeratum* [13] et *H. sessiliflorum* [20].



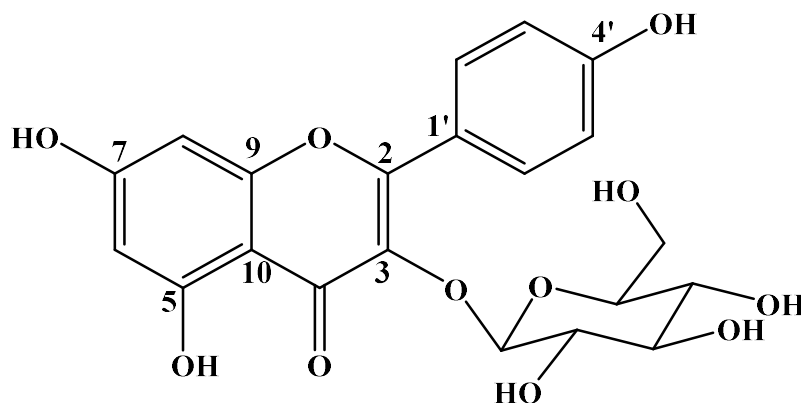
Les valeurs des déplacements chimiques de tous les protons et carbones du composé **HH4** sont représentées dans le tableau II-4.

Tableau II-4 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé HH4 (CD_3OD)

Position	RMN ^1H δ_{H} (m, J en Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
2	-	157,5
3	-	133,7
4	-	178,0
5	-	161,4
6	6,16 (d, 1,8)	98,7
7	-	164,6
8	6,33 (d, 1,8)	93,5
9	-	157,8
10	-	104,2
1'	-	121,3
2'	8,07 (d, 8,9)	130,9
3'	6,85 (d, 8,9)	114,6
4'	-	160,1
5'	6,85 (d, 8,9)	114,6
6'	8,07 (d, 8,9)	130,9
1''	5,25 (d, 7,8)	102,6
2''	3,50 (t, 7,4)	74,4
3''	3,52 (t, 7,4)	76,6
4''	3,34 (dd, 7,4; 9,4)	70,1

5''	3,50 (m)	74,4
6''	4,22 (dd, 6,5; 11,8) 4,33 (dd, 2,2; 11,8)	62,7
1'''	-	125,7
2'''	7,34 (d, 7,8)	125,7
3'''	6,83 (d, 8,9)	129,8
4'''	-	159,8
5'''	6,83 (d, 8,9)	115,9
6'''	7,34 (d, 7,8)	129,8
7'''	7,43 (d, 15,9)	113,5
8'''	6,10 (d, 15,9)	145,3
9'''	-	167,4

II-1-4-5-Détermination structurale du composé HH5



Kaempférol 3-O- β -glucopyranoside (Astragaline)

Le composé **HH5**, visible en UV à 254 nm, se présente comme le composé **HH4** sous forme d'une poudre jaune. Sa couleur jaune après analyse CCM et révélation par une solution acide puis chauffage à 100 °C renseigne aussi sur sa nature flavonoïdique.

Son spectre de masse ESI (Figure II-59) enregistré en mode négatif, montre deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 447,0$ $[M-H]^-$ et $895,1$ $[2M-H]^-$, suggérant une masse moléculaire de 448 uma et une formule brute en $C_{21}H_{20}O_{11}$.

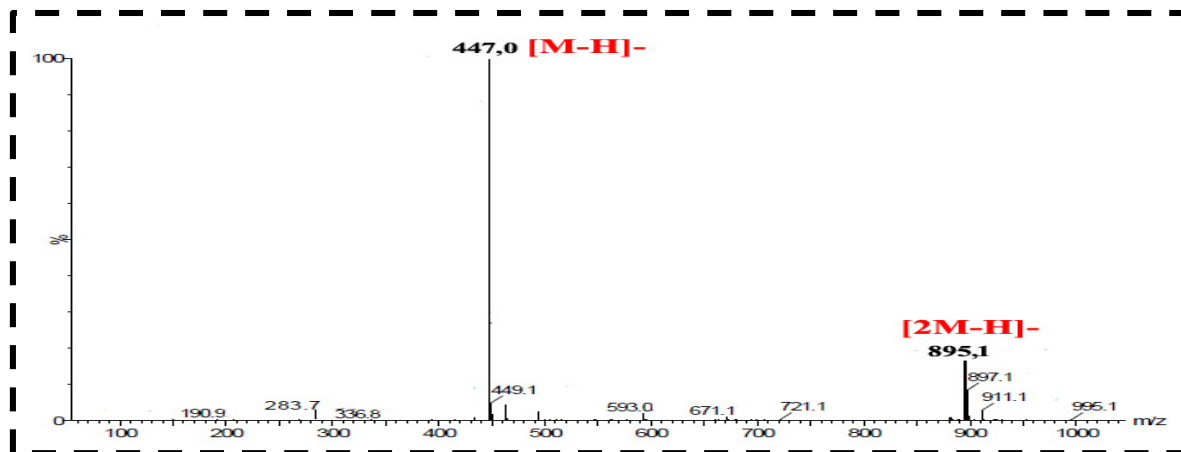


Figure II-59 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé HH5

Les spectres RMN 1H , RMN ^{13}C , COSY H-H, HSQC et HMBC du composé **HH5** sont similaires à ceux du composé **HH4** élucidé précédemment, au niveau de la génine, et l'unité osidique.

En effet, l'analyse des spectres RMN 1H (Figure II-60) et RMN ^{13}C (Figure II-61) du composé **HH5** permet de reconnaître aisément tous les signaux caractéristiques des protons et carbones du kaempférol et β -D-glucose.

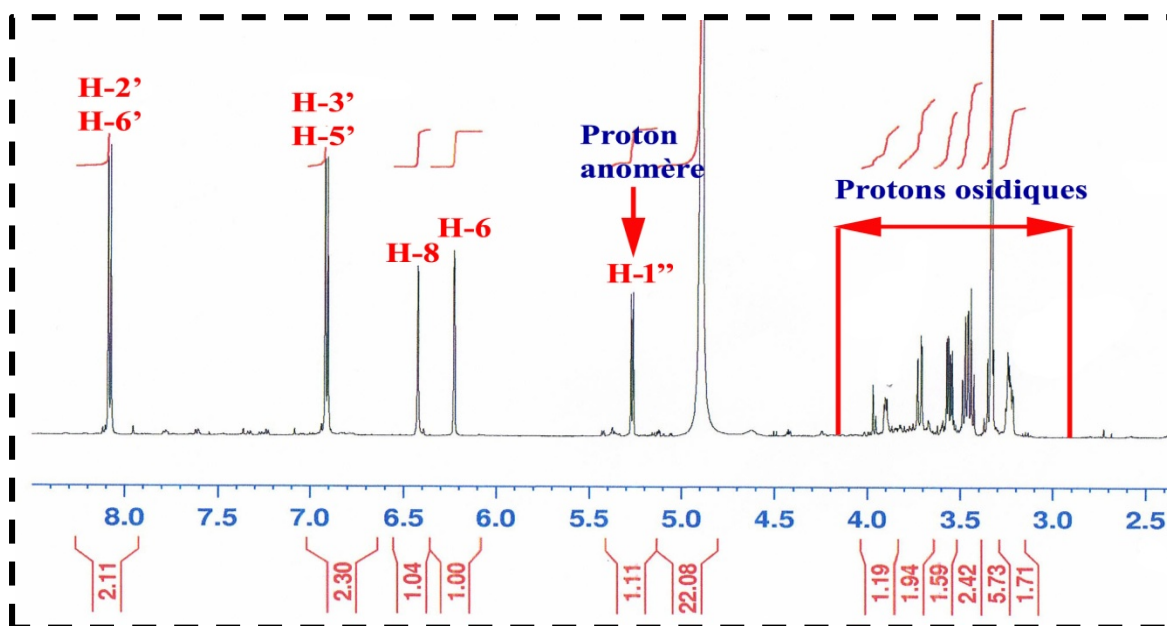


Figure II-60 : Spectre RMN 1H du composé HH5

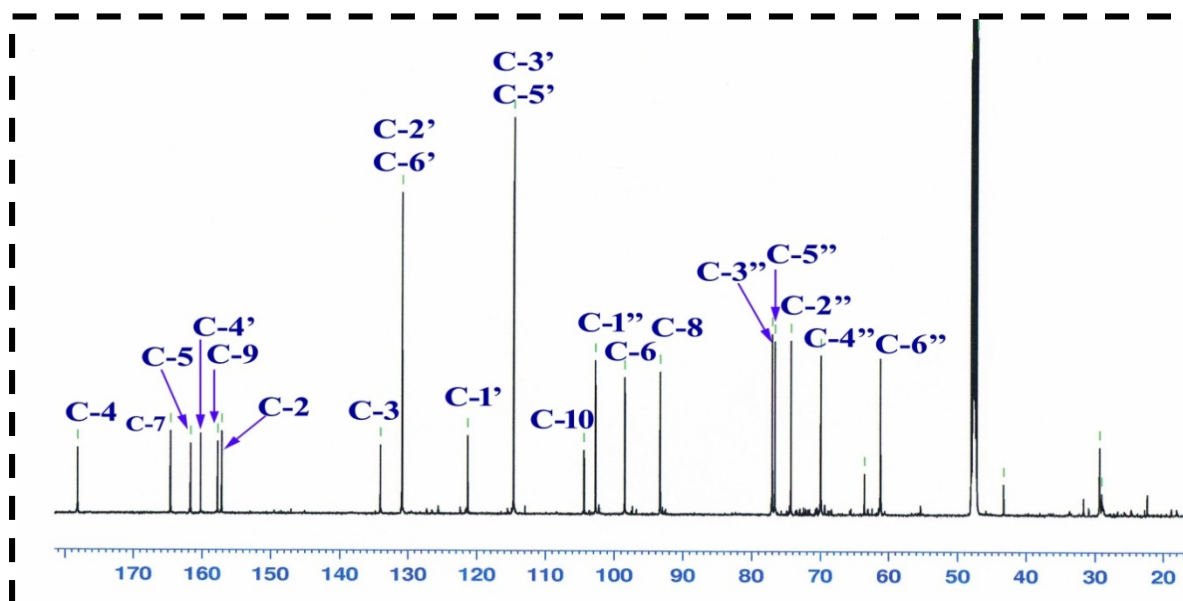
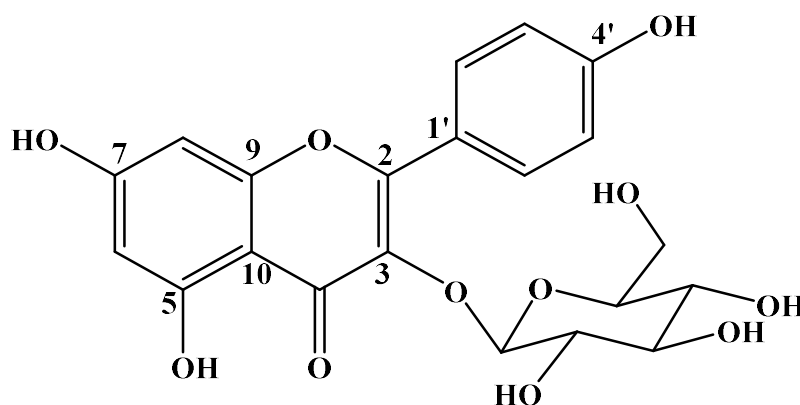


Figure II-61 : Spectre RMN ^{13}C du composé HH5

La différence majeure constatée se caractérise par l'absence du groupement *trans-p*-coumaryle en C-6'' du glucose. Cette absence est confirmée par la différence de masse de l'ordre de 146 uma entre les composés HH4 (M = 594) et HH5 (M = 448).

La position d'attachement du glucose sur le Kaempférol assignée par expérience HMBC est similaire à celle observée pour le composé HH4.

Le composé HH5 est identifié au Kaempférol 3-*O*- β -glucopyranoside [54].



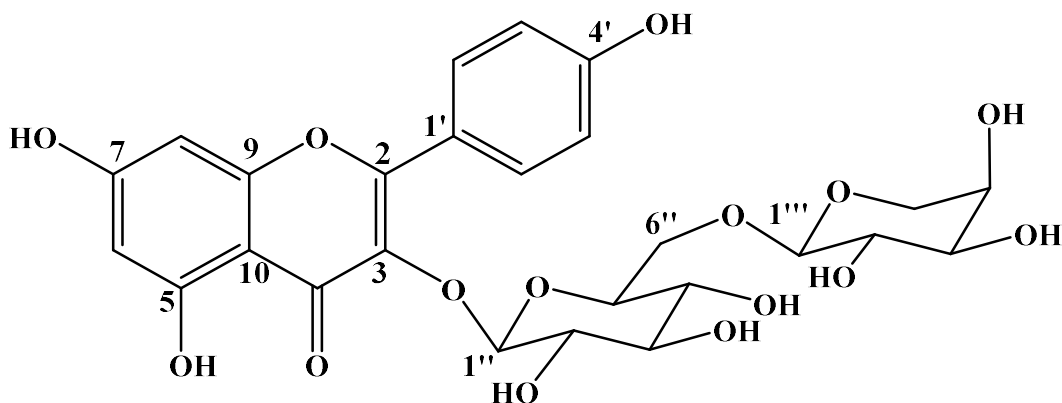
Ce composé connu sous le nom d'astragaline, a été isolé précédemment de l'espèce *H. glomeratum* [13] et *H. sessiliflorum* [20].

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé HH5 sont rassemblés dans le tableau II-5.

Tableau II-5 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé HH5 (CD_3OD)

Position	RMN ^1H δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
2	-	157,2
3	-	133,9
4	-	178,0
5	-	161,5
6	6,21 (<i>d</i> , 2)	98,5
7	-	164,4
8	6,41 (<i>d</i> , 2)	93,5
9	-	157,6
10	-	104,4
1'	-	121,4
2'	8,08 (<i>d</i> , 8,6)	130,9
3'	6,89 (<i>d</i> , 8,6)	114,5
4'	-	160,2
5'	6,89 (<i>d</i> , 8,6)	114,5
6'	8,08 (<i>d</i> , 8,6)	130,9
1''	5,25 (<i>d</i> , 7,8)	102,5
2''	3,50 (<i>t</i> , 8,0)	74,3
3''	3,52 (<i>m</i>)	76,9
4''	3,34 (<i>m</i>)	70,0
5''	3,50 (<i>m</i>)	76,7
6''	4,22 (<i>dd</i> , 6,5; 11,8) 4,33 (<i>dd</i> , 2,2; 11,8)	61,4

II-1-4-6- Détermination structurale du composé HH6

Kaempférol 3-*O*-[\alpha-L-arabinopyranosyl-(1→6)-\beta-D-glucopyranoside(Kaempférol 3-*O*-vicianoside)

Le composé **HH6**, visible en UV (254 nm), se présente sous forme d'une poudre jaunâtre soluble dans le méthanol. Il donne une couleur jaune après analyse CCM et révélation par une solution acide puis chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse ESI de ce composé enregistré en mode négatif (Figure II-62), donne un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 579,1$ $[M-H]^-$, indiquant une masse moléculaire de 580 uma qui correspond à une formule brute en $C_{26}H_{28}O_{15}$.

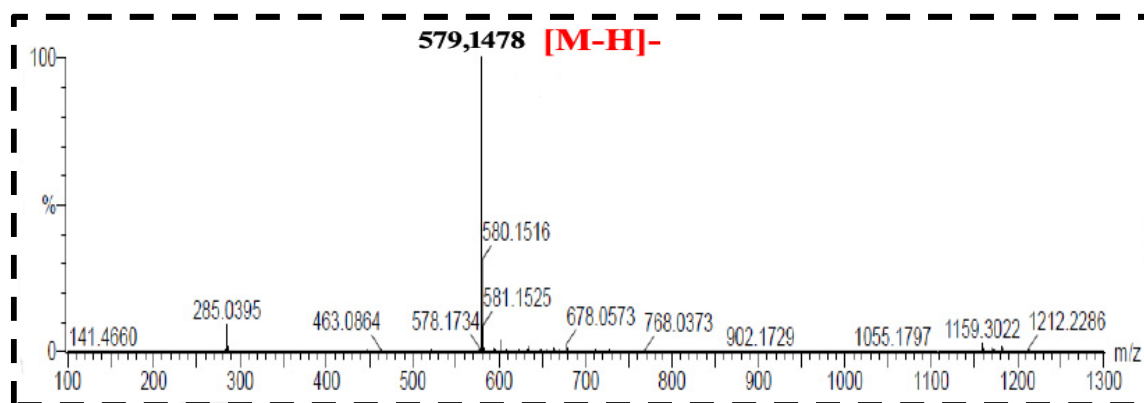
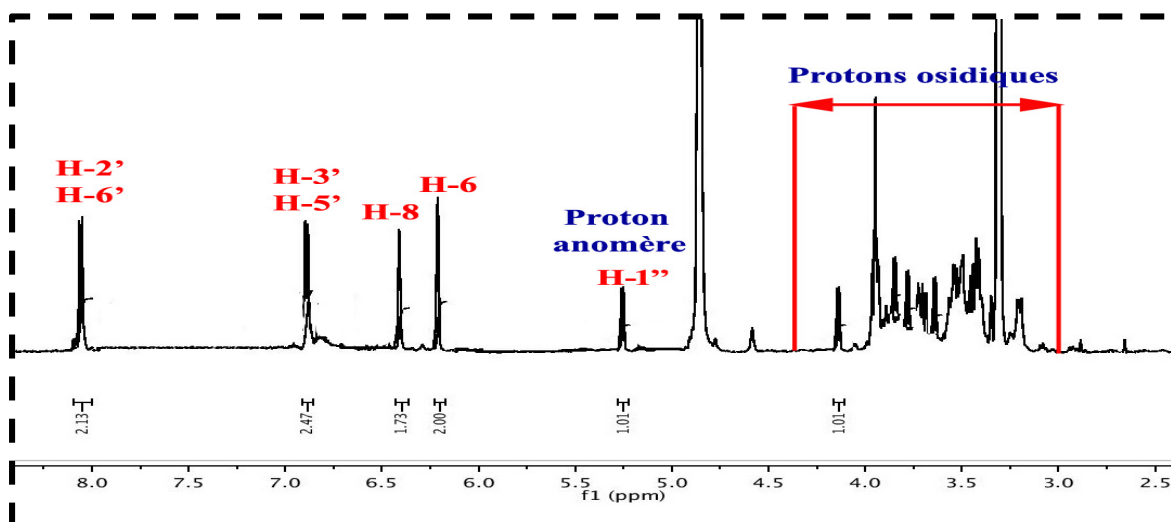
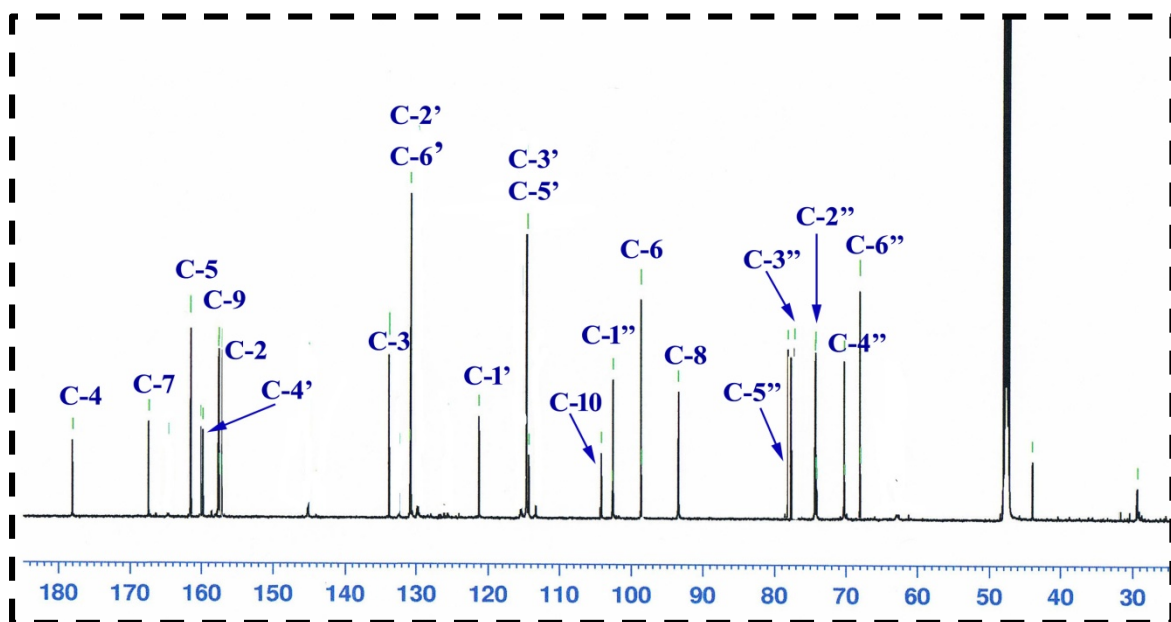


Figure II-62 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé HH6

Les données RMN 1H et ^{13}C (Tableau II-6) du composé **HH6**, supportées par les expériences COSY H-H, HMBC et HSQC, sont globalement identiques à celles du composé **HH5** déjà identifié. Elles mettent en évidence la présence du squelette kaempférol porteur du β -D-glucose en C-3 (Figures II-63 et II-64).

Figure II-63 : Spectre RMN ^1H du composé HH6Figure II-64 : Spectre RMN ^{13}C du composé HH6

La différence notable entre ce composé et le composé **HH5** se situe au niveau de la partie osidique et cela par l'apparition sur le spectre RMN ^1H de signaux supplémentaires :

- ⊙ l'un détecté à δ_{H} 4,07 (1H, *d*, $J = 6,8$ Hz, H-1''') caractéristique d'un proton anomère de sucre.
- ⊙ les autres sortant en massif dans la zone 3,20-3,65 ppm, de protons osidiques.

Ces constatations qui attestent de la présence d'une seconde unité osidique sont confirmées par le spectre de masse qui indique une différence de masse moléculaire de 132 uma d'un pentose.

L'analyse des spectres COSY H-H et TOCSY (Figures II-65 et II-66) met en évidence un système de spins à six protons correspondant d'un pentose, via les corrélations:

- H-1''' [δ_H 4,07 (*d*, $J = 6,8$ Hz)]/H-2''' [δ_H 3,52 (*dd*, $J = 6,2; 8,5$ Hz)].
- H-2'''/H-3''' [δ_H 3,41 (*dd*, $J = 3,2; 8,5$ Hz)].
- H-3'''/H-4''' [δ_H 3,62 (*m*)].
- H-4'''/H-5'''b [δ_H 3,24 (*dd*, $J = 3,0; 12,6$ Hz)].
- H-5'''b/H-5'''a [δ_H 3,64 (*m*)].

Toutes ces données permettent d'identifier ce pentose à un arabinose de configuration α au regard des constantes de couplage $J_{1'''-2'''} = 6,8$ Hz, $J_{2'''-H-3'''} = 8,5$ Hz et $J_{3'''-H-4'''} = 3,2$ Hz.

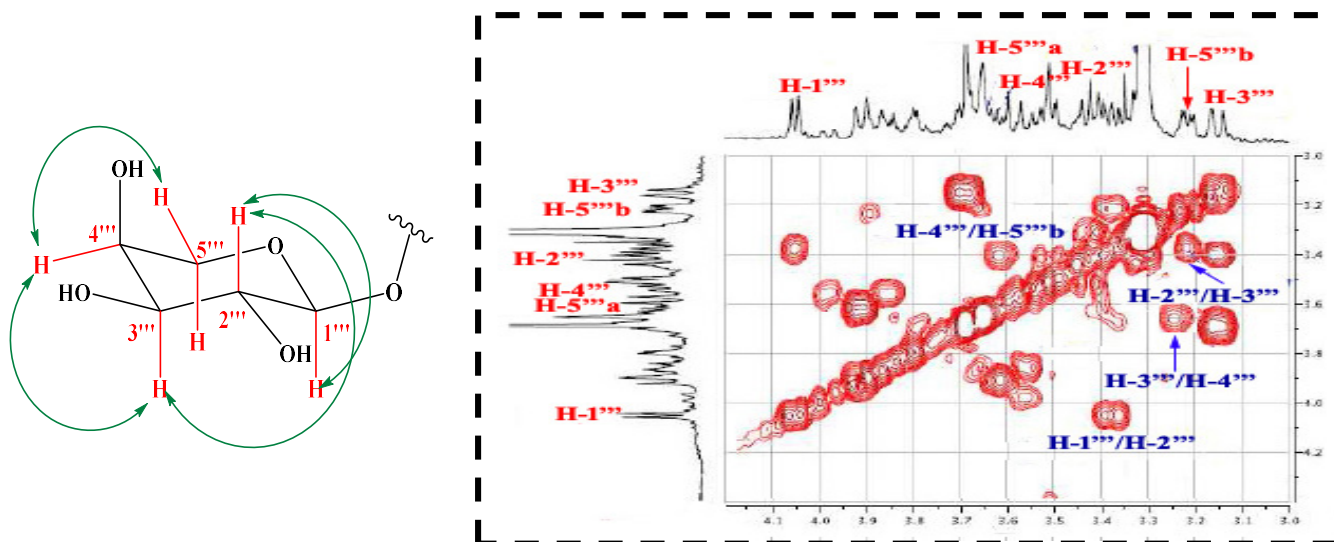


Figure II-65 : Spectre COSY H-H de la partie osidique (α -L-arabinose)

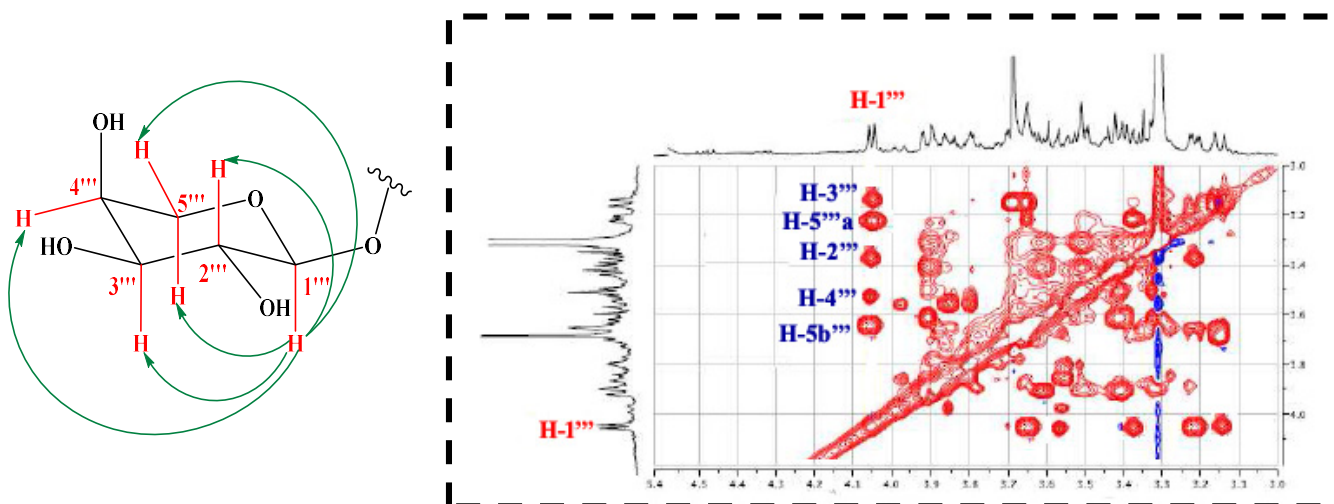


Figure II-66 : Spectre TOCSY de la partie osidique (α -L-arabinose)

L'analyse du spectre HMBC (Figure II-67) a permis d'établir l'enchaînement des deux unités osidiques, glucose et arabinose. En effet, la corrélation observée entre le proton anomérique H-1''' (δ_H 4,07) de l'arabinose et le carbone C-6'' (δ_C 67,9) du glucose, suggère l'enchaînement [α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranosyl], appelé vicianoside.

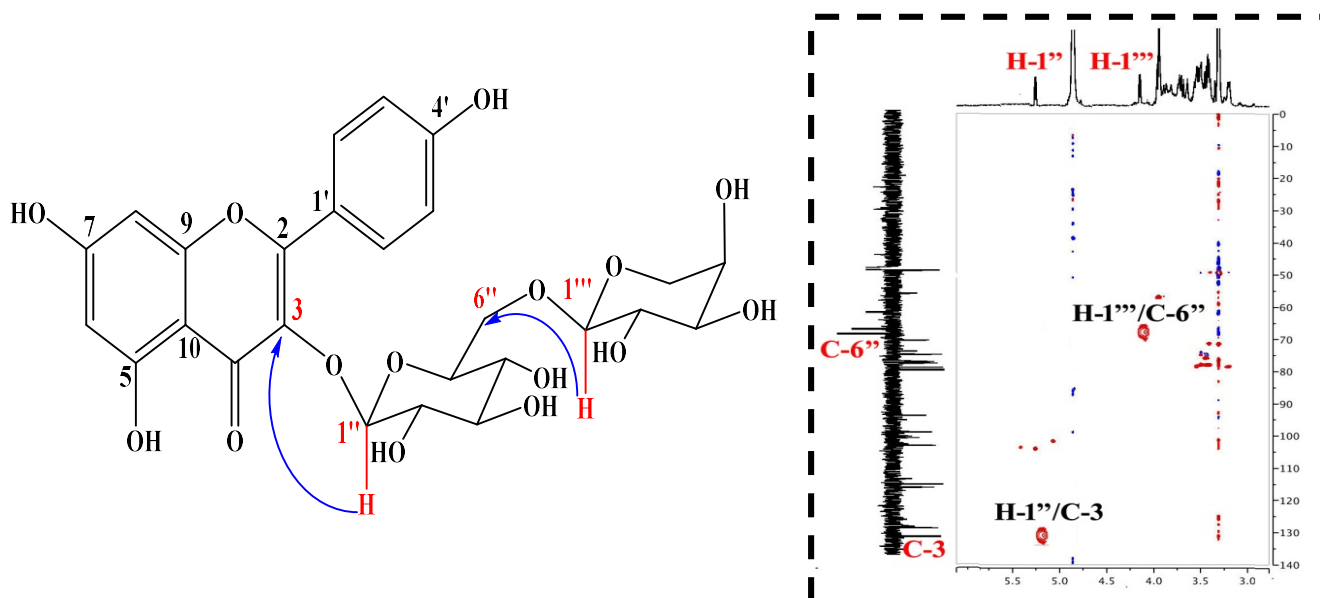
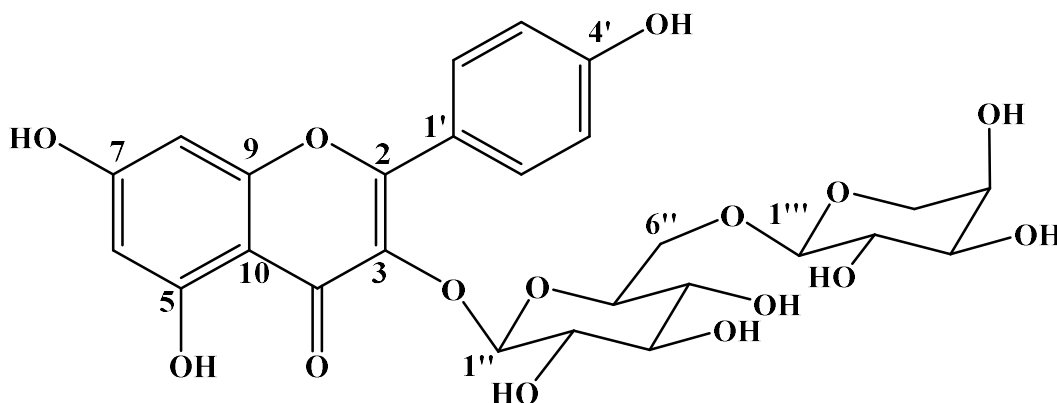


Figure II-67 : Spectre HMBC du composé HH6

L'analyse spectrale permet de déterminer la structure de ce composé **HH6** comme étant le Kaempférol 3-O-[[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside] nommé Kaempférol 3-O-vicianoside [55]. Il a été isolé précédemment des parties aériennes de *Helianthemum sessiliflorum* [20]. C'est sa deuxième détection dans le genre.



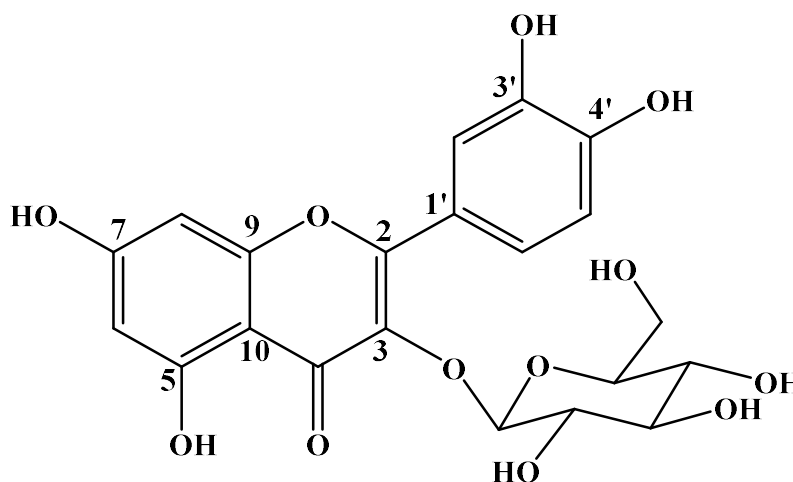
Le tableau II-6 englobe les données de RMN ^1H et ^{13}C du composé **HH6**.

Tableau II-6 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé HH6 (CD_3OD)

Position	RMN ^1H δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
2	-	157,2
3	-	133,9
4	-	178,1
5	-	161,4
6	6,21 (<i>d</i> , 2,1)	98,6
7	-	164,4
8	6,41 (<i>d</i> , 2,2)	93,3
9	-	157,6
10	-	104,5
1'	-	121,5
2'	8,11 (<i>d</i> , 8,7)	130,8
3'	6,92 (<i>d</i> , 8,8)	114,4
4'	-	160,2
5'	6,92 (<i>d</i> , 8,8)	114,4
6'	8,11 (<i>d</i> , 8,7)	130,8
1''	5,22 (<i>d</i> , 7,5)	103,3
2''	3,53 (<i>t</i> , 7,9)	75,1
3''	3,44 (<i>m</i>)	77,4
4''	3,34 (<i>t</i> , 7,7)	70,9
5''	3,42 (<i>m</i>)	77,8
6''	3,80 (<i>dd</i> , 2,5; 11,1) 3,62 (<i>dd</i> , 5,8; 11,2)	67,9

1'''	4,07 (<i>d</i> , 6,8)	103,4
2'''	3,41 (<i>dd</i> , 6,2; 8,5)	72,2
3'''	3,23 (<i>dd</i> , 3,2; 8,5)	74,4
4'''	3,62 (<i>m</i>)	69,8
5'''	3,64 (<i>m</i>)	67,4
	3,24 (<i>dd</i> , 3,0; 12,6)	

II-1-4-7-Détermination structurale du composé HH7



Quercétine 3-*O*- β -glucopyranoside (Isoquercitrine)

Le composé **HH7** est obtenu sous forme de poudre jaune, visible en UV (254 nm) et soluble dans le méthanol. Sa coloration jaune après révélation par une solution acide et chauffage, suggère une structure de nature flavonoïdique.

Le spectre de masse ESI du composé **HH7** (Figure II-68), révèle deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 463,0$ $[M-H]^-$ et $927,1$ $[2M-H]^-$, en accord avec une masse moléculaire de 464 uma et une formule brute en $C_{21}H_{20}O_{12}$.

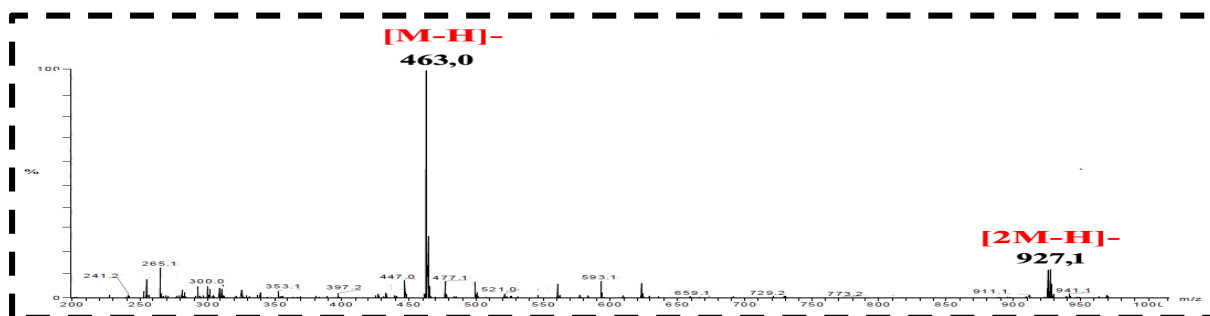


Figure II-68 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé HH7

Le spectre RMN ^1H (Figure II-69) du composé **HH7** enregistré dans CD_3OD permet de visualiser cinq signaux très caractéristiques de protons aromatiques d'un flavonoïde. Les signaux sortant à :

- ⊙ δ_{H} 6,21 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz) et 6,40 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) attribuables respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A substitué en C-5 et C-7.
- ⊙ δ_{H} 7,70 (1H, *d*, $J = 2,3$ Hz), 6,90 (1H, *dd*, $J = 2,3; 8,4$ Hz) et 7,63 (1H, *d*, $J = 8,3$ Hz) formant un système AMX assigné respectivement aux protons H-2', H-6' et H-5' du cycle B du flavonoïde.

En plus, des signaux remarquables dans la zone osidique ainsi qu'un signal doublet à δ_{H} 5,29 (1H, $J = 7,8$ Hz) caractéristique d'un proton anomère, attestent de la présence d'une unité osidique.

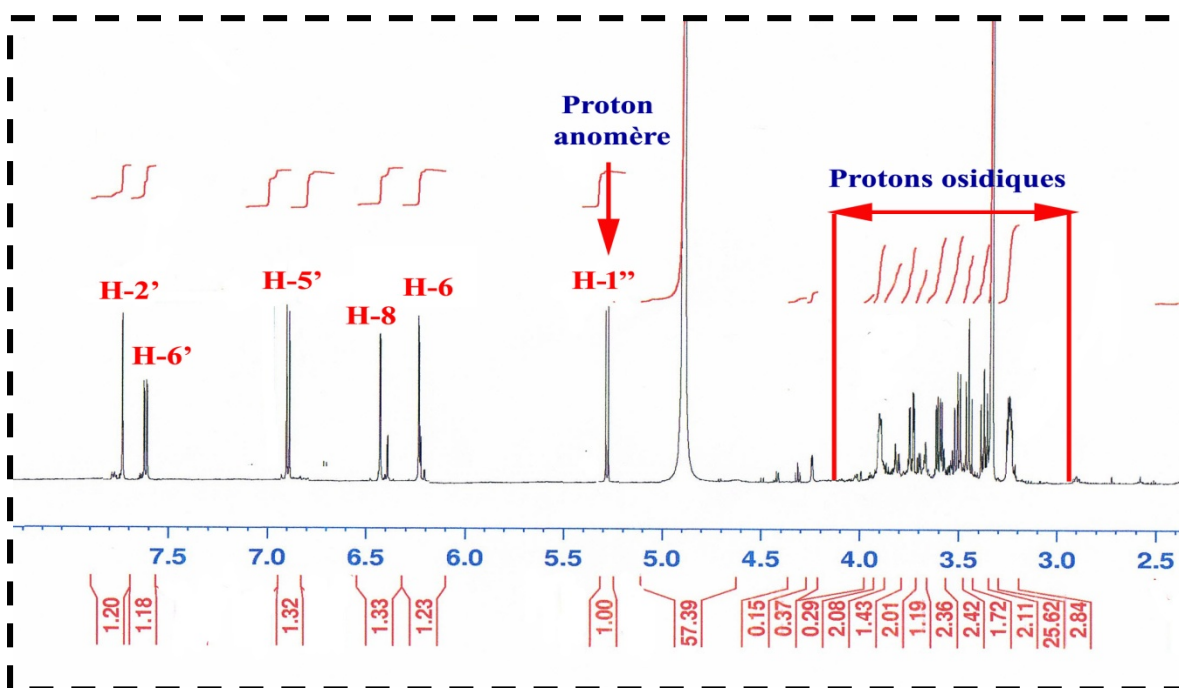


Figure II-69 : Spectre RMN ^1H de la partie aromatique et osidique du composé **HH7**

Le spectre RMN ^{13}C (Figure II-70), révèle globalement la présence de :

- ⊙ cinq CH aromatiques à δ_{C} (93,5-122,0).
- ⊙ dix carbones quaternaires à δ_{C} (108,0-178,3) dont un groupement carbonyle repéré à 178,3 ppm (C-4) confirmant la nature flavonoïdique du composé.
- ⊙ carbones de l'unité osidique à δ_{C} (61,3-103,0).

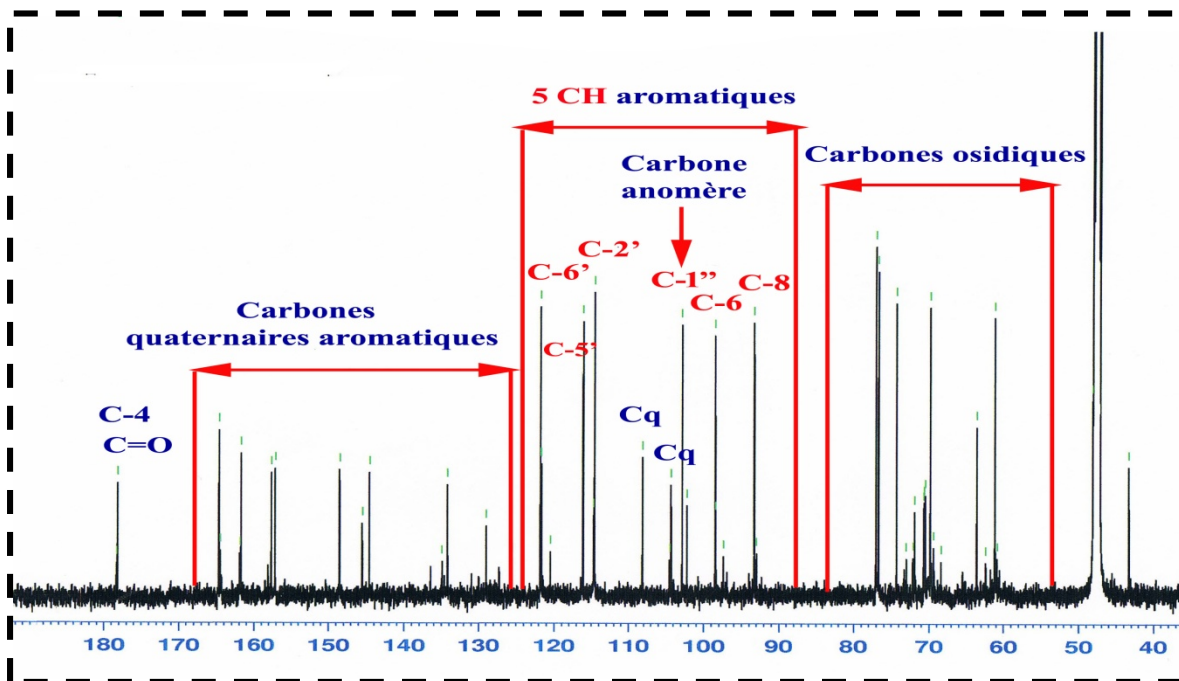


Figure II-70 : Spectre RMN ^{13}C du composé HH7

A partir des protons caractéristiques attribués précédemment, l'expérience COSY H-H (Figure II-71) permet d'identifier deux systèmes de spins correspondant aux protons H-6, H-8, H-2', H-5' et H-6' du flavonoïde.

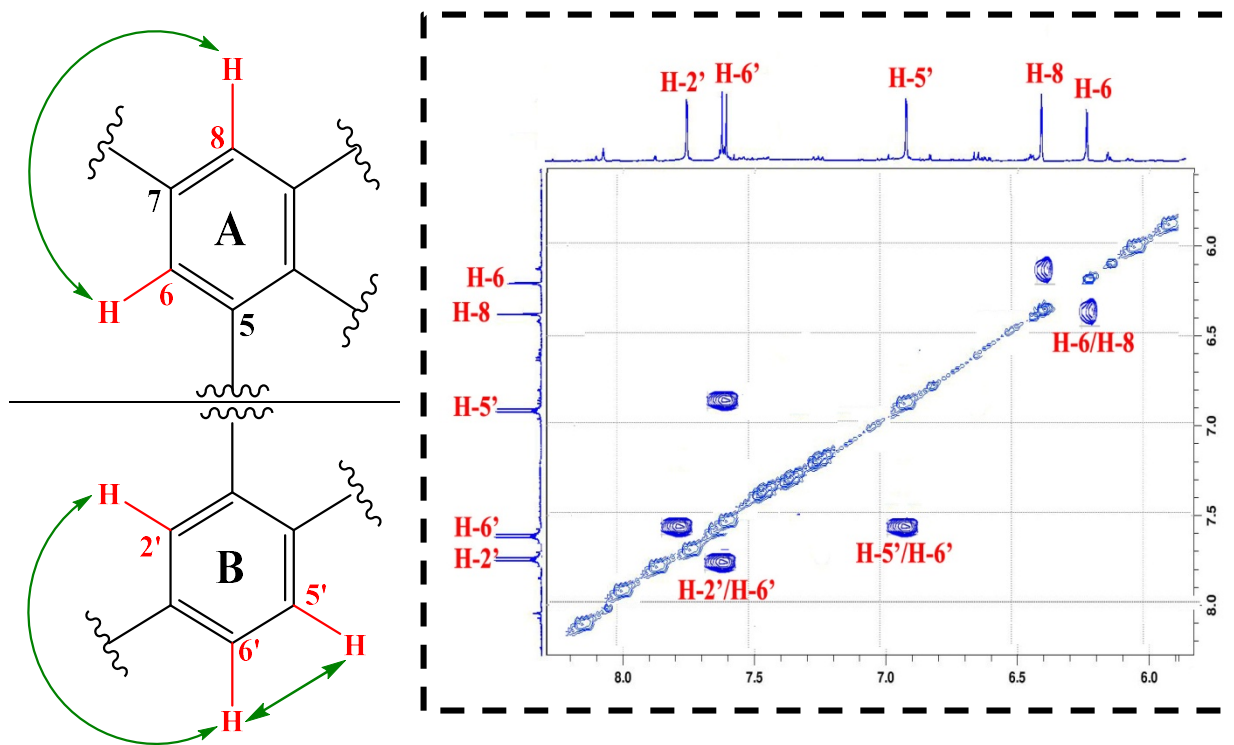


Figure II-71 : Spectre COSY H-H du composé HH7

L'expérience HSQC (Figure II-72) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones qui les portent : C-6 (δ_C 98,6), C-8 (δ_C 93,5), C-2' (δ_C 116,0), C-5' (δ_C 114,8) et C-6' (δ_C 122,0).

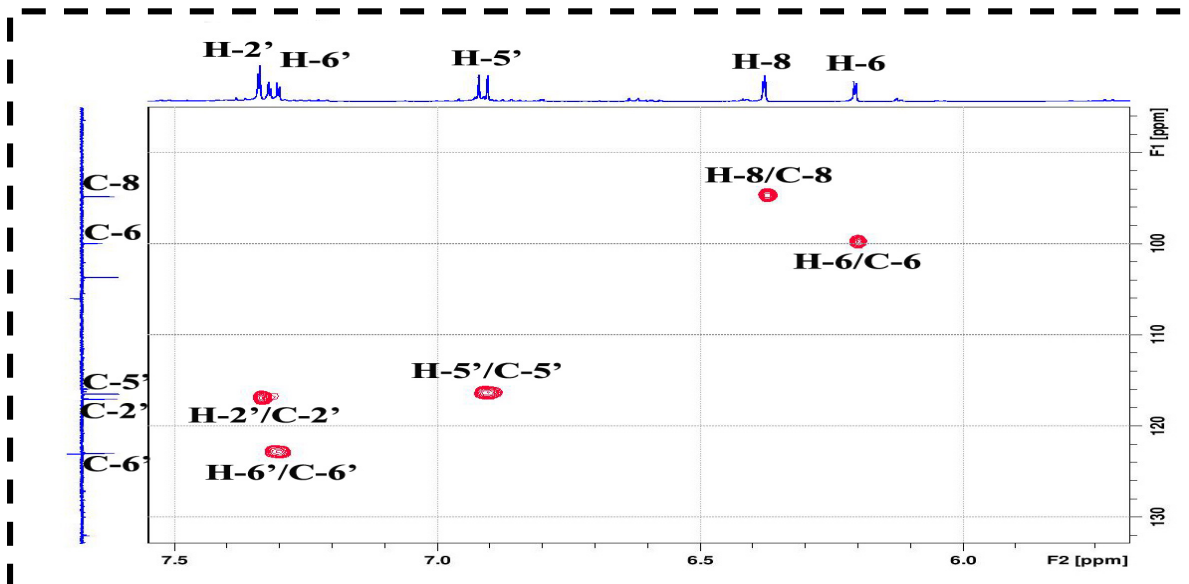
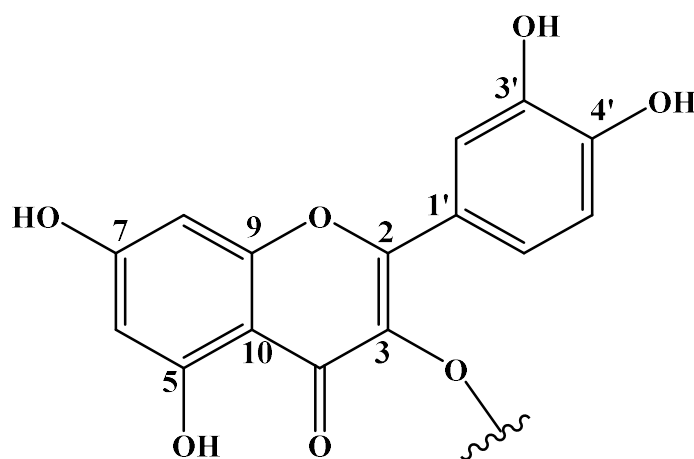


Figure II-72 : Spectre HSQC du composé HH7

Toutes ces données montrent clairement que le composé **HH7** est un flavonol de type quercétine portant l'unité osidique en C-3.



Cette identification a été établie, comme pour les composés à squelette flavonol glycosilé en C-3 élucidés précédemment, sur la base des valeurs de déplacement chimique des carbones C-2 (157,8 ppm) et C-3 (134,4 ppm), et confirmées par analyse HMBC (Figure II-73).

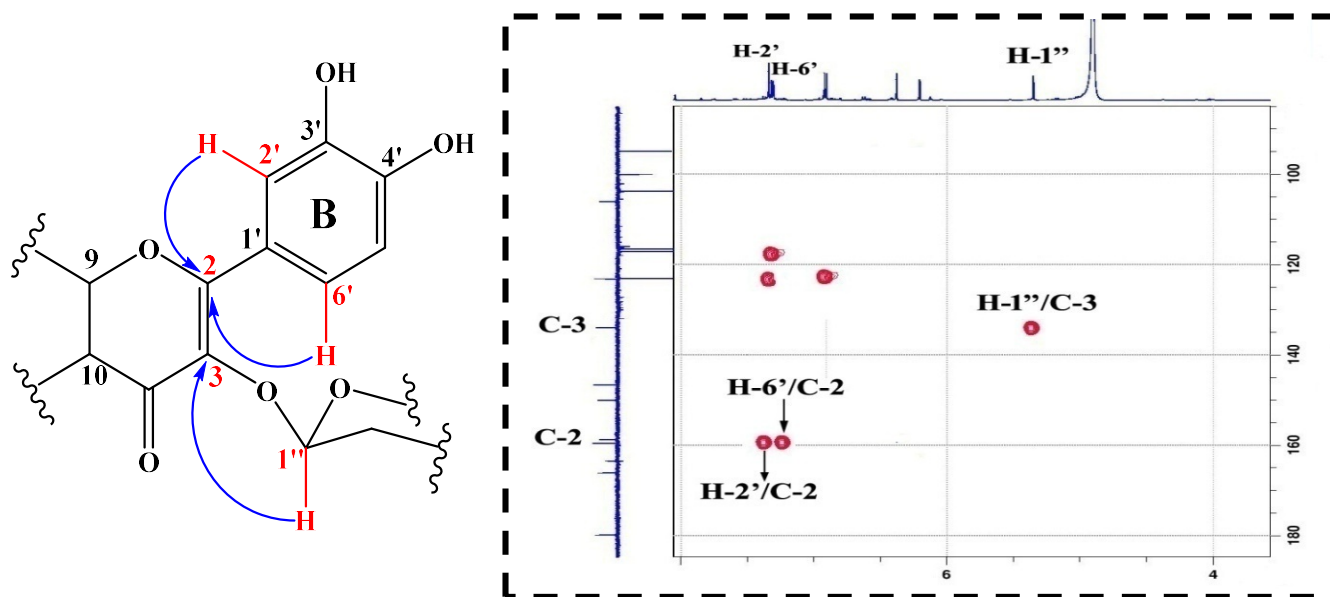


Figure II-74 : Spectre HMBC du composé HH7

Le spectre HMBC (Figure II-75) permet de visualiser tous les couplages hétéronucléaires longue distance correspondant au composé.

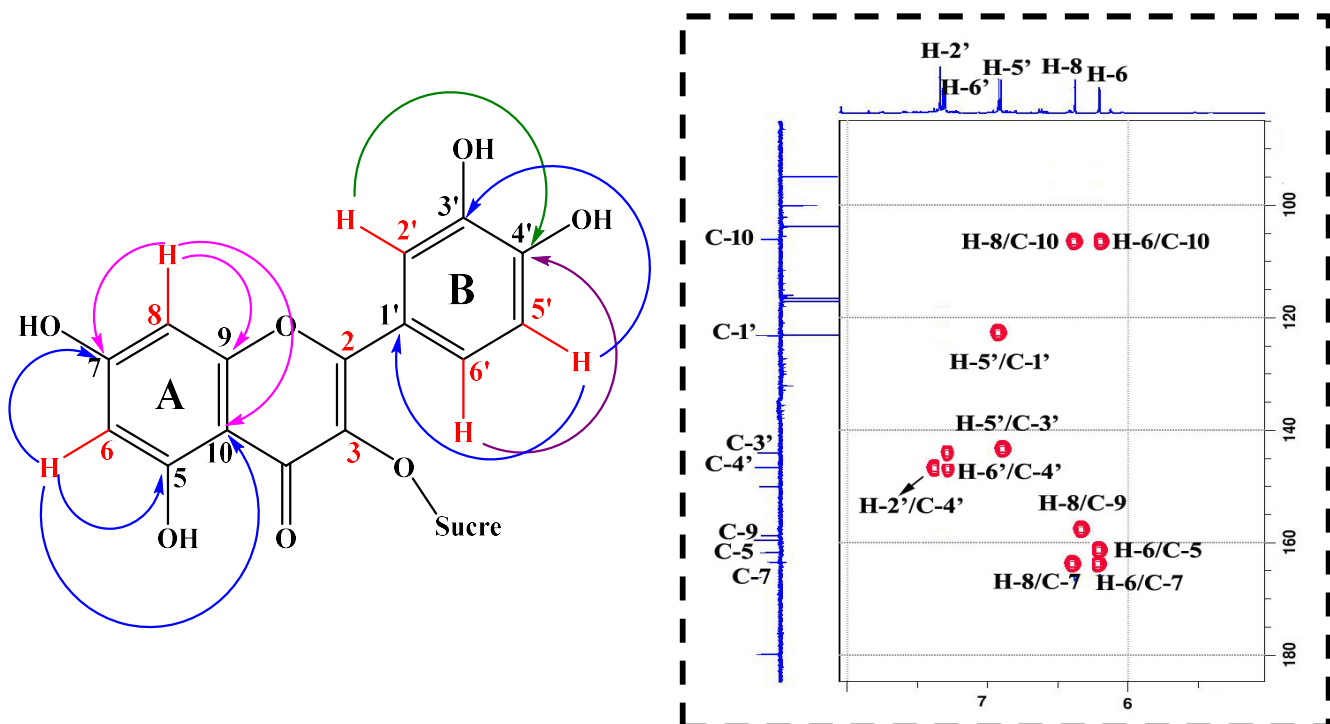


Figure II-75 : Spectre HMBC du composé HH7

L'identification de la partie osidique a été faite par l'analyse du spectre COSY H-H (Figure II-76) qui montre les corrélations spécifiques :

- H-1'' (δ_H 5,29, *d*, $J = 7,8$ Hz)/H-2'' (δ_H 3,48, *m*).
- H-2'' / H-3'' (δ_H 3,56, *dd*, $J = 7,0; 9,4$ Hz).

- H-3''/H-4'' (δ_H 3,35, *m*).
- H-4''/H-5'' (δ_H 3,42, *t*, $J = 9,0$ Hz).
- H-5''/H-6'' (δ_H 3,72, *m*, H-6''a)/(δ_H 3,64, *dd*, $J = 6,0; 11,1$ Hz, H-6''b).

L'ensemble de ces corrélations indique qu'il s'agit d'un glucose de configuration β ($J_{1''-2''} = 7,8$ Hz).

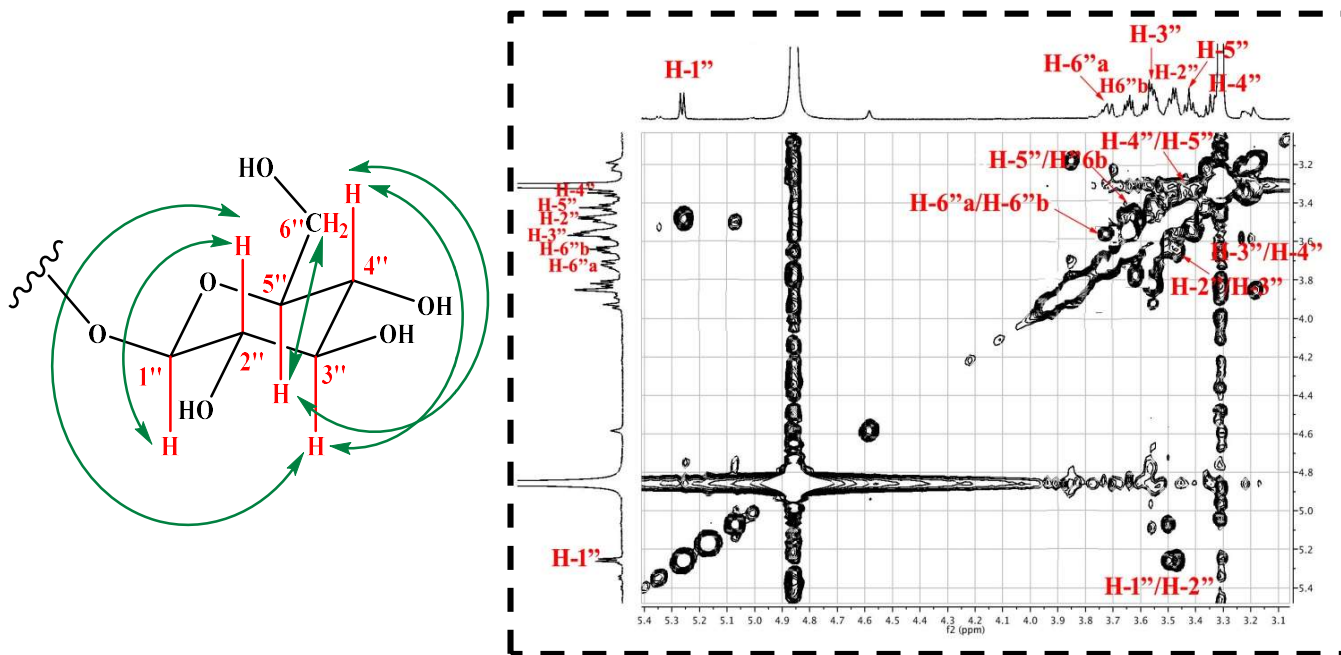


Figure II-76 : Spectre COSY H-H de la partie osidique du composé HH7

L'analyse du spectre HSQC permet de caractériser tous les carbones du β -glucose (Figure II-77).

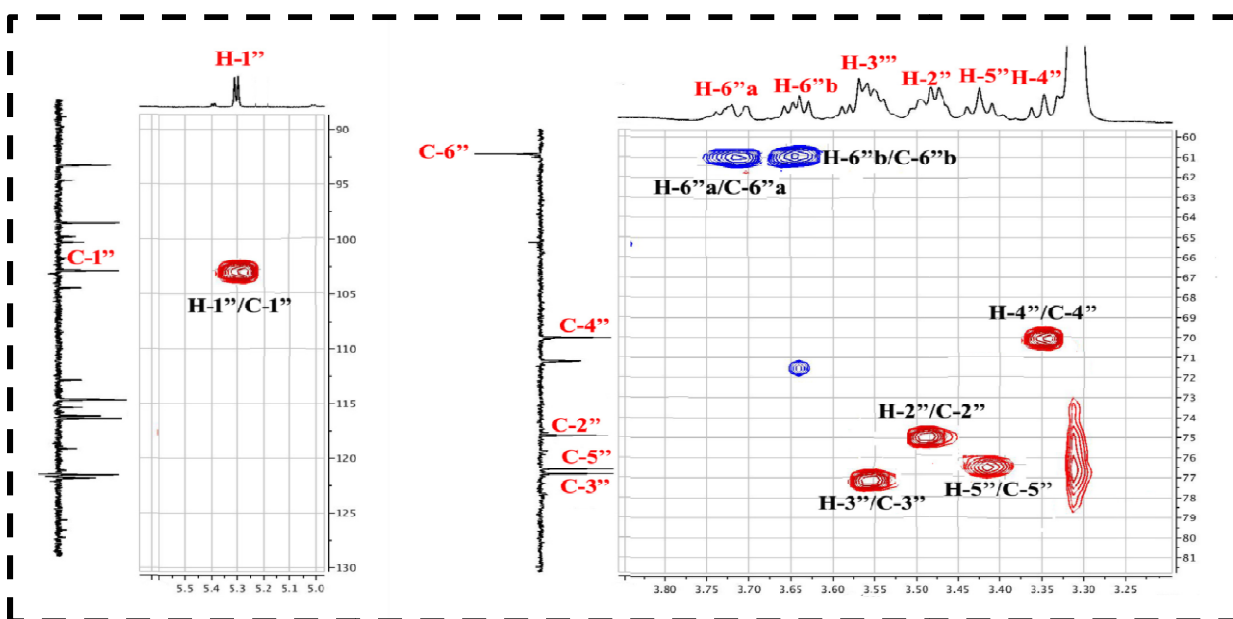
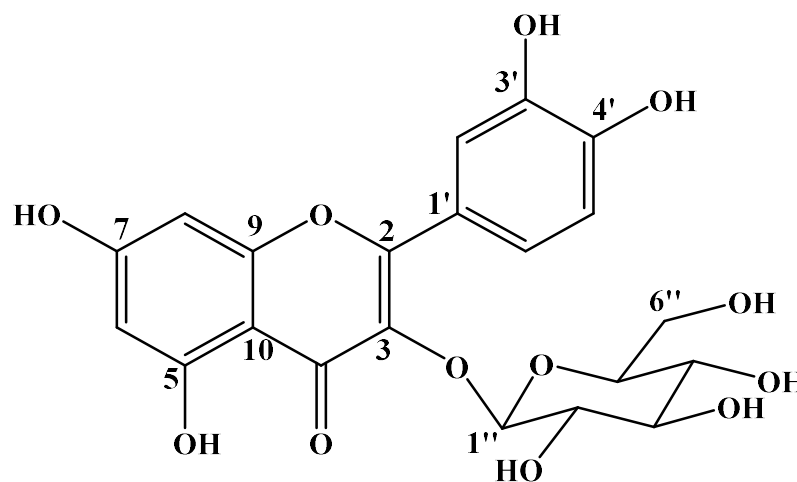


Figure II-77 : Spectre HSQC du β -glucose du composé HH7

L'ensemble de ces données spectrales (Tableau II-7), établies par RMN ^1H , RMN ^{13}C , HMBC, COSY H-H et HSQC, ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [56], permettent d'attribuer au composé **HH7**, la structure suivante:



Quercétine 3-*O*- β -D-glucopyranoside

Ce composé appelé isoquercitrine a été isolé antérieurement des espèces *Helianthemum glomeratum* et *Helianthemum sessiliflorum* [13, 20].

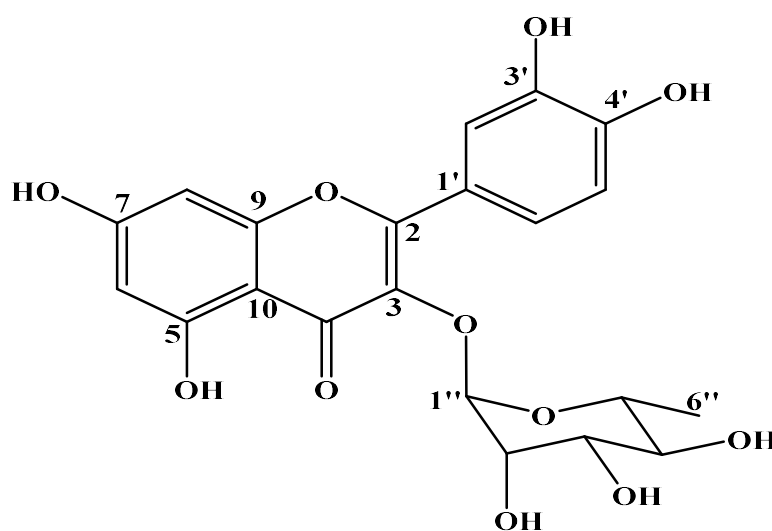
Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont regroupés dans le tableau II-7.

Tableau II-7 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé HH7 (CD_3OD)

Position	RMN ^1H δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
2	-	157,8
3	-	134,4
4	-	178,3
5	-	161,9
6	6,21 (<i>d</i> , 2,0)	98,6
7	-	164,8
8	6,40 (<i>d</i> , 2,1)	93,5
9	-	157,2

10	-	108,4
1'	-	121,9
2'	7,70 (d, 2,2)	116,0
3'	-	144,8
4'	-	148,7
5'	6,90 (d, 8,3)	114,8
6'	7,63 (dd, 2,3; 8,3)	122,0
1''	5,29 (d, 7,8)	103,0
2''	3,48 (m)	74,9
3''	3,56 (dd, 7,0; 9,4)	77,3
4''	3,35 (m)	70,0
5''	3,42 (t, 9,0)	76,8
6''	3,72 (m) 3,64 (dd, 6,0; 11,1)	61,3

II-1-4-8- Détermination structurale du composé HH8



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

Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaunâtre soluble dans le méthanol. Il est visible en UV à 254 nm et se colore en jaune sur CCM après révélation par une solution acide et chauffage à 100 °C.

Son spectre de masse ESI⁻ possède deux pics d'ions pseudomoléculaires (Figure II-78) à $m/z = 447,0$ [M-H]⁻ et $895,0$ [2M-H]⁻, donnant une masse moléculaire égale à 448 uma, en accord avec une formule brute en C₂₁H₂₀O₁₁.

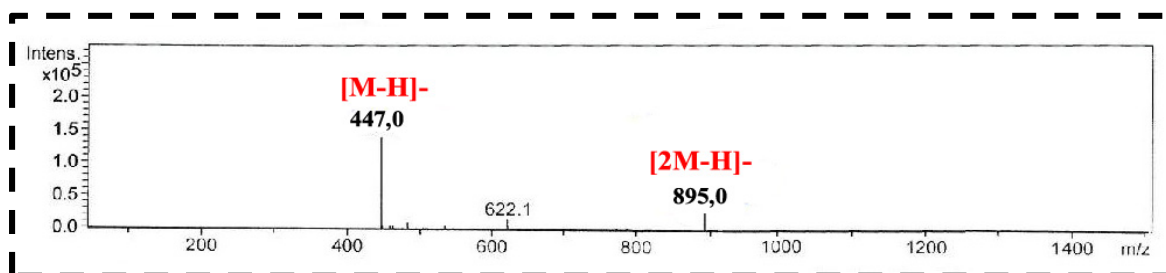


Figure II-78 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé HH8

Une grande similitude est observée entre les spectres RMN ¹H (Figure II-79) et ¹³C DEPTQ (Figure II-80) de ce composé et ceux du composé HH7 déjà caractérisé, permettant de déduire qu'on est également en présence d'une quercétine-3-O-glycosylée.

Cependant, l'apparition d'un signal doublet ($J = 6,1$ Hz) d'intégration 3H à 0,93 ppm typique d'un groupement méthyle renseigne sur la nature du sucre, en l'occurrence le rhamnose.

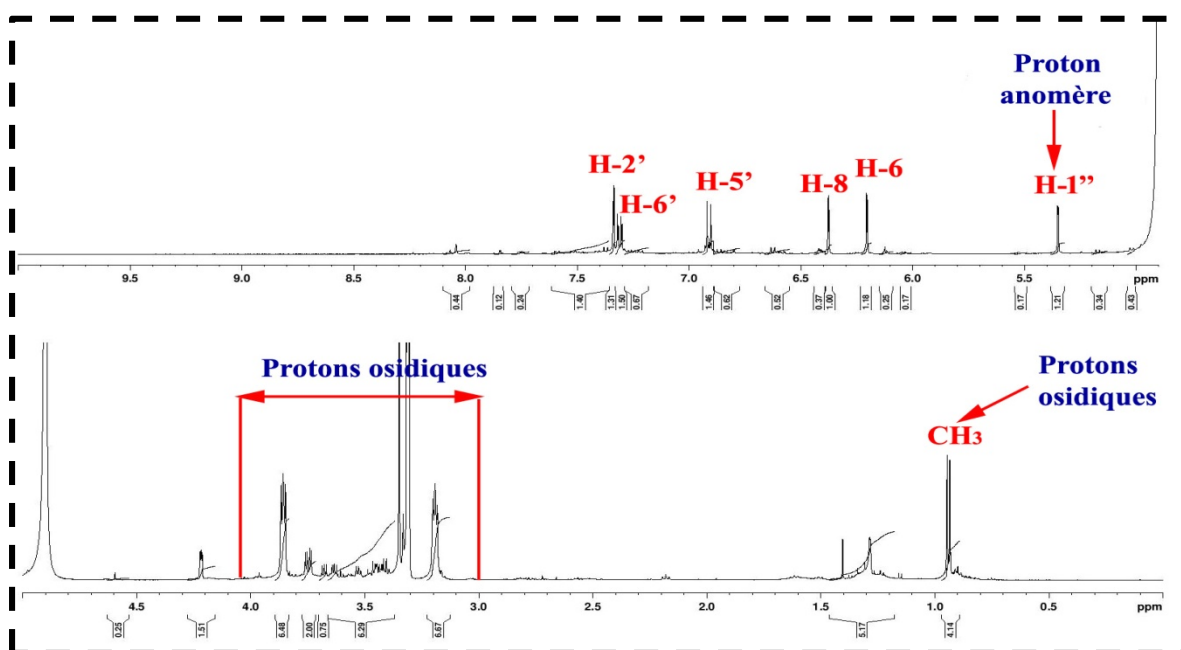


Figure II-79 : Spectre RMN ¹H du composé HH8

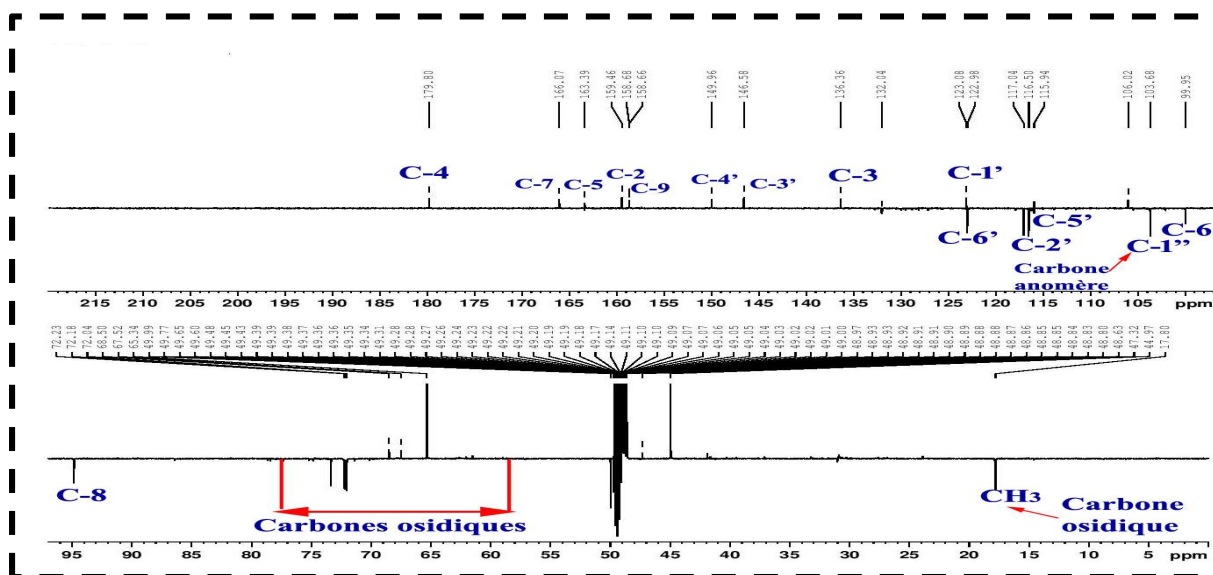


Figure II-80 : Spectre RMN ^{13}C DEPTQ du composé HH8

La nature du sucre est confirmée par analyse du spectre COSY H-H (Figure II-81) qui met en évidence un système de spins à sept protons d'un rhamnose. En effet, à partir du proton anomère H-1'' (δ_{H} 5,35, *d*, $J = 1,5$ Hz), il est observé les couplages :

- H-1''/H-2'' (δ_{H} 4,22, *dd*, $J = 1,5; 3,2$ Hz).
- H-2''/H-3'' (δ_{H} 3,75, *dd*, $J = 3,3; 9,5$ Hz).
- H-3''/H-4'' (δ_{H} 3,35, *t*, $J = 9,5$ Hz).
- H-4''/H-5'' (δ_{H} 3,42, *m*).
- H-5''/CH₃-6'' (δ_{H} 0,93, 3H, *d*, $J = 6,1$ Hz).

Les valeurs de constantes de couplage indiquent qu'il s'agit d'un rhamnose de configuration α ($J_{1''-2''} = 1,5$ Hz).

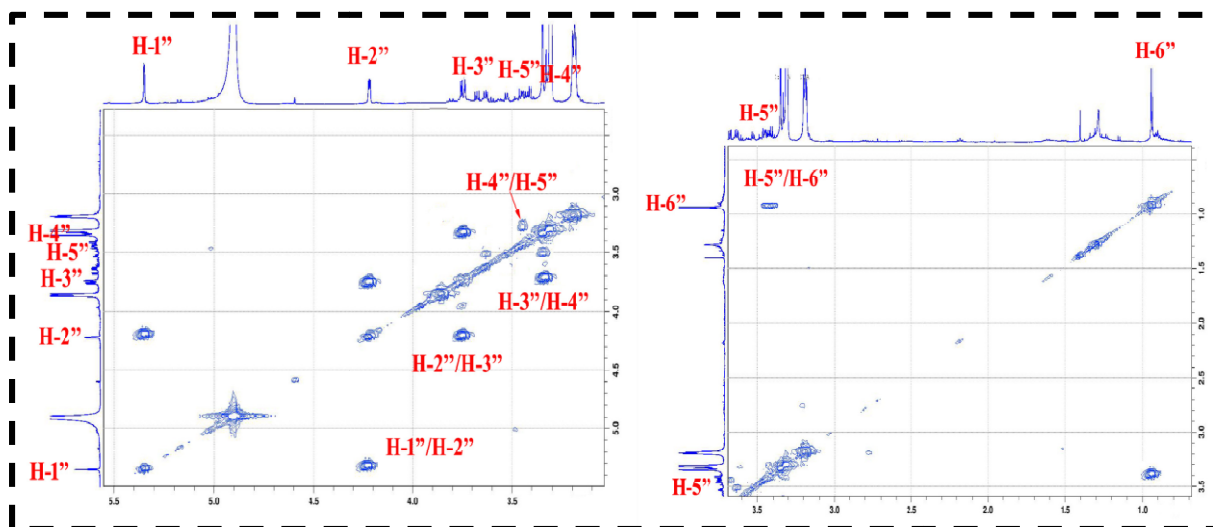


Figure II-81 : Spectre COSY H-H de la partie osidique (rhamnose) du composé HH8

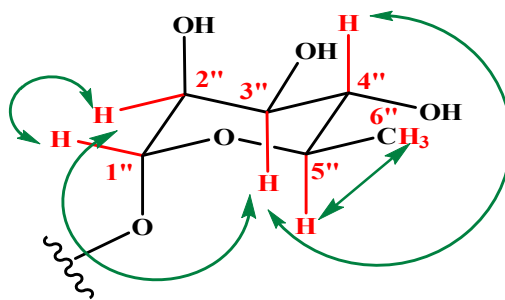


Figure II-82 : Corrélations COSY H-H de α -L-rhamnose (composé HH8)

L'analyse du spectre HSQC permet d'attribuer les déplacements chimiques de tous les carbones du rhamnose (Figure II-83).

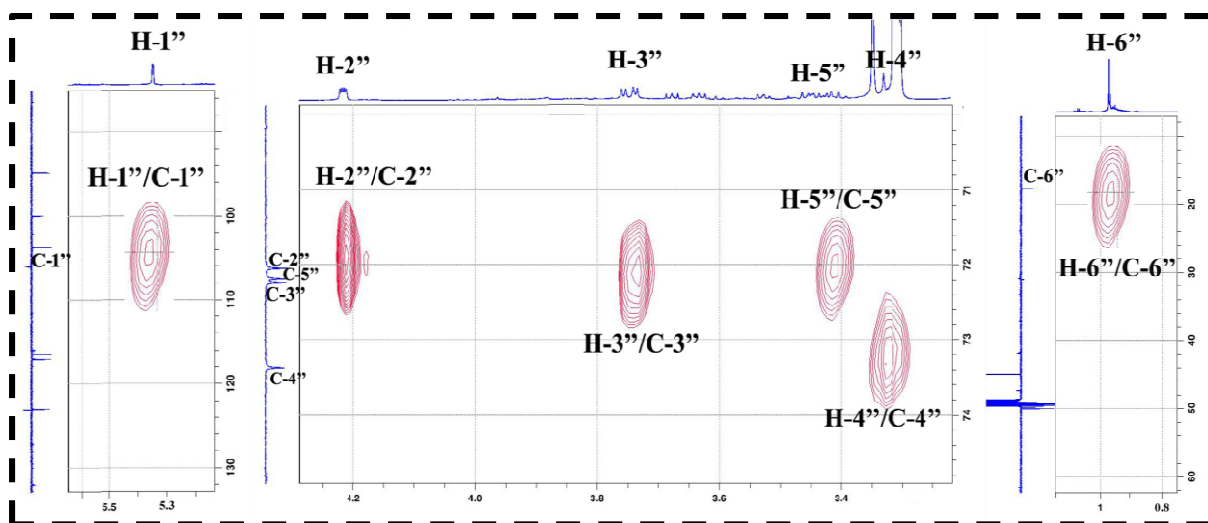


Figure II-83 : Spectre HSQC de la partie osidique (rhamnose) du composé HH8

La position du rhamnose en C-3 de la quercétine est confirmée par le spectre HMBC (Figure II-84) qui révèle la corrélation entre le proton anomérique du rhamnose (δ_H 5,35) et le carbone C-3 de l'aglycone résonnant à δ_C 136,6.

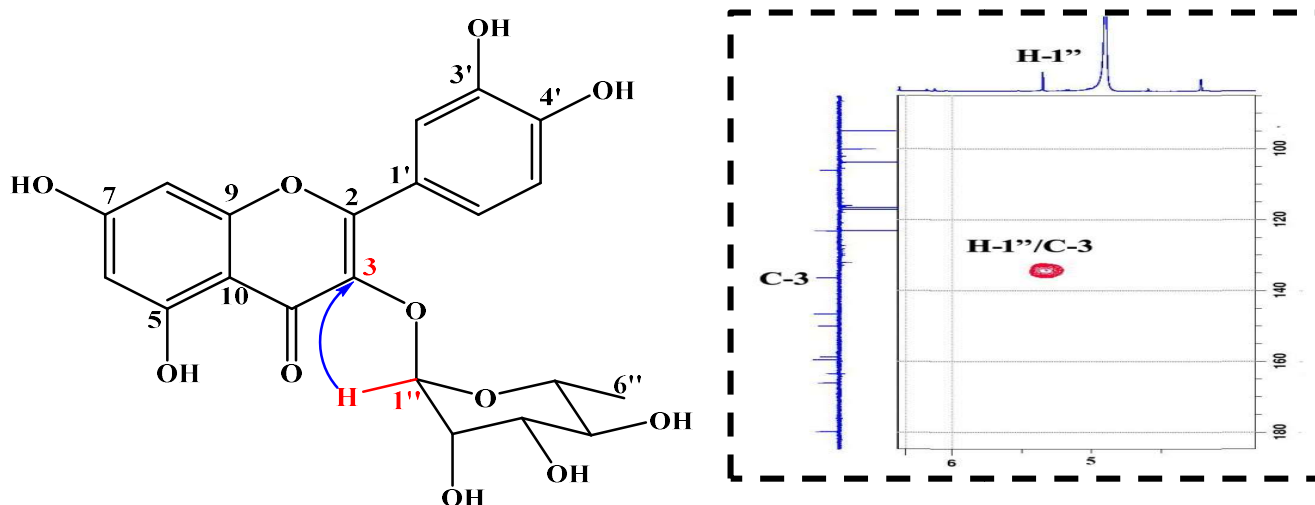
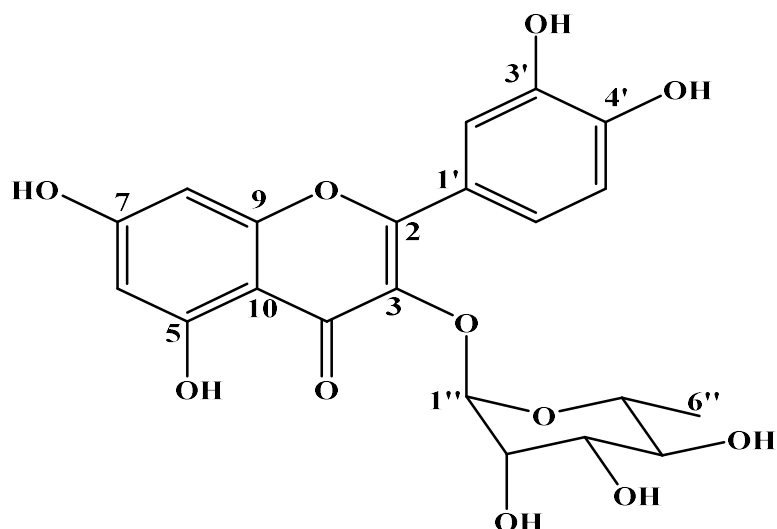


Figure II- 84 : Spectre HMBC montrant le branchement de α -L-rhamnose

L'ensemble de ces données spectrales ainsi que la comparaison avec celles rapportées dans la littérature [57], permettent d'établir la structure du composé **HH8** comme étant : Quercétine 3-*O*- α -rhamnopyranoside nommé quercitrine. Il a été isolé précédemment des espèces *Helianthemum glomeratum* et *Helianthemum sessiliflorum* [13, 20].



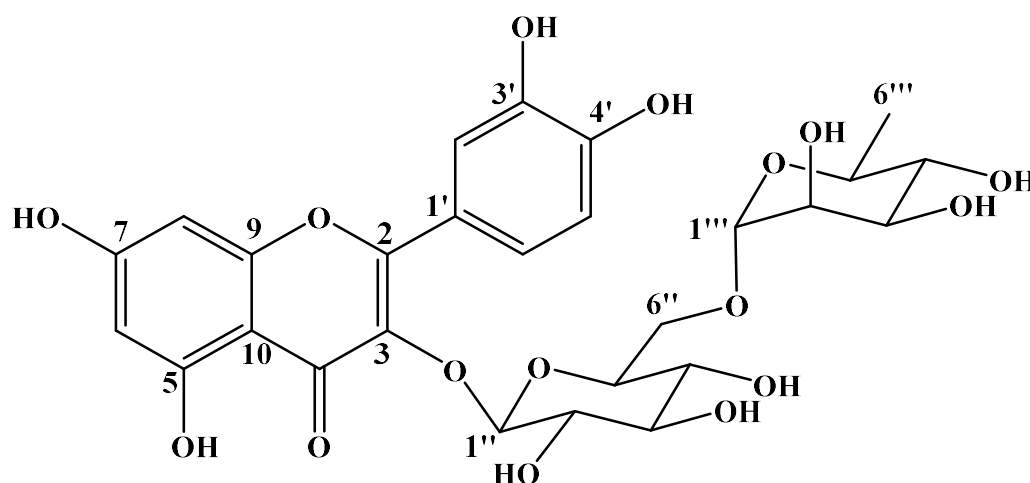
Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones du composé **HH8** sont regroupés dans le tableau II-8.

Tableau II-8 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé **HH8** (CD_3OD)

Position	RMN ^1H	RMN ^{13}C
	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	δ_{C} (ppm)
2	-	159,3
3	-	136,6
4	-	178,8
5	-	163,4
6	6,20 (<i>d</i> , 2,0)	99,8
7	-	166,1
8	6,37 (<i>d</i> , 2,0)	94,9
9	-	158,7
10	-	106,1

1'	-	123,1
2'	7,34 (<i>d</i> , 2,0)	117,0
3'	-	146,6
4'	-	149,9
5'	6,91 (<i>d</i> , 8,3)	116,6
6'	7,31 (<i>dd</i> , 2,0; 8,3)	122,9
1''	5,35 (<i>d</i> , 1,5)	103,7
2''	4,22 (<i>dd</i> , 1,5; 3,2)	72,0
3''	3,75 (<i>dd</i> , 3,3; 9,5)	72,3
4''	3,35 (<i>t</i> , 9,5)	73,4
5''	3,42 (<i>m</i>)	72,1
6''	0,94 (<i>d</i> , 6,1)	17,9

II-1-4-9- Détermination structurale du composé HH9



Quercétine 3-*O*-rutinoside (Rutine)

Le composé **HH9** a été isolé sous forme d'une poudre jaune. Il est visible en UV (254 et 366 nm) et réagit sur CCM en donnant une coloration jaune après révélation par une solution acide et chauffage à 100 °C.

Son spectre de masse ESI⁺ (Figure II-85) donne deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 611,1$ $[M+H]^+$ et $1221,3$ $[2M+H]^+$ qui correspondent à une masse de 610 uma et une formule brute en $C_{27}H_{30}O_{16}$.

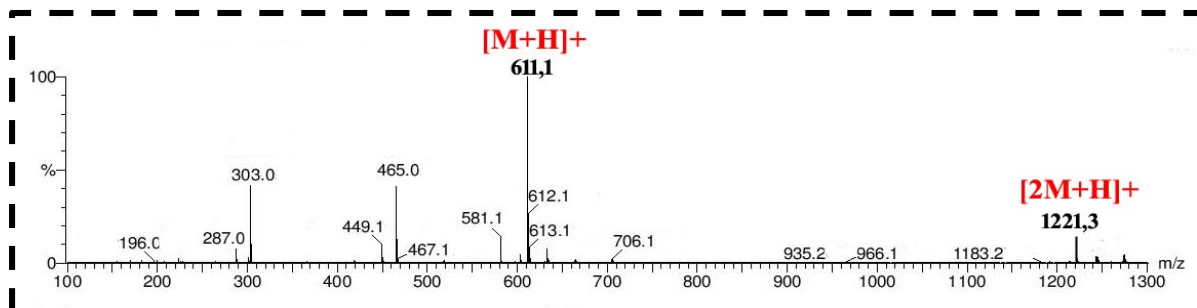


Figure II-85 : Spectre de masse ESI (mode positif) du composé HH9

Les spectres de RMN 1H et ^{13}C du composé **HH9** (Figures II-86 et II-87) montrent de grandes similitudes avec le composé **HH8** décrit précédemment, particulièrement dans sa partie génine. Ils permettent de retrouver tous les signaux identifiant la génine quercétine glycosilée en C-3 et le α -L-rhamnose.

Toutefois, l'observation de signaux supplémentaires dans la zone osidique justifie la présence d'un second ose comme le montre clairement le spectre RMN 1H , à travers un signal à δ_H 5,13 (d , $J = 7,6$ Hz, H-1'') et une plus grande densité de signaux dans l'intervalle 3-4 ppm, typiques respectivement d'un proton anomère et de protons osidiques.

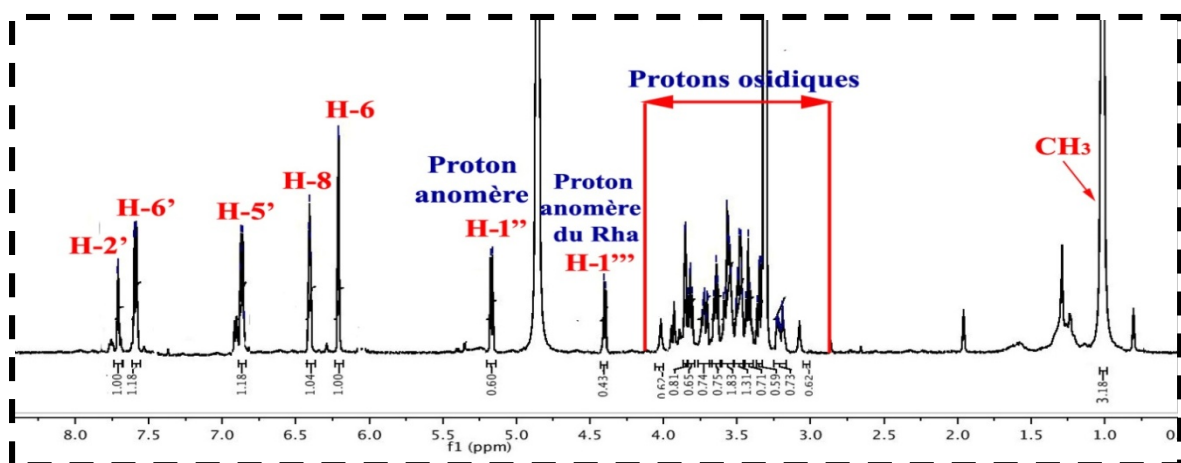


Figure II-86 : Spectre RMN 1H du composé HH9

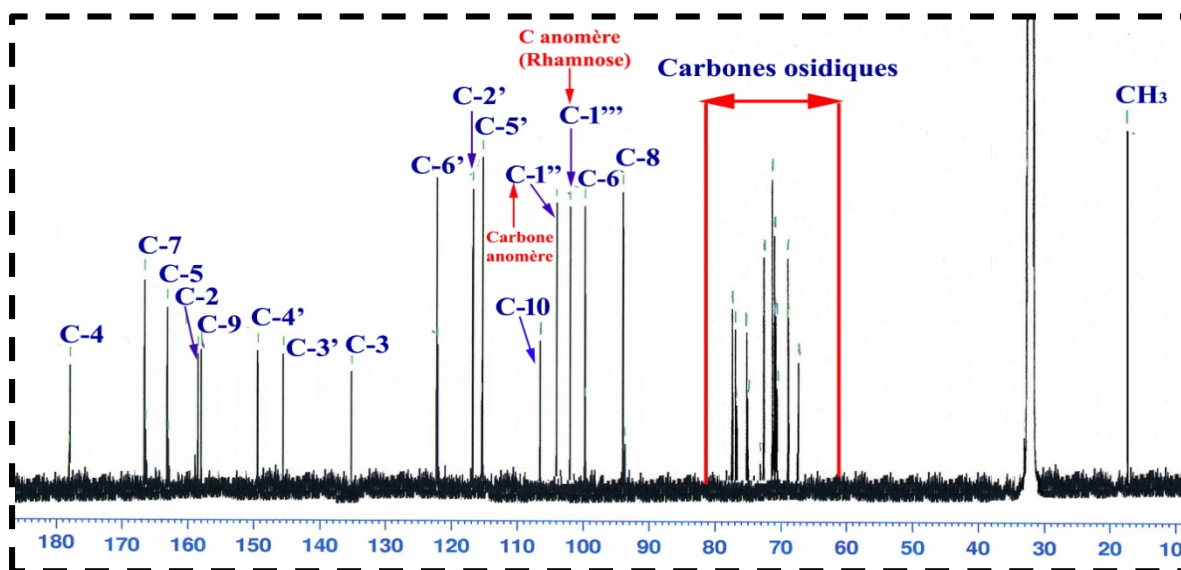


Figure II-87 : Spectre RMN ^{13}C du composé HH9

La différence de 162 uma entre les composés HH9 et HH8 suggère l'existence d'un hexose comme second sucre.

Partant de son proton anomère (δ_{H} 5,13, *d*, $J = 7,6$ Hz, H-1''), l'analyse du spectre COSY H-H (Figure II-88) met en évidence un système de spins à sept protons confirmant la présence d'un hexose, et cela à travers les couplages :

- ◆ H-1''/H-2'' (δ_{H} 3,47, *dd*, $J = 7,6; 8,5$ Hz).
- ◆ H-2''/H-3'' (δ_{H} 3,44, *m*).
- ◆ H-3''/H-4'' (δ_{H} 3,27, *t*, $J = 8,6$ Hz).
- ◆ H-4''/H-5'' (δ_{H} 3,41, *m*).
- ◆ H-5''/H-6''b (δ_{H} 3,63, *dd*, $J = 5,5; 11,1$ Hz).
- ◆ H-6''b/H-6''a (δ_{H} 3,82, *dd*, $J = 2,5; 11,0$ Hz).

Les grandes valeurs de constantes de couplage indiquent que cet hexose est un D-glucose de configuration β ($J_{1''-2''} = 7,6$ Hz).

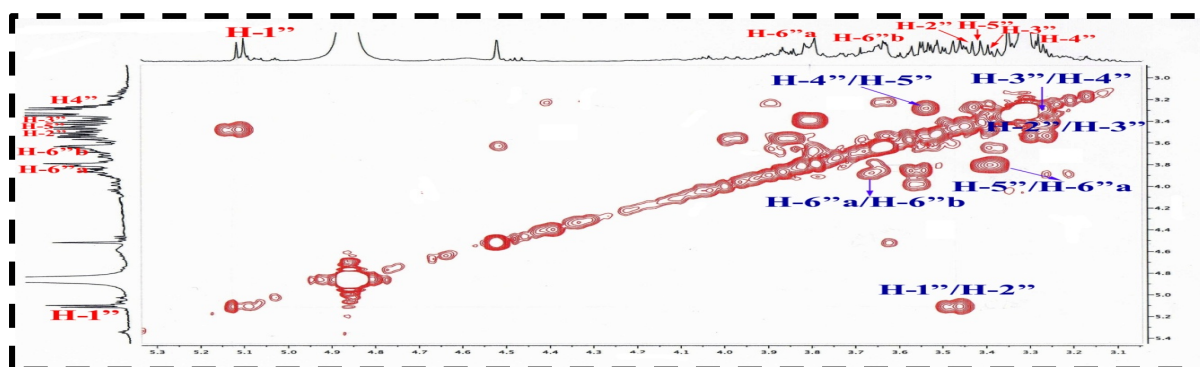


Figure II-88 : Spectre COSY H-H du β -D- glucose du composé HH9

Les sites de branchement des unités osidiques sont déterminés par expérience HMBC (Figure II-89) qui met en évidence les corrélations entre :

- 1) le proton anomère H-1'' du glucose (δ_H 5,13) et le carbone C-3 (δ_C 135,5), confirmant sa fixation en C-3 de la quercétine.
- 2) le proton anomère H-1''' du rhamnose (δ_H 4,54) et le carbone C-6'' (δ_C 68,3) du glucose à travers une liaison 1''' \rightarrow 6''. Ce séquençage ainsi que la nature des sucres constituent une partie osidique appelée rutinose.

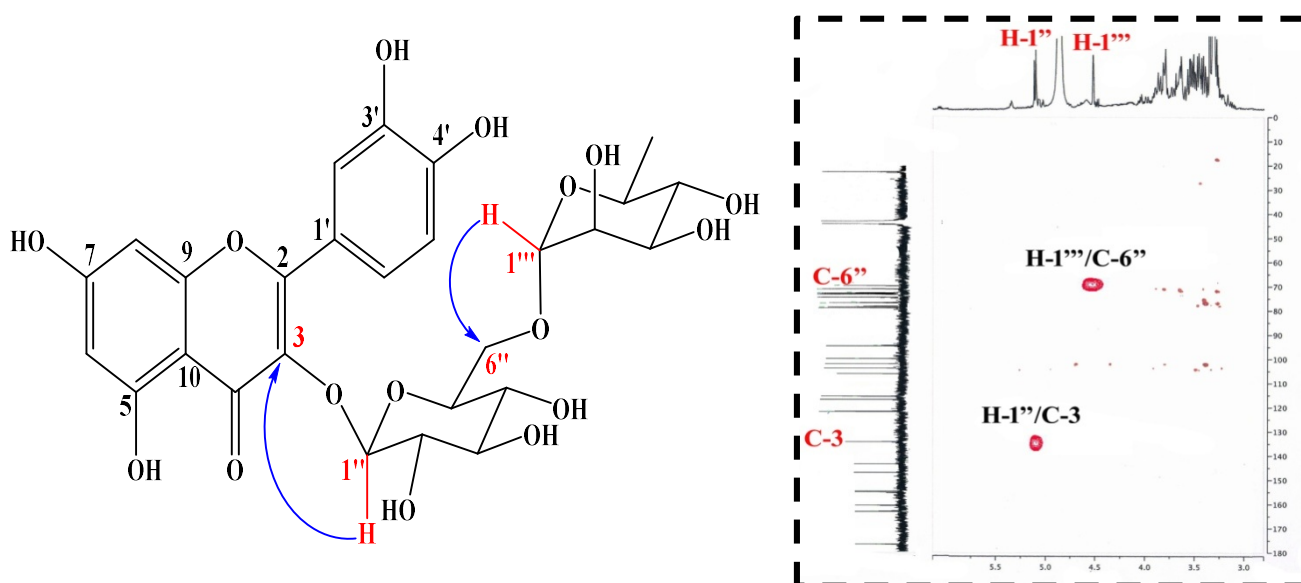
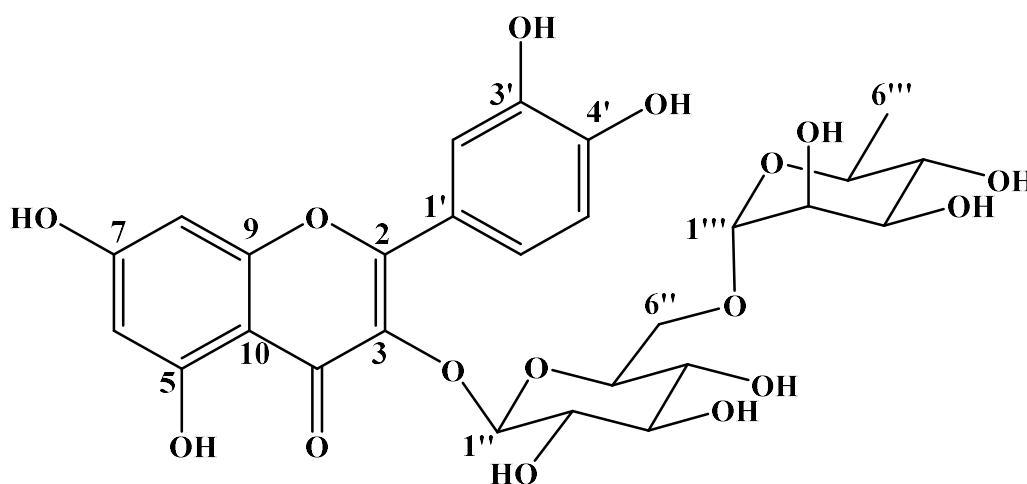


Figure II-89 : Spectre HMBC mettant en évidence la séquence de sucres

Le composé **HH9** a donc la structure suivante [58] :



Quercétine-3-O-rutinoside

Ce composé connu sous le nom rutine, a été identifié antérieurement dans l'espèce *H. sessiliflorum* [20]. C'est sa seconde citation dans le genre.

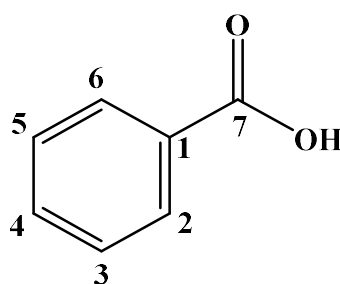
Les données RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **HH9** sont résumées dans le tableau II-9.

Tableau II-9 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé HH9 (CD_3OD)

Position	RMN ^1H δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
2	-	159,0
3	-	135,5
4	-	178,3
5	-	163,0
6	6,24 (<i>d</i> , 2,0)	99,6
7	-	165,8
8	6,42 (<i>d</i> , 2,0)	94,7
9	-	158,3
10	-	105,3
1'	-	122,9
2'	7,68 (<i>d</i> , 2,1)	117,3
3'	-	145,4
4'	-	149,6
5'	6,89 (<i>d</i> , 8,3)	115,7
6'	7,61 (<i>dd</i> , 2,0; 8,5)	123,2
1''	5,13 (<i>d</i> , 7,6)	104,3
2''	3,43 (<i>dd</i> , 7,6; 8,5)	75,4
3''	3,44 (<i>m</i>)	76,8
4''	3,27 (<i>t</i> , 8,6)	71,2
5''	3,41 (<i>m</i>)	77,9

6''	3,83 (<i>dd</i> , 5,5; 11,1)	68,3
	3,64 (<i>dd</i> , 2,5; 11,0)	
1'''	4,54 (<i>d</i> , 1,8)	102,1
2'''	3,65 (<i>dd</i> , 1,6; 3,4)	71,8
3'''	3,55 (<i>dd</i> , 9,4; 3,4)	71,9
4'''	3,30 (<i>t</i> , 9,5)	73,6
5'''	3,44 (<i>m</i>)	69,3
6'''	1,13 (<i>d</i> , 6,2)	17,3

II-1-4-10- Détermination structurale du composé HH10



Acide benzoïque

Le composé **HH10** se présente sous la forme d'une poudre blanche. Il montre une tache visible en UV (254 et 366 nm), incolore après pulvérisation sur CCM par une solution acide puis chauffage à 100 °C.

Son spectre de masse ESI du composé **HH10** enregistré en mode négatif (Figure II-90), présente un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 121,1$ $[M-H]^-$, suggérant une masse moléculaire de 122 uma correspondant une formule brute en $C_7H_6O_2$.

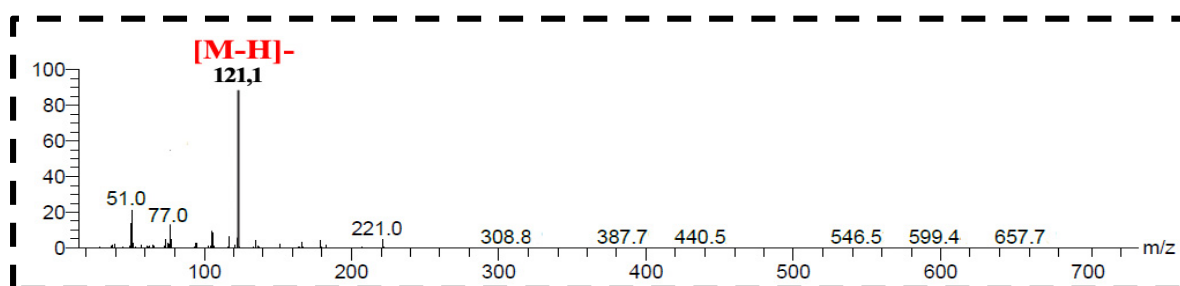


Figure II-90 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé HH10

L'analyse du spectre ^1H RMN (Figure II-91) du composé **HH10** montrant un profil relativement simple, permet de mettre en évidence la présence de cinq signaux de protons aromatiques dont :

- ▣ un signal d'intégration 2H repéré à δ_{H} 7,55 (*dd*, $J = 1,7; 8,0$ Hz) de deux protons couplant en *mé*ta (H-2 et H-6).
- ▣ un signal d'intégration 2H sortant à δ_{H} 6,41 (*t*, $J = 8,2$ Hz) est attribué à deux protons couplant en *ortho* (H-3 et H-5).
- ▣ un signal résonant à δ_{H} 6,69 (*t*, $J = 8,1$ Hz) attribuable au proton H-4.

Le spectre ^{13}C RMN (Figure II-91) indique la présence de :

- ▣ cinq CH aromatiques localisés à δ_{C} 130,7 (C-2 et C-6), 128,1 (C-3 et C-5) et 133,0 (C-4).
- ▣ un carbone quaternaire à δ_{C} 129,6 (C-1).
- ▣ un carbone quaternaire à 172,8 ppm caractéristique d'un groupement carbonyle d'acide (C-7).

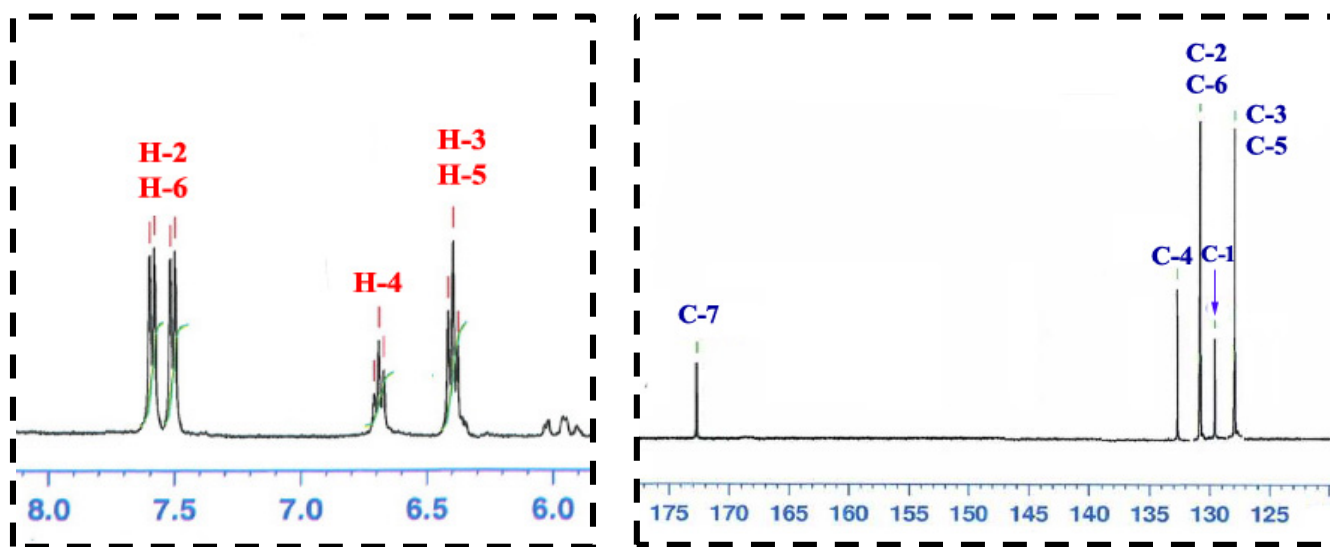
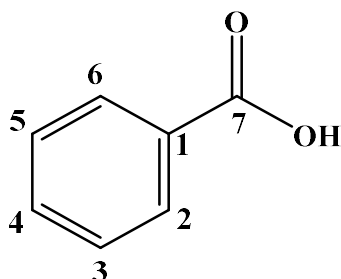


Figure II-91 : Spectres RMN ^1H et ^{13}C du composé **HH10**

Ces résultats permettent d'identifier l'acide benzoïque [59]. Il a été isolé antérieurement des espèces *Helianthemum ordosicum* [60] et *H. sessiliflorum* [20].

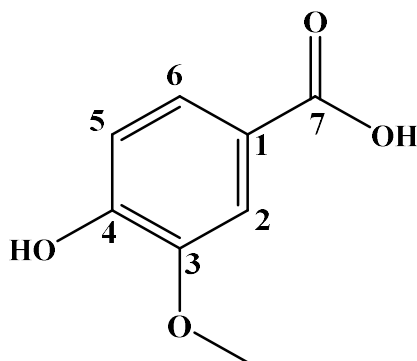


Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones du composé **HH10** sont réunies dans le tableau II-10.

Tableau II-10 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé HH10 (CD_3OD)

Position	RMN ^1H δ_{H} (m, J en Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
1	-	129,6
2	7,55 (dd, 1,5; 8,0)	130,7
3	6,41 (t, 8,2)	128,1
4	6,69 (t, 8,1)	133,0
5	6,41 (t, 8,2)	128,1
6	7,55 (dd, 1,5; 8,0)	130,7
7	-	172,8

II-1-4-11- Détermination structurale du composé HH11



Acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (Acide vanillique)

Ce composé a été obtenu sous forme d'une poudre jaune soluble dans le MeOH. Il prend une coloration jaune après révélation de sa CCM par une solution d'acide et chauffage à 100 °C.

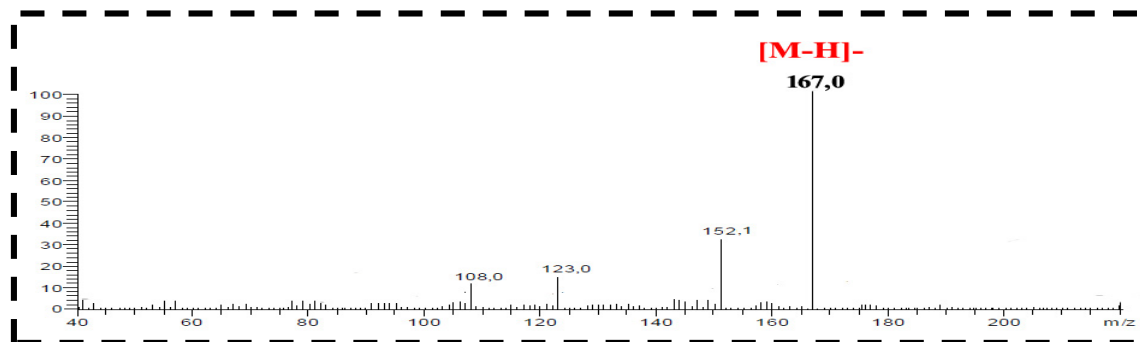


Figure II-93 : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé HH11

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C (Figure II-94) du composé **HH11** sont très semblables à ceux du composé précédent (**HH10**). Il semble que le composé **HH11** est un dérivé de l'acide benzoïque. Ces spectres laissent apparaître des signaux de protons et carbones d'un groupement méthoxyle ($\delta_{\text{H}} 3,81 / \delta_{\text{C}} 57,0$).

La combinaison des données RMN ^1H et ^{13}C ainsi que les corrélations HMBC permettent de conclure que le groupement méthoxyle est situé en C-3 du noyau aromatique, menant à la structure suivante : acide 4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque (acide vanillique) [61].

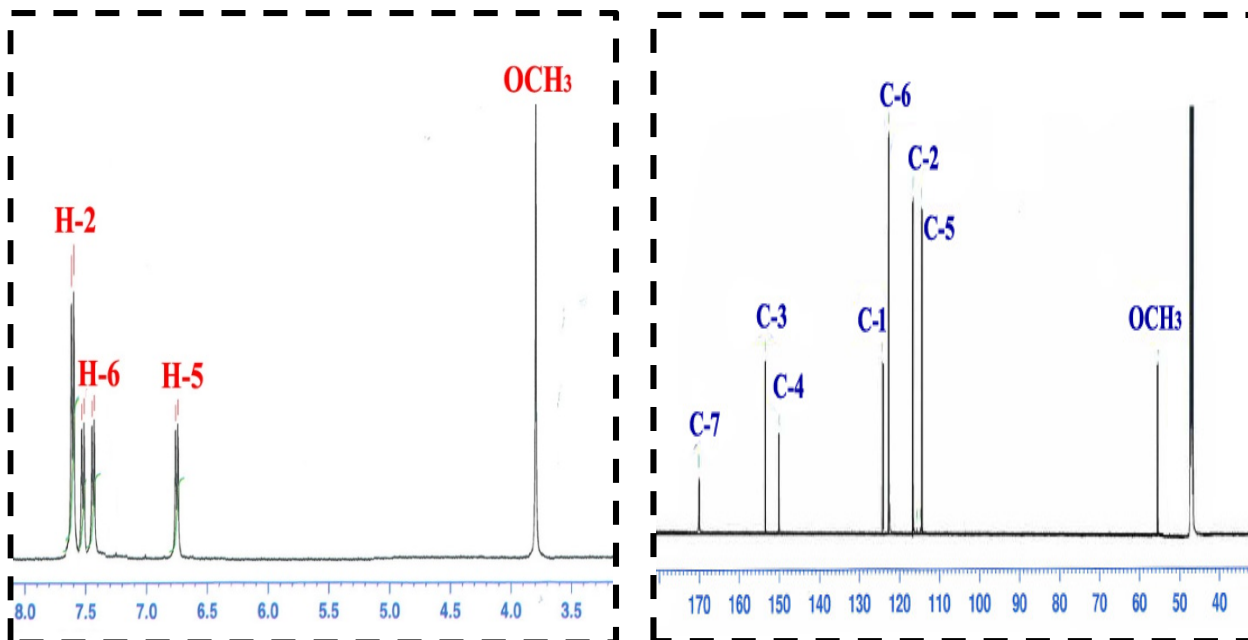


Figure II-94 : Spectre RMN ^1H et ^{13}C du composé HH11

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **HH11** sont présentés dans le tableau II-11.

Tableau II-11 : Données RMN ¹H et ¹³C du composé HH11 (CD₃OD)

Position	RMN ¹ H δ_H (m, J en Hz)	RMN ¹³ C δ_C (ppm)
1	-	129,6
2	7,60 (d, 2,0)	116,4
3	-	154,0
4	-	150,0
5	6,78 (d, 8,6)	114,5
6	7,52 (dd, 2,1; 8,4)	123,0
7	-	170,1
3-OMe	3,81 (s)	57,0

II-1-5- Conclusion

L'étude phytochimique réalisée sur les parties aériennes de l'espèce *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.) Maire, appartenant à la famille Cistaceae, a mené à l'isolement et à la caractérisation de onze composés naturels appartenant à différentes classes de métabolites secondaires, représentés comme suit :

- Un néolignane glucoside :
 - (7*R*, 8*R*)-7,8 dihydro-9'-hydroxyl-3'-méthoxyl-8-hydroxyméthyl-7-(4-hydroxy-3-méthoxyphenyl)-1'-benzofuranpropanol 9'-*O*- β -D-glucopyranoside
- Deux dérivés d'acide quinique :
 - Acide 4-*O*-*p*-coumaryl quinique méthyl ester
 - Acide 5-*O*-*p*-coumaryl quinique méthyl ester
- Six flavonoïdes :
 - Tliliroside
 - Astragaline
 - Kaempférol 3-*O*-vicianoside

- Isoquercitrine
- Quercitrine
- Rutine
- Acide benzoïque
- Acide vanillique

Les résultats obtenus ont révélé la richesse de l'espèce *H. hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.) Maire en composés phénoliques.

Les trois composés, néolignane glucoside (**HH1**), acide 4-*O-p*-coumaryl quinique méthyl ester (**HH2**) et acide 5-*O-p*-coumaryl quinique méthyl ester (**HH3**), isolés de l'extrait *n*-BuOH sont nouveaux pour le genre *Helianthemum*. Les composés **HH1** et **HH2** sont décrits pour la première fois dans la famille Cistaceae à laquelle appartient ce genre.



Chapitre III

III-1- Etude phytochimique de l'espèce *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.

III-1-1- Extraction

1,5 Kg de poudre sèche de la plante entière *Onobrychis crista-galli*, est mis à macérer trois fois dans un mélange Eau/Ethanol à 70% (3 x 10 L), à température ambiante durant 72 heures (trois jours). Après filtration et concentration non à sec, l'extrait aqueux résultant subit une extraction liquide-liquide avec trois solvants : éther de pétrole (200 ml x 3), acétate d'éthyle (200 ml x 5) et *n*-butanol (200 ml x 5). L'évaporation des solvants a fourni 5,1 g de l'extrait éthéropétrolique, 30,6 g de l'extrait acétate d'éthyle et 32,3 g de l'extrait *n*-butanolique.

Le protocole d'extraction est récapitulé dans la Figure III-1.

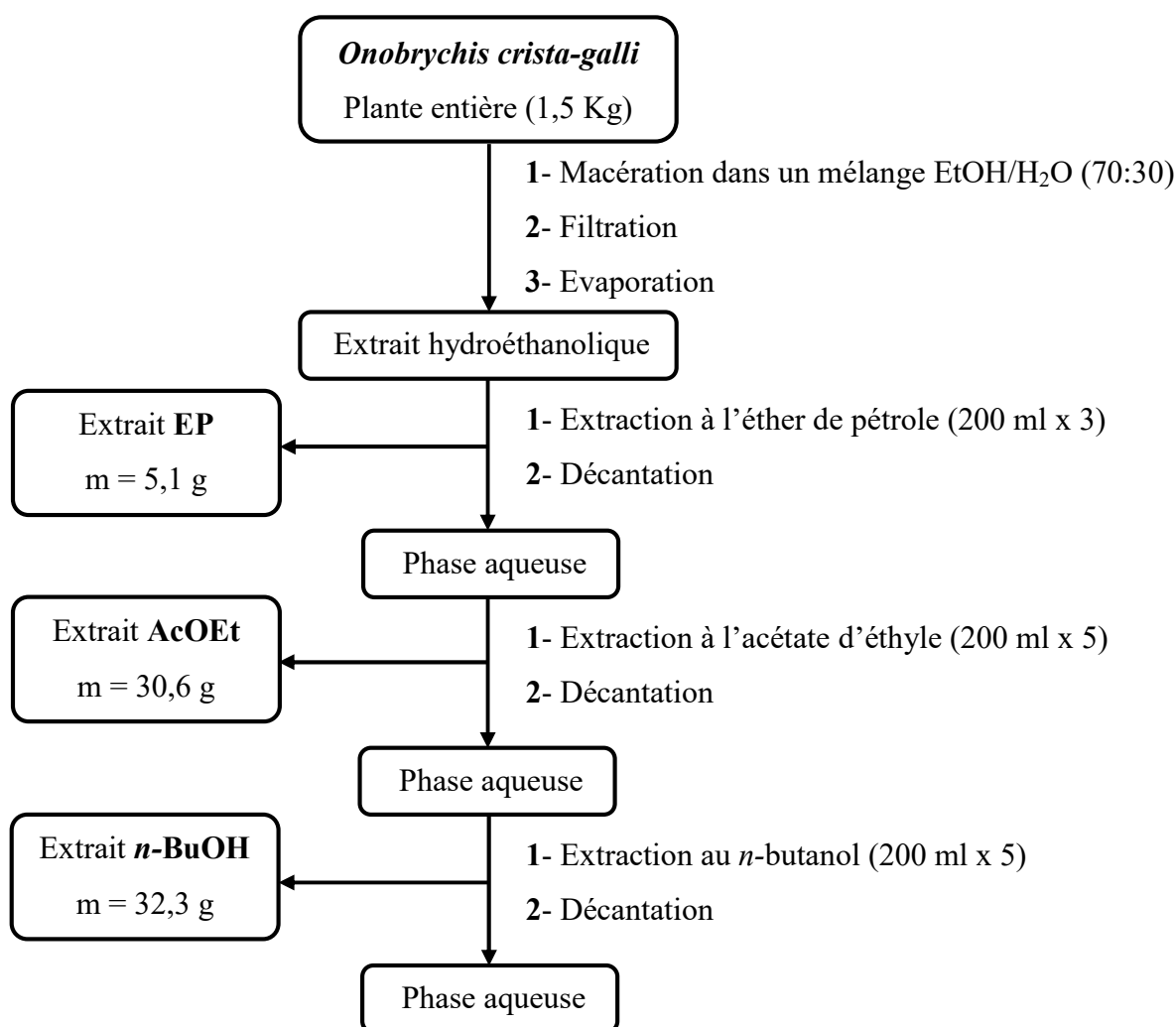


Figure III-1 : Schéma général d'extraction de *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.

Les deux extraits AcOEt et *n*-BuOH ont été choisis sur la base de tests par HPLC-UV(DAD)-ELSD et UPLC-TOF donnant un profil chromatographique attestant de la riche composition chimique de ces extraits.

III-1-2- Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle

L'extrait acétate d'éthyle de *Onobrychis crista-galli* (4 g) a été soumis à un fractionnement par chromatographie liquide sous moyenne pression (MPLC) sur silice C-18 en utilisant comme phase mobile un gradient (H₂O/MeOH/acide formique 0,1%), donnant 43 fractions (F1-F43).

Les fractions obtenues, préalablement filtrées dans une cartouche SPE en C-18 dans un mélange MeOH-H₂O (85-15), ont été analysées par UHPLC-UV et UHPLC-TOF permettant de donner 9 composés purs (OC1, OC7-OC14). La fraction F-25 a été reprise par chromatographie HPLC semi-préparative en phase inverse, fournissant le composé (OC4) (0,9 mg) (Figure III-2).

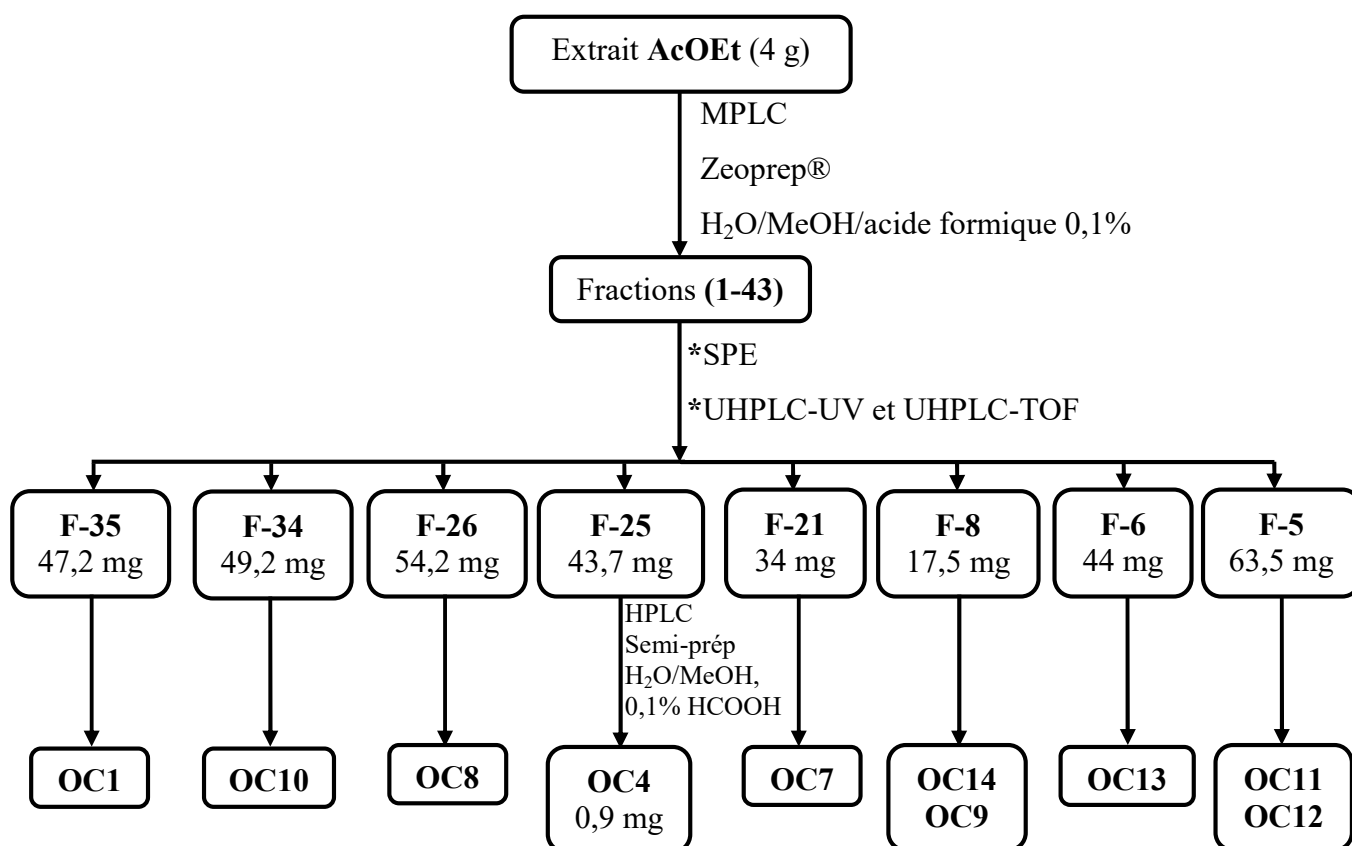


Figure III-2 : Schéma de purification des composés isolés de l'extrait AcOEt de l'espèce *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.

III-1-3- Fractionnement et purification de l'extrait *n*-butanolique

20 g de l'extrait *n*-butanolique ont été fractionnés par une chromatographie sur colonne ouverte de polyamide SC6 dans un mélange H₂O/MeOH (100/0 à 0/100). Cette étape préliminaire s'est soldée principalement par l'obtention de 16 fractions (F1 à F16).

Différentes techniques chromatographiques de séparation et purification ont été appliquées pour aboutir à l'isolement de cinq composés purs (Figure III-3).

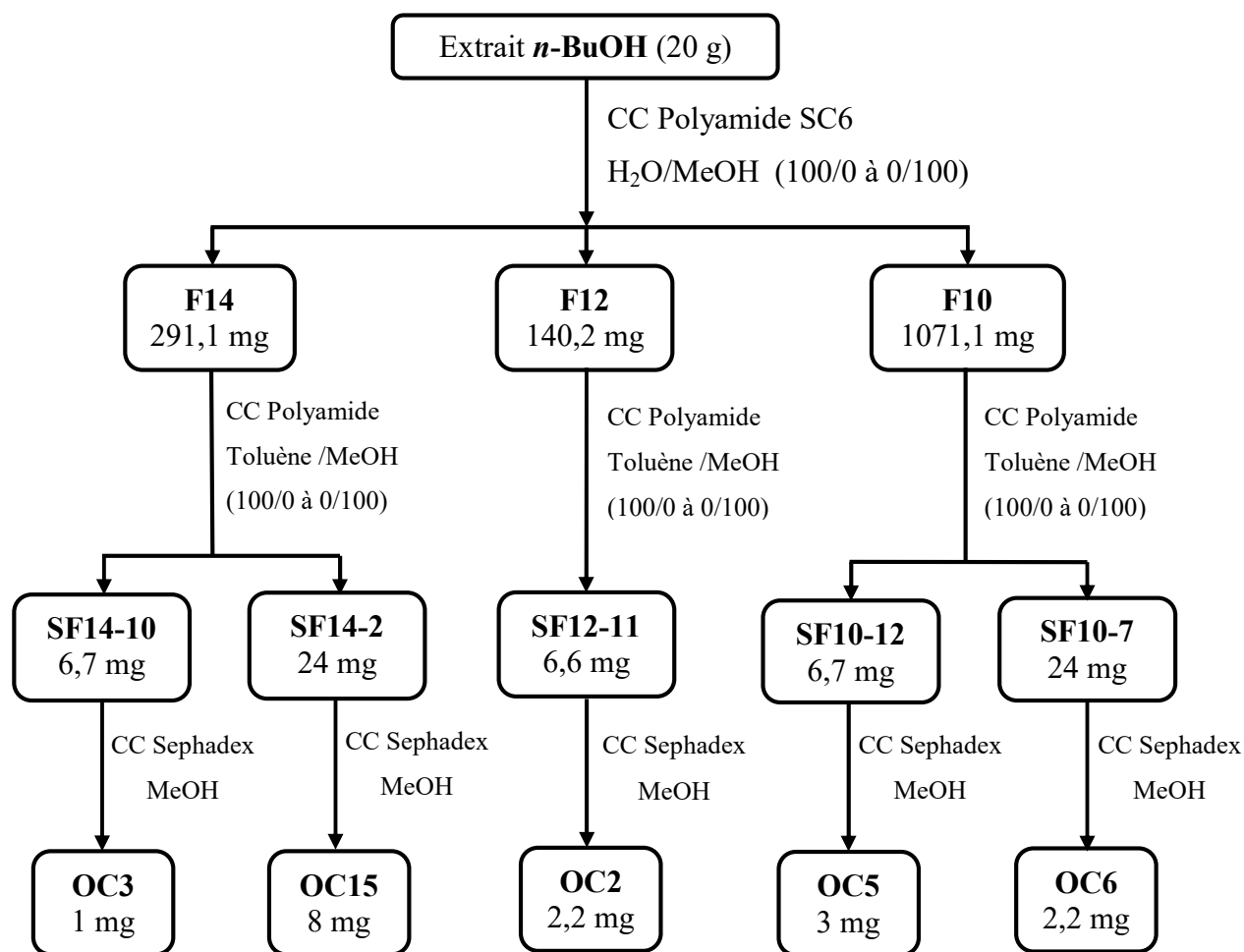
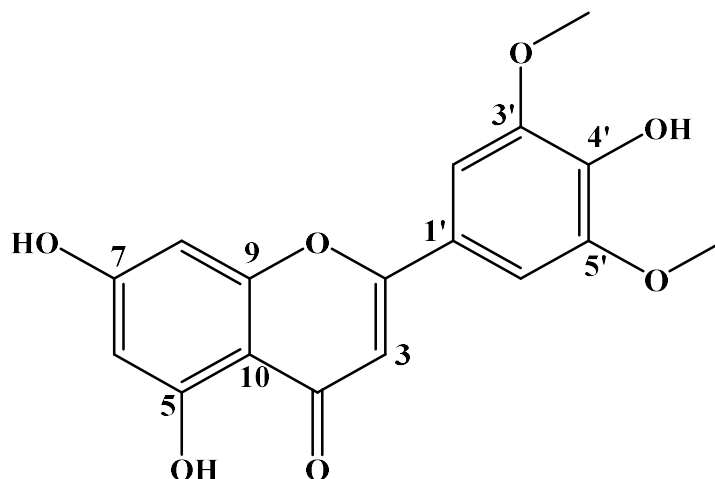


Figure III-3 : Schéma de purification des composés isolés de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.

III-1-4- Détermination structurale des composés obtenus OC (1-15)

Les produits isolés ont été caractérisés par les différentes méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D du proton et du carbone, RMN 2D (COSY H-H, HSQC et HMBC) et spectrométrie de masse à haute résolution HR-ESI-MS, ainsi que par comparaison avec les données de la littérature.

III-1-4-1- Détermination structurale du composé OC1



5, 7, 4'-trihydroxy-3', 5'-diméthoxyflavone (Tricine)

Le spectre de masse à haute résolution HR-ESIMS de ce composé (Figure III-4) enregistré en mode négatif, révèle un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 329,066$ $[M-H]^-$. Ceci correspond à une masse moléculaire de 330 uma et une formule brute en $C_{17}H_{14}O_7$.

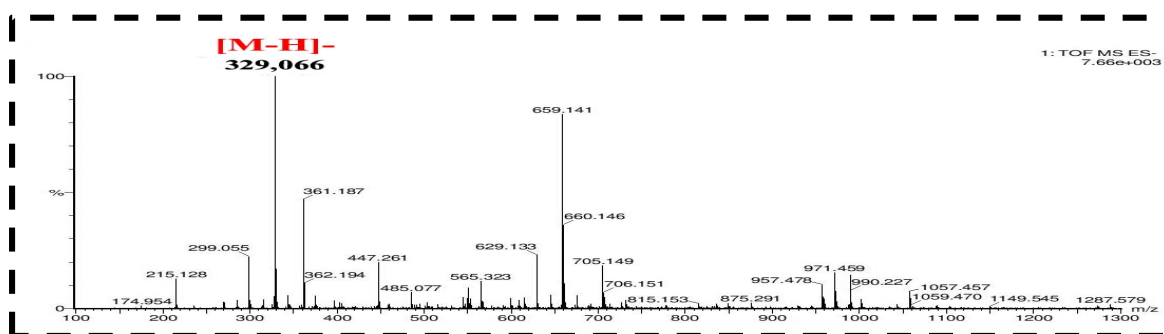
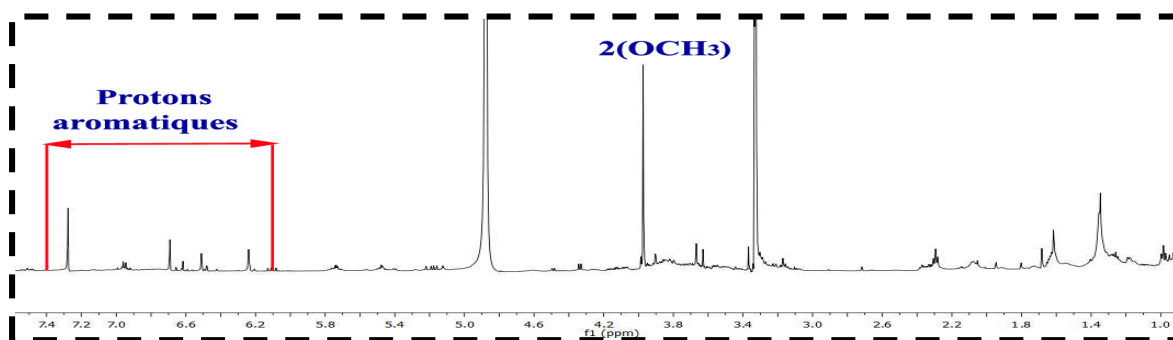


Figure III-4 : Spectre de masse HR-ESIMS (mode négatif) du composé OC1

Son spectre RMN 1H (Figure III-5) enregistré dans MeOD, révèle clairement un profil typique d'un flavonoïde par l'existence de signaux de protons aromatiques allant de 6,20 à 7,30 ppm et un signal d'intégration 6H à 3,97 ppm, de deux groupements méthoxyles.

Figure III-5 : Spectre RMN 1H du composé OC1

Par ailleurs, Le spectre RMN ^{13}C DEPTQ (Figure III-6) montre la présence :

- ⊙ de signaux de carbones aromatiques résonant entre 94,0 et 104,2 ppm.
- ⊙ d'un signal de carbone carbonyle à δ_{C} 182,8 correspondant au carbone C-4 d'un flavonoïde.
- ⊙ d'un signal à δ_{C} 103,5 très caractéristique du carbone C-3 d'une flavone.
- ⊙ d'un signal à δ_{C} 56,01 confirmant de la présence de deux groupements méthoxyes.
- ⊙ de signaux de carbones quaternaires aromatiques sortant entre 104-164 ppm.

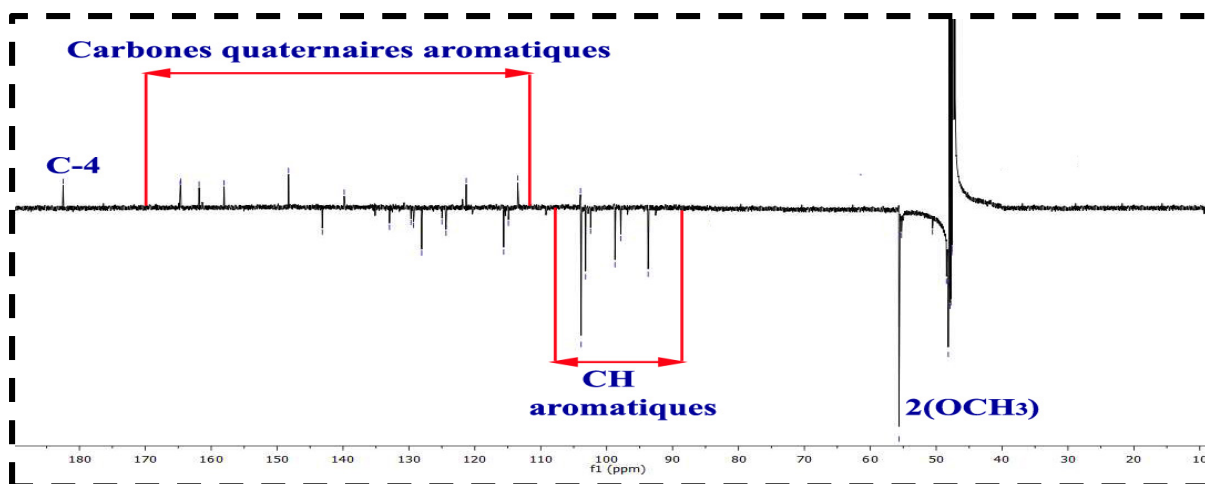


Figure III-6 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé OC1

Toutes ces caractéristiques spectrales attestent que notre composé est un flavonoïde de type flavone.

L'analyse du spectre RMN ^1H (Figure III-7) permet de trouver globalement les signaux des protons du composé. En effet, il est visualisé :

- ▣ deux signaux à δ_{H} 6,23 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) et 6,50 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) attribués respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle aromatique A substitué en C-5 et C-7.
- ▣ deux signaux à δ_{H} 7,27 (2H, *s*) attribués aux protons H-2' et H-6' du cycle aromatique B tétrasubstitué.
- ▣ un signal singulet d'intégration 1H résonant à δ_{H} 6,69 (1H, *s*) attribuable au proton H-3 d'une flavone.

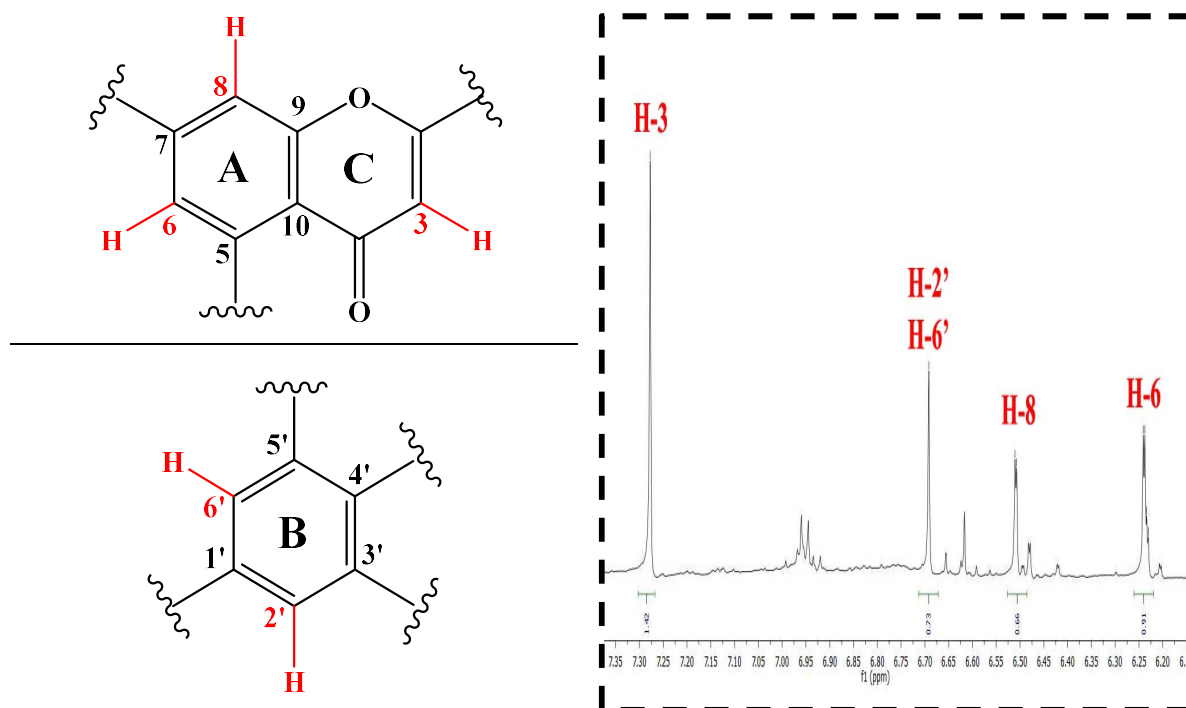


Figure III-7 : Spectre RMN ^1H du composé OC1

Le spectre COSY H-H (Figure III-8) présente une corrélation entre les protons H-6/H-8 du cycle A.

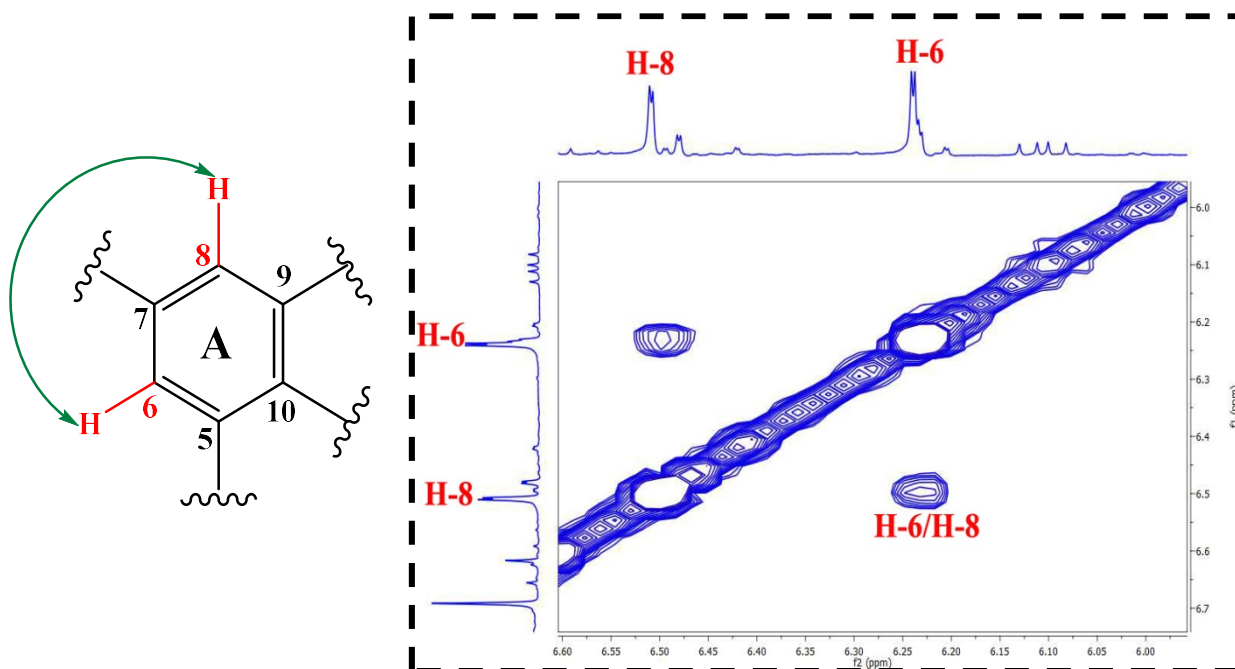


Figure III-8 : Spectre COSY H-H du composé OC1

L'expérience HSQC (Figure III-9) permet d'accorder les protons cités précédemment à leurs carbones résonant à δ_C 103,5 (C-3), 99,0 (C-6), 94,0 (C-8), 104,2 (C-2') et 104,2 (C-6').

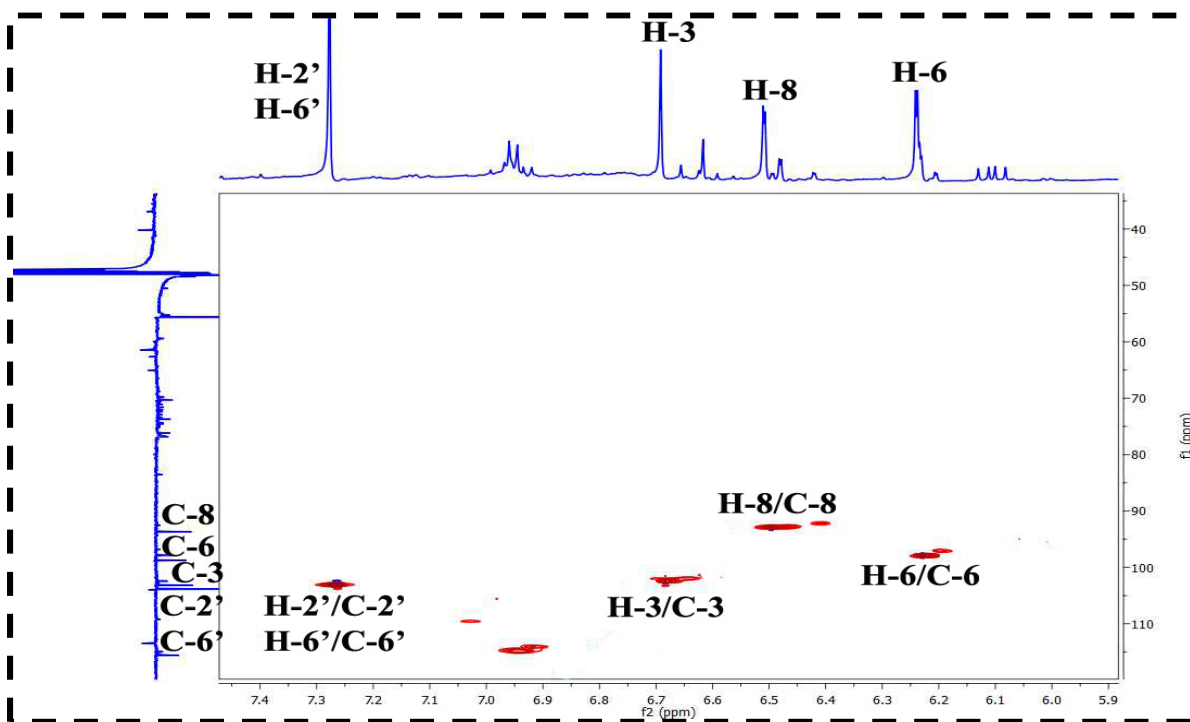


Figure III-9 : Spectre HSQC du composé OC1

Le spectre HMBC (Figures III-10 et III-11) permet d'assigner les carbones quaternaires du composé OC1, à travers les couplages entre :

- ☐ les protons H-6/H-8 du cycle A et les carbones quaternaires C-10 (δ_C 104,3) et C-7 (δ_C 163,5).
- ☐ le proton H-6 et le carbone quaternaire oxygéné C-5 (δ_C 157,2).
- ☐ le proton H-8 et un carbone quaternaire résonant à δ_C 158,3 (C-9).
- ☐ les protons H-2'/H-6' du cycle B et le carbone quaternaire oxygéné C-4' (δ_C 140,1).
- ☐ le proton H-3 (1H, δ_H 6,69, s) et les carbones quaternaires C-10 (δ_C 104,3), C-1' (δ_C 121,6), C-2 (δ_C 162,1) et le carbone du carbonyle C-4 (δ_C 182,8).
Ce dernier couplage confirme le caractère flavonique du composé.

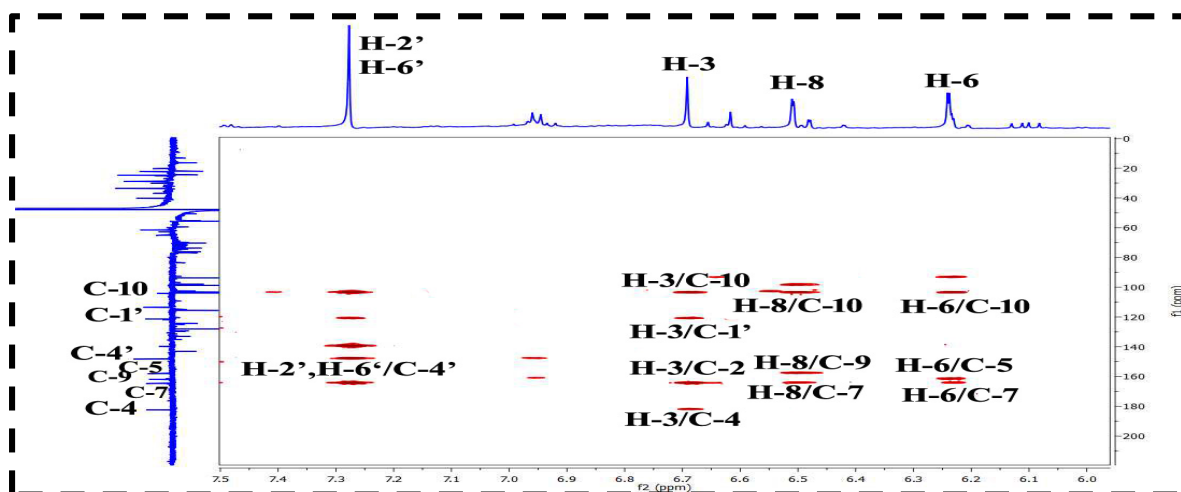


Figure III-10 : Spectre HMBC du composé OC1

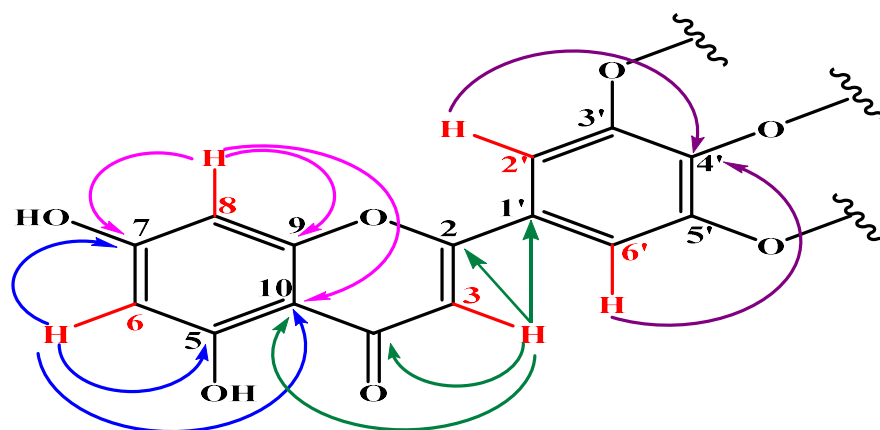


Figure III-11 : Corrélations HMBC observées pour le composé OC1

La localisation des deux groupements méthoxyes (6H, s , δ_H 3,97) est établie à partir de la corrélation HMBC entre les protons de ces derniers et les deux carbones quaternaires C-3' et C-5' (δ_C 148,5) du cycle B (Figure III-12).

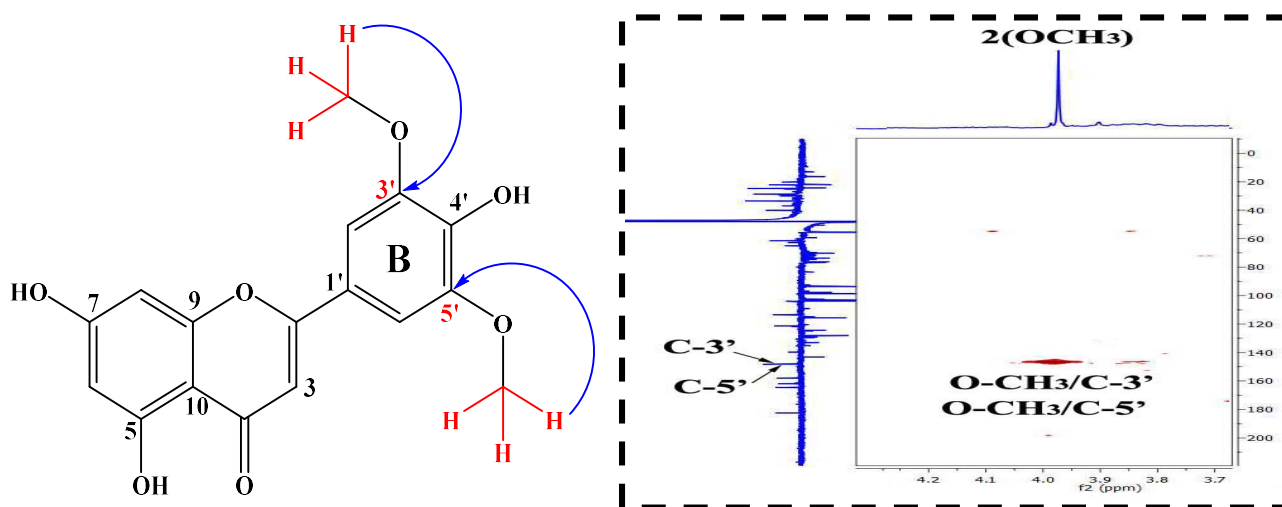
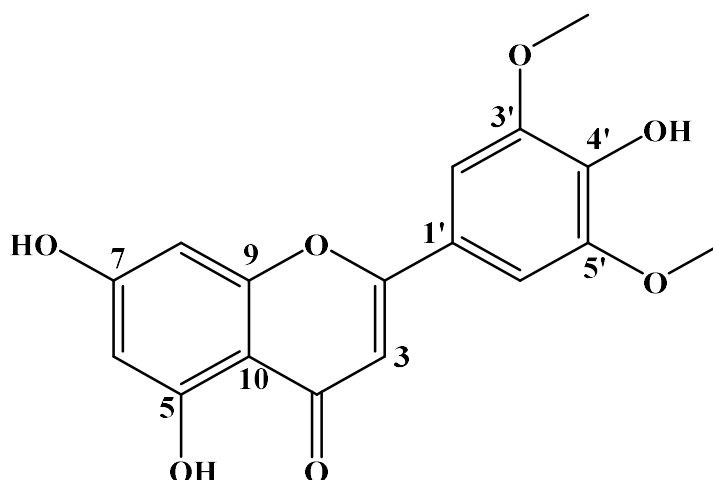


Figure III-12 : Spectre HMBC partiel du composé OC1

Toutes ces données spectrales (Tableau III-1) et la comparaison avec les résultats de la littérature [62], permettent de proposer pour le composé **OC1** la structure suivante :



5,7,4'-trihydroxy-3',5'-diméthoxyflavone

Ce composé, nommé également tricine, a été précédemment isolé de l'espèce *Sphenostylis stenocarpa* (Hochst ex A. Rich) Harms de la famille Fabaceae [63]. Il est signalé pour la première fois dans le genre *Onobrychis*.

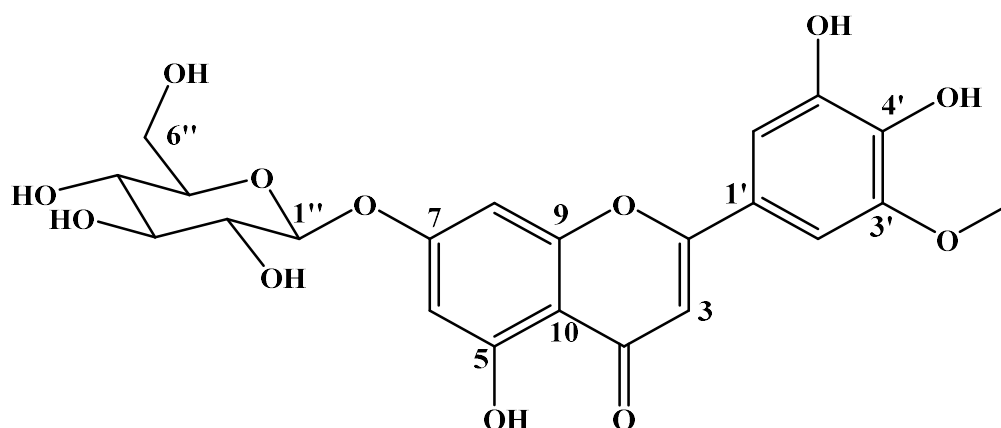
Le tableau III-1 reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **OC1**.

Tableau III-1 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé **OC1** (MeOD)

Position	RMN ^1H δ_{H} (m, J en Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
2	-	162,1
3	6,69 (s)	103,5
4	-	182,8
5	-	157,2
6	6,23 (d, 2,1)	99,1
7	-	163,5
8	6,50 (d, 2,1)	94,1

9	-	158,3
10	-	104,3
1'	-	121,6
2'	7,27 (s)	104,2
3'	-	148,5
4'	-	140,1
5'	-	148,5
6'	7,27 (s)	104,2
3',5'-OMe	3,97 (s)	56,01

III-1-4-2- Détermination structurale du composé OC2



3'-OMe-tricétine 7-O- β -glucoside

Le composé **OC2** visible en UV (254 nm), est obtenu sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. La coloration jaune après révélation par une solution acide et chauffage oriente vers un composé à structure flavonoïdique.

Son spectre de masse à haute résolution HR-ESIMS (Figure III-13) enregistré en mode négatif exhibe un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 477,1022$ $[M-H]^-$, soit une masse moléculaire de 478 uma correspondant à une formule brute en $C_{22}H_{22}O_{12}$.

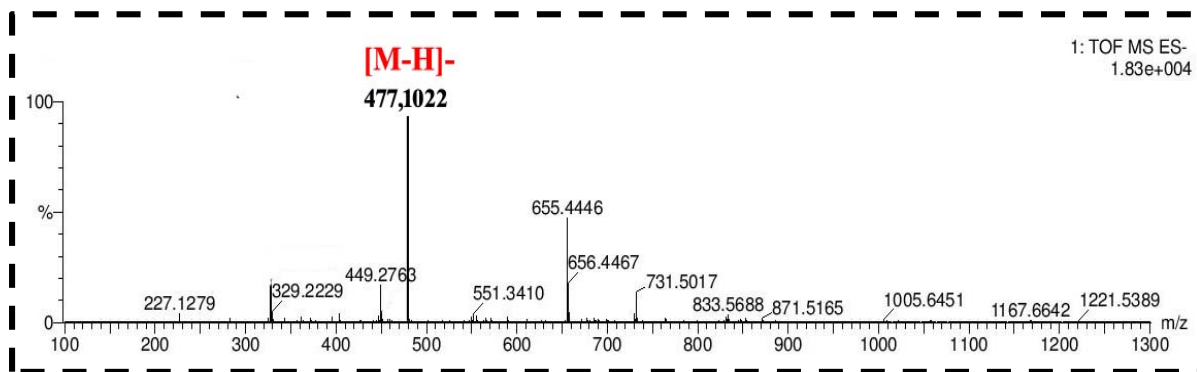


Figure III-13 : Spectre HR-ESIMS (mode négatif) du composé OC2

Le spectre RMN ^1H (Figure III-14), enregistré dans MeOD, est très proche de celui du composé OC1. Il permet de reconnaître entre autres :

- ▣ les deux protons H-6 et H-8 du cycle A résonant à δ_{H} 6,22 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) et 6,54 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) respectivement.
- ▣ le proton H-3 à δ_{H} 6,68 (1H, *s*) caractéristique du noyau flavone.
- ▣ les protons H-2' et H-6' du cycle B repérés respectivement à δ_{H} 7,60 (1H, *s*) et 7,31 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz)

Il est à noter la présence d'un seul groupement méthoxyle détecté à δ_{H} 3,96 (3H, *s*).

De plus, l'apparition de plusieurs signaux dans l'intervalle 3,43-4,20 ppm ainsi qu'un signal d'intégration 1H à δ_{H} 5,19 (*d*, $J = 7,8$ Hz, H-1''), indiquent la présence d'une unité osidique.

Il apparaît ainsi que le composé OC2 est une flavone porteuse d'une unité osidique. Il est similaire au composé OC1 dans sa partie génine.

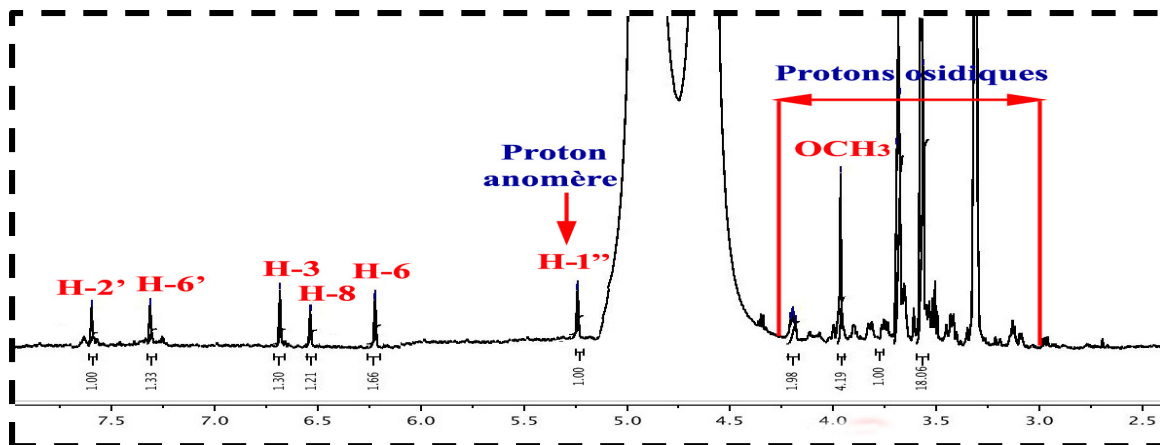


Figure III-14 : Spectre RMN ^1H la partie génine du composé OC2

Le spectre RMN ^{13}C (Figure III-15) permet de reconnaître tous les carbones de la génine du composé.

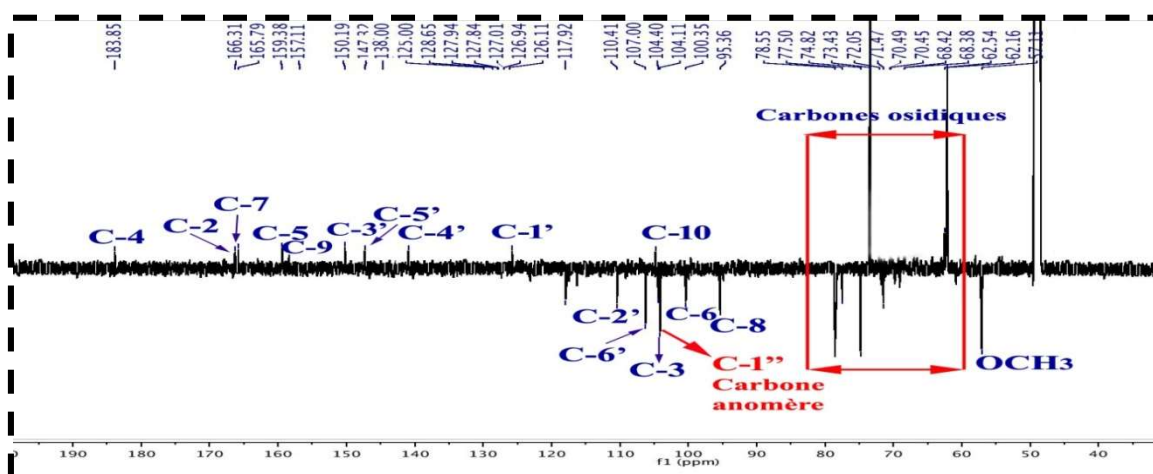


Figure III-15 : Spectre RMN ^{13}C DEPTQ la partie génine du composé OC2

La différence de masse de l'ordre de 148 uma entre les composés OC1 ($M = 330$) et OC2 ($M = 478$) confirme la présence d'un seul groupement méthoxyle et d'un hexose comme unité osidique.

L'analyse des spectres COSY H-H et HSQC (Figure III-16) permet d'assigner tous les déplacements chimiques des protons et carbones de l'unité osidique, identifiant un β -D-glucose.

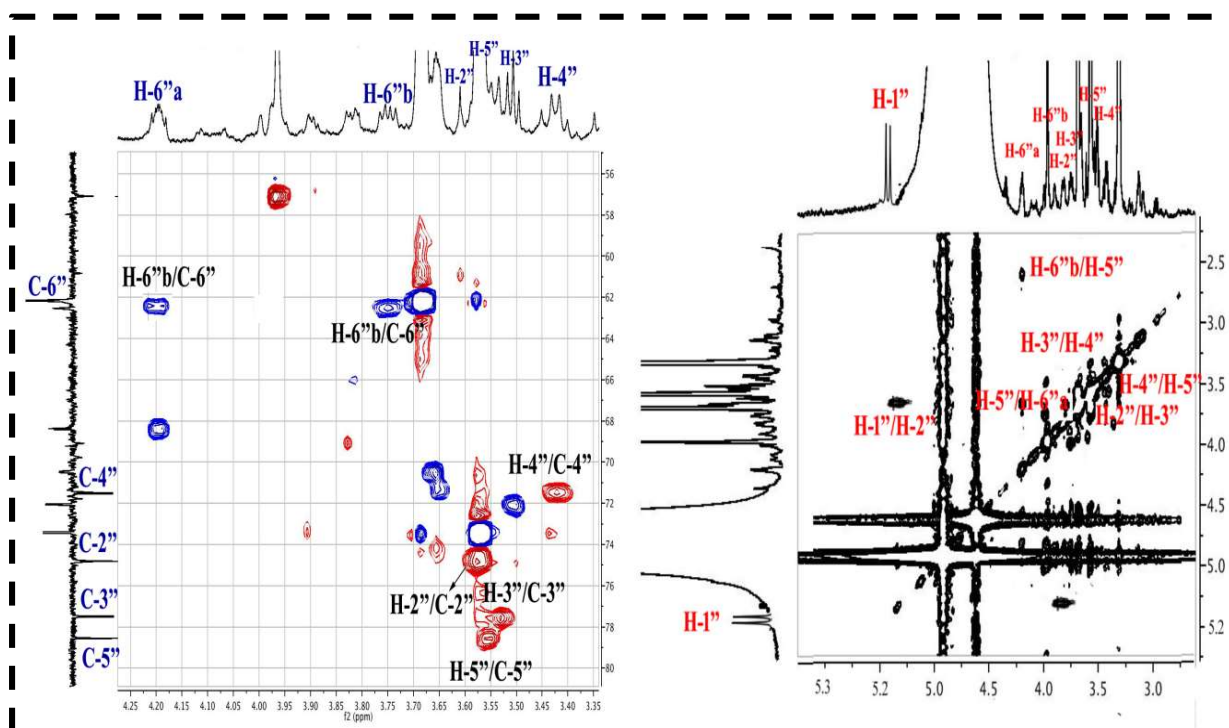


Figure III-16 : Spectres COSY H-H et HSQC du β -D-glucose du composé OC2

Le point de branchement du β -D-glucose en C-7 (δ_C 165,8) de la génine est déterminé par expérience HMBC (Figure III-17) qui présente une corrélation entre ce dernier et le proton anomère (δ_H 5,19, *d*, $J = 7,8$ Hz, H-1'') du glucose.

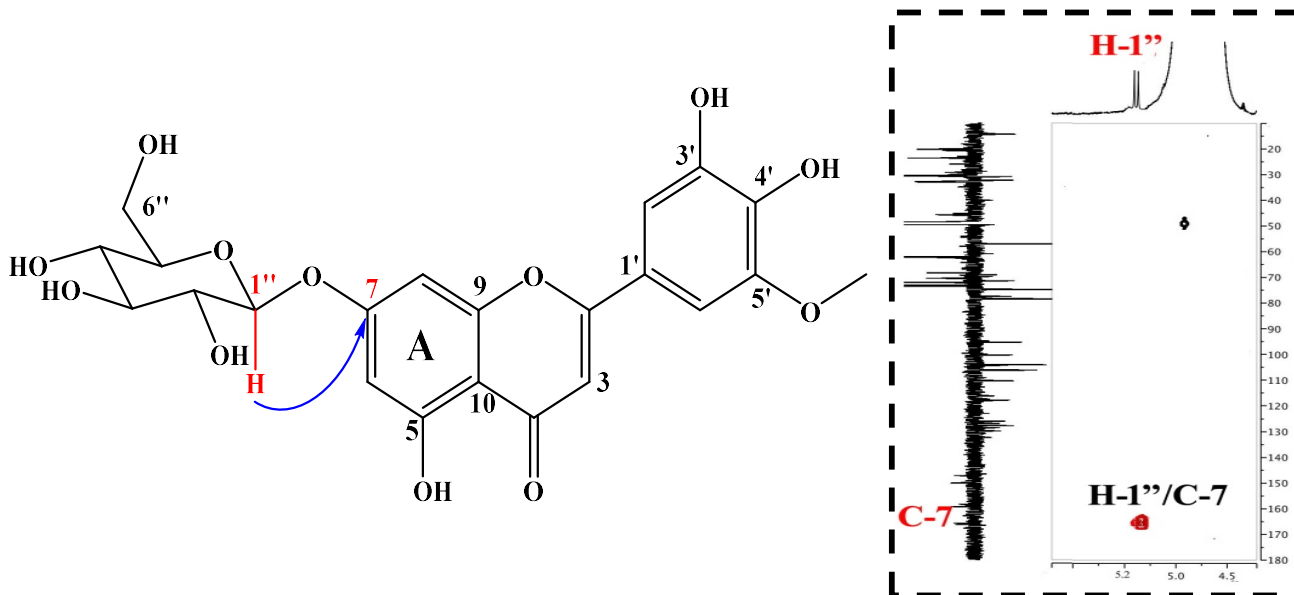
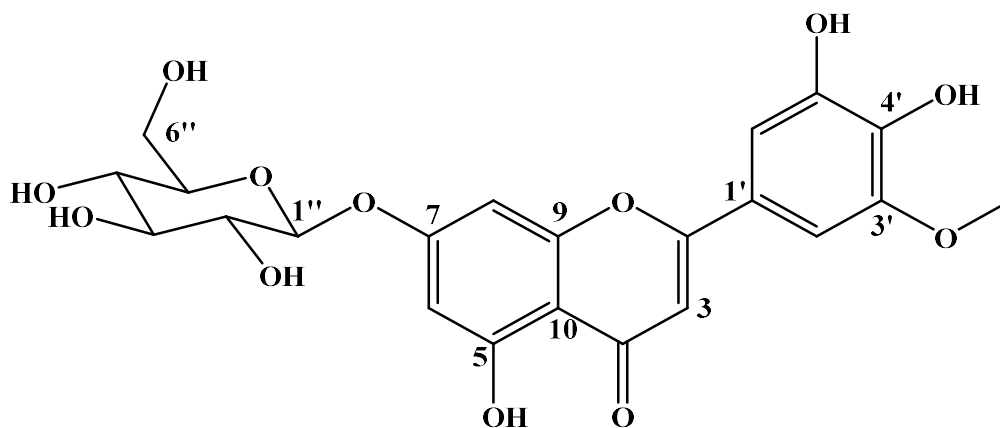


Figure III-17 : Spectre HMBC montrant l'attachement du β -D-glucose à la génine

Toutes les données spectrales permettent d'attribuer sans ambiguïté pour le composé **OC2**, la structure suivante [64] :



3'-OMe-tricétine 7-O- β -glucopyranoside

Ce composé a été antérieurement isolé de l'espèce *Taxodium distichum* de la famille Taxodiaceae [65]. Il est identifié pour la première fois dans la famille Fabaceae.

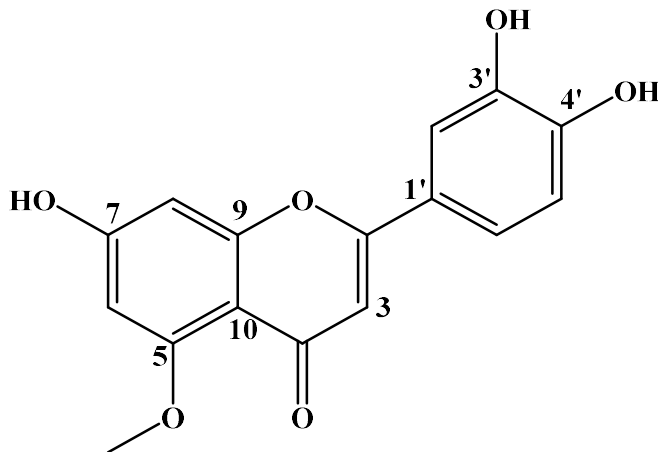
Le tableau ci-après reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **OC2**.

Tableau III-2 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé OC2 (MeOD)

Position	RMN ^1H δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
2	-	166,3
3	6,68 (<i>s</i>)	104,4
4	-	183,8
5	-	159,4
6	6,22 (<i>d</i> , 2,1)	100,4
7	-	165,8
8	6,54 (<i>d</i> , 2,1)	95,4
9	-	157,1
10	-	107,0
1'	-	125,0
2'	7,60 (<i>s</i>)	110,4
3'	-	150,2
4'	-	138,0
5'	-	147,3
6'	7,31 (<i>d</i> , 2,1)	106,3
1''	5,19 (<i>d</i> , 7,8)	104,1
2''	3,57 (<i>m</i>)	74,8
3''	3,53 (<i>m</i>)	77,5
4''	3,43 (<i>m</i>)	71,5
5''	3,56 (<i>m</i>)	78,6
6''	4,20 (<i>m</i>) 3,75 (<i>m</i>)	62,5

3'-OMe	3.96 (s)	57,1
--------	----------	------

III-1-4-3- Détermination structurale du composé OC3



7,3',4'-trihydroxy-5-méthoxyflavone (Lutéoline 5-méthyl éther)

Ce composé a été isolé sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il donne une tache visible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en jaune après révélation par une solution d'acide et chauffage à 100 °C, caractéristique d'un flavonoïde.

Son spectre de masse à haute résolution HR-ESIMS enregistré en mode négatif (Figure III-18) montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 299,0432$ $[M-H]^-$, indiquant une masse moléculaire égale à 300 uma et correspondant à une formule brute en $C_{16}H_{12}O_6$.

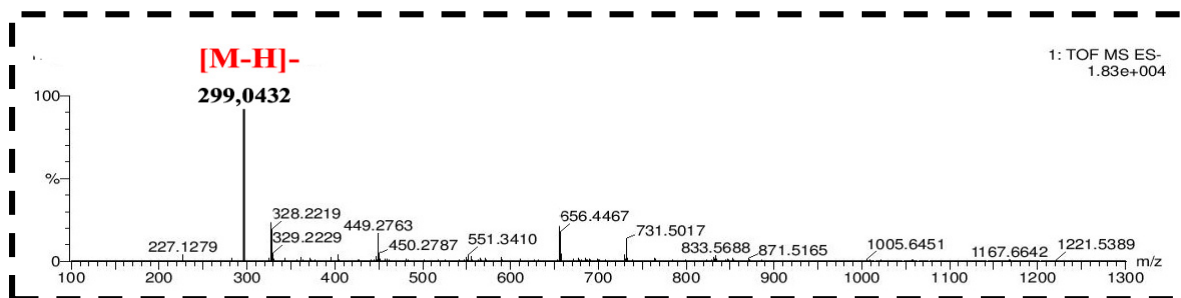


Figure III-18 : Spectre HR-ESIMS (mode négatif) du composé OC3

L'analyse du spectre RMN 1H enregistré dans MeOD (Figure III-19), confirme sa nature flavonoïdique. On distingue :

- ▣ les signaux des protons H-6 (1H, δ_H 6,33, *d*, $J = 2,1$ Hz) et H-8 (1H, δ_H 6,46, *d*, $J = 2,1$ Hz) du noyau aromatique A.
- ▣ les signaux des protons H-2'/H-6' et H-5' et repérés à δ_H 7,35 (2H, *m*), δ_H 6,80 (1H, *d*, $J = 8,8$ Hz) du cycle aromatique B.

- un signal singulet d'intégration 1H à δ_H 6,40 attribuable au proton H-3 d'une flavone.

En outre, il est observé un signal singulet d'intégration 3H à 3,91 ppm d'un groupement méthoxyle.

Toutes ces observations, permettent de déduire que le composé **OC3** est une flavone substituée en C-5, C-7, C-3' et C-4', par 3 groupements OH et un groupement OCH_3 .

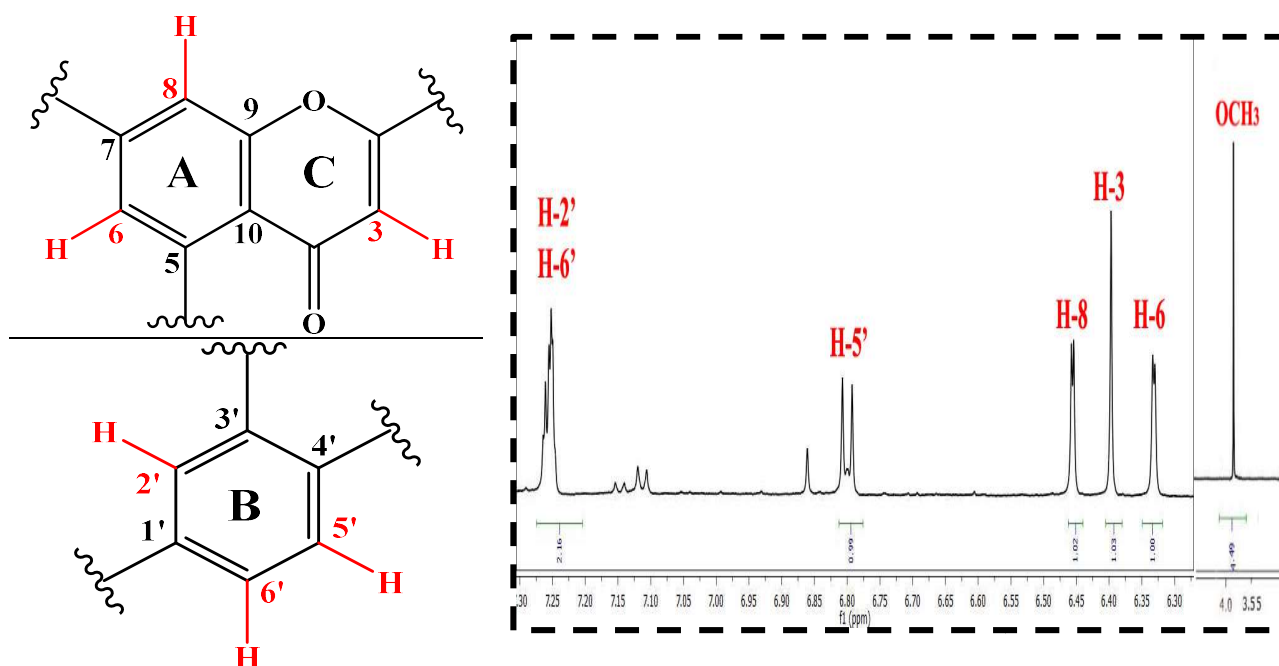


Figure III-19 : Spectre de RMN 1H du composé OC3

Le spectre de RMN ^{13}C DEPTQ (Figure III-20) permet de caractériser tous les carbones de cette flavone.

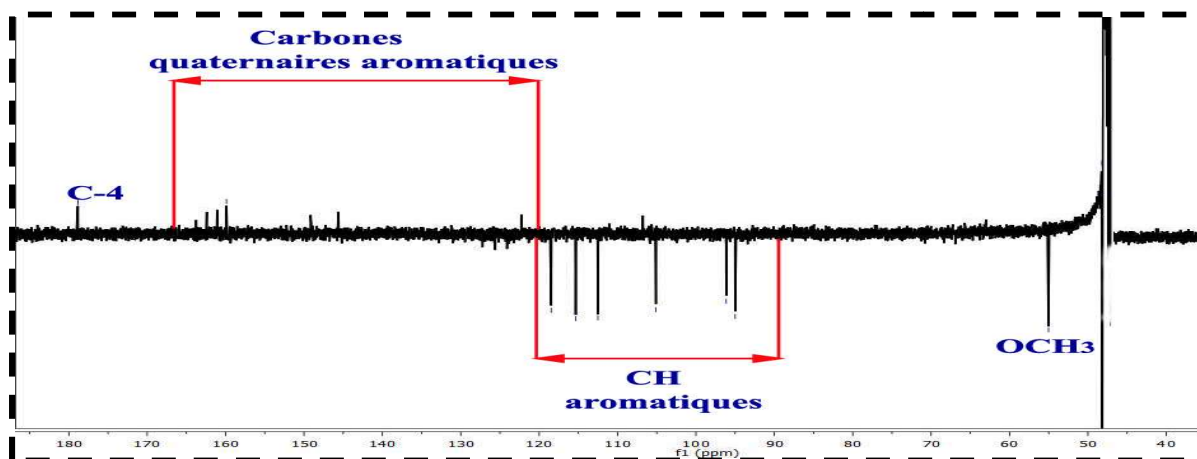


Figure III-20 : Spectre RMN ^{13}C DEPTQ du composé OC3

La localisation du groupement OCH_3 en C-5 de la flavone est déterminée par l'expérience HMBC (Figure III-23) qui révèle une corrélation entre les protons de ce dernier (δ_{H} 3,91, s) et le carbone C-5 (δ_{C} 164,2).

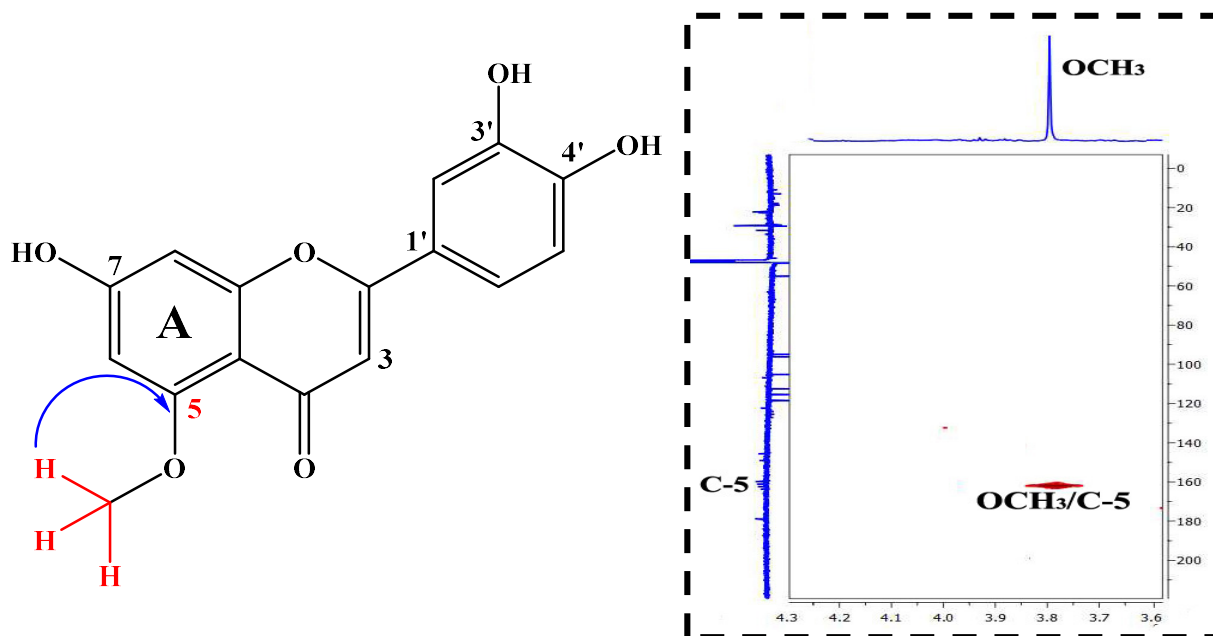
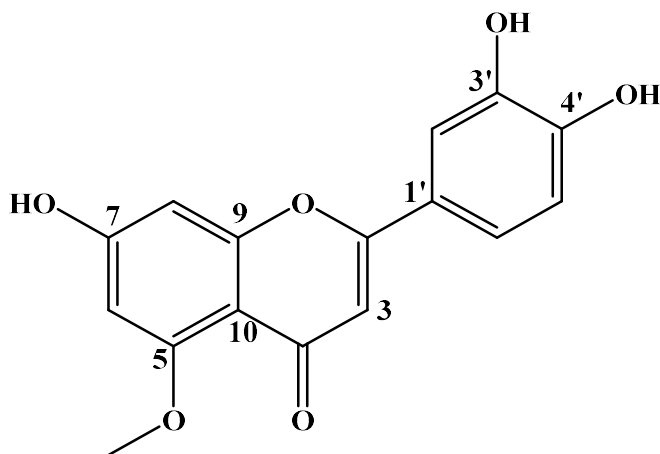


Figure III-23 : Spectre HMBC du composé OC3

L'analyse spectrale, comparée aux données de la littérature [66], a permis d'élucider la structure du composé **OC3** (7,3',4'-trihydroxy-5-méthoxyflavone).



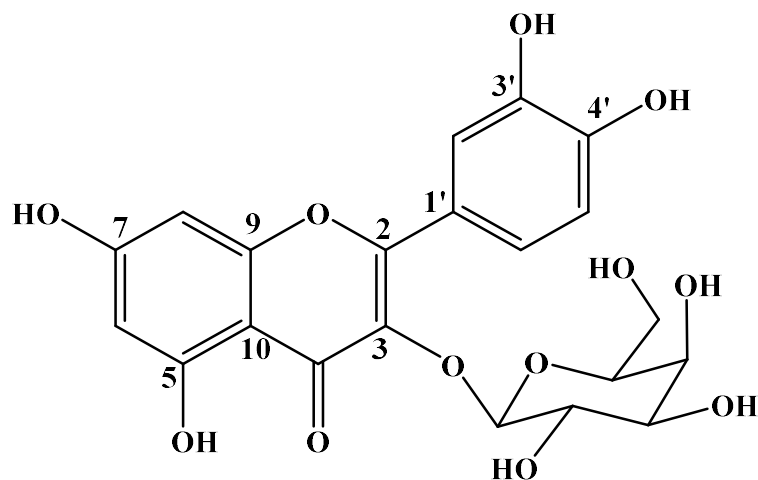
Ce composé connu sous le nom lutéoline 5-méthyl éther, a été isolé antérieurement des espèces Fabaceae comme *Medicago varia* [67]. Il est cité pour la première fois dans le genre *Onobrychis*.

Le tableau III-3 englobe les valeurs de déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé.

Tableau III-3 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé OC3 (MeOD)

Position	RMN ^1H δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
2	-	161,1
3	6,40 (<i>s</i>)	105,1
4	-	178,8
5	-	162,4
6	6,33 (<i>d</i> , 2,1)	96,1
7	-	163,7
8	6,46 (<i>d</i> , 2,1)	94,9
9	-	159,9
10	-	106,8
1'	-	122,3
2'	7,35 (<i>m</i>)	112,5
3'	-	145,6
4'	-	149,2
5'	6,80 (<i>d</i> , 8,8)	115,3
6'	7,26 (<i>m</i>)	118,5
5-OMe	3,91 (<i>s</i>)	55,0

III-1-4-4-Détermination structurale du composé OC4

Quercétine 3-*O*- β -D-galactopyranoside (Hyperoside)

Le spectre de masse à haute résolution HR-ESIMS du composé **OC4** enregistré en mode négatif (Figure III-24) exhibe un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 463,0854$ $[M-H]^-$, suggérant une masse moléculaire égale à 464 uma et une formule brute en $C_{21}H_{20}O_{12}$.

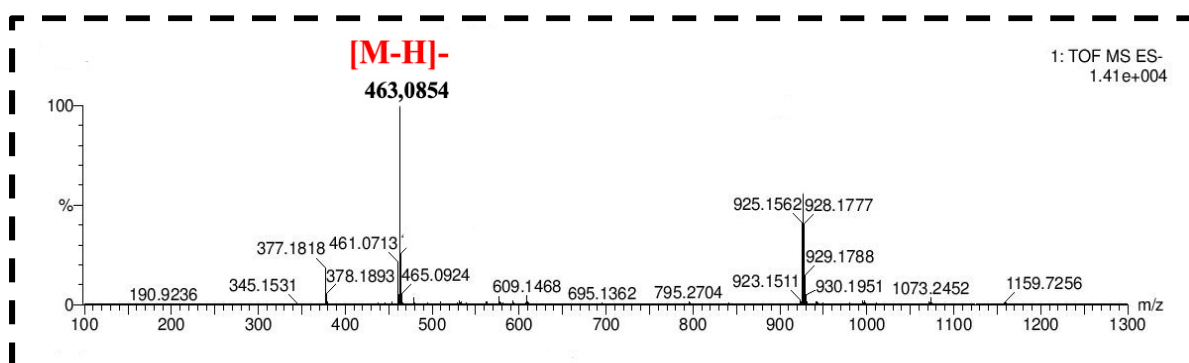


Figure III-24 : Spectre de masse HR-ESIMS (mode négatif) du composé OC4

L'analyse des spectres RMN 1H et RMN ^{13}C DEPT (Figures III-25 et 27), supportée par les expériences COSY H-H, HSQC et HMBC et spectrométrie de masse, montre clairement que la structure du composé est strictement similaire à celle composé **HH7** identifié précédemment et isolé de la plante *H. hirtum* (Figures III-26 et 28).

Elle est constituée d'une même génine (quercétine) porteuse d'une unité osidique en C-3.

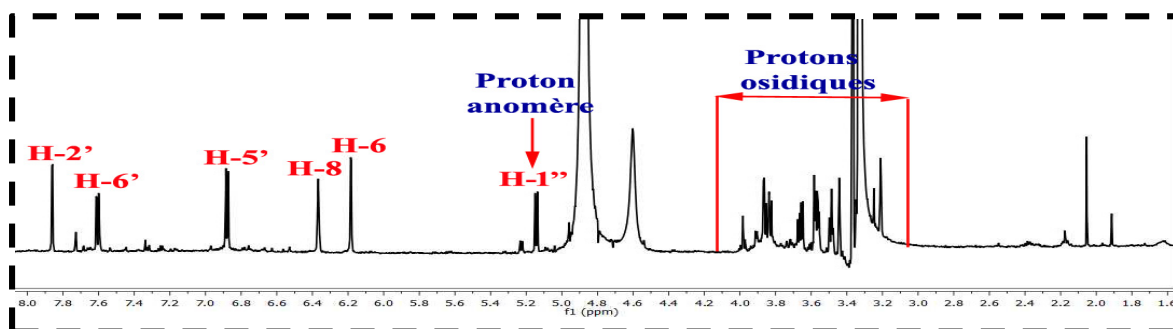


Figure III-25 : Spectre RMN ^1H du composé OC4

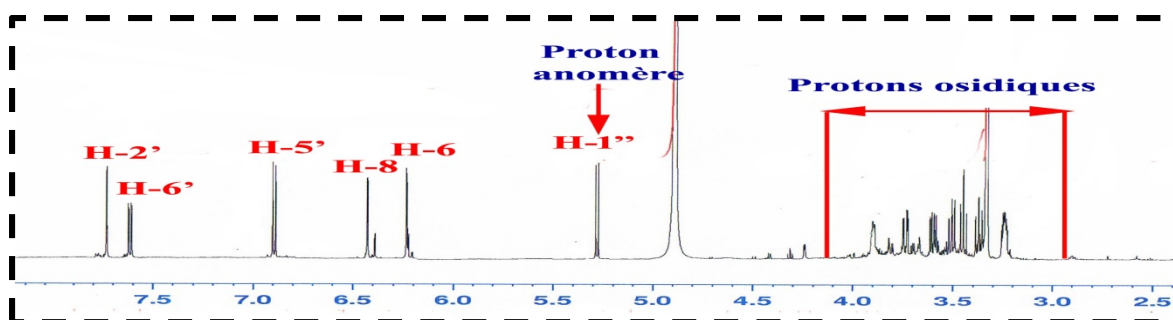


Figure III-26 : Spectre RMN ^1H du composé HH7

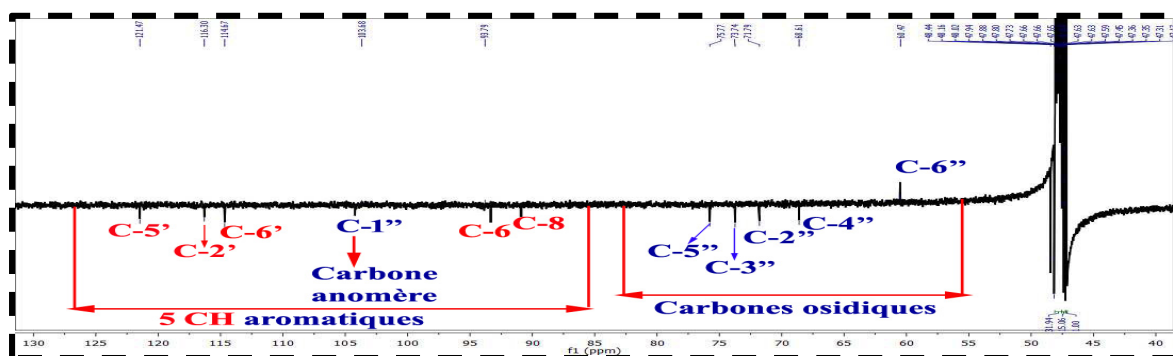


Figure III-27 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé OC4

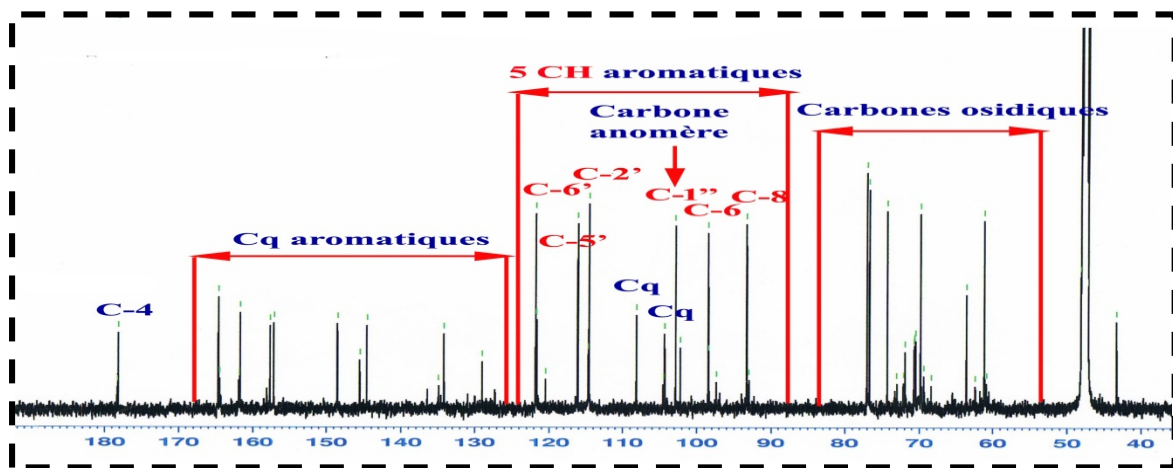


Figure III-28 : Spectre RMN ^{13}C du composé HH7

L'unique différence réside au niveau de la valeur de déplacement chimique du carbone C-4'' de l'unité osidique résonant à δ_C 68,6. Cette valeur permet d'identifier un β -D-galactose au lieu d'un β -D-glucose [68].

La tache de corrélation visualisée sur le spectre HMBC (Figure III-29) entre le proton anomérique H-1'' (5,17 ppm) du β -D-galactose et le carbone C-3 (δ_C 134,5), confirme l'attachement de l'unité osidique en position 3 de la quercétine.

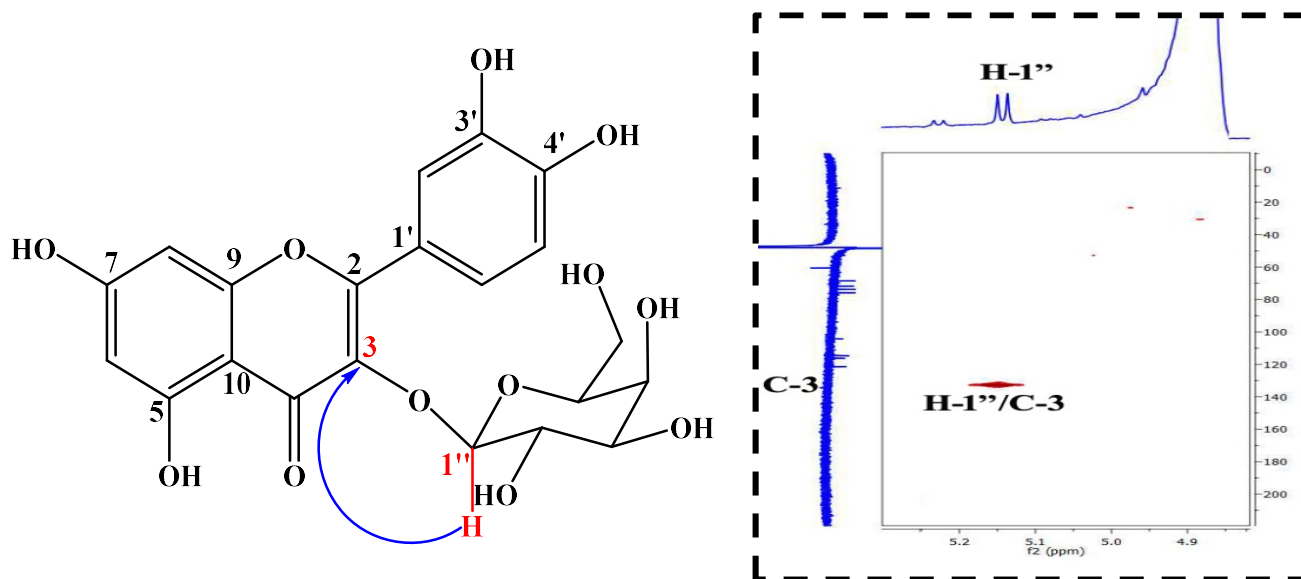
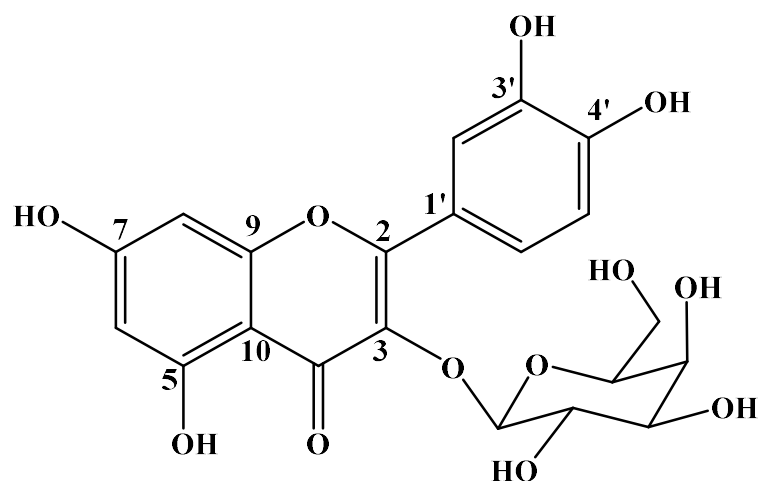


Figure III-29 : Spectre HMBC du composé OC4

L'ensemble de ces données ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [69], permettent d'assigner pour le composé OC4 la structure suivante :



Quercétine 3-O- β -D-galactopyranoside

Ce composé connu sous le nom de hyperoside, a été rencontré dans certaines

espèces de la famille Fabaceae comme *Hedysarum sericeum* et *Hedysarum caucasicum* [70]. Il est décrit pour la première fois dans le genre *Onobrychis*.

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **OC4** sont récapitulés dans le tableau III-4.

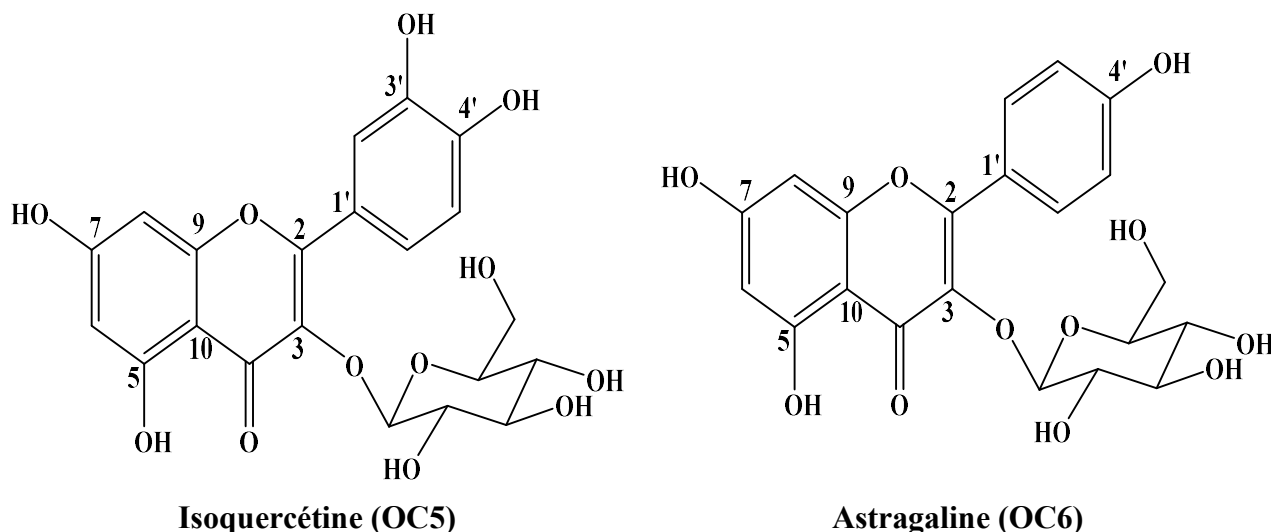
Tableau III-4 : Données RMN ¹H et ¹³C du composé OC4 (MeOD)

Position	RMN ¹ H	RMN ¹³ C
	δ_H (m, J en Hz)	δ_C (ppm)
2	-	156,8
3	-	134,5
4	-	176,8
5	-	164,2
6	6,18 (d, 2,1)	93,0
7	-	161,7
8	6,37 (d, 2,1)	89,0
9	-	159,1
10	-	105,0
1'	-	120,9
2'	7,86 (d, 2,2)	116,3
3'	-	141,8
4'	-	149,5
5'	6,88 (d, 8,4)	114,6
6'	7,61 (dd, 2,2; 8,5)	121,5
1''	5,11 (d, 7,8)	104,9
2''	3,88 (m)	71,8
3''	3,55 (m)	73,7

4''	3,95 (m)	68,6
5''	3,48 (m)	75,8
6''	3,58 (m) 3,65 (dd, 6,1; 11,2)	60,5

III-1-4-5- Détermination structurale des composés OC5 et OC6

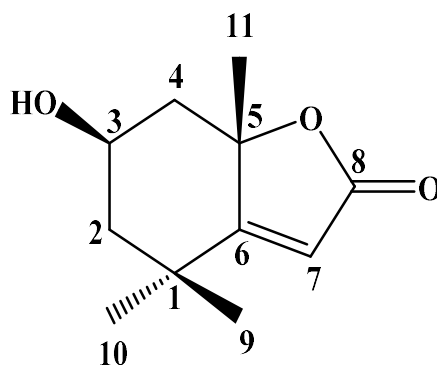
La détermination structurale a permis d'identifier deux composés, isoquercétine et astragaline, décrits précédemment dans l'étude de l'espèce *Helianthemum hirtum ssp. ruficomum*.



Le composé **OC5** a été isolé précédemment de l'espèce *Onobrychis viciifolia* [43].

Le composé **OC6** a été rencontré dans les espèces du genre *Onobrychis* comme *O. bobrovii* [71], *O. arenaria* et *O. viciifolia* [72, 45].

III-1-4-6- Détermination structurale du composé OC7



Loliolide

Le spectre de masse à haute résolution HR-ESIMS (mode négatif) du composé **OC7** révèle un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 437,2059$ $[(2M+HCOOH)-H]^-$ (Figure III-29), soit une masse moléculaire de 196 uma impliquant une formule brute en $C_{11}H_{16}O_3$. Formule qui atteste de la nature monoterpénique du composé.

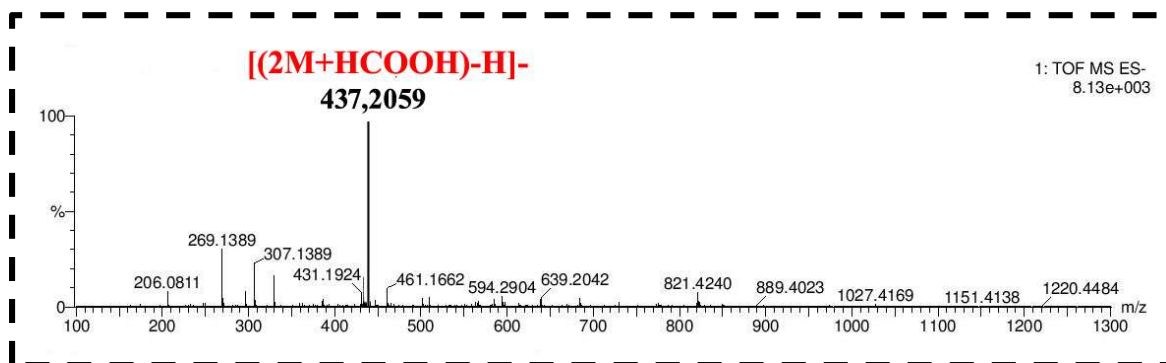


Figure III-29 : Spectre HR-ESIMS (mode négatif) du composé **OC7**

Le spectre RMN ^{13}C DEPTQ (Figures III-30) confirme la nature terpénique du composé **OC7** par la présence de onze carbones constitués de :

- ⊙ trois carbones de groupements méthyliques à δ_C 26,3 (C-9), 26,8 (C-11) et 30,3 (C-10).
- ⊙ deux carbones méthyléniques (CH_2) à δ_C 47,3 (C-2) et 45,8 (C-4).
- ⊙ un carbone éthylénique (CH) repéré à δ_C 112,7 (C-7).
- ⊙ deux carbones oxygénés à δ_C 66,6 (C-3) et 88,6 (C-5).
- ⊙ trois carbones quaternaires à δ_C 37,5 (C-1), 185,0 (C-6) et 173,0 (C-8). Ce dernier est caractéristique d'un carbone carbonyle d'une lactone.

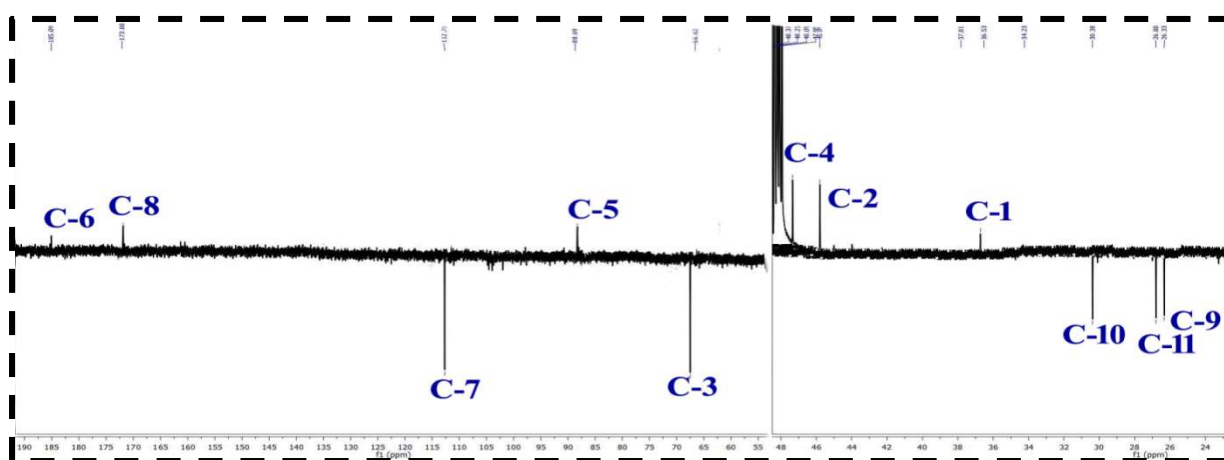


Figure III-30 : Spectre RMN ^{13}C DEPTQ du composé **OC7**

Le spectre RMN ^1H (Figure III-31) enregistré dans MeOD, indique la présence de :

- ▣ trois signaux dans la région des champs forts à δ_{H} 1,29 (3H, *s*, H-9), 1,48 (3H, *s*, H-10) et 1,78 (3H, *s*, H-11) révélant la présence de trois groupements méthyles.
- ▣ deux signaux blindés à δ_{H} 1,55 (1H, *dd*, $J = 3,7; 11,8$ Hz, H-2a) et 2,00 (1H, *dd*, $J = 2,7; 11,8$ Hz, H-2b) caractéristiques de deux protons géminés non équivalents.
- ▣ deux signaux à δ_{H} 1,76 (1H, *dd*, $J = 4,3; 11,7$ Hz, H-4a), 2,44 (1H, *dd*, $J = 2,3; 11,7$ Hz, H-4b) de deux autres protons géminés non équivalents.
- ▣ un signal à δ_{H} 4,24 (1H, *m*, H-3) d'un proton porté par un carbone oxyméthine.
- ▣ un signal déblindé à δ_{H} 5,77 (1H, *s*, H-7) d'un proton éthylénique.

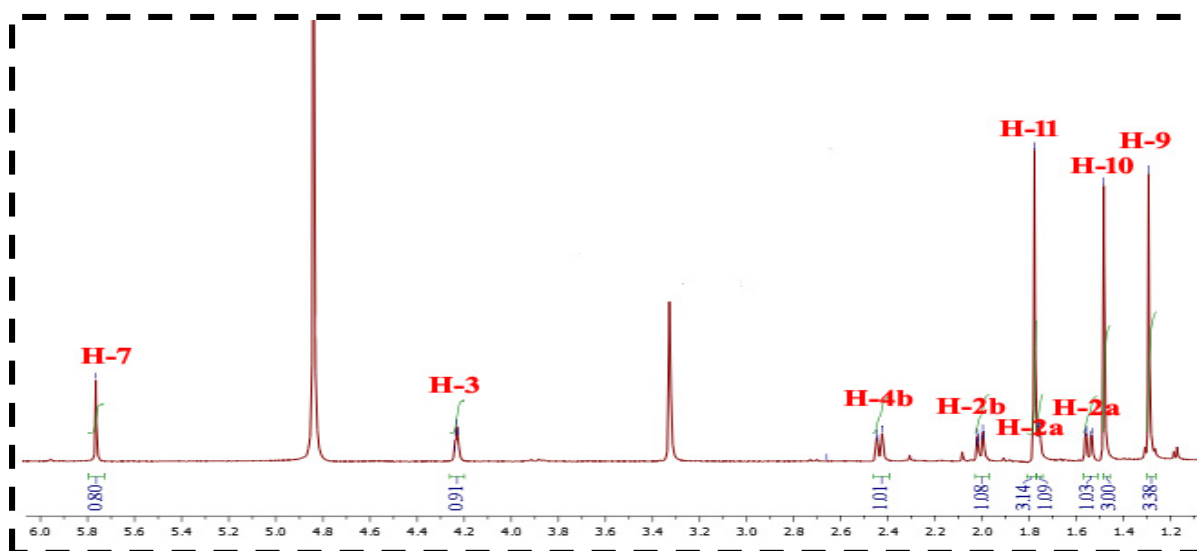
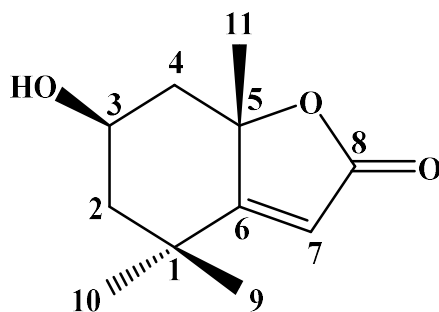


Figure III-31 : Spectre RMN ^1H du composé OC7

Ces données, appuyées par l'analyse des spectres COSY H-H, HMBC et HSQC (Figures III-32, 33 et 34), sont identiques à celles d'un composé nommé loliolide [73].



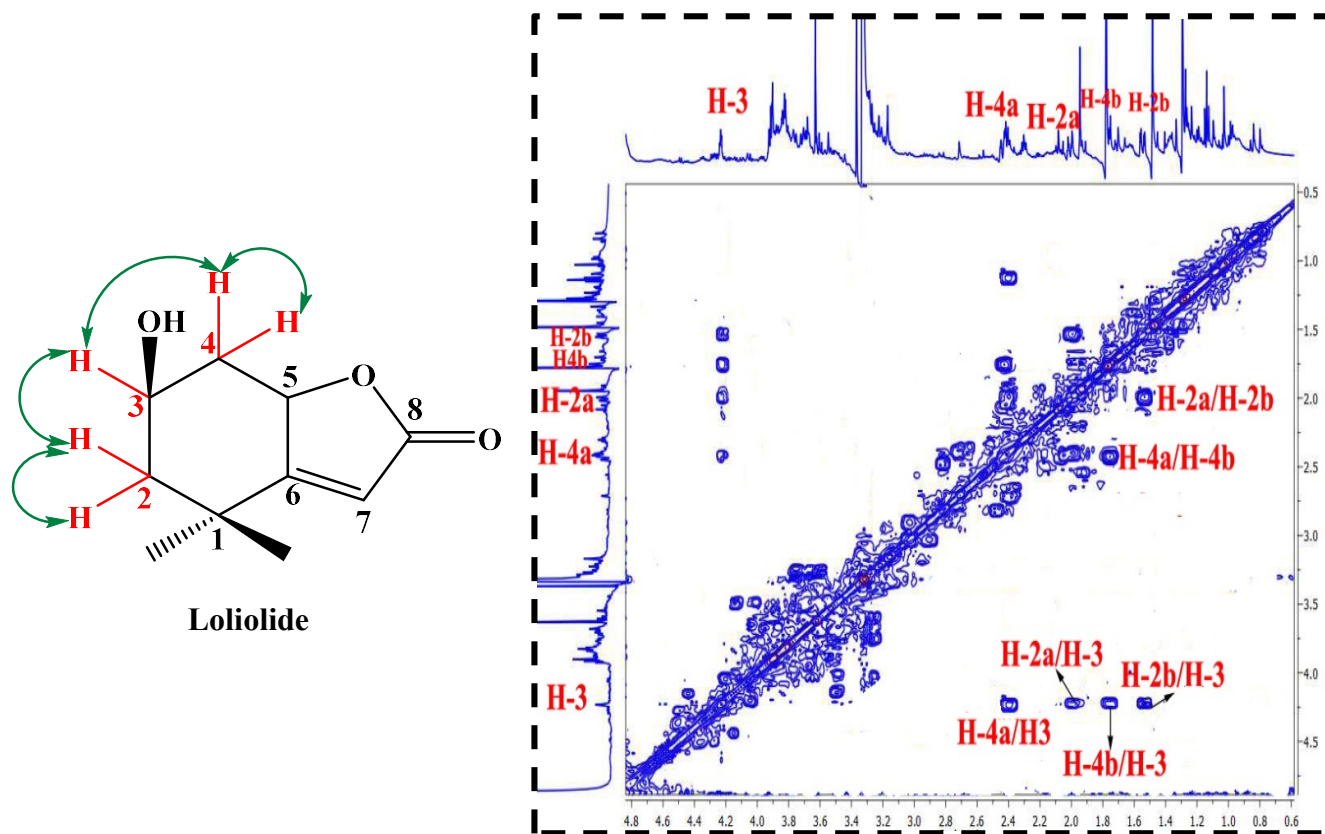


Figure III-32 : Spectre COSY H-H du composé OC7

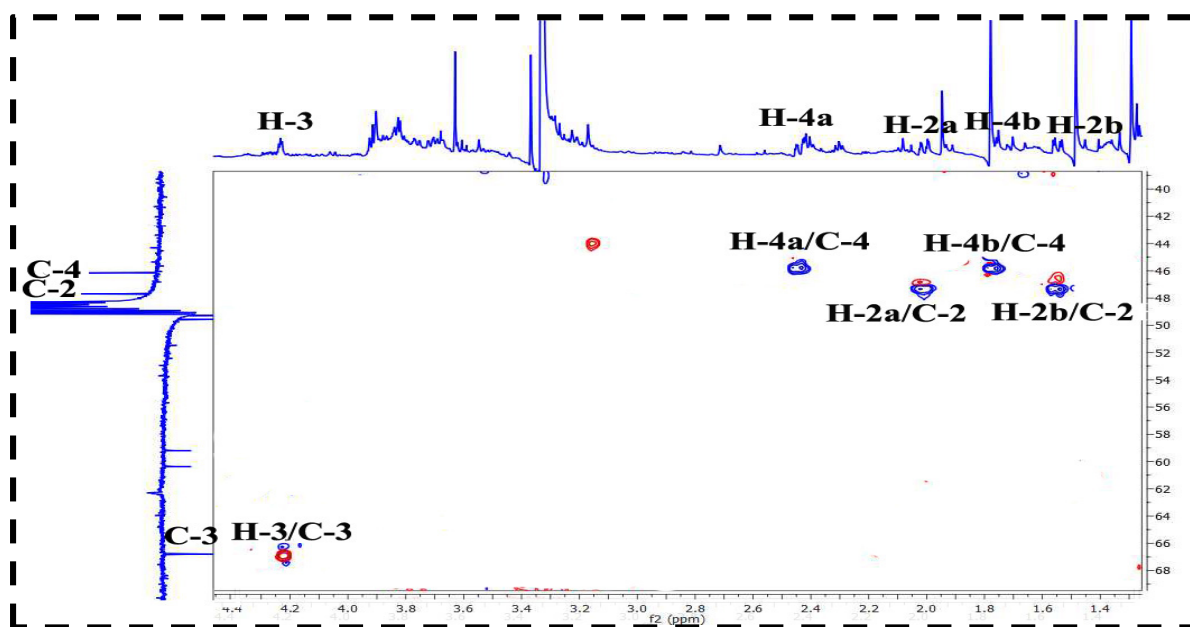


Figure III-33 : Spectre HSQC du composé du composé OC7

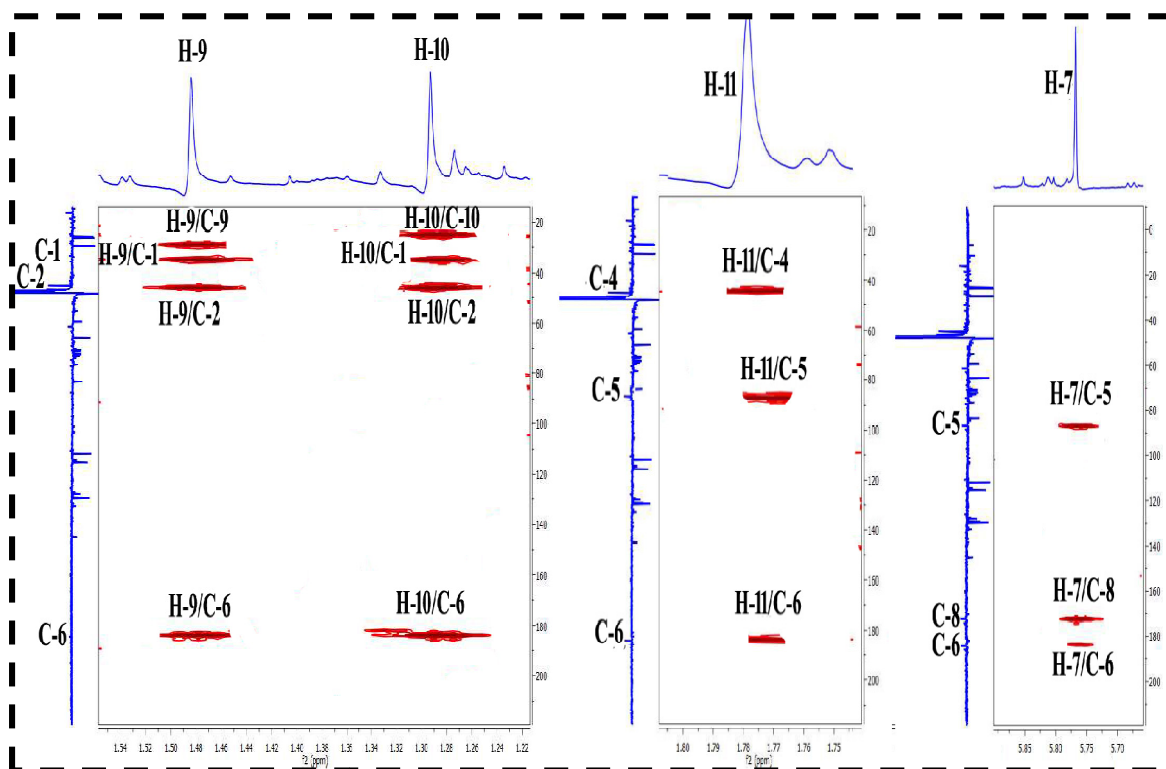


Figure III-34 : Spectre HMBC du composé OC7

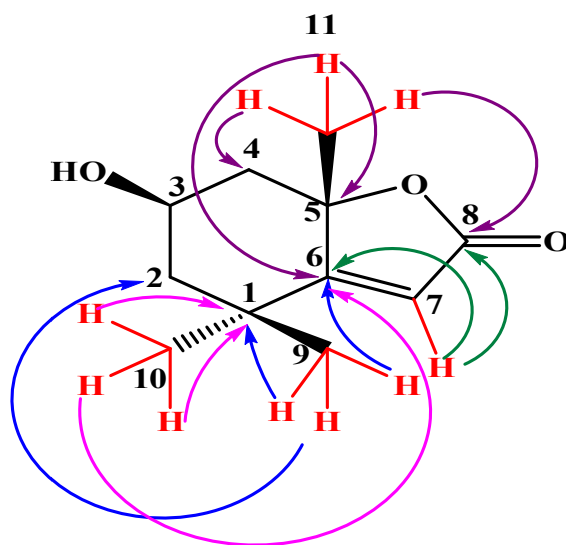


Figure III-35 : Corrélations HMBC du composé OC7

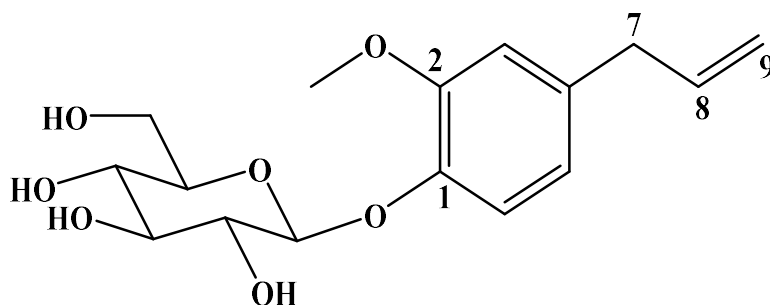
Il a été rencontré dans un certain nombre d'espèces Fabaceae comme *Cassia laevigata* [74], *Medicago sativa* [75], *Pueraria lobata* [76], *Lonchocarpus atropurpureus*, *L. oliganthus*, et *L. montevidis* [77]. Il est détecté pour la première fois dans le genre *Onobrychis*.

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

Tableau III-5 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé OC7 (MeOD)

Position	RMN ^1H δ_{H} (m, J en Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
1	-	36,5
2	1,55 (dd, 3,7; 11,7)	47,3
	2,00 (dd, 2,7; 11,7)	
3	4,24 (m)	66,6
4	1,76 (dd, 4,3; 11,8)	45,8
	2,44 (dd, 2,3; 11,8)	
5	-	88,6
6	-	185,0
7	5,77 (s)	112,7
8	-	173,0
9	1,29 (s)	26,0
10	1,48 (s)	30,3
11	1,78 (s)	26,8

III-1-4-7- Détermination structurale du composé OC8

Eugényl *O*- β -D-glucopyranoside (Citrusine C)

Le spectre de masse à haute résolution (HR-ESIMS) du composé **OC8** enregistré en mode négatif (Figure III-36), présente un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 371,1328$ $[(M+HCOOH)-H]^-$, en accord avec une masse moléculaire de 326 uma et une formule brute en $C_{16}H_{22}O_7$.

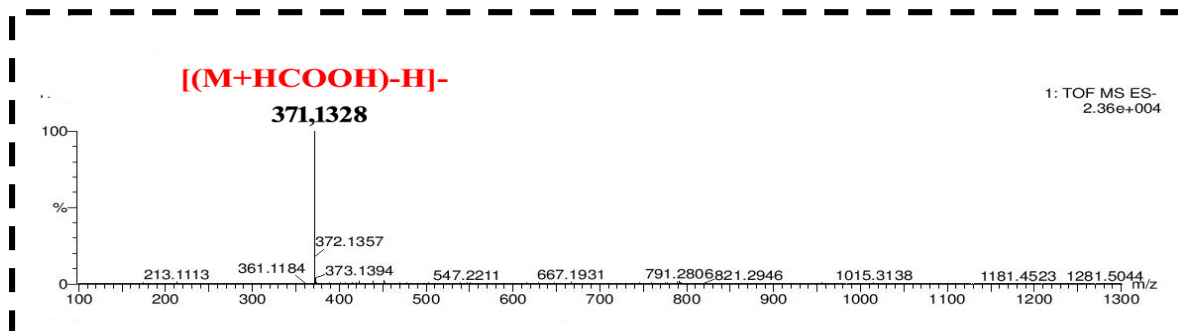


Figure III-36 : Spectre HR-ESIMS (mode négatif) du composé **OC8**

Les spectres RMN 1H et HSQC (Figure III-37 et III-41) enregistrés dans MeOD, révèlent des signaux de protons et carbones aromatiques résonant entre 6,80/112,7 et 7,10/120,6 ppm, oléfiniques entre 5,05/114,3 et 5,95/137,6 ppm. Ces spectres mettent aussi en évidence la présence d'un groupement OCH_3 à travers un singulet d'intégration 3H détecté à δ_H 3,84/55,2, deux protons méthyléniques localisés à 3,35/39,3 ppm, de signaux de protons sortant entre 3 et 4 ppm d'une unité osidique. Son proton anomère (enveloppé par le pic du méthanol) repéré 4,85 ppm (1H, *nd*) est mis en évidence par l'analyse COSY H-H (Figure III-45).

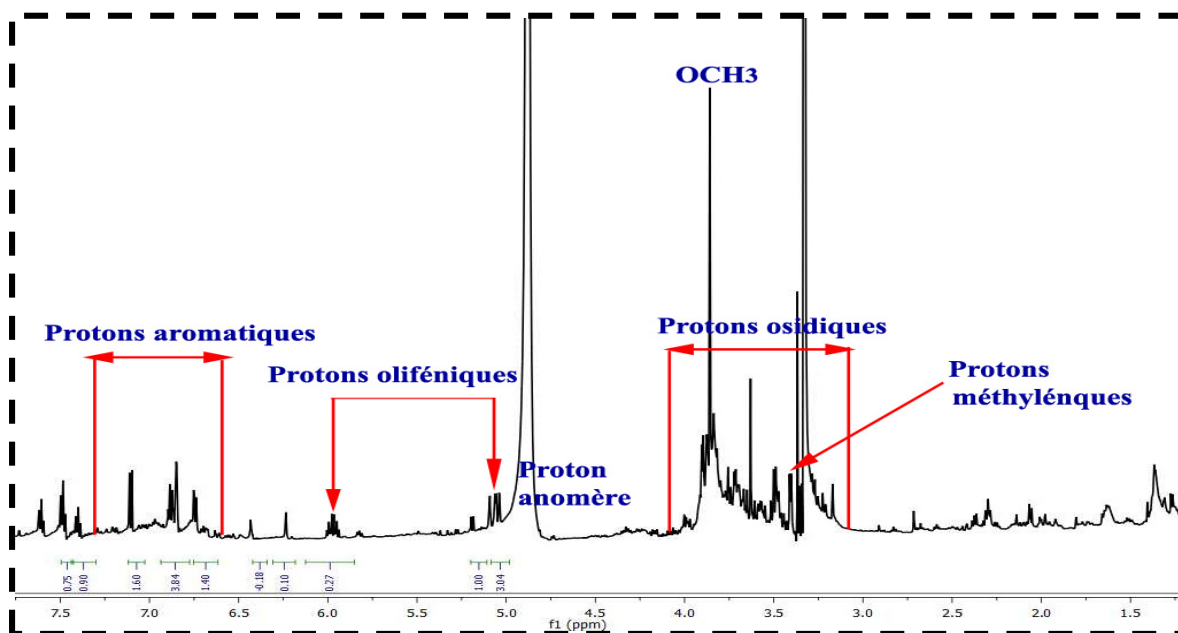


Figure III-37 : Spectre RMN 1H du composé **OC8**

Le spectre RMN ^{13}C J -modulé (Figure III-38) de ce composé montre la présence de :

- signaux de carbones aromatiques résonant à δ_{C} 149,2 (C), 145,0 (C), 116,8 (CH), 135,0 (C), 120,6 (CH) et 112,7 (CH).
- deux signaux de carbones oléfiniques sortant à δ_{C} 137,6 (CH) et 114,3 (CH₂).
- un signal de carbone méthylénique (CH₂) repéré à δ_{C} 39,35.
- un signal de groupement méthoxyle à δ_{C} 55,2.
- six signaux CH résonant entre 61 et 102 ppm, de carbones de l'unité osidique.

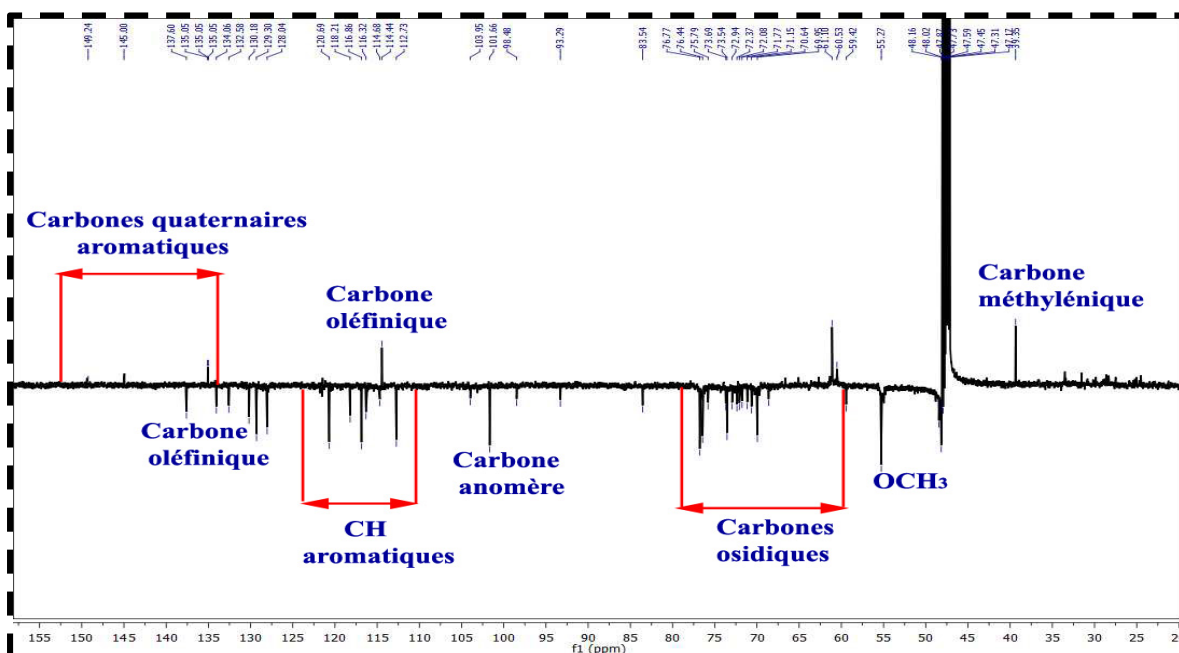
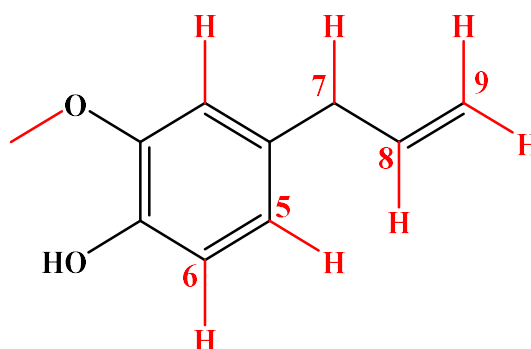


Figure III-38 : Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé OC8

Ces données nous rapprochent d'un composé aromatique nommé eugénol.



On reconnaît sur le spectre RMN ^1H (Figures III-39) :

- ▣ les signaux des trois protons H-3 (1H, δ_{H} 6,86, *d*, $J = 1,6$ Hz), H-5 (1H, δ_{H} 6,72, *dd*, $J = 2,0; 8,2$ Hz) et H-6 (1H, δ_{H} 7,09, *d*, $J = 8,1$ Hz) du noyau aromatique.
- ▣ les signaux des trois protons oléfiniques H-8 (1H, δ_{H} 5,95, *ddt*, $J = 6,6; 10,0; 16,8$ Hz) et H-9 (1H, δ_{H} 5,08, *dd*, $J = 1,6; 17,0$ Hz) et 5,05 (1H, $J = 1,6; 10,0$ Hz).
- ▣ le signal des protons méthoxyliques (3H, δ_{H} 3,84, *s*).
- ▣ Le signal des protons méthyléniques (2H, *d*, δ_{H} 3,35, $J = 6,4$ Hz).

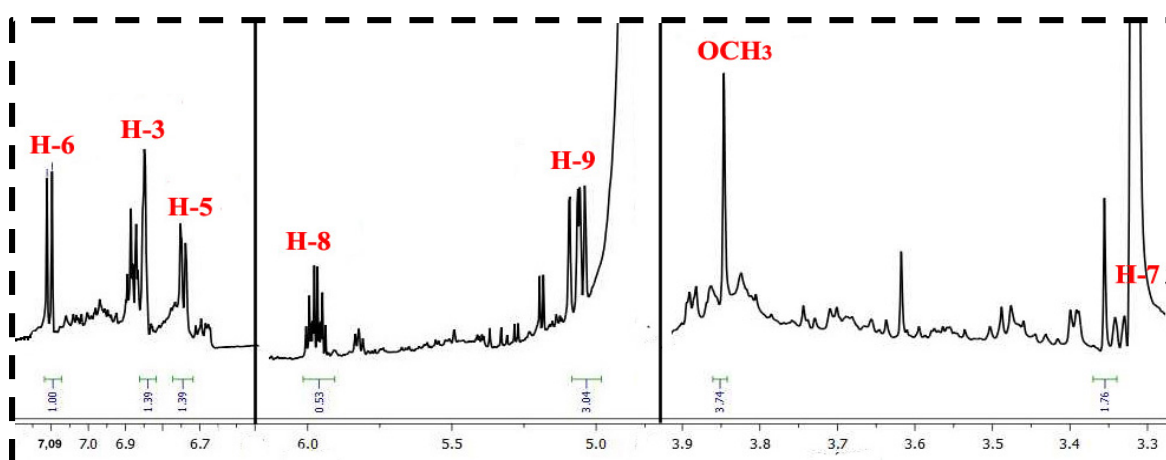


Figure III-39 : Spectre RMN ^1H du composé OC8

L'expérience COSY H-H (Figure III-40) montre clairement les deux systèmes de spins constituant les protons cités précédemment.

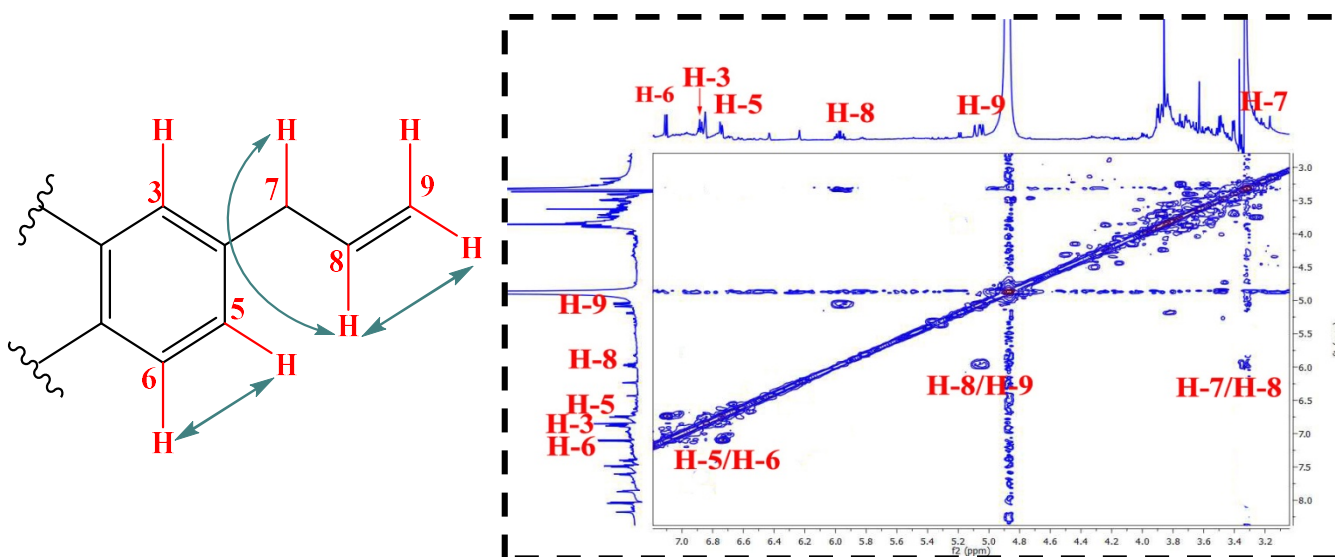


Figure III-40 : Spectre COSY H-H du composé OC8

Les déplacements chimiques des carbones porteurs des protons déjà cités sont déterminés par analyse du spectre HSQC (Figure III-41) à δ_C 116,8 (C-3), 120,6 (C-5), 112,7 (C-6), 39,3 (C-7), 137,6 (C-8), 114,3 (C-9) et -OCH₃ à δ_C 55,2.

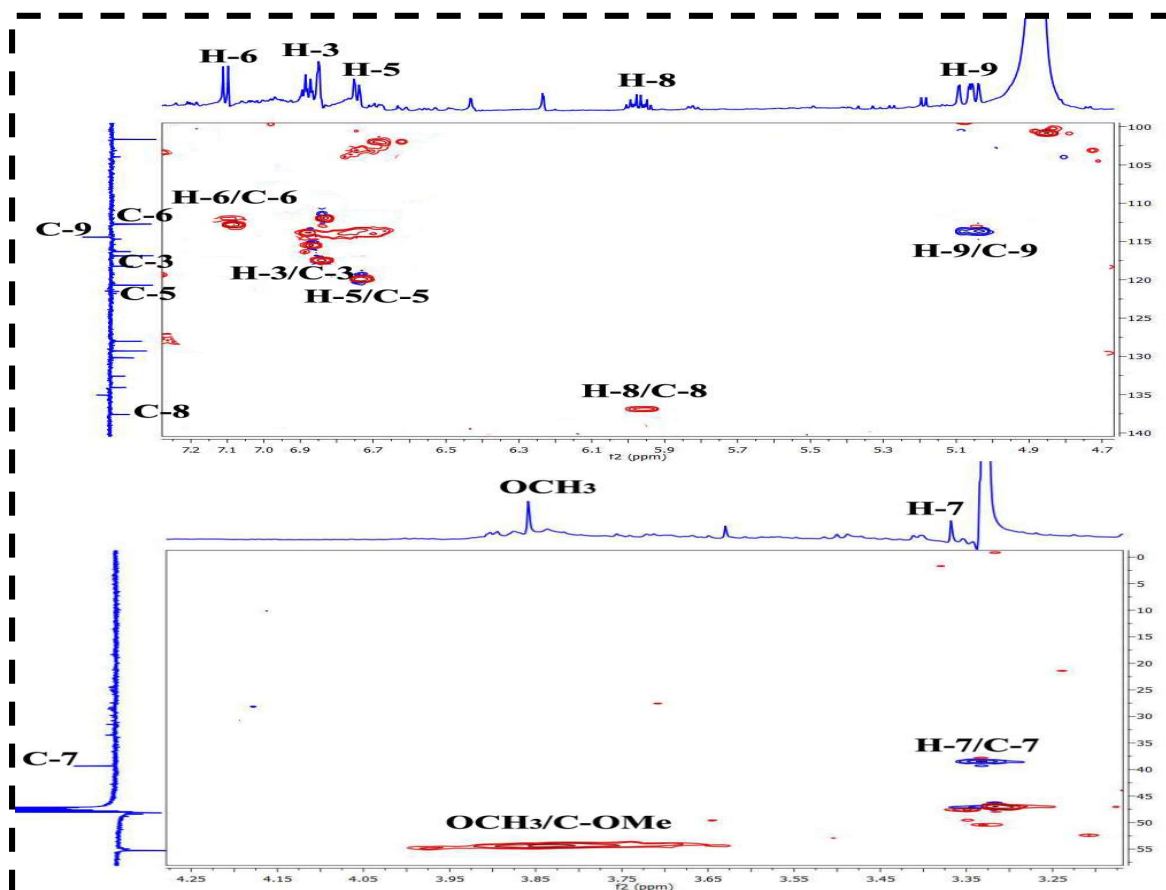


Figure III-41 : Spectre HSQC du composé OC8

Le spectre HMBC (Figures III-42 et 43) conduit à attribuer les autres carbones du noyau aromatique, et également de localiser les différents substituants sur ce dernier à travers les corrélations qu'ils présentent entre :

- ⊙ les protons H-3, H-5 et H-6 et un carbone quaternaire sortant à 145,0 ppm, attribuable au carbone oxygéné C-1.
- ⊙ les deux protons H-3 et H-5 et un carbone résonant à δ_C 39,3 attribué au carbone C-7.
- ⊙ le proton H-6 et un carbone quaternaire oxygéné résonant à δ_C 149,2 correspondant au carbone C-2.
- ⊙ les protons de groupement méthoxyle (3,84 ppm) et le carbone aromatique C-2 (δ_C 149,2).

- ⊙ les deux protons H-8, H-9 et le carbone C-7 (δ_C 39,3).
- ⊙ le proton H-7 et un carbone aromatique quaternaire localisé à δ_C 135,0, s'accordant au carbone C-4 du noyau aromatique.

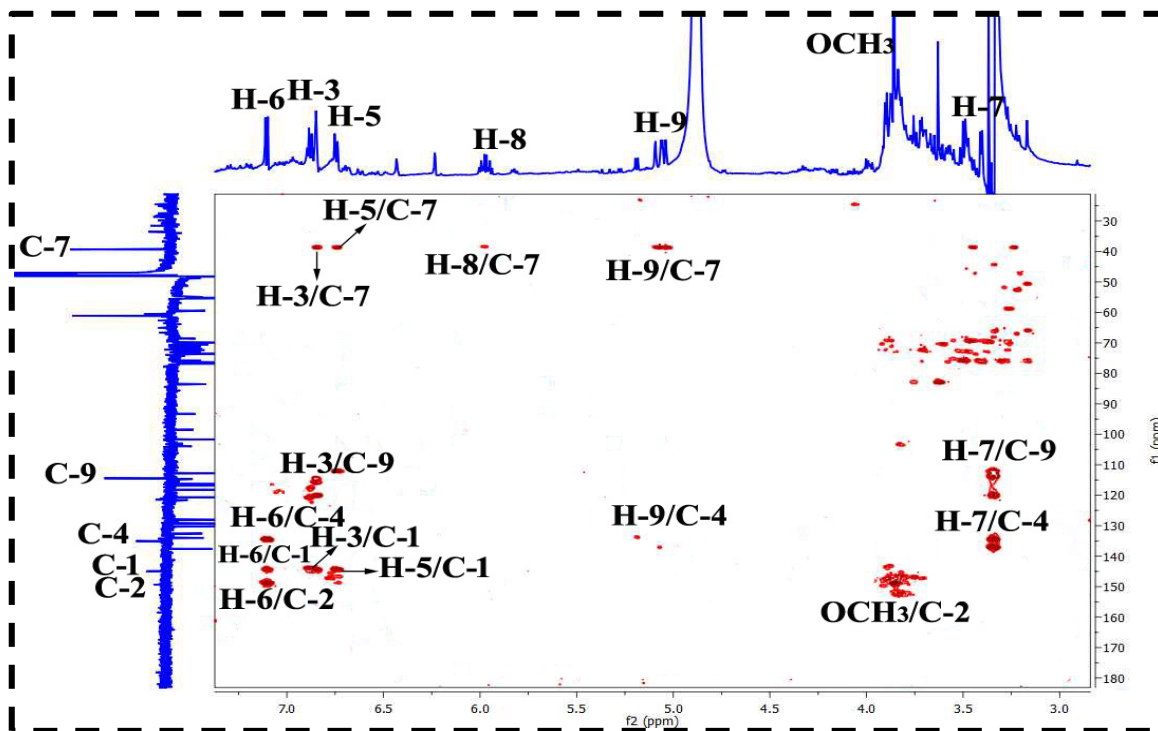


Figure III-42 : Principales corrélations HMBC du composé OC8

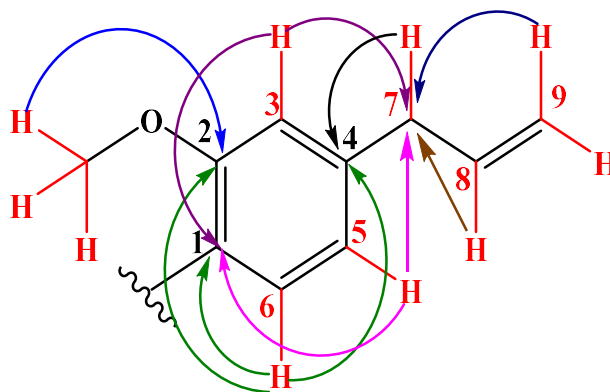


Figure III-43 : Corrélations HMBC du composé OC8

L'identification de l'unité osidique est basée principalement sur l'analyse du spectre COSY H-H (Figure III-44), qui met en évidence la présence de sept protons d'un hexose.

Les grandes valeurs de constantes de couplage conduisent à identifier cet hexose à un glucose de configuration β .

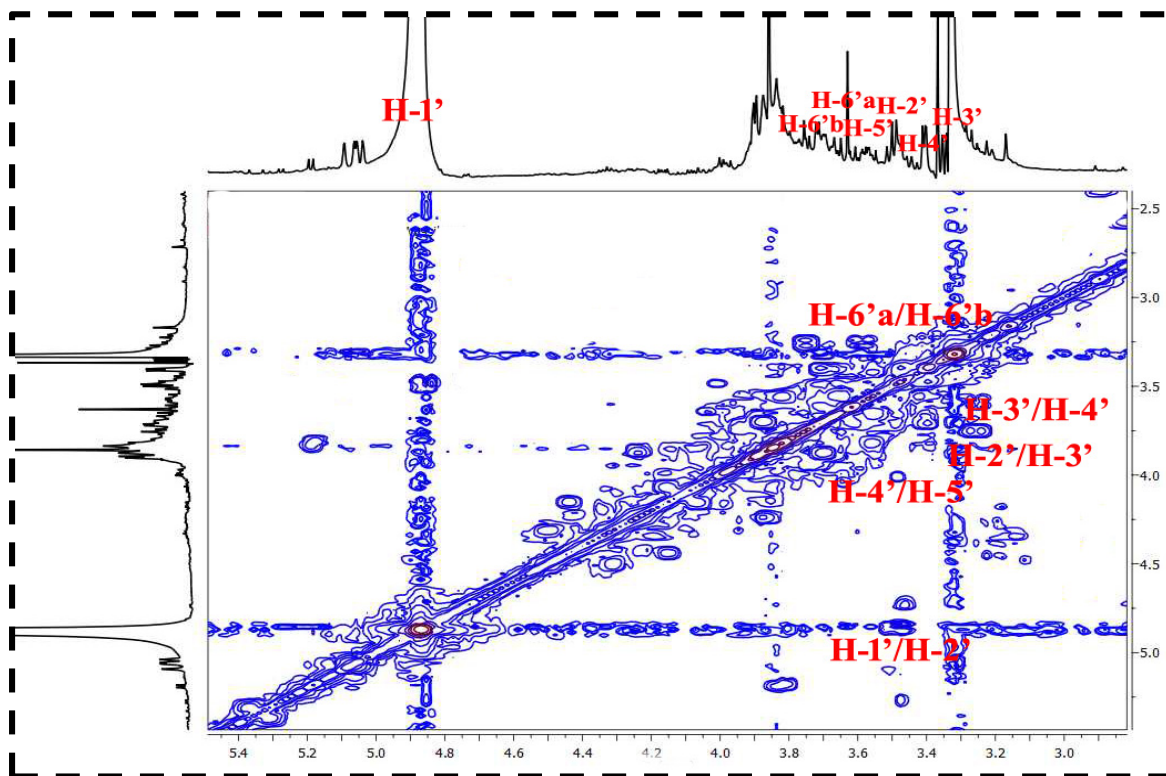


Figure III-44 : Spectre COSY H-H de l'unité osidique du composé OC8

L'expérience HMBC (Figure III-45) montre une tache de corrélation entre le proton anomère H-1' (δ_H 4,85, *nd*) du β -D-glucose et le carbone aromatique quaternaire C-1 (δ_C 145,0), indiquant son attachement en cette position.

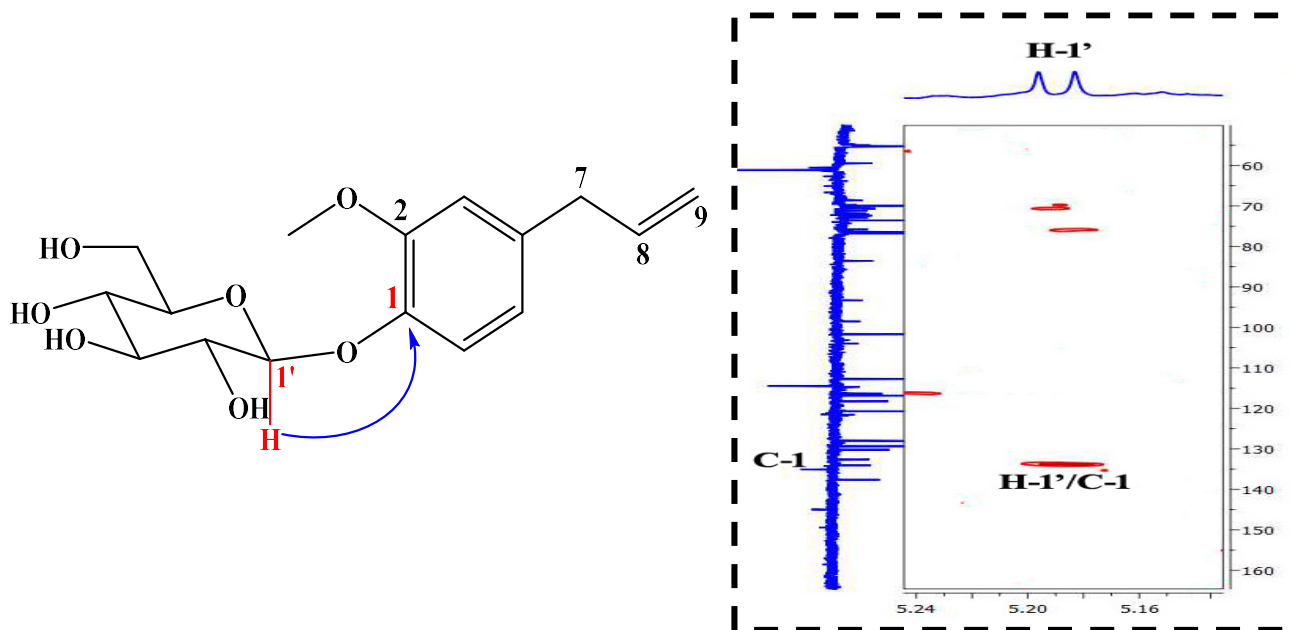
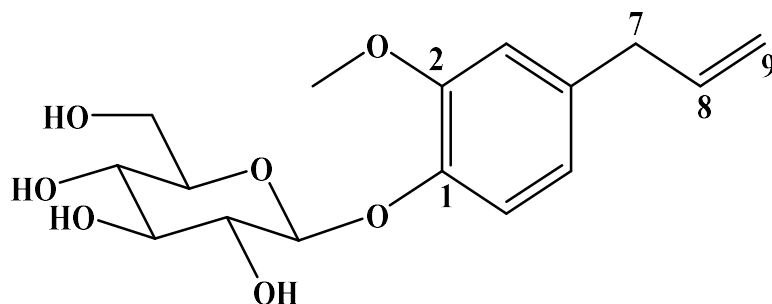


Figure III-45 : Spectre HMBC montrant l'attachement du β -glucose (Composé OC8)

Toutes ces données spectroscopiques, permettent d'attribuer pour le composé **OC8** la structure suivante [78] :



Eugényl *O*- β -D-glucopyranoside

Ce composé appelé aussi citrusine C, a été isolé antérieurement des espèces de la famille Fabaceae comme *Ononis angustissima* [79]. Il est rencontré pour la première fois dans le genre *Onobrychis*.

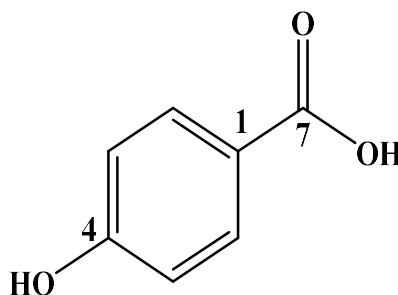
Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **OC8** sont reportés dans le tableau III-6.

Tableau III-6 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé **OC8** (MeOD)

Position	RMN ^1H δ_{H} (m, J en Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
1	-	145,0
2	-	149,2
3	6,86 (d, 1,6)	116,8
4	-	135,0
5	6,72 (dd, 2,0; 8,2)	120,6
6	7,09 (d, 8,1)	112,7
7	3,35 (d, 6,4)	39,3
8	5,95 (ddt, 6,6; 10,0; 16,8)	137,6
9	5,05 (dd, 1,6; 10,0)	114,3
	5,08 (dd, 1,6; 17,0)	

2-OMe	3,84 (s)	55,2
1'	4,85 (nd)	101,6
2'	3,48 (t, 8,0)	73,5
3'	3,41 (m)	76,4
4'	3,36 (t, 8,2)	70,0
5'	3,46 (m)	76,7
6'	3,55 (m)	61,1
	3,66 (dd, 5,6; 11,6)	

III-1-4-8- Détermination structurale du composé OC9



Acide 4-hydroxybenzoïque

Le spectre de masse à haute résolution (HR-ESIMS) du composé **OC9** enregistré en mode négatif (Figure III-46), montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 137,022$ $[M-H]^-$, correspondant à une masse moléculaire de 138 uma et une formule brute en $C_7H_6O_3$.

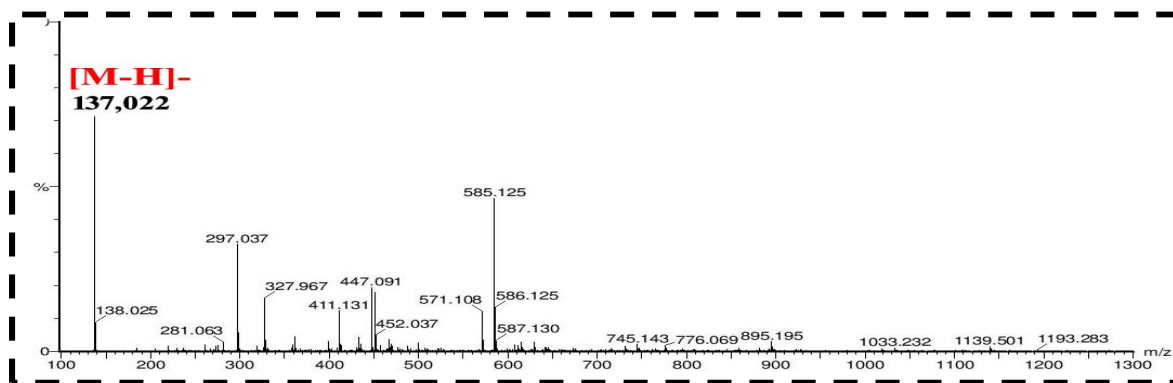


Figure III-46 : Spectre HR-ESIMS (mode négatif) du composé OC9

Le spectre RMN ^1H (Figure III-47) enregistré dans le MeOD présente deux signaux à δ_{H} 7,14 (2H, *d*, $J = 8,7$ Hz, H-3/H-5) et 7,97 (2H, *d*, $J = 8,6$ Hz, H-2/H-6) attestant de la présence d'un noyau aromatique paradisubstitué.

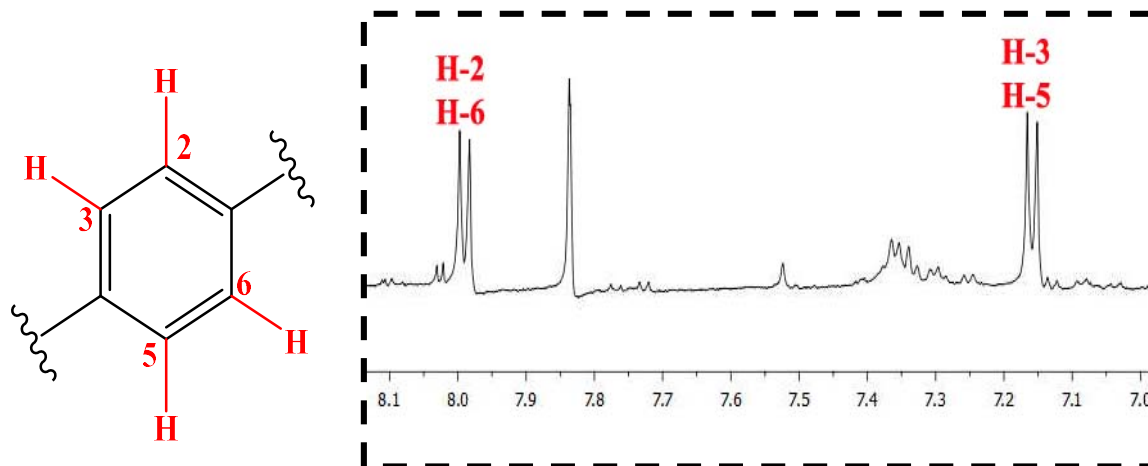


Figure III-47 : Spectre RMN ^1H du composé OC9

Leurs carbones sont déterminés aisément par l'analyse du spectre RMN ^{13}C DEPT (Figure III-48).

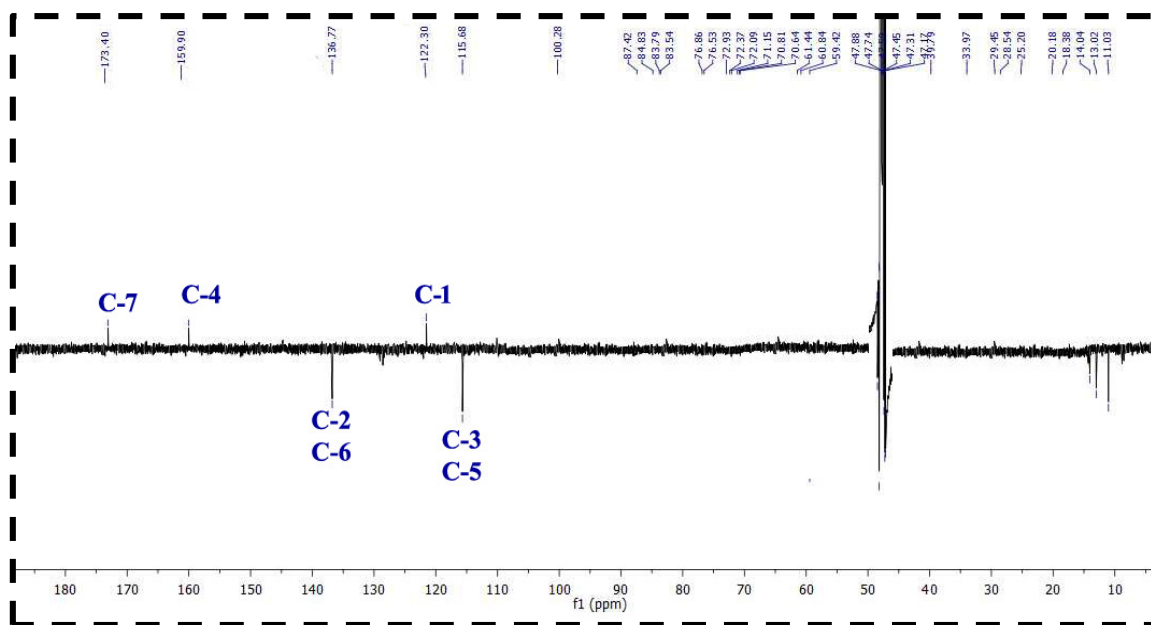
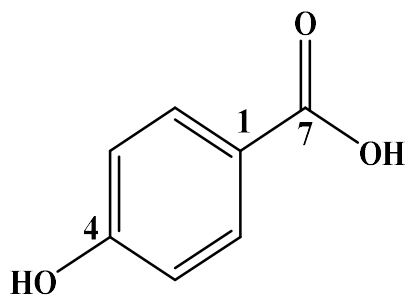


Figure III-48 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé OC9

Cette analyse, permet d'identifier le composé OC9 à l'acide *p*-hydroxybenzoïque (Acide 4-hydroxybenzoïque) [80].



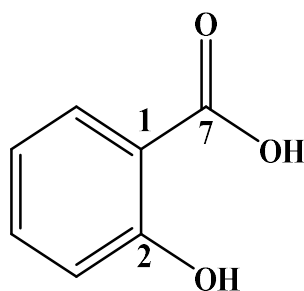
Ce composé a été antérieurement isolé de l'espèce *Onobrychis viciifolia* [45].

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III-7.

Tableau III-7 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé OC9 (MeOD)

Position	RMN ^1H δ_{H} (m, J en Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
1	-	122,3
2	7,97 (d, 8,6)	136,8
3	7,14 (d, 8,7)	115,7
4	-	159,9
5	7,14 (d, 8,7)	115,7
6	7,97 (d, 8,6)	136,8
7	-	173,4

III-1-4-9- Détermination structurale du composé OC10



Acide 2-hydroxybenzoïque (Acide salicylique)

Le spectre de masse du composé **OC10** à haute résolution (HR-ESIMS) enregistré en mode négatif (Figure III-49) est totalement identique à celui du composé **OC9**. En effet, il montre un pic d'ion pseudomoléculaire $[M-H]^-$ à $m/z = 137,022$, indiquant une masse moléculaire égale à 138 uma et correspondant à une formule brute en $C_7H_6O_3$.

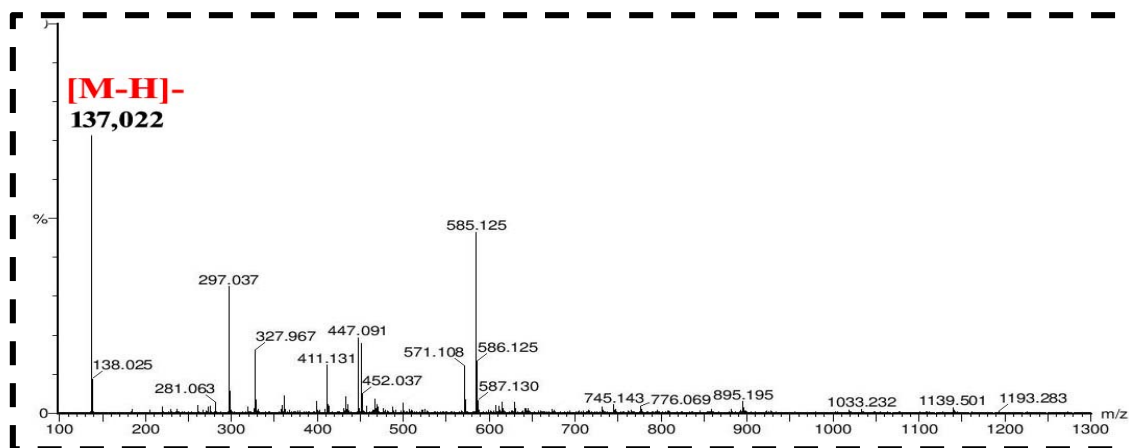


Figure III-49 : Spectre HR-ESIMS (mode négatif) du composé OC10

Les spectres RMN 1H (Figure III-50) et ^{13}C DEPTQ (Figure III-51) enregistrés dans MeOD de ce composé confirment cette similitude.

Cependant l'absence de la symétrie au niveau du noyau aromatique plaide pour un composé isomère ayant le groupement hydroxyle en *ortho* du groupement carboxyle (Tableau III-8).

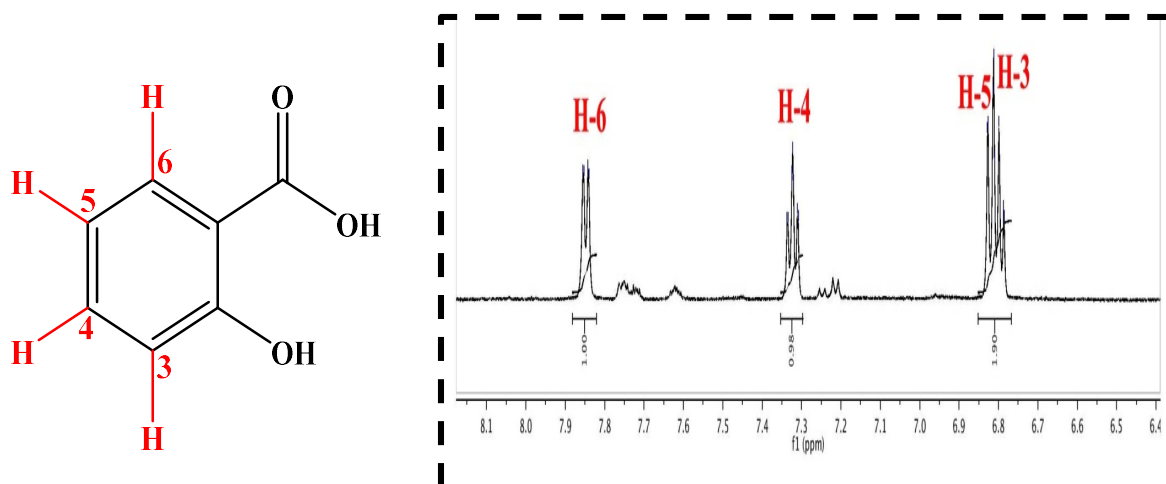


Figure III-50 : Spectre RMN 1H du composé OC10

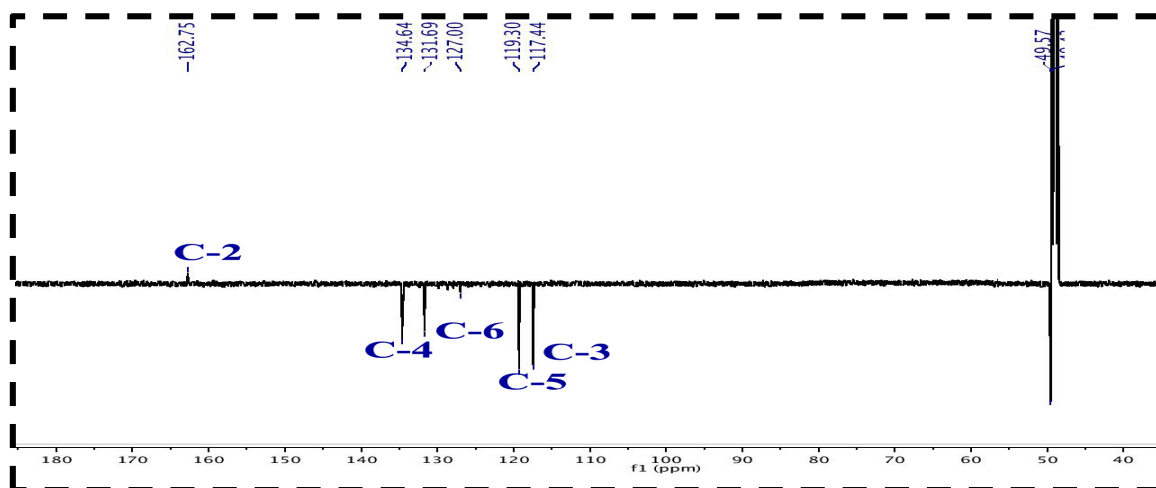


Figure III-51 : Spectre RMN ^{13}C DEPTQ du composé OC10

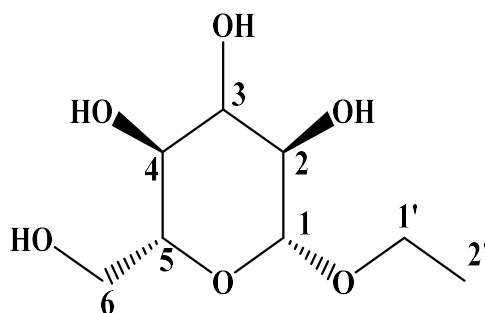
Ce composé connu sous le nom d'acide salicylique [81], a été isolé dans des espèces de la famille Fabaceae comme *Ononis speciosa* [82]. Il est cité pour la première fois dans le genre *Onobrychis*.

Le tableau suivant reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé OC10.

Tableau III-8 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé OC10 (MeOD)

Position	RMN ^1H δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
1	-	113,7
2	-	162,7
3	6,87 (<i>m</i>)	117,4
4	7,44 (<i>ddd</i> , 1,7; 7,2; 8,7)	134,6
5	6,90 (<i>dd</i> , 1,1; 8,4)	119,3
6	7,85 (<i>dd</i> , 1,8; 7,8)	131,6
7	-	172,2

III-1-4- 10- Détermination structurale du composé OC11

Ethyl- β -D-glucopyranoside

Le spectre de masse à haute résolution (HR-ESIMS) du composé **OC11** enregistré en mode négatif (Figure III-52) exhibe un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 253,0901$ $[(M+HCOOH)-H]^-$, suggérant une masse moléculaire égale à 208 uma et une formule brute en $C_8H_{16}O_6$.

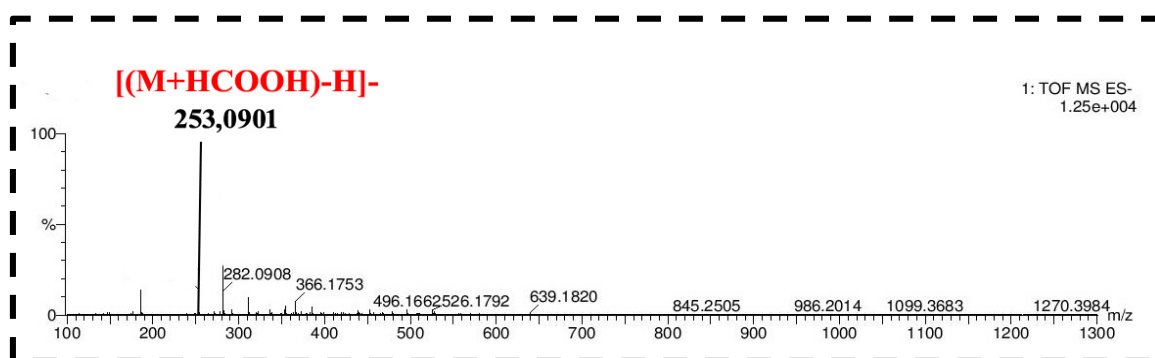
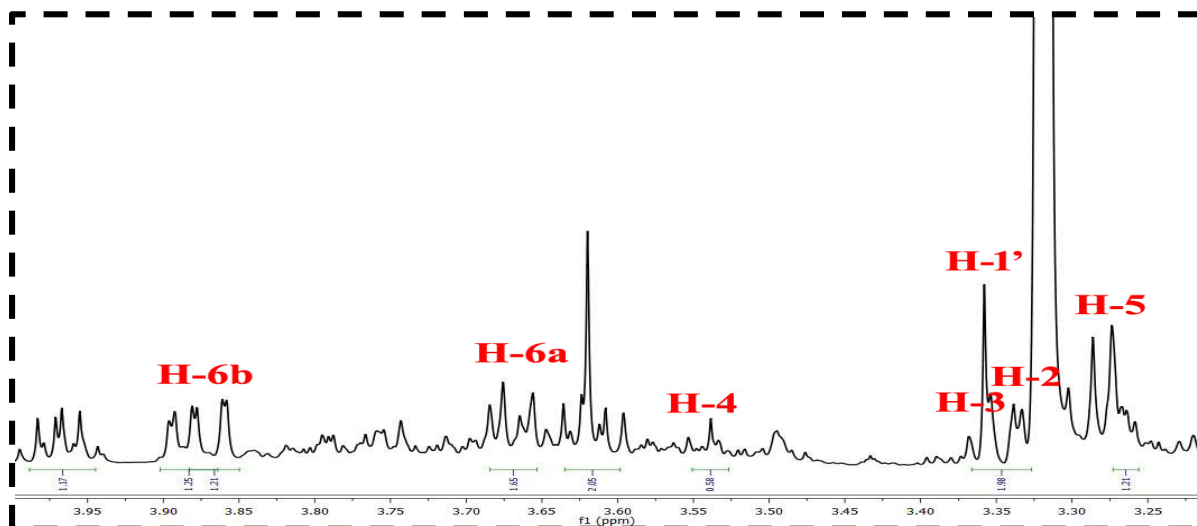
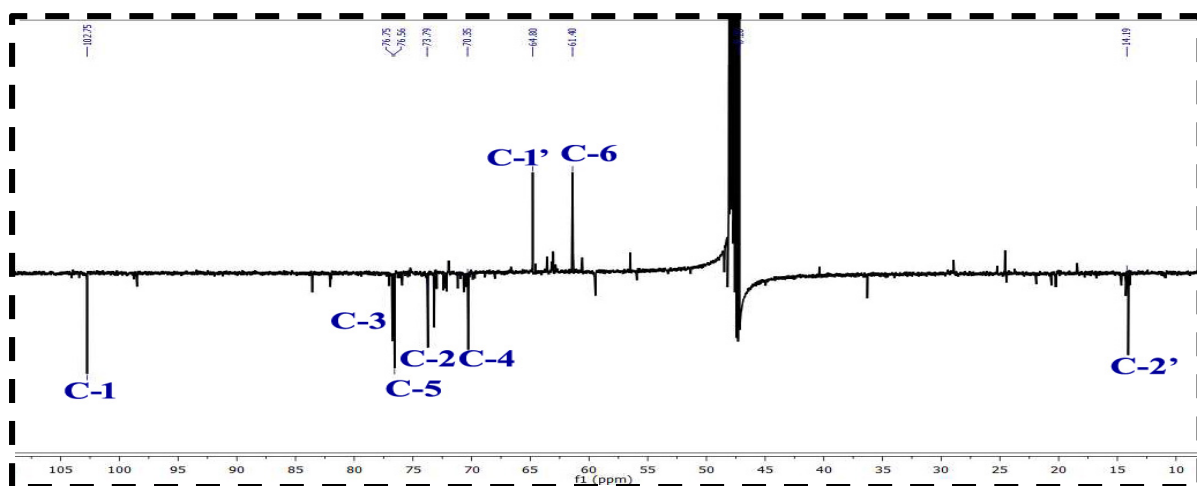


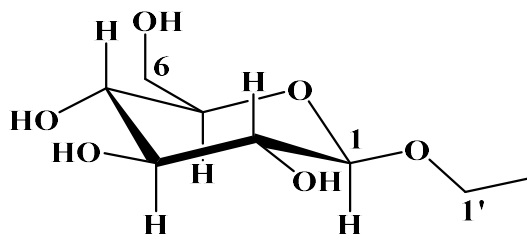
Figure III-52 : Spectre HR-ESIMS (mode négatif) du composé OC11

Les spectres RMN 1H (Figure III-53) et ^{13}C J -modulé (Figure III-54) de ce composé permettent d'identifier un glucose de configuration β ($J_{1-2} = 7,8$ Hz) substitué par un groupement éthoxy (Tableau III-9). Ce dernier est mis en évidence par l'observation de signaux d'un groupement méthyle à δ_H 1,23 (3H, t , $J = 7,1$ Hz)/(δ_C 14,1) et d'un méthylène à δ_H 3,37 (2H, q , $J = 7,1$ Hz)/(δ_C 64,8).

Les attributions de tous les protons et carbones ont été assignés par analyses COSY H-H, HSQC et HMBC.

Figure III-53 : Spectres RMN ^1H du composé OC11Figure III-54 : Spectres RMN ^{13}C *J*-modulé du composé OC11

Toutes ces données spectrales ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [83], permettent d'attribuer au composé OC11 la structure suivante :

1-*O*-éthyl- β -D-glucopyranoside

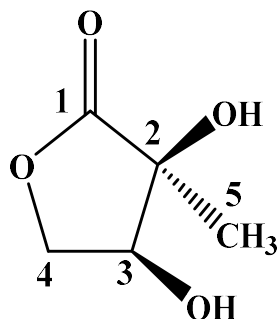
Ce composé isolé antérieurement des espèces de la famille Fabaceae comme *Lotus lalambensis* [84], est décrit pour la première fois dans le genre *Onobrychis*.

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **OC11** sont présentés dans le tableau III-9.

Tableau III-9 : Données RMN ¹H et ¹³C du composé OC11 (MeOD)

Position	RMN ¹ H δ_H (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	RMN ¹³ C δ_C (ppm)
1	4,27 (<i>d</i> , 7,8)	102,7
2	3,33 (<i>m</i>)	73,7
3	3,36 (<i>m</i>)	76,7
4	3,54 (<i>m</i>)	70,3
5	3,28 (<i>m</i>)	76,5
6	3,69 (<i>dd</i> , 1,9; 11,8) 3,86 (<i>dd</i> , 5,2; 11,8)	61,4
1'	3,37 (<i>q</i> , 7,1)	64,8
2'	1,25 (<i>t</i> , 7,1)	14,1

III-1-4-8- Détermination structurale du composé OC12



2,3-dihydroxy-2-méthylbutyrolactone

Le spectre de masse HR-ESIMS de ce composé enregistré en mode négatif (Figure III-55), présente un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 177,0386$ $[(M+HCOOH)-H]^-$, correspondant à une masse moléculaire de 132 uma et une formule brute en $C_5H_8O_4$.

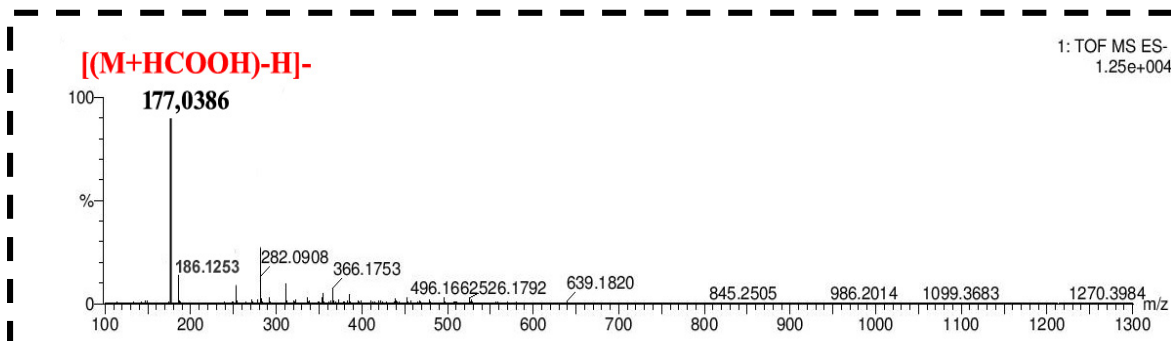


Figure III-55 : Spectre HR-ESIMS (mode négatif) du composé OC12

L'analyse des spectres RMN 1H , HSQC, COSYH-H et HMBC (Figures III-56, III-57, III-58, III-59 et III-60) ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [85], ont permis d'identifier le composé OC12 au 2,3-dihydroxy-2-méthylbutyrolactone.

Ce composé a été isolé précédemment à partir de plantes Fabaceae comme *Cicer arietinum* L. [86], *Astragalus lusitanicus* [87]. Il est décrit pour la première fois dans le genre *Onobrychis*.

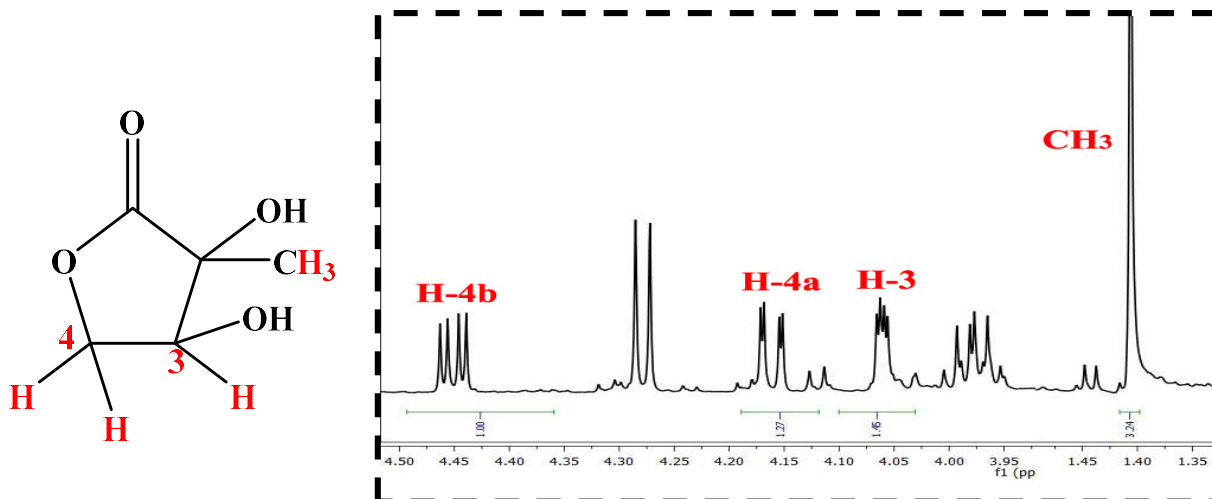


Figure III-56 : Spectre RMN 1H du composé OC12

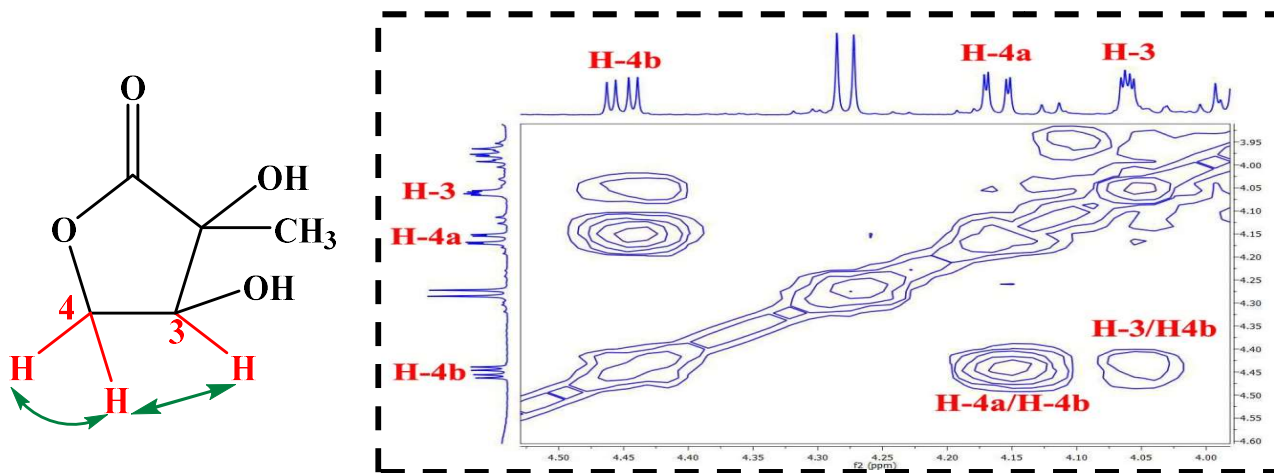


Figure III-57 : Spectre COSY H-H du composé OC12

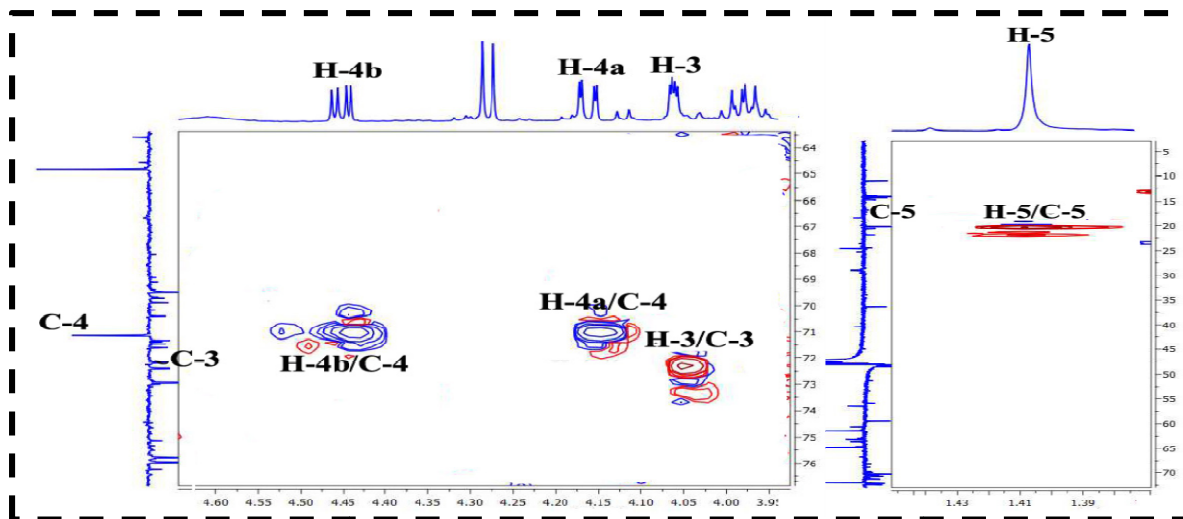


Figure III-58 : Spectre HSQC du composé OC12

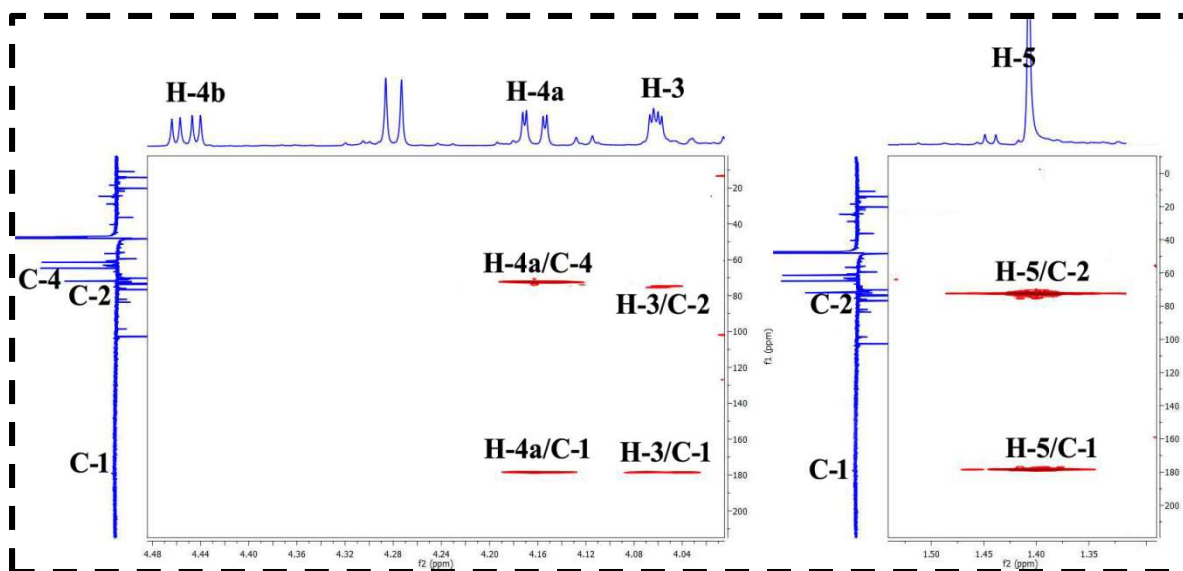


Figure III-59 : Spectre HMBC des protons H-3 et H₂-4 du composé OC12

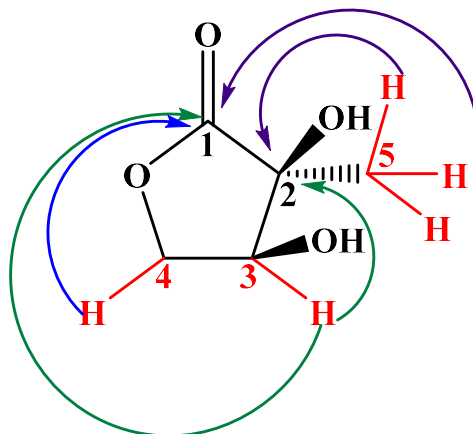


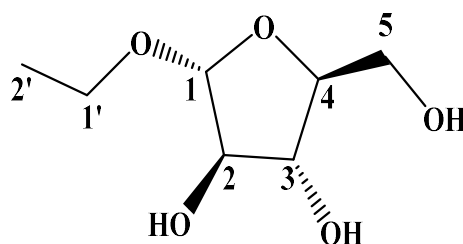
Figure III-60 : Principales corrélations HMBC du composé OC12

Le tableau III-10 reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé OC12.

Tableau III-10 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé OC12 (MeOD)

Position	RMN ^1H δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
1	-	179,0
2	-	75,2
3	4,06 (<i>dd</i> , 1,8; 4,0)	72,6
4	4,16 (<i>dd</i> , 1,8; 10,1) 4,45 (<i>dd</i> , 4,1; 10,1)	71,3
5	1,41 (<i>s</i>)	20,2

III-1-4-12- Détermination structurale du composé OC13



Ethyl α -L-arabinofuranoside

Le spectre de masse HR-ESIMS enregistré en mode négatif (Figure III-61), montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 223,0796$ $[(M+HCOOH)-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 178 uma correspondant à une formule brute en $C_7H_{14}O_5$.

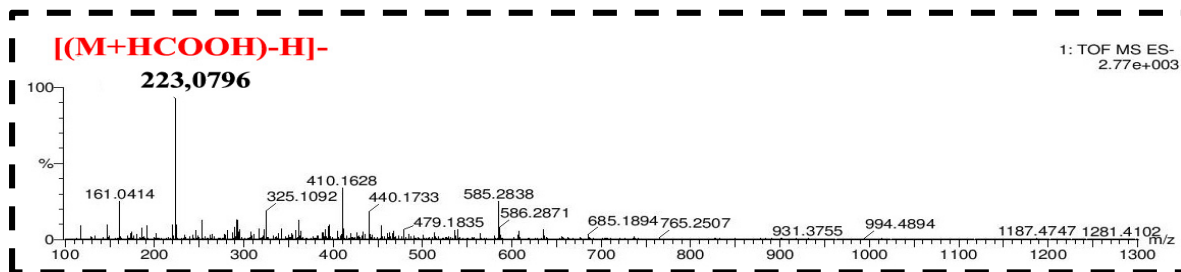


Figure III-61 : Spectre HR-ESIMS (mode négatif) du composé OC13

La comparaison des données spectrales obtenues à travers l'analyse des spectres RMN 1H (Figure III-62) et ^{13}C (Figure III-63) avec celles de la littérature [88], permet d'identifier sans ambiguïté le composé OC13 au éthyl α -L-arabinofuranoside.

Ce composé a été isolé antérieurement de l'espèce *Trichosanthes kirilowii* (Cucurbitaceae) [89]. Il est détecté pour la première fois dans la famille Fabaceae.

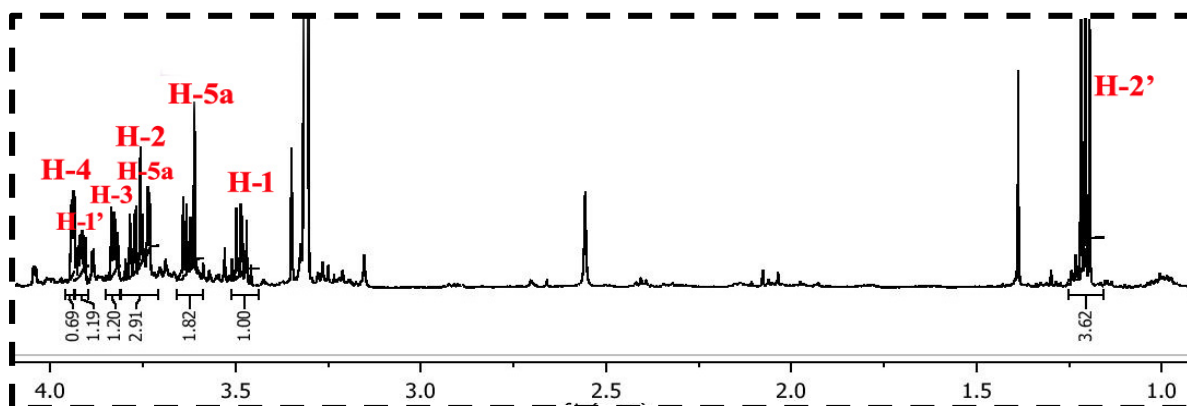


Figure III-62 : Spectre RMN 1H du composé OC13

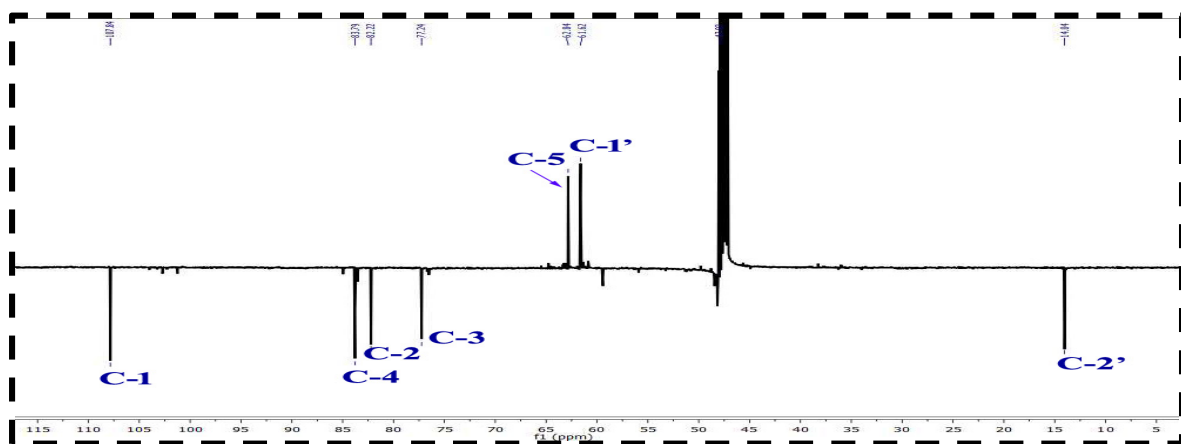


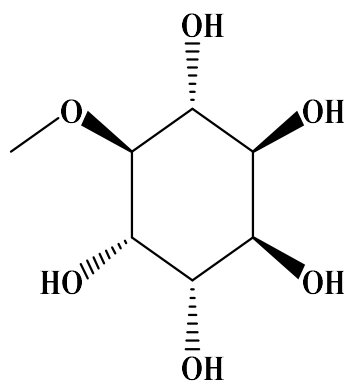
Figure III-63 : Spectre RMN ^{13}C DEPTQ du composé OC13

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **OC13** sont donnés dans le tableau III-11.

Tableau III-11 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé OC13 (MeOD)

Position	RMN ^1H	RMN ^{13}C
	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	δ_{C} (ppm)
1	3,80 (<i>d</i> , 1,9)	107,8
2	3,78 (<i>m</i>)	82,2
3	3,85 (<i>dd</i> , 5,2; 5,9)	77,2
4	3,94 (<i>m</i>)	83,7
5	3,65 (<i>dd</i> , 5,2; 11,8)	62,8
	3,72 (<i>dd</i> , 3,0; 11,8)	
1'	3,92 (<i>q</i> , 7,0)	61,6
2'	1,21 (<i>t</i> , 7,0)	14,0

III-1-4-13- Détermination structurale du composé OC14



3-*O*-méthyl-chiro-inositol (D-pinitol)

Le spectre de masse à haute résolution HR-ESIMS du composé **OC14** (Figures III-64) donne en mode négatif un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 239,0727$ $[(\text{M}+\text{HCOOH})-\text{H}]^-$, soit une masse moléculaire de 194 uma correspondant à une formule brute en $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_6$.

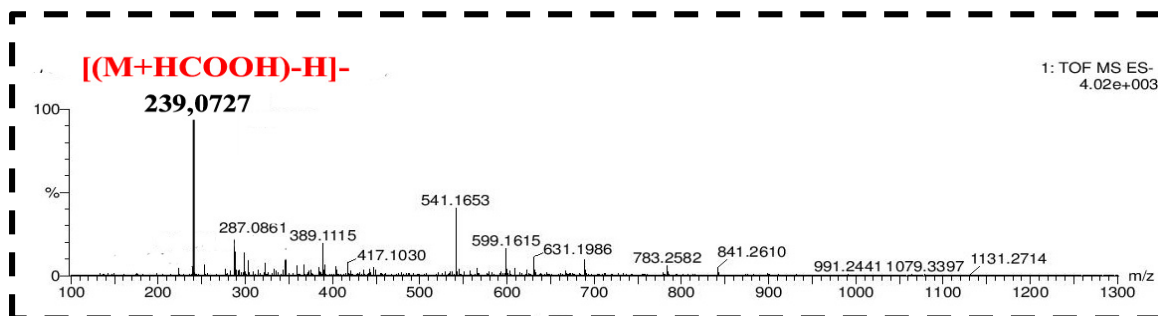


Figure III-64 : Spectre HR-ESIMS (mode négatif) du composé OC14

L'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C J -modulé (Figures III-65 et III-66) ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [90], ont permis d'identifier ce composé au 3-*O*-méthyl-chiro-inositol nommé D-pinitol. Ce dernier a été isolé précédemment de l'espèce *Onobrychis viciifolia* [42].

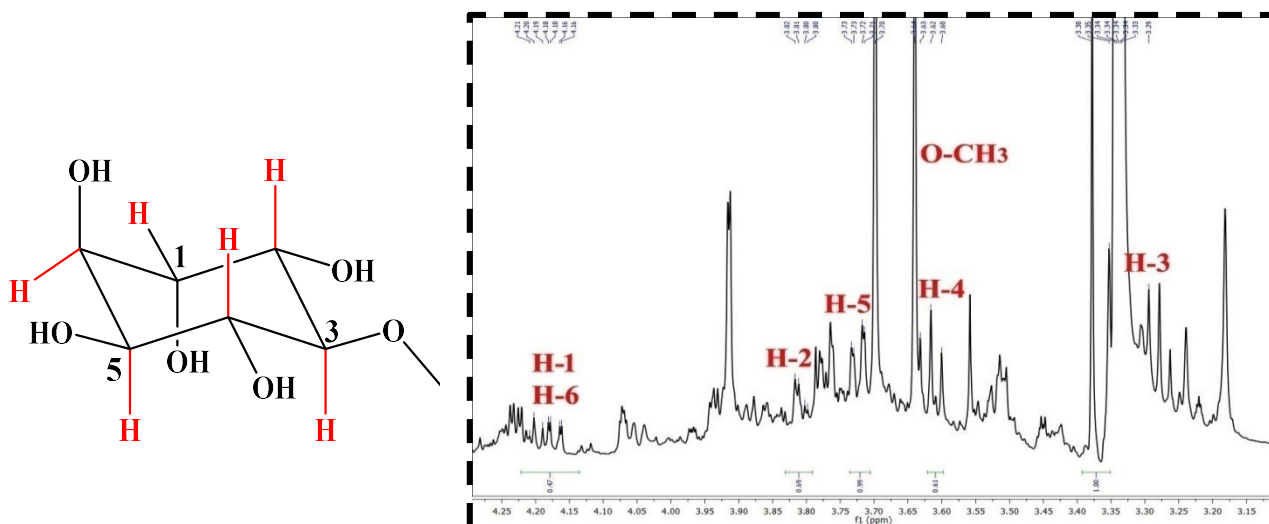


Figure III-65 : Spectre RMN ^1H du composé OC14

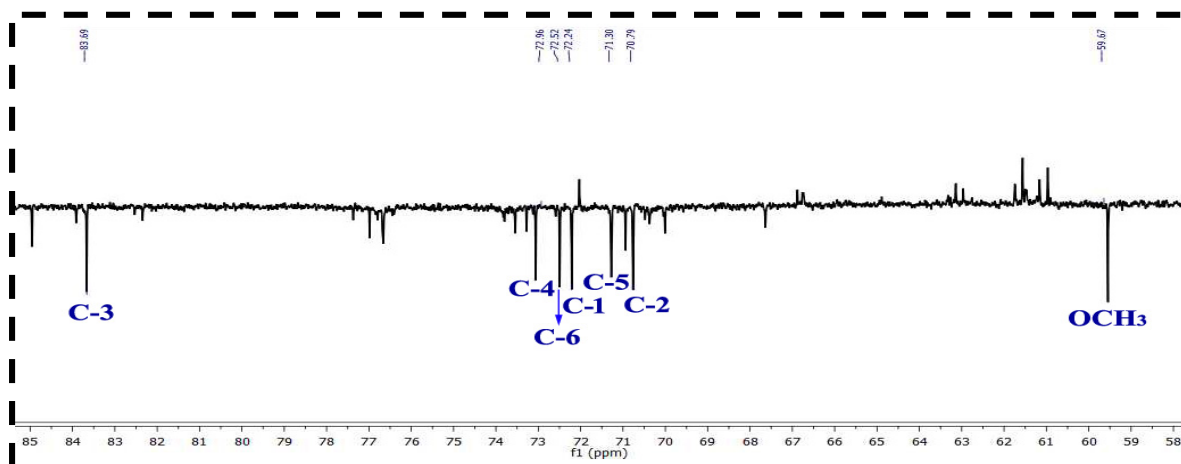


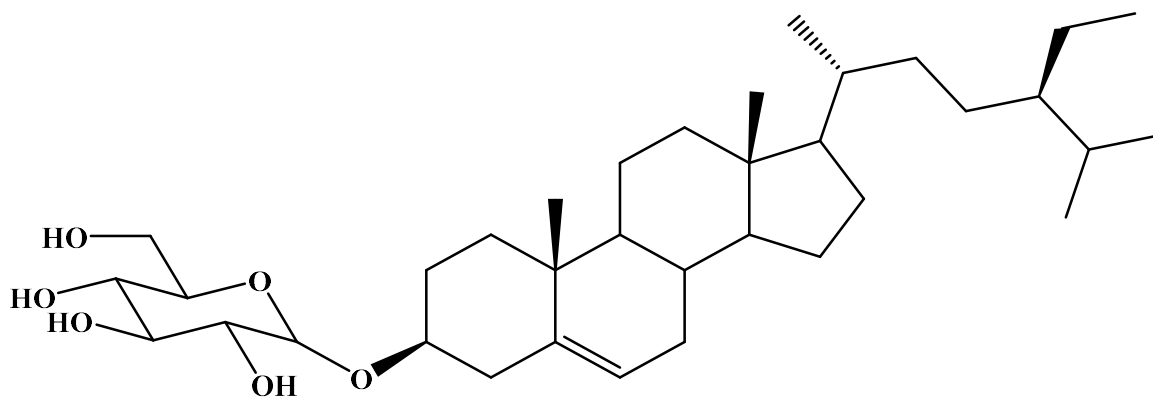
Figure III-66 : Spectre ^{13}C J -modulé du composé OC14

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones du composé **OC14** sont réunis dans le tableau III-12.

Tableau III-12 : Données RMN ^1H et ^{13}C du composé OC14 (MeOD)

Position	RMN ^1H δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	RMN ^{13}C δ_{C} (ppm)
1	4,15 (<i>m</i>)	72,2
2	3,81 (<i>dd</i> , 2,0; 8,5)	70,7
3	3,33 (<i>m</i>)	83,6
4	3,62 (<i>m</i>)	72,9
5	3,72 (<i>dd</i> , 2,1; 9,5)	71,3
6	4,15 (<i>m</i>)	72,5
O-Me	3,63 (<i>s</i>)	59,6

III-1-4-14- Détermination structurale du composé OC15



***β* -sitostéryl 3-*O*- β -D-glucopyranoside (Daucostérol)**

Ce composé est purifié sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Il est invisible sous lumière UV à 254 nm et se colore en mauve après révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. La comparaison des données spectrales de ce composé avec celles de la littérature, indique qu'il s'agit du β -

sitostéryl 3-*O*- β -D-glucopyranoside nommé aussi Daucostérol. Il est cité pour la première fois dans le genre *Onobrychis*.

III-1-4- Conclusion

Ce travail a porté sur l'investigation phytochimique de la plante *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam., appartenant à la famille Fabaceae (Leguminosae).

Cette espèce n'a fait l'objet d'aucune étude phytochimique, ni évaluation biologique antérieures. Cette étude réalisée sur les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique a abouti à l'isolement et l'identification de 15 composés naturels. 10 composés ont été isolés de l'extrait AcOEt et 5 de l'extrait *n*-BuOH. Il s'agit de :

- Tricine (**OC1**)
- 3'-OMe-tricétine 7-*O*- β -D-glucoside (**OC2**)
- Lutéoline 5-méthyl éther (**OC3**)
- Hyperoside (**OC4**)
- Isoquercétine (**OC5**)
- Astragaline (**OC6**)
- Loliolide (**OC7**)
- Citrusine C (**OC8**)
- Acide 4-hydroxy benzoïque (**OC9**)
- Acide salicylique (**OC10**)
- 1-*O*-éthyl- β -D-glucopyranoside (**OC11**)
- 2,3-dihydroxy-2-méthylbutyrolactone (**OC12**)
- Ethyl α -L-arabinofuranoside (**OC13**)
- D-pinitol (**OC14**)
- β -sitostérol-3-*O*-glucoside (**OC15**)

La composition chimique de l'espèce *Onobrychis crista-galli* est en parfait accord avec celle établie pour les plantes du même genre. Elle confirme la prépondérance des composés polyphénoliques. Neuf composés (**OC1**, **OC3**, **OC4**, **OC7**, **OC8**, **OC10**, **OC11**, **OC12**) ont été décrits pour la première fois dans le genre *Onobrychis* et un composé (**OC2**) est cité pour la première fois dans la famille Fabaceae.



Chapitre IV

IV- Introduction

Ce travail reporte l'évaluation (*in vitro*) des propriétés antioxydantes des différents extraits (éthéropétrolique, acétate d'éthyle et *n*-butanolique) des deux espèces *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.) Maire et *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam., en utilisant plusieurs modèles. Une évaluation de l'activité anti-inflammatoire de la plante *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam., a été également mise en œuvre.

Au préalable, une quantification spectrophotométrique des phénols totaux et des flavonoïdes a été réalisée.

IV-1- Dosage des polyphénols totaux

Cette analyse permet d'avoir une idée sur la composition chimique des extraits des deux plantes étudiées. En effet, nous avons caractérisé quantitativement les extraits en utilisant deux techniques de dosages globaux (polyphénols et flavonoïdes).

IV-1-1- Préparation des extraits

Les extraits éthéropétrolique, acétate d'éthyle et *n*-butanolique des deux plantes citées (1 mg) sont initialement dissous dans 1 ml de méthanol.

IV-1-2- Détermination de la teneur totale en composés phénoliques

La teneur en polyphénols totaux a été effectuée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu (RFC) selon une méthode de dosage sur microplaque décrite par Muller et al. (2010) [91, 92].

Ce réactif constitué par un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$), est réduit lors de l'oxydation des phénols, en mélange d'oxydes de tungstène (W_8O_{23}) et de molybdène (MO_8O_{23}). La coloration bleue produite est proportionnelle à la teneur en phénols totaux et possède une absorption maximale aux environs de 750-765 nm.

IV-1-2-1- Procédure expérimentale

20 μ l de chaque extrait préparé ont été ajoutés à 100 μ l de RFC dilué (1:10) et 75 μ l de carbonate de sodium (7,5%). Le mélange est ensuite laissé à l'obscurité pendant 2h à

température ambiante. La lecture a été réalisée à 765 nm. Un blanc est préparé de la même manière en remplaçant l'extrait par le solvant utilisé, en l'occurrence le méthanol.

Les résultats ont été rapportés en microgramme d'équivalent d'acide gallique par millilitre d'extrait ($\mu\text{g EAG/ml}$ d'extrait).

IV-1-3- Détermination de la teneur totale en flavonoïdes

Le dosage des flavonoïdes dans les extraits est basé sur la formation d'un complexe entre Al^{+3} et les flavonoïdes, en suivant la méthode de Topçu et *al.*, (2007) modifiée pour une détermination sur lecteur de microplaques à 96 puits [93]. L'absorbance a été mesurée à 415 nm.

IV-1-3-1- Procédure expérimentale

50 μl de chaque extrait de plante ont été mélangés à 130 μl de MeOH, 10 μl d'acétate de potassium (CH_3COOK) et 10 μl de nitrate d'aluminium ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$). Après 40 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été lue à 415 nm. Un blanc échantillon est préparé en remplaçant les réactifs par le méthanol (50 μl d'extrait et 150 μl de méthanol). Les résultats ont été exprimés en microgramme d'équivalent de quercétine par millilitre d'extrait ($\mu\text{g EQ/ml}$ d'extrait).

IV-2- Evaluation de l'activité antioxydante

Les propriétés antioxydantes *in vitro* des différents extraits (éther de pétrole, acétate d'éthyle et *n*-butanolique) des deux plantes *Helianthemum hirtum* et *Onobrychis crista-galli* ont été évaluées par cinq tests :

- ⊙ DPPH
- ⊙ ABTS
- ⊙ capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)
- ⊙ superoxyde DMSO alcalin
- ⊙ test de blanchissement du β -carotène

Cinq flavonoïdes isolés à partir de la plante *Onobrychis crista-galli* ont été testés selon deux essais complémentaires, à savoir :

- ◆ DPPH
- ◆ CUPRAC

4 mg des trois extraits des deux plantes étudiées sont solubilisés dans 1 ml de méthanol. Les extraits ont été préparés à différentes concentrations. Les cinq flavonoïdes (1 mg chacun) sont dissous dans 1 ml de méthanol.

IV-2-1- Test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité anti-radicalaire libre a été déterminée spectrophotométriquement par le dosage du 1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) de couleur violette, qui donne à la solution une coloration jaunâtre dont l'absorbance est fixée à une longueur d'onde de 517 nm selon le protocole de Blois (1958) légèrement modifié [94].

IV-2-1-1- Procédure expérimentale

160 µl de solution de DPPH ont été ajoutés à 40 µl de solution d'extraits ou composés purs, dilués dans le méthanol à différentes concentrations (12,5-800 µg/ml). Après 30 min d'incubation à température ambiante et à l'obscurité, la lecture de l'absorbance a été ensuite effectuée à 517 nm. Le BHA (Butyl Hydroxy Anisol), BHT (Butyl Hydroxy Toluène) et α -tocophérol ont été utilisés comme standards de références pour la comparaison de l'activité.

Les résultats ont été donnés sous forme d'IC₅₀ (µg/ml) correspondant à la concentration inhibitrice à 50%. L'activité antiradicalaire a été calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{DPPH Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{échantillon}}) / A_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

$A_{\text{Contrôle}}$ = absorbance du contrôle après 30 min

$A_{\text{échantillon}}$ = absorbance de l'échantillon (extrait ou composé isolé) après 30 min

IV-2-2- Test de piégeage du radical ABTS^{•+}

La méthode spectrophotométrique de l'activité de piégeage du radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) est estimée par Re et *al.* (1999) [95].

Cette méthode est basée sur la production du radical ABTS^{•+} via une réaction entre l'ABTS et le persulfate de potassium. Le radical créé possède une couleur bleu-vert avec un maximum d'absorbance à 734 nm. Cette couleur s'éclaircit puis disparaît au contact d'un antioxydant.

IV-2-2-1- Procédure expérimentale

L'ABTS^{•+} a été généré par la réaction entre 7 mM de l'ABTS dans l'eau et 2,45 mM de persulfate de potassium. Le mélange est mis à l'obscurité à température ambiante pendant 12h à 16h. Avant utilisation, la solution obtenue du radical ABTS a été diluée dans l'éthanol pour obtenir une absorbance de $0,708 \pm 0,025$ à 734 nm.

Une solution de 160 µl de ABTS^{•+} et 40 µl de solution d'extraits ou de composés purs sont dilués dans le méthanol à diverses concentrations (12,5-800 µg/ml). Après 10 min d'incubation, l'absorbance a été enregistrée à 734 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme standards pour la comparaison de l'activité. Les résultats ont été calculés en IC₅₀ (µg/ml) correspondant aux concentrations inhibitrices à 50%. La capacité de piégeage de ABTS^{•+} a été évaluée à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{ABTS Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{échantillon}})/A_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

IV-2-3- Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La réduction du cuivre a été réalisée selon le protocole de Apak et *al.* (2004) [96].

Le principe de la méthode repose sur le suivi de la diminution de l'absorbance du complexe cuivre-néocuproïne en présence de l'agent antioxydant. Le complexe cuivre-néocuproïne est réduit, produisant un complexe chromogène de Cu⁺²-Nc. La réaction est quantifiée à une longueur d'onde de 450 nm.

IV-2-3-1- Procédure expérimentale

Dans chaque puits d'une plaque qui en compte 96, sont mélangés 60 µl d'acétate d'ammonium (AcNH₄) (pH = 7), 50 µl de néocuproïne et 50 µl de solution (CuCl₂, 2H₂O).

Le mélange additionné à 40 µl d'extraits ou de composés purs à diverses concentrations (12,5-800 µg/ml), est laissé incuber à l'arbi de la lumière pendant 1h. L'absorbance de la solution a été ensuite mesurée à 450 nm. La capacité de réduction est comparée avec le BHA et le BHT. Les résultats ont été donnés sous la forme A_{0,5} (µg/ml) correspondant à une concentration indiquant une intensité d'absorbance de 0,50.

IV-2-4- Test de piégeage du radical superoxyde O₂⁻ par la méthode DMSO alcalin

L'activité superoxyde DMSO alcalin a été effectuée par la méthode de Rao et Kunchandy (1990) [97].

IV-2-4-1- Procédure expérimentale

Le mélange réactionnel contenant 130 µl de solution alcaline DMSO (20 mg de NaOH dissous dans 1 ml de DMSO et 100 ml d'eau) et 30 µl de NBT (10 mg de NBT dissous dans 10 ml d'eau) est additionné à 40 µl d'extraits ou composés purs dilués dans du méthanol à différentes concentrations (12,5-800 µg/ml). La lecture de l'absorbance est effectuée à 560 nm. L' α -tocophérol et l'acide tannique sont utilisés comme antioxydants de référence. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{DMSO Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{échantillon}})/A_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

IV-2-5- Test de blanchissement du β -carotène

Ce test a été évalué selon la procédure décrite par Marco (1968) [98]. Il est habituellement employé pour estimer l'activité antioxydante des substances dans les émulsions.

IV-2-5-1- Procédure expérimentale

40 µl d'extrait dilué dans des solutions de méthanol à des concentrations différentes (12,5-800 µg/ml) ont été mélangés à 160 µl d'une solution constituée de 0,5 mg de β -carotène, 200 µl de Tween 40, 25 µl d'acide linoléique, 1 ml de chloroforme et 50 ml d'eau. L'absorbance est lue à 470 nm. Le BHA et le BHT ont été utilisés comme étalons positifs. Les résultats sont donnés en IC₅₀ (µg/ml) correspondant à la concentration inhibitrice à 50% et comparés à ceux de BHA et BHT utilisés comme antioxydants normes. Le pourcentage d'inhibition a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{échantillon}})/A_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

IV-3- Activité anti-inflammatoire *in vitro* par inhibition de la dénaturation des protéines

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des trois extraits (éthéropétrolique, acétate d'éthyle et *n*-butanolique) de l'espèce *Onobrychis crista-galli* a été testée par l'utilisation de la méthode basée sur le calcul du pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines. Elle a été réalisée selon le procédé décrit par Karthik et *al.* (2013) [99], légèrement modifié.

IV-3-1- Procédure expérimentale

1 ml de solution de BSA (Bovine Serum Albumin) à 0,2% préparé dans un Tris HCl (pH = 6,6) et incubé à 37 °C pendant 15 minutes, a été ajouté à 1 ml de chaque concentration d'extrait (0,5, 1, 2, 4 mg/ml) ou standard. Le mélange réactionnel a été chauffé à 72 °C pendant 5 minutes, puis laissé refroidir pendant 10 minutes. L'absorbance de ces solutions a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau UV-VIS à une longueur d'onde de 660 nm. Le diclofénac (1 mg/ml) a été utilisé comme médicament de référence standard et contrôle. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\text{Pourcentage d'inhibition de la dénaturation (\%)} = [(A_{\text{Contrôle}} - A_{\text{extrait}})/A_{\text{Contrôle}}] \times 100$$

IV-4- Analyse statistique

Les analyses de la variance ont été effectuées par le logiciel statistique GraphPad Prism. Tous les résultats ont été rapportés en moyennes \pm écarte type (SD) de trois mesures. Les valeurs IC₅₀ et A_{0.50} ont été calculées par l'analyse de régression linéaire et l'analyse de la variance ANOVA (one-way) suivie d'un multiple test post hoc de Tukey's-HSD. La signification statistique a été déterminée à $p < 0,05$ en utilisant XLSTAT.

IV-5- Résultats

IV-5-1- Dosage des phénols totaux

La teneur en composés phénoliques totaux de chaque extrait (EP, AcOEt et *n*-BuOH) des deux plantes en question a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en microgramme d'équivalent d'acide gallique par millilitre d'extrait (μg

EAG/ml d'extrait) (Figure IV-1). Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux IV-1 et IV-2.

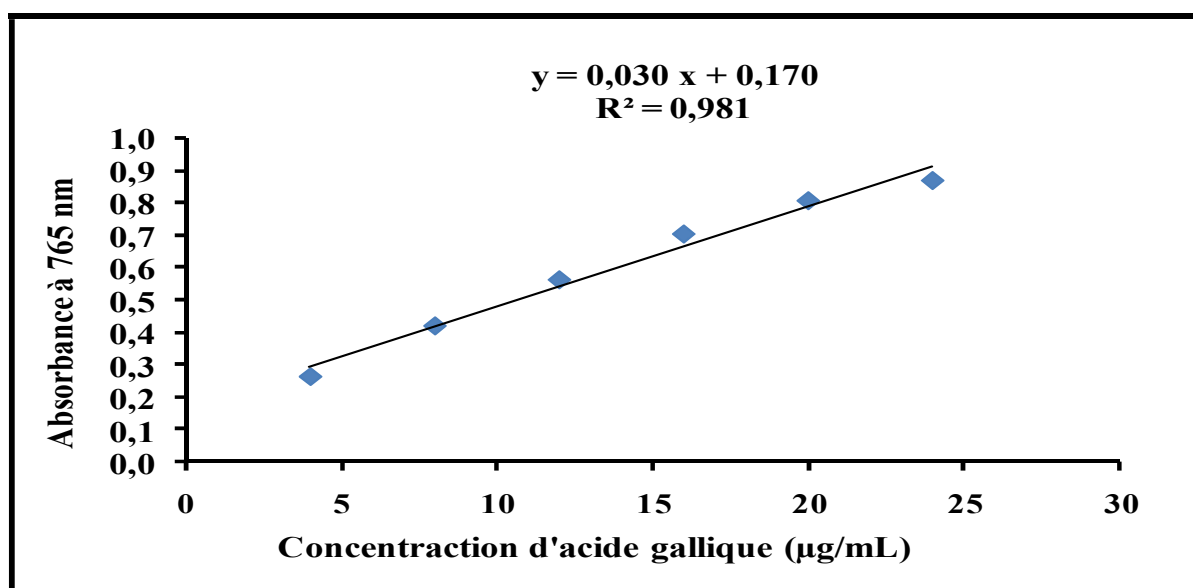


Figure IV-1 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm écart type (SD))

Tableau IV-1 : Teneur en polyphénols totaux de la plante *Helianthemum hirtum*

Extrait de la plante <i>H. hirtum</i>	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
Total phénolique (µg EAG/ml d'extrait)	125,04 \pm 1,34	95,06 \pm 0,90

Tableau IV-2 : Teneur en polyphénols totaux de la plante *Onobrychis crista-galli*

Extrait de la plante <i>O. crista-galli</i>	EP	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
Total phénolique (µg EAG/ml d'extrait)	12,70 \pm 0,04	31,05 \pm 0,60	26,09 \pm 0,40

IV-5-2- Dosage des flavonoïdes

Le contenu en flavonoïdes des extraits de la plante *Helianthemum hirtum* et de deux extraits (AcOEt et *n*-BuOH) de l'espèce *Onobrychis crista-galli* a été évalué en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire tracée par une solution de quercétine à différentes

concentrations (Figure IV-2). Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux IV-3 et IV-4.

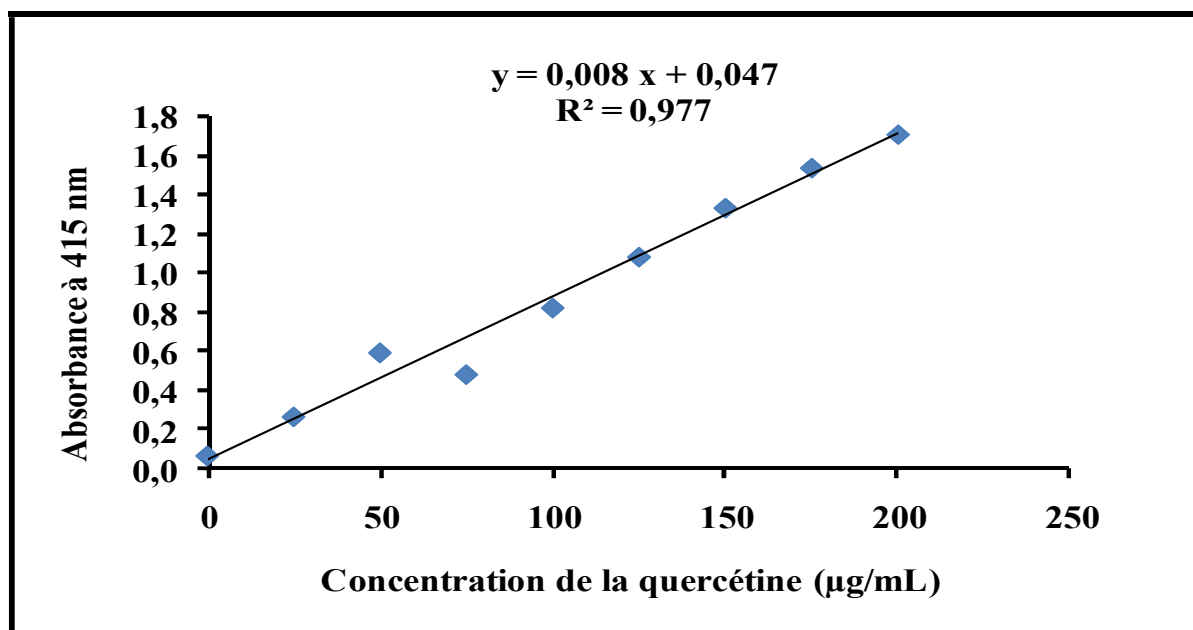


Figure IV-2 : Courbe d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm écart type (SD))

Tableau IV-3 : Contenu en flavonoïdes de la plante *Helianthemum hirtum*

Extrait de la plante <i>H. hirtum</i>	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
Contenu en flavonoïdes (µg EQ/ml d'extrait)	232,59 \pm 4,76	132,06 \pm 2,20

Tableau IV-4 : Contenu en flavonoïdes de la plante *Onobrychis crista-galli*

Extrait de la plante <i>O. crista-galli</i>	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
Contenu en flavonoïdes (µg EQ/ml d'extrait)	11,06 \pm 0,05	60,70 \pm 0,70

Le dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes des différents extraits des deux plantes a été effectué en vue d'estimer les teneurs.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux obtenus indiquent que l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *H. hirtum* s'avère le plus riche en phénols ($125,04 \pm 1,34$ µg EAG/ml d'ext.) comparé à l'extrait *n*-BuOH ($95,06 \pm 0,90$ µg EAG/ml d'ext.).

Concernant la plante *O. crista-galli*, la teneur en phénols totaux est plus marquée dans l'extrait acétate d'éthyle ($31,05 \pm 0,60$ µg EAG/ml d'ext.), suivie de l'extrait *n*-BuOH ($26,09 \pm 0,40$ µg EAG/ml d'ext.). L'extrait EP ($12,70 \pm 0,04$ µg EAG/ml d'ext.) a la plus faible teneur.

Les données du dosage des flavonoïdes montrent que l'extrait AcOEt de *H. hirtum* est le plus riche en flavonoïdes avec une valeur ($232,59 \pm 4,76$ µg EQ/ml d'ext.) suivi par l'extrait *n*-BuOH ($132,06 \pm 2,20$ µg EQ/ml d'ext.).

Pour la plante *O. crista-galli*, l'extrait *n*-BuOH possède une teneur plus élevée en flavonoïdes de l'ordre de ($60,70 \pm 0,70$ µg EQ/ml d'ext.) puis l'extrait AcOEt ($11,06 \pm 0,05$ µg EQ/ml d'ext.).

Il en ressort que l'extrait acétate d'éthyle de la plante *H. hirtum*, renferme le taux le plus élevé en polyphénols et en flavonoïdes, suivi par les extraits (AcOEt, *n*-BuOH et EP) de l'espèce *O. crista-galli*.

Ces études prouvent que les deux plantes sont une source importante de composés phénoliques et flavonoïdes, corroborant ainsi les résultats des études phytochimiques antérieures effectuées sur les espèces des genres *Helianthemum* et *Onobrychis* qui réaffirment leur richesse en ces composés [20, 34, 36].

IV-5-3- Activité antioxydante

L'activité antioxydante des trois extraits des deux plantes a été étudiés *in vitro* par une série de tests : DPPH, ABTS, CUPRAC, superoxide DMSO alcalin et β -carotène.

Deux méthodes (DPPH et CUPRAC) ont été utilisées pour évaluer les propriétés antioxydantes des cinq flavonoïdes isolés de la plante *Onobrychis crista-galli*.

IV-5-3-1- Activité antiradicalaire au DPPH

L'activité antiradicalaire au DPPH est représentée par les pourcentages d'inhibition pour chaque concentration en fonction des valeurs de la concentration inhibitrice à 50% de

l'extrait ou du composé pur testé. Une augmentation de l'activité antiradicalaire proportionnelle à celle de la concentration des échantillons.

Le tableau IV-5 et figure IV-3 résument les résultats obtenus pour les extraits bruts de l'espèce *H. hirtum*. L'extrait AcOEt possède la meilleure activité antioxydante de l'ordre $10,28 \pm 0,34$ $\mu\text{g/ml}$ suivi de l'extrait *n*-BuOH ($21,87 \pm 1,03$ $\mu\text{g/ml}$).

Tableau IV-5 : Activité antiradicalaire au DPPH des extraits de *H. hirtum* et des standards

Extraits et standards	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
AcOEt	$10,28 \pm 0,34$
<i>n</i> -BuOH	$21,87 \pm 1,03$
BHA	$6,14 \pm 0,41$
BHT	$12,99 \pm 0,41$
α -tocophérol	$13,02 \pm 5,17$

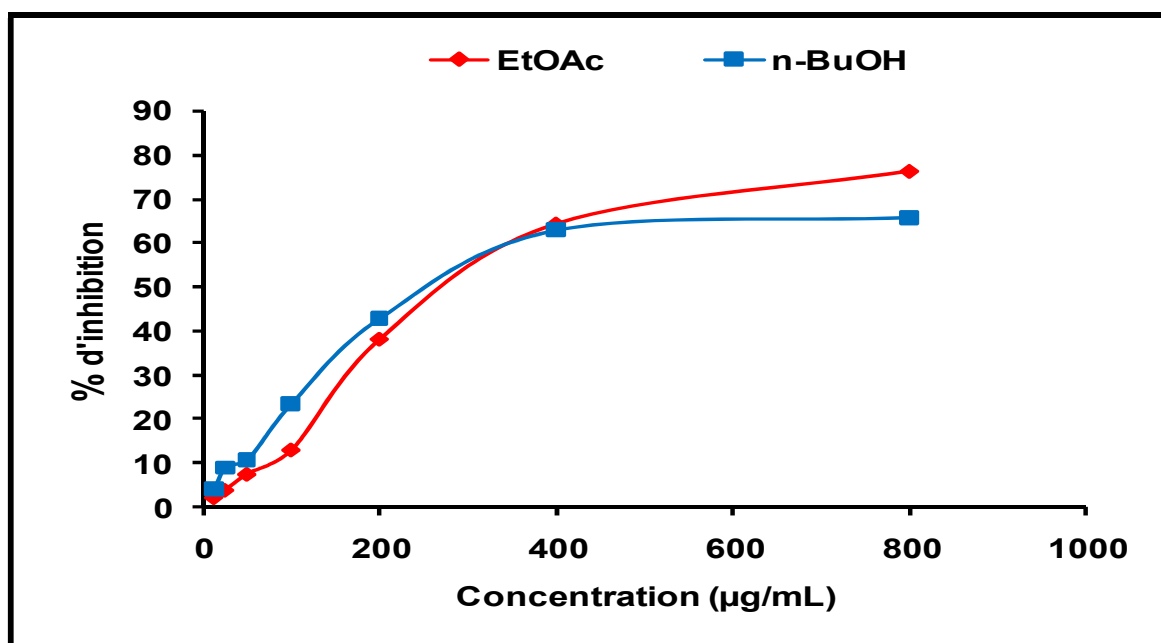


Figure IV-3 : Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH des extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *H. hirtum*

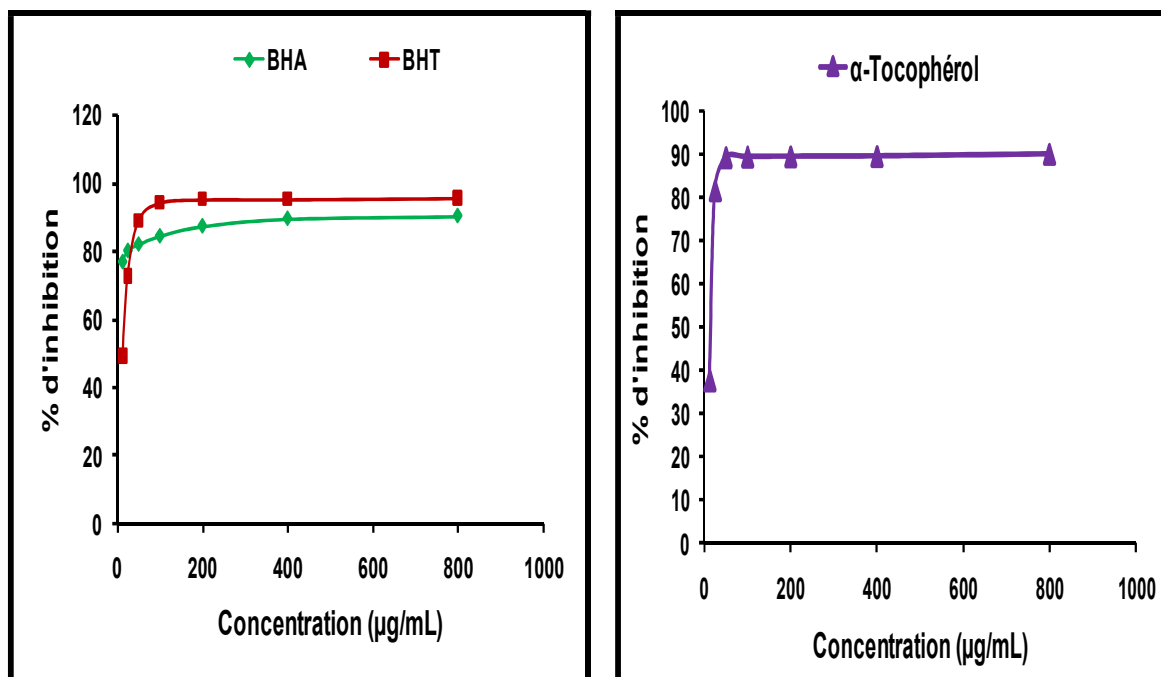


Figure IV-4 : Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH des standards BHA, BHT et α -tocophérol (moyennes \pm SD (n=3))

Concernant la seconde la plante *O. crista-galli*, les résultats obtenus indiquent que l'extrait AcOEt est le plus actif avec une valeur d'IC₅₀ de l'ordre de 17,13 µg/ml suivi de l'extrait *n*-BuOH avec une valeur d'IC₅₀ égale à 106,32 µg/ml, en comparaison avec les standards (Tableau IV-6, Figure IV-5). Les valeurs des IC₅₀ sont exprimées en µg/ml.

Tableau IV-6 : Activité antiradicalaire au DPPH des extraits de *O. crista-galli* et antioxydants standards

Extraits et standards	IC ₅₀ (µg/ml)
AcOEt	17,13 \pm 0,51
<i>n</i> -BuOH	106,32 \pm 2,13
BHA	6,14 \pm 0,41
BHT	12,99 \pm 0,41
α -tocophérol	13,02 \pm 5,17

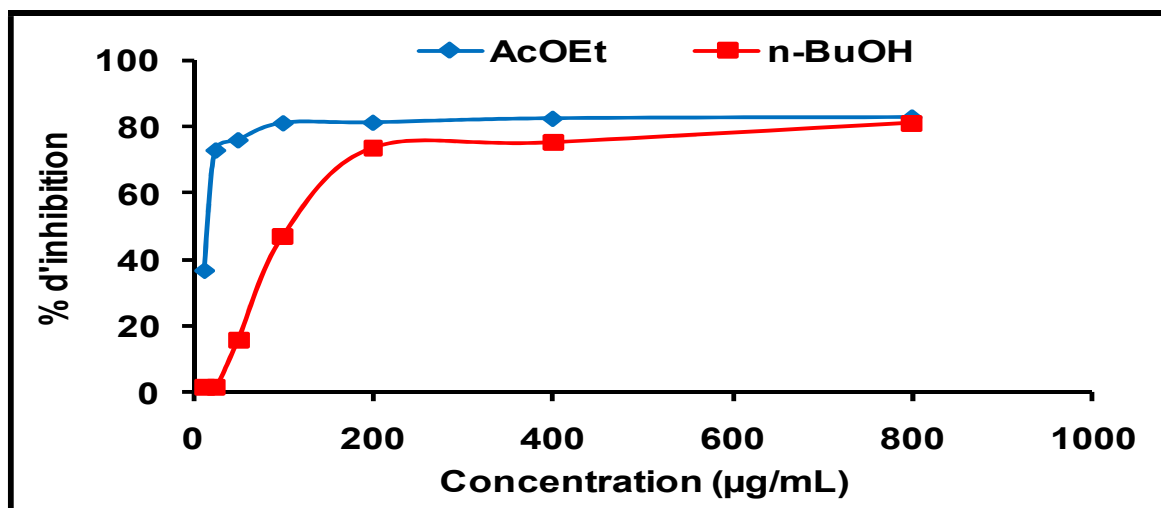


Figure IV-5 : Courbe de pourcentage d'inhibition du DPPH des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *O. crista-galli* (moyennes \pm SD (n=3))

Les profils d'activité antiradicalaire des cinq flavonoïdes, tricine (**OC1**) et hyperoside (**OC4**) isolés de l'extrait AcOEt, 3'-OMe-tricétine 7-*O*-glucoside (**OC2**), astragaline (**OC6**) et lutéoline 5-méthyl éther (**OC3**) isolés de l'extrait *n*-BuOH (Tableau IV-7 et Figure IV-6), révèlent que le composé **OC3** possède l'effet de piégeage du radical DPPH le plus puissant avec une valeur d'IC₅₀ égale à $6,05 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$. Ils ont permis de classer les composés flavonoïdiques en fonction de leur IC₅₀ :

Lutéoline 5-méthyl éther (**OC3**) > 3'-OMe-tricétine 7-*O*-glucoside (**OC2**) > tricine (**OC1**) > hyperoside (**OC4**) > astragaline (**OC6**).

L'histogramme ci-dessous reproduit le pouvoir d'inhibition des 5 flavonoïdes testés en comparaison avec les deux antioxydants standards.

Tableau IV-7 : Activité antiradicalaire au DPPH des flavonoïdes isolés de *O. crista-galli* et antioxydants standards

DPPH		IC ₅₀ (µg/ml)
Flavonoïdes	Tricine (OC1)	$12,01 \pm 0,34^d$
	Hyperoside (OC4)	$31,04 \pm 0,40^b$
	3'-OMe-Tricétine 7- <i>O</i> - glycoside (OC2)	$10,81 \pm 0,51^d$
	Astragaline (OC6)	$43,27 \pm 0,89^a$
	Lutéoline 5-méthyl éther (OC3)	$6,05 \pm 0,15^e$
Standards	BHA	$5,73 \pm 0,41^e$
	BHT	$22,32 \pm 1,19^c$

Les valeurs avec différents exposants (a, b, c, d et e) dans les mêmes colonnes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

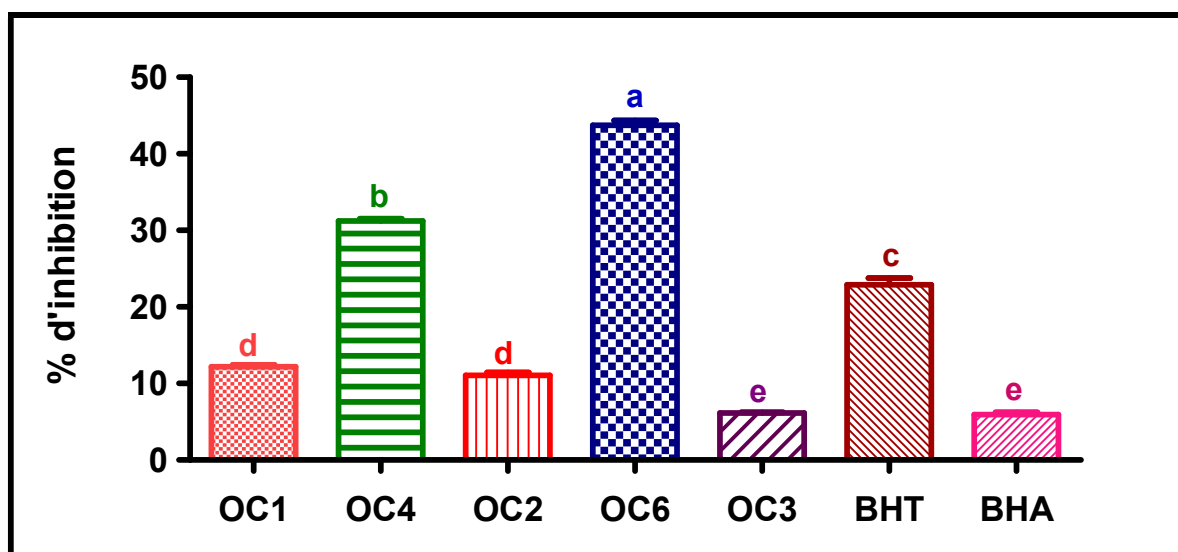


Figure IV-6 : Pourcentage d'inhibition des flavonoïdes (OC1), (OC2), (OC3), (OC4) et (OC6) vis-à-vis du radical DPPH (moyenne \pm SD (n=3))

IV-5-3-2- Activité de piégeage de l'ABTS (ou anti-ABTS)

Les résultats du test ABTS des extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *H. hirtum* (Tableau IV-8 et figure IV-7) montrent que l'extrait AcOEt présente une plus forte activité antioxydante ($25,37 \pm 0,37 \mu\text{g/ml}$) comparée aux standards BHA ($1,81 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}$) et BHT ($1,29 \pm 0,30 \mu\text{g/ml}$)

Tableau IV-8 : Activité antiradicalaire du test ABTS des extraits de *H. hirtum* et standards

Extraits et standards	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
AcOEt	$25,37 \pm 0,37$
<i>n</i> -BuOH	$53,73 \pm 1,07$
BHA	$1,81 \pm 0,10$
BHT	$1,29 \pm 0,30$

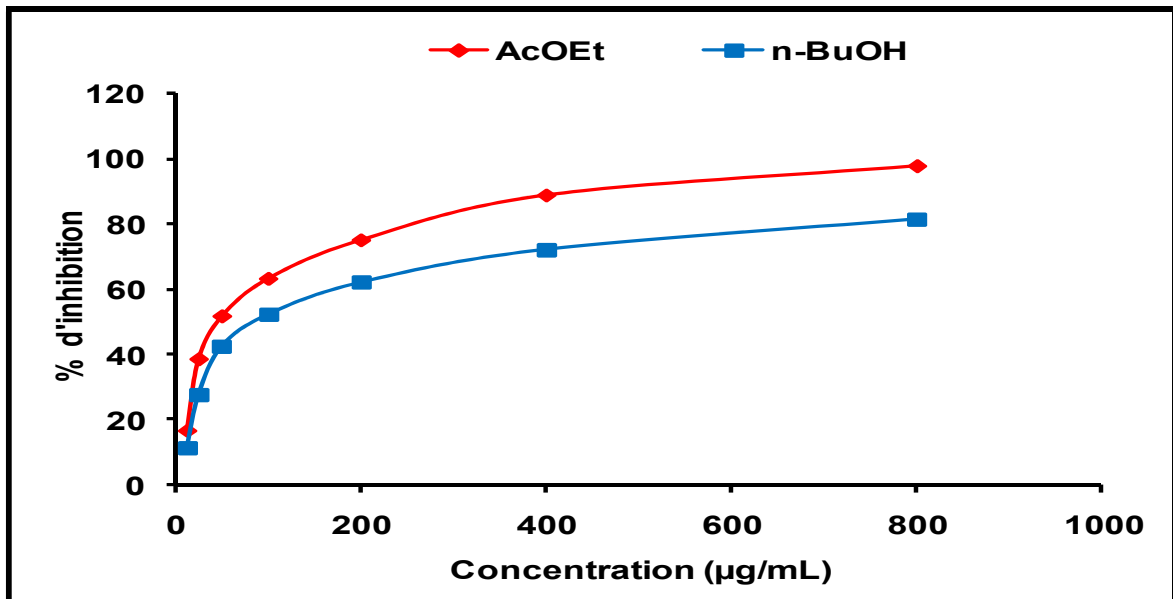


Figure IV-7 : Courbe du pourcentage d'inhibition de l'ABTS des extraits AcOEt et n-BuOH de l'espèce *H. hirtum* (moyennes \pm SD (n=3))

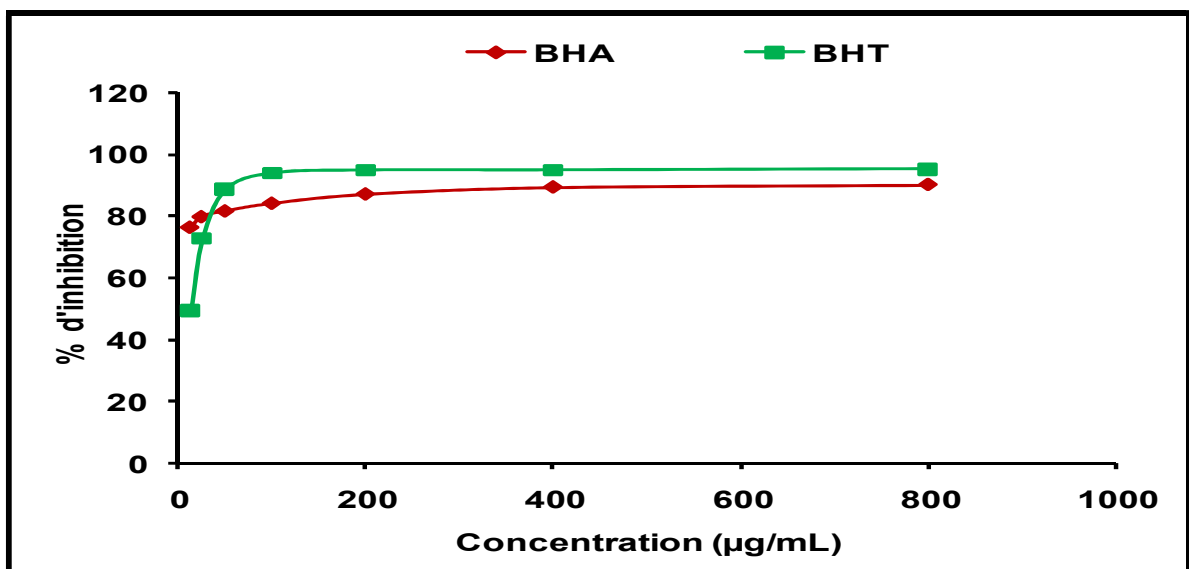


Figure IV-8 : Courbe du pourcentage d'inhibition de l'ABTS des standards (moyennes \pm SD) (n=3)

Les résultats du même test montrent que l'extrait AcOEt de *O. crista-galli* (Figure IV-9) a présenté une capacité inhibitrice du radical ABTS plus élevée par rapport à celle de l'extrait n-BuOH avec respectivement, des valeurs d'IC₅₀ de $82,99 \pm 2,50$ µg/ml et $90,73 \pm 3,27$ µg/ml.

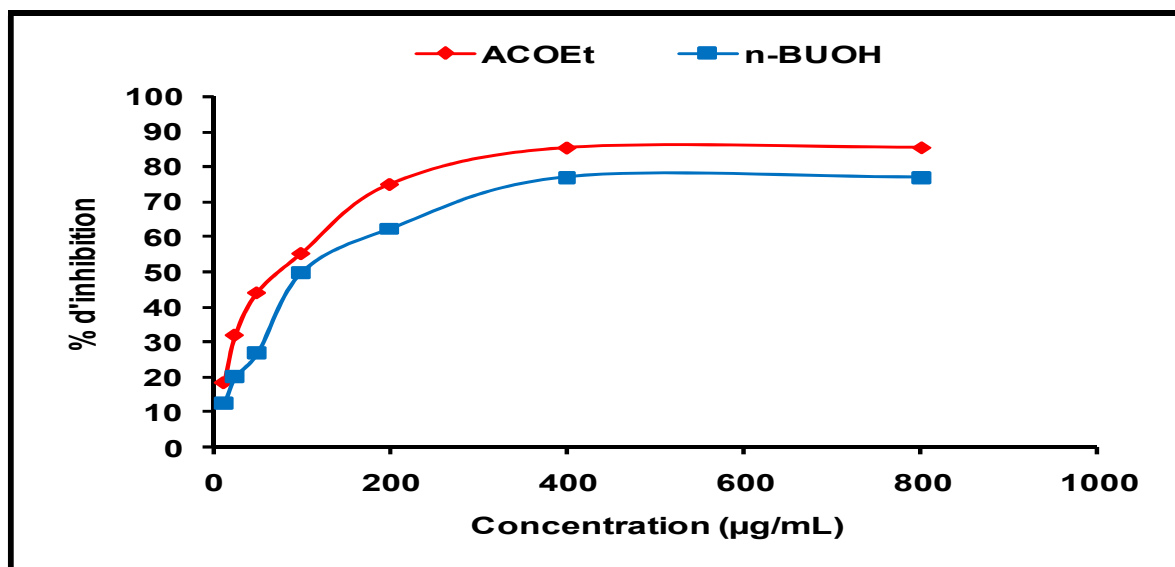


Figure IV-9 : Courbe du pourcentage d'inhibition de l'ABTS des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *O. crista-galli* (moyennes \pm SD (n=3))

Le tableau IV-9 montre les valeurs d'IC₅₀ calculées pour chaque extrait de la plante *O. crista-galli* comparées à celles des standards BHA et BHT.

Tableau IV-9 : Activité antiradicalaire du test ABTS des différents extraits de *O. crista-galli* et antioxydants standards

Extraits et standards	IC ₅₀ (µg/ml)
AcOEt	82,99 \pm 2,50
<i>n</i> -BuOH	90,73 \pm 3,27
BHA	1,81 \pm 0,10
BHT	1,29 \pm 0,30

IV-5-3-3- Activité antiréductrice de l'ion cuprique (CUPRAC)

Ce test est basé principalement sur la mesure de l'absorbance. Le pouvoir inhibiteur des extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *H. hirtum* est de 52,07 \pm 0,53 µg/ml et 97,76 \pm 0,90 µg/ml, respectivement (Figure IV-10). L'extrait AcOEt montre une meilleure activité.

Les résultats sont résumés dans le tableau IV-10.

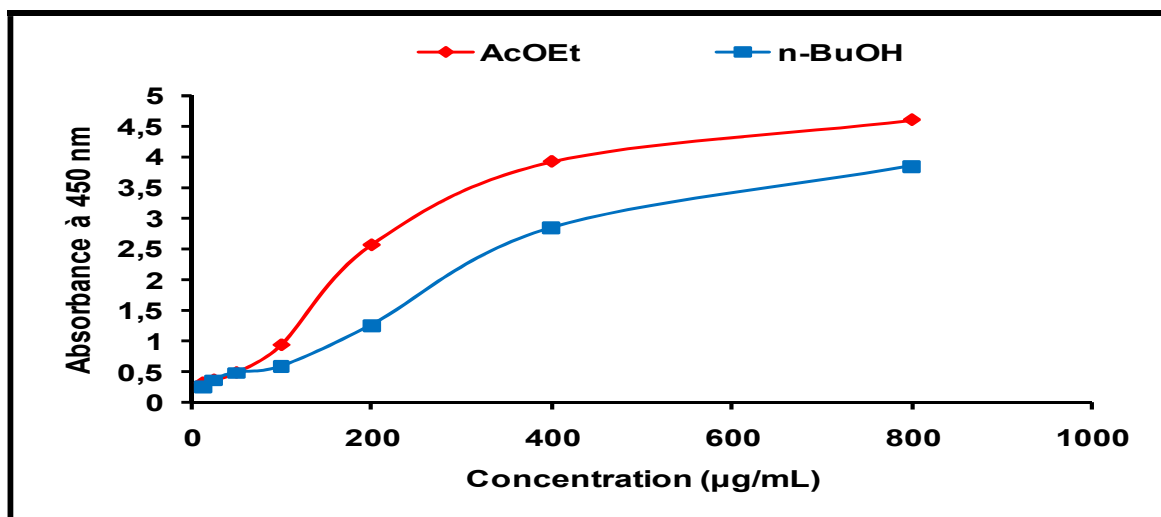


Figure IV-10 : Courbe de l'absorbance du test CUPRAC des extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *H. hirtum* (moyennes \pm SD (n=3))

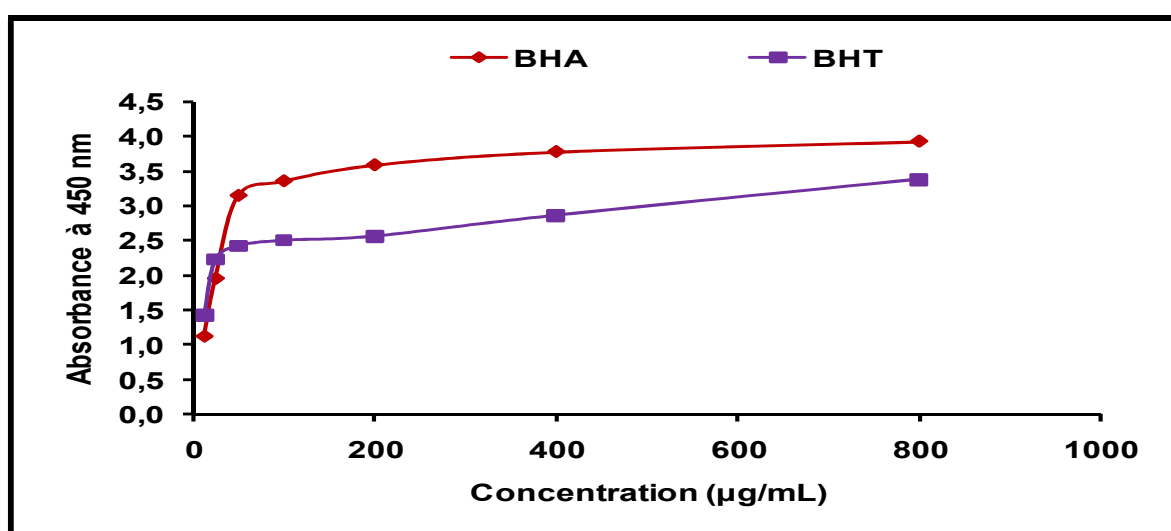


Figure IV-11 : Courbe de l'absorbance du test CUPRAC des standards (moyennes \pm SD (n=3))

Tableau IV-10 : Inhibition du test CUPRAC des extraits de *H. hirtum* et standards

Extraits et standards	A _{0.50} (µg/ml)
AcOEt	52,07 \pm 0,53
<i>n</i> -BuOH	97,76 \pm 0,90
BHA	5,35 \pm 0,71
BHT	8,97 \pm 3,94

L'extrait AcOEt de *O. crista-galli* a montré une meilleure activité ($A_{0,50} = 94,67 \pm 0,41$ $\mu\text{g/ml}$) comparée à celle des deux autres extraits (Tableau IV-11 et figure IV-12).

Tableau IV-11 : Inhibition du test CUPRAC des différents extraits de *O. crista-galli* et standards

Extraits et standards	$A_{0,50}$ ($\mu\text{g/mL}$)
EP	$99,40 \pm 0,86$
AcOEt	$94,67 \pm 0,41$
<i>n</i> -BuOH	$97,17 \pm 0,40$

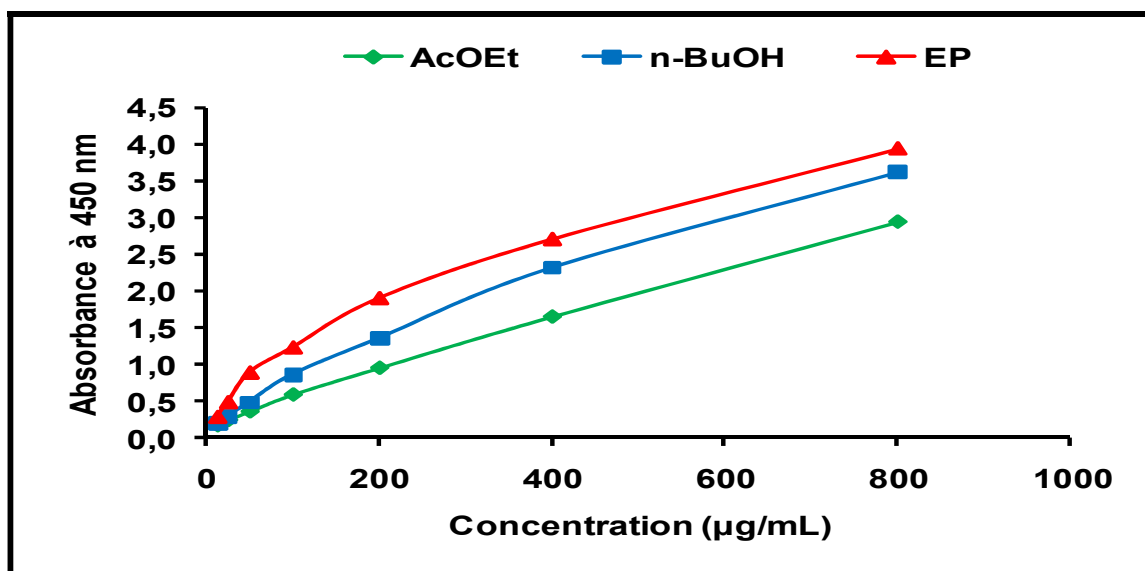


Figure IV-12 : Courbe de l'absorbance du test CUPRAC des trois extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) de la plante *O. crista-galli* (moyennes \pm SD (n=3))

Le flavonoïde lutéoline 5-méthyl éther (**OC3**) isolé de l'extrait butanolique présente la plus forte activité antioxydante par le test CUPRAC avec une valeur $A_{0,50}$ égale à $12,57 \pm 0,34$ $\mu\text{g/mL}$. Les valeurs A_{50} ont permis de classer le pouvoir anti-oxydant des flavonoïdes comme suit: lutéoline 5-méthyl éther (**OC3**) > 3'-OMe-tricétine 7-*O*-glucoside (**OC2**) > tricine (**OC1**) > hyperoside (**OC4**) > astragaline (**OC6**). La figure IV-13 et le tableau IV-12 illustrent les résultats du test de l'activité réductrice du cuivre par les 5 flavonoïdes.

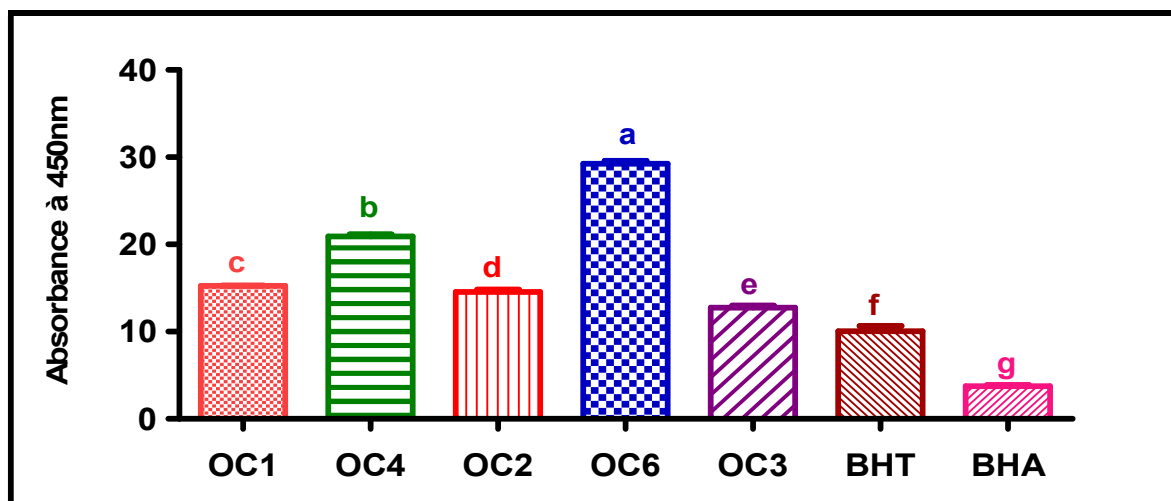


Figure IV-13 : Absorbance du test CUPRAC des 5 flavonoïdes isolés de *O. crista-galli* et antioxydants standards (moyennes \pm SD (n=3))

Tableau IV-12 : Absorbance du test CUPRAC des 5 flavonoïdes et antioxydants standards

CUPRAC		A _{0.50} ($\mu\text{g/ml}$)
Flavonoïdes	Tricine (OC1)	16,20 \pm 0,07 ^c
	Hyperoside (OC4)	20,72 \pm 0,37 ^b
	3'-OMe-Tricétine 7-O- glucoside (OC2)	14,35 \pm 0,39 ^d
	Astragaline (OC6)	29,01 \pm 0,48 ^a
	Lutéoline 5-méthyl éther (OC3)	12,57 \pm 0,34 ^e
Standards	BHA	3,64 \pm 0,19 ^g
	BHT	9,62 \pm 0,87 ^f

Les valeurs avec différents exposants (a, b, c, d, e, f et g) dans les mêmes colonnes sont significativement différentes ($p < 0,05$).

IV-5-3-4- Test superoxyde DMSO alcalin

Dans le test superoxyde alcalin DMSO (Figure IV-14 et Tableau IV-13), l'extrait AcOEt de *H. hirtum* révèle une puissante activité de l'ordre de $19,83 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$ suivi par l'extrait *n*-BuOH avec un pourcentage d'inhibition de $24,17 \pm 1,06 \mu\text{g/mL}$.

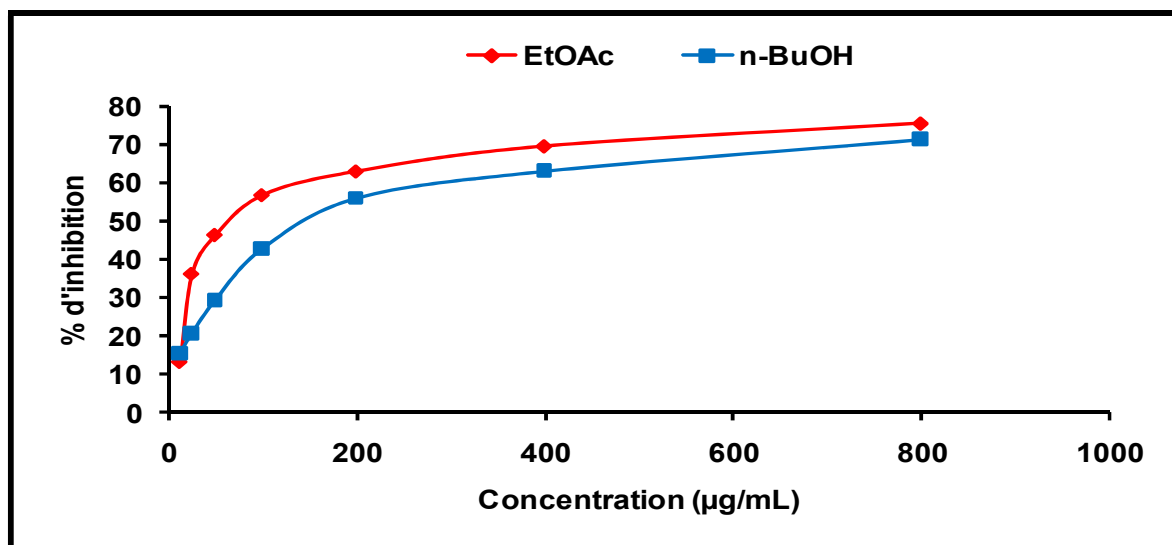


Figure IV-14 : Courbe du pourcentage d'inhibition de DMSO alcalin des extraits (AcOEt et *n*-BuOH) de l'espèce *H. hirtum* (moyennes \pm SD (n=3))

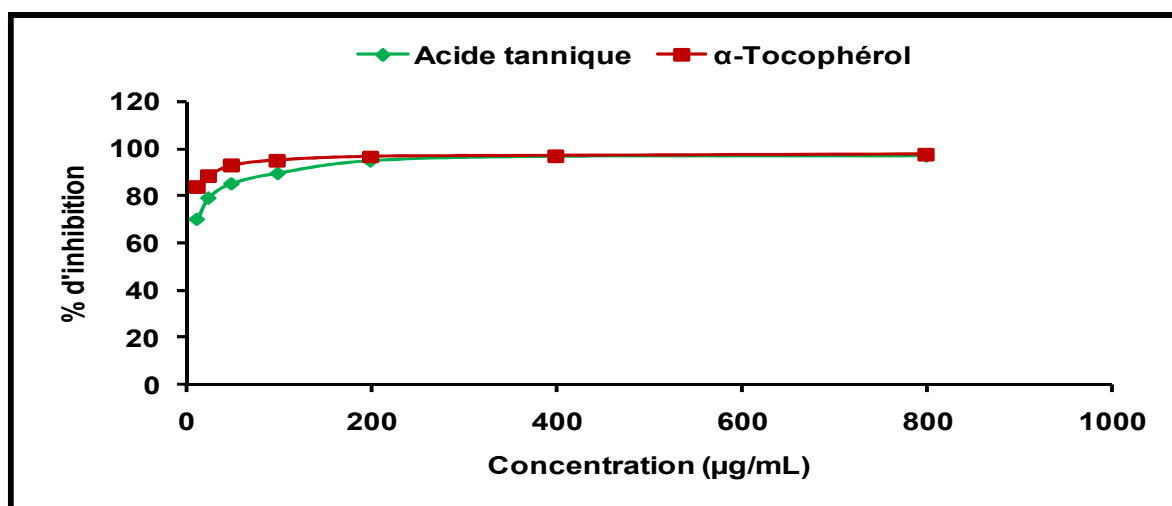


Figure IV-15 : Courbe du pourcentage d'inhibition de DMSO alcalin des standards (moyennes \pm SD (n=3))

Tableau IV-13 : Activité du test DMSO alcalin des extraits de *H. hirtum* et standards

Extraits et standards	IC ₅₀ (µg/mL)
AcOEt	19,83 \pm 0,9
<i>n</i> -BuOH	24,17 \pm 1,06
α-Tocophérol	<3
Acide tannique	<3

Pour la plante *O. crista-galli*, la meilleure activité a été enregistrée dans l'extrait AcOEt avec une valeur d'IC₅₀ égale à 97,09 ± 2,20 µg/ml (Tableau IV-14 et Figure IV-16).

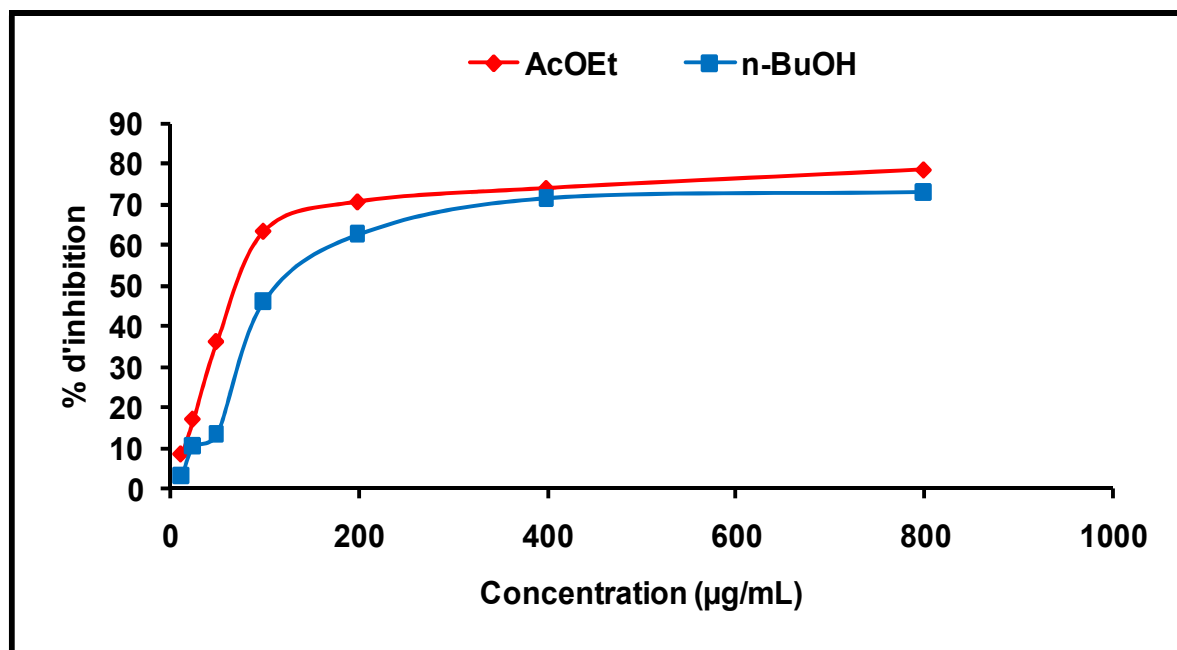


Figure IV-16 : Courbe du pourcentage d'inhibition de DMSO alcalin des extraits AcOEt et *n*-BuOH de *O. crista-galli* (moyennes ± SD (n=3))

Tableau IV-14 : Activité du test DMSO alcalin des deux extraits de *O. crista-galli*

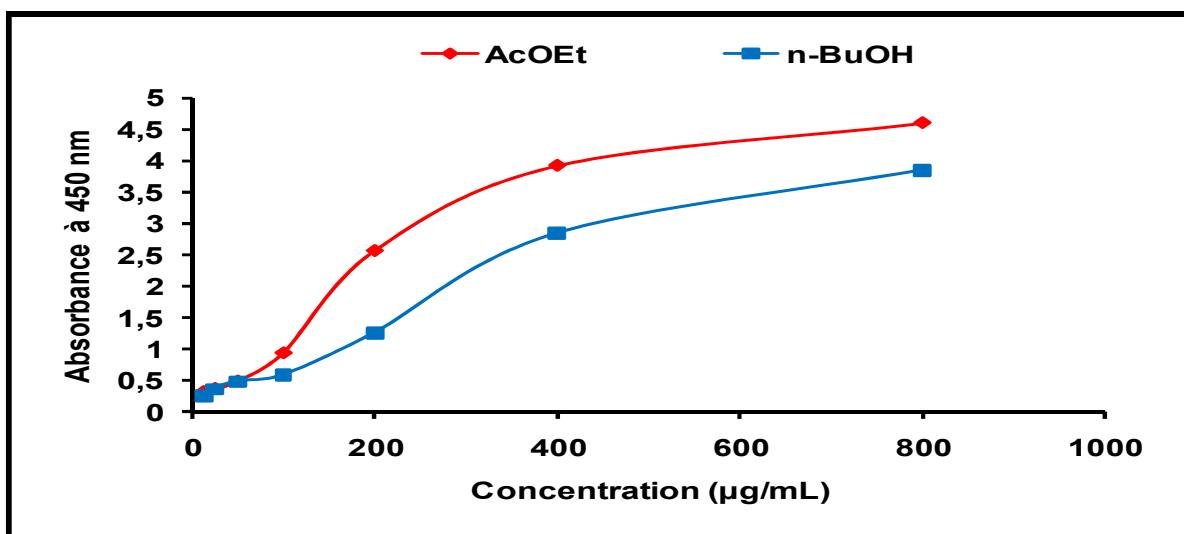
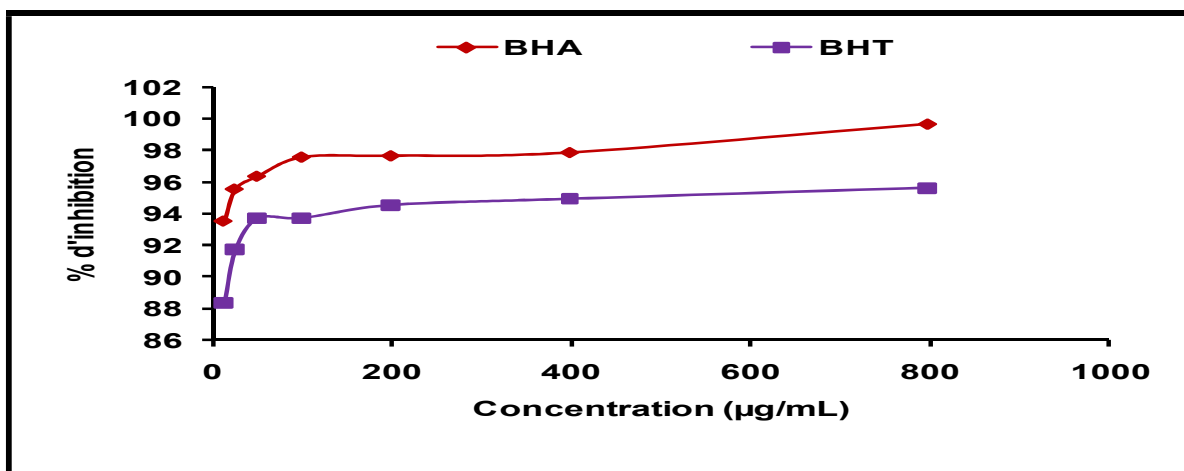
Extraits et standards	IC ₅₀ (µg/ml)
AcOEt	97,09 ± 2,20
<i>n</i> -BuOH	107,16 ± 2,42

IV-5-3-5- Test de blanchissement du β-carotène

Concernant les extraits de l'espèce *H. hirtum*, l'extrait AcOEt a exhibé une activité inhibitrice supérieure (22,64 ± 1,18 µg/ml), suivie par l'extrait *n*-BuOH (49,50 ± 1,02 µg/ml) (Tableau IV-15 et figure IV-17).

Tableau IV-15 : Test de blanchissement du β -carotène des extraits de *H. hirtum* et standards

Extraits et standards	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
AcOEt	22,64 \pm 1,18
<i>n</i> -BuOH	49,50 \pm 1,02
BHA	1,05 \pm 0,03
BHT	0,91 \pm 0,01

Figure IV-17 : Pourcentages d'inhibition du blanchissement du β -carotène des extraits AcOEt et *n*-BuOH de *H. hirtum* (moyennes \pm SD (n=3))Figure IV-18 : Pourcentages d'inhibition du test de blanchissement du β -carotène des standards (moyennes \pm SD (n=3))

Pour ce qui est des extraits de *O. crista-galli*, les résultats obtenus (Figure IV-19 et tableau IV-16) montrent que l'extrait AcOEt constitue un bon piègeur de radicaux libres avec une valeur d'IC₅₀ égale à 36,73 ± 1,17 µg/ml, suivi de l'extrait *n*-BuOH (IC₅₀ = 65,63 ± 0,8 µg/ml) et enfin l'extrait EP (IC₅₀ = 103,93 ± 2,04 µg/ml).

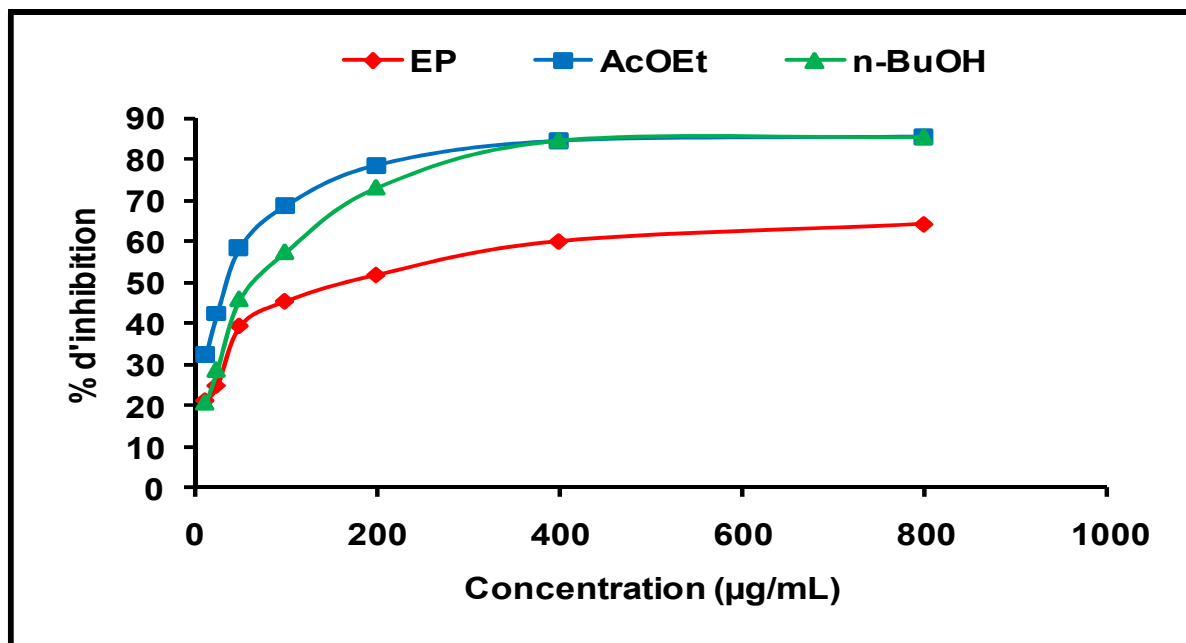


Figure IV-19 : Test de blanchissement du β -carotène des trois extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) de la plante *O. crista-galli* (moyennes \pm SD (n=3))

Tableau IV-16 : test de blanchissement du β -carotène des différents extraits de *O. crista-galli* et antioxydants standards

Extraits et standards	IC ₅₀ (µg/ml)
EP	103,93 \pm 2,04
AcOEt	36,73 \pm 1,17
<i>n</i> -BuOH	65,63 \pm 0,8
BHA	1,05 \pm 0,03
BHT	0,91 \pm 0,01

IV-5-3-6- Synthèse des résultats pour l'activité antioxydante

A l'issue de ces résultats, il s'avère que l'extrait AcOEt de deux espèces *H. hirtum* et *O. crista-galli* possède une forte activité antioxydante dans la totalité des tests effectués, probablement en raison de sa richesse en composés polyphénoliques.

Pour ce qui est des cinq composés isolés, le flavonoïde lutéoline 5-méthyle éther (**OC3**) a montré une meilleure activité anti-DDPH et une meilleure capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC). La différence d'activité antioxydante entre les trois flavonoïdes, lutéoline 5-méthyle éther (**OC3**), 3'-OMe-triciné 7-O-glycoside (**OC2**) et triciné (**OC1**), peut être expliquée par le nombre et la position des groupements hydroxyles au niveau du cycle aromatique B [100, 101]. Une baisse d'activité antioxydante des flavonoïdes glycosylés en C-3, hyperoside (**OC4**) et astragaline (**OC6**), pourrait être due à l'absence de groupement hydroxyle en cette position [102].

IV-5-4- Activité anti-inflammatoire *in vitro*

Les résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* réalisée sur les trois extraits (éther de pétrole, acétate d'éthyle et *n*-butanol) de la plante *Onobrychis crista-galli* indiquent, selon l'histogramme du pourcentage d'inhibition de la dénaturation protéique (Figure IV-20), que les extraits AcOEt et *n*-BuOH possèdent une activité anti-inflammatoire significative aux concentrations 0,5, 1, 2, et 4 mg/ml. Ils ont montré une réponse positive par rapport au standard diclofénac. Le pourcentage maximal d'inhibition de la dénaturation des protéines a été observé dans l'extrait acétate d'éthyle ($95,45 \pm 0,84$ mg/ml) en comparaison à celui de l'extrait *n*-butanol ($62,08 \pm 0,51$ mg/ml), et cela à la concentration de 4 mg/ml.

Ces résultats ont été présentés dans le tableau IV-17 et la figure IV-20. Les extraits de *O. crista-galli* possèdent une activité anti-inflammatoire significative par rapport au standard diclofénac. A notre connaissance, il s'agit de la première étude sur l'activité anti-inflammatoire du genre *Onobrychis*.

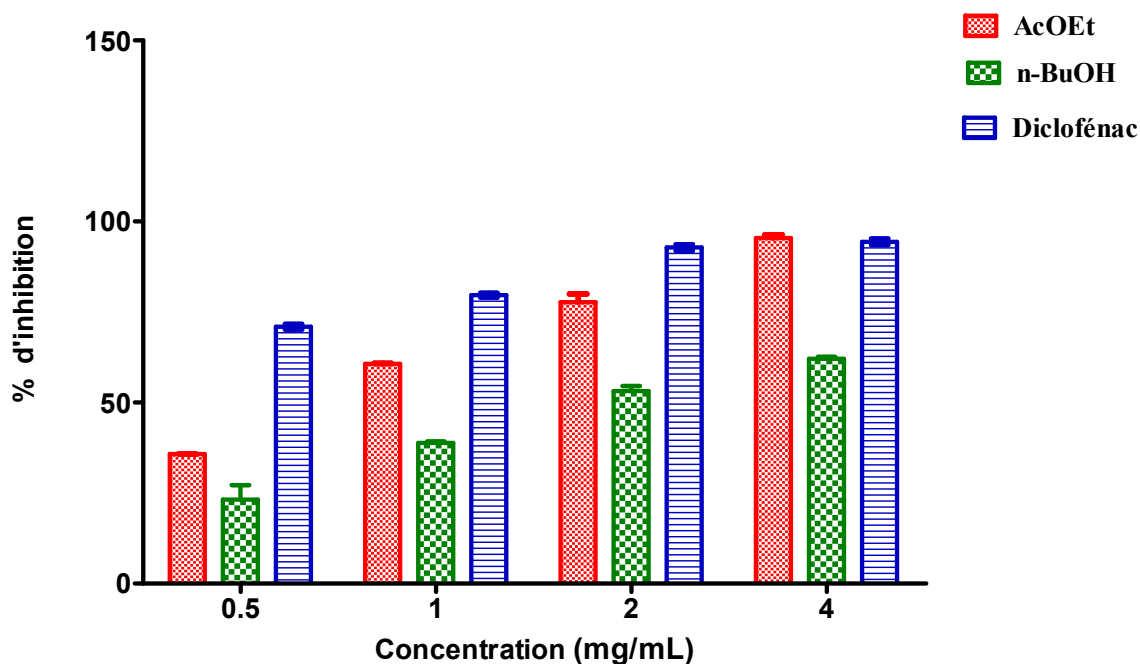


Figure IV-20 : Activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits bruts AcOEt et *n*-BuOH) de l'espèce *O. crista-galli* et du standard diclofénac (moyennes \pm SD (n=3))

Tableau IV-17 : Résultats de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* de *O. crista-galli*

Extraits et standards	Concentration d'extraits /% Activité anti-inflammatoire			
	0,5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml	4 mg/ml
AcOEt	35,76 \pm 0,04	60,68 \pm 0,13	77,73 \pm 2,26	95,45 \pm 0,84
<i>n</i> -BuOH	23,21 \pm 4,00	38,85 \pm 0,43	53,16 \pm 1,43	62,08 \pm 0,51
Diclofénac (1 mg/ml)	70,95 \pm 0,82	79,65 \pm 0,65	92,82 \pm 0,90	94,4 \pm 0,89

La bonne activité inhibitrice de la dénaturation des protéines observée pour l'extrait AcOEt, peut être attribuée à la présence de différents composés bioactifs comme les carbohydrates [103]. L'activité anti-inflammatoire modérée par rapport au diclofénac de l'extrait *n*-BuOH pourrait s'expliquer par la présence de flavonoïdes tels que l'astragaline et la tricine isolés lors de l'étude phytochimique [104, 105, 106].

IV-6- Conclusion

Des déterminations quantitatives des composés phénoliques et flavonoïdes ont été effectués sur les extraits des deux plantes. Le contenu en polyphénols totaux et flavonoïdes a été estimé selon les méthodes de Folin-Ciocalteu et du trichlorure d'aluminium, respectivement. Les résultats obtenus révèlent la présence de polyphénols totaux et de flavonoïdes dans les deux plantes étudiées mais avec des quantités différentes.

L'évaluation de l'activité antioxydante *in vitro* des différents extraits des deux plantes ainsi que des cinq flavonoïdes isolés à partir de l'espèce *O. crista-galli*, a été établie par cinq tests : DPPH, ABTS, CUPRAC, superoxide DMSO alcalin et β -carotène.

Les résultats enregistrés permettent de conclure que les deux plantes en question, *Helianthemum hirtum* et *Onobrychis crista-galli*, possèdent à différents niveaux des propriétés antioxydantes relativement dépendantes de la teneur en phénols totaux et en flavonoïdes, confirmant que ces deux plantes constitueraient une bonne source en substances antioxydantes.

Les cinq flavonoïdes isolés de l'espèce *O. crista-galli* ont montré également une excellente activité antioxydante.

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits éther de pétrole, acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'espèce *O. crista-galli*, a été évaluée par la méthode de dénaturation des protéines. Les résultats montrent que l'extrait acétate d'éthyle a présenté la meilleure activité anti-inflammatoire, due certainement à la prépondérance des composés phénoliques.

Globalement, notre évaluation biologique montre que les deux plantes présentent une bonne activité antioxydante et anti-inflammatoire, en parfait accord avec celles enregistrées pour les plantes des mêmes genres.



Conclusion générale

Conclusion générale

Ce travail est consacré à une étude de la composition chimique et une évaluation biologique (activités anti-oxydante et anti-inflammatoire) de deux plantes algériennes *Helianthimum hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.) Maire et *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam., appartenant respectivement aux familles Cistaceae et Fabaceae.

L'investigation chimique effectuée sur les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique des parties aériennes de *H. hirtum* ssp. *ruficomum* a conduit à l'isolement de 11 composés naturels connus : un néolignane glucoside (**HH1**), 2 dérivés de l'acide quinique [acide 4-*O*-*p*-coumaryl quinique méthyl ester (**HH2**) et acide 5-*O*-*p*-coumaryl quinique méthyl ester (**HH3**)], six flavonoïdes de type flavonol [tiliroside (**HH4**), astragaline (**HH5**), kaempférol 3-*O*-vicianoside (**HH6**), isoquercétrine (**HH7**), quercitrine (**HH8**) et rutine (**HH9**)], acide benzoïque (**HH10**) et acide vanillique (**HH11**).

L'étude chimique réalisée également sur les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique de la plante entière de *O. crista-galli*, a permis l'obtention de 15 composés naturels connus : six flavonoïdes dont trois de type flavone [tricine (**OC1**), 3'-OMe-tricétine 7-*O*- β -glucoside (**OC2**), lutéoline 5-méthyl éther (**OC3**)] et trois autres de type flavonol [hyperoside (**OC4**), isoquercitrine (**OC5**), astragaline (**OC6**)], loliolide (**OC7**), citrusine C (**OC8**), acide 4-hydroxybenzoïque (**OC9**), acide salicylique (**OC10**), éthyl- β -D-glucopyranoside (**OC11**), 2,3-dihydroxy-2-méthylbutyrolactone (**OC12**), éthyl α -L-arabinofuranoside (**OC13**), D-pinitol (**OC14**) et β -sitostérol-3-*O*-glucoside (**OC15**).

L'isolement et la purification de tous ces composés ont été essentiellement fondés sur l'utilisation de différentes techniques chromatographiques: CCM, VLC, CC (SiO₂, polyamide SC6 et Sephadex LH-20), CLMP et CLHP semi préparative.

Leur élucidation structurale a été établie principalement par les méthodes d'analyse spectroscopiques : RMN 1D (¹H et ¹³C *J*-modulé et DEPT), RMN 2D (COSY H-H, TOCSY, HSQC et HMBC), spectrométrie de masse (HRESI et ESI) en plus de la mesure du pouvoir rotatoire [α]_D et la comparaison avec les données de la littérature.

En ce qui concerne l'espèce *H. hirtum* ssp. *ruficomum*, il est important de mentionner que c'est la première fois qu'un néolignane glucoside (**HH1**) et un acide méthyl 4-*O-p*-coumaryl quinique méthyl ester (**HH2**) ont été rencontrés au sein des plantes Cistaceae. Le composé qu'est l'acide 5-*O-p*-coumaryl quinique méthyl ester (**HH3**) a été, pour sa part, identifié pour la première fois dans le genre *Helianthemum*.

Cette étude qui constitue le second rapport scientifique sur la même plante, confirme la prépondérance des composés phénoliques dont les flavonoïdes.

La prépondérance des composés phénoliques comme les flavonoïdes au sein de l'espèce *Onobrychis crista-galli* reflète les résultats des études chimiques antérieures menées sur les plantes du même genre. Il est à souligner toutefois que les flavonoïdes nommés tricine (**OC1**), tricétine (**OC2**), lutéoline 5-méthyl éther (**OC3**) et hypéroside (**OC4**) ont été mis en évidence pour la première fois dans le genre. Les composés appelés isoquercitrine (**OC5**) et astragaline (**OC6**) ont été rencontrés dans les espèces du genre *Onobrychis* comme *O. vicifolia* et *O. bobrovii*.

Globalement, la composition chimique des deux espèces étudiées est en parfait accord avec celle des plantes des genres dont elles dérivent, à savoir *Helianthimum* et *Onobrychis*. Elle confirme la prédominance des composés phénoliques, particulièrement les flavonoïdes.

Au cours de cette étude, différentes analyses ont été menées afin d'évaluer les teneurs en composés phénoliques (polyphénols totaux et flavonoïdes) ainsi que les propriétés antioxydante et anti-inflammatoire des extraits des deux plantes.

L'évaluation des teneurs en phénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu et en flavonoïdes par celle du trichlorure d'aluminium (AlCl_3), montre que les teneurs les plus élevées en phénols totaux ($125,04 \pm 1,34 \mu\text{g EAG/ml}$ d'extrait) et en flavonoïdes ($232,59 \pm 4,76 \mu\text{g EQ/ml}$ d'extrait) ont été enregistrées dans l'extrait AcOEt de l'espèce *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum*. L'extrait *n*-BuOH de la même plante vient en seconde position ($95,06 \pm 0,90 \mu\text{g EAG/ml}$ d'extrait et $132,06 \pm 2,20 \mu\text{g EQ/ml}$ d'extrait respectivement), avant l'extrait AcOEt de la plante *Onobrychis crista-galli*, qui présente respectivement, des teneurs en phénols totaux et en flavonoïdes égales à ($31,05 \pm 0,60 \mu\text{g EAG/ml}$ d'extrait) et ($60,70 \pm 0,70 \mu\text{g EQ/ml}$ d'extrait).

Les propriétés antioxydantes des différents extraits testés ont été évaluées *in vitro* au moyen de cinq tests: DPPH, ABTS, CUPRAC, superoxide DMSO alcalin et β -carotène. Les résultats obtenus indiquent que le meilleur pouvoir antioxydant est le fait de l'extrait AcOEt, et cela pour les deux plantes et pour la totalité des méthodes utilisées. La richesse de l'extrait en flavonoïdes et polyphénols totaux, révélée par l'évaluation de leur teneur, expliquerait le bon potentiel antioxydant des deux plantes.

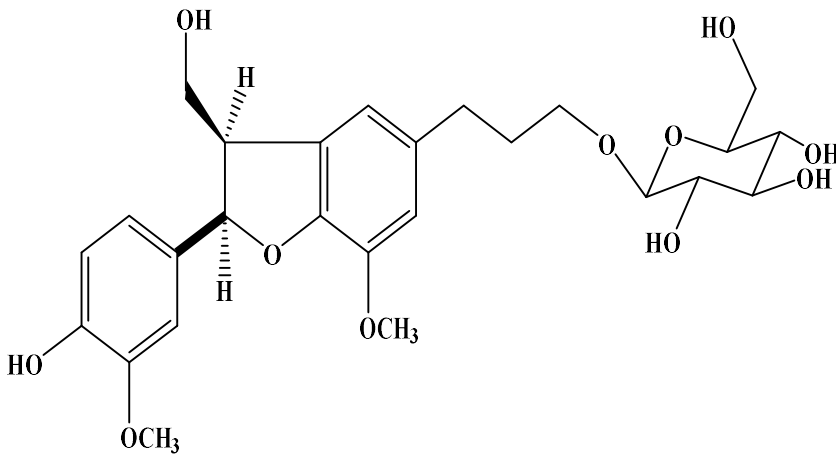
Les flavonoïdes isolés de l'espèce *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam., lutéoline 5-méthyl éther (**OC3**), 3'-OMe-tricétine 7-O-glucoside (**OC2**), tricine (**OC1**), hyperoside (**OC4**) et astragaline (**OC6**), ont manifesté une meilleure activité antioxydante, par les deux tests au DPPH et CUPRAC.

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire *in vitro* des trois extraits (Ep, AcOEt et *n*-BuOH) de l'espèce *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam., par la méthode de la dénaturation des protéines, montre une bonne activité pour l'extrait AcOEt à la concentration de 4 mg/ml comparativement à l'extrait *n*-BuOH. L'extrait étheropétrolique (EP), quant à lui, n'a présenté aucune activité.

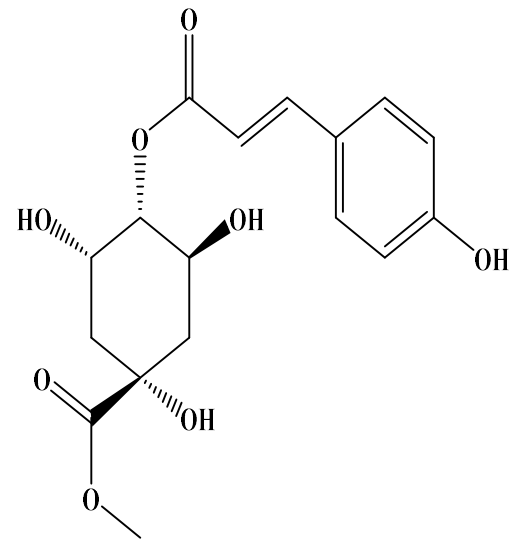
Globalement, cette étude révèle que les deux plantes possèdent des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Ces propriétés sont probablement liées à la composition de l'extrait en composés phénoliques. En effet, il est constaté une bonne corrélation entre la composition en phénols totaux et flavonoïdes de l'ensemble des extrais testés et les deux activités biologiques.

Les résultats obtenus appellent des études plus approfondies. Des essais complémentaires seront nécessaires afin de confirmer les performances établies à l'issue de ce travail. Une étude *in vivo* est souhaitable, pour obtenir une vue globale sur l'activité antioxydante et anti-inflammatoire des extraits testés.

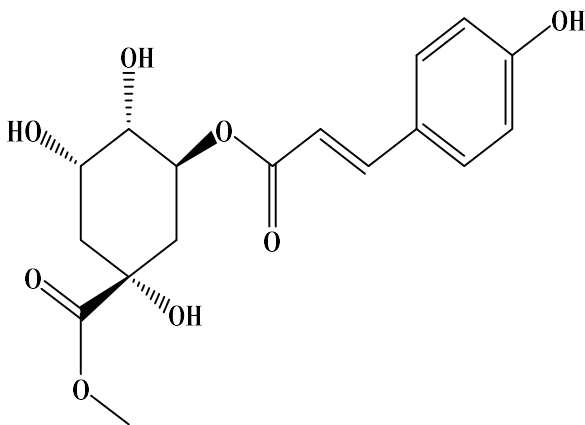
□ *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.) Maire



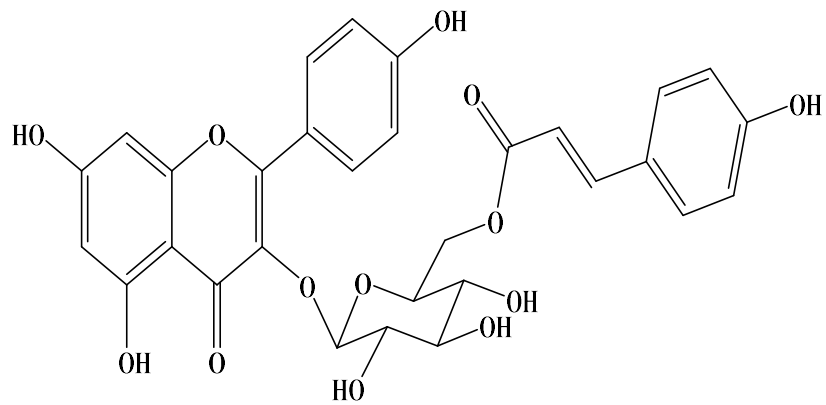
(7R, 8R)-7,8 dihydro-9'-hydroxyl-3'-méthoxyl-8-hydroxyméthyl-7-(4-hydroxy-3-méthoxyphenyl)-1'-benzofuranpropanol 9'-O- β -D-glucopyranoside (HH1)



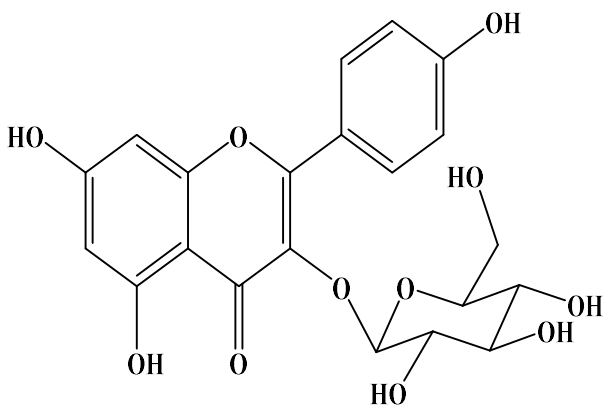
Acide 4-O-p-coumaryl quinique méthyl ester (HH2)



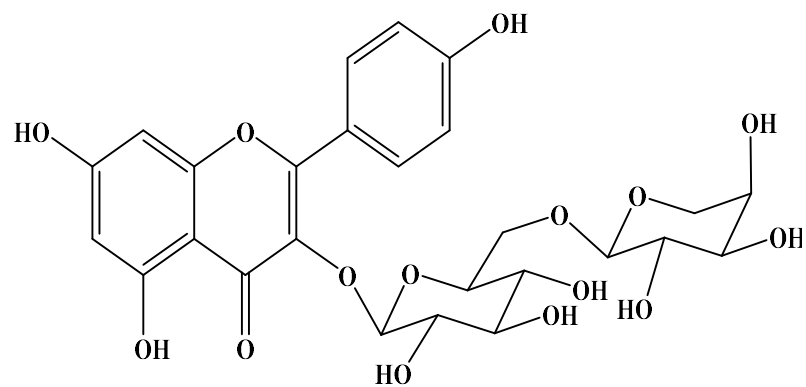
Acide 5-O-p-coumaryl quinique méthyl ester (HH3)



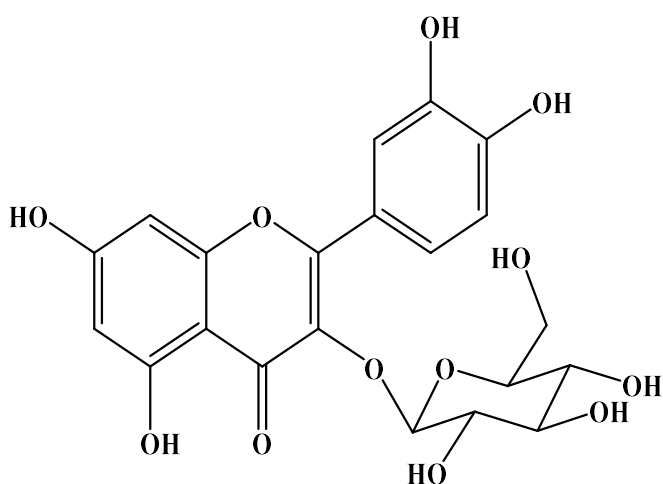
Tiliroside (HH4)



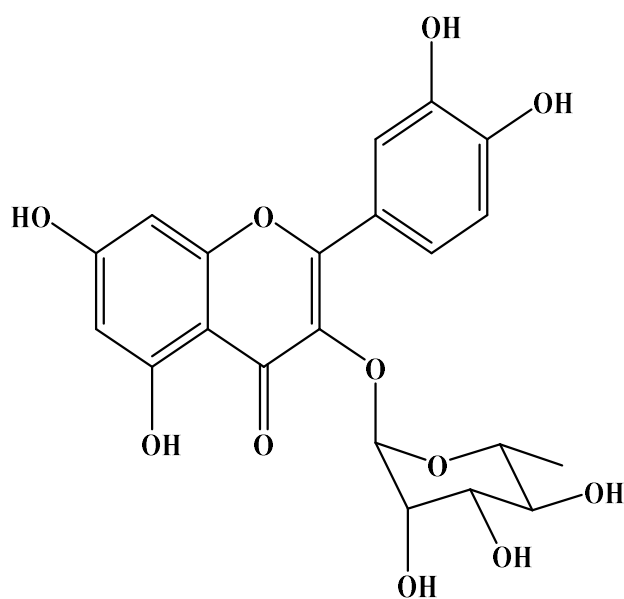
Astragaline (HH5)



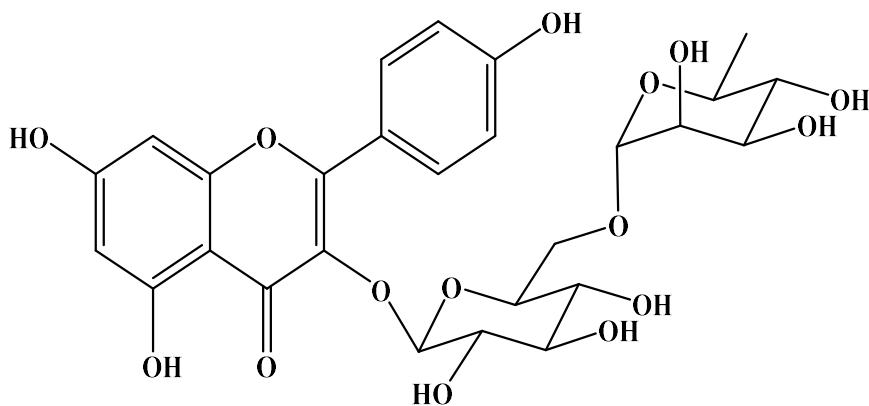
Kaempférol 3-O-vicianoside (HH6)



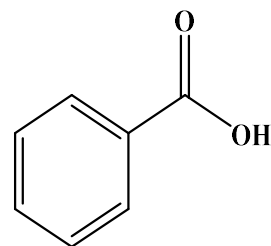
Isoquercitrine (HH7)



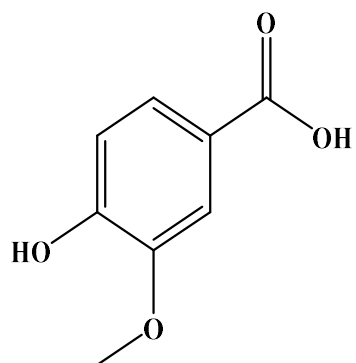
Quercitrine (HH8)



Rutine (HH9)

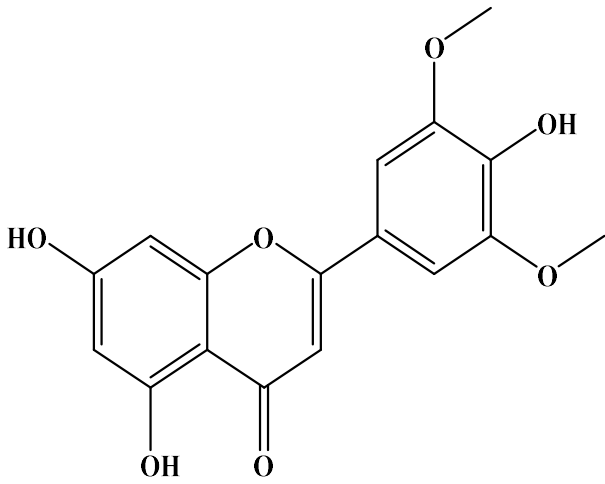


Acide benzoïque (HH10)

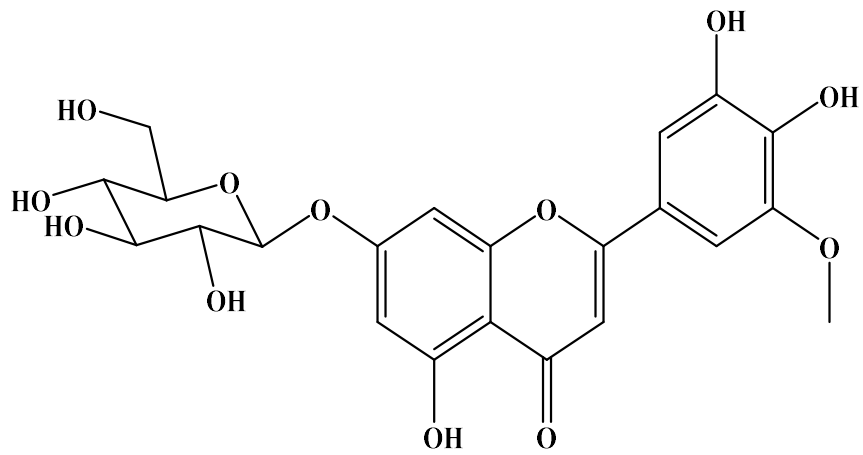


Acide vanillique (HH11)

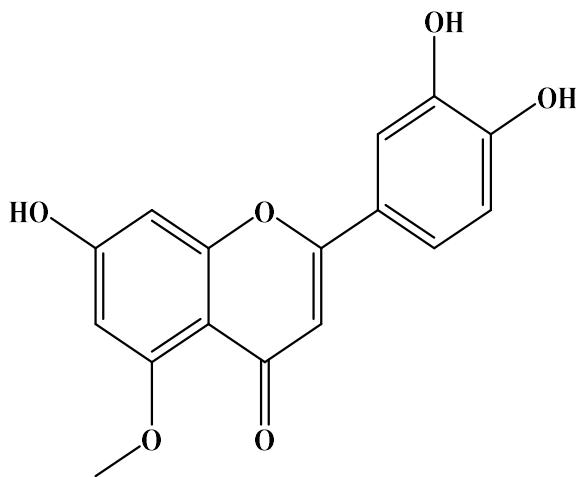
○ *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.



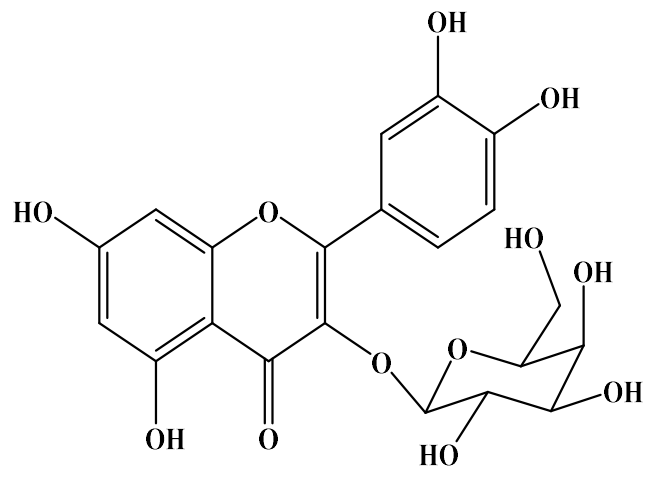
Tricine (OC1)



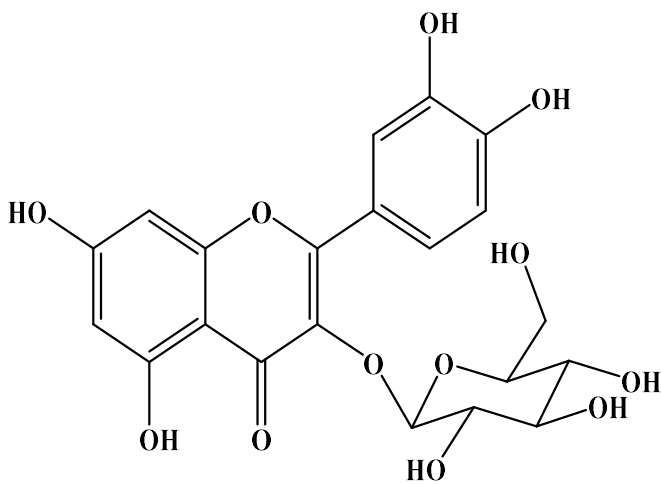
3'-OMe-Tricétine 7-O- β -glucoside (OC2)



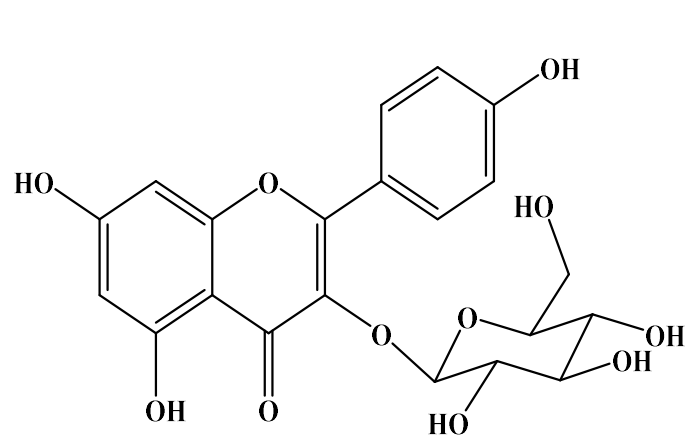
Lutéoline 5-méthyl éther (OC3)



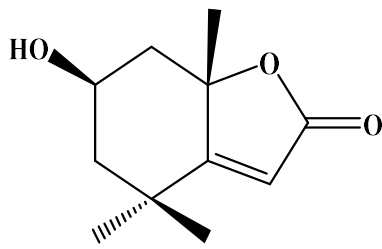
Hyperoside (OC4)



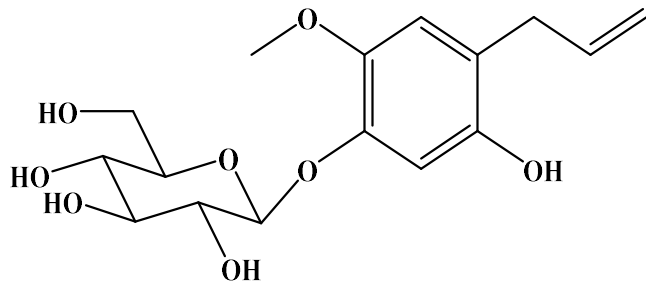
Isoquercitrine (OC5)



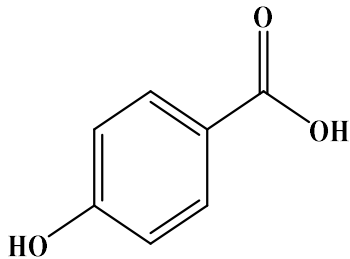
Astragaline (OC6)



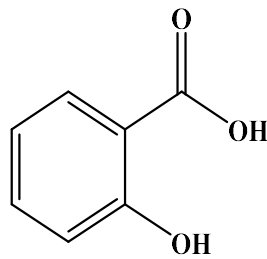
Lolilide (OC7)



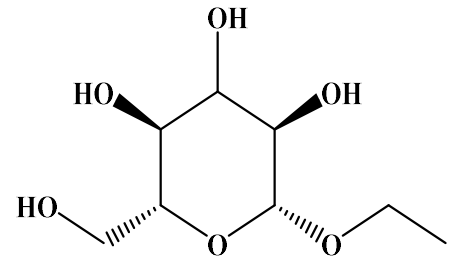
Citrusine C (OC8)



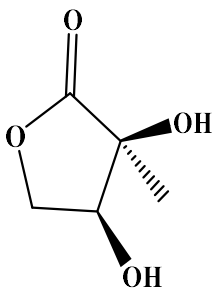
Acide 4-hydroxy benzoïque
(OC9)



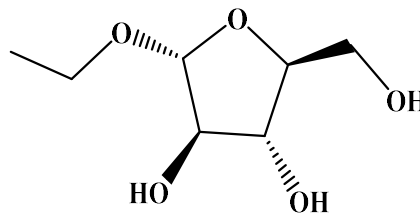
Acide salicylique
(OC10)



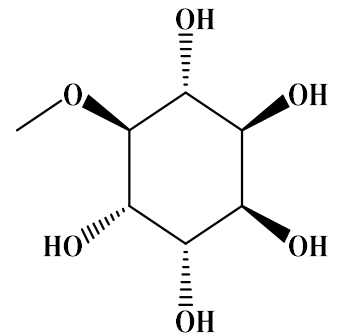
Ethyl-β-D-glucopyranoside
(OC11)



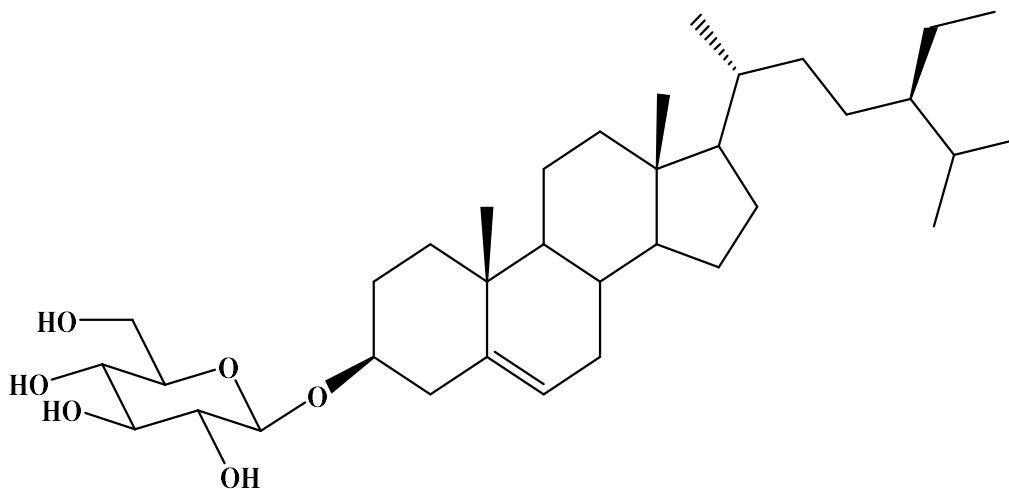
2,3-dihydroxy-2-méthylbutyrolactone
(OC12)



Ethyl α-L-arabinofuranoside
(OC13)



D-Pinitol
(OC14)



β-sitostérol-3-O-glucoside (OC15)



Chapitre V

V-1- Matériel et méthodes

V-1-1- Matériel végétal

Les deux plantes étudiées ont été identifiées par le Professeur Bachir Oudjehih du Département d'Agronomie de l'Institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques de l'Université de Batna-1.

V-1-1- Récolte des plantes *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.) Maire et *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.

La récolte de la plante *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Viv.) Maire a été effectuée au mois de mai 2012 aux alentours d'El Kantara (Wilaya de Biskra).

La récolte de l'espèce *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam. a été faite durant le mois de juillet 2014, dans la région d'Ariss (Wilaya de Batna).

V-1-2- Méthodes analytiques et préparatives de séparation

V-1-2-1- Chromatographie sur couche mince (CCM)

C'est une technique analytique rapide et simple, utilisée au cours de la séparation et l'identification des métabolites. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption. Elle s'applique aussi bien aux molécules pures qu'aux extraits (mélange complexe de métabolites). L'adsorbant utilisé tout au long des différentes étapes de purification est la silice Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck®, 250 µm sur feuille d'aluminium (20 x 20 cm). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. La phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée. Les révélateurs utilisés sont les vapeurs d'iode et/ou un mélange acide (50% eau, 25% acide acétique et 25% acide sulfurique). L'observation des plaques CCM s'effectue en lumière visible et sous une lampe UV à 254 et 365 nm.

V-1-2-2- Chromatographie liquide sous vide (VLC)

La chromatographie liquide sous vide est une technique beaucoup rapide et moins consommatrice de solvants, principalement utilisée pour une séparation grossière des extraits bruts. Elle a été effectuée sur silice en phase normale (Kieselgel Merck® 70-230 mesh) dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n° 4.

V- 1- 2-3- Chromatographie liquide sur colonne (CC)

Elle est utilisée pour le fractionnement et la purification. Les chromatographies sur colonne ouverte ont été réalisées avec deux types de phase stationnaire dans des colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à étudier. Les phases stationnaires utilisées sont :

1. Gel de silice en phase normale Kieselgel Merck® (70-230 mesh)
2. Polyamide SC6 et Sephadex LH-20

La quantité de phase stationnaire a été adaptée à la quantité et à la nature de l'échantillon à étudier. Le choix des conditions d'élution, le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions sont effectués sur la base d'analyses par CCM.

V- 1- 2- 4- Chromatographie liquide moyenne pression (CLMP)

La chromatographie liquide à moyenne pression (CLMP) est une technique de séparation permettant de fractionner en une seule analyse plusieurs grammes d'un mélange complexe avec une résolution convenable. Elle a été effectuée à l'aide d'une pompe Büchi 681, d'un détecteur à longueur d'onde fixe UV detector K 2001 (Knauer) et d'un enregistreur Pharmacia LKB-REC 1.

La séparation a été réalisée sur une colonne ZeoPrép. RP-18 (460 x 49 mm, Büchi) équipée d'une précolonne (Büchi), toutes deux remplies de silice greffée en C-18 (15-20 µm; Merck). L'échantillon est introduit, sous forme solide mélangé au gel de silice (12 g), dans une cartouche complétée avec du sable et reliée à la pré-colonne.

Les systèmes d'élution utilisés sont des mélanges binaires (H₂O-MeOH-acide formique 0,1%) dans des proportions qui varient au cours de l'analyse. La colonne a été éluee avec un débit d'environ 5 ml/min, à une pression moyenne comprise entre 15 et 20 bars.

Les conditions chromatographiques ont été déterminées préalablement par analyse HPLC de l'échantillon sur une colonne Nova-Pak RP-18 (4 µm, 250 × 4.6 mm d.i; Waters). Les fractions ont été récoltées avec un collecteur automatique Büchi 684.

V-1-2-4- Chromatographie liquide haute pression semi-préparative (CLHP semi-prép)

La chromatographie liquide semi-préparative à haute pression est une technique de pointe largement répandue pour les étapes finales de purification des échantillons.

La séparation et la purification des composés **HH1**, **HH2** et **HH3** ont été réalisées en phase inverse sur une colonne (SunFire RP-18, 100 x 30 mm, 5 μ m), sur un appareil du laboratoire de l'Institut de Recherche Pierre Fabre de Toulouse (France). L'élution a été menée par un mélange de solvants (MeCN-H₂O-acide formique 0,1%) en mode gradient et avec un débit fixé à 50 ml/min.

La séparation et la purification du composé **OC4** ont été effectuées en phase inverse sur une colonne (X Bridg RP-18, 250 x 21,2 mm, 10 μ m), sur un appareil du Centre Médical Universitaire de l'Université de Genève (Suisse). L'élution s'est faite par un mélange de solvants (H₂O-MeOH-acide formique 0,1%) en mode gradient et avec un débit fixé à 25 ml/min.

V- 1- 3- Chimie structurale

V- 1- 3-1- Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$

Le pouvoir rotatoire des trois composés obtenus **HH1**, **HH2** et **HH3** a été mesuré dans MeOH sur un polarimètre Perkin-Elmer 341 à 20-25°C. La source de lumière utilisée est la raie D du sodium (589 nm) dans une cuve de longueur 10 cm et de volume 1 ml, à température ambiante.

V- 1- 3-2- Spectrométrie de masse

Les spectres de masse ESI et HR-ESI ont été enregistrés respectivement, sur un spectromètre à trappe d'ions "Thermo LCQ Advantage" du laboratoire de l'Institut de Recherche Pierre Fabre de Toulouse (France) et un spectromètre de masse type Micromass-LCT Premier Time of Flight mass spectrometer de l'Ecole des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Genève (Suisse).

V-1-3-3- Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été effectués au :

1. Laboratoire de l'Institut de Recherche Pierre Fabre de Toulouse (France) sur un spectromètre Brüker DRX à 500 MHz pour ^1H et 125 MHz pour ^{13}C .
2. Centre Médical Universitaire de l'Université de Genève (Suisse), sur un appareil Varian/Agilent Inova, RMN à 600 MHz pour ^1H et 150 MHz pour ^{13}C .

Les solvants deutérés (CD_3OD , MeOD) de solubilisation des composés pour la réalisation des spectres sont précisés à chaque fois.

V-1-4- Etude de l'espèce *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum*

V-1-4-1- Extraction

Les parties aériennes ($m = 1000$ g) de *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum*, préalablement séchées et réduites en poudre sont soumises sous agitation, à une double macération dans le mélange de solvants $\text{EtOH-H}_2\text{O}$ (70:30) (2 x 10 litres) pendant 72 h à température ambiante. Après filtration et évaporation non à sec du solvant, la phase aqueuse résultante subit une extraction liquide-liquide en utilisant des solvants à polarité croissante : l'éther de pétrole (400 ml, 3 fois), acétate d'éthyle (400 ml, 3 fois) et enfin le *n*-butanol (400 ml, 5 fois). L'évaporation à sec des solutions organiques résultantes a donné 4,43 g pour l'extrait étheropétrolique, 4,9 g pour l'extrait acétate d'éthyle et 32,7 g pour l'extrait *n*-butanolique.

Les CCM effectuées sur les trois extraits dans plusieurs systèmes de solvants révèlent la richesse en métabolites secondaires, des deux extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique.

V-1-4-2- Fractionnement et purification de l'extrait d'acétate d'éthyle

4,9 g de l'extrait acétate d'éthyle ont été soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice normal comme phase stationnaire (50 g). L'élution a été réalisée par un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle à divers gradients (100-0 à

0-100), puis par un gradient de solvants méthanol/acétate d'éthyle (0-100 à 100-0), donnant neuf fractions majoritaires (Tableau V-1).

Tableau V-1 : Fractionnement de l'extrait AcOEt de l'espèce *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum*

Eluant de la colonne		Fractions	Poids en mg
EP/AcOEt	100- 0	F1	4,2
	97-3		
	95-5		
	90-10		
	80-20	F2	38,1
	70-30		
	60-40	F-3	144,2
	50- 50		
	40-60	F4	60,6
	30-70	F5	121,5
	20-80	F6	758,9
	10-90		
	0-100		
AcOEt/MeOH	99-1	F7	821,3
	97-3		
	95-5	F8	3507,5
	90-10		
	80-20		
	70-30 à 0-100	F9	219,1

- La fraction F6 (758,9 mg) soumise à une chromatographie sur une colonne de gel de silice dans un mélange EP/AcOEt (100-0 à 0-100) a fourni 19 sous-fractions (F6-1 à F6-19). La sous fraction F6-18 (332,4 mg) a ensuite subi une chromatographie sur une colonne ouverte de polyamide SC-6 comme phase stationnaire. L'élution a été réalisée dans un mélange toluène/MeOH à différents gradients (100-0 à 0-100), donnant les composés **HH4** (20 mg) et **HH5** (16 mg).
- Les deux fractions F7 et F8 regroupées (3,85 g) sont soumises à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale. L'élution effectuée par un mélange de solvants CHCl₃/MeOH (100-0 à 80-20) a permis de recueillir 15 sous fractions (F7-1 à F7-15).
- La purification des composés **HH8** (10 mg) et **HH7** (5 mg) a été réalisée par une chromatographie sur une colonne de polyamide SC-6 sur la sous fraction F7-12 (244,6 mg) éluee par le mélange toluène/MeOH (100-0 à 80-20), puis une chromatographie sur une colonne de Sephadex LH-20 dans MeOH.
- La sous fraction F7-14 (226,5 mg) soumise à une chromatographie sur colonne de polyamide SC-6 dans un mélange toluène/MeOH (100-0 à 0-100), suivie d'une filtration sur colonne de Sephadex LH-20 dans MeOH (100%), a permis d'obtenir les composés **HH6** (7 mg) et **HH9** (5 mg) à l'état pur.
- La fraction F3 (144,2 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution menée dans un mélange EP/AcOEt (100/0 à 40/60) a donné 15 sous-fractions (F3-1 à F3-15). Une purification des sous fractions F3-7 (3 mg) et F3-9 (3,9 mg) sur colonne de Sephadex LH-20 dans MeOH (100%) a abouti à l'isolement des composés **HH10** (2,1 mg) et **HH11** (2,8 mg).

V-1-4-3- Fractionnement et purification de l'extrait *n*-butanolique

20 g de l'extrait *n*-BuOH sont séparés par une chromatographie sur colonne ouverte en utilisant le polyamide SC-6 comme phase stationnaire. L'élution est effectuée par le mélange eau/méthanol (100/0, 80/20, 50/50, 20/80 et 0/100). A l'issue de ce fractionnement primaire, 15 fractions ont été recueillies (F1-F15) (Tableau V-2).

Tableau V-2 : Fractionnement de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum*

Eluant colonne	Fractions	Poids en mg
H ₂ O	F1	17,8
	F2	4036,4
	F3	3177,0
	F4	2251,1
	F5	1302,8
	F6	755,5
H ₂ O/MeOH (80-20)	F7	702,7
	F8	360,9
	F9	561,2
H ₂ O/MeOH (50-50)	F10	207
	F11	197,7
	F12	888,5
H ₂ O/MeOH (20-80)	F13	503,7
	F14	955,5
MeOH 100%	F15	677,7

- La fraction 8 (360,9 mg) a été reprise par une chromatographie sur colonne de polyamide SC-6, éluée par un mélange toluène/MeOH (100/0 à 70/30), permettant d'obtenir 7 sous-fractions (F8-1 à F8-7).
- La sous-fraction F8-4 (90 mg) a subi une séparation en phase inverse sur une colonne HPLC semi-préparative avec un gradient H₂O/MeCN (90/10 à 60/40-acide formique 0,1%) et un débit fixé à 50 ml/min. Elle a permis d'obtenir les trois composés **HH1** ($t_R = 8,267$ min, $m = 3$ mg), **HH2** ($t_R = 9,333$ min, $m = 1,2$ mg) et **HH3** ($t_R = 9,820$ min, $m = 1$ mg).

V-1-4-4- Composés isolés de l'espèce *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum*

V-1-4-4-1- Composé HH1

-Nom : Neolignane glucoside

-Formule brute : $C_{26}H_{34}O_{11}$

-Masse moléculaire : 522 uma

-MS : ESI-MS (modes négatif et positif)

$$m/z = 520,7 [M-H]^-$$

$$m/z = 545 [M+H]^+$$

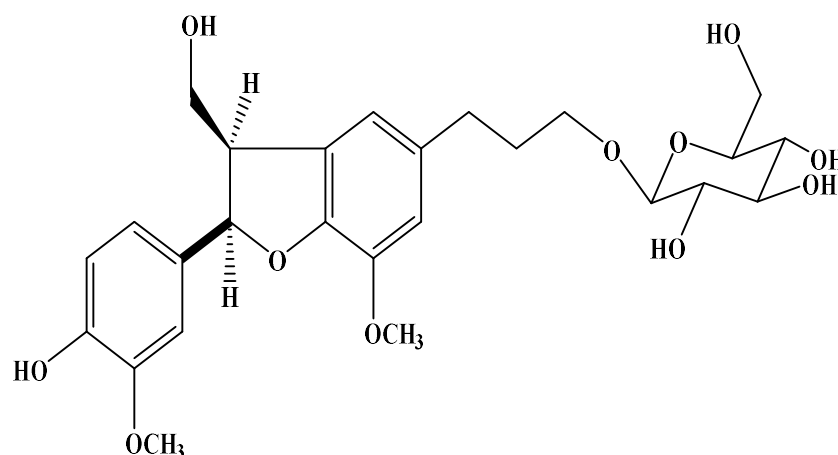
$$[\alpha]_D = -45 (c = 3,33 \times 10^{-4};$$

MeOH)

-RMN 1H : 500 MHz, MeOD-RMN ^{13}C : 125 MHz, MeOD

-Données spectrales :

Tableau II-1, pages 43-44



V-1-4-4-2- Composé HH2

-Nom : Acide méthyl 4-*O-p*-coumaryl quinique-Formule brute : $C_{17}H_{20}O_8$

-Masse moléculaire : 352 uma

-MS : ESI-MS mode négatif et positif

$$m/z = 350,6 [M-H]^-$$

$$m/z = 374,9 [M+Na]^+$$

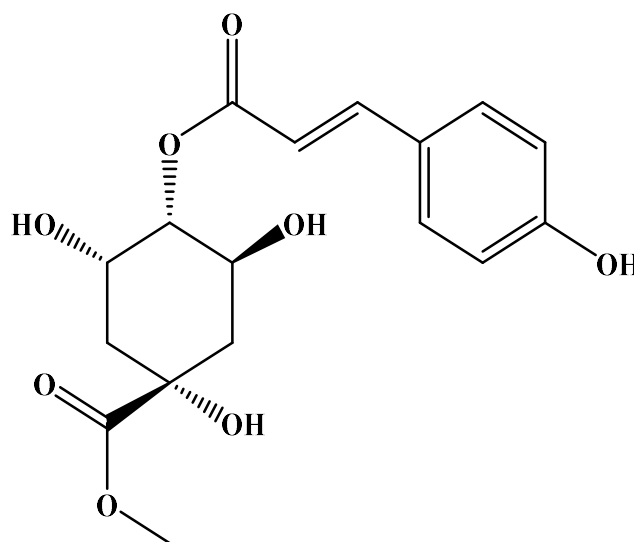
$$m/z = 727 [2M+Na]^+$$

$$[\alpha]_D = -19 (c = 4,17 \times 10^{-4}; \text{MeOH})$$

-RMN 1H : 500 MHz, MeOD-RMN ^{13}C : 125 MHz, MeOD

-Données spectrales :

Tableau II-2, pages 51-52



V-1-4-4-3- Composé HH3

-Nom : Acide méthyl 5-*O*-*p*-coumaryl
quinique

-Formule brute : C₁₇H₂₀O₈

-Masse moléculaire : 352 uma

-MS : ESI-MS modes négatif et positif

$$m/z = 350,6 [M-H]^-$$

$$m/z = 374,9 [M+Na]^+$$

$$m/z = 727 [2M+Na]^+$$

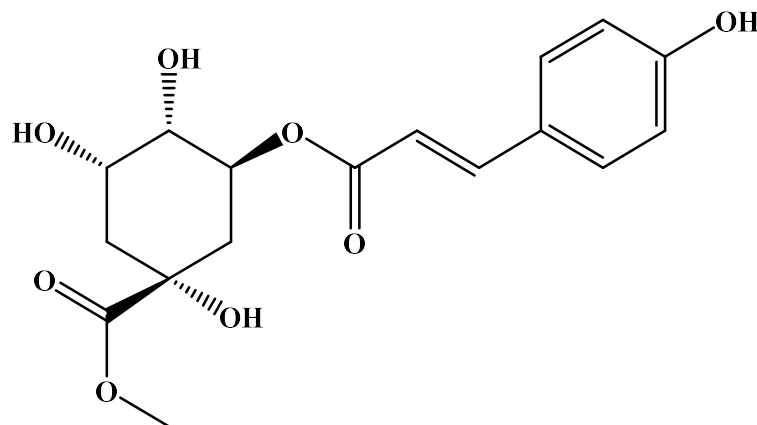
[α]_D = -8,6 (*c* = 2,33 x 10⁻³ ; MeOH)

-RMN ¹H : 500 MHz, MeOD

-RMN ¹³C : 125 MHz, MeOD

-Données spectrales:

Tableau II-3, pages 55-56



V-1-4-4-4- Composé HH4

-Nom : Tiliroside

-Formule brute : C₃₀H₂₆O₁₃

-Masse moléculaire : 594 uma

-MS : ESI-MS mode négatif

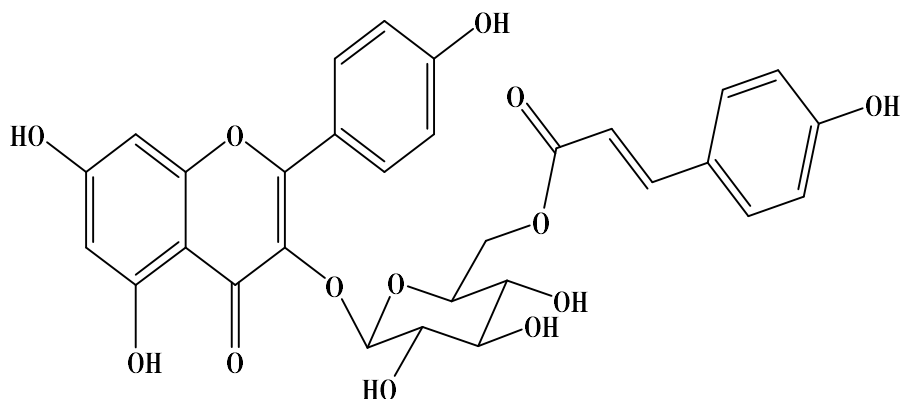
$$m/z = 593,0 [M-H]^-$$

-RMN ¹H : 600 MHz, CD₃OD

-RMN ¹³C : 150 MHz, CD₃OD

-Données spectrales :

Tableau II-4, pages 65-66



V-1-4-4-5- Composé HH5

-Nom : Astragaline

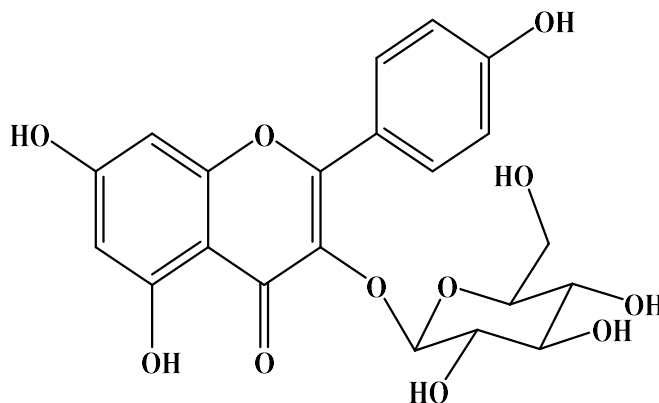
-Formule brute : C₂₁H₂₀O₁₁

-Masse moléculaire : 448 uma

-MS : ESI-MS mode négatif

$$m/z = 447,0 [M-H]^-$$

$$m/z = 895,1 [2M-H]^-$$



-RMN ^1H : 600 MHz, CD_3OD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD

-Données spectrales :

Tableau II-5, page 69

V-1-4-4-6- Composé HH6

-Nom : Kaempférol 3-O-vicianoside

-Formule brute : $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_{15}$

-Masse moléculaire : 580 uma

-MS : ESI-MS mode négatif

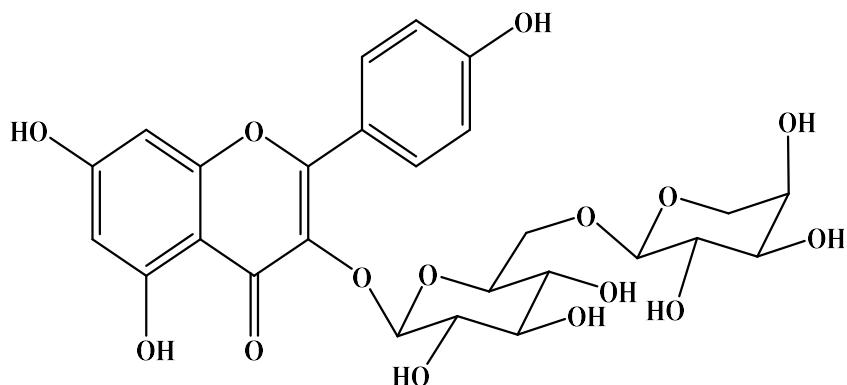
$m/z = 579,1$ $[\text{M-H}]^-$

-RMN ^1H : 600 MHz, CD_3OD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD

-Données spectrales :

Tableau II-6, pages 74-75



V-1-4-4-7- Composé HH7

-Nom : Isoquercitrine

-Formule brute : $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$

-Masse moléculaire : 464 uma

-MS : ESI-MS mode négatif

$m/z = 463,0$ $[\text{M-H}]^-$

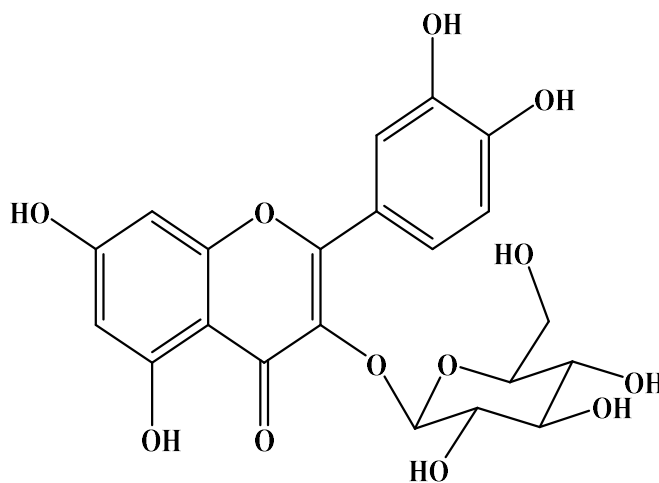
$m/z = 927,1$ $[2\text{M-H}]^-$

-RMN ^1H : 600 MHz, CD_3OD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD

-Données spectrales :

Tableau II-7, pages 81-82



V-1-4-4-8- Composé HH8

-Nom : Quercitrine

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

-Masse moléculaire: 448 uma

-MS : ESI-MS mode négatif

$$m/z = 447,0 [M-H]^-$$

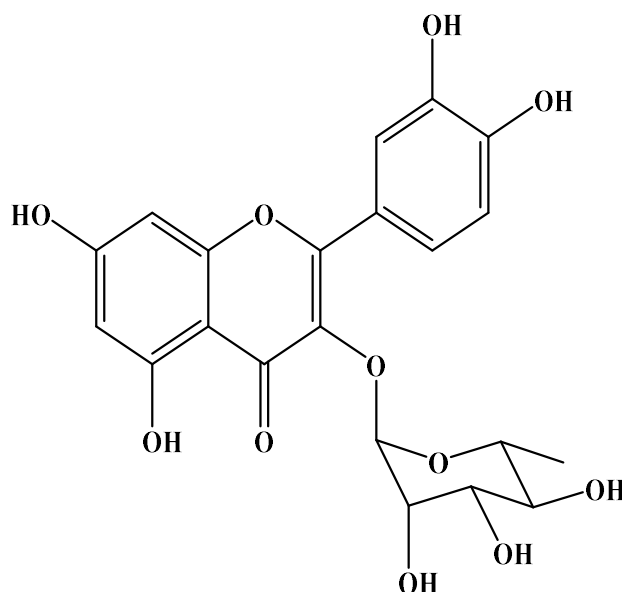
$$m/z = 895,0 [2M-H]^-$$

-RMN 1H : 600 MHz, CD_3OD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD

-Données spectrales :

Tableau II-8, pages 86-87

**V-1-4-4-9- Composé HH9**

-Nom : Rutine

-Formule brute : $C_{27}H_{30}O_{16}$

-Masse moléculaire : 610 uma

-MS : ESI-MS mode positif

$$m/z = 611,1 [M+H]^+$$

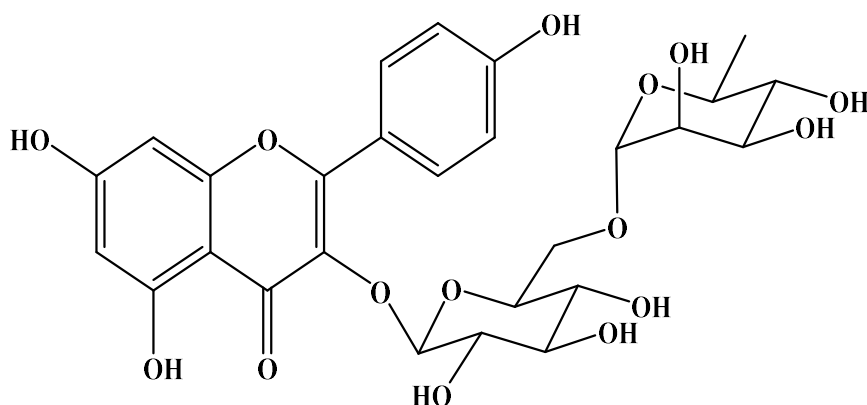
$$m/z = 1221,3 [2M+H]^+$$

-RMN 1H : 600 MHz, CD_3OD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD

-Données spectrales :

Tableau II-9, pages 91-92

**V-1-4-4-10- Composé HH10**

-Nom : Acide benzoïque

-Formule brute : $C_7H_6O_2$

-Masse moléculaire : 122 uma

-MS: ESI-MS mode négatif

$$m/z = 121,1 [M-H]^-$$

-RMN 1H : 600 MHz, CD_3OD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, CD_3OD

-Données spectrales :

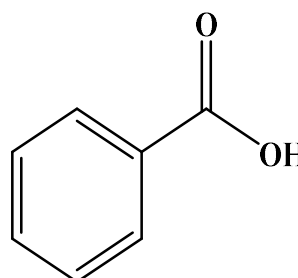


Tableau II-10, page 94

V-1-4-4-11- Composé HH11

-Nom : Acide vanillique

-Formule brute : C₈H₈O₄

-Masse moléculaire : 168 uma

-MS : ESI-MS mode négatif

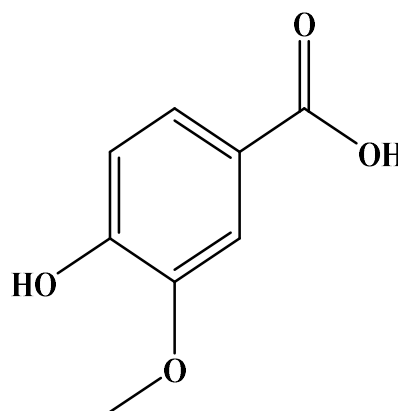
$$m/z = 167,0 [M-H]^-$$

-RMN ¹H : 600 MHz, CD₃OD

-RMN ¹³C : 150 MHz, CD₃OD

-Données spectrales :

Tableau II-11, page 96



V-1-5- Etude de l'espèce *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.

V-1-5-1- Extraction

1500 g de la plante entière (parties aériennes et racines) de l'espèce *Onobrychis crista-galli*, préalablement séchés et finement pulvérisés, ont été soumis à une double macération (2 x 10 l) dans un mélange EtOH/H₂O 70/30 (10 litres) pendant 72h. Cette macération a été réalisée sous agitation et à température ambiante. Après filtration et concentration sous vide et non à sec, l'extrait aqueux résultant est soumis successivement à une extraction liquide-liquide à l'éther de pétrole (200 ml x 3), l'acétate d'éthyle (200 ml x 5) et enfin au *n*-butanol (200 ml x 5). L'évaporation à sec des phases organiques a permis de recueillir 5,1 g de l'extrait éthéropétrolique, 30,6 g de l'extrait d'acétate d'éthyle et 32,3 g de l'extrait *n*-butanolique.

Les deux extraits AcOEt et *n*-BuOH de *Onobrychis Crista-galli* ont été préalablement analysés par HPLC-UV(DAD)-ELSD et UPLC-TOF afin de comparer leur profil chromatographique et d'obtenir des informations quant à la nature chimique de leurs constituants.

V-1-5-2- Fractionnement et purification des constituants de l'extrait acétate d'éthyle

4 grammes de l'extrait acétate d'éthyle ont été soumis à un fractionnement grossier au moyen d'une chromatographie liquide moyenne pression (MPLC) utilisant comme phase stationnaire le gel de silice greffé en C-18 (12 g). L'élution est réalisée par un gradient mélange de solvants eau/méthanol à différents gradients additionné de 0,1% d'acide formique. 43 fractions (F1-F43) ont été obtenues.

Les fractions obtenues de MPLC ont été soumises à une filtration sur cartouche SPE en C-18, dans un système des solvants MeOH/H₂O (85/15). Le volume d'injection étant de 5 ml. Les fractions, une fois filtrées, ont été analysées par UHPLC-UV et UHPLC-TOF-MS. 18 fractions ont été ainsi sélectionnées pour être analysées par RMN.

Cela a permis d'identifier neuf composés purs.

- La fraction F35 a donné le composé **OC1** (47,2 mg).
- La fraction F21 a fourni le composé **OC7** (34 mg).
- La fraction F26 a donné le composé **OC8** (54,2 mg) et la fraction F8 les deux composés **OC14** et **OC9** (17,4 mg) identifiés en mélange.
- La fraction F-34 a fourni le composé **OC10** (49,2 mg) et la fraction F-5 les deux composés **OC11** et **OC12** (63,5 mg) identifiés en mélange.
- La fraction F-6 a donné le composé **OC13** (44 mg).
- La sous fraction F-25 (43,7 mg) a été purifiée par HPLC-UV à l'échelle semi-préparative en phase inverse avec un gradient (H₂O/MeOH/acide formique 0,1%) (70/30 à 62/38-acide formique 0,1%) et un débit fixé à 25 ml/min. L'analyse a abouti à l'isolement du composé **OC4** ($t_R = 10,0910$ min, $m = 0,9$ mg).

V-1-5-3- Fractionnement et purification des constituants de l'extrait *n*-butanolique

20 grammes de l'extrait *n*-butanolique sont soumis à une chromatographie sur une colonne de polyamide SC6 comme phase stationnaire. L'élution est effectuée par le système de solvants H₂O/MeOH (100/0 à 0/100). A l'issue de ce fractionnement primaire, 16 fractions sont recueillies (Tableau V-3).

Tableau V-3 : Fractionnement de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *Onobrychis crista-galli*

Eluant colonne	Fractions	Poids en mg
H ₂ O (100%)	F1	9936,7
	F2	1862,3
	F3	820,14
H ₂ O/MeOH (80-20)	F4	460
	F5	816,4
H ₂ O/MeOH (50-50)	F6	1057,7
	F7	599,1
	F8	736,1
H ₂ O/MeOH (20-80)	F9	175,8
	F10	1071,1
	F11	247
	F12	140,2
	F13	322,5
MeOH 100%	F14	291,1
	F15	191,8
	F16	90,91

- La fraction 12 (140,2 mg) a été reprise par une colonne ouverte de polyamide SC6, éluee par un mélange toluène/MeOH (100/0 à 0/100). Ceci a permis d'obtenir 16 sous-fractions (F12-1 à F12-16). La sous-fraction F12-11 (6,6 mg) a été filtrée sur une colonne de Sephadex LH-20 dans le méthanol, fournissant le composé **OC2** (2,2 mg).

- La fraction 10 (1071,1mg) a subi une séparation sur colonne ouverte de polyamide SC6. L'élution réalisée dans le mélange toluène/MeOH (100/0–0/100) a donné 13 sous-fractions (F10-1 à F10-13). La sous-fraction F10-12 (6,7 mg) est ensuite filtrée sur une colonne de Sephadex LH-20 dans le méthanol, conduisant au composé **OC5** (3 mg).
- La sous-fraction F10-7 (24 mg) filtrée sur une colonne de Sephadex LH-20 dans le méthanol, a abouti à l'isolement du composé **OC6** (2,2 mg).
- La fraction 14 (291,1 mg) est chromatographiée sur une colonne de polyamide SC6 utilisant le mélange toluène/MeOH à différents gradients (100/0 à 0/100), permettant de recueillir 12 sous-fractions. Les deux sous-fractions F14-10 (11,1 mg) et F14-2 (12,6 mg) sont purifiées sur une colonne de Sephadex LH-20 dans le méthanol. Cette purification a conduit à l'isolement des deux composés **OC3** (1 mg) et **OC15** (8 mg).

V-1-5-4- Composés isolés de l'espèce *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.

V-1-5-4-1- Composé OC1

-Nom : Tricine

-Formule brute : $C_{17}H_{14}O_7$

-Masse moléculaire : 330 uma

-HR-ESI-MS : mode négatif

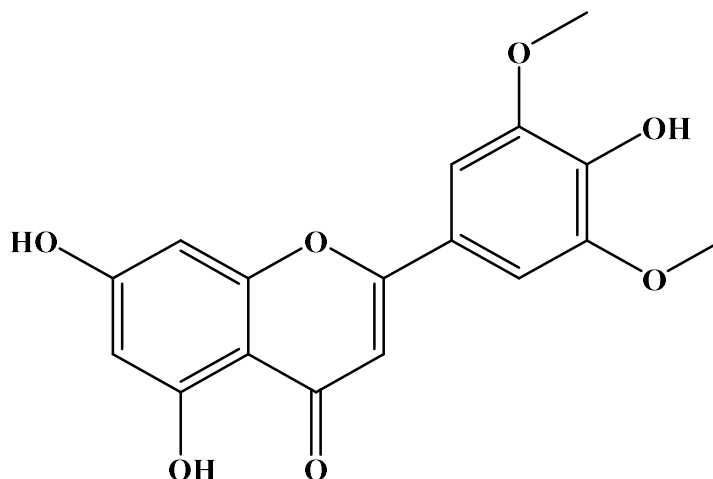
$$m/z = 329,066 [M-H]^-$$

-RMN 1H : 600 MHz, MeOD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, MeOD

-Données spectrales :

Tableau III-1, page 106



V-1-5-4-2- Composé OC2

-Nom : 3'-OMe-Tricetin 7-O- β -glucoside

-Formule brute : $C_{22}H_{22}O_{12}$

Masse moléculaire : 478 uma

-HR-ESI-MS : mode négatif

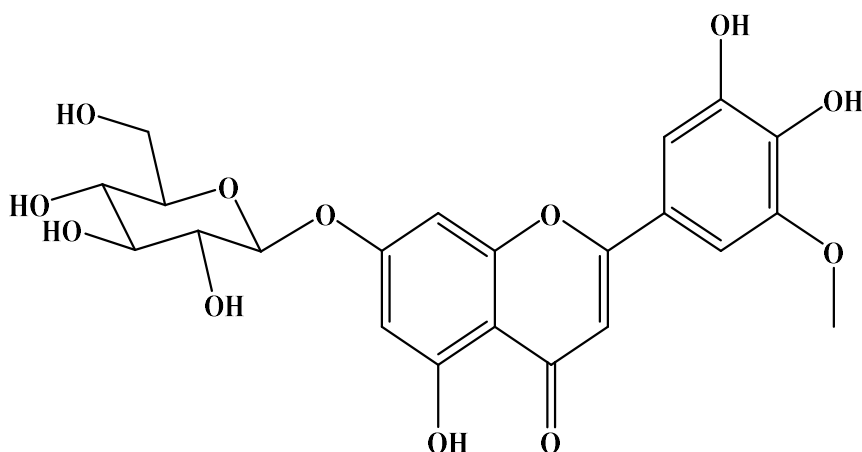
$$m/z = 477,1022 [M-H]^-$$

-RMN 1H : 600 MHz, MeOD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, MeOD

-Données spectrales :

Tableau III-2, pages 111-112



V-1-5-4-3- Composé OC3

-Nom : Luteolin 5-méthyle éther

-Formule brute : $C_{16}H_{12}O_6$

-Masse moléculaire : 300 uma

-HR-ESI-MS : mode négatif

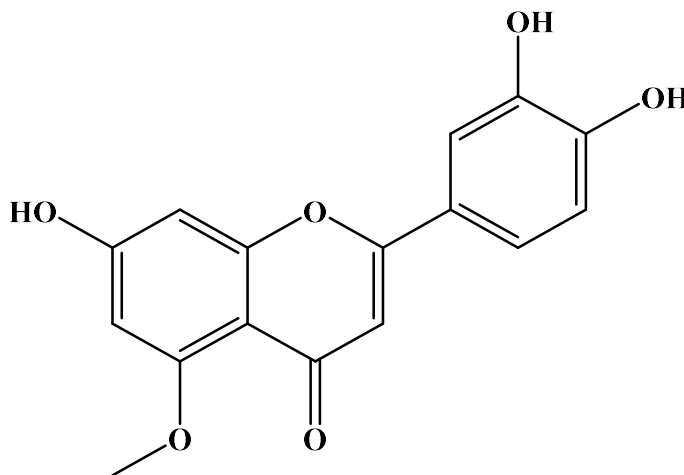
$$m/z = 299,0432 [M-H]^-$$

-RMN 1H : 600 MHz, MeOD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, MeOD

-Données spectrales :

Tableau III-3, page 115



V-1-5-4-4- Composé OC4

-Nom : Hyperoside

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

-Masse moléculaire : 464 uma

-HR-ESI-MS : mode négatif

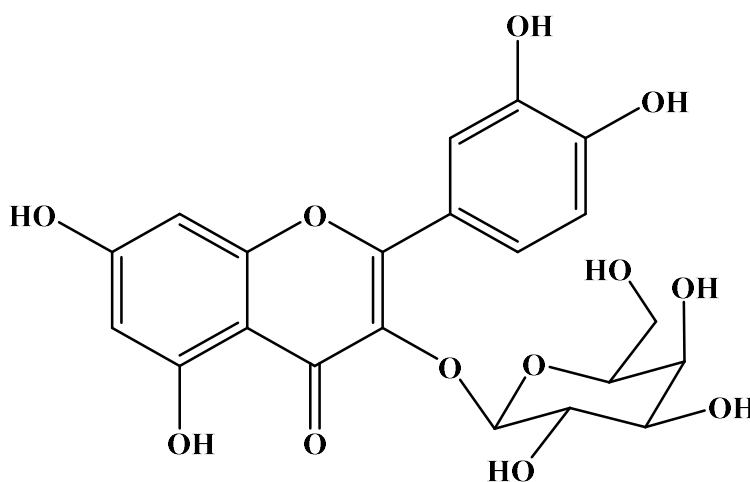
$$m/z = 463,0854 [M-H]^-$$

-RMN 1H : 600 MHz, MeOD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, MeOD

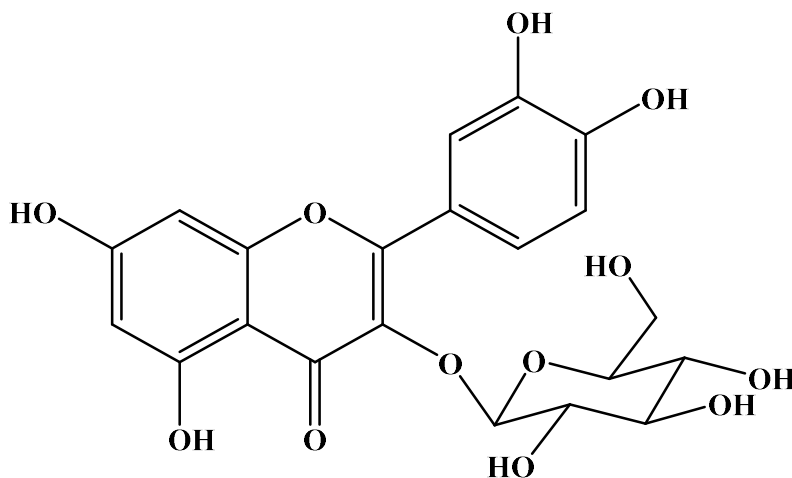
-Données spectrales :

Tableau III-4, pages 119-120



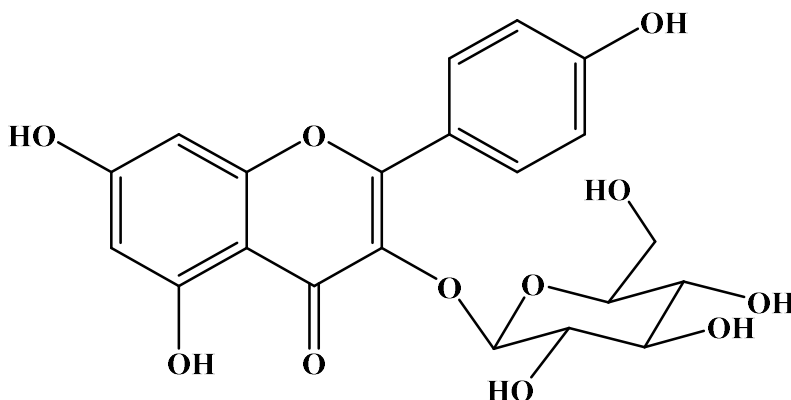
V-1-5-4-5- Composé OC5

- Nom : Isoquercitrine
- Formule brute : $C_{21}H_{20}O_{12}$
- Masse moléculaire : 464 uma
- RMN 1H : 600 MHz, MeOD
- RMN ^{13}C : 150 MHz, MeOD



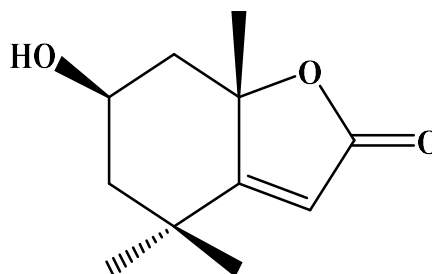
V-1-5-4-6- Composé OC6

- Nom : Astragaline
- Formule brute : $C_{21}H_{20}O_{11}$
- Masse moléculaire : 448 uma
- RMN 1H : 600 MHz, MeOD
- RMN ^{13}C : 150 MHz, MeOD



V-1-5-4-7- Composé OC7

- Nom : Loliolide
- Formule brute : $C_{11}H_{16}O_3$
- Masse moléculaire : 196 uma
- HR-ESI-MS : mode négatif
 $m/z = 437,2059 [(2M+HCOOH)-H]^-$
- RMN 1H : 600 MHz, MeOD
- RMN ^{13}C : 150 MHz, MeOD
- Données spectrales :
Tableau III-5, page 125



V-1-5-4-8- Composé OC8

-Nom : Citrusine C

-Formule brute : $C_{16}H_{22}O_7$

-Masse moléculaire : 326 uma

-HR-ESI-MS : mode négatif

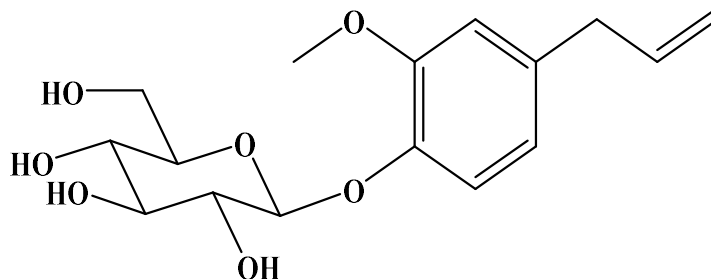
$m/z = 471, 1328 [(M+HCOOH)-H]^-$

-RMN 1H : 600 MHz, MeOD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, MeOD

-Données spectrales :

Tableau III-6, pages 132-133



V-1-5-4-9- Composé OC9

-Nom : Acide 4-Hydroxy benzoïque

-Formule brut : $C_7H_6O_3$

-Masse moléculaire : 138 uma

-HR-ESI-MS : mode négatif

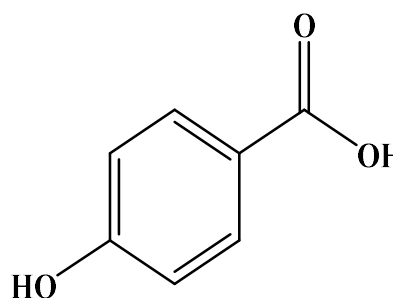
$m/z = 137,022 [M-H]^-$

-RMN 1H : 600 MHz, MeOD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, MeOD

-Données spectrales :

Tableau III-7, page 135



V-1-5-4-10- Composé OC10

-Nom : Acide salicylique

-Formule brute : $C_7H_6O_3$

-Masse moléculaire : 138 uma

-HR-ESI-MS : mode négatif

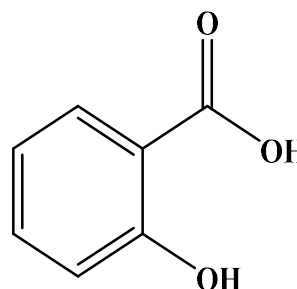
$m/z = 137,022 [M-H]^-$

-RMN 1H : 600 MHz, MeOD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, MeOD

-Données spectrales :

Tableau III-8, page 137



V-1-5-4-11- Composé OC11

-Nom : Ethyl- β -D-glucopyranoside

-Formule brute : $C_8H_{16}O_6$

-Masse moléculaire : 208 uma

-HR-ESI-MS : mode négatif

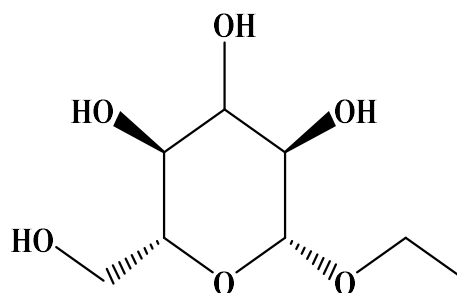
$m/z = 253,0901 [(M+HCOOH)-H]^-$

-RMN 1H : 600 MHz, MeOD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, MeOD

-Données spectrales :

Tableau III-9, page 140



V-1-5-4-12- Composé OC12

-Nom : Dihydro-3,4-dihydroxy-3-méthyl-2(3H)-furanone

-Formule brute : $C_5H_8O_4$

-Masse moléculaire : 132 uma

-HR-ESI-MS : mode négatif

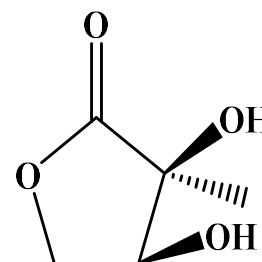
$m/z = 177,0386 [(M+HCOOH)-H]^-$

-RMN 1H : 600 MHz, MeOD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, MeOD

-Données spectrales :

Tableau III-10, page 143



V-1-5-4-13- Composé OC13

-Nom : Ethyl α -L-arabinofuranoside

-Formule brute : $C_7H_{14}O_5$

-Masse moléculaire : 178 uma

-HR-ESI-MS : mode négatif

$m/z = 223,0796 [(M+HCOOH)-H]^-$

-RMN 1H : 600 MHz, MeOD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, MeOD

-Données spectrales :

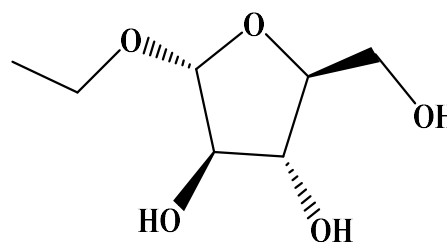


Tableau III-11, page 145

V-1-5-4-14- Composé OC14

-Nom : D-Pinitol

-Formule brute : $C_7H_{14}O_6$

-Masse moléculaire : 194 uma

-HR-ESI-MS : mode négatif

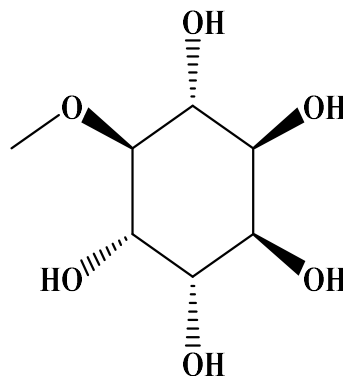
$m/z = 239,0727 [(M+HCOOH)-H]^-$

-RMN 1H : 600 MHz, MeOD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, MeOD

-Données spectrales :

Tableau III-12, page 147



V-1-5-4-14- Composé OC15

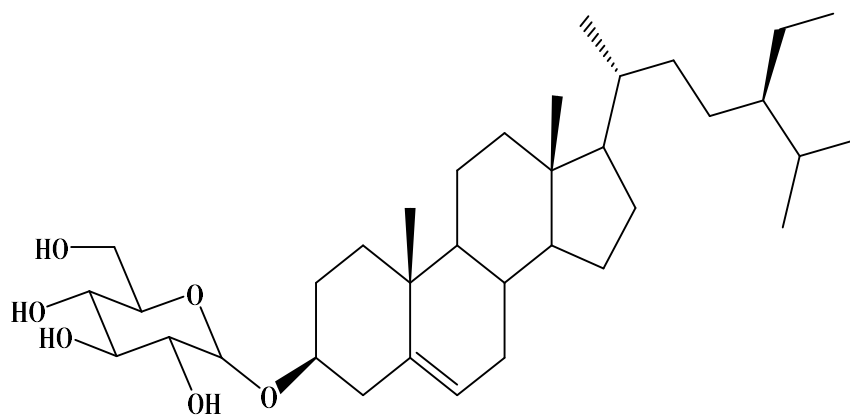
-Nom: β -sitosterol-3-O-glucoside

-Formule brute: $C_{35}H_{60}O_6$

-Masse moléculaire : 576 uma

-RMN 1H : 600 MHz, MeOD

-RMN ^{13}C : 150 MHz, MeOD





Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Liu, Y., Wang, Z., Zhang, J., 2015. Dietary Chinese Herbs: Chemistry, Pharmacology and Clinical Evidence, pringer Science & Business Media: Berlin, Germany, 767-780.
- [2] Zhang, X., 1998. Organisation mondiale de la santé (OMS). Réglementation des médicaments à base de plantes. La situation dans le monde, P (1-59).
- [3] Galanakis, C.M., 2018. Properties, Recovery, and Applications covers polyphenol properties.
- [4] Queen, B.L., Tollefsbol, T.O., 2010. Polyphenols and Aging. Current Aging Science. 3(1), 34-42.
- [5] Raynaud, C., 1985. Contribution à l'étude de certaines espèces du genre *Helianthemum*. sect. *Helianthemum*. Note préliminaire. Anales Jardin Botanico de Madrid. 41, 303-311.
- [6] Ozenda, P., 1991. Flore et végétation du Sahara. Edition CNRS, Paris, France.
- [7] Boissduval, M.J.A., 1828. Flore française. Ou, Description synoptique de toutes les plantes phanérogames et cryptogames qui croissent naturellement sur le sol française. Paris, France.
- [8] Rubio-Moraga, Á., Argandoña, J., Mota, B., Pérez, J., Verde, A., Fajardo, J., Gómez-Navarro, J., Castillo-López, R., Ahrazema, O., Gómez-Gómez, L., 2013. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. J. Ethnopharmacol., 148(1), 287-296.
- [9] Calzada, F., Alanis, A.D., 2007. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. Phytother. Res. 21, 78-80.
- [10] Marius, C., Neamtu, G., Stanescu, U., 1993. Constituents of *Helianthemum nummularium*. Faculty of pharmacy, Agronomie university, Institute of molecular Isotopic Technology, Cluj-Napoca, Romania.
- [11] Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris, France.
- [12] La base de données d'Afrique.
- [13] Clazada, F., Lupéz, R., Meckes, M., Rivera, R.C., 1995. Flavonoids of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. International Journal of Pharmacognosy. 33,351-352.

- [14] Barbosa, E., Calzada, F., Campos, R., 2006. Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1. *J. Ethnopharmacol.* 108, 395-397.
- [15] Barbosa, E., Calzada, F., Campos, R., 2007. In vivo antigiardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *J. Ethnopharmacol.* 109, 552-554.
- [16] Meckes, M., Calzada, F., Contreras, A.T., Rivera, R. C., 1999. Antiprotozoal properties of *Helianthemum glomeratum*. *Phytotherapy research.* 13, 102-105.
- [17] Barroso, F.G., Martmhez, T.F., Paz, T., Para, A., Alarcon, F.J., 2001. Tannin content of grazing plants of southern Spanish arid lands. *Journal of Arid Environements.* 49, 301-314.
- [18] Javidnia, K., Nasiri, A., 2007. Composition of the essential oil of *Helianthemum kahiricum* Del. from Iran, *J. Essent. Oil Res.*, 19, 52-53.
- [19] Wang, Q., Wu, R., Jiesi Wu, J., Nayintai Dai, N., Han, N., 2015. A new alkaloid from *Helianthemum ordosicum*, *Magn. Reson. Chem.*, 53, 314-316.
- [20] Benabdelaziz, I., Haba, H., Lavaud, C., Harakat, D., Benkhaled, M., 2015. Lignans and other constituents from *Helianthemum sessiliflorum*, *Pers. Rec. Nat. Prod.*, 9, 342-348.
- [21] Gökşena, N., Demircib, B., Baldemirc, A., Koşara, M., 2017. Essential oil composition of *Helianthemum canum* (L.) Baumg. (Cistaceae) growing in Turkey. *Asian Society of Pharmacognosy.* 1(1), 5-10.
- [22] Jean, L.M., 2006. Esparcette ou sainfoin ?. *Bulletin du Cercle Vaudois de Botanique* N° 35, 77-80.
- [23] Genier, M., 1966. Etude biométrique des espèces françaises du genre *Onobrychis*. *Ann. Abeille*, 9(3), 175-208.
- [24] Abdelgurfi, A., Laouar, M., 2002. Distribution des espèces d'*Onobrychis* en relation avec quelques facteurs du milieu, en Algérie. *Annales de l'institut national agronomique-El-Harrach*, 32(1) et (2).
- [25] Cronquist, A., 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York: Columbia University Press.
- [26] Halabalaki, M., Alexi, X., Aligiannis, N., Alexis, M.N., Skaltsounis, A.L., 2008. Ebenfurans IV-VIII from *Onobrychis ebenoides*: Evidence that C-Prenylation is the key

determinant of the cytotoxicity of 3-Formyl-2-arylbenzofurans. J. Nat. Prod., 71(11), 1934-1937.

[27] Malisch, C.S., Luescher, A., Baert, N., Engstrom, M.T., Studer, B., Frygnas, C., Suter, D., Mueller-Harvey, I., Salminen, J.P., 2015. Large variability of proanthocyanidin content and composition in sainfoin (*onobrychis viciifolia*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(47), 10234-10242.

[28] Thill, J., Regos, I., Farag, M.A., Ahmad, A.F., Kusek, J., Castro, A., Schlangen, K., Carbonero, C.H., Gadjev, I.Z., Smith, L.M.J., Halbwirth, H., Treutter, D., Stich, K., 2012. Polyphenol metabolism provides a screening tool for beneficial effects of *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). Phytochemistry, 82, 67-80.

[29] Ince, S., Ekici, H., Yurdakok, B., 2012. Determination of in vitro antioxidant activity of the sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extracts. Ankara Univ Veteriner Fakültesi dergisi, 59(1), 23-27.

[30] Halabalaki, M., Aligiannis, N., Papoutsis, Z., Mitakou, S., Moutsatsou, P., Sekeris, C., Skaltsounis, A.L., 2000. Three new arylobenzofurans from *Onobrychis ebenoides* and evaluation of their binding affinity for the estrogen receptor. J. Nat. Prod., 63(12), 1672-1674.

[31] Papoutsis, Z., Kassi, E., Halabalaki, M., Mitakou, S., Moutsatsou, P., 2007. Evaluation of estrogenic/ antiestrogenic activity of *Onobrychis ebenoides* extract-Interaction with estrogen receptor subtypes ERA and ERB. Toxicol. in Vitro, 21(3), 364-370.

[32] Usta, C., Yildirim, A.B., Turker, A.U., 2014. Antibacterial and antitumor activities of some plants grown in Turkey. Biotechnol. Biotechnol.Eq., 28(2), 306-315.

[33] Zengin, G., Guler, G.O., Aktumsek, A., Ceylan, R., Picot, C.M.N., Mahomoodally, M.F., 2015. Enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical profile of three medicinal plants from Turkey. Adv. pharmacol. sci., 1-8.

[34] Karakoca, K., Asan-Ozusaglam, M., Cakmak, Y.S., Teksen, M., 2015. Phenolic compounds, biological and antioxidant activities of *Onobrychis armena Boiss. & Huet* flower and root extracts. Chiang Mai J. Sci., 42(2), 376-392.

[35] Erbil, N., Duzguner, V., Durmusahya, C., Alan, Y., 2015. Antimicrobial and antioxidant effects of Some Turkish fodder plants belongs to fabaceae family (*Vicia villosa*, *Trifolium ochroleucum* and *Onobrychis altissima*). Orient. J. Chem., 31, 53-58.

- [36] Karamian, R., Asadbegy, M., 2016. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of three *Onobrychis* species from Iran. *J. Pharm. Sci.*, 22(2), 112-119.
- [37] Guler, G.O., Zengin, G., Karadag, F., Mollica, A., Picot, C.M.N., Mahomoodally, M.F., 2018. HPLC-DAD profiles and pharmacological insights of *Onobrychis argyrea* subsp *isaurica* extracts. *J. Comput. Chem.*, 76, 256-263.
- [38] Delamarck, M., Decandolle, M., 1805. Flore française, ou description succinctes de toutes les plantes qui croissant naturellement en France, chez. Agasse, rue des poitevins N° 6, Paris, pp. 613.
- [39] Ingham, J.L., 1978. Flavonoid and isoflavonoid compounds from leaves of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Z. Naturforsch C*, 33(1), 146-148.
- [40] Russeli, G.B., Shaw, G.J., Christmas, P.E., Yates, M. B., Sutherland, O.R.W., 1984. Two 2-aryl benzofurans as insect feeding deterrents from sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Phytochemistry*, 23(7), 1417-1420.
- [41] Sinch, S., Mccallum, J., Gruber, M.Y., Neil Towers, G.H., Muir, A.D., Bohm, B.A., Koupai-Abyzani, M. R. K., Glass, A.D.M., 1997. Biosynthesis of flanan-3-ols by leaf extracts of *Onobrychis viciifolia*. *Phytochemistry*, 44(3), 425-432.
- [42] Marais, J.P.J., Harvey, I.M., Brandt, E.V., Ferreira, D., 2000. Polyphenols, condensed tannins, and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (Sainfoin). *J. Agric. Food Chem.*, 48(8), 3440- 3447.
- [43] Lu, Y., Sun, Y., Foo, L. Y., McNabb, W.C., Molan, A.L., 2000. Phenolic glycosides of forage legume *Onobrychis viciifolia*. *Phytochemistry*, 55(1), 67-75.
- [44] Godevac, D., Pejin, B., Zdunic, G., Savikin, K., Stesevic, D., Vajs, V., Millosavljevic, S., 2008. Flavonoids from the aerial parts of *Onobrychis montana* subsp. *Scardica*. *J. Serb. Chem. Soc.*, 73(5), 525-529.
- [45] Regos, I., Uebanella, A., Treutter, D., 2009. Identification and quantification of phenolic compounds from the forage legume sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *J. Agric. Food Chem.*, 57(13), 5843-5852.
- [46] Regos, I., Treutter, D., 2010. Optimization of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of complex polyphenol mixtures and application for sainfoin extracts (*Onobrychis viciifolia*). *J. Chromatogr. A.*, 1217(40), 6169- 6177.
- [47] Veitch, N.C., Regos, I., Kite, G.C., Treutter, D., 2011. Acylated flavonol glycosides from the forage legume, *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). *Phytochemistry*, 72(4-5), 423-429.

- [48] Stringano, E., Hayot Carbonero, C., Smith, L.M.J., Brown, R.H., Mueller-Harvey, I., 2012. Proanthocyanidin diversity in the EU 'HealthyHay' sainfoin (*Onobrychis*
- [48] Stringano, E., Hayot Carbonero, C., Smith, L.M.J., Brown, R.H., Mueller-Harvey, I., 2012. Proanthocyanidin diversity in the EU 'HealthyHay' sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) germplasm collection. *Phytochemistry*, 77, 197-208.
- [49] Halabalaki, M., Alexi, X., Aligiannis, N., Alexis, M.N., Skaltsounis, A.L., 2008. Ebenfurans IV-VIII from *Onobrychis ebenoides*: Evidence that C-Prenylation is the key determinant of the cytotoxicity of 3-Formyl-2-arylbenzofurans. *J. Nat. Prod.*, 71(11), 1934-1937.
- [50] Dong, L.P., Ni, W., Dong, J.Y., Li, J.Z, Chen, C.X., Liu, H.Y., 2006. A New Neolignan Glycoside from the Leaves of *Acer truncatum*. *Molecules*, 11(12), 1009-1014.
- [51] Wu, P.L., Hsu, Y.L., Zao, C.W., Damu, A.M., Wu, T.S., 2005. Constituents of *Vittaria anguste-elongata* and Their Biological Activities. *J. Nat. Prod.*, 68(6), 1180-1184.
- [52] Sadhu, S.K., Okuyama, E., Fujimoto, H., Ishibashi, M., Yesilada, E., 2006. Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of *Cistus laurifolius*, a Turkish medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(3), 371-378.
- [53] Phan, N.H.T, Thuan, N.T.D., Duy, N.V., Huong, P.T.M., Cuong, N.X., Nam, N.H., Thanh, N.V., Chau Van Minh, C.V., 2015. Flavonoids isolated from *Dipterocarpus obtusifolius*. *vietnam journal of chemistry*. 53(2e), 131-136.
- [54] Harbone, J. B., Mabry. T. J., 1982. The flavonoids: Advance in Research. Chapman and Hall Ltd., New York.
- [55] Xie, C., Veitch, N.C., Houghton, P.J., Simmonds, M.S., 2004. Flavonoid glycosides and isoquinolinone alkaloids from *Corydalis bungeana*. *Phytochemistry* 65(22), 3041-3047.
- [56] Shen, G., Oh, S.E., Min, B.S., Lee, J., Ahn, K.S., Kim, Y.H., Lee, H.K., 2008. Phytochemical Investigation of *Tiarella polyphylla*. *Arch. Pharm. Res.*, 31(1), 10-16.
- [57] Thanh, N.T.V., Hien, D.T.T., Minh, T.T., Cuong, H.D., Nhiem, N.X., Yen, P.H., Kiem, P.V., 2019. Quercetin glycosides and sesquiterpenes from *Phoebe poilanei* Kosterm. *vietnam journal of chemistry*, 57(4), 401-405.
- [58] Sousa, E.A., Silva, A. A. C. A., Cavalheiro, A.J., Lago, J.H.G., Chaves, M.H., 2014. A New Flavonoid Derivative from Leaves of *Oxandra sessiliflora* R. E. Fries. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(4), 704-708.

- [59] Laurent, P., Lebrun, B., Braekman, J.C., Daloz, D., Pasteels, J.M., 2001. Biosynthetic studies on adaline and adalinine, two alkaloids from ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae). *Tetrahedron*, 57, 3403-3412
- [60] Hu, W.Q., Hubisihalatu, H., Jiesi W., Jun, R., Narenchaoketu, N., Yintai, D.N., 2014. Chemical constituents of *Helianthemum ordosicum*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 18, 2607-2611.
- [61] Chang, S.W., Kim, K.H., Lee, I.L., Choi, S.U., Ryu, S.Y., Lee, K.R., 2009. Phytochemical Constituents of *Bistorta manshuriensis*. *Natural Product Sciences*. 15(4), 234-240.
- [62] Kuwabara, H., Mouri, K., Otsuka, H., Kasai, R., Yamasaki, K., 2003. Tricin from a Malagasy *connaraceous* plant with potent antihistaminic activity. *J. Nat. Prod.*, 66(99), 1273- 1275.
- [63] Nyananyo, B.L., Nyingifa, A.L., 2011. Phytochemical investigation on the seed of *Sphenostylis stenocarpa* (Hochst ex A. Rich.) Harms (Family Fabaceae). *J. Appl. Sci. Environ. Manage.*, 15(3), 419-423.
- [64] Marin, P.D., Grayer, R.J., Grujic-Jovanovic, S., Kite, G. C., Veitch, N.C. 2004. Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys* subgenus *Betonica*. *Phytochemistry*, 65(9), 1247-1253.
- [65] Geiger, H., Groot-Pfleiderer, W., 1979. Die flavon- und flavonolglykoside von *Taxodium distichum*. *Phytochemistry*, 18(10), 1709-1710.
- [66] Heshmati Afshar, F.; Delazar, A.; Nazemiyeh, H.; Bamdad Moghaddam, S. Phenolic derivatives of *Artemisia spicigera* C. Koch growing in Iran. *Iran. J. Pharm. Sci. Res.*, 2015, 14(4), 1241-1246.
- [67] Gehring, E., Geiger, H., 1980. Die Flavonoide der Samen von *Medicago x varia* Martyn c.v. Cardinal (Fabaceae). *Z. Naturforsch.*, 35c, 380-383.
- [68] William, A. B., 2006. NMR spectroscopy in the study of carbohydrates: Characterizing the structural complexity. School of Molecular and Microbial Biosciences, University of Sydney, New South Wales, Australia.
- [69] Ghanadian, S.M., Ayatollahi, A.B., Afsharypour, C., Hareem, S., Abdalla, O.M., Bankeu, J.J.K., 2012. Flavonol glycosides from *Euphorbia microsciadia* Bioss. with their Immunomodulatory activities. *Iran. J. Pharm. Sci.*, 11(3), 925-930.
- [70] Alaniya M. D., 1983. Flavonoïds of *Hedysarum sericeum* and *H. caucasicum*. *Plenum publishing corporation*, 19, 612-613.

- [71] Luk'yanchikov, M. S., 1982. Polyphenols of *Onobrychis bobrovii*. Chem. Nat. Compd., 18(2), 237-237.
- [72] Yuldashev, M. P., Batirov, E. Kh., Malikov, V M., 1996. Flavonoids of the epigeal part of *Onobrychis arenaria*. Chem. Nat. Compd., 32(4), 590-591.
- [73] Hiraga, Y., Taino, K., Kurokawa, M., Takagi, R., Ohkata, K., 1997. (-)- Loliolide and other germination inhibitory active constituents in *Equisetum Arvense*. Natural Product Research, 10, 181-186.
- [74] Jones, L., Bartholomew, B., Latif, Z., Sarker, S.D., Nash, R.J., 2000. Constituents of *Cassia laevigata*. *Fitoterapia*, 71, 580-583.
- [75] Hong, Y.H., Wang, S.C., Hsu, C., Lin B.F., Kuo, Y.H., Huang, C.J., 2011. Phytoestrogenic compounds in alfalfa sprout (*Medicago sativa*) beyond coumestrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 131-137.
- [76] Schühly, W., Fabian, C., Jahangir, S., Fabian, W.M.F., 2007. Structure and absolute configuration of loliolide isomers determined by comparison of calculated and experimental CD spectra. 11th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry.
- [77] Deskinsa, C.E., Voglera, B., Dosoky, N.S., Chhetri, B.K., Haber, W.A., Setzera, W.N., 2014. Phytochemical Investigations of *Lonchocarpus* Bark Extracts from Monteverde, Costa Rica. *Natural Product Communications*, 9 (4), 508-510.
- [78] Fujita, T., Nakayama, M., 1992. Perilloside A, A monoterpene glucoside from *Perilla frutescens*, *Phytochemistry*, 31(9), 3265 -3267.
- [79] Mezrag, A., Malafronte, N., Bouheroum, M., Travaglino, C., Russo, D., Milella, L., Severino, L., Tommasi, N.D., Braca, A., Piaz, F.D., Phytochemical and antioxidant activity studies on *Ononis angustissima* L. aerial parts: isolation of two new flavonoids. *Natural Product Research*, 31(5), 507-514.
- [80] Feng, W.S., Zhu, B., Zheng, X.K., Zhang, Y.L., Yang, L.G., Li, Y.J., 2011. Chemical Constituents of *Selaginella stautoniana*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 9(2), 0108-0111.
- [81] Nur Hakimah, A., Fatimah, S., Rohaya, A., 2016. Chemical Constituents of Malaysian *U. cordata* var. *ferruginea* and Their *in Vitro* α -Glucosidase Inhibitory Activities. *Molecules*, 21(5), 525-536.

- [82] Barrero, A.F., Sanchez, J.F., Barrón, A., Corrales, F., Rodriguez, I., 1989. Resorcinol derivatives and other components of *Ononis speciosa*. *Phytochemistry*, 28(1), 161-164.
- [83] Prawat, H., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Prawat, U., Tuntiwachwut-tikul, P., Tooptakong, U., Taylor, W.C., Pakawatchai, C., Skeleton, B.W., White, A.H., 1995. Cyanogenic and non-cyanogenic glycosides from *Manihot esculenta*. *Phytochemistry*, 40(4), 1167-1173.
- [84] El-Youssef, H.M., Murphy, B.T., Amer, M.E., Abdel-Kader, M.S., Kingston, D.J. I., 2008. Phytochemical and biological study of the aerial parts of *Lotus lalambensis* growing in Saudi Arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 16(2), 122-134.
- [85] Ahmed, A.A., Spring, O., el-Razek, M.H., Hussein, N.S., Mabry, T.J., 1995. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Hymenoxys richardsonii* and *H. subintegra*. *Phytochemistry*, 39(5), 1127-1131.
- [86] Ford, C.W., 1981. A new lactone from water-stressed chickpea. *Phytochemistry*, 20(8), 2019-2020.
- [87] Teresa, J.P., Aubanell, J.C.H., Feliciano, A.S., Corral, J.M.M.D., 1980. Saccharinic acid lactone from *Astragalus lusitanicus* Lam. (-)-2-c-methyl-d-erythrono-1,4-lactone. *Tetrahedron Lett.*, 21, 1359-1360.
- [88] Xie, H.H., Xu, X.Y., Dan, Y., Wei, X.Y., 2009. Alkyl Glycosides from Mycelial Cultures of *Dichomitus squalens*. *Chin J Nat Med.*, 7(5), 390-393.
- [89] Kitajima, J., Tanaka, Y., 1989. Studies on the constituents of *trichosanthes* root. I. Constituents of roots of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. var. japonicum Kitam. *Yakugaku Zasshi. Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 109(4), 250-255.
- [90] Angyal, S.J., 1983. The effect of O-methylation on chemical shifts in the ¹H- and ¹³C-n.m.r. spectra of cyclic polyols. *Carbohydrure Research*, 123(1), 23-29.
- [91] Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158.
- [92] Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A.M., Böhm, V., 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT- J.Food Sci.Technol.*, 43(6), 992-999.
- [93] Topçu, G., Ay, A., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A., 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chem.*, 103(3), 816-822.
- [94] Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1119-1200.

- [95] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.*, 26(9-10), 1231-1237.
- [96] Apak, R., Güçlü, K., Ozyurek, M., Arademir, S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J.Agric. Food Chem.*, 52(26), 7970-7981.
- [97] Kunchandy, E., Rao, M.N.A., 1990. Oxygen radical scavenging activity of *curcumin*. *Int. J. Pharm.*, 58(3), 237-240.
- [98] Marco, G.J., 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 45, 594-595.
- [99] Karthik, K., Kumar, P.B.R., Priya, R.V., Kumar, K.S., Rathore, R.S.B., 2013. Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* byin vitro method. *Indian J. Res. Pharm. Biotech.*, 1(5), 729-3471.
- [100] Husain, S.R., Cillard, J., Cillard, P., 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 26(9), 2489-2491.
- [101] Lin, C.Z., Zhu, C.C., Hu, M., Wu, A.Z., Bairu, Z.D., Kangsa, S.Q., 2014. Structure-activity relationships of antioxidant activity in vitro about flavonoids isolated from *Pyrethrum tatsienense*. *J. Intercult. Ethnopharmacol.*, 3(3), 123-127.
- [102] Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, 13(10), 572-584.
- [103] Singh, R.K., Pandey, B.L., Tripathi, M., Pandey, B., 2001. Anti-inflammatory effect of (+)-pinitol. *Fitoterapia*, 72(2), 168-170.
- [104] Riaz, A., Rasul ,A., Hussain, G., Zahoor, M.K., Jabeen, F., Subhani, Z., Younis, T., Ali, M., Sarfraz, I., Selamoglu, Z., 2018. Astragalin: a bioactive phytochemical with potential therapeutic activities. *Adv. pharmacol. sci.*, 32, 1-15.
- [105] Kang, B.M., An, B.K., Jung, W.S., Jung, H.O., Cho, J.H., Cho, H.W., Jang, S.J., Yun, Y.B., Kuk, Y.I., 2016. Anti-inflammatory effect of tricinin isolated from *Alopecurus aequalis* Sobol. on the LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Int. J. Mol. Med.*, 38, 1614-1620.
- [106] Garbor. M., 1972. The anti-inflammatory actions of flavonoids., *Akademia kiado: Budapest, Hungary.* pp.698-699.



Résumés

Résumé

La présente étude est dédiée à la recherche des constituants chimiques de deux plantes locales, en l'occurrence *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Cistaceae) et *Onobrychis crista-galli* (Fabaceae), en plus de l'évaluation des activités antioxydantes et anti-inflammatoires de leurs extraits.

L'investigation chimique portant sur les extraits AcOEt et *n*-BuOH des deux plantes citées, a abouti à la caractérisation de **26** composés naturels. Ces derniers ont été isolés par les méthodes chromatographiques (CCM, VLC, CC, MPLC et HPLC semi-préparative). Leurs structures ont été établies au moyen de techniques d'analyse spectroscopiques (RMN 1D et 2D, la spectrométrie de masse à haute résolution HR-ESI-MS, ESI-MS), la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$ et la comparaison des données spectrales avec celles décrites dans la littérature.

Les extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* ont fourni 11 composés connus, constitués principalement de composés polyphénoliques dont un néolignane glucoside, six flavonoïdes, deux dérivés d'acide benzoïque et deux dérivés d'acide quinique.

Quinze composés ont été également isolés des extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Onobrychis crista-galli*. Ils se répartissent en six flavonoïdes, un monoterpène lactonique, deux dérivés d'acide benzoïque, un dérivé de l'eugénol, un cyclitol, trois osides libres et un phytostérol.

La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu tandis que les flavonoïdes ont été quantifiés par dosage direct au moyen du tri-chlorure d'aluminium. Les résultats révèlent que les extraits AcOEt des deux plantes sont les plus riches en polyphénols totaux. L'extrait AcOEt de *H. hirtum* et l'extrait *n*-BuOH de la plante *O. crista-galli* ont les teneurs les plus élevées en flavonoïdes.

L'évaluation *in vitro* des activités antioxydantes des différents extraits des deux plantes, a été réalisée par usage de cinq méthodes : DPPH, ABTS, CUPRAC, DMSO alcalin, β -carotène. Cinq flavonoïdes (**OC1**, **OC2**, **OC3**, **OC4** et **OC6**) isolés à partir de la plante *O. crista-galli* ont été évalués par les méthodes DPPH et CUPRAC. Les résultats de ces tests montrent que les extraits AcOEt des deux plantes ainsi que les cinq flavonoïdes présentent un bon pouvoir antioxydant.

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH de la plante *O. crista-galli* a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines. L'extrait acétate d'éthyle révèle une excellente activité anti-inflammatoire.

Mots clés : *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum*, *Onobrychis crista-galli*, flavonoïdes, RMN 1D et 2D, spectrométrie de masse, activités antioxydante et anti-inflammatoire.

Abstract

The present study is dedicated to the research of the chemical constituents from two local plants named *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Cistaceae) and *Onobrychis crista-galli* (Fabaceae), and the evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activities of their organic extracts and some isolated secondary metabolites.

The chemical investigation of the EtOAc and *n*-BuOH extracts of the two plants led to the isolation and characterization of **26** natural compounds. Indeed, the isolates were obtained by chromatographic methods (VLC, CC, TLC, MPLC and semi-preparative HPLC). Their structures were established using spectroscopic analysis (1D and 2D NMR, high resolution mass spectrometry HR-ESI-MS, ESI-MS), the measurement of the optical rotation $[\alpha]_D$ and by comparison of their spectral data with those described in the literature.

The EtOAc and *n*-BuOH extracts of *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* species provided 11 known compounds, consisting mainly of polyphenolic compounds including a neolignan glucoside, six flavonoids, two derivatives of benzoic acid and two derivatives of quinic acid.

Fifteen secondary metabolites were also isolated from the EtOAc and *n*-BuOH extracts of *Onobrychis crista-galli* species. They are divided into six flavonoids, a lactone monoterpene, two derivatives of benzoic acid, a derivative of eugenol, a cyclitol, three free osides and a phytosterol.

The total content of phenolic compounds was determined using the Folin-Ciocalteu reagent while the flavonoids were quantified by direct determination with aluminum trichloride. The results revealed that the EtOAc extracts of the two plants possess the greatest content in total polyphenols. Moreover, the EtOAc extract of *H. hirtum* and the *n*-BuOH extract of the plant *O. crista-galli* have the highest flavonoid contents.

The *in vitro* evaluation of the antioxidant activity of the different extracts of the two plants was performed using five methods termed DPPH, ABTS, CUPRAC, alkaline DMSO and β -carotene. Five flavonoids (**OC1**, **OC2**, **OC3**, **OC4** and **OC6**) isolated from the plant *O. crista-galli* were evaluated by the DPPH and CUPRAC assays. The results showed that the extracts and the five flavonoids have a good antioxidant power.

The *in vitro* anti-inflammatory activity of the PE, EtOAc and *n*-BuOH extracts obtained from *O. crista-galli* plant was carried out according to the method of inhibition of protein denaturation. The ethyl acetate extract exhibited an excellent anti-inflammatory activity.

Keywords : *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum*, *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam., flavonoids, NMR, antioxidant activity, anti-inflammatory activity.

ملخص

هذه الدراسة مخصصة للبحث في المكونات الكيميائية لنبتتين محليتين، في هذه الحالة *Onobrychis crista-galli* (Fabaceae) و *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Cistaceae) بالإضافة إلى تقييم الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات لمستخلصاتها.

أسفر الفحص الكيميائي لمستخلصات AcOEt و *n*-BuOH للنبتتين المذكورتين سابقاً، إلى عزل 26 مركباً طبيعياً. و التي تم الحصول عليهم من خلال استعمال مختلف الطرق الكروماتوغرافية (CCM, VLC, CC, MPLC et HPLC semi-préparative). تم تحديد بنيتهم الكيميائية باستخدام تقنيات التحليل الطيفي (مطيافية الرنين النووي المغناطيسي ذات بعد واحد و ذات بعدين، مطيافية الكتلة عالي الدقة HR-ESI-MS و ESI-MS، و حساب زاوية التدوير النوعي ومقارنة البيانات الطيفية مع تلك الموصوفة في الدراسات السابقة).

الأعمال المنجزة على المستخلصين AcOEt و *n*-BuOH الخاصين بالنبتة *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Cistaceae) تم من خلالها عزل 11 مركباً معروفاً، يتكون بشكل أساسي من مركبات بوليفينوليك بما في ذلك نيوليان غليكوسيدي، وستة مركبات فلافونويدية، ومشتقتين من حمض البنزويك ومشتقتين من حمض الكينيك.

كما تم عزل خمسة عشر مركباً من مستخلصات AcOEt و *n*-BuOH من النبتة *Onobrychis crista-galli* وهي مقسمة إلى ستة فلافونويدات، مونوتاربان لاکتون، مشتقان من حمض البنزويك، مشتق من الأوجينول، سيكلتول، ثلاث مركبات سكرية حرة، وفيتوستيرول. تم تحديد المحتوى الكلي للمركبات الفينولية باستخدام كاشف Folin-Ciocalteu بينما تم تحديد كمية مركبات الفلافونويدات عن طريق التحديد المباشر باستخدام ثلاثي كلوريد الألمنيوم. أظهرت النتائج أن المستخلصات AcOEt للنبتتين هي الأغنى في إجمالي البوليفينول.

بينما يحتوي مستخلص AcOEt من *H. hirtum* و مستخلص *n*-BuOH للنبتة *O. crista-galli* على أعلى محتويات من الفلافونويدات.

تم إجراء التقييم المخبري للأنشطة المضادة للأكسدة من المستخلصات المختلفة الخاصة للنبتتين باستخدام خمس طرق: DPPH, CUPRAC, ABTS, DMSO alcalin, و β -carotène. بالنسبة لخمسة مركبات الفلافونويدية (OC1, OC2, OC3, OC4, OC6) المعزولة من نبتة *O. crista-galli* فتقييم نشاطها الأكسدي بطريقتين هما CUPRAC, DPPH. تظهر نتائج هذه الاختبارات أن مستخلصات AcOEt من النبتتين و بالإضافة إلى الفلافونويدات الخمسة لديها قوة مضادة للأكسدة جيدة.

تم تنفيذ النشاط المضاد للالتهابات المخبري من المستخلصات الثلاثة EP و AcOEt و *n*-BuOH من نبات *O. crista-galli* وفقاً لطريقة تثبيط تمسخ البروتين. يظهر مستخلص أسيتات الإيثيل نشاطاً ممتازاً مضاداً للالتهابات.

الكلمات المفتاحية: *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* ، *Onobrychis crista-galli*

فلافونويدات ، الرنين المغناطيسي، قياس الطيف الكتلي، الأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات.

RESEARCH ARTICLE

Chemical Composition, Antioxidant, and Anti-inflammatory Activities of Whole Parts of *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam

Wassila Benchadi¹, Hamada Haba¹, Emerson Ferreira Queiroz², Laurence Marcourt², Jean-Luc Wolfender², Chawki Bensouici³ and Mohammed Benkhale^{1,*}

¹Laboratory of Chemistry and Environmental Chemistry (L.C.C.E), Department of Chemistry, Faculty of Science of Matter, Batna-1 University, Algeria; ²Phytochemistry and Bioactive Natural Products, School of Pharmaceutical Science, EPGL, University of Geneva, Geneva, Switzerland; ³Centre de Recherche en Biotechnologie, Constantine, Algeria

Abstract: Objective: The aim of the present study is to examine the phytochemical components and the biological activities of the whole parts of *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam. growing in Algeria.

Methods: The structures of the isolated compounds **1-15** were elucidated using different spectroscopic methods and by comparison with literature data. The biological evaluation of the plant was determined by the *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities. The antioxidant activity of various extracts (petroleum ether, ethyl acetate, and *n*-butanol) and some isolated flavonoids was assessed by using five different test systems, namely, 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS), cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC), superoxide alkaline DMSO, and β -carotene/linoleic acid tests. In addition, the total phenolic and flavonoid contents of the extracts were determined as gallic acid and quercetin equivalents, respectively. *In vitro* anti-inflammatory activity by protein denaturation was measured for all extracts.

Results: Phytochemical investigation of the ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *Onobrychis crista-galli* led to the isolation for the first time of fifteen known compounds. The present study reports for the first time the isolation and identification of fifteen known compounds from this species. The ethyl acetate extract had rich phenolic content indicating (31.09 \pm 0.40 mg gallic acid equivalents/g of fresh weight), while *n*-butanol extract displayed a high content in flavonoid compounds (60.70 \pm 0.7 mg quercetin equivalents/ g of fresh weight). This investigation indicated that the ethyl acetate extract of *O. crista-galli* showed the highest antioxidant activity (IC_{50} = 17.13 \pm 0.51 μ g/mL, DPPH), (IC_{50} = 82.99 \pm 2.50 μ g/mL, ABTS), and ($A_{0.50}$ = 94.67 \pm 0.41 μ g/mL, CUPRAC), (IC_{50} = 97.09 \pm 2.20 μ g/mL, DMSO), (IC_{50} : 36.73 \pm 1.17 μ g/mL, β -carotene/linoleic acid). Furthermore, the compound luteolin 5-methyl ether (**14**) exhibited a good antioxidant activity in DPPH (IC_{50} = 06.05 \pm 0.15 μ g /mL) and CUPRAC ($A_{0.5}$ = 12.57 \pm 0.34 μ g /mL) assays. Moreover, the ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *O. crista-galli* evidenced a good to moderate *in vitro* anti-inflammatory activity.

Conclusion: The extracts of the whole plant of *O. crista-galli* (L.) Lam. showed potent antioxidant and anti-inflammatory activities.

Keywords: *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam., flavonoids, NMR, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, total phenolic content, total flavonoid content.

1. INTRODUCTION

The genus *Onobrychis* belonging to the subfamily Papilionoideae of the family Fabaceae is represented in Algeria by five annual or perennial species [1]. *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam. [2, 3] is an annual plant [3, 4], growing mainly in the lower rainfall regions, semiarid bioclimatic stage [5]. The leaflets of its leaves are shorter. The ears contain 4 or 5

flowers and the petals are almost equal to each other [4]. This plant is common in Algeria in the forests and scrublands of the "Algerian Tell" [1].

Previous and limited phytochemical studies of *Onobrychis* species have mainly referred to *O. viciifolia* due to its considerable economic importance. This forage legume contains a wide range of diverse polyphenolic compounds [6-16, 17]. Ebenfuran compounds have been also isolated from *O. ebenoides* [18, 19].

Onobrychis species have been reported to possess various biological and pharmacological activities such as antioxi-

*Address correspondence to this author at the Department of chemistry, Faculty of science of matter, Batna1 University, P.O. Box: 05000, Batna, Algeria; Tel/Fax: +213-33-319015; E-mail: mchenkhaled@yahoo.fr

dant, enzymatic, antibacterial and antitumor [16, 20-23], cytotoxic, anti-fungal, anti-plasmodial, anti-VIH [17], and antiestrogenic properties [24], anticholinesterase and tyrosinase, amylase and glucosidase inhibitory activity [17, 25].

The present work describes the chemical composition and biological activities of the whole parts of *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam. The different crude extracts of this plant have not been the subject of any previous study focusing on their chemical constituents or their biological properties.

The current study reports, for the first time, the characterization of secondary metabolites **1-15**, and the *in vitro* anti-oxidant and anti-inflammatory activities from the petroleum ether, ethyl acetate, and *n*-butanol extracts of *O. crista-galli*.

2. EXPERIMENTAL

2.1. General Experimental Procedures

The ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data were recorded on a Varian Inova 600 MHz spectrometer (Varian, Palo Alto, CA, USA) at 600 and 150 MHz, respectively, in MeOD. HRESIMS spectra were obtained on a Micromass-LCT Premier Time of flight (TOF) mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) with an electrospray interface and coupled with an Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, USA). Column chromatography (CC) was carried out using silica gel 60 (SiO_2 ; 320-400 mesh; Merck), RP-18 reversed-phase SiO_2 (40-63 μm , Merck), Polyamide (SC-6), and Sephadex LH-20 (25-100 μm). TLC was carried on Silica gel (Kieselgel 60 F254, Merck) and developed by spraying with 50 % sulfuric acid reagent followed by heating. Analytical HPLC was performed using an HP 1100 system equipped with a photodiode array detector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Preparative MPLC was performed using a modular Buchi MPLC system (Flawil, Switzerland) equipped with 681 pump module C-615, UV-Vis Detector module C-640 and fraction collector module C-660 (Buchi, Flawil, Switzerland). The column (460 \times 49 mm i.d.) was loaded with ZEOprep $^{\text{®}}$ C18 as the stationary phase (ZEOprep $^{\text{®}}$ C18, 15-20 μm , Zeochem, Uetikon amSee, Switzerland). HPLC microfractionation was performed with an Armen modular spot prep II (Saint-Avé, France) with an X-Bridge RP C18 column (250 \times 10 mm, i.d.; 5 μm) (Waters, Milford, MA, USA). UHPLC/HR-TOF-MS analyses were performed on a Micromass-LCT Premier Time of Flight mass spectrometer from Waters (Milford, MA, USA) with an electrospray (ESI) interface coupled with an Acquity UPLC system from Waters.

2.2. Plant Material

Onobrychis crista-galli (L.) Lam. (Fabaceae) was collected in Arris region (Algeria) in July 2014 and was identified by Pr Bachir Oudjehih, Agronomic Institute of the University of Batna 1 where a voucher specimen is deposited (No. 913/LCCE).

2.3. Extraction and Isolation

The dried and powdered whole parts (aerial parts and roots) of *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam. (1500 g) were

successively macerated at room temperature (25 $^{\circ}\text{C}$), with 10 liters of EtOH- H_2O 70%, for 3 days. The aqueous ethanolic solution obtained after filtration was concentrated under vacuum at approximately 40 $^{\circ}\text{C}$, yielding (200 mL) of hydroethanolic extract. The hydroethanolic extract was diluted in water and then submitted separately to liquid/liquid extraction with petroleum ether (3 \times 200 mL), ethyl acetate (5 \times 200 mL) and *n*-butanol (5 \times 200 mL). Then, the solvents were evaporated to dryness under vacuum to give (5.1 g) of petroleum ether, (30.6 g) of ethyl acetate, and (32.3 g) of *n*-butanol extracts.

The crude ethyl acetate extract (4 g) was purified by MPLC eluted with ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$, 0.1% formic acid) with increasing polarity to obtain forty-three fractions (F-1 to F-43), which were analyzed by UHPLC-TOF-MS. Nine compounds were identified (**1-9**). The fraction F-5 yielded ethyl- β -D-glucopyranoside (**1**) and dihydro-3,4-dihydroxy-3-methyl-2(3H)-furanone (**2**) (63.5 mg) (identified as a mixture), fraction F-6 afforded ethyl arabinofuranoside (**3**) (44 mg), fraction F-8 gave pinitol (**4**) and 4-hydroxybenzoic acid (**5**) (17.4 mg) (identified as a mixture), fraction F-21 furnished loliolide (**6**) (34 mg), fraction F-26 yielded citrusin C (**7**) (54.2 mg), fraction F-34 provided salicylic acid (**8**) (49.2 mg), and fraction F-35 yielded tricetin (**9**) (47.2 mg). Fraction F-25 was selected for further purification using HPLC-UV semi-preparative with ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 0.1% formic acid) as the solvent system, 30 to 38 % of MeOH. Subfraction F-25-28 afforded hyperoside (**10**) (0.9 mg).

The *n*-butanol extract (20 g) was fractionated using column chromatography on polyamide SC6, eluted with a gradient of the polarity of $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (100:0 to 0:100) yielded sixteen fractions (F-1 to F-16). The fraction F-12 was subjected to polyamide column chromatography SC-6 CC with the solvent system Toluene/MeOH (100:0 to 0:100) to give 16 subfractions (F-12-1 to F-12-16). Fraction F-12-11 was purified on Sephadex LH-20 using MeOH (100%), to provide 3'-OMe-tricetin 7- β -*O*-glucoside (**11**) (2.2 mg). Fraction F-10 was fractionated to Polyamide SC-6 CC using Toluene/MeOH (100:0 to 0:100) to yield 13 subfractions (F-10-1 to F-10-13). F-10-12 and F-10-7 were purified on Sephadex LH-20 using MeOH (100%) to give isoquercitrin (**12**) (3 mg) and astragalins (**13**) (2.2 mg), respectively. Fraction F-14 was chromatographed over polyamide CC using a gradient of Toluene/MeOH (100:0 to 0:100) to obtain 12 subfractions (F-14-1 to F-14-12). F-14-10 and F-14-2 were purified on Sephadex LH-20 using MeOH (100%) to afford luteolin 5-methyl ether (**14**) (1 mg) and β -sitosterol-3-*O*- β -glucoside (**15**) (8 mg), respectively.

2.4. In Vitro Antioxidant Activity

2.4.1. DPPH Radical Scavenging Activity Assay

The free radical scavenging activity was determined by 1, 1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH) assay spectrophotometric method described by Blois (1958) [26] with some modifications. 160 μL of DPPH solution was added to 40 μL of extracts or isolates solution in methanol at different concentrations (12.5-800 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 30 min later, the absorbance of the solution was measured at 517 nm. BHA and BHT, α -tocopherol were used as positive standards for comparison of the activity. The results were given as IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) corre-

sponding to the concentration of 50% inhibition. The antioxidant activity was calculated using the following equation:

$$\text{Scavenging activity (\%)} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100$$

2.4.2. ABTS Cation Radical Decolorization Assay

The spectrophotometric method described by Re *et al.* (1999) [27] was used to determine the radical cation decolorization assay. 160 μL of ABTS⁺ solution was added to 40 μL of extracts or isolates solution in methanol at different concentrations (12.5-800 $\mu\text{g/mL}$). After 10 min, the absorbance was measured at 734 nm by using a 96-well microplate reader. BHA and BHT were utilized as positive standards for comparison of the activity. The results were expressed as IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) corresponding to the concentration of 50% inhibition. The scavenging capability of ABTS⁺ was evaluated using the following equation:

$$\text{ABTS}^+ \text{ scavenging effect (\%)} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100$$

2.4.3. Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) Assay

CUPRAC was determined according to the method described by Apak *et al.* (2004) [28]. In a 96 well plate, to each well 60 μL of ACNH_4 (pH=7), 50 μL of Neocupronin, and 50 μL of ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) solutions were added to 40 μL of extracts or isolates at different concentrations (12.5-800 $\mu\text{g/mL}$). 1h later, the absorbance of the solution was measured at 450 nm. BHA and BHT were used as positive standards for comparison of the activity. The results were given as $A_{0.5}$ ($\mu\text{g/mL}$) corresponding to the concentration indicating 0.50 absorbance intensity.

2.4.4. Superoxide Radical Scavenging Activity by Alkaline DMSO

Superoxide radical scavenging activity was done based on the method described by Rao and Kunchandy (1990) [29]. Briefly, the reaction mixture containing 130 μL of DMSO alkaline solution (20 mg of NaOH in 1 mL DMSO and complete with water at 100 mL) and 30 μL NBT (10 mg NBT in 10 mL distilled water) were added to 40 μL of extract solution in methanol at different concentrations (12.5-800 $\mu\text{g/mL}$), the absorbance was measured at 560 nm. α -tocopherol and tannic acid used as antioxidant standards. The calculation was performed according to the following equation:

$$\text{DMSO activity (\%)} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100$$

2.4.5. β -Carotene-linoleic Acid Assay

The antioxidant activity of the extracts was evaluated using β -carotene/linoleic acid assay as previously described by Marco (1968) [30]. 40 μL of extract solution in methanol at different concentrations (12.5-800 $\mu\text{g/mL}$) were added to 160 μL of the solution (0.5 mg β -carotene + 200 μL Tween 40 + 25 μL linolic acid + 1 mL chloroform + 50 mL H_2O), the absorbance was measured at 470 nm. BHA and BHT were employed as positive standards. The results were expressed as IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) corresponding to the concentration of 50% inhibition.

2.5. In Vitro Anti-inflammatory Activity

2.5.1. In Vitro Anti-inflammatory Activity by Inhibition of Protein Denaturation

The *in vitro* anti-inflammatory activity by protein denaturation method was determined by following the method described by Karthik *et al.* (2013) [31] with slight modifications. 1 mL of BSA solution 0.2% prepared in a Tris HCl pH=6.6 and incubated at 37 $^\circ\text{C}$ for 15 minutes was added to 1 mL of each extract concentration (0.5, 1, 2, 4 mg/mL) or standard. The reaction mixture was heated at 72 $^\circ\text{C}$ for 5 minutes. Then, the test tubes were cooled for 10 minutes. The absorbance of these solutions was determined using a UV-VIS double beam spectrophotometer at a wavelength of 660 nm. Diclofenac (1 mg/mL) was used as reference standard drug and control. The percentage of inhibition was calculated on a percentage basis relative to control using the equation:

$$\text{Percentage of inhibition (\%)} = [(A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}) / A_{\text{Control}}] \times 100$$

2.6. Statistical Analysis

The results were reported as mean \pm SD, of three measurements; the IC_{50} and $A_{0.50}$ values were calculated by linear regression analysis, and one-way analysis of variance ANOVA followed by Tukey's-HSD multiple range post hoc test. Statistical significance was determined at $p < 0.05$ using XLSTAT.

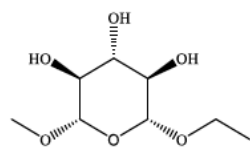
3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Characterization of Compounds (1-15)

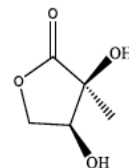
In this study, we report the isolation of 15 known compounds including ethyl- β -D-glucopyranoside (**1**), dihydro-3,4-dihydroxy-3-methyl-2(3H)-furanone (**2**), ethyl arabinofuranoside (**3**), pinitol (**4**), 4-hydroxybenzoic acid (**5**), loliolide (**6**), citrusin C (**7**), salicylic acid (**8**), tricrin (**9**), hyperoside (**10**), 3'-OMe-tricetin 7-O- β -glycoside (**11**), isoquercitrin (**12**), astragalol (**13**), luteolin 5-methyl ether (**14**), and β -sitosterol-3-O-glucoside (**15**).

Compound (9) was isolated as a yellow powder. The ESIMS showed pseudomolecular ion at m/z 331 $[\text{M}+\text{H}]^+$ corresponding to a $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$ composition. The ^1H NMR spectrum of (**9**) showed two AX systems for four meta coupling aromatic protons at δ_{H} 6.23 (1H, *d*, $J=2.1$ Hz, H-6), δ_{H} 6.50 (1H, *d*, $J=2.1$ Hz, H-8) and δ_{H} 7.27 (2H, *s*, H-2', H-6'). The chemical shifts of protons and carbons, established mainly by COSY H-H, HSQC, and HMBC, are similar to those reported for a methoxylated flavone called tricrin [32]. This compound was obtained for the first time in the genus *Onobrychis*.

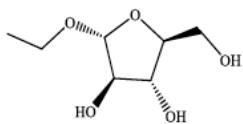
Compound (10) was isolated as a light powder, ESIMS m/z 465 $[\text{M}+\text{H}]^+$ corresponds to the formula $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$. ^1H NMR spectrum showed, for the aglycon moiety, an ABX system for three aromatic protons at δ_{H} 7.86 (1H, *d*, $J=2.2$, H-2'), 6.88 (1H, *d*, $J=8.4$ Hz, H-5'), 7.61 (1H, *dd*, $J=8.5$ and 2.2 Hz, H-6') and AX system for two aromatic protons at δ_{H} 6.18 (1H, *d*, $J=2.1$ Hz, H-6) and 6.37 (1H, *d*, $J=2.1$ Hz, H-8), characteristics for quercetin skeleton. Furthermore, the



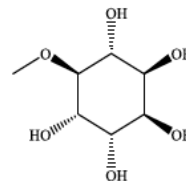
Ethyl-β-D-glucopyranoside (1)



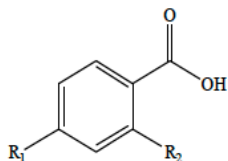
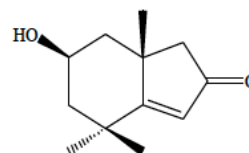
Dihydro-3,4-dihydroxy-3-methyl-2(3H)-furanone (2)



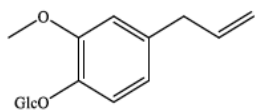
Ethyl α-L-arabinofuranoside (3)



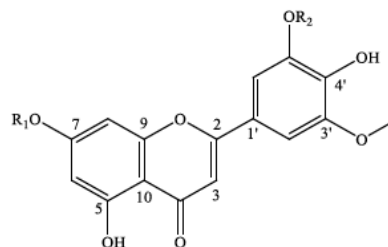
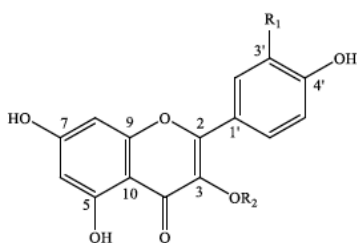
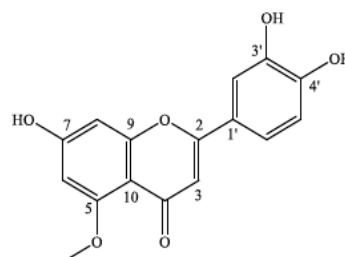
Pinitol (4)

4-Hydroxybenzoic acid (5), R₁=OH, R₂=H
Salicylic acid (8), R₁=H, R₂=OH

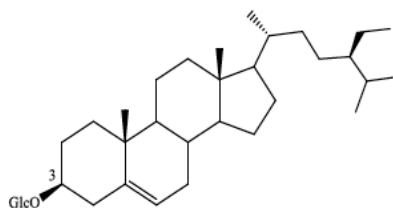
Loliolide (6)



Citrusin C (7)

Tricin (9), R₁=H, R₂=CH₃
3'-O-Me-Tricetin 7-O-β-glycoside (11), R₁=Glc, R₂=OHHyperoside (10), R₁=OH, R₂=Gal
Isoquercitrin (12), R₁=OH, R₂=Glc
Astragalin (13), R₁=H, R₂=Glc

Luteolin 5-methyl ether (14)



β-sitosterol-3-O-glucoside (15)

Fig. (1). Structures of the isolated compounds from *O. crista-galli* (L.) Lam.

Table 1. NMR data of compounds 9-12 (600 MHz, 150 MHz, Me OD).

-	Tricin (9)		-	Hyperoside (10)		3'-OMe-Tricetin 7-O-glucoside (11)		Isoquercitrin (12)	
	¹ H (m, J)	¹³ C		¹ H (m, J)	¹³ C	¹ H (m, J)	¹³ C	¹ H (m, J)	¹³ C
2	-	162.1	2	-	156.8	-	166.3	-	158.8
3	6.97 (s)	103.5	3	-	134.5	6.68 (s)	104.4	-	135.8
4	-	182.8	4	-	176.8	-	183.8	-	179.5
5	-	157.2	5	-	164.2	-	159.4	-	164.8
6	6.23 (d, 2.1 Hz)	99.08	6	6.18 (d, 2.1 Hz)	93.04	6.22 (d, 2.1 Hz)	100.4	6.21 (d, 2.0 Hz)	100.1
7	-	163.5	7	-	161.7	-	165.8	-	166.1
8	6.50 (d, 2.1 Hz)	94.07	8	6.37 (d, 2.1 Hz)	89.0	6.54 (d, 2.1 Hz)	95.4	6.40 (dd, 2.1, 4.9 Hz)	95.0
9	-	158.3	9	-	159.1	-	157.1	-	158.5
10	-	104.3	10	-	105.0	-	107.0	-	106.1
1'	-	121.6	1'	-	120.9	-	125.0	-	123.1
2'	7.27 (s)	104.2	2'	7.86 (d, 2.2 Hz)	114.6	7.60 (s)	110.4	7.84 (d, 2.2 Hz)	116.1
3'	-	148.5	3'	-	141.8	-	150.2	-	145.9
4'	-	140.1	4'	-	149.5	-	138	-	149.9
5'	-	148.5	5'	6.88 (d, 8.4 Hz)	116.3	-	147.3	6.87 (dd, 2.9, 8.5 Hz)	117.8
6'	7.27 (s)	104.2	6'	7.61 (dd, 2.2, 8.5 Hz)	121.5	7.31 (d, 2.1 Hz)	106.3	7.59 (dd, 2.2, 8.5 Hz)	123.2
3',5'-OMe	3.97 (s)	56.01	1''	5.11 (d, 7.8 Hz)	104.9	5.19 (d, 7.8 Hz)	104.1	5.17 (d, 7.8 Hz)	104.6
			2''	3.88 (m)	71.78	3.57 (m)	74.82	3.48 (m)	75.7
			3''	(3.55) (m)	73.74	3.53 (m)	77.5	3.35 (m)	78.1
			4''	3.95 (m)	68.6	3.43 (m)	71.5	3.42 (t, 8.9 Hz)	71.2
			5''	3.48 (m)	75.8	3.56 (m)	78.6	3.21 (m)	78.4
			6''	3.58 (m) 3.65 (dd, 6.1, 11.2 Hz)	60.5	3.75 (m) 4.20 (m)	62.5	3.56 (ddd, 5.0, 9.4, 11.8 Hz) 3.64 (dd, 6.0, 11.2 Hz)	61.9
			3'-OMe	-	-	3.96 (s)	57.1	-	-

¹H NMR spectrum of (10) showed anomeric proton at δ_H 5.11 (d, $J = 7.8$ Hz) indicative of β -linked sugar moiety. The NMR data determined unambiguously by COSY and HSQC experiments showed the presence of β -galactose. The site of sugar location was obtained from the HMBC correlation between the anomeric proton H-1'' and the carbon resonance C-3 (δ_C 103.5) of the aglycon moiety. Thus, the structure of

compound (10) was identified as quercetin 3-O- β -galactopyranoside. This compound is named also hyperoside [33]. It was found for the first time in the genus *Onobrychis*.

Compound (11) was isolated as a yellow powder. The ESIMS indicated pseudomolecular ion at m/z 480 [M+H]⁺ corresponding to the formula C₂₁H₂₁O₁₃. Analysis of the NMR data revealed the close structural relationship with

Table 2. NMR data of compounds 13 and 15 (600 MHz, 150 MHz, Me OD).

	Astragalin (13)		Luteolin 5-methyl ether (14)	
	¹ H (m, J)	¹³ C	¹ H (m, J)	¹³ C
2	-	150.0	-	161.1
3	-	135.8	6.40 (m)	105.1
4	-	179.5	-	178.8
5	-	163.0	-	162.4
6	6.21 (d, 2.0 Hz)	100.0	6.33 (d, 2.1 Hz)	96.1
7	-	166.1	-	163.7
8	6.40 (d, 2.1 Hz)	95.0	6.46 (d, 2.1 Hz)	94.99
9	-	159.0	-	159.9
10	-	106.5	-	106.8
1'	-	122.0	-	122.3
2'	7.59 (dd, 2.2, 8.4 Hz)	123.2	7.26 (dq, 2.2, 3.7 Hz)	112.5
3'	6.87 (dd, 2.8, 8.4 Hz)	117.8	-	145.6
4'	-	158.8	-	149.2
5'	6.87 (dd, 2.8, 8.4 Hz)	117.8	6.80 (d, 8.8 Hz)	115.3
6'	7.59 (dd, 2.2, 8.4 Hz)	123.2	7.66 (m)	118.5
1"	5.17 (d, 7.8 Hz)	105.5		
2"	3.48 (m)	74.4		
3"	3.42 (t, 8.9 Hz)	77.9		
4"	3.35 (m)	71.2		
5"	3.47 (m)	78.1		
6"	3.56 (dd, 2.5, 11.2 Hz) 3.64 (dd, 6, 11.8 Hz)	61.9		
5-OMe	-	-	3.91 (s)	55.0

compound (**9**). The difference is that compound (**11**) possessed only one methoxy group at δ_H 3.96 (3H, s) and one β -linked sugar unit with a signal of anomeric proton appearing at δ_H 5.19 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1"). The precise location of the methoxyl group was confirmed from the HMBC correlation between C-3' (δ_C 150.2) of the aglycon moiety and methoxyl protons. The chemical shifts of all proton and carbon resonances of the sugar unit were ascertained from COSY and HSQC experiments. These data showed the presence of the β -glucopyranosyl unit. The site of attachment of sugar moiety on the aglycon of (**11**) was determined by the HMBC

experiment, which showed long-range correlation between the anomeric proton signal (δ_H 5.19, H-1") and the carbon resonance at C-7 (δ_C 165.8). Therefore, the structure of compound (**11**) was identified as tricetin methyl ether 7-O- β -glucopyranoside [34]. It was isolated for the first time in the genus *Onobrychis*.

Compound (12) was isolated as a yellow amorphous powder. The ESIMS showed pseudomolecular ion at m/z 465 $[M+H]^+$ corresponding to the formula $C_{21}H_{20}O_{12}$. The ¹H and ¹³C NMR spectral data of (**12**) were closely similar to those of compound (**10**). The only difference was the presence, at

Table 3. Results of antioxidant activities of *O. crista-galli*.

-	DPPH Assay	ABTS Assay	CUPRAC Assay	Superoxide Alkaline DMSO Assay	β -carotene Linoleic Acid Assay
Extracts and standards	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	$A_{0.50}$ ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
PE	NA	NA	77.75 ± 0.86^c	NA	103.93 ± 2.04^a
EtOAc	17.13 ± 0.51^b	82.99 ± 2.50^b	94.67 ± 0.41^b	97.09 ± 2.20^b	36.73 ± 1.17^c
<i>n</i> -BuOH	106.32 ± 2.13^a	90.73 ± 3.27^a	97.17 ± 0.40^a	107.16 ± 2.42^a	65.63 ± 0.8^b
BHA ^b	6.14 ± 0.41^d	1.81 ± 0.10^c	5.35 ± 0.71^e	NT	1.05 ± 0.03^d
BHT ^b	12.99 ± 0.41^c	1.29 ± 0.30^c	8.97 ± 3.94^d	NT	0.91 ± 0.01^d
α -Tocopherol ^b	13.02 ± 5.17^c	NT	NT	<3	NT
Tannic acid ^b	NT	NT	NT	<3	NT

IC_{50} and $A_{0.50}$ values are defined as the concentration of 50% inhibition and the concentration at 0.50 absorbance, respectively. IC_{50} and $A_{0.50}$ were calculated by linear regression analysis and expressed as Mean \pm SD (n=3). The values with different superscripts (a, b, c, d, e) in the same columns are significantly different ($p < 0.05$), ^bReference compounds, NA: Not Absorbance, NT: Not Tested.

the same position, of a β -D-glucose instead of β -D-galactose in compound (**10**). On the basis of all this evidence, the structure of compound (**12**) was characterized as quercetin 3-*O*- β -glucopyranoside. This compound named isoquercitrin [35] was previously reported from *Onobrychis viciifolia* [10].

Compound (13) was isolated as a yellow amorphous powder. The ESIMS showed pseudomolecular ion at m/z 449 $[M+H]^+$ corresponding to a $C_{21}H_{20}O_{11}$ composition. For the aglycon portion, the ^1H NMR spectrum indicated an AA'XX' for four aromatic protons at δ_H 7.59 (2H, *dd*, $J = 8.4$ and 2.2 Hz, H-2', H-6'), 6.87 (2H, *dd*, $J = 8.4$ and 2.8 Hz, H-3', H-5') and AM system for two aromatic protons at δ_H 6.21 (1H, *d*, $J = 2.0$ Hz, H-6) and 6.40 (1H, *d*, $J = 2.1$ Hz, H-8). Based on these findings and by comparison of NMR data reported in the literature, the aglycon was determined as kaempferol. Additionally, one anomeric proton signal resonating at δ_H 5.17 (*d*, $J = 7.8$ Hz, H-1"). The chemical shifts of protons and carbons established by COSY and HSQC showed the presence of the β -D-glucopyraosyl unit. The site of attachment of sugar moiety on the aglycon was determined by the HMBC experiment, which showed long-range C/H correlation between the anomeric proton signal at (δ_H 5.17, H-1") and the carbon resonance at δ_C 135.8 (C-3). Thus, the structure of compound (**13**) was established as kaempferol 3-*O*- β -glucopyranoside [36]. This compound named astragalín was identified previously from *Onobrychis bobrovii* [37], *O. arenaria*, and *O. viciifolia* [38, 12].

Compound (14) was obtained as a yellow powder. The ESIMS showed pseudomolecular ion at m/z 301 $[M+H]^+$ corresponding to the formula $C_{16}H_{12}O_6$. Based on the ^1H NMR spectrum of compound (**14**), the data revealed an ABX system for three aromatic protons at δ_H 7.26 (1H, *dq*, $J = 3.7$ and 2.2 Hz, H-2'), 7.66 (1H, *m*, H-6'), 6.80 (1H, *d*, $J = 8.8$ Hz, H-5') and an AX system for two aromatic protons at δ_H 6.33 (1H, *d*, $J = 2.1$ Hz, H-6), 6.46 (1H, *d*, $J = 2.1$ Hz, H-8). It showed also the presence of methoxyl protons at δ_H 3.91 (3H, *s*). The HMBC spectrum showed a correlation between

the methoxy proton with the aglycon at δ_C 162.4 (C-5). These results, in addition to the carbon data established by COSY and HSQC, were identical to those of luteolin 5-methyl ether [39]. It was reported for the first time in the genus *Onobrychis*.

3.2. Total Phenolic and Flavonoid Contents

The total phenolic and flavonoid contents of the extracts (PE, EtOAc, and *n*-BuOH) of *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam. species were expressed as gallic acid equivalents (mg GAE/ g of fresh weight) and quercetin equivalents (mg QE/ g of fresh weight), respectively. The results obtained showed that the ethyl acetate extract provides the highest phenol content (31.09 ± 0.40 mg GAE/ g FW) among the other extracts. The most flavonoid-rich extract was the *n*-butanol extract (60.2 ± 0.7 mg QE/ g FW), while the petroleum ether extract had not total flavonoid content.

Previous studies performed on *Onobrychis* species showed the highest contents in polyphenols and flavonoids [10, 14]. These compounds were also isolated from the ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *O. crista-galli*. This finding is important because phenolic compounds have been usually linked with the antioxidant activity.

3.3. Antioxidant Activity

The antioxidant activity of the three extracts (PE, EtOAc, and *n*-BuOH) of the whole plant *O. crista-galli* were evaluated using five various methods including DPPH, ABTS, CUPRAC, DMSO, and the β -carotene-linoleic acid assays (Table 3). The five isolated compounds (tricin, hyperoside, 3'-*O*-Me-tricetin 7-*O*-glucoside, astragalín, and luteolin 5-methyl ether) were investigated for their antioxidant activity by using DPPH and CUPRAC assays (Table 4).

The extracts (PE, EtOAc, and *n*-BuOH) and the pure compounds (tricin, hyperoside, 3'-*O*-Me-tricetin 7-*O*-glucoside, astragalín, and luteolin 5-methyl ether), as well as the antioxidant standards (BHA, BHT, α -tocopherol, and tannic

acid), showed antioxidant potency in all the tested systems (Tables 3 and 4).

Table 4. Results of antioxidant activities of *O. crista-galli* (L.) Lam.

-	DPPH Assay	CUPRAC Assay
Isolated compounds and standards	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	$A_{0.50}$ ($\mu\text{g/mL}$)
Tricin (9)	12.01 ± 0.34^d	16.20 ± 0.07^c
Hyperoside (10)	31.04 ± 0.40^b	20.72 ± 0.37^b
3'-OMe-Tricetin 7-O- glycoside (11)	10.81 ± 0.51^d	14.35 ± 0.39^d
Astragalín (13)	43.27 ± 0.89^a	29.01 ± 0.48^a
Luteolin 5-methyl ether (14)	6.05 ± 0.15^e	12.57 ± 0.34^e
BHA ^b	5.73 ± 0.41^e	3.64 ± 0.19^e
BHT ^b	22.32 ± 1.19^c	9.62 ± 0.87^f

IC_{50} and $A_{0.50}$ values are defined as the concentration of 50% inhibition percentages and the concentration at 0.50 absorbance, respectively. IC_{50} and $A_{0.50}$ were calculated by linear regression analysis and expressed as Mean \pm SD (n=3). The values with different superscripts (a, b, c, d, e, f, or g) in the same columns are significantly different ($p < 0.05$). ^bReference compounds.

As can be seen in Table 4 and Fig. (3), the flavonoid compound luteolin 5-methyl ether (14) isolated from the *n*-butanol extract indicated the highest antioxidant activity in two tests with values of IC_{50} at $6.05 \pm 0.15 \mu\text{g/mL}$ and $A_{0.5}$ at 12.57 ± 0.34 in DPPH and CUPRAC assays, respectively, compared with other compounds: luteolin 5-methyl ether (14) > 3'-OMe-tricetin 7-O-glucoside (11) > tricetin (9) > hyperoside (10) > astragalín (13).

In DPPH and β -carotene linoleic acid assays, the EtOAc extract was found more effective than the *n*-BuOH extract.

The presence of powerful antioxidant activity was noticed in DPPH radical scavenging and β -carotene linoleic acid assays. This is feasible due to the presence of main bioactive compounds responsible for the antioxidant activity in crude extracts such as phenolics and flavonoids.

As shown in Fig. (2), the DPPH free radical scavenging activity of the extracts (PE, EtOAc, and *n*-BuOH) of *O. crista-galli* species, radical scavenging activity increases with increasing the amount of the extracts. The EtOAc extract demonstrated the strongest activity ($IC_{50} = 17.13 \pm 0.51 \mu\text{g/mL}$) followed by *n*-butanol extract ($IC_{50} = 106.32 \pm 2.13 \mu\text{g/mL}$) and the PE extract was not active. The obtained data are in accordance with the phenolic contents of the extracts. The results previously reported by Karakoca *et al.* [19] demonstrated that the methanolic extract of *O. Armena* had an excellent radical DPPH scavenging activity ($IC_{50} = 669.23 \mu\text{g/mL}$). On the other hand, Ince *et al.* [40] studied the DPPH activity of the aerial parts of *O. vicifolia* plant revealing that the acetone extract had a higher property of radical scavenging activity.

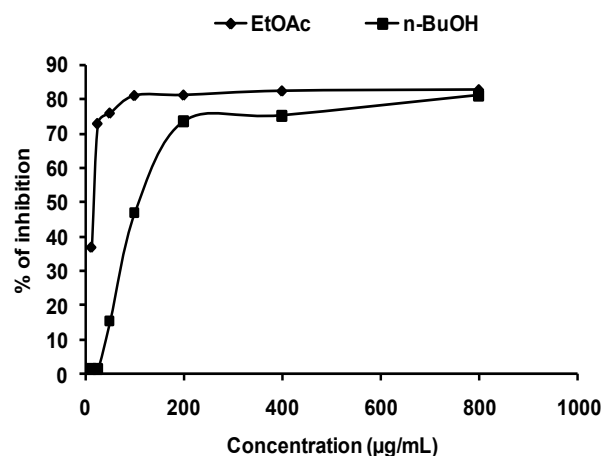


Fig. (2). DPPH radical scavenging activity of crude extracts (Mean \pm SD of three trials).

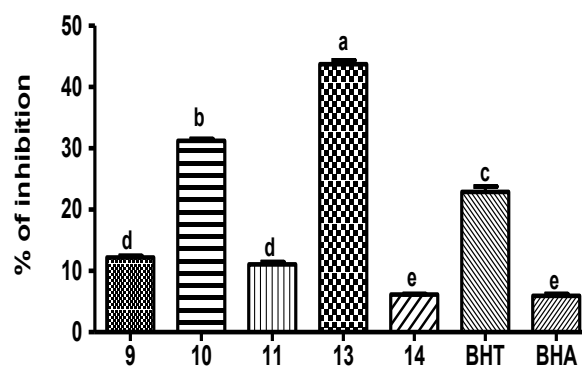


Fig. (3). Percentage of inhibition of DPPH radical scavenging activity of flavonoids (9), (10), (11), (13) and (14) (Mean \pm SD of three trials).

In the ABTS assay, Fig. (4) demonstrates that the ethyl acetate extract of *O. crista-galli* was found to be more active extract ($IC_{50} = 82.99 \pm 2.50 \mu\text{g/mL}$) than *n*-butanol extract ($IC_{50} = 90.73 \pm 3.27 \mu\text{g/mL}$), but the petroleum ether extract was not active. The ability of the extracts to scavenge the synthetic ABTS free radical is also used as an estimate of the total antioxidant activity. However, it is more specific than the DPPH method. There are no reports on the evaluation of the scavenging activity of ABTS⁺ radical properties of *Onobrychis* species. It is very important to indicate that this is the first work on ABTS⁺ activity.

In the CUPRAC assay, the results were given as absorbance. This assay is based on the measurement of absorbance at 450 nm by the formation of a stable complex between neocuproine and copper (I), the latter is formed by the reduction of copper (II) in the presence of neocuproine. Increasing activity was seen with increasing amount of the extracts. As mentioned in Fig. (5), the ethyl acetate extract was also found to be the best active extract with ($A_{0.50} = 94.67 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$) followed by *n*-butanol extract ($A_{0.50} = 97.17 \pm 0.40 \mu\text{g/mL}$) and petroleum ether extract ($A_{0.50} = 99.4 \pm 2.80 \mu\text{g/mL}$). Finding reported previously reveals that the meth-

anolic extract of *O. armena* displayed significant activity against CUPRAC [21].

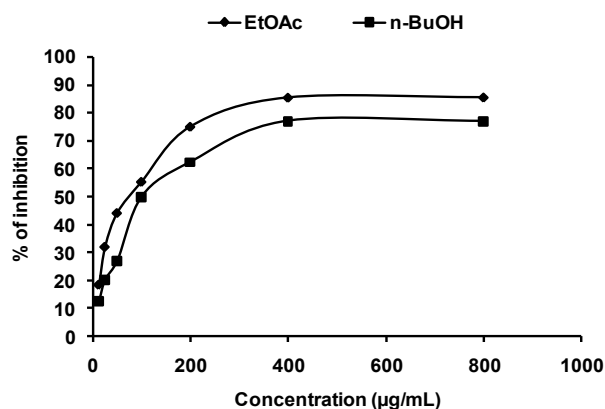


Fig. (4). ABTS activity of crude extracts (Mean ± SD of three trials).

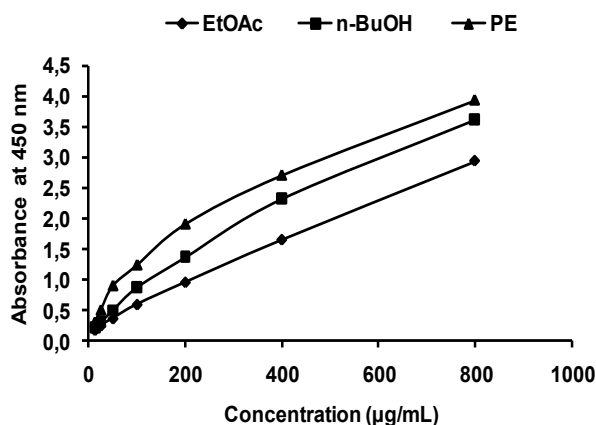


Fig. (5). CUPRAC activity of crude extracts (Mean ± SD of three trials).

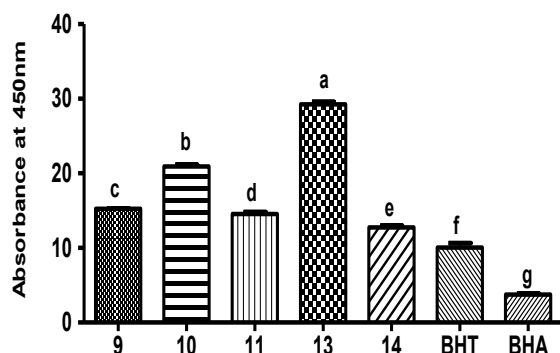


Fig. (6). CUPRAC activity of flavonoids (9), (10), (11), (13) and (14) (Mean ± SD of three trials).

The experimental findings (Table 4, Figs. (3) and (6)) indicated that the flavonoid luteolin 5-methyl ether (14) was found to be active in DPPH radical scavenging and CUPRAC assays. The difference of the antioxidant activity be-

tween the three compounds luteolin 5-methyl ether (14), 3'-OMe-tricetin 7-O-glycoside (11), and tricetin (9) could be explained by the number and position of hydroxyl groups in the aromatic B-ring of the flavonoid [41, 42]. The two other flavonoids hyperoside (10) and astragalins (13) are glycosylated in position 3 of the C-ring. Therefore, the lesser antioxidant activity of compounds (10) and (13) is due to the lack of hydroxyl group in the C-3 position [43].

In Superoxide alkaline DMSO, the best activity was found in the ethyl acetate extract with an $IC_{50} = 97.09 \pm 2.20$ µg/mL followed by *n*-butanol extract ($IC_{50} = 107.16 \pm 2.42$ µg/mL), while the petroleum ether extract is also not active as described in Fig. (7). There is no previous study regarding the assessment of the DMSO effects of *Onobrychis* species. To the best of our knowledge, this is the first report that documents the antioxidant activity of *O. crista-galli* in Superoxide alkaline DMSO assay.

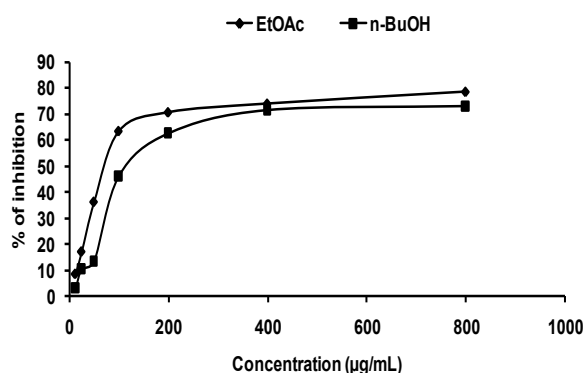


Fig. (7). Superoxide alkaline DMSO activity of crude extracts (Mean ± SD of three trials).

In β -carotene-linoleic acid assay, the highest lipid peroxidation inhibition activity was observed in ethyl acetate extract with an IC_{50} of 36.73 ± 1.17 µg/mL followed by *n*-butanol extract ($IC_{50} = 65.63 \pm 0.8$ µg/mL) and petroleum ether extract ($IC_{50} = 103.93 \pm 2.04$ µg/mL), under the same conditions BHA and BHT as standards exhibited IC_{50} values of 0.91 and 1.05 µg/mL, respectively (Fig. (8)). A study conducted by Ince *et al.* [40] on different extracts of *O. vicifolia* plant showed that the acetone extract exhibited the most effective effect.

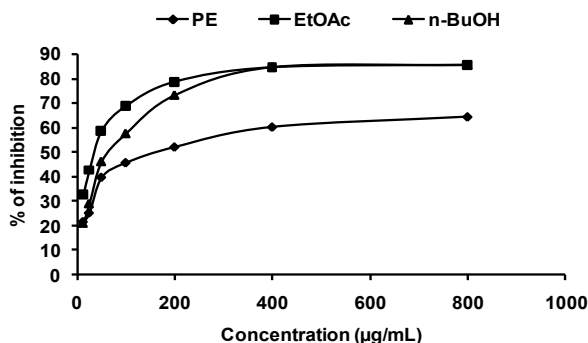
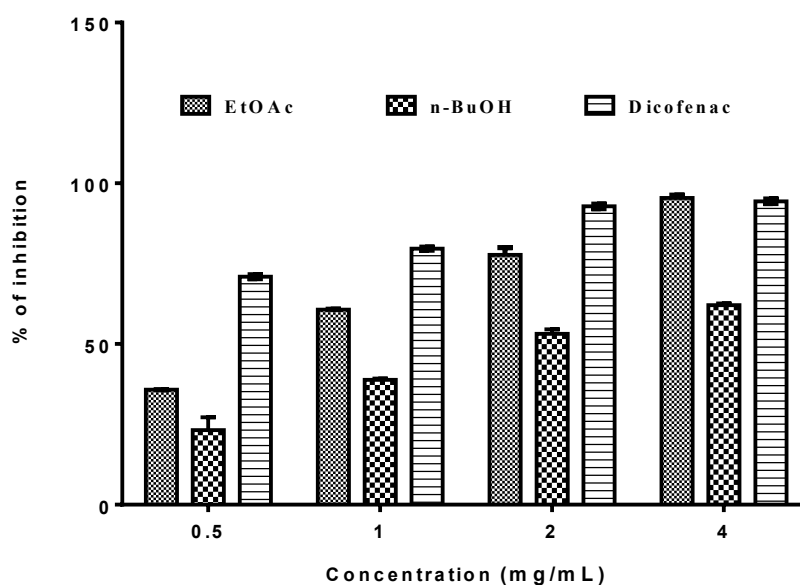


Fig. (8). β -carotene-linoleic acid activity of crude extracts (Mean ± SD of three trials).

Table 5. Results of anti-inflammatory activity of *O. crista-galli*.

Extracts	Concentration of Extracts / % Anti-inflammatory Activity			
	0.5 mg/mL	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL
PE	ND	ND	ND	ND
EtOAc	35.76±0.04	60.68±0.13	77.73±2.26	95.45±0.84
<i>n</i> -BuOH	23.21±4.00	38.85±0.43	53.16±1.43	62.08±0.51
Diclofenac (1mg/mL)	70.95±0.82	79.65±0.65	92.82±0.90	94.4±0.89

Diclofenac: Reference compound.
ND: Not Detected.

**Fig. (9).** Anti-inflammatory activity of crude extracts and diclofenac as standard (Mean ± SD of three trials).

In the present study, the decreasing order of antioxidant activity among the *O. crista-galli* extracts was found as ethyl acetate > *n*-butanol > petroleum ether. This order is in accordance with the phenolic contents of the corresponding extracts. The ethyl acetate extract having the highest total phenolic content exhibited better antioxidant activity in all tests in comparison with the two other extracts (petroleum ether and *n*-butanol). Previous studies performed on some *Onobrychis* species such as *O. armena*, *O. sosnovskyi*, *O. viciifolia*, *O. melanotricha*, and *O. nitida* showed a strong correlation between total phenolic content of the extracts and their antioxidant activities [21, 22, 44]. This is in agreement with our results. The higher antioxidant activity of the ethyl acetate extract of this plant could be attributed to the presence of phenolics [45] and flavonoids [43, 46]. Furthermore, it has already been reported that plants of the *Onobrychis* genus are good antioxidants.

3.4. Anti-inflammatory Activity

The petroleum ether, ethyl acetate, and *n*-butanol extracts of the whole parts of *Onobrychis crista-galli* were subjected

to *in vitro* anti-inflammatory activity. The different extracts displayed significantly anti-inflammatory activity at different concentrations 0.5, 1, 2, 4 mg/mL. Ethyl acetate and *n*-butanol extracts showed a positive response compared to standard drug diclofenac. The maximum percentage of inhibition of protein denaturation was observed in ethyl acetate extract (95.45±0.84 mg/mL) compared to that of *n*-butanol extract (62.08±0.51 mg/mL) at the concentration of 4 mg/mL. These findings were presented in Table 5 and Fig. (9). The extracts of *O. crista-galli* possess significant anti-inflammatory activity as compared with the standard drug diclofenac. To the best of our knowledge, this is the first study on the anti-inflammatory activity of the *Onobrychis* genus.

Many previous studies showed that different members of the Fabaceae family such as *Indigofera heterantha* and some *Lathyrus* L. species revealed a potential anti-inflammatory activity [47, 48].

The good anti-inflammatory activity observed in the EtOAc extract of *O. crista-galli* may be due to its content of carbohydrates as pinitol [49]. The *n*-BuOH extract exhibited

a moderate anti-inflammatory activity compared to diclofenac might be explained by the presence of flavonoids such as astragalins and tricins [50-52].

CONCLUSION

In this work, 15 compounds were isolated and identified from the ethyl acetate and *n*-butanol extracts of Algerian plant *Onobrychis crista-galli* (L.) Lam. The presence of polyphenolic compounds, especially flavonoids in this species is in good agreement with major previous studies reported on *Onobrychis* species. Our report confirms that phenolic compounds and flavonoids are the major constituents of the *Onobrychis* genus.

In addition, the total phenolic and flavonoid contents of various crude extracts (PE, EtOAc, and *n*-BuOH) were measured. Data from the present results clearly revealed that the ethyl acetate extract and isolated compound luteolin 5-methyl ether (**14**) had higher antioxidant activity than *n*-butanolic and petroleum ether extracts in all tests. Other compounds like tricins (**9**), hyperoside (**10**), 3'-OMe-tricetin 7-*O*- β -glucoside (**11**), astragalins (**13**) were indicated good antioxidant potential. The ethyl acetate extract showed the presence of significant anti-inflammatory activity more than *n*-butanolic extract. Thus, it can be noticed that there is a real link between antioxidant and anti-inflammatory activities.

In conclusion, *O. crista-galli* could be considered as a source of antioxidant and anti-inflammatory agents due to its richness in phenolic and flavonoid compounds.

LIST OF ABBREVIATIONS

ABTS	=	2,2'-AzinoBis (3-ethylBenzoThiazoline-6-Sulfonic acid
CC	=	Column Chromatography
COSY	=	Correlation Spectroscopy
CUPRAC	=	Cupric Reducing Antioxidant Capacity
DMSO	=	DiMethyl Sulfoxyd
DPPH	=	1,1-DiPhenyl-2-Picryl-Hydrazil
EtOAc	=	Ethyl Acetate
FW	=	Fresh weight
GAE	=	Gallic Acid Equivalent
HMBC	=	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation spectroscopy
HPLC	=	High Performance Liquid Chromatography
HSQC	=	Heteronuclear Single Quantum Correlation
MeOH	=	Methanol
MPLC	=	Medium Pressure Liquid Chromatography
<i>n</i> -BuOH	=	<i>n</i> -Butanol
NMR	=	Nuclear Magnetic Resonance
PE	=	Petroleum Ether
QE	=	Quercetin Equivalent
UHPLC	=	Ultra-High Pressure Liquid Chromatography
UV	=	UltraViolet spectrum

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable.

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

No animals/humans were used for studies that are the basis of this research.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

Not applicable.

FUNDING

None.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the DGRSDT of the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Algeria for PRFU Project (B00L01UN050120180002) and School of Pharmaceutical Sciences, EPGL, University of Geneva, University of Lausanne, Switzerland for research facilities and technical support.

REFERENCES

- Quezel, P.; Santa, S. *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.*, 1963, Vol. 1-2
- ILDIS (International Legume Database & Information Service). World Database of Legumes, Version 10.01. <http://www.ildis.org/LegumeWeb>.
- Kavandi, A.; Jafari, A.A.; Jafarzadeh, M. Effect of seed priming on enhancement of seed germination and seedling growth of annual Sainfoin (*Onobrychis crista-galli* (L.) Lam.) in medium and long-term collections of gene bank. *J. range. sci.*, **2018**, 8(2), 117-128.
- Delamarck, M.; Decandolle, M. flore française, ou description succinctes de toutes les plantes qui croissant naturellement en France chez. *Agasse, rue des poitevins N° 6, Paris*, **1805**, 613.
- Abdelgurf, A.; Laouar, M. Distribution des espèces d'*Onobrychis* en relation avec quelques facteurs du milieu, en Algérie. *Annales de l'institut national agronomique-El-Harrach*, **2002**, 32(1), et (2).
- Ingham, J.L. Flavonoid and isoflavonoid compounds from leaves of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Z. Naturforsch. C.*, **1978**, 33(1), 146-148. [<http://dx.doi.org/10.1515/znc-1978-1-227>]
- Russeli, G.B.; Shaw, G.J.; Christmas, P.E.; Yates, M.B.; Sutherland, O.R.W. Two 2-aryl benzofurans as insect feeding deterrents from sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Phytochemistry*, **1984**, 23(7), 1417-1420. [[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)80477-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)80477-X)]
- Sinch, S.; McCallum, J.; Gruber, M.Y.; Neil Towers, G.H.; Muir, A.D.; Bohm, B.A.; Koupai-Abyzani, M.R.K.; Glass, A.D.M. Biosynthesis of flanan-3-ols by leaf extracts of *Onobrychis viciifolia*. *Phytochemistry*, **1997**, 44(3), 425-432. [[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00415-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00415-3)]
- Marais, J.P.J.; Mueller-Harvey, I.; Brandt, E.V.; Ferreira, D. Polyphenols, condensed tannins, and other natural products in *Onobrychis viciifolia* (Sainfoin). *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48(8), 3440-3447.

- [10] [http://dx.doi.org/10.1021/jf000388h] [PMID: 10956131]
Lu, Y.; Sun, Y.; Foo, L.Y.; McNabb, W.C.; Molan, A.L. Phenolic glycosides of forage legume *Onobrychis viciifolia*. *Phytochemistry*, **2000**, 55(1), 67-75.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00143-6] [PMID: 11021646]
- [11] Godevac, D.; Pejin, B.; Zdunic, G.; Savikin, K.; Stesevic, D.; Vajs, V.; Millosavljevic, S. Flavonoids from the aerial parts of *Onobrychis montana* subsp. *Scardica*. *J. Serb. Chem. Soc.*, **2008**, 73(5), 525-529.
[http://dx.doi.org/10.2298/JSC0805525G]
- [12] Regos, I.; Urbanella, A.; Treutter, D. Identification and quantification of phenolic compounds from the forage legume sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, 57(13), 5843-5852.
[http://dx.doi.org/10.1021/jf900625r] [PMID: 19456170]
- [13] Regos, I.; Treutter, D. Optimization of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of complex polyphenol mixtures and application for sainfoin extracts (*Onobrychis viciifolia*). *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217(40), 6169-6177.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.07.075] [PMID: 20817190]
- [14] Veitch, N.C.; Regos, I.; Kite, G.C.; Treutter, D. Acylated flavonol glycosides from the forage legume, *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). *Phytochemistry*, **2011**, 72(4-5), 423-429.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.001] [PMID: 21292287]
- [15] Stringano, E.; Hayot Carbonero, C.; Smith, L.M.J.; Brown, R.H.; Mueller-Harvey, I. Proanthocyanidin diversity in the EU 'HealthyHay' sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) germplasm collection. *Phytochemistry*, **2012**, 77, 197-208.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.01.013] [PMID: 22313998]
- [16] Thill, J.; Regos, I.; Farag, M.A.; Ahmad, A.F.; Kusek, J.; Castro, A.; Schlangen, K.; Carbonero, C.H.; Gadjev, I.Z.; Smith, L.M.J.; Halbwirth, H.; Treutter, D.; Stich, K. Polyphenol metabolism provides a screening tool for beneficial effects of *Onobrychis viciifolia* (sainfoin). *Phytochemistry*, **2012**, 82, 67-80.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.05.030] [PMID: 22818525]
- [17] Guler, G.O.; Zengin, G.; Karadag, F.; Mollica, A.; Picot, C.M.N.; Mahomoodally, M.F. HPLC-DAD profiles and pharmacological insights of *Onobrychis argyrea* subsp. *isaurica* extracts. *Comput. Biol. Chem.*, **2018**, 76, 256-263.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.07.016] [PMID: 30081342]
- [18] Halabalaki, M.; Aligiannis, N.; Papoutsis, Z.; Mitakou, S.; Moutsatsou, P.; Sekeris, C.; Skaltsounis, A.L. Three new arylobenzofurans from *Onobrychis ebenoides* and evaluation of their binding affinity for the estrogen receptor. *J. Nat. Prod.*, **2000**, 63(12), 1672-1674.
[http://dx.doi.org/10.1021/np000071b] [PMID: 11141112]
- [19] Halabalaki, M.; Alexi, X.; Aligiannis, N.; Alexis, M.N.; Skaltsounis, A.L. Ebenfurans IV-VIII from *Onobrychis ebenoides*: evidence that C-prenylation is the key determinant of the cytotoxicity of 3-formyl-2-arylbenzofurans. *J. Nat. Prod.*, **2008**, 71(11), 1934-1937.
[http://dx.doi.org/10.1021/np800134h] [PMID: 18986200]
- [20] Usta, C.; Yildirim, A.B.; Turker, A.U. Antibacterial and antitumor activities of some plants grown in Turkey. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **2014**, 28(2), 306-315.
[http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2014.909708] [PMID: 26740759]
- [21] Karakoca, K.; Asan-Ozusaglam, M.; Cakmak, Y.S.; Teksen, M. Phenolic compounds, biological and antioxidant activities of *Onobrychis armena* Boiss. & Huet flower and root extracts. *Warasan Khana Withayasat Maha Withayalai Chiang Mai*, **2015**, 42(2), 376-392.
- [22] Karamian, R.; Asadbegy, M. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents of three *Onobrychis* species from Iran. *J. Pharm. Sci.*, **2016**, 22(2), 112-119.
[http://dx.doi.org/10.1517/PS.2016.18]
- [23] Erbil, N.; Duzguner, V.; Durmusahya, C.; Alan, Y. Antimicrobial and antioxidant effects of Some Turkish fodder plants belongs to fabaceae family (*Vicia villosa*, *Trifolium ochroleucum* and *Onobrychis altissima*). *Orient. J. Chem.*, **2015**, 31, 53-58.
[http://dx.doi.org/10.13005/ojcc/31.Special-Issue1.06]
- [24] Papoutsis, Z.; Kassi, E.; Halabalaki, M.; Mitakou, S.; Moutsatsou, P. Evaluation of estrogenic/antiestrogenic activity of *Onobrychis ebenoides* extract - interaction with estrogen receptor subtypes ERalpha and ERbeta. *Toxicol. In Vitro*, **2007**, 21(3), 364-370.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2006.09.009] [PMID: 17092687]
- [25] Zengin, G.; Guler, G.O.; Aktumsek, A.; Ceylan, R.; Picot, C.M.N.; Mahomoodally, M.F. Enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical profile of three medicinal plants from Turkey. *Adv. Pharmacol. Sci.*, **2015**, 2015410675
[http://dx.doi.org/10.1155/2015/410675] [PMID: 26798334]
- [26] Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **1958**, 181(4617), 1119-1200.
[http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0]
- [27] Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, **1999**, 26(9-10), 1231-1237.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3] [PMID: 10381194]
- [28] Apak, R.; Güçlü, K.; Ozyürek, M.; Karademir, S.E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52(26), 7970-7981.
[http://dx.doi.org/10.1021/jf048741x] [PMID: 15612784]
- [29] Kunchandy, E.; Rao, M.N.A. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *Int. J. Pharm.*, **1990**, 58(3), 237-240.
[http://dx.doi.org/10.1016/0378-5173(90)90201-E]
- [30] Marco, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1968**, 45, 594-595.
[http://dx.doi.org/10.1007/BF02668958]
- [31] Karthik, K.; Kumar, P.B.R.; Priya, R.V.; Kumar, K.S.; Rathore, R.S.B. Evaluation of anti-inflammatory activity of *canthium parviflorum* by in vitro method. *Indian J. Res. Pharm. Biotech.*, **2013**, 1(5), 729-3471.
- [32] Kuwabara, H.; Mouri, K.; Otsuka, H.; Kasai, R.; Yamasaki, K. Tricin from a *malagasy connaraceous* plant with potent antihistaminic activity. *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66(9), 1273-1275.
[http://dx.doi.org/10.1021/np030020p] [PMID: 14510616]
- [33] Ghanadian, S.M.; Ayatollahi, A.M.; Afsharypour, S.; Hareem, S.; Abdalla, O.M.; Jules Kezetas Bankeu, J. Flavonol glycosides from *Euphorbia microsciadia* Bioss. with their Immunomodulatory activities. *Iran. J. Pharm. Res.*, **2012**, 11(3), 925-930.
[PMID: 24250520]
- [34] Marin, P.D.; Grayer, R.J.; Grujic-Jovanovic, S.; Kite, G.C.; Veitch, N.C. Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys* subgenus *Betonica*. *Phytochemistry*, **2004**, 65(9), 1247-1253.
[http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.014] [PMID: 15184009]
- [35] Panda, S.; Kar, A. Antidiabetic and antioxidative effects of *Annona squamosa* leaves are possibly mediated through quercetin-3-O-glucoside. *Biofactors*, **2007**, 31(3-4), 201-210.
[http://dx.doi.org/10.1002/biof.5520310307] [PMID: 18997283]
- [36] Lee, K.H.; Tagahara, K.; Suzuki, H.; Wu, R.Y.; Haruna, M.; Hall, I.H.; Huang, H.C.; Ito, K.; Iida, T.; Lai, J.S. Antitumor agents. 49 tricetin, kaempferol-3-O-beta-D-glucopyranoside and (+)-nortrachelogenin, antileukemic principles from *Wikstroemia indica*. *J. Nat. Prod.*, **1981**, 44(5), 530-535.
[http://dx.doi.org/10.1021/np50017a003] [PMID: 7320737]
- [37] Luk'yanchikov, M.S. Polyphenols of *Onobrychis bobrovii*. *Chem. Nat. Compd.*, **1982**, 18(2), 237-237.
[http://dx.doi.org/10.1007/BF00577212]
- [38] Yuldashev, M.P.; Batirov, E.Kh.; Malikov, V.M. Flavonoids of the epigeal part of *Onobrychis arenaria*. *Chem. Nat. Compd.*, **1996**, 32(4), 590-591.
[http://dx.doi.org/10.1007/BF01372623]
- [39] Heshmati Afshar, F.; Delazar, A.; Nazemiyeh, H.; Khodaie, L.; Bamdad Moghaddam, S. Phenolic derivatives of *Artemisia spicigera* C. Koch growing in Iran. *Iran. J. Pharm. Res.*, **2015**, 14(4), 1241-1246.
[PMID: 26664392]
- [40] Ince, S.; Ekici, H.; Yurdakok, B. Determination of in vitro antioxidant activity of the sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extracts. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.*, **2012**, 59, 23-27.

- [41] [http://dx.doi.org/10.1501/Vetfak_0000002496] Husain, S.R.; Cillard, J.; Cillard, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, **1987**, 26(9), 2489-2491. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83860-1]
- [42] Lin, C.Z.; Zhu, C.C.; Hu, M.; Wu, A.Z.; Bairu, Z.D.; Kangsa, S.Q. Structure-activity relationships of antioxidant activity in vitro about flavonoids isolated from *Pyrethrum tatsienense*. *J. Intercult. Ethnopharmacol.*, **2014**, 3(3), 123-127. [http://dx.doi.org/10.5455/jice.20140619030232] [PMID: 26401360]
- [43] Heim, K.E.; Tagliaferro, A.R.; Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.*, **2002**, 13(10), 572-584. [http://dx.doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5] [PMID: 12550068]
- [44] Bektas, E.; Kaltalioglu, K.; Sahin, H.; Turkmen, Z.; Kandemir, A. Analysis of phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial properties of some endemic medicinal plants. *Int. j. second. metab.*, **2018**, 5(2), 75-86.
- [45] Shahidi, F.; Wanasundara, P.K.; Wanasundara, P.D. Phenolic antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **1992**, 32(1), 67-103. [http://dx.doi.org/10.1080/10408399209527581] [PMID: 1290586]
- [46] Kumar, S.; Pandey, A.K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal*, **2013**, 2013162750 [http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750] [PMID: 24470791]
- [47] Halim, A.; Aurang Zeb, M.; Ullah Khan, S. *In-vitro* anti-inflammatory activity of *Indigofera heterantha* roots. *Pharm Pharmacol Int J.*, **2018**, 6(4), 307-308.
- [48] Heydari, H.; Saltan İscan, G.; Eryılmaz, M.; Acikara, O.B.; Sezen Yılmaz Sarıaltın, S.Y.; Tekin, M.; Çoban, T. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of some *Lathyrus* L. (Fabaceae) species growing in Turkey. *Turk J Pharm Sci*, **2019**, 16(2), 240-245. [http://dx.doi.org/10.4274/tjps.galenos.2018.86719]
- [49] Singh, R.K.; Pandey, B.L.; Tripathi, M.; Pandey, V.B. Anti-inflammatory effect of (+)-pinitol. *Fitoterapia*, **2001**, 72(2), 168-170. [http://dx.doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00267-7] [PMID: 11223227]
- [50] Riaz, A.; Rasul, A.; Hussain, G.; Zahoor, M.K.; Jabeen, F.; Subhani, Z.; Younis, T.; Ali, M.; Sarfraz, I.; Selamoglu, Z. Astragalins: a bioactive phytochemical with potential therapeutic activities. *Adv. Pharmacol. Sci.*, **2018**, 20189794625 [http://dx.doi.org/10.1155/2018/9794625] [PMID: 29853868]
- [51] Kang, B.M.; An, B.K.; Jung, W.S.; Jung, H.K.; Cho, J.H.; Cho, H.W.; Jang, S.J.; Yun, Y.B.; Kuk, Y.I. Anti-inflammatory effect of triclin isolated from *Alopecurus aequalis* Sobol. on the LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 cells. *Int. J. Mol. Med.*, **2016**, 38(5), 1614-1620. [http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2016.2765] [PMID: 28025993]
- [52] Garbor, M. The anti-inflammatory actions of flavonoids. *Akademia kiado: Budapest, Hungary.*, **1972**, 698-699.

Résumé

La présente étude est dédiée à la recherche des constituants chimiques de deux plantes locales, en l'occurrence *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* (Cistaceae) et *Onobrychis crista-galli* (Fabaceae), en plus de l'évaluation des activités antioxydantes et anti-inflammatoires de leurs extraits.

L'investigation chimique portant sur les extraits AcOEt et *n*-BuOH des deux plantes citées, a abouti à la caractérisation de **26** composés naturels. Ces derniers ont été isolés par les méthodes chromatographiques (CCM, VLC, CC, MPLC et HPLC semi-préparative). Leurs structures ont été établies au moyen de techniques d'analyse spectroscopiques (RMN 1D et 2D, la spectrométrie de masse à haute résolution HR-ESI-MS, ESI-MS), la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$ et la comparaison des données spectrales avec celles décrites dans la littérature.

Les extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum* ont fourni 11 composés connus, constitués principalement de composés polyphénoliques dont un néolignane glucoside, six flavonoïdes, deux dérivés d'acide benzoïque et deux dérivés d'acide quinique.

Quinze composés ont été également isolés des extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Onobrychis crista-galli*. Ils se répartissent en six flavonoïdes, un monoterpène lactonique, deux dérivés d'acide benzoïque, un dérivé de l'eugénol, un cyclitol, trois osides libres et un phytostérol.

La teneur totale en composés phénoliques a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu tandis que les flavonoïdes ont été quantifiés par dosage direct au moyen du tri-chlorure d'aluminium. Les résultats révèlent que les extraits AcOEt des deux plantes sont les plus riches en polyphénols totaux. L'extrait AcOEt de *H. hirtum* et l'extrait *n*-BuOH de la plante *O. crista-galli* ont les teneurs les plus élevées en flavonoïdes.

L'évaluation *in vitro* des activités antioxydantes des différents extraits des deux plantes, a été réalisée par usage de cinq méthodes : DPPH, ABTS, CUPRAC, DMSO alcalin, β -carotène. Cinq flavonoïdes (**OC1**, **OC2**, **OC3**, **OC4** et **OC6**) isolés à partir de la plante *O. crista-galli* ont été évalués par les méthodes DPPH et CUPRAC. Les résultats des ces tests montrent que les extraits AcOEt des deux plantes ainsi que les cinq flavonoïdes présentent un bon pouvoir antioxydant.

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH de la plante *O. crista-galli* a été effectuée selon la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines. L'extrait acétate d'éthyle révèle une excellente activité anti-inflammatoire.

Mots clés : *Helianthemum hirtum* ssp. *ruficomum*, *Onobrychis crista-galli*, flavonoïdes, RMN 1D et 2D, spectrométrie de masse, activités antioxydante et anti-inflammatoire.