

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE



MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE EL HADJ LAKHDAR-BATNA
FACULTE DES SCIENCES DEPARTEMENT DES SCIENCES
DE LA MATIERE



THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

SPECIALITE
CHIMIE ORGANIQUE

Présentée par

GOLEA LYNDA

Thème

**Etude phytochimique de *Silene arenarioides* Desf. (Caryophyllaceae)
et *Lotus pusillus* Medik. (Leguminosae)**

JURY

Hamada HABA	Maître de Conférences A Université de Batna	Président
Mohammed BENKHALED	Professeur Université de Batna	Rapporteur
Fadila BENAYACHE	Professeur Université de Constantine	Examinatrice
Belkacem LEGSEIR	Professeur Université de Annaba	Examineur
Ali BENTAMENE	Professeur Université de Constantine	Examineur
Hassina HARKAT	Maître de Conférences A Université de Batna	Examinatrice

Année 2014



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES
DE LA MATIERE

**Etude phytochimique de *Silene arenarioides* Desf.
(Caryophyllaceae) et *Lotus pusillus* Medik. (Leguminosae)**

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Présentée par

GOLEA LYNDA

JURY

Hamada HABA	Maître de Conférences A Université de Batna	Président
Mohammed BENKHALED	Professeur Université de Batna	Rapporteur
Fadila BENAYACHE	Professeur Université de Constantine	Examinatrice
Belkacem LEGSEIR	Professeur Université de Annaba	Examineur
Ali BENTAMENE	Professeur Université de Constantine	Examineur
Hassina HARKAT	Maître de Conférences A Université de Batna	Examinatrice

Année 2014

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

*A mes parents, sources constantes d'encouragement,
de soutien, de confiance et d'affection.*

A mes beaux parents pour leur soutien moral

A mon Mari

Et mon fils Haroun

Remerciements

Cette thèse de doctorat réalisée dans le laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) de la Faculté des Sciences de l'Université de Batna, sous la direction du professeur BENKHALED Mohammed. Je tiens à lui exprimer toute ma reconnaissance et profonde gratitude pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de m'avoir permis de préparer mon doctorat dans les meilleures conditions. Je tiens à le remercier pour tous ses encouragements et pour le soutien qu'il m'a témoigné tout au long de cette étude placée sous sa direction.

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

Je tiens particulièrement à exprimer mes remerciements à Madame le Professeur BENAYACHE Fadila de l'Université de Constantine, Monsieur le Professeur LEGSEIR Belgacem de l'Université de Annaba, Monsieur le Professeur BENTAMENE Ali de l'Université de Constantine et Mademoiselle HARKAT Hassina Maître de conférences à l'Université de Batna pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie le Docteur Catherine LAVAUD, Professeur à l'UFR de Pharmacie de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, le Docteur Christophe Long, du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles CNRS-Pierre Fabre, pour la réalisation des spectres de RMN et masse.

J'aimerais également remercier vivement mon mari CHEBAKI Rachid pour son aide constant et ses précieux conseils et surtout sa patience pendant toute la durée de ce travail.

Un merci du cœur tout particulier à mes amies : Habiba, Hanane, Nabila, Abla et Sawsan, Amani, Wahiba, Nawel et tous mes collègues de l'Université de Khenchela.

Un grand merci à mes parents pour m'avoir permis de réaliser mes longues études et pour tous leurs sacrifices consentis. Sans vous, je n'aurais jamais pu aller jusqu'au bout.

Un merci à vous, mes chères sœurs Nadia et Hafida et ma belle sœur Naima pour vos encouragements et votre soutien, souvent discret, mais toujours efficace.

Un merci à vous, mes chères frères Samir, Walid et Hakim mes beaux frères Mouhamed, Karim, Walid et Soufian.

A mes chers petits Romaisa, Haythem, Nassim, Amira, Hajer et Ayoub.

Je tiens enfin à redire le plaisir que j'ai eu à travailler au sein du laboratoire (LCCE), et j'en remercie ici tous les membres.

Toutes les personnes m'ayant permis de mener à bien ce travail sont assurées de ma gratitude.

Abréviations

APG	Angiosperm Phylogeny Group
CC	Chromatographie sur Colonne ouverte
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CI ₅₀	Concentration Inhibitrice de 50%
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
cm	centimètre
COSY	Correlated Spectroscopy
<i>d</i>	doublet
<i>dd</i>	doublet dédoublé
<i>ddd</i>	doublet dédoublé dédoublé
<i>dl</i>	doublet large
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAPP	Diméthylallyl Diphosphate
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
<i>dt</i>	doublet de triplets
EI	Impacte Electronique
ESI	Spectrométrie de Masse par Electrospray
FAB	Fast atom bombardment
Gal	Galactose
Glu	Glucose
Xly	Xylose
Rha	Rhamnose
GPP	Géranyl Pyrophosphate
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HR	Haute Résolution
IPP	Isopentényl Diphosphate
IR	Infra rouge
<i>qd</i>	quadruplet
RMN ¹ H	Résonance Magnétique Nucléaire du Proton
RMN (<i>J</i> -modulé) ¹³ C	Résonance Magnétique Nucléaire du Carbone 13 en <i>J</i> modulé
ROESY	Rotational Overhauser Enhancement Spectroscopy
<i>s</i>	singulet
<i>sl</i>	singulet large
SM	Spectrométrie de Masse
<i>t</i>	triplet
<i>td</i>	triplet de doublet
uma	unité de masse atomique
UV	Ultraviolet
VLC	Chromatographie Liquide sous vide
Hz	Hertz
<i>J</i>	constante de couplage exprimée en Hz
<i>m/z</i>	masse/charge d'un ion
ppm	partie par million
δ	déplacement chimique exprimé en ppm
λ _{max}	longueur d'onde d'absorption maximale

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I - Rappels bibliographiques	4
I.1- Famille Caryophyllaceae	5
I.2- Classification systématique et aspects botaniques	5
I.3- Utilisation en médecine traditionnelle	6
I.4- Genre <i>Silene</i>	7
I.4.1- Toxicité	7
I.4.2- Usage traditionnel	7
I.5 - Principaux métabolites secondaires du genre <i>Silene</i>	8
I.5.1 - Ecdystéroïdes	8
I.5.2- Saponosides	10
I.5.3- Autres composés	14
Chapitre II- Etude des Sphingolipides et Saponines triterpéniques	17
II.1- Sphingolipides	18
II.1.1- Généralités	18
II.1.2- Rôles biologiques de sphingolipides	19
II.1.3- Biosynthèse des sphingolipides	19
II.2- Saponosides	20
II.2.1- Généralités	20
II.2.2- Isolement de saponines	23
II.2.3- Biosynthèse des triterpènes saponosides	25
Chapitre III - Etude phytochimique de l'espèce <i>Silene arenarioides</i> Desf.	27
III.1- Introduction	29
III.2- Aspect botanique	29
III.3- Taxonomie	30
III.4- Résultats et discussions	30
III.4.1- Récolte du matériel végétal	30
III.4.2- Extraction de <i>Silene arenarioides</i> Desf.	30

III.4.3- Fractionnement de l'extrait méthanolique et isolement des composés Si1, Si2, Si3	31
III.4.4- Détermination structurale des composés isolés	32
III.4.4.1- Détermination structurale du composé Si1	32
III.4.4.2- Détermination structurale du composé Si2	36
III.4.4.3- Détermination structurale du composé Si3	44
Chapitre IV- Activités biologiques	51
IV.1- Introduction	52
IV.2- Evaluation de l'activité antioxydante	52
IV.3- Activité antimicrobienne	53
IV.4- Résultats et discussions	54
IV.4.1- Activité antioxydante	54
IV.4.2- Activité antimicrobienne	56
Chapitre V - Etude de la Famille Fabaceae	58
V.1- Famille Fabaceae	59
V.2- Classification systématique et aspects botaniques	59
V.3- Intérêts économiques et médicaux de la sous-famille des Faboideae	60
V.4- Présentation du genre <i>Lotus</i>	61
V.4.1- Toxicité	61
V.4.2- Usage traditionnel	61
V.5- Principaux métabolites secondaires des plantes du genre <i>Lotus</i>	61
V.6- Autres composés	66
Chapitre VI - Etude des Polyphénols	70
VI.1- Composés phénoliques	71
VI.1.1- Généralité	71
VI.1.2- Les non flavonoïdes	71
VI.2- Les flavonoïdes	73
VI.2.1- Les isoflavonoïdes	73
VI.2.2- Distribution	75
VI.3- Biosynthèse des grandes classes d'isoflavonoïdes	75
VI.4- Rôle et intérêt des composés phénoliques	77
VI.4.1- Chez les végétaux	77
VI.4.2- Chez les humains	77

Chapitre VII- Etude Phytochimique de l'espèce <i>Lotus pusillus</i> Medik.	78
VII- Etude Phytochimique	79
VII.1 - <i>Lotus pusillus</i> Medik.	79
VII.2 - Isolement des composés	79
VII.3 - Identification des composés	81
VII.3.1- Détermination structurale du composé L1	81
VII.3.2- Détermination structurale du composé L2	87
VII.3.3- Détermination structurale du composé L3	89
VII.3.4- Détermination structurale du composé L4	95
VII.3.5- Détermination structurale du composé L5	99
VII.3.6- Détermination structurale du composé L6	105
VII.3.7- Détermination structurale du composé L7	109
VII.3.8- Détermination structurale du composé L8	116
VII.3.9- Détermination structurale du composé L9	117
VII.3.10- Détermination structurale du composé L10	128
VII.3.11- Détermination structurale du composé L11	134
Conclusion Générale	144
Chapitre VIII - Partie expérimentale	150
VIII.1- Matériel végétal et extraction	151
VIII.1.1- Identification de la plante	151
VIII.2- Méthodes chromatographiques analytiques	151
VIII.2.1- Chromatographie sur couche mince (CCM)	151
VIII.2.2- Chromatographie liquide sous vide (VLC)	151
VIII.2.3- Chromatographie sur colonne ouverte (CC)	152
VIII.2.3.1- Chromatographie d'adsorption	152
VIII.2.3.2- Chromatographie d'exclusion	152
VIII.2.4- Chromatographie liquide haute performance (CLHP)	152
VIII.2.5- Chromatographie préparative sur couche épaisse (CCE)	152
VIII.3- Méthodes physico-chimiques	152
VIII.3.1- Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$	152
VIII.3.2- Spectrométrie UV-Visible	153
VIII.3.3- Spectrométrie de masse	153
VIII.3.4- Spectrométrie IR	153

VIII.3.5- Spectroscopie de RMN	153
VIII.4- Extraction	153
VIII.4.1- Extrait méthanolique des parties aériennes de <i>S.arenarioides</i> .	153
VIII.4.1.1- Fractionnement et purification de l'extrait méthanolique	154
VIII.4.1.1.1- Etude de la fraction F9	155
VIII.4.1.1.2- Etude de la fraction F8' (F7 + F8)	155
VIII.4.1.1.3- Etude de la fraction F6	156
VIII.5 - Composés isolés de l'espèce <i>Silene arenarioides</i>	156
VIII.6 - Extrait d'acétate d'éthyle de <i>Lotus pusillus</i> Medik.	157
VIII.6.1 - Fractionnement et purification des extraits	157
VIII.6.2 - Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle	157
VIII.6.2.1- Etude de la fraction F6	158
VIII.6.2.1- Etude de la fraction F7	159
VIII.6.3- Fractionnement de l'extrait méthanolique	160
VIII.6.3.1- Etude de la fraction F3	160
VIII.6.3.2- Etude de la fraction F5	160
VIII.6.3.3- Etude de la fraction F4'	161
VIII.7- Composés isolés de l'espèce <i>Lotus pusillus</i> Medik.	162
Bibliographie	165

Introduction

Les produits naturels constituent une source importante d'agents thérapeutiques. Actuellement, environ 75 % de médicaments disponibles pour le traitement de diverses maladies dérivent de produits naturels. Nous citerons pour exemples révélateurs les Vinblastine et Vincristine, alcaloïdes indoliques isolés de la plante *Catharanthus roseus* connue sous le nom de pervenche de Madagascar. Ces produits naturels cités sont utilisés à des fins médicales, dans le traitement de diverses formes de cancer (poumon, sein, lymphomes). Leurs analogues hémisynthétiques, à savoir la vinorelbine et la vindésine, sont aussi utilisés pour leurs propriétés antinéoplasiques. Le taxol isolé de *Taxus brevifolia* ou if d'Amérique, médicament reconnu mondialement pour son action anticancéreuse hautement efficace, constitue également un parfait exemple. La morphine, substance naturelle isolée du latex d'une papaveraceae appelée *Papaver somniferum* et médicament utilisé principalement contre la douleur, est prise actuellement comme référence de choix du point de vue efficacité analgésique. Les produits naturels représentent une source extrêmement précieuse pour la production de nouvelles entités chimiques.

Par ailleurs, il est actuellement établi que 20.000 à 30.000 espèces végétales, sur les 500.000 répertoriées mondialement, sont utilisées dans la pharmacopée humaine et pas moins de 75 % de médicaments sont d'inspiration végétale. En dépit du fait indiscutable que les plantes constituent un réservoir de molécules bioactives, le potentiel floristique demeure encore peu exploré.

Deux grandes stratégies sont utilisées pour la recherche de molécules bioactives issues de plantes. Une d'ordre ethnopharmacologique consistant à faire inventorier les plantes médicinales utilisées par des groupes ethniques (pharmacopées traditionnelles) et une d'ordre chimiotaxonomique. Cette dernière passe par une approche phylogénétique et une approche classification de la taxonomie pour cibler des métabolites secondaires particuliers, ou encore un criblage systématique des espèces, ou toute combinaison des précédentes.

C'est dans ce sens que notre Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (L.C.C.E) a engagé, et cela depuis plusieurs années, un programme de recherche destiné à la valorisation de la flore locale par la découverte éventuelle de principes actifs nouveaux. La flore des Aurès et du Nord-Sahara est visée exclusivement. Bien inscrit dans ce contexte, le travail de thèse qui m'a été confié, a pour objectif de caractériser chimiquement les métabolites secondaires dans les parties aériennes de deux espèces sahariennes *Silene*

arenarioides Desf. et *Lotus pusillus* Medik. appartenant respectivement aux familles Caryophyllaceae et Fabaceae (Leguminosae). Les plantes relevant de ces familles sont connues pour leur richesse remarquable en métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique. Un bon nombre fait également l'objet d'un usage thérapeutique traditionnel. Les plantes du genre *Silene* sont riches en saponosides. Ils sont d'ailleurs considérés comme les marqueurs chimiotaxonomiques de ce genre. Les flavonoïdes constituent une famille métabolique très représentée dans le genre *Lotus*.

Les deux espèces, objet de ce travail, n'ont fait l'objet d'aucune étude phytochimique antérieure. La seule étude mentionnée est d'ordre biologique et concerne *Lotus pusillus* Medik. Cette dernière a montré des activités antibactérienne et fongique.

Notre travail portant sur l'investigation phytochimique de *Silene arenarioides* et *Lotus pusillus* sera présenté comme suit :

Rappels Bibliographiques

- Classification systématique et aspects botaniques de la famille Caryophyllaceae
- Utilisation en médecine traditionnelle de la famille Caryophyllaceae
- Présentation du genre *Silene*
- Toxicité
- Usages traditionnels
- Métabolites isolés du genre *Silene*

Etude des Sphingolipides et Saponines triterpéniques

- Généralités
- Rôles biologiques des sphingolipides
- Biosynthèse des sphingolipides
- Identification des céramides
- Nomenclature des céramides
- Saponosides
- Isolement des saponines
- Biosynthèse des saponines

Etude phytochimique de l'espèce *Silene arenarioides* Desf.

- Introduction

- Aspect botanique
- Taxonomie
- Travaux antérieurs

Activités Biologiques

- Introduction
- Evaluation de l'activité antioxydante
- Activité antimicrobienne
- Résultats et discussion

Etude de la Famille Fabaceae

- Classification systématique et aspects botaniques de la famille Fabaceae
- Intérêts économiques et médicaux de la sous-famille Faboideae
- Présentation du genre *Lotus*
- Toxicité
- Usages traditionnels

Etude des polyphénols

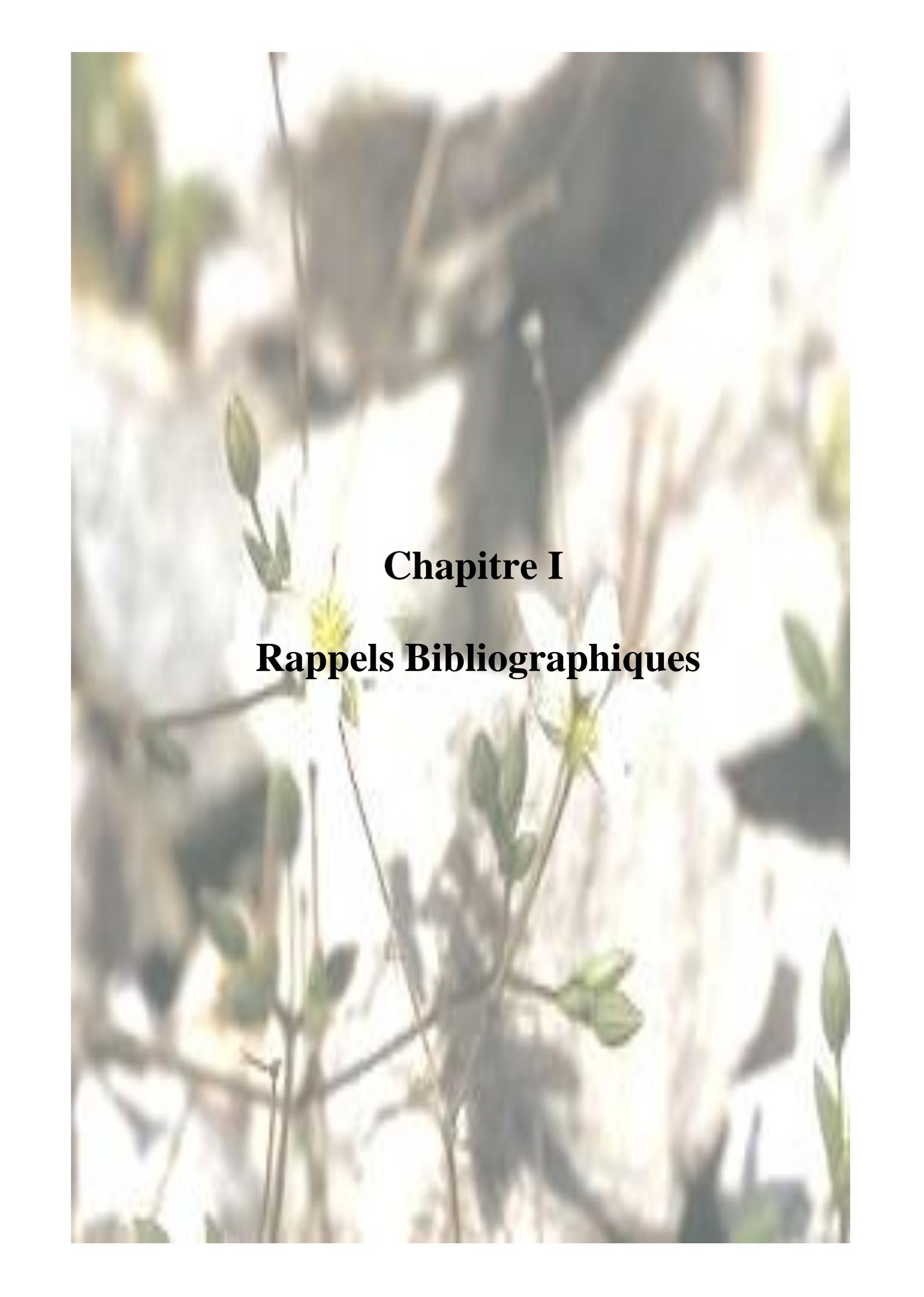
- Généralités
- Isoflavonoïdes
- Rôle et intérêt des composés phénoliques

Etude Phytochimique de l'espèce *Lotus pusillus* Medik.

- Isolement des composés
- Identification des composés

Conclusion Générale

Bibliographie



Chapitre I
Rappels Bibliographiques

I.1- Famille Caryophyllaceae

Les plantes Caryophyllaceae représentent une grande famille de plantes herbacées et possèdent un grand nombre de plantes ornementales et autant d'adventices. Cette cosmopolite famille est surtout bien représentée dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord. Elle est particulièrement riche sur le pourtour méditerranéen et en Asie. Sous les tropiques, elle est limitée aux secteurs montagneux [1, 2]. Elle compte 80 genres et 1800 espèces. Elle est particulièrement développée dans la région méditerranéenne. Au Sahara septentrional et central, 12 genres et une vingtaine d'espèces sont répertoriés [1].



Figure 1 : Répartition géographique des plantes Caryophyllaceae.

I.2- Classification systématique et aspects botaniques

Les plantes Caryophyllaceae constituent une famille de plantes dicotylédones. Le nom de cette famille est basé sur le genre *Caryophyllus* Mill., synonyme de *Dianthus* L. Toutefois le nom *Caryophyllaceae* a fait l'objet d'une proposition de conservation. Ceci explique pourquoi, autant la classification classique de Cronquist (1981) (tableau 1) que celle phylogénétique APG III (2009), emploient le nom de *Caryophyllaceae*.

La famille est divisée en trois sous-familles : Alsinoideae, Silenoideae et Paronychioideae [1, 3].

La sous-famille **Alsinoideae** groupe des genres aux stipules absents et aux sépales libres (*Arenaria*, *Minuartia*, *Honkenya*, *Stellaria*, *Cerastium*, *Sagina*, *Colobanthus*, *Lyallia*...).

La sous-famille **Silenoideae** (ou Caryophylloideae), groupe des espèces aux stipules absents, aux sépales soudés et pétales articulés à onglet distinct (*Silene*, *Dianthus*, *Gypsophila*, *Agrostemma*, *Lychnis*...). La sous famille **Paronychioideae** (*Paronychia*, *Stipulicida*, *Pteranthus*, *Gymnocarpus*, *Polycarpaea*,...) se caractérise par des plantes aux stipules présentes, généralement scarieuses et aux sépales libres ou connés. Cette sous-famille est plus variable que les deux autres groupes. La position systématique des plantes Caryophyllaceae est présentée au tableau 1.

Classification	Cronquist 1981
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Caryophyllidae
Ordre	Caryophyllales
Famille	Caryophyllaceae

Tableau 1 : Phylogénie de la famille Caryophyllaceae (Cronquist 1981)

Cette famille rassemble exclusivement des plantes herbacées dont la petite tige porte des nœuds bien visibles qui se lignifient à la base. Les caractères morphologiques principaux des plantes relevant de cette famille sont les suivants :

- **Les feuilles** : opposées et entières, sont parfois réunies à la base de façon à former une gaine et ne sont pas toujours munies de stipules.
- **Les fleurs** : sont pollinisées par divers insectes (mouches, papillons..) qui récoltent le nectar, fleurs minuscules généralement à 5 sépales libres entre eux (Paronychioideae ou Alsinoideae) ou soudés en tube (Silenoideae).
- **Le fruit** : sec tantôt à une seule graine et tantôt à graines multiples généralement sphériques, entourées d'une aile membraneuse.

I.3 - Utilisation en médecine traditionnelle

Les plantes Caryophyllaceae contiennent essentiellement des saponines qui leur donnent des propriétés médicinales très ponctuelles. A titre d'exemple, *Saponaria officinalis* est utilisée en thérapeutique traditionnelle chinoise pour réguler certains cycles hormonaux (menstruations) et soigner les infections du sein et certains cancers [3]. La décoction de cette

espèce appliquée sur le visage, permet de lutter efficacement contre les maladies de la peau telles que l'acné. Les roumains en mettaient dans leur bain pour guérir les démangeaisons [3].

A ce jour, les plantes qui suivent sont utilisées dans la médecine traditionnelle chinoise :

- ✓ *Stellaria dichotomu* L. var. *lanceolata*, et *Silene jennisseensis* Willd pour le traitement de la fièvre et la malnutrition infantile [4, 5].
- ✓ La graine de la plante *Vaccaria segetalis* Neck. pour l'activation de la circulation sanguine, le soulagement d'escarboucle, la promotion de la diurèse et la sécrétion de lait [6].
- ✓ *Gypsophila oldhamiana* Miq. pour le syndrome de malnutrition infantile. En outre, ses racines sont aussi utilisées comme remède contre le diabète [7].

I.4- Genre *Silene*

Le genre *Silene* qui comprend environ 700 espèces [8] appartient donc à la famille Caryophyllaceae, sous famille Silenoideae. Il est le plus représentatif de la famille et aussi le plus fourni de toute la flore Nord-Africaine. En Algérie, on rencontre principalement les espèces suivantes : *S. tridentata* Desf., *S. setacea* Viv., *S. getula* Pomel., *S. arenarioides* Desf., *S. villosa* Forsk., *S. kilianii* Maire, *S. nocturna* L., *S. rubella* L., *S. apetala* Willd. et *S. succulenta* Forsk. [1].

Le genre *Silene* possède les caractéristiques morphologiques suivantes :

- Fleurs disposées en cymes allongées, non entremêlées de feuilles, s'ouvrant la nuit (*S. nocturna* L., *S. setacea* Viv., *S. villosa* Forsk.)
- Feuilles étroites ou même linéaires.
- Calice à 5 dents fructifère brusquement rétréci en col au sommet du tube, sous les dents.
- Le fruit est une capsule à 5 loges.

I.4.1- Toxicité

De toutes les plantes formant le genre *Silene*, seule l'espèce *Silene inflata* Sm. quand elle n'est pas à l'état de plantules, est considérée par les populations comme susceptible d'être toxique, par voie interne, d'où une prudente utilisation [3].

I.4.2- Usages traditionnel

Dans le Tadla et la région de Marrakech (Maroc) [3], la décoction des racines de *Silene inflata* dans du lait ou de l'eau, est utilisée à faible dose, comme vomitif et antidote général dans les empoisonnements.

A Taza et Berkine (Maroc), elle est utilisée en infusion contre la constipation. Dans les campagnes, cette décoction est utilisée en usage externe, pour soigner les plaies, la gale, le prurit et diverses affections de la peau [3].

Silene cucubalus Wib. est une plante herbacée vivace se propageant tout au long de la région de Ourika près de Marrakech (Maroc). Les racines de cette plante, populairement connue sous le nom «Tighicht», sont utilisées pour le soin des cheveux [9].

Les racines de *Silene viscidula*, sont utilisées en médecine traditionnelle chinoise pour le traitement des rhumatismes, la coque et les douleurs osseuses [10].

I.5- Principaux métabolites secondaires du genre *Silene*

Une recherche bibliographique réalisée sur les espèces du genre *Silene*, montre qu'elles ont fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques. Celles-ci ont permis d'isoler un grand nombre de métabolites secondaires. Les substances dominantes sont les ecdystéroïdes et saponines triterpéniques qui présentent de multiples propriétés biologiques et pharmacologiques : analgésique, sédative, anti-inflammatoire, antivirale et antifongique [11].

Ces études chimiques ont montré aussi la présence de flavonoïdes rencontrés surtout au sein de l'espèce *S. conoidea* [12], ainsi que d'autres composés dérivés d'esters cycliques [13].

La composition chimique du genre *Silene* est très diversifiée. Les pages qui suivent en sont l'illustration, avec une mention particulière pour les ecdystéroïdes et saponines triterpéniques en raison de leur prédominance.

I.5.1- Ecdystéroïdes

Les ecdystéroïdes, hormones stéroïdes constituant une vaste famille chimique, regroupent toutes les molécules naturelles à squelette stéroïdique caractérisées en général par la présence de deux groupements hydroxyles en positions 2 et 3 et d'un système carbonyle en C-6 α, β insaturé. Un exemple est illustré par la figure 2 ci-dessous.

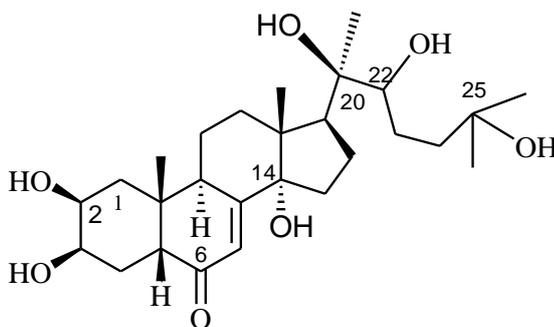
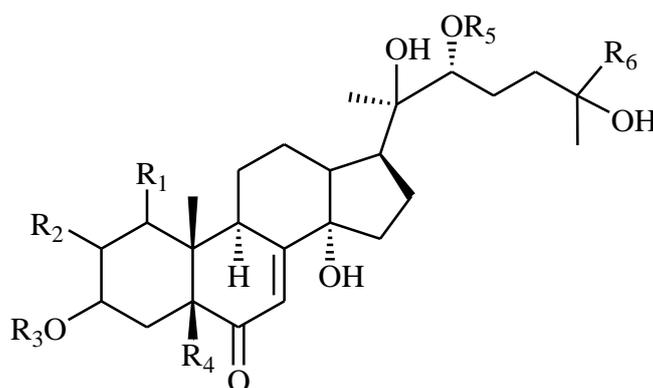


Figure 2 : Structure de la 20-hydroxyecdysone (20 E)

Il a été démontré que ces stéroïdes sont présents à tous les stades de développement chez les insectes. Ils ont pour rôle de réguler un grand nombre de processus biochimiques et physiologiques au cours du développement embryonnaire, post embryonnaire de la métamorphose et de la reproduction.

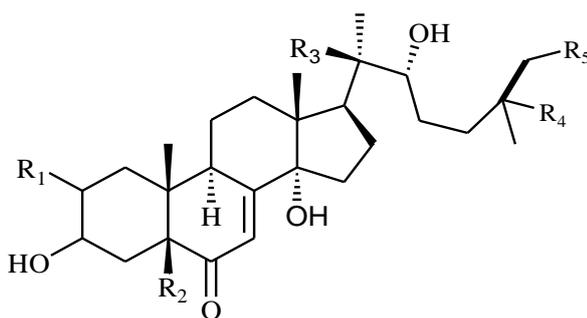
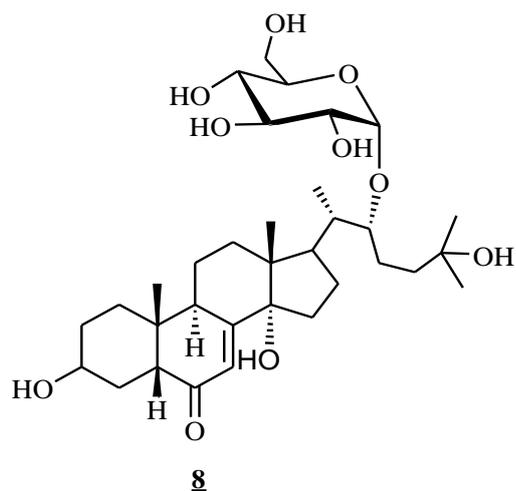
Des analogues des ecdystéroïdes sont aussi présents dans certaines espèces de plantes. Ils sont appelés "phytoecdystéroïdes". Ceux isolés chez les insectes sont nommés "zoo-ecdystéroïdes".

Sept ecdystéroïdes ont été isolés des parties aériennes de *Silene viridiflora* L. [14]. Il s'agit de : polipodine B (**1**), 2-désoxyecdystérone (**2**), ecdystérone (**3**), 26-hydroxypolipodine B (**4**), silénoside D (**5**), intégristérone A (**6**) et silénoside A (**7**). Leurs structures ont été établies par RMN 1D et 2D, HREI-MS et par comparaison avec les données de la littérature.

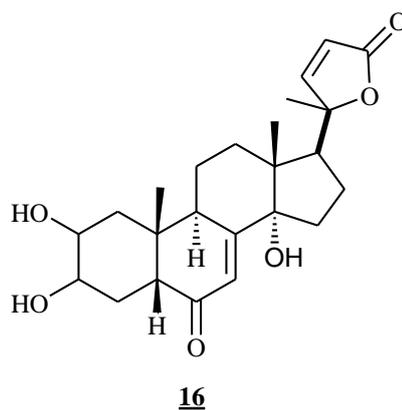
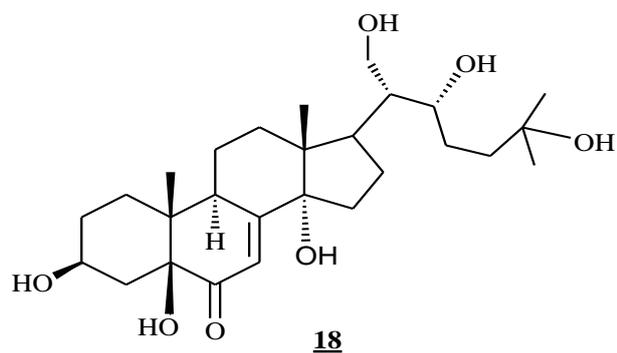
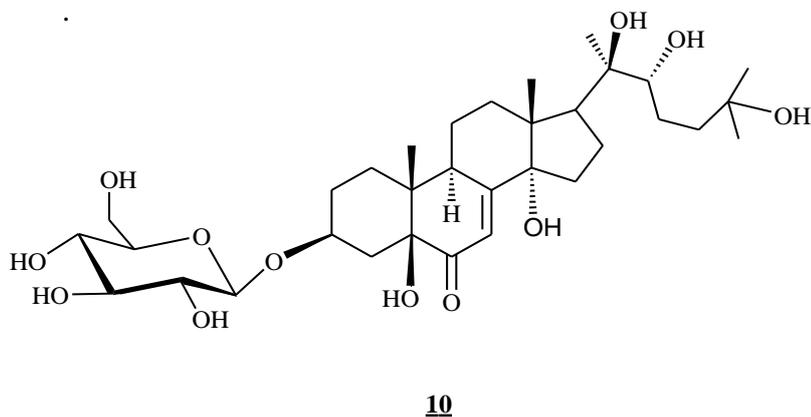
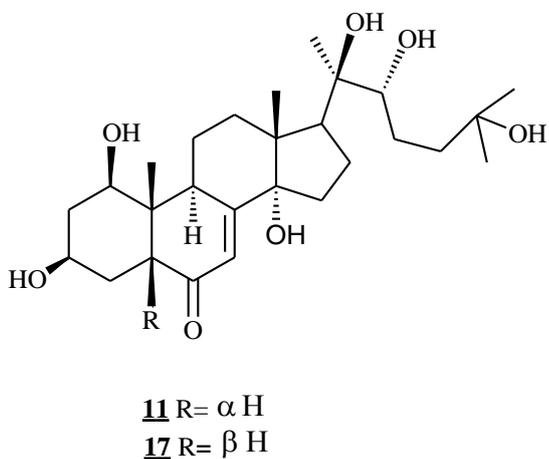


- 1** $R_1 = R_3 = R_5 = R_6 = H, R_2 = R_4 = OH.$
2 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H.$
3 $R_1 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H, R_2 = OH.$
4 $R_1 = R_3 = R_5 = H, R_2 = R_4 = R_6 = OH.$
5 $R_1 = R_4 = R_5 = R_6 = H, R_2 = OH, R_3 = \alpha\text{-D-gal.}$
6 $R_1 = R_2 = OH, R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = H.$
7 $R_1 = R_3 = R_4 = R_6 = H, R_2 = OH, R_5 = \alpha\text{-D-gal.}$

L'espèce *Silene pseudotites* s'est révélée extrêmement riche en ecdystéroïdes. En effet, l'investigation chimique de l'extrait méthanolique des graines de l'espèce citée, a permis d'en isoler 14: 2-désoxyecdysone 22 β -D-glucoside (**8**), 2-désoxy-20,26-dihydroxyecdysone (**9**), 2-désoxypolypodine B 3 β -D-glucoside (**10**), (5 α -H)-2-désoxyintégristérone A (**11**), polipodine B (**1**), 20-hydroxyecdysone (**12**), inokostérone (**13**), ecdystéone (**3**), 2-désoxyecdystérone (**2**), 2-désoxy-20-hydroxyecdysone (**14**), ponastérone A (**15**), sadistérone (**16**), 2-désoxyintégristérone A (**17**) et 2-désoxy-21-hydroxyecdysone (**18**) [15].



- 9** $R_1 = R_2 = H, R_3 = R_4 = R_5 = OH.$
12 $R_1 = R_3 = R_4 = OH, R_2 = R_5 = H.$
13 $R_1 = R_3 = R_5 = OH, R_2 = R_4 = H.$
14 $R_1 = R_2 = R_5 = H, R_3 = R_4 = H.$
15 $R_1 = R_3 = OH, R_2 = R_4 = R_5 = H$

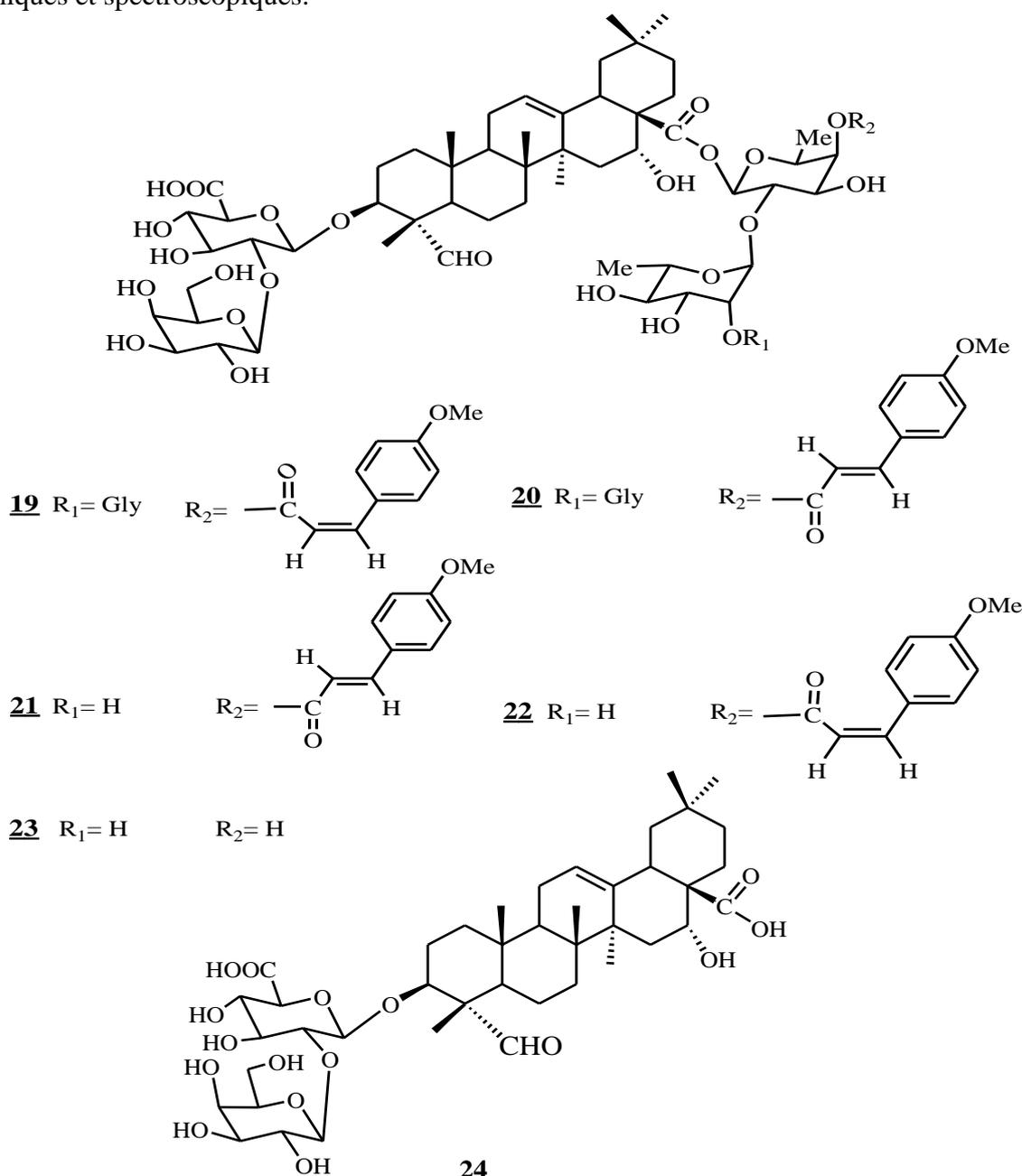


I.5.2- Saponosides

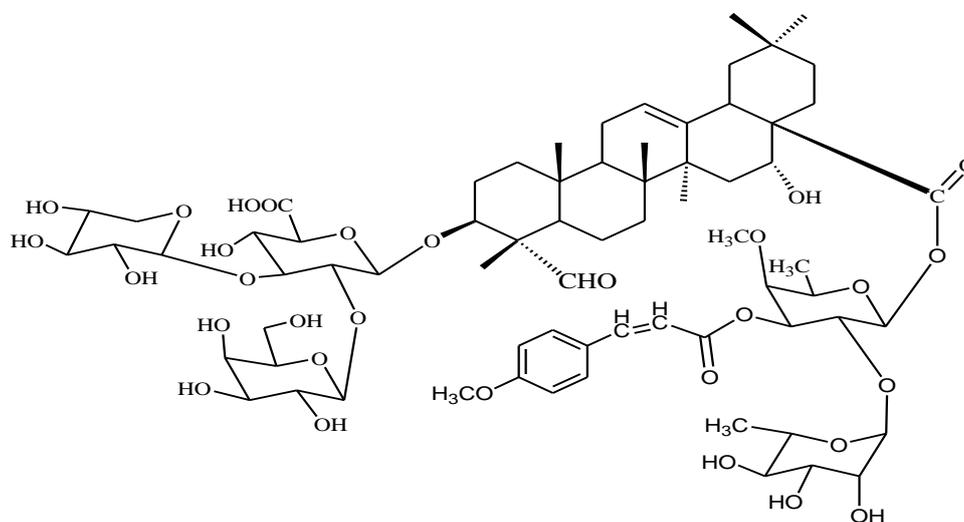
Les saponines constituent un groupe comprenant divers métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. La structure chimique des saponines est constituée d'un groupe aglycone de nature triterpénoïdique ou stéroïdique et d'une ou plusieurs chaînes

glycosidiques. Les saponines doivent leur nom au mot latin « sapo » qui signifie mousse, au fait qu'elles peuvent former une mousse stable dans des solutions aqueuses. Traditionnellement, elles ont été utilisées en tant que détergents, piscicides et molluscicides en plus de leurs applications industrielles en tant qu'agents moussants et tensioactifs [16].

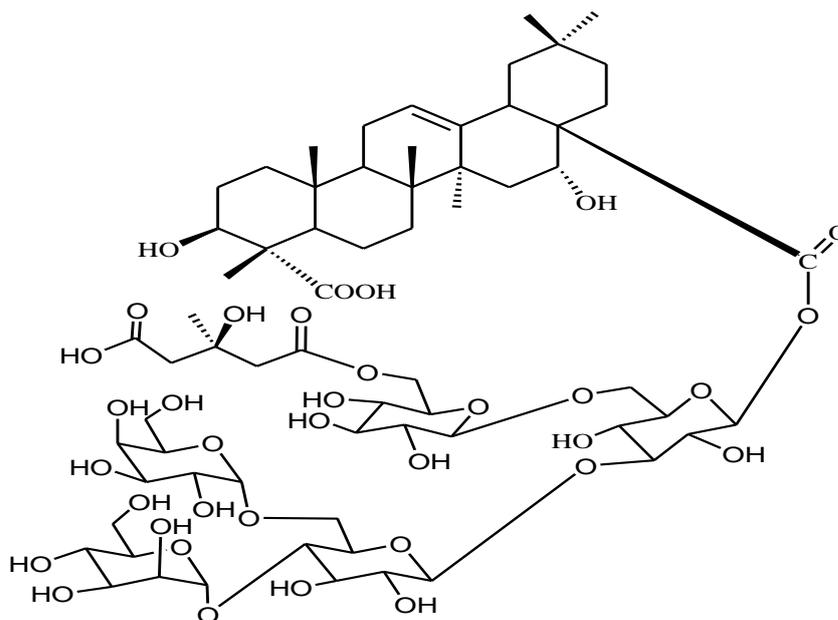
Les études phytochimiques portant sur les racines de *Silene jensseensis* [17], ont abouti à l'isolement de cinq saponosides: Jensseensoside A (**19**), Jensseensoside B (**20**), Jensseensoside C (**21**), Jensseensoside D (**22**), 3-*O*-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-28-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopyranosyl] acide quillaïque (**23**). L'hydrolyse de ce dernier saponoside dans KOH à 5 % pendant une heure à 100°C a donné la prosapogénine (**24**). Leurs structures ont été déterminées par les méthodes chimiques et spectroscopiques.

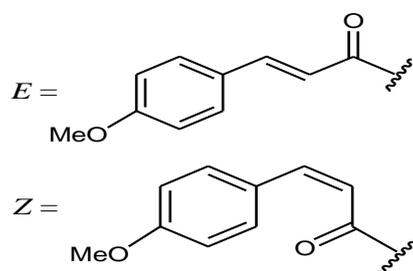
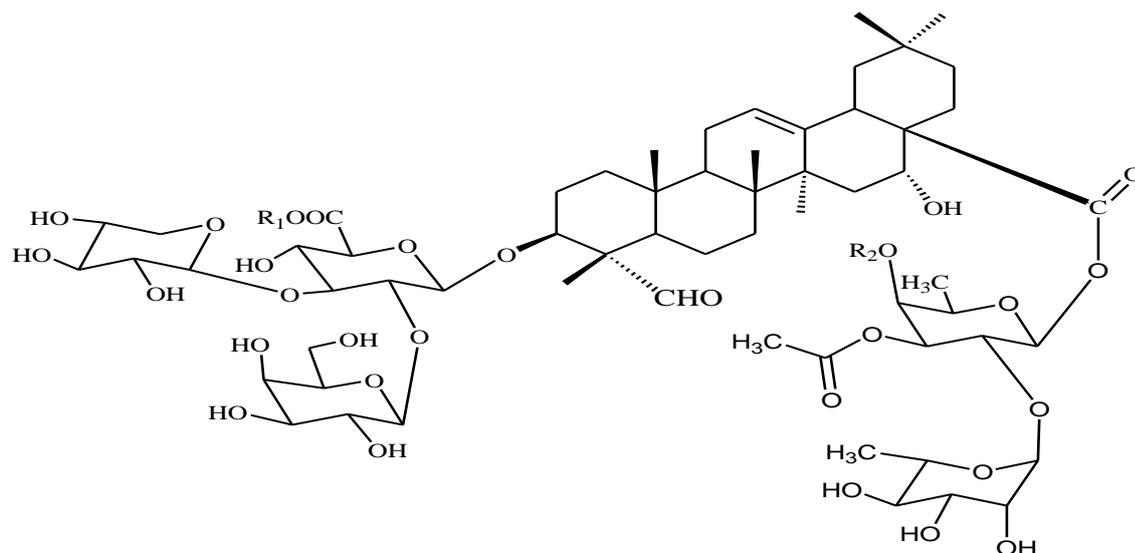


L'investigation chimique de l'extrait éthanolique des racines de *Silene szechuensis*, plante utilisée en médecine traditionnelle chinoise pour traiter les douleurs gastriques [18], a abouti à la caractérisation d'une saponine originale nommée silénoside (**25**).

**25**

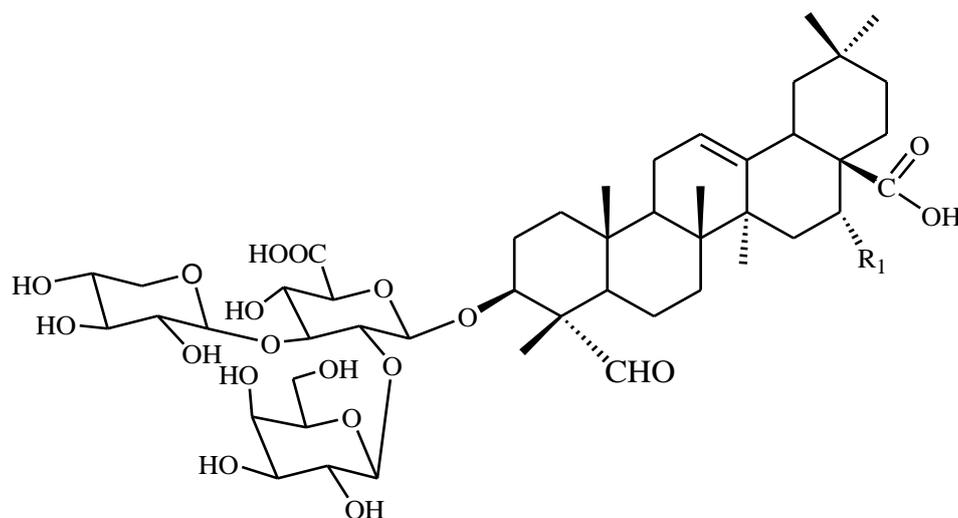
L'étude réalisée sur l'extrait butanolique de *Silene viscidula* [19], autre plante utilisée en médecine traditionnelle chinoise pour le traitement des rhumatismes, a permis l'isolement et l'identification de trois saponines triterpéniques nouvelles : viscidulosides A (**27**) et B (**28**), silenoviscoside D (**26**). Deux autres connues ont été également identifiées : sinocrassuloside VIII (**29**) et sinocrassuloside IX (**30**). Les structures des composés isolés ont été assignées par analyses spectrales et comparaison avec les données de la littérature.

**26**



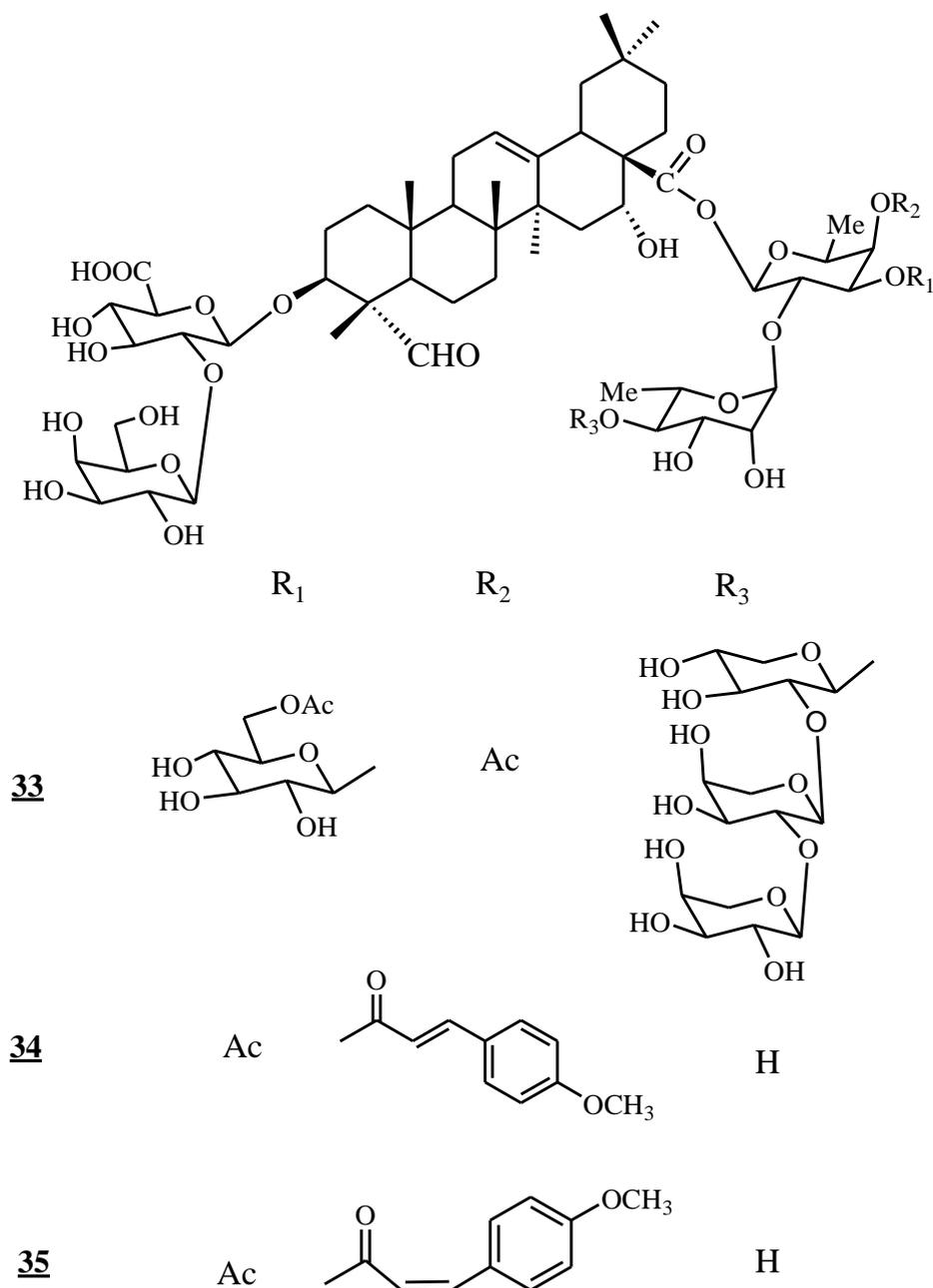
	R ₁	R ₂
27	Bu	E
28	Bu	Z
29	Me	E
30	Me	Z

L'étude chimique de l'extrait butanolique des racines de l'espèce *Silene cucubalus* Wib., plante marocaine utilisée localement comme détergent et pour le soin des cheveux [20], a permis d'isoler une nouvelle saponine nommée gypsogénine (**31**) ainsi qu'une autre préalablement identifiée (**32**). Leurs structures ont été établies par analyse spectrale et comparaison avec les données de la littérature.



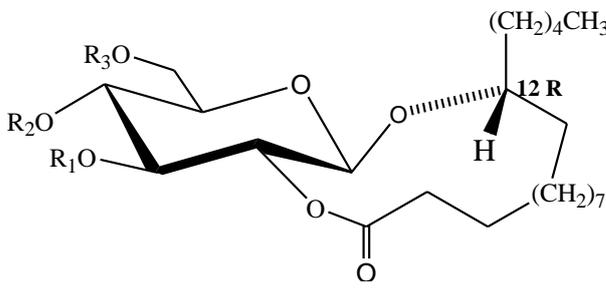
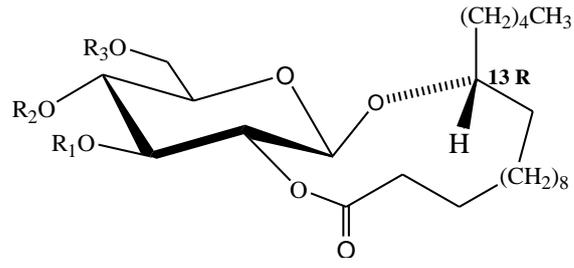
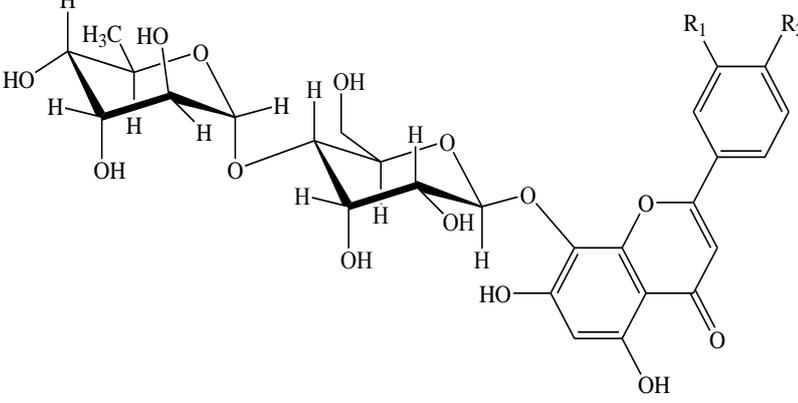
31	R ₁ = H
32	R ₁ = OH

L'extrait éthanolique des racines de l'espèce *Silene fortunei* Vis, plante native de Chine [21], a permis d'isoler trois nouvelles saponines triterpéniques acétylées (**33**), (**34**) et (**35**). D'autres saponines décrites antérieurement ont également été citées : Jenisseensoside C (**21**) et D (**22**). Ces composés ont révélé des activités antitumorales [21].



I.5.3- Autres composés

Comme il a été dit précédemment, d'autres types de composés moins dominants ont été isolés et identifiés dans le genre *Silene*. Un certain nombre est cité dans le tableau 2 ci-dessous.

Type de composés	Molécules	Plante
Esters cycliques	 <p> <u>36</u> $R_1 = R_2 = \text{Ac}, R_3 = \text{H}$ <u>37</u> $R_1 = R_2 = R_3 = \text{Ac}$ <u>38</u> $R_1 = R_3 = \text{Ac}, R_2 = \text{H}$ <u>39</u> $R_1 = R_2 = \text{H}, R_3 = \text{Ac}$ <u>40</u> $R_1 = R_2 = R_3 = \text{H}$ <u>41</u> $R_1 = \text{Ac}, R_2 = R_3 = \text{H}$ </p>	<p><i>S. gallica</i> [13]</p>
	 <p> <u>42</u> $R_1 = R_2 = \text{Ac}, R_3 = \text{H}$ <u>43</u> $R_1 = R_2 = R_3 = \text{Ac}$ <u>44</u> $R_1 = R_3 = \text{Ac}, R_2 = \text{H}$ <u>45</u> $R_1 = R_2 = \text{H}, R_3 = \text{Ac}$ </p>	
O-glycosylflavone	 <p> <u>46</u> $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OMe}$ <u>47</u> $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}$ </p>	<p><i>S. conoidea</i> [12]</p>

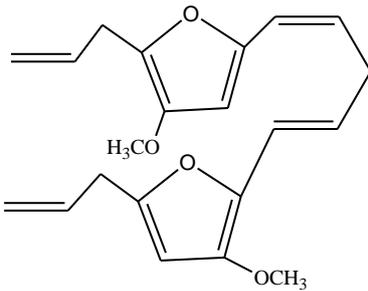
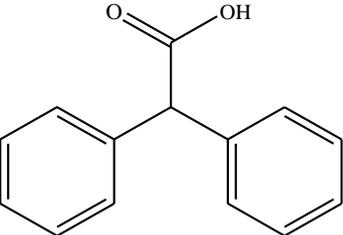
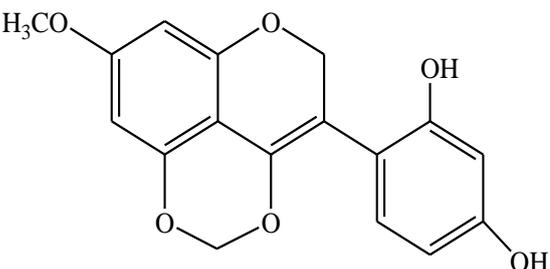
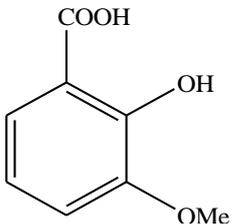
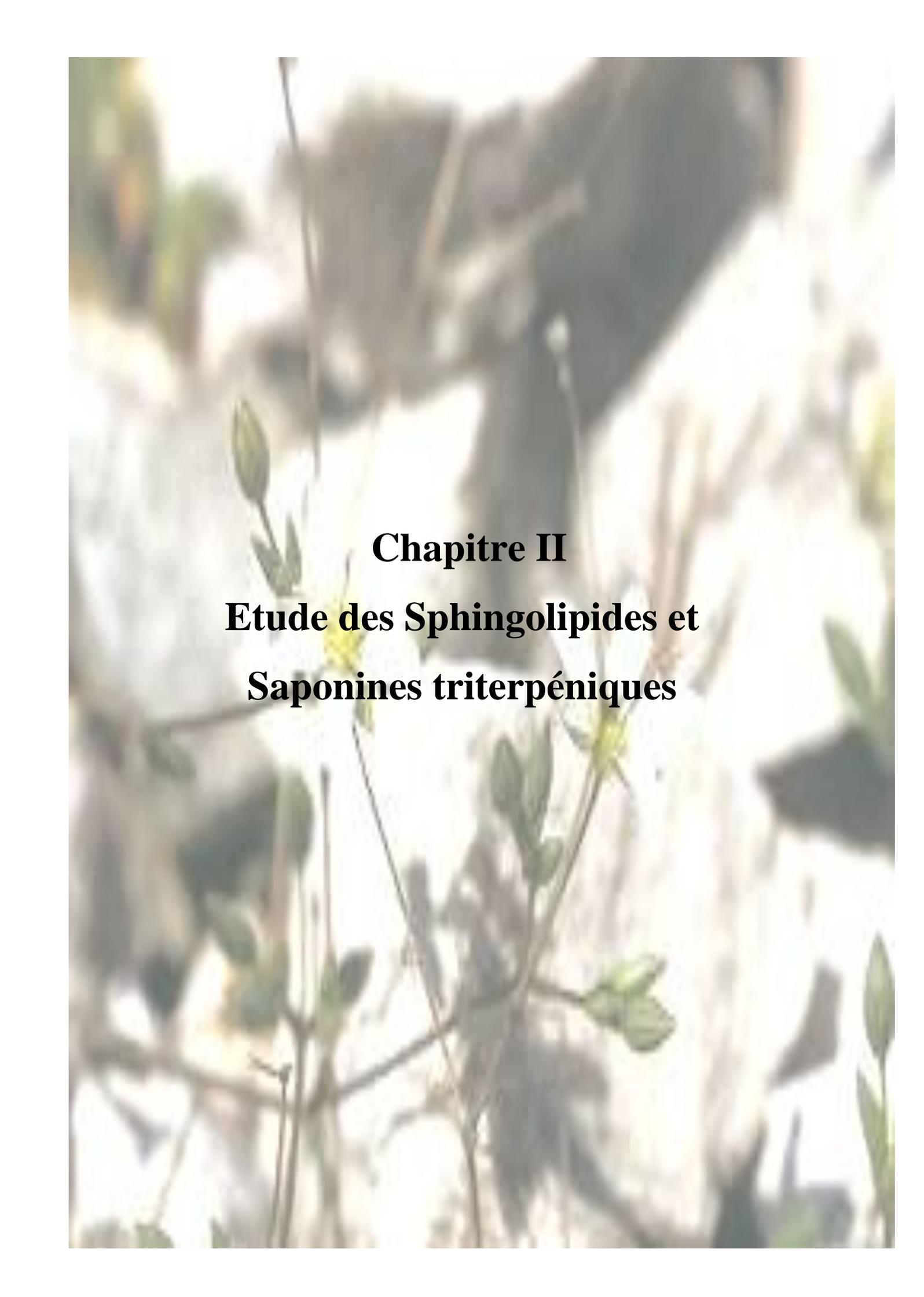
Conoïdène	 <p style="text-align: center;">48</p>	
Acide diphénylacétique	 <p style="text-align: center;">49</p>	
Brahène	 <p style="text-align: center;">50</p>	<i>S.</i> <i>conoidea</i> [12]
2-hydroxy-3-méthoxy benzoïque	 <p style="text-align: center;">51</p>	

Tableau 2: Autres composés identifiés dans le genre *Silene*



Chapitre II
Etude des Sphingolipides et
Saponines triterpéniques

II.1- Sphingolipides

II.1.1- Généralités

Les sphingolipides sont des lipides polaires complexes, structurellement très diversifiés et impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques [22]. D'origines animale ou végétale, ils sont tous issus d'une même molécule appelée sphingosine (Figure 3) et du même processus de synthèse, liant une chaîne lipophile à un squelette hydrophile et pouvant contenir un groupement phosphaté ou glycosylé [23]. Les céramides résultent ainsi d'une N-acylation de la sphingosine par un acide gras tandis que les glycosphingolipides, sulfatides et cérébrosides, résultent de la substitution d'une fraction céramide par un sucre (Figure 3).

Les glycocérébrosides sont les sphingolipides majoritaires des végétaux. On les trouve à l'état naturel dans de nombreuses sources alimentaires telles que le soja, le blé, le riz ou les épinards [24]. Chaque classe de sphingolipides contient plusieurs composés selon le degré d'hydroxylation et la longueur de la chaîne hydrophobe, ce qui complique fortement l'identification et la quantification individuelle des molécules. De ce fait, peu de travaux ont reporté leur teneur exacte chez le soja. Il est à signaler que l'étude des sphingolipides d'origine végétale est assez récente.

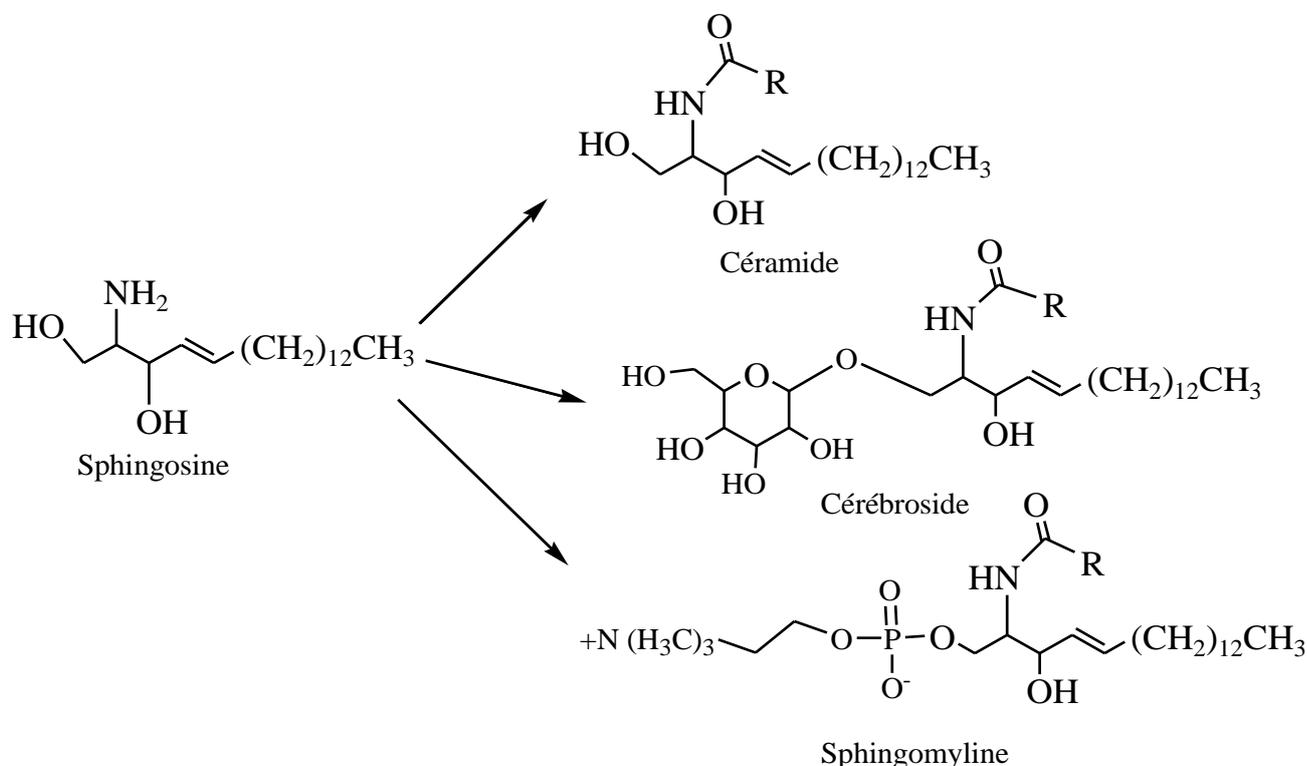


Figure 3 : Structures des sphingolipides

II.1.2- Rôles biologiques des sphingolipides

Des propriétés intéressantes leur ont été attribuées dans la prévention du cancer du colon ou de la peau [24]. Les sphingolipides interagissent également avec le cholestérol au niveau de l'intestin, ce qui limite son absorption. Cependant, les études cliniques évaluant ces propriétés chez l'homme sont rares et la quantité effective de sphingolipides apportées par l'alimentation reste méconnue.

Les céramides ont un grand rôle biologique dans les cellules végétales. Elles seraient responsables d'enzyme de l'apoptose cellulaire qui impliquées dans l'activation de la cascade des protéines kinases. Les céramides sont synthétisées dans les conditions de toutes les cellulaires.. Ce processus est nécessaire pour l'homéostasie des tissus. L'arrêt de l'apoptose pourrait avoir de graves conséquences entraînant ainsi plusieurs maladies telles que le cancer, , la neuropathie, la maladie de Parkinson. [25].

II.1.3- Biosynthèse des sphingolipides

La biosynthèse des sphingolipides dont le point départ est la sérine et le palmitoyl-Coenzyme A, est illustrée par la figure ci-dessous.

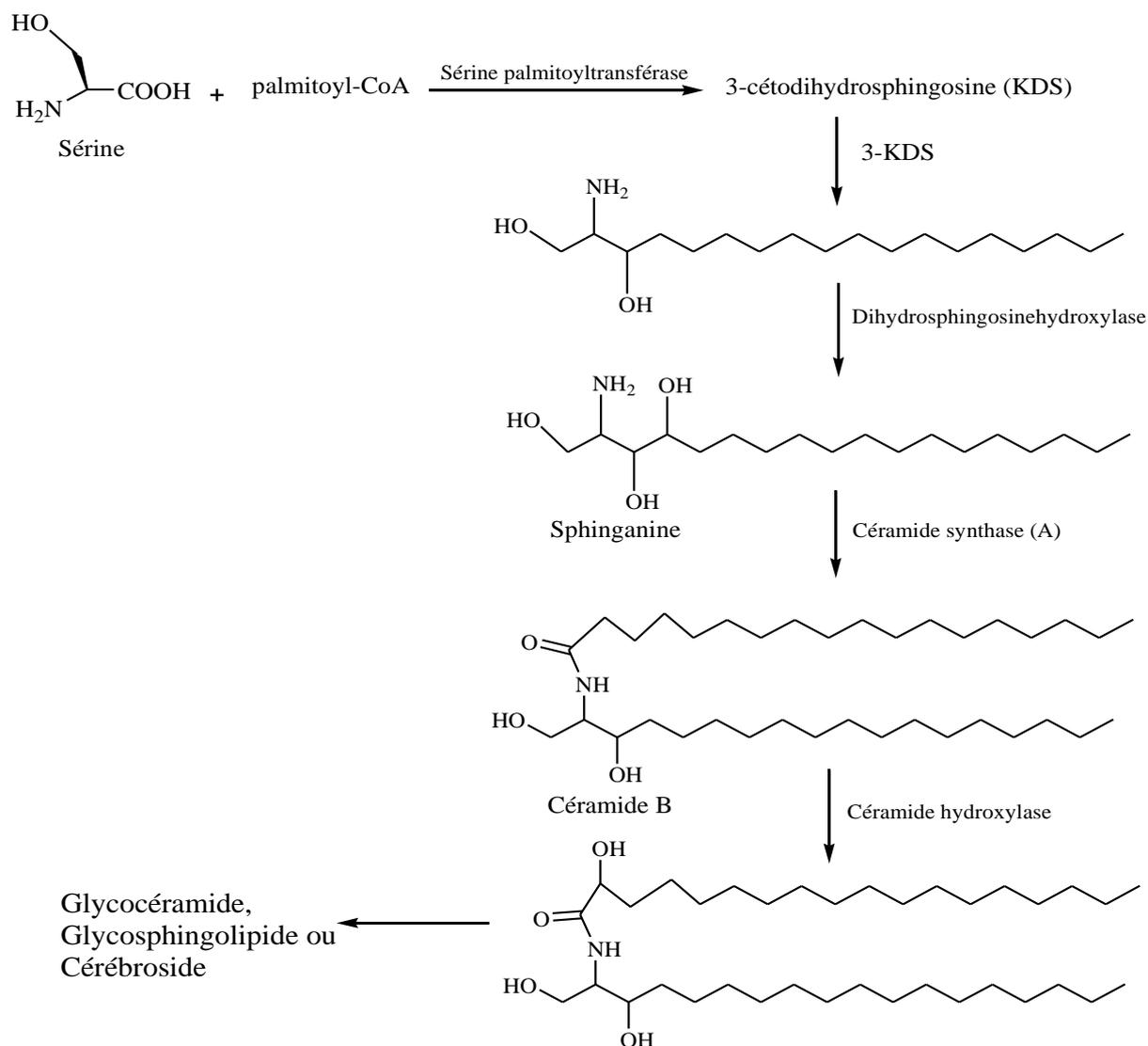


Figure 4 : Biosynthèse des céramides

II.2. Saponosides

II.2.1- Généralités

Les saponines qui constituent une importante classe de métabolites secondaires d'origines végétale et animale, sont des hétérosides complexes appartenant aux terpènes cycliques (nom générique donné aux hydrocarbures saturés cycliques ou acycliques ayant pour motif de base le terpène) ou aux stéroïdes. Ils sont rencontrés chez de nombreux végétaux (*Saponaria*, Quinoa, etc.) sous forme d'hétérosides (saponosides). Les plantes à saponines ont été très recherchées pour leurs propriétés détergentes [26], à l'instar de la Saponaire (*Saponaria officinalis* L.) qui a été largement employée pendant des siècles. Les saponines ont été aussi recherchées par l'industrie pharmaceutique parce qu'elles forment le

point de départ pour l'hémi-synthèse des médicaments stéroïdiens [27]. Elles présentent plusieurs propriétés pharmacologiques et sont employées dans la phytothérapie et dans l'industrie cosmétique.

Se basant sur la nature de leur squelette aglycone, les saponines peuvent être classées en deux groupes, triterpènes et stéroïdes.

➤ **Triterpènes** (squelette à 30 carbones)

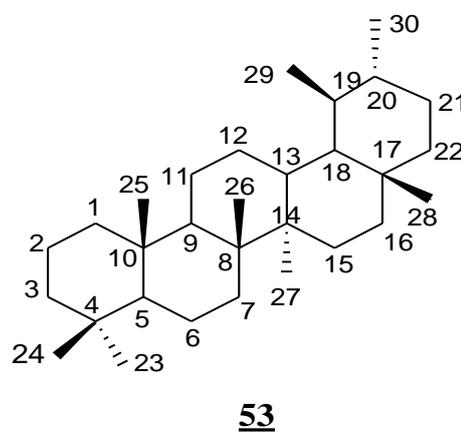
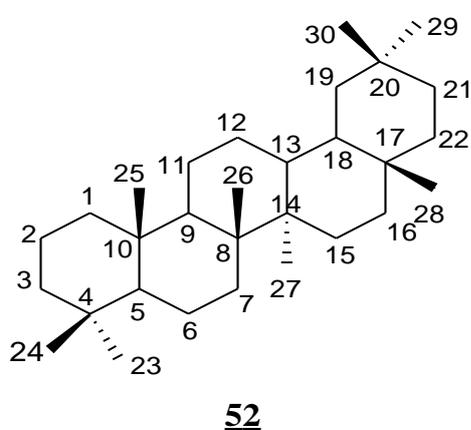
- pentacycliques : de type oléane (52), ursane (53), lupane (54), hopane (55), friedelane (56), serratane ou holostane (57).

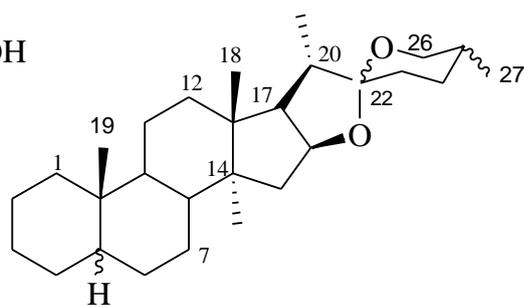
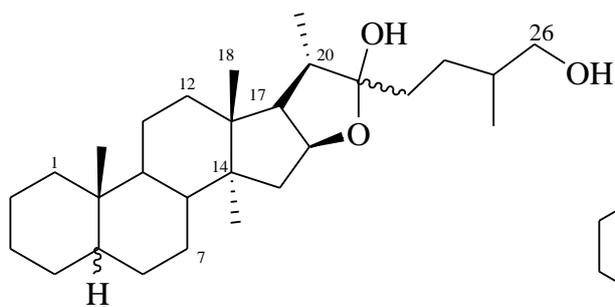
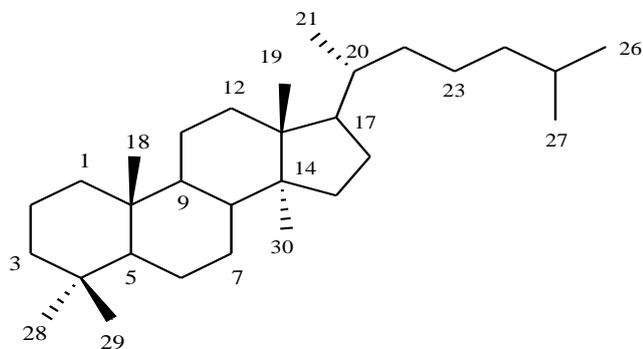
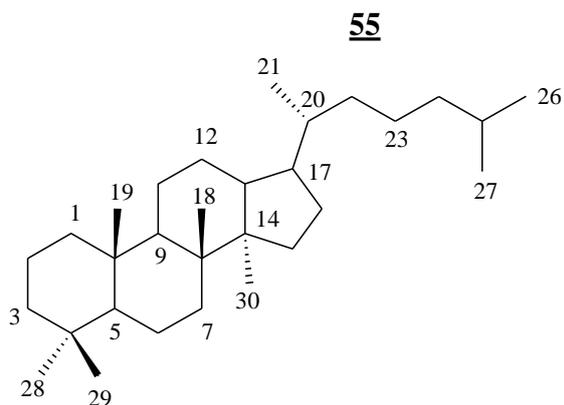
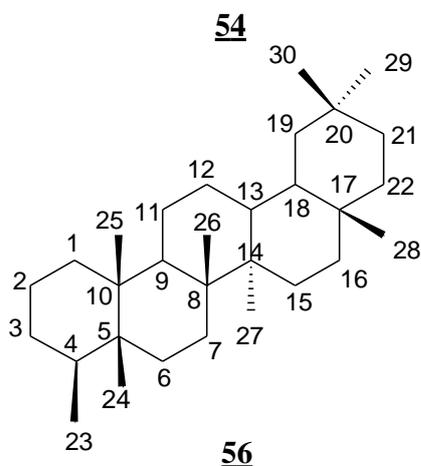
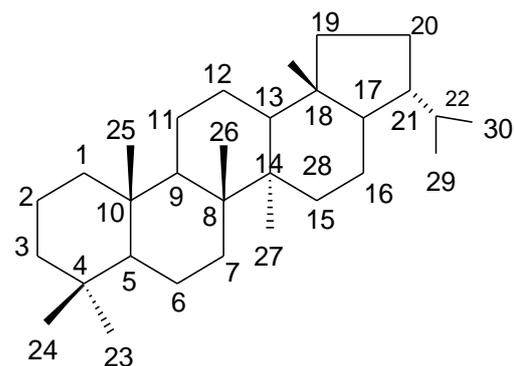
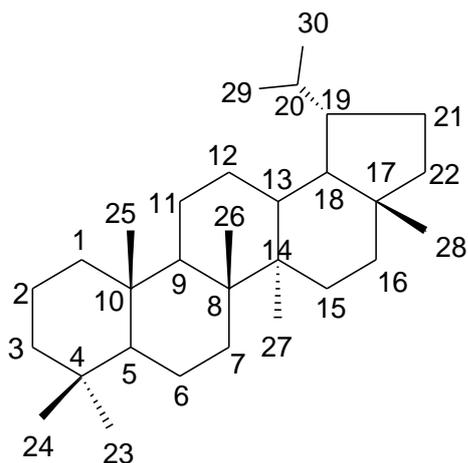
- tétracycliques : de type dammarane, lanostane ou cucurbitane (58).

➤ **Stéroïdes** (squelette à 24-29 carbones)

- de type Pentacyclique : furostane (59).

- de type Hexacyclique : spirostane (60).





59

60

II.2.2- Isolement de saponoside

A de rares exceptions, les saponines ne peuvent être isolées d'une matrice végétale en une seule étape. Se retrouvant généralement sous forme de mélanges complexes, plusieurs séparations sur différents supports solides doivent être effectuées pour parvenir au résultat escompté. De plus, la forte polarité, la relative fragilité et les différences structurales mineures entre ces composés de masse moléculaire élevée (>900 g/mol) rendent difficile l'obtention d'une saponine pure et homogène. Par ailleurs, ces molécules cristallisent très mal en raison de leurs propriétés hygroscopiques et de ce fait, ne donnent que très rarement des points de fusion nets [28].

Du fait que les saponines se solubilisent bien dans l'eau [29], une macération ou un chauffage à reflux à l'aide de ce solvant polaire, constitue une bonne voie d'extraction. Toutefois, l'étape suivante de lyophilisation de l'extrait est susceptible de provoquer l'hydrolyse éventuelle des saponines bidesmosidiques. Par conséquent, l'extraction des saponines se fait habituellement à l'aide d'alcools comme le méthanol ou butanol, à différentes concentrations, dans l'eau. En se référant à de nombreuses publications récentes ayant trait à l'isolement de ces molécules [30], une méthode d'isolement standard peut être préconisée. Elle est conforme à la démarche expérimentale décrite ci-dessous.

- Sécher la matrice végétale et la broyer finement.
- Extraire à reflux ou par macération à température ambiante avec un mélange MeOH/H₂O.
- Concentrer l'extrait sous pression réduite.
- Suspendre l'extrait dans l'eau distillée.
- Extraire successivement avec AcOEt et MeOH en séparant les deux phases.
- Charger la fraction soluble dans le n-BuOH sur une colonne de Sephadex LH-20 et éluer avec 30, 50, 70 et 100% de méthanol.
- Combiner les fractions éluées avec MeOH (70%) possédant les mêmes motifs sur CCM.
- Charger la fraction sur une colonne contenant du gel de silice et éluer avec un mélange CHCl₃/MeOH/H₂O selon différents ratios, comme par exemple (8:5:1).
- Effectuer la séparation finale des saponines par HPLC ou semi-préparative munie d'une colonne C₁₈ en phase inverse éluee avec un gradient binaire H₂O/MeOH.

- Évaporer les solvants sous pression réduite et caractériser la saponine.

Les techniques modernes de RMN (^1H , ^{13}C , COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC, etc) à haut champ (à partir de 500 MHz) peuvent être utilisées pour élucider la structure des saponines [31]. De plus, une hydrolyse acide ultérieure confirmera la nature de la génine et des sucres constituant la partie osidique [32].

II.2.3- Biosynthèse des triterpènes et saponosides

Partant de l'oxydosqualène, plusieurs voies biosynthétiques de glycosides stéroïdiques et triterpéniques sont reportées dans la littérature, expliquant leur grande variété structurale.

La condensation tête-à-queue du pyrophosphate IPP sur une molécule de diméthylallyle de pyrophosphate DMAPP, permet la formation du précurseur de monoterpènes, le géranyl pyrophosphate GPP selon la Figure 5 suivante.

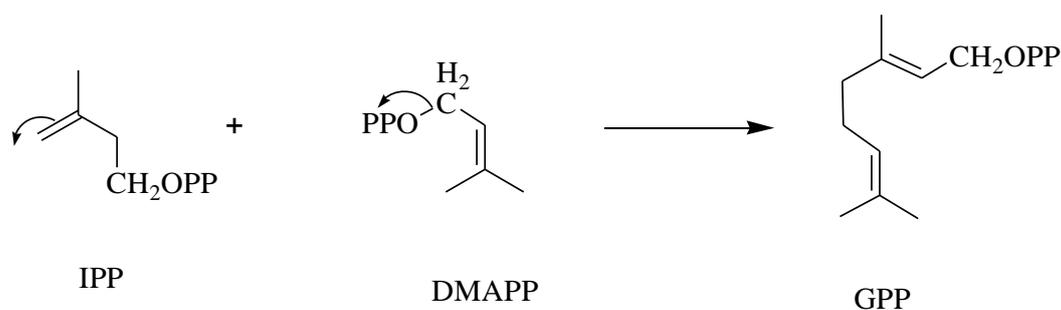


Figure 5 : Formation du géranyl pyrophosphate

La molécule GPP est condensée avec une unité IPP pour former le précurseur des sesquiterpènes, le farnésyl pyrophosphate FPP (Figure 6).

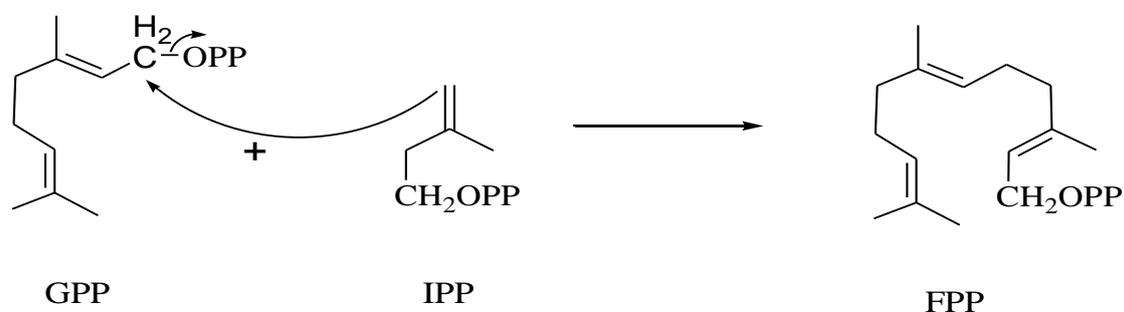


Figure 6: Formation du farnésyl pyrophosphate

La condensation de deux molécules queue-à-queue de FPP va former le squalène. En suite une oxydation permet l'élaboration de l'époxy-2,3-squalène, précurseur des triterpènes et des stéroïdes (Figure 7).

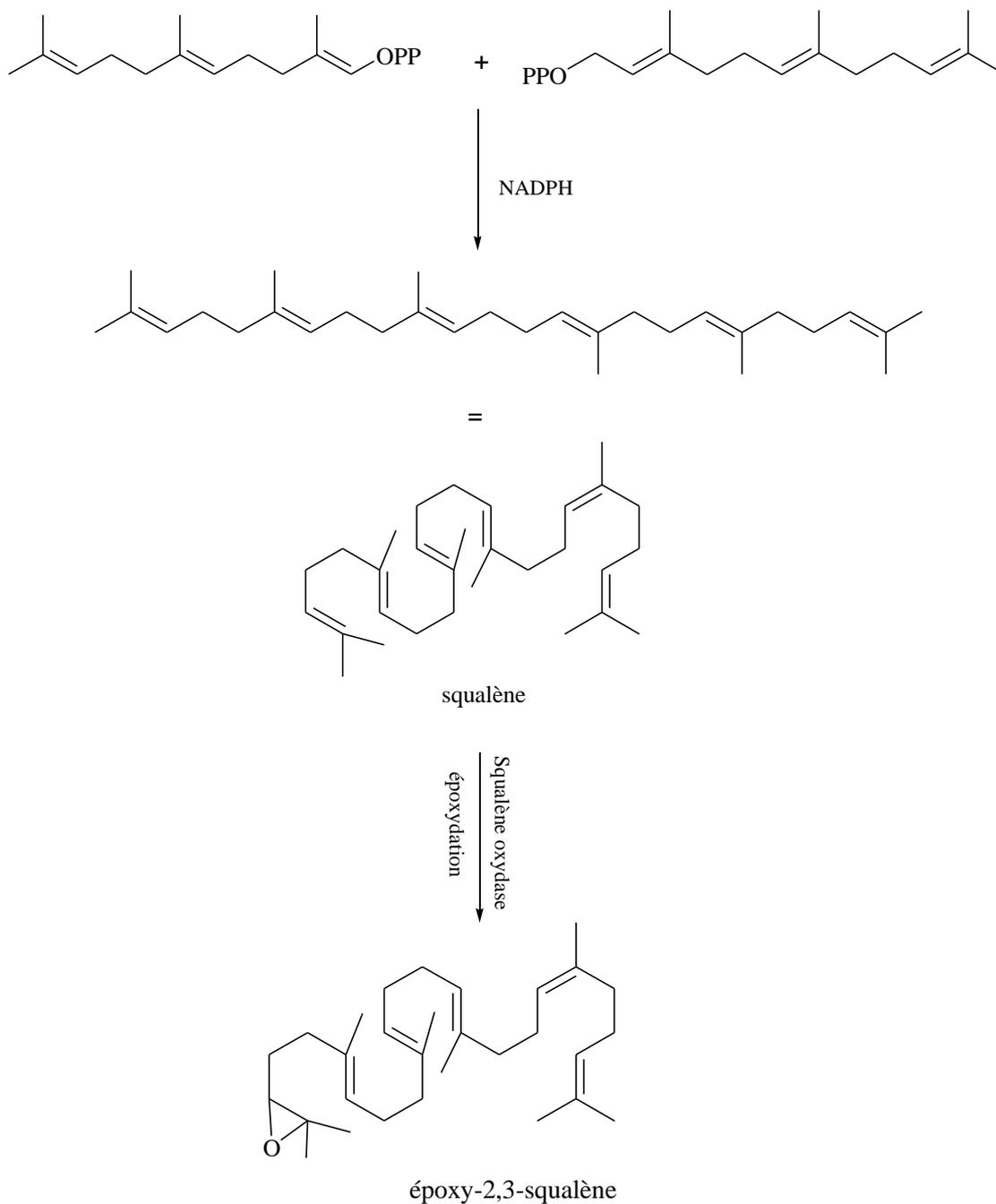


Figure 7 : Oxydation du squalène

L'époxy-squalène adopte la conformation chaise-chaise-chaise-bateau pour former le cation dammarényl tétracyclique. Ce dernier peut évoluer pour donner naissance aux

triterpènes tétracycliques et pentacycliques à squelette β -amyrine. Toutes ces transformations sont illustrées dans la Figure 8.

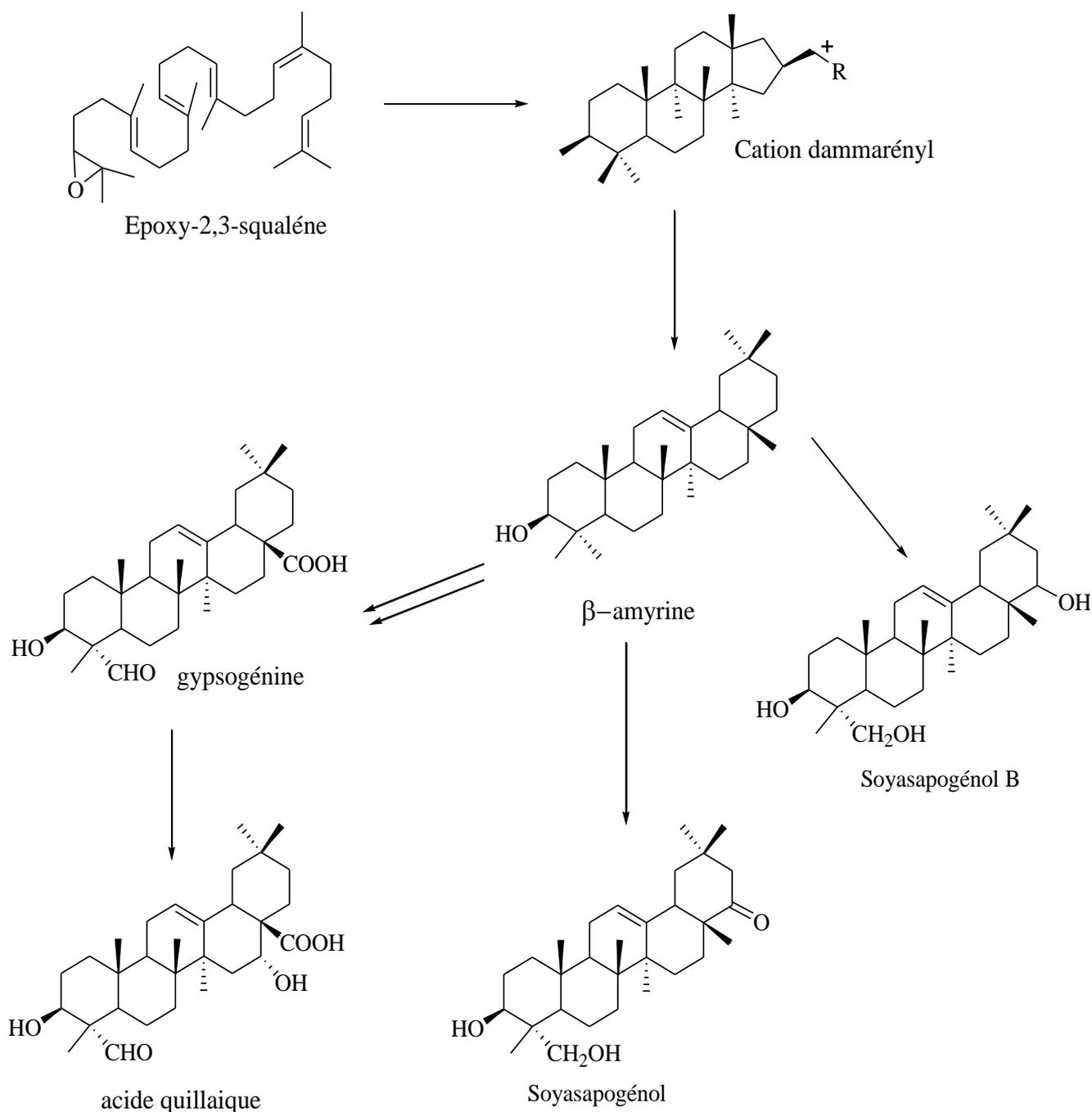
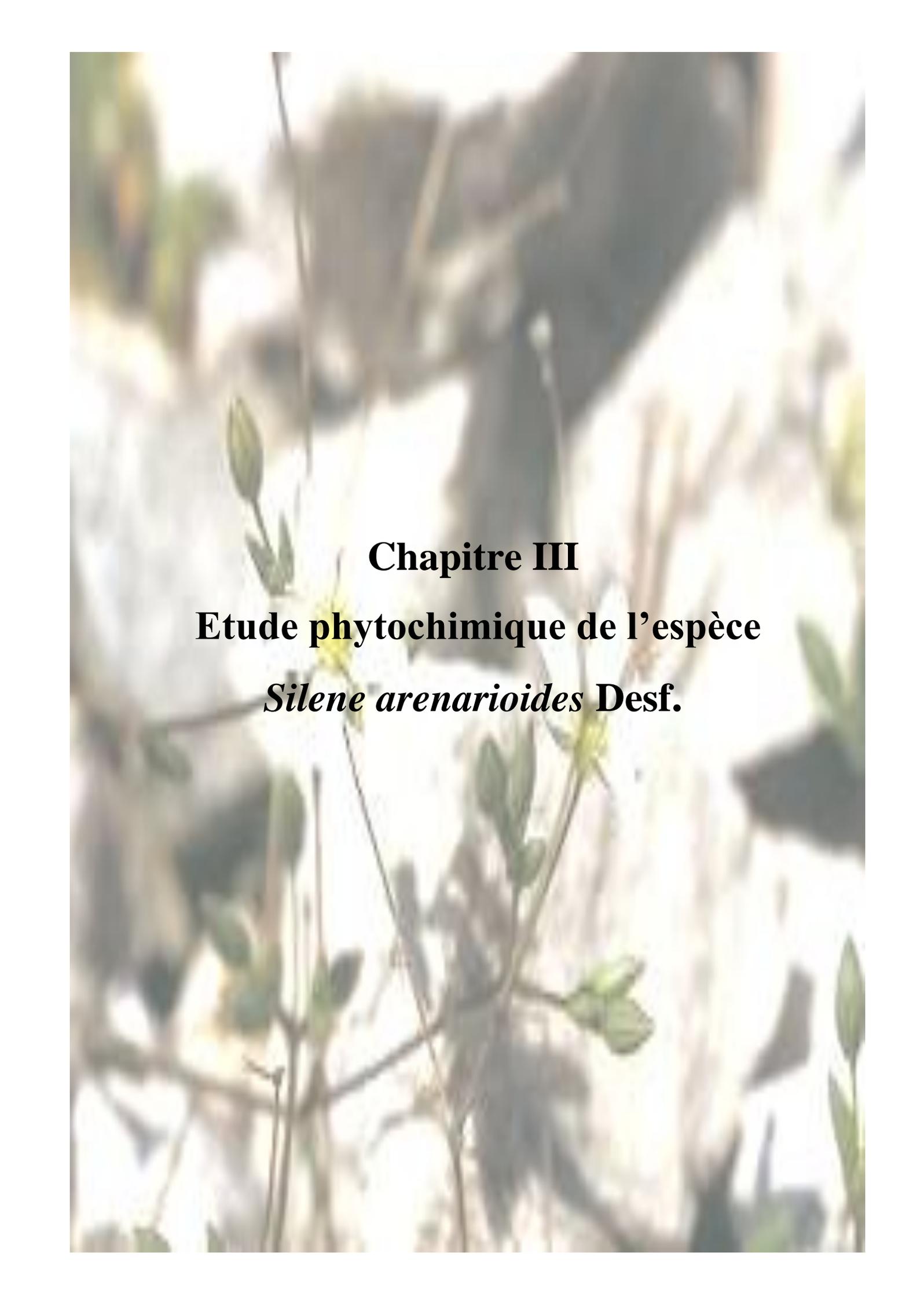


Figure 8 : Cyclisation de l'époxy-2,3-squalène

La cyclisation des triterpènes peut se faire également selon le cation dammarényl tétracyclique. Ce dernier peut subir ultérieurement des réarrangements conduisant à la formation de triterpénoïdes pentacycliques. Des substitutions ou des additions de sucres sur la génine par différentes enzymes au niveau des positions C-3 ou C-28 conduisent à la biosynthèse des saponines [33].



Chapitre III
Etude phytochimique de l'espèce
***Silene arenarioides* Desf.**

III.1- Introduction

A notre connaissance *Silene arenarioides* Desf. n'a fait l'objet d'aucune étude chimique ou biologique. L'objectif phytochimique se résume, à l'isolement et la détermination structurale des constituants chimiques issus des parties aériennes de *S. arenarioides*. Pour ce faire, nous avons procédé à l'extraction, au fractionnement et à la purification des différents phytoconstituants en utilisant diverses techniques de chromatographie. Les métabolites secondaires isolés sont par la suite analysés et caractérisés par des techniques de spectrométrie de masse (SM), spectroscopie UV, RMN mono et bidimensionnelle. Ces données sont complétées dans certains cas par la mesure de l'activité optique.

III.2- Aspect botanique

L'espèce *S. arenarioides*. est une plante endémique à l'Algérie. Elle se rencontre particulièrement dans la région de Biskra. C'est une plante visqueuse agglutinant le sable, à feuilles étroites ou même linéaires, fleurs insérées deux par deux sur l'axe de l'inflorescence, à pétales blancs ou rosés, veinés de bleu extérieurement [1]. On ne connaît pas d'usage en médecine traditionnelle à *S. arenarioides* Desf.



Figure 9 : Espèce *Silene arenarioides* Desf. (Caryophyllaceae)

III.3- Taxonomie

Selon Cronquist, *S. arenarioides* Desf. est classée comme suit :

Règne	Végétal
Embranchement	Spermatophytes
Sous Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Ordre	Caryophyllales
Famille	Caryophyllaceae
Genre	Silene
Espèce	<i>Silene arenarioides</i> Desf.

Tableau 3 : Phylogénie de la famille Caryophyllaceae (Cronquist 1981)

III.4- Résultats et discussions

III.4.1- Récolte du matériel végétal

La plante *Silene arenarioides* Desf. a été récoltée en avril 2007, dans la région de Biskra. L'identification a été faite par le Professeur Bachir Oudjehih du Département d'Agronomie de l'Université de Batna. Le matériel végétal fraîchement récolté est séché, broyé et conservé à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la chaleur.

III.4.2- Extraction de *Silene arenarioides* Desf.

Les parties aériennes (800 g) de *Silene arenarioides* Desf. préalablement séchées et broyées, sont mises à macérer dans l'éther de pétrole (2 x 5 L) pendant 2 jours. La filtration et l'évaporation à sec du solvant ont permis d'obtenir 3,8 g de l'extrait étheropétrolique. Le résidu est ensuite mis à macérer dans l'acétate d'éthyle (2 x 5 L). Après filtration et évaporation du solvant, 14 g d'extrait acétate d'éthyle ont été obtenus. Les marcs sont mis à macérer de nouveau dans le méthanol (2 x 5 L) pendant 2 jours. La filtration et l'évaporation totale du solvant ont donné 35 g de l'extrait méthanolique.

Le protocole d'extraction est résumé dans le schéma 1 ci-dessous.

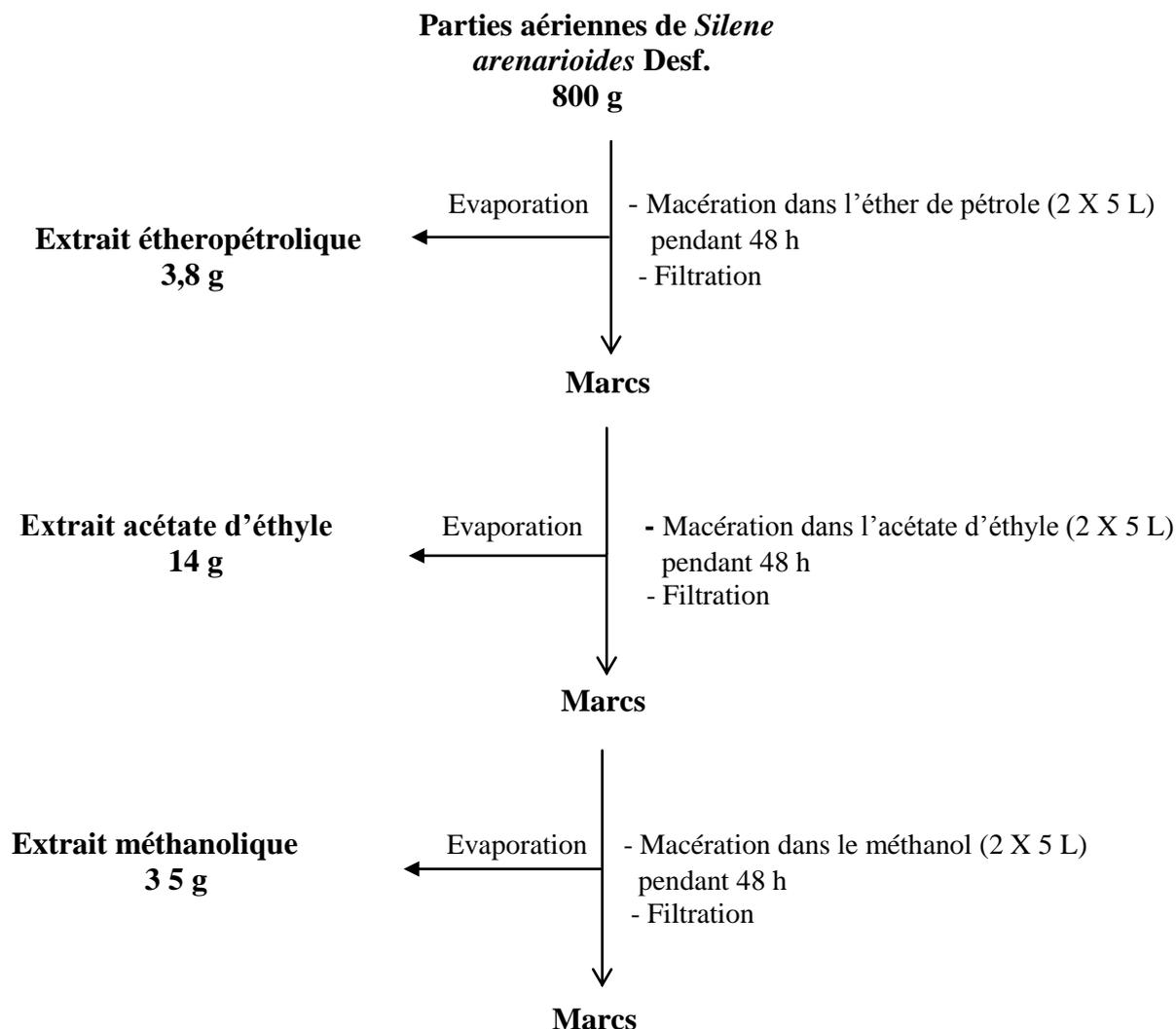


Schéma 1 : Extraction des parties aériennes de *Silene arenarioides* Desf.

III.4.3- Fractionnement de l'extrait méthanolique et isolement des composés Si1, Si2 et Si3

La chromatographie sur couche mince effectuée sur les trois extraits a montré que l'extrait méthanolique est plus nettement riche en taches après révélation par $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$ dans les proportions (20/70/10). A cet effet, nous nous sommes intéressés à étudier l'extrait cité.

L'étude de l'extrait méthanolique (7g) est soumise à un fractionnement préalable par une chromatographie liquide sous vide (VLC), sur une silice phase inverse RP-18 en utilisant des gradients d'éluant $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (0/100, 100/0). Ceci a permis de collecter 9 fractions allant de F1 à F9.

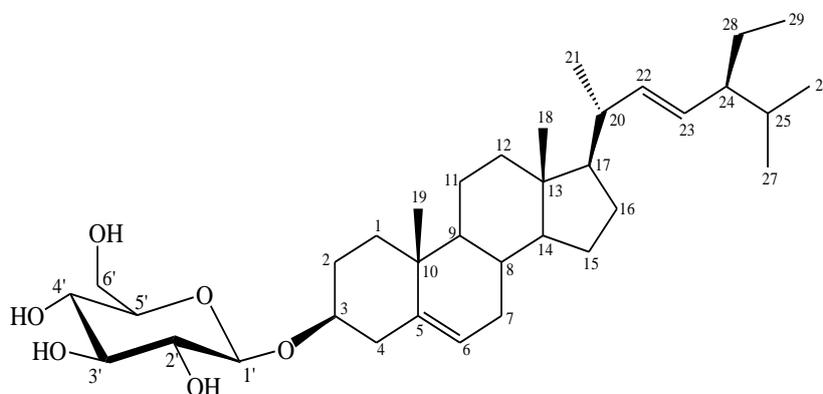
La fraction F9 d'un poids de 250 mg est mise à chromatographie sur une colonne de gel de silice normale. L'élution menée au moyen d'un mélange chloroforme/méthanol à différents gradients (100/0, 80/20), a abouti à l'isolement du composé **Si1** (11 mg). Ce dernier est soumis à une ultime purification sur colonne de Sephadex LH-20 en présence de méthanol.

Les fractions F7 et F8 réunies (90 mg) sont soumises à une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20, utilisant comme éluant un mélange chloroforme/méthanol (100/0 à 80/20). Le composé **Si2** (14 mg).

La fraction F6 (150 mg), la plus importante quantitativement et présentant en CCM une tâche majoritaire visible en UV (254 nm), est également soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice. L'élution menée au moyen d'un mélange chloroforme/méthanol à différents gradients (100/0 à 70/30), a permis d'obtenir le composé **Si3** (13 mg).

III.4.4- Détermination structurale des composés isolés

III.4.4-1- Détermination structurale du composé Si1



3-O-β-D-glucopyranosyl stigmastérol

Le spectre de masse ESI-MS enregistré en mode positif (Figure 10) du composé **Si1** obtenu sous forme de poudre blanche, montre un ion pseudomoléculaire à $m/z = 597$ $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 574 uma correspondant à une formule brute en $C_{35}H_{58}O_6$.

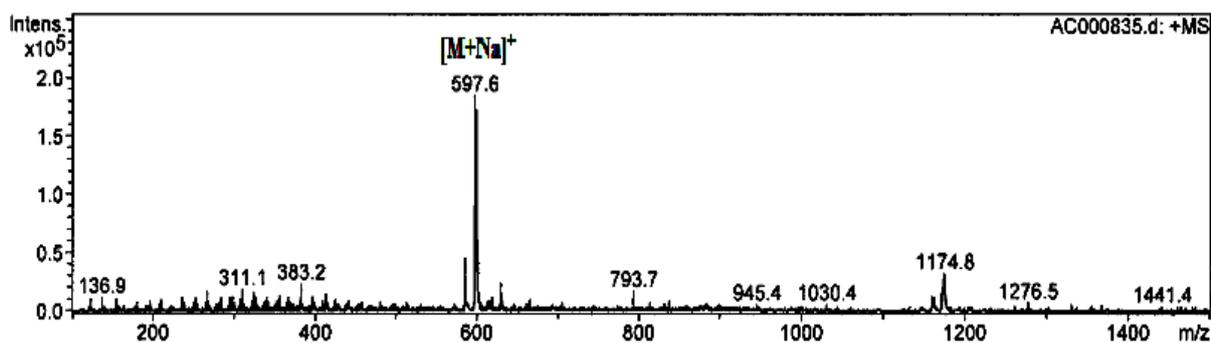


Figure 10 : Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé Si1

Le spectre RMN ^1H (Figure 11) enregistré dans un mélange $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ permet l'observation de signaux résonants à champ fort entre 0,66-0,99 ppm, correspondant à des groupements méthyles. Il montre aussi un signal doublet large d'intégration 1H à 5,32 ppm d'un proton éthylénique, deux signaux résonant à 4,96 et 5,13 sous forme de doublet de doublet ($J = 15,0$ et $8,5$ Hz) et ($J = 15,0$ et $8,7$ Hz), également de deux protons oléfiniques et enfin un signal multiplet à 3,55 ppm caractéristique d'un proton porté par un carbone oxygéné. Ceci nous oriente logiquement vers un composé à squelette stéroïdique très présent dans le règne végétal, à savoir le stigmasterol. En outre, l'observation de signaux entre 3 et 4 ppm et d'un signal doublet localisé à 4,41 ppm suggère l'existence d'une unité osidique.

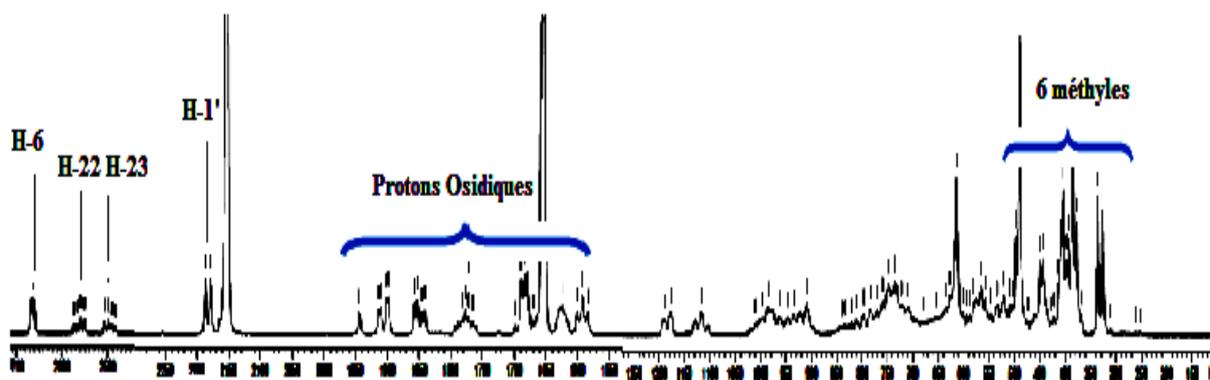


Figure 11: Spectre RMN ^1H du composé Si1

Le spectre RMN ^{13}C J -modulé (Figure 12) en apporte par la confirmation l'observation de 6 signaux de carbones méthyliques entre δ_c 12,4 à 20,1, d'un signal d'un carbone oxyméthylène repéré à 79,6 ppm et dont le déplacement chimique indique qu'il est porteur de l'unité osidique, de 4 signaux de carbones éthyléniques dont un quaternaire sortant à 122,5, 140,9, 129,8 et 138,9 ppm.

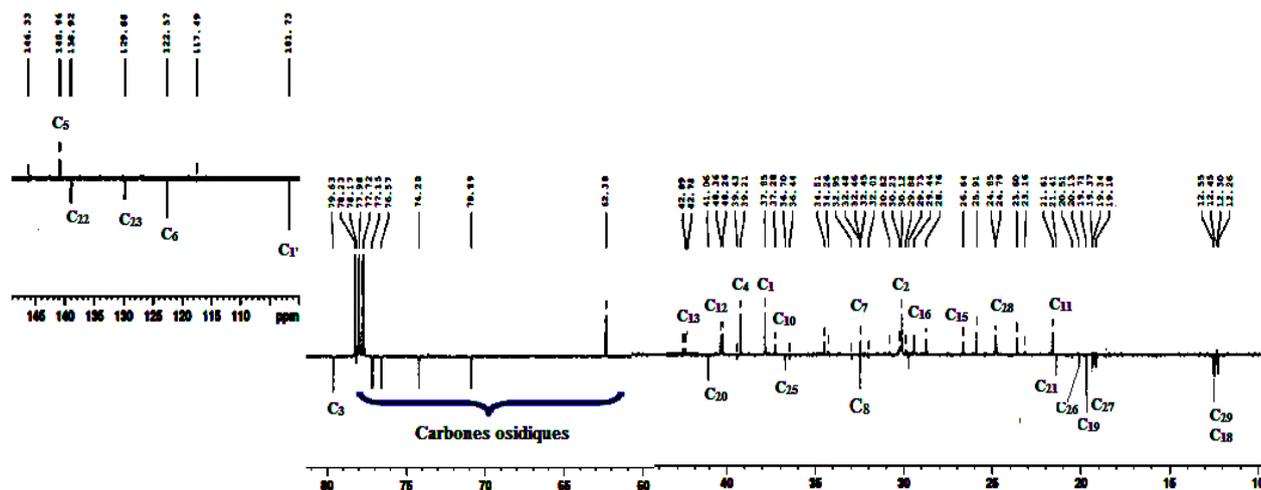


Figure 12 : Spectre RMN ^{13}C du composé Si1

L'expérience COSY H-H (Figure 13) permet l'identification de l'unité osidique. A partir du proton anomère repéré à 4,36 ppm, on relie sept protons d'un hexose. Les grandes valeurs des constantes de couplage montrent que ces protons sont axiaux. Il s'agit d'un glucose de configuration β comme l'indique la valeur de la constante de couplage $J_{1'-2'} = 7,8$ Hz.

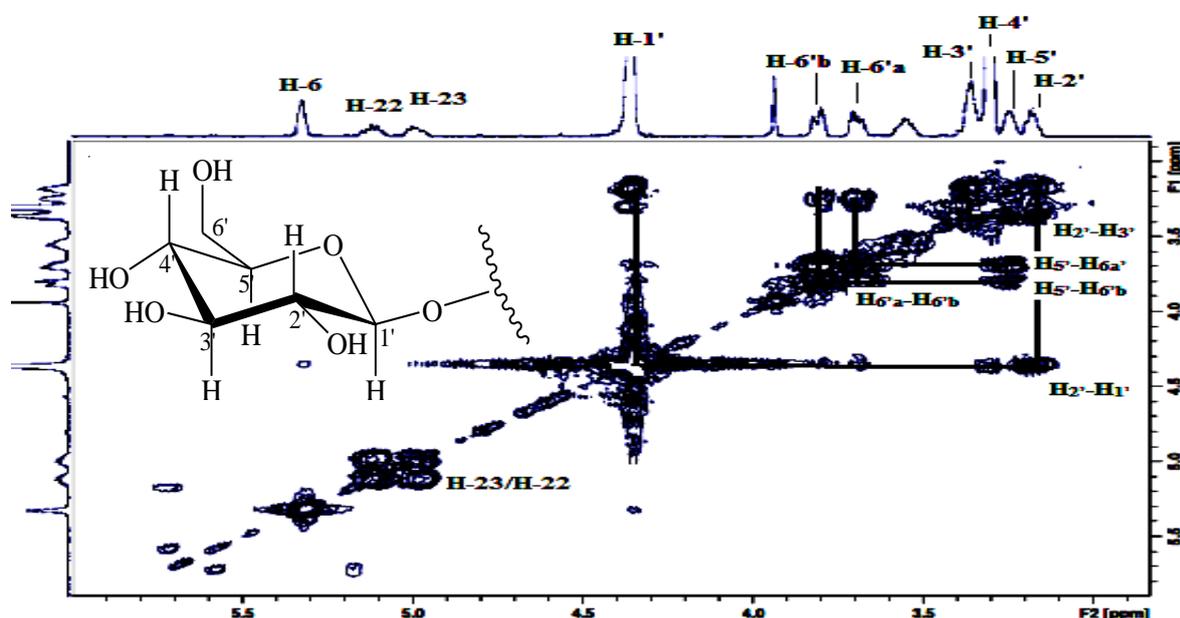


Figure 13: Spectre COSY de la partie glucose

Tous les déplacements chimiques des protons et carbones (Tableau 4) déterminés conjointement par les expériences COSY H-H, HSQC (Figure 14) et HMBC (Figure 15), le spectre de masse, le pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D = -6,5^\circ$, $C = 0,6$ mg/100 ml dans CHCl_3) et enfin la comparaison avec les données de la littérature, permettent d'identifier le composé Si1 au 3-*O*- β -D-glucopyranosyl Stigmastérol. Ce métabolite secondaire en fait commun à toutes les

plantes, a été isolé antérieurement de plusieurs espèces du genre *Silene*. On citera pour l'exemple *Silene Conidea* Linn [12].

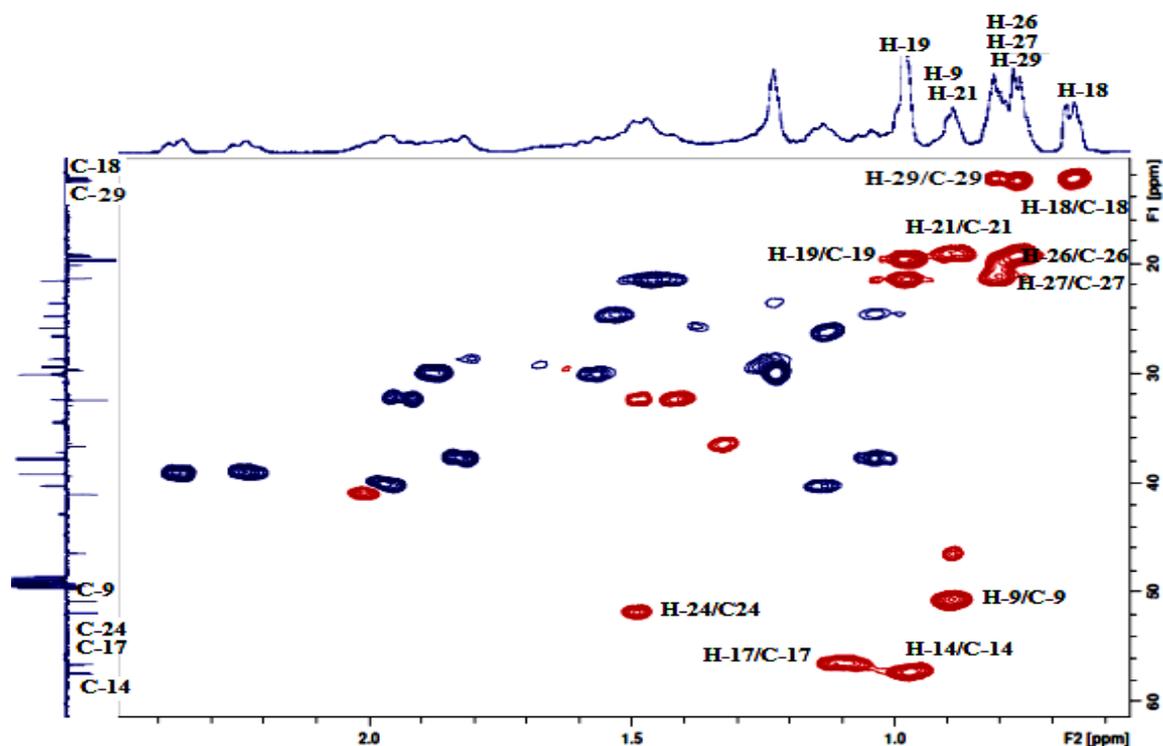


Figure 14: Spectre HSQC du composé Si1

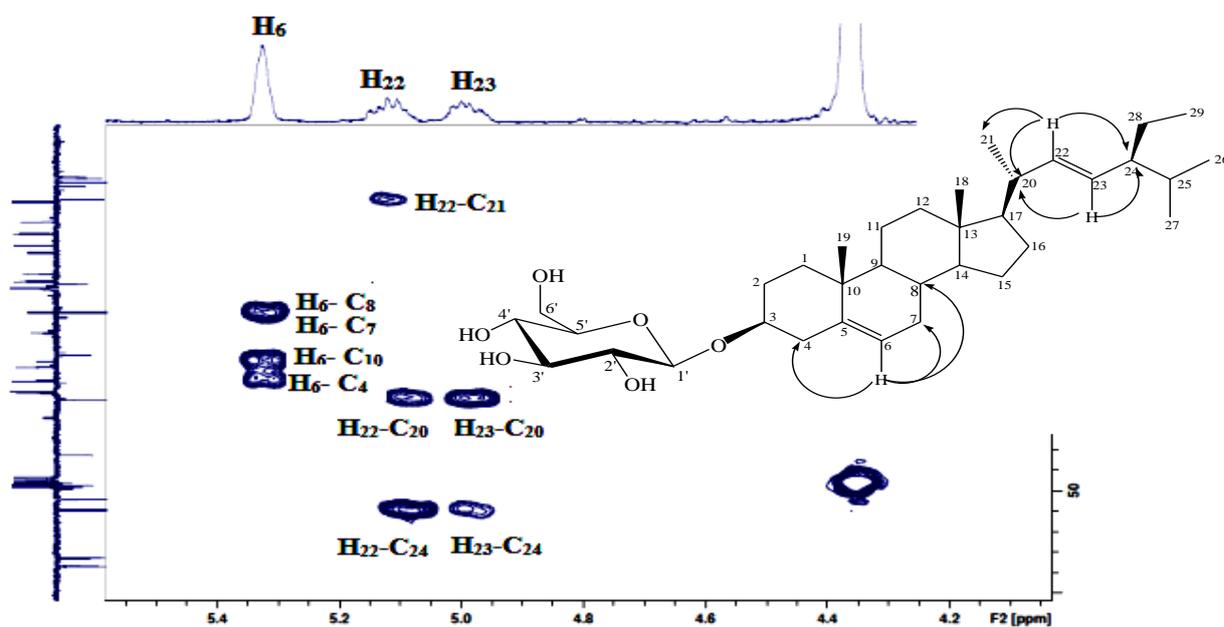


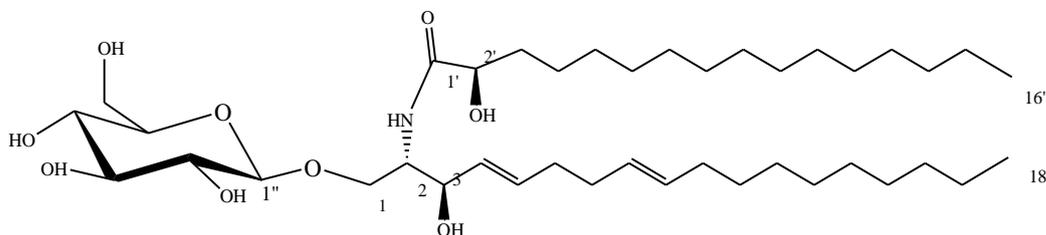
Figure 15 : Corrélations observées en HMBC

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones du composé **Si1** sont représentées dans le tableau suivant :

C	δ_C	δ_H J Hz	C	δ_C	δ_H J Hz
1	37,8	1,04 <i>m</i> H-1b 1,82 <i>m</i> H-1a	19	19,7	0,99 <i>s</i>
2	30,1	1,57 <i>m</i> H-2b 1,87 <i>m</i> H-2a	20	41,0	2,02 <i>m</i>
3	79,6	3,55 <i>m</i>	21	21,4	0,93 <i>d</i> 6,1
4	39,2	2,23 <i>m</i> H-4b 2,35 <i>m</i> H-4a	22	138,9	5,13 <i>dd</i> (15,0; 8,7)
5	140,9	-	23	129,8	4,96 <i>dd</i> (15,0; 8,5)
6	122,5	5,32 <i>dl</i> 5,2	24	51,8	1,49 <i>m</i>
7	32,4	1,93 <i>m</i> H-7b 1,96 <i>m</i> H-7a	25	36,7	1,33 <i>m</i>
8	32,4	1,48 <i>m</i>	26	20,1	0,79 <i>m</i>
9	50,8	0,90 <i>m</i>	27	19,3	0,77 <i>m</i>
10	37,2	-	28	24,8	1,03 <i>m</i> H-28b 1,54 <i>m</i> H-28a
11	21,6	1,46 <i>m</i>	29	12,5	0,73 <i>m</i>
12	40,2	1,44 <i>m</i> 1,97 <i>m</i>	1'	101,7	4,36 <i>d</i> 7,8
13	42,7	-	2'	74,2	3,18 <i>t</i> 8,1
14	57,4	0,98 <i>m</i>	3'	77,1	3,37 <i>m</i>
15	26,6	1,11 <i>m</i>	4'	70,8	3,36 <i>m</i>
16	29,4	1,23 <i>m</i> H-16b 1,88 <i>m</i> H-16a	5'	76,5	3,25 <i>m</i>
17	56,5	1,13 <i>m</i>	6'	62,3	3,70 <i>dd</i> H-6'b (11,9; 4,8) 3,81 <i>dd</i> H-6'a (11,9-2,4)
18	12,4	0,65 <i>s</i>			

Tableau 4: Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C de **Si1** (CDCl_3 , CD_3OD)

III.4.4-2- Détermination structurale du composé Si2



1-O- β -D-glucopyranosyl-2-N-2'S-hydroxy-palmitoyl-2S, 3R, 4(E), 8(E) octadecasphingadiénine

Ce composé se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Son spectre de masse ESI-MS, enregistré en mode positif (Figure 16), montre un ion

pseudomoléculaire à $m/z = 737$ $[M+Na+H]^+$, soit une masse moléculaire impaire égale à 713 uma, correspondant à une formule en $C_{40}H_{75}NO_9$.

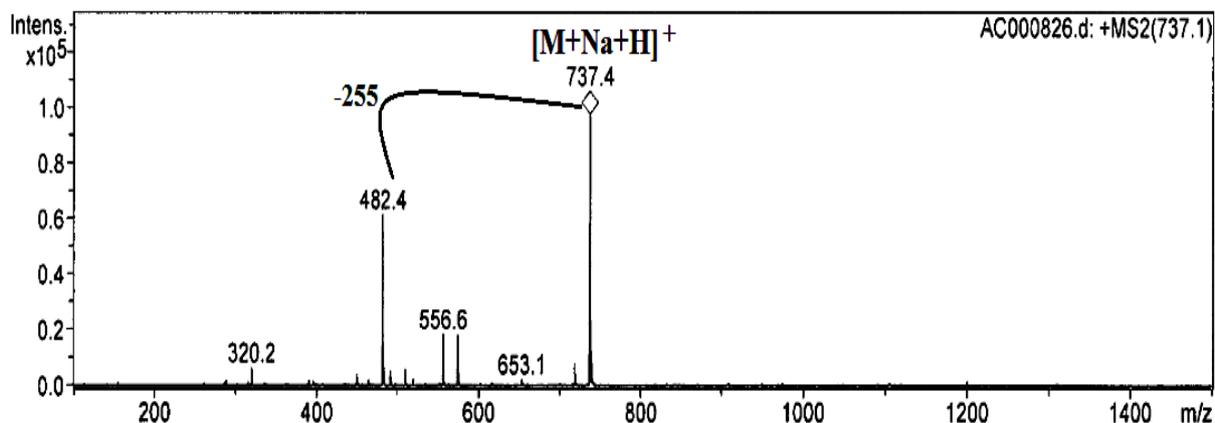


Figure 16 : Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé Si2

Le spectre RMN 1H (Figure 17) montre des signaux à 3-4 ppm caractéristiques de protons osidiques. Le signal doublet résonant à 4,30 ppm ($J = 7,8$ Hz) est attribué au proton anomère H-1'' du sucre. L'observation des quatre signaux à champ faible résonant entre 5,45 et 5,76 ppm correspondent aux protons oléfiniques.

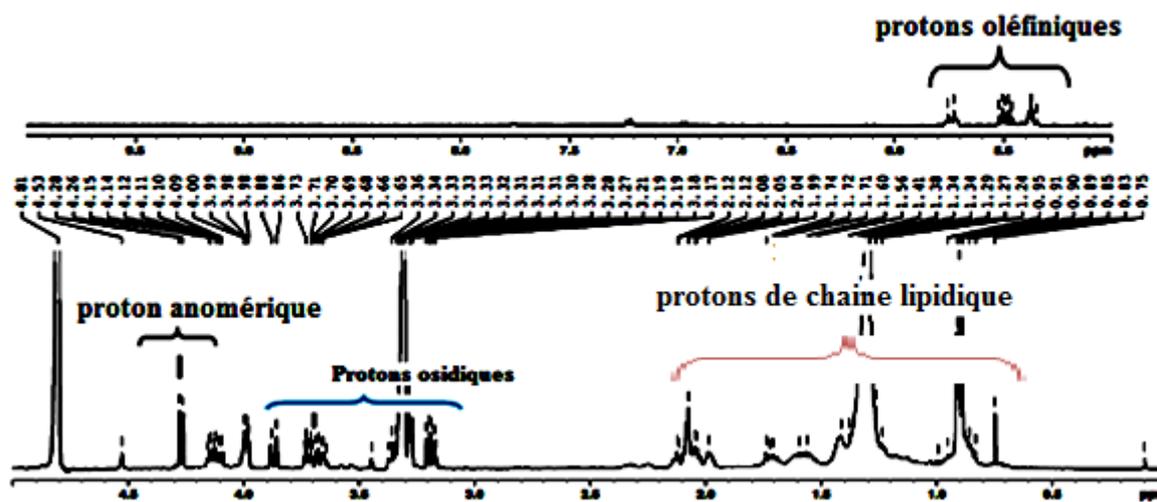


Figure 17 : Spectre RMN 1H du composé Si2

Le spectre COSY H-H (Figure 19) permet d'identifier sept protons d'un hexose. En effet et partant du proton anomérique H-1'', on relie à travers leurs taches de corrélations les protons H-2'' (3,31 ppm, dd , $J = 7,8$ et $9,1$ Hz), H-3'' (3,38 ppm, t , $J = 9,0$ Hz), H-4'' (3 ppm, nd), H-5'' (3,30 ppm, m) et H-6'' (3,38 ppm, H-6''b, m) et (3,89 ppm, H-6''a, d , $J =$

11 Hz). Les grandes valeurs de constantes de couplage indiquent qu'ils sont tous axiaux. Il s'agit d'un glucose de configuration β .

Le spectre RMN ^1H montre également la présence de plusieurs signaux résonant à champ fort entre 0.93-2.10 ppm caractéristiques de protons de chaîne lipidique. Ainsi cette première analyse RMN conjuguée au spectre de masse qui montre une masse moléculaire impaire et un fragment à 482 uma (M-255) indique que le composé **Si2** est un glucolipide, plus précisément un sphingolipide en raison de la présence d'un atome d'azote au niveau de la chaîne en question. A noter que ce type de squelette est rencontré au sein de la famille Caryophyllaceae [34]. La corrélation remarquable observée sur le spectre HMBC entre le carbone anomérique C-1'' (103,3 ppm) du glucose, lui-même identifié par analyse HSQC, et 2 protons repérés à 3,74 et 4,13 ppm d'un groupement oxyméthylène indique clairement que la chaîne lipidique est fixée en C-1'' du glucose.

Il reste maintenant à établir la structure précise de cette chaîne. A cet effet, l'analyse COSY H-H a été déterminante. L'élucidation structurale proprement dite est initiée à partir des protons H-1 (3,74 ppm, *dd*, $J = 10,3$ et $3,7$ Hz, H-1b) et (4,13 ppm, *dd*, $J = 10,3$ et $5,5$ Hz, H-1a) cités plus haut du groupement hydroxyméthylène qui corrélient avec un proton nommé H-2 résonant à δ_{H} 3,90 (1H, *dd*, $J = 7,2$ et $3,5$ Hz) porté par un carbone repéré à 53,2 ppm par analyse HSQC. Ce déplacement chimique est très caractéristique d'un carbone lié à un atome d'azote [34]. Ce même proton H-2 corrélie avec un proton H-3 résonant sous forme de triplet (1H, *t*, $J = 7,2$ Hz) à 4,17 ppm. L'analyse HSQC (Figure 20) montre que ce dernier est porté par un carbone dont la valeur de déplacement chimique de l'ordre de 71,4 ppm, traduisant la présence d'un groupement oxyméthine CHOH en C-3. Partant du proton H-3, le spectre COSY H-H met clairement en évidence un système de spin constitué par 2 groupements allyliques comme il est représenté dans les Figures 18 et 19. En effet, Ce dernier couple avec un proton éthylénique H-4 résonant à 5,51 ppm sous forme doublet de doublet (*dd*, $J = 7,3$ et $15,3$ Hz, H-4), lui-même corrélie avec un proton éthylénique H-5 résonant à 5,76 ppm (*m*, H-5). Sa corrélation avec deux protons méthyléniques équivalents (*sl*, 2,10 ppm) permet d'identifier le premier groupement allylique avec une configuration *trans* pour la fonction éthylénique au vu de la constante de couplage $J_{4,5}$ égale à 15,3 Hz. De la même manière et partant des protons oléfiniques numérotés H-8 et H-9 résonant à 5,45 ppm (2H, *t*, $J = 4,8$ Hz) qui présentent une tache de corrélation avec 2 protons d'un groupement méthylénique CH₂ (2,10 ppm, *sl*), on identifie le deuxième groupement allylique avec une configuration *trans* pour la fonction éthylénique. Cette configuration a été établie du fait de la valeur de déplacement chimique du carbone CH₂ de l'ordre de 32,2 ppm de ce groupement allyle [35].

Le proton oléfinique H-9 cité plus haut corrèle avec un proton multiplet H-10 repéré à 2,01 ppm, lui même montrant une tache de corrélation avec l'amas de protons entre 1,28-1,40 ppm de nature méthylénique attestée par le spectre HSQC (Figure 21). Cet amas corrèle avec un groupement méthyle (3H, *t*, $J = 7,1$ Hz, H-18) résonant à 0,97 ppm, terminant ainsi la première chaîne lipidique et dont il faut cependant déterminer le nombre de CH₂ aliphatiques constituant cette dernière.

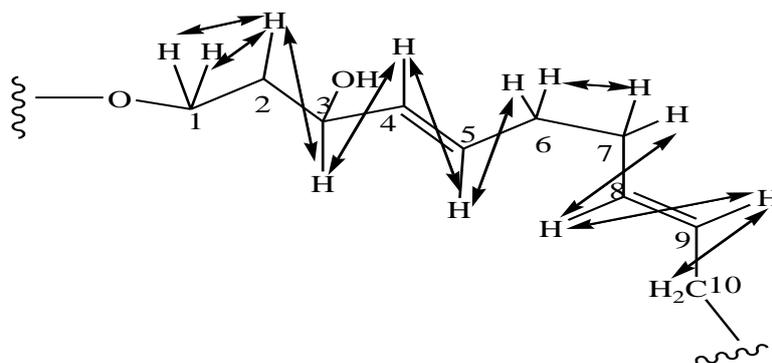


Figure 18 : Corrélations COSY H-H de la chaîne lipidique

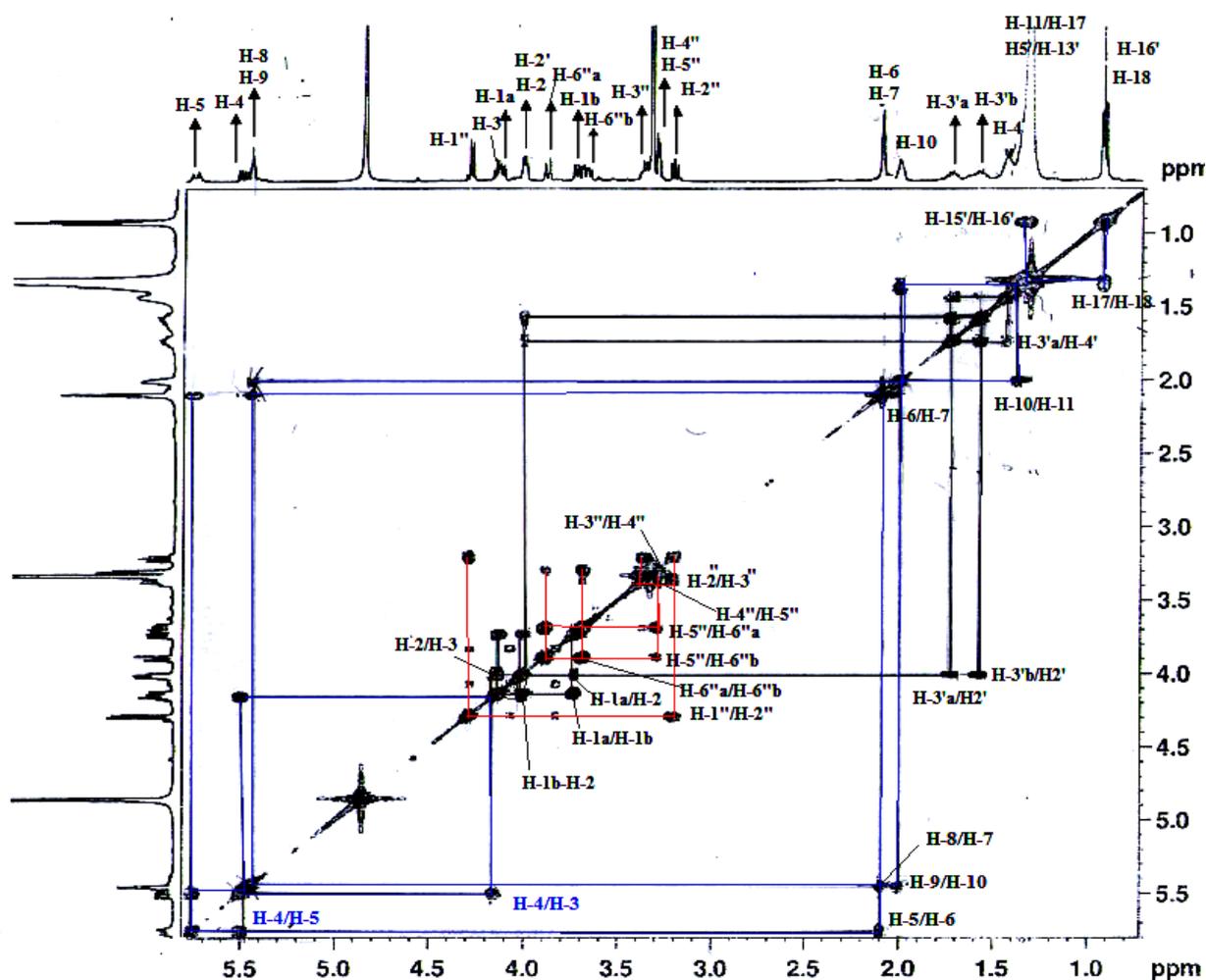


Figure 19: Spectre COSY H-H du composé Si2

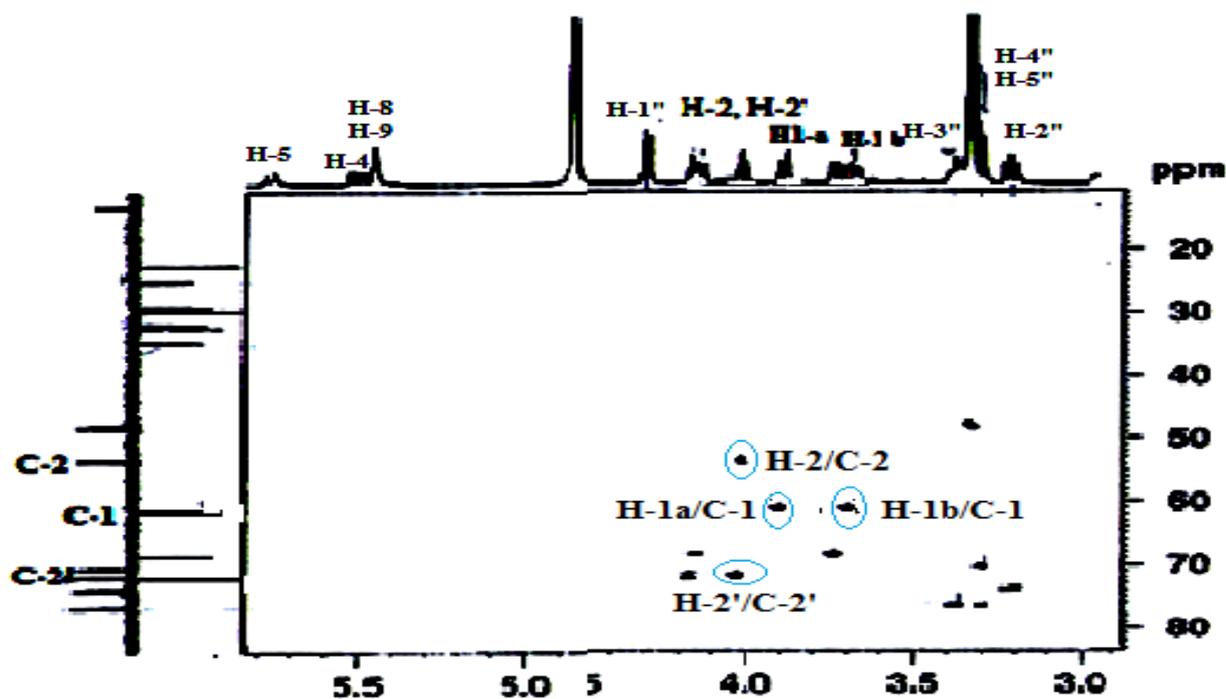


Figure 20: Spectre HSQC *J*-modulé du composé Si2

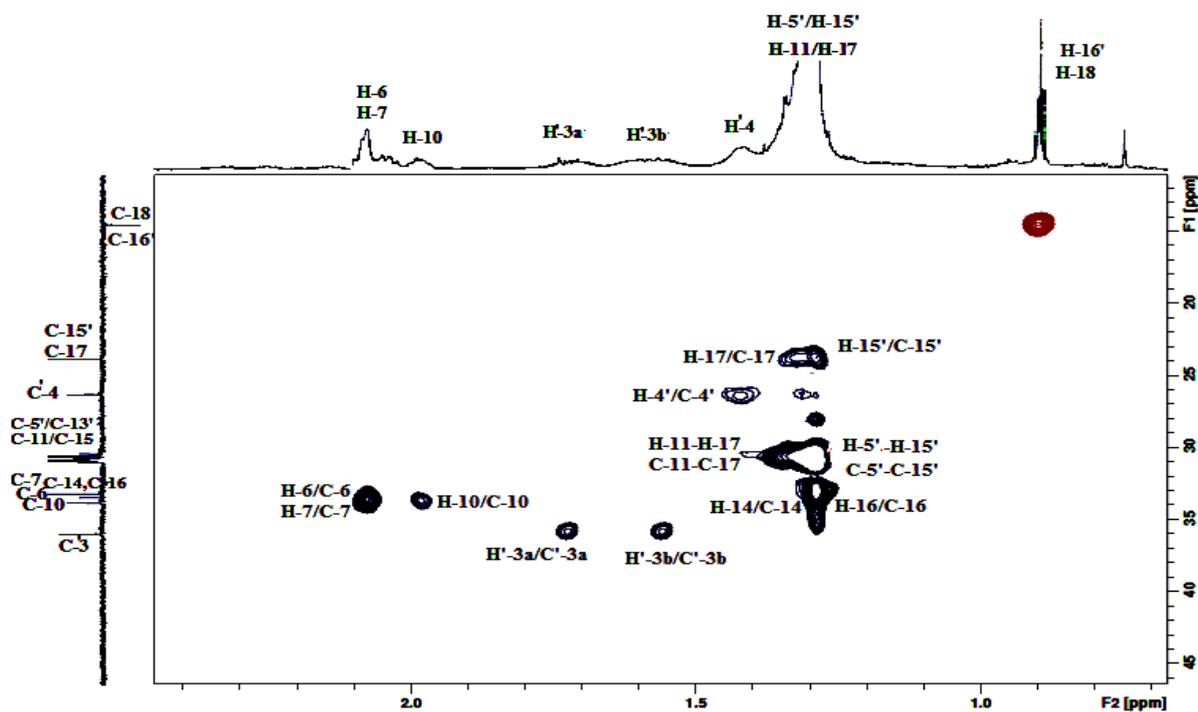


Figure 21 : Spectre HSQC *J*-modulé des chaînes lipidiques

Toutes ces attributions sont confirmées par analyse HMBC (Figure 23). En effet, il est observé les corrélations entre les protons H-2, H-3 et les carbones C-1 et C-4 préalablement

identifiés, les protons H-4, H-5 et les carbones C-3 et C-6, les protons H-7 et H-10 avec les carbones C-8 et C-9.

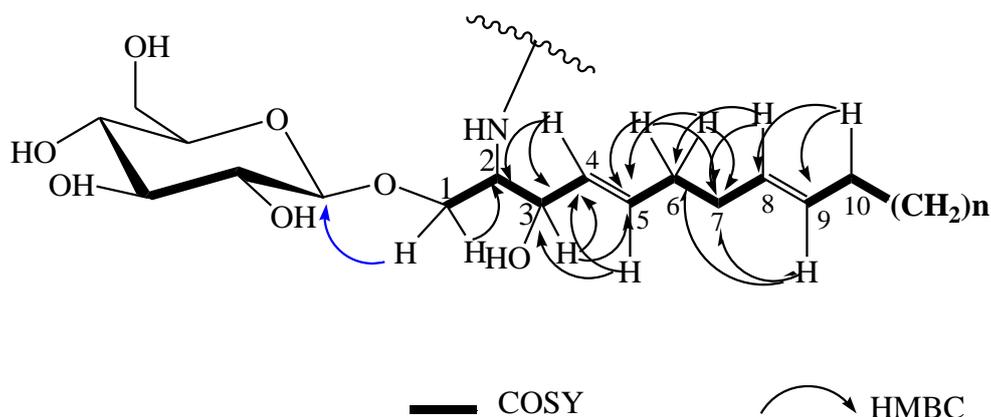


Figure 22: Corrélations importantes HMBC et COSY du composé Si2

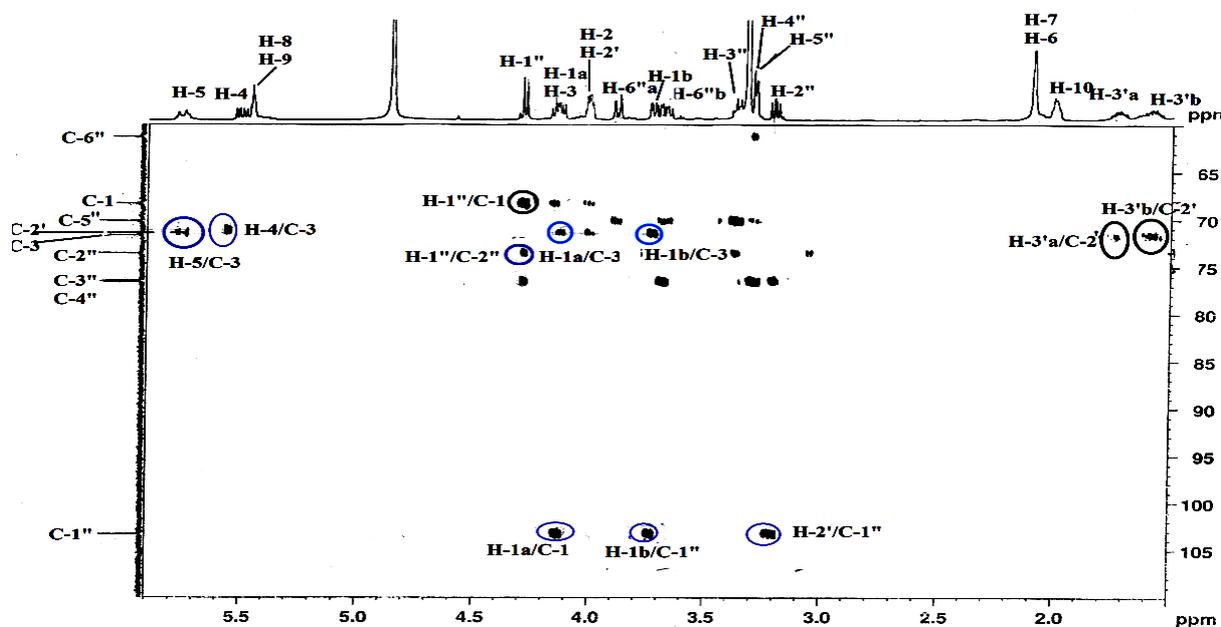


Figure 23 : Spectre HMBC du composé Si2

D'autre part, le spectre COSY H-H (Figure 19) montre une corrélation entre un proton oxyméthine nommé H-2' résonant à 3,90 ppm (1H, *dd*, $J = 7,2$ et $3,6$ Hz) de même déplacement chimique que le proton H-2 de la première chaîne, et 2 protons méthyléniques multiplets nommés H-3'b et H-3'a résonant à 1,58 et 1,73 ppm respectivement. Ces protons (H-2' et H-3') montrent clairement sur le spectre HMBC (Figure 25) des corrélations longue distance avec un carbone résonant à δ_C 178,8 caractéristique d'un groupement carbonyle mettant en évidence la présence d'une seconde chaîne amide d'acide gras saturé. Le spectre de masse (Figure 17) qui présente un pic de fragmentation de 482 uma [M-255], traduit ainsi

la perte d'un fragment de 255 uma correspondant au groupement 2-hydroxypalmitoyle. Ceci nous permet d'identifier sans ambiguïté la longueur de la deuxième chaîne aliphatique constituée donc de 8 CH₂. La configuration relative au niveau des carbones C-2(S), C-3 (R) et C-2' (S) a été établie sur la base des données spectrales RMN ¹³C en plein accord avec les données de la littérature [35].

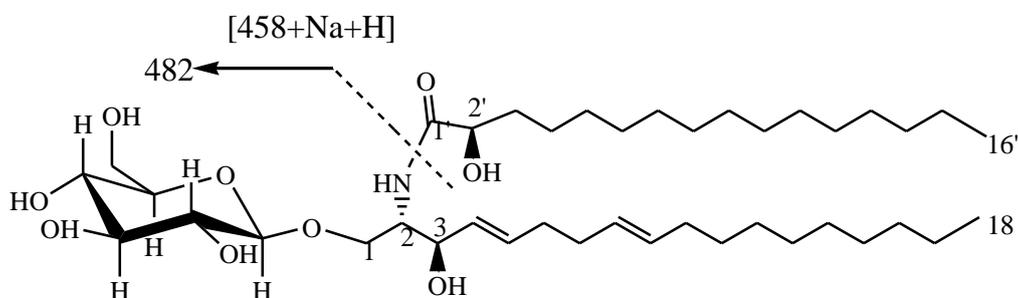


Figure 24: Fragmentations du composé Si2

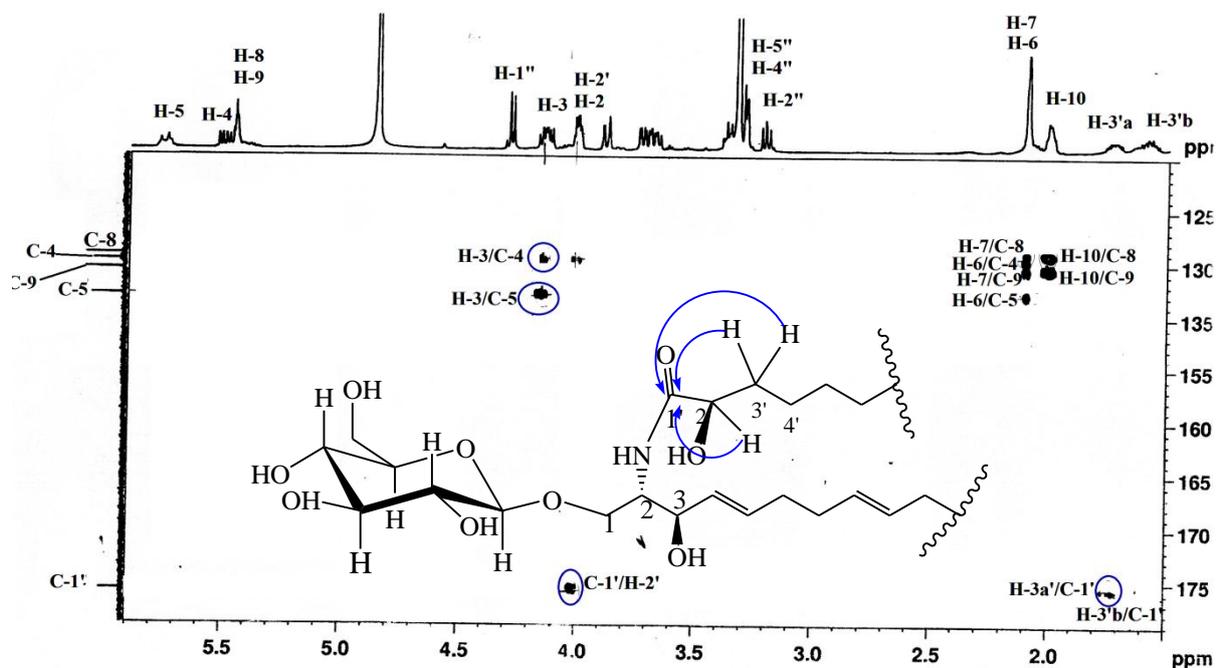


Figure 25 : Spectre HMBC du composé Si2

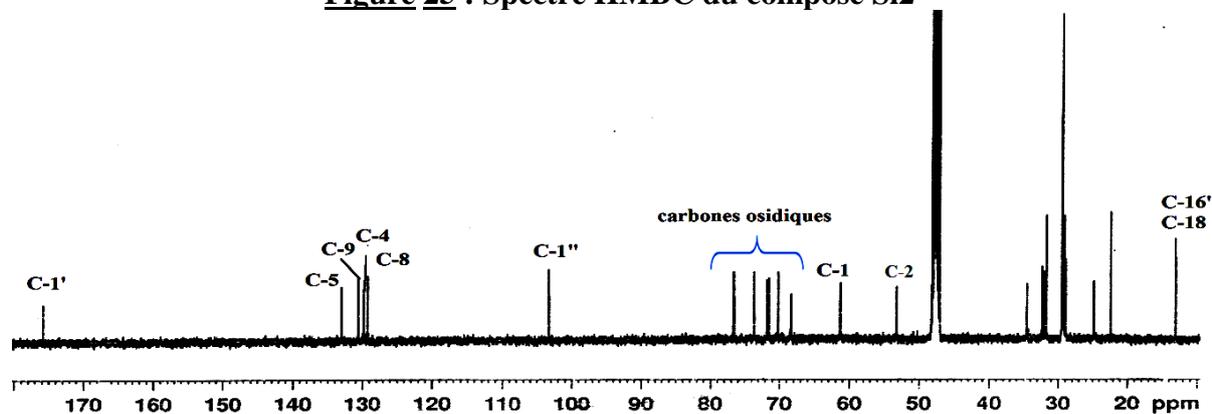


Figure 26: Spectre RMN ¹³C du composé Si2

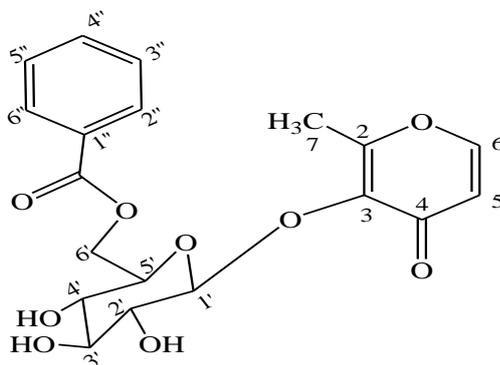
Toute cette analyse ainsi que les données spectrales établies au moyen des spectres RMH ^1H (Figure 18), RMN ^{13}C (Figure 26), COSY H-H (Figure 19), HSQC *J*-modulé (Figures 20 et 21) et HMBC (Figures 23 et 25), la valeur du pouvoir rotatoire mesuré dans le mélange chloroforme/méthanol ($[\alpha]_{\text{D}} = + 5,1^\circ$, $\text{C} = 0,60 \text{ g}/100 \text{ ml}$) ainsi que la comparaison avec les données de la littérature, permettent d'attribuer sans ambiguïté pour le composé Si2 la structure suivante : 1-*O*- β -D-glucopyranosyl-2-*N*-2'-*S*-hydroxy-palmitoyl-2*S*,3*R*,4(*E*),8(*E*)-octadecasphingadiénine. Ce composé est connu sous le nom de Soyacérébroside I, isolé précédemment de *Dimocarpus fumatus* (Sapindaceae) [35] et *Cucumis sativus* L. (Cucurbitaceae) [36]. Il est décrit pour la première fois dans le genre *Silene*.

C	δ_{C}	δ_{H} J Hz
1	68,9	3,74 <i>dd</i> H-1b (3,5 ; 10,3) 4,13 <i>dd</i> H-1a (5,5 ; 10,3)
2	53,2	3,90 <i>dd</i> (3,6; 7,2)
3	71,4	4,17 <i>t</i> 7,2
4	129,7	5,51 <i>dd</i> 7,3-15,3
5	133,0	5,76 <i>m</i>
6	32,2	2,10 <i>sl</i>
7	32,3	2,10 <i>sl</i>
8	129,2	5,45 <i>t</i> 4,8
9	130,6	5,45 <i>t</i> 4,8
10	31,9	2,01 <i>m</i>
11-15	28,8-29,4	1,28-1,40 <i>m</i>
16	31,6	1,28-1,40 <i>m</i>
17	22,3	1,28-1,40 <i>m</i>
18	13,0	0,93 <i>t</i> 7,1
NH	-	-
1'	175,8	-
2'	71,7	3,90 <i>dd</i> (3,6; 7,2)
3'	34,4	1,58 <i>m</i> H-3'b 1,73 <i>m</i> H-3'a
4'	24,7	1,44 <i>m</i>
5'-13'	28,8-29,4	1,28-1,40 <i>m</i>
14'	31,6	1,28-1,40 <i>m</i>
15'	22,3	1,28-1,40 <i>m</i>
16'	13,0	0,93 <i>t</i> 7,1
1''	103,3	4,30 <i>d</i> 7,8

2''	73,6	3,31 <i>dd</i> (7,8 ; 9,1)
3''	76,5	3,38 <i>t</i> 9,1
4''	76,5	3,30 <i>nd</i>
5''	68,3	3,30 <i>m</i>
6''	61,2	3,68 <i>m</i>
		3,89 <i>d</i> 11,8

Tableau 5 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **Si2** (CD_3OD).

III.4.4-3- Détermination structurale du composé **Si3**



maltol 3-O-[6-O-benzoyl]-β-D-glucopyranoside

Le composé **Si3** est obtenu sous forme de cristaux incolores. Il présente une formule moléculaire en $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_9$. Formule déterminée grâce au spectre de masse ESI-MS (Figure 27) enregistré en mode positif, qui montre un ion pseudomoléculaire m/z 415 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, correspondant à une masse moléculaire égale à 392 uma.

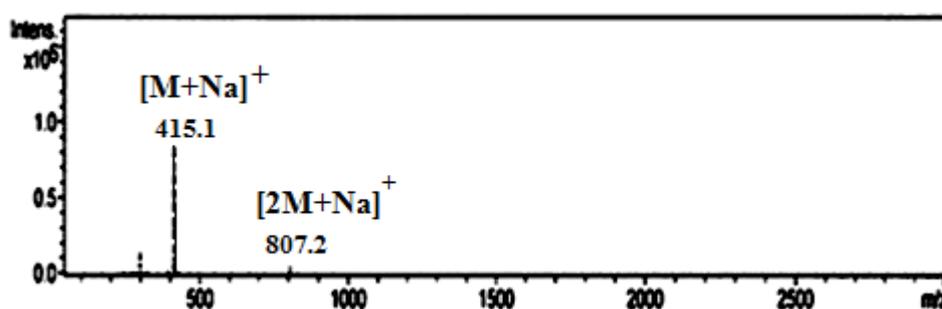


Figure 27 : Spectre de masse ESI (mode positif) du composé **Si3**

Le spectre UV effectué dans le méthanol permet d'observer deux bandes d'absorption à 255 et 206 nm, très caractéristiques d'un groupement pyrone [37]

Le spectre IR montre notamment des bandes d'absorption à 1657 cm^{-1} (groupement carbonyle conjugué) et $1587\text{-}1615\text{ cm}^{-1}$ ($\text{C}=\text{C}$ double liaison).

Le spectre RMN ^1H (500 Hz, CD_3OD) (Figure 28) permet de mettre en évidence la présence des signaux à champ faible allant de 7,45 à 7,94 ppm d'intégration 5H de protons aromatiques. En outre, l'observation de signaux entre 3,28 et 4,51 ppm et d'un signal doublet de proton anomère (d , $J = 7,9$ Hz, 1H) localisé à 4,89 ppm suggère l'existence d'une unité osidique. On repère à 2,27 ppm un signal singulet (s , 3H) de protons méthyliques.

Par ailleurs les deux signaux doublets d'intégration 1H chacun observés à 6,30 ppm (1H, $J = 5,3$ Hz) et 7,80 ppm (1H, $J = 5,3$ Hz) et corrélant en HMBC (Figure 30) avec un carbone d'un carbonyle à 177 ppm sont caractéristiques de protons oléfiniques vicinaux pouvant faire partie du groupement pyrone cité précédemment. La présence de ce groupement pyrone, plus précisément γ -pyrone, est en outre attesté par analyse HMBC (Figure 30) du fait des corrélations observées entre le proton oléfinique nommé H-5 (6,30 ppm, 1H, d , 5,3 Hz) et un carbone quaternaire oxygéné à 164,5 ppm d'une part, le proton oléfinique vicinal H-6 (7,82 ppm, 1H, d , 5,3 Hz) et un autre carbone quaternaire plus blindé à 143,6 ppm d'autre part en raison de sa substitution par un groupement méthyle décrit plus haut. Cette substitution confirmée par HMBC permet d'identifier le squelette γ -pyrone ou maltol. A noter que ce noyau a été antérieurement décrit dans la famille Caryophyllaceae en général (*Dianthus japonicus*). Il a été cité une seule fois dans le genre *Silene* (*S. vulgaris*) [37].

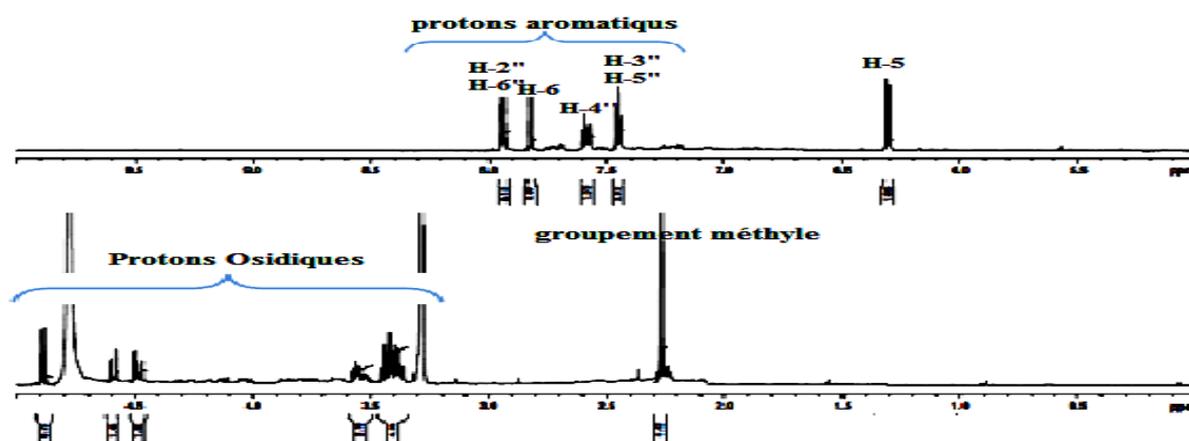


Figure 28 : Spectre RMN ^1H du composé Si3

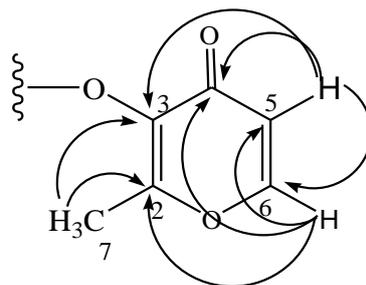


Figure 29 : Corrélations HMBC du groupement pyrone (maltol)

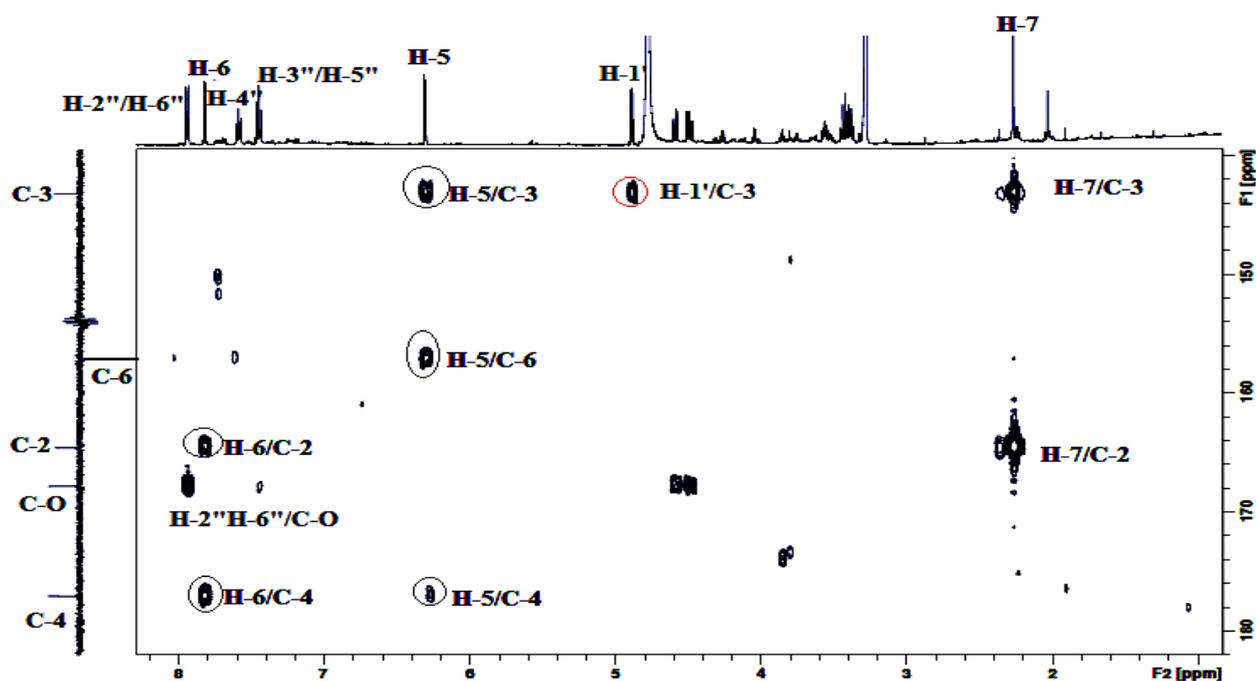


Figure 30: Spectre HMBC du composé Si3

L'unité osidique a été identifiée par expérience COSY H-H (Figure 31). Celle-ci a permis de relier tous les protons d'un hexose. En effet, il est observé les couplages entre :

- Le proton anomère H-1' et le proton H-2' résonant à 3,28 ppm (*t*, 7,9).
- Le proton H-2' et le proton H-3' à 3,46 ppm (*m*, H-3').
- Le proton H-3' et le proton H-4' résonant sous forme d'un triplet à 3,40 ppm (*t*, $J = 8,7$ Hz, H-4').
- Le proton H-4' et le proton H-5' repéré à 3,57 ppm. Ce dernier couple avec deux autres protons résonant sous forme de doublet de doublet chacun à 4,47 ppm (*dd*, $J = 6,7$ et 11,8 Hz) et 4,59 ppm (*dd*, $J = 2,4$ et 11,8 Hz), correspondant respectivement aux protons H-6'a et H-6'b. Le déblindage de ces derniers indiquent une acylation à ce niveau.

Les grandes valeurs de constantes de couplages indiquent qu'il s'agit donc d'un glucose de configuration β au regard de la constante de couplage $J_{1'-2} = 7,9$ Hz.

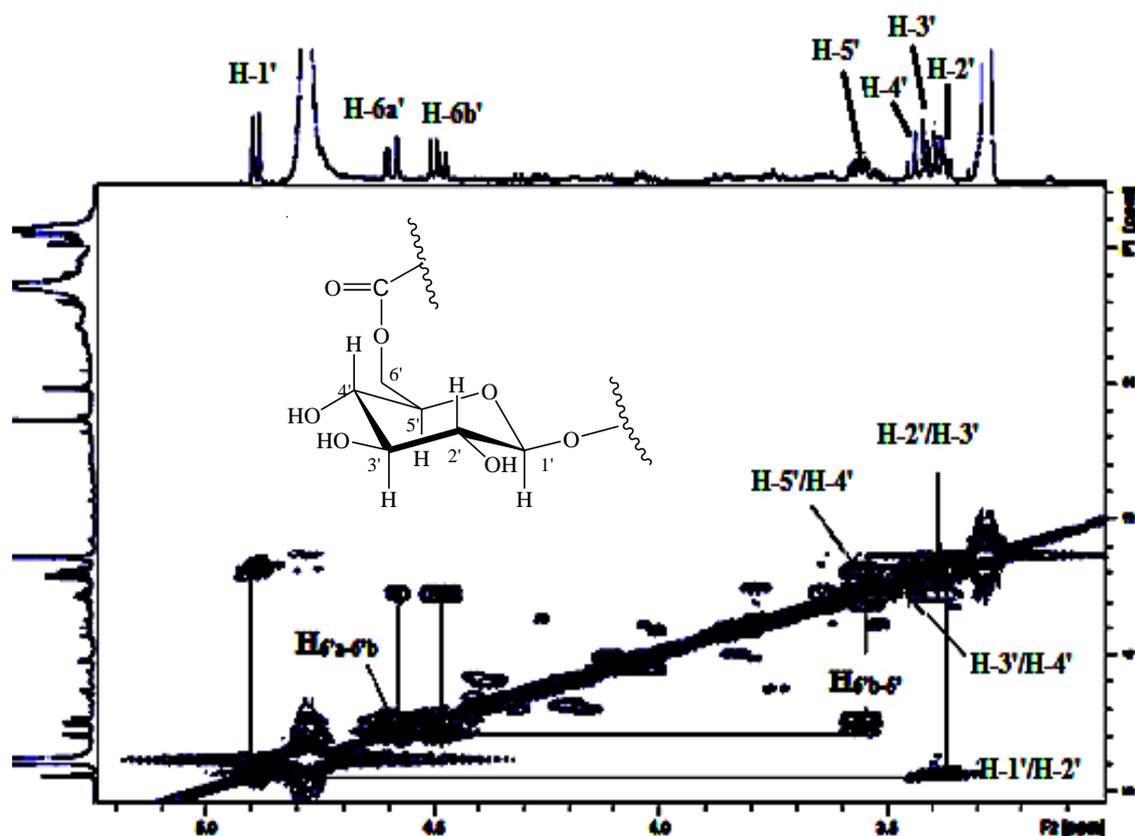


Figure 31: Spectre COSY H-H (partie osidique) du composé Si3

L'expérience COSY H-H (Figure 32) du composé Si3 indique également la présence de protons aromatiques résonant à δ_H 7,94 (*dd*, $J = 1,2$ et $8,8$ Hz, 2H), 7,59 (*t*, $J = 7,8$ Hz, 2H) et 7,45 (*td*, $J = 1,2$ et $7,8$ Hz, 1H) appartenant à un même système de spin et constituant un noyau aromatique monosubstitué estérifiant le glucose identifié précédemment en position C-6. Ceci est confirmé par l'analyse HMBC (Figure 33) qui montre un couplage hétéronucléaire en 3J entre les protons H-6 du glucose et le carbone d'un carbonyle sortant à 167,8 ppm, lui-même couplant avec les protons aromatiques H-2"/H-6" (Figure 33).

Enfin un ultime couplage hétéronucléaire observé entre le proton anomère H-1' du glucose (1H, *d*, $J = 7,9$ Hz) et le carbone quaternaire C-3 (164,5 ppm) du noyau maltol confirmant la substitution du sucre en cette position, permet de suggérer la structure suivante pour notre composé Si3 : maltol 3-*O*-[6-*O*-benzoyl]- β -D-glucopyranoside.

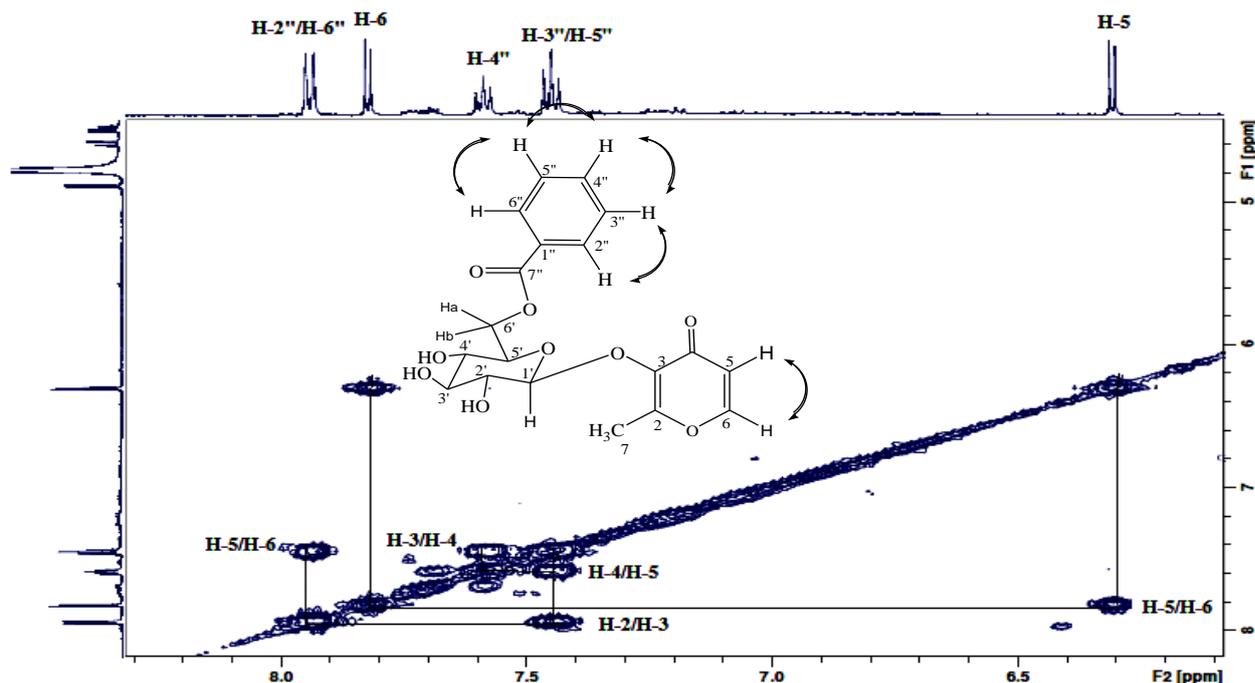


Figure 32 : Spectre COSY H-H de la partie benzoyle du composé Si3

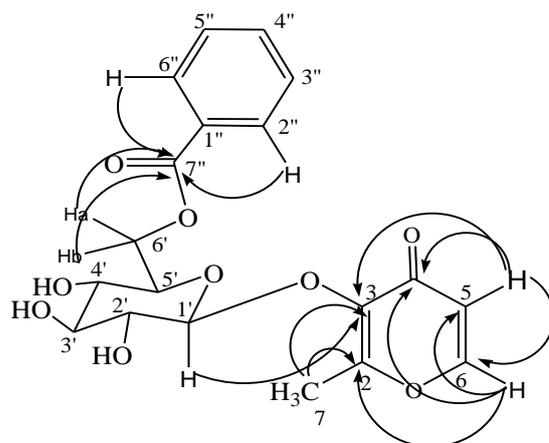


Figure 33: Corrélations HMBC du composé Si3

Tous les déplacements chimiques des protons et carbones (Tableau 6) déterminés conjointement par les expériences RMN ^1H (Figure 28), RMN ^{13}C (Figure 34), COSY H-H (Figure 32), HSQC (Figure 35) et HMBC (Figure 30) ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_{\text{D}} = -13^\circ$, $C = 0,3 \text{ g}/100 \text{ ml}$, MeOH), permettent d'identifier le composé Si3 au maltol 3-*O*-[6-*O*-benzoyl]- β -D-glucopyranoside. Ce dernier a été isolé récemment de l'espèce *Dianthus japonicus* (Caryophyllaceae) [38]. Il apparaît ainsi que ce composé a été décrit pour

la première fois dans le genre *Silene*. Le tableau 6 reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **Si3**.

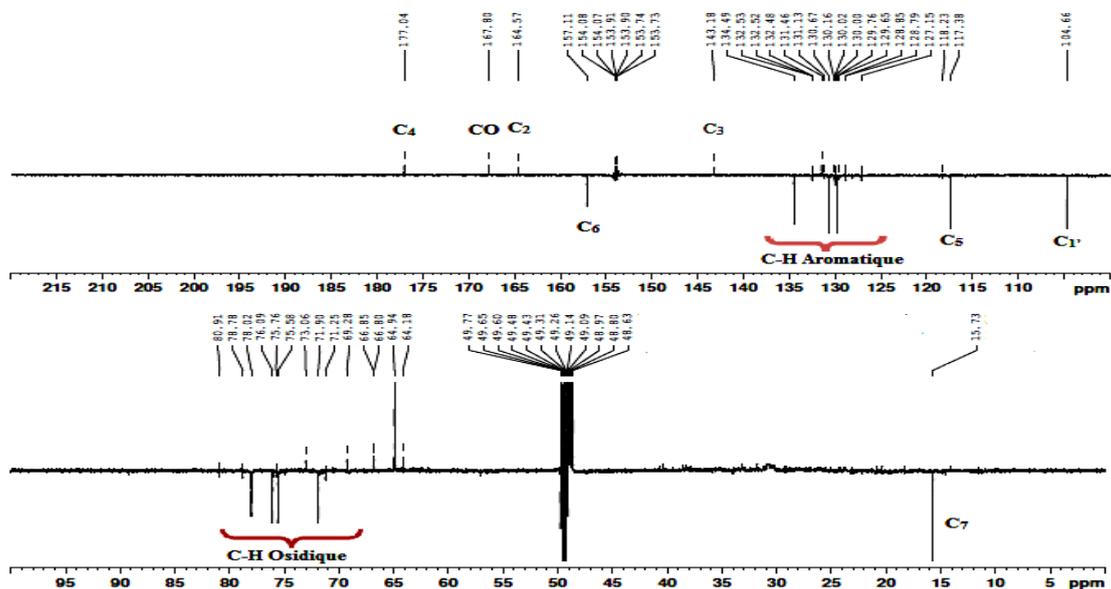


Figure 34: Spectre J-modulé du composé **Si3**

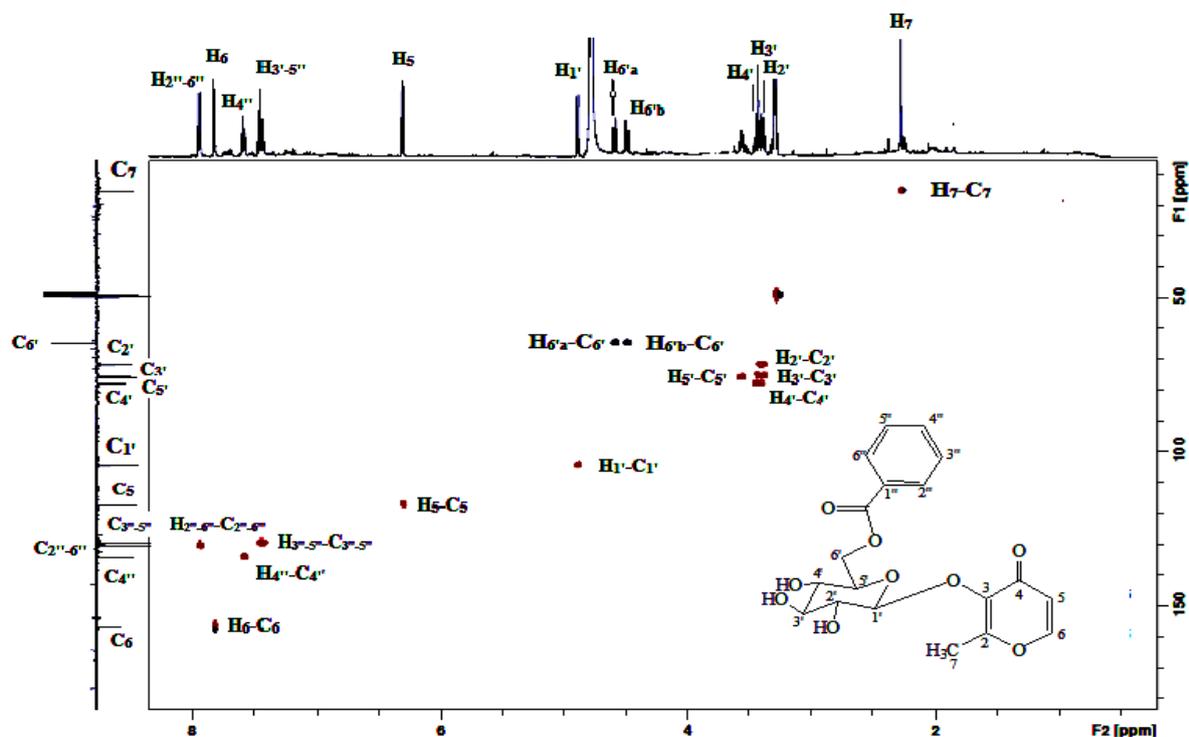


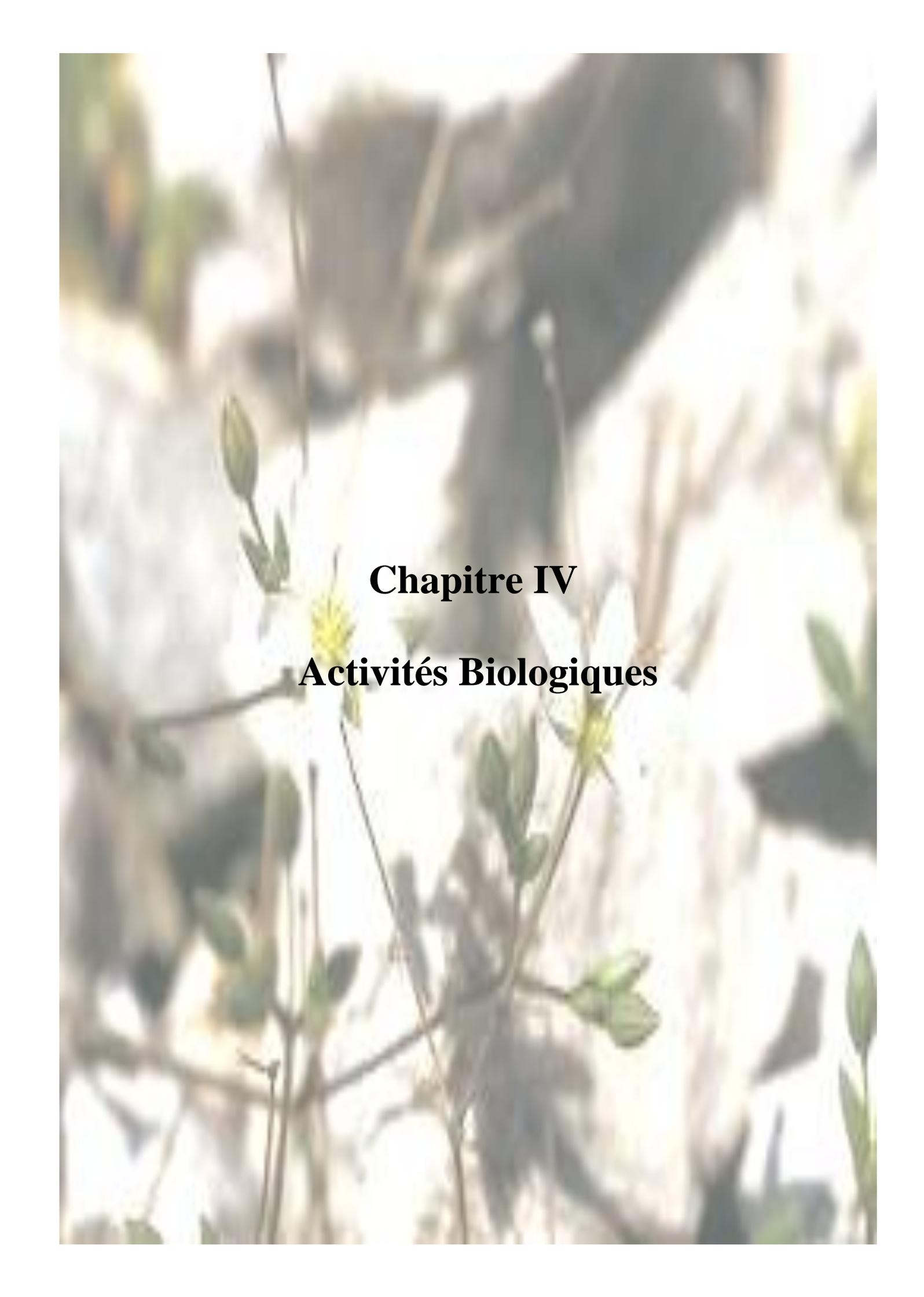
Figure 35: Spectre HSQC du composé **Si3**

C	δ_C	δ_H J Hz
2	164,5	-
3	143,1	-
4	177,0	-
5	117,3	6,30 <i>d</i> 5,3
6	157,1	7,82 <i>d</i> 5,3
7	15,7	2,27 <i>s</i>
1'	104,6	4,89 <i>d</i> 7,9
2'	75,5	3,28 <i>t</i> 7,9
3'	78,0	3,46 <i>m</i>
4'	71,9	3,40 <i>t</i> 8,7
5'	76,0	3,57 <i>m</i>
6'	64,9	4,47 <i>dd</i> H-6'b (6,7; 11,8) 4,59 <i>dd</i> H-6'a (2,4; 11,8)
1''	132,5	-
2''-6''	130,6	7,94 <i>dd</i> (1,2; 8,5)
3''-5''	129,6	7,45 <i>t</i> 7,8
4''	134,4	7,59 <i>td</i> (1,2; 7,8)
CO	167,8	-

Tableau 6: Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **Si3**
(CD_3OD)

Conclusion

L'étude chimique de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Silene arenarioides* Desf., plante appartenant à la famille Caryophyllaceae riche en ecdystéroïdes et saponines, a abouti à l'isolement et la caractérisation de trois produits naturels constitués d'une saponine stéroïdique **Si1**, d'un glycolipide **Si2** connu sous le nom de soyacérébroside I et d'un maltol glucoside **Si3**. Les deux derniers composés ont été isolés pour la première fois dans le genre *Silene*. un nombre non négligeable de saponosides triterpéniques à squelette oléanane ont été isolées mais dans leur forme brute qu'il a été impossible de séparer. L'usage de la chromatographie liquide haute performance HPLC s'avère incontournable.

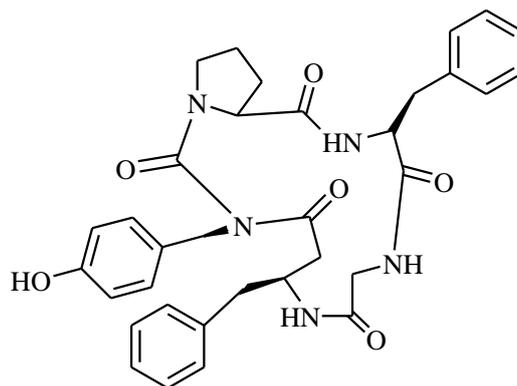


Chapitre IV

Activités Biologiques

IV.1- Introduction

Les plantes Caryophyllaceae, à l'instar des plantes de bon nombre de familles, renferment des métabolites secondaires dotés de diverses activités biologiques, anticancéreuses, antimicrobiennes, antifongiques, antivirales etc... Nous citerons pour exemple la Longicolycine A, peptide cyclique isolé de *Dianthus superbus* Var., plante médicinale chinoise appartenant justement à la même famille Caryophyllaceae et dont le genre est très proche morphologiquement du genre *Silene*.

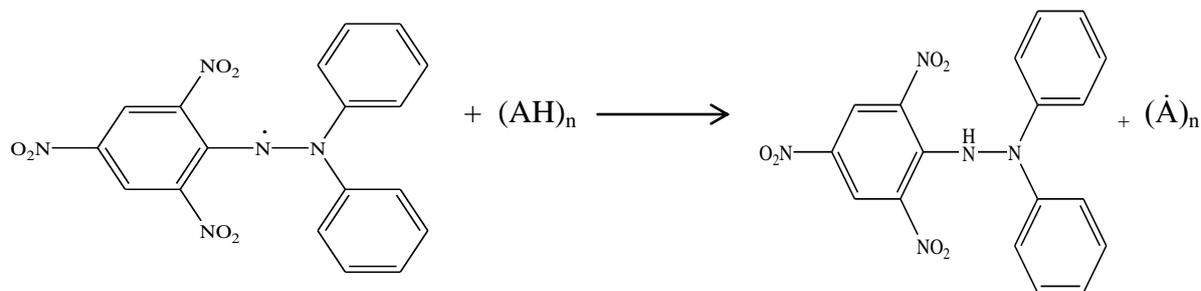


Longicolycine A

Par ailleurs, l'extrait chloroformique de *Silene multifida* (Adams) Rohrb. (Caryophyllaceae) a montré des activités antimicrobienne et antifongique jugées intéressantes. Suite à cela et dans le but d'une éventuelle valorisation de *Silene arenarioides*, il a été entrepris une étude biologique pour évaluer les activités antibactérienne et antioxydante des différents extraits, ainsi que le maltol glucoside qui a été isolé et caractérisé.

IV.2- Evaluation de l'activité antioxydante

Pour évaluer l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique, nous avons utilisé la méthode du DPPH (1,1-diphényl-di-picrylhydrazyl), radical libre stable de couleur violette en solution et présentant une absorbance caractéristique à 517 nm. Cette couleur disparaît rapidement lorsque le DPPH est réduit en diphényle picryl-hydrazine par un composé à propriété antiradicalaire, entraînant ainsi une décoloration (l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans un milieu à donneur de protons). On peut résumer la réaction sous la forme suivante :



Diphenylpicrylhydrazyl (radical libre)

Diphenylpicrylhydrazyl (non radical)

(AH)_n représente un composé capable de céder un hydrogène au radical DPPH (violet) pour le transformer en diphenyl picryl hydrazine (jaune). Ceci permet de suivre la cinétique de décoloration à 517 nm.

Les échantillons ont été préparés par dissolution dans MeOH à raison de 50 µg/ml. Ces solutions, dites solutions mères, ont subi ensuite des dilutions pour avoir les concentrations suivantes : 5, 10, 15, 25, 30, 40 et 50 µg/ml. Le test s'effectue en mélangeant 900 µl de la solution précédente de DPPH avec 100 µl d'échantillon à différentes concentrations. L'antioxydant de référence, en l'occurrence l'acide ascorbique, a été aussi préparé selon la méthode de Leitao [39].

La mesure de la variation de l'absorbance a été faite 30 min après l'introduction des cuves dans le spectrophotomètre UV. Les valeurs obtenues sont transformées ensuite en pourcentages d'inhibition en utilisant la formule suivante :

$$A\% = 100 \times (A_{\text{témoin}} - A_{\text{test}}) / A_{\text{témoin}}$$

$A_{\text{témoin}}$ est l'absorbance du témoin (contenant tous les réactifs sans le produit à tester), A_{test} étant l'absorbance du test.

Le graphe de la variation du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait méthanolique, le seul qui a été soumis à l'évaluation de l'activité antioxydante, permet de déterminer le IC₅₀ (autrement appelée EC₅₀, concentration correspondant à 50 % d'inhibition et qui constitue l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique). Cette valeur est comparée à celle trouvée pour le composé de référence.

L'expérience a été effectuée dans un spectrophotomètre UV/visible monochromatique (Littrow 1200 lignes/mm par palier) à la longueur d'onde de 517 nm.

IV.3- Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des extraits MeOH, AcOEt et Ep, en plus du produit **Si3** a été déterminée par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Trois souches bactériennes ont été testées : à Gram négatif, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* et à Gram positif, *Staphylococcus aureus*.

Il est établi qu'un certain nombre de bacilles à Gram négatif se comportent comme des bactéries opportunistes et sont souvent à l'origine d'infections nosocomiales. Il s'agit souvent de bactéries résistantes à de nombreux antibiotiques. Une des plus redoutables est *Pseudomonas aeruginosa* [40].

Escherichia coli (bacille à Gram négatif) est la bactérie la plus fréquemment impliquée dans les infections urinaires. Elle peut aussi provoquer des diarrhées par des mécanismes très divers, ainsi que diverses infections communautaires ou nosocomiales [41].

Les staphylocoques sont des cocci à Gram positif qui tendent à se grouper en amas. L'espèce *Staphylococcus aureus*, tient une place très importante dans les infections communautaires et nosocomiales [42].

Le principe de cette méthode est d'utiliser des disques de papier Whatmann de 6 mm de diamètre. Les disques ont été imprégnés dans différentes solutions (1g/ml) d'extraits dissous dans le DMSO. Un disque imbibé par le DMSO a été employé en tant que contrôle négatif. Les disques sont ensuite déposés à la surface d'un milieu écouvillonné par une suspension microbienne d'une densité optique de 0,5 McFarland. Nous avons utilisé pour les souches bactériennes le milieu Muller Hinton. A la fin de la durée d'incubation (18 - 24 h pour les souches bactériennes à 37°C) en atmosphère normale, l'activité antimicrobienne a été déterminée à l'aide d'une règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

IV.4- Résultats et discussion

IV.4.1- Activité antioxydante

La mesure de l'absorbance (ou densité optique DO) a été effectuée par spectrophotométrie à 517 nm. A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé les pourcentages d'inhibition en utilisant la formule donnée auparavant. Les valeurs obtenues ont permis de tracer la courbe (Figure 37) qui représente la variation du pourcentage d'inhibition en fonction des concentrations de l'extrait méthanolique. Nous avons déterminé graphiquement la concentration correspondant à 50 % d'inhibition (IC₅₀), qui constitue l'activité antioxydante de l'extrait méthanolique étudié. Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, deux autres paramètres sont introduits :

- Calcul de l'EC₅₀ qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel [concentration effective à 50%, EC₅₀= (IC₅₀/mg de DPPH/ml)].

- Calcul du pouvoir antiradicalaire (APR) qui est inversement proportionnel à l'EC₅₀.

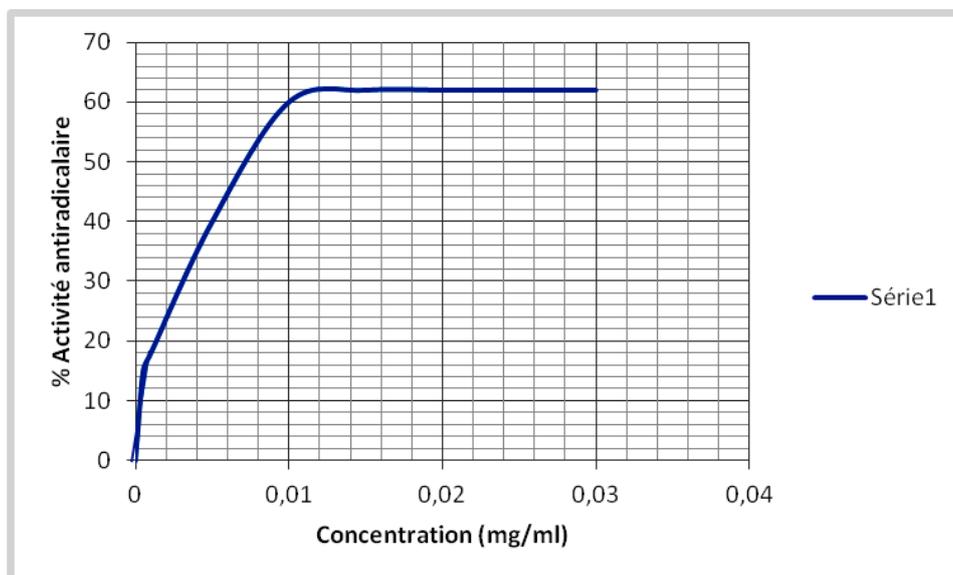


Figure 36 : Activité antiradicalaire des standards l'acide ascorbique (chaque valeur représente la moyenne de trois essais)

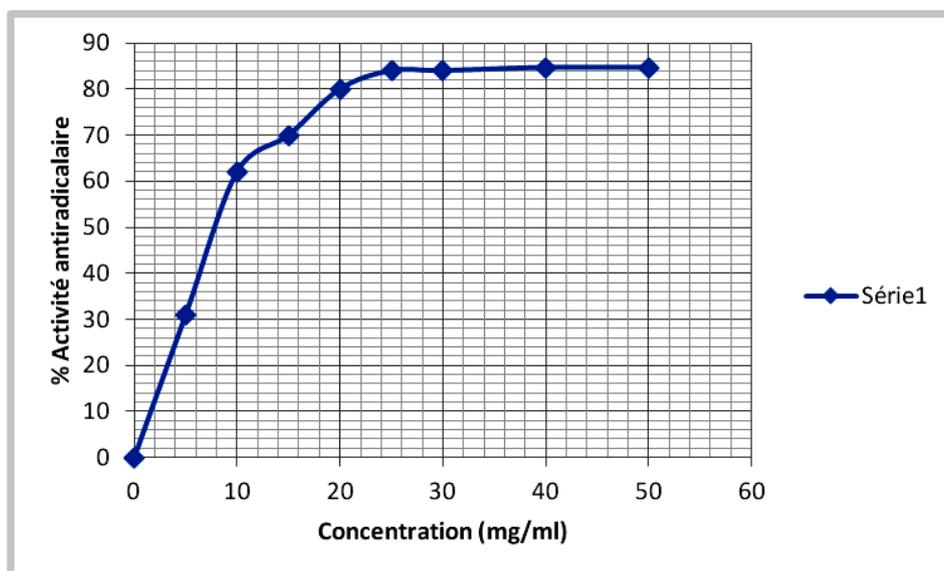


Figure 37 : Activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique (chaque valeur représente la moyenne de trois essais).

L'activité antioxydante de notre extrait est exprimée en IC₅₀. Ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats. Il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité de DPPH (couleur). La valeur de l'IC₅₀ est déterminée graphiquement à partir des trois essais. L'abscisse

représente la concentration de l'extrait brut et l'ordonnée, le pourcentage de l'activité antioxydante. La valeur de chaque IC_{50} exprime la concentration de l'extrait exigée pour réduire 50% de DPPH en solution.

Par ailleurs, en comparaison avec l'antioxydant standard (l'acide ascorbique) qui présente une valeur d' IC_{50} de 6,5 $\mu\text{g/ml}$ et d'APR de 5,74, l'extrait méthanolique de notre plante indique une valeur d' IC_{50} égale 42,34 $\mu\text{g/ml}$, une valeur d' EC_{50} de 1,085 $\mu\text{g/ml}$ et d'APR de 0,92. Il est à signaler que plus les valeurs d'APR ne tendent pas vers zéro et s'en éloignent plutôt, plus la puissance antioxydante augmente. Par conséquent, on peut dire que l'extrait méthanolique de *S. arenarioides* présente une activité antioxydante. De plus, la valeur du pouvoir antioxydant de l'ordre de 0,92 montre clairement que l'extrait méthanolique est doté d'une importante efficacité réductrice du radical DPPH, étant uniquement 5 fois moins actif que l'antioxydant standard. Il est évident que la forte activité de l'extrait MeOH pourrait être due à sa richesse en composés phénoliques et saponines [39].

IV.4.2- Activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des différents extraits de *Silene arenarioides* Desf. a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, en mesurant les diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne.



Zones d'inhibition des extraits sur *Pseudomonas aeruginosa*



Zones d'inhibition des extraits sur *Escherichia coli*



Zones d'inhibition des extraits sur *Staph. aureus*

L'activité antimicrobienne obtenue par la mesure des diamètres des zones d'inhibition de la croissance microbienne autour des disques, est représentée dans le tableau 7 ci-après.

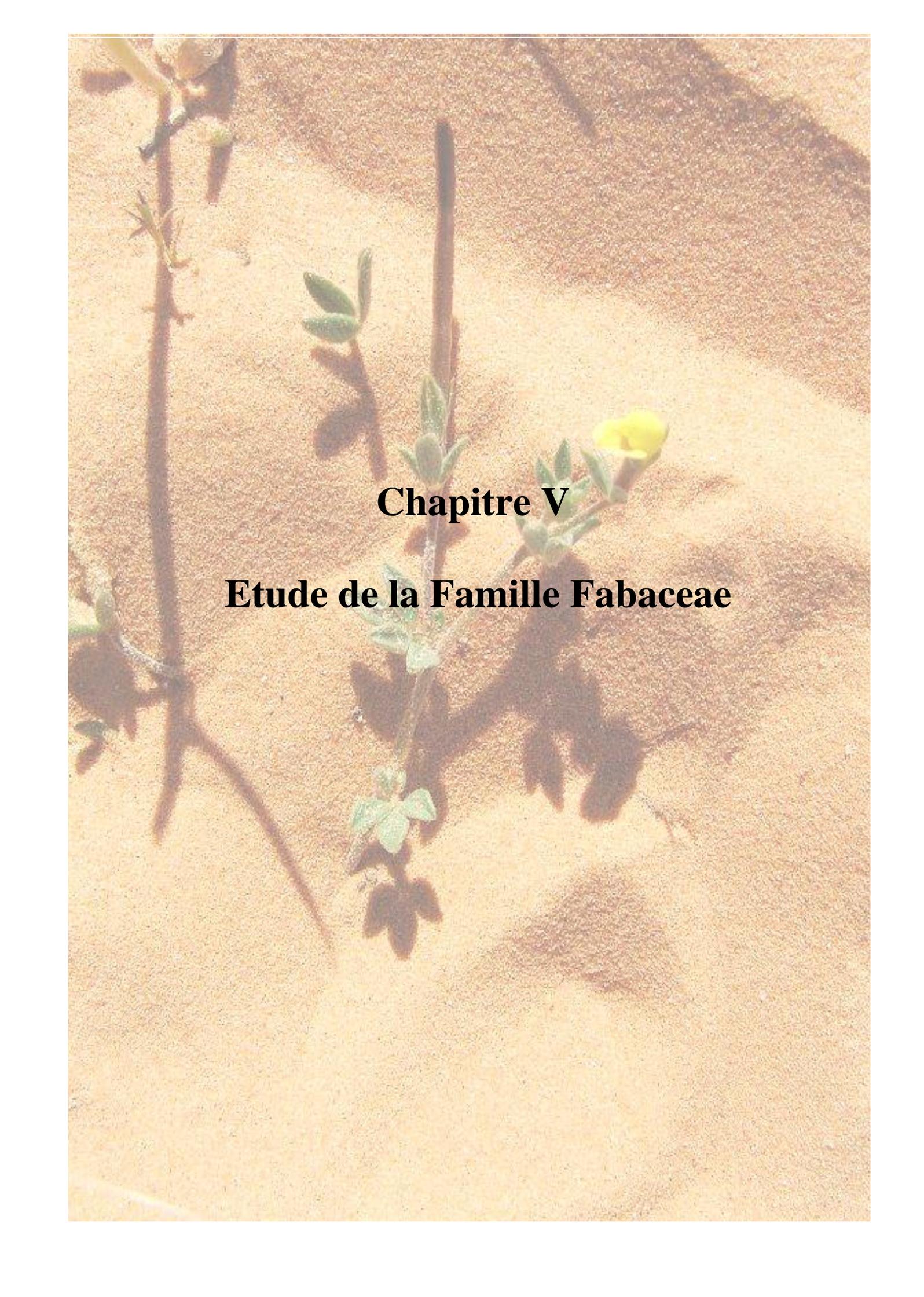
Extraits	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
EP	-	+	-
AcOEt	+	+++	++
MeOH	+++	++	+++
C	-	+	+++

Tableau 7 : Activités antimicrobiennes des divers extraits

La sensibilité aux extraits a été classée par le diamètre des zones d'inhibition [43] comme suit :

- Non sensible (-) pour un diamètre inférieur à 8 mm.
- Sensible (+) pour un diamètre de 9 à 14 mm.
- Très sensible (+ +) pour les 15-19 mm de diamètre.
- Extrêmement sensible (+++) pour un diamètre supérieur à 20 mm.

Selon les résultats mentionnés dans le tableau 7, nous n'avons détecté aucune résistance et aucune zone d'inhibition au niveau de l'extrait étheropétrolique contre toutes les souches microbiennes. La seule zone mesurée contre *Escherichia coli* est extrêmement faible (9 mm). L'extrait AcOEt montre une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus* (13 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* (16 mm), de même qu'une forte activité contre *Escherichia coli* (21 mm). Par contre, l'extrait méthanolique de *Silene arenarioides* Desf. inhibe fortement la croissance de tous les types de bactéries *Escherichia coli* (18 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (22 mm) et *Staphylococcus aureus* (24 mm). La souche bactérienne *S. aureus* a présenté une résistance avec le maltol glucoside. Ces résultats montrent ainsi que l'activité antibactérienne varie d'un extrait à un autre et d'un germe à l'autre.



Chapitre V

Etude de la Famille Fabaceae

V.1- Famille Fabaceae

La famille Fabaceae ou Leguminosae constitue la troisième famille des angiospermes de par le nombre de ses représentants. Ses plantes ont une distribution quasi cosmopolite et se trouvent dans les zones tropicales, subtropicales ou tempérées [44]. Cette famille s'accommode d'une très large gamme d'habitats et inclut autant de plantes herbacées. Elle compte 18500 espèces classées en 720 –750 genres [45] et constitue avec les céréales, l'épine dorsale du système alimentaire. De nombreuses espèces sont utilisées comme sources protéiques dans l'alimentation humaine (fève, soja, haricot, pois chiche, lentille, etc.) [46].

V.2- Classification systématique et aspects botaniques

La famille Fabaceae est une famille de plantes dicotylédones. Pendant longtemps, elles ont porté le nom de Papilionaceae à cause de la forme particulière de leurs fleurs. De nombreuses légumineuses constituent une source majeure de protéines et huiles végétales [46] et sont largement cultivées sur l'ensemble de la planète. La classification actuelle des angiospermes place les Fabaceae dans l'ordre de Fabales et reconnaît trois sous-familles : Faboideae (Papilionoideae), Caesalpinioideae et Mimosoideae. Les plantes Faboideae sont cosmopolites et se retrouvent presque dans tous les milieux du globe terrestre, alors que les plantes Mimosoideae et Caesalpinioideae sont plutôt tropicales. Bien que le terme Fabaceae soit actuellement préféré dans la nouvelle classification systématique APG (Angiosperm Phylogeny Group), le terme Leguminosae est encore couramment utilisé par certaines catégories de scientifiques. La position systématique des Fabaceae est présentée au tableau 8 suivant.

Classification	APGII (2003)
Règne	Plantae
Embranchement	Spermatophyta
Sous embranchement	Angiospermae
Classe	Eudicotyledonae
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Eurosidae I
Sous-ordre	Fabales
Famille	Fabaceae (Leguminosae)
Sous-famille	Faboideae
	Mimosoideae
	Caesalpinioideae

Tableau 8 : Phylogénie de la famille Fabaceae (Leguminosae) (APG II, 2003)

La famille Fabaceae étant extrêmement vaste, nous allons nous intéresser pour la suite de la discussion, plus particulièrement à la sous-famille Faboideae qui est la plus importante de la famille. En effet, elle compte plus de 300 genres, dont une vingtaine représente la flore saharienne [1]. Les caractères morphologiques principaux des Faboideae sont les suivants :

- **Feuilles** : rarement simples, formées de plusieurs folioles (généralement au nombre de trois).
- **Fleurs** : de type « papilionacé », corolle est plus nettement irrégulière, les deux pétales inférieurs sont soudés en une pièce unique dite *carène*.
- **Fruits** : Gousse ou légume (fruit sec, déhiscent par deux fentes).

V.3- Intérêts économiques et médicaux de la sous-famille Faboideae

Une grande quantité de graines de diverses espèces herbacées de la sous-famille Faboideae, communément appelées légumes secs, sont une source alimentaire universelle autant humaine qu'animale. Ces plantes alimentaires de grande consommation comprennent entre autres *Arachis hypogaea* L., *Cajanus cajan* L., *Cicer arietinum* L., *Dolichos lablab* L., *Glycine max* Merr., *Glycyrrhiza glabra* L. Les jeunes feuilles fermentées et séchées de *Aspalathus linearis* sont utilisées comme une alternative au thé, particulièrement en Afrique du Sud. La consommation de ce thé s'étend actuellement, même en Europe, d'autant plus qu'on leur prête des vertus antioxydantes [47].

Certaines plantes Faboideae font l'objet d'un usage ornemental. Les genres les plus connus sont : *Cytisus*, *Laburnum*, *Lathyrus*, *Lupinus*, *Wisteria* et *Genista*. Ce dernier possède une espèce très utilisée en industrie pour ses propriétés colorantes comme *Genista tinctoria* L. [48]. De nombreuses plantes Faboideae ont joué un rôle important dans l'histoire de l'industrie pharmaceutique, notamment comme source de matière première à l'image de la lécithine de *Glycine max* Merr., présente dans toutes les cellules vivantes et qui est un constituant important des cellules nerveuses et cérébrales. Plusieurs molécules très utilisées en thérapeutique sont extraites de diverses plantes Faboideae. On citera la spartéine, cet alcaloïde ganglioplégique utilisé en cardiologie et en obstétrique, isolé de *Cytisus scoparius* (L.) Link ou la rutine, un flavonoïde utilisé en phlébologie, isolé de *Sophora japonica* L. ou encore la physostigmine issue de *Physostigma venenosum* Balf. Cette dernière qui est un inhibiteur

réversible des cholinestérases, est utilisée comme antidote lors de l'intoxication par les parasympholytiques. Elle est aussi testée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer [49].

V.4- Présentation du genre *Lotus*

Le genre *Lotus*, avec 120-130 espèces, est le plus grand genre de la tribu Loteae [50]. Il est largement distribué autour de la Méditerranée. Ce genre comprend des plantes annuelles et vivaces avec une racine pivotante ramifiée forte Il est représenté en Algérie par 15 espèces : *Lotus conimbricensis* Brot, *L. glinoides* Del, *L. edulis* L, *L. drepanacarpus* Dur, *L. ornithopodioides* L, *L. roudairei* Bonnet, *L. jolyi* Batt, *L. creticus* L, *L. pedunculatus* Cav, *L. palustris* Willd, *L. corniculatus* L, *L. parviflorus* Desf, *L. hispidus* Desf, *L. pusillus* Medik. et *Lotus angustissimus* L [1].

Il possède les caractères suivants :

- Calice à 5 dents presque égales ou à 2 lèvres, ovaire multi ovulé, gousse linéaire déhiscente non ailée sur les sutures.
- Feuilles trifoliées et stipulées.
- Fleurs jaunes, blanchâtres ou rosées.

V.4.1- Toxicité

Les espèces *Lotus jolyi* Batt et *L. arabicus* L. (vesce d'égypte) sont toxiques pour les animaux (chevaux, moutons, chèvres, dromadaires). Plusieurs cas d'intoxication de bétail par *Lotus jolyi* ont été observés au Maroc. Les symptômes de l'intoxication sont les suivants : météorismes, inappétence, immobilité de l'animal [3].

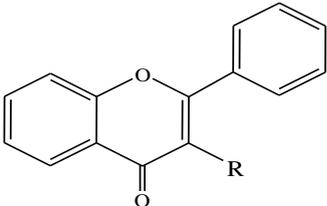
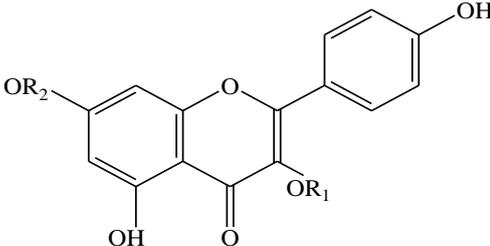
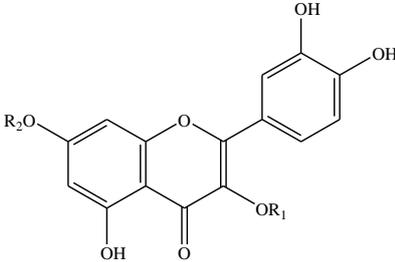
V.4.2- Usage traditionnel

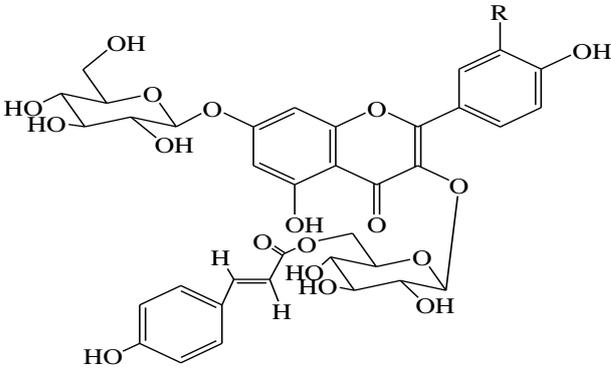
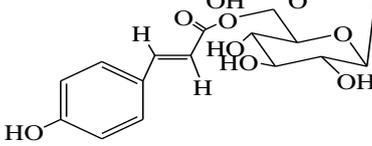
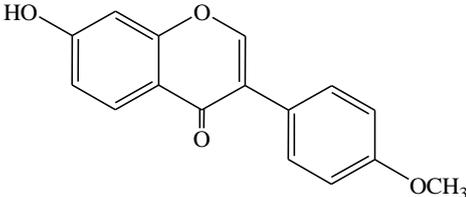
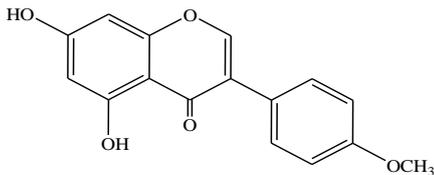
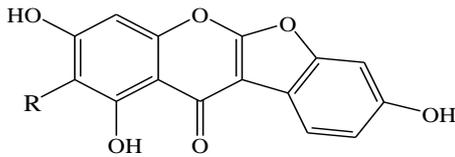
Les espèces appartenant au genre *Lotus* ne sont pas très utilisées en médecine traditionnelle si l'on se réfère à la littérature.

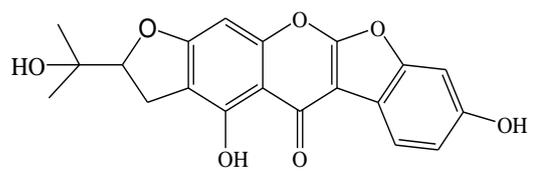
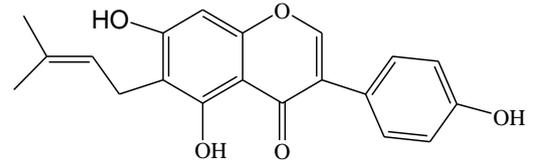
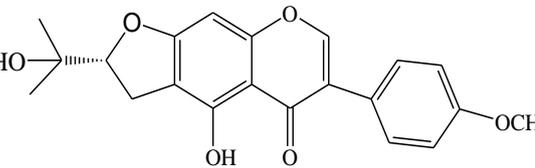
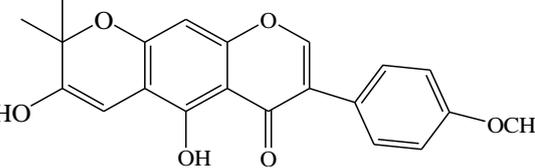
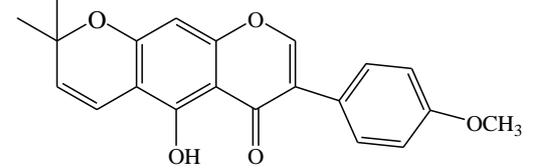
L'espèce *Lotus jolyi* Batt est utilisée, en cataplasmes, avec de l'ail haché et de l'huile d'olive, pour faire pousser les cheveux. Cependant, en phytothérapie, il est connu que *Lotus corniculatus* est un antidépresseur naturel qui agit également sur l'hypertension artérielle et certaines de ses conséquences. Il agit aussi sur la production par le cœur d'une hormone qui augmente la pression artérielle [51].

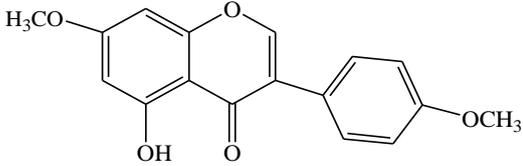
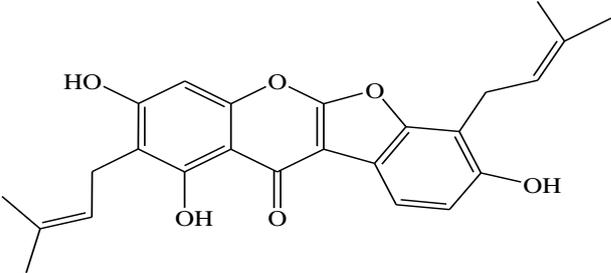
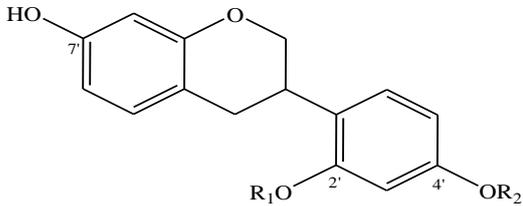
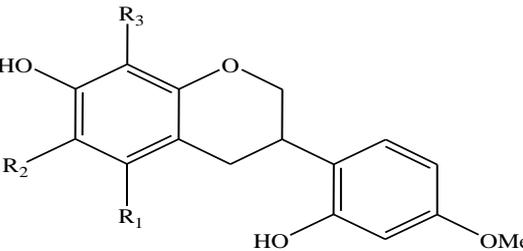
V.5- Principaux métabolites secondaires des plantes du genre *Lotus*

Les investigations chimiques réalisées sur le genre *Lotus* ont révélé une richesse quasi-exclusive en composés flavoniques : flavones, isoflavones, isoflavanes... L'ensemble des métabolites identifiés est rassemblé dans le tableau 9 ci-dessous.

Type de composé	Molécules	Plante	
Flavone		<i>L. tenuis</i> [52]	
Flavonol			<p><u>61</u> R= H <u>62</u> R= OH</p>
Kaempférol-7- <i>O</i> -glucoside			
Kaempférol-3- <i>O</i> -glucoside			<p><u>63</u> R₁= H, R₂= glycosyl <u>64</u> R₁= glycosyl, R₂= H <u>65</u> R₁= R₂= rhamnosyl <u>66</u> R₁= H, R₂= rhamnosyl <u>67</u> R₁= glycosyl, R₂= rhamnosyl</p>
Kaempférol-3,7-di- <i>O</i> -rhamnoside			
Kaempférol-3,7-di- <i>O</i> -rhamnoglucoside			
Kaempférol-7-rhamnoside			
Quercétine-7- <i>O</i> -rhamnoside			
Quercétine-3- <i>O</i> -rhamnoside	<p><u>68</u> R₁= H, R₂= rhamnosyl <u>69</u> R₁= rhamnosyl, R₂= H <u>70</u> R₁= galactosyl, R₂= H <u>71</u> R₁= rhamnosyl, R₂= glycosyl <u>72</u> R₁= rhamnosyl, R₂= rhamnosyl</p>		
Quercétine-3- <i>O</i> -galactoside			
Quercétine-3,7- <i>O</i> -rhamnoglucoside			
Quercétine-3,7-di- <i>O</i> -rhamnoside			

<p>Kaempférol 3-O-β-(6''-O-E-p-coumaroylglucoside)-7-O-β-glucoside</p>		<p><i>L. corniculatus</i> [52, 53]</p>
<p>Quercétine 3-O-β-(6''-O-E-p-coumaroylglucoside)-7-O-β-glucoside</p>		
<p>isorhamnétine 3-O-β-(6''-O-E-p-coumaroylglucoside)-7-O-β-glucoside</p>	<p><u>73</u> R= H <u>74</u> R= OH <u>75</u> R= OCH₃</p>	
<p>Formononétine</p>	 <p><u>76</u></p>	<p><i>L. creticus</i> [53]</p>
<p>Biochanine A</p>	 <p><u>77</u></p>	
<p>Lupinalbine A Lupinalbine B</p>	 <p><u>78</u> R= H <u>79</u> R= C(CH₃)₂=CH-CH₂-</p>	

<p>Lupinalbine C</p>	 <p style="text-align: center;">80</p>	
<p>Wightéone-4''-Méthyléther</p>	 <p style="text-align: center;">81</p>	<p><i>L. polyphyllos</i> [54]</p>
<p>4'-O-méthylerythrine C</p>	 <p style="text-align: center;">82</p>	
<p>4'-O-méthyl-2''-hydroxydihydroalpinumisoflavone</p>	 <p style="text-align: center;">83</p>	
<p>4'-O-méthylalpinumisoflavone</p>	 <p style="text-align: center;">84</p>	

<p>4',7-diméthoxy-5-hydroxyisoflavone</p> <p>Lupinalbine F</p>	 <p style="text-align: center;">85</p>  <p style="text-align: center;">86</p>	
<p>deméthylvestitol (7, 2',4'-trihydroxyisoflavane)</p>	 <p style="text-align: center;">87 R₁ = R₂ = H 88 R₁ = H, R₂ = Me 89 R₁ = R₂ = Me 90 R₁ = Me, R₂ = H</p>	<p><i>L. polyphyllos</i> [54]</p>
<p>vestitol (7,2'-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavane)</p>		
<p>sativane (7-hydroxy-2',4'-diméthoxyisoflavane)</p>		
<p>isovestitol (7, 4'dihydroxy-2'-méthoxyisoflavane)</p>		
<p>5-méthoxyvestitol (5,4'-diméthoxy-7,2' dihydroxyisoflavane)</p>		
<p>6-méthoxyvestitol</p>		

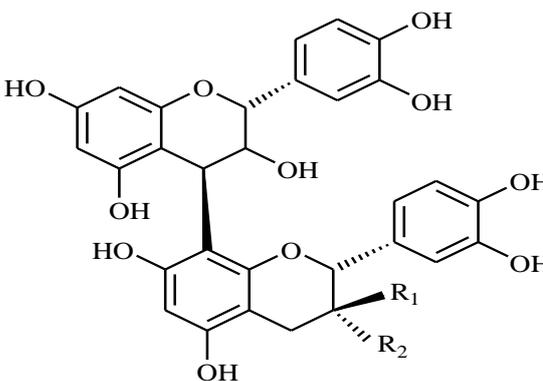
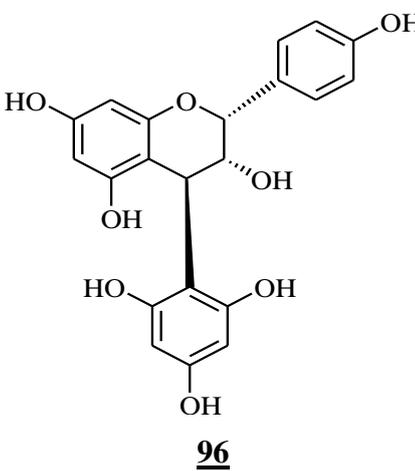
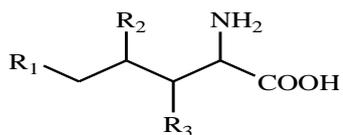
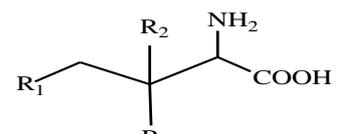
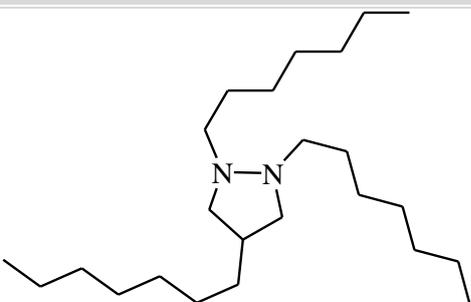
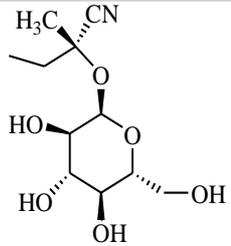
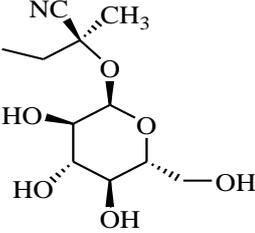
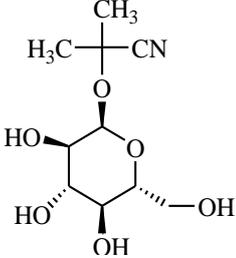
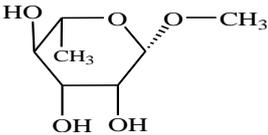
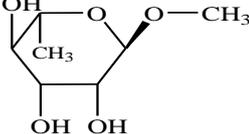
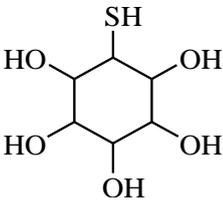
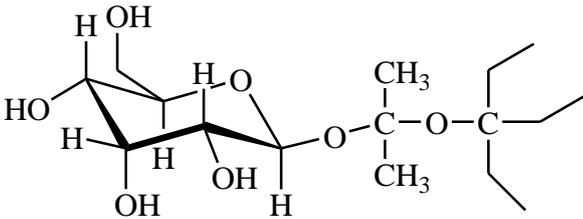
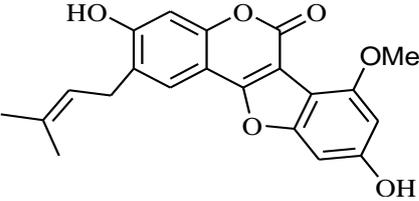
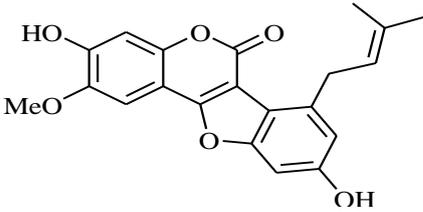
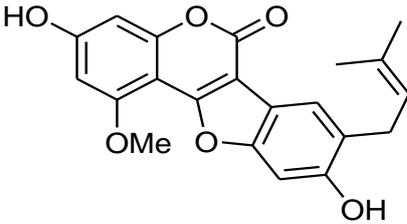
8-méthoxyvestitol	<p>91 R₁= OMe, R₂= R₃= H 92 R₁= R₃= H, R₂= OMe 93 R₁= R₂= H, R₃= OMe</p>	
Epicatechine-(4β→8)- catéchine		
Epicatechine-(4β→8)- épicatechine	<p>94 R₁=OH, R₂=H 95 R₁=H, R₂=OH</p>	<i>L. hispidus.</i> [55]
Epicatechine-(4β→2)- phloroglucinoles	 <p style="text-align: center;">96</p>	

Tableau 9 : Principaux métabolites secondaires du genre *Lotus*V.6 - Autres composés

D'autres composés, issus de diverses classes de substances naturelles, ont été identifiés dans le genre (Tableau 10).

Type de composé	Molécules	Plante
Aminoacides	 <p>97 R₁= NH₂, R₂= R₃= H 98 R₁= NH₂, R₂= R₃= H 99 R₁= NH₂, R₂= R₃= H</p>	<i>L. tenuis</i> [56]
	 <p>100 R₁= H, R₂= Me, R₃= NH₂ 101 R₁= NH₂, R₂= H, R₃= Me</p>	
Garciène	 <p>102</p>	<i>L. garcinii</i> [57]
Epilotaustraline	 <p>103</p>	<i>L. lalambensis</i>

<p>Lotaustraline</p>	 <p>104</p>	<p>[58]</p>
<p>Linamarine</p>	 <p>105</p>	<p><i>L. lalambensis</i></p>
<p>méthyl-α et β-L-rhamnopyranoside</p>	 <p>106</p>	<p>[58]</p>
	 <p>107</p>	
<p>Garthiol</p>	 <p>108</p>	<p><i>L. garcinii</i></p> <p>[55]</p>

<p>Garoside</p>	 <p style="text-align: center;">109</p>	
	 <p style="text-align: center;">110</p>	
	 <p style="text-align: center;">111</p>	<p><i>L. creticus</i> [59]</p>
<p>Coumestane</p>	 <p style="text-align: center;">112</p>	

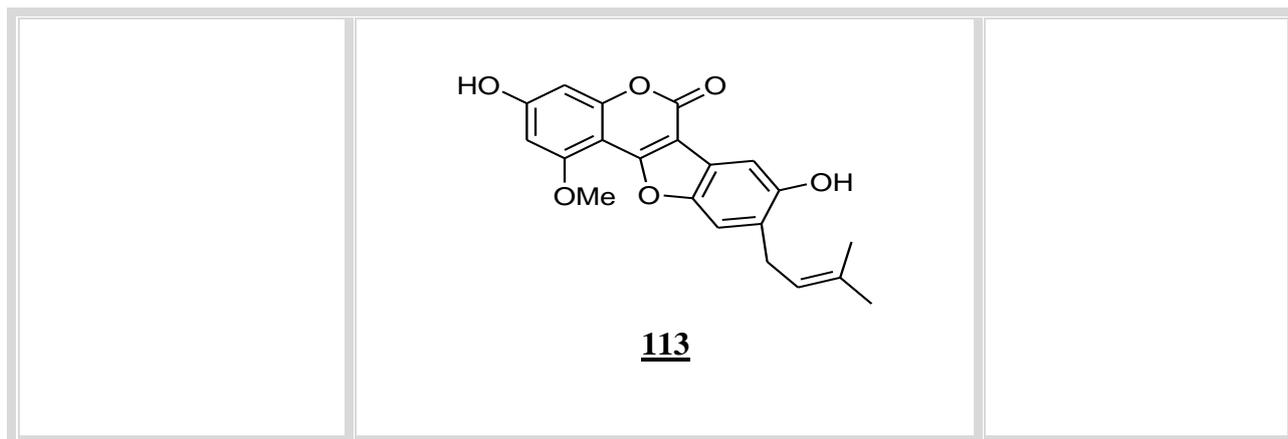
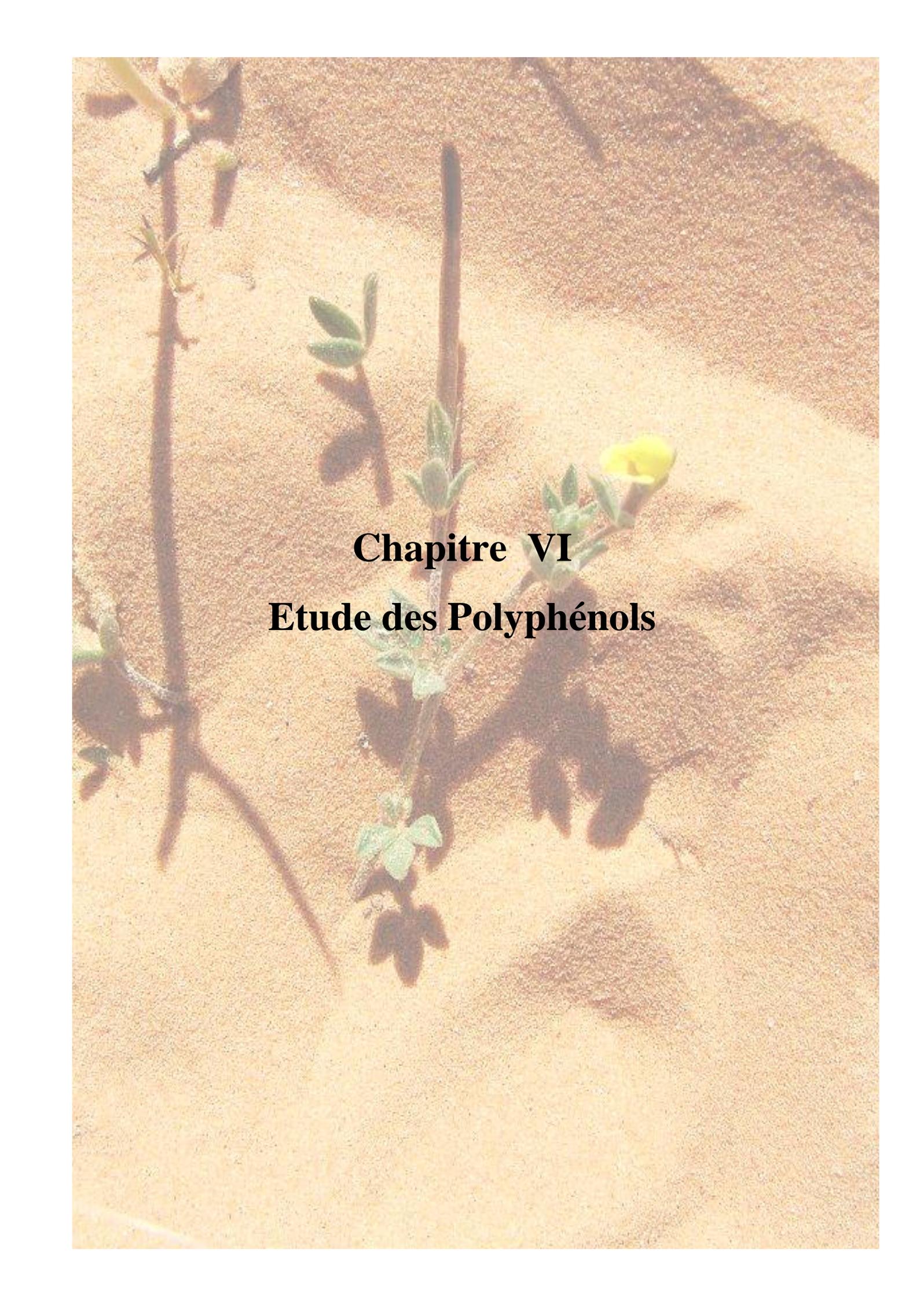


Tableau 10 : Autres composés identifiés dans le genre *Lotus*



Chapitre VI
Etude des Polyphénols

VI.1- Composés phénoliques

VI.1.1- Généralités

Le terme « *polyphénols* » est fréquemment utilisé dans le langage courant et même dans des articles scientifiques ou de vulgarisation pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. En fait, il devrait être réservé aux seules molécules présentant plusieurs fonctions phénols, excluant ainsi les monophénols, pourtant abondants et importants chez les végétaux. La désignation générale « composés phénoliques » concerne donc à la fois les mono, les di et les polyphénols dont les molécules contiennent respectivement une, deux ou plusieurs fonctions phénoliques [60].

Les polyphénols possèdent donc plusieurs groupement phénoliques, avec ou non d'autres fonctions (OH, COOH,...). Ils sont probablement les composés naturels les plus répandus dans la nature et de ce fait, sont des éléments faisant partie de l'alimentation animale. Ces composés présentent une grande diversité de structures, divisées en non flavonoïdes et flavonoïdes.

VI.1.2- Les non flavonoïdes

Ce groupe comprend plusieurs composés parmi lesquels, on distingue les acides phénoliques, les stilbènes, les lignanes, les coumarines et les xanthones.

□□ Les acides phénoliques

On distingue deux principales classes d'acide phénolique : les dérivés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique. La concentration de l'acide hydroxybenzoïque est généralement très faible chez les végétaux comestibles. Ces dérivés sont assez rares dans l'alimentation humaine contrairement à ceux de l'acide hydroxycinnamique [62].

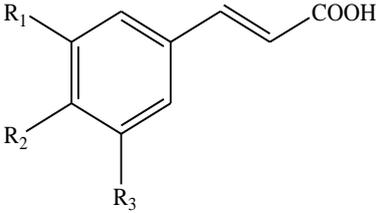
	R ₁	R ₂	R ₃	Acides phénoliques
	H	H	H	Acide cinnamique
	H	OH	H	Acide <i>p</i> coumarique
	H	OH	OH	Acide caféique
	OCH ₃	OH	H	Acide férulique
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique

Tableau 11 : Principaux acides hydroxycinnamiques

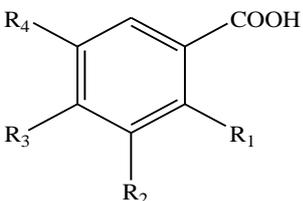
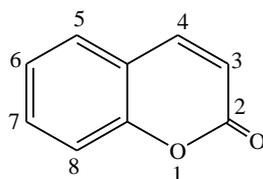
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Acides phénoliques
	H	H	H	H	Acide benzoïque
	H	H	OH	H	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque
	H	OH	OH	H	Acide protocatechique
	H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
	H	OH	OH	OH	Acide gallique
	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
	OH	H	H	H	Acide salicylique
	OH	H	H	OH	Acide gentisique

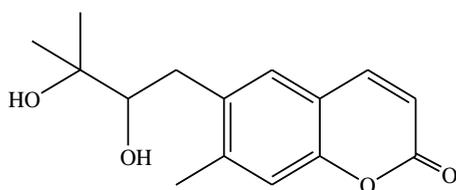
Tableau 12 : Principaux acides hydroxybenzoïques

□□ Les coumarines

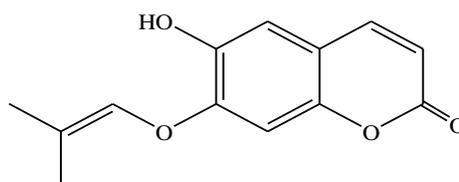
Les coumarines sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone (**114**). Elles ont été isolées pour la première fois de *Coumarouna odorata*, par Vogel en 1820 [62]. Aujourd'hui, près de 1000 composés coumariniques ont été isolés de plus de 800 espèces de plantes et de microorganismes. Chez les végétaux, on les rencontre chez les Apiacées, Astéracées, Fabacées, Rosacées, Rubiacées, Rutacées et Solanacées. Du point de vue structural, elles sont classées en coumarines simples (**115**, **116**) avec des substituants sur le cycle benzénique, furanocoumarines (**117**), pyranocoumarines (**115**, **118**) et coumarines substituées en positions 3 et/ou 4 (**119**). Le dernier groupe serait celui des dimères [63].



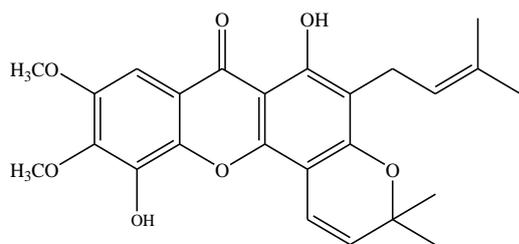
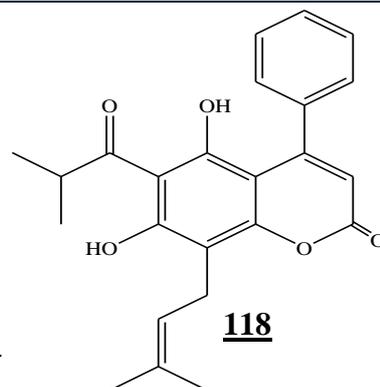
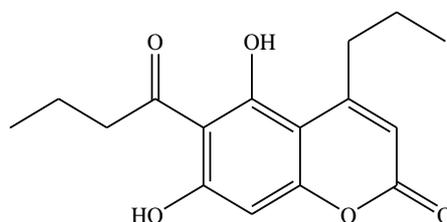
114



115



116

**117****118****119**

VI.2- Les flavonoïdes

Les flavonoïdes représentent une classe de métabolites secondaires largement répandus dans le règne végétal. Ce sont des pigments quasiment universels des végétaux qui sont en partie responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Le terme flavonoïde regroupe une très large gamme de composés naturels polyphénoliques. On dénombre près de 6500 flavonoïdes répartis en 12 classes [64] et leur nombre ne cesse d'accroître. Par définition, les flavonoïdes sont des composés qui ont en commun la structure du diphenylpropane (C6-C3-C6) (**120**); les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C [65]. On distingue différentes structures de flavonoïdes dont les flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavanols, flavylum, chalcones, auronnes, isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, ptérocarpanes, coumaronochromones, 3-arylcoumarines, coumestanes et autres roténoïdes.

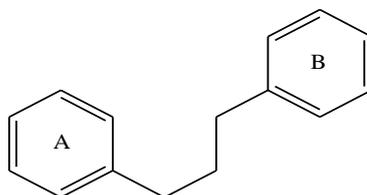


Figure 38 : Structure générale des flavonoïdes (**120**)

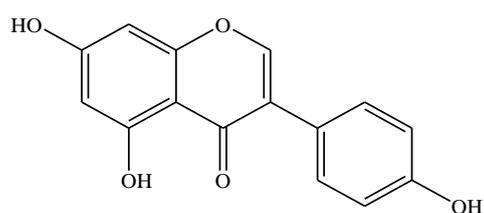
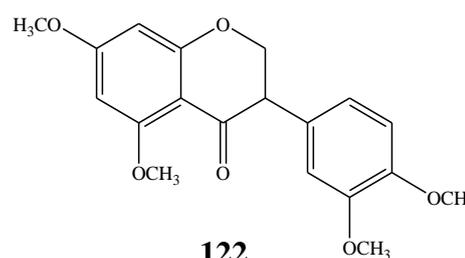
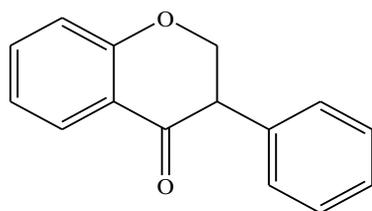
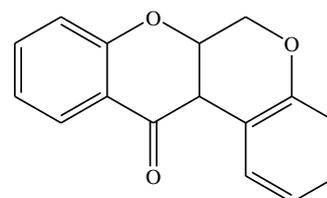
VI.2.1- Les isoflavonoïdes

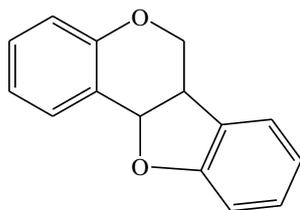
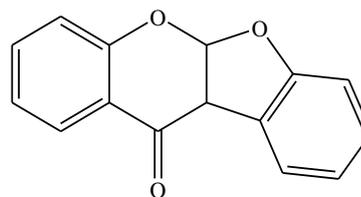
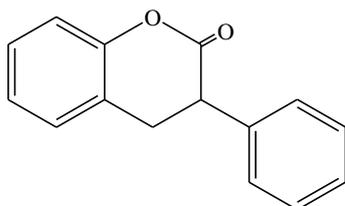
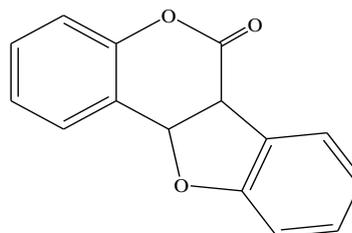
Les isoflavonoïdes constituent une grande et très diversifiée sous classe des flavonoïdes. Ils dérivent d'une structure 1,2-diphénylpropane (**121-123**). Malgré leur caractérisation sporadique dans la classe des dicotylédones, ce sont des composés presque

spécifiques de la famille Fabaceae. Cette spécificité est probablement due à la présence dans cette famille de l'enzyme responsable du réarrangement du 2-phénylchromone (flavanone) en 3-phénylchromone (isoflavone) [66]. Ils peuvent être classés en une douzaine de catégories structurales: 3-arylcoumarines, coumaronochromones, coumestanes, isoflavanes, isoflavènes, isoflavones, roténoïdes, ptérocarpanes. Ces catégories diffèrent entre elles, par le degré d'oxydation et l'existence ou non, d'hétérocycles supplémentaires.

Dans chaque catégorie, on note également la présence fréquente de dérivés prénylés, c'est-à-dire munis d'un radical prényle. Le terme « prénylé » au sens large désigne ainsi le substituant prényle et ou isopentényle, les dérivés furano et diméthylpyrano ou encore le substituant géranyle ou autre.

Parmi tous les isoflavonoïdes répertoriés dans le règne végétal, la catégorie la plus largement représentée est celle des isoflavones non glycosylées. Les isoflavones glycosylées (*O*-glycosylées et exceptionnellement *C*-glycosylées) existent mais sont plus rares. Certains isoflavonoïdes possèdent un cycle supplémentaire résultant de la cyclisation du dérivé 2'-hydroxylé. Les ptérocarpanes (**124**) et leurs dérivés ainsi que les coumaronochromones (**125**) en font partie. D'autres ont une structure de type coumarinique induite par l'oxydation d'une isoflavone. C'est le cas par exemple des coumestanes (**126**) et de leurs dérivés. Un dernier groupe d'isoflavonoïdes possède non seulement un cycle, mais en plus un carbone supplémentaire. C'est le cas des roténoïdes (**127**) qui proviennent d'une cyclisation oxydative de la 2'-méthoxyisoflavone (**128**).

**121****122****123****124**

**125****126****127****128**

VI.2.2- Distribution

Les isoflavonoïdes, en particulier les aglycones, sont présents dans les racines, les rhizomes, le bois, l'écorce, les graines et quelquefois dans les feuilles et fleurs [66].

Contrairement aux flavonoïdes, composés ubiquitaires dans le règne végétal, les isoflavonoïdes sont presque exclusivement présents chez les Légumineuses. En effet, 85% d'entre eux ont été isolés de cette famille [66]. Il apparaît néanmoins qu'au moins 225 isoflavonoïdes décrits ont été isolés de plantes appartenant à 59 autres familles [67]. Comme chez les Légumineuses, la majorité des isoflavonoïdes isolés sont des isoflavones [68].

VI.3- Biosynthèse des grandes classes d'isoflavonoïdes

La biosynthèse des isoflavones repose sur une voie générale avec la phénylalanine comme précurseur. Sa transformation en acide cinnamique ou l'un de ses dérivés, lui-même transformé en acide paracoumarique ou l'un de ses dérivés, aboutit à une chalcone, précurseur biosynthétique de la plupart des flavonoïdes [69]. La figure suivante illustre la voie biosynthétique des isoflavonoïdes.

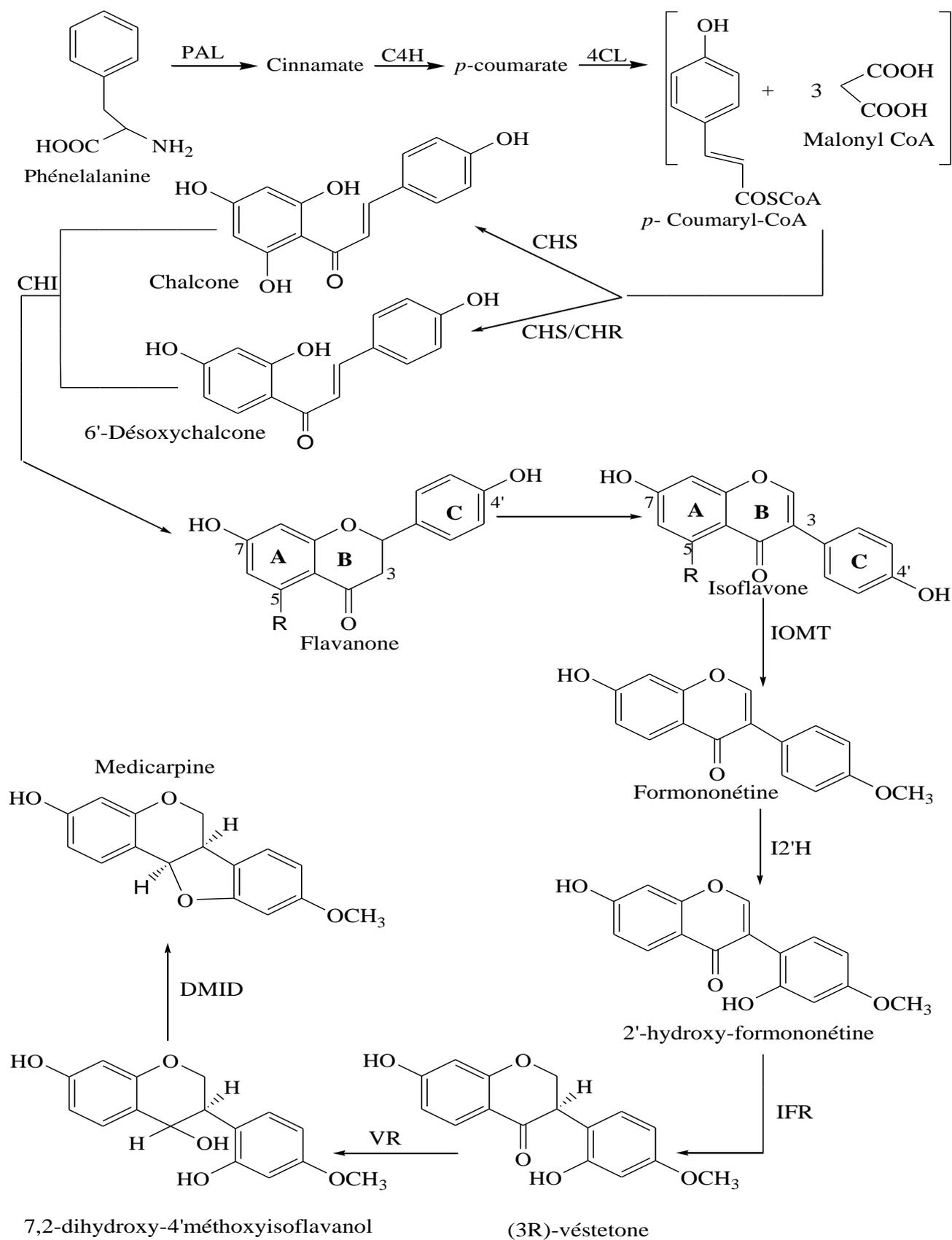
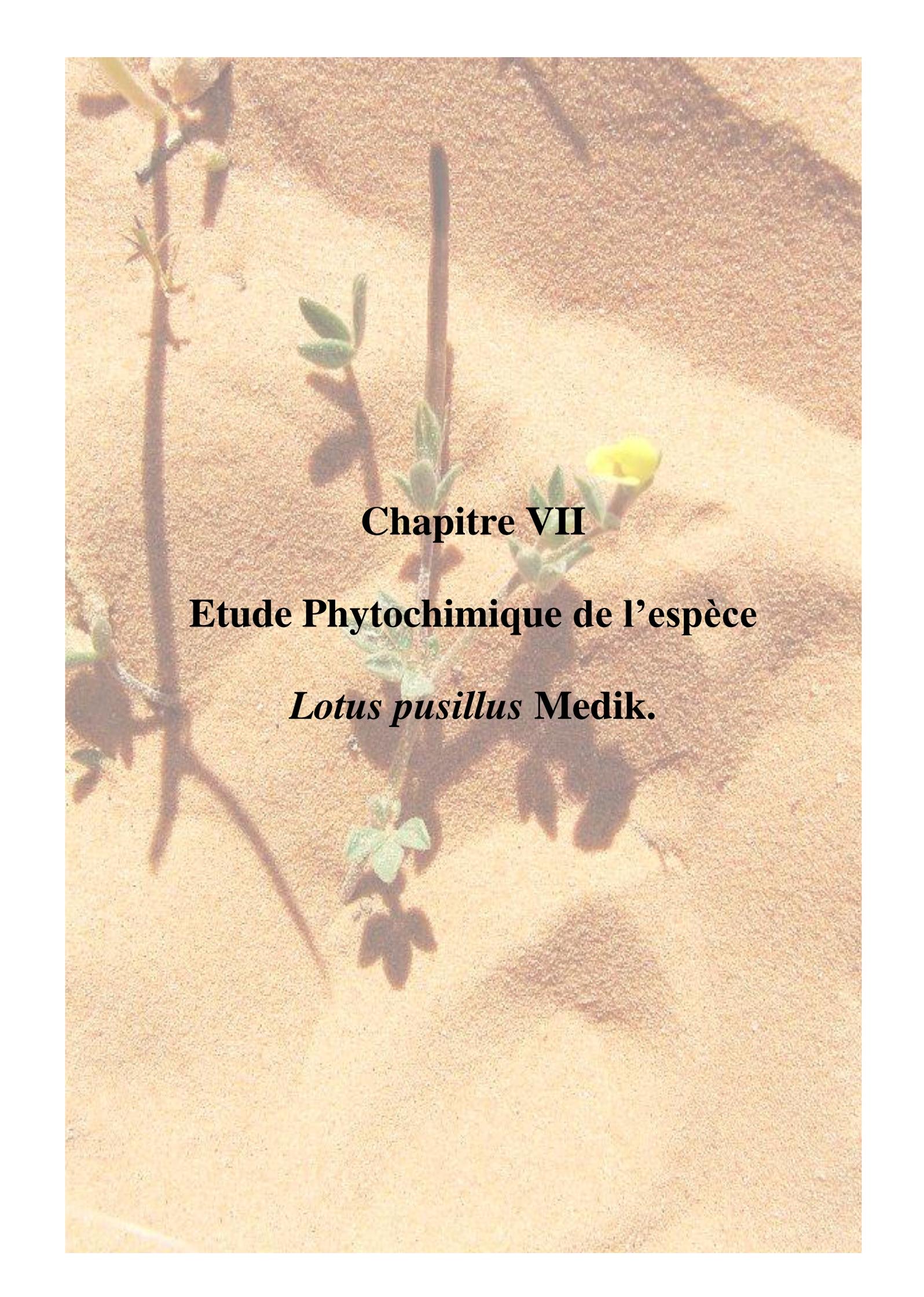


Figure 39 : Biosynthèse des grandes classes d'isoflavonoïdes et leur conversion

VI.4- Rôle et intérêt des composés phénoliques

Les composés phénoliques peuvent intervenir dans certains aspects de la physiologie de la plante (lignification, régulation de la croissance, interactions moléculaires avec certains microorganismes symbiotiques ou parasites...), dans les interactions des plantes avec leur environnement biologique et physique (relations avec les bactéries, les champignons, les insectes).

Le rôle des composés phénoliques est largement démontré dans la protection contre certaines maladies en raison de leur interaction possible avec de nombreuses enzymes et de leurs propriétés antioxydantes [70]. Spécifiquement, on attribue aux flavonoïdes des propriétés variées: veinotonique, antitumorale, anti-radicalaire, anti-inflammatoire, analgésique, antiallergique, antispasmodique, antibactérienne, hépatoprotectrice, estrogénique ou anti-estrogénique. Ils sont également connus pour moduler l'activité de plusieurs enzymes ou de récepteurs cellulaires. Les flavonoïdes favorisent la relaxation vasculaire et empêchent l'agglutinement des plaquettes sanguines. Par conséquent, ils réduisent la coagulation du sang et le rendent plus fluide. Ils limitent l'oxydation des lipides sanguins et contribuent à la lutte contre les plaques d'athérome. Ils sont aussi anxiolytiques et protègent nos artères contre l'athérosclérose et réduit la thrombose (caillots dans les artères).



Chapitre VII

Etude Phytochimique de l'espèce

***Lotus pusillus* Medik.**

VII- Etude Phytochimique

VII.1- *Lotus pusillus* Medik.

L. pusillus est une très petite plante des sables désertiques, couverte de poils soyeux, calice à dents intégrales, les deux médianes nettement plus courtes ; fleurs jaunes, par 1-2 pédoncules nettement plus longs que la feuille avec des tiges couchées. Elle se rencontre dans la région prédésertique du sud Tunisien et Constantinois allant jusqu'à Boussaâda [1]. La région d'El-Kantara-Biskra en est très fournie.



Figure 40 : Parties aériennes de *Lotus pusillus*

L. pusillus n'a fait l'objet d'aucune investigation chimique antérieure. Les travaux présentés ici reproduisent l'isolement et l'identification de onze composés issus des parties aériennes de cette dernière.

VII.2- Isolement des composés

Les parties aériennes de *Lotus pusillus* Medik. séchées et pulvérisées sont initialement mises à macérer dans l'éther de pétrole, sous agitation et à température ambiante pendant 48 heures. La filtration et l'évaporation à sec du solvant ont permis d'obtenir 9 g de l'extrait étheropétrolique. Le marc est ensuite mis à macérer dans l'acétate d'éthyle (2 x 5 l). Après filtration et évaporation du solvant, 14 g de l'extrait acétate d'éthyle ont été obtenus. Les marcs résultants sont mis à macérer dans le méthanol (2 x 5 l) pendant 3 jours. La filtration et l'évaporation totale du solvant ont donné 35 g de l'extrait méthanolique.

L'analyse des ces extraits par chromatographie analytique, après révélation à l'acide sulfurique, a montré une plus grande richesse de l'extrait acétate d'éthyle en métabolites. La purification de cet extrait a fourni six composés purs **L1-L6** (Schéma 2).

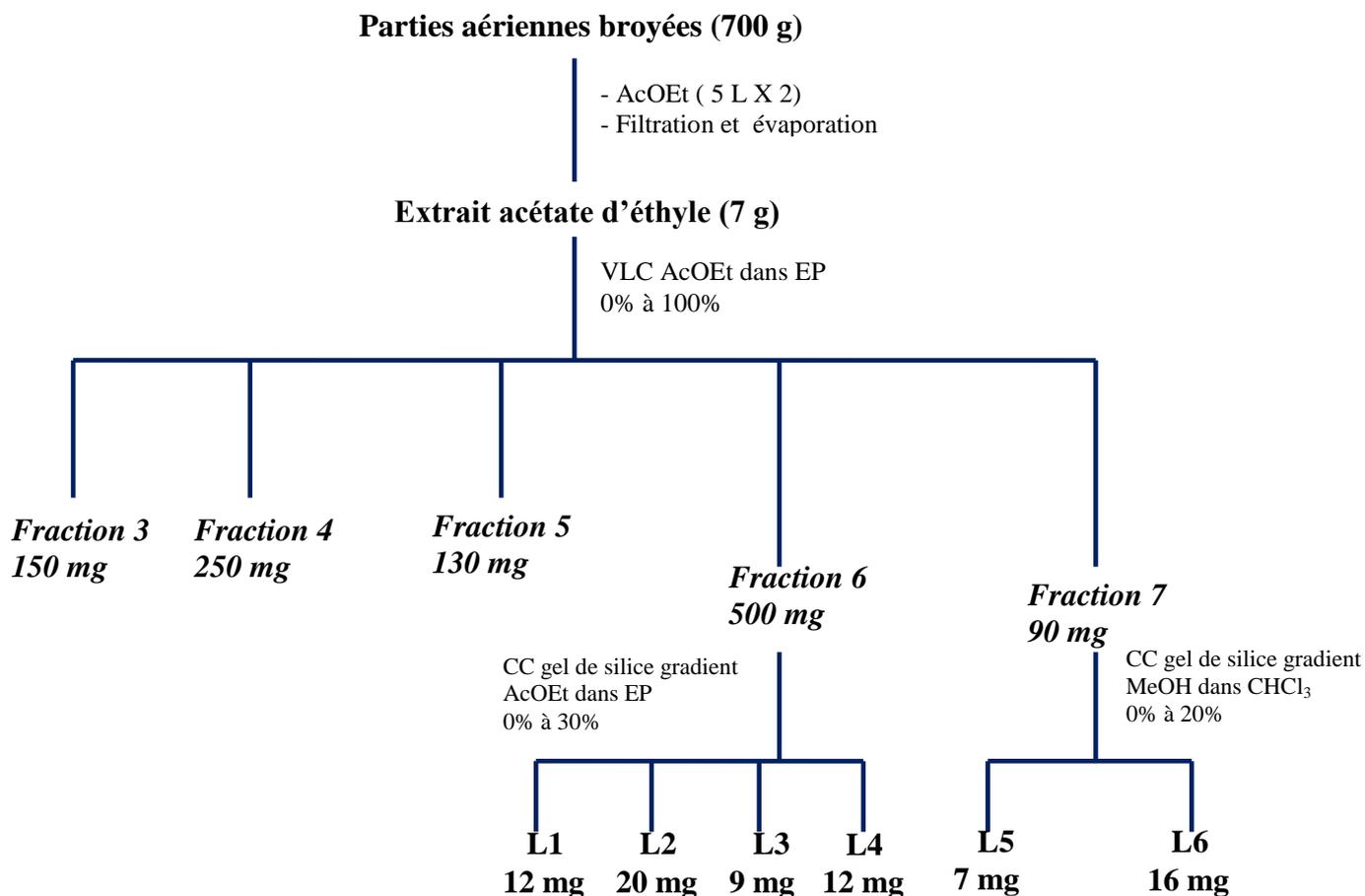


Schéma 2 : Isolement des composés obtenus à partir de l'extrait acétate d'éthyle

7 grammes de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Lotus pusillus* sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice greffée en C-18 (phase inverse) avec les gradients d'élution eau-méthanol: 80-20 à 0-100. La purification de cet extrait a fourni cinq composés purs allant de **L7** à **L11** (schéma 3).

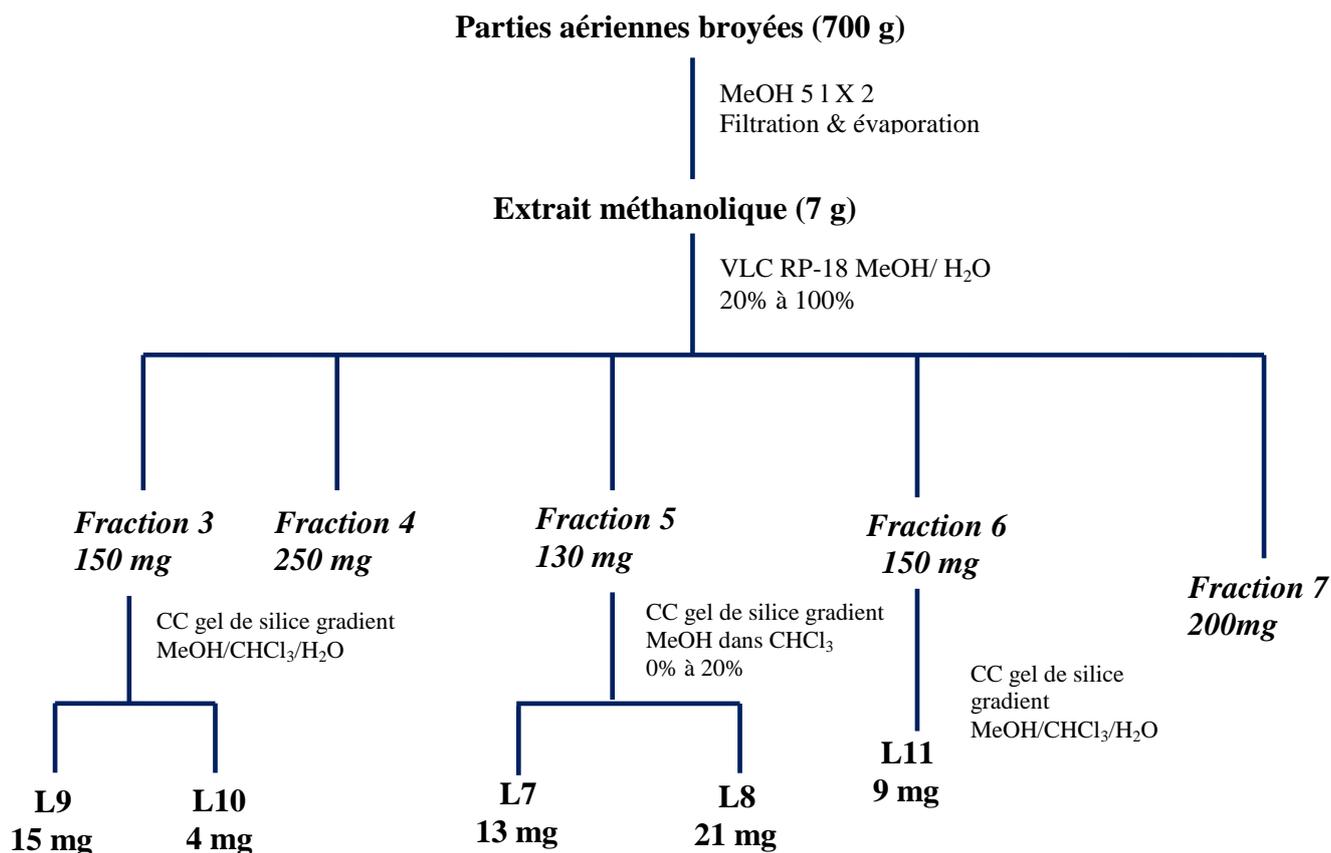
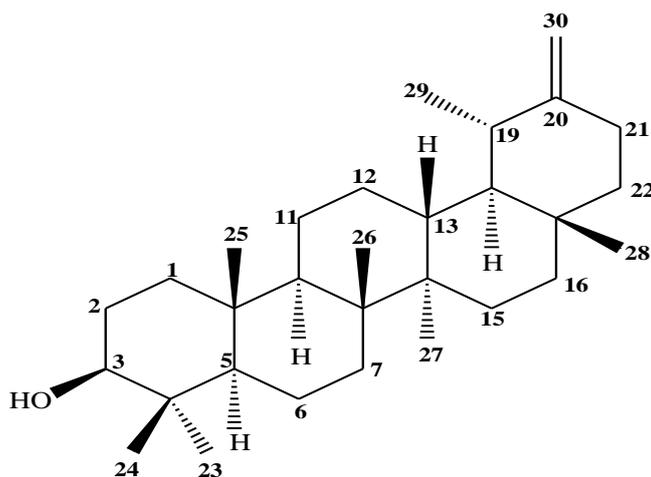


Schéma 3 Isolement des composés obtenus à partir de l'extrait méthanolique

VII.3- Identification des composés

VII.3.1- Détermination structurale du composé **L1**



18 α ,19 α -urs-20(30)-èn-3 β -ol

Ce produit se présente sous forme d'une fine poudre blanche. Son spectre de masse ESI-MS (Figure 41) montre en mode négatif deux pics d'ions pseudomoléculaires et $m/z =$

425,3 $[M-H]^-$ et 851,2 $[2M-H]^-$, soit une masse moléculaire égale à 426 uma et correspondant à une formule brute en $C_{30}H_{50}O$.

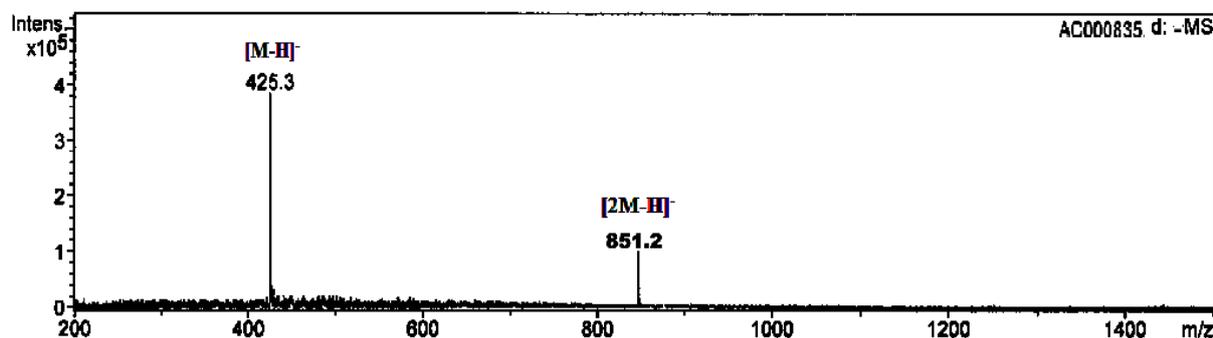


Figure 41 : Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé L1

Le spectre RMN 1H du composé L1 (Figure 42) montre un profil typique de triterpènes pentacycliques avec la présence de sept groupements méthyles dont six singulets à δ_H 0,95 (H-23), 0,77 (H-24), 0,84 (H-25), 1,06 (H-26), 0,92 (H-27), 0,84 (H-28) et un doublet à 1,02 ppm ($J=7,2$, H-29). En plus, le spectre RMN 1H révèle, dans la région des champs faibles, la présence d'un signal correspondant à un groupement hydroxyméthine à δ_H 3,18 et des signaux de deux protons résonant sous forme de singulet large à 4,61 et 4,62 ppm typiques d'un groupement CH_2 oléfinique.

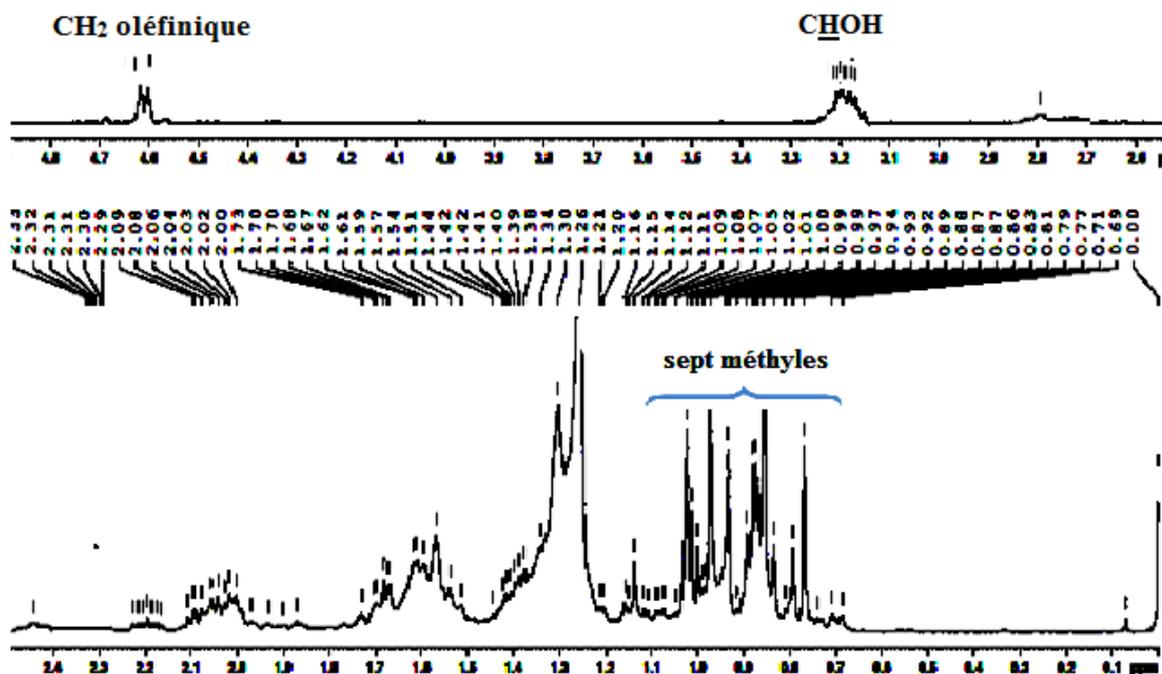


Figure 42 : Spectre RMN 1H du composé L1

Son spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (Figure 43) montre 30 signaux confirmant bien la présence d'un squelette triterpénique, avec sept carbones méthyliques dont l'expérience HSQC *J*-modulé a permis d'assigner leurs déplacements chimiques : δ_{C} 28,3 (C-23), 15,5 (C-24), 16,4 (C-25), 16,1 (C-26), 15,5 (C-27) et 19,1 (C-28). Par ailleurs, il est aussi observé les signaux d'un carbone quaternaire oléfinique à δ_{C} 154,8 (C-20) et d'un carbone secondaire oléfinique à δ_{C} 107,3 (C-30) très caractéristiques d'une double liaison exocyclique. Ce dernier constat conjugué à la présence d'un méthyle doublet observé en RMN ^1H et confirmé par HSQC permet de suggérer que notre composé est de nature triterpénique à squelette ursène porteur d'un hydroxyle libre en C-3. Son déplacement chimique de l'ordre de 79,2 ppm a été déduit du spectre HSQC *J*-modulé du fait de sa corrélation directe avec le proton H-3 (3,21 ppm, *m*) identifié précédemment.

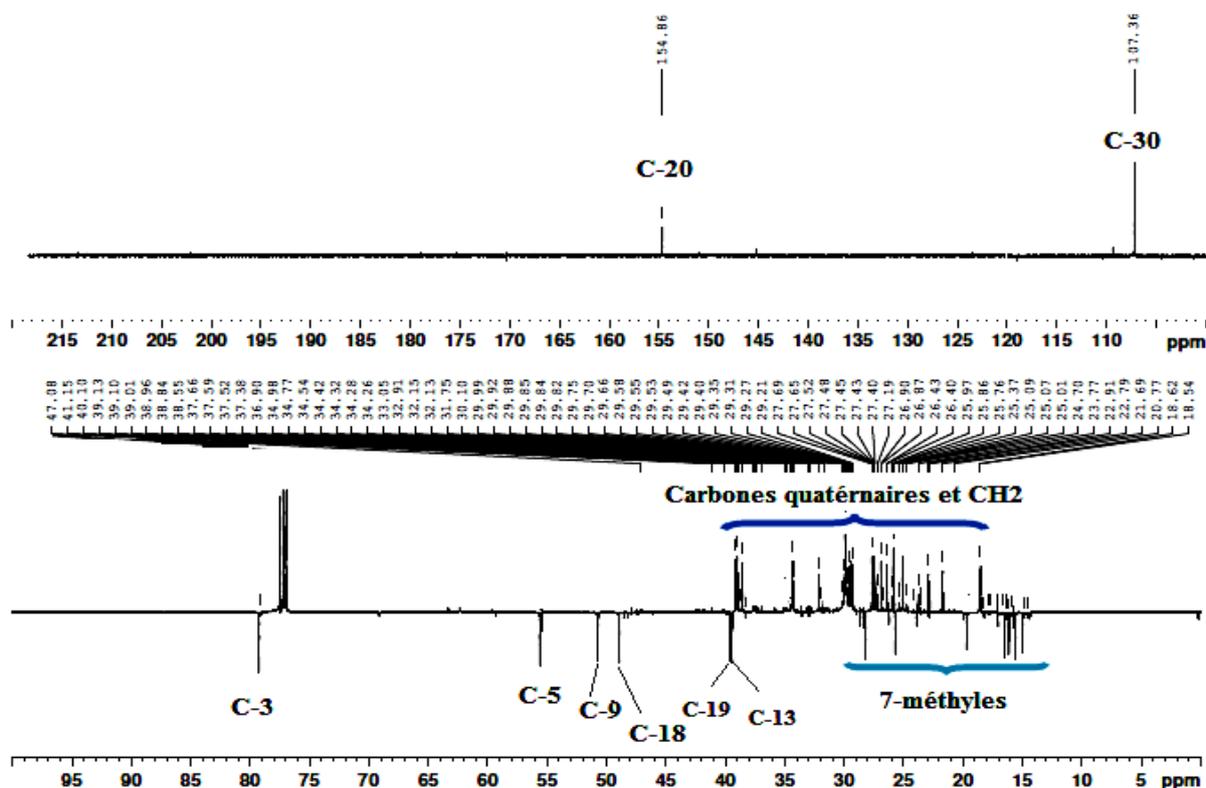


Figure 43 : Spectre RMN ^{13}C du composé L1

L'identification, voire la confirmation de la structure du composé **L1** repose principalement sur l'examen conjoint des spectres HMBC, COSY H-H et HSQC *J*-modulé. L'expérience COSY H-H identifie clairement le cycle A, partant du proton H-3 (3,21 ppm, *m*) qui corrèle avec 2 protons équivalents H-2 (1,63 ppm, *m*), eux-mêmes corrélant avec deux protons géminés H-1a et H-1b détectés à 1,70 et 0,94 ppm respectivement. L'expérience HSQC *J*-modulé permet d'identifier leurs carbones à δ_{C} 39,1 (C-1), 27,7 (C-2) et 79,2 (C-3).

La configuration β orientée du groupement hydroxyle est attestée par la valeur de déplacement chimique du carbone C-3 de l'ordre de 79,2 ppm [71].

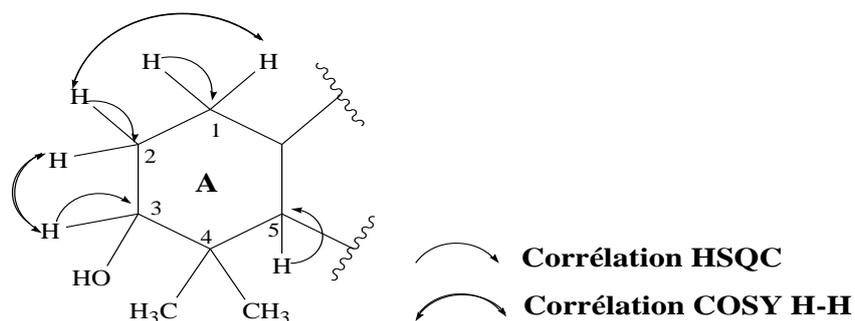


Figure 44 : Corrélations HSQC et COSY H-H du cycle A

L'analyse HMBC, notamment dans le cas de triterpènes, constitue un atout majeur dans leur identification car permettant d'assigner les déplacements chimiques de la majorité des carbones et cela par l'observation de leurs corrélations avec les méthyles ainsi que le proton H-3. Ce dernier identifié à 3,21 ppm corrèle avec deux carbones de groupements méthyliques CH₃-23 (28,3 ppm) et CH₃-24 (15,5 ppm). Partant de leurs protons H-23 (δ_H 0,95, *s*, 3H) et H-24 (δ_H 0,77, *s*, 3H) identifiés par HSQC, l'analyse HMBC (Figures 45 et 46) montre des corrélations hétéronucléaires longue distance avec un carbone quaternaire à 38,6 ppm attribué au carbone C-4 et un carbone méthine C-5 à 55,4 ppm. Ce dernier permet d'identifier les protons du groupement méthylique H-25 (3H, *s*) à 0,84 ppm. Selon l'expérience HSQC, le carbone méthylique CH₃-25 est repéré à 16,4 ppm. Ce dernier corrèle, outre les carbones C-5 (55,4 ppm) et C-1(39,1 ppm) préalablement identifiés, avec deux autres carbones, un quaternaire à 37,4 ppm et un méthine à 50,7 ppm correspondant respectivement aux carbones C-10 (37,4 ppm) et C-9 (50,7 ppm). A partir des protons méthyliques H-26 (1,02 ppm, *s*) identifiés de par leur corrélation avec le carbone C-9 (50,7 ppm) déjà identifié, on localise les carbones C-8 (41,1 ppm), C-7 (34,2 ppm) et C-14 (40,1 ppm). Ce dernier a été identifié à travers la corrélation qu'il présente avec des protons de groupement méthylique ne pouvant être que le groupement CH₃-27 (0,92 ppm, *s*). De la même manière et partant de ces derniers, on identifie les carbones C-13 (39,5 ppm) et C-15 (27,1 ppm).

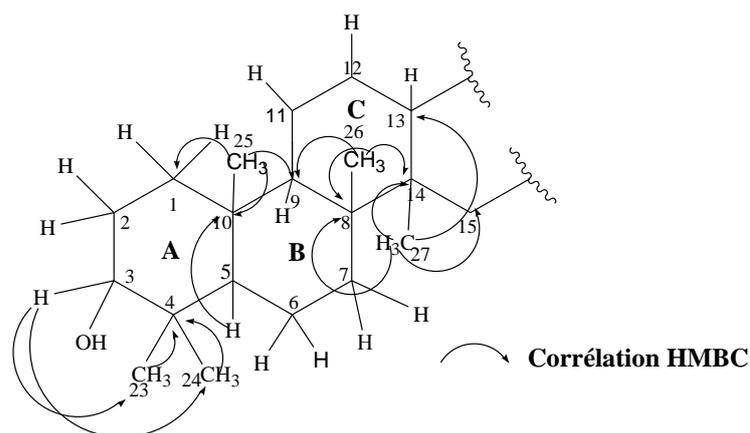


Figure 45 : Corrélations HMBC du composé L1

L'apparition de deux signaux d'intégration 1H sous forme de singulet large chacun à 4,61 et 4,62 ppm sont attribuables aux protons éthyléniques géminés d'un groupement méthylène exocyclique. Le spectre HSQC *J*-modulé permet de déterminer le déplacement chimique de leur carbone résonant à 107,3 ppm (C-30). Ces protons corrélient en HMBC (Figure 46) avec deux carbones, un CH à 39,7 ppm (C-19) et un CH₂ à 25,7 ppm (C-21). Leurs protons sont repérés par analyse HSQC à δ_H 2,08 (H-19), 2,42 (H-21a) et 2,18 (H-21b).

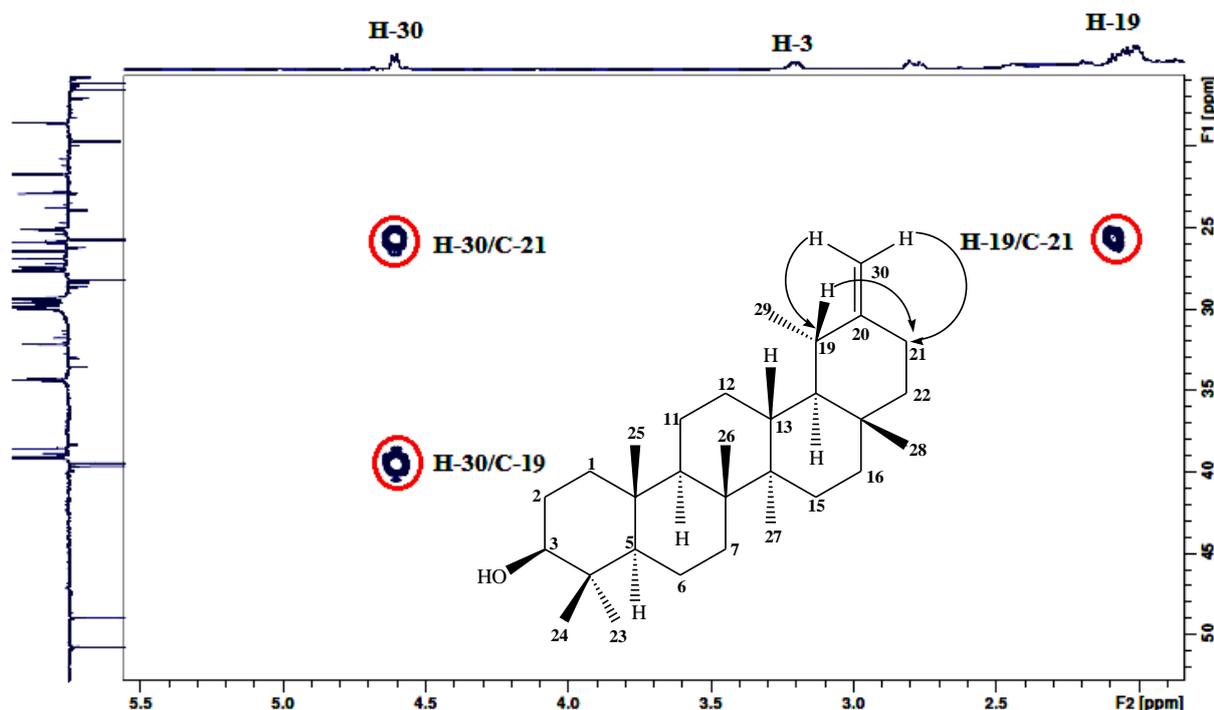


Figure 46 : Spectre HMBC du composé L1

Les protons H-21 couplent en COSY H-H (Figure 47) avec deux protons résonant à 1,37 ppm (*m*, H-22). L'expérience HSQC permet d'assigner le déplacement chimique du carbone C-22 à 38,5 ppm. Le proton H-19 apparaissant sous forme de multiplet couple avec les protons méthyliques H-29 (1,02, *d*, $J = 7,2$ Hz) et un proton méthine attribué au proton H-18 (0,97 ppm, *m*). Les protons H-19 et H-21 montrent en HMBC (Figure 47) des corrélations en 3J avec un carbone quaternaire sp^3 résonant à 34,5 ppm identifié au carbone C-17 et confirmé par sa corrélation avec les protons méthyliques H-28 (*s*, 0,84 ppm). Ce même carbone présente également des couplages, en plus des protons H-18 et H-22 déjà identifiés, avec les protons H-13 (1,49 ppm, *m*), H-15 (0,98 et 1,66 ppm, *m*) et H-16 (1,15 et 1,26 ppm, *m*). Les déplacements chimiques des carbones correspondant repérés, par analyse HSQC *J*-modulé, à 48,9 (C-18), 39,5 (C-13), 38,5 (C-22), 27,1 (C-15) et 39,1 ppm (C-16), en plus des carbones du groupement méthylène exocyclique, identifient clairement les cycles D et E.

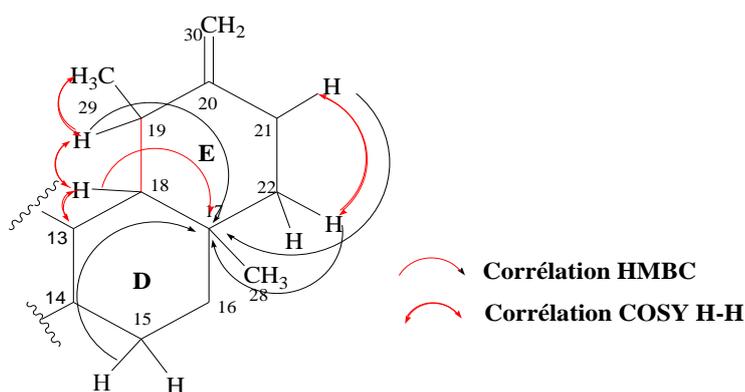


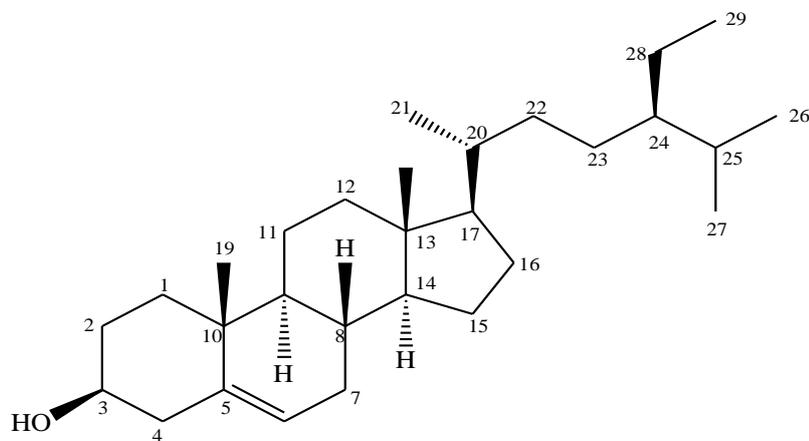
Figure 47: Corrélations HMBC et COSY du composé L1

Ainsi les déplacements chimiques de tous les protons et carbones (Tableau 13) déterminés par les expériences COSY H-H, HMBC et HSQC, la valeur du pouvoir rotatoire établie dans le chloroforme ($[\alpha]_D = +95^\circ$, $C = 0,36$ g/100 ml) ainsi que la comparaison avec les données de la littérature ont permis d'élucider la structure du composé **L1** nommé $18\alpha,19\alpha$ -urs-20(30)-èn-3 β -ol. Ce composé considéré comme rare et connu sous le nom taraxastérol, a été isolé antérieurement de certaines espèces dont *Cirsium setosum* (Compositae) [72], *Milletia versicolor* (Fabaceae) [73]. Il est identifié pour la première fois dans le genre *Lotus*.

C	δ_C	δ_H J Hz	C	δ_C	δ_H J Hz
1	39,1	0,94 <i>m</i> H-1b 1,70 <i>m</i> H-1a	16	39,1	1,15 <i>m</i> H-16b 1,26 <i>m</i> H-16a
2	27,7	1,63 <i>m</i>	17	34,5	-
3	79,2	3,21 <i>m</i>	18	48,9	0,97 <i>m</i>
4	38,6	-	19	39,7	2,08 <i>m</i>
5	55,4	0,75 <i>m</i>	20	154,8	-
6	18,5	1,37 <i>m</i> H-6b 1,52 <i>m</i> H-6a	21	25,7	2,18 <i>m</i> H-21b 2,41 <i>m</i> H-21a
7	34,2	1,38 <i>m</i>	22	38,5	1,37 <i>m</i>
8	41,1	-	23	28,3	0,95 <i>s</i>
9	50,7	1,31 <i>sl</i>	24	15,5	0,77 <i>s</i>
10	37,4	-	25	16,4	0,84 <i>s</i>
11	21,6	1,55 <i>m</i>	26	16,1	1,02 <i>s</i>
12	26,6	1,13 <i>m</i> H-12b 1,64 <i>m</i> H-12a	27	15,5	0,92 <i>s</i>
13	39,5	1,49 <i>m</i>	28	19,1	0,84 <i>s</i>
14	40,1	-	29	26,4	1,02 <i>d</i> 7,2
15	27,1	0,99 <i>m</i> H-15b 1,66 <i>m</i> H-15a	30	107,3	4,61 <i>sl</i> H-30a 4,62 <i>sl</i> H-30b

Tableau 13 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du composé **L1** ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$).

VII.3.2- Détermination structurale du composé **L2**



24-éthylcholest-5-èn-3-ol (β -sitostérol)

L'analyse des spectres RMN ^1H (Figure 48), ^{13}C (Figure 49) et spectre de masse EI (m/z 414), la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_{\text{D}} = -30^\circ$ ($C = 0,80 \text{ mg}/100 \text{ ml}$, CHCl_3) ainsi que la comparaison avec les données de la littérature ont permis d'identifier le composé **L2** au β -sitosolé. Ce métabolite secondaire, commun à toutes les plantes, a été isolé de plusieurs espèces du genre *Lotus* dont *L. alambensis* et *L. corniculatus* [74]. De nombreuses études pharmacologiques ont montré qu'il possède des propriétés anti-inflammatoire et antipyrétique [75]. Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^1H et ^{13}C sont présentés dans le tableau 14.

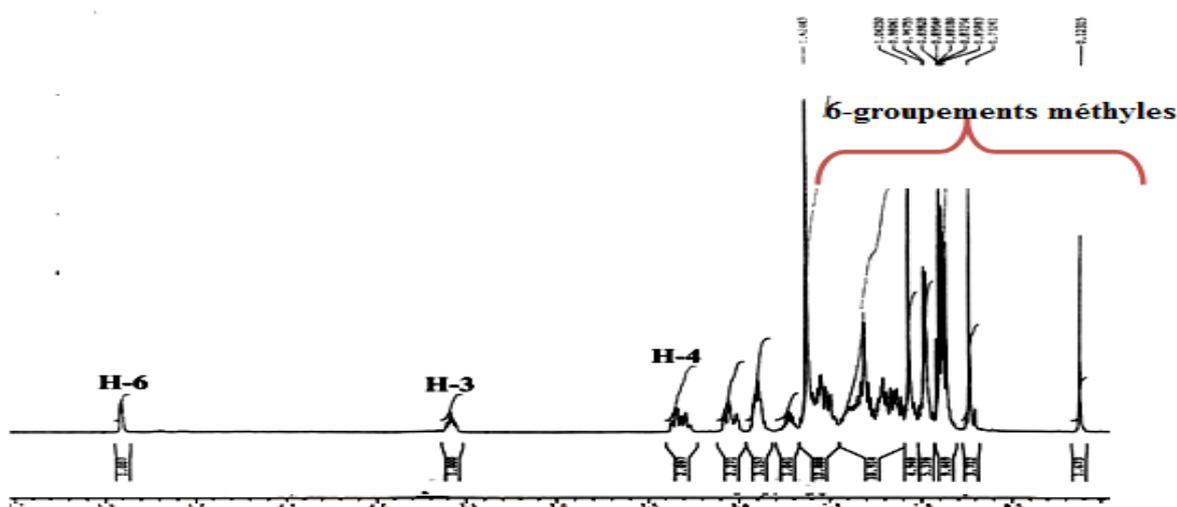


Figure 48 : Spectre RMN ^1H du composé L2

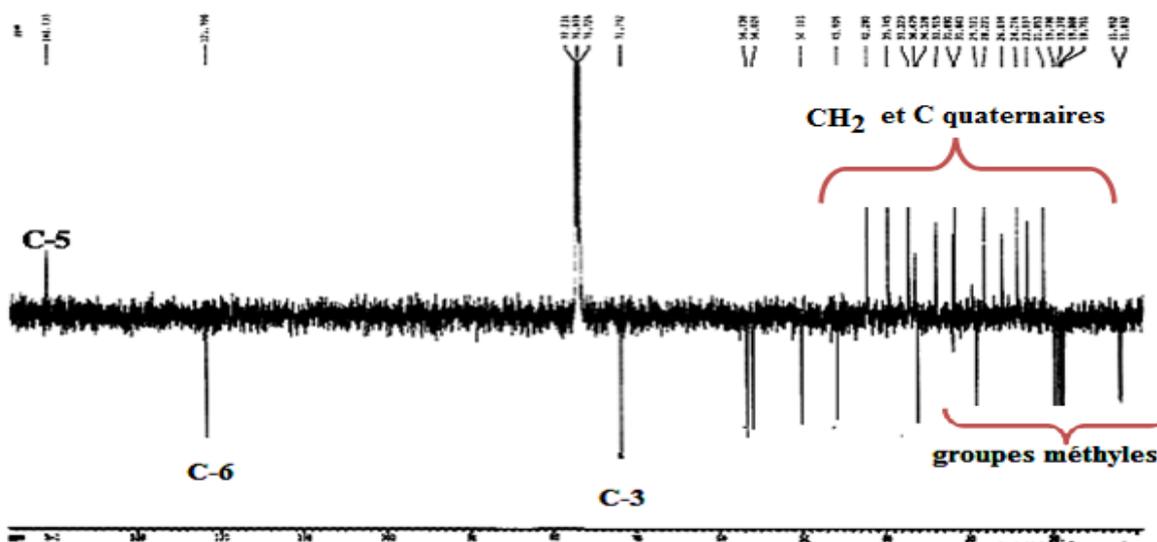
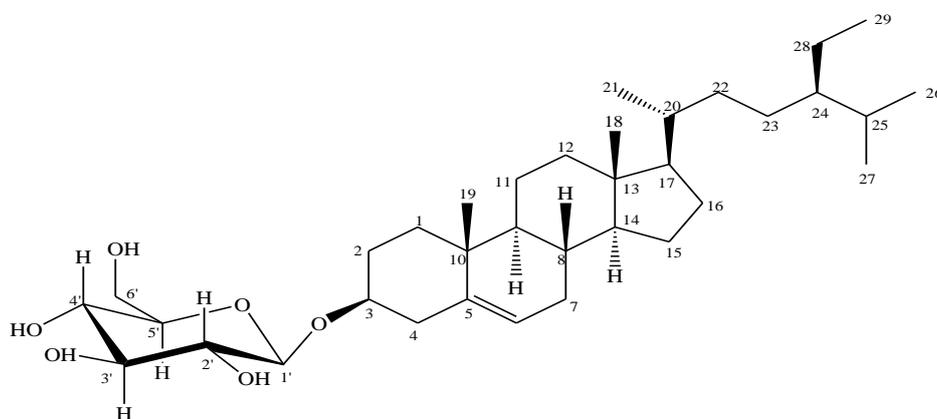


Figure 49 : Spectre RMN ^{13}C du composé L2

C	δ_C	δ_H J Hz	C	δ_C	δ_H J Hz
1	37,2	1,13 <i>m</i> H-1b 1,90 <i>m</i> H-1a	16	28,2	1,30 <i>m</i> H-16b 1,89 <i>m</i> H-16a
2	31,6	1,56 <i>m</i> H-2b 1,88 <i>m</i> H-2a	17	56,0	1,16 <i>t</i> 10,0
3	71,8	3,58 <i>tt</i> (11,3 ; 5,3)	18	11,8	0,74 <i>s</i>
4	42,3	2,30 <i>td</i> H-4b (11,0; 2,0) 2,34 <i>dd</i> H-4a (13,0; 2,0)	19	19,4	1,06 <i>s</i>
5	140,7	-	20	36,1	1,4 <i>m</i>
6	121,7	5,40 <i>dd</i> (5,2 ; 2,3)	21	18,8	0,93 <i>d</i> 6,5
7	31,9	1,38 <i>m</i>	22	33,9	1,07 <i>m</i> H-22b 1,36 <i>m</i> H-22a
8	31,8	2,03 <i>td</i> (12,1; 2,4)	23	26,0	1,21 <i>m</i>
9	50,1	0,98 <i>m</i>	24	45,8	0,97 <i>m</i>
10	36,5	-	25	29,1	1,71 <i>m</i>
11	21,1	1,50 <i>qd</i> H-11b (10,8; 4,6) 1,55 <i>m</i> H-11a	26	19,1	0,88 <i>d</i> 6,9
12	39,7	2,06 <i>dt</i> H-12a (12,8; 3,6) 1,21 <i>m</i> H-12b	27	19,0	0,86 <i>d</i> 6,9
13	42,3	-	28	23,0	1,31 <i>m</i>
14	56,7	1,04 <i>m</i>	29	12,1	0,89 <i>t</i> 7,4

Tableau 14 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C de L2 (CDCl_3).

VII.3.3- Détermination structurale du composé L3



β -sitostéryl 3 β -D-glucopyranoside

Ce composé a été isolé sous forme d'une poudre amorphe blanche. Son spectre de masse ESI enregistré en modes positif (Figure 50) et négatif (Figure 51) montrent respectivement des pics d'ions pseudomoléculaire à $m/z = 599$ $[M+Na]^+$ et $m/z = 575$ $[M-H]^-$, soit une masse moléculaire de 576 uma correspondant à une formule brute en $C_{35}H_{60}O_6$.

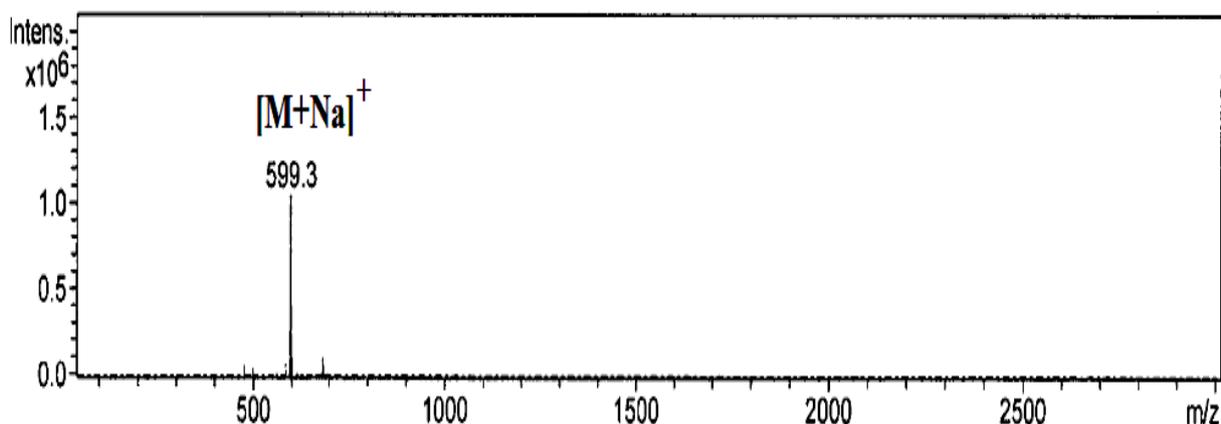


Figure 50: Spectre de masse ESI (mode positif) du composé L3

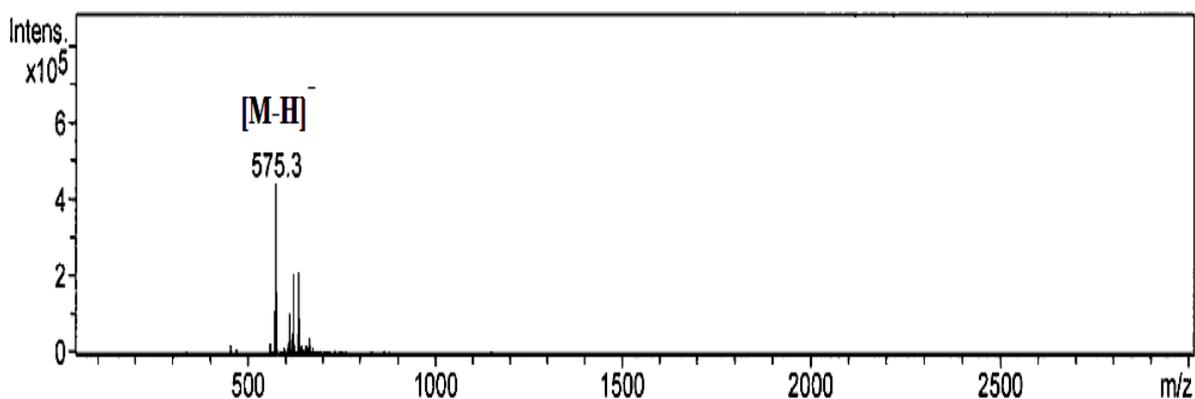


Figure 51: Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé L3

Le spectre RMN 1H (Figure 52) de ce composé enregistré dans le mélange méthanol, chloroforme deutérés présente beaucoup de similitudes avec celui du composé **L2**. En effet, on observe les mêmes signaux caractéristiques des protons : H-3 (3,59 ppm, *m*), H-6 (5,37 ppm, *d*, 5,0 Hz), des groupements méthyliques repérés à 0,70 (*s*), 1,03 (*s*), 0,95 (*d*, 5,1 Hz), 0,83 (*d*, 6,9 Hz), 0,94 (*d*, 5,3 Hz) et 0,85 ppm (*t*, $J = 7,5$ Hz). La différence notable réside en la présence, au niveau du composé **L2**, de signaux supplémentaires dans la zone allant de 3,2 à 3,84 ppm et d'un signal à 4,40 ppm (1H, *d*, 7,9 Hz) caractéristique d'un proton anomère, indiquant ainsi la présence d'une unité osidique.

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (Figure 53) montre clairement tous les signaux des carbones du β -sitostérol discuté précédemment (Figure 49). La seule exception concerne la valeur du déplacement chimique du carbone C-3 de l'ordre de 79,9 ppm au lieu de 71,5 ppm dans le cas du β -sitostérol. Le déblindage important vers les champs faibles de ce signal, traduit une substitution à ce niveau par l'unité osidique. La partie osidique est confirmée par la présence d'un signal de carbone anomère résonant à 101,5 ppm et de cinq signaux de carbones osidiques entre 60 et 76,9 ppm.

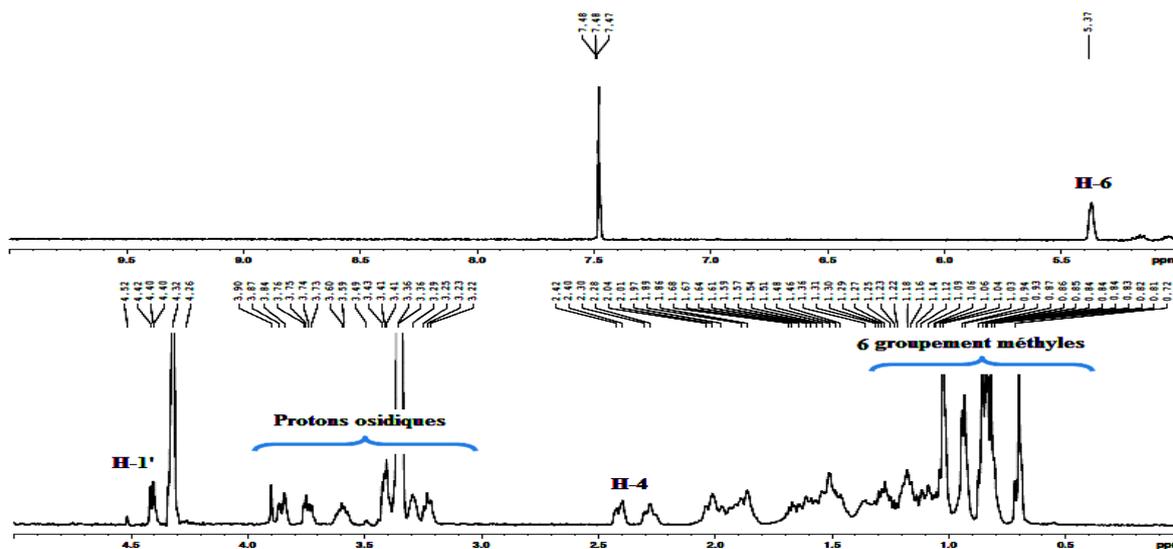


Figure 52 : Spectre RMN ^1H du composé L3

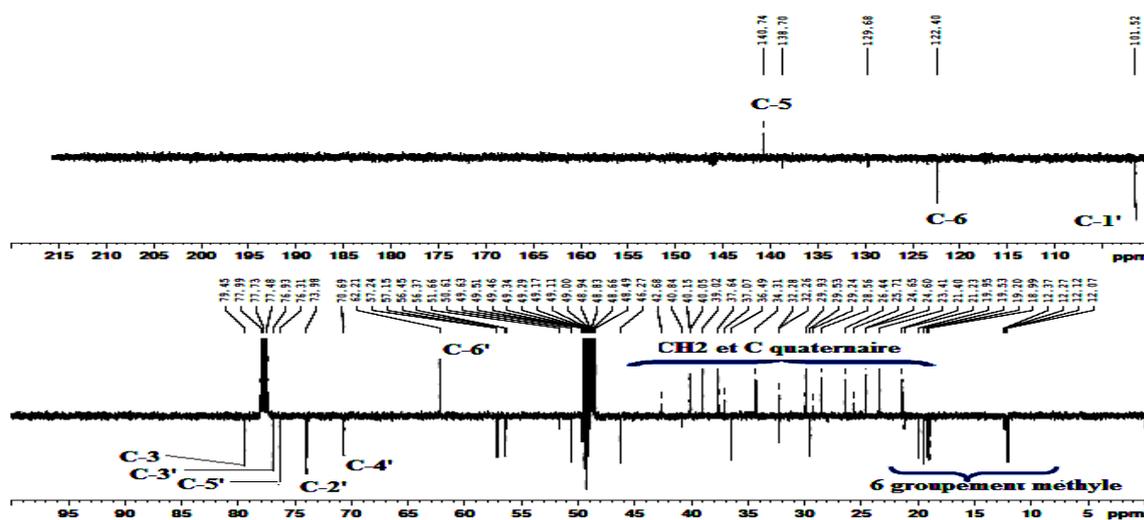


Figure 53 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé L3

Cette unité osidique a été identifiée par analyse COSY H-H (Figure 54) qui montre clairement la présence d'un système de spin à sept protons d'un hexose. En effet, partant du

proton anomérique H-1' à 4,40 ppm (1H, *d*, 7,9), on relie à travers leurs taches de corrélation, les protons H-2' (3,23 ppm, *t*, 7,9 Hz), H-3' (3,42 ppm, *t*, 7,9 Hz), H-4' (3,42 ppm, *t*, 7,9 Hz), H-5' (3,29 ppm, *m*) et enfin les 2 protons H-6'(3,84 ppm, *dl*, 10 Hz, H-6'a ; 3,75 ppm, *dd*, 10 et 5,0 Hz, H-6'b). Les grandes valeurs de constantes de couplage indiquent qu'il s'agit d'un glucose de configuration β ($J_{H1'-H2'} = 7,9$ Hz).

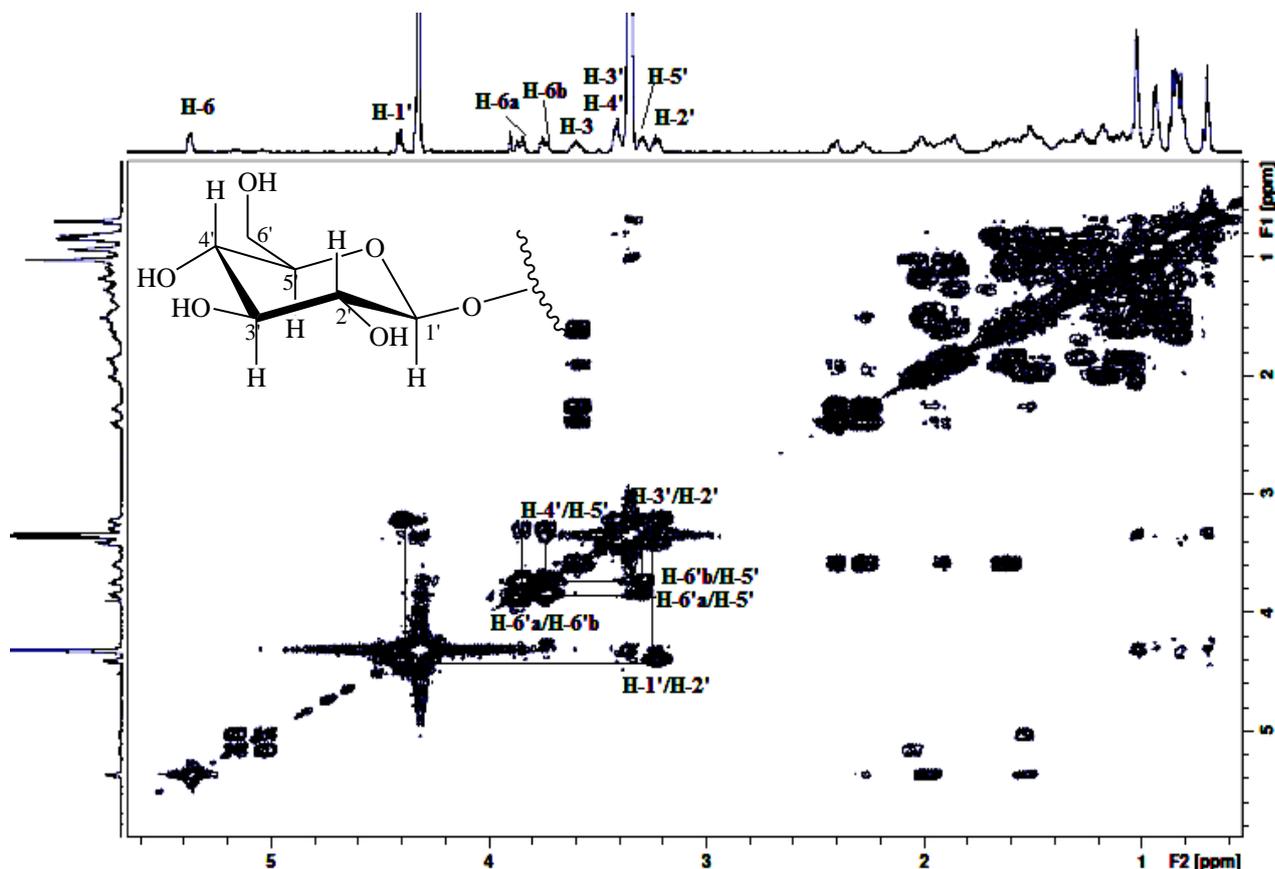


Figure 54 : Spectre COSY H-H de la partie glucosidique

L'expérience HSQC *J*-modulé (Figure 55) permet d'attribuer tous les déplacements chimiques des carbones du glucose : δ_C 101,5 (C-1'), 74,0 (C-2'), 76,9 (C-3'), 70,7 (C-4'), 76,3 (C-5') et 62,2 (C-6').

La corrélation $^3J_{H-C}$ observée sur le spectre HMBC (Figures 56) entre le proton anomère H-1' du glucose et le carbone C-3 de la génine, confirme que ce sucre est positionné en C-3.

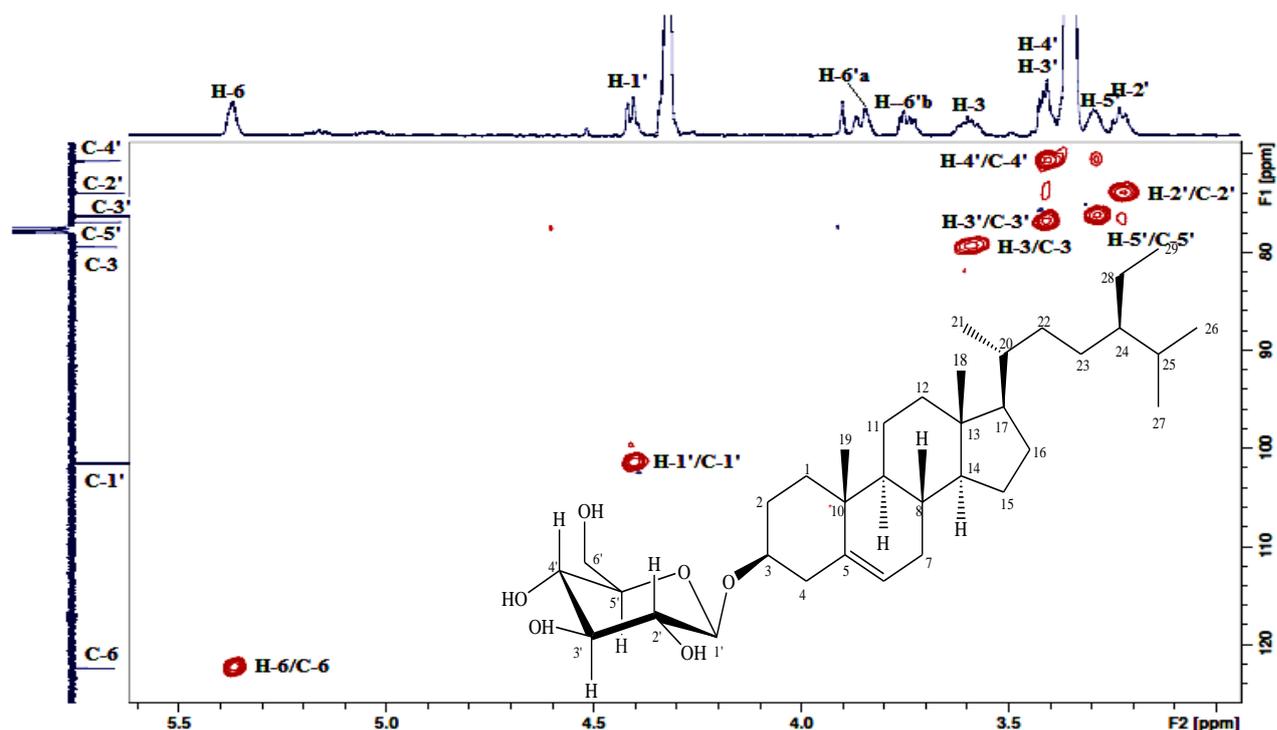


Figure 55: Spectre HSQC du composé L3

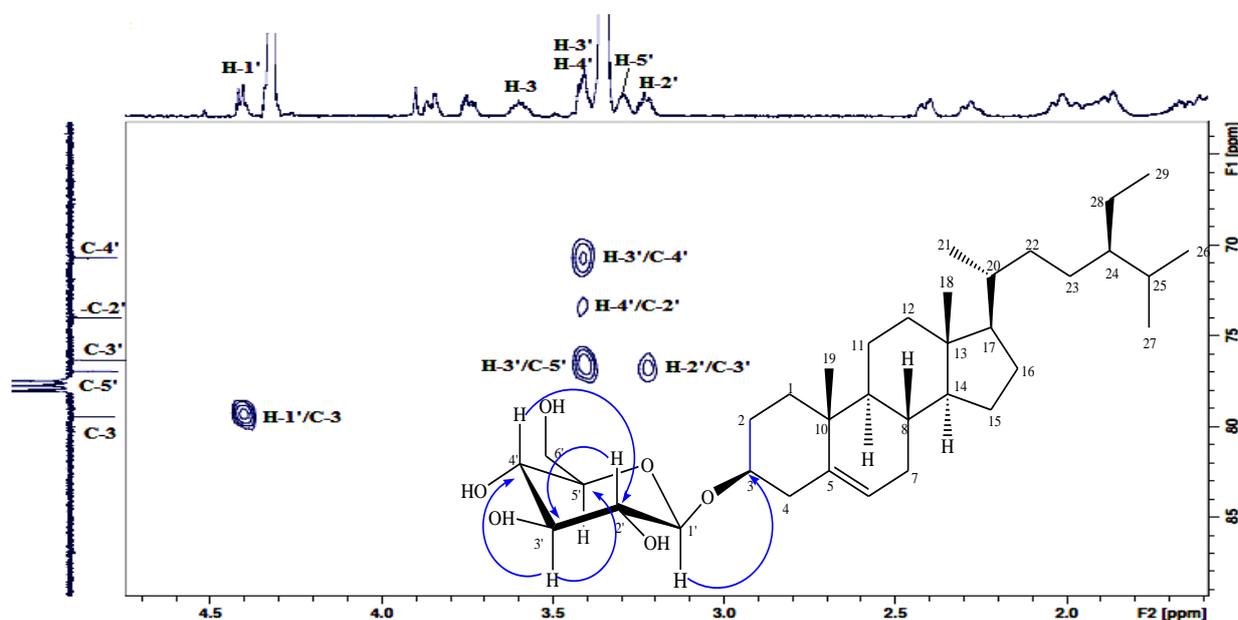
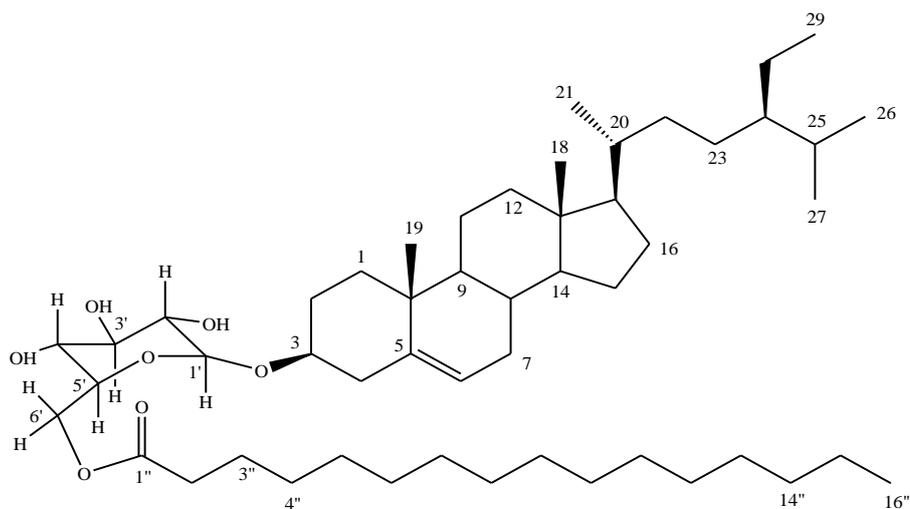


Figure 56: Partie du Spectre HMBC du composé L3

A l'issue de ces résultats spectraux, de la valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D = -43^\circ$, $C = 1,9$ g/100 ml dans CHCl_3) et de la comparaison avec les données de la littérature, le composé **L3** est identifié sans ambiguïté au 3β -D-glucopyranosyl β -sitostérol communément appelé Daucostérol. Le tableau 15 englobe les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé.

C	δ_C	$\delta_H J$ Hz	C	δ_C	$\delta_H J$ Hz
1	37,6	1,08 <i>m</i> H-1b 1,88 <i>m</i> H-1a	19	19,5	1,03 <i>s</i>
2	29,9	1,62 <i>m</i> H-2b 1,92 <i>m</i> H-2a	20	36,5	1,37 <i>m</i>
3	79,5	3,59 <i>m</i>	21	18,9	0,95 <i>d</i> 5,1
4	39,0	2,28 <i>dl</i> H-4b 10,0 2,42 <i>dm</i> H-4a 10,0	22	34,3	1,04 <i>m</i> H-22b 1,34 <i>m</i> H-22a
5	140,7	-	23	26,4	1,19 <i>m</i>
6	122,4	5,37 <i>d</i> 5,0	24	46,2	0,93 <i>m</i>
7	32,3	1,47 <i>m</i>	25	29,5	1,68 <i>m</i>
8	32,3	1,97 <i>m</i>	26	19,9	0,94 <i>m</i>
9	50,6	0,96 <i>m</i>	27	19,2	0,83 <i>m</i>
10	37,1	-	28	23,4	1,26 <i>m</i>
11	21,2	1,02 <i>m</i> H-11b 1,45 <i>m</i> H-11a	29	12,3	0,85 <i>t</i> 7,4
12	40,8	1,17 <i>m</i> H-12b 2,01 <i>m</i> H-11a	Glucose		
13	42,7	-	1'	101,5	4,40 <i>d</i> 7,9
14	57,2	1,03 <i>m</i>	2'	74,0	3,23 <i>t</i> 7,9
15	24,6	1,11 <i>m</i> H-15b 1,59 <i>m</i> H-15a	3'	76,9	3,42 <i>t</i> 7,9
16	28,6	1,29 <i>m</i> H-16b 1,84 <i>m</i> H-16a	4'	70,7	3,42 <i>t</i> 7,9
17	56,4	1,14 <i>m</i>	5'	76,3	3,49 <i>m</i>
18	12,1	0,70 <i>s</i>	6'	62,2	3,75 <i>dl</i> H6'b (10,0) 3,84 <i>dd</i> H6'a (5,0 ; 10,0)

Tableau 15: Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C du composé **L3** ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$)

VII.3.4- Détermination structurale du composé **L4** **β -sitostéryl-3 β -glucopyranoside-6'-O-palmitate**

Ce composé a été isolé sous forme d'une poudre blanche soluble dans un mélange chloroforme/méthanol. Le spectre de masse ESI-MS, enregistré en mode positif (Figure 57), donne un pic pseudomoléculaire à $m/z = 837$ correspondant à l'adduit $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire de 814 uma et une formule brute en $C_{51}H_{90}O_7$.

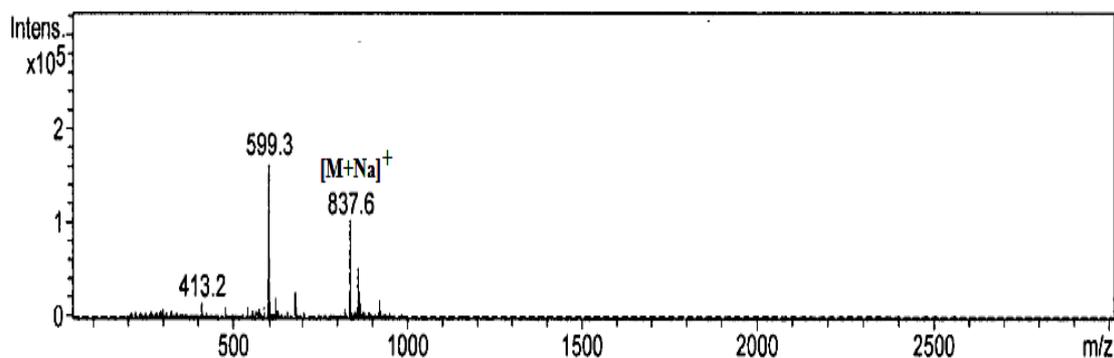


Figure 57: Spectre de masse ESI (mode positif) du composé **L4**

Le spectre RMN 1H de ce composé, enregistré dans un mélange chloroforme/méthanol deutérés (Figure 58), montre une similitude structurale avec celui du composé **L3** décrit précédemment. En effet, on reconnaît aisément les signaux des 6 groupements méthyles sortant dans l'intervalle 0,62-0,94 ppm (Me-18, Me-29, Me-26, Me-27, Me-21 et Me-19). On identifie également un signal sous forme de singulet large résonant à 5,41 ppm correspondant au proton oléfinique H-6, de même que le signal multiplet sortant à 3,55 ppm du proton oxyméthine H-3. On reconnaît également tous les signaux des protons du glucose H-1' (4,43 ppm, *d*, 7,5 Hz), H-2' (3,25 ppm, *t*, 8,4 Hz), H-3' (3,41 ppm, *m*), H-4' (3,39 ppm, *t*, 9,1 Hz),

H-5' (3,46 ppm, *m*) et H-6'(4,24 ppm, *m*, H-6'a ; 4,38 ppm, *m*, H-6'b) substituant la génine. Les différences majeures par rapport au composé **L3** résident en l'apparition de plusieurs signaux résonants à champ fort entre 1,09-1,30 ppm caractéristiques de protons de chaîne lipidique d'un acide gras. Le déblindage des signaux des protons osidiques H-6'a et H-6'b repérés à 4,38 et 4,24 ppm au lieu de 3,75 et 3,84 ppm observés pour composé **L3** (tableau 15) indique une acylation à ce niveau par l'acide gras saturé en question.

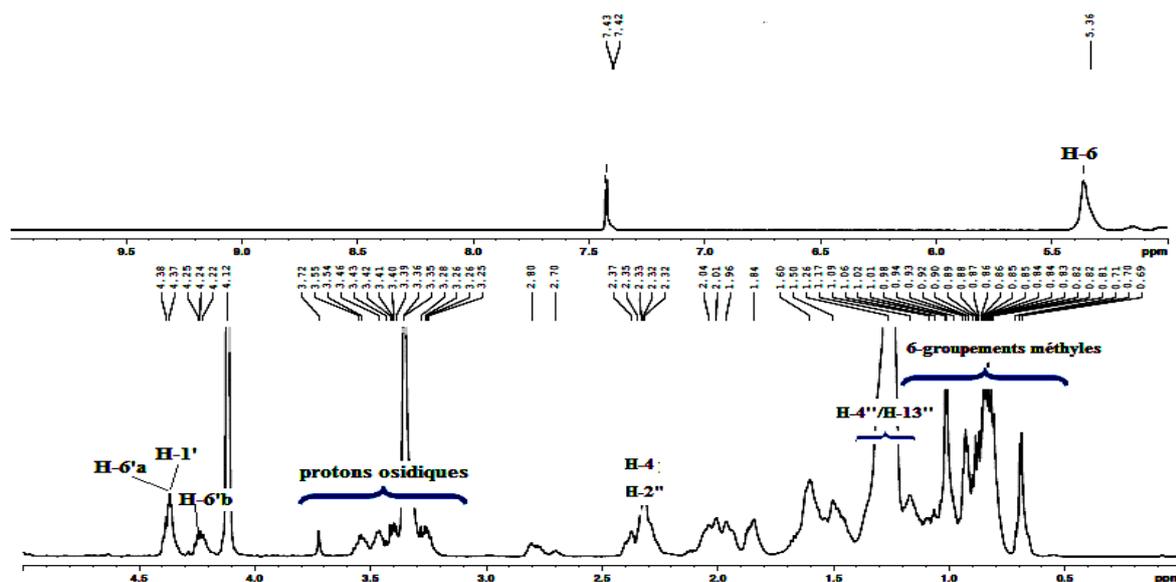
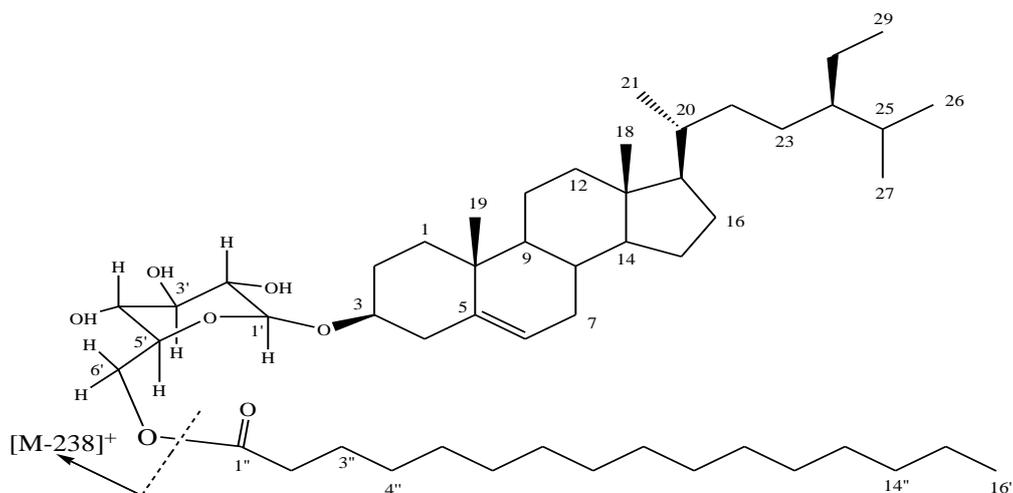


Figure 58 : Spectre RMN ^1H du composé **L4**

La présence d'une chaîne d'acide gras est confirmée par le pic de fragmentation à $m/z = 599$ observé sur le spectre de masse (Figure 57). Une différence de 238 uma permet d'identifier une chaîne palmitoyle.



Ces suggestions se trouvent renforcées par l'analyse du spectre RMN ^{13}C (Figure 59) qui confirme la similitude structurale entre les composés **L4** et **L3**, en permettant de

reconnaitre toutes les attributions des carbones établies pour le composé **L3**. Cependant, il révèle en outre un signal de carbone quaternaire à δ_C 174,6 ppm, un signal de carbone CH_3 à 14,0 ppm ainsi que des signaux apparaissant à 34,5, 25,1 et 29,1-29,9 ppm, confirmant ainsi la présence d'un acide gras.

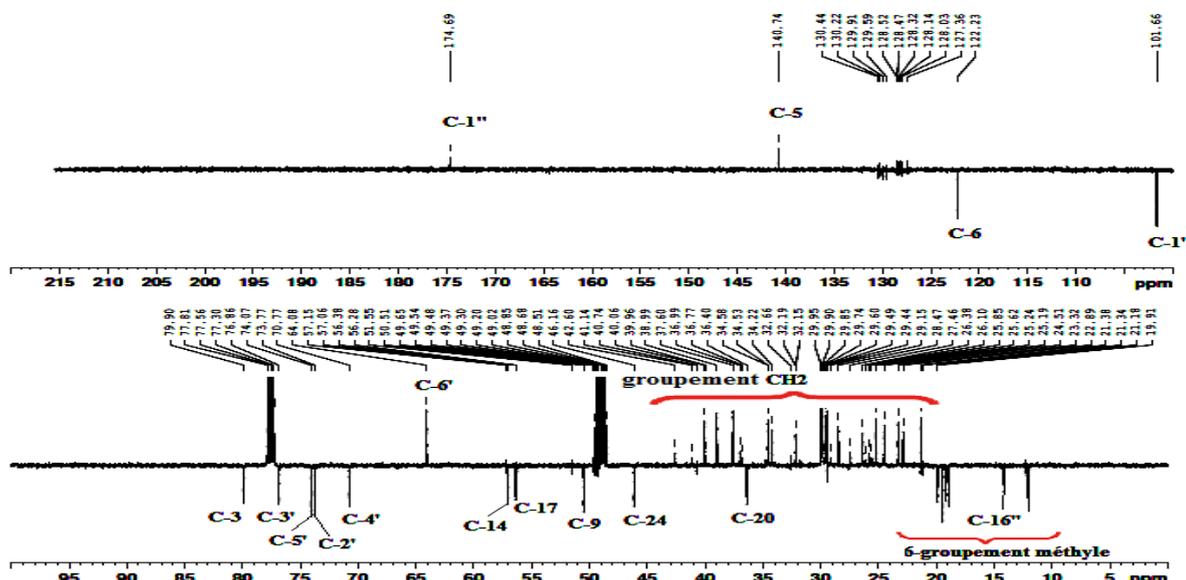


Figure 59 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **L4**

L'expérience HSQC *J*-modulé permet d'attribuer tous les déplacements chimiques des carbones du glucose (Tableau). Les déplacements chimiques déblindés des protons H-6' (δ_H 4,38 H-6'a ; δ_H 4,24 H-6'b) indiquent une substitution à ce niveau par un groupement acyle. L'expérience HMBC qui montre des corrélations entre les protons H-6'a et H-6'b (δ_H 4,38 H-6'a ; δ_H 4,24 H-6'b) et le carbonyle d'un groupement ester résonant à 174,6 ppm (C-1'') confirme bien l'attachement de la chaîne palmitoyle en C-6' du glucose.

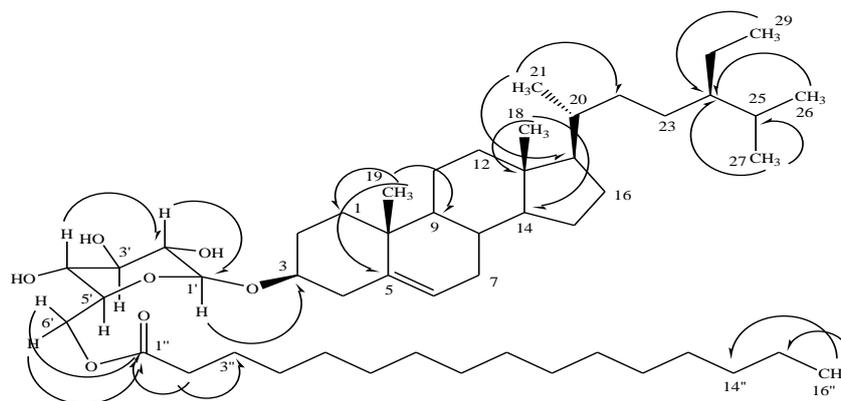


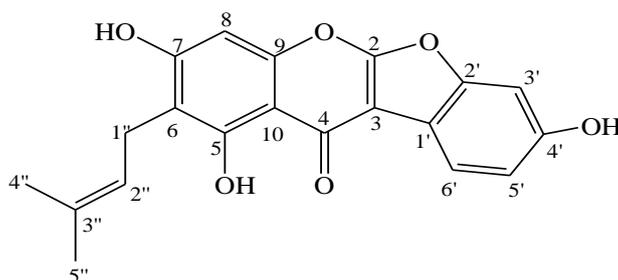
Figure 60 : Principales corrélations HMBC observées pour le composé **L4**

L'ensemble des données spectrales accumulées, en plus de la valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = -40^\circ$ ($C = 1,0$ g/100 ml, $CHCl_3$), confirme que le présent composé est totalement identique au β -sitoséryl-3 β -glucopyranoside-6'-*O*-palmitate, isolé antérieurement

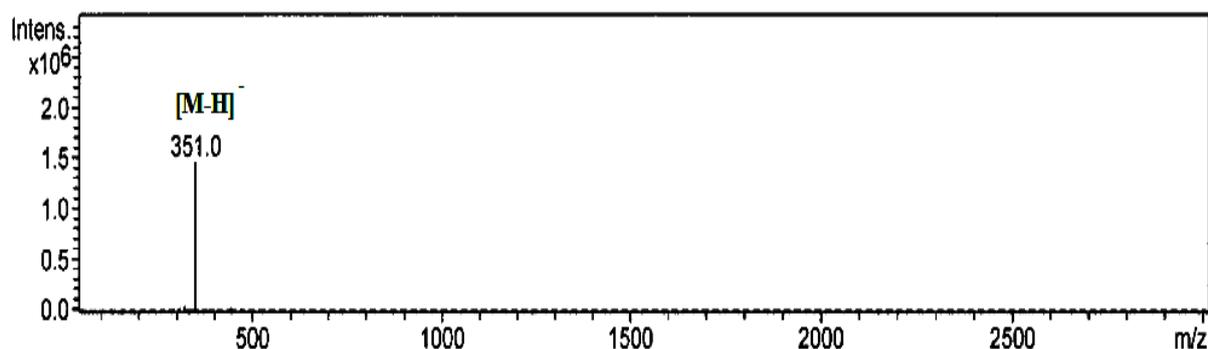
de *Centaurea regia* (Asteraceae) [76] et *Plumbago zeylanica* L. (Plumbaginaceae) [77]. A notre connaissance, ce composé a été identifié pour la première fois au sein de la famille Fabaceae.

C	δ_C	$\delta_H J$ Hz	C	δ_C	$\delta_H J$ Hz
1	37,6	1,05 <i>m</i> H-1b 1,85 <i>m</i> H-1a	23	26,1	1,18 <i>m</i>
2	29,9	1,61 <i>m</i> H-2b 1,98 <i>m</i> H-2a	24	46,1	0,89 <i>m</i>
3	79,9	3,60 <i>m</i>	25	29,5	1,59 <i>m</i>
4	39,9	2,29-2,32 <i>m</i>	26	19,2	0,76 <i>d</i> 8,6
5	140,7	-	27	19,8	0,76 <i>d</i> 8,6
6	122,2	5,41 <i>sl</i>	28	21,1	1,12 <i>m</i>
7	32,1	1,50 <i>m</i> H-7b 1,98 <i>m</i> H-7a	29	21,3	0,72 <i>d</i> 6,8
8	29,9	1,47 <i>m</i>	Glucose		
9	50,5	0,94 <i>m</i>	1'	101,6	4,43 <i>d</i> 7,5
10	36,7	-	2'	73,7	3,25 <i>t</i> 8,4
11	21,1	1,51 <i>m</i>	3'	76,8	3,41 <i>m</i>
12	39,9	1,12 <i>m</i> H-12b 2,01 <i>m</i> H-11a	4'	70,4	3,39 <i>t</i> 9,1
13	42,7	-	5'	74,0	3,46 <i>m</i>
14	57,0	0,98 <i>m</i>	6'	64,0	4,24 <i>m</i> H6'b 4,38 <i>m</i> H6'a
15	24,5	1,05 <i>m</i> H-15b 1,53 <i>m</i> H-15a	palmitate		
16	28,4	1,31 <i>m</i> H-16b 1,83 <i>m</i> H-16a	1''	174,6	-
17	56,3	1,18 <i>m</i>	2''	34,5	2,32 <i>m</i>
18	12,0	0,62 <i>s</i>	3''	25,1	1,60 <i>m</i>
19	19,2	0,94 <i>m</i>	4''-13''	29,1-29,9	1,20-1,30 <i>m</i>
20	36,5	1,38 <i>m</i>	14''	32,1	1,17 <i>m</i>
21	18,8	0,86 <i>m</i>	15''	22,6	1,24 <i>m</i>
22	34,2	1,02 <i>m</i> H-22b 1,32 <i>m</i> H-22a	16''	14,0	0,86 <i>t</i> 7,6

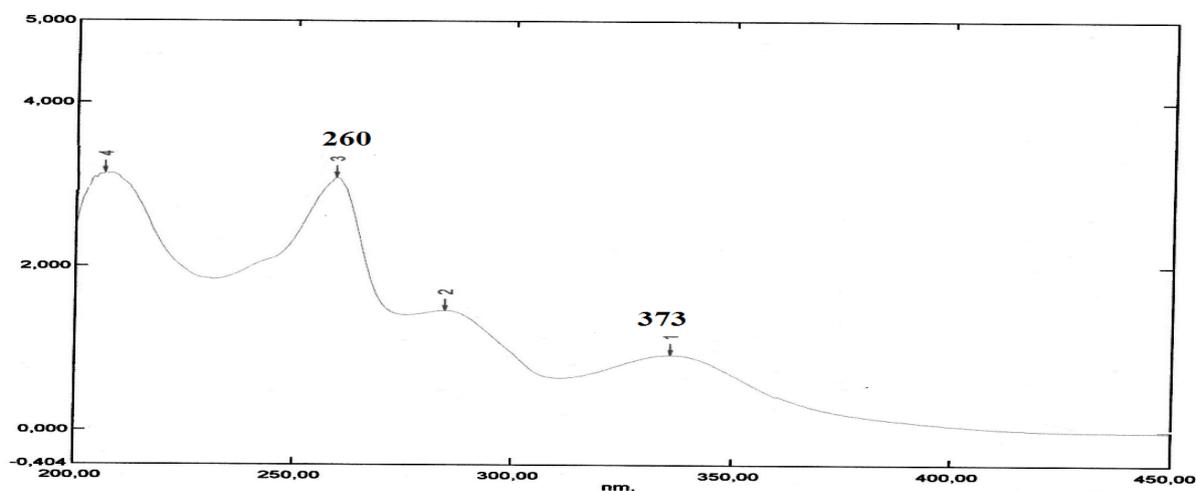
Tableau 16 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C de **L4** ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$)

VII.3.5- Détermination structurale du composé **L5****Lupinalbine B**

Le composé **L5** a été isolé sous forme d'un cristal jaune. Son spectre ESI-MS, enregistré en mode négatif, présente un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 351$ $[M-H]^-$ correspondant à une masse moléculaire de 352 uma et une formule brute en $C_{20}H_{16}O_6$.

**Figure 61** : Spectre de masse ESI (mode négatif) du composé **L5**

Le spectre UV (Figure 62) du composé **L5** présente des maxima à 260, 285,5, 328,5 et 373 nm, très caractéristiques d'un isoflavonoïde [78, 79].

**Figure 62** : Spectre UV du composé **L5**

Le spectre RMN ^1H (Figure 63) du composé **L5** montre la présence de quatre protons aromatiques entre 6,55 et 7,85 ppm se répartissant en :

- trois protons résonant à δ_{H} 6,95 (*dd*, $J = 8,4$; 1,5 Hz, 1H), 7,02 (*d*, $J = 1,5$ Hz, 1H) et 7,85 (*dd*, $J = 8,4$ Hz, 1H) appartenant à un même système de spin selon le spectre COSY H-H (Figure 64). Ils sont identifiables à un système AMX du cycle B d'un isoflavonoïde 2',4' di- oxygénés [78], confirmé d'ailleurs par analyse HMBC (Figure 65).
- un proton à δ_{H} 6,55 (*s*, 1H) positionné en C-6 ou C-7 ou C-8 du cycle A trisubstitué de l'isoflavonoïde [78].

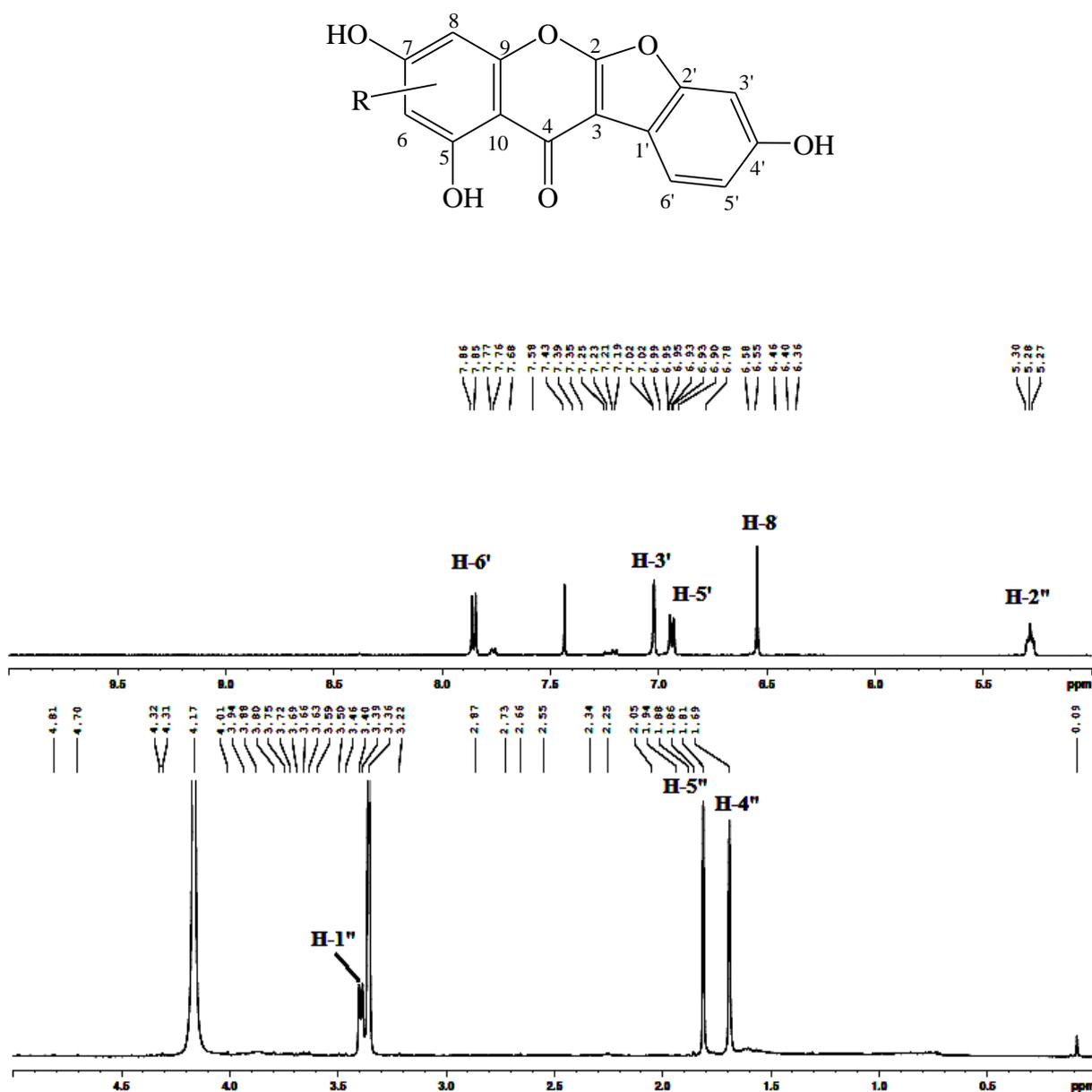


Figure 63 : Spectre RMN ^1H du composé **L5**

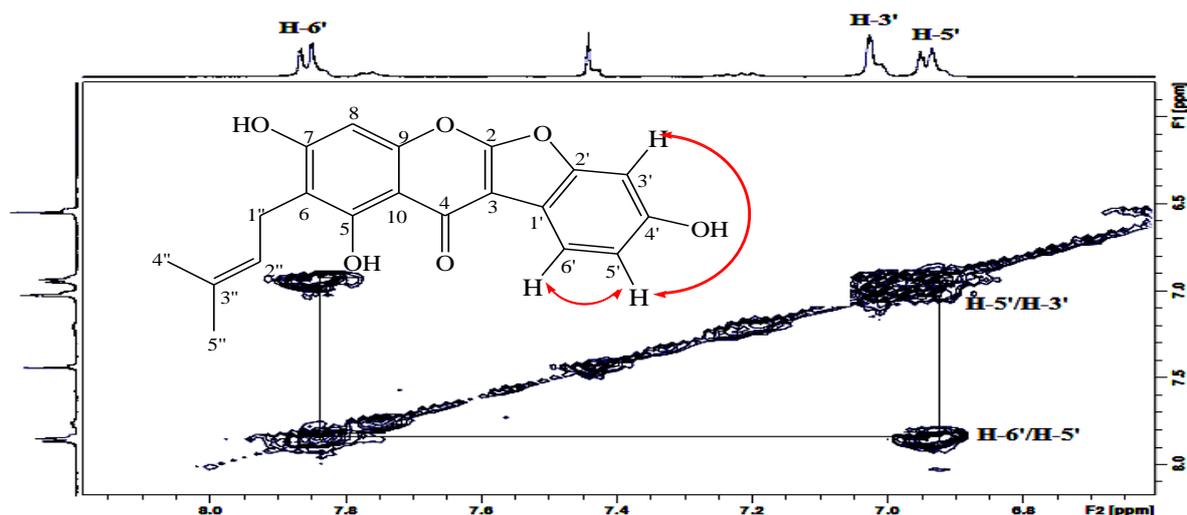


Figure 64 : Spectre COSYH-H étalé du composé L5

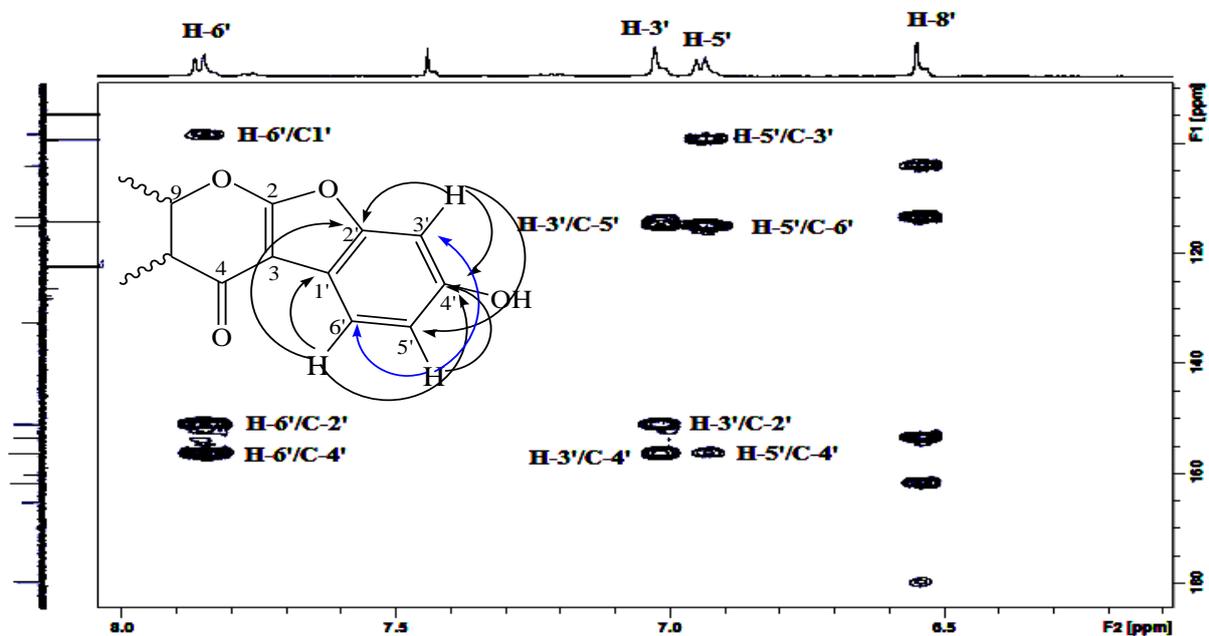


Figure 65 : Spectre HMBC étalé du composé L5

Le spectre proton montre également deux signaux singulets relativement déblindés d'intégration 3H chacun à 1,70 et 1,82 ppm indiquant la présence de deux groupements méthyles, un signal triplet à 5,28 ppm (1H, t , $J = 6,9$ Hz) d'un proton éthylénique ainsi qu'un signal doublet à 3,5 ppm (2H, d , $J = 6,9$ Hz) d'un groupement CH_2 . L'ensemble de ces signaux ainsi que la multiplicité observée nous oriente vers la présence d'un groupement linéaire de type 3,3-diméthylallyle (3,3-DMA) rencontré dans bon nombre d'isoflavonoïdes [78] appelés justement isoflavonoïdes prénylés et substituant le cycle A. La prénylation linéaire de type 3,3-DMA de notre isoflavonoïde est confirmé par le spectre COSY H-H (Figure 64) qui montre les corrélations entre le proton éthylénique nommé H-2'' et les protons

méthyléniques H-1'' d'une part, les protons méthyliques nommés H-4'' et H-5'' et les protons H-1'' et H-2'' d'autre part.

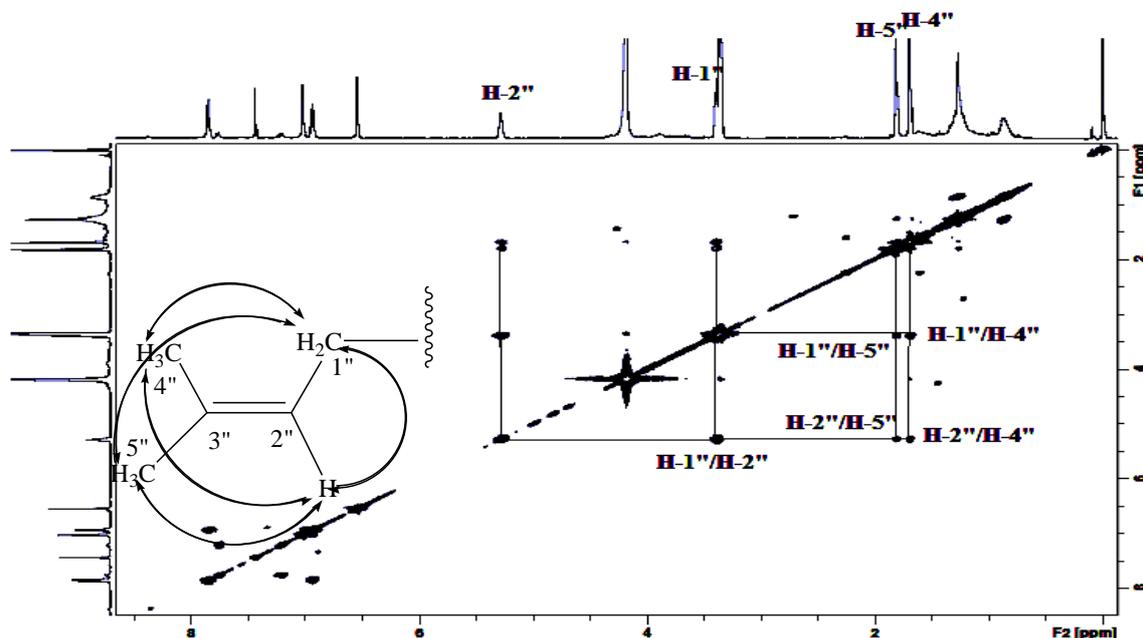


Figure 66 : Spectre COSY H-H du composé L5

Il reste maintenant à déterminer le point de branchement du groupement prénylé sur le cycle A sachant que ce dernier est trisubstitué et possède deux groupements hydroxyles. Sa localisation en C-6 est confirmée par analyse HMBC (Figure 67) qui montre des corrélations entre le proton H-1'' (3,50 ppm, 2H, *d*, $J = 6,9$ Hz) de ce groupement et deux carbones oxygénés repérés à 160,1 et 161,7 ppm ne pouvant être que C-5 et C-7 respectivement [78]. Le proton repéré à 6,55 ppm (*s*, 1H) et attribué au proton H-8 du cycle A, corrèle sur le spectre HMBC (Figure 68) avec des carbones résonant à δ_C 113,4 (C-6), 161,7 (C-7) ainsi qu'avec 2 carbones quaternaires repérés à 158,5 et 104,0 ppm correspondant respectivement aux carbones C-9 et C-10.

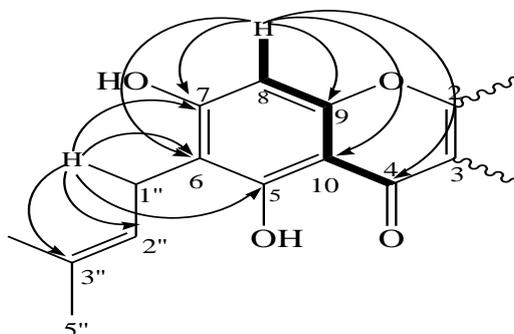


Figure 67 : Corrélations HMBC des protons H-8 et H-1''

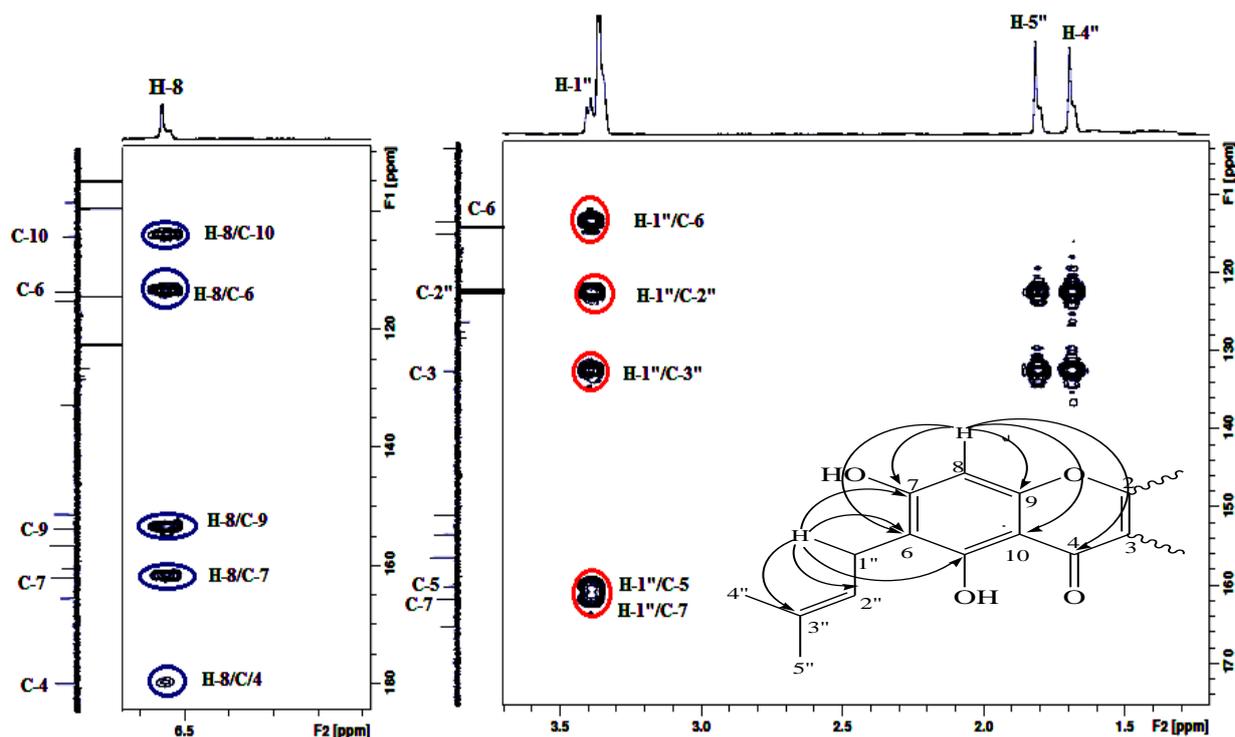


Figure 68 : Spectre HMBC du composé L5

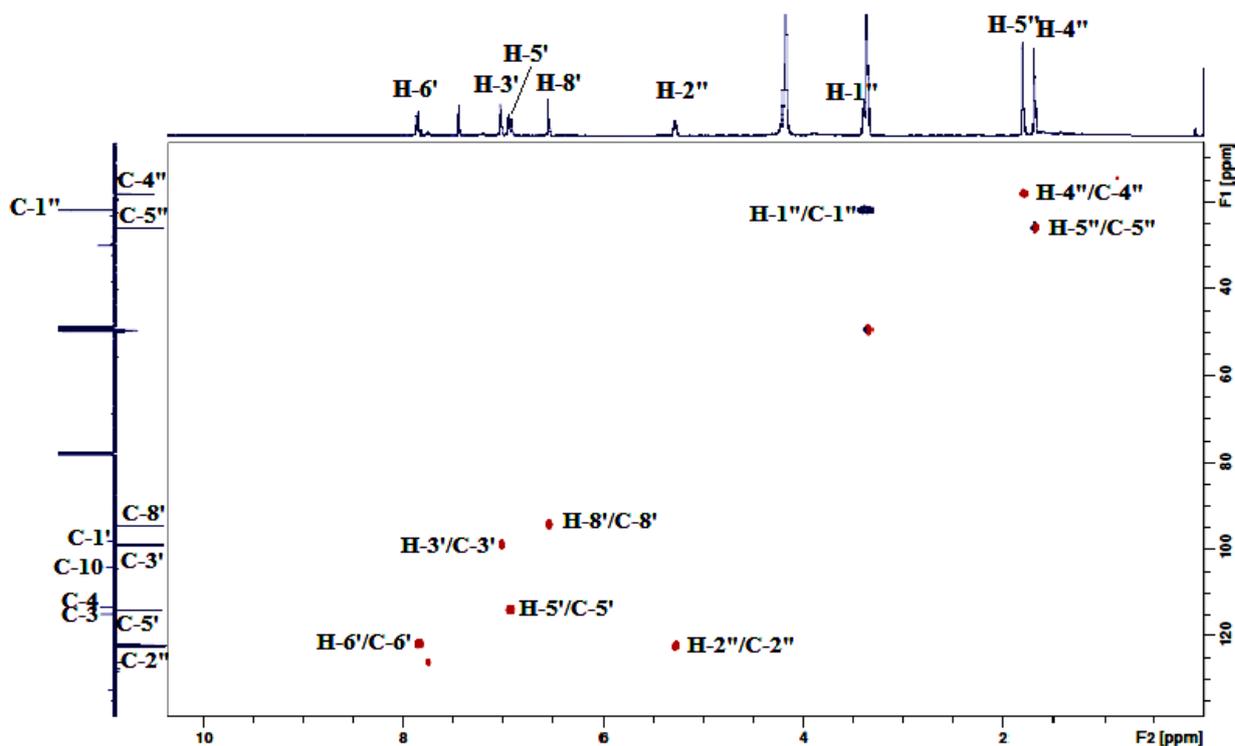


Figure 69 : Spectre HSQC du composé L5

L'analyse combinée des spectres COSY H-H, HSQC et HMBC permet d'assigner tous les signaux des carbones de la molécule (Figure 70).

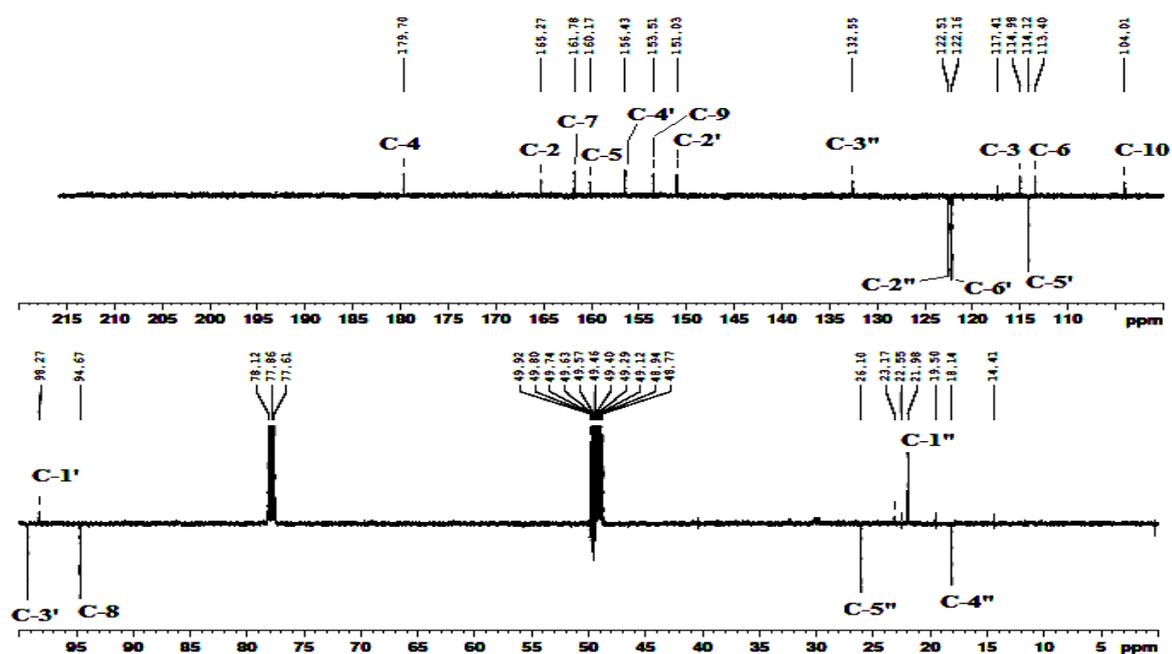


Figure 70 : Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **L5**

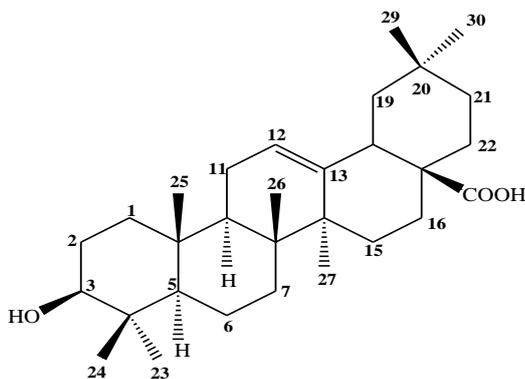
Toutes les données spectrales établies par RMH ^1H (Figure 63), RMN ^{13}C (Figure 70), COSY H-H (Figure 64, 66), HMBC (Figure 65 et 68) et HSQC (Figure 70) ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [78], permettent d'identifier le composé **L5** au 2, 6, 8-trihydroxy-7-(3-méthyl-but-2-ényl)-10, 11-dioxa-benzo[b]fluorèn-5-one, connu sous le nom de Lupinalbine B. Ce composé a été identifié antérieurement dans les plantes du genre *Lotus* comme *L. creticus* [79]. Les déplacements chimiques de ses protons et carbones sont présentés dans le tableau 17 suivant.

C	δ_{C}	δ_{H} <i>J</i> Hz
1	-	-
2	165,2	-
3	114,9	-
4	179,7	-
5	160,1	-
6	113,4	-
7	161,7	-
8	94,6	6,55 <i>s</i>
9	158,5	-

10	104,0	-
1'	98,2	-
2'	151,0	-
3'	98,2	7,02 <i>d</i> 1,5
4'	156,4	-
5'	114,1	6,95 <i>dd</i> (8,4, 1,5)
6'	122,1	7,85 <i>d</i> 8,4
1''	21,9	3,40 <i>d</i> 6,9
2''	122,5	5,28 <i>t</i> 6,9
3''	132,5	-
4''	18,1	1,7 <i>sl</i>
5''	26,1	1,82 <i>sl</i>

Tableau 17 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C de **L5**
($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$)

VII.3.6- Détermination structurale du composé **L6**



Acide (3 β)-3-hydroxyoléan-12-én-28-oïque ou Acide oléanolique

Le composé **L6** a été obtenu sous forme d'une poudre blanche amorphe, soluble dans le chloroforme et donnant une coloration rouge après révélation à l'acide sulfurique.

Son spectre de masse ESI, enregistré en mode négatif (Figure 71), montre un pic pseudomoléculaire à $m/z = 455$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ correspondant à une masse moléculaire de 456 uma et une formule brute en $\text{C}_{34}\text{H}_{62}\text{O}_3$.

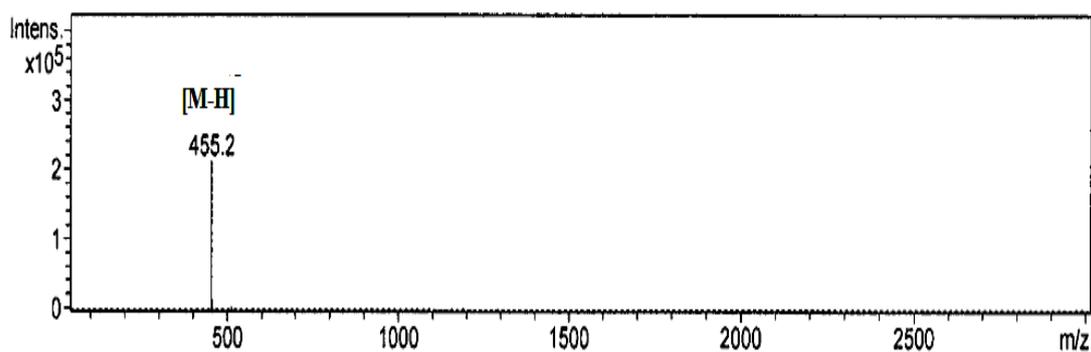


Figure 71 : Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) composé L6

Son spectre RMN- ^1H enregistré dans le mélange $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$, présente sept signaux singulets de protons méthyliques entre 0,8 et 1,2 ppm, un signal de proton hydroxyméthine à 3,2 ppm (1H, *dd*, $J = 6,0 ; 9,9$ Hz) ainsi qu'un signal de proton oléfinique à 5,27 ppm (1H, *t*, $J = 3,6$ Hz), indiquant clairement qu'on est en présence d'un triterpène pentacyclique à squelette oléanane insaturé en 12-13: squelette Δ^{12} oléanène. Le déblindage du signal du proton H-18 résonant à 2,85 ppm (1H, *dd*, 13,5 et 3,8 Hz) suggère la présence d'un groupement carboxyle substituant le carbone C-23 du triterpène.

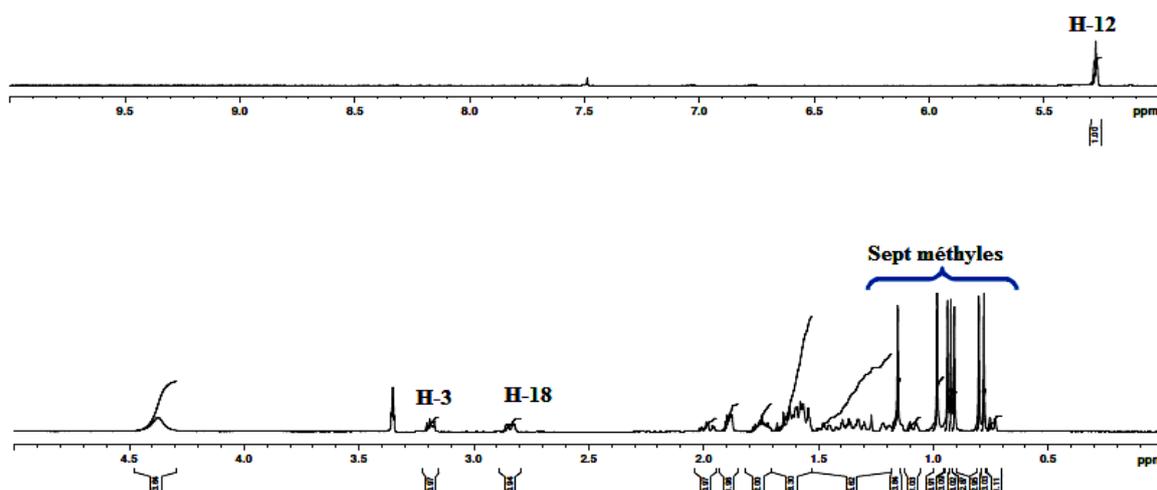


Figure 72 : Spectre RMN ^1H du composé L6

Le spectre RMN ^{13}C (Figure 73) en apporte la confirmation à travers les sept signaux méthyliques résonants dans la région allant de 15,5 à 33,2 ppm, le signal C-H éthylénique (C-12) à 122,8 ppm ainsi que le carbone C-3 oxygéné à 79,0 ppm. Sa valeur de déplacement

chimique montre que ce dernier est porteur d'un OH libre. Par ailleurs, il est aussi observé un signal d'un carbonyle d'acide résonant 181,7 ppm.

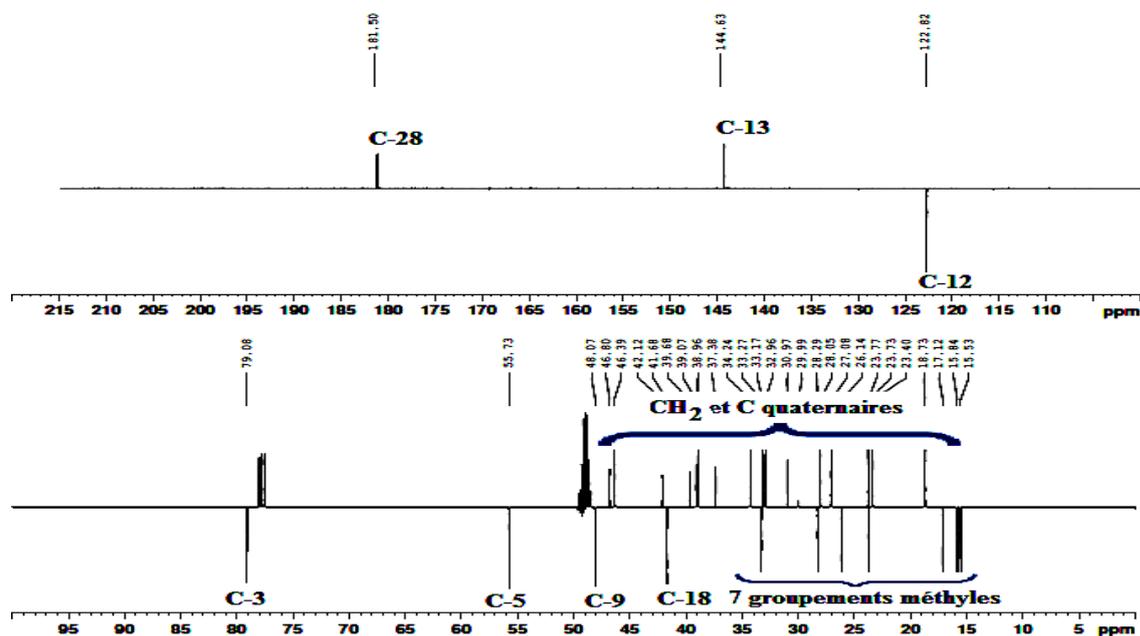
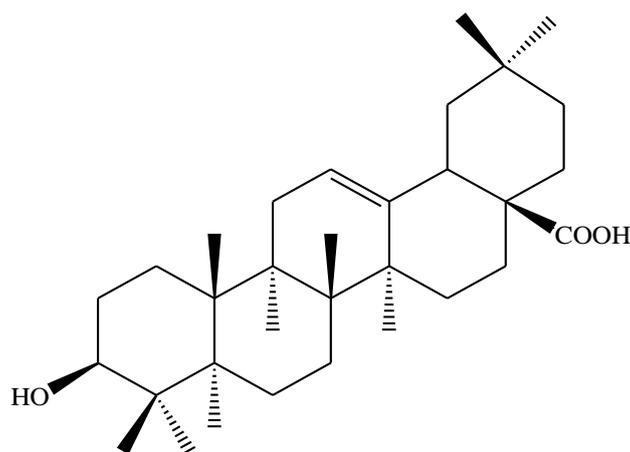


Figure 73 : Spectre RMN ^{13}C J-modulé du composé L6

L'attribution des autres carbones, obtenue conjointement par HSQC (Figure 74) et HMBC (Figure 75), permet d'identifier un composé assez distribué dans le règne végétal, à savoir l'acide oléanolique [80]. Ce composé possède des activités biologiques : anti-inflammatoire, antitumorale, anti-hyperlipidémie et antimicrobienne [81]. Ce composé a été antérieurement isolé de plusieurs espèces du genre *Lotus* comme *L. garcinii* [57].



Acide oléanolique

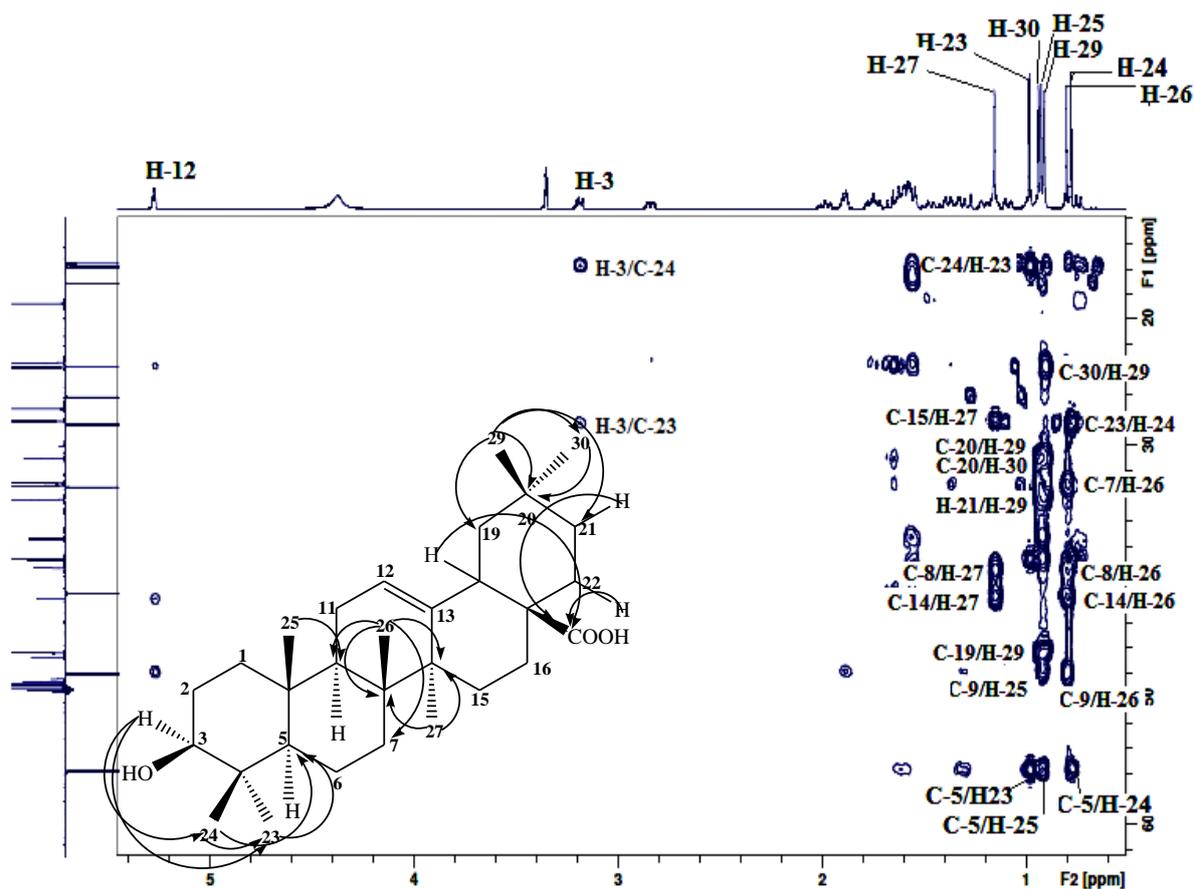


Figure 74 : Spectre HMBC du composé L6

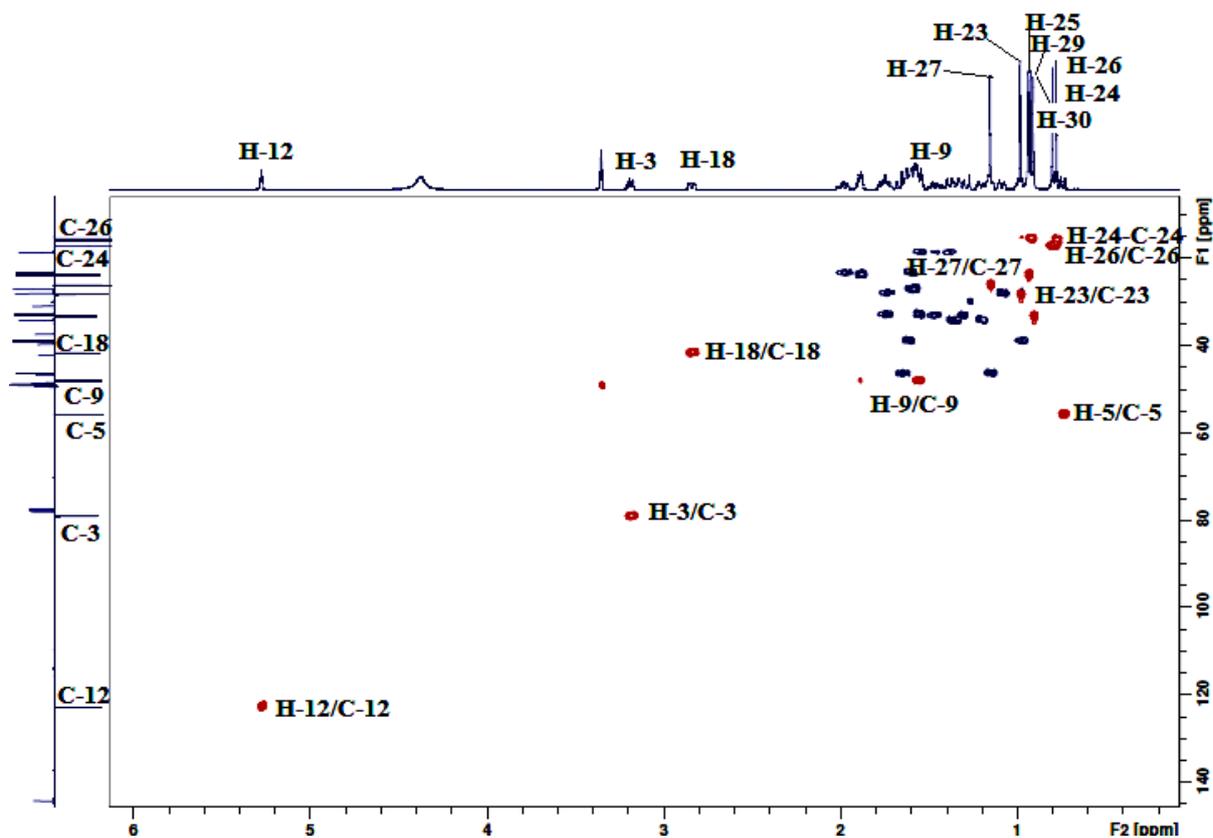


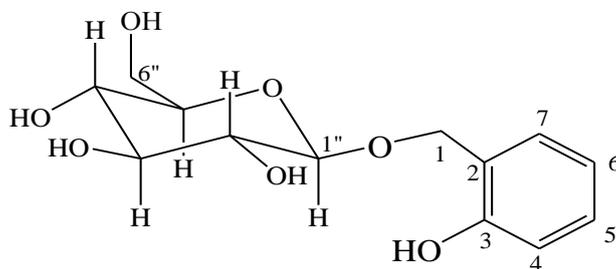
Figure 75 : Spectre HSQC du composé L6

Les déplacements chimiques des signaux observés en RMN ^1H et ^{13}C de **L6** sont présentés dans le tableau 18.

C	δ_{C}	δ_{H} J Hz	C	δ_{C}	δ_{H} J Hz
1	38,9	0,98 <i>m</i> H-1b 1,61 <i>m</i> H-1a	16	23,4	1,62 <i>m</i> H-16b 1,94 <i>m</i> H-16a
2	28,0	1,15 <i>m</i> H-1b 1,74 <i>m</i> H-1a	17	46,8	-
3	79,0	3,20 <i>dd</i> (6,0 ; 9,9)	18	41,6	2,85 <i>dd</i> (4,0; 13,6)
4	39,1	-	19	46,3	1,15 <i>m</i> H-19b 1,67 <i>m</i> H-19a
5	55,7	0,58 <i>m</i>	20	30,9	-
6	18,7	1,55 <i>m</i> H-6b 1,75 <i>m</i> H-6a	21	34,1	1,31 <i>m</i> H-21b 1,47 <i>m</i> H-21a
7	32,9	1,38 <i>m</i>	22	33,1	1,55 <i>m</i> H-22b 1,65 <i>m</i> H-22a
8	39,9	-	23	28,2	1,15 <i>s</i>
9	48,0	1,57 <i>m</i>	24	15,8	0,79 <i>s</i>
10	37,3	-	25	15,5	0,92 <i>s</i>
11	23,7	1,88 <i>m</i>	26	17,1	0,80 <i>s</i>
12	122,8	5,27 <i>t</i> 3,6	27	26,1	1,15 <i>s</i>
13	144,6	-	28	181,5	-
14	42,1	-	29	33,1	0,90 <i>s</i>
15	27,0	1,59 <i>m</i> H-15a 1,90 <i>m</i> H-15b	30	23,7	0,93 <i>s</i>

Tableau 18: Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C de **L6** ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$).

VII.3.7- Détermination structurale du composé **L7**



2-hydroxybenzyl β -D-glucopyranoside

Le composé **L7** a été isolé sous forme d'une poudre blanche. Il est visible en UV (254 nm) et Il réagit par CCM en donnant une coloration rose claire après pulvérisation à l'acide sulfurique à 50 %.

Son spectre de masse obtenu par ionisation douce (ESIMS) montre en mode positif (Figure 75), deux pics d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 595 [2M+Na]^+$ et $309 [M+Na]^+$, soit une masse moléculaire de 286 uma correspondant à une formule brute en $C_{13}H_{18}O_7$.

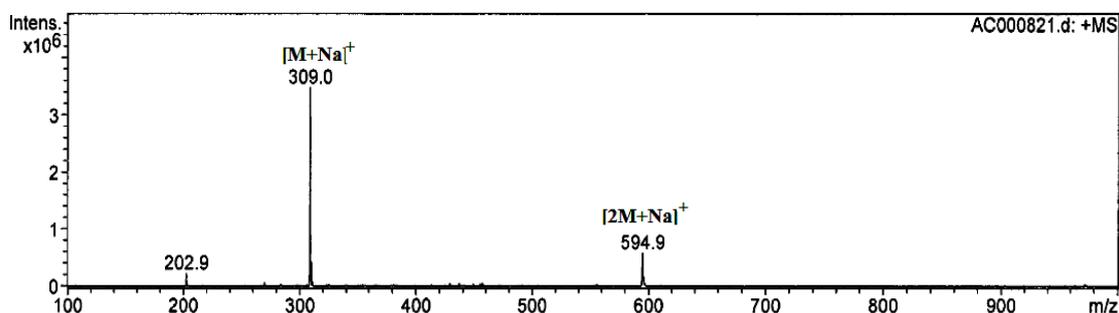


Figure 76 : Spectre de masse ESI/MS (mode positif) du composé L7

Le spectre RMN 1H , enregistré dans CD_3OD à 500 MHz (Figure 77), montre les signaux correspondant à 4 protons aromatiques résonnant entre 6,78 et 7,35 ppm, de protons osidiques sortant dans la zone 3,41-3,91ppm et un signal caractéristique de proton anomère repéré à 4,41 ppm (1H, *d*, 7,7 Hz). La multiplicité des signaux des 4 protons aromatiques (Figure 78) sortant à δ_H 6,79 (*d*, $J = 9,7$ Hz), 7,13 (*td*, $J = 7,8 ; 1,4$ Hz), 6,83 (*d*, $J = 7,4$ Hz) et 7,34 (*dd*, $J = 7,5 ; 1,3$ Hz) suggère la présence d'un noyau aromatique orthodisubstitué.

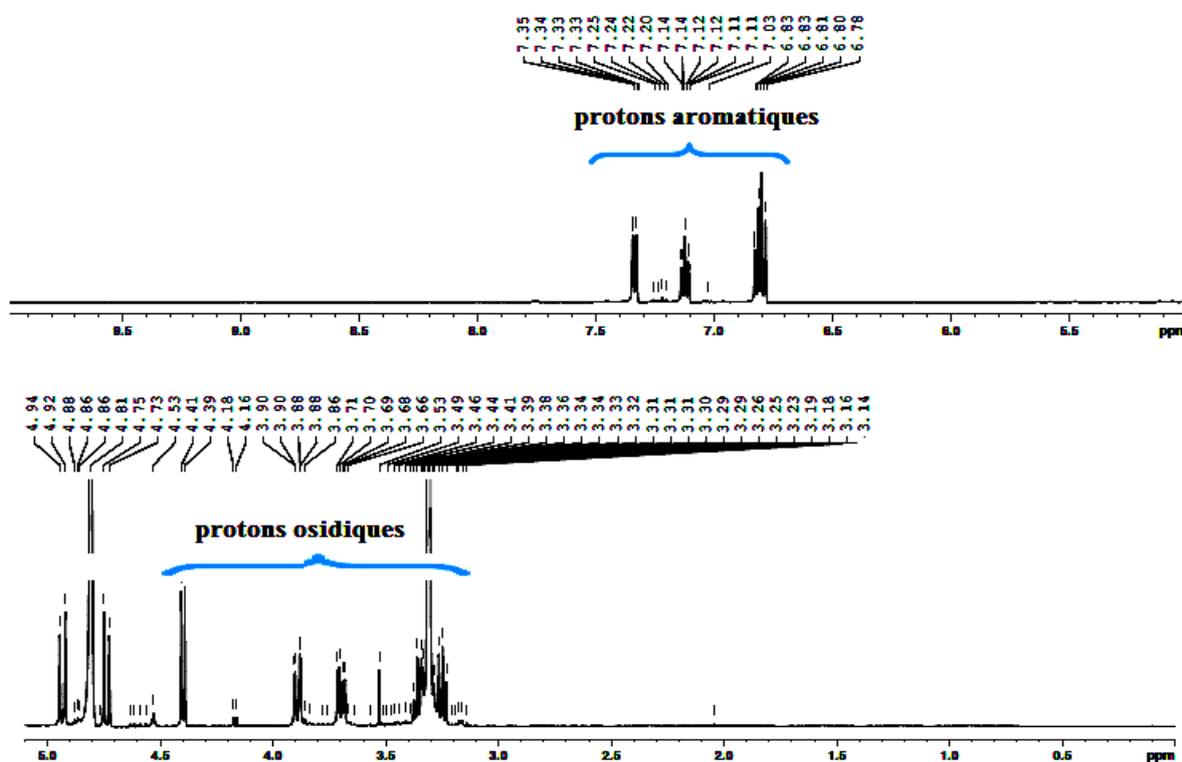


Figure 77: Spectre RMN 1H du composé L7

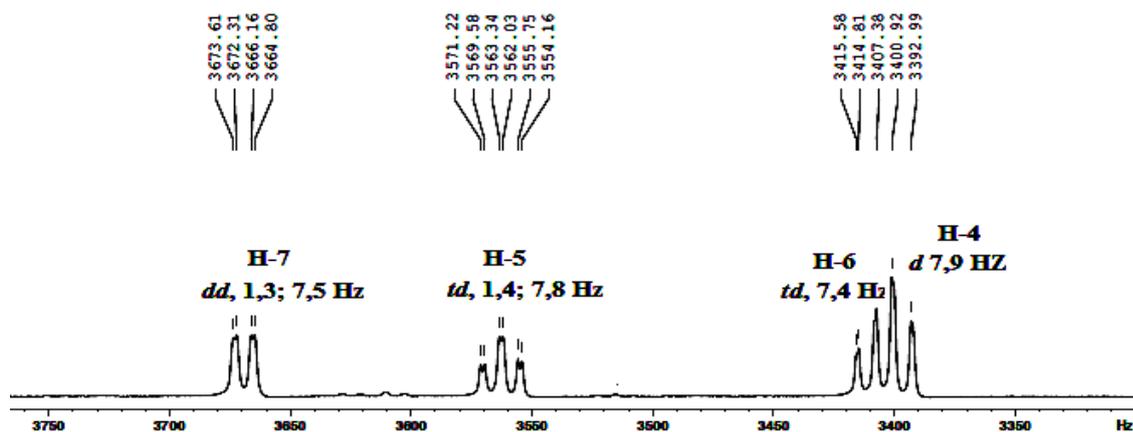


Figure 78: Spectre RMN ^1H étalé (région 6,7-7,4 ppm) du composé L7

Ceci est confirmé par expérience COSY H-H (Figure 79) qui montre clairement le système de spins constituant les protons cités. Ce premier constat nous oriente vers un composé phénolique non flavonoïdique glycosylé.

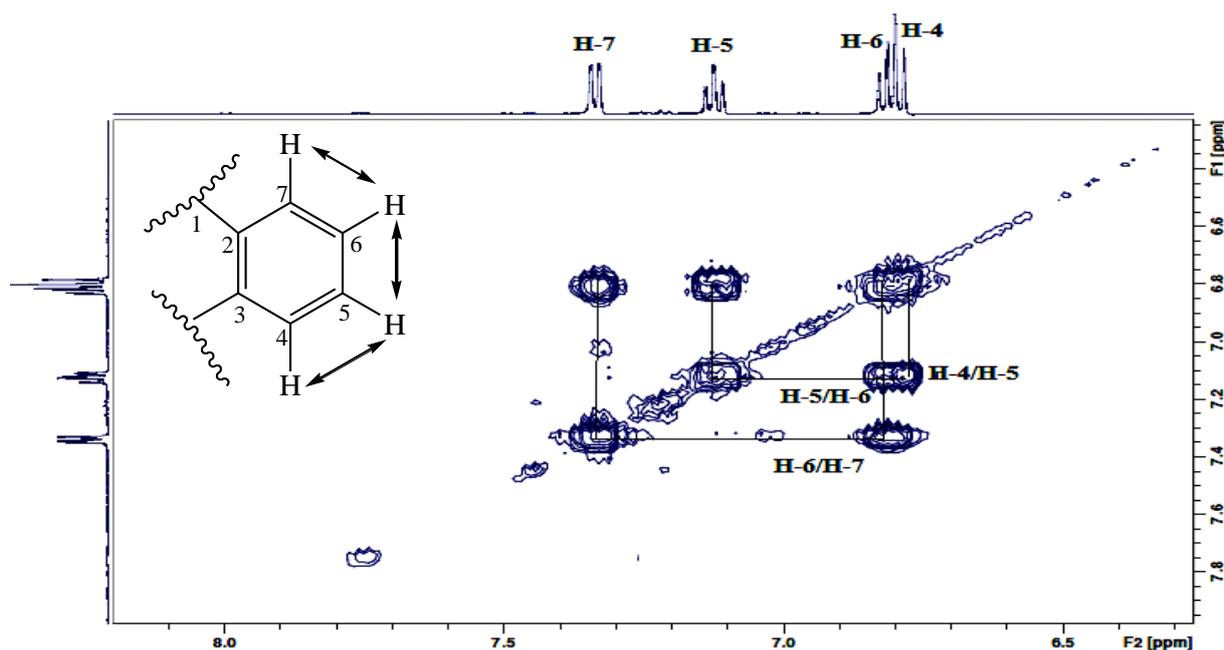


Figure 79: Spectre COSY H-H (région 6,7-7,4 ppm) du composé L7

Le spectre de masse MS/MS de l'ion pseudomoléculaire $m/z=285$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, enregistré en mode négatif (Figure 80), donne un pic de fragmentation de 178 uma $[\text{M}-107]$ qu'on peut attribuer à celui d'un hexose. Le fragment de 107 uma issu de cette fragmentation correspondrait à celui d'un groupement benzylique porteur d'un groupement hydroxyle.

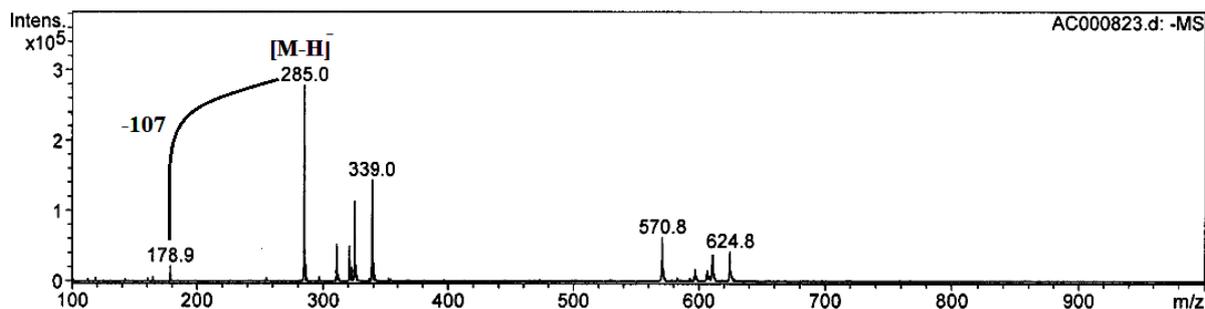


Figure 80: Spectre de masse MS/MS (mode négatif) du composé L7

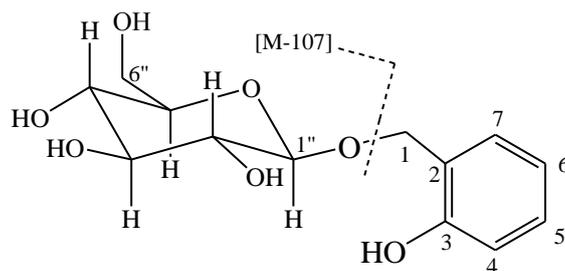


Figure 81: Fragmentations du composé L7

La présence du groupement CH₂ benzylique se justifie par l'observation sur le spectre RMN ¹H (Figure 82) de deux protons formant un système AB à 4,73 (1H, *d*, *J* = 11,9 Hz) et 4,86 ppm (1H, *d*, *J* = 11,9 Hz).

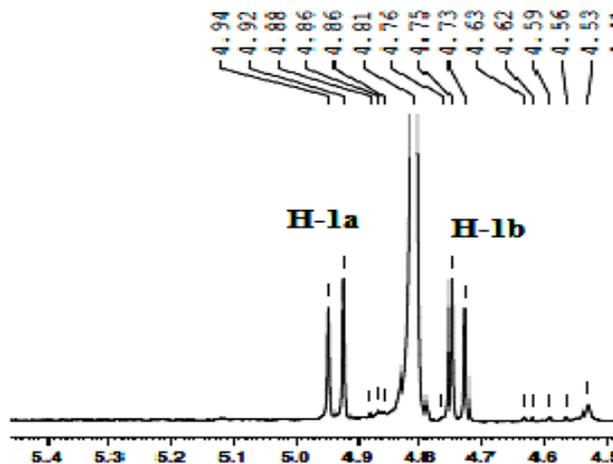


Figure 82: Spectre RMN ¹H étalé (région 4,5-5,0 ppm) du composé L7

L'observation sur le spectre HMBC (Figures 84, 85) de corrélations entre les protons CH₂ benzyliques et le carbone anomérique C-1' déterminé par HSQC (Figure 88) et résonant à 103,6 ppm, atteste que le noyau benzylique est branché en cette position de l'hexose dont il faut maintenant identifier la nature.

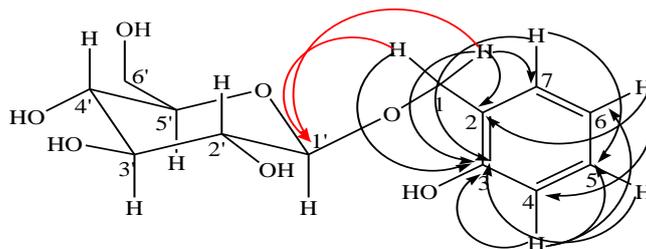


Figure 83: principaux corrélations C-H en 2J et 3J du composé L7

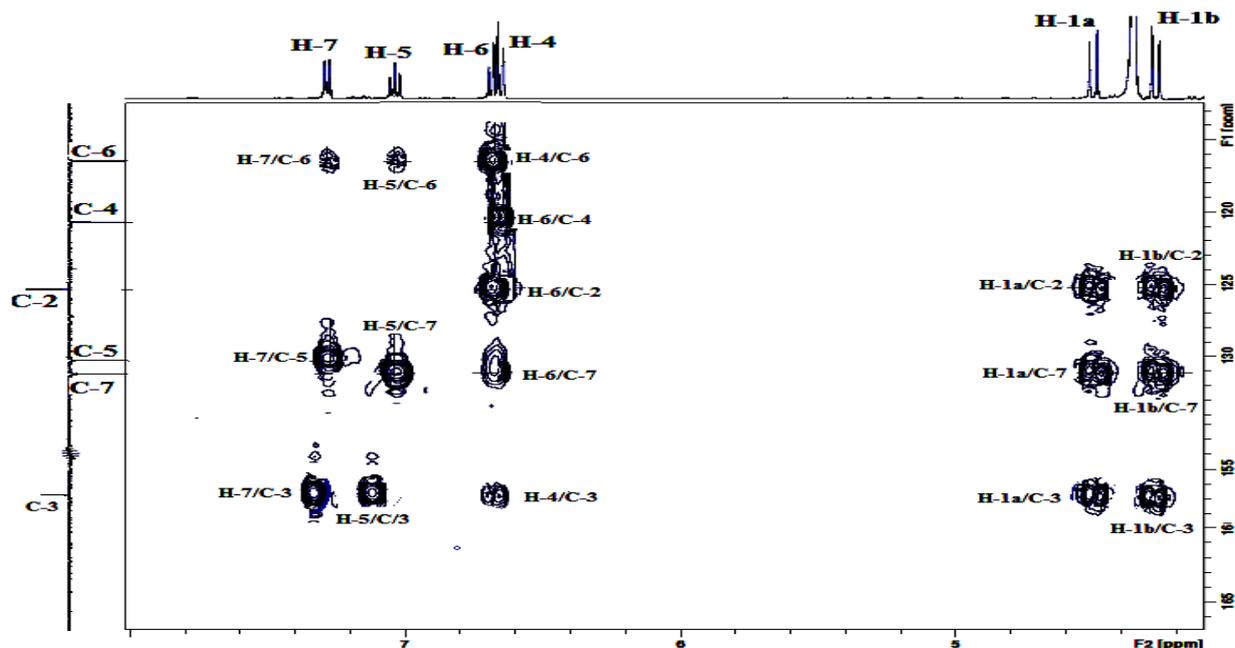


Figure 84: Partie du Spectre HMBC du composé L7

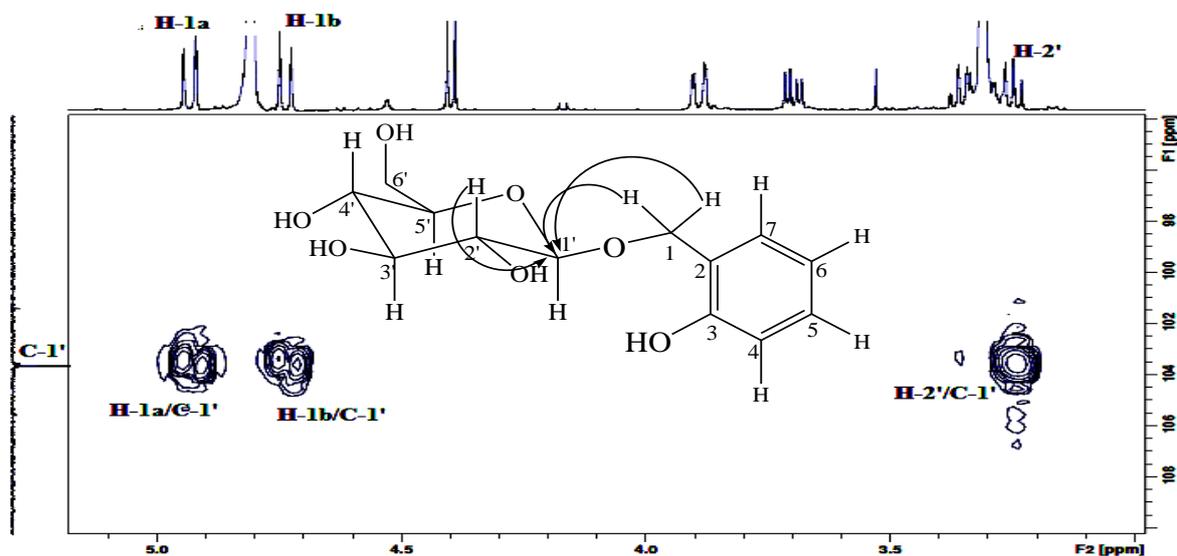


Figure 85 : Spectre HMBC du composé L7

La présence d'une unité osidique, plus précisément d'un hexose, est confirmé par analyse COSY H-H (Figure 86). En effet, à partir du proton anomérique H-1' résonant à 4,41

ppm (1H, *d*, $J = 7,7$ Hz), on identifie clairement un système à sept protons d'un hexose, et cela à travers les corrélations H-1'/H-2' (3,23ppm, *d*, $J = 8,3$ Hz), H-2'/H-3' (3,33 ppm, *t*, $J = 8,3$), H-3'/H-4' (3,24 ppm, *t*, $J = 8,3$ Hz), H-4'/H-5' (3,24 ppm, *d*, $J = 8,3$ Hz) et H-5'/H-6' (H-6'a 3,9 ppm, *dd*, $J = 11,5, 1,8$ Hz et H-6'b 3,71 ppm, *dd*, $J = 11,5, 5,3$ Hz). Les grandes valeurs de constantes de couplage impliquant que tous ces protons sont axiaux, permettent d'identifier un glucose de configuration β ($J_{H1'-H2'} = 7,7$ Hz).

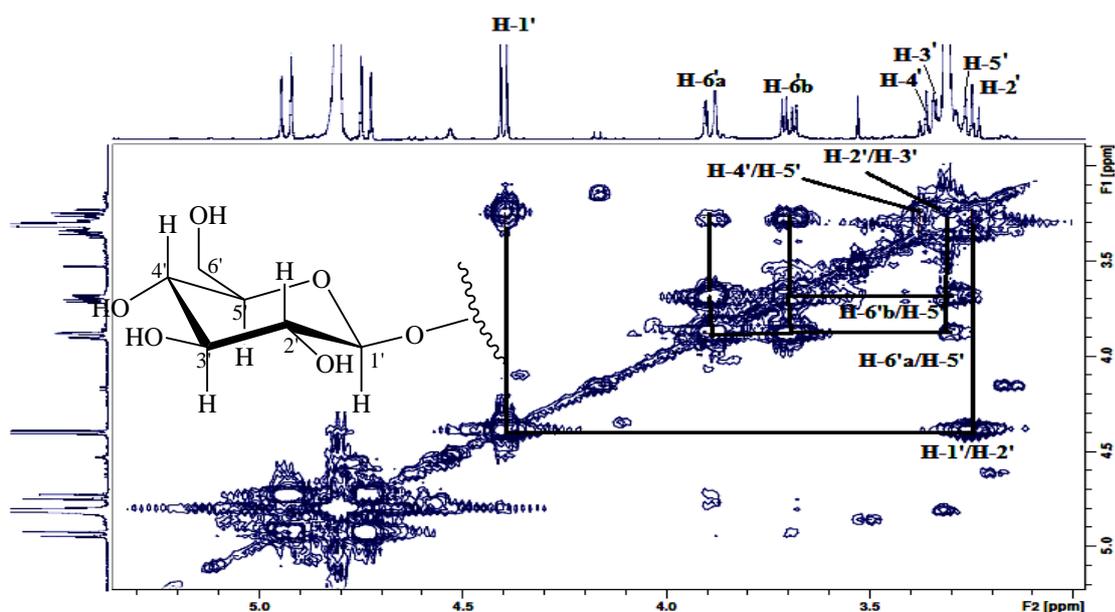


Figure 86: Spectre COSY H-H de la partie osidique du composé L7

L'analyse combinée des spectres HSQC et t HMBC permet d'assigner tous les signaux des carbones de cette molécule (Figure 87)

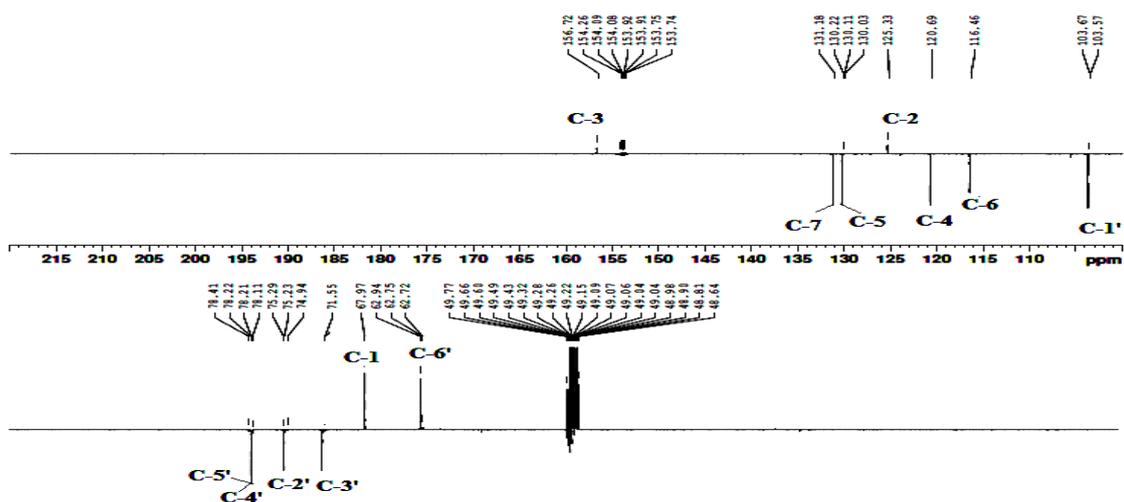


Figure 87: Spectre RMN ^{13}C J-modulé du composé L7

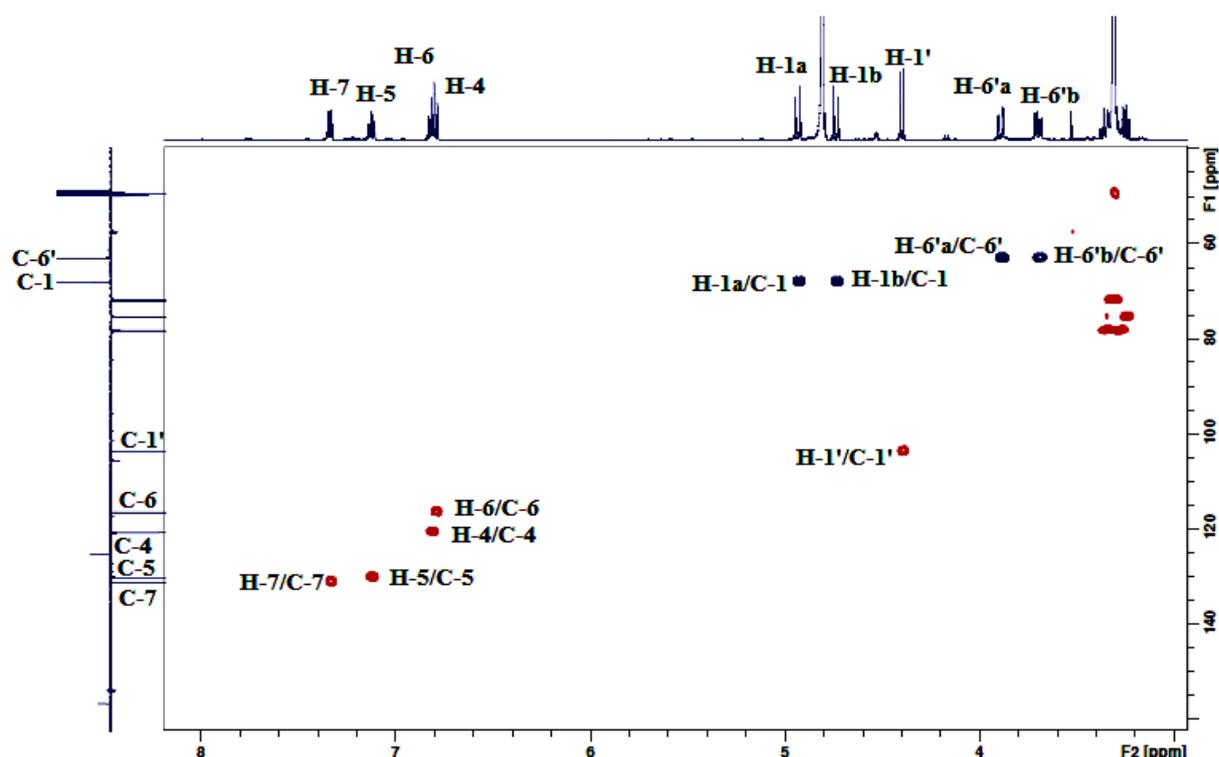


Figure 88: Spectre HSQC du composé L7

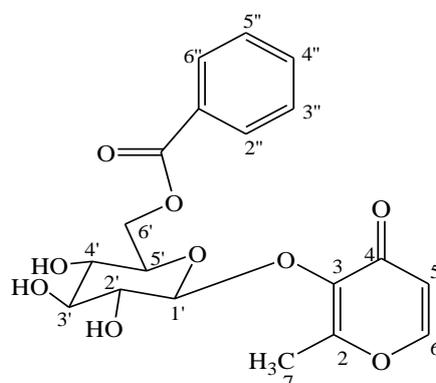
A l'issue de cette analyse, tous les protons et carbones de **L7** sont attribués. L'ensemble de ces données permet d'assigner sans ambiguïté pour le composé **L7** la structure suivante : 2-hydroxybenzyl β -D-glucopyranoside. Ce composé a été isolé antérieurement de l'espèce *Hypericum oblongilium* (Hypericaceae) [82]. Il a été identifié pour la première fois dans le genre *Lotus*. Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau 19 ci-après.

C	δ_C	δ_H J Hz
1	67,9	4,73 H-1b <i>d</i> 11,9 4,86 H-1a <i>d</i> 11,9
2	125,3	-
3	156,7	-
4	116,4	6,79 <i>d</i> 7,8
5	130,1	7,13 <i>td</i> (1,3 ; 7,8)
6	120,6	6,83 <i>t</i> (7,4)
7	131,1	7,34 <i>dd</i> (1,3 ; 7,4)
1'	103,6	4,41 <i>d</i> 7,7

2'	75,2	3,23 t 8,3
3'	71,5	3,33 t 8,3
4'	78,2	3,34 t 8,3
5'	78,2	3,24 m
6'	62,7	3,71 dd H-6b (5,3; 11,5) 3,91 dd H-6a (1,8; 11,5)

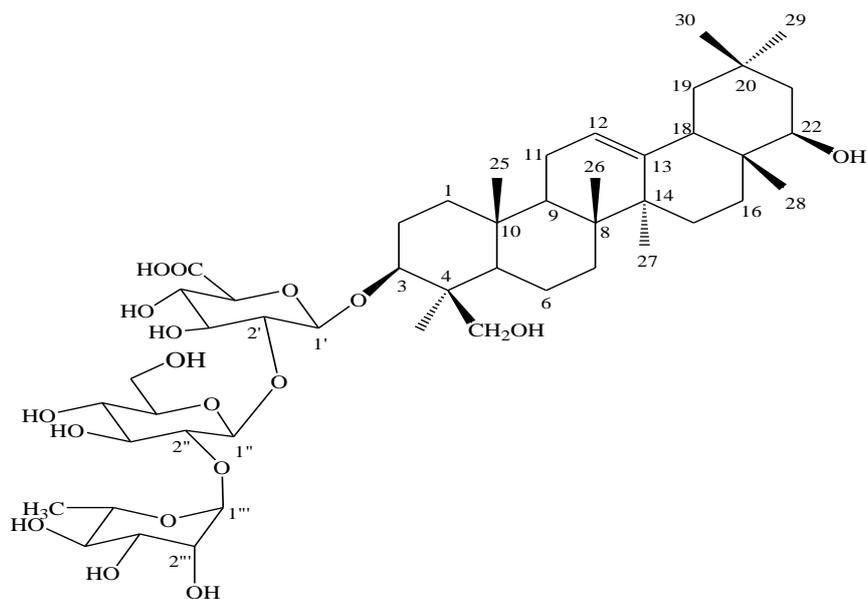
Tableau 19 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C de **L7** (CD_3OD)

VII.3.8- Détermination structurale du composé **L8**



Maltol 3-O-[6-O-benzoyl]-β-D-glucopyranoside

Ce composé a été identifié au maltol glycoside, de par les données RMN ^1H , ^{13}C et masse ESI (m/z 415 $[\text{M}+\text{Na}]^+$) ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_{\text{D}} = -30^\circ$ ($C = 0,80$ g/100 ml, CHCl_3). Ce métabolite secondaire déjà isolé dans le cadre de ce travail, de *Silene arenarioides* Desf., est décrit pour la première fois dans le genre *Lotus*. Les dérivés glycosylés du maltol sont rencontrés au niveau des plantes Fabaceae. On citera le maltol 3-O-[6-O-(3-hydroxy-3-méthyl-glutaroyl)]-β-D-glucopyranoside isolé à partir des racines de *Glycyrrhiza glabra* L. [83] et 3-hydroxy-2-méthyl-4H-pyran-4-one 3-O-[4'-O-*p*-coumaroyl]-6'-O-(3-hydroxy-3-méthyl-glutaroyl)]-β-D-glucopyranoside des feuilles de *Styphnolobium japonicum* L. [84].

VII.3.9- Détermination structurale du composé **L9**

3-O-[α -L-rhamnospyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucoronopyranosyl]- 22 β , 24-dihydroxyoléan-12-ène

Le composé **L9**, invisible en UV, a été isolé sous forme d'une poudre blanche. Il donne en CCM une coloration violette, après pulvérisation à l'acide sulfurique à 50 %.

Le spectre de masse ESI (Figure 89), enregistré en mode positif, présente un pic d'ion pseudo-moléculaire à $m/z = 965$ $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 942 uma correspondant à une formule brute en $C_{48}H_{78}O_{18}$.

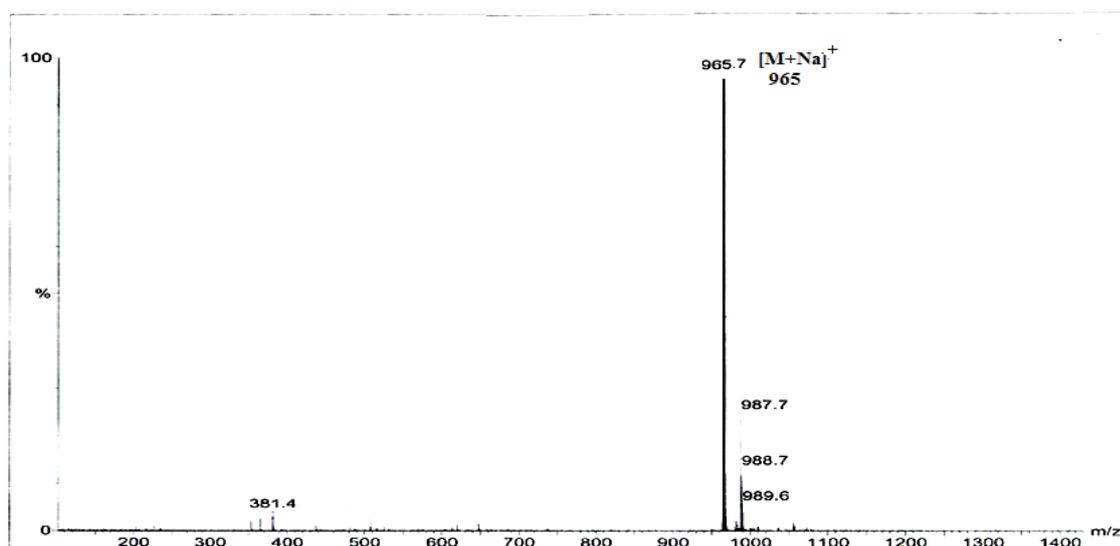


Figure 89: Spectre de masse ESI (mode positif) du composé **L9**

L'observation du spectre RMN ^1H (Figure 90) de ce composé enregistré dans CD_3OD , renseigne d'emblée sur sa nature glycosidiques prononcée. En effet, on observe :

- ✓ Plusieurs signaux entre 3 et 4 ppm caractéristiques de protons de sucres. Leur forte densité suggère a priori l'existence de plusieurs unités osidiques.
- ✓ Trois signaux résonant chacun sous forme de doublet à 4,47 (1H, d , $J = 7,9$ Hz), 4,89 (1H, d , $J = 7,6$ Hz) et 5,15 ppm (1H, d , $J = 1,8$ Hz) caractéristiques de protons anomères de sucres, suggérant la présence de trois unités osidiques. La faible constante de couplage du signal du proton cité en dernier ainsi que l'observation d'un signal CH_3 (3H, d , $J = 6,2$ Hz) à 1,03 ppm permet d'identifier un rhamnose.

Par ailleurs, l'observation de sept signaux singulets d'intégration 3H chacun (0,85-1,28 ppm) et d'un signal de proton oléfinique à 5,27 ppm (1H, t , $J = 3,7$ Hz) indique qu'on est en présence d'une saponine triterpénique à squelette oléanane insaturé en 12-13 ou Δ^{12} oléanène.

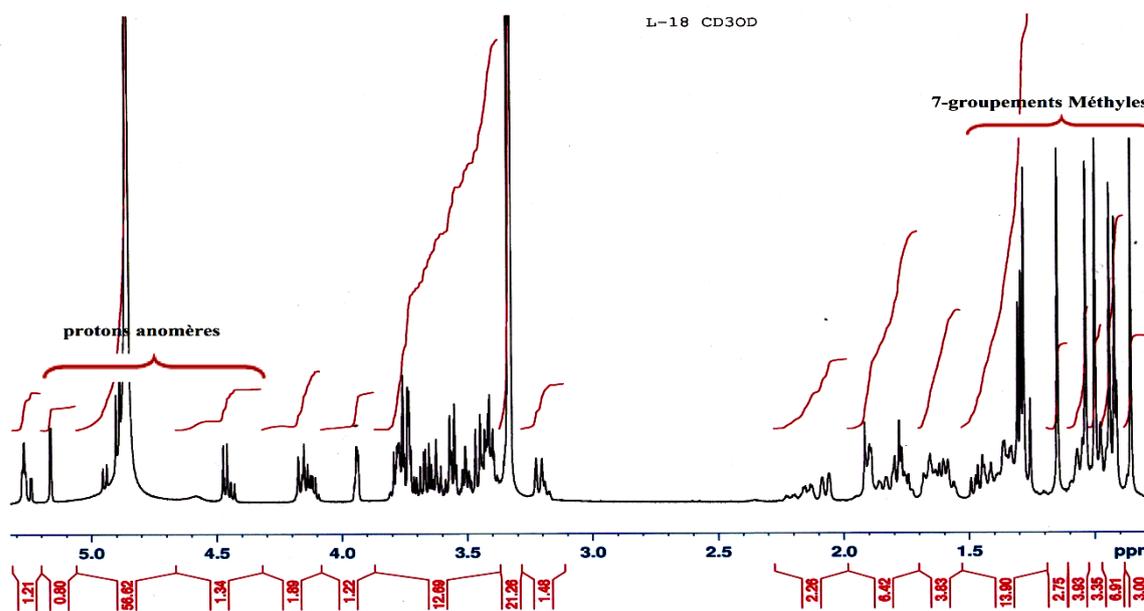


Figure 90: Spectre RMN ^1H du composé L9

Le spectre RMN ^{13}C (Figure 91) en apporte la confirmation à travers les sept signaux de carbones méthyliques résonant dans la région allant de 15,1 à 31,1 ppm, le signal C-H éthylénique à 122,3 ppm et enfin les trois signaux C-H vers 100 ppm de carbones anomères de sucre.

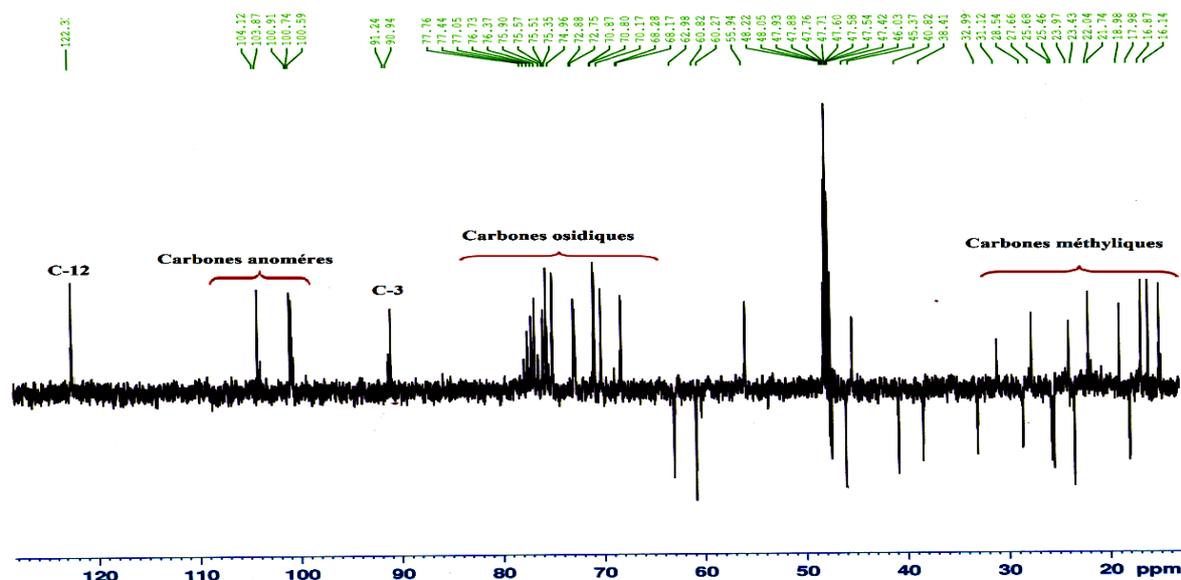


Figure 91: Spectre RMN ^{13}C J-modulé du composé L9

Identification de la génine

La présence de seulement sept méthyles implique évidemment l'oxydation d'un des huit méthyles constituant le squelette oléanane, en général positionné en C-4 et C-17. L'absence de signaux au delà de 150 ppm sur le spectre RMN ^{13}C indique que le carbone oxydé est inclus dans un groupement hydroxyméthyle CH_2OH . Ceci est confirmé en RMN ^1H (Figure 90) par la présence des protons résonant à 3,22 et 4,17 ppm sous forme de doublet avec une constante de couplage de 11,5 Hz. Le carbone de ce groupement est repéré à 62,9 ppm sur le spectre HSQC (Figure 92). Le carbone sortant à 90,9 ppm sur le spectre RMN ^{13}C est attribué sans ambiguïté au carbone C-3 oxygéné du triterpène. Le déblindage important ce signal, comparé à celui du C-3 portant un OH libre de l'ordre de 70 ppm [85], montre bien des substitutions à ce niveau par des sucres. Les corrélations observées par expérience HMBC entre le proton oxyméthine H-3 de configuration α -axiale à 3,43 ppm (1H, *dd*, $J = 10,1; 4$ Hz) identifié par HSQC et un carbone résonant à 62,9 ppm indique que le groupement CH_2OH est positionné en C-4 du triterpène, suggérant ainsi que septième groupement (CH_3 -28) est localisé en C-17. Ceci est confirmé clairement par analyse HMBC qui montre une corrélation entre le carbone CH_3 -28 (19,0 ppm) et le proton caractéristique H-18 du triterpène repéré à 2,07 ppm. La même expérience montre aussi les corrélations attendues entre le proton H-3 et les carbones C-1 (38,4 ppm), C-2 (25,7 ppm), C-4 (43,3 ppm), C-5 caractéristique (55,9 ppm) et le carbone méthylique sortant à 22 ppm. Cette valeur de déplacement chimique est propre au CH_3 -23 en position α [86]. Le proton H-5 (0,97 ppm) identifié par analyse HSQC (Figure 92) corrèle avec les carbones méthyliques CH_3 -25 (3H, *s*, 0,92 ppm), eux-mêmes couplant

avec C-1 (38,4 ppm) préalablement caractérisé, C-10 (36,1 ppm) et C-9 (47,5 ppm). Ce dernier corrèle avec les protons méthyliques CH₃-26 (3H, *s*, 0,99 ppm), eux-mêmes couplant avec les carbones C-7 (33,0 ppm), C-8 (39,4 ppm) et C-14 (42,0 ppm). De la même manière, on identifie le groupement CH₃-27 (3H, *s*, 1,44 ppm). Par ailleurs, L'expérience HMBC (Figure 93) montre des corrélations entre les protons CH₃-28 (3H, *s*, 0,82 ppm) et le carbone C-18 (45,5 ppm) identifié par HSQC ainsi qu'un carbone C-H résonant à 75,6 ppm caractéristique d'un groupement CH-OH qui serait en C-16 ou C-22. Ceci est clarifié par analyse conjointe HMBC et COSY H-H. Le spectre HMBC montre un couplage entre les protons CH₃-27 et un carbone CH₂ attribué à C-15 et résonant à 25,5 ppm. Les protons portés par ce dernier, identifiés par HSQC et repérés à 1,06 et 1,79 ppm, donnent sur le spectre COSY H-H un couplage avec les protons H-16 sortant à 1,33 et 1,75 ppm, indiquant aussi que le groupement OH est porté par le carbone C-22 (75,6 ppm) du triterpène. Le proton H-22 est assigné par HSQC à δ_H 3,41 (1H, *dd*, $J = 5,3; 2,7$ Hz). Les petites valeurs de constantes de couplage indiquent que le proton H-22 est α équatorial [86].

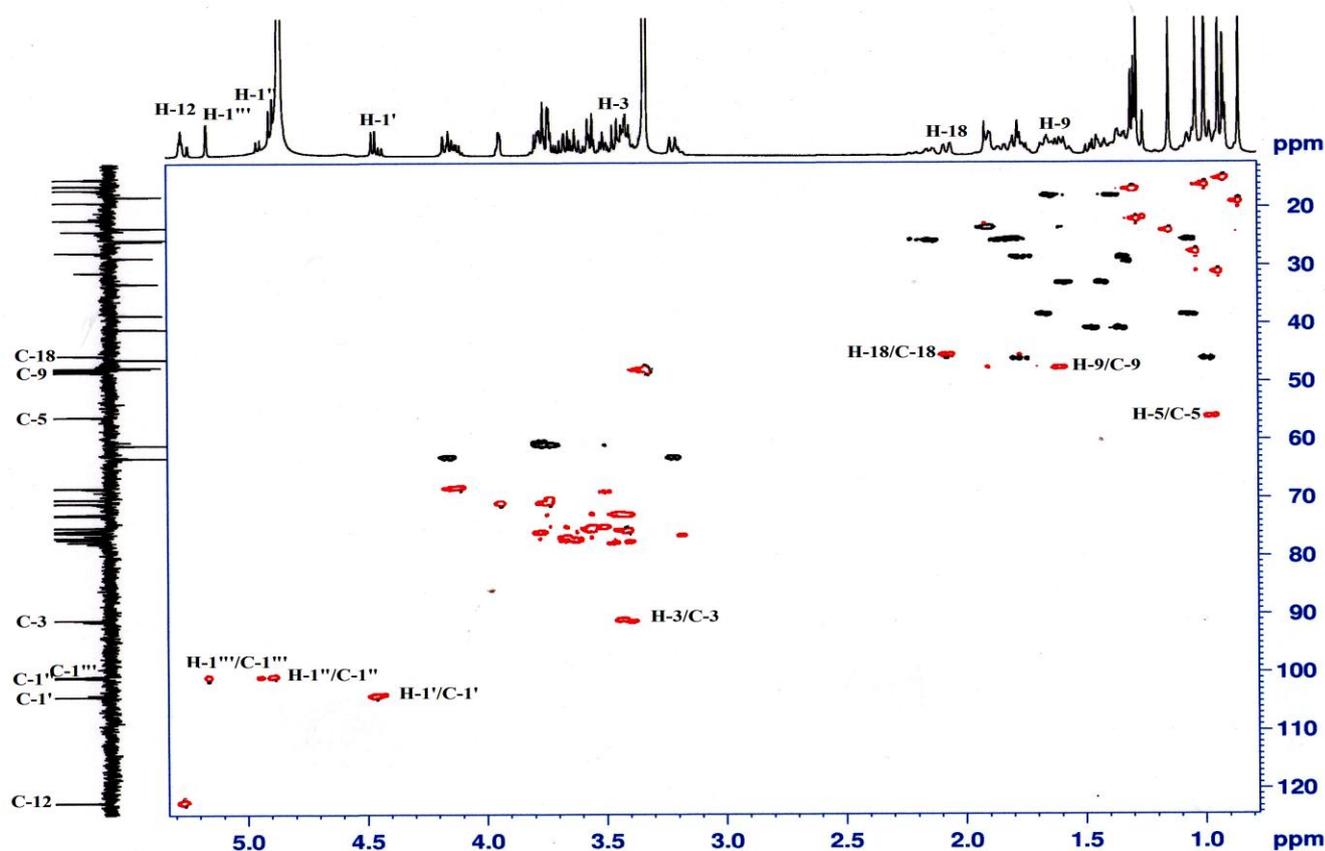


Figure 92 : Spectre HSQC du composé L9

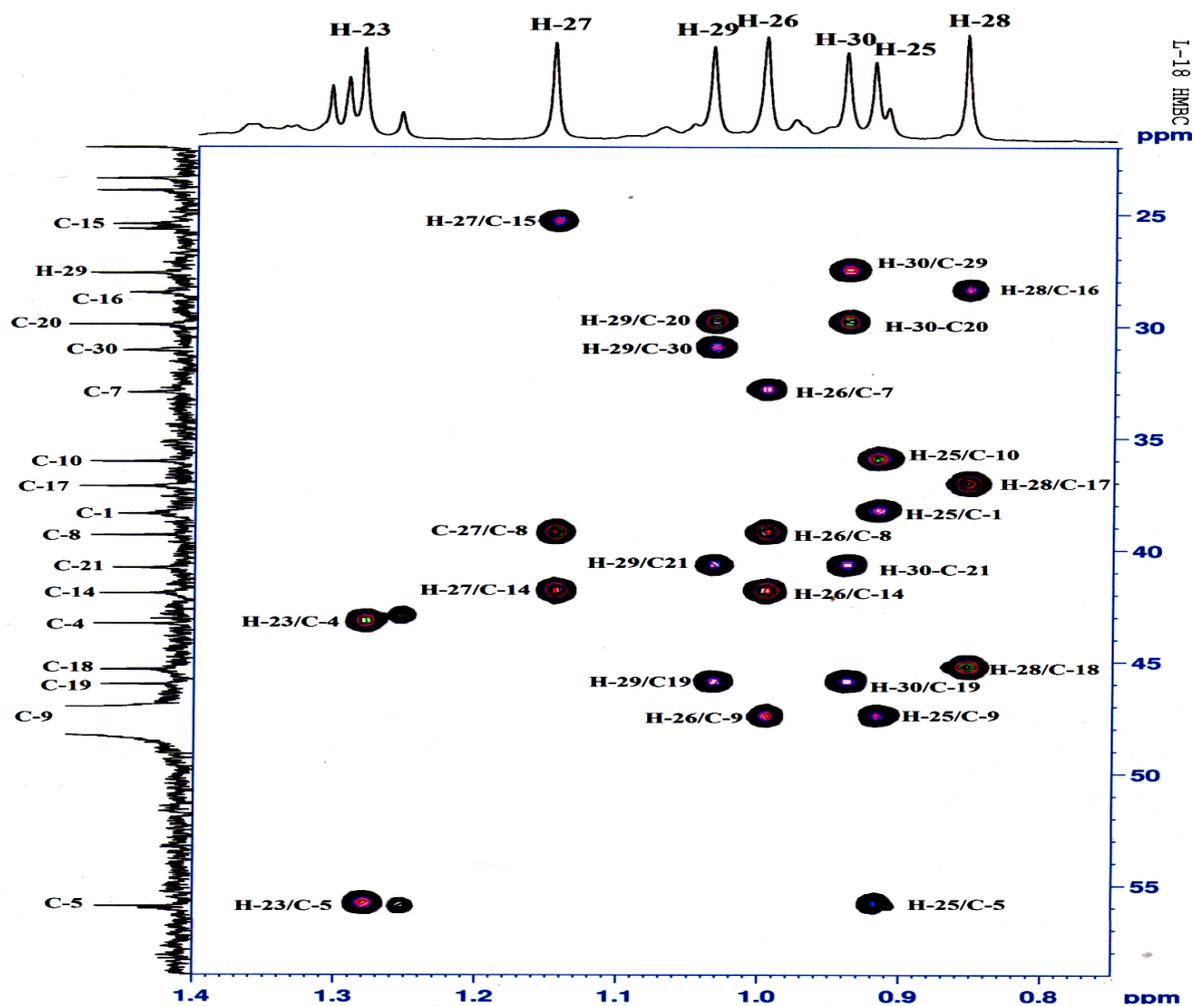
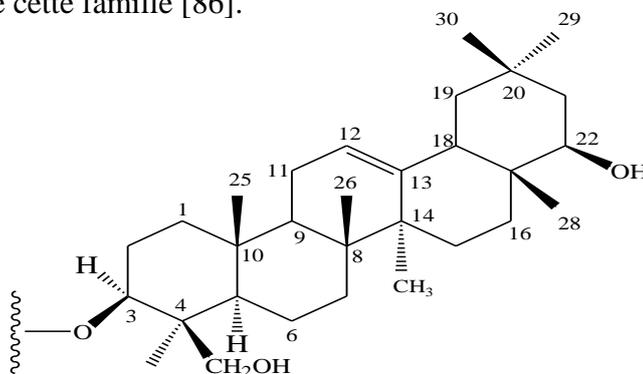


Figure 93 : Spectre HMBC du composé L9

Toute cette analyse permet finalement d'identifier cette génine au Soyasapogénol B, aglycone isolé initialement des graines de soja [87] et omniprésent au sein de la famille Fabaceae. En effet, les saponines à soyasapogénol B sont considérées comme les marqueurs chimiotaxonomiques de cette famille [86].



Soyasapogénol B

La stéréochimie au niveau la génine est confirmée par expérience ROESY (Figure 94). Ainsi la position α -axiale du proton H-3 est confirmée du fait d'effets Overhauser H-3/H-

5 et H-3/H-23. Des effets rOe (Figure 94) observés entre le proton H-18 et le proton H-12 et H-30, les protons méthyliques H-28 et les protons CH₃-25 et 26 ainsi que CH₃-25 et CH₂OH-24, prouvent la stéréochimie β -axiale de H-18, CH₃-25, CH₃-26, CH₃-28 et CH₂OH-24.

Par ailleurs, l'absence de corrélation en ROESY entre le proton H-22 et les protons H-18 et CH₃-30, confirme l'orientation α -équatoriale du proton H-22.

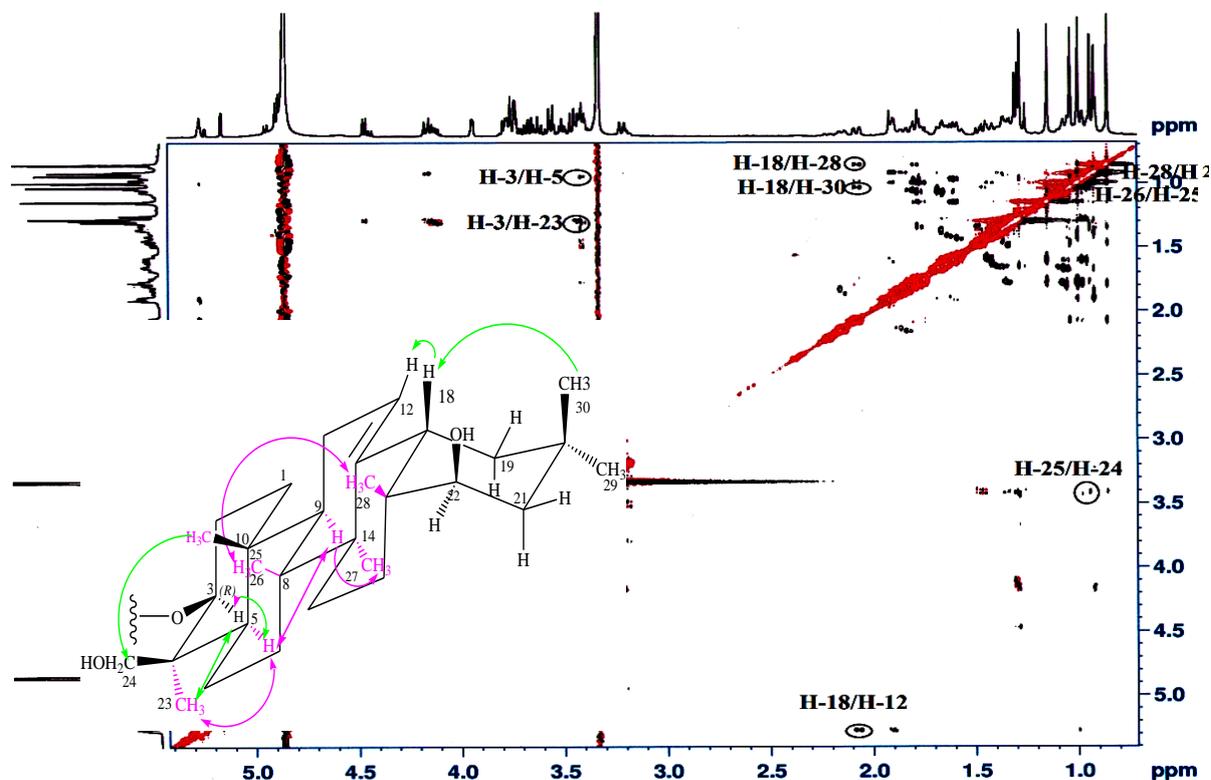


Figure 94 : Spectre ROESY du composé L9

Caractérisation des sucres

L'analyse RMN ¹H décrite précédemment (Figure 90) a permis d'une part de montrer l'existence de trois unités osidiques et cela par la présence de leurs protons anomères à 4,47 (1H, *d*, *J* = 7,9 Hz), 4,89 (1H, *d*, *J* = 7,6 Hz) et 5,15 ppm (1H, *d*, *J* = 1,8 Hz), et établir d'autre part que notre composé est une saponine monodesmosidique avec une seule chaîne de sucres branchée en C-3 de la génine au vu de sa valeur de déplacement chimique de l'ordre de 90 ppm.

L'identification des trois unités osidiques est établie par expériences COSY H-H (Figure 96) et TOCSY (Figure 95) qui constituent indiscutablement des outils de choix dans ce domaine. Partant du proton anomère H-1' résonant à 4,47 ppm (1H, *d*, *J* = 7,9 Hz), les expériences citées (Figures 95 et 96) montrent clairement un système de spins à cinq protons. En effet, Il est observé les corrélations H-1'/H-2' (3,77 ppm, *dd*, *J* = 9,2 ; 7,9 Hz), H-2'/H-3'

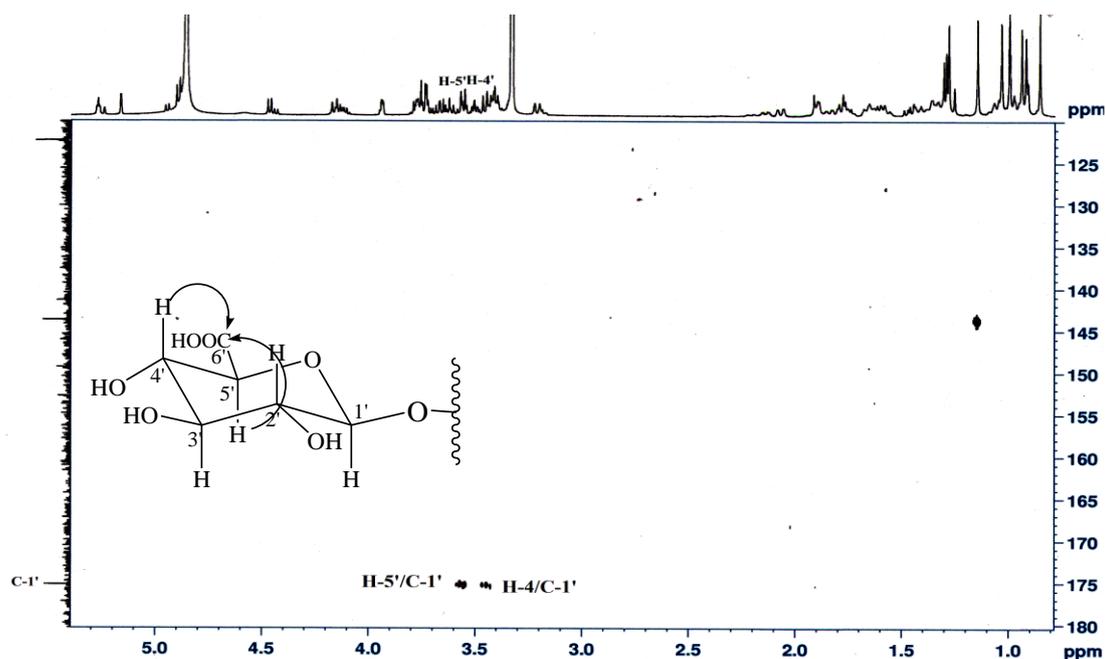


Figure 97: Partie du Spectre HMBC mettant en évidence les corrélations de l'acide glucuronique

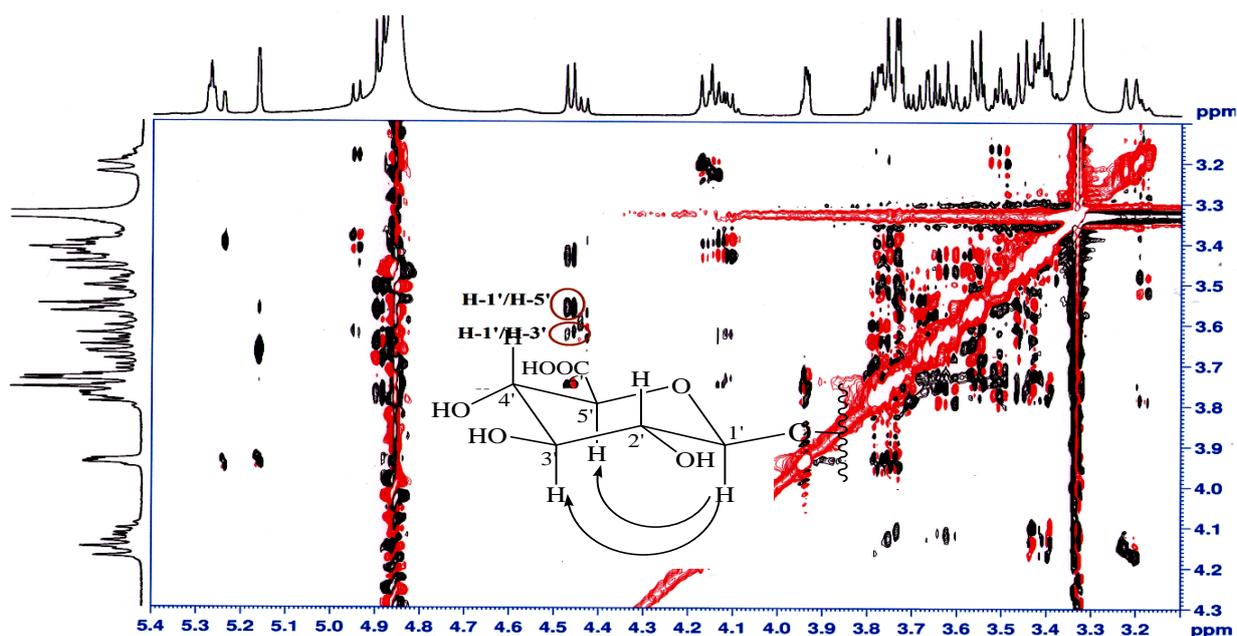


Figure 98: Spectre ROESY de l'acide glucuronique

De la même manière et à partir du proton anomère H-1'' résonant à 4,89 ppm (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz), on relie sept protons d'un hexose (Figures 95 et 96). Les grandes valeurs de constantes de couplage montrent que ces protons sont axiaux. Il s'agit d'un glucose de configuration β ($J_{1''-2''} = 7,6$ Hz).

La séquence des sucres ainsi que les points de branchement, tels que présentés ci-dessous, ont été déterminés au moyen d'une expérience HMBC (Figure 101). En effet, on observe des corrélations entre :

- Le proton anomère H-1''' du rhamnose et le carbone C-2'' (76,7 ppm) du glucose.
- Le proton anomère H-1'' du glucose et le carbone C-2' (75,9 ppm) de l'acide glucuronique.
- Le proton anomère H-1' de l'acide glucuronique et le carbone C-3 (91,3 ppm) de la génine.

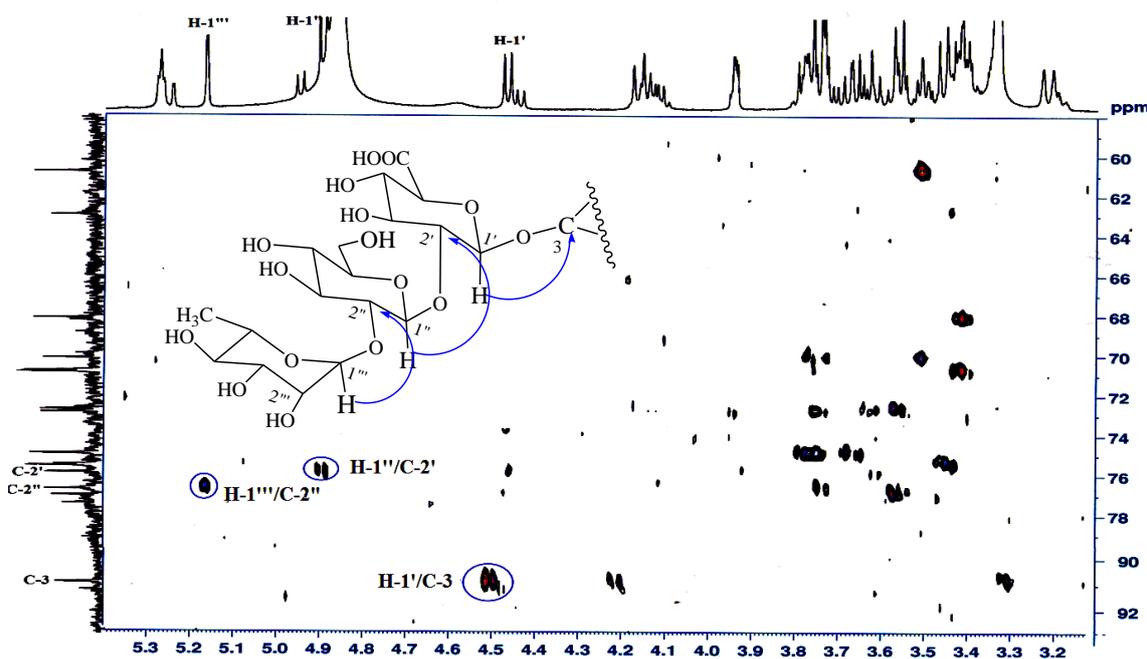
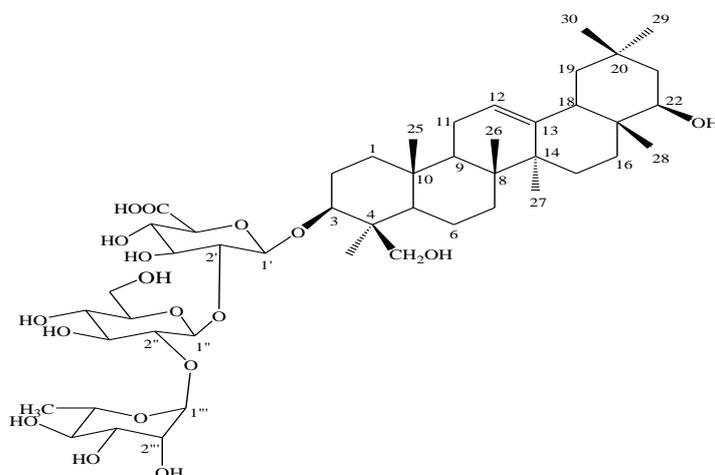


Figure 101 : Spectre HMBC montrant le branchement des sucres

Toute cette analyse spectrale permet ainsi d'assigner la structure suivante pour le composé **L9** :



3-O-[α-L-rhamnospyranosyl-(1→2)-β-D-glycopyranosyl-(1→2)-β-D-glucuronopyranosyl]- 22β, 24-dihydroxyoléan-12-ène

Cette saponine s'est avérée identique à l'Azukisaponine V, isolée précédemment de plantes Fabaceae comme *Mellilotus officinalis* [88], *Astragalus tauricolus* [89] et *Astragalus cruciatus* Link. [90]. Elle a été identifiée pour la première fois dans le genre *Lotus*. C'est aussi la première fois qu'une saponine a été caractérisée dans le genre. En effet, les études chimiques antérieures effectuées sur le genre *Lotus*, ne mentionne nullement la présence de saponines, sauf dans le cas de *L. corniculatus* où une faible quantité de saponines brutes a été mise en évidence. L'hydrolyse a permis d'accéder au soyasapogénol B [91].

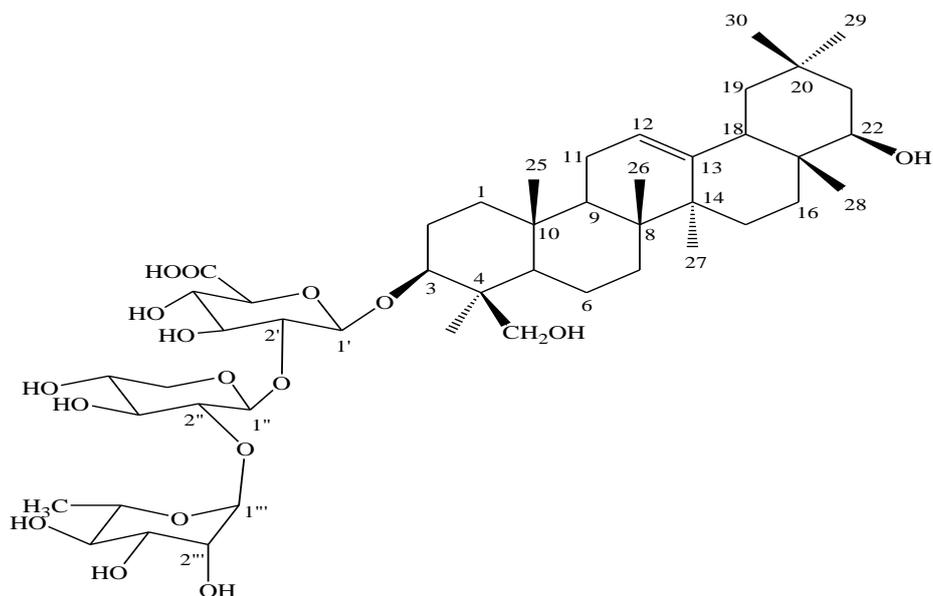
Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau 20 ci-dessous.

C	δ_C	δ_H J Hz	C	δ_C	δ_H J Hz
1	38,4	1,06 <i>dm</i> H-1b 14,0 1,67 <i>m</i> H-1a	25	15,1	0,92 <i>s</i>
2	25,7	2,15 H-2a <i>m</i> 1,84 H-2b <i>m</i>	26	16,1	0,99 <i>s</i>
3	91,3	3,43 <i>dd</i> (10,1; 4,0)	27	24,0	1,44 <i>s</i>
4	43,3	-	28	19,0	0,85 <i>s</i>
5	55,9	0,97 <i>m</i>	29	28,0	1,03 <i>s</i>
6	18,0	1,39 H-6b <i>m</i> 1,64 H-6a <i>m</i>	30	31,1	0,94 <i>s</i>
Acide glucuronique					
7	33,0	1,42 H-7b <i>m</i> 1,58 H-7a <i>m</i>	1'	104,1	4,47 <i>d</i> 7,9
8	39,4	-	2'	75,9	3,77 <i>dd</i> (9,2; 7,9)
9	47,5	1,59 <i>dl</i> 10,2	3'	77,0	3,62 <i>t</i> 9,2
10	36,1	-	4'	72,7	3,45 <i>t</i> 9,5
11	23,4	1,91 <i>dd</i> (10,2; 3,7)	5'	74,9	3,56 <i>d</i> 9,5
12	122,3	5,27 <i>t</i> 3,7	6'	175,5	-
Glucose					
13	143,7	-	1''	100,9	4,89 <i>d</i> 7,6
14	42,0	-	2''	76,7	3,67 <i>dd</i> (9,5 ; 7,6)

15	25,5	1,06 H-15b <i>m</i> 1,79 H-15a <i>m</i>	3"	74,9	3,55 <i>dd</i> (9,7 ; 9,5)
16	28,5	1,33 H-16b <i>m</i> 1,75 H-16a <i>m</i>	4"	70,2	3,77 <i>t</i> 9,7
17	37,2	-	5"	74,9	3,50 <i>dd</i> (9,7 ; 5,3)
18	45,4	2,07 <i>dl</i> 12,0	6"	60,8	3,72 <i>m</i> H-6''b 3,76 <i>m</i> H-6''a
Rhamnose					
19	46,1	0,99 H-19b <i>m</i> 1,78 H-19a <i>m</i>	1'''	100,7	5,15 <i>d</i> 1,8
20	30,0	-	2'''	70,8	3,93 <i>dd</i> (3,4 ; 1,8)
21	40,8	1,35 H-21b <i>dd</i> (13,8 ; 5,3) 1,47 H-21a <i>dd</i> (13,8 ; 2,7)	3'''	70,9	3,75 <i>m</i>
22	75,6	3,41 <i>dd</i> (5,3; 2,7)	4'''	72,8	3,41 <i>t</i> 9,3
23	22,0	1,28 <i>s</i>	5'''	68,2	4,15 <i>dq</i> (9,3 ; 6,2)
24	63,0	3,22 H-24b <i>d</i> 11,5 4,17 H-24a <i>d</i> 11,5	6'''	16,9	1,03 <i>d</i> 6,2

Tableau 20 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C de **L9** (CD_3OD)

VII.3.10- Détermination structurale du composé **L10**



3-O-[α -L-rhamnospyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-22 β , 24-dihydroxyoléan-12-ène

Le composé **L10**, invisible en UV, a été isolé sous forme d'une poudre blanche. Il donne en CCM une coloration bleue, après pulvérisation avec une solution de H₂SO₄ à 50 %.

Le spectre de masse ESI (Figure 102), enregistré en mode positif, présente un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 935$ [M+Na]⁺, soit une masse moléculaire égale à 912 uma correspondant à une formule brute en C₄₇H₇₆O₁₇.

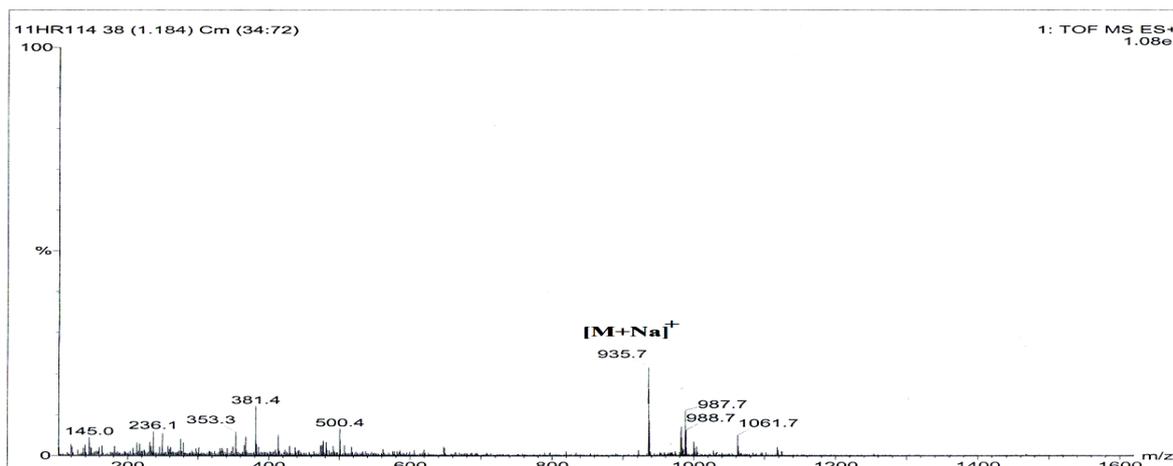


Figure 102 : Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé **L10**

Il présente des données physicochimiques et spectrales (RMN ¹H et ¹³C) très proches de celles du composé **L9** décrit précédemment. Une différence de poids moléculaire de 30 uma entre ces deux composés, suggère l'absence d'un groupement CH₂O au niveau du composé **L10**.

Les spectres RMN ¹H (Figure 103) et RMN ¹³C (Figure 104) sont en effet très voisins de ceux du composé **L9**. En effet, on reconnaît pratiquement tous les signaux de la génine, le soyasapogénol B, à savoir :

- les sept signaux singulets entre 0,85 et 1,28 ppm s'intégrant pour trois protons chacun correspondant aux sept groupements méthyles.
- le signal du proton H-3 (3,39 ppm) et son carbone C-3 (91,3 ppm).
- le signal sous forme de singulet large à 5,25 ppm du proton oléfinique H-12. Les pics à 122,3 et 143,8 ppm sont ceux des carbones C-12 et C-13.
- les deux signaux résonants à 3,22 (1H, *d*, *J* = 11 Hz) et 4,15 ppm (1H, *d*, *J* = 11 Hz) ainsi que signal carbone à 62,9 ppm sont attribuables au groupement CH₂OH positionné en C-4 de la génine.

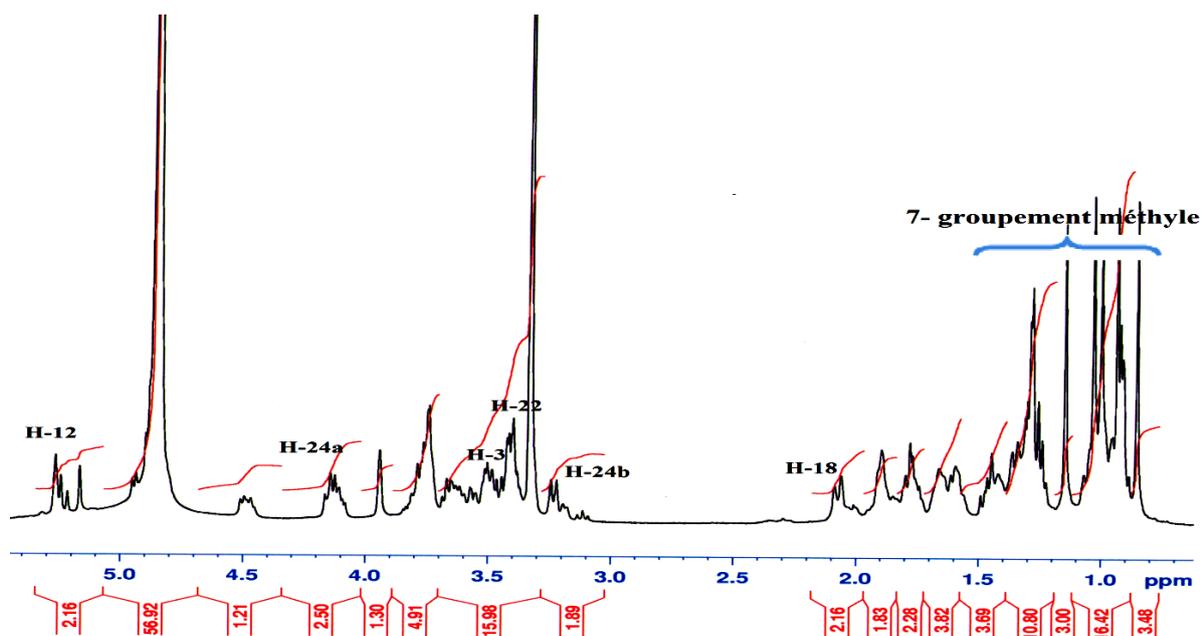


Figure 103 : Spectre RMN ^1H du composé L10

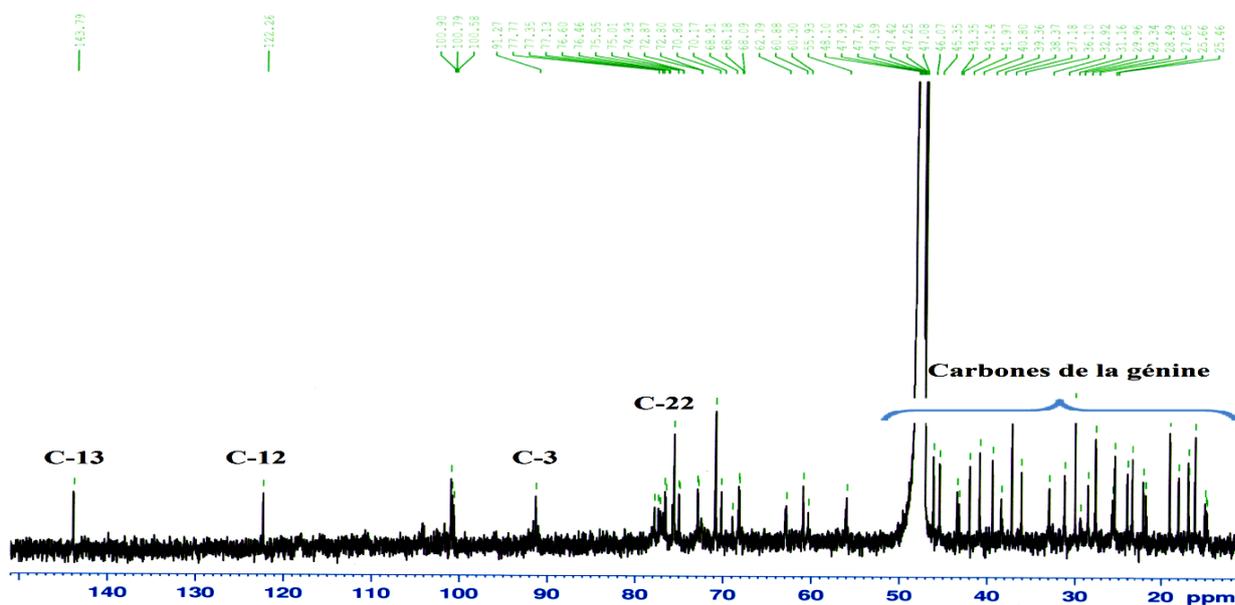


Figure 104: Spectre RMN ^{13}C du composé L10

La génine étant le soyasapogénol B pour les deux composés **L9** et **L10**, la différence se situerait donc au niveau de la partie osidique. La perte d'un groupement CH_2O constatée, laisse suggérer que le $\beta\text{-D-glucose}$ (hexose) a laissé la place à un pentose dans le cas du composé **L10**. Les expériences COSY H-H et TOCSY (Figure 105) montrent toutes les corrélations identifiant l'acide $\beta\text{-D-glucuronique}$ et le $\alpha\text{-L-rhamnose}$ au niveau du composé **L9** (Tableau 20). A partir du deuxième proton anomère H-1'' (4,87 ppm, 1H, *d*, 7,6 Hz), ces mêmes expériences mettent en évidence la présence d'un système de spins à six protons d'un pentose et cela à travers les corrélations H-1''/H-2'' (3,66 ppm, 1H, *dd*, $J = 7,6 ; 9,7$ Hz), H-

2''/H-3'' (3,57 ppm, 1H, *t*, $J = 9,7$ Hz), H-3''/H-4'' (3,74 ppm, 1H, *m*) et H-4''/H-5'' (3,71 ppm, 1H, *m*, H-5''a et 3,75 ppm, 1H, *dd*, 11,6 ; 5,3 Hz, H-5''b). Les grandes valeurs de constantes de couplage permettent d'identifier un xylose de configuration β ($J_{1''2''} = 7,6$ Hz).

A partir des protons du xylose, l'analyse HSQC permet d'attribuer les carbones correspondants : C-1'' (100,8 ppm), C-2'' (76,7 ppm), C-3'' (74,7 ppm), C-4'' (70,4 ppm), C-5'' (66,8 ppm),

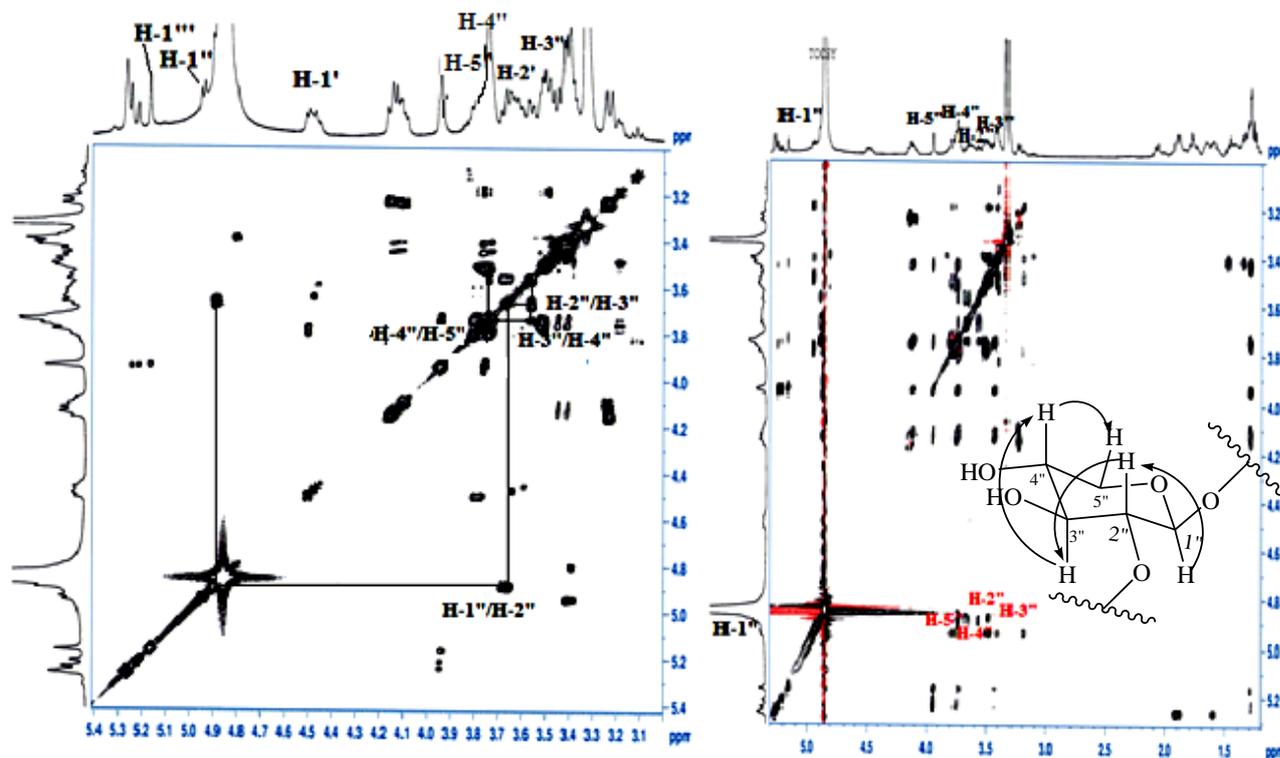


Figure 105: Spectres COSY H-H et TOSCY du xylopyranose

Les points de branchements des sucres ont été vérifiés à partir de l'expérience HMBC (Figure 106) qui montre les corrélations entre :

- le proton anomère H-1''' (5,12 ppm, *d*, $J = 1,8$ Hz) du rhamnose et le carbone C-2'' du xylose (76,6 ppm).
- le proton anomère H-1'' (4,87 ppm, *d*, $J = 7,6$ Hz) du xylose et le carbone C-2' (75,7 ppm) de l'acide glucuronique.
- le proton anomère de l'acide glucuronique H-1' (4,46 ppm, *d*, $J = 7,9$ Hz) et le carbone C-3 (91,3 ppm) de la génine.

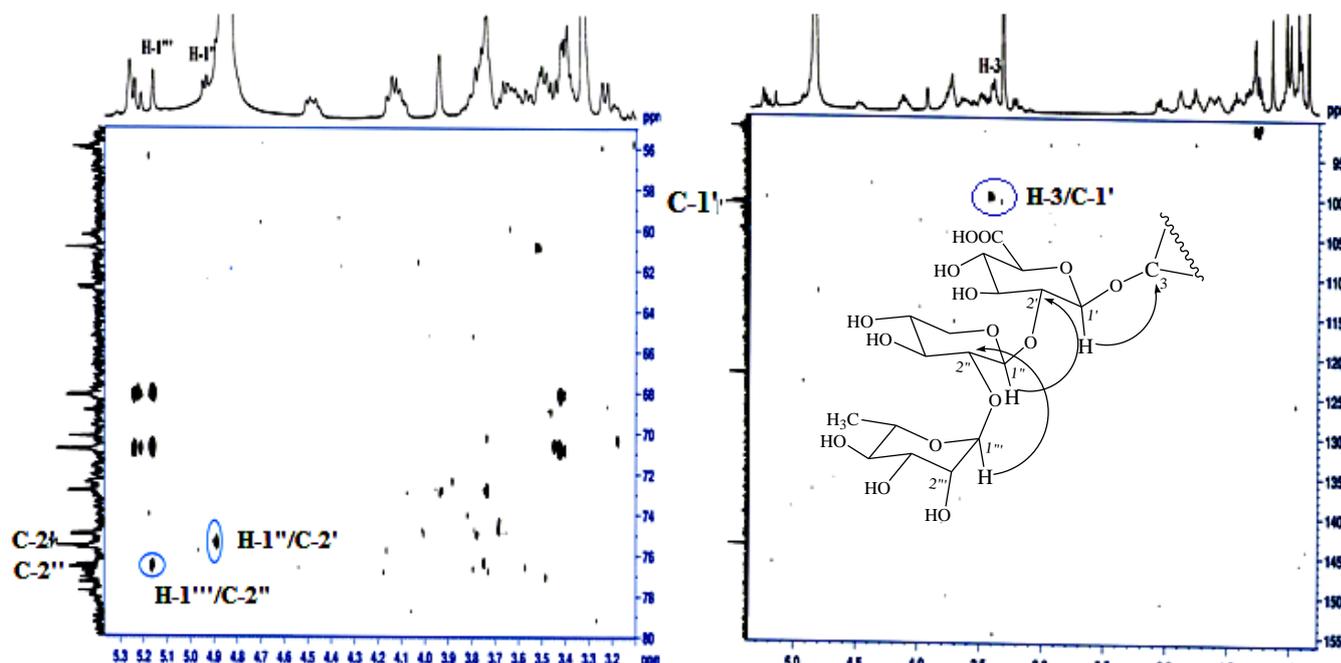
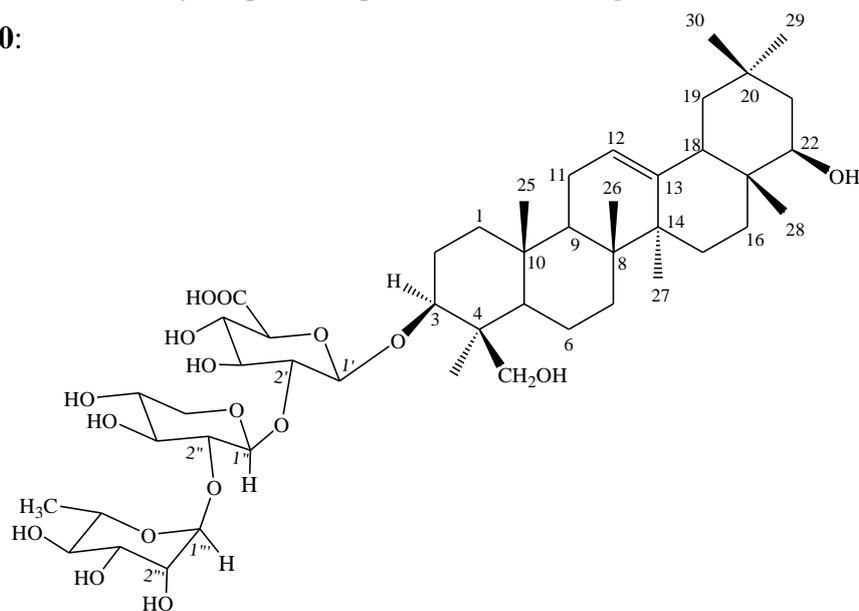


Figure 106: Spectre HMBC montrant le branchement des sucres

Toute cette analyse spectrale permet ainsi d'assigner la structure suivante pour le composé **L10**:



3-O-[α -L-rhamnospyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-22 β , 24-dihydroxyoléan-12-ène

Cette saponine est identique à l'Astragaloside VIII, isolé antérieurement de plantes Fabaceae comme *Mellilotus officinalis* [88], *Astragalus radix* [89] et *Astragalus cruciatus* Link. [90]. Elle est citée pour la première fois dans le genre *Lotus*.

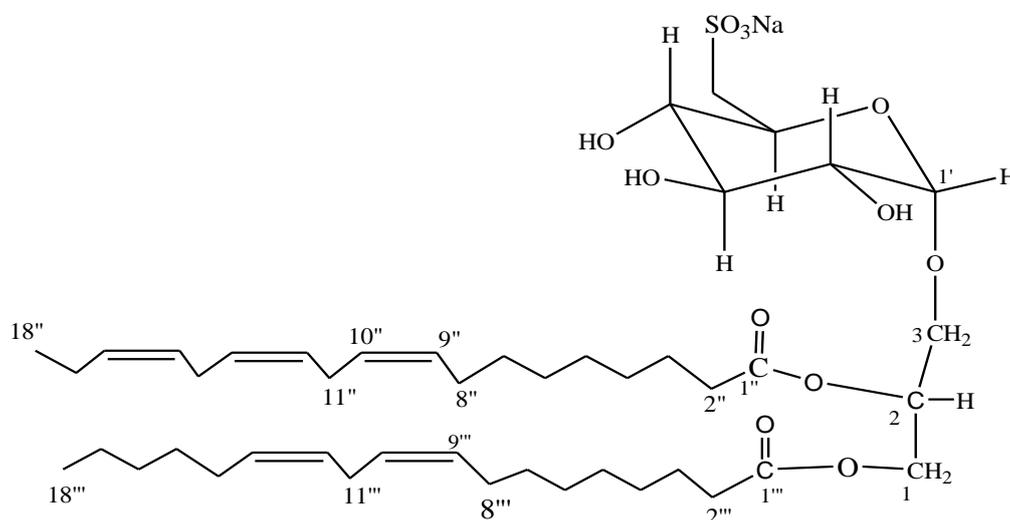
Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **L10** sont rassemblés dans le tableau 21 ci-dessous.

C	δ_C	δ_H J Hz	C	δ_C	δ_H J Hz
1	38,4	1,06 H-1b <i>m</i> 1,67 H-1a <i>m</i>	25	15,0	0,92 <i>s</i>
2	25,8	1,85 H-2b <i>m</i> 2,15 H-2a <i>m</i>	26	16,1	1,00 <i>s</i>
3	91,3	3,39 <i>m</i>	27	24,0	1,15 <i>s</i>
4	43,3	-	28	19,0	0,85 <i>s</i>
5	56,0	0,96 <i>m</i>	29	27,7	1,03 <i>s</i>
6	18,0	1,39 H-6b <i>m</i> 1,65 H-6a <i>m</i>	30	31,2	0,93 <i>s</i>
Acide glucuronique					
7	33,0	1,43 H-7b <i>m</i> 1,58 H-7a <i>m</i>	1'	104,1	4,46 <i>d</i> 7,9
8	39,4	-	2'	75,7	3,76 <i>m</i>
9	47,5	1,60 <i>dl</i> 9,7	3'	77,1	3,64 <i>t</i> 9,2
10	36,1	-	4'	72,8	3,47 <i>dd</i> (9,2; 9,0)
11	23,4	1,91 <i>m</i>	5'	74,9	3,56 <i>d</i> 9,0
12	122,3	5,27 <i>sl</i>	6'	175,2	-
Xylose					
13	143,8	-	1''	100,8	4,87 <i>d</i> 7,6
14	42,0	-	2''	76,6	3,66 <i>dd</i> (9,7; 7,6)
15	25,5	1,06 H-15b <i>m</i> 1,79 H-15a <i>m</i>	3''	74,7	3,57 <i>t</i> 9,7
16	28,5	1,33 H-16b <i>m</i> 1,77 H-16a <i>m</i>	4''	70,4	3,74 <i>m</i>
17	37,2	-	5''	66,8	3,71 H-5''b <i>m</i> 3,75 H-5''a <i>dd</i> (11,6; 5,3)
Rhamnose					
18	45,4	2,07 <i>dl</i> 13,6	1'''	100,7	5,12 <i>d</i> 1,8
19	46,1	0,97 H-19b <i>m</i> 1,77 H-19a <i>m</i>	2'''	70,8	3,91 <i>dd</i> (3,4; 1,8)

20	30,0	-	3'''	70,9	3,76 <i>m</i>
21	40,8	1,35 H-21b <i>dd</i> (13,8; 5,3) 1,47 H-21a <i>dd</i> (13,8; 2,8)	4'''	72,8	3,42 <i>t</i> 9,2
22	75,6	3,41 <i>dd</i> (5,3; 2,8)	5'''	68,2	4,14 <i>dq</i> (9,4; 6,2)
23	22,0	1,28 <i>s</i>	6'''	16,9	1,02 <i>d</i> 6,2
24	62,9	3,22 H-24b <i>d</i> 11,3 4,15 H-24a <i>d</i> 11,3			

Tableau 21 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C de **L10** (CD_3OD)

VII.3.11- Détermination structurale du composé **L11**



1-O-(9Z, 12Z, 15Z-octadécatriénoyl)-2-O-(9Z, 12Z-octadécadiénoyl)-3-O-(6' sulfoquinovopyranosyl)-glycérol.

Le composé **L11** a été isolé sous forme d'une poudre blanche, donnant une coloration rose après pulvérisation avec une solution de H_2SO_4 .

Le spectre de masse EI-MS (Figure 107) enregistré en mode négatif présente un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 861$ $[\text{M}-\text{H}]^-$, soit une masse moléculaire égale à 862 uma. La présence d'un fragment à $m/z = 781$ $[\text{M}-\text{H}-80]^-$ [92], très révélateur de la présence d'un groupement sulfate, laisse suggérer une formule brute en $\text{C}_{45}\text{H}_{75}\text{O}_{12}\text{NaS}$.

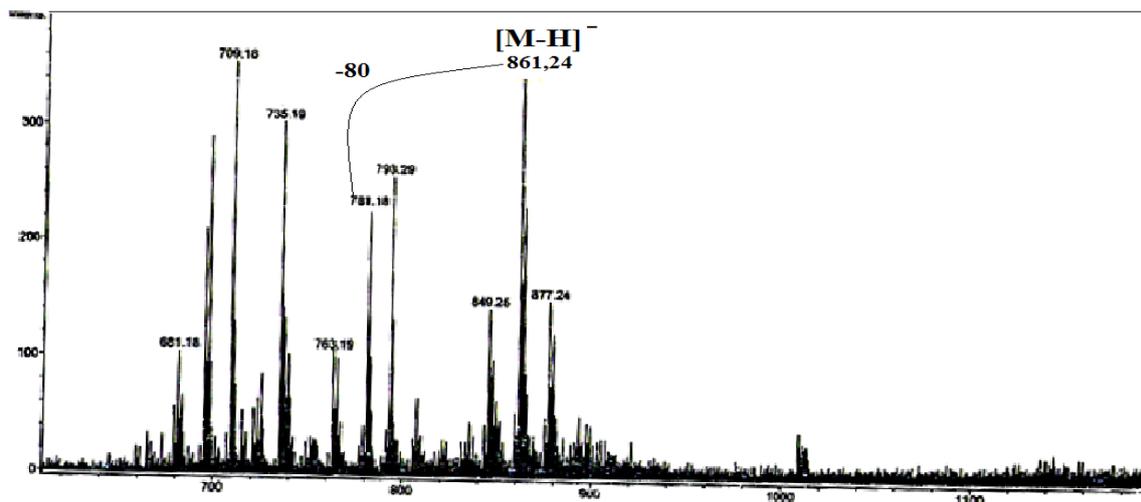


Figure 107 : Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé L11

Le spectre RMN ^1H (Figure 108) de ce composé, enregistré dans CDCl_3 et CD_3OD , montre des signaux à 3-4 ppm caractéristiques de protons osidiques, un signal doublet à 4,79 ppm ($J = 3,8$ Hz) d'un proton anomère (H-1'') de sucre ainsi que des signaux multiplets entre 5,31 et 5,42 ppm de protons oléfiniques. L'observation également de nombreux signaux à champ fort entre 1,26-1,40 ppm renseigne sur la nature lipidique de notre composé.

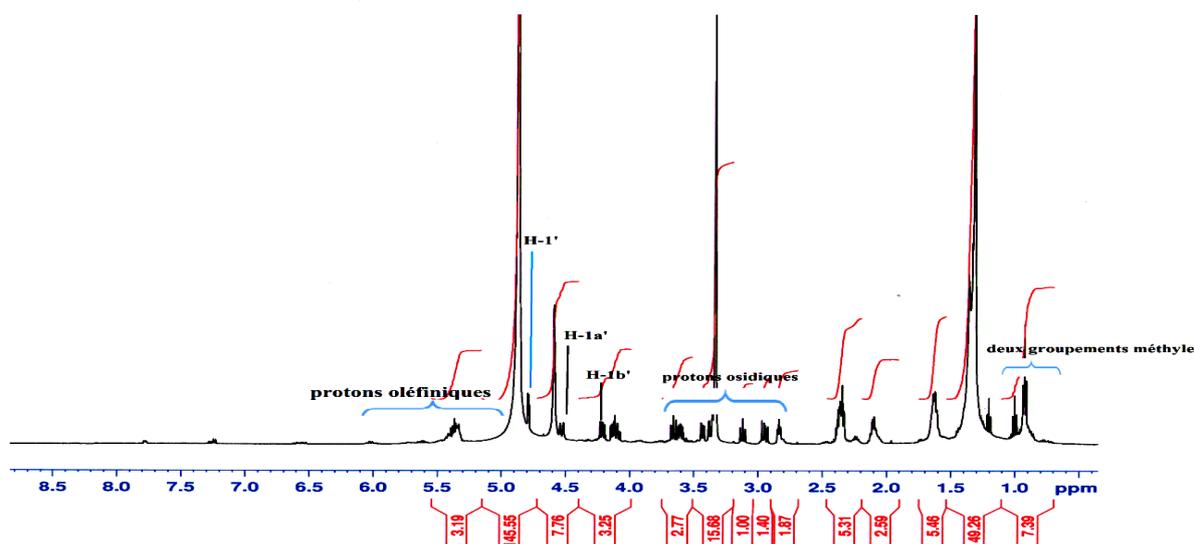


Figure 108 : Spectre RMN ^1H du composé L11

Le spectre RMN ^1H (Figure 108) montre deux signaux d'intégration 1H chacun à 4,22 ppm (H-1, dd , $J = 6,9$ et $12,1$ Hz) et 4,53 ppm (H-1, dd , $J = 2,9$ et $12,0$ Hz) caractéristique d'un groupement oxyméthylène acylé qui suggérerait la présence d'une chaîne lipidique. Ces derniers montrent sur le spectre COSY H-H (Figure 109) des corrélations avec un proton déblindé sortant à 5,33 ppm, lui-même corrélant avec deux protons géminés à $\delta_{\text{H}} 3,60$ (1H, dd ,

$J = 6,4$ et $10,8$ Hz) et $\delta_H 4,12$ (1H, *dd*, 5,2 et 10,8 Hz), très caractéristique d'un groupement glycérol acylé (Figure 109).

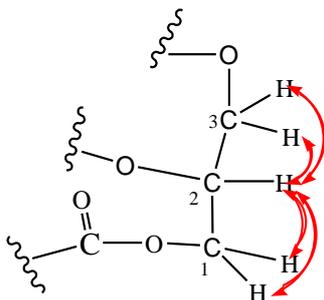


Figure 109 : Corrélations COSY H-H du groupement glycérol acylé

Le spectre HSQC (Figure 110) permet d'identifier les carbones C-1 (62,8 ppm), C-2 (70,3 ppm) et C-3 (65,7 ppm) de l'unité glycérol. Ces caractéristiques spectrales conformes aux données de la littérature [93, 94], suggèrent que le composé **L11** est un glycolipide dont il reste à identifier l'unité osidique et les deux chaînes lipidiques qui le constituent.

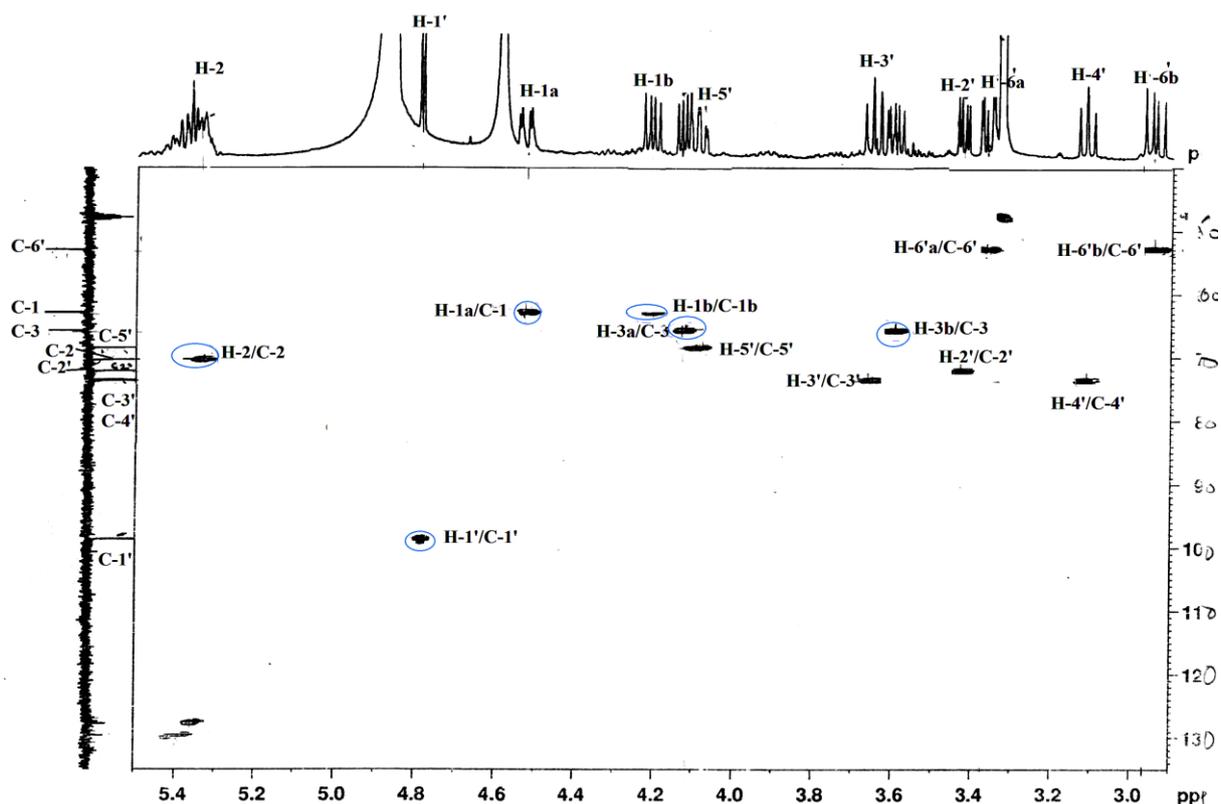


Figure 110 : Spectre HSQC du composé L11

L'unité osidique est identifiée par analyse COSY H-H (Figure 111). Partant du proton anomère H-1' résonant à 4,79 ppm (1H, *d*, 3,8 Hz) cité précédemment, le spectre COSY H-H (Figure 111) permet d'identifier un hexose et cela par l'observation des corrélations H-1'/H-2' (1H, $\delta_H 3,43$, *dd*, $J = 3,8 ; 9,5$ Hz), H-2'/H-3' (1H, $\delta_H 3,56$, *t*, $J = 9,5$ Hz), H-3' et H-4' (1H, δ_H

3,14, *t*, $J = 9,5$ Hz), H-4' et H-5' (1H, δ_H 4,09, *dd*, $J = 2,3 ; 9,1$ Hz), H-5'/H-6'b (1H, δ_H 2,95, *dd*, $J = 9,1 ; 14,3$ Hz) et enfin H-5'/H-6'a (1H, δ_H 3,38, *dd*, $J = 2,3 ; 14,3$ Hz). Les grandes valeurs de constantes de couplage permettent d'identifier un glucose de configuration α au regard de la constante de couplage $J_{H1'-H2'} = 3,8$ Hz.

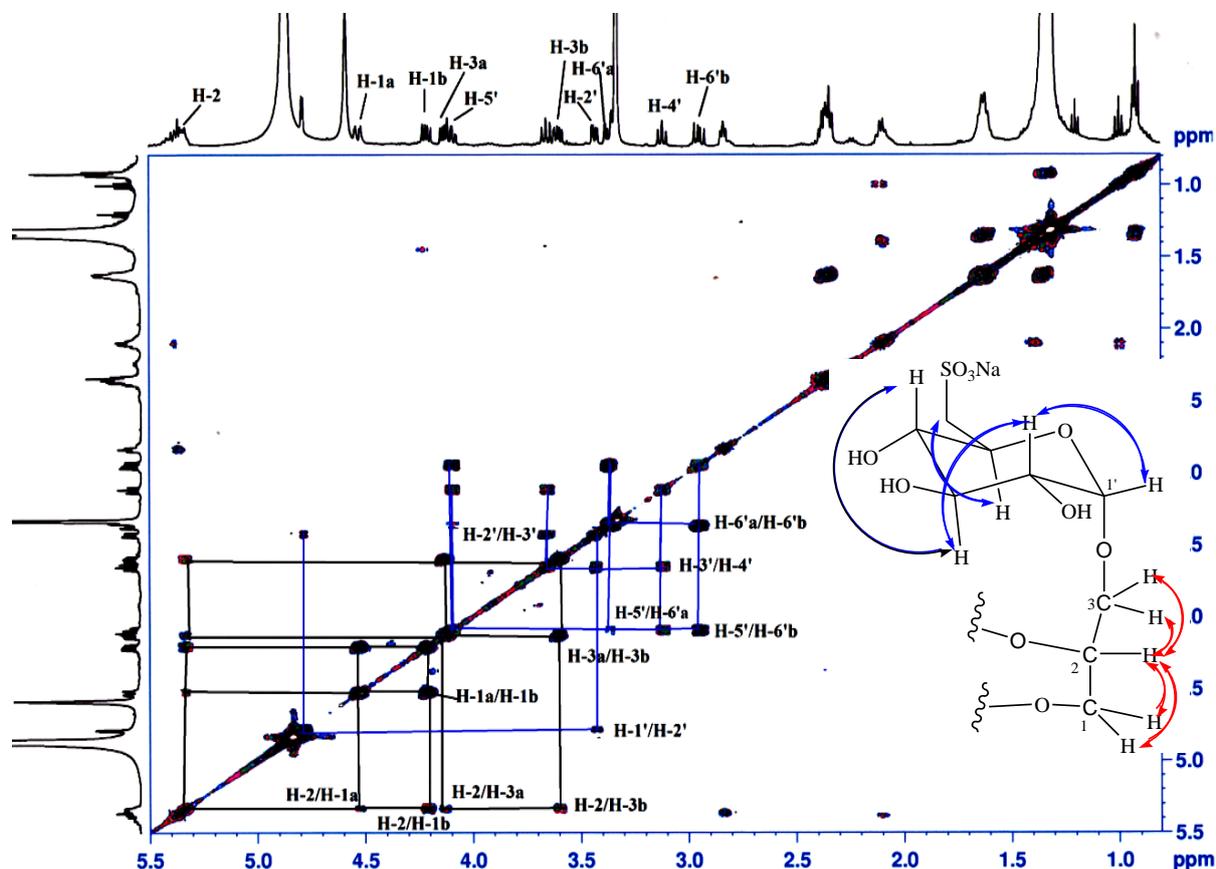


Figure 111 : Spectre COSY H-H du composé L11

L'analyse HSQC (Figure 110) a permis d'assigner les déplacements chimiques de tous les carbones osidiques : C-1' (98,6 ppm), C-2' (71,1 ppm), C-3' (73,5 ppm), C-4' (73,6 ppm), C-5' (70,3 ppm) et C-6' (52,9 ppm). La valeur de déplacement chimique de ce dernier est très caractéristique d'un groupement $\text{CH}_2\text{-6'}$ lié directement à un atome de soufre. De même que les déplacements chimiques et constantes de couplage de H-6'a (1H, δ_H 3,38, *dd*, $J = 2,3 ; 14,3$ Hz) et H-6'b (1H, δ_H 2,95, *dd*, $J = 9,1 ; 14,3$ Hz) confirment l'identité du groupement thiométhylénique, $\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$ ou $\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$ [95].

La corrélation remarquable observée sur le spectre HMBC (Figure 113) entre le carbone anomérique C-1' (98,6 ppm) du glucose et 2 protons repérés à 3,60 (1H, *m*) et 4,12 ppm (1H, *dd*, 6,3 ; 12,1 Hz) du groupement oxyméthylène de l'unité glycérol indique la fixation du sucre sur le carbone C-3 de cette dernière.

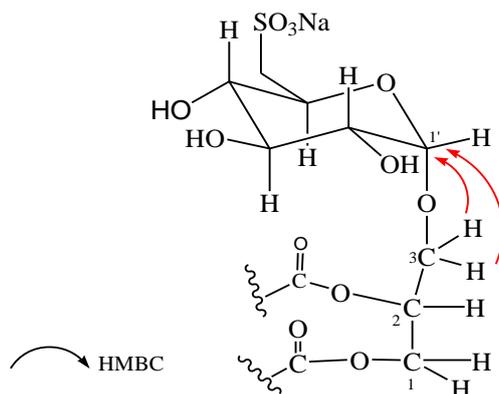


Figure 112 : Corrélations HMBC montrant la fixation du sucre

La présence de deux chaînes lipidiques acylant l'unité glycérol est confirmée par expérience HMBC (Figure 113) qui montre des corrélations $^2J_{H-C}$ entre les protons oxyméthyléniques CH₂-1 de l'unité glycérol repérés à 4,22 et 4,53 ppm et un carbonyle à δ_C 173,5 (C-1'') d'une part, le proton H-2 (5,33 ppm) de la même unité et un deuxième carbonyle sortant à 173,7 ppm (C-1''') d'autre part. La présence de deux longues chaînes aliphatiques d'acide gras insaturées liées aux carbones C-2 et C-1 de l'unité glycérol est donc parfaitement établie.

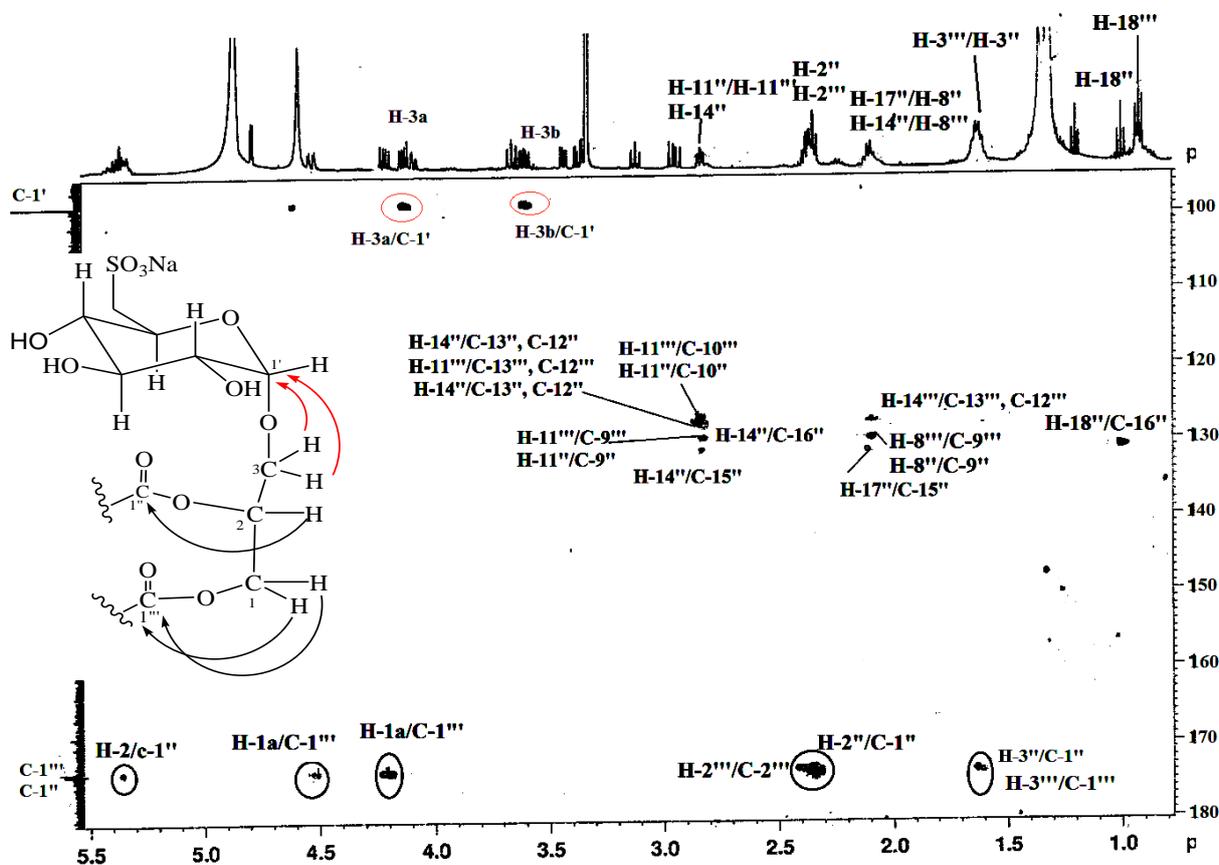


Figure 113: Spectre HMBC du composé L11

Maintenant il reste à déterminer les structures précises de ces deux chaînes. L'analyse combinée des spectres RMN ^1H (Figure 108) et COSY H-H (Figure 114) a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs protons oléfiniques apparaissant entre 5,31-5,42 ppm, sous forme de multiplet. Ces derniers montrent des couplages sur le spectre COSY H-H (Figure 114) avec des protons méthyléniques à 2,11 ppm sous forme de quadruplet (q , $J=7,6$ Hz) et des protons repérés à δ_{H} 2,83 sous forme de triplet (t , $J=6,0$ Hz) caractéristiques de protons allyliques, faisant partie des chaînes d'acide gras insaturés.

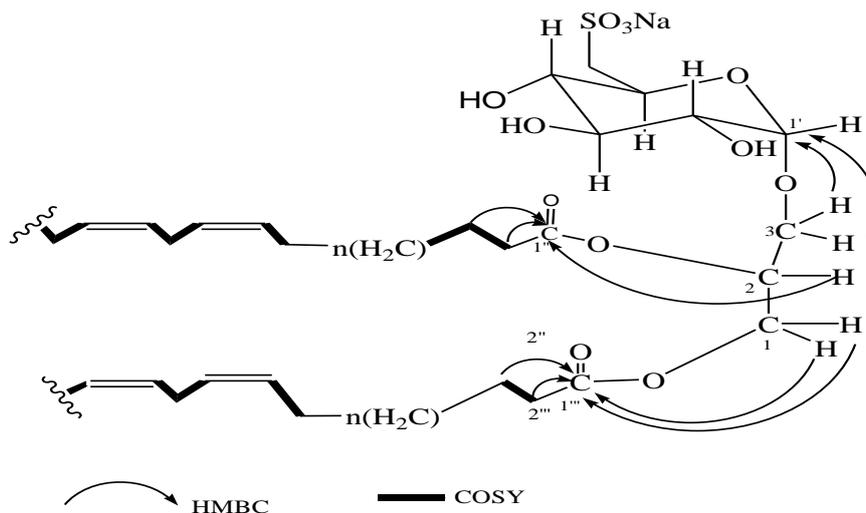


Figure 114: Corrélations importantes COSY H-H et HMBC du composé L11

La localisation des doubles liaisons des chaînes grasses et la détermination de leur géométrie, ont été établies conjointement par analyse COSY H-H (Figure 115), HSQC J -modulé (Figure 110) et HMBC (Figure 113). Le spectre HMBC montre des couplages hétéronucléaires longue distance entre les deux carbonyles d'ester C-1'' (173,7 ppm) et C-1''' (173,5 ppm) avec des protons équivalents repérés à 2,34 ppm (4H, m) et 1,64 ppm (4H, m), correspondant à quatre groupements méthyléniques, $\text{CH}_2\text{-}2''\text{-CH}_2\text{-}3''$ démarrant la 1^{ère} chaîne grasse et $\text{CH}_2\text{-}2'''\text{-CH}_2\text{-}3'''$ démarrant la seconde. Le spectre COSY H-H (Figure 114) montre les corrélations attendues entre les protons $\text{CH}_2\text{-}2''/\text{CH}_2\text{-}3''$ et $\text{CH}_2\text{-}2'''\text{-CH}_2\text{-}3'''$. Par ailleurs, les protons H-3'' et H-3''' montrent des corrélations avec un massif à 1,26-1,40 ppm de groupements $(\text{CH}_2)_n$, eux-mêmes corrélant avec des protons repérés à 2,11 ppm (q , $J=7,6$ Hz) attribués à 2 groupements CH_2 en position allylique. Ces derniers couplent à leur tour avec les protons oléfiniques (5,31-5,42 ppm), lesquels corréleront avec des protons résonant à 2,83 ppm sous forme de triplet (t , $J=6,0$ Hz) caractéristiques de protons allyliques, suggérant

la présence d'une séquence allylique répétitive avec 2 double liaisons pour chaque chaîne, en plus d'une symétrie remarquable dans les deux chaînes d'acide gras.

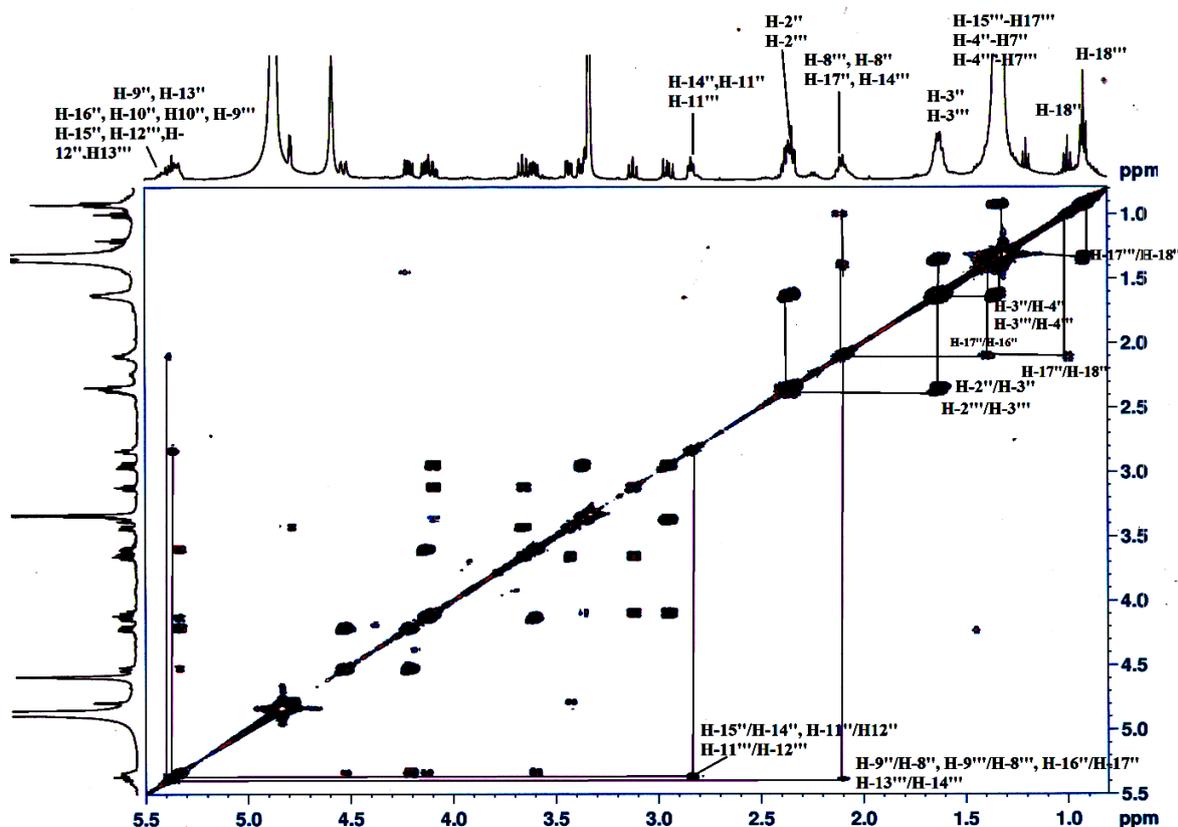


Figure 115: Spectre COSY H-H du composé L11

Le spectre COSY H-H (Figure 115) montre des corrélations entre des protons méthyliques attribués au groupement CH_3 terminal de la chaîne d'acide gras résonant à 1,11 ppm (3H , t , $J = 7,3$ Hz) et un groupement CH_2 allylique repéré à 2,11 ppm (q , $J = 7,6$ Hz). Ce dernier corrèle avec un proton oléfinique (m , 5,31-5,42 ppm) porté par un carbone résonant à 127,8-129,6 ppm d'après le spectre HSQC J -modulé. L'analyse HMBC (Figure 113) montrant clairement la corrélation entre le groupement méthyle CH_3 terminal cité et un carbone oléfinique (127,8-129,6 ppm), indique qu'une double liaison supplémentaire est localisée en □□de l'extrémité de la chaîne grasse. Ce qui permet de compter 5 doubles liaisons, 2 sur une chaîne et 3 sur l'autre. La première chaîne d'acide gras contient 3 doubles liaisons et la deuxième chaîne portera 2 doubles liaisons. Le second groupement CH_3 terminant la seconde chaîne grasse (3H , t , $J = 7,4$ Hz) et sortant à 0,93 ppm montre sur le spectre COSY H-H (Figure 103) des corrélations avec des protons en massif (1,26-1,40 ppm) de groupements $(\text{CH}_2)_n$ constituant la seconde chaîne, eux même couplant avec un groupement CH_2 allylique (q , $J = 7,6$ Hz). Le déplacement chimiques de tous les

groupements CH₂ en position α (allyliques) des double liaisons, de l'ordre de 25,1 ppm, confirme bien la configuration *cis* de ces dernières [96]. Une configuration β donnerait une valeur de déplacement chimique de l'ordre de 30 ppm. La comparaison avec les données de la littérature, la masse moléculaire égale à 862 uma ainsi que différents pics de fragmentation (793, 735 et 709 uma), nous permettent d'identifier sans ambiguïté les chaînes grasses comme étant 9Z, 12Z, 15Z-octadécatriénoate pour la première chaîne et 9Z, 12Z-octadécadiénoate pour la deuxième chaîne [96].

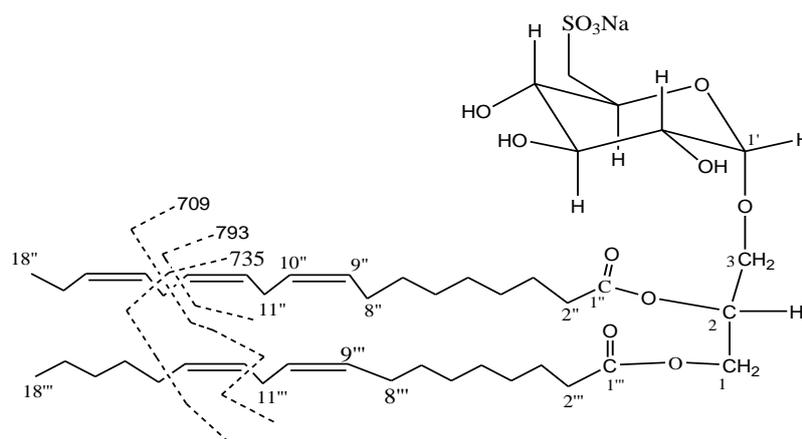
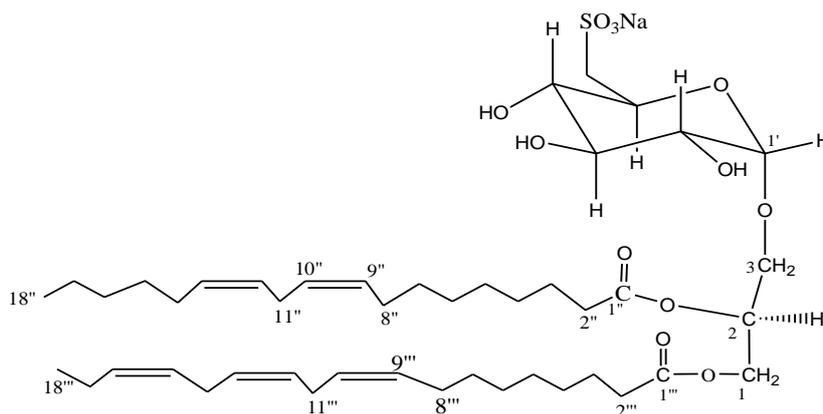


Figure 116: Fragments observés en masse pour le composé L11

Cette attribution qui a écarté une possible permutation des chaînes (la première en C-1 et la seconde en C-2) a été dictée sur la base des données spectrales d'un glycolipide possédant des chaînes grasses totalement identiques [96].



La stéréochimie au niveau du carbone C-2 de l'unité glycérol est généralement déterminée pour ce type de composés sur la base des valeurs de constantes de couplage H-2/H-3a et H-2/H-3b [95]. Des valeurs de 6 Hz et 3,6 Hz plaident pour une stéréochimie C-2

(R). Des valeurs plus grandes de l'ordre de 6 et 11 Hz, comme c'est le cas de notre composé, plaident pour une stéréochimie C-2 (S).

Cette analyse spectrale appuyée par les données de la littérature, nous permet de proposer pour ce composé nouveau, la structure suivante:

1-*O*-(9Z,12Z,15Z-octadécatriénoyl)-2-*O*-(9Z,12Z-octadécadiénoyl)-3-*O*-(6' sulfoquinovopyranosyl)-glycérol. [un glycolipide voisin possédant des chaînes grasses identiques substituant un β -D-galactose non sulfaté, à été isolé de l'extrait EtOAc des fruits d'une plante solanacée nommée *Lycium chinense*].

Il est à signaler que les glycolipides sont les constituants des membranes des cellules animales et végétales. Ils jouent un rôle physiologique important [94] (rôle protecteur, réserve glucidique, ..)

C	δ_C	$\delta_H J$ Hz	C	δ_C	$\delta_H J$ Hz
1'	98,6	4,79 <i>d</i> 3,8	11'', 14''	25,1	2,83 <i>t</i> 6,0
2'	72,1	3,43 <i>dd</i> (3,8; 9,5)	17''	26,1	2,83 <i>t</i> 6,0
3'	73,5	3,65 <i>t</i> 9,5	18''	13,0	1,11 <i>t</i> 7,3
4'	73,6	3,14 <i>t</i> 9,5	1'''	173,5	-
5'	70,3	4,09 <i>dd</i> (2,3; 9,1)	2'''	33,5	2,37 <i>m</i>
6'	52,9	2,95 H-6'b <i>dd</i> (9,1; 14,3) 3,38 H-6'a <i>dd</i> (2,3; 14,3)	3'''	24,6	1,64 <i>m</i>
1	62,8	4,22 H-1b <i>dd</i> (6,9; 12,1) 4,53 H-1a <i>dd</i> (2,9; 12,1)	4'''-7'''	28,8- 29,3	1,26-1,40 <i>m</i>
2	70,3	5,33 <i>m</i>	8'''	26,8	2,11 <i>q</i> 7,6
3	65,7	3,60 H-3b <i>dd</i> (6,4;10,8) 4,12 H-3a <i>dd</i> (5,2; 10,8)	9'''-10''' 12'''-13'''	126,8- 131,3	5,31-5,42 <i>m</i>
1''	173,7	-	11'''	25,1	2,83 <i>t</i> 6,0
2''	33,7	2,34 <i>m</i>	14'''	26,8	2,11 <i>q</i> 7,6
3''	24,6	1,64 <i>m</i>	15'''	24,6	1,26-1,40 <i>m</i>
4''-7''	28,2- 29,3	1,26-1,40 <i>m</i>	16'''	31,6	1,26-1,40 <i>m</i>
8''	26,8	2,11 <i>q</i> 7,6	17'''	22,3	1,26-1,40 <i>m</i>
9'',10'',12'', 13'',15'',16''	126,8 - 131,3	5,31-5,42 <i>m</i>	18'''	13,0	0,93 <i>t</i> 7,4

Tableau 22 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C de **L11** (CD_3OD).

Conclusion

Les résultats obtenus à l'issue de cette investigation chimique concernant l'espèce *Lotus pusillus* Medik. (Fabaceae), ont révélé la richesse de cette dernière en métabolites secondaires de structures diverses. L'extraction liquide-liquide des parties aériennes de cette plante, commune à toute la région méditerranéenne, et les séparations chromatographiques successives ont permis d'isoler 11 composés dont 1 nouveau au stade de notre recherche bibliographique. En faisant appel aux différentes méthodes modernes d'analyse spectroscopiques, particulièrement les techniques de RMN 2D (COSY, TOCSY, HMBC, HMQC et HSQC), nous avons pu identifier 11 composés: taraxasterol **L1**, β -sitostérol **L2**, β -sitostéryl 3 β -D-glucopyranoside **L3**, β -sitostéryl 3 β -D-glucopyranoside-6-*O*-palmitate **L4** Lupinalbine B **L5**, acide oléanolique **L6**. 2-hydroxybenzyl β -D-glucopyranoside **L7**, maltol 3-*O*-[6-*O*-benzoyl]- β -D-glucopyranoside **L8**, Azukisaponine V **L9**, Astragaloside VIII **L10** et 1-*O*-(9Z,12Z-octadécadiénoyl)-2-*O*-(9Z,12Z,15Z-octadecatrienoyl)-3-*O*-(6'-sulfoquinovopyranosyl)-glycérol **L11**.

Conclusion Générale

Le présent travail avait pour objet l'étude phytochimique d'une plante saharienne *Silene arenarioides* Desf. (Caryophyllaceae) et d'une plante commune à toute la région méditerranéenne *Lotus pusillus* Medik. (Fabaceae ou Leguminosae), appartenant respectivement aux deux familles Caryophyllaceae et Fabaceae (Leguminosae). Ces familles sont connues pour leur richesse en divers métabolites secondaires, notamment les flavonoïdes et saponosides. Les saponosides sont considérés comme marqueurs chimiotaxonomiques de la famille Caryophyllaceae alors que les isoflavonoïdes le sont pour la famille Fabaceae. Les deux espèces en question n'ont fait l'objet d'aucune investigation chimique antérieure. Notre étude s'est focalisée sur l'isolement et la détermination de leur composition chimique ainsi que sur l'évaluation du potentiel antioxydant et de l'activité antibactérienne des différents extraits de *Silene arenarioides* Desf.

L'étude chimique de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Silene arenarioides* Desf. a conduit à l'isolement et l'identification de trois métabolites secondaires : (3-*O*- β -D-glycopyranosyl)-Stigmastérol **Si1**, Soyacérébroside I **Si2** et maltol 3-*O*-[6-*O*-benzoyl]- β -D-glucopyranoside **Si3**. Cette investigation phytochimique n'a pas permis l'isolement d'ecdystéroïdes, composés typiques en général du genre *Silene*. Cependant le même constat a été relevé à l'issue de plusieurs études réalisées sur diverses espèces comme *S. conoidea*, *S. cucubalus* et *S. viscidula*. Le contenu saponosidique, de loin majoritaire au sein de la plante, n'a pu être caractérisé en l'absence de moyens de séparation appropriés. Le recours à la séparation par CLHP apparaît comme l'ultime solution. Il est important de mentionner que Soyacérébroside I **Si2** et maltol 3-*O*-[6-*O*-benzoyl]- β -D-glucopyranoside **Si3**, ont été isolés pour la première fois dans le genre *Silene*.

L'analyse des extraits acétate d'éthyle des parties aériennes de *Lotus pusillus* a mené à l'identification de six produits naturels se répartissant en : taraxasterol **L1**, β -sitostérol **L2**, β -sitostéryl 3 β -D-glucopyranoside **L3**, β -sitostéryl 3 β -D-glucopyranoside-6-*O*-palmitate **L4** Lupinalbin B **L5**, acide oléanolique **L6**. Cinq autres composés ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique des parties aériennes : 2-hydroxybenzyl β -D-glucopyranoside **L7**, maltol 3-*O*-[6-*O*-benzoyl]- β -D-glucopyranoside **L8**, Azukisaponine V **L9**, Astragaloside VIII **L10** et 1-*O*-(9*Z*, 12*Z*-octadécadiénoyl)-2-*O*-(9*Z*, 12*Z*, 15*Z*-octadécatriénoyl)-3-*O*-(6'

sulfoquinovopyranosyl)-glycérol **L11**. Les quatre premiers composés sont décrits pour la première fois dans le genre *Lotus*. Le composé **L11** est considéré comme nouveau.

L'identification de tous les métabolites isolés, dans le cadre de ce travail de recherche, est rendue possible grâce à l'utilisation combinée des différentes méthodes d'analyse spectroscopiques modernes particulièrement la RMN ¹D (¹H, ¹³C DEPT et ¹³C *J*-modulé) et 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé et HMBC), la spectrométrie de masse ESI-MS, la mesure du pouvoir rotatoire [α]_D et la comparaison avec les données de la littérature.

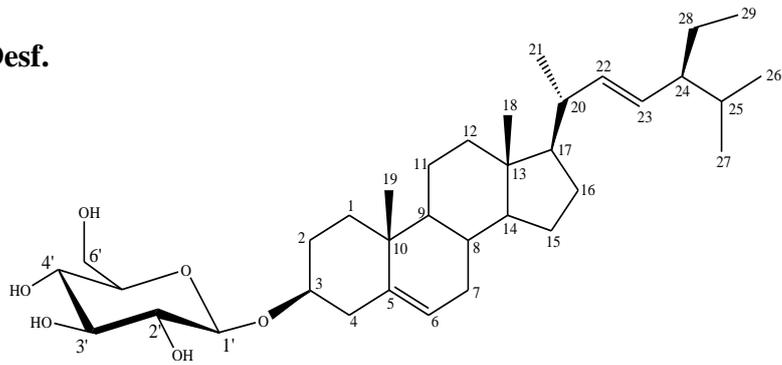
L'activité antioxydante de l'extrait méthanolique de *Silene arenarioides* Desf. à été évaluée par le test antiradicalaire qui consiste à estimer la capacité du DPPH à piéger les radicaux libres. L'étude a révélé que l'extrait méthanolique présente une activité antioxydante importante par rapport à l'antioxydant standard, en l'occurrence l'acide ascorbique. Les extraits MeOH, AcOEt et Ep ainsi que le produit **Si3** ont montré, par usage de la méthode de diffusion en milieu gélosé, des activités antibactériennes vis-à-vis de trois espèces *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Il a été relevé que l'extrait méthanolique de *Silene arenarioides* Desf. inhibe fortement la croissance de tous les types de bactéries. La forte activité antimicrobienne et antioxydante de l'extrait méthanolique pourrait être due à sa richesse et variété en composés secondaires.

L'ensemble de ces résultats montre que les sources naturelles peuvent être un véritable réservoir de molécules originales susceptibles d'être proposées comme modèle pour des travaux de chimie médicinale. Il prouve aussi que notre flore est encore riche et prometteuse dans le domaine des produits naturels.

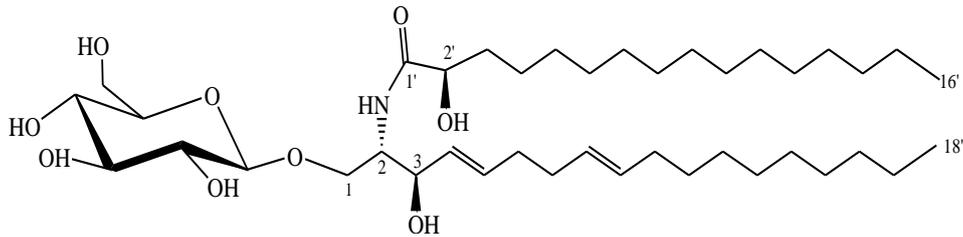
Enfin nous espérons que ce travail constitue une modeste contribution dans la mise en valeur de la flore algérienne qui reste à explorer.

Les structures des produits isolés au niveau des deux plantes, objet de ce travail, sont représentées ci-après.

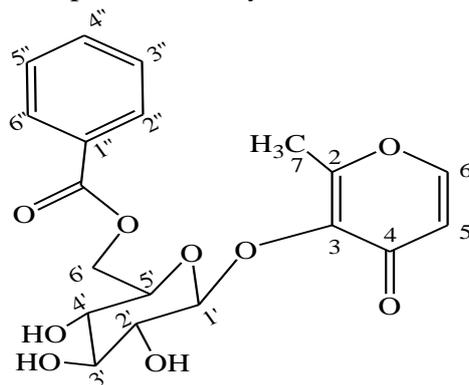
Silene arenarioides Desf.



Composé Si1 Stigmastérol glucosilé

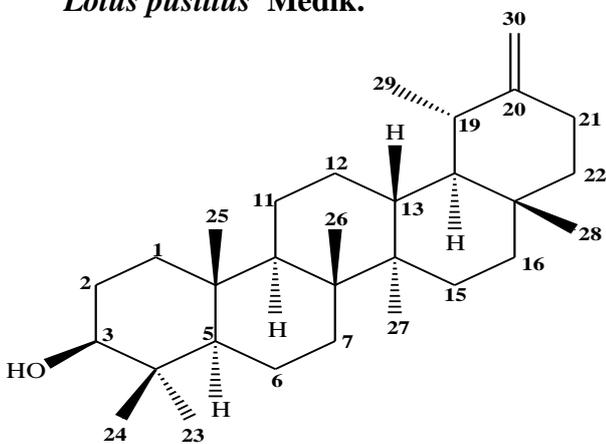


Composé Si2 Soyacérebroside I

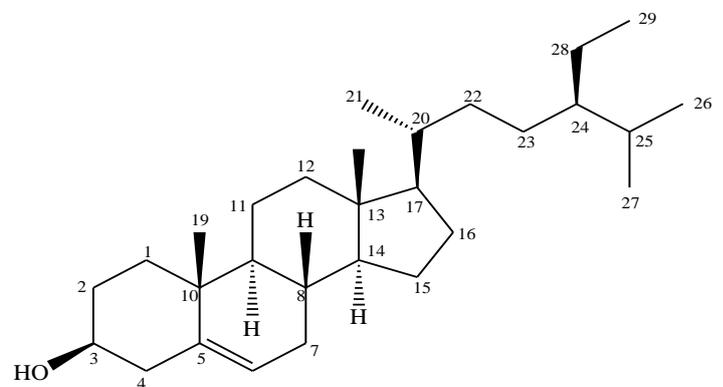


Composé Si3 maltol 3-O-[6-O-benzoyl]-β-D-glucopyranoside

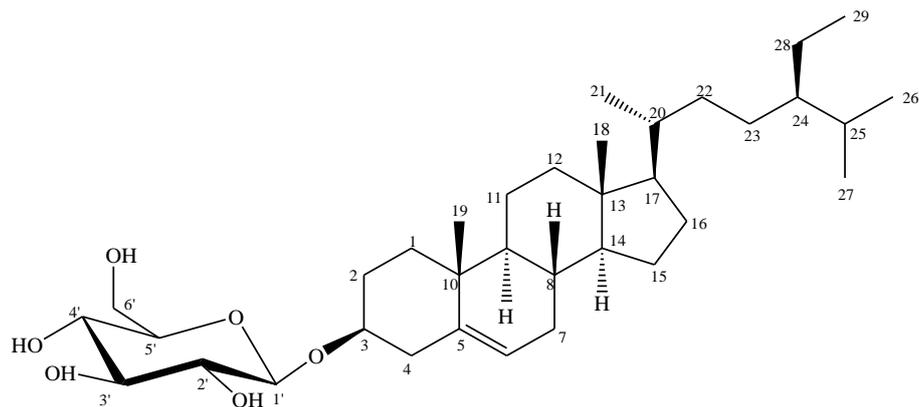
Lotus pusillus Medik.



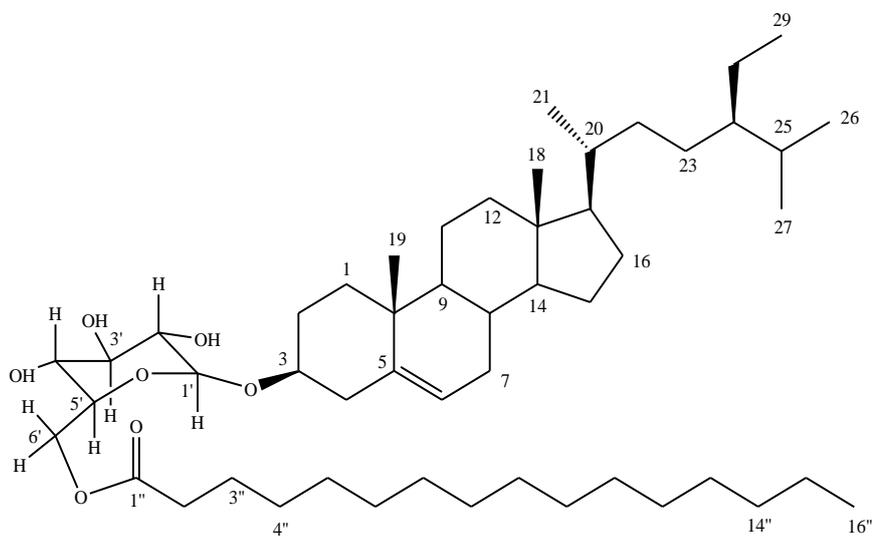
Composé L1 18α,19α-urs-20(30)-én-3β-ol



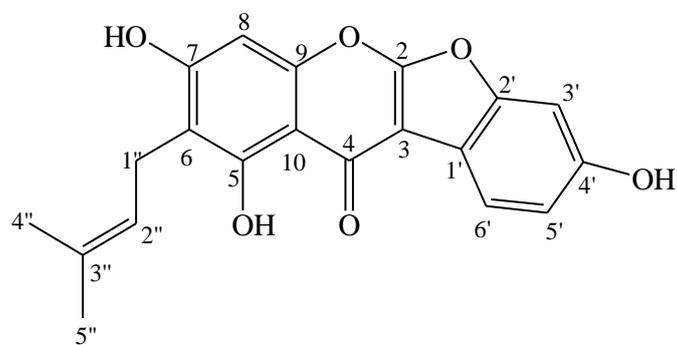
Composé L2 β-sitostérol



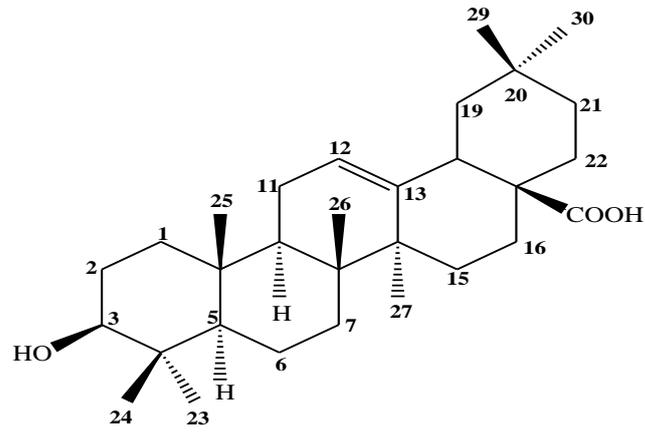
Composé **L3** β -sitostéryl 3 β -D-glucopyranoside



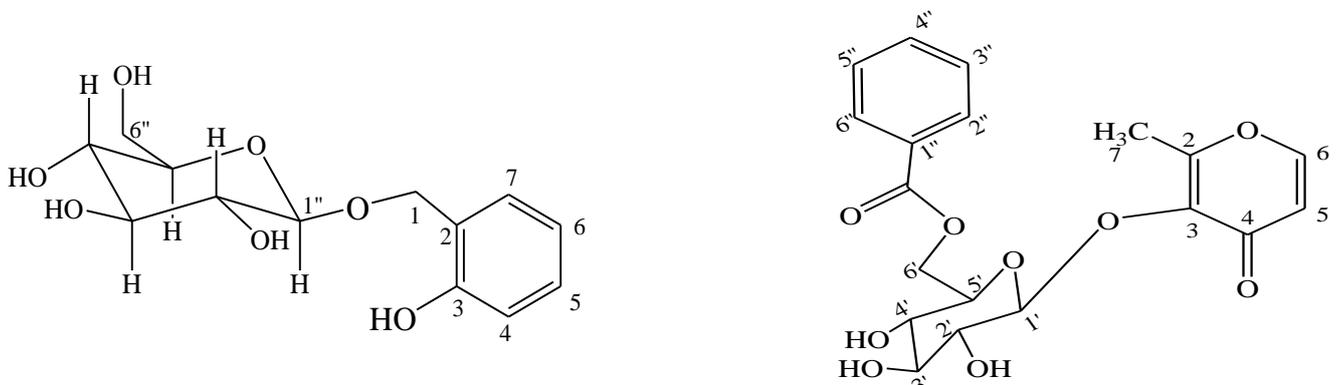
Composé **L4** β -sitostéryl 3 β -D-glucopyranoside-6'-O-palmitate



Composé **L5** Lupinalbine B

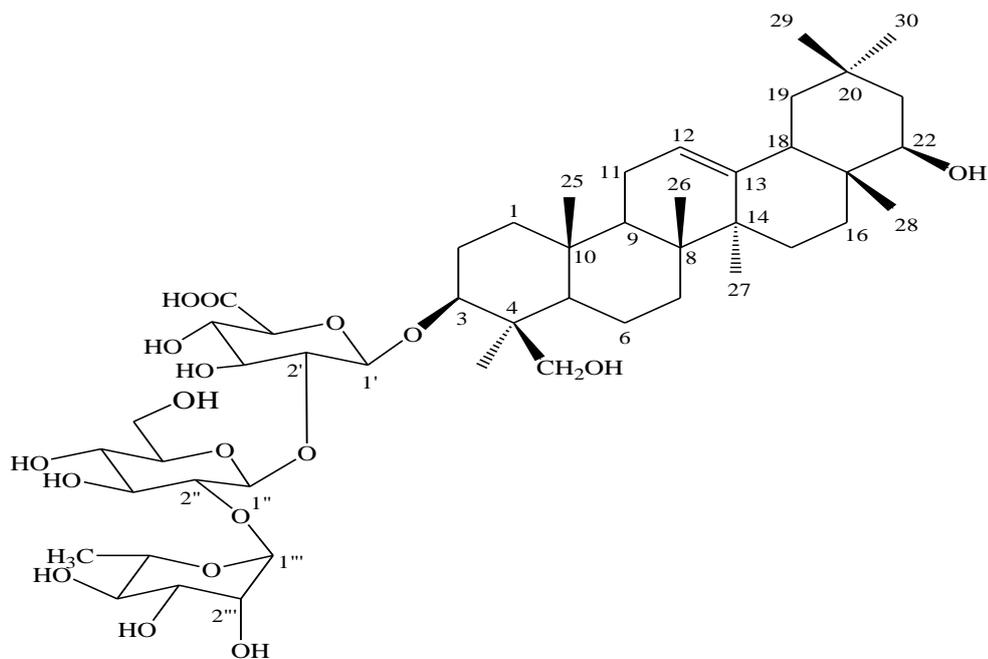


Composé L6 Acide oléanolique

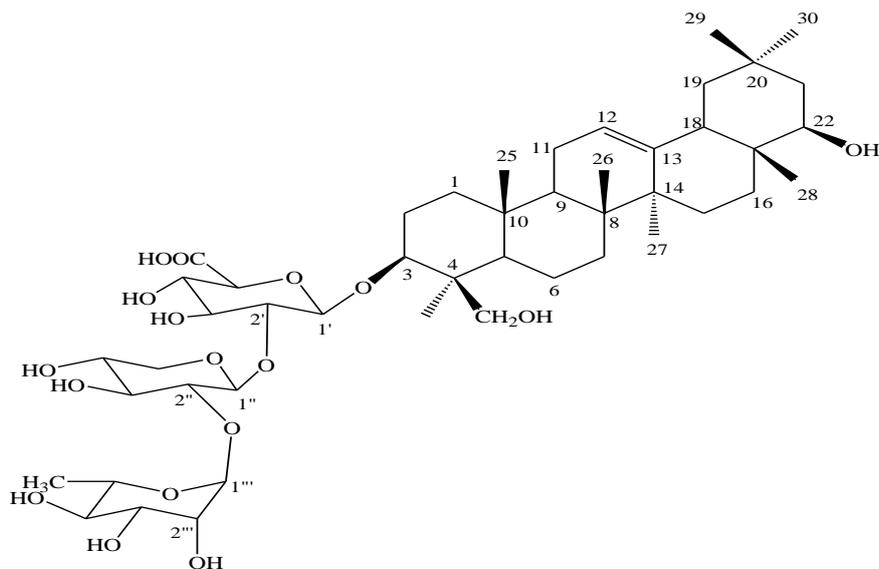


Composé L7 2-hydroxybenzyl β-D-glucopyranoside

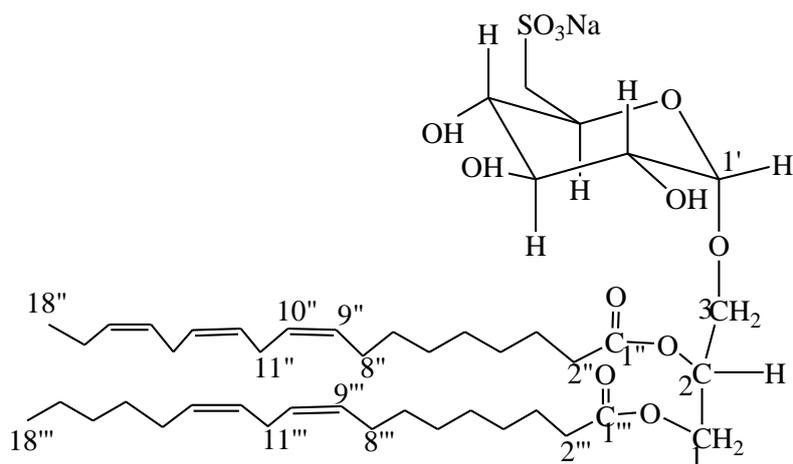
Composé L8 maltol 3-O-[6-O-benzoyl]-β-D-glucopyranoside



Composé L9 Azukisaponine V



Composé **L10** Astragaloside VIII



Composé **L11** 1-*O*-(9*Z*, 12*Z*-octadécadiényl)-2-*O*-(9*Z*, 12*Z*, 15*Z*-octadécatriényl)-3-*O*-(6'-sulfoquinovopyranosyl)-glycérol.



Chapitre VIII

Partie Expérimentale



VIII.1- Matériel et méthodes

VIII.1.1- Matériel végétal et extraction

Les plantes *Silene arenarioides* Desf. et *Lotus pusillus* Medik. ont été récoltées respectivement aux mois d'avril 2006 et 2008 dans la région de Biskra. Elles ont été identifiées par le Professeur Bachir Oudjehih, Institut des Sciences Agronomiques et Vétérinaires, Université de Batna.

Les parties aériennes séchées et pulvérisées, ont été extraites trois fois par l'éther de pétrole, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Chaque extraction a été effectuée pendant 4 jours d'agitation minimum, à température ambiante et dans une proportion d'environ 5 litres de solvant pour 700 g de matériel végétal. Les solvants ont été évaporés à basse pression et les extraits finalement séchés et stockés à basse température et à l'abri de la lumière jusqu'à leur exploitation.

VIII.2- Méthodes chromatographiques analytiques

VIII.2.1- Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées avec des plaques de Silicagel 60 F₂₅₄ sur feuille d'aluminium (Merck). Après développement dans des cuves en verre, les plaques sont observées à la lumière et sous lampe UV à 254 et 366 nm. Nous avons également utilisé des plaques de silice RP-18 prêtes à l'emploi à support en aluminium (Merck). Les systèmes de solvants utilisés sont constitués principalement de mélanges méthanol/eau.

VIII.2.2- Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique est utilisée pour obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut. Elle est rapide et a l'avantage de consommer moins de solvants que les méthodes chromatographiques classiques. La rapidité de cette méthode évite les phénomènes d'isomérisations observées souvent dans le cas de la chromatographie sur colonne. Des chromatographies en phase inverse (une silice greffée Lichroprep RP-18 Merck 40-63 µm), sont préconisées pour les extraits polaires et silice Kieselgel Merck (70-230 mesh, 63-200 µm) pour les extraits apolaires. Les fractionnements ont été effectués dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n° 4.

VIII.2.3- Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

VIII.2.3.1- Chromatographie d'adsorption

Des colonnes ouvertes sur Silicagel 60 (70-230 mesh, 63-200 μm) ont été utilisées pour les fractionnements et purifications des extraits. La taille des colonnes, la granulométrie de la phase solide, le débit de la phase mobile et la taille des fractions ont été adaptés à la quantité et à la nature (extrait, fraction) des échantillons à séparer. Le choix des conditions d'élution, le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base d'analyses par CCM.

VIII.2.3.2- Chromatographie d'exclusion

Les chromatographies d'exclusion ou filtration sur gel ont été réalisées comme étapes de fractionnement. Elles ont été effectuées sur Sephadex LH-20 avec un système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ ou MeOH pur comme phase mobile avec un débit de 1 ml. Les échantillons à séparer ont été introduits sous forme liquide après dissolution dans un volume d'éluant le plus petit possible. Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

VIII.2.4- Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Les opérations de chromatographie HPLC ont été effectuées sur un appareillage constitué des éléments suivants :

- une pompe P580 A quaternaire avec dégazeur intégré.
- un passeur d'échantillon ASI 100.
- un détecteur UV/Visible à barrette de diodes UVD 170S/340S.
- une colonne thermostatée par un four STH 585.
- La colonne employée est UP 5 ODB.25M 250x10 mm Interchrom.

VIII.2.5- Chromatographie préparative sur couche épaisse (CCE)

Les chromatographies préparatives sur couche épaisse ont été effectuées sur des plaques de silice Keisegel 60.F₂₅₄ (Merck) et silice RP-18. Les plaques ont été observées sous lampe UV à 250 et 366 nm.

VIII.3- Méthodes physico-chimiques

VIII.3.1- Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$

Les pouvoirs rotatoires spécifiques sont mesurés sur un polarimètre électronique Perkin-Elmer 241 à 20 °C. La source de la lumière utilisée est la raie D du sodium (589 nm).

La cuve employée est de 1 ml et une longueur de 10 cm. Le solvant de solubilisation et la concentration sont indiqués dans chaque cas.

VIII.3.2- Spectrométrie UV-Visible

Les spectres UV des composés isolés ont été mesurés dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre de type UV KONTRON Logiciel UVS900Lite. Les mesures sont effectuées dans des cuves en quartz contenant 2 ml de solution.

VIII.3.3- Spectrométrie de masse

Les spectres de masse des produits isolés ont été enregistrés en modes positif et négatif par un spectromètre de type Brüker LC-MS/MS type esquire-LC, du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles CNRS-Pierre Fabre de Toulouse (France).

VIII.3.4 - Spectrométrie IR

Les spectres IR des molécules ont été réalisés au moyen d'un spectrophotomètre Shimadzu IR-470, du Département de Chimie de l'Université de Batna. Les échantillons sont déposés sur des pastilles de KBr.

VIII.3.5- Spectroscopie RMN

Les spectres RMN ont été mesurés à 500 MHz (^1H) et 125 MHz (^{13}C) sur des appareils de type Brüker Avance DRX-500 du Centre de Recherche sur les Substances Naturelles de Toulouse (UMS CNRS-Pierre Fabre 2597) et de l'Institut de Chimie Moléculaire de Reims (UMR CNRS 6229). Les échantillons ont été dissous dans des solvants deutérés CD_3OD ou CDCl_3 . Les déplacements chimiques δ ont été exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne. Les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

VIII.4- Extraction

VIII.4.1- Extrait méthanolique des parties aériennes de *S. arenarioides* Desf.

800 g des parties aériennes de *S. arenarioides* Desf., préalablement séchées et pulvérisées, sont mis à macérer dans l'éther de pétrole (5 l x 2) pendant 3 jours. Le mélange est ensuite filtré et concentré à sec, donnant 3,8 g d'extrait étheropétrolique. Les marcs résultants sont ensuite extraits par de d'acétate d'éthyle (5 l x 2) durant 3 jours. Après

filtration et évaporation du solvant, 14 g d'extrait acétate d'éthyle ont été obtenus. Les marcs sont repris dans le méthanol (5 l x 2) pendant 3 jours, donnant 35 g d'extrait méthanolique.

Les CCM réalisées sur les trois extraits dans différents systèmes de solvants, ont montré une composition chimique plus riche au niveau de l'extrait méthanolique.

VIII.4.1.1- Fractionnement et purification de l'extrait méthanolique

L'extrait méthanolique (7 g) a été préalablement soumis à un fractionnement grossier au moyen d'une chromatographie liquide sous vide (VLC) utilisant comme phase stationnaire le gel de silice greffé en C-18 (50 g) et un mélange eau/méthanol à différents gradients (80/20 à 0/100) comme éluant. Après séparation et rassemblement des fractions possédant un profil chromatographique similaire, 9 fractions allant de **F1** à **F9** ont été obtenues. Les CCM ont été éluées dans un mélange ternaire $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (60/40/7 et 70/30/5). Ces différentes fractions sont traitées individuellement par la suite en fonction de leur composition et en fonction de leur intérêt et poids. Le fractionnement de l'extrait méthanolique de *Silene arenarioides* est récapitulé dans le tableau ci-dessous.

Eluant colonne		Fractions	Poids en mg
Méthanol/eau	80-20	F1	720
	70-30		
	60-40	F2	380
	50-50	F3	130
	40-60	F4	90
	30-70	F5	125
	20-80	F6	150
	10-90	F7	50
Méthanol	100	F8	40
		F9	250

Tableau 21 : Fractionnement de l'extrait méthanolique de *S. arenarioides*

VIII.4.1.1.1- Etude de la fraction F9

Une chromatographie sur colonne de gel de silice normale effectuée sur la fraction **F9** (250 mg) dans un mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95:5, 90:10, 80:20, 70:30), suivie d'une filtration sur Sephadex LH-20 dans le méthanol, a permis d'isoler le composé **Si1** à l'état pur (11 mg).

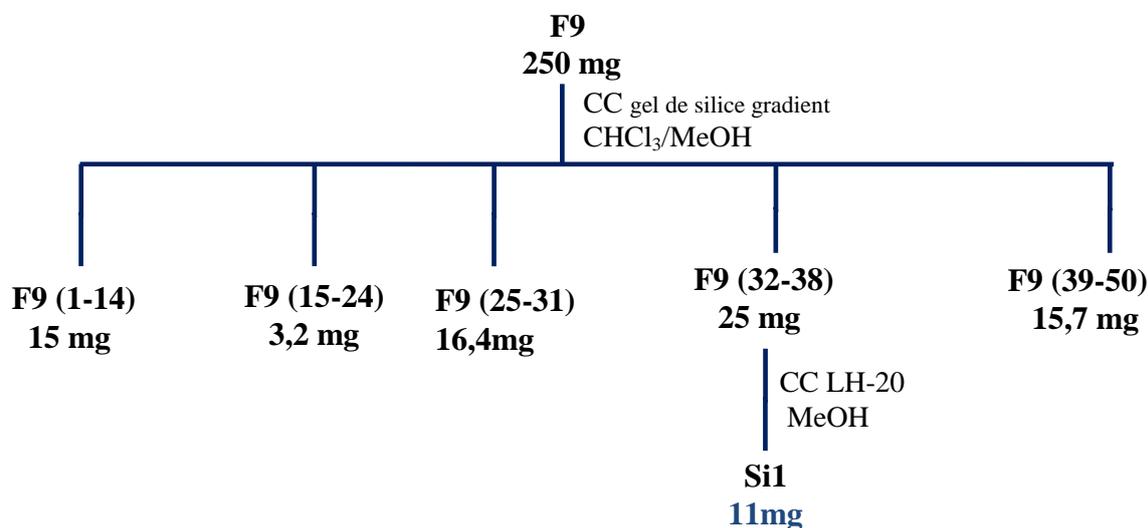


Schéma 4 : Purification de la fraction F9

VIII.4.1.1.2- Etude de la fraction F8' (F7 + F8)

Les fractions F7 et F8 réunies (90 mg) sont soumises à une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20, dans un mélange chloroforme/méthanol à différents gradients (100/0 à 80/20), conduisant à sept sous fractions (Schéma 5). La filtration sur colonne de Sephadex de la sous fraction F8' (55-86) d'un poids de 20 mg, a donné le composé **Si2** (14 mg)

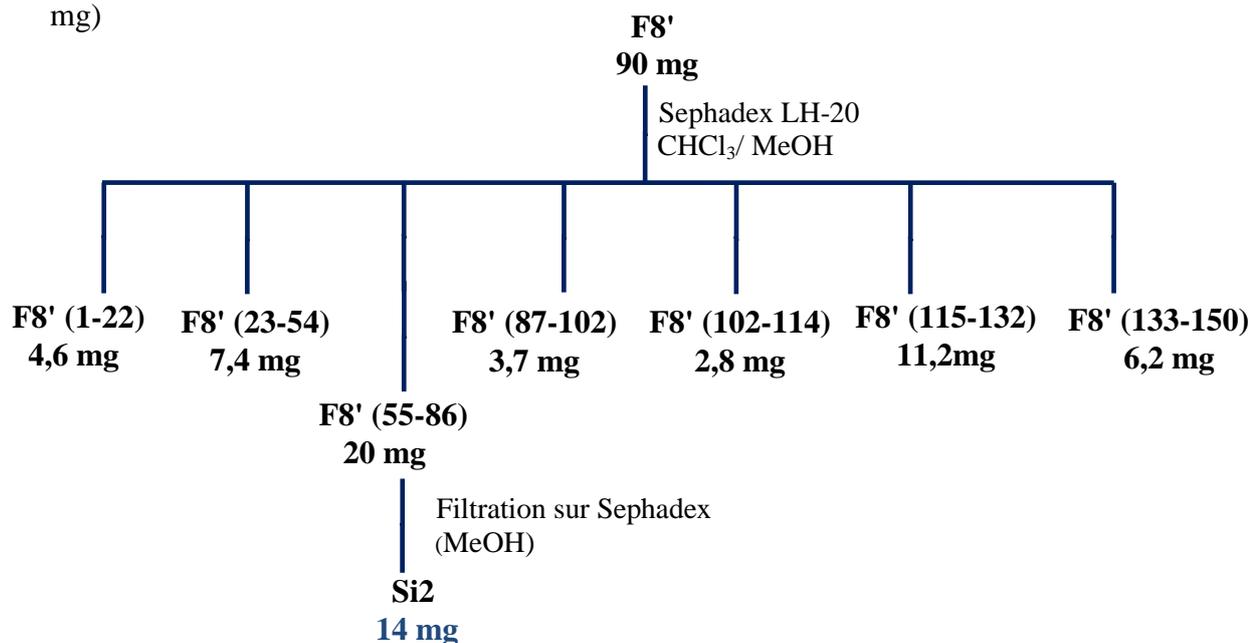


Schéma 5 : Purification de la fraction F8'

VIII.4.1.1.3- Etude de la fraction F6

La fraction F6 (150 mg) est la plus importante d'un point de vue quantitatif. Son analyse CCM après révélation par une solution d'acide sulfurique à 50%, montre une seule tache majoritaire incluse dans une trainée, se colorant en rose foncé. Une chromatographie sur une colonne de gel de silice dans un mélange chloroforme/méthanol (70/30), puis une recristallisation dans le méthanol ont conduit au composé **Si3** (13 mg).

VIII.5- Composés isolés de l'espèce *Silene arenarioides*VIII.5.1- **Composé Si1**

3-O-β-D-glycopyranosyl stigmastérol

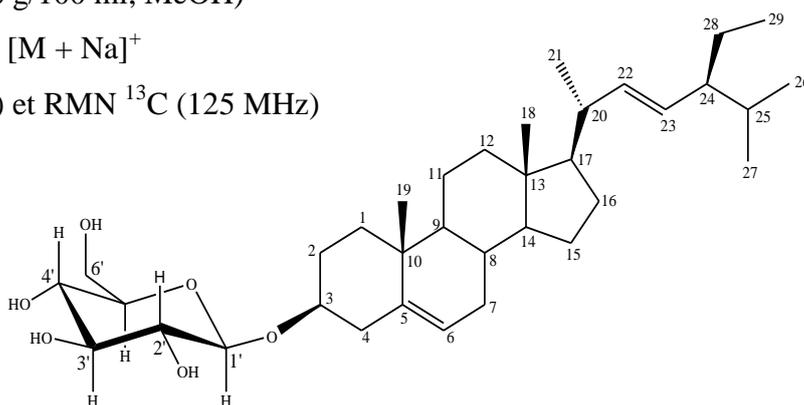
Formule brute : C₃₅H₅₈O₆

[α]_D = - 6,5° (C= 0,6 g/100 ml, MeOH)

MS : ESI m/z = 597 [M + Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

(Tableau 4)

VIII.5.2- **Composé Si2**

Soyacérobroside I

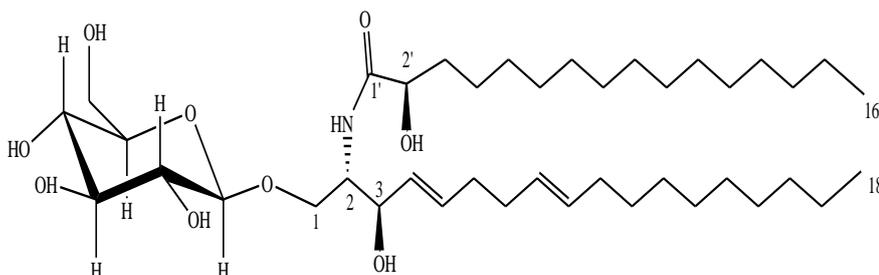
Formule brute: C₄₀H₇₅NO₉.

[α]_D = + 5,0° (C= 0,60 g/100 ml, MeOH)

MS : ESI m/z = 737 [M+Na+H]⁺

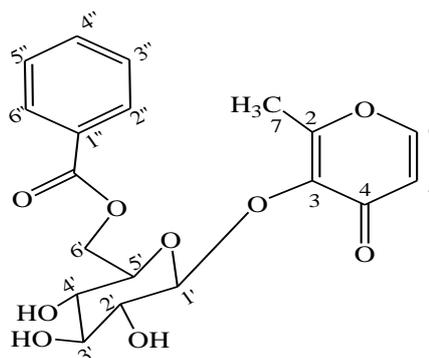
RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

(Tableau 5)



VIII.5.3- Composé Si3

maltol 3-O-[6-O-benzoyl]-β-D-glucopyranoside

Formule brute: C₁₉H₂₀O₉.[α]_D = - 13°, (C= 0, 3 g/100 ml, CHCl₃).**MS :** ESI m/z = 415 [M + Na]⁺.RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)**(Tableau 6)**VIII.6- Extrait acétate d'éthyle de *Lotus pusillus* Medik.

L'étude phytochimique a été réalisée à partir de 700 g de poudre sèche des parties aériennes de *Lotus pusillus* Medik. La poudre est préalablement dégraissée à l'éther de pétrole (5l) pendant 3 jours. Cette opération est répétée deux fois. La masse obtenue pour cet extrait, après filtration et évaporation à sec du solvant, est égale à 9 g. Le résidu résultant est mis à macérer dans l'acétate d'éthyle dans les mêmes conditions. Après filtration et évaporation à sec du solvant, 14 g d'extrait acétate d'éthyle ont été obtenus. Les marcs obtenus sont repris deux fois par le méthanol. Après filtration et concentration à sec du solvant, un extrait méthanolique d'une masse de 35 g a été obtenu

VIII.6.1- Fractionnement et purification des extraits

La chromatographie liquide sous vide, avec gel de silice en phase normale pour l'extrait acétate d'éthyle et gel de silice greffée RP-18 pour l'extrait méthanolique, a été utilisée dans la première phase de fractionnement des extraits.

VIII.6.2- Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle

L'élution est réalisée initialement par l'éther de pétrole dont on augmente la polarité par addition d'acétate d'éthyle, puis par l'acétate d'éthyle avec augmentation de la polarité par le méthanol jusqu'à 100%. Après fractionnement, les fractions aux profils chromatographiques voisins sont rassemblées. 9 fractions (**F1** à **F9**) ont été ainsi obtenues. Ces différentes fractions sont traitées individuellement par la suite en fonction de la complexité de leur composition.

Eluant colonne		Fractions	Poids en mg
Ether de pétrole/ Acétate d'éthyle	99-1	F1	25
	95-5		
	90-10	F2	121
	80-20		
	70-30	F3	63
	60-40		
	50-50	F4	250
	40-60		
	70-30	F5	130
	20-80	F-6	500
	10-90		
	100		
Acétate d'éthyle/ méthanol	99-1	F-7	100
	97-3		
	95-5	F-8	120
	90-10		
	80-20	F9	270
	60-40		
	20-80		

Tableau 22 : Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de *Lotus pusillus*

VIII.6.2.1- Etude de la fraction F6

La purification de cette fraction (500 mg) est réalisée par chromatographie sur une colonne de gel de silice dans un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle à différents gradients. Des fractions de 20 ml ont été collectées. Le suivi de ce fractionnement par CCM ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 93/7), a permis de recueillir 8 sous-fractions comme il est rapporté dans le schéma ci-dessous.

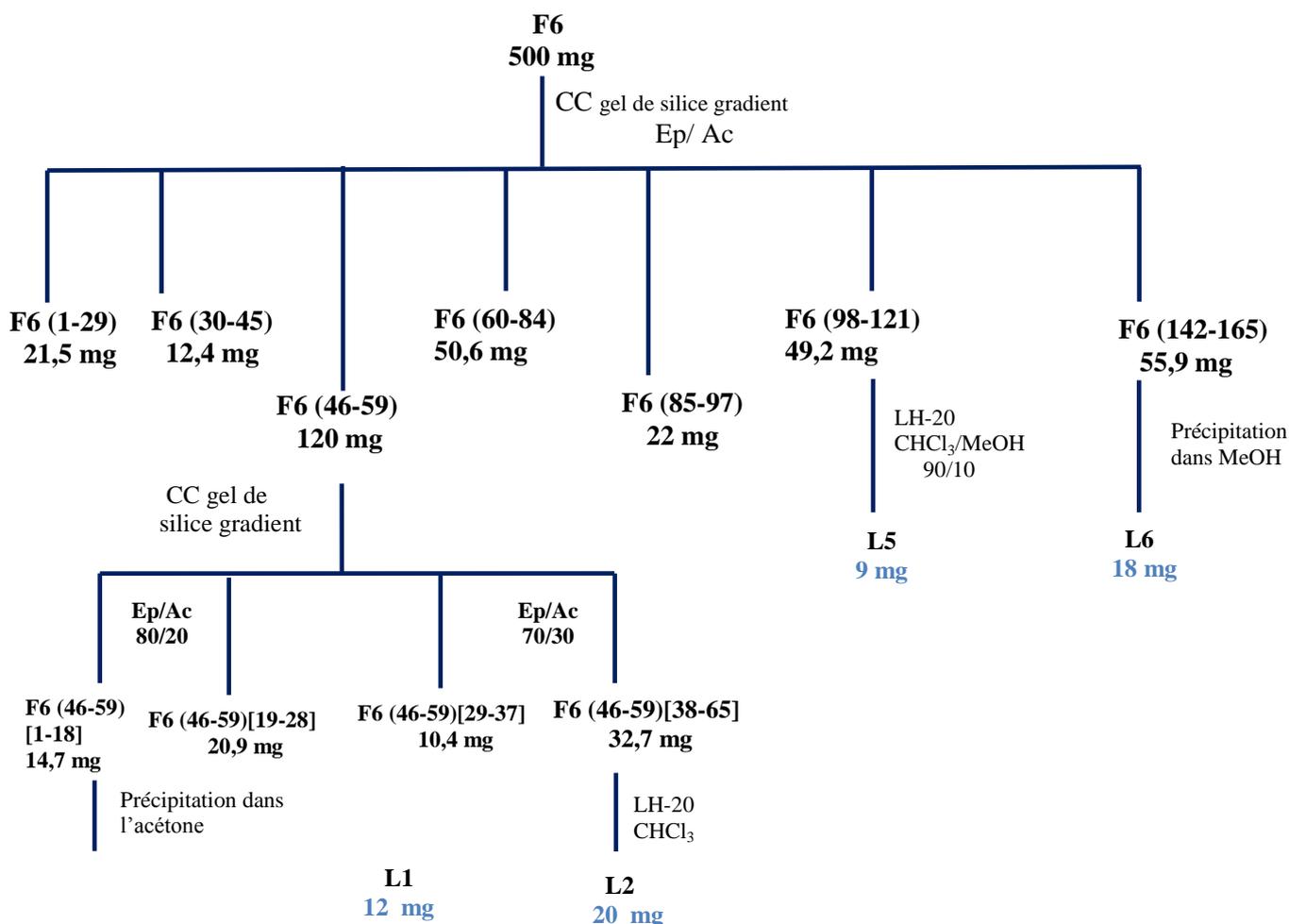


Schéma 6 : Purification de la fraction F6

VIII.6.2.2- - Etude de la fraction F7

La purification de la fraction F7 menée successivement par chromatographies sur colonne de gel de silice et Sephadex LH-20 dans le méthanol, suivie d'une précipitation dans le chloroforme, a abouti à l'isolement de deux produits à l'états pur **L3** (7 g) et **L4** (16 g).

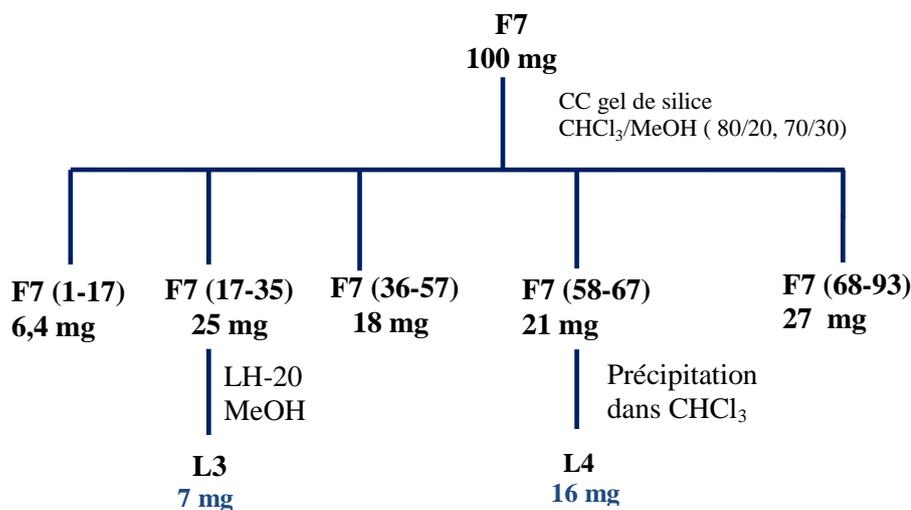


Schéma 7 : Purification de la fraction F7

VIII.6.3- Fractionnement de l'extrait méthanolique

Comme nous l'avons signalé précédemment, 7 g de l'extrait méthanolique ont été initialement fractionnés par chromatographie liquide sous vide sur gel de silice greffée RP-18. L'élution a été menée dans un système eau/méthanol à divers gradients (80/20 à 0/100). Cette étape préliminaire consistant en une séparation grossière de l'extrait, a donné 7 fractions allant de **F1** à **F7** (Tableau 23). Le suivi CCM a été effectué dans un mélange chloroforme/méthanol/eau (60/40/5).

Eluant colonne	Fractions	Poids en mg	
eau/ Méthanol	80-20	F1	250
	70-30	F2	130
	60-40		
	50-50	F3	150
	40-60		
	30-70	F4	75
	20-80	F5	150
10-90	F6	230	
Méthanol	100	F7	120

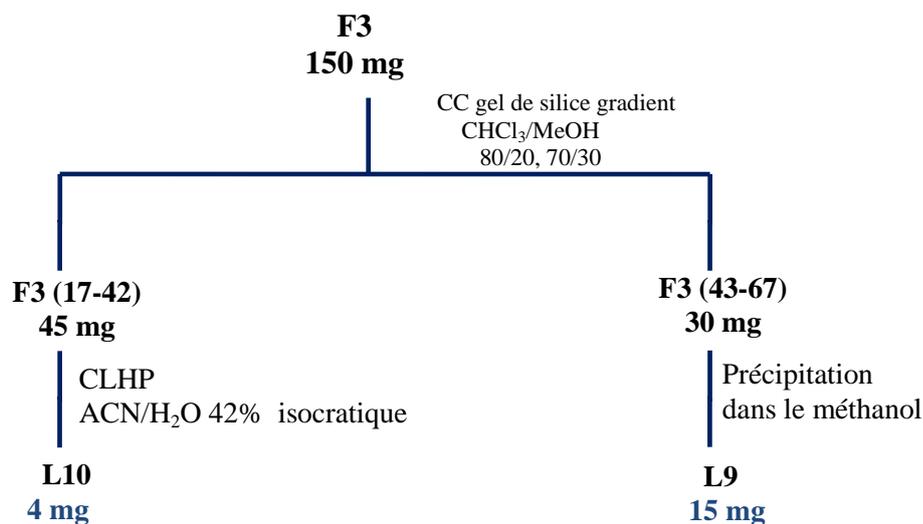
Tableau 23 : Fractionnement de l'extrait méthanolique de *L. pusillus*

VIII.6.3.1- Etude de la fraction F3

Les CCM réalisées sur la fraction **F3** (150 mg) présentent deux produits majoritaires quasiment purs mais à R_f très proches. Le traitement de cette dernière a débuté par chromatographie sur colonne ouverte de gel de silice en phase normale, dans un mélange chloroforme/méthanol/eau (90/10/1 à 70/30/5). Cette séparation a permis de rassembler deux sous fractions **F3** (17-42) et **F3** (43-67).

La précipitation dans le méthanol de la seconde sous fraction **F3** (43-67) (30 mg) a permis d'accéder au produit **L9** (15 mg).

La sous fraction **F3** (17-42) a nécessité une purification par HPLC semi-préparative dans le système de solvant ACN/H₂O à 42 %, conduisant au produit **L10** (4 mg).

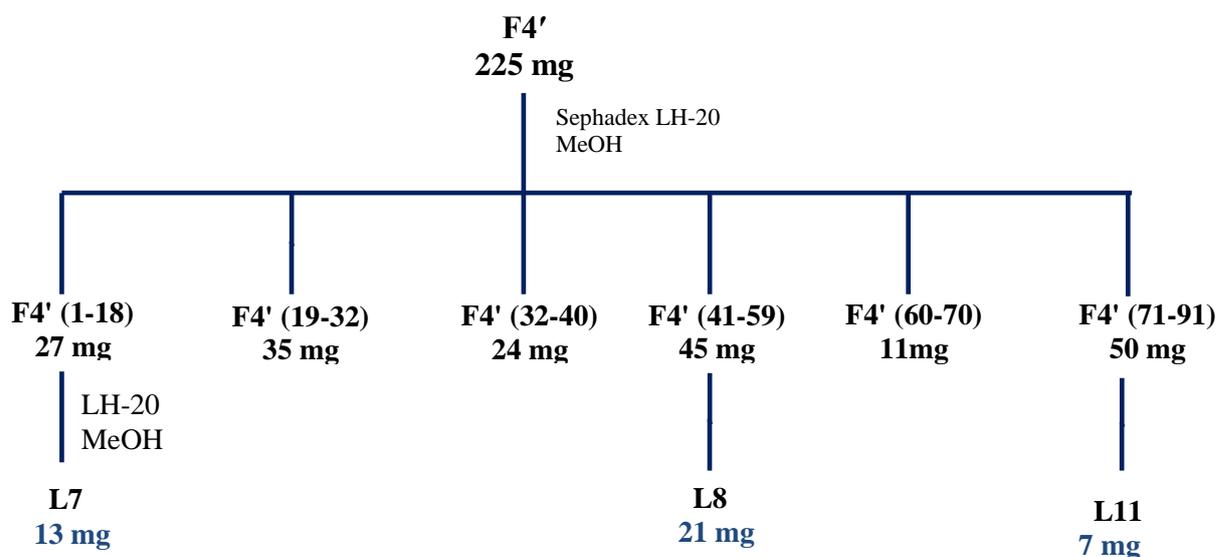
**Schéma 8** : Purification de la fraction F3VIII.6.3.3- Etude de la fraction F4'

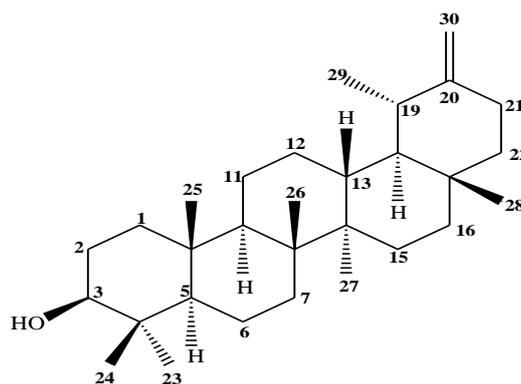
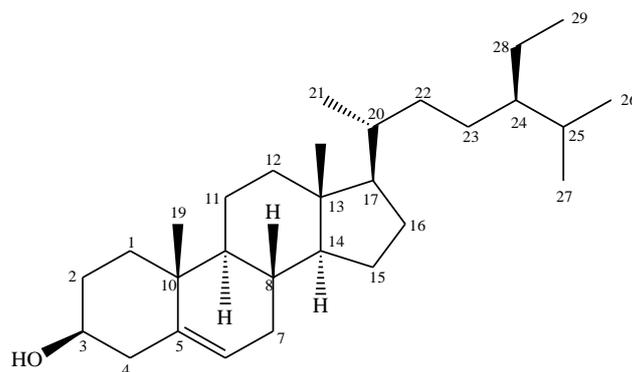
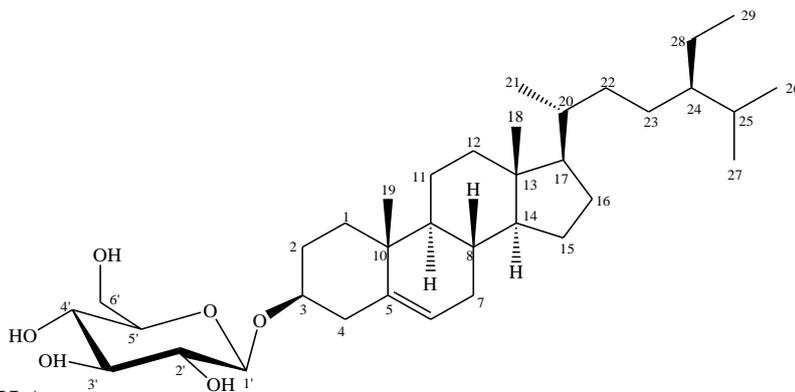
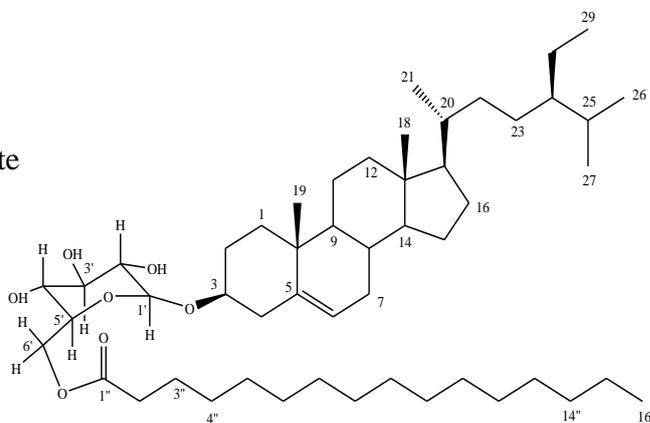
Les fractions F4 et F5 rassemblées, d'un poids total de 225 mg, ont été d'abord soumises à une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 dans le méthanol. Ceci a permis de recueillir 6 sous-fractions.

La sous-Fraction **F4'** (1-18) soumise à une colonne de Sephadex LH-20 dans le méthanol, a conduit à l'isolement du composé **L7** (13 mg).

La recristallisation de la sous-Fraction **F4'** (41-59) dans le méthanol a donné le composé **L8** (21 mg).

Une chromatographie préparative sur plaque de silice greffée RP-18 de la sous-Fraction **F4'** (71-90) au moyen d'un mélange MeOH/H₂O 80/20, puis une filtration sur colonne de Sephadex LH-20 dans le méthanol, a permis d'isoler le composé **L11** (7 mg) pur.

**Schéma 9** : Purification de la fraction (F4+F5)

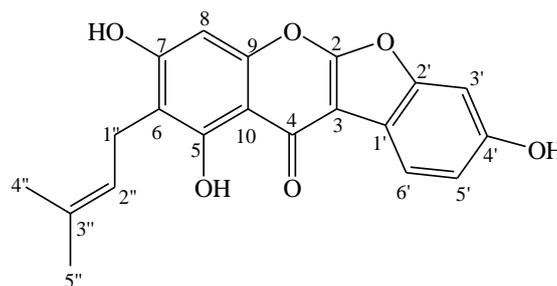
VIII.7- Composé isolés de l'espèce *Lotus pusillus* Medik.VIII.7.1- **Composé L1**18 α ,19 α -urs-20(30)-én-3 β -ol**Formule brute :** C₃₃H₅₀O**[α]_D** = + 95° (C = 0,36 g/100 ml, CHCl₃)**MS :** ESI m/z = 425 [M - H]⁻RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)**(Tableau 13)**VIII.7.2- **Composé L2** β -sitostérol**Formule brute :** C₂₀H₅₀O**[α]_D** = -30° (C = 0,8 g/100 ml, CHCl₃)**MS :** ESI m/z = 437 [M + Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)**(Tableau 14)**VIII.7.3- **Composé L3** β -sitostéryl 3 β -D-glucopyranoside**Formule brute :** C₃₅H₆₀O₆**[α]_D** = -41,5 (C = 0,4 g/100 ml, MeOH)**MS :** ESI m/z = 575 [M - H]⁻RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)**(Tableau 15)**VIII.7.4- **Composé L4** β -sitostéryl 3 β -D-glucopyranoside-6-O-palmitate**Formule brute :** C₅₁H₉₀O₇**[α]_D** = -40 (C = 1,0 g/100 ml, CHCl₃)**MS :** ESI m/z = 837 [M + Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)**(Tableau 16)**

VIII.7.5- Composé L5

Lupinalbine B

Formule brute : C₂₀H₁₆O₆**MS** : ESI m/z = 351 [M -H]⁻RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

(Tableau 17)

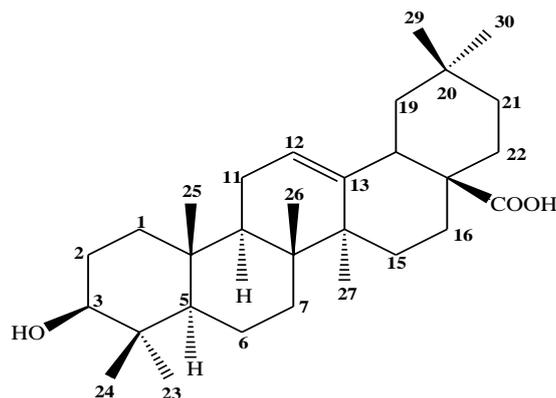


VIII.7.6- Composé L6

Acide oléanolique

Formule brute : C₃₅H₅₈O₆**MS** : ESI m/z = 455[M -H]⁻RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

(Tableau 18)

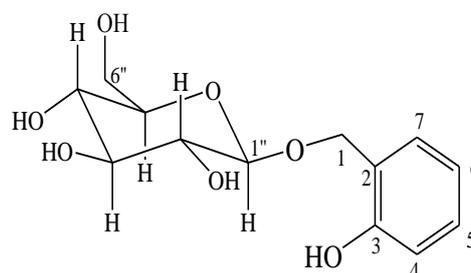


VIII.7.7- Composé L7

2-hydroxybenzyl β-D-glucopyranoside

Formule brute : C₃₅H₅₈O₆[α]_D = -62,6° (C = 0,43 g/100 ml, MeOH)**MS** : ESI m/z = 597 [M + Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

(Tableau 19)

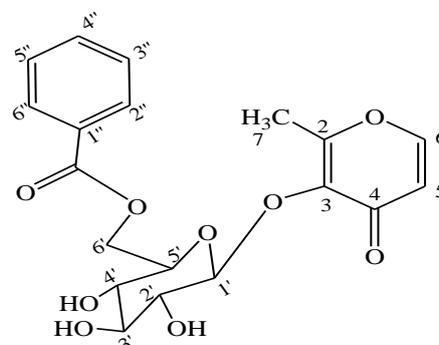


VIII.7.8- Composé L8

maltol 3-O-[6-O-benzoyl]-β-D-glucopyranoside

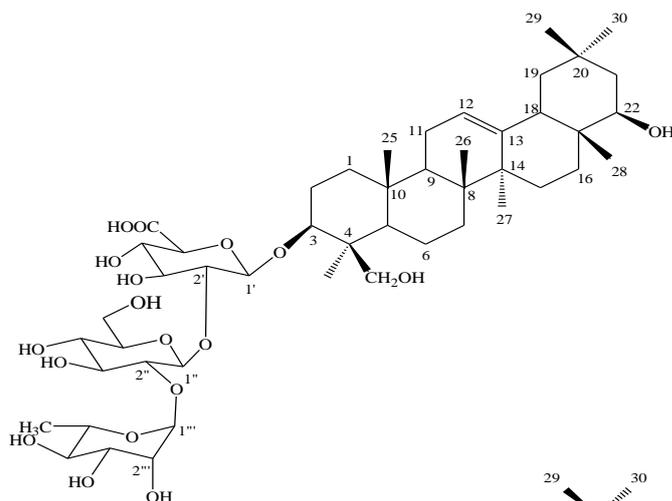
Formule brute : C₃₅H₅₈O₆[α]_D = - 13°, (C= 0, 3 g/100 ml, CHCl₃).**MS** : ESI m/z = 597 [M + Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

(Tableau 6)



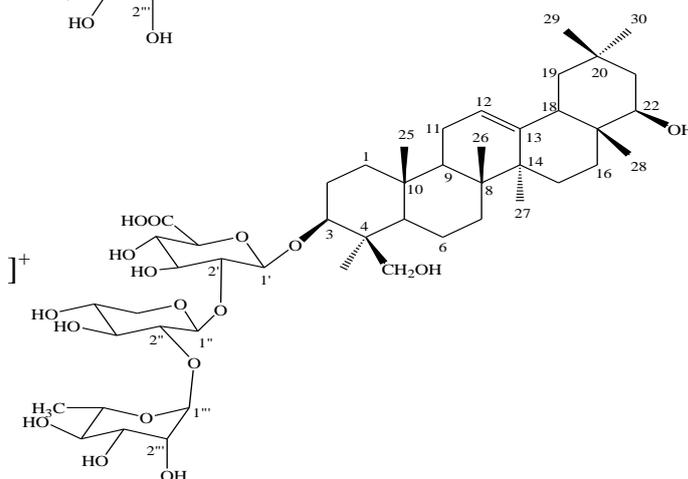
VIII.7.9- Composé L9

AzukisaponineV

Formule brute : C₃₅H₅₈O₆**[α]_D** = -22,5 (C = 0,43 g/100 ml, MeOH)**MS** : ESI m/z = 965 [M + Na]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)**(Tableau 20)**

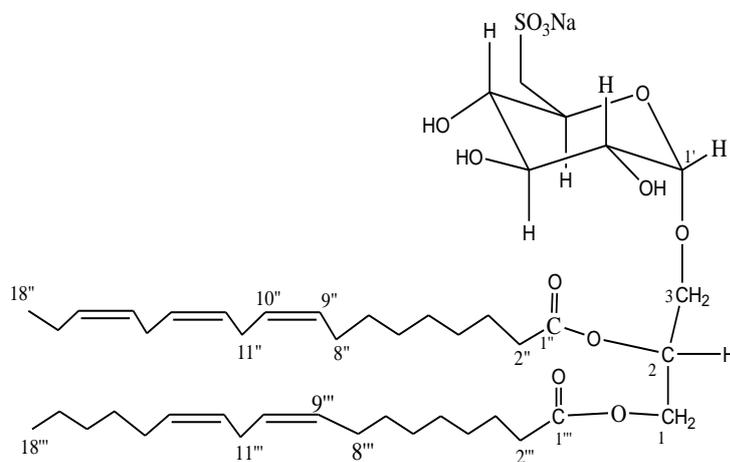
VIII.7.10- Composé L10

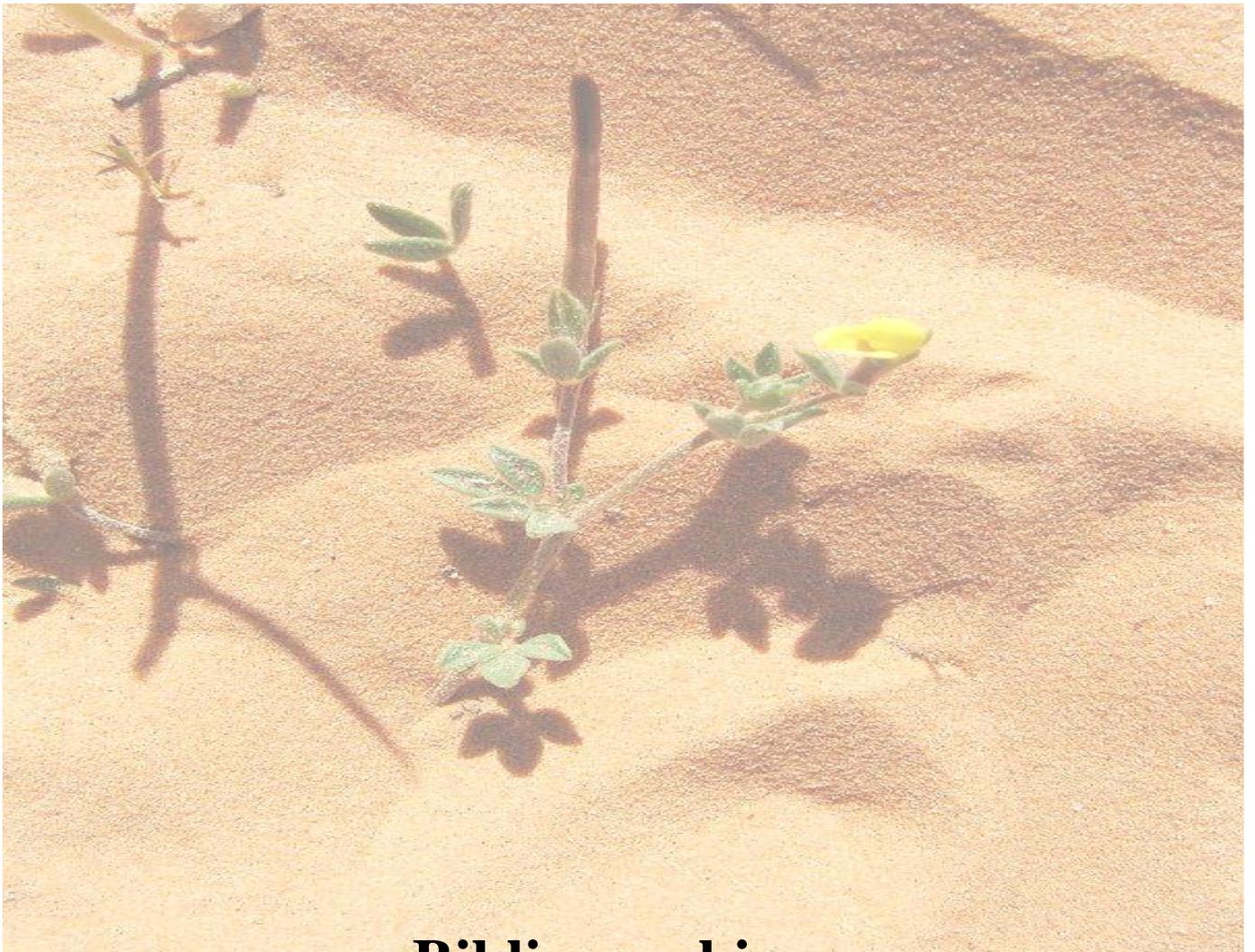
Astragaloside VIII

Formule brute : C₃₅H₅₈O₆**[α]_D** = -41,5 (C = 0,40 g/100 ml, MeOH)**MS** : ESI m/z = 935 [M + Na]⁺, 989 [M-H+2K]⁺RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)**(Tableau 21)**

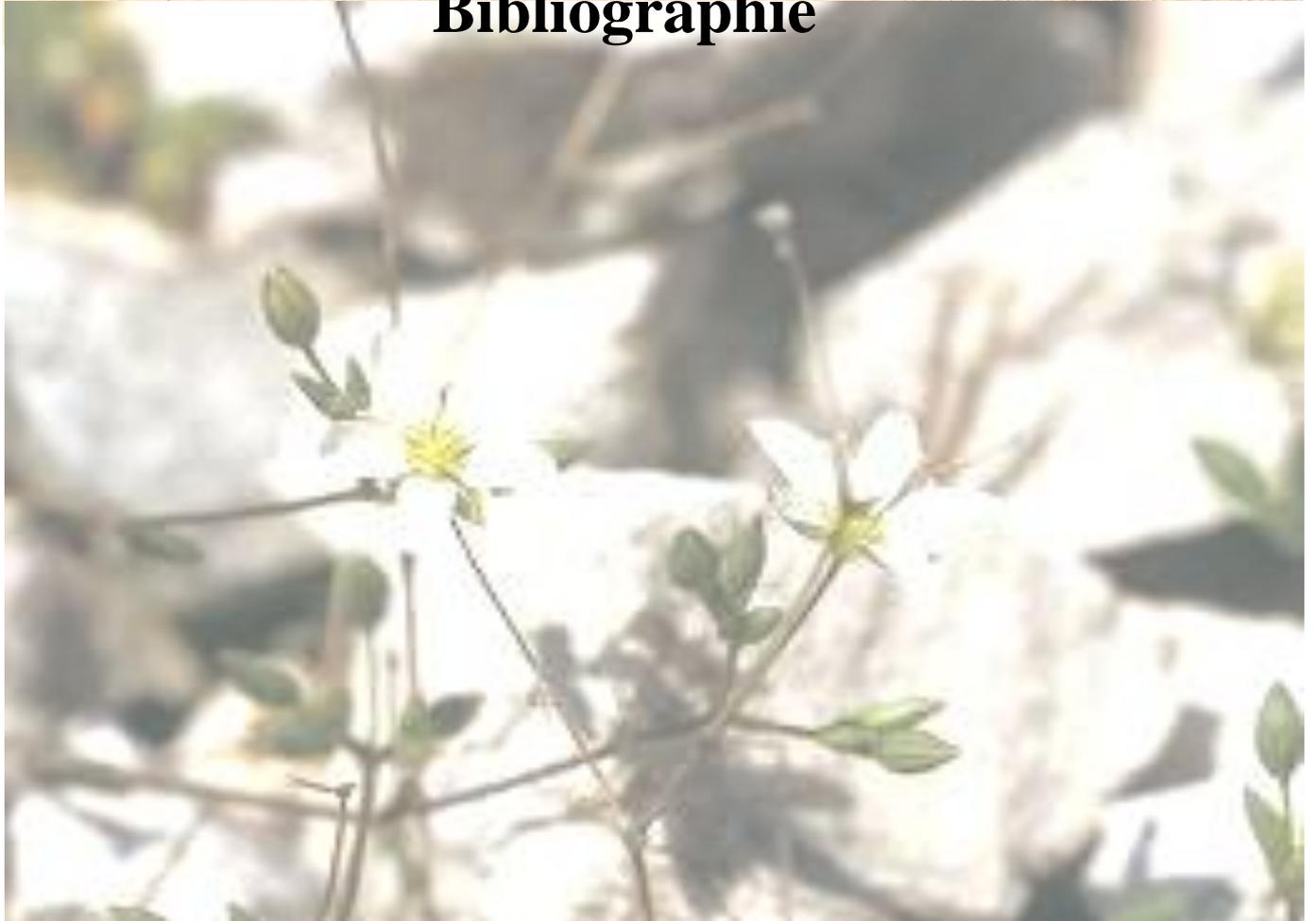
VIII.7.1- Composé L11

1-*O*-(9*Z*, 12*Z*-octadécadiénoyl)-2-*O*-
(9*Z*, 12*Z*, 15*Z*-octadécatriénoyl)-3-*O*-
(6'-sulfoquinovopyranosyl)-glycérol.

Formule brute : C₄₅H₇₅O₁₂NS**[α]_D** = -54,2 (C = 0,32 g/100 ml, MeOH)**MS** : ESI m/z = 862 [M-H]⁻RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)**(Tableau 22)**



Bibliographie



Bibliographie

- [1] Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris.
- [2] Ai-Qun, J., Ning-Hua, T., Yong-Ping, Y., Su-Gong, W., Li-Qin, W., Jun, Z., 2004. Cyclopeptides from Three Arctic Caryophyllaceae Plants, Chemotaxonomy and Distribution Significance of Caryophyllaceae Cyclopeptides. *Acta Botanica Sinica*. 46, 625-630.
- [3] Bellakhdar, J., 1997. La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, Ibis Press
- [4] Liu, Z., Li, D., Owen, L. N., 1995. Triterpenoid Saponins From *Gypsophila Oldhamiana*, *Journal of Natural Products*. 58, 1632-1635.
- [5] Dubois, M.A.L., Hanquet, B., Cui, Z.H., Lou, Z.C., Wagner, H., 1995. Acylated triterpene saponine from *Silene jensiseensis*, *Phytochemistry*. 95, 509-514.
- [6] Jia, Z., Koike, K., Kudo, M., Li, H., Li, H., Nikaido, T., 1998. Triterpiod Saponins and Sapogenins From *Vaccaria Segetalis* . *Phytochemistry*. 48, 529-536.
- [7] Guang Luo, G., Ma, L., Yi Kong, A., 2008. New triterpenoid saponins with strong α -glucosidase inhibitory activity from the roots of *Gypsophila oldhamiana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16, 2912-2920.
- [8] Hamzaglu, E., Aksoy, A., Budak, M., 2010. A new species of *Silene* (Caryophyllaceae) from Turkey. *Turk J Bot*. 34, 47-50.
- [9] Larhsini, M., Marston, A., Hostettmann, k., 2003. Triterpenoid saponins from the roots of *Silene cucubalus*. *Fitoterapia*. 74, 237-241.
- [10] Xu, W., Wu, J. M., Zhu, Z., Sha, Y., Fang, J., Li, Y.S., 2010. Pentacyclic Triterpenoid Saponins from *Silene viscidula*, *Helvetica Chimica Acta*. 93, 2007-2014.
- [11] Hernandez, J.C., Leon, .F., Brouard, I., Torres, F., Rubio,S., Quintana, J., Estevez, F., Bermejo, J., 2008. Synthesis of novel spirostanic saponins and their cytotoxic activity, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16, 2063-2076.
- [12] Ali, Z., Ahmad, V.U., Ali, M.S., Iqbal, F., Zahid, M., Alam, N., 1999. Two New C-Glycosylflavones From *Silene Conoidea*. *Nat Prod Res* 13, 121-129.
- [13] Asai, T., Fujimoto, Y., 2010. Cyclic fatty acyl glycosides in the glandular trichome exudate of *Silene gallica*, *Phytochemistry*. 71, 1410-1417.
- [14] Mamadaliyeva, N. Z., Zibareva, L. N., Saatov, Z., Lafont, R., 2003. Phytoecdysteroids of *Silene viridiflora*, *Chemistry of Natural Compounds*, 39, 199-203.
- [15] Meng, Y., Whiting, P., Zibareva, L., Bertho, G., , Girault, J.P., Lafont, R., Dinan, L., 2001. Identification and quantitative analysis of the phytoecdysteroids in *Silene* species

- (Caryophyllaceae) by high-performance liquid chromatography. Novel ecdysteroids from *S. pseudotites*, *Journal of Chromatography A*. 935, 309-319.
- [16] Avis du groupe scientifique sur les contaminants de la chaîne alimentaire, 2009. Les saponines de *Madhuca Longifolia* en tant que substances indésirables dans l'alimentation animale. *The EFSA Journal*. 979, 2-3.
- [17] Dubois, M.A.L., Hanquet, B., Cui, Z.H., Lou, Z.C., Wagner, H., 1997. Jénisseensosides C and D, Biologically Active Acylated Triterpene Saponins From *Silene jénisseensis*. *Phytochemistry*. 45, 985-990.
- [18] Zou, C., Jiang, J. X., Chen, C.X., Zhou, J., Zhao, Q., 1999. Diacylated Triterpenoid Saponin from *Silene szechuensis*. *Chinese Chemical Letters* .10, 33-36.
- [19] Xu, W., Wu, J. M., Zhu, Z., Sha, Y., Fang, J., Li, Y.S., 2010. Pentacyclic Triterpenoid Saponins from *Silene viscidula*, *Helvetica Chimica Acta*. 93, 2007-2014.
- [20] Larhsini, M., Marston, A., Hostettmann, K., 2003. Triterpenoid saponins from the roots of *Silene cucubalus*, *Fitoterapia*. 74, 237-241.
- [21] Gaidi, G., Miyamoto, T., Laurens, V., Dubois, M.A.L., 2002. New Acylated Triterpene Saponins from *Silene fortunei* that Modulate Lymphocyte Proliferation, *J. Nat. Prod.* 65, 1568-1572.
- [22] Sullards, M. C., Liu, Y., Chen, Y., Merrill, A.H., 2011. Analysis of mammalian sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and tissue imaging mass spectrometry (TIMS), *Biochimica et Biophysica Acta*. 1811, 838-853.
- [23] Kuchar, L., Asfaw, B., Ledvinov, J., 2012, Tandem Mass Spectrometry of Sphingolipids: Application in Metabolic Studies and Diagnosis of Inherited Disorders of Sphingolipid Metabolism Tandem. *Mass Spectrometry – Applications and Principles*. 29, 721 -750
- [24] Vesper H., Schmelz E.M., Nikolova-Karakashian M.N., Dillehay D.L., Lynch D.V., Merrill A.H., 1999. Sphingolipids in food and the emerging importance of sphingolipids to nutrition. *J. Nut.* 129, 1239-1250.
- [25] Voet, D., Voet, J. G., 2005. Biochimie, 2^{ème} Edition. De Boeck, Bruxelles.
- [26] Sparg, S.G., Light, M.E., van Staden, J., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. 94, 219-243.
- [27] Mors, W.B., do Nascimen, M.C.L., Ruppelt Pereira, B.M., Pereira, N.A., 2000. Plant natural products active against snake bite the molecular approach. *Phytochemistry*. 55, 627-642.

- [28] Bruneton, J. In *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*; Editions Technique & Documentation: Paris, 1995.
- [29] Sparg, S.G., Light, M.E., van Staden, J., 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*. 94, 219-243.
- [30] Caulier, G., Van Dyck, S., Gerbaux, P., Eeckhaut, I., Flammang, P., 2011. Etude sur la diversité des saponines parmi les holothuries de la famille des holothurioides (Holothuriidae). La Bêche-de-mer, *Bulletin de la CPS*. 31, 48-54.
- [31] Agrawal, P. K., 1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*. 31, 3307-3330.
- [32] Plock, A., Beyer, G., Hiller, K., Grundemann, E., Krause, E., Nimtz, M., Wray, V., 2001. Application of MS and NMR to the structure elucidation of complex sugar moieties of natural products: exemplified by the steroidal saponin from *Yucca filamentosa* L. *Phytochemistry*. 57, 489-496.
- [33] Vincken, J. P., Heng, L., Groot, A., Gruppen, H., 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 68, 275-297.
- [34] Jia, A. Q., Yang, X., Wang, W. X., Jia, Y. X., 2010. Glycocerebroside bearing a novel long-chain base from *Sagina japonica* (Caryophyllaceae). *Fitoterapia*. 81, 540-545.
- [35] Voutquenne, L., Lavaud, C., Massiot, G., Sevenet, T., Hadi, H.A., 1999. Cytotoxic polyisoprenes and glycosides of long-chain fatty alcohols from *Dimocarpus fumatus*. *Phytochemistry*, 50. 63-69.
- [36] Tang, J., Meng, X., Liu, H., Zhao, J., Zhou, L., Qiu, M., Zhang, X., Yu, Z., Yang, F., 2010. Antimicrobial Activity of Sphingolipids Isolated from the Stems of Cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Molecules*. 15, 9288-9297.
- [37] Borris, R.P., Seifert, K., Johne, S., Hesse, M., 1982. 2-[6'-(*O*-trans-Cinnamoyl)- β -D-glucopyranosyloxy]-3-methyl-4*H*-pyran-4-one, a New Acylated Pyrone Glucoside from *Silene vulgarise* (Caryophyllaceae). *Helv. Chim. Acta*. 65. 2481-2485.
- [38] Nakano, T., Sugimoto, S., Matsunami, K., Otsuka, H., 2011. Dianthosaponins A-F, Triterpene Saponins, Flavonoid Glycoside, Aromatic Amide Glucoside and δ -Pyrone Glucoside from *Dianthus japonicus* Chem. Pharm. Bull. 59, 1141-1148.
- [39] Leitao, G.G., Leitao, S.G., Vilagag, W., 2002. Quick preparative separation of natural naphthopyranones with antioxidant activity by high-speed counter-current chromatography, *Naturforsch*. 57, 1051-1055.
- [40] Nauciel, C., 2000. Bactériologie médicale, Masson 2 (Ed).Paris, 140.

- [41] Amisano, G., Fornasero, S., Migliaretti, G., Caramello, S., Tarasco, V., Savino, F., 2011. Diarrheagenic *Escherichia coli* in acute gastroenteritis in infants in North-West Italy, *New Microbiologica*. 34, 45-51.
- [42] Fernandez, G.M., Marrero, A., Pique, S. G., Castellanos, R. G., Ruth, F. X. G., 2004. Staphylococcal methicillin resistance: fine focus on folds and functions. *FEMS Microbiology Letters*, 235, 1-8.
- [43] Celikel, N., Kavas, G., 2008. Antimicrobial Properties of Some Essential Oils against Some Pathogenic Microorganisms, *Czech J Food Sci*. 26. 174-181.
- [44] Shaiq ALI, M., Farman, A., Viqar Uddin, A., 2001. Unusual Chemical Constituents of *Lotus garcinii* (Fabaceae). *Turk J Chem*. 25. 107-112.
- [45] Wink, M., Mohamed, G.I.A., 2003. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene, *Biochem. Syst. Ecol*. 31. 897-917.
- [46] Wojciechowski M.F., Lavin M. and Sanderson M.J. A. 2004. phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *MATK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*. 11. 1846-2004.
- [47] Gadow, A. V., Joubert, E., Hansmam, C. F., 1997. Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry*. 60, 73-77.
- [48] Jean-Marie Van Bol, Jardin des plantes à couleurs, Collection de plantes tinctoriales Service Espaces verts, Rue Frères Biéva 203 - 5020 Vedrin, p 30.
- [49] Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie Phytochimie Plantes médicinales*. 3ème édition, Technique & Documentation, Paris, 393-397.
- [50] Allan, G.J., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Boerner, E., Zimmer, E.A., 2004. Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island Lotus (Fabaceae: Loteae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 32, 123-138.
- [51] Strittmatter, C.D., Wagner, M.L., Kade, M., Crurni, A.A., 1992, Identification of *Lotus tenuis* Flavonoids parts III. *Biochemical Systematics and Ecology*. 20, 685-687.
- [52] Reynaud, J., Lussignol, M., 2005. The Flavonoids of *Lotus corniculatus*. *Lotus Newsletter*. 35, 78-82.
- [53] Koelzer, J., Pereira, D.A., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M.G., Frode, T.S., 2009. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. *Food Chemistry*. 117, 444-450.

- [54] Abdel-kader, M.S., Amer, M. E, Tang, S. and Kingston, D.G.I. Two new isoflavone derivatives from the roots of an Egyption collection of *Lotus polyphyllus*. *Nat. Prod.* 20, 922-926.
- [55] Ingham, J. L. and Dewick, P. M, 1979. A new isoflavan phytoalexin from leaflets of *Lotus hispidus*. *Phytochemistry*.18, 1711-1714.
- [56] John Shaw, G., Ellingham, P.J., Nixon, L.N., 1981. 2,4-Diamino-3-Methylbutanoic Acid, A Novel Amino Acid in Root Nodule Hydrolysates from *Lotus tenuis*. *Phytochemistry*.20, 1853-1855.
- [57] Shaiq ALI, M., Ahmad, F., Ahmad, V. U., 2001. Unusual Chemical Constituents of *Lotus garcinii* (Fabaceae). *Turk J Chem.* 25, 107-112.
- [58] El Youssef, H.M., Murphy, B.T., Amer, M.E., Abdel-kader, M.S., Kingston, D.J.I., 2008. Two New Flavonol Glycosides from the Aerial Parts of *Lotus lalambensis* Growing in Saudi Arabia Saudi. *Natural Product Sciences*.16, 86-89.
- [59] Mahmoud, Z. F, Amer, M. E, Abdel Kader, M. S. and Abdel-Salam, N. A, A coumestan from *Lotus creticus*. *Phytochemistry*. 29, 355-356.
- [60] Fleuriet A., Jay-Allemand C., Macheix J.J., 2005. Composés phénoliques des végétaux un exemple des métabolites secondaires d'importance économique. *Presses polytechniques et universitaires romandes*. 121-216.
- [61] Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire, Ed. Lavoisier (Tec &Doc), Paris, 2006, 300-398.
- [62] journal de pharmacie et des sciences accessoires contenant le bulletin des travaux de la société de pharmacie de paris, tom XXI , janvier 1853, p 173.
- [63] Ravisé, A., Irkiacharian, B., 1976. Influence de la structure de composés phénoliques sur l'inhibition du *Phytophthora parasitica* et d'enzymes participant aux processus parasitaires. *Phytopath.* 85, 74-85.
- [64] Stöckigt J., Sheludko Y., Unger M., Gerasimenko I., Warzecha H., Stöckigt D., 2002. High-performance liquid chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrophoretic- electrospray ionization mass spectrometric analysis of selected alkaloid groups. *Journal of chromatography A*. 967, 85-113.
- [65] De Rijke E., Out P., Niessen W M A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U A T., 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 1112, 31-63.
- [66] Iwashina T. 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*. 113, 287-299.

- [67] Lapcik O. 2007. Isoflavonoids in non-leguminous taxa: a rarity or a rule. *Phytochemistry*. 68, 2909-2916.
- [68] Reynaud J., Guilet D., Terreux R., M.Lussignol and Walchshofer N. 2005. Isoflavonoids in non leguminous families: an update. *Natural Products Reports*. 22, 504-515.
- [69] Wang, X., 2011. Structure, function, and engineering of enzymes in isoflavonoid biosynthesis. *Funct Integr Genomics*. 11, 13-22.
- [70] Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B., 2009. Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel*. 4, 25-39.
- [71] Mahato, S. B., Kundu, A. P., 1994. ¹³C-NMR Spectra of pentacyclic triterpenoids-a compilation and some salient features. *Phytochemistry*. 37, 1517-1575.
- [72] Jordon-Thaden, I. E., Louda, S. M., 2003. Chemistry of *Cirsium* and *Carduus*: a role in ecological risk assessment for biological control of weeds. *Biochemical Systematics and Ecology*. 31, 1353–1396.
- [73] Ongoka, P. R., Banzouzi, J.T., Poupat, C., Ekouya, A., Ouamba, J. M. and Moudachirou, M., 2008. Steroids isolated from *Millettia versicolor* Baker (Fabaceae). *African Journal of Biotechnology*. 7, 1727-1730.
- [74] Koelzer, J., Diana Ana Pereira, D. A., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M. G., Frode, T. S., 2009. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Lotus corniculatus*. *Food Chemistry* 117, 444-450.
- [75] Dae-Sup, P., Choi, S. Z., Ran, K. K., Mee, L. S., Ro, L. K., Suhkneung, P., 2004. Immunomodulatory activity of triterpenes and phenolic compounds from *Viscum album* L. *Journal of applied pharmacology*. 11, 1-4.
- [76] Uluben, A., Oksuz, S., Mericil, A. H., 1988. Palmitic Acid Ester of Sitosteryl 3 β -glucoside from *Centaurea regia*. *Phytochemistry*, 27, 3964- 3965.
- [77] Nguyen, A.T., Malonne, H., Duez, P., Vanhaelen-Fastre, R., Vanhaelen, M., Fontaine, J., 2004. Cytotoxic constituents from *Plumbago zeylanica*. *Fitoterapia*. 75, 500-504.
- [78] Tahara, S., Ingham.J. L., Mizutani, J., 1985. New Coumaronochromones from White Lupin, *Lupinus albus* L. (Leguminosae). *Agric. Biol. Chem.* 49, 1775-1783
- [79] Yang, S. S., Gao, F., Mabry, T. J., Amer, M. E., Abdel-Kader, M. A. MahmoudA, Z. F., AbdelB-Salem, N. A., 1989. Flavonoids From *Lotus Creticus*. *Phytochemlstry*. 28, 1749-1750.

- [80] Tori, K., Seo, S., Shimaoka, A., Tomita, Y., 1974. Carbon-13 NMR Spectra of Olean-12-enes full signal assignments including quaternary carbon signals assigned by use of indirect ^{13}C , ^1H , spin couplings. *Tetrahedron Letters*. 48, 4227-4230.
- [81] Liu, J., 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. 49, 57-68.
- [82] Ferheen, S., Ahmed, E., Afza, N., Malik, A., 2005. Phytochemical Investigations on *Hypericum oblongifolium*. *Jour. Chem. Soc. Pak*. 27, 533-537.
- [83] Li, W., Asada, Y., Yoshikawa, T., 2000. Flavonoid constituents from *Glycyrrhiza glabra* hairy root cultures. *Phytochemistry*. 55, 447-456.
- [84] Kite, G. C., Stoneham, C. A., Veitch, N. C., 2007. Flavonol tetraglycosides and other constituents from leaves of *Styphnolobium japonicum* (Leguminosae) and related taxa. *Phytochemistry*. 68, 1407-1416.
- [85] Tori, K., Yoshimura, Y., Seo, S., Sakurawi, K., Tomita, Y., Ishii, H., 1976. Carbon-13 NMR stereochemical dependence in spectra of sikogenins. Hydroxylation effects upon carbon-13 chemical shifts of oléanéne-type triterpénoïdes. *Tetrahedron Letters*. 46, 4163-4166.
- [86] Avunduk, S., Mitaine-offer, A. C., Caliskan, O. A., Miyamoto, T., Senol, S. G, Lacaille-Dubois, M. A., 2008. Triterpene Glycosides from the Roots of *Astragalus flavescens*. *J. Nat. prod.* 71, 141-145.
- [87] Rupasinghe, H. P., Jackson, C. J., Poysa, V., Di Berardo, C., Bewley, J. D., Jenkinson, J., 2003. Soyasapogenol A and B distribution in soybean (*Glycine max* L. Merr.) in relation to seed physiology, genetic variability, and growing location. *J Agric Food Chem*. 20, 5888-5894.
- [88] Hirakawa, T., Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T., 2000. A New Oleanene Glucuronide Obtained from the Aerial Parts of *Melilotus officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.* 48, 286-287.
- [89] Gulcema, D., Masullo, M., Napolitano, A., Karayıldırım, T., Bedir, E., Alankus, O., Caliskan, O., Piacente, S., 2013. Oleanane glycosides from *Astragalus tauricolus*: Isolation and structural elucidation based on a preliminary liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry profiling. *Phytochemistry*. 86, 184-194.
- [90] Benchadi, W., Haba, H., Lavaud, C., Harakat, D., Benkhaled, M., 2013. Secondary Metabolites of *Astragalus cruciatus* Link. and Their Chemotaxonomic Significance. *Rec. Nat. Prod.* 7, 105-113.
- [91] warter, E. D., 1961. Isolation of oleanolic acid and saponin from trefoil (*Lotus corniculatus*, var. viking). *J. Pharm. Sci.* 50, 173.

- [92] Harkat, H., Haba, H., Marcourt, L., Long, C., Benkhaled, M., 2007. An unusual lignan sulfate and aromatic compounds from *Frankenia thymifolia* Desf. *Biochemical Systematics and Ecology*. 35, 176-179.
- [93] He, Z. D., Ma, C. Y., Tan, G. T., Sydara, K., Tamez, P., Southavong, B., Bouamanivong, S., Soejarto, D. D., Pezzuto, J. M., Fong, H. H. S., Zhang, H. J., 2006. Rourinoside and rouremin, antimalarial constituents from *Rourea minor*. *Phytochemistry*. 67, 1378-1384.
- [94] Diop, M. S., Samb, A., 2004. Identification de glycolipides isolés d'algues et de cnidaire de la côte sénégalaise. *C. R. Chimie*. 7, 965-971.
- [95] Al-Fadhli, A., Solimabi Wahidull, S., D'Souza, L., 2006. Glycolipids from the red alga *Chondria armata* (Kütz.) Okamura. *Glycobiology*. 16, 902-915.
- [96] Reshef, V., Mizrahi, E., Marezki, T., Silberstein, C., Loya, S., Hizi, A., Carmeli, S., 1997. New Acylated Sulfoglycolipids and Digalactolipids and Related Known Glycolipids from Cyanobacteria with a Potential To Inhibit the Reverse Transcriptase of HIV-1. *J. Nat. Prod.* 60, 1251-1260.
- [97] Jung, K., Chin, Y. W., Kim, Y. C., Kim, J. W., 2005. Potentially Hepatoprotective Glycolipid Constituents of *Lycium chinense* Fruits. *Arch Pharm Res.* 28, 1381-1385.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de deux plantes, *Silene arenarioides* Desf. et *Lotus pusillus* Medik. appartenant respectivement aux familles Caryophyllaceae et Fabaceae (Leguminosae). Ces deux familles sont connues pour leur richesse en divers métabolites secondaires. L'objectif du présent travail est la détermination des structures des molécules isolées à partir de ces deux plantes, ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne et anti-oxydante des extraits végétaux de *Silene arenarioides*.

L'investigation chimique de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Silene arenarioides*, plante n'ayant fait l'objet d'aucune étude phytochimique antérieure, a conduit à l'isolement et la caractérisation de trois constituants chimiques : stigmastérol 3 β -glucoside, Soyacérébroside I et maltol glucoside. Les deux derniers composés ont été décrits pour la première fois dans le genre *Silene*.

Les extraits acétate d'éthyle et méthanolique de la plante *Lotus pusillus* ont donné onze composés de divers squelettes : triterpénique, stéroïdique et phénolique. Un nouveau composé à squelette sulfoglycolipidique a été mis en évidence.

L'isolement et la purification des composés ont été effectués par la combinaison de méthodes chromatographiques. Leur détermination structurale a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques physicochimiques et spectroscopiques, telles que la spectroscopie UV, la RMN 1D et 2D (^1H , ^{13}C *J*-modulé, COSY H-H, HSQC *J*-modulé et HMBC), la spectrométrie de masse ESI (Electrospray Ionisation) et à la comparaison avec les données de la littérature.

Mots clés: Phytochimie, *Silene arenarioides* Desf., *Lotus pusillus* Medik., Triterpènes, Maltol, sulfoglycolipidique, RMN 1D et 2D, Spectrométrie de masse, Activité antibactérienne, Activité antioxydante.

ملخص

يعتمد هذا العمل علي الدراسة الفيتوكيميائية للنوعين سيلان أريناريويدس داسف من عائلة كاريوفيلاسي و لوتوس بيزيلوس مديك. التي تنتمي الي عائلة فباسي، هاتين النباتين المعروفتين بوفرتهما بمختلف أنواع الأيض الثانوي. الهدف من هذا العمل هو تحديد صيغ المركبات المفصولة و كذلك تقييم العمل التثبيطي للبكتيريا و النشاط المضاد للتأكسد المستخلصات الخامة للنبته سيلان أريناريويدس.

عملنا يتركز على مستخلص الميثانول للأجزاء الهوائية لنوع سيلان أريناريويدس التي لم تخضع لأي دراسة سابقة و قد أدى هذا البحث إلى عزل ثلاث مركبات أفضية منها : ستيرويد، صوياسربروزيد و مالتول غليكوزيد.

الدراسة المماثلة لمستخلصي أسيتات الأيثيل و الميثانول لنبات و لوتوس بيزيلوس سمحت بفصل و تحديد احدى عشر مركب أفضي ثانوي: منها تريتربان، ستيرويد و فينول و مركب جديد عزل لأول مرة سولفو غليكوليبيد.

إن عزل و تحديد بنية المركبات المستخرجة يعتمد على مختلف الطرق الكروماتوغرافية و كذلك بواسطة إستخدام طرق التحليل الطيفي بجميع أنواعها، كمتيافية الأشعة فوق البنفسجية و متيافية الرنين المغناطيسي، و متيافية الكتلة و المقارنة مع الدراسات السابقة.

الكلمات المفتاحية

الفيتوكيميائية، النشاط المضاد للتأكسد، متيافية الرنين المغناطيسي، العمل التثبيطي للبكتيريا، سولفو غليكوليبيد ، لوتوس بيزيلوس مديك، سيلان أريناريويدس داسف