

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE HADJ LAKHDAR-BATNA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE

FILIERE CHIMIE

Thèse de Doctorat LMD

SPECIALITE : Chimie Organique

OPTION : Chimie des Substances Naturelles d'Intérêt Biologique

Présentée par :

M^{me} MAAMRIA Leyla

Thème

Etude phytochimique de deux plantes Leguminosae :
Astragalus depressus L. et Astragalus gombo Coss. et Dur.

Soutenue publiquement le 28/05/2015

Devant le JURY

Hamada HABA	Prof.- Université de Batna	Président
Mohammed BENKHALED	Prof.- Université de Batna	Rapporteur
Hocine DENDOUGUI	Prof.- Université de Ouargla	Examineur
Abdelkrim CHERITI	Prof.- Université de Béchar	Examineur
Mohamed-Chérif ABERKANE	M.C.A- Université de Batna	Examineur
Abdelhamid BENKOUIDER	M.C.A- Université de Batna	Examineur

Année Universitaire : 2014-2015

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (LCCE) de la Faculté des Sciences de l'Université de Batna, sous la direction du Pr ***BENKHALED Mohammed***.

Je tiens particulièrement à remercier mon directeur de thèse, Monsieur ***BENKHALED Mohammed***, Professeur à l'Université de Batna; pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour ses orientations, ses conseils, sa disponibilité et sa gentillesse. Je le remercie également pour tous les efforts qu'il a consentis sans cesse durant la rédaction de cette thèse, sa disponibilité et son dynamisme pour la recherche des produits naturels et qui ont été pour nous une source de motivation.

Mes vifs remerciements vont à Monsieur ***HABA Hamada***, Professeur 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 voudrais aussi remercier les membres du jury, le Professeur ***DENDOUGUI Hocine*** de l'Université de Ouargla, le Professeur ***CHERITI Abdelkrim*** de l'Université de Béchar, Monsieur ***ABERKANE Mohamed-Chérif***, Maître de Conférences à l'Université de Batna et Monsieur ***BENKOUIDER Abdelhamid***, également Maître de Conférences à l'Université de Batna, qui m'ont honoré en acceptant de faire partie du jury de thèse.

Je remercie vivement le professeur ***LAVAUD Catherine*** de l'UFR de Pharmacie-Institut de Chimie Moléculaire (ICMR) de l'université de Reims Champagne-Ardenne (France) ainsi que le Docteur ***Christophe Long***, du Centre de Recherche sur les Substance Naturelles (CNRS-Pierre Fabre), pour la réalisation des spectres de RMN et masse.

J'exprime également mes remerciements à mes collègues et amies pour leur amitié et gentillesse: Zina, Hasna, Hassina, Habiba, Sonia, Wassila, Imene, Nabila.

Dédicace

Cette thèse est dédiée

A mes chers parents, qui par leur compréhension, leur tendresse et leurs encouragements, ont soutenu sans cesse mes efforts durant la réalisation de ce travail.

A mon mari et à mon fils Adam qui m'ont toujours donné le sourire dans les moments difficiles, qui ont toujours su raviver en moi cette flamme de l'espoir pour qu'elle ne s'éteigne jamais.

A mes sœurs Imane et Meriem pour leur tendresse, amour et soutien.

A mes frères Issam et Djamel pour leur disponibilité, encouragements et amour.

A ma famille pour leurs encouragements

A mes amies: Amina, Rokia et Saida.

Abréviations

AcOEt	acétate d'éthyle
ACN	acétonitrile
CHCl₃	chloroforme
CH₂Cl₂	dichlorométhane
CDCl₃	chloroforme deutéré
CD₃OD	méthanol deutéré
DMSO-d₆	diméthylsulfoxyde deutéré
EtOH	éthanol
EP	éther de pétrole
MeOH	méthanol
<i>n</i>-BuOH	<i>n</i> -butanol
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CCE	Chromatographie sur Couche Epaisse
CLV	Chromatographie Liquide sous Vide
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
SiO₂	gel de silice normale
RP- 18	silice greffée en C-18
ax	axial
éq	équatorial
<i>d</i>	doublet
<i>dd</i>	doublet de doublets
<i>ddd</i>	doublet de doublets de doublets
<i>dl</i>	doublet large
<i>dt</i>	doublet de triplets
<i>td</i>	triplet de doublets
<i>t</i>	Triplet
<i>qd</i>	quadruplet de doublets
<i>q</i>	Quadruplet
<i>s</i>	singulet
<i>sl</i>	singulet large
<i>m</i>	multiplet
<i>nd</i>	non déterminée
RMN ¹H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton

RMN ¹³C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
COSY H-H	Correlated Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Connectivity
HMBC	Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
ROESY	Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
δ	déplacement chimique exprimé en ppm
J	constante de couplage exprimée en Hz
SM	Spectrométrie de Masse
ESI	Spectrométrie de masse par Electrospray
uma	unité de masse atomique
m/z	masse/charge d'un ion
R	Radical
glc	glucose
gal	galactose
rha	rhamnose
xyl	xylose
ara	arabinose
gluc	acide glucuronique

SOMMAIRE

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I: Rappels bibliographiques

I.1 Classification de la famille Fabaceae.....	3
I.2 Présentation du genre <i>Astragalus</i>	3
I.3 Propriétés biologiques et pharmacologiques du genre <i>Astragalus</i>	4
I.3.1 Utilisation en médecine traditionnelle.....	4
I.3.2 Activités biologiques.....	4
I.4 Etudes phytochimiques antérieures sur le genre <i>Astragalus</i>	5
I.4.1 Saponosides de type cycloartane.....	11
I.4.2 Saponosides de type oléanane.....	18
I.4.3 Flavonoïdes.....	20
I.4.4 Autres composés.....	23

Chapitre II: Etude des Saponosides et Flavonoïdes

II.1 Saponosides.....	24
II.1.1 Définition	24
II.1.2 Classification structurale.....	24
II.1.2.1 Saponosides stéroïdiques.....	24
II.1.2.2 Saponosides triterpéniques.....	25
II.1.2.3 Oses.....	26
II.1.3 Biosynthèse des saponosides.....	26
II.1.4 Propriétés biologiques des saponosides.....	28
II.2 Flavonoïdes	29
II.2.1 Définition.....	29
II.2.2 Classification.....	29
II.2.3 Biosynthèse des flavonoïdes.....	31

II.2.4 Activités biologiques des flavonoïdes.....	33
---	----

Chapitre III: Etude phytochimique de l'espèce *Astragalus gombo*

III.1 Rappels botaniques.....	34
III.2 Résultats et discussions.....	35
III.2.1 Extraction.....	35
III.2.2 Séparation et purification.....	36
III.2.3 Caractérisation des produits obtenus.....	37
III.2.3.1 Elucidation structurale du composé 1.....	37
III.2.3.2 Elucidation structurale du composé 2.....	53
III. 2.3.3 Elucidation structurale du composé 3.....	60
III. 2.3.4 Elucidation structurale du composé 4.....	71
III. 2.3.5 Elucidation structurale du composé 5.....	77
III. 2.3.6 Elucidation structurale du composé 6.....	83
III. 2.3.7 Elucidation structurale du composé 7.....	88
III. 2.3.8 Elucidation structurale du composé 8.....	93
III. 2.3.9 Elucidation structurale du composé 9.....	101
III.3 Conclusion.....	106

Chapitre IV: Etude phytochimique de l'espèce *Astragalus depressus*

IV.1 Rappels botaniques.....	108
IV.2 Résultats et discussions.....	108
IV.2.1 Extraction.....	108
IV.2.2 Séparation et purification.....	109
IV.2.3 Caractérisation des produits obtenus.....	111
IV.2.3.1 Elucidation structurale du composé 10.....	111
IV. 2.3.2 Elucidation structurale du composé 11.....	124
IV. 2.3.3 Elucidation structurale du composé 12.....	131
IV. 2.3.4 Elucidation structurale du composé 13.....	140
IV. 2.3.5 Elucidation structurale du composé 14.....	146

IV. 2.3.6 Elucidation structurale du composé 15.....	151
IV. 2.3.7 Elucidation structurale du composé 16.....	154
IV. 2.3.8 Elucidation structurale du composé 17.....	169
IV. 2.3.9 Elucidation structurale du composé 18.....	172
IV.3 Conclusion.....	178
Conclusio générale.....	180

Chapitre V: Partie expérimentale

V.1 Matériels et appareillage.....	184
V.1.1 Récolte des plantes <i>A. gombo</i> Coss & Dur. et <i>A. depressus</i> L.....	184
V.1.2 Techniques préparatives de séparation.....	184
V.1.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)	184
V.1.2.2 Chromatographie liquide sous vide (VLC)	184
V.1.2.3 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)	184
V.1.2.3.a Chromatographie d'adsorption.....	183
V.1.2.3.b Chromatographie d'exclusion.....	185
V.1.2.4 Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)	185
V.1.3 Chimie structurale.....	185
V.1.3.1 Pouvoir rotatoire.....	185
V.1.3.2 Spectrométrie de masse.....	186
V.1.3.3 Spectroscopie de RMN.....	186
V.2 Etude de l'espèce <i>Astragalus gombo</i>	186
V.2.1 Extraction.....	186
V.2.2 Fractionnement et purification de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	186
V.2.3 Composés isolés de l'espèce <i>Astragalus gombo</i>	188
V.3 Etude de l'espèce <i>Astragalus depressus</i>	191
V.3.1 Extraction.....	191
V.3.2 Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle.....	191
V.3.3 Fractionnement et purification de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	193

V.3.4 Composés isolés de l'espèce <i>Astragalus depressus</i> L.	194
Références bibliographiques.....	197

Introduction

Introduction

L'utilisation des plantes pour leurs vertus thérapeutiques n'est plus à démontrer. Actuellement, une large frange de la population mondiale, notamment celle des pays sous-développés et même en voie de développement, a grandement recours aux remèdes traditionnels à base de plantes pour se soigner.

Exploitant les vertus thérapeutiques des plantes mises en évidence par ce qu'on appelle la "médecine traditionnelle", la recherche dans les domaines de la chimie et pharmacie a pris le relais en recherchant les voies et moyens efficaces pour combattre diverses pathologies, et cela par la recherche perpétuelle de principes actifs nouveaux issus de végétaux.

La flore algérienne constituée de milliers de plantes, qu'elles soient alimentaires, médicinales ou toxiques, offre un terrain propice pour la recherche et découverte de nouvelles molécules biologiquement actives. Cette recherche, axe principal de notre laboratoire, permettra ainsi de contribuer grandement à la valorisation de cette flore encore sous-exploitée.

Le travail qui m'a été confié rentre pleinement dans ce cadre et a pour but d'étudier chimiquement deux plantes appartenant à la famille Fabaceae. Cette famille est une des plus importantes des plantes supérieures. Elle compte 19400 espèces classées en 730 genres et trois sous-familles: Caesalpinioideae, Faboideae (Papilionoideae) et Mimosoideae [1].

Nous nous sommes intéressés à l'investigation chimique de deux plantes du genre *Astragalus*, *A. gombo* Coss & Dur. et *A. depressus* L. (Fabaceae). Cet intérêt s'explique d'une part par le fait que ces dernières n'ont fait l'objet d'aucune étude chimique antérieure conséquente et d'autre part la richesse des plantes du genre *Astragalus* en métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique, comme les saponosides, flavonoïdes et autres polysaccharides.

Notre travail de recherche sera exposé en six chapitres :

Le premier chapitre sera consacré à une étude bibliographique incluant la systématique de la famille Fabaceae, la présentation du genre *Astragalus* et enfin le passage en revue des

principaux résultats phytochimiques antérieurs relatifs aux plantes appartenant au genre *Astragalus*.

Le deuxième chapitre concerne l'étude des saponines et flavonoïdes, classes de métabolites secondaires très présentes dans le genre *Astragalus*. Dans ces chapitres, seront présentés la définition, classification, biosynthèse ainsi que les propriétés biologiques de ces deux classes de substances naturelles.

Les troisième et quatrième chapitres sont consacrés aux résultats phytochimiques personnels obtenus dans le cadre de cette étude chimique sur deux espèces locales du genre *Astragalus*, *A. gombo* et *A. depressus*. Il est discuté l'isolement, la purification et la caractérisation structurale de tous les métabolites isolés.

Enfin le cinquième et dernier chapitre concerne la partie expérimentale incluant les différentes techniques chromatographiques et les méthodes d'analyse structurale utilisées.

CHAPITRE I

Rappels bibliographiques

I.1 Classification de la famille Fabaceae

La grande famille des plantes Fabaceae (de *faba*, la fève) doit son nom à son fruit, appelé gousse ou légume, d'où l'autre dénomination de Légumineuses (Leguminosae) sous laquelle cette famille est plus connue. Elle constitue une des plus grandes familles de plantes à fleurs, avec plus de 730 genres et 19400 espèces, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical [1]. Ce sont essentiellement des plantes herbacées, des arbustes, des plantes aquatiques, xérophytes et grimpantes. Beaucoup d'espèces de cette famille sont d'une importance majeure pour l'homme au niveau thérapeutique, économique et écologique [2].

Selon le système de classification en vigueur (APG III, 2009), ces espèces sont distribuées en trois sous-familles (Caesalpinioideae, Mimosoideae et Faboideae) comme le montre le tableau phylogénique suivant:

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

I.2 Présentation du genre *Astragalus*

Le genre *Astragalus* est le plus grand genre de la famille Fabaceae. Il renferme plus de 1500 espèces localisées essentiellement en Orient [3]. Une cinquantaine d'espèces se rencontre en Afrique du Nord dont 15 environ au Sahara algérien [3].

Selon Quezel et Santa [4], les plantes de ce genre présentent en général les caractéristiques suivantes: un calice tubuleux en cloche, à 5 dents subégales ou très inégales. Pétales généralement longuement ongiculés. Etendard dressé. Carène égalant environ les ailes. Etamines diadelphes, à gaine fendue au sommet. Ovaire pluriovulé à ovules sur 2 rangs. Gousse de forme variée, rarement uniloculaire, généralement à 2 loges plus ou moins

complètes par introflexion de l'une des sutures, déhiscente ou indéhiscente. Feuilles imparipennées en général, stipulées

I.3 Propriétés biologiques et pharmacologiques du genre *Astragalus*

I.3.1 Utilisation en médecine traditionnelle

Les plantes du genre *Astragalus* font l'objet de multiples usages thérapeutiques traditionnels. En Turquie où ce genre est représenté par 380 espèces [5], les racines d'un certain nombre d'espèces sont utilisées pour le traitement de néphrites, diabète, leucémie et cancer utérin. Elles sont également utilisées pour leurs propriétés antitranspirantes, diurétiques et également toniques [6].

Certaines espèces d'astragale comme *Astragalus mongholicus* et *A. membranaceus* sont utilisées en médecine traditionnelle chinoise en raison de leurs propriétés anticancéreuses [6, 7, 8].

Astragali Radix, mixture préparée à partir des racines sèches de *Astragalus membranaceus*, *A. mongholicus* et d'autres espèces d'astragale [9], constitue la fameuse drogue orientale utilisée pour ses propriétés antitranspirantes, diurétiques et toniques. Elle est également employée pour traiter l'anémie, les blessures, la fièvre, les allergies multiples, la fatigue chronique ainsi que la perte d'appétit [10].

L'espèce *Astragalus scorpioides* est employée en application locale contre les piqûres de scorpions [11].

I.3.2 Activités biologiques

Les plantes du genre *Astragalus* sont connues pour leur richesse en saponosides à squelette cycloartane, possédant diverses et intéressantes activités biologiques, notamment antitumorales, anti HIV et antivirales [11].

Par ailleurs, des études biologiques ont confirmé que les triterpènes glycosylés à squelette cycloartane isolés de *Astragalus oleifolius*, sont dotés d'activités antipaludique, anti-trypanosomique et antileishmaniose [12].

En Egypte où le genre en question est représenté par 32 espèces [13,14], certaines ont montré des activités immunostimulante, cardiovasculaire et antivirale [15,16]. Ainsi, l'extrait brut de *A. Kahiricus* montre une cytotoxicité reproductible contre le cancer ovarien de la ligne cellulaire A 2780 [17].

I.4 Etudes phytochimiques antérieures sur le genre *Astragalus*

Les investigations chimiques réalisées sur le genre *Astragalus*, ont permis l'isolement et l'identification de divers types de métabolites secondaires, constitués majoritairement de saponosides triterpéniques et flavonoïdes. Le tableau I.1 rassemble les différents métabolites secondaires isolés du genre.

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

Classe phytochimique	Nom de l'espèce	Parties étudiées	Composés identifiés	Réf
Saponosides de type cycloartane	<i>A. aureus</i>	plante entière	<p>3-<i>O</i>-[α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-α-L-arabinopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-xylopyranosyl]-6-<i>O</i>-β-D-xylopyranosyl-3β,6α,16β,24(S),25-pentahydroxycycloartane (1)</p> <p>3,6-di-<i>O</i>-β-D-xylopyranosyl-3β,6α,16β,24(S),25-pentahydroxycycloartane (2)</p> <p>3,6-di-<i>O</i>-β-D-xylopyranosyl-25-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,24(S),25-pentahydroxycycloartane (3)</p> <p>3-<i>O</i>-β-D-xylopyranosyl-6,25-di-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,24(S),25-pentahydroxycycloartane (4)</p> <p>6-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,24(S),25-pentahydroxycycloartane (5)</p> <p>3-<i>O</i>-[α-L-arabinopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-xylopyranosyl]-3β,6α,16β,24α-tetrahydroxy-20(R),25-époxy-cycloartane (6)</p> <p>6-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,24α-tetrahydroxy-20(R),25-époxy-cycloartane (7)</p> <p>6-<i>O</i>-β-D-xylopyranosyl-3β,6α,16β,24α-tetrahydroxy-20(R),25-époxy-cycloartane (8)</p>	[18]
	<i>A. amblolepis</i>	racines	<p>3-<i>O</i>-β-D-xylopyranosyl-25-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,24(S),25-pentahydroxycycloartane (9)</p> <p>3-<i>O</i>-β-D-xylopyranosyl,16-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,24(S),25-pentahydroxycycloartane (10)</p>	[19]

			<p>3-<i>O</i>-[β-D-glucuronopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-xylopyranosyl]-25-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,24(S),25-pentahydroxycycloartane (11)</p> <p>3-<i>O</i>-β-D-xylopyranosyl-24,25-di-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,24(S),25-pentahydroxycycloartane (12)</p> <p>6-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl-16,24-di-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,24(S),25-pentahydroxycycloartane (13)</p> <p>6-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl-16,25-di-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,24(S),25-pentahydroxycycloartane (14)</p>	
	<i>A. stereocalyx</i>	racines	<p>3-<i>O</i>-[α-L-arabinopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-xylopyranosyl]-16-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,20(S),24(R),25-hexahydroxycycloartane (15)</p> <p>3-<i>O</i>-[α-L-arabinopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-xylopyranosyl]-3β,6α,16β,20(S),24(R),25-hexahydroxycycloartane (16)</p> <p>3-<i>O</i>-[α-L-arabinopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucopyranosyl]-3β,6α,16β,20(S),24(R),25-hexahydroxycycloartane (17)</p> <p>3-<i>O</i>-[α-L-arabinopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucopyranosyl]-24-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,24(R),25-pentahydroxycycloartane (18)</p> <p>3-<i>O</i>-[α-L-arabinopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucopyranosyl]-16-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-3β,6α,16β,24(R),25-pentahydroxycycloartane (19)</p> <p>3-<i>O</i>-{α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow4)-[α-L-arabinopyranosyl-(1\rightarrow2)]-β-D-glucopyranosyl}-3β,6α,16β,24(R),25-pentahydroxycycloartane (20)</p>	[20]

	<i>A. schottianus</i>	plante entière	3- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl-3 β ,6 α ,16 β , 20(S), 24(S),25-hexahydroxycycloartane (21) 20(R),25-époxy-3- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl-24- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β ,6 α ,16 β , 24 α -tetrahydroxycycloartane (22) 20(R),25-époxy-3- <i>O</i> -[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-xylopyranosyl- 24- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β ,6 α ,16 β , 24 α -tetrahydroxycycloartane (23)	[21]
	<i>A. icmadophilus</i>	plante entière	3- <i>O</i> -[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -3-acétoxy- α -L-arabinopyranosyl]-6- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β ,6 α ,16 β ,24(S),25-pentahydroxycycloartane (24) 3- <i>O</i> -[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl]-6- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β ,6 α ,16 β ,24(S),25-pentahydroxycycloartane (25) 3- <i>O</i> -[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -3,4-diacétoxy- α -L-arabinopyranosyl]-6- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β ,6 α ,16 β ,24(S),25-pentahydroxycycloartane (26) 3- <i>O</i> -[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl]-6- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β ,6 α ,16 β ,24 α -tetrahydroxy-20(R),25-époxy-cycloartane (27) 3- <i>O</i> -[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> - α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl]-6- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β ,6 α ,16 β ,24 α -tetrahydroxy-20(R),25-époxy-cycloartane (28) 3- <i>O</i> -[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> -3-acétoxy- α -L-arabinopyranosyl]-6- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahydroxy-20(R),24(S)-époxy-cycloartane (29)	[22]
	<i>A. eremophilus</i>	parties aériennes	Eremophiloside A (30), B (31), C (32), D (33), E (34), F (35), G (36), H (37), I (38), J (39), K (40).	[23]
	<i>A. hareftae</i>	plante entière	Hareftoside A (41), B (42), C (43), D (44).	[24]

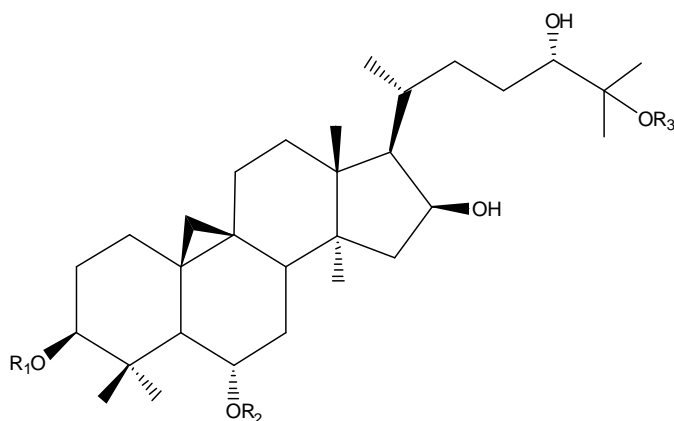
	<i>A. cicer</i>	parties aériennes	Cicerosides A (45), B (46), Eremophiloside B (31).	[25]
	<i>A. caspicus</i>	racines	Caspicuside I (47), Caspicuside II (48), Astragaloside IV (49), Cycloastragenol (50).	[26]
	<i>A. bicuspis</i>	plante entière	Bicuspiside C (51), Bicusposide D (52), E (53), F (54).	[27]
	<i>A. membranaceus</i>	racines	Agroastragaloside V (55), Agroastragaloside I (56), II (57), Isoastragaloside II (58), Astragaloside IV (49)	[28]
	<i>A. plumosus</i> var. <i>krugianus</i>	plante entière	krugianoside A (59)	[29]
	<i>A. halicacabus</i>	plante entière	20(R),24(S)-3- <i>O</i> -[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-20,24-époxy-16- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahydrocycloartane (60)	[30]
Saponosides de type oléanane	<i>A. cruciatus</i>	plante entière	Azukisaponine V (61), Astragaloside VIII (62)	[31]
	<i>A. hareftae</i>	plante entière	3- <i>O</i> -[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- <i>O</i> - β -D-glucuronopyranosyl] soyasapogénol B (63)	[24]
	<i>A. bicuspis</i>	plante entière	Soyasapogénol B (64)	[27]
	<i>A. tauricolus</i>	plante entière	acide 3- <i>O</i> -[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-29- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β ,22 β ,24-trihydroxyoléan-12-ène-29-oïque (65) 3- <i>O</i> -[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-29- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β ,22 β ,24,29-tetrahydroxyoléan-12-ène (66) acide 3- <i>O</i> -[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-29- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-3 β ,22 β ,24-trihydroxyoléan-12-ène-29-oïque (67) 3- <i>O</i> -[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-22- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-3 β ,22 β ,24-trihydroxyoléan-12-ène (68)	[32]

			<p>acide 3-<i>O</i>-[β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucuronopyranosyl]-29-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-3β,22β,24,-trihydroxyoléan-12-ène-29-oïque (69)</p> <p>acide 3-<i>O</i>-[β-D-xylopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucuronopyranosyl]-29-<i>O</i>-β-D-glucopyranosyl-3β,22β,24,-trihydroxyoléan-12-ène-29-oïque (70)</p> <p>3-<i>O</i>-[α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-xylopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucuronopyranosyl]-21-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl-3β,21β,22α,24-tetrahydroxyoléan-12-ène (71)</p> <p>3-<i>O</i>-[α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucuronopyranosyl]-21-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl-3β,21β,22α,24-tetrahydroxyoléan-12-ène (72)</p> <p>3-<i>O</i>-[α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucuronopyranosyl]-3β,21β,22α,24,29-pentahydroxyoléan-12-ène (73)</p> <p>acide 3-<i>O</i>-[α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-glucuronopyranosyl]-3β,24-dihydroxyoléan-12-ène-22-one-29-oïque (74)</p>	
Flavonoïdes	<i>A. adsurgens</i>	plante entière	<p>Astradurnine (75)</p> <p>4,2',4'-trihydroxy-3'-prenylchalcone (76)</p> <p>2',4'-dihydroxy-3,4-diméthoxychalcone (77)</p> <p>4,2',4'-trihydroxychalcone (78)</p> <p>2',4'-dihydroxy-2,3-diméthoxychalcone (79)</p> <p>2',4'-dihydroxy-4-méthoxychalcone [isoliquiritigenin-4-méthyl éther] (80)</p> <p>2',4'-dihydroxy-4-méthoxychalcone (81)</p> <p>Melilotocarpane B (82)</p> <p>2,3-dihydro-5-hydroxy-4,7-diméthoxyflavanone (83)</p>	[33]

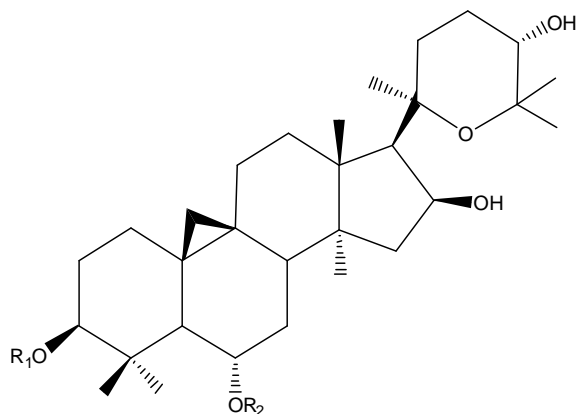
			<p>2,3-dihydro-6,3'-dihydroxy-4'-méthoxyflavanone (84) 5,7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavanone (85) 7,4'-diméthoxyisoflavanone (86)</p> <p>5,7,2'-trihydroxy-4'-méthoxy- isoflavanone (87) 7,3'-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavanone (88) (3R)-7,3'-dihydroxy-2',4'-diméthoxy isoflavane[(R)-mucronulatol] (89)</p>	
	<i>A. gombiformis</i>	parties aériennes	<p>Kaempférol 3-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-[6-<i>O</i>-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)-β-D-galactopyranoside] (90)</p> <p>7-Méthylkaempférol-3-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-[6-<i>O</i>-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)-β-D-galactopyranoside] (91) 7-Méthylquercetin-3-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-[6-<i>O</i>-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)-β-D-galactopyranoside] (92) 7-Méthylquercetin-3-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl- (1\rightarrow2)-β-D-galactopyranoside (93) 7-Méthylkaempférol 3-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl-(1\rightarrow2)-β-D-galactopyranoside (94) 7-Méthylquercetin 3-<i>O</i>-β-D-galactopyranoside (95) Kaempférol (96)</p>	[34]
	<i>A. inopinatus</i>	parties aériennes	Apigénine (97)	[35]
	<i>A. shikokianus</i>	parties aériennes	<p>Astrasikokioside I (98)</p> <p>Kaempférol 3-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranosyl (1\rightarrow2)-β-D-galactopyranosyl-7-<i>O</i>-α-L-rhamnopyranoside (99)</p> <p>Robinine (100)</p>	[36]
	<i>A. mongholicus</i>	racines	<p>Formononetine (101) Ononine (102) Calycosine (103) Calycosine7-<i>O</i>- glucopyranoside(104)</p>	[37]

			9,10-diméthoxypterocarpan 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside (105)	
	<i>A. cruciatus</i>	plante entière	Narcissine (106) Nicotiflorine (107) Kaempferol 3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (108) 5,7,2'-trihydroxyflavone (109)	[31]
Autres composés	<i>A. zahlbruckneri</i>	racines	(+)-neoolivil-4- <i>O</i> - β -apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -glucopyranoside(110) 7,8-dihydro-7-hydroxyconiferyl alcohol 4- <i>O</i> - β -apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)-glucopyranoside (111) 2-méthoxyphénol-4- <i>O</i> - β -apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -glucopyranoside (112) 3-hydroxy-5-méthoxyphénol-2- <i>O</i> - β -apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -glucopyranoside (113).	[38]
	<i>A. canadensis</i>	parties aériennes	1- <i>O</i> -[5-oxotetrahydrofuran-3-yl]-acétyl-2,6-di- <i>O</i> -[3-nitropropanoyl]- β -D-glucopyranoside (114) 1- <i>O</i> -[5-oxotetrahydrofuran-3-yl]-acétyl-6- <i>O</i> -[3-nitropropanoyl]- β -D-glucopyranoside (115)	[39]
	<i>A. trojanus</i>	parties aériennes	Maackiaïne (116)	[40]
	<i>A. inopinatus</i>	parties aériennes	Tricosane-1-ol (117) Tetracosane-1-ol (118)	[35]
	<i>A. danicus</i>	parties aériennes	3- <i>O</i> -méthyl-D-chiroinositol (119) Acide linoléique (120)	[35]

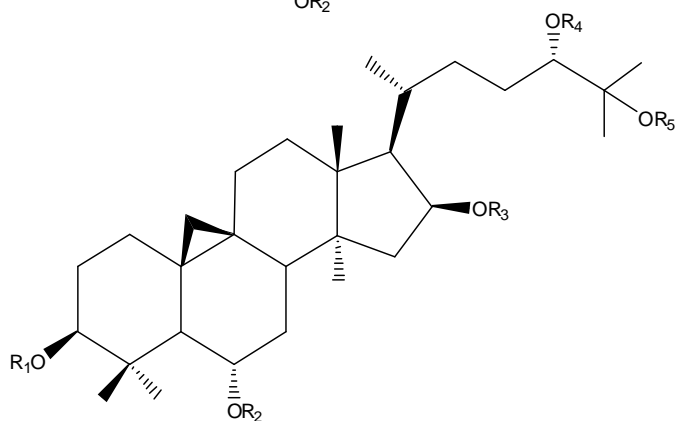
I.4.1 Saponosides de type cycloartane



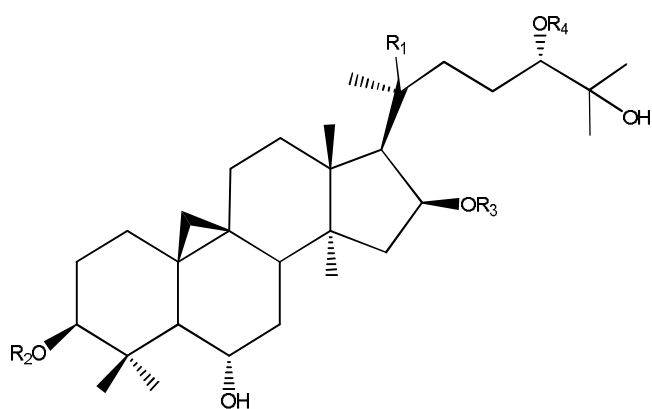
	R ₁	R ₂	R ₃
1	rha(1 \rightarrow 2)ara(1 \rightarrow 2)xyl	xyl	H
2	xyl	xyl	H
3	xyl	xyl	Glc
4	xyl	glc	Glc
5	H	glc	H



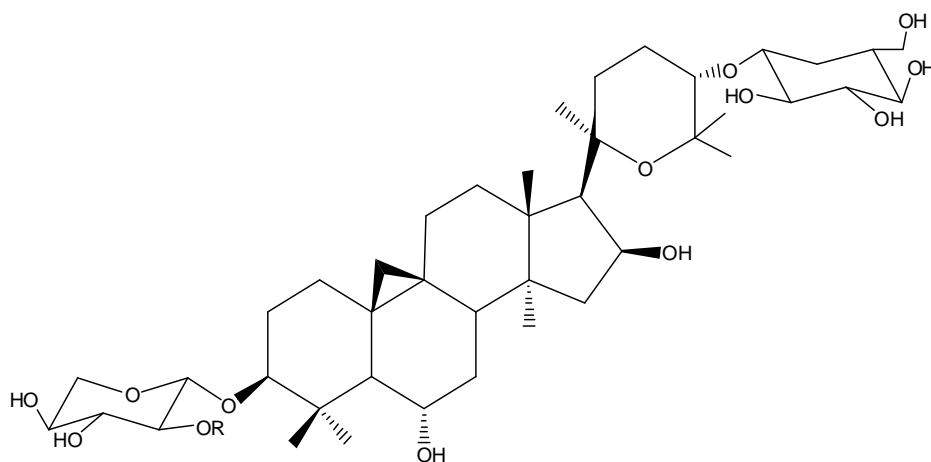
	R ₁	R ₂
6	ara(1→2)xyl	H
7	H	glc
8	H	xyl



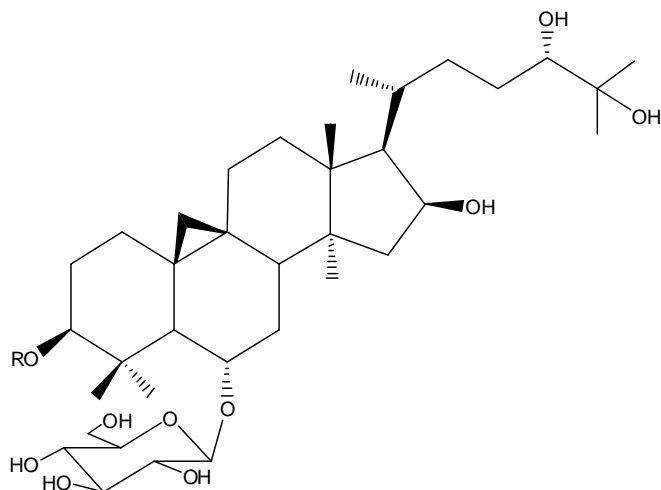
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
9	xyl	H	H	H	glc
10	xyl	H	glc	H	H
11	gluc(1→2)xyl	H	H	H	Glc
12	xyl	H	H	glc	Glc
13	H	rha	glc	glc	H
14	H	rha	glc	H	glc



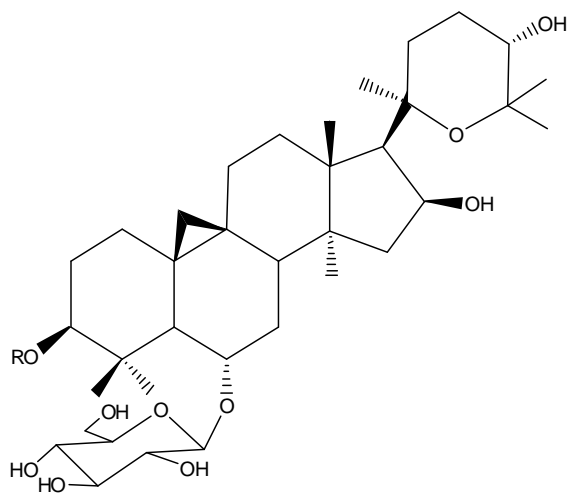
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
15	OH	ara(1→2)xyl	glc	H
16	OH	ara(1→2)xyl	H	H
17	OH	ara(1→2)glc	H	H
18	H	ara(1→2)glc	H	glc
19	H	ara(1→2)glc	glc	H
20	H	rha(1→4)[ara(1→2)]glc	H	H
21	OH	xyl	OH	OH



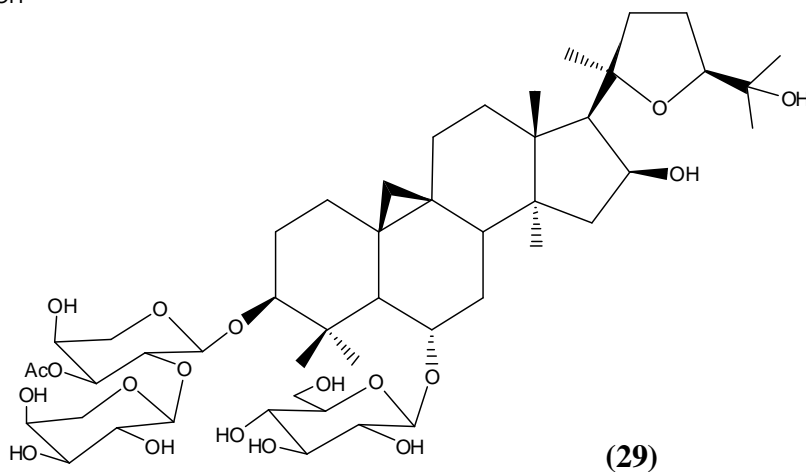
	R
22	H
23	glc

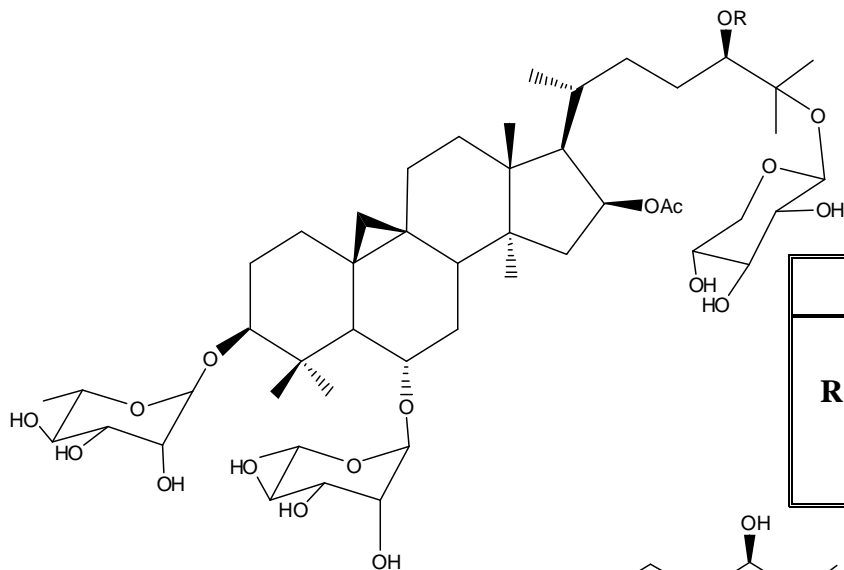


	24	25	26
R			

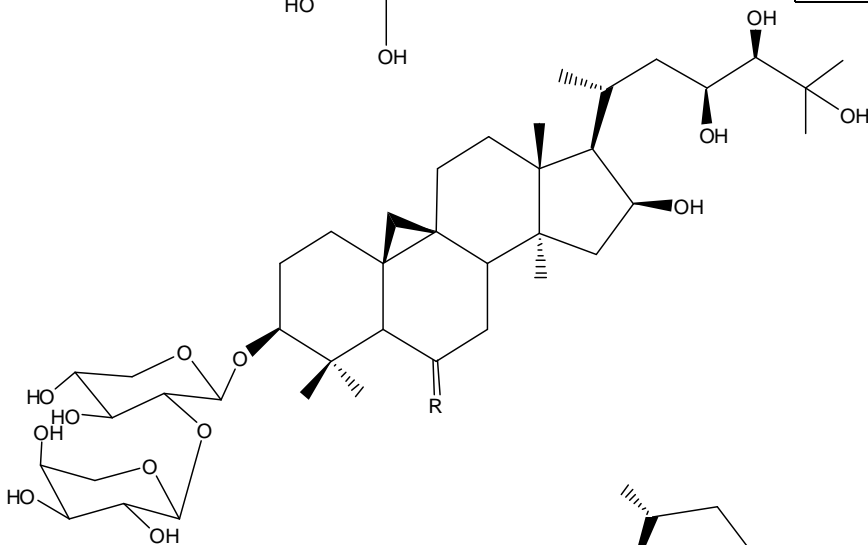


	R
27	ara(1→2)xyl
28	rha(1→2)ara(1→2)xyl

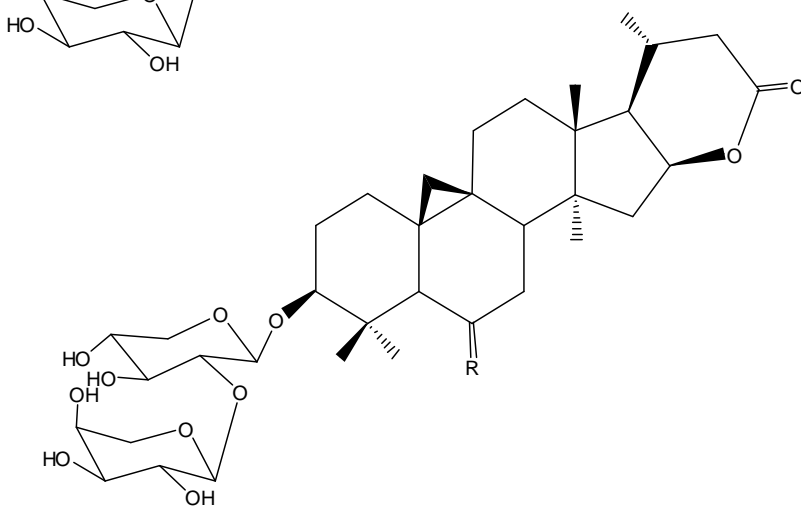




	30	31
R		H

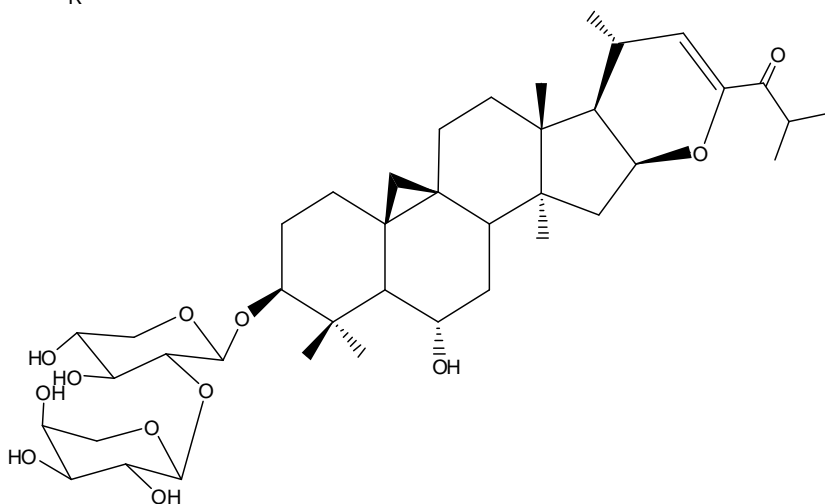


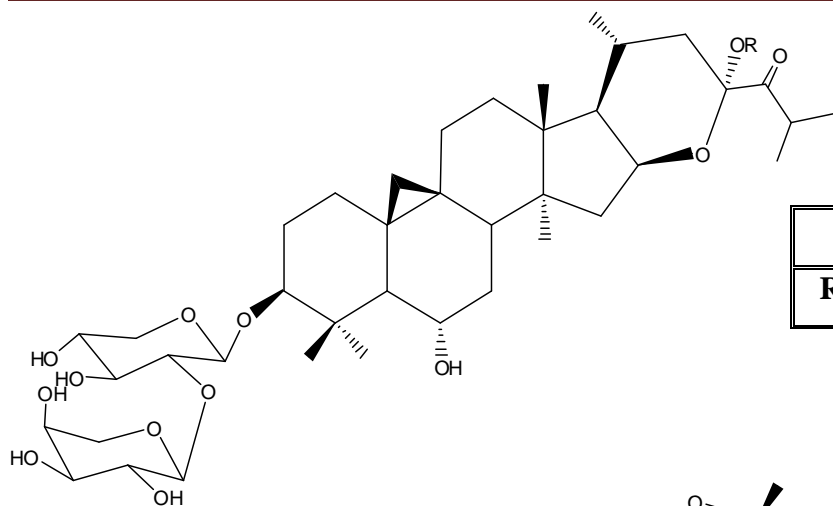
	32	33
R	α -OH	O



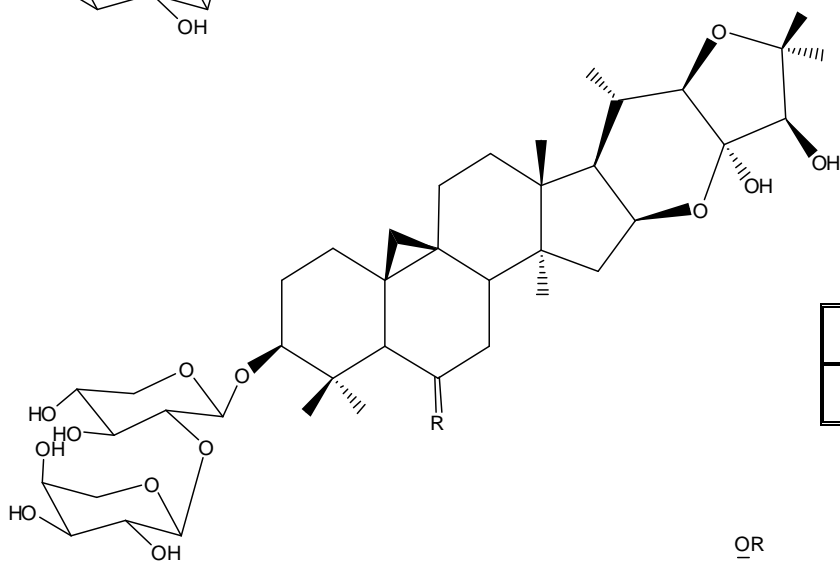
	34	35
R	α -OH	O

(36)

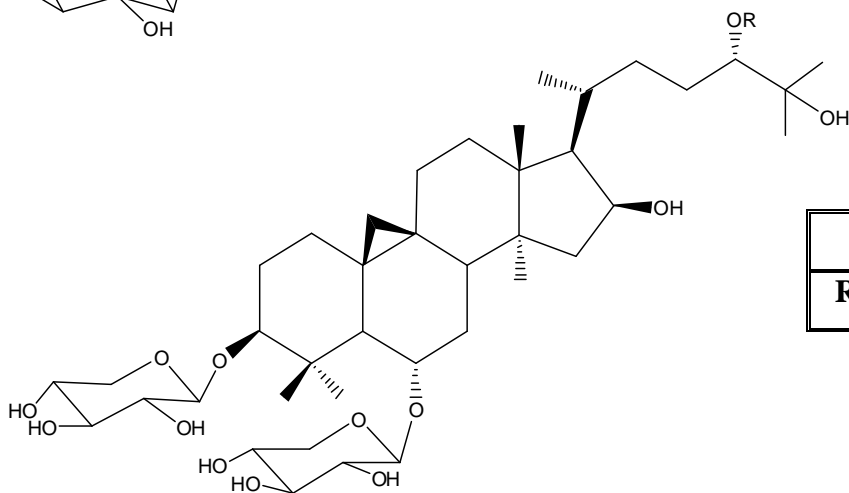




	37	38
R	CH ₃	CH ₂ CH ₃

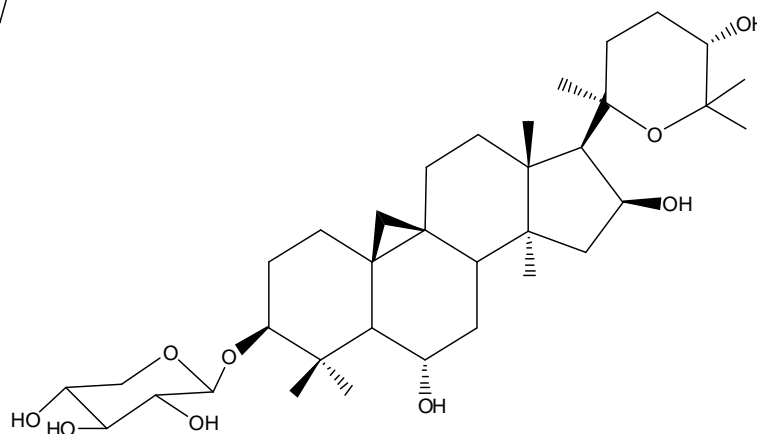


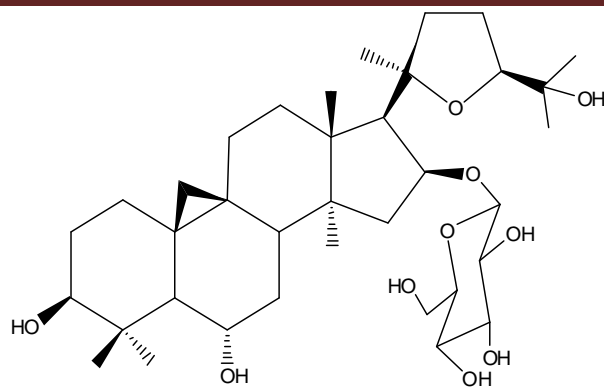
	39	40
R	α-OH	O



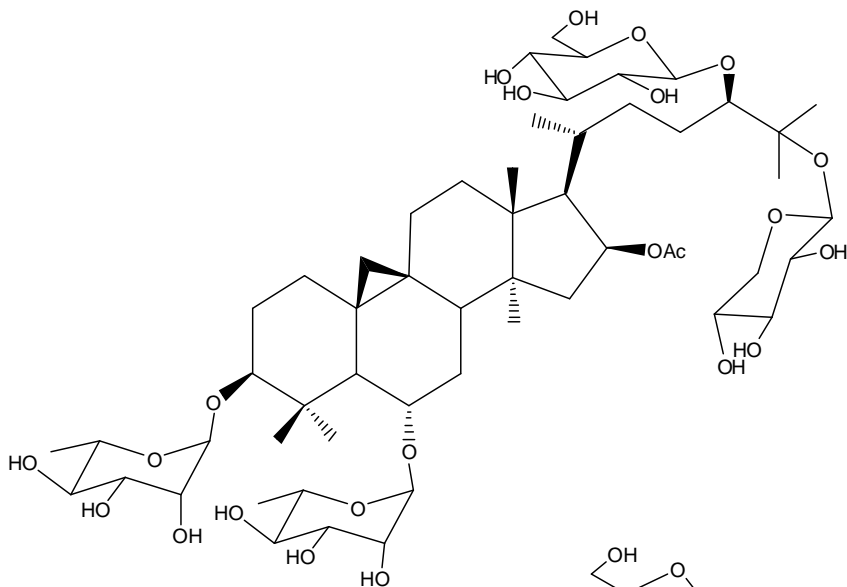
	41	42
R	H	xyl

(43)

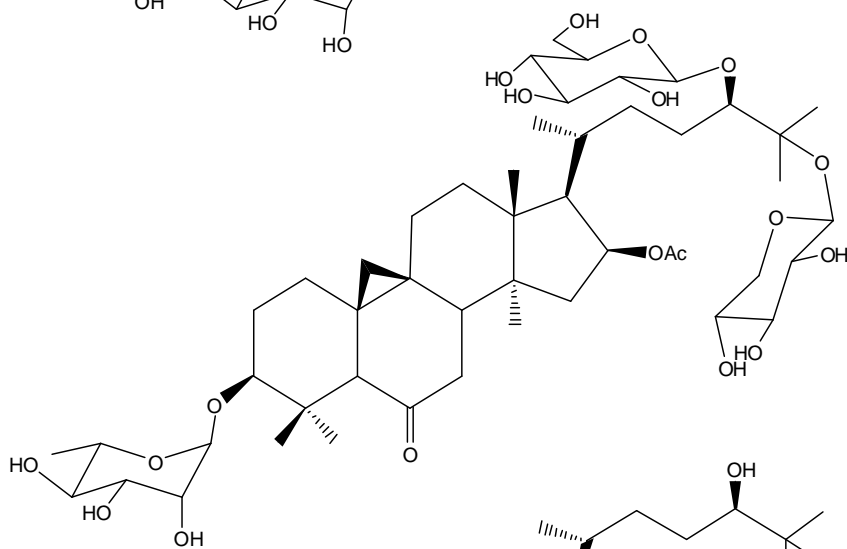




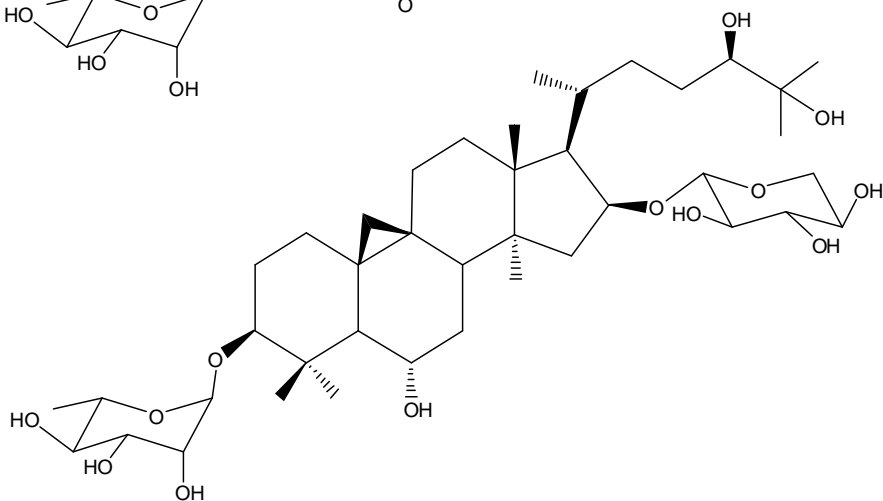
(44)



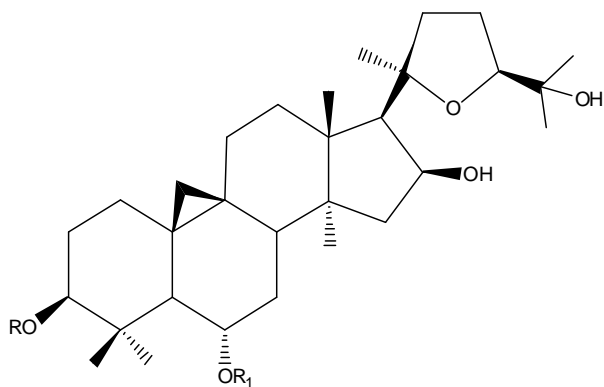
(45)



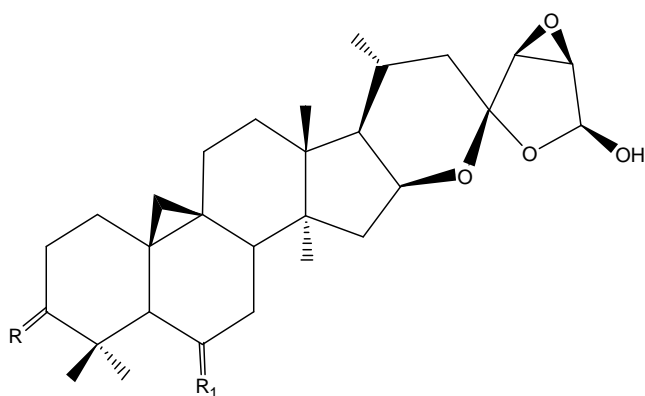
(46)



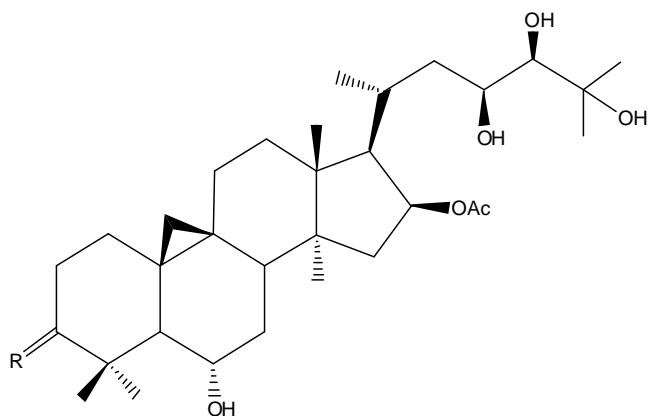
(47)



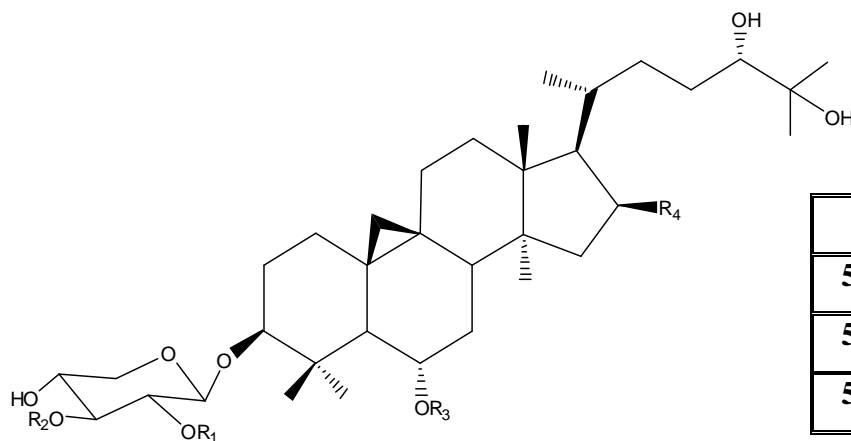
	R	R ₁
48	xyl(1→3)glc	xyl
49	xyl	glc
50	H	H



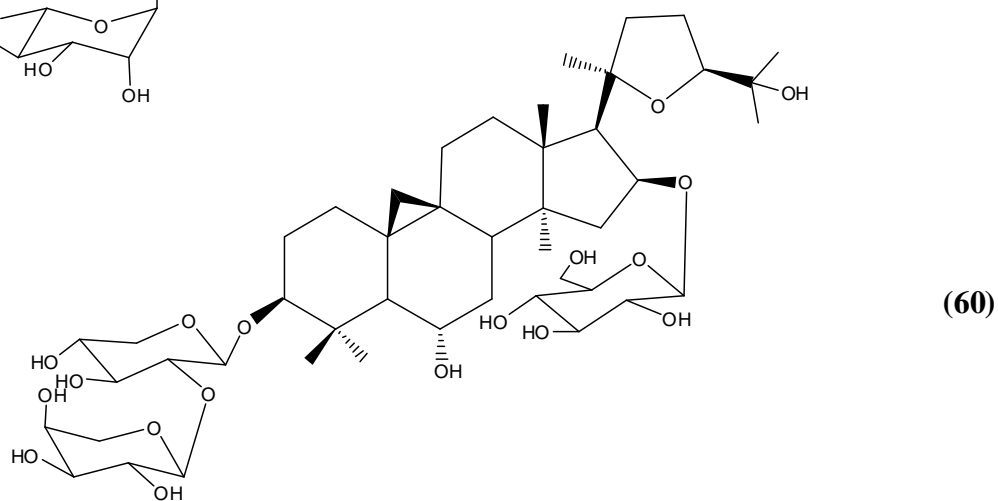
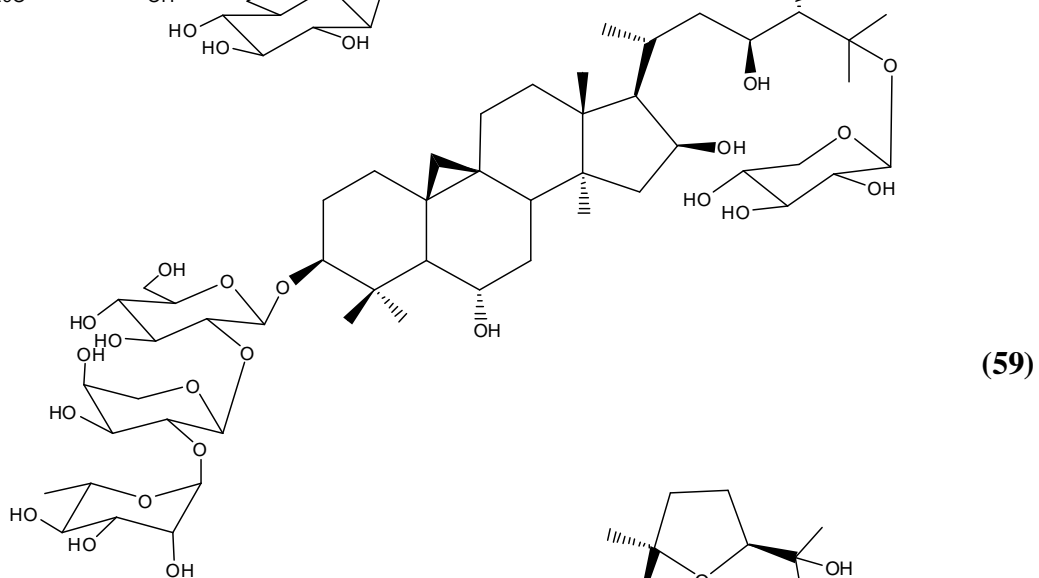
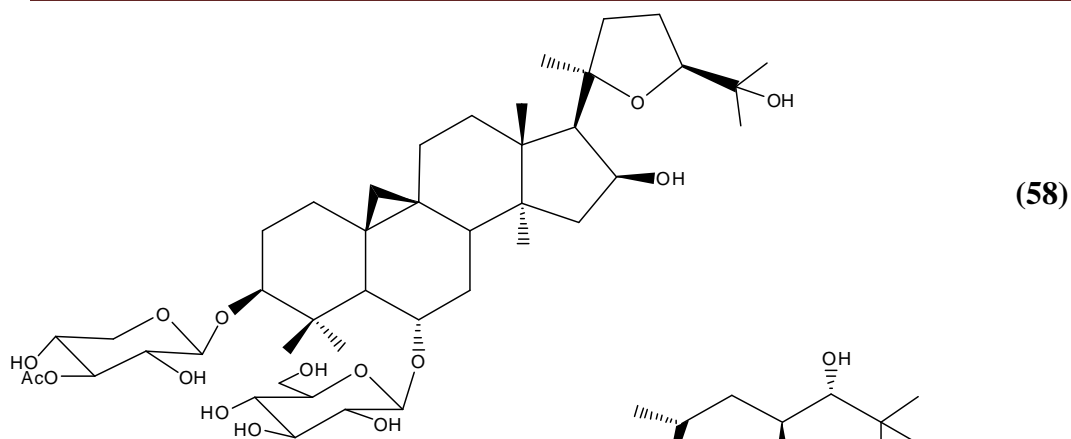
	51	52
R	β-O-xyl	O
R ₁	α-OH	O



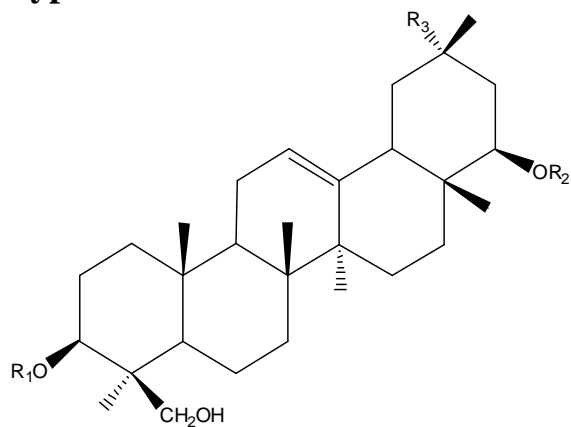
	R
53	O
54	β-O-xyl

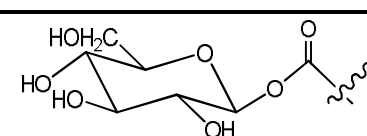
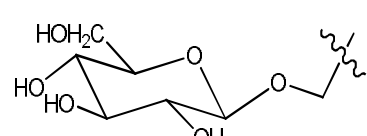
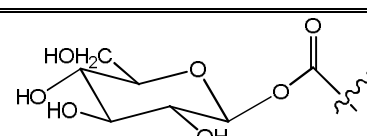
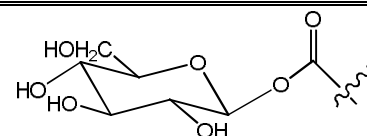
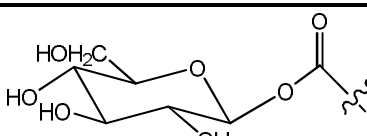


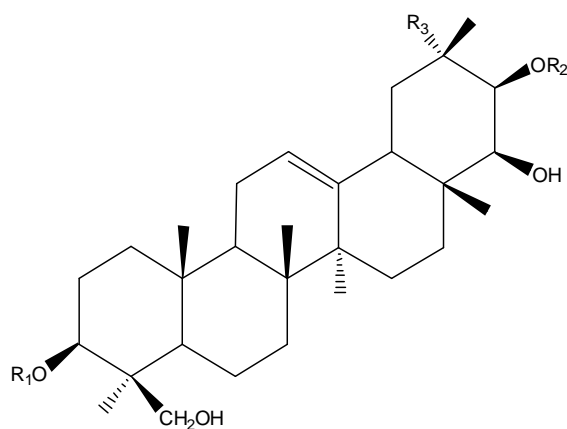
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
55	Ac	H	glc	H
56	Ac	Ac	glc	OH
57	Ac	H	glc	OH



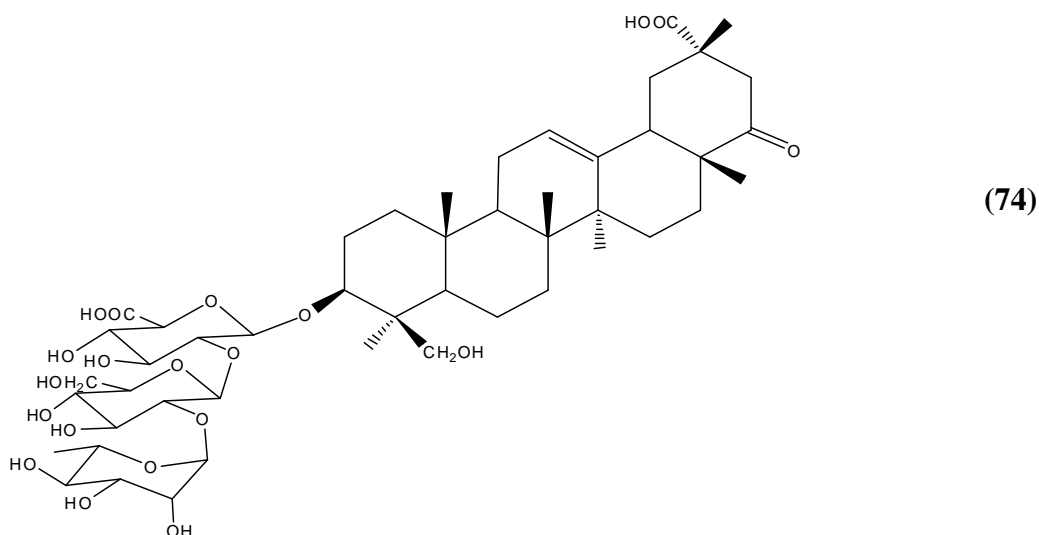
I.4.2 Saponosides de type oléanane



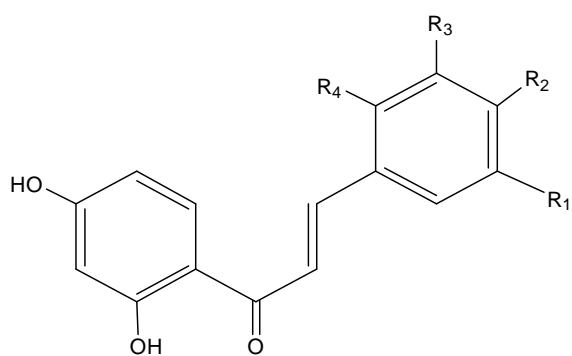
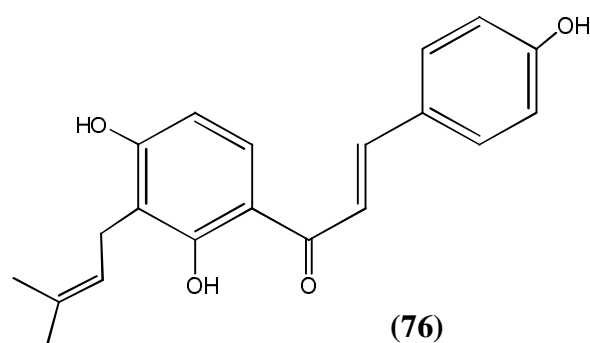
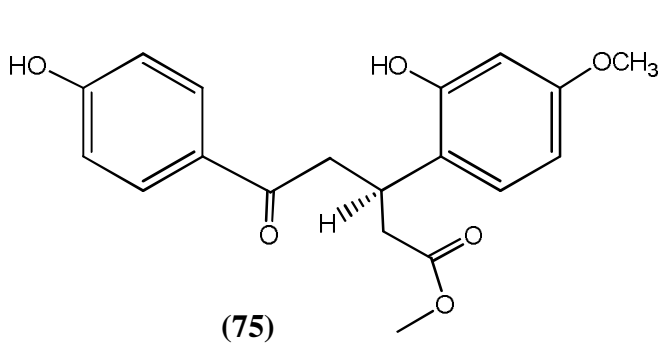
	R₁	R₂	R₃
61	rha(1→2)glc(1→2)gluc	H	CH ₃
62	rha(1→2)xyl(1→2)gluc	H	CH ₃
63	xyl(1→2)glc(1→2)gluc	H	CH ₃
64	H	H	CH ₃
65	rha(1→2)xyl(1→2)gluc	H	
66	rha(1→2)glc(1→2)gluc	H	
67	rha(1→2)glc(1→2)gluc	H	
68	rha(1→2)xyl(1→2)gluc	rha	CH ₃
69	glc(1→2)gluc	H	
70	xyl(1→2)gluc	H	



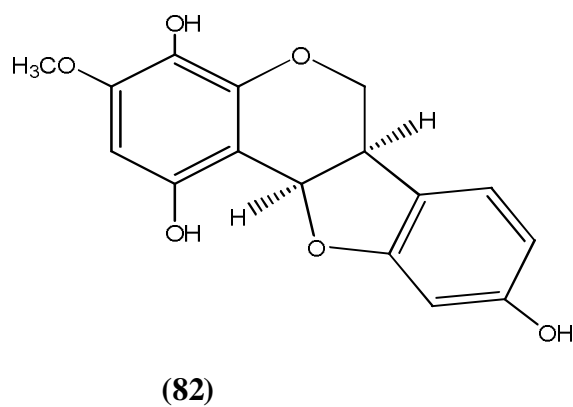
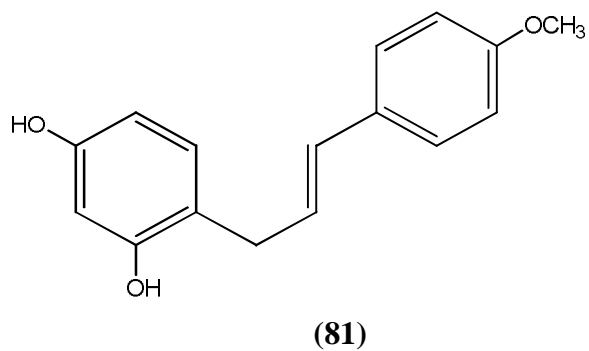
	R₁	R₂	R₃
71	rha(1→2)xyl(1→2)gluc	rha	CH ₃
72	rha(1→2)glc(1→2)gluc	rha	CH ₃
73	rha(1→2)glc(1→2)gluc	H	CH ₂ OH

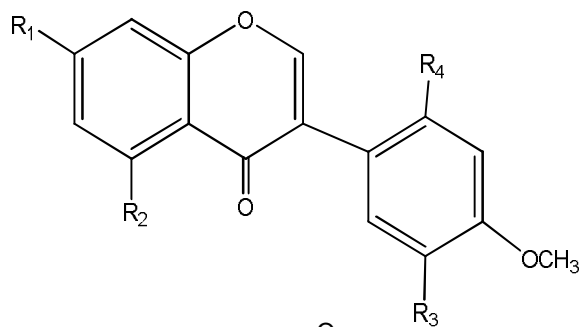
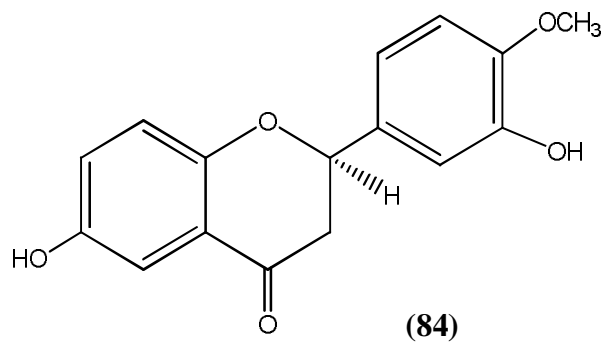
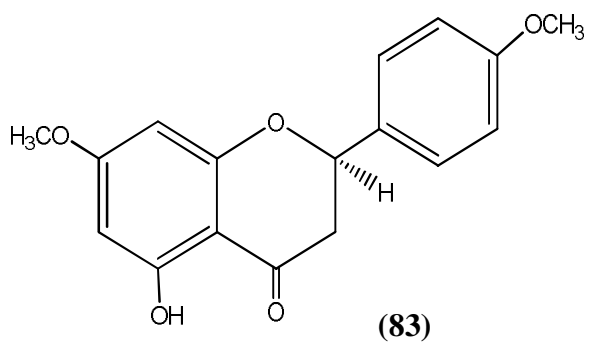


I.4.3 Flavonoïdes

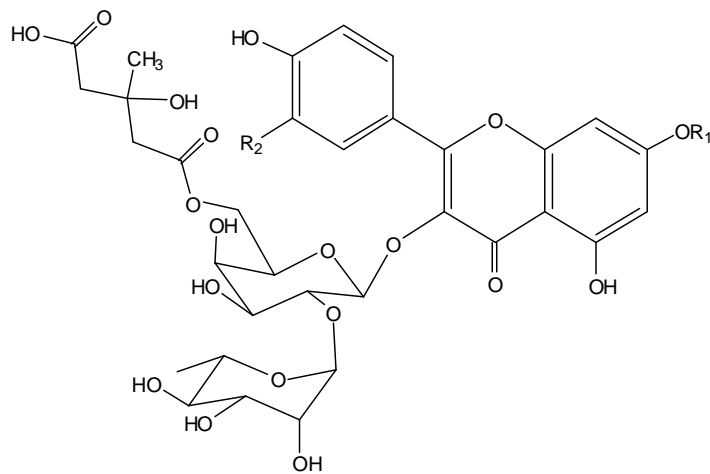
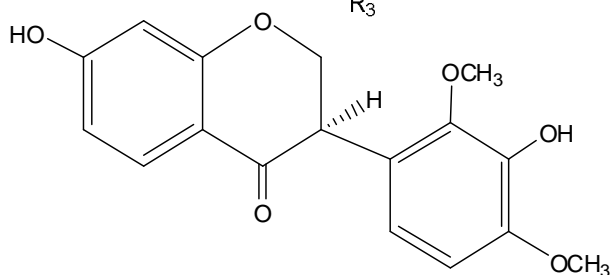


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
77	OCH ₃	OCH ₃	H	H
78	H	OH	H	H
79	H	H	OCH ₃	OCH ₃
80	H	OCH ₃	H	H

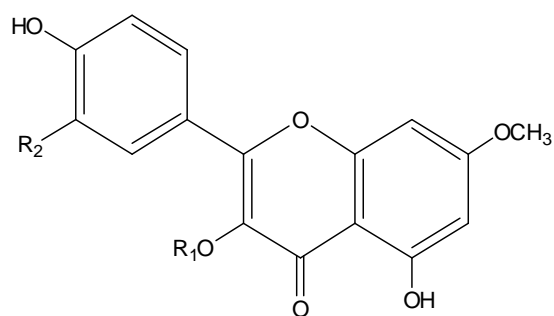




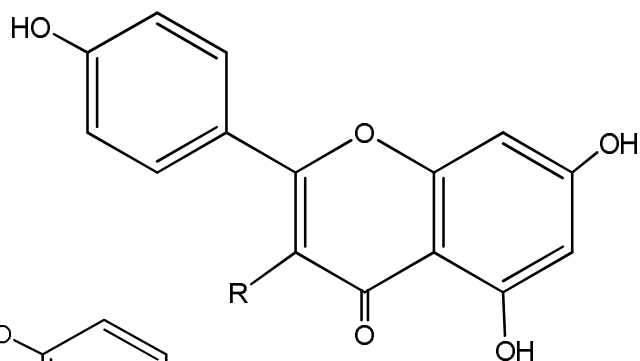
	R₁	R₂	R₃	R₄
85	OH	OH	H	H
86	OCH ₃	H	H	H
87	OH	OH	H	OH
88	OH	H	OH	H



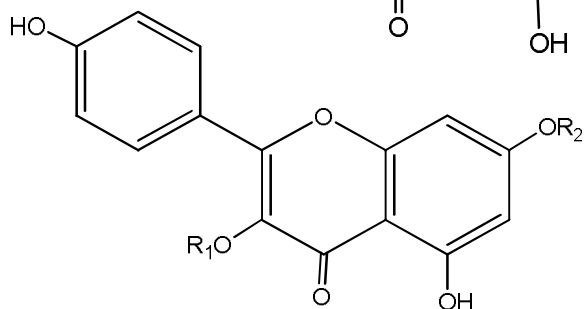
	R₁	R₂
90	H	H
91	CH ₃	H
92	CH ₃	OH



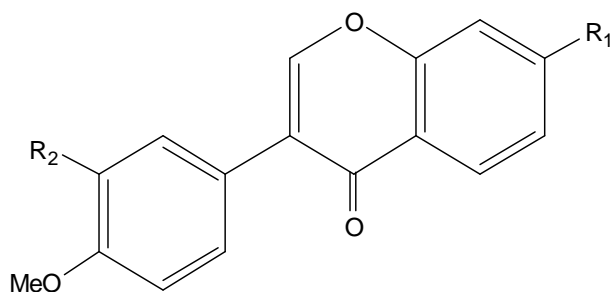
	R₁	R₂
93	rha(1→2)gal	OH
94	rha(1→2)gal	H
95	gal	OH



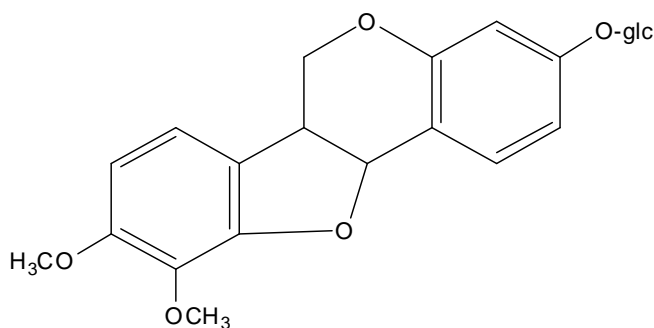
	R
96	OH
97	H



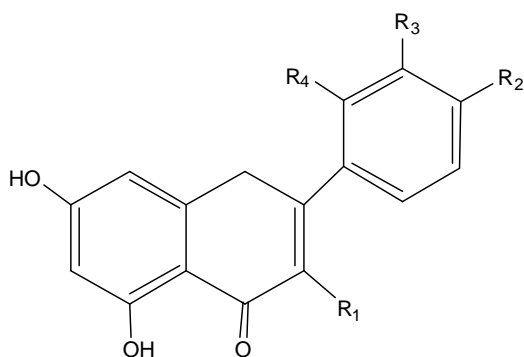
	R ₁	R ₂
98	rha(1→6) rha(1→2)gal	rha
99	rha(1→2)gal	rha
100	rha(1→6)gal	H



	R ₁	R ₂
101	OH	H
102	Oglc	H
103	OH	OH
104	Oglc	OH

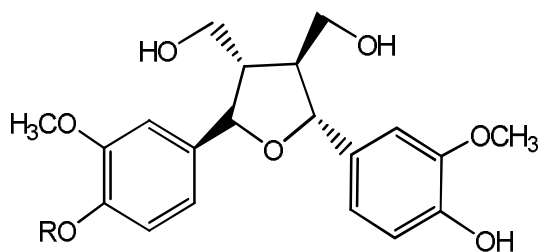


(105)

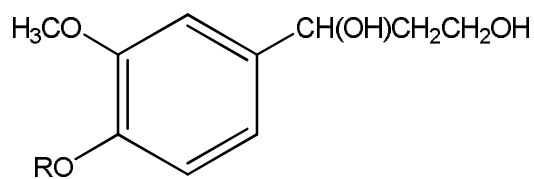


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
106	rha(1→6)glc	OH	OCH ₃	H
107	rha(1→6)glc	OH	H	H
108	rha(1→4)rha(1→6)glc	OH	H	H
109	H	H	H	OH

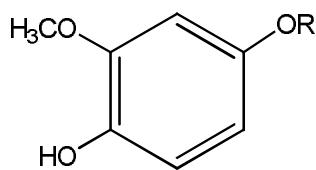
I.4.4 Autres composés



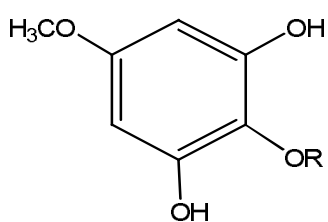
(110)



(111)

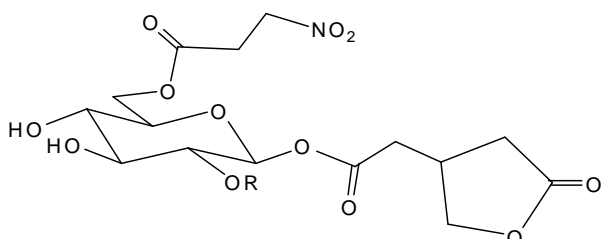
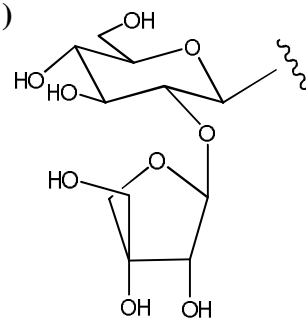


(112)

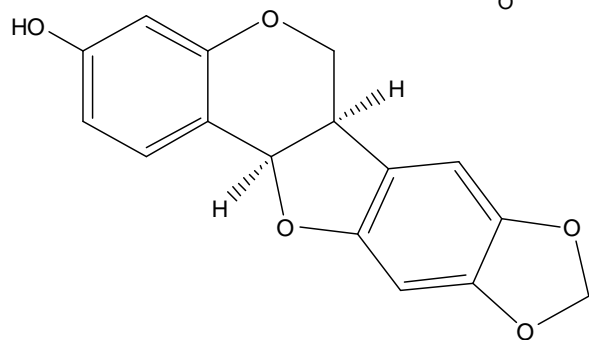


(113)

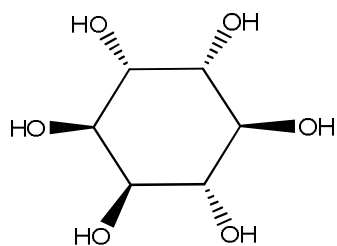
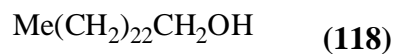
R=



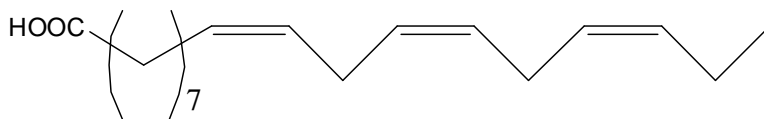
	R
114	COCH ₂ CH ₂ NO ₂
115	H



(116)



(119)



(120)

CHAPITRE II
Etude des Saponosides et
Flavonoïdes

II.1 Saponosides

II.1.1 Définition

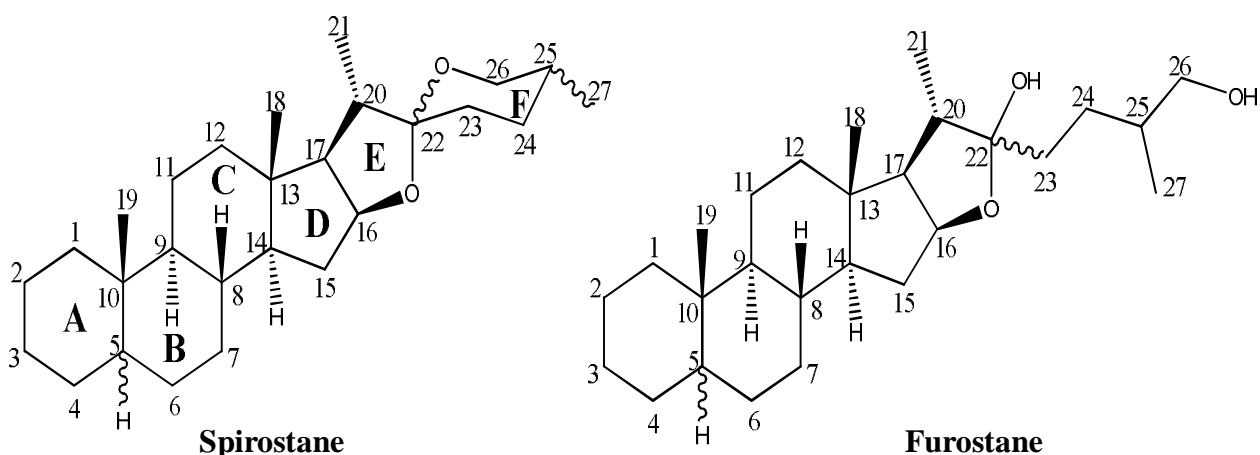
Les saponosides, produits naturels issus du métabolisme secondaire, constituent un vaste groupe d'hétérosides fréquemment rencontrés chez les végétaux. Elles sont caractérisées par leurs propriétés tensioactives car ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes [41]. Du point de vue chimique, elles se caractérisent par un radical osidique (glucose, galactose...), lié à un radical aglycone via une fonction éther ou ester.

II.1.2 Classification structurale

D'un point de vue structural, les saponosides sont classées en deux groupes selon la nature de la génine: les saponosides à génine triterpénique, de loin les plus nombreux se rencontrant principalement chez les angiospermes dicotylédones ainsi que chez certains animaux marins et celles à génine stéroïdique, presque exclusivement présentes chez les angiospermes monocotylédones [41].

II.1.2.1 Saponosides stéroïdiques

Les angiospermes monocotylédones Liliaceae (Asperge, petit houx), Dioscoraceae (Discoreae) et Agavaceae sont assez fournies en saponosides stéroïdiques [42,43]. La génine de ces derniers (on dénombre plus d'une centaine) est constituée d'un squelette à 27 atomes de carbone [44]. Deux principaux types de squelette existent [42]: pentacyclique (furostane) et hexacyclique (spirostane).

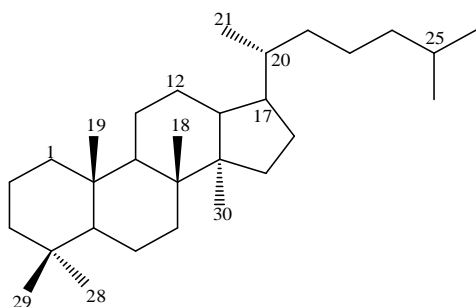


Pour ces deux squelettes et en l'absence d'une double liaison en 5(6), la fusion des cycles A et B peut être *cis* ou *trans*. Ces composés possèdent invariablement un hydroxyle en

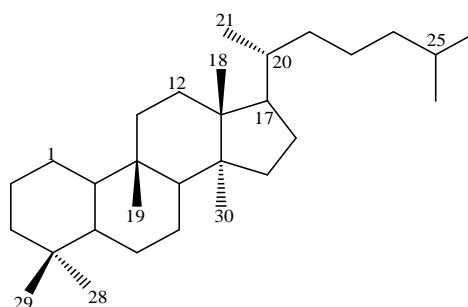
positions 3 (α ou β). D'autres fonctions hydroxyles peuvent être présentes en positions C-1, C-2, C-6, C-14 et C-17 [42].

II.1.2.2 Saponosides triterpéniques

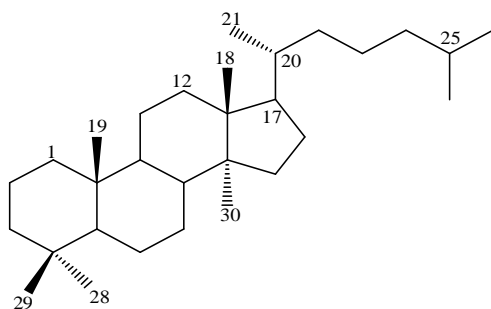
Les saponosides triterpéniques sont rencontrés principalement chez les angiospermes dicotylédones (Araliaceae, Caryophyllaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Fabaceae...) [45]. Leur génine à 30 atomes de carbone peut être tétracyclique (dammarane, cucurbitane, lanostane) ou pentacyclique (oléanane, ursane, lupane, friedelane, hopane) [42].



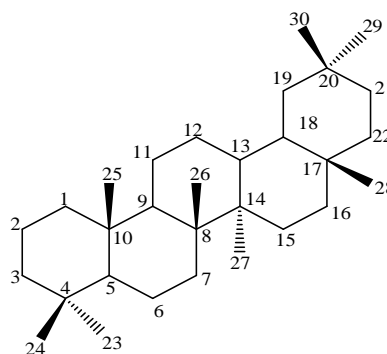
Dammarane



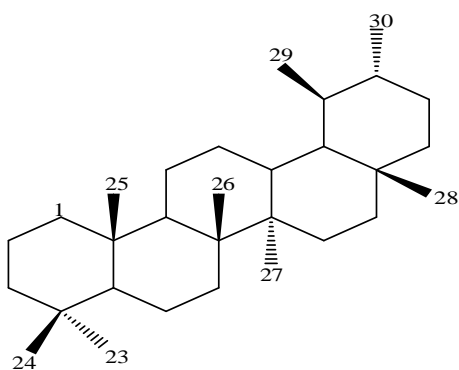
Cucurbitane



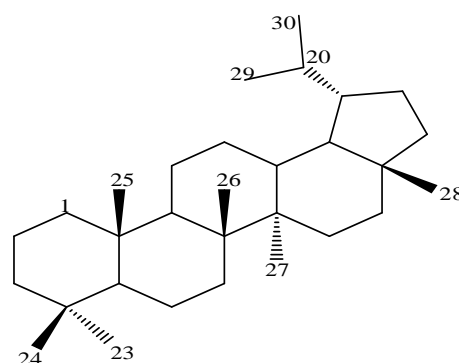
Lanostane



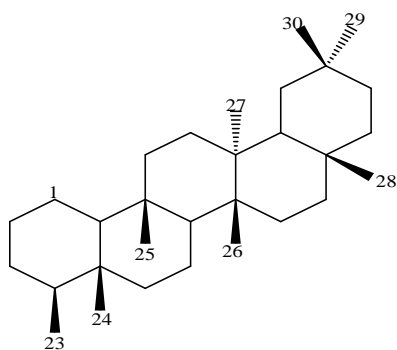
Oléanane



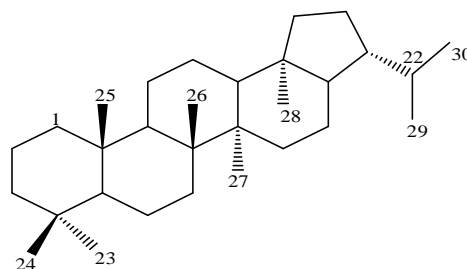
Ursane



Lupane



Friedelane



Hopane

II.1.2.3 Oses

Les oses, constitutifs des saponines, les plus courants sont [42]: D-glucopyranose, D-galactopyranose, L-rhamnopyranose, D-fucopyranose, acide D-glucuronique, acide D-galacturonique, D-xylopyranose, L-arabinopyranose et D-apiose.

La configuration anomérique de ces sucres est généralement de type β dans la série D et de type α dans la série L. La majorité des unités osidiques se trouvent sous la forme pyrane en conformation chaise à l'exception du D-apiose qui est toujours sous forme furane [42].

En fonction du nombre de chaînes greffées sur la génine à travers une liaison éther ou ester, on distingue les saponines monodesmosidiques possédant une seule chaîne osidique, bidesmosidiques à deux chaînes osidiques, tridesmosidiques (trois chaînes), voire tétradesmosidique (quatre chaînes) [46].

II.1.3 Biosynthèse des triterpénoïdes

Les saponines sont produites à partir du squalène, lui-même formé par la condensation de deux unités farnésyl-pyrophosphate via la condensation d'unités isopréniques par la voie mévalonique (MVA). Dans la plupart des cas, le squalène est converti en 2,3-squalène époxyde par une enzyme appelée squalène époxydase, puis cyclisé grâce à une oxydosqualène cyclase pour donner les cations dammarényle ou prostostéryle [47]. La figure suivante (Figure II.1) montre le schéma de biosynthèse des triterpénoïdes.

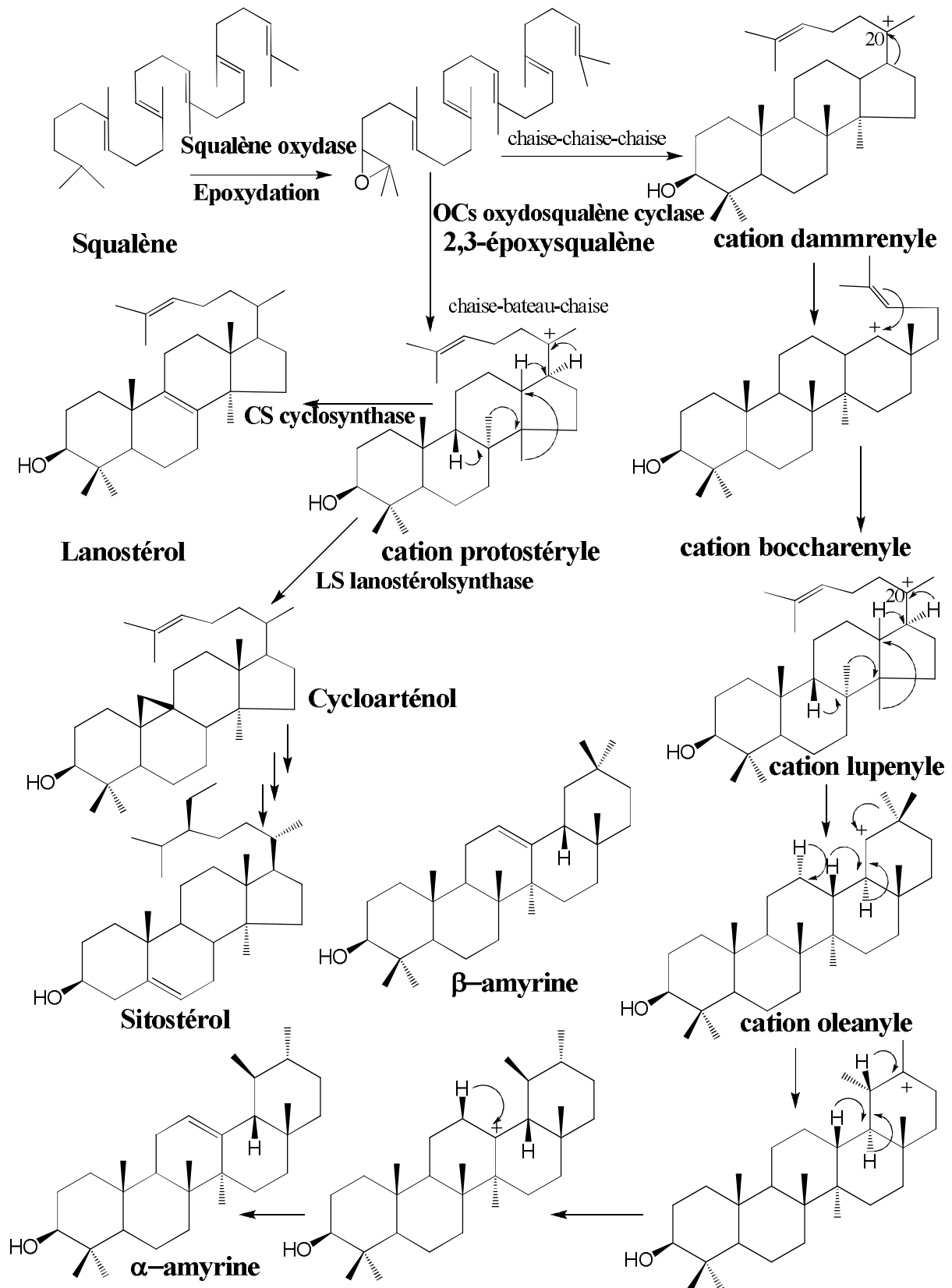


Figure II.1: Schéma de biosynthèse des triterpénoïdes

II.1.4 Propriétés biologiques des saponosides

Les nombreuses études biologiques ont montré que les saponosides possèdent des propriétés biologiques et pharmacologiques diverses: molluscicide, anti-inflammatoire, antifongique, antimicrobienne, antiparasitaire, cytotoxique, antitumorale, immunostimulante et immunomodulatrice [48, 49, 50]. Depuis quelques années, des recherches sur des saponines mentionnent également des activités antiapoptotiques sur différents types de cellules: Jurkat (lymphocytes T humains leucémiques), tératocarcinome F9, hépatocytes humains, SK-HEP-1, macrophages des tissus périphériques [51, 52, 53, 54].

Le pouvoir des saponosides à lyser les globules rouges ou hémolytique (érythrocytes) est connu depuis très longtemps [46]. Cette propriété peut être utilisée comme moyen de détection au sein des plantes. Cependant, en raison de la variation structurale de cette classe de métabolites secondaires, chaque saponoside n'est pas forcément hémolytique [46]. Le phénomène d'hémolyse est expliqué par l'adsorption du saponoside sur la membrane cellulaire des érythrocytes. Cette adsorption se ferait par complexation du saponoside avec les stérols membranaires [46].

Le pouvoir hémolytique dépend de la nature de la génine et du nombre d'unités osidiques [55]. La comparaison des activités des saponosides monodesmosides et bidesmosides a prouvé que les premiers cités sont généralement plus hémolytiques [56].

De nombreuses saponines ont montré une activité cytotoxique *in vitro* envers une grande variété de lignées cellulaires cancéreuses [57]. Les valeurs d'IC₅₀ mentionnées dans la littérature varient entre environ 4 µg/ml et 20 µg/ml en fonction de la nature de la saponine et de la lignée cellulaire [58].

Les saponosides sont connus pour leur toxicité envers les animaux à sang froid tels que les poissons. Quelques plantes à saponosides sont ainsi utilisées traditionnellement comme poison de pêche [46].

Certains saponosides à squelette cycloartane comme l'oleifolioside A, oleifolioside B, cyclocanthoside E et astragaloside II, isolés tous de l'espèce *Astragalus oleifolius*, sont très actifs contre la leishmaniose [56].

II.2 Flavonoïdes

II.2.1 Définition

Le terme flavonoïde dérivé du mot grec «flavus» qui veut dire jaune [59]. Il rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols [60]. Les flavonoïdes sont des composés constitués d'un squelette à 15 atomes de carbone qui, à son niveau le plus simple, consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C 6-C3-C6). Ce dernier situé entre les cycles A et B est communément cyclisé pour former le cycle C. Les atomes de carbone dans les cycles C et A sont numérotés de 2 à 8, et le cycle B de 2' à 6' (Figure II.2) [61].

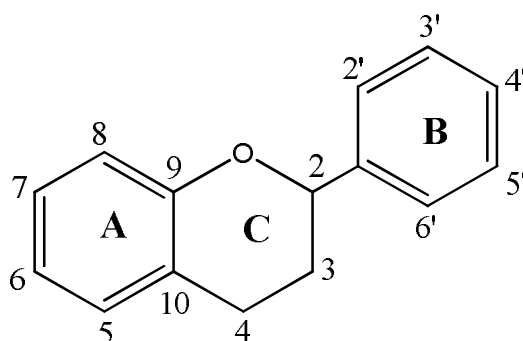
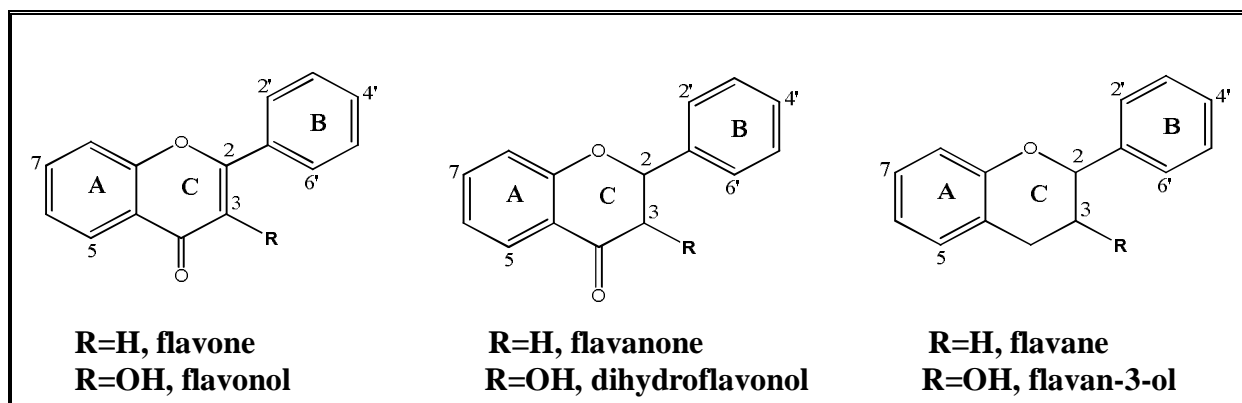


Figure II.2: Squelette de base des flavonoïdes

II.2.2 Classification

Les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation du cycle pyranique central (la chaîne en C3) [60]. Les flavonoïdes comprennent les flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, auronnes, isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, ptérocarpanes, coumaronochromones, roténoïdes, 3-arylcoumarines, coumestanesetc (Figure II.3) [62].



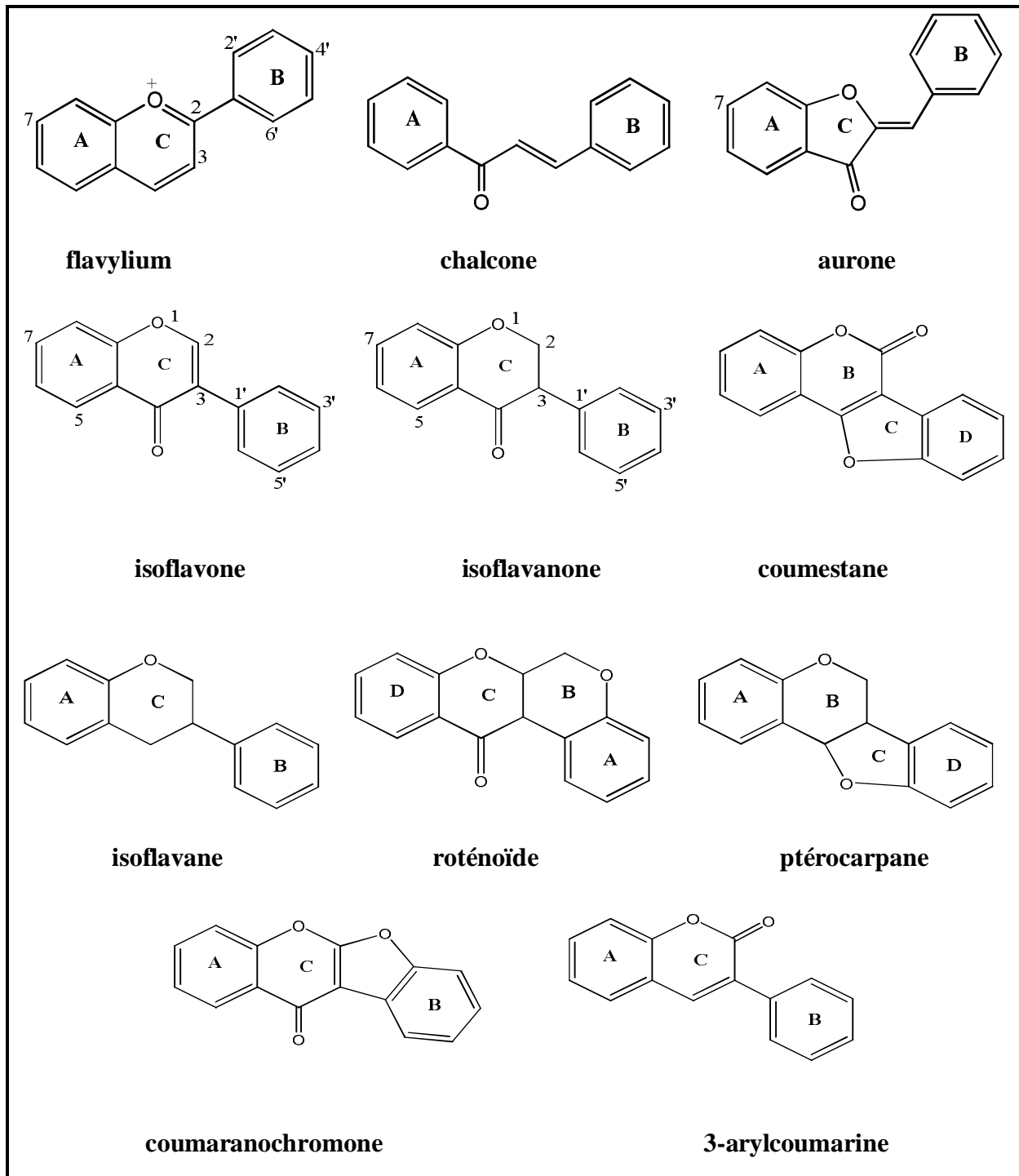


Figure II.3: Structures des différents squelettes des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont le plus souvent constitués d'unités osidiques se fixant sur le squelette de base ou l'aglycone quand celui-ci est notamment porteur de groupements hydroxyles. La partie osidique peut être mono, di ou trisaccharidique. Les monosaccharides sont généralement le D-glucose, le D-galactose, le L-rhamnose, l'acide D-glucuronique, l'acide D-galacturonique, le L-arabinose, le D-xylose. En règle générale, ce sont surtout

l'hydroxyle en 7 des flavones et l'hydroxyle en 3 des flavonols qui sont les sites de glycosilation [63].

II.2.3 Biosynthèse des flavonoïdes

L'enzyme clé pour la formation du squelette flavonique est la chalcone synthase (CHS) qui catalyse l'étape de condensation de trois molécules de malonyl-CoA avec la 4-coumaroyl-CoA pour donner l'intermédiaire en C15, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone [64]. Cette dernière est l'intermédiaire qui caractérise la synthèse des différentes classes de flavonoïdes.

Le tableau II.1 rassemble la liste des enzymes impliquées dans les différentes étapes de biosynthèse des flavonoïdes telles que présentées dans la Figure II.4.

Tableau II.1: Liste des enzymes

Numéro	Abréviations	L'enzymes
1	CHS	Chalcone synthase
2	CHI	Chalcone isomerase
3	FNSI	Flavone synthase I
4	FNSII	Flavone synthase II
5	IFS	Isoflavone synthase
6	FNR	Flavanone 4-reductase
7	F3H	Flavanone 3-hydroxylase
8	ANS	Anthocyanine synthase
9	DFR	Flavonol synthase
10	DFR	Dihydroflavonol 4-reductase
11	F3GT	Flavonoïde 3-O-glucosyl-transférase

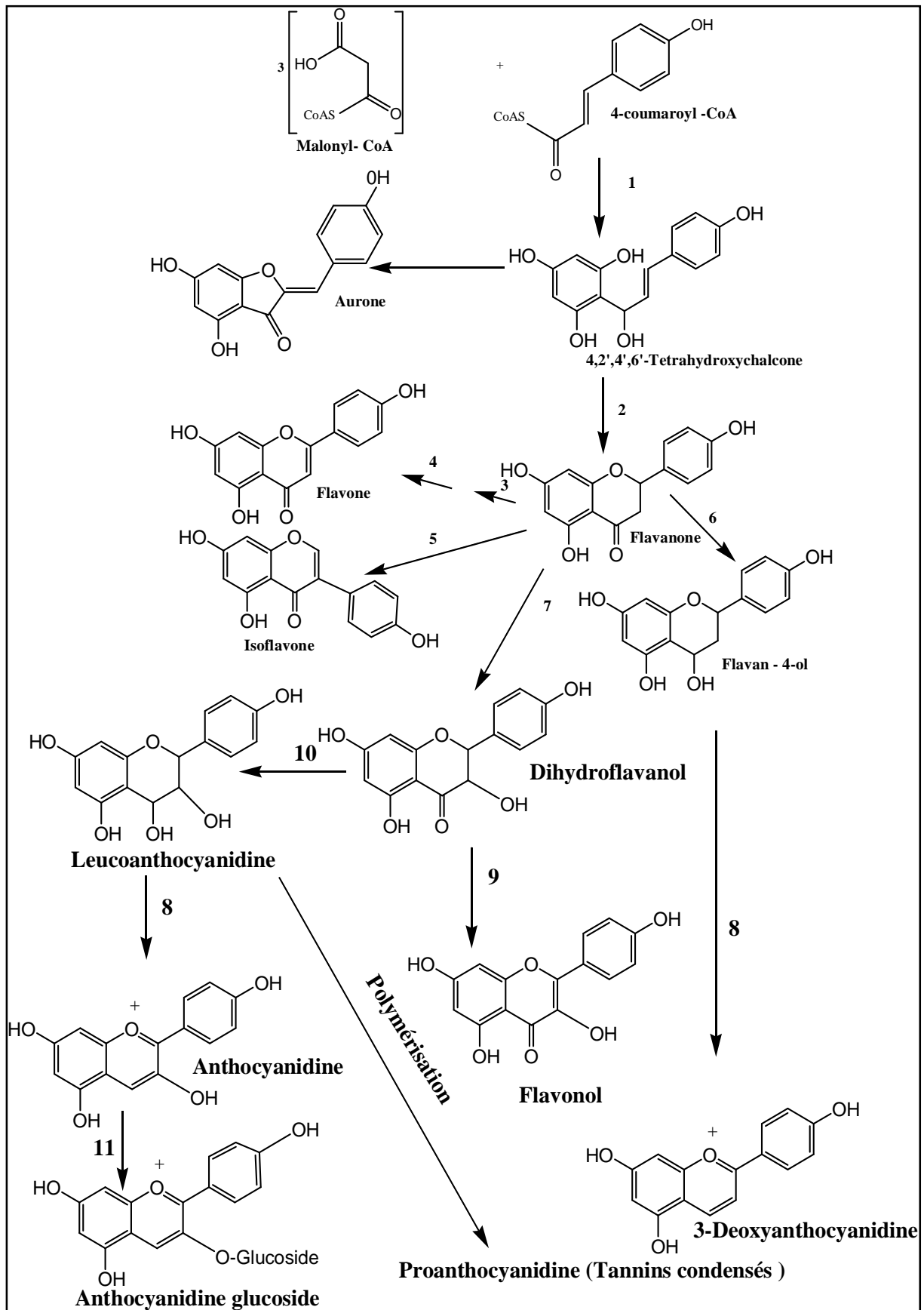


Figure II.4: Biosynthèse des flavonoïdes

II.2.4 Activités biologiques des flavonoïdes

Les propriétés thérapeutiques des flavonoïdes sont largement prises en compte dans le domaine médical où on leur reconnaît diverses activités très intéressantes: anti-inflammatoire, antivirale, antibactérienne, anti-allergique et antitumorale [65].

L'interaction des flavonoïdes avec de nombreux radicaux a été exploitée dans plusieurs études afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante. A cause de leur faible potentiel redox [66], les flavonoïdes sont thermodynamiquement capables de réduire les radicaux libres oxydants comme le superoxyde, le peroxyde, l'alkoxyde et l'hydroxyde par transfert d'hydrogène.

L'activité anti-radicalaire des flavonoïdes [67, 68, 69, 70] est conditionnée par:

- Pour le cycle C: la présence d'une double liaison en 2,3 avec un groupement oxo en 4 et une hydroxylation en 3
- Pour le cycle A: une dihydroxylation en 5 et 7
- Pour le cycle B: une *ortho*-dihydroxylation.

Le potentiel antioxydant des flavonoïdes peut aussi s'expliquer par la capacité de chélation des ions métalliques par les flavonoïdes [67, 71]. Cette capacité est très largement dépendante du nombre d'hydroxyles dans la molécule [67]. Les 3 sites de chélation principaux [69] se situent:

- Entre l'hydroxyle en 5 et le carbonyle en position 4
- Entre l'hydroxyle en position 3 et le carbonyle en 4
- Entre les deux hydroxyles en positions 3' et 4' sur le cycle B

De nombreux flavonoïdes dont le plus grand nombre appartient aux flavanones et flavanes, possèdent des activités antifongiques [72]. Une flavanone prénylée (5,7,4'-trihydroxy-8-méthyl-6-(3-méthyl-[2-butényl])-(2S)-flavanone) et une flavane (7-hydroxy-3',4'-(méthylènedioxy)-flavane) se sont avérées très actives contre *Candida albicans*, alors que plusieurs flavones polyméthoxylées le sont contre *Aspergillus flavus* [73].

Le groupe des ptérocarpanes regroupe de nombreux antifongiques. Il semblerait que cette activité est liée à la configuration particulière de ces molécules (structure plane). De plus, la présence de substituants oxygénés en positions 3 et 9 apparaît comme essentielle pour l'activité [74]. Quelle que soit la classe de flavonoïdes considérée, il apparaît que le caractère lipophile des composés augmente l'activité, permettant aux molécules de pénétrer plus facilement à travers la membrane fongique [72, 74]. En outre, la présence d'une chaîne isoprénique apparaît comme importante pour l'activité mais pas essentielle [74].

CHAPITRE III
Etude phytochimique de
l'espèce *Astragalus gombo*

III.1 Rappels botaniques

L'espèce *A. gombo* est une plante vigoureuse au port dressé élevé de couleur claire. Elle porte de très longues feuilles aux nombreuses petites folioles. Les pétioles, perdant leurs folioles, deviennent coriaces et piquants à l'extrémité. Les pieds bien développés atteignent aisément 40 à 50 cm de haut. Les fleurs papilionacées sont jaunes, en grappes axillaires denses. Comme pour toutes les espèces d'Astragale, la caractérisation du fruit est déterminante. La gousse de celui-ci, couverte d'un duvet soyeux, a une forme renflée avec des nervures superficielles [75].

Endémique saharienne, elle pousse sur le plateau, dans les lits sablonneux des oueds, ou les éboulis de falaises. Elle forme parfois d'importants pâturages après la pluie et résiste longtemps dans certains oueds [75].

Le nom vernaculaire de cette espèce est « Gelza », « Foum el hamir » ou « Djelban el hamir » [4].



Figure III.1: *Astragalus gombo*

Selon la classification Angiosperm Phylogeny Group (1998) [76], la plante *Astragalus gombo* est classée comme suit :

Famille : Fabaceae (Leguminosae)

Sous-famille : Faboideae

Genre : *Astragalus*

Espèce : *Astragalus gombo*

III.2 Résultats et discussions

III.2.1 Extraction

Le matériel végétal (1000 g) constitué des parties aériennes de la plante *Astragalus gombo*, préalablement séché et pulvérisé, est soumis à une double extraction primaire par l'éthanol à 70% (2 × 10 litres). L'extrait éthanolique résultant après filtration et concentration, est soumis à une extraction liquide/liquide au moyen de trois solvants à polarité croissante, éther de pétrole (3 × 500 ml), acétate d'éthyle (3 × 500 ml) et *n*-butanol (3 × 500 ml). Ceci a permis d'obtenir les masses suivantes: 3,5 g pour l'extrait étheropétrolique, 9,5 g pour l'extrait acétate d'éthyle et enfin 25 g pour l'extrait butanolique.

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

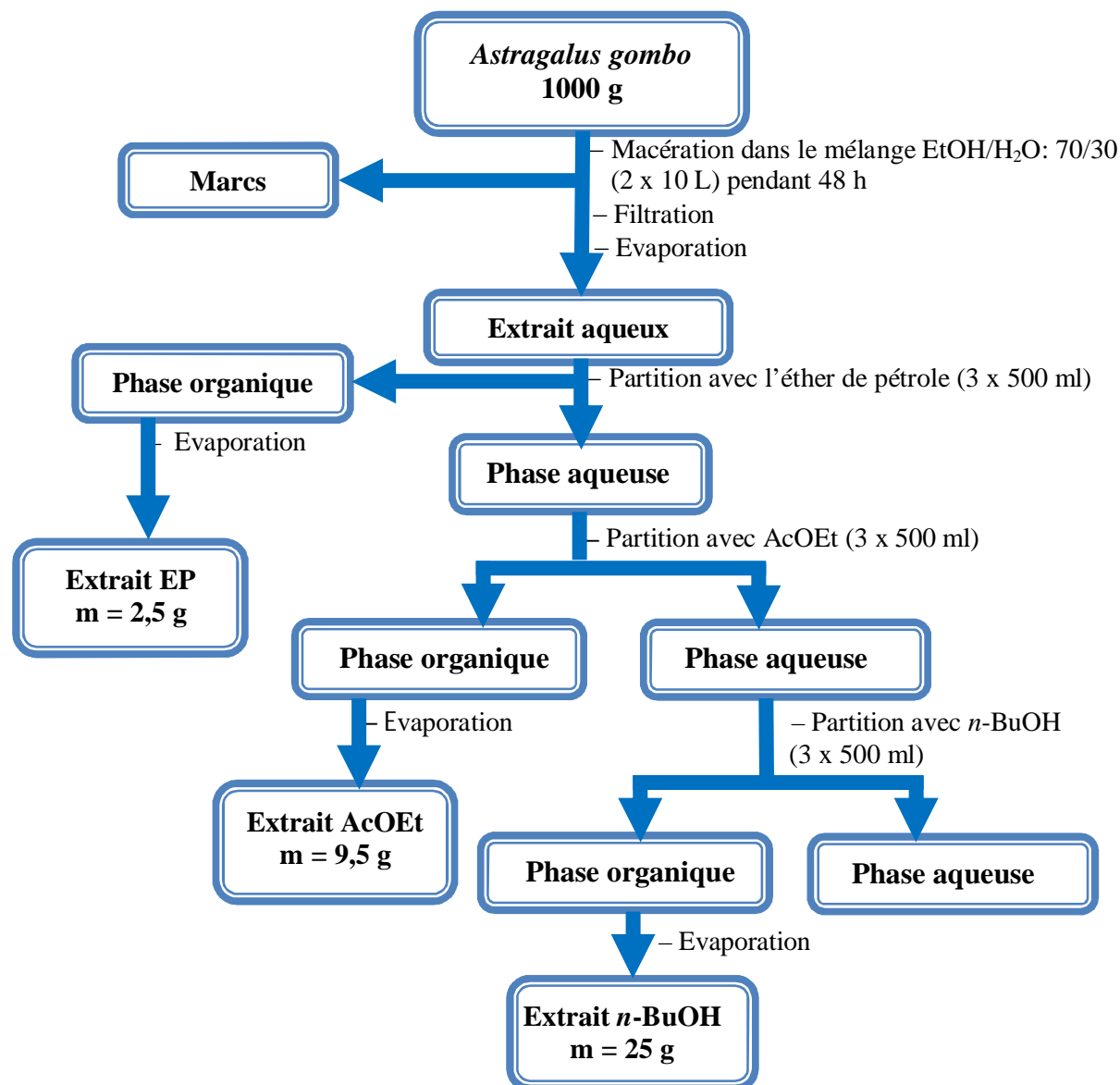


Figure III.2: Schéma d'extraction de la plante *Astragalus gombo*

III.2.2 Séparation et purification

Les CCM réalisées sur les trois extraits dans différents systèmes de solvants, montrent la richesse prévisible de l'extrait butanolique en métabolites secondaires comparativement aux deux autres extraits, AcOEt et étheropétrolique.

Le fractionnement primaire de l'extrait butanolique (14 g) a été réalisé par chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice greffée RP-18 comme phase stationnaire. L'éluion est effectuée avec un gradient de solvants méthanol-eau allant de 20-80 à 100-0. A l'issue de ce fractionnement, 14 fractions ont été recueillies sur la base de l'analyse par CCM. Ces fractions sont soumises par la suite à des opérations de purification (Figure IV.3) utilisant la chromatographie sur colonnes de gel de silice normale et Sephadex LH-20 (CC), plaque préparative (CCE) et enfin la chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

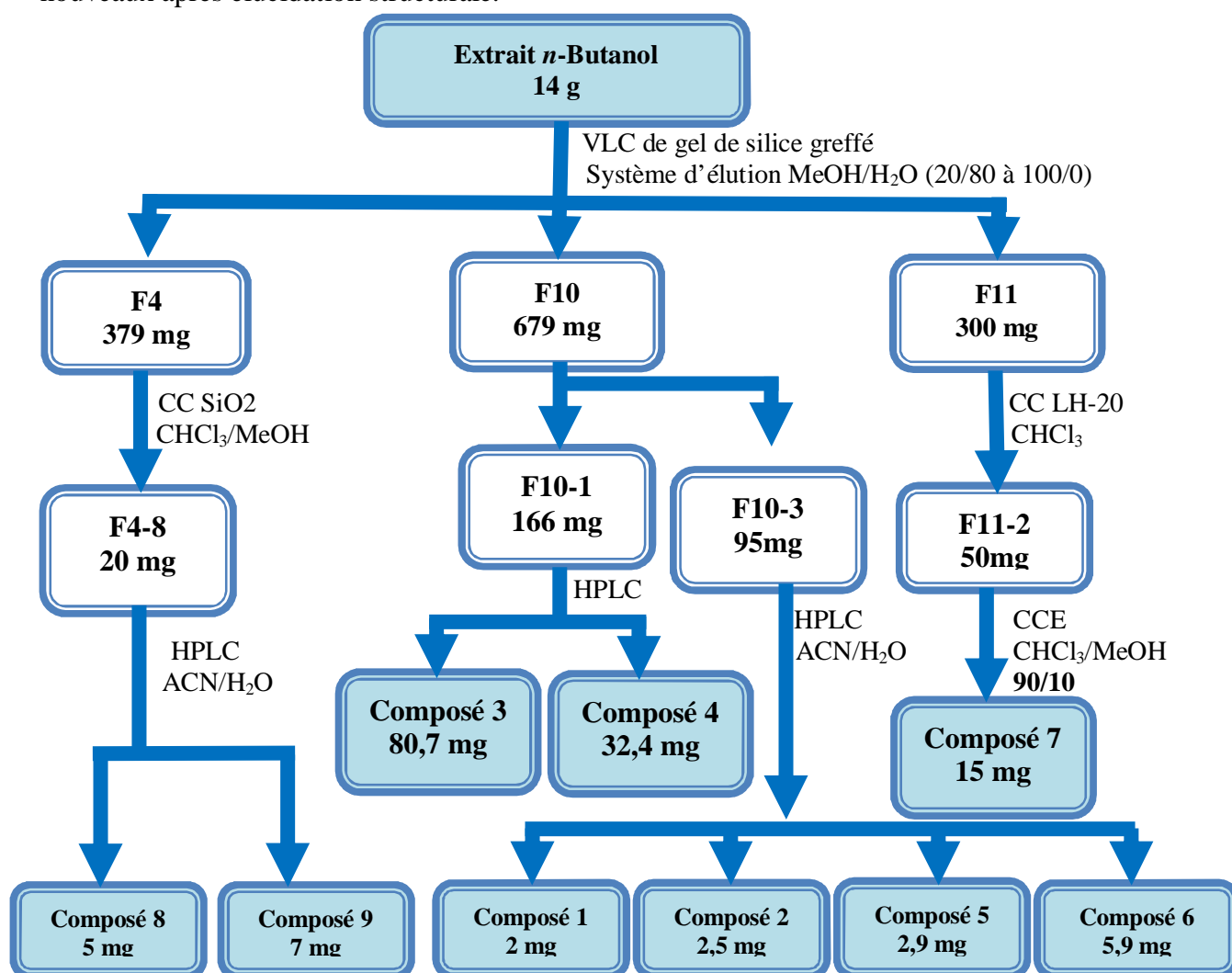
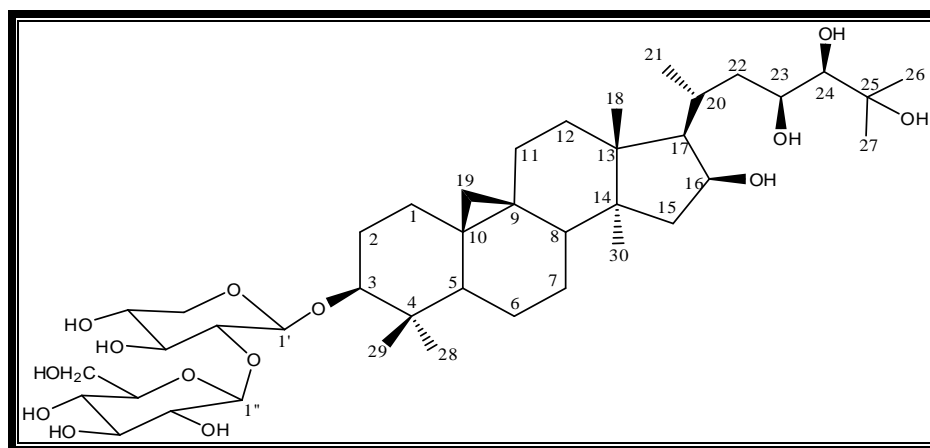


Figure III.3: Schéma de purification des produits de l'extrait *n*-BuOH de *Astragalus gombo*

III.2.3 Caractérisation des produits obtenus

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

III.2.3.1 Elucidation structurale du composé 1



3-O-[[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-3 β ,16 β ,23(R),24(R),25-pentahydroxycycloartane (1)

Le spectre de masse ESI du composé **1** enregistré en mode positif (Figure III.4), présente un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 809 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire de 786 uma, correspondant à la formule moléculaire $C_{41}H_{70}O_{14}$. Cette dernière est confirmée par le spectre de masse à haute résolution HRESIMS (Figure III.5) qui montre un pic à m/z 809,5589 (calc. $C_{41}H_{70}O_{14}Na$, 809,4658).

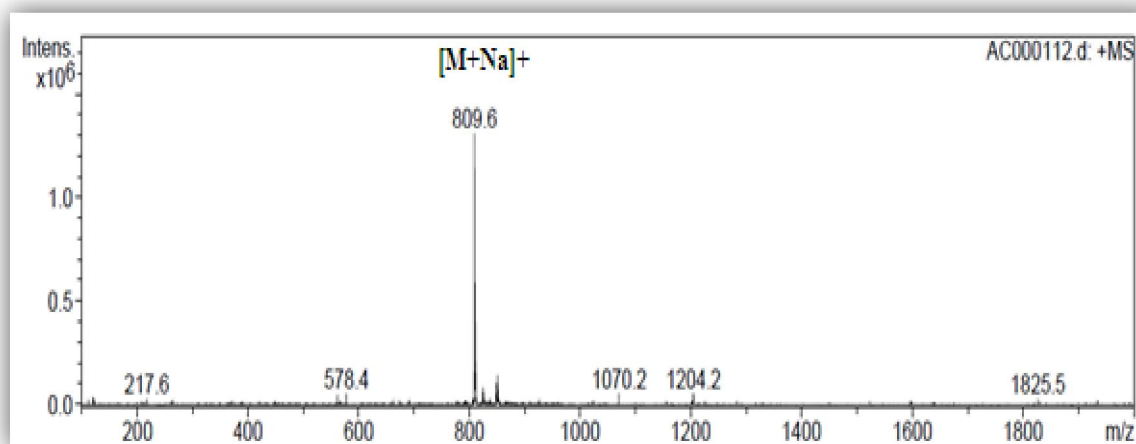


Figure III.4: Spectre de masse ESIMS du composé 1

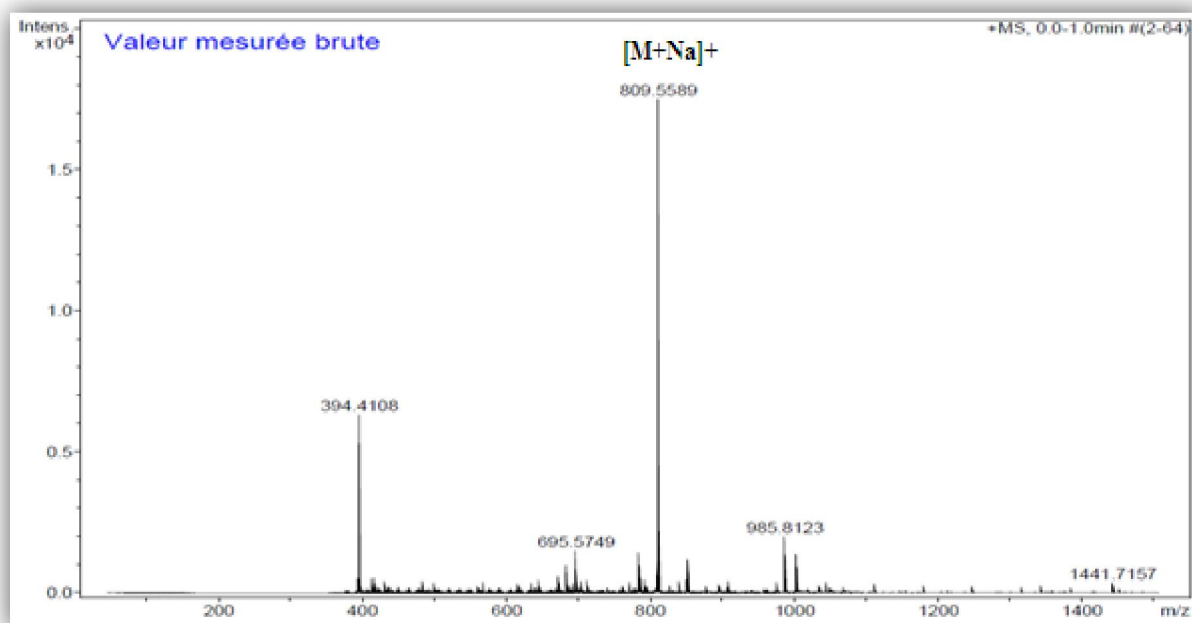


Figure III.5: Spectre de masse HRESIMS du composé 1

Le spectre RMN ^1H (Figure III.6) de ce composé, enregistré dans le méthanol deutéré, permet d'observer les signaux suivants:

- ❖ sept signaux à champ fort résonant à δ_{H} 0,91 (3H, *s*, H-29), 0,95 (3H, *s*, H-30), 1,05 (3H, *d*, $J = 6,5$ Hz, H-21), 1,09 (3H, *s*, H-28), 1,22 (3H, *s*, H-18), 1,24 (3H, *s*, H-27), 1,25 (3H, *s*, H-26), attestant de la présence de sept groupements méthyles.
- ❖ deux signaux fortement blindés résonant sous forme de doublet à δ_{H} 0,40 (1H, *d*, $J = 4,0$ Hz, H-19 *exo*), 0,62 (1H, *d*, $J = 4,0$ Hz, H-19 *endo*) très caractéristiques de deux protons non équivalents d'un noyau cyclopropane [77, 78, 79].
- ❖ un signal sous forme de doublet de doublet à δ_{H} 3,24 (1H, *dd*, $J = 8,1; 4,2$ Hz) d'un proton porté par un carbone oxyméthine (H-3).

Ces premiers éléments montrent clairement que le composé est de nature triterpénique à squelette cycloartane. Ce squelette est particulièrement présent, voire dominant au sein du genre *Astragalus* [18, 19, 20].

Le même spectre montre également la présence de plusieurs signaux entre 3 et 5 ppm caractéristiques de protons osidiques ainsi que deux signaux d'intégration 1H chacun à δ_{H} 4,47 (*d*, $J = 7,9$ Hz), 4,68 (*d*, $J = 7,7$ Hz) de deux protons anomères de sucres, établissant ainsi que le composé **1** est une saponine cycloartanique.

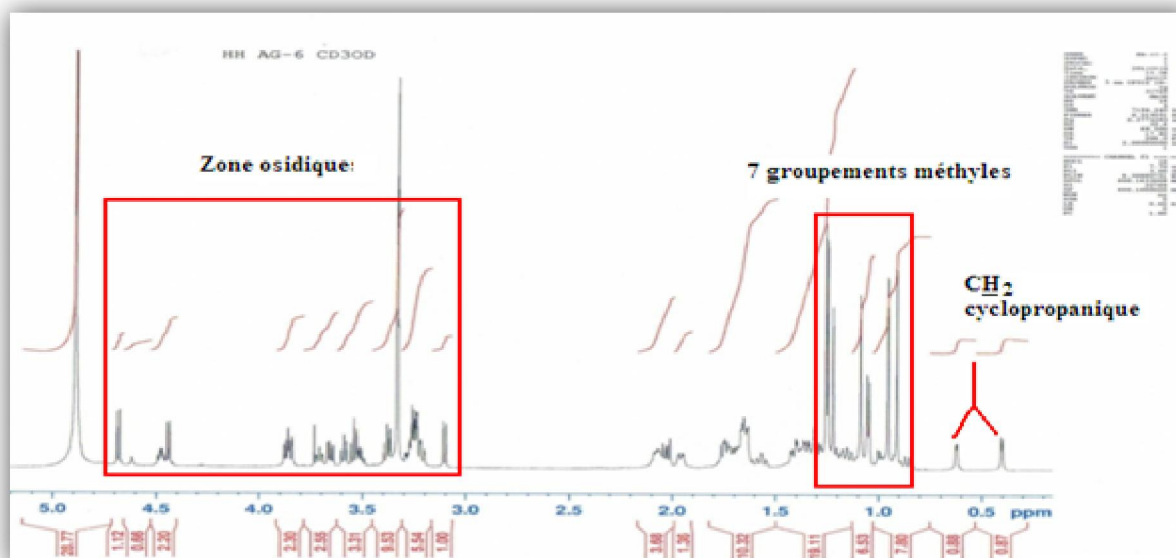


Figure III.6: Spectre RMN ^1H du composé 1

Les spectres RMN ^{13}C et RMN ^{13}C DEPT (Figures III.7 et III.8) montrent les signaux correspondant à sept méthyles, huit méthylènes, huit méthines et six atomes de carbone quaternaires, confirmant la nature triterpénique du composé. La nature glycosidique de ce dernier y est également confirmée par l'observation de deux signaux de carbones anomères de sucres à δ_{C} 104,5 (C-1') et 103,2 (C-1'') ainsi des signaux allant de 61,6 à 79,6 ppm caractéristiques de carbones osidiques (Figure III.7).

Par ailleurs, le signal carbone à 89,3 ppm observé sur les mêmes spectres, est attribuable au carbone oxyméthine C-3 du triterpène. Le déblindage important de ce dernier (+10 ppm) comparé à celui du même carbone porteur d'un OH libre (78,3 ppm) [80], traduit bien une substitution à ce niveau, sans nul doute par une unité osidique.

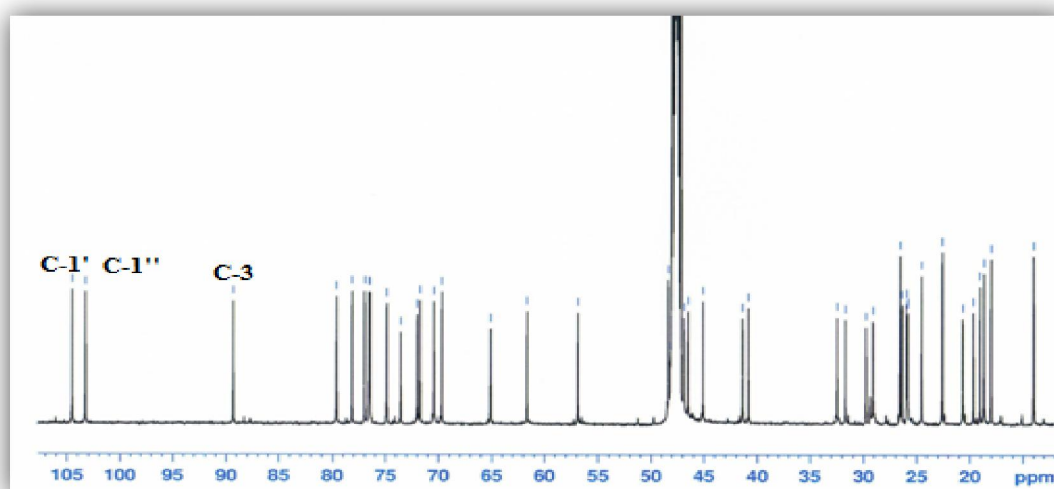


Figure III.7: Spectre RMN ^{13}C du composé 1

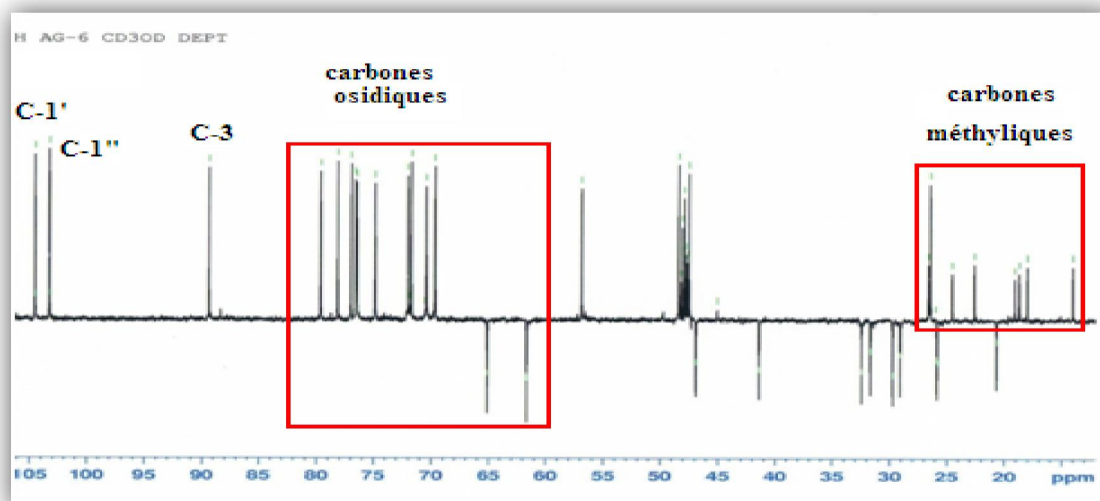


Figure III.8: Spectre RMN ¹³C DEPT du composé 1

L'élucidation structurale du composé 1 sera présentée en deux parties distinctes: l'une consacrée à l'identification de la génine et l'autre à la partie osidique.

Identification de la génine

A partir des protons méthyliques cités précédemment, l'expérience hétéronucléaire HSQC permet d'identifier les carbones qui les portent (Figure III.9). Ces derniers sont repérés à 26,5 (C-27), 24,5 (C-28), 22,5 (C-26), 19,0 (C-30), 18,4 (C-18) et 14,0 ppm (C-29). Elle permet également, à partir des protons cyclopropaniques H₂-19, d'identifier le carbone C-19 (δ_C 29,8) qui les porte.

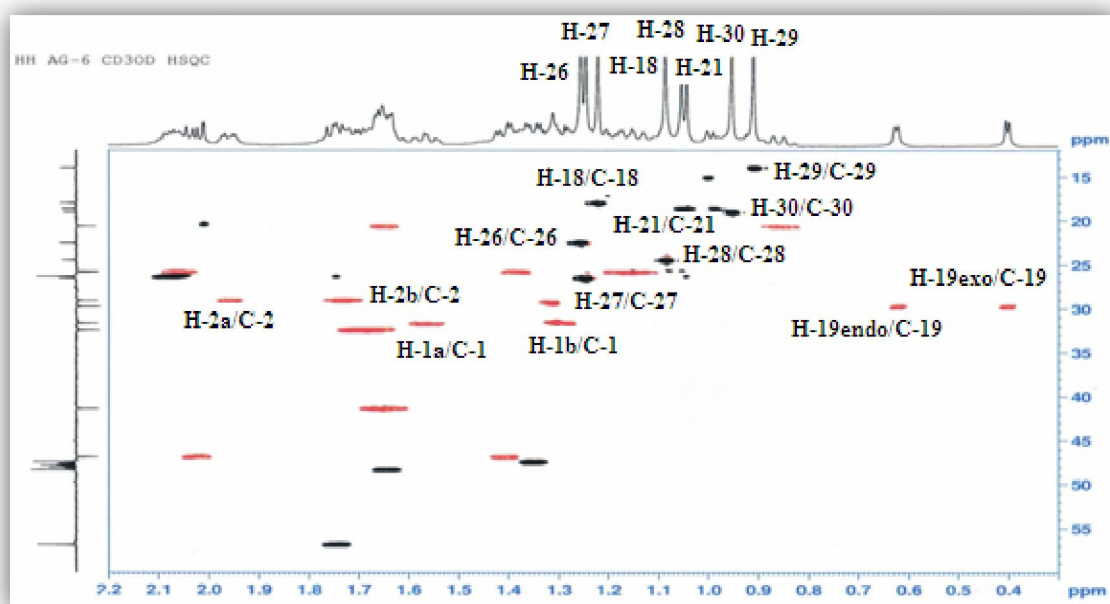


Figure III.9: Spectre HSQC de la partie génine du composé 1

La même expérience confirme l'attribution du signal du carbone C-3 (89,3 ppm) faite précédemment (Figure IV.10).

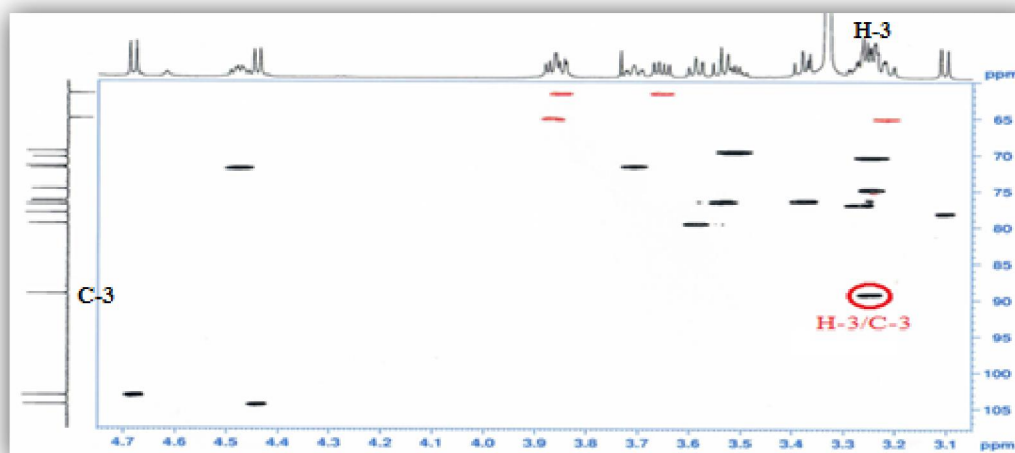


Figure III.10: Spectre HSQC de la partie génine du composé 1

L'expérience HMBC (Figures III.11, III.12 et III.13) et particulièrement dans le cas de triterpènes, constitue l'outil idéal en matière d'élucidation structurale car permettant de caractériser un grand nombre de carbones de la génine par observation de leurs couplages en 2J et 3J avec les protons méthyliques angulaires, chacun corrélant au maximum avec quatre atomes de carbone. Ainsi:

- ❖ les méthyles 28 et 29 géminés résonant respectivement à 1,09 et 0,91 ppm sont les seuls à corrélérer avec le carbone C-3 préalablement identifié (δ_c 89,3). Ils corrèlent également avec le carbone quaternaire C-4 (δ_c 40,8) et le carbone C-5 (δ_c 47,4) (Figure III.11).

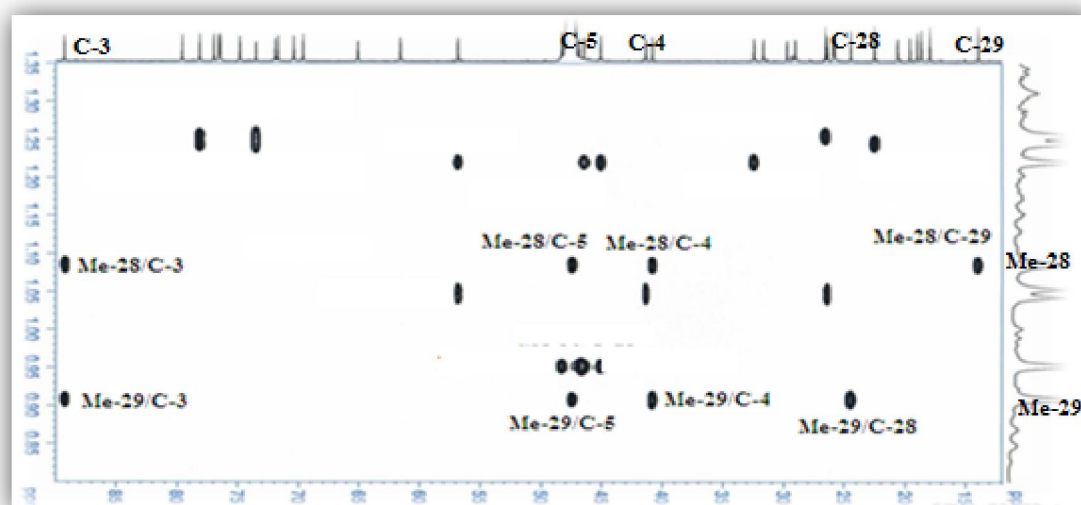


Figure III.11: Spectre HMBC de la partie génine du composé 1

- ❖ Le proton H-5 résonant à 1,35 ppm (1H, *dd*, $J = 12,5; 4,2$ Hz), identifié par expérience HSQC, montre sur la carte HMBC cinq taches de corrélation avec les carbones C-4 ($\delta_C 40,8$) et C-3 ($\delta_C 89,3$) déjà identifiés, un carbone quaternaire ($\delta_C 25,9$) ne pouvant être que C-10, le carbone méthylique C-29 et un carbone secondaire attribué à C-6 ($\delta_C 20,6$) (Figures III.12). Ce dernier a été également identifié par HSQC du fait de sa corrélation directe avec les deux protons H-6 repérés à 1,65 et 0,85 ppm, eux-mêmes déterminés par expérience COSY H-H du fait du couplage vicinal H-5 ($\delta_H 1,35$)/H-6.

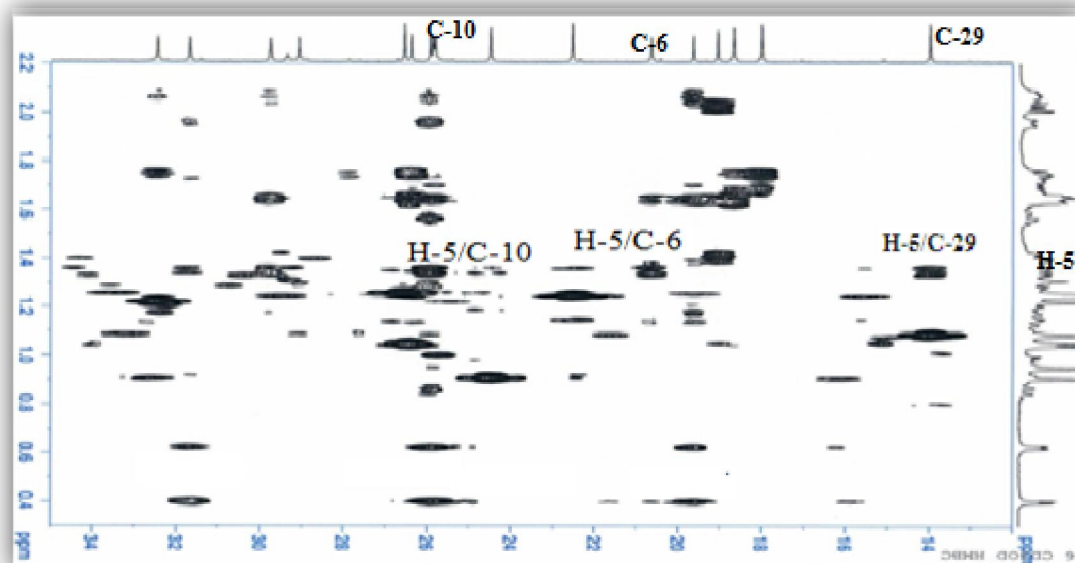


Figure III.12: Spectre HMBC de la partie génine du composé 1

- ❖ Les protons méthyliques CH₃-30 ($\delta_H 0,95$, *s*) sont préalablement caractérisés sur la base de leur corrélation CH longue distance avec le carbone C-8 ($\delta_C 48,3$), lui-même identifié du fait également de son couplage $^3J_{C-H}$ avec les protons H-19 du système cyclopropanique ($\delta_H 0,40; 0,62$). L'analyse HMBC montre les autres corrélations de ces protons méthyliques CH₃-30 avec le carbone secondaire C-15 ($\delta_C 46,9$) et les deux carbones quaternaires à signaux superposables, C-13 et C-14 ($\delta_C 46,5$) (Figure III.13).
- ❖ Les protons méthyliques CH₃-18 ($\delta_H 1,22$, *s*) corrélient en plus des carbones C-13 et C-14 identifiés, avec le carbone secondaire C-12 ($\delta_C 32,4$) et le carbone primaire C-17 ($\delta_C 56,7$) (Figure III.13).

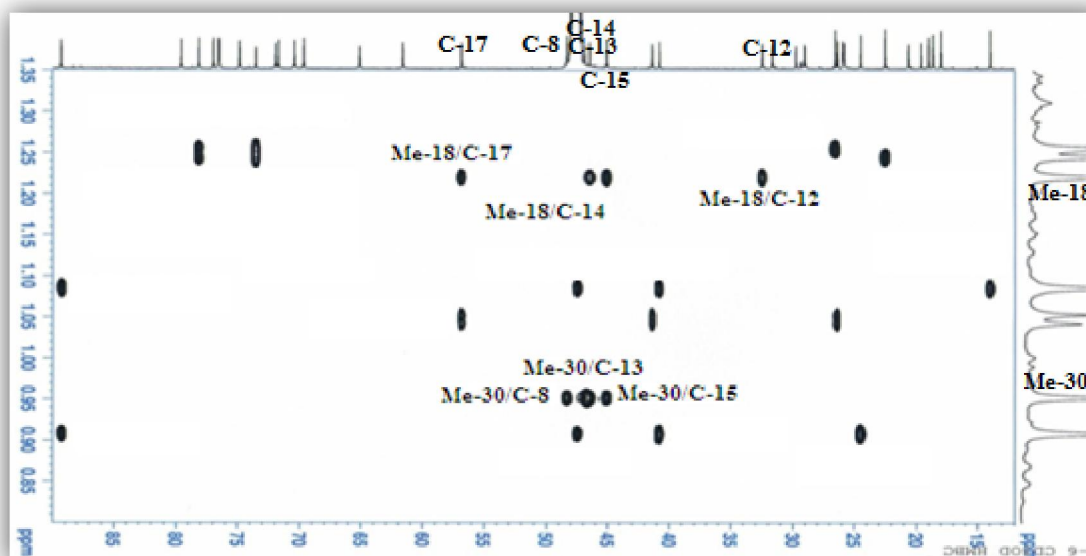


Figure III.13: Spectre HMBC de la partie génine du composé 1

Comme on le voit, le spectre HMBC a permis de caractériser la quasi-totalité des carbones du noyau cycloartane, du fait des corrélations observées à partir des méthyles angulaires. Les corrélations observées entre les protons cyclopropaniques H₂-19 et le carbone secondaire C-11 (δ_C 25,9) d'une part, et entre le proton H-3 (δ_H 3,24) et le carbone C-1 (δ_C 31,7) d'autre part, complètent pour une grande partie la caractérisation des carbones constituant le squelette cycloartane.

La figure III.14 ci-dessous reproduit les corrélations HMBC observées notamment à partir des méthyles CH₃-18, CH₃-28, CH₃-29, CH₃-30.

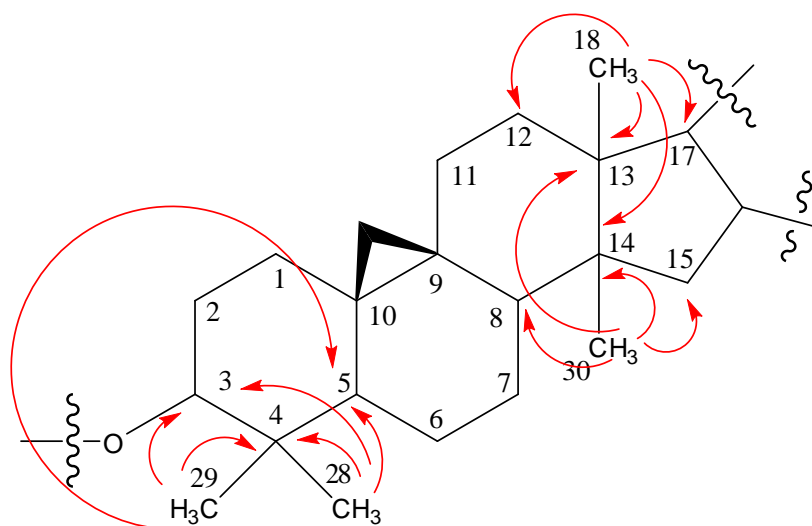


Figure III.14: Corrélations HMBC des méthyles Me-18, Me-28, Me-29 et Me-30

Il reste maintenant à élucider la nature des substituants (non osidiques) et leur position au sein du noyau cycloartane.

Le spectre COSY H-H (Figure III.15) montre clairement une corrélation entre les protons H-15 (δ_H 2,03; 1,40) identifiés par expérience HSQC et le proton H-16 de la génine sortant à 4,70 ppm (1H, *td*, $J = 7,6; 5,2$ Hz). Cette valeur de déplacement chimique conjuguée à celle du carbone C-16 (δ_C 72,0) caractérisé par expérience HSQC montre que ce dernier est porteur d'un groupement hydroxyle.

En outre, la même expérience met en évidence la présence d'un système de spins à travers les corrélations H-16/H-17, H-17 et un proton nommé H-20 (1H, *m*) repéré à 2,04 ppm, H-20 et les protons méthyliques CH₃-21 (*d*, $J = 6,5$ Hz), H-20 et deux protons H-22 à 1,66 ppm, H-22 et un proton oxyméthine sortant à 3,71 ppm nommé H-23 (*ddd*, $J = 10,5; 8,2; 2,3$ Hz), H-23 et un autre proton oxyméthine H-24 à 3,1 ppm (*d*, $J = 8,2$ Hz). Ce système (Figure III.16) substitue le noyau cycloartane en C-17. Ceci est confirmé par expérience HMBC qui montre une corrélation entre les protons méthyliques H-21 et C-17. Partant du proton H-24 (δ_H 3,10), l'expérience HMBC qui montre des corrélations longue distance avec les carbones de deux groupements méthyles CH₃-26 (δ_C 22,5) et CH₃-27 (δ_C 26,5) ainsi qu'un carbone quaternaire C-25 repéré à 73,5 ppm, permet d'identifier la structure du substituant en C-17.

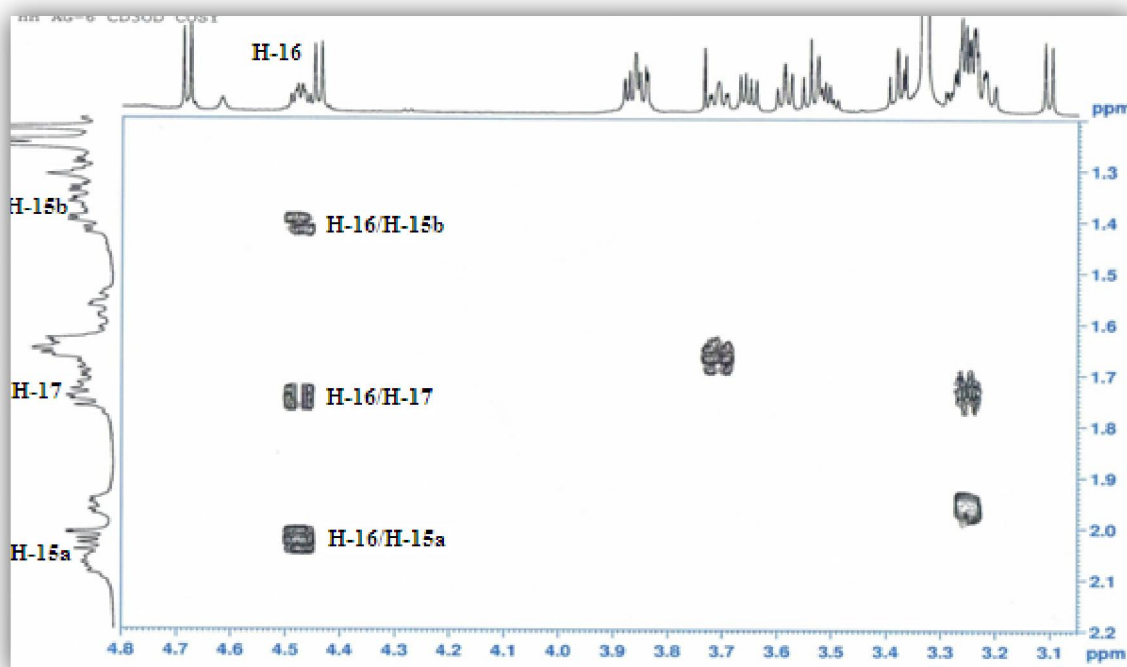


Figure III.15: Spectre COSY H-H de la partie génine du composé 1

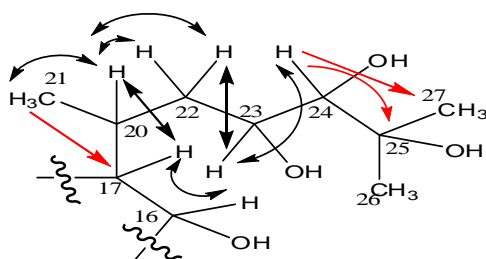


Figure III.16: Corrélations COSY H-H et HMBC de la chaîne latérale du composé 1

L'expérience ROESY s'est avérée judicieuse pour assigner la stéréochimie de la génine, particulièrement au niveau de la chaîne latérale (Figures III.17, III.18 et III.19). Il faut signaler d'abord la position β du groupement méthylène CH_2 -19 qui concerne tous les composés à squelette 9,19-cyclotriterpénoïde [81]. L'effet ROE observé sur le spectre ROESY enregistré dans CD_3OD entre le proton H-19 *endo* (δ_{H} 0,62) et les protons méthyliques Me-29 et Me-18, confirme l'orientation β -axiale de ces groupements. L'absence de corrélation H-19/H-5 montre que le proton H-5 est α orienté. Des effets ROE sont visualisés également entre les protons H-19 *endo* et H-8 β ainsi qu'entre les protons méthyliques Me-30 α et le proton H-17. Il y est observé également les corrélations Me-18 β /H-20 et Me-21 α /H-23. Par ailleurs, la constante de couplage du proton H-3 ($J = 8,1$ Hz) et l'effet ROE H-3/H-5 α indique qu'il est α -orienté.

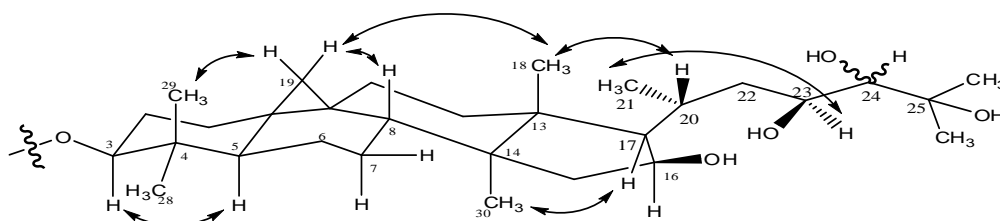


Figure III.17: Principales corrélations ROE (CD_3OD) observées pour le composé 1

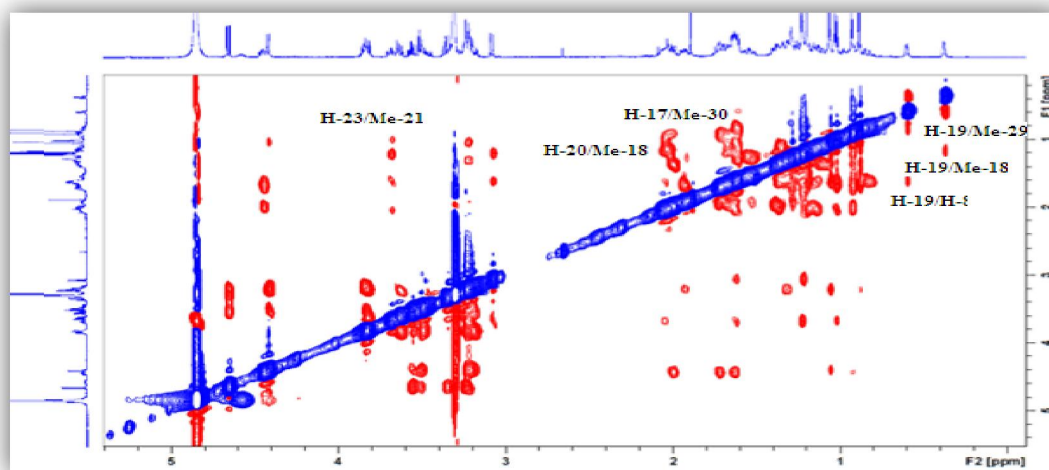


Figure III.18: Spectre ROESY(CD_3OD) de la partie génine du composé 1

Seule persiste la détermination de la stéréochimie au niveau du carbone C-24. En se basant sur les déplacements chimiques des carbones C-24 (δ_C 79,6) et C-23 (δ_C 71,7), la grande valeur de constante de couplage $^3J_{H-23/H-24}$ (8,2 Hz) ainsi que les effets ROE observés sur le spectre ROESY enregistré dans la pyridine (Figure III.19), notamment entre Me-21 (δ_H 1.21)/ H-23 (δ_H 4.35), OH-23 (δ_H 6.85, d, $J = 2.2$ Hz)/H-20 (δ_H 2.60) et H-24 (δ_H 3.78)/H-22b (δ_H 2.20) qui se sont avérés totalement identiques à ceux observés dans le cas de l'ermophiloside C antérieurement isolé de *Astragalus eremophilus* [23] et possédant la même chaîne latérale, il apparaît clairement que le composé **1** possède la même configuration *R* au niveau des carbones C-23 et C-24. L'orientation α du proton H-16 est confirmée par l'effet ROE H-20 β /OH-16.

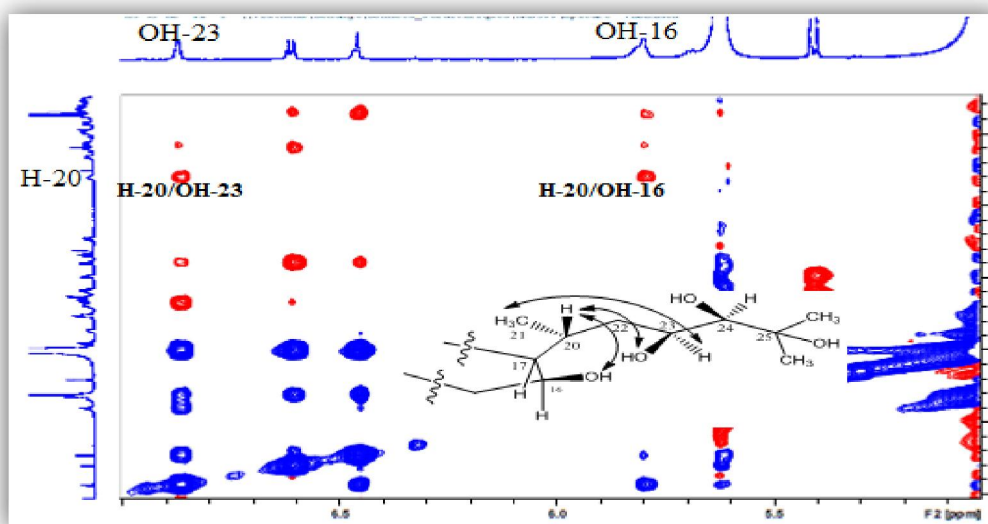
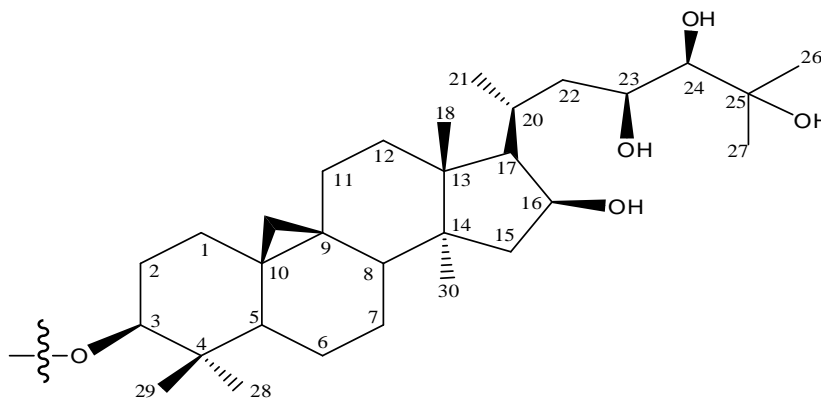


Figure III.19: Spectre ROESY (pyridine- d_5) de la partie génine du composé **1**

Toutes ces données spectrales se sont avérées similaires à celles observées pour une génine connue sous le nom de cycloorbiginine C isolée de deux espèces d'astragale: *A. orbiculatus* [82] et *A. eremophilus* [23]. La seule différence se résume à la disparition de groupement OH en C-6 laissant la place du groupement CH_2 -6.



Identification du sucre

Comme il a été avancé plus haut, deux signaux de protons anomères résonnant à 4,47 (*d*, *J* = 7,9 Hz) et 4,68 ppm (*d*, *J* = 7,7 Hz) ont été visualisés sur le spectre RMN ^1H (Figure III.20). Les signaux de leurs carbones respectifs résonnant à δ_{C} 104,5 (C-1') et 103,2 (C-1'') ont été assignés par expérience HSQC (Figure III.21).

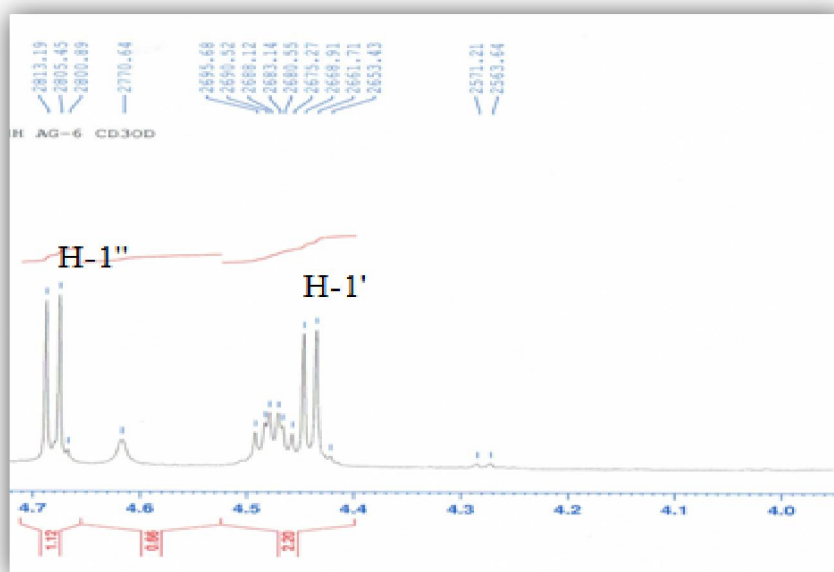


Figure III.20: Spectre RMN ^1H mettant en évidence les protons anomères (composé 1)

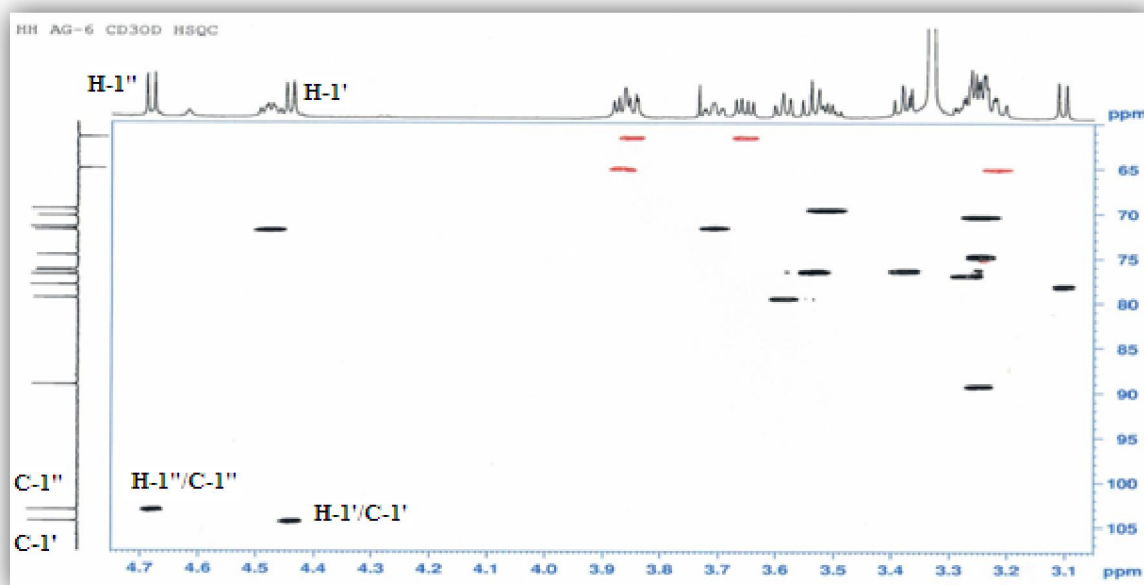


Figure III.21: Spectre HSQC mettant en évidence les protons et carbones anomères

L'identification des deux unités osidiques repose essentiellement sur l'expérience COSY H-H (Figure III.22). A partir du proton anomère H-1' résonant à 4,47 ppm (d , $J = 7,9$ Hz), il est observé les couplages H-1'/H-2' (δ_H 3,59, t , $J = 7,9$ Hz), H-2'/H-3' (δ_H 3,54, t , $J = 7,9$ Hz), H-3'/H-4' (δ_H 3,51, m), H-4'/H-5'a (δ_H 3,86, dd , $J = 11,5; 4,7$ Hz) et enfin H-5'a/H-5'b (δ_H 3,21, m). Ces corrélations traduisent la présence d'un pentose. Les grandes valeurs de constantes de couplage permettent d'identifier un xylose de configuration β ($J_{1'-2'} = 7,9$ Hz).

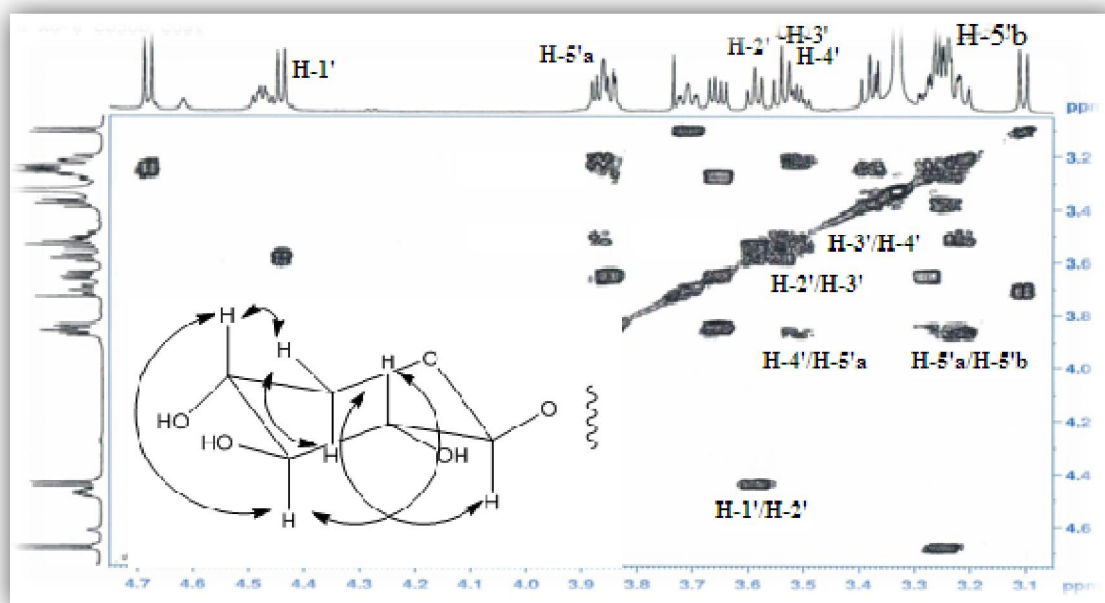


Figure III.22: Spectre COSY H-H de l'unité β -D-xylose

L'analyse HSQC (Figure III.23) permet de caractériser tous les carbones du xylose à travers les corrélations entre :

- Le proton anomère H-1' et son carbone C-1' résonant à 104,5 ppm
- Le proton H-2' et son carbone C-2' résonant à 79,6 ppm
- Le proton H-3' et son carbone C-3' résonant à 76,5 ppm
- Le proton H-4' et son carbone C-4' résonant à 69,7 ppm
- Les protons H-5'a et H-5'b et leur carbone C-5' résonant à 65,1 ppm.

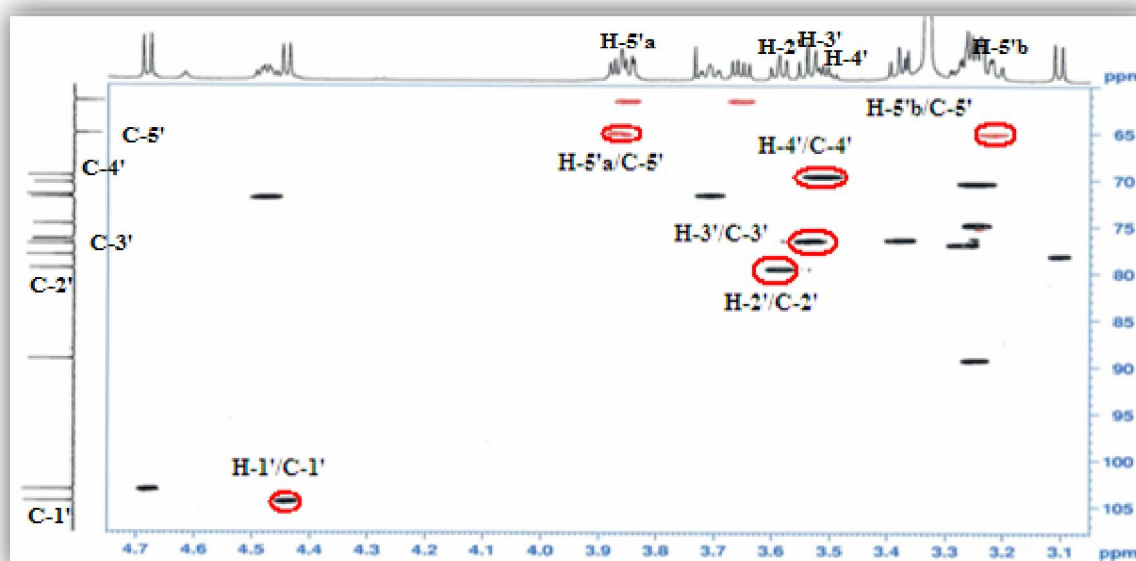


Figure III.23: Spectre HSQC de l'unité β -D-xylose

A partir du deuxième proton anomère H-1'' sortant à 4,68 ppm (d , $J = 7,7$ Hz), l'expérience COSY H-H permet d'identifier un système de spins à sept protons d'un hexose (Figure III.24). En effet, cette dernière permet de visualiser les corrélations:

- H-1''/H-2'' [δ_H 3,25 (dd , $J = 8,6; 7,7$ Hz)]
- H-2''/H-3'' [δ_H 3,38 (t , $J = 8,6$ Hz)]
- H-3''/H-4'' [δ_H 3,24 (t , $J = 8,6$ Hz)]
- H-5'' [δ_H 3,28 (ddd , $J = 8,6; 6,5; 5,9$ Hz)]/ H-6b'' [δ_H 3,66 (dd , $J = 11,2; 5,9$ Hz)]
- H-6b''/H-6a'' [δ_H 3,85 (dd , $J = 11,2; 6,5$ Hz)]
-

Les grandes valeurs de constantes de couplage traduisant une position axiale des protons H-1'' jusqu'à H-5'', montrent qu'on est en présence d'un D-glucose de configuration β ($J_{1''-2''} = 7,7$ Hz).

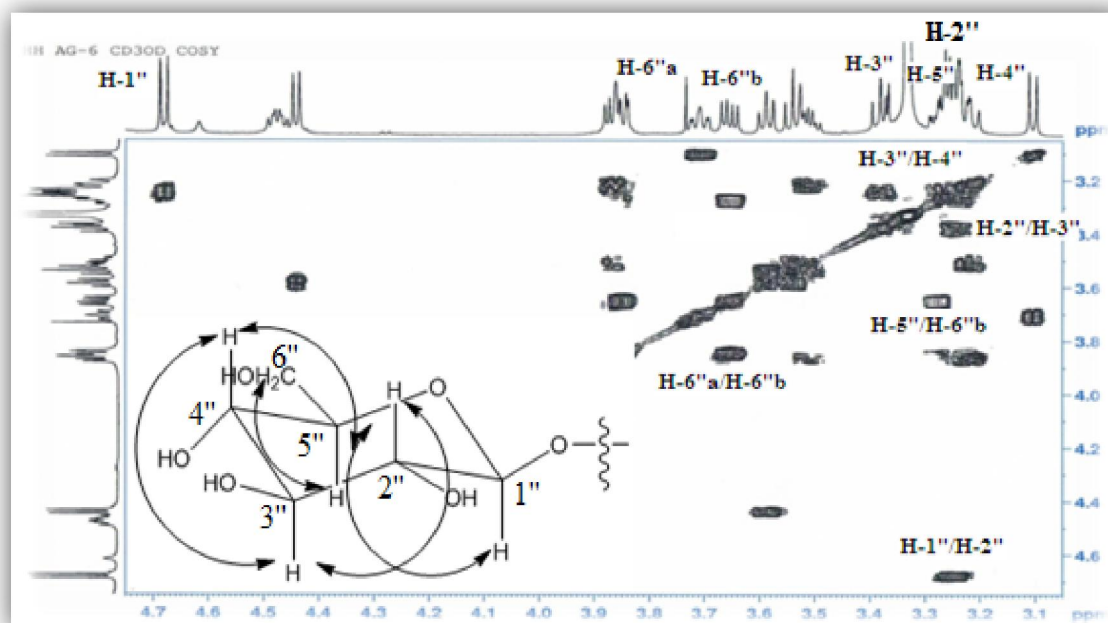


Figure III.24: Spectre COSY H-H du β -D-glucose

Les déplacements chimiques des carbones du glucose sont assignés sans ambiguïté par analyse HSQC (Figure III.25).

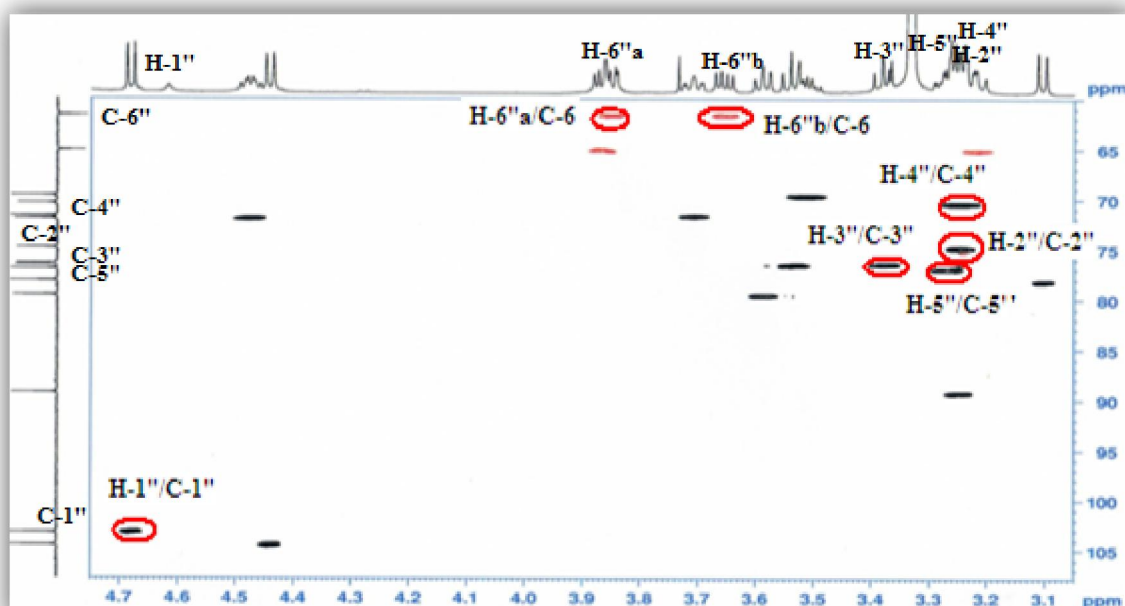


Figure III.25: Spectre HSQC de la partie osidique

Le spectre HMBC (Figure III.26) montre clairement le caractère monodesmosidique en C-3 de la saponine et cela par l'observation de la corrélation attendue entre le proton H-1' du xylose et le carbone C-3 (δ_C 89,3) de la génine d'une part, et la corrélation interglycosidique

entre le proton H-1'' (δ_H 4,68) du glucose et le carbone C-2' (δ_C 79,6) du xylose. Ces deux unités osidiques forment donc en C-3 l'enchaînement [β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl].

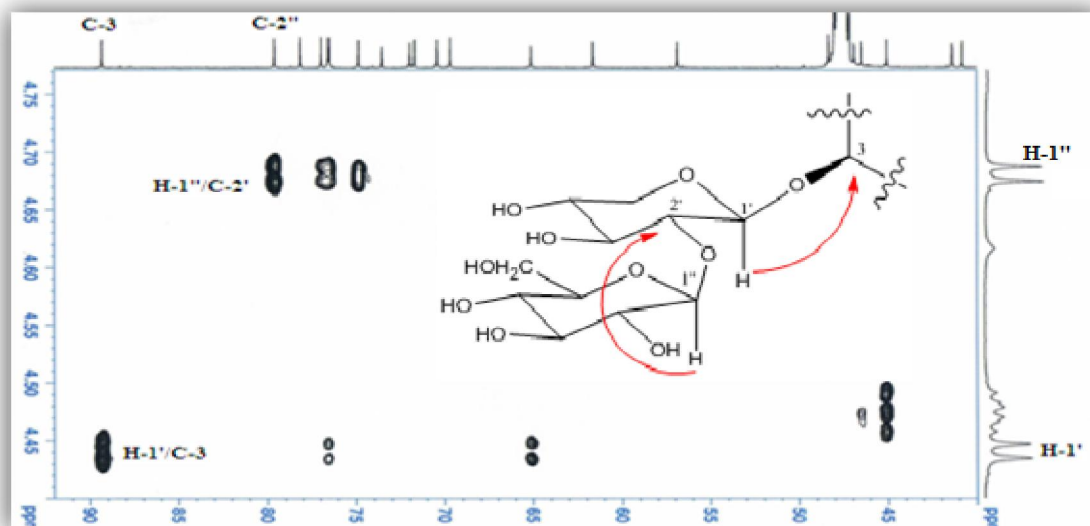
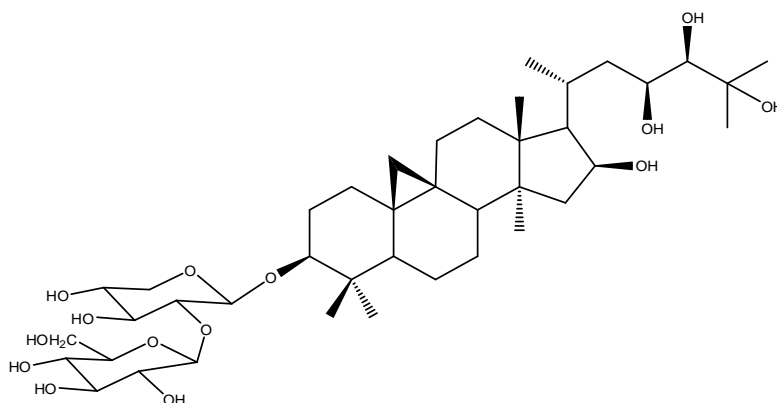


Figure III.26: Spectre HMBC mettant en évidence la séquence des sucres

Toutes ces données spectrales (Tableau III.1) permettent d'attribuer sans ambiguïté au composé **1** la structure suivante: 3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-3 β ,16 β ,23(R),24(R),25-pentahydrocycloartane, appelée aussi gomboside A. Cette saponine s'est avérée nouvelle.



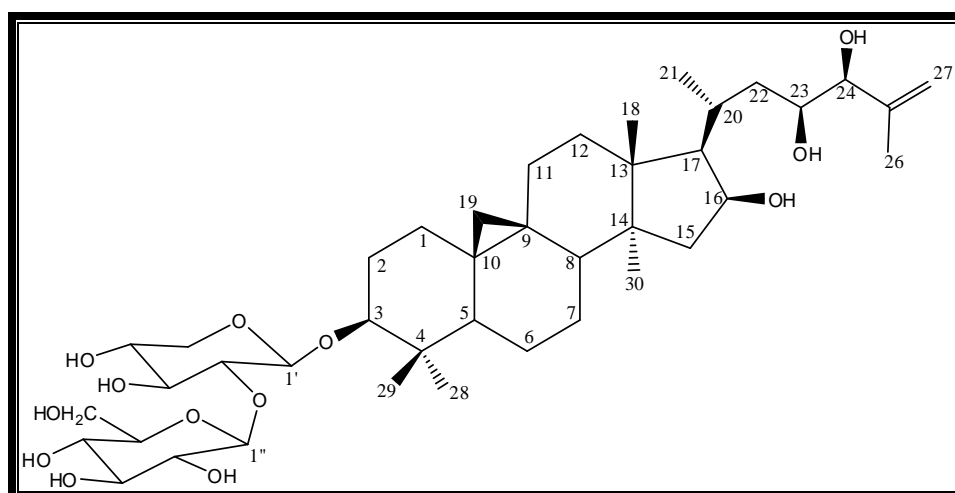
Le tableau suivant reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **1**.

Tableau III.1: Déplacements chimiques RMN 1H et ^{13}C du composé **1** dans CD_3OD

Position	δ_C (ppm)	δ_H (m, J en Hz)
1	31,7	1,56 -1,30 (m)
2	29,1	1,96-1,72 (m)
3	89,3	3,24 (dd, 8,1; 4,2)

4	40,8	-
5	47,4	1,35 (<i>dd</i> , 12,5; 4,2)
6	20,6	1,65-0,85 (<i>m</i>)
7	25,9	1,39-1,15 (<i>m</i>)
8	48,3	1,65 <i>nd</i>
9	19,6	-
10	25,9	-
11	25,9	2,05-1,15 (<i>m</i>)
12	32,4	1,7 (<i>m</i>)
13	46,5	-
14	46,5	-
15	46,9	2,03 (<i>dd</i> , 12,4; 7,6) 1,40 (<i>dd</i> , 12,4; 5,2)
16	72,0	4,70 (<i>td</i> , 7,6; 5,2)
17	56,7	1,75 (<i>dd</i> , 11,3; 7,6)
18	18,4	1,22 (<i>s</i>)
19	29,8	0,62 (<i>d</i> , 4,0) 0,40 (<i>d</i> , 4,0)
20	26,4	2,04 (<i>m</i>)
21	18,7	1,05 (<i>d</i> , 6,5)
22	41,4	1,66 (<i>m</i>)
23	71,7	3,71 (<i>ddd</i> , 10,5; 8,2; 2,3)
24	79,6	3,10 (<i>d</i> , 8,2)
25	73,5	-
26	22,5	1,25 (<i>s</i>)
27	26,5	1,24 (<i>s</i>)
28	24,5	1,09 (<i>s</i>)
29	14,0	0,91 (<i>s</i>)
30	19,0	0,95 (<i>s</i>)
1'	104,5	4,47 (<i>d</i> , 7,9)
2'	79,6	3,59 (<i>t</i> , 7,9)
3'	76,5	3,54 (<i>t</i> , 7,9)
4'	69,7	3,51 (<i>m</i>)
5'	65,1	3,86 (<i>dd</i> , 11,5; 4,7) 3,21 (<i>m</i>)
1''	103,2	4,68 (<i>d</i> , 7,7)
2''	74,8	3,25 (<i>dd</i> , 8,6; 7,7)
3''	76,5	3,38 (<i>t</i> , 8,6)
4''	70,4	3,24 (<i>t</i> , 8,6)
5''	77,0	3,28 (<i>ddd</i> , 8,6; 6,5; 5,9)
6''	61,6	3,85 (<i>dd</i> , 11,2; 6,5) 3,66 (<i>dd</i> , 11,2; 5,9)

III. 2.3.2 Elucidation structurale du composé 2



3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-3 β ,16 β ,23(R),24(R)-tetrahydroxy-25-dehydrocycloartane (2)

Le spectre de masse ESI du composé 2 (Figure III.27), enregistré en mode positif, présente un pic d'ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 791, soit une masse moléculaire de 768 uma correspondant à une formule brute en $C_{41}H_{68}O_{13}$.

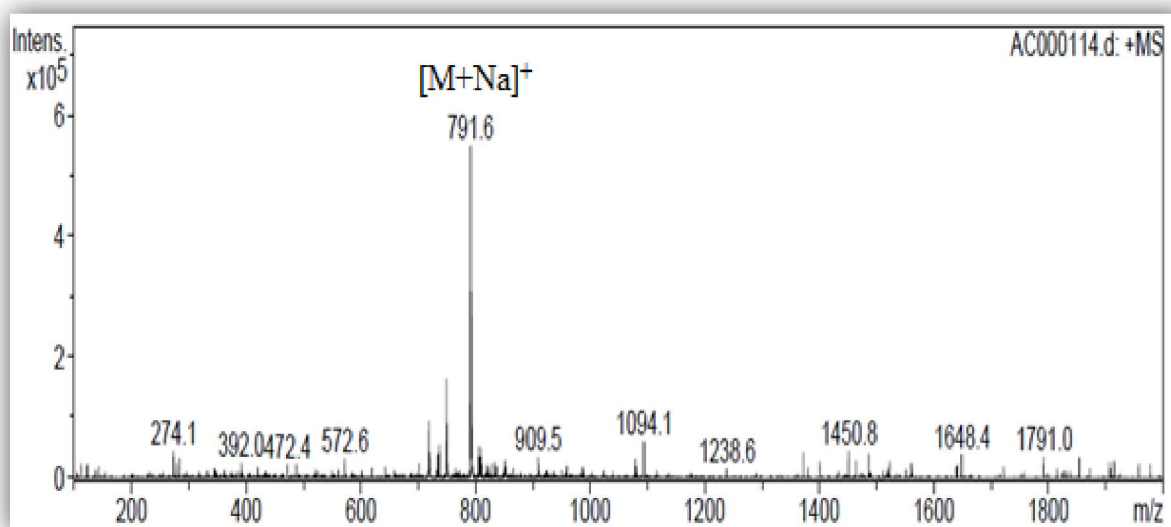


Figure III.27: Spectre de masse ESI⁺ du composé 2

Cette formule est confirmée par le spectre de masse à haute résolution HRESIMS (Figure III.28) qui montre un pic à m/z 791,5493 (calc. $C_{41}H_{68}O_{13}Na$, 791,4552).

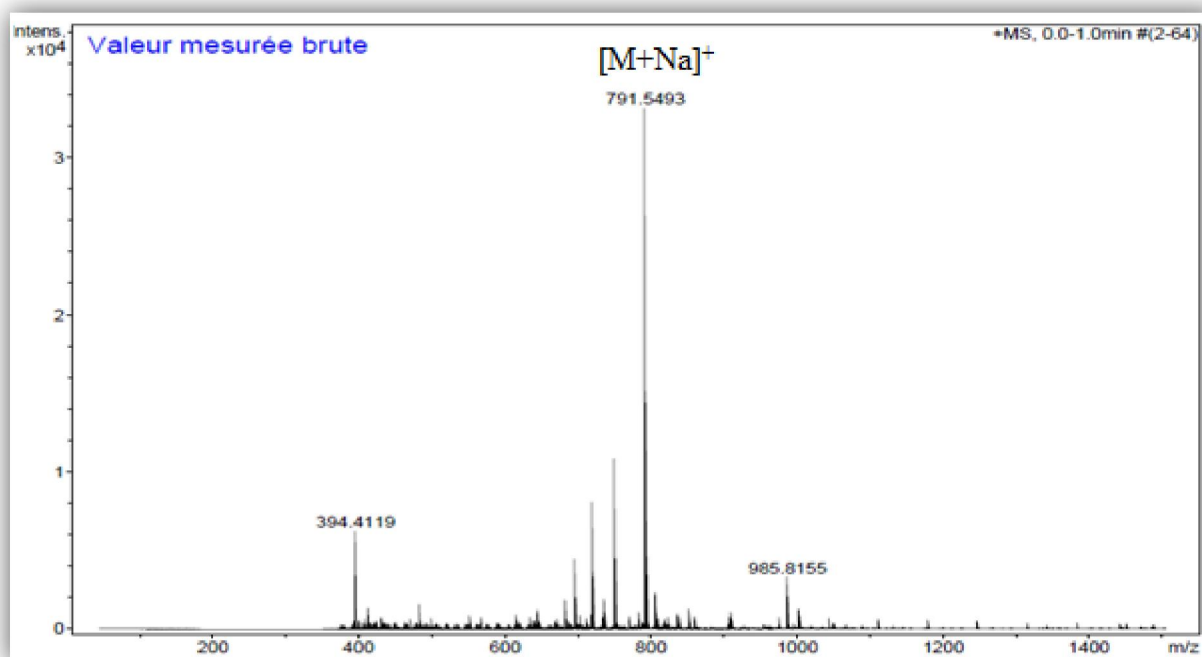


Figure III.28: Spectre de masse HRESIMS du composé 2

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C DEPT (Figures III.29 et III.30) de ce composé présentent de grandes similitudes avec ceux du composé **1** décrit précédemment. D'abord, Ils permettent de reconnaître quasiment tous les signaux des protons et carbones constituant la génine. Il est notamment observé:

- ❖ six signaux de protons méthyliques résonant à δ_{H} 0,88 (3H, *s*, H-29), 0,93 (3H, *s*, H-30), 0,99 (3H, *d*, $J = 6,7$ Hz, H-21), 1,05 (3H, *s*, H-28), 1,18 (3H, *s*, H-18) et enfin δ_{H} 1,76 (3H, *s*, H-26). La valeur de déplacement chimique (1,76 ppm) des protons de ce dernier groupement et la présence de six groupements au lieu de sept (composé **1**) s'imposent d'emblée comme une première différence.
- ❖ deux signaux fortement blindés sous forme de doublet à δ_{H} 0,38 (1H, *d*, $J = 3,9$ Hz, H-19 exo), 0,60 (1H, *d*, $J = 3,9$ Hz, H-19 endo) des deux protons non équivalents du noyau cyclopropane.
- ❖ les signaux des protons et carbones des groupements oxyméthine H-3, H-16, H-23 et H-24 résonant respectivement à δ_{H} 3,23 (*dd*, $J = 11,6; 4,4$ Hz)/ δ_{C} 90,8; 4,45 (*m*)/ δ_{C} 73,6; 3,64 (*dd*, $J = 11,4; 5,7$ Hz)/ δ_{C} 72,2 et 3,88 (*d*, $J = 5,7$ Hz)/ δ_{C} 80,3.

L'analyse conjointe des spectres HSQC, HMBC et COSY H-H confirment effectivement la similitude de la génine du composé **1** avec celle du composé **2**. La différence notable réside en l'apparition sur le spectre RMN ^1H de signaux à δ_{H} 4,98 (1H, *sl*, H-27a) et 4,90 (1H, *sl*, H-27b) et sur le spectre RMN ^{13}C de deux signaux de carbones éthyléniques

146,7 et 113,2 ppm, attestant de la présence d'un groupement méthylène exocyclique (Figures III.29 et III.30).

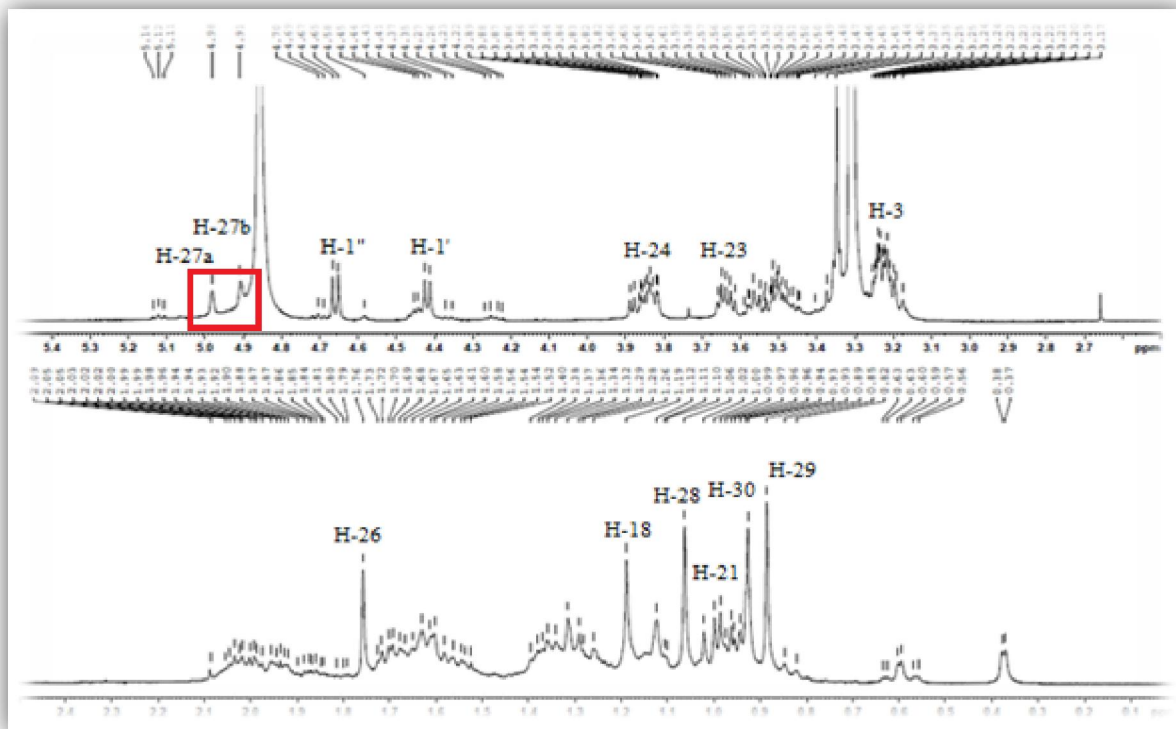


Figure III.29: Spectre RMN ^1H du composé 2

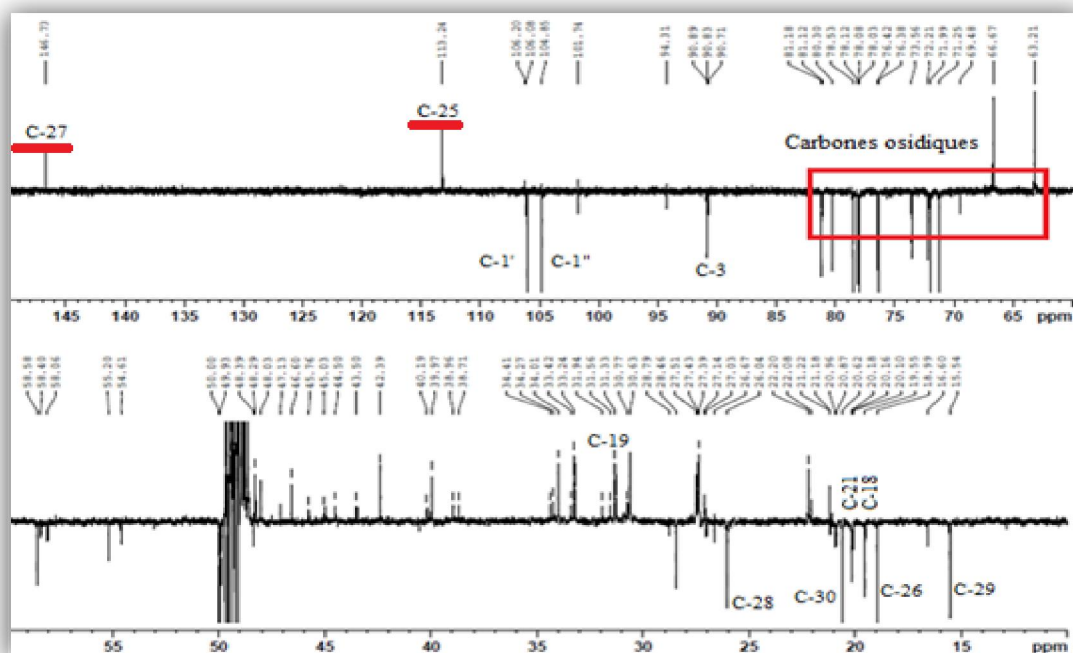


Figure III.30: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé 2

La localisation de la double liaison en C-25 (δ_c 146,7) de la génine a été déterminée par expérience HMBC (Figures III.31 et III.32) qui montre des corrélations en $^3J_{H-C}$ entre les deux protons éthyléniques (H₂-27) et le carbone C-24 (δ_c 80,3) d'une part et un carbone méthylique à 19 ppm attribué à CH₃-26 d'autre part. Elle montre également les couplages longue distance H-24 (δ_H 3,88, *d*, $J = 5,7$ Hz)/C-25 quaternaire (δ_c 146,7) et CH₃-26 (δ_H 1,76, *s*)/C-25.

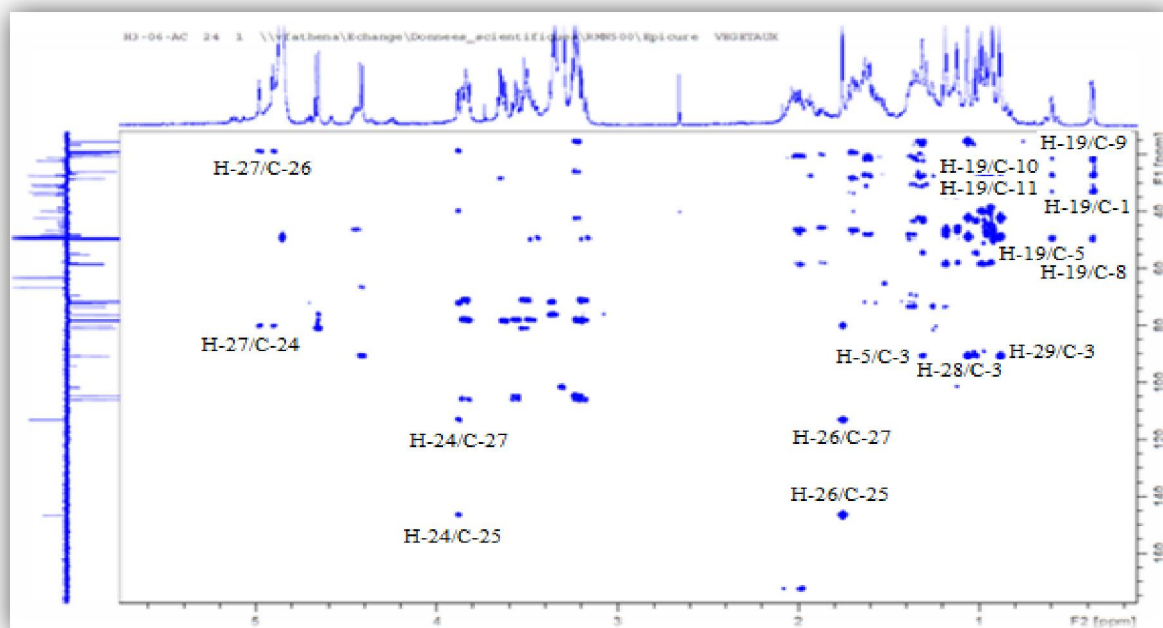


Figure III.31: Spectre HMBC du composé 2

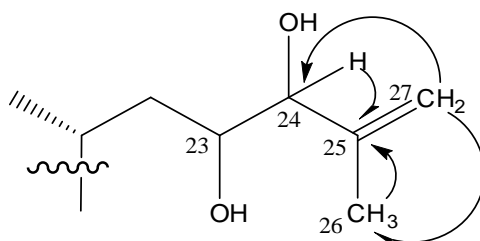


Figure III.32: Corrélations HMBC localisant le méthylène exocyclique

La présence de ce groupement méthylène a induit différentes valeurs de déplacements chimiques pour les protons H-24, CH₃-26, voire H-23 comparativement au composé 1.

L'attribution complète des déplacements chimiques des protons et carbones (tableau III.2) constituant la génine, a été établie conjointement par expériences COSY H-H, HSQC et HMBC.

L'analyse COSY H-H de la partie osidique du composé 2 révèle sa totale similitude avec celle du composé 1, c'est-à-dire la présence d'un β -D-xylose [H-1' (δ_H 4,41)/C-1' (δ_C

106,1)] et d'un β -D-glucose [H-1" (δ_H 4,66)/C-1" (δ_C 104,8)] (Figures III.33 et III.34). Les attributions des carbones osidiques (Tableau III.2) ont été assignées par expérience HSQC.

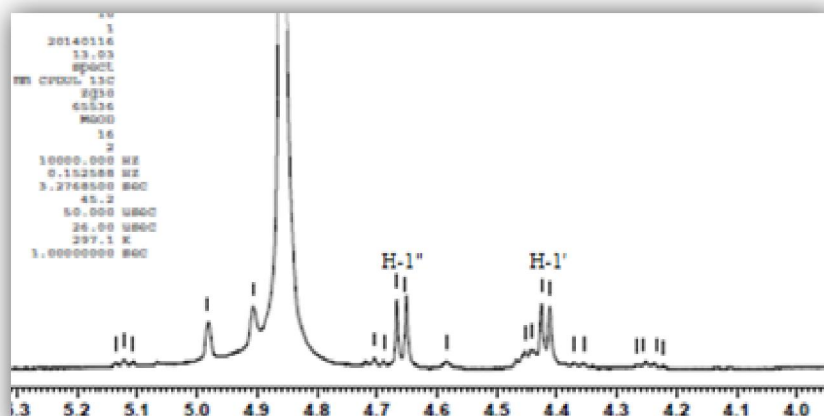


Figure III.33: Spectre RMN ^1H mettant en évidence les protons anomères (composé 2)

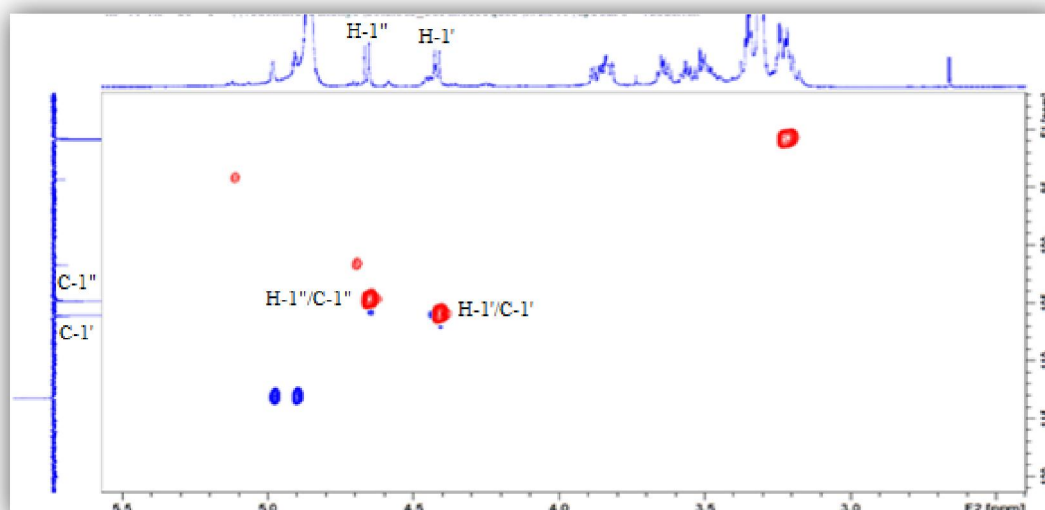


Figure III.34: Spectre HSQC mettant en évidence les protons et carbones anomères

Le point de branchement et la séquence des sucres, similaires à ceux observés pour le composé **1**, sont confirmés par expérience HMBC (Figure III.35). En effet cette dernière montre des corrélations entre le proton anomère du xylose résonant à 4,41 ppm et le carbone C-3 (90,8 ppm) de la génine, le proton anomère du glucose résonant à 4,66 ppm et le carbone C-2' (81,2 ppm) du xylose.

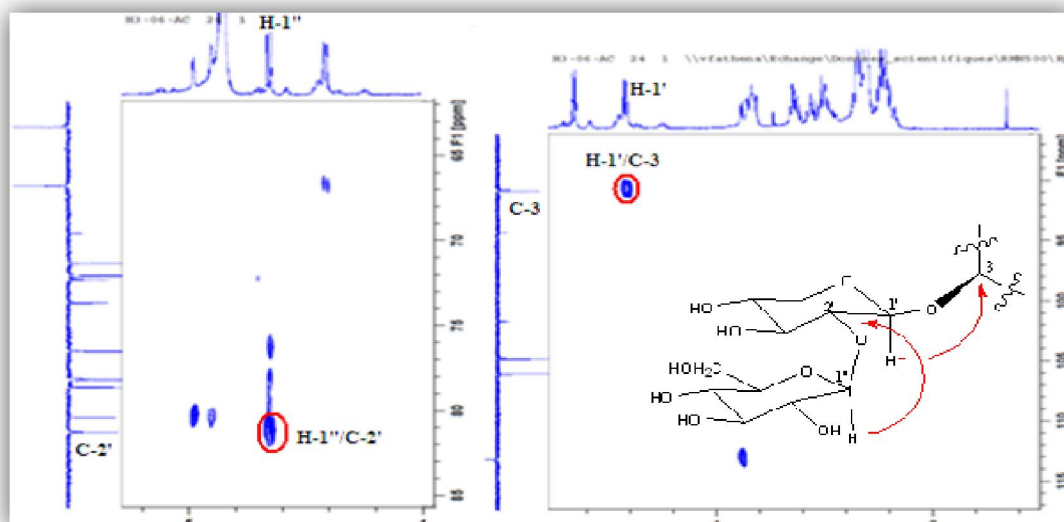


Figure III.35: Spectre HMBC du composé 2

Toutes ces données spectrales (Tableau III.2) permettent d'attribuer au composé **2** la structure suivante: 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-3 β ,16 β ,23(*R*),24(*R*)-tetrahydroxy-25-dehydrocycloartane, appelée aussi gomboside B. Une recherche bibliographique exhaustive indique clairement que ce composé est nouvellement décrit.

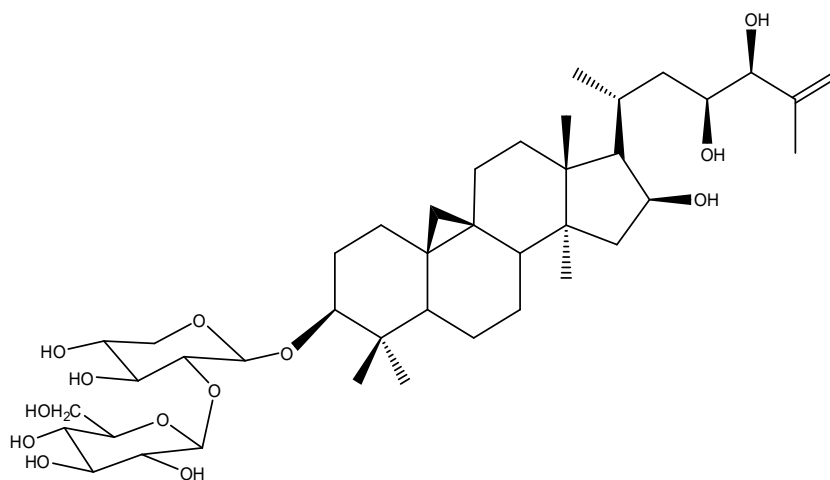
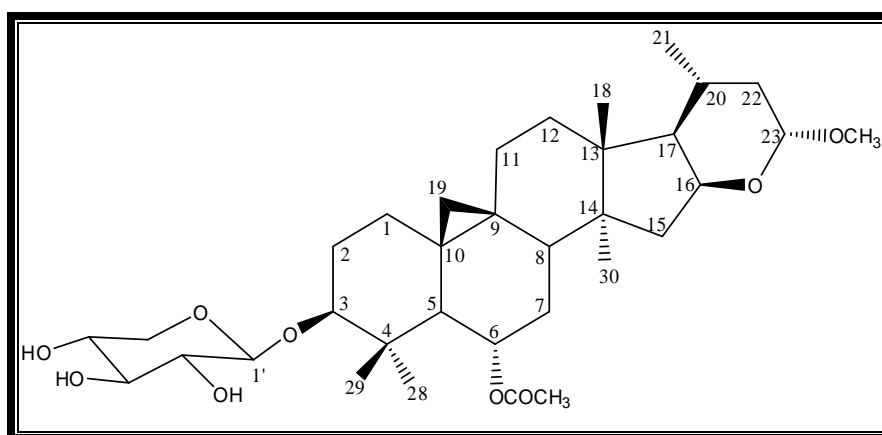


Tableau III.2: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé 2 dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)
1	33,2	1,53-1,25 (<i>m</i>)
2	30,6	1,94-1,71 (<i>m</i>)
3	90,8	3,23 (<i>dd</i> , 11,6; 4,4)
4	42,4	-
5	49,0	1,32 <i>nd</i>
6	22,2	1,59-0,83 (<i>m</i>)
7	27,4	1,35-1,12 (<i>m</i>)

8	49,9	1,62 (<i>dd</i> , 13,5; 4,2)
9	21,2	-
10	27,5	-
11	27,4	2,02-1,12 (<i>m</i>)
12	34,0	1,63 (<i>m</i>)
13	47,1	-
14	48,0	-
15	48,3	2,00-1,37 (<i>m</i>)
16	73,6	4,45 (<i>m</i>)
17	58,6	1,68 (<i>dd</i> , 11,3; 7,2)
18	19,5	1,18 (<i>s</i>)
19	31,3	0,60 (<i>d</i> , 3,9) 0,38 (<i>d</i> , 3,9)
20	28,5	2,01 (<i>m</i>)
21	20,2	0,99 (<i>d</i> , 6,7)
22	40,0	1,57-1,32 (<i>m</i>)
23	72,2	3,64 (<i>dd</i> , 11,4; 5,7)
24	80,3	3,88 (<i>d</i> , 5,7)
25	146,7	-
26	19,0	1,76 (<i>s</i>)
27	113,2	4,98-4,90 (<i>sl</i>)
28	26,0	1,05 (<i>s</i>)
29	15,5	0,88 (<i>s</i>)
30	20,6	0,93 (<i>s</i>)
1'	106,1	4,41 (<i>d</i> , 7,5)
2'	81,2	3,56 (<i>t</i> , 7,5)
3'	71,2	3,48 (<i>t</i> , 7,5)
4'	73,0	3,22 (<i>ddd</i> , 10,8, 7,5, 4,6)
5'	66,7	3,84 (<i>dd</i> , 10,8; 4,6) 3,20 (<i>t</i> , 10,8)
1"	104,8	4,66 (<i>d</i> , 7,9)
2"	76,4	3,19 (<i>t</i> , 7,9)
3"	78,0	3,36 (<i>t</i> , 7,9)
4"	78,1	3,51 (<i>t</i> , 7,9)
5"	78,5	3,24 (<i>ddd</i> , 7,9; 6,0; 2,3)
6"	63,2	3,82 (<i>dd</i> , 11,5; 2,3) 3,63 (<i>dd</i> , 11,5; 6,0)

III. 2.3.3 Elucidation structurale du composé 3



3-O-[β -D-xylopyranosyl]-6 α -acétoxy-23 α -méthoxy-16 β ,23(R)-époxy-24,25,26,27-tetranorcyloartane (3)

Le spectre de masse ESI du composé 3 enregistré en mode positif (Figure III.36), présente un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 629 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire de 606 uma, correspondant à la formule moléculaire $C_{34}H_{54}O_9$. Cette dernière est confirmée par le spectre de masse à haute résolution HRESIMS (Figure III.37) qui montre un pic à m/z 629,4482 (cal. $C_{34}H_{54}O_9Na$, 629,3660).

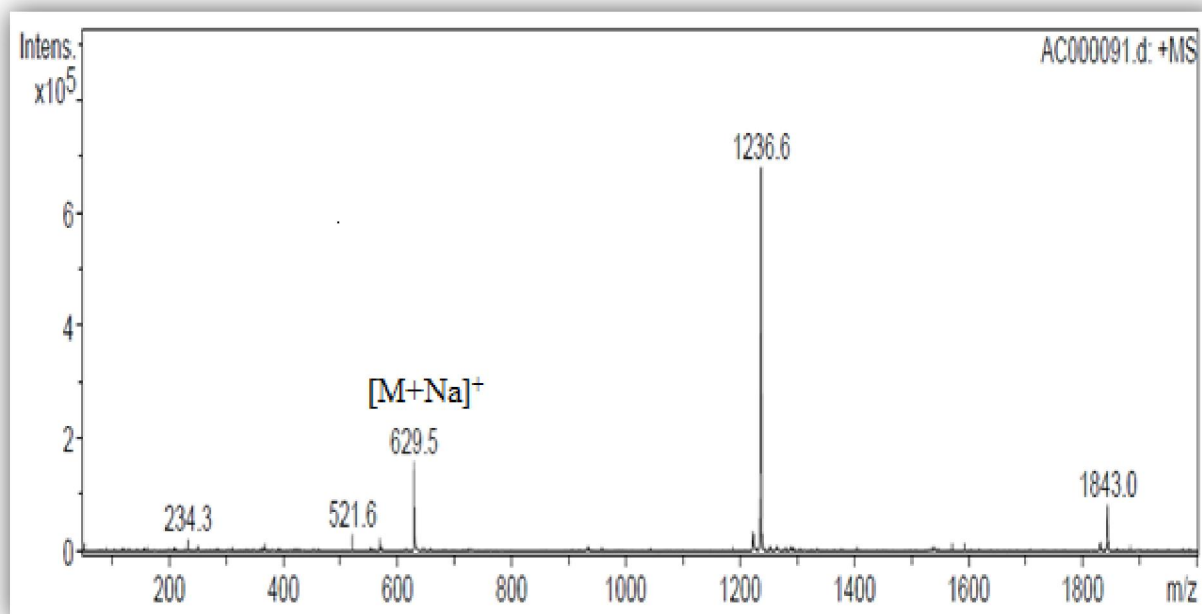


Figure III.36: Spectre de masse ESI⁺ du composé 3

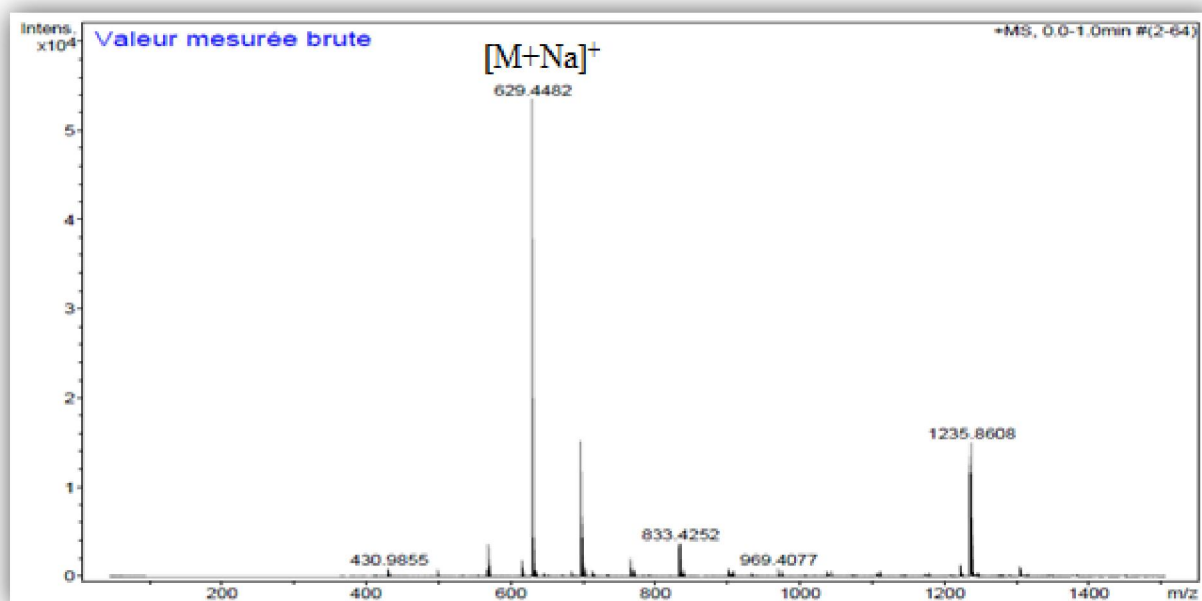


Figure III.37: Spectre de masse HRESIMS du composé 3

Le spectre RMN ¹H (Figure III.38) de ce composé, enregistré dans CDCl₃, permet d'observer les signaux suivants, très caractéristiques d'une saponine triterpénique à squelette cycloartane:

- ❖ deux signaux fortement blindés résonant sous forme de doublet à δ_H 0,31 (1H, *d*, $J = 4,5$ Hz, H-19 *exo*), 0,60 (1H, *d*, $J = 4,5$ Hz, H-19 *endo*) typiques de deux protons non équivalents d'un noyau cyclopropane [77, 78, 79].
- ❖ cinq signaux à champ fort résonant à δ_H 0,91 (3H, *s*, H-30), 0,92 (3H, *d*, $J = 6,5$ Hz, H-21), 0,95 (3H, *s*, H-29), 0,97 (3H, *s*, H-28), 1,07 (3H, *s*, H-18), correspondant à cinq groupements méthyles.
- ❖ un doublet de doublets résonant à δ_H 3,23 ($J_{ax-ax} = 11,6$ et $J_{ax-eq} = 4,4$ Hz), attribuable au proton H-3 α -axial
- ❖ plusieurs signaux entre 3 et 5 ppm caractéristiques de protons osidiques ainsi qu'un signal de proton anomère résonant à δ_H 4,49 (*d*, $J = 5,8$ Hz, H-1'), traduisant la présence d'une seule unité osidique.

Le spectre RMN ¹H permet d'observer deux signaux singulets d'intégration 3 H chacun à 1,99 et 3,30 ppm, indiquant l'existence d'un groupement acétate et un groupement méthoxyle.

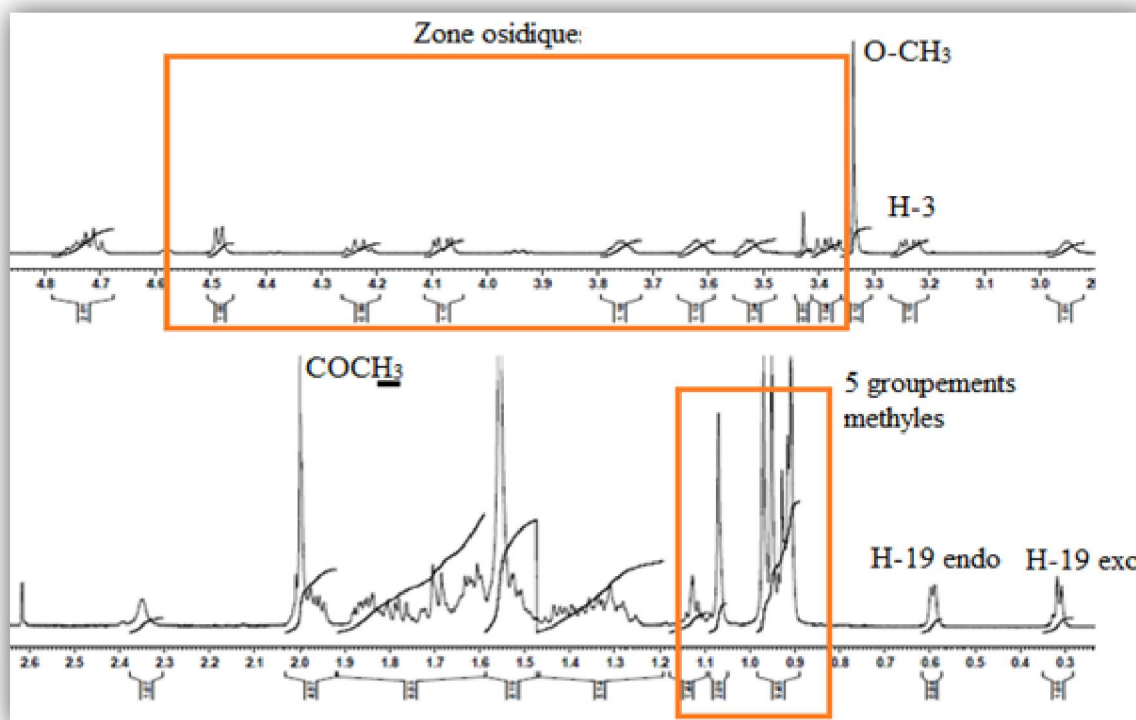


Figure III.38: Spectre RMN ^1H du composé 3

Le spectre RMN ^{13}C DEPT (Figure III.39) montre des signaux correspondant à cinq méthyles, huit méthylènes, huit méthines et cinq atomes de carbone quaternaires, confirmant la nature triterpénique du composé. Il est en outre détecté un carbone quaternaire à 170,6 ppm, attribuable à un carbonyle d'ester.

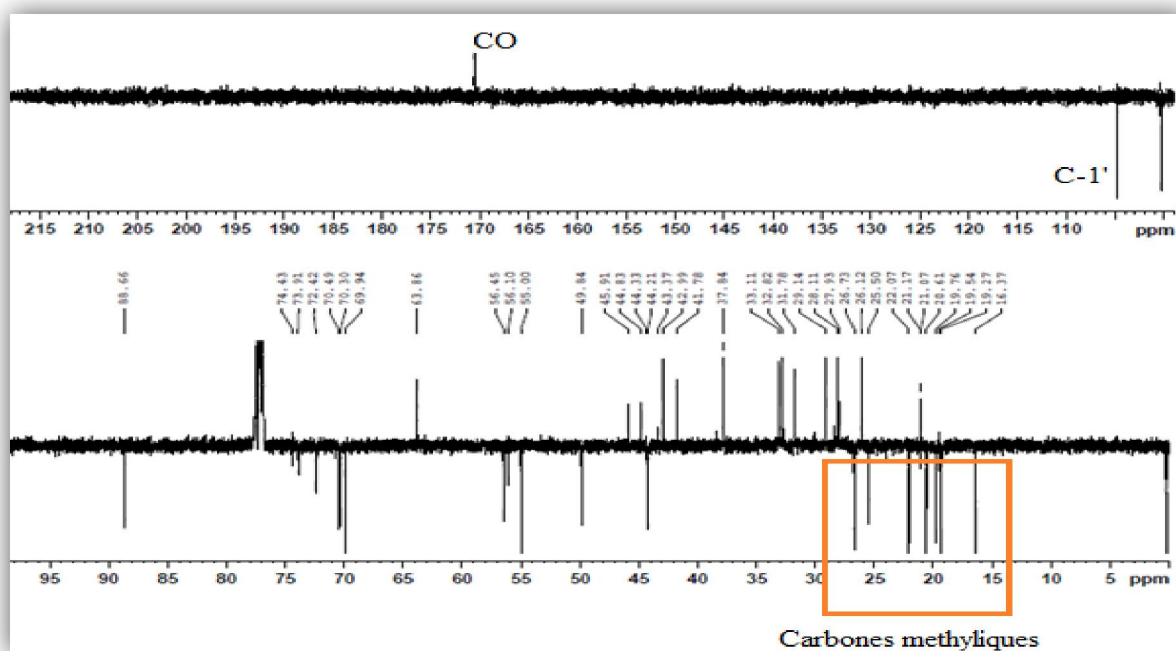


Figure Iii.39: Spectre RMN ^{13}C du composé 3

L'expérience HSQC (Figures III.40 et III.41) permet de repérer les carbones méthyliques sortant à δ_C 16,4 (C-29), 19,3 (C-30), 19,8 (C-18) 20,6 (C-21) et 26,7 (C-28). Elle permet aussi d'identifier le carbone C-19 du noyau cyclopropane (δ_C 28,1), le carbone anomère de sucre C-1' (δ_C 104,9), le carbone méthylique du groupement acétate COCH_3 (δ_C 22,1), le carbone du groupement méthoxy (δ_C 55,0) et enfin le carbone C-3 repéré à 88,7 ppm. Le déblindage de ce dernier traduit bien une substitution à ce niveau.

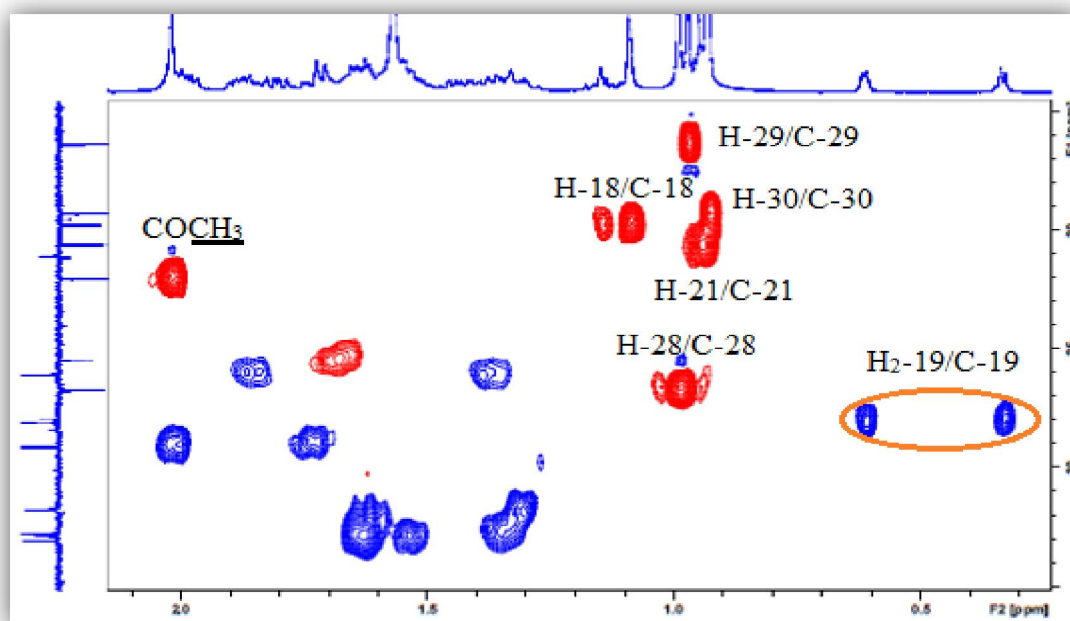


Figure III.40: Spectre HSQC du composé 3

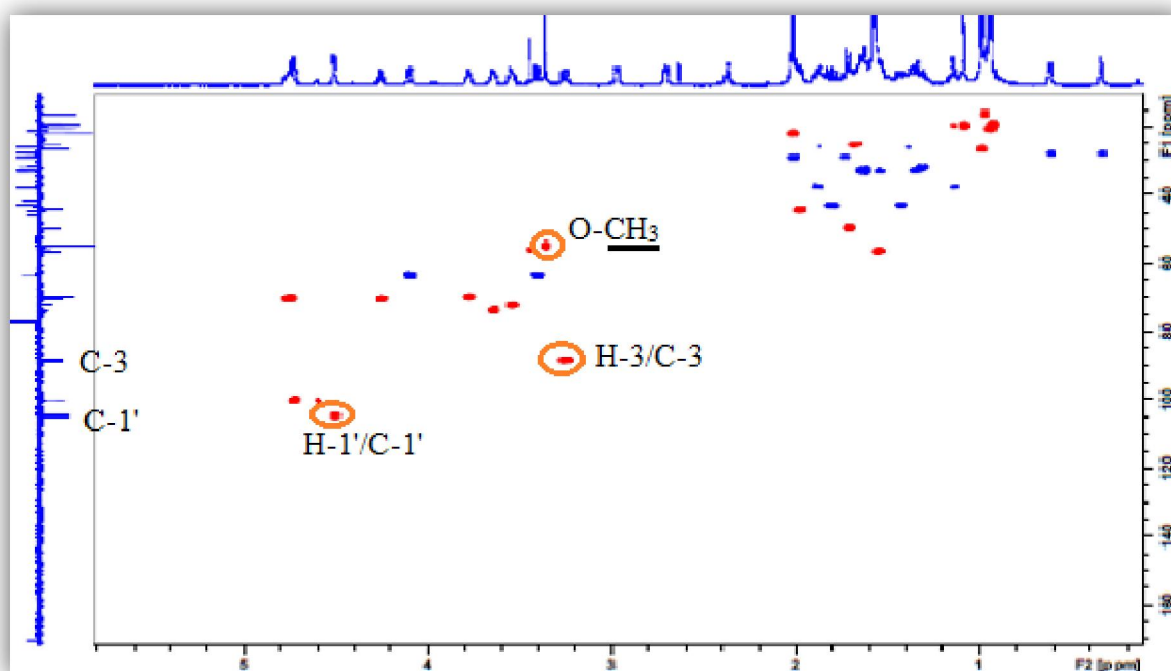


Figure III.41: Spectre HSQC du composé 3

L'expérience HMBC (Figure III.42) permet d'attribuer les méthyles ainsi que les autres carbones de la génine par l'observation de leurs couplages en $^2J_{H-C}$ et $^3J_{H-C}$. Dans cette expérience, les protons des méthyles corréleront au maximum avec quatre carbones constituant le socle de la base carbonée qui les porte. Ainsi les protons méthyliques Me-28 (δ_H 0,97) et Me-29 (δ_H 0,95) sont repérés au moyen de leur corrélation avec le carbone C-3 (δ_C 88,7) déjà identifié ainsi que les carbones C-4 (δ_C 41,8) et C-5 (δ_C 49,9). Le proton de ce dernier résonant à 1,69 ppm (1H, *d*, $J = 9,4$ Hz), identifié par expérience HSQC, montre sur le spectre HMBC six corrélations avec les carbones C-3 et C-4 déjà identifiés, un carbone quaternaire (δ_C 27,9) ne pouvant être que C-10, le carbone méthylique C-29, un carbone méthylène C-1 à 31,8 ppm et un carbone oxyméthine à 70,3 ppm attribuable au carbone C-6. Ce dernier a été identifié par HSQC du fait de sa corrélation directe avec le proton H-6, lui-même déterminé par expérience COSY H-H qui présente un couplage vicinal H-5 (δ_H 1,69)/H-6 (δ_H 4,75). Le déblindage important du proton H-6 (δ_H 4,75) lié certainement à une acylation suggère une localisation en C-6 du groupement acétate préalablement identifié. Ceci est confirmé par expérience HMBC (Figure III.42) qui montre un couplage longue distance H-6/COCH₃ (δ_C 170,6).

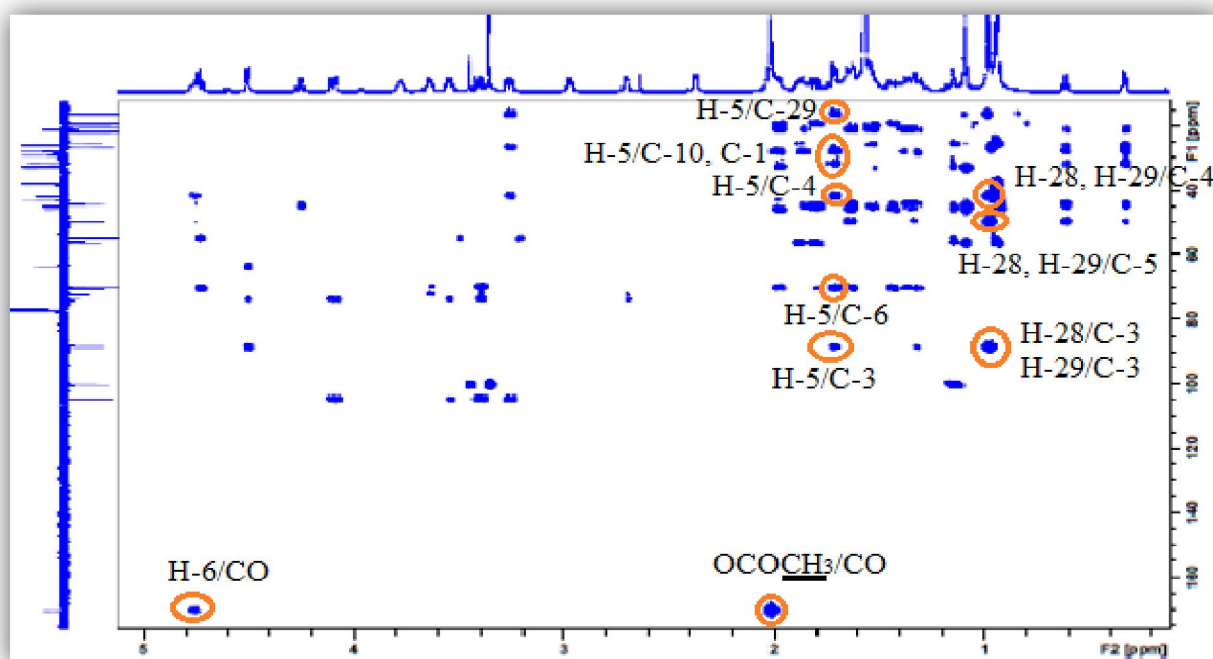


Figure III.42: Spectre HMBC de composé 3

A partir des protons H-19 du noyau cyclopropane, l'expérience HMBC (Figures III.43 et III.44) montre leurs corrélations avec les carbones C-1, C-5 et C-10 connus, un carbone quaternaire C-9 (δ_C 21,1), un carbone méthine C-8 (δ_C 44,3) et un carbone méthylénique C-11

(δ_C 26,1). Les protons méthyliques Me-30 (δ_H 0,91) corrèlent avec le carbone C-8 connu, un carbone secondaire C-15 (δ_C 43,0) ainsi qu'avec deux carbones quaternaires C-13 (δ_C 44,8) et C-14 (δ_C 45,9). La distinction entre les carbones quaternaires C-13 et C-14 est rendue possible du fait de la corrélation $^3J_{H-C}$ du carbone C-14 avec les protons H-7 (δ_H 1,61; 1,33) déterminés par expérience COSY H-H qui présente un couplage vicinal H-6/H-7. A partir du dernier méthyle singulet Me-18 (δ_H 1,07), l'analyse HMBC permet de caractériser les carbones C-12 (δ_C 32,8), C-14 et C-13.

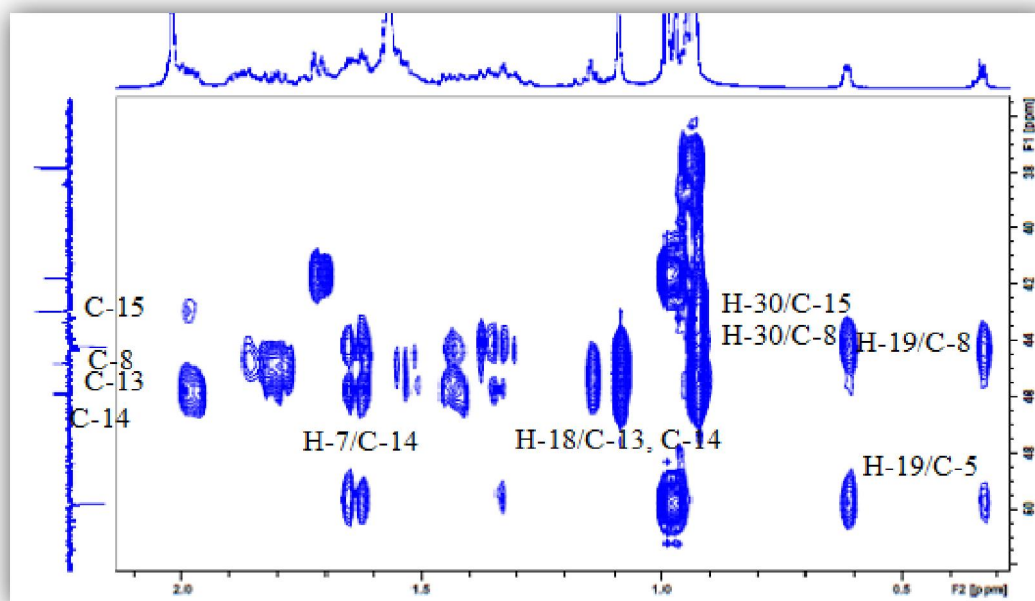


Figure III.43: Spectre HMBC de composé 3

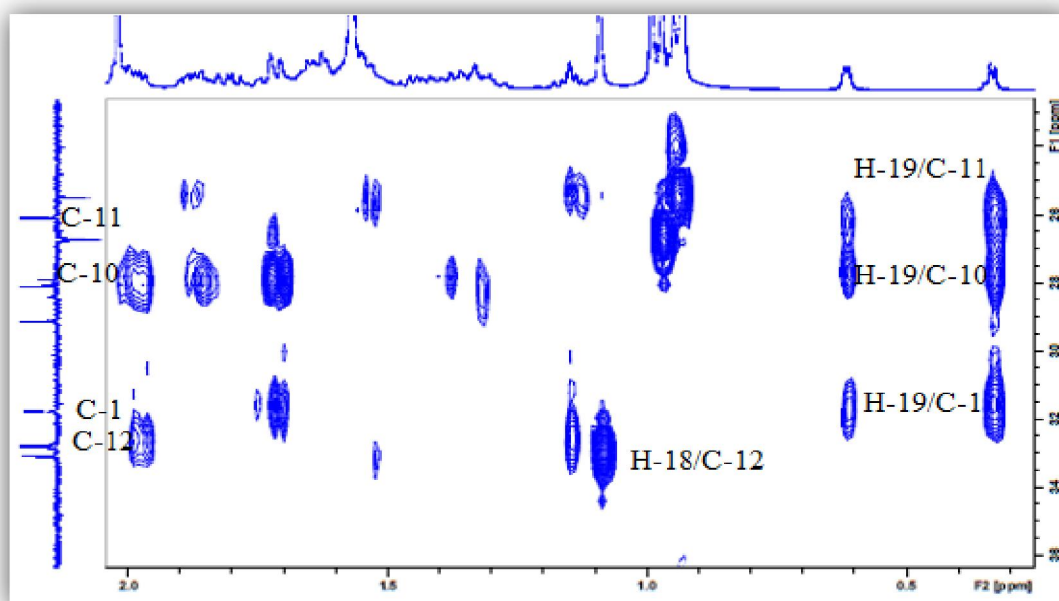


Figure III.44: Spectre HMBC de composé 3

Le spectre COSY H-H (Figure III.45) montre les corrélations entre les protons H-15 (δ_{H} 1,78; 1,40) identifiés par HSQC et le proton H-16 résonant à 4,23 ppm (1H, *q*, $J = 7,9$ Hz). Cette valeur de déplacement chimique ainsi que celle du carbone C-16 (δ_{C} 70,5) déterminée par expérience HSQC, montre que ce dernier est oxydé. Le même spectre indique la présence d'un même système de spins à travers les corrélations entre H-16 et H-17 résonant à 1,52 ppm, H-17 et H-20 repéré à 1,66 ppm, H-20 et le méthyle doublet nommé Me-21 (δ_{H} 0,92, *d*, $J = 6,5$ Hz), H-20 et les protons H₂-22 (δ_{H} 1,83; 1,12), H₂-22 et un proton oxyméthine H-23 sortant à 4,71 ppm (*t*, $J = 7,2$ Hz).

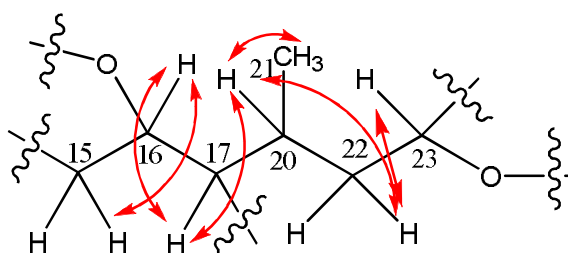


Figure III.45: Corrélation COSY H-H du composé 3

Ce constat laisse suggérer la présence d'un fragment pyrane très présent dans ce type de composés triterpéniques à squelette cycloartane, faisant jonction avec le cycle pentanique en C-16/C-17 [86]. Ceci est confirmé par expérience HMBC qui montre une corrélation entre le proton H-23 (δ_{H} 4,71, *t*, $J = 7,2$ Hz) et le carbone C-16 (δ_{C} 70,5). L'expérience HMBC qui montre également la corrélation entre les protons méthoxyliques (δ_{H} 3,30, *s*) et le carbone C-23 (δ_{C} 100,4) identifié par analyse HSQC, confirme la substitution à ce niveau par le groupement OCH₃.

La stéréochimie de la génine du composé **3** a été établie principalement par analyse des corrélations observées sur le spectre ROESY (Figures III.46 et III.47). En effet, ce dernier montre les taches de corrélation entre le proton H-19 β (*endo*) du groupement CH₂ du noyau cyclopropane et les protons H-8 et H-6 ainsi que les protons méthyliques CH₃-29 β . Il est également observé des effets ROE entre le proton H-3 α et les protons méthyliques CH₃-28 ainsi que le proton H-5. Le spectre ROESY montre également sur la face β , les corrélations Me-29/H-6 et H-23/H-22a avec une constante de couplage ($J = 7,1$ Hz). Cette valeur confirme bien que H-23 est β -axial. D'autres effets NOE sont observés entre les protons Me-30 α et le proton H-17.

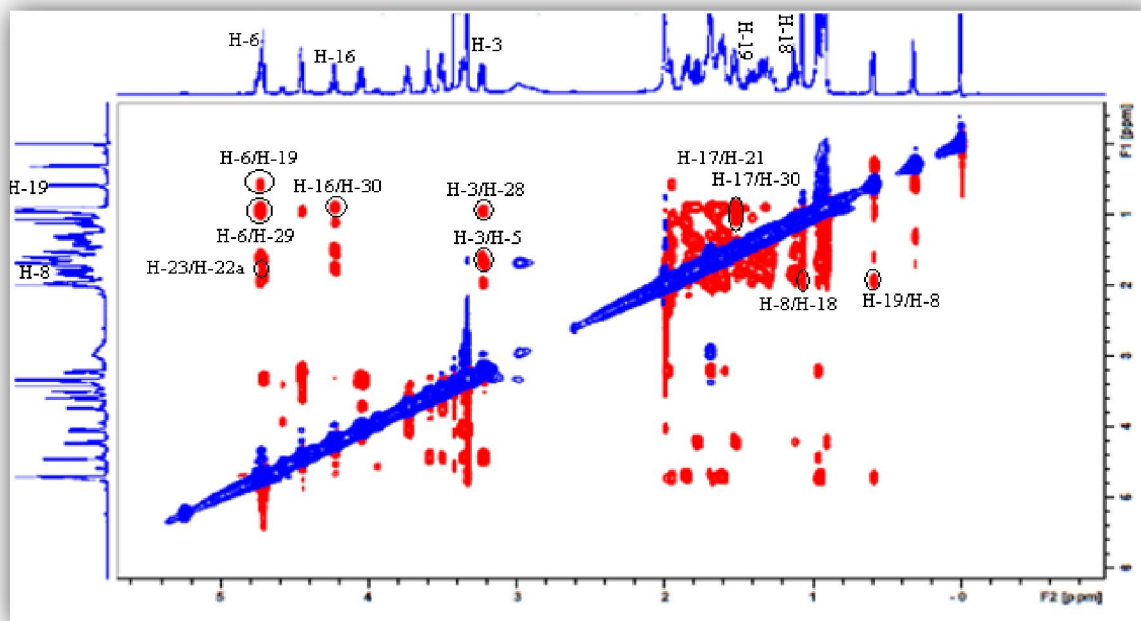


Figure III.46: Spectre ROESY du composé 3

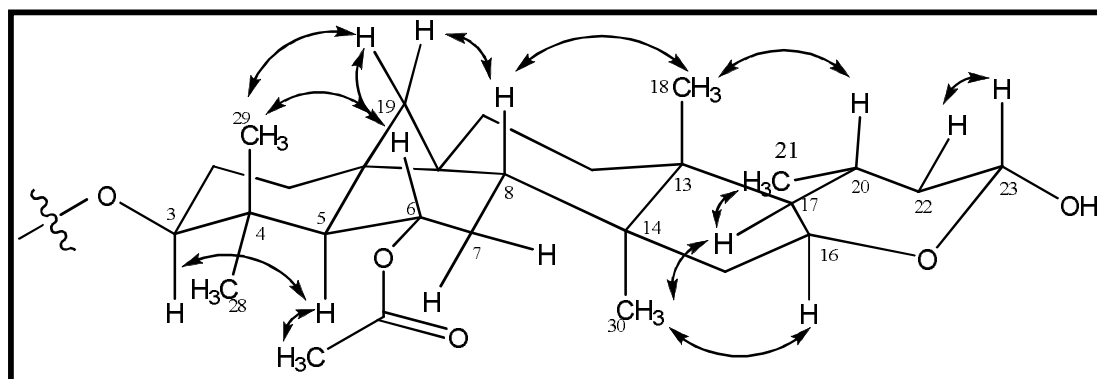
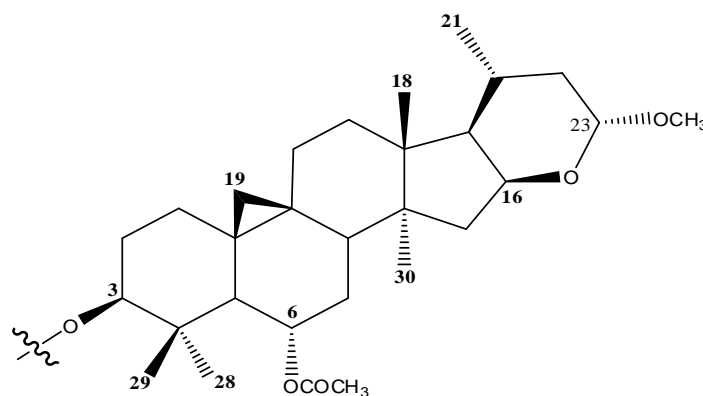


Figure III.47: Principaux effets ROE observés pour le composé 5

L'ensemble de cette analyse spectrale a permis d'assigner à la génine la structure suivante:



L'unité osidique dont le signal du proton anomère résonne à 4,49 ppm (d , $J = 5.8$ Hz) est identifiée par analyse du spectre COSY H-H (Figures III.48) qui montre clairement la présence d'un système de spins à six protons d'un pentose. En effet, il est visualisé les couplages suivants:

- H-1'/H-2' [δ_H 3,52 (dd , $J = 8,9; 5,8$ Hz)]
- H-2'/H-3' [δ_H 3,63 (dd , $J = 9,7; 8,9$ Hz)]
- H-3'/H-4' [δ_H 3,76 (ddd , $J = 9,7; 7,5; 4,1$ Hz)]
- H-4'/H-5'b [δ_H 3,38 (dd , $J = 11,9; 7,5$ Hz)]
- H-5'b/H-5'a [δ_H 4,08 (dd , $J = 11,9; 4,1$ Hz)].

Les grandes valeurs de constantes de couplage traduisant une position axiale pour ces protons montrent qu'on est en présence d'un D-xylose de configuration β ($J_{1'2'} = 5,8$ Hz).

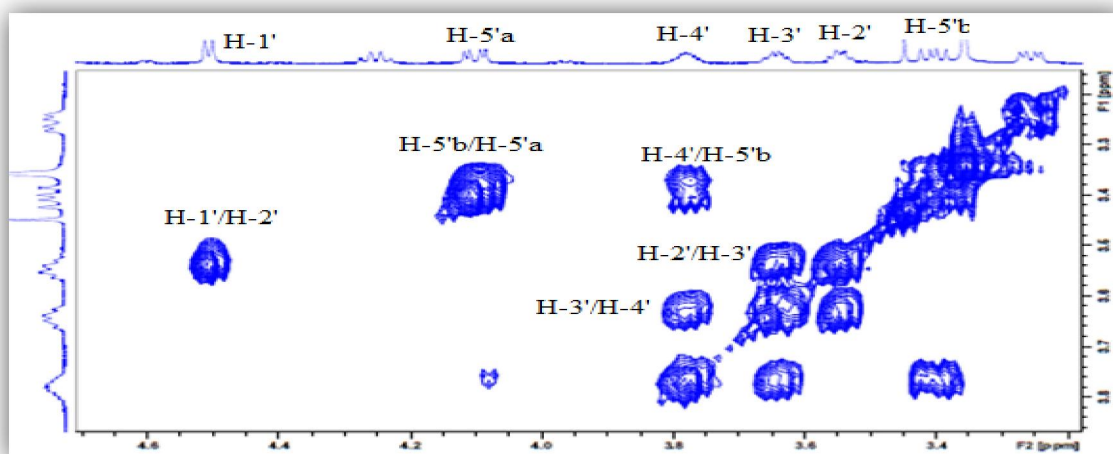


Figure III.48: Spectre COSY H-H de l'unité β -D-xylose (composé 3)

Les carbones du xylose ont été assignés sans ambiguïté par analyse HSQC (Figure III.49).

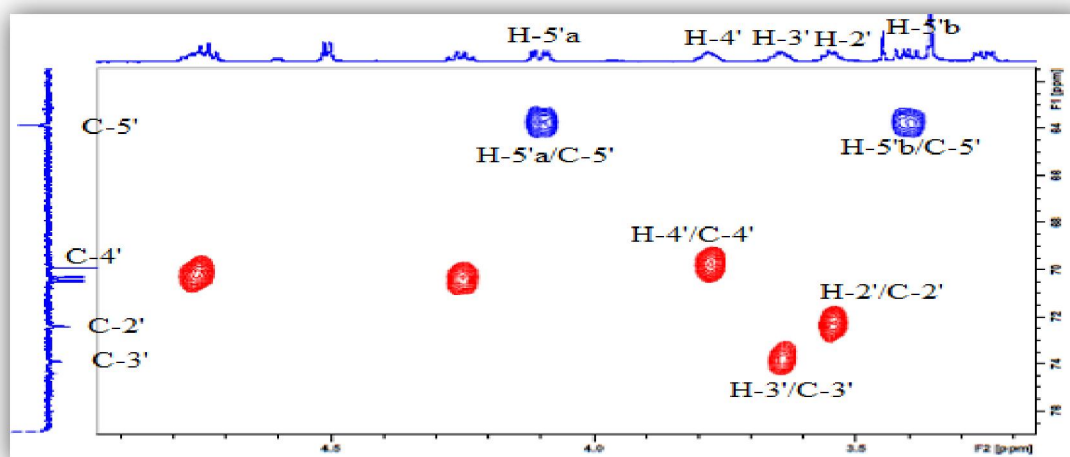


Figure III.49: Spectre HSQC de l'unité β -D-xylose (composé 3)

La localisation de l'unité osidique en C-3 de la génine est confirmée par expérience HMBC (Figure III.50) et cela par l'observation de la corrélation entre le proton anomère H-1' du xylose et le carbone C-3 (δ_C 88,7).

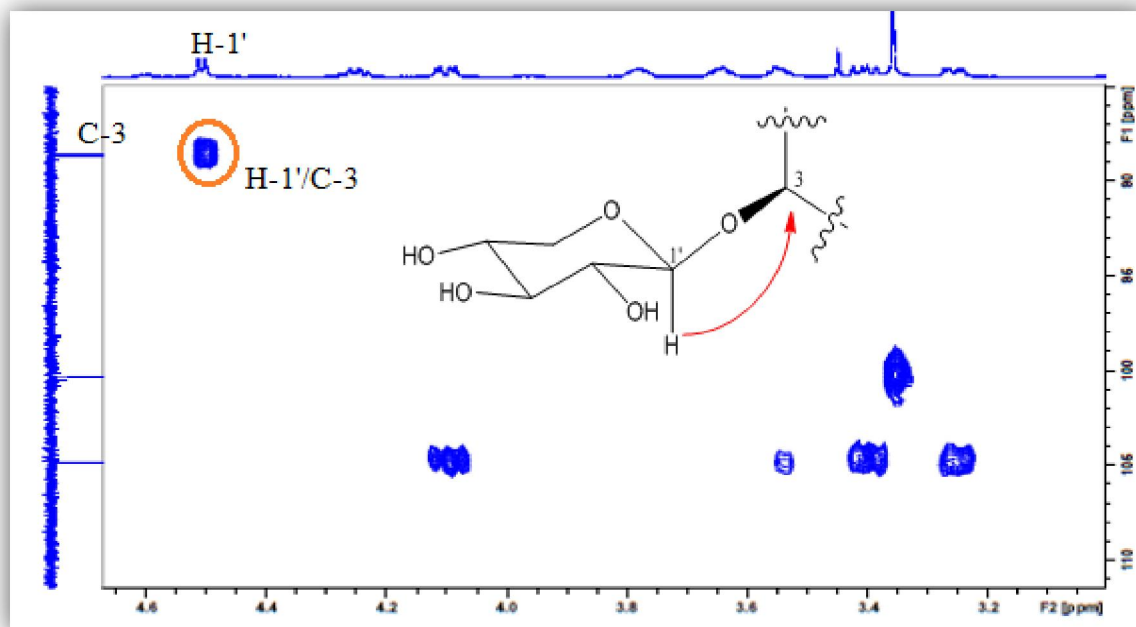
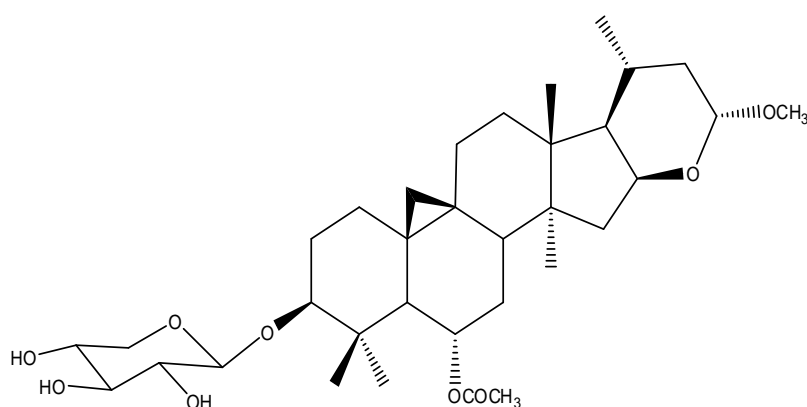


Figure III.50: Spectre HMBC mettant en évidence la position du sucre

Toutes ces données spectrales (Tableau III.3) permettent d'attribuer sans ambiguïté au composé **3** la structure suivante: 3-*O*-[β -D-xylopyranosil]-6 α -acétoxy-23 α -méthoxy-16 β , 23(*R*)-époxy-24,25,26,27-tetranorcycloartane, appelée aussi gomboside C. Il s'agit d'une nouvelle saponine.

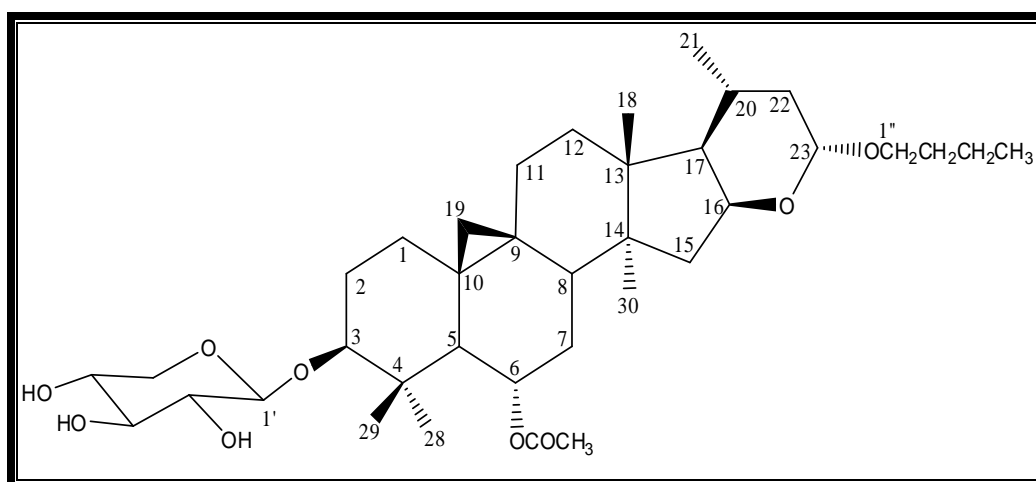


Le tableau suivant reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **3**.

Tableau III.3: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé 3 dans CDCl_3

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	31,8	1,58-1,30 (m)
2	29,1	1,99-1,72 (m)
3	88,7	3,23 (dd, 11,6; 4,4)
4	41,8	-
5	49,9	1,69 (d, 9,4)
6	70,3	4,75 (m)
7	33,1	1,61-1,33 (m)
8	44,3	1,97 (m)
9	21,1	-
10	27,9	-
11	26,1	1,83-1,35 (m)
12	32,8	1,61-1,51 (m)
13	44,8	-
14	45,9	-
15	43,0	1,78 (dd, 12,5; 7,9) 1,40 nd
16	70,5	4,23 (q, 7,9)
17	56,5	1,52 nd
18	19,8	1,07 (s)
19	28,1	0,60 (d, 4,5) 0,31 (d, 4,5)
20	25,5	1,66 (m)
21	20,6	0,92 (d, 6,5)
22	37,8	1,83-1,12 (m)
23	100,4	4,71 (t, 7,2)
28	26,7	0,97 (s)
29	16,4	0,95 (s)
30	19,3	0,91 (s)
OCH ₃	55,0	3,30 (s)
CO	170,6	-
OCOCH ₃	22,1	1,99 (s)
1'	104,9	4,49 (d, 5,8)
2'	72,4	3,52 (dd, 8,9; 5,8)
3'	73,9	3,63 (dd, 9,7; 8,9)
4'	69,6	3,76 (ddd, 9,7; 7,5; 4,1)
5'	63,9	4,08 (dd, 11,9; 4,1) 3,38 (dd, 11,9; 7,5)

III. 2.3.4 Elucidation structurale du composé 4



3-O-[β -D-xylopyranosyl]-6 α -acétoxy-23 α - butoxy-16 β ,23(R)-époxy-24,25,26,27-tetranorcyloartane (4)

Le spectre de masse ESI du composé **4** (Figure III.51) enregistré en mode positif, montre un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 671 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 648 uma correspondant à une formule brute en $C_{37}H_{60}O_9$. Cette formule est confirmée par le spectre HRESIMS (Figure III.52) ($m/z = 671,5006$, calc. $C_{37}H_{60}O_9Na$, 671,4130).

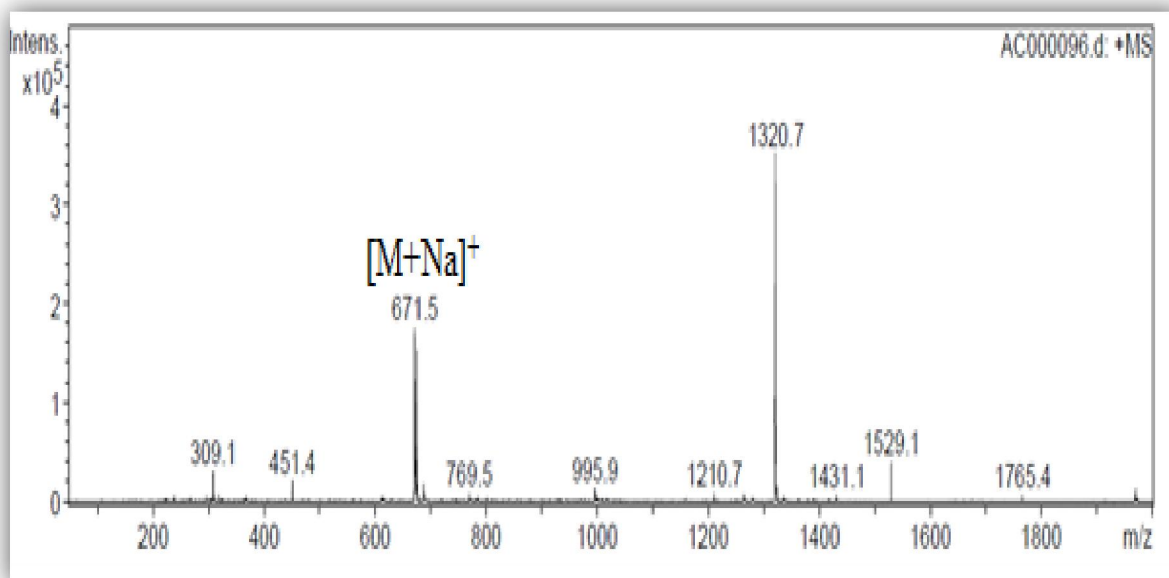


Figure III.51: Spectre de masse ESI⁺ du composé 4

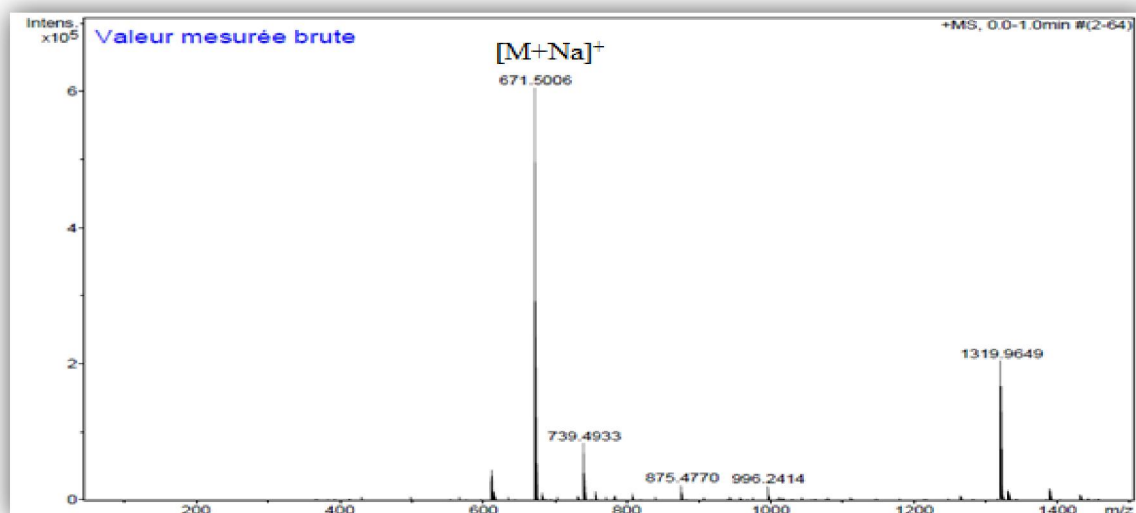


Figure III.52: Spectre de masse HRESIMS du composé 4

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C DEPT (Figures III. 53 et III.54) du composé **4** sont très voisins de ceux du composé **3**. En effet, on reconnaît tous les signaux caractéristiques des protons et carbonés, à savoir:

- ❖ les deux signaux doublets fortement blindés résonant à δ_{H} 0,33 (1H, *d*, $J = 4,8$ Hz, H-19 *exo*) et δ_{H} 0,61 (1H, *d*, $J = 4,8$ Hz, H-19 *endo*) caractérisant le noyau cyclopropane du cycloartane.
- ❖ les signaux des protons et carbonés des groupements oxyméthines CH-3, CH-6, CH-16 et CH-23 résonant respectivement à δ_{H} 3,20 (*dd*, $J = 11,5; 4,6$ Hz)/ δ_{C} 88,7; δ_{H} 4,75 (*m*)/ δ_{C} 70,4; δ_{H} 4,27 (*q*, $J = 7,9$ Hz)/ δ_{C} 70,4 et δ_{H} 4,83 (*t*, $J = 7,2$ Hz)/ δ_{C} 99,1.
- ❖ le signal singulet d'intégration 3H à 2,02 ppm, des protons méthyliques du groupement acétate.
- ❖ les cinq signaux de protons et carbonés méthyliques résonant à δ_{H} 0,93 (*s*, CH₃-30)/ δ_{C} 19,3; δ_{H} 0,94 (*d*, $J = 6,1$ Hz, CH₃-21)/ δ_{C} 20,6; δ_{H} 0,97 (*s*, CH₃-29)/ δ_{C} 16,4; δ_{H} 0,99 (*s*, CH₃-28)/ δ_{C} 26,8; δ_{H} 1,09 (*s*, CH₃-18)/ δ_{C} 19,8. En outre, le spectre proton met en évidence la présence d'un signal triplet d'intégration 3H à δ_{H} 0,92 (3H, *t*, $J = 7,1$ Hz, H-4'') attestant de la présence d'un sixième groupement méthyle lié à un groupement CH₂, induisant une différence par rapport au composé **3** décrit précédemment.
- ❖ le signal du proton anomère résonant à δ_{H} 4,51 (*d*, $J = 5,7$ Hz, H-1'), traduisant la présence d'une seule unité osidique.

La différence notable entre les composés **3** et **4** apparaît clairement sur le spectre RMN ^1H qui montre, pour le composé **4**, deux signaux déblindés résonant à δ_{H} 3,69 (*dt*, $J = 9,8; 6,8$

Hz, H-1''a) et 3,40 (m, H-1''b) et qui permet aussi de constater l'absence du signal du groupement méthoxyle à δ_H 3,30 observé pour le composé **3**. Ce constat permet de suggérer la présence d'un groupement de type $OCH_2CH_2\dots CH_3$ qui remplacerait le groupement OCH_3 en C-23 de la génine. La différence de masse de 42 uma entre ces deux composés plaiderait pour un groupement butoxyyle $O(CH_2)_3CH_3$.

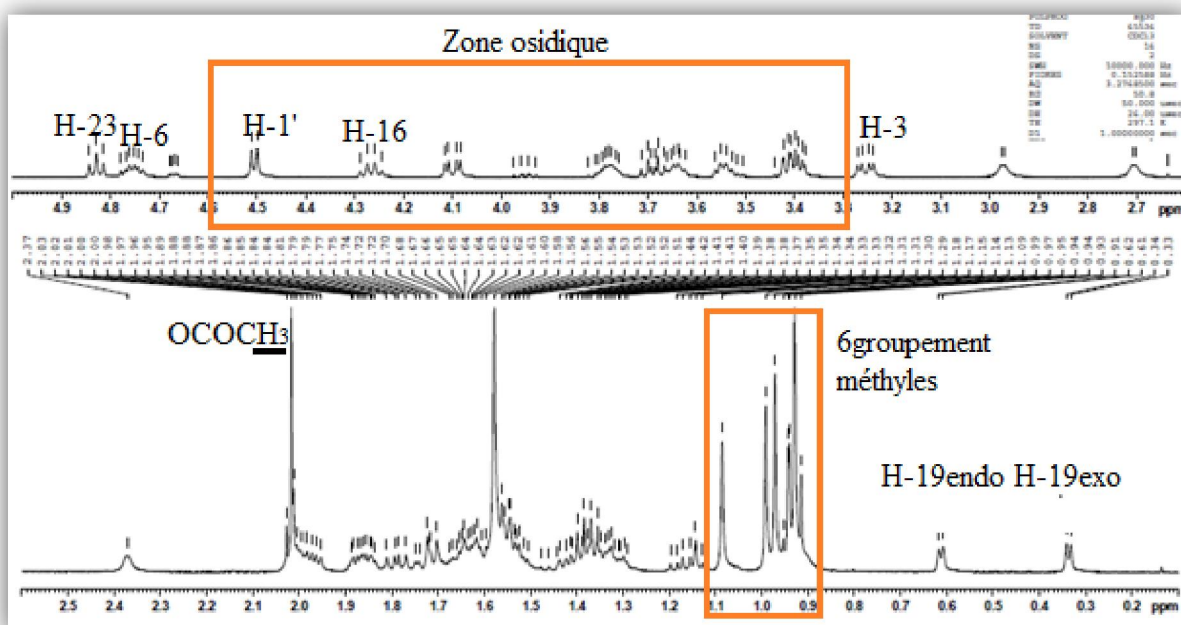


Figure III.53: Spectre RMN 1H du composé **4**

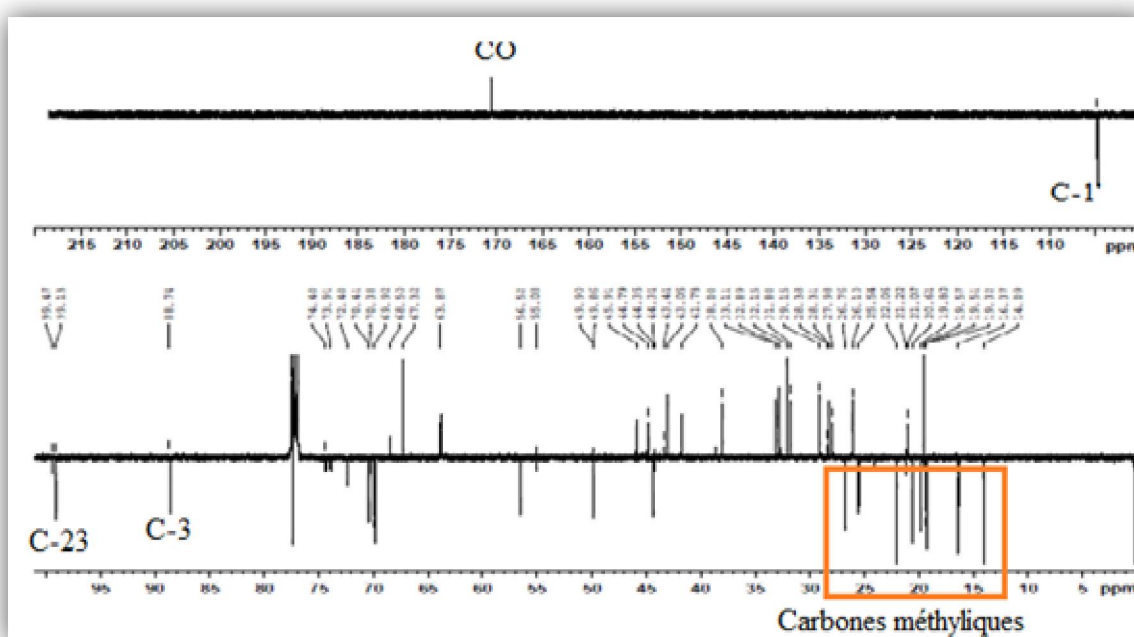


Figure III.54: Spectre RMN ^{13}C du composé **4**

La présence du groupement butoxyyle est confirmée par analyse COSY H-H (Figure III.55) qui permet de déceler un système de spins à 9 protons d'un fragment butyle [δ_H 3,69 (*dt*, $J = 9,8; 6,8$ Hz, H-1''a) et 3,40 (*m*, H-1''b), 1,54 (*m*, H₂-2''), 1,38 (*m*, H₂-3'') et 0,92 (*t*, $J = 7,1$ Hz, Me-4'')].

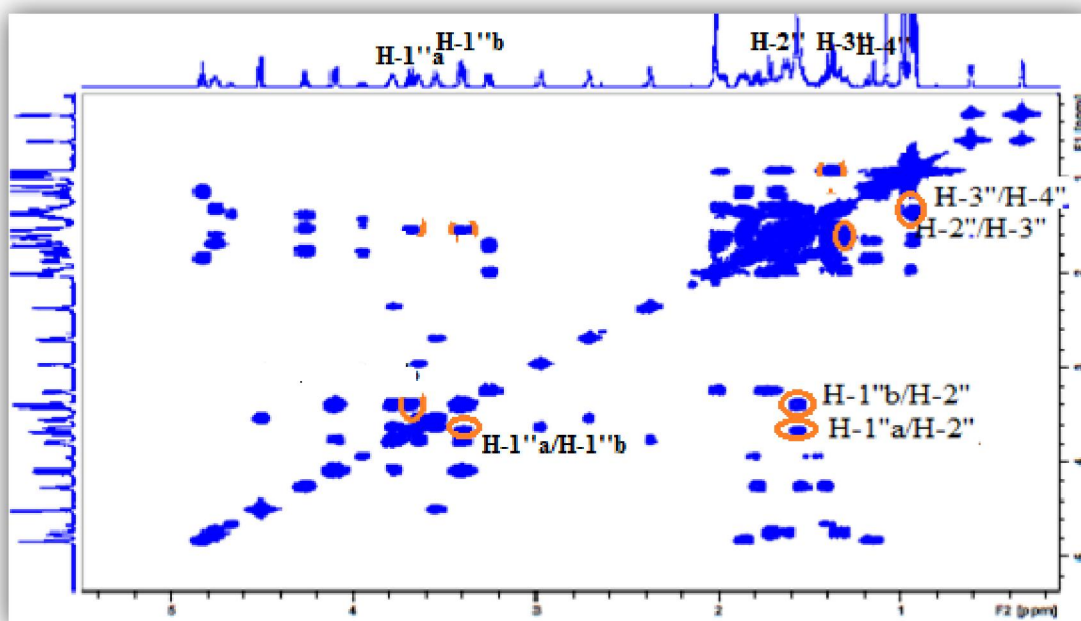


Figure III.55: Spectre COSY H-H mettant en évidence le groupement butoxyyle (composé 4)

L'expérience HSQC a permis de caractériser tous les carbones de ce groupement (Figure III.56).

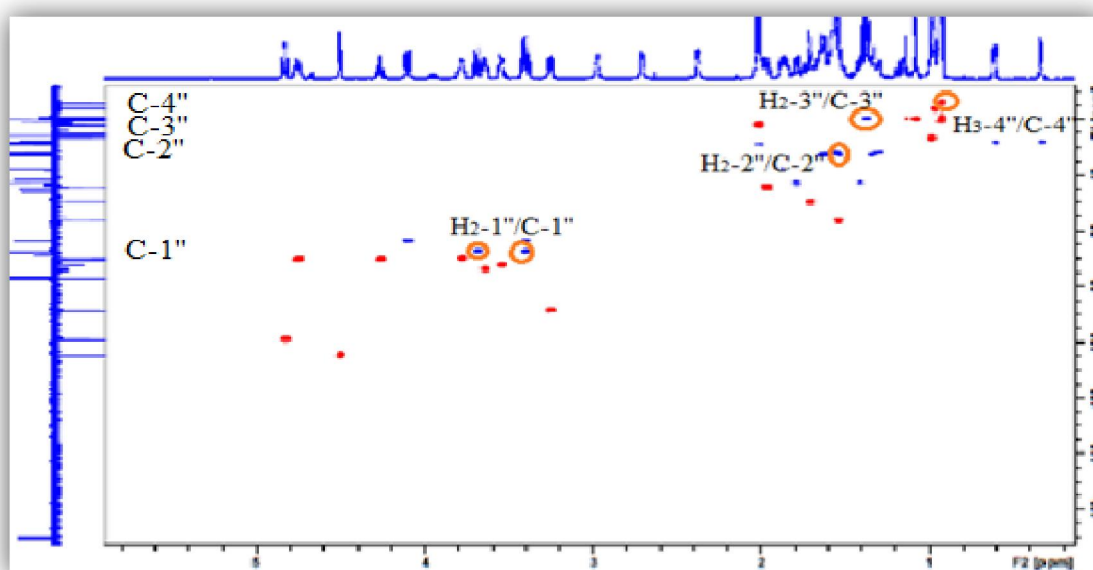


Figure III.56: Spectre HSQC mettant en évidence le groupement butoxyyle (composé 4)

L'expérience HMBC qui montre clairement une corrélation en 3J entre le proton H-23 de la génine (δ_H 4,83, t , $J = 7,2$ Hz) et le carbone CH_2-1'' (δ_H 67,3) identifié par HSQC confirme bien que le carbone oxyméthine C-23 (δ_H 99,1) est substitué par le groupement butoxyle.

La partie osidique du composé **4** est identique à celle du composé **3** comme l'indique l'analyse des spectres COSY H-H, HSQC et ^{13}C qui identifie un β -D-xylose [H-1' (δ_H 4,51)/C-1' (δ_C 104,9)]. Les attributions des carbones osidiques (Tableau III.4) ont été assignées par expérience HSQC.

Le point de branchement de sucre est confirmé par expérience HMBC (Figure III.57) qui montre la corrélation entre le proton anomère du xylose (4,51 ppm) et le carbone C-3 (88,7 ppm) de la génine.

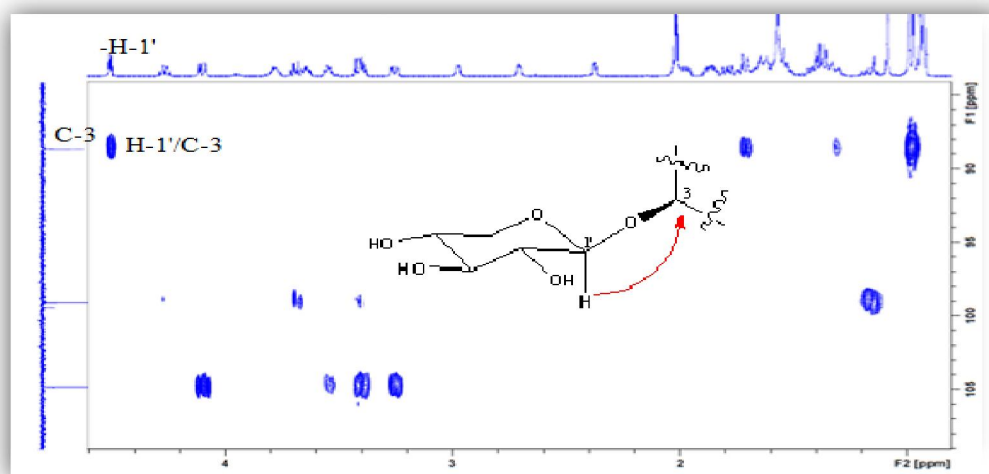
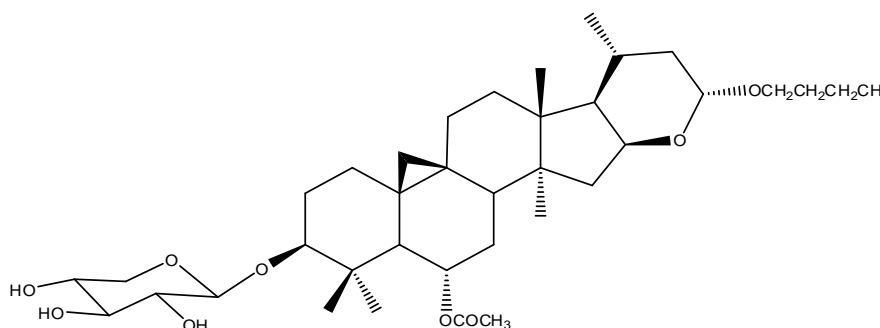


Figure III.57: Spectre HMBC mettant en évidence la séquence de sucre

L'ensemble de ces données spectroscopiques (Tableau III.4) permettent l'attribution au composé **4** la structure suivante: 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl]-6 α -acétoxy-23 α -butoxy-16 β ,23(*R*)-époxy-24,25,26,27-tetranorcyloartane, appelée aussi gomboside D.



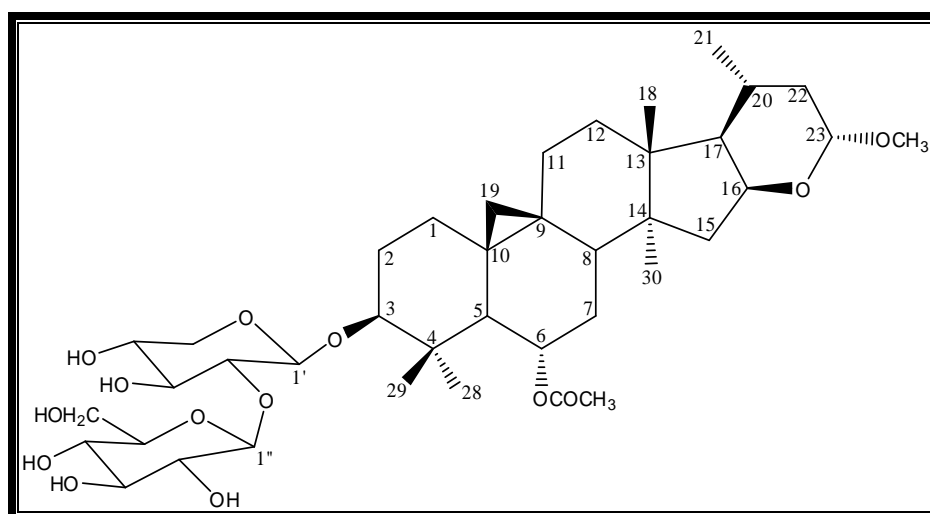
Il n'est pas à exclure que ce composé nouveau, au regard de la recherche bibliographique réalisée, soit un artéfact formé durant la phase d'extraction au *n*-butanol.

Le tableau suivant reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé 4.

Tableau III.4: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé 4 dans CDCl_3

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	31,8	1,60-1,32 (m)
2	29,1	2,01-1,74 (m)
3	88,7	3,2 (dd, 11,5; 4,6)
4	41,8	-
5	49,9	1,71 (d, 9,4)
6	70,4	4,75 (m)
7	33,1	1,63-1,35 (m)
8	44,3	1,97 (m)
9	21,1	-
10	28,0	-
11	26,1	1,87-1,35 (m)
12	32,1	1,63-1,55 (m)
13	44,8	-
14	45,9	-
15	43,0	1,79 (dd, 12,3; 7,9) 1,42 nd
16	70,4	4,27 (q, 7,9)
17	56,5	1,55 nd
18	19,8	1,09 (s)
19	28,3	0,61 (d, 4,8) 0,33 (d, 4,8)
20	25,5	1,67 (m)
21	20,6	0,94 (d, 6,1)
22	38,0	1,86-1,15 (m)
23	99,1	4,83 (t, 7,2)
28	26,8	0,99 (s)
29	16,4	0,97 (s)
30	19,3	0,93 (s)
CO	170,6	-
OCOCH ₃	22,1	2,02 (s)
1'	104,9	4,51 (d, 5,7)
2'	72,4	3,55 (dd, 9,3; 5,7)
3'	73,9	3,64 (dd, 11,6; 9,3)
4'	69,9	3,78 (ddd, 11,6; 7,3; 4,0)
5'	63,9	4,10 (dd, 12,0; 4,0) 3,40 (dd, 12,0; 7,3)
1''	67,3	3,69 (dt, 9,8; 6,8) 3,40 (m)
2''	32,9	1,54 (m)
3''	19,6	1,38 (m)
4''	14,1	0,92 (t, 7,1)

III. 2.3.5 Elucidation structurale du composé 5



3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-6 α -acétoxy-23 α -méthoxy-16 β ,23(R)-époxy-24,25,26,27-tetranorcyloartane (5)

Le spectre de masse ESI (Figure III.58) enregistré en mode positif, montre un pic d'ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à m/z 791, correspondant à une masse moléculaire de 768 uma et une formule brute en $C_{40}H_{64}O_{14}$. Cette formule est confirmée par le spectre de masse HRESIMS (Figure III.59) montrant un pic à m/z 791,5141 (calc. $C_{40}H_{64}O_{14}Na$, 791,4188).

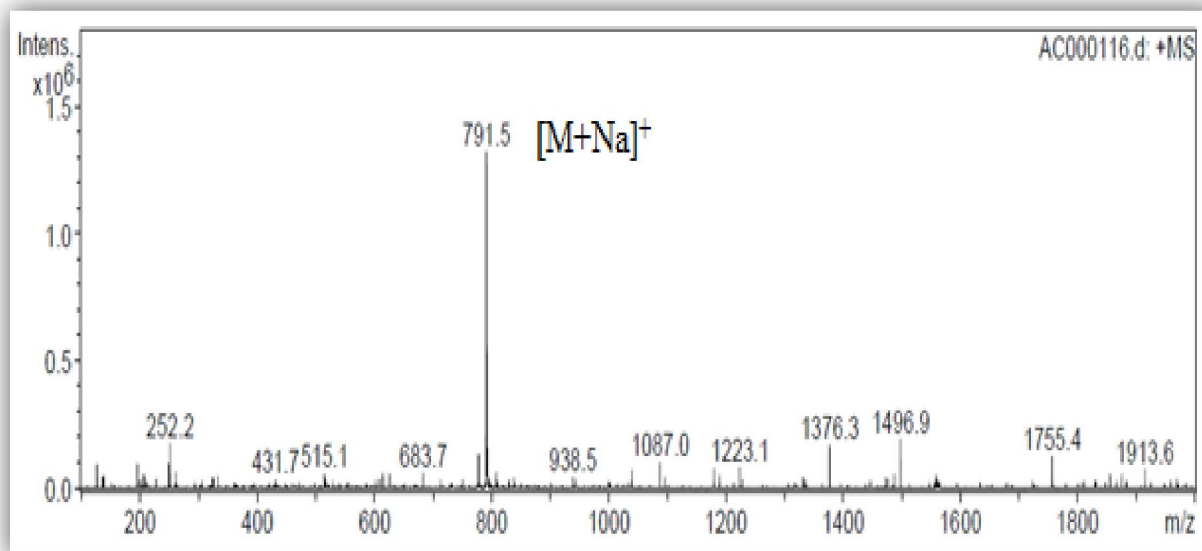


Figure III.58: Spectre de masse ESI⁺ du composé 5

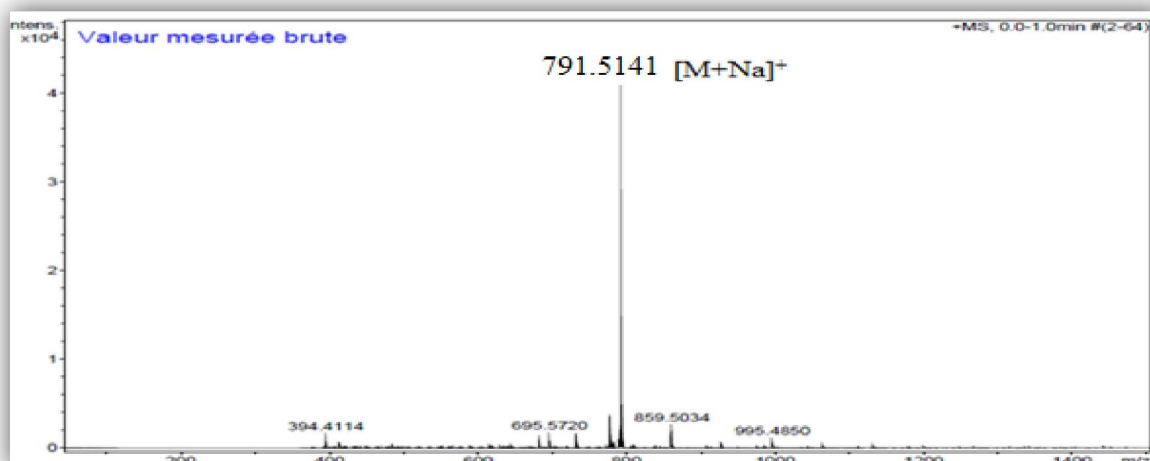


Figure III.59: Spectre de masse HRESIMS du composé 5

L'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C DEPT du composé 5 (Figures III.60 et III.61) montre une grande similitude structurale, notamment au niveau de la génine, avec le composé 3 déjà identifié. En effet, on observe les signaux caractéristiques des protons et carbones de la génine cycloartanique à :

- δ_{H} 1,12/ δ_{C} 20,4 (CH₃-18, *s*), δ_{H} 0,94/ δ_{C} 20,9 (CH₃-21, *d*, $J = 6,3$ Hz), δ_{H} 1,05/ δ_{C} 27,2 (CH₃-28, *s*), δ_{H} 0,98/ δ_{C} 16,6 (CH₃-29, *s*), δ_{H} 0,96/ δ_{C} 19,8 (CH₃-30, *s*).
- δ_{H} 0,61/ δ_{C} 29,3 (CH-19 *endo*, *d*, $J = 4,8$ Hz), δ_{H} 0,37/ δ_{C} 29,3 (CH-19 *exo*, *d*, $J = 4,8$ Hz).
- δ_{H} 3,23/ δ_{C} 89,8 (CH-3, *dd*, $J = 10,6; 4,3$ Hz), δ_{H} 4,74/ δ_{C} 71,9 (CH-6, *m*), δ_{H} 4,23/ δ_{C} 71,9 (CH-16, *q*, $J = 7,6$ Hz), δ_{H} 4,70/ δ_{C} 101,7 (CH-23, *t*, $J = 7,1$ Hz).
- δ_{H} 3,31/ δ_{C} 55,2 (OCH₃, *s*), δ_{H} 1,99/ δ_{C} 22,0 (OCOCH₃, *s*), δ_{C} 172,6 (CO).

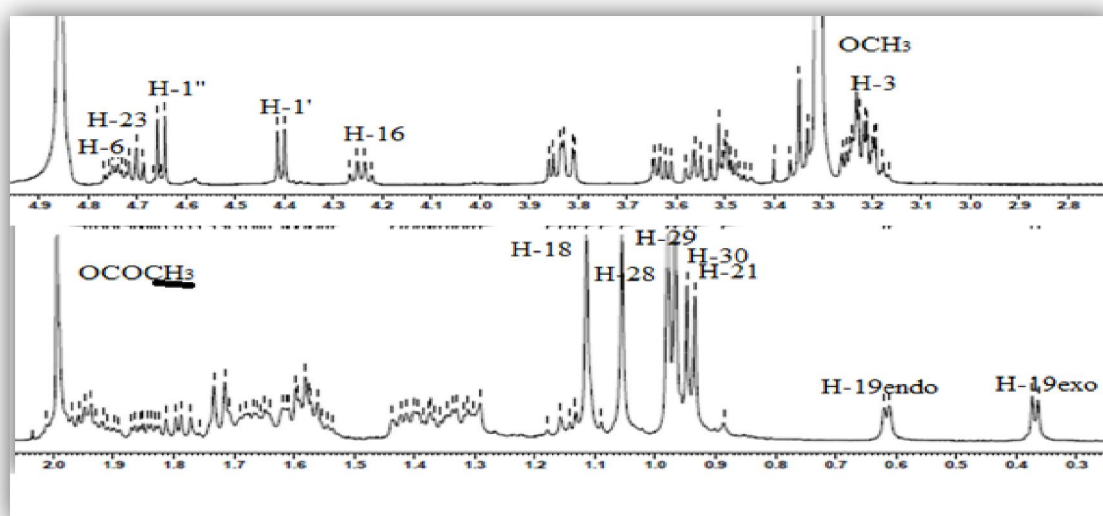


Figure III.60: Spectre RMN ^1H du composé 5

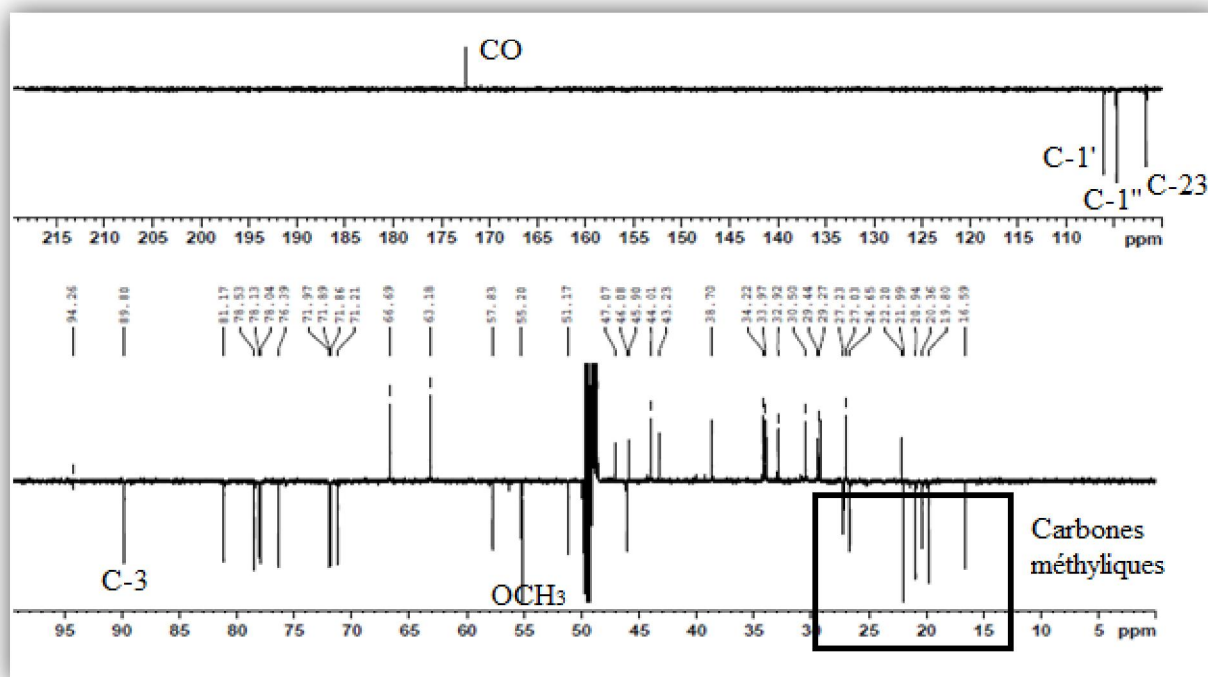


Figure III.61: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé 5

Cette analyse appuyée par celle des spectres HMBC et HSQC montre clairement que cette génine est totalement identique à celle du composé 3.

La différence entre les composés 5 et 3 réside donc au niveau de la partie osidique. En effet, le spectre RMN ^1H permet d'observer deux signaux caractéristiques de protons anomères à δ_{H} 4,41 (*d*, $J = 7,5$ Hz, H-1') et δ_{H} 4,66 (*d*, $J = 7,9$ Hz, H-1'') indiquant la présence de deux unités osidiques identifiées par analyse COSY H-H.

A partir du premier proton anomère sortant à 4,41 ppm, cette dernière a permis d'identifier comme pour le composé 3, un β -D-xylose. La différence de 162 uma entre les composés 3 et 5 permet d'avancer l'existence d'un hexose comme second sucre dont le proton anomère sort à 4,66 ppm. Partant de ce dernier, l'analyse du spectre COSY H-H (Figure III.62) met en évidence un système de spins à sept protons confirmant la présence d'un hexose à travers les couplages:

- H-1''/H-2'' (δ_{H} 3,19, *t*, $J = 7,9$ Hz)
- H-2''/H-3'' (δ_{H} 3,36, *t*, $J = 7,9$ Hz)
- H-3''/H-4'' (δ_{H} 3,51, *t*, $J = 7,9$ Hz)
- H-4''/H-5'' (δ_{H} 3,24, *ddd*, $J = 7,9; 6; 2,3$ Hz)
- H-5''/H-6''b (δ_{H} 3,63, *dd*, $J = 11,5; 6,0$ Hz)
- H-6''b/H-6''a (δ_{H} 3,82, *dd*, $J = 11,5; 2,3$ Hz)

Les grandes valeurs de constantes de couplage indiquent que l'hexose est un D-glucose de configuration β ($J_{1''-2''} = 7,9$ Hz).

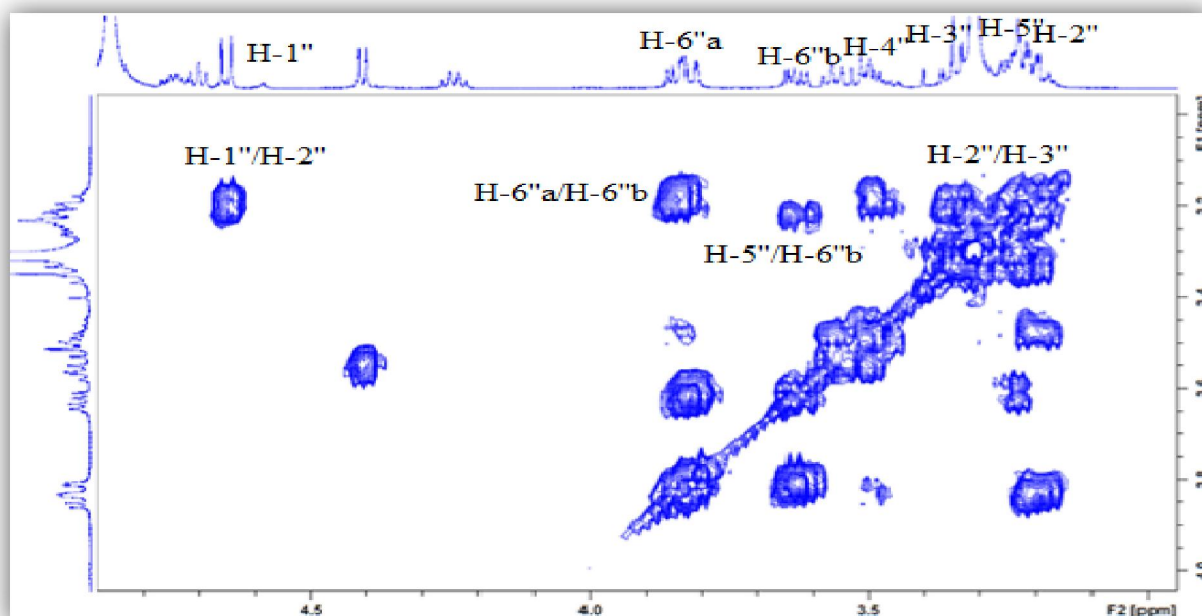


Figure III.62: Spectre COSY H-H mettant en évidence l'unité β -D-glucose (composé 5)

L'analyse du spectre HSQC (Figure III.63) permet d'attribuer tous les carbones du β -D-glucose : C-1'' (δ_C 104,8), C-2'' (δ_C 76,4), C-3'' (δ_C 78,0), C-4'' (δ_C 78,1), C-5'' (δ_C 78,5) et C-6'' (δ_C 63,2).

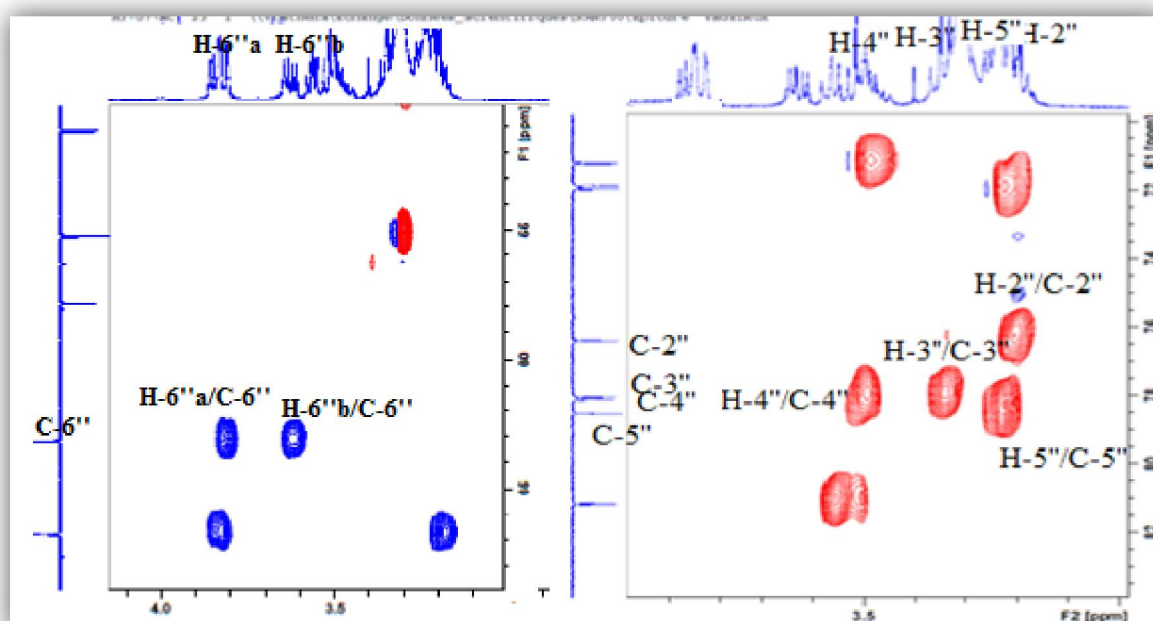


Figure III.63: Spectre HSQC mettant en évidence l'unité β -D-glucose (composé 5)

Le séquençage de la partie osidique est réalisé par analyse du spectre HMBC (Figure III.64) à travers les corrélations $^3J_{H-C}$ H-1'_{xy}/C-3 de la génine et H-1''_{glc}/C-2'_{xy} indiquant que cette saponine est de nature monodesmosidique.

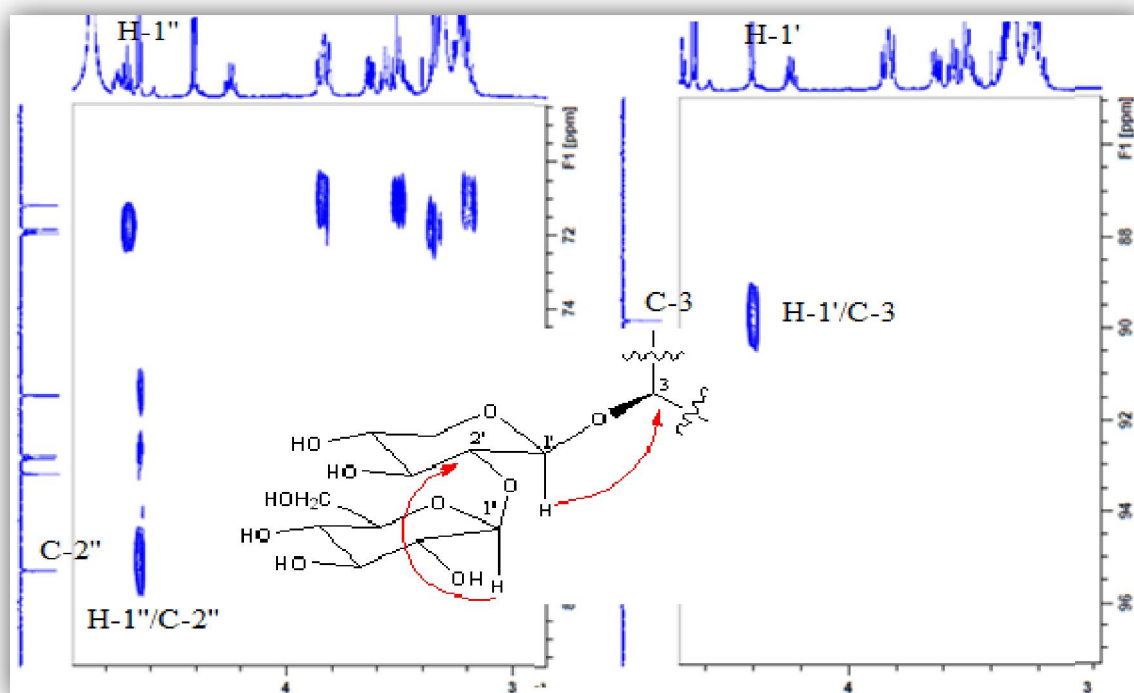
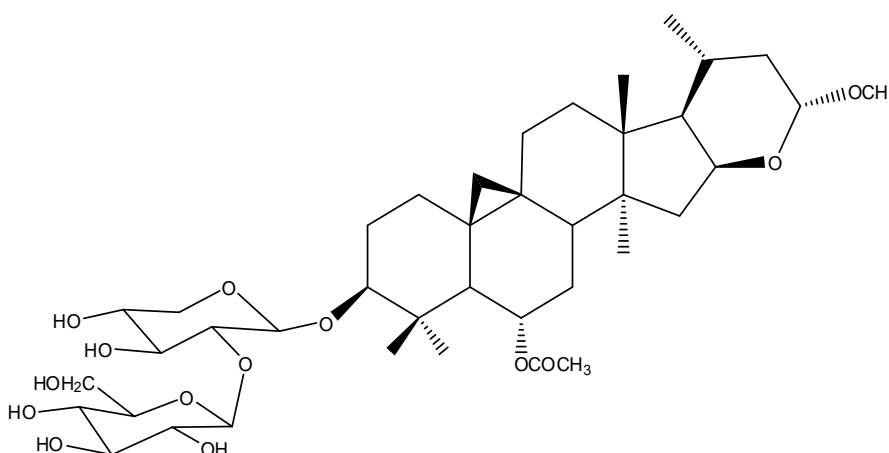


Figure III.64: Spectre HMBC mettant en évidence la séquence de sucre

Toutes ces données spectrales (Tableau III.5) permettent de proposer pour le composé **5** la structure suivante : 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-6 α -acétoxy-23 α -méthoxy-16 β ,23(*R*)-époxy-24,25,26,27-tetranorcyloartane, appelée aussi gomboside E. Ces données confrontées également à celles de la littérature attestent de la nouveauté de ce composé.

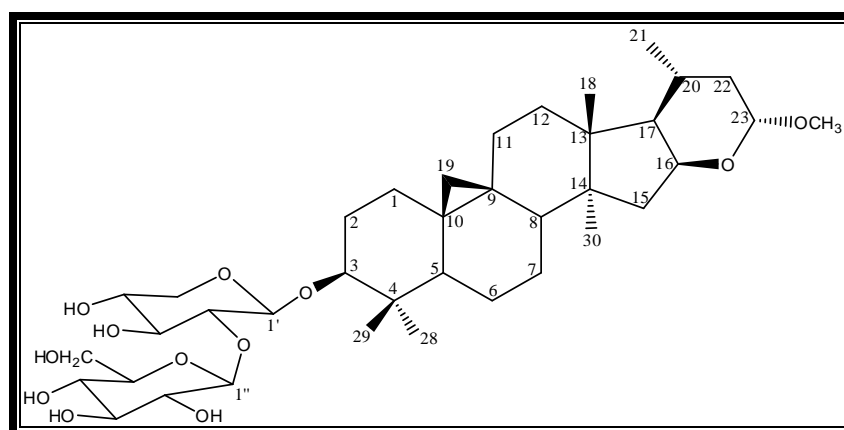


Le tableau suivant reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **5**.

Tableau III.5: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé 5 dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	32,9	1,60-1,31 (m)
2	30,5	1,98-1,70 (m)
3	89,8	3,23 (dd, 10,6; 4,3)
4	43,2	-
5	51,2	1,72 (d, 9,4)
6	71,9	4,74 (m)
7	34,2	1,66-1,58 (m)
8	46,1	1,95 (dd, 10,1; 5,2)
9	22,2	-
10	29,4	-
11	27,0	1,91-1,39 (m)
12	34,0	1,66-1,58 (m)
13	45,9	-
14	47,1	-
15	44,0	1,79 (dd, 11,9; 8,3) 1,42 (dd, 11,9; 6,5)
16	71,9	4,23 (q, 7,6)
17	57,8	1,57 nd
18	20,4	1,12 (s)
19	29,3	0,61 (d, 4,8) 0,37 (d, 4,8)
20	26,6	1,66 (m)
21	20,9	0,94 (d, 6,3)
22	38,7	1,85-1,12 (m)
23	101,7	4,70 (t, 7,1)
28	27,2	1,05 (s)
29	16,6	0,98 (s)
30	19,8	0,96 (s)
OCH ₃	55,2	3,31 (s)
CO	172,6	-
OCOCH ₃	22,0	1,99 (s)
1'	106,1	4,41 (d, 7,5)
2'	81,2	3,56 (t, 7,5)
3'	71,2	3,48 (t, 7,5)
4'	73,0	3,22 (t, 7,5)
5'	66,7	3,84 (dd, 10,8; 4,6) 3,20 (t, 10,8)
1''	104,8	4,66 (d, 7,9)
2''	76,4	3,19 (t, 7,9)
3''	78,0	3,36 (t, 7,9)
4''	78,1	3,51 (t, 7,9)
5''	78,5	3,24 (ddd, 7,9; 6,0; 2,3)
6''	63,2	3,82 (dd, 11,5; 2,3) 3,63 (dd, 11,5; 6,0)

III. 2.3.6 Elucidation structurale du composé 6



**3-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-23 α -méthoxy-16 β ,23(R)-époxy-
24,25,26,27-tetranorcycloartane (6)**

Le spectre de masse ESI⁺ du composé **6** (Figure III.65) présente un pic d'ion pseudomoléculaire [M+Na]⁺ à m/z 733, soit une masse moléculaire de 710 uma correspondant à une formule brute en C₃₈H₆₂O₁₂, confirmée par HRESIMS (Figure III.66) qui montre un pic à m/z 733,5020 (calc. C₃₈H₆₂O₁₂Na, 733,4133).

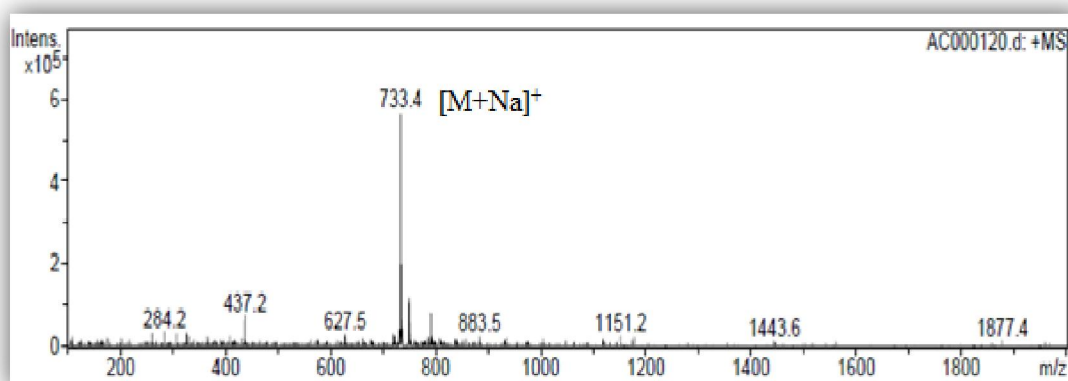


Figure III.65: Spectre de masse ESI⁺ du composé 6

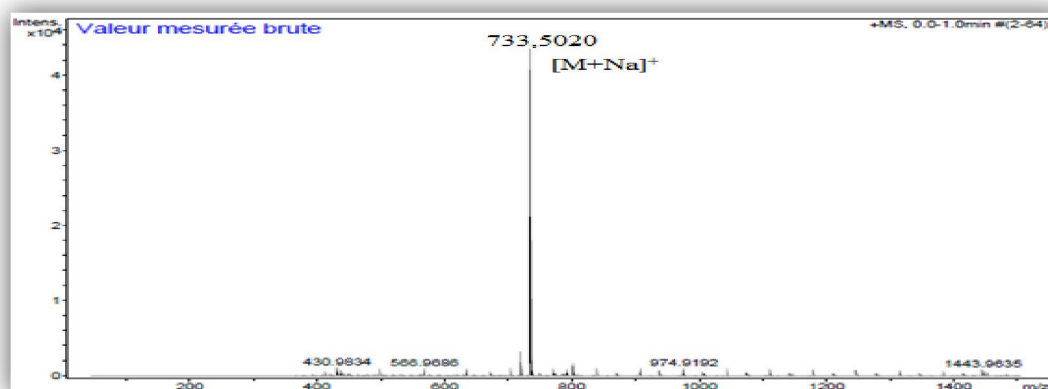


Figure III.66: Spectre de masse HRESIMS du composé 6

L'analyse des spectres RMN ^1H et ^{13}C DEPT (Figures III.67 et III.68) montre clairement que le composé **6** est de constitution quasi-identique à celle du composé **5**, c'est-à-dire la présence d'une génine cycloartanique et deux unités osidiques. On reconnaît, en s'appuyant sur les expériences HSQC et HMBC, tous les signaux de protons et carbones caractérisant la génine décrite précédemment (Composé **5**), à savoir:

- les signaux des groupements méthyles : CH₃-18 [δ_{H} 1,08 (s)/ δ_{C} 20,1], CH₃-21 [δ_{H} 0,87 (d, $J = 5,9$ Hz)/ δ_{C} 20,1], CH₃-28 [δ_{H} 0,89 (s)/ δ_{C} 25,0], CH₃-29 [δ_{H} 0,77 (s)/ δ_{C} 14,5], CH₃-30 [δ_{H} 0,83 (s)/ δ_{C} 19,2].
- les deux signaux fortement blindés du noyau cyclopropane CH₂-19 [δ_{H} 0,28; 0,54 (d, $J = 3,5$ Hz)/ δ_{C} 29,5].
- les signaux de groupements oxyméthines: CH-3 [δ_{H} 3,09 (dd, $J = 11,7; 4,1$ Hz)/ δ_{C} 87,4], CH-16 [δ_{H} 4,11 (q, $J = 7,6$ Hz)/ δ_{C} 69,7], CH-23 [δ_{H} 4,65 (t, $J = 7,2$ Hz)/ δ_{C} 99,3].
- le signal du groupement méthoxyle OCH₃ [δ_{H} 3,19 (s)/ δ_{C} 54,1].

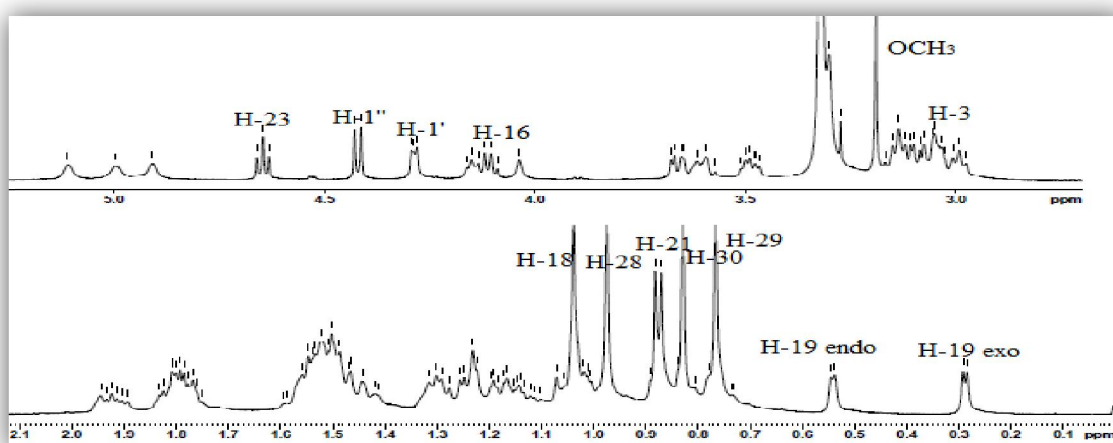


Figure III.67: Spectre RMN ^{13}C du composé **6**

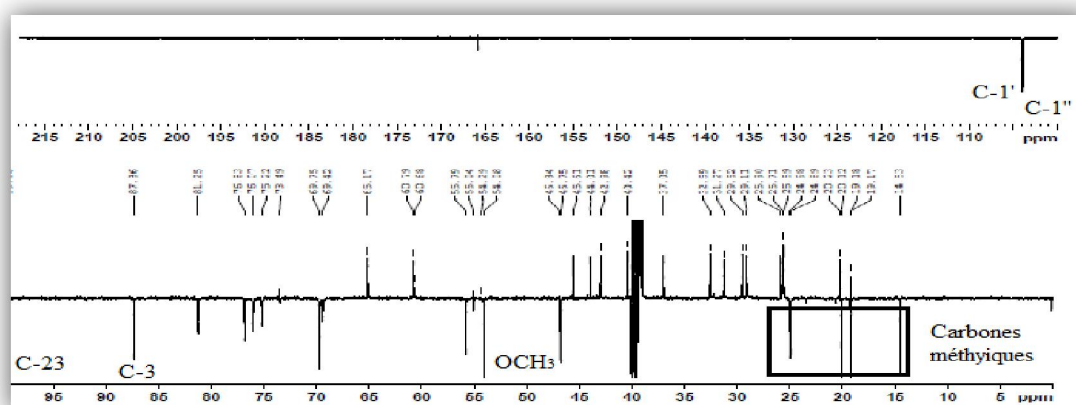


Figure III.68: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **6**

La seule différence notable entre le composé **6** et la saponine **5** réside en la disparition des signaux du groupement acétate en C-6. L'absence du signal du proton H-6 déblindé à 4,74 ppm observé pour le composé **5** et la différence de 58 uma entre les masses des deux composés déduite de leurs spectres de masse, plaide pour cette hypothèse. Ceci est confirmé par expérience COSY H-H qui montre des couplages homonucléaires entre le proton H-5 (δ_H 1,24, *dd*, $J = 11,8; 3,7$ Hz) de la génine et deux protons non équivalents repérés à 1,49 et 0,78 ppm attribués aux protons CH₂-6. Le carbone C-6 est identifié par expérience HSQC (δ_C 20,2)

L'analyse COSY H-H de la partie osidique du composé **6** confirme sa totale similitude avec celle du composé **5**, c'est-à-dire la présence d'un β -D-xylose [H-1' (δ_H 4,29, *d*, $J = 6,9$ Hz)/C-1' (δ_C 104,1)] et d'un β -D-glucose [H-1'' (δ_H 4,42, *d*, $J = 7,7$ Hz)/C-1'' (δ_C 104,0)] (Figures III.69 et III.70). Les attributions des carbones osidiques (Tableau III.6) ont été assignées par expérience HSQC.

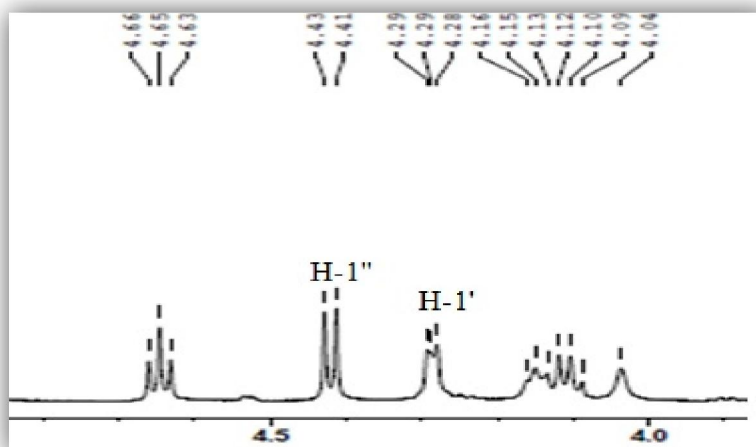


Figure III.69: Spectre RMN ¹H mettant en évidence les protons anomères (composé **6**)

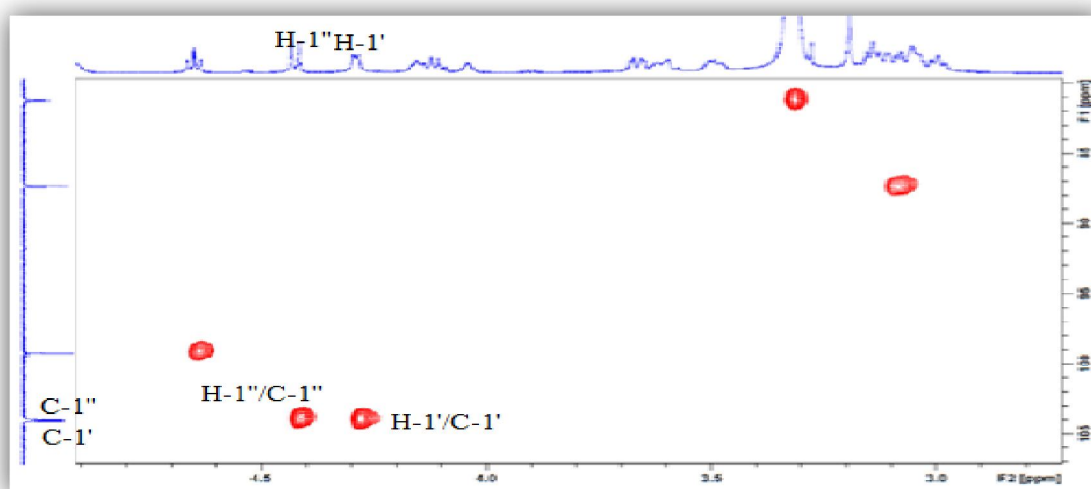


Figure III.70: Spectre HSQC mettant en évidence les protons et carbones anomères

Le point de branchement et la séquence des sucres, similaires à ceux observés pour le composé **5**, sont confirmés par expérience HMBC (Figure III.71) qui montre des corrélations entre le proton anomère du xylose résonant à 4,29 ppm et le carbone C-3 (87,4 ppm) de la génine, le proton anomère du glucose résonant à 4,42 ppm et le carbone C-2' (81,2 ppm) du xylose.

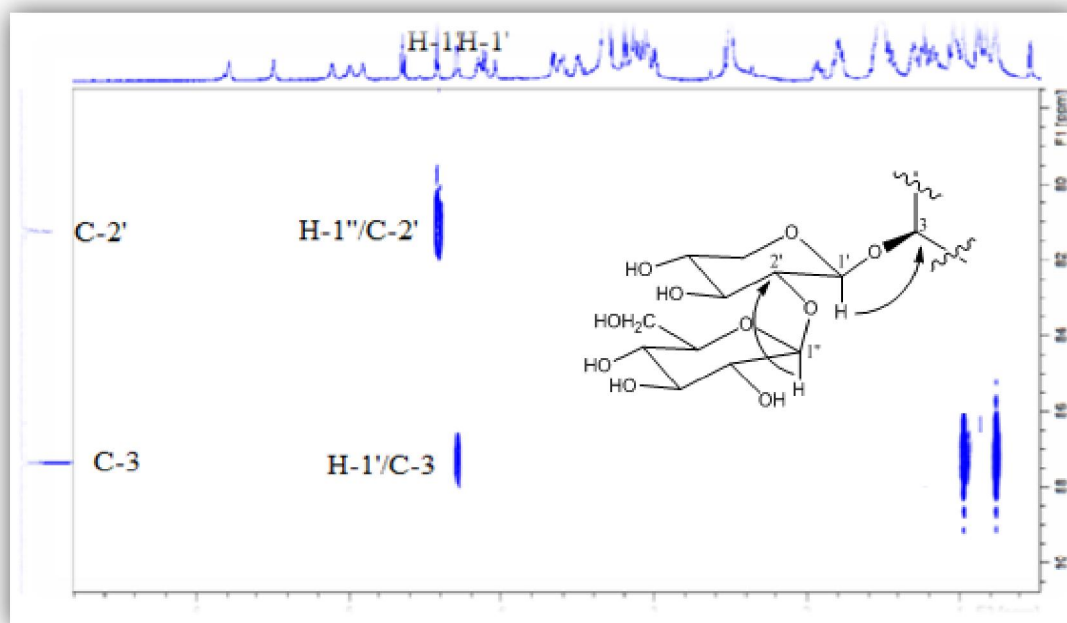
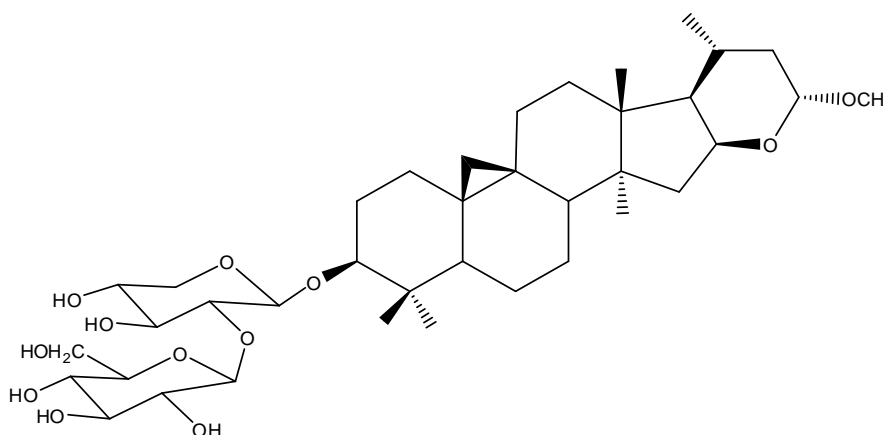


Figure III.71: Spectre HMBC mettant en évidence la séquence de sucre

L'ensemble de ces données permet d'assigner pour le composé **6** la structure nouvelle suivante: 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosil]-23 α -méthoxy-16 β ,23(*R*)-époxy-24,25,26,27-tetranorcyloartane, appelée aussi gomboside F.

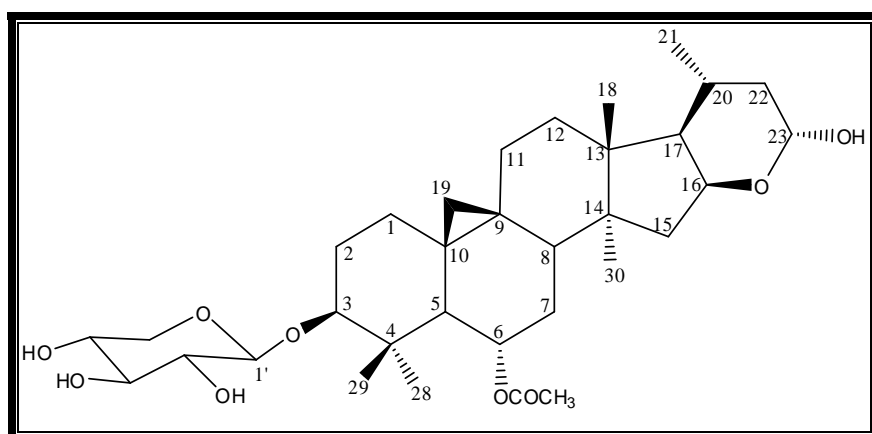


Le tableau III.6 contient tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **6**.

Tableau III.6: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé 6 dans le DMSO- d_6

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	31,3	1,43-1,17 (m)
2	29,1	1,79-1,50 (m)
3	87,4	3,09 (dd, 11,7; 4,1)
4	40,4	-
5	46,7	1,24 (dd, 11,8; 3,7)
6	20,2	1,49-0,78 (m)
7	25,7	1,29-1,02 (m)
8	46,8	1,54 nd
9	19,2	-
10	25,9	-
11	25,6	1,91-1,12 (m)
12	32,6	1,52 (m)
13	44,0	-
14	45,6	-
15	43,0	1,78-1,28 nd
16	69,7	4,11 (q, 7,6)
17	55,8	1,48 nd
18	20,1	1,08 (s)
19	29,5	0,54 (d, 3,5) 0,28 (d, 3,5)
20	24,9	1,51 (m)
21	20,1	0,87 (d, 5,9)
22	37,0	1,76-1,01 (m)
23	99,3	4,65 (t, 7,2)
28	25,0	0,89 (s)
29	14,5	0,77 (s)
30	19,2	0,83 (s)
OCH ₃	54,1	3,19 (s)
1'	104,1	4,29 (d, 6,9)
2'	81,2	3,30 (t, 6,9)
3'	69,4	3,30 (t, 6,9)
4'	69,7	3,12 (m)
5'	65,2	3,66 (dd, 11,3; 3,2) 3,03 (t, 11,3)
1''	104,0	4,42 (d, 7,7)
2''	75,2	2,99 (t, 7,7)
3''	76,1	3,14 (t, 7,7)
4''	76,1	3,30 (t, 7,7)
5''	76,8	3,03 (m)
6''	60,8	3,59 (m) 3,48 (dd, 11,4; 4,3)

III. 2.3.7 Elucidation structurale du composé 7



3-O-[β -D-xylopyranosyl]-6 α -acétoxy-23 α -hydroxy-16 β ,23(R)-époxy-24,25,26,27-tetranorcycloartane (7)

Le spectre de masse ESI enregistré en mode positif (Figure III.72), présente des pics d'ions pseudomoléculaires à m/z 615 $[M+Na]^+$ et 1207 $[2M+Na]^+$. Ceci correspond à une masse moléculaire de 592 uma et une formule brute en $C_{33}H_{52}O_9$.

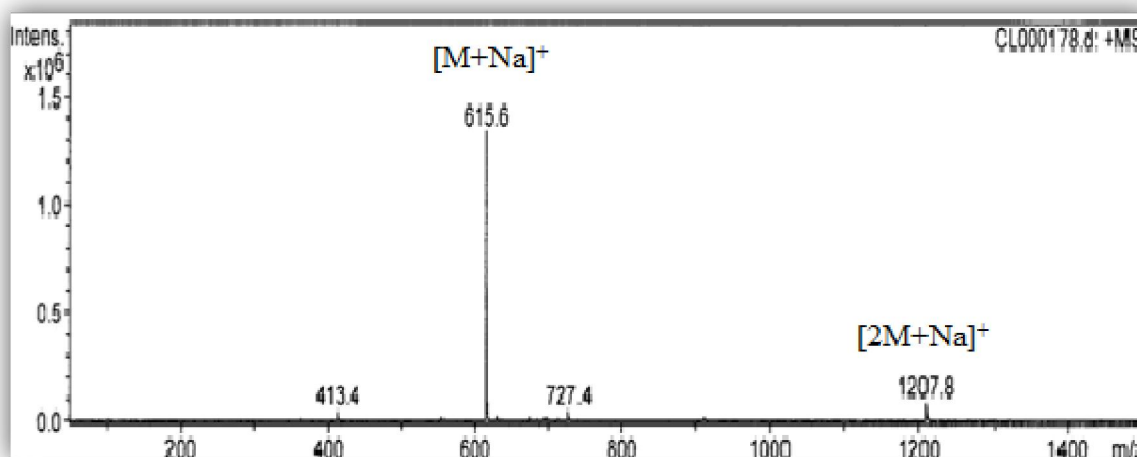


Figure III.72: Spectre de masse ESI en mode positif du composé 7

Les spectres RMN 1H et ^{13}C DEPT du composé 7 (Figures III.73 et III. 75), supportés par les expériences COSY H-H, HMBC et HSQC, sont globalement similaires à ceux du composé 3 (Figures IV.74 et 76). En effet, On identifie:

- une même génine à squelette cycloartane à travers les signaux caractéristiques des méthyles (CH₃-18 [δ_H 1,1 (*s*)/ δ_C 20,3], CH₃-21 [δ_H 0,95 (*d*, $J = 6,3$ Hz)/ δ_C 21,0], CH₃-28 [δ_H 0,97 (*s*)/ δ_C 27,2], CH₃-29 [δ_H 1,03 (*s*)/ δ_C 16,5] et CH₃-30 [δ_H 0,97 (*s*)/ δ_C 19,8], du noyau cyclopropane (CH₂-19 [δ_H 0,35; 0,60 (*d*, $J = 4,5$ Hz)/ δ_C 29,4], des groupements oxyméthines (CH-3 [δ_H 3,22 (*dd*, $J = 10; 4,3$ Hz)/ δ_C 89,3], CH-6 [δ_H

4,75(m)/ δ_C 71,9], CH-16 [δ_H 4,38 (q, $J = 7,2$ Hz)/ δ_C 71,9], CH-23 [δ_H 5,12 (t, $J = 7,8$ Hz)/ δ_C 94,3]).

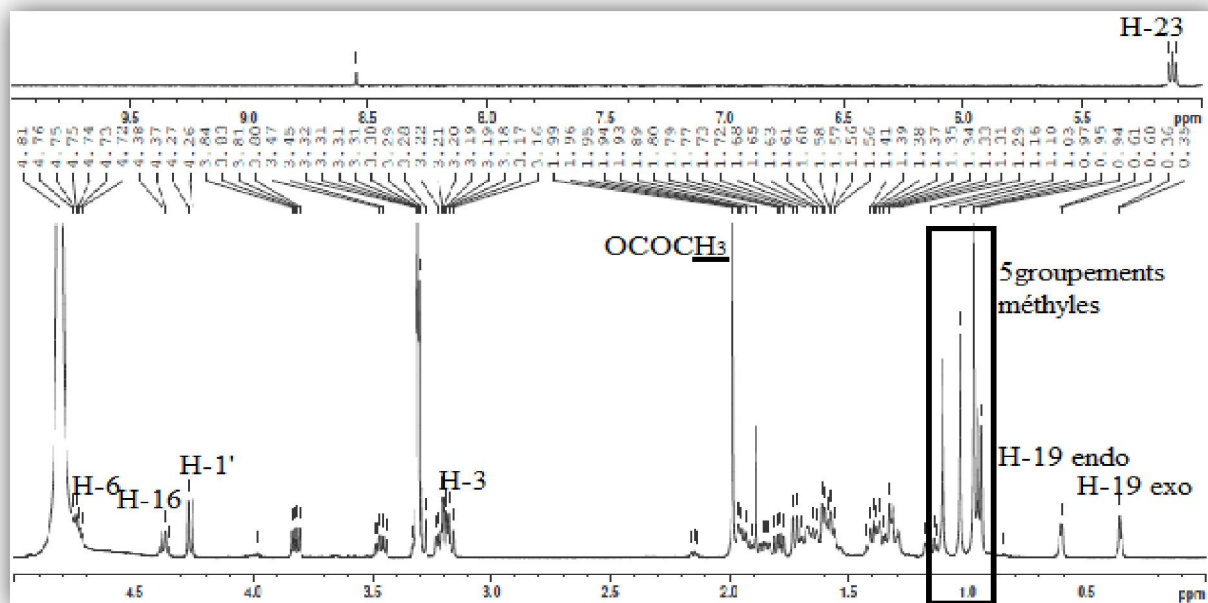


Figure III.73: Spectre RMN ^1H du composé 7

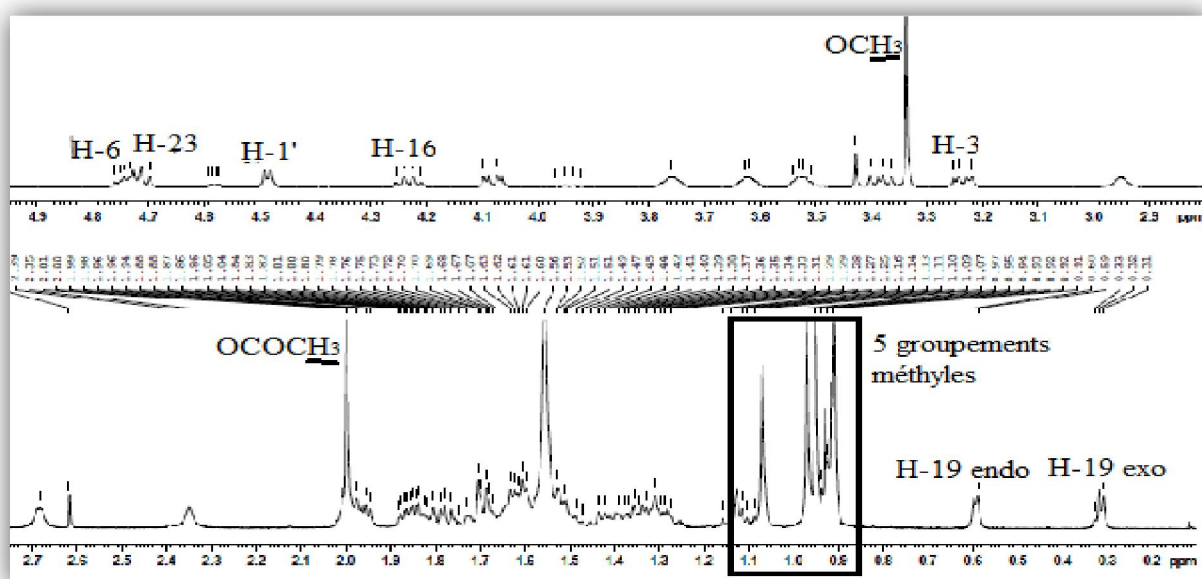


Figure III.74: Spectre RMN ^1H du composé 3

- une même unité osidique, c'est-à-dire la présence d'un β -D-xylose, à travers les signaux caractéristiques suivants : CH-1' [δ_H 4,27 (d, $J = 7,5$ Hz)/ δ_C 107,5], CH-2' [δ_H 3,20 (dd, $J = 8,3; 7,5$ Hz)/ δ_C 75,6], CH-3' [δ_H 3,28 (t, $J = 8,3$ Hz)/ δ_C 78,1], CH-4' [δ_H 3,46 (ddd, $J = 10,4; 8,3; 5$ Hz)/ δ_C 71,4], CH₂-5'a [δ_H 3,82 (dd, $J = 10,4; 5$ Hz)/ δ_C

66,8], CH₂-5'b [δ_{H} 3,17 (*t*, *J* = 10,4 Hz)/ δ_{C} 66,8]. Toutes ces attributions ont été confirmées par analyses COSY H-H et HSQC. L'expérience HMBC ainsi que la valeur de déplacement chimique du carbone C-3 (δ_{C} 89,3 ppm) indique que l'unité osidique substitue la génine en C-3 (Figure III.77).

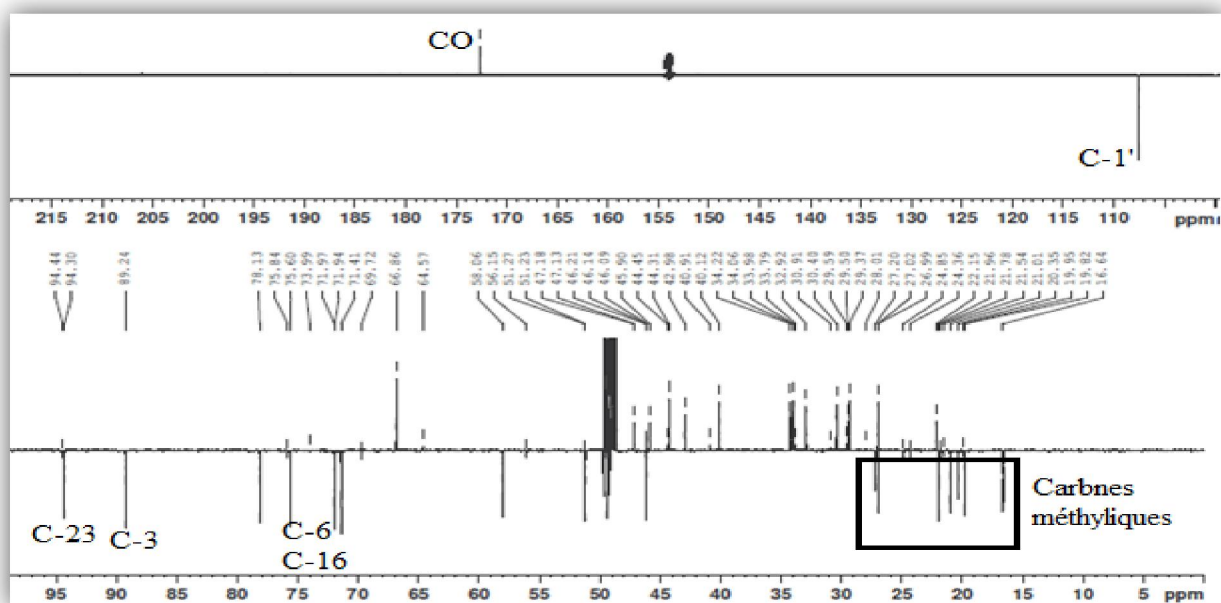


Figure III.75: Spectre RMN ¹³C DEPT du composé 7

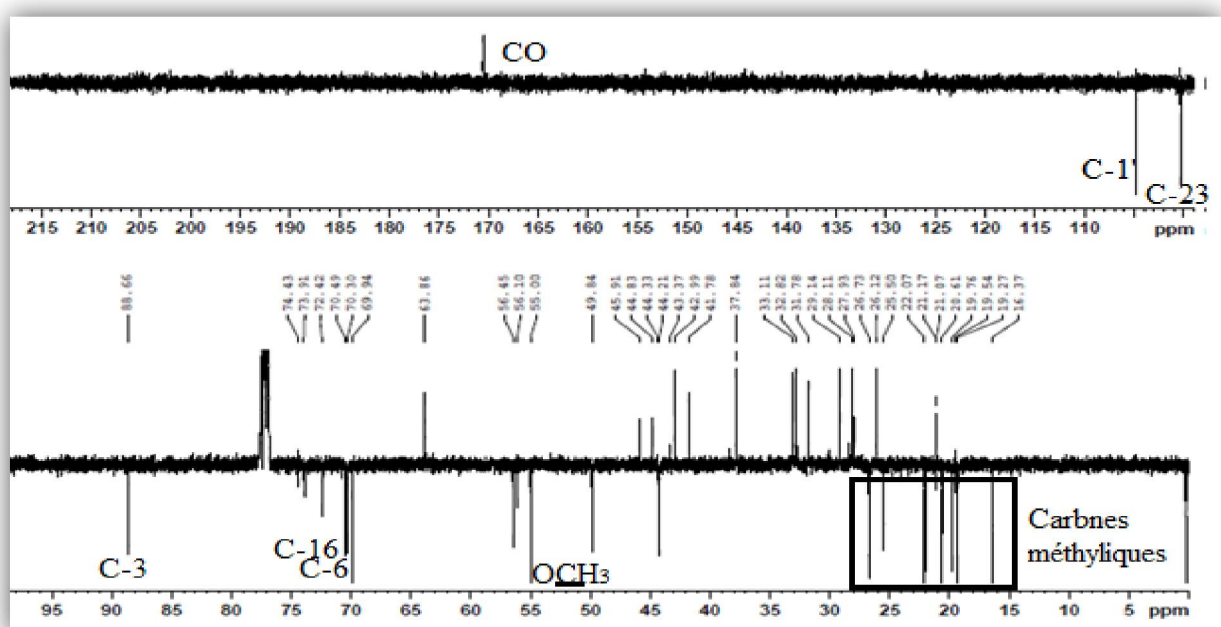


Figure III.76: Spectre RMN ¹³C DEPT du composé 3

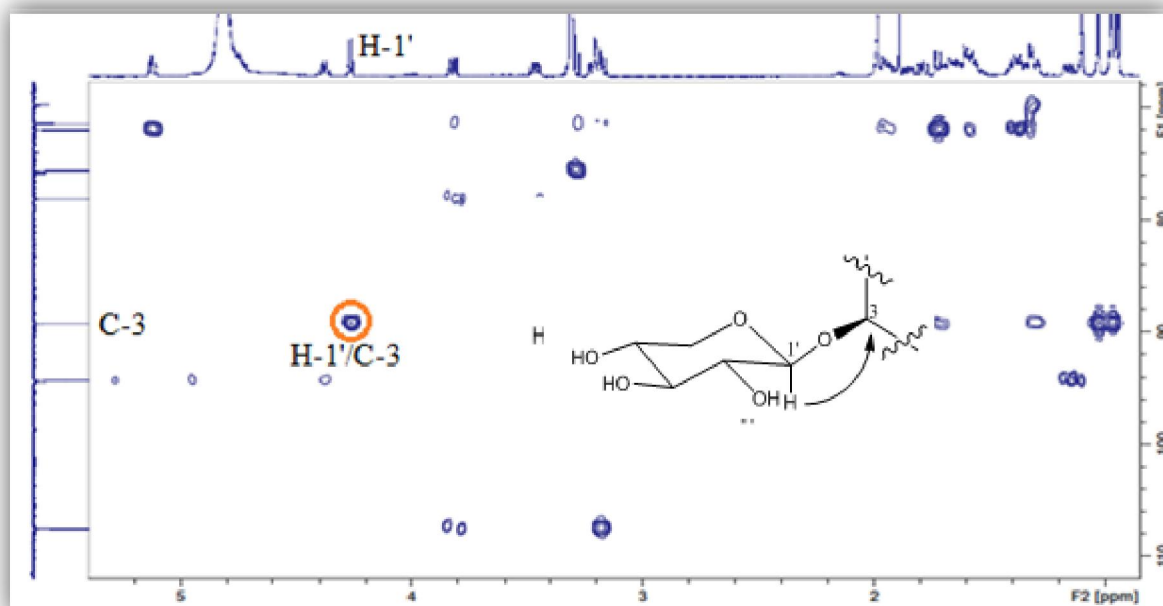
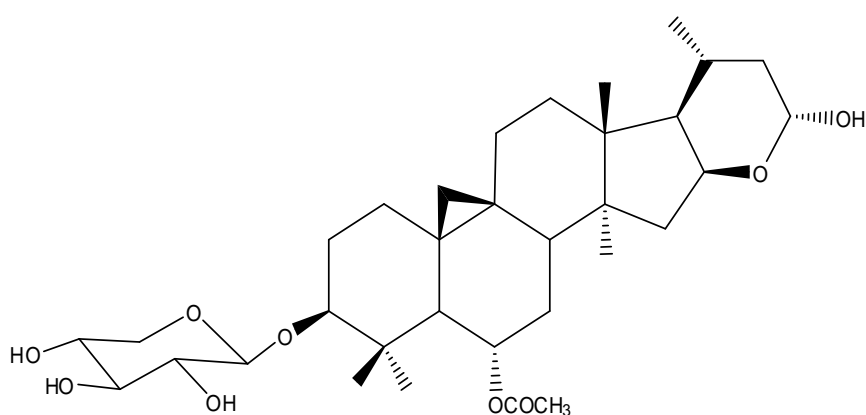


Figure III.77: Spectre HMBC mettant en évidence la position de sucre (composé 7)

La seule et unique différence constatée comparativement au composé **3**, a trait à la disparition du groupement méthoxyle en C-23 de la génine. Ceci est conforté par le déblindage du signal de proton H-23 résonant à 5,12 ppm au lieu de 4,71 ppm pour le composé **3** et la différence de 14 uma observée au niveau des spectres de masse, confirmant la présence d'un groupement hydroxyle en C-23 à la place du groupement OCH₃.

En vertu de cette analyse (Tableau III.7), il a été établi sans ambiguïté pour ce composé, la structure suivante : 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl]-6 α -acétoxy-23 α -hydroxy-16 β ,23(*R*)-époxy-24,25,26,27-tetranorcycloartane.



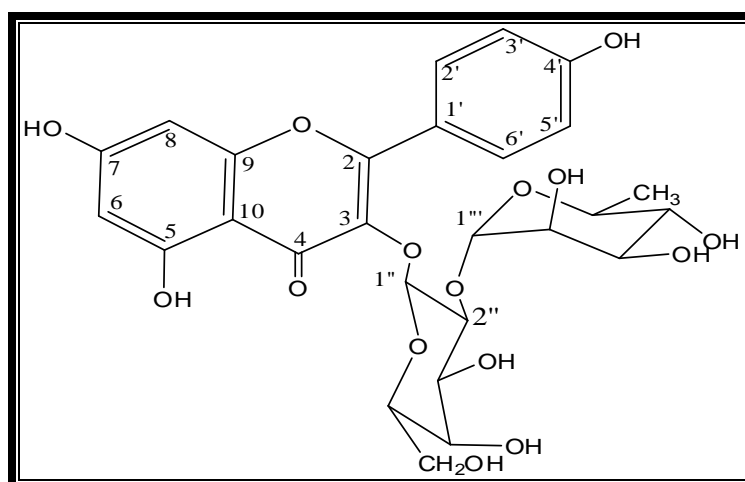
Ce composé appelé tomentoside II a été isolé antérieurement des parties aériennes d'une autre espèce du genre *Astragalus*, *A. tomentosus* [83].

Le tableau III.7 reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé 7.

Tableau III.7: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé 7 dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	33,9	1,33-1,56 (m)
2	30,4	1,63-1,95 (m)
3	89,3	3,22 (dd, 10; 4,3)
4	42,9	-
5	51,2	1,70 (d, 9,3)
6	71,9	4,75 (m)
7	32,9	1,29- 1,61 (m)
8	46,1	1,94 (m)
9	22,1	-
10	29,5	-
11	27,0	1,38 -1,89 (m)
12	34,2	1,58 -1,68 (m)
13	47,1	-
14	45,9	-
15	44,3	1,39-1,79 (m)
16	71,9	4,38 (q, 7,2)
17	58,1	1,59 (m)
18	20,3	1,1 (s)
19	29,4	0,35 (d, 4,5) 0,60 (d, 4,5)
20	26,9	1,61 (m)
21	21,0	0,95 (d, 6,3)
22	40,1	1,16 -1,85 (m)
23	94,3	5,12 (t, 7,8)
28	27,2	0,97 (s)
29	16,5	1,03 (s)
30	19,8	0,97 (s)
CO	172,6	-
OCOCH ₃	21,9	1,99 (s)
1'	107,5	4,27 (d, 7,5)
2'	75,6	3,20 (dd, 8,3; 7,5)
3'	78,1	3,28 (t, 8,3)
4'	71,4	3,46 (ddd, 10,4; 8,3; 5)
5'	66,8	3,82 (dd, 10,4; 5) 3,17 (t, 10,4)

III. 2.3.8 Elucidation structurale du composé 8

**Kaempférol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside (8)**

Le composé **8**, visible en UV (254 nm), se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Sa coloration jaune, après révélation par une solution acide et chauffage, oriente vers un composé à structure flavonoïdique.

Le spectre de masse ESI (Figure III.78) de ce composé, enregistré en mode positif, montre un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 617 $[M+Na]^+$, correspondant à une masse moléculaire de 594 uma et une formule brute en $C_{27}H_{30}O_{15}$.

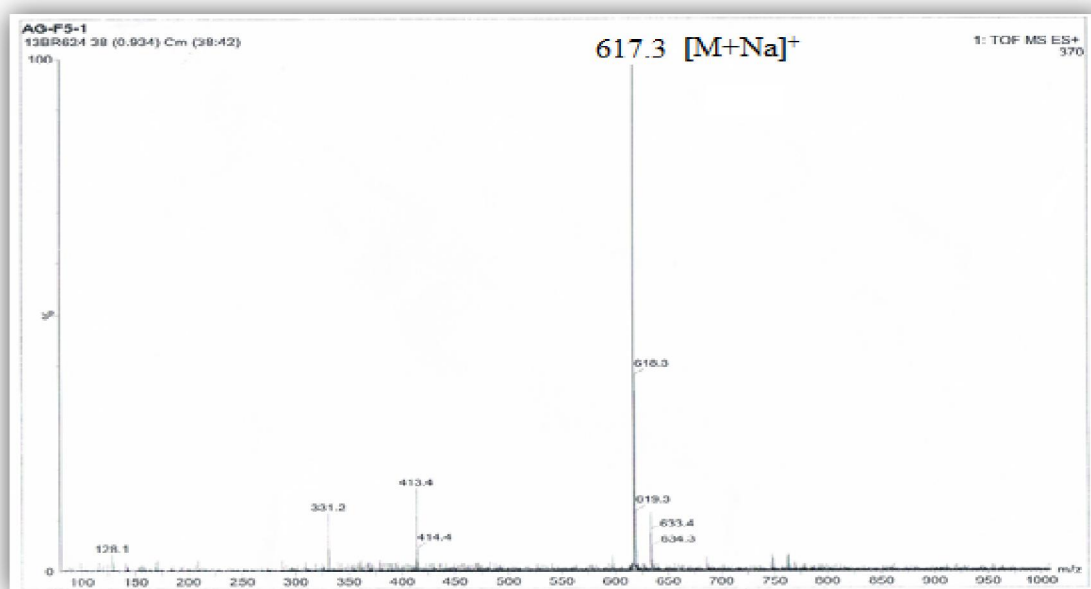


Figure III.78: Spectre de masse ESI⁺ du composé 8

Le spectre RMN 1H (Figures III.79 et III.80) enregistré dans CD_3OD montre des signaux des protons aromatiques résonants entre 6 et 8,2 ppm et osidiques entre 3 et 5,8 ppm,

suggérant que le composé **8** est un flavonoïde glycosylé. Ce spectre met aussi en évidence la présence d'un groupement méthyle à travers un signal doublet à δ_H 0,95 (3H, *d*, $J = 6,2$ Hz).

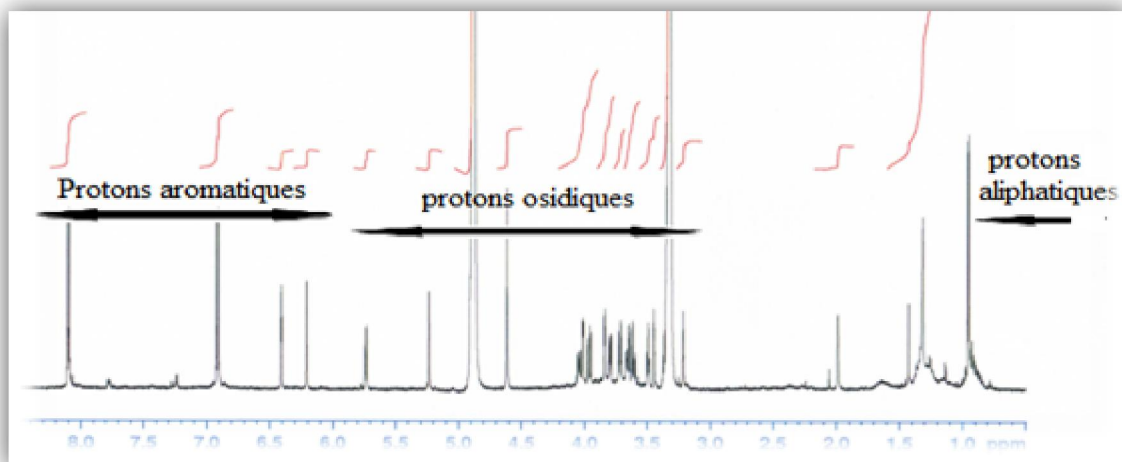


Figure III.79: Spectre RMN ^1H du composé **8**

Le spectre RMN ^1H (Figure III.80) du composé **8** présente :

- deux signaux à δ_H 6,20 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) et δ_H 6,40 (1H, *d*, $J = 2,1$ Hz) attribuables respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A du flavonoïde substitué en positions 5 et 7. Ceci est confirmé par expérience COSY H-H (Figure III.81).
- deux signaux déblindés s'intégrant pour deux protons chacun sous forme de deux doublets résonant à δ_H 8,10 (2H, *d*, $J = 6,9$ Hz) et 6,90 (2H, *d*, $J = 6,9$ Hz), attribuables aux protons du cycle B parasubstitué en position 4' comme le montre l'expérience COSY H-H (Figure III.81).

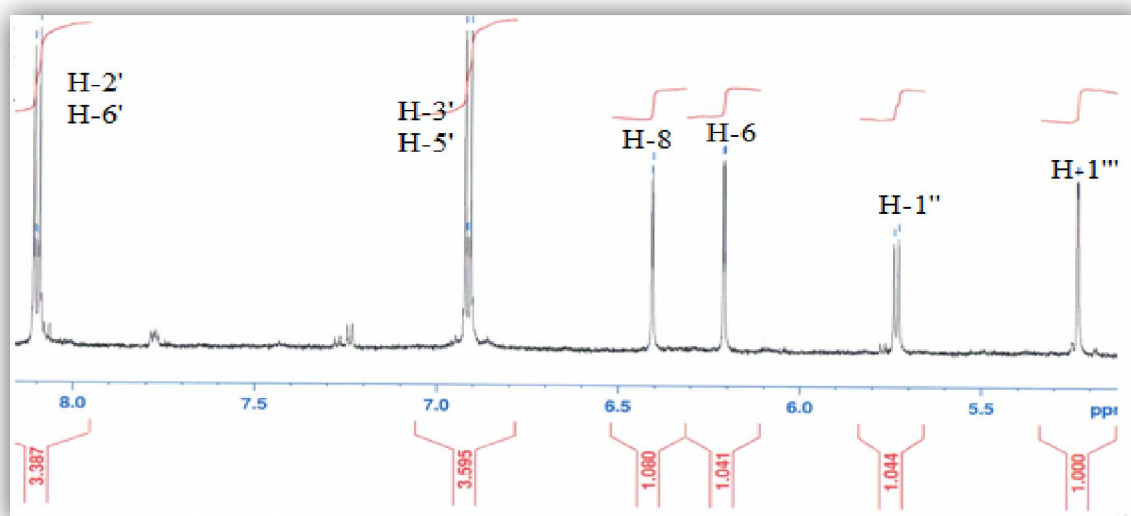


Figure III.80: Spectre RMN ^1H du composé **8**

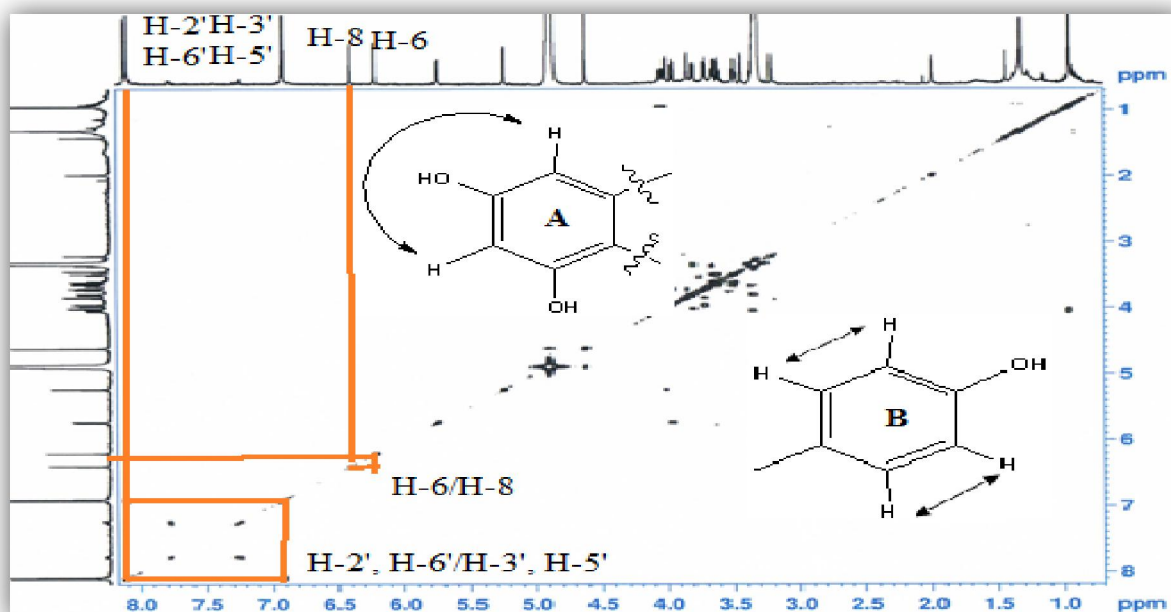


Figure III.81: Spectre COSYH-H du composé 8

- plusieurs signaux dans l'intervalle 3,30-4,5 ppm ainsi que deux signaux d'intégration $1H$ chacun à δ_H 5,20 ($d, J = 1,5$ Hz) et 5,70 ($d, J = 7,7$ Hz), établissant la présence de deux unités osidiques. La présence d'un groupement méthyle ($d, J = 6,2$ Hz) observé sur le spectre RMN 1H et la constante de couplage du premier proton anomère ($d, J = 1,5$ Hz) montre clairement qu'une des deux unités osidiques est un rhamnose.

A partir des protons cités précédemment, l'expérience hétéronucléaire HSQC permet d'identifier les carbones qui les portent (Figure III.82). Ces derniers sont repérés à δ_C 98,0 (C-6), 93,0 (C-8), 130,8 (C-2', C-6'), 114,7 (C-3', C-5'), 99,2 (C-1'') et 101,2 (C-1''').

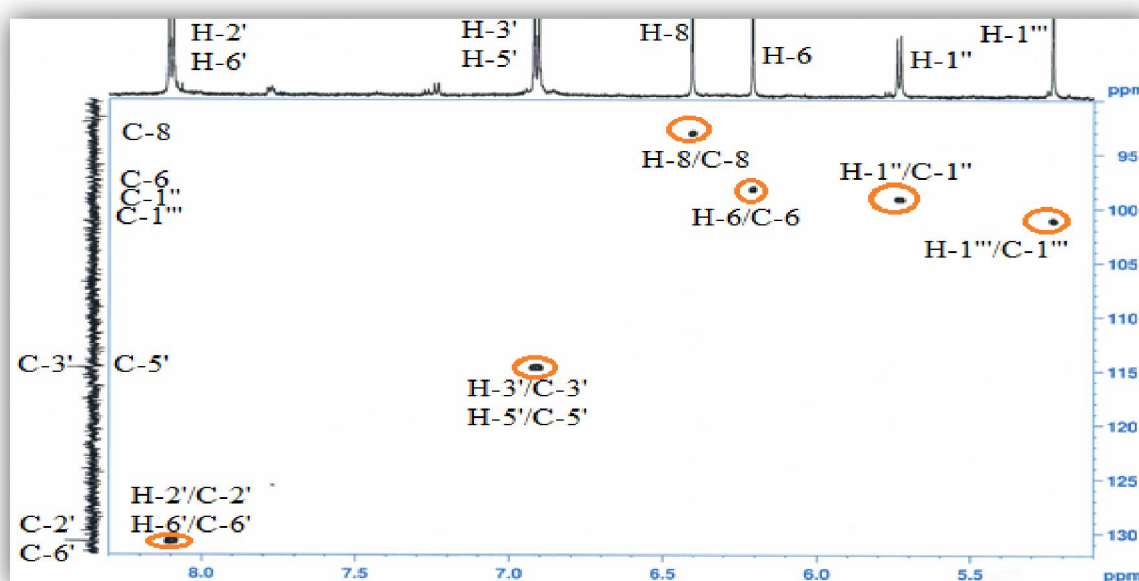


Figure III.82: Spectre HSQC du composé 8

A l'issue de cette première analyse, il apparaît que le composé **8** est un flavonoïde disubstitué sur le cycle A et parasubstitué sur le cycle B. Il est aussi porteur de deux unités osidiques dont il reste à identifier et confirmer leur nature ainsi que leur point de branchement sur l'aglycone qui est aussi à identifier.

Identification de la partie aglycone

L'identification de la génine à un flavonol, plus précisément un kaempférol glycosylé en C-3, a été établie sur la base de la valeur de déplacement chimique très caractéristique du carbone C-2 égale à 157 ppm, déduite par analyse HMBC qui montre clairement une corrélation entre les protons H-2'/H-6' du cycle B et ce carbone.

L'analyse du spectre HMBC (Figure III.83) permet de visualiser les corrélations entre:

- les protons H-3'/H-5' du cycle B et deux carbones quaternaires résonant à δ_C 122,0 et 160,0 attribuables respectivement aux carbones C-1' et C-4' oxygéné.
- les protons H-2'/H-6' et un carbone quaternaire oxygéné C-4' (δ_C 160,0).
- le proton H-8 (δ_H 6,40) et deux carbones quaternaires à δ_C 105,0 et 157,0 attribuables respectivement aux carbones C-10 et C-9 oxygéné.
- le proton H-6 (δ_H 6,20) et deux carbones quaternaires oxygénés à δ_C 162,0 et 165,0, ne pouvant être que C-5 et C-7.

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

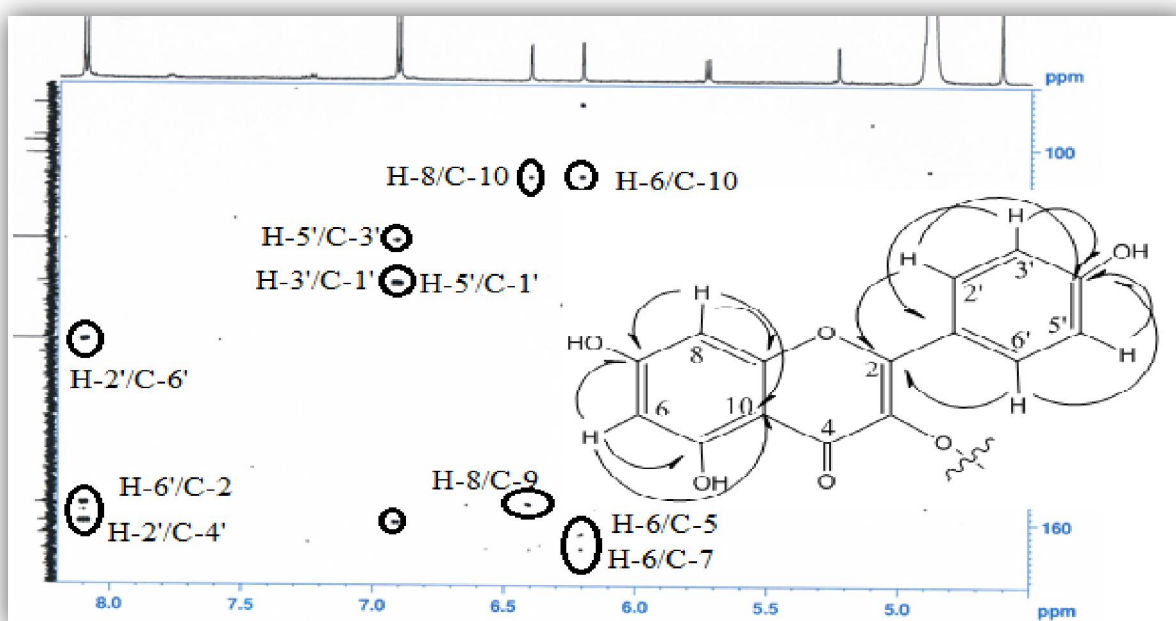
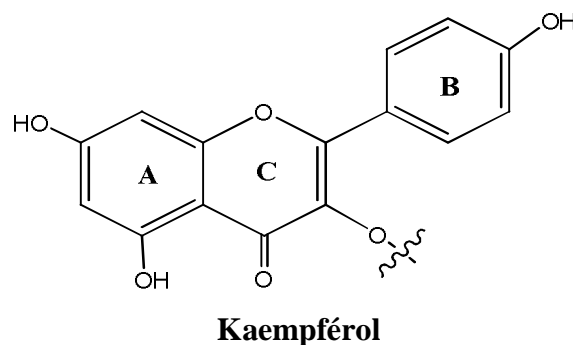


Figure III.83: Spectre HMBC de la partie aglycone du composé **8**

Le signal carbone résonant à δ_C 133,0 attribuable au carbone C-3 est confirmé par HMBC du fait de sa corrélation longue distance avec le proton anomère (δ_H 5,70) d'une unité osidique. La valeur de déplacement chimique de ce carbone confirme la glycosylation en cette position du flavonol. Le signal apparaissant à 178,0 ppm est attribué au carbonyle (C-4).

Toutes ces données spectrales permettent d'identifier l'aglycone comme étant le kaempférol, glycosylé en C-3 [36].



Identification de la partie osidique

Cette identification est évidemment effectuée au moyen de l'expérience COSY H-H.

Partant du premier proton anomère H-1" [δ_H 5,70 (*d*, $J = 7,7$ Hz)], un système de spins à sept protons d'un hexose est visualisé à travers les corrélations (Figure III.84) :

- H-1"/H-2" [δ_H 3,96 (*dd*, $J = 9,6; 7,7$ Hz)]
- H-2"/H-3" [δ_H 3,71 (*dd*, $J = 9,6; 3,1$ Hz)]
- H-3"/H-4" [δ_H 3,84 (*dl*, $J = 3,1$ Hz)]
- H-4"/H-5" [δ_H 3,49 (*m*)]
- H-5"/H₂-6" [δ_H 3,91 (*dd*, $J = 11,4; 6,1$ Hz, H-6"b)/ δ_H 3,95 (*dd*, $J = 11,4; 6,1$ Hz, H- 6"a)]

La petite valeur de constante de couplage $J_{3''-4''}$, de l'ordre de 3,1 Hz, traduisant une position équatoriale pour le proton H-4'', indique clairement que l'hexose est un galactose de configuration β ($J_{1''-2''} = 7,7$ Hz).

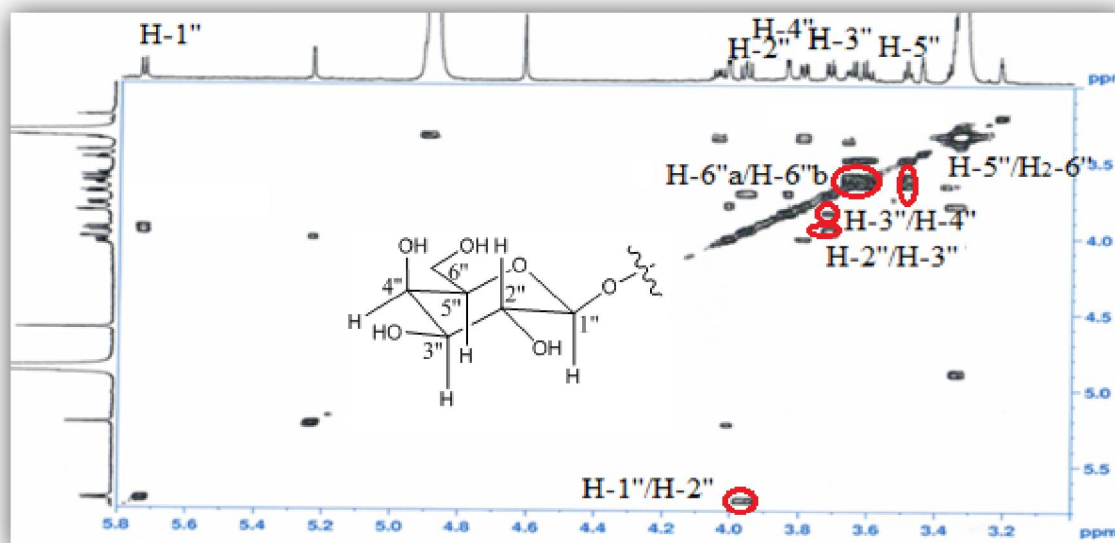


Figure III.84: Spectre COSY H-H identifiant le β -D-galactose

Partant du deuxième proton anomère H-1''' [δ_H 5,20 (*d*, $J = 1,5$ Hz)], il est aisément détectable sur le spectre COSY H-H (Figures III.85 et III.86) un autre système de spins à huit protons d'un déoxyhexose, et cela à travers les couplages: H-1'''/H-2''' (δ_H 4,01, *dd*, $J = 3,3$; 1,5 Hz), H-2'''/H-3''' (δ_H 3,79, *dd*, $J = 9,6$; 3,3 Hz), H-3'''/H-4''' (δ_H 3,35, *t*, $J = 9,6$ Hz), H-4'''/H-5''' (δ_H 4,04, *m*) et enfin H-5'''/CH₃-6''' (δ_H 0,95, *d*, $J = 6,2$ Hz). Cette dernière corrélation en plus de la valeur de la constante de couplage $J_{1''-2''} = 1,5$ Hz permettent d'identifier un α -L-rhamnose.

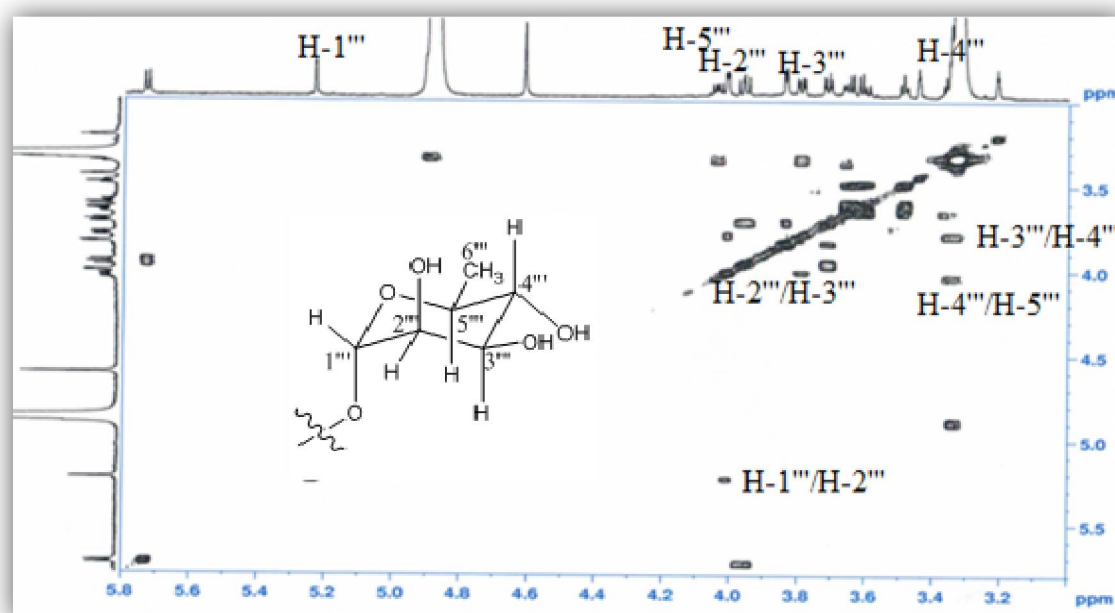


Figure III.85: Spectre COSY H-H identifiant le α -L-rhamnose

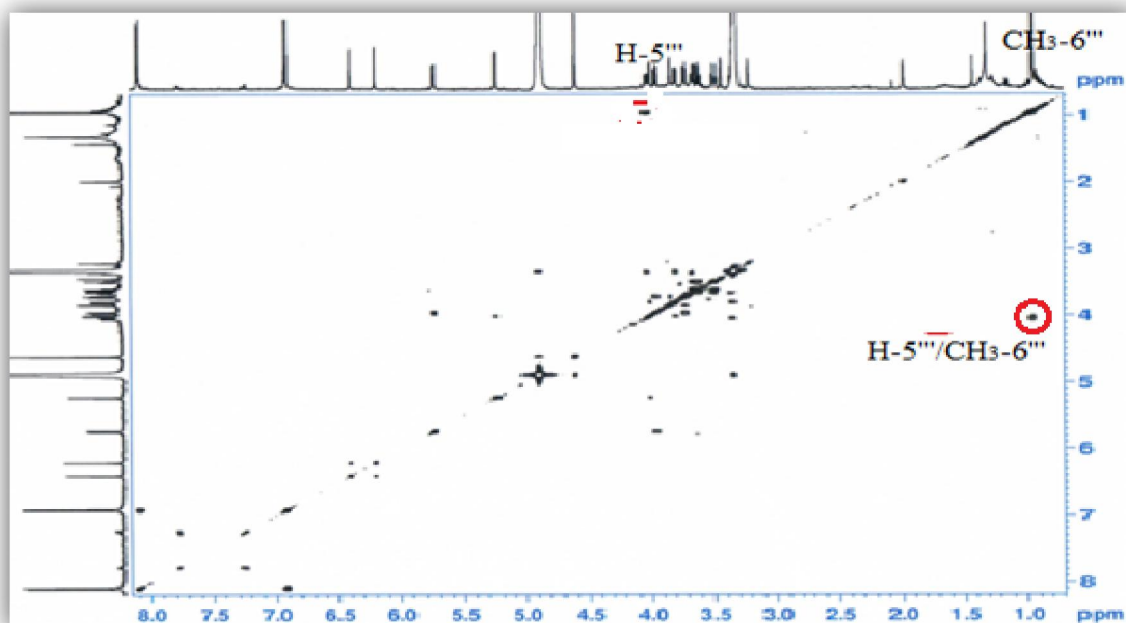


Figure III.86: Spectre COSY H-H identifiant le α -L-rhamnose

Les carbones de ces deux unités osidiques ont été caractérisés par expérience HSQC (Figure III.87).

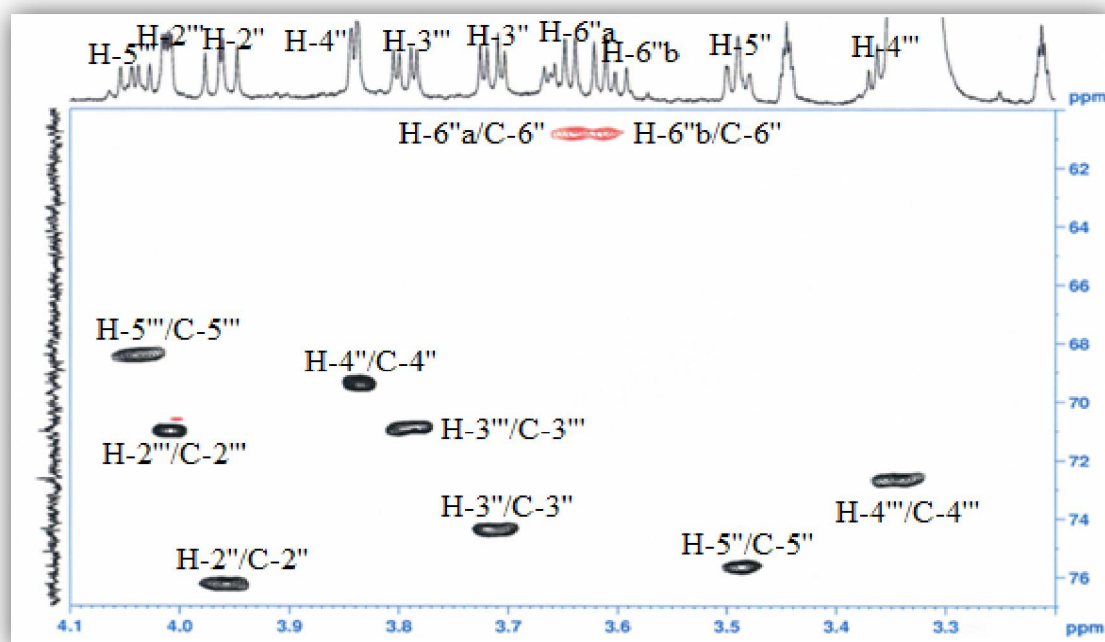


Figure III.87: Spectre HSQC de la partie osidique du composé 8

Les corrélations HMBC H-1''' (rhamnose)/C-2'' (galactose) et H-1'' (galactose)/C-3 (génine) (Figure III.88), montrent que ces deux unités osidiques forment en C-3 l'enchaînement [α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside].

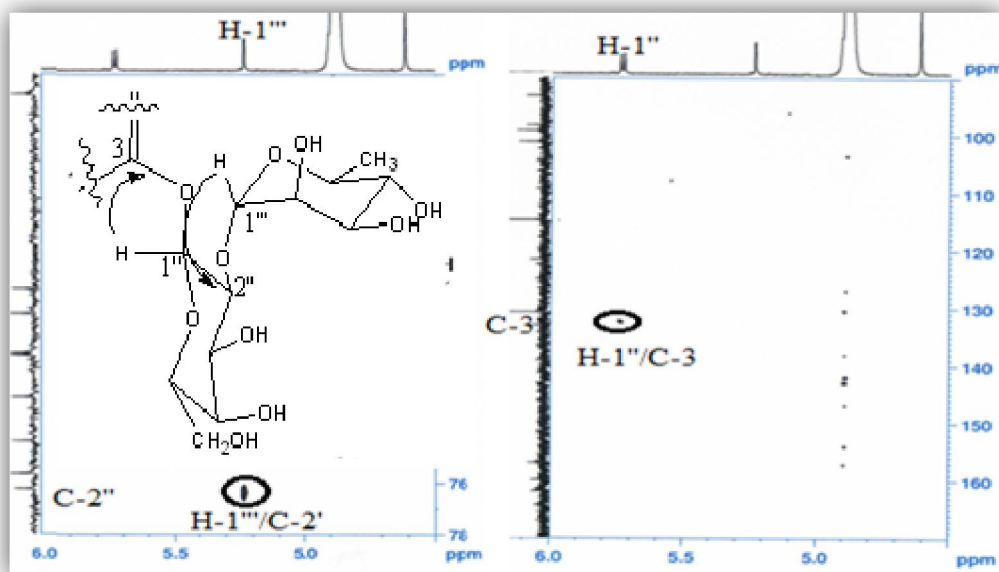
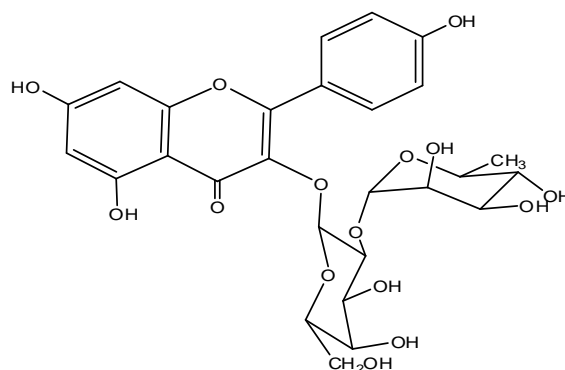


Figure III.88: Spectre HMBC mettant en évidence la séquence des sucres

En se basant sur ces données spectroscopiques, le composé **8** est identifié sans ambiguïté au kaempférol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside.



Ce composé isolé antérieurement de l'espèce *Lysimachia mauritiana* [84], est décrit pour la première fois dans le genre *Astragalus*.

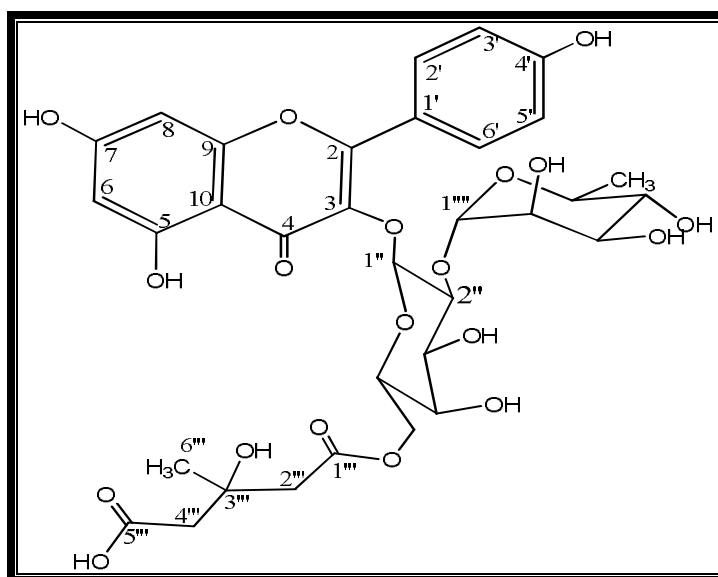
Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau IV.8.

Tableau III.8: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé **8** dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)
2	157,0	-
3	133,0	-
4	178,0	-
5	162,0	-
6	98,0	6,20 (<i>d</i> , 2,1)

7	165,0	-
8	93,0	6,40 (d, 2,1)
9	157,0	-
10	105,0	-
1'	122,0	-
2'	130,8	8,10 (d, 6,9)
3'	114,7	6,90 (d, 6,9)
4'	160,0	-
5'	114,7	6,90 (d, 6,9)
6'	130,8	8,10 (d, 6,9)
1''	99,2	5,70 (d, 7,7)
2''	76,2	3,96 (dd, 9,6; 7,7)
3''	74,4	3,71 (dd, 9,6; 3,1)
4''	69,4	3,84 (dl, 3,1)
5''	75,6	3,49 (m)
6''	60,8	3,95 (dd, 11,4; 6,1) 3,91 (dd, 11,4; 6,1)
1'''	101,2	5,20 (d, 1,5)
2'''	71,0	4,01 (dd, 3,3; 1,5)
3'''	70,9	3,79 (dd, 9,6; 3,3)
4'''	72,6	3,35 (t, 9,6)
5'''	68,4	4,04 (m)
6'''	16,0	0,95 (d, 6,2)

III.3.9 Elucidation structurale du composé 9



Kaempférol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[6-*O*-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)- β -D-galactopyranoside] (9)

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

L'analyse conjointe des spectres RMN ^1H et ^{13}C , COSY H-H, HSQC et HMBC indiquent clairement que le composé **9**, comme le composé **8**, est un kampférol porteur en C-3 du même enchainement [α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside]. En effet, on reconnaît aisément sur le spectre proton (Figure III.89) les signaux correspondant aux protons :

- H-2' et H-6' résonant à δ_{H} 8,05 ($d, J = 6,9$ Hz).
- H-3' et H-5' sortant à δ_{H} 6,85 ($d, J = 6,9$ Hz).
- H-6 et H-8 repérés à 6,20 ($d, J = 2,0$ Hz) et 6,40 ($d, J = 2,0$ Hz) respectivement.
- H-1'' et H-1''' résonant à δ_{H} 5,60 ($d, J = 7,7$ Hz) et 5,20 ($d, J = 1,5$ Hz), protons anomères du β -D-galactose et α -L-rhannose respectivement. La nature de ces deux unités osidiques ainsi que leur site de branchement sur la génine ont été confirmés par les expériences COSY H-H et HMBC.

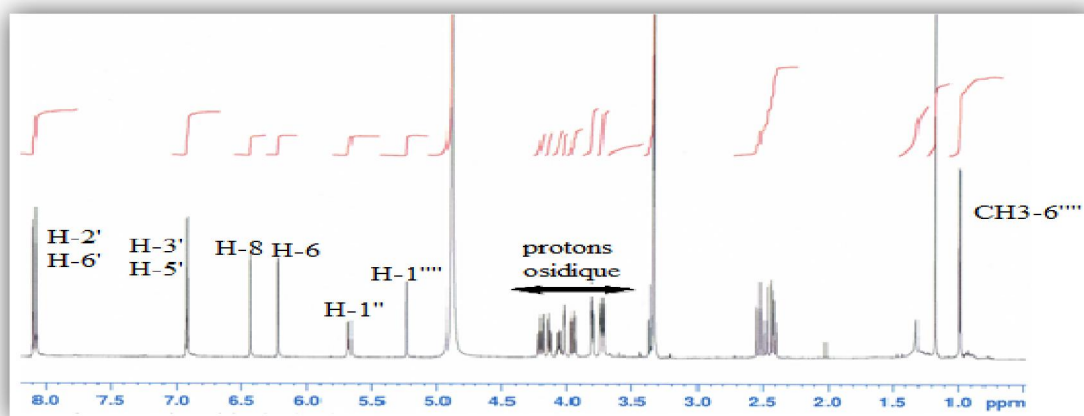


Figure III.89: Spectre RMN ^1H du composé **9**

Le spectre RMN ^{13}C (Figure III.90) montre entre autres, les signaux attribuables aux :

- carbones aromatiques oxygénés résonant à δ_{C} 157,2 (C-2), 133,0 (C-3), 161,8 (C-5), 164,3 (C-7), 157,0 (C-9) et 159,9 (C-4').
- CH aromatiques à 130,8 (C-2' et C-6'), 114,8 (C-3' et C-5'), 98,4 (C-6) et 93,3 ppm (C-8).
- carbones aromatiques quaternaires à δ_{C} 104,5 (C-10), 121,6 (C-1') et le carbone du carbonyle à δ_{C} 178,0 (C-4).

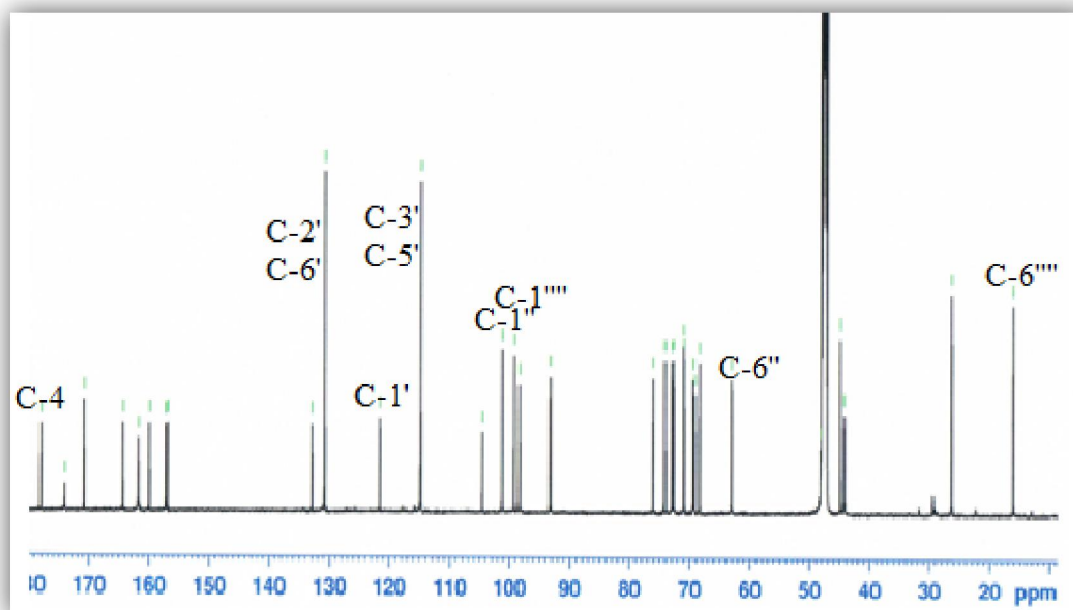


Figure III.90: Spectre RMN ^{13}C du composé 9

Les différences notables entre les deux composés consistent en l'apparition:

- sur le spectre proton, d'un signal d'intégration 3H résonant sous forme d'un singulet à 1,17 ppm, attribuable à un groupement CH_3 et dont le carbone est repéré à 26,2 ppm par expérience HSQC, ainsi que quatre signaux doublets résonant à δ_{H} 2,53 (1H, *d*, $J = 14,5$ Hz), 2,42 (1H, *d*, $J = 14,5$ Hz), δ_{H} 2,40 (1H, *d*, $J = 15,3$ Hz) et 2,48 (1H, *d*, $J = 15,3$ Hz), mettant en évidence la présence de deux groupements méthylènes liés à des groupements déblindants. Les deux carbones CH_2 sont caractérisés par HSQC à δ_{C} 44,8 et 44,3.
- sur le spectre COSY H-H (Figure III.91), de deux signaux attribués aux protons H_2-6'' du galactose à δ_{H} 4,20 (*dd*, $J = 11,5; 7,7$ Hz) et 4,14 (*dd*, $J = 11,5; 4,5$ Hz). Les valeurs déblindées des déplacements chimiques de ces deux protons, comparativement à celles obtenues dans le cas du composé **8**, traduit une acylation à ce niveau. Cette acylation est confirmée par HMBC (Figure III.92) qui montre une corrélation entre les protons H_2-6'' et un carbonyle d'ester résonant à 170,2 ppm (C-1'''). De plus, le couplage longue distance de ce dernier avec les deux protons géminés CH_2 repérés à 2,53 et 2,43 ppm (H_2-2''') mettant en évidence un début d'enchaînement $\text{CH}_2-6''\text{OCOCH}_2-2''$, permet de suggérer que le composé **9** diffère du composé **8** uniquement par la présence supplémentaire d'un groupement acyle substituant le galactose en C-6''.

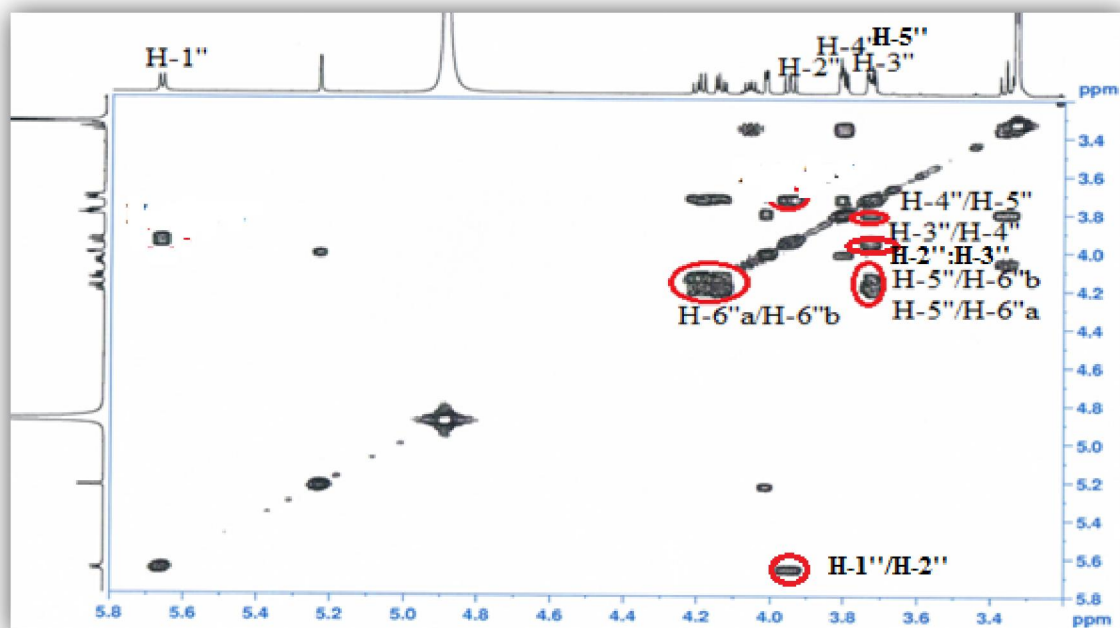


Figure III.91: Spectre COSY H-H mettant en évidence le β -D-galactose

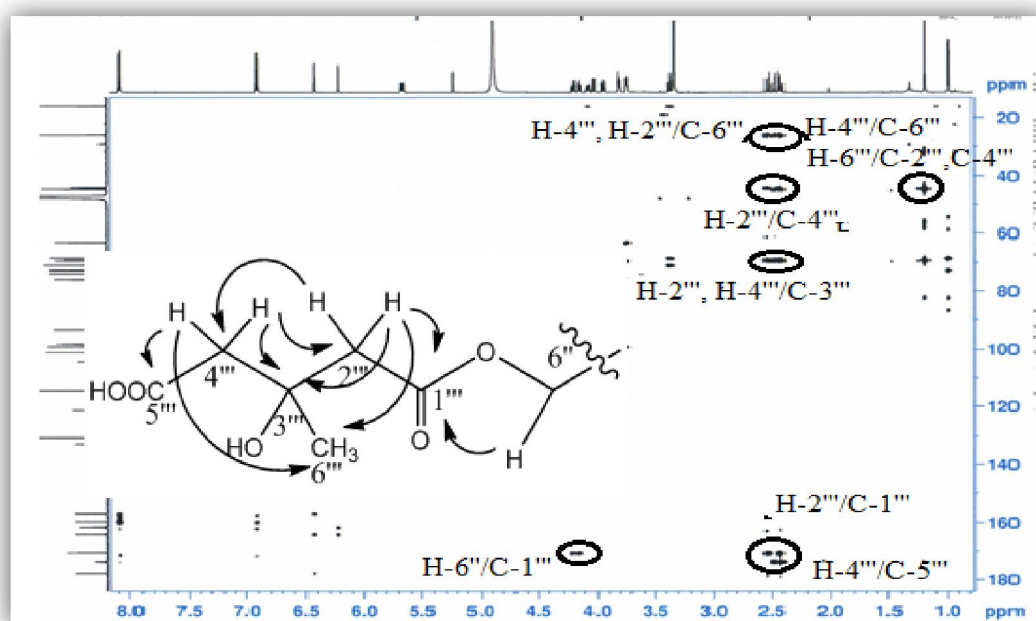
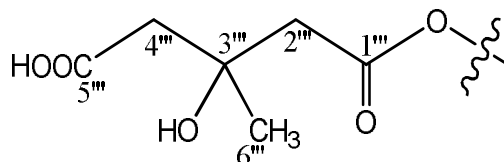


Figure III.92: Spectre HMBC de la partie acyle du composé 9

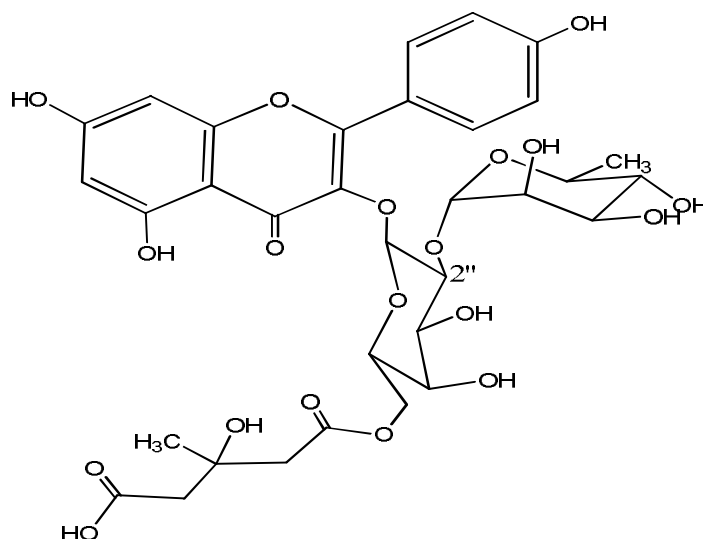
L'expérience HMBC (Figure III.92) montre également les corrélations entre les signaux de protons du second groupement méthylène résonant à 2,40 (1H, *d*, $J = 15,3$ Hz) et 2,48 ppm (1H, *d*, $J = 15,3$ Hz) et un groupement CO à δ_C 174,0.

Par ailleurs, les couplages HMBC entre les protons des deux groupements méthyléniques ($\text{CH}_2\text{-2}'''$ et $\text{CH}_2\text{-4}'''$) et le carbone méthylique (δ_C 26,2) décrit précédemment

ainsi qu'un carbone quaternaire oxygéné résonant à 69,1 ppm (C-3''') permet de finaliser l'enchaînement et établir ainsi la structure du groupement acyle substituant le galactose en C-6'' : acide 3-hydroxy-3-méthylglutarique [85].



Tous les déplacements chimiques des protons et carbones (Tableau III.9) assignés conjointement par les expériences COSY H-H, HSQC et HMBC permettent d'attribuer au composé **9** la structure suivante: kaempférol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[6-*O*-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)- β -D-galactopyranoside].



Ce flavonol glycosilé, isolé antérieurement de l'espèce *Rosa spinosissima* (Rosaceae) [86], a été cité une seule fois dans le genre *Astragalus* (*A. gombiformis*) [34].

Tableau III.9: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé **9 dans CD_3OD**

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
2	157,2	-
3	133,0	-
4	178,0	-
5	161,8	-
6	98,4	6,20 (d, 2,0)
7	164,3	-
8	93,3	6,40 (d, 2,0)

9	157,0	-
10	104,5	-
1'	121,6	-
2'	130,8	8,05 (d, 6,9)
3'	114,8	6,85 (d, 6,9)
4'	159,9	-
5'	114,8	6,85 (d, 6,9)
6'	130,8	8,05 (d, 6,9)
1''	99,1	5,60 (d, 7,7)
2''	76,1	3,95 (dd, 9,6; 7,7)
3''	74,1	3,73 (dd, 9,6; 3,5)
4''	69,3	3,80 (dd, 3,5; 3,2)
5''	73,0	3,73 (m)
6''	63,1	4,20 (dd, 11,5; 7,7) 4,14 (dd, 11,5; 4,5)
1'''	170,2	-
2'''	44,8	2,53 (d, 14,5) 2,42 (d, 14,5)
3'''	69,1	-
4'''	44,3	2,48 (d, 15,3) 2,40 (d, 15,3)
5'''	174,0	-
6'''	26,2	1,17 (s)
1''''	101,2	5,20 (d, 1,5)
2''''	71,0	4,02 (dd, 3,3; 1,5)
3''''	70,9	3,80 (dd, 9,6; 3,3)
4''''	72,7	3,36 (t, 9,6)
5''''	68,4	4,06 (m)
6''''	16,1	0,99 (d, 6,2)

III.3 Conclusion

L'étude phytochimique réalisée sur les racines de la plante *Astragalus gombo* Coss. & Dur., plante saharienne appartenant à la famille Fabaceae, nous a permis d'isoler neuf produits naturels très complexes des deux points de vue, séparation et élucidation structurale.

Les composés identifiés appartiennent à deux classes de métabolites secondaires très présents dans le genre, les flavonoïdes et surtout les saponosides. Ils se repartissent comme suit :

- Sept saponines à squelette cycloartane dont six nouveaux (gomboside A à gomboside F):
 - gomboside A: 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-3 β ,16 β ,23 (*R*), 24(*R*),25-pentahydroxycycloartane

- gomboside B: 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-3 β ,16 β ,23(*R*),24(*R*)-tetrahydroxy-25-dehydrocycloartane
- gomboside C: 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl]-6 α -acétoxy-23 α -méthoxy-16 β ,23(*R*)-époxy-24,25,26,27-tetranorcycloartane
- gomboside D: 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl]-6 α -acétoxy-23 α -butoxy-16 β ,23(*R*)-époxy-24,25,26,27-tetranorcycloartane
- gomboside E: 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-6 α -acétoxy-23 α -méthoxy-16 β ,23(*R*)-époxy-24,25,26,27-tetranorcycloartane
- gomboside F: 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-23 α -méthoxy-16 β ,23(*R*)-époxy-24,25,26,27-tetranorcycloartane
- tomentoside II
- Deux flavonoïdes *O*-glycosylés :
 - kaempférol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[6-*O*-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)- β -D-galactopyranoside]
 - kaempférol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside

Le dernier flavonoïde est décrit pour la première fois dans le genre *Astragalus*.

CHAPITRE V
Etude phytochimique de
l'espèce *Astragalus depressus*

IV.1 Rappels botaniques

Astragalus depressus est une plante herbacée pérenne densément pubescente, glabre seulement sur la face supérieure des folioles. Elle possède des fleurs blanchâtres en tête dense, sur un pédoncule plus court que les feuilles. Ces dernières sont dotées de 9 à 11 paires de folioles. Cette espèce méditerranéenne, broutée par les animaux à l'instar de bon nombre de plantes légumineuses, pousse particulièrement sur les rochers des hautes montagnes algériennes [4].



Figure IV.1: Espèce *Astragalus depressus*

La classification botanique de cette plante s'établit comme suit :

Famille : Fabaceae (Leguminosae)

Sous-famille : Faboideae

Genre : *Astragalus*

Espèce : *Astragalus depressus*

IV.2 Résultats et discussions

IV.2.1 Extraction

800 g des racines de *Astragalus depressus*, séchées et broyées, ont été soumis à une double extraction hydro-alcoolique EtOH-H₂O (70:30) à température ambiante. Après filtration et évaporation, l'extrait aqueux est soumis à une extraction liquide-liquide en utilisant successivement des solvants à polarité croissante: éther de pétrole, acétate d'éthyle et *n*-butanol. Le schéma ci-dessous (Figure IV.2) englobe les différentes étapes de l'extraction.

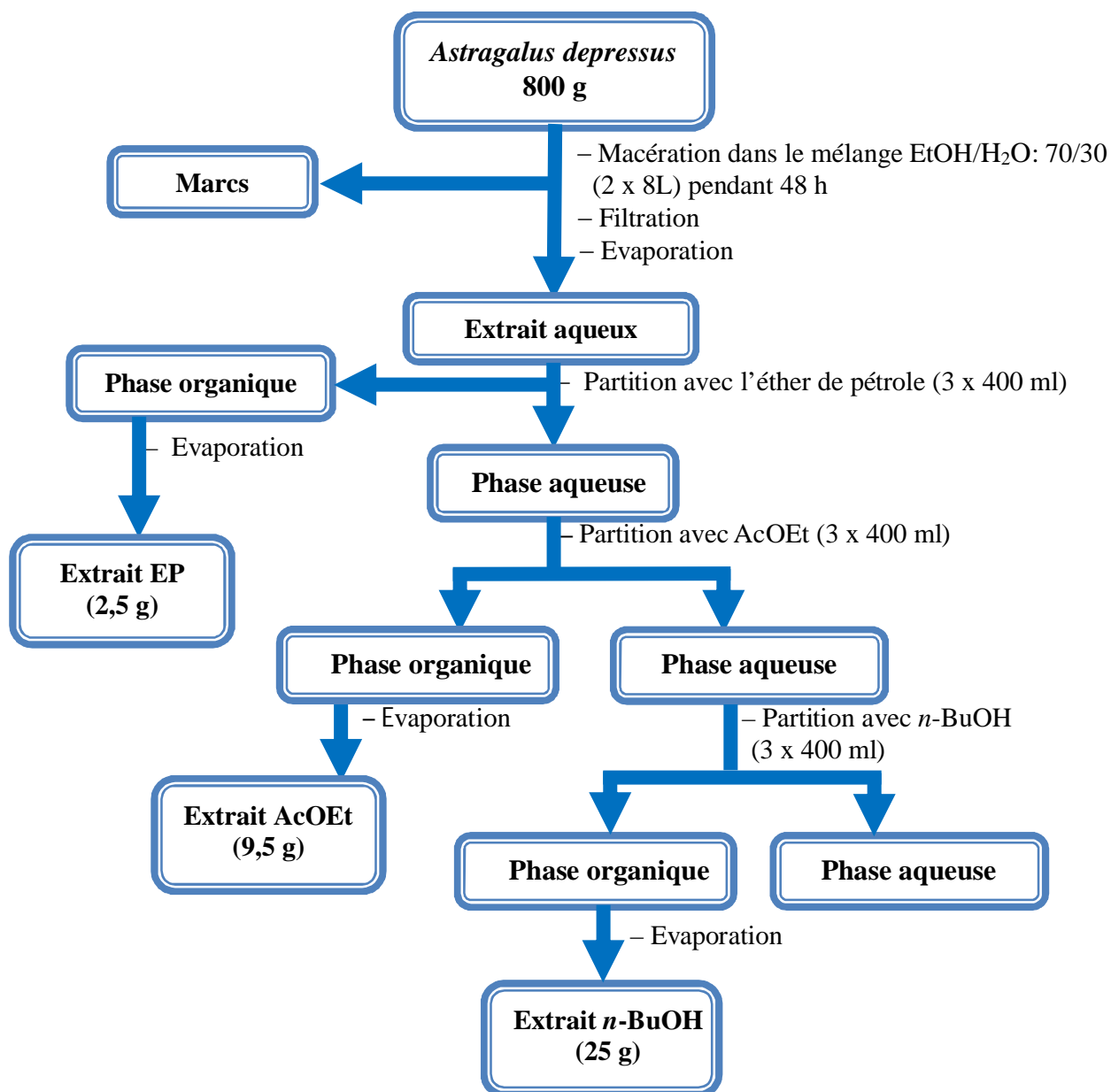


Figure IV.2: Protocole d'extraction de la plante *Astragalus depressus*

IV.2.2 Séparation et purification

La comparaison des profils CCM en phase normale réalisés dans différents systèmes d'éluion mettant en évidence la richesse des deux extraits AcOEt et *n*-BuOH en métabolites secondaires, nous a orienté préférentiellement vers l'investigation chimique de ces deux extraits.

L'extrait AcOEt (7 g) est initialement soumis à un fractionnement par chromatographie liquide sous vide (VLC) sur silice normale en utilisant les systèmes de solvants CHCl₃-MeOH (100:0 à 70:30) et CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:1 à 50:50:10) (Figure IV.3), donnant 10 fractions.

L'extrait *n*-butanol (8 g) est également soumis à un premier fractionnement par chromatographie liquide sous vide (VLC) sur silice greffée en C-18 (Figure IV.4). L'élution effectuée avec un mélange eau-méthanol à différents gradients (80:20 à 0:100) a permis de recueillir 10 fractions.

Les fractions résultantes, au niveau des deux extraits, sont ensuite purifiées par différentes méthodes chromatographiques : sur colonne de gel de silice en phase normale, sur colonne de Sephadex LH-20 et sur plaques préparatives en phases normale et inverse (Figures IV.3 et V.4).

L'utilisation combinée de ces techniques chromatographiques a conduit à l'isolement de 9 composés à l'état pur, 6 pour l'extrait AcOEt et 3 pour l'extrait *n*-BuOH.

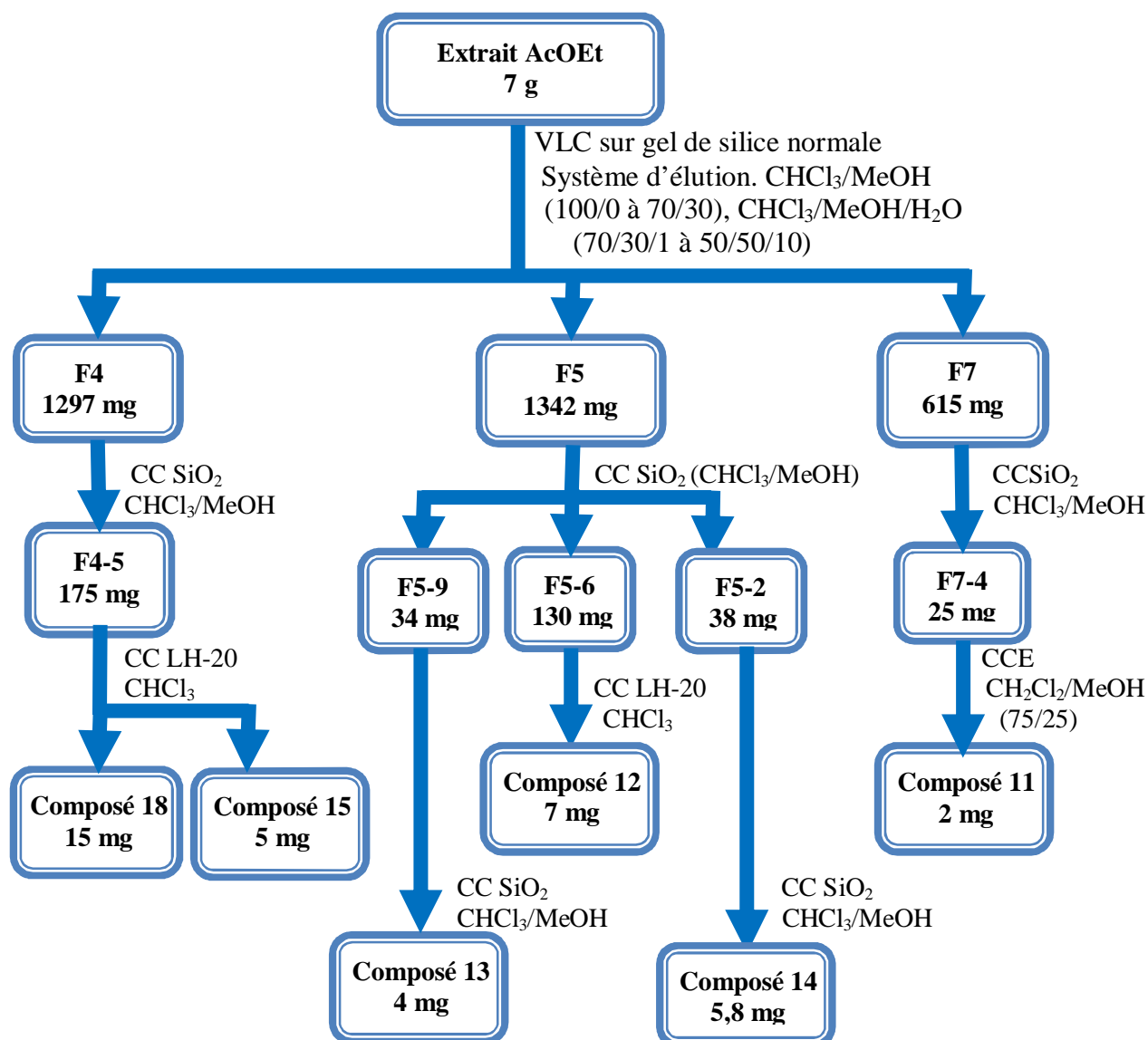


Figure IV.3: Schéma de purification des produits issus de l'extrait AcOEt de

A. depressus

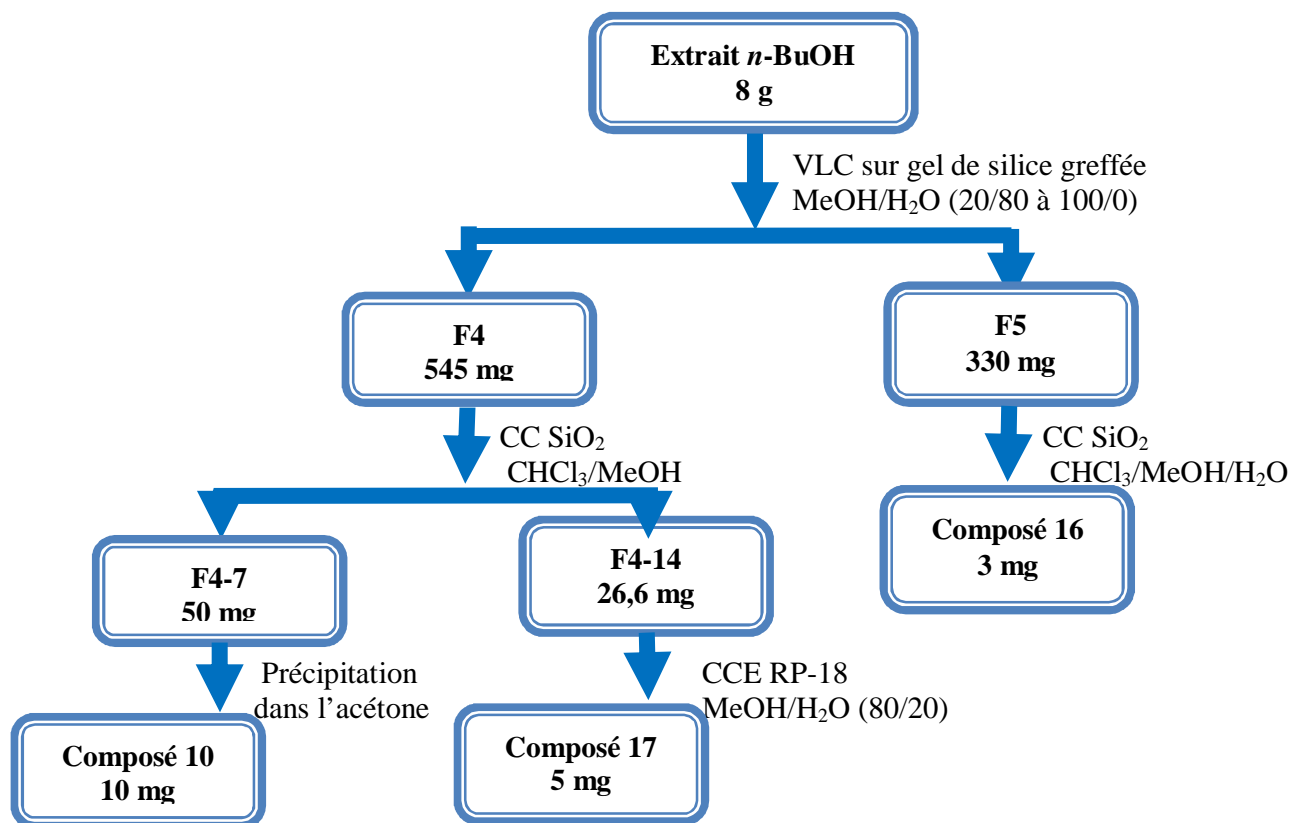
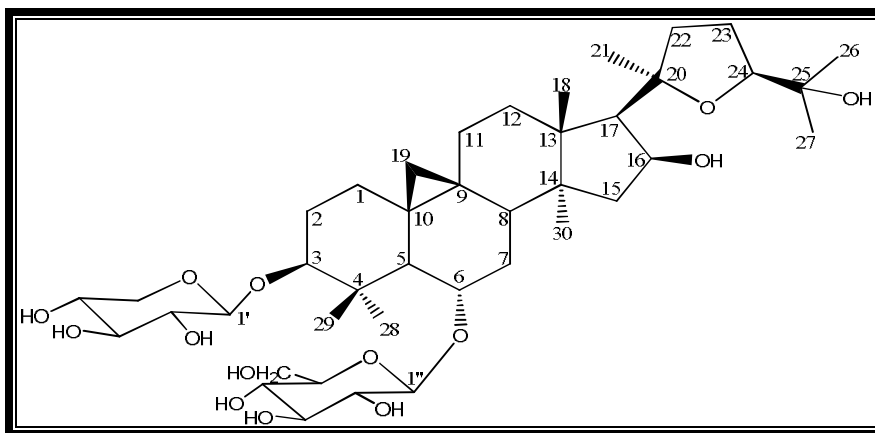


Figure IV.4: Schéma de purification des produits issus de l'extrait *n*-BuOH de *A. depressus*

IV.2.3 Caractérisation des produits obtenus

Les produits isolés ont été caractérisés par les méthodes spectroscopiques d'analyse RMN ^1H et ^{13}C , RMN 2D (COSY H-H, HSQC, TOCSY, HMBC et NOESY), spectrométrie de masse ESI, la mesure des pouvoirs rotatoires et par comparaison avec les données de la littérature.

IV.2.3.1 Elucidation structurale du composé 10



3-*O*- β -D-xylopyranosyl-6-*O*- β -D-glucopyranosyl-20(*R*),24(*S*)-époxy-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahydrocycloartane (10)

Le composé **10** se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol.

Son spectre de masse ESI enregistré en mode positif (Figure IV.5), présente un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 807 $[M+Na]^+$, correspondant à une masse moléculaire de 784 uma et une formule brute en $C_{41}H_{68}O_{14}$.

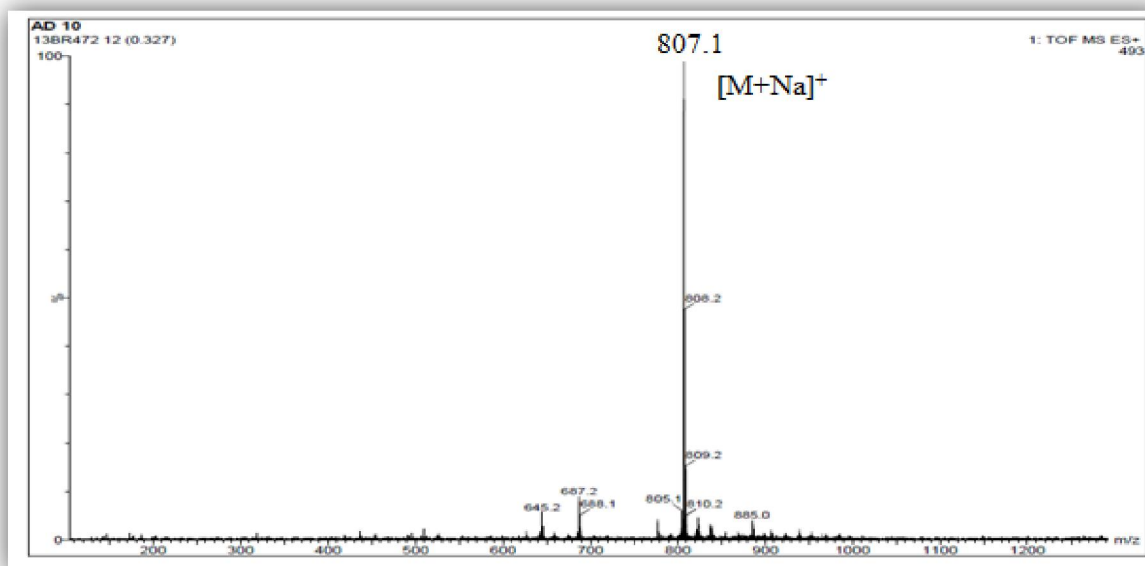


Figure IV.5: Spectre de masse ESI⁺ du composé 10

Le spectre RMN 1H de ce composé (Figure IV.6), enregistré dans CD_3OD , montre six signaux singulets résonant dans une région allant de 1,04 à 1,30 ppm, caractéristiques de protons méthyliques [δ_H 1,04 (6H, s), 1,15 (3H, s), 1,23 (3H, s), 1,27 (3H, s), 1,28 (3H, s), 1,30 (3H, s)], indiquant l'existence de sept groupement méthyles. Il montre aussi deux signaux fortement blindés résonant sous forme de doublet à δ_H 0,29 (1H, d, $J = 4,4$ Hz, H-19 *exo*), 0,62 (1H, d, $J = 4,4$ Hz, H-19 *endo*) très caractéristiques de deux protons non équivalents d'un noyau cyclopropane [77, 78, 79] ainsi qu'un signal à 3,23 ppm (1H, dd, $J_{ax-ax} = 7,5$, $J_{ax-eq} = 4,5$ Hz, H-3) d'un proton oxyméthine d'orientation α . De plus, la présence de plusieurs signaux entre 3 et 4 ppm ainsi que deux signaux doublets à 4,30 (1H, d, $J = 7,6$ Hz, H-1') et 4,35 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H-1'') très caractéristiques de protons anomères de sucres, indique que notre composé est une saponine triterpénique à squelette cycloartane possédant deux unités osidiques.

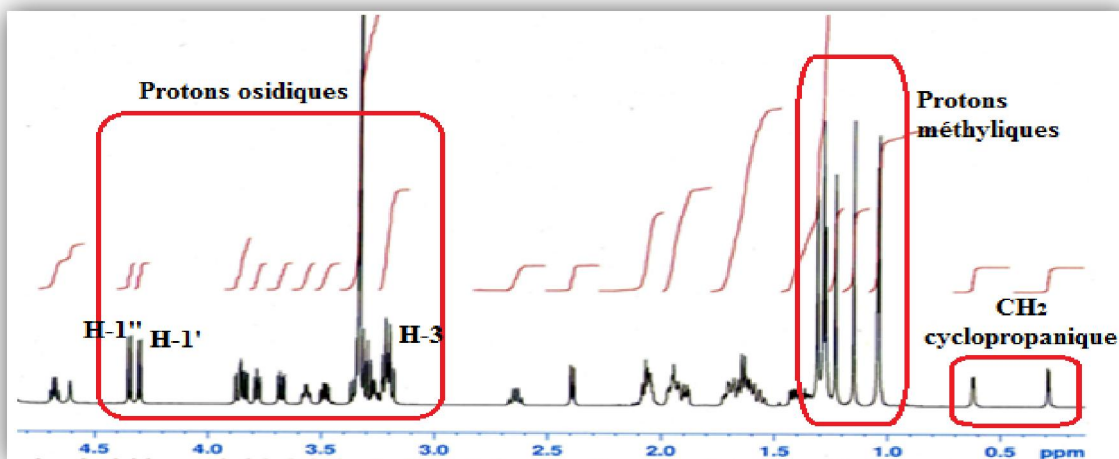


Figure IV.6: Spectre RMN ^1H du composé 10

Les spectres RMN ^{13}C DEPT et RMN ^{13}C (Figures IV.7 et IV.8) montrent les signaux correspondant à sept méthyles, neuf méthylènes, sept méthines et sept atomes de carbones quaternaires, confirmant la nature triterpénique du composé. Il permet également de visualiser les carbones anomères à 106 et 103,5 ppm, attestant de l'existence de deux unités osidiques.

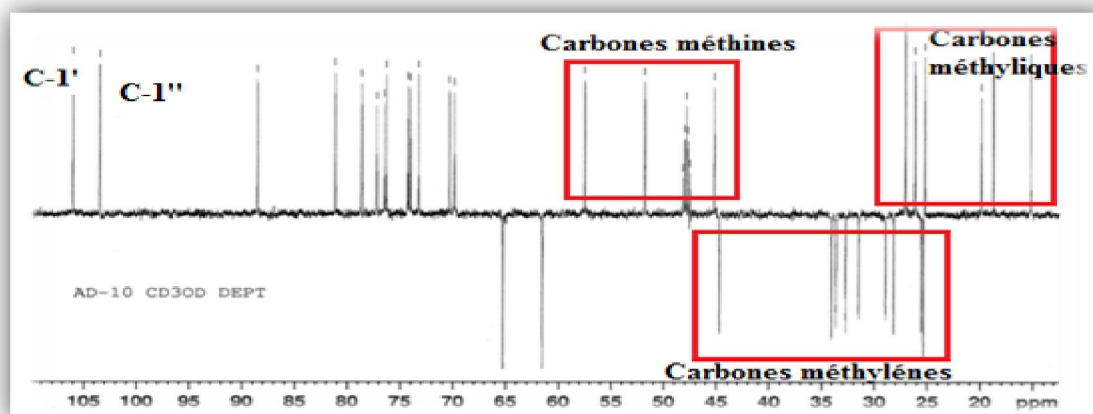


Figure IV.7: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé 10

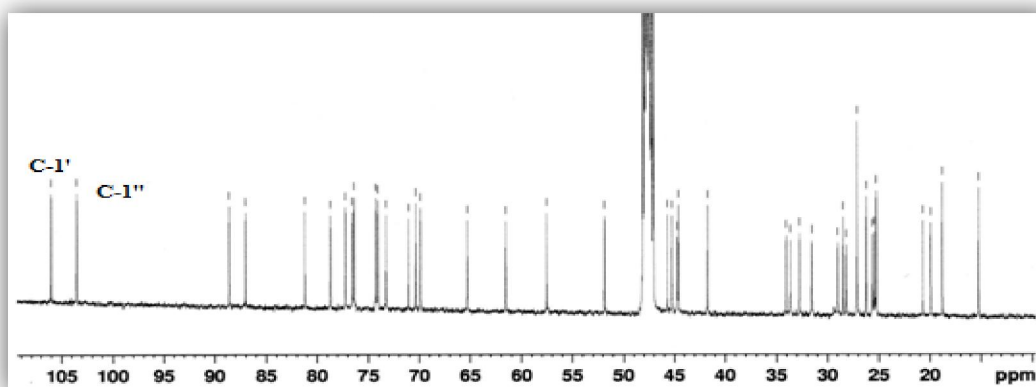


Figure IV.8: Spectre RMN ^{13}C du composé 10

A partir des protons caractéristiques d'une génine triterpénique à noyau cycloartane observés sur le spectre RMN ^1H (Figure IV.6), l'expérience HSQC (Figures IV.9 et IV.10) permet l'identification des carbones qui les portent. Ainsi les carbones méthyliques sont repérés à 15,2, 18,8, 25,2, 27,1, 19,9, 26,2 et 27,1 ppm, le carbone C-19 du noyau cyclopropane à δ_{C} 28,2 et enfin le carbone C-3 de la génine à 88,6 ppm. La valeur de déplacement chimique de ce dernier suggère une glycosylation à ce niveau. Les deux carbones anomères des oses sont repérés à δ_{C} 106 (C-1') et δ_{C} 103,5 (C-1'').

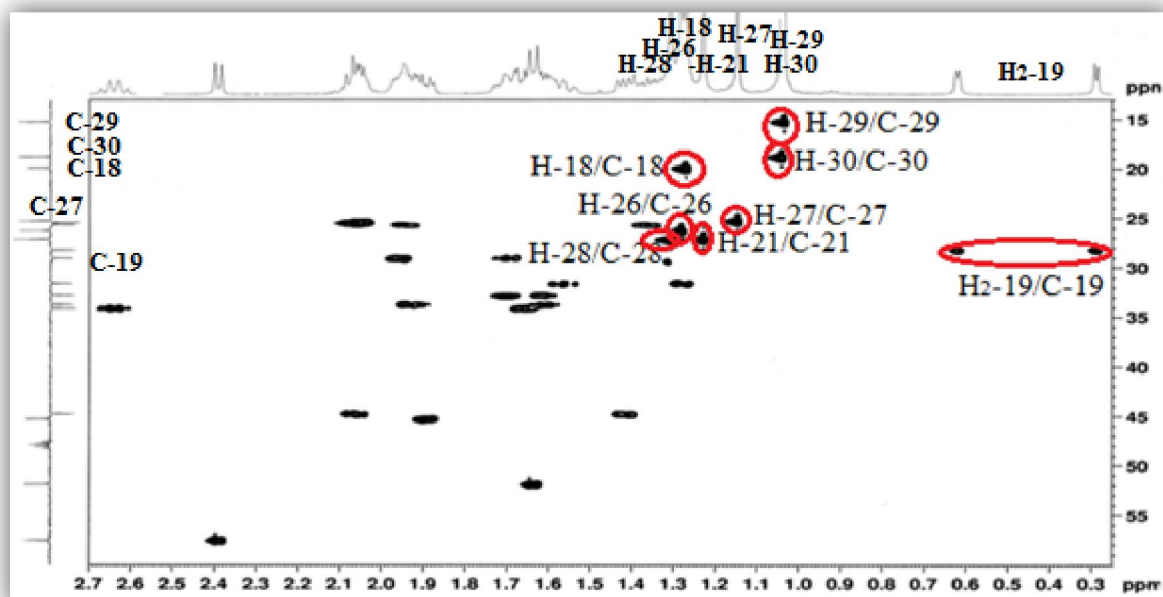


Figure IV.9: Spectre HSQC du composé 10

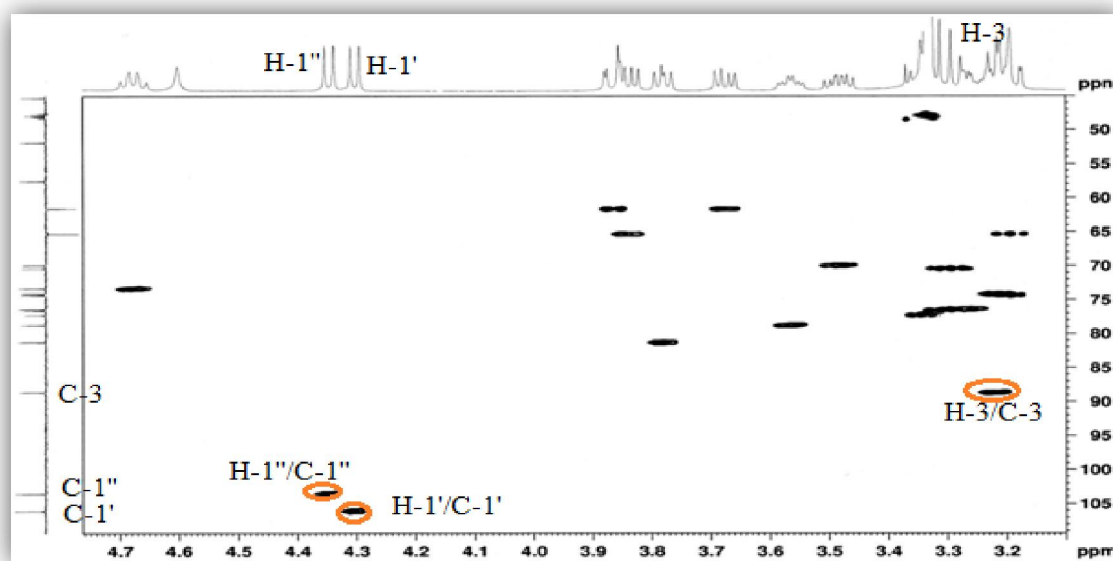


Figure IV.10: Spectre HSQC du composé 10

Cette glycosylation en C-3 de la génine est confirmée par expérience HMBC (Figure IV.11) qui montre un couplage en 3J entre ce carbone et le proton anomère H-1' (4,30 ppm) d'une des deux unités osidiques.

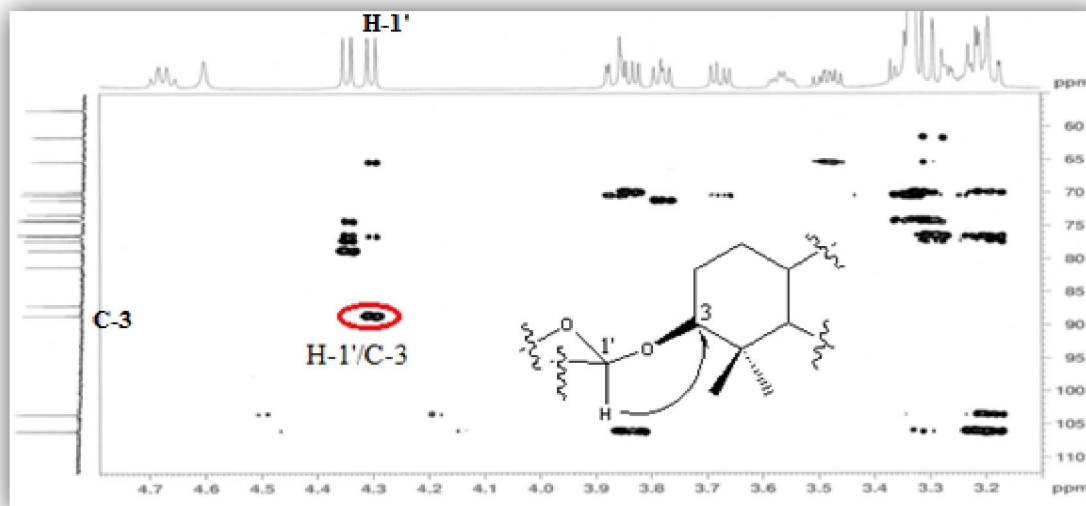


Figure IV.11: Spectre HMBC du composé 10

L'identification de la génine à squelette cycloartane peut être réalisée par l'expérience HMBC (Figure IV.12) qui permet de caractériser un grand nombre de carbones par l'observation de leurs couplages en 2J et 3J avec les protons méthyliques. Ainsi les protons méthyliques Me-28 et Me-29 géminés résonant respectivement à 1,30 et 1,04 ppm, sont les seuls à corrélérer avec le carbone C-3 (δ_C 88,6) de la génine. Ces mêmes protons méthyliques corrèlent également avec le carbone quaternaire C-4 (δ_C 41,6) et le carbone C-5 (δ_C 51,8). Ce dernier corrèle avec les protons H₂-19 (δ_H 0,29 et 0,62) du noyau cyclopropane.

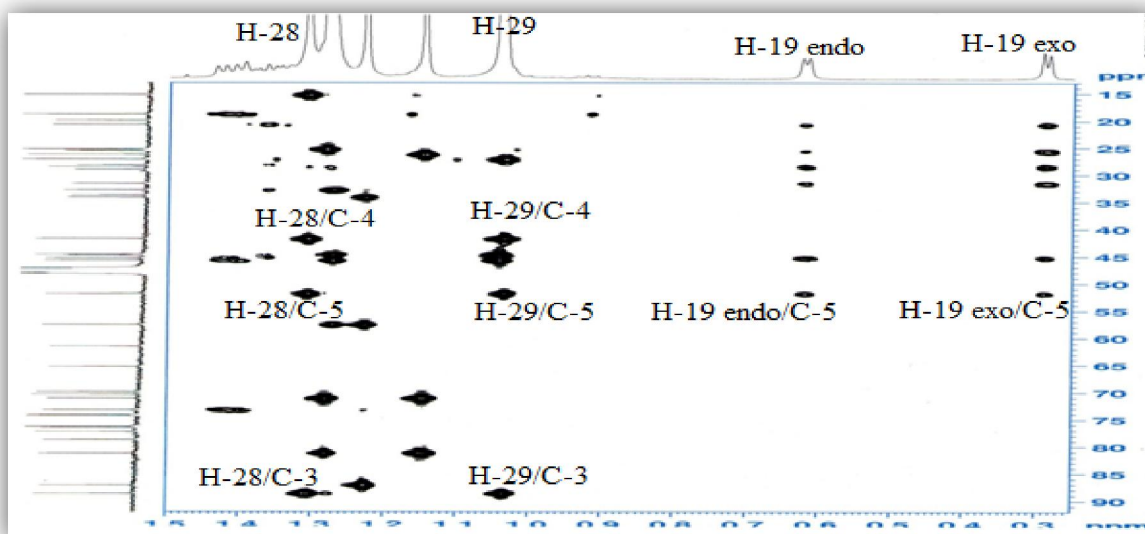


Figure IV.12: Spectre HMBC du composé 10

Le proton H-5 résonant à 1,64 ppm (1H, *d*, $J = 8,6$ Hz) identifié par expérience HSQC, montre en HMBC (Figure IV.13) les couplages hétéronucléaires avec les carbones CH₃-28 (δ_C 27,1), CH-29 (δ_C 15,2), C-19 (δ_C 28,2), C-4 (δ_C 41,6) et C-3 (δ_C 88,6) caractérisés précédemment, Il corrèle également avec deux carbones méthyléniques résonant à 33,7 et 31,5 ppm. Cette dernière valeur de déplacement chimique est attribuée au carbone C-1 de la génine du fait de son couplage avec les protons CH₂-19 du noyau cyclopropane. L'autre valeur (33,7 ppm) est attribuée obligatoirement au carbone C-7. Le proton H-5 corrèle aussi avec un carbone oxyméthine CH-6 résonant à 78,7 ppm. Le proton H-6 (*td*, $J = 8,6$; 3,8 Hz) qui le substitue est repéré par HSQC à 3,57 ppm. Sa grande valeur de constante de couplage (8,6 Hz) indique qu'il est β orienté [19].

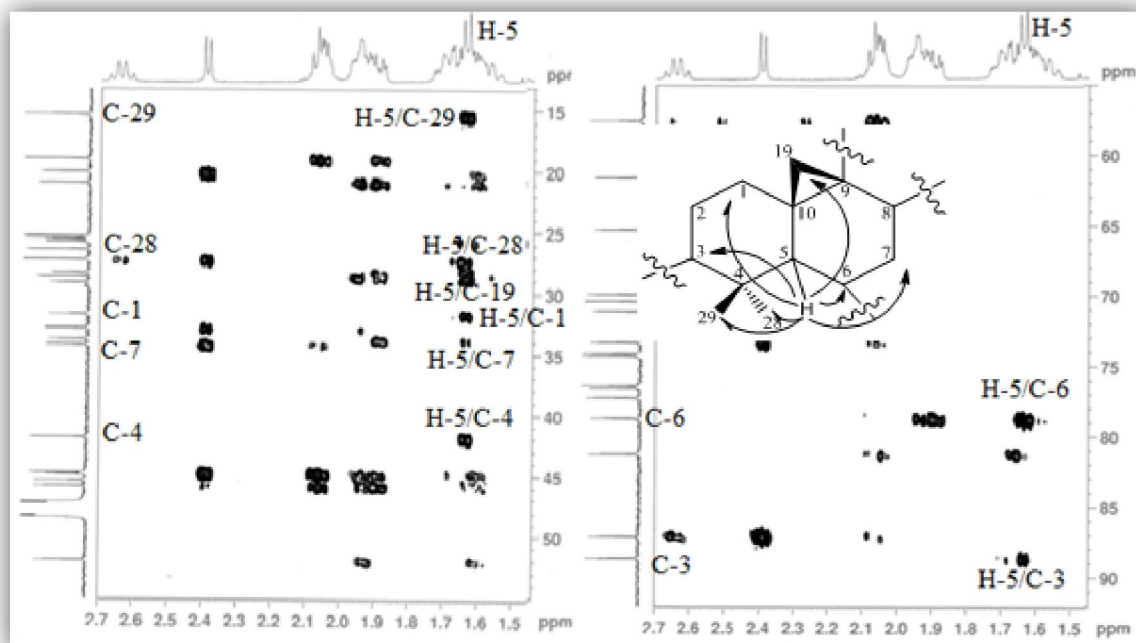


Figure IV.13: Spectre HMBC du composé 10

La corrélation observée sur le spectre HMBC (Figure IV.14) entre ce proton H-6 et le carbone anomère de sucre C-1'' (δ_C 103,5) cité précédemment, indique une substitution en C-6 par une unité osidique et met en évidence le caractère bidesmosidique de la saponine, avec un ose branché en C-3 et un autre en C-6 de la génine.

Les protons méthyliques CH₃-30 repérés à 1,04 ppm sont caractérisés par HMBC (Figure IV.15) du fait de leur corrélation avec le carbone C-8 (δ_C 45,2), lui-même identifié du fait de son couplage HSQC avec le proton H-8 (δ_H 1,89) qui le substitue. Ce dernier est identifié au moyen de la corrélation HMBC qu'il présente avec le carbone C-7 (δ_C 33,7). Les protons méthyliques Me-30 (δ_C 1,04) montrent en HMBC des couplages supplémentaires avec

deux carbones quaternaires à 44,6 et 45,7 ppm attribuables aux carbones C-13 et C-14, de même qu'avec un carbone méthylénique à 44,7 ppm ne pouvant être que le carbone C-15. Les deux protons H-15a (2,05 ppm) et H-15b (1,41 ppm) qui le substituent sont déterminés par HSQC.

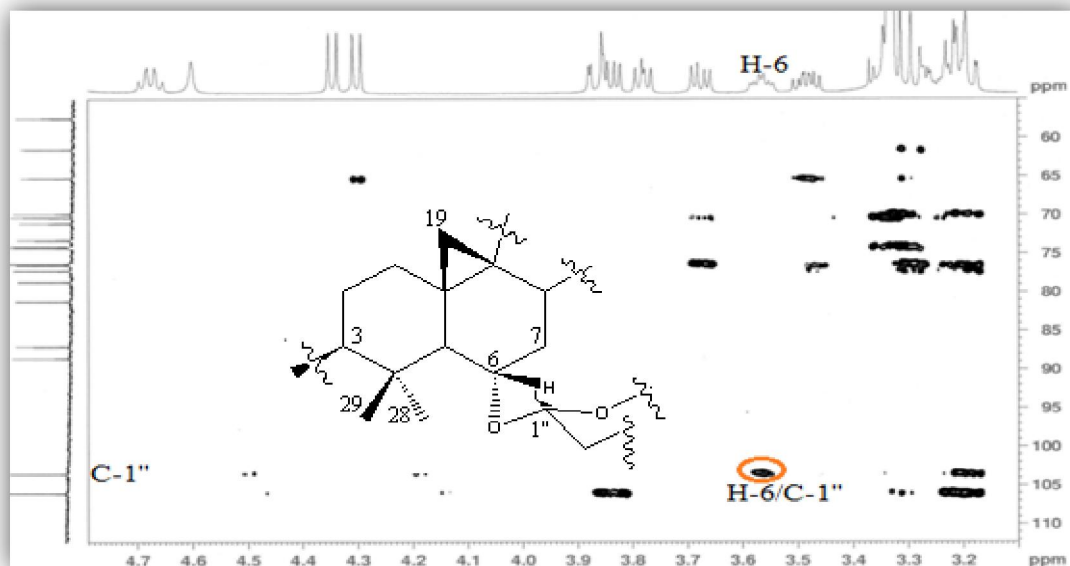


Figure IV.14: Spectre HMBC du composé 10

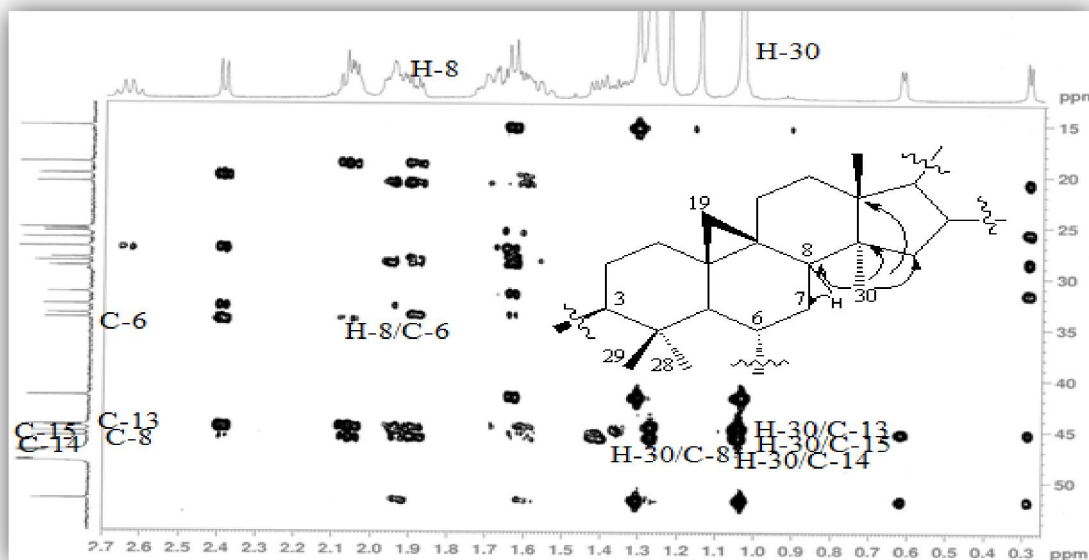


Figure IV.15: Spectre HMBC du composé 10

A partir de ceux derniers protons, l'expérience homonucléaire COSY H-H (Figure IV.16) permet d'identifier le proton H-16 d'orientation α résonant à 4,67 ppm (1H, q , $J = 7,6$ Hz) [19]. La valeur de déplacement chimique égale à 73,1 ppm du carbone C-16 déterminé

par HSQC, indique qu'il est porteur d'un groupement OH. Le spectre COSY H-H (Figure IV.16) permet d'identifier également le proton H-17 à 2,39 ppm (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz). Sa multiplicité indique une substitution en C-17 du noyau cycloartane. Sa valeur de constante de couplage de l'ordre de 7,6 Hz indique que ce proton H-17 est α orienté [87, 88]. Le carbone C-17 (δ_C 57,5) est caractérisé par expérience HSQC.

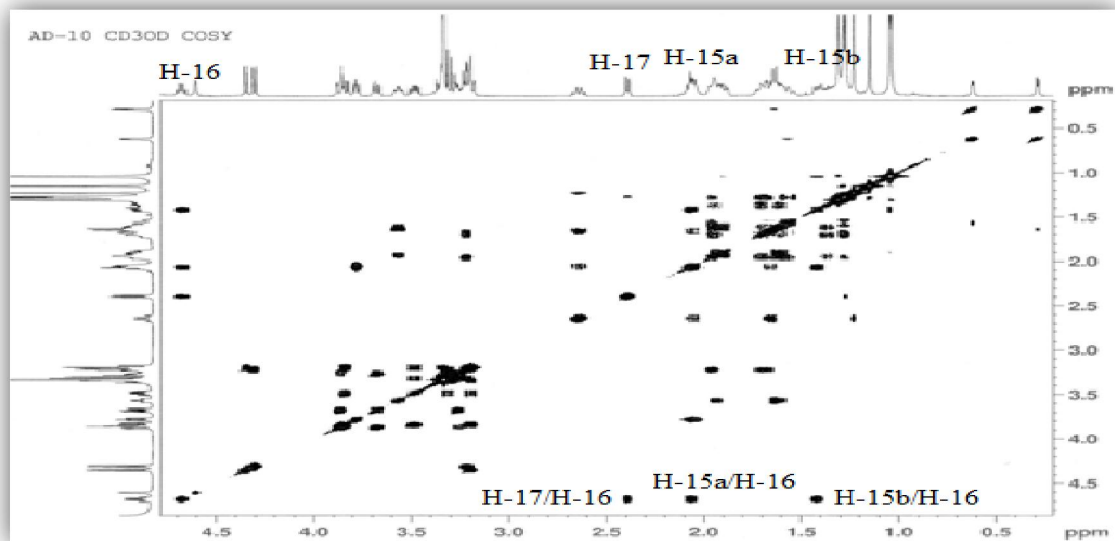


Figure IV.16: Spectre COSY H-H du composé 10

Les protons méthyliques CH₃-18 (1,27 ppm) sont identifiés au moyen des couplages longue distance observés sur le spectre HMBC (Figure IV.17) avec les carbones C-13 (44,6 ppm), C-14 (45,7 ppm), C-17 (57,5 ppm) préalablement identifiés et le carbone C-12 (32,8 ppm).

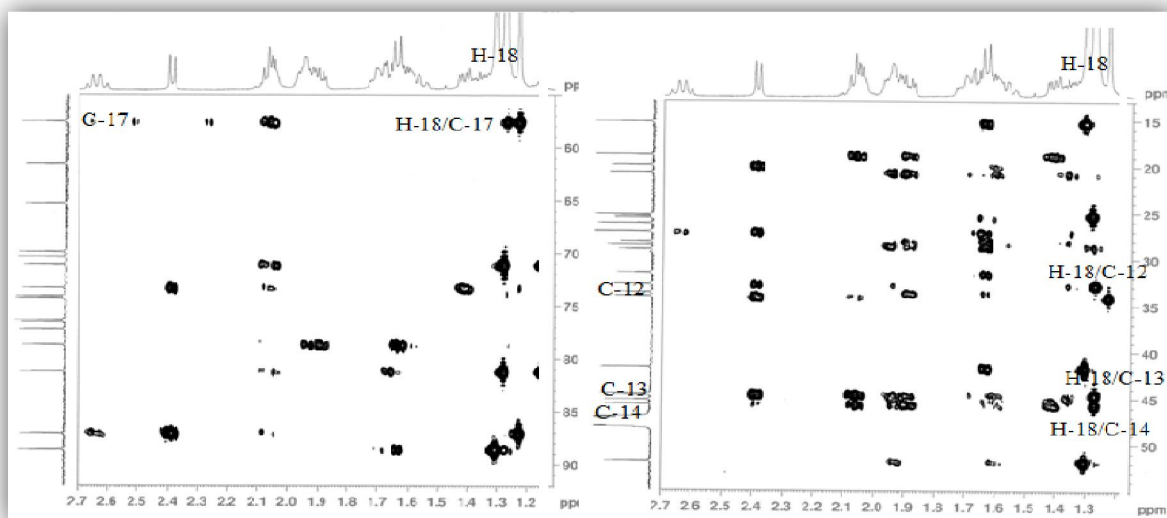


Figure IV.17: Spectre HMBC du composé 10

Toute cette analyse spectrale qui a abouti à la caractérisation de tous les carbones de la génine, permet d'attribuer au composé **10** le squelette moléculaire représenté par la figure ci-dessous.

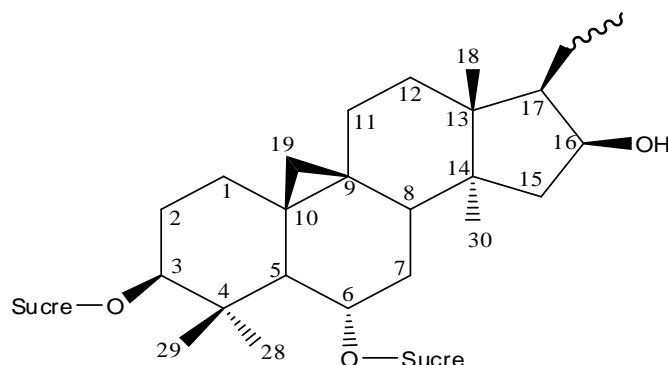


Figure IV.18: Structure globale du composé 10

Il reste maintenant à identifier la nature du substituant en C-17 de la génine ainsi que celle des deux unités osidiques en C-3 et C-6.

Le proton H-17 corrèle en HMBC (Figure IV.19) avec, en plus des carbones CH₃-18, C-15, C-16 et C-13 déjà décrits, un autre carbone de groupement méthylique à 27,1 ppm faisant partie du groupement substituant la molécule en C-17. Il corrèle avec deux autres carbones appartenant au même groupement, l'un quaternaire fortement déblindé et donc oxydé à 87,1 ppm (C-20) et l'autre méthylénique à 34,1 ppm (C-22).

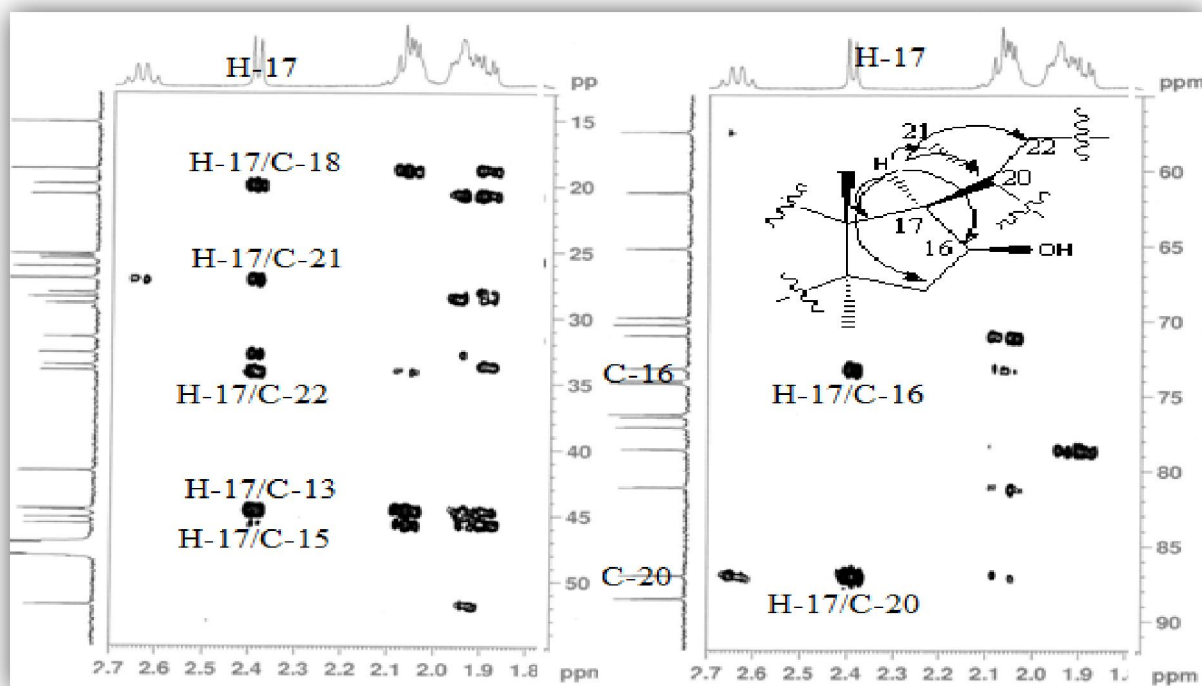


Figure IV.19: Spectre HMBC du composé 10

Le couplage mutuel observé en HMBC (Figure IV.20) entre les signaux singulets de protons des deux groupements méthyles non encore identifiés (CH₃-26 et CH₃-27) résonnant à 1,28 et 1,15 ppm, et deux carbones méthyliques à 26,2 ppm (C-26) et 25,2 ppm (C-27), indique que ces groupements CH₃ sont géminés. Ils couplent également avec un carbone quaternaire (C-25) fortement déblindé avec un déplacement chimique de 71,1 ppm comparable à celui d'un carbone porteur d'un OH libre. Ce carbone montre des corrélations avec trois protons, l'un déblindé repéré à 3,78 ppm (*dd*, $J = 8,3: 6,0$ Hz, H-24) et deux autres géminés à 2,05 ppm (2H, *m*) confirmés par analyse HSQC. L'ensemble de ces données nous amène à établir la présence d'un noyau furane substitué (Figure IV.21) et lié au carbone C-17. En effet, les déplacements chimiques des protons et carbones résultant de cette analyse sont conformes aux données de la littérature [97].

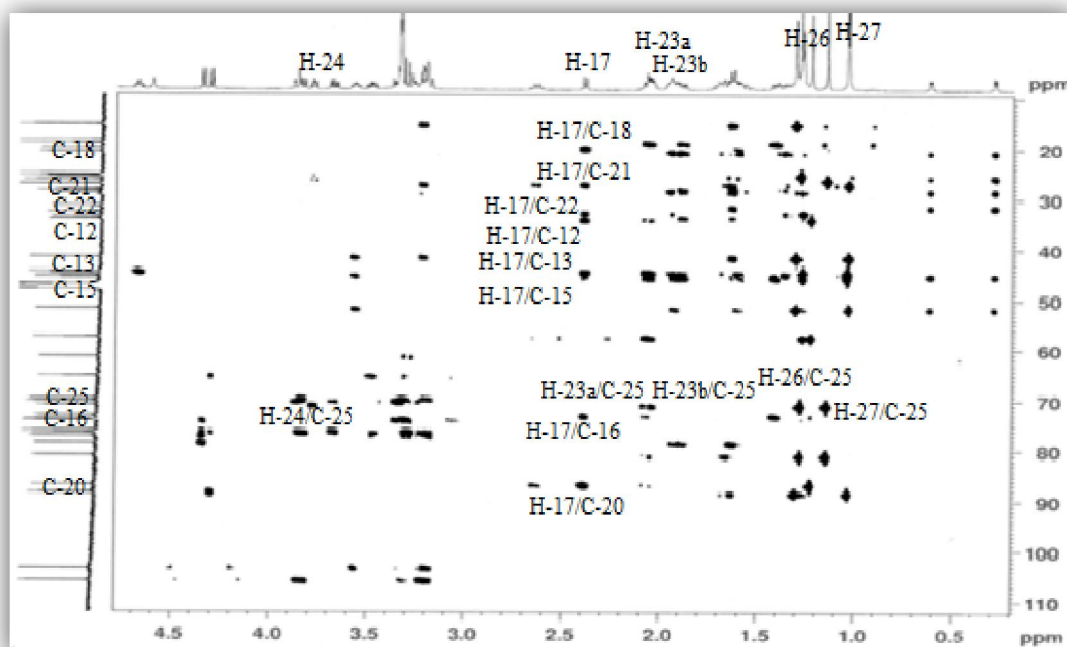


Figure IV.20: Spectre HMBC du composé 10

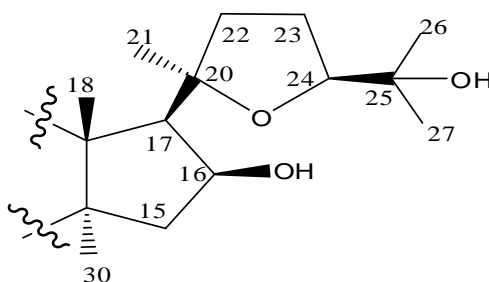


Figure IV.21: Noyau furane

La stéréochimie au niveau de la génine sera discutée en détail lors de l'élucidation structurale du composé **12** (voir page 134).

L'identification des deux unités osidiques a été réalisée au moyen de l'expérience COSY H-H.

A partir du premier proton anomère H-1' résonant à 4,3 ppm (1H, *d*, $J = 7,6$ Hz), on repère sur le spectre COSY (Figure IV.22) les corrélations H-1'/H-2' (1H, δ_H 3,22, *t*, $J = 7,6$ Hz), H-2'/H-3' (1H, δ_H 3,31, *t*, $J = 7,6$ Hz), H-3'/H-4' (1H, δ_H 3,48, *ddd*, $J = 10,8; 7,6; 5,6$ Hz), H-4'/H-5'a (1H, δ_H 3,84, *dd*, $J = 10,8; 5,6$ Hz), H-4'/H-5'b (1H, δ_H 3,20, *m*) et enfin H-5'a/H-5'b. Ces corrélations permettent ainsi d'identifier un pentose, plus précisément un xylose de configuration β ($J_{1'-2'} = 7,6$ Hz) substituant, comme il a été démontré plus haut, la génine en C-3.

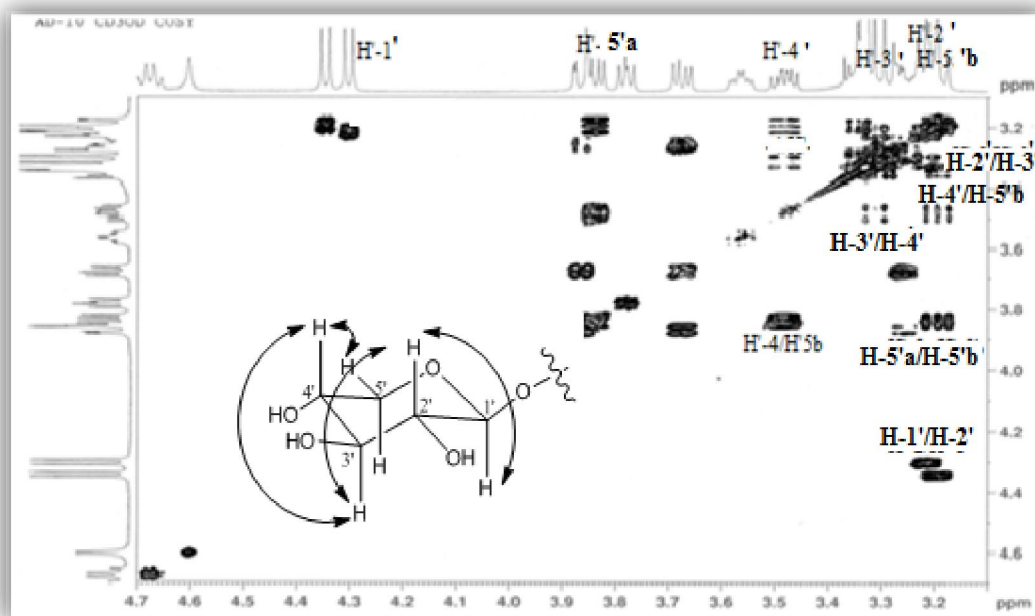


Figure IV.22: Spectre COSY H-H de la partie osidique (β -D-xylose)

A partir du second proton anomère H-1'' résonant à 4,35 ppm (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz), on relie tous les protons d'un hexose (Figure IV.23), à travers les corrélations H-1''/H-2'' (1H, δ_H 3,20, *dd*, $J = 8,9; 7,8$ Hz), H-2''/H-3'' (1H, δ_H 3,34, *t*, $J = 8,9$ Hz), H-3''/H-4'' (1H, δ_H 3,29, *t*, $J = 8,9$ Hz), H-4''/H-5'' (1H, δ_H 3,25, *nd*) et H-5''/H-6''b (1H, δ_H 3,68, *dd*, $J = 11,5; 5,4$ Hz) et enfin H-6''b/H-6''a (1H, δ_H 3,87, *dd*, $J = 11, 5; 2,0$ Hz). Les grandes taches de corrélation impliquant de grandes valeurs de constantes de couplage indiquent qu'il s'agit d'un glucose de configuration β ($J_{1''-2''} = 7,8$ Hz). Ce dernier substitue la génine en C-6.

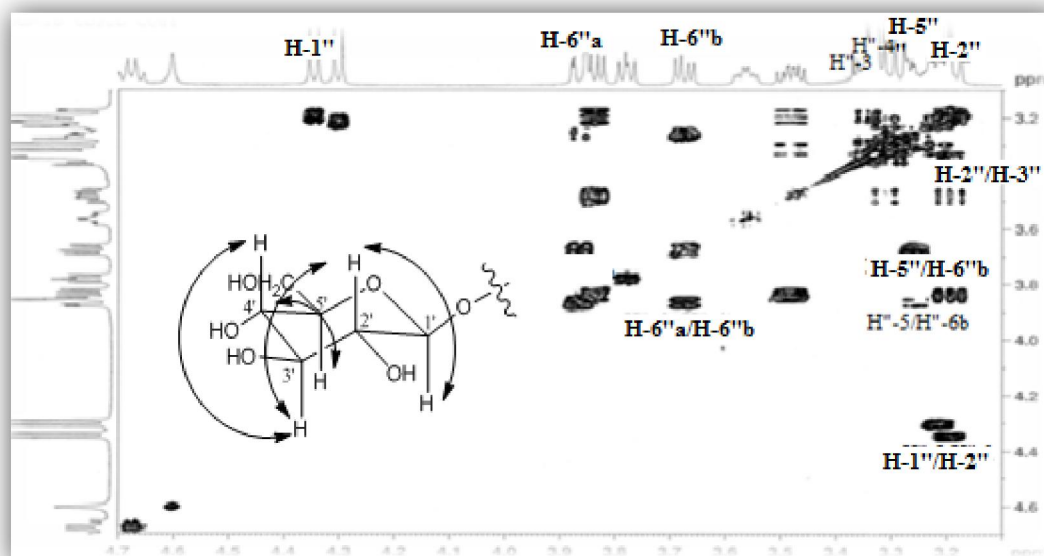


Figure IV.23: Spectre COSY H-H de la partie osidique (β -D-glucose)

L'analyse HSQC (Figure IV.24) permet de caractériser tous les carbones des deux unités osidiques.

Pour le β -D-xylose, on observe les corrélations H-1'/C-1' (δ_C 106), H-2'/C-2' (δ_C 74,1), H-3'/C-3' (δ_C 76,5), H-4'/C-4' (δ_C 69,9), H-5'a et H-5'b/C-5' (δ_C 65,3).

De la même manière, les carbones constituant le β -D-glucose sont assignés à 103,5 (C-1''), 74,3 (C-2''), 77,2 (C-3''), 70,4 (C-4''), 76,3 (C-5'') et enfin 61,6 ppm (C-6'').

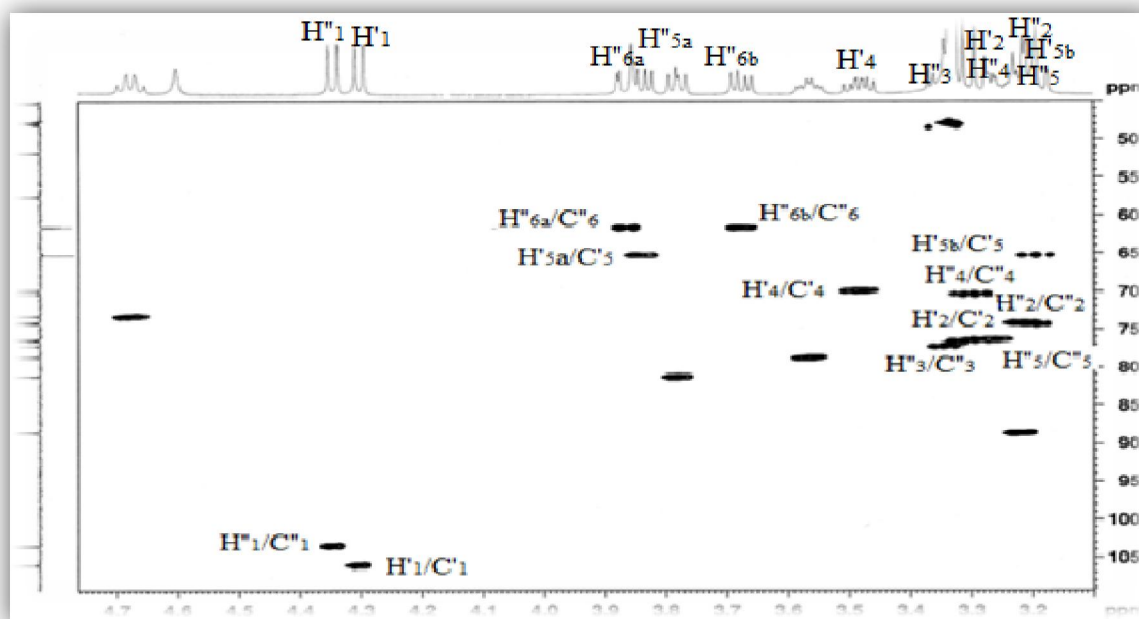
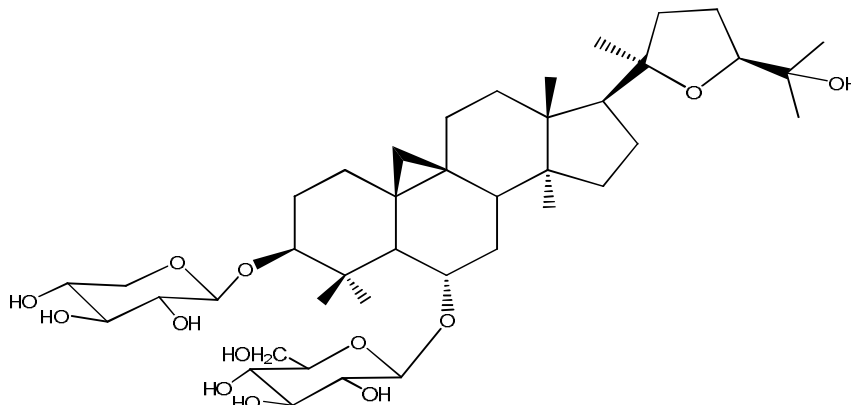


Figure IV.24: Spectre HSQC de la partie osidique du composé 10

Sur la base de cette analyse, la valeur du pouvoir rotatoire et la comparaison avec les données de la littérature, le composé **10** est identifié sans ambiguïté comme étant: 3-*O*- β -D-xylopyranosyl-6-*O*- β -D-glucopyranosyl-20(*R*),24(*S*)-époxy-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahydroxycycloartane.



Ce composé, connu sous le nom de astrasieversianine XIV, a été isolé antérieurement d'une autre espèce du genre *Astragalus*, *A. sieversianus* [89].

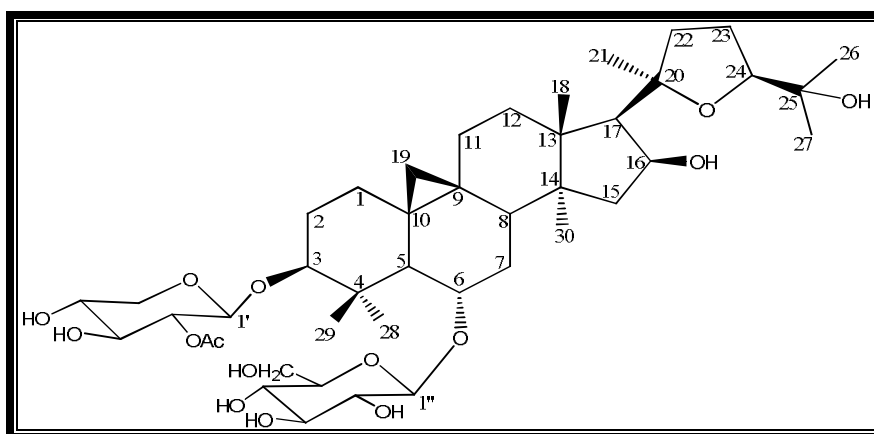
Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones du composé **10** sont regroupées dans le tableau IV.1.

Tableau IV.1: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé **10 dans CD_3OD**

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)
1	31,5	1,56-1,26 (<i>m</i>)
2	29,0	1,95-1,69 (<i>m</i>)
3	88,6	3,23 (<i>dd</i> , 7,5; 4,5)
4	41,6	-
5	51,8	1,64 (<i>d</i> , 8,6)
6	78,7	3,57 (<i>td</i> , 8,6; 3,8)
7	33,7	1,91-1,60 (<i>m</i>)
8	45,2	1,89 (<i>m</i>)
9	20,7	-
10	28,5	-
11	25,6	1,93-1,36 (<i>m</i>)
12	32,8	1,69-1,60 (<i>m</i>)
13	44,6	-
14	45,7	-
15	44,7	2,05-1,41 (<i>m</i>)
16	73,3	4,67 (<i>q</i> , 7,6)
17	57,5	2,39 (<i>d</i> , 7,6)
18	19,9	1,27 (<i>s</i>)
19	28,2	0,62 (<i>d</i> , 4,4) 0,29 (<i>d</i> , 4,4)

20	87,1	-
21	27,1	1,23 (s)
22	34,1	2,63 (q, 10,6) 1,67 (m)
23	25,4	2,05 (m)
24	81,2	3,78 (dd, 8,3; 6,0)
25	71,1	-
26	26,2	1,28 (s)
27	25,2	1,15 (s)
28	27,1	1,30 (s)
29	15,2	1,04 (s)
30	18,8	1,04 (s)
1'	106,0	4,30 (d, 7,6)
2'	74,1	3,22 (t, 7,6)
3'	76,5	3,31 (t, 7,6)
4'	69,9	3,48 (ddd, 10,8; 7,6; 5,6)
5'	65,3	3,84 (dd, 10,8; 5,6) 3,20 (m)
1''	103,5	4,35 (d, 7,8)
2''	74,3	3,20 (dd, 8,9; 7,8)
3''	77,2	3,34 (t, 8,9)
4''	70,4	3,29 (t, 8,9)
5''	76,3	3,25 nd
6''	61,6	3,87 (dd, 11,5; 2,0) 3,68 (dd, 11,5; 5,4)

IV. 2.3.2 Elucidation structurale du composé 11



**3-O-(2'-O-acétyl)- β -D-xylopyranosyl-6-O- β -D-glucopyranosyl-20(R),24(S)-époxy-3 β ,6 α ,
16 β ,25-tetrahydrocycloartane (11)**

Le spectre de masse ESI⁺ du composé **11** (Figure IV.25) montre un pic d'ion pseudo-moléculaire [M+Na]⁺ à m/z 849, soit une masse moléculaire de 826 uma correspondant à une formule brute en C₄₃H₇₀O₁₅.

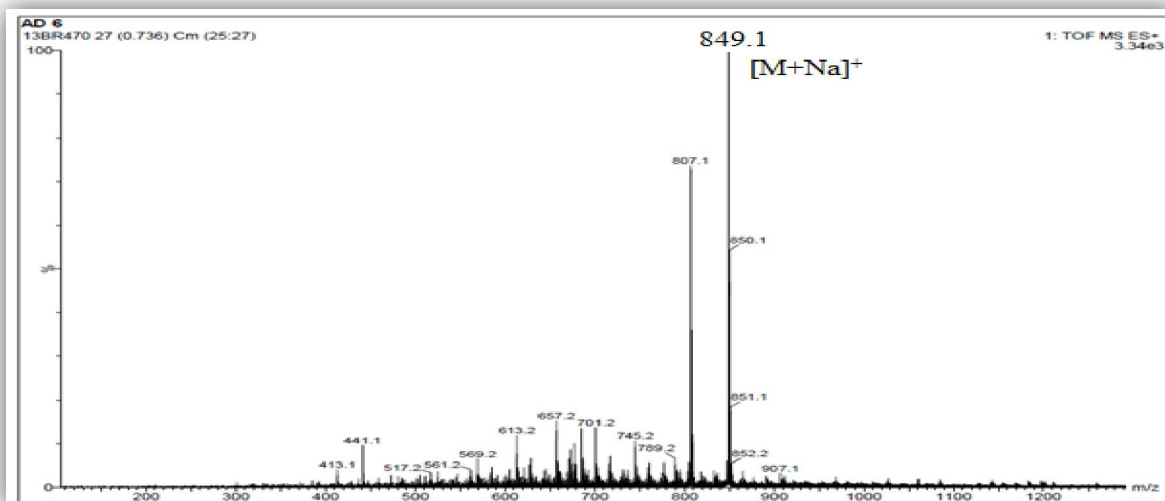
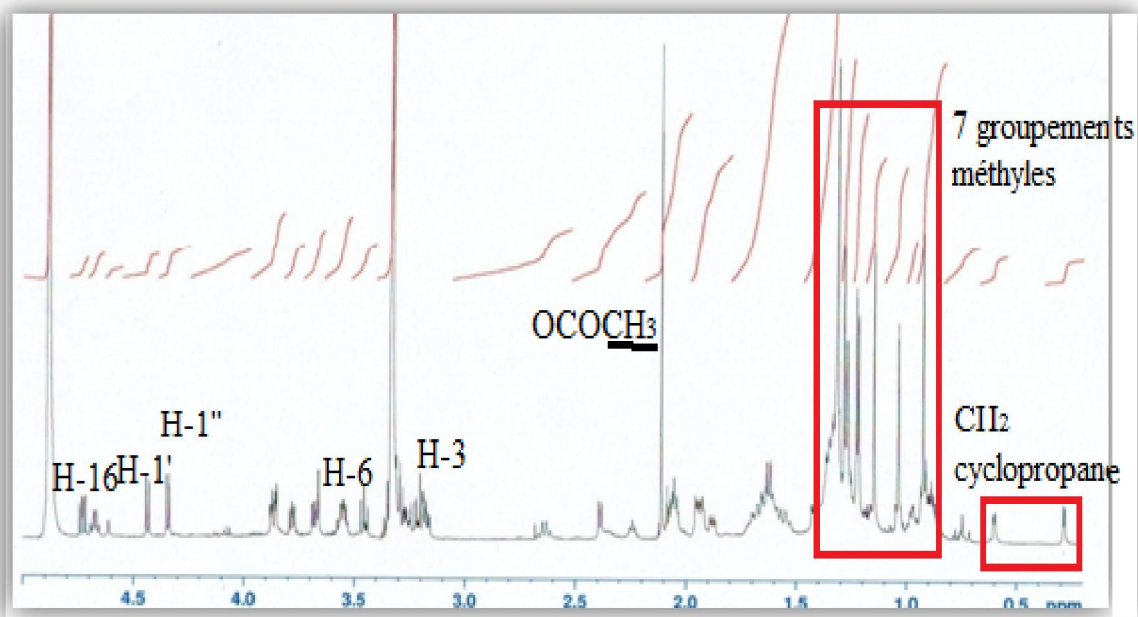
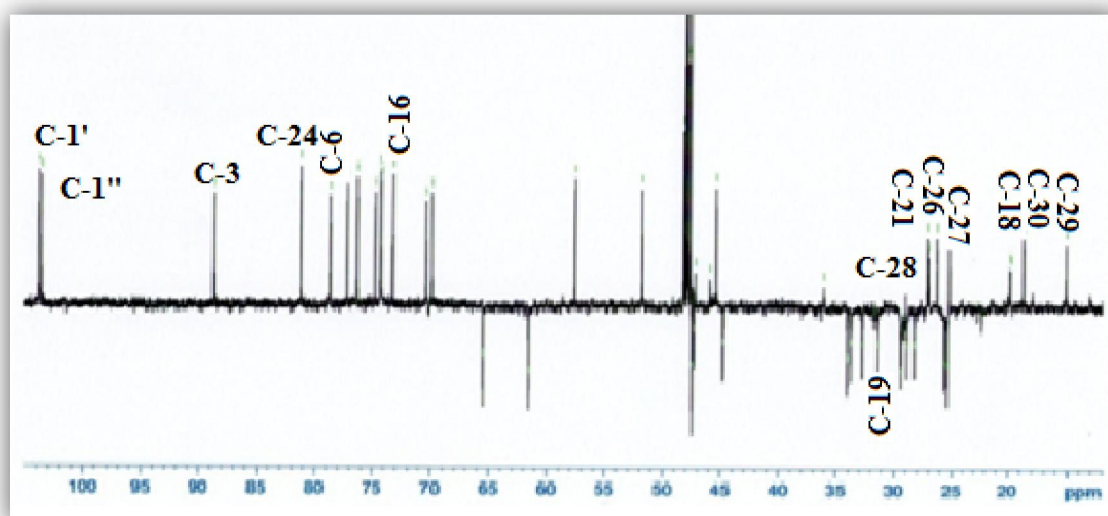


Figure IV.25: Spectre de masse ESI (mode positif) du composé 11

Ses spectres RMN ¹H et ¹³C DEPT (Figures IV.26 et IV.27) sont globalement similaires à ceux du composé 10 décrit précédemment. Il est notamment observé les signaux caractéristiques:

- du noyau cyclopropane: δ_H 0,28 (1H, *d*, $J = 4,3$ Hz, H-19 *exo*)/ δ_C 28,2, 0,60 (1H, *d*, $J = 4,3$ Hz, H-19 *endo*) / δ_C 28,2.
- des sept groupements méthyles: CH₃-29 [δ_H 0,92 (3H, *s*)/ δ_C 15,1], CH₃-30 [δ_H 1,04 (3H, *s*)/ δ_C 18,8], CH₃-28 [δ_H 1,22 (3H, *s*)/ δ_C 27,1], CH₃-27 [δ_H 1,15 (3H, *s*)/ δ_C 25,2], CH₃-21 [δ_H 1,23 (3H, *s*)/ δ_C 26,9], CH₃-18 [δ_H 1,27 (3H, *s*)/ δ_C 19,9], CH₃-26 [δ_H 1,28 (3H, *s*)/ δ_C 26,2.]
- des groupements oxyméthines: CH-3 [δ_H 3,17 (*dd*, $J = 9,4; 4,5$ Hz)/ δ_C 88,7], CH-6 [δ_H 3,56 (*m*)/ δ_C 78,7], CH-16 [δ_H 4,67 (*q*, $J = 7,5$ Hz)/ δ_C 73,3], CH-24 [δ_H 3,78 (*dd*, $J = 8,4; 5,8$ Hz)/ δ_C 81,2].
- de deux protons et carbones anomériques des deux unités osidiques: CH-1' [δ_H 4,43 (*d*, $J = 7,9$ Hz)/ δ_C 103,8], CH-1'' [δ_H 4,34 (*d*, $J = 7,8$ Hz)/ δ_C 103,5].

Figure IV.26: Spectre RMN ^1H du composé 11Figure IV.27: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé 11

La différence notable entre les composés **11** et **10** réside en l'apparition sur le spectre RMN ^1H (Figure IV.26) du composé **11**, d'un signal singulet d'intégration 3H résonant à δ_{H} 2,11, et sur le spectre RMN ^{13}C (Figure IV.28) d'un signal à 170,5 ppm, traduisant la présence d'un groupement acétate. Ceci est confirmé par la comparaison des spectres de masse qui montrent une différence masse de l'ordre de 42 uma entre ces deux composés.

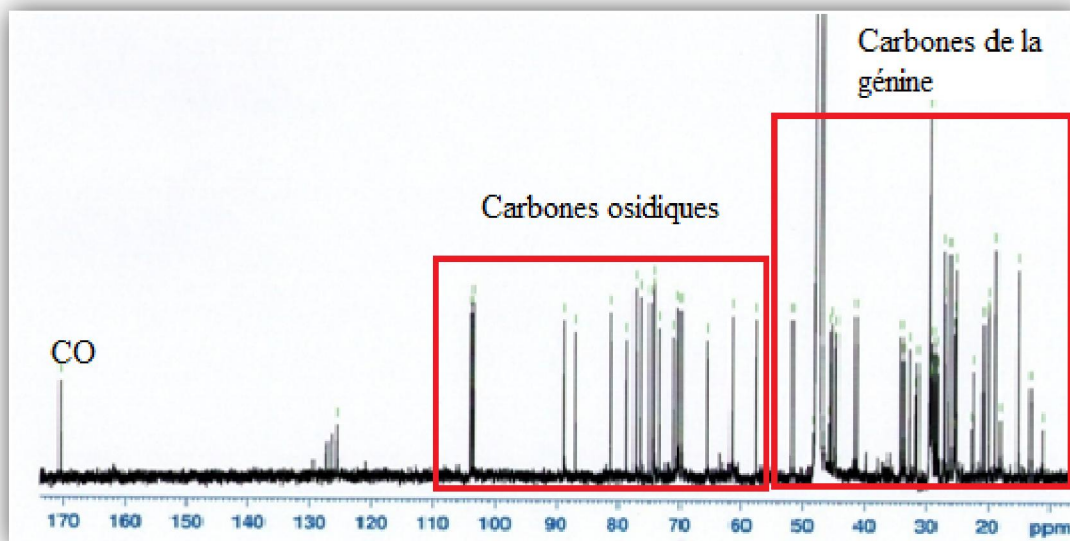


Figure IV.28: Spectre RMN ^{13}C du composé 11

L'analyse conjuguée des spectres COSY H-H, HMBC et HSQC montre clairement la totale similitude de la génine pour les deux composés **10** et **11**, suggérant que le groupement acétate se trouverait au niveau de la partie osidique.

L'analyse COSY H-H de la partie osidique permet d'identifier, comme pour le composé **10**, un β -D-xylose [H-1' (δ_{H} 4,43), /C-1' (δ_{C} 103,8)] (Figure IV.29) et un β -D glucose [H-1'' (δ_{H} 4,34)/C-1'' (δ_{C} 103,5)] (Figure IV.30).

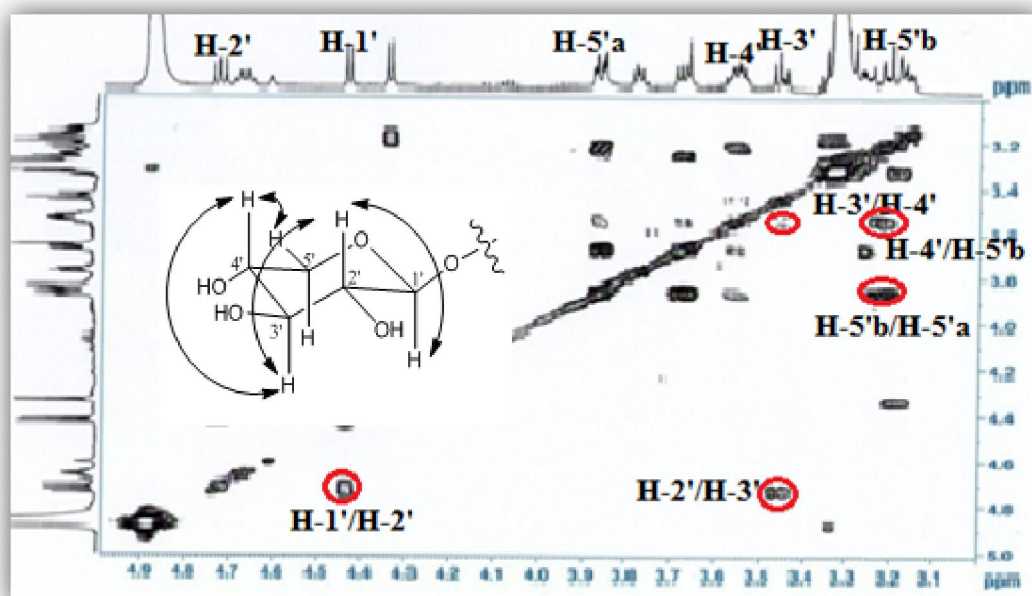


Figure IV.29: Spectre COSY H-H du β -D-xylose (composé 11)

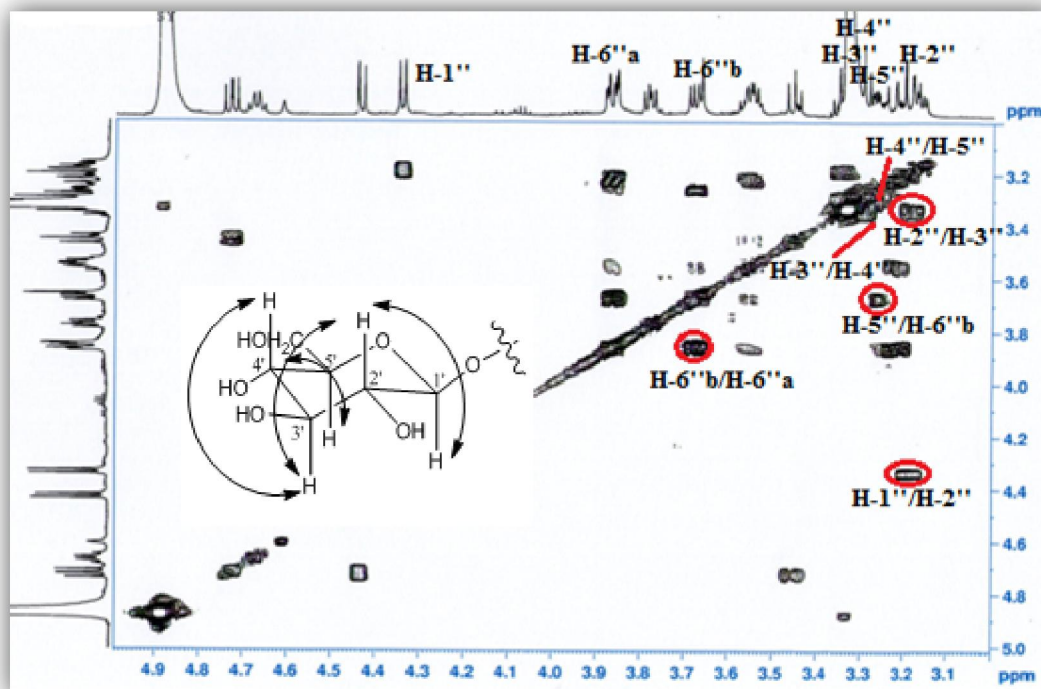


Figure IV.30: Spectre COSY H-H du β-D-glucose (composé 11)

Le déblindage important de l'ordre de + 1,51 ppm du signal du proton H-2' (δ_H 4,73) du β-D-xylose indique que le groupement acétate est porté par le carbone C-2' de ce dernier. Ceci est confirmé par expérience HMBC qui montre une corrélation longue distance entre le carbonyle du groupement acétate (δ_C 170,5) et le proton H-2' du xylose (Figure IV.31).

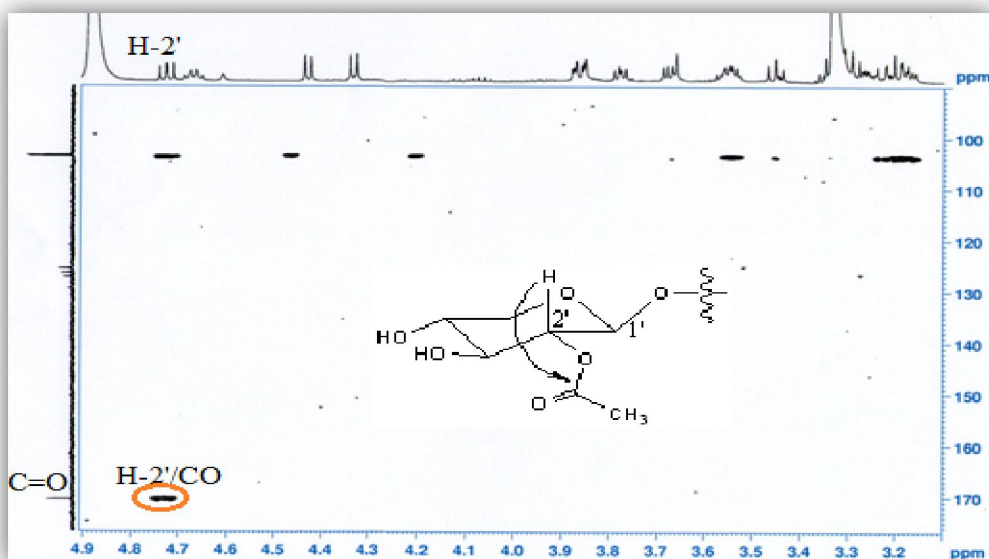


Figure IV.31: Spectre HMBC montrant la corrélation entre le groupement acétate et le proton H-2' du β-D-xylose (composé 11)

Tous les carbones des deux unités osidiques ont été caractérisés par analyse HSQC (Figure IV.32).

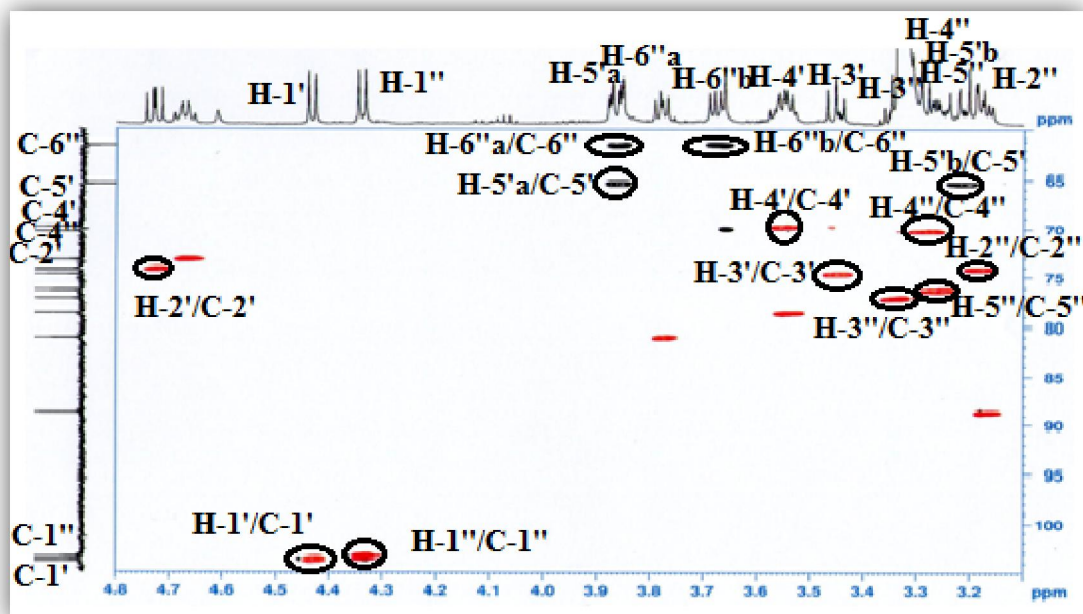


Figure IV.32: Spectre HSQC de la partie osidique (composé 11)

Les points de branchement des sucres, similaires à ceux établis pour le composé **10**, sont confirmés par expérience HMBC (Figure IV.33) qui montre des corrélations entre le signal du proton anomère du xylose (H-1') résonant à 4,43 ppm et le carbone C-3 (88,7 ppm) de la génine d'une part, et entre le proton anomère H-1'' (δ_H 4,34) du glucose et le carbone C-6 (78,7 ppm) de la génine d'autre part.

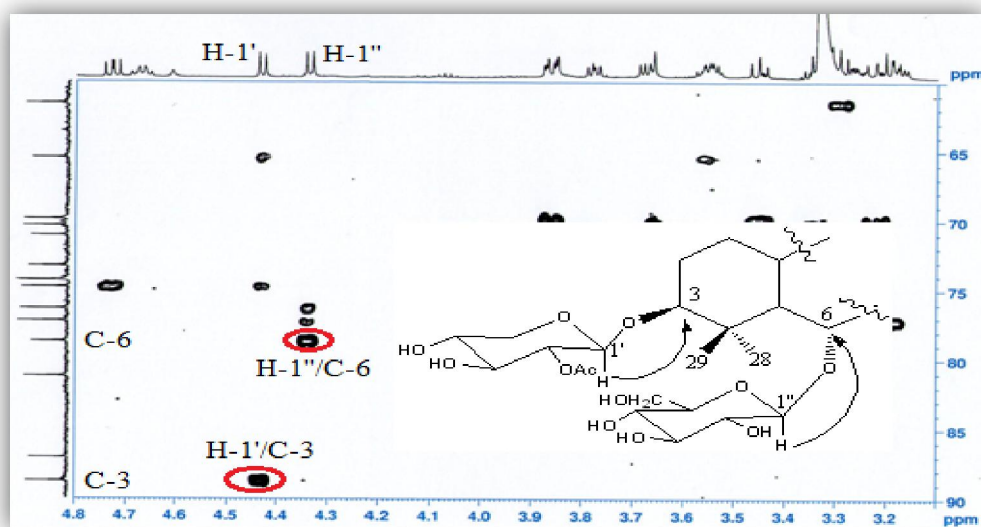
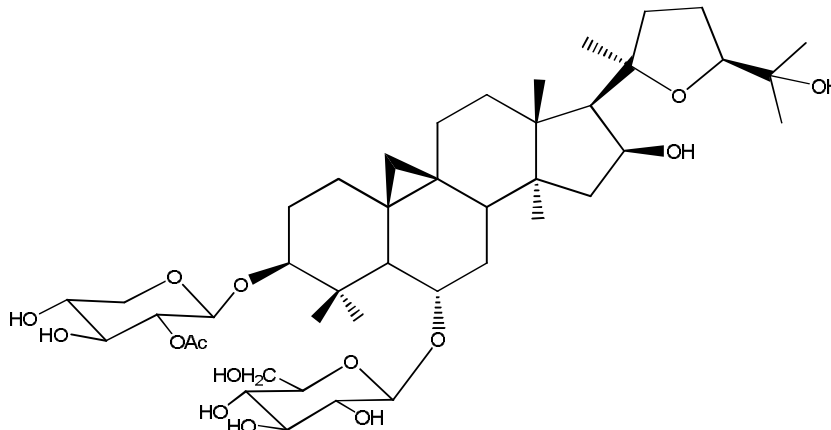


Figure IV.33: Spectre HMBC mettant en évidence les sites de fixation des sucres

Tous les déplacements chimiques des protons et carbones (Tableau IV.2) assignés conjointement par expériences COSY H-H, HSQC et HMBC, permettent d'attribuer au composé **11** la structure suivante: 3-*O*-(2'-*O*-acétyl)- β -D-xylopyranosyl-6-*O*- β -D-glucopyranosyl-20(*R*),24(*S*)-époxy-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahydroxycycloartane.



Ce composé connu sous le nom de astrasieverianine VIII a été précédemment isolé, comme le composé **10**, des racines de *Astragalus sieversianus* [89].

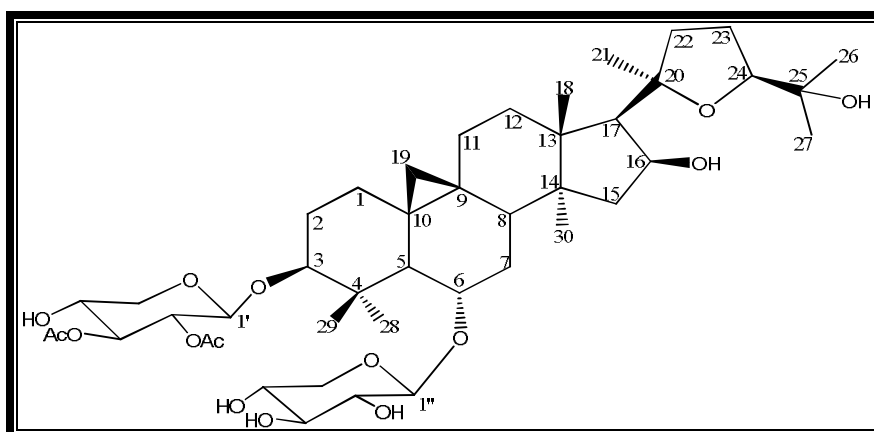
Le tableau IV.2 contient tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **11**.

Tableau IV.2: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé 11 dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	31,4	1,54-1,30 (m)
2	29,1	1,93-1,65 (m)
3	88,7	3,17 (dd, 9,4; 4,5)
4	41,4	-
5	51,7	1,61 (m)
6	78,7	3,56 (m)
7	33,7	1,93-1,59 (m)
8	45,7	1,88 (dd, 10,2; 4,7)
9	20,7	-
10	28,5	-
11	25,6	1,93-1,31 (m)
12	32,7	1,67-1,57 (m)
13	44,6	-
14	44,7	-
15	45,7	2,05 -1,40 (m)
16	73,3	4,67 (q, 7,5)
17	57,5	2,39 (d, 7,5)
18	19,9	1,27 (s)
19	28,2	0,28 (d, 4,3) 0,60 (d, 4,3)

20	87,0	-
21	26,9	1,23 (s)
22	34,0	2,64 (q, 10,6) 1,64 (m)
23	25,4	2,05 (m)
24	81,2	3,78 (dd, 8,4; 5,8)
25	71,1	-
26	26,2	1,28 (s)
27	25,2	1,15 (s)
28	27,1	1,22 (s)
29	15,1	0,92 (s)
30	18,8	1,04 (s)
1'	103,8	4,43 (d, 7,9)
2'	74,3	4,73 (dd, 9,6; 7,9)
3'	74,8	3,45 (t, 9,6)
4'	69,9	3,55 (ddd, 11,5; 9,6; 4,8)
5'	65,5	3,86 (dd, 11,5; 4,8) 3,22 (dd, 11,5; 9,6)
2'-CO	170,5	-
OCOCH ₃	19,9	2,11 (s)
1''	103,5	4,34 (d, 7,8)
2''	74,3	3,19 (dd, 8,5; 7,8)
3''	77,2	3,35 (t, 8,5)
4''	70,4	3,29 (t, 8,5)
5''	76,3	3,26 (ddd, 8,5; 5,4; 2,3)
6''	61,5	3,86 (dd, 11,5; 2,3) 3,67 (dd, 11,5; 5,4)

IV. 2.3.3 Elucidation structurale du composé 12



**3-O-(2',3'-O-diacétyl)- β -D-xylopyranosyl-6-O- β -D-xylopyranosyl-20(R),24(S)-époxy-3 β ,
6 α ,16 β ,25-tetrahydroxycycloartane (12)**

Le spectre de masse ESI⁺ du composé **11** (Figure IV.34), révèle un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z 861 [M+Na]⁺, soit une masse moléculaire de 838 uma qui correspond à une formule brute en C₄₄H₇₀O₁₅.

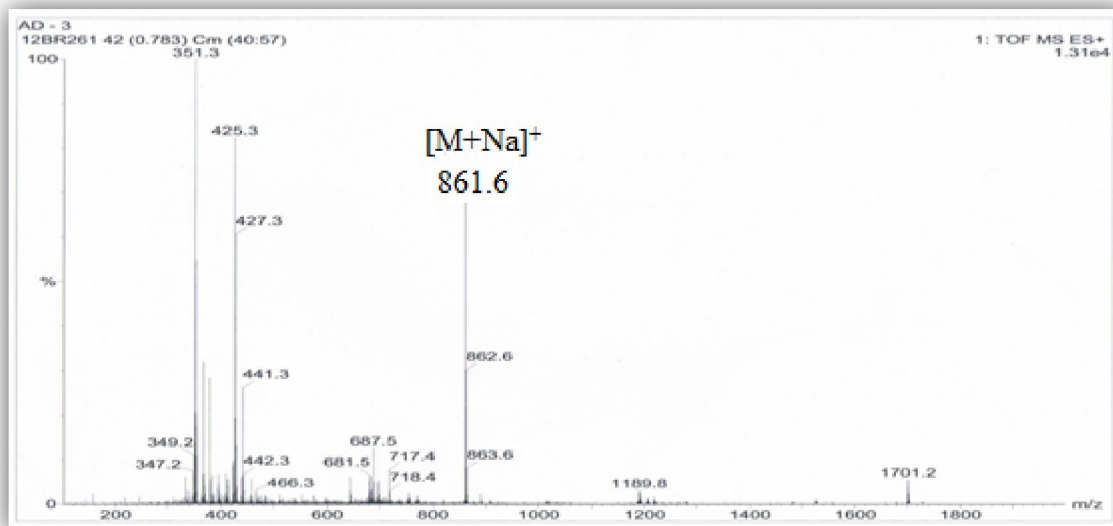
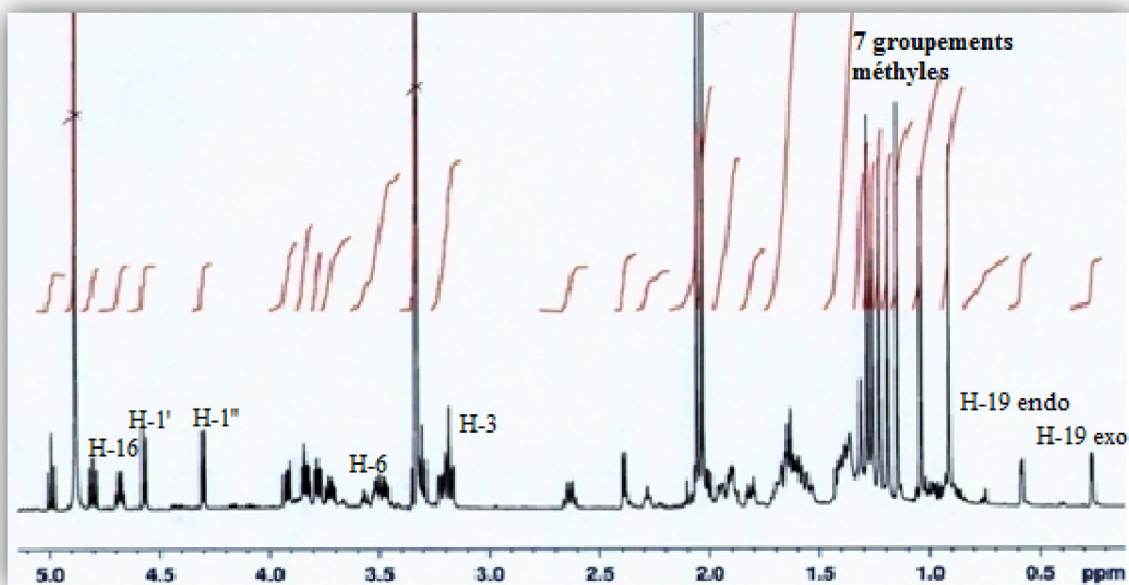
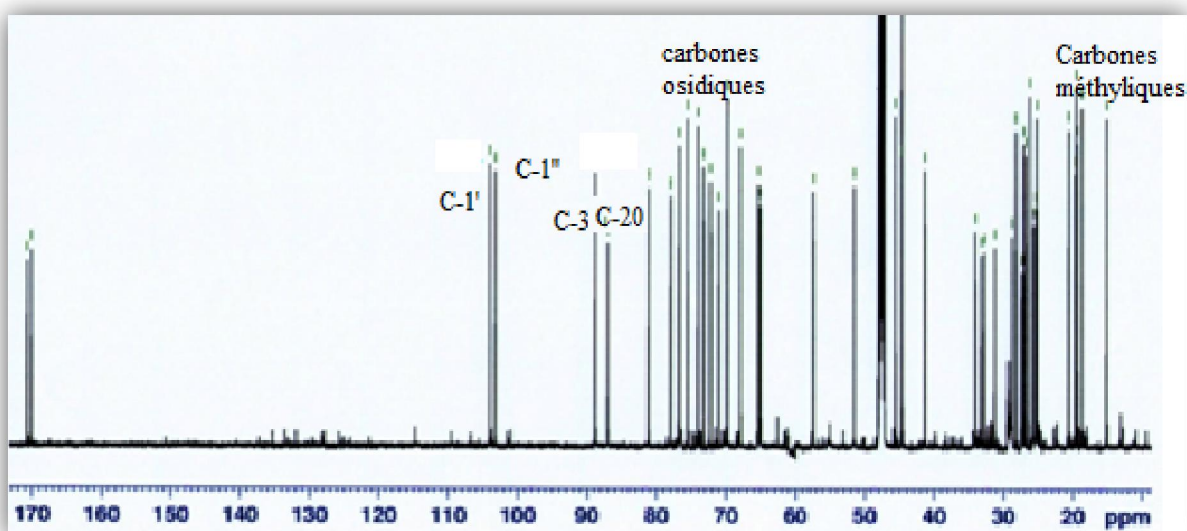


Figure IV.34: Spectre de masse ESI⁺ du composé 12

L'analyse des spectres RMN ¹H et ¹³C du composé **12** (Figures IV.35 et IV.36) montre une similitude structurale avec le composé **11**. En effet, on observe les signaux caractéristiques d'une génine à squelette cycloartane à :

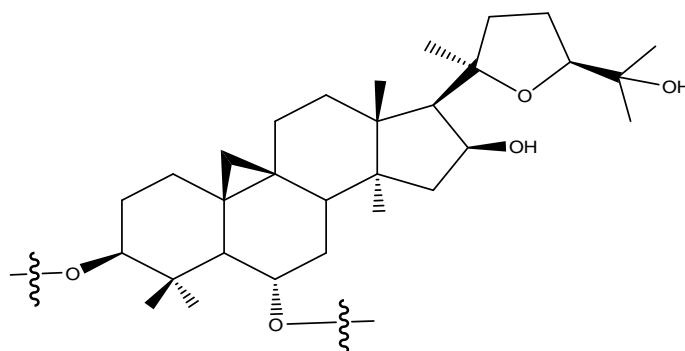
- δ_H 1,26/ δ_C 19,7 (CH₃-18, s), δ_H 1,23/ δ_C 27,1 (CH₃-21, s), δ_H 1,28/ δ_C 26,2 (CH₃-26, s), δ_H 1,15/ δ_C 25,2 (CH₃-27, s), δ_H 1,19/ δ_C 26,8 (CH₃-28, s), δ_H 0,91/ δ_C 15,1 (CH₃-29, s), δ_H 1,04/ δ_C 18,7 (CH₃-30, s).
- δ_H 0,58/ δ_C 27,4 (CH-19 *endo*, *d*, $J = 4,4$ Hz), δ_H 0,26/ δ_C 27,4 (CH-19 *exo*, *d*, $J = 4,4$ Hz).
- δ_H 3,22/ δ_C 88,8 (CH-3, *dd*, $J = 12,2; 4,4$ Hz), δ_H 3,51/ δ_C 78,0 (CH-6, *td*, $J = 8,2; 4,6$ Hz), δ_H 4,68/ δ_C 73,2 (CH-16, *q*, $J = 7,7$ Hz), δ_H 3,78/ δ_C 81,2 (CH-24, *dd*, $J = 8,3; 5,9$ Hz).

La présence de deux unités osidiques est établie par l'observation sur les mêmes spectres de signaux caractéristiques de protons et carbones anomères: CH-1' [δ_H 4,56 (*d*, $J = 7,9$ Hz)/ δ_C 104,1] et CH-1'' [δ_H 4,30 (*d*, $J = 8,5$ Hz)/ δ_C 103,2].

Figure IV.35: Spectre RMN ^1H du composé 12Figure IV.36: Spectre RMN ^{13}C du composé 12

De plus, le spectre RMN ^1H permet de visualiser deux signaux singulets s'intégrant chacun pour 3H résonant à δ_{H} 2,03 et 2,06 attribuables à deux groupements acétates.

Les expériences combinées HSQC, COSY H-H et HMBC, ont permis d'assigner tous les déplacements chimiques des protons et carbones de la génine (Tableau IV.3) qui s'avère totalement identique à celles des composés **10** et **11**. Elle a la structure suivante:



La stéréochimie au niveau de la génine a été confirmée principalement par analyse des corrélations observées sur le spectre NOESY (Figures IV.37 et IV.38). En effet, ce dernier montre les couplages entre le proton H-19 du groupement CH₂ du noyau cyclopropane en position β [77, 78, 79] et les protons des groupements méthyles CH₃-29 et CH₃-18 β-axial, les protons du méthyle CH₃-28 d'orientation α-équatoriale et les protons H-3/H-5, ainsi que H-6 et CH₃-29β. D'autres effets NOE sont également observés: H-18β/H-8, H-30α/H-17, H-17/H-16, H-17/H-21 et enfin H-21α/H-24.

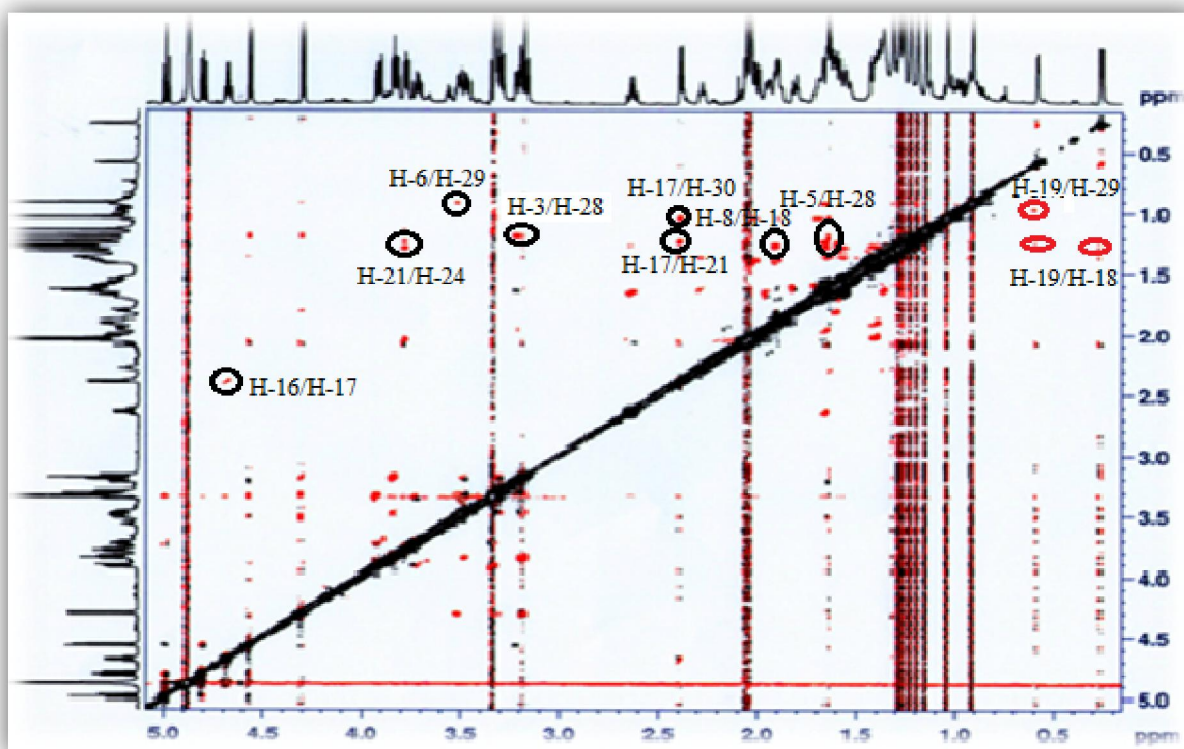


Figure IV.37: Spectre NOESY du composé 12

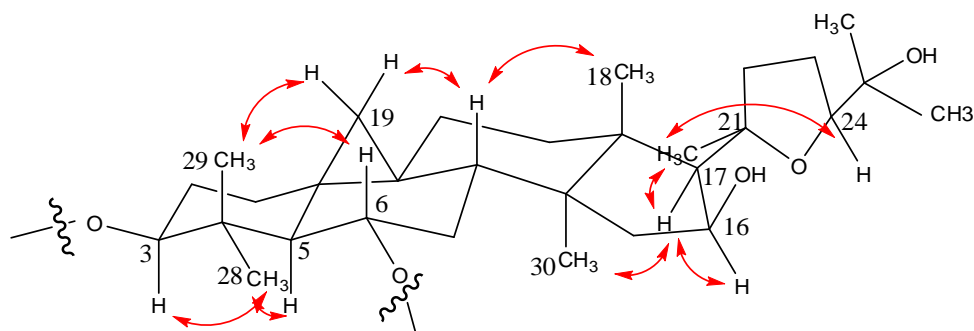


Figure IV.38: Principales Corrélations NOESY observées pour le composé 12

La différence entre les composés **12** et **11** se situe donc au niveau de la partie osidique qui renferme deux groupements acétates. L'analyse des spectres COSY H-H et TOCSY a permis d'établir la nature des deux unités osidiques.

A partir du proton anomère (H-1') repéré à 4,56 ppm (*d*, $J = 7,9$ Hz), cette analyse (Figures IV.39 et IV.40) permet d'identifier un xylose de configuration β à travers les corrélations H-1'/H-2' (δ_H 4,80, *dd*, $J = 9,6; 7,9$ Hz), H-2'/H-3' (δ_H 4,99, *t*, $J = 9,6$ Hz), H-3'/H-4' (δ_H 3,72, *ddd*, $J = 11,1; 9,6; 5,6$ Hz), H-4'/H-5'a (δ_H 3,92, *dd*, $J = 11,1; 5,6$ Hz) et H-4'/H-5'b (δ_H 3,33, *t*, $J = 11,1$ Hz). Le déblindage des signaux des protons H-2' (δ_H 4,80) et H-3' (δ_H 4,99) indique clairement que les deux groupements acétates estérifient le β -D-xylose en C-2' et C-3'. La confirmation est apportée par le spectre HMBC (Figure IV.40) qui présente deux corrélations entre les carbones de carbonyles des groupements acétate (δ_C 170 et 170,5) et les protons H-2' et H-3'.

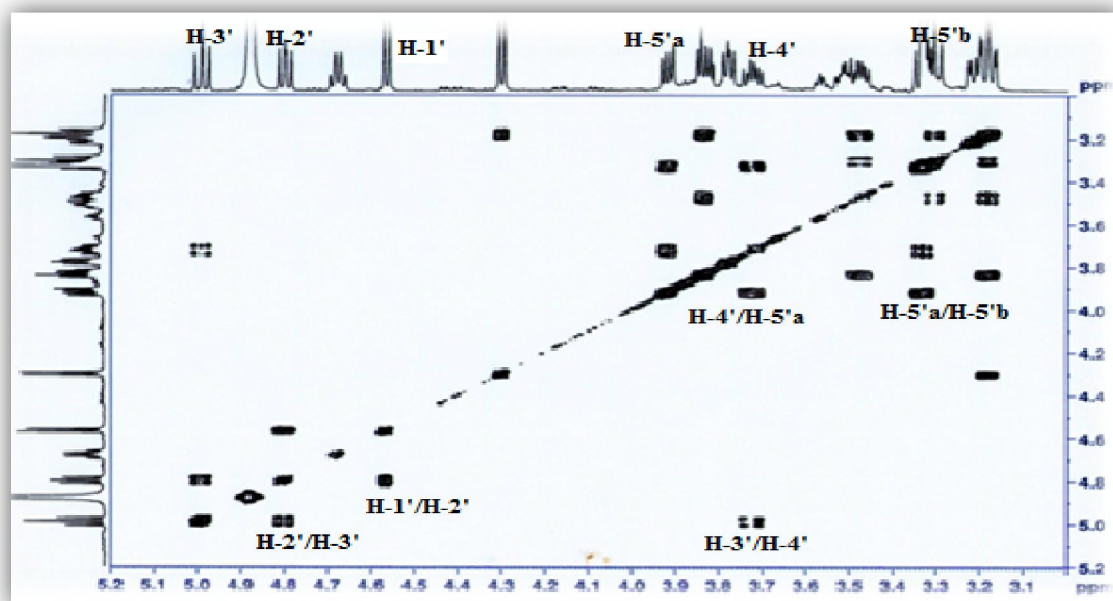


Figure IV.39: Spectre COSY H-H du β -D-xylose (composé 12)

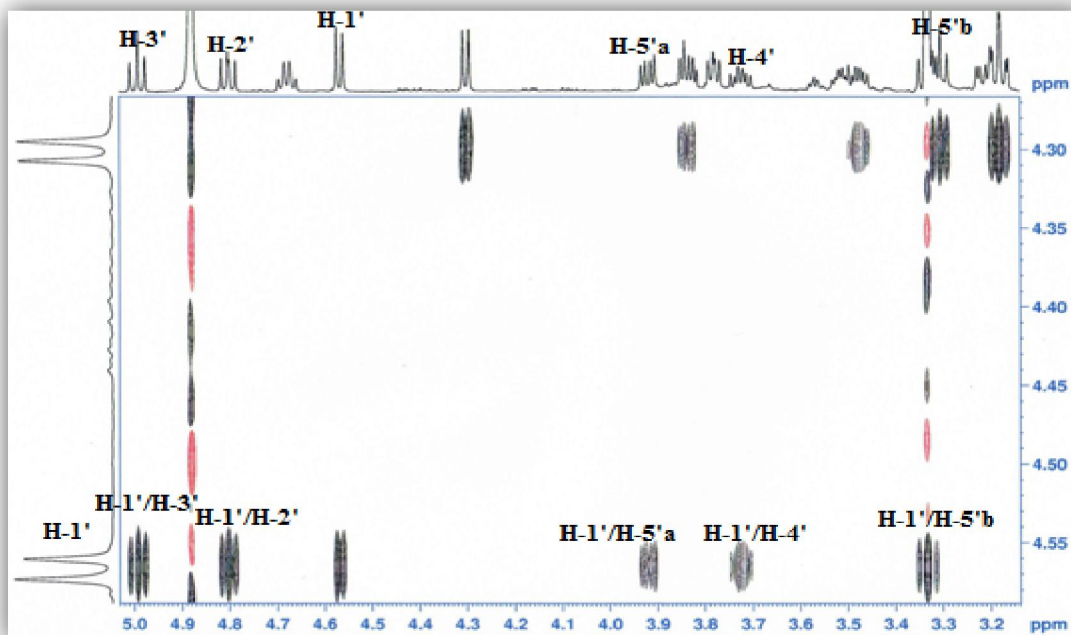


Figure IV.40: Spectre TOCSY du β -D-xylose (composé 12)

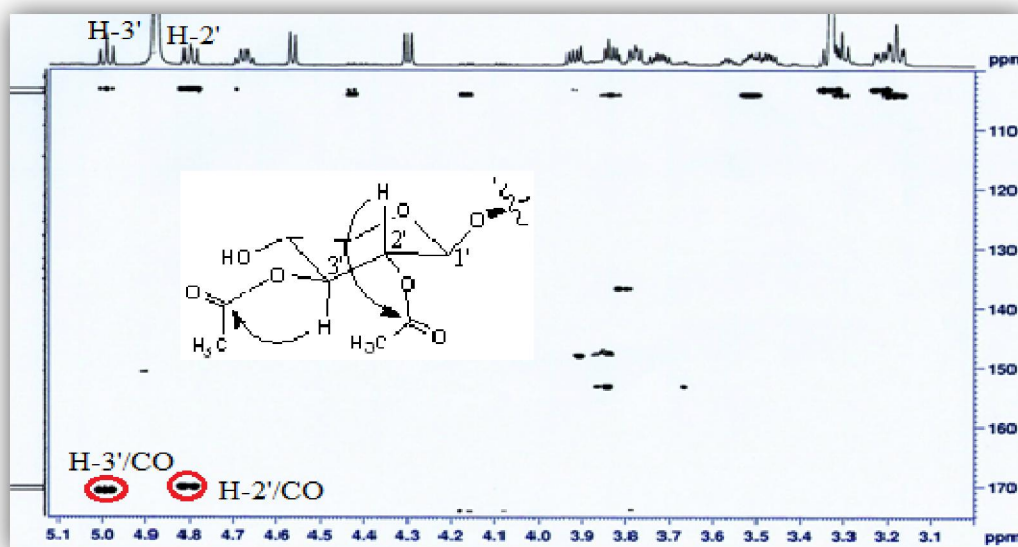


Figure IV.41: Spectre HMBC montrant les corrélations entre les groupements acétates et les protons H-2' et H-3' du β -D-xylose (composé 12)

A partir du signal du second proton anomère (H-1'') résonant à δ_H 4,30 (*d*, $J = 8,5$ Hz), l'analyse des spectres COSY H-H (Figure IV.42) et TOCSY (Figure IV.43) met en évidence un système de spins à six protons d'un pentose à travers les couplages homonucléaires:

- H-1''/H-2'' [δ_H 3,18 (*t*, $J = 8,5$ Hz)]
- H-2''/H-3'' [δ_H 3,35 (*t*, $J = 8,5$ Hz)]

- H-3''/H-4'' [δ_{H} 3,48 (*ddd*, $J = 11,3; 8,5; 5,1$ Hz)]
- H-4''/H-2-5'' [δ_{H} 3,84 (*dd*, $J = 11,3; 5,1$ Hz, H-5''a), δ_{H} 3,18 (*t*, $J = 11,3$ Hz, H-5''b)].

Les grandes valeurs des constantes de couplage permettent d'identifier un second β -D-xylose. Tous les carbones de ce dernier ont été caractérisés par analyse HSQC: C-1'' (δ_{C} 103,2), C-2'' (δ_{C} 74,1), C-3'' (δ_{C} 76,7), C-4'' (δ_{C} 69,8) et C-5'' (δ_{C} 65,3).

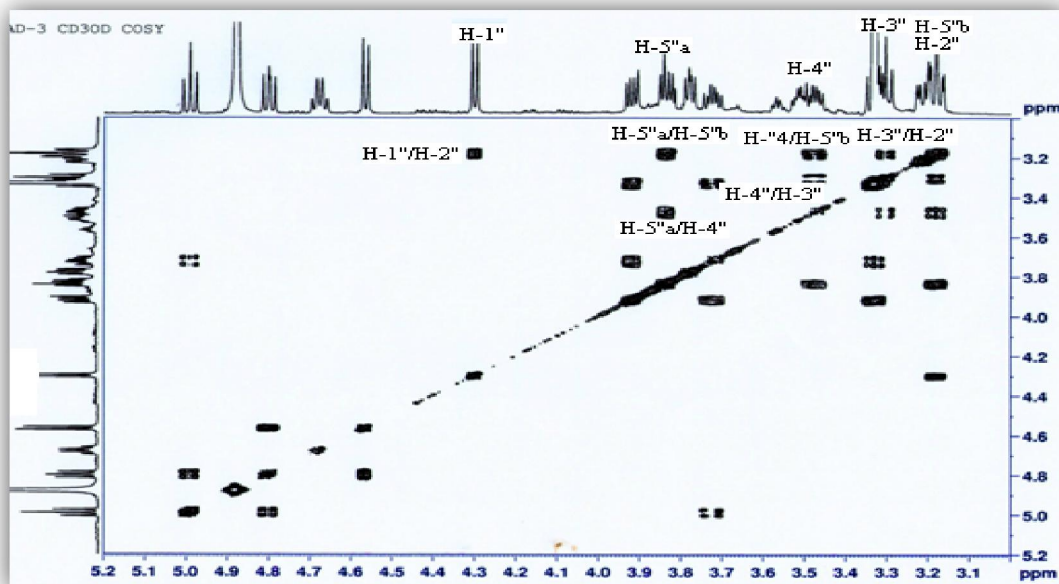


Figure IV.42: Spectre COSY H-H du second β -D-xylose (composé 12)

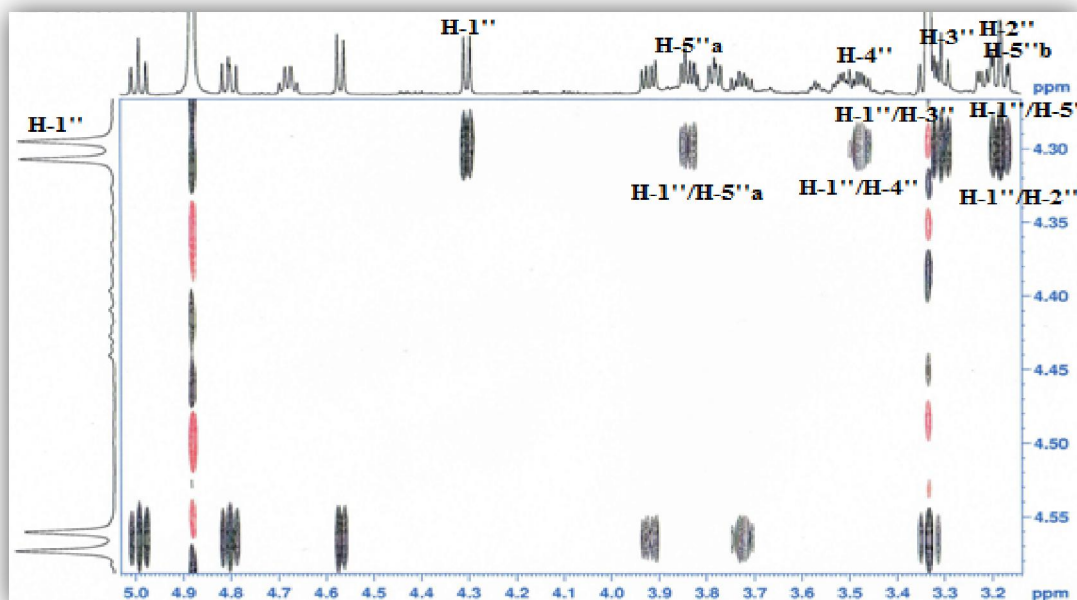


Figure IV.43: Spectre TOCSY du second β -D-xylose (composé 12)

Les sites de fixation, identiques à ceux observés pour le composé **11**, sont confirmés par expérience HMBC (Figure IV.44) à travers les couplages entre le proton anomère H-1' (4,56

ppm) du premier xylose et le carbone C-3 (88,8 ppm) de la génine, entre le proton anomère H-1'' (4,30 ppm) du second xylose et le carbone C-6 (78,0 ppm) de la génine.

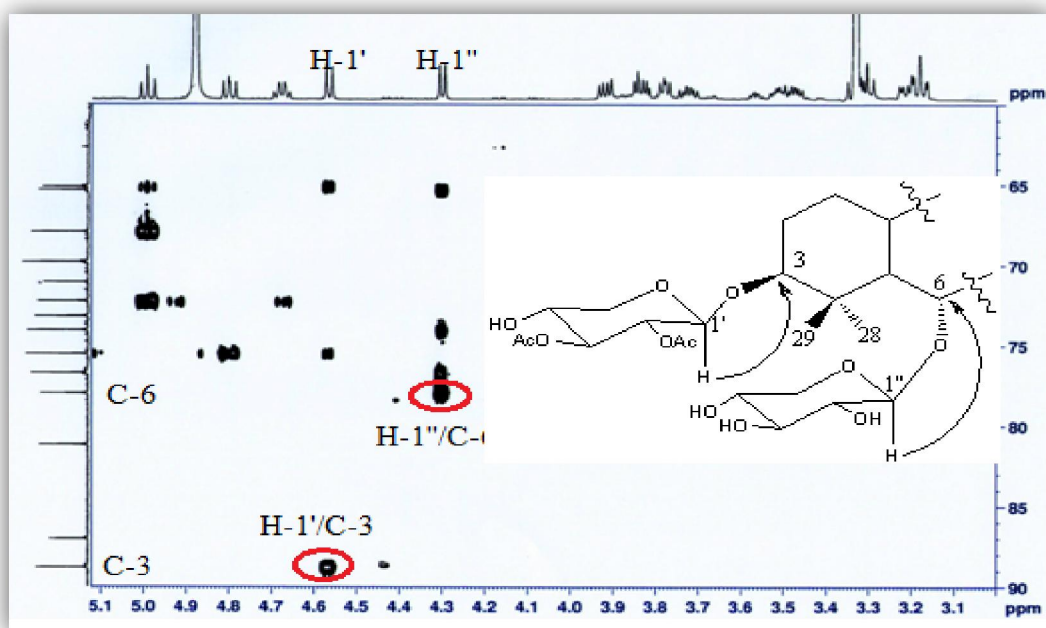
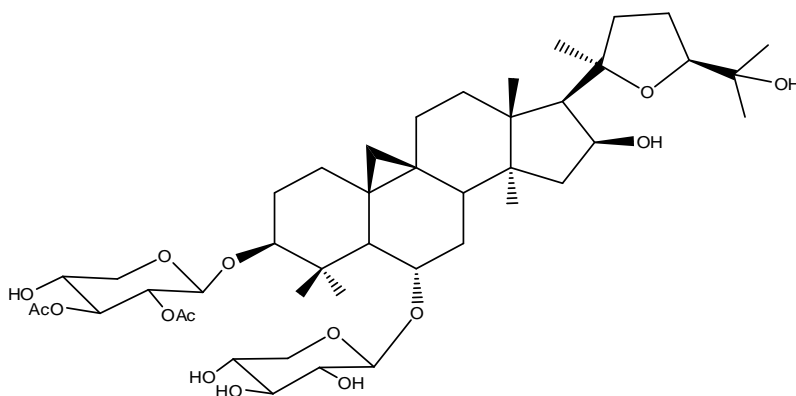


Figure IV.44: Spectre HMBC mettant en évidence les sites de fixation des sucres

L'ensemble de ces données permet d'assigner pour le composé **6** la structure suivante: 3-*O*-(2',3'-*O*-diacétyl)- β -D-xylopyranosyl-6-*O*- β -D-xylopyranosyl-20(*R*),24(*S*)-époxy-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahydrocycloartane. Ce saponoside appelé astrasieversianine II a été précédemment isolé, comme les composés **10** et **11**, à partir des racines de l'espèce *Astragalus sieversianus* [89].



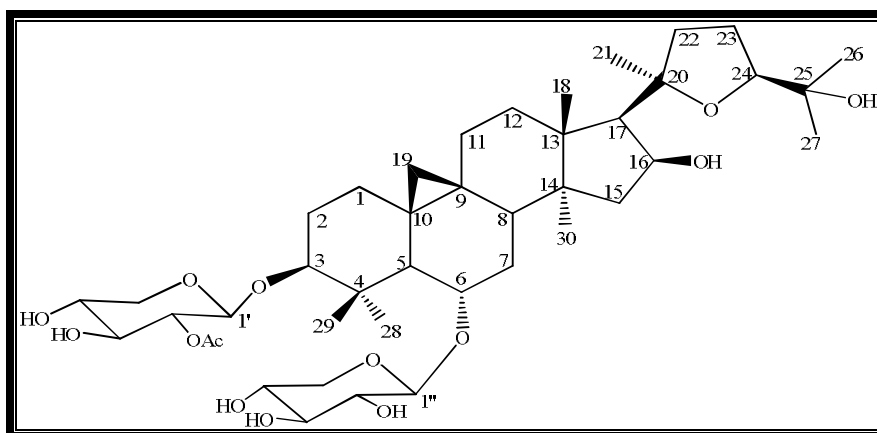
Le tableau IV.3 reproduit tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **12**.

Tableau IV.3: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé 12 dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	31,3	1,54-1,30 (m)
2	28,7	1,95-1,66 (m)
3	88,8	3,22 (dd, 12,2; 4,4)
4	41,4	-
5	51,5	1,64 (d, 8,2)
6	78,0	3,51 (td, 8,2; 4,6)
7	33,2	1,81 (dt, 13,5; 4,6) 1,59 (m)
8	44,7	1,9 (dd, 9,6; 4,6)
9	20,6	-
10	28,2	-
11	25,6	1,91 (td, 10,1; 4,7) 1,40 (m)
12	32,7	1,68- 1,58 (m)
13	45,6	-
14	45,6	-
15	44,6	2,00 (dd, 12,7; 7,7) 1,39 (m)
16	73,2	4,68 (q, 7,7)
17	57,4	2,39 (d, 7,7)
18	19,7	1,26 (s)
19	27,4	0,58 (d, 4,4) 0,26 (d, 4,4)
20	87,0	-
21	27,1	1,23 (s)
22	34,1	2,63 (q, 10,8) 1,65 (m)
23	25,4	2,05 (m)
24	81,2	3,78 (dd, 8,3; 5,9)
25	71,1	-
26	26,2	1,28 (s)
27	25,2	1,15 (s)
28	26,8	1,19 (s)
29	15,1	0,91 (s)
30	18,7	1,04 (s)
2'-CO	170,0	-
OCOCH ₃	19,5	2,03 (s)
3'-CO	170,5	-
OCOCH ₃	19,4	2,06 (s)
1'	104,1	4,56 (d, 7,9)
2'	72,2	4,80 (dd, 9,6; 7,9)
3'	75,5	4,99 (t, 9,6)
4'	67,9	3,72 (ddd, 11,1; 9,6; 5,6)

5'	65,1	3,92 (<i>dd</i> , 11,1; 5,6) 3,33 (<i>t</i> , 11,1)
1''	103,2	4,30 (<i>d</i> , 8,5)
2''	74,1	3,18 (<i>t</i> , 8,5)
3''	76,7	3,35 (<i>t</i> , 8,5)
4''	69,8	3,48 (<i>ddd</i> , 11,3; 8,5; 5,1)
5''	65,3	3,84 (<i>dd</i> , 11,3; 5,1) 3,18 (<i>t</i> , 11,3)

IV. 2.3.4 Elucidation structurale du composé 13



3-O-(2'-O-acétyl)- β -D-xylopyranosyl-6-O- β -D-xylopyranosyl-20(R),24(S)-époxy-3 β ,6 α , 16 β , 25-tetrahydroxycycloartane (13)

L'analyse conjointe des spectres RMN ^1H , ^{13}C , COSY H-H, HSQC et HMBC indiquent clairement que le composé **13** est de même structure que le composé **12**, c'est-à-dire une génine cycloartanique identique porteuse de deux unités osidiques, l'une branchée en C-3 et l'autre en C-6. On identifie sur les spectres proton et carbone (Figures IV.45 et IV.46) les signaux des:

- sept groupements méthyles: CH₃-18 [δ_{H} 1,26 (*s*)/ δ_{C} 19,9], CH₃-21 [δ_{H} 1,23 (*s*)/ δ_{C} 27,1], CH₃-26 [δ_{H} 1,28 (*s*)/ δ_{C} 26,2], CH₃-27 [δ_{H} 1,15 (*s*)/ δ_{C} 25,2], CH₃-28 [δ_{H} 1,19 (*s*)/ δ_{C} 26,8], CH₃-29 [δ_{H} 0,91 (*s*)/ δ_{C} 15,1], CH₃-30 [δ_{H} 1,04 (*s*)/ δ_{C} 18,7].
- deux protons non équivalents du noyau cyclopropane: CH₂-19 [δ_{H} 0,28; 0,54 (*d*, $J = 3,5$ Hz)/ δ_{C} 29,5].
- groupements oxyméthines: CH-3 [δ_{H} 3,16 (*dd*, $J = 11,7$; 4,1 Hz)/ δ_{C} 88,6], CH-6 [δ_{H} 3,51 (*td*, $J = 8,2$; 4,6 Hz)/ δ_{C} 78,0], CH-16 [δ_{H} 4,68 (*q*, $J = 7,6$ Hz)/ δ_{C} 73,2], CH-24 [δ_{H} 3,78 (*dd*, $J = 8,3$; 5,6 Hz)/ δ_{C} 81,2].

- deux protons et carbones anomériques: CH-1' [δ_H 4,43 (*d*, *J* = 7,9 Hz)/ δ_C 104,1], CH-1'' [δ_H 4,30 (*d*, *J* = 7,4 Hz)/ δ_C 103,7].

La présence d'un seul groupement acétate, au lieu de deux dans le cas du composé **12**, est attestée par l'observation sur le spectre proton d'un signal singulet d'intégration 3H à 2,11 ppm.

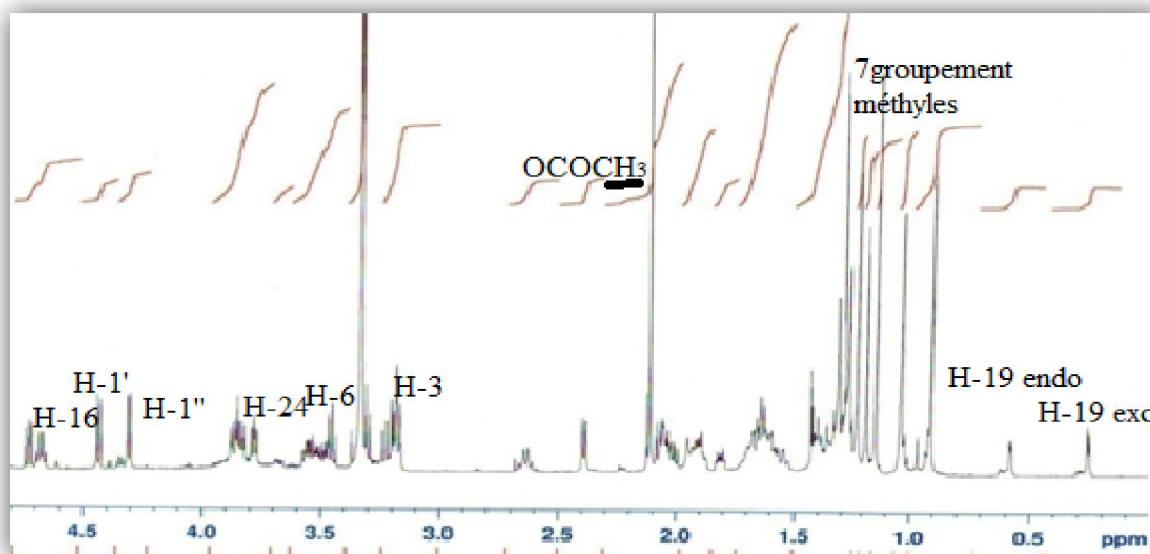


Figure IV.45: Spectre RMN ^1H du composé **13**

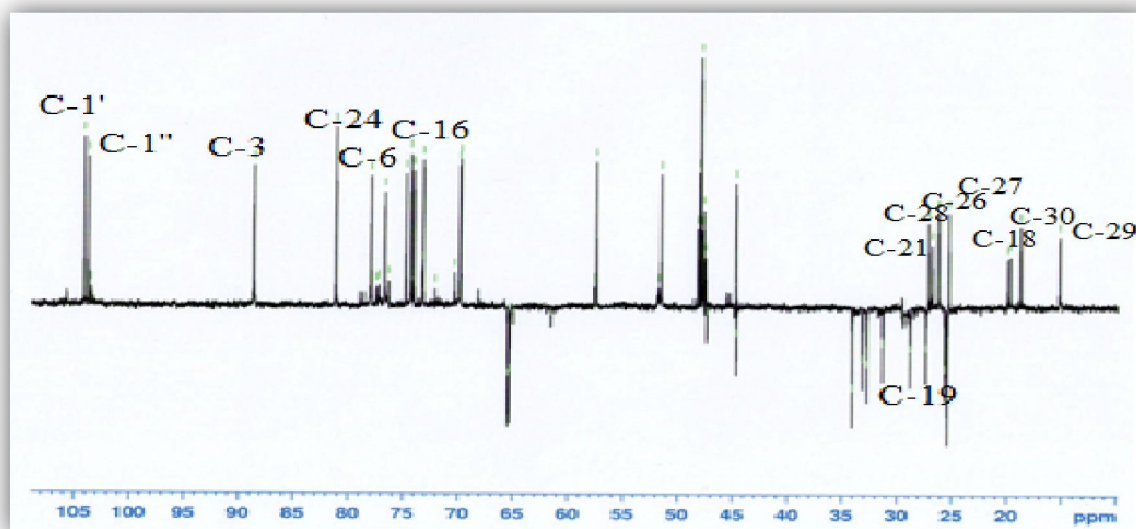


Figure IV.46: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **13**

Le spectre de masse ESI du composé **13** enregistré en mode positif (Figure IV.47), révèle un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 819 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, soit une masse moléculaire $M = 796$ uma et une formule brute en $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{O}_{14}$. La différence de masse de l'ordre de 42 uma

entre les composés **12** ($M = 838$) et **13** ($M = 796$) confirme l'existence d'un seul groupement acétate au niveau du composé **13**.

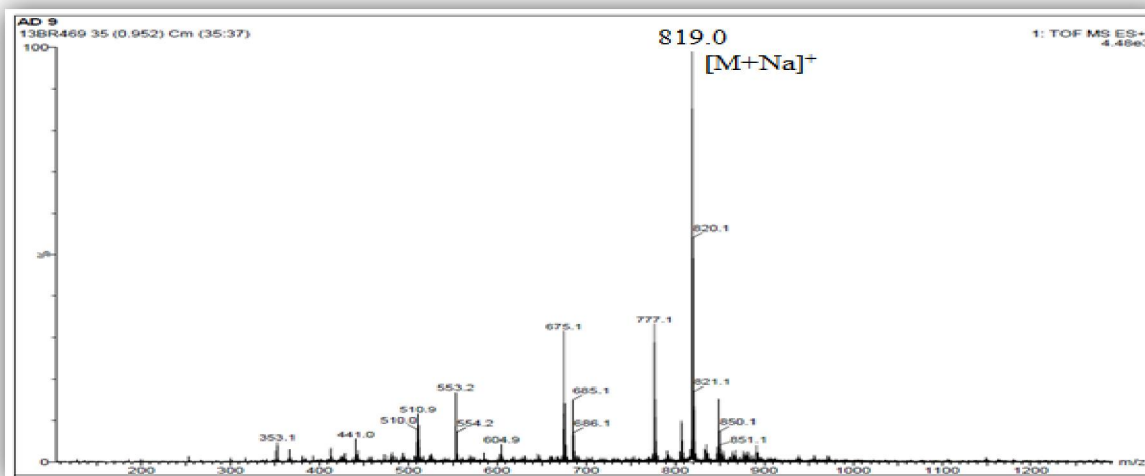


Figure IV.47: Spectre de masse ESI⁺ du composé **13**

La partie osidique du composé **13** s'avère presque identique à celle du composé **12** comme le montrent les spectres COSY H-H et TOCSY (Figures IV.48 et IV.49). Partant des deux protons anomères H-1' [δ_H 4,43 (d , $J = 7,9$ Hz)] et H-1'' [δ_H 4,30 (d , $J = 7,4$ Hz)], leur analyse a permis d'identifier également deux xyloses de configuration β . La valeur de déplacement chimique égale à 4,73 ppm du signal de proton H-2' traduit une acylation à ce niveau par le groupement acétate.

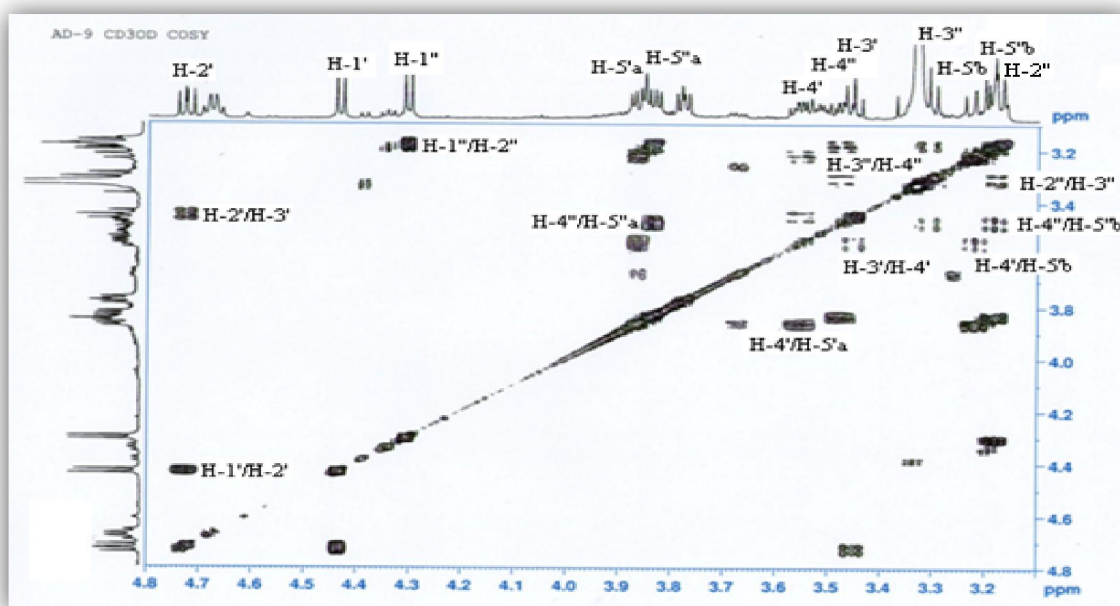


Figure IV.48: Spectre COSY H-H de la partie osidique du composé **13**

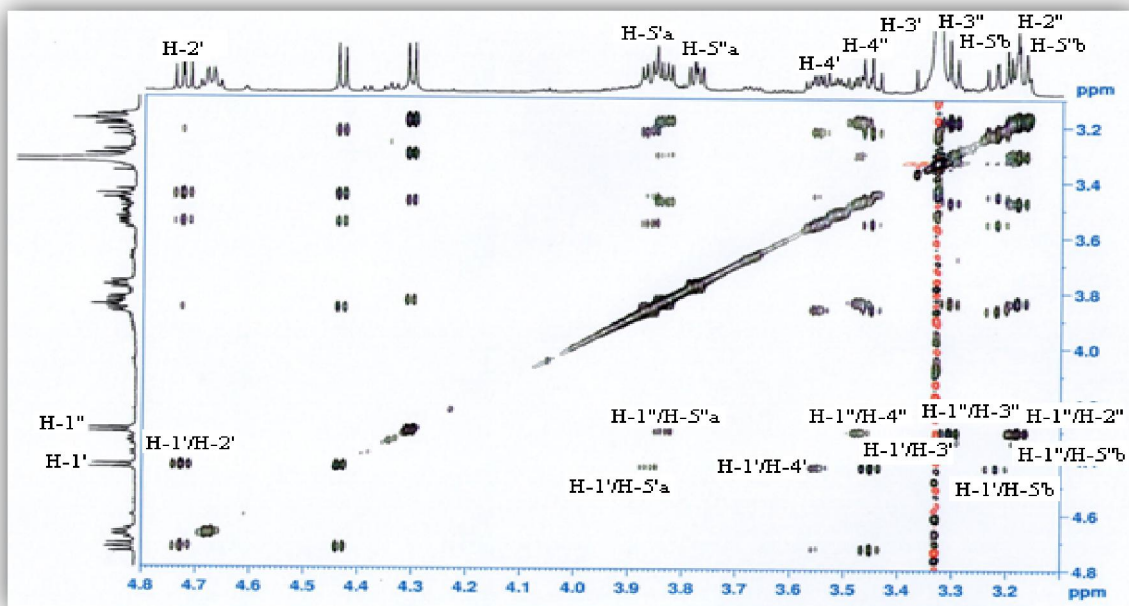


Figure IV.49: Spectre TOCSY de la partie osidique du composé 13

L'analyse HSQC (Figure IV.50) a permis d'assigner les déplacements chimiques de tous les carbones constituant les deux unités osidiques : C-1' (δ_H 104,1), C-2' (δ_H 74,2), C-3' (δ_H 74,8), C-4' (δ_H 69,8), C-5' (δ_H 65,3), C-1'' (δ_H 103,7), C-2'' (δ_H 74,1), C-3'' (δ_H 76,7), C-4'' (δ_H 69,9) et C-5'' (δ_H 65,5).

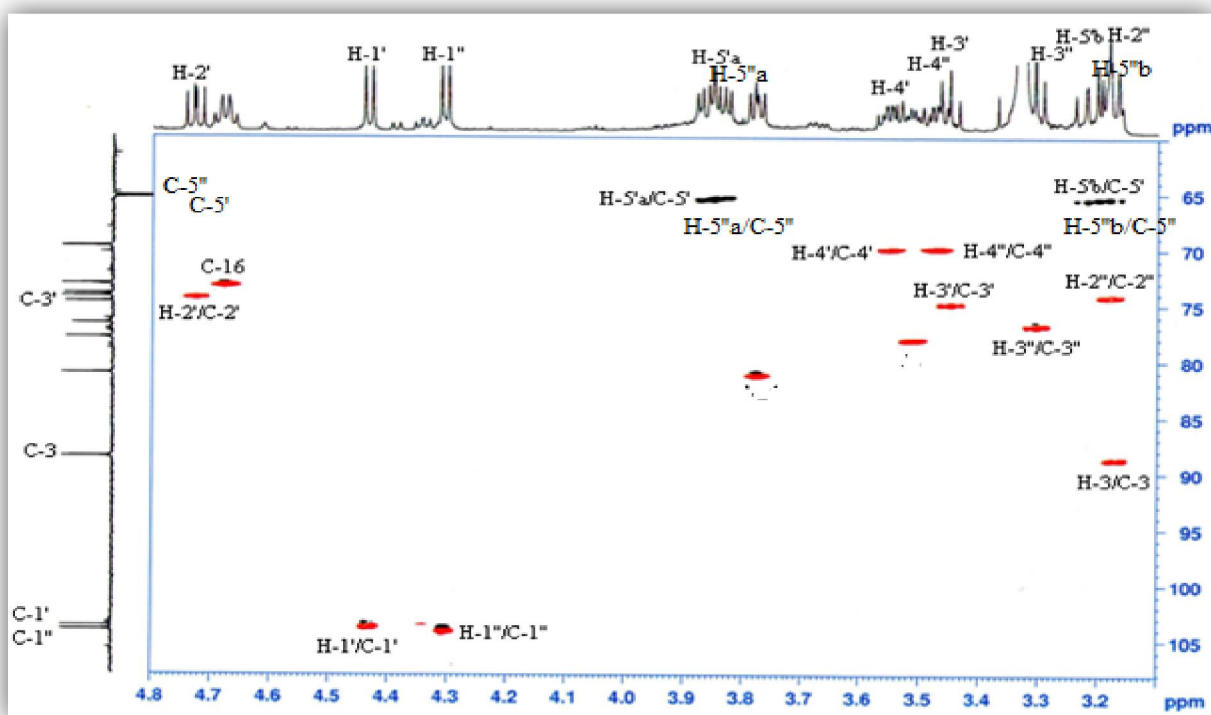


Figure IV.50: Spectre HSQC de la partie osidique du composé 13

Les points de branchement des sucres sur la génine, similaires à ceux observés pour le composé **12**, sont confirmés par expérience HMBC (Figure IV.51).

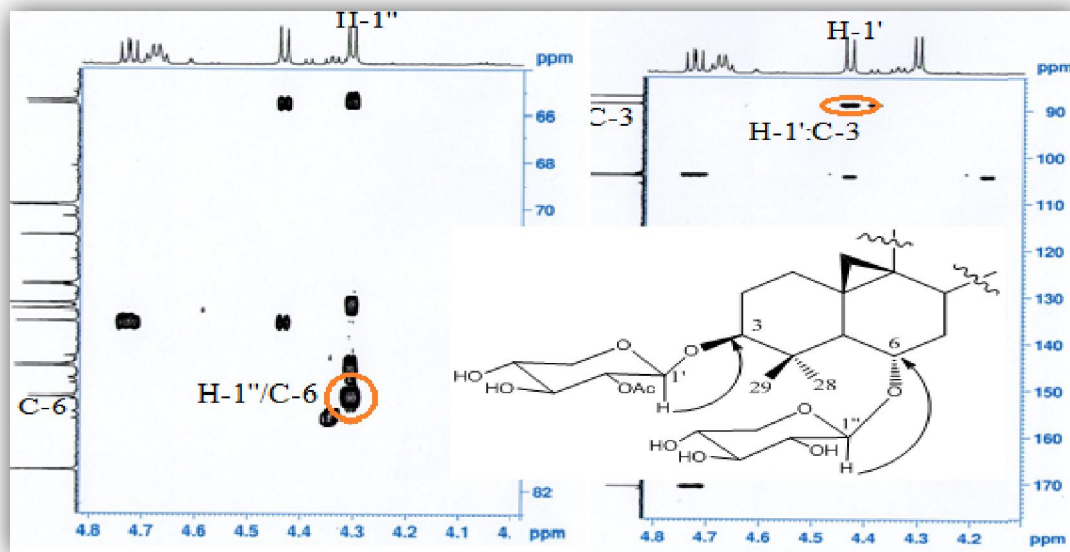


Figure IV.51: Spectre HMBC du composé **13**

Ces données spectrales permettent l'attribution au composé **13** la structure suivante: 3-*O*-(2'-*O*-acétyl)- β -D-xylopyranosyl-6-*O*- β -D-xylopyranosyl-20(*R*),24(*S*)-époxy-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahydroxycycloartane. Ce saponoside, appelé astrasieversianine VI, a été isolé antérieurement de *Astragalus sieversianus* [89].

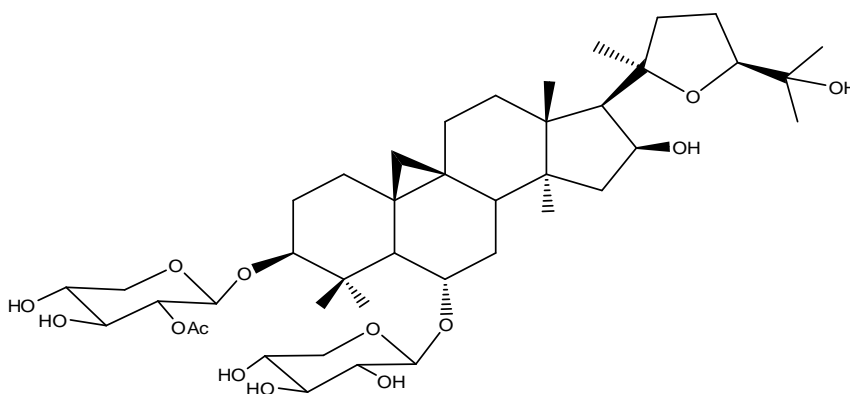
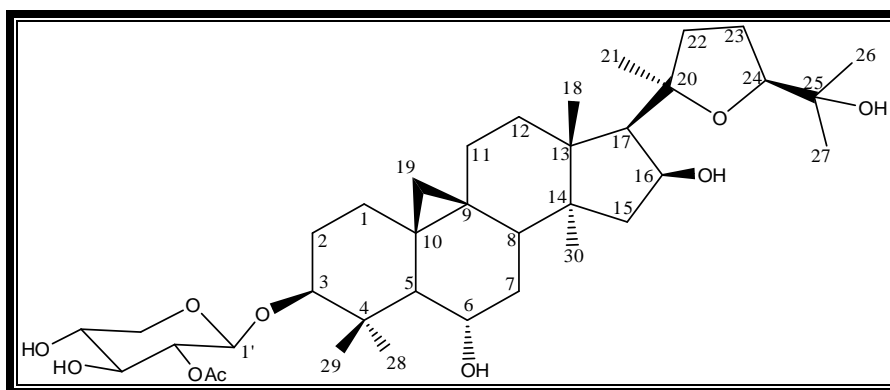


Tableau IV.4: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé **13** dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)
1	31,3	1,54-1,30 (<i>m</i>)
2	28,8	1,95-1,66 (<i>m</i>)
3	88,6	3,16 (<i>dd</i> , 11,7; 4,1)
4	41,3	-

5	51,5	1,63 (<i>m</i>)
6	78,0	3,51(<i>td</i> , 8,2; 4,6)
7	33,2	1,81-1,59 (<i>m</i>)
8	44,7	1,90 (<i>dd</i> , 9,6; 4,6)
9	20,6	-
10	28,2	-
11	25,6	1,91-1,41 (<i>m</i>)
12	32,7	1,68-1,58 (<i>m</i>)
13	45,6	-
14	45,6	-
15	44,6	2,01 (<i>dd</i> , 12,7; 7,6) 1,40 (<i>m</i>)
16	73,2	4,68 (<i>q</i> , 7,6)
17	57,4	2,39 (<i>d</i> , 7,6)
18	19,9	1,26 (<i>s</i>)
19	27,3	0,58 (<i>d</i> , 4,4) 0,26 (<i>d</i> , 4,4)
20	87,0	-
21	27,1	1,23 (<i>s</i>)
22	34,1	2,63 (<i>q</i> , 10,3) 1,65 (<i>m</i>)
23	25,4	2,05 (<i>m</i>)
24	81,2	3,78 (<i>dd</i> , 8,3; 5,6)
25	71,1	-
26	26,2	1,28 (<i>s</i>)
27	25,2	1,15 (<i>s</i>)
28	26,8	1,19 (<i>s</i>)
29	15,1	0,91 (<i>s</i>)
30	18,7	1,04 (<i>s</i>)
1'	104,1	4,43 (<i>d</i> , 7,9)
2'	74,2	4,73 (<i>dd</i> , 9,3; 7,9)
3'	74,8	3,45 (<i>t</i> , 9,3)
4'	69,8	3,55 (<i>ddd</i> , 11,4; 9,3; 5,2)
5'	65,3	3,86 (<i>dd</i> , 11,4; 5,2) 3,22 (<i>dd</i> , 11,4; 9,3)
2'-CO	170,5	-
OCOCH ₃	19,7	2,11(<i>s</i>)
1''	103,7	4,30 (<i>d</i> , 7,4)
2''	74,1	3,18 (<i>dd</i> , 9,7; 7,4)
3''	76,7	3,31 (<i>t</i> , 9,7)
4''	69,9	3,48 (<i>ddd</i> , 11,4; 9,7; 5,2)
5''	65,5	3,84 (<i>dd</i> , 11,4; 5,2) 3,18 (<i>dd</i> , 11,4; 9,7)

IV. 2.3.5 Elucidation structurale du composé 14



3-*O*-(2'-*O*-acétyl)- β -D-xylopyranosyl-20(*R*),24(*S*)-époxy-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahydrocycloartane (14)

Le spectre de masse ESI⁺ (Figure IV.52) de ce composé présente un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 687 [M+Na]⁺, soit une masse moléculaire égale à 664 uma correspondant à une formule brute en C₃₇H₅₆O₁₀.

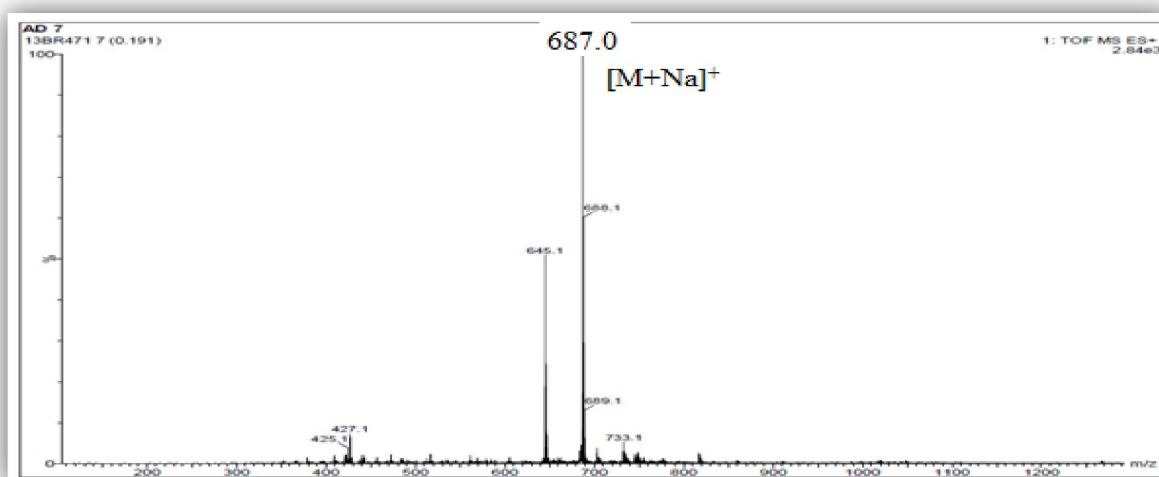


Figure IV.52: Spectre de masse ESI⁺ du composé 14

Il en ressort, d'après le spectre RMN ¹H (Figure IV.53), que le composé **14** est de même nature que le composé **13** décrit précédemment, avec une génine strictement identique. On citera tous les signaux caractéristiques: H₂-19 [δ_H 0,60; 0,28 (*d*, *J* = 4,3 Hz)], H-3 [δ_H 3,17 (*dd*, *J* = 11,6; 4,5 Hz)], H-6 [δ_H 3,45 (*td*, *J* = 9,6; 4,1 Hz)], H-16 [δ_H 4,68 (*q*, *J* = 7,8 Hz)] et H-24 [δ_H 3,78 (*dd*, *J* = 8,3; 6,0 Hz)], en plus des signaux des sept groupements méthyles résonant dans l'intervalle 0,93-1,29 ppm et un signal à 2,10 ppm d'un CH₃ de groupement acétate. L'observation sur le même spectre d'un signal résonant à δ_H 4,42 (*d*, *J* = 7,9 Hz) caractéristique de proton anomère (H-1'), atteste de la présence d'une seule unité osidique.

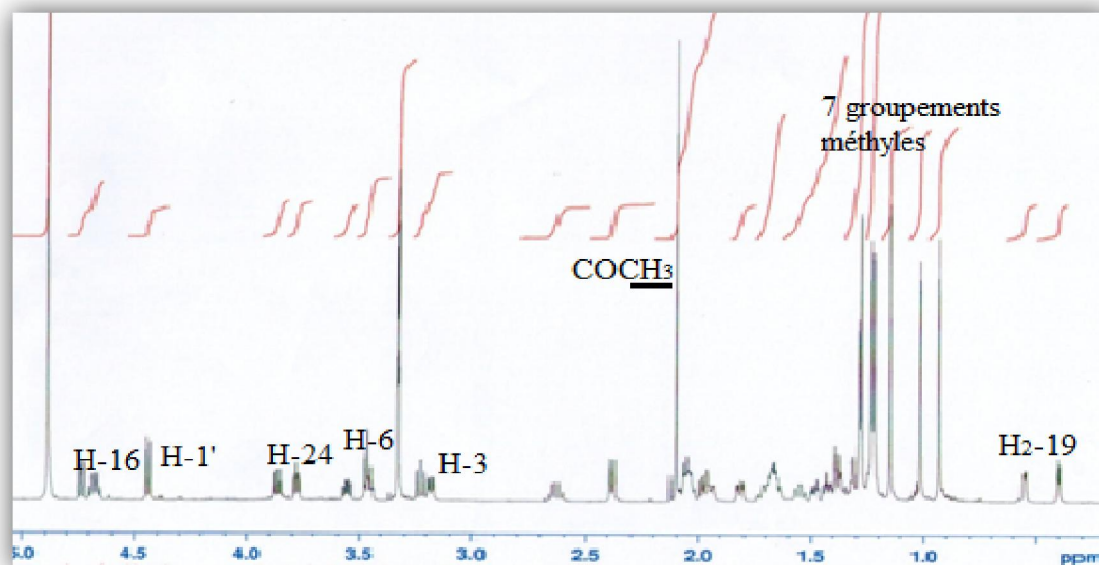


Figure IV.53: Spectre RMN ^1H du composé 14

Le spectre RMN ^{13}C DEPT (Figure IV.54) permet de reconnaître et d'identifier tous les carbones de la génine, à l'exception du carbone C-6 dont le signal apparaît à 68,1 ppm, indiquant ainsi qu'il est porteur d'un groupement hydroxyle. Le signal du carbone C-3 résonnant à 88,6 ppm montre que ce dernier est porteur de l'unité osidique.

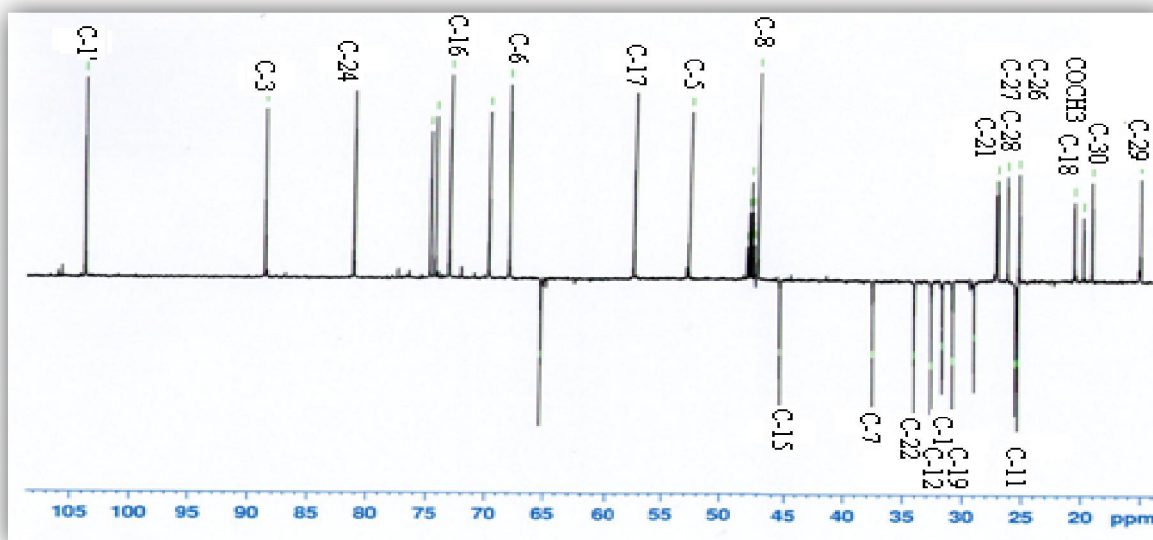


Figure IV.54: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé 14

A partir du proton anomère H-1' [δ_{H} 4,42 (*d*, $J = 7,9$ Hz)], l'analyse COSY H-H (Figure IV.55) permet d'identifier un système de spins à six protons d'un pentose, à travers les couplages homonucléaires:

- H-1'/H-2' (δ_{H} 4,73, *dd*, $J = 9,3; 7,9$ Hz)

- H-2'/H-3' (δ_H 3,46, *t*, $J = 9,3$ Hz)
- H-3'/H-4' (δ_H 3,56, *ddd*, $J = 10,7; 9,3; 5,4$ Hz)
- H-4'/H₂-5' [(δ_H 3,86, *dd*, $J = 10,7; 5,4$ Hz), (δ_H 3,22, *t*, $J = 10,7$ Hz)]

Les grandes valeurs de constantes de couplage permettent d'identifier un xylose de configuration β , porteur d'un groupement acétate branché en C-2' au regard de la valeur de déplacement chimique du proton H-2' (δ_H 4,73). Ceci est confirmé par HMBC (Figure IV.56) qui montre une corrélation entre ce dernier et le carbonyle (δ_C 170,4) du groupement acétate.

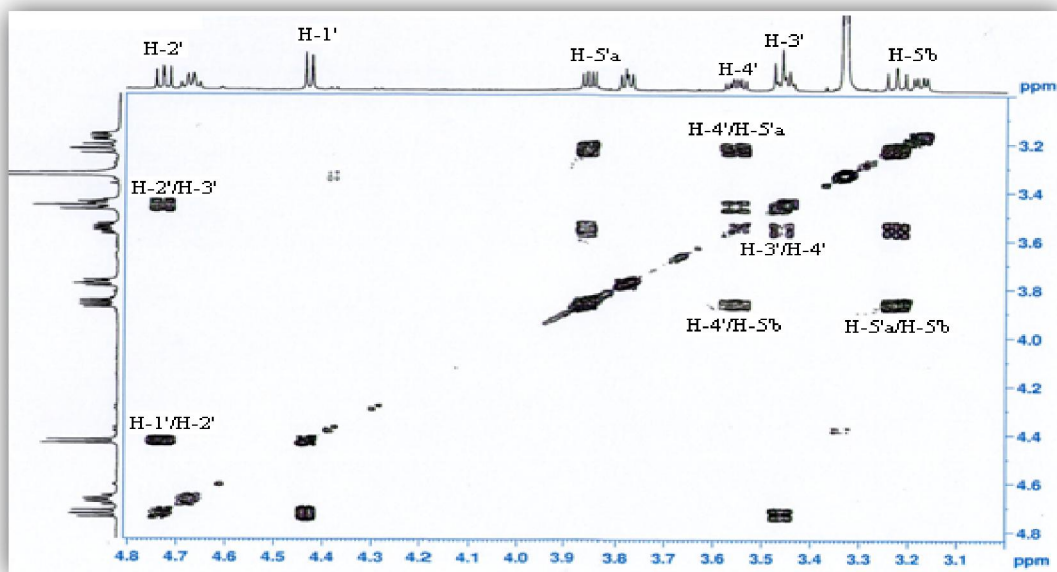


Figure IV.55: Spectre COSY H-H du β -D-xylose (composé 14)

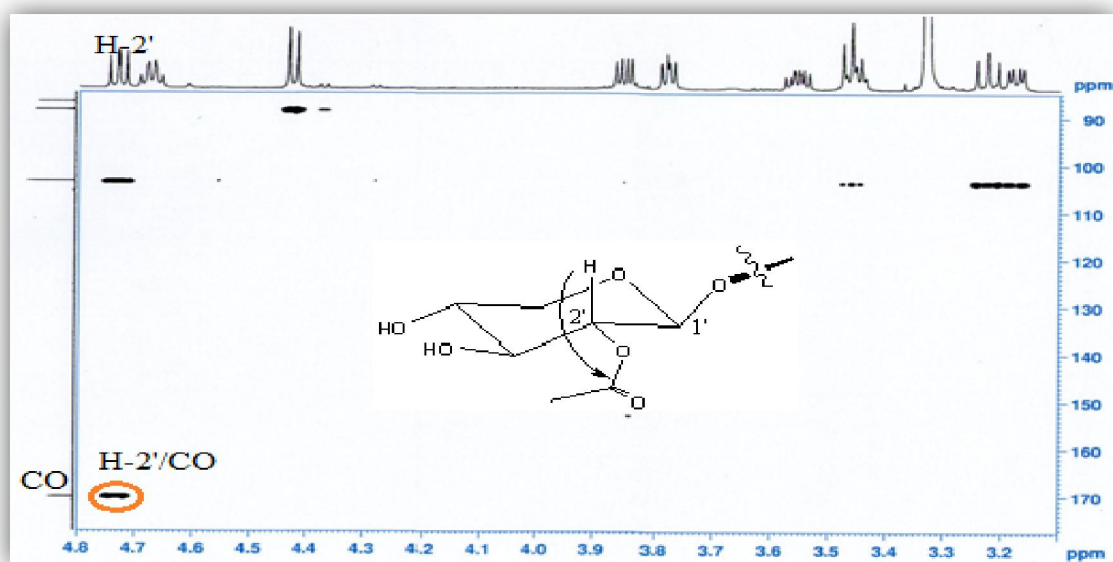


Figure IV.56: Spectre HMBC montrant le branchement de l'acétate sur l'unité osidique

Les carbones du xylose sont assignés par analyse HSQC (Figure IV.57).

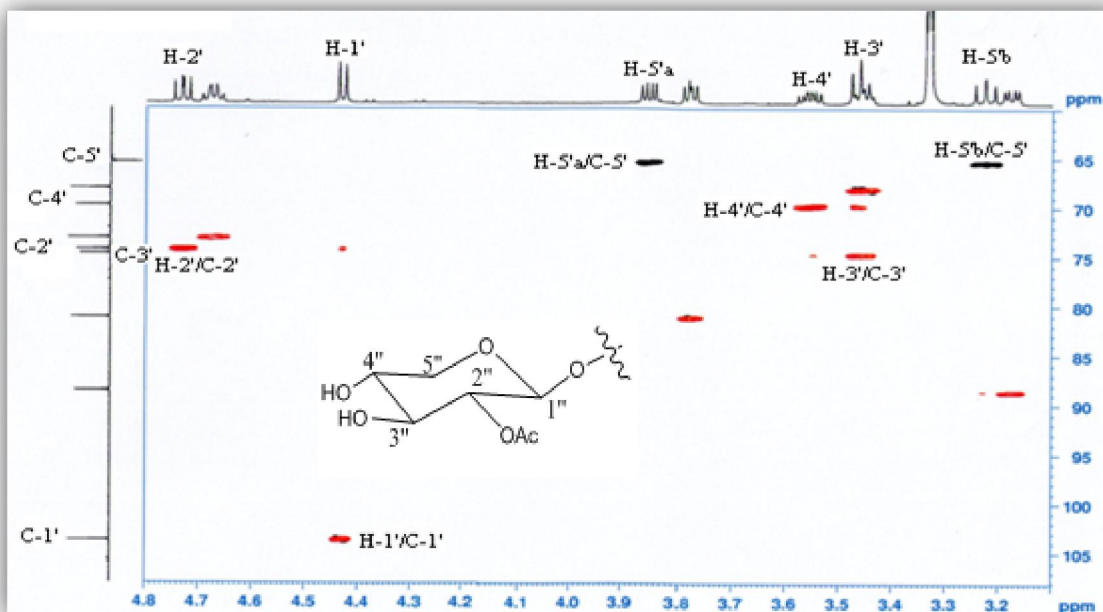


Figure IV.57: Spectre HSQC du β -D-xylose

Le point de fixation de ce xylose est confirmé par expérience HMBC (Figure IV.58) qui montre une corrélation entre le proton anomère H-1' (δ_H 4,42) et le carbone C-3 de la génine (88,6 ppm).

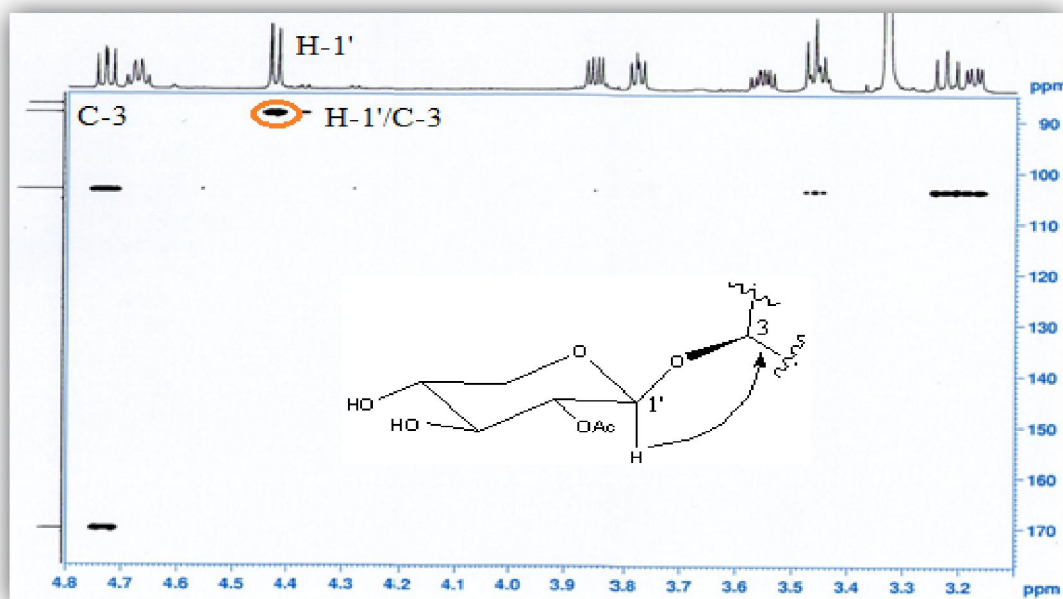
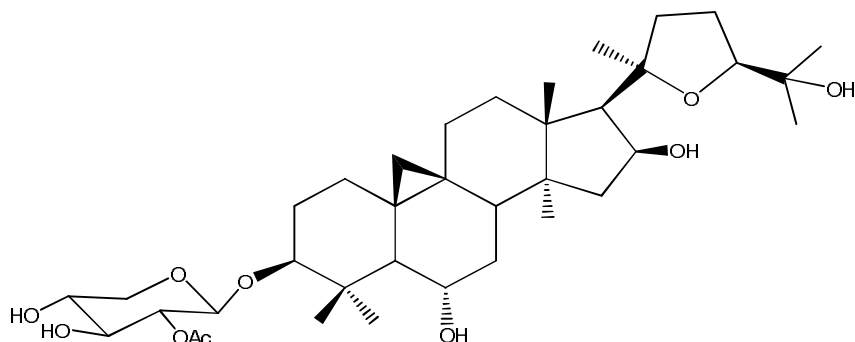


Figure IV.58: Spectre HMBC montrant le branchement du xylose sur la génine

Cette analyse spectrale permet d'attribuer pour le composé **14** la structure suivante: 3-*O*-(2'-*O*-acétyl)- β -D-xylopyranosyl-20(*R*),24(*S*)-époxy-3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahydrocycloartane.



Ce composé connu et nommé cyclogalgénoside A, a été antérieurement isolé d'une autre espèce du genre *Astragalus*: *A. galegiformis* [90].

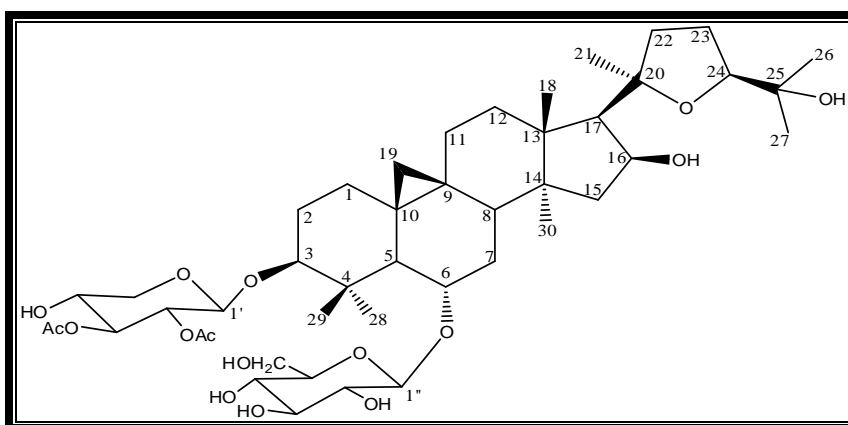
Le tableau suivant reproduit les déplacements chimiques de tous les carbones et protons du composé 14.

Tableau IV. 5: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé 14 dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	31,7	1,56-1,22 (m)
2	29,0	1,96-1,65 (m)
3	88,6	3,17 (dd, 11,6; 4,5)
4	41,4	-
5	53,0	1,37 (m)
6	68,1	3,45 (td, 9,6; 4,1)
7	37,6	1,48-1,38 (m)
8	47,3	1,82 (dd, 12,3; 4,1)
9	20,4	-
10	29,2	-
11	25,4	2,04-1,22 (m)
12	32,5	1,68 (m)
13	44,5	-
14	45,6	-
15	45,4	1,97 (dd, 12,9; 7,8) 1,37 (m)
16	73,2	4,68 (q, 7,8)
17	57,7	2,38 (d, 7,8)
18	20,6	1,29 (s)
19	30,8	0,60 (d, 4,3) 0,28 (d, 4,3)
20	86,9	-
21	27,1	1,23 (m)
22	34,1	2,63 (q, 10,7) 1,65 (m)
23	25,5	2,04 (m)
24	81,2	3,78 (dd, 8,3; 6,0)
25	71,0	-

26	25,2	1,14 (s)
27	26,2	1,28 (s)
28	27,2	1,22 (s)
29	15,0	0,93 (s)
30	19,1	1,02 (s)
1'	103,8	4,42 (d, 7,9)
2'	74,3	4,73 (dd, 9,3; 7,9)
3'	74,8	3,46 (t, 9,3)
4'	69,9	3,56 (ddd, 10,7; 9,3; 5,4)
5'	65,5	3,86 (dd, 10,7; 5,4) 3,22 (t, 10,7)
2'-CO	170,4	-
OCOCH ₃	19,8	2,10 (s)

IV. 2.3.6 Elucidation structurale du composé 15



**3-O-(2',3'-O-diacétyl)- β -D-xylopyranosyl-6-O- β -D-glucopyranosyl-20(R),24(S)-époxy-3 β ,
6 α ,16 β ,25-tetrahydroxycycloartane (15)**

Le spectre de masse ESI du composé **15** enregistré en mode positif (Figure IV.59), révèle un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 891 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire $M = 868$ uma et une formule brute en $C_{45}H_{72}O_{16}$.

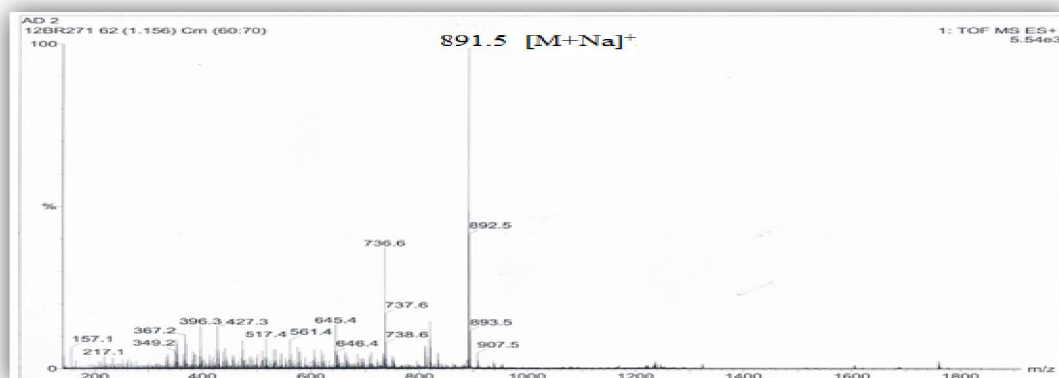


Figure IV.59: Spectre de masse ESI⁺ du composé 15

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C DEPT (Figures IV.60 et IV.61) de ce composé présentent de grandes similitudes avec ceux du composé **12**. Ils permettent l'identification de tous les protons et carbones d'une même génine porteuse de deux unités osidiques, confirmée par analyse conjointe des spectres COSY H-H, TOCSY, HSQC et HMBC.

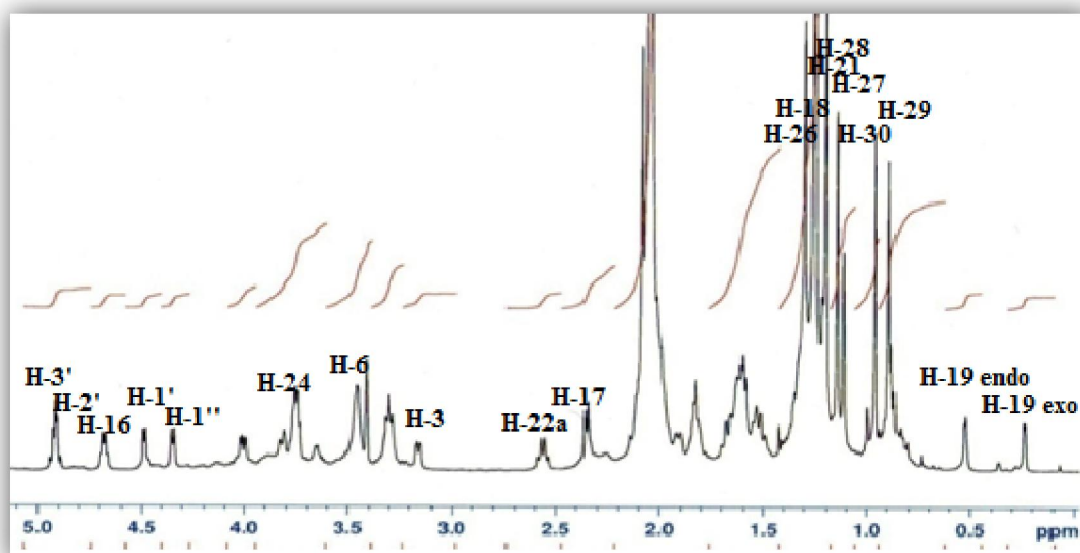


Figure IV.60: Spectre RMN ^1H du composé **15**

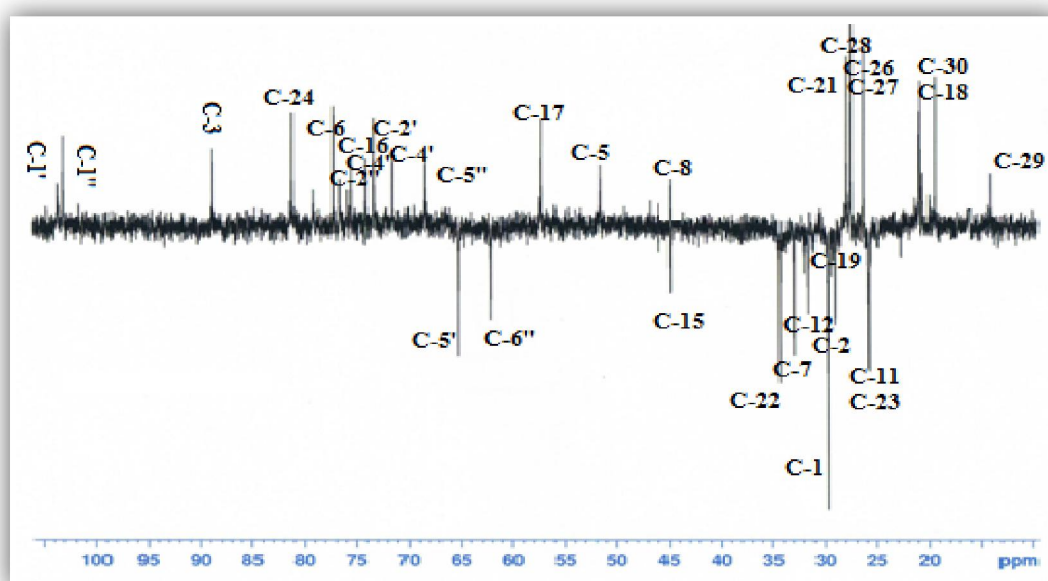


Figure IV.61: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **15**

L'analyse a abouti également à l'identification des deux unités osidiques, β -D-glucose et β -D-xylose positionnés respectivement en C-6 et C-3 de la génine. La seule différence entre les deux composés **15** et **12** se situe donc au niveau de la partie osidique, par la présence d'un glucose en C-6 de la génine (composé **15**) au lieu d'un xylose dans le cas du composé **12**.

Ceci est expliqué par la différence de 30 uma entre les masses moléculaires des composés **12** (M = 838) et **15** (M = 868), indiquant la présence d'un groupement $-\text{CH}_2\text{O}-$ au niveau du composé **15**.

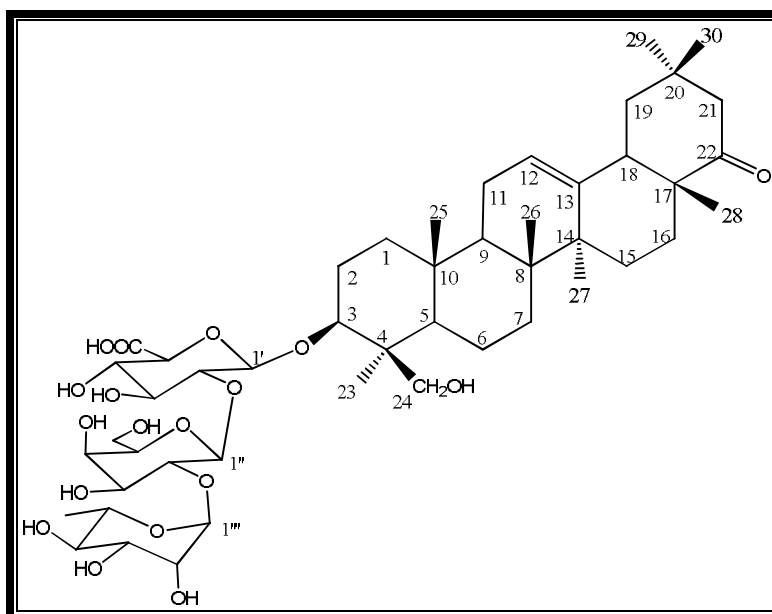
Ce composé, connu sous le nom d'astrasieversianine IV, a été isolé précédemment de l'espèce *Astragalus sieversianus* [89].

Tableau IV.6: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé 15 dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	31,3	1,54-1,30 (m)
2	28,7	1,95-1,66 (m)
3	88,8	3,22 (dd, 12,2; 4,4)
4	41,4	-
5	51,5	1,64 (d, 8,2)
6	78,0	3,51 (td, 8,2; 4,6)
7	33,2	1,81-1,59 (m)
8	44,7	1,9 (dd, 9,6; 4,6)
9	20,6	-
10	28,2	-
11	25,6	1,91 (td, 10,1; 4,7) 1,40 (m)
12	32,7	1,68- 1,58 (m)
13	45,6	-
14	45,6	-
15	44,6	2,00-1,39 (m)
16	73,2	4,68 (q, 7,7)
17	57,4	2,39 (d, 7,7)
18	19,7	1,26 (s)
19	27,4	0,58 (d, 4,4) 0,26 (d, 4,4)
20	87,0	-
21	27,1	1,23 (s)
22	34,1	2,63-1,65 (m)
23	25,4	2,05 (m)
24	81,2	3,78 (dd, 8,3; 5,9)
25	71,1	-
26	26,2	1,28 (s)
27	25,2	1,15 (s)
28	26,8	1,19 (s)
29	15,1	0,91 (s)
30	18,7	1,04 (s)
2'-CO	170,0	-
OCOCH ₃	19,5	2,03 (s)
3'-CO	170,5	-

OCOCH ₃	19,4	2,06 (<i>s</i>)
1'	104,1	4,56 (<i>d</i> , 7,9)
2'	72,2	4,80 (<i>dd</i> , 9,6; 7,94)
3'	75,5	4,99 (<i>t</i> , 9,6)
4'	67,9	3,72 (<i>ddd</i> , 11,1; 9,6; 5,6)
5'	65,1	3,92 (<i>dd</i> , 11,1; 5,6) 3,33 (<i>t</i> , 11,1)
1''	103,5	4,35 (<i>d</i> , 7,8)
2''	74,3	3,20 (<i>dd</i> , 8,9; 7,8)
3''	77,2	3,34 (<i>t</i> , 8,9)
4''	70,4	3,29 (<i>t</i> , 8,9)
5''	76,3	3,25 <i>nd</i>
6''	61,6	3,87 (<i>dd</i> , 11,5; 2,0) 3,68 (<i>dd</i> , 11,5; 5,4)

IV. 2.3.7 Elucidation structurale du composé 16



3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-3 β ,24-dihydroxyoléan-12-ène-22-one (16)

Le spectre ESIMS du composé **16** obtenu en mode positif (Figure IV.62) montre un pic d'ion pseudomoléculaire m/z 963 $[M+Na]^+$, soit une masse moléculaire égale à 940 uma correspondant à une formule brute en C₄₈H₇₆O₁₈.

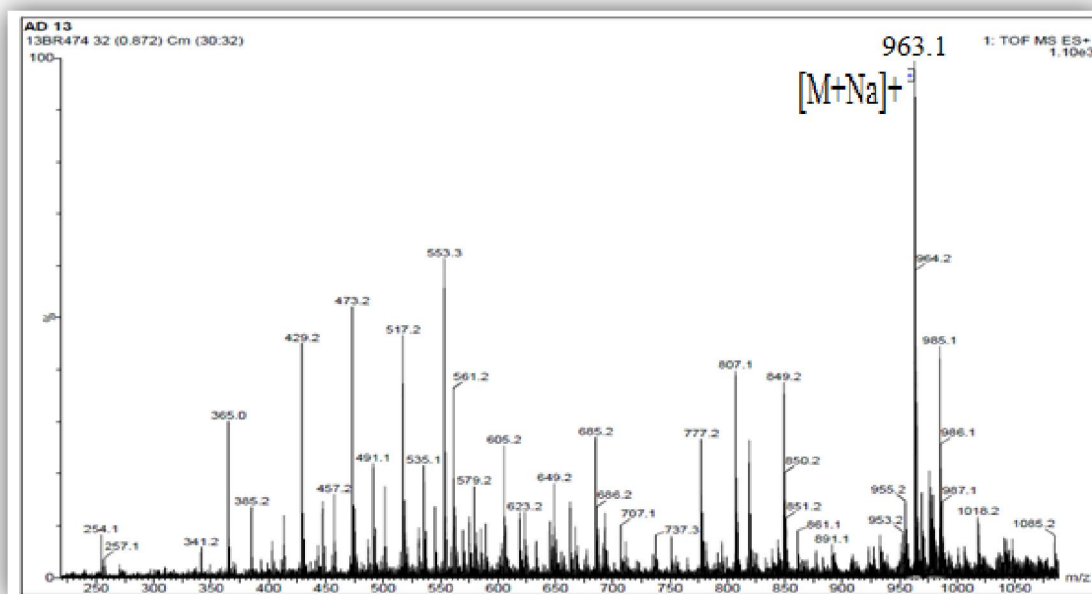


Figure IV.62: Spectre masse ESI⁺ du composé 16

Le spectre RMN ¹H (Figure IV.63) ne refait pas apparaitre les deux signaux fortement blindés des deux protons non équivalents du noyau cyclopropane, indique clairement que ce composé qui a toutes les caractéristiques d'une saponine triterpénique n'est pas à génine cycloartanique comme celle des saponosides décrits jusqu'ici. Ce spectre permet plutôt d'identifier une génine triterpénique à squelette oléanane insaturée en 12-13 (Figure IV.64), et cela par l'observation de :

- ✓ sept signaux singulets d'intégration 3H chacun résonant dans un intervalle allant de 0,87 à 1,30 ppm, correspondant à sept groupements méthyles.
- ✓ un signal résonant à δ_H 3,42 ppm (1H, *dd*, $J_{ax-ax} = 10,3$, $J_{ax-eq} = 4,5$ Hz) d'un proton oxyméthine H-3 α -axial d'un triterpène.
- ✓ un signal de proton éthylénique à δ_H 5,35 (*t*, $J = 3,5$ Hz) caractéristique du proton H-12 du squelette oléanène.
- ✓ un signal à δ_H 2,37 (*dd*, $J = 13,8; 3,8$) attribuable au proton H-18 du triterpène. La valeur de son déplacement chimique laisse suggérer qu'il est voisin d'un groupement déblindant.

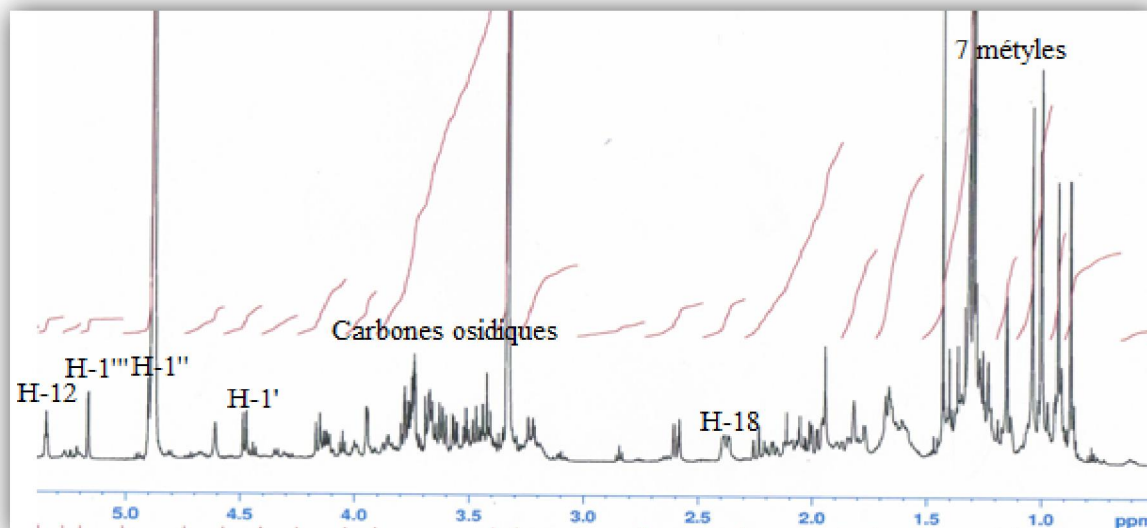


Figure IV.63: Spectre RMN ^1H du composé 16

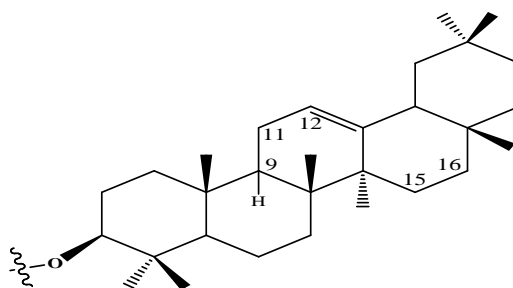


Figure IV.64: Squelette Δ -12 oléanène

La nature glycosidique du composé est attestée par l'observation de plusieurs signaux entre 3 et 4,2 ppm et trois signaux doublets à δ_{H} 4,48 (1H, *d*, *J* = 8,3 Hz), 4,90 (1H, *d*, *J* = 7,5 Hz), 5,15 (1H, *d*, *J* = 1,6 Hz) caractéristiques de protons anomères, suggérant la présence de trois unités osidiques.

Le spectre RMN ^{13}C (Figure IV.65) confirme la nature du composé, c'est à dire une saponine triterpénique à squelette Δ -12 oléanène, par l'observation de signaux des carbones correspondant aux:

- sept méthyles repérés entre 14,9 et 30,8 ppm
- deux carbones éthyléniques C-12 et C-13 à δ_{H} 123,7 et 141,4
- carbone C-3 de la génine détecté à 91,0 ppm. La valeur de déplacement chimique montre une glycosilation à ce niveau.
- carbones anomères de sucres sortant à 100,7, 100,9 et 104,1 ppm.
- carbones osidiques sortant entre 60,8 et 77 ppm

Le même spectre indique la présence de deux signaux à δ_C 218,3 et 175,6 caractéristiques respectivement de carbonyles d'une cétone et d'un acide libre.

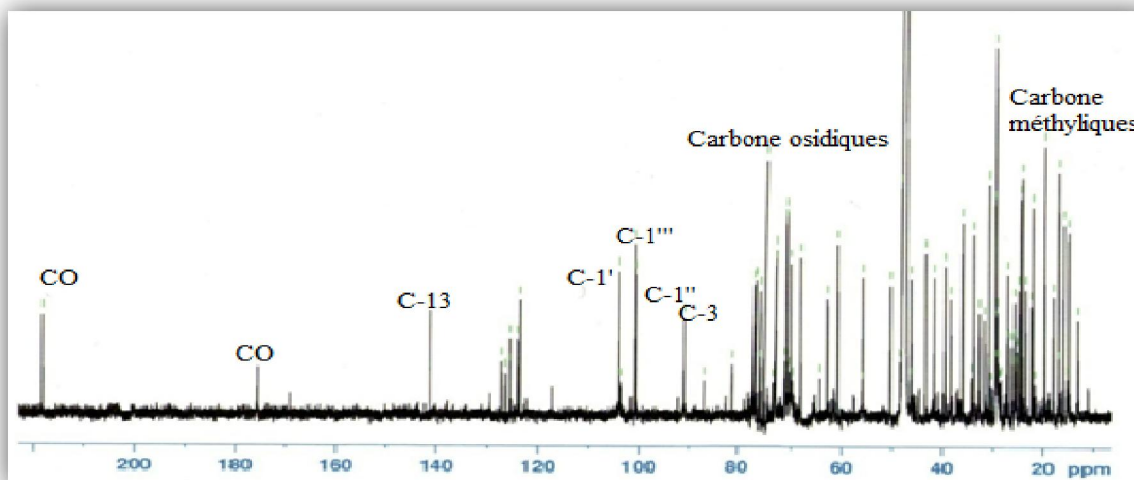


Figure IV.65: Spectre RMN ^{13}C du composé 16

La nature du composé établie, il reste maintenant à procéder à son élucidation structurale qui passera par l'identification séparée de l'aglycone et de la partie osidique.

Identification de la génine

La présence uniquement de sept méthyles implique évidemment l'oxydation d'un des huit méthyles constituant le squelette oléanane. La présence de signaux de deux protons résonant à 3,23 (d, $J= 11,5$ Hz) et 4,16 ppm (d, $J= 11,5$ Hz) observée sur le spectre RMN ^1H laisse suggérer que le carbone oxydé est inclus dans un groupement hydroxyméthyle CH_2OH . Son carbone est repéré sur le spectre HSQC à 62,9 ppm.

L'expérience HMBC (Figures IV.66 et IV.67) permet d'attribuer une bonne partie des carbones de la génine par observation de leurs couplages en 2J et 3J avec les protons méthyliques. Ainsi les protons CH_3 -23 résonant à 1,29 ppm sont les seuls à corrélérer avec le carbone C-3 connu (δ_C 91,0). Ils couplent également avec le carbone quaternaire C-4 (δ_C 43,3), le carbone C-24 du groupement CH_2OH (δ_C 62,9) et le carbone C-5 (δ_C 55,9). Ce dernier corrèle aussi avec les protons méthyliques CH_3 -25 (δ_H 0,92). Ceux-ci couplent avec les carbones C-1 (δ_C 38,3), C-10 (δ_C 36,1) et C-9 (δ_C 47,3). Le proton de ce dernier résonant à 1,64 ppm selon l'analyse HSQC, montre sur le spectre COSY H-H un couplage avec les protons H_2 -11 repérés à 1,92 ppm, eux-mêmes corrélant aussi avec le proton éthylénique résonant à 5,35 ppm. La localisation de la double liaison en C12-C13 est confirmée par

HMBC qui met en évidence les couplages longue distance entre le proton H-11 et deux carbones éthyléniques résonant à 123,7 (C-12) et 141,4 ppm (C-13).

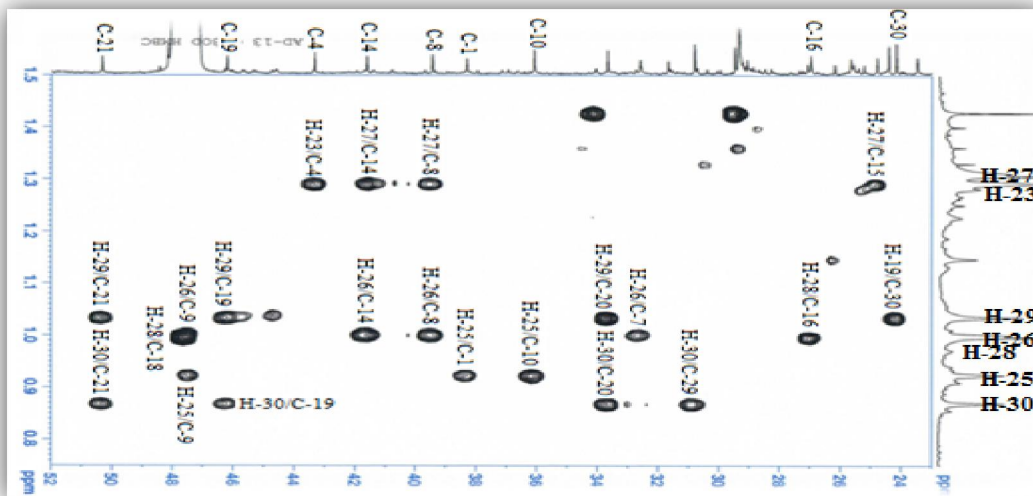


Figure IV.66: Spectre HMBC du composé 16

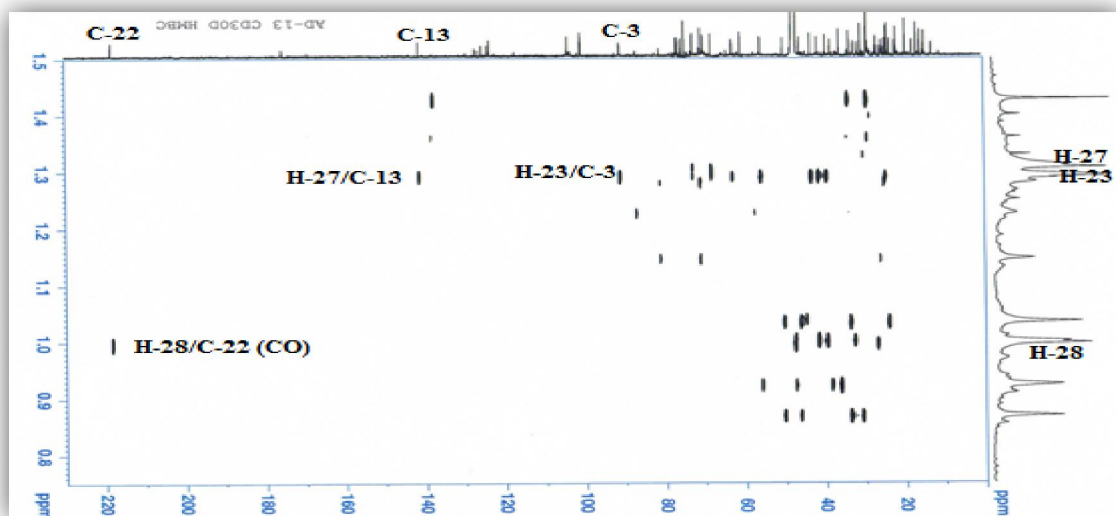
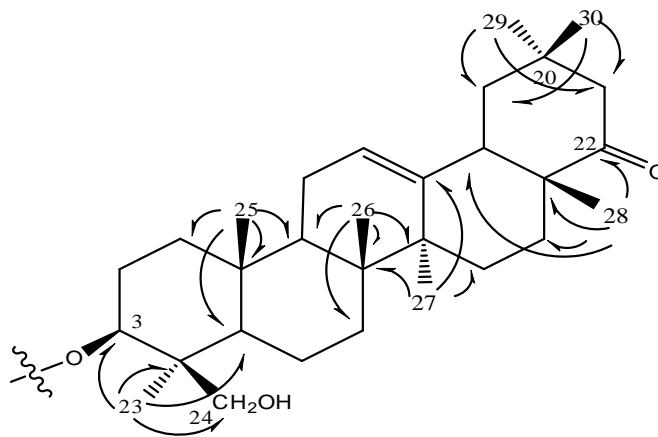


Figure IV.67: Spectre HMBC du composé 16

Les protons méthyliques CH₃-26 repérés à 1,00 ppm couplent avec le carbone C-9 déjà identifié, le carbone méthylénique C-7 (δ_C 32,6) et les carbones quaternaires C-8 (δ_C 39,4) et C-14 (δ_C 41,6). Ces deux derniers corrént avec les protons méthyliques (δ_H 1,30) du groupement CH₃-27. Ils corrént également avec le carbone méthylénique CH₂-15 (25,7 ppm) et le carbone quaternaire oléfinique C-13 (δ_C 141,4).

Les protons H₂-15 localisés par analyse du spectre HSQC à δ_H 1,33 et 1,85 montrent sur le spectre COSY H-H des corrélations avec deux protons sortant à δ_H 1,12 et 2,17 attribuables aux protons géminés H₂-16. Leur carbone est repéré à δ_C 27,0 (C-16) par expérience HSQC. Ce dernier corrént en HMBC avec les protons du groupement méthylique Me-28 (δ_H 1,01), eux-mêmes couplant avec le carbone méthine C-18 (δ_C 47,6), le carbone quaternaire C-17 (δ_C 48,0) et un carbonyle résonant à δ_C 218,3 positionné en C-22, expliquant le relatif déblindage du proton H-18 (δ_H 2,37).

Les protons des deux derniers groupements méthyles Me-29 (1,03 ppm) et Me-30 (0,87 ppm) corrént avec les carbones méthyléniques C-19 (δ_C 46,2) et C-21 (δ_C 50,3), et le carbone quaternaire C-20 (δ_C 33,7). Leurs carbones respectifs sont localisés sur le spectre HSQC à 30,8 et 24,2 ppm.

Les protons respectifs H-5 (δ_H 0,96), H₂-7 (δ_H 1,40; 1,68), H₂-19 (δ_H 1,34; 2,23), H₂-21 (δ_H 1,99; 2,59) sont assignés également par expérience HSQC (Figure IV.68).

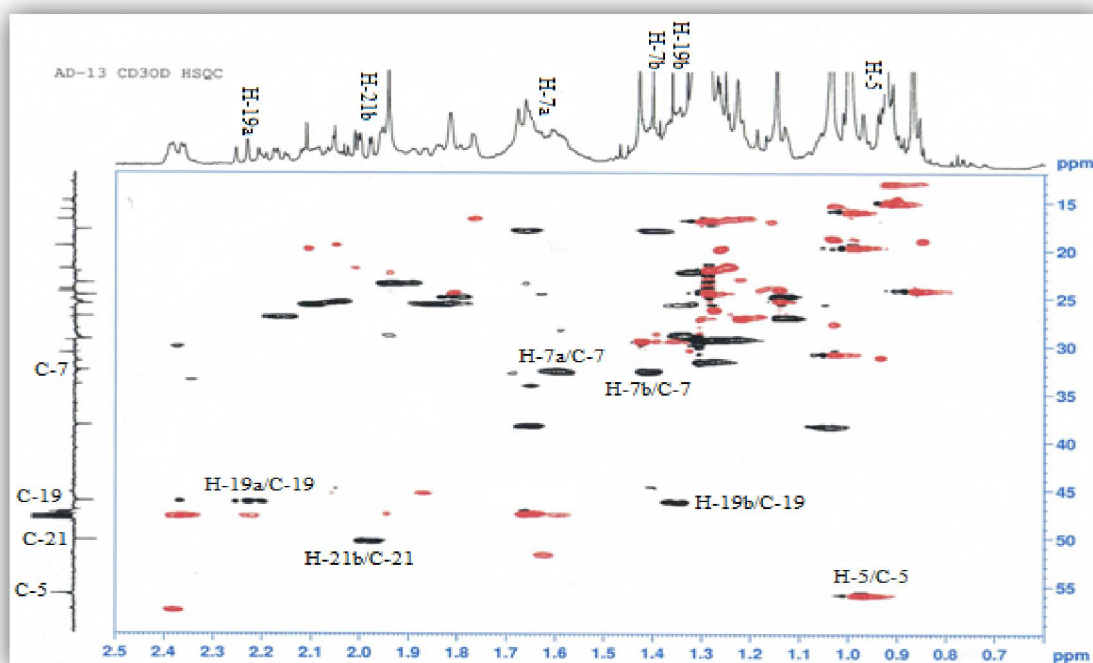


Figure IV.68: Spectre HSQC de la génine du composé 16

Les autres carbones et protons de la génine sont identifiés par analyse des deux expériences HSQC et COSY H-H. Ainsi, les protons H₂-6 (δ_H 1,39; 1,66) et H₂-2 (δ_H 1,8; 1,13) sont identifiés sur le spectre COSY H-H (Figure IV.69), en raison des corrélations qu'ils présentent avec les protons H₂-7 et H₂-1, respectivement. Leurs carbones sont repérés à δ_C 18,0 (C-6) et δ_C 24,8 (C-2).

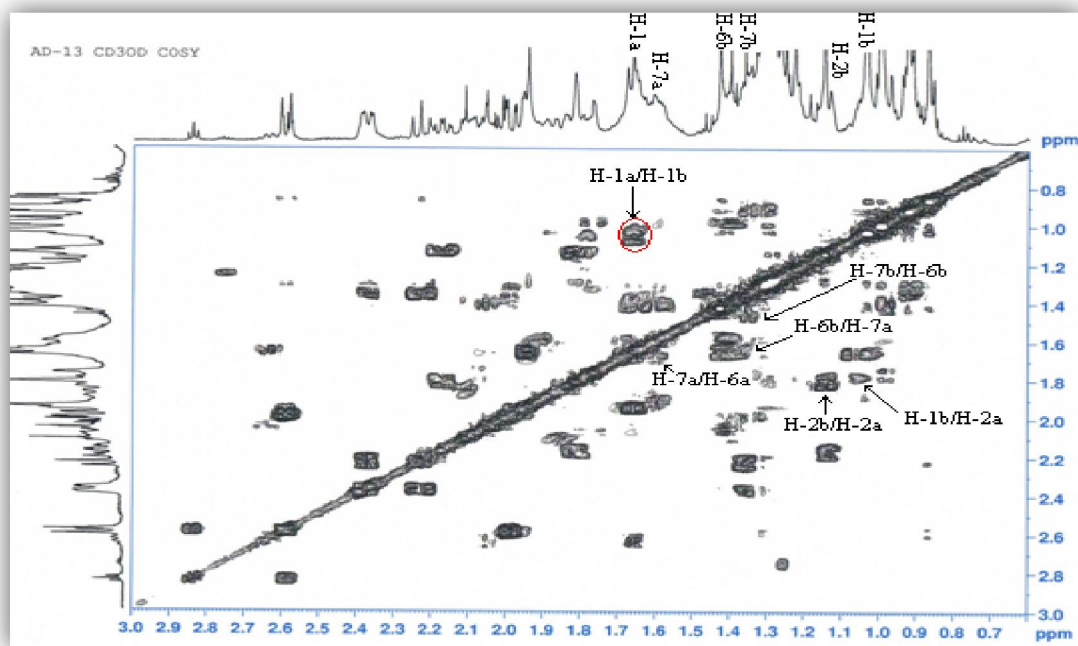


Figure IV.69: Spectre COSY H-H de l'aglycone du composé 16

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

La stéréochimie au niveau de la génine est établie par analyse des effets Overhauser observés sur le spectre NOESY (Figures IV.70 et IV.71) et des valeurs de constantes de couplage.

Le proton H-3 a une stéréochimie α -axiale du fait de la valeur de la constante de couplage $^3J_{3ax-2ax} = 10,3$ Hz. Cette stéréochimie est confirmée par les effets nOe H-3/H-5 α et H-3/CH₃-23 α .

Les effets nOe H-18/H-12, H-18/CH₃-30 et la grande constante de couplage $^3J_{18ax-19ax} = 13,8$ Hz définissent la stéréochimie β -axiale du proton H-18.

Les effets nOe observés entre les protons de groupements CH₂OH-24, CH₃-25 et CH₃-26 confirment l'orientation β -axiale de ces derniers.

Les effets nOe H-5 α /H-9 et H-9/CH₃-27 traduisent une stéréochimie α -axiale pour les protons H-9 et CH₃-27.

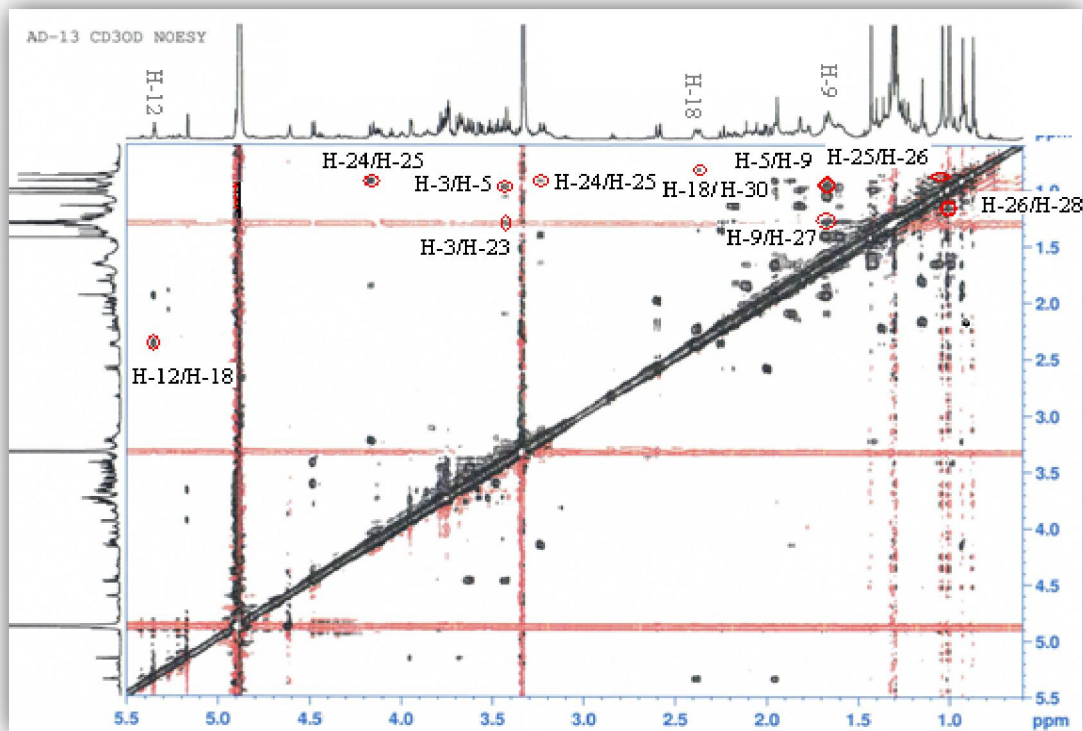


Figure IV.70: Spectre NOESY du composé 16

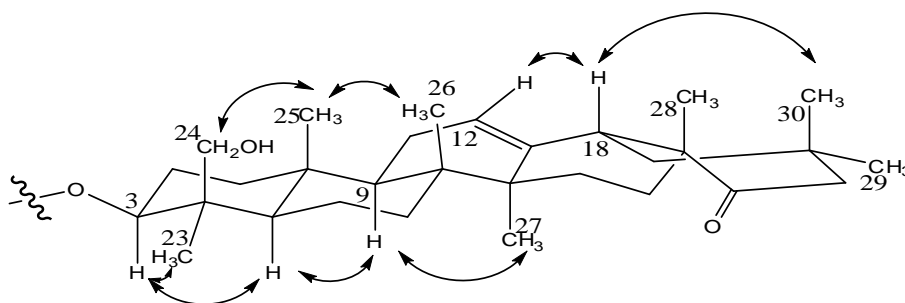


Figure IV.71: Corrélations nOe observées sur le spectre NOESY (composé 16)

Identification de la partie osidique

L'analyse RMN ¹H a montré l'existence de trois unités osidiques par l'observation de trois signaux de protons anomères à δ_H 4,48 (*d*, *J* = 8,3 Hz, H-1'), δ_H 4,90 (*d*, *J* = 7,5 Hz, H-1'') et δ_H 5,15 (*d*, *J* = 1,6 Hz, H-1'''). Les carbones anomères sont repérés à δ_C 104,1 (C-1'), 100,7 (C-1'') et 100,9 (C-1''') sur le spectre HSQC (Figure IV.72).

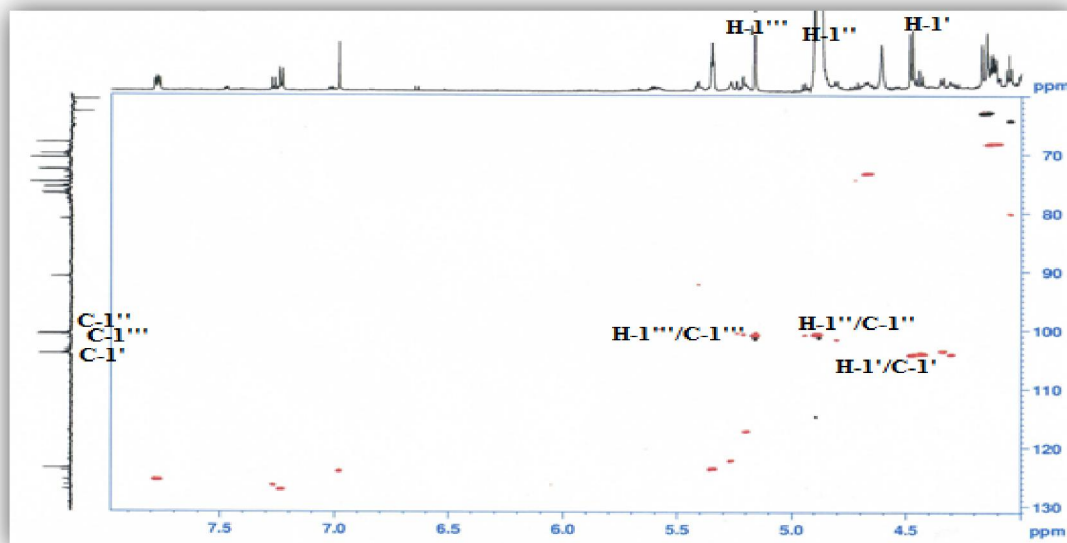


Figure IV.72: Spectre HSQC mettant en évidence les protons et carbones anomères

A partir du proton anomère nommé H-1' (δ_H 4,48), l'analyse des spectres COSY H-H (Figure IV.73) et TOCSY (Figure IV.74) permet d'identifier un système de spins à cinq protons, à travers les couplages H-1'/H-2' (δ_H 3,78, *t*, $J = 8,3$ Hz), H-2'/H-3' (δ_H 3,62, *dd*, $J = 9,2; 8,3$ Hz), H-3'/H-4' (δ_H 3,46, *t*, $J = 9,2$ Hz), H-4'/H-5' (δ_H 3,61, *d*, $J = 9,2$ Hz). La multiplicité du signal du proton H-5' ainsi que l'observation sur le spectre RMN ^{13}C d'un carbonyle d'acide à 175,6 ppm corrélant en HMBC (Figure IV.75) avec les protons H-5' et H-4' identifient cette unité osidique à l'acide glucuronique. Les grandes valeurs de constantes de couplage indiquent qu'il s'agit de l'acide β -D-glucuronopyranoïque ($J_{1',2'} = 8,3$ Hz).

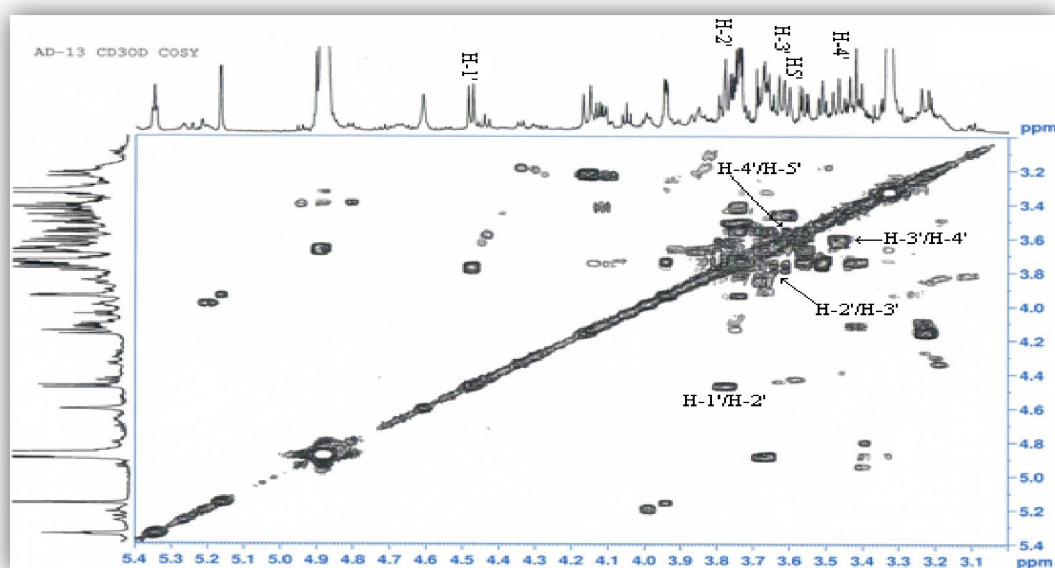


Figure IV.73: Spectre COSY H-H identifiant l'acide β -D-glucuronique (composé 16)

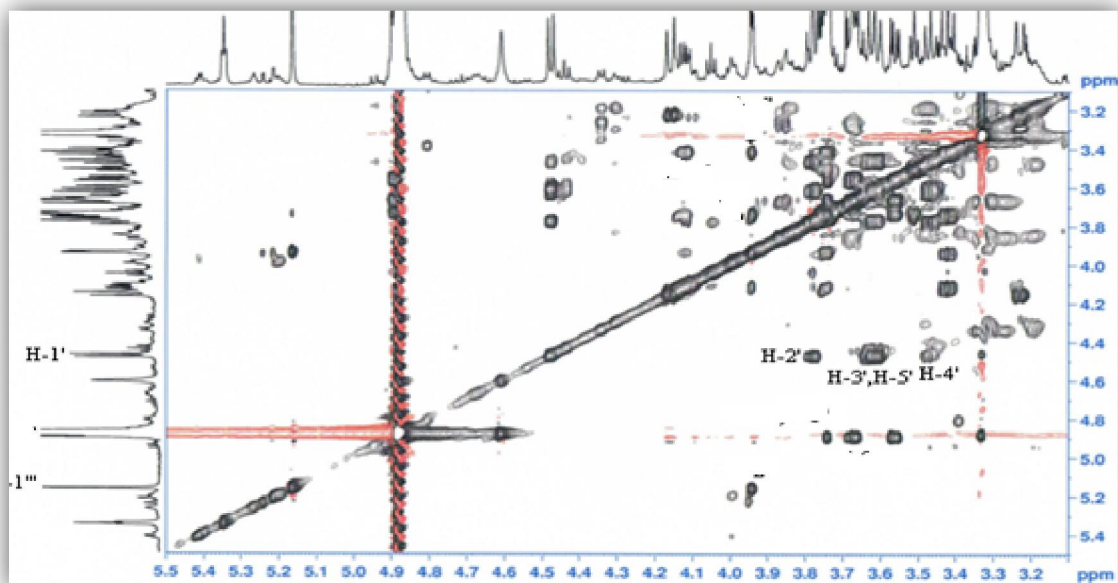


Figure IV.74: Spectre TOCSY identifiant l'acide β -D-glucuronique (composé 16)

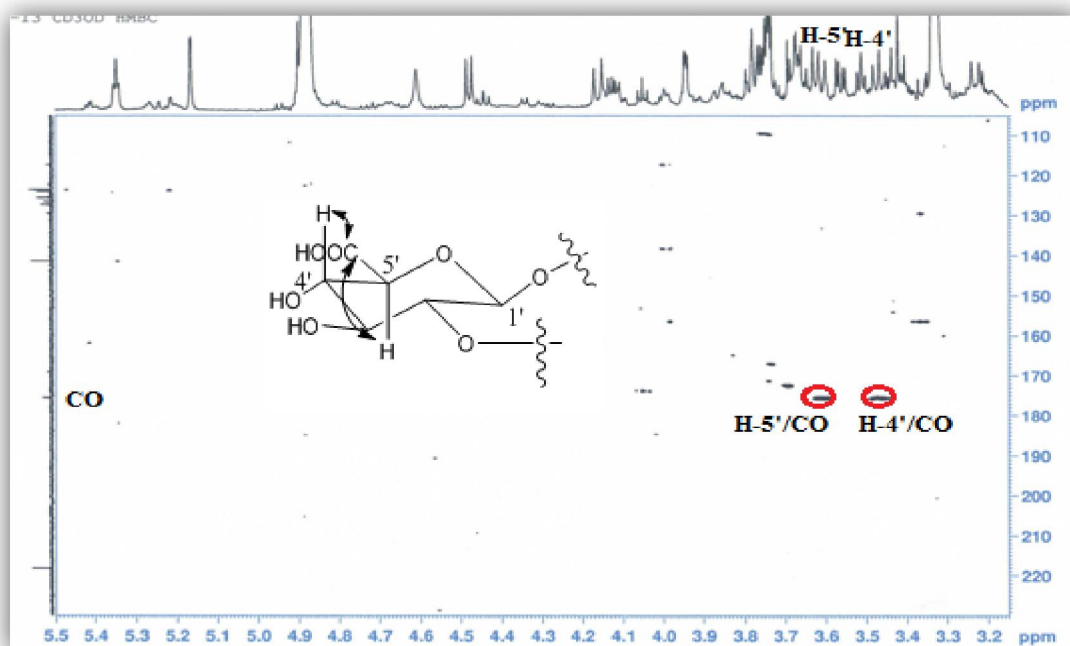


Figure IV.75: Spectre HMBC mettant en évidence les corrélations entre le carbonyle et les protons H-4' et H-5'

L'analyse des spectres COSY H-H et TOCSY (Figures IV.76 et IV.77) met également en évidence un système de spins à sept protons d'un hexose dont le proton anomère est détecté à δ_H 4,90 (*d*, $J = 7,5$ Hz, H-1''). Ce système est établi du fait des corrélations H-1''/H-2'' (δ_H 3,66, *m*), H-2''/H-3'' (δ_H 3,56, *dd*, $J = 9,6; 3,5$ Hz), H-3''/H-4'' (δ_H 3,74, *m*), H-4''/H-5''

(δ_{H} 4,12, *m*), H-5''/H₂-6'' (δ_{H} 3,76; 3,72, *m*). La faible valeur de la constante de couplage $J_{\text{H-3''-H-4''}}$ égale à 3,5 Hz permet d'identifier cet hexose à un β -D-galactose ($J_{1''-2''} = 7,5$ Hz).

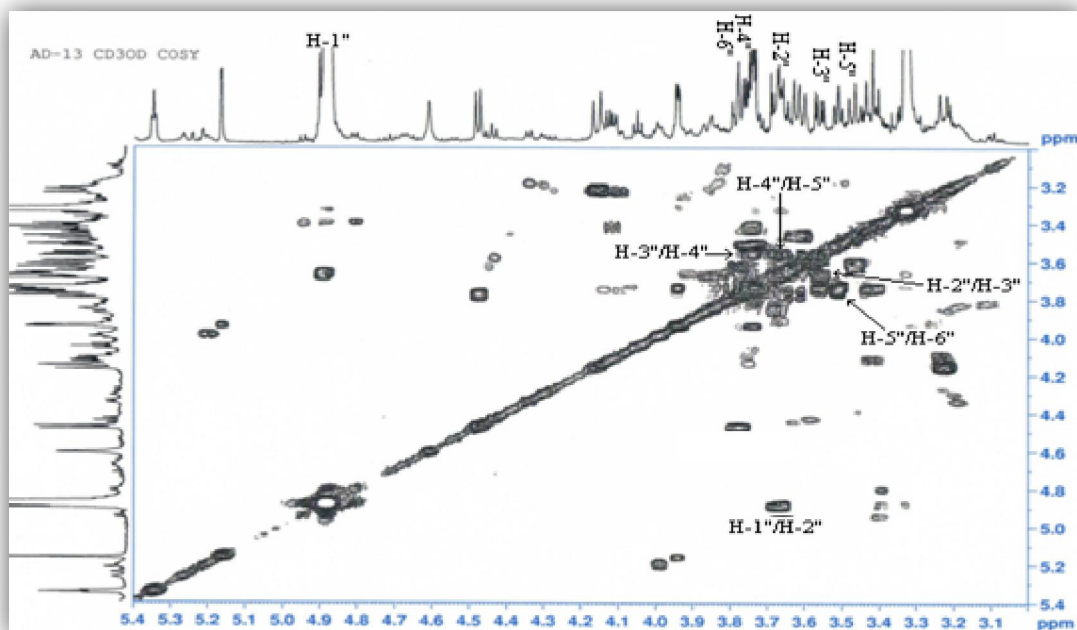


Figure IV.76: Spectre COSY H-H du β -D-galactose

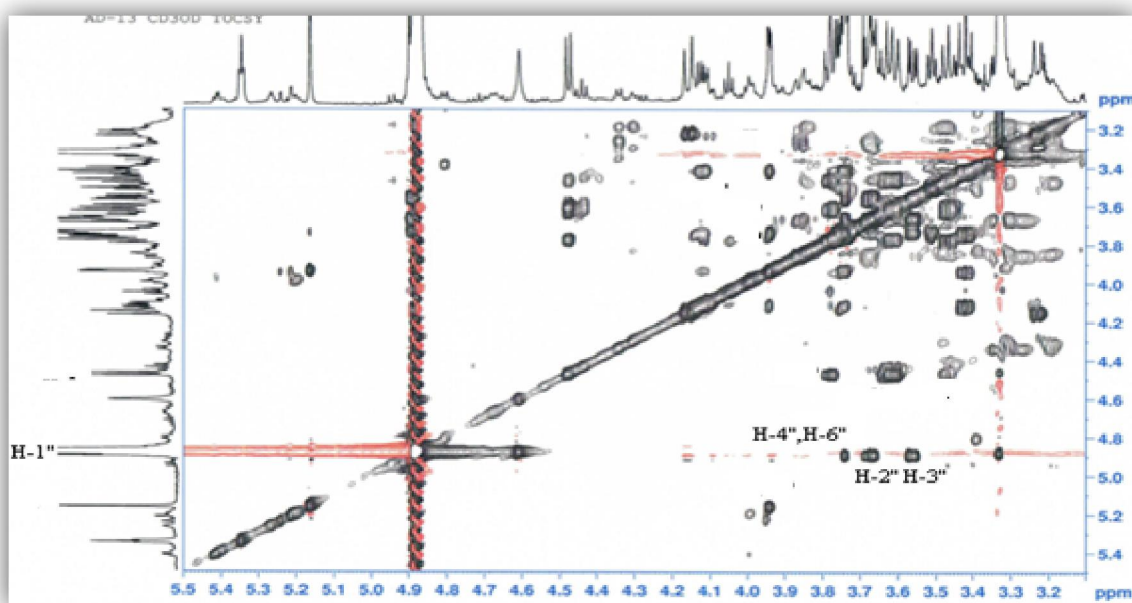


Figure IV.77: Spectre TOCSY du β -D-galactose

A partir du troisième proton anomère H-1''' (δ_{H} 5,15), l'analyse des spectres COSY H-H et TOCSY (Figures IV.78 et IV.79) montre un système de spins à huit protons d'un rhamnose au vu des couplages H-1'''/H-2''' [δ_{H} 3,94 (*dd*, $J = 3,3; 1,6$ Hz)], H-2'''/H-3''' [δ_{H} 3,73 (*nd*)], H-3'''/H-4''' [δ_{H} 3,42 (*t*, $J = 9,6$ Hz)], H-4'''/H-5''' [δ_{H} 4,12 (*m*)] et H-5'''/H₃-6''' [δ_{H}

1,30 (*d*, $J = 8,6$ Hz)]. La valeur de la constante de couplage $J_{1''-2''} = 1,5$ Hz indique qu'il s'agit d'un α -L-rhamnose.

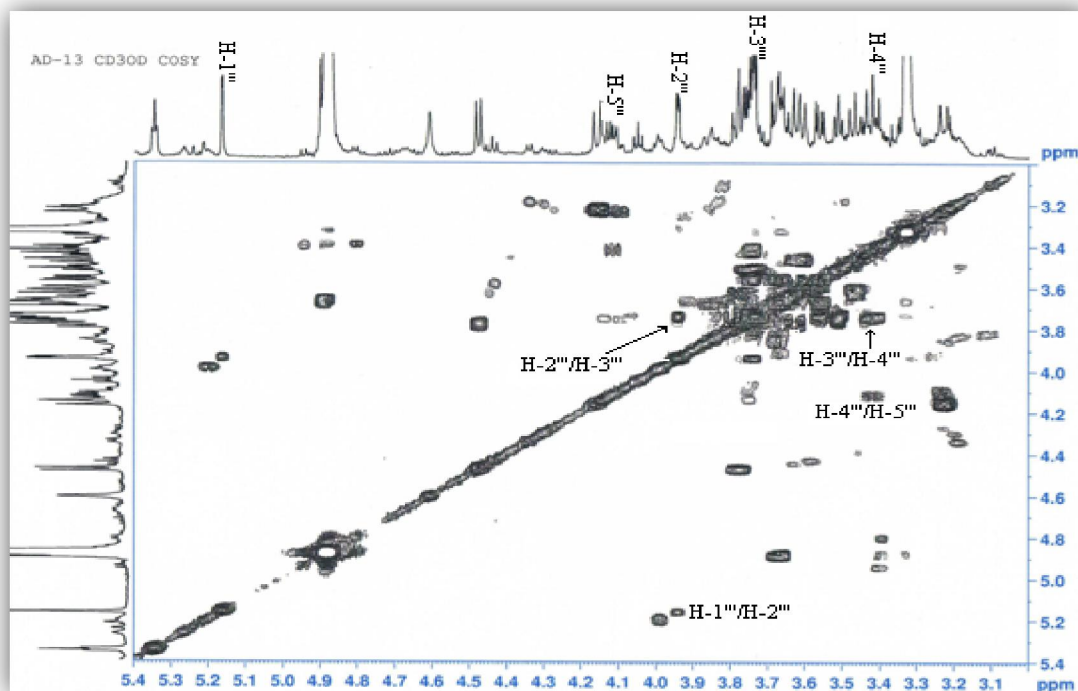


Figure IV.78: Spectre COSY H-H du α -L-rhamnose (composé 16)

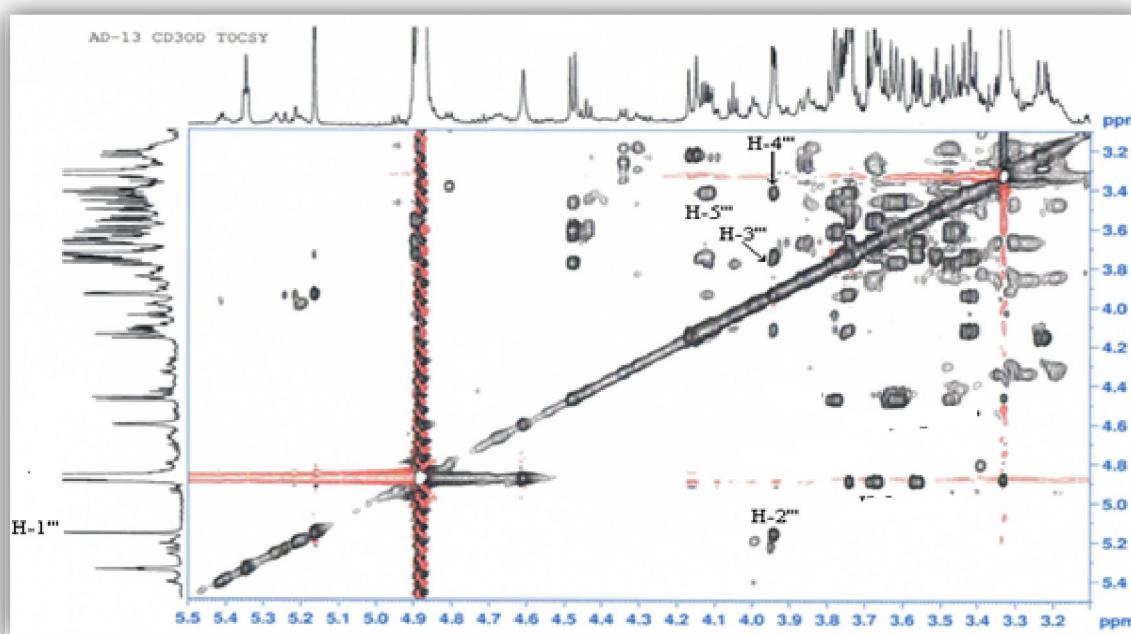


Figure IV.79: Spectre TOCSY du α -L-rhamnose (composé 16)

L'expérience HSQC (Figure IV.80) a permis d'assigner les déplacements chimiques de tous les carbones des trois oses.

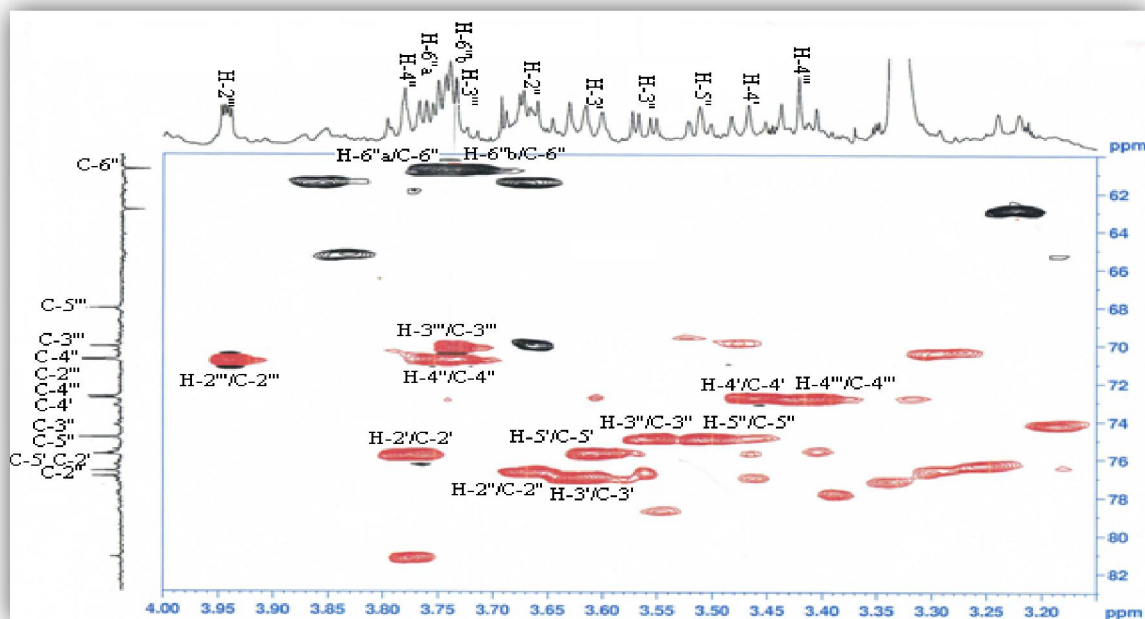


Figure IV.80: Spectre HSQC de la partie osidique du composé 16

La séquence et les sites de fixation des différents oses ont été déterminés par expérience HMBC (Figure IV.81) qui montre les corrélations entre :

- ✓ Le proton anomère H-1' (δ_H 4,48) de l'acide glucuronique et le carbone C-3 (91,0 ppm) de la génine.
- ✓ Le proton anomère H-1'' (δ_H 4,90) du galactose et le carbone C-2' (75,8 ppm) de l'acide glucuronique.
- ✓ Le proton anomère H-1''' (δ_H 5,15) du rhamnose et le carbone C-2'' (77,8 ppm) du galactose.

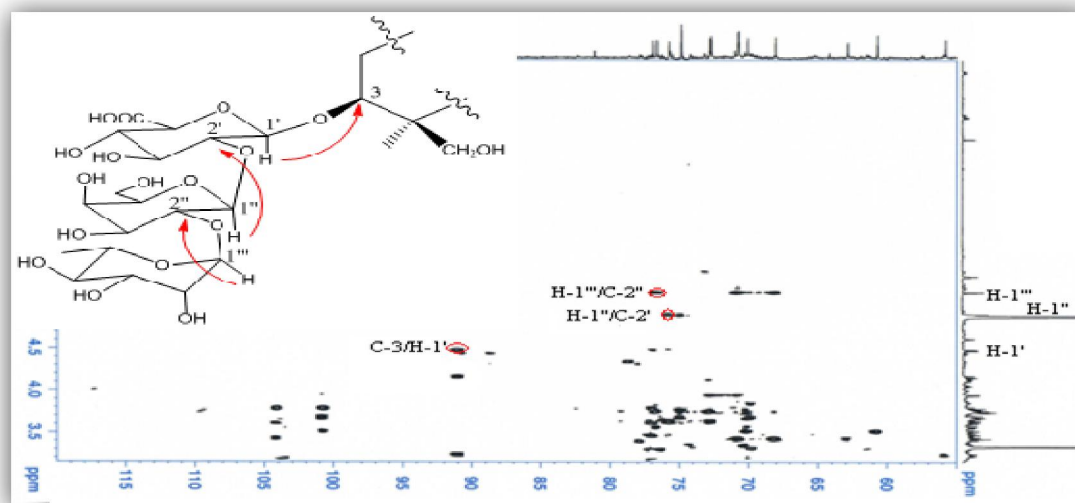
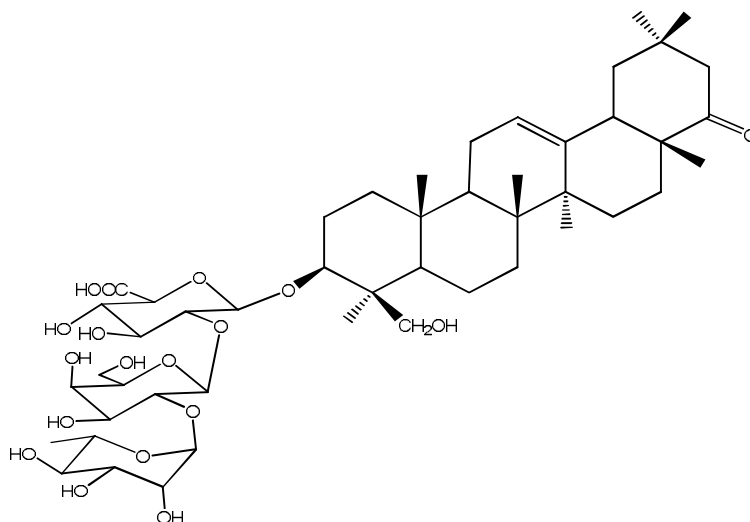


Figure IV.81: Spectre HMBC montrant le branchement des sucres (composé 16)

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



Cette saponine s'est avérée identique à le déhydrosoyasaponine I, rencontrée précédemment dans certaines espèces appartenant à la famille Fabaceae comme *Medicago sativa* [91], *Pisum sativum* L. [92], *Desmodium adscendens* [93] et *Hedysarum polybotrys* [94]. Elle est décrite pour la première fois dans le genre *Astragalus*.

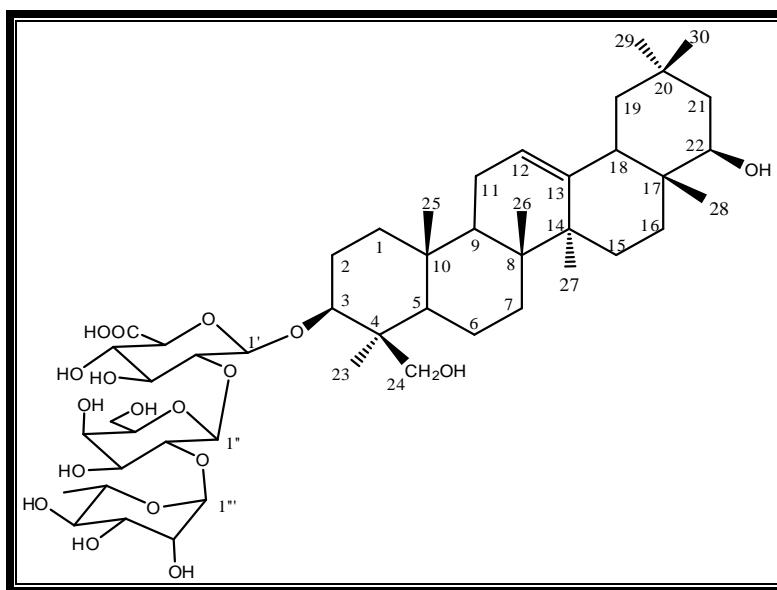
Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau IV.7.

Tableau IV.7: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé 16 dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	38,3	1,03-1,66 (m)
2	24,8	1,8-1,13 (m)
3	91,0	3,42 (dd, 10,3; 4,5)
4	43,3	-
5	55,9	0,96 (m)
6	18,0	1,39-1,66 (m)
7	32,6	1,40-1,68 (m)
8	39,4	-
9	47,3	1,64 (m)
10	36,1	-
11	23,5	1,92 (m)
12	123,7	5,35 (t, 3,5)
13	141,4	-
14	41,6	-
15	25,7	1,33-1,85 (m)
16	27,0	1,12-2,17 (m)
17	48,0	-
18	47,6	2,37 (dd, 13,8; 3,8)

19	46,2	1,34 (<i>m</i>) 2,23 (<i>t</i> , 13,8)
20	33,7	-
21	50,3	1,99-2,59 (<i>m</i>)
22	218,3	-
23	22,0	1,29 (<i>s</i>)
24	62,9	3,23 (<i>d</i> , 11,5) 4,16 (<i>d</i> , 11,5)
25	14,9	0,92 (<i>s</i>)
26	15,9	1,00 (<i>s</i>)
27	16,9	1,30 (<i>s</i>)
28	19,7	1,01 (<i>s</i>)
29	30,8	1,03 (<i>s</i>)
30	24,2	0,87 (<i>s</i>)
1'	104,1	4,48 (<i>d</i> , 8,3)
2'	75,8	3,78 (<i>t</i> , 8,3)
3'	76,9	3,62 (<i>dd</i> , 9,2; 8,3)
4'	72,8	3,46 (<i>t</i> , 9,2)
5'	75,8	3,61 (<i>d</i> , 9,2)
COOH	175,6	-
1''	100,7	4,90 (<i>d</i> , 7,5)
2''	77,8	3,66 (<i>dd</i> , 9,6; 7,5)
3''	74,9	3,56 (<i>dd</i> , 9,6; 3,5)
4''	70,8	3,74 (<i>nd</i>)
5''	75,7	3,51 (<i>m</i>)
6''	60,8	3,76 (<i>m</i>) 3,72 (<i>m</i>)
1'''	100,9	5,15 (<i>d</i> , 1,6)
2'''	70,8	3,94 (<i>dd</i> , 3,3; 1,6)
3'''	70,3	3,73 (<i>nd</i>)
4'''	72,8	3,42 (<i>t</i> , 9,6)
5'''	68,1	4,12 (<i>m</i>)
6'''	16,9	1,30 (<i>d</i> , 8,6)

IV. 2.3.8 Elucidation structurale du composé 17



3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-3 β , 22 β , 24-trihydroxyoléan-12-ène (17)

Le spectre de masse ESI⁺ (Figure IV.82) du composé **17** présente un pic d'ion pseudomoléculaire [M+Na]⁺ à m/z 965, soit une masse moléculaire M = 942 uma correspondant à la formule C₄₈H₇₈O₁₈.

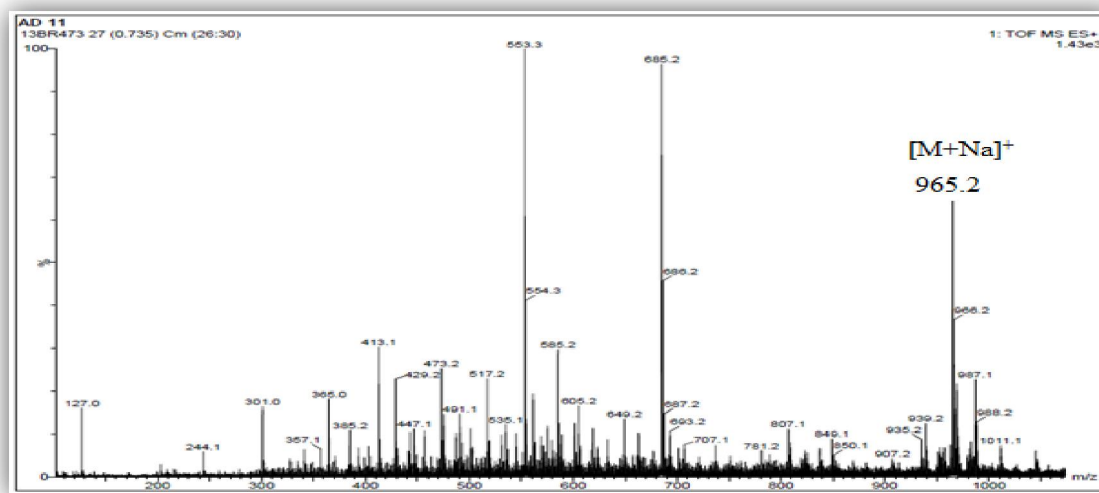


Figure IV.82: Spectre masse ESI⁺ du composé 17

Le spectre RMN ¹H du composé **17** (Figure IV.83) montre une forte similitude structurale avec le composé **16** (Figure IV.84) décrit précédemment. Sa masse moléculaire de plus de 2 unités de masse atomique par rapport au composé **16** (déhydrosoyasaponine D), suggère la présence supplémentaire de deux hydrogènes au niveau du composé **17**. Cette

différence traduit la réduction du carbone carbonyle C-22 en groupement hydroxyméthine CHOH.

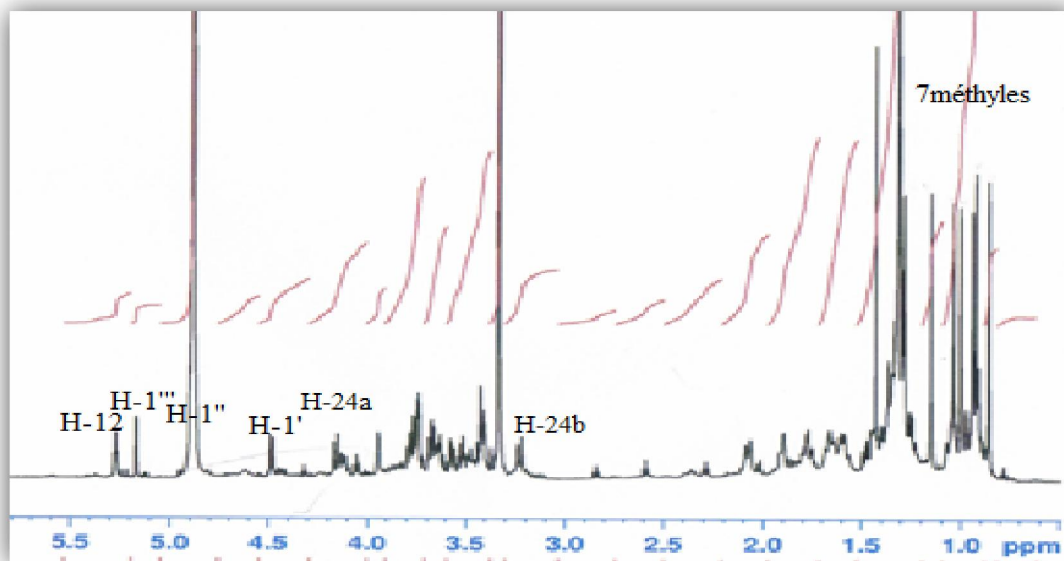


Figure IV.83: Spectre RMN ^1H du composé 17

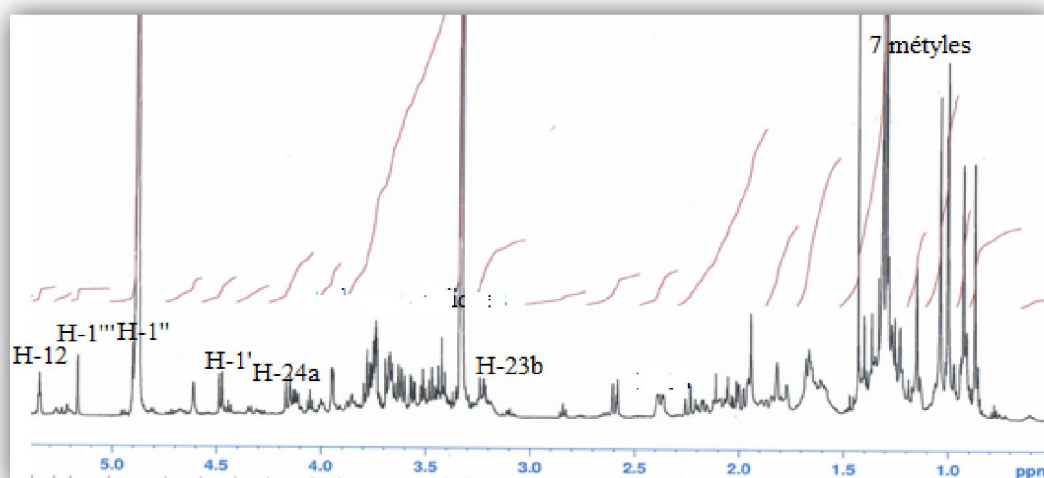


Figure IV.84: Spectre RMN ^1H du composé 16

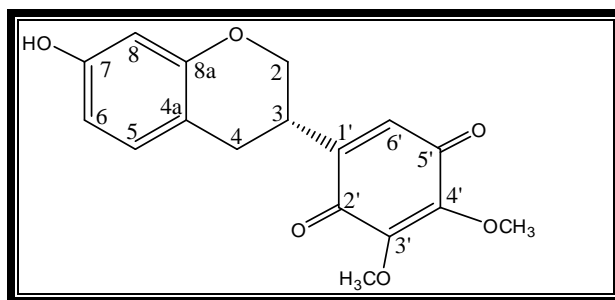
Il se confirme aisément que le composé **17** est identique à la soyasaponine I, isolée antérieurement des plantes du genre *Astragalus*: *A. crysopterus* [95], *A. shikokianus* [96], *A. trimestris* [98] et *A. membranaceus* [98]. Il est rencontré dans un grand nombre de genres de la famille Fabaceae comme *Pisum* [92], *Hedysarum* [94], *Melilotus* [99], *Trifolium* [100], *Lupinus* [101], *Glycine* [102] et *Medicago* [103]. Cette large distribution a fait que ce composé est utilisé comme marqueur chimiotaxonomique de la famille Fabaceae et du genre *Astragalus* [104].

Tableau IV.8: Déplacements chimiques RMN ¹H et ¹³C du composé 17 dans CD₃OD

Position	δ _C (ppm)	δ _H (m, J en Hz)
1	38,3	1,03-1,66 (m)
2	24,8	1,8-1,13 (m)
3	91,0	3,42 (dd, 10,3; 4,5)
4	43,3	-
5	55,9	0,96 (m)
6	18,0	1,39-1,66 (m)
7	32,6	1,40-1,68 (m)
8	39,4	-
9	47,3	1,64 (m)
10	36,1	-
11	23,5	1,92 (m)
12	123,7	5,35 (t, 3,5)
13	141,4	-
14	41,6	-
15	25,7	1,33-1,85 (m)
16	27,0	1,12-2,17 (m)
17	37,2	-
18	47,6	2,37 (dd, 13,8; 3,8)
19	46,2	1,34 (m) 2,23 (t, 13,8)
20	33,7	-
21	40,8	1,47 (dd, 13,8; 2,8) 1,35 (dd, 13,8; 5,3)
22	75,6	3,41 (dd, 5,3; 2,8)
23	22,0	1,29 (s)
24	62,9	3,23 (d, 11,5) 4,16 (d, 11,5)
25	14,9	0,92 (s)
26	15,9	1,00 (s)
27	16,9	1,30 (s)
28	19,7	1,01 (s)
29	30,8	1,03 (s)
30	24,2	0,87 (s)
1'	104,1	4,48 (d, 8,3)
2'	75,8	3,78 (t, 8,3)
3'	76,9	3,62 (dd, 9,2; 8,3)
4'	72,8	3,46 (t, 9,2)
5'	75,8	3,61 (d, 9,2)
COOH	175,6	-
1''	100,7	4,90 (d, 7,5)
2''	77,8	3,66 (dd, 9,6; 5,5)
3''	74,9	3,56 (dd, 9,6; 3,5)
4''	70,8	3,74 (nd)
5''	75,7	3,51 (m)
6''	60,8	3,76 (m) 3,72 (m)

1'''	100,9	5,15 (<i>d</i> , 1,6)
2'''	70,8	3,94 (<i>dd</i> , 3,3; 1,6)
3'''	70,3	3,73 (<i>nd</i>)
4'''	72,8	3,42 (<i>t</i> , 9,6)
5'''	68,1	4,12 (<i>m</i>)
6'''	16,9	1,30 (<i>d</i> , 8,6)

IV. 2.3.9 Elucidation structurale du composé 18



7-Hydroxy-3',4'-diméthoxyisoflavanequinone (18)

La couleur rouge ainsi que le spectre UV (Figure IV.85) qui présente une large bande d'absorption à 268 nm, met en relief le caractère quinonoïdique du composé **18** [105], contrastant avec tous les autres composés décrits jusqu'ici.

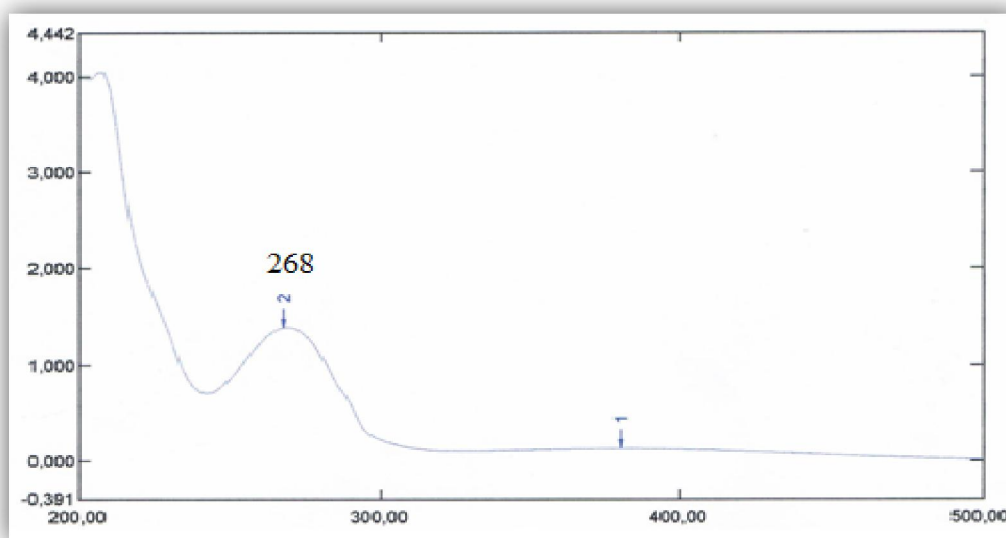


Figure IV.85: Spectre UV du composé 18

Le spectre de masse ESI⁺ de ce composé (Figure IV.86) exhibe deux pics d'ions pseudomoléculaires à m/z 339 [M+Na]⁺ et m/z 655 [2M+Na]⁺, en accord avec une formule brute en C₁₇H₁₆O₆ et une masse moléculaire de 316 uma.

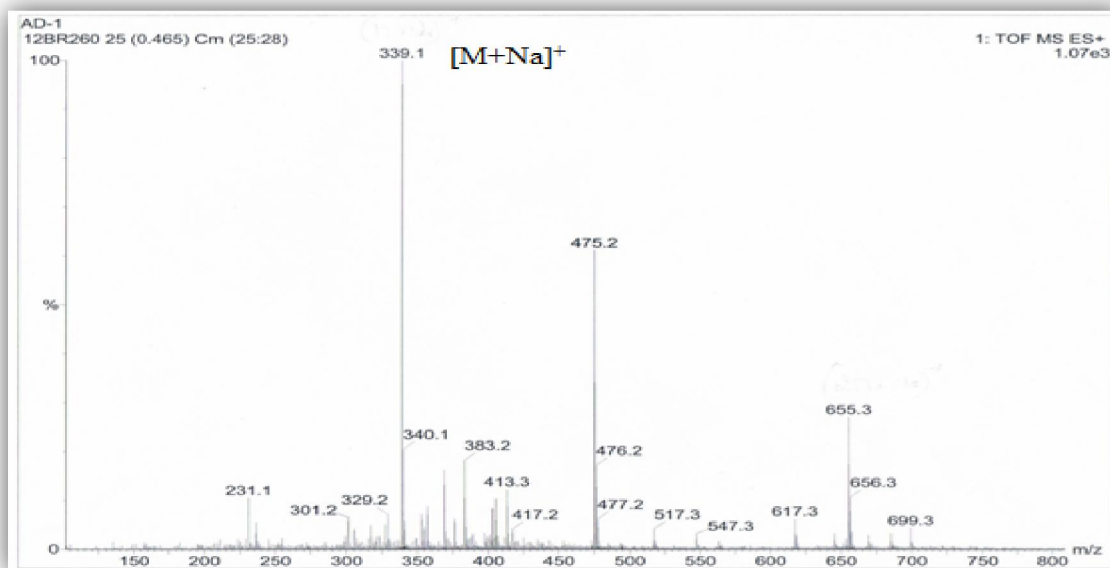


Figure IV.86: Spectre de masse ESI⁺ du composé 18

Son spectre RMN ¹H (Figure IV.87) enregistré dans CDCl₃, montre des signaux de protons aromatiques résonant entre 6 et 7 ppm et aliphatiques entre 2,5 et 4,5 ppm, suggérant que le composé **18** est de nature phénolique. Ce spectre met aussi en évidence la présence d'un groupement hydroxyle et deux groupements OCH₃ à travers un singulet large d'intégration 1H résonant à δ_H 4,97 et un autre d'intégration 6H à δ_H 4,04.

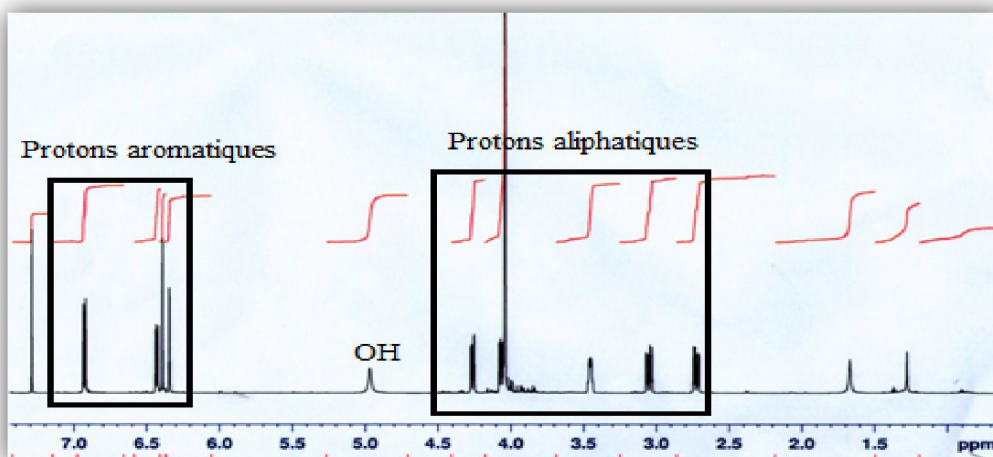


Figure IV.87 : Spectre RMN ¹H du composé 18

La présence d'un noyau aromatique trisubstitué est attestée par l'observation d'un système ABX constitué par les signaux à δ_H 6,93 (1H, *d*, *J* = 8,3 Hz), δ_H 6,43 (1H, *d*, *J* = 8,3; 2,5 Hz) et δ_H 6,34 (1H, *d*, *J* = 2,5 Hz) (Figure IV.88) et confirmée par expérience COSY H-H (Figure IV. 89).

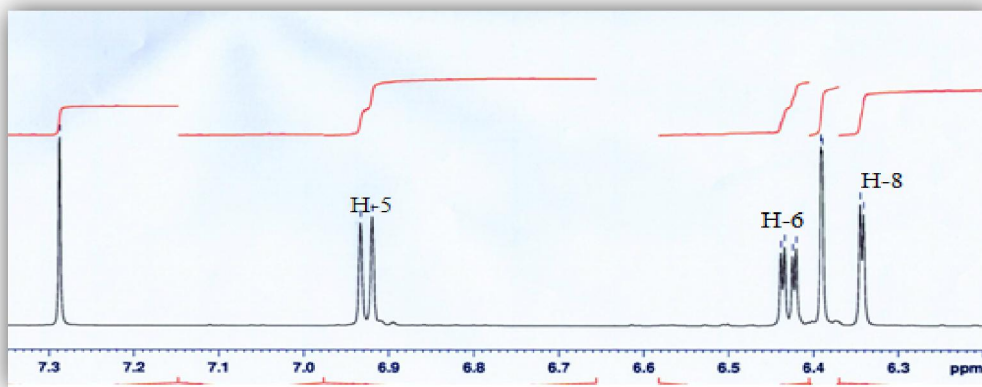
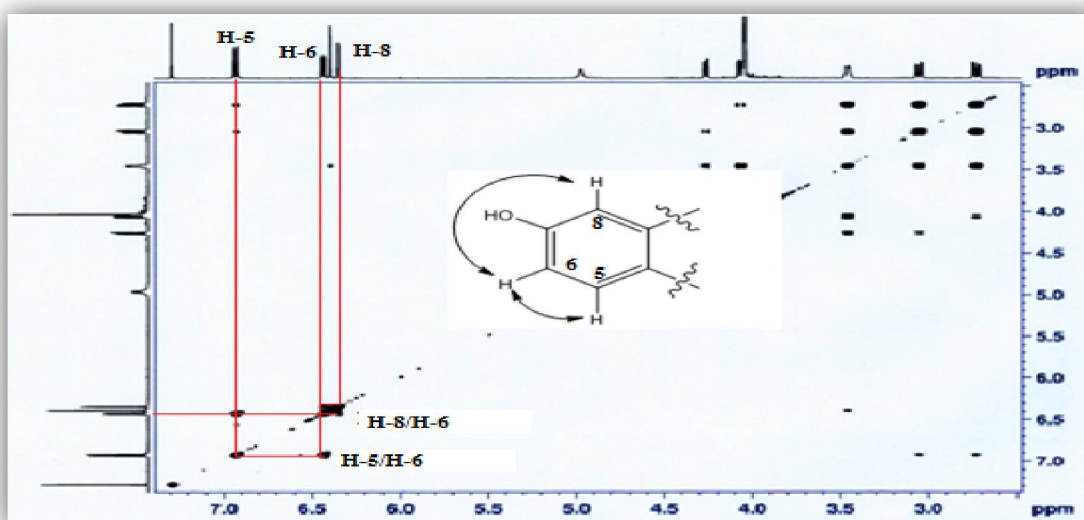
Figure IV.88 : Spectre RMN ^1H du composé 18

Figure IV.89: Spectre COSY H-H du composé 18

Les carbones qui les portent sont repérés respectivement à 130,4, 108,8 et 103,4 ppm, selon le spectre HSQC (Figure IV.90).

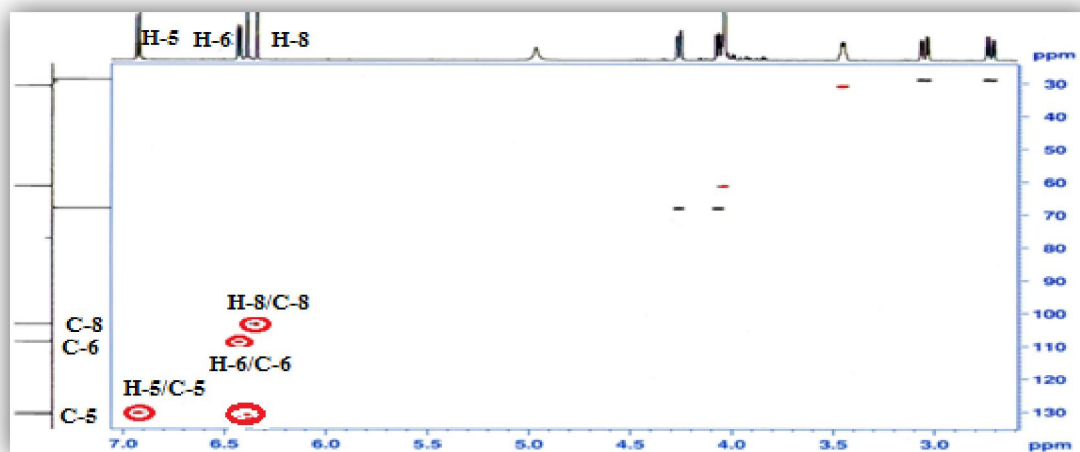


Figure IV.90: Spectre HSQC du composé 18

Il est observé aussi un signal singulet fortement déblindé d'intégration 1H à δ_H 6,39. Le carbone qui le porte est localisé à 131 ppm.

La nature isoflavanique du composé est supportée en partie par le spectre COSY H-H (Figure IV.91), partant du proton situé à 6,93 ppm (H-5) pris comme proton espion. En effet, ce dernier corrèle avec deux protons géminés repérés à δ_H 3,05 (*dd*, $J = 16,0; 6,2$ Hz, H-4a), 2,72 (*dd*, $J = 16,0; 6,2$ Hz, H-4b). A partir de ces deux derniers protons aliphatiques, on identifie un système de spins à cinq protons, à travers les couplages H₂-4/H-3 (δ_H 3,45, *qd*, $J = 6,2; 2,5$ Hz), H-3/H-2a (δ_H 4,27, *dd*, $J = 10,6; 2,5$ Hz) et H-3/H-2b (δ_H 4,07, *dd*, $J = 10,6; 6,2$ Hz). Les valeurs de résonance des carbones qui les portent, établies par HSQC (Figure V.92), à δ_C 68,1(C-2), 30,8 (C-3) et 28,9 (C-4), sont typiques d'un squelette isoflavane [106]. Un couplage allylique est également observé entre le proton H-3 et un proton éthylénique résonnant à 6,39 ppm (H-6'). Sa valeur de résonance s'explique par sa proximité avec un carbonyle.

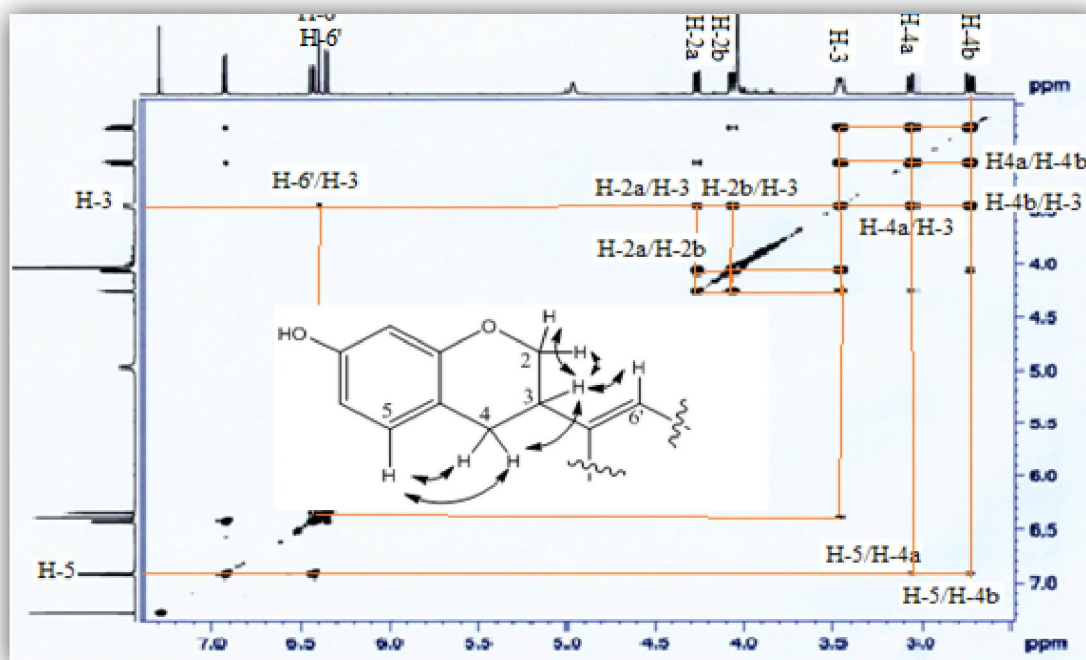


Figure IV.91: Spectre COSY H-H du composé 18

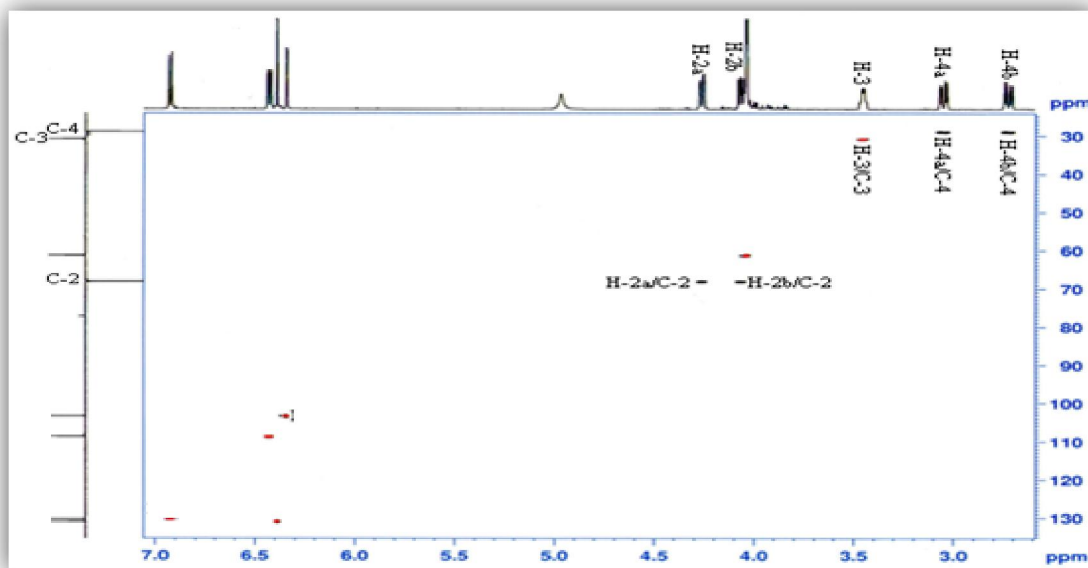
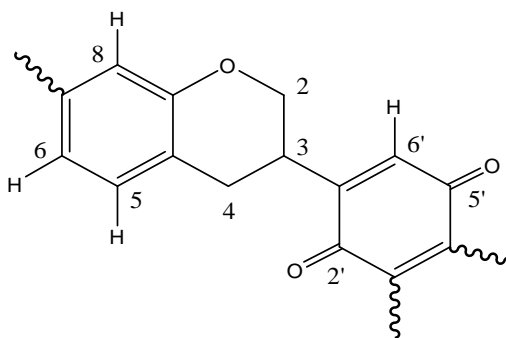


Figure IV.92: Spectre HSQC *J*-modulé du composé 18

Toutes cette analyse à laquelle s'ajoute l'observation sur le spectre RMN ^{13}C de deux signaux de carbonyles détectés à 183,5 et 184,1 ppm, permet d'affirmer que ce composé possède une structure de type 2',5'-dioxoisoflavane [107].



Le spectre HMBC (Figure IV.93) exhibe les corrélations attendues entre:

- ✓ le proton H-5 (δ_{H} 6,93) et les carbones C-4 (δ_{C} 28,9), C-8 (δ_{C} 103,4) et un carbone aromatique quaternaire résonant à 154,7 ppm (C-8a)
- ✓ le proton H-8 (δ_{H} 6,34) et les carbones C-6 (δ_{C} 108,8), C-8a et deux carbones aromatiques quaternaires résonant à δ_{C} 112,3 et 155,2 attribuables respectivement au carbones C-4a et C-7 oxygéné.
- ✓ les protons H₂-2 (δ_{H} 4,27; 4,07) et deux carbones quaternaires à 146,6 ppm (C-1') et 154,7 ppm (C-8a)
- ✓ Les deux protons H-3 (δ_{H} 3,45) et H-6' (δ_{H} 6,39) et deux carbonyles résonant respectivement à δ_{C} 183,5 (C-2') et 184,1(C-5').

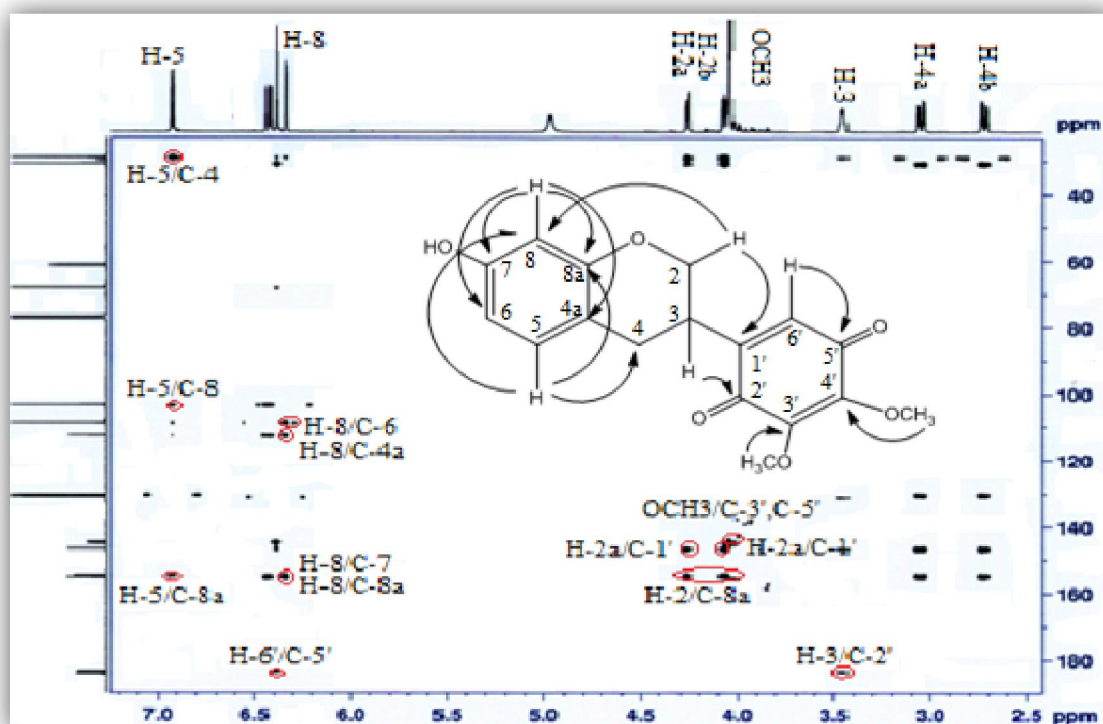
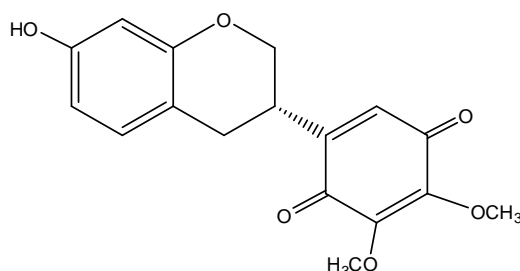


Figure IV.93: Spectre HMBC du composé **18**

Le spectre HMBC montre également les couplages longue distance entre les deux groupements méthoxyles resonant à 4,04 ppm et deux carbones quaternaires à 145,1 (C-3') et 144,6 ppm (C-4').

L'ensemble de toute ces données spectrales ainsi la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = -70,3^\circ$ (C = 0.81 g/100 ml, MeOH) permettent d'assigner pour le composé **18** la structure suivante: 7-Hydroxy-3',4'-diméthoxyisoflavanequinone



Ce composé, connu sous le nom de pendulone, est doté d'activité anti-tumorale potentielle. Il a été rencontré dans les espèces *Millettia pendula* [108], *Oxytropis falcata* [109] et *Astragalus membranaceus* [110], appartenant toutes à la famille Fabaceae. C'est sa seconde citation dans le genre *Astragalus*.

Tous les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé, reportés ici pour la première fois, sont rassemblés dans le tableau IV.9 ci-dessous.

Tableau IV.9: Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé 18 dans CDCl_3

Position	Δ_C (ppm)	δ_H (m, J en Hz)
2	68,1	4,27 (dd, 10,6; 2,5) 4,07 (dd, 10,6; 6,2)
3	30,8	3,45 (qd, 6,2; 2,5)
4	28,9	2,72 (dd, 16,0; 6,2) 3,05 (dd, 16,0; 6,2)
4a	112,3	-
5	130,4	6,93 (d, 8,3)
6	108,8	6,43 (dd, 8,3; 2,5)
7	155,2	-
8	103,4	6,34 (d, 2,5)
8a	154,7	-
1'	146,6	-
2'	183,5	-
3'	145,1	-
4'	144,6	-
5'	184,1	-
6'	131,0	6,39 (s)
7-OH	-	4,97 (sl)
3'-OCH ₃	61,4	4,04 (s)
4'-OCH ₃	61,2	4,04 (s)

V.3 Conclusion

L'investigation chimique effectuée sur la plante *Astragalus depressus* L. (Fabaceae), espèce poussant dans tout le pourtour méditerranéen, a permis d'isoler et de caractériser neuf composés naturels constitués de deux classes de métabolites secondaires, les saponosides au nombre de huit et un flavonoïde à squelette isoflavane.

Les huit saponines se répartissent comme suit:

- Six à squelette cycloartane, antérieurement rencontrées dans le genre *Astragalus* et connus sous les noms de: cyclogaleginoside A, astrasieversianine II, astrasieversianine IV, astrasieversianine VIII, astrasieversianine VI et astrasieversianine XIV.
- Deux à squelette oléanène, précédemment rencontrées dans la famille Fabaceae: déhydrosoyasaponine I et soyasaponine I.

L'isoflavane isolé est connu sous le nom de pendulone.

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

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

Le pendulone a été identifié pour la deuxième fois dans le genre *Astragalus*. Ce composé suscite un grand intérêt en raison de ses activités antitumorale et antileishmaniose jugées très prometteuses.

Conclusion Générale

CONCLUSION GENERALE

Ce travail concerne une étude chimique de deux plantes appartenant à la riche famille Fabaceae et au genre *Astragalus*, *A. gombo* Coss & Dur. et *A. depressus* L. La famille en général et le genre en particulier sont connus pour leur richesse en divers métabolites secondaires d'un grand intérêt biologique, tels que les flavonoïdes et les saponosides. Ces deux espèces n'ont fait l'objet d'aucune investigation chimique.

Cette investigation phytochimique qui a porté sur l'extrait *n*-butanolique de *Astragalus gombo* ainsi que les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique de *A. depressus*, a permis d'isoler et d'identifier dix-huit composés. Ces derniers appartenant à deux classes de métabolites secondaires, les plus dominants au sein du genre, se répartissent en :

- ✓ Quinze saponines dont treize à squelette cycloartane et deux à squelette oléanane. Six saponines cycloartaniques isolées de *A. gombo* et nommées gombosides **A-F**, se sont avérées nouvelles.
- ✓ Trois flavonoïdes dont deux *O*-glycosylés et un isoflavane.

L'isolement de ces métabolites secondaires est rendu possible grâce à l'utilisation conjointe des techniques chromatographiques, à savoir:

- ✓ La chromatographie liquide sous vide (VLC) de silice greffée en C-18 et silice normale
- ✓ La chromatographie sur colonne de gel de silice normale.
- ✓ La chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20.
- ✓ La chromatographie sur plaques préparatives en phases normale et inverse.
- ✓ La chromatographie liquide haute performance CLHP

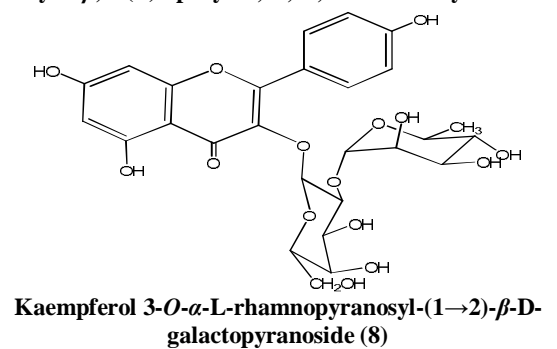
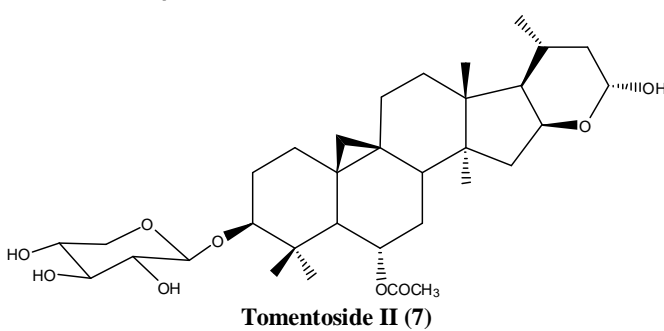
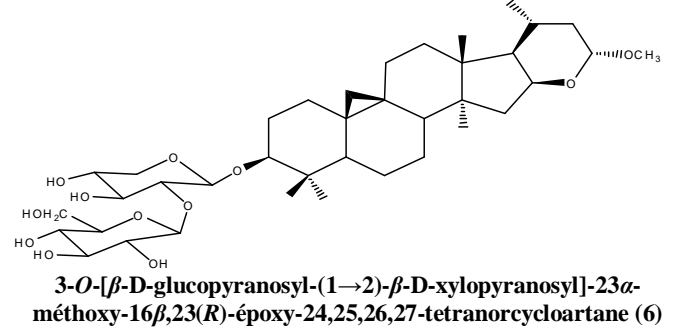
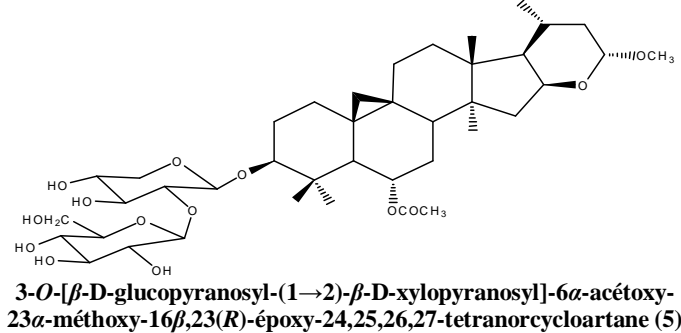
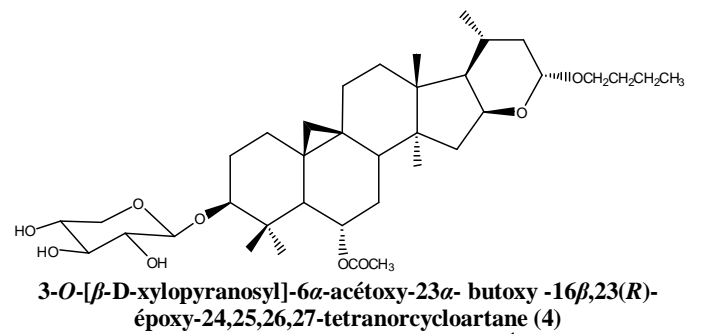
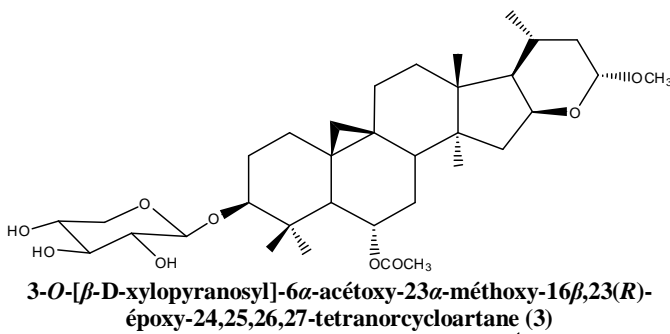
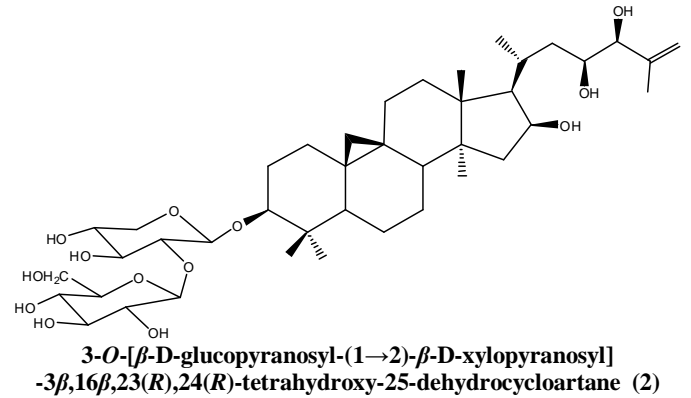
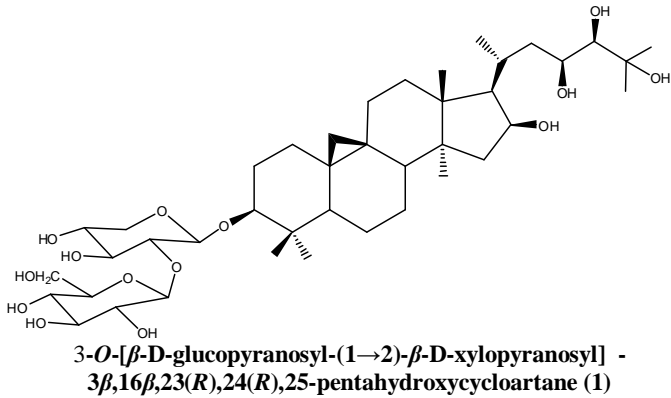
L'élucidation structurale de ces composés a été réalisée au moyen de méthodes d'analyse spectroscopiques impliquant la RMN 1D (^1H , ^{13}C *J*-modulé et DEPT), la RMN 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC, TOCSY, ROESY et NOESY), la spectrométrie de masse ESI et haute résolution HRMS, la mesure des pouvoirs rotatoires et la comparaison avec les données de la littérature.

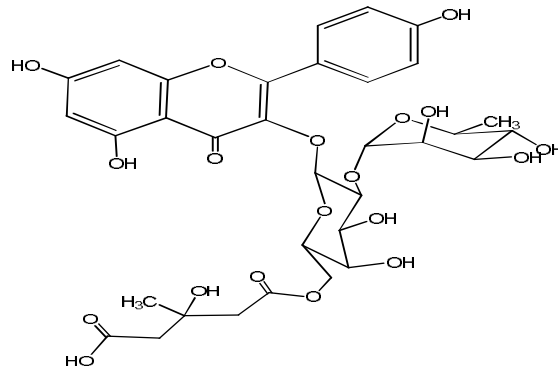
Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail sont en parfait accord avec ceux obtenus antérieurement à l'issue d'études chimiques réalisées sur le genre en question. Ils confirment

une fois de plus la prédominance des saponines triterpéniques, particulièrement à squelette cycloartane.

Les saponines cycloartaniques étant connues pour leurs diverses activités biologiques (immunostimulante, antivirale, cytotoxique, cardiotonique et anti-inflammatoire), des études dans ce sens sur les produits nouveaux sont envisagées.

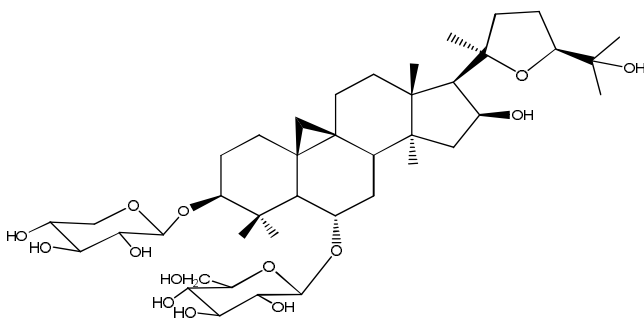
Astragalus gombo



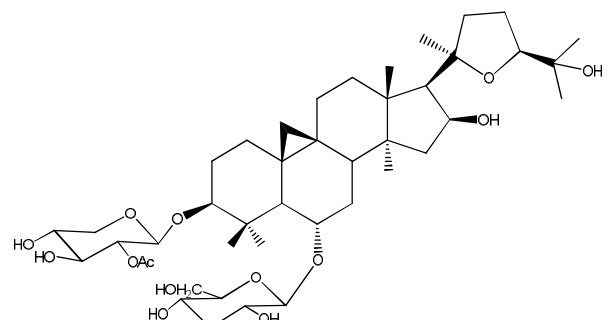


Kaempférol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[6-*O*-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)- β -D-galactopyranoside] (9)

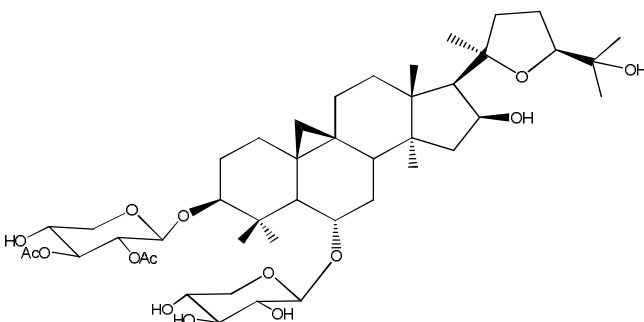
Astragalus depressus



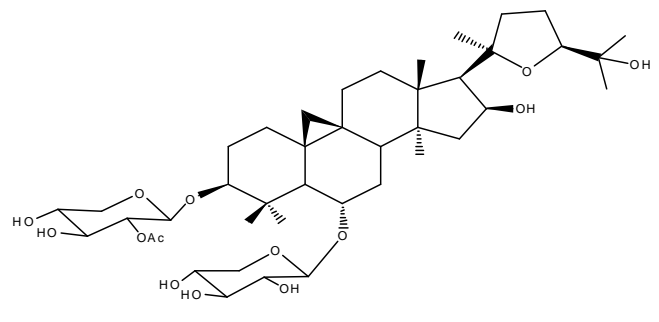
Astrasieversianine XIV (10)



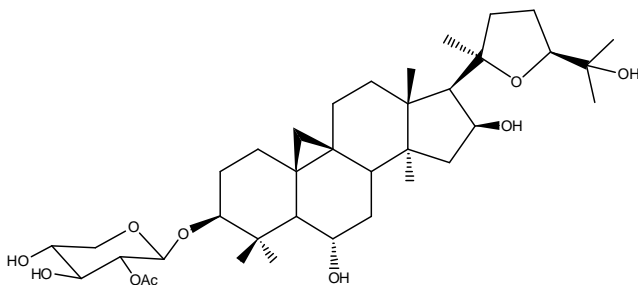
Astrasieversianine VIII (11)



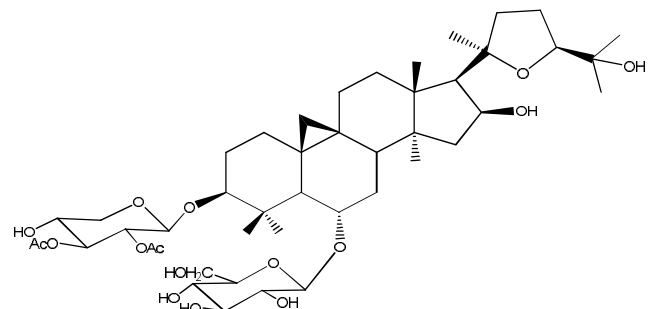
Astrasieversianine II (12)



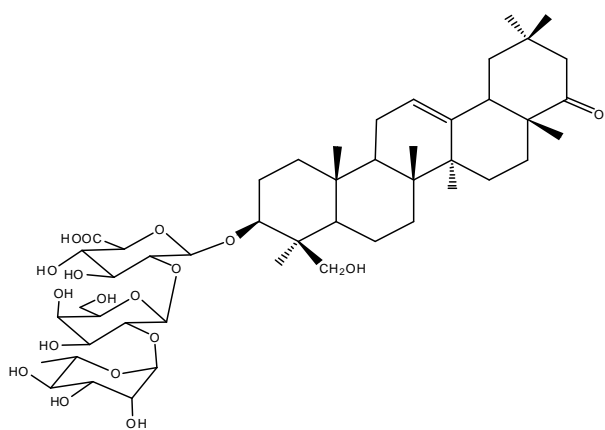
Astrasieversianine VI (13)



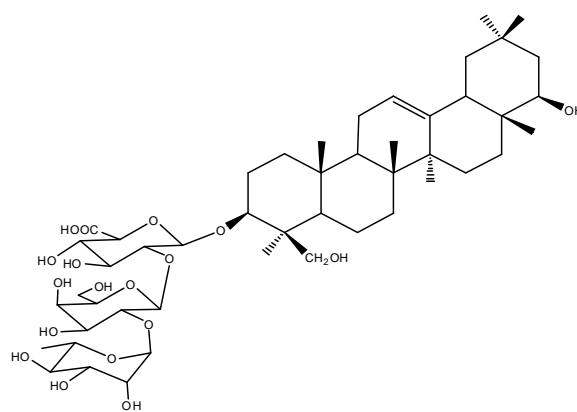
Cyclogaléginoside A (14)



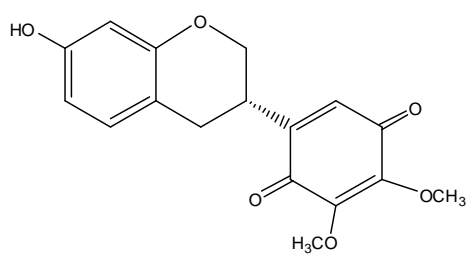
Astrasieversianine IV (15)



Dehydrosoyasaponine I (16)



Soyasaponine I (17)



Pendulone (18)

CHAPITRE V

Partie expérimentale

V.1 Matériels et appareillage

V.1.1 Récolte des plantes *A. gombo* Coss & Dur. et *A. depressus* L.

La plante *Astragalus gombo* Coss & Dur. a été récoltée en mai 2009 dans la région de Biskra. *Astragalus depressus* L. a été récoltée en mai 2011 dans la région de Khenchela. Elles ont été identifiées par le Professeur Bachir Oudjehih de l'Institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques relevant de l'Université de Batna.

V.1.2 Techniques préparatives de séparation

V.1.2.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les chromatographies analytiques CCM ont été effectuées sur des plaques en verre ou aluminium recouvertes de silice.

Support aluminium: en phase normale, Kieselgel 60 F254 Merck, 250 µm (20 x 20 cm).

Support verre:

- En phase normale, Kieselgel 60 F254 Merck, 250 µm (10 ou 20 x 20 cm).
- En phase inverse, RP 18 F254S, 200 µm Merck (5 x 10, 10 x 20 cm).

Le révélateur utilisé est un mélange d'acides (acide sulfurique 25 % et acide acétique 25%) et d'eau (50 %).

Les purifications par CCE préparative ont été réalisées sur des plaques en verre recouvertes de silice Kieselgel 60 F254 Merck, 250 µm (20 x 20 cm).

V.1.2.2 Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique généralement utilisée pour obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut, est rapide et a surtout l'avantage de consommer moins de solvants comparativement aux méthodes chromatographiques classiques. La silice Kieselgel Merck (70-230 mesh, 63-200 µm) ou bien la silice greffée Lichroprep RP-18 Merck (40-63 µm), sont mises dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n° 4.

V.1.2.3 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

V.1.2.3.a Chromatographie d'adsorption

Le fractionnement est réalisé par chromatographie d'adsorption sur une phase stationnaire de silice Kieselgel Merck (70-230 mesh). La quantité de silice utilisée est généralement 40 fois supérieure à la quantité de l'échantillon à purifier. La taille de la colonne

(diamètre et longueur) a été choisie en fonction de la quantité d'extraits ou de fractions à séparer. Les échantillons ont été introduits sous forme de dépôt solide (enrobage).

V.1.2.3.b Chromatographie d'exclusion

Les chromatographies d'exclusion ou filtration sur gel ont été réalisées comme étapes de fractionnement visant à séparer les molécules par leur volume et polarité d'une part et d'autre part éliminer les pigments contenus dans les échantillons. Elles ont été effectuées sur Sephadex LH-20 dans le chloroforme (phase mobile).

Les échantillons à séparer ont été introduits sous forme liquide après dissolution dans un volume d'éluant le plus petit possible, et éventuellement filtration. Le suivi des séparations et le rassemblement final des fractions ont été faits sur la base d'analyses par CCM.

V.1.2.4 Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP)

L'appareillage est constitué d'une chaîne chromatographique Dionex, pilotée par le logiciel Chromeleon version 6.01. La chaîne est équipée d'une pompe quaternaire P580 A avec dégazeur intégré, d'un passeur d'échantillon ASI 100, d'un détecteur UV/Visible à barrette de diodes UVD 170S/340S et d'une colonne thermostatée par un four STH 585. La colonne employée est CLHP semi-préparative: Colonne X-Terra RP18 (19 x 250 mm), 10 μ m.

Les conditions d'élution sont :

- Mode : gradient
- Système de solvants : H₂O-ACN
- Débit = 20 ml/min
- Température = 25 °C
- Détection : λ = 205 et 250 nm

V.1.3 Chimie structurale

V.1.3.1 Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire des composés a été déterminé au moyen d'un polarimètre de type Perkin-Elmer 241 à 20 °C.

La mesure a été réalisée dans une cuve de 1 ml et d'une longueur de 10 cm, en utilisant la raie D du sodium (589 nm) comme source lumineuse. Le solvant de solubilisation ainsi que la concentration de l'échantillon sont indiqués dans chaque cas. La valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D$) est exprimée en degrés.

V.1.3.2 Spectrométrie de masse

Les spectres de masse basse résolution ESI-MS et haute résolution HR-ESI-MS sont obtenus par electrospray (ESI) sur des spectromètres thermofinnigan MSQ et Micromasse Q-TOF respectivement, en m/z .

V.1.3.3 Spectroscopie de RMN

Les spectres RMN ont été enregistrés sur deux appareils BRUKER Avance DRX-600 et 500. Les microprogrammes BRUKER et le logiciel de traitement des données (XWIN-NMR 2.6) sont appliqués. Les solvants deutérés de solubilisation des produits pour la réalisation des spectres sont précisés à chaque fois. Les spectres RMN ^1H sont enregistrés à 600 et 500 MHz alors que les spectres RMN ^{13}C le sont à 125 et 150 MHz.

V.2 Etude de l'espèce *Astragalus gombo*

V.2.1 Extraction

1000 g des parties aériennes de l'espèce *A. gombo* préalablement séchées et pulvérisées, sont mis en macération dans l'éthanol à 70 % (10 litres, 2 fois) pendant 48 h à la température ambiante. Le mélange est ensuite filtré et concentré. La phase aqueuse résultante subit une extraction liquide-liquide, d'abord par l'éther de pétrole (500 ml, 3 fois) puis l'acétate d'éthyle (500 ml, 3 fois) et enfin le butanol (500 ml, 3 fois). L'évaporation à sec des phases organiques a permis de recueillir les masses suivantes: 2,5 g pour l'extrait étheropétrolique, 9,5 g pour l'extrait AcOEt et 25 g pour l'extrait butanolique. Les CCM réalisées sur les trois extraits dans différents systèmes de solvants, mettent en relief la richesse de l'extrait butanolique en métabolites secondaires.

V.2.2 Fractionnement et purification de l'extrait *n*-butanol

Le fractionnement de l'extrait butanolique (14 g) a été réalisé initialement par chromatographie liquide sous vide VLC en utilisant le gel de silice greffée en C-18 (RP-18) comme phase stationnaire. L'élution est effectuée avec un gradient de solvants méthanol-eau allant de 20-80 à 100-0. Les fractions de 50 ml récoltées à chaque fois sont rassemblées en 14 fractions (F1 à F14), sur la base de l'analyse CCM. Le fractionnement de l'extrait butanolique de *Astragalus gombo* est présenté dans le tableau suivant (Tableau V.1).

Tableau V.1: Fractionnement de l'extrait *n*-butanol

Eluant colonne		Fractions	Eluant CCM	Poids en mg
MeOH/H ₂ O	20-80	F1	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 7/3/0,5	4023
	20-80	F2		1459
	20-80	F3		2430
	20-80	F4		379
	40-60	F5		342
	40-60	F6		561
	60-40	F7	CHCl ₃ /MeOH 7/3	460
	60-40	F8		356
	60-40	F9		307
	80-20	F10		679
	80-20	F11		300
MeOH	100	F12	CHCl ₃ /MeOH 8/2	260
		F13		300
		F14		130

La fraction F10 (679 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution menée dans un mélange CH₂Cl₂-MeOH (99:1, 97:3, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30 et 60:40) a donné 8 sous-fractions (F10-1 à F10-8). La sous-fraction F10-1 (166 mg) soumise à une purification par HPLC semi-préparative dans le système de solvants ACN-H₂O (50:50, 100:0) a abouti à l'isolement des composés **3** (80,7 mg) et **4** (32,4 mg).

La purification de la sous-fraction F10-3 (95 mg) par HPLC semi-préparative éluee par un gradient de solvants ACN-H₂O (25:75, 56:44, 100:0) a permis d'obtenir 4 produits: **1** (2 mg), **2** (2,5 mg), **5** (2,9 mg) et **6** (5,9 mg).

La fraction F11 (300 mg) soumise à une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 dans CHCl₃, a permis de recueillir 5 sous-fractions (F11-1 à F11-5). La purification de la sous-fraction F11-2 (50 mg) sur plaques préparatives de silice normale dans un mélange CHCl₃-MeOH (90:10), a abouti à l'isolement du composé **7** (15 mg).

La fraction F4 (379 mg) est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale avec comme éluant un mélange CHCl₃-MeOH (100:0, 90:10, 80:20, 75:25, 70:30). Les fractions recueillies sont rassemblées, selon leur profil CCM, en 10 sous-fractions (F4-1 à F4-10). La sous-fraction F4-8 (20 mg) a fait l'objet d'une purification par HPLC semi-préparative dans le système de solvants H₂O-acétonitrile (80:20, 70:30). Cette purification a permis d'obtenir les deux composés **8** (5 mg) et **9** (7 mg).

V.2.3 Composés isolés de l'espèce *Astragalus gombo*

V.2.3.1 Composé 1

3-*O*-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl]-
3β,16β,23(*R*), 24(*R*),25-pentahydroxycycloartane

Formule brute: C₄₁H₇₀O₁₄

Masse moléculaire: 786 uma

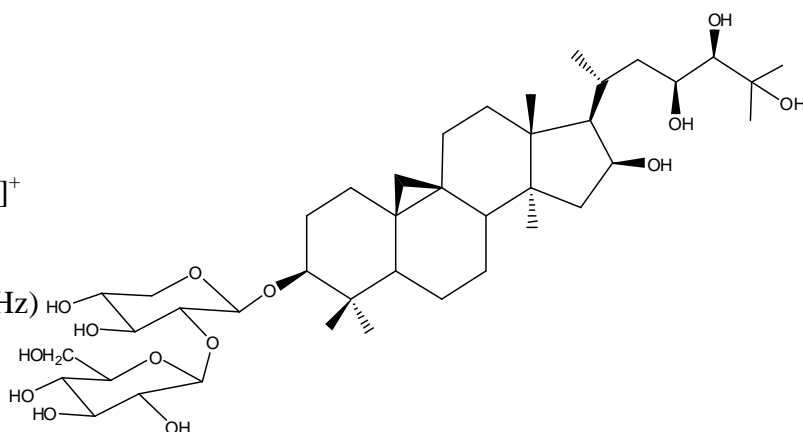
[α]_D + 30,0; (C = 0,33, MeOH)

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 809 [M+Na]⁺

R_t = 5,851 min

RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz)

dans CD₃OD (Tableau III.1, pages 51-52)



V.2.3.2 Composé 2

3-*O*-[β-D-glucopyranosyl-(1→2)-β-D-xylopyranosyl]-
3β,16β,23 (*R*),24(*R*)- tetrahydroxy-25-dehydrocycloartane

Formule brute : C₄₁H₆₈O₁₃

Masse moléculaire : 768 uma

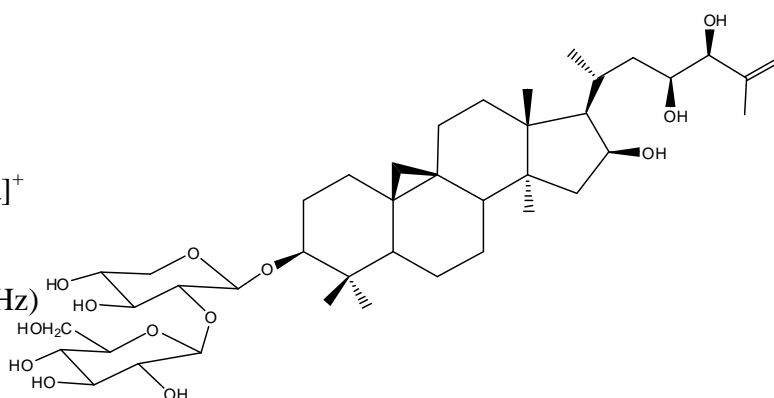
[α]_D - 2,4; (C = 1,66, MeOH)

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 791 [M+Na]⁺

R_t = 6,678 min

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans CD₃OD (Tableau III.2, pages 58-59)



V.2.3.3 Composé 3

3-*O*-[β -D-xylopyranosil]-6 α -acétoxy-23 α -méthoxy-
16 β ,23(*R*)-époxy-24,25,26,27-tetranorcyloartane

Formule brute : C₃₄H₅₄O₉

Masse moléculaire : 606 uma

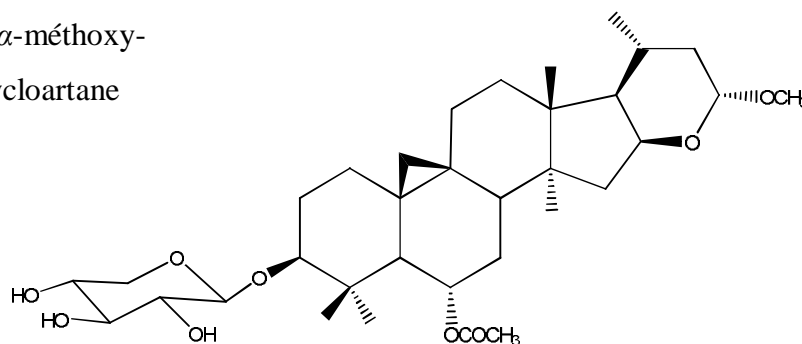
[α]_D – 20,8; (C = 2,5, CH₂Cl₂/MeOH)

R_t = 9,521 min

MS: ESI (mode positif) *m/z* : 629 [M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans CDCl₃ (Tableau III.3, page 70)



V.2.3.4 Composé 4

3-*O*-[β -D-xylopyranosil]-6 α -acétoxy-23 α -butoxy –
16 β ,23(*R*)-époxy-24,25,26,27-tetranorcyloartane

Formule brute : C₃₇H₆₀O₉

Masse moléculaire: 648 uma

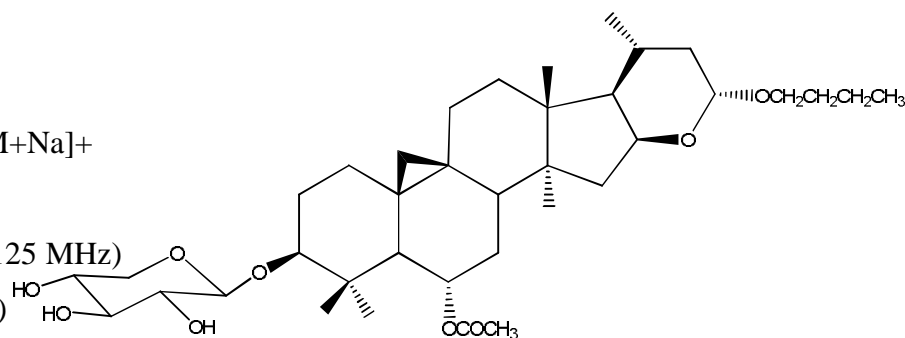
[α]_D – 5,5; (C = 4,0, MeOH)

MS: ESI (mode positif) *m/z*: 671 [M+Na]⁺

R_t = 12,346 min

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans CDCl₃ (Tableau III.4, page 76)



V.2.3.5 Composé 5

3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosil]-
6 α -acétoxy-23 α -méthoxy-16 β ,23(*R*)-époxy-24,25,26,27-tetranorcyloartane

Formule brute : C₄₀H₆₄O₁₄

Masse moléculaire : 768uma

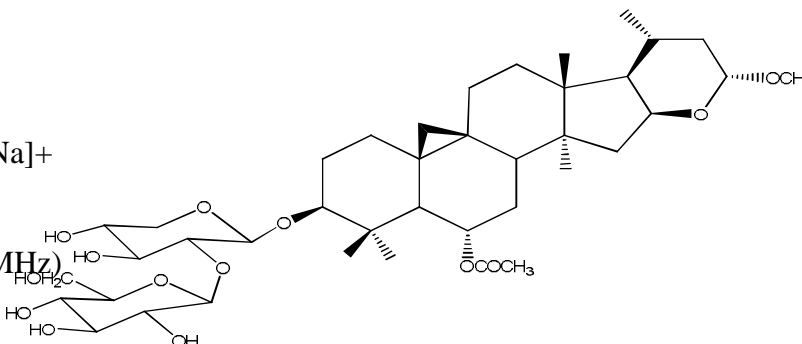
[α]_D – 14,5; (C = 1,93, MeOH)

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 791 [M+Na]⁺

R_t = 7,743 min

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans CD₃OD (Tableau III.I5, page 82)



V.2.3.6 Composé 6

3-*O*-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosil]-
23 α -méthoxy-16 β ,23(*R*)-époxy-24,25,26,27-tetranorcycloartane

Formule brute : C₄₀H₆₄O₁₄

Masse moléculaire : 710 uma

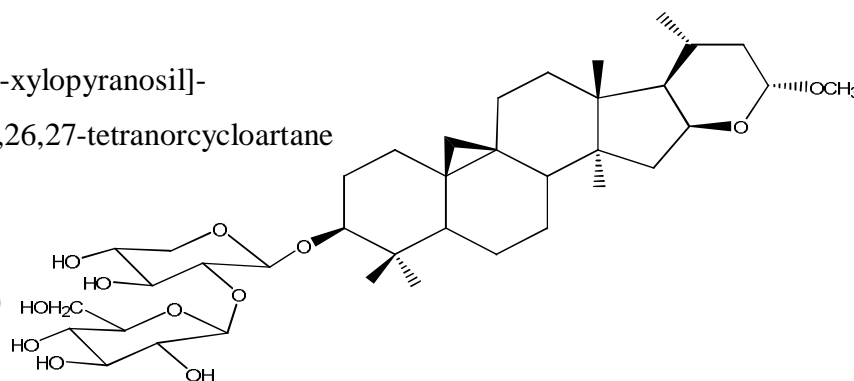
[α]_D -28,5; (C = 2,95, CH₂Cl₂/MeOH)

R_t = 8,728 min

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 733 [M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans DMSO-d₆ (Tableau III.6, page 87)



V.2.3.7 Composé 7

Tomentoside II

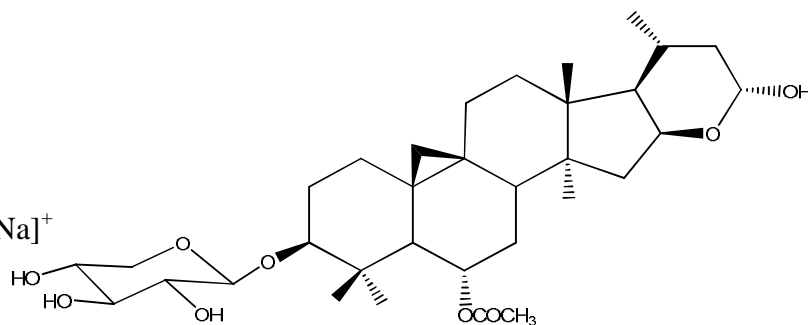
Formule brute: C₃₃H₅₂O₉

Masse moléculaire: 592 uma

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 615 [M+Na]⁺

RMN ¹H (500 MHz) et RMN ¹³C (125 MHz)

dans CD₃OD (Tableau III.7, page 92)



V.2.3.8 Composé 8

Kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-
 β -D-galactopyranoside

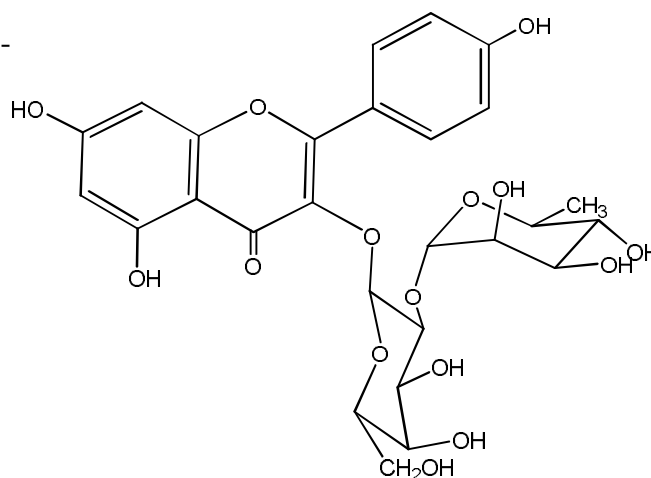
Formule brute: C₂₇H₃₀O₁₆

Masse moléculaire: 594 uma

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 617 [M+Na]⁺

RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz)

dans (CD₃OD) (Tableau III.8, pages 100-101)



V.2.3.8 Composé 9

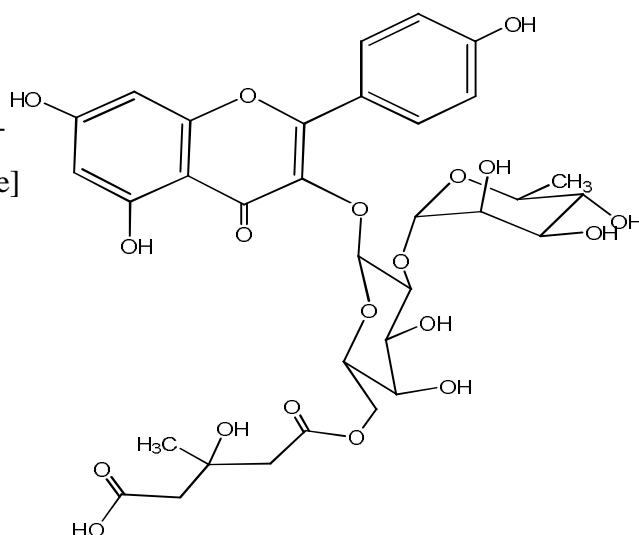
Kaempférol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[6-*O*-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)- β -D-galactopyranoside]

Formule brute: C₃₃H₃₈O₁₉

Masse moléculaire: 738 uma

MS : ESI (mode positif) *m/z* : 761 [M+Na]⁺

RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) dans CD₃OD) (Tableau III.9, pages 105-106)



V.3 Etude de l'espèce *Astragalus depressus*

V.3.1 Extraction

La plante entière (800 g) de *Astragalus depressus* réduite en poudre est soumise à une double macération dans l'éthanol à 70 % (2 x 8 litres) pendant 48 h à la température ambiante. Après filtration et évaporation du solvant, la phase aqueuse résultante subit une extraction liquide-liquide, par l'éther de pétrole (400 ml, 3 fois) puis l'acétate d'éthyle (400 ml, 3 fois) et enfin le butanol (400 ml, 3 fois). L'évaporation à sec des solutions organiques a permis de recueillir les masses suivantes: 3 g pour l'extrait étheropétrolique, 8 g pour l'extrait AcOEt et 40 g pour l'extrait butanolique. Les CCM effectuées sur les trois extraits dans plusieurs systèmes de solvants révèlent la richesse des deux extraits acétate d'éthyle et butanolique en produits.

V.3.2 Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle

7g de l'extrait acétate d'éthyle des racines de cette plante ont été soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC), en utilisant comme phase stationnaire le gel de silice normale. L'élution est réalisée initialement par le chloroforme dont on augmente la polarité par addition de méthanol (100-0 à 70-30), puis de l'eau (70-30-0 à 50-50-10). A l'issue de ce fractionnement, 10 fractions ont été recueillies (F1-F10). Le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de *Astragalus depressus* est présenté dans le tableau suivant (Tableau V.2).

Tableau V.2: Fractionnement de l'extrait AcOEt

Eluant colonne		Fractions	Eluant CCM	Poids en mg
CHCl ₃ /MeOH	100	F1	CHCl ₃ /MeOH 9-1	201
	99-1			
	97-3	F2		159
	95-5	F3		499.5
	93-7	F4		1296.8
	90-10			
	80-20	F5		1342.2
	70-30	F6		2385.8
	70-30			
CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O	70-30-1	F7	CHCl ₃ /MeOH 8-2	614.7
	70-30-3			
	70-30-5	F8		303.3
	70-30-7			
	60-40-7	F9		208.4
	50-50-1	F10		142.4

La fraction F4 (1297 mg) est mise à chromatographier sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'éluion est réalisée par le mélange CHCl₃/MeOH (100-0 à 80-20). Les fractions recueillies sont rassemblées selon l'analyse CCM en phase normale (éluant: CHCl₃/MeOH : 95/5), donnant 8 sous fractions (F4-1 à F4-8).

La sous fraction F4-5 (175 mg) soumise à une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 dans le chloroforme, a permis d'isoler les composés **18** (15 mg) et **15** (5 mg) à l'état pur.

La fraction F5 (1342 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale avec un gradient d'éluion CHCl₃/MeOH (100-0 à 80-20), pour donner 15 fractions (F5-1 à F5-15). La fraction F5-6 (130 mg) est purifiée sur une colonne de Sephadex LH-20 dans le chloroforme, pour conduire au composé **12** (7 mg). La fraction F5-2 (38 mg) a aussi subi une purification sur une colonne de gel de silice en phase normale dans un mélange CHCl₃/MeOH (97:3 à 93:7), aboutissant à l'isolement du composé **14** (5,8 mg).

Une chromatographie sur colonne de gel de silice normale effectuée sur la fraction F5-9 (34 mg), au moyen d'un mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (100:0 à 93:7), a permis l'isolement du composé **13** (4 mg).

La fraction F7 (614 mg) a été fractionnée sur une colonne de gel de silice en phase normale dans un système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (100:0 à 90:10), donnant 5 fractions (F7-1 à F7-5).

La fraction F7-4 (25 mg) soumise à une chromatographie sur plaques préparatives de silice normale dans le mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (75-25), a entraîné l'isolement du composé **11** (2 mg).

V.3.3 Fractionnement et purification de l'extrait *n*-butanol

8g de l'extrait butanolique ont été soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice greffée en C-18 (RP-18). L'élution est effectuée dans un mélange méthanol-eau à différents gradients (20-80 à 100-0). A l'issue de ce fractionnement primaire, 10 fractions (F1 à F10) ont été recueillies (tableau V.3).

Tableau V.3: Fractionnement de l'extrait *n*-butanol

Eluant colonne		Fractions	Eluant CCM	Poids en mg
MeOH/ H ₂ O	20-80	F1	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 7/3/0,5	3800
	20-80			
	40-60	F2		305
	40-60			
	60-40	F3		268
	60-40			
	80-20	F4		545
	80-20			
MeOH	100	F5		330
		F6		150
		F7	90	
		F8	66	
		F9	30	
		F10	25	

La fraction F4 d'un poids de 545 mg est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale. L'élution menée dans un mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (100-0 à 40-60) a permis d'obtenir 20 fractions (F4-1 à F4-20).

La précipitation dans l'acétone de la sous fraction F4-7 (50 mg) a permis de recueillir à l'état pur le composé **10** (10 mg).

La sous fraction F4-14 (26,6 mg) est purifiée à son tour sur plaques préparatives RP-18 dans le mélange $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (80:20), fournissant le composé **17** (5 mg).

La fraction F5 (330 mg) est mise à chromatographier sur une colonne de gel de silice normale. L'élution réalisée par le système $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (90:10:0,5 à 70:30:3), a permis de recueillir le composé **16** pur (3 mg).

V.3.4 Composés isolés de l'espèce *Astragalus depressus* L.

VI.3.4.1 Composé 10

Astrasieversianine XIV

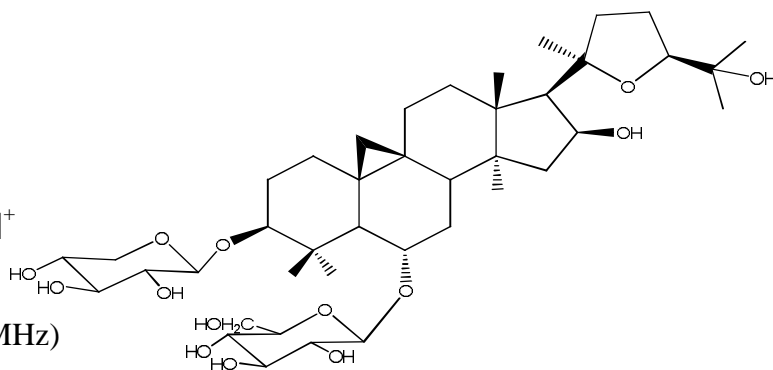
Formule brute : $\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{O}_{14}$

Masse moléculaire: 784 uma

$[\alpha]_{\text{D}} +24,1^\circ$ (C = 0,19, MeOH)

MS : ESI (mode positif) m/z : 807 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

RMN ^1H (600 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz)
dans CD_3OD (Tableau IV.1, pages 123-124)



V.3.4.2 Composé 11

Astrasieversianine VIII

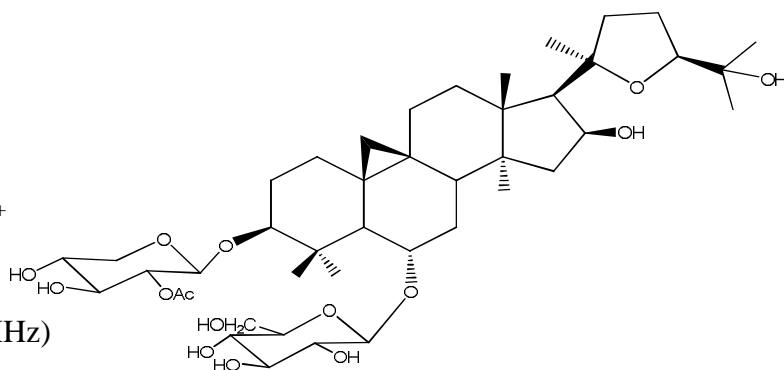
Formule brute : $\text{C}_{43}\text{H}_{70}\text{O}_{15}$

Masse moléculaire : 826 uma

$[\alpha]_{\text{D}} +25,2^\circ$ (C = 0,16, MeOH)

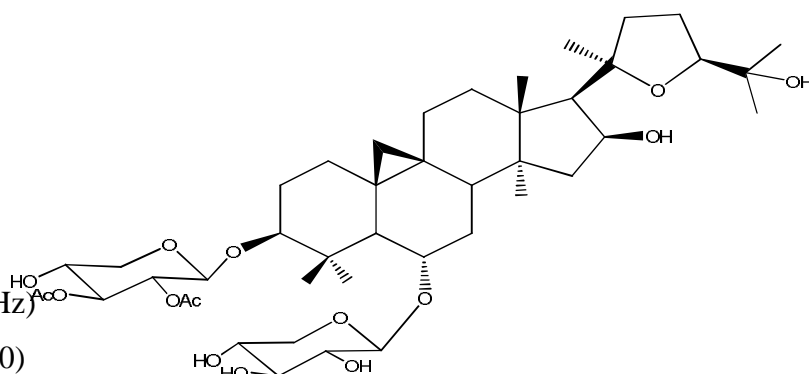
MS : ESI (mode positif) m/z : 849 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

RMN ^1H (600 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz)
dans CD_3OD (Tableau IV.2, pages 130-131)



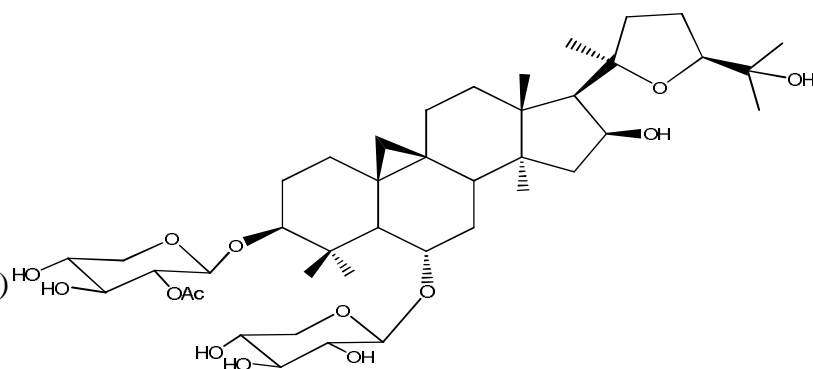
V.3.4.3 Composé 12

Astrasierversianine II

Formule brute : C₄₄H₇₀O₁₅**Masse moléculaire** : 838 uma**[α]_D** +13,7° (C = 0,58, MeOH)**MS** : ESI (mode positif) *m/z*: 861 [M+Na]⁺RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz)dans CD₃OD (Tableau IV.3, pages 139-140)

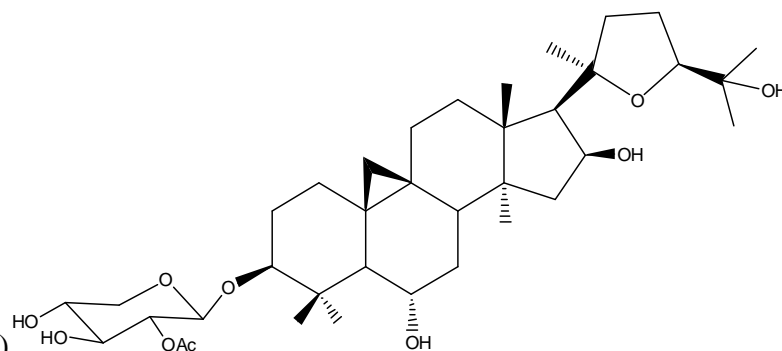
V.3.4.4 Composé 13

Astrasierversianine VI

Formule brute : C₄₂H₆₄O₁₄**Masse moléculaire** : 796**[α]_D** +15,0° (C = 0,22, MeOH)**MS** : ESI (mode positif) *m/z*: 819 [M+Na]⁺RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz)dans CD₃OD (Tableau IV.4, pages 144-145)

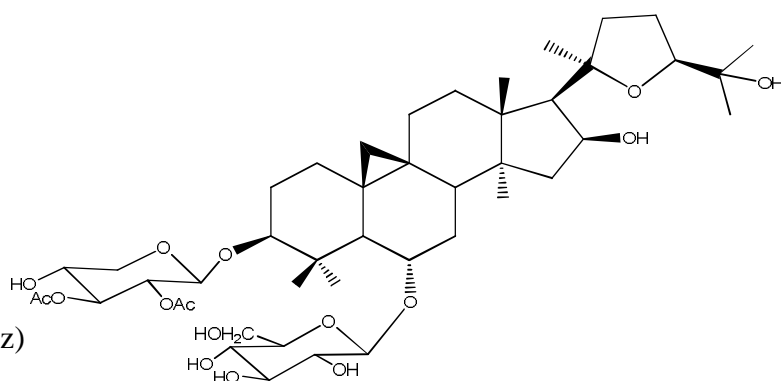
V.3.4.5 Composé 14

Cyclogaléginoside A

Formule brute : C₃₇H₅₆O₁₀**Masse moléculaire** : 664 uma**[α]_D** +36,1° (C = 0,31, MeOH)**MS** : ESI (mode positif) *m/z*: 687 [M+Na]⁺RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz)dans CD₃OD (Tableau IV.5, pages 150-151)

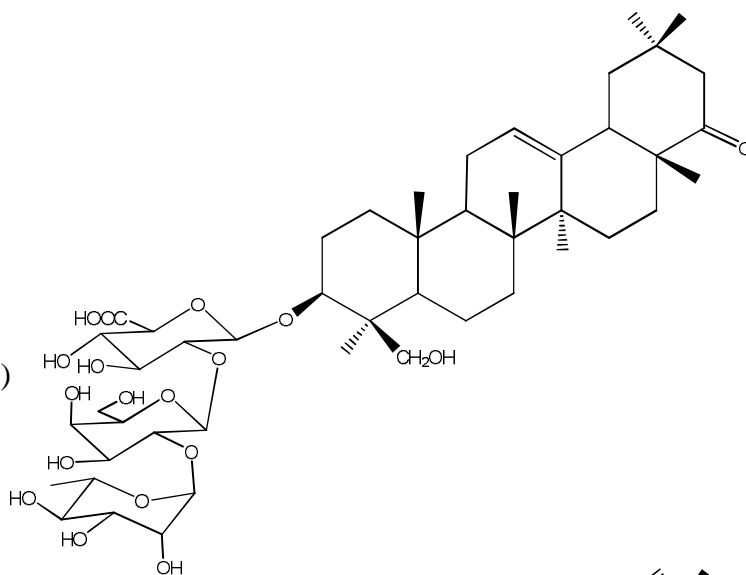
V.3.4.6 Composé 15

Astrasierversianine IV

Formule brute : C₄₅H₇₂O₁₆**Masse moléculaire** : 868 uma**[α]_D** +10,7° (C = 0,25, MeOH)**MS** : ESI (mode positif) *m/z*: 891 [M+Na]⁺RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz)dans CDCl₃+ CD₃OD (Tableau IV.6, pages 153-154)

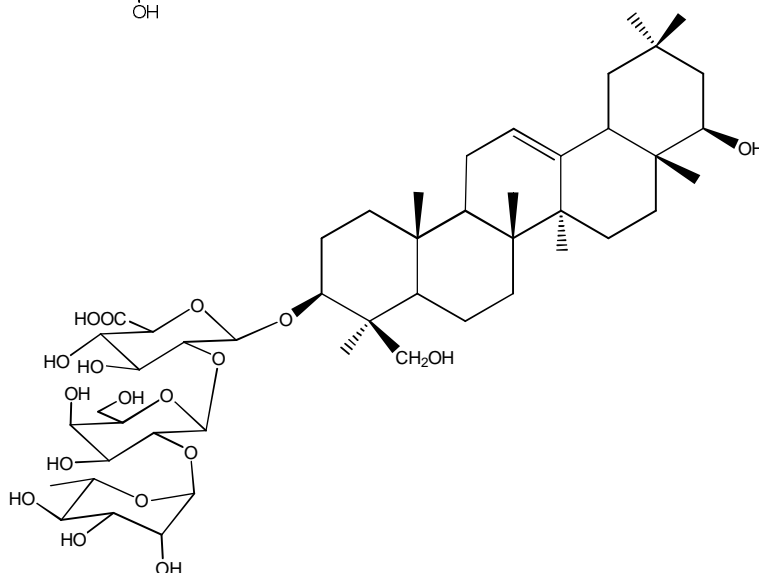
V.3.4.7 Composé 16

Dehydrosoyasaponine I

Formule brute : $C_{48}H_{76}O_{18}$ **Masse moléculaire** : $M = 940$ um $[\alpha]_D -15,2^\circ$ ($C = 0,23$, MeOH)**MS** : ESI (mode positif) m/z : 963 $[M+Na]^+$ RMN 1H (600 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz)
dans CD_3OD (Tableau IV.7, pages 167-168)

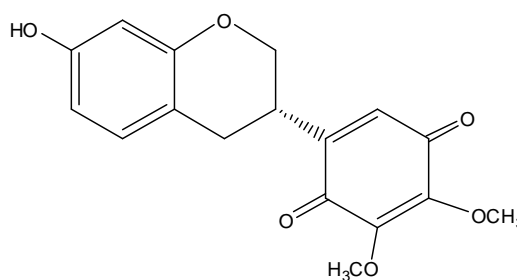
V.3.4.8 Composé 17

Soyasaponine I

Formule brute : $C_{48}H_{78}O_{18}$ **Masse moléculaire** : $M = 942$ $[\alpha]_D - 3,3^\circ$ ($C = 0,36$, MeOH)**MS** : ESI (mode positif) m/z : 965 $[M+Na]^+$ RMN 1H (600 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz)
dans CD_3OD (Tableau IV.8, pages 171-172)

V.3.4.9 Composé 18

Pendulone

Formule brute : $C_{17}H_{16}O_6$ **Masse moléculaire** : 316 $[\alpha]_D -70,3^\circ$ ($C = 0,81$, MeOH)**MS** : ESI (mode positif) m/z : 339 $[M+Na]^+$ RMN 1H (600 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz)
dans $(CDCl_3)$ (Tableau IV.9, page 178)

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Wojciechowski, M. F., Lavin, M., Sanderson, M. J., 2004. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *MATK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany* 11, 1846–1862.
- [2] Cavin, A. L., 2007. Contribution à la connaissance taxonomique et chimique de fruits africains du genre *Detarium* (Fabaceae - Caesalpinioideae) : *D. microcarpum* Guill. et Perr. et des formes comestibles et toxiques de *D. senegalense* J.F. Gmel. Thèse de doctorat. Université de Genève.
- [3] Ozenda, P., 1991. Flore et végétation du Sahara. In: CNRS (Ed.), Paris, France.
- [4] Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1–2. Paris. France.
- [5] Davis, P. H., 1970. Flora of Turkey and East Aegean Islands, vol. 3. University Press, Edinburg, pp. 49–254.
- [6] Tang, W., Eisenbrand, G., 1992. Chinese drugs of plant origin: chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine. Berlin: Springer-Verlag.
- [7] Leung, A. Y., Foster, S., In: Leung A. Y, Foster S, editors. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics. 2nd ed. New York: Wiley; 1996. p. 50.
- [8] Upton, R., Petrone, C., 1999. Santa Cruz: American Herbal Pharmacopoeia.
- [9] Kitagawa, I., Wang, H. K., Katagi, A., Fuchida, M., Miura, I., Yoshikawa, M., 1983. Chemical constituents of *Astragalus radix*, the root of *Astragalus membranaceus* Bunge. (1). Cycloastragenol, the 9,19-cyclolanostane-type aglycone astragalosides, and the artifact aglycone astragenol. *Chem. Pharm. Bull.* 31, 689–697.
- [10] Kim, C., Ha, H., Kim, J. S., Kim, Y. T., Kwon, S.C., Park, S.W., 2003. Induction of growth hormone by the roots of *Astragalus membranaceus* in pituitary cell culture. *Archives of Pharmacal Research* 26, 34–39.
- [11] Bellakhdar, J., 1997. La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, Ibis Press.
- [12] Gariboldi, P., Pelizzoni, F., Tato, M., Verotta, L., El-Sebakhy, N. A., Asaad, A. M., Abdallah, R. M., Toaima, S. M., 1995. Cycloartane triterpene glycosides from *Astragalus trigonus*. *Phytochemistry* 40, 1755–1760.
- [13] Evans, W.C., 1998. Trease and Evans Pharmacognosy, 14th. ed. W. B. Saunders, Philadelphia, PA, p. 40.

- [14] Boulos, L., 1999. Flora of Egypt, first ed. Alhadara Publishing, Cairo, Egypt, pp. 230–336.
- [15] Rios, L. J., Waterman, G. P., 1997. A review of the pharmacology and toxicology of *Astragalus*. *Phytotherapy Res.* 11, 411–418.
- [16] Verotta, L., El-Sebakhy, N. A., 2001. Studies in Natural Products Chemistry: Bioactive Natural Products, vol. 25. Elsevier, Amsterdam (Part F), pp. 179–234.
- [17] Radwan, M. M., El-Sebakhy, N. A., Asaad, A. M., Toaima, S. M., Kingston, D. G. I., 2004. Kahiricosides II–V, cycloartane glycosides from an Egyptian collection of *Astragalus kahiricus*. *Phytochemistry* 65, 2909–2913.
- [18] Gülcemal, D., Alankuş-Çalışkan, Ö., Perrone, A., Özgökçe, F., Piacente, S., Bedir, E., 2011. Cycloartane glycosides from *Astragalus aureus*. *Phytochemistry* 72, 761–768.
- [19] Polat, E., Caliskan-Alankus, O., Perrone, A., Piacente, S., Bedir, E., 2009. Cycloartane-type glycosides from *Astragalus amblolepis*. *Phytochemistry* 70, 628–634.
- [20] Yalçın, F. N., Piacente, S., Perrone, A., Capasso, A., Duman, H., Çalış, I., 2012. Cycloartane glycosides from *Astragalus stereocalyx* Bornm. *Phytochemistry* 73, 119–126.
- [21] Karabey, F., Khan, I. A., Bedir, E., 2012. Cycloartane-type glycosides from *Astragalus schottianus*. *Phytochemistry Letters* 5, 320–324.
- [22] Horo, I., Bedir, E., Perrone, A., Özgökçe, F., Piacente, S., Alankuş-Çalışkan, Ö., 2010. Triterpene glycosides from *Astragalus icmadophilus*. *Phytochemistry* 71, 956–963.
- [23] Perrone, A., Masullo, M., Bassarello, C., Bloise, E., Hamed, A., Nigro, P., Pizza, C., Piacente, S., 2008. Unusual cycloartane glycosides from *Astragalus eremophilus*. *Tetrahedron* 64, 5061–5071.
- [24] Horo, I., Bedir, E., Masullo, M., Piacente, S., Özgökçe, F., Alankuş-Çalışkan, Ö., 2012. Saponins from *Astragalus hareftae* (NAB.) SIRJ. *Phytochemistry* 84, 147–153.
- [25] Linneka, J., Mitaine-Offer, A. C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Paululat, T., Avunduk, S., Alankuş-Çalışkan, Ö., Lacaille-Dubois, M. A., 2011. Cycloartane Glycosides from Three Species of *Astragalus* (Fabaceae). *Helvetica Chimica Acta* 94, 230–237.
- [26] Fathiazada, F., Khosropanahb, M. K., Movafeghib, A., 2010. Cycloartane-type glycosides from the roots of *Astragalus caspicus* Bieb. *Natural Product Research* 24, 1069–1078.
- [27] Jan, S., Abbaskhan, A., Musharraf, S. G., Sattar, S. A., Samreen., Resayes, S. I., Al-Othman, Z. A., Al-Majid, A. M., Atta-ur-Rhman., Choudhary, M. I., 2011. Three New Cycloartane Triterpenoids from *Astragalus bicuspis*. *Planta Med.* 77, 1829–1834.

- [28] Lee, D. Y., Noh, H. J., Choi, J., Lee, K. H., Lee, M. H., Lee, J. H., Hong, Y., Lee, S. E., Kim, S. Y., Kim, G. S., 2013. Anti-Inflammatory Cycloartane-Type Saponins of *Astragalus membranaceus*. *Molecules* 18, 3725–3732.
- [29] Denizli, N., Horo, I., Gülcemal, D., Masullo, M., Festa, M., Capasso, A., Koz, Ö., Piacente, S., Alankuş-Çalışkan, Ö., 2014. Cycloartane glycosides from *Astragalus plumosus* var. *krugianus* and evaluation of their antioxidant potential. *Fitoterapia* 92, 211–218
- [30] Djimtombaye, B. J., Alankuş-Çalışkan, Ö., Gülcemal, D., Khan, I. A., Anıl, H., Bedir, E., 2013. Unusual Secondary Metabolites from *Astragalus halicacabus* Lam. *Chemistry & Biodiversity* 10, 1328–1334.
- [31] 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.
- [32] Gülcemal, D., Masullo, M., Napolitano, A., Karayıldırım, T., Bedir, E., Alankuş-Çalışkan, Ö., Piacente, S., 2013. Oleanane glycosides from *Astragalus tauricolus*: Isolation and structural elucidation based on a preliminary liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry profiling. *Phytochemistry* 86, 184–194.
- [33] Chen, J., Li, Y., Yang, L. Q., Li, Y. Z., Nan, Z. B., Gao, K., 2012. Biological activities of flavonoids from pathogenic-infected *Astragalus adsurgens*. *Food Chemistry* 131, 546–551.
- [34] Montoro, P., Teyeb, H., Masullo, M., Mari, A., Douki, W., Piacente, S., 2013. LC–ESI-MS quali-quantitative determination of phenolic constituents in different parts of wild and cultivated *Astragalus gombiformis*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 72, 89–98.
- [35] Gromova, A. S., Lutsky, V. I., Cannon, J. G., Li, D., Owen, N. L., 2001. Secondary metabolites of *Astragalus danicus* Retz. and *Astragalus inopinatus* Boriss. *Russian Chemical bulletin* 50, 1107–1112.
- [36] Yahara, S., Kohjyouma, M., Kohoda, H., 2000. Flavonoid glycosides and saponins from *Astragalus shikokianus*. *Phytochemistry* 53, 469–471.
- [37] Yu, D., Duan, Y., Bao, Y., Wei, C., An, L., 2005. Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 89–94.

- [38] Çalis, I., Abou Gazar, H., Piacente, S., Pizza, C., 2000. Secondary Metabolites from the Roots of *Astragalus zahlbruckneri*. *J. Nat. Prod.* 64, 1179–1182.
- [39] Been, M., Bai, Y., Majak, W., 1995. Aliphatic nitro compounds in *Astragalus canadensis*. *Phytochemistry* 40, 1629–1631.
- [40] Bedir, E., Calis, I., Aquino, R., Piacente, S., Pizza, C., 1999. Trojanoside H : cycloartane type glycoside from the aerial parts of *Astragalus trojanus*. *Phytochemistry* 51, 1017–1020.
- [41] Bruneton, J., 2009. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. Ed. Tec & Doc.
- [42] Chawlek, M., 2004. Hémisynthèse de saponosides à hédérágénine, étude de l' influence de la chaîne osidique sur l'activité HémoLytique. Thèse de Doctorat. Université de Reims, France.
- [43] Robinet, F. G., 2004. Métabolites des terpénoïdes chez les caprins. Thèse de Doctorat. Université de Paris, France.
- [44] Malecky, M., 1951. Saponosides stéroïdes et triterpéniques de synthèse. Thèse de Doctorat. Ecole Polytechnique Fédérale, Zurich, Suisse.
- [45] Louis Pergaud, S., 2009. Sphingolipides, Triterpénoïdes et autres métabolites secondaires des variétés sauvage et cultivée de l'espèce *Triumfetta cordifolia* A. Rich. (Tiliaceae): Transformations chimiques et évaluation des propriétés biologiques de quelques composés isolés. Thèse de Doctorat. Université de Yaoundé I, Cameroun.
- [46] Alabdul Magid, A., 2005. Etude chimique de deux *Caryocar* de guyane et d'un *Guioa* de nouvelle calédonié. Thèse de Doctorat. Université de Reims, France.
- [47] Belloum, Z., 2007. Etude phytochimique des plantes médicinales Algériennes, cas de l'espèce *Inula crithmoides* L. Mémoire de Magister. Université Mentouri, Constantine.
- [48] Lacaille-Dubois, M. A., Wagner, H., 1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine* 2, 363–386.
- [49] Lacaille-Dubois, M. A., Wagner, H., 2000. In Atta-Ur-Rhaman, Editor. Bioactive saponins from plants: an update in studies in Natural Product Chemistry Vol.21. Elsevier Amsterdam, 633–687.
- [50] Lacaille-Dubois, M. A., 2005. Bioactive saponins with Cancer related and immunomodulatory activity: recent developments. In: Attar-Ur-Rahman (Ed.). *Stud. Nat. Prod. Chem.* 32, 209–246.
- [51] Lee, Y. N., Lee, H. Y., Kim, S. I., Lee, S. K., Park, B. C., Kim, K. W., 1996. *In vitro* introduction of differentiation by gensenosides in F9 Teratocarcinoma cells. *Eur. J. Cancer.* 32A, 1420–1428.

- [52] Park, J. A., Lee, K. Y., Oh, Y. J., Kim, K. W., Lee, S. K., 1997. Activation of capase-3 protease via a Bcl-2 insensitive pathway during the process of gensenosides Rh2-induced apoptosis. *Cancer Lett.* 121, 73–81.
- [53] Yui, S., Ubukata, K., Hodono, K., Kitahara, M., Mimaki, Y., Kuroda, M., Sashida, Y., Yamasaki, M., 2001. Macrophage-oriented cytotoxic activity of novel triterpene saponins extracted from roots of *Securidaca inappendiculata*. *Int Immunopharmacol.* 1, 1989–2000.
- [54] Gaidi, G., Correira, M., Chauffert, B., Beltramo, J. L., Wagner, M., Lacaille-Dubois, M. A., 2002. Saponins mediated potentiation of cisplatin accumulation and cytotoxic in human colon cells. *Planta Med.* 68, 70–72.
- [55] Hassane, A., 2010. Etude de l'activité antioxydante des saponines du tourteau de l'arganier. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V Agdal, Maroc.
- [56] Arrif, S., 2009. Etude des métabolites secondaires de deux scrophulariacées du genre *Verbascum*: *V. ballii* et *V. dentifolium*. Université Hadj Lakhdar, Batna.
- [57] Gauthier, C., 2008. Amélioration du comportement biopharmaceutique de triterpènes naturels anticancéreux par synthèse de saponines mono- et bidesmosidique. Thèse de Doctorat. Université du Québec, Canada.
- [58] Gauthier, C., 2006. Glycosidation de triterpène pentacyclique de type lupane et évaluation in vitro de leur potentiel anticancéreux. Thèse de Doctorat. Université du Québec., Canada.
- [59] Pengelly, A., 2004. The constituents of medicinal plants. Ed. (2). Australia.
- [60] Portet, B., 2007. Recherche bioguidée de molécules antipaludiques d'une plante guyanaise *Piper hostmannianum* var. *berbicense*. Thèse de Doctorat. Université Toulouse, France.
- [61] Lhuillier, A., 2007. Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *agauria salicifolia* hook. F. Ex. oliver, *agauria polyphyla* baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* baker (Monimiaceae) & *Embelia concina* baker (Myrsinaceae). Thèse de Doctorat. Université Toulouse, France.
- [62] Lawson, A. M., 2006. Etude phytochimique d'une fabacee tropicale, *Lonchocarpus Nicou* evaluation biologique preliminaire. Thèse de Doctorat. Université de Limoges
- [63] Bruneton, J., 1993. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales. 2ième édition Université de Paris- sud, France. pp 389–617.
- [64] Richter, G., 1993. Métabolisme des végétaux (Physiologie et Biochimie). Presses polytechniques et universitaires romandes, Lansanne CH-1015.

- [65] Xu, Y. C., Leung, S. W., Yeung, D. Y., Hu, L. H., Chen, G. H., Che, C. M., Man, R. K., 2007. Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry* 68, 1179–1188.
- [66] Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 20, 933–956.
- [67] Halbwirth, H., 2010. The creation and physiological relevance of divergent hydroxylation patterns in the flavonoid pathway. *International Journal of Molecular Sciences*. 11, 595–621.
- [68] Kale, A., Gawande, S., Kotwal, S., 2008. Cancer phytotherapeutics: role for flavonoids at the cellular level. *Phytotherapy Research* 22, 567–577.
- [69] Mladinka, P., Zatloukalova, L., Filipisky, T., Hrdina R., 2010. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine* 49, 963–975.
- [70] Rufer, C. E., Kulling, S. E., 2006. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different *in vitro* assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2926–2931.
- [71] Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M., 2010. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* 125, 288–306.
- [72] Grayer, R. J., Harborne, J. B., 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. *Phytochemistry* 37, 19–42.
- [73] Cushnie, T. P. T., Lamb, A. J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26, 343–356.
- [74] Jimenez-Gonzalez, L., Alvarez-Corral, M., Munoz-Dorado, M.; Rodriguez-Garcia, I., 2008. Pterocarpan : interesting natural products with antifungal activity and other biological properties. *Phytochemistry Reviews* 7, 125–154.
- [75] benchelah, A. C., Bouziane, H., Make, M., Ouahès, C., 2000. *Fleurs du Sahara*. Paris, Ibis, Press.
- [76] Munarai, C., 2006. Investigation phytochimique de plantes alpines. Thèse de Doctorat. Université de Genève, Suisse.
- [77] Pistelli, L., Pardossi, S., Flamini, G., Bertoli, A., Manunta, A., 1997. Three cycloastragenol glucosides from *Astragalus verrucosus*. *Phytochemistry* 45, 585–587.
- [78] Bedir, E., Çalis, I., Aquino, R., Piacente, S., Pizza, C., 1998. Cycloartane triterpene glycosides from the roots of *Astragalus brachypterus* and *Astragalus microcephalus*. *J.*

- Nat. Prod. 61, 1469–1472.
- [79] Zhou, Y., Hirotani, M., Rui, H., Furuya, T., 1995. Two triglycosidic triterpene astragalosides from hairy root cultures of *Astragalus membranaceus*. *Phytochemistry* 38, 1407–1410.
- [80] Verotta, L., Tato, M., El-Sebakhy, N. A., Toaima, S. M., 1998. Cycloartane triterpene glycosides from *Astragalus sieberi*. *Phytochemistry* 48, 1403–1409.
- [81] Pascal, S., Taton, M., Rahier, A., 1993. Plant sterol biosynthesis. *The journal of biological chemistry* 268, 11639–11654.
- [82] Mamedova, R. P., Agzamova, M. A., Turgunov, K. K., Tozhiboev, A., Tashkhodzhaev, B., Isaev, I., 2006. Triterpene glycosides of *Astragalus* and their genins. LXXII. X-Ray crystal structure of cycloorbicoside D. *Chemistry of Natural Compounds* 42, 501–502.
- [83] Abdallah, R. M., Ghazy, N. M., Asaad, A. M., El-Sebakhy, N. A., Pirillo, A., Verotta, L., 1994. Constituents of the Egyptian *Astragalus tomentosus* Lam. *Pharmazie* 49, 377–378.
- [84] Yasukawa, K., Takido, M., 1987. A flavonol glycoside from *Lysimachia mauritiana*. *Phytochemistry* 26, 1224–1226.
- [85] Jung, K. Y., Do, J. C., Son, K. H., 1993. Kaempferol 3-*O*-[6-*O*-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl)glucoside] from leaves of polygala japonica. *Phytochemistry* 34, 1196–1197.
- [86] Porter, E. A., Van den Bos, A. A., Kite, G.C., Veitch, N.C., Simmonds, M.S.J., 2012. Flavonol glycosides acylated with 3-hydroxy-3-methylglutaric acid systematic characters in *Rosa*. *Phytochemistry* 81, 90–96.
- [87] Polat, E., Bedir, E., Perrone, A., Piacente, S., Alankus-Caliskan, O., 2010. Triterpenoid saponins from *Astragalus wiedemannianus* Fischer. *Phytochemistry* 71, 658–662.
- [88] Çalış, İ., Dönmez, A. A., Perrone, A., Pizza, C., Piacente, S., 2008. Cycloartane glycosides from *Astragalus campylosema* Boiss. ssp. *campylosema*. *Phytochemistry* 69, 2634–2638.
- [89] Li-Xiang, G., Xiao-Bing, H., Yu-Qun, C., 1986. The structures of thirteen astrasieversianins from *Astragalus sieversianus*. *Phytochemistry* 25, 2389–2393.
- [90] Alaniya, M. D., Isaev, M. I., Gorovits, M. B., Abdullaev, N. D., Kemertelidze, E. P., Abubakirov, N. K., 1984. Triterpene glycosides of *Astragalus* and their genins XVI. Cyclogaleginosides A and B from *Astragalus galegiformis*. *Khim. Prir. Soedin.* 20, 451–454.

- [91] Kitagawa, I., Taniyama, T., Murakami, T., Yoshihara, M., Yoshikawa, M., 1988. Saponin and sapogenol. XLVI. On the constituents in aerial part of American alfalfa, *Medicago sativa* L. The structure of dehydrosoyasaponin I. *Yakugaku Zasshi* 108, 547–554.
- [92] Taylor, W. G., Fields, P. G., Sutherland, D. H., 2004. Insecticidal Components from Field Pea Extracts: Soyasaponins and Lysolecithins. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7484–7490.
- [93] McManus, O. B., Harris, G. H., Giangiacomo, K. M., Feigenbaum, P., Reuben, J. P., Addy, M. E., Burka, J. F., Kaczorowski, G. J., Garcia, M. L., 1993. An activator of calcium-dependent potassium channels isolated from a medicinal herb. *Biochemistry* 32, 6128–6133.
- [94] Liu, Y., Zhang, Q. Y., Zhao, Y. Y., Wang, B., Hai, L. Q., Ying, Y. P., Chen, H. B., 2007. Saponins from the roots of *Hedysarum polybotrys*. *Biochem. Syst. Ecol.* 35, 389–391.
- [95] Wang, H. K., He, K., Xu, H. X., Zhang, Z. L., Wang, Y. F., Kikuchi, T., Tezuka, Y., 1990. The structure of astrachryosid A and the study of 2D-NMR on astrasieversianin XV and 7,2'-dihydroxy-3',4'-dimethoxy- isoflavane-7-O-beta-D-glycoside. *Yaoxue Xuebao* 25, 445–450.
- [96] Yahara, S., Kihjyouma, M., Kohoda, H., 2000. Flavonoid glycosides and saponins from *Astragalus shikokianus*. *Phytochemistry* 53, 469–471.
- [97] El-Hawiet, A. M., Toaima, S. M., Asaad, A. M., Radwan, M. M., El-Sebakhy, N. A., 2010. Chemical constituents from *Astragalus annularis* Forssk. and *A. trimestris* L., Fabaceae. *Braz. J. Pharmacognosy.* 20, 860–865.
- [98] Kitagawa, I., Wang, H. K., Saito, M., Takagi, A., Yoshikawa, M., 1983. Chemical constituents of astragali radix, the root of *Astragalus membranaceus* Bunge. (2). Astragalosides, I, II, IV, acetylastragaloside I and isoastragalosides I and II. *Chem. Pharm. Bull.* 31, 698–708.
- [99] 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.
- [100] Jurzysta, M., Price, K., Ridout, C., Fenwick, R., 1989. The structure of four triterpenoid saponins isolated from the seed of *Trifolium incarnatum*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 58, 575–582.
- [101] Woldemichael, G. M., Wink, M., 2002. Triterpene glycosides of *Lupinus angustifolus*. *phytochemistry* 60, 323–327.

- [102] Hosny, M., Rosazza, J. P. N., 1999. Novel isoflavanone, cinnamic acid and triterpenoid glycosides in soybean molasses. *J. Nat. Prod.* 62, 853–858.
- [103] Bialy, Z., Jurzysta, M., Oleszek, W., Piacente, S., Pizza, C., 1999. Saponins in alfalfa (*Medicago sativa* L.) root and their structural elucidation. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3185–3192
- [104] Oleszek, W., Stochmal, A., 2002. Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of *Trifolium* species. *Phytochemistry* 61, 165–170.
- [105] Kurosawa, K., Ollis, W. D., Sutherland, I. O., Gottlieb, O. R., Oliveira, A. B., 1978. Mucronulatol, mucroquinone and mucronucarpan, isoflavonoids from *Machaerium Mucronulatum* and *M. Villosum*. *Phytochemistry* 17, 1405–1411.
- [106] El-Sebakhy, N. A., Asaad, A. M., Abdallah, R. M., Toaima, S. M., Abdel-Kader, M. S., Stermitz, F. R., 1994. Antimicrobial isoflavans from *Astragalus Species*. *Phytochemistry* 36, 1387–1389.
- [107] Hamburger, M. O., Cordell, G. A., Tantivana, P., Ruangrunsi, N., 1987. Traditional Plants of Thailand, VII. Isoflavonoids of *Dalbergia candenatensis*. *J. Nat. Prod.* 50, 696–699.
- [108] Hayashi, Y., Shirato, T., Sakurai, K., Takahashi, T., 1978. *Mokuzai Gakkaishi* 24, 898–901.
- [109] Chen, W. H., Wang, R., Shi, Y. P., 2010. Flavonoids in the Poisonous Plant *Oxytropis falcata*. *J. Nat. Prod.* 73, 1398–1403.
- [110] Zhang, L. J., Liu, H. K., Hsiao, P. C., Kuo, L. M. Y., Lee, I. J., Wu, T. S., Chiou, W. F., Kuo, Y. H., 2011. New isoflavonoid glycosides and related constituents from *Astragali Radix (Astragalus membranaceus)* and their inhibitory activity on nitric oxide production, *J. Agric. Food Chem.* 59, 1131–1137.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique de deux plantes appartenant à la famille Fabaceae : *Astragalus gombo* Coss. et Dur. et *Astragalus depressus* L. Cette étude a permis l'isolement par les méthodes chromatographiques (VLC, CCM, CC et CLHP) et la caractérisation par les méthodes spectroscopiques (RMN et spectrométrie de masse) de 18 métabolites secondaires constitués de 15 saponosides et 3 composés de nature flavonoïdique.

Neuf composés ont été isolés de l'extrait *n*-butanolique des parties aériennes de l'espèce *A. gombo* dont sept saponosides triterpéniques à squelette cycloartane. Six se sont avérés originaux. Les deux autres composés sont de nature flavonoïdique, plus précisément des flavonols *O*-glycosylés.

Neuf autres métabolites secondaires ont été isolés des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique de la seconde plante : *Astragalus depressus* L. Ils se répartissent en huit saponosides triterpéniques, 6 à squelette cycloartane et 2 à squelette oléanane. Le dernier composé, de nature flavonoïdique, est un isoflavane plus connu sous le nom de pendulone. Il possède des activités antitumorales jugées intéressantes.

Les structures moléculaires des composés isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D (^1H , ^{13}C , DEPT, COSY H-H, HSQC, TOCSY, HMBC, ROESY et NOESY), la spectrométrie de masse (ESI-MS et HR-MS), par la mesure du pouvoir rotatoire et par la comparaison avec les données de la littérature.

La composition chimique de deux espèces étudiées est en parfait accord avec celle des plantes du genre *Astragalus*. En effet, ce travail de recherche a montré encore une fois que les saponines triterpéniques, particulièrement à squelette cycloartane, sont les constituants majoritaires du genre.

Mots clés : *Astragalus gomb*, *Astragalus depressus*, Fabaceae, Saponines, Flavonoïdes, RMN 1D et 2D, Spectrométrie de masse.

Abstract

This work is concerning the phytochemical study of two plants belonging to the family Fabaceae : *Astragalus gombo* Coss. and Dur. and *Astragalus depressus* L. This study led to the isolation by chromatographic methods (VLC, TLC, CC and HPLC.) and characterization by spectroscopic methods (NMR, Mass) of 18 secondary metabolites including 3 flavonoids and 15 saponins.

9 compounds were isolated from the *n*-butanol extract of the aerial parts of *Astragalus gombo* Coss. and Dur. from which 6 new triterpenic saponins with cycloartane skeleton. Three known secondary metabolites consist of 2 flavonoids and another cycloartane-type triterpene glycoside.

From the following extracts, ethyl acetate and *n*-butanol of *Astragalus depressus* L., 9 secondary metabolites including 6 cycloartane-type triterpene glycosides, 2 oleanane-type triterpene glycosides and one flavonoid with an isoflavan skeleton, were isolated and characterized.

The structures of isolated compounds were established particularly by the use of NMR 1D and 2D technics (^1H , *J*-modulated ^{13}C , DEPT, COSY H-H, TOCSY, HMBC, ROESY and NOESY), mass spectrometry (ESI-MS et HR-MS), measurement of the optical rotations and by comparison with literature data.

The chemical composition of these species is in full agreement with the plants of the genus *Astragalus* which particularly contain flavonoids and saponins. These latter are considered as typical constituents of this genus.

Keywords: *Astragalus gomb*, *Astragalus depressus*, Fabaceae, Saponins, Flavonoids, NMR 1D and 2D, Mass spectrometry.

ملخص

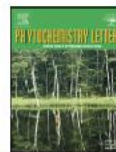
يعتمد هذا العمل على الدراسة الفيتوكيميائية للنبتين *Astragalus* و *Astragalus gombo depressus* من عائلة Fabaceae. سمحت هذه الدراسة بعزل وتحديد بنية 18 مركب طبيعي وذلك باستعمال الطرق الكروماتوغرافية (HPLC, VLC, CCM, CC) وباستعمال طرق التحليل الطيفي كمتيافية الرنين المغناطيسي النووي بجميع أنواعها، متيافية الكتلة وحساب زاوية التدوير النوعي والمقارنة مع الدراسات السابقة. أين وجد أن المركبات المعزولة تنتمي إلى نوعين من الأيضات الثانوية: 15 من الصابونينات و3 فلافونويدات.

تم عزل 9 مركبات طبيعية من مستخلص *n*-Butanol للأجزاء الهوائية للنبته *Astragalus gombo*، منها 6 مركبات جديدة: صابونينات ذات هيكل سيكلوأرتان. 3 مركبات معروفة منها 2 فلافونويد، 1 صابونين ذات هيكل سيكلوأرتان.

انطلاقاً من المستخلصات AcOEt و *n*-BuOH للنبته *Astragalus depressus*، تم فصل 9 مركبات معروفة منها: 6 صابونينات من هيكل سيكلوأرتان، 2 صابونينات من هيكل أوليانان وإيزوفلافان.

تتفق الدراسة الكيميائية لهذين النوعين مع الدراسات السابقة لنباتات جنس *Astragalus* اتفاقاً تاماً. حيث تحتوي التركيبة الكيميائية على الفلافونويدات والصابونينات بشكل خاص التي تعتبر المكونات النموذجية لهذا الجنس.

الكلمات المفتاحية: *Astragalus gombo*، *Astragalus depressus*، Fabaceae، الفلافونويدات، الصابونينات، متيافية الرنين المغناطيسي، متيافية الكتلة.

Cycloartane glycosides from *Astragalus gombo*Leyla Maamria^a, Christophe Long^b, Hamada Haba^a, Catherine Lavaud^c, Audrey Cannac^b, Mohammed Benkhaled^{a,*}^a Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (L.C.C.E.), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Batna, Batna 05000, Algeria^b USR 3388 CNRS-Pierre Fabre, 3 Avenue Hubert Curien BP 13562, 31035 Toulouse, France^c Institut de Chimie Moléculaire de Reims, CNRS UMR 7312, BP 1039, 51097 Reims Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 November 2014

Received in revised form 19 January 2015

Accepted 20 January 2015

Available online 31 January 2015

Keywords:

Astragalus gombo

Fabaceae

Cycloartane glycosides

NMR

ABSTRACT

Six new cycloartane-type triterpene glycosides named 3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-3 β ,16 β ,23(R),24(R),25-pentahydroxycycloartane (1), 3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-3 β ,16 β ,23(R),24(R)-tetrahydroxy-25-dehydrocycloartane (2), 3-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl]-6 α -acetoxy-23 α -methoxy-16 β ,23(R)-epoxy-24,25,26,27-tetranorcycloartane (3), 3-O- $[\beta$ -D-xylopyranosyl]-6 α -acetoxy-23 α -butoxy-16 β ,23(R)-epoxy-24,25,26,27-tetranorcycloartane (4), 3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-xylopyranosyl]-6 α -acetoxy-23 α -methoxy-16 β ,23(R)-epoxy-24,25,26,27-tetranorcycloartane (5), 3-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-xylopyranosyl]-23 α -methoxy-16 β ,23(R)-epoxy-4,25,26,27-tetranorcycloartane (6), in addition to three known secondary metabolites consisting of another cycloartane triterpene glycoside and two flavonol glycosides, were isolated from the aerial parts of *Astragalus gombo* Coss. & Dur. (Fabaceae). The structures of the isolated compounds were established by spectroscopic methods, including 1D and 2D-NMR, mass spectrometry and comparison with literature data.

© 2015 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The genus *Astragalus* contains about 3000 species and represents one of the largest genus in the family of Fabaceae (Heywood, 1978). It is widely distributed throughout the temperate regions of the world and located principally in Europe, Asia and North America (Davis, 1982; Rios and Waterman, 1997). This genus is represented in Algeria by about 40 species, including *Astragalus gombo* Coss. & Dur. This endemic perennial plant grows in sandy arid and desert pastures of Algeria (Quezel and Santa, 1963).

Several *Astragalus* species are used in traditional medicine as antiperspirants, diuretics, tonics, in treatment of nephritis, diabetes, leukemia and uterine cancer (Avunduk et al., 2008; Choudhary et al., 2008). The genus *Astragalus* is known for the presence of two major classes of biologically active compounds, polysaccharides and saponins (Bedir et al., 2000; Li, 2000; Rios and Waterman, 1997). Previous phytochemical studies on *Astragalus* saponins have shown the importance of cycloartane-type triterpene glycosides as major compounds (Barbić et al., 2010;

Choudhary et al., 2008; Polat et al., 2010). They are known for their interesting biological properties, including immunostimulating (Bedir et al., 2000; Çaliş et al., 1997; Yesilada et al., 2005), anti-protozoal (Özipek et al., 2005), antiviral (Gariboldi et al., 1995), wound healing (Sevimli-Gur et al., 2011), anti-inflammatory (Lee et al., 2013) and cytotoxic activities (Radwan et al., 2004).

In a continuation of our work on the chemical constituents of *Astragalus* species growing in Algeria (Benchadi et al., 2013; Maamria et al., 2014), the aerial parts of *A. gombo* were investigated. We reported in the present study the isolation of six new cycloartane-type triterpene glycosides (1–6) (Fig. 1) from the *n*-butanol extract, along with three known compounds (7–9). Structures of the isolated compounds have been determined on the basis of 1D and 2D homo- and heteronuclear NMR and mass spectrometry, as well as by comparison with reported literature data.

2. Results and discussion

The *n*-BuOH extract of the aerial parts of *A. gombo* was subjected to vacuum liquid chromatography (VLC) and different chromatographic steps to yield six new saponins (1–6) (Fig. 1), along with three known compounds (7–9). The known compounds were

* Corresponding author. Tel.: +213 33 868980; fax: +213 33 868980.

E-mail address: mbenkhaled@yahoo.fr (M. Benkhaled).

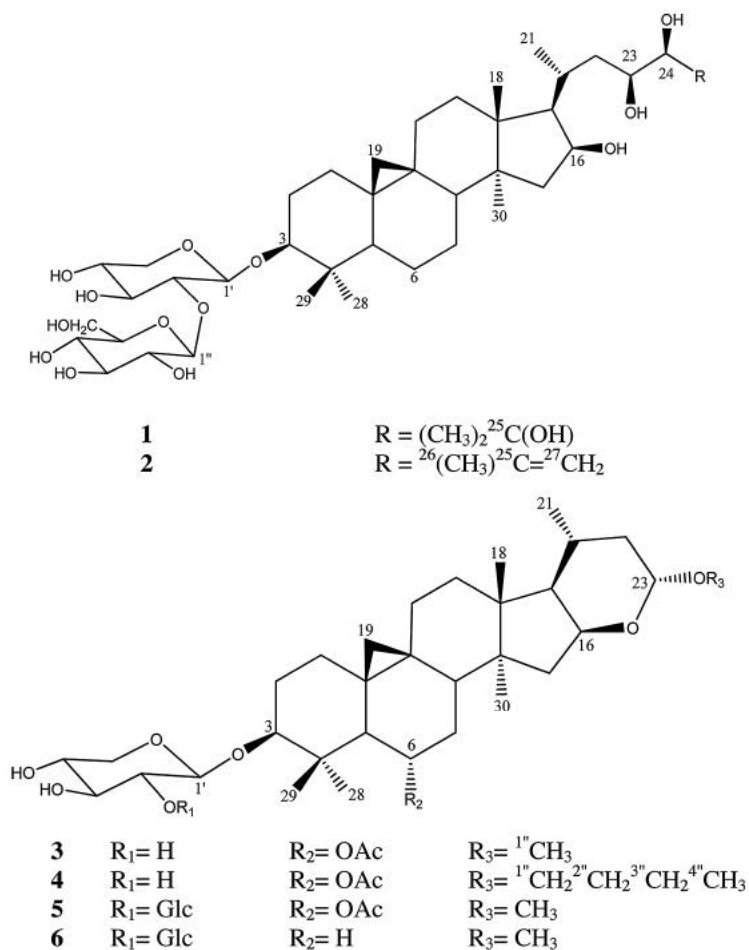


Fig. 1. Structures of new compounds 1–6.

identified as tomentoside II (7) (Abdallah et al., 1994), kaempferol 3-O- α -l-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[6-O-(3-hydroxy-3-methylglutaryl)- β -D-galactopyranoside] (8) (Montoro et al., 2013; Porter et al., 2012) and kaempferol 3-O- α -l-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside (9) (Yasukawa and Takido, 1987).

The HRESIMS mass spectrum of **1** (m/z 809.5589 [M+Na]⁺, calcd. for C₄₁H₇₀O₁₄Na, 809.4658) supported a molecular formula of C₄₁H₇₀O₁₄. The ESI-MS mass spectrum showed the major ion peak at m/z 809 which was assigned to [M+Na]⁺. The ¹H NMR spectrum showed for the aglycon moiety, signals due to a cyclopropane methylene at δ_{H} 0.62 and 0.40 (each 1H, d, $J = 4.0$ Hz) characteristic for cycloartane-type triterpenes, six tertiary methyl groups at δ_{H} 0.91, 0.95, 1.09, 1.22, 1.24, and 1.25, and a secondary methyl group at δ_{H} 1.05 (d, $J = 6.5$ Hz). Additionally, four methine proton signals at δ_{H} 4.70 (ddd, $J = 7.6, 7.6, 5.2$ Hz), 3.71 (ddd, $J = 10.5, 8.2, 2.3$ Hz), 3.24 (dd, $J = 8.1, 4.2$ Hz), and 3.10 (d, $J = 8.2$ Hz), were indicative of secondary alcoholic functions (Table 1). Furthermore, the ¹H NMR spectrum of **1** showed two anomeric protons at δ_{H} 4.47 (d, $J = 7.9$ Hz) and 4.68 (d, $J = 7.7$ Hz) in the downfield region,

indicative of two β -linked sugar moieties (Table 1). The chemical shifts of all individual protons of the two sugar units were ascertained from COSY spectral analysis, and the ¹³C NMR chemical shifts of their attached carbons could be assigned unambiguously from the HSQC spectrum (Table 1). These data showed the presence of one β -xylopyranosyl unit (δ_{H} 4.47) and one β -glucopyranosyl unit (δ_{H} 4.68). The sites of attachment of sugar moieties on the aglycon of **1** were determined by HMBC experiment, which showed long-range correlations between the anomeric proton signal at δ_{H} 4.47 (H-1') and the carbon resonance at δ_{C} 89.3 (C-3) and between the second anomeric proton signal at δ_{H} 4.68 (H-1'') and the carbon resonance at δ_{C} 79.6 (C-2') indicating the presence of a disaccharide unit at C-3. The chemical shifts of protons and carbons of the aglycon moiety (Table 1), established mainly by COSY H–H, HSQC and HMBC, are similar to those reported for signals of cycloobigenin C (Mamedova et al., 2003; Perrone et al., 2008), except for the upfield shifts of CH₂-6 resonances (δ_{H} 1.65, 0.85, δ_{C} 20.6), suggesting the absence of the hydroxyl group at this position. Based on the fact that the chemical

*

Table 1
¹H and ¹³C NMR data of compounds **1** and **2** in CD₃OD.

1		2		
δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	
1	1.56, 1.30 (m)	31.7	1.53, 1.25 (m)	33.2
2	1.96, 1.72 (m)	29.1	1.94, 1.71 (m)	30.6
3	3.24 (dd 8.1, 4.2)	89.3	3.23 (dd 11.6, 4.4)	90.8
4	–	40.8	–	42.4
5	1.35 dd (12.5, 4.2)	47.4	1.32 ^a	49.0
6	1.65, 0.85 (m)	20.6	1.59, 0.83 (m)	22.2
7	1.39, 1.15 (m)	25.9	1.35, 1.12 (m)	27.4
8	1.65 ^a	48.3	1.62 (dd 13.5, 4.2)	49.9
9	–	19.6	–	21.2
10	–	25.9	–	27.5
11	2.05, 1.15 (m)	25.9	2.02, 1.12 (m)	27.4
12	1.7 (m)	32.4	1.63 (m)	34.0
13	–	46.5	–	47.1
14	–	46.5	–	48.0
15	2.03 (dd 12.4, 7.6)	46.9	2.00, 1.37 (m)	48.3
	1.40 (dd 12.4, 5.2)			
16	4.7 (ddd 7.6, 7.6, 5.2)	72.0	4.45 (m)	73.6
17	1.75 (dd 11.3, 7.6)	56.7	1.68 (dd 11.3, 7.2)	58.6
18	1.22 (s)	18.4	1.18 (s)	19.5
19	0.62 (d 4.0)	29.8	0.60 (d 3.9)	31.3
	0.40 (d 4.0)		0.38 (d 3.9)	
20	2.04 (m)	26.4	2.01 (m)	28.5
21	1.05 (d 6.5)	18.7	0.99 (d 6.7)	20.2
22	1.66 (m)	41.4	1.57, 1.32 (m)	40.0
23	3.71 (ddd 10.5, 8.2, 2.3)	71.7	3.64 (dd 11.4, 5.7)	72.2
24	3.10 (d 8.2)	79.6	3.88 (d 5.7)	80.3
25	–	73.5	–	146.7
26	1.25 (s)	22.5	1.76 (s)	19.0
27	1.24 (s)	26.5	4.98, 4.90 (br s)	113.2
28	1.09 (s)	24.5	1.05 (s)	26.0
29	0.91 (s)	14.0	0.88 (s)	15.5
30	0.95 (s)	19.0	0.93 (s)	20.6
1'	4.47 (d 7.9)	104.5	4.41 (d 7.5)	106.1
2'	3.59 (t 7.9)	79.6	3.56 (t 7.5)	81.2
3'	3.54 (t 7.9)	76.5	3.48 (t 7.5)	71.2
4'	3.51 (m)	69.7	3.22 (ddd 10.8, 7.5, 4.6)	73.0
5'	3.86 (dd 11.5, 4.7)	65.1	3.84 (dd 10.8, 4.6)	66.7
	3.21 (m)		3.20 (t 10.8)	
1''	4.68 (d 7.7)	103.2	4.66 (d 7.9)	104.8
2''	3.25 (dd 8.6, 7.7)	74.8	3.19 (t 7.9)	76.4
3''	3.38 (t 8.6)	76.5	3.36 (t 7.9)	78.0
4''	3.24 (t 8.6)	70.4	3.51 (t 7.9)	78.1
5''	3.28 (ddd 8.6, 6.5, 5.9)	77.0	3.24 (ddd 7.9, 6.0, 2.3)	78.5
6''	3.85 (dd 11.2, 6.5)	61.6	3.82 (dd 11.5, 2.3)	63.2
	3.66 (dd 11.2, 5.9)		3.63 (dd 11.5, 6.0)	

^a Signal patterns are unclear due to overlapping.

shift values of C-23 (δ_{C} 71.7) and C-24 (δ_{C} 79.6), the large homonuclear coupling constant $^3J_{\text{H-23-H-24}} = 8.2$ Hz, and the ROE effects (Fig. 2) observed in the ROESY spectrum of compound **1** recorded in pyridine-*d*₅, particularly between Me-21 (δ_{H} 1.21)/H-23 (δ_{H} 4.35), OH-23 (δ_{H} 6.85, *d*, *J* = 2.2 Hz)/H-20 (δ_{H} 2.60) and H-24 (δ_{H} 3.78)/H-22b (δ_{H} 2.20), are completely similar to those depicted in the case of eremophiloside C previously isolated from *Astragalus*

eremophilus (Perrone et al., 2008), it seems evident that the new cycloartane triterpene glycoside **1** possesses the same *R* configuration at carbons C-23 and C-24. From all these elements, compound **1** was elucidated to be 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-3 β ,16 β ,23(*R*),24(*R*),25-pentahydroxycycloartane and named gomboside A.

The ESI⁺ mass spectrum of compound **2** showed a quasi-molecular ion signal at *m/z* 791 [M+Na]⁺, indicating a molecular mass of 768 uma. The molecular formula was confirmed as C₄₁H₆₈O₁₃ by HRESIMS (*m/z* 791.5493 [M+Na]⁺, calcd. for C₄₁H₆₈O₁₃Na, 791.4552). The ¹H and ¹³C NMR spectral data of **2** (Table 1) were closely similar to those of compound **1**. The difference is that compound **2** possessed an exocyclic methylene attached to the carbon C-25 [δ_{H} 4.98 (1H, br s, H-27a), δ_{H} 4.90 (1H, br s, H-27b), δ_{C} 113.2 (C-27), δ_{C} 146.7 (C-25)]. However, the presence of the methylene group induced different chemical shifts for protons and carbons CH-24 (δ_{H} 3.88, δ_{C} 80.3), CH-23 (δ_{H} 3.64, δ_{C} 72.2) and CH₃-26 (δ_{H} 1.76, δ_{C} 19.0). The points of attachment of sugar moieties to the aglycon were confirmed by HMBC experiment, which showed long-range correlations between the xyl H-1' at δ_{H} 4.41 and the carbon resonance at δ_{C} 90.8 (C-3), and between the glc H-1'' at δ_{H} 4.66 and the carbon resonance at δ_{C} 81.2 (C-2''_{xy}). Thus, the structure of compound **2** was elucidated as 3-*O*-[β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-3 β ,16 β ,23(*R*),24(*R*)-tetrahydroxy-25-dehydrocycloartane and named gomboside B.

The ESI⁺ mass spectrum of compound **3** gave a quasi-molecular ion peak at *m/z* 629 [M+Na]⁺ indicating a molecular mass *M* = 606 corresponding to the formula C₃₄H₅₄O₉ which was supported by HRESIMS (*m/z* 629.4482 [M+Na]⁺, calcd. for C₃₄H₅₄O₉Na, 629.3660). For the aglycon portion, the ¹H NMR spectrum (Table 2) showed two characteristic cyclopropane methylene at δ_{H} 0.60 and 0.31 (each 1H, *d*, *J* = 4.5 Hz), four tertiary methyl groups at δ_{H} 0.91, 0.95, 0.97 and 1.07, a secondary methyl group at δ_{H} 0.92 (*d*, *J* = 6.5 Hz), four methine proton signals at δ_{H} 4.75 (m), 4.71 (t, *J* = 7.2 Hz), 4.23 (q, *J* = 7.6 Hz) and 3.23 (dd, *J* = 11.6, 4.4 Hz), indicative of secondary alcoholic functions. The ¹H NMR spectrum of **3** revealed also the presence of one β -linked sugar unit with signal of one anomeric proton doublet at δ_{H} 4.49 (*J* = 5.8 Hz) and a signal for one acetyl methyl group (δ_{H} 1.99) which showed in HSQC spectrum correlation with carbon signal at δ_{C} 22.1 (Table 2). The chemical shifts of all individual protons of the sugar unit were determined from COSY spectrum, and the ¹³C NMR chemical shifts of their attached carbons were assigned unambiguously from the HSQC spectrum (Table 2). These data showed the presence of one β -xylopyranosyl unit. The determination of the linkage site was obtained from the HMBC correlation (Fig. 3) between the anomeric proton signal (δ_{H} 4.49) and the carbon resonance at δ_{C} 88.7 (C-3). The ¹H NMR and ¹³C NMR data of **3** are found closely similar to those of tomentoside II (**7**) isolated in this work and previously from *Astragalus tomentosus* (Abdallah et al., 1994). The only difference was the presence in compound **3** of a methoxy group at δ_{H} 3.30 and δ_{C} 55.0 linked at C-23 instead of the

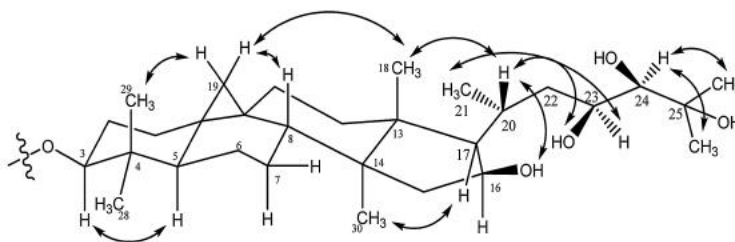


Fig. 2. Key ROESY correlations of aglycon moiety (compound **1**).

Table 2
¹H and ¹³C NMR data of compounds **3** and **4** in CDCl₃.

	3		4	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1	1.58, 1.30 (m)	31.8	1.60, 1.32 (m)	31.8
2	1.99, 1.72 (m)	29.1	2.01, 1.74 (m)	29.1
3	3.23 (dd 11.6, 4.4)	88.7	3.2 (dd, 11.5, 4.6)	88.7
4	–	41.8	–	41.8
5	1.69 (d 9.4)	49.9	1.71 (d 9.4)	49.9
6	4.75 (m)	70.3	4.75 (m)	70.4
7	1.61, 1.33(m)	33.1	1.63, 1.35 (m)	33.1
8	1.97(m)	44.3	1.97 (m)	44.3
9	–	21.1	–	21.1
10	–	27.9	–	28.0
11	1.83, 1.35(m)	26.1	1.87, 1.35 (m)	26.1
12	1.61, 1.51 (m)	32.8	1.63, 1.55 (m)	32.1
13	–	44.8	–	44.8
14	–	45.9	–	45.9
15	1.78 (dd 12.5, 7.9)	43.0	1.79 (dd 12.3, 7.9)	43.0
	1.40 ^a		1.42 ^a	
16	4.23 (q 7.9)	70.5	4.27 (q 7.9)	70.4
17	1.52 ^a	56.5	1.55 ^a	56.5
18	1.07 (s)	19.8	1.09 (s)	19.8
19	0.60 (d 4.5)	28.1	0.61 (d 4.8)	28.3
	0.31 (d 4.5)		0.33 (d 4.8)	
20	1.66 (m)	25.5	1.67 (m)	25.5
21	0.92 (d 6.5)	20.6	0.94 (d 6.1)	20.6
22	1.83, 1.12 (m)	37.8	1.86, 1.15 (m)	38.0
23	4.71 (t 7.2)	100.4	4.83 (t 7.2)	99.1
28	0.97 (s)	26.7	0.99 (s)	26.8
29	0.95 (s)	16.4	0.97 (s)	16.4
30	0.91 (s)	19.3	0.93 (s)	19.3
1'	4.49 (d 5.8)	104.9	4.51 (d 5.7)	104.9
2'	3.52 (dd 8.9, 5.8)	72.4	3.55 (dd 9.3, 5.7)	72.4
3'	3.63 (dd 9.7, 8.9)	73.9	3.64 (dd, 11.6, 9.3)	73.9
4'	3.76 (ddd 9.7, 7.5, 4.1)	69.6	3.78 (ddd 11.6, 7.3, 4.0)	69.9
5'	4.08 (dd 11.9, 4.1)	63.9	4.10 (dd 12.0, 4.0)	63.9
	3.38 (dd 11.9, 7.5)		3.40 (dd 12.0, 7.3)	
1''	3.30 (s)	55.0	3.69 (dt, 9.8, 6.8)	67.3
			3.40 (m)	
2''	–	–	1.54 (m)	32.9
3''	–	–	1.38 (m)	19.6
4''	–	–	0.92 (t 7.1)	14.1
OCOCH ₃	1.99 (s)	22.1	2.02 (s)	22.1
CO	–	170.6	–	170.6

^a Signal patterns are unclear due to overlapping

hydroxyl group in the case of **7**. The precise location of this methoxy at C-23 and the glucopyranosyl moiety at C-3 was confirmed from the observation of appropriate long-range CH correlations (Fig. 3) in the HMBC spectrum. The stereochemistry at C-6, C-16, C-17, C-20 and C-23 for compound **3** was confirmed by analysis of the ROESY spectrum. The β -orientation of H-6 (δ_{H} 4.75) induced a ROE effect with H-19 β (δ_{H} 0.60). The ROE effects between Me-30 α (δ_{H} 0.91) and H-16 (δ_{H} 4.23) and H-17 (δ_{H} 1.52)

indicated that these protons were on the same side and involved in a α configuration. The ROE effect between H-17 α and Me-21 (δ_{H} 0.92) proved the α orientation of CH₃-21. The value of coupling constant of H-23 (δ_{H} 4.71, $J = 7.2$ Hz) and the absence of ROE effects between H-16 α and H-23 confirmed the β orientation of H-23. Thus, the structure of **3** was characterized as 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl]-6 α -acetoxy-23 α -methoxy-16 β ,23(*R*)-epoxy-24,25,26,27-tetranorcyloartane named gomboside C.

The ESI mass spectrum in positive mode of compound **4** showed quasi-molecular ion peak at m/z 671 [M+Na]⁺, indicating a molecular mass of 648 uma. The formula was confirmed as C₃₇H₆₀O₉ by HRESIMS (m/z 671.5006 [M+Na]⁺, calcd. for C₃₇H₆₀O₉Na, 671.4130). The NMR data of **4** (Table 2), established mainly by COSY H–H, HSQC, HMBC and ROESY, in comparison to those of **3** showed that **4** differed only by the presence of butoxy group at C-23 [δ_{H} 3.69 (1H, dt, $J = 9.8, 6.8$ Hz, H-1''a), 3.40 (1H, m, H-1''b), 1.54 (1H, m, H-2''), 1.38 (1H, m, H-3''), 0.92 (1H, t, $J = 7.1$ Hz, H-4'') and δ_{C} 67.3 (C-1''), δ_{C} 32.9 (C-2''), δ_{C} 19.6 (C-3''), δ_{C} 14.1 (C-4'')] instead of methoxy group for **3**. This was confirmed by the HMBC experiment which showed correlation between CH₂-1'' and C-23 (δ_{C} 99.1). The point of attachment of the xylopyranosyl moiety to the aglycon was evident from a HMBC correlation between the Xyl H-1' (δ_{H} 4.51) and C-3 (δ_{C} 88.7) signals. Therefore, the structure of compound **4** was established as 3-*O*-[β -D-xylopyranosyl]-6 α -acetoxy-23 α -butoxy-16 β ,23(*R*)-epoxy-24,25,26,27-tetranorcyloartane and named gomboside D.

The HRESIMS mass spectrum of **5** exhibited a major ion peak at m/z 791.5141 [M+Na]⁺ which corresponded to the molecular formula C₄₀H₆₄O₁₄ (calcd. for C₄₀H₆₄O₁₄Na, 791.4188). The ¹H NMR spectrum (Table 3) displayed two characteristic cyclopropane methylene at δ_{H} 0.61 and 0.37 (each 1H, d, $J = 4.8$ Hz), four tertiary methyl groups at δ_{H} 0.96, 0.98, 1.05, and 1.12, a secondary methyl group at δ_{H} 0.94 ($d, J = 6.3$ Hz), four methine proton signals at δ_{H} 4.74 (m), 4.70 (t, $J = 7.1$ Hz), 4.23 (q, $J = 7.6$ Hz) and 3.23 (dd, $J = 10.6, 4.3$ Hz), attributed to secondary alcoholic functions (Table 3). A detailed comparison of the aglycon moiety NMR data (¹H, ¹³C, HSQC, HMBC and COSY) of compounds **5** and **3** indicated that the aglycon moiety was similar in the two compounds. Furthermore, the ¹H NMR spectrum of **5** showed two anomeric protons doublets at δ_{H} 4.66 ($J = 7.9$ Hz) and 4.41 ($J = 7.5$ Hz) in the downfield region, corresponding to two β -linked sugar units (Table 3). The chemical shifts of all individual protons and carbons of the two sugar units were ascertained from COSY and HSQC experiments (Table 3). These data showed the presence of β -xylopyranosyl (δ_{H} 4.41) and β -glucopyranosyl (δ_{H} 4.66) units. The sites of attachment and sequence of sugar moieties on the aglycon were determined by HMBC experiment, which showed long-range CH correlations between the anomeric proton signal resonating at δ_{H} 4.41 (H-1'_{xy1}) and the carbon resonance at δ_{C} 89.8 (C-3), and

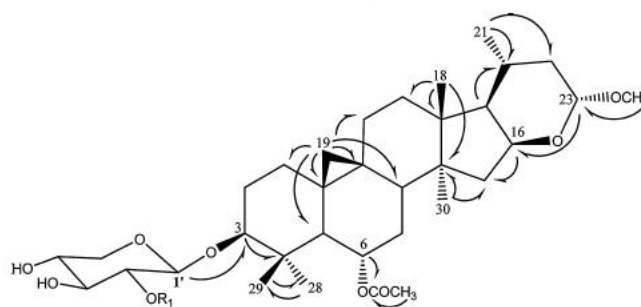


Fig. 3. Selected HMBC correlations of compound **3** (arrows from H to C).

Table 3
¹H and ¹³C NMR data of compounds **5** (CD₃OD) and **6** (DMSO-d₆).

	5		6	
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1	1.60, 1.31 (m)	32.9	1.43, 1.17 (m)	31.3
2	1.98, 1.70 (m)	30.5	1.79, 1.50 (m)	29.1
3	3.23 (dd 10.6, 4.3)	89.8	3.09 (dd 11.7, 4.1)	87.4
4	–	43.2	–	40.4
5	1.72 (d 9.4)	51.2	1.24 (dd 11.8, 3.7)	46.7
6	4.74 (m)	71.9	1.49, 0.78 (m)	20.2
7	1.66, 1.58 (m)	34.2	1.29, 1.02 (m)	25.7
8	1.95 (dd 10.1, 5.2)	46.1	1.54 ^a	46.8
9	–	22.2	–	19.2
10	–	29.4	–	25.9
11	1.91, 1.39 (m)	27.0	1.91, 1.12 (m)	25.6
12	1.66, 1.58 (m)	34.0	1.52 (m)	32.6
13	–	45.9	–	44.0
14	–	47.1	–	45.6
15	1.79 (dd, 11.9, 8.3) 1.42 (dd 11.9, 6.5)	44.0	1.78, 1.28 ^a	43.0
16	4.23 (q 7.6)	71.9	4.11 (q 7.6)	69.7
17	1.57 ^a	57.8	1.48 ^a	55.8
18	1.12 (s)	20.4	1.08 (s)	20.1
19	0.61 (d 4.8) 0.37 (d 4.8)	29.3	0.54 (d 3.5) 0.28 (d 3.5)	29.5
20	1.66 (m)	26.6	1.51 (m)	24.9
21	0.94 (d 6.3)	20.9	0.87 (d 5.9)	20.1
22	1.85, 1.12 (m)	38.7	1.76, 1.01 (m)	37.0
23	4.70 (t 7.1)	101.7	4.65 (t 7.2)	99.3
28	1.05 (s)	27.2	0.89 (s)	25.0
29	0.98 (s)	16.6	0.77 (s)	14.5
30	0.96 (s)	19.8	0.83 (s)	19.2
1'	4.41 (d 7.5)	106.1	4.29 (d 6.9)	104.1
2'	3.56 (t 7.5)	81.2	3.30 (t 6.9)	81.2
3'	3.48 (t 7.5)	71.2	3.30 (t 6.9)	69.4
4'	3.22 (t 7.5)	73.0	3.12 (m)	69.7
5'	3.84 (dd 10.8, 4.6) 3.20 (t 10.8)	66.7	3.66 (dd 11.3, 3.2) 3.03 (t 11.3)	65.2
1''	4.66 (d 7.9)	104.8	4.42 (d 7.7)	104.0
2''	3.19 (t 7.9)	76.4	2.99 (t 7.7)	75.2
3''	3.36 (t 7.9)	78.0	3.14 (t 7.7)	76.1
4''	3.51 (t 7.9)	78.1	3.30 (t 7.7)	76.1
5''	3.24 (ddd 7.9, 6.0, 2.3)	78.5	3.03 (m)	76.8
6''	3.82 (dd 11.5, 2.3)	63.2	3.59 (m)	60.8
	3.63 (dd 11.5, 6.0)		3.48 (dd 11.4, 4.3)	
OCH ₃	3.31 (s)	55.2	3.19 (s)	54.1
OCOCH ₃	1.99 (s)	22.0	–	–
CO	–	172.6	–	–

^a Signal patterns are unclear due to overlapping.

between the second anomeric proton signal detected at δ_{H} 4.66 (H-1'_{glc}) and the carbon resonance at δ_{C} 81.2 (C-2'_{xylyl}) indicating the presence of a disaccharide unit at C-3. On the basis of all these evidence, the structure of compound **5** was elucidated as 3-O-[β -D-glucopyranosyl(1 → 2)]- β -D-xylopyranosyl]-6 α -acetoxy-23 α -methoxy-16 β ,23(R)-epoxy-24,25,26,27-tetranorcytartinolide named gomboside E.

The molecular formula of compound **6** was determined to be C₃₈H₆₂O₁₂ on the basis of HRESIMS data (m/z 733.5020 [M+Na]⁺, calc. for C₃₈H₆₂O₁₂Na, 733.4133). The NMR data (¹H, ¹³C, COSY, HSQC, HMBC and ROESY) of **6** in comparison to those of **5** suggested that **6** differed only by the absence of acetyl group in the carbon C-6 (CH₂-6, δ_{H} 1.49, 0.78, δ_{C} 20.2). The sequence and linkage sites were confirmed from the HMBC spectrum, which showed long-range correlations between the anomeric proton signal at δ_{H} 4.29 (H-1'_{xylyl}) and the carbon resonance at δ_{C} 87.4 (C-3) and between the second anomeric proton signal at δ_{H} 4.42 (H-1''_{glc}) and the carbon resonance at δ_{C} 81.2 (C-2'_{xylyl}). Thus, the structure of **6** was characterized as 3-O-[β -D-glucopyranosyl(1 → 2)]- β -D-xylopyranosyl]-23 α -methoxy-16 β ,23(R)-epoxy-4,25,26,27-tetranorcytartinolide and was named gomboside F.

3. Conclusions

These results are in agreement with previous studies performed on *Astragalus* species (Özipek et al., 2005; Pistelli et al., 2003). The phytochemical investigation of *A. gombo* confirms the occurrence of cycloartane triterpene glycosides in the *Astragalus* genus. In fact, the present study reports the isolation of seven cycloartane glycosides of which six compounds (gombosides A–F) are described for the first time. However, it is not excluded that compound **4** (gomboside D) could be an artifact formed during the butanolic extraction. To the best of our knowledge, kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)-[6-O-(3-hydroxy-3-methyl-glutaril)- β -D-galactopyranoside] was previously identified only in *Astragalus gombiformis* (Montoro et al., 2013) while this is the first report of kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 → 2)- β -D-galactopyranoside in the *Astragalus* genus.

4. Experimental

4.1. General experimental procedures

Optical rotations were measured on a Perkin Elmer model 241 polarimeter. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a Bruker Avance II spectrometer equipped with a cryoprobe and Bruker Avance 600 spectrometer at 500 and 600 MHz for ¹H, 125 and 150 MHz for ¹³C. Complete assignments were performed on the basis of 2D NMR experiments (COSY, HSQC, HMBC and ROESY). Positive ESI mass spectra were produced on ion trap Bruker Esquire-LC. HRESIMS spectra were performed on a Bruker Micromass Q-TOF. A pre-packed C₁₈ reversed-phase column (XTerra RP-18, 19 mm × 250 mm, 10 μ m) was used for semi-preparative HPLC with a binary gradient elution (solvent A: H₂O and solvent B: MeCN) at 25 °C, a flow rate of 20 ml min⁻¹ and the chromatogram was monitored at 205 nm and 250 nm. Column chromatography was carried out using Merck Kieselgel 60 (70–230 mesh), Merck Lobar Lichroprep RP-18 (40 μ m × 63 μ m) and Sephadex LH-20. Analytical TLC was carried out in silica gel plates (Merck Kieselgel 60 F_{254S}).

4.2. Plant material

The plant material (aerial parts) was collected in April 2009 in the Biskra area (Algeria) and was identified by Pr Bachir Oudjehih, Agronomic institute of the University of Batna, where a voucher specimen has been deposited (N° 663/LCCE).

4.3. Extraction and isolation

Part of the air-dried and powdered plant material of *A. gombo* (aerial parts; 1 kg) was macerated two times (10 l × 2, each 48 h) with EtOH–H₂O (70:30) at room temperature. After filtration, the filtrate was concentrated under vacuum at room temperature to obtain 500 mL. The solution was submitted to liquid–liquid fractionation using solvents (petroleum ether, EtOAc and *n*-butanol) with increasing polarities (each solvent, 500 mL × 3). Filtration and evaporation of different solvents produced 2.5 g of petroleum ether, 9.5 g of EtOAc and 25 g of *n*-butanol extracts.

The *n*-BuOH extract (14 g) was separated over a VLC chromatography (vacuum liquid chromatography) using reverse-phase material. Elution was performed with H₂O–MeOH (100:0 to 0:100) to give fourteen fractions (F1–F14). Fraction F10 (679 mg) was subjected to silica gel column chromatography with the solvent system CH₂Cl₂–MeOH (100:0 to 60:40) to give 8 sub-fractions (F10-1 to F10-8). The sub-fraction F10-1 (166 mg) was chromatographed by semi-preparative HPLC using a gradient of H₂O–acetonitrile (50:50, 50:50, 0:100, 0:100) to yield compounds

3 ($R_t = 9.521$ min, 80.7 mg) and 4 ($R_t = 12.346$ min, 32.4 mg). Sub-fraction F10-3 (95 mg) was purified by semi-preparative HPLC using a gradient of H₂O–acetonitrile (75:25, 44:56, 0:100) to yield compounds 1 ($R_t = 5.851$ min, 2 mg), 2 ($R_t = 6.678$ min, 2.5 mg), 5 ($R_t = 7.743$ min, 2.9 mg) and 6 ($R_t = 8.728$ min, 5.9 mg). Fraction F11 (300 mg) was subjected to CC on Sephadex LH-20 in CHCl₃ giving 5 sub-fractions (F11-1 to F11-5). Preparative TLC of sub-fraction F11-2 (50 mg), developed with CHCl₃–MeOH (90:10), afforded compound 7 (15 mg). Fraction F4 (379 mg) was applied to silica gel CC eluting with CHCl₃–MeOH (100:0, 90:10, 80:20, 75:25, 70:30), to obtain ten sub-fractions (F4-1 to F4-10). The sub-fraction F4-8 (30 mg) was chromatographed by semi-preparative HPLC using a gradient of H₂O–acetonitrile (80:20, 70:30) to give 8 (5 mg) and 9 (7 mg).

4.3.1. Gomboside A (1)

Amorphous powder; $[\alpha]_D^{20} + 30.0$ (c 0.33, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 600 MHz) and ¹³C NMR (CD₃OD, 150 MHz), see Table 1; HRESIMS m/z [M+Na]⁺ 809.5589 (calcd. for C₄₁H₇₀O₁₄Na, 809.4658); ESI-MS m/z 809 [M+Na]⁺.

4.3.2. Gomboside B (2)

Amorphous powder; $[\alpha]_D^{20} - 2.4$ (c 1.66, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) and ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz), see Table 1; HRESIMS m/z [M+Na]⁺ 791.5493 (calcd. for C₄₁H₆₈O₁₃Na, 791.4552); ESI-MS m/z 791 [M+Na]⁺.

4.3.3. Gomboside C (3)

Amorphous powder; $[\alpha]_D^{20} - 20.8$ (c 2.5, CH₂Cl₂/MeOH); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz), see Table 2; HRESIMS m/z [M+Na]⁺ 629.4482 (calcd. for C₃₄H₅₄O₉Na, 629.3660); ESI-MS m/z 629 [M+Na]⁺.

4.3.4. Gomboside D (4)

Amorphous powder; $[\alpha]_D^{20} - 5.5$ (c 4.0, MeOH); ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz), see Table 2; HRESIMS m/z [M+Na]⁺ 671.5006 (calcd. for C₃₇H₆₀O₉Na, 671.4130); ESI-MS m/z 671 [M+Na]⁺.

4.3.5. Gomboside E (5)

Amorphous powder; $[\alpha]_D^{20} - 14.5$ (c 1.93, MeOH); ¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) and ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz), see Table 3; HRESIMS m/z [M+Na]⁺ 791.5141 (calcd. for C₄₀H₆₄O₁₄Na, 791.4188); ESI-MS m/z 791 [M+Na]⁺.

4.3.6. Gomboside F (6)

Amorphous powder; $[\alpha]_D^{20} - 28.5$ (c 2.95, CH₂Cl₂/MeOH); ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz) and ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz), see Table 3; HRESIMS m/z [M+Na]⁺ 733.5020 (calcd. for C₃₈H₆₂O₁₂Na, 733.4133); ESI-MS m/z 733 [M+Na]⁺.

4.4. Acid hydrolysis

Methanolic solutions of compounds 1 (1.5 mg), 2 (2 mg), 3 (20 mg), 4 (10 mg), 5 (2.5 mg) and 6 (5 mg) were refluxed separately with 5 ml of 3% H₂SO₄ in dry MeOH for 5 h. The solutions were neutralized with Na₂CO₃ and then extracted with EtOAc to give aqueous layers which were combined and repeatedly evaporated to dryness with MeOH. Two sugars were identified as xylose and glucose, by comparison with authentic samples on TLC in CH₂Cl₂–MeOH–H₂O (6:4:1) and *n*-BuOH–HOAc–H₂O (5:5:1). The purification of the two sugars was performed by preparative TLC using CHCl₃–MeOH–H₂O (70:30:3) as eluting solvent. The D configuration of xylose ($[\alpha]_D^{20} + 13.2$) and glucose ($[\alpha]_D^{20} + 32.8$) was established by comparison of their optical rotation values with reported literature data (Denizli et al., 2014).

Acknowledgments

The authors wish to express thanks to the Algerian Minister of Higher Education and Scientific Research for providing a research grant and to François Sautel and Nicolas Molinier (Centre de Recherche Pierre FABRE sur les Substances Naturelles) for technical support and performing the mass spectra.

References

- Abdallah, R.M., Ghazy, N.M., Asaad, A.M., El-Sebakhy, N.A., Pirillo, A., Verotta, L., 1994. Constituents of the Egyptian *Astragalus tomentosus* Lam. Pharmazie 49, 377–378.
- Avunduk, S., Mitaine-Offer, A.C., Alankuş-Çalışkan, Ö., Miyamoto, T., Senol, S.G., Lacaille-Dubois, M.A., 2008. Triterpene glycosides from the roots of *Astragalus flavescens*. J. Nat. Prod. 71, 141–145.
- Barbić, M., Macabeo, A.P.J., Kreft, S., Heilmann, J., 2010. Cycloastragenol glycosides from *Astragalus glycyricus*. Biochem. Syst. Ecol. 38, 460–462.
- Bedir, E., Pugh, N., Calis, I., Pasco, D.S., Khan, I.A., 2000. Immunostimulatory effects of cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus* species. Biol. Pharm. Bull. 23, 834–837.
- 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.
- Çalış, I., Yuruker, A., Tasdemir, D., Wright, A.D., Sticher, O., Luo, Y.D., Pezzuto, J.M., 1997. Cycloartane triterpene glycosides from the roots of *Astragalus melanophyllus*. Planta Med. 63, 183–186.
- Choudhary, M.I., Jan, S., Abbaskhan, A., Musharraf, S.G., Samreen, Sattar, S.A., Attar-Rahman, 2008. Cycloartane triterpenoids from *Astragalus bicuspidis*. J. Nat. Prod. 71, 1557–1560.
- Davis, A.M., 1982. Crude protein, crude fiber, tannin, and oxalate concentrations of 33 *Astragalus* species. J. Range Manage. 35, 32–34.
- Denizli, N., Horo, I., Gülcemal, D., Masullo, M., Festa, M., Capasso, A., Koz, Ö., Piacente, S., Alankuş-Çalışkan, Ö., 2014. Cycloartane glycosides from *Astragalus plumosus* var. *krugianus* and evaluation of their antioxidant potential. Fitoterapia 92, 211–218.
- Gariboldi, P., Pelizzoni, F., Tatò, M., Verotta, L., El-Sebakhy, N., Asaad, A.M., Abdallah, R.M., Toaima, S.M., 1995. Cycloartane triterpene glycosides from *Astragalus trigonus*. Phytochemistry 40, 1755–1760.
- Heywood, V.H., 1978. Flowering Plants of the World. Oxford University Press, London.
- Lee, D.-Y., Noh, H.-J., Choi, J., Lee, K.-H., Lee, M.-H., Lee, J.-H., Hong, Y., Lee, S.-E., Kim, S.-Y., Kim, G.-S., 2013. Anti-inflammatory cycloartane-type saponins of *Astragalus membranaceus*. Molecules 18, 3725–3732.
- Li, X.Y., 2000. Immunomodulating components from Chinese medicines. Pharm. Biol. 38, 33–40.
- Maamria, L., Haba, H., Lavaud, C., Harakat, D., Benkhaled, M., 2014. An isoflavan and saponins from *Astragalus depressus* L. J. Serb. Chem. Soc. 79, 1–10. <http://dx.doi.org/10.2298/JSC140526094M>.
- Mamedova, R.P., Agzamova, M.A., Isaev, M.I., 2003. Triterpene glycosides of *Astragalus* and their genins. LXVIII. Cycloartanigenin C, a new cycloartane genin. Chem. Nat. Compd. 39, 470–474.
- Montoro, P., Teyeb, H., Masullo, M., Mari, A., Douki, W., Piacente, S., 2013. LC–ESI-MS qualitative determination of phenolic constituents in different parts of wild and cultivated *Astragalus gombiformis*. J. Pharm. Biomed. Anal. 72, 89–98.
- Özipek, M., Dönmez, A.A., Çalış, I., Brun, R., Rüedi, P., Tasdemir, D., 2005. Leishmanicidal cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus oleifolius*. Phytochemistry 66, 1168–1173.
- Perrone, A., Masullo, M., Bassarello, C., Bloise, E., Hamed, A., Nigro, P., Pizzi, C., Piacente, S., 2008. Unusual cycloartane glycosides from *Astragalus eremophilus*. Tetrahedron 64, 5061–5071.
- Pistelli, L., Giachi, I., Lepori, E., Bertoli, A., 2003. Further saponins and flavonoids from *Astragalus verrucosus* Moris. Pharm. Biol. 41, 568–572.
- Polat, E., Bedir, E., Perrone, A., Piacente, S., Alankuş-Çalışkan, Ö., 2010. Triterpenoid saponins from *Astragalus wiedemannianus* Fischer. Phytochemistry 71, 658–662.
- Porter, E.A., Van den Bos, A.A., Kite, G.C., Veitch, N.C., Simmonds, M.S.J., 2012. Flavonol glycosides acylated with 3-hydroxy-3-methylglutaric acid systematic characters in *Rosa*. Phytochemistry 81, 90–96.
- Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, vol. 1–2. CNRS, Paris.
- Radwan, M.M., El-Sebakhy, N.A., Asaad, A.M., Kington, D.G.L., 2004. Kahiricosides II–V, cycloartane glycosides from an Egyptian collection of *Astragalus kahiricus*. Phytochemistry 65, 2909–2913.
- Rios, J.L., Waterman, P.G., 1997. A review of the pharmacology and toxicology of *Astragalus*. Phytother. Res. 11, 411–418.
- Sevimli-Gur, C., Onbasilar, I., Atilla, P., Cakar, N., Deliloglu-Gurhan, I., Bedir, E., 2011. Wound healing effects of cycloartane-type triterpenes isolated from *Astragalus* species. J. Ethnopharmacol. 134, 844–850.
- Yasukawa, K., Takido, M., 1987. A flavonol glycoside from *Lysimachia mauritiana*. Phytochemistry 26, 1224–1226.
- Yesilada, E., Bedir, E., Çalış, I., Takaiishi, Y., Ohmoto, Y., 2005. Effects of triterpene saponins from *Astragalus* species on in vitro cytokine release. J. Ethnopharmacol. 96, 71–77.



J. Serb. Chem. Soc. 80 (2) 137–142 (2015)
JSCS–1704

Journal of
the Serbian
Chemical Society

JSCS-info@shd.org.rs • www.shd.org.rs/JSCS

UDC **Astragalus depressus*: 577.121:547.918:
543.422.25:543.51

Short communication

SHORT COMMUNICATION

An isoflavane and saponins from *Astragalus depressus* L.

LEYLA MAAMRIA¹, HAMADA HABA¹, CATHERINE LAVAUD²,
DOMINIQUE HARAKAT² and MOHAMMED BENKHALED^{1*}

¹Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (L.C.C.E), Département de Chimie,
Faculté des Sciences, Université de Batna, Batna 05000, Algeria and ²Laboratoire de
pharmacognosie, Institut de Chimie Moléculaire de Reims, CNRS UMR 6229, BP 1039,
51097 Reims Cedex 2, France

(Received 26 May, revised 14 September, accepted 16 September 2014)

Abstract: In this study, nine known secondary metabolites were isolated from ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *Astragalus depressus* L. (Fabaceae family), including one isoflavane, namely pendulone (1) and eight saponins, namely cyclogaleginoside A (2), astrasieversianin II (3), astrasieversianin IV (4), astrasieversianin VIII (5), astrasieversianin VI (6), astrasieversianin XIV (7), dehydrosoyasaponin I (8) and soyasaponin I (9). The structures of compounds 1–9 were elucidated by spectroscopic methods, including 1D and 2D NMR, ESI mass spectrometry and comparison with literature data.

Keywords: Fabaceae; *Astragalus depressus*; saponins; pendulone; NMR; ESI.

INTRODUCTION

Astragalus depressus L. belongs to the genus *Astragalus* L.,¹ which is the largest genus in the Leguminosae (Fabaceae) family.² This Mediterranean species that is grazed by livestock is a perennial herb that grows in the rocks of the high mountains of Algeria.¹

Astragalus, a member of the tribe Galegeae under the subfamily Papilionoideae (or Laboideae),³ is found mainly in the temperate and arid regions of the world. Several *Astragalus* species are used worldwide in traditional medicine as antiperspirants, diuretics, tonics, in the treatment of nephritis, diabetes, leukemia and uterine cancer.^{4,5}

In the course of previous investigations on Algerian Fabaceae plants, oleanane-type triterpene glycosides and flavonoids were isolated from *Astragalus cruciatus* Link³ and *Lotus pusillus* Medik.⁶ Saponins, cycloartane-type glycosides particularly, are the major class of chemical compounds that were isolated

*Corresponding author. E-mail: mbenkhaled@yahoo.fr
doi: 10.2298/JSC140526094M

previously from *Astragalus* species. Saponin compounds are known to possess immunostimulating,⁷ cytotoxic⁸ and antiviral activities.⁹

Hitherto, there have been no literature reports on the chemical constituents of *A. depressus*. A phytochemical investigation of the ethyl acetate and *n*-butanol extracts of this species was undertaken in order to determine its major components, such as saponins, which could be helpful for the chemotaxonomic profile of this species and *Astragalus* genus for further investigations.

EXPERIMENTAL

General

UV spectra were recorded on a Beckman DU-600 spectrometer. Positive and negative ion mode mass spectra were obtained on a Bruker Esquire Ion trap spectrometer. 1D and 2D NMR spectra (COSY, HSQC, HMBC, TOCSY, NOESY and ROESY) were obtained on a Bruker Avance spectrometer (¹H, 600 MHz, ¹³C, 150 MHz). Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 241 polarimeter. CC was performed on silica gel 60 (320–400 mesh) and Sephadex LH-20. Analytical and preparative (1 mm thickness) TLCs were run on silica gel (Kieselgel 60 F254, Merck).

Plant material

The plant material (aerial parts and roots) was collected in May 2011 nearby Khenchela (Algeria) and was identified by Prof. Bachir Oudjehih, Agronomic Institute of the University of Batna, where a voucher specimen was deposited, with the identification number 659/I.C.C.F.

Extraction and isolation

The air-dried and powdered whole plant of *Astragalus depressus* (800 g) was macerated with EtOH:H₂O (70:30 *V/V*, 8 L×2) for 3 days at room temperature. After filtration and evaporation of the aqueous alcoholic solution, the aqueous residue (0.5 L) was extracted successively with petroleum ether, EtOAc and *n*-butanol (each solvent, 0.5 L×3). The solvents were removed under vacuum to yield the following extracts: petroleum ether (3 g), ethyl acetate (8 g) and *n*-butanol (40 g). The details related to isolation are given in the Supplementary material to this paper.

RESULTS AND DISCUSSION

Nine known compounds were isolated from the ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *A. depressus*, including eight saponins and one isoflavan. The structures of the compounds (Fig. 1) were identified clearly by comparison of ¹H- and ¹³C-NMR data, ESI mass spectra and values of optical rotation with published data. The isolated compounds were identified as pendulone (1),^{10,11} cyclogaleginoside A (2),¹² astrasieversianin II (3),¹³ astrasieversianin IV (4),¹³ astrasieversianin VIII (5),¹³ astrasieversianin VI (6),¹³ astrasieversianin XIV (7),¹³ dehydrosoyasaponin I (8)¹⁴ and soyasaponin I (9).¹⁵

Pendulone (1) was previously found in *Millettia pendula*,¹⁶ *Oxytropis falcata*¹⁷ and *Astragalus membranaceus*¹⁸ that belong to the Fabaceae family. This is the second report of the occurrence of pendulone in the *Astragalus* genus. This

isoflavan has potent leishmanicidal activity¹⁰ and showed potent anti-tumor-promoting activity.¹⁹

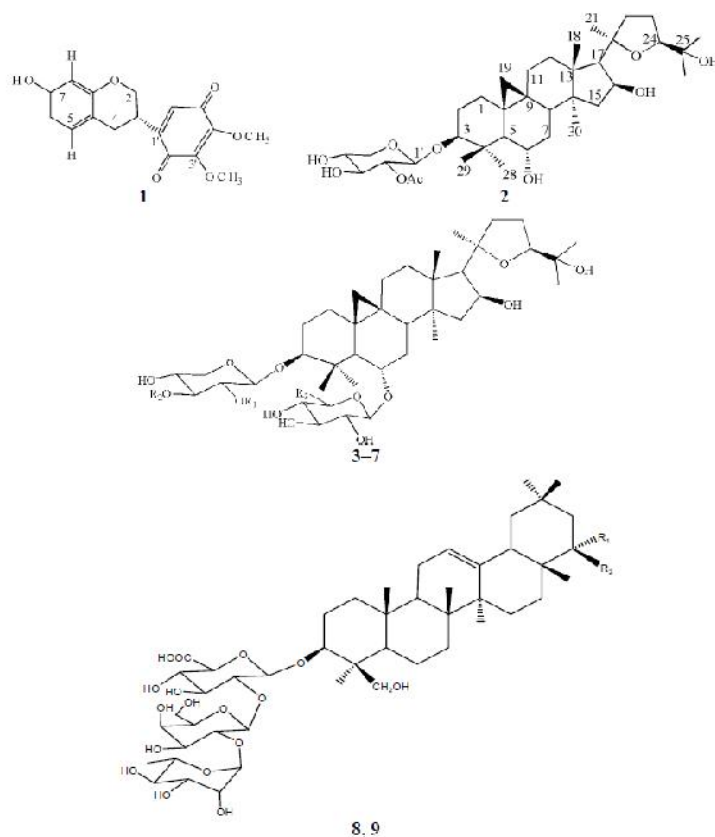


Fig. 1. Structures of compounds 1-9; **3** - R₁ = R₂ = Ac, R₃ = H; **4** - R₁ = R₂ = Ac, R₃ = CH₂OH; **5** - R₁ = Ac, R₂ = H, R₃ = CH₂OH; **6** - R₁ = Ac, R₂ = R₃ = H; **7** - R₁ = R₂ = H, R₃ = CH₂OH; **8** - R₁, R₂ = O; **9** - R₁ = αH, R₂ = βOH.

The cycloartane-type triterpene glycosides **2-7** isolated previously from several *Astragalus* species are considered as common saponins for the genus *Astragalus*.^{12,13,20-26}

Dehydrosoyasaponin I (8) was found in many genera of the Fabaceae family, such as *Medicago sativa*²⁷ and *Pisum sativum* L.²⁸ This study reports its first identification in the *Astragalus* genus. Soyasaponin I (9) was identified previously from several *Astragalus* species, such as *A. crysopterus*,²⁹ *A. shikokianus*³⁰ and *A. trimestris*³¹ besides some other Fabaceae genus, such as *Pisum*,²⁸ *Hebysarum*³² and *Melilotus*.³³

CONCLUSIONS

This is the first report on the chemical composition of *Astragalus depressus*. This work, which is in full agreement with the previous studies performed on the *Astragalus* genus, confirmed the importance of saponins as major compounds of this genus. Soyasaponin I (9), largely distributed in Fabaceae plants, is used as a chemotaxonomic marker for the family Fabaceae and *Astragalus* genus.³⁴

To the best of our knowledge, the full ¹H- and ¹³C-NMR data of pendulone (1) and cyclogaleginoside A (2) are given here for the first time.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The experimental details about isolation of the fractions, as well as the characterization data for pendulone (1) and cyclogaleginoside A (2) are available electronically from <http://www.shd.org.rs/JSCS/>, or from the corresponding author on request.

Acknowledgement. The authors wish to express thanks to the Algerian Minister of Higher Education and Scientific Research for providing a research grant and the University of Reims Champagne-Ardenne (France) for providing research facilities and technical support.

ИЗВОД

ИЗОФЛАВОНИ И САПОНИНИ ИЗОЛОВАНИ ИЗ *Astragalus depressus* L.

LEYLA MAAMRIA¹, HAMADA HABA¹, CATHERINE LAVAUD², DOMINIQUE HARAKAT²
и MOHAMMED BENKHALED¹

¹Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (I.C.C.F), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Batna, Batna 05000, Algeria и ²Laboratoire de pharmacognosie, Institut de Chimie Moléculaire de Reims, CNRS UMR 6229, BP 1039, 51097 Reims Cedex 2, France

Током овог истраживања изоловано је девет познатих секундарних метаболита из етил ацетатног екстракта и *n* бутанолног екстракта *Astragalus depressus* L. (Fabaceae фамилија), и то пендулон (1) и осам сапонина, циклогалинозида А (2), астрасиверсијанин II (3), астрасиверсијанин IV (4), астрасиверсијанин VIII (5), астрасиверсијанин VI (6), астрасиверсијанин XIV (7), дехидросојасопонин I (8) и сојасопонин I (9). Структуре једињења 1-9 утврђене су спектроскопским методама које подразумевају 1D и 2D NMR спектроскопију и ESI масену спектрометрију и поређене са подацима из литературе.

(Примљено 26. маја, ревидирано 14. септембра, прихваћено 16. септембра 2014.)

REFERENCES

1. P. Quezel, S. Senta, *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Vol. 1, CNRS, Paris, 1963, p. 552

2. D. Podlech, *Proc. Roy. Soc. Edinburgh* **89** (1986) 37
3. W. Benchadi, H. Haba, C. Lavaud, D. Harekat, M. Benkhaled, *Rec. Nat. Prod.* **7** (2013) 105
4. S. Avunduk, A. C. Mitaine-Offer, Ö. Alenkus-Caliskan, T. Miyamoto, S. G. Senol, M. A. Lacaille-Dubois, *J. Nat. Prod.* **71** (2008) 141
5. M. I. Choudhary, S. Jan, A. Abbaskhan, S. G. Musharraf, Samreen, S. A. Sattar, Atta-ur-Rahman, *J. Nat. Prod.* **71** (2008) 1557
6. L. Golea, H. Haba, C. Lavaud, L. Christophe, M. Benkhaled, *Biochem. Syst. Ecol.* **45** (2012) 12
7. E. Bedir, N. Pugh, I. Calis, D. S. Pasco, I. A. Khan, *Biol. Pharm. Bull.* **23** (2000) 834
8. M. M. Radwan, N. A. El-Sebakhy, A. M. Asaad, S. M. Toaima, D. G. I. Kingston, *Phytochemistry* **65** (2004) 2909
9. P. Gariboldi, F. Pelizzoni, M. Tarò, L. Verotta, N. A. El-Sebakhy, A. M. Asaad, R. M. Abdallah, S. M. Toaima, D. G. I. Kingston, *Phytochemistry* **40** (1995) 1755
10. M. Takahashi, H. Fuchino, S. Sekita, M. Satake, F. Kiuchi, *Chem. Pharm. Bull.* **54** (2006) 915
11. W. H. Chen, Z. Y. Ren, R. Wang, Y. P. Shi, *Anal. Sci.* **24** (2008) 209
12. M. D. Alaniya, M. I. Isacv, M. B. Gorovits, N. D. Abdullacv, E. P. Kemrcitelidze, N. K. Abubakirov, *Khim. Prir. Soedin.* **20** (1984) 451
13. G. Li-Xiang, H. Xiao-Bing, C. Yu-Qun, *Phytochemistry* **25** (1986) 2389
14. H. Miyao, Y. Sakai, T. Takeshita, J. Kinjo, T. Nohara, *Chem. Pharm. Bull.* **44** (1996) 1222
15. I. Kitagawa, M. Yosikawa, I. Yosioka, *Chem. Pharm. Bull.* **24** (1976) 121
16. Y. Hayashi, I. Shirato, K. Sakurai, T. Takahashi, *Mokuzai Gakkaishi* **24** (1978) 898 (in Japanese)
17. W. H. Chen, R. Wang, Y. P. Shi, *J. Nat. Prod.* **73** (2010) 1398
18. L. J. Zhang, H. K. Liu, P. C. Hsiao, L. M. Y. Kuo, I. J. Lee, T. S. Wu, W. F. Chiou, Y. H. Kuo, *J. Agric. Food Chem.* **59** (2011) 1131
19. T. Konoshima, M. Takasaki, M. Kozuka, H. Tokuda, H. Nishino, E. Matsuda, M. Nagai, *Biol. Pharm. Bull.* **20** (1997) 865
20. M. D. Alaniya, *Zv. Akad. Nauk Gruz. SSR, Ser. Khim.* **14** (1988) 73
21. I. Calis, A. Yurker, D. Tasdemir, A. D. Wright, O. Sticher, Y. D. Iuo, J. M. Pezzuto, *Planta Med.* **63** (1997) 183
22. M. T. Baratta, G. Ruberto, *Planta Med.* **63** (1997) 280
23. S. Nikolov, N. Benbassat, *Farmatsiya (Sofia)* **44** (1997) 34 (in Bulgarian)
24. F. Pan, J. Yao, Y. Teng, *Zhiwu Xuebao* **38** (1996) 836 (in Chinese)
25. L. Verotta, N. A. El-Sebakhy, *Studies in natural products chemistry: Bioactive natural products*, Elsevier, Amsterdam, 2001
26. F. N. Yalcin, S. Piacente, A. Perrone, A. Capasso, H. Duman, I. Calis, *Phytochemistry* **73** (2012) 119 (in Japanese)
27. I. Kitagawa, T. Taniyama, T. Murakami, M. Yoshihara, M. Yoshikawa, *Yakugaku Zasshi* **108** (1988) 547 (in Japanese)
28. W. G. Teylor, P. G. Fields, D. H. Sutherland, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 7484
29. H. K. Wang, K. He, H. X. Xu, Z. L. Zhang, Y. F. Wang, T. Kikuchi, Y. Tezuka, *Yaoxue Xuebao* **25** (1990) 445 (in Japanese)
30. S. Yalilar, M. Kilijyouna, H. Kohoda, *Phytochemistry* **53** (1990) 469
31. A. M. El-Hawiet, S. M. Toaima, A. M. Asaad, M. M. Radwan, N. A. El-Sebakhy, *Rev. Bras. Pharmacogn.* **20** (2010) 860

32. Y. Liu, Q. Y. Zhang, Y. Y. Zhao, B. Wang, L. Q. Hai, Y. P. Ying, H. B. Chen, *Biochem. Syst. Ecol.* **35** (2007) 389
33. T. Hirakawa, M. Okawa, J. Kiijo, T. Nohara, *Chem. Pharm. Bull.* **48** (2000) 286
34. W. Oleszek, A. Stochmal, *Phytochemistry* **61** (2002) 165.