



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ «ABBES LAGHROUR»
DE KHENCHELA



FACULTÉ DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE

Département : Sciences de la matière

N° de série :

Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du diplôme de Master (L.M.D)

Spécialité: Chimie analytique et environnement

Thème :

Etude phytochimique de la plante *Astragalus depressus*

Dirigé par : Dr. MAAMRIA LEYLA

Réalisé par :

- BOUGANDOURA KHADIDJA
- GHOULI YAMINA

Membres de jury :

- LACHEKHAB MASSAOUDA - MAB
- REGUAI SABRINA - MCB

Présenté le : 30 /06/2019

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Dieu tout puissant qui nous a donné la santé, le courage et la patience pour mener à bien ce modeste travail.

Nous exprimons toutes nos profondes reconnaissances à notre encadreur Dr MAAMRIA LEYLA pour le temps consacré à nous écouter, nous orienter et nous corriger tout au long de notre projet.

Nous souhaitons exprimé nos profondes gratitudees à tous les enseignants qui ont contribué à notre formation et à l'élaboration de ce présent travail

Ainsi nous exprimons nos reconnaissances à tous les membres de jury d'avoir accepté de lire ce manuscrit et d'apporter les critiques nécessaires à la mise en forme de cet ouvrage.

En fin nous remercions tout ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce modeste travail.

Khadidja et Yamina

Dédicace

Je dédie ce modeste travail avec l'aide de dieu tout puissant à :

- ❖ *Mes chers parents pour leur sacrifice et leur encouragement.*
- ❖ *Mon cher époux Fatah pour son soutien.*
- ❖ *Mes petit enfants MERIEM et MOHAMED AMINE.*
- ❖ *Mes frères et mes sœurs.*
- ❖ *Toute ma grande famille.*
- ❖ *Tous mes vrais amis.*
- ❖ *Ma collègue khadidja pour son aide et sa compréhension.*
- ❖ *Mes collègues de la promotion 2019*

YAMINA

DEDICACES

Rien n'est aussi beau à offrir que le fruit d'un labeur qu'on dédie du fond du coeur à ceux qu'on aime et qu'on remercie en exprimant la gratitude et la reconnaissance durant toute notre existence.

Je dédie ce modeste travail :

À ma plus belle étoile qui puisse exister dans l'univers Et m'a guidé durant les moments les plus pénibles de ce long chemin, et qui a été à mes cotés et ma soutenu durant toute ma vie, ma chère mère.

À mon père, qui a sacrifié toute sa vie afin de me voir devenir ce que je suis.

À mes meilleurs frères, les plus beaux de tous les Frères.

À mes très chères sœurs pour leur soutien et leur présence que dieux vous garde pour moi.

À ceux que j'ai eu la chance de connaître dans les meilleurs moments de ma vie, à ma chère sœur et ma cousine « merci pour votre présence et votre aide et ton soutien moral ».

À toute ma famille sans exception.

À mon ami et binôme, qui m'a supporté toute ces années.

À mes enseignants et tous mes amis les plus fidèles de ma vie, à toutes mes camarades de l'étude.

À tout ce qui j'aime et j'ai connu de près ou de loin.

KHADIDJA

Abréviations

AcOEt	Acétate d'éthyle
CH₃COOH	Acide acétique
CHCl₃	Chloroforme
CH₂Cl₂	Dichlorométhane
CDCl₃	Chloroforme deutéré
CD₃OD	Méthanol deutéré
EtOH	Ethanol
EP	Ether de pétrole
H₂O	Eau
H₂SO₄	Acide sulfurique
MeOH	Méthanol
n-BuOH	n-butanol
TMS	Tétraméthyle silane
CCE	Chromatographie sur Couche Epaisse
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CLV	Chromatographie Liquide sous Vide
RP- 18	Silice greffée en C-18
SiO₂	Gel de silice normale
ax	Axial
éq	Equatorial
d	Doublet
dd	doublet de doublets
ddd	doublet de doublets de doublets
t	Triplet
q	Quadruplet
s	Singulet
m	Multiplet
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
ROESY	Rotating-frame Overhauser Effect Spectroscopy
ROE	Rotating-frame Overhauser Effect
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
δ	Déplacement chimique exprimé en ppm
J	Constante de couplage exprimée en Hz
SM	Spectrométrie de Masse
EI	Ionisation par impacte Electronique
ESI	Spectrométrie de masse par Electrospray
HR-ESI	High Resolution-ESI
uma	Unité de masse atomique
Cq	Carbone quaternaire
F	Fraction
Hz	Herz
OH	Hydroxyle
m/z	Rapport masse / charge élémentaire de l'ion mmultiplet
ppm	Unité de (Parties Par Million, Parts per Million = 10 ⁻⁶ , RMN)
R	Radical
R_x	Alkyl
Glc	glucose
Xyl	xylose

Table des matières

Introduction	8
CHAPITRE I:Rappels bibliographique.	
I.1. La famille des <i>Fabacées</i>	10
I.1.1. Généralités.....	10
I.1.2. Répartition géographique.....	10
I.1.3 Classification.....	11
I.1.4. Importance des <i>Fabacées</i>	11
I.2. Le genre <i>Astragalus</i>	12
I.2.1 Description botanique et répartition géographique.....	12
I.2.2 L'espèce <i>Astragalus depressus</i>	12
I.2.2.1 Aspect botanique	12
I.2.3 Propriétés biologiques et pharmacologiques du genre <i>Astragalus</i>	13
I.2.3.1 Utilisation en médecine traditionnelle	13
I.2.3.2 Activités biologiques	14
I.2.3.3 Toxicité du genre <i>Astragalus</i>	14
I.2.4 Travaux phytochimiques antérieurs effectués sur le genre <i>Astragalus</i>	15
CHAPITRE II :Etude des Saponosides	
II.1 Les Saponosides.....	26
II.1.1. Généralité.....	26
II.1.2. Définition.....	26
II.1.3. Classification stucturale.	26
II.1.3.1 Saponosides stéroïdiques.	26
II.1.3.2 Saponosides triterpéniques.	27
II.1.3.3 Les sucres.	29
II.1.4. Biosynthèses des triterpenoïdes.	29
II.1.5. Propriétés et activités biologiques des soponosides.....	31
CHPITRE III :Etude phytochimique de l'espèce <i>Astragalus depressus</i>.	
III.1. Résultats et discussion.	32
III.1.1 Extraction.	32
III.1.2 Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle.....	33
III.1.3 Elucidation structurale du composé 1	33

CHAPITRE IV : Partie expérimentale.

IV.1. Matériel et appareillage.	58
IV.1.1. Récolte de la plante <i>Astragalus depressus</i> L.	58
IV.1.2. Méthodes chromatographiques.	58
IV.1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).	58
IV.1.2.2. Chromatographie liquide sous vide (VLC).	58
IV.1.2.3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC).	58
IV.1.3 Méthodes spectroscopiques.	59
IV.1.3.1 Spectrométrie de masse.	59
IV.1.3.2 Spectroscopie de RMN.	59
IV.2 Etude de l'espèce <i>Astragalus depressus</i>	61
IV.2.1 Extraction.	61
IV.2.2 Fractionnement et purification.	61
IV.2.3 Constantes physiques et données spectrale de composé isolé	64
Conclusion	67

Références bibliographiques

Résumé

Introduction

Introduction

Les plantes occupent une position très importante dans la vie quotidienne des hommes, puisque, elles sont utilisées comme bois de chauffage, matières premières dans l'immobilier, la décoration et dans les soins de maladies. Aujourd'hui, celles-ci sont une véritable ruche à médicaments car, elles sont totalement intégrées dans les mœurs de plusieurs franges de populations et particulièrement africaines et interviennent en pharmacopée traditionnelle dans la lutte contre de nombreuses maladies telles que le paludisme, la dysenterie, la fièvre jaune, le cancer et la stérilité,...etc.

Le continent africain est un des continents fourni d'une biodiversité la plus riche dans le monde. L'Algérie possède une des flores les plus diversifiées et les plus originales du bassin méditerranéen. Cette flore compte près de 3 000 espèces réparties dans près de 150 familles parmi lesquelles près de 653 espèces sont endémiques [1]. Ce potentiel de plantes médicinales constitue des milliers d'espèces présentant divers intérêts, est très peu exploré du point de vue chimique et pharmacologique.

Dans le cadre de la valorisation de notre flore, par la découverte de principes actifs originaux, nous nous sommes intéressés à l'investigation chimique d'une plante Fabaceae nommée *Astragalus depressus*. Cet intérêt s'explique par la richesse des plantes du genre *Astragalus* en métabolites secondaires dotés d'activités biologique remarquables comme les saponoside cycloartaniques.

Ce mémoire est organisée comme suit :

Dans le premier chapitre de ce mémoire, il est présenté une description botanique du genre *Astragalus* et de la famille Fabaceae ainsi que l'utilisation traditionnelle des plantes de ce genre. Cette partie est suivie d'une synthèse bibliographique résumant les différentes investigations phytochimiques réalisées sur des espèces de genre *Astragalus*.

Le second chapitre rapporte l'étude théorique des saponosides. Cette partie englobe leur classification chimique, biosynthèse et intérêt thérapeutique.

La troisième partie est consacrée à l'investigation phytochimique de l'espèce *A.depressus*. Dans cette partie, il est décrit l'isolement, la purification et la caractérisation structurale du composé isolé.

Le quatrième chapitre est consacré aux travaux expérimentaux effectués sur l'extrait AcOEt de l'espèce *A. depressus*. Les différentes méthodes chromatographiques et spectroscopiques utilisées.

CHAPITRE I

Rappels bibliographiques.

I.1 La famille des *Fabacées*

I.1.1 Généralités

La famille des Fabacées (ex. *Légumineuses*) est l'une des plus importantes du règne végétal [2], communément appelée fabales comptent 630 genres et 18000 espèces environ, répandues dans le monde entier [3]. Dans l'Algérie on enregistre 53 genres et 339 espèces [4].

La famille des Fabacées est la famille des plantes dicotylédones. Depuis longtemps, elles portaient le nom Papilionacées à cause de la forme spéciale des fleurs où l'on reconnaît par un pétale supérieure ou étendard, deux pétales inférieurs unis ou carène et deux pétales latéraux ou ailes.

De nombreuses Légumineuses constituent une source importante de protéines et huiles végétales [5].

I.1.2 Répartition géographique

Le principal centre de la diversité des Fabacées est situé en Amérique du centre et du sud. D'autres centres de la diversité sont localisés également en Afrique et en Asie. En général, les Fabacées sont distribuées dans tous les biomes terrestres « Figure I.1 » [6].



Figure I.1 : Carte de répartition géographique des Fabacées (en rouge) [7].

I.1.3 Classification

Selon la Classification phylogénétique d'APG III (2009) (Angiosperm Phylogeny Group), les Fabaceae reconnaît trois sous-familles, Faboideae (*Papilionoideae*), *Caesalpinioideae* et *Mimosoideae*.

Les plantes Faboideae sont cosmopolites et se retrouvent presque dans tous les milieux du globe terrestre alors que les plantes *Mimosoideae* et *Caesalpinioideae* sont plutôt tropicales.

La position systématique des Fabaceae est présentée au tableau suivant.

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

Tableau I.1 : Classification des *Fabaceae*

I.1.4 Importance des *Fabacées*

Certaines spontanées ou cultivées, les Fabacées au point de vue de leurs propriétés, ont un haut intérêt économique et médical. Elles fournissent de nombreuses substances alimentaires, des substances médicales, des bois magnifiques pour la construction, des substances tinctoriales, des gommes et des résines, etc.

Sur le plan agricole dans le monde entier. Les Fabacées herbacées cultivées dans les régions tempérées peuvent jouer un rôle important comme engrais vert ou l'assurance du sol

pour réduire l'érosion [8].

Sur le plan alimentaire, un grand nombre de *Fabacées* à graines ou même les fruits comestibles : haricot, pois, fève; contient beaucoup d'amidon et une proportion de matière azotée supérieure à celle des viandes de boucherie.

Sur le plan industriel, les *Fabacées* exotiques nous fournissent des bois très recherchés en ébénisterie; l'Indigotier (*Indigofera tinctoria*) produit l'indigo, matière colorante bleue; le bois de Campêche (*Hematoxylon campechianum*), cultivé en Inde, fournit une matière colorante rouge.

Sur le plan pharmaceutique les *Fabacées* sont très intéressants vu le nombre élevé d'espèces figurant dans les pharmacopées et donnent plusieurs produits utilisables en thérapeutique [9,10].

I.2 Le genre *Astragalus*

I.2.1 Description botanique et répartition géographique

En général, les plantes du genre *Astragalus* présentent, selon Quezel et Santa [11], les caractéristiques suivantes : un calice tubuleux en cloche, à 5 dents subégales ou très inégales. Pétales généralement longuement onguiculés. 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.

Selon Ozenda [12], ce genre qui est le plus important de la famille des légumineuses, comporte plus de 1500 espèces. La plupart des espèces se rencontre en orient, une cinquantaine en Afrique du Nord et quinze environ au Sahara [12].

En Algérie, on trouve plusieurs espèces. On citera *A. gryphus* (Saida, Tiaret) et *A. Goua* (Sétif, Laghouat, Tlemcen) [11].

I.2.2 L'espèce *Astragalus depressus*

I.2.2.1 Aspect botanique

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 [13].



Figure I.2: Espèce *Astragalus depressus*.

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

- Famille : Fabaceae (Leguminosae).
- Sous-famille : Faboideae.
- Genre : *Astragalus*.
- Espèce : *Astragalus depressus*.

I.2.3 Propriétés biologiques et pharmacologiques du genre *Astragalus*

I.2.3.1 Utilisation en médecine traditionnelle

Les espèces du genre *Astragalus* sont utilisées dans la médecine traditionnelle dans le monde entier comme des herbes médicinales contre l'ulcère de l'estomac, la toux, la bronchite chronique, l'hypertension, les troubles gynécologiques, le diabète et les piqûres venimeuses de scorpion [14].

En Algérie, l'espèce *Astragalus gyzensis* Bunge est utilisée pour soulager les morsures des serpents [15].

Au Maroc, la décoction des feuilles et des racines d'*Astragalus tenuifolius* Desf. est utilisée contre la fatigue et la helminthiase [16].

Certaines espèces d'astragale comme *Astragalus mongholicus* et *A. membranaceus* sont utilisées en médecine traditionnelle chinoise en raison de leurs propriétés anticancéreuses [17, 18, 19].

Astragalus membranaceus est une plante traditionnelle chinoise bien connue pour le traitement des maladies neurodégénératives, elle compte parmi les herbes toniques les plus populaires. Les Chinois utilisent les racines de cette espèce comme un fortifiant [20].

I.2.3.2 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 [21].

Par ailleurs, des études biologiques ont confirmé que les triterpènes glycosylés à squelette cycloartane isolés d'*Astragalus oleifolius*, sont dotés d'activités antipaludique, antitrypanosomique et antileishmaniose [22].

En Egypte où le genre en question est représenté par 32 espèces [9], certaines ont montré des activités immunostimulante, cardiovasculaire et antivirale [23,24]. Ainsi, l'extrait brut de *A. Kahiricus* montre une cytotoxicité reproductible contre le cancer ovarien de la ligne cellulaire A 2780 [25].

I.2.3.3 Toxicité du genre *Astragalus*

Le genre *Astragalus* regroupe les espèces toxiques ainsi que les non toxiques.

a-Astragales non toxiques

La plupart des astragales ne sont pas toxiques. Certaines sont utilisées comme des espèces de pâturage, comme *Astragalus nuttalianus* et *Astragalus cicer* rencontrées respectivement dans le Sud-Ouest et à l'Ouest des Etats Unis sont très appréciées par le bétail [26]. De même pour les espèces *Astragalus gyzensis* Bunge. et *Astragalus gombo* Bunge. localisés dans le nord du Sahara Algérien [15].

b- Astragales toxiques : Les espèces toxiques de ce genre sont classées selon la nature de la toxine dominant et le type d'intoxication qu'elles provoquent, et se divisent en trois catégories [20]:

- Les astragales accumulatrices de Sélénium [27] .

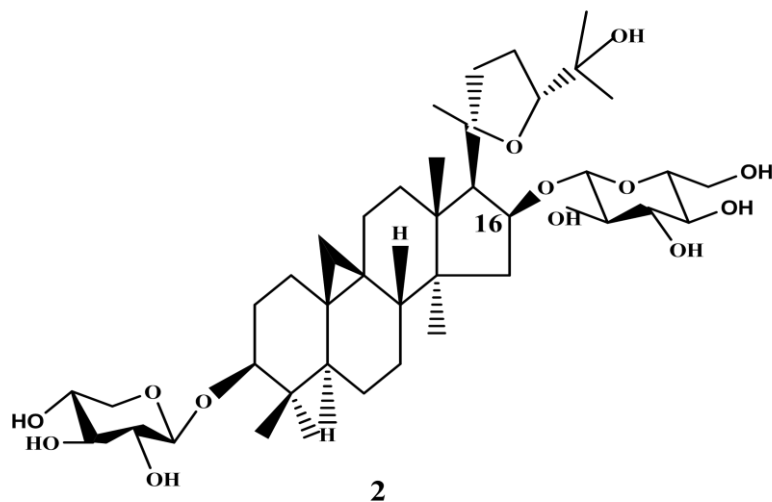
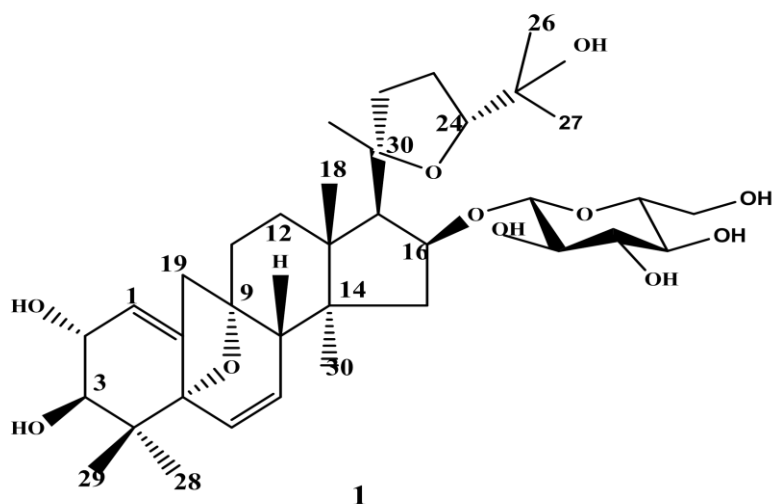
- Les astragales synthétisant des produits nitrés [28].
- Les astragales contenant des alcaloïdes indolizidiques [29].

I.2.4 Travaux phytochimiques antérieurs sur le genre *Astragalus*

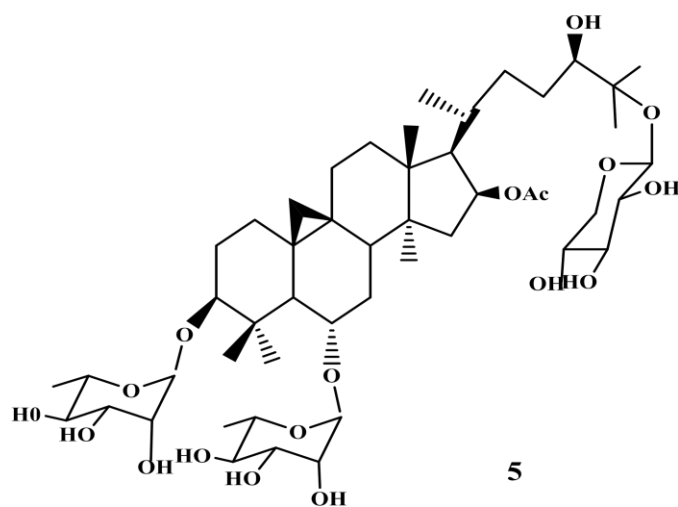
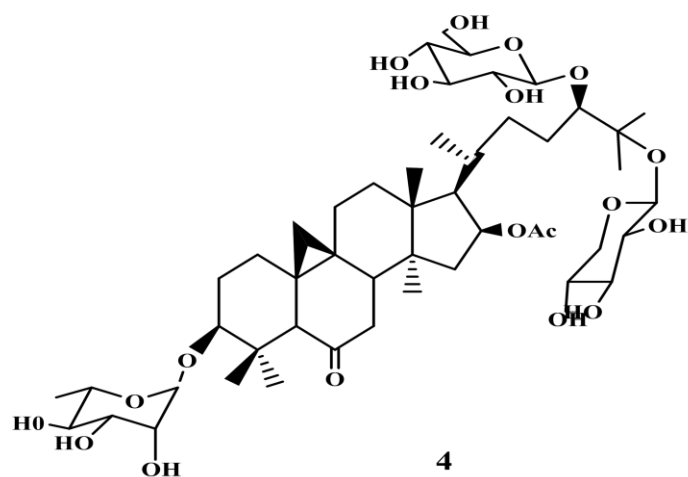
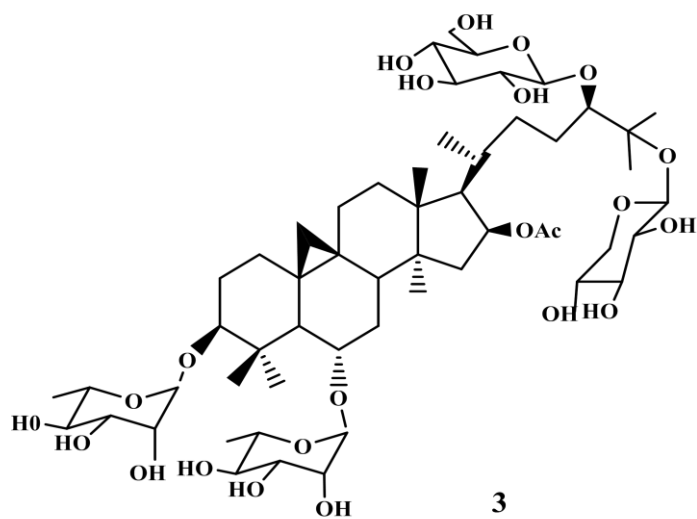
Les investigations chimiques effectués sur le genre *Astragalus* ont permis essentiellement l'isolement de saponines notamment à squelette cycloartane et oléanane, des composés phénoliques surtout les flavonoïdes et les isoflavonoïdes. Les polysaccharides sont aussi abondants dans ce genre.

Une étude portant sur l'extrait méthanolique des racines de *A. prusianus*, a révélé la présence de deux saponosides nouveaux à squelette cycloartane.

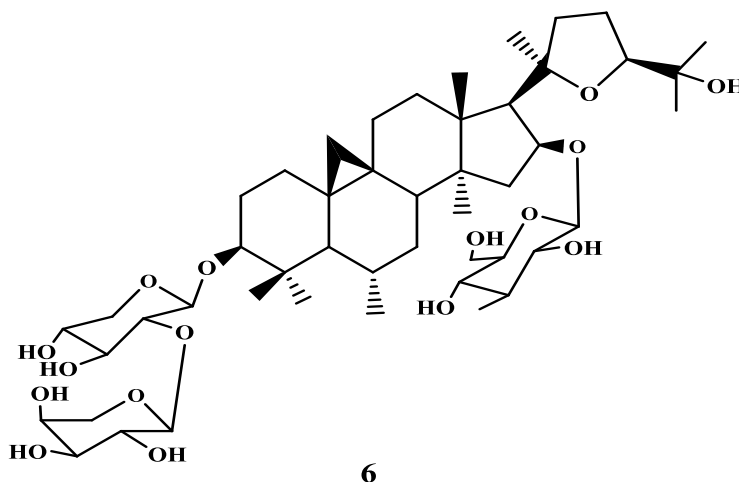
Il s'agit de : 16-O- β -D-glucopyranosyl-20(S), 24(R)-5 α , 9-diepoxy-2 α ,3 β ,25-tetrahydroxy-9, 10-seco-cycloarta-1(10),6(7)-diene (**1**) et 3-O- β -D-xylopyranosyl- 16-O- β -D-glucopyranosyl-20(S),24(R)-epoxy-3 β , 16 β , 25-tetrahydroxy-cycloartane (**2**) [30].



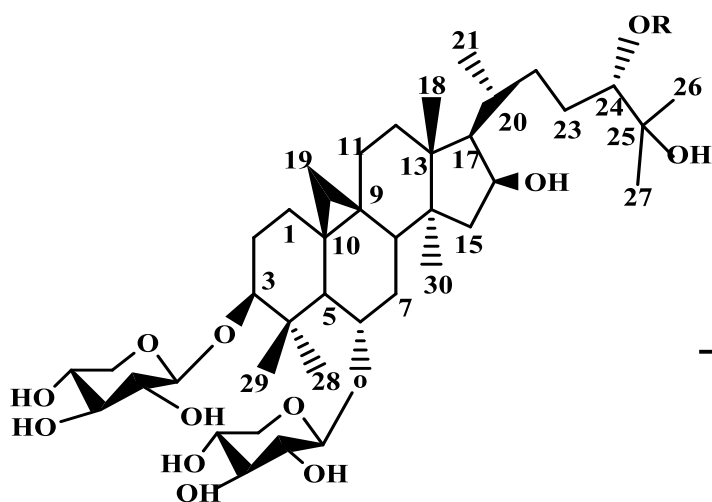
Autre étude phytochimique réalisée sur les parties aériennes de la plante *A. cicer*, permis d'isolé trois saponines cycloartaniques : Cicerosides A (3), B (4), Eremophiloside B (5) [31].



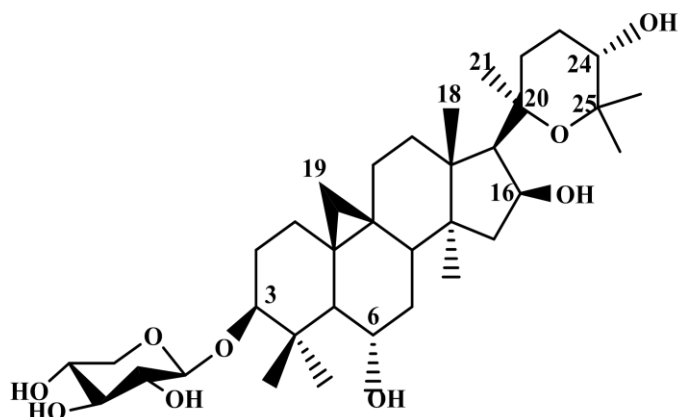
Une saponine de type cycloartane a été isolé de la plante *A. halicacabus* :20(R),24(S)-3-O-[α -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl]-20,24-époxy-16-O- β -D-glucopyranosyl 3 β ,6 α ,16 β ,25-tetrahydroxycycloartane (**6**)[32].



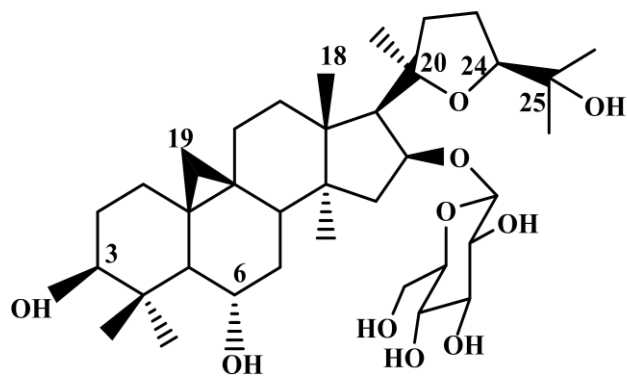
Quatre triterpènes de type cycloartanes et un de type oléanane ont été isolés de *Astragalus hareftae* :Harefloside A(**7**), B(**8**), C(**9**), D(**10**) et 3-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucuronoglucuronopyranosyl] soyasapogénol B (**11**) [33].



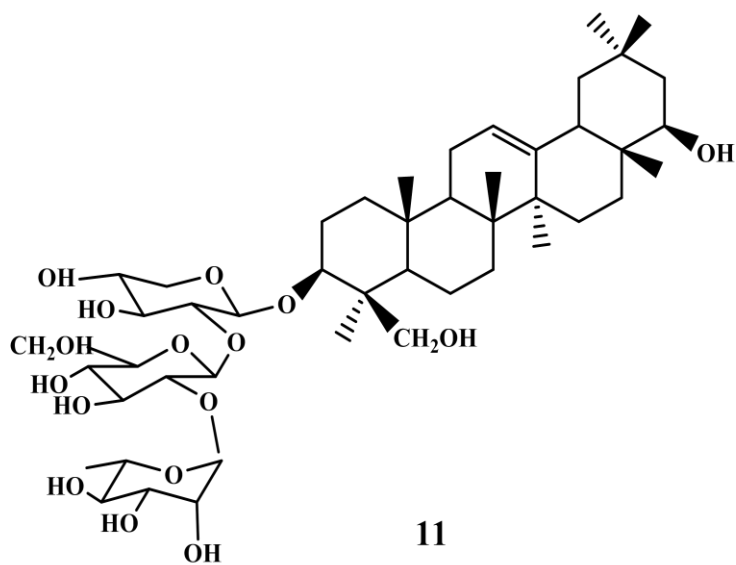
composé	7	8
R	H	



9

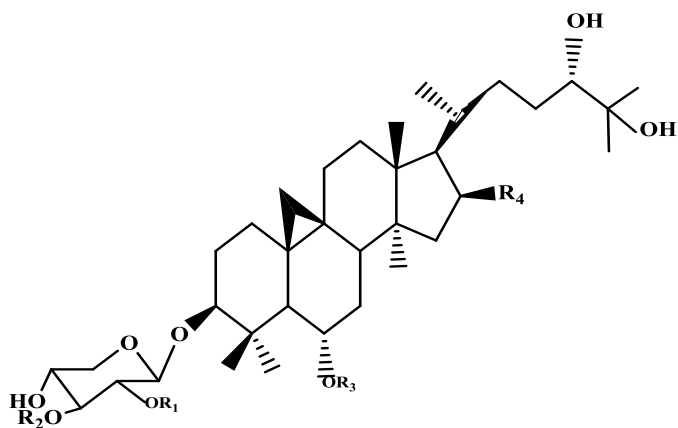


10

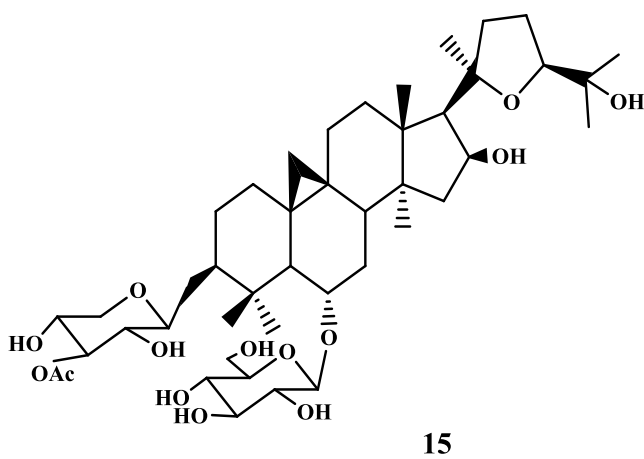


11

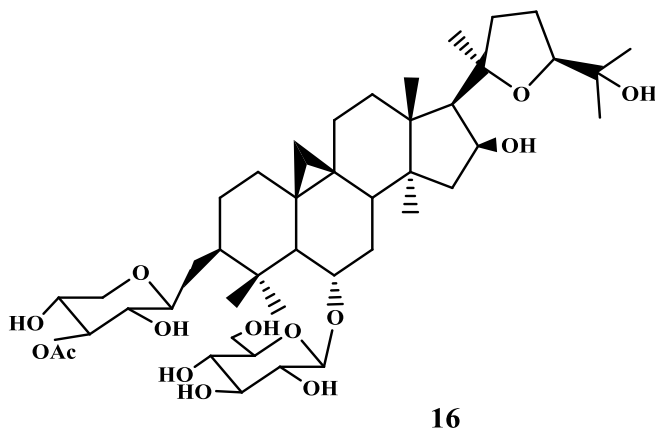
Une autre étude chimique réalisée sur les racines de *A.membranaceus*, a donné cinq saponines à squelette cycloartaniques : Agroastragaloside V (**12**), Agroastragaloside I (**13**), II (**14**), Isoastragaloside II (**15**), Astragaloside IV (**16**) [34].



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
12	Ac	H	glc	H
13	Ac	Ac	glc	OH
14	Ac	H	glc	OH

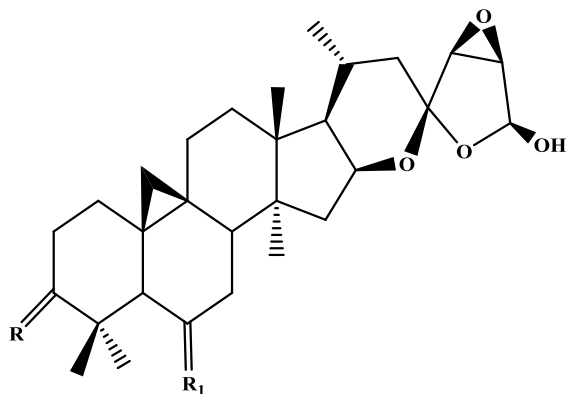


15

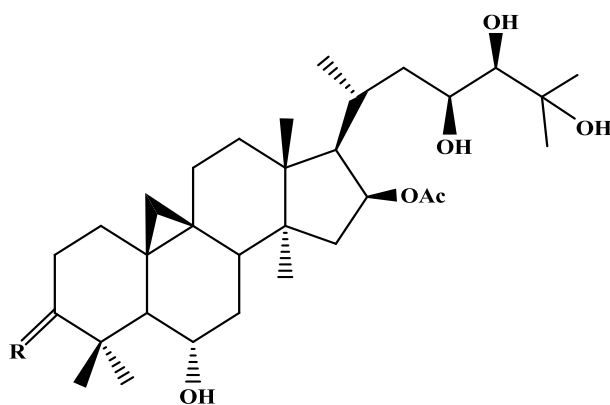


16

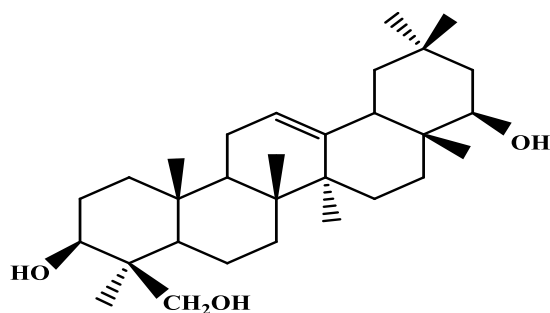
Quatre saponines de type cycloartanes : Bicuspiside C (17), Bicusposide D (18), E (19), F (20), et une saponines de type oléanane :,Soyasapogénol B (21) ont été isolés de la plante entière *Astragalus bicuspis*. [35].



	17	18
R	β -O-xyl	O
R₁	α -OH	O



	R
19	O
20	β -O-xyl

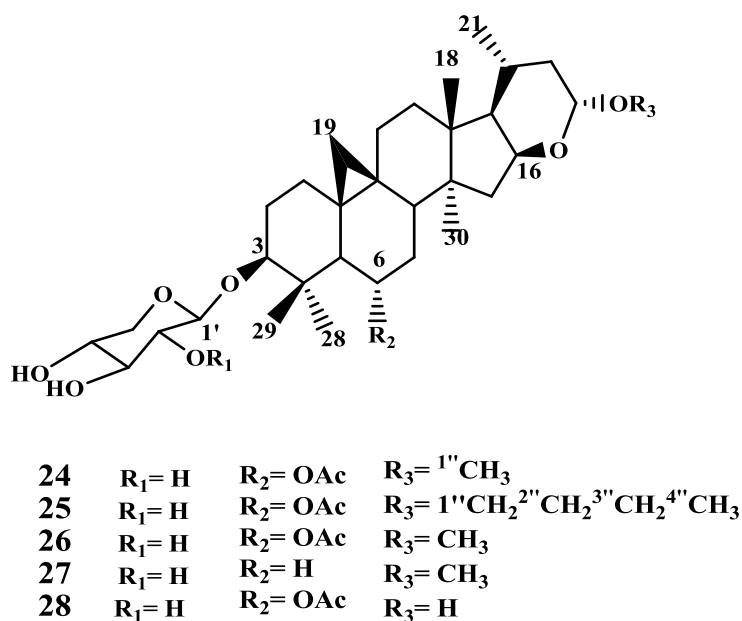
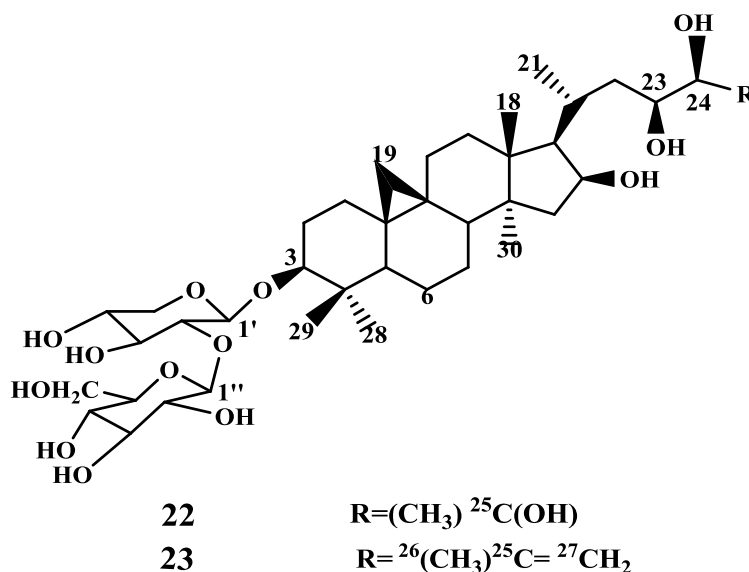


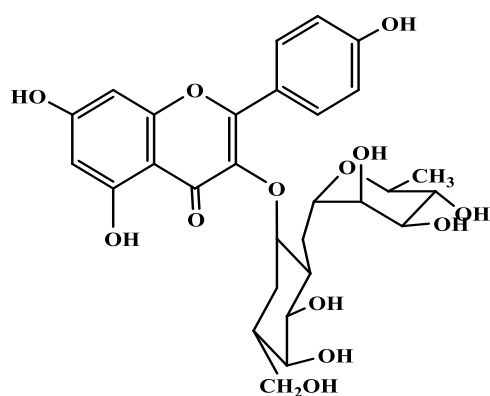
21

L'étude phytochimique réalisée sur les racines de la plante *Astragalus gombo* Coss. & Dur., permet d'isoler neuf composés.

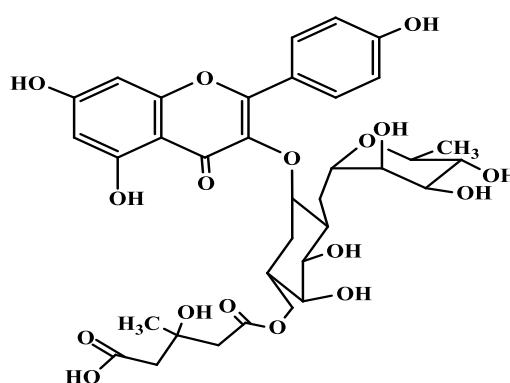
Sept saponines à squelette cycloartane dont six nouveaux (gomboside A à gomboside F): gomboside A (**22**), gomboside B (**23**), gomboside C (**24**), gomboside D (**25**), gomboside E (**26**), gomboside F (**27**), tomentoside II (**28**).

Et deux flavonoïdes *O*-glycosylés : kaempférol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[6-*O*-(3-hydroxy-3-méthylglutaryl)- β -D-galactopyranoside](**29**), kaempférol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside (**30**)[36].



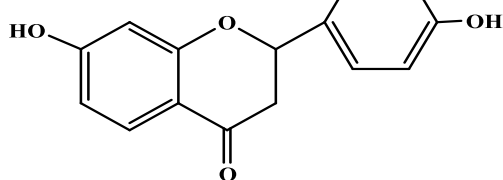


29

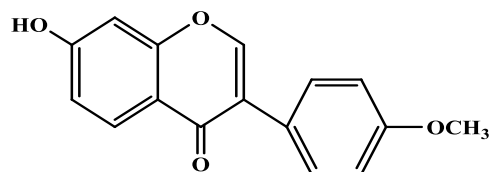


30

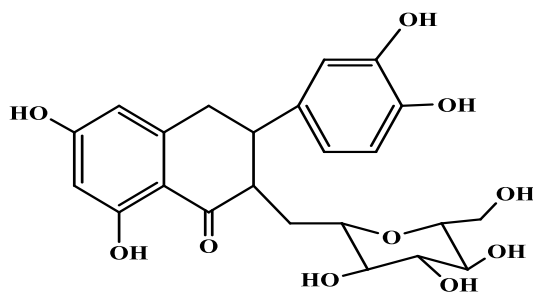
L'analyse phytochimique des racines d'*Astragalus maximus* a donné trois flavonoides només : liquiritigenin (31), formononetin (32), isoquercitrin (33) et une saponine de type cycloartane acylée, astragaloside I (34) [37].



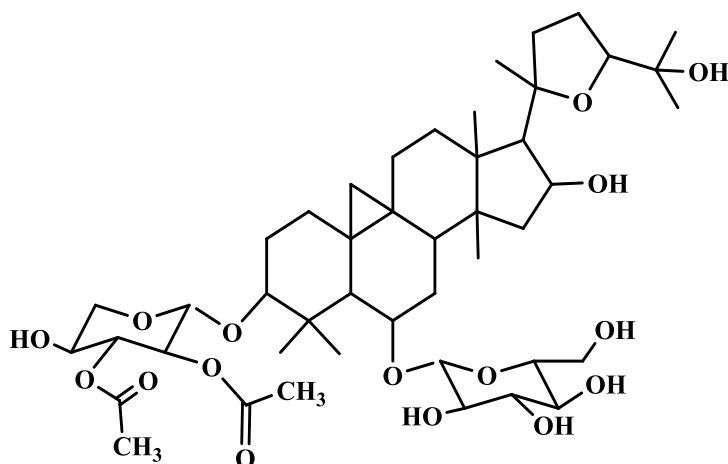
31



32

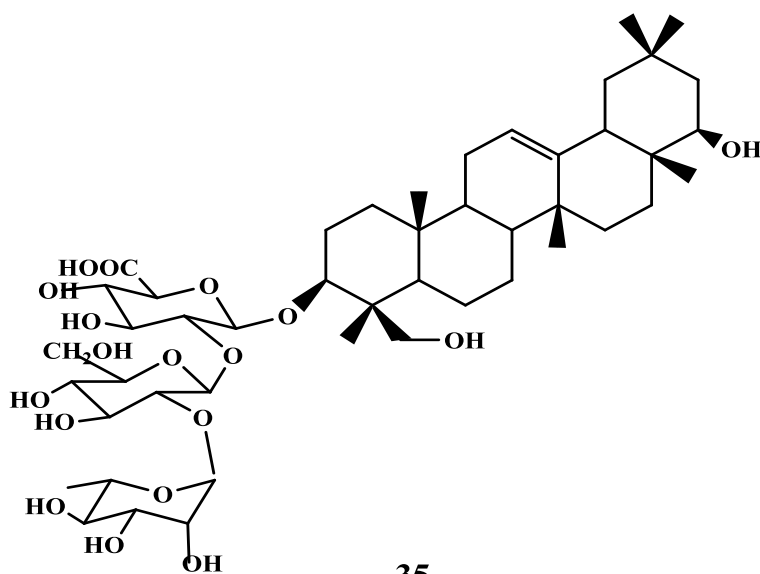


33

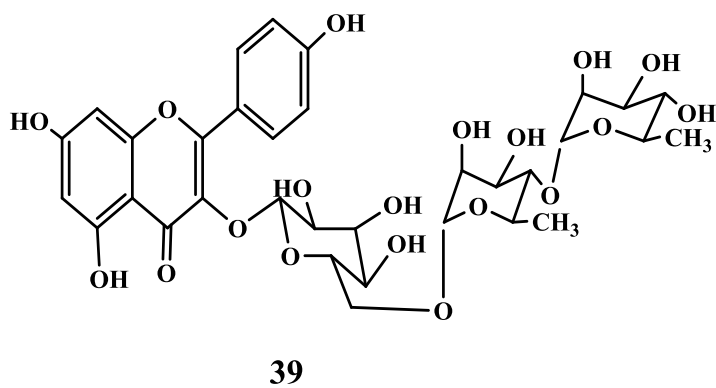
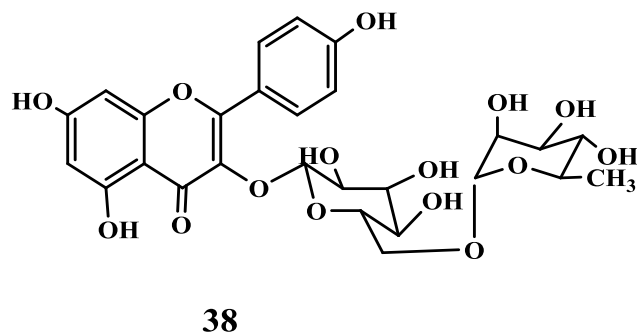
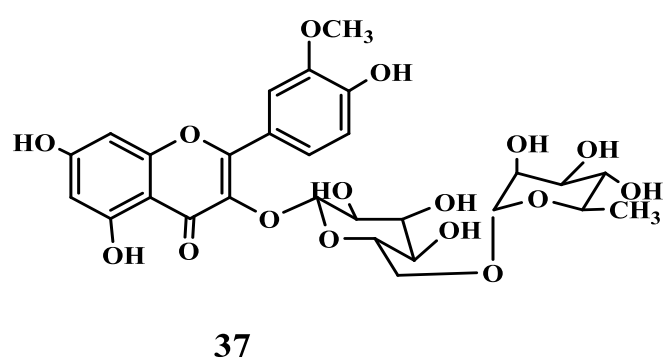
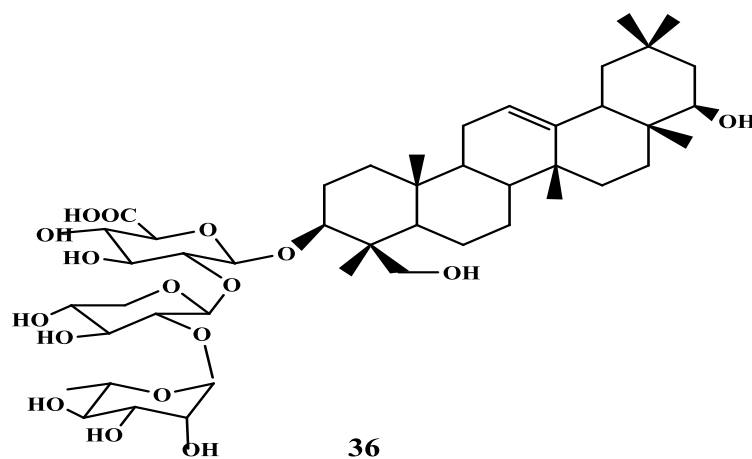


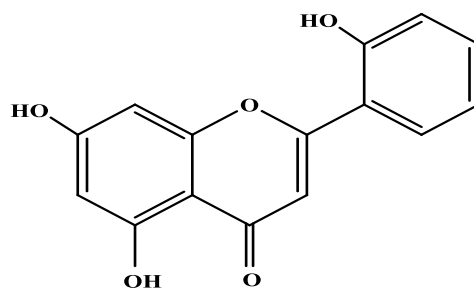
34

Dans une autre étude, six métabolites secondaires connus, dont deux saponines, quatre flavonoïdes ont été isolés de l'extrait méthanolique de *A. cruciatus*.: azukisaponin V (35) et astragaloside VIII (36) [24], narcissin (37), nicotiflorin (38) et kaempferol 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(14)- α -L-rhamnopyranosyl-(16)- β -D-glucopyranoside (39), 5,7,2'-trihydroxyflavone (6), et β -sitosterol 3-O- β -D-glucoside (40) [38].



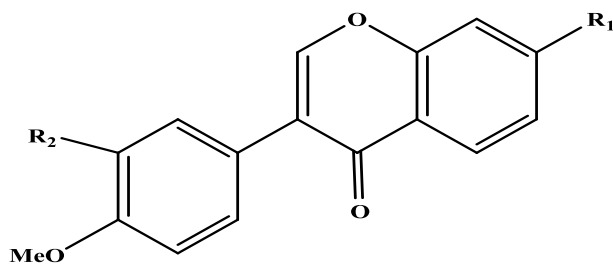
35



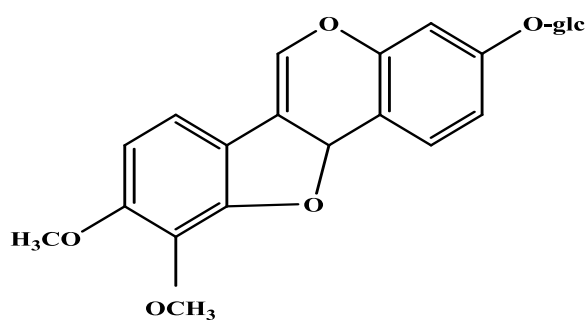


40

L'étude phytochimique des racines d'*Astragalus mongholicus*, a donnée cinq flavonoides, Formononetine (**41**), Ononine (**42**), Calycosine (**43**), Calycosine 7-O- glucopyranoside (**44**), 9,10-diméthoxypterocarpan 3-O-β-D-gluco-pyranoside (**45**) [39].



	R ₁	R ₂
41	OH	H
42	Oglc	Hc
43	OH	OH
44	Oglc	OH



45

CHAPITRE II

Etude des saponosides.

II.I Les saponosides

II.1.1 Généralité

Les saponines ou saponosides sont une classe spécifique de métabolites secondaires, généralement connues comme des composés non-volatils, tensio-actifs [40], des produits naturels abondamment retrouvés dans le règne végétal [41]. Il est intéressant de noter que des organismes marins comme le concombre de mer contiennent des saponines par exemple le frondoside A isolé de *Cucumaria frondosa*, l'eximisoside A isolé de *Psolus eximius* [42].

II.1.2 Définition

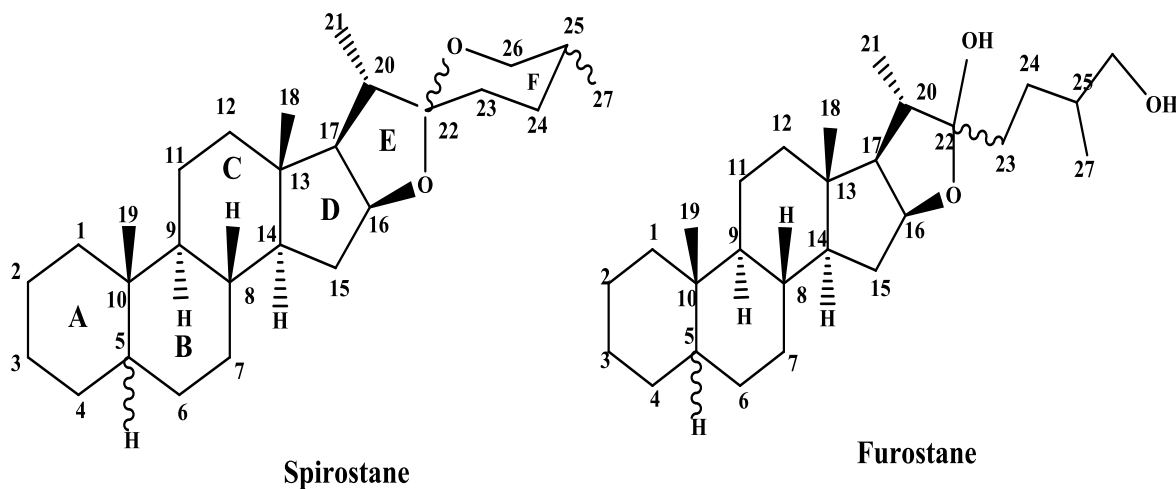
Le nom saponine dérive du mot latin « sapo », qui signifie savon, parce que ces composés moussent une fois agités avec de l'eau. Structuralement, les saponines sont constituées d'un squelette stéroïdique ou triterpénique (aglycones non polaires) porteur d'une ou de plusieurs sections sucres, de masse moléculaire entre 600 à 2000 Daltons et de structure complexe. Cette combinaison d'éléments structuraux polaires et non polaires explique leur comportement moussant en solution aqueuse. La nature des sections osidiques retrouvées à l'intérieur des saponines est très variée, mais elles sont habituellement constituées de D-glucose, D-galactose, L-rhamnose, D-xylose, D-fucose et acide D-glucuronique [43].

II.1.3 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 [44].

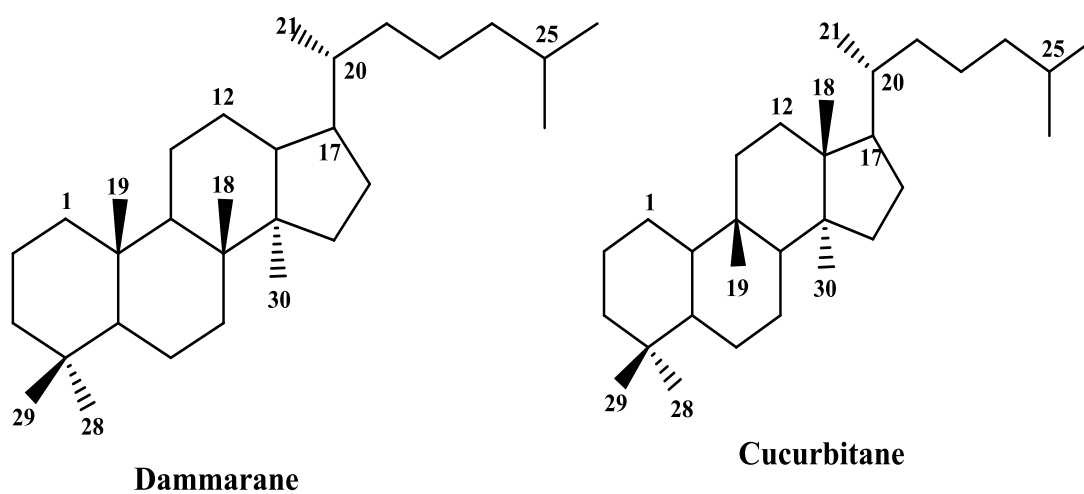
II.1.3.1 Saponosides stéroïdiques

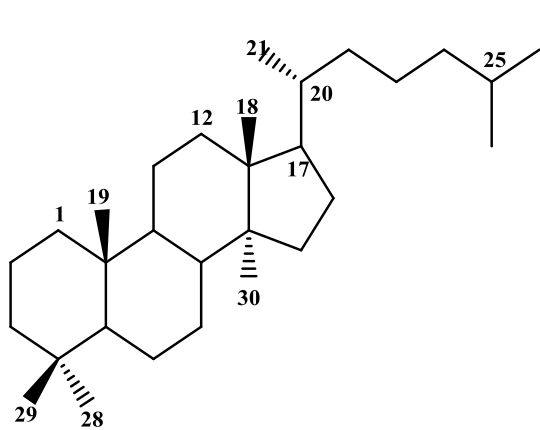
La structure chimique des génines stéroïdiques est similaire à celle de nombreuses hormones humaines, et de plusieurs plantes qui contiennent un effet sur l'activité hormonale. L'igname sauvage (*Dioscorea villosa*) contient des saponines stéroïdiques à partir desquelles, on synthétise la pilule contraceptive [20]. Deux principaux types de squelette existent [45]. : pentacyclique (furostane) et hexacyclique (spirostane).



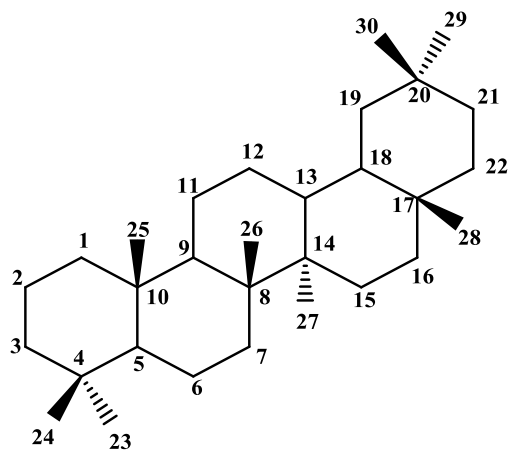
II.1.3.2 Saponosides triterpéniques

Les saponosides triterpéniques sont rencontrés principalement chez les angiospermes dicotylédones (Araliaceae, Caryophyllaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Fabaceae...) [46]. Leur génine à 30 atomes de carbone peut être tétracyclique (dammarane, cucurbitane, lanostane) ou pentacyclique (oléanane, ursane, lupane, friedelane, hopane) [45].

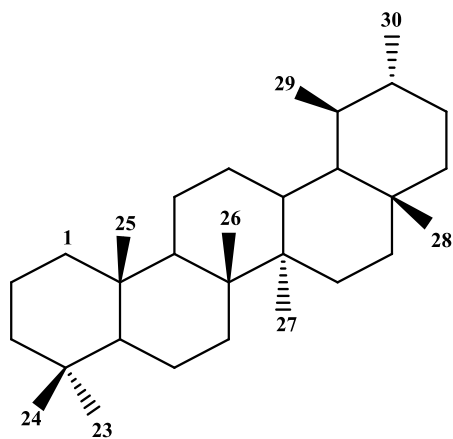




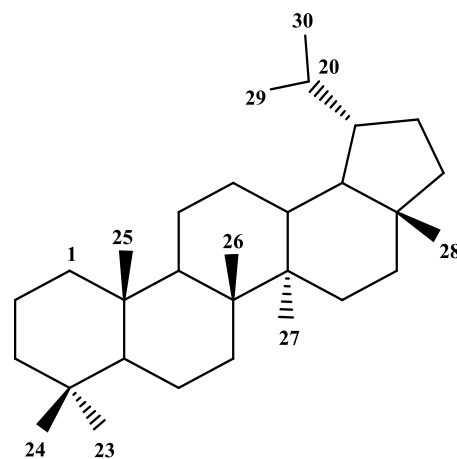
Lanostane



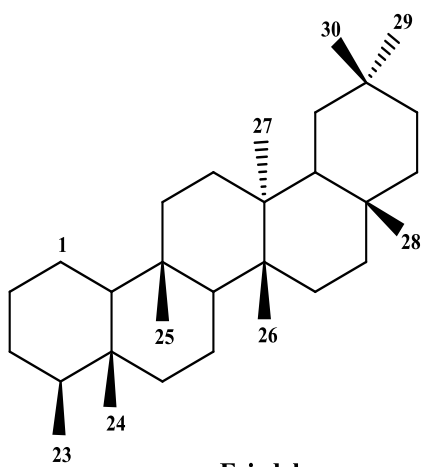
Oléane



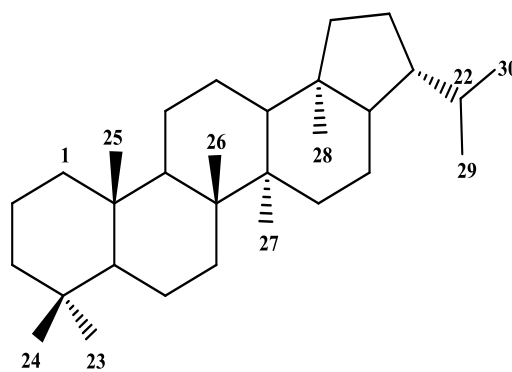
Ursane



Lupane



Friedelane



Hopane

II.1.3.3 Les sucres

Les sucres constituent la partie hydrophile des saponines. Elles peuvent être constituées d'une ou plusieurs chaînes osidiques (linéaires ou ramifiées) à des positions différentes sur l'aglycone. Les saponines stéroïdiques, ainsi que triterpéniques sont souvent des saponines monodesmosidiques en général C-3 par la fixation d'une unique chaîne de sucres. Des saponines bidesmosidiques sont rencontrées parmi les saponines triterpéniques de type oléane avec une liaison en C-3 et C-28 et pour les saponines stéroïdiques de type furostane avec une fixation en C-3 et C-26 [47]. Parmi les saponines triterpéniques de type cycloartane on peut trouver des structures tridesmosidiques, les chaînes de sucres sont fixés en C-3, C-6, C-16, C-24 et C-25 dans la plupart des cas [48], et même des saponines tétradesmosidiques ont été décrites mais semblent être très rares [49].

Le tableau ci-dessous regroupe les sucres les plus fréquemment rencontrés dans les saponines:

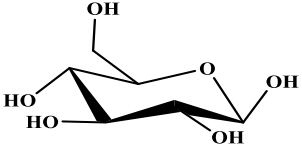
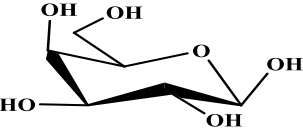



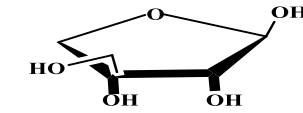

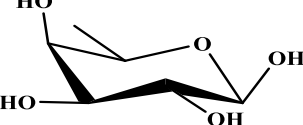
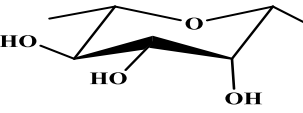
 D-glucopyranose	 D-galactopyranose	 D-xylopyranose
 L-arabinopyranose	 acide D-glucuronique	 D-apiofuranose
 D-quinovopyranose	 D-fucopyranose	 L-rhamnopyranose

Figure II.1. Les principaux sucres constitutifs rencontrés dans les saponines [47].

II.1.4 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 [50]. La figure suivante (Figure II.2) montre le schéma de biosynthèse des triterpénoïdes.

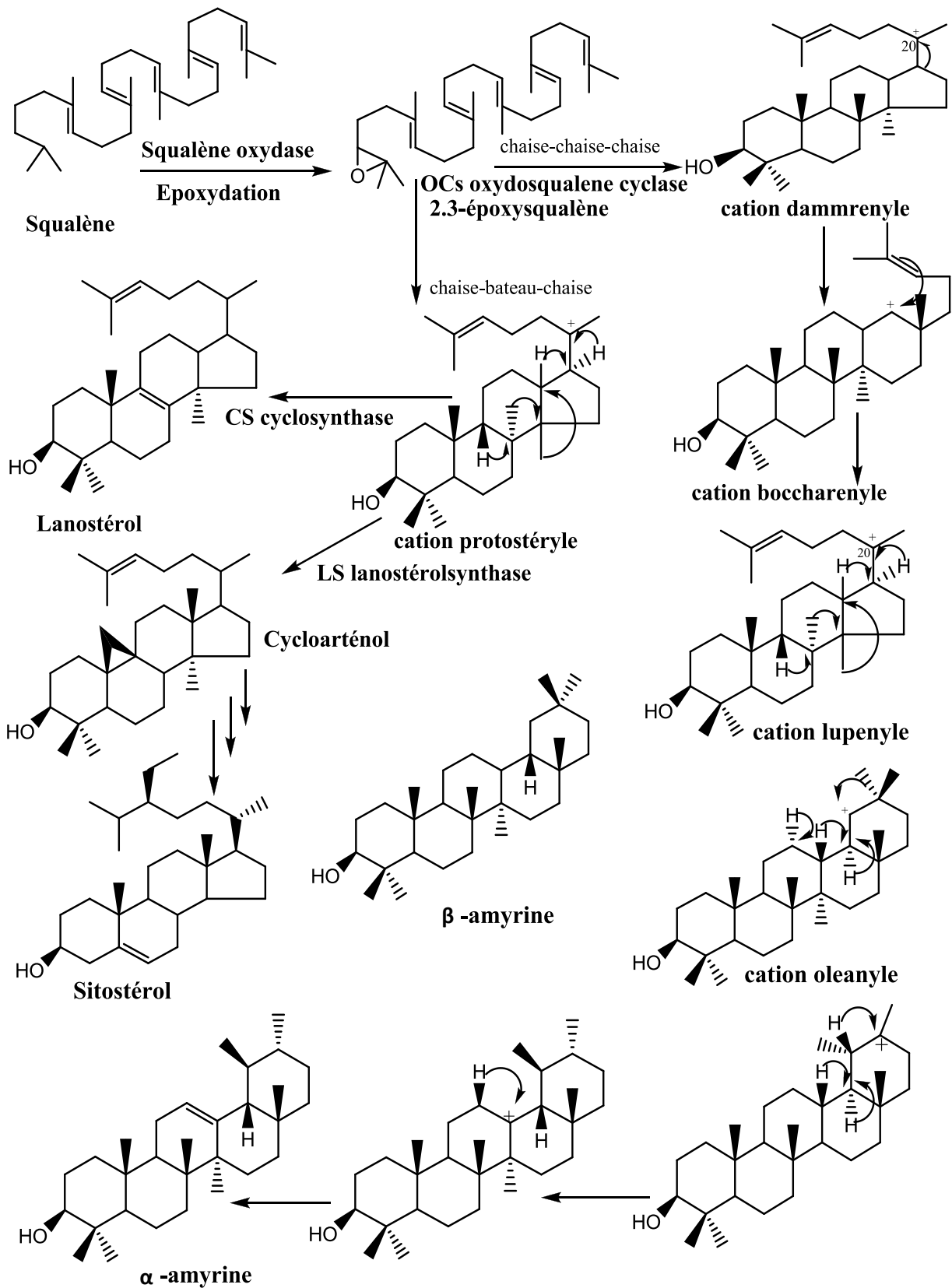


Figure II.2: Schéma de biosynthèse des triterpénoïdes

II.1.5 Propriétés et activités biologiques des saponines

De nombreuses revues rapportent que les saponines existent dans les plantes sous forme biologiquement active et sont impliquées dans la phyto-protection antimicrobienne [51]. Elles ne sont pas limitées qu'à la protection des plantes, mais elles présentent aussi des activités biologiques variées, principalement dans les domaines de l'immunologie, la cancérologie et la microbiologie [52,53,54,55]. Ces métabolites manifestent plusieurs propriétés pharmacologiques, hémolytiques, antimicrobiennes, insecticides, anti-inflammatoires, antalgiques [56], réduction du cholestérol et effet cardiovasculaire, activité antivirale.

Les saponines triterpénoïdes de la famille des Fabaceae ont montré une activité antiherpétique [57]. Et leur structure influencerait sur cette activité en particulier de la nature, du nombre et la séquence des sucres dans les saponines. Ainsi, elles sont employées dans la phytothérapie et dans l'industrie cosmétique. Elles formeraient les principaux constituants de plusieurs remèdes issus des plantes [58].

CHAPITRE III

Etude phytochimique de l'espèce Astragalus depressus

III.1. Résultats et discussions

III.1.1 Extraction

La plante *Astragalus depressus* a été récoltée en Mai 2011 dans la région de kenchela. La plante découpée, séchée et broyée, ont donné 800 g de poudre fine. Cette dernière a été macérée dans un mélange éthanol-eau (70%-30%) pendant 48 heures. Cette opération est répétée deux fois avec renouvellement de solvant. Après filtration et concentration de l'extrait, une solution aqueuse a été obtenue. Cette solution est soumise à une extraction liquide-liquide par les solvants suivants : éther de pétrole, acétate d'éthyle et enfin par n-butanol. Les trois phases organiques récupérées sont évaporées et concentrées à sec pour conduire aux extraits suivants : éther de pétrole (2.5 g), acétate d'éthyle (9.5 g) et n-butanol (25 g). Le protocole d'extraction est schématisé dans la figure III.1.

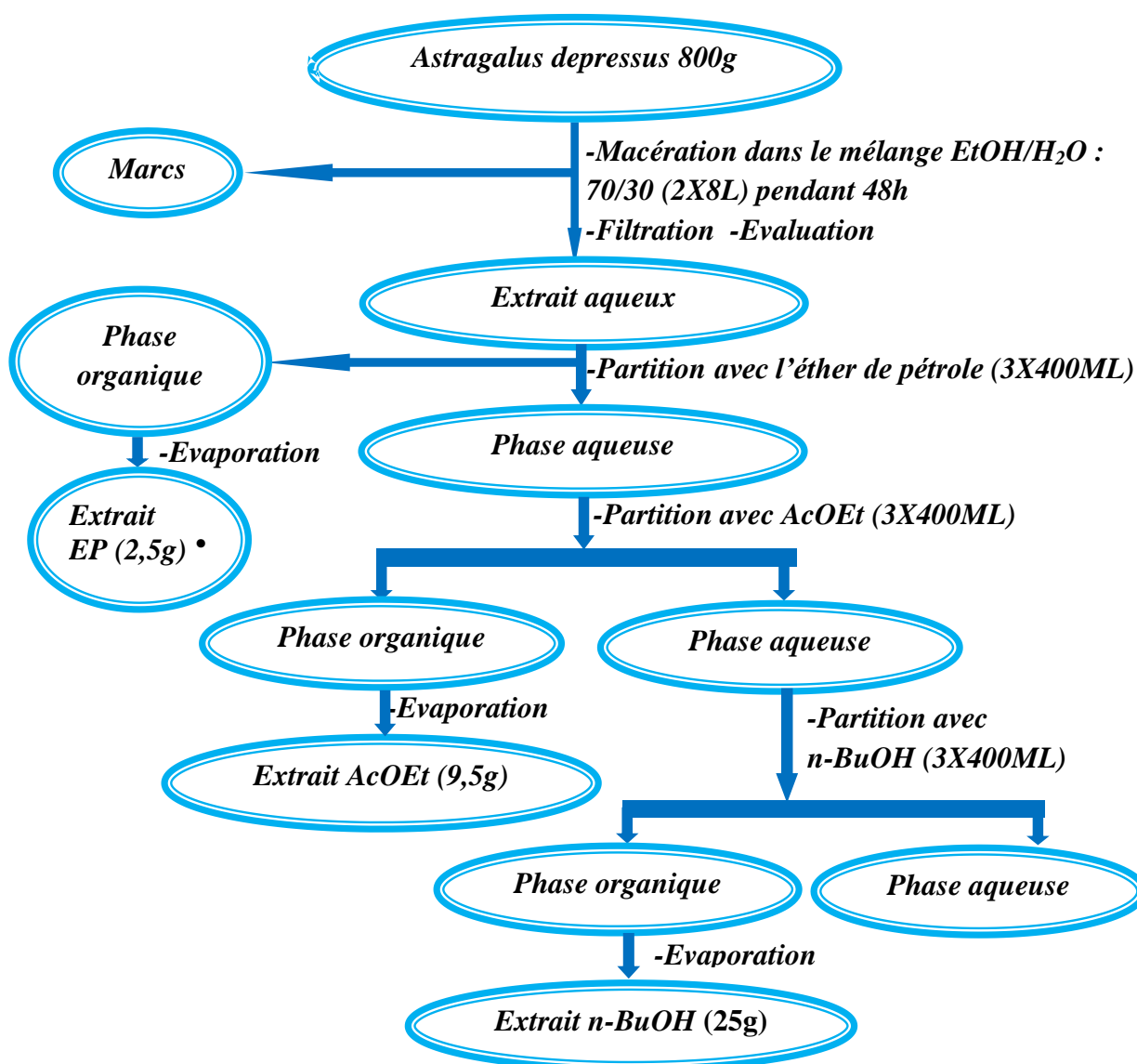


Figure III.1 : Protocole d'extraction de la plante *Astragalus depressus*

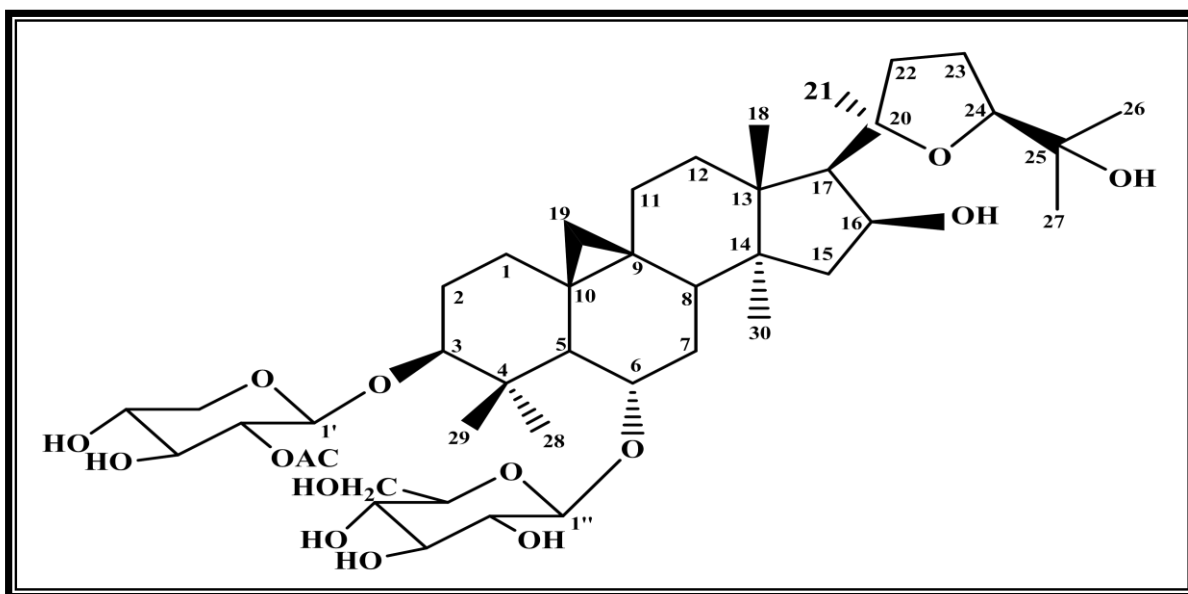
III.1.2 Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle

7 g de l'extrait acétate d'éthyle ont subi une VLC (chromatographie liquide sous vide) sur gel de silice en phase normale. L'élution a été réalisée par le mélange de solvants suivants : CHCl_3 -MeOH à différents gradients (100:0 à 70:30), puis un mélange CHCl_3 - MeOH- H_2O (70:30:1 à 50:50:10). Les fractions collectées de 100 ml ont été examinées par CCM. La révélation des CCM obtenues a été faite par un mélange acide-sulfurique-acide acétique-eau : 25/25/50 (v/v/v) et chauffage à 100 °C, permettant de constituer 10 fractions allant de F1 à F10

La fraction F7 de masse égale à 614 mg est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale. L'élution réalisée par un gradient de solvants : CHCl_3 /MeOH (100 :0 à 90:10), a permis d'obtenir 5 sous-fractions. Une chromatographie préparative sur silice normale ou C.C.E (éluant : CH_2Cl_2 /méthanol(75:25) réalisée sur la sous-fraction F7-4 (25mg), a permis l'isolement du composé 1 à l'état pur (2 mg).

III.1.3 Elucidation structurale du composé 1

La détermination structurale de composé isolé a été réalisée grâce à la combinaison des différentes méthodes spectroscopiques RMN ^1H et ^{13}C , RMN 2D (COSY H-H, HSQC, TOCSY, HMBC et ROESY), spectrométrie de masse ESI et par comparaison avec les données de la littérature.



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

Le spectre de masse ESI du composé A enregistré en mode positif (figure III.2), montre un pic d'ion pseudo-moléculaires $[M+Na]^+$ à m/z 849, suggérant une masse moléculaire de 826 uma et une formule brute en $C_{43}H_{70}O_{15}$.

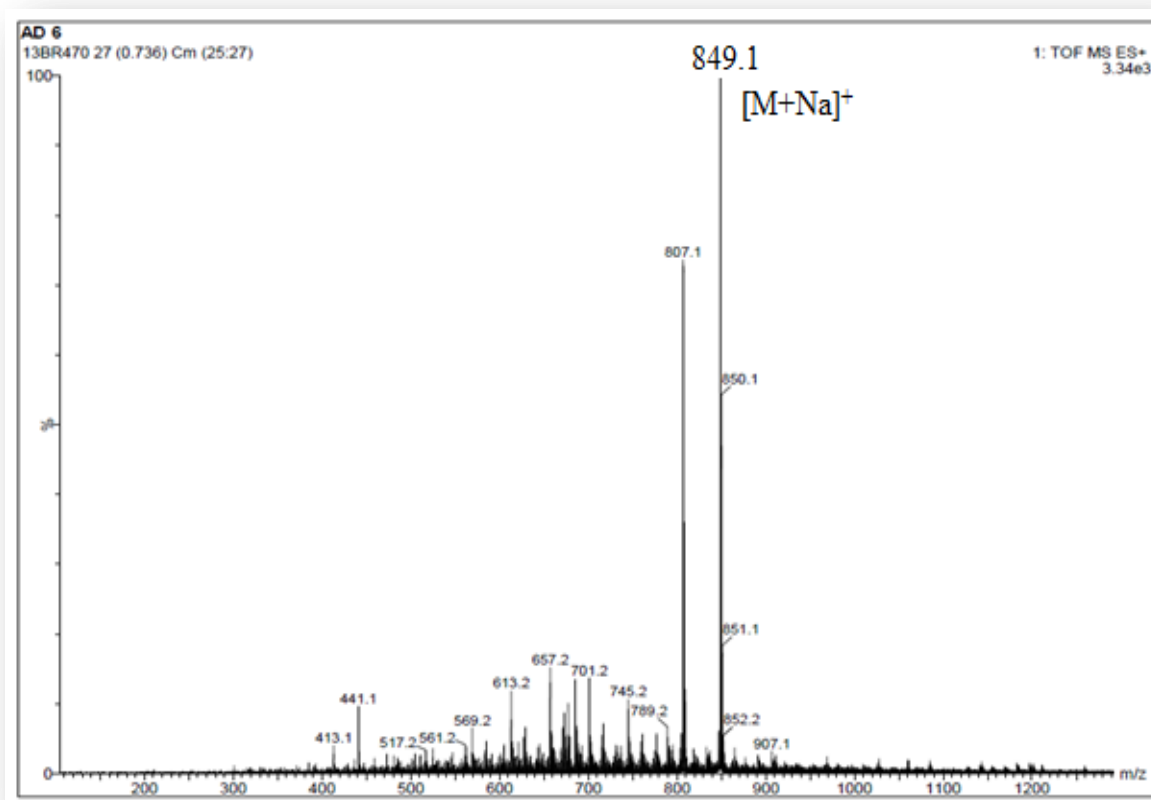


Figure III.2 : Spectre de masse ESI⁺ du composé

L'analyse du spectre RMN 1H (Figure III.3) enregistré dans le CD_3OD , permet de visualiser les signaux suivants :

- Sept signaux à champ fort résonant à δ_H 0,92 (3H, s, H-29), 1,04 (3H, s, H-30), 1,22 (3H, s, H-28), 1,15 (3H, s, H-27), 1,23 (3H, s, H-21), 1,27 (3H, s, H-18), 1,28 (3H, s, H-26), attestant de la présence des sept groupements méthyles.
- Deux signaux fortement blindés résonant sous forme de doublet à δ_H 0,28 (1H, d, $J = 4,3$ Hz, H-19 *exo*), 0,60 ppm (1H, d, $J = 4,3$ Hz, H-19 *endo*), très caractéristiques de deux protons non équivalents d'un noyau cyclopropane [59, 60, 61].
- un signal à champ faible sous forme de doublet de doublet d'intégration 1H apparaissant à δ_H 3,17 ppm ($J = 9,4; 4,5$ Hz, H-3) correspondant au proton porté par un carbone oxyméthine.

Le même spectre montre également la présence de plusieurs signaux entre 3 et 5 ppm, ainsi que deux signaux doublets d'intégration 1H chacun à δ_H 4,43 (1H, *d*, $J = 7,9$ Hz, H-1') et 4,34 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz, H-1''), caractérisés les deux protons anomères de sucre, traduisant la présence de deux unités osidiques.

A partir des éléments précédents notre composé est de nature triterpénique à squelette cycloartane possédant deux unités osidiques.

Le spectre RMN 1H permet d'observer un signal singulet d'intégration 3H résonant à δ_H 2,11 ppm, montre la présence d'un groupement acétate.

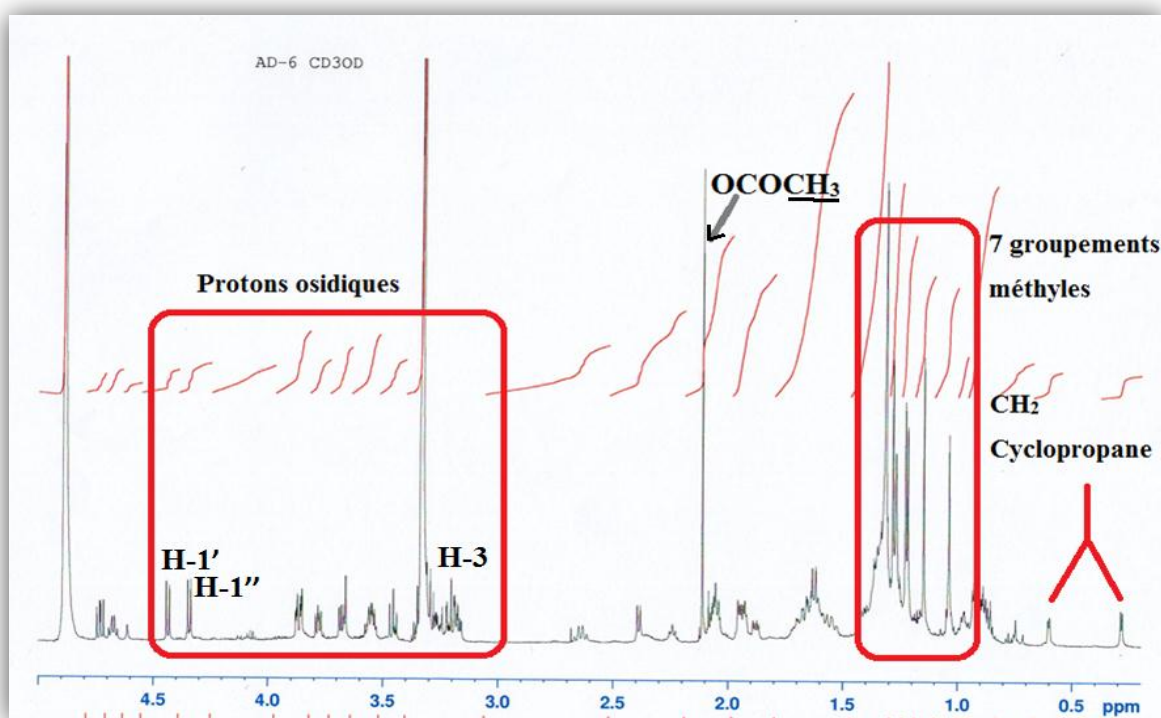
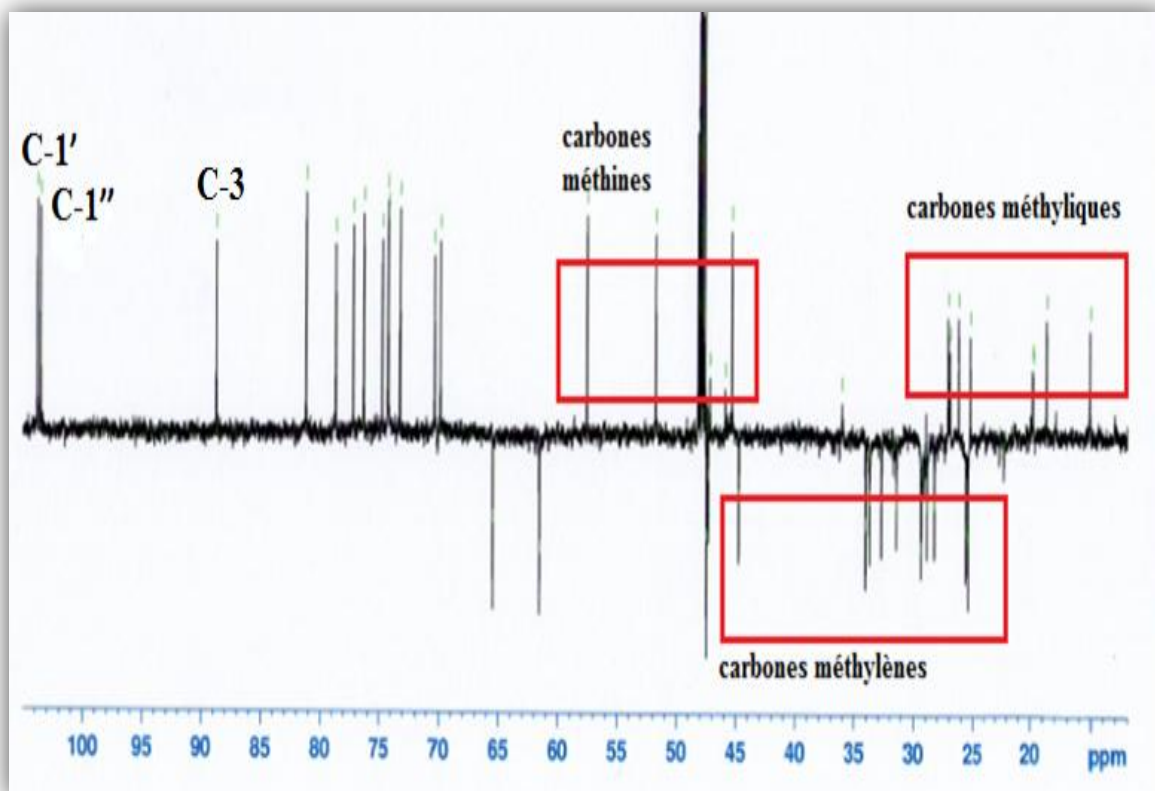
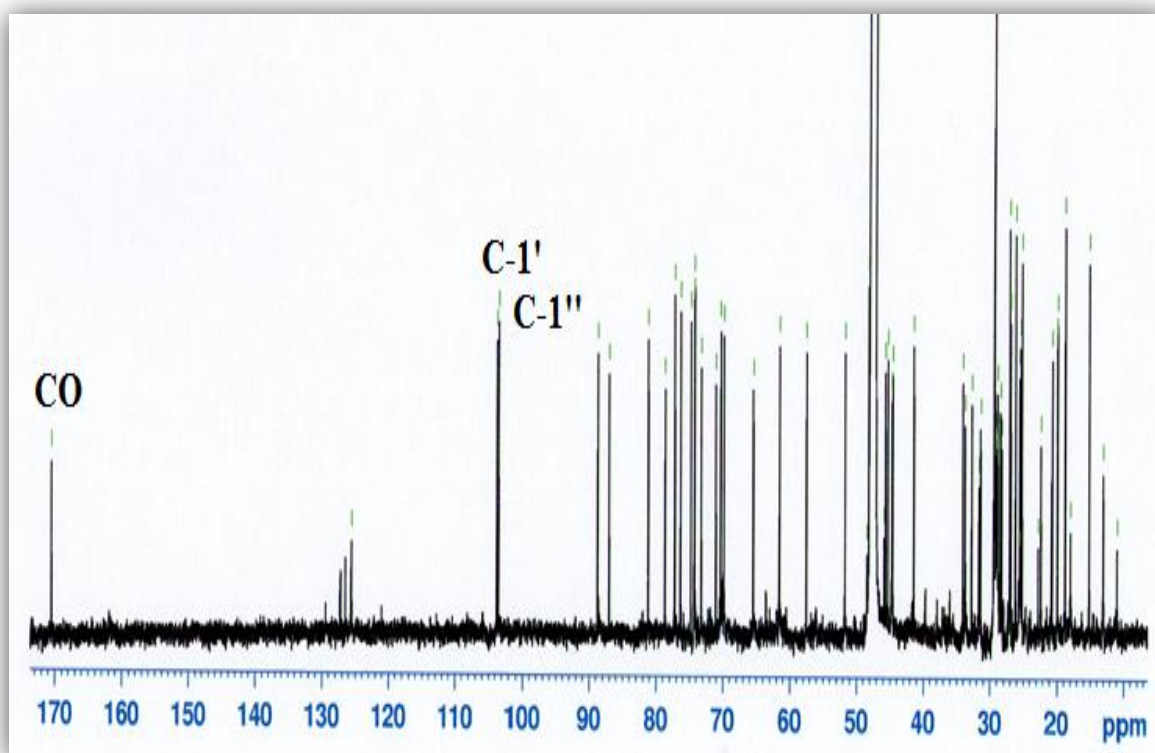


Figure III.3 : Spectre RMN 1H du composé

Les spectres RMN ^{13}C DEPT et RMN ^{13}C (Figures III.4 et III.5) montrent les signaux caractéristiques à sept méthyles, neuf méthylènes, sept méthines et sept atomes de carbones quaternaires, attestant la nature triterpénique du composé. Il permet également de visualiser les carbones anomères à δ_C 103,8 et 103,5 ppm, attestant de l'existence de deux unités osidiques. Il est en outre détecté un carbone quaternaire à δ_C 170,5 ppm, attribuable à un carbonyle d'ester. De plus, un signal d'un carbone C-3 est fortement déblindé à δ_C 88,7 ppm du fait de la présence d'une substitution osidique.

Figure III.4 : Spectre RMN ^{13}C DEPT du composéFigure III.5 : Spectre RMN ^{13}C du composé

La détermination structurale du composé sera présentée en deux parties : l'une consacrée à l'identification de la génine et l'autre à la partie osidique.

Identification de la génine

L'analyse des couplages hétéronucléaires $^1J_{H-C}$ visualisés sur le spectre HSQC J -modulé (Figure III.6) permet d'identifier les carbones méthyliques sortant à δ_C 15,1, 18,8, 27,1, 25,2, 26,2, 26,9 et 19,9 ppm. Il permet d'identifier le carbone C-19 du noyau cyclopropane à (δ_C 28,2 ppm), les deux carbones anomères des sucre (Figure III.7) sont repérés à δ_C 103,8, 103,5 ppm, le carbone méthylique du groupement acétate $COCH_3$ à (δ_C 19,9 ppm) et enfin le carbone C-3 de la génine à δ_C 88,7 ppm. La valeur de déplacement chimique de ce dernier suggère une glycosylation à ce niveau.

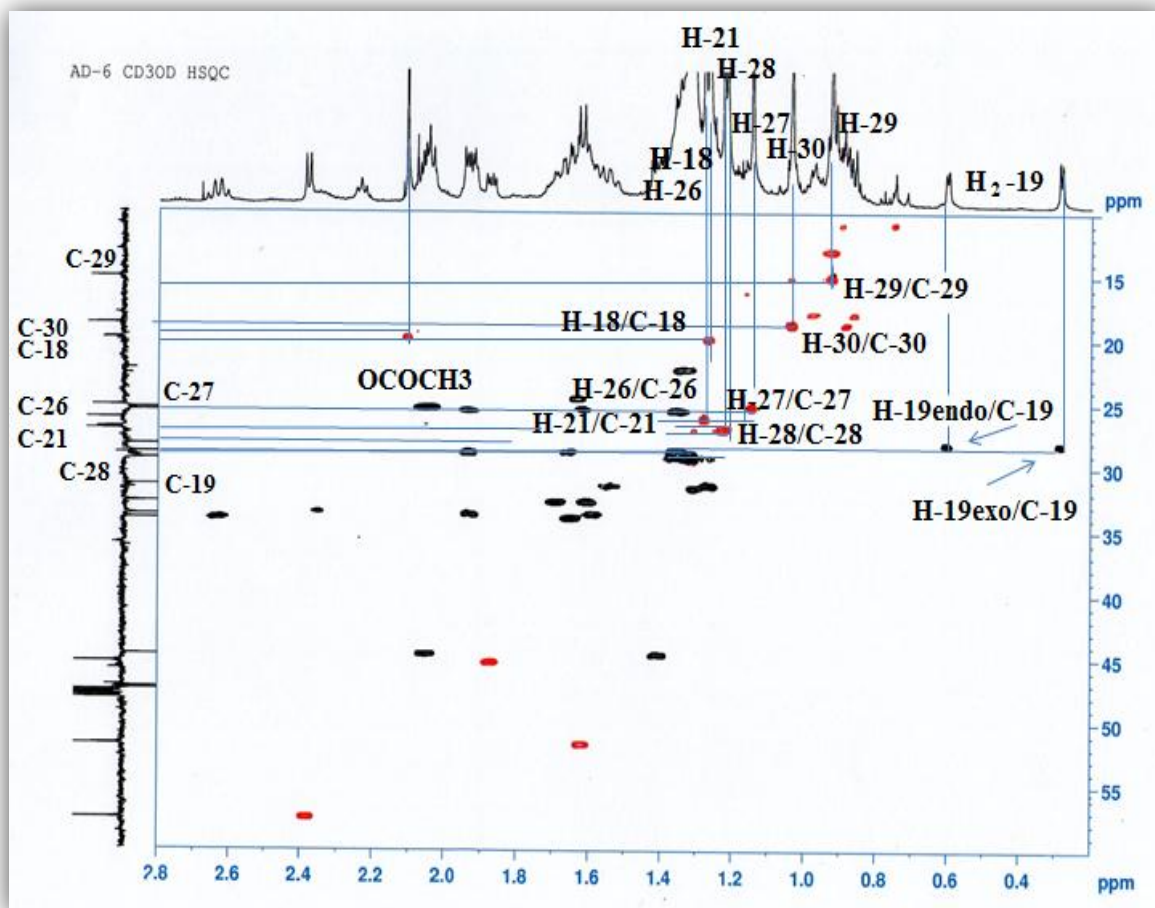


Figure III.6 : Spectre HSQC du composé

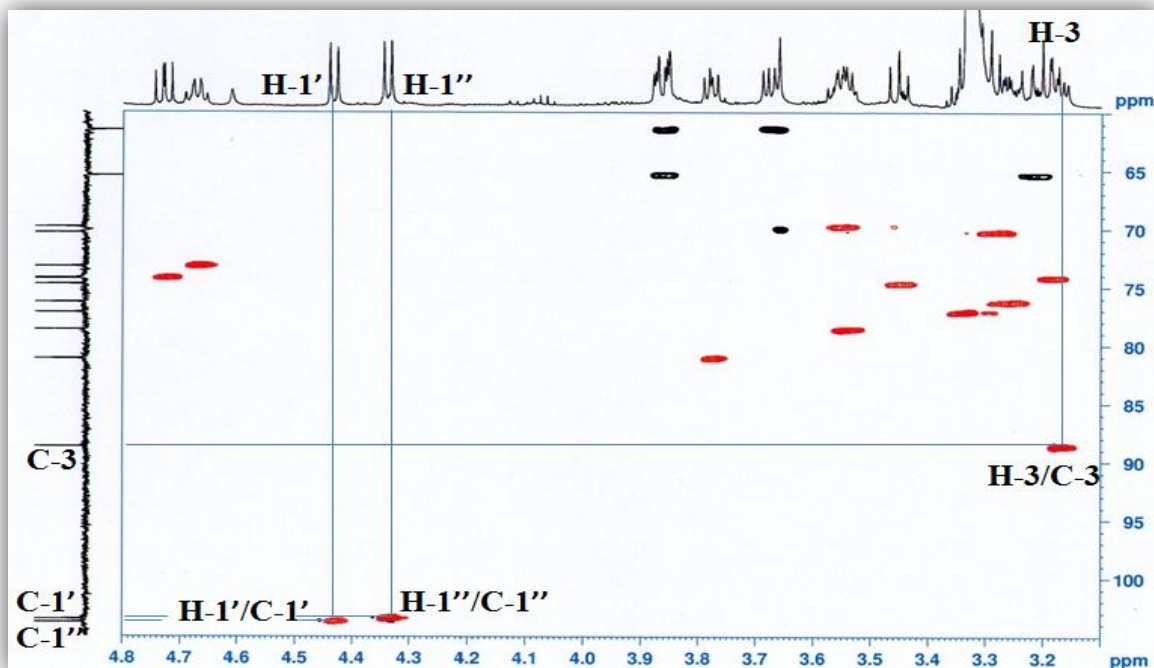


Figure III.7 : Spectre HSQC du composé

Cette glycosylation en C-3 de la génine est confirmée par expérience HMBC (Figure III.8) qui montre un couplage en 3J entre ce carbone et le proton anomère H-1' (δ_H 4,43 ppm) d'une des deux unités osidiques.

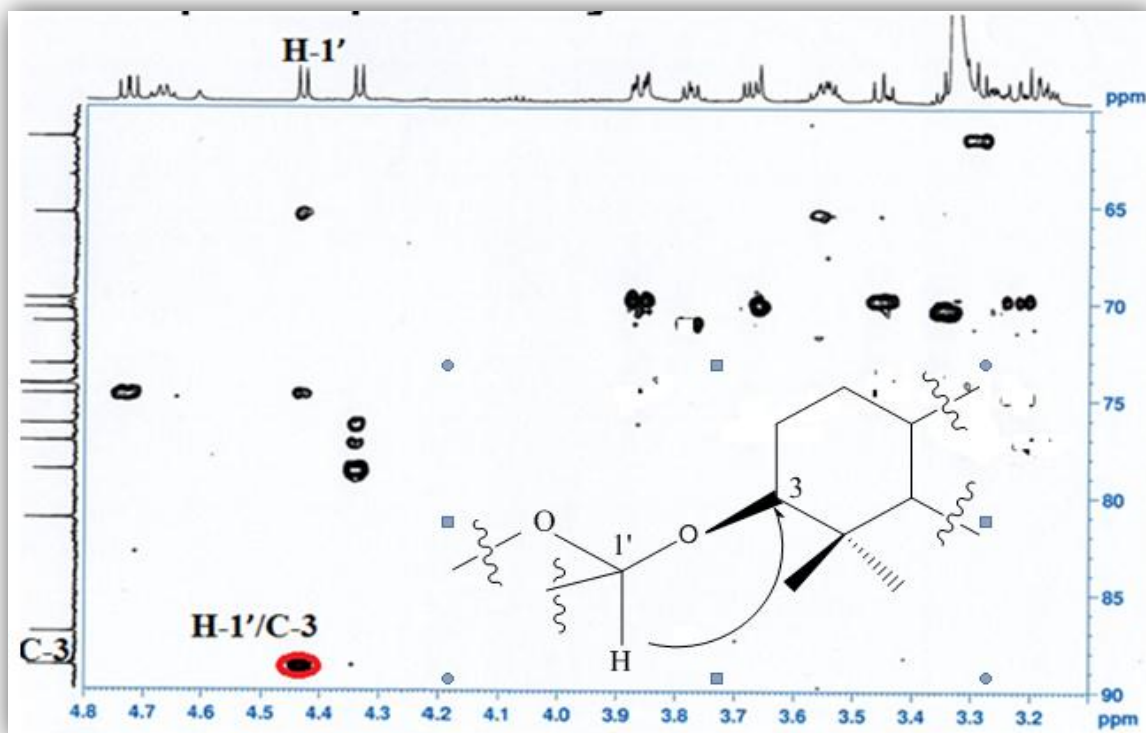


Figure III.8 : Spectre HMBC du composé

L'expérience HMBC (Figure III.9) et particulièrement dans le cas de triterpènes, constitue un excellent outil 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, chacun corrélant au maximum avec quatre atomes de carbone. Ainsi les méthyles-28 et 29 géminés résonnant respectivement à δ_H 1,22 et δ_H 0,92 ppm sont les seuls à corrélérer avec le carbone C-3 connu à (δ_C 88,7 ppm) de la génine. Ils corrèlent également avec le carbone quaternaire C-4 (δ_C 41,4 ppm), le carbone C-5 (δ_C 51,7 ppm). Qu'il couplé simplement avec leur proton (H-5) à (δ_H 1,61 ppm) identifié par expérience HSQC.

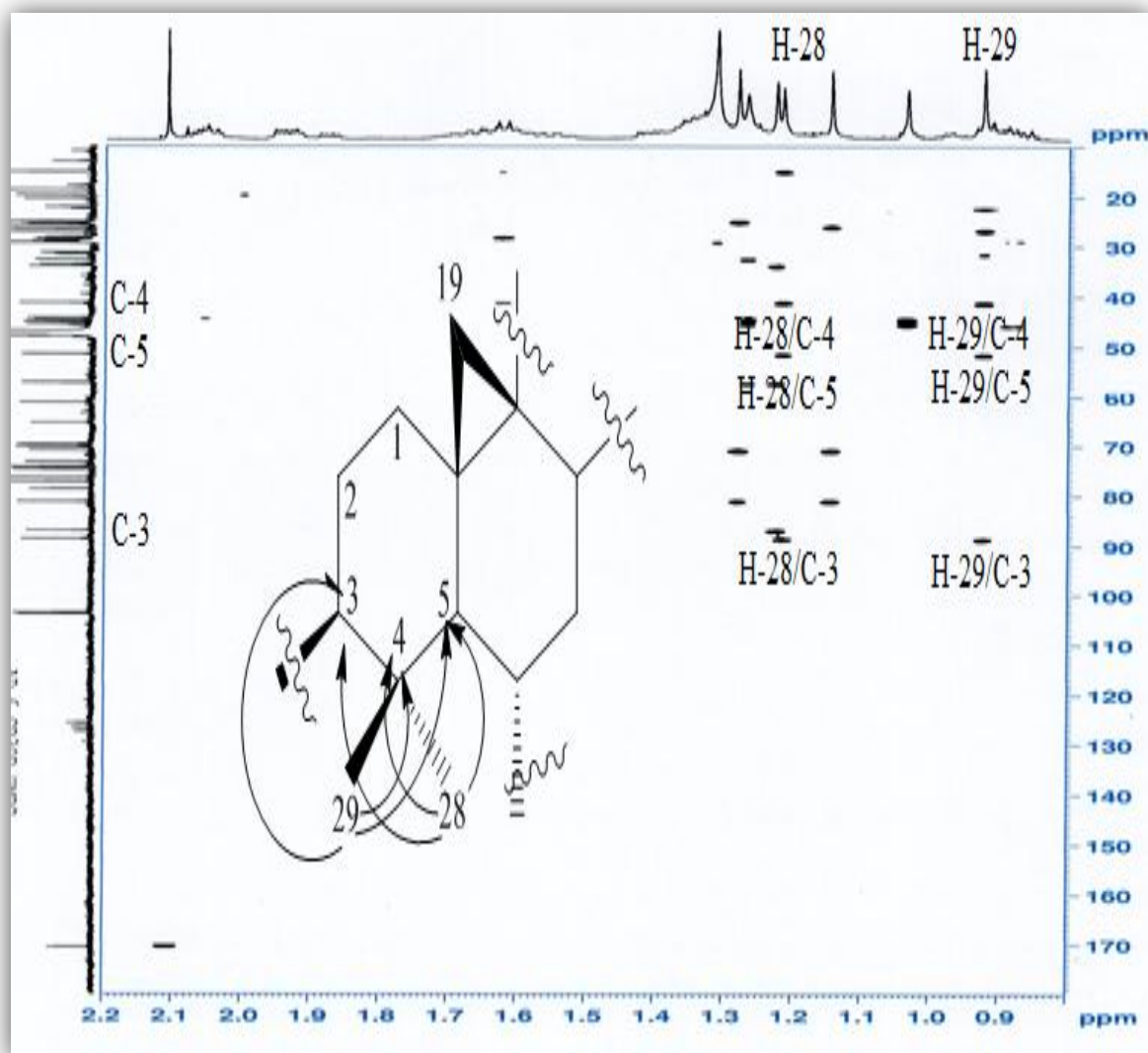


Figure III.9 : Spectre HMBC du composé considéré

Le spectre HMBC (Figure III.10) montre plusieurs tâches de corrélations entre le proton H-5 (δ_H 1,61 ppm) identifié par expérience HSQC et les carbones : C-3 et C-4 déjà identifiés, C-28 (δ_C 27,1 ppm), C-29 (δ_C 15,1 ppm), C-19 (δ_C 28,2), un carbone quaternaire repérés à (δ_C 28,5 ppm) ne pouvant être que C-10, deux carbones méthyléniques résonant à δ_C 33,7 et 31,4 ppm. Ces dernières valeurs sont attribuées respectivement aux carbones C-7 et C-1. Le proton H-5 corrèle aussi avec un carbone oxyméthine C-6 (δ_C 78,7 ppm). Ce dernier a été identifié par HSQC du fait de sa corrélation directe avec le proton H-6 repéré à (δ_H 3,56 ppm), lui-même déterminé par expérience COSY H-H qui montre un couplage vicinal H-5/H-6.

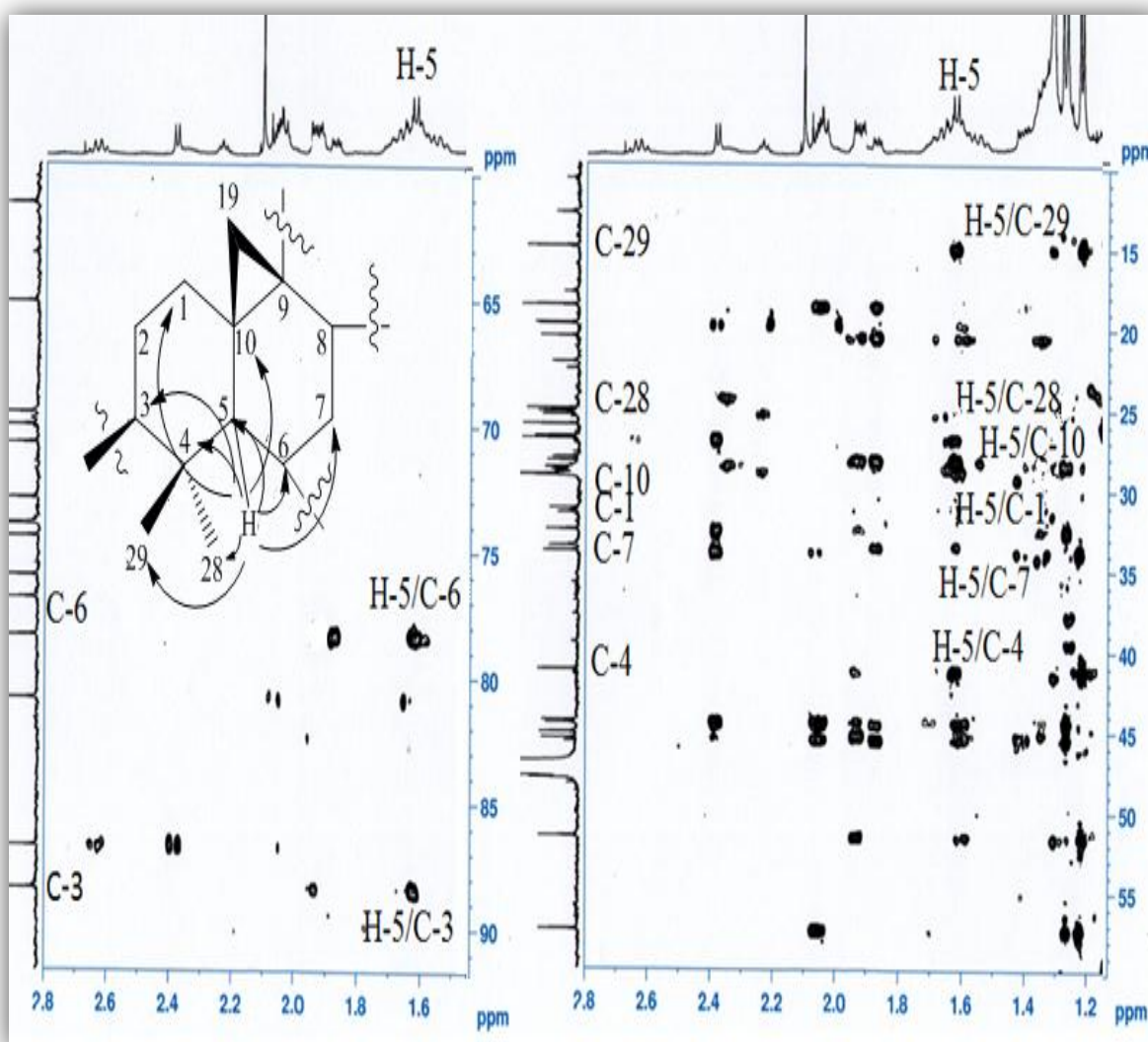


Figure III.10 : Spectre HMBC du composé considéré

Les protons du noyau cyclopropane H₂-19 (δ_H 0,28 ; 0,60 ppm) corrént avec les carbone C-5, C-1 et les deux carbones quaternaires C-10, C-9 déjà identifiés (Figure III.11).

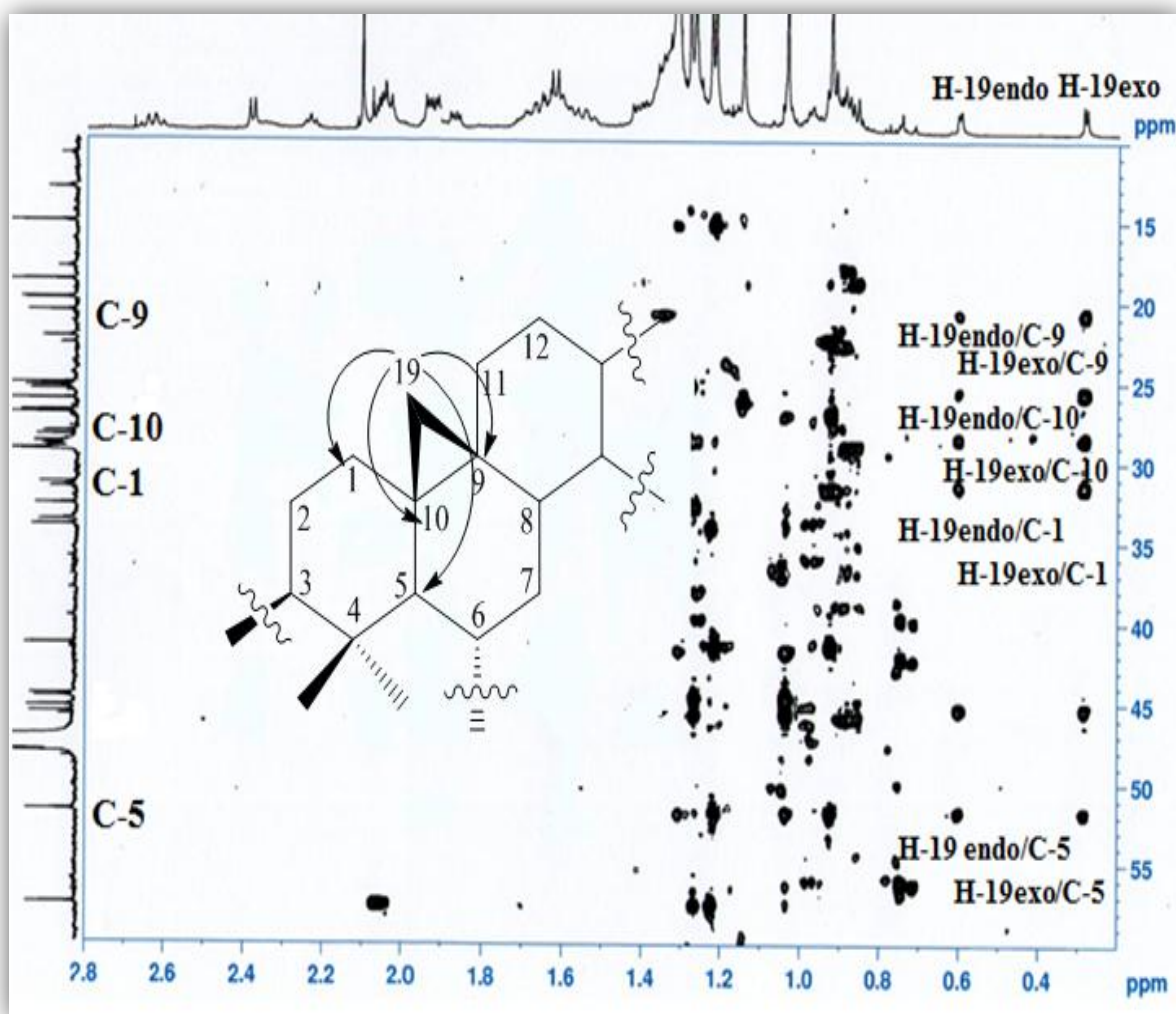


Figure III.11 : Spectre HMBC du composé

Les protons méthylque CH₃-30 (δ_H 1.04 ppm) sont identifié sur la base de son couplage en HMBC (Figure III.12) avec le carbone C-8 (δ_C 45,7 ppm), lui-même identifié du fait également de son couplage $^3J_{C-H}$ avec les protons H-19 du système cyclopropanique et une autre corrélation avec le carbone C-7 (δ_C 33,7 ppm).

La carte HMBC montre également les couplages mêmes protons méthylques avec deux carbones quaternaires C-13 (δ_C 44,6 ppm), C-14 (δ_C 44,7 ppm) et le carbone méthylénique C-15 résonant à (δ_C 45,7ppm). Les deux protons (Figure III.13) H-15a (2,05 ppm) et H-15b (1,40 ppm) qui le substituent sont déterminés par HSQC.

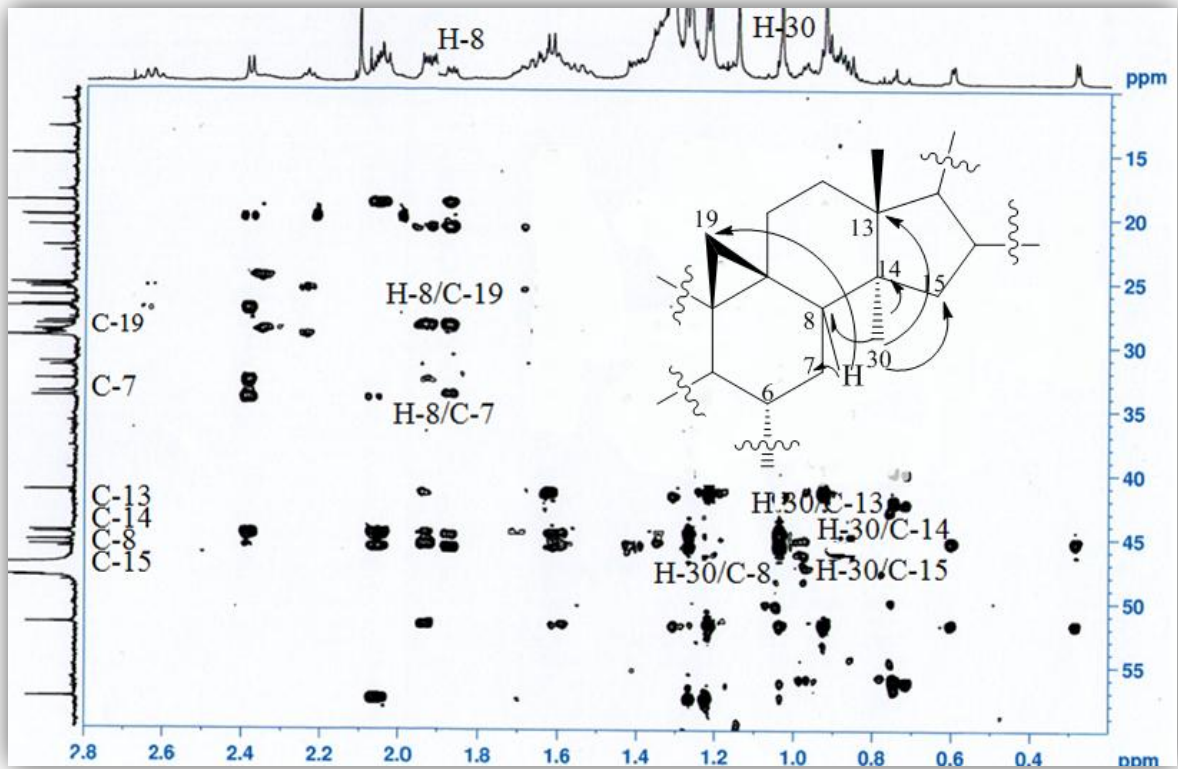


Figure III.12 : Spectre HMBC du composé

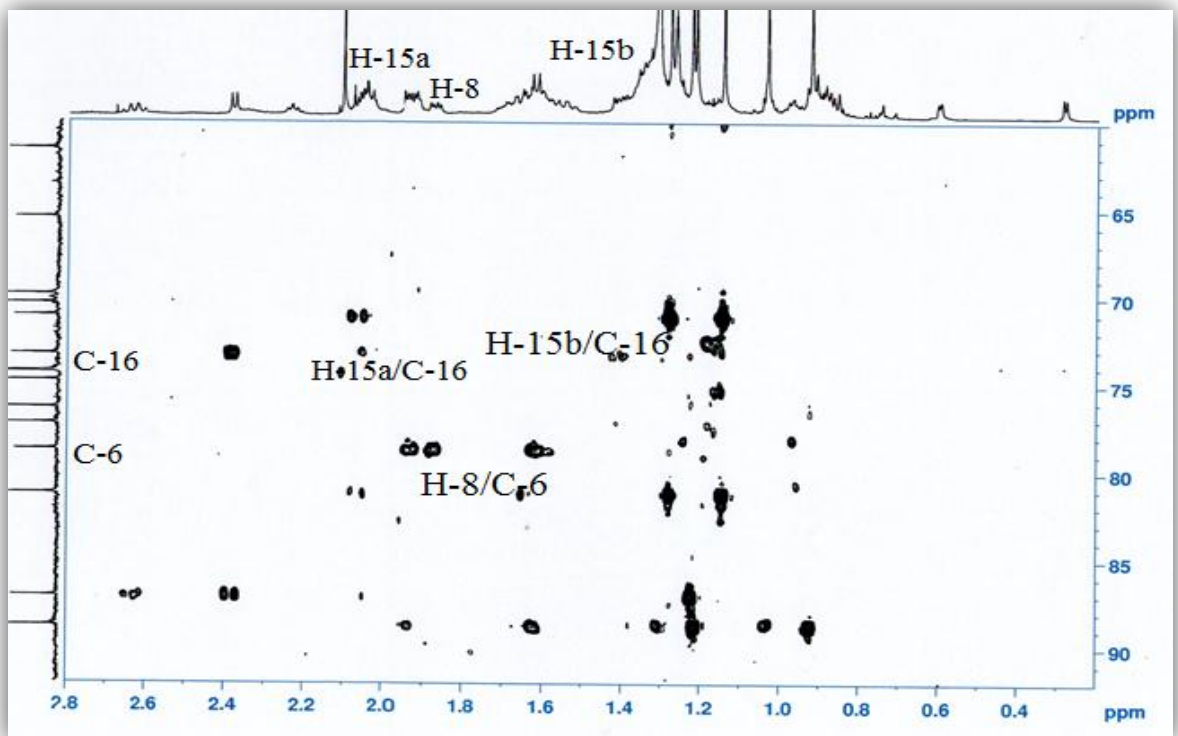


Figure III.13 : Spectre HMBC du composé

Les protons méthyliques CH₃-18 (δ_H 1,27 ppm) sont identifiés au moyen des couplages longue distance observés sur le spectre HMBC (Figure III.14) avec les deux carbones quaternaires C- 13, C-14 connus, un carbone méthylène C-12 (δ_C 32,7 ppm) et un carbone nommée C-17 (δ_C 57,5 ppm).

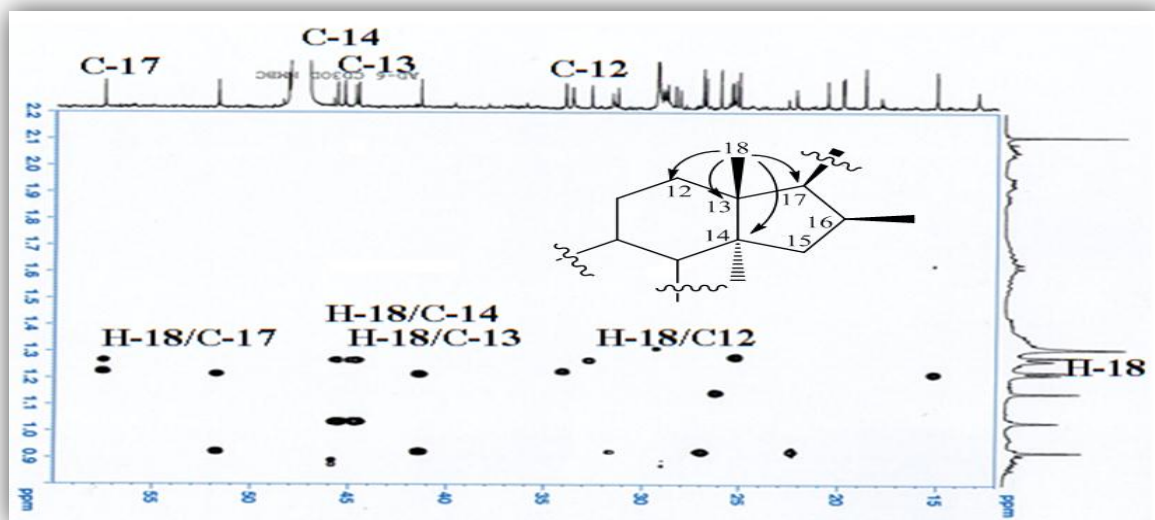


Figure III.14 : Spectre HMBC du composé

L'expérience COSY H-H (Figure III.15) montre clairement une corrélation entre les protons H₂-15 et le proton H-16 de la génine sortant à δ_H 4,67 ppm (*q*, $J = 7,5$ Hz). Cette valeur de déplacement chimique conjuguée à celle du carbone C-16 (δ_C 73.3 ppm) caractérisé par expérience HSQC montre que ce dernier est porteur d'un groupement hydroxyle. La même expérience montre également un couplage entre le proton H-16 et le proton H-17 repéré à δ_H 2,39 ppm (1H, *d*, $J = 7,5$ Hz).

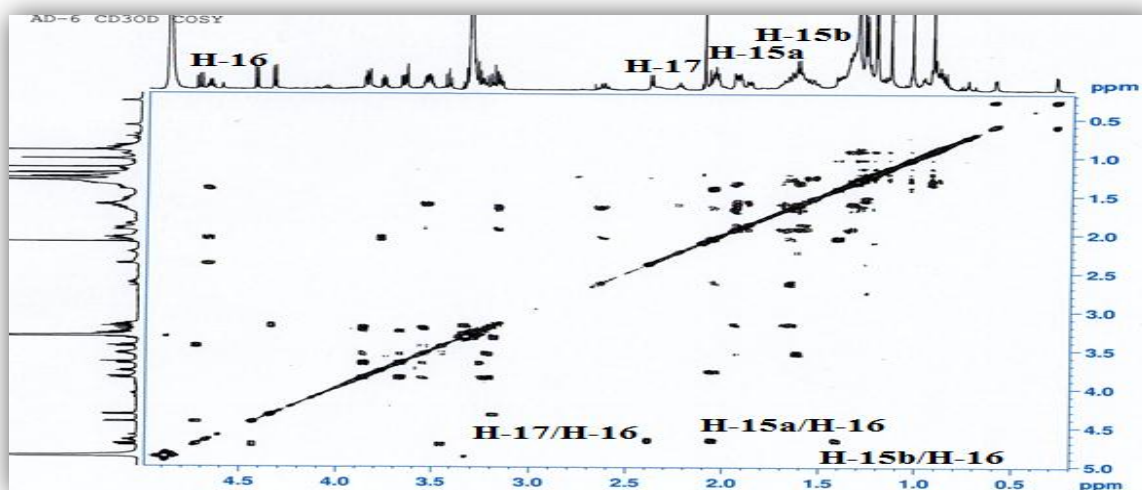


Figure III.15 : Spectre COSY H-H du composé

Toute cette analyse spectrale qui a abouti à la caractérisation de tous les carbones de la génine, permet d'attribuer au composé. AU squelette moléculaire représenté par la Figure III.16 ci-dessous.

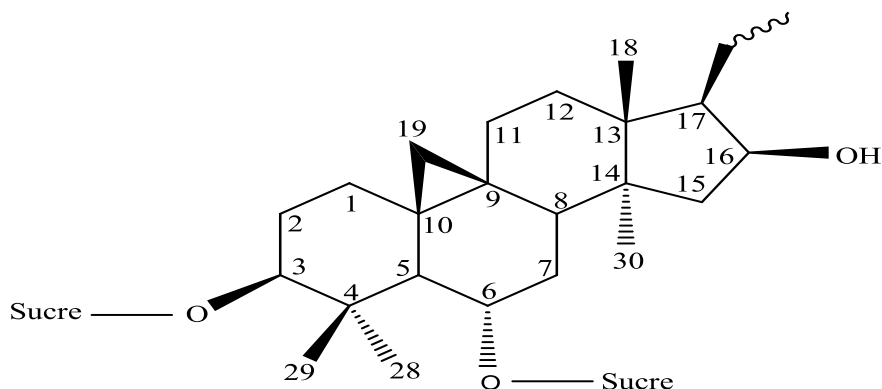


Figure III.16 : Structure globale du composé

Il reste maintenant à identifier la nature du substituant en C-17 pour compléter la génine. Sur le spectre HMBC (Figure III.17), le proton H-17 corrèle avec, en plus de CH₃-18, C-13, C-16, C-15 déjà connus, un autre carbone méthylique résonant à δ_C 26,9 ppm. Il montre également un couplage avec deux autres carbones l'un quaternaire fortement déblindé sortant à δ_C 87,0 ppm (C-20) donc oxydé et l'autre méthylénique à δ_C 34,0 ppm (C-22). Les protons de ce dernier sont identifiés par expérience HSQC.

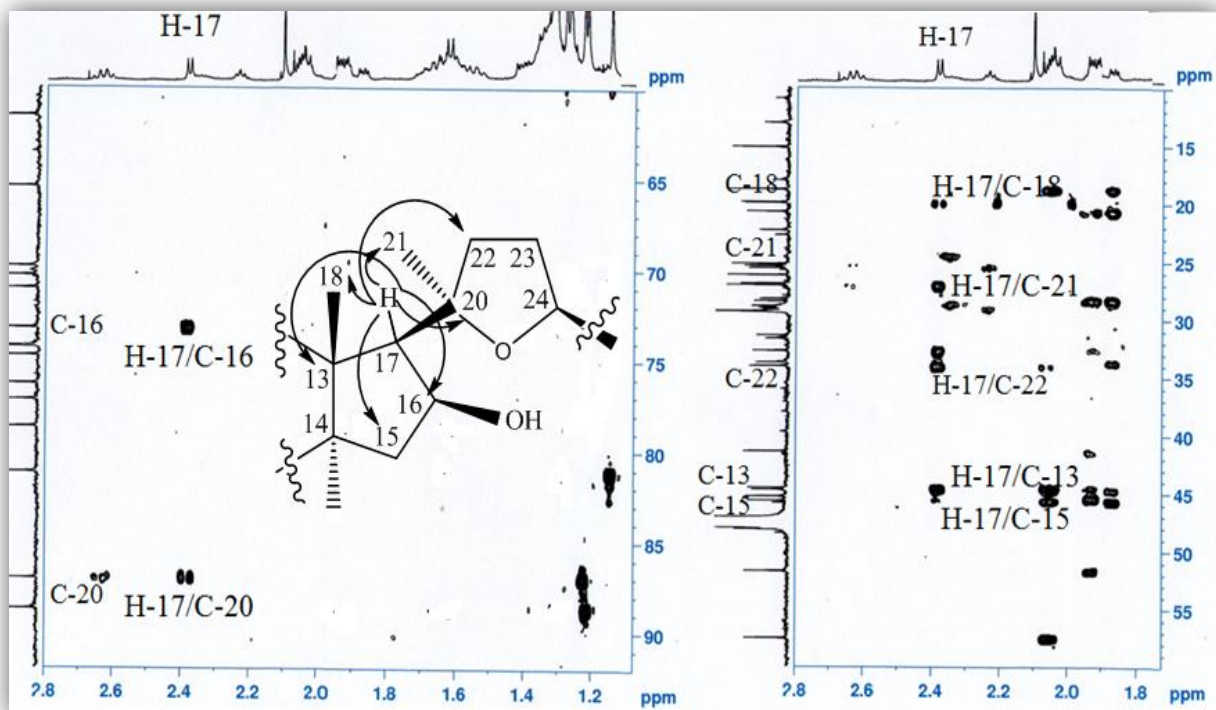


Figure III.17 : Spectre HMBC du composé

Les protons méthyliques H-21 (δ_H 1,23 ppm) corrélient avec les carbone C-17, C-22 et le carbone quaternaire C-20 déjà identifiés (Figure III.18).

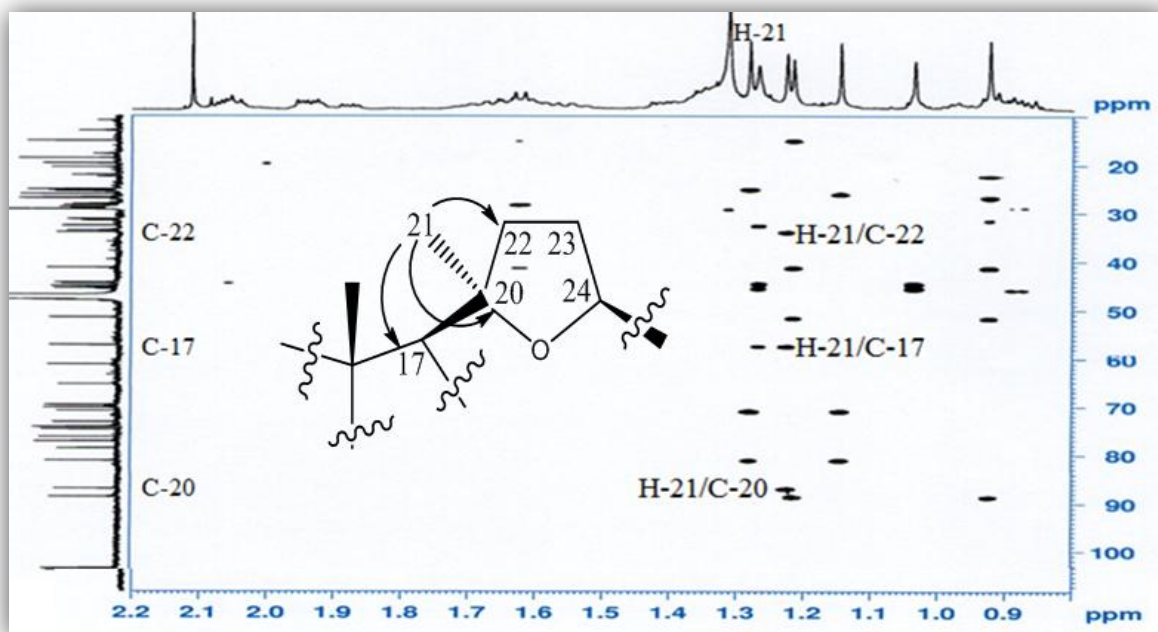


Figure III.18 : Spectre HMBC du composé

A partir des protons H₂-22 à (δ_H 1,65 ppm, 2,64 ppm), l'expérience COSY H-H (Figure III.19) permet d'observer les corrélations suivant : H-22/H-23 (δ_H 2,64-1,65/ δ_H 2,05 ppm), H-23 et H-24 (3,78 ppm, *dd*, $J = 8,4 ; 5,8$ Hz).

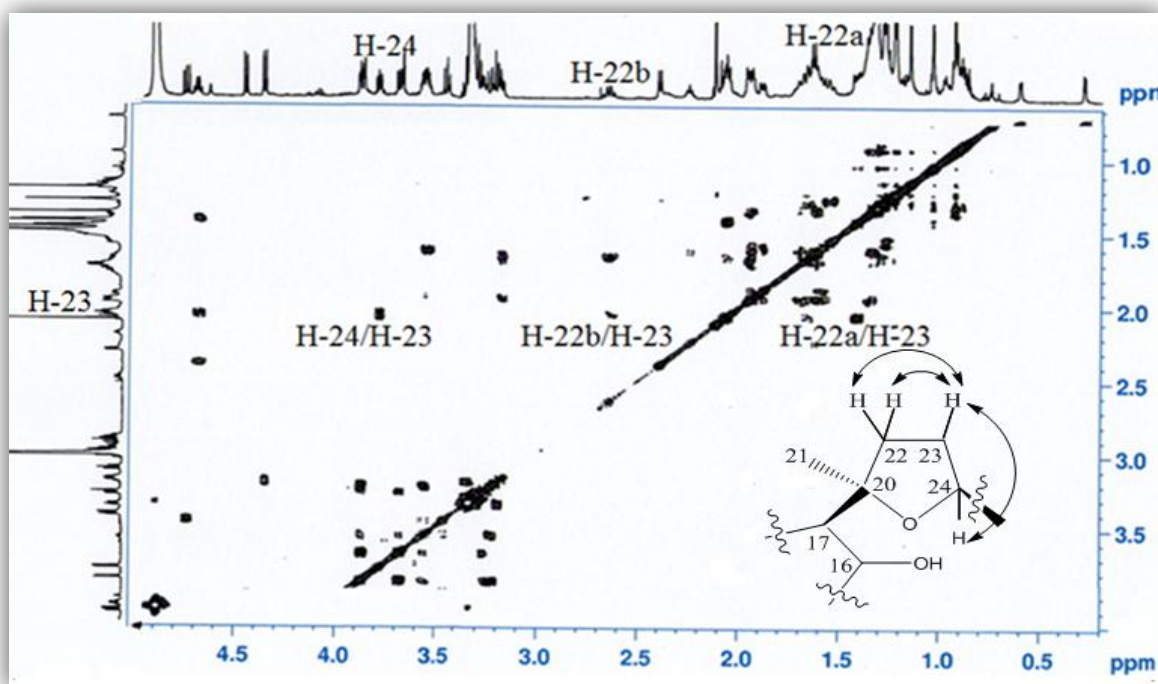


Figure III.19 : Spectre COSY H-H du composé

Partant des deux protons de deux derniers groupements méthyliques CH₃-26 (δ_H 1,28 ppm) et CH₃-27 (δ_H 1,15 ppm), l'expérience HMBC (Figure III.20) montre des corrélations longue distance avec un carbone quaternaire C-25 fortement déblindé repéré à 71.1 ppm comparable à celui d'un carbone porteur d'un OH libre. Ce carbone fait une corrélation avec un proton déblindé repéré à 3,78 ppm attribuable au proton H-24 qu'il former une cyclisation à partir de son couplage avec le carbone quaternaire C-20 fortement déblindé sortant à δ_C 87,0 ppm donc oxydé. L'ensemble de ces données cité précédemment nous oriente vers la présence d'un noyau furane substitué et lié au carbone C-17. En effet, les déplacements chimiques des protons et carbones résulte de cette analyse sont conformes au données de la littérature [62].

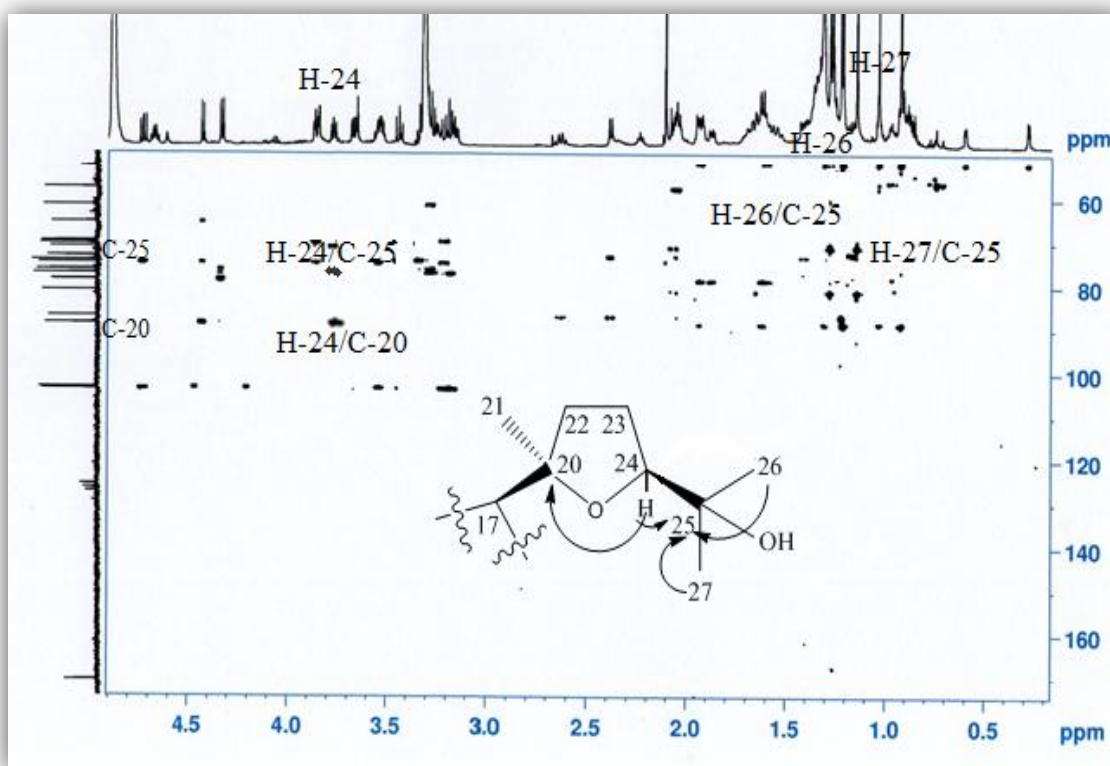


Figure III.20 : Spectre HMBC du composé

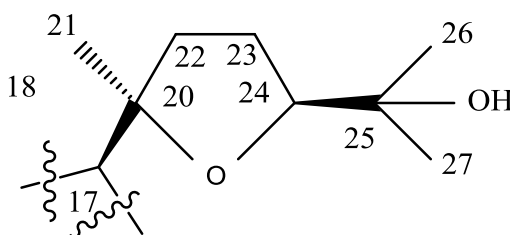


Figure III.21 : Noyau furane

La stéréochimie au niveau de la génine a été établie principalement par analyse du spectre ROESY (Figure III.22, III.23 et III.24). En effet, ce dernier montre les corrélations entre le proton H-19 du groupement CH₂ du noyau cyclopropane en position β [59, 60, 61] et les protons méthyliques CH₃-29 et CH₃-18 β-axial, L'absence de corrélation H-19/H-5 montre que le proton H-5 est α orienté. Le proton H-3 a une stéréochimie α-axiale du fait de la valeur de constante de couplage $^3J_{3ax-2ax} = 9,4$ Hz. Cette stéréochimie est confirmée par les effets ROE H-3/H-28 α et H-5/H-28 α.

D'autres effets ROE sont également observés : H-6/ H-29, H-17 /H-30, H-17/H- 16, H-17/H-21 et enfin H-21/H-24.

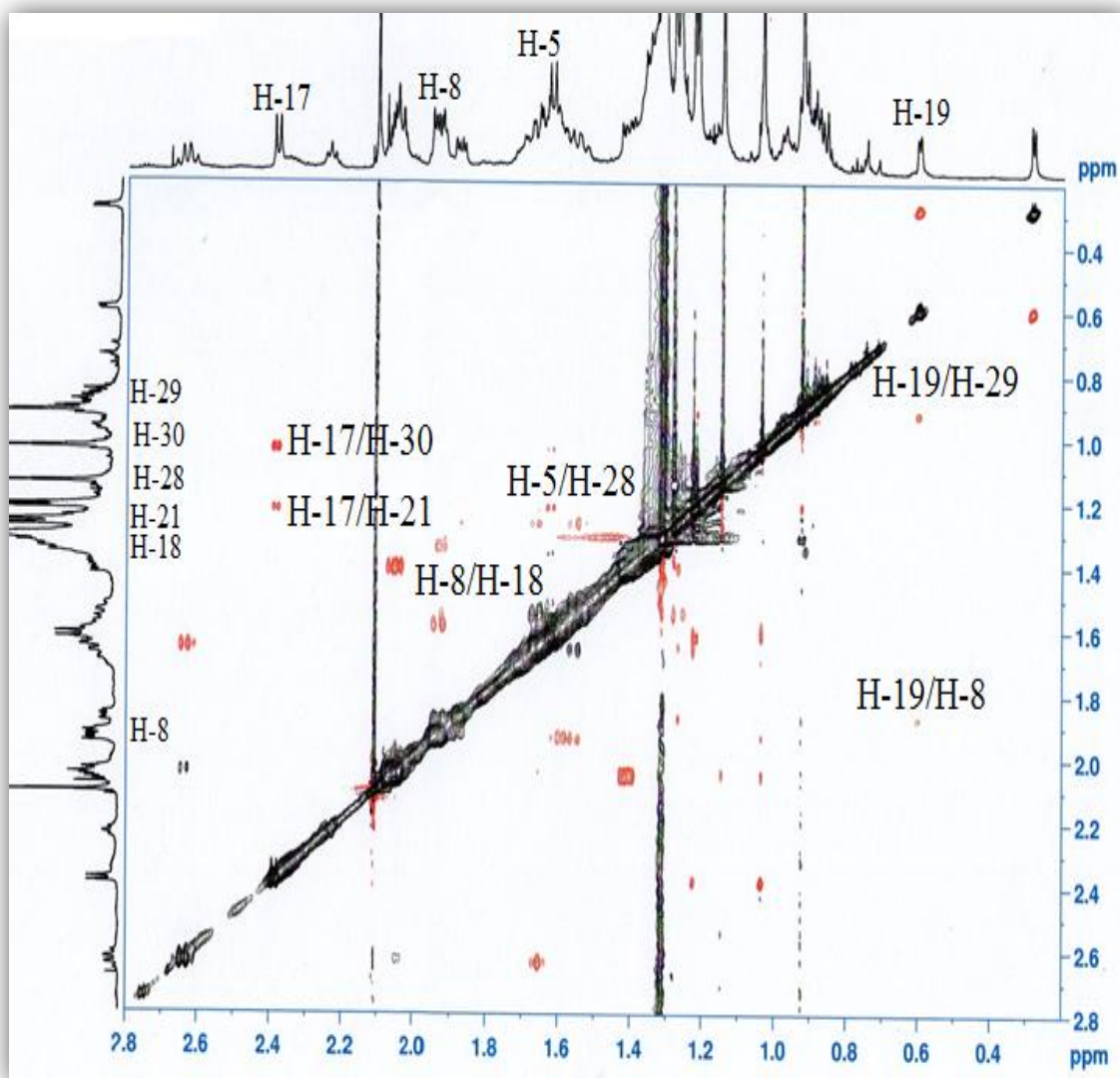


Figure III.22 : Spectre ROESY du composé

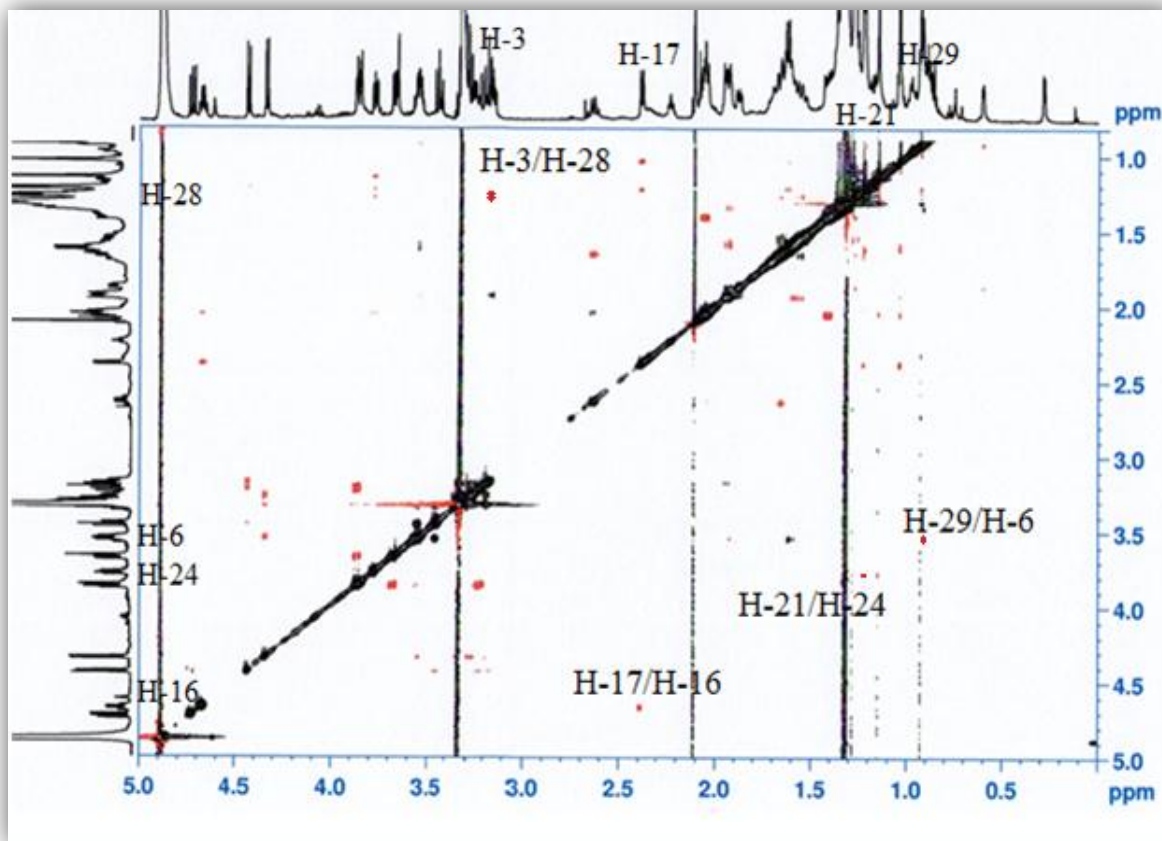


Figure III.23 : Spectre ROESY du composé

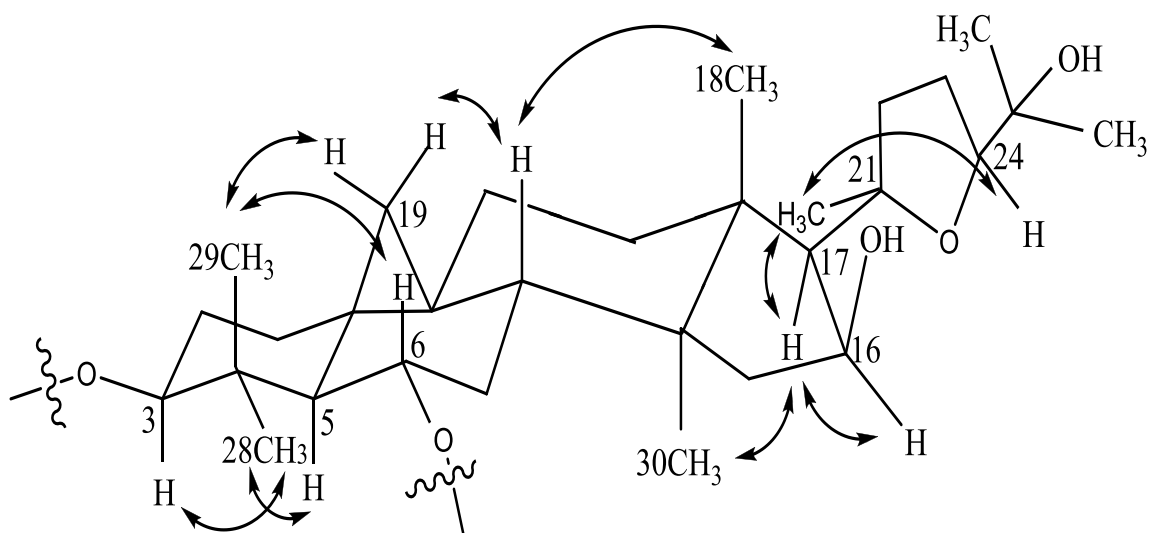


Figure III.24 : Principales Corrélations ROESY observées pour le composé 1

Identification de la partie osidique

L'identification de deux unités osidiques repose essentiellement sur les expériences COSY 1H-1H et TOCSY.

A partir du premier proton anomère H-1' résonant à 4,43 ppm (1H, *d*, $J = 7,9$ Hz), on repère sur les spectres COSY H-H et TOCSY (Figure III.25, III.26 et III.27) les corrélations H-1'/H-2'(1H, δ_H 4,73, *dd*, $J = 7,9; 9,6$ Hz), H-2'/H-3' (1H, δ_H 3,45, *t*, $J = 9,6$ Hz), H-3'/H-4' (1H, δ_H 3,55, *m*), H-4'/H-5'a (1H, δ_H 3,86, *dd*, $J = 11,5; 4,8$ Hz), H-4'/H-5'b (1H, δ_H 3,22, *dd*, 11,5, 9,6 Hz) et enfin H-5'a/H-5'b.

Ces corrélations permettent ainsi d'identifier un pentose, plus précisément un xylose de configuration β ($J_{1'-2'} = 7,9$ Hz)

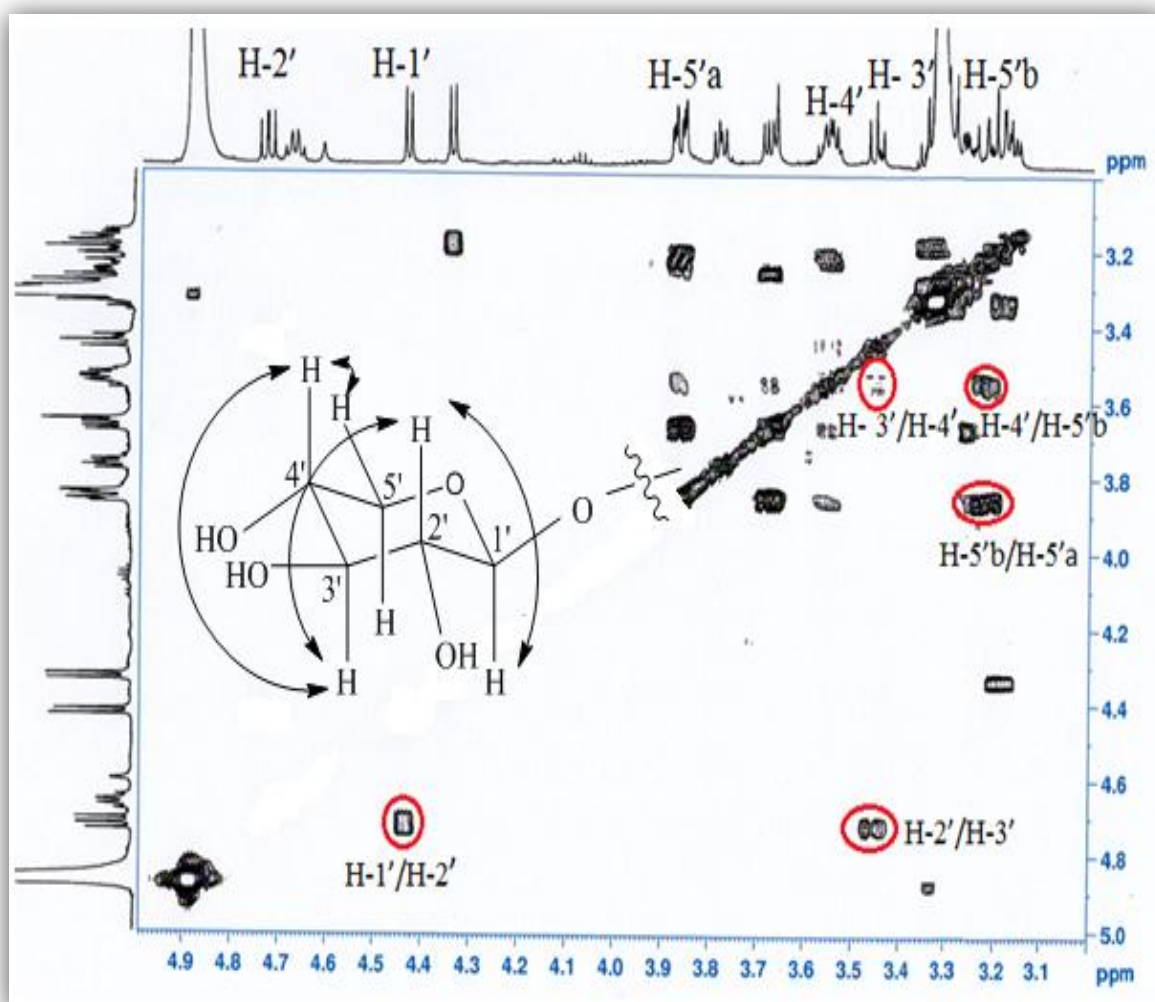


Figure III.25 : Spectre COSY H-H de la partie osidique (β -D-xylose)

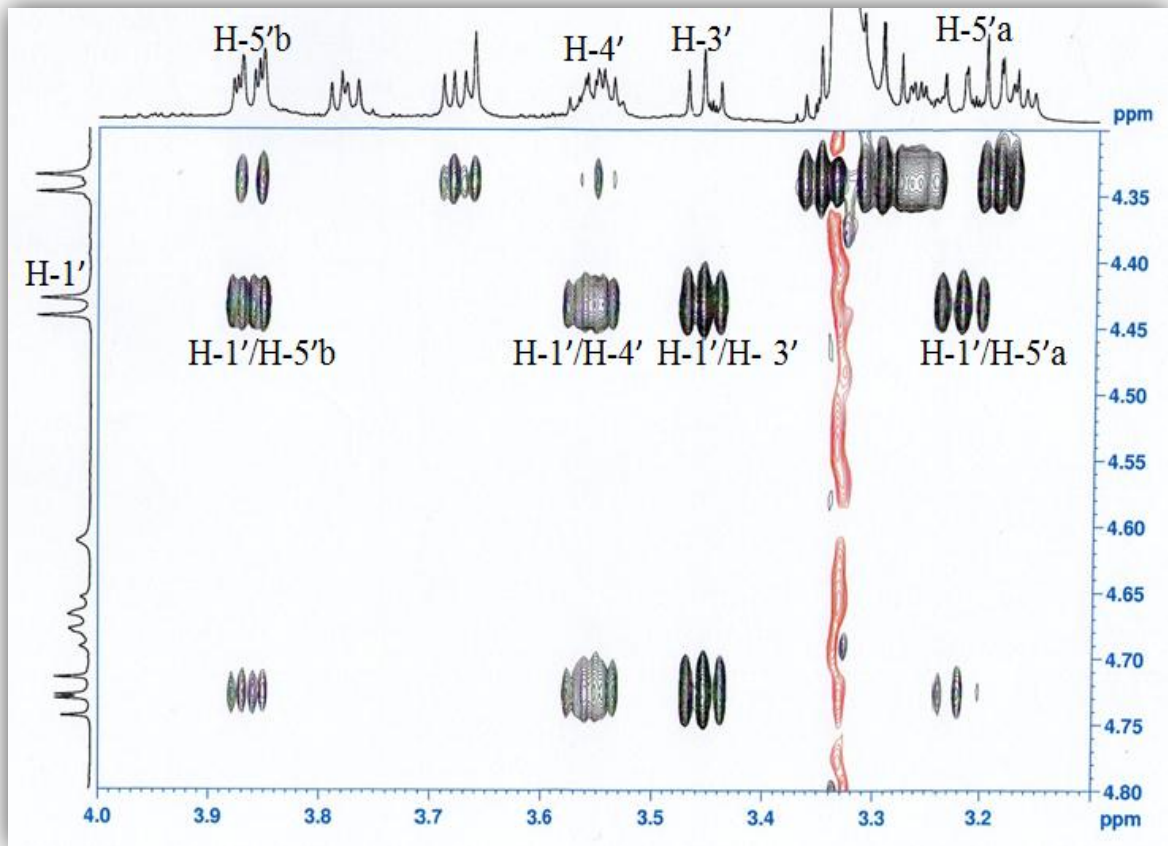


Figure III.26 : Spectre TOCSY de la partie osidique (β -D-xylose)

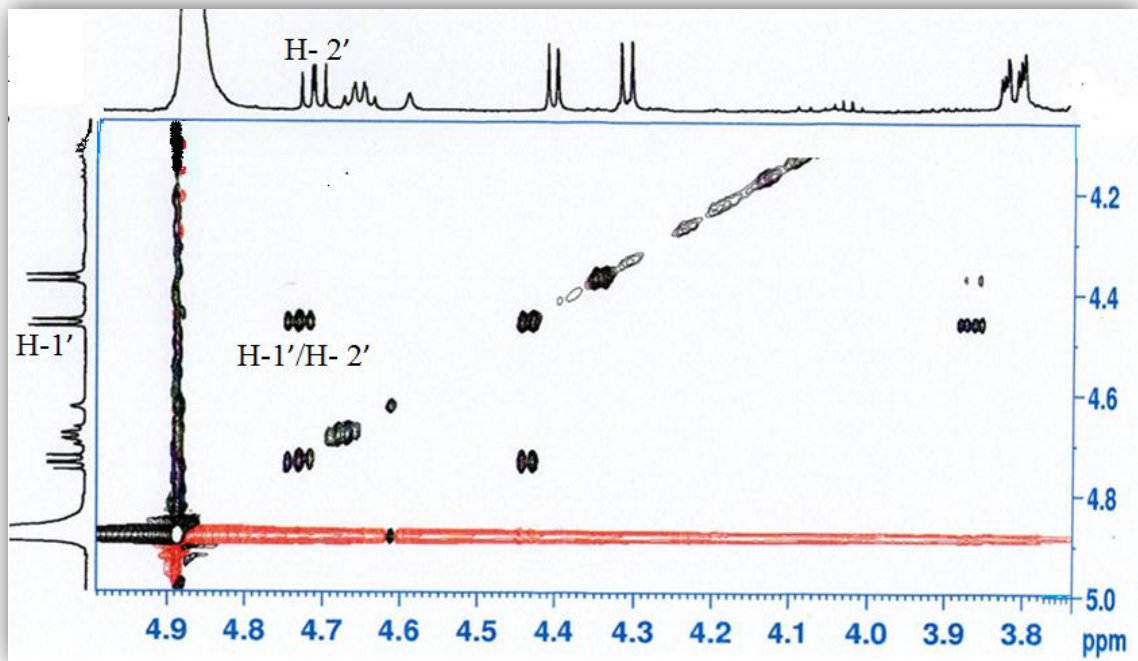


Figure III.27 : Spectre TOCSY de la partie osidique (β -D-xylose)

L'analyse HSQC (Figure III.28) permet de caractériser tous les carbones trouver dans la partie osidique (β -D-xylose) à travers les corrélations entre :

- le proton anomère H-1' et son carbone C-1' résonant à δ_C 103,8 ppm.
- le proton H-2' et son carbone C-2' résonant à δ_C 74,3 ppm.
- le proton H-3' et son carbone C-3' résonant à δ_C 74,8 ppm.
- le proton H-4' et son carbone C-4' résonant à δ_C 69,9 ppm.
- les protons H-5'a et H-5'b et leur carbone C-5' résonant à δ_C 65,5 ppm.

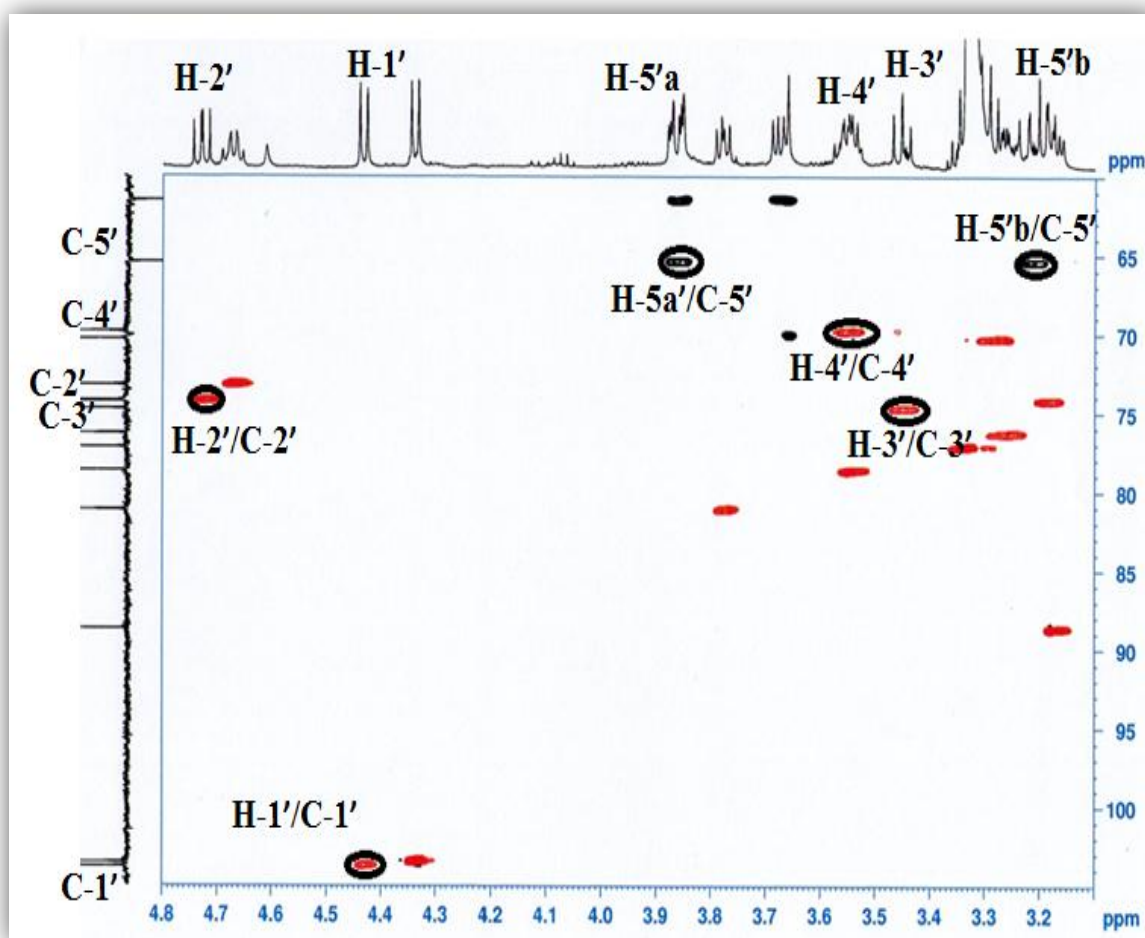


Figure III.28 : Spectre HSQC de la partie osidique (β -D-xylose)

Le déblindage important de + 1,51 ppm du signal du proton H-2' (δ_H 4,73) du β -D-xylose lié certainement à une acylation suggère une localisation en C-2' du groupement acétate préalablement identifié. Ceci est confirmé par expérience HMBC (Figure III.29) qui montre un couplage longue distance entre H-2' et le carbonyle CO (δ_C 170,5 ppm).

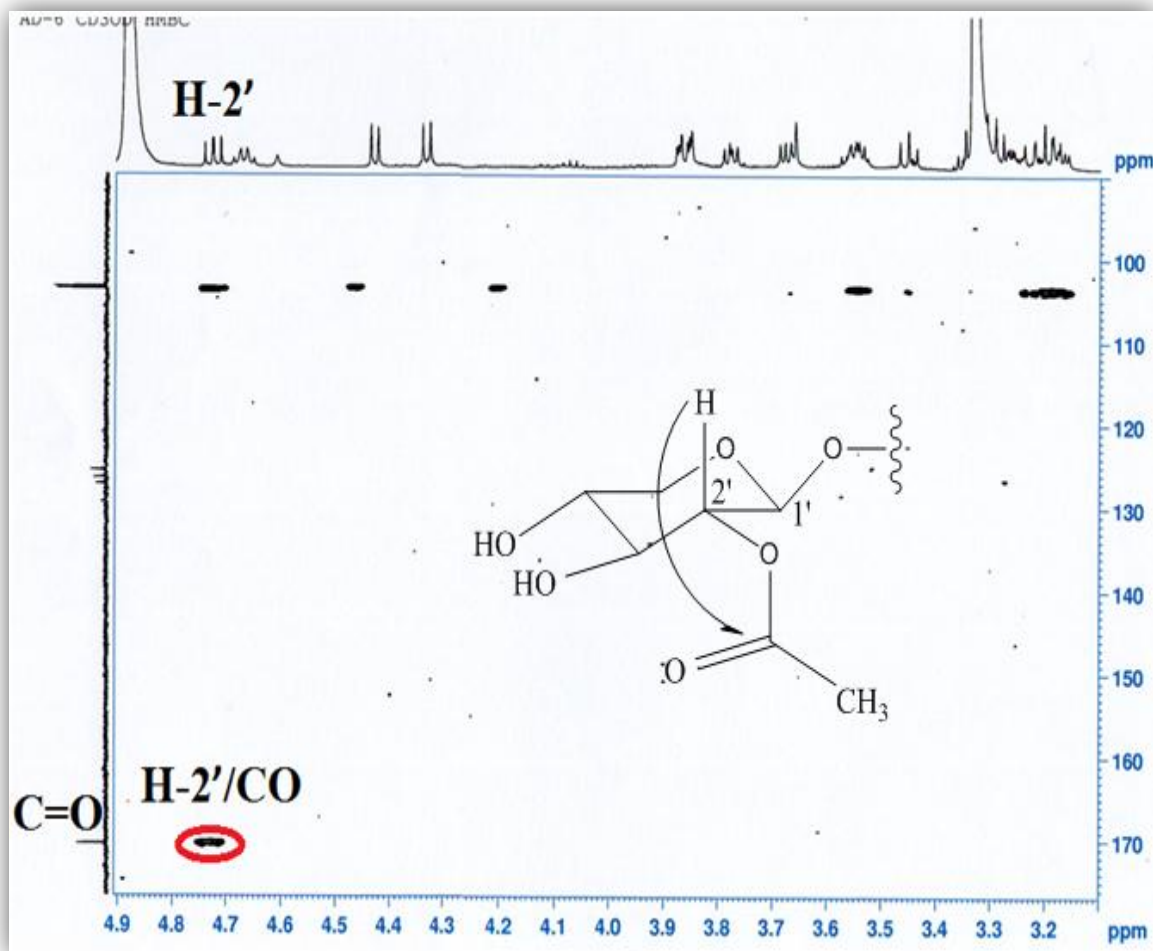


Figure III.29: Spectre HMBC montrant la corrélation entre le groupement acétate et le proton H-2' du β -D-xylose

A partir du second anomère H-1'' résonant à 4,34 ppm (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz), l'analyse des spectre COSY H-H et TOCSY (Figure III.30 et III.31) met en évidence la présence d'un hexose à travers les corrélations H-1''/H-2'' (1H, δ_H 3,19, *d*, $J = 8,5 ; 7,8$, Hz), H-2''/H-3'' (1H, δ_H 3,35, *t*, $J = 8,5$ Hz), H-3''/H-4'' (1H, δ_H 3,29, *t*, $J = 8,5$ Hz), H-4''/H-5'' (1H, δ_H 3,26, *ddd*, 8,5; 5,4; 2,3 Hz) et H-5''/H-6''b (1H, δ_H 3,67, *dd*, $J = 11,5; 5,4$ Hz) et enfin H-6''b/H-6''a (1H, δ_H 3,86, *dd*, $J = 11,5; 2,3$ Hz). Les grandes valeurs de constante de couplage indiquent qu'il s'agit d'un glucose de configuration β ($J_{1''-2''} = 7,8$ Hz).

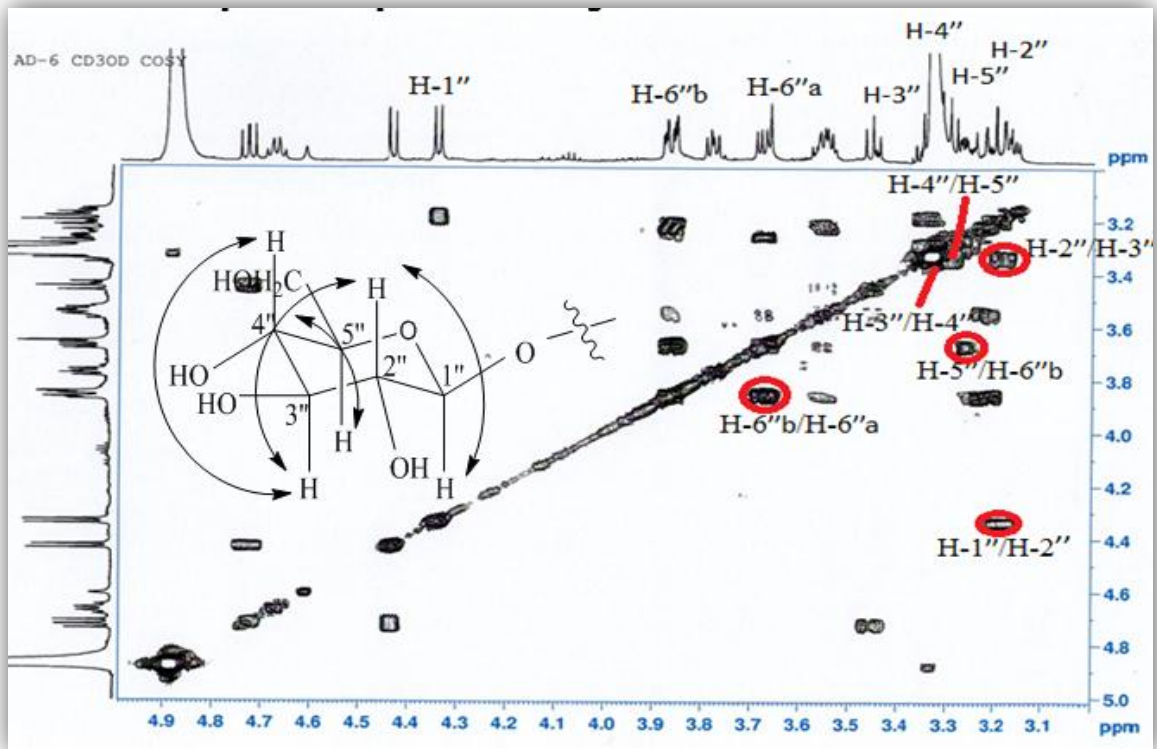


Figure III.30 : Spectre COSY H-H de la partie osidique (β -D-glucose)

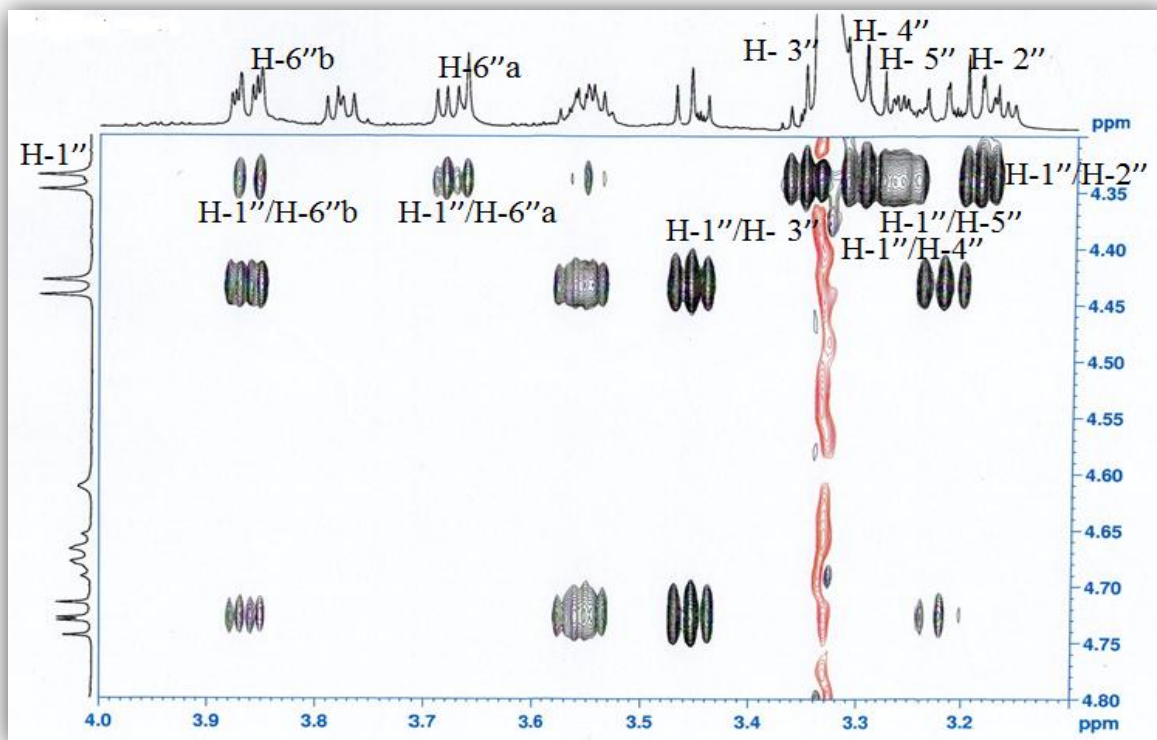


Figure III.31 : Spectre TOCSY de la partie osidique (β -D-glucose)

L'analyse HSQC (Figure III.32) permet de caractériser tous les carbones trouvés dans la partie osidique (β -D-glucose) à travers les corrélations entre :

- le proton anomère H-1'' et son carbone C-1'' résonant à δ_C 103,5 ppm.
- le proton H-2'' et son carbone C-2'' résonant à δ_C 74,3 ppm.
- le proton H-3'' et son carbone C-3'' résonant à δ_C 77,2 ppm.
- le proton H-4'' et son carbone C-4'' résonant à δ_C 70,4 ppm.
- les protons H-5'' et leur carbone C-5'' résonant à δ_C 70,4 ppm.
- les protons H-6''a et H-6''b et leur carbone C-6'' résonant à δ_C 61, ppm.

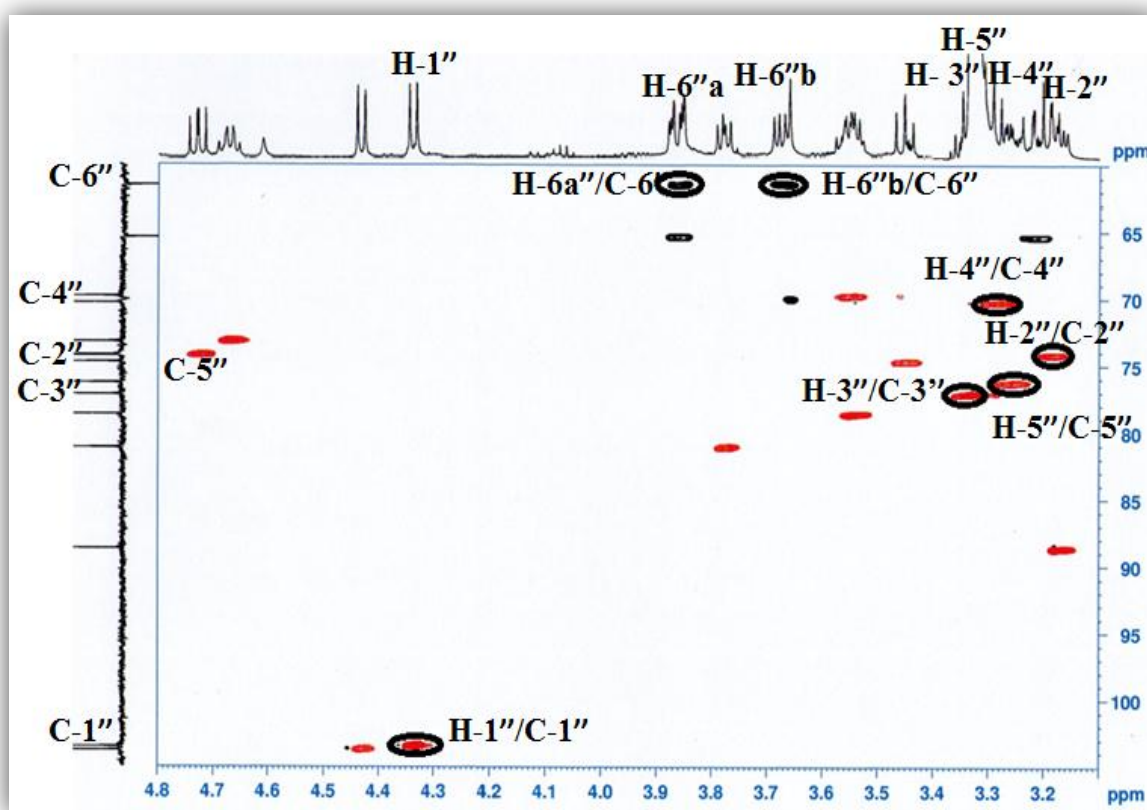


Figure III.32 : Spectre HSQC de la partie osidique (β -D-glucose)

Les sites de fixation des deux unités osidiques sont confirmés par expérience HMBC (Figure III. 33) à travers les corrélations entre le proton anomère H-1' (δ_H 4,43 ppm) du xylose et le carbone C-3 (δ_C 88,7 ppm) de la génine, entre le proton anomère H-1'' (δ_H 4,34 ppm) du glucose et le carbone C-6 (δ_C 78.7 ppm),

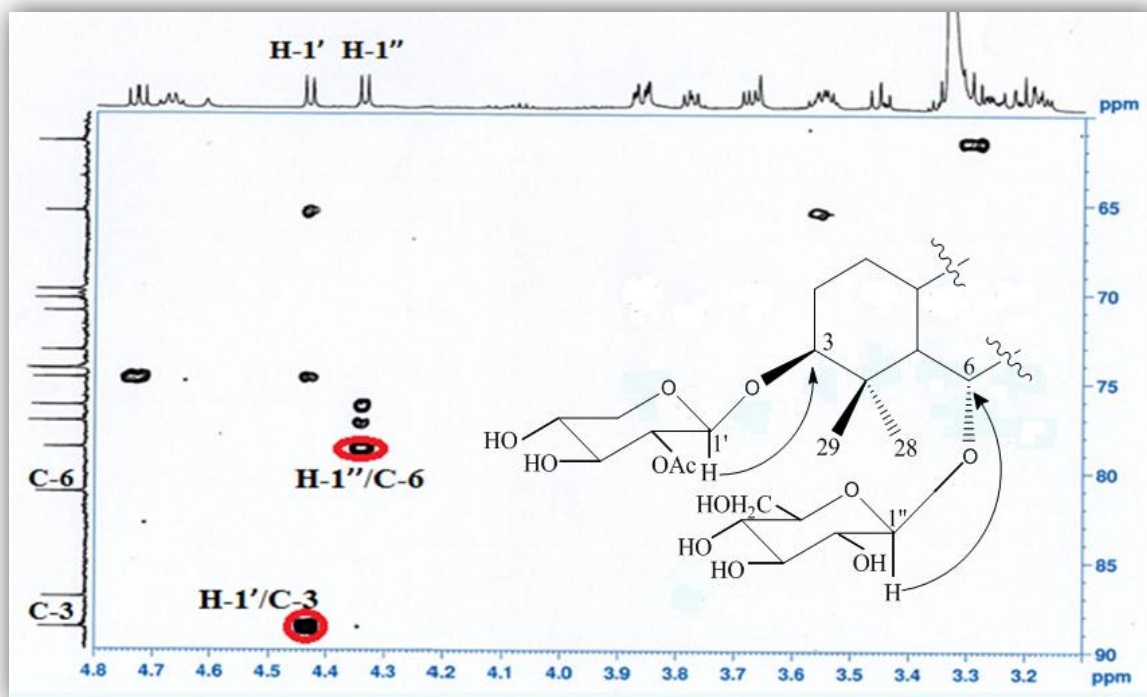
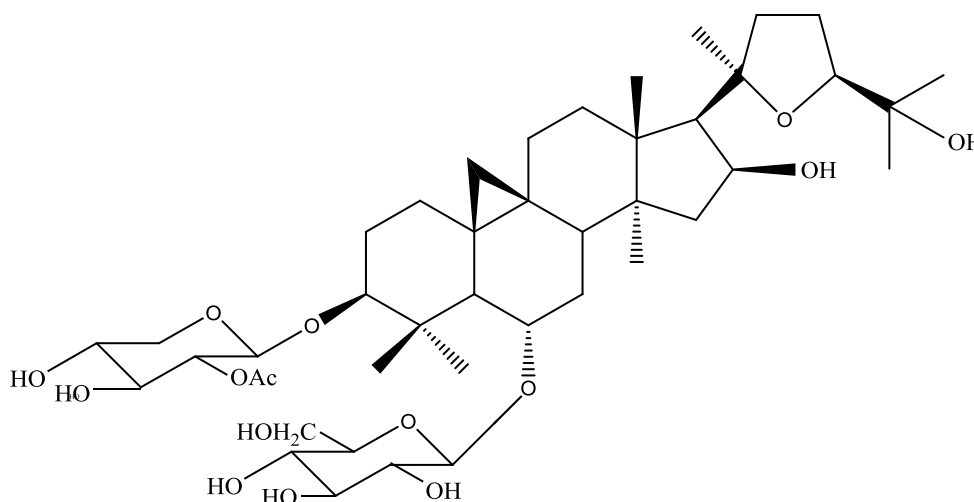


Figure III.33 : Spectre HMBC mettant en évidence les sites de fixation des sucres

L'ensemble de ces données citées précédemment permet d'assigner pour le composé 1 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 appelé astrasieversianine VIII, a été isolé antérieurement des racines de la plante *Astragalus sieversianus*.

Le tableau III.1 contient tous les déplacements chimiques des protons et carbones du Composé.

Tableau III.1 : Déplacements chimiques RMN ^1H et ^{13}C du composé 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	1,26 (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) 1,65 (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, 9,5; 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)

CHAPITRE IV

Partie expérimentale

IV.1 Matériels et appareillage

IV.1.1 Récolte de la plante *A. depressus* L.

La plante *Astragalus depressus* L. a été récoltée en mai 2011 dans la région de Khenchela. Elle a été identifiée par le Professeur Bachir Oudjehih (Département d'Agronomie Institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques), Université de Batna-1.

IV.1.2 Méthodes chromatographiques

IV.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).

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).

IV.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.

IV.1.2.3 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Ce sont des colonnes en verre remplies de phases stationnaires dont la nature est choisie par rapport à la manoeuvre visée (fractionnement, séparation ou purification). Le diamètre et la taille de la colonne ainsi que le débit de la phase mobile et le volume des fractions sont adaptés en fonction de la quantité et la nature de l'échantillon à séparer. Le choix des systèmes d'élution, le suivi de la séparation et le rassemblement des fractions collectées est fait sur la base d'analyse sur CCM.

On a recouru dans ce travail à une chromatographie d'adsorption sur colonne ouverte :

- **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).

Le principe de cette technique est simple il réside dans la différence d'affinité d'un soluté envers une phase stationnaire (l'adsorbant) et une phase mobile (l'éluant). Evidemment un soluté sera séparé des autres solutés selon sa plus ou moins affinité pour ces phases.

IV.1.3 Méthodes spectroscopiques

IV.1.3.1 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 QTOF respectivement, en m/z .

IV.1.3.2 Spectroscopie de RMN

Pour la détermination structurale des produits isolés, divers spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C , mono (1D) et bidimensionnelles (2D) ont été réalisés à l'université de Reims, en France, sur un appareil Bruker avancé DRX-500.

Les spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C sont enregistrés respectivement à 500 et 125 MHz avec le TMS comme référence. Le solvant deutéré choisi pour solubiliser le produit isolés est le chloroforme deutéré (CDCl_3).

Les déplacements chimiques ont été exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne, et les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

Voici quelques idées sur les méthodes mono et bidimensionnelles en question :

-La RMN monodimensionnelle (1D)

- **La RMN du proton (RMN ^1H)**

A cause de son abondance dans les composés organiques, l'isotope ^1H de spin $\frac{1}{2}$ possède une excellente sensibilité à la détection RMN [63]. Généralement, dans un spectre RMN ^1H , chaque type de proton apparait sous forme d'un signal caractérisé par un déplacement

chimique (δ exprimé en ppm), une multiplicité (m) et une constante de couplage (J exprimé en Hz). L'ensemble de ces informations donne une idée sur l'environnement chimique du proton et ainsi permet l'analyse structurale de la molécule.

Le spectre de RMN- ^1H d'une saponine se présente au trois zones de résonances [64]:

- de 0.5 à 3 ppm : les protons de la génine, en particulier les méthyles,
- de 3 à 4.5 ppm : les protons osidiques sauf les anomères,
- de 4.5 à 6 ppm : les protons anomériques sous la forme de doublets ou de singulets élargis, et les protons éthyléniques de la génine.

- **RMN du carbone (RMN ^{13}C)**

En RMN ^{13}C , la faible abondance naturelle (1,1%) du carbone 13 impose l'utilisation de plusieurs séquences impulsionsnelles. Pour les besoins de notre analyse phytochimique, on a utilisé la séquence *J*-modulé qui est facile et très utilisée pour attribuer les signaux des carbones ainsi qu'à les distinguer en carbones quaternaires et secondaires d'un côté et primaires et tertiaires de l'autre.

Le spectre de RMN- ^{13}C se présente les zones de résonance suivante:

- de 10 à 60 ppm : les carbones de la génine,
- de 60 à 90 ppm : les carbones osidiques sauf les anomères, et quelques carbones hydroxylés de la génine,
- au-delà de 90 ppm : les carbones anomériques des sucres.

La RMN bidimensionnelle (2D)

Introduite par Jeener en 1971 [63], l'emploi de cette technique devient vite nécessaire à l'analyse structurale des composés organiques, et parmi les types de cette technique on a :

- **La Corrélation HSQC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$**

L'expérience HSQC en Anglais (Heteronuclear Single Quantum Correlation) permet de relier les protons aux noyaux carbones où ils sont fixés ($^1J_{\text{H-C}}$).

- **La Corrélation HMBC $^1\text{H}/^{13}\text{C}$**

L'expérience HMBC en Anglais (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) permet de déterminer les corrélations entre protons et carbones à longue distance (plus d'une liaison) en $^2J_{\text{H-C}}$, $^3J_{\text{H-C}}$ et rarement en $^4J_{\text{H-C}}$.

- **La Corrélation COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$**

L'expérience COSY en Anglais (Correlated Spectroscopy) permet d'identifier les protons ^1H couplés en 2J , 3J et même parfois en 4J .

- **La Corrélation (TOCSY)**

A partir de cette expérience, les corrélations de tous les protons d'un même système de spin, comme pour l'expérience COSY mais sur des constantes de couplages plus importants, sont mis en évidence. Elle donc importante pour l'analyse de la structure des sucres [64,65].

IV.2 Etude de l'espèce *Astragalus depressus*

IV.2.1 Extraction

800g de la plante entière *Astragalus depressus* pulvérisée est soumis à une double macération dans l'éthanol à 70 % (2×8 litres) pendant 2 jours à la température ambiante. Après filtration et évaporation de l'éthanol, la phase aqueuse résultante est soumise à une extraction liquide-liquide, par l'éther de pétrole (3×400 ml) puis l'acétate d'éthyle (3×400 ml) et enfin le butanol (3×400 ml). Les extraits obtenus sont ensuite séchés, filtrés et enfin évaporés. Cette opération a permis de recueillir les masses suivantes: 2,5g pour l'extrait étheropétrolique, 9,5g pour l'extrait AcOEt et 25g pour l'extrait butanolique. Les CCM réalisées sur les trois extraits dans différents systèmes de solvants, ont montré une composition chimique plus riche au niveau des deux extraits acétate d'éthyle et butanolique, mais ce travail va se limiter uniquement à l'étude de l'extrait acétate.

I.2.2 Fractionnement et purification

7 g de l'extrait acétate d'éthyle 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). Après séparation et rassemblement des fractions possédant un profil chromatographique similaire, 10 fractions allant de **F1** à **F10** ont été obtenues. Le fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle d'*Astragalus depressus* est présenté dans le tableau suivant (Tableau IV.1).

-Tableau IV.1: Fractionnement de l'extrait AcOEt de la plante *A.dperessus*

		Fraction	Eluant CCM	Pois (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		CHCl ₃ /MeOH 8-2	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

-Etude de la Fraction F7

La fraction F7 (614 mg) est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale en utilisant un gradient d'élution chloroforme/méthanol à différents gradients (100:0 à 95:5), (Tableau IV.2).

-Tableau IV.2: Fractionnement de la Fraction F7

Fraction	Eluant	
1-24	100	CHCl ₃ /MeOH
25-42	99-1	
43-72	97-3	
73-90	95-5	

L'examen des plaques CCM a permis de rassembler cinq sous fractions (F7-1 à F7-5). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant (Tableau IV.3) :

-Tableau IV.3: Rassemblement des sous fractions

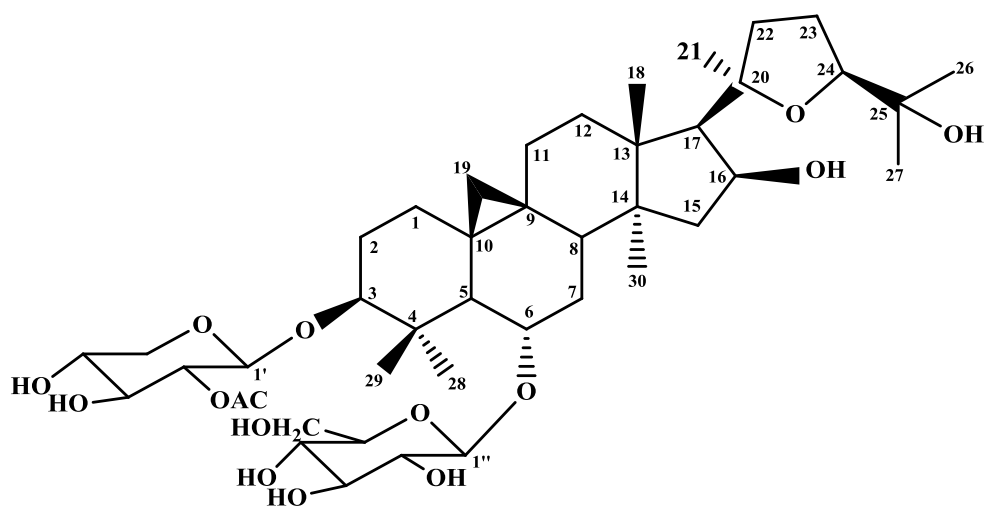
	Regroupement des Fractions	Quantités (mg)
F1	(5-25)	16,7
F2	(26-42)	11,3
F3	(43-74)	32,9
F4	(75-84)	25
F5	(85-90)	450

Une chromatographie préparative C.C.E réalisée sur la fraction F7- 4 (25 mg) (éluant : CH₂Cl₂/MeOH (75-25)) a permis d'isoler le composé **1** (2mg). La CCM de ce dernier indique la présence d'une tache invisible à 254 nm, se révélant en mauve à l'acide sulfurique/acide acétique et chauffage à 100 °C (Figure IV.2).



Figure IV.1: Plaque CCM du produit 1, système d'élution ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$)

IV.2.3 Constantes physiques et données spectrale de composé isolé



Formule brute	$C_{43}H_{70}O_{15}$
Masse moléculaire	826 uma
Nom systématique	3- <i>O</i> -(2'- <i>O</i> -acétyl)- β -D-xylopyranosyl-6- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl-20(<i>R</i>),24(<i>S</i>)-époxy-3 β ,6 α , 16 β ,25-tetrahydroxycycloartane.
Nomenclature triviale	Astrasieversianine VIII
EI-MS	$m/z=849[M+Na]^+$
RMN 1H (500 MHz) dans le CD_3OD .	<p>1,54-1,30 (<i>m</i>, 2H, H-1) ; 1,93-1,65 (<i>m</i>, 2H, H-2) ; 3,17 (<i>dd</i>, 1H, 9,4; 4,5, H-3) ; 1,61 (<i>m</i>, 1H, H-5) ; 3,56 (<i>m</i>, 1H, H-6) ; 1,93-1,59 (<i>m</i>, 2H, H-7) ; 1,88 (<i>dd</i>, 1H, 10,2; 4,7, H-8) ; 1,93-1,31 (<i>m</i>, 2H, H-11) ; 1,67-1,57 (<i>m</i>, 2H, H-12) ; 2,05-1,40 (<i>m</i>, 2H, H-15) ; 4,67 (<i>q</i>, 1H, 7,5, H-16) ; 2,39 (<i>d</i>, 1H, 7,5, H-17) ; 1,26 (<i>s</i>, 3H, H-18) ; 0,28 (<i>d</i>, 1H, 4,3, H-19a) ; 0,60 (<i>d</i>, 1H, 4,3, H-19b) ; 1,23 (<i>s</i>, 3H, H-21) ; 2,64 (<i>q</i>, 1H, 10,6, H-22a) ; 1,65 (<i>m</i>, 1H, H-22b) ; 2,05 (<i>m</i>, 2H, H-23) ; 3,78 (<i>dd</i>, 1H, 8,4; 5,8, H-24) ; 1,28 (<i>s</i>, 3H, H-26) ; 1,15 (<i>s</i>, 3H, H-27) ; 1,22 (<i>s</i>, 3H, H-28) ; 0,92 (<i>s</i>, 3H, H-29) ; 1,04 (<i>s</i>, 3H, H-30) ; 4,43 (<i>d</i>, 1H, 7,9, H-1') ; 4,73 (<i>dd</i>, 1H, 9,5; 7,9, H-2') ; 3,45 (<i>t</i>, 1H, 9,6, H-3') ; 3,55 (<i>ddd</i>, 1H, 11,5; 9,6; 4,8, H-4') ; 3,86 (<i>dd</i>, 1H, 11,5; 4,8, H-5 a') ; 3,22 (<i>dd</i>, 1H, 11,5; 9,6, H-5'b) ; $OCOCH_3$ 2,11(<i>s</i>, 3H) ; 4,34 (<i>d</i>, 1H, 7,8, H-1'') ; 3,19 (<i>dd</i>, 1H, 8,5; 7,8 H-2'') ; 3,35 (<i>t</i>, 1H, 8,5, H-3'') ; 3,29 (<i>t</i>, 1H, 8,5, H-4'') ; 3,26 (<i>ddd</i>, 1H, 8,5; 5,4; 2,3, H-5'') ; 3,86 (<i>dd</i>, 1H, 11,5; 2,3, H-6'' a) ; 3,67 (<i>dd</i>, 1H, 11,5; 5,4, H-6''b).</p>

RMN ^{13}C (125 MHz) dans le CD_3OD .	31,4 (CH-1), 29,1 (CH-2), 88,7 (CH-3), 41,4 (CH-4), 51,7 (CH-5), 78,7 (CH-6), 33,7 (CH-7), 45,7 (CH-8), 20,7 (CH-9), 28,5 (CH-10), 25,6 (CH-11), 32,7 (CH-12), 44,6 (CH-13), 44,7 (CH-14), 45,7 (CH-15), 73,3 (CH-16), 57,5 (CH-17), 19,9 (CH-18), 28,2 (CH-19), 87,0 (CH-20), 26,9 (CH-21), 34,0 (CH-22), 25,4 (CH-23), 81,2 (CH-24), 71,1(CH-25), 26,2 (CH-26), 25,2 (CH-27), 27,1 (CH-28), 15,1 (CH-29), 18,8 (CH-30), 103,8 (CH-1'), 74,3 (CH-2'), 74,8 (CH-3'), 69,9 (CH-4'), 65,5 (CH-5'), 170,5 (2'-CO), 19,9 (OCOCH ₃), 103,5 (CH-1''), 74,3 (CH-2''), 77,2 (CH-3''), 70,4 (CH-4''), 76,3 (CH-5''), 61,5 (CH-6'').
---	--

Conclusion

CONCLUSION

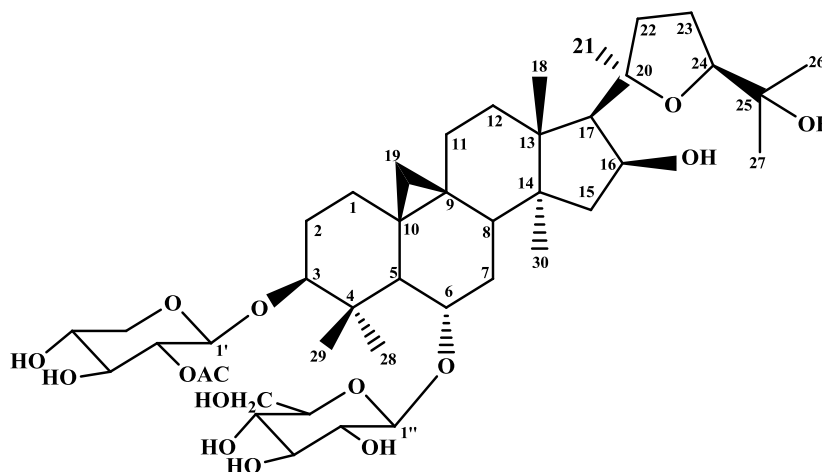
L'objectif de notre travail concerne l'investigation phytochimique d'une plante appartenant à la famille Fabaceae et au genre *Astragalus* nommée *Astragalus depressus*, espèce poussant dans tout le pourtour méditerranéen.

Cette étude a permis d'isoler et d'identifier une saponine triterpénique à squelette cycloartane, de grande complexité. Le produit a été isolé à l'état pur grâce à l'utilisation combinée des différentes techniques chromatographiques (CC, CCM et CCE).

L'élucidation structurale de ce composé 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), la spectrométrie de masse ESI, et la comparaison avec les données de la littérature.

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail sont en accord avec ceux obtenus antérieurement à l'issue d'études chimiques réalisées sur le genre en question. Ils confirment que les saponosides triterpéniques particulièrement à squelette cycloartane sont les constituants essentiels du genre *Astragalus*.

La structure du composé isolé à l'issue de cette investigation chimique, est illustrée ci-dessous



**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 (Astrasieversianine VIII)**

*Références
bibliographiques*

Références Bibliographiques

- [1] Anastas,P.T.,Warner.,J.C.(1998).Green Chemistry: Theory and Practice, Oxford University Press: New York, 30.
 - [2] Ozenda, P. (1991).Flore et végétation du Sahara.Paris:3ème edition CNRS.279-280 p.
 - [3] Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P. (2002). Botanique systématique.une perspective phyllogénétique. Systematics and Geography of Plants, 72(1), 242-243.
 - [4] Quézel, P. et Santa, S. (1962). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques.
 - [5] Tietze, L. F., Beifuss, U. (1993). Sequential transformations in organic chemistry: Asynthetic strategy with a future. Angewandte Chemie (International Edition in English),32, 131-163.
 - [6] Ndayishimiye, J. (2011). Diversité, endémisme, géographie et conservation des Fabaceae de l'Afrique Centrale. Thèse de Docteur en Sciences: Service d'Ecologie du Paysage et Systèmes de Production Végétale. Bruxelles: Ecole Inter facultaire de Bio ingénieurs.12 p.
 - [7] Heywood, V.H. (1996). Flowering Plants of the World. Oxford : 3th edition Oxford University Press. 141 p.
 - [8] Hamid, M.H.S. A., Slatford, P. A., Williams, J. M. J. (2007). Borrowing hydrogen in the activation of alcohols. Advanced Synthesis and Catalysis, 349, 1555-1575.
 - [9] Cavar,S.,Kovac, F.,Maksimovic, M. (2009). Food Chemistry., 117, 135.
 - [10] Mladenović,M., Vuković,N., Sukdolak, S., Solujić, S. (2010). Molecules., 15, 4294.
 - [11] Li, S. M., HEID L. (2005). Current medicinal chemistry.,12, 419.
 - [12] Bruneton, J. (1999). Pharmacognosie (phytochimie, plantes médicinales)., Tec et Doc, Paris.
 - [13] Quezel,P.,Santa,S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiquesméridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1–2. Paris. France.
 - [14] Walter, H. (1991). Ger. Offen. DE 4,025,443, Chemical Abstracts (1991), 114,247575r.
 - [15] Vejdelek, Z., Protiva, M.(1990). Potential antidepressant and tranquilizers:ynthesis of some 9-(aminoalkoxy)-2,3,6,7-tetrahydro-1h,5h-benzo(ij) quinolizines and 1-substituted amino)-3-(1-naphthoxy)-2-propanols. Collection of Czechoslovak Chemical Communications, 55, 1290-1296.
-

- [16] Moran, A. M., Delbecque, C., Kelley, A. M. (2001). Solvent effects on ground and excited electronic state structures of the push-pull chromophore julolidinyl-N,N'-diethylthiobarbituric acid. *The Journal of Physical Chemistry A*, 105, 10208-10219.
- [17] Tang, W., Eisenbrand, G. (1992). *Chinese drugs of plant origin: chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine*. Berlin: Springer-Verlag.
- [18] Leung, A. Y., Foster, S., In: Leung A.Y, Foster S, editors. (1996). *Encyclopedia of common ingredients used in food, drugs and cosmetics*. 2nd ed. New York: Wiley;. p. 50.
- [19] Upton, R., Petrone, C., 1999. Santa Cruz: American Herbal Pharmacopoeia.
- [20] Barbero, N., Barolo, C., Marabello, D., Buscaino, R., Gervasio, G. And Viscardia, G. (2012). Synthesis, optical characterization and crystal and molecular X-ray structure of a phenylazojulolidine derivative. *Dyes and Pigments*, 92, 1177-1183.
- [21]. Muraca, M.G. *Arch. Sci. Med.* (1999), 158, 133.
- [22] a) Casley-Smith J.R. (1999), 16, 31.
b) *Natura News*-décembre (2007).
- [23] a) Hoeksema, H., Johnson, J. L., Hinman, J. W. (1955), *J AM Chem Soc.*, 77, 6710.
b) Smith, C. G., Dietz, A., Sokolski, W. T., et sauvage, G. M. *Antibiotics et chimiothérapie*, (1956), 6, 135.
- [24] Mladenović, M., Vuković, N., Sukdolak, S., Solujić, S. (2010). *Molecule.*, 15, 4294.
- [25] Mao, W.; Wang, T.; Zeng, H.; Wang, Z.; Chen, J.; Shen, J. (2009). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.*, 19, 4570.
- [26] Sutharsan, J., Lichlyter, D., Wright, N. E., Dakanali, M., Haidekker, M. A. Theodorakis, E. A. (2010). Molecular rotors: synthesis and evaluation as viscosity sensors. *Tetrahedron*, 66, 2582-2588.
- [27] Ablinger, E., Leitgeb, S., Zimmer, A. (2013). Differential scanning fluorescence approach using a fluorescent molecular rotor to detect thermal stability of proteins in surfactant-containing formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 441, 255-260.
- [28] Nagasaka, H.; Ohta, K. (1989) . The European patent applications, EP 300,410, *Chemical Abstracts*. 1989, 110, 202873n.
-

- [29] Kuttyrev, A. and Kappe, T. (1997). Methane tricarboxylates as key reagents for the simple preparation of heteroarylcarboxamides with potential biological activity.
Part 1 : reaction of methane tricarboxylates with indoline and 1,2,3,4-tetrahydroquinoline. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 34, 969.
- [30] Bedir, E., Ihsançalia, A., Aquino, R., Piacente, S., Pizza, C. (2005). Tetrahydroquinoline derivatives. *Tetrahedron* 5 pp. 5961-5966.
- [31] Linneka, J., Mitaine-Offer, A. C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Paululat, T., Avunduk, S., Alankus-Çalışkan, Ö., Lacaille-Dubois, M. A. (2011). Cycloartane Glycosides from Three Species of *Astragalus* (Fabaceae). *Helvetica Chimica Acta* 94, 230–237.
- [32] Djimtombaye, B. J., Alankus-Çalışkan, Ö., Gülcemal, D., Khan, I. A., Anil, H., Bedir, E. (2013). Unusual Secondary Metabolites from *Astragalus halicacabus* Lam. *Chemistry & Biodiversity* 10, 1328–1334.
- [33] Horo, I., Bedir, E., Masullo, M., Piacente, S., Özgökçe, F., Alankus-Çalışkan, Ö., (2012). Saponins from *Astragalus hareftae* (NAB.) SIRJ. *Phytochemistry* 84, 147–153.
- [34] 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.
- [35] Jan, S., Abbaskhan, A., Musharraf, S. G., Sattar, S. A., Samreen, S. I., Al-Othman, Z. A., Al-Majid, A. M., Atta-ur-Rahaman, M. I. (2011). Three New Cycloartane Triterpenoids from *Astragalus bicuspis*. *Planta Med.* 77, 1829–1834.
- [36] Maamria, L., Long, C., Haba, H., Lavaud, C., Cannac, A., Benkhaled, M. (2015). Cycloartane Glycosides *Astragalus gombo* phytochemistry 11, 286-291.
- [37] Ghasemian-Yadegari, J., Nazemiyeh, H., Hamedeyazdan, S., Fathiazad, F. (2017). Secondary metabolites from the roots of *Astragalus maximus*, *Research Journal of Pharmacognosy (RJP)* 4(2),: 31-38.
- [38] Benchadi, W., Haba, H., Lavaud, C., Haraat, D., Benkhaled, M. (2013). Secondary Metabolites of *Astragalus scruciatus* Link. and Their Chemotaxonomic Significance. *Rec. Nat. Prod.* 7, 105–113.
- [39] 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.
- [40] Vincken, J.P., Heng, L. De Groot, A., Gruppen, H. (2007).
-

- [41] Sparg, S. G., Light, M. E., and van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *J Ethnopharmacol*, 94(2-3) :219–243.
- [42] Girard, M., Belanger, J., Apsimon, J. W., Garneau, F.,-X., Harvey, C., Brisson, J.-R.(1990). Frondoside A. A novel triterpene glycoside from the holothurian *Cucumariafrondosa*. *Canadian Journal of Chemistry*, 68:11–18; Kalinin, V. I., Avilov, S. A., Kalinina, E. Y., Korolkova, O. G., Kalinovskiy, A. I., Stonik, V. A., Riguera, R., Jiménez, C.(1997). Structure of Eximisoside A, a novel triterpene glycoside from the far-Eastern sea cucumber *Psoluseximius*. *Journal of Natural Products*, 60:817–19; Moraes, G., Norhcote, P. C., Kalinin, V. I., Avilov, S.A., Silchenko, A. S., Dmitrenok, P. S., Stonik, V. A., Levin, V.S. (2004). Structure of major triterpene glycoside from the sea cucumber *Stichopusmollis* and evidence to reclassify this species into the new genus *Australostichopus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32:637– 650.
- [43] Bruneton, J. (1999). *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*. Editions TEC &DOC, 3ème édition, PP 783- 785.
- [44] Bruneton, J. 2009. *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales*. Ed. Tec &Doc.
- [45] Chawlek, M. (2004). *Hémisynthèse de saponosides à hédéragénine, étude de l'influence de la chaîne osidique sur l'activité Hémolytique*. Thèse de Doctorat. Université de Reims, France.
- [46] 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.
- [47] BRUNETON, J. (2009). *Pharmacognosie – Phytochimie, Plantes médicinales*, Tec & Doc, Médicales internationales (Eds.), 4e édition.
- [48] Bedir, E., Çalis, I., Aquino, R., Piacente, S., Pizza, C. (1999a). Secondary metabolites from the roots of *Astragalus trojanus*. *Journal of Natural Products*, 62:563–8; Bedir, E., Çalis, I., Aquino, R., Piacente, S., Pizza, C. (1999b). Trojanoside H : a cycloartane-type glycoside from the aerial parts of *Astragalus trojanus*. *Phytochemistry*, 51:1017-20.
-

- [49] Perrone, A., Masulio, M., Bassarello, C., Bloise, E., Hamed, A., Nigro, P., Pizza, C., Piacente, S. (2008). Unusual cycloartane glycosides from *Astragalus eremophilus*. *Tetrahedron*, 64:5061-71; Linnek, J., Mitaine-Offer, A.-C., Miyamoto, T., Tanaka, C., Paululat, T., Avunduk, S., Alankus-Caliskan, Ö., Lacaille-dubois, M.-A. (2011). Cycloartane glycosydes from three species of *Astragalus* (Fabaceae). *Helvetica Chimica Acta*, 94:230-7.
- [50] Belloum, Z. (2007). Etude phytochimique des plantes médicinales Algériennes, cas de l'espèce *Inulacrithmoides* L. Mémoire de Magister. Université Mentouri, Constantine.
- [52] Lacaille-Dubois, M.A., Wagner, H. (2000). Bioactive saponins from plants: an update in: *Studies in Natural Products Chemistry Series*, Atta-Ur-Rahman (Eds.), Elsevier Science, Vol. 21, pp 633–87.
- [53] Lacaille-Dubois, M.A. (2005a). Bioactive saponins with cancer related and immunomodulatory activity: Recent developments, Atta-Ur-Rahman (Eds.), *Studies in natural products chemistry series*, vol. 32. Elsevier, Amsterdam; pp 209–46.
- [54] Lacaille-Dubois, M.A. (2005b). Bioactive saponins from plants: recent developments in "Handbook of Medicinal Plants", Yaniv Z., Bachrach, U. (Eds.). Food Products Press (FPP). The Haworth Medical Press (HMP): New York, Chapter 19, pp 399–428
- [55] Lacaille-Dubois, M.A. (2013). Newest results of the chemistry and pharmacology of triterpene and steroid saponins containing TCM-drugs in "Evidence and rational based research on Chinese drugs", H. Wagner, G. Ulrich-Merzenich (Eds.). Springer-Verlag Wien pp 87–135.
- [56] Vincken, J.-P., Heng, L. De Groot, A., Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68:275–297.
- [57] Vincken, J.-P., Heng, L., de Groot, A., and Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68(3) :275–297.
- [58] Estrada, A., Katselis, G. S., Laarveld, B., And Barl, B. (2000). Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 23(1) :27–43.
- [59] Pistelli, L., Pardossi, S., Flamini, G., Bertoli, A., Manunta, A. (1997). Three cycloastragenol glucosides from *Astragalus verrucosus*. *Phytochemistry* 45, 585–587.
- [60] 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.
- [61] Zhou, Y., Hirotani, M., Rui, H., Furuya, T. (1995). Two triglycosidic triterpene astragalosides from hairy root cultures of *Astragalus membranaceus*. Phytochemistry 38, 1407–1410.
- [62] 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.
- [63] G. Plé, I. Grosu. (1999). Résonance magnétique nucléaire appliquée à l'analyse structurale de composé organique, Publications de l'université de Rouen,.
- [64] Massiot, G., Lavaud, C. (1995). Structural elucidation of saponins, Atta-Ur-Rahman (Eds.), Structure and chemistry (Part 3): Studies in natural products chemistry, Elsevier: Amsterdam, pp 187–224.
- [65] Gunther, H. (1996). La spectroscopie de RMN: Principes de bases, concepts et applications de la spectroscopie de résonance magnétiques nucléaires du carbone 13 en chimie. Elsevier Masson (Eds.).
-

Résumé

Résumé

Le présent travail est consacré à l'étude phytochimique de l'extrait Acétate d'ethyle de la plante *Astragalus depressus*, appartenant à la famille Fabaceae et genre *Astragalus*.

La méthodologie de séparation et purification de composé est basée sur la chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale, la chromatographie sur couche mince et la chromatographie sur plaque préparative. Elle a permis d'isoler une saponine triterpénique à squelette cycloartane .

La détermination structurale de ce composé a été réalisée par la combinaison de plusieurs méthodes spectroscopiques telles que la RMN 1D et 2D (1H, 13C *J*-modulé, TOCSY, COSY H-H, HSQC, HMBC et ROESY), la spectrométrie de masse ESI, et par la comparaison avec les données de la littérature.

Mots-clés : *Astragalus depressus*, Fabaceae, saponines, RMN 1D et 2D, spectrométrie de masse.

Abstract

The present work is devoted to the phytochemical study of ethyl acetate extract of the plant *Astragalus depressus*, belonging to the fabaceae family and *Astragalus* genus.

The methodology of separation, purification of the compound is based on silica gel column chromatography, and thin layer chromatography (TLC). It allowed the isolation of one triterpene saponin with cycloartane skeleton.

The structure elucidation of the isolated secondary metabolite was carried out by a combination of several spectroscopic methods such as 1D and 2D NMR (1H, *J*-modulated 13C, COSY H-H, TOCSY, HSQC, HMBC and ROESY), mass spectrometry ESI and by comparison with literature data.

Keywords: *Astragalus depressus*, Fabaceae, saponins, NMR 1D and 2D, mass spectrometry.

ملخص

خصص هذا العمل للدراسة الفيتوكيميائية لمستخلص Acétate d'ethyle لنبته *Astragalus depressus* من جنس *Astragalus* و المنتمية لعائلة fabaceae.

ترتكز منهجية الفصل والتصفية لهذا المركب على التحليل على عمود gel de silice العادي، التحليل على طبقة رقيقة، التحليل على صفيحة معدة مسبقا، حيث تسمح هذه المنهجية بعزل صابونين triterpenique من هيكل cycloartane.

تم تحديد بنية هذا المركب باستخدام عدة طرق مطيافية، مطيافية الرنين المغناطيسي أحادي وثنائي الأبعاد، مطيافية الكتلة والمقارنة مع المعطيات الجغرافية السابقة.

الكلمات المفتاحية: *Astragalus depressus* ، fabaceae صابونين ، تقنية الرنين المغناطيسي أحادي وثنائي البعد، مطيافية الكتلة.