



MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ « Abbès LAGHROUR » DE KHENCHELA  
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE



Département des Sciences de la Matière

N° de série :

## Mémoire de fin d'études

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

**Filière : Chimie**

**Spécialité : Chimie analytique**

**Intitulé :**

**Isolement et élucidation structurale des  
produits de la plante *Astragalus gombo***

*Réalisé par :*

**Hassad Abir  
Saoudi Soumiya**

*Dirigé par :*

**Dr. Maamria Leyla**

*Membres du jury :*

*Président : Golea Lynda*

*MCA*

*Univ. Abbès Laghrou Khenchela*

*Examineur : Lachekheb Messouda*

*MAA*

*Univ. Abbès Laghrou Khenchela*

*Présenté le : 13/07/2021*

## ***Remerciement***

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements à dieu le plus puissant, pour la volonté, la santé, et la patience que dieu nous a donné durant toutes ces longues d'étude.

Nous remercions d'une manière particulière nos parents pour tous les sacrifices qu'ils ont dû subir tout au long de nos études, afin de nous permettre d'arriver à ce stade.

Nous adressons notre profonde gratitude à notre encadreur M<sup>me</sup> *Maamria Leyla* pour ces conseils, ses remarques, et le temps qu'il a consacré à notre travail. Nous aimerons aussi le remercier pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Mes sincères remerciements vont également au président du jury M<sup>me</sup> **Golea Lynda**, d'avoir accepté de juger ce modeste travail.

Nous aimerons remercier M<sup>me</sup> **Lachekheb Messouda** d'avoir accepté de faire partie de jury de mémoire.

Nous tenons aussi à remercier toutes les personnes qui ont aidé de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

## *Dédicace*

### **Abir**

*On dit que la réussite est la fierté dans les yeux des gens qu'on aime, et étant donné que ce manuscrit est le premier travail scientifique que j'ai accompli, J'aimerais le dédier tout d'abord :*

*Je dédie ce modeste travail à mes très chers parents*

*Aucune dédicace très chère maman, ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous, vos sacrifices innombrables et votre dévouement firent pour moi un encouragement.*

*Puisse Dieu, tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.*

*A mon très cher père, tout l'encre du monde ne pourrait suffire pour exprime mes sentiments envers un être très cher. Vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour. Vous êtes et vous resterez pour moi ma référence, la lumière qui illumine mon chemin.*

*J'implore Dieu, tout puissant, de vous accorder une bonne santé, une longue vie et beaucoup de bonheur.*

*À mes belles-sœurs : **Lamiss, Wanassa**, À mes chers frères surtout mon frère Akram pour leur disponibilité, encouragements et amour.*

*A mes chères amies et collègues. **Dhaoui Hafiza, Islem Ouchen, Asma, Imen Djaber, Imen kribi.***

*A tous mes oncles et tantes.*

*A tous mes cousins et cousines.*

## *Dédicace*

**Soumiya**

*Je tiens à dédier ce travail à*

*Mon cher père*

*Ma chère mère*

*Je dédie cet humble travail à mon mari **Bahaeddineet**, ma fille **Roudayna***

*Mes frères **Said, Ayoub, Anfal, Khawla**, mes neveux **Bouchra, Islam** et*

***Kawthar***

*A toute la famille **Saoudi** et **Zakraoui***

## *Abréviations*

<b>ACOET</b>	Acétate D'éthyle.
<b>Ac</b>	Acétyle.
<b>R</b>	Radical.
<b>Glc</b>	Glucose.
<b>Rha</b>	Rhamnose.
<b>Mva</b>	La Voie Mévalonique.
<b>SM</b>	Spectrométrie De Masse.
<b>CCM</b>	Chromatographie Sur Couche Mince.
<b>EP</b>	Ether De Pétrole.
<b>Vlc</b>	Chromatographie Liquide Sous Vide.
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Eau.
<b>CC</b>	Chromatographie Sur Colonne Ouverte.
<b>CLHP</b>	La Chromatographie Liquide A Haute Performance.
<b>CC</b>	Chromatographie Sur Colonne De Gel De Silice Normale.
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Résonance Magnétique Nucléaire Du Proton.
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Résonance Magnétique Nucléaire Du Carbone 13.
<b>DEPT</b>	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer.
<b>COSY H-H</b>	Correlated Spectroscopy.
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Connectivity.
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity.
<b>ROESY</b>	Rotating-Frame Overhauser Effect Spectroscopy.
<b>ESI</b>	Le Spectre De Masse.
<b>Ppm</b>	Partie Par Million.
<b>Hz</b>	Hertz.
<b>Mhz</b>	Mégahertz.
<b>Me</b>	Méthyle.

<b>Uma</b>	Unité De Masse Atomique.
<b>M/Z</b>	Masse/Charge D'un Ion.
<b>S</b>	Singulet.
<b>Dd</b>	Doublet De Doublets.
<b>Ddd</b>	Doublet De Doublets De Doublets.
<b>Td</b>	Triplet De Doublets.
<b>T</b>	Triplet.
<b>M</b>	Multiplet.
<b>Nd</b>	Non Déterminée.
<b>Δ</b>	Déplacement Chimique Exprimé En Ppm.
<b>J</b>	Constante de couplage exprimée en Hz.
<b>1D</b>	Monodimensionnelle.
<b>2D</b>	Bidimensionnelle.
<b>ACN</b>	acétonitrile.
<b>n-BuOH</b>	n-butanol.
<b>SiO<sub>2</sub></b>	gel de silice normale.
<b>RP- 18</b>	silice greffée en C-18.

# **SOMMAIRE**

<b>Introduction générale</b> .....	2
<b>Chapitre I. Aspects botaniques et études antérieures</b>	
I.1. Aperçu bibliographique sur le genre <i>Astragalus</i> et activités biologiques .....	5
I.1.1. Les Fabaceae .....	5
I.1.2. Le genre <i>Astragalus</i> .....	5
I.1.2.1. Description botanique .....	6
I.1.2.2. Répartition et écologie .....	6
I.1.2.3. L'espèce <i>Astragalus gombo</i> .....	7
I.1.2.3.1. Description Botanique .....	7
I.1.2.3.2. Position systématique.....	8
I.1.2.4. Propriétés biologiques et pharmacologiques du genre <i>Astragalus</i> ....	9
I.1.2.4.1. Utilisation en médecine traditionnelle .....	9
I.1.2.4.2 Activités biologiques .....	9
I.2. Etudes phytochimiques antérieures sur le genre <i>Astragalus</i> .....	10
I.2.1. Généralités sur les Saponines.....	16
I.2.1.1. Définition .....	16
I.2.1.2. Classification structurale.....	17
I.2.1.3. La biosynthèse.....	19
I.2.1.4. Distribution des saponines .....	21
I.2.1.5. Propriétés physiques des saponines .....	21
I.2.1.6. Propriétés biologiques des saponosides .....	21
<b>Chapitre II. Etude phytochimique de l'espèce <i>Astragalus gombo</i></b>	
II.1. Résultats et discussions .....	25
II.1.1. Extraction.....	25
II.1.2. Séparation et purification.....	26

II.2.Elucidation structurale du composé A.....	27
--	----

### **Chapitre III. Partie expérimentale**

III.1.Matériels et appareillage .....	44
III.1.1.Récolte de plantes A. gombo .....	44
III.1.2.Méthodes analytiques de séparation.....	44
III.1.2.1.C'est quoi une chromatographie ?.....	44
III.1.3. Méthodes physicochimiques .....	46
III.2.Etude de l'espèce Astragalus gombo .....	47
III.2.1.Extraction .....	47
III.2.2.Fractionnement et purification de l'extrait n-butanol .....	48
III.2.21.Etude de la fraction F10 .....	49
III.2.3. Constante physique et données spectrales de composé A .....	49
<b><i>Conclusion générale</i></b> .....	<b>52</b>
<b><i>Références Bibliographiques</i></b> .....	<b>54</b>

# *Introduction*

# Introduction

Depuis l'antiquité, l'homme a pu compter sur la nature pour subvenir à ses besoins de base : nourriture, abris, vêtements et également pour ses besoins médicaux. A cet effet, les plantes font partie du savoir de base de toutes les sociétés humaines. L'homme utilise les plantes pour lutter contre diverses maladies qui guettent sans cesse sa vie. Cette médecine, connue sous le nom de phytothérapie.

La phytothérapie a été développée à partir d'extraits de plantes en se basant sur des méthodes traditionnelles de guérison. Selon les idées modernes de l'étiologie, de la pathogenèse des maladies et grâce à l'évolution de la science, la phytothérapie a exempté de l'utilisation essentiellement empirique de la médecine des plantes.

Dans le passé, on ne connaissait pas le mode exact d'activité des plantes et leurs propriétés curatives enregistrées empiriquement. Ces propriétés ont suscité l'intérêt des chercheurs à mener de nombreuses études afin de vérifier ces observations et de déterminer la substance responsable de ces propriétés. On sait aujourd'hui que les propriétés des plantes médicinales appartiennent aux composés chimiques qu'elles contiennent appelées phytochimiques.

Aujourd'hui, grâce à la phytochimie, on sait davantage sur ces extraits miraculeux qu'on peut même reproduire leurs effets synthétiquement au laboratoire. Pour ce faire, on doit d'abord isoler la ou les molécules responsables des effets en question et une fois la molécule pure est obtenue, on va la caractériser au moyen des méthodes spectroscopiques de façon à déterminer sa structure afin de pouvoir la reconstruire chimiquement.

Le continent africain est un des continents fournis 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 constituée des milliers de plantes (alimentaires, médicinales ou toxiques). 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 cet ordre d'idées, et dans le cadre de la réalisation de notre mémoire de fin d'études, il nous a été proposé de réaliser une étude phytochimique sur une plante saharienne nommée *Astragalus gombo*, appartenant à la famille des Fabaceae. Ce genre est réputé pour sa richesse en saponosides à squelette cycloartane et oléane et aussi en hétérosides

flavoniques. L'objectif principal de ce travail est l'extraction, l'isolement et l'identification de biomolécules isolées des extraits organiques de la plante *Astragalus gombo*.

**Notre travail sera présenté comme suit :**

- Le premier chapitre de ce travail réservé à l'étude bibliographique de la plante, cette étude commence par la présentation de la famille Fabaceae en générale, en suite par la description botanique du genre *Astragalus*, description qui permet de positionner ce genre dans la systématique des Fabaceae. Il se termine par un petit aperçu sur les travaux phytochimiques antérieurs effectués sur le genre *Astragalus*, la définition, classification, biosynthèse ainsi que les propriétés biologiques de ces deux classes de substances naturelles.
- Le deuxième chapitre est consacré aux résultats phytochimiques obtenus à partir de l'étude chimique de l'espèce *Astragalus gombo*. Il est décrit la méthodologie appliquée pour l'obtention des produits à l'état pur en utilisant les différentes méthodes chromatographiques, Cette partie rapporte d'une manière détaillée l'élucidation structurale des différents composés isolés.
- Le troisième chapitre ou la dernière partie, présente le travail expérimental, contient une présentation des méthodes chromatographiques et spectroscopiques utilisées. Cette partie est terminée par la discussion des résultats des différentes étapes d'extraction, de fractionnement et de purification qui ont conduit à l'isolement de produits naturel.
- Le troisième chapitre résume le travail expérimental effectué dans le cadre de l'investigation phytochimique d des parties aériennes d'*Astragalus gombo*. Il est présenté l'appareillage employé au cours de cette étude suivie de différentes étapes d'extraction, de fractionnement et de purification qui ont conduit à l'isolement de produit naturel. Cette partie est terminée par la présentation des différentes constantes physicochimiques de la biomolécule isolée.

Chapitre I :

Aspects botaniques  
et études antérieures

### I.1.Aperçu bibliographique sur le genre *Astragalus* et activités biologiques

#### I.1.1. Les Fabaceae

La famille Fabaceae ou Légumineusae est la troisième des plus grandes familles de plantes à fleurs après la famille Orchidaceae et la famille Asteraceae, avec 730 genres et plus de 19400 espèces. Elle regroupe de très nombreuses plantes qui poussent dans le monde entier. Leur emploi est très développé dans divers secteurs économiques: pharmaceutiques, agricoles, agroalimentaires, paysagers et horticoles[1].

Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin), pour leur huile (arachide, soja), leurs fibres, comme combustible, pour leur bois, leur utilisation en médecine (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) ou en chimie.

Selon les jardins botaniques royaux, les plus grands genres présents dans cette famille sont le genre *Astragalus* avec plus de 3000 espèces, le genre *Acacia* avec plus de 900 espèces, le genre *Indigofera* avec environ 700 espèces, le genre *Crotalaria* avec 600 espèces et le genre *Mimosa* avec 500 espèces[2].

La famille Fabaceae est cosmopolite. Elle est particulièrement concentrée dans les régions tropicales, subtropicales et tempérées chaudes comme en Afrique du Sud ou le pourtour méditerranéen. Les régions tropicales abritent essentiellement des espèces ligneuses, tandis que les régions tempérées sont riches en espèces herbacées[3].

#### I.1.2.Le genre *Astragalus*

Le mot *astragale* est d'origine grecque ; il signifie l'un des os de l'articulation ti-bio-tarsienne. Cette dénomination vient de la ressemblance du bruit des grains séchés de la plante avec celui de l'os, quand ils tombent sur une surface solide[4].

Le genre *Astragalus* est le genre le plus important chez les plantes à fleurs[5]et donc également le plus important de la famille des Fabaceae (les légumineuses) [6]. Il comporte environ 3270 espèces. Il est caractérisé par son fort taux de diversification morphologique et sa large répartition géographique[7].

## Chapitre I : Aspects botaniques et études antérieures

---

Certaines espèces de ce genre peuvent présenter des indices de spéciation et d'endémisme[8]. L'origine probable du genre *Astragalus* est l'Eurasie et plus précisément les régions situées entre les montagnes du sud-ouest asiatique et le plateau de l'Himalaya[9].

### I.1.2.1. Description botanique

Le genre *Astragalus*, a été décrit pour la première fois par LINNE en 1753, est classé dans la sous famille des *papilionacées*, appartient à l'embranchement des spermaphytes ; sous embranchement des angiospermes, classe des dicotylédones, sous classe des dialypétales ; tribu des galégas. C'est l'un des plus importants genres de la famille des fabaceae.

Selon Quezel le genre *Astragalus* est défini : Calice tubuleux en cloche, à dents subégales ou très inégales. Pétales généralement longuement onguiculés, étendards dressés, carêmes égalant environ les ailes, étamines didelphes à gaine fendue au sommet ovaire pluri ovule sur 2 rangs gousse de forme variée rarement uniloculaire généralement à 2 loges plus ou moins complètes par introflexion de l'une des structures déhiscente ou indéhiscente. Feuilles imparipennées en générale stipulées [10].

### I.1.2.2. Répartition et écologie

Le genre *Astragalus* est réparti partout dans le monde mais majoritairement dans l'hémisphère Nord du globe terrestre[11]. On trouve une prédominance d'espèces en Asie du sud (1500 espèces), Europe (500 espèces), Amérique du Nord (500 espèces) et Amérique latine. On dénombre ainsi 150 espèces tout le long de la cordillère des Andes [7]. Dans les pays du bassin Méditerranéen, 500 espèces ont été décrites dont une centaine sont localisées en Afrique du Nord, et une quinzaine plus spécifiquement au Sahara[12]. Les noms communs incluent le milkvetch (la plupart des espèces), locoweed (en Amérique du Nord, quelques espèces) et l'épine de chèvre (*A. gummifère*, *A. tragacanthus*), (Figure 1).



**Figure I.1 : Répartition géographique des espèces appartenant au genre *Astragalus*.**

### I.1.2.3. L'espèce *Astragalus gombo*

#### I.1.2.3.1. Description Botanique

L'espèce *Astragalus gombo* est une plante vigoureuse et basse à port chamaephytique dont les bourgeons se situent près du sol, de 10 à 50 cm de haut, aux tiges dressées, tomenteuses (cotonneuses) recouvertes de poils épais blancs. Elles sont de couleur claire, pourvues de très longues feuilles aux nombreuses petites folioles. Les pétioles, deviennent coriaces et piquants à l'extrémité en perdant leurs folioles [12]. Les fleurs papilionacées de 25 mm sont jaunes, regroupées en grappes compactes axillaires, sessiles (dépourvues de pédoncules) ou presque, insérées à l'aisselle des feuilles terminales. Comme pour toutes les espèces d'Astragale, la caractérisation du fruit est déterminante. La gousse est divisée complètement en deux loges par une cloison longitudinale, à paroi épaisse, ligneuse, renflée, très dure, et couverte d'un duvet soyeux dépassant 1 cm de diamètre[10, 12]. Elle a une forme saillante ornée de nervures superficielles, terminée en bec robuste.

*Astragalus gombo* est une espèce endémique saharienne[12]. Elle pousse sur les plateaux calcaires ou gréseux où s'écoulent les oueds, dans les lits sablonneux, ou les éboulis de falaises. Elle forme parfois d'importants pâturages après la pluie et résiste longtemps dans certains oueds[13]. Elle est bien appréciée par les animaux, notamment, le dromadaire[14].



**Figure I.2 : *Astragalus gombo***

### I.1.2.3.2. Position systématique

Règne	Plantes
Embranchement	Spermatophytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Fabale
Famille	Fabaceae
Sous famille	Papilionacée
Genre	<i>Astragalus</i>
Espèce	<i>Astragalus gombo</i>

### I.1.2.4. Propriétés biologiques et pharmacologiques du genre *Astragalus*

#### I.1.2.4.1. 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[15], 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 anti-transpirantes, diurétiques et également toniques[16].

Certaines espèces d'astragale comme *Astragalus mongholicus* et *A. membranaceus* sont utilisées en médecine traditionnelle chinoise en raison de leurs propriétés anticancéreuses [16-18].

*Astragali Radix*, mixture préparée à partir des racines sèches *Astragalus membranaceus*, *A. mongholicus* et d'autres espèces d'astragale[19], 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[20]. L'espèce *Astragalus scorpioides* est employée en application locale contre les piqûres de scorpions[21].

#### I.1.2.4.2 Activités biologiques

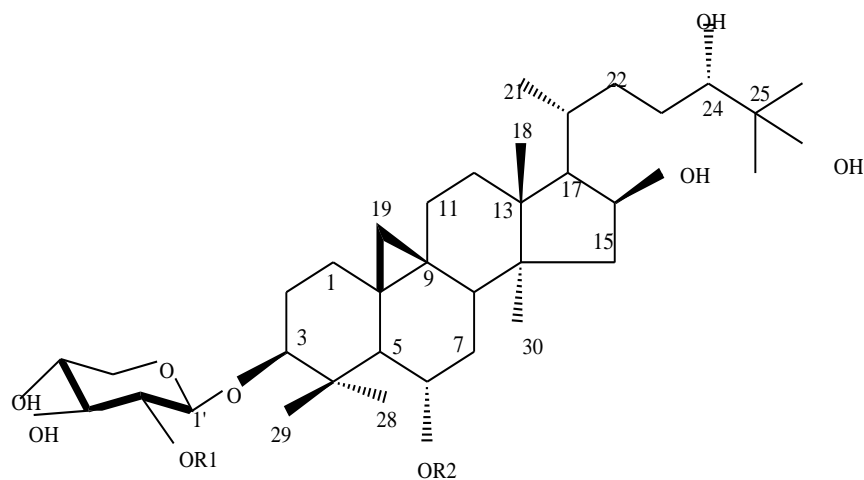
Les plantes du genre *Astragalus* sont connues pour leur richesse en *saponosides* à squelette cycloartane, possédant diverses et intéressantes activités biologiques, notamment antitumorales, anti HIV et antivirales[21]. Par ailleurs, des études biologiques ont confirmé que les triterpènes glycosylés 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 [23, 24]. Certaines ont montré des activités immunostimulante, cardiovasculaire et antivirale[25, 26]. Ainsi, l'extrait brut d'*A. Kahiricus* montre une cytotoxicité reproductible contre le cancer ovarien de la ligne cellulaire A 2780[27].

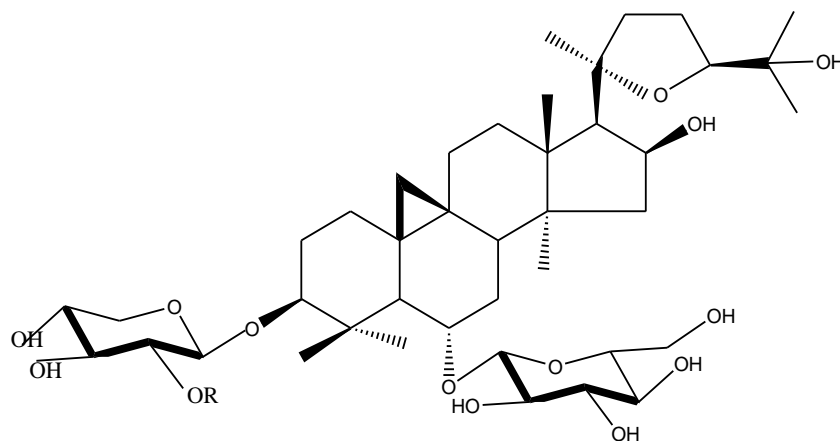
## I.2. Etudes phytochimiques antérieures sur le genre *Astragalus*

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.

Une étude chimique réalisée sur l'extrait méthanolique des parties inférieures des tiges de *A. oleifolius*, a permis d'isoler cinq saponosides triterpéniques à squelette cycloartane (1), (2), (3), (4) et (5). Les deux premiers composés sont nouveaux[28].



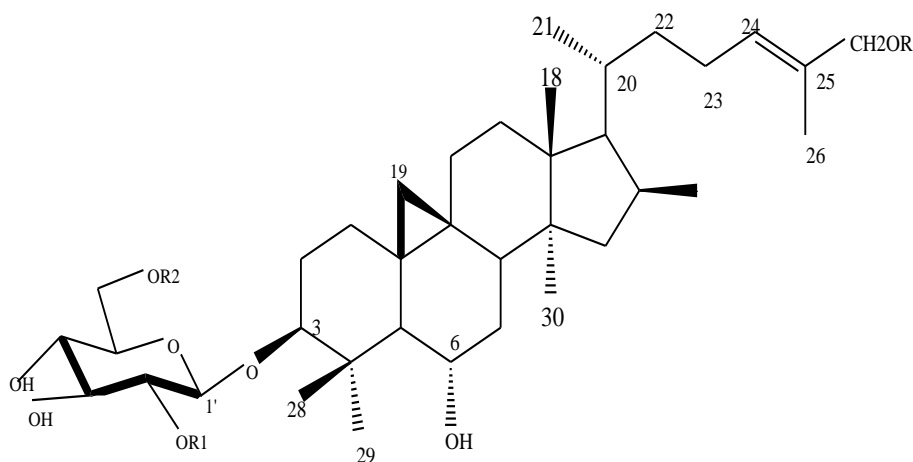
	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
<b>(1)</b>	$\alpha$ -arabinose	$\beta$ -xylose
<b>(2)</b>	$\alpha$ -arabinose	$\beta$ -glucose
<b>(3)</b>	H	$\beta$ -glucose



## Chapitre I : Aspects botaniques et études antérieures

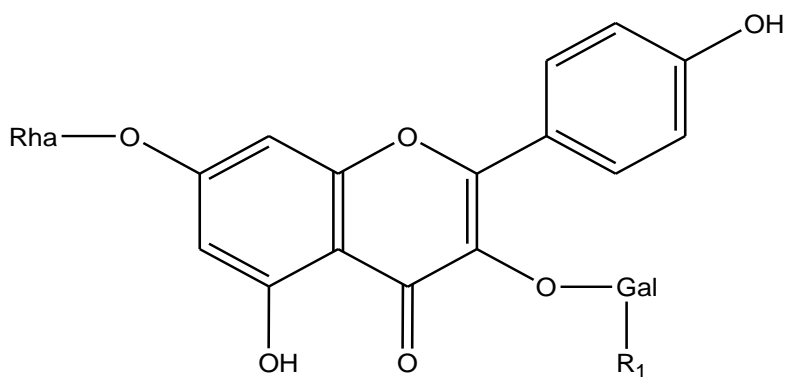
	<b>R</b>
<b>(4)</b>	Ac
<b>(5)</b>	H

L'étude phytochimique effectuée sur l'extrait dichlorométhane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) des parties aériennes de *A. kahiricus*, a permis d'isoler quatre nouvelles saponines nommées *Kahiricoside II (6)*, *Kahiricoside III (7)*, *Kahiricoside IV (8)* et *Kahiricoside V (9)* [27].



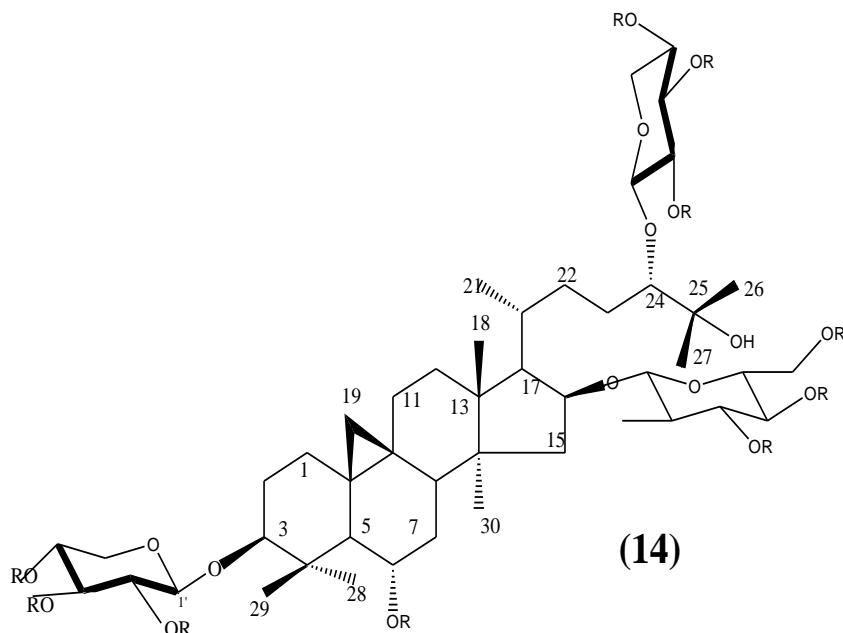
	<b>R</b>	<b>R<sup>1</sup></b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>(6)</b>	H	H	H
<b>(7)</b>	H	Ac	H
<b>(8)</b>	H	H	Ac
<b>(9)</b>	glc	Ac	H

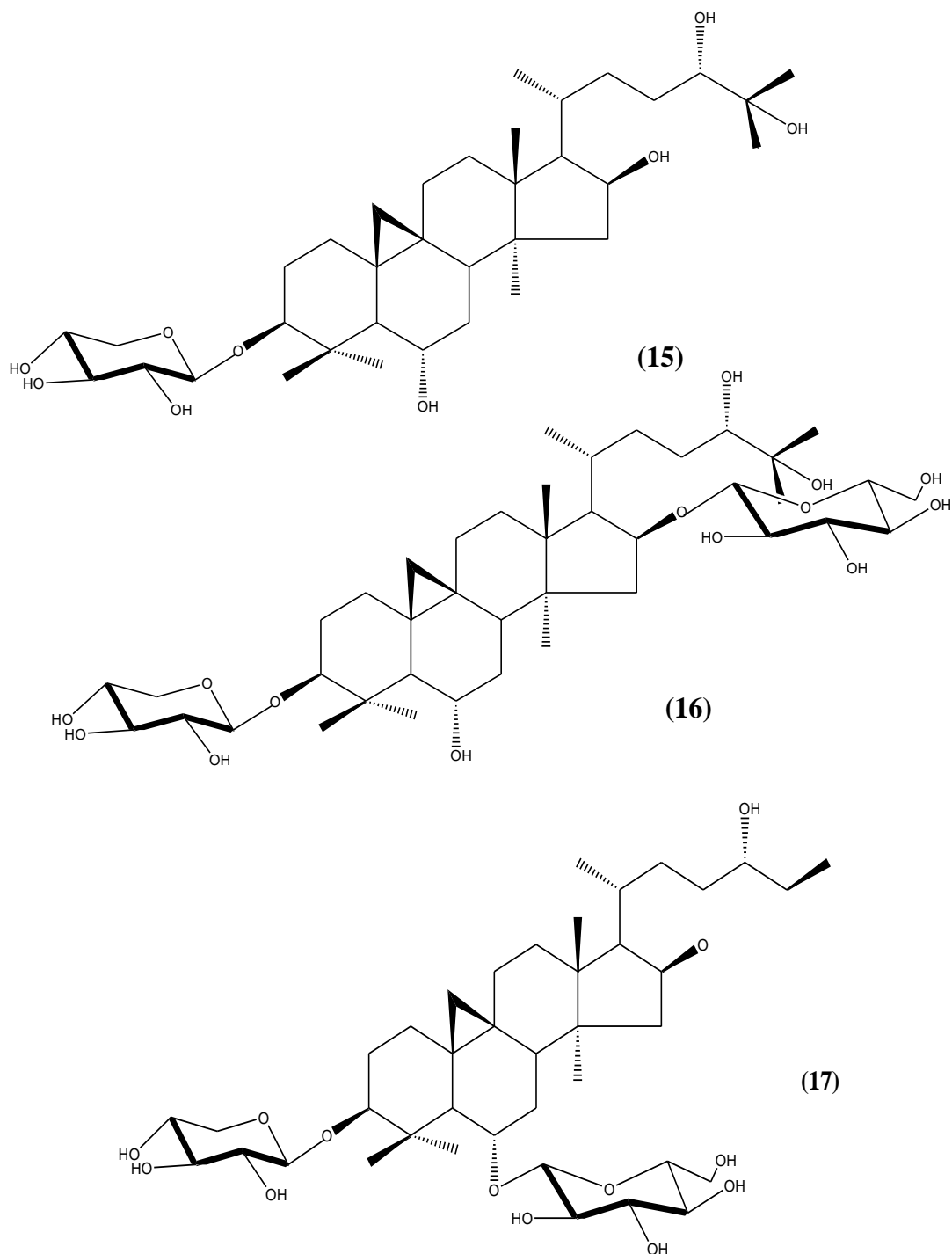
L'investigation chimique de l'extrait méthanolique des parties aériennes séchées et pulvérisées de *Astragalus shikokianus*, a permis l'identification de trois flavonoïdes glycosilés : astrasikokioside-1 (**10**) nouveau et deux autres connus (**11**) et (**12**) [29].



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>(11)</b>	Rha	Rha
<b>(12)</b>	Rha	H
<b>(13)</b>	H	Rha

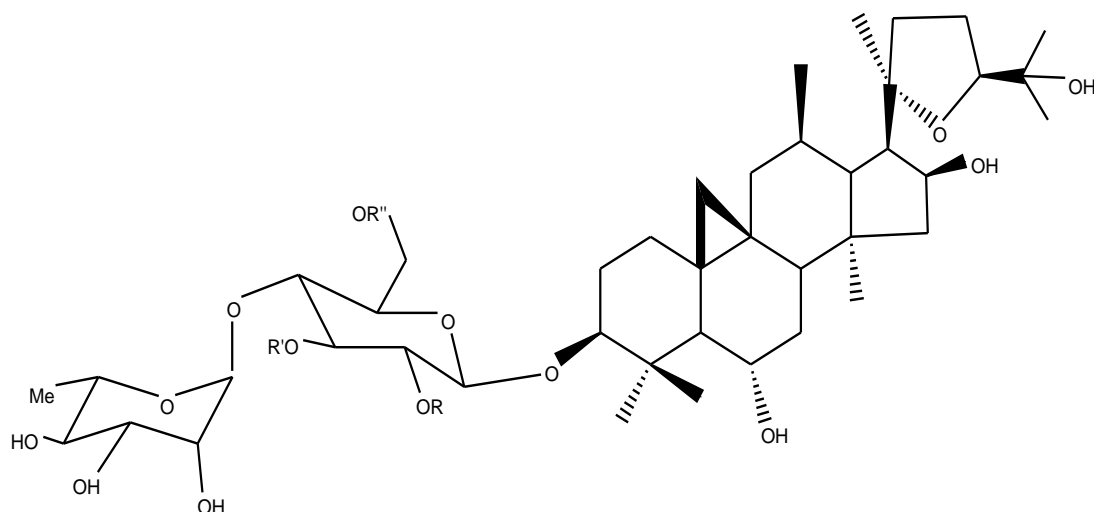
Quatre autres saponines cycloartaniques ont été mises en évidence suite à l'étude chimique de l'extrait éthanolique à 80% des racines d'*Astragalus cephalotes*. Il s'agit de : cephalotoside A (**14**) nouveau et trois autres (**15**), (**16**) et (**17**) connues.





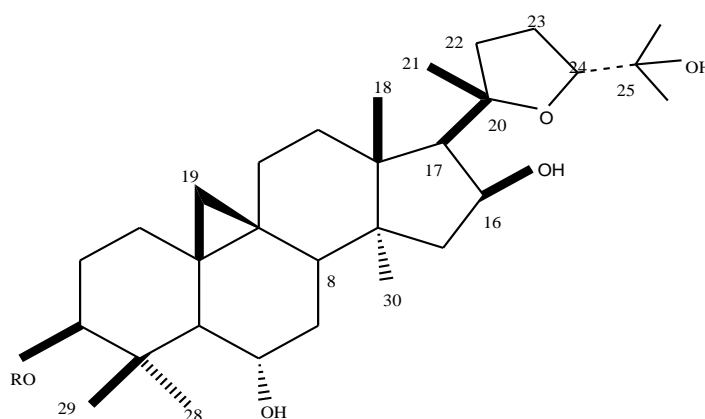
Une autre étude phytochimique a été réalisée sur l'extrait méthanolique des parties aériennes d'*A.verrucosus*. Elle a permis d'isoler et de caractériser par les méthodes spectrales, principalement la RMN mono et bidimensionnelle ainsi que la spectrométrie de masse, trois nouveaux saponosides cycloartaniques nommés: *astraverrucine IV*(18), *astraverrucine V*(19) et *astraverrucine VI*(20) [30].

# Chapitre I : Aspects botaniques et études antérieures



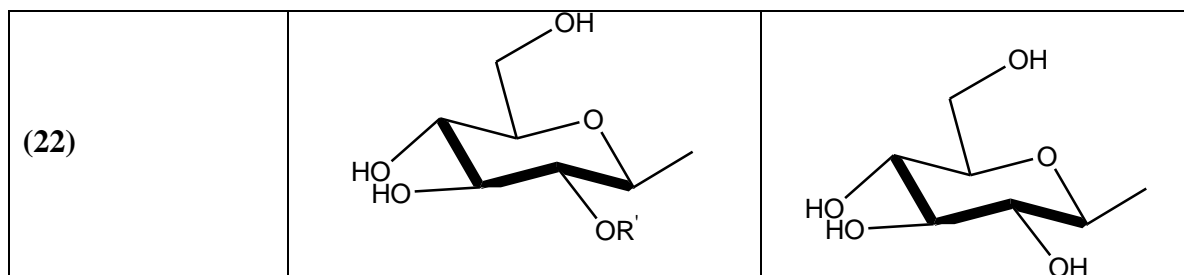
	<b>R</b>	<b>R'</b>	<b>R''</b>
<b>(18)</b>	H	H	H
<b>(19)</b>	H	Ac	H
<b>(20)</b>	H	H	Ac

Une étude phytochimique effectuée sur l'extrait éthanolique des parties aériennes de *A. sieberi*, a permis d'isoler deux nouvelles saponines cycloartaniques nommées : *sieberoside I (21)* et *sieberoside II (22)*[31].

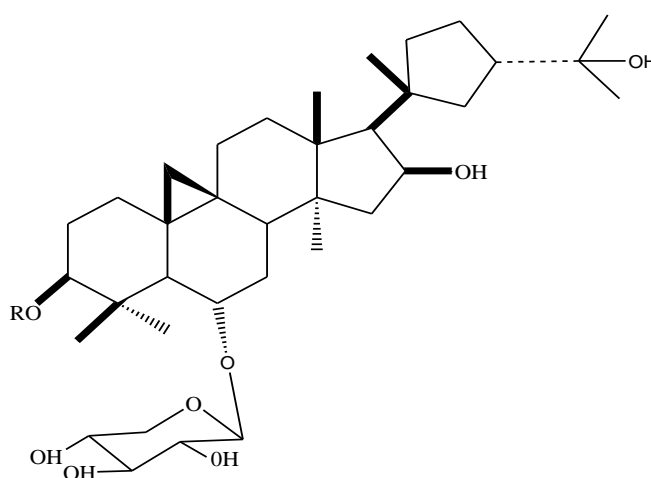


	<b>R</b>	<b>R'</b>
<b>(21)</b>		H

## Chapitre I : Aspects botaniques et études antérieures



L'investigation chimique de l'extrait éthanolique des racines d'*A. trigonus*, a permis d'isoler et d'identifier trois nouveaux saponosides ayant pour noms : *trigonoside I* (**23**), *trigonoside II* (**24**) et *trigonoside III* (**25**) [22].

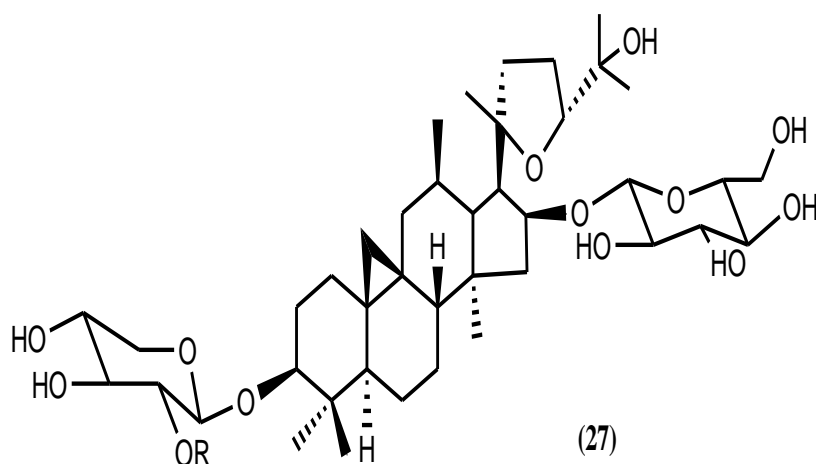
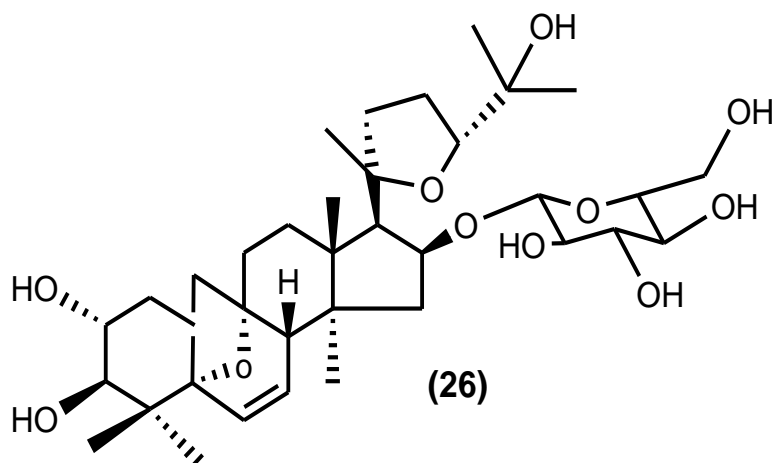


	<b>R</b>	<b>R'</b>
<b>(23)</b>	<b>H</b>	/
<b>(24)</b>		<b>H</b>
<b>(25)</b>		<b>COMe</b>

## Chapitre I : Aspects botaniques et études antérieures

Une autre étude portant sur l'extrait méthanolique des racines d'*A. Prusianus*, a révélé la présence de deux saponosides nouveaux également à squelette cycloartane. Il s'agit de :

16-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-20(S), 24(R)-5 $\alpha$ , 9-diepoxy-2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,25-tetrahydroxy-9, 10-seco-cycloartane-1(**10**), 6(7)-diene (**26**) et 3-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl-16-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-20(S),24(R)-epoxy-3 $\beta$ , 16 $\beta$ , 25-tetrahydroxy-cycloartane (**27**).



### I.2.1. Généralités sur les Saponines

#### I.2.1.1. Définition

Le terme saponine tire son origine du nom latin *sapo* signifiant savon en raison des propriétés tensio-actives des saponines, à produire après agitation des solutions moussantes en présence d'eau [32, 33].

Le saponines ou saponosides sont un groupe de métabolites secondaires hétérosidiques largement distribués dans le règne végétal (*salsepareille*, *saponaire*, *quinoa*,...etc.), de masses

## Chapitre I : Aspects botaniques et études antérieures

moléculaires élevées variant entre 600 à 2000 Daltons et de structures moléculaires complexes[34]. Les saponines sont fréquemment caractérisées par un goût amer, sauf certaines dites "douces" comme la réglisse (acide glycyrrhizique) qui présente un goût particulièrement sucré, est rapportée dans plus d'une centaine de familles de plantes et dans quelques sources marines (poissons, étoiles, concombres de mer) [34].

Les saponosides sont des molécules se composant de deux parties, une partie lipophile nommée aglycone (sapogénine ou génine) et une partie hydrophile constituée des glucides (oses) [35].

### I.2.1.2. Classification structurale

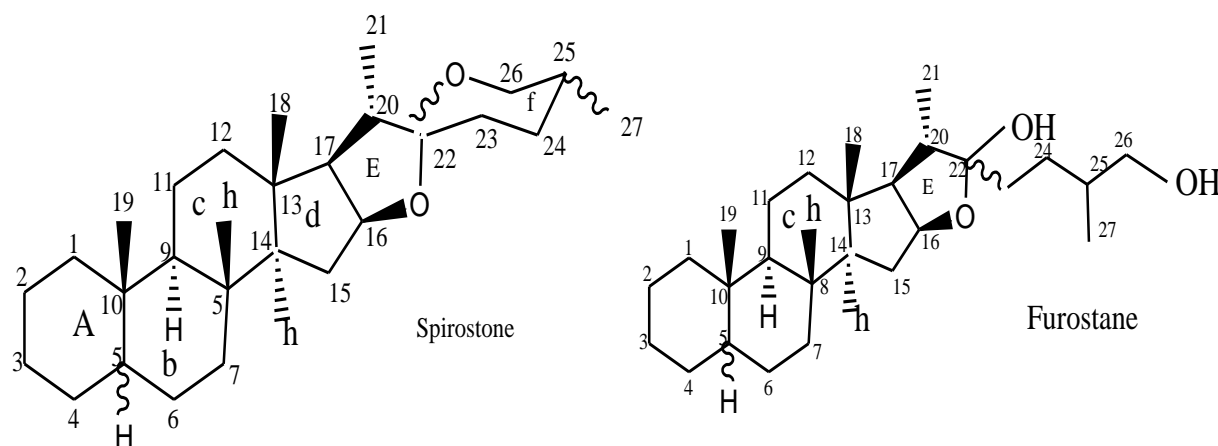
Selon la nature de leur génine, les saponines existent sous deux catégories [32, 35] :

- Saponines aux génines stéroïdiques.
- Saponines aux génines triterpéniques.

Quelques auteurs distinguent une troisième catégorie de saponines aux génines amines stéroïdiques, qui est classée par certains auteurs comme des alcaloïdes stéroïdiques[34].

#### a. Saponosides stéroïdiques

Les angiospermes monocotylédones Liliaceae (Asperge, petit houx), Dioscoraceae (Discoreae) et Agavaceae sont assez fournies en saponosides stéroïdiques. La génine de ces derniers (on dénombre plus d'une centaine) est constituée d'un squelette à 27 atomes de carbone [36]. Deux principaux types de squelette existent[35]: pentacyclique (furostane) et hexacyclique (spirostane).

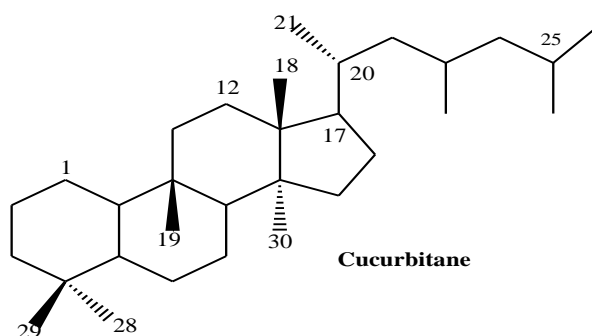
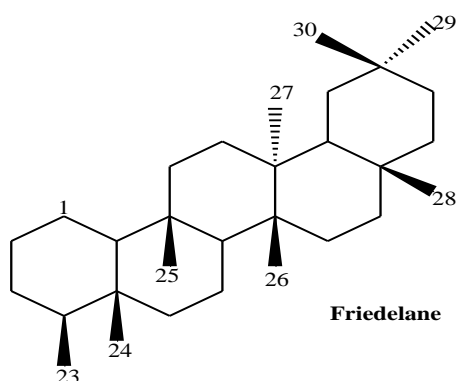
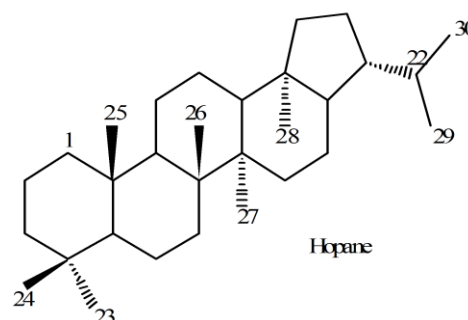
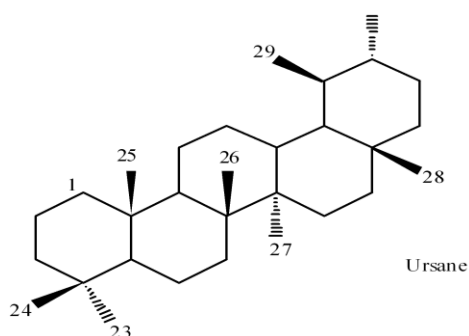
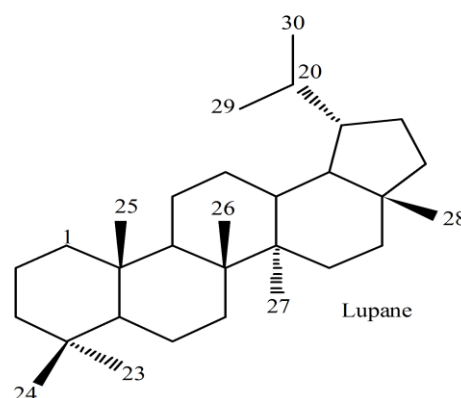
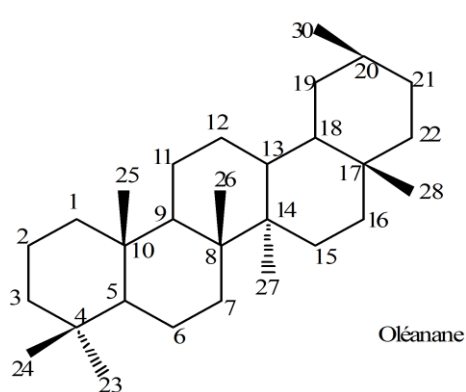


## Chapitre I : Aspects botaniques et études antérieures

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 ( $\alpha$  ou  $\beta$ ). D'autres fonctions hydroxyles peuvent être présentes en positions C-1, C-2, C-6, C-14 et C-17 [35].

### b. Saponosides triterpéniques

Les saponosides triterpéniques sont rencontrés principalement chez les angiospermes dicotylédones (Araliaceae, Caryophyllaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Fabaceae...)[34]. Leur génine à 30 atomes de carbone peut être tétracyclique (dammarane, lanostane) ou pentacyclique (oléanane, ursane, lupane, friedelane, hopane) [35].



### I.2.1.3. La biosynthèse

La grande diversité structurale des saponines peut être expliquée par leurs origines biosynthétiques variées. En effet, à partir de l'oxydosqualène à 30 atomes de carbone, la biosynthèse des génines triterpéniques et stéroïdiques est effectuée selon diverses voies métaboliques suivie de l'assemblage des différentes sections osidiques par des enzymes telles que les glycosyltransférases et les glycosidases. Par la suite, des modifications subséquentes peuvent avoir lieu sur la saponine dont, entre autres, des oxydations, réarrangements, méthylations et estérifications, ce qui augmentent d'autant plus la possibilité de variations structurales à l'intérieur de cette classe de produits naturels de grands intérêts sur les plans chimique et pharmacologique [37].

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 oxydosqualènecyclase pour donner les cations dammarenyle ou prostosteryle [38].

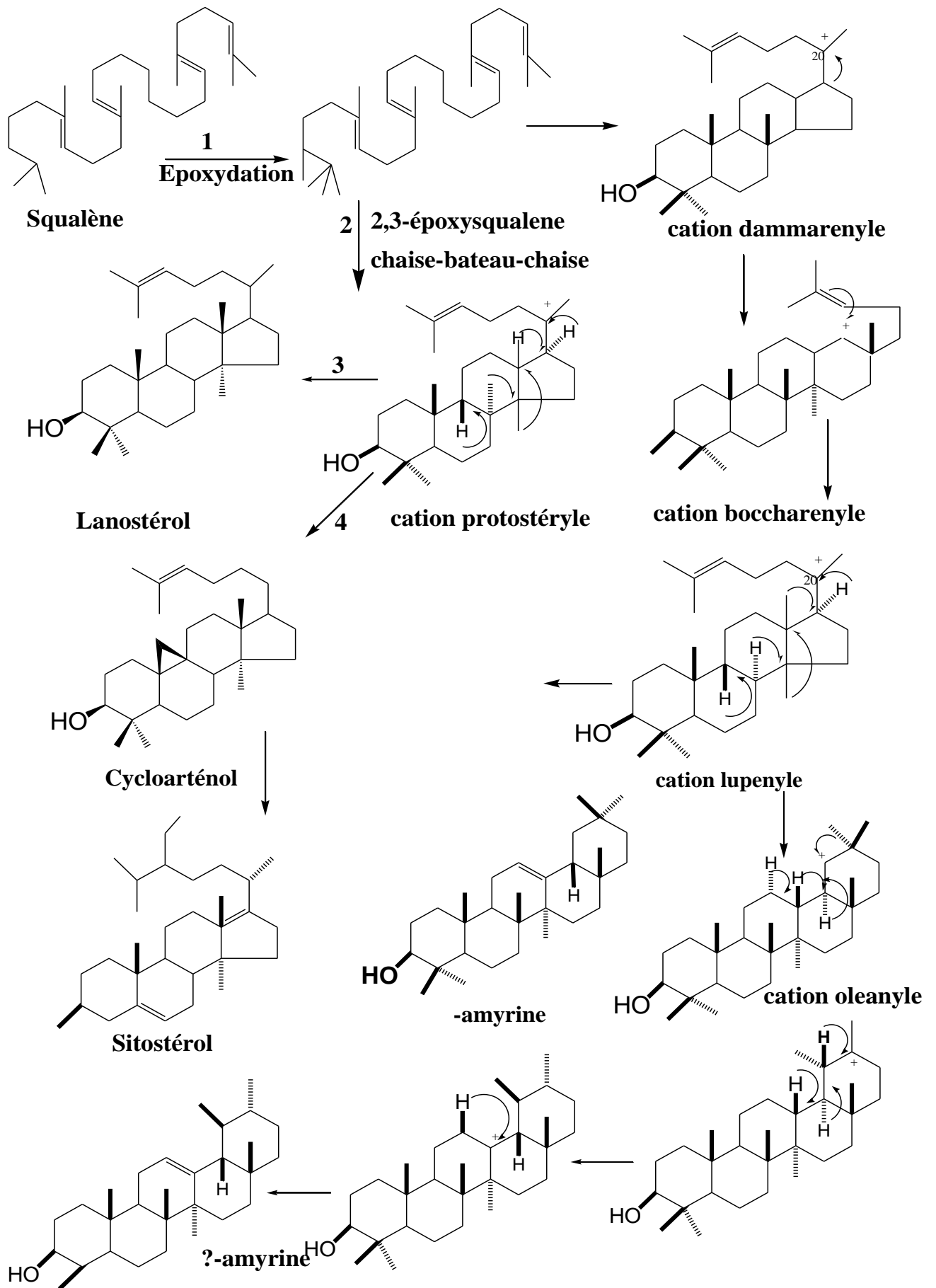


Figure I.3: Schéma de biosynthèse des triterpénoïdes

### I.2.1.4. Distribution des saponines

Les saponines constituent une importante classe de métabolites secondaires d'origine végétale et animale [34]. Elles sont distribuées dans une large variété de produits alimentaires et dans plusieurs familles de plantes incluant l'asperge, les haricots, les mûres sauvages, les pois, les pommes de terre, la betterave sucrière et le thé. La complexité structurale des saponines induit un certain nombre de propriétés physiques, chimiques et biologiques diversifiées.

### I.2.1.5. Propriétés physiques des saponines

1. Toutes les saponines sont solubles à chaud dans l'alcool dilué (méthanol) d'où elles cristallisent parfois par refroidissement, plusieurs de ces substances sont aussi solubles dans le méthanol, dans l'éthanol absolu ou même dans l'eau, et insolubles dans l'éther diéthylique et l'éther de pétrole.
2. Agitées dans leur solution aqueuse, elles fournissent une mousse persistante et abondante.
3. Elles donnent des solutions aqueuses à allure colloïdale qui dialysent très mal et ont un fort pouvoir émulsionnant.
4. Elles donnent des produits d'addition avec le cholestérol, le tanin, les lécithines, de même qu'avec certains alcools ou phénols (alcools butylique et amylique, géraniol, linalool, phénol, carvomenthol, etc.).
5. Les saponines modifient considérablement la tension superficielle du solvant dans lequel elles se trouvent. En solution aqueuse, elles sont un poison violent pour les poissons et les animaux à appareil respiratoire de type branchies. Les saponosides du *Sapindus saponaria* tuent un poisson en 11 minutes à une concentration de 0,1 %.
6. Ces substances présentent soit une réaction acide soit une réaction neutre. Elles sont précipitées de leur solution aqueuse par de nombreux sels tels que:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , acétate de plomb, hydroxyde de baryum,... etc. [36].

### I.2.1.6. Propriétés biologiques des saponosides

Les saponines à génines stéroïdiques et triterpéniques ont été intensivement étudiées au cours des dernières années sur les plans chimiques et pharmacologiques. Elles sont considérées par certains chercheurs comme étant responsables de la plupart des activités biologiques des plantes de la médecine traditionnelle orientale [32, 39].

## Chapitre I : Aspects botaniques et études antérieures

---

La plupart des saponosides présentent des propriétés hémolytiques qui signifient leur capacité à s'attaquer aux érythrocytes présents dans le plasma sanguin[33]. Cette activité hémolytique est généralement expliquée par l'interaction des saponines avec les stérols de la membrane cellulaire des érythrocytes. Les dommages causés sont irréversibles : la perméabilité de la membrane est modifiée, ce qui entraîne une perte de l'hémoglobine sanguin. Cette propriété a amené la mise en place de tests hémolytiques permettant la détection des saponines dans les drogues ou extraits de plantes [32]. Le niveau d'activité hémolytique a été attribué au type d'aglycone et la présence de chaînes de sucre[37]. La comparaison des activités des saponosides bidesmosides et monodesmosides a prouvé que ces derniers sont généralement plus hémolytiques.

Toutefois, la forte activité hémolytique de la plupart des saponines a retardé considérablement leur développement clinique en raison de leur toxicité potentielle lors de traitements donnés sous la forme d'injections intraveineuses [39].

De nombreuses saponines ont montré une activité cytotoxique *in vitro* envers une grande variété de lignées cellulaires cancéreuses [39]. 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 [32].

Les saponosides sont toxiques à l'égard des animaux à sang froid, notamment les poissons et mollusques. Certaines plantes à saponosides sont ainsi utilisées traditionnellement comme poison de pêche [33].

Certains saponosides à squelette cycloartane comme oleifolioside A, oleifolioside B, cyclocanthoside E et astragaloside II, isolés tous de l'espèce *Astragalus oleifolius* manifestent une activité biologique contre la leishmaniose.

La principale source commerciale en saponosides est obtenue à partir du Bois de Panama (*Quillaja saponaria*) originaire du Chili, riche en saponosides triterpéniques. Ceux-ci sont employés dans de nombreux produits commerciaux. Ils sont utilisés dans des vaccins à usage vétérinaire et humain sous forme de complexes immunostimulants (ISCOMs) constitués d'une association de saponosides, cholestérol, phospholipides et antigène. La firme internationale BASF-Chili vient de mettre au point un produit constitué de saponosides pour contrôler le développement des nématodes parasitant les cultures agricoles. Ils sont également

## Chapitre I : Aspects botaniques et études antérieures

---

utilisés pour leurs propriétés surfactantes afin de diminuer la tension de surface d' électrolytes utilisés pour extraire le cuivre (MISTOP) [35].

Les saponosides trouvent actuellement de nombreuses applications commerciales et industrielles, allant de leur utilisation en hémisynthèse des hormones stéroïdiques dans l' industrie pharmaceutique, à leur utilisation en industrie cosmétique ou comme additif alimentaire dans l' industrie agroalimentaire, mais aussi dans des émulsions photographiques, extincteurs chimiques[33]. Ces mêmes saponosides sont utilisés en industrie comme agent hémolytique pour effectuer des numérations leucocytaires et beaucoup d' autres applications dues généralement à leur tensioactivité non ionique [33], ces molécules entrent dans la formulation de nombreux produits tels que des shampooings (Saponaire, Sapindus, Bois de Panama), des détergents ou encore des sodas [35].

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

### II.1. Résultats et discussions

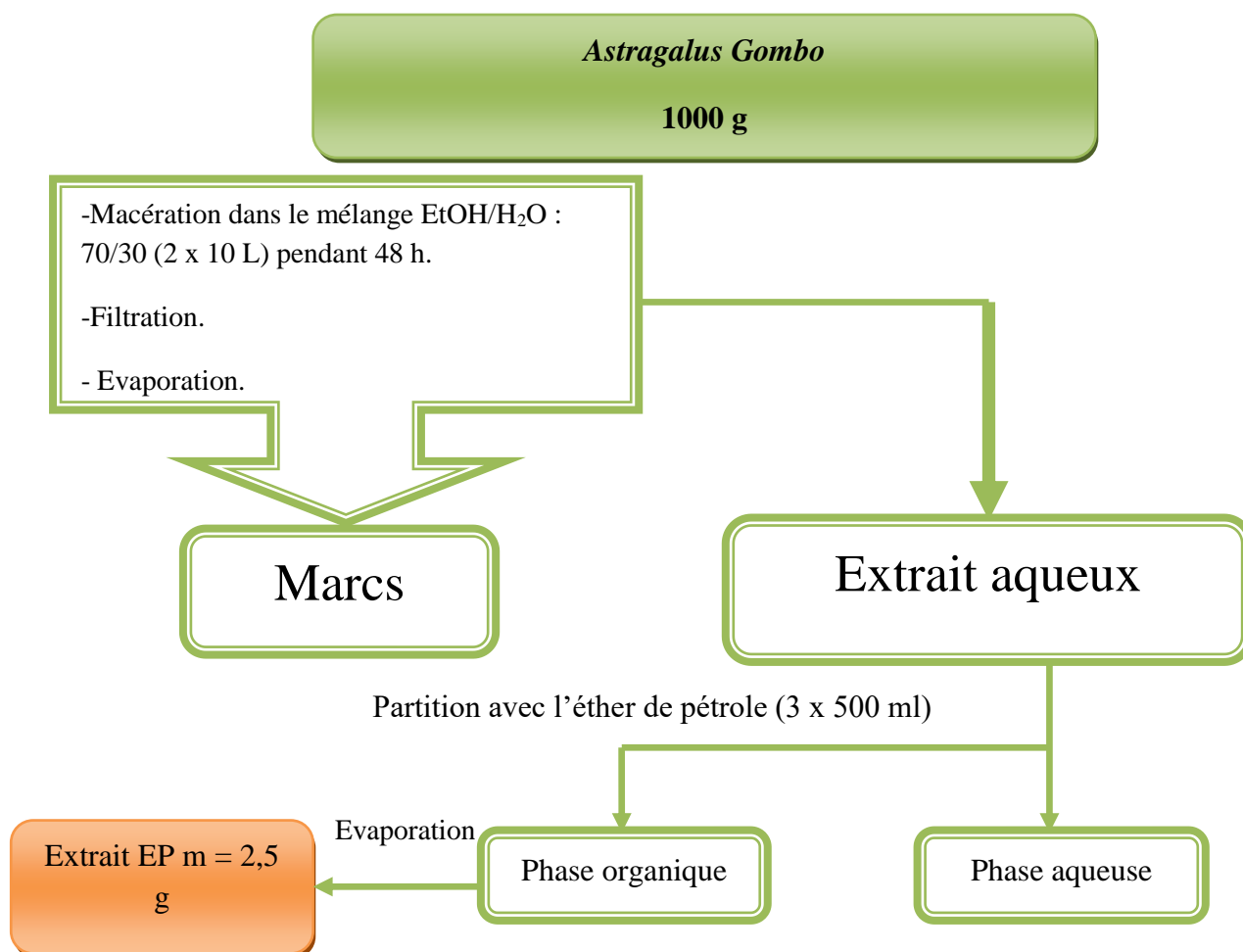
#### II.1.1 Extraction

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 en commençant par : éther de pétrole puis l'acétate d'éthyle et enfin le n-butanol.

Les extraits totaux obtenus après l'évaporation sont pesés pour donner :

- 3,5 g de l'extrait étheropétrolique (EP).
- 9,5 g de l'extrait acétate d'éthyle
- 25 g de l'extrait butanolique.

Le schéma ci-dessous récapitule les différentes étapes de l'extraction.



## Chapitre II : Etude phytochimique de l'espèce *Astragalus gombo*

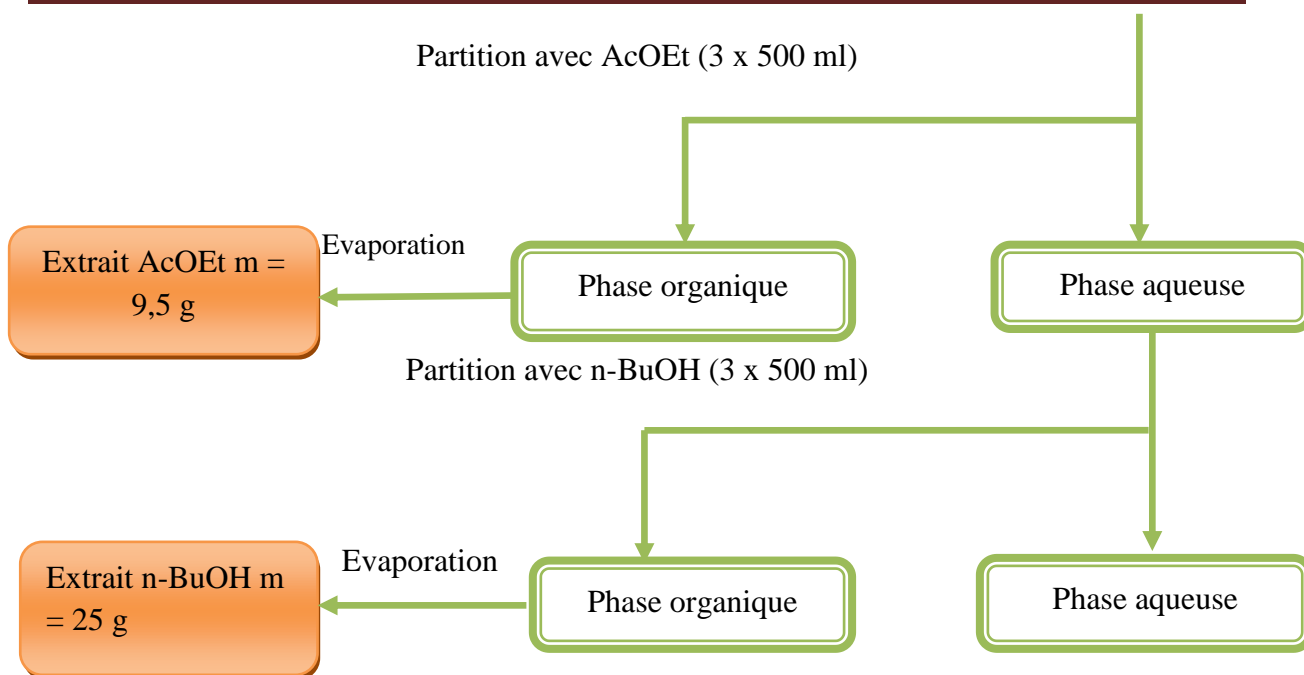


Figure II.1: Schéma d'extraction de la plante *Astragalus gombo*

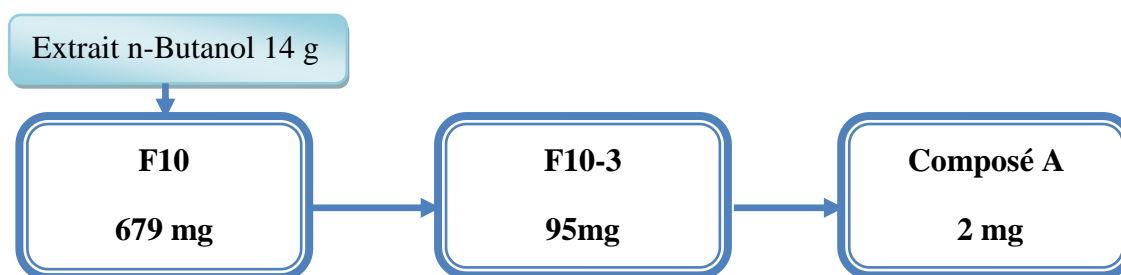
### II.1.2. Séparation et purification

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 (EP).

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'élution 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.

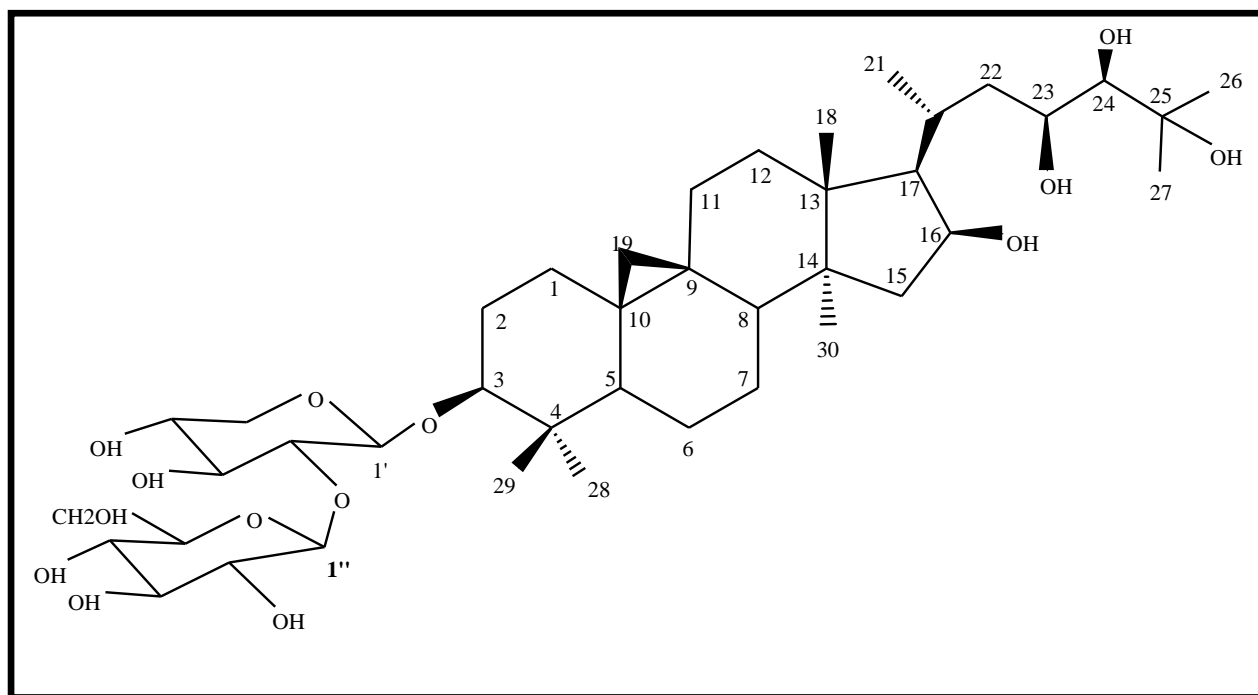
La fraction F-10 est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution menée dans un mélange  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH a donné 8 sous-fractions (F<sub>10-1</sub> à F<sub>10-8</sub>).

La purification de la sous-fraction F<sub>10-3</sub> (95 mg) par HPLC semi-préparative élue par un gradient de solvants ACN-H<sub>2</sub>O (25 :75, 56 :44, 100 :0) a permis d'obtenir le **composé A** à l'état pure (2mg).



### II.2. Elucidation structurale du composé A

Le produit isolé a été caractérisé 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.



**3-O-[B-D-Glucopyranosyl-(1→2)-B-D-Xylopyranosyl]-3 $\beta$ ,16 $\beta$ ,23(R),24(R),25-Pentahydroxycycloartane**

Le spectre de masse ESI du **composé A** enregistré en mode positif (Figure II.3), 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 II.4) qui montre un pic à  $m/z$  809,5589 (calc.  $C_{41}H_{70}O_{14}Na$ , 809,4658).

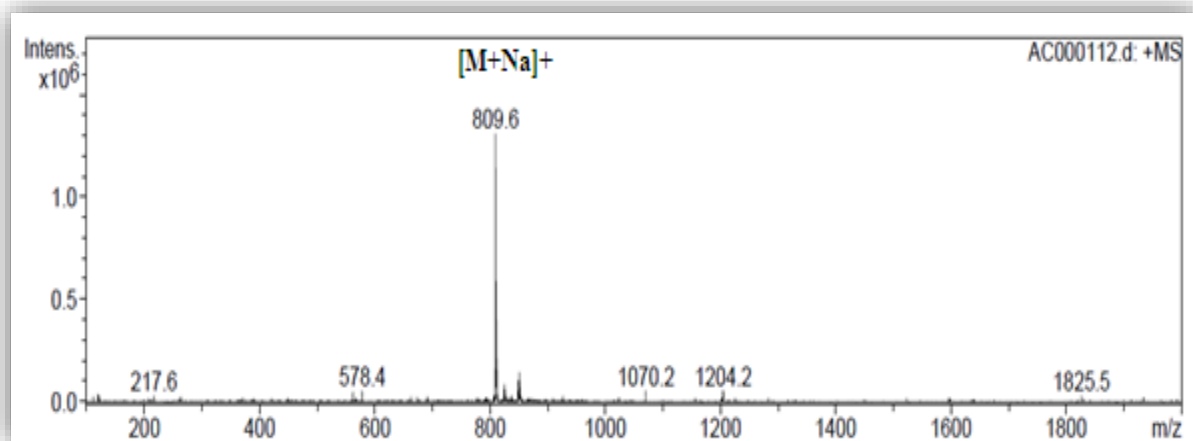


Figure II.3: Spectre de masse ESIMS du composé A

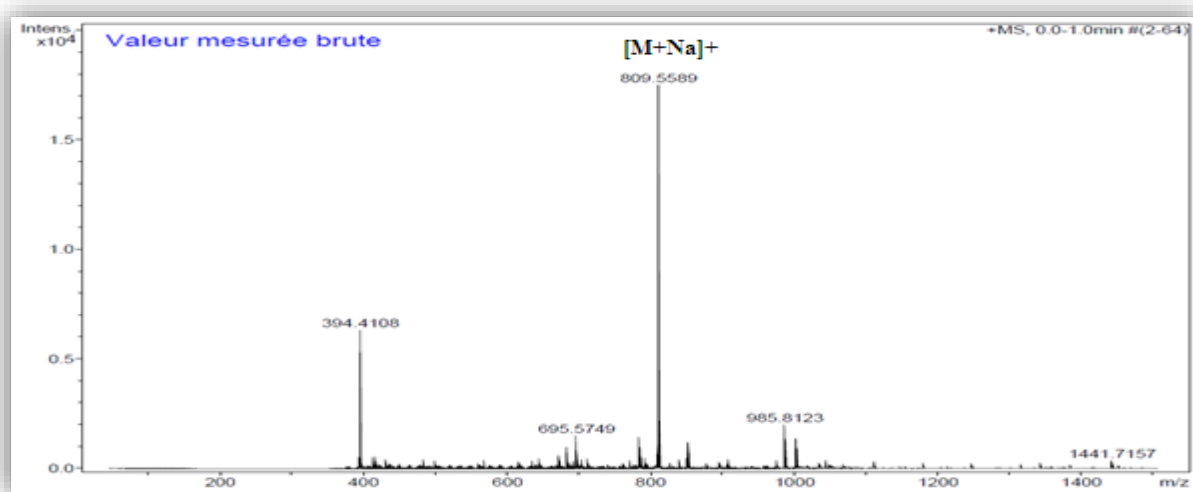


Figure II.4: Spectre de masse HRESIMS du composé A.

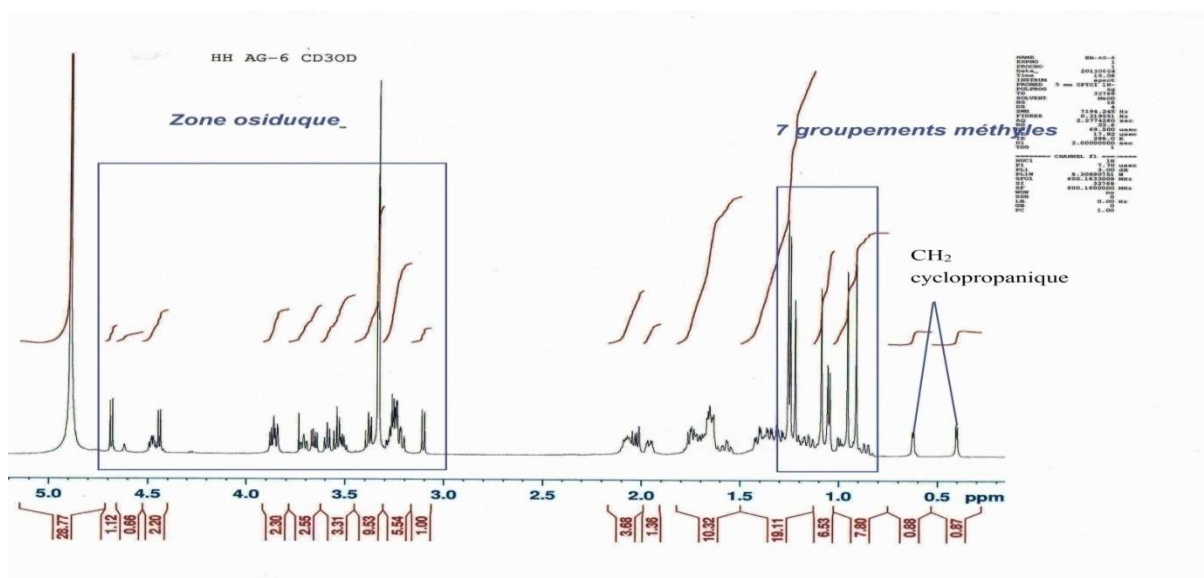
Le spectre RMN  $^1H$  (Figure II.5) de ce **composé A**, enregistré dans le méthanol deutéré, permet d'observer les signaux suivants :

- ❖ sept signaux à champ fort résonant à  $\delta_H$  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. <sup>TM</sup>
- ❖ deux signaux fortement blindés résonant sous forme de doublet à  $\delta_H$  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 [40-42]. <sup>TM</sup>
- ❖ un signal sous forme de doublet de doublet à  $\delta_H$  3,24 (1H, *dd*,  $J = 8,1; 4,2$  Hz) d'un proton porté par un carbone oxyméthine (H-3).

## Chapitre II : Etude phytochimique de l'espèce *Astragalus gombo*

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*[43-45].

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  $\delta_H$  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 A est une saponine cycloartanique.

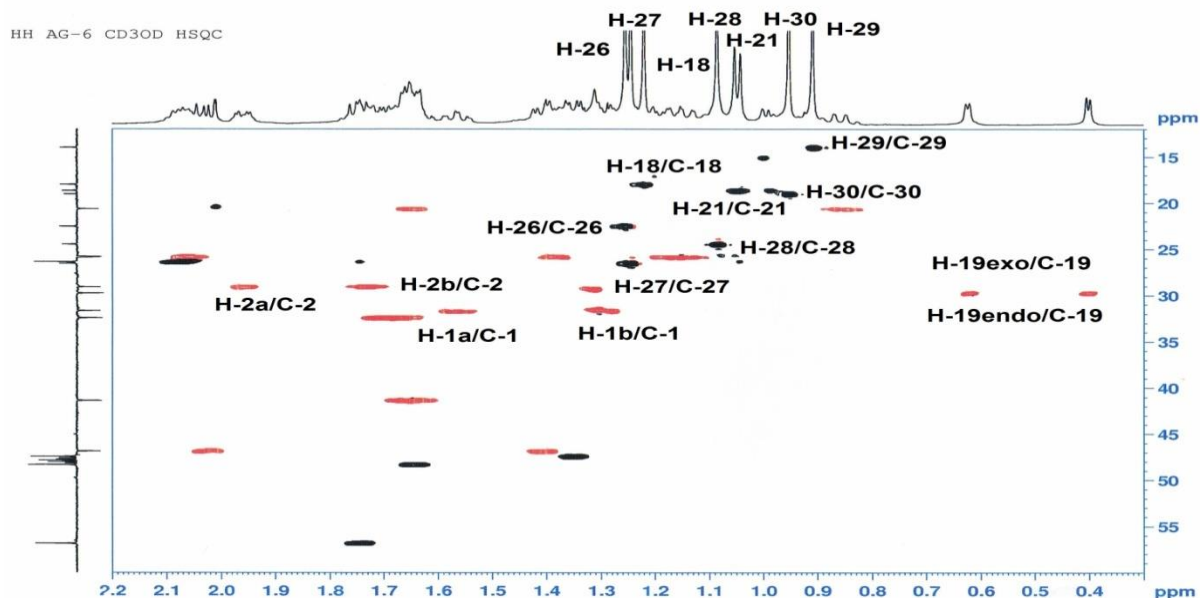


**Figure II.5: Spectre RMN  $^1H$  du composé A**

Les spectres RMN  $^{13}C$  et RMN  $^{13}C$  DEPT (Figures II.6 et II.7) 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  $\delta_C$  104,5(C-1') et 103,2(C-1'') ainsi des signaux allant de 61,6 à 79,6 ppm caractéristiques de carbones osidiques.

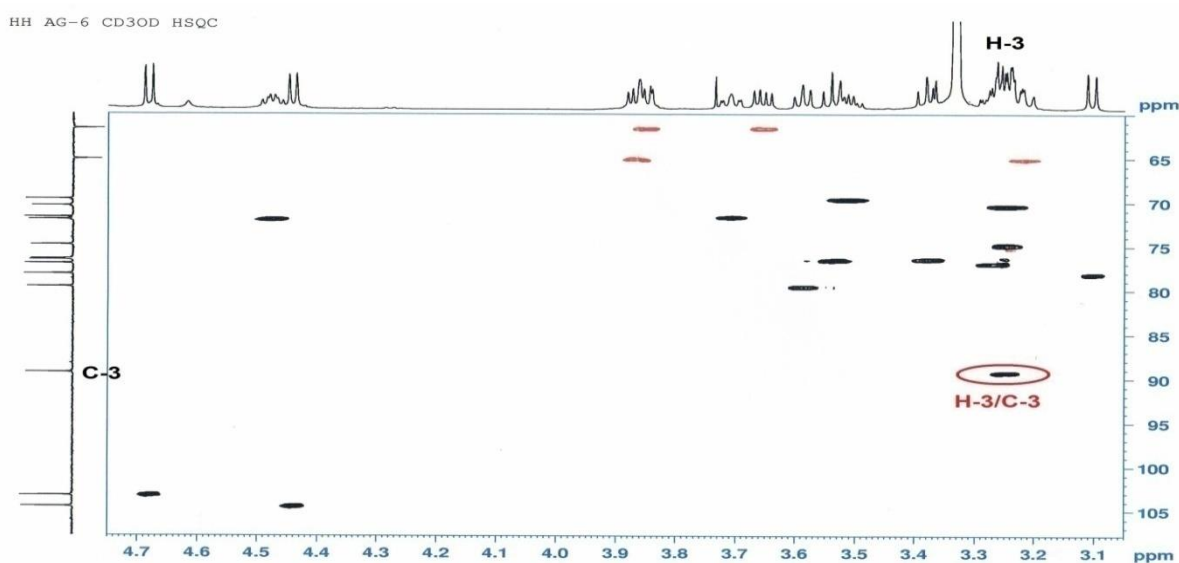
Par ailleurs, le signal carbone à 89,3 ppm observé sur les mêmes spectres, est attribuable au carbone oxyméthine C-3 du triterpène. Le déblindage important de ce dernier (+10 ppm) comparé à celui du même carbone porteur d'un OH libre (78,3 ppm) [31], traduit bien une substitution à ce niveau, sans nul doute par une unité osidique.





**Figure II.8: Spectre HSQC de la partie génine du composé A.**

La même expérience confirme l'attribution du signal du carbone C-3 (89,3 ppm) faite précédemment (Figure II.9).



**Figure II.9: Spectre HSQC de la partie génine du composé A.**

L'expérience HMBC (Figures II.10, II.11 et II.12) 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 :

## Chapitre II : Etude phytochimique de l'espèce *Astragalus gombo*

- les méthyles 28 et 29 géminés résonnant respectivement à 1,09 et 0,91 ppm sont les seuls à corrélérer avec le carbone C-3 préalablement identifié ( $\delta_C 89,3$ ). Ils corrèlent également avec le carbone quaternaire C-4 ( $\delta_C 40,8$ ) et le carbone C-5 ( $\delta_C 47,4$ ) (Figure II.10).

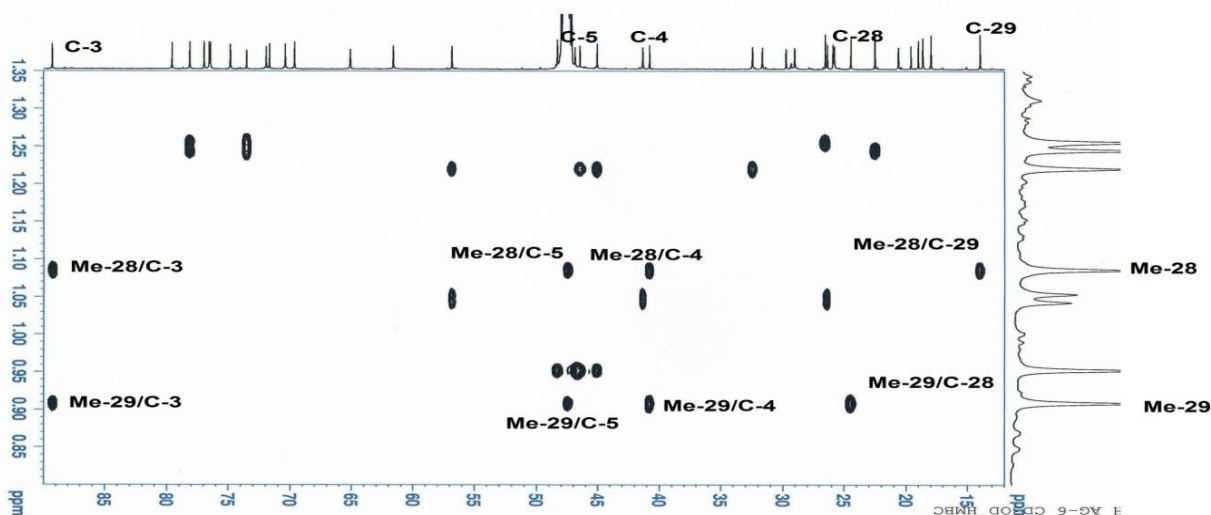


Figure II.10: Spectre HMBC de la partie génine du composé A.

- Le proton H-5 résonnant 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 II.11). 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.

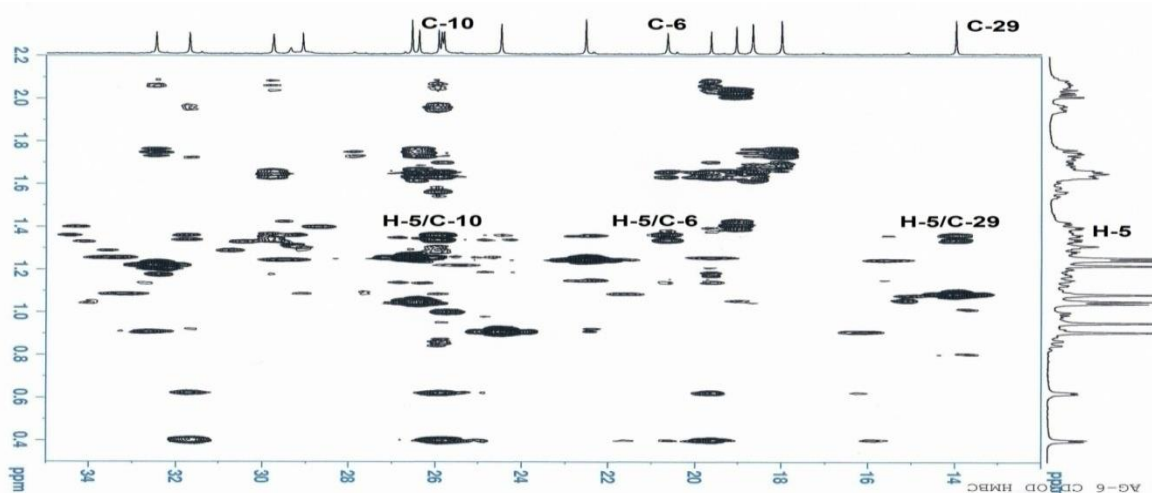
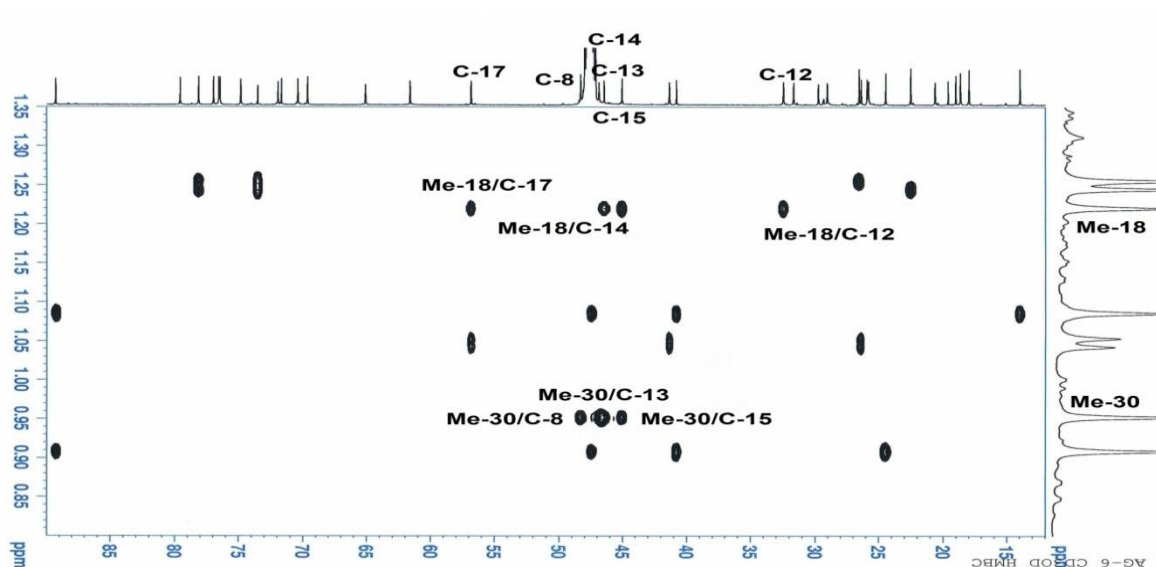


Figure II.11: Spectre HMBC de la partie génine du composé A.

## Chapitre II : Etude phytochimique de l'espèce *Astragalus gombo*

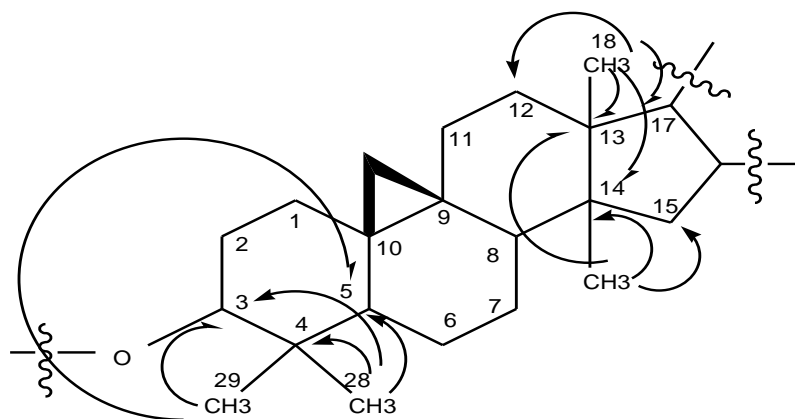
- Les protons méthyliques CH<sub>3</sub>-30 ( $\delta_H$  0,95, s) sont préalablement caractérisés sur la base de leur corrélation CH longue distance avec le carbone C-8 ( $\delta_C$  48,3), lui-même identifié du fait également de son couplage  $^3J_{C-H}$  avec les protons H-19 du système cyclopropanique ( $\delta_H$  0,40 ; 0,62). L'analyse HMBC montre les autres corrélations de ces protons méthyliques CH<sub>3</sub>-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 II.12).
- Les protons méthyliques CH<sub>3</sub>-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 C17 ( $\delta_C$  56,7) (Figure II.12).



**Figure II.12: Spectre HMBC de la partie génine du composé A.**

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 entrent :

- Les protons cyclopropaniques H<sub>2</sub>-19 et le carbone secondaire C-11 ( $\delta_C$  25,9).
- Le proton H-3 ( $\delta_H$  3,24) et le carbone C-1 ( $\delta_C$  31,7) d'autre part, complètent pour une grande partie la caractérisation des carbones constituant le squelette cycloartane.



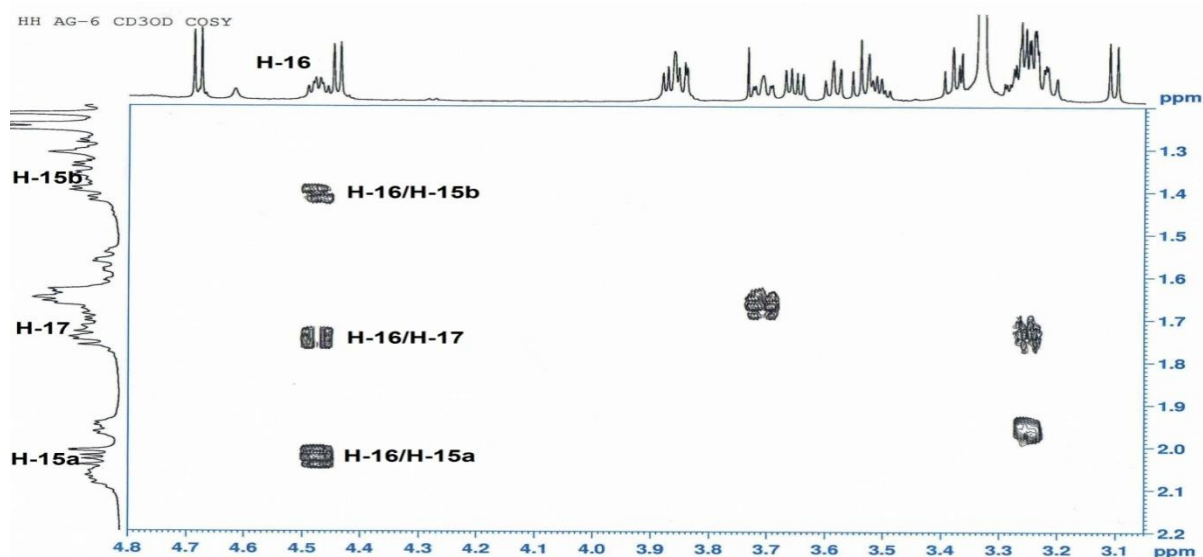
**Figure II.13: Corrélations HMBC des méthyles Me-18, Me-28, Me-29 et Me-30.**

Le spectre COSY H-H (Figure II.14) montre clairement une corrélation entre les protons H-15 ( $\delta_H$  2,03 ; 1,40) 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 ( $\delta_C$  72,0) caractérisé par expérience HSQC montre que ce dernier est porteur d'un groupement hydroxyle.

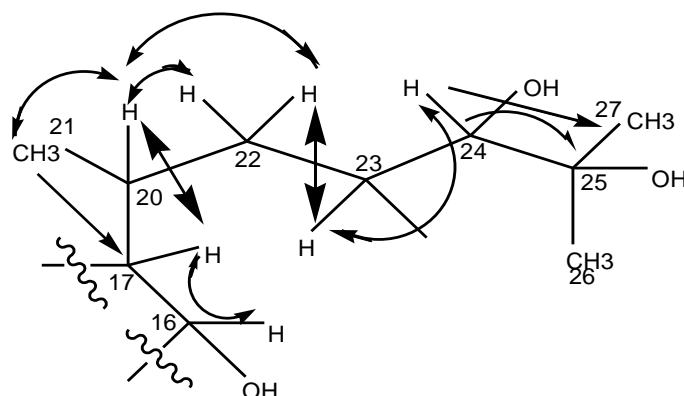
En outre, la même expérience met en évidence la présence d'un système de spins à travers les corrélations H-16/H-17.

- H-17 et un proton nommé H-20 (1H, *m*) repéré à 2,04 ppm, H-20 et les protons méthyliques CH<sub>3</sub>-21 (*d*,  $J = 6,5$  Hz), H-20.
- Deux protons H-22 à 1,66 ppm, H-22.
- Un proton oxyméthine sortant à 3,71 ppm nommé H-23 (*ddd*,  $J = 10,5 ; 8,2; 2,3$  Hz), H-23
- Un autre proton oxyméthine H-24 à 3,1 ppm (*d*,  $J = 8,2$  Hz).

Ce système (Figure II.15) 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 ( $\delta_H$  3,10), l'expérience HMBC qui montre des corrélations longue distance avec les carbones de deux groupements méthyles CH<sub>3</sub>-26 ( $\delta_C$  22,5) et CH<sub>3</sub>-27 ( $\delta_C$  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 II.14:** Spectre COSY H-H de la partie génine du composé A.



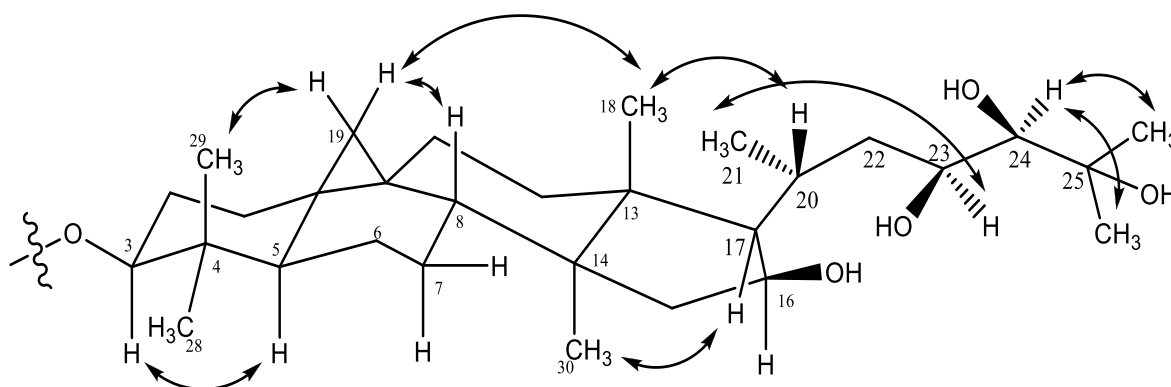
**Figure II.15:** Corrélations COSY H-H et HMBC de la chaîne latérale du composé A.

L'expérience ROESY s'est avérée judicieuse pour assigner la stéréochimie au niveau de la génine, particulièrement au niveau de la chaîne latérale (Figure II.16 et II.17). Il faut signaler d'abord la position  $\beta$  du groupement méthylène  $\text{CH}_2$ -19 qui concerne tous les composés à squelette 9,19-cyclotriterpénoïde de [46]. L'effet ROE observé entre le proton H-19 endo ( $\delta_{\text{H}}$  0,62) et les protons méthyliques Me-29 et Me-18 confirme l'orientation  $\beta$ -axiale de ces groupements. L'absence de corrélation H-19/H-5 montre que le proton H-5 est  $\alpha$  orienté. Les effets ROE sont visualisés également entre les protons H-19 endo et H-8 $\beta$  ainsi qu'entre les protons méthyliques Me-30 $\alpha$  et le proton H-17. Il y est observé également les corrélations Me-18 $\beta$ /H-20 et Me-21 $\alpha$ /H-23.

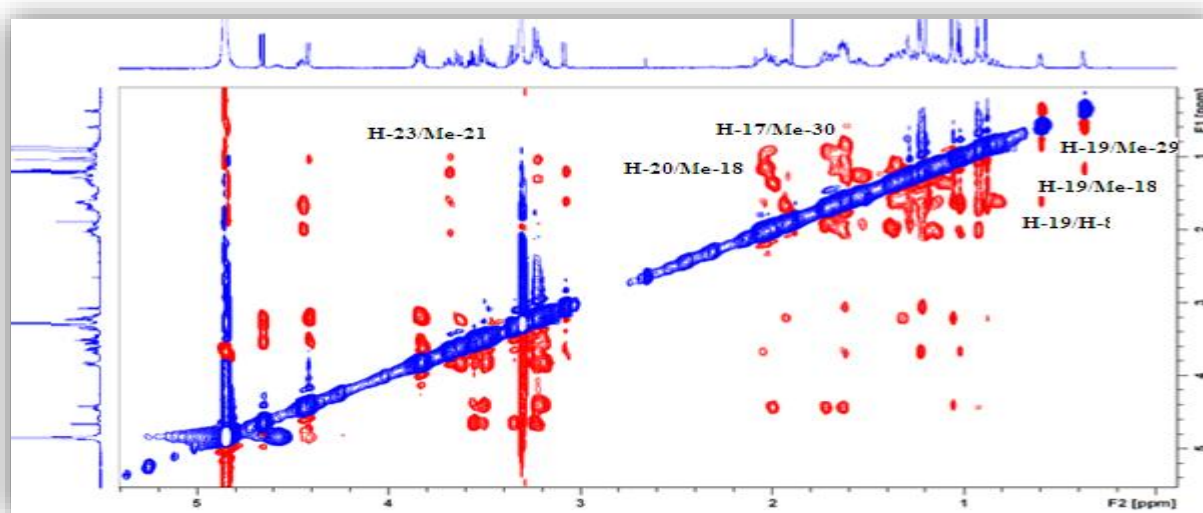
Par ailleurs, il est établi que les valeurs de déplacements chimiques sont décisives pour assigner la configuration absolue au niveau du carbone C-24. Ce dernier résonne à 77-77,2 ppm [47-48] dans le cas d'une configuration 24 (*S*) et autour de 80 ppm pour une

## Chapitre II : Etude phytochimique de l'espèce *Astragalus gombo*

configuration 24 (*R*). Une valeur de 79,6 ppm plaide en faveur de la dernière configuration. En outre, la valeur de la constante de couplage du proton H-16 ( $J = 7,6$  Hz) indique qu'il est  $\alpha$  orienté [49].



**Figure II.16: Principales corrélations ROE observées pour le composé A.**



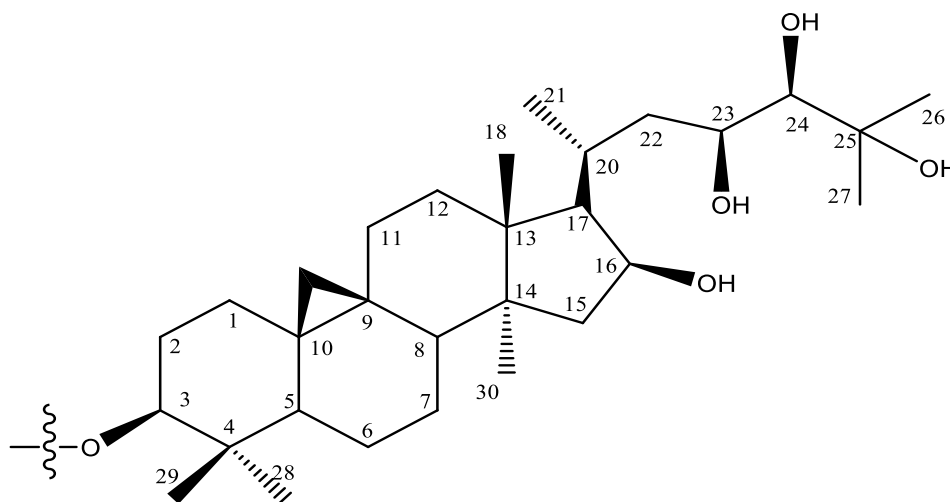
**Figure II.17: Spectre ROESY (CD<sub>3</sub>OD) de la partie génine du composé A.**

Seule persiste la détermination de la stéréochimie au niveau du carbone C-24. En se basant sur les déplacements chimiques des carbones C-24 ( $\delta_c$  79,6) et C-23 ( $\delta_c$  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, notamment entre Me-21 ( $\delta_H$  1.21)/ H-23 ( $\delta_H$  4.35), OH-23 ( $\delta_H$  6.85, d,  $J = 2.2$  Hz)/H-20 ( $\delta_H$  2.60) et H-24 ( $\delta_H$  3.78)/H-22b ( $\delta_H$  2.20) qui se sont avérés totalement identiques à ceux observés dans le cas de l'ermophiloside C antérieurement isolé de *Astragalus eremophilus* [50] et possédant la même chaîne latérale, il apparaît clairement que le composé 1 possède la même configuration R au

## Chapitre II : Etude phytochimique de l'espèce *Astragalus gombo*

niveau des carbones C-23 et C-24. L'orientation  $\uparrow$  du proton H-16 est confirmée par l'effet ROE H-20 $\beta$ /OH-16.

Toutes ces données spectrales se sont avérées similaires à celles observées pour une génine connue sous le nom de cycloorbigénine C isolée de deux espèces d'astragale: *A. orbiculatus* [47] et *A. eremophilus* [50]. La seule différence se résume à la disparition de groupement OH en C-6 laissant la place du groupement CH<sub>2</sub>-6.



### Identification du sucre

Comme il a été avancé plus haut, deux signaux de protons anomères résonant à 4,47 (d, J = 7,9 Hz) et 4,68 ppm (d, J = 7,7 Hz) ont été visualisés sur le spectre RMN <sup>1</sup>H (Figure II.18). Les signaux de leurs carbones respectifs résonnant à  $\delta$ C 104,5 (C-1') et 103,2 (C-1'') ont été assignés par expérience HSQC (Figure II.19).

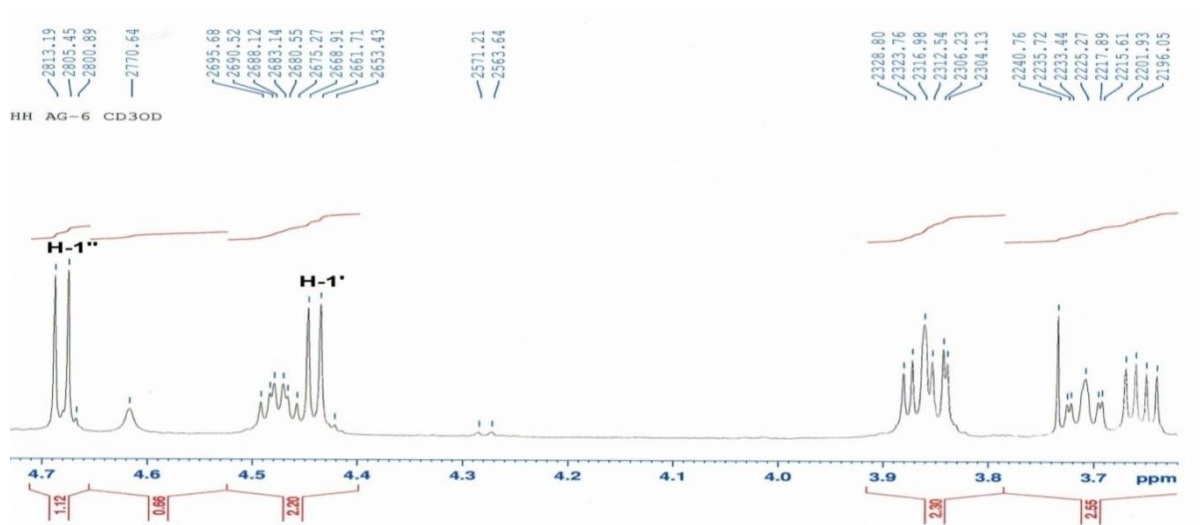
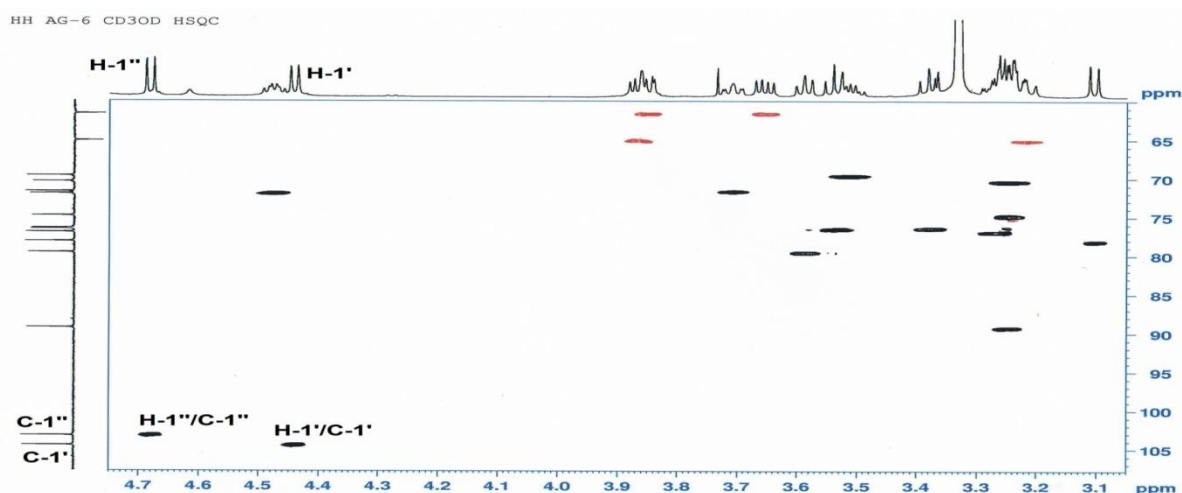


Figure II.18: Spectre RMN <sup>1</sup>H mettant en évidence les protons anomères (composé A).

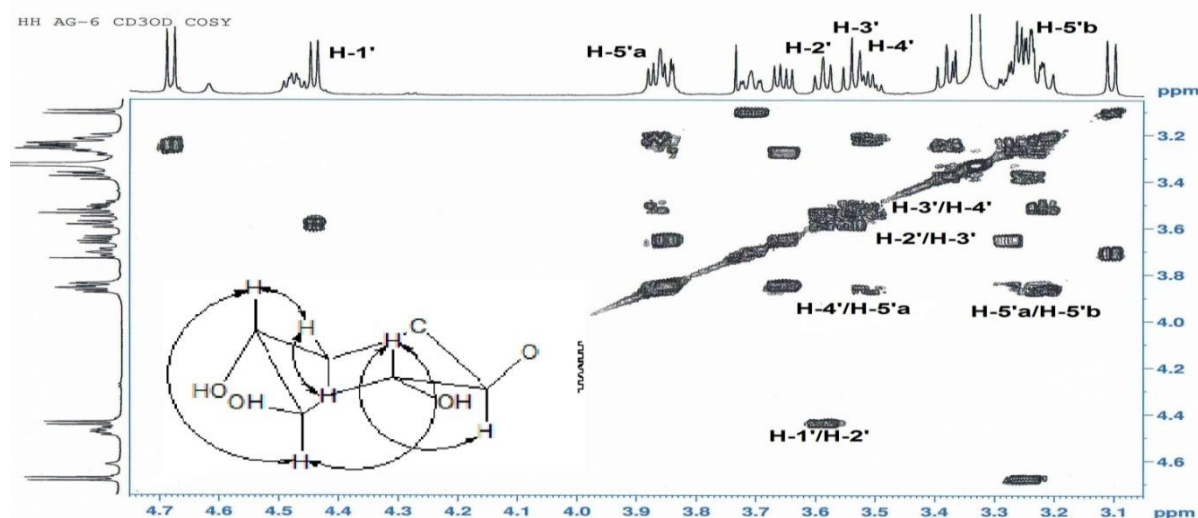


**Figure II.19:** Spectre HSQC mettant en évidence les protons et carbones anomères.

L'identification des deux unités osidiques repose essentiellement sur l'expérience COSY H-H (Figure II.20). 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' ( $\delta_H$  3,59,  $t$ ,  $J = 7,9$  Hz)
- H-2'/H-3' ( $\delta_H$  3,54,  $t$ ,  $J = 7,9$  Hz).
- H-3'/H-4' ( $\delta_H$  3,51,  $m$ ).
- H-4'/H-5'a ( $\delta_H$  3,86,  $dd$ ,  $J = 11,5; 4,7$  Hz).
- H-5'a/H5'b ( $\delta_H$  3,21,  $m$ ).

Ces corrélations traduisent la présence d'un pentose. Les grandes valeurs de constantes de couplage permettent d'identifier une xylose de configuration  $\beta$  ( $J_{1'-2'} = 7,9$  Hz).

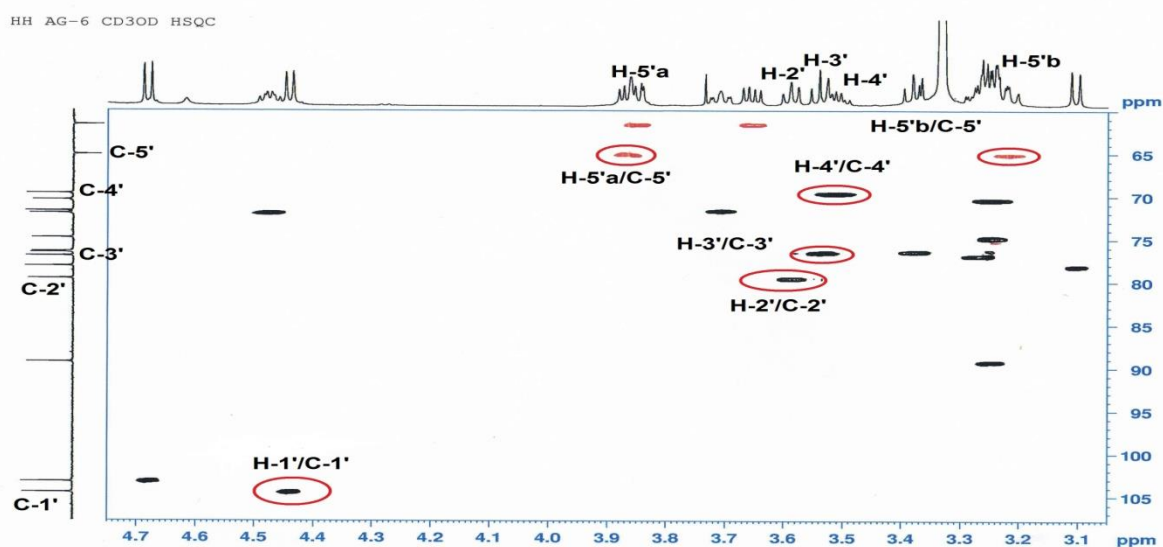


**Figure II.20:** Spectre COSY H-H de l'unité  $\beta$ -D-xylose

## Chapitre II : Etude phytochimique de l'espèce *Astragalus gombo*

L'analyse HSQC (Figure II.21) permet de caractériser tous les carbones des xyloses 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.

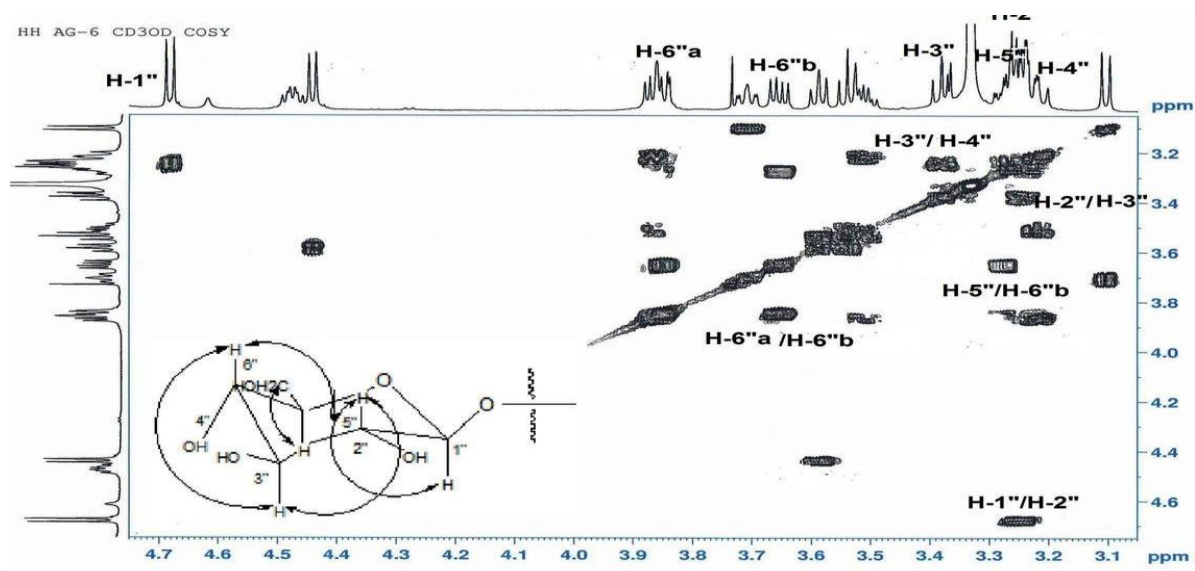


**Figure II.21: Spectre HSQC de l'unité  $\beta$ -D-xylose**

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 II.22). En effet, cette dernière permet de visualiser les corrélations :

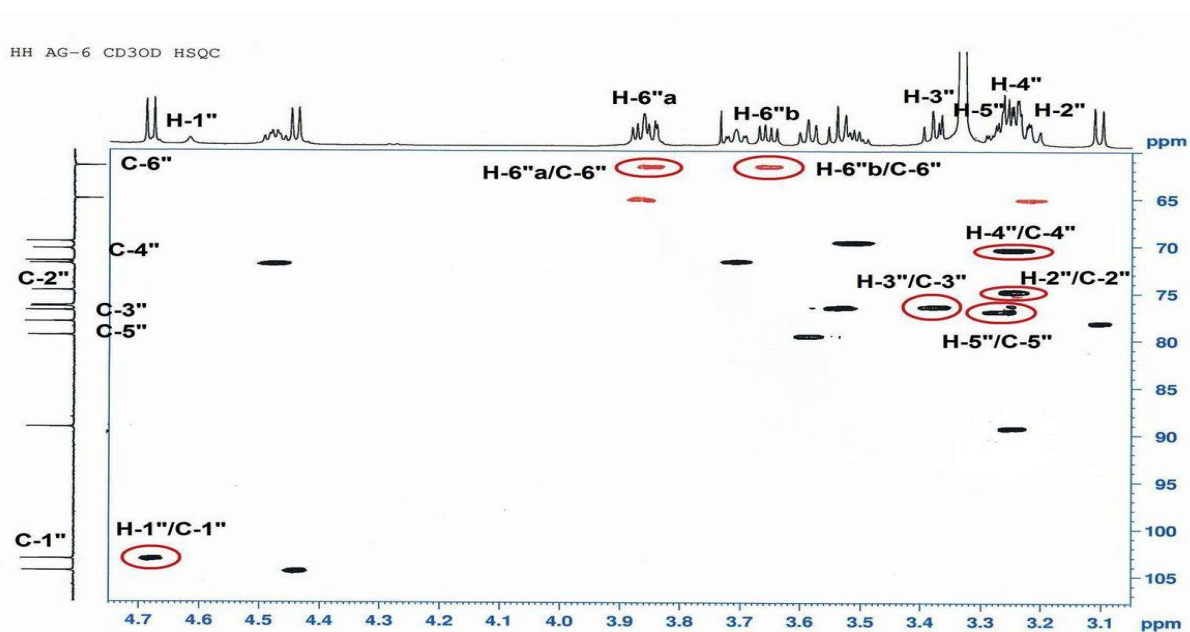
- H-1''/H-2'' [ $\delta_H$  3,25 ( $dd$ ,  $J = 8,6; 7,7$  Hz)].
- H-2''/H-3'' [ $\delta_H$  3,38 ( $t$ ,  $J = 8,6$  Hz)].
- H-3''/H-4'' [ $\delta_H$  3,24 ( $t$ ,  $J = 8,6$  Hz)].
- H-5'' [ $\delta_H$  3,28 ( $ddd$ ,  $J = 8,6; 6,5; 5,9$  Hz)]/ H-6b'' [ $\delta_H$  3,66 ( $dd$ ,  $J = 11,2; 5,9$  Hz)].
- H-6b''/H-6a'' [ $\delta_H$  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  $\beta$  ( $J_{1''-2''} = 7,7$  Hz).



**Figure II.22: Spectre COSY H-H du  $\beta$ -D-glucose**

Les déplacements chimiques des carbones du glucose sont assignés sans ambiguïté par analyse HSQC (Figure II.23).

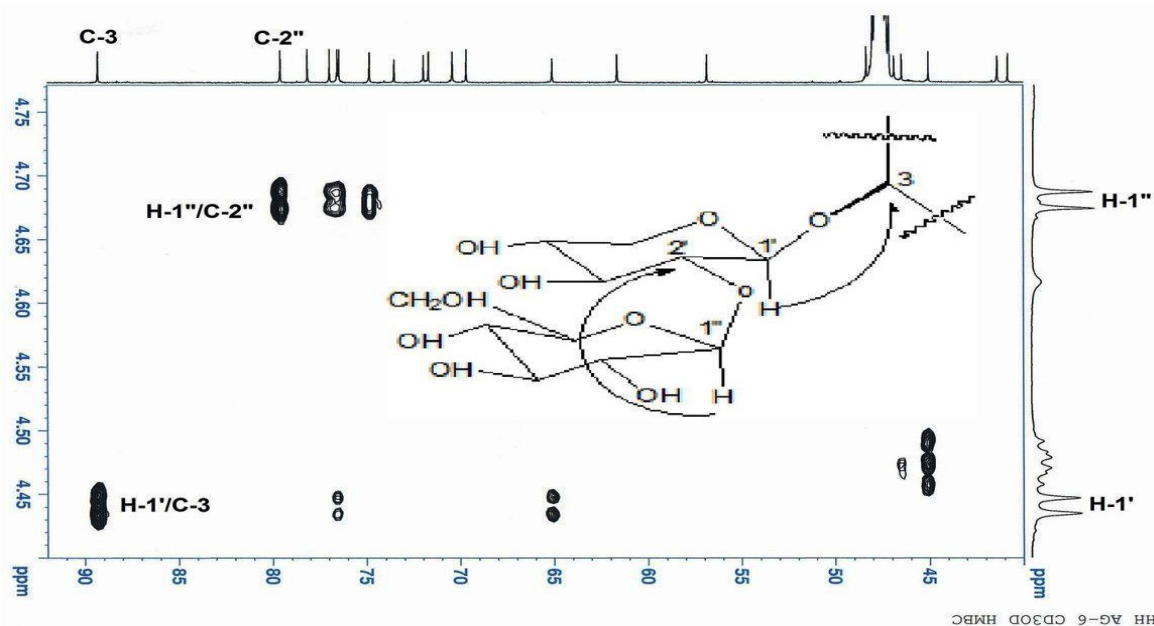


**Figure II.23: Spectre HSQC de la partie osidique.**

Le spectre HMBC (Figure II.24) 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 ( $\delta_C$  89,3) de la génine d'une part, et la corrélation interglycosidique entre le proton H-1'' ( $\delta_H$  4,68) du glucose et le carbone C-2' ( $\delta_C$  79,6) du xylose. Ces deux

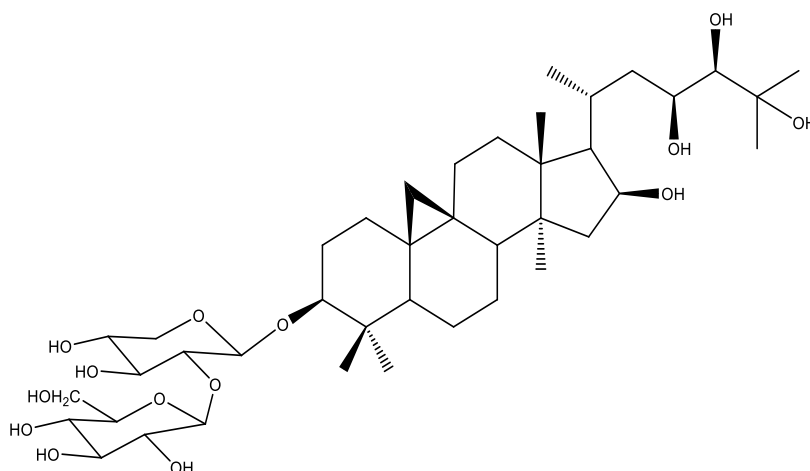
## Chapitre II : Etude phytochimique de l'espèce *Astragalus gombo*

unités osidiques forment donc en C-3 l'enchaînement [ $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-xylopyranosyl].



**Figure II.24: Spectre HMBC mettant en évidence la séquence des sucres.**

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



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

## Chapitre II : Etude phytochimique de l'espèce *Astragalus gombo*

Position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ ( <i>m</i> , <i>J</i> en Hz)
1	31,7	1,56 -1,30 ( <i>m</i> )
2	29,1	1,96-1,72 ( <i>m</i> )
3	89,3	3,24 ( <i>dd</i> , 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)

# Chapitre III :

## Partie expérimentale

### III.1. Matériels et appareillage

#### III.1.1. Récolte de plantes *A. gombo*

La plante *Astragalus gombo* a été récoltée en mai 2009 dans la région d'Ouargla. Elle a été identifiée par le Professeur *Bachir Oudjehih* de l'Institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques relevant de l'Université de Batna.

#### III.1.2. Méthodes analytiques de séparation

##### III.1.2.1. C'est quoi une chromatographie ?

C'est une méthode de séparation (Physico-chimique) des molécules présentes dans un échantillon en phase homogène liquide ou gazeuse ; il y a plusieurs types de chromatographie connus comme : CCM, VLC, CC ...

##### ❖ Chromatographie sur couche mince (CCM).

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une technique analytique rapide, simple et peu coûteuse, utilisée au cours de la séparation et de l'identification des métabolites. Elle est employée également pour la recherche du système de solvants avant d'entreprendre une étape de séparation. Elle repose principalement sur le phénomène d'adsorption.

Dans notre étude, nous avons utilisé essentiellement des plaques de silice gel 60 F<sub>254</sub> prêtes à l'emploi, à support en aluminium (Merck). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. La phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée.

##### ❖ Chromatographie sur colonne ouverte (CC).

Pour les chromatographies sur colonnes ouvertes, plusieurs types de phases ont été mis en oeuvre dans des colonnes en verre. La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée.

- a. **Les chromatographies d'exclusion** sont réalisées sur gel de Sephadex LH-20 avec un système méthanol, méthanol-eau et chloroforme-méthanol comme phases mobiles. Les échantillons à séparer ont été introduits sous forme liquide après dissolution dans un volume d'éluant le plus petit possible. Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

b. **Chromatographies d'adsorption** Pour les chromatographies d'adsorption, la phase stationnaire utilisée est le gel de silice Kieselgel Merck (70-230 mesh). L'élution est réalisée par simple gravité. La quantité de silice utilisée est généralement 40 fois supérieure à la quantité d'échantillon à purifier et 10 fois pour le polyamide. 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 choix des conditions d'élution, le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions sont effectués sur la base d'analyses par CCM.

### ❖ Chromatographie liquide sous vide (VLC).

Technique rapide utilisée pour un fractionnement (séparation) grossière d'extraits végétaux ou pour éliminer les pigments de certaines fractions et a l'avantage de consommer moins de solvants que les méthodes de chromatographies classiques. La rapidité de cette méthode évite les phénomènes d'isomérisations observées souvent dans le cas de la chromatographie sur colonne. Des chromatographies avec phase inverse (une silice greffée Lichroprep RP-18 Merck 40-63  $\mu\text{m}$ ), sont préconisées pour les extraits polaires. Le rapport de la quantité de phase sur la masse de l'échantillon est d'un facteur 4 à 10. Les fractionnements ont été effectués dans des entonnoirs cylindriques avec verre fritté n° 4.

### ❖ Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

Le système HPLC semi-préparative est constitué d'une chaîne chromatographique Dionex, pilotée par le logiciel Chromeleon version 6.01. La chaîne est équipée d'une pompe P580 A quaternaire avec dégazeur intégré, d'un passeur d'échantillon ASI 100, d'un détecteur UV/Visible à barette de diodes UVD 170S/340S et d'une colonne thermostatée par un four STH 585. La colonne employée est UP 5 ODB.25M 250x10 mm Interchrom. Les conditions d'élution sont :

- Mode : gradient.
- Système de solvants : H<sub>2</sub>O-ACN.
- Débit = 20 ml/min.
- Température = 25 °C.
- Détection :  $\lambda = 205$  et 250 nm.

### III.1.3. Méthodes physicochimiques

#### 1. Spectrométrie de masse (MS)

Le spectromètre de masse est un appareil qui sert à établir les masses moléculaires et de caractériser leur structure à partir de la nature des fragments formés. Son principe est simple, après que la volatisation du produit aura lieu dans la machine, des ions en phase gazeuse vont être formés puis séparés selon le rapport masse  $M$  sur la charge  $Z$ . Il existe plusieurs techniques d'ionisations, mais dans ce travail on a utilisé que deux :

- L'ionisation par impact électronique (EI-MS) sur un appareil « Maldimicro MX, micromasse walter »
- L'ionisation douce « Electrospray » (ESI-MS) sur un spectromètre Micromasse Q-TOF.

#### 2. Spectroscopie de RMN

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés sur des appareils de type Brüker Avance à 500 MHz (RMN  $^1\text{H}$ ) et 125 MHz (RMN  $^{13}\text{C}$ ), du Centre de recherche sur les Substances Naturelles de Toulouse (UMS CNRS-Pierre Fabre 2597) et de l'Institut de Chimie Moleculaire de Reims (UMR CNRS 6229).

Les échantillons ont été solubilisés dans les solvants deutérés  $\text{CDCl}_3$  et  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS); les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

Voici quelques idées sur les méthodes mono et bidimensionnelles :

- **La RMN monodimensionnelle (1D)**

-La RMN du proton (RMN  $^1\text{H}$ ) : A cause de son abondance dans les composés organiques, l'isotope  $^1\text{H}$  de spin  $\frac{1}{2}$  possède une excellente sensibilité à la détection RMN. Généralement, dans un spectre RMN  $^1\text{H}$ , chaque type de proton apparait sous forme d'un signal caractérisé par un déplacement chimique ( $\delta$  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.

-La RMN du carbone (RMN  $^{13}\text{C}$ ) : En RMN  $^{13}\text{C}$ , la faible abondance naturelle (1,1%) du carbone  $^{13}\text{C}$  impose l'utilisation de plusieurs séquences impulsionnelles. Pour les besoins de notre analyse phytochimique, on a utilisé la séquence J-modulé qui est facile et très utilisée

## Chapitre III : Partie expérimentale

---

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.

- **La RMN bidimensionnelle (2D)**

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

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

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

- 2) 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 ( $^1J_{\text{H/C}}$ ).

- 3) 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  $^4J_{\text{H/C}}$ .

### III.2. Etude de l'espèce *Astragalus gombo*

#### III.2.1. Extraction

1000g de la plante *Astragalus gombo* pulvérisée, est soumis à une macération dans l'éthanol/eau à (70/30). Cette macération est répétée 2 fois avec renouvellement du solvant et pendant 48 heures dans chaque cas à la température ambiante. Le mélange est ensuite filtré et concentré. La phase aqueuse résultante subit une extraction liquide-liquide par trois solvants successivement :

- L'éther de pétrole (500 ml, 3 fois).
- L'acétate d'éthyle (500 ml, 3 fois).
- Le butanol (500 ml, 3 fois).

## Chapitre III : Partie expérimentale

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.

### III.2.2. Fractionnement et purification de l'extrait n-butanol

14 g de l'extrait butanolique a été réalisé initialement par chromatographie liquide sous vide VLC en utilisant le gel de silice SiO<sub>2</sub> greffée en C-18 (RP-18) comme phase stationnaire. L'élution est effectuée avec un gradient de solvants méthanol-eau (MeOH/H<sub>2</sub>O) 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 d'*Astragalus gombo* est présenté dans le tableau suivant (Tableau II.1).

Eluant colonne		Fractions	Eluant CCM	Poids en mg
MeOH/H <sub>2</sub> O	20-80	F1	CHCl <sub>3</sub> /MeOH/H <sub>2</sub> O 7/3/0,5	4023
	20-80	F2		1459
	20-80	F3		2430
	20-80	F4		379
	40-60	F5		342.4
	40-60	F6		561
	60-40	F7	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 7/3	459.7
	60-40	F8	356.7	
	60-40	F9	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 8/2	307
	80-20	F10		679
	80-20	F11		914
MeOH	100	F12	CHCl <sub>3</sub> /MeOH 8/2	260
		F13		300
		F14		130

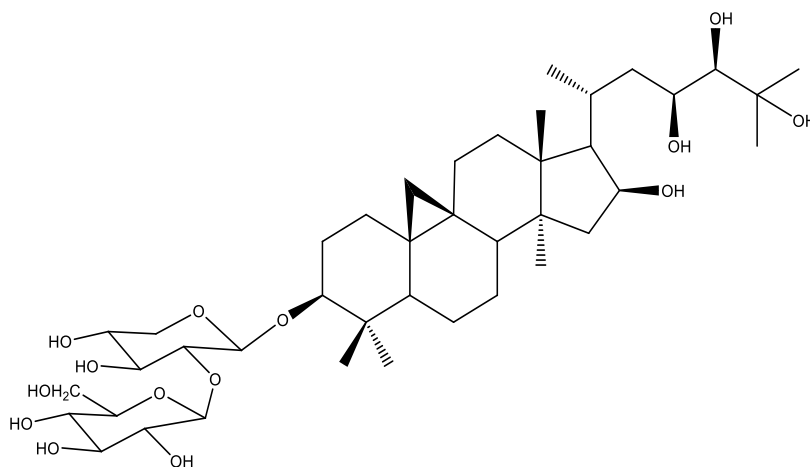
## Chapitre III : Partie expérimentale

### III.2.21. Etude de la fraction F10

La fraction F10 (679 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'éluion menée dans un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-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 F10-3 (95mg) soumise à une purification par HPLC semi-préparative dans le système de solvants ACN-H<sub>2</sub>O (25:75, 56:44, 100:0) a abouti à l'isolement de composés A (2 mg).

### III.2.3. Constante physique et données spectrales de composé A



Nom systématique	<b>3-O-[[<math>\beta</math>-D-glucopyranosyl-(1<math>\bar{1}</math>2)]-<math>\beta</math>-D-xylopyranosyl]-3<math>\beta</math>,16<math>\beta</math>,23(R),24(R),25-pentahydroxycycloartane</b>
Nom trivial	<i>gomboside A</i>
Formule brute	<b>C<sub>41</sub>H<sub>70</sub>O<sub>14</sub></b>
Masse moléculaire	<b>786 uma</b>
MS	<b>ESI (mode positif) m/z : 809 [M+Na]<sup>+</sup></b>
R <sub>t</sub>	<b>5,851 min</b>
RMN <sup>1</sup> H (600 MHz) dans CD <sub>3</sub> OD	1,56 -1,30 ( <i>m</i> ); 1,96-1,72 ( <i>m</i> ); 3,24 ( <i>dd</i> , 8,1; 4,2); 1,35 ( <i>dd</i> , 12,5; 4,2); 1,65-0,85 ( <i>m</i> ); 1,39-1,15 ( <i>m</i> ); 1,65 <i>nd</i> , 2,05-1,15 ( <i>m</i> ); 1,7 ( <i>m</i> ), 2,03 ( <i>dd</i> , 12,4; 7,6) ; 1,40 ( <i>dd</i> , 12,4; 5,2) ; 4,70 ( <i>td</i> , 7,6; 5,2) ; 1,75 ( <i>dd</i> , 11,3; 7,6) ; 1,22 ( <i>s</i> ) ; 0,62( <i>d</i> , 4,0) ; 0,40 ( <i>d</i> , 4,0) ; 2,04 ( <i>m</i> ), 1,05 ( <i>d</i> , 6,5) ; 1,66 ( <i>m</i> ) ; 3,71 ( <i>ddd</i> , 10,5; 8,2; 2,3) ; 3,10 ( <i>d</i> , 8,2) ; 1,25 ( <i>s</i> ) ; 1,24 ( <i>s</i> ) ; 1,09 ( <i>s</i> ) ; 0,91 ( <i>s</i> ) ; 0,95 ( <i>s</i> ) ; 4,47 ( <i>d</i> , 7,9); 3,59 ( <i>t</i> , 7,9); 3,54 ( <i>t</i> , 7,9) ; 3,51 ( <i>m</i> ) ; 3,86 ( <i>dd</i> , 11,5; 4,7) ; 3,21 ( <i>m</i> ) ; 4,68 ( <i>d</i> , 7,7) ; 3,25 ( <i>dd</i> , 8,6; 7,7) ; 3,38 ( <i>t</i> , 8,6) ; 3,24 ( <i>t</i> , 8,6) ; 3,28 ( <i>ddd</i> , 8,6; 6,5; 5,9) ; 3,85 ( <i>dd</i> , 11,2; 6,5) ; 3,66 ( <i>dd</i> , 11,2; 5,9).

## Chapitre III : Partie expérimentale

---

RMN $^{13}\text{C}$ (150 MHz) dans $\text{CD}_3\text{OD}$	31,7(CH <sub>2</sub> -1),29,1(CH <sub>2</sub> -2),89,3(CH-3),40.8(Cq-4),47,4(CH <sub>3</sub> -5),20,6(CH <sub>2</sub> -6),25,9(CH <sub>3</sub> -7), 48,3(CH <sub>3</sub> -8),19.6(C-9),25.9 (Cq-10), ,25,9(CH <sub>2</sub> -11),32,4(CH <sub>2</sub> -12),46.5(Cq-13),46.5(Cq-14), 46,9(CH <sub>2</sub> -15),72,0(CH <sub>3</sub> -16),56,7(CH-17),18,4(CH <sub>3</sub> -18) ,29,8(CH <sub>2</sub> -19),26,4(CH,18,7,41,4,71,7,79,6,73.5(Cq-25),22,5(CH <sub>3</sub> -26),26,5(CH <sub>3</sub> -27),24,5(CH <sub>3</sub> -28),14,0(CH <sub>3</sub> -29),19,0(CH <sub>3</sub> -30), 104,5(CH <sub>2</sub> -1'), 79,6(C-2'), 76,5(CH <sub>3</sub> -3'), 69,7(CH <sub>3</sub> -4'),65,1(CH <sub>2</sub> -5'), 103,2(CH <sub>3</sub> -1''),74,8(CH <sub>3</sub> -2''), 76,5(CH <sub>3</sub> -3''),70,4(CH <sub>3</sub> -4''),77,0(CH <sub>3</sub> -5''),61,6(CH <sub>2</sub> -6'').
--	---

*Conclusion*  
*générale*

### *Conclusion générale*

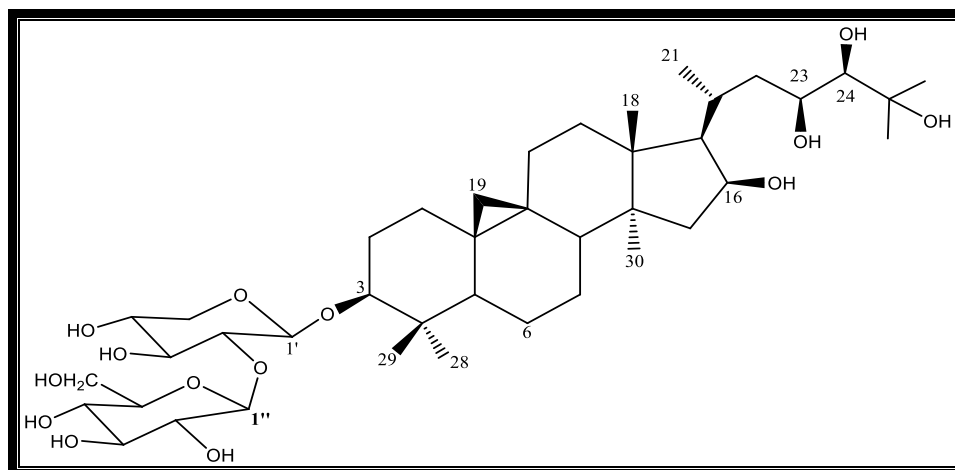
Cette étude concerne l'investigation phytochimique de l'espèce *Astragalus gombo*, plante Saharienne et appartenant à la famille Leguminosae(Fabaceae). Cette plante n'a pas fait l'objet d'étude phytochimique. Ce qui constitue, à notre avis, une motivation fondée quant à son étude chimique en vue d'en isoler de biomolécules à intérêts biologiques pouvant contribuer à sa valorisation' investigation phytochimique réalisée sur l'extrait butanolique de la plante (parties aériennes)*Astragalus gombo*, a permis d'isoler un composé naturel appartenant à la classe des saponosides. Cette saponine s'est avérée nouvelle.

Le fractionnement, la séparation et la purification de ce métabolite secondaire s'est principalement reposés sur l'utilisation en alternance des différentes méthodes chromatographiques à savoir :

- La chromatographie liquide sous vide (VLC) de silice greffée en C-18.
- La chromatographie sur colonne de gel de silice normale.
- La chromatographie liquide haute performance CLHP.

L'élucidation structurale des composés isolées a été faite au moyen de méthodes physicochimiques et spectroscopiques modernes impliquant la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN monodimensionnelle ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  DEPT et  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé) et les techniques de corrélations bidimensionnelles (COSY, HSQC *J*-modulé, HMBC et ROESY) ainsi que la spectrométrie de masse ESI-MS. La mesure du pouvoir rotatoire et la comparaison avec les données de la littérature.

Cette étude confirme encore une fois que les saponosides triterpéniques 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.



*Références*

*Bibliographiques*

### *Références bibliographiques*

- [1] A. Szyszkowska, J. Koper, J. Szczerba, M. Pulawska, and D. Zajdel, "The use of medicinal plants in dental treatment," *Herba Pol.*, vol. 56, no. 1, pp. 97–107, 2010.
- [2] W. J. Craig, "Health-promoting properties of common herbs," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 70, no. 3, pp. 491s-499s, 1999.
- [3] I. T. Johnson, "Phytochemicals and cancer," *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 66, no. 2, pp. 207–215, 2007.
- [4] L. F. James, W. J. Hartley, and K. R. Van Kampen, "Syndromes of Astragalus poisoning in livestock.," *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 178, no. 2, pp. 146–150, 1981.
- [5] K. M. Watrous and J. H. Cane, "Breeding biology of the threadstalk milkvetch, *Astragalus filipes* (Fabaceae), with a review of the genus," *Am. Midl. Nat.*, vol. 165, no. 2, pp. 225–240, 2011.
- [6] R. A. Scherson, R. Vidal, and M. J. Sanderson, "Phylogeny, biogeography, and rates of diversification of New World *Astragalus* (Leguminosae) with an emphasis on South American radiations," *Am. J. Bot.*, vol. 95, no. 8, pp. 1030–1039, 2008.
- [7] S. Zarre and N. Azani, "Perspectives in taxonomy and phylogeny of the genus *Astragalus* (Fabaceae): a review," *Prog. Biol. Sci.*, vol. 3, no. 1, pp. 1-6, 2013.
- [8] M. J. Sanderson and M. F. Wojciechowski, "Diversification rates in a temperate legume clade: are there 'so many species' of *Astragalus* (Fabaceae)?," *Am. J. Bot.*, vol. 83, no. 11, pp. 1488–1502, 1996.
- [9] A. Liston and J. A. Wheeler, "The phylogenetic position of the genus *Astragalus* (Fabaceae): evidence from the chloroplast genes *rpoC1* and *rpoC2*," *Biochem. Syst. Ecol.*, vol. 22, no. 4, pp. 377–388, 1994.
- [10] P. Quezel and S. Santa, "Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales," 1963.
- [11] F. James, "Monte Carlo theory and practice," *Reports Prog. Phys.*, vol. 43, no. 9, p. 1145, 1980.
- [12] P. Ozenda, "Flore et faune du Sahara," *Cent. Nati. Rech. Sci.(CNRS)*, 2004.
- [13] M. Benchelah, *Bassora Express. Recherche Midi*, 2011.
- [14] M. E. Kherraze et al., "Atlas floristique de la vallée de l'Oued Righ par écosystème," *Ed. CRSTRA Touggourt*, vol. 91, 2010.
- [15] P. H. Davis, "Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 3.," *Flora Turkey East Aegean Islands. Vol. 3.*, 1970.

## Références Bibliographiques

---

- [16] W. Tang and G. Eisenbrand, *Chinese drugs of plant origin: chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine*. Springer Science & Business Media, 2013.
- [17] A. Y. Leung, *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*. Wiley, 1980.
- [18] R. Upton and C. Petrone, “American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium, Astragalus Root, *Astragalus membranaceus* and *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*, Analytical, Quality Control, and Therapeutic Monograph,” *St. Cruz Am. Herb. Pharmacopoeia*, 1999.
- [19] A. El-Mawla and A. Attia, “Production of flavonoids in cell cultures of *Astragalus sieberi* DC,” *Bull. Pharm. Sci. Assiut*, vol. 25, no. 1, pp. 79–83, 2002.
- [20] C. Kim, H. Ha, J. S. Kim, Y. T. Kim, S.-C. Kwon, and S. W. Park, “Induction of growth hormone by the roots of *Astragalus membranaceus* in pituitary cell culture,” *Arch. Pharm. Res.*, vol. 26, no. 1, pp. 34–39, 2003.
- [21] J. Bellakhdar, *Pharmacopée marocaine traditionnelle*. Ibis press, 1997.
- [22] P. Gariboldi et al., “Cycloartane triterpene glycosides from *Astragalus trigonus*,” *Phytochemistry*, vol. 40, no. 6, pp. 1755–1760, 1995.
- [23] E. WC, “*Trease and Evans Pharmacognosy*. 15th,” Ed. Saunders Elsevier, 2009.
- [24] M. M. Marzouk, “Flavonoid constituents and cytotoxic activity of *Erucaria hispanica* (L.) Druce growing wild in Egypt,” *Arab. J. Chem.*, vol. 9, pp. S411–S415, 2016.
- [25] L. J. Rios and P. G. Waterman, “A Review of the Pharmacology and Toxicology of *Astragalus*. *Phytoterapy Research*, 11, 411-418.” 1997.
- [26] L. Verotta and N. A. El-Sebakhy, “*Studies in Natural Products Chemistry: Bioactive Natural Products*, vol. 25,” 2001.
- [27] M. M. Radwan, N. A. El-Sebakhy, A. M. Asaad, S. M. Toaima, and D. G. I. Kingston, “Kahiricosides II–V, cycloartane glycosides from an Egyptian collection of *Astragalus kahiricus*,” *Phytochemistry*, vol. 65, no. 21, pp. 2909–2913, 2004.
- [28] M. Özipek, A. A. Dönmez, İ. Çalış, R. Brun, P. Rüedi, and D. Tasdemir, “Leishmanicidal cycloartane-type triterpene glycosides from *Astragalus oleifolius*,” *Phytochemistry*, vol. 66, no. 10, pp. 1168–1173, 2005.
- [29] S. Yahara, M. Kohjyouma, and H. Kohoda, “Flavonoid glycosides and saponins from *Astragalus shikokianus*,” *Phytochemistry*, vol. 53, no. 4, pp. 469–471, 2000.
- [30] L. Pistelli, S. Pardossi, A. Bertoli, and D. Potenza, “Cicloastragenol glycosides from *Astragalus verrucosus*,” *Phytochemistry*, vol. 49, no. 8, pp. 2467–2471, 1998.

## Références Bibliographiques

---

- [31] L. Verotta, M. Tatò, N. A. El-Sebakhy, and S. M. Toaima, "Cycloartane triterpene glycosides from *Astragalus sieberi*," *Phytochemistry*, vol. 48, no. 8, pp. 1403–1409, 1998.
- [32] C. Gauthier, "glycosidation de triterpènes pentacycliques de type lupane et évaluation in vitro de leur potentiel anticancéreux," 2006.
- [33] A. Alabdul Magid, "Étude chimique de deux Caryocar de Guyane et d'un Guioa de Nouvelle Calédonie." Reims, 2005.
- [34] L. P. Sandjo, "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." Université Paul Verlaine-Metz, 2010.
- [35] M. Chwalek, "Hémisynthèse de saponosides à hédéragénine. Etude de l'influence de la chaîne osidique sur l'activité hémolytique." Reims, 2004.
- [36] F.-G. Robinet, "Saponosides stéroïdes et triterpéniques de synthèse." ETH Zurich, 1951.
- [37] H. Amzal, "Étude de l'activité antioxydante des saponines du tourteau de l'arganier," Rabat Univ. Mohammed V Agdal Fac. des Sci. Rabat, 2010.
- [38] Z. Belloum, "Etude phytochimique des plantes médicinales algériennes, cas de l'espèce *Inula crithmoides* L.," 2007.
- [39] C. Gauthier, Amélioration du comportement biopharmaceutique de triterpènes naturels anticancéreux par synthèse de saponines mono-et bidesmosidiques. Université du Québec à Chicoutimi, 2008.
- [40] L. Pistelli, S. Pardossi, G. Flamini, A. Bertoli, and A. Manunta, "Three cycloastragenol glucosides from *Astragalus verrucosus*," *Phytochemistry*, vol. 45, no. 3, pp. 585–587, 1997.
- [41] E. Bedir, I. Calis, R. Aquino, S. Piacente, and C. Pizza, "Cycloartane triterpene glycosides from the roots of *Astragalus brachypterus* and *Astragalus microcephalus*," *J. Nat. Prod.*, vol. 61, no. 12, pp. 1469–1472, 1998.
- [42] M. Hirotsu, Y. Zhou, H. Lui, and T. Furuya, "Astragalosides from hairy root cultures of *Astragalus membranaceus*," *Phytochemistry*, vol. 36, no. 3, pp. 665–670, 1994.
- [43] D. Gülcemal, Ö. Alankuş-Çalışkan, A. Perrone, F. Özgökçe, S. Piacente, and E. Bedir, "Cycloartane glycosides from *Astragalus aureus*," *Phytochemistry*, vol. 72, no. 8, pp. 761–768, 2011.
- [44] E. Polat, O. Caliskan-Alankus, A. Perrone, S. Piacente, and E. Bedir, "Cycloartane-

## Références Bibliographiques

---

- type glycosides from *Astragalus amblolepis*,” *Phytochemistry*, vol. 70, no. 5, pp. 628–634, 2009.
- [45] F. N. Yalçın, S. Piacente, A. Perrone, A. Capasso, H. Duman, and İ. Çalış, “Cycloartane glycosides from *Astragalus stereocalyx* Bornm.,” *Phytochemistry*, vol. 73, pp. 119–126, 2012.
- [46] S. Pascal, M. Taton, and A. Rahier, “Plant sterol biosynthesis. Identification and characterization of two distinct microsomal oxidative enzymatic systems involved in sterol C4-demethylation,” *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 16, pp. 11639–11654, 1993.
- [47] R. P. Mamedova, M. A. Agzamova, K. K. Turgunov, A. Tozhiboev, B. Tashkhodzhaev, and M. I. Isaev, “Triterpene glycosides of *Astragalus* and their genins. LXXII. X-ray crystal structure of cycloorbicoside D,” *Chem. Nat. Compd.*, vol. 42, no. 4, pp. 501–502, 2006.
- [48] R. M. Abdallah, N. Ghazy, A. M. Assad, A. El-sebakhy, and A. Pirillo, “Constituents of the Egyptian *astragalus tomentosus* Lam,” *Pharmazie*, vol. 49, no. 5, pp. 377–378, 1994.
- [49] K. Yasukawa and M. Takido, “A flavonol glycoside from *Lysimachia mauritiana*,” *Phytochemistry*, vol. 26, no. 4, pp. 1224–1226, 1987.
- [50] A. Perrone et al., “Unusual cycloartane glycosides from *Astragalus eremophilus*,” *Tetrahedron*, vol. 64, no. 22, pp. 5061–5071, 2008.

## ***Résumé***

Ce travail est consacré essentiellement à l'étude phytochimique de l'extrait butanolique des parties aériennes de la plante *Astragalus gombo* appartenant à la famille Fabaceae.

La méthodologie de séparation, purification et isolement de composé est basée sur les techniques chromatographiques (VLC, CCM, CC, HPLC). Elle a permis d'isoler une saponine triterpenique à squelette cycloartane nommée gomboside A.

La détermination structurale a été réalisée par la combinaison de plusieurs méthodes spectroscopiques telles que la RMN 1D et 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé, COSY H-H, HSQC, HMBC et ROESY) et la spectrométrie de masse (EI-MS & ESI-MS), et par la comparaison avec les données de la littérature.

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

## ***Abstract***

This work is devoted mainly to the phytochemical study of the *n*-butanol extract of the aerial parts of the plant *Astragalus gombo* belonging to the Fabaceae family.

The methodology of separation, purification and isolation of the compound is based on chromatographic methods (VLC, TLC, CC and HPLC). It allowed the isolation of a new triterpenic saponin with cycloartane skeleton named gomboside A.

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

**Keywords:** Phytochemistry, *Astragalus gombo*, Fabaceae, saponins, 1D and 2D NMR, mass spectrometry

## تلخيص

هذا العمل مكرس بشكل أساسي للدراسة الكيميائية النباتية لمستخلص البوتانول من الأجزاء الهوائية لنبات استراغالوس Astragalus gombo الذي ينتمي إلى عائلة Fabaceae.

تعتمد منهجية فصل وتنقية وعزل المركب على تقنيات كروماتوغرافية (VLC ، TLC ، CC ، HPLC)

جعل من الممكن عزل saponine triterpenique à squelette cycloartane يسمى gomboside A .

تم إجراء التحديد الهيكلي من خلال الجمع بين عدة طرق طيفية مثل (1D ,2D, 1H, <sup>13</sup>C J-modulé, COSY H-H)

(HSQC, HMBC ,ROESY) وقياس الطيف الكتلي (EI-MS&ESI-MS) بواسطة مقارنة مع

البيانات العلمية السابقة.

الكلمات المفتاحية: كيمياء النبات , قياس الطيف الكتلي , RMN 1D, 2D , Astragalus gombo, saponine ,