

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



Université Hadj Lakhdar - BATNA 1

Faculté des Sciences de la Matière

Département de Chimie



THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du
Diplôme de Doctorat troisième cycle

Par :

M^{elle} Saliha BESBAS

Thème :

Métabolites secondaires de *Ononis mitissima* L. (Fabaceae) et évaluation biologique

Domaine : Sciences de la Matière
Filière : Chimie
Spécialité : Chimie Organique

Soutenu le / / 2020

Devant le jury :

Président :	Hamada HABA	Professeur	Université de Batna 1
Rapporteur :	Mohammed BENKHALED	Professeur	Université de Batna 1
Examineurs :	Belgacem LEGSEIR	Professeur	Université de Annaba
	Ammar DIBI	Professeur	Université de Batna 1
	Lotfi LOUCIF	Maitre de conférences A	Université de Batna 2

Remerciements

Nos remerciements vont d'abord au Créateur qui nous a doté d'intelligence et maintenu en santé pour mener à bien toutes ces années d'études.

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

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude au directeur de cette thèse, Professeur **Mohammed BENKHALED**, pour le temps qu'il a consacré à m'apporter les outils méthodologiques indispensables à la conduite de cette recherche, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Son exigence m'a grandement stimulée.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur **Hamada HABA**, Professeur à l'Université de Batna 1, pour sa disponibilité, ses compétences dans le domaine de la chimie des substances naturelles, ses précieux conseils et son expérience très enrichissante qui m'ont fait avancer dans mes recherches. Je le remercie grandement pour avoir accepté de présider le jury de la présente thèse.

Je tiens à remercier les membres du jury, Monsieur le Professeur **Belgacem LEGSEIR** de l'Université de Annaba, Professeur **Ammar DIBI** de l'Université de Batna 1 et Monsieur **Lotfi LOUCIF**, Maître de Conférences à l'Université de Batna 2, pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner ce travail.

J'adresse également tous mes remerciements et exprime toute ma reconnaissance au Professeur **Jean-Luc WOLFENDER** et au Docteur **Laurence MARCOURT** de l'Université de Lausanne-Genève (Suisse) pour la réalisation des analyses spectroscopiques.

J'exprime mes sincères remerciements au Docteur **Soumia MOUFFOUK** du Département des Sciences de la Matière de l'Université de Batna 1, pour sa précieuse aide à la réalisation et la rédaction de la partie biologique, au sein du Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (LCCE). J'aimerais la remercier pour sa serviabilité et sa disponibilité.

Je remercie en particulier **Chaima MOUFFOUK**, Docteur en Biochimie Moléculaire à l'Université de Batna 2, pour sa gentillesse et son aide pour la réalisation de l'activité anti-hémolytique au sein du même laboratoire.

Mes remerciements et ma reconnaissance vont également à toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs conseils et leurs critiques, ont guidé mes réflexions et accepté de me rencontrer et de répondre à mes questions durant mes recherches.




Dédicaces

Tout d'abord, louange à « Allah » qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long du travail et m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes. Sans sa miséricorde, ce travail n'aura pas abouti.

À mes parents .Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

À mes frères et sœurs qui n'a cessé de me soutenir pendant tout mon parcours. Je leur exprime toute ma gratitude pour leur soutien financier et moral, ce qui m'a permis d'être à ce niveau. Puisse ce diplôme nous réserver a tous des lendemains meilleurs.

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, je vous dis merci.



Abréviations

BHA	Hydroxyanisole butylé
BHT	Hydroxytoluène butylé
CC	Chromatographie sur Colonne
CCE	Chromatographie sur Couche Epaisse
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
COSY H-H	Correlation spectroscopy H-H
<i>d</i>	Doublet
<i>dd</i>	Doublet de doublets
<i>ddd</i>	Doublet de doublets de doublets
<i>ddt</i>	Doublet de doublets de triplets
DMSO-<i>d</i>₆	Diméthylsulfoxyde deutéré
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
<i>dt</i>	Doublet de triplets
EAA	Equivalents d'acide ascorbique
EC₅₀	Concentration efficace médiane
EGA	Equivalent gramme d'acide gallique
EQ	Equivalent de la quercétine
ERO	Espèces oxygénées réactives
ESI	Electrospray Spray Ionisation
FRAP	Pouvoir réducteur du fer
FTC	Thiocyanate du fer
glu	Glucose
gluc	Acide glucuronique
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HMG	3-hydroxy-3-méthylglutaryle

HR-ESI-MS	Spectrométrie de masse à haute résolution
HSQC	Heteronuclear single-quantum correlation
Hz	Hertz
IC₅₀	Concentration inhibitrice à 50%
<i>J</i>	Constante de couplage exprimée en Hz
<i>m</i>	Multiplet
<i>m/z</i>	Masse/Charge d'un ion
MS	Mass spectrometry
Na₂SO₄	Sulfate de sodium
<i>nd</i>	Non déterminée
ppm	Partie par million
PPM	Phosphomolybdate
<i>q</i>	Quadruplet
rha	Rhamnose
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMN ¹³C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
RMN ¹H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
ROESY	Rotating-frame overhauser effect spectroscopy
RP-18	Silice greffée en C-18 (Reverse Phase-18)
<i>s</i>	Singulet
SiO₂	Gel de silice normale
<i>t</i>	Triplet
<i>td</i>	Triplet dédoublé
uma	Unité de masse atomique
VLC	Chromatographie Liquide sous Vide
δ	Déplacement chimique exprimé en ppm
[α]_D	Pouvoir rotatoire

Sommaire

Introduction	1
--------------------	---

CHAPITRE I : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I.1. Famille Fabaceae	3
I.2. Présentation du genre <i>Ononis</i>	3
I.3. Usage traditionnel et propriétés biologiques du genre <i>Ononis</i>	4
I.3.1. Utilisation en médecine traditionnelle	4
I.3.2. Propriétés biologiques	4
I.4. Travaux antérieurs sur le genre <i>Ononis</i>	5
I.4.1. Acides anthraniliques	5
I.4.2. Acides phénoliques	6
I.4.3. Ptérocarpanes	7
I.4.4. Dérivés de résorcinol.....	7
I.4.5. Dihydroisocoumarine.....	9
I.4.6. Flavones, isoflavones, chalcones et auronés	10
I.4.7. Lactones aromatiques.....	13
I.4.8. Saponines et triterpènes.....	14

CHAPITRE II : ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE L'ESPECE *ONONIS*

MITISSIMA

II.1. Aspect botanique	15
II.2. Extraction.....	16
II.3. Fractionnement et purification.....	16
II.4. Identification structurale des produits isolés (1-14)	18
II.4.1. Elucidation structurale du composé 1	21
II.4.2. Elucidation structurale du composé 2	36
II.4.3. Elucidation structurale du composé 3	47
II.4.4. Elucidation structurale du composé 4	53
II.4.5. Elucidation structurale du composé 5	58
II.4.6. Elucidation structurale du composé 6	64
II.4.7. Elucidation structurale du composé 7	66
II.4.8. Elucidation structurale du composé 8	71

II.4.9. Elucidation structurale du composé 9	83
II.4.10. Elucidation structurale du composé 10	99
II.4.11. Elucidation structurale des composés 11 et 12	104
II.4.12. Elucidation structurale des composés 13 et 14	104

CHAPITRE III : ACTIVITES BIOLOGIQUES

III.1. Stress oxydatif et activité anti-oxydante	105
III.2. Activité anti-inflammatoire	105
III.3. Activité anti-hémolytique.....	106
III.4. Résultats et discussion.....	106
III.4.1. Dosage des polyphénols totaux	106
III.4.2. Dosage des flavonoïdes	107
III.4.3. Evaluation de l'activité anti-oxydante	108
III.4.3.1. Piégeage du radical libre DPPH	108
III.4.3.2. Activité anti-oxydante par peroxyde d'hydrogène.....	110
III.4.3.3. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)	111
III.4.3.4. Test de phosphomolybdate (PPM)	112
III.4.3.5. Test de dosage par le thiocyanate de fer (FTC).....	113
III.4.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	114
III.4.5. Evaluation de l'activité anti-hémolytique	115
Conclusion.....	117

CHAPITRE IV : PARTIE EXPERIMENTALE

Extraction-Purification

IV.1. Matériel et méthodes	122
IV.1.1. Récolte du matériel végétal	122
IV.1.2. Chimie extractive	122
IV.1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	122
IV.1.2.2. Chromatographie liquide sous vide (VLC)	122
IV.1.2.3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)	122
IV.1.3. Chimie structurale	123
IV.1.3.1. Spectrométrie de masse	123
IV.1.3.2. Spectrométrie de RMN.....	123

IV.1.3.3. Pouvoir rotatoire.....	123
IV.2. Extraction.....	123
IV.3. Etude de l'extrait acétate d'éthyle.....	123
IV.3.1. Fractionnement.....	124
IV.3.2. Purification.....	125
IV.3.2.1. Purification de la fraction F-2.....	125
IV.3.2.2. Purification de la fraction F-3.....	125
IV.3.2.3. Purification de la fraction F-4.....	126
IV.3.2.4. Purification de la fraction F-5.....	127
IV.4. Etude de l'extrait <i>n</i> -butanolique.....	127
IV.4.1. Fractionnement.....	127
IV.4.2. Purification.....	128
IV.4.2.1. Purification de la fraction F-2.....	128
IV.4.2.2. Purification de la fraction F-3.....	129
IV.4.2.3. Purification de la fraction F-4.....	129
IV.4.2.4. Purification de la fraction F'-6.....	130
IV.5. Composés isolés de l'espèce <i>Ononis mitissima</i>	130

Activités biologiques

IV.6. Matériel et méthodes.....	134
IV.6.1. Matériel végétal.....	134
IV.6.2. Dosage des polyphénols totaux.....	134
IV.6.3. Dosage des flavonoïdes.....	134
IV.6.4. Evaluation de l'activité anti-oxydante.....	135
IV.6.4.1. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	135
IV.6.4.2. Activité anti-oxydante par peroxyde d'hydrogène.....	136
IV.6.4.3. Pouvoir réducteur du fer (FRAP).....	136
IV.6.4.4. Test de phosphomolybdate (PPM).....	137
IV.6.4.5. Test de dosage par le thiocyanate de fer (FTC).....	137
IV.6.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	138
IV.6.6. Evaluation de l'activité anti-hémolytique.....	138
Références bibliographiques.....	140

Introduction

Introduction

Les plantes médicinales ont toujours joué un rôle de grande importance dans la santé humaine [1]. À l'heure actuelle, les substances chimiques issues du métabolisme secondaire qu'elles contiennent, sont encore le premier réservoir de nouveaux médicaments, en raison de leurs diverses activités biologiques (anti-oxydante, anti-inflammatoire, anticancéreuse, anti-hémolytique, antimicrobienne... etc). Elles représentent près de 60 % des médicaments dont nous disposons [2]. Les 40 % restants sont souvent issus de la synthèse chimique de molécules ou parties de molécules naturelles prises comme tête de séries [3]. Selon un rapport de l'OMS, plus de 80 % de la population mondiale utilise les plantes médicinales pour traiter diverses maladies [4].

L'utilisation des plantes à des fins thérapeutiques en Afrique dont l'Algérie est une partie intégrante de la culture et de la tradition [5]. Cependant, cette utilisation empirique ne suit pas des règles précises et ne tient pas compte des réelles nécessités de la thérapeutique actuelle.

De nombreuses recherches à travers le monde se sont orientées vers la valorisation de la flore par la découverte de substances naturelles douées d'activités biologiques. Le travail de recherche qui m'a été confié rentre dans ce contexte et est axé principalement sur l'étude de la composition chimique et l'évaluation des propriétés anti-oxydante, anti-inflammatoire et anti-hémolytique d'une plante locale nommée *Ononis mitissima*, appartenant à la famille Fabaceae. Cette large famille qui regroupe plus de 770 genres dont *Ononis* et environ 19500 espèces [6], est connue par sa richesse en divers métabolites secondaires comme les alcaloïdes [7-9], les saponosides [10,11] et les flavonoïdes, particulièrement les isoflavonoïdes [12,13].

Une investigation chimique antérieure réalisée au sein de notre laboratoire sur une plante du même genre appelée *Ononis pusilla*, a abouti à l'isolement et la caractérisation de quatre dérivés d'acide anthranilique dont trois nouveaux et six flavonoïdes [14]. Par ailleurs, l'espèce *Ononis mitissima* n'a fait l'objet d'aucune étude chimique et évaluation biologique antérieures.

Ce travail de recherche sera présenté en quatre chapitres :

Le premier chapitre concerne une étude bibliographique exhaustive sur la composition chimique du genre *Ononis*. Etude qui montre sa richesse en divers métabolites secondaires d'intérêt biologique comme les dérivés de l'acide anthranilique et du résorcinol, les ptéocarpanes, les flavonoïdes, les isocoumarines, les triterpénoïdes et autres lactones aromatiques [15-21].

Le deuxième chapitre est consacré aux résultats personnels obtenus à l'issue de l'investigation chimique de l'espèce *O. mitissima*. Cette partie de la thèse décrit l'isolement, la purification et la caractérisation des produits naturels issus des extraits AcOEt et *n*-BuOH.

Le troisième chapitre présente l'analyse quantitative du contenu en polyphénols et flavonoïdes ainsi que l'évaluation biologique à travers les activités antioxydante, anti-inflammatoire et anti-hémolytique, de trois extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH de la plante. L'évaluation de l'activité anti-oxydante a été réalisée par plusieurs tests *in vitro* (Piégeage du radical libre DPPH, test de la capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène, test du pouvoir réducteur du fer, test du phosphomolybdate et test de dosage du thiocyanate de fer). L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des trois extraits et du médicament de référence, en l'occurrence le diclofénac, a été évaluée par un essai de dénaturation de l'albumine d'œuf. L'activité anti-hémolytique a été évaluée par le test de fragilité osmotique des érythrocytes.

Le quatrième chapitre reproduit le matériel ainsi que les différentes méthodes chromatographiques, spectroscopiques et biologiques utilisées pour mener à bien ce travail.

Chapitre I

Rappel bibliographique

I.1. Famille Fabaceae

Avec environ 770 genres et 19 500 espèces, la famille Fabaceae qui se situe chez les Angiospermes, est la troisième plus grande famille après celles des Asteraceae et Orchidaceae [6]. Selon APGL, La nouvelle classification de la famille Fabaceae montre leur division en six sous-familles : Cercidoideae avec 12 genres et 335 espèces, Detarioideae avec 84 genres et 760 espèces, Duparquetioideae avec 1 genre et 1 espèce, Dialioideae avec 17 genres et 85 espèces, Caesalpinioideae avec 148 genres et 4400 espèces et Papilionoidea avec 503 genres et 14000 espèces [22]. Elle s'étend des zones froides aux zones tropicales et tempérées [23].

Cette famille est représentée par des plantes herbacées, annuelles ou vivaces, lianes ou plantes volubiles, arbustes et même arbres, souvent de nodules racinaires fixateurs de l'azote atmosphérique grâce à une symbiose entre des bactéries du genre *Rhizobium* et différentes espèces de Légumineuses ou Fabaceae [23,24].

La position systématique de cette famille se présente comme suit [22] :

Règne :	Plantae	
Embranchement :	Spermatophyta	
Sous-embranchement :	Angiospermae	
Classe :	Eudicotyledonae	
Sous-classe :	Rosidae	
Ordre :	Eurosidiae I	
Sous-ordre :	Fabales	
Famille :	Fabaceae	
Sous-famille :	Cercidoideae	Dialioideae
	Detarioideae	Caesalpinioideae
	Duparquetioideae	Papilionoidea

I.2. Présentation du genre *Ononis*

Le genre *Ononis* qui relève de la famille Fabaceae, est représenté par plus de 75 espèces. Ce genre est largement distribué en Europe, dans les îles de l'Atlantique, en Asie occidentale, en Afrique du Nord et dans la région méditerranéenne [25,26].

I.3. Usage traditionnel et propriétés biologiques du genre *Ononis*

I.3.1. Utilisation en médecine traditionnelle

Les recherches bibliographiques réalisées sur le genre *Ononis* ont montré que de nombreuses espèces de ce genre sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies telles que les infections des voies urinaires et les maladies de la peau [27-29]. Ainsi,

- Les racines de *Ononis spinosa* L. *Ononis arvensis* L. *Ononis hircina* Jacq. et *Ononis antiquorum* L. sont connues pour leur utilisation contre les irritations de la peau, les démangeaisons, les cicatrices et la dermatite [30].
- Les extraits préparés à partir de l'espèce *O. natrix* sont utilisés comme antirhumatismaux, antibactériens, diurétiques, urolithiaques et pour réduire la pression artérielle [15,31,30].
- Dans la médecine populaire jordanienne, les parties aériennes de la plante *Ononis sicula* Desf. et *Ononis hirta* L. sont utilisées contre le cancer et les lésions cutanées [33].
- L'espèce *O. spinosa* L. est utilisée comme remède populaire contre des maladies des voies urinaires, l'eczéma, les affections cutanées ainsi que pour la cicatrisation des plaies [34,35].
- La décoction des racines de l'espèce *Ononis natrix* L. est employée pour traiter l'arthrite rhumatoïde, les problèmes de prostate, les coliques néphrétiques et les troubles digestifs ainsi que la constipation [36].
- Les parties aériennes de *Ononis arvensis* L. sont utilisées pour traiter les infections des voies urinaires et les maladies de la peau [16].

I.3.2. Propriétés biologiques

Plusieurs études montrent qu'un certain nombre d'espèces du genre *Ononis* sont connues pour leurs activités biologiques : antimicrobienne [37-40], antioxydante [37-41], anti-inflammatoire et effet de cicatrisation [40,42-43], cytotoxique [44-45], analgésique [30,41], antiprolifératrice [29,46], antifongiques et antibiofilme [46,47]. Ainsi,

- L'étude de quatre fractions de *O. pubescens* a révélé des activités anti-oxydantes, et la majorité des fractions organiques étudiées inhibe les souches microbiennes pertinentes validant ainsi son utilisation populaire dans le traitement des infections des voies respiratoires supérieures [39].

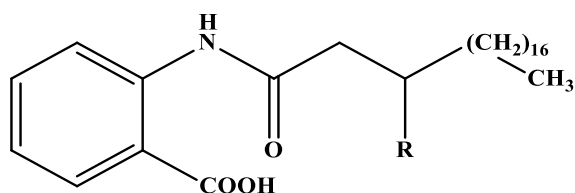
- Des études pharmacologiques ont montré que l'espèce *Ononis spinosa* est considérée comme une plante médicinale prometteuse disposant d'un large éventail d'activités pharmacologiques (diurétique, antimicrobienne, anti-inflammatoire, analgésique, anti-oxydante, dermatologique, anticancéreuse et hépatoprotectrice) qui pourrait être utilisée dans plusieurs applications médicales en raison de son efficacité [40].
- Des résultats expérimentaux ont révélé que les solutions aqueuses et éthanolique des extraits des parties aériennes de *O. macrosperma* ont montré un effet de cicatrisation et une activité anti-inflammatoire [42]. De même pour l'extrait d'acétate d'éthyle préparé à partir de racines de l'espèce *O. spinosa* subsp. *leiosperma* [43].
- Les résultats d'étude d'activités antifongiques et antibiofilme de l'extrait méthanolique obtenu à partir de l'espèce *O. spinosa*, ont montré que l'extrait exerce une activité antifongique par perturbation de la biosynthèse de l'ergostérol et par modulation de la perméabilité de la membrane cellulaire [34] et un potentiel anti-biofilm [47].
- *Ononis viscosa* a montré une activité antibactérienne contre les bactéries Gram (+) [48].

I.4. Travaux antérieurs sur le genre *Ononis*

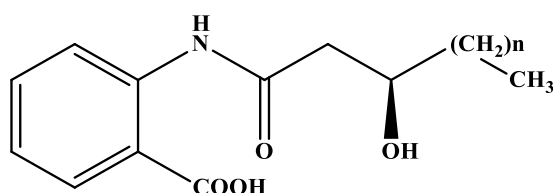
Les études phytochimiques antérieures réalisées sur diverses espèces du genre *Ononis* montrent que ces dernières contiennent divers métabolites : sucres, tannins, saponines, lectines, flavonoïdes, acides phénoliques, huiles essentielles, stérols, substances triterpéniques, acides anthraniliques, dérivés de résorcinol, lactones aromatiques et coumarines [15-21].

I.4.1. Acides anthraniliques

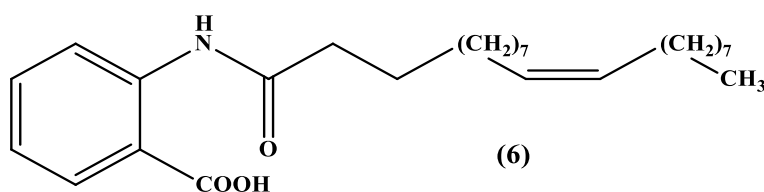
Nom de l'espèce	Composés identifiés	Réf.
<i>Ononis natrix</i>	(1) acide N-arachidylanthranilique (2) acide N-β-hydroxyarachidylanthranilique	[33,49,50]
<i>Ononis pusilla</i>	(3) acide N-(R)-3'-hydroxydocosanoylanthranilique (4) acide N-(R)-3'-hydroxytricosanoylanthranilique (5) acide N-(R)-3'-hydroxytétracosanoylanthranilique	[14]
<i>Ononis viscosa</i> subsp. <i>breviflora</i>	(6) acide N-13'-docosénoylanthranilique	[51,52]



	R
(1)	H
(2)	OH

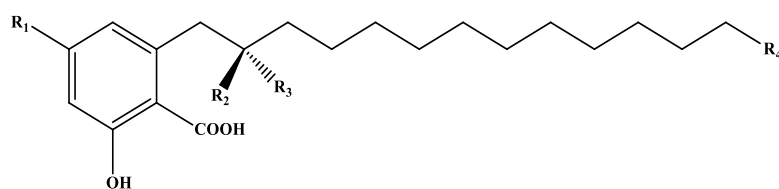


	n
(3)	18
(4)	19
(5)	20

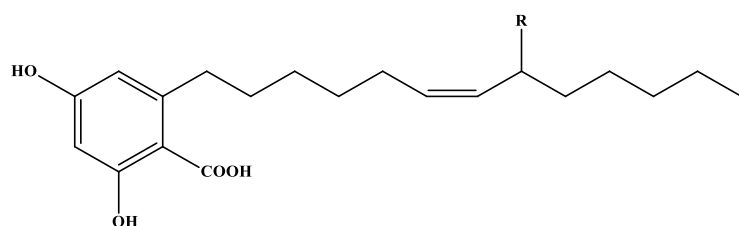


I.4.2. Acides phénoliques

Nom de l'espèce	Composés identifiés	Réf.
<i>Ononis viscosa</i> subsp. <i>breviflora</i>	(7) acide 2,4-dihydroxy-6-(2-oxotridecyl) benzoïque (8) acide 2,4-dihydroxy-6-(2-acétoxytridecyl) benzoïque (9) acide 2,4-dihydroxy-6-(13-hydroxy-2-acétoxytridecyl) benzoïque (10) acide 2-hydroxy-4-méthoxy-6-(13-hydroxy-2-oxotridecyl) benzoïque	[51,52]
<i>O. natrix</i>	(11) acide 2-hydroxy-4-méthoxy-6-(2-oxotridecyl) benzoïque	[53]
<i>O. speciosa</i>	(12) acide 2,4-dihydroxy-6-(pentadec-8Z-ényl) benzoïque (13) acide 2,4-dihydroxy-6-(10-acétoxy-pentadec-8Z-ényl) benzoïque	[54,55]



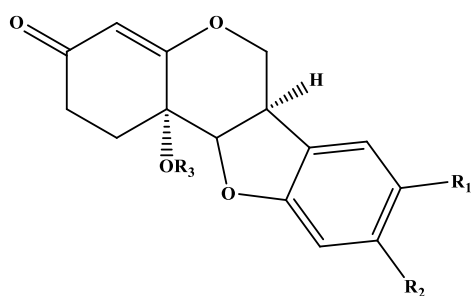
	R1	R2	R3	R4
(7)	OH	O	O	H
(8)	OH	OAc	H	H
(9)	OH	OAc	H	OH
(10)	OMe	O	O	OH
(11)	OMe	O	O	H



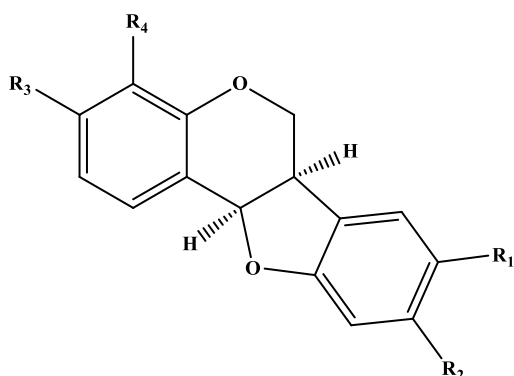
	R
(12)	H
(13)	OAc

I.4.3. Ptérocarpanes

Nom de l'espèce	Composés identifiés	Réf.
<i>Ononis viscosa</i> subsp. <i>breviflora</i>	(14) 11b-hydroxy-11b, 1-dihydromédicarpine (15) 11b-hydroxy-11b, 1-dihydromaakiaine (16) médicarpine (17) maakiaine	[51,52]
<i>Ononis spinosa</i>	(18) 3-O-β-D-glucoside 6''-O-piperidin-2-ylacetatemaackiaïn (19) 3-O-β-D-glucoside 6''-O-piperidin-2-ylacetatemédicarpine	[56]
<i>Ononis vaginalis</i>	(20) 3,4-di-O-β-D-gluco-pyranosyl-4-hydroxymédicarpine	[57]
<i>Ononis angustissima</i>	(21) (-)-trifolirhizine (22) (-)-trifolirhizine-6'-O-malonate	[58]



	R ₁	R ₂	R ₃
(14)	H	OMe	H
(15)	OCH ₂ O		H

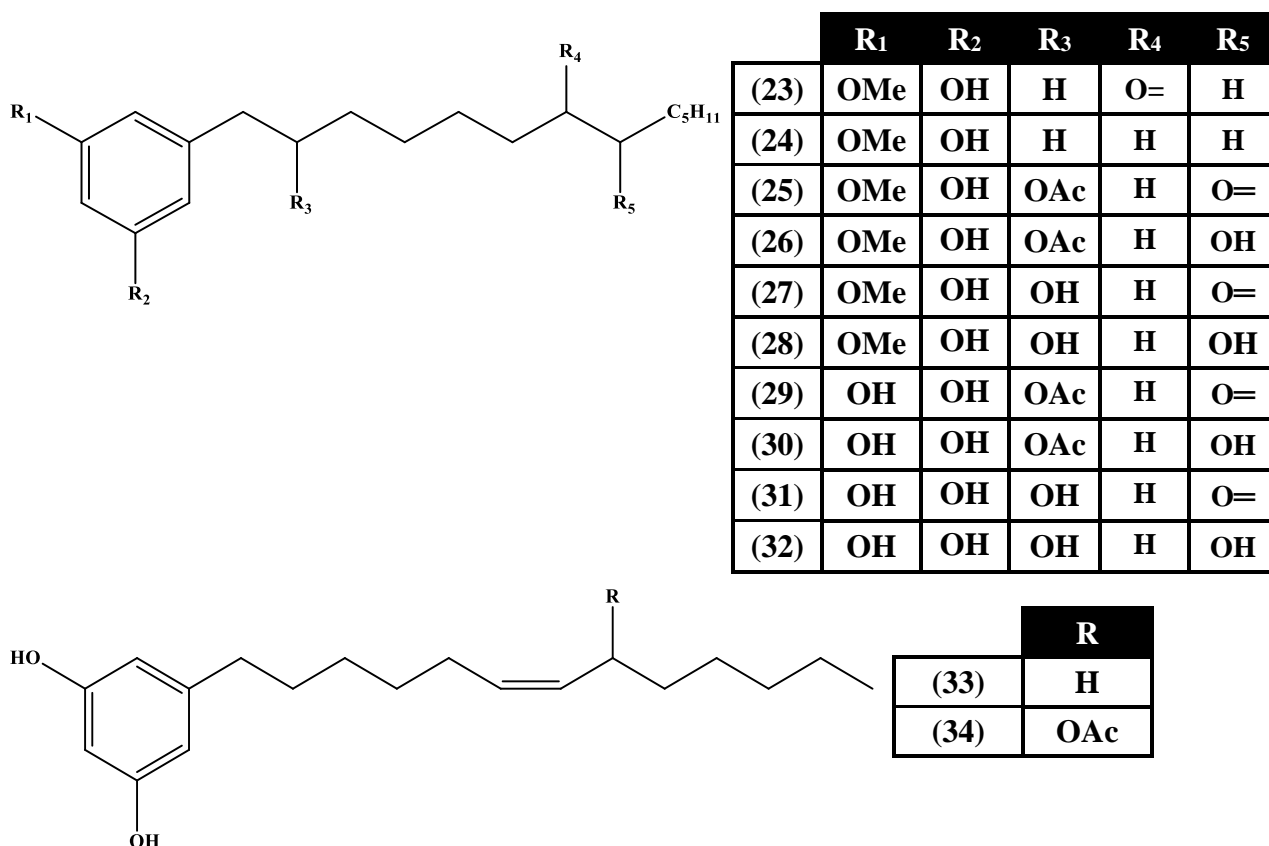


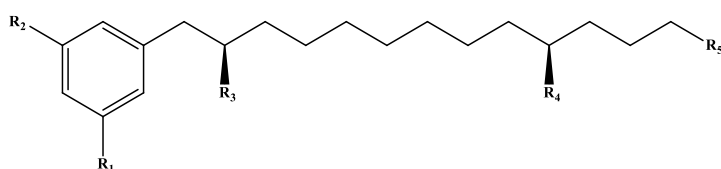
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(16)	H	OMe	OH	H
(17)	OCH ₂ O		OH	H
(18)	OCH ₂ O		pipéridine-2-ylacétate	H
(19)	H	OMe	pipéridine-2-ylacétate	H
(20)	H	OMe	glu	
(21)	OCH ₂ O		Oglu	H
(22)	OCH ₂ O		O-6'-malonate-glu	H

I.4.4. Dérivés de résorcinol

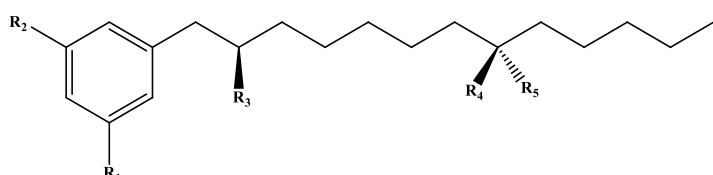
Nom de l'espèce	Composés identifiés	Réf.
<i>Ononis natrix</i>	(23) 5-(7'-Oxotridecyl)-3-methoxyphenol (24) 1-O-méthyl-5-(tridecyl) résorcinol	[53]

<i>Ononis natrix</i>	(25) 1- <i>O</i> -méthyl-5-(2-acétoxy-8-oxotridecyl) résorcinol (26) 1- <i>O</i> -méthyl-5-(2-acétoxy-8-hydroxytridecyl) résorcinol (27) 1- <i>O</i> -méthyl-5-(2-hydroxy-8-oxotridecyl) résorcinol (28) 1- <i>O</i> -méthyl-5-(2-8-dihydroxytridecyl) résorcinol (29) 5-(2-acétoxy-8-oxotridecyl) résorcinol (30) 5-(2-acétoxy-8-hydroxytridecyl) résorcinol (31) 5-(2-hydroxy-8-oxotridecyl) résorcinol (32) 5-(2,8-dihydroxytridecyl) résorcinol	[33,49,50]
<i>Ononis speciosa</i>	(33) 5-(pentadec-8 <i>Z</i> -ényl) résorcinol (Cardolmonoène) (34) 5-(10-acétoxy-pentadec-8 <i>Z</i> -ényl) résorcinol	[54,55]
<i>Ononis viscosa</i> <i>subsp. brevisflora</i>	(35) 1- <i>O</i> -méthyl-5-(13-hydroxytridecyl) résorcinol (36) 5-(2,13-dihydroxytridecyl) résorcinol (37) 1- <i>O</i> -méthyl-5-(2-acétoxy-13-hydroxytridecyl) résorcinol (38) 1- <i>O</i> -méthyl-5-(10-hydroxytridecyl) résorcinol (39) 5-(2-acétoxytridecyl) résorcinol (40) 5-(2-hydroxy-8-oxotridecyl) résorcinol (41) 1- <i>O</i> -méthyl-5-(2,8-dihydroxytridecyl) résorcinol	[51,52]





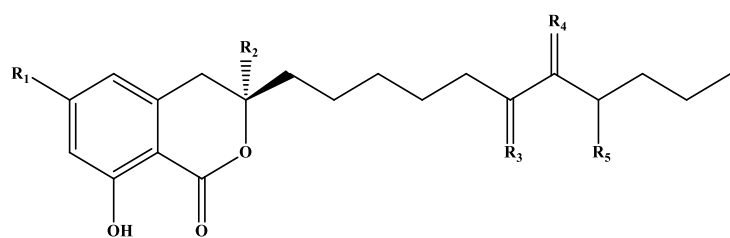
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(35)	OMe	OH	H	H	OH
(36)	OH	OH	OH	H	OH
(37)	OMe	OH	OAc	H	OH
(38)	Me	OH	H	OH	H



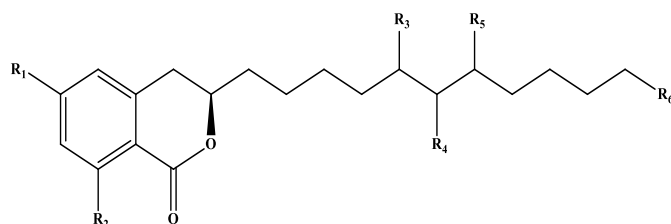
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(39)	OH	OH	OAc	H	H
(40)	OH	OH	OH	O=	
(41)	OH	OMe	OH	H	OH

I.4.5. Dihydroisocoumarine

Nom de l'espèce	Composés identifiés	Réf.
<i>Ononis natrix</i>	(42) (3R)-6,8-dihydroxy-3-(7'-oxoundecyl)-3,4- dihydroisocoumarine	[53]
	(43) (3R)-6,8-dihydroxy-3-(8'-hydroxyundecyl)-3,4- dihydroisocoumarine	
	(44) (3R)-3,8-dihydroxy-6-methoxy-3-undecyl-3,4- dihydroisocoumarine	
	(45) (3R)-6,8-dihydroxy-3-(6-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarin (3R)-6,8-dihydroxy-3-(6-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine	
	(46) (3R)-8-hydroxy-3,6-dimethoxy-3-undecyl-3,4-dihydroisocoumarine	
	(47) (3R)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-undecyl-3,4-dihydroisocoumarine	
	(48) (3R)-6,8-dihydroxy-3-undecyl-3,4-dihydroisocoumarine	
	(49) (3R)-6,8-dihydroxy-3-(6-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine	
	(50) (3R)-6,8-dihydroxy-3-(6-hydroxyundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine	
	(51) (3R)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(6-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine	[51,52]
(52) (3R)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(6-hydroxyundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine		
(53) (3R)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-undecyl-3,4-dihydroisocoumarine		
(54) (3R)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(11-hydroxyundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine		
(55) (3S)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(7-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine		
(56) (3R)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(6-hydroxy-5-oxoundecyl)-3,4-dihydroisocoumarine	[51,52]	
(57) (3R)-8-hydroxy-6-méthoxy-3-(6-hydroxy-5-oxotridecyl)-3,4-dihydroisocoumarine		



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(42)	OH	H	H ₂	O	H
(43)	OH	H	H ₂	H ₂	OH
(44)	OMe	OH	H ₂	H ₂	H
(45)	OH	H	O	H ₂	H
(46)	OMe	OMe	H ₂	H ₂	H

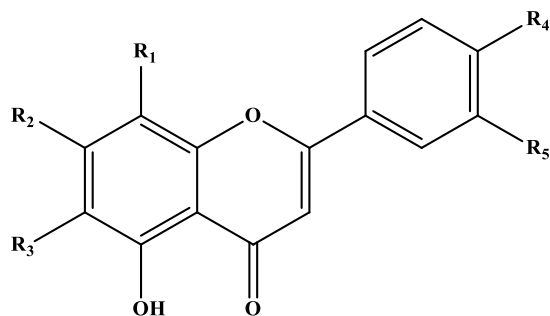


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
(47)	OH	OMe	H	H	H	H
(48)	OH	OH	H	H	H	H
(49)	OH	OH	H	O=	H	H
(50)	OH	OH	H	OH	H	H
(51)	OH	OMe	H	O=	H	H
(52)	OH	OMe	H	OH	H	H
(53)	OMe	OH	H	H	H	H
(54)	OMe	OH	H	H	H	OH
(55)	OMe	OH	Me	H	H	H
(56)	OMe	OH	O=	OH	OH	H
(57)	OMe	OH	O=	OH	OH	C ₂ H ₅

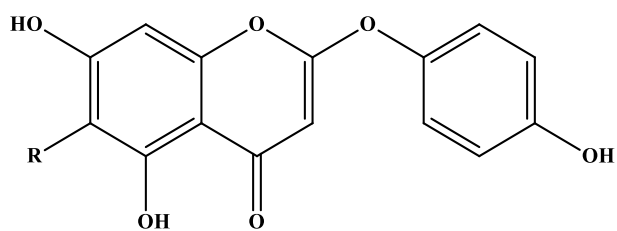
I.4.6. Flavones, isoflavones, chalcones et aurones

Nom de l'espèce	Composés identifiés	Réf.
<i>Ononis natrix</i>	(58) 5-hydroxy-6,7,8,3',4'-pentaméthoxyflavone (59) 5,7-dihydroxy-8,3',4'-triméthoxyflavone (60) 5,4'-dihydroxy-6,7-diméthoxyflavone (cirsimaritine) (61) 5,7-dihydroxy-6,8,3',4'-tétraméthoxyflavone (hyménoxine) (62) 5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavone (genkwanine) (63) 5,3'-dihydroxy-6,7,8,4'-tétraméthoxyflavone (64) 5,4'-dihydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone (xanthomicrol) (65) 5,7,4'-trihydroxy-6-méthoxyflavone (hispiduline)	[33,49,50]
<i>Ononis angustissima</i> L.	(66) 5-hydroxy-6,7,8-triméthoxyflavone (alnétine) (67) 5-hydroxy-6,7-diméthoxyflavone (6,7-di-O-methylbaicaleine) (68) 5,6-dihydroxy-7-méthoxyflavone (neglétéine) (69) 5,7-dihydroxyflavone (chryisine)	[59,60]

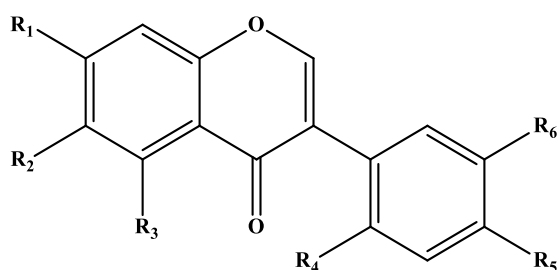
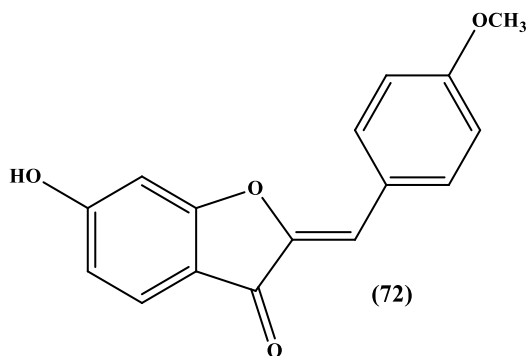
	(70) 2',4'-dihydroxychalcone (71) 2'-hydroxychalcone (72) 6-hydroxy-4'-méthoxyaurone	
	(73) 3-(4-(glucopyranosyloxy)-5-hydroxy-2-methoxyphenyl)-7-hydroxy-4H-chromen-4-one (74) 7-hydroxy-4'-methoxyisoflavone (formononétine) (75) 4'-methoxyisoflavone 7-O-β-D-glucopyranoside (ononine)	[58]
<i>Ononis spinosa</i> . L (racines)	(76) 7-hydroxy-3',4'-methylenedioxyisoflavone (pseudobaptigénine) (77) 4', 5, 7-trihydroxy-isoflavone (genistéine) (78) 5, 7-dihydroxy-4'-méthoxyisoflavone (biochanine A) (79) 4', 7-dihydroxy-6-méthoxyisoflavone (tectorigénine) (80) 7-hydroxy-2', 4'-diméthoxyisoflavone (sativanone) (81) 7-hydroxy-2'-méthoxy-3',4'-methylenedioxyisoflavone (onogénine)	[56]
<i>Ononis serrata</i>	(82) 2-(<i>p</i> -hydroxyphénoxy)-6-méthoxy-5,7-dihydroxy-chromone (capillarisine) (83) 2-(<i>p</i> -hydroxyphénoxy)-5,7-dihydroxy-chromone (6-déméthoxycapillarisine)	[61]
<i>Ononis spinosa</i>	(84) 7-O-β-D-glucoside 6''-O-pipéridine-2-ylacétateformononétine (85) 7-O-β-D-glucoside 6''-O-pipéridine-2-ylacétate pseudobaptigénine (86) 7-O-β-D-glucoside 6''-O-pipéridine-2-ylacétatesativanone (87) 7-O-β-D-glucoside 6''-O-pipéridine-2-ylacétateonogénine	[56]
<i>Ononis vaginalis</i>	(88) 3-O-[2-O-(<i>E</i>)- <i>p</i> -coumaroyl-β-D-galactopyranosyl]-7-O-β-D-glucopyranosylkaempférol	[57]



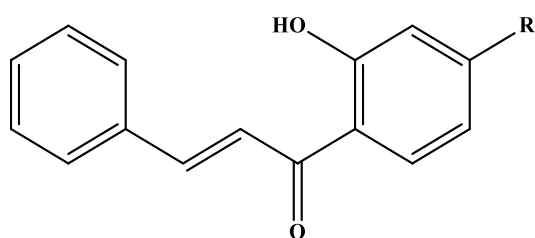
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
(58)	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe
(59)	OMe	OH	H	OMe	OMe
(60)	H	OMe	OMe	OH	H
(61)	OMe	OH	OMe	OMe	OMe
(62)	H	Me	H	OH	H
(63)	OMe	OMe	OMe	OMe	OH
(64)	OMe	OMe	OMe	OH	H
(65)	H	OH	OMe	OH	H
(66)	OMe	OMe	OMe	H	H
(67)	H	OMe	OMe	H	H
(68)	H	OMe	OH	H	H
(69)	H	OH	H	H	H



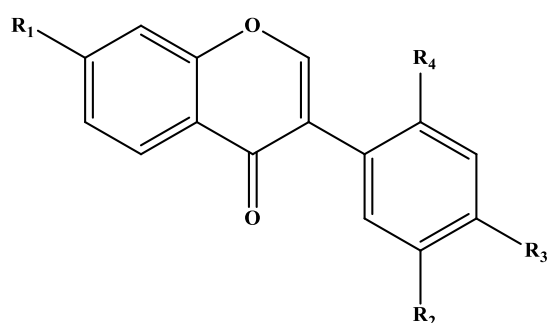
	R
(70)	OH
(71)	H



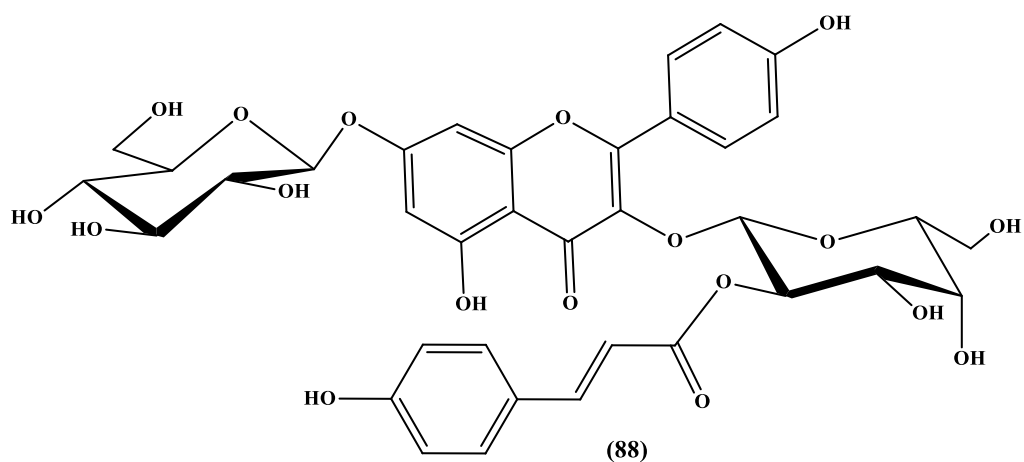
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
(73)	OH	H	H	OMe	OGlu	OH
(74)	OH	H	H	H	OMe	H
(75)	OGlu	H	H	H	OMe	H
(76)	OH	H	H	H	OCH ₂ O	
(77)	OH	H	OH	H	OH	H
(78)	OH	H	OH	H	OMe	H
(79)	OH	OMe	OH	H	OH	H
(80)	OH	H	H	OMe	OMe	H
(81)	OH	H	H	OMe	OCH ₂ O	



	R
(82)	OMe
(83)	H

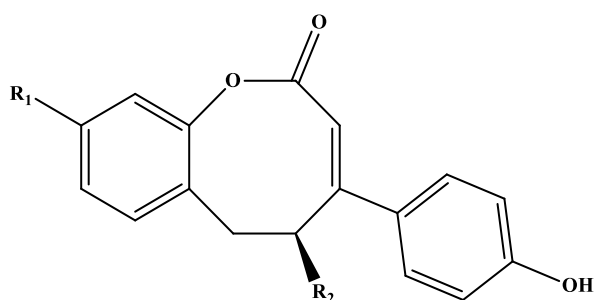


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
(84)	pipéridine-2-ylacétate	H	OMe	H
(85)	pipéridine-2-ylacétate	OCH ₂ O		H
(86)	pipéridine-2-ylacétate	H	OMe	OMe
(87)	pipéridine-2-ylacétate	OCH ₂ O		OMe

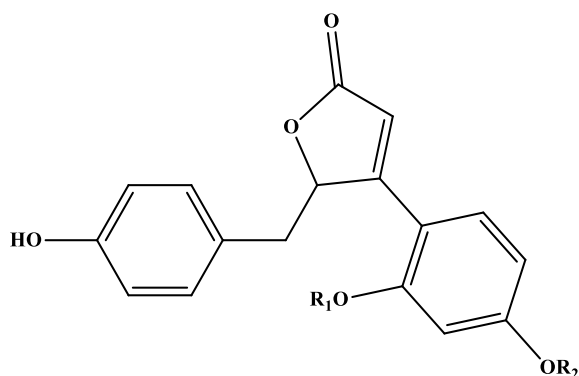


I.4.7. Lactones aromatiques

Nom de l'espèce	Composés identifiés	Réf.
<i>Ononis speciosa</i>	(89) spécionine (90) spécionine 5-O-β-D-glucopyranoside (91) spécionine 9-O-β-D-glucopyranoside	[53-55]
<i>Ononis angustissima</i>	(92) (+)-puerol A-2'-O-β-D-glucose (93) (-)-puerol B-2'-O-β-D-glucopyranose ((-)-sophoraside A) (94) (+)-puerol A	[58]



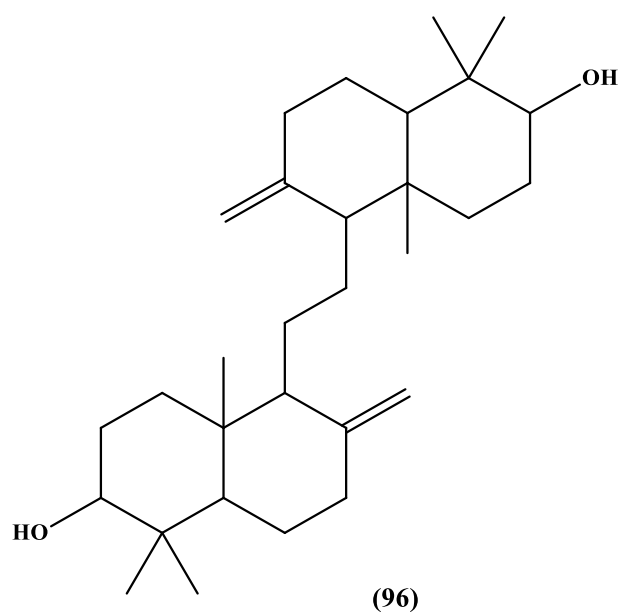
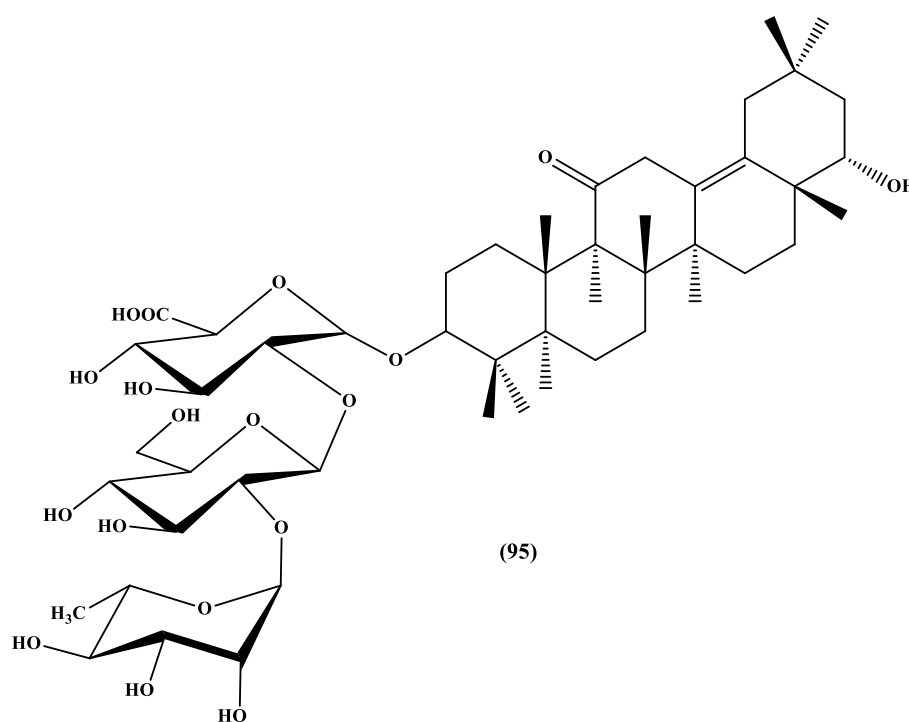
	R ₁	R ₂
(89)	OH	OH
(90)	OH	OGlu
(91)	OGlu	OH



	R ₁	R ₂
(92)	Glu	H
(93)	Glu	Me
(94)	H	H

I.4.8. Saponines, triterpènes

Nom de l'espèce	Composés identifiés	Réf.
<i>Ononis spinosa</i>	(95) 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosyl]-3 β ,22 α -dihydroxyoléane-13-ène-11-one	[20, 56]
<i>Ononis pusilla</i>	(96) α -onocérine	[62]



Chapitre II

Etude Phytochimique
de l'espèce *Ononis mitissima*

II.1. Aspect botanique

L'espèce *O. mitissima* est une plante annuelle de 20-60 cm, dressée ou ascendante, glabrescente et non épineuse. Les feuilles de latige sont trifoliolées, courtement pétiolées, à folioles elliptiques-oblongues, fortement nervées avec les florales supérieures simples ou nulles. Les fleurs sont jaunes, petites, en grappes spiciformes denses. Les stipules sont entières, rapprochées en une gaine embrassante et à 2 lobes, plus courtes que le pétiole. Les pédoncules sont très courts, non articulés, calice tubuleux, à lobes égalant le tube, la corolle dépassant peu le calice, gousse égalant le calice, ovoïde, velue, à 3-4 graines petites, tuberculeuses [26] (Figure II.1).



Figure II.1. Espèce *Ononis mitissima* L.

La plante *Ononis mitissima* est classée comme suit [22] :

Famille : Fabaceae (Leguminosae)

Sous-famille : Faboideae

Genre : *Ononis*

Espèce : *Ononis mitissima* L.

II.2. Extraction

800 g de poudre de la plante *O. mitissima* sont soumis à une double macération (2 x 8 L) dans un mélange hydroalcoolique (Ethanol/Eau : 70/30) à température ambiante, avec renouvellement du solvant toutes les 48 heures. L'extrait hydroalcoolique est concentré sous vide à une température de 40 °C. L'extrait aqueux résultant subit une extraction liquide-liquide avec trois solvants à polarité croissante : éther de pétrole, acétate d'éthyle et *n*-butanol. Les phases organiques obtenues sont séchées sur Na₂SO₄ puis évaporées à sec, donnant 3 g d'extrait étheropétrolique, 7,4 g d'extrait acétate d'éthyle et enfin 12,7 g d'extrait butanolique.

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

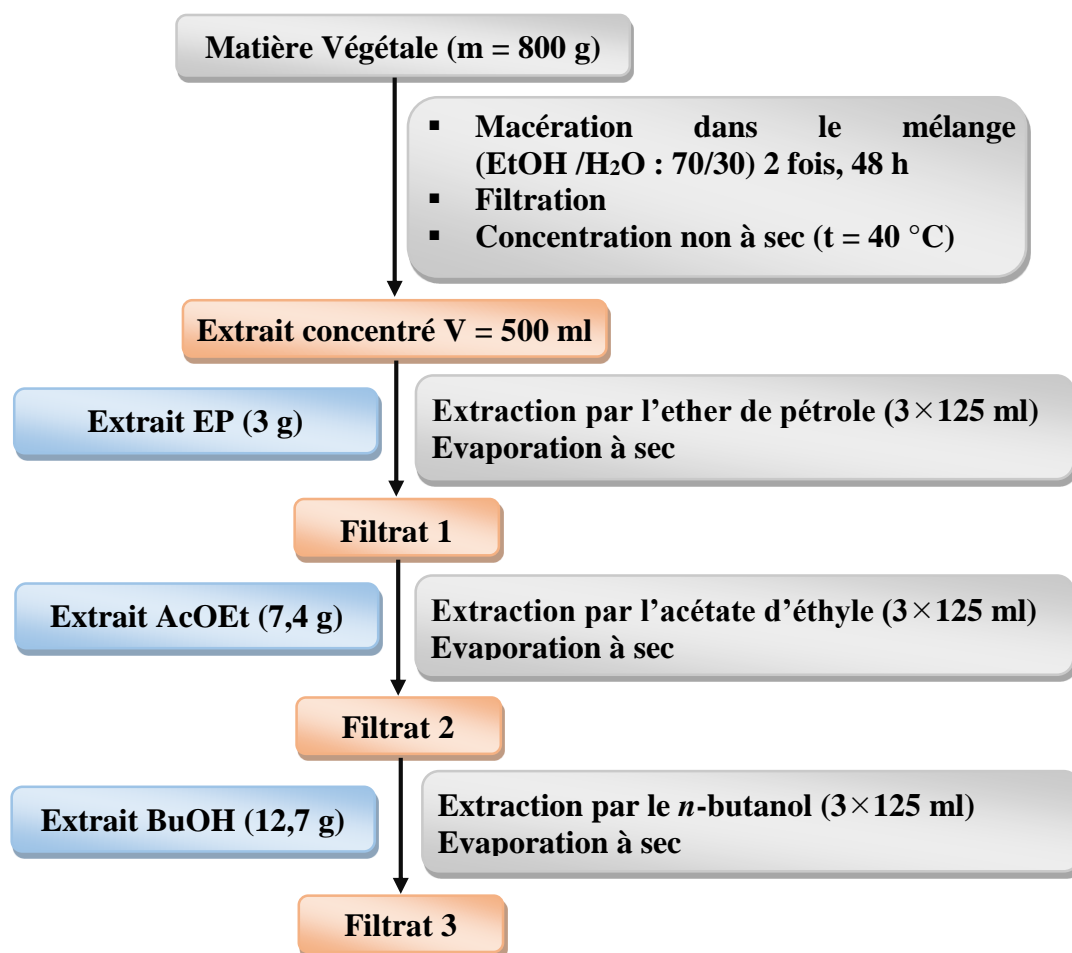


Figure II.2. Schéma d'extraction de la plante *O. mitissima* L.

II.3. Fractionnement et purification des extraits AcOEt et *n*-BuOH

Une analyse CCM a été réalisée sur les trois extraits, en utilisant plusieurs systèmes d'éluion. Elle atteste d'une composition chimique appréciable des extraits AcOEt et *n*-BuOH.

7 g de l'extrait AcOEt ont été soumis à une chromatographie sous vide (VLC) sur gel de silice normale en utilisant des gradients d'éluant EP/AcOEt (100:0 à 0:100), puis AcOEt/MeOH (100:0 à 0:100). Les fractions présentant le même profil chromatographique sur CCM ont été regroupées pour donner huit fractions F1-F8. Ces fractions sont soumises par la suite à des opérations de purification (Figure II.3) utilisant la chromatographie sur colonne de gel de silice normale et la précipitation dans divers solvants. Dix composés (1-10) ont été obtenus.

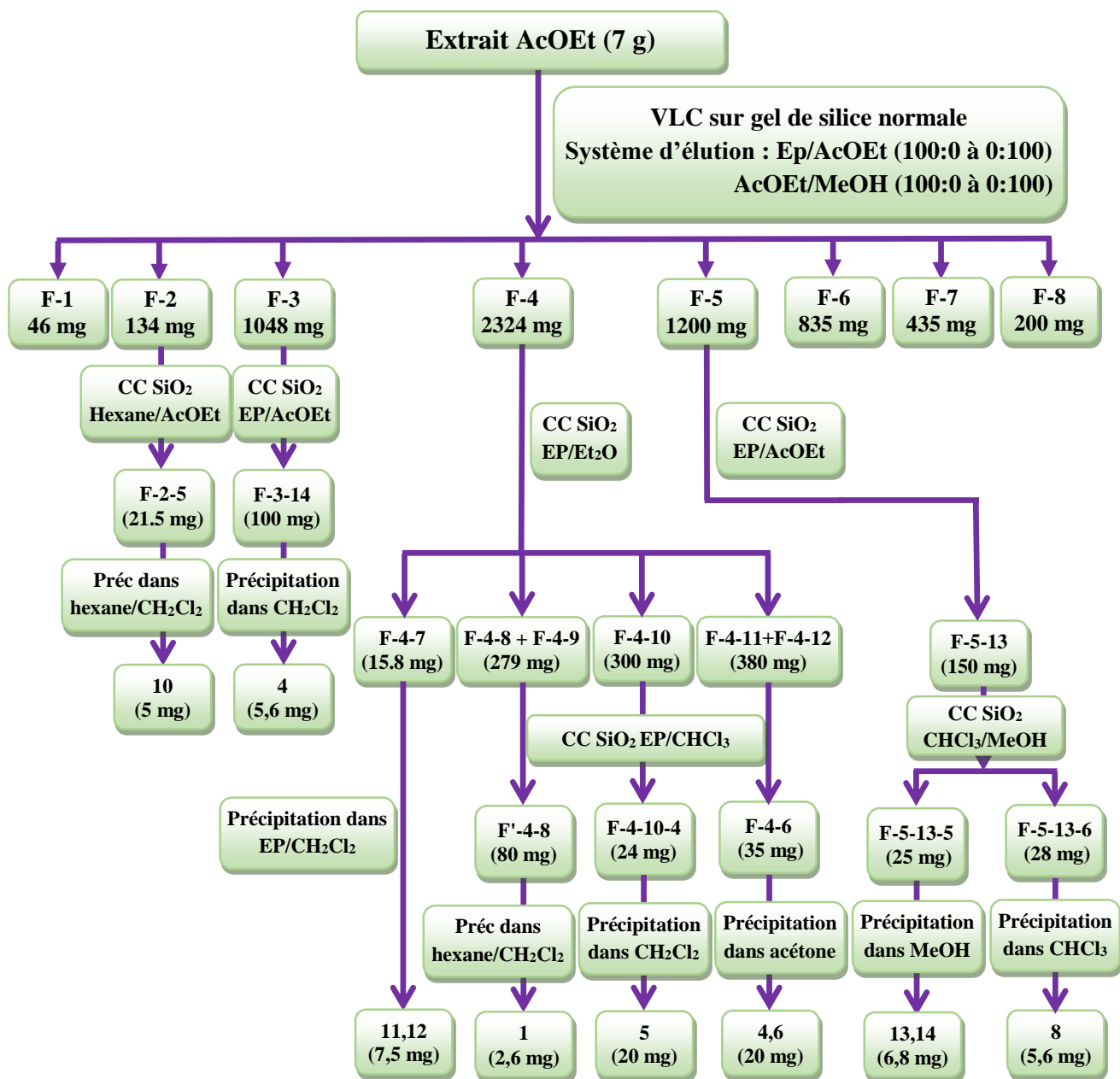


Figure II.3. Schéma de fractionnement et purification de l'extrait AcOEt de l'espèce

Ononis mitissima

7 g de l'extrait butanolique ont été fractionnés par une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice greffée en C-18 avec les gradients d'éluion H₂O/MeOH allant de 100:0 à 0:100. Cette étape a permis d'obtenir 8 fractions F1-F8. Elles sont ensuite soumises à des opérations de purification par chromatographie sur colonnes de gel de silice normale, Polyamide, Sephadex LH-20 et sur plaque préparative et par la précipitation (Figure II.4). Quatre composés ont été ainsi isolés (11-14).

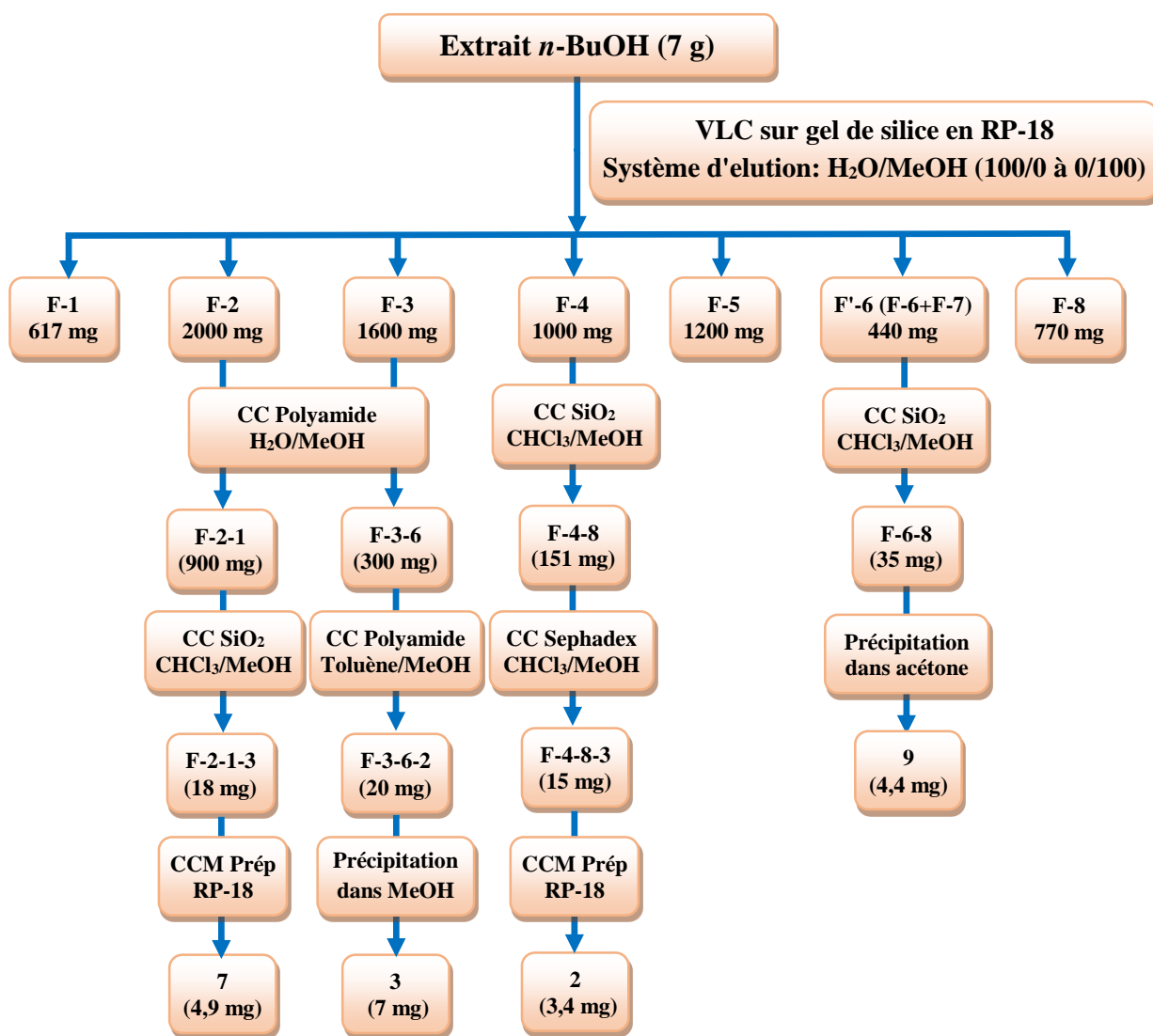
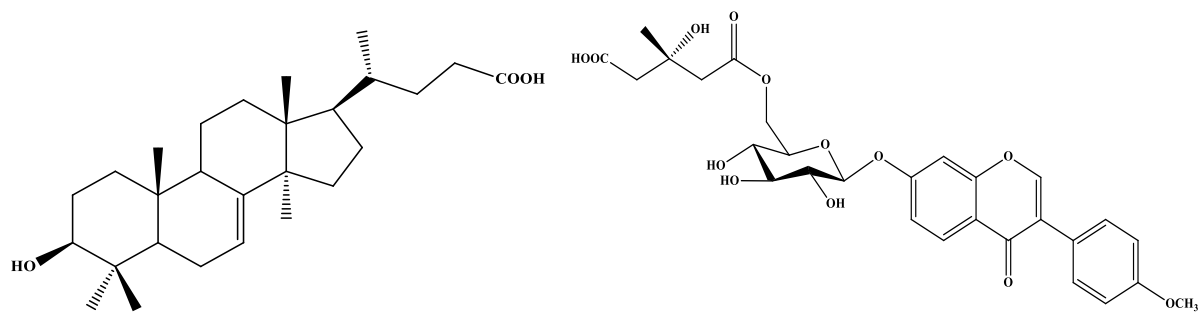


Figure II.4. Schéma de fractionnement et purification de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *Ononis mitissima*

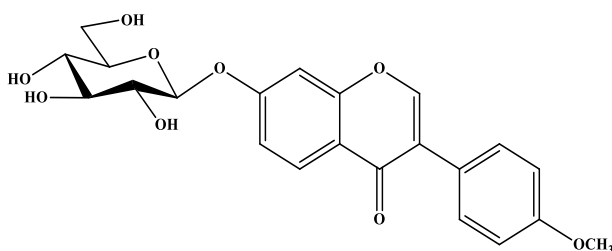
II.4. Identification structurale des composés isolés

Les produits isolés (1-14), reportés ci-après, ont été caractérisés par différentes méthodes spectroscopiques, RMN 1D du proton et du carbone 13, RMN 2D (COSY H-H, HSQC, HMBC et ROESY), spectrométrie de masse à haute résolution HR-ESI-MS, la mesure du pouvoir rotatoire ainsi que par comparaison avec les données de la littérature.

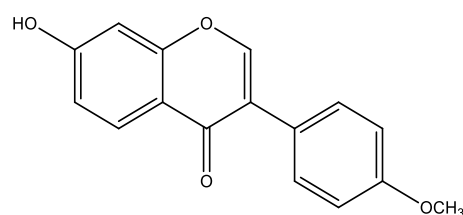


Acide 25, 26, 27-trisnor-3-hydroxy-lanost-7(8)-
èn-24-oïque (1) (nouveau)

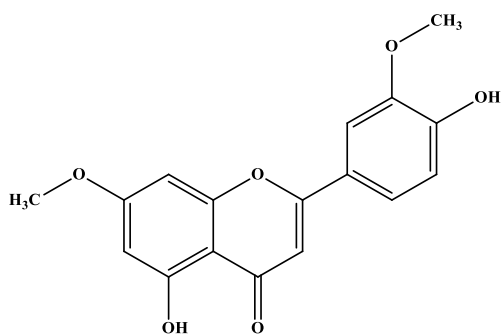
Formononétine-7-*O*-[6'-*O*-((*S*)-3-hydroxy-3-
méthylglutaryl)]-β-D-glucopyranoside (2) (nouveau)



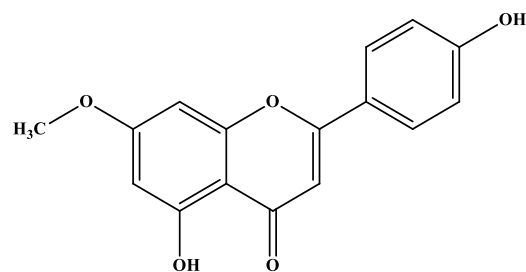
4'-methoxyisoflavone 7-*O*-β-D-
glucopyranoside (Ononine) (3)



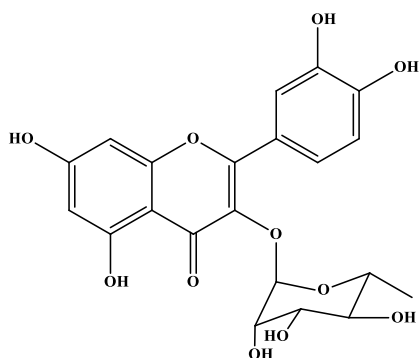
7-hydroxy-4'-methoxyisoflavone
(Formononétine) (4)



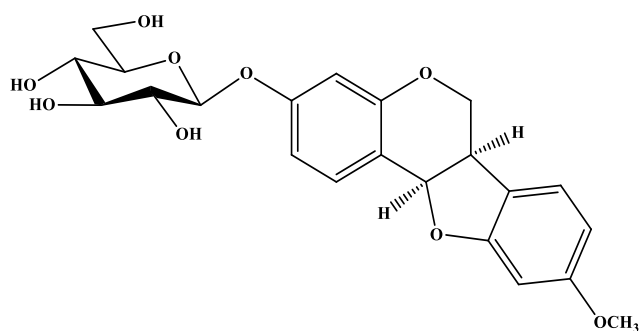
5,4'-dihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone
(Velutine) (5)



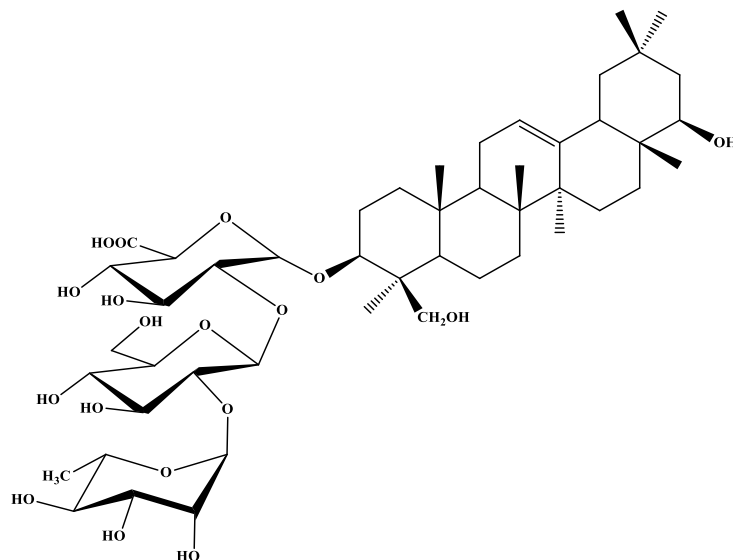
5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavone
(Genkwanine) (6)



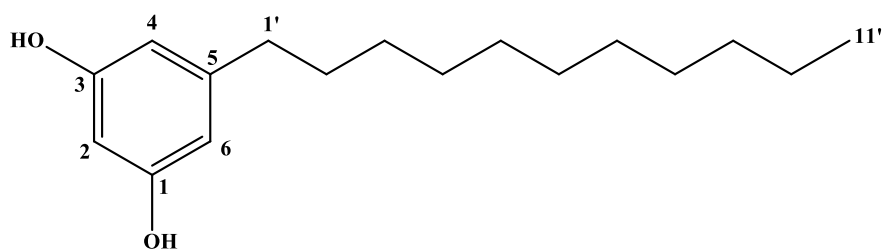
Quercétine 3-*O*-α-rhamnopyranoside
(Quercitrine) (7)



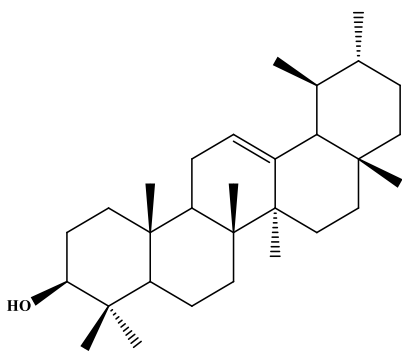
(6*aR*, 11*aR*)-3-*O*-β-D-glucopyranosyl-
médicarpine (8)



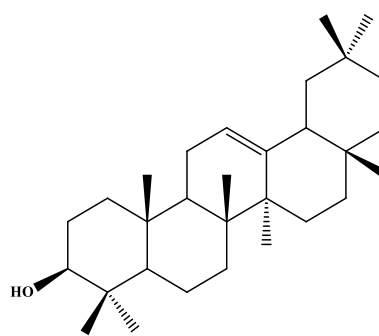
3-O-[\alpha-L-rhamnospyranosyl-(1→2)-\beta-D-glucopyranosyl-(1→2)-\beta-D-glucuronopyranosyl]-22\beta, 24-dihydroxyoléan-12-ène (9)



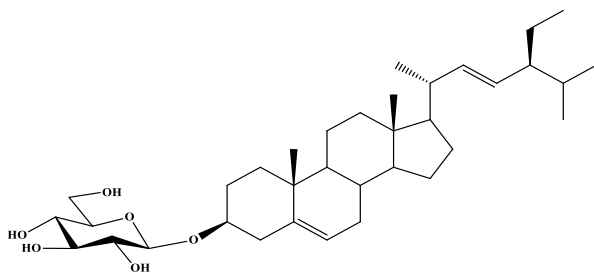
1,3-dihydroxy-5-undecyl résorcinol (10)



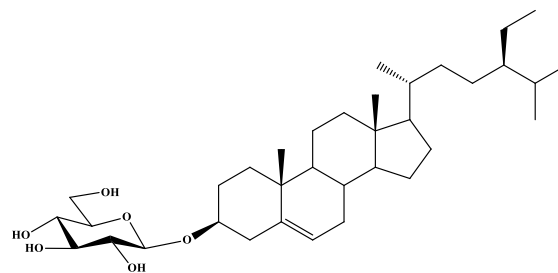
\alpha-amyrine (11)



\beta-amyrine (12)

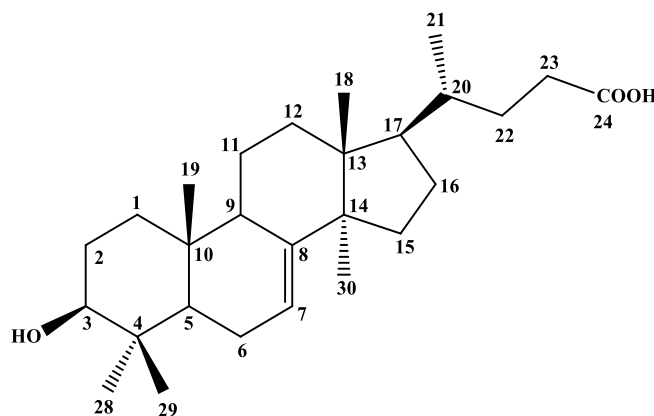


Stigmastérol glucosylé (13)



Daucostérol (\beta-sitostérol-3-O-glucoside) (14)

II.4.1. Elucidation structurale du composé 1



Acide 25,26,27-trisor-3-hydroxy-lanost-7(8)-èn-24-oïque

Le composé **1** est obtenu à l'état d'une poudre blanche, soluble dans un mélange CHCl_3 /méthanol. Invisible à la lumière UV (254 et 366 nm), il se colore en marron après révélation sur CCM par une solution sulfurique et chauffage.

Son spectre de masse à haute résolution (HRESIMS) enregistré en mode négatif (Figure II.5) exhibe un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 415,3206$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calc. 415.3207, $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{O}_3$), suggérant une masse moléculaire égale à 416 uma correspondant à une formule brute en $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$.

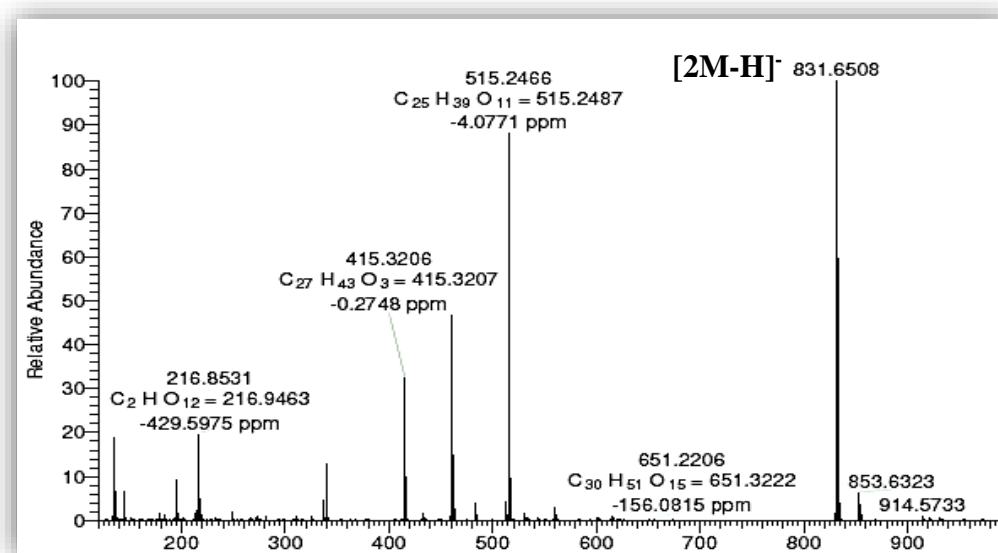


Figure II.5. Spectre HRESIMS (mode négatif) du composé **1**

L'analyse du spectre RMN ^1H du composé **1** enregistré dans le $\text{DMSO}-d_6$ (Figure II.6) permet d'observer les signaux suivants :

- Six signaux d'intégration 3H correspondant à six groupements méthyles, dont cinq signaux résonant sous forme de singulets (δ_H 0,69, 0,75, 0,77, 0,87 et 0,94) et un signal sous forme de doublet (δ_H 0,80, d , $J = 6,4$ Hz).
- Un signal d'intégration 1H à δ_H 3,03 (dt , $J = 10,4 ; 5,0$ Hz) d'un proton porté par un carbone oxyméthine (H-3).
- Un signal doublet d'intégration 1H à δ_H 5,22 (q , $J = 3,2$ Hz) correspondant à un proton éthylénique.

Toutes ces données, ajoutées à la formule brute, sont très caractéristiques d'un triterpène tétracyclique.

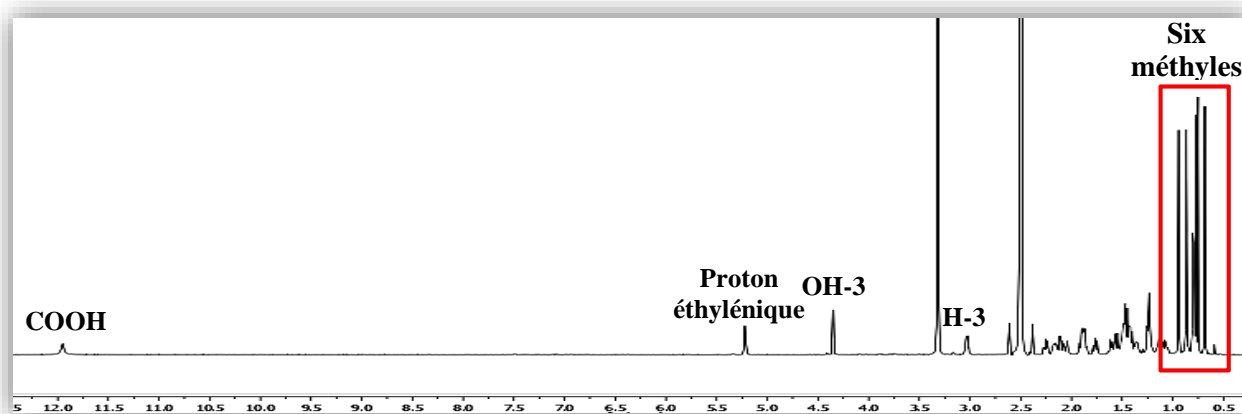


Figure II.6. Spectre RMN ^1H du composé **1** (600 MHz, DMSO- d_6)

Le spectre RMN ^{13}C J -modulé (Figure II.7) permet d'observer 27 signaux attestant la présence de 6 méthyles allant de 12,9 à 27,7 ppm, 9 méthylènes, 6 méthines dont 1 oxyméthine (δ_C 76,9) et 1 éthylénique (δ_C 117,5), ainsi que 6 atomes de carbone quaternaires dont un hybridé en sp^2 (δ_C 145,4) et un carbone de carbonyle d'acide (δ_C 174,7), confirmant ainsi la nature triterpénique du composé.

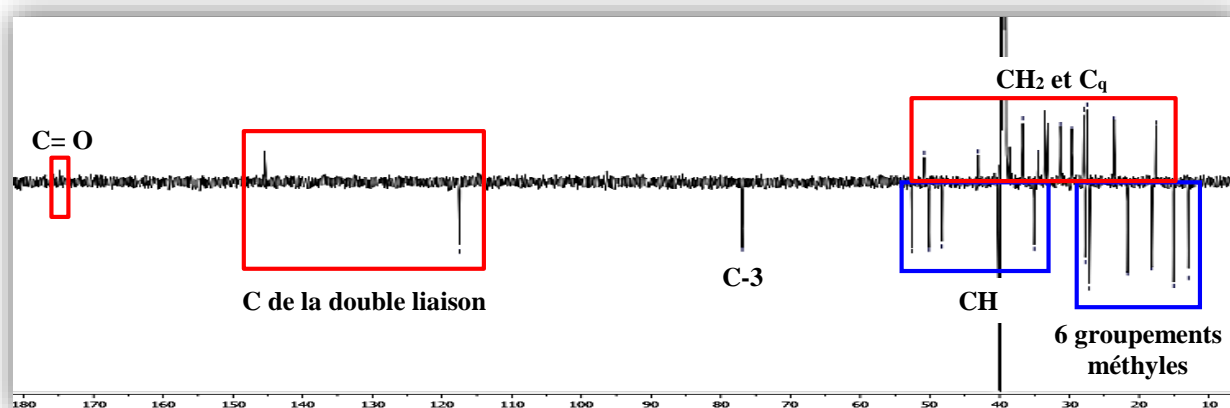


Figure II.7. Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé **1** (150 MHz, DMSO- d_6)

L'identification du squelette triterpénique du composé est basée sur les analyses conjuguées des spectres COSY H-H, HMBC et HSQC. Partant du proton oxyméthine H-3 repéré à δ_H 3,03 (dt , $J = 10,4; 5,0$ Hz, δ_C 76,9), le spectre COSY H-H (Figure II.8) présente des corrélations entre ce dernier et 2 protons équivalents (δ_H 1,48, 2H, m), et un autre proton à δ_H 4,35 (d , $J = 5,0$ Hz), attribuables respectivement aux protons H₂-2 et OH-3 de cycle A du triterpène. Les protons H₂-2 corrélient sur le même spectre avec deux protons géminés résonant à δ_H 1,56 (dt , $J = 12,8; 3,4$ Hz) et 1,07 (td , $J = 12,8; 5,6$ Hz) attribuables aux protons H-1a et H-1b. Les carbones de ces groupements sont repérés à δ_C 27,5 (C-2) et 36,7 (C-1) sur le spectre HSQC (Figure II.9).

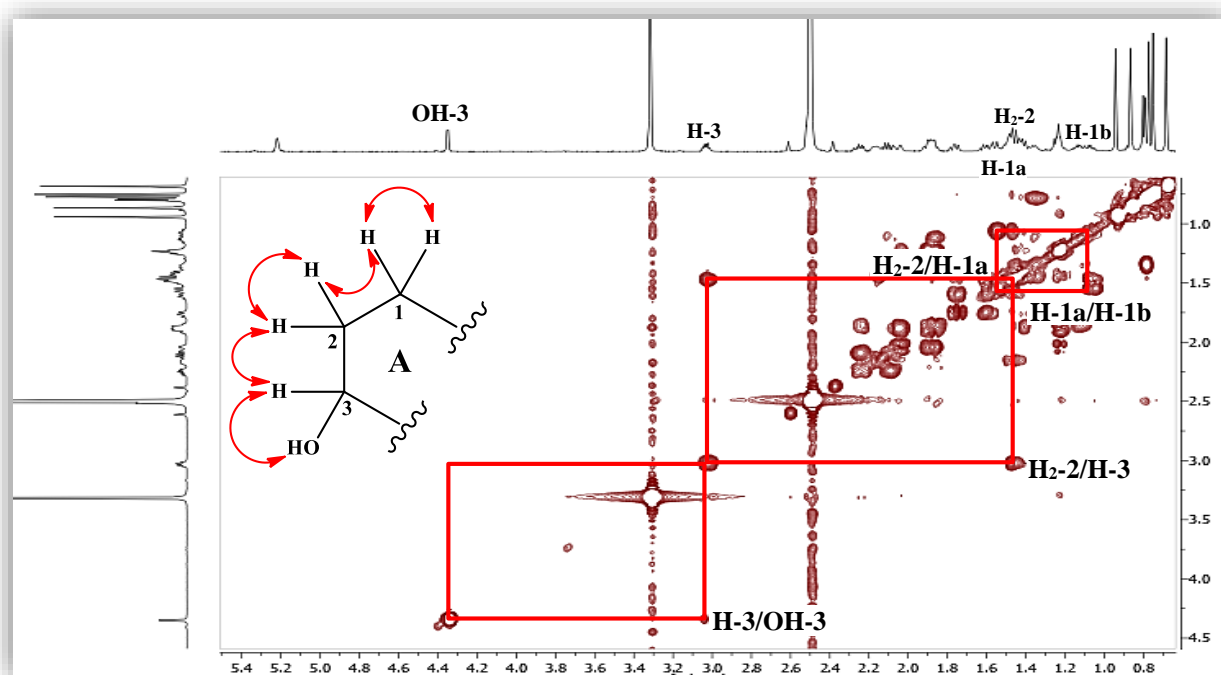


Figure II.8. Spectre COSY H-H du composé 1

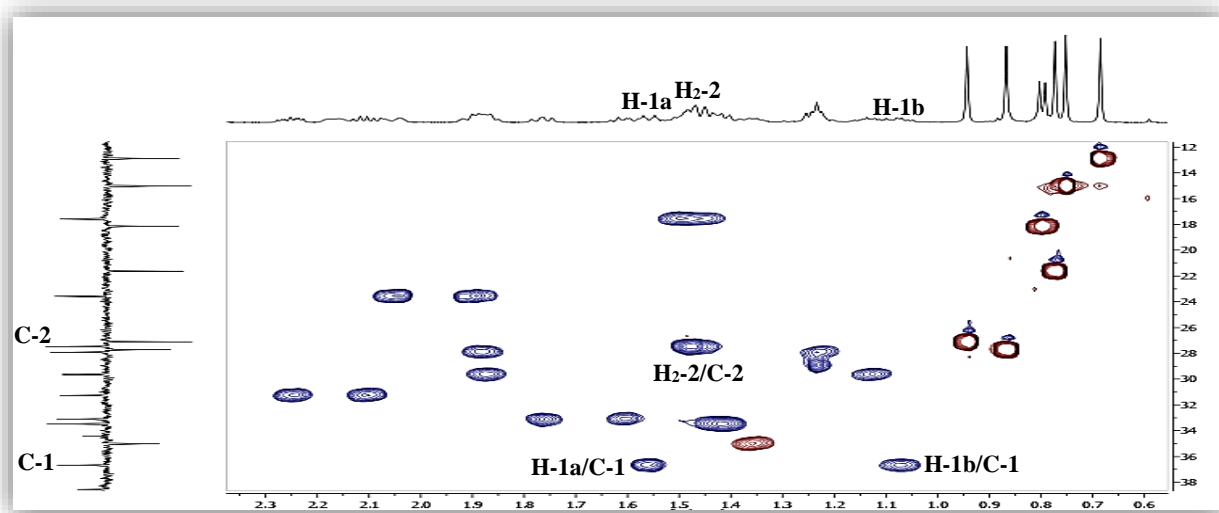


Figure II.9. Spectre HSQC du composé 1 (600 MHz, DMSO- d_6)

Le proton H-3 montre sur le spectre HMBC (Figure II.10) des corrélations avec deux carbones à δ_C 27,7 et 15,0 des deux groupements méthyliques Me-28 et Me-29. Les protons de ces derniers sont repérés sur le spectre HSQC à δ_H 0,87 (*s*, H₃-28) et δ_H 0,75 (*s*, H₃-29) (Figure II.11). Ces protons confirment les attributions réalisées précédemment par les corrélations qu'ils présentent à leur tour sur le spectre HMBC (Figure II.12) avec trois carbones repérés à δ_C 76,9, 38,5 et 50,1 attribuables aux carbones C-3, C-4 et C-5. Le proton du carbone C-5 est repéré selon l'expérience HSQC à δ_H 1,24 (*m*) (Figure II.11).

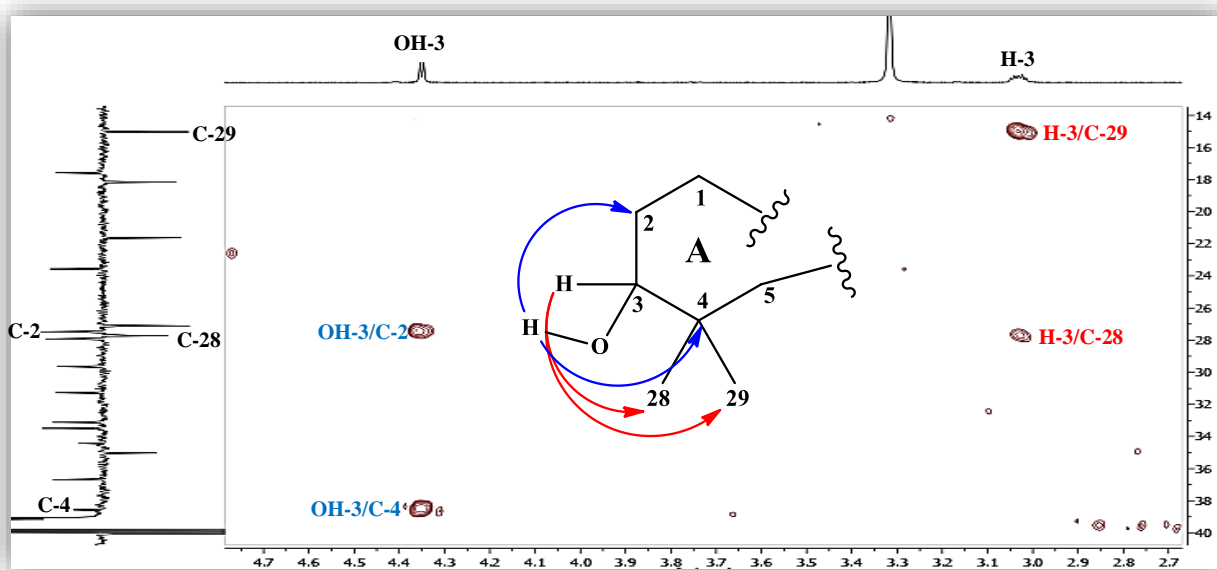


Figure II.10. Spectre HMBC du composé 1

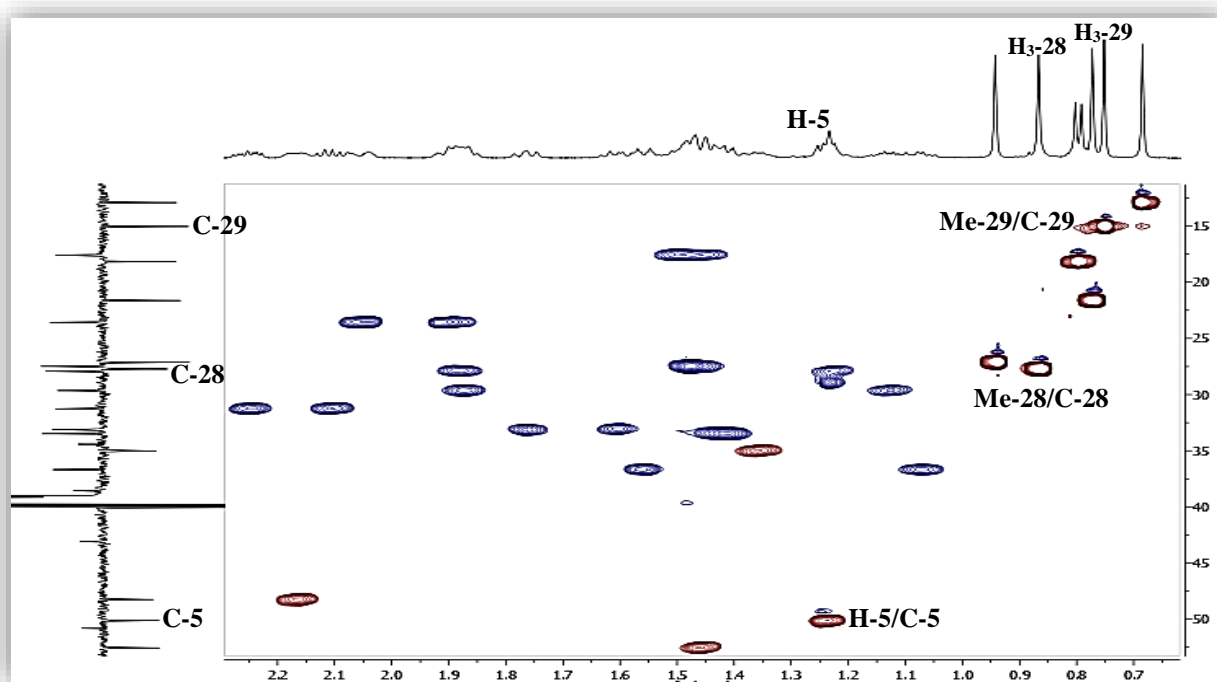


Figure II.11. Spectre HSQC du composé 1 (600 MHz, DMSO-*d*₆)

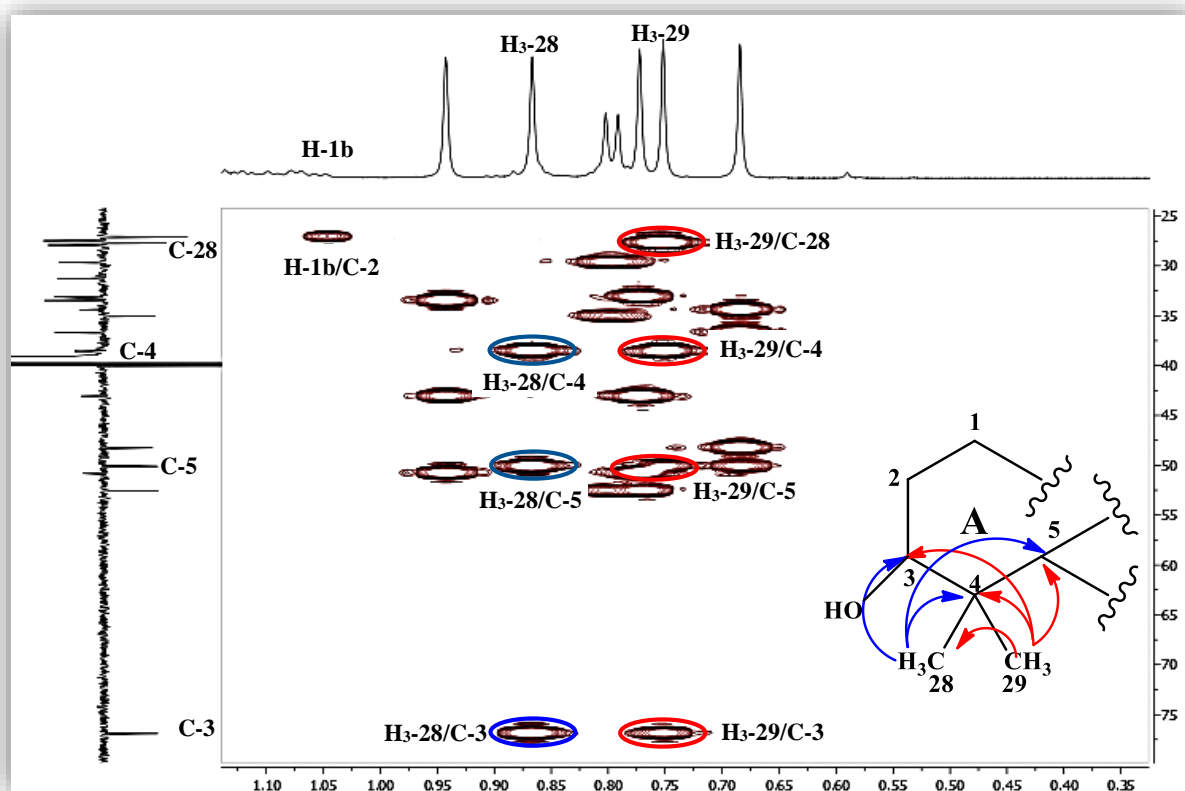


Figure II.12. Spectre HMBC du composé 1

La fermeture du cycle **A** est déduite de la corrélation HMBC (Figure II.13) du proton H-5 (δ_H 1,24, m) avec le carbone C-4 (δ_C 38,5) et un carbone quaternaire résonant à δ_C 34,4. Ces corrélations, ainsi que celles des protons H₂-2 (δ_H 1,48) avec le même carbone (δ_C 34,4), permettent de l'attribuer au carbone quaternaire C-10. Le proton H-5 montre aussi sur le même spectre (Figure II.14) des corrélations avec un carbone repéré à δ_C 12,9 attribuable à un groupement méthylique Me-19 (δ_H 0,69, s) (Figure II.13). Les protons H₃-19 présentent des corrélations sur le spectre HMBC (Figure II.14) avec trois carbones repérés à δ_C 36,7, 34,4, et 50,1 attribuables respectivement aux carbones C-1, C-5, et C-10 préalablement identifiés.

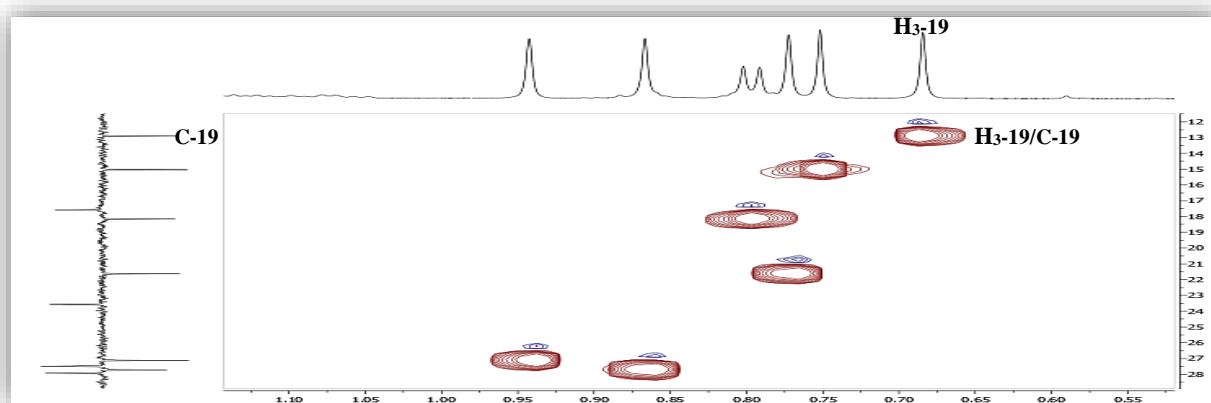


Figure II.13. Spectre HSQC du composé 1 (600 MHz, DMSO-*d*₆)

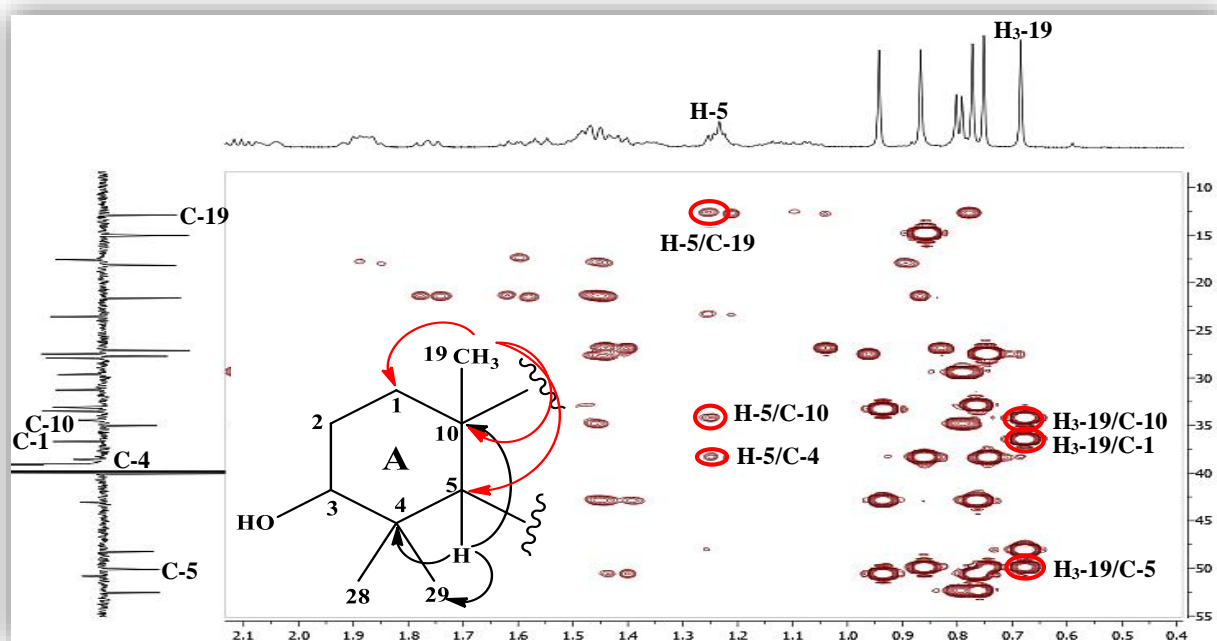


Figure II.14. Spectre HMBC du composé 1

A partir du proton H-5, l'expérience de corrélations COSY H-H (Figure II.15) permet de repérer un système de spins constitué de quatre protons $^5\text{CH}-^6\text{CH}_2-^7\text{CH}$, résonant à 2,06 (H-6a), 1,89 (H-6b) et 5,22 ppm (H-7). Les carbones C-6 et C-7 qui les portent sont assignés à 23,6 et 117,5 ppm respectivement selon l'expérience HSQC (Figure II.16). Il en résulte que la double liaison est positionnée en C-7/C-8.

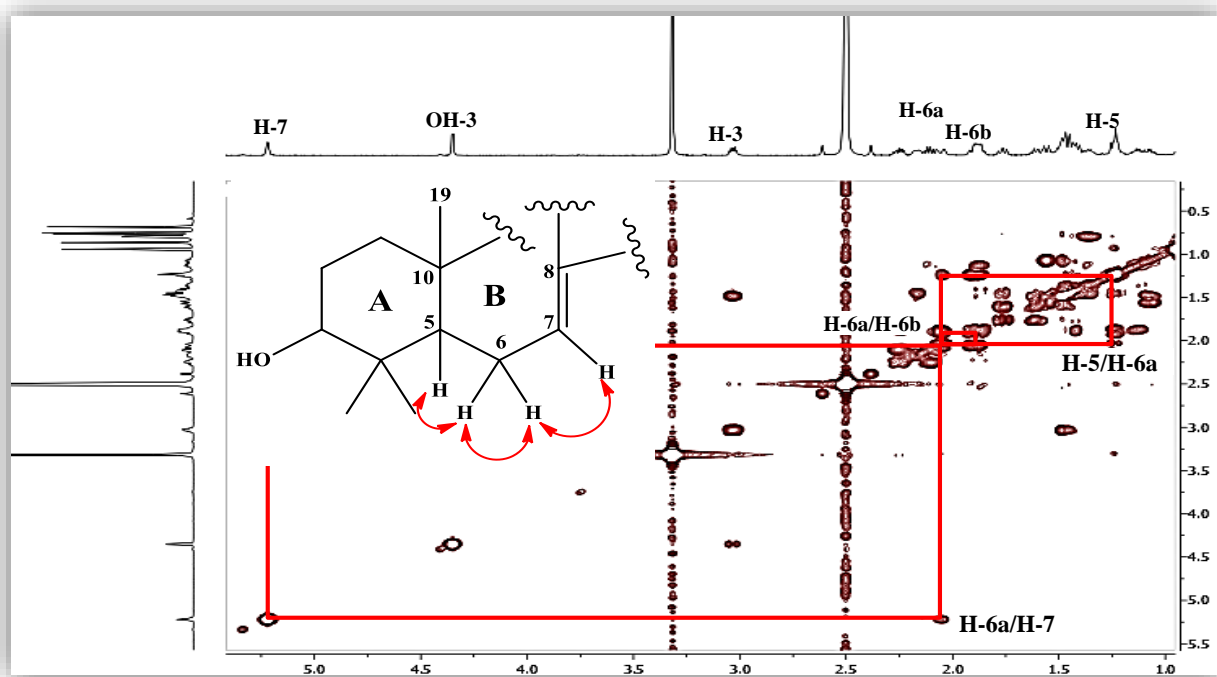


Figure II.15. Spectre COSY H-H du cycle B du composé 1

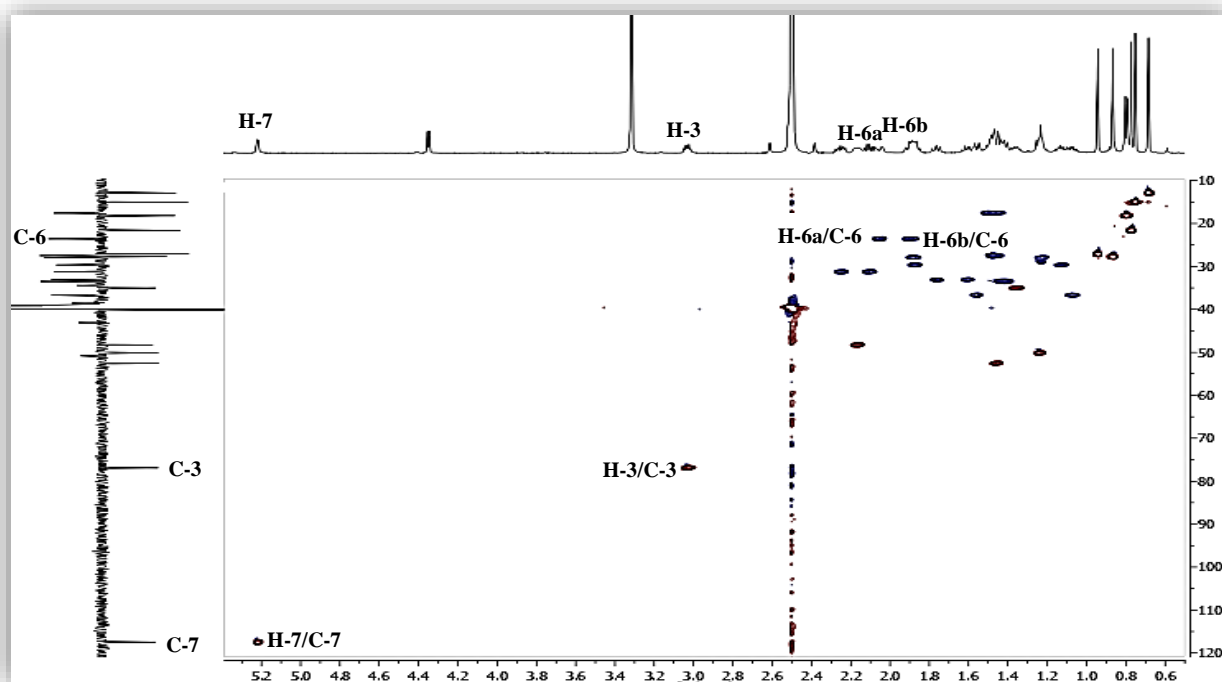


Figure II.16. Spectre HSQC du composé **1** (600 MHz, DMSO- d_6)

Le dernier carbone du cycle B de triterpène est localisé par les corrélations HMBC (Figure II.17) entre les protons H-5 (δ_H 1,24, *m*)/H-7 (δ_H 5,22, *q*, $J = 3,2$ Hz) et un carbone CH (δ_C 48,2) attribuable au carbone C-9. Les corrélations H₃-19/C-9, H-7/C-6 et H-7/C-5 (δ_C 50,1) sont également observées.

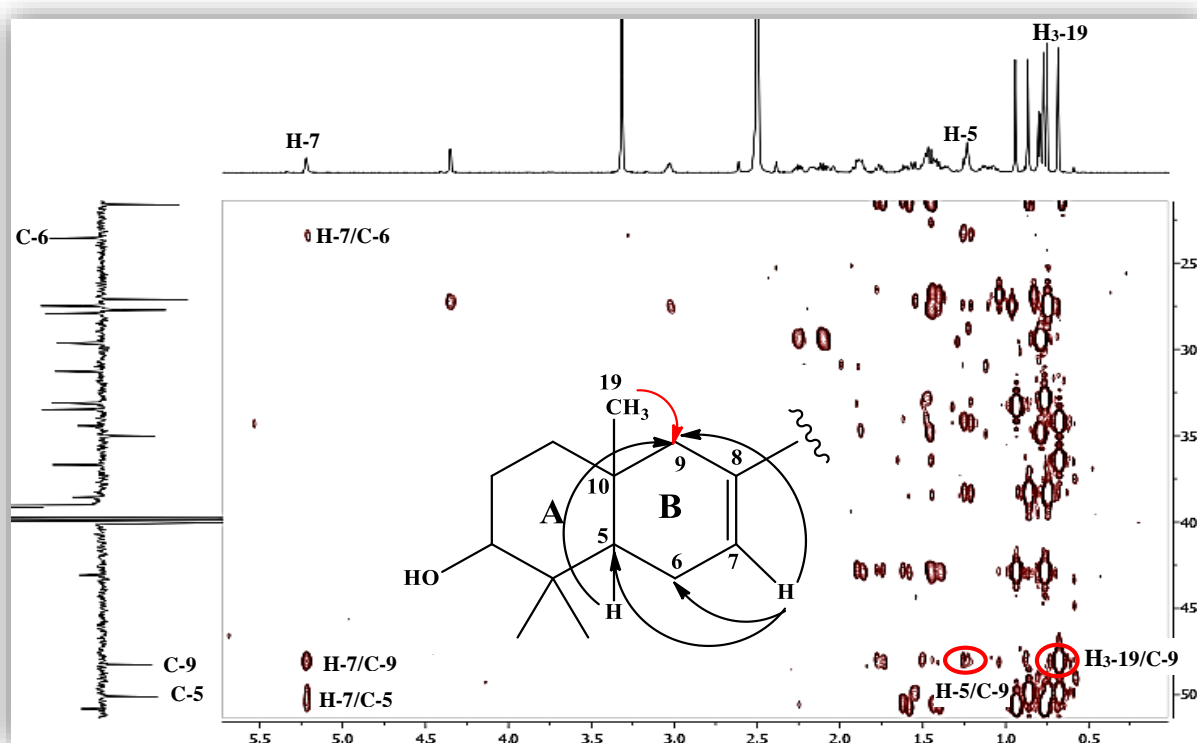


Figure II.17. Spectre HMBC du cycle B du composé **1**

A partir du proton H-9 (δ_H 2.17, *ddd*, $J = 13,7; 6,4; 3,1$ Hz), le spectre COSY H-H (Figure II.18), permet de repérer un système de spins à cinq protons H-9/H₂-11 (δ_H 1,50;*m*)/H-12a (δ_H 1,77, *dd*, $J = 13,6; 9,5$)/H-12b (δ_H 1,61, *dt*, $J = 13,6; 9,5$) constituant l'enchaînement carboné $^9\text{CH}-^{11}\text{CH}_2-^{12}\text{CH}_2-$. Leurs carbones sont localisés à δ_C 17,6 (C-11), 33,1 (C-12) sur le spectre HSQC (Figure II.19).

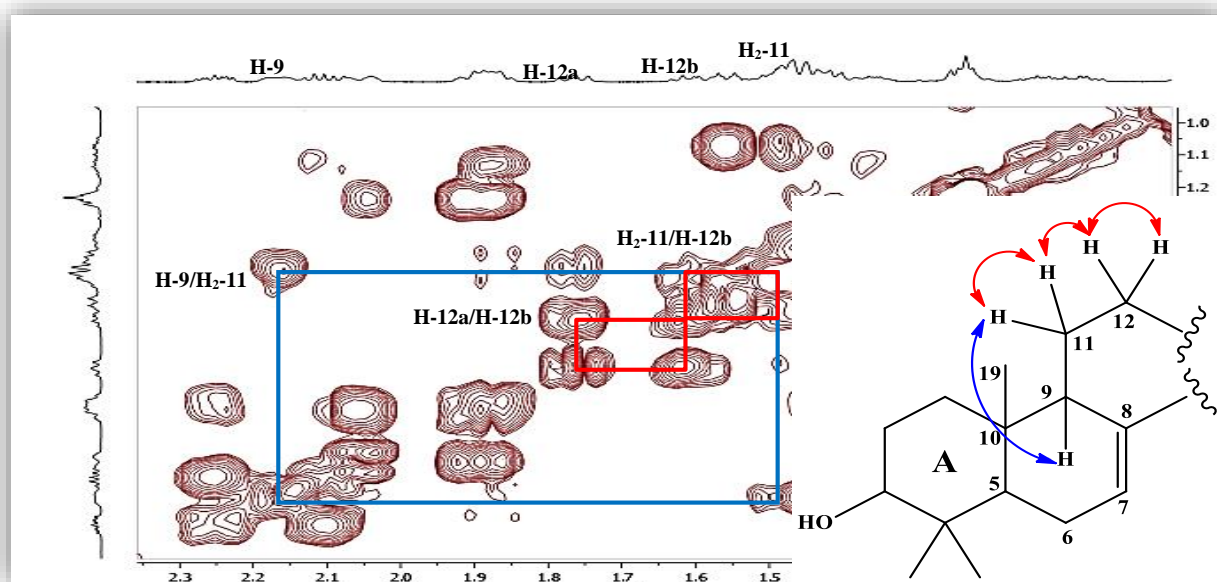


Figure II.18. Spectre COSY H-H du cycle C du composé 1

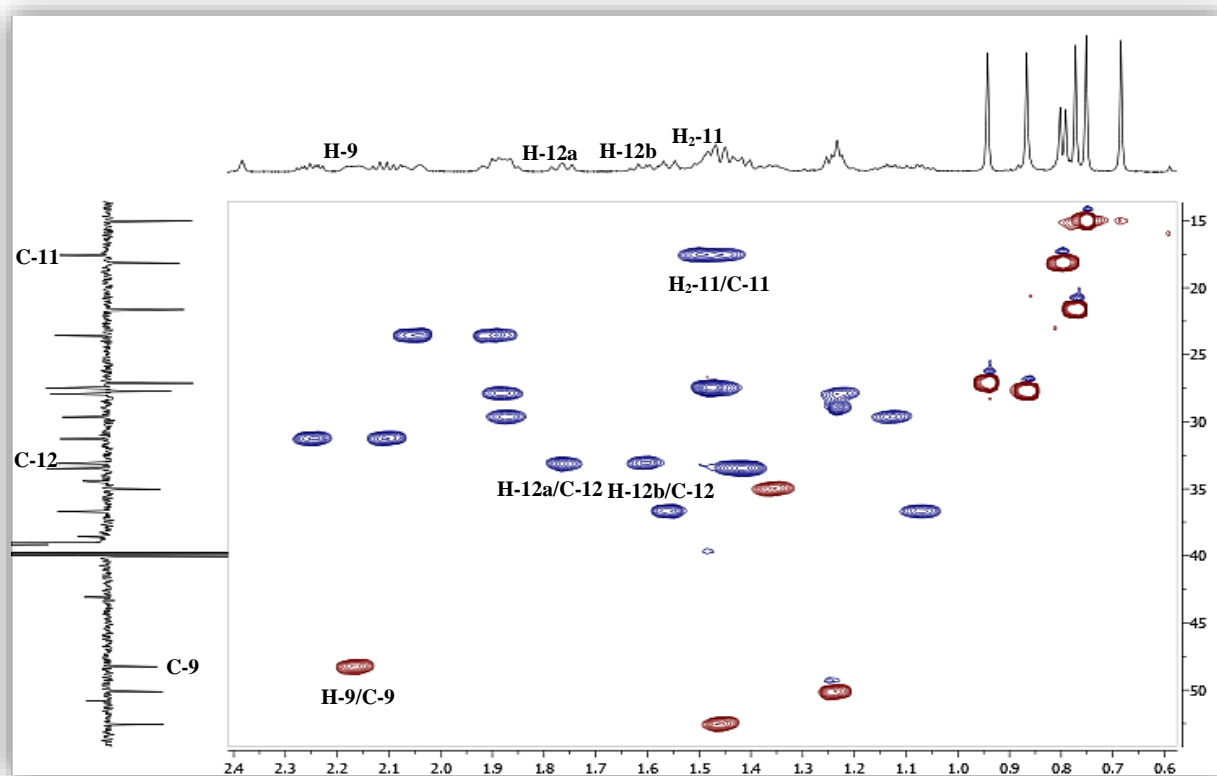


Figure II.19. Spectre HSQC du composé 1 (600 MHz, DMSO-*d*₆)

Le spectre HMBC (Figure II.20) montre des couplages entre les protons H-12a (δ_H 1,77)/H-12b (δ_H 1,61) et un carbone quaternaire (δ_C 43,1) et entre H-12b (δ_H 1,61) et un autre carbone localisé à 50,8 ppm. Ces carbones attribués respectivement aux carbones quaternaires C-13 et C-14, conduisent à finaliser la construction du cycle C du composé. D'autres corrélations, H₂-11/C-9, H₂-11/C-13 et H-12a/C-9 sont observées aussi (Figure II.20).

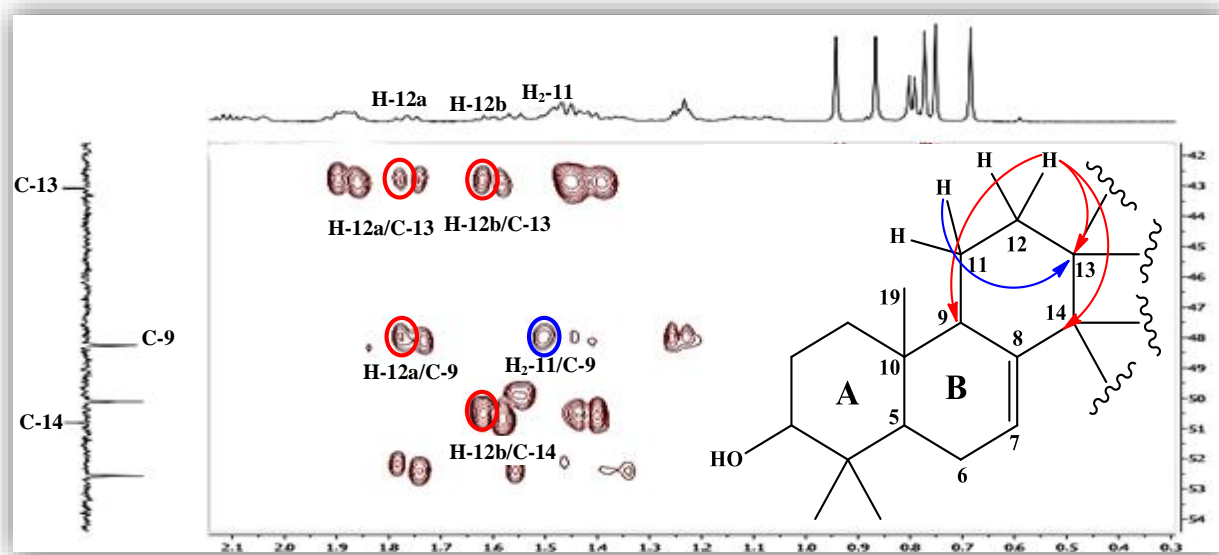


Figure II.20. Spectre HMBC du cycle C du composé 1

Les protons H₂-12 corréleront également en 3J (Figure II. 21) avec un carbone (δ_C 21,6) d'un groupement CH₃ ne pouvant être que le méthyle CH₃-18. Ses protons sont localisés par HSQC à δ_H 0,77 (s, H₃-18) (Figure II.22). Les protons méthyliques H₃-30 repérés à 0,94 ppm sont caractérisés par HMBC (Figure II.20) du fait de leur corrélation avec le carbone C-8 (δ_C 145,4).

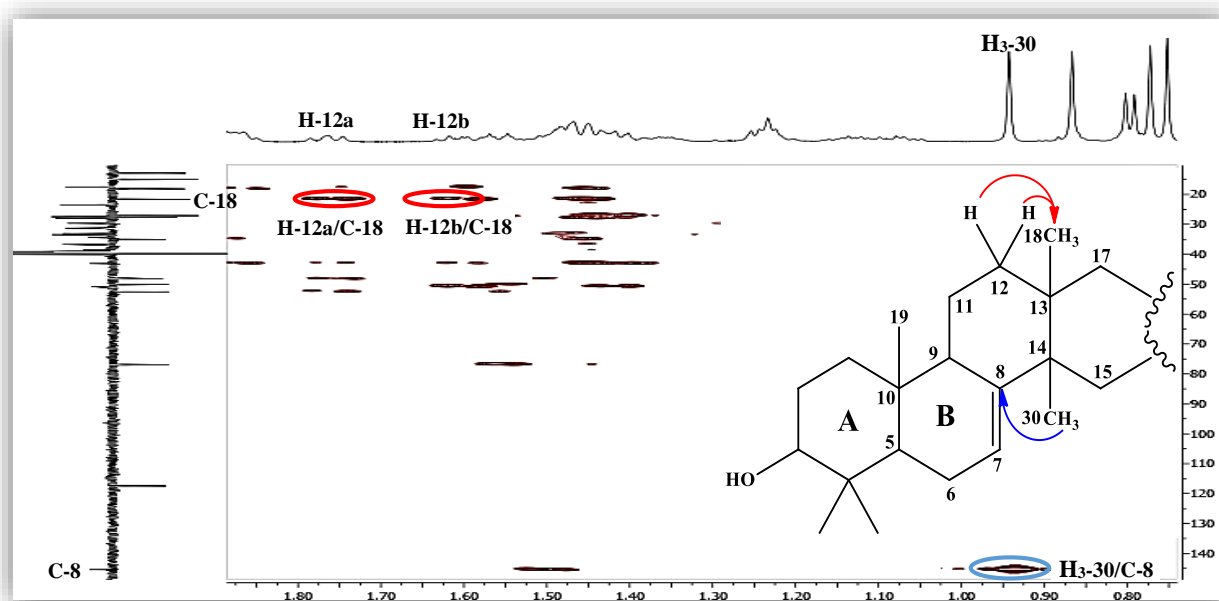


Figure II.21. Spectre HMBC du cycle C du composé 1

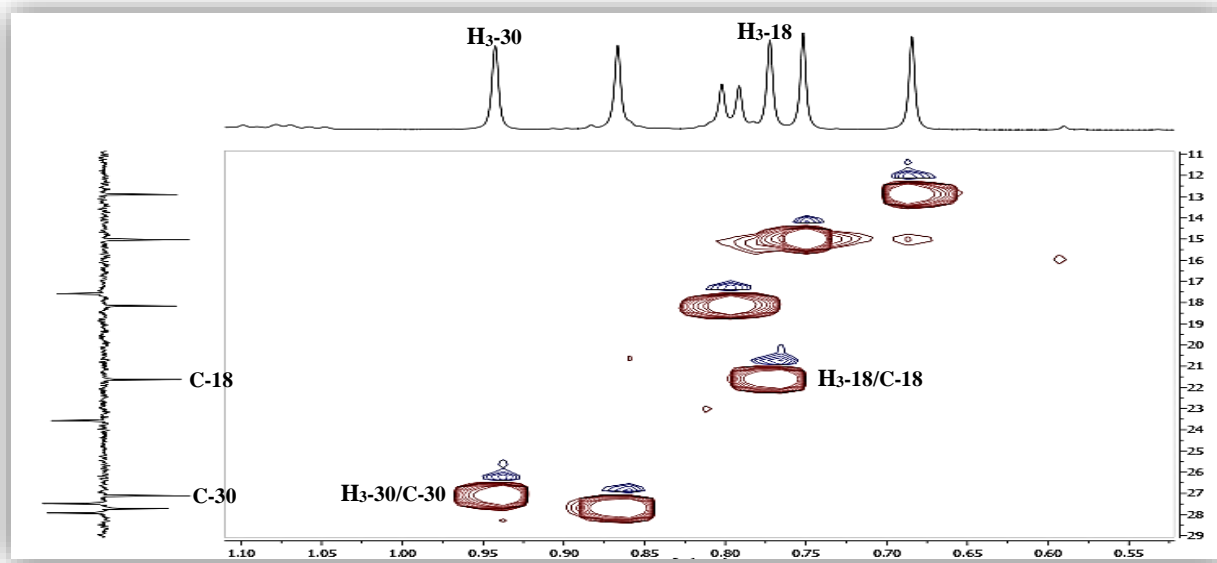


Figure II.22. Spectre HSQC du cycle C du composé 1

L'analyse des taches de corrélation observées sur le spectre HMBC (Figure II.23) confirme ces assignements par les couplages visualisés entre :

- Les protons H₃-30 et les carbones C-13 (δ_C 43,1), C-14 (δ_C 50,8) et un carbone résonant à δ_C 33,5 attribué au groupement méthylène CH₂-15.
- Les protons H₃-18 et les carbones C-12 (δ_C 33,1), C-13 (δ_C 43,1), C-14 (δ_C 50,8) et un carbone méthine résonant à δ_C 52,5 ne pouvant être que le groupement CH-17.

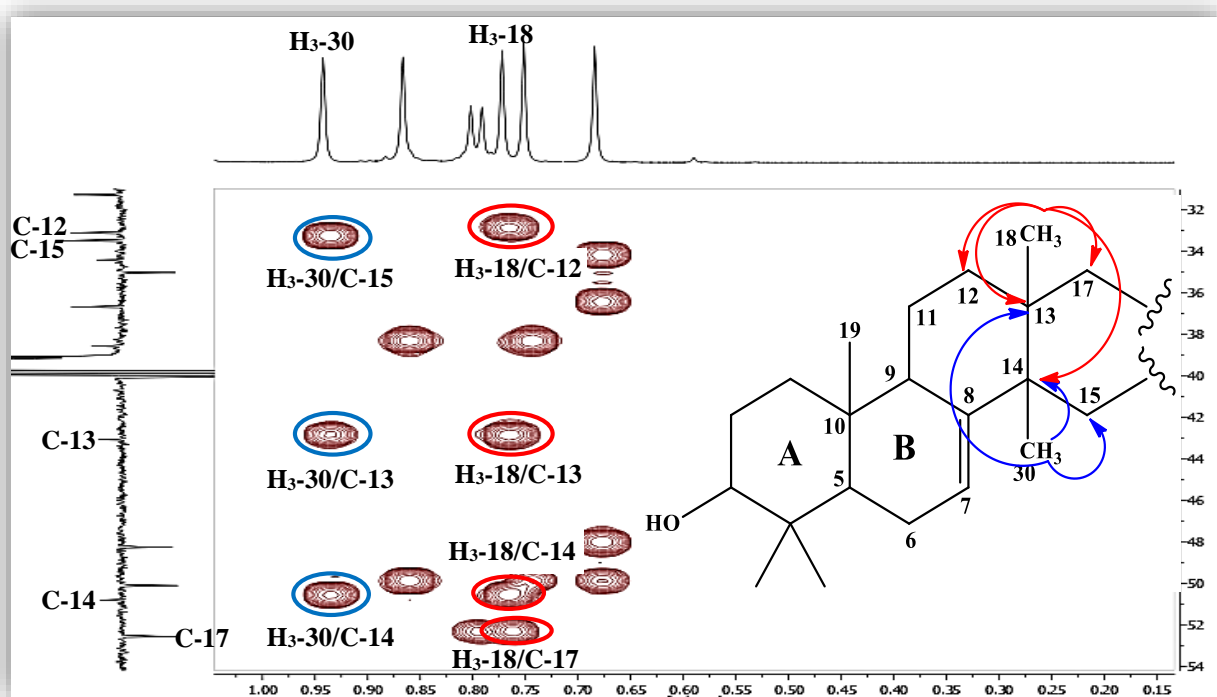


Figure II.23. Spectre HMBC du composé 1

- Les protons de ces deux groupements 15-CH₂ (δ_H 1,42, *m*) et 17-CH (δ_H 1,46, *m*) sont caractérisés par l'analyse du spectre HSQC (Figure II.24).

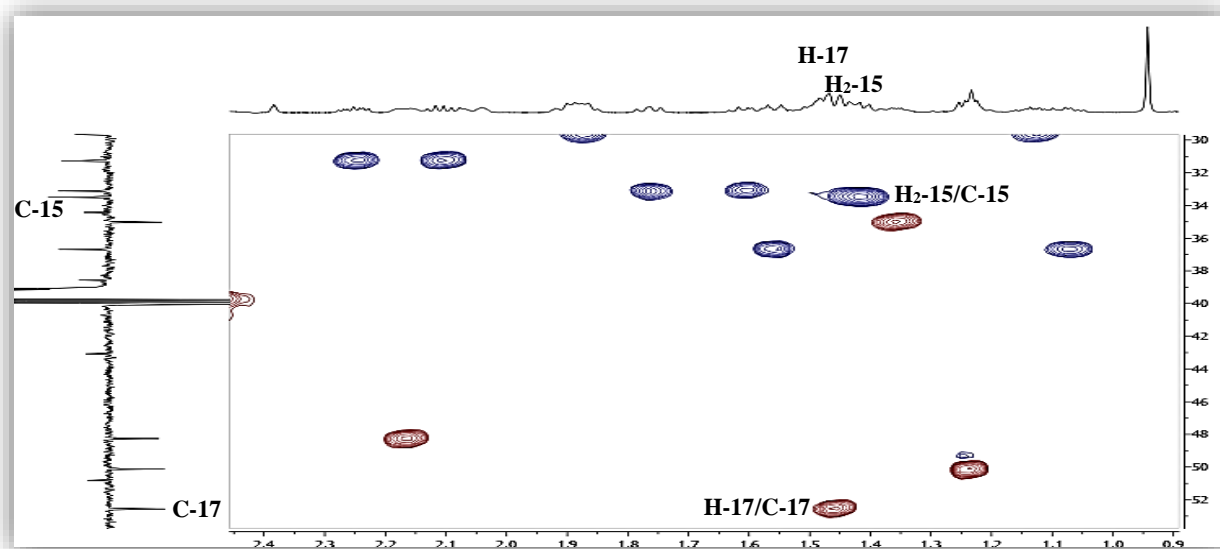


Figure II.24. Spectre HSQC du composé **1** (600 MHz, DMSO-*d*₆)

La fermeture du cycle D du triterpène est confirmée par les corrélations observées sur le spectre COSY H-H (Figure II.25) entre les protons H₂-15 (δ_H 1,42, *m*) déjà identifiés et les protons H₂-16 (δ_H 1,88, *m*, H-16a, δ_H 1,23, *m*, H-16b), lesquels couplent avec le proton H-17 (δ_H 1,46, *m*). Le carbone C-16 est localisé à δ_C 27,9 selon l'expérience HSQC (Figure II.26).

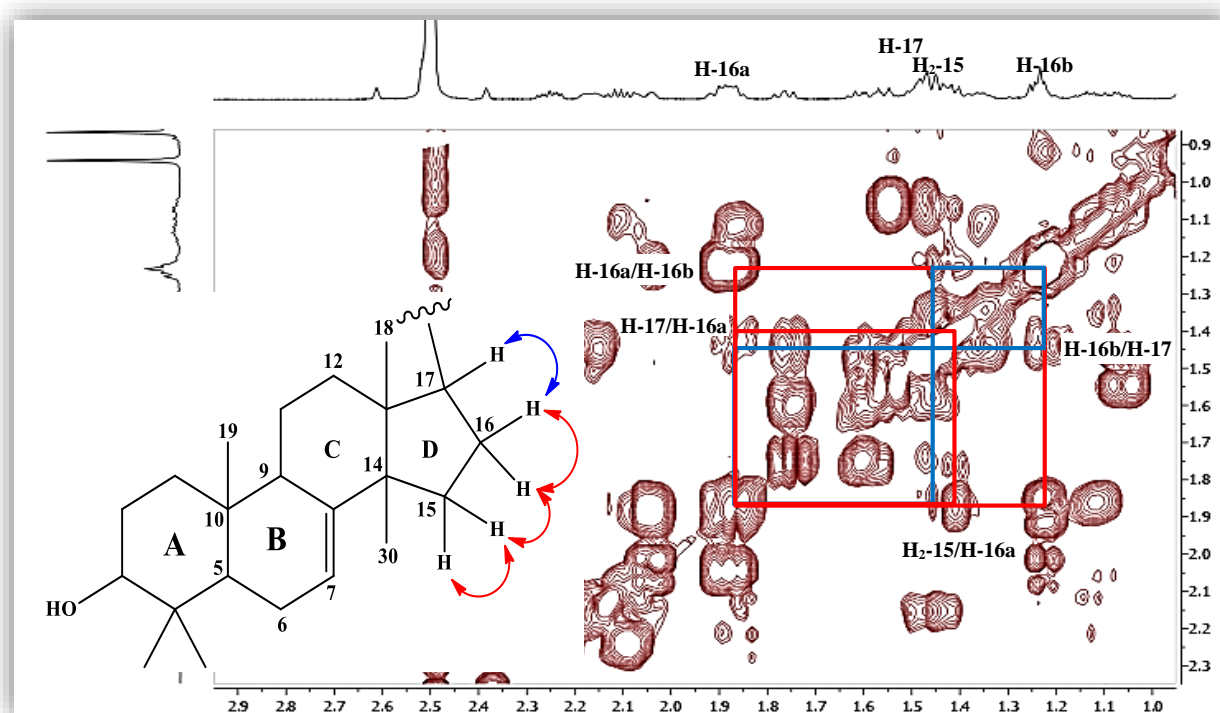


Figure II.25. Spectre COSY H-H du cycle B du composé **1**

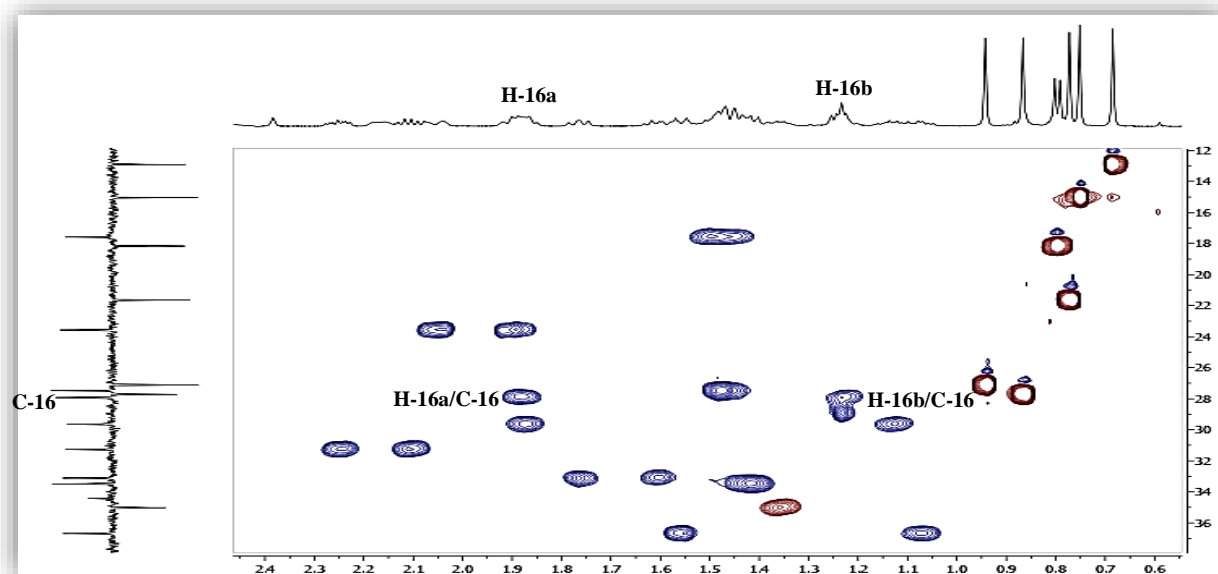


Figure II.26. Spectre HSQC du composé **1** (600 MHz, DMSO- d_6)

La même expérience (Figure II.27) met en évidence les corrélations entre le proton H-17 et un proton CH repéré à δ_H 1,36 (*m*) ne pouvant être que le proton H-20. Ce dernier couple avec les protons méthyliques H₃-21 (δ_H 0,80, *d*, $J = 6,5$ Hz), les protons H-22a (δ_H 1,87, *m*) et H-22b (δ_H 1,13, *ddt*, $J = 13,4 ; 8,9 ; 5,0$), eux même corrélant avec les protons H-23a (δ_H 2,25, *ddd*, $J = 15,7 ; 8,9, 5,0$), H-23b (δ_H 2,10, *dt*, $J = 15,7 ; 8,1$). L'expérience HSQC permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones qui les portent : C-20 (δ_C 35,0), C-21 (δ_C 18,1), C-22 (δ_C 29,6) et C-23 (δ_C 31,2) (Figure II.28).

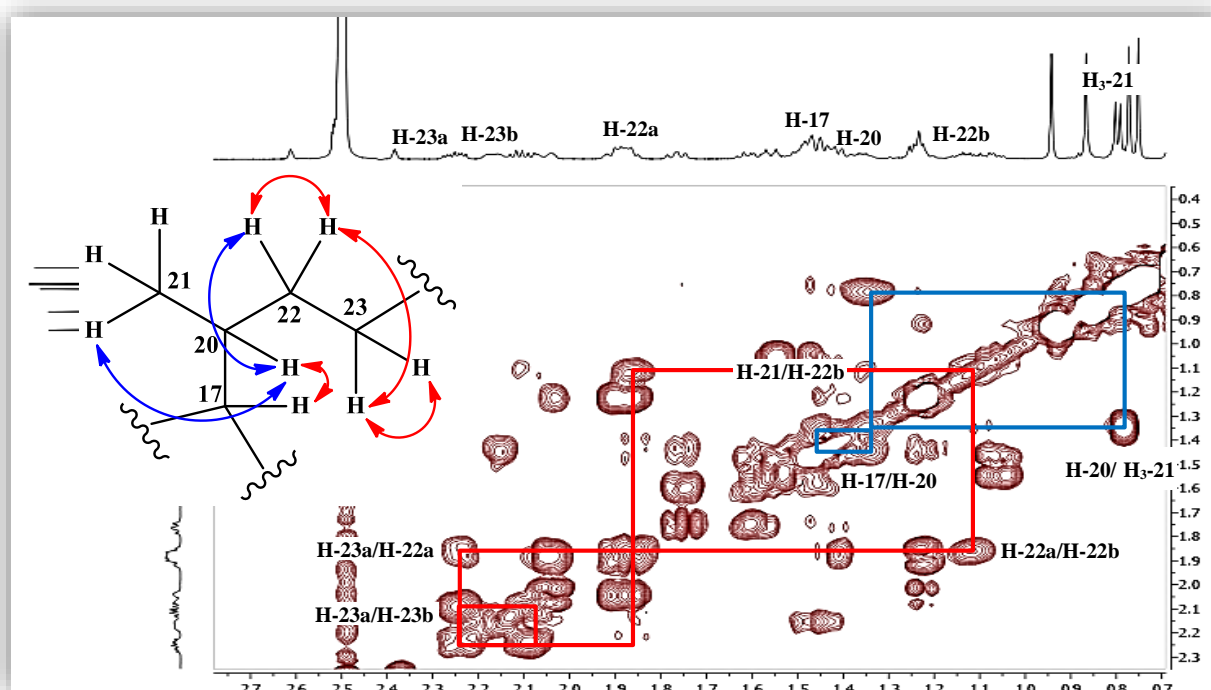


Figure II.27. Spectre COSY H-H de la chaîne latérale du composé **1**

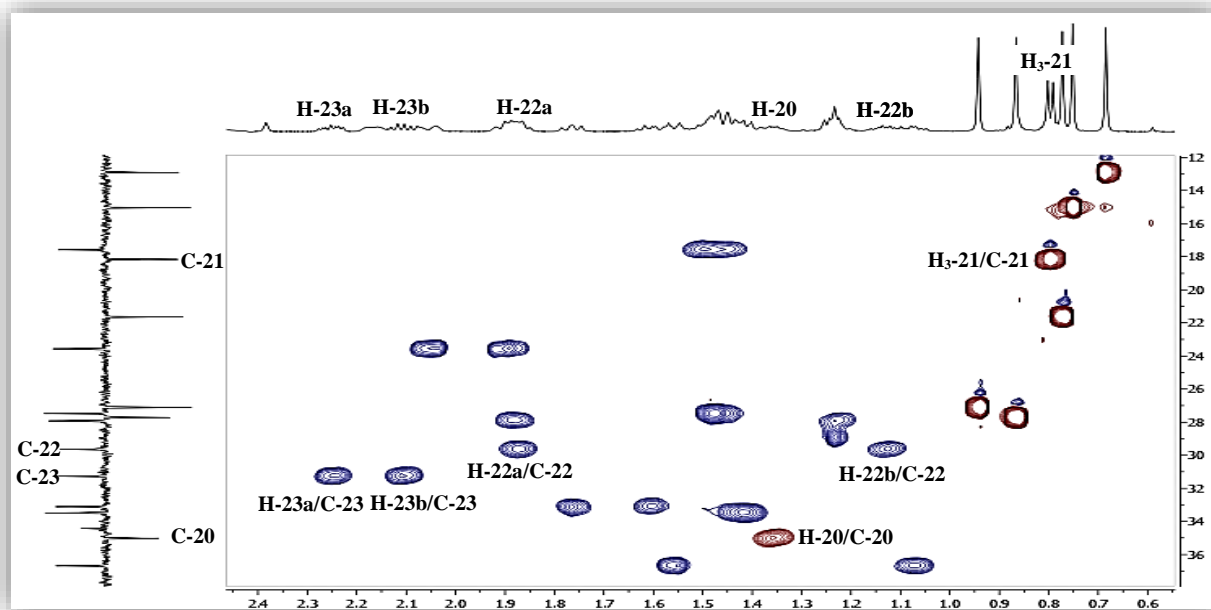


Figure II.28. Spectre HSQC du composé **1** (600 MHz, DMSO- d_6)

La substitution du cycle D en C-17 est confirmée par l'analyse HMBC (Figure II.29) qui montre des couplages hétéronucléaires longue distance entre les protons méthyliques H₃-21 et les carbones C-17, C-20 et C-22, les protons H-17/H-22a/H₂-23 et le carbone C-20 et enfin entre les protons H₂-23 et le carbone C-22.

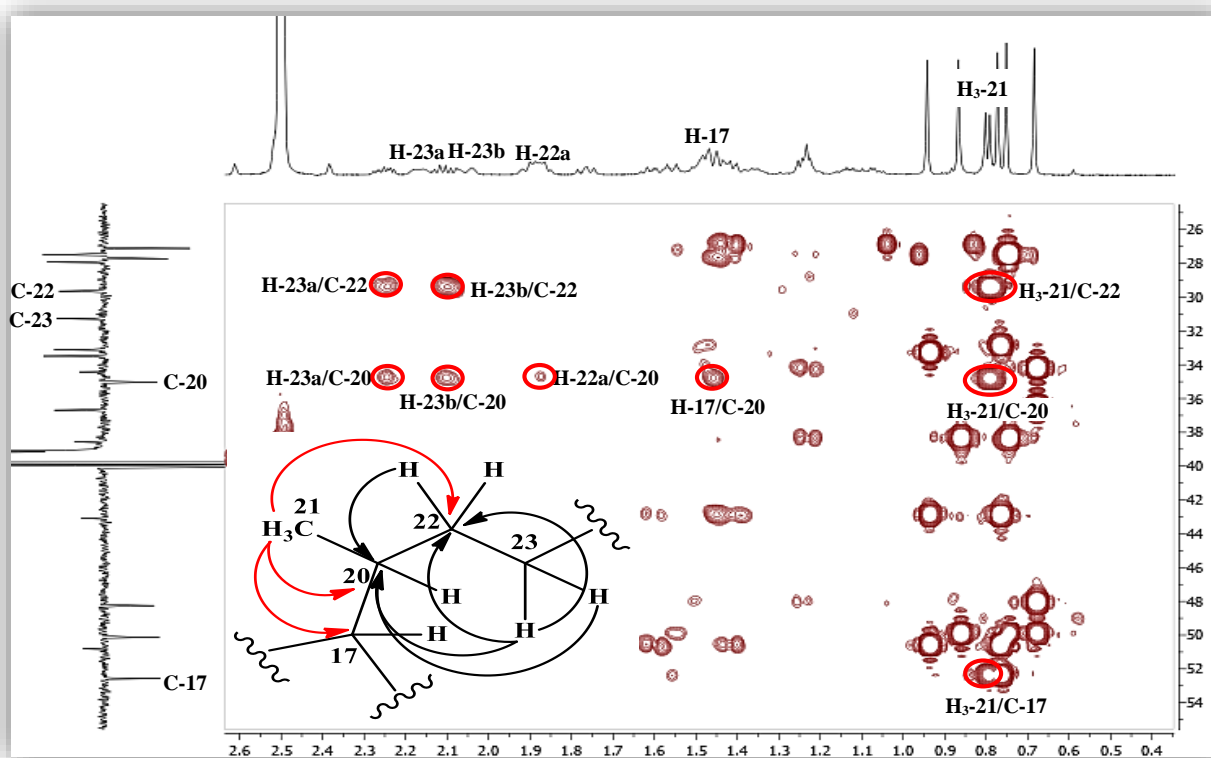


Figure II.29. Spectre HMBC de la chaîne latérale du composé **1**

Les corrélations observées sur le spectre HMBC (Figure II.30) entre les protons H-23a (δ_H 2,25)/H-23b (δ_H 2,10) et le carbone de carbonyle d'acide (C-24) à δ_C 174,7 terminent l'identification de la chaîne latérale.

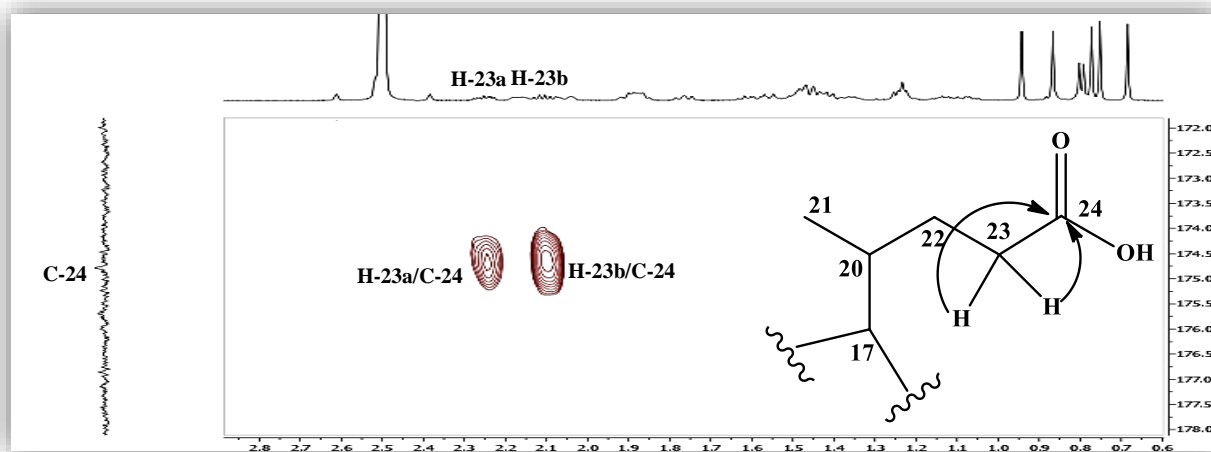


Figure II.30. Spectre HMBC de la chaîne latérale du composé **1**

La stéréochimie de ce composé est établie par analyse du spectre ROESY (Figure II.31). Les effets Overhauser H-3 α /H-5/H₃-28, H-5/H-9, H₃-28/H₃-30 et H₃-30/H-17 traduisent leur orientation α . Il montre également sur la face β , les corrélations H₃-18/H₃-19, H₃-19/H₃-29, H-20/H-16a.

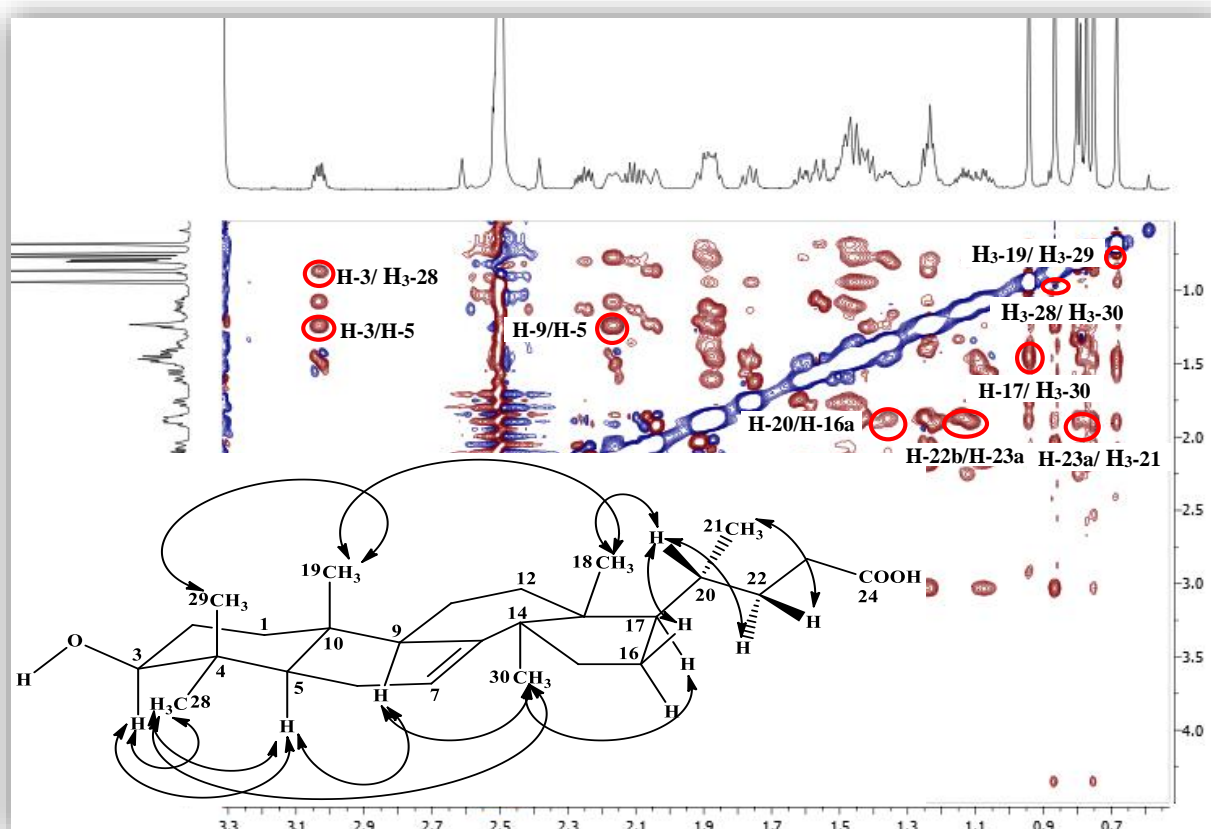
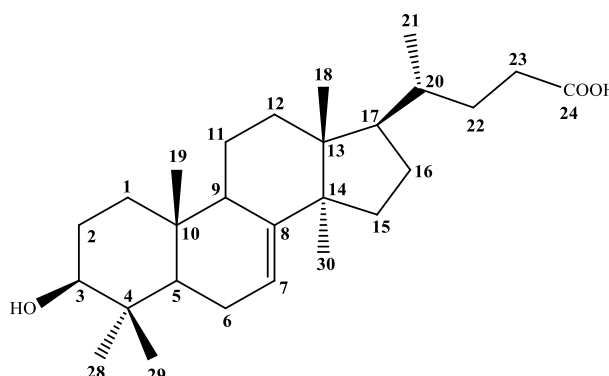


Figure II.31. Spectre ROESY du composé **1**

L'ensemble des données spectrales accumulées, permettent d'assigner pour le composé **1** la structure nouvelle suivante:



Acide 25,26,27-trisnor-3 β -hydroxy-lanost-7(8)-èn-24-oïque

Il apparait que c'est la première fois qu'un triterpène à squelette lanostane a été rencontré dans le genre *Ononis*.

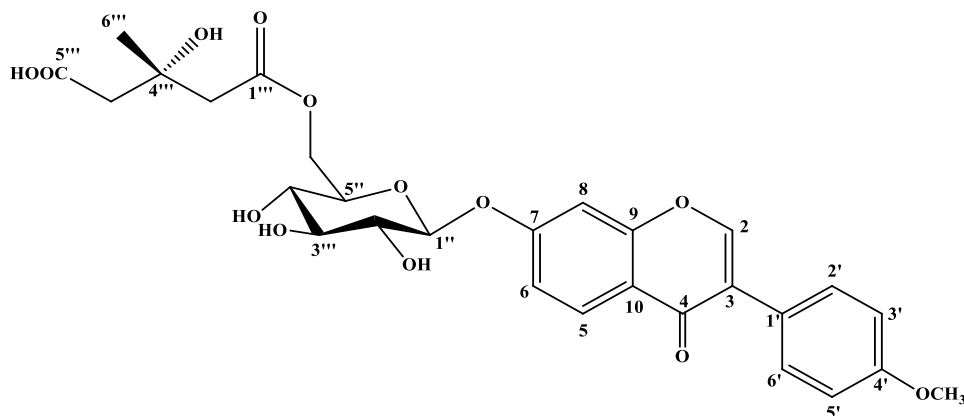
Les valeurs de déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont représentées dans le tableau II.1.

Tableau II.1. Données RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) de **1** dans DMSO- d_6

Position	δ_{H} (m, J en Hz)	δ_{C} (ppm)
1 β	1,56 (dt, 12,8; 3,4)	36,7
1 α	1,07 (td, 12,8; 5,6)	-
2	1,48 (m)	27,5
3 α	3,03 (dt, 10,4; 5,0)	76,9
4	-	38,5
5 α	1,24 (m)	50,1
6 α	2,06 (dl, 18,4)	23,6
6 β	1,89 (m)	-
7	5,22 (q, 3,2)	117,5
8	-	145,4
9 α	2,17 (ddd, 13,7; 6,4; 3,1)	48,2
10	-	34,4
11	1,50 (m)	17,6
12 β	1,77 (dd, 13,6; 9,5)	33,1
12 α	1,61 (dt, 13,6; 9,5)	-
13	-	43,1

14	-	50,8
15	1,42 (<i>m</i>)	33,5
16 β	1,88 (<i>m</i>)	27,9
16 α	1,23 (<i>m</i>)	-
17	1,46 (<i>m</i>)	52,5
18	0,77 (<i>s</i>)	21,6
19	0,69 (<i>s</i>)	12,9
20	1,36 (<i>m</i>)	35,0
21	0,80 (<i>d</i> , 6,4)	18,1
22a	1,87 (<i>m</i>)	29,6
22b	1,13 (<i>ddt</i> , 13,4; 8,9; 5,0)	-
23a	2,25 (<i>ddd</i> , 15,7; 8,9; 5,0)	31,2
23b	2,10 (<i>dt</i> , 15,7; 8,1)	-
24	-	174,7
28	0,87 (<i>s</i>)	27,7
29	0,75 (<i>s</i>)	15,0
30	0,94 (<i>s</i>)	27,1
OH-3 β	4,35 (<i>d</i> , 5,0)	-
COOH	11,95	-

II.4.2. Elucidation structurale du composé 2



Formononetine-7-O-[6''-O-((S)-3-hydroxy-3-méthylglutaryl)]- β -D-glucopyranoside

Le composé **2** a été obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Ses spectres de masse à haute résolution HR-ESI-MS, enregistrés en modes positif (Figure II.32) et négatif (Figure II.33), montre respectivement des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 575,1744$ (calc. 575,1759, pour $[M+H]^+$) et à 573,1611 (calc. 573,1603, pour $[M-H]^-$), soit une masse moléculaire égale à 574 uma correspondant à une formule brute en $C_{28}H_{30}O_{13}$.

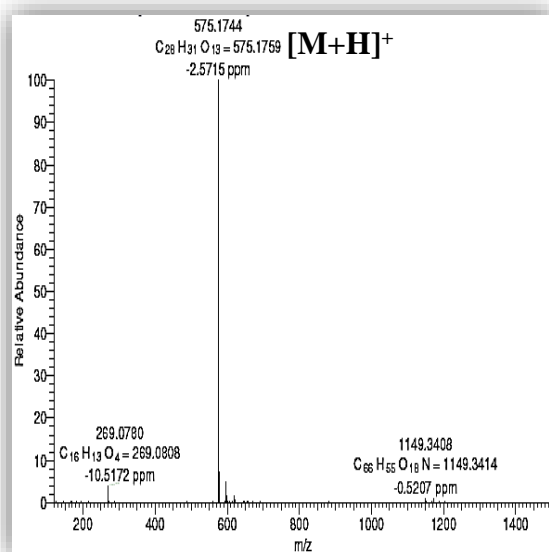


Figure II.32. Spectre de masse HRESI⁺ du composé **2**

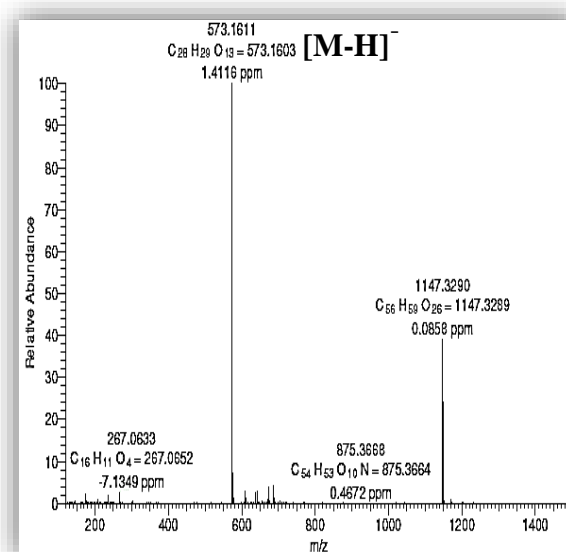


Figure II.33. Spectre de masse HRESI⁻ du composé **2**

Son spectre RMN ¹H (Figure II.34) enregistré dans le DMSO-*d*₆, montre toutes les caractéristiques d'un flavonoïde glycosylé. En effet, il met en évidence la présence de :

- Un signal à δ_H 8.49 (*d*, $J = 1,7$ Hz), caractéristique du proton H-2 d'une isoflavone.
- Trois signaux sortant à δ_H 7,22 (1H, *d*, $J = 2,3$ Hz), 7,15 (1H, *dd*, $J = 8,9 ; 2,3$ Hz) et 8,06 (1H, *d*, $J = 8,9$ Hz), formant un système AMX, attribuables respectivement aux protons H-8, H-6 et H-5 du cycle A substitué en C-7.
- Deux signaux d'intégration 2H chacun à δ_H 7,00 (*m*) et 7,55 (*m*), correspondant aux protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6' du cycle B parasubstitué en C-4'.
- Des signaux dans la zone comprise entre 3,33 et 4,37 ppm et un signal de proton anomère à δ_H 5,14 (*d*, $J = 7,0$), indiquant la présence d'une unité osidique.

Par ailleurs, il est également observé un signal à δ_H 3,79 (3H, *s*) d'un groupement O-CH₃ ainsi que des signaux supplémentaires de protons aliphatiques sortant dans l'intervalle allant de 1,08 à 2,38 ppm.

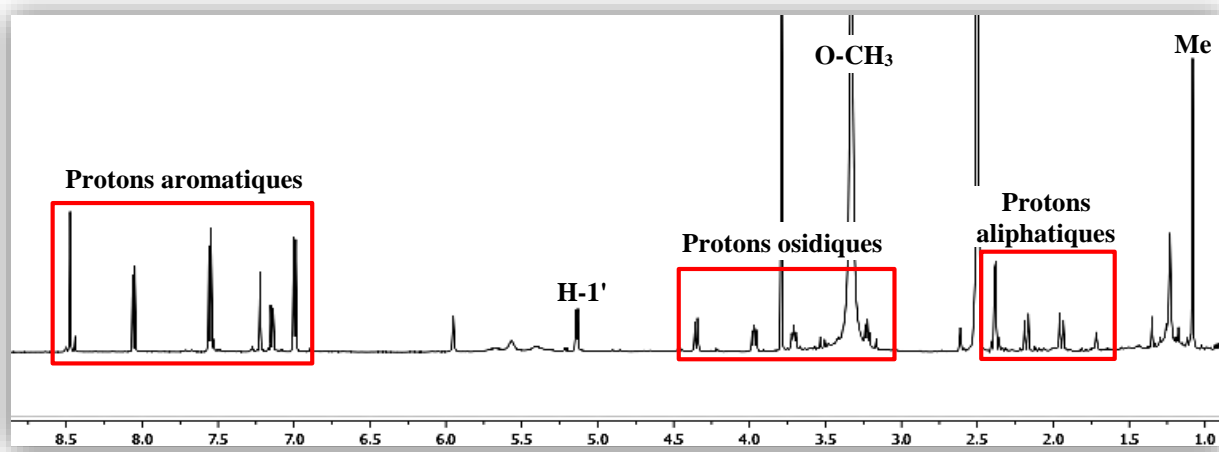


Figure II.34. Spectre RMN ^1H du composé 2

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (Figure II.35) confirme la nature isoflavonoïdique du composé à travers les signaux correspondant à sept carbones quaternaires (δ_{C} 123,9-174,7) dont un carbone de carbonyle (δ_{C} 174,7) et huit CH aromatiques (δ_{C} 103,5-153,9). Le signal résonant à δ_{C} 153,8 est typique du carbone C-2 d'une isoflavone.

Le même spectre confirme également la présence de l'unité osidique du fait des signaux sortant dans l'intervalle 62,9-99,8 ppm et du signal du carbone anomère (C-1'') repéré à δ_{C} 99,8. Le signal à δ_{C} 55,1 est celui du carbone du groupement OCH_3 .

Le même spectre montre deux signaux à δ_{C} 170,7 et 175,4 correspondant respectivement à 2 carbones de carbonyle, l'un ester et l'autre d'acide. Ceci atteste clairement de la présence d'un groupement acyle dont reste à élucider la nature. Il est relevé également la présence d'un carbone quaternaire oxyméthylène à δ_{C} 68,8, deux carbones méthylènes à δ_{C} 46,8 et 47,2 ainsi qu'un carbone de groupement méthyle à δ_{C} 28,3.

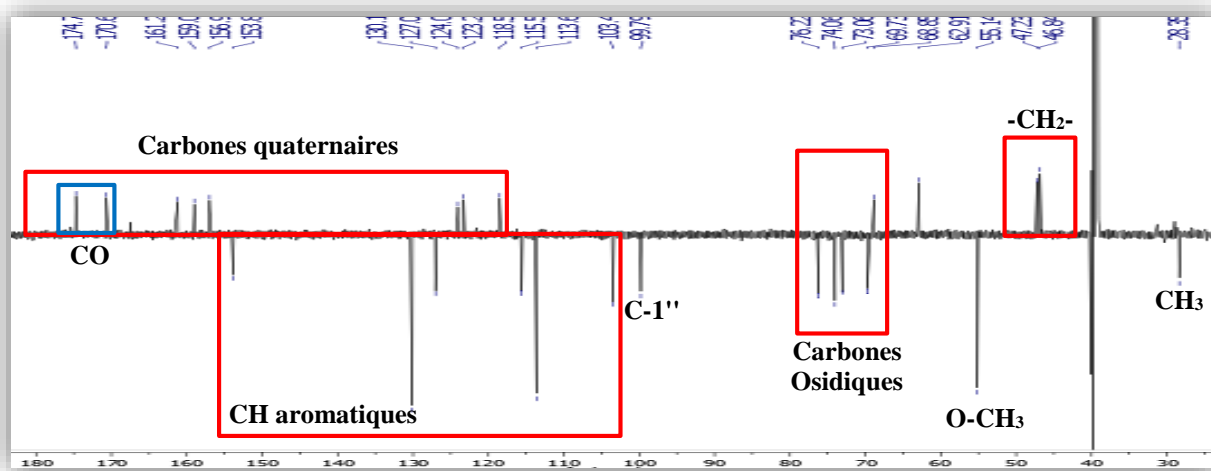


Figure II.35. Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé 2

L'expérience de corrélation COSY H-H (Figure II.36) montre les couplages attendus entre H-5/H-6, H-6/H-8 du cycle A et H-2'/H-3', H-5'/H-6' du cycle B.

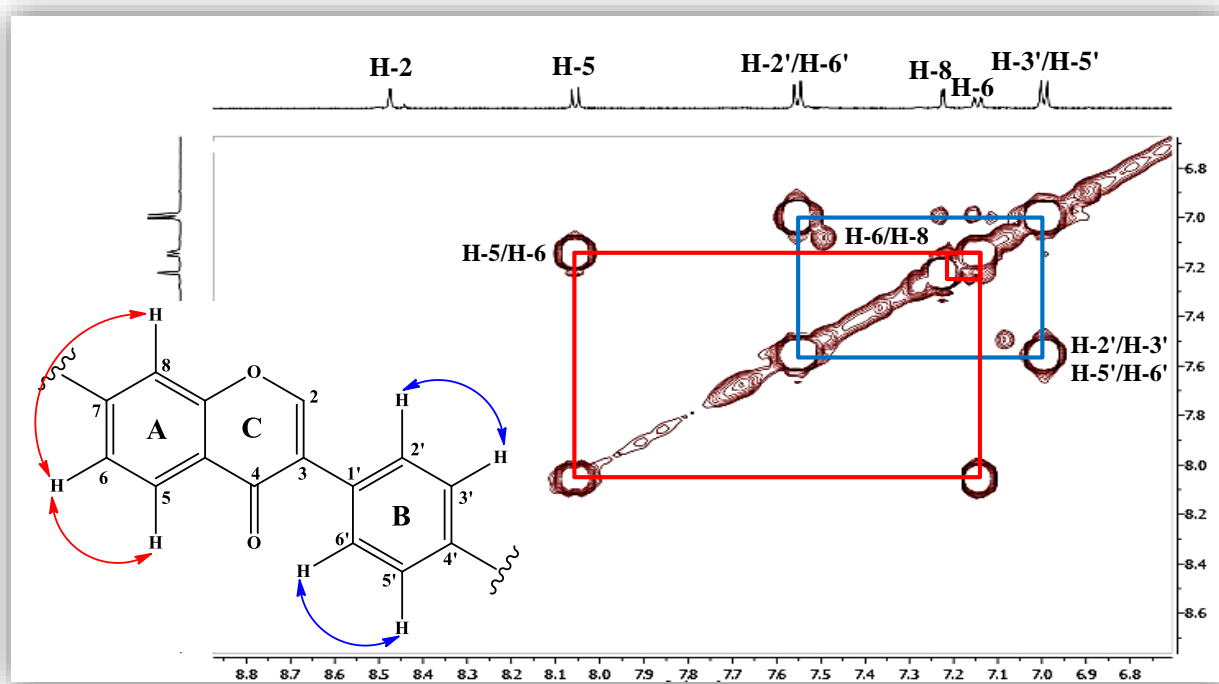


Figure II.36. Spectre COSY H-H de la génine du composé 2

L'analyse du spectre HSQC (Figure II.37) du composé 2 permet de caractériser les carbones C-5 (δ_c 127,0), C-6 (δ_c 115,6), C-8 (δ_c 103,5), C-2'/C-6' (δ_c 130,1) et C-3'/C-5' (δ_c 113,1).

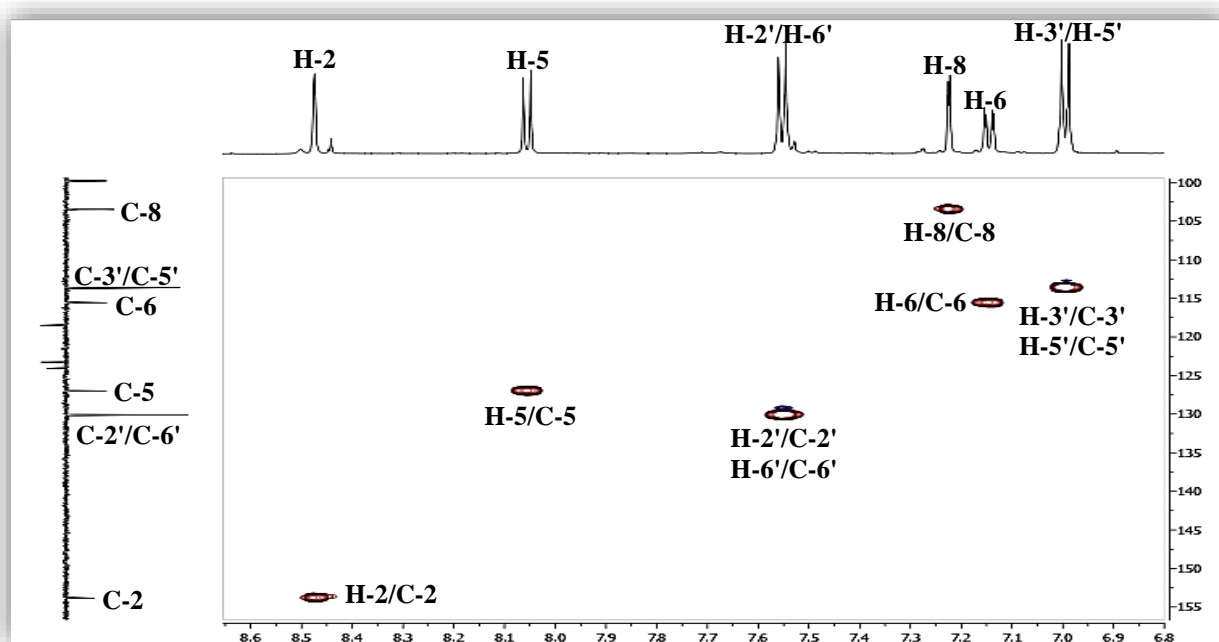


Figure II.37. Spectre HSQC de la génine du composé 2

L'expérience HMBC (Figures II.38 et II.39) permet de caractériser les carbones de l'isoflavone à travers les corrélations entre :

- Les protons H-6 (δ_H 7,15)/H-8 (δ_H 7,22) et deux carbones quaternaires, l'un oxygéné repéré à δ_C 161,2 (C-7) et l'autre à δ_C 118,5 (C-10).
- Le proton H-6 et un carbone CH sortant à δ_C 103,5 (C-8).
- Le proton H-8 et trois carbones résonant à 174,7 (C-4), 156,9 (C-9) et 115,6 ppm (C-6).
- Les protons H-2'/H-6' (δ_H 7,55) et les carbones repérés à δ_C 123,3 (C-3), 113,1 (C-3'/C-5') et 159,0 (C-4').
- Les protons H-3'/H-5' (δ_H 7,00) et les carbones quaternaires repérés à δ_C 124,1 (C-1') et 159,0 (C-4').
- Le proton H-5 (δ_H 8,06) et les carbones repérés à δ_C 174,7 (C-4), 161,2 (C-7) et 156,9 (C-9).
- Le proton H-2 (δ_H 8,49) et les carbones repérés à δ_C 174,7 (C-4), 123,3 (C-3), 124,1 (C-1') et 156,9 (C-9).

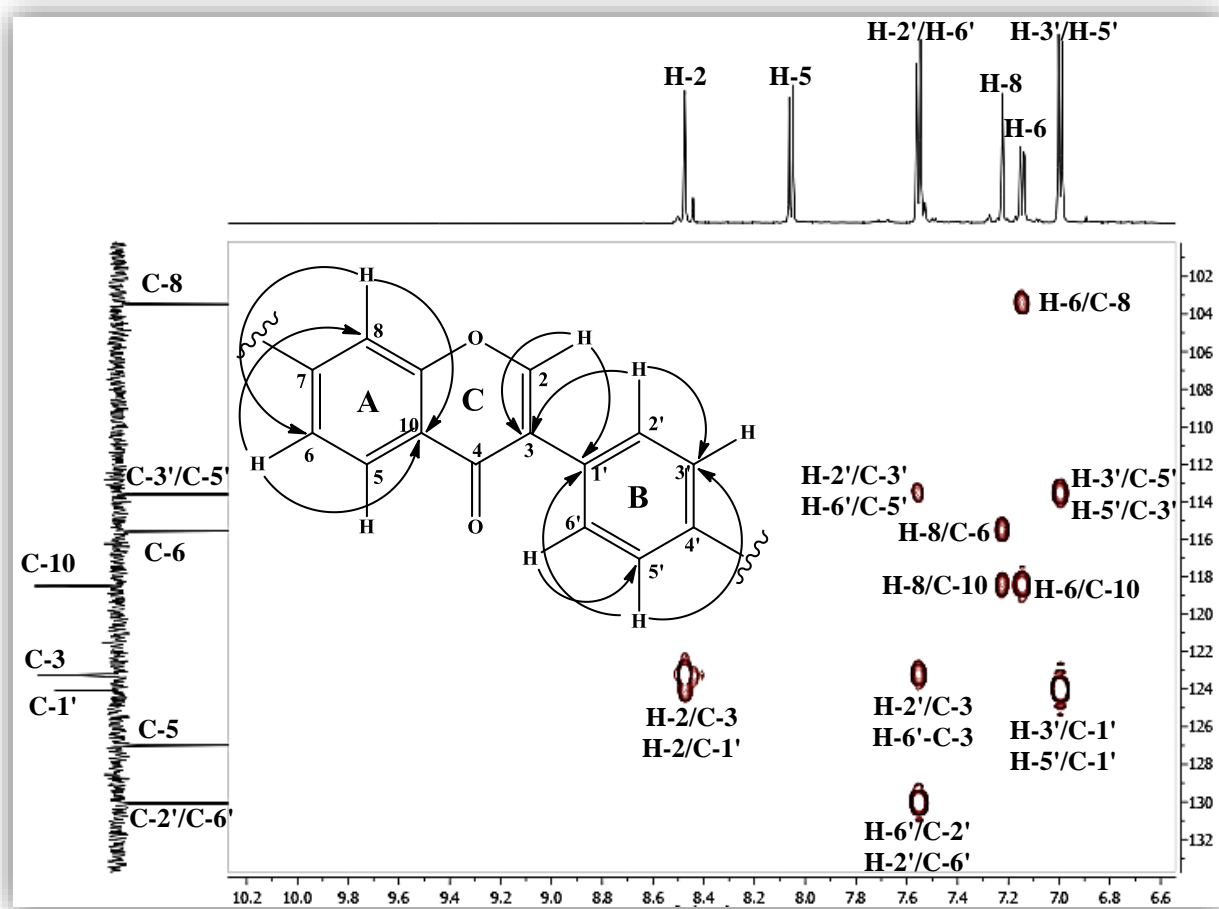


Figure II.38. Spectre HMBC de la génine du composé 2

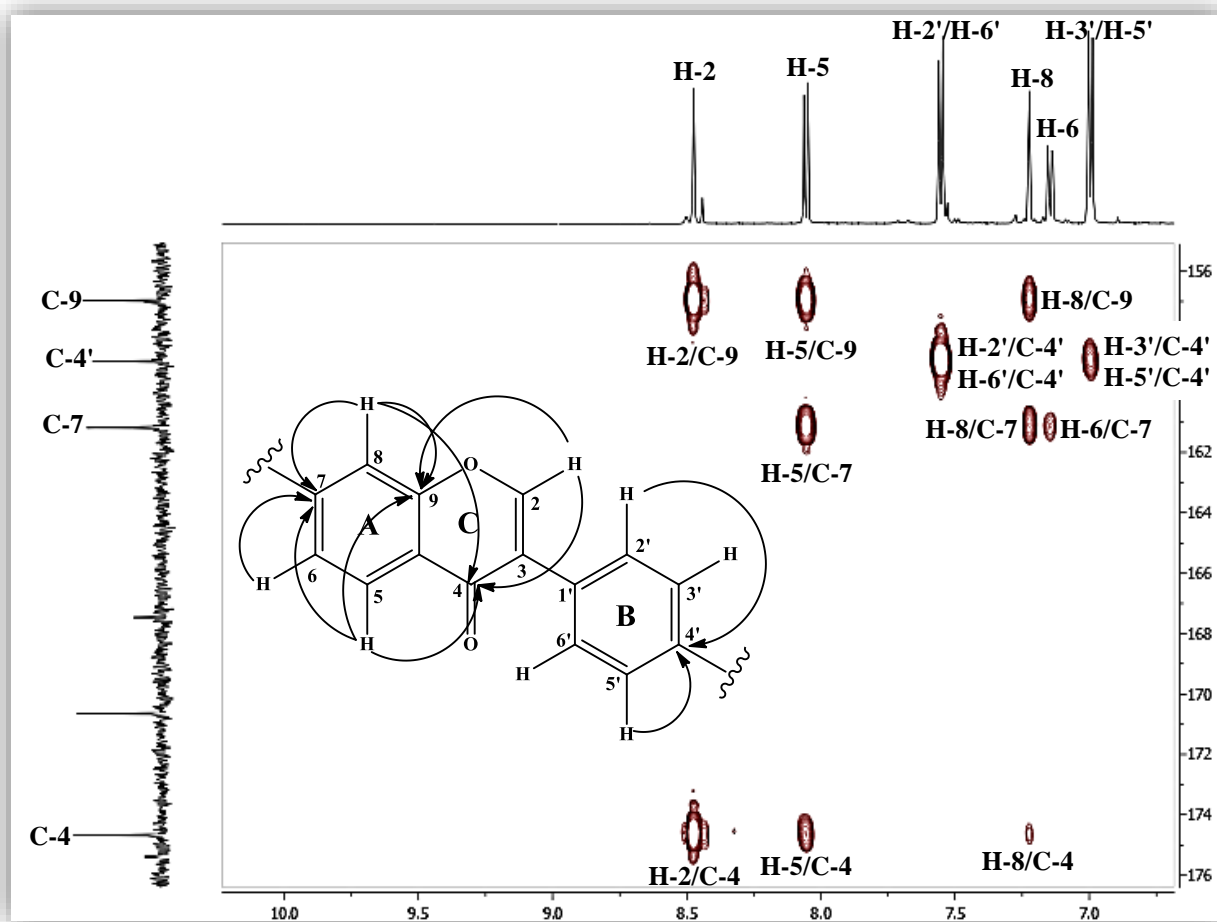


Figure II.39. Spectre HMBC de la partie génine du composé 2

L'expérience COSY H-H (Figure II.40) a permis d'identifier la partie osidique. A partir du proton anomère H-1'' (δ_H 5,14, *d*, $J = 7,0$ Hz), un système de spins à sept protons d'un hexose est établi via les corrélations H-1''/H-2'' (δ_H 3,33), H-2''/H-3'' (δ_H 3,34, *m*), H-3''/H-4'' (δ_H 3,23, *m*), H-4''/H-5'' (δ_H 3,71, *ddd*, $J = 9,0 ; 6,7 ; 2,1$ Hz), H-5''/H-6''b (δ_H 3,97, *dd*, $J = 11,9 ; 6,7$ Hz) et enfin H-6''b/H-6''a (δ_H 4,37, *dd*, $J = 11,9 ; 2,1$ Hz). Les valeurs de constantes de couplage indiquent qu'il s'agit d'un glucose de configuration β ($J_{H1''-H2''} = 7,0$ Hz).

Les valeurs de déplacements chimiques 4,37 et 3,97 ppm des protons H-6''b/H-6''a de l'unité osidique indiquent clairement sa substitution en C-6 par le groupement acyle.

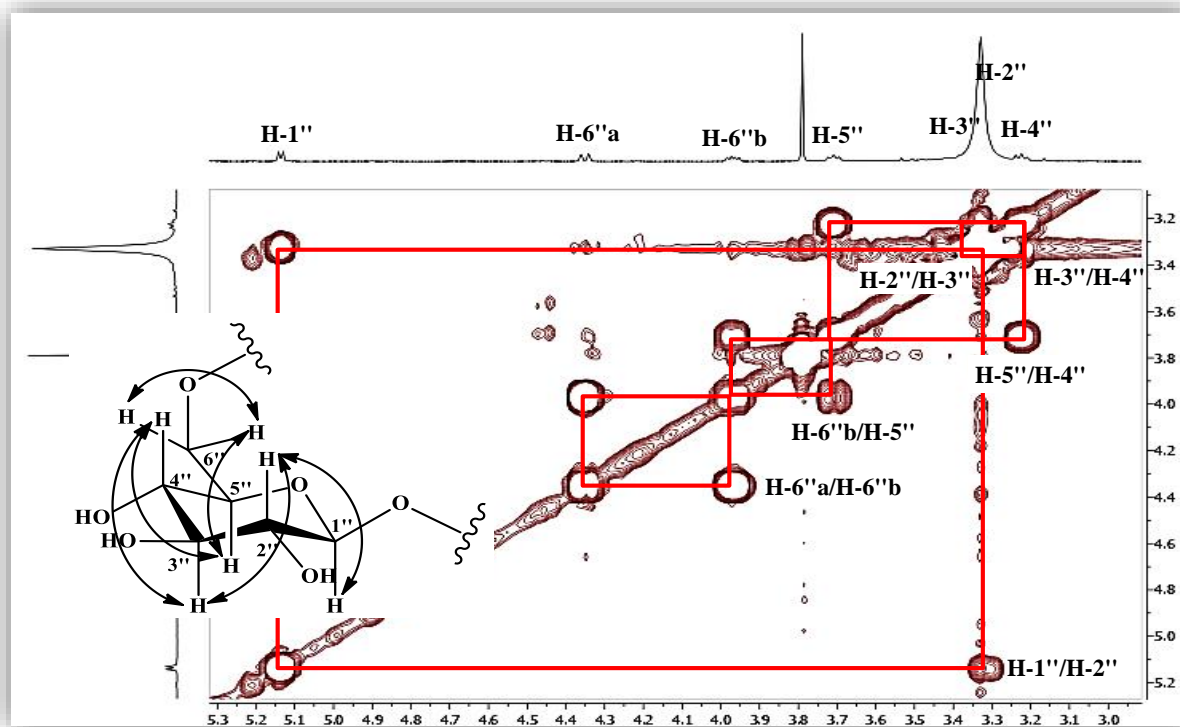


Figure II.40. Spectre COSY H-H de la partie osidique du composé 2

Le spectre HSQC (Figure II.41) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones du sucre : C-1'' (δ_c 99,8), C-2'' (δ_c 73,0), C-3'' (δ_c 76,2), C-4'' (δ_c 69,7), C-5'' (δ_c 74,0) et C-6'' (δ_c 62,9).

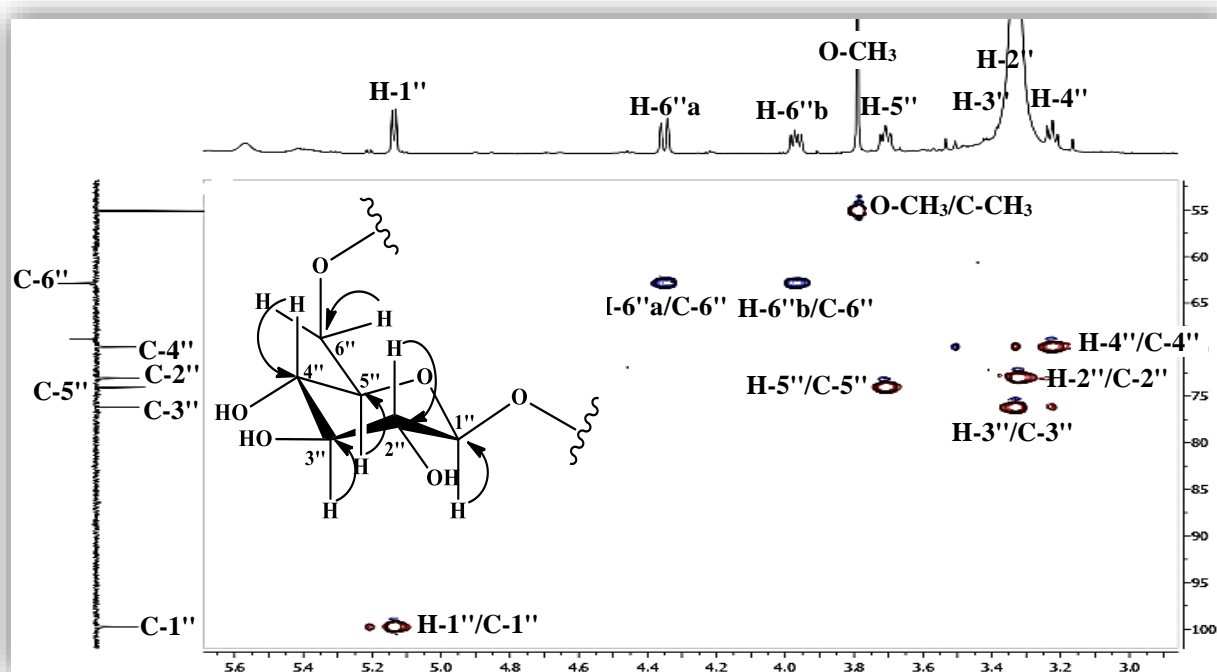


Figure II.41. Spectre HSQC de la partie osidique du composé 2

La présence d'un groupement 3-hydroxy-3-méthylglutaryle (HMG) substituant le glucose en C-6 a été établie sur la base des analyses conjointes des spectres RMN ^1H , RMN ^{13}C et HMBC.

Le spectre RMN ^1H (Figure II.42) montre, dans la zone aliphatique, la présence de protons de deux méthylènes [δ_{H} 2,38 (*dd*, $J= 4,4; 2,3$ Hz, $\text{H}_2\text{-2}''''$), δ_{H} 2,17 (*d*, $\text{H-4}''''\text{a}$), δ_{H} 1,95 (*d*, $\text{H-4}''''\text{b}$)] et de protons d'un groupement méthyle (δ_{H} 1,08, *s*, $\text{H}_3\text{-6}''''$). Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (Figure III.40) présente des signaux de carbones à δ_{C} 46,8 ($\text{C-2}''''$), δ_{C} 68,8 ($\text{C-3}''''$), δ_{C} 47,2 ($\text{C-4}''''$), δ_{C} 28,3 ($\text{C-6}''''$) ainsi que deux carbones de carbonyles à δ_{C} 170,7 ($\text{C-1}''''$) et 175,4 ($\text{C-5}''''$). Ces signaux sont caractéristiques d'un groupement HMG : acide 3-hydroxy-3-méthylglutaryle [63].

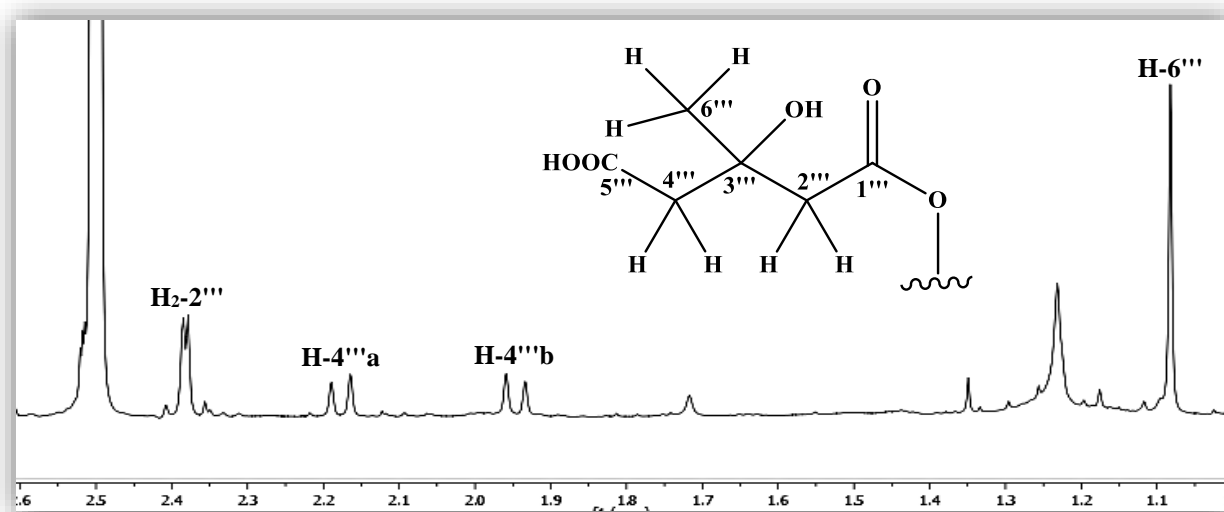


Figure II.42. Spectre RMN ^1H du composé 2

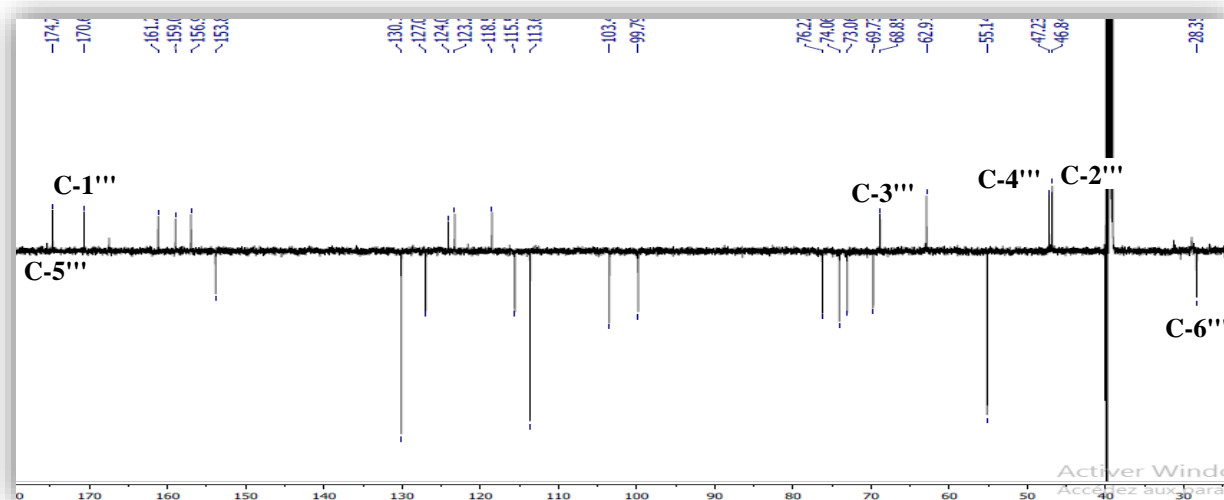


Figure II.43. Spectre RMN ^{13}C du composé 2

Le fragment à $m/z = 267,0633$ [M-Glu-HMG-H^-] (calc. $\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_4$, 267.0652), observé sur le spectre de masse confirme aussi la présence de ce groupement (Figure II.44).

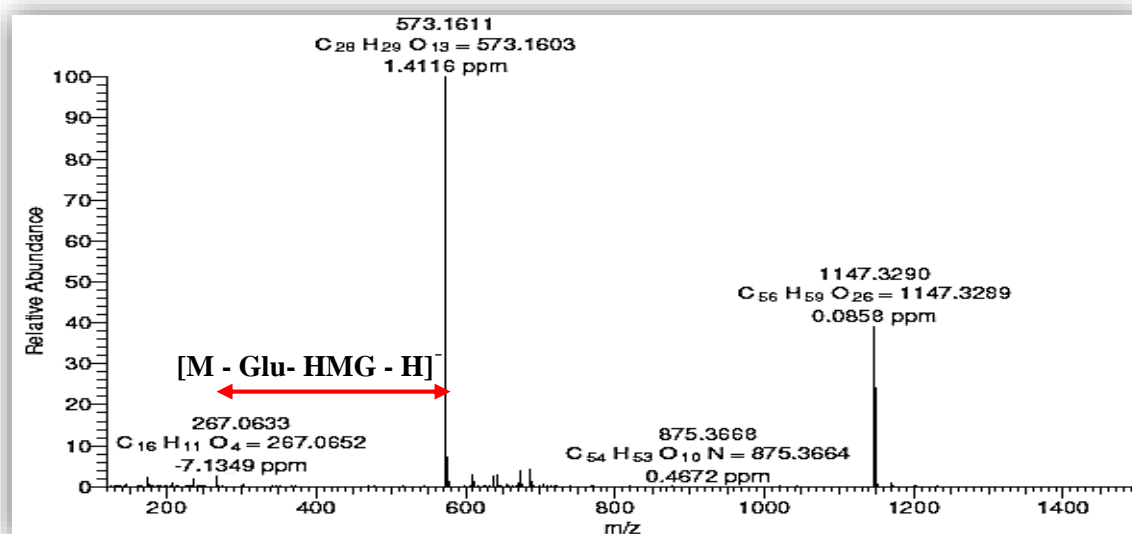


Figure II.44. Spectre de masse HRESI du composé 2

Le spectre HMBC (Figures II.45 et II.46) permet de retrouver toutes les corrélations attendues pour ce groupement : H₂-2''' (δ_{H} 2,38)/C-1''' (δ_{C} 170,7), H₂-2'''/C-4''' (δ_{C} 47,2), H₂-2'''/C-3''' (δ_{C} 68,8), H-4'''a (δ_{H} 2,17)/H-4'''b (δ_{H} 1,95) et C-2''' (δ_{C} 46,8), C-3''', C-5''' (δ_{C} 175,4) et C-6''' (δ_{C} 28,3), entre H₃-6''' (δ_{H} 1,08) et C-2''', C-3''' et C-4'''.

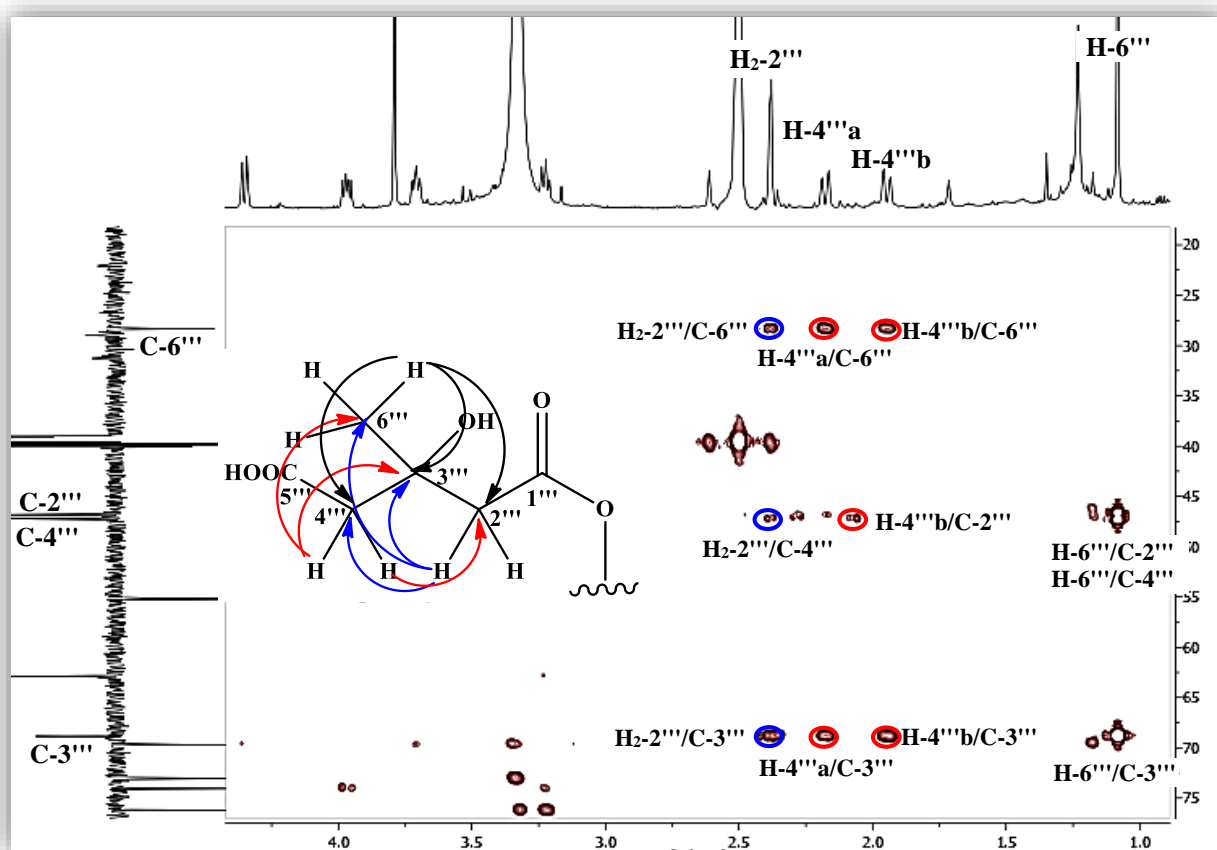


Figure II.45. Spectre HMBC de la partie HMG du composé 2

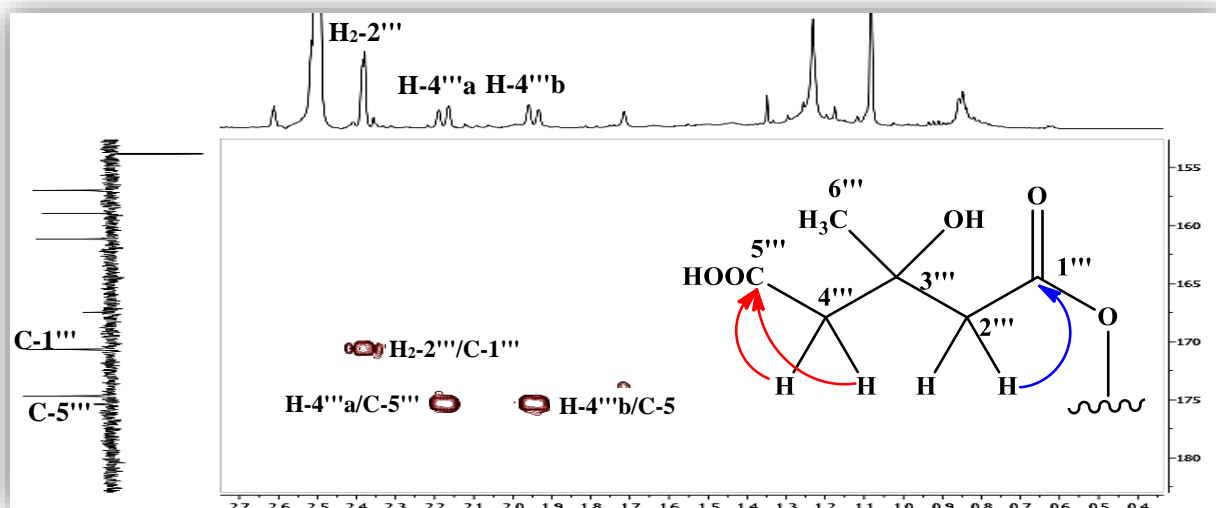


Figure II.46. Spectre HMBC de la partie HMG du composé 2

D'autres corrélations sont visualisées sur le spectre HMBC (Figure II.47) entre :

- Le proton anomère H-1'' (δ_H 5,14) du glucose et le carbone C-7 (161, 2 ppm), indiquant que le sucre est positionné en C-7.
- Les protons du groupement méthoxyle (δ_H 3,79) et le carbone C-4' (159,0 ppm), indiquant que le groupe méthoxyle est localisé en C-4'.
- Les protons H-6''a (δ_H 4,37) et H-6''b (δ_H 3,96) et le carbone de carbonyle du groupement ester résonant à 170,6 ppm (C-1'''), confirmant la substitution à ce niveau par le groupement HMG.

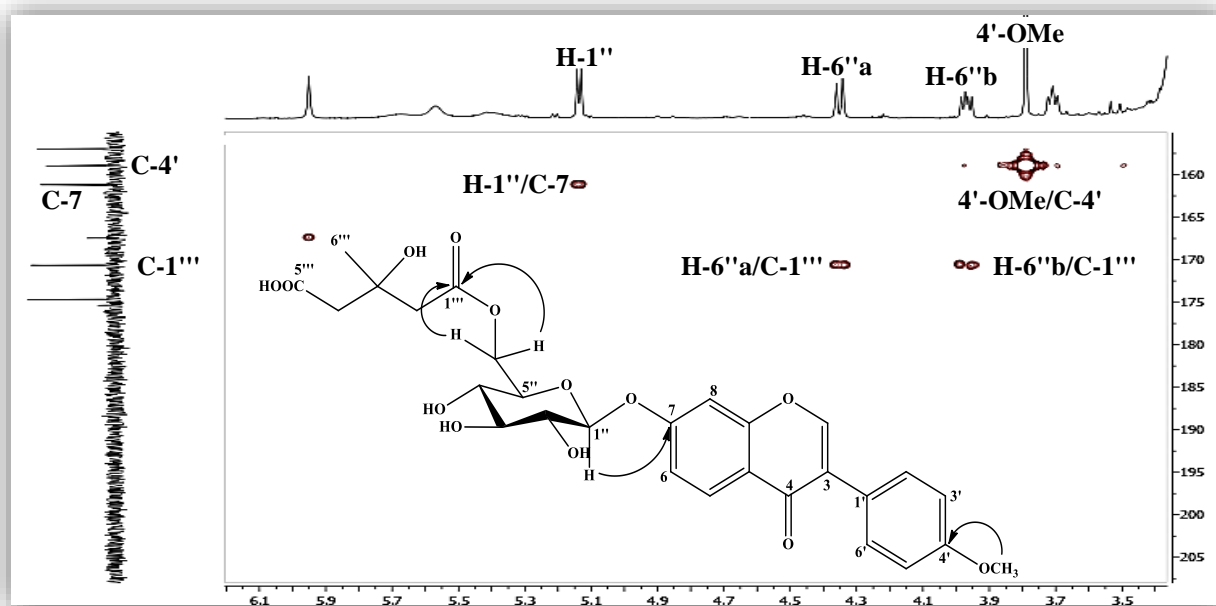
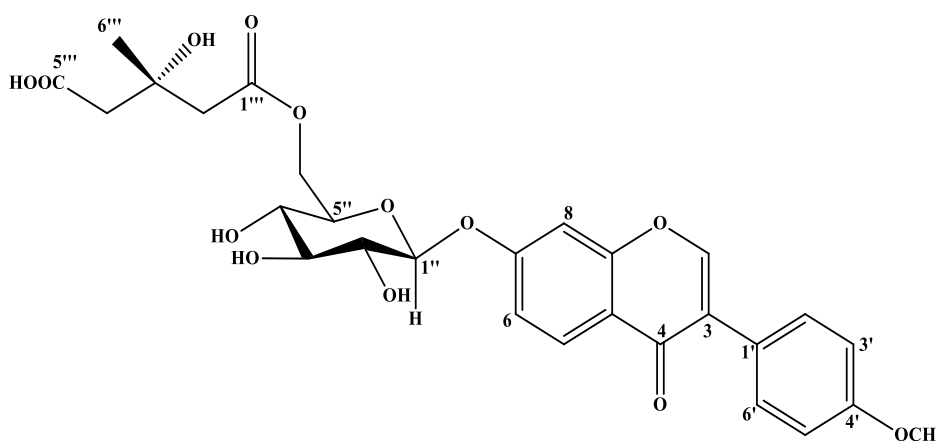


Figure II.47. Spectre HMBC du composé 2

La configuration absolue du centre chiral du groupe HMG a été établie comme *S*, conformément à la voie mévalonique biosynthétique, selon laquelle les esters HMG naturels se forment via l'acylation d'un groupe OH par (3*S*)-HMG-CoA [64,65].

L'ensemble des données spectroscopiques permettent d'identifier ce nouvel isoflavonoïde nommé : formononétine-7-*O*-[6''-*O*-((*S*)-3-hydroxy-3-méthylglutaryl)]-β-D-glucopyranoside. Il est à souligner que c'est la première fois qu'un isoflavonoïde avec un groupe HMG est identifié dans le genre *Ononis* et dans la famille Fabaceae.



Formononétine-7-*O*-[6''-*O*-((*S*)-3-hydroxy-3-méthylglutaryl)]-β-D-glucopyranoside

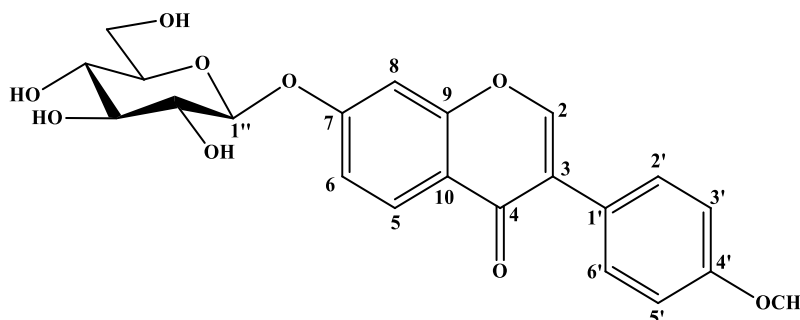
Les valeurs de déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont représentées dans le tableau II.2.

Tableau II.2. Données RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) du composé **2** dans $\text{DMSO-}d_6$

Position	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	δ_{C} (ppm)
2	8,49 (<i>d</i> , 1,7)	153,9
3	-	123,9
4	-	174,7
5	8,06 (<i>d</i> , 8,9)	127,0
6	7,15 (<i>dd</i> , 8,9; 2,3)	115,6
7	-	161,2
8	7,22 (<i>d</i> , 2,3)	103,5
9	-	156,9
10	-	118,5
1'	-	124,1
2'	7,55 (<i>d</i>)	130,1
3'	7,00 (<i>d</i>)	113,1

4'	-	159,0
5'	7,00 (<i>d</i>)	113,1
6'	7,55 (<i>d</i>)	130,1
1''	5,14 (<i>d</i> , 7,0)	99,8
2''	3,33 (<i>m</i>)	73,0
3''	3,34 (<i>m</i>)	76,2
4''	3,23 (<i>m</i>)	69,7
5''	3,71 (<i>ddd</i> , 9,0; 6,7; 2,1)	74,0
6''a	4,37 (<i>dd</i> , 11,9; 2,1)	62,9
6''b	3,97 (<i>dd</i> , 11,9; 6,7)	
OMe-4'	3,79 (<i>s</i>)	55,1
1'''	-	170,7
2'''	2,38 (<i>dd</i> , 4,4; 2,3)	46,8
3'''	-	68,8
4'''a	2,17 (<i>d</i>)	47,2
4'''b	1,95 (<i>d</i>)	
5'''	-	175,4
6'''	1,08 (<i>s</i>)	28,3

II.4.10. Elucidation structurale du composé 3



4'-méthoxyisoflavone 7-O-β-D-glucopyranoside (Ononine)

Le composé **3**, visible en UV (254 nm), a été obtenu sous forme d'une poudre blanche. Son spectre de masse ESI à haute résolution (Figure II.48), enregistré en mode positif, montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 431,1409$ $[M+H]^+$ (calc. 431,1337, $C_{22}H_{23}O_9$), soit une masse moléculaire égale à 430 uma et correspondant à une formule brute en $C_{22}H_{22}O_9$.

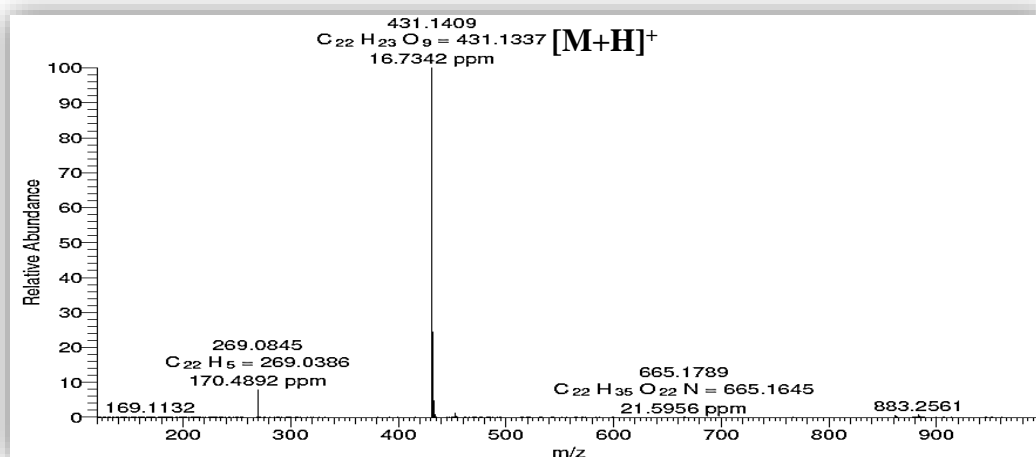


Figure II.48. Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **3**

Son spectre RMN ^1H (Figure II.49) enregistré dans le DMSO- d_6 , présente beaucoup de similitudes avec celui du composé **2**, notamment au niveau de l'aglycone et l'unité osidique dont le proton anomère est repéré à δ_{H} 5,11 (*d*, $J = 7,2$ Hz).

On reconnaît aisément :

- le proton H-2 sortant à δ_{H} 8,44 (1H, *s*) de l'isoflavone.
- les protons H-2'/H-6', H-3'/H-5' sortant respectivement à δ_{H} 7,00 (2H, *d*) et 7,53 (2H, *d*) et confirmés par expérience COSY H-H (Figure III.50).
- les protons H-5, H-6 et H-8 repérés respectivement à δ_{H} 8,06 (1H, *d*, $J = 8,9$ Hz), 7,15 (1H, *dd*, $J = 8,9 ; 2,3$ Hz) et 7,24 (1H, *d*, $J = 2,3$ Hz), confirmés également par expérience COSY H-H (Figure II.49).

Il met aussi en évidence la présence d'un groupement méthoxyle à travers un signal singulet à 3,79 ppm.

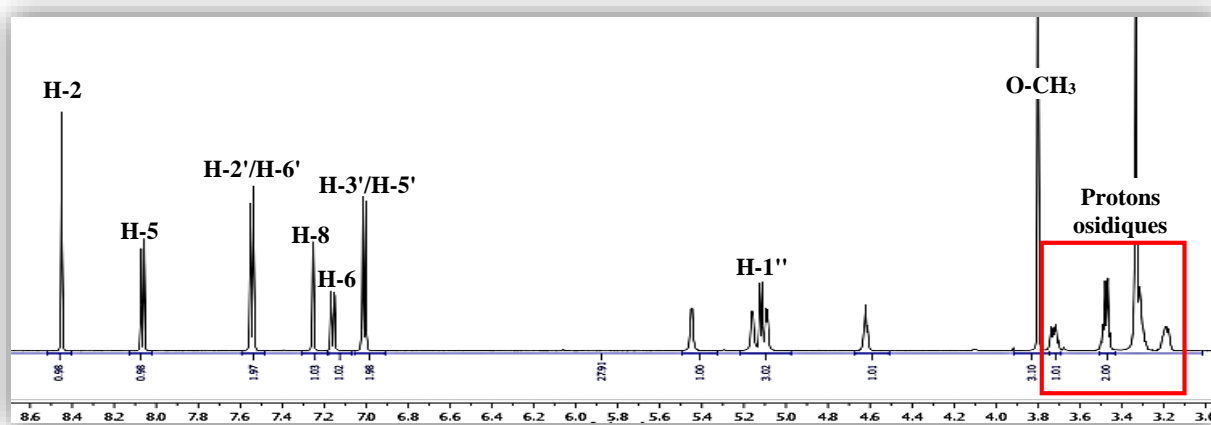


Figure II.49. Spectre RMN ^1H du composé **3** (600 MHz, DMSO- d_6)

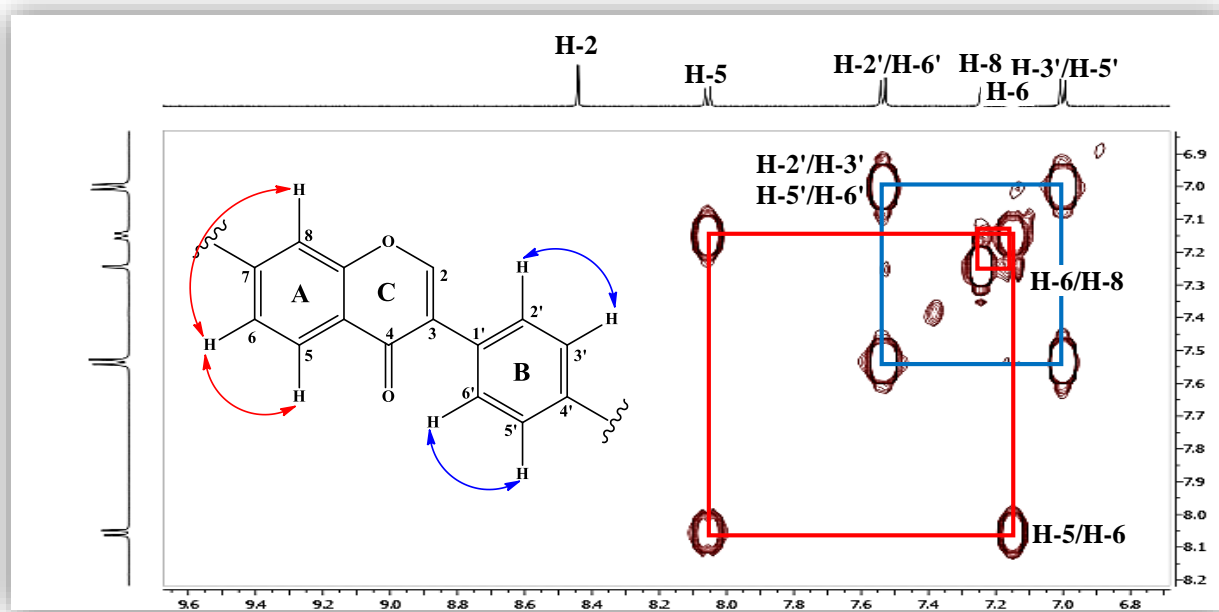


Figure II.50. Spectre COSY H-H du composé 3 (Partie génine)

A partir des protons cités précédemment, l'expérience HSQC (Figure II.51) permet d'identifier les carbones qui les portent. Ces derniers sont repérés à δ_C 153,7 (C-2), 127,0 (C-5), 115,6 (C-6), 103,4 (C-8), 130,1 (C-2'/C-6'), 113,6 (C-3'/C-5').

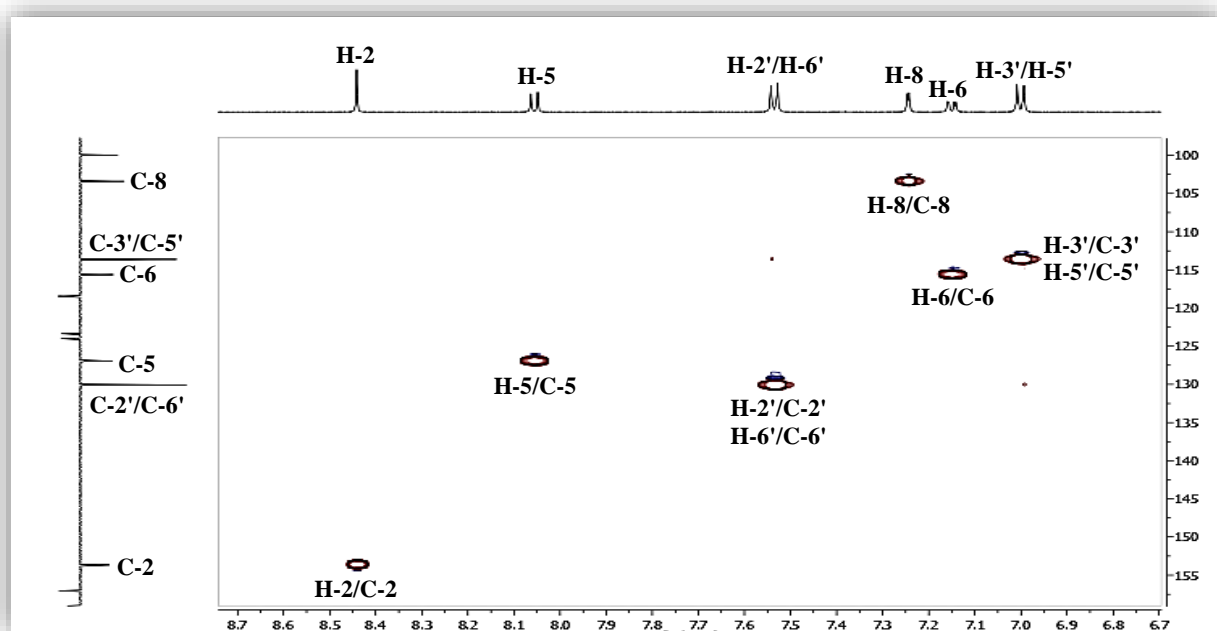


Figure II.51. Spectre HSQC du composé 3

A partir du proton anomère H-1'' (δ_H 5,11, *d*, $J = 7,2$ Hz), l'analyse du spectre COSY H-H (Figure II.52) permet d'identifier l'unité osidique à un glucose de configuration β ($J_{H1''-H2''} = 7,2$ Hz), et cela à travers les couplages H-1''/H-2'' (δ_H 3,29, *t*, $J = 9,1$ Hz), H-2''/H-3'' (δ_H 3,30, *t*, $J = 9,1$

H_z), H-3''/H-4'' (δ_{H} 3,18, *td*, $J = 8,6; 3,9$ Hz), H-4''/H-5'' (δ_{H} 3,45, *m*), H-5''/H-6''b (δ_{H} 3,47, *dd*, $J = 9,6; 4,4$ Hz) et enfin H-6''b/H-6''a (δ_{H} 3,72, *dd*, $J = 9,6; 5,0$ Hz).

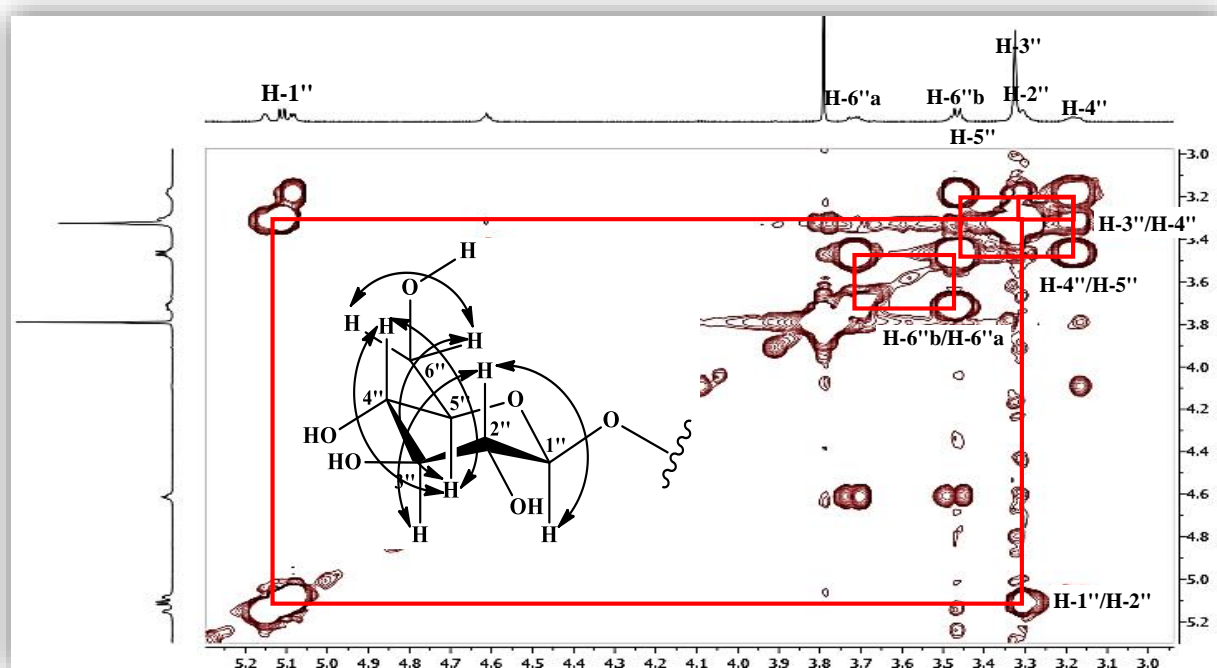


Figure II.52. Spectre COSY H-H du composé **3** (Partie osidique)

Les carbones de cette unité osidique ont été assignés par expérience HSQC (Figure II.53) : C-1'' (δ_{C} 99,9), C-2'' (δ_{C} 73,1), C-3'' (δ_{C} 76,5), C-4'' (δ_{C} 69,6), C-5'' (δ_{C} 77,2) et C-6'' (δ_{C} 60,6).

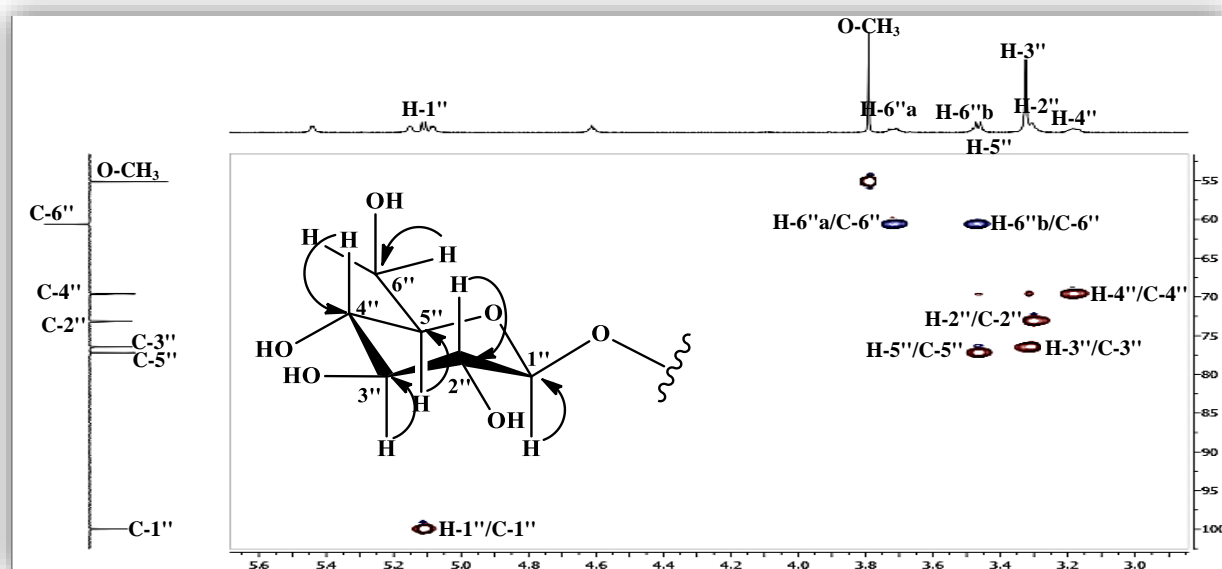


Figure II.53. Spectre HSQC du composé **3** (Partie osidique)

Le spectre HMBC permet de retrouver toutes les corrélations observées pour le composé **2**. L'observation sur le même spectre (Figure II.53) d'un couplage longue distance OCH₃ (δ_{H} 3,79)/C-

4' (δ_C 159,0) et H-1'' (δ_H 5,11, *d*, $J = 7,2$ Hz)/C-7 (δ_C 161,4) confirme que le groupement méthoxyle et le sucre sont positionnés en C-4' et C-7 respectivement.

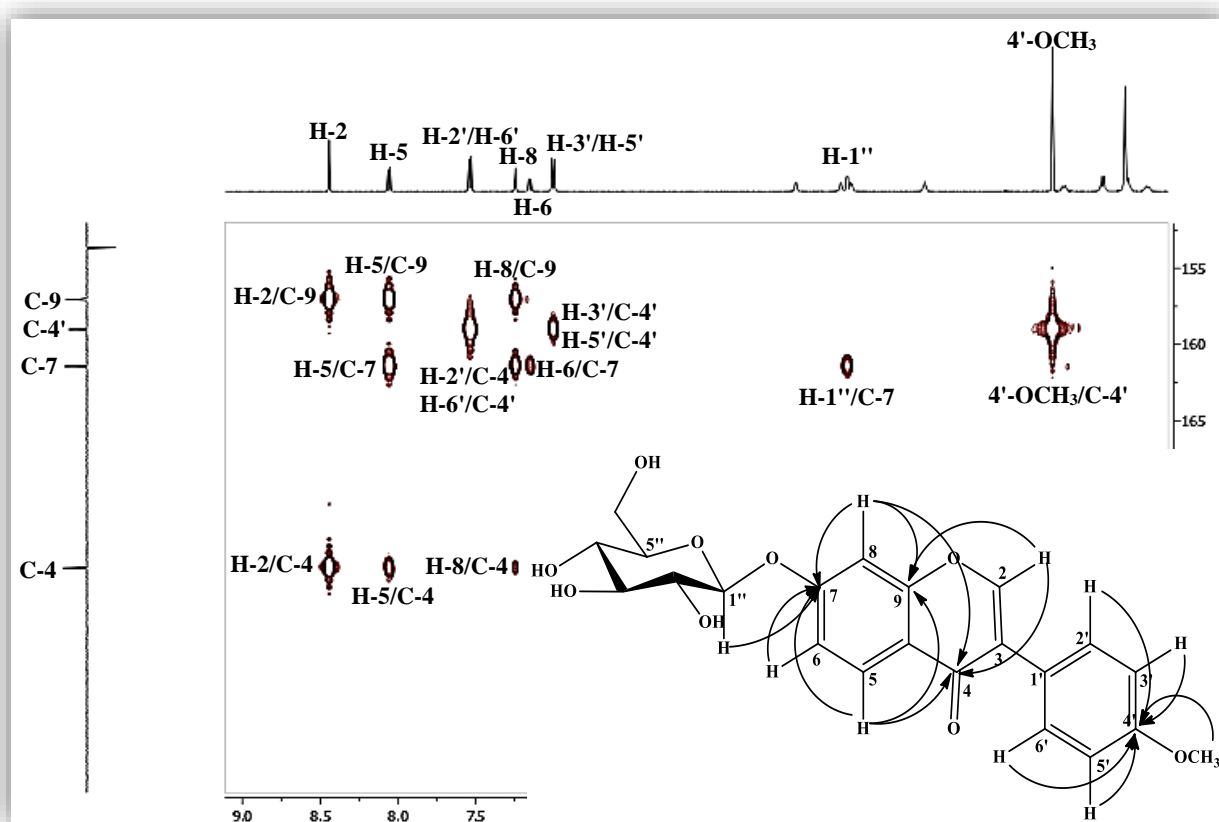


Figure II.54. Spectre HMBC du composé 3

L'analyse combinée des spectres HSQC et HMBC permet de déterminer les déplacements chimiques de tous les carbones de la molécule (Figure II.55).

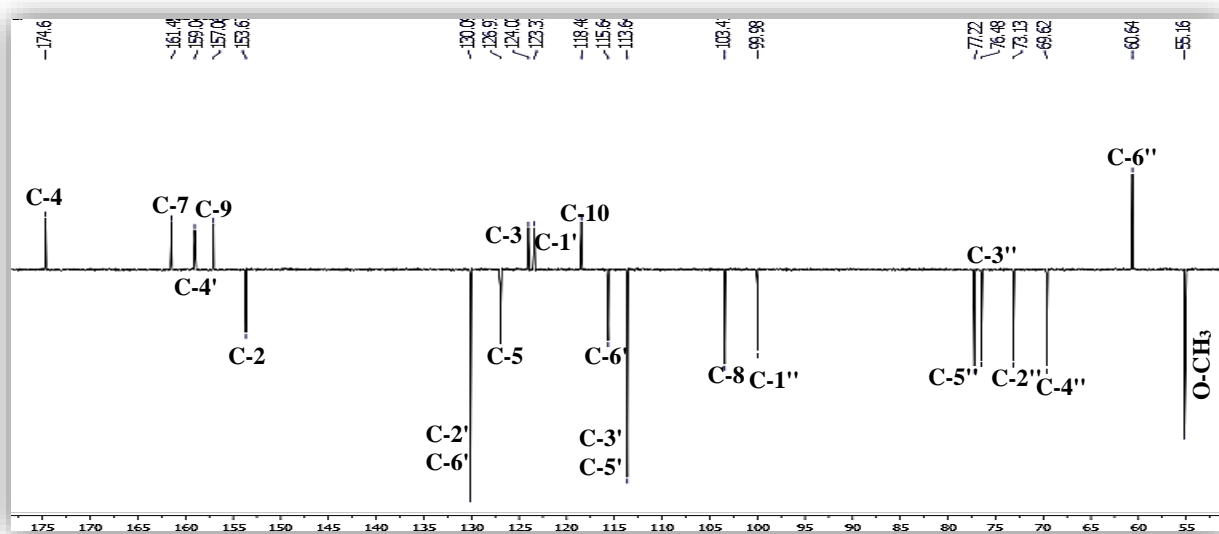
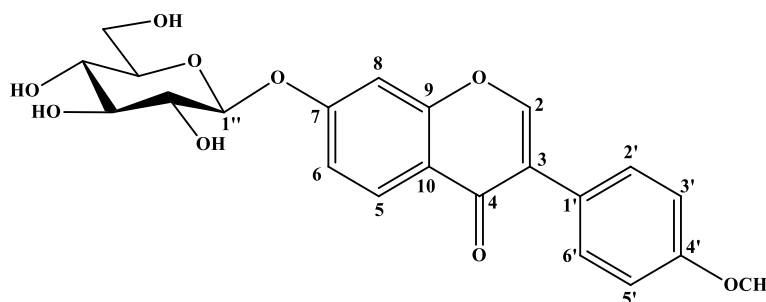


Figure II.55. Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé 3

Cette analyse spectrale permet d'attribuer sans ambiguïté au composé **3**, la structure suivante:



4'-méthoxyisoflavone 7-O-β-D-glucopyranoside (Ononine)

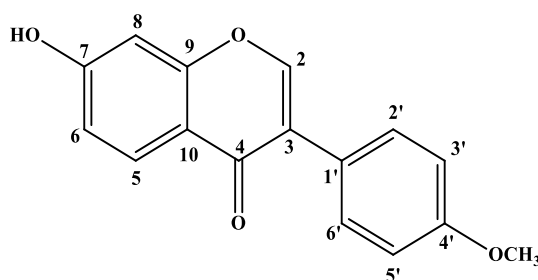
Les données spectroscopiques du composé **3**, représentées dans le tableau II.3, sont aussi en parfait accord avec celles de la littérature [66]. Ce composé appelé ononine a été identifié dans certaines espèces du genre *Ononis* comme *O. spinosa*. L [56], *O. pusilla* [14], *O. arvensis* et *O. spinosa* subsp. *leiosperma* [67, 68]. Il a été rencontré également dans certaines espèces appartenant à la famille Fabaceae comme *Glycyrrhiza aechinata*, *Glycyrrhiza glabra* [48], *Maackia amurensis* [69] et *Caragana arborescens* [70].

Tableau II.3. Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **3** dans DMSO- d_6

Position	δ_H (m, J en Hz)	δ_C (ppm)
2	8,49 (s)	153,7
3	-	124,0
4	-	174,7
5	8,06 (d, 8,9)	127,0
6	7,15 (dd, 8,9; 2,3)	115,6
7	-	161,4
8	7,24 (d, 2,3)	103,4
9	-	157,1
10	-	118,4
1'	-	123,4
2'	7,53 (d)	130,1
3'	7,00 (d)	113,6
4'	-	159,0
5'	7,00 (d)	113,6
6'	7,55 (d)	130,1
1''	5,11 (d, 7,2)	99,9
2''	3.29 (t, 7,2)	73,1

3''	3,30 (<i>t</i> , 9,1)	76,5
4''	3,18 (<i>td</i> , 3,9, 8,6)	69,6
5''	3,45 (<i>m</i>)	77,2
6''a	3,72 (<i>dd</i> , 9,6 ; 5,0)	60,6
6''b	3,46 (<i>dd</i> , 9,6 ; 4,4)	
4'-OCH ₃	3,79 (<i>s</i>)	55,2

II.4.4. Elucidation structurale du composé 4



7-hydroxy-4'-méthoxyisoflavone (formononétine)

Le composé **4** a été obtenu sous forme d'une poudre blanche. Ses spectres de masse ESI en haute résolution, enregistrés en modes positif (Figure II.56) et négatif (Figure II.57), montrent des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 269,0818$ $[M+H]^+$ (calc. C₁₆H₁₃O₄, 269,0808) et 267,0661 $[M-H]^-$ (calc. C₁₆H₁₁O₄, 267,0652), soit une masse moléculaire égale à 268 uma et correspondant à la formule brute en C₁₆H₁₂O₄.

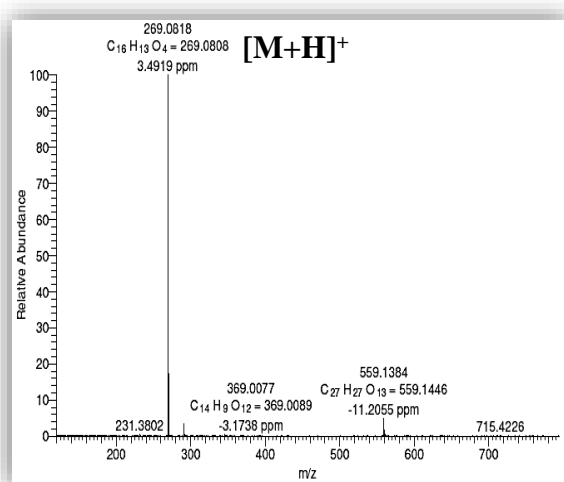


Figure II.56. Spectre de masse HRESI⁺
du composé **4**

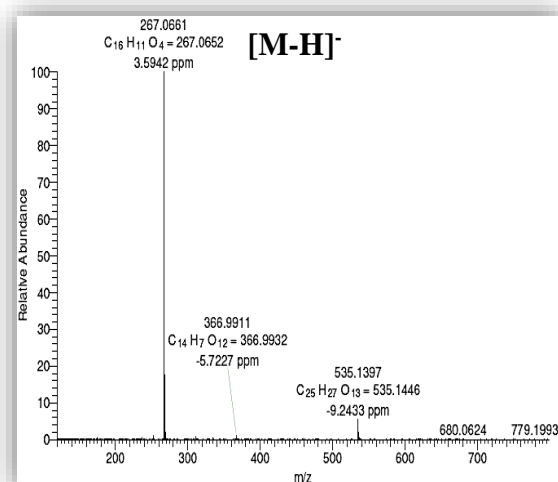


Figure II.57. Spectre de masse HRESI⁻
du composé **4**

Le spectre RMN ^1H (Figure II.58) du composé **4**, enregistré dans le DMSO- d_6 , permet de retrouver globalement les signaux des protons de la génine isoflavonique du composé **3** à l'exception des protons osidiques. En effet, il est observé :

- Un signal à δ_{H} 8,33 (s), très caractéristique du proton H-2 d'une isoflavone.
- Deux signaux d'intégration 2H chacun à δ_{H} 6,98 (d) et 7,51 (d), attribués respectivement aux protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6' du cycle B paradisubstitué de l'isoflavone.
- Trois signaux résonant à δ_{H} 6,87 (1H, d, $J = 2,2$ Hz), 6,94 (1H, dd, $J = 8,7, 2,2$ Hz) et 7,96 (1H, d, $J = 8,7$ Hz), formant un système ABX attribuables respectivement aux protons H-8, H-6 et H-5 du cycle A substitué en C-7.
- Un signal à δ_{H} 3,78 (3H, s), correspondant à un groupe méthoxyle O-CH₃.
- Un signal à δ_{H} 10,83 qui ne montre aucune corrélation sur le spectre HSQC, attribué à un proton hydroxyle.

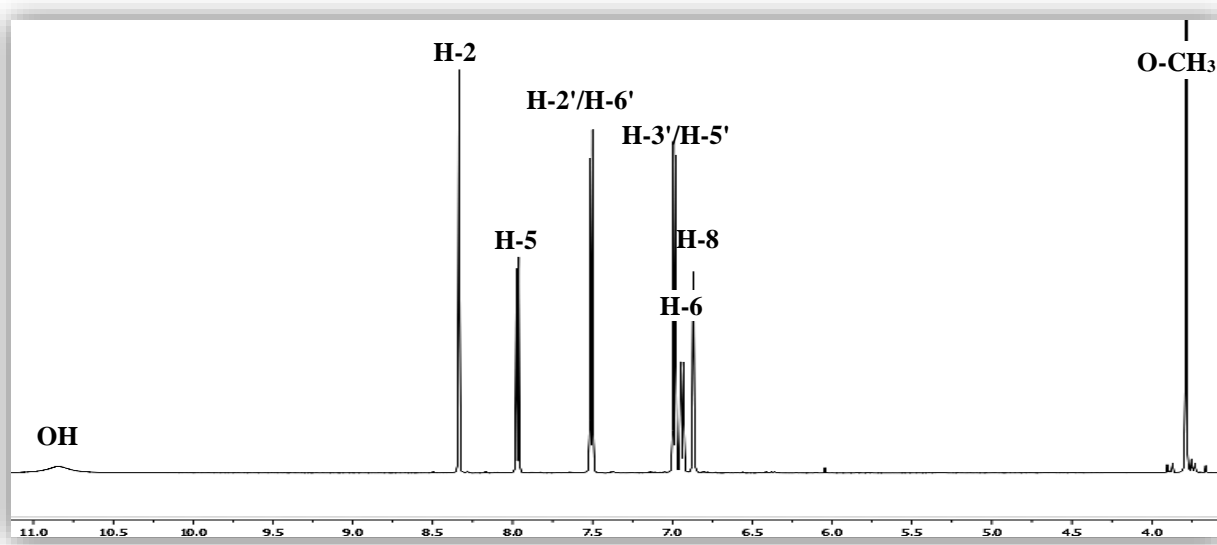


Figure II.58. Spectre RMN ^1H du composé **4**

Le spectre RMN ^{13}C J -modulé (Figure II.59) montre les signaux correspondant à sept carbones quaternaires (δ_{C} 116,6-174,6) dont un carbone de carbonyle (δ_{C} 174,6) et huit CH aromatiques (δ_{C} 102,1-153,1). Le signal du carbone résonant à δ_{C} 153,1 est très caractéristique du carbone C-2 d'une isoflavone. Le signal de carbone résonant à δ_{C} 55,1 atteste de la présence d'un groupement OCH₃.

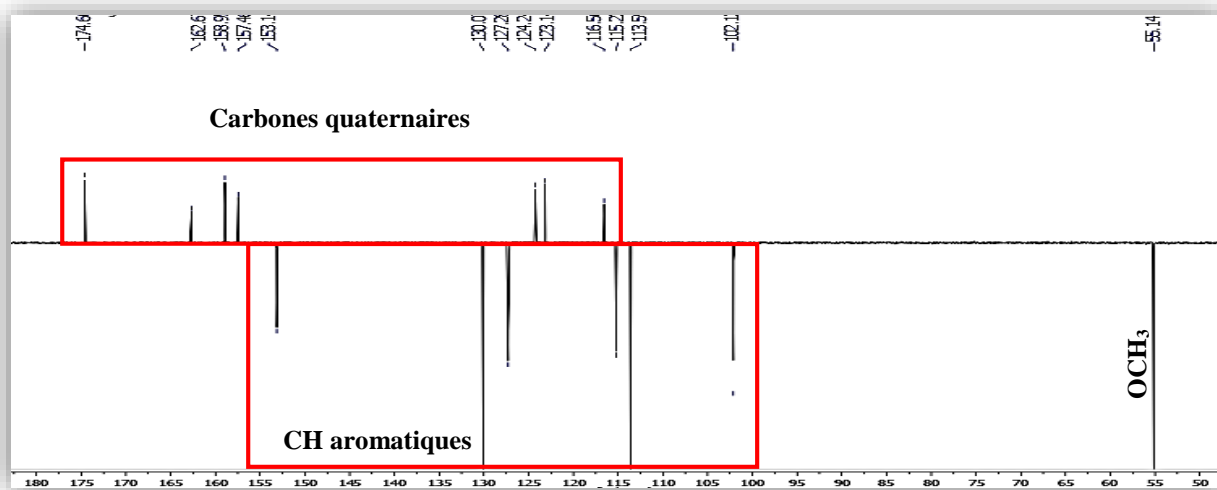


Figure II.59. Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé 4

L'expérience COSY H-H (Figure II.60) montre les corrélations attendues entre les protons H-5/H-6/H-8 du cycle A et met aussi en évidence le système de spins constitué par les protons H-5', H-6', H-3' et H-2' du cycle B.

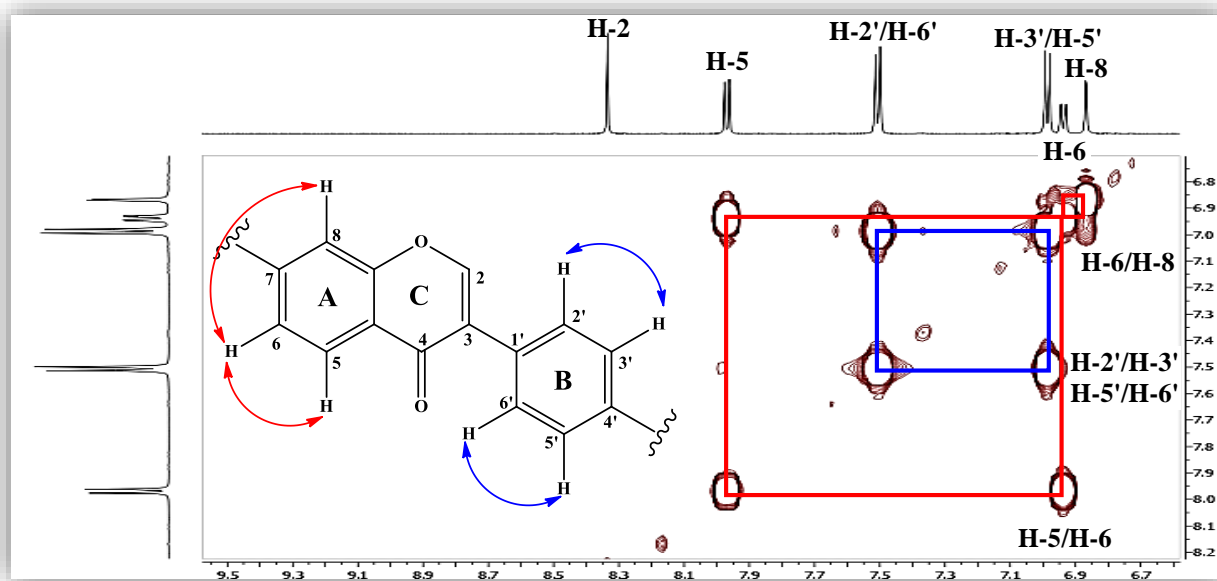


Figure II.60. Spectre COSY H-H du composé 4

L'analyse du spectre HSQC (Figure II.61) confirme le caractère isoflavonique du composé à travers la corrélation H-2 (δ_{H} 8,33, s)/C-2 (δ_{C} 153,1). Elle permet de caractériser les autres carbones CH que sont C-5 (δ_{C} 127,3), C-6 (δ_{C} 115,2), C-8 (δ_{C} 102,1), C-2'/C-6' (δ_{C} 130,1) et C-3'/C-5' (δ_{C} 113,6).

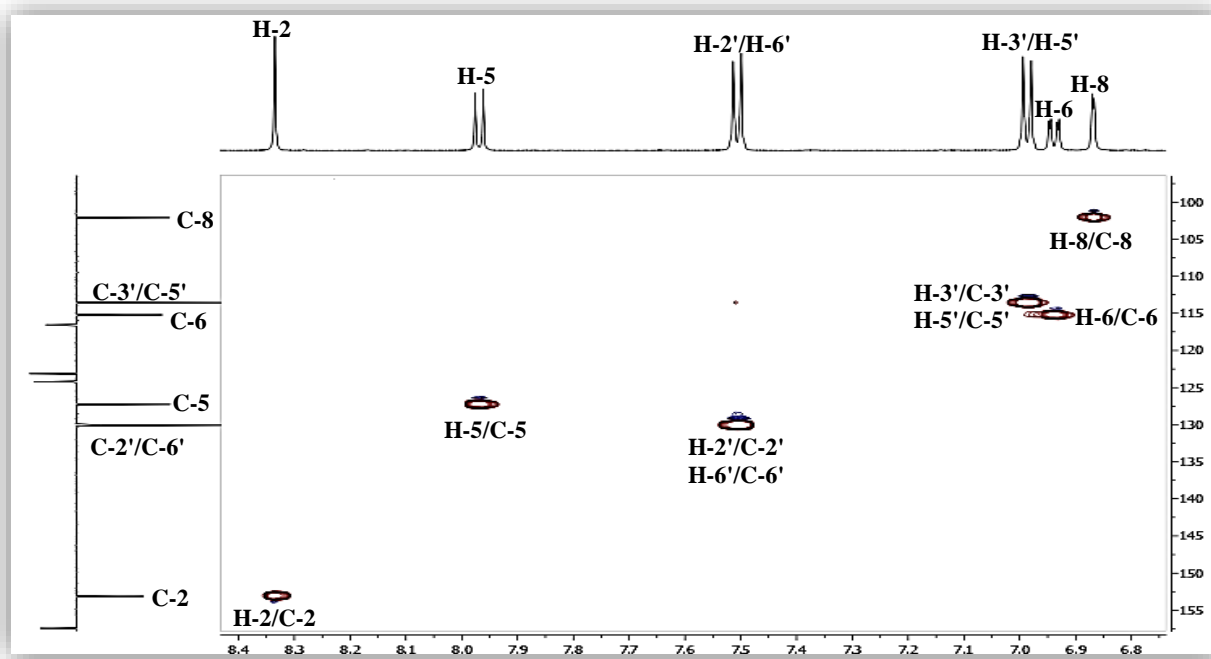


Figure II.61. Spectre HSQC du composé 4

L'élucidation structurale du composé 4 est confirmée par le spectre HMBC (Figures II.62 et II.63) qui montre les corrélations entre le proton H-2 (δ_H 8,33, δ_C 153,1) et quatre carbones quaternaires résonant à δ_C 157,5, 174,6, 124,2 et 123,1. Le premier carbone est attribué facilement au carbone aromatique C-9 (δ_C 157,5), tandis que le deuxième correspond au carbone C-4. Le troisième carbone C-3 (δ_C 124,2) présente une tache de corrélation en HMBC avec les protons H-2'/H-6' (δ_H 7,50) du cycle B. Le dernier carbone est identifié au carbone C-1' (δ_C 123,1) du fait de sa corrélation avec les protons H-3'/H-5' (δ_H 6,98).

L'expérience HMBC (Figures II.62 et II.63) a permis d'identifier les autres carbones quaternaires du composé à travers les appropriés couplages en 2J et 3J : C-7 (δ_C 162,7), C-10 (δ_C 116,6) et C-4' (δ_C 159,0).

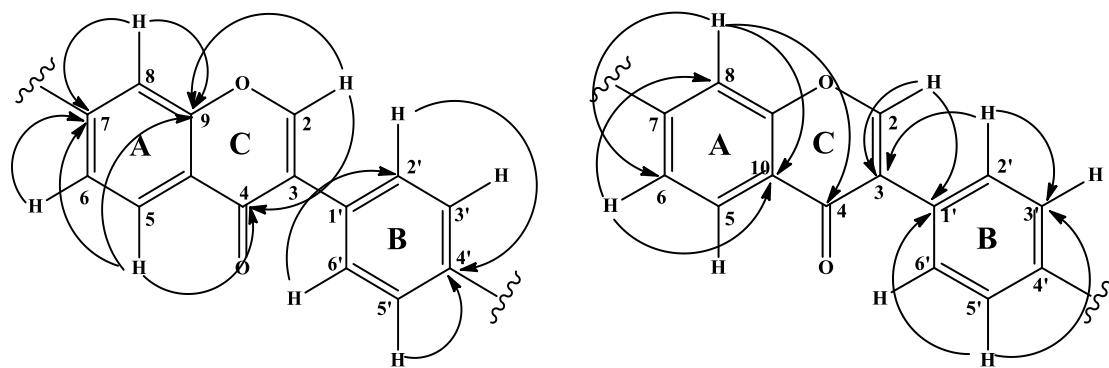


Figure II.62. Corrélations HMBC observées pour le composé 4

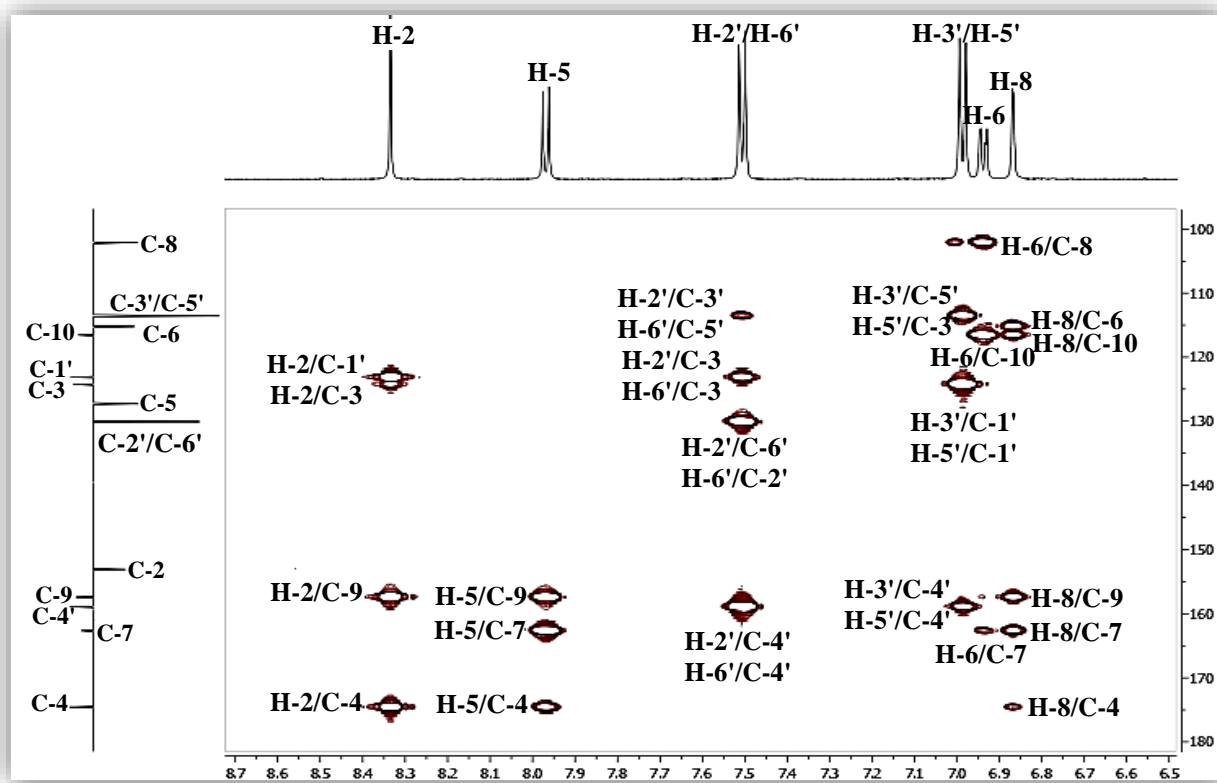


Figure II.63. Spectre HMBC du composé 4

La position du groupement méthoxyle en C-4' (Figures II.64) est assignée par la corrélation HMBC OCH₃ (δ_H 3,78, *s*, 3H)/C-4' (δ_C 159,0).

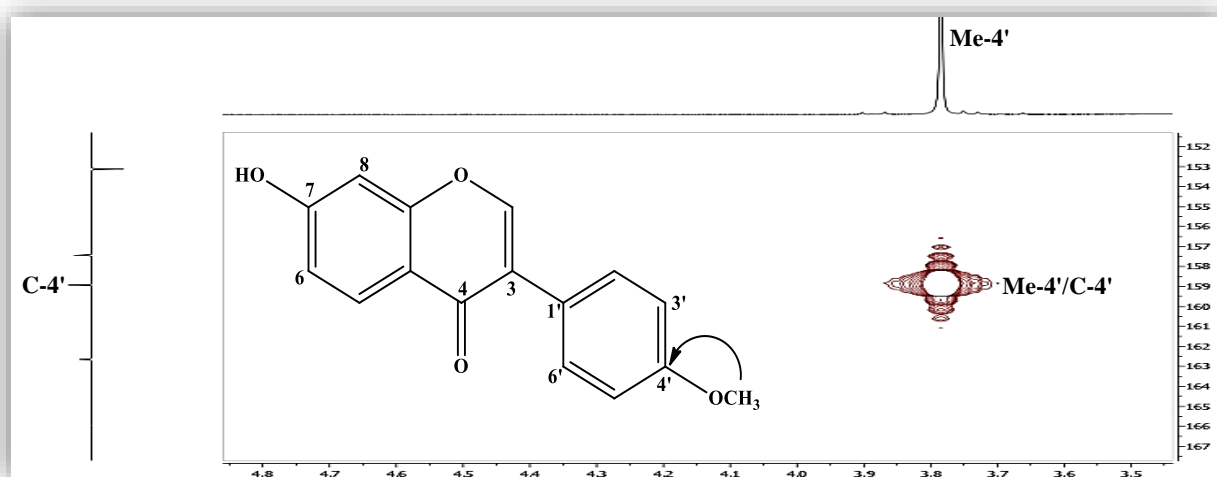


Figure II.64. Spectre HMBC du composé 4

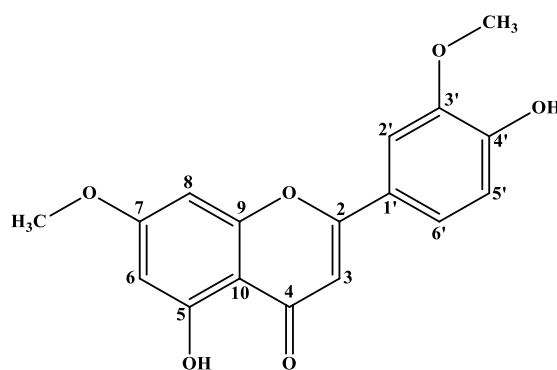
L'ensemble de ces données spectrales ainsi que la comparaison avec les données de la littérature permettent d'identifier le composé 4 au 7-hydroxy-4'-méthoxyisoflavone plus connu sous le nom de formononétine. Il a été isolé antérieurement des espèces du genre *Ononis* comme *O. angustissima* L. [58], *O. spinosa* L. [56], *O. pusilla* [14] et *O. speciosa* [54]. Il a été rencontré

également dans certaines espèces Fabaceae comme *Glycyrrhiza echinata*, *Glycyrrhiza glabra* [48], *Caragana tangutica* [71] et *Astragalus monspessulanus* L. [72].

Tableau II.4. Données RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) de **4** dans DMSO- d_6

Position	δ_{H} (m, J en Hz)	δ_{C} (ppm)
2	8,33 (s)	153,1
3	-	123,1
4	-	174,6
5	7,97 (d, 8,8)	127,3
6	6,94 (dd, 2,2, 8,8)	115,2
7	-	162,7
8	6,87 (d, 2,2)	102,1
9	-	157,5
10	-	116,6
1'	-	124,2
2'	7,51 (d)	130,1
3'	6,89 (d)	113,6
4'	-	159,0
5'	6,89 (d)	113,6
6'	7,51 (d)	130,1
4'-OMe	3,78 (s)	55,1

II.4.5. Elucidation structurale du composé **5**



5,4'-dihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone (velutine)

Le composé **5** a été obtenu sous forme d'une poudre jaune. Son spectre de masse à haute résolution (HRESIMS), enregistré en modes positif (Figure II.65) et négatif (Figure II.66), montre des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 315,0863$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_6$, 315,0863) et

313,0718 [M-H]⁻ (calc. C₁₇H₁₃O₆, 313,0707), soit une masse moléculaire égale à 314 et une formule brute en C₁₇H₁₄O₆.

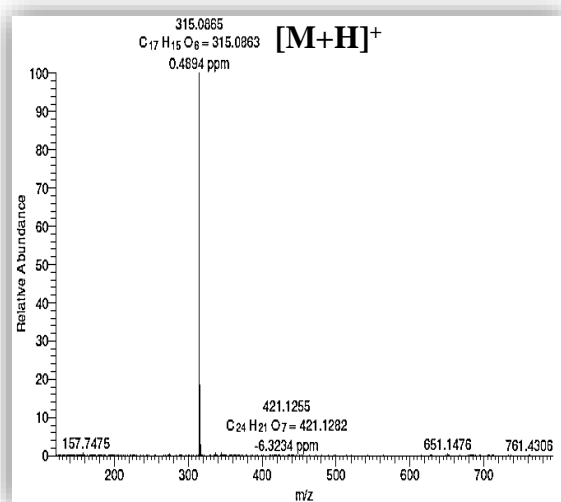


Figure II.65. Spectre de masse HRESI⁺ du composé **5**

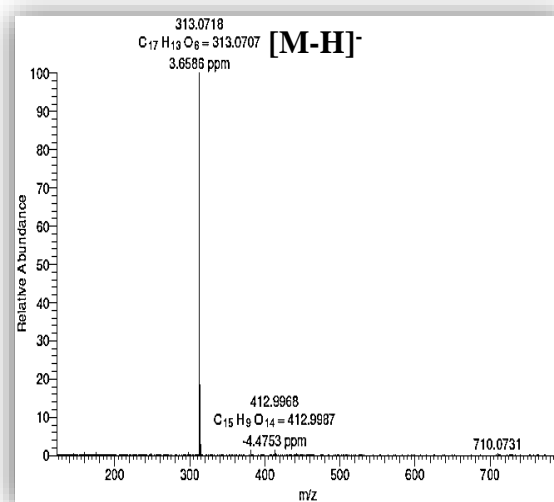


Figure II.66. Spectre de masse HRESI⁻ du composé **5**

Son spectre RMN ¹H (Figure II.67) enregistré dans DMSO-*d*₆, montre des signaux à δ_H 6,36-7,60 de protons aromatiques, illustrant son caractère flavonoïdique. Il met aussi en évidence la présence de deux singulets d'intégration 3H chacun à δ_H 3,87 et 3,90, correspondant à des protons de deux groupements méthoxyles et deux autres signaux singulets à δ_H 10,0 et 12,96 attribuables à deux groupements OH.

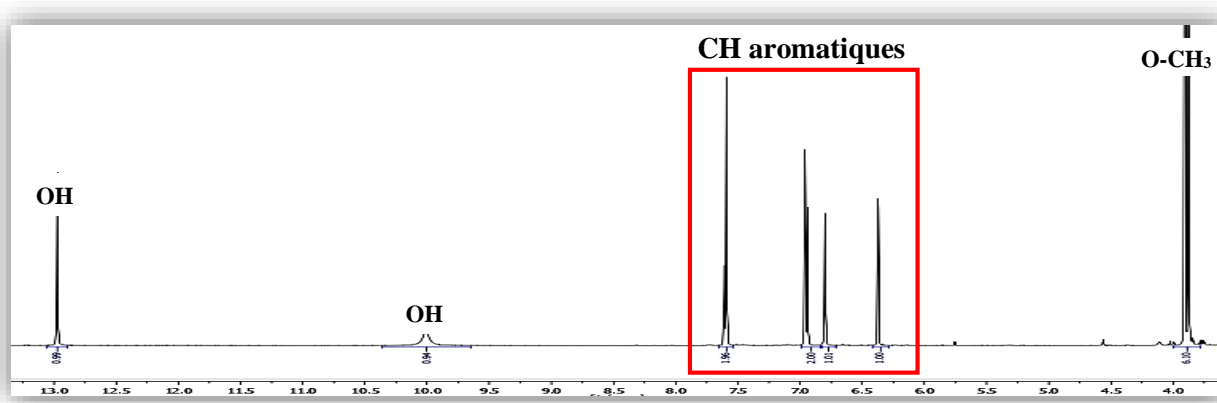


Figure II.67. Spectre RMN ¹H du composé **5**

Le spectre RMN ¹³C *J*-modulé (Figure II.68) indique l'existence de 17 atomes de carbone se répartissant en six CH, neuf carbones quaternaires dont un apparaissant à δ_C 182,0 d'un carbone de carbonyle et deux carbones résonant à δ_C 56,0 et 56,1, confirmant la présence de deux groupements OCH₃.

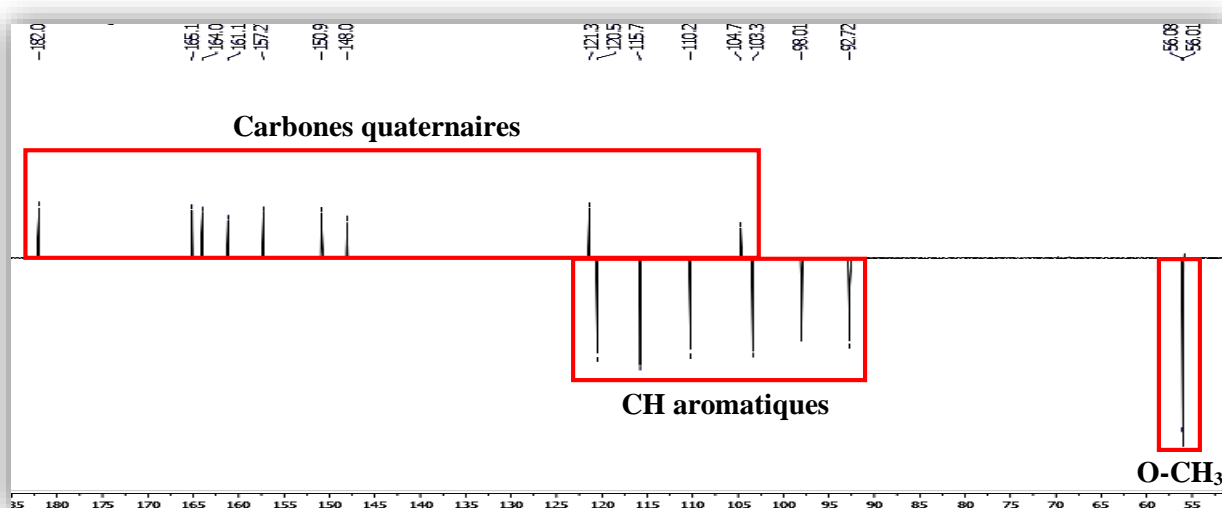


Figure II.68. Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé **5** (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Les signaux de protons flavonoïdiques (Figure II.69), d'intégration 1H chacun, sont attribuables aux protons H-6 (δ_{H} 6,36, d , $J = 2,2$ Hz) et H-8 (δ_{H} 6,79, d , $J = 2,2$ Hz) du cycle A substitué en C-5 et C-7, ainsi qu'aux protons H-2' (δ_{H} 7,59, d , $J = 2,2$ Hz), H-6' (δ_{H} 7,60, dd , $J = 8,4, 2,2$ Hz) et H-5' (δ_{H} 6,94, d , $J = 8,4$ Hz) du cycle B substitué en C-3' et C-4'. Le signal à δ_{H} 6,95 (d , $J = 1,7$ Hz) est caractéristique du proton H-3 d'une flavone.

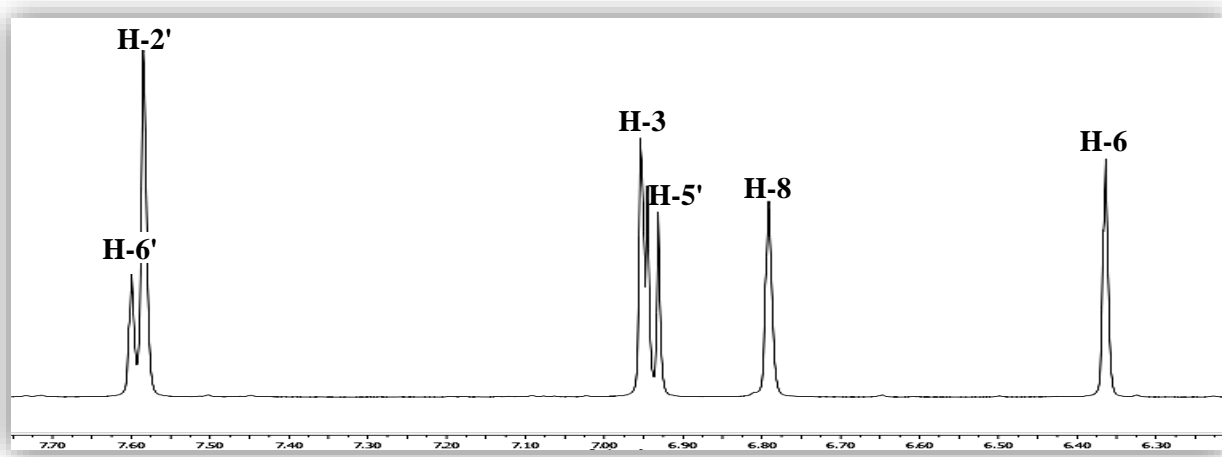


Figure II.69. Spectre RMN ^1H exhibant les protons aromatiques du composé **5**

L'expérience de corrélation COSY H-H (Figure II.70) montre les corrélations attendues entre les protons H-6 et H-8 du cycle A et les protons H-5', H-6' et H-2' du cycle B.

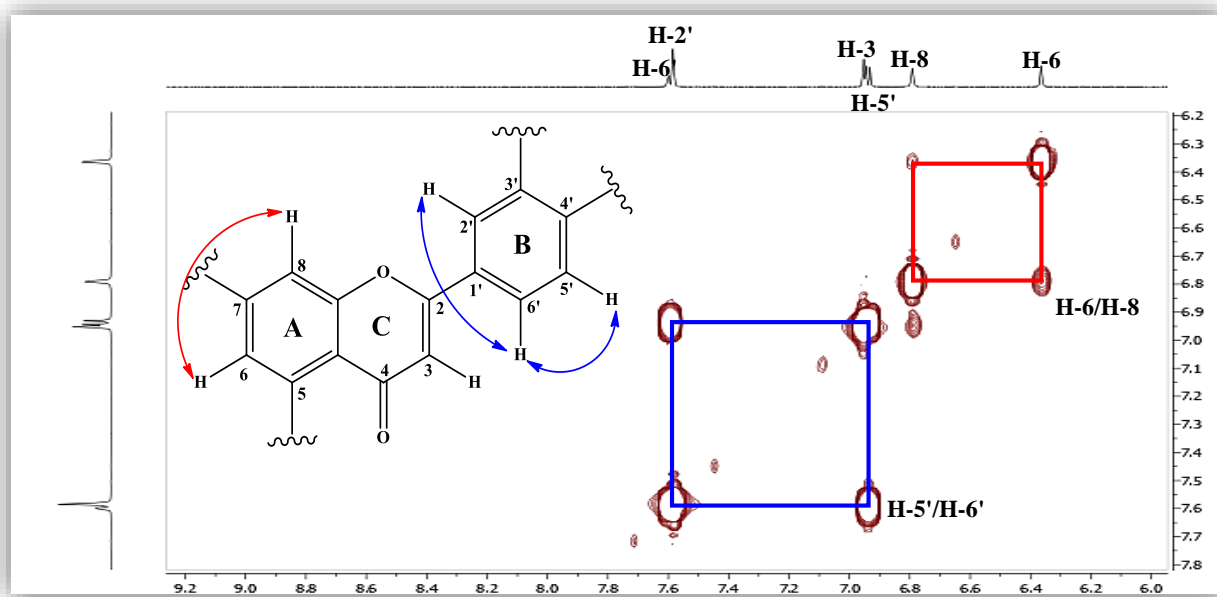


Figure II.70. Spectre COSY H-H du composé 5

Ces protons sont accordés, sur le spectre HSQC (Figure II.71), aux carbones sortant à δ_C 103,4 (C-3), 98,0 (C-6), 92,7 (C-8), 115,7 (C-5'), 110,2 (C-2') et 120,5 (C-6').

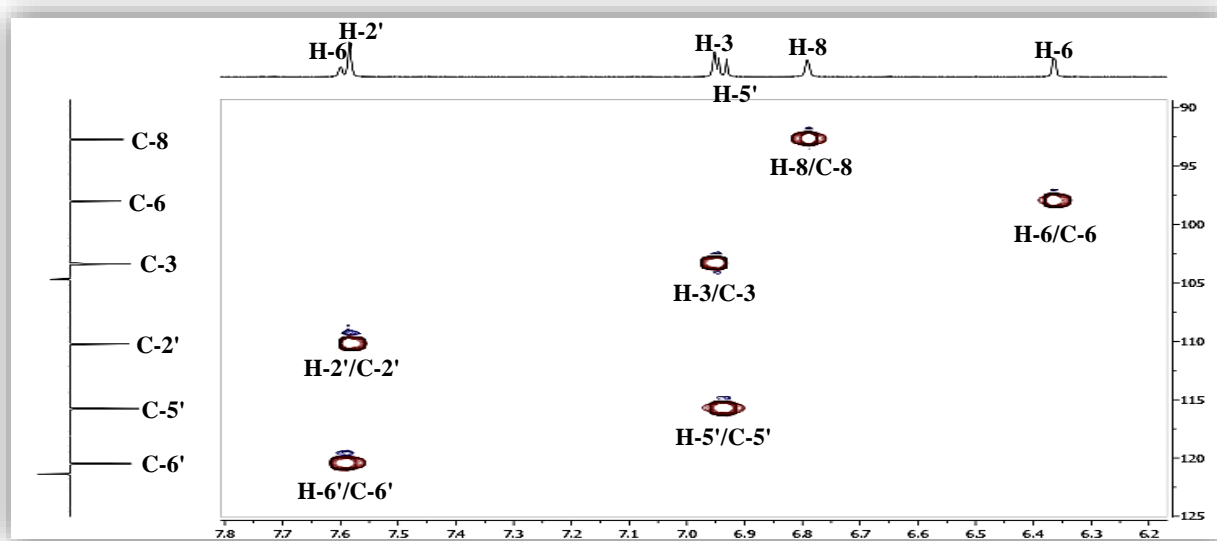


Figure II.71. Spectre HSQC du composé 5

L'expérience HMBC (Figures II.72 et II.73) du composé permet d'assigner tous les carbones des deux cycles aromatiques A et B, suite aux corrélations longue distance observées entre :

- Le proton H-3 (δ_H 6,95) et les carbones repérés à δ_C 182,0 (C-4), 104,7 (C-10), 164,0 (C-2) et 121,4 (C-1').
- Les protons H-6/H-8 et deux carbones, l'un oxygéné résonant à δ_C 165,1 (C-7) et l'autre quaternaire sortant à δ_C 104,7 (C-10).

- Le proton H-6 (δ_H 6,36) et deux carbones résonant à δ_C 92,7 (C-8) et 161,1 (C-5)
- Le proton H-8 (δ_H 6,79) et le carbone C-4 (δ_C 182,0) ainsi que les carbones résonant à δ_C 157,3 (C-9) et δ_C 98,0 (C-6).
- Les protons H-2' (δ_H 7,59)/H-5' (δ_H 6,94) et les carbones résonant à δ_C 148,0 (C-3') et 150,9 (C-4')
- Le proton H-2' et les carbones résonant à δ_C 164,0 (C-2) et 120,5 (C-6').
- Le proton H-6' et C-2' (δ_C 110,2), C-4' (δ_C 150,9) et le proton H-5' et C-1' (δ_C 121,4).

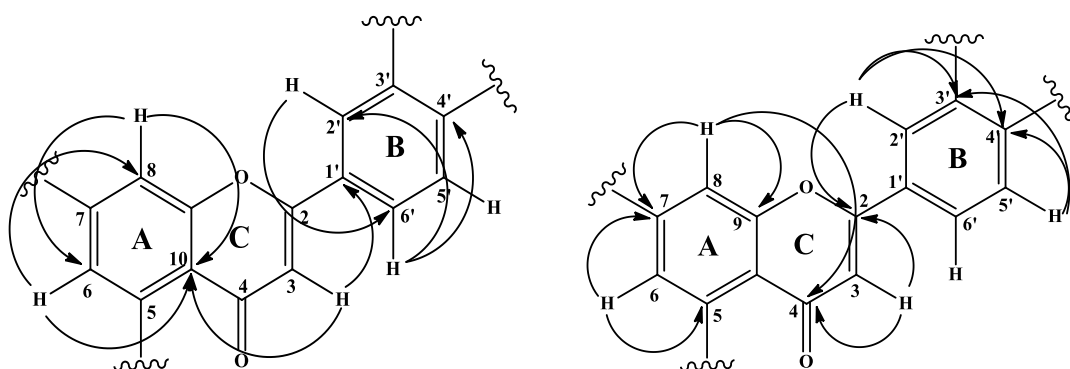


Figure II.72. Corrélations HMBC observées pour le composé 5

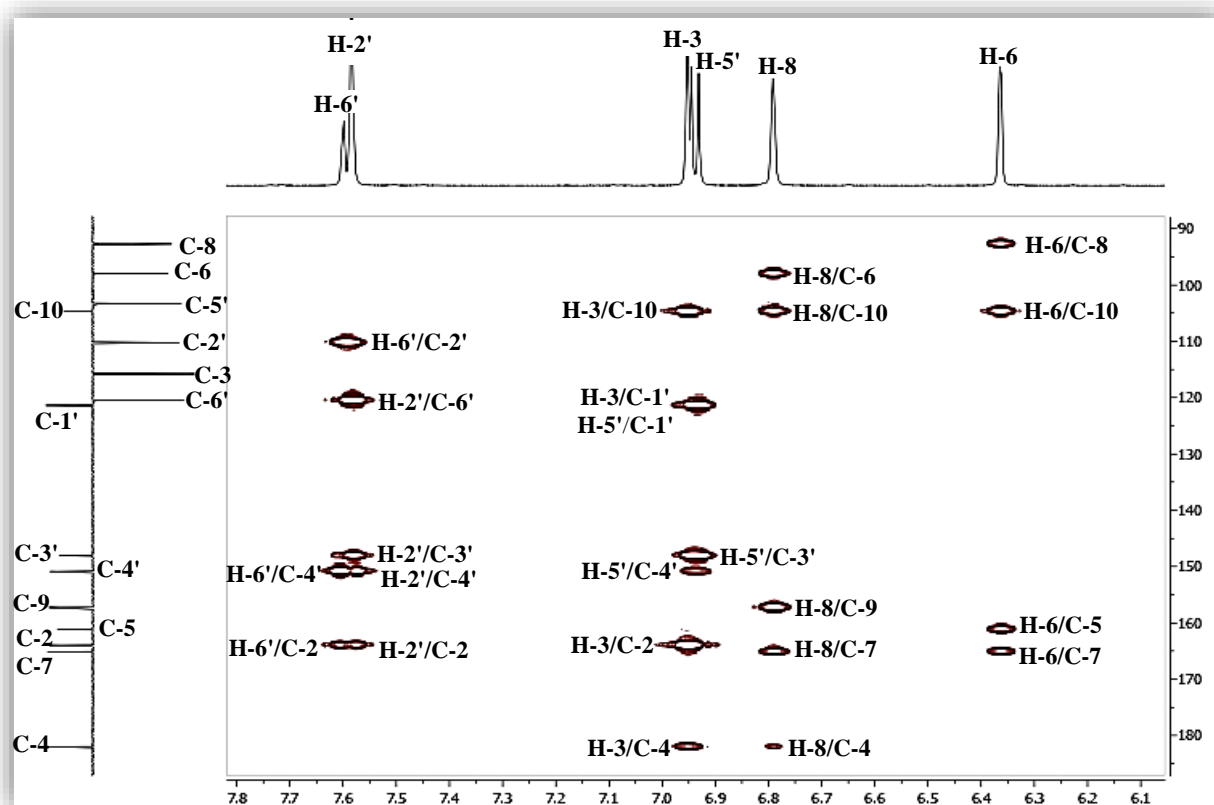


Figure II.73. Spectre HMBC du composé 5

La position des groupements méthoxyles en C-7 et C-3' est établie suite aux corrélations HMBC (Figures II.74) OCH₃ (3H, δ_H 3,86, s)/C-7 (δ_C 165,1) et OCH₃ (3H, δ_H 3,90, s)/C-3' (δ_C 148,0).

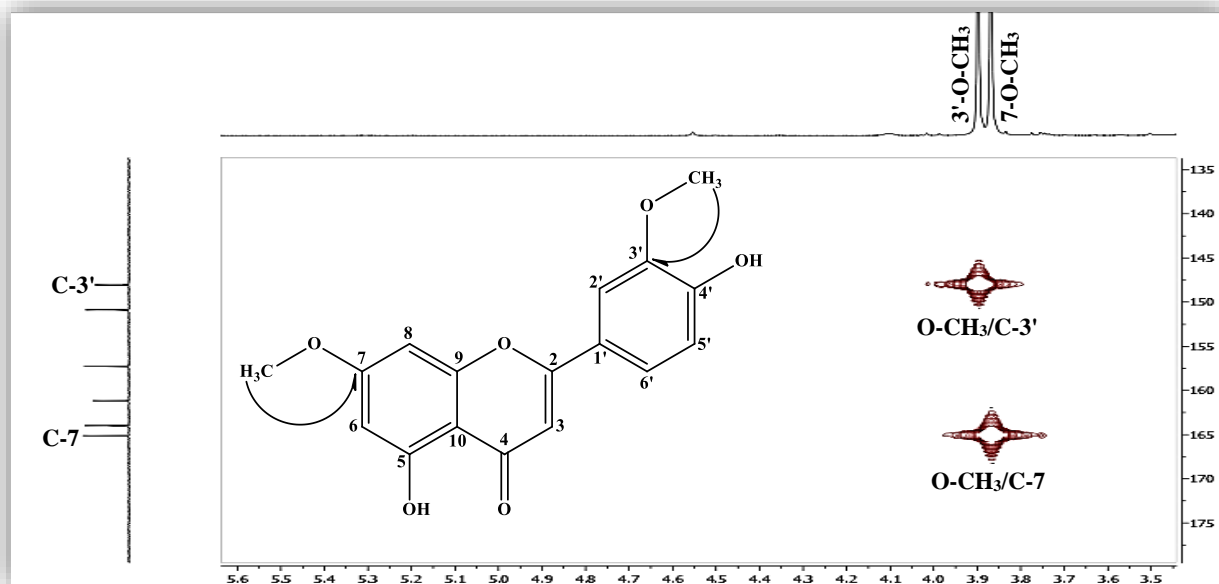
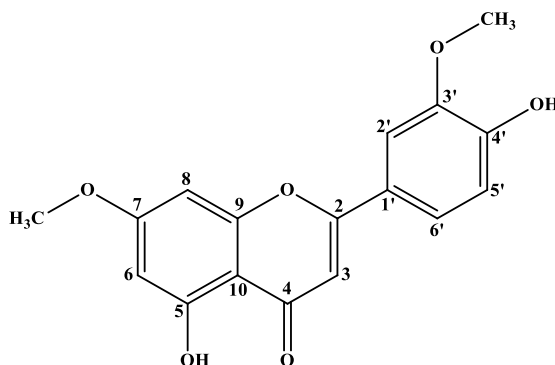


Figure II.74. Spectre HMBC du composé **5**

Toutes les données spectroscopiques représentées dans le tableau II.5 ci-après et comparées à celles de la littérature [56], permettent de caractériser ce composé au 5,4'-dihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone (velutine).



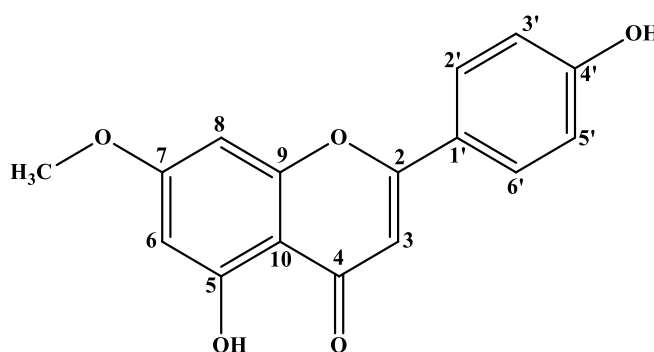
5,4'-dihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone (velutine)

Ce composé a été isolé antérieurement des espèces *Ononis*. On citera *O. pusilla* [14], *O. natrix*, *O. spinosa* et *O. tridentata* [73].

Tableau II.5. Données RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) du composé **5** dans $\text{DMSO-}d_6$

Position	δ_{H} (m, J en Hz)	δ_{C} (ppm)
2	-	164,0
3	6,95 (d, 1,7)	103,4
4	-	182,0
5	-	161,2
6	6,36 (d, 2,2)	98,0
7	-	165,1
8	6,79 (d, 2,2)	92,7
9	-	157,3
10	-	104,7
1'	-	121,4
2'	7,60 (d, 2,2)	110,2
3'	-	148,0
4'	-	150,9
5'	6,94 (d, 8,4)	115,8
6'	7,59 (dd, 8,4, 2,2)	120,5
3'-OMe	3,90 (s)	56,1
7-OMe	3,86 (s)	56,0

II.4.6. Elucidation structurale du composé **6**



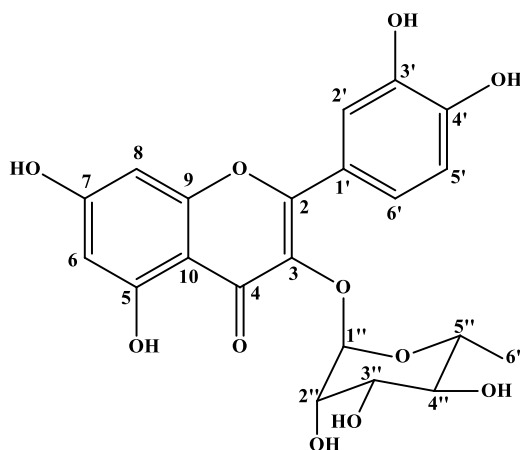
5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavone (genkwanine)

Toutes les données spectroscopiques représentées dans le tableau II.6, permettent de caractériser ce composé à 5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavone (genkwanine), isolé antérieurement des espèces : *O. fruticosa*, *O. rotundifolia* et *O. spinosa* [73], *O. pusilla* [14]. Il a été rencontré également dans d'autres espèces de la famille Fabaceae comme *Sophora interrupta* et *Genista quadriflora* Munby [74,75].

Tableau II.6. Données RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) du composé **6** dans DMSO- d_6

Position	δ_{H} (<i>m</i> , <i>J</i> en Hz)	δ_{C} (ppm)
2	-	163,9
3	6,85 (<i>s</i>)	102,5
4	-	182,4
5	-	161,0
6	6,37 (<i>d</i> , 2,1)	97,9
7	-	165,0
8	6,80 (<i>d</i> , 2,1)	92,5
9	-	157,1
10	-	104,9
1'	-	121,0
2'	7,96 (<i>d</i> , 8,8)	128,4
3'	6,94 (<i>d</i> , 8,8)	115,7
4'	-	161,8
5'	6,94 (<i>d</i> , 8,8)	115,7
6'	7,96 (<i>d</i> , 8,8)	128,4
7-OMe	3.87 (<i>s</i>)	55,8

II.4.7. Elucidation structurale du composé **7**



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

Le composé **7** a été obtenu sous forme d'une poudre jaune. Son spectre de masse ESI enregistré en modes positif (Figure II.75) et négatif (Figure II.76), montre respectivement des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 449,1080$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc. 449,1078, $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_{11}$) et $447,0930$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calc. 447,0922, $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{O}_{11}$). Ceci correspond à une masse moléculaire égale à 448 uma et une formule brute en $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$.

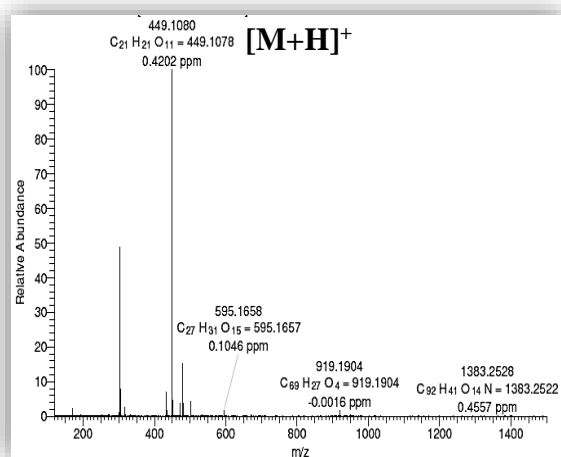


Figure II.75. Spectre de masse HR-ESI⁺ du composé **7**

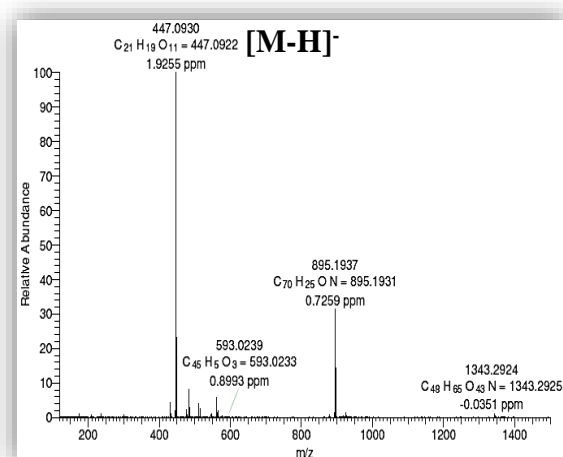


Figure II.76. Spectre de masse HR-ESI⁻ du composé **7**

Son spectre RMN ¹H (Figure II.77), enregistré dans le DMSO-*d*₆, présente des signaux caractéristiques d'un flavonoïde glycosilé. Il met aussi en évidence la présence d'un groupement méthyle à travers un signal doublet à δ_H 0,81 (3H, *d*, *J* = 6,1 Hz).

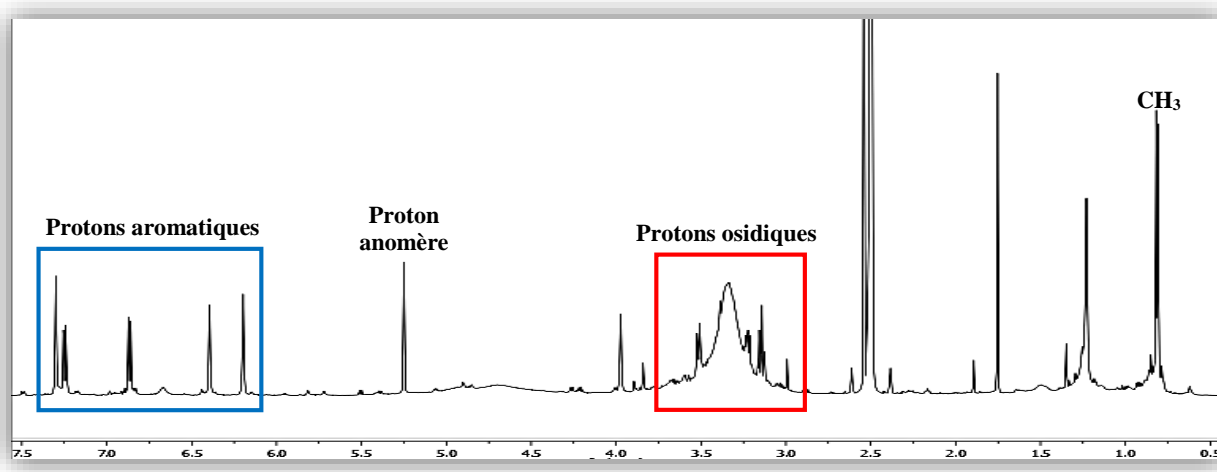


Figure II.77. Spectre RMN ¹H du composé **7**

Dans sa partie aromatique (Figure II.75), on reconnaît les signaux des :

- Deux protons aromatiques à δ_H 6,20 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz) et 6,39 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz), attribués respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7.
- Trois protons H-2' (δ_H 7,30, *d*, *J* = 2,2 Hz), H-6' (δ_H 7,25, *dd*, *J* = 8,3; 2,2 Hz) et H-5' (δ_H 6,87, *d*, *J* = 8,3 Hz) du cycle B du flavonoïde substitué C-3' et C-4'.

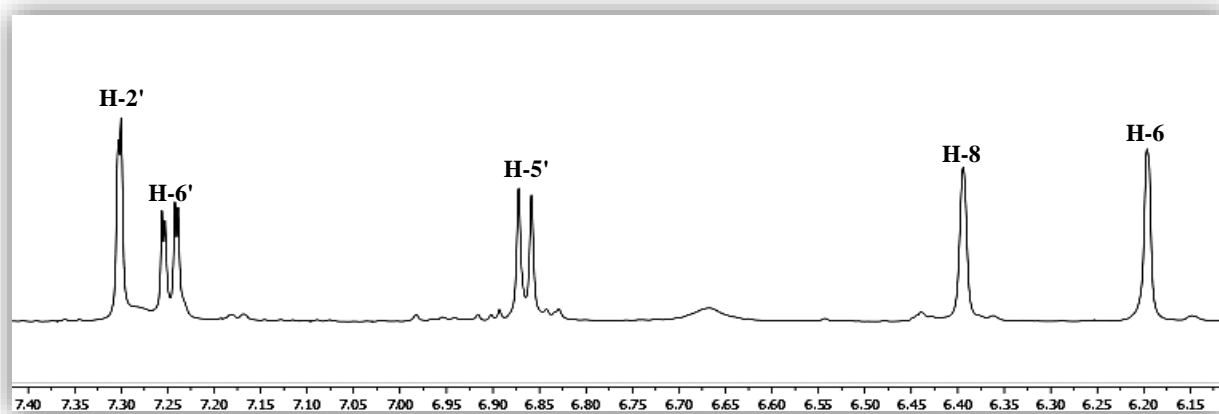


Figure II.78. Spectre RMN ^1H du composé 7

Les déplacements chimiques des carbones porteurs des protons déjà cités sont assignés par analyse du spectre HSQC (Figure II.79) à δ_{C} 98,9 (C-6), 93,7 (C-8), 115,6 (C-2'), 115,5 (C-5'), 121,0 (C-6').

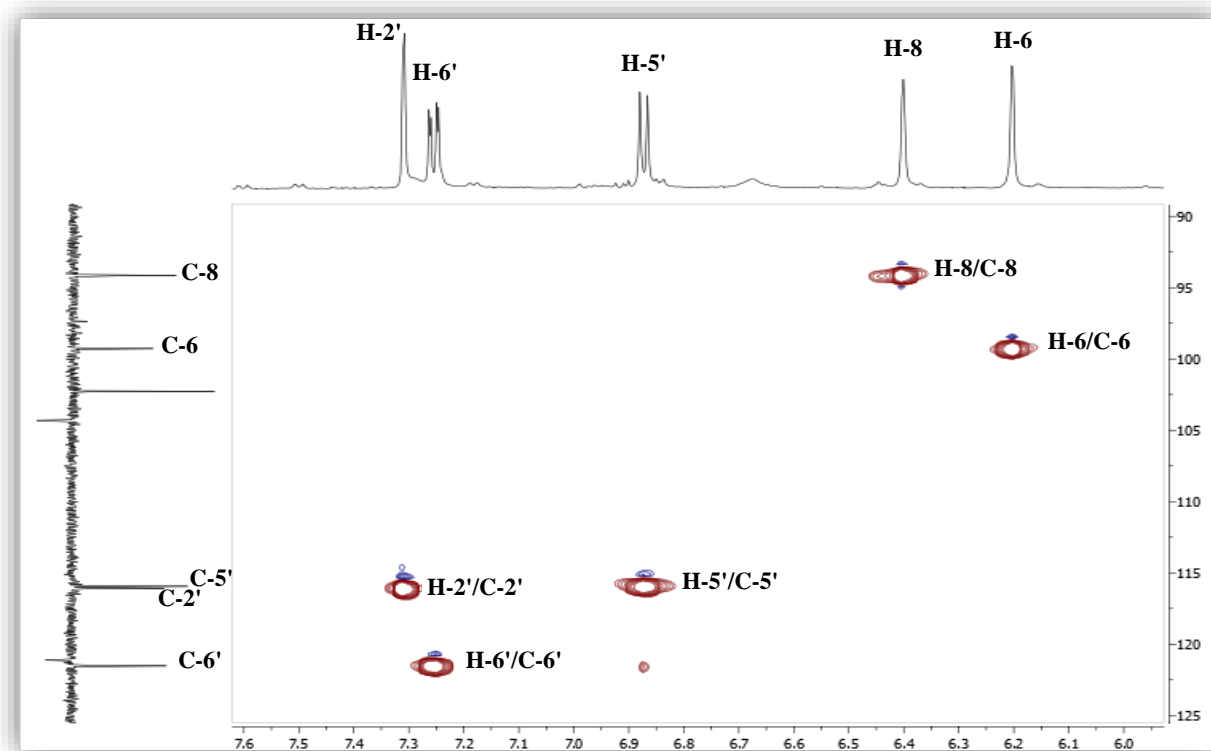


Figure II.79. Spectre HSQC de la partie génine du composé 7

L'identification de la génine à un flavonol de type quercétine porteur d'une liaison éther, en l'occurrence une unité osidique en C-3, est déduite de la valeur de déplacement chimique très caractéristique des carbones C-2 (δ_{C} 157,2) et C-3 (δ_{C} 134,1). Ceci est confirmé par analyse HMBC (Figure II.80) qui met en évidence les corrélations entre les protons H-2'/H-6' du cycle B et le

carbone C-2 d'une part, entre le proton anomère H-1'' de l'unité osidique (δ_H 5,25, *d*, $J = 1,6$ Hz) et le carbone C-3 de la génine d'autre part.

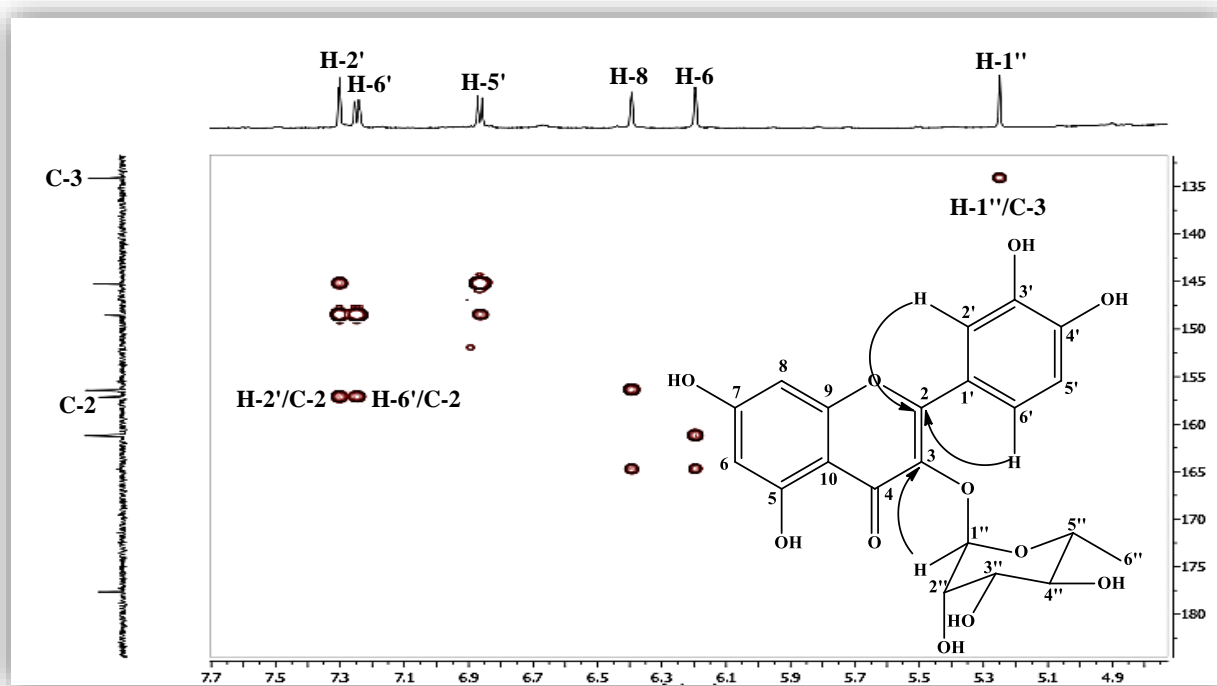


Figure II.80. Spectre HMBC du composé 7

Sur le spectre RMN 1H et comme soulevé précédemment, on identifie le signal d'un proton anomère (δ_H 5,25, *d*, $J = 1,6$ Hz) ainsi que les signaux des autres protons sortant entre 3,14 et 3,97 ppm, d'une unité osidique.

Le spectre COSY H-H (Figure II.81) permet d'identifier cette unité à travers les corrélations H-1''/H-2'' (δ_H 3,97, 1H, *dd*, $J = 3,3, 1,6$ Hz), H-2''/H-3'' (δ_H 3,51, 1H, *dd*, $J = 9,3, 3,3$ Hz), H-3''/H-4'' (δ_H 3,14, 1H, *t*, $J = 9,3$ Hz), H-4''/H-5'' (δ_H 3,22, 1H, *m*), H-5''/H-6'' (δ_H 0,81, 3H, *d*, $J = 6,1$ Hz). L'ensemble de ces corrélations indique qu'il s'agit d'un rhamnose de configuration α ($J_{H1''-H2''} = 1,6$ Hz) substituant la génine en C-3.

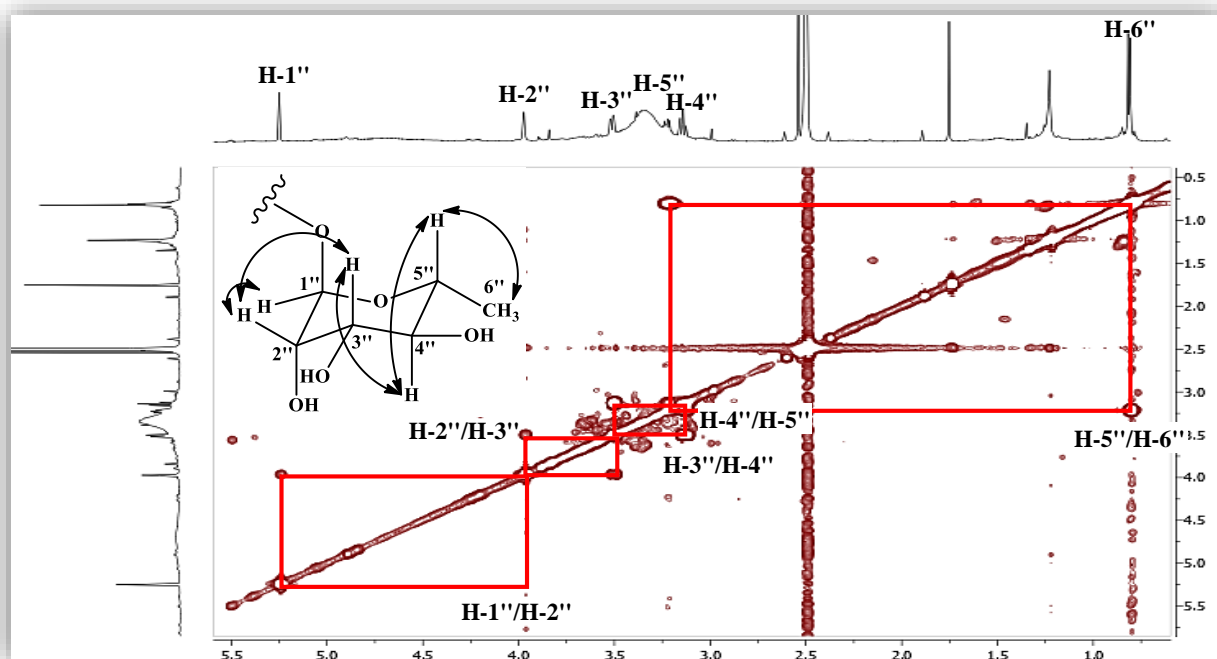


Figure II.81. Spectre COSY H-H de la partie osidique du composé **7**

Le spectre HSQC (Figure II.82) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones du rhamnose : δ_C 101,8 (C-1''), 70,0 (C-2''), 70,3 (C-3''), 71,2 (C-4''), 70,5 (C-5'') et 17,5 (C-6'').

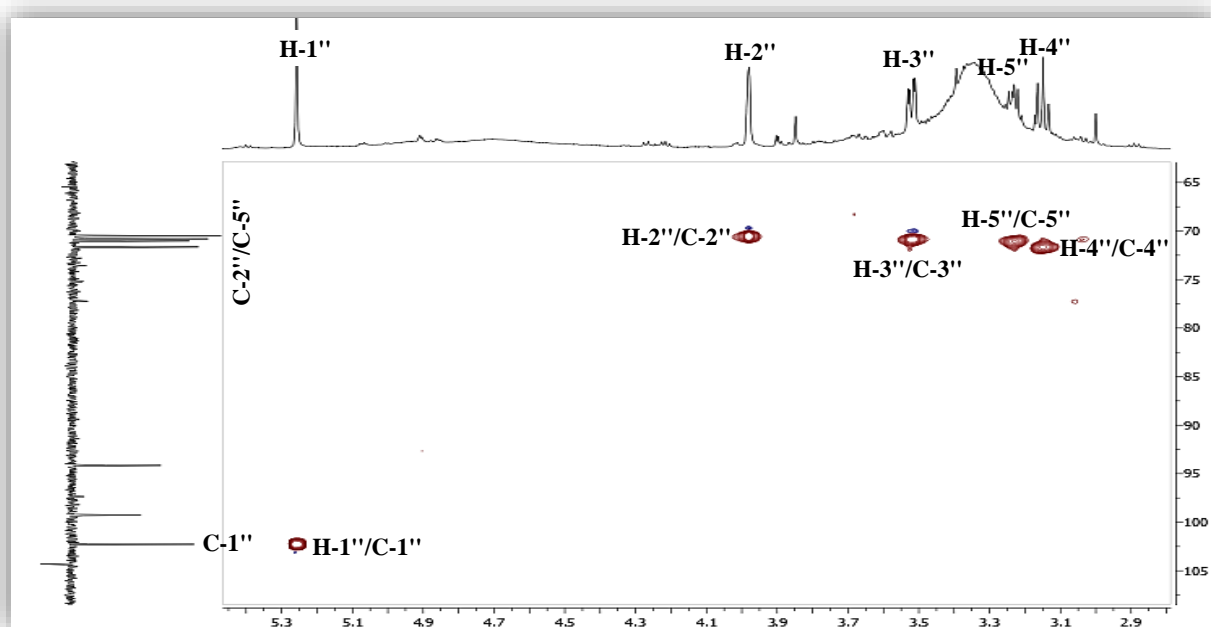


Figure II.82. Spectre HSQC de la partie osidique du composé **7**

L'analyse combinée des spectres COSY H-H, HSQC et HMBC permet d'assigner tous les signaux des carbones de la molécule (Figure II.83).

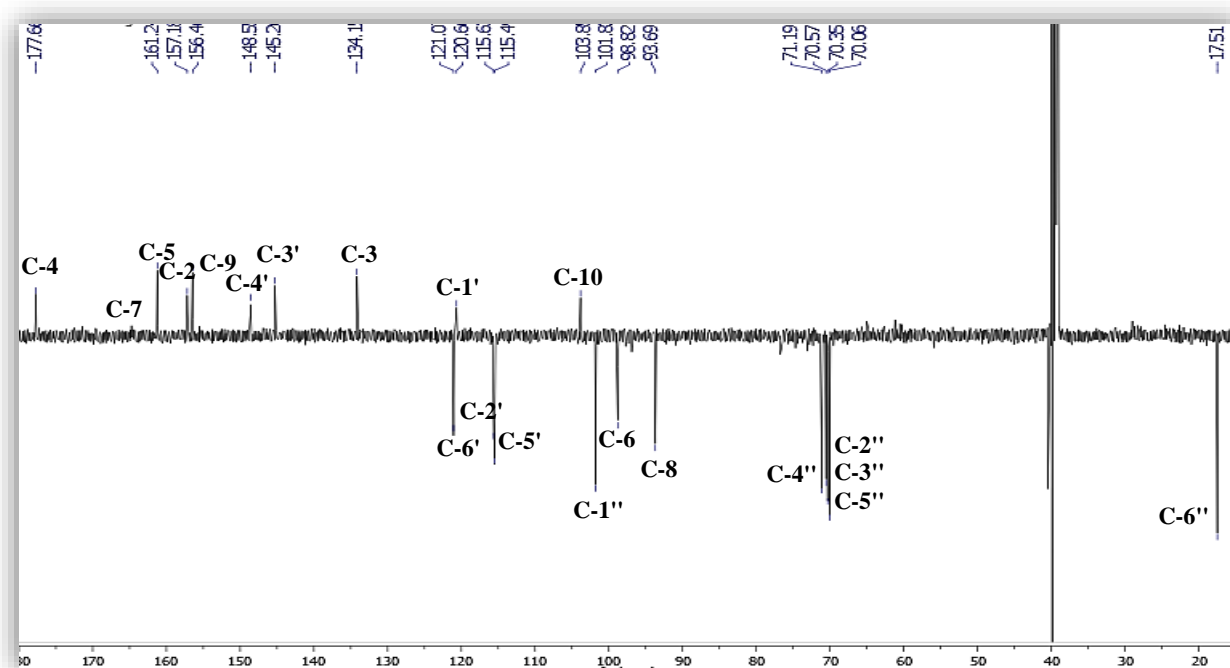
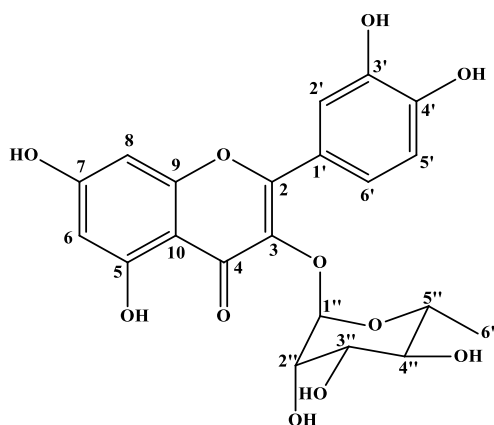


Figure II.83. Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé 7

L'ensemble de ces données spectrales (Tableau II.7) établies par RMN ^1H , RMN ^{13}C J -modulé, HMBC, COSY H-H et HSQC, ainsi que la comparaison avec les données de la littérature, permettent à proposer pour le composé 7, la structure suivante :

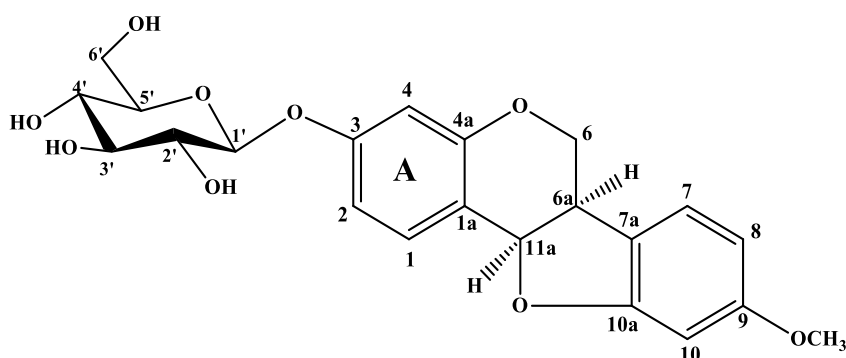


Quercétine 3- O - α -rhamnopyranoside

Ce composé appelé également quercitrine a été isolé pour la première fois dans le genre *Ononis*, au sein de l'espèce *O. pusilla* [14]. Il été isolé antérieurement dans un bon nombre d'espèces Fabaceae comme *Sophora tonkinensis* [76], *Genista tinctoria* L. [77], *Astragalus missouriensis* Nutt. [78], *Hymenaea martiana* Hayne [79], *Lotus corniculatus* [80], *Ceratonia siliqua* [81] et *Daniellia oliveri* [82].

Tableau II.10. Données RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) de composé **7** dans $\text{DMSO-}d_6$

Position	δ_{H} (m, J en Hz)	δ_{C} (ppm)
2	-	157,2
3	-	134,1
4	-	177,6
5	-	161,2
6	6,20 (d, 2,0)	98,8
7	-	164,6
8	6,39 (d, 2,0)	93,7
9	-	156,4
10	-	103,8
1'	-	120,6
2'	7,30 (d, 2,2)	115,6
3'	-	145,3
4'	-	148,5
5'	6,87 (d, 8,3)	115,5
6'	7,25 (dd, 8,3; 2,2)	121,0
1''	5,25 (d, 1,6)	101,8
2''	3,97 (dd, 3,3; 1,6)	70,0
3''	3,51 (dd, 9,3; 3,3)	70,3
4''	3,14 (t, 9,3)	71,2
5''	3,22 (m)	70,5
6''	0,81 (d, 6,1)	17,5

II.4.8. Elucidation structurale du composé **8**(6aR, 11aR)-3-O- β -D-glucopyranosyl-médicarpine

Le composé **8** a été obtenu sous forme d'une poudre blanche. Son spectre de masse ESI⁺ (Figure II.84), montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 450,1755$ (calculé 450,1759, pour $[M+NH_4]^+$), soit une masse moléculaire égale à 432 uma et une formule brute en $C_{22}H_{24}O_9$.

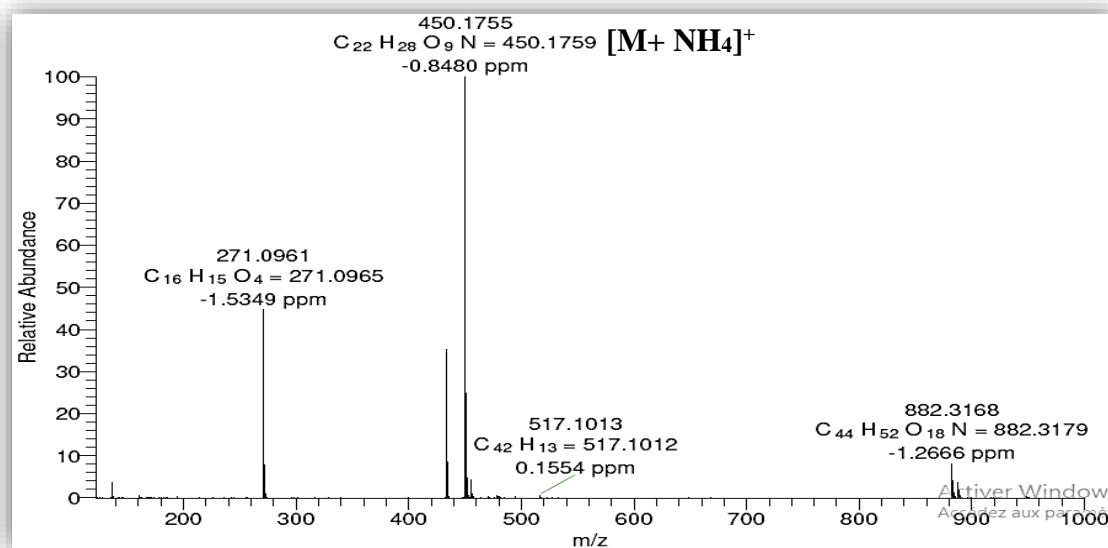


Figure II.84. Spectre de masse HRESI⁺ du composé **8**

Le spectre RMN ¹H (Figure II.85) du composé, enregistré dans le DMSO-*d*₆, révèle l'existence de trois types de protons : aromatiques sortant dans la zone 6,43-7,38 ppm, osidiques entre 3,15 et 4,84 ppm et aliphatiques entre 3,65 et 5,60 ppm. Ce spectre met aussi en évidence la présence d'un groupement OCH₃ (3H, *s*, δ_H 3,68).

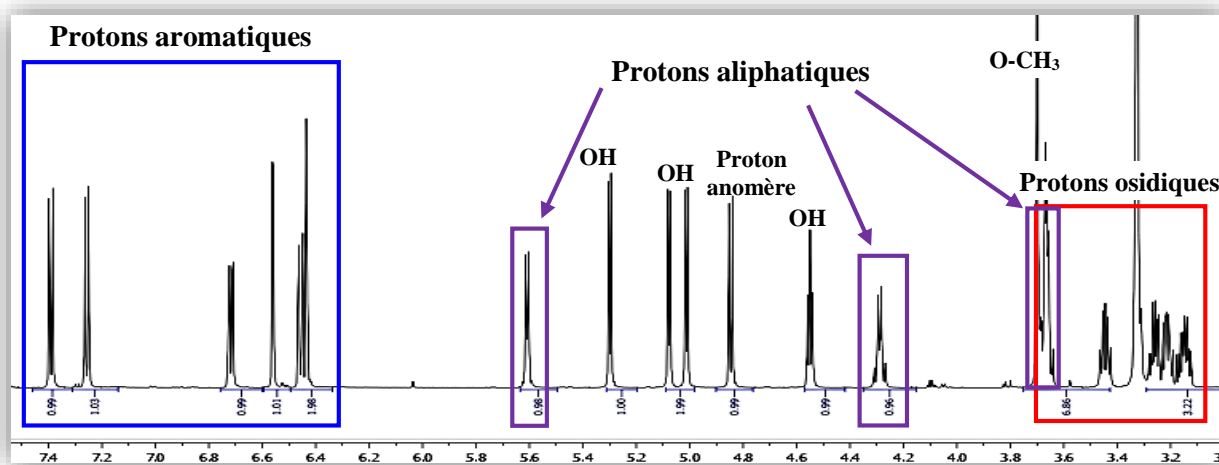


Figure II.85. Spectre RMN ¹H du composé **8** (600 MHz, DMSO-*d*₆)

Au niveau de la zone aromatique, il est observé six signaux de protons d'intégration 1H à δ_H 7,38 (*d*, $J = 8,5$ Hz), 6,71 (*dd*, $J = 8,5, 2,4$ Hz), 6,55 (*d*, $J = 2,4$ Hz), 7,25 (*d*, $J = 8,1$ Hz), 6,45 (*dd*, $J = 8,1, 2,2$ Hz) et 6,43 (*d*, $J = 2,2$ Hz) (Figure III.86). La multiplicité ainsi que les valeurs des

constantes de couplage observées pour chaque proton indique la présence de deux noyaux aromatiques nommés A et D avec trois protons dans chaque cycle.

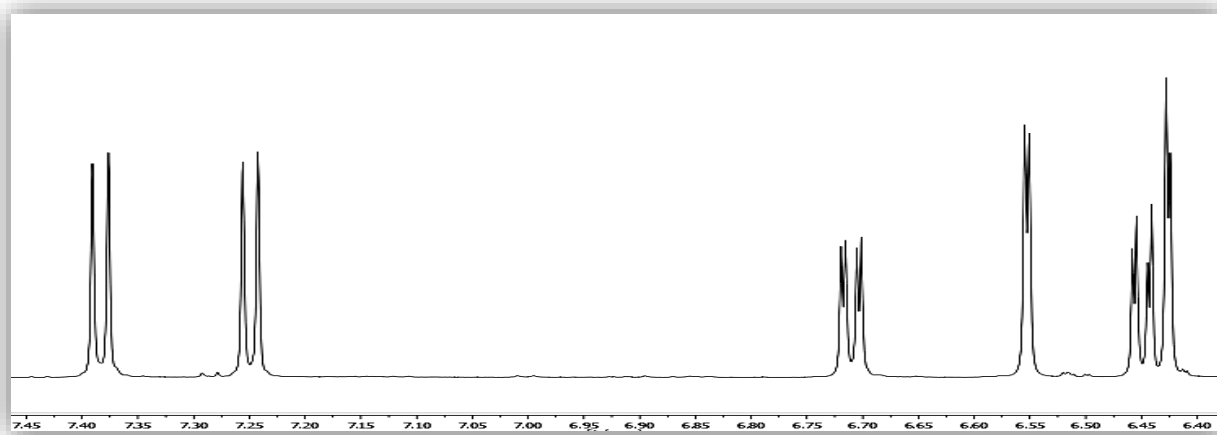


Figure II.86. Spectre RMN ^1H du composé **8** (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

Le cycle A présente un système ABX qui implique le proton H-1 repéré à δ_{H} 6,80 (d , $J = 8,5$ Hz) couplant en ortho avec le proton H-2 (δ_{H} 6,71, dd , $J = 8,5, 2,4$ Hz), lui-même couplant en méta avec un proton sortant à 6,55 ppm (H-4, d , $J = 2,4$ Hz). Ceci est confirmé par le spectre COSY H-H (Figure II.87). Les protons nommés H-7 (δ_{H} 7,25, d , $J = 8,1$ Hz), H-8 (δ_{H} 6,46, dd , $J = 8,1, 2,2$ Hz) et H-10 (δ_{H} 6,43, d , $J = 2,2$ Hz) font partie du second cycle aromatique D.

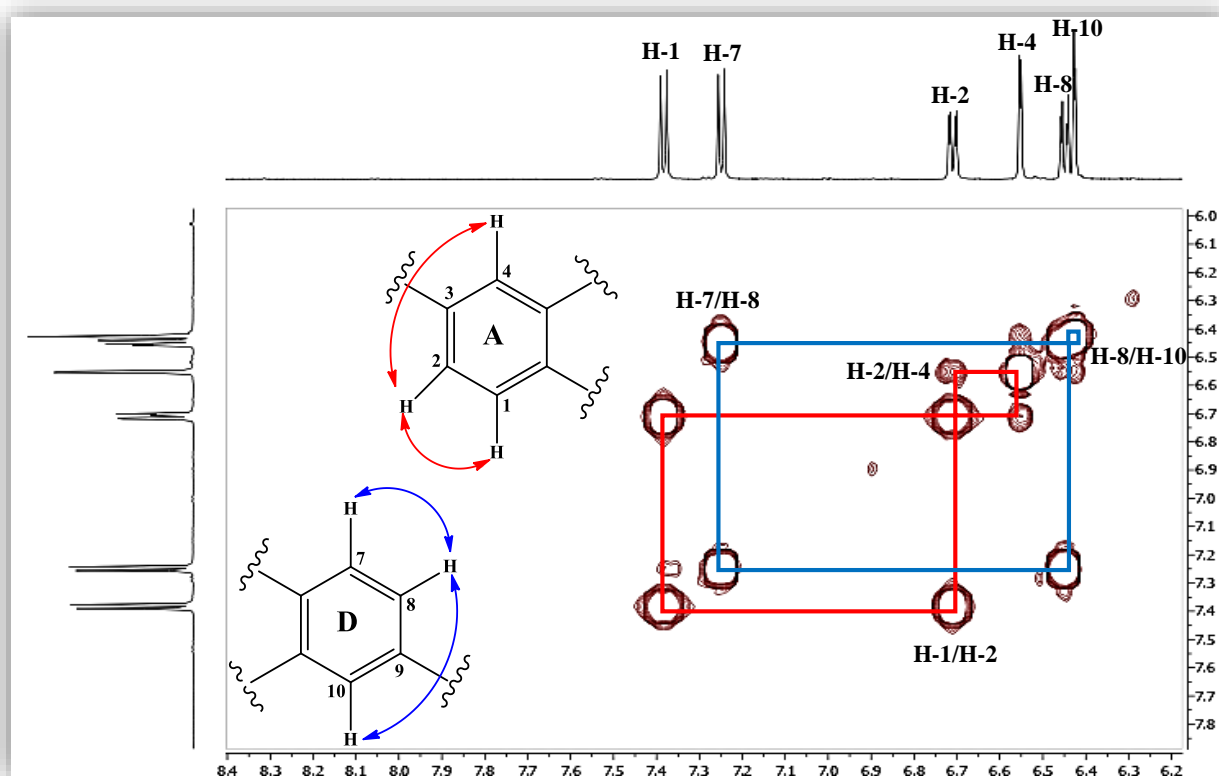


Figure II.87. Spectre COSY H-H du composé **8**

Le spectre HSQC (Figure II.88) permet d'attribuer les 6 carbones CH résonant à δ_C 131,9 (C-1), 110,4 (C-2), 104,0 (C-4), 125,2 (C-7), 106,1 (C-8) et 96,3 (C-10).

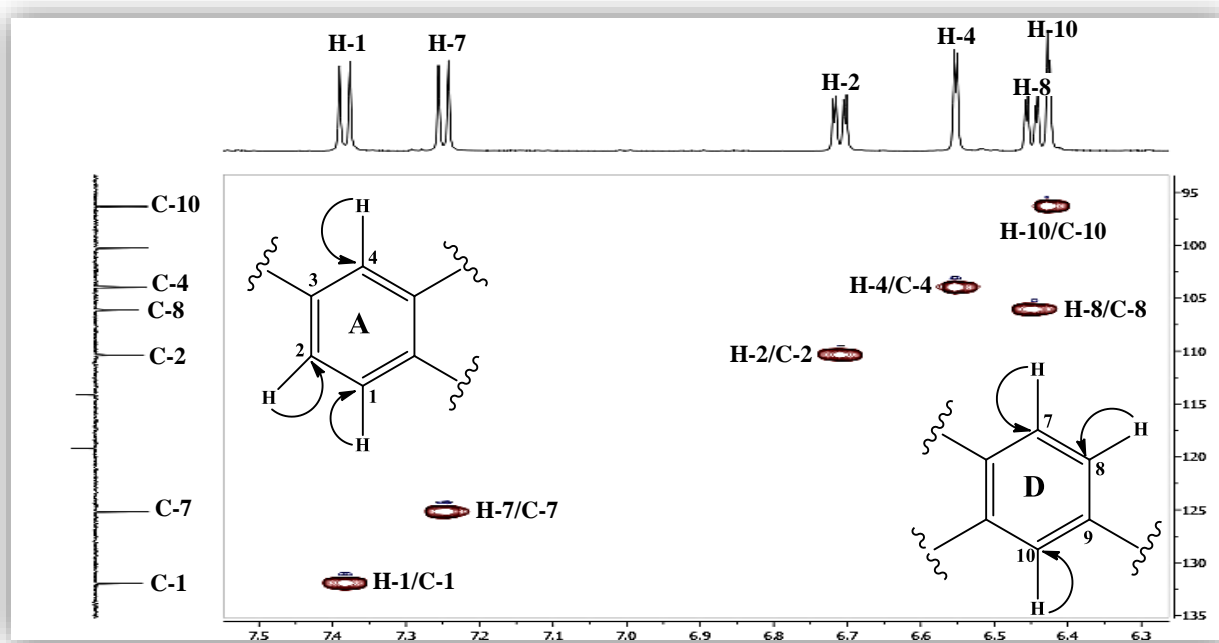


Figure II.88. Spectre HSQC du composé 8

L'analyse du spectre HMBC (Figure II.89) conduit à distinguer tous les carbones quaternaires des deux cycles aromatiques à travers les corrélations hétéronucléaires en 2J et 3J observées entre :

- Le proton H-1 (δ_H 6,80) et le carbone quaternaire sortant à δ_C 156,2 (C-4a) ainsi que le carbone oxygéné C-3 (δ_C 158,4).
- Le proton H-2 (δ_H 6,71) et le carbone quaternaire repéré à δ_C 114,1 (C-1a) et le carbone C-3.
- Le proton H-4 (δ_H 6,55) et le carbone C-4a.
- Les protons H-7 (δ_H 7,25)/H-8 (δ_H 6,46)/H-10 (δ_H 6,43) et un carbone quaternaire oxygéné résonant à δ_C 160,5 (C-9).
- Les protons H-7/H-10 et le carbone résonant à δ_C 160,2 (C-10a)
- Les protons H-8/H-10 et le carbones repéré à δ_C 119,2 (C-7a).

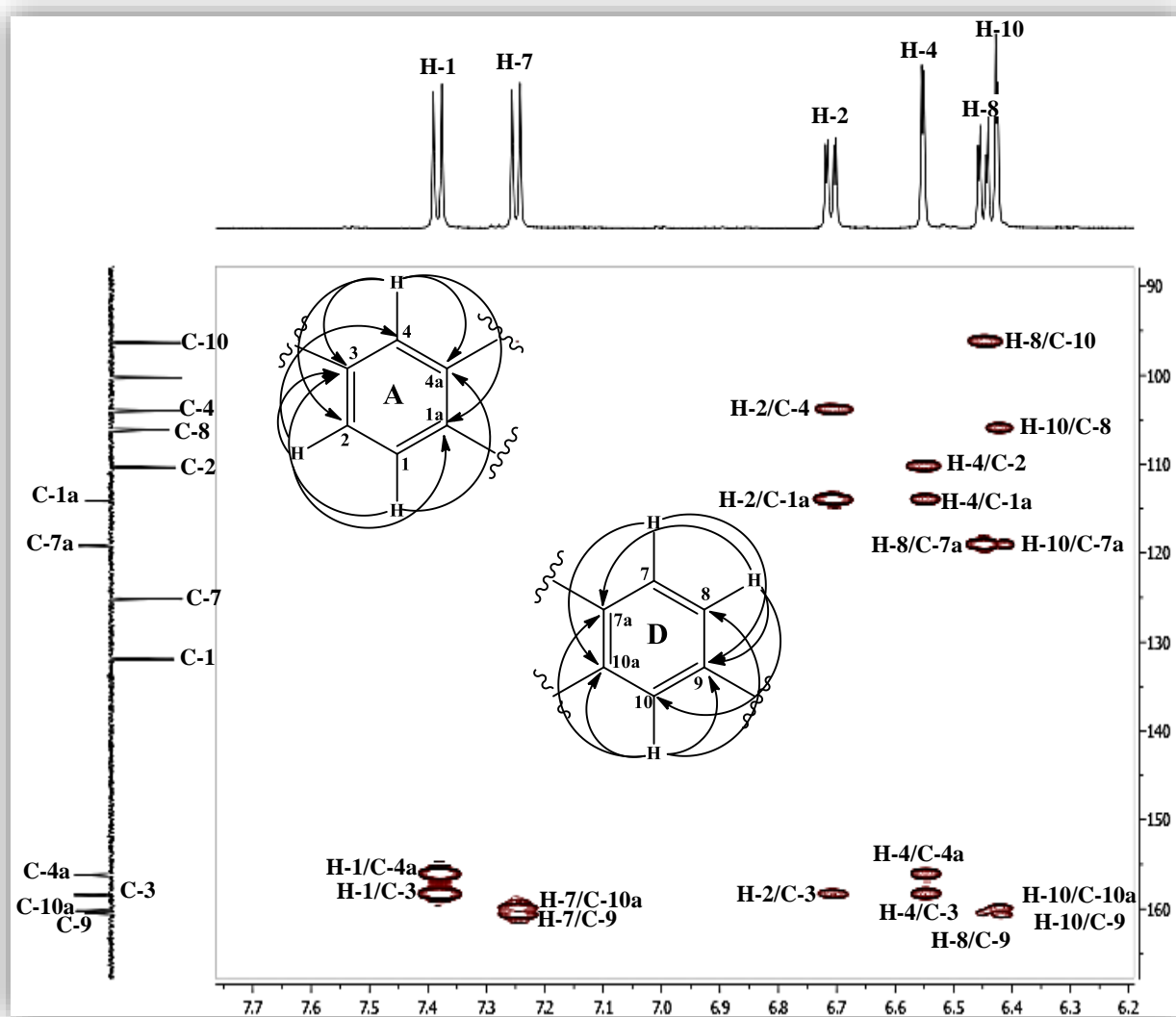


Figure II.89. Spectre HMBC du composé 8

Comme il a été présenté précédemment, le spectre RMN ^1H (Figure II.85) révèle la présence d'autres signaux se répartissant en :

- Un signal singulet d'intégration 3H sortant à 3,68 ppm, lié selon le spectre HSQC (Figure II.90) à un signal d'un carbone méthoxylique résonant à 55,3 ppm.
- Deux signaux multiplets d'intégration 1H chacun à δ_{H} 4,28 et 3,66 de deux protons d'un groupement CH_2 selon le spectre HSQC (Figure II.90). Le carbone qui les porte sort à δ_{C} 65,9. Sa valeur de déplacement indique qu'il est oxydé.
- Deux signaux singulets d'intégration 1H résonant à 3,65 et 5,60 ppm, attribuables à deux protons de deux groupements méthines. Les carbones CH qui les portent sont repérés à 38,5 et

77,7 ppm sur le spectre HSQC (Figure II.91). Cette dernière valeur de déplacement chimique implique une oxydation de ce groupement CH.

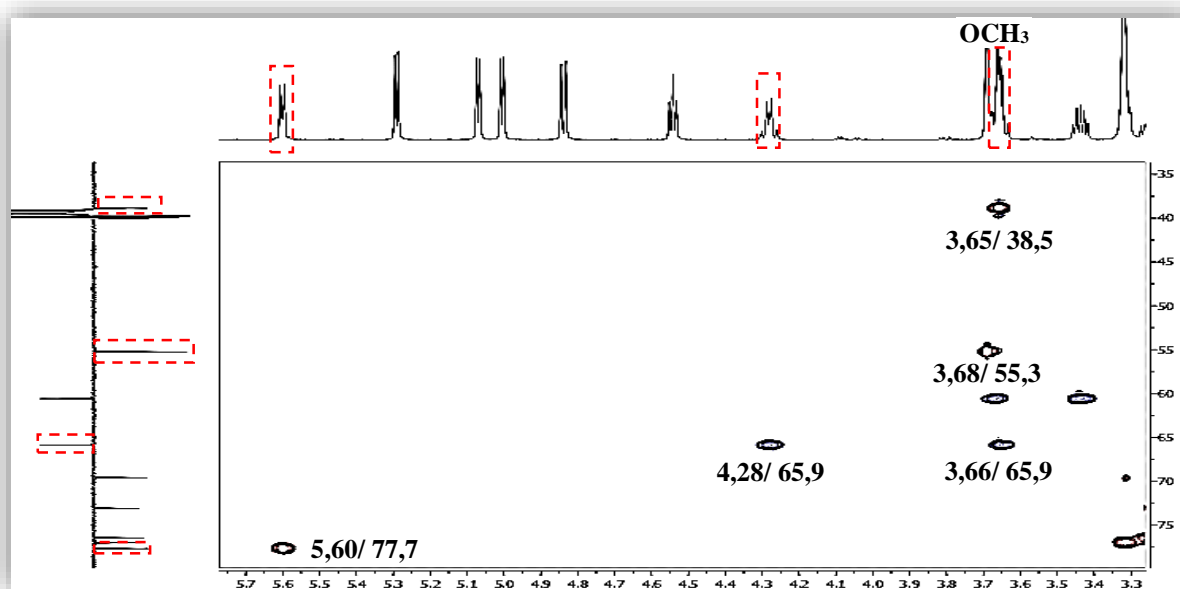


Figure II.90. Spectre HSQC du composé 8

La localisation du groupement méthoxyle sur le cycle D est mise en évidence par la corrélation HMBC (Figure II.91) entre les protons OCH₃ (3,68 ppm) et le carbone C-9 (δ_C 160,5) de la génine.

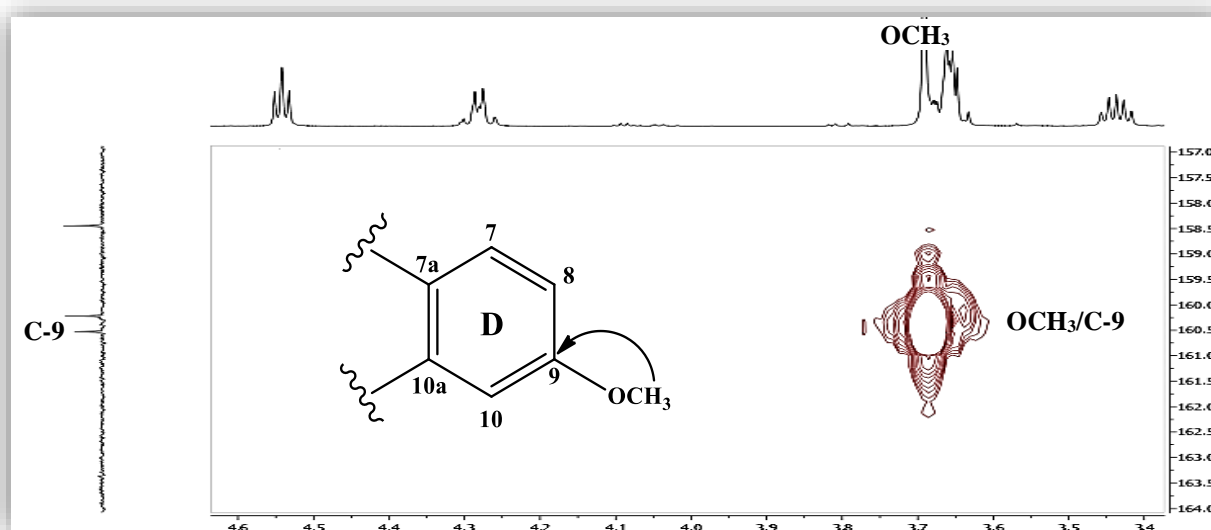


Figure II.91. Spectre HMBC du composé 8

Le proton repéré δ_H 3,65 corrèle sur le spectre COSY H-H (Figure II.92) avec des protons géminés sortant à δ_H 4,28 et 3,66, ainsi qu'avec un autre proton à δ_H 5,60, constituant un enchaînement-O-CH₂-CH-CH-O-, très caractéristique de protons H₂-6/H-6a/H-11a des deux hétérocycles d'un squelette ptérocarpane [56].

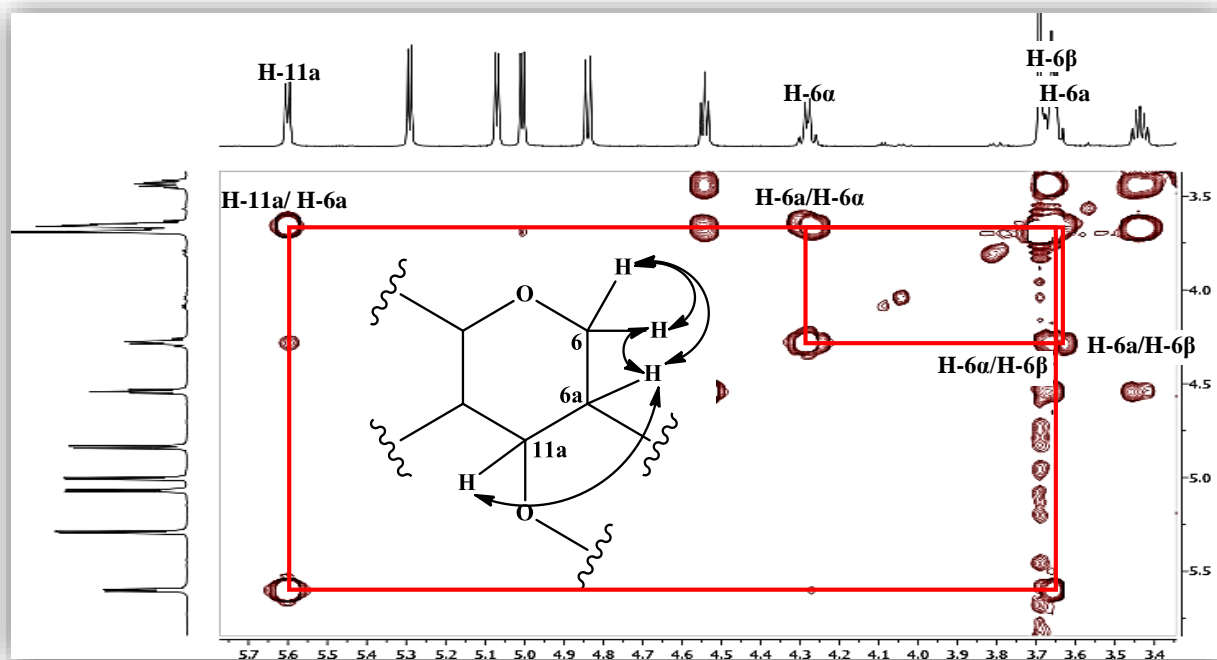


Figure II.92. Spectre COSY H-H du composé 8

Cet enchainement $-O-{}_6CH_2-{}_{6a}CH-{}_{11a}CH-O-$ est confirmé par HMBC (Figure II.93) qui montre des couplages hétéronucléaires entre les protons H-6a/H-6α/H-6β et C-11a (δ_C 77,7), H-11a/H-6β et C-6 (δ_C 65,9) et entre H-11a/H-6α/H-6β et le carbone C-6a (δ_C 65,9).

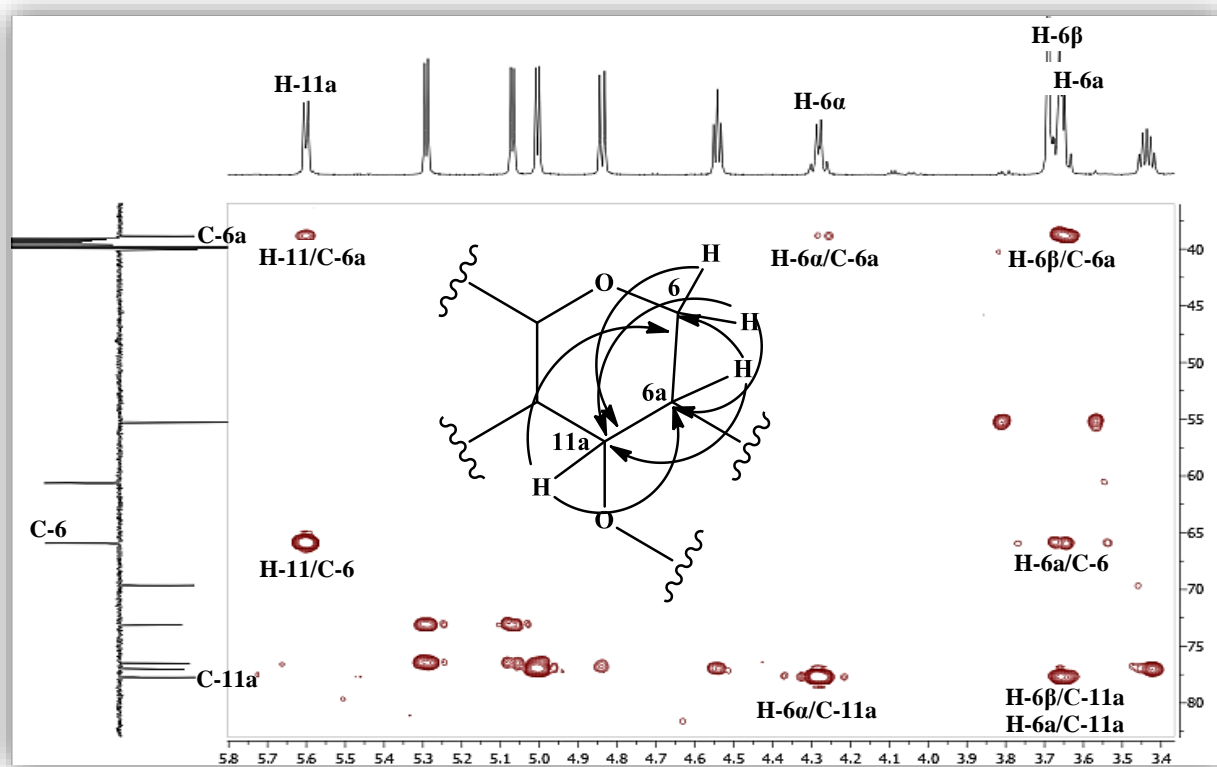


Figure II.93. Spectre HMBC du composé 8

Le spectre HMBC (Figure II.94) montre bien la connectivité entre le cycle A (en positions 1a et 4a) et le carbone C-11a (δ_C 77,7) par les corrélations observées entre le proton oxyméthine H-11a et les carbones aromatiques C-1 (δ_C 131,9), C-1a (δ_C 114,1) et C-10a (δ_C 160,2). De même pour le cycle B, il est visualisé également des couplages entre le proton H-6a (δ_H 3,65) et le carbone quaternaire C-7a (δ_C 119,2) ainsi que le carbone C-7 (δ_C 125,2).

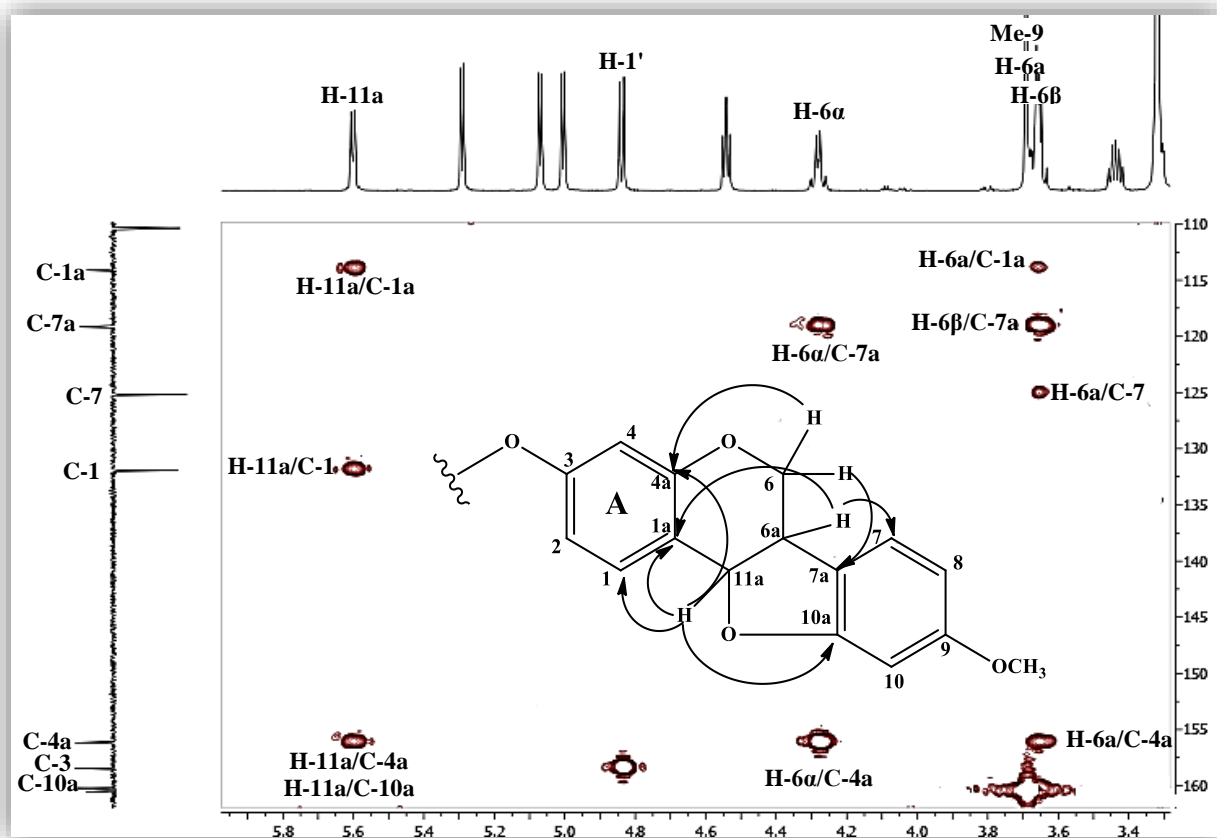


Figure II.94. Spectre HMBC du composé 8

Une simple comparaison des déplacements chimiques des carbones de ce composé avec ceux cités dans la littérature, permet de confirmer la structure de notre composé (Figure II.95), dans sa partie non osidique, à un ptérocarpane plus connu sous le nom de médicarpine [56].

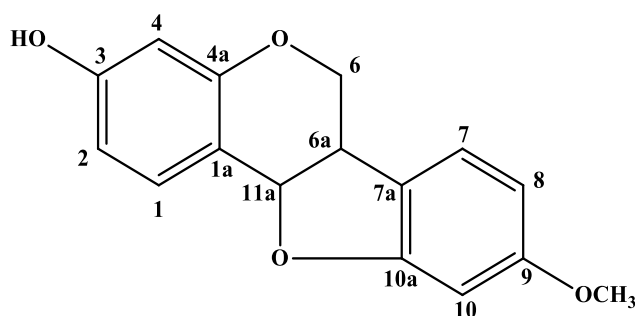


Figure II.95. Structure de la médicarpine

En plus des éléments structuraux identifiés précédemment, le spectre RMN ^1H (Figure II.96) montre des signaux de protons résonnant entre 3,15 et 3,65 ppm ainsi qu'un signal de proton anomère à δ_{H} 4,84 (d , $J = 7,6$ Hz) établissant la présence d'une unité osidique.

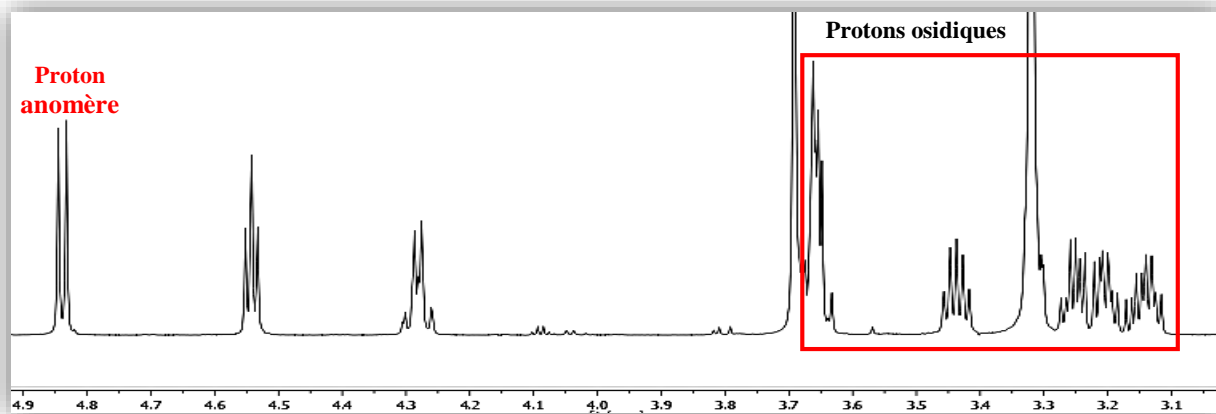


Figure II.96. Spectre RMN ^1H des protons osidiques du composé **8**

Partant du proton anomérique H-1' (δ_{H} 4,84, d , $J = 7,6$ Hz), il est aisé d'identifier sur le spectre COSY H-H (Figure II.97), un système de spins à sept protons d'un hexose. Ce système est illustré par les corrélations H-1'/H-2' (δ_{H} 3,20, t , $J = 7,6$ Hz) H-2'/H-3' (δ_{H} 3,25, t , $J = 7,6$ Hz), H-3'/H-4' (δ_{H} 3,15, dd , $J = 9,0, 7,7$), H-4'/H-5' (δ_{H} 3,32, ddd , 9,0; 6,7; 2,1 Hz) et H-5'/H-2-6' (δ_{H} 3,65, dd , $J = 11,9$; 6,7 Hz, H-6'a/ δ_{H} 3,44, dd , $J = 11,9$; 2,1 Hz, H-6'b). Les grandes valeurs de constantes de couplage indiquent qu'il s'agit d'un glucose de configuration β ($J_{\text{H-1'}/\text{H-2'}} = 7,6$ Hz).

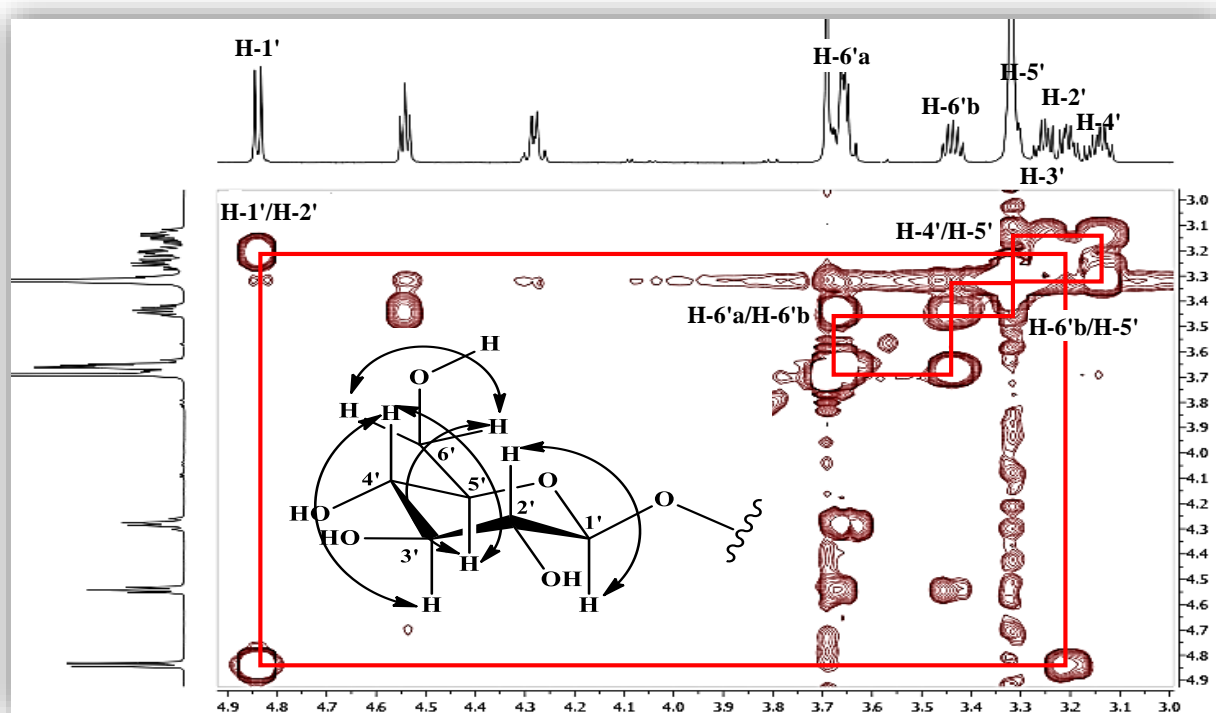


Figure II.97. Spectre COSY H-H de la partie osidique du composé **8**

L'analyse du spectre HSQC *J*-modulé (Figure II.98) permet d'assigner les déplacements chimiques des carbones du sucre : δ_C 100,3 (C-1'), 73,1 (C-2'), 76,5 (C-3'), 69,6 (C-4'), 77,7 (C-5') et 60,6 (C-6').

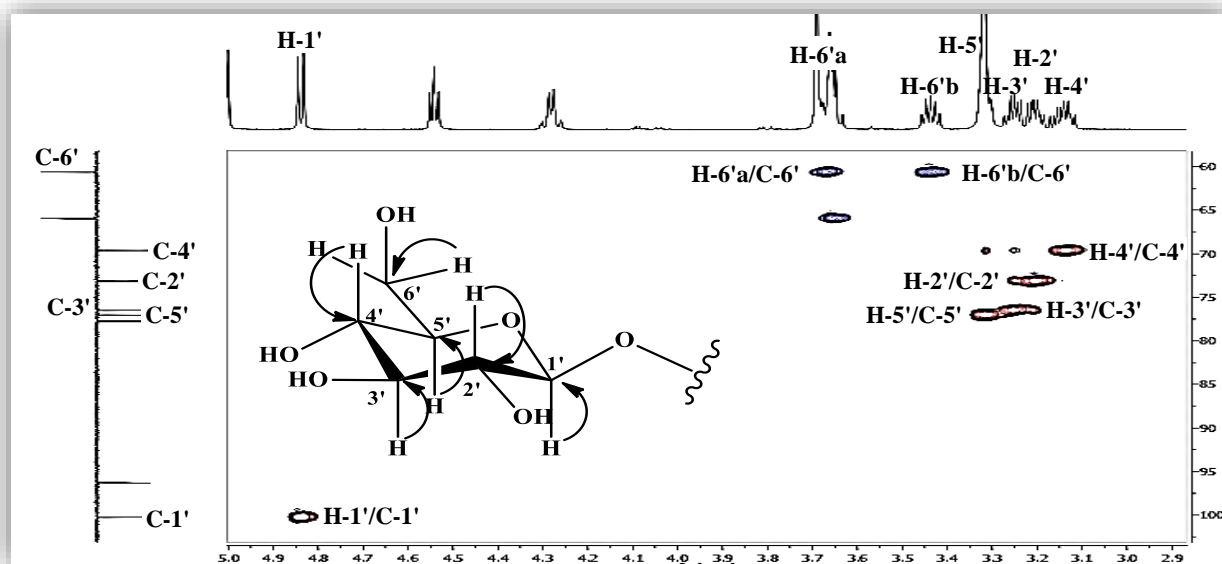


Figure II.98. Spectre HSQC de la partie osidique du composé **8**

Le branchement de glucose en C-3 de la génine est établie par la corrélation HMBC (Figure II.99) entre le proton anomère H-1' (δ_H 4,84) et le carbone C-3 (δ_C 158,4).

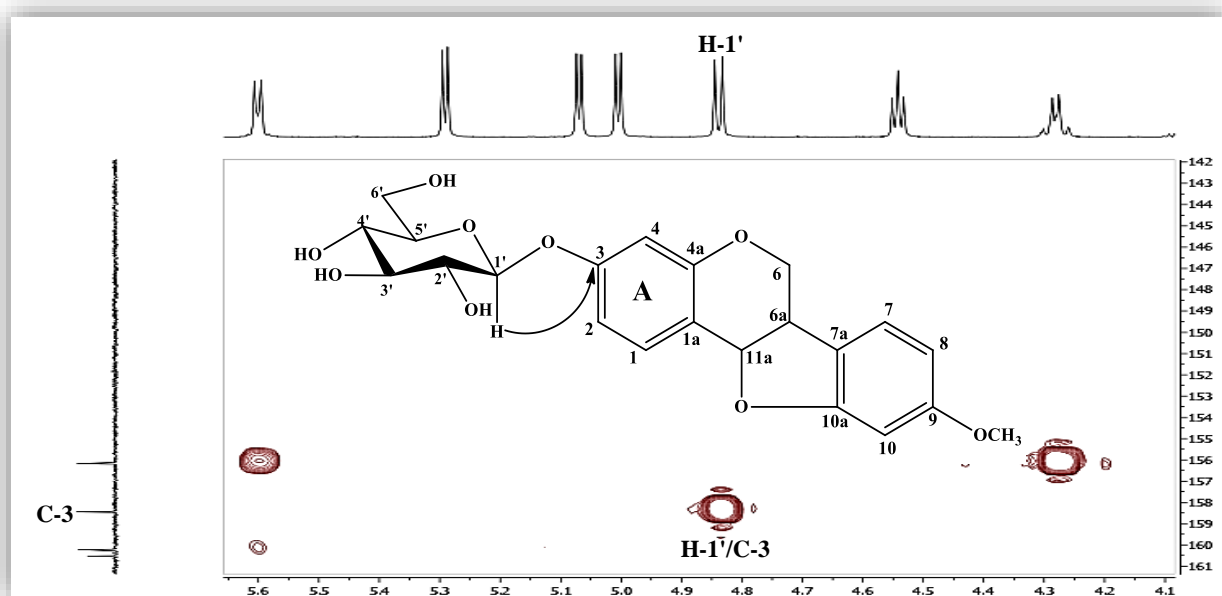


Figure II.99. Spectre HMBC du composé **8**

Les ptéocarpanes naturels se rencontrent dans la nature sous la forme de deux isomères (6a*R*, 11a*R* et 6a*S*, 11a*S*) [83], et donc une orientation *Cis* pour les protons 6a et 11a. La valeur de la constante de couplage $J_{H-11a/H-6a}$ égale à 6,5 Hz observée pour le composé **8**, confirme cette

orientation. La similitude des données spectroscopiques avec celles des ptérocarpanes ayant le même squelette médicarpine, isolés des espèces du même genre comme *Ononis vaginalis* [57] et *O. spinosa* [56], nous autorise à proposer également une stéréochimie 6a*R*, 11a*R* dans le cas de notre composé.

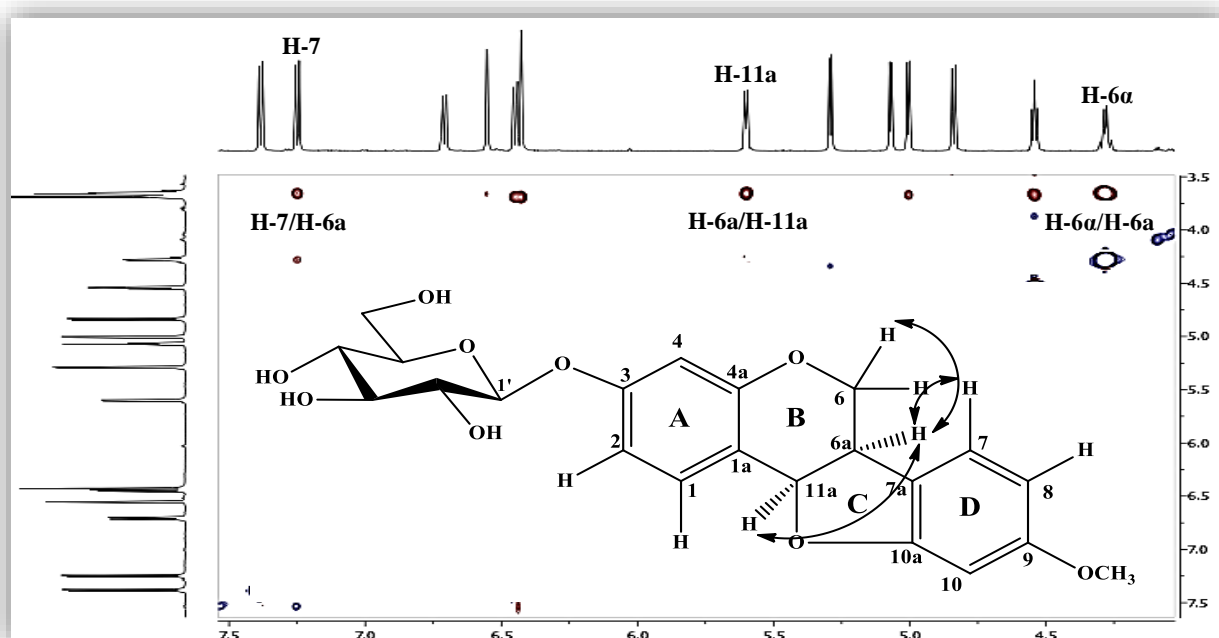


Figure II.100. Spectre ROESY du composé **8**

L'analyse combinée des spectres HSQC et HMBC permet d'attribuer tous les signaux des carbones du composé **8** (Figure II.101).

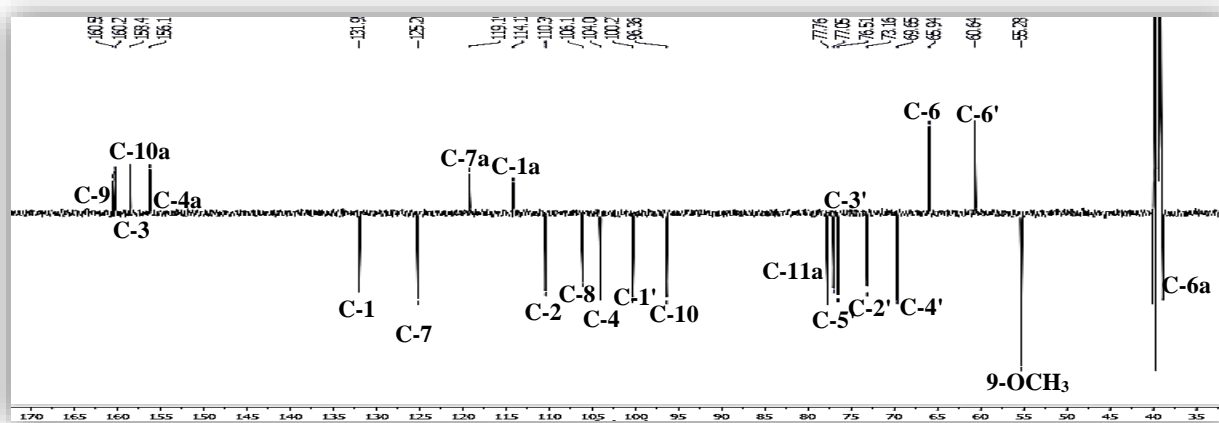
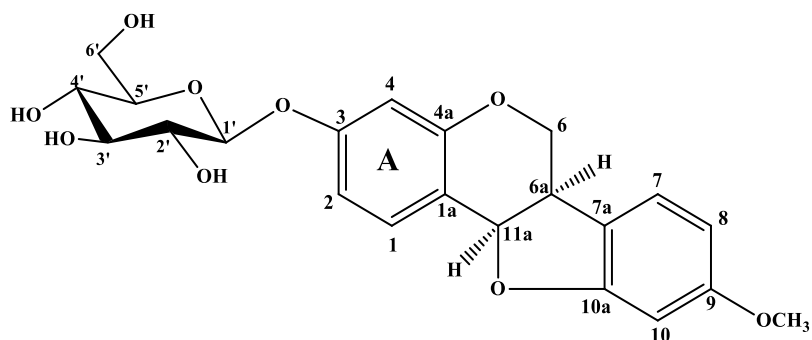


Figure II.101. Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **8** (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

L'ensemble de ces données spectroscopiques (Tableau II.8) ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire ($[\alpha]_D$: -73,8, $C = 0,05$, pyridine) et la comparaison avec les données de la littérature, nous permettent d'identifier le composé **8** au (6a*R*, 11a*R*)-3-*O*- β -D-glucopyranosyl-médicarpine.

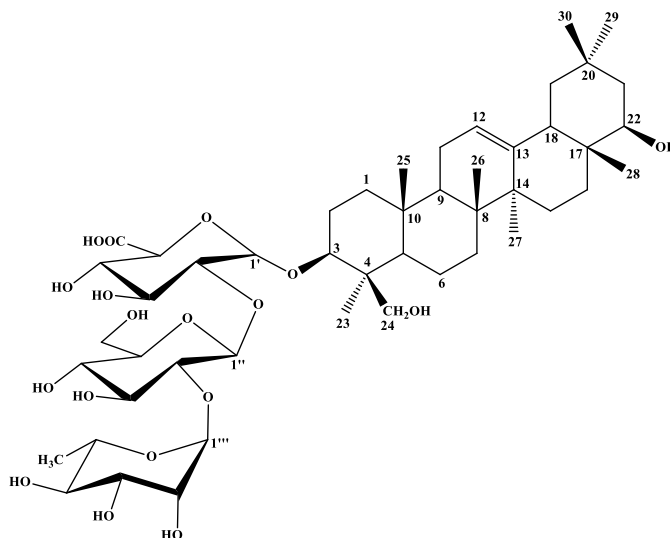


Ce composé a été isolé de certaines espèces du genre *Ononis* comme *O. arvensis* [84] et *O. spinosa* subsp. *leiosperma* [67,85]. Il a été également rencontré dans des espèces Fabaceae comme *Gueldenstaedtia multiflora* [86].

Tableau II.8. Données RMN ^1H (600 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz) du composé **8** dans DMSO- d_6

Position	δ_{H} (m, J en Hz)	δ_{C} (ppm)
1	7,38 ($d, 8,5$)	131,9
1a	-	114,1
2	6,71 ($dd, 8,5, 2,4$)	110,4
3	-	158,4
4	6,55 ($d, 2,4$)	104,0
4a	-	156,2
6α	4,28 (m)	65,9
6β	3,66 (m)	-
6a	3,65 (m)	38,5
7	7,25 ($d, 8,1$)	125,2
7a	-	119,2
8	6,45 ($dd, 8,1, 2,2$)	106,1
9	-	160,5
10	6,43 ($d, 2,2$)	96,3
10a	-	160,2
11a	5,60 ($d, 6,5$)	77,7
1'	4,84 ($d, 7,6$)	100,3
2'	3,20 ($t, 7,6$)	73,1
3'	3,25 ($t, 7,6$)	76,5
4'	3,15 ($dd, 9,0; 7,7$)	69,6
5'	3,32 ($ddd, 9,0; 6,7; 2,1$)	77,0
6'a	3,65 ($dd, 11,9; 6,7$)	60,6
6'b	3,44 ($dd, 11,9; 2,1$)	
OMe-9	3,68 (s)	55,3

II.4.9. Elucidation structurale du composé 9



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

Le composé **9** a été obtenu sous forme d'une poudre blanche. Son spectre de masse à haute résolution (HR-ESI-MS) (Figure II.102), enregistré en mode négatif, montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 911,500$ $[M-CH_2OH]^-$ (calc. 911,4999, $C_{47}H_{75}O_{17}$), soit une masse moléculaire égale à 942 uma correspondant à une formule brute en $C_{48}H_{78}O_{18}$.

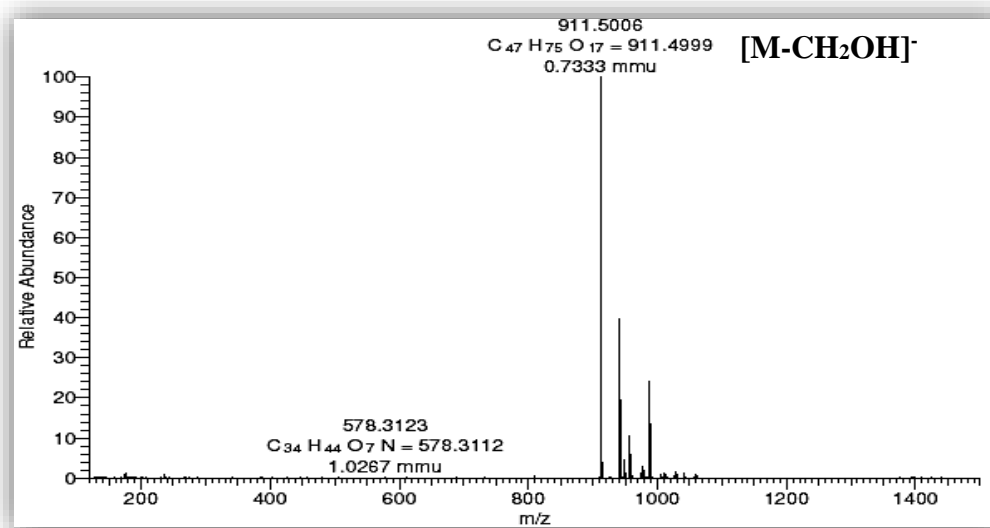


Figure II.102. Spectre de masse HR-ESI-MS (mode négatif) du composé **9**

Son spectre RMN 1H (Figure II.103), enregistré dans $DMSO-d_6$, présente toutes les caractéristiques d'une génine triterpénique à squelette oléanane insaturée en 12-13 [87], et cela par l'observation de :

- Sept signaux singulets à champ fort entre 0,76 et 1,14 ppm, s'intégrant pour trois protons chacun, correspondant à sept groupements méthyles.
- Un signal résonant à δ_H 3,21 (*dd*, $J = 10,0; 4,4$ Hz) attribuable au proton oxyméthine H-3 α -axial de la génine triterpénique.
- Un signal de proton éthylénique à δ_H 5,18 (*t*, $J = 3,7$ Hz) caractéristique du proton H-12 du squelette oléanène.
- Un signal à δ_H 2,00 (*dd*, $J = 14,5, 3,3$ Hz) attribuable au proton H-18 du triterpène.

La nature glycosidique du composé est attestée par l'observation de plusieurs signaux entre 3,10 et 3,92 ppm et trois signaux doublets à δ_H 4,18 (1H, *d*, $J = 7,5$ Hz), 4,76 (1H, *d*, $J = 7,2$ Hz) et 4,95 ppm (1H, *d*, $J = 1,5$ Hz) caractéristiques de protons anomères, suggérant la présence de trois unités osidiques. La faible constante de couplage du signal du dernier proton ainsi que l'observation d'un signal doublet de protons méthyliques (3H, δ_H 1,10, *d*, $J = 6,2$ Hz) suggèrent la présence d'un rhamnose.

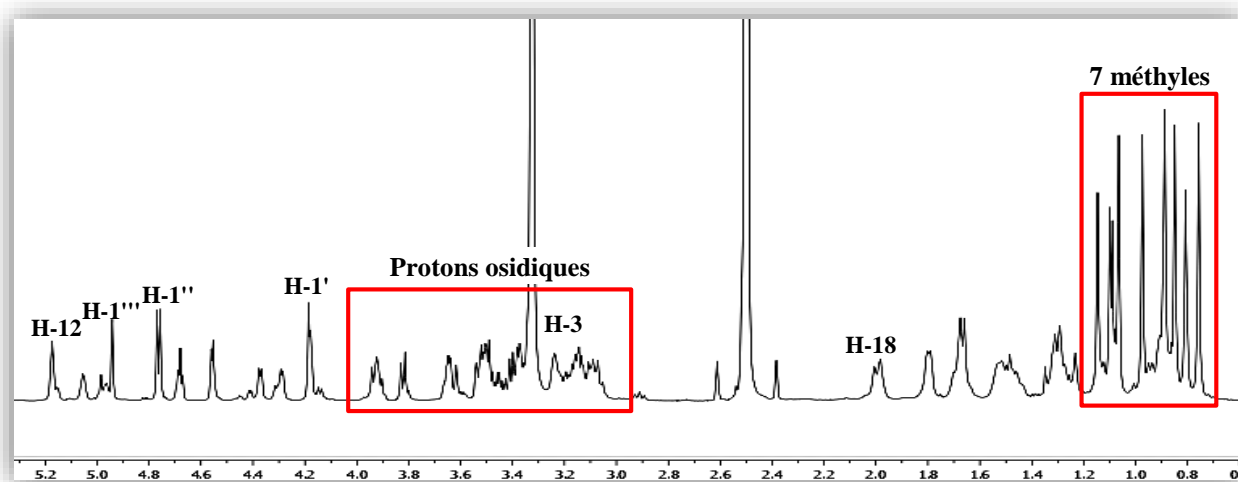


Figure II.103. Spectre RMN 1H du composé 9

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (Figure II.104), confirme la nature du composé à travers les signaux des carbones méthyliques résonant dans la région allant de 15,4 à 32,7 ppm, des deux carbones éthyléniques C-12 (δ_C 121,6) et C-13 (δ_C 144,1), du carbone oxygéné C-3 repéré à 90,0 ppm, des trois carbones anomères (δ_C 104,0, 99,7, 100,3) et des autres carbones osidiques résonant entre 59,8 à 77,1 ppm. Il est à signaler que le déblindage important (de l'ordre de 10 ppm) du carbone C-3 (δ_C 90,0) implique une glycosylation à ce niveau [87].

Par ailleurs, il est aussi observé un signal d'un carbone de carbonyle d'acide à 172,3 ppm.

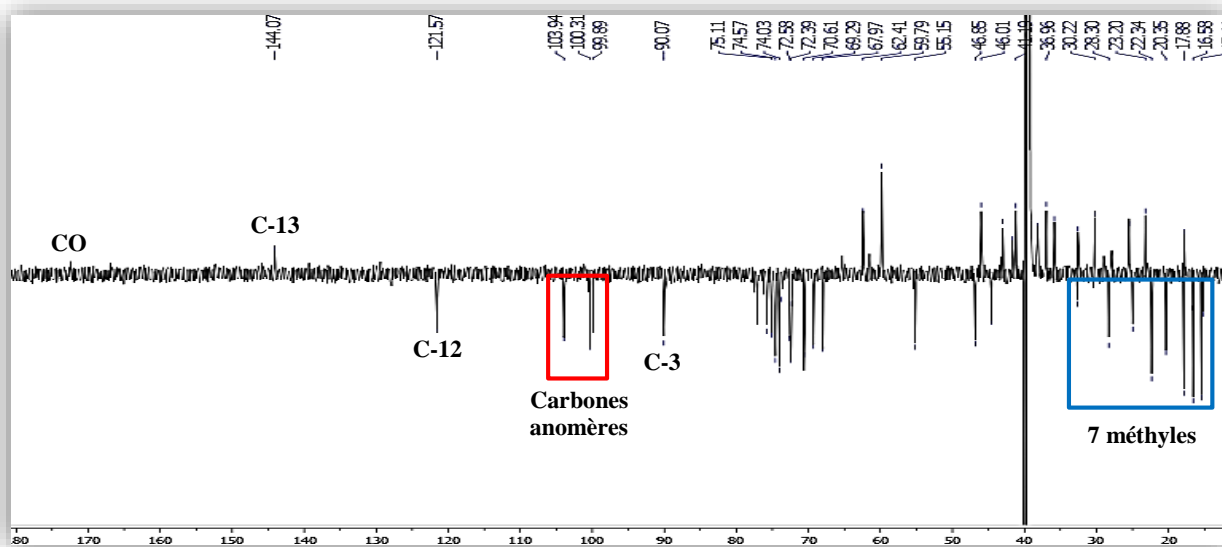


Figure II.104. Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé **9**

L'élucidation structurale du composé **8** se répartit en deux parties: identification de la génine puis de la partie osidique.

Identification de la génine

La présence de sept méthyles suppose l'oxydation d'un des huit méthyles constituant habituellement le squelette oléanane. Cela est confirmé par la présence de signaux de deux protons d'un groupement hydroxyméthylène (CH_2OH) résonant à δ_{H} 3,94 et 3,07. Leur carbone est repéré sur le spectre HSQC à δ_{C} 62,4 ppm.

L'expérience HMBC (Figures II.105 et II.106) permet d'identifier les carbones méthyliques ainsi que les autres carbones de la génine. Ainsi :

- les protons méthyliques sortant à δ_{H} 1,14 corrént avec les carbones C-3 (δ_{H} 90,2), C-4 (δ_{C} 42,9), C-5 caractéristique (δ_{C} 55,1) et le carbone hydroxyméthylène (62,4 ppm). La valeur de déplacement chimique égale à 22,3 ppm, est propre au groupement équatorial CH_3 -23 [88] substituant avec le groupement CH_2OH -24, la génine en C-4.
- Les protons H_3 -25 repérés à δ_{H} 0,81 couplent sur le même spectre avec les carbones C-1 (δ_{C} 38,2), C-10 (δ_{C} 35,8), C-5 (δ_{C} 55,1) et C-9 (δ_{C} 46,9). Le proton de ce dernier repéré à 1,49 ppm selon l'analyse HSQC, couple sur le spectre COSY H-H avec les protons H_2 -11 repérés à δ_{H} 1,80, eux-mêmes corrélant avec le proton éthylénique résonant à 5,18 ppm. La localisation de la double liaison en C-12-C-13 est confirmée sur le spectre HMBC qui met en évidence les couplages longue distance entre les protons H_2 -11 et deux carbones éthyléniques résonant à

121,6 (C-12) et 144,1 ppm (C-13). Le proton H-5 repéré à δ_H 0,88 (m) selon l'expérience HSQC, corrèle avec le carbone C-9 déjà identifié, les carbones quaternaires C-1 (δ_C 38,2), C-8 (δ_C 38,3), le carbone méthylénique C-7 (δ_C 32,6) ainsi qu'avec le carbone méthylique C-25 (δ_C 15,4).

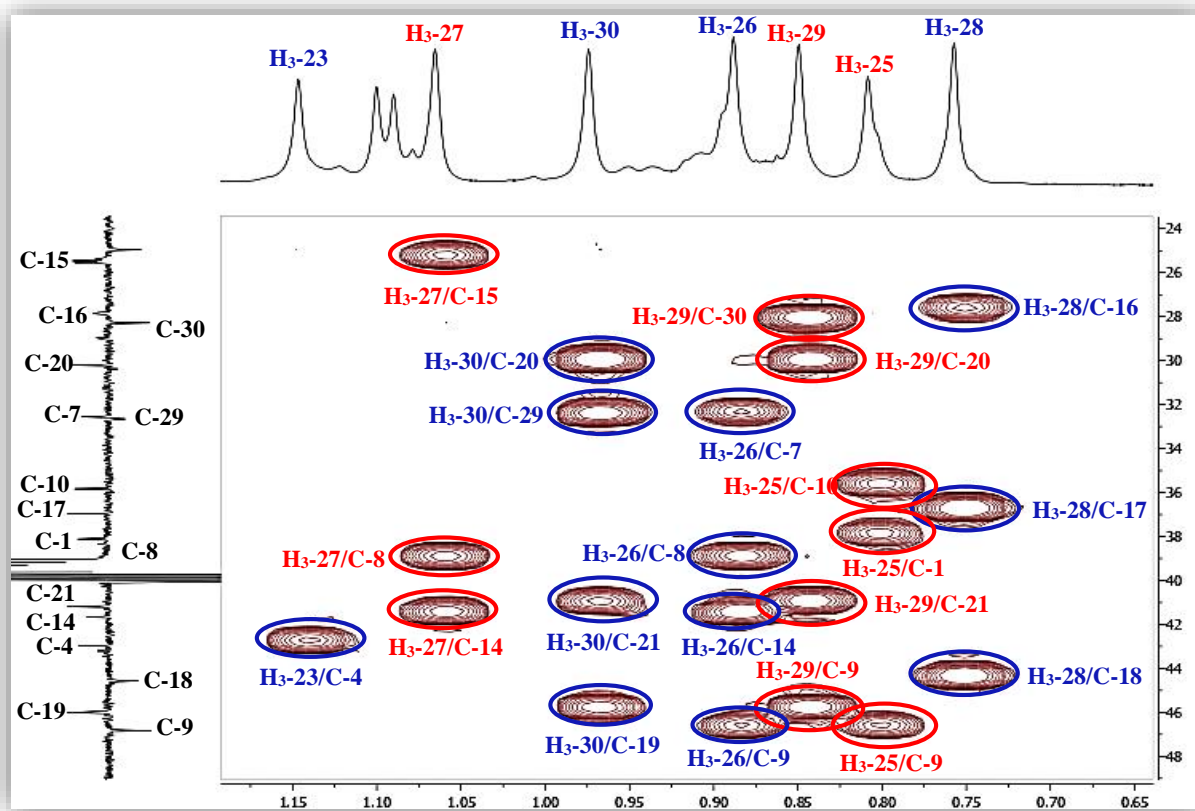
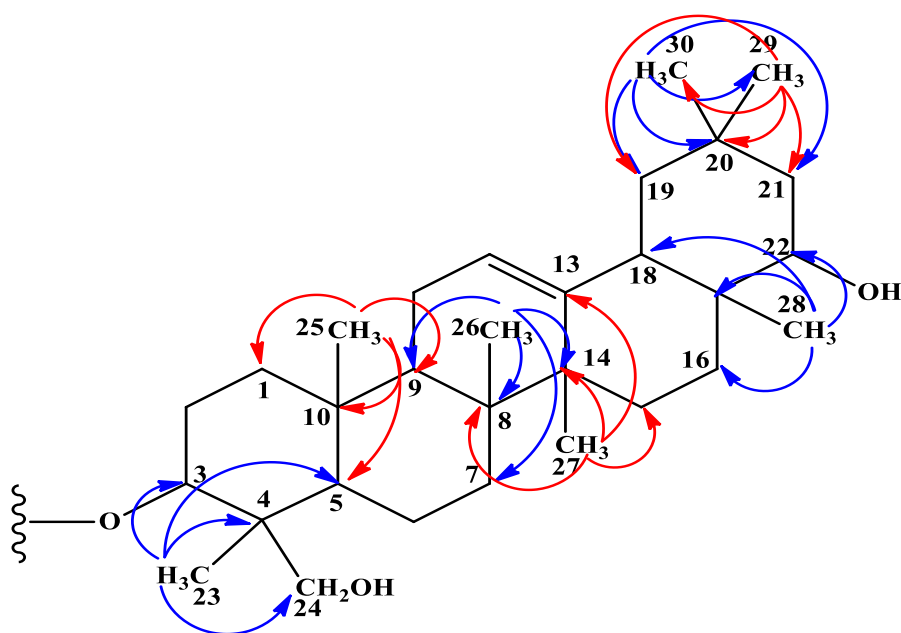


Figure II.105. Spectre HMBC du composé 9



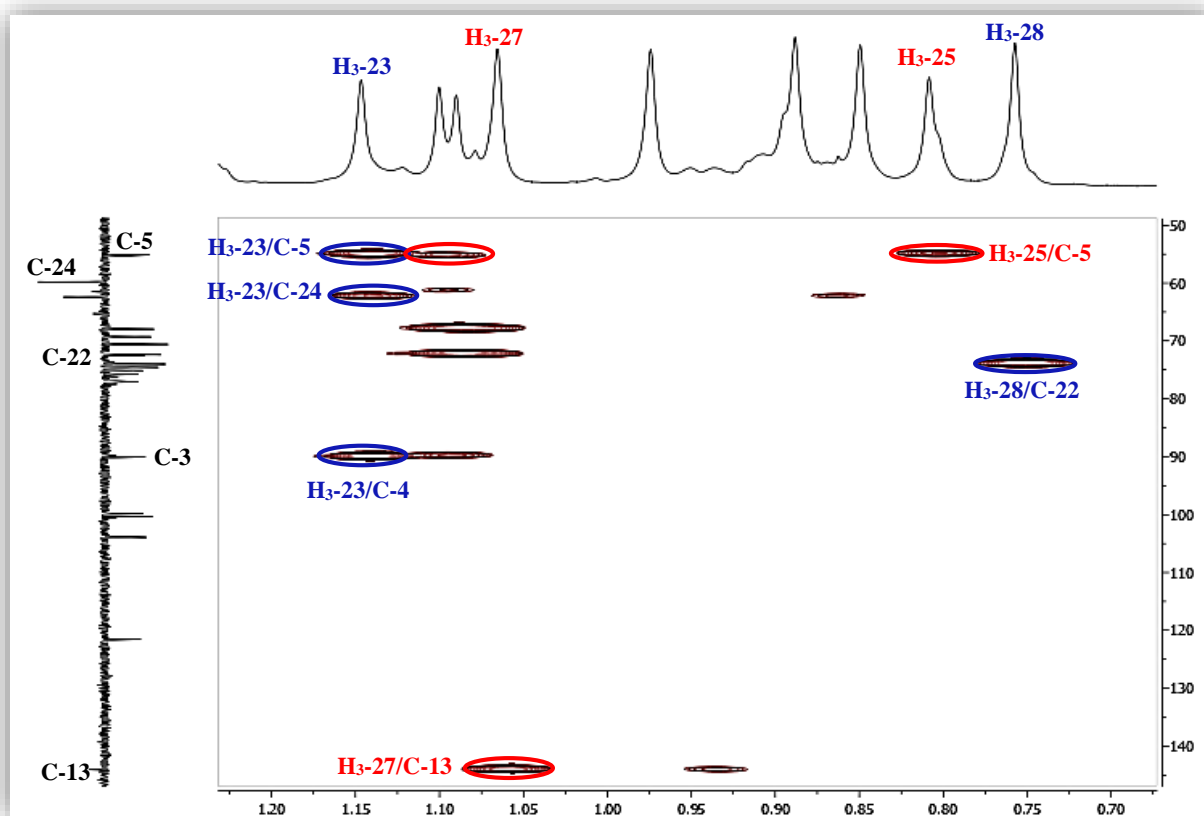


Figure II.106. Spectre HMBC du composé 9

- Les protons H₃-26 (δ_{H} 0,89, *s*) corrént avec les carbones C-7 (δ_{C} 32,6), C-9 (δ_{C} 46,9) et les carbones quaternaires C-8 (δ_{C} 38,3) et C-14 (δ_{C} 41,7). Ces deux derniers corrént avec les protons méthyliques H₃-27 repérés à δ_{H} 1,06, qui couplent à leur tour avec le carbone quaternaire oléfinique C-13 (δ_{C} 144,1) et le carbone méthylénique CH₂-15 (25,5 ppm). Les protons portés par ce dernier, identifiés par HSQC (Figure II.107), sont repérés à 0,95 et 1,66 ppm. Ces derniers montrent sur le spectre COSY H-H (Figure II.109) des corrélations avec deux protons sortant à δ_{H} 1,67 et 1,13 attribuables aux protons géminés H₂-16.
- Les protons H₃-28 (δ_{H} 0,76, *s*) corrént avec les carbones C-16, C-17 (δ_{C} 37,0), le carbone méthine C-18 (δ_{C} 44,6) ainsi que le carbone oxygéné C-H résonant à 73,8 ppm caractéristique d'un groupement CH-OH en C-22. Le proton porté par ce dernier, identifié par l'expérience HSQC (δ_{H} 3,23) ppm, donne sur le spectre COSY H-H (Figure II.109), un couplage avec les protons H-21 (δ_{H} 1,32). Le carbone de ce dernier est assigné à 41,2 ppm.
- Les protons des méthyles géminaux H₃-29 (δ_{H} 0,85, *s*) et H₃-30 (δ_{H} 0,97, *s*) corrént avec les carbones méthyléniques C-19 (δ_{C} 46,0) et C-21 ainsi que le carbone quaternaire C-20 (δ_{C} 30,2).

Les protons H₂-7 (δ_H 1,46 ; 1,31) et H₂-19 (δ_H 1,69 ; 0,91) sont assignés par expérience HSQC (Figure II.107).

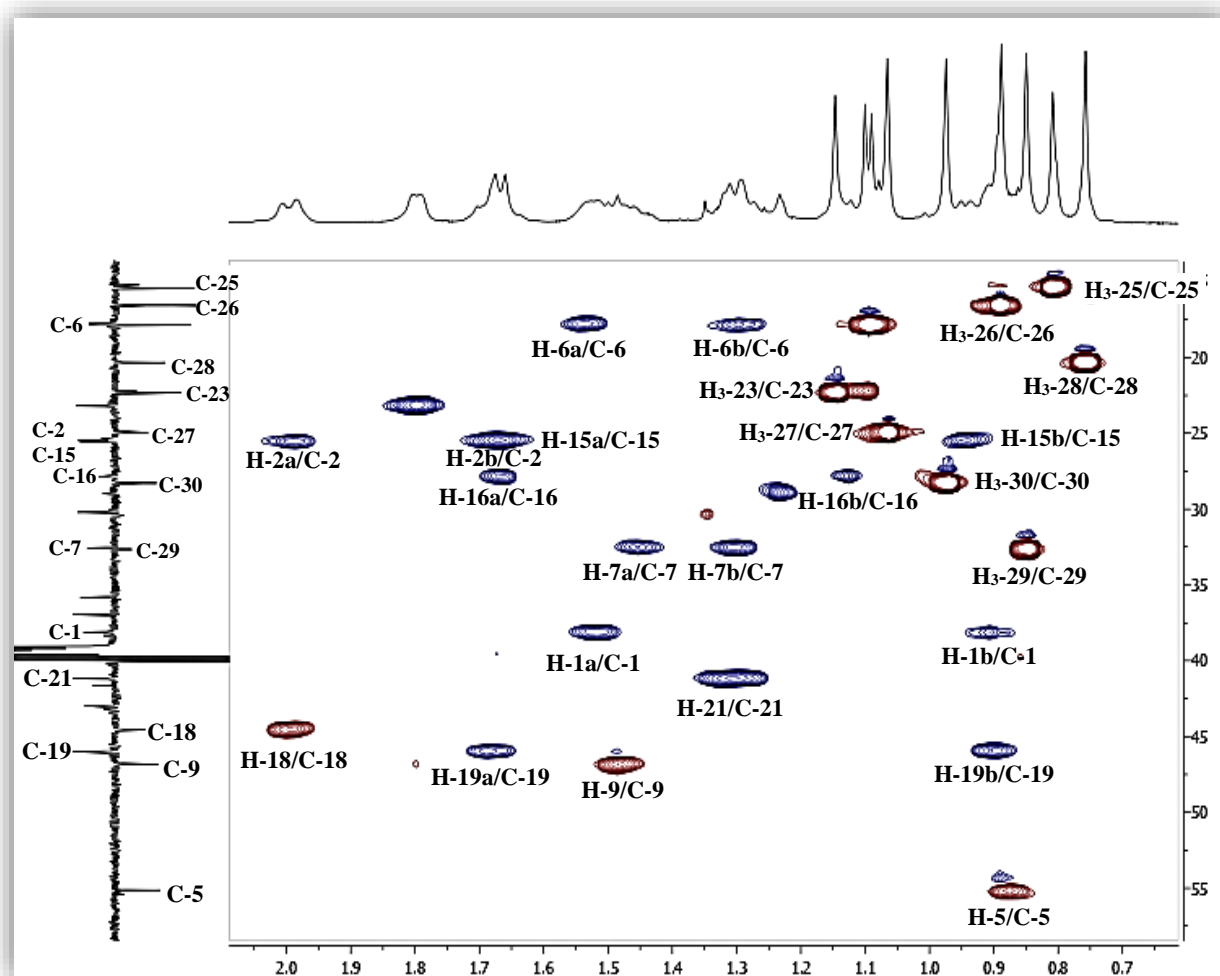


Figure II.107. Spectre HSQC du composé **9**

L'expérience COSY H-H (Figures II.108 et II.109) permet de localiser les autres protons de la génine par les corrélations observées entre :

- Le proton H-3 (δ_H 3,21) déjà identifié et deux protons à δ_H 1,99 et 1,67, attribuables aux protons H₂-2. Ces derniers corréleront à leur tour avec les deux protons H₂-1 résonant à δ_H 1,52 et 0,92.
- Les protons H₂-6 (δ_H 1,54 ; 1,31) et le proton H-5 (δ_H 0,88) déjà identifié.

Les carbones de ces protons sont repérés sur le spectre HSQC (Figure II.107) : δ_C 25,5 (C-2), 38,2 (C-1), δ_C 17,8 (C-6), δ_C 44,6 (C-18) et δ_C 46,0 (C-19).

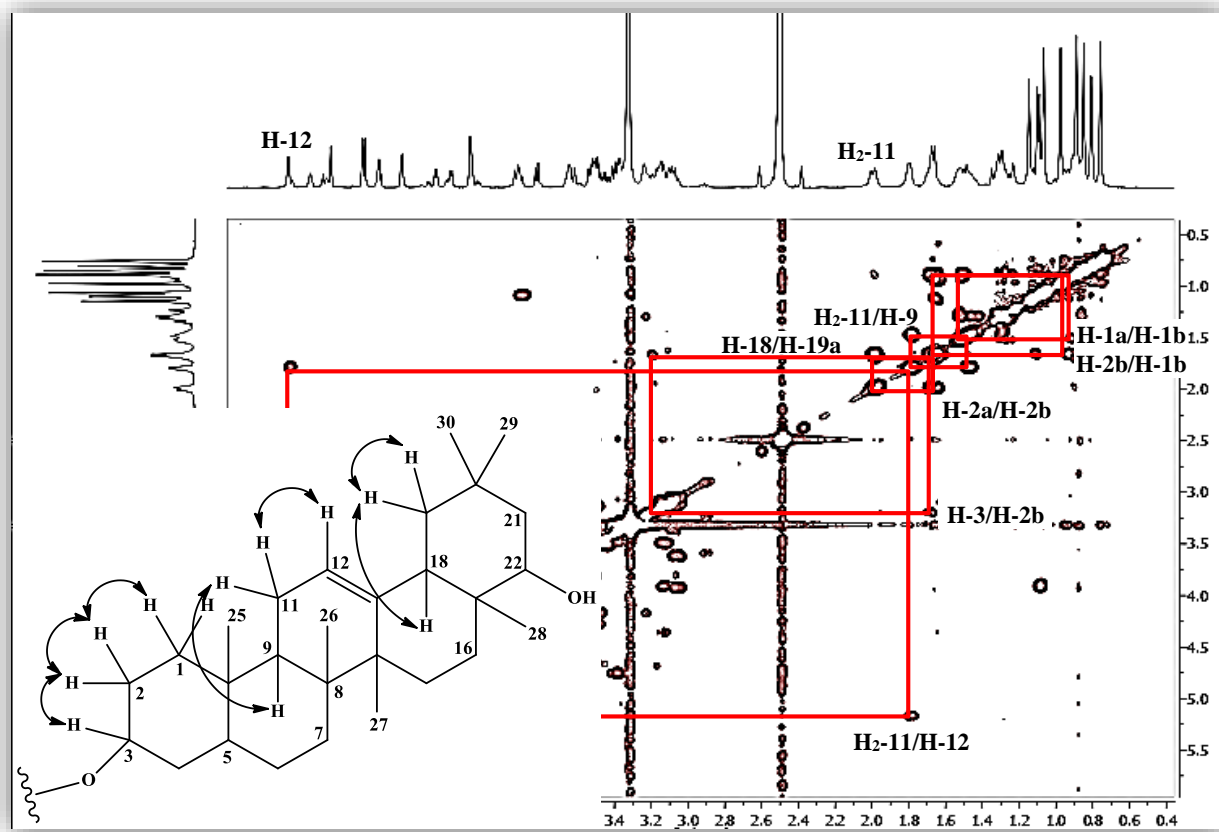


Figure II.108. Spectre COSY H-H du composé 9

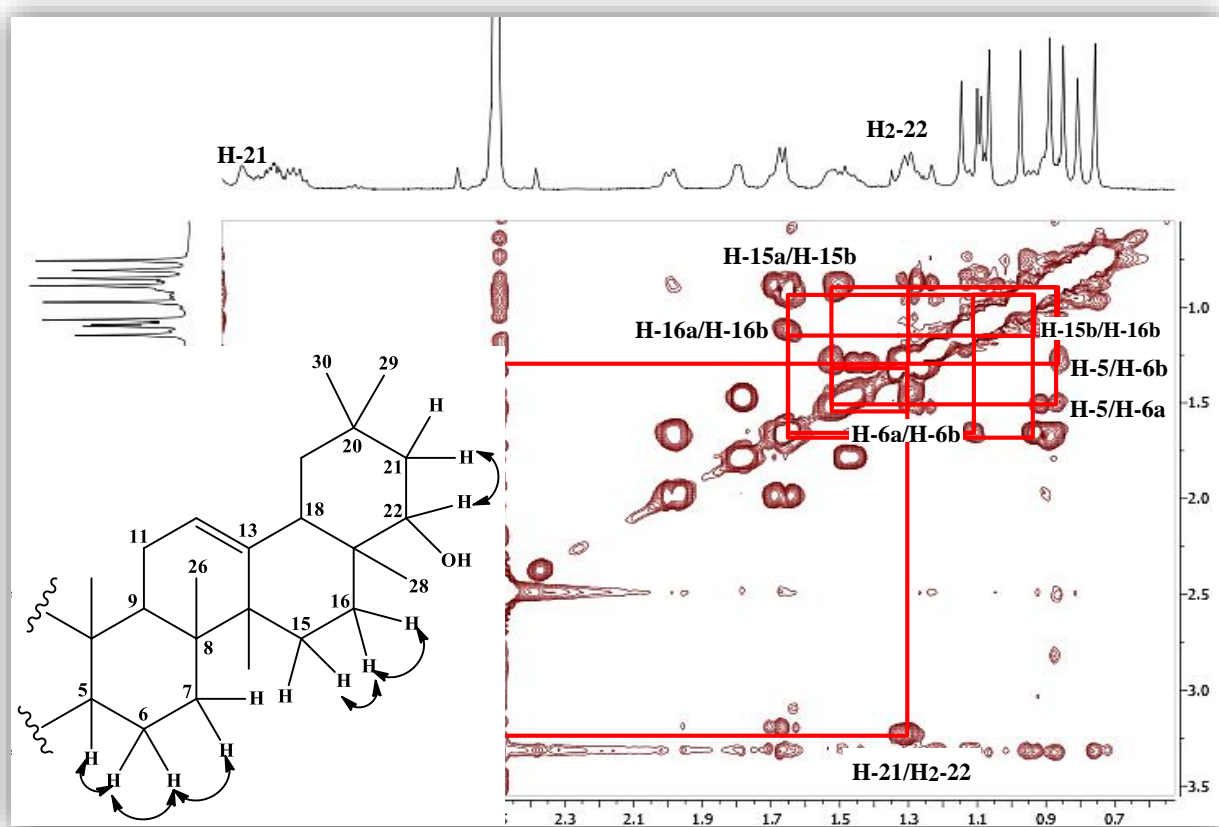


Figure II.109. Spectre COSY H-H du composé 9

La stéréochimie de la génine est établie par analyse des effets rOe observés sur le spectre ROESY (Figures II.110 et II.111) et les valeurs de constantes de couplage.

- La stéréochimie α des protons H-5 (δ_H 0,88) et H₃-23 (δ_H 1,14) est confirmée par les effets rOe qu'ils présentent avec le proton α -axial H-3 (δ_H 3,21, $^3J_{3ax-2ax} = 10,0$ Hz).
- L'orientation β -axiale du proton H-18 est établie par la grande constante de couplage $^3J_{18ax-19ax}$ (14,5 Hz). Elle est confirmée par l'effet rOe qu'il présente avec le proton éthylénique H-12 (δ_H 5,18) et les protons méthyliques H₃-30.
- L'orientation β -axiale des protons méthyliques H₃-28 est attribuée suite à leur corrélation avec le proton H-18 β .
- Les effets rOe observés entre les protons H₃-28/H₃-26 et H₃-26/H₃-25, confirment l'orientation β -axiale de méthyles CH₃-25 et CH₃-26.
- L'effet rOe observé entre les protons H₃-25 β et CH₂OH-24 a (δ_H 3,94) du groupement hydroxyméthylène confirme l'orientation β -axiale de ce dernier.
- Les effets rOe H-5 α /H-9 et H-9/H₃-27 traduisent une stéréochimie α pour les protons H-9 et H₃-27.
- l'absence d'effet rOe entre le proton H-22 (δ_H 3,24) et les protons H-18 β et CH₃-30, confirme l'orientation α du proton H-22.

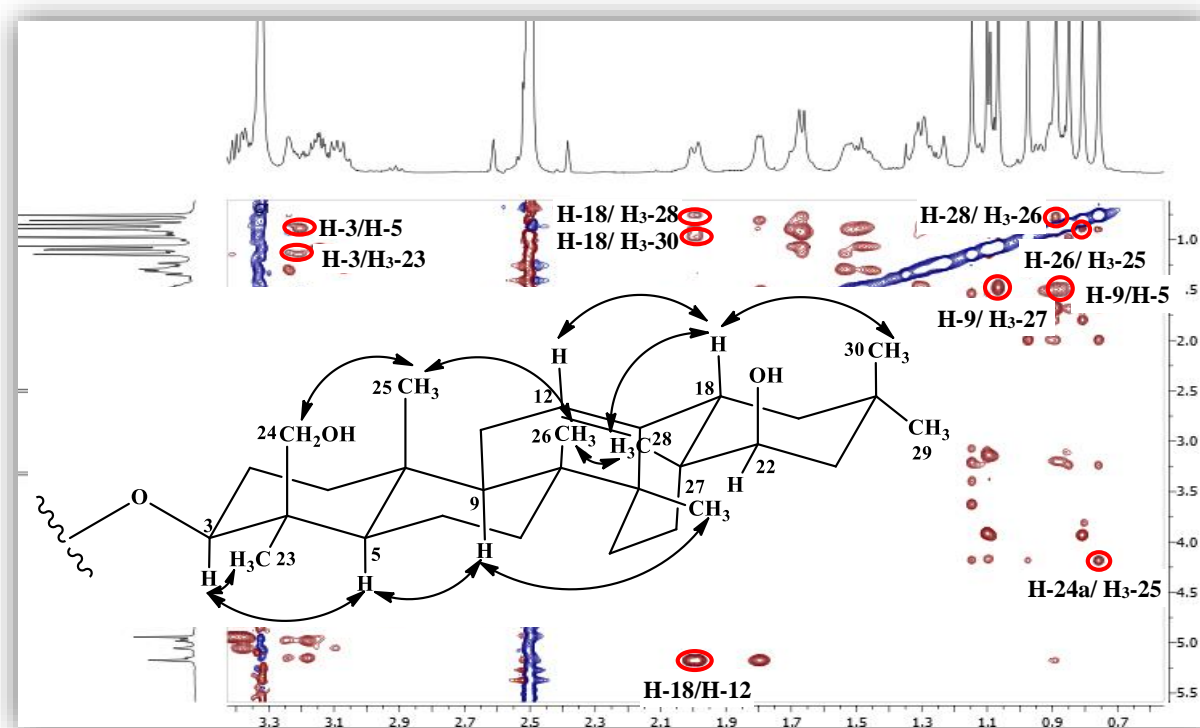
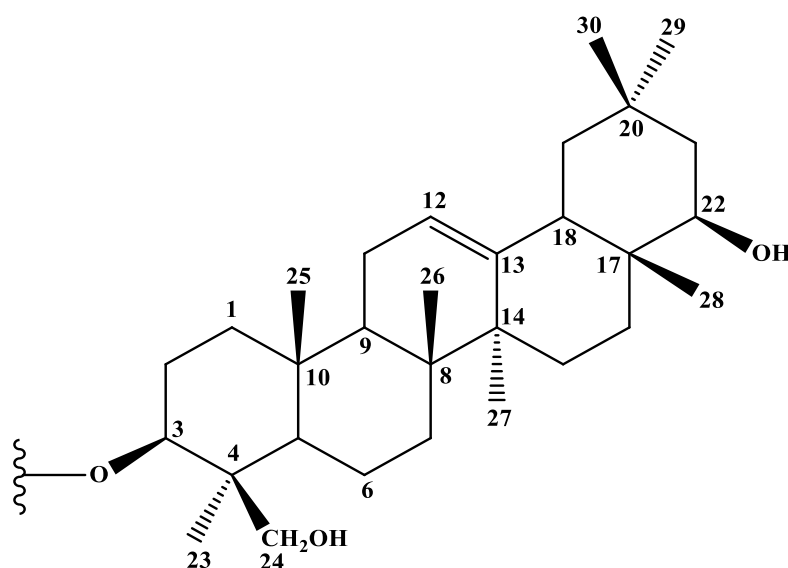


Figure II.111. Spectre ROESY du composé 9

Cette analyse a permis d'identifier la génine comme un oléanène connu sous le nom de soyasapogénol B [88].



Soyasapogénol B

Identification de la partie osidique

Sur le spectre RMN ^1H de ce composé, trois protons anomères sortant sous forme de doublet sont observés à δ_{H} 4,18, 4,76 et 4,95. Ces protons montrent sur le spectre HSQC (Figure II.112) des corrélations $J_{\text{H/C}}$ avec leurs carbones respectifs C-1' (δ_{C} 104,0), C-1'' (δ_{C} 99,7) et C-1''' (δ_{C} 100,3).

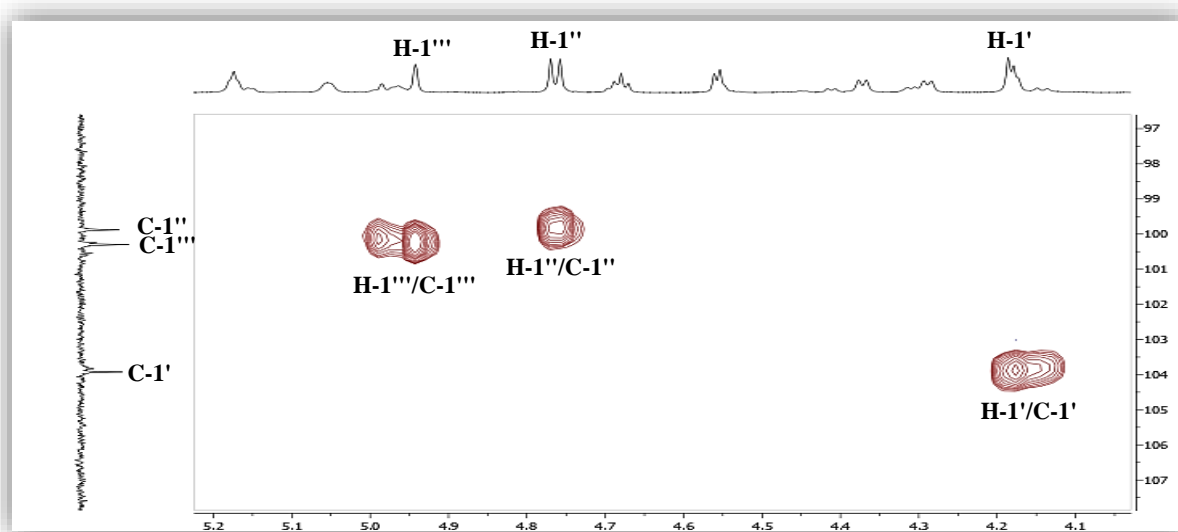


Figure II.112. Spectre HSQC montrant les protons et carbones anomères (Composé **9**)

A partir du proton anomère H-1' (δ_H 4,18, *d*, $J = 7,5$ Hz), l'analyse du spectre COSY H-H (Figure II.113) permet d'identifier le premier système de spins à cinq protons illustré par les corrélations H-1'/H-2' (δ_H 3,48, 1H, *dd*, $J = 9,2; 7,5$ Hz), H-2'/H-3' (δ_H 3,38, 1H, *t*, $J = 9,2$ Hz), H-3'/H-4' (δ_H 3,10, 1H, *t*, $J = 9,5$ Hz), H-4'/H-5' (δ_H 3,14, 1H, *d*, $J = 9,2$ Hz). L'observation d'une tache de corrélation sur le spectre HMBC (Figure II.114) entre le proton H-5' et un carbone repéré à 172,3 ppm permet d'identifier cette unité osidique à l'acide glucuronique de configuration β ($J_{H-1'-H-2'} = 7,5$ Hz) [88].

L'analyse du même spectre (Figure II.113) montre un deuxième système de spins à sept protons d'un hexose dont l'anomère H-1'' résonne à δ_H 4,76 (*d*, $J = 7,2$ Hz). En effet, à partir de ce proton, on relie les protons H-2'' (δ_H 3,41, 1H, *dd*, $J = 9,5; 7,2$), H-3'' (δ_H 3,36, 1H, *dd*, $J = 9,7; 9,5$), H-4'' (δ_H 3,56, 1H, *t*, $J = 9,7$ Hz), H-5'' (δ_H 3,33, 1H, *dd*, $J = 9,7; 5,3$), H-6''a (δ_H 3,52, *m*) et H-6''b (δ_H 3,47, *m*). Les grandes valeurs de constante de couplage indiquent qu'il s'agit d'un glucose de configuration β ($J_{H-1''-H-2''} = 7,2$ Hz).

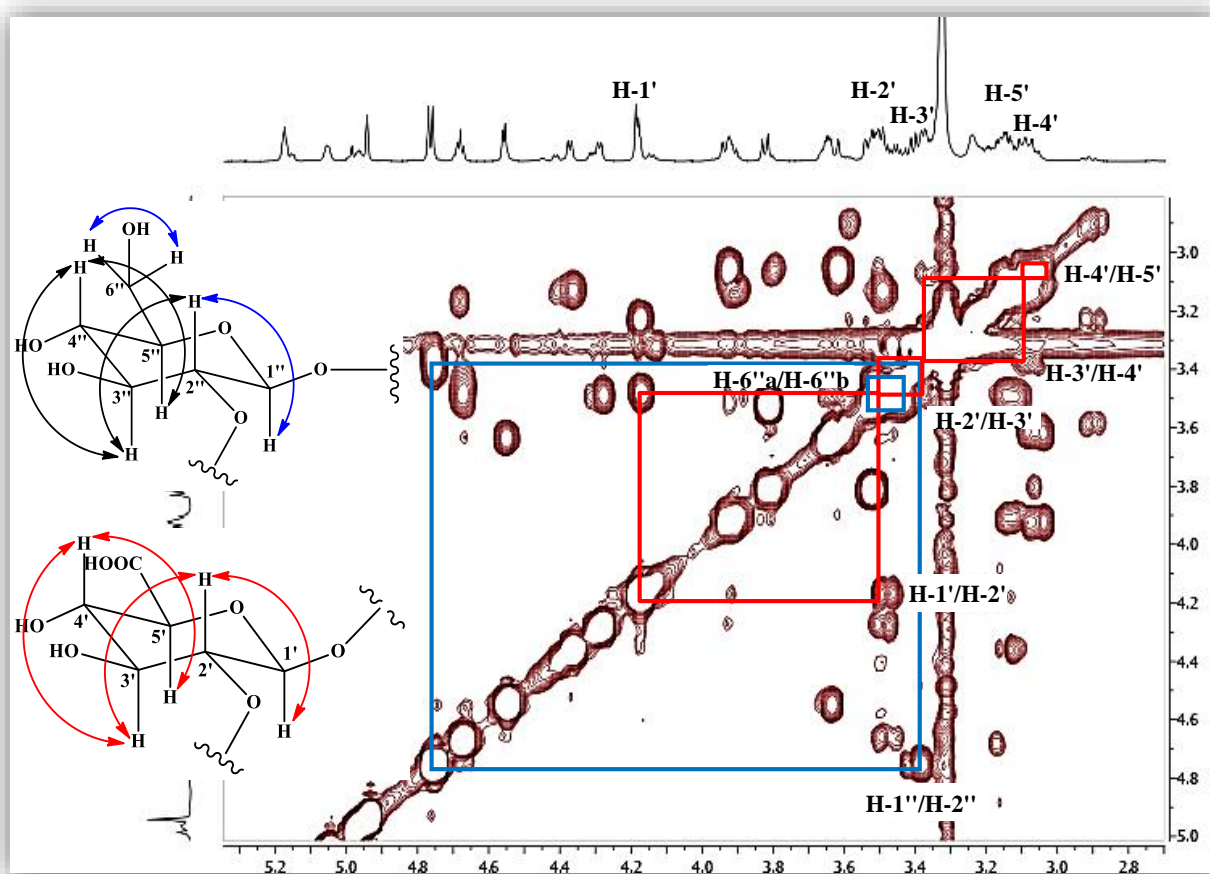


Figure II.113. Spectre COSY H-H identifiant l'acide β -D-glucuronique et le β -D-glucose (Composé 9)

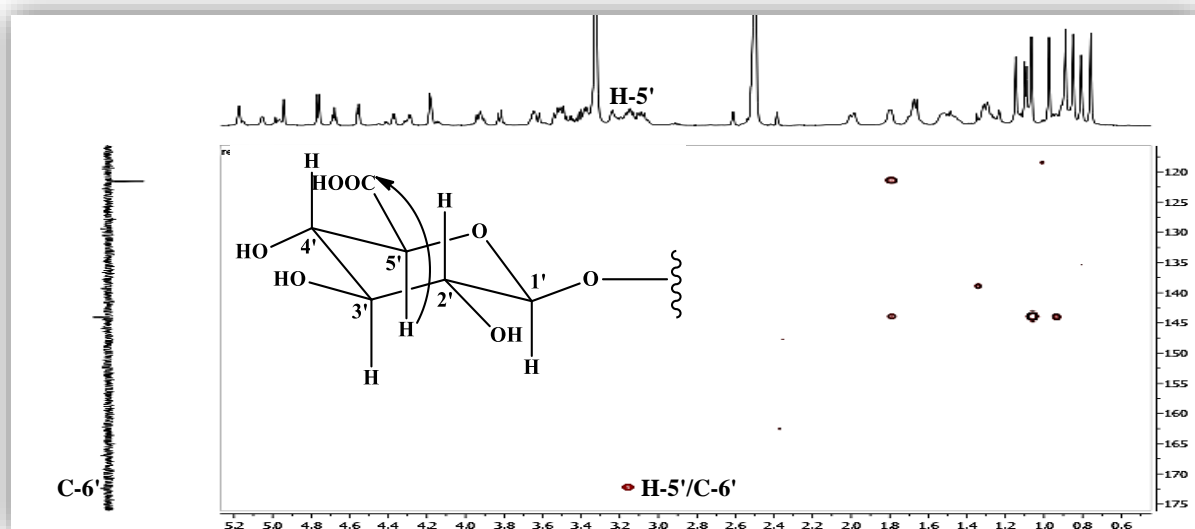


Figure II.114. Spectre HMBC de l'acide glucuronique

A partir du troisième proton anomère H-1''' résonant à 4,95 ppm (1H, *d*, $J = 1,5$ Hz), la même expérience (Figure II.115) permet d'identifier un α -L-rhamnose au vu des corrélations H-1'''/H-2''' (δ_H 3,65, *dd*, $J = 3,1; 1,5$ Hz), H-2'''/H-3''' (δ_H 3,50, *m*), H-3'''/H-4''' (δ_H 3,13, *t*, $J = 9,3$ Hz), H-4'''/H-5''' (δ_H 3,92, *dd*, $J = 9,3; 6,2$ Hz) et enfin H-5'''/H-6''' (δ_H 1,10, *d*, $J = 6,2$ Hz).

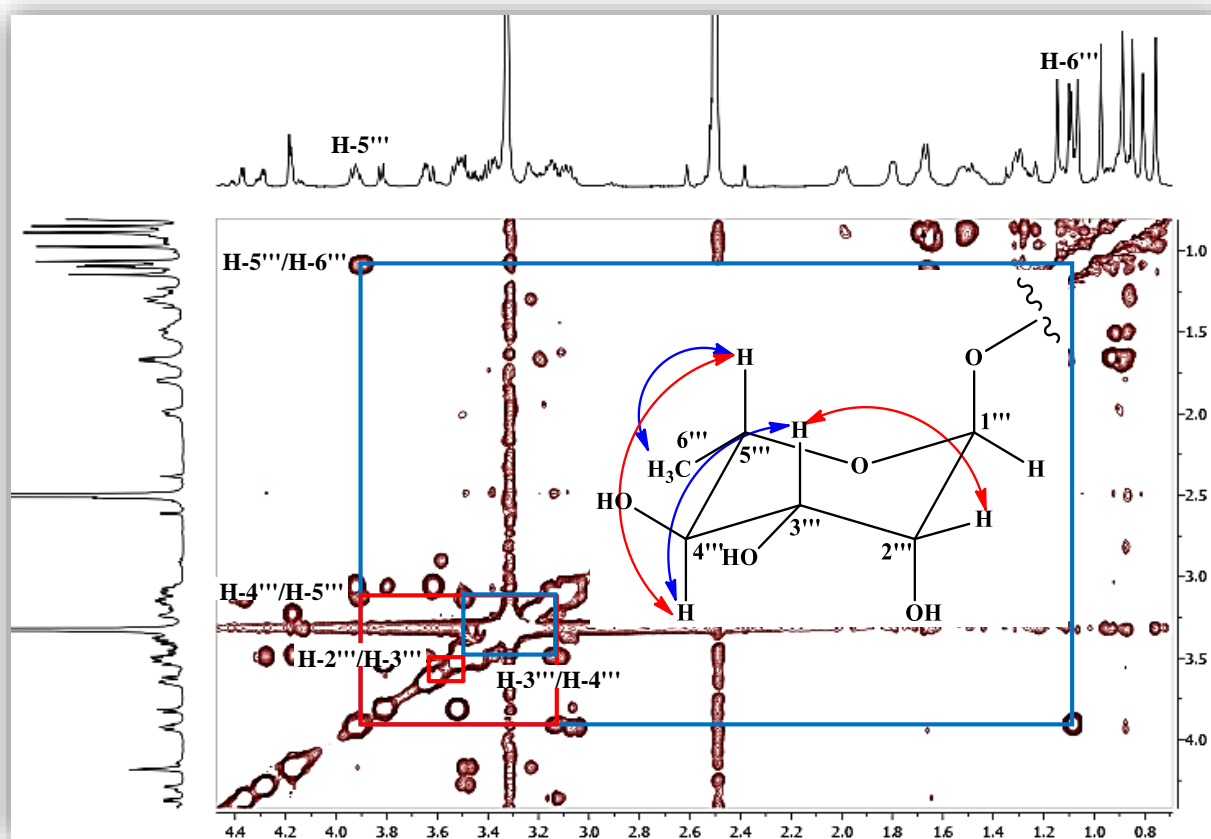


Figure II.115. Spectre COSY H-H identifiant le α -L-rhamnose

La valeur de la constante de couplage $J_{H-1''-H-2''}$ égale à 1,5 Hz, la présence d'un effet rOe H-1'' (δ_H 4,95)/H-2'' (δ_H 3,65) et l'absence d'effets rOe entre H-1''/H-3'' (δ_H 3,50) et H-1''/H-5'' (δ_H 3,92) (Figure II.116), indiquent une position α -équatoriale du proton anomérique H-1''.

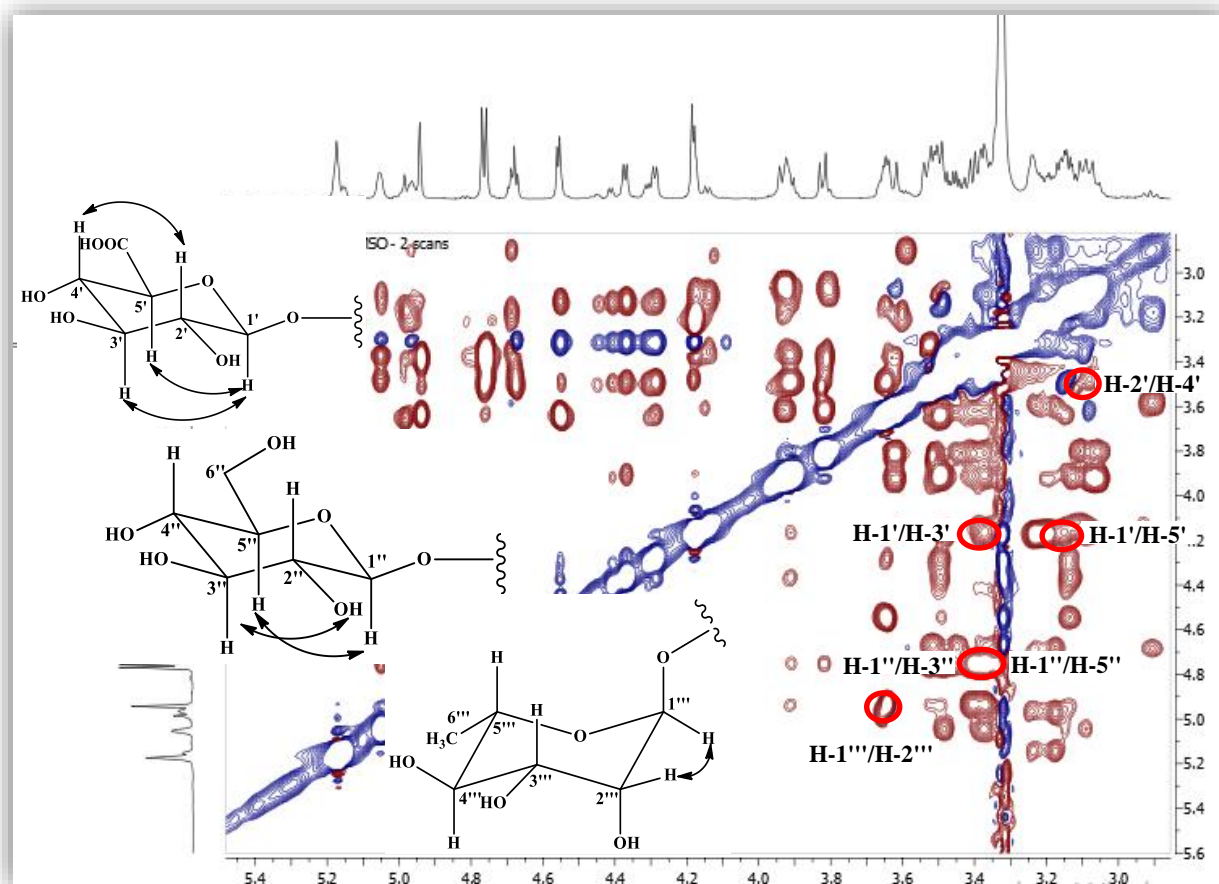


Figure II.116. Spectre ROESY de la partie osidique

L'expérience HSQC (Figure II.117) a permis d'assigner les déplacements chimiques de tous les carbones osidiques.

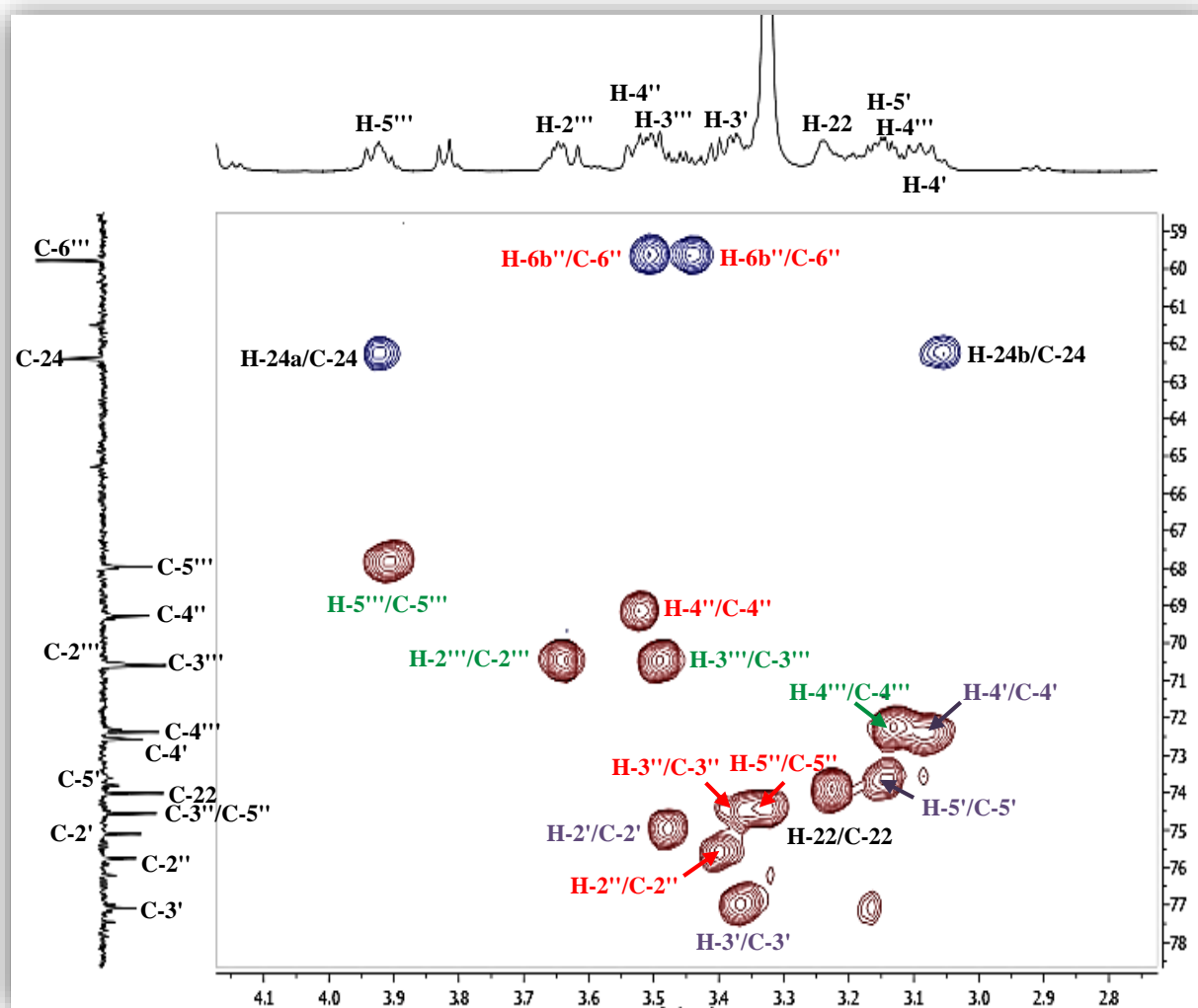


Figure II.117. Spectre HSQC de la partie osidique du composé **13**

Les points de branchement des sucres ont été déterminés par les corrélations observées sur le spectre HMBC (Figures II.118) entre :

- Le proton anomère H-1' (δ_H 4,18) de l'acide glucuronique et le carbone C-3 (δ_C 90,0) de la génine.
- Le proton anomère H-1'' (δ_H 4,76) du glucose et le carbone C-2' (δ_C 75,2) de l'acide glucuronique.
- Le proton anomère H-1''' (δ_H 4,95) du rhamnose et le carbone C-2'' (δ_C 75,7) du glucose.

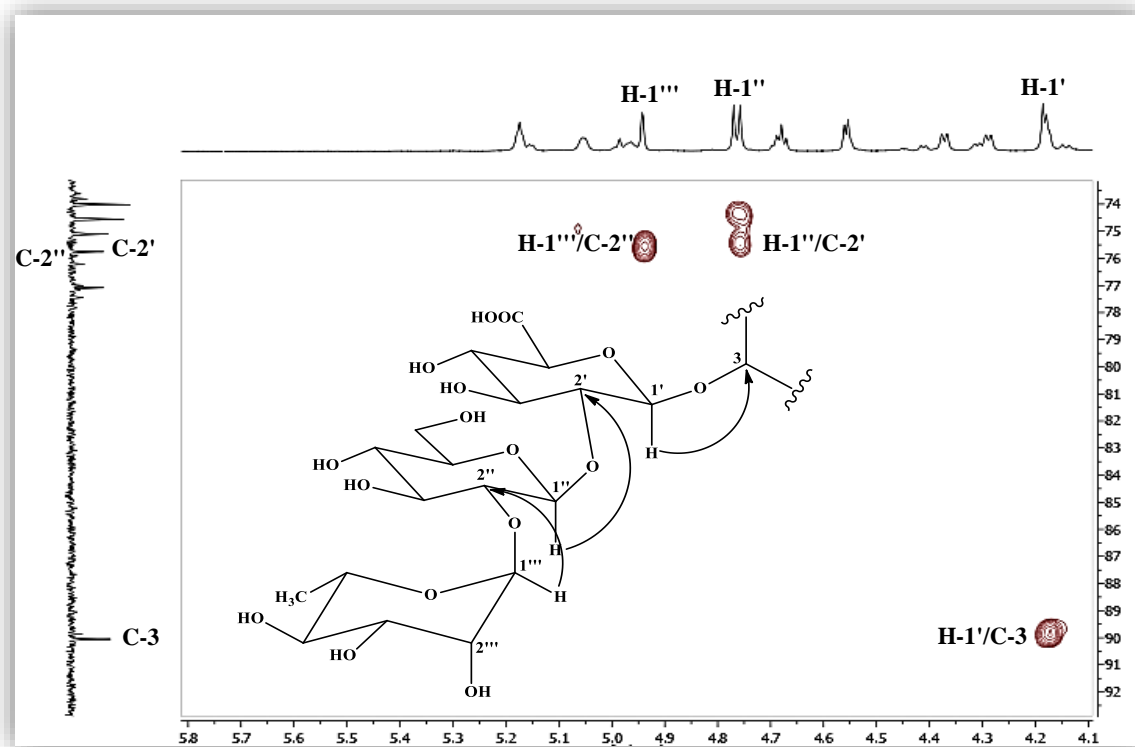
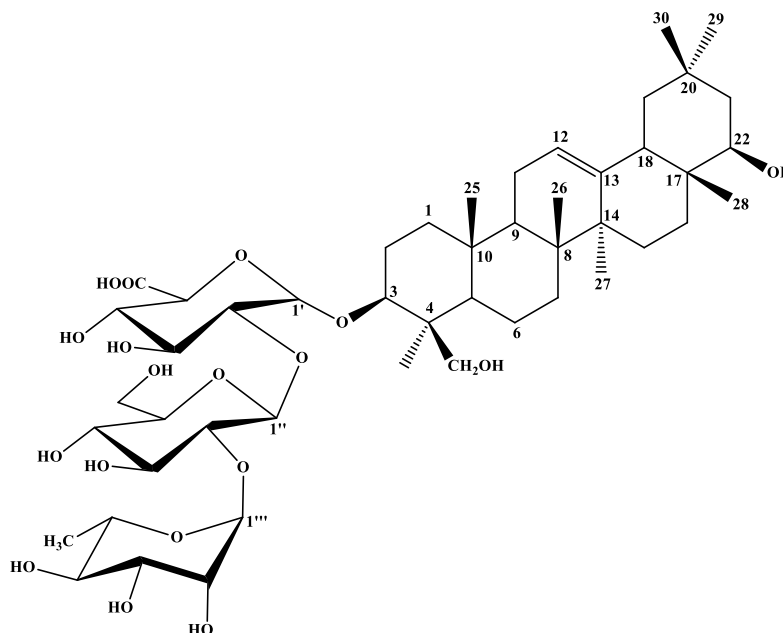


Figure II.118. Spectre HMBC montrant le branchement des sucres

L'ensemble des données spectrales (Tableau II.9) permet d'attribuer au composé **9**, la structure suivante :



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

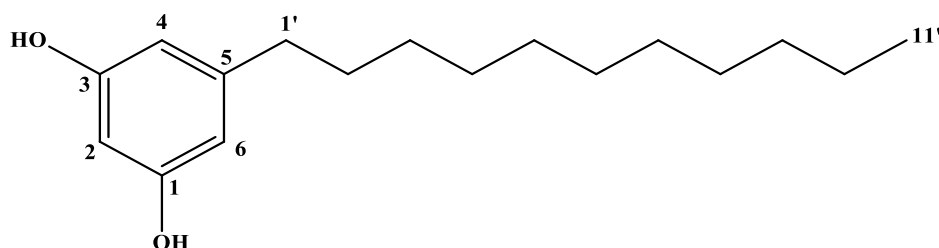
Cette saponine également connue sous le nom d'azukisaponine V a été isolée antérieurement des graines de soja [89]. Elle a été rencontrée au sein de plantes Fabaceae comme *Mellilotus officinalis* [90], *Astragalus tauricolus* [91], *Astragalus cruciatus* Link. [92] et *Lotus pusillus* Medik [93]. Elle est décrite pour la première fois dans le genre *Ononis*.

Tableau II.9. Données RMN ^1H (600 MHz) et ^{13}C (150 MHz) du composé **9** dans DMSO- d_6

Position	δ_{H} (m, J en Hz)	δ_{C} (ppm)
1a	1,52 (m)	38,1
1b	0,92 (m)	-
2a	1,99 (m)	25,5
2b	1,67 (m)	-
3	3,21 (dd, 10,0 ; 4,4)	90,0
4	-	42,9
5	0,88 (m)	55,1
6a	1,54 (m)	17,8
6b	1,31 (m)	-
7a	1,46 (m)	32,5
7b	1,31 (m)	-
8	-	38,3
9	1,49 (m)	46,9
10	-	35,8
11	1,80 (dd, 8,9 ; 3,7)	20,3
12	5,18 (t, 3,7)	121,6
13	-	144,1
14	-	41,7
15a	1,66 (m)	25,5
15b	0,95 (m)	-
16a	1,67 (m)	27,9
16b	1,13 (m)	-
17	-	37,0
18	2,00 (dd, 14,5, 3,3)	44,6
19a	1,69 (m)	46,0
19b	0,91 (m)	-
20	-	30,2
21	1,32 (m)	41,2
22	3,24 (m)	74,03
23	1,14 (s)	22,3
24a	3,94 (d, 11,5)	62,4

24b	3,07 (<i>d</i> , 11,5)	-
25	0,81 (<i>s</i>)	15,4
26	0,89 (<i>s</i>)	16,6
27	1,06 (<i>s</i>)	25,0
28	0,76 (<i>s</i>)	20,3
29	0,85 (<i>s</i>)	32,7
30	0,97 (<i>s</i>)	28,5
Acide glucuronique		
1'	4,18 (<i>d</i> , 7,5)	104,0
2'	3,48 (<i>dd</i> , 9,2; 7,5)	75,2
3'	3,38 (<i>t</i> , 9,2)	77,1
4'	3,10 (<i>t</i> , 9,5)	72,5
5'	3,14 (<i>d</i> , 9,2)	73,8
6'	-	172,3
Glucose		
1''	4,76 (<i>d</i> , 7,2)	99,7
2''	3,41 (<i>dd</i> , 9,5; 7,2)	75,7
3''	3,36 (<i>dd</i> , 9,7; 9,5)	74,6
4''	3,56 (<i>t</i> , 9,7)	69,3
5''	3,33 (<i>dd</i> , 9,7; 5,3)	74,6
6''a	3,52 (<i>m</i>)	59,8
6''b	3,47 (<i>m</i>)	
Rhamnose		
1'''	4,95 (<i>d</i> , 1,5)	100,3
2'''	3,65 (<i>dd</i> , 3,1 ; 1,5)	70,6
3'''	3,50 (<i>m</i>)	70,6
4'''	3,13 (<i>t</i> , 9,3)	74,0
5'''	3,92 (<i>dq</i> , 9,3; 6,2)	67,8
6'''	1,10 (<i>d</i> , 6,2)	17,9

II.4.10. Elucidation structurale du composé 10



1,3-dihydroxy-5-undecyl résorcinol

Le composé **10** a été obtenu sous forme d'une poudre amorphe de couleur jaune pâle soluble dans le chloroforme. Visible à la lumière UV (254 et 366 nm), il se colore en jaune après révélation par une solution d'acide et chauffage.

Son spectre RMN ^1H (Figure II.119) enregistré dans le DMSO- d_6 présente :

- Un signal singulet d'intégration 3H sortant à δ_{H} 6,00, correspondat au trois protons d'un noyau aromatique trimétasubstitué.
- Plusieurs signaux résonant entre 1,23 et 2,34 ppm, traduisant la présence d'une chaîne aliphatique. Ce constat est confirmé par expérience HSQC (Figure II.120) qui montre clairement des corrélations entre ces protons sous forme de massif et des carbones secondaires sortant dans l'intervalle 22,5-35,8.
- Un signal triplet d'intégration 3H à 0,85 ppm ($J = 6,8$ Hz) caractéristique d'un groupement méthyle terminant probablement la chaîne aliphatique.
- Un signal à 9,00 ppm (2H, m) ne montrant aucune corrélation HSQC (Figure II.120) attribuable à deux groupements OH substituant le noyau aromatique.

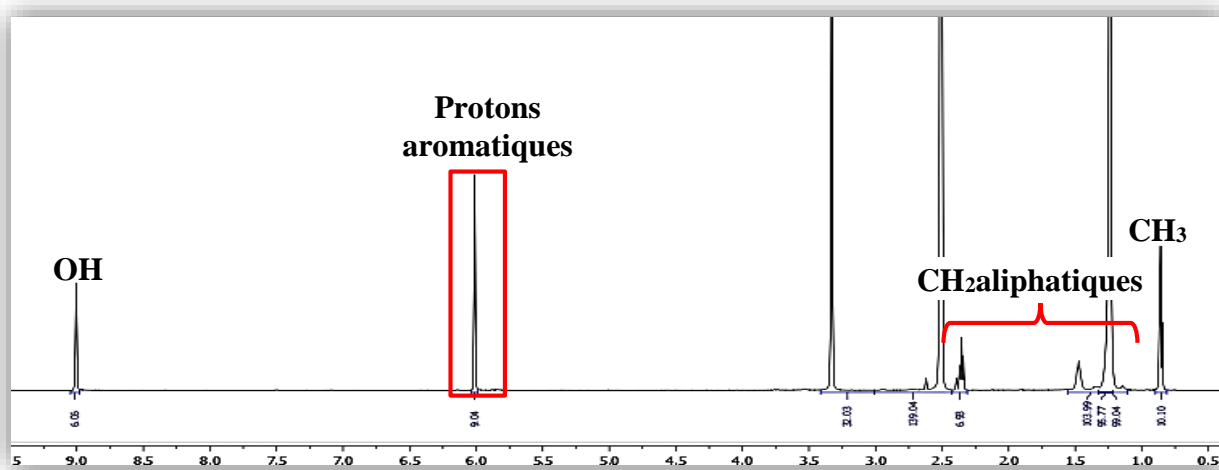


Figure II.119. Spectre RMN ^1H du composé **10**

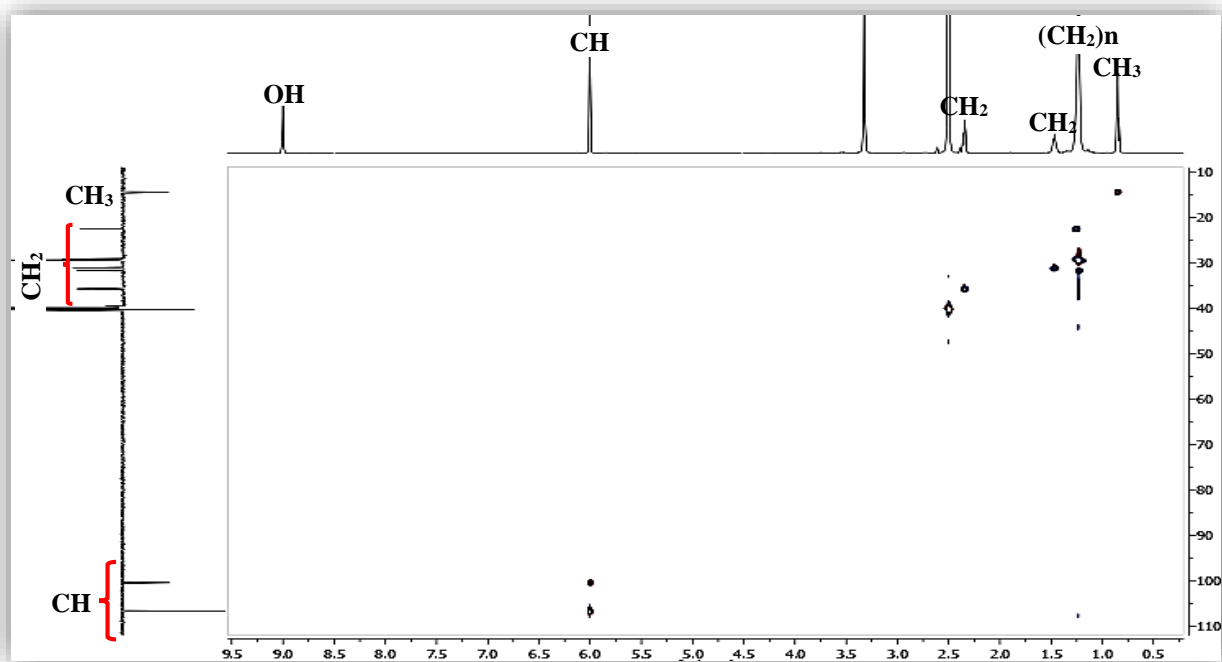


Figure II.120. Spectre HSQC du composé 10

Le spectre RMN ^{13}C (Figure II.121) confirme la présence d'un noyau aromatique trisubstitué à travers les signaux de trois carbones méthines à 100,3 (1 CH) et 106,6 ppm (2 CH) et de trois carbones quaternaires à 144,6 (1 Cq) et 158,6 ppm (2 Cq). L'observation également, sur le même spectre, d'un signal d'un carbone méthylique (δ_{C} 14.4) et de signaux de carbones méthyléniques sortant dans la zone allant de 22,5 à 35,8 ppm atteste bel et bien de la présence d'une longue chaîne aliphatique substituant, avec les deux groupements OH, un noyau aromatique.

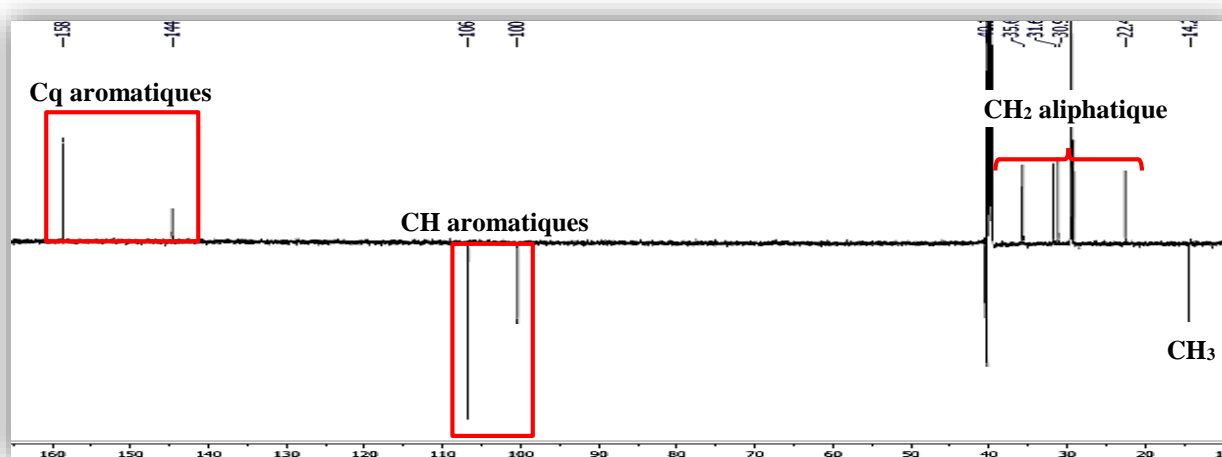


Figure II.121. Spectre RMN ^{13}C du composé 10

Tous ces éléments nous orientent vers un composé à squelette résorcinol, très présent au sein de plantes du genre *Ononis* on citera par exemple: *O. natrix* [94] et *O. speciosa* [54].

L'analyse COSY H-H (Figure II.122) met également en évidence la présence de la chaîne aliphatique à travers un système de spins impliquant les protons H₂-1' (δ_H 2,34, *t*, $J = 7,6$ Hz), les protons du groupement H₂-2' (δ_H 1,47, *t*, $J = 7,6$ Hz), les protons CH₂ aliphatiques (δ_H 1,23–1,26, 16 H) et les protons méthyliques (δ_H 0,85, *t*, $J = 6,8$ Hz), permettant de constituer l'enchaînement de la chaîne latérale -CH₂-CH₂- (CH₂)₈-CH₃. Cet enchaînement est appuyé par la masse moléculaire (264 uma) et la formule brute (C₁₇H₂₈O₂) du composé.

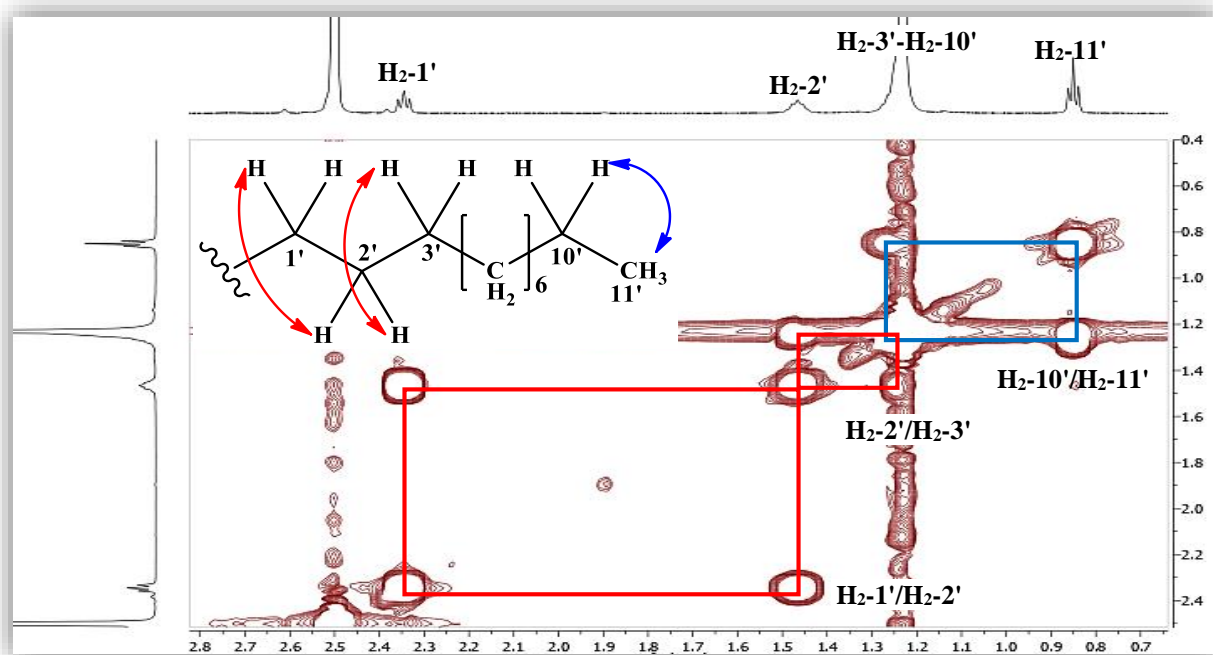


Figure II.122. Spectre COSY H-H de la chaîne latérale du composé **10**

Le spectre HMBC (Figure II.123) confirme cette analyse à travers les diverses corrélations attendues.

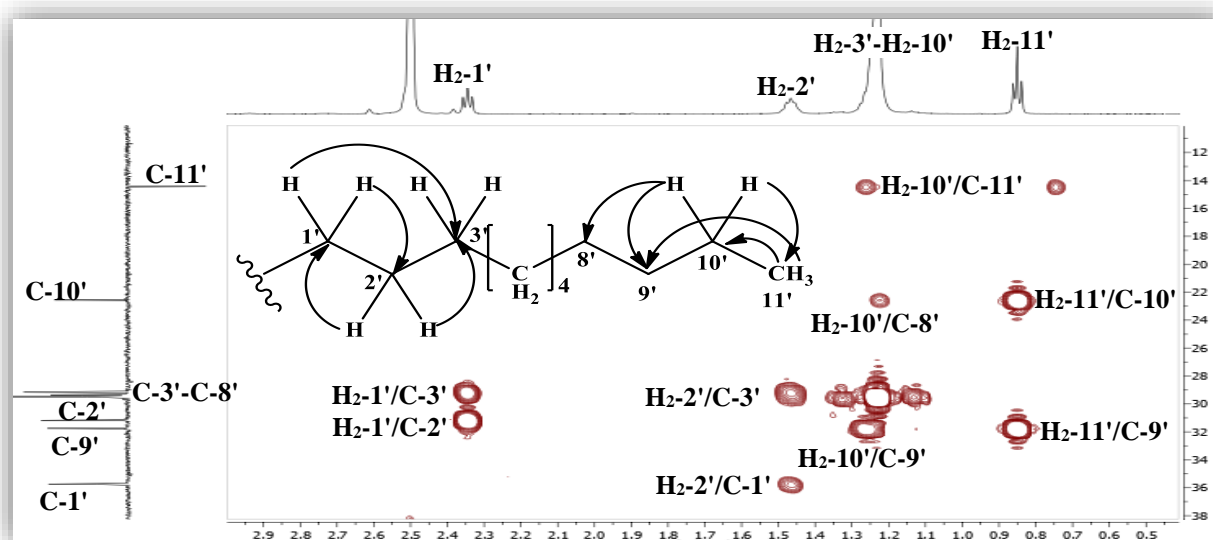


Figure II.123. Spectre HMBC de la chaîne latérale du composé **10**

Le même spectre confirme également le point de branchement de la chaîne aliphatique au noyau aromatique, plus précisément au carbone nommé C-5, à travers les couplages H₂-1'/C-5, H₂-1'/C-4, H₂-1'/C-6 et H₂-2'/C-6 (Figure II.124).

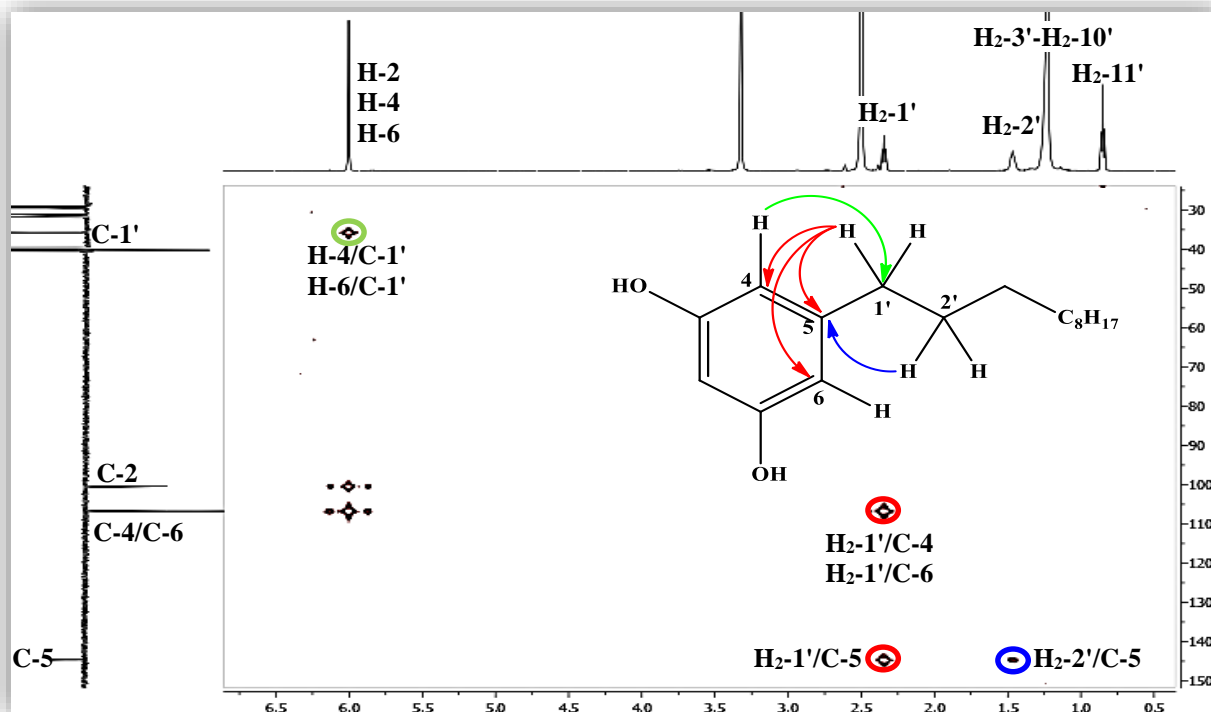


Figure II.124. Spectre HMBC du composé 10

Le spectre HMBC (Figure II. 125) montre aussi toutes les corrélations afférentes au noyau aromatique.

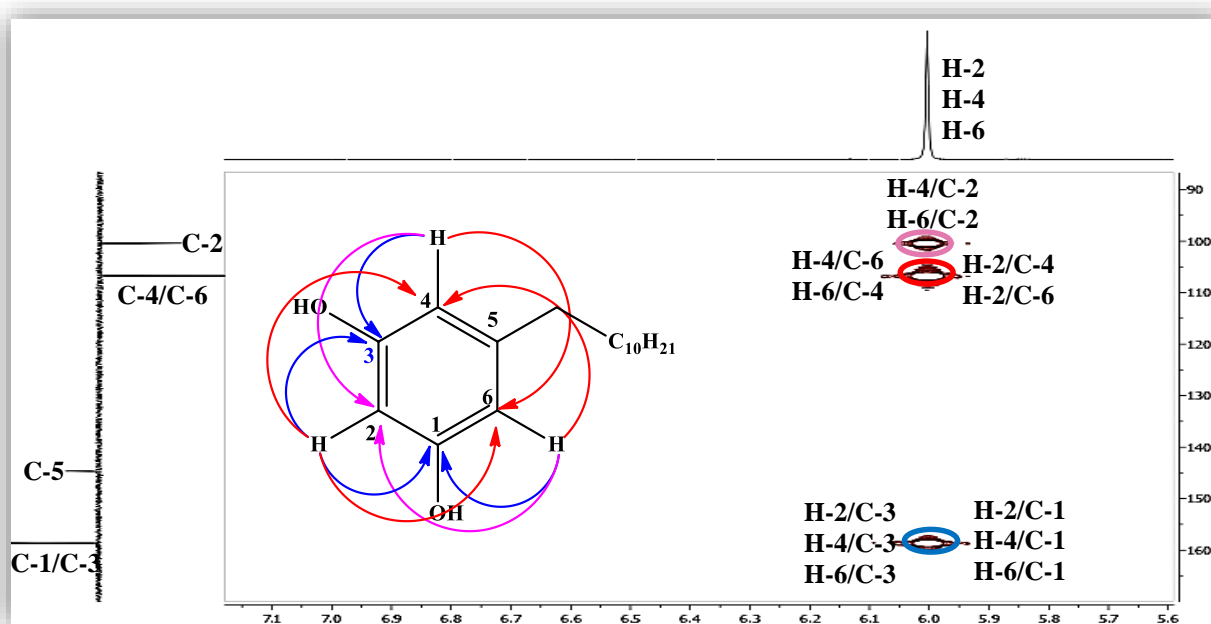
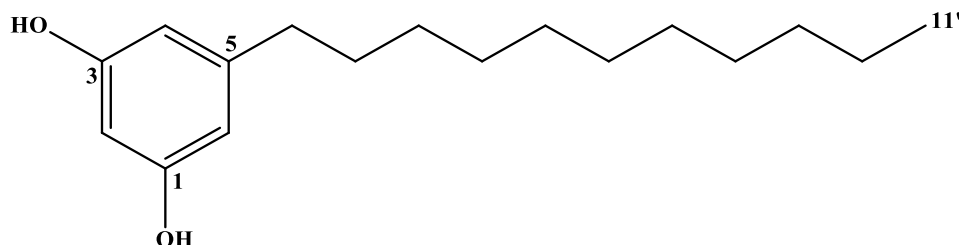


Figure II.125. Spectre HMBC du noyau benzénique du composé 10

Toutes ces données spectrales permettent d'identifier notre composé au 1,3-dihydroxy-5-undecyl résorcinol. C'est sa première citation dans le genre *Ononis* et la famille Fabaceae. Il a été isolé antérieurement de l'espèce *Grevillea robustae* (Proteaceae) [95].

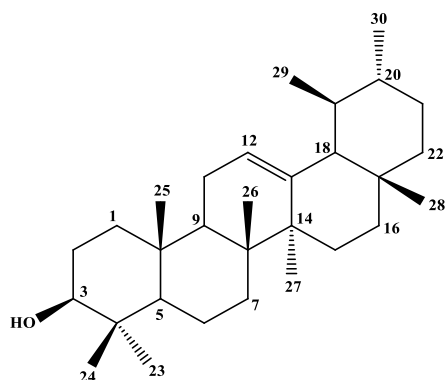
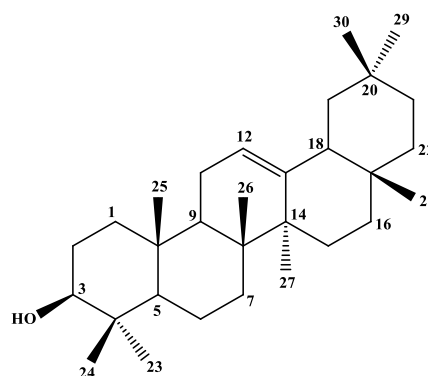


1,3-dihydroxy-5-undecyl résorcinol

Tableau II.10. Données RMN ^1H (600 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz) du composé **10** dans DMSO- d_6

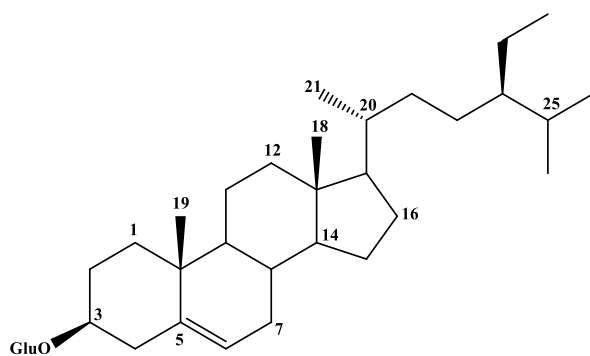
Position	δ_{H} (m, J en Hz)	δ_{C} (ppm)
1	-	158,8
2	6,00 (s)	100,3
3	-	158,6
4	6,00 (s)	106,6
5	-	144,6
6	6,00 (s)	106,6
1'	2,34 (t, 7,6)	35,8
2'	1,47 (t, 7,6)	31,2
3' – 8'	1,23 (m)	29,5
9'	1,23 (m)	31,7
10'	1,26 (m)	22,5
11'	0,85 (t, 6,8)	14,4
OH-1	9,00 (m)	-
OH-3	9,00 (m)	-

II.4.11. Elucidation structurale des composés 11 et 12

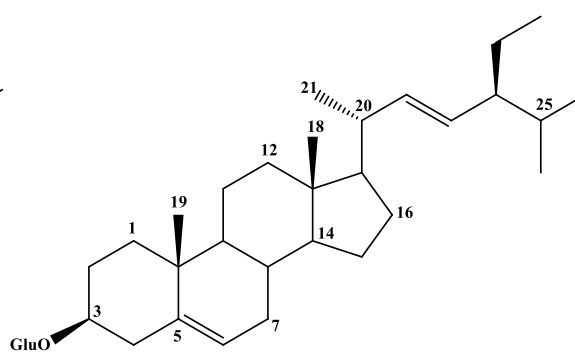
 α -amyrine β -amyrine

Les composés **11** (α -amyrine) et **12** (β -amyrine) ont été identifiés par comparaisons de leurs données spectrales (RMN ^1H , RMN ^{13}C J-modulé et masse ESI) avec celles de la littérature [96]. Le composé **11** a été antérieurement isolé de l'espèce *Ononis spinosa* [97].

II.4.12. Elucidation structurale des composés 13 et 14



Daucostérol



Stigmastérol glucosylé

La comparaison des données spectroscopiques RMN ^1H , RMN ^{13}C et masse ESI des composés **13** et **14** avec celles de la littérature, indique qu'il s'agit du daucostérol (**13**) [94, 98] et du stigmastérol glucosylé (**14**) [99], métabolites communs au monde végétal.

Chapitre III

Activités biologiques

III.1. Stress oxydatif et antioxydants

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont des espèces chimiques comprenant les radicaux libres tels que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle ($\cdot OH$), ainsi que les molécules non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (1O_2) [100]. Ces molécules se lient rapidement à leurs homologues non radicalaires se trouvant à proximité, formant en général de nouveaux radicaux. Dans certaines conditions, au cours d'une inflammation ou en réponse à certains facteurs environnementaux comme les irradiations (UV et rayons X), les carences nutritionnelles (en vitamines et oligo-éléments), le tabac, la pollution ou les intoxications aux métaux lourds (mercure, plomb, cadmium...), la production de ces radicaux libres augmente en générant un déséquilibre en faveur des entités oxydantes appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO), provoquant un «stress oxydatif» [101].

Pour lutter contre les radicaux libres, l'organisme dispose de systèmes de protection efficaces tels que les antioxydants qui sont définis comme des substances capables à des concentrations relativement faibles, de retarder ou d'inhiber l'oxydation des substrats [102]. Les anti-oxydants de notre organisme se divisent en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques [103]. Les antioxydants non enzymatiques peuvent être d'origine endogène, synthétisés de manière intracellulaire comme les vitamines C et E, les carotènes, ou exogène, acquis via les aliments et souvent retrouvés dans les plantes (composés phytochimiques) comme les flavonoïdes, les anthocyanines ou les catéchines [104].

III.2. Activité anti-inflammatoire

L'inflammation est un processus de défense physiologique complexe utilisé par l'organisme, après une attaque étrangère (vasculaire et tissulaire), pour éliminer ou isoler l'agresseur et maintenir l'intégrité des tissus infectés [105]. Elle se caractérise par la rougeur, l'œdème, la fièvre, la douleur et une perte de fonction [106]. Il existe deux types d'inflammation, l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique. Le traitement actuel de l'inflammation implique des anti-inflammatoires stéroïdiens, des glucocorticoïdes ainsi que des anti-inflammatoires non stéroïdiens. Ces molécules, bien qu'elles soient efficaces, présentent le plus souvent des effets indésirables, pouvant entraver leur utilisation à long terme [107, 108]. Les composés phytochimiques constituent un excellent palliatif vu que leur utilisation est bénéfique, efficace et sans effets secondaires [109]. En effet et pour l'exemple, la consommation régulière de poireau riche en flavonoïdes et polyphénols permet de soulager les personnes souffrant de maladies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde et les douleurs causées par l'obésité [110].

III.3. Activité anti-hémolytique

L'hémolyse (hemo : sang, lyse : perturbation) est un phénomène physiologique irréversible dû à une libération des composants intracellulaires des érythrocytes notamment l'hémoglobine, suite à une perturbation de la membrane cellulaire des globules rouges après une durée de vie de 120 jours, laps de temps normal [111]. On distingue deux types d'hémolyse, l'un est physiologique et l'autre pathologique (hyper hémolyse) [112]. Un certain nombre de médicaments anti-hémolytiques, qui sont des substances présentant une capacité à retarder ou à inhiber la lyse des globules rouges est disponible. L'acide folique, les corticoïdes et les suppléments de la vitamine B peuvent être utilisés pour traiter les anémies hémolytiques [113]. D'autre part, les polyphénols possèdent également des effets anti-hémolytiques grâce à l'action stabilisante de la membrane des globules rouges contre la lyse osmotique [114] et la chélation des métaux de transition tels que le cuivre et le fer, qui peuvent renforcer les effets oxydatifs par la production de radicaux hydroxyles ($\text{OH}\cdot$) [115].

III.4. Résultats et discussion

III.4.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits bruts EP, AcOEt et *n*-BuOH obtenus à partir de la plante *Ononis mitissima*, a été estimée par la méthode de Folin-ciocalteu [116]. Cette méthode est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique présent dans le réactif de Folin par les polyphénols en milieu alcalin [117]. Elle se traduit par le développement d'un complexe de couleur bleu foncé mesurable spectrophotométriquement.

Le taux des polyphénols a été calculé à partir de la courbe d'étalonnage établie par l'acide gallique, ayant pour équation : $Y = 0,0062X + 0,1416$ et $R^2 = 0,9985$ (Figure III.1). Les résultats ont été exprimés en microgrammes équivalents d'acide gallique par mg d'extrait brut ($\mu\text{g EAG}/\text{mg}$ d'extrait). Ils sont représentés dans le tableau III.1.

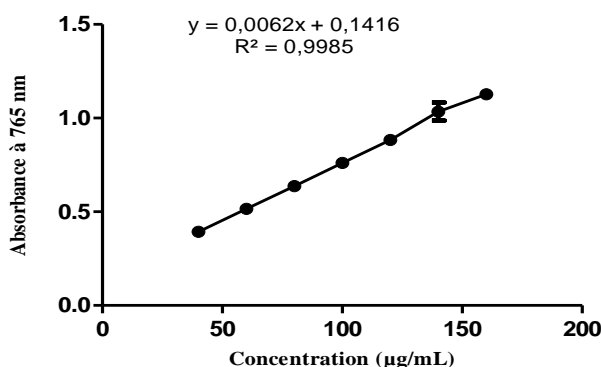


Figure III.1. Droite d'étalonnage de l'acide gallique (Moyenne \pm SD)

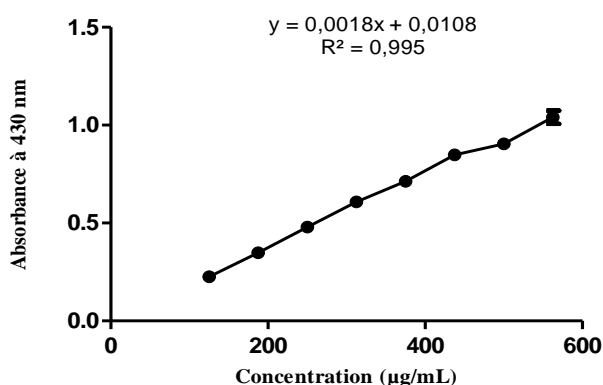
Tableau III.1. Teneur en polyphénols totaux de la plante *Ononis mitissima*

Extrait	EP	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
Teneur ($\mu\text{g EAG/mg d'extract}$)	52.11 ± 0.65	177.96 ± 0.16	157.10 ± 0.24

III.4.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes dans les trois extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) de l'espèce *O. mitissima*, a été quantifiée par la méthode du trichlorure d'aluminium [116]. Dans cette technique, les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par des chélation avec l'aluminium, se traduisant par l'apparition d'une couleur jaune [118].

La quantité de flavonoïdes dans les extraits bruts a été déduite par la courbe d'étalonnage établie par la quercétine et ayant pour équation : $Y = 0,0018X + 0,0108$ et $R^2 = 0,995$ (Figure III.2). Les résultats ont été exprimés en microgrammes équivalents de la quercétine par mg d'extrait brut ($\mu\text{g EQ/mg d'extract}$). Les teneurs sont représentées dans le tableau III.2.

**Figure III.2.** Droite d'étalonnage de la quercétine (Moyenne \pm SD)**Tableau III.2.** Teneur en flavonoïdes totaux de la plante *Ononis mitissima*

Extrait	EP	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
Teneur ($\mu\text{g EQ/mg d'extract}$)	27.27 ± 0.41	132.83 ± 0.32	117.95 ± 0.61

Les résultats du dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux révèlent que l'extrait acétate d'éthyle est le plus riche en polyphénols ($177.96 \pm 0.16 \mu\text{g EGA/mg d'extr.}$) et en flavonoïdes ($132.83 \pm 0.32 \mu\text{g EQ/mg d'extr.}$), suivi par l'extrait *n*-BuOH ($157.10 \pm 0.24 \mu\text{g EAG/mg d'Ex}$; $117.95 \pm 0.61 \mu\text{g EQ/mg d'extr.}$) et enfin l'extrait EP ($52.11 \pm 0.65 \mu\text{g EAG/mg d'Ex}$; $27.27 \pm 0.41 \text{EQ/mg d'extr.}$).

Les variations observées dans les taux de composés phénoliques et flavonoïdes, dans les différents extraits, pourraient être associées à la quantité de composés présents dans les extraits bruts. En effet, cinq polyphénols (1 isoflavonoïde, 3 flavanones et 1 ptérocarpane) ont été isolés à partir de l'extrait AcOEt. De nombreux facteurs pourraient affecter la quantité de contenus phénoliques et flavonoïdes, y compris la période et la zone de récolte du matériel végétal, la procédure d'extraction et l'efficacité des solvants d'extraction. Selon Adaramola et ses collaborateurs [119], l'utilisation de solvants moyennement polaires pour extraire les composés phénoliques et les antioxydants est préférable à celle des solvants polaires et apolaires, en accord avec les résultats de notre étude [119].

Plusieurs études menées sur les teneurs totales en polyphénols et flavonoïdes des espèces du genre *Ononis* ont montré des variations à leur niveau. En fait, les plantes *Ononis natrix* et *O. spinosa* ont montré de faibles teneurs en polyphénols et flavonoïdes par rapport à nos résultats [120]. En revanche, les espèces *O. angustissima* [36], *O. sessilifolia*, *O. basiadnata* et *O. macrosperma* [121] ont présenté une teneur en polyphénols élevée par rapport aux nôtres. De plus, certaines recherches ont mis en évidence des teneurs en polyphénols différentes dans plusieurs espèces du genre *Ononis*, telles que *O. spinosa* [122], *O. pubescens*, *O. ornithopodioides* [123] et *O. natrix* [32].

Les composés phénoliques sont des antioxydants naturels qui possèdent des propriétés redox. Ils sont très réactifs et ont la capacité de neutraliser les radicaux libres par des réactions de piégeage et/ou de chélation [124]. La quantification des composés phénoliques dans les extraits bruts pourrait prédire le pouvoir de l'activité antioxydante.

III.4.3. Evaluation de l'activité antioxydante

Pour mettre en évidence l'activité antioxydante des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH obtenus à partir de notre plante, cinq tests *in vitro* ont été utilisés : le piégeage des radicaux libres **DPPH** et peroxyde d'hydrogène **H₂O₂**, le pouvoir réducteur du fer (**FRAP**), la capacité antioxydante totale par phosphomolybdate (**PPM**) et l'activité antioxydante par le thiocyanate de fer (**FTC**). Ces méthodes sont basées, pour la plupart, sur la coloration ou décoloration d'un réactif dans un milieu réactionnel.

III.4.3.1. Piégeage du radical libre DPPH

Ce test est basé sur la réduction du radical libre DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) ayant une couleur violette, en DPPH-H (1,1-diphényl-2-picrylhydrazine) de couleur jaunâtre en

présence des antioxydants. L'intensité de la couleur est proportionnelle au pouvoir des antioxydants présents dans le milieu (Figure III.3).

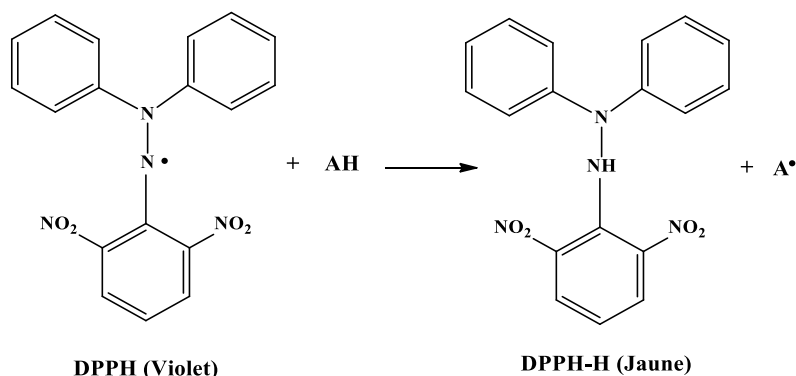


Figure III.3. Réduction du radical libre DPPH en DPPH-H

Les résultats de l'activité antioxydante de l'espèce *O. mitissima* (Figure III.4) ont révélé que les trois extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH, ainsi que les antioxydants standards (BHA, BHT et acide ascorbique) agissent positivement au DPPH d'une manière dose-dépendante. Les valeurs d'IC₅₀ pour chaque extrait et standards sont représentées dans le tableau III.3.

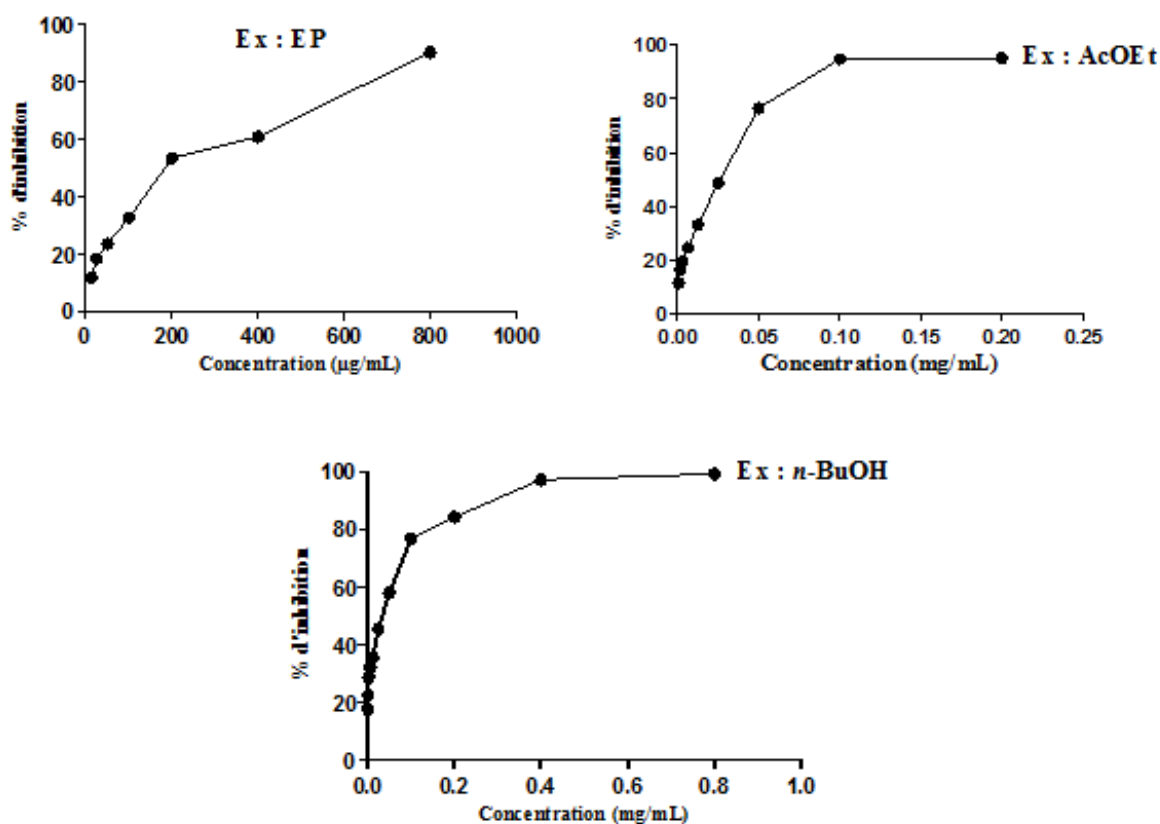


Figure III.4. Activité antioxydante des extraits (EP, AcOEt, *n*-BuOH) de la plante *O. mitissima*

Tableau III.3. Valeurs d'IC₅₀ des extraits et antioxydants standards

Extrait/Standard	IC ₅₀ (µg/mL)
EP	181.9 ± 0.002
AcOEt	27.3 ± 0.015
<i>n</i> -BuOH	38.3 ± 0.003
BHA	6.82 ± 0.49
BHT	22.32 ± 0.02
Acide ascorbique	7.74 ± 0.19

Les résultats de l'activité antioxydante par piégeage des radicaux libres DPPH ont montré que tous les extraits testés possèdent une activité antioxydante variant d'une manière dépendante à la concentration. L'extrait AcOEt (27.3 ± 0.015 µg/ml) présente une activité supérieure à celle des extraits *n*-BuOH (38.3 ± 0.003 µg/ml) et EP (181.9 ± 0.002 µg/ml) et très proche du BHT (22.32 ± 0.02 µg/ml). Cependant, elle s'avère relativement inférieure au BHA (6,82 ± 0,49 µg/ml) et l'acide ascorbique (3,1 ± 0,002 µg/ml) utilisés comme molécules de référence.

Des études effectuées sur l'activité antioxydante par DPPH des espèces du genre *Ononis* comme *Ononis natrix*, *O. spinosa*, *O. viscosa*, *O. variegata*, *O. sessilifolia*, *O. basiadnata* et *O. macrosperma* [38,121], ont montré une faible activité par rapport à nos résultats. Cependant, les espèces *O. angustissima* [36] et *O. pubescens* [123] ont présenté une bonne activité comparativement aux résultats de la présente étude.

La forte activité antioxydante de l'extrait AcOEt, par rapport aux extraits EP et *n*-BuOH, pourrait être liée à sa richesse en composés phénoliques et flavonoïdes. En effet, plusieurs études ont indiqué la puissante activité antioxydante des composés phénoliques, due notamment à la présence de groupements hydroxyles [125].

III.4.3.2. Activité antioxydante par le peroxyde d'hydrogène

Dans le test de piégeage du peroxyde d'hydrogène, l'extrait éther de pétrole a présenté un pourcentage d'inhibition plus élevé (85,26 %) par rapport à l'acide ascorbique (62,36 %) utilisé comme molécule de référence, à la concentration de 100 µg/mL. Les extraits AcOEt et *n*-BuOH ont manifesté une activité antioxydante modérée à la même concentration avec des valeurs de 31,18 et 31,11 % respectivement (Figure III.5).

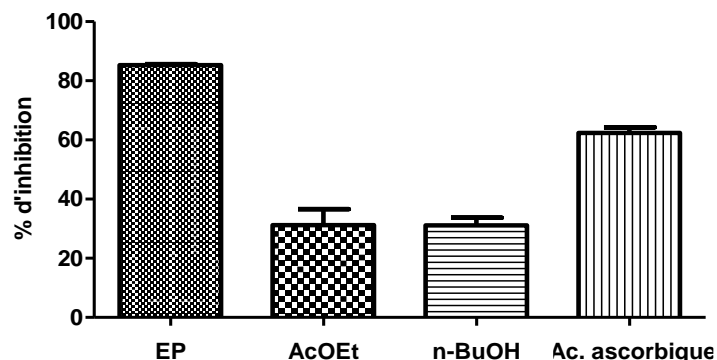


Figure III.5. Pourcentage d'inhibition des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *O. mitissima* par H₂O₂ à la concentration de 100 µg/mL (Moyenne ± SD de trois essais)

Le peroxyde d'hydrogène se produit naturellement à de faibles concentrations dans l'air, l'eau, le corps humain, les plantes, les micro-organismes et les aliments. A des concentrations élevées, il devient toxique pour les cellules vivantes. Sa décomposition rapide en oxygène et en eau, peut produire des radicaux hydroxyles (\bullet OH), déclenchant la peroxydation des lipides et endommageant l'ADN [126]. L'activité antioxydante puissante de l'extrait éther de pétrole pourrait être due à la présence d'autres composés bioactifs tels que les huiles essentielles, les caroténoïdes, les vitamines et les acides gras qui peuvent réagir dans les systèmes non polaires [119, 127].

III.4.3.3. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Cette technique permet de contrôler la réduction du Fe³⁺ (fer ferrique) en Fe²⁺ (fer ferreux) en présence d'un antioxydant [128]. Par conséquent, l'ion Fe²⁺ peut être évalué en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur bleue cyanée dans le milieu réactionnel à 700 nm [129].

Le pouvoir réducteur du fer a été mesuré en utilisant la courbe d'étalonnage établie par l'acide ascorbique (Figure III.6) et les résultats sont exprimés en microgrammes équivalents d'acide ascorbique par milligramme d'extrait (µg EAA/mg d'extrait).

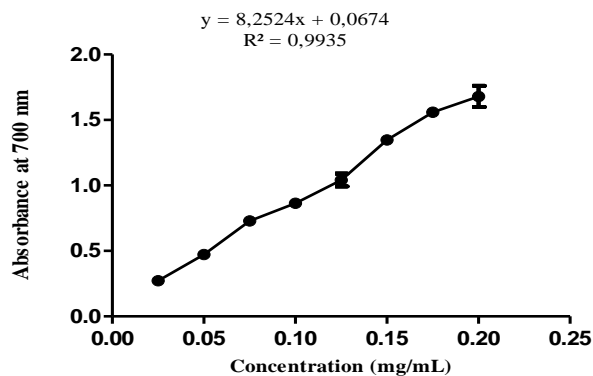


Figure III.6. Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (Moyenne ± SD de trois essais)

Les résultats ont montré que l'extrait AcOEt ($122.23 \pm 0.014 \mu\text{g EAA/mg d'extrait}$) possède un pouvoir antioxydant plus important que celui des extraits *n*-BuOH ($101.83 \pm 0.003 \mu\text{g EAA/mg d'extrait}$) et éther de pétrole ($63.57 \pm 0.001 \mu\text{g EAA/mg d'extrait}$) (Figure III.7).

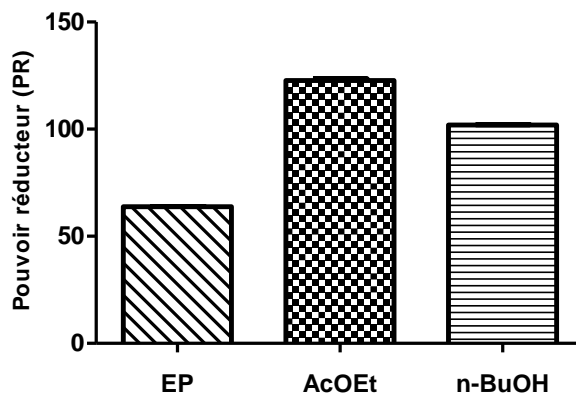


Figure III.7. Pouvoir réducteur des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH d'*Ononis mitissima* (Moyenne \pm SD de trois essais)

III.4.3.4. Test au phosphomolybdate (PPM)

La capacité antioxydante totale des extraits bruts (EP, AcOEt et *n*-BuOH) a été évaluée par la méthode au phosphomolybdate. Les résultats sont exprimés en μg équivalents d'acide ascorbique par milligramme d'extrait, en utilisant la courbe de l'acide ascorbique comme molécule de référence (Figure III.8).

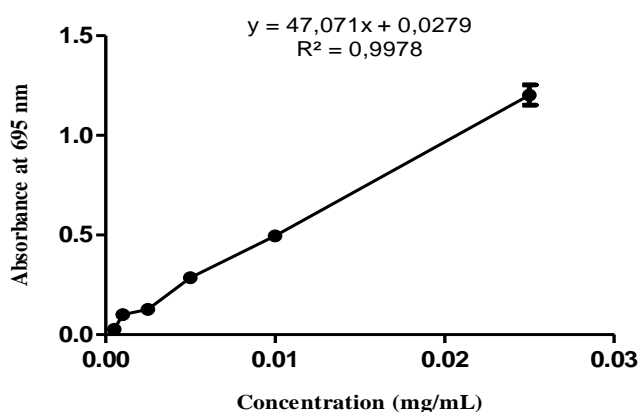


Figure III.8. Droite d'étalonnage de l'acide ascorbique (Moyenne \pm SD de trois essais).

L'extrait AcOEt a montré une forte activité antioxydante ($16.44 \pm 0.0012 \mu\text{g EAA/mg d'extrait}$), suivi de l'extrait *n*-butanolique ($14.95 \pm 0.035 \mu\text{g EAA/mg d'extrait}$) et enfin l'extrait étheropétrolique ($11.84 \pm 0.001 \mu\text{g EAA/mg d'extrait}$) (Figure III.9).

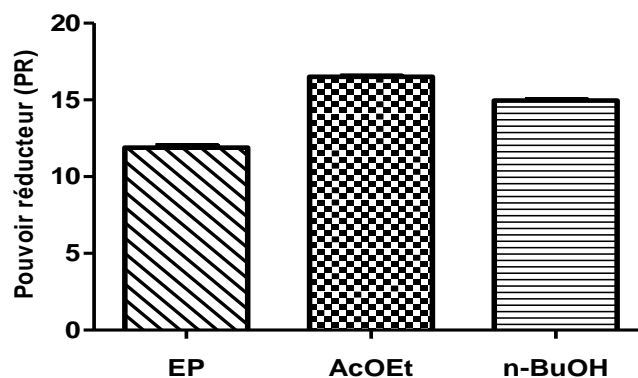


Figure III.9. Capacité anti-oxydante totale des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH de *O. mitissima* (Moyenne \pm SD de trois essais)

La puissante activité antioxydante de l'extrait AcOEt observée dans les tests de pouvoir réducteur du fer et la capacité antioxydante totale pourrait s'expliquer par la présence de composés responsables de l'activité antioxydante comme les composés phénoliques et les flavonoïdes. En effet, la configuration spatiale et le nombre de groupements hydroxyles dans les structures des flavonoïdes, ont une influence sur le pouvoir antioxydant [130, 131].

III.4.3.5. Test de dosage par le thiocyanate du fer (FTC)

L'activité antioxydante des extraits a été mesurée par l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique, en utilisant la méthode au thiocyanate ferrique [132].

Les résultats ont révélé que les extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH possèdent une capacité à inhiber la peroxydation lipidique avec des valeurs de 42.1, 37.1 et 48.6 %, respectivement. Ces valeurs sont proches du BHA (41,9 %) et de la quercétine (42,1%) mais inférieures à celles de l'acide ascorbique (61,9 %) pris comme antioxydant standard (Figure III.10).

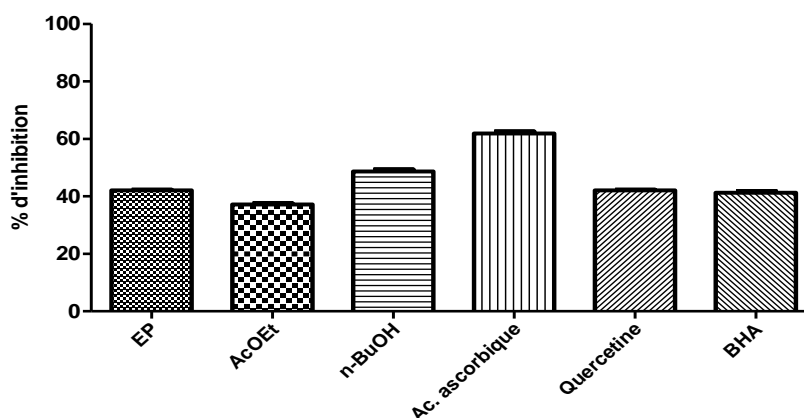


Figure III.10. Pourcentage d'inhibition des extraits bruts de l'espèce *O. mitissima* (Moyenne \pm SD de trois essais)

La peroxydation lipidique comprend une série de radicaux libres produisant des changements dans les chaînes d'acides gras polyinsaturés, qui endommagent le système biologique et provoquent ainsi des maladies induites par le stress oxydatif. Les extraits de l'espèce *Ononis mitissima* ont montré une bonne activité d'inhibition de la peroxydation lipidique par rapport aux molécules de référence. Cela pourrait s'expliquer par la quantité et le type de composés responsables de cette activité.

En revanche, la capacité antioxydante des extraits végétaux n'est pas limitée à la présence de composés phénoliques, mais pourrait également être due à d'autres composés bioactifs tels que les huiles essentielles, les caroténoïdes, les vitamines et les acides gras qui peuvent réagir dans des systèmes non polaires [127, 133]. Ces résultats pourraient expliquer la puissante activité antioxydante de l'extrait EP observée dans les dosages du thiocyanate ferrique et du peroxyde d'hydrogène.

III.4.4. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire des extraits bruts a été évaluée par la méthode de dénaturation de l'albumine d'oeuf [132] en prenant le diclofénac comme médicament standard. Les résultats ont montré que tous les trois extraits testés (EP, AcOEt et *n*-BuOH) avaient une activité anti-inflammatoire modérée à la concentration de 500 µg/mL avec des pourcentages d'inhibition respectifs à 21,96, 33,41 et 11,48 %, comparativement au diclofénac (86,72 %) à la même concentration (Figure III.11).

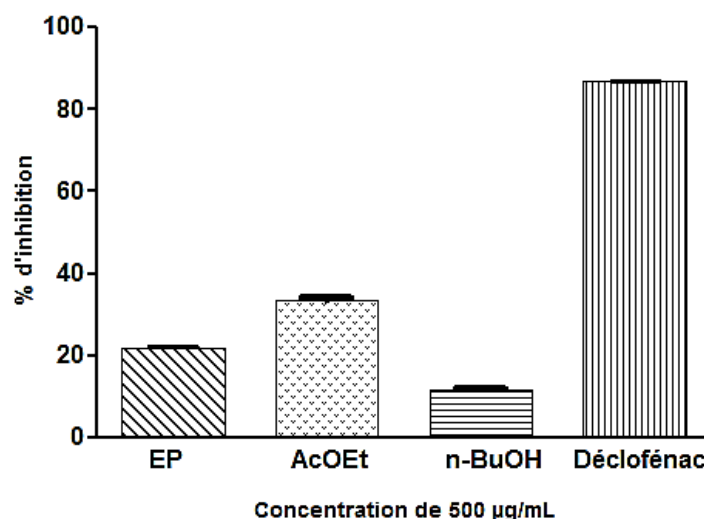


Figure III.11. Activité anti-inflammatoire par dénaturation de l'albumine d'œuf des extraits de *O. mitissima* et du diclofénac comme standard

La dénaturation des protéines est une méthode utilisée pour déterminer le changement des protéines, d'une forme soluble à une forme insoluble. Le changement est causé par une grande variété d'agents chimiques et physiques comme les acides, les bases, les solvants organiques ou les sels inorganiques, les colorants et la chaleur [133]. De nombreuses études ont montré que la dénaturation des protéines est l'une des causes principales de la polyarthrite rhumatoïde. Le mécanisme de dénaturation est probablement lié à l'altération des liaisons électrostatiques, hydrophobes, hydrogène et disulfure. De plus, la prévention de la dénaturation des protéines peut également aider à prévenir les maladies inflammatoires [134-135]. L'activité anti-inflammatoire des extraits de l'espèce *Ononis mitissima* peut être due à la présence de composés bioactifs tels que les polyphénols et les flavonoïdes connus pour leurs propriétés pharmacologiques intéressantes dont notamment l'activité anti-inflammatoire [135-136].

III.4.5. Evaluation de l'activité anti-hémolytique

L'activité anti-hémolytique des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH a été évaluée par le test de fragilité osmotique des érythrocytes. Les résultats sont illustrés dans la Figure III.12. Dans ce test, tous les extraits bruts ont présenté un effet anti-hémolytique qui varie d'une manière dépendante de la concentration. L'activité anti-hémolytique la plus élevée a été observée dans l'extrait AcOEt avec une valeur d'IC₅₀ égale à 0,65 mg/mL. Les deux extraits EP et *n*-BuOH ont montré des propriétés anti-hémolytiques modérées avec des valeurs de pourcentage d'inhibition de l'hémolyse à 19,28 et 38,58 %, à la concentration de 0,8 mg/mL.

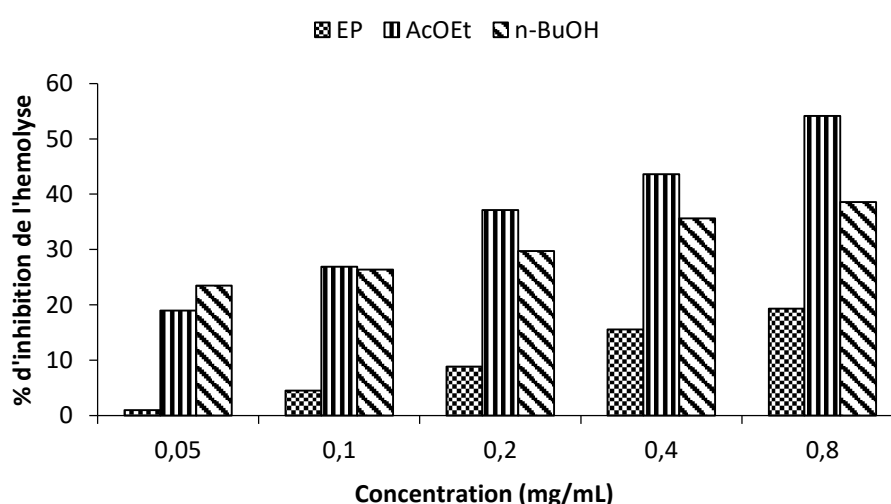


Figure III.12. Pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des extraits bruts de l'espèce *O. mitissima*

L'activité anti-hémolytique est un bon modèle pour mesurer la fragilité des globules rouges (GR) en cas d'anémie chronique ou récurrente. Par conséquent, les agents qui empêchent l'hémolyse des cellules sanguines sont considérés comme des médicaments anti-anémiques importants. La forte activité anti-hémolytique de l'extrait AcOEt pourrait être associée à la présence de fortes concentrations de polyphénols et de flavonoïdes [137]. En effet, de nombreuses études antérieures ont rapporté que la présence de polyphénols et de flavonoïdes dans les extraits bruts améliore la stabilité de la membrane érythrocytaire et inhibe l'hémolyse [138].

Conclusion

Générale

Conclusion générale

Notre travail de recherche porte sur la détermination des constituants chimiques de l'espèce *Ononis mitissima* L., poussant en Algérie ainsi que l'évaluation biologique de ses extraits.

Cette première investigation phytochimique de l'espèce citée a concerné les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique. Elle a permis d'isoler et de caractériser deux nouveaux métabolites secondaires, un triterpénoïde à squelette lanostane et un isoflavonoïde glycosylé, en plus de douze composés connus. Ces derniers se répartissent en 6 flavonoïdes (deux glycosylés, trois aglycones et un ptérocarpane), deux génines triterpéniques à squelette oléanane, une saponine triterpénique également à squelette oléanane, deux phytostérols ainsi qu'un dérivé du résorcinol.

La séparation, l'isolement et la purification de ces composés ont été réalisés par la combinaison de différentes méthodes chromatographiques (VLC, CC, CCE) sur divers supports (silice normale, silice greffée en C-18, polyamide SC6 et Sephadex LH-20).

Leur détermination structurale a été réalisée grâce aux méthodes d'analyse spectroscopiques incluant la RMN 1D (^1H et ^{13}C *J*-modulé) et 2D (COSY H-H, HMBC, HSQC et ROESY), la spectrométrie de masse à haute résolution (HR-ESI-MS), en plus de la mesure du pouvoir rotatoire et la comparaison avec les données de la littérature.

Cette investigation chimique qui a permis de compléter nos connaissances quant à la composition chimique des espèces appartenant au genre *Ononis*, s'est avérée globalement en accord avec les études antérieures réalisées sur les espèces du même genre comme *O. pusilla*, *O. spinosa*, *O. speciosa* et *O. natrix*. Elle confirme leur richesse en flavonoïdes comme la genkwanine, la velutine, la formononétine et l'ononine. Cependant quatre composés, acide 25,26,27-trisnor-3 β -hydroxy-lanost-7(8)-èn-24-oïque, formononétine-7-O-[6''-O-((*S*)-3-hydroxy-3-méthylglutaryl)]- β -D-glucopyranoside, Azukisaponine V et 1,3-dihydroxy-5-undecyl résorcinol, ont été décrits pour la première fois dans le genre *Ononis*. Il est important de signaler que c'est la première fois qu'un acide triterpénique à squelette lanostane (**1**) et un composé isoflavonoïdique possédant un groupement HMG (**2**) sont cités dans le genre *Ononis*.

Notre travail, dans sa partie biologique, a permis de déterminer la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes de trois extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) de la plante, par la méthode de Folin-Ciocalteu et trichlorure d'aluminium respectivement. Les teneurs les plus élevées en phénoliques et en flavonoïdes ont été trouvées dans l'extrait d'acétate d'éthyle, suivi de l'extrait *n*-

butanolique et enfin l'extrait éther de pétrole. Ceci est confirmé par l'analyse phytochimique qui révèle une plus grande présence de polyphénols et flavonoïdes au sein de l'extrait acétate d'éthyle.

L'évaluation *in vitro* de l'activité anti-oxydante des extraits de la plante et standards a été réalisée par cinq méthodes, à savoir le piégeage du radical libre DPPH, le test de la capacité de piégeage du peroxyde d'hydrogène, le test du pouvoir réducteur du fer (FRAP), le test de la capacité anti-oxydante totale par phosphomolybdate (PPM) et le test de dosage du thiocyanate de fer (FTC). Les résultats de l'activité anti-oxydante par piégeage des radicaux DPPH ont montré que l'extrait AcOEt présente la plus grande capacité antioxydante par rapport aux extraits EP et *n*-BuOH. Toutefois, cette activité est proche du standard BHT. De plus, l'extrait AcOEt a montré l'activité la plus élevée, en pouvoir antioxydant réducteur ferrique et en capacité antioxydante totale avec des valeurs respectives de $122,23 \pm 0,014$ et $16,44 \pm 0,0012$ $\mu\text{g EAA/mg}$ par rapport aux résultats des extraits de *n*-BuOH et éthéropétrolique. Dans le test de piégeage du peroxyde d'hydrogène, l'extrait EP a révélé un pourcentage d'inhibition plus élevé (85,26 %) que l'acide ascorbique en standard (62,36 %) à la concentration de 100 $\mu\text{g/mL}$. Les extraits AcOEt et *n*-BuOH ont indiqué une activité antioxydante modérée à la même concentration avec des valeurs de 31,18 et 31,11 % respectivement. Les extraits EP ($42,07 \pm 0,25\%$) et *n*-BuOH ($48,62 \pm 0,67\%$) ont une capacité antioxydante plus élevée dans le dosage du thiocyanate ferrique que le BHA ($41,92 \pm 0,44$ %) pris comme référence. Ces résultats mettent en évidence une corrélation entre la teneur des extraits en polyphénols et en flavonoïdes de l'espèce *O. mitissima* et son activité antioxydante.

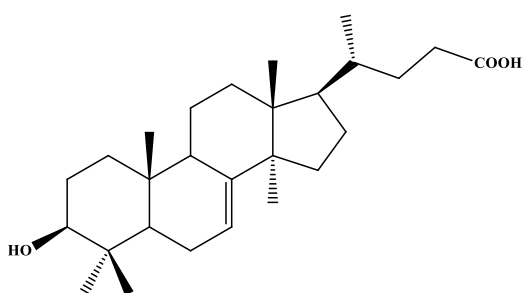
Par ailleurs, l'évaluation *in vitro* du pouvoir anti-inflammatoire des trois extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) par la méthode de dénaturation de l'albumine d'œuf, a montré que les extraits testés ont une activité anti-inflammatoire modérée avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 21,96, 33,41 et 11,48 %, par rapport au diclofénac (86,72%), à la même concentration (500 $\mu\text{g/mL}$).

L'activité anti-hémolytique des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH a été évaluée par le test de fragilité osmotique des érythrocytes. L'activité anti-hémolytique la plus forte a été observée dans l'extrait AcOEt avec une valeur de IC_{50} égale à 0,65 mg/mL . Les deux autres (extraits EP et *n*-BuOH) ont montré des propriétés anti-hémolytiques modérées avec des valeurs de pourcentage d'inhibition de l'hémolyse à 19,28 et 38,58 % à la concentration de 0,8 mg/ml .

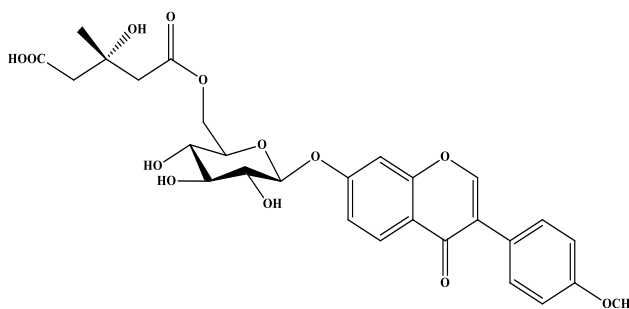
Les activités antioxydantes, anti-hémolytiques et anti-inflammatoires élevées de l'extrait AcOEt pourraient être liées à sa grande teneur en phénols et en flavonoïdes. De plus, les deux

extraits EP et *n*-BuOH ont montré des propriétés anti-hémolytiques et anti-inflammatoires modérées.

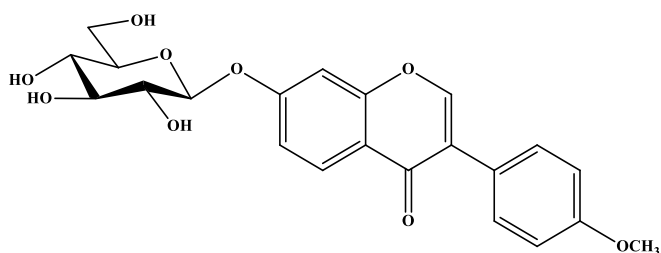
Comme perspectives, il est envisagé d'effectuer des investigations chimiques complémentaires permettant de disposer de plus grandes quantités des deux produits nouveaux, l'acide triterpénique à squelette lanostane (**1**) et le composé isoflavonoïdique doté d'un groupement HMG (**2**), pour une évaluation biologique. Cette évaluation se trouve confortée par le fait que les études antérieures ont montré que les acides triterpéniques à squelette lanostane possèdent des activités anti-inflammatoires et neurotrophiques très intéressantes [139-143]. De même que les composés flavonoïdiques porteurs d'un groupement HMG ont des propriétés cytotoxiques [144] et inhibitrice de l' α -glucosidase [145].



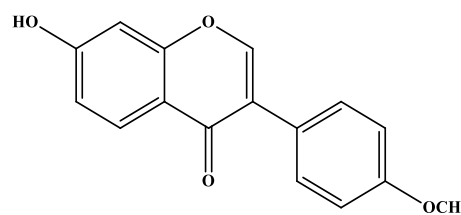
Acide 25,26,27-trisnor-3-hydroxy-lanost-7(8)-
èn-24-oïque (**1**)



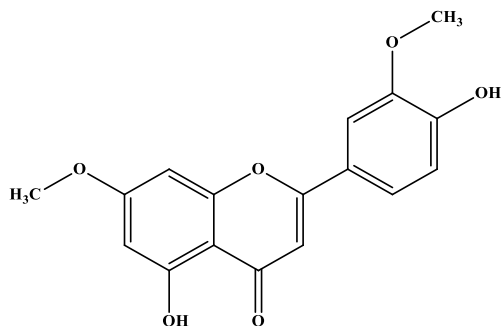
Formononetine-7-O-[6''-O-((S)-3-hydroxy-3-
méthylglutaryl)]-β-D-glucopyranoside (**2**)



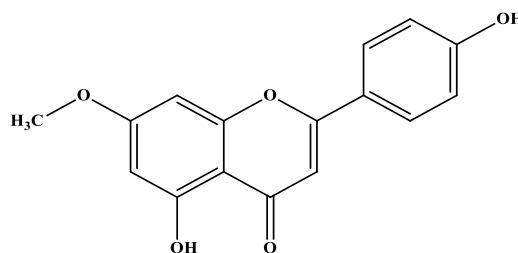
4'-méthoxyisoflavone 7-O-β-D-
glucopyranoside (Ononine) (**3**)



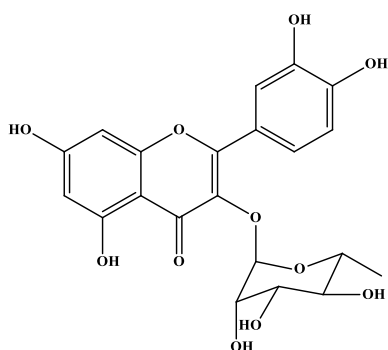
7-hydroxy-4'-méthoxyisoflavone
(formononétine) (**4**)



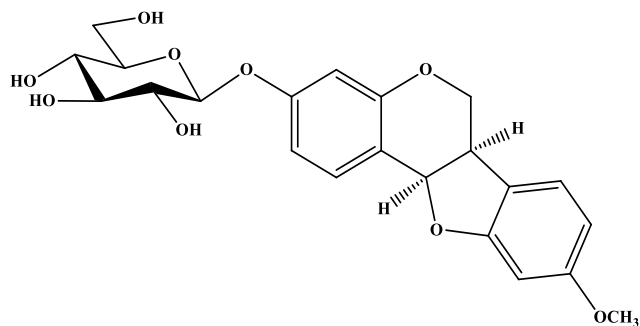
5,4'-dihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone
(velutine) (5)



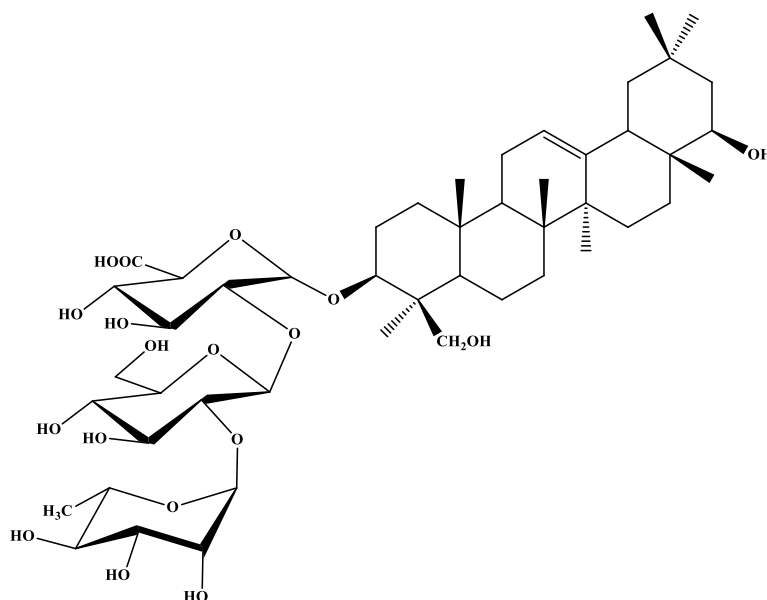
5,4'-dihydroxy-7-méthoxyflavone
(genkwanine) (6)



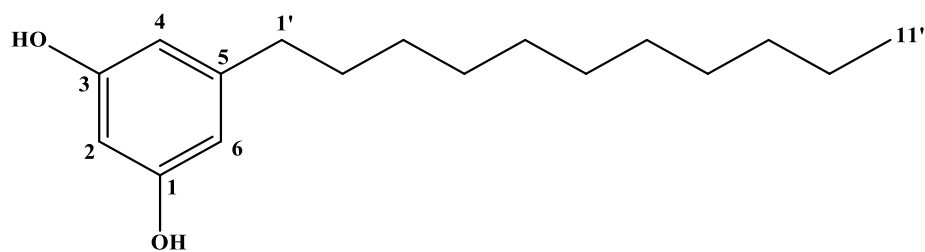
Quercétine 3-O- α -rhamnopyranoside
(Quercitrine) (7)



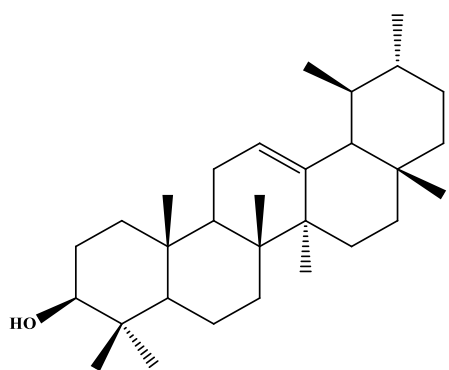
(6aR, 11aR)-3-O- β -D-glucopyranosyl-
médicarpine (8)



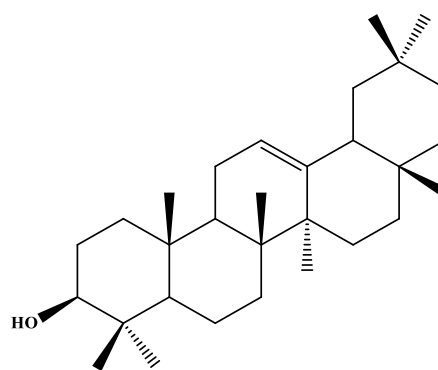
3-O-[α -L-rhamnospyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-
glucuronopyranosyl]-22 β , 24-dihydroxyléan-12-ène (9)



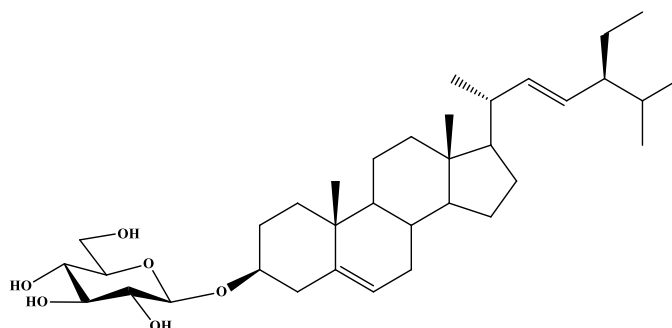
1,3-dihydroxy-5-undecyl résorcinol (10)



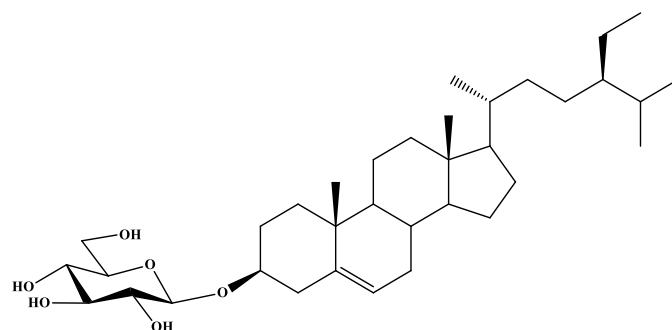
α -amyrine (11)



β -amyrine (12)



Stigmastérol glucosylé (13)



Daucostérol (β -sitostérol-3-O-glucoside) (14)

Chapitre IV

Partie expérimentale

IV.1. Matériel et appareillage

IV.1.1. Récolte du matériel végétal

La plante *Ononis mitissima* a été collectée en mai 2017 dans la région de Batna (Algérie). Elle a été identifiée par le Professeur Bachir Oudjehih du Département d'Agronomie de l'Institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques de l'Université de Batna 1. La plante a été séchée à l'abri de la lumière et de l'humidité, à température ambiante et stockée soigneusement dans un endroit sec en vue de leur extraction.

IV.1.2. Chimie extractive

IV.1.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

C'est une méthode analytique couramment utilisée dans les laboratoires de Phytochimie pour le suivi de la séparation et l'identification rapides des constituants d'un extrait donné.

Les analyses par chromatographie sur couche mince ont été effectuées avec des plaques de Kiesegel 60 F₂₅₄ sur feuille d'aluminium (Merck) 250 µm (10 ou 20 x 20 cm) (en phase normale), RP-18 F_{254S}, 200 µm Merck (20 x 20 cm) (en phase inverse). Après développement dans des cuves en verre, les plaques ont été observées sous lampe UV à 254 et 366 nm. Elles sont ensuite révélées par un mélange constitué d'acide sulfurique (25 %), d'acide acétique (25 %) et d'eau (50 %). Les plaques sont finalement chauffées avec un sèche-cheveux jusqu'à apparition de taches de diverses couleurs en fonction du type de composés.

IV.1.2.2. Chromatographie liquide sous vide (VLC)

C'est une technique rapide qui a l'avantage de consommer moins de solvants que les autres méthodes chromatographiques classiques. Elle est utilisée pour une séparation grossière des extraits bruts.

L'adsorbant est mis à sec dans un entonnoir de verre fritté. L'échantillon est appliqué par la méthode sèche. La phase mobile est ajoutée portion par portion. Le vide est ensuite appliqué après chaque portion pour recueillir plusieurs fractions.

IV.1.2.3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

Elle permet la séparation des constituants d'un mélange et leur isolement à partir d'échantillons dont la masse peut atteindre plusieurs grammes.

La phase stationnaire ou adsorbant (gel de silice, polyamide, Sephadex LH-20) est contenue dans une colonne et la phase mobile peut être un solvant unique ou un mélange de solvants. La

taille des colonnes, la granulométrie de la phase solide, le débit de la phase mobile et le volume des fractions ont été adaptés à la quantité et à la nature (extrait, fraction) des échantillons à séparer. Le choix des conditions d'éluion, le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base d'analyses par CCM en phase normale.

IV.1.3. Chimie structurale

IV.1.3.1. Spectrométrie de masse

Les spectres HRESIMS ont été obtenus sur un système Acquity UHPLC (Waters, Milford, MA, USA) couplé à un spectromètre de masse QExacte Plus (Thermo Scientific, Bremen, Allemagne), en utilisant une source d'ionisation par électrospray (HESI-II).

IV.1.3.2. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de résonance magnétique nucléaire ont été enregistrés sur un appareil de type Brüker Avance Neo à 600 MHz (RMN ^1H) et 150 MHz (RMN ^{13}C). Les échantillons ont été solubilisés dans le DMSO- d_6 . Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au DMSO- d_6 utilisé comme standard interne (δ_{H} 2,50; δ_{C} 39,5) et les constantes de couplage en Hz.

IV.1.3.3. Pouvoir rotatoire

La mesure du pouvoir rotatoire des composés **1** et **2** a été réalisée dans le méthanol sur un polarimètre JASCO dans un tube de 1 cm.

IV.2. Extraction

La plante (800 g) séchée et pulvérisée, est mise à macérer dans un mélange EtOH/H₂O (70/30). L'extrait récupéré est concentré sous pression réduite, à une température oscillant entre 35 et 40°C. La macération est répétée 2 fois avec renouvellement du solvant. Après filtration et évaporation non à sec, la solution résultante (500 ml) a fait l'objet d'une extraction liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante (éther de pétrole, acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol).

Les trois phases organiques récupérées sont séchées sur Na₂SO₄ anhydre, filtrées et enfin concentrées à sec sous pression réduite. 3,1 g, 4,70 g et 12,6 g ont été obtenus respectivement des extraits éther de pétrole, acétate d'éthyle et *n*-butanol.

IV.3. Etude de l'extrait acétate d'éthyle

IV.3.1. Fractionnement

7 g de l'extrait AcOEt ont été soumis à une chromatographie sous vide (VLC) sur gel de silice RP-18 (50 g), en utilisant des gradients d'éluion EP/AcOEt (100:0 à 0:100), puis AcOEt /MeOH (100:0 à 0:100). Des fractions de 100 ml ont été collectées à chaque fois. Le fractionnement est suivi analytiquement sur CCM avec le système d'éluion $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ à 7 %. Les fractions présentant le même profil chromatographique sur CCM ont été regroupées pour donner huit fractions allant de F-1 à F-8 (Tableau IV.1 et Figure IV.1).

Tableau IV.1. Fractionnement de l'extrait AcOEt de l'espèce *Ononis mitissima*

	Eluant	Fractions	Masse (mg)
EP/AcOEt	100-0 à 70-30	F-1	46,7
	60-40	F-2	134,2
	50-50 à 40-60	F-3	1048,1
	30-70 à 10-90	F-4	2324
AcOEt /MeOH	100-0 à 95-5	F-5	1265,6
	90-10 à 80-20	F-6	835,5
	70-30 à 60-40	F-7	435,5
	50-50 à 0-100	F-8	119,9

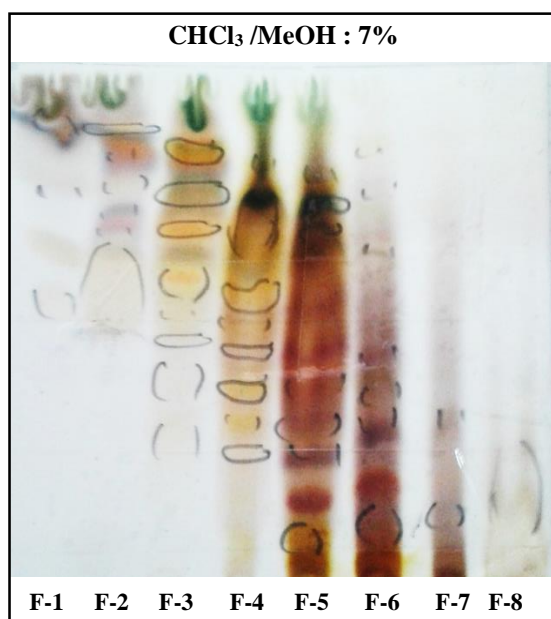


Figure IV.1. CCM récapitulative de l'extrait AcOEt

IV.3.2. Purification

IV.3.2.1. Purification de la fraction F-2

La fraction F-2 (134 mg) est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale. L'élution est réalisée par un mélange hexane/AcOEt à différents gradients (100:0, 99:1, 97:3, 95:5: 90:10, 85:15, 80:20, 70:30 et 50:50). Les fractions collectées sont réunies selon leur profil CCM (EP/AcOEt à 3%), donnant 6 sous-fractions (F-2-1 à F-2-6).

La précipitation des sous-fractions F-2-5 et F-2-6 dans le mélange CH₂Cl₂/hexane a conduit à l'isolement du composé **10** (5 mg) (Figure IV.2).



Figure IV.2. CCM du composé **10**

IV.3.2.2. Purification de la fraction F-3

La fraction F-3 (1048 mg) chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale et éluee par un mélange EP/AcOEt à différents gradients (100:0, 99:1, 97:3, 95:5: 90:10, 85:15, 80:20, 70:30 et 50:50), a permis d'obtenir 14 sous fractions (F-3-1 à F-3-14).

La précipitation de la sous-fraction F-3-14 dans le dichlorométhane a conduit à l'isolement du composé **4** (5,6 mg) (Figure IV.3).



Figure IV.3. CCM du composé **4**

IV.3.2.3. Purification de la fraction F-4

La fraction F-4 (2324 mg) est soumise à une chromatographie sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution réalisée au moyen d'un mélange EP/Et₂O (100:0, 97:3, 95:5, 93:7, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 et 0:100) a fourni 15 sous fractions (F-4-1 à F-4-15).

La précipitation de la sous fraction F-4-7 (15,8 mg) dans un mélange EP/CH₂Cl₂ suivie d'un lavage à l'acétone, ont permis d'obtenir les composés **11** et **12** (7,5 mg) sous forme d'un mélange inséparable.

Les sous fractions F-4-8 et F-4-9 rassemblées, d'une masse égale à 279 mg, ont subi une purification sur une colonne de gel de silice normale. L'élution réalisée dans un système EP/CHCl₃ à différents gradients (100:0, 99:1, 97:3, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 et 0:100) a permis de collecter 10 autres sous-fractions (F-4-8-1 à F-4-8-10). La précipitation de la sous fraction F-4-8-8 dans un mélange hexane/CH₂Cl₂ a donné le composé **1** (2,6 mg).

La sous fraction F-4-10 (300 mg) est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice normale, éluee avec un gradient d'élution EP/CHCl₃ (100:0 à 0:100). Le fractionnement a abouti à la collecte de 8 fractions (F-4-10-1 à F-4-10-8). La sous fraction F-4-10-4 (24 mg) précipitée dans CH₂Cl₂ a permis de recueillir le composé **5** (20 mg).

Les sous fractions F-4-11 et F-4-12 (380 mg) rassemblées ont subi une chromatographie sur une colonne de gel de silice normale. L'élution menée par un mélange de solvants EP/CHCl₃ (100:0 à 0:100) a donné 8 autres sous fractions (F-4-11-1 à F-4-11-8). La sous fraction F-4-11-6 (35 mg) mise à précipiter dans l'acétone, a donné les composés **4** et **6** (20 mg) sous forme d'un mélange inséparable.

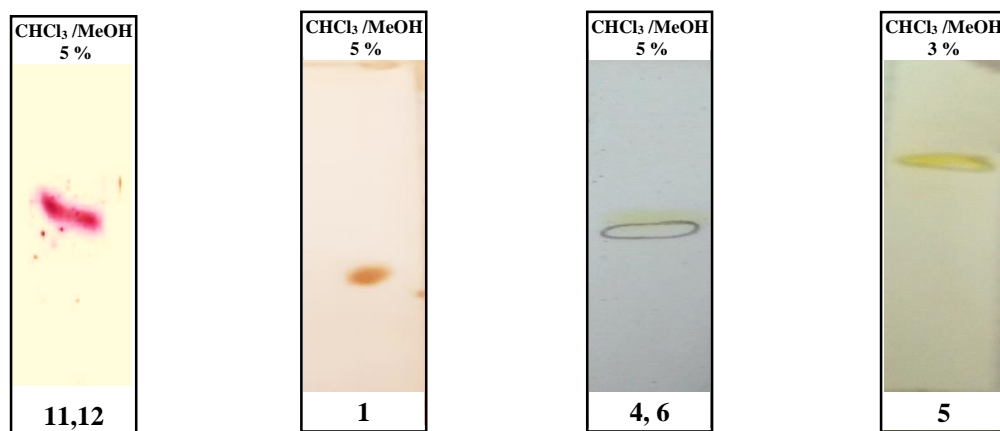


Figure IV.4. CCM des composés **1**, **4**, **5**, **6**, **11** et **12**

IV.3.2.4. Purification de la fraction F-5

La fraction F-5 d'une masse de 1200 mg est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice normale. L'éluion est réalisée au moyen d'un mélange EP/AcOEt (100:0, 97:3, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 20:80 et 0:100) et AcOEt/MeOH (100:0, 50:50 et 90:10), pour donner 13 sous fractions (F-5-1 à F-5-13).

Un fractionnement de la sous-fraction F-5-13 (530 mg) sur une colonne de gel de silice dans un mélange de solvants CHCl₃/MeOH (100:0, 99:1, 98:2, 97:3, 96:4, 95:5, 94:6, 93:7, et 90:10), a permis de récolter 11 autres sous fractions (F-5-13-1 à F-5-13-11).

La précipitation dans le méthanol de la sous fraction F-5-13-5 (25 mg) a abouti à l'isolement en mélange des composés **13** et **14** (6,8 mg). De même, la sous-fraction F-5-13-6 (28 mg) mise à précipiter dans CHCl₃ a donné le composé **8** (5,6 mg).

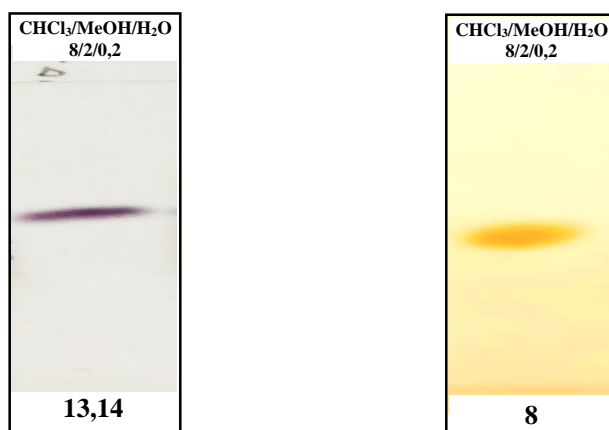


Figure IV.5. CCM des composés **8**, **13** et **14**

IV.4. Etude de l'extrait *n*-BuOH

IV.4.1. Fractionnement

7 g de l'extrait butanolique ont été fractionnés par une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice greffée en C-18, dans un mélange H₂O/MeOH avec des gradients d'éluion allant de 100:0 à 0:100. Cette étape préliminaire a permis d'obtenir 8 fractions (F-1 à F-8), illustrée par le tableau IV.2 et la figure IV.6.

Tableau IV.2. Fractionnement de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *Ononis mitissima*

Eluant (H ₂ O/MeOH)	Fractions	Masse (mg)
80-20	F-1	617
80-20 à 70-30	F-2	2000
60-40	F-3	1600

40-60	F-4	1000
30-70	F-5	1200
20-80	F-6	250
20-80	F-7	190
0-100	F-8	770

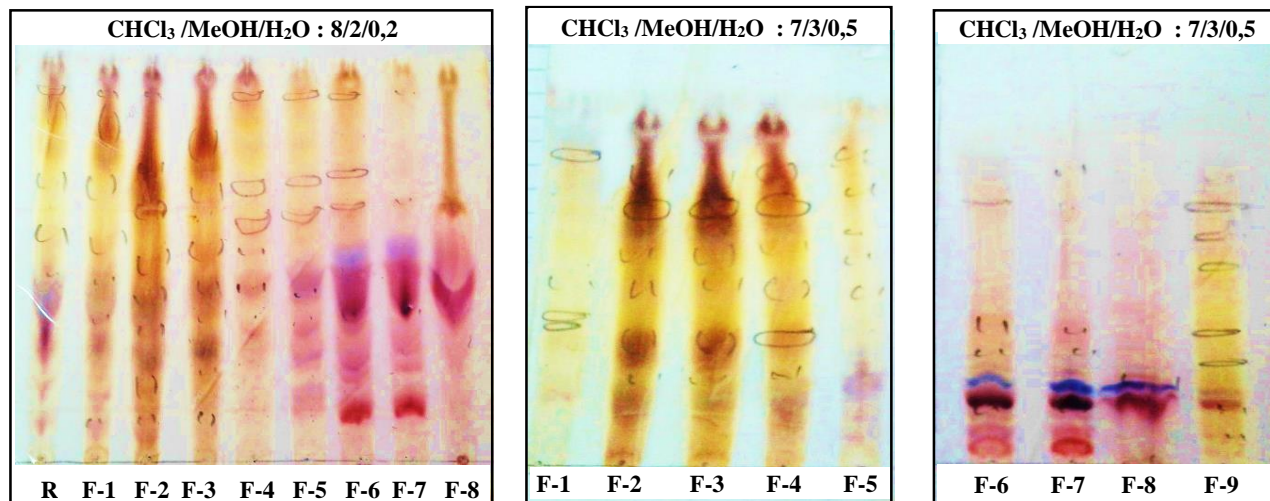


Figure IV.6. CCM récapitulatives de l'extrait *n*-BuOH

IV.4.2. Purification

IV.4.2.1. Purification de la fraction F-2

La fraction F-2 (2000 mg) est chromatographiée sur une colonne utilisant le polyamide SC-6 comme phase stationnaire. L'élution menée par le mélange H₂O/MeOH à différents gradients (100:0 à 0:100), a fourni 10 sous-fractions (F-2-1 à F-2-10).

La sous-fraction F-2-1 (900 mg) est fractionnée sur une colonne de gel de silice normale avec un gradient de solvants CHCl₃/MeOH (100:0 à 50:50), donnant 7 sous-fractions (F-2-1-1 à F-2-1-7). La sous fraction F-2-1-3 (18 mg) est purifiée sur une plaque préparative de silice dans le mélange CHCl₃/MeOH/H₂O (8/2/0,2), conduisant à l'isolement du composé **7** (4,9 mg).

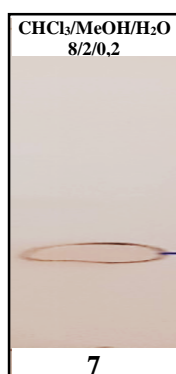


Figure IV.7. CCM du composé **7**

IV.4.2.2. Purification de la fraction F-3

La fraction F-3 (1600 mg) est chromatographiée sur une colonne de polyamide SC-6. L'élution réalisée par le mélange H₂O/MeOH (100:0, 80:20, 50:50, 20:80 et 0:100) a permis de récolter 7 sous-fractions (F-3-1 à F-3-7).

La sous-fraction F-3-6 (300 mg) fractionnée sur une colonne de polyamide dans le système de solvants toluène/MeOH (100:0 à 0:100) a donné 9 sous-fractions (F-3-6-1 à F-3-6-9). La sous fraction F-3-6-2 (20 mg), précipitée dans le méthanol, a abouti à l'isolement du composé **3** (7 mg).

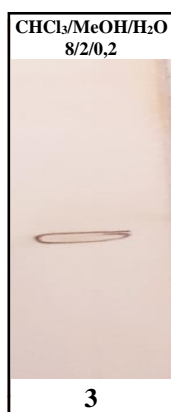


Figure IV.8. CCM du composé **3**

IV.4.2.3. Purification de la fraction F-4

La fraction F-4 (1000 mg) est fractionnée sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution a été effectuée par un système de solvants CHCl₃/MeOH (100:0 à 80:20) puis CHCl₃/MeOH/H₂O (80/20/2, 70/30/5, 60/40/5), pour fournir 9 sous-fractions (F-4-1 à F-4-9).

La sous fraction F-4-8 (151 mg) a subi un fractionnement sur une colonne de Sephadex LH-20 au moyen du système CHCl₃/MeOH (5/5), donnant pour 5 sous-fractions (F-4-8-1 à F-4-8-5). Une chromatographie sur plaque préparative de gel de silice réalisée sur la sous fraction F-4-8-3 (15 mg) dans un mélange CHCl₃/MeOH/H₂O (7/3/0,5), a fourni le composé **2** (3,4 mg).



Figure IV.9. CCM du composé **2**

V.4.2.4. Purification de la fraction F'-6 (F-6 + F-7)

La fraction F'-6 (440 mg) est fractionnée sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'éluion menée par le mélange de solvants CHCl₃/MeOH (100:0 à 80:20) puis CHCl₃/MeOH/H₂O (80/20/2, 70/30/5, 60/40/5) a permis d'obtenir 10 sous-fractions (F'-6-1 à F'-6-10).

La précipitation dans l'acétone de la fraction F'-6-8 a donné le composé **9** (4,4 mg) à l'état pur. La CCM de ce composé présente une tache invisible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en violet après pulvérisation par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Figure V-8).



Figure IV.10. CCM du composé **9**

IV.5. Composés isolés de l'espèce *Ononis mitissima*

Composé 1

Aspect : Poudre blanche

Nom : Acide 25,26,27-trisnor-3β-hydroxy-lanost-7(8)-èn-24-oïque

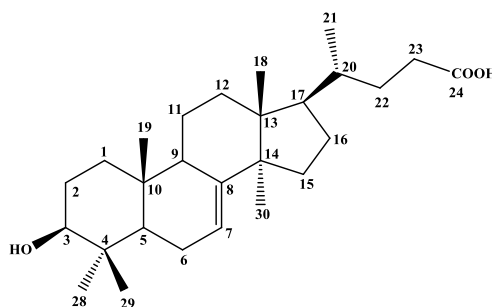
Formule : C₂₇H₄₄O₃

[α]_D: -21.50 (c 0.2, MeOH)

HRESIMS : $m/z = 415,3207$ [M-H]⁻ (calc. 415.3206 C₂₇H₄₃O₃)

RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz)

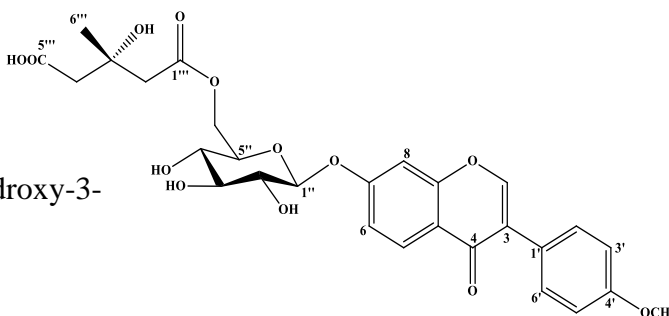
dans DMSO-*d*₆ (Tableau II.1, pages 35-36)



Composé 2

Aspect : Poudre blanche

Nom: Formononetine-7-*O*-[6''-*O*-((*S*)-3-hydroxy-3-méthylglutaryl)]-β-D-glucopyranoside



Formule : C₂₈H₃₀O₁₃

[α]_D : -25.59 (c 0.2, MeOH)

HRESIMS : *m/z* = 575,1744 (cal. 575,1759, pour [M-H]⁻)

m/z = 573,1611 (calc. 573,603, pour [M+H]⁺)

MS/MS : *m/z* = 1147,3290 (calc. 1147,3289, pour [2M-H]⁻)

RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) dans DMSO-*d*₆ (Tableau II.2, page 46-47)

Composé 3

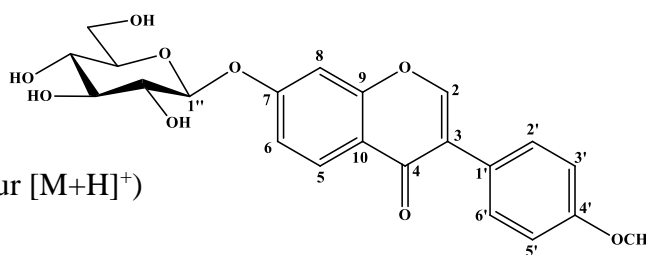
Aspect : Poudre amorphe jaune pâle

Nom : Ononine

Formule : C₂₂H₂₂O₉

HRESIMS : *m/z* = 431,1409 (calc. 431,1337, pour [M+H]⁺)

RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) dans DMSO-*d*₆ (Tableau II.3, page 52-53)



Composé 4

Aspect : Poudre blanche

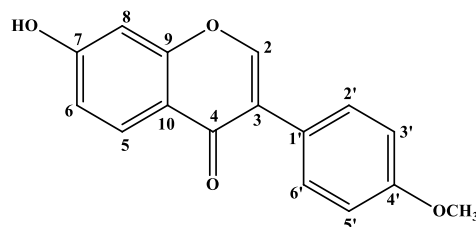
Nom : Formononétine

Formule : C₁₆H₁₂O₄

HRESIMS : *m/z* = 269,0818 (cal. 269,0808, pour [M-H]⁻)

m/z = 267,0661 (calc. 267,0652, pour [M+H]⁺)

RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) dans DMSO-*d*₆ (Tableau II.4, page 58)



Composé 5

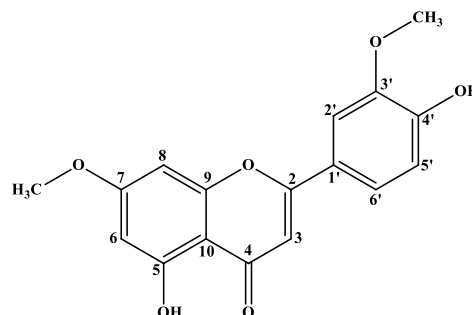
Aspect : Poudre jaune

Nom : Velutine

Formule : C₁₇H₁₄O₆

HRESIMS: *m/z* = 283 [M-H]⁻

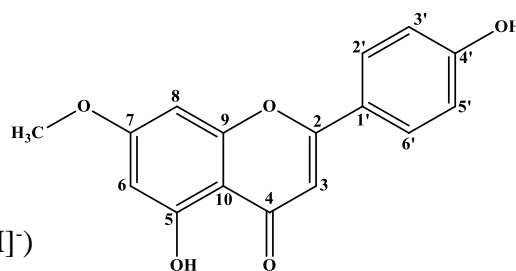
RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz) dans DMSO-*d*₆ (Tableau II.5, page 64)



Composé 6

Aspect : Poudre jaune

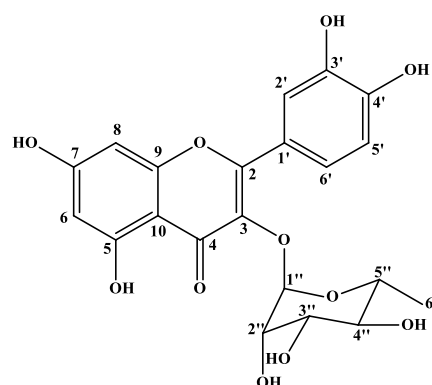
Nom : Genkwanine

Formule : C₁₆H₁₂O₅HRESIMS : $m/z = 313,0718$ (calc. 313,0707, pour [M-H]⁻) $m/z = 315,0863$ (calc. 315,0863, pour [M+H]⁺)RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz)dans DMSO-*d*₆ (Tableau II.6, page 65)

Composé 7

Aspect : Poudre jaune

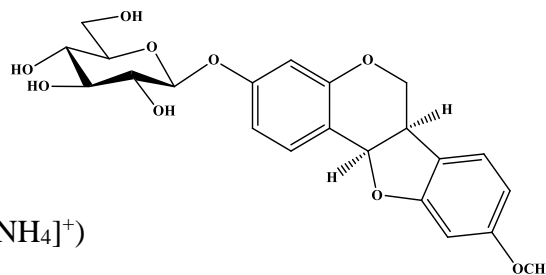
Nom : Quercitrine

Formule : C₂₁H₂₀O₁₁HRESIMS : $m/z = 447,0930$ (calc. 447,0922, pour [M-H]⁻) $m/z = 449,1080$ (calc. 449,1078, pour [M+H]⁺)RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz)dans DMSO-*d*₆ (Tableau II.7, page 71)

Composé 8

Aspect : Poudre blanche

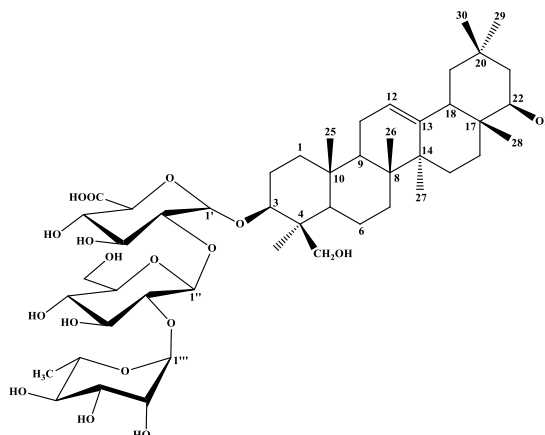
Nom : 3-O-β-D-glucopyranosyl-medicago

Formule : C₂₂H₂₄O₉HRESIMS: $m/z = 450,1755$ (calc. 450,1759, pour [M+NH₄]⁺)RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz)dans DMSO-*d*₆ (Tableau II.8, page 82)

Composé 9

Aspect : Poudre blanche

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

Formule : C₄₈H₇₈O₁₈ESI/MS : $m/z = 911,500$ (calc. 911,4999, pour [M-CH₂OH]⁻)

$m/z = 449,1080$ (calculé 449,1078, pour $[M+H]^+$)

RMN 1H (600 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz)
dans DMSO- d_6 (Tableau II.9, pages 97-98)

Composé 10

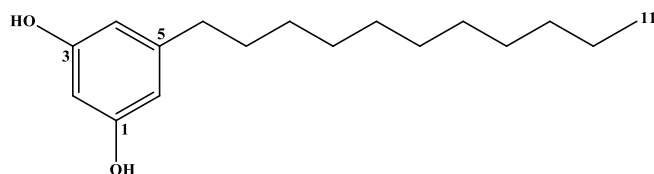
Aspect : Poudre blanche

Nom : 1,3-dihydroxy-5-undecyl résorcinol

Formule : $C_{17}H_{28}O_2$

HRESIMS : $m/z = 236$ ($[M-H]^-$)

RMN 1H (600 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz)
dans DMSO- d_6 (Tableau II.10, page 103)



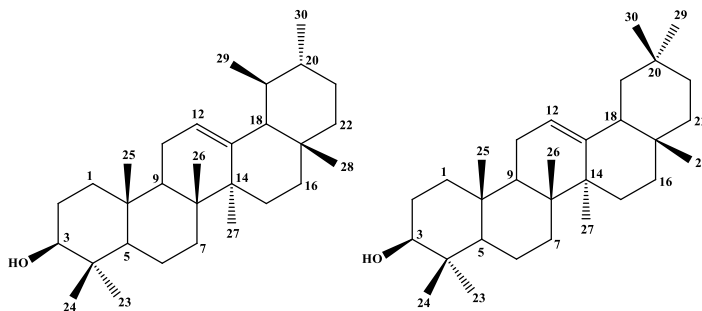
Composé 11 et 12

Aspect : Poudre blanche

Nom : α -amyrine, β -amyrine

Formule : $C_{30}H_{50}O$

RMN 1H (600 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz)
dans DMSO- d_6



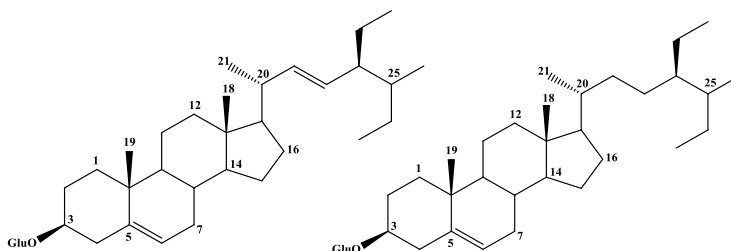
Composé 13 et 14

Aspect : Poudre blanche

Nom : Daucostérol et Stigmastérol glucosylé

Formule : $C_{35}H_{60}O_6$

RMN 1H (600 MHz) et RMN ^{13}C (150 MHz)
dans DMSO- d_6



IV.6. Matériel et appareillage

IV.6.1. Matériel végétal

Le matériel végétal (Plante *Ononis mitissima*) est conservé et laissé sécher à l'abri de la lumière et de l'humidité. Il est ensuite broyé finement.

Le mode d'extraction de la plante a été évoqué dans le troisième chapitre (Figure II.2, page 16). Les extraits obtenus sont solubilisés dans différents solvants pour la réalisation des tests biologiques.

IV.6.2. Dosage des polyphénols totaux

IV.6.2.1. Principe

La teneur totale en phénolique des trois extraits bruts (EP, AcOEt et *n*-BuOH) a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu [116]. La réaction est basée sur la réduction de l'acide phosphomolybdique du réactif Folin-ciocalteu (un acide de couleur jaune, constitué de polyhétérocycles acides contenant du molybdène et tungstène) par les polyphénols en milieu alcalin [117]. Elle se traduit par le développement d'une coloration bleu foncée due à la formation d'un complexe molybdène-tungstène, mesuré au spectrophotomètre.

IV.6.2.2. Mode opératoire

Un volume de 200 μ l des solutions des extraits à différentes concentrations a été ajouté à 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu (1/10). Après 4 min, 800 μ L de carbonate de sodium saturé (75 g/L) ont été ajoutés. Les tubes préparés ont ensuite été placés dans l'obscurité pendant 2 heures et l'absorbance à 765 nm a été mesurée par spectrophotomètre UV-Vis (Vis-7220G). Les résultats ont été exprimés en équivalent d'acide gallique par mg d'extrait brut (μ g EAG/mg d'extrait) et calculés en tant que valeur moyenne \pm SD ($n = 3$).

IV.6.3. Dosage des flavonoïdes

IV.6.3.1. Principe

La quantification des flavonoïdes dans les trois extraits de la plante a été quantifiée par la méthode de trichlorure d'aluminium [116]. Les flavonoïdes forment des complexes jaunâtres par chélation des métaux (fer et aluminium). Ceci se traduit par le fait que ces derniers perdent deux électrons pour s'unir à deux atomes d'oxygène de la molécule phénolique qui agit comme donneur d'électrons [118].

IV.6.3.2. Mode opératoire

1 ml de solution de trichlorure d'aluminium AlCl_3 (2 %) a été ajouté à 1 ml des trois extraits. Le mélange a été vigoureusement agité. Après 10 min d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été lue à 430 nm. La quercétine a été utilisée pour établir la courbe d'étalonnage afin d'estimer la concentration des flavonoïdes (Figure III.2). Les résultats ont été exprimés en microgrammes équivalent de quercétine par milligramme d'extrait ($\mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait).

IV.6.4. Evaluation de l'activité anti-oxydante

IV.6.4.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

IV.6.4.1.1. Principe

L'activité anti-oxydante des extraits bruts a été évaluée par spectrophotométrie à l'aide du radical libre DPPH [116]. Le DPPH (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable caractérisé par une couleur violette en solution dans le méthanol. Dans ce test, les antioxydants réduisent le DPPH ayant une couleur violette en 1,1-diphényl-2-picrylhydrazine, de couleur jaunâtre. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu (Figure IV.11).

IV.6.4.1.2. Mode opératoire

25 μL de différentes dilutions des trois extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) ou standards (acide ascorbique, BHA et BHT) ont été ajoutés à 975 μl d'une solution méthanolique de DPPH (0,025 mg/ml). Le mélange a ensuite été maintenu dans un endroit sombre à température ambiante pendant 30 minutes. Après incubation, l'absorbance a été mesurée à 517 nm et le pourcentage d'activité d'élimination des radicaux DPPH de chaque extrait ou standard a été calculé comme suit :

$$I\% = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Echantillon}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

A_{Blanc} est l'absorbance du blanc et $A_{\text{Echantillon}}$ l'absorbance du contrôle positif ou de l'échantillon. Les expériences ont été réalisées en triple et les résultats ont été transmis en moyenne (valeurs \pm SD).

Les résultats sont exprimés en IC_{50} . Ce dernier est défini comme étant la concentration efficace de l'extrait capable de piéger 50 % des radicaux DPPH dans le mélange réactionnel dont l'activité la plus forte correspond à l' IC_{50} la plus faible.

IV.6.4.2. Activité antioxydante par le peroxyde d'hydrogène

IV.6.4.2.1. Principe

Le piégeage du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) peut être déterminé par la méthode H₂O₂ [146]. Cette méthode est basée sur l'absorption de cette molécule dans le domaine UV. Comme la concentration de H₂O₂ diminue du fait des composés piègeurs, sa valeur d'absorbance à 230 nm diminue également.

IV.6.4.2.2. Mode opératoire

600 µL d'une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, 43 mM) préparée dans du tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4), ont été ajoutés à 1 mL d'échantillons à la concentration de 100 µg/mL. L'absorbance du mélange réactionnel a été lue à 230 nm après 10 minutes d'incubation. Le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Activité (\%)} = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Echantillon}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

A_{Blanc} est l'absorbance du blanc et $A_{\text{Echantillon}}$ l'absorbance de l'échantillon.

IV.6.4.3. Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

IV.6.4.3.1. Principe

Cette technique permet de mesurer la réduction du Fe³⁺ (fer ferrique) en Fe²⁺ (fer ferreux) en présence d'un antioxydant [128]. La présence des réducteurs (AH) dans les extraits des plantes provoque la réduction de Fe³⁺/complexe ferricyanide à la forme ferreuse. Par conséquent, le Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu cyanée dans le milieu réactionnel à 700 nm [129]. L'acide ascorbique est utilisé comme contrôle positif.

IV.6.4.3.2. Mode opératoire

100 µL des différents extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) ont été ajoutés à 500 µL d'une solution tampon phosphate (0,2 M; pH 6,6) et 500 µL de solution de ferricyanure de potassium K₃Fe(CN)₆ (1 %). Le mélange a été incubé pendant 20 min à 50 °C. 500 µL d'acide trichloracétique (10 %,) ont été ensuite ajoutés. Les tubes préparés ont été centrifugés pendant 10 min à 3000 tr/min. Après centrifugation, 500 µL de la solution surnageante ont été mélangés avec 500 µL d'eau distillée et 100 µL d'une solution aqueuse de chlorure ferrique (FeCl₃) fraîchement préparé à 0,1 %. Les valeurs des absorbances ont été enregistrées à 700 nm.

IV.6.4.4. Test du Phosphomolybdate (PPM)

IV.6.4.4.1. Principe

Le test est basé sur la réduction de molybdène Mo (VI) présent sous la forme d'ions molybdate MoO_4^{2-} au molybdène Mo (V) MoO^{2+} en présence de l'extrait ou d'un agent antioxydant. Cette réduction se matérialise par la formation d'un complexe verdâtre (phosphate/Mo (V) à un pH acide [147]. On mesure l'augmentation de la coloration du complexe molybdène (VI) en présence d'antioxydant. A la différence des autres tests, ce test permet non seulement de quantifier l'apport de l'activité antioxydante des polyphénols mais aussi d'autres composés antioxydants tels que les vitamines (C, E...).

IV.6.4.4.2. Mode opératoire

La capacité antioxydante totale des extraits a été évaluée spectrophotométriquement par dosage du phosphomolybdène [116]. 100 μL d'extraits ont été ajoutés à 900 μL de solution de réactif (0,6 M d'acide sulfurique, 28 mM de phosphate de sodium et 4 mM de molybdate d'ammonium). Le mélange a été incubé à 95 °C pendant 90 min. Après retour à la température ambiante, l'absorbance de différents échantillons est lue à 695 nm.

IV.6.4.5. Test de dosage par le thiocyanate de fer (FTC)

IV.6.4.5.1. Principe

L'activité antioxydante des extraits de la plante est mesurée à travers l'inhibition de la peroxydation de l'acide linoléique en utilisant la méthode au thiocyanate ferrique, conformément à la méthode décrite par Takao et collaborateurs [148].

IV.6.4.5.2. Mode opératoire

Le mélange a été préparé en ajoutant 400 μL de solution d'échantillons (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) à 400 μL d'acide linoléique (2,52 %) et 800 μL de tampon phosphate (pH 7,4). Les tubes ont été incubés à 40 °C pendant 1 heure. Ensuite, 100 μL de cette solution ont été ajoutés à 5 ml d'éthanol (70 %) et 100 μL de thiocyanate d'ammonium (30 %). Après 3 minutes, 100 μL de FeCl_2 préparés dans de l'acide chlorhydrique (3,5 %) ont été ajoutés au mélange. Une solution à blanc a été réalisée en remplaçant les échantillons par de l'eau distillée. L'absorbance de la coloration rouge de la solution résultante a été lue pendant 7 jours à 500 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique a été calculé selon l'équation suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Echantillon}})] \times 100$$

A_{Blanc} est l'absorbance du blanc et $A_{\text{Echantillon}}$ l'absorbance de l'échantillon.

IV.6.5. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

IV.6.5.1. Principe

L'activité anti-inflammatoire des extraits bruts de la plante *O. mitissima* est évaluée par la méthode de dénaturation de l'albumine d'œuf [132]. Dans cette méthode, l'anti-inflammatoire diclofénac est utilisé comme médicament de référence.

IV.6.5.2. Mode opératoire

Le mélange réactionnel était composé de 200 μL d'albumine d'œuf (œuf de poule fraîche), 2,8 ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH 6,4) et 2 ml de différentes concentrations d'extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) et de diclofénac comme standard. Les mélanges ont été incubés à 37 °C pendant 15 min puis chauffés à 70 °C pendant 5 min. Après retour à la température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 660 nm. Une solution témoin a été préparée en remplaçant les échantillons par de l'eau bidistillée et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times [V_s / V_c - 1]$$

V_s est l'absorbance de l'échantillon d'essai et V_c l'absorbance du contrôle. Chaque expérience a été réalisée en triple et les résultats ont été transmis en moyenne (valeurs \pm SD).

IV.6.6. Evaluation de l'activité anti-hémolytique

IV.6.6.1. Principe

L'effet anti-hémolytique des extraits de la plante a été évalué *in vitro* par l'utilisation du modèle érythrocytaire. Ce dernier étant facile à isoler du sang et sa membrane est similaire à d'autres membranes cellulaires [149].

L'exposition des globules rouges (RBC) à certains paramètres physicochimiques telles que le milieu hypotonique, l'utilisation d'un perturbateur membranaire comme les détergents ou les espèces réactives oxygénées ou les températures élevées, provoque une rupture de sa membrane cytoplasmique. Cette rupture provoque ainsi la libération de l'hémoglobine qui sera alors dosée par spectrophotométrie d'absorbance visible.

IV.6.6.2. Mode opératoire

IV.6.6.2.1. Prélèvement et préparation d'échantillons de sang

Le sang prélevé à partir des volontaires masculins, est stocké dans des tubes à héparine qui sont ensuite centrifugés à 3500 tr/min pendant 15 minutes. Après centrifugation, le plasma a été prélevé et les cellules de globules rouges ont été suspendues dans 10 volumes de NaCl à 0,9 %, puis centrifugées à 2500 tr/min pendant 10 min. Les cellules résultantes ont été lavées trois fois avec la même solution.

IV.6.6.2.2. Détermination de la concentration inhibitrice de l'hémolyse à 50% (CIH₅₀)

Un volume de 50 µL d'échantillon de sang a été mélangé à 5 mL des différentes solutions hypertoniques (7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 et 0 g/L). Les mélanges ont été immédiatement mélangés par retournement plusieurs fois et incubés pendant 30 minutes à 37 °C. Le contenu a été mélangé à nouveau et centrifugé pendant 5 minutes à 1500 tr/min. L'absorbance de l'hémoglobine libre dans le surnageant a été mesurée spectrophotométriquement à 540 nm en utilisant comme blanc une solution de NaCl à la concentration de 7,0 g/L. Cette procédure a été répétée trois fois pour les différents sangs et la moyenne a été prise [150].

IV.6.6.2.3. Test de fragilité osmotique érythrocytaire d'extraits bruts

L'activité anti-hémolytique des extraits de la plante *O. mitissima* a été réalisée en utilisant le modèle de fragilité osmotique érythrocytaire. En effet, 4,5 ml de solution saline hypotonique NaCl (CIH₅₀ = 4 g/l) ont été ajoutés à 500 µL d'extraits bruts à différentes concentrations et 50 µL de la suspension érythrocytaire. Les tubes ont été incubés pendant 30 min à 37 °C puis centrifugés à 1500 tr/min pendant 5 min. L'absorbance du surnageant a été lue par spectrophotométrie à 540 nm. A partir des mesures d'absorbance, le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des différents extraits a été déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Inhibition de l'hémolyse} = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Echantillon}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

A_{Blanc}: Absorbance de l'extrait d'échantillon et **A_{Echantillon}**: Absorbance de la solution de contrôle

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- [1] Carillon, E., 2000. La phytothérapie face à l'évolution médicale. *Phyto*. 10-15.
- [2] Organisation Mondiale de la Santé, 2002. Stratégie de l'OMS pour la médecine traditionnelle pour 2002-2005. Genève. 78.
- [3] Fouché J., Marquet A., Hambuckers A., 2000. Les plantes médicinales de la plante au médicament, *Observation du monde des plantes*. Vol 19.
- [4] Pierangeli, G., Vital, G., Windell Revera, L.J., 2009. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Chromolaena odorata* (L. f.) King and Robinson and *Uncaria perrottetii* (A. Rich) Merr. *Extracts. J. Med. Plant. Res.* 3, 511-518.
- [5] Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., Ignacimuthu, S., 2006. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 2, 1-10.
- [6] Lewis G. P., Schrire B. D., Mackinder B. A., Rico L., Clark R., 2013. A 2013 linear sequence of legume genera set in a phylogenetic context: A tool for collections management and taxon sampling. *S. African. J. Bot.* 89, 76–84.
- [7] Fdil, R., El Hamdani, N., El Kihel, A., Sraidi, K., 2012. Distribution of alkaloids in the aerial parts of *Retama monosperma* (L.) Boiss. In Morocco. *Ann. Toxicol. Anal.* 24, 139-143.
- [8] Wink, M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem.* 64, 3-19.
- [9] Greinwald, R., Bachmann, P., Witte, L., Czygan, F. C., 1992. The alkaloids of *Hesperolaburnum platycarpum* (Fabaceae: Genisteae): Chemotaxonomic implications. *Biochem. Syst. Ecol.* 20, 583-588.
- [10] Negri, G., Tabach, R., 2013. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. *Rev. Bras. Farmacogn.* 23, 851-860.
- [11] Anam, E. M., 2003. Triterpenoid saponins from *Abrus precatorius* (Fabaceae). *Ind. J. Chem.* 42, 386-389.
- [12] Bruneton, J., 1999. *Pharmacognosie, Phytochimie des plantes médicinales*. Ed° TEC DOC, 3^{ème} édition, Paris, 347-351.

- [13] Botta, B., Menendez, P., Zappia, G., Lima, R. A., Torge, R., Monachea, G. D., 2009. Prenylated isoflavonoids: Botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006). *Curr. Med. Chem.* 16, 3414-3468.
- [14] Khouni, L., Long, C., Haba, H., Molinier, N., Benkhaled, M., 2014. Anthranilic acid derivatives and other components from *Ononis pusilla*. *Nat. Prod. Commun.* 9, 1159-1162
- [15] Al-Khalil, S., Masalmeh, A., Abdalla, S., Tosa, H., Iinuma, M., 1995. N-arachidyl anthranilic acid, a new derivative from *Ononis natrix*. *J. Nat. Prod.* 58, 760-763.
- [16] Al-Qudah, M. A., Al-Ghoul, A. M., Trawenh, I. N., Al-Jaber, H. I., Al Shboul, T. M., Abu Zarga, M. H., Abu orabi, S. T., 2014. Antioxidant Activity and chemical composition of essential oils from Jordanian *Ononis natrix* L. and *Ononis sicula* guss. *Journal of Biologically Active Products from Nature.* 4, 52-61.
- [17] Baytop, T., 1999. Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi. Geçmişte ve Bugün, second edition, Nobel Tıp Kitabevleri, Istanbul, 251.
- [18] Klejdus, B., Vacek, J., Benešová, L., Kopecký, J., Lapčík, O., Kubáň, V., 2007. Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soypreparations and plant extracts. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 2277-2285.
- [19] Klejdus, B., Vacek, J., Lojkova, L., Benešová, L., Kubáň, V., 2008. Ultrahigh-pressure liquid chromatography of isoflavones and phenolic acids on different stationary phases. *J. Chromatog. A.* 1195, 52-59.
- [20] Daruházi, Á. E., Szarka, S., Héthelyi, É., Simándi, B., Gyurján, I., László, M., Lemberkovics, É., 2008. GC-MS identification and GC-FID quantitation of terpenoids in *Ononidis spinosae radix*. *Chromatographia.* 68, 71-76.
- [21] Benedec, D., Vlase, L., Oniga, I., Toiu, A., Tamas, M., Tipericiuc, B., 2012. Isoflavonoids from *Glycyrrhiza* sp. and *Ononis spinosa*. *Farmacina.* 60, 615-620.
- [22] Azani, N., Babineau, M., Bailey, C. D., Banks, H., Barbosa, A. R., Pinto, R. B., Zimmerman, E., 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon.* 1, 44-77.

- [23] Wojciechowski, M. F., Lavin, M., Sanderson, M. J., 2004. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *MATK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *Am. J. Bot.* 11, 1846-2004.
- [24] Wink, M., 2013. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). *South African Journal of Botany.* 89, 164-175.
- [25] Willis, J. C., 1973. *A dictionary of the flowering plants and ferns*, 8th Ed. Cambridge University Press.
- [26] Quezel, P., Santa, S., 1963. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, Vol. 1-2. CNRS, Paris, France.
- [27] Bellakhdar, J., 1997. *La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle*. Ibis Press, Paris, France.
- [28] Nawasreh, M., Abu Zarga, M., Sabri, S., Al-Khalil, S., Bomeister, E., Zeller, C-P., Atta-Ur-Rahman., 2004. A new anthranilic acid derivative from *Ononis natrix* of Jordanian origin. *Alex. J. Pharm. Sci.* 18, 165-170.
- [29] Talib, W. H., Mahasneh, A. M., 2010. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Sci. Pharm.* 78, 33-45.
- [30] Mamedov, N., Gardner, Z., Craker, L.E., 2005. Medicinal plants used in Russia and Central Asia for the treatment of selected skin conditions. *J. Herbs. Spices. Med. Plants.* 11, 191-222.
- [31] Al-Bakri, A.G., Afifi, F.U., 2007. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial numeration. *J. Microbiol. Meth.* 68, 19-25.
- [32] Saeed, A., 2003. Stereoselective synthesis of (3R)-3,4-dihydro-6,8-dimethoxy-3-undecyl-1H-[2] benzopyran-1-one and derivatives, metabolites from *Ononis natrix*. *Helv. Chim. Acta.* 86, 377-383.
- [33] Talib, W.H., Mahasneh, A.M., 2010. Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine. *Molecules.* 15, 1811-1824.
- [34] Altanlar, N., Saltan, Ç-G.G., Yilmaz, B.S., 2006. Antilisterial activity of some plants used in folk medicine. *Pharm. Biol.* 44, 91-94.
- [35] Yölmaz, B. S., Özbek, H., Çitoğlu, G. S., Uğraş, S., Bayram, İ., Erdoğan, E., 2006. Analgesic and hepatotoxic effects of *Ononis spinosa L.* *Phytotherapy Research: An*

- International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 20, 500-503.
- [36] El rhaffari, L., Zaid, A., 2002. Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Actes du 4^{ème} congrès Européen d’Ethnopharmacologie : origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes. 295-304.
- [37] Mhamdi, B., Abbassi, F., Abdelly, C., 2015. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal *Ononis natrix* growing wild in Tunisia. Nat. Prod. Res. 29, 1157-1160.
- [38] Sayari, N., Saidi, M. N., Sila, A., Bougatef, A., 2016. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxydant and antimicrobial activities of *Ononis natrix* leaves extracts. Free Radicals and Antioxidants. 6, 23-33.
- [39] Jaradat, N. A., Al-Masri, M., Zaid, A. N., Hussein, F., Al-Rimawi, F., Mokh, A. A., Ghonaim, S., 2017. Phytochemical, antimicrobial and antioxidant preliminary screening of a traditional Palestinian medicinal plant, *Ononis pubescens* L. Eur. J. Integr. Med. 14, 46-51.
- [40] Al-Snafi, A. E., 2020. The Traditional Uses, Constituents and Pharmacological Effects of *Ononis spinosa*. IOSR Journal Of Pharmacy. 10, 53-59.
- [41] Mezrag, A., Malafronte, N., Bouheroum, M., Travaglino, C., Russo, D., Milella, L., Dal Piaz, F., 2017. Phytochemical and antioxidant activity studies on *Ononis angustissima* L. aerial parts: isolation of two new flavonoids. Nat. Prod. Res. 31, 507-514.
- [42] Süntar, İ., Baldemir, A., Coşkun, M., Keleş, H., Akkol, E. K., 2011. Wound healing acceleration effect of endemic *Ononis* species growing in Turkey. J Ethnopharmacol. 135, 63-70.
- [43] Öz, B. E., İşcan, G. S., Akkol, E. K., Süntar, İ., Keleş, H., Acıkara, Ö. B., 2017. Wound healing and anti-inflammatory activity of some *Ononis* taxons. Biomed. Pharmacother. 91, 1096-1105.
- [44] Kuete, V., Wiench, B., Alsaid, M. S., Alyahya, M. A., Fankam, A. G., Shahat, A. A., Efferth, T. 2013. Cytotoxicity, mode of action and antibacterial activities of selected Saudi Arabian medicinal plants. BMC Complement. Altern. Med. 13, 354.

- [45] Ghribi, L., Nejma, A. B., Besbes, M., Harzalla-Skhiri, F., Flamini, G., Jannet, H. B., 2016. Chemical composition, cytotoxic and antibacterial activities of the essential oil from the Tunisian *Ononis angustissima* L. (Fabaceae). *J. Oleo. Sci.* 1-6.
- [46] Stojkovic, D., Drakulic, D., Gašić, U., Zengin, G., Stevanovic, M., Sokovic, M., 2020. *Ononis spinosa* L. an edible and medicinal plant: UHPLC-LTQ-Orbitrap/MS chemical profiling and biological activities of the herbal extract. *Food Func.* 11, 7138-7151.
- [47] Stojković, D., Dias, M. I., Drakulić, D., Barros, L., Stevanović, M., CFR Ferreira, I., D Soković, M., 2020. Methanolic Extract of the Herb *Ononis spinosa* L. Is an Antifungal Agent with no Cytotoxicity to Primary Human Cells. *Pharmaceuticals*, 13, 78.
- [48] Diaz, R. M., Quevedo-Samiento, J., Ramos-Cormenzana, A., Cabo, P., Cabo, J., 1989. Phytochemical and antibacterial screening of some species of Spanish Asteraceae. Part II. *Fitoterapia.* 60, 353-355.
- [49] Cañedo, L. M., Miguel del Corral, J. M., San Feliciano, A., 1997. 5-Alkylresorcinols from *Ononis natrix*. *Phytochem.* 44, 1559-1563.
- [50] Feliciano, A., Miguel Del Corral, J. M., Cañedo, L. M., Medarde, M., 1990. 3,4-Dihydroisocoumarins from *Ononis natrix*. *Phytochem.* 29, 945-948.
- [51] Barrero, A. F., Cabrera, E., Rodriguez Garcia, I., 1998. Pterocarpanes from *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*. *Phytochem.* 48, 187-190.
- [52] Barrero, A. F., Cabrera, E., Rodriguez, I., Fernandez-Gallego, E. M., 1994. Resorcinol derivatives and other components from *Ononis viscosa* subsp. *breviflora*. *Phytochem.* 36, 189-194.
- [53] Yousaf, M., Al-Rehaily, A. J., Ahmad, M. S., Mustafa, J., Al-Yahya, M. A., Al-Said, M. S., Khan, I. A., 2015. A 5-alkylresorcinol and three 3, 4-dihydroisocoumarins derived from *Ononis natrix*. *Phytochem. Lett.* 13, 1-5.
- [54] Barrero, A. F., Sanchez, J. F., Barron, A., Corrales, F., Rodriguez, I., 1989. Resorcinol derivatives and other components of *Ononis speciosa*. *Phytochem.* 28, 161-164.
- [55] Barrero, A. F., Sanchez, J. F., Barron, A., Rodriguez, I., 1989. Specionin and speciosides A and B: new aromatic lactones from *Ononis speciosa*. *J. Nat. Prod.* 52, 1334-1337.
- [56] Gampe, N., Darcsi, A., Kursinszki, L., Béni, S., 2018. Separation and characterization of homopipecolic acid isoflavonoid ester derivatives isolated from *Ononis spinosa* L. root. *J Chromatogr. B.* 1091, 21-28.

- [57] Shaker, K. H., Dockendorff, K., Bernhardt, M., Seifert, K., 2004. A new triterpenoid saponin from *Ononis spinosa* and two new flavonoid glycosides from *Ononis vaginalis*. Z. Naturforsch. 59b, 124-128.
- [58] Ghribi, L., Waffo-Téguo, P., Cluzet, S., Marchal, A., Marques, J., Mérillon, J. M., Jannet, H. B., 2015. Isolation and structure elucidation of bioactive compounds from the roots of the Tunisian *Ononis angustissima* L. Bioorg. Med. Chem. Lett. 25, 3825-3830.
- [59] Bouheroum, M., Zaiter, L., Benayache, S., Benayache, F., Bermejo, J. B., Leon, F., Garcia, V., 2009. Four flavonoids from the aerial part of *Ononis angustissima* species. Chem. Nat. Compd. 45, 874-875.
- [60] Mezrag, A., Bouheroum, M., Beghidja, N., Khalfaoui, A., Zaiter, L., Benayache, S., Benayache, F., 2013. More flavonoids from the ethyl acetate extract of *Ononis angustissima* species. Chem. Nat. Compd. 49, 749-750.
- [61] Amer, M. E., Kassem, F. F., Abdel-Kader, M. S., 2004. Rare 2-Phenoxychromones from *Ononis serrata* growing in Egypt. Nat. Prod. Sci. 10, 32-34.
- [62] Rowan, M. G., Dean, P. D. G., 1972. α -Onocerin and sterol content of twelve species of *Ononis*. Phytochem. 11, 3263-3265.
- [63] Wang, S.S., Zhang, X.J., Que, S., Tu, G.Z., Wan, D., Cheng, W., Liang, H., Ye, J., Zhang, Q.-Y., 2012. 3-hydroxy-3-methylglutaryl flavonol glycosides from *Oxytropis falcata*. J. Nat. Prod. 75, 1359-1364.
- [64] Bergot, B. J., Baker, F. C., Lee, E., Schooley, D.A., 1979. Absolute configuration of homomevalonate and 3-hydroxy-3-ethylglutaryl- and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA, produced by cell-free extracts of insect *Corpora allata*; cautionary note on prediction of absolute stereochemistry based on liquid chromatographic elution order of diastereomeric derivatives. J. Am. Chem. Soc. 101, 7432-7434.
- [65] Hattori, Y., Horikawa, K. H., Makabe, H., Hirai, N., Hirota, M., Kamo, T., 2007. A refined method for determining the absolute configuration of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl group. Tetrahedron: Asymmetry. 18, 1183-1186.
- [66] Lewis P, Kaltia S, Wähälä K., 1998. The phase transfer catalysed synthesis of isoflavone-O-glucosides. J. Chem. Soc. 1, 2481-2484.

- [67] Kırmızıgül, S., Gören, N., Yang, S. W., Cordell, G. A., Bozok-Johansson, C., 1997. Spinonin, a novel glycoside from *Ononis spinosa* subsp. *leiosperma*. J. Nat. Prod. 60, 378-381.
- [68] Kovalev, V. N., Borisov, M. I., Spiridonov, V. N., 1974. Phenolic compounds of *Ononis arvensis*. Int. Chem. Nat. Compd. 10, 820-821.
- [69] Komissarenko, A. N., Kovalev, V. N., Komissarenko, N. F., 1994. Isoflavonoids of the bark and leaves of *Maackia amurensis*. Chem. Nat. Compd. 30, 264-265.
- [70] Olennikov, D. N., Tankhaeva, L. M., Partilkhayev, V. V., 2013. Chemical Investigation of *Caragana arborescens* Shoots. Nat. Prod. Commun. 8, 1-2.
- [71] Niu, X., Li, Y-M., Hu, H., Liu, X., Qi, L., 2013. Chemical constituents from *Caragana tangutica*. Biochem Sys Ecol. 51, 288-290.
- [72] Bourezzane, S., Haba, H., Long, C., Benkhaled, M., 2018. Chemical composition and antioxidant activity of *Astragalus monspessulanus* L. growing in semiarid areas of Algeria. J Serb Chem Soc. 83, 31-38.
- [73] Wollenweber, E., Dörr, M., Rivera, D., Roitman, J. N., 2003. Externally accumulated flavonoids in three Mediterranean *Ononis* species. Z. Naturforsch. 58, 771-775.
- [74] Aluru Rammohan, A., Munikishore, R., Gunasekar, D., Deville, A., Bodo, B., 2015. A new di-C-prenylated coumarin from *Sophora interrupta*. Nat. Prod. Res. 29, 82-85.
- [75] Boukaabache, R., Boubekri, N., Boumaza, O., Mekkiou, R., Seghiri, R., Sarri, D., Zama, D., Benayache, F., Benayache, S., 2013. Phytochemical study of ethyl acetate extract and antioxidant activity of *Genista quadriflora* Munby (Fabaceae). Der. Pharmacia. Lettre. 5, 56-59.
- [76] Hou, M., Hu, W., Hao, K., Xiu, Z., 2020. Flavonoids and phenolic acids from the roots of *Sophora tonkinensis* Gagnep. Biochem. Syst. Ecol. 89, 104011.
- [77] Hanganu, D., Olah, N. K., Benedec, D., Mocan, A., Crisan, G., Vlase, L., Oniga, I., 2016. Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of *Genista tinctoria* L. and *Genistella sagittalis* L. Gams (Fabaceae). Pak. J. Pharm. Sci. 29.
- [78] Ionkova, I., 2009. Optimization of flavonoid production in cell cultures of *Astragalus missouriensis* Nutt. (Fabaceae). Pharmacognosy Magazine. 5, 92.

- [79] Pacheco, A. G. M., Branco, A., Câmara, C. A., Silva, T. M. S., Silva, T. M. G., de Oliveira, A. P., Mendonça, J. N., 2019. Identification of flavonoids in *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae) by HPLC-DAD-MS nanalysis. Nat. Prod. Res. 1-6.
- [80] Reynaud, J., Jay, M., Raynaud, J., 1982. Flavonoid glycosides of *lotus corniculatus* (Leguminosae). Phytochem. 21, 2604-2605.
- [81] Gohar, A., Gedara, S. R., Baraka, H. N., 2009. New acylated flavonol glycoside from *Ceratonia siliqua* L. seeds. J. Med. Plants. Res. 3, 424-428.
- [82] Ahmadu, A. A., Haruna, A. K., Garba, M., Sule, M., Pateh, U., Ebeshi, B., Sarker, S., 2004. Flavonoid glycosides from the leaves of *Daniellia oliveri*. Nig. J. Nat. Prod. And Med. 8, 67-68.
- [83] Tokés, A.L., Litkei, G., Gulácsi, K., Antus, S., Baitz-Gács, E., Szántay, C., Darkó, L.L., 1999. Absolute configuration and total synthesis of (-)-cabenegrin A-I. Tetrahedron. 55, 9283-9296.
- [84] Gampe, N., Darcsi, A., NagynéNedves, A., Boldizsár, I., Kursinszki, L., Béni, S., 2019. Phytochemical analysis of *Ononis arvensis* L. by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. J. Mass. Spectrom. 54, 121-133.
- [85] Öz, B. E., İşcan, G. S., Akkol, E. K., Süntar, İ., Acıkara, Ö., B. 2018. Isoflavonoids as wound healing agents from *Ononidis Radix*. Journal of Ethnopharmacology. 211, 384-393.
- [86] Tsunoda, Y., Okawa, M., Kinjo, J., Ikeda, T., Nohara, T., 2008. Studies on the constituents of *Gueldenstaedtia multiflora*. Chem. Pharm. Bull. 56, 1138-1142.
- [87] Tori, K., Yoshimura, Y., Seo, S., Sakurawi, K., Tomita, Y., Ishii, H., 1976. Carbon-13 NMR stereochemical dependence in spectra of sikogenins. Hydroxylation effects upon carbon-13 chemical shifts of oléanéne-type triterpénoïdes. Tetrahedron Letters. 46, 4163-4166.
- [88] Avunduk, S., Mitaine-offer, A. C., Caliskan, O. A., Miyamoto, T., Senol, S. G, Lacaille-Dubois, M. A., 2008. Triterpene Glycosides from the Roots of *Astragalus flavescens*. J. Nat. prod. 71, 141-145.
- [89] Rupasinghe, H. P., Jackson, C. J., Poysa, V., Di Berardo, C., Bewley, J. D., Jenkinson, J., 2003. Soyasapogenol A and B distribution in soybean (*Glycine max* L. Merr.) in

- relation to seed physiology, genetic variability, and growing location. *J. Agric. Food. Chem.* 51, 5888-5894.
- [90] Hirakawa, T., Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T., 2000. A New OleaneneGlucuronide Obtained from the Aerial Parts of *Melilotus officinalis*. *Chem. Pharm. Bull.* 48, 286-287.
- [91] Gulcema, D., Masullo, M., Napolitano, A., Karayıldırım, T., Bedir, E., Alankus, O., Caliskan, O., Piacente, S., 2013. Oleanane glycosides from *Astragalus tauricolus*: Isolation and structural elucidation based on a preliminary liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry profiling. *Phytochem.* 86, 184-194.
- [92] Benchadi, W., Haba, H., Lavaud, C., Harakat, D., Benkhaled, M., 2013. Secondary Metabolites of *Astragalus cruciatus* Link. and Their Chemotaxonomic Significance. *Rec. Nat. Prod.* 7, 105-113.
- [93] Golea, L., Haba, H., Lavaud, C., Long, C., Benkhaled, M., 2012. Chemical constituents from *Lotus pusillus* Medik. *Biochem. Syst. Ecol.* 45, 12-15.
- [94] Barrero, A. F., Herrador, M. M., Arteaga, P., Rodríguez-García, I., García-Moreno, M., 1997. Resorcinol derivatives and flavonoids of *Ononis natrix* subspecies *ramosissima*. *J. Nat. Prod.* 60, 65-68.
- [95] Wang, K. W., Zhang, T. T., Zhang, L., 2018. Chemical constituents and biological activities of *Grevillea robusta*. *Chem. Nat. Compd.* 54, 153-155.
- [96] Dias, M. M., Hamerski, L., Pinto, A., 2011. Separacao semipreparative de α e β -amyrina por cromatografia líquida de alta eficiencia. *Quimica. Nova.* 34, 704-706.
- [97] Daruhazi, A.E., Szarka, S., Hethelyi, E., Simandi, B., Gyurjan, I., Laszlo, M., Szoke, E., Lemberkovics, E., 2008. GC-MS identification and GC-FID quantitation of terpenoids in *Ononidis spinosae Radix*. *Chromatographia.* 68, 71-76.
- [98] Mouffok, S., Haba, H., Lavaud, C., Long, C., Benkhaled, M., 2012. Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. *Rec. Nat. Prod.* 6, 292-295.
- [99] Mikhova, B., Duddeck, H., Taskova, R., Mitova, M., Alipieva, K., 2004. Oxygenated bisabolane fucosides from *Carthamus lanatus* L. *Z Naturforsch C.* 59, 244-248.
- [100] Wiseman, H., Halliwell, B., 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 313, 17-29.

- [101] Favier, A., 2003. Le stress oxydant: Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *Actualité chimique*. (11/12), 108-117.
- [102] Halliwell, B., 1999. Antioxidant defence mechanisms : from the beginning to the end (of the beginning). *Free. Radic. Res.* 31, 261-272.
- [103] Goudable, J., Favier, A., 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nut. Clin. Metabol.* 11, 115-120.
- [104] Pisoschi, A. M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 55-74.
- [105] Sarkhel, S., 2015. Evaluation of the anti-inflammatory activities of *Quillaja saponaria*. *Toxicol. Rep.* 2, 1-3.
- [106] El Cadi, M. A., Makram, S., Ansar, M., Khabbal, Y., Alaoui, K., Faouzi, M. A., Taoufik, J., 2012. Activité anti-inflammatoire des extraits aqueux et éthanolique de *Zygophyllum gaetulum*. In. *Ann. Pharm. Fr.* 70, 113-116.
- [107] Henzen, C., 2003. Traitement aux glucocorticoïdes : risques et effets secondaires. *Forum médical suisse.* 19, 442-446.
- [108] Nicolas, J-F., Florence, C., Jean, T., 2001. Immunologie clinique et allergologie. Aspirine et AINS : intolérance et allergie. John Libbey Eurotext. 55-58.
- [109] Barnes, P.J., 1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Sci.* 94, 557-572.
- [110] Alghazeer, R., El-Saltani, H., Saleh, N., Al-Najjar, A., Habail, F., 2012. Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. *Nat. Sci.* 4, 324-335.
- [111] Thomas, L., 2013. Haemolysis as influence and interference factor. 13.
- [112] Lippi, G., AvanzinI, P., Pavesi, F., Bardi, M., Ippolito, L., Aloe, R., Favaloro, E.J., 2011. Studies on in vitro hemolysis and utility of corrective formulas for reporting results on hemolyzed specimens. *Biochemia. Medica.* 21, 297-305.
- [113] Bachy, E., Houot, R., Dony, A., 2015. Hématologie adulte et pédiatrique, *Onco Hématologie (Ellipses)*. 9, 44-46.

- [114] Chaudhuri, S., Banerjee, A., Basu, K., Sengupta, B., Sengupta, P.K., 2007. Interaction of flavonoids with red blood cell membrane lipids and proteins: antioxidant and antihemolytic effects. *Int. J. Biol. Macromol.* 41, 42-48.
- [115] Mladenka, P., Macakova, K., Filipický, T., Zatloukalova, L., Jahodar, L., Bovicelli, P., Saso L., 2011. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. *J. Inorg. Biochem.* 105, 693-701.
- [116] Mouffouk, C., Hambaba, L., Haba, H., Mouffouk, S., Bensouici, C., Hachemi, M., Khadraoui, H., 2018. Acute toxicity and *in vivo* anti-inflammatory effects and *in vitro* antioxidant and anti-arthritic potential of *Scabiosa stellata*. *Orient. Pharm. Exp. Med.* 18, 335-348.
- [117] Catalano, L., Franco I., De Nobili, M., Leita, L., 1999. Polyphenols in olive mill waste waters and their depuration plant effluents: comparaison of the Folin-Ciocalteau and HPLC methods. *Agrochimica.* 43, 193-205.
- [118] Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, M., Ribéreau-Gayon, P., Sudraud P., 1972. *Sciences et techniques du vin. Tome 1, analyse et controle des vins.* Ed. Dunod, Paris, 671.
- [119] Adaramola, B., Onigbinde, A., 2016. Effect of extraction solvent on the phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity of clove bud. *J. Pharm. Biol. Sci. IOSR.* 11, 33-8.
- [120] Alali, F. Q., Tawaha, K., El-Elimat, T., Syouf, M., El-Fayad, M., Abulaila, K., Oberlies, N. H., 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project. *Nat. Prod. Res.* 21, 1121-1131.
- [121] Baldemir, A., Köroğlu, A., Altanlar, N., Coşkun, M., 2018. A Comparative Study on the *in vitro* antioxidant and antimicrobial potentials of three endemic *Ononis* L. Species from Turkey. *Turk. J. Pharm. Sci.* 15, 125-129.
- [122] Orhan, D. D., Özçelik, B., Hoşbaş, S., Vural, M., 2012. Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, and antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi. *Turkish. J. Biol.* 36, 672-686.
- [123] Kocak, M. S., Sarikurkcu, C., Cengiz, M., Kocak, S., Uren, M. C., Tepe, B., 2016. *Salvia cadmica*: phenolic composition and biological activity. *Ind. Crops. Prod.* 85, 204-212.

- [124] Petti, S., Scully, C., 2009. Polyphenols, oral health and disease: a review. *J. Dent.* 37, 413-423.
- [125] Amič, D., Davidovič-Amič, D., Beslo, D., Trinajstić, N., 2003. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croat. Chem. Acta.* 76, 55-61.
- [126] Hazra, B., Biswas, S., Mandal, N., 2008. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complement. Altern. Med.* 8, 1-10.
- [127] Adnan, L., Osman, A., Abdul Hamid, A., 2011. Antioxidant activity of different extracts of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) seed. *Int. J. Food. Prop.* 14, 1171-1181.
- [128] Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K., 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J. Agr. Food. Chem.* 50, 3122-3128.
- [129] Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F., Chou, S. T., 2002. Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J. Agr. Chem.* 50, 2454-2458.
- [130] Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R., 2016. Flavonoids: an overview. *J. Nutr. Sci.* 5.
- [131] Pietta, P. G., 2000. Flavonoids as antioxidants. *J. Nutr. Sci.* 63, 1035-1042.
- [132] Sunmathi, D., Sivakumar, R., Ravikumar, K., 2016. In vitro anti-inflammatory and antiarthritic activity of ethanolic leaf extract of *Alternanthera sessilis* (L.) R. BR. ex DC and *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem.* 5, 109-115.
- [133] Robertson, T. B., 1918. *The physical chemistry of the proteins*. Longmans, Green and Company.
- [134] Vane, J. R., Botting, R. M., 1995. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *J. Inflamm. Res.* 44, 1-10.
- [135] Elisha, I. L., Dzoyem, J. P., Mc Gaw, L. J., Botha, F. S., Eloff, J. N., 2016. The antiarthritic, anti-inflammatory, antioxidant activity and relationships with total phenolics and total flavonoids of nine South African plants used traditionally to treat arthritis. *BMC Compl. Alternative. Med.* 16, 1-10.

- [136] Marrassini, C., Peralta, I., Anesini, C., 2018. Comparative study of the polyphenol content-related anti-inflammatory and antioxidant activities of two *Urera aurantiaca* specimens from different geographical areas. *Chin. Med.* 13, 1-12.
- [137] Asgary, S., Naderi, G.H., Askari, N., 2005. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Exp. Clin. Cardiol.* 10, 88-90.
- [138] Awe, E.O., Makinde, J.M., Adeloye, O.A., Banjoko, S.O., 2009. Membrane stabilizing activity of *Russelia equisetiformis* Schlecht and Chan. *J. Nat. Prod.* 2, 3-9.
- [139] Luo, D., Xie, J. Z., Zou, L. H., Qiu, L., Huang, D. P., Xie, Y. F., Wu, X. D., 2020. Lanostane-type triterpenoids from *Ganoderma applanatum* and their inhibitory activities on NO production in LPS-induced BV-2 cells. *Phytochem.* 177, 112453.
- [140] Yang, Y. P., Tasneem, S., Daniyal, M., Zhang, L., Jia, Y. Z., Jian, Y. Q., Wang, W., 2020. Lanostane tetracyclic triterpenoids as important sources for anti-inflammatory drug discovery. *World. J. Tradit. Chin. Med.* 6, 229.
- [141] Wu, Y. L., Han, F., Luan, S. S., Ai, R., Zhang, P., Li, H., Chen, L. X., 2019. Triterpenoids from *Ganoderma lucidum* and their potential anti-inflammatory effects. *J. Agric. Food. Chem.* 67, 5147-5158.
- [142] Kamo, T., Asanoma, M., Shibata, H., Hirota, M., 2003. Anti-inflammatory Lanostane-Type Triterpene Acids from *Piptoporus betulinus*. *J. Nat. Prod.* 66, 1104-1106.
- [143] Zhang, X. Q., Ip, F. C., Zhang, D. M., Chen, L. X., Zhang, W., Li, Y. L., Ye, W. C., 2011. Triterpenoids with neurotrophic activity from *Ganoderma lucidum*. *Nat. Prod. Res.* 25, 1607-1613.
- [144] Song, S., Zheng, X., Liu, W., Du, R., Bi, L., Zhang, P., 2010. 3-Hydroxymethylglutaryl flavonol glycosides from a Mongolian and Tibetan medicine, *Oxytropis racemosa*. *Chem. Pharm. Bull.* 58, 1587-1590.
- [145] Li, X., Zhu, L. J., Chen, J. P., Shi, C. Y., Niu, L. T., Zhang, X., Yao, X. S., 2019. C-Methylated flavanones from the rhizomes of *Matteuccia intermedia* and their α -glucosidase inhibitory activity. *Fitoterapia.* 136, 104147.
- [146] Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E., 1989. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. *Carcinogen.* 10, 1003-1008.

- [147] Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application of vitamin E analytical. *Biochem.* 269, 337-341.
- [148] Takao, T., Kitatani, F., Watanabe, N., Yagi, A., Sakata, K., 1994 A simple screening method for antioxidant and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 58, 1780-1783.
- [149] Shobana, S., Vidhya, R., 2016 .Evaluation of in vitro hemolytic activity of different parts of *abutilon indicum* (Linn.). *World. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5, 1182-1196.
- [150] Avaligbe, C. T., Gbenou, J. D., Kpoviessi, D. S., Accrombessi, G.C., Moudachirou, M., Gbeassor, M., 2012. Antihemolytic properties of extracts of six plants used in the traditional treatment of sickle cell disease in Benin. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2, 8.

Résumé

Ce présent travail de recherche a porté sur l'investigation phytochimique d'une plante nommée *Ononis mitissima* L., appartenant à la famille Fabaceae. Il a été consacré également à une évaluation biologique à travers les activités biologique, anti-oxydante, anti-hémolytique et anti-inflammatoire de ses extraits (éther de pétrole, acétate d'éthyle et *n*-butanol).

L'étude phytochimique réalisée sur les extraits AcOEt et *n*-BuOH a permis d'isoler et d'identifier 14 métabolites secondaires. Le processus de séparation de ces composés s'est basé sur les méthodes chromatographiques (VLC, CCM et CC) et l'élucidation structurale par les méthodes modernes d'analyse spectroscopiques (RMN multiimpulsionnelle, la spectrométrie de masse à haute résolution HR-ESI-MS, la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20}$ et par la comparaison avec les données de la littérature.

L'extrait AcOEt de l'espèce *Ononis mitissima* a fourni dix composés se répartissant en un isoflavonoïde, deux flavones, un ptérocarpane, un dérivé du résorcinol, deux phytostérols et trois triterpènes, dont un à squelette lanostane s'est avéré original.

A partir de l'extrait butanolique, 4 métabolites secondaires ont été identifiés. Il s'agit d'une saponine triterpénique à squelette oléanane, deux isoflavonoïdes glucosylés dont un à groupement 3-hydroxy-3-methylglutaryle nouveau et un flavonol 3-glycosilé.

La composition chimique de l'espèce étudiée est en parfait accord avec celle des plantes du genre *Ononis*. En effet, ce travail de recherche a montré encore une fois que les flavonoïdes sont les constituants majoritaires du genre.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Ononis mitissima*, obtenus par les méthodes de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium (AlCl₃), révèlent que l'extrait AcOEt est le plus riche en polyphénols totaux et flavonoïdes par rapport aux extraits EP et *n*-BuOH.

Les résultats de l'activité anti-oxydante par piégeage des radicaux DPPH, pouvoir réducteur de fer et capacité antioxydante totale par le phosphomolybdate ont montré que l'extrait AcOEt présente le plus grand pouvoir par rapport aux extraits EP et *n*-BuOH. L'extrait EP a révélé un pourcentage d'inhibition plus élevé (85,26%) que l'acide ascorbique en standard (62,36%) à la concentration de 100 µg/mL dans le test de piégeage du peroxyde d'hydrogène et une capacité antioxydante plus élevée (42,07 ± 0,25%) que le BHA (41,92 ± 0,44%) dans le dosage du thiocyanate ferrique.

Tous les extraits ont montré une activité anti-inflammatoire modérée avec des pourcentages d'inhibition respectifs de 21,96, 33,41 et 11,48 %, par rapport au diclofénac (86,72%), à la même concentration. L'activité anti-hémolytique la plus forte a été observée avec l'extrait AcOEt dans une IC₅₀ égale à 0,65 mg/ml.

Mots clés : *Ononis mitissima* L., Fabaceae, Acide triterpénique, Flavonoïdes, Activité anti-oxydante, Activité anti-hémolytique, Activité anti-inflammatoire, RMN

Abstract

This work is focused on the phytochemical investigation of a plant called *Ononis mitissima* L., belonging to the Fabaceae family. It also concerning of a biological evaluation through the biological activities, anti-oxidant, anti-hemolytic and anti-inflammatory of its extracts (petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol).

The phytochemical study carried out on EtOAc and *n*-BuOH extracts allowed the isolation and identification of 14 secondary metabolites. The separation process for these compounds was based on chromatographic methods (VLC, TLC and CC) and structural elucidation by modern methods of spectroscopic analysis (NMR, high resolution mass spectrometry HR-ESI MS, measurement of the optical rotation $[\alpha]_D^{20}$ and by comparison with data from the literature.

The EtOAc extract of the species *Ononis mitissima* provided ten compounds consisting of an isoflavon, two flavons, a pterocarpan, a resorcinol derivative, two phytosterols and three triterpenes, from which one new triterpene with lanostane skeleton.

From the butanol extract, 4 secondary metabolites have been identified. These compounds consisted of a triterpenic saponin with oleanane skeleton, two isoflavon glucosides, from which one new has a 3-hydroxy-3-methylglutaryl group and a flavonol 3-glycosid.

The chemical composition of studied species is in full agreement with the plants of the genus *Ononis*. Indeed, this research work has shown once again that flavonoids are the major constituents of this genus.

The results of total phenolic and flavonoid contents of the EtOAc and *n*-BuOH extracts from species *Ononis mitissima* obtained by the Folin-Ciocalteu and $AlCl_3$ methods revealed that EtOAc recorded the highest content of polyphenols and flavonoids compared to the PE and *n*-BuOH extracts.

The results of the antioxidant activity by DPPH radical scavenging activity, ferric reducing power and total antioxidant capacity by the phosphomolybdate showed that the EtOAc extract has the greatest power compared to the PE and *n*-BuOH extracts. The PE extract revealed a higher percentage of inhibition (85.26 %) than ascorbic acid as standard (62.36 %) at the concentration of 100 μ g/mL in hydrogen peroxide scavenging test and a higher antioxidant capacity (42.07 ± 0.25 %) in the ferric thiocyanate assay compared to the BHA (41.92 ± 0.44 %) as a reference.

All the tested extracts had moderate anti-inflammatory activity with the percentages of inhibition at 21.96, 33.41 and 11.48 % respectively, compared to diclofenac (86,72 %). The strongest anti-hemolytic activity was observed in EtOAc extract with a value of IC_{50} at 0.65 mg/mL.

Keywords: *Ononis mitissima* L., Triterpenoid acid, Flavonoids, Antioxidant activity, Anti-inflammatory activity, Anti-hemolytic activity, NMR

ملخص

ركز هذا البحث على الدراسة الفيتو كيميائية للنبذة *Ononis mitissima L.*، التي تنتمي إلى عائلة البقوليات. كذلك تمت الدراسة البيولوجية من خلال تقييم النشاط المضادة للأكسدة، التأثير المضاد للالتهاب و النشاط المضاد لانحلال الدم للمستخلصات العضوية (أثير البترول، الأستات الإيثيلي و البوتانول).

أدت الدراسة الفيتوكيميائية لمستخلصي الاستات الإيثيلي و البوتانول إلى عزل وتحديد 14 مركب طبيعي. استندت عملية فصل هذه المركبات إلى طرق كروماتوجرافية (CC و CCM و VLC). اعتمد التوضيح الهيكلي لهذه المركبات على الطرق الحديثة للتحليل الطيفي (مطيافية الرنين النووي المغناطيسي بجميع أنواعه، مطيافة الكتلة، حساب زاوية التدوير النوعي $[\alpha]_D^{20}$ والمقارنة مع الدراسات السابقة).

أعطى مستخلص الأستات الإيثيل لنبات *Ononis mitissima* 10 مركبات مقسمة إلى 1 إيزوفلافونويد، 2 فلافونون، 1 بتيروكاربان، 1 مشتق ريسورسينول، اثنين من فيتوستيرولات و ثلاث مركبات ثلاثية التربينات، أحدها مركب جديد ذو هيكل لانوستان.

انطلاقاً من مستخلص البوتانول، تم تحديد 4 مركبات. وهي عبارة عن صابونين ذو هيكل أوليانان، و اثنين من إيزوفلافونويدات غلوكوزيلاتية، أحدهما جديد يحتوي على مجموعة ميثيل جلوتاريل و فلافونول-3 جليكوزيلاتية.

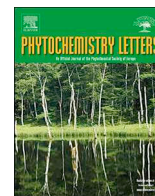
التركيب الكيميائي للنوع المدروس يتفق تماماً مع الدراسات السابقة لنباتات الجنس *Ononis* حيث أظهر هذا البحث مرة أخرى أن الفلافونويدات هي المكونات الرئيسية لهذا للجنس.

تكشف نتائج المحتوى الإجمالي لمتعددات الفينول و الفلافونويدات لمستخلصي الاستات الإيثيلي و البوتانول لنبات *Ononis mitissima* بواسطة طريقتي Ciocalteu-Folin و ثلاثي كلور الألمنيوم ($AlCl_3$) على التوالي أن مستخلص الاستات الإيثيلي هو الأغنى بالمواد البوليفينولية و الفلافونويدية مقارنة مع مستخلصي البوتانول و الأثير البترولي.

أظهرت نتائج النشاط المضاد للأكسدة عن طريق النشاط الازاحي للجذر الحر DPPH، القوة المضادة لأكسدة الحديد (FRAP) واجمالي القدرة المضادة للأكسدة عن طريق الفوسفومولبيدات (PPM)، أن مستخلص الاستات الإيثيلي يبدي أكبر قوة مقارنة مع مستخلصي البوتانول و الاثير البترولي. كما أظهر مستخلص الاثير البترولي نسبة تثبيط أعلى (85.26 %) من حمض الأسكوربيك كدواء مرجعي (62.36 %) بتركيز 100 ميكروغرام/مل في النشاط المضاد للأكسدة عن النشاط الازاحي لـ H_2O_2 وقدرة مضادة للأكسدة (42.07 ± 0.25 %) أعلى من BHA (41.92 %) ($0.44 \pm$ في معايرة ثيوسيانات الحديد).

أظهرت جميع المستخلصات نشاطاً معتدلاً مضاداً للالتهاب بنسب 21,96 %، 33.41 % و 11.48 % مقارنة بالديكلوفيناك (86.72 %) و بنفس التركيز. سجل مستخلص الاستات الإيثيلي أقوى نشاط مضاد لانحلال الدم بتركيز IC_{50} يقدر بـ 0.65 مغ/مل.

الكلمات المفتاحية: *Ononis mitissima L.*، Fabaceae، تربين ثلاثي، الفلافونويدات، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد لانحلال الدم، نشاط مضاد للالتهابات، مطيافية الرنين المغناطيسي



Chemical composition, antioxidant, antihemolytic and anti-inflammatory activities of *Ononis mitissima* L.

Saliha Besbas^a, Soumia Mouffouk^a, Hamada Haba^a, Laurence Marcourt^b, Jean-Luc Wolfender^b, Mohammed Benkhaled^{a,*}

^a Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (L.C.C.E), Département de Chimie, Faculté des Sciences de la Matière, Université de Batna-1, Batna 05000, Algeria

^b Institute of Pharmaceutical Sciences of Western Switzerland, CMU - Rue Michel-Servet 1, CH1211 Geneva, Switzerland

ARTICLE INFO

Keywords:

Ononis mitissima L.
Triterpenoid acid
Flavonoids
Antioxidant activity
Anti-inflammatory activity
Antihemolytic activity

ABSTRACT

A new trisnorlanostene-type triterpenoid 25,26,27-trisnor-3 α -hydroxy-lanost-7(8)-en-24-oic acid and a new isoflavone, formononetin-7-*O*-[6''-*O*-((*S*)-3-hydroxy-3-methylglutaryl)]- β -*D*-glucopyranoside, in addition to twelve known compounds, were isolated from the ethyl acetate and *n*-butanolic extracts of *Ononis mitissima* L. Their structures were elucidated by spectroscopic analysis, including 1D and 2D NMR, mass spectrometry and comparison with literature data. The total phenolic and flavonoid contents were estimated. Furthermore, the antihemolytic and anti-inflammatory activities of the crude extracts (petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol) were evaluated, as well as their antioxidant activity. The tested extracts displayed antioxidant activity on different methods including DPPH free radical scavenging activity, ferric reducing antioxidant power, ferric thiocyanate assay, hydrogen peroxide scavenging capacity and total antioxidant activity by phosphomolybdate assay. All extracts showed a moderate anti-inflammatory activity at the concentration of 500 μ g/mL. The strongest antihemolytic activity was observed with the EtOAc extract.

1. Introduction

The genus *Ononis* belongs to the Fabaceae family and represents about 75 species, widespread in the Mediterranean region, Canary Islands, Europe and Central Asia (Willis and Shaw, 1973). The *Ononis* species are used for their biological effects, such as antimicrobial effect (Mhamdi et al., 2015; Sayari et al., 2016; Jaradat et al., 2017), as antioxidants (Mhamdi et al., 2015; Sayari et al., 2016; Jaradat et al., 2017; Merzag et al., 2017), wound healing and anti-inflammatory activities (Süntar et al., 2011; Öz et al., 2017), anticancer activity (Kuetze et al., 2013; Ghribi et al., 2016), and as analgesics (Yölmaz et al., 2006). *Ononis mitissima* is an annual plant growing in the "Algerian Tell" (Quezel and Santa, 1963). The previous phytochemical studies revealed that *Ononis* species contain essentially flavonoid derivatives, phenolic acids, anthranilic acid and resorcinol derivatives, aromatic lactones and coumarins (Khouni et al., 2014; Al-Khalil et al., 1995; Klejduš et al., 2007, 2008; Benedec et al., 2012).

Our ongoing work on the chemical constituents of *Ononis* species growing in Algeria (Khouni et al., 2014), prompted us to investigate the EtOAc and *n*-BuOH extracts of *Ononis mitissima* L., which have never been studied. Hence, the present work describes the isolation and

structural elucidation of a new triterpenoid acid (1) and a new isoflavone glucoside (2) (Fig. 1), along with twelve known compounds. The known compounds were identified by comparison of their spectral data with those reported in the literature: 1,3-dihydroxy-5-undecylresorcinol (3) (Chakthong et al., 2010; Wang et al., 2018), formononetin (4) (Yahara et al., 1989), velutin (5) (Das et al., 1970), genkwanin (6) (Silva et al., 1971), α -amyrin (7) and β -amyrin (8) (Dias et al., 2011), 3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl stigmaterol (9) (Mouffok et al., 2012), daucosterol (10) (Mikhova et al., 2004), 3-*O*- β -*D*-glucopyranosyl-medicago (11) (Tsunoda et al., 2008) and ononin (12) (Lewis et al., 1998), azukisaponin V (13) (Gülcemal et al., 2013), quercitrin (14) (Gohar et al., 2009). Moreover, the antioxidant, anti-inflammatory and antihemolytic activities of the extracts were evaluated. Finally the total phenolic and flavonoid contents were measured.

2. Results and discussion

Compound 1 was obtained as a white powder. Its molecular formula was determined as C₂₇H₄₄O₃ by HRESIMS (*m/z* 415.3207 [M-H]⁻ calcd for C₂₇H₄₂O₃, 415.3206). The ¹H NMR spectrum of 1 (Table 1) displayed signals characteristics of a triterpene skeleton: five singlet

* Corresponding author.

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

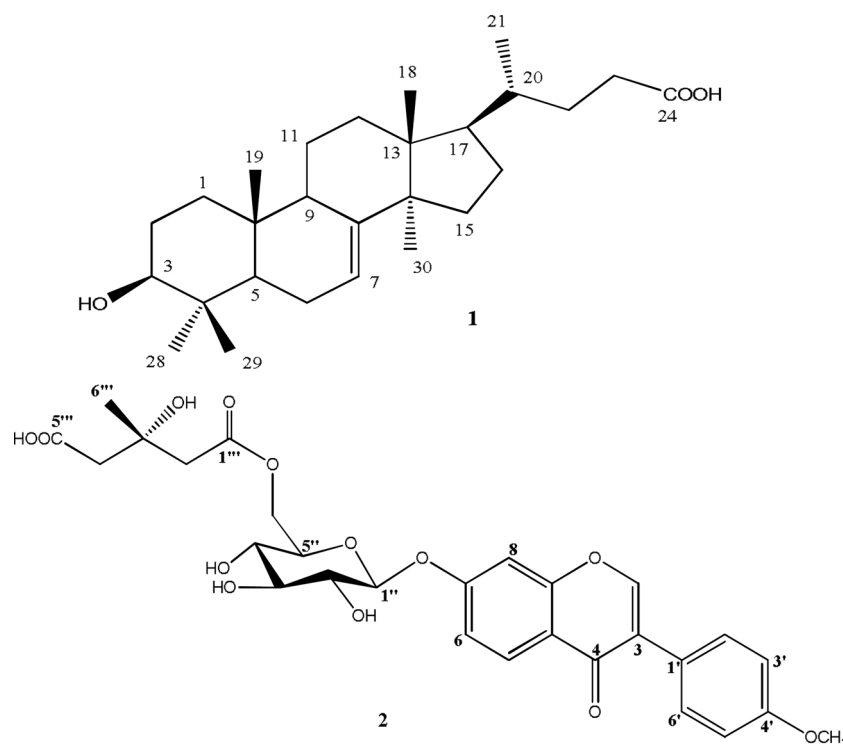


Fig. 1. Structures of new compounds 1-2.

methyl groups (δ_{H} 0.77, 0.69, 0.87, 0.75, 0.94) and one doublet methyl (δ_{H} 0.80, d, $J = 6.4$ Hz, CH₃-21), an oxygenated proton at δ_{H} 3.03 (dt, $J = 10.4, 5.0$ Hz, H-3), an olefinic proton at δ_{H} 5.22 (q, $J = 3.2$ Hz, H-7). The ¹³C NMR spectra showed the existence of 27 carbons consisting of six methyl groups, six methines including one oxymethine at δ_{C} 76.9, nine methylenes and six quaternary carbons including one carboxyl at δ_{C} 174.7 (Table 1). The structure of compound 1 (Fig. 1), confirmed by COSY, HSQC, HMBC and ROESY analysis was similar to that of 25,26,27-trisnor-3 α -hydroxy-lanost-9(11)-en-24-oic acid, previously isolated from the stem bark of *Pinus luchuensis* (Wada and Tanaka, 2000), except the position of the double bond. The HMBC correlations (Fig. 2) of the olefinic proton H-7 with C-5 (δ_{C} 50.1), C-6 (δ_{C} 23.6) and C-9 (δ_{C} 48.2), and the ¹H-¹H COSY correlations from H₂-6 (δ_{H} 2.06 and 1.89) to H-5 and H-7 suggested a 7(8) position of the double bond. The side chain linked to C-17 was identified, thanks to the COSY correlations between H₃-21 and H-20 (δ_{H} 1.36), H-20 and H₂-22 (δ_{H} 1.87 and 1.13), as well as between H₂-22 and H₂-23 (δ_{H} 2.25 and 2.10) and to the HMBC correlations between H₂-23 and the carboxyl carbon (δ_{C} 174.7), and between H₃-21 and C-17 (δ_{C} 52.5) (Fig. 2). The multiplicity of H-3 (dt, $J = 10.4, 5.1$ Hz) indicated its axial configuration. Furthermore, the ROESY correlations (Fig. 3) from H-3 to H-5 (δ_{H} 1.24), from H₃-28 to H-3 and H-5, from H-9 (δ_{H} 2.17) to H-5 and from H₃-30 to H₃-28 and H-17 indicated the α -orientation of these protons, and those from H₃-19 to H₃-18 and H₃-29, from H-20 to H₃-18 (Fig. 3) suggests a β -orientation of these protons. Therefore, compound 1 was identified as 25,26,27-trisnor-3 α -hydroxy-lanost-7(8)-en-24-oic acid.

Compound 2 was obtained as a white powder. The molecular formula was determined as C₂₈H₃₀O₁₃ by HRESIMS (m/z 573.1611 [M-H]⁻ calcd for C₂₈H₂₉O₁₃, 573.1603, m/z 1147.3290 [2M-H]⁻ calcd for C₅₆H₅₉O₂₆, 1147.3289). The ¹H NMR spectrum of 2 (Table 1) showed a singlet at δ_{H} 8.47 ascribable to the H-2 signal of isoflavone, a singlet at δ_{H} 3.79 (s) corresponding to a methoxy group, signals due to an aromatic A₂X₂ system at δ_{H} 7.00 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-3', 5') and 7.55 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, H-2', 6') indicating the presence of a *para* disubstituted ring, and signals due to the aromatic protons of an AMX system at δ_{H} 8.06 (1H, d, $J = 8.9$ Hz, H-5), 7.22 (1H, d, $J = 2.3$ Hz, H-8)

and 7.15 (1H, dd, $J = 8.9, 2.3$ Hz, H-6) attributed to A ring of the isoflavone. These spectral data together with COSY, HSQC and HMBC experiments allowed the identification of formononetin as aglycon moiety (Yahara et al., 1989). The linkage of the methoxy group to C-4' was confirmed by the HMBC correlation between the protons of the methoxy group and the quaternary carbon C-4' at δ_{C} 159.0 (Fig. 4). The presence of a sugar unit was evidenced by the presence of a signal of anomeric proton H-1'' at δ_{H} 5.14 (d, $J = 7.0$ Hz). The chemical shifts of all individual protons and carbons of the sugar unit were confirmed by COSY, HSQC and HMBC analyses (Table 1). Both chemical shifts values of protons and carbons and coupling constants indicated the presence of a β -D-glucopyranosyl moiety (Table 1). The site of linkage of the sugar moiety on the aglycon was established by the HMBC correlation between the anomeric proton signal H-1'' and the carbon resonance at δ_{C} 161.2 (C-7), indicating the presence of the sugar moiety at C-7. Additionally, the ¹H-NMR and HSQC spectra showed the presence of two methylenes [(δ_{H} 2.37 and 2.40 ($J = 13.8$ Hz); δ_{C} 46.8) and (δ_{H} 2.18 and 1.94 ($J = 16.0$ Hz); δ_{C} 47.2), CH₂-2''' and CH₂-4''', respectively] and a tertiary methyl group at δ_{H} 1.08 (CH₃-6'''). The HMBC correlations from H₂-2''' to C-1''' (δ_{C} 170.7), from H₂-4''' to C-5''' (δ_{C} 175.4) and from H₃-6''' to C-1''', C-2''' (δ_{C} 68.9) and C-4''' allowed to identify 3-hydroxy-3-methylglutaryl acid (HMG) (Wang et al., 2012). The linkage site of the HMG unit to C-6'' of glucose was deduced from the downfield shifts of protons H₂-6''' (δ_{H} 4.37 and 3.97) and confirmed by the HMBC correlations between these protons and C-1''' of the HMG unit. The absolute configuration of the chiral center (C-3''') of the HMG group was established as *S*, in accordance with the mevalonic biosynthetic pathway, in which naturally occurring HMG esters are formed via acylation of an OH group by (3*S*)-HMG-CoA (Bergot et al., 1979; Hattori et al., 2007). Hence, compound 2 was identified to be formononetin-7-*O*-[6''-*O*-((*S*)-3-hydroxy-3-methylglutaryl)]- β -D-glucopyranoside.

The total phenolic and flavonoid contents were carried out according to the calibration curves established for gallic acid and quercetin, respectively and the results are presented in Table 2. The highest phenolic and flavonoid contents were found in the ethyl acetate extract, followed by *n*-butanolic and petroleum ether extracts. Several studies

Table 1
 ^{13}C and ^1H NMR data of compounds **1** and **2** (in DMSO- d_6).

1			2		
	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}		δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1 β	1.56 (dt, 12.8, 3.4)	36.7	2	8.49 (d, 1.7)	153.9
1 α	1.07 (td, 12.8, 5.6)	-	3	-	123.3
2	1.48 (m)	27.5	4	-	174.7
3 α	3.03 (dt, 10.4, 5.0)	76.9	5	8.06 (d, 8.9)	127.0
4	-	38.5	6	7.15 (dd, 2.3, 8.9)	115.6
5 α	1.24 (m)	50.1	7	-	161.2
6 α	2.06 (brd, 18.4)	23.6	8	7.22 (d, 2.3)	103.5
6 β	1.89 (m)	-	9	-	156.9
7	5.22 (q, 3.2)	117.5	10	-	118.5
8	-	145.4	1'	-	124.1
9 α	2.17 (ddd, 13.7, 6.4, 3.1)	48.2	2'	7.55 (m)	130.1
10	-	34.4	3'	7.00 (m)	113.6
11	1.50 (m)	17.6	4'	-	159.0
12 β	1.77 (dd, 13.6, 9.5)	33.1	5'	7.00 (m)	113.1
12 α	1.61 (dt, 13.6, 9.5)	-	6'	7.55 (m)	130.1
13	-	43.1	1''	5.14 (d, 7.0)	99.8
14	-	50.8	2''	3.33	73.0
15	1.42 (m)	33.5	3''	3.34	76.2
16a	1.88 (m)	27.9	4''	3.23	69.7
16b	1.23 (m)	-	5''	3.71 (ddd, 2.1, 6.7, 9.0)	74.0
17	1.46 (m)	52.5	6''a	4.37 (dd, 2.1, 11.9)	62.9
18	0.77 (s)	21.6	6''b	3.97 (dd, 6.7, 11.9)	-
19	0.69 (s)	12.9	OMe-4'	3.79 (s)	55.1
20	1.36 (m)	35.0	1'''	-	170.7
21	0.80 (d, 6.4)	18.1	2'''	2.38 (dd, 2.3, 4.4)	46.8
22a	1.87 (m)	29.6	3'''	-	68.8
22b	1.13 (ddt, 13.4, 8.9, 5.0)	-	4'''a	2.17 (m)	47.2
23a	2.25 (ddd, 15.7, 8.9, 5.0)	31.2	4'''b	1.95 (m)	-
23b	2.10 (dt, 15.7, 8.1)	-	5'''	-	175.4
24	-	174.7	6'''	1.08 (s)	28.3
28	0.87 (s)	27.7	-	-	-
29	0.75 (s)	15.0	-	-	-
30	0.94 (s)	27.1	-	-	-
OH-3	4.35 (d, 5.0)	-	-	-	-
COOH	11.95	-	-	-	-

carried out on total phenolic and flavonoid contents from *Ononis* species showed variations in their levels. Indeed, the lowest content of phenols and flavonoids was observed in the species *Ononis natrix* and *O. spinosa* compared to our results (Alali et al., 2007). While, other species such as *O. angustissima* (Mezrag et al., 2017) and *O. macrosperma* (Baldemir et al., 2018) displayed a high content of phenols. Many

factors could affect the amount of phenolic and flavonoid content, including the period and area of plant material harvest, the extraction procedures and the effectiveness of extraction solvents. The use of medium-polar solvents to extract phenolic compounds and antioxidants is preferable to that of polar and apolar solvents (Adaramola and Onigbinde, 2016), which is in agreement with the results of our study.

The antioxidant activity of the crude extracts and the antioxidant standards (BHT, BHA and ascorbic acid) was evaluated spectrophotometrically by five different methods namely scavenging of the free radical DPPH, hydrogen peroxide scavenging capacity and ferric thiocyanate, ferric reducing antioxidant power and total antioxidant capacity. The results are summarized in Table 3. The results of DPPH radical scavenging activity showed that all the tested extracts possessed an antioxidant activity in a dose-dependent manner. The EtOAc extract exhibited a greater antioxidant capacity, closer to the BHT as standard. Moreover, the EtOAc extract displayed the highest antioxidant activity in ferric reducing antioxidant power and total antioxidant capacity with values of 122.23 ± 0.014 and 16.44 ± 0.0012 μg EAA/mg, respectively. In hydrogen peroxide scavenging test, the petroleum ether extract exhibited the highest percentage of inhibition (85 %), even higher than ascorbic acid as standard (62 %), at the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Both EtOAc and *n*-BuOH extracts indicated moderate antioxidant activity at the same concentration with value of 31 %. The crude extracts PE (42 ± 0.25 %) and *n*-BuOH (48 ± 0.67 %) had a higher antioxidant capacity in the ferric thiocyanate assay compared to the BHA (41 ± 0.44 %) as a reference. The potent antioxidant activity of EtOAc extract in most tests could be related to its richness in polyphenols and flavonoids. However, the antioxidant capacity of plant extracts is not restricted to the presence of polyphenols or flavonoids alone. This activity could be also due to the presence of other bioactive compounds such as volatile essential oils, carotenoids, vitamins and fatty acids which can react in nonpolar systems (Adnan et al., 2011; Adaramola and Onigbinde, 2016). These findings could explain the powerful antioxidant activity of PE extract observed in ferric thiocyanate and hydrogen peroxide assays.

The *in vitro* anti-inflammatory activity of the crude extracts and a reference drug (diclofenac sodium) was evaluated by egg albumin denaturation assay (Fig S4.9). The results indicated that all the tested extracts had moderate anti-inflammatory activity at the concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with the percentages of inhibition at 22, 33 and 11 % for PE, EtOAc and *n*-BuOH extracts, respectively, compared to diclofenac (86 %) at the same concentration. Protein denaturation was used to determine the change of proteins from a soluble form to an insoluble form, caused by a wide variety of chemical and physical agents: acids, bases, organic solvents, inorganic salts, dyes, and heat (Robertson,

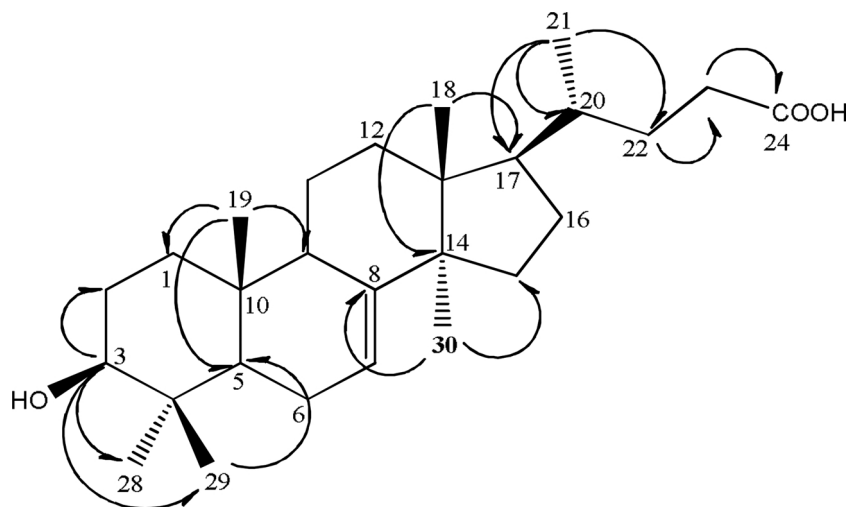


Fig. 2. HMBC correlations of compound **1** (arrows from H to C).

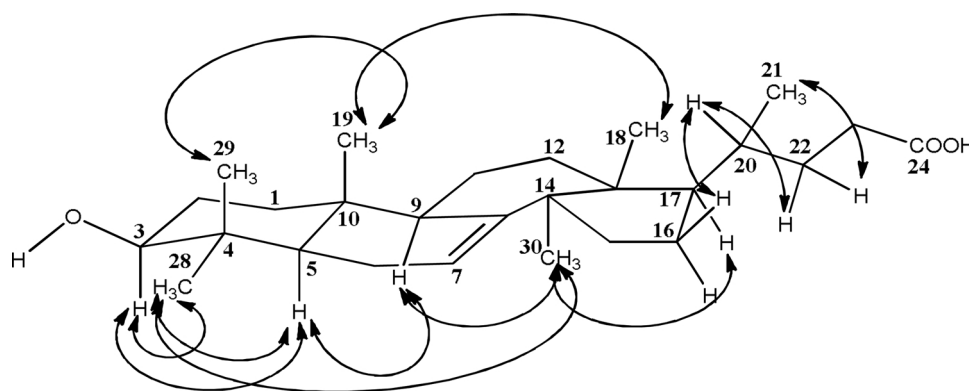


Fig. 3. ROESY correlations of compound 1.

1918). Many studies showed that protein denaturation was one of the causes of rheumatoid arthritis and the denaturation mechanism was probably related to the alteration of electrostatic, hydrophobic, hydrogen and disulfide bonds. Moreover, the prevention of protein denaturation may also help in preventing inflammatory diseases (Vane and Botting, 1995; Elisha et al., 2016). The anti-inflammatory activity of *Ononis mitissima* extracts may be due to the presence of bioactive compounds such as polyphenols and flavonoids (Marrassini et al., 2018; Elisha et al., 2016).

The antihemolytic activity of the extracts was evaluated by erythrocyte osmotic fragility test and the results were illustrated (Fig S4.11). In this work, all extracts exhibited an antihemolytic effect with a dose-dependent manner. The strongest antihemolytic activity was observed with EtOAc extract with a value of IC_{50} at 0.65 mg/mL, while both PE and *n*-BuOH extracts showed moderate antihemolytic properties with values of percentage of hemolysis inhibition of 19 and 38 %, at 0.8 mg/mL concentration. The antihemolytic activity is a good model for measuring the fragility of red blood cells (RBC) in the case of chronic or recurrent anemia. Therefore, agents that prevent hemolysis of blood cells are considered as important anti-anemia drugs. The observed activity of the EtOAc extract could be associated with the presence of high concentrations of polyphenols and flavonoids (Asgary et al., 2005). Indeed, many previous studies reported that the presence of polyphenols and flavonoids in crude extracts enhances the stability of the erythrocyte membrane and inhibits hemolysis (Awe et al., 2009).

3. Conclusions

This first phytochemical investigation of *Ononis mitissima* L. growing in Algeria, allowed the isolation and characterization of two new secondary metabolites: 25,26,27-trisnor-3 α -hydroxy-lanost-7(8)-en-24-oic acid (1) and formononetin-7-O-[6''-O-((S)-3-hydroxy-3-

Table 2

Total phenolic and flavonoid contents.

Extracts	Total phenolic content ^a (μ g GAE/ mg of plant extract)	Total flavonoids content ^b (μ g QE/ mg of plant extract)
PE	52.11 \pm 0.65	27.27 \pm 0.41
EtOAc	177.96 \pm 0.16	132.83 \pm 0.32
<i>n</i> -BuOH	157.10 \pm 0.24	117.95 \pm 0.61

^a Total phenolic content was expressed as μ g gallic acid equivalent/mg of plant extract.

^b Flavonoid content was expressed as μ g quercetin equivalent / mg of plant extract.

methylglutaryl)]- β -D-glucopyranoside (2), along with twelve known compounds 3–14. These results confirm the occurrence of flavonoids such as genkwanin, velutin, formononetin and ononin, in agreement with previous studies performed on *Ononis* species (Khouni et al., 2014; Öz et al., 2018; Yerlikaya et al., 2017). This is the first time that a lanostane triterpenoid and an isoflavonoid with a HMG group are reported in the *Ononis* species. The high antioxidant, antihemolytic and anti-inflammatory activities of EtOAc extract could be related to its greater phenolic and flavonoid contents. Furthermore, the both extracts PE and *n*-BuOH showed moderate antihemolytic and anti-inflammatory properties.

4. Experimental

4.1. General experimental procedures

The optical rotations were measured in methanolic solutions on a JASCO polarimeter in a 1 cm tube. The 1H and ^{13}C NMR spectroscopic data were recorded on a Bruker Avance Neo 600 MHz NMR

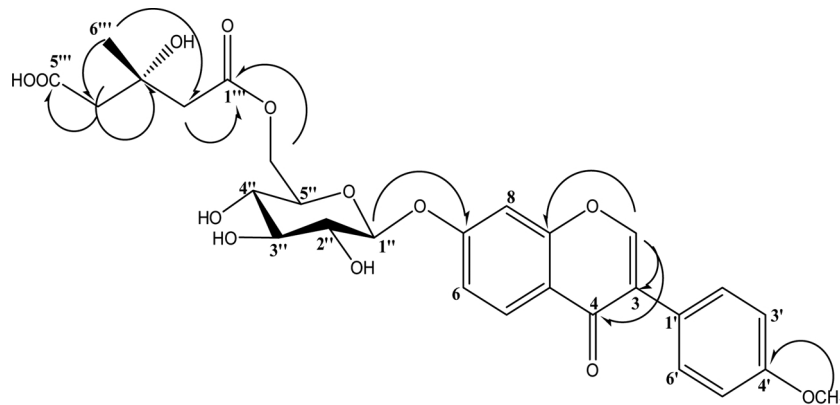


Fig. 4. HMBC correlations of compound 2 (arrows from H to C).

Table 3
Antioxidant power of extracts by DPPH, H₂O₂, FTC, FRAP, PPM tests.

	DPPH assay ^a	H ₂ O ₂ assay ^a	FTC assay ^a	FRAP assay ^a	PPM assay ^a
Extracts and standards	IC ₅₀ (µg/mL)	% of inhibition	% of inhibition	µg EAA/mg ex	µg EAA/mg ex
PE	181.9 ± 0.002	85.26 ± 0.66	42.07 ± 0.25	63.57 ± 0.001	11.84 ± 0.001
EtOAc	27.3 ± 0.015	31.18 ± 0.5	37.12 ± 0.44	122.23 ± 0.014	16.44 ± 0.0012
<i>n</i> -BuOH	38.3 ± 0.003	31.11 ± 0.35	48.62 ± 0.67	101.83 ± 0.003	14.95 ± 0.035
BHA ^b	6.82 ± 0.49	NT	41.92 ± 0.43	NT	NT
BHT ^b	22.32 ± 0.02	NT	87.31 ± 0.27	NT	NT
Ascorbic acid ^b	7.74 ± 0.19	62.36 ± 0.26	61.86 ± 0.73	NT	NT

^a Values expressed are means ± SD of three measurements ($p < 0.05$).

^b Reference compounds, NT : not tested. µg EAA/mg ex: µg of Ascorbic acid equivalents per mg of dried extract.

spectrometer equipped with a QCI 5 mm Cryoprobe and a SampleJet automated sample changer (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) at 600 and 150 MHz, respectively. Complete assignments were performed on the basis of 2D NMR experiments (COSY, HSQC, HMBC and ROESY). Chemical shifts are reported in parts per million (δ) using the residual DMSO-*d*₆ signal (δ _H 2.50; δ _C 39.5) as internal standard for ¹H and ¹³C NMR, respectively; coupling constants (*J*) are given in Hz. HRESIMS spectra were obtained on a Acquity UHPLC system (Waters, Milford, MA, USA) interfaced to a QExactive Plus mass spectrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany), using a heated electrospray ionization (HESI-II) source. Chromatographic separation was performed on a Waters BEH C18 column (50 × 2.1 mm, 1.7 µm), the mobile phase consisted of 0.1 % formic acid in water (A) and 0.1 % formic acid in acetonitrile (B), the flow rate was 600 µL/min, the injection volume was 1 µL, and the linear gradient elution initially increased from 5 to 100% B for 7 min, followed by isocratic conditions at 100 % B for 1 min, and then decreased to 5% B for the final step for 2 min. Column chromatography was carried out using Merck Kieselgel 60 (70–230 mesh), Merck Lobar Lichroprep RP-18 (40 µm × 63 µm) and Sephadex LH-20. Analytical TLC was carried out in silica gel plates (Merck Kieselgel 60 F_{254S}).

4.2. Plant material

The plant material (aerial parts) was collected in May 2017 in the Batna area (Algeria) and was identified by Pr Bachir Oudjehih from the Agronomic Department of the University of Batna 1, where a voucher specimen has been deposited (N° 610/LCCE).

4.3. Extraction and isolation

The aerial parts of *Ononis mitissima* (800 g) were extracted with EtOH–H₂O (70 %) for 48 h. After filtration, the filtrate was concentrated and dissolved in H₂O (500 mL). The suspension was extracted successively with light petroleum, ethyl acetate and *n*-butanol. The organic phases were dried with Na₂SO₄, filtered and evaporated to provide the following extracts: light petroleum (3.1 g), ethyl acetate (8.6 g) and *n*-butanol (12 g). The ethyl acetate extract (7 g) was submitted to vacuum liquid chromatography (VLC) on silica gel eluting with PE/EtOAc (100 :0 to 0 :100) and EtOAc/MeOH (100:0 to 0:100), to provide 8 major fractions (F1–F8). Chromatographic separation and purification using CC and precipitation of fractions F2 (130 mg), F3 (1048 mg), F4 (2324 mg) and F5 (1200 mg) allowed the isolation of ten compounds (1, 3–11). The *n*-butanol extract (7 g) was fractionated over VLC on silicagel RP-18 using a gradient of H₂O/MeOH (100:0 to 0:100) as eluent, to obtain 8 fractions (F1– F8). Chromatographic separation and purification using CC, precipitation and preparative TLC of fractions F2 (2000 mg), F3 (1600 mg), F4 (1000 mg) and F6–F7 (440 mg) afforded four compounds (2, 12–14).

4.3.1. 25,26,27-trisnor-3 α -hydroxy-lanost-7(8)-en-24-oic acid (1)

White powder; [α]_D : -21.50 (c 0.2, MeOH); ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) and ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) see Table 1; HR-ESI-MS *m/z* 415.3207 [M–H][–] (Calcd for C₂₇H₄₃O₃, 415.3206).

4.3.2. Formononetin-7-O-[6''-O-((S)-3-hydroxy-3-methylglutaryl)]- β -D-glucopyranoside (2)

White powder; [α]_D: -25.59 (c 0.2, MeOH); ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) and ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) see Table 1; HR-ESI-MS *m/z* 573.1611 [M–H][–] (Calcd for C₂₈H₂₉O₁₃, 573.1603) and 1147.3290 [2M–H][–] (Calcd for C₅₆H₅₉O₂₆, 1147.3289).

4.4. Total phenolic and flavonoid contents

The total phenolic and flavonoid contents of the crude extracts were estimated by the Folin-Ciocalteu and trichloroaluminum methods respectively (Mouffouk et al., 2018).

4.5. Antioxidant activities

The evaluation of antioxidant activity of the crude extracts (PE, EtOAc and *n*-BuOH) was performed using five different methods including DPPH free radical scavenging activity, ferric reducing antioxidant power, ferric thiocyanate assay, hydrogen peroxide scavenging capacity and total antioxidant activity by phosphomolybdate assay.

4.6. Anti-inflammatory activity

The anti-inflammatory activity was studied by the egg albumin denaturation method (Sunmathi et al., 2016).

4.7. Antihemolytic activity

The antihemolytic activity of *O. mitissima* extracts was carried out using the erythrocyte osmotic fragility model.

4.8. Statistical analysis

The results of antihemolytic, anti-inflammatory and antioxidant activities of different extracts (PE, EtOAc and *n*-BuOH) and standards (BHA, BHT and ascorbic acid) were given as the means ± S.D ($p < 0.05$) for three replicates for each sample. The IC₅₀ was employed for DPPH radical scavenging and antihemolytic activities, and the percentage of inhibition (%) was used to calculate ferric thiocyanate, hydrogen peroxide scavenging and anti-inflammatory assays. The results of total antioxidant capacity and ferric reducing antioxidant power were expressed as µg EAA/mg extract according to linear regression analysis.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors wish to express thanks to the DGRSDT of the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research for providing a research grant. The School of Pharmaceutical Sciences of the University of Geneva (Prof. J.-L. Wolfender) is thankful to the Swiss National Science Foundation for the support in the acquisition of the NMR 600 MHz (SNF R'Equip grant 316030_164095).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.04.002>.

Details on determination of the total phenolic and flavonoid contents, antioxidant, antihemolytic and anti-inflammatory activities, ^1H and ^{13}C NMR, HSQC, HMBC, ROESY and ESI-MS spectra for compounds **1** and **2** are given in the supplementary material.

References

- Adaramola, B., Onigbinde, A., 2016. Effect of extraction solvent on the phenolic content, flavonoid content and antioxidant capacity of clove bud. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 11 (3), 33–38. <https://doi.org/10.9790/3008-1103013338>.
- Adnan, L., Osman, A., Abdul Hamid, A., 2011. Antioxidant activity of different extracts of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) seed. *Int. J. Food. Prod.* 14 (6), 1171–1181. <https://doi.org/10.1080/10942911003592787>.
- Alali, F.Q., Tawaha, K., El-Elimat, T., Syouf, M., El-Fayad, M., Abulaila, K., Oberlies, N.H., 2007. Antioxidant activity and total phenolic content of aqueous and methanolic extracts of Jordanian plants: an ICBG project. *Nat. Prod. Res.* 21 (12), 1121–1131. <https://doi.org/10.1080/14786410701590285>.
- Al-Khalil, S., Masalmeh, A., Abdalla, S., Tosa, H., Iinuma, M., 1995. N-arachidylanthranilic acid, a new derivative from *Ononis natrix*. *J. Nat. Prod.* 58 (5), 760–763. <https://doi.org/10.1021/np50119a018>.
- Asgary, S., Naderi, G.H., Askari, N., 2005. Protective effect of flavonoids against red blood cell hemolysis by free radicals. *Exp. Clin. Cardiol.* 10 (2), 88–90.
- Awe, E.O., Makinde, J.M., Adeloje, O.A., Banjoko, S.O., 2009. Membrane stabilizing activity of *Russelia equisetiformis* Schlecht & Cham. *J. Nat. Prod.* 2, 3–9.
- Baldemir, A., Köroğlu, A., Altanlar, N., Coşkun, M., 2018. A comparative study on the *in vitro* antioxidant and antimicrobial potentials of three endemic *Ononis* L. species from Turkey. *Turk. J. Pharm. Sci.* 15 (2), 125–129. <https://doi.org/10.4274/tjps.62533>.
- Benedec, D., Vlase, L., Oniga, I., Toiu, A., Tamas, M., Tiperciuc, B., 2012. Isoflavonoids from *Glycyrrhiza* sp. and *Ononis spinosa*. *Farmacia*. 60 (5), 615–620.
- Bergot, B.J., Baker, F.C., Lee, E., Schooley, D.A., 1979. Absolute configuration of homomevalonate and 3-hydroxy-3-ethylglutaryl- and 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA, produced by cell-free extracts of insect *corpora allata*; cautionary note on prediction of absolute stereochemistry based on liquid chromatographic elution order of diastereomeric derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 101 (24), 7432–7434. <https://doi.org/10.1021/ja00518a064>.
- Chakthong, S., Chiraphan, C., Jundee, C., Chaowalit, P., Voravuthikunchai, S.P., 2010. Alkyl phenols from the wood of *Averrhoa carambola*. *Chin. Chem. Lett.* 21 (9), 1094–1096. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2010.03.031>.
- Das, K.C., Farmer, W.J., Weinstein, B., 1970. Phytochemical studies. IX. A new flavone, velutin. *J. Org. Chem.* 35 (11), 3989–3990. <https://doi.org/10.1021/jo00836a101>.
- Dias, M.M., Hamerski, L., Pinto, A., 2011. Separacao semipreparativa de α e β -amyrina por cromatografia líquida de alta eficiencia. *Quimica Nova*. 34 (4), 704–706.
- Elisha, I.L., Dzoyem, J.P., Mc Gaw, L.J., Botha, F.S., Eloff, J.N., 2016. The anti-arthritis, anti-inflammatory, antioxidant activity and relationships with total phenolics and total flavonoids of nine South African plants used traditionally to treat arthritis. *BMC Compl. Altern. Med.* 16 (307), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1301-z>.
- Ghribi, L., Nejma, A.B., Besbas, M., Harzalla-Skhir, F., Flamini, G., Jannet, H.B., 2016. Chemical composition, cytotoxic and antibacterial activities of the essential oil from the Tunisian *Ononis angustissima* L. (Fabaceae). *J. Oleo Sci.* 1–7.
- Gohar, A., Gedara, S.R., Baraka, H.N., 2009. New acylated flavonol glycoside from *Ceratonia siliqua* L. seeds. *J. Med. Plant. Res.* 3, 424–428.
- Gülçemal, D., Masullo, M., Napolitano, A., Karayıldırım, T., Bedir, E., Alankuş-Çalışkan, Ö., Piacente, S., 2013. Oleanane glycosides from *Astragalus tauricolus*: isolation and structural elucidation based on a preliminary liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry profiling. *Phytochemistry* 86, 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.10.001>.
- Hattori, Y., Horikawa, K.H., Makabe, H., Hirai, N., Hirota, M., Kamo, T., 2007. A refined method for determining the absolute configuration of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl group. *Tetrahedron Asymmetry*. 18 (10), 1183–1186. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2007.05.013>.
- Jaradat, N.A., Al-Masri, M., Zaid, A.N., Hussein, F., Al-Rimawi, F., Mokh, A.A., Ghonaim, S., 2017. Phytochemical, antimicrobial and antioxidant preliminary screening of a traditional Palestinian medicinal plant, *Ononis pubescens* L. *Eur. J. Integr. Med.* 14, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2017.08.012>.
- Khouni, L., Long, C., Haba, H., Molinier, N., Benkhaled, M., 2014. Anthranilic acid derivatives and other components from *Ononis pusilla*. *Nat. Prod. Com.* 9 (8), 1159–1162. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900825>.
- Klejduš, B., Vacek, J., Benešová, L., Kopecký, J., Lapčík, O., Kubáň, V., 2007. Rapid-resolution HPLC with spectrometric detection for the determination and identification of isoflavones in soy preparations and plant extracts. *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (7–8), 2277–2285. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1606-3>.
- Klejduš, B., Vacek, J., Lojkořa, L., Benešová, L., Kubáň, V., 2008. Ultrahigh-pressure liquid chromatography of isoflavones and phenolic acids on different stationary phases. *J. Chromatogr. A*. 1195, 52–59. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.069>.
- Kuete, V., Wiench, B., Alsaid, M.S., Alyahya, M.A., Fankam, A.G., Shahat, A.A., Efferth, T., 2013. Cytotoxicity, mode of action and antibacterial activities of selected Saudi Arabian medicinal plants. *BMC Compl. Altern. Med.* 13 (354), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-354>.
- Lewis, P., Kalia, S., Wähälä, K., 1998. The phase transfer catalysed synthesis of isoflavone-O-glucosides. *J. Chem. Soc.* 1 (16), 2481–2484. <https://doi.org/10.1039/A804406F>.
- Marrasini, C., Peralta, I., Anesini, C., 2018. Comparative study of the polyphenol content-related anti-inflammatory and antioxidant activities of two *Urea aurantiaca* specimens from different geographical areas. *Chin. Med.* 13 (1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0181-1>.
- Mezrag, A., Malafrente, N., Bouheroum, M., Travaglino, C., Russo, D., Milella, L., Dal Piaz, F., 2017. Phytochemical and antioxidant activity studies on *Ononis angustissima* L. aerial parts: isolation of two new flavonoids. *Nat. Prod. Res.* 31 (5), 507–514. <https://doi.org/10.1080/14786419.2016.1195381>.
- Mhamdi, B., Abbassi, F., Abdelly, C., 2015. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal *Ononis natrix* growing wild in Tunisia. *Nat. Prod. Res.* 29 (12), 1157–1160. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.981188>.
- Mikhova, B., Duddeck, H., Taskova, R., Mitova, M., Alipieva, K., 2004. Oxygenated bisabolane fucosides from *Carthamus lanatus* L. *Z. Naturforsch. C* 59 (3–4), 244–248. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-3-422>.
- Mouffok, S., Haba, H., Lavaud, C., Long, C., Benkhaled, M., 2012. Chemical constituents of *Centaurea omphalotricha* Coss. & Durieu ex Batt. & Trab. *Rec. Nat. Prod.* 6 (3), 292–295.
- Mouffok, S., Hambaba, L., Haba, H., Mouffok, S., Bensouici, C., Hachemi, M., Khadraoui, H., 2018. Acute toxicity and *in vivo* anti-inflammatory effects and *in vitro* antioxidant and anti-arthritis potential of *Scabiosa stellata*. *Orient. Pharm. Exp. Med.* 18 (4), 335–348.
- Öz, B.E., Işcan, G.S., Akkol, E.K., Süntar, İ., Keleş, H., Acikara, Ö.B., 2017. Wound healing and anti-inflammatory activity of some *Ononis* taxons. *Biomed. Pharmacother.* 91, 1096–1105. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.040>.
- Öz, B.E., Işcan, G.S., Akkol, E.K., Süntar, İ., Acikara, Ö.B., 2018. Isoflavonoids as wound healing agents from *Ononidis* Radix. *J. Ethnopharmacol.* 211, 384–393. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.029>.
- Quezel, P., Santa, S., 1963. *Nouvelle Flore De L'Algérie Et Des Régions Désertiques Méridionales* 1 CNRS, Paris.
- Robertson, T.B., 1918. *The Physical Chemistry of the Proteins*. Longmans. Green and Company.
- Sayari, N., Saidi, M.N., Sila, A., Bougatef, A., 2016. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitor, antioxidant and antimicrobial activities of *Ononis natrix* leaves extracts. *Free Radicals and Antioxidants*. 6 (1), 23–33. <https://doi.org/10.5530/fra.2016.1.3>.
- Silva, M., Mundaca, J.M., Sammes, P.G., 1971. Flavonoid and triterpene constituents of *Baccharis rhomboidalis*. *Phytochemistry*. 10, 1942–1943.
- Sunmathi, D., Sivakumar, R., Ravikumar, K., 2016. *In vitro* anti-inflammatory and anti-arthritis activity of ethanolic leaf extract of *Alternanthera sessilis* (L.) R.Br. ex DC and *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. *Int. J. Adv. Pharm., Biol. Chem.* 5, 109–115.
- Süntar, İ., Baldemir, A., Coşkun, M., Keleş, H., Akkol, E.K., 2011. Wound healing acceleration effect of endemic *Ononis* species growing in Turkey. *J. Ethnopharmacol.* 135 (1), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.02.023>.
- Tsunoda, Y., Okawa, M., Kinjo, J., Ikeda, T., Nohara, T., 2008. Studies on the constituents of *Gueldenstaedtia multiflora*. *Chem. Pharm. Bull.* 56 (8), 1138–1142. <https://doi.org/10.1248/cpb.56.1138>.
- Vane, J.R., Botting, R.M., 1995. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *J. Inflamm. Res.* 44 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF01630479>.
- Wada, S.I., Tanaka, R., 2000. Four new trisnorlanostene-type triterpenoids from the stem bark of *Pinus luchuensis*. *J. Nat. Prod.* 63 (8), 1055–1057. <https://doi.org/10.1021/np000155k>.
- Wang, S.S., Zhang, X.J., Que, S., Tu, G.Z., Wan, D., Cheng, W., Liang, H., Ye, J., Zhang, Q.Y., 2012. 3-hydroxy-3-methylglutaryl flavonol glycosides from *Oxytropis falcata*. *J. Nat. Prod.* 75 (7), 1359–1364. <https://doi.org/10.1021/np300292f>.
- Wang, K.W., Zhang, T.T., Zhang, L., 2018. Chemical constituents and biological activities of *Grevillea robusta*. *Chem. Nat. Compd.* 54 (1), 153–155. <https://doi.org/10.1007/>

- s10600-018-2279-1.
- Willis, J.C., Shaw, H.K.A., 1973. A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns. CUP Archive.
- Yahara, S., Ogata, T., Saijo, R., Konishi, R., Yamahara, J., Miyahara, K., Nohara, T., 1989. Isoflavan and related compounds from *Dalbergia odorifera*. Chem. Pharm. Bull. 37, 979–987. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.979>.
- Yerlikaya, S., Zengin, G., Mollica, A., Baloglu, M.C., Celik Altunoglu, Y., Aktumsek, A., 2017. A multidirectional perspective for novel functional products: *in vitro* pharmacological activities and *in silico* studies on *Ononis natrix* subsp. *hispanica*. Front. Pharmacol. 8, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00600>.
- Yölmaz, B.S., Özbek, H., Çitoğlu, G.S., Uğraş, S., Bayram, İ., Erdoğan, E., 2006. Analgesic and hepatotoxic effects of *Ononis spinosa* L. Phytother. Res. 20 (6), 500–503. <https://doi.org/10.1002/ptr.1891>.