

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
Et de la Recherche Scientifique
UNIVERSITÉ CONSTANTINE 1



FACULTÉ DES SCIENCES
De la Nature et de la Vie
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE Et ÉCOLOGIE
Option BIOTECHNOLOGIE VÉGÉTALE
Laboratoire D'obtention des Substances
Thérapeutiques (L.O.S.T.)

N° d'ordre:.....

N° de Série:.....

Thèse en cotutelle pour l'obtention du grade de:

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE CONSTANTINE 1/

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE

République française
UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE



UFR des Sciences de Santé
(Secteur pharmacie)



ÉCOLE DOCTORALE
PRES | Bourgogne | Franche-Comté
Environnements - Santé

ÉCOLE DOCTORALE ES
EA 4267 FDE/UFC
Option PHARMACOGNOSIE
Laboratoire de Pharmacognosie

**ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DE SAPONOSIDES
EXTRAITS DE DEUX PLANTES MÉDICINALES
Cyclamen africanum, Zygophyllum cornutum
ET ÉVALUATION DE LEUR ACTIVITÉ ANTI-INFLAMMATOIRE**

Présenté et soutenu publiquement le : 13 Octobre 2014

par Mme BETINA-BENCHARIF Soumeya

JURY

Président	Pr. Douadi KHELIFI Université Constantine 1, Algérie
Directrice de Thèse	Pr. Zahia KABOUCHE Université Constantine 1, Algérie
Directrice de Thèse	Pr. Marie Aleth LACAILLE-DUBOIS Université de Bourgogne, France
Rapporteur	Pr. Mesbah.LAHOUEL Université de Jijel, Algérie
Rapporteur	Pr. Élisabeth SEGUIN Université de Rouen, France
Examineur	Pr. Anne.-Claire MITAINE-OFFER Université de Bourgogne, France

Année 2014-2015

A mon Père, l'homme d'exception, mon guide
spirituel
A ma mère, ma force et ma source de valeurs
A Mon mari mon équilibre, qu'il retrouve dans ce
travail toute ma gratitude
A mes enfants, ma joie de vivre

A mon frère et ma sœur, mon cocon utérin
A mon neveu et mes nièces
A ma belle-mère pour son aide et sa patience
tous les membres de ma famille et de ma belle famille
A Hayat qu'elle trouve ici ma reconnaissance totale et absolue
A Douda , notre grand-mère

A la mémoire de
Mes grands Parents
M. BETINA AHCENE et M^{me} ATHMENE LELOUCHA,
M.SERRA CHERIF et M^{me} DJEDAB AICHA,
Et au Grand monsieur BENZAADA ABDELHAK

Remerciements

Cette thèse a été réalisée sous la direction de Madame le Professeur KABOUCHE Zahia directrice du Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques de L'Université Constantine 1 Algérie et la direction de madame le Professeur Marie-Aleth LACAILLE-DUBOIS, EA 4267 à L'Université de Bourgogne.

À Madame le Professeur KABOUCHE Zahia, Professeur de phytochimie, Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Constantine 1, ma directrice de thèse qui m'a accueillie dans son laboratoire, a initié ce travail et pour la confiance qu'elle m'a témoigné tout au long de cette thèse.

À Madame Marie-Aleth LACAILLE-DUBOIS, Professeur de Pharmacognosie, ma directrice de thèse qui m'a accueilli dans son Laboratoire, m'a confié ce travail et l'a dirigé avec Compétence, rigueur, efficacité, j'exprime mes sincères remerciements.

À Madame le Professeur Anne-Claire MITAINE-OFFER, Professeur de Pharmacognosie, UMIB, EA 3660, Faculté de Pharmacie, Université de Bourgogne, pour sa gentillesse et son humilité je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

À Madame le Professeur Élisabeth SEGUIN, Laboratoire de Pharmacognosie, UMR 6014-COBRA, IRCOF, UFR de Médecine-Pharmacie, Université de Rouen, qui a accepté de juger ce travail en tant que rapporteur et membre du Jury, qui nous a fait l'honneur de venir en Algérie, à Constantine.

À Monsieur le Professeur KHELIFI Douadi, Professeur de biochimie génétique, Faculté des Sciences, Université de Constantine 1, qui a toujours cru en mes capacités et qui a eu l'amabilité d'accepté d'être le président du Jury, je vous exprime ma profonde reconnaissance.

À Monsieur Le Pr. LAHOUEL Mesbah, professeur en pharmacologie et toxicologie à l'Université de JIJEL, pour avoir accepté de faire partie du Jury de cette thèse et pour son aide précieuse et sans lequel la partie biologique n'aurait pas pu être réalisée, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail, je le remercie pour être un model d'enseignement et une référence dans la recherche scientifique, puissiez vous retrouvez dans cette thèse ma reconnaissance et ma sincère gratitude .

J'adresse mes sincères remerciements et ma profonde gratitude à madame BENGUEDOUAR Lamia, Docteur en pharmacologie et toxicologie à l'Université de JIJEL pour sa générosité et son aide malgré ses occupations et ses responsabilités.

Au Docteur HAMANE Douadi, docteur en biologie clinique et directeur du laboratoire d'Analyses médicales "IBN SINA", Constantine, pour sa qualité de travail et son immense générosité, je vous exprime ma totale reconnaissance.

Mes remerciement vont au Professeur DJEKKOUNE Abdelhamid, Recteur de l'Université de Constantine 1, Algérie, pour ses conseils et et son soutien moral et matériels pendant la préparation.

J'adresse également de vifs remerciements à tous les collaborateurs appartenant à l'Unité ou externe qui ont Contribué à la réalisation de cette thèse, notamment:

MR. KABOUCHE KAMEL pour avoir récolté Zygophyllum cornutum de Ghardaïa et Cyclamen africanum de Constantine malgré les difficultés de l'endroit glissant et périlleux.

AU Dr. BERREHAL nedjwa, DR. TOUAFEK ouassila qui ont la gentillesse de m'aider dans le bon déroulement des travaux réalisés .

J'adresse également de vifs remerciements à tous les collaborateurs de l'Unité qui ont Contribué à la réalisation de cette thèse, notamment Dr. Tomofumi Miyamoto et Dr. Thomas Pour l'acquisition des spectres des composés de ma thèse.

Je tiens à remercier Dr. Nicolas DESBOIS, Maître de conférences, Membre de la commission recherche de l'UFR Pharmacie, Université de Bourgogne.

Je remercie également tous mes collègues de l'équipe dijonnaise : Gaoussou, Mahenina, JENS Sandrine et David, spéciale dédicace pour Stephanie pour sa bonne humeur, sa disponibilité et ses précieux conseils.

A Rym -Tinhinane Maougal, celle qui a su trouver les mots pour me motiver dans les moments les plus difficiles, à Maya KECHID pour son aide précieuse, à Sara BECHKRI, à Yousria MAGHRAOUI, à Meriem BENAMARA, , Hania BENMEBAREK, Sandra KASSEM, Nadjat MISSI, Wahiba HAMDI à toute l'équipe du magister 2001.

Enfin le meilleur pour la fin à mon père, celui qui m'a légué le seul héritage intarissable : la droiture, le gout de l'excellence, l'ambition, et le don du meilleur de soit, tu es le père rêvé et espéré de tout enfant, puisses tu retrouver dans ce travail les enseignements que tu m'as donné;

A Maman, ma force et ma dignité, celle qui m'a transmis le gène dominant du courage, de la volonté inébranlable, l'infatigable, à ma boule d'énergie.

A mon chère mari Slimane, ma moitié, l'Homme de valeur, mon mentor, mon soutien et mon équilibre

J'exprime ma gratitude à ma belle mère Maya pour sa générosité, sa gentillesse et sa disponibilité,

A ma sœur Sabrina ma siamoise ma première maitresse la meilleure, à Sofia e Léna Camélia ses princesses de filles, à Icham son mari pour ses précieux conseil et ses encouragements.

A Mon frère Fouad, à son fils Adem, Yasmine sa femme et ses deux adorables filles Maria et Danya.

A mon Oncle Mahmoud BETINA, l'homme avant-gardiste et visionnaire.

A mes exceptionnelles tantes, Rabia, Saida, Razika, Nadra, Ratiba, Malika, Dalila

A Lamia ma belle sœur, à son mari Moncef, à Nayla leur magnifique fille.

RÉSUMÉ

L'apparition de plusieurs maladies, telles que le cancer, le diabète, l'hypertension artérielle et la propagation d'infections de type virus mutagènes peuvent être liées à la qualité et au mode de vie que nous menons aujourd'hui. En effet, plusieurs études sur les facteurs déclenchant ces maladies dites "morbides" à long ou à court terme, sont liées au stress et à la qualité des aliments consommés, qu'ils soient d'origine végétale ou animale. Ces maladies deviennent un phénomène courant, elles touchent différentes races et toutes les catégories de la société. D'après les recherches ethnobotaniques, les substances d'origine naturelle, ont permis à des civilisations de survivre à des maladies mortelles. A titre d'exemple, on retrouve ainsi des références à des périodes de fièvre paludique en Chine et à des symptômes de cette maladie dans le «Huangdi Neijiang» Le Canon de Médecine datant des environs du premier siècle avant notre ère, plus de 2000 ans, qui relate de l'emploi de plantes médicinales, pour soulager les fièvres (Desgrouas et al., 2014).

Vers 186 avant J.-C. apparaît, dans certaines régions de Chine, l'utilisation en tisane, du Qing hao su, appelé plus tard artémisinine en Occident et extrait d'une plante médicinale utilisée comme antipyrétique appelée "Qing hao", *Artemisia annua* ou Armoise annuelle. L'artémisinine bloque une enzyme qui permet au parasite de pomper le calcium et l'empêche ainsi de se développer. Au jour d'aujourd'hui l'Artemisinin-based combination therapy, en français Thérapie combinée à base d'artémisinine et en sigle ACT, est une thérapie et une prévention tertiaire dans les cas de paludisme simple.

Dans cette optique notre étude vient s'ajouter à une longue série d'études menées sur les plantes médicinales et les substances naturelles extraites. Elle a pour objectif de révéler de nouvelles biomolécules, de mettre en évidence leurs activités biologiques grâce à des techniques de biotechnologies d'une part. D'autre part ces investigations permettront de valoriser les ressources naturelles qui se distinguent par leur endémicité.

Pour se faire, notre choix s'est porté sur deux plantes médicinales endémiques à l'Algérie *Cyclamen africanum* Boiss. & Reuter et *Zygophyllum cornutum* Coss., après une recherche ethnobotanique sur la pharmacopée traditionnelle du Nord de l'Afrique, et qui a révélé l'efficacité de ces plantes dans les problèmes inflammatoires minimes chez les autochtones, nous avons entrepris des investigations pharmaco- biochimiques.

Ces dernières nous ont permis d'isoler : cinq composés à partir de l'extrait méthanolique des racines de l'espèce *Cyclamen africanum* Boiss. & Reuter, deux nouvelles saponines triterpéniques de type Oleanane, Afrocyclamin A et B (1, 2), ainsi que trois saponines triterpénoïdes connus sous le nom de lysikokianoside (3), degluco-cyclamin I (4) et de son dérivé d'acide dicrotalique (5); et Sept saponosides connus à partir de l'extrait méthanolique de la plante entière de *Zygophyllum cornutum* Coss., ces saponosides sont de type ursane, ce type de triterpène est rapporté dans cette espèce pour la première fois et peuvent être considérés comme un marqueur chimio-taxonomique (chemotype) du genre *Zygophyllum*. Les structures ont été élucidées, sur la base de l'analyse des spectres de l'expérience RMN-1D et RMN- 2D (COSY, TOCSY, NOESY, HMBC et HSQC) et spectrométrie de masse en source FAB mode ion négatif. Des activités biologiques, des fractions saponosidiques Fr.1 et Fr.2, ont été testées sur des lignées de Rats mâles et femelles, de la race Winstar pour évaluer l'activité anti inflammatoire. La fraction saponosidique Fr.1 de *Cyclamen africanum* à la dose 5 mg, a montré un effet significatif sur l'inflammation causé par la carragénine, en réduisant l'œdème et la réponse immunitaire, qui s'est traduite par la concentration des protéines de la réponse inflammatoire (PRI) à travers leurs action sur les pro-médiateurs de l'inflammation (COX-2, PGE2, TNF - α , iNOS). La fraction saponosidique Fr.2 de *Zygophyllum* à la dose 20 mg n'a pas montré un effet significatif sur l'inflammation en général.

Mots clés : *Cyclamen africanum*, *Zygophyllum cornutum*, Activité anti inflammatoire, Saponines triterpéniques, RMN 1D et 2D, spectrométrie de masse, protéines réponse inflammatoire (PRI), anti-inflammatoires (AINS), médiateurs pro-inflammatoire (COX-2, PGE2, TNF - α , iNOS).

ABSTRACT

The appearance of several diseases, such as cancer, diabetes, high blood pressure and spread of infections mutagenic virus type can be linked to the quality and lifestyle that we lead today. Indeed, several studies on the factors triggering these so-called "morbid" long-or short-term illnesses are related to stress and quality of food consumed, whether of plant and animal origin. These diseases are becoming a common occurrence, they affect different races and all classes of society. According ethnobotanical research, naturally occurring substances, allowed civilizations to survive deadly diseases. For example, we thus find references to periods of malarial fever in China and one of the symptoms of this disease in the "Huangdi Neijiang" The Canon of Medicine dating from around the first century BC, more than 2000 years, which relates to the use of herbal medicines to relieve fevers (Desgrouas et al., 2014).

Around 186 BC appears, in some parts of China, the use in herbal tea, Qing hao su, later known as artemisinin in the West and extracted from a medicinal plant used as antipyretic called "Qing hao" *Artemisia annua* or annual wormwood. Artemisinin blocks an enzyme which enables the parasite to pump calcium and prevents it from developing. As of today the Artemisinin-based combination therapy in French Combination therapy of artemisinin and ACT acronym, is a therapy and tertiary prevention in cases of uncomplicated malaria.

From this perspective our study adds to a long series of studies on medicinal plants and natural substances extracted. It aims to reveal new biomolecules, highlighting their biological activities through techniques of biotechnology on the one hand. Moreover, these investigations will develop natural resources that are characterized by endemic.

To do this, our choice is focused on two endemic medicinal plants in Algeria *Cyclamen africanum* Boiss. & Reuter and *Zygophyllum cornutum* Coss. After an ethnobotanical research on traditional medicine in Northern Africa, which showed the effectiveness of these plants in minimal inflammatory problems among Aboriginal, we undertook biochemical pharmacological investigations.

The latter allowed us to isolate, five compounds from the methanol extract of the roots of the species *Cyclamen africanum* Boiss. Reuter & two new oleanane triterpene saponins type, Afrocyclamin A and B (1, 2) and three triterpenoid saponins known lysikokianoside of (3), degluco-cyclamin I (4) and its derivative dicrotalique acid (5) September and known from the methanol extract saponins from the whole plant of *Zygophyllum cornutum* Coss. these saponins are ursane type, type triterpenes are reported in this species for the first time and can be considered a chemotherapy marker Taxonomic (chemotype) of *Zygophyllum* kind. The structures were elucidated on the basis of the analysis of NMR spectra of the experience-1D and 2D-NMR (COSY, TOCSY, NOESY, HSQC and HMBC) and mass spectrometry method negative ion FAB source. The biological activities of saponosidiques FR.1 and Fr.2 fractions were tested on lines of male and female rats of the Winstar rats to evaluate the anti-inflammatory activity. The saponosidique fraction FR.1 *Cyclamen africanum* the 5 mg dose, showed a significant effect on inflammation caused by carrageenan, reducing edema and immune response, which resulted in the concentration of protein the inflammatory response (PRI) through their action on the pro-inflammatory mediators (COX-2, PGE₂, TNF - α , iNOS). The fraction of Fr.2 saponosidique *Zygophyllum* dose 20 mg did not show a significant effect on inflammation in general.

Key words : *Cyclamen africanum*, *Zygophyllum cornutum*, anti inflammatory activity, saponins triterpene, 1D and 2D NMR, mass spectrometry, protein inflammatory response (PRI), anti-inflammatory drugs (NSAIDs), pro-inflammatory mediators (COX-2, PGE₂, TNF - α , iNOS).

Publications

1/-Two New Triterpene Saponins from *Cyclamen africanum* Boiss. & Reuter Soumeya Bencharif-Betina^{1,3}, Tomofumi Miyamoto², Chiaki Tanaka², Zahia Kabouche³, Anne-Claire Mitaine-Offer¹, Marie Aleth Lacaille-Dubois^{1,*} Article first published online: 13 SEP 2012 DOI: 10.1002/hlca.201200041, Helvetica Chimica Acta , Volume 95, Issue 9, pages 1573-1580, September 2012.

2/- "Isolation an Ursene -Type saponins from *Zygophyllum cornutum*"

Bencharif-Betina S^{a, c}, Miyamoto T^b, Tanaka C^b, Kabouche Z^c, Mitaine-Offer A-C^a, and Lacaille-Dubois M-A^a. *2012. Natural Product Communications. January 17th 2013 vol 8.No.573-574.

*Poster

1/- 8th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA,PSE & SIF , 28th July-1August 2012 , NewYork City, USA *Planta medica*

TWO NEW TRITERPENE SAPONINS FROM *CYCLAMEN AFRICANUM*

Soumeya Bencharif-Betina^{1,3}, Tomofumi Miyamoto², Chiaki Tanaka², Zahia Kabouche³, Anne-Claire Mitaine-Offer¹, and Marie-Aleth Lacaille-Dubois¹. ¹EA 4267 (FDE/ UFC), Laboratoire de Pharmacognosie, Université de Bourgogne, Dijon, France, ²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8582, Japan, ³Laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques, L.O.S.T., Faculté des Sciences, Université de Constantine, Algérie.

*Communication

1-/ 1^{ier} congrès International de la Société Algérienne de Nutrition 05-06 décembre 2012, Oran Sheraton Hotel & Towers

Two New Triterpene Saponins from *Cyclamen africanum*

Bencharif-Betina S^{1, 3}, Miyamoto T², Tanaka C², Kabouche Z³, Mitaine-Offer A-C¹, and Marie -Aleth Lacaille-Dubois¹. *Nutrition & Santé*,2012,Vol.01,N°00, 1-110.

Acronymes et abréviations

[α]_D	Pouvoir rotatoire à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589,3 nm)
δ	Déplacement chimique (<i>RMN</i>)
¹D	Monodimensionnel
²D	Bidimensionnel
¹³C	Carbone 13
¹H	Proton
APG	Angiosperm Phylogeny Group
1, 2, 3,...	Désignation des composés natifs purifiés dans cette étude
Ara	Arabinose
CC	Chromatographie sur Colonne ouverte (<i>Column Chromatography</i>)
CCM	Chromatographie sur Colonne Mince
COSY	<i>CO</i> rrelation <i>S</i> pectroscopY(<i>RMN</i>)
D	Doublet (<i>RMN</i>)
Dd	Double Doublet (<i>RMN</i>)
DEPT	<i>Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer</i> (<i>RMN</i>)
DMS-<i>d</i>6	DiMéthylSulfOxyde hexaDeutérié (<i>RMN</i>)
EI	Ionisation par impact électronique (<i>Electron Impact ionization, MS</i>)
ESI	Ionisation par électrospray (<i>ElectroSpray Ionization, MS</i>)
EtOH	Ethanol
Glc	Glucose
H₂O	Eau
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Coherence</i> (<i>RMN</i>)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> (<i>RMN</i>)
HR	Haute Résolution (<i>High Resolution, MS</i>)
Hz	Hertz
J	Constante de couplage (<i>RMN</i>)
LC	Chromatographie liquide (<i>Liquid Chromatography</i> , terme générique)
m	Multiplet (<i>RMN</i>)
Qui	Quinovose
MeOH	Méthanol
MPLC	Chromatographie liquide à moyenne pression (<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i>)
MS	Spectrométrie de masse (<i>Mass Spectrometry</i>)
m/z	Rapport entre la masse et le nombre de charges élémentaires d'ions (<i>MS</i>)
n.d	Non déterminé
RMN	Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (<i>Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy</i>)
NOE	Effet nucléaire Overhauser
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
Ppm	Unité de (Parties Par Million, <i>Parts per Million</i> = 10 ⁻⁶ , <i>RMN</i>)
RP	Phase inverse (<i>Reversed Phase</i> , phases stationnaires en chromatographie)
s	Singulet (<i>RMN</i>)
s l	Singulet large
sp.	Espèce botanique non précisée
Si	Silice

t	Triplet (<i>RMN</i>)
Ac-Dicro	Acide Dicrotalique
TOCSY	Spectroscopie de corrélation totale
VLC	Chromatographie liquide sous vide
Xyl	Xylose
CRP	C -Protein -Reactiv
Fib	Fibrinogène
Hp	Haptoglobine
PRI	Protéine de la Réaction Inflammatoire
AINS	Anti-Inflammatoire Non-Stéroïdien
COX	Cyclo-oxygénase (1 et 2)
PGE	Prostaglandine E
IL6	Inter-Leukine 6
IL 1	Inter-Leukine 1
LPS	LipoPolySaccharide
TNF (α-β)	Tumor necrosis factor(alpha-béta)

SOMMAIRE

-Remerciements.....	I
-Résumé.....	II
-Abstract.....	III
- Liste des publications.....	IV
*Participation aux congrès.....	IV
*Publications.....	IV
-Liste des abréviations.....	V

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	01
-----------------------------------	-----------

PARTIE I: REVUES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I : BOTANIQUE

I. 1.Présentation de l'espèce <i>Cyclamen africanum</i> (Boisson & Reuter)	05
I.1.1. Famille de <i>Primulaceae</i>	05
I.1.2. Présentation du Genre <i>Cyclamen</i>	05
I.1.3.Classification botanique du genre <i>Cyclamen</i>	06
I.1.4.Répartition géographique.....	06
I.1.5.Espèce <i>Cyclamen africanum</i> (Boisson & Reuter)	08
I.1.5.1.Description botanique.....	08
I.1.5.2.Classification et systématique.....	09
I.2.Présentation de l'espèce <i>Zygophyllum cornutum</i> (Cosson).....	10
I.2.1.Famille des <i>Zygophyllaceae</i>	10
I.2.2.Classification du genre <i>Zygophyllum</i>	10
I.2.3.Répartition géographique.....	10
I.2.4.Présentation de l'espèce <i>Zygophyllum cornutum</i> (Cosson)	11
I.2.4.1.Description botanique.....	12
I.2.4.2.Classification botanique.....	12
I.2.5. Utilisation ethnopharmacologique du genre <i>Zygophyllum</i>	12

CHAPITRE II : PHYTOCHIMIE

* Introduction.....	14
II.1. Généralités sur les biomolécules.....	14
II.1.1.Métabolites secondaires végétaux.....	14
II.1.2.Hétérosides.....	15
II.2. Généralités sur les saponosides.....	16
II.2.1.Définition.....	16
II.2.2.Classification des saponosides.....	17
II.2.2.1.Saponosides stéroïdiques.....	17
II.2.2.2. Saponosides triterpéniques.....	18
II.2.3.Biosynthèse de saponosides à partir de l'oxydosqualène.....	19
II.2.4.Distribution des saponosides dans le règne végétal.....	23
II.2.5. Méthodes de phytochimie extractive et structurale des saponosides	26
II.2.5.1.Extraction.....	26

II.2.5.2.Purification.....	27
II.2.5.3. Détermination structurale des saponosides.....	27
II.2.5.3.1. Méthodes chimiques.....	28
*Hydrolyse acide et analyse par chromatographie à phase gazeuse (GC)	28
II.2.5.3.2. Méthodes spectroscopiques.....	28
II.2.5.3.2.1.spectrométrie de masse.....	28
II.2.5.3.2.2.Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	30
*.Spectroscopie de RMN monodimensionnelle (1H et 13C)	32
*.Résonance Magnétique Nucléaire bidimensionnelle homonucléaire	33
*.Résonance Magnétique Nucléaire bidimensionnelle hétéronucléaire.....	35
II.3. Travaux phytochimiques antérieurs sur les saponosides des genres <i>Cyclamen</i>.....	37
et <i>Zygophyllum</i>	37
III.1.Genre <i>Cyclamen</i>	37
III.2.Genre <i>Zygophyllum</i>	41

CHAPITRE III : PHARMACOLOGIE

III.1. Réaction inflammatoire	50
III.1.1.Définition	50
III.1.1.1.Première phase.....	50
III.1.1.2.Deuxième phase	50
III.1.1.3.Troisième phase.....	50
III.1.1.4.Quatrième phase.....	50
III.2. Cellules de l'inflammation.....	51
III.2.1. Polynucléaires neutrophiles (PNN)	51
III.2.2 . Les monocytes et macrophages.....	51
III.2.3 .Les cellules endothéliales.....	52
III.2.4. Autres cellules.....	53
III.3 .Médiateurs de l'inflammation.....	53
III.3.1.Systemes d'activation plasmatique.....	54
III.3.1.1. Le système contact.....	54
III.3.1.2. Les systèmes coagulation-fibrinoformation et fibrinolyse.....	54
III.3.1.3.Le système du complément.....	55
III.4. Médiateurs cellulaires.....	55
III.4.1.Les radicaux libres.....	55
III.4.2.Les Eicosanoïdes.....	55
III.4.3.Les cytokines.....	57
III.5. Marqueurs biologiques de la réaction inflammatoire.....	59
III.5.1. Protéine-C-réactive (CRP).	60
III.5.2.Dosage du Fibrinogène (Fib) ou Facteur I.....	60
III.5.3.Dosage de l'Haptoglobine (Hp)	60
III.5.4. L'électrophorèse des protéines sériques.....	61
III.6.Clasement des Protéines de la Réaction Inflammatoire (PRI) selon leur cinétique...	62
III.6.1. Les PRI à amplitude de variation élevée.....	64
III.6.2. Les PRI à amplitude de variation modérée.....	64
III.6.3. Les PRI à amplitude de variation faible.....	64
III.4.Interpretationdes variations des protéines de la réaction inflammatoire(PRI).....	64
V.1. Les anti-inflammatoires.....	65

V.1.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens.....	66
V.1.2. Les anti-leucotriènes.....	66
V.1.3. Les inhibiteurs des cytokines pro-inflammatoires.....	66
V.2. Activité anti-inflammatoire des saponosides.....	67

PARTIE II: TRAVAUX PERSONNELS PHYTOCHIMIQUES

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

I.1. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES SAPONOSIDES A PARTIR DE L'ESPECE

Cyclamen africanum Boisson ET Reuter

I.1.1 Matériel végétal.....	70
I.1.2. Méthodes.....	70
I.1.2.1.Extraction des métabolites secondaires	70
I.1.2.2.Fractionnement et séparation des métabolites secondaires	71
I.1.2.3.Isolement et purification des saponosides de <i>Cyclamen africanum</i>	72

I.2.ISOLEMENT ET PURIFICATION DE SAPONOSIDES A PARTIR DE L'ESPECE

Zygophyllum cornutum Cosson

I.2.1 Matériel végétal.....	74
I.2.2. Méthodes.....	74
I.2.2.1.Extraction des métabolites secondaires.....	74
I.2.2.2.Fractionnement et séparation des métabolites secondaires.....	74
I.2.2.3.Isolement et purification des saponosides de <i>Zygophyllum cornutum</i>	75

CHAPITRE II: RESULTATS et DISCUSSION

II.1. ELUCIDATION STRUCTURALE DES SAPONOSIDES A PARTIR DE L'ESPECE *Cyclamen africanum* Boisson ET Reuter.....

II.1.1.Détermination structurale du composé 1.....	76
II.1.1.1.Spectrométrie de masse	76
II.1.1.2. Spectrométrie de RMN.....	78
II.1.1.2.1. Partie génine.....	78
II.1.1.2.2. Partie osidique.....	85
II.1.1.2.2.1.Détermination du nombre et de la nature des sucres.....	86
II.1.1.2.2.2.Détermination de l'enchaînement des sucres et leur fixation sur l'aglycone..	88
*.structure du composé 1	91
II.1.2.Détermination structurale du composé 2.....	91
II.1.2.1.Spectrométrie de masse	91
II.1.2.2. Spectrométrie de RMN.....	92
II.1.2.2.1. Partie génine.....	92
II.1.2.2.2. Partie osidique.....	98
II.1.2.2.2.1. Détermination de l'enchaînement osidique et de l'unité acide et leur fixation sur l'aglycone.....	98
*.structure du composé 2	101
II.1.3.Identification des composé 3, 4, 5.....	101
II.1.3.1.Identification du composé 3.....	101

II.1.3.1.1.Spectrométrie de masse	101
II.1.3. 1.2.Spectrométrie de RMN.....	102
II.1.3.1.2.1. Partie génine.....	102
II.1.3.1.2.1.Partie osidique.....	109
*.Détermination du nombre et de la nature des sucres.....	109
*.Identification du composé 3.....	110
II.1.3.2. Identification du composé 4.....	110
II.1.3.2.1.Spectrométrie de masse	110
II.1.3.2.2. Spectrométrie de RMN.....	111
II.1.3.2.2.1. Partie génine.....	111
II.1.3.2.2. 2.Partie osidique.....	113
*.Détermination du nombre et de la nature des sucres.....	113
*. Identification du composé 4	114
II.1.3.3. Identification du composé 5.....	114
II.1.3.3.1.Spectrométrie de masse	114
II.1.3.3.2. Spectrométrie de RMN.....	115
II.1.3.3.2.1. Partie génine.....	115
II.1.3.3.2.2. Partie osidique.....	117
*.Détermination du nombre et de la nature des sucres.....	117
*. Identification du composé 5	119
Conclusion 1.....	119

II.2. IDENTIFICATION DES SAPONOSIDES A PARTIR DE L'ESPECE *Zygophyllum cornutum*

Cosson.....	122
II.2.1. Identification du composé 1.....	122
II.2.1.1.Spectrométrie de masse	122
II.2.1.2. Spectrométrie de RMN.....	123
II.2.1.2.1. Partie aglycone.....	123
II.2.1.2.2. Partie osidique.....	129
*.Détermination du nombre et de la nature des sucres.....	129
*.Identification du composé 1	132
II.2.2. Identification du composé 2.....	134
II.2.2.1.Spectrométrie de masse	134
II.2.2.2. Spectrométrie de RMN.....	135
II.2.2.2.1. Partie osidique.....	135
*.Détermination du nombre et de la nature des sucres.....	135
*. Identification du composé 2	138
II.2.3. Identification du composé 3.....	138
II.2.3.1.Spectrométrie de masse	138
II.2.3.2. Spectrométrie de RMN.....	140
II.2.3.2.1. Partie osidique.....	140
*.Détermination du nombre et de la nature des sucres.....	140
*. Identification du composé 3	142
II.2.4. Identification du composé 4.....	143
II.2.4.1.Spectrométrie de masse	143
II.2.4.2. Spectrométrie de RMN.....	144
II.2.4.2.1. Partie osidique.....	144

*.Détermination du nombre et de la nature des sucres.....	144
*. Identification du composé 4	147
II.2.5. Identification du composé 5	148
II.2.5.1.Spectrométrie de masse	148
II.2.5.2. Spectrométrie de RMN.....	150
II.2.5.2.1. Partie osidique.....	150
*.Détermination du nombre et de la nature des sucres.....	150
*. Identification du composé 5	153
II.2.6. Identification du composé 6	153
II.2.6.1.Spectrométrie de masse	153
II.2.6.2. Spectrométrie de RMN.....	155
II.2.6.2.1. Partie osidique.....	155
*.Détermination du nombre et de la nature des sucres.....	155
*. Identification du composé 6	157
II.2.7. Identification du composé 7	158
II.2.7.1.Spectrométrie de masse	158
II.2.7.2. Spectrométrie de RMN.....	160
II.2.7.2.. Partie osidique.....	160
*.Détermination du nombre et de la nature des sucres.....	160
*. Identification du composé 7	162
*Conclusion 2	163

PARTIE III: TRAVAUX PERSONNELS PHARMACOLOGIQUE

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

.1.Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de deux fractions saponosidiques issues respectivement des espèces *Cyclamen africanum* et *Zygophyllum cornutum*

I.1.1.Matériel végétal.....	166
I.1.2.Animaux	166
I.1.3.Produits chimiques.....	167
I.1.4. Méthodes	167
I.1.4.1.Evaluation de l'activité anti-inflammatoire.....	167
I.1.4.1.1.Protocole expérimental.....	167
I.1.4.1.2.Calcul du pourcentage d'inhibition.....	168
I.1.4.1.3.Prélèvement sanguin.....	168
I.1.4.1.4.Dosages des protéines de la réaction inflammatoire (PRI).....	169
I.1.5.Traitement des résultats et analyses statistiques	169

CHAPITRE II: RESULTATS et DISCUSSION

II.1.Evaluation de l'activité anti-inflammaoire	170
II.1.1.Evaluation de la toxicité aiguë	170
II.1.2.Mesure de l'œdème de la patte.....	171
II.1.3.Résultats des dosages des protéines de la réaction inflammatoire (PRI).....	173
II.1.3.1.Résultats du Dosage de la CRP.....	174
II.1.3.2.Résultats du Dosage du fibrinogène.....	175
II.1.3.3.Résultats du Dosage de l'haptoglobine.....	177
II.1.3.4.Eléctrophrèses des protéines sériques.....	178

*Conclusion 3.....	179
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	180
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	182
ANNEXES.....	200

INTRODUCTION GENERALE

Les plantes médicinales sont un élément essentiel des soins de santé partout dans le monde, depuis les premiers jours de l'espèce humaine. Elles sont encore largement utilisées et ont une importance considérable dans le commerce international. On retrouve les traces de leur utilisation dans beaucoup de civilisations, pour ne citer qu'une "les Aryens" une civilisation Iranienne, qui remonte au septième millénaire av. J.-C., où l'utilisation de ce genre de plantes pour les guérisons demeure gravée dans les inscriptions de l'époque, confirmant ainsi cette réalité. Le zoroastrien **Treata**, connu comme premier médecin persan de l'histoire tant en Iran qu'en Inde, se servit pour la première fois des plantes médicinales qui étaient abondantes dans ces deux pays et dont il connaissait les usages et les vertus. Une fois l'essence extraite, il les appliquait pour guérir les maladies dont il supposait avoir trouvé le remède (Ghâsemi, 2010). Il fonda l'école de médecine de Saenamaragha, dont les vestiges ont toujours éveillé la curiosité des chercheurs au point qu'on a avancé l'hypothèse selon laquelle le nom « **traitement** » trouve peut-être son origine dans le nom de ce grand médecin perse. Nous pouvons notamment citer les noms de : Abou Bakr Mohammad Ibn Zakariyâ al-Râzi ou « Rhazès » (865-925), savant pluridisciplinaire persan qui contribua à ces sciences il aurait isolé à partir d'une plante l'acide sulfurique et l'éthanol dont il initia l'utilisation médicale. **Avicenne** (ou Ibn Sinâ) (980-1037 ap. J.-C.) mondialement connu, ce médecin et scientifique iranien pratiquait l'alchimie et la chimie, il rédigea un ouvrage encyclopédique de médecine médiévale, le Kitâb al-Qânoun fi al-Tibb, connu en Occident sous le titre de Canon au Xe siècle, et qui servit de base à l'enseignement de la médecine en Europe jusqu'au XVIIe siècle. Il y introduisit les propriétés et l'emploi de plus de 811 plantes médicinales expérimentées par sa propre personne. Avicenne fut le premier à rédiger une nomenclature exhaustive (à l'époque) des plantes médicinales (DeSmet PAGM, 1993).

D'autres pays musulmans comptèrent également de brillants savants et érudits qui surent mettre à profit les bienfaits des plantes médicinales et contribuèrent au progrès de la médecine traditionnelle (ainsi nommée aujourd'hui). Parmi eux, le savant Abou Mansour Mouwaffaq ibn 'Ali al-Hirawi, pharmacien et alchimiste du Xe siècle qui écrivit l'ouvrage « Les fondements des vraies propriétés des remèdes » en y décrivant 585 médicaments à base de plantes (Ghâsemi, 2010).

L'histoire nous a livré beaucoup de preuves sur l'efficacité des plantes médicinales, il est indéniable qu'elles contiennent des principes actifs qui exercent une action biologique directe sur l'organisme. En réalité, chacune d'elle offrirait deux à trois cents composants différents, c'est de l'interaction entre ces différentes substances que naît l'efficacité thérapeutique. C'est à partir de différentes recherches ethnobotaniques menées que, l'industrie pharmaceutique s'est basée sur le développement de nouveaux médicaments à base de plantes. La reconnaissance de leur valeur clinique, pharmaceutique et économique continue de croître, bien que cela varie fortement selon les pays.

Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières

pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmacologiquement actifs.

Ces dernières années, de nombreux pays développés ont manifesté un intérêt croissant dans les systèmes de médecine alternatifs ou complémentaires, ce qui a abouti à une intensification du commerce international des préparations à base de plantes et des autres types de remèdes traditionnels.

Des raisons existent donc, tant dans les pays développés que dans les pays en voie de développement, ces dernières nous ont conduits, à nous intéresser à deux plantes médicinales endémiques à l'Algérie : *Cyclamen africanum* (Boiss. & Reuter) et *Zygophyllum cornutum* (Coss.). Connues pour leur utilisation dans la médecine traditionnelle maghrébine, elles possèderaient des vertus antidiabétiques, hypoglycémiantes, hypotensives et anti inflammatoires.

Ceci nous a mené à entreprendre une étude pharmaco-chimique, dans le cadre d'une cotutelle Franco-Algérienne, en associant les compétences des Laboratoires de Pharmacognosie (EA 4267) de l'Université de Bourgogne en France dirigé par Mme le Professeur Marie-Aleth LACAILLE-DUBOIS et celles du laboratoire d'Obtention des Substances Thérapeutiques de l'Université de Constantine 1, Algérie dirigé par Melle le Professeur Zahia KABOUCHE et Ces plantes n'ont jamais fait l'objet d'investigations chimiques concernant les saponosides. L'étude a permis dans un premier temps de réaliser une extraction des métabolites secondaires, en utilisant un solvant aqueux méthanolique, à partir de racines de l'espèce *Cyclamen* sp, d'isoler la fraction des saponosides, de purifier chaque saponoside et d'identifier leur structure chimique. Dans un deuxième temps nous avons réalisé une seconde extraction méthanolique des métabolites secondaires à partir de la plante entière cette fois-ci de l'espèce *Zygophyllum* sp, (avec la même démarche) nous avons pu isoler, purifier et identifier les saponosides de cette plante.

Enfin, dans un troisième temps, nous avons testé deux produits isolés pour l'activité anti-inflammatoires sur des lignées de rats mâles et femelles, de la race Winstar. Nous avons réalisé des dosages des protéines de l'inflammation, notamment la protéine C-réactive(CRP), le Fibrinogène, l'Haptoglobine et l'électrophorèse des protéines sériques. Cette activité biologique nous a permis de mettre en évidence les relations effet anti-inflammatoire d'une substance végétale naturelle.

Notre étude se structure en cinq chapitres:

PARTIE-I/ REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

➤ **CHAPITRE I : BOTANIQUE**

Présentation du Genre *Cyclamen* et de l'espèce *Cyclamen africanum* (Aspet botanique et ethnobotanique) et répartition géographique.

Présentation du Genre *Zygophyllum* et de l'espèce *Zygophyllum cornutum* (Aspet botanique et ethnobotanique) et répartition géographique.

➤ **CHAPITRE II : PHYTOCHIMIE**

Biomolécules et saponosides

Méthodes d'identification structurale (RMN-1D ,2D).

Travaux phytochimiques antérieurs portant sur les saponosides dans les genres

➤ **CHAPITRE III : PHARMACOLOGIE**

Définition de la Réaction inflammatoire et des marqueurs biologiques de l'inflammation (Protéines de la Réaction Inflammatoire (PRI))

PARTIE-II/ TRAVAUX PERSONNELS PHYTOCHIMIQUES

Les techniques utilisées dans ce travail pour isoler et purifier les saponosides à partir des deux espèces et élucidation de leurs structures.

PARTIE-III/ TRAVAUX PERSONNELS PHARMACOLOGIQUES

Résultats des tests de l'activité anti –inflammatoire, des deux extraits saponosidiques issus des deux plantes.

PARTIE-IV/CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.

PARTIE I : REVUES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I : BOTANIQUE

Dans ce chapitre nous présenterons dans le détail la classification botanique de notre espèce, qui nous permettra plus tard (partie matériels et méthodes) de mettre en évidence lien phylogénique entre les différentes espèces appartenant au même genre et leur composition chimique.

I. 1.Présentation de l'espèce *Cyclamen africanum* (Boisson & Reuter)

I.1.1. Famille de Primulaceae

L'espèce *Cyclamen africanum* appartient à la grande famille des *Primulaceae* (Punt et al., 1974) ce nom vient du genre *Primula*, du latin primus, premier, en référence à la floraison très précoce dans l'année de ces plantes. On connaît des *Primulaceae* fossiles dès l'Eocène. L'ordre des Primulales comprend trois familles fort affines : les *Theophrastaceae*, les *Myrsinaceae* et les *Primulaceae* (Corner, 1961). Ces trois familles ont en commun d'avoir des fleurs gamopétales, généralement pentamères, des étamines épipétales et une placentation centrale. Le fruit est très souvent une capsule. A l'époque Emberger (Corner, 1961) les situait à proximité des Centrospermales et des Plumbaginales. Toutefois, dès 1993 cet ordre est considéré comme polyphylétique et placé par Cronquist près des Ebenales ou par Takhtajan près des Sapotales. Lors de la parution d'APG II (Angiosperm Phylogeny Group 2003), la situation va évoluer. Elles sont dorénavant incluses dans l'ordre des Ericales regroupant 24 familles M. Kallersjö et al., 2000. En ce qui concerne la Flore de France les genres de "Primulaceae" se retrouvent dans les 3 familles suivantes :

-*Primulaceae* : *Androsace* (incl. *Douglasia*), *Cortusa*, *Hottonia*, *Primula* et *Soldanella*

-*Myrsinaceae* : *Anagallis*, *Asterolinon*, *Centunculus*, *Coris* (genre de 2 espèces, à fleurs zygomorphes), *Cyclamen*, *Glauca*, *Lysimachia* et *Trientalis*

- *Theophrastaceae* : *Samolus*

La situation change à nouveau en 2009, année de la parution d'APG III. Ces trois familles sont réunies en une seule, les *Primulaceae*. Les *Primulaceae* sont une famille de plantes dicotylédones qui comprend 1000 espèces réparties en 22 genres et 850 espèces. De nombreuses espèces sont cultivées comme plantes ornementales.

Cette famille est particulièrement présente dans les régions tempérées de l'hémisphère Nord. Elle est présente essentiellement dans des régions froides, tempérées, montagneuses et tropicales, elle est dite Sub-cosmopolite, mais surtout centrée sur l'hémisphère nord. La Chine regroupe un peu plus de la moitié des espèces de cette famille, concentrées principalement dans le Sud et l'Ouest du pays. L'analyse comparée de séquences géniques de chloroplastes (Kallersjö et al., 2000) a montré que les *Myrsinaceae* et les *Primulaceae* étaient paraphylétiques. Certains genres (*Anagallis*, *Ardisiandra*, *Coris*, *Lysimachia*, *Trientalis*) appartiennent plus à la voie des *Myrsinaceae* qu'à celle des *Primulaceae*. Dans d'autres classifications récentes, cette famille de plante se rapproche des *Plumbaginaceae*.

I.1.2. Présentation du Genre *Cyclamen*

Le nom *Cyclamen* est la transposition du mot grec : cercle ou couronne. C'est un genre géophyte à gros tubercule arrondi et aplati, en forme de petit pain, cultivé dans toutes les

zones tempérées. Son nom vulgaire de Pain-de-pourceau a été donné, dit-on, aux cyclamens, à cause de l'avidité avec laquelle les porcs recherchent leurs racines tuberculeuses, les porcs se nourrissent de ses tubercules, sans qu'il en résulte pour eux d'inconvénients (Sow bread en anglais, Pan porcino en italien, varkensbrood en néerlandais)(Widmer, 1992). Le genre *Cyclamen* appartient à la famille des *Myrsinaceae*, anciennement *Primulaceae*, selon la classification classique et selon la classification phylogénétique. Il n'y a pas de parenté nette avec les autres *Primulaceae* (Jalali et al., 2012).

La taxonomie reconnaît actuellement 24 espèces, notamment :

C. balearicum, *C. repandum*, *C. purpurascens*, *C. hederifolium*, *C. rhodium*, *C. creticum*, *C. graecum*, *C. coum*, *C. colchicum*, *C. parviflorum*, *C. abchasicum*, *C. elegans*, *C. alpinum*, *C. intaminatum*, *C. cilicium*, *C. mirabile*, *C. pseudibericum*, *C. cyprium*, *C. libanoticum*, *C. persicum*, *C. rohlfsianum* et enfin *Cyclamen africanum*(Fig.17).

I.1.3. Classification botanique du genre *Cyclamen*

Le genre *Cyclamen* appartient à la famille des *Primulaceae*, qui compte 22 genres, il est divisé en quatre sous-genres, il obéit à la classification botanique suivante:

I*Sous-genre *Corticata* : *Cyclamen cyprium* et *Cyclamen libanoticum*

II*Sous-genre *Cyclamen*, avec trois séries :

1*Série *Cyclamen* : *Cyclamen hederifolium* et *Cyclamen africanum*

2*Série *Persicum* *Cyclamen persicum* et *Cyclamen somalense*, ainsi que *Cyclamen graecum* et *Cyclamen rohlfsianum*

3*Série *Purpurascens* : *Cyclamen purpurascens* et *Cyclamen colchicum*

III*Sous-genre *Gyrophoebe*, avec deux séries :

1*Série *Cilicium* : *Cyclamen cilicium* et espèces apparentées

2*Série *Pubipedia*: *Cyclamen coum* et espèces apparentées

IV*Sous-genre *Psilanthum* : *Cyclamen repandum* et espèces apparentées.

I.1.4. Répartition géographique

Les espèces appartenant au genre poussent en plein air dans de nombreux pays méditerranéens, où elles croissent surtout dans les régions fraîches et montagneuses. La plus grande concentration d'espèces se trouve en Asie Mineur. On les retrouve de plus en plus dans les régions Est de la Méditerranée du Liban, Syrie, Turquie, Chypre, la Grèce, Israël et l'Iran avec des espèces enclavées supplémentaires en Afrique du Nord , figure N° 1 (Jalali et al., 2012) .

1. *C.balearicum* ; 2. *C.repandum* ; 3. *C.purpurascens* ; 4. *C.hederifolium* ; 5. *C.rhodium* ;
 6. *C.creticum* ; 7. *C.graecum* ; 8. *C.coum* ; 9. *C.colchicum* ; 10. *C.parviflorum* ; *C.abchasicum* ;
 11. *C.elegans* ; 12. *C.alpinum* ; *C.intaminatum* ; *C.cilicium* ; *C.mirabile* ; *C.pseudibericum* ;
 13. *C.cyprum* ; 14. *C.libanoticum* ; 15. *C.persicum* ; 16. *C.rohlfianum* ; 17. *C.africanum*.

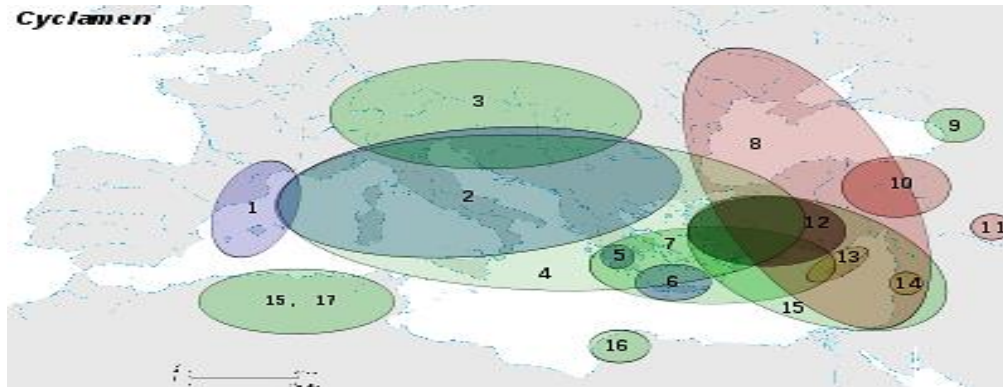


Figure N° 1 : Répartition géographique des espèces botaniques du genre *Cyclamen* (Jalali et al., 2012, Wikipedia).

Le genre *Cyclamen* est remarquable par le fait que pratiquement chaque mois de l'année, il y a des espèces en fleurs. Les fleurs sont rouges, roses, blanches ou panachées, et sont abondantes (fig.2). Celles de certaines espèces, dont le cyclamen des Alpes, *Cyclamen purpurascens*, répandent un parfum agréable.



Figure N° 2 : Quelques fleurs du genre *Cyclamen* (Jalali et al., 2012).

Les feuilles se développent en rosette basilaire de laquelle émergent les fleurs gracieuses portées par une tige mince. Leur face supérieure est souvent marbrée de blanc avec, dans sa partie centrale, un motif en « sapin de Noël ». La face inférieure des feuilles de plusieurs espèces est pourprée. On suppose que cette couleur, servant de calorifère, capte la lumière qui traverse la feuille et la transforme en chaleur. Les feuilles disparaissent en été, sauf chez certain espèces (fig.3).



Figure N° 3 : Les différentes formes de feuilles des espèces de *Cyclamen* (Jalali et al., 2012)

I.1.5. Espèce *Cyclamen africanum* (Boisson & Reuter)

I.1.5.1. Description botanique

La plante médicinale *Cyclamen africanum* Boisson. & Reuter., pousse dans les taillis et les anfractuosités des rochers dans le nord de l'Algérie et en Tunisie. L'espèce se développe dans les broussailles et ravins rocheux dans le nord de l'Algérie et de la Tunisie. Elle ressemble en plus grand à *Cyclamen confusum*. Les fleurs, dont les étamines ont des anthères jaunes sont portées sur des pédoncules de 10 à 20 cm. Les feuilles, qui peuvent atteindre 15 cm de diamètre, apparaissent après les premières fleurs. Certains taxons sont diploïdes, d'autres sont tétraploïdes (figure 4). Il ressemble à un sosie de *Cyclamen hederifolium*. Ils disent que la seule façon de les distinguer est que *C. africanum* meurt à l'extérieur où *C. hederifolium* vivra. Il est certainement plus sensible à la fois à l'excès d'humidité en été et au froid en hiver qu'en est l'espèce *hederifolium*. Il est très étroitement lié à *C. hederifolium*, avec lequel il va croiser. Le tubercule produit des racines à partir du haut, sur les côtés et en bas, contrairement à *Cyclamen hederifolium*, qui produit des racines du haut et sur les côtés, mais pas le fond. Il existe des individus diploïdes (nombre chromosomique $2n = 34$) et tétraploïdes ($2n = 68$). Les formes de *C. africanum* dont on dit qu'ils diffèrent l'une de l'autre en ce que la plante diploïde a des feuilles plus petites ayant des pétioles de forme et les fleurs sont dites être parfumées. La plante tétraploïde est parfois appelée *C. commutatum* Schwarz & Lepper, mais cette distinction est controversée et rarement utilisée car elle repose sur le nombre de chromosome plutôt que des caractéristiques visuelles.



Copyright © 2007 by Dennis Stevenson ([ref. DOL29093]

Figure N° 4 : Composition florale de l'espèce *Cyclamen africanum*

Cyclamen africanum est une plante vigoureuse des feuilles coriaces d'un vert vif, elles atteignent jusqu'à 15 cm de long et de large (fig.4). Leurs motifs sont généralement moins nettes que dans de nombreuses autres espèces, bien que la couleur «feuilles argent» existe. Les feuilles augmentent généralement directement à partir du tubercule, c'est l'une des principales différences entre cette espèce et l'espèce *Cyclamen hederifolium*. Les feuilles sont souvent très volumineuses, dépassant souvent 10 cm (4 pouces) de diamètre. Les fleurs apparaissent généralement avant ou avec les jeunes feuilles entre Septembre et Novembre, les feuilles apparaissent presque directement à partir du tubercule sur 11-22cm (4-8 pouces) pédicelles. La couleur des pétales varie du rose pâle au rose-rose foncé (fig.5).



Copyright © 2007 by Dennis Stevenson ([ref. DOL29093]

Figure N° 5 : Aspect général de l'espèce *Cyclamen africanum*.

I.1.5.2. Classification et systématique

Faite par Boisson. Et Reuter en 1852, l'espèce *Cyclamen africanum* suit la classification suivante:

Règne	<i>Plantae</i>
Sous-règne	<i>Tracheobionta</i>
Division	<i>Magnoliophyta</i>
Classe	<i>Magnoliopsida</i>
Sous-classe	<i>Dilleniida</i>
Ordre	<i>Ericales</i>
Famille	<i>Primulaceae</i>
Sous-famille	<i>Myrsinoideae</i>
Tribu	<i>Cyclamineae</i>
Genre	<i>Cyclamen</i>
Sous-genre	<i>Cyclamen</i>
Serie	<i>Cyclamen</i>
Espèce	<i>Cyclamen africanum</i>

1.2.Présentation de l'espèce *Zygophyllum cornutum* (Coss)

1.2.1.Famille des *Zygophyllaceae*

Ces espèces sont décrites et nommées suivant la nomenclature introduite en 1753 par Karl Von Linné, elles sont regroupées dans 300 familles différentes (Roland, 2005). La flore algérienne avec ses 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, dont 15% endémiques (Quezel et Santa, 1963.), reste très peu explorée sur le plan phytochimique ainsi que pharmacologique. Dans ce qui suit, nous allons nous intéresser à la famille des *Zygophyllaceae*.

Les plantes appartenant à cette famille, sont très reconnaissables à l'aspect de leurs herbes, arbustes, ou arbres. Elles ont des feuilles stipulées, très polymorphes.

Les fleurs de tétra ou pentamères, isolées ou en inflorescences, possèdent une corolle, également tétra ou pentamère, parfois nulle. Généralement, ces plantes renferment 10 étamines, le plus souvent, à stipules unies, un ovaire de 4 à 5 carpelles, à un ou plusieurs ovules par loge. Les fruits, sont en général, capsulés, loculicides, ou septicides, se dissociant en coques, parfois bacciformes.

Zygophyllum geslini est une espèce très répandue dans le Sahara septentrional. Plusieurs espèces du même genre partagent avec cette espèce le nom vernaculaire de «aggaya» telles que *Zygophyllum album*, *Zygophyllum cornutum*, *Zygophyllum gaetulum* et *Zygophyllum waterlot*. (Jouad et al., 2001 ; Eddouks et Maghrani, 2004).

1.2.2.Classification du genre *Zygophyllum*

Les *Zygophyllaceae*, dans la classification de Sheahan et Chase, constituent une famille avec environ 285 espèces, qui se subdivisent en cinq sous-familles et 27 genres (Sheahan et Chase, 1996 ; Sheahan et Chase, 2000). Elles sont largement distribuées dans les régions arides, semi-arides, les terrains salés, et les pâturages désertiques (Quezel et Santa , 1963).

Les *Zygophyllodeae*, constituent la sous famille la plus large avec 180 espèces, regroupées en quatre genres : *Augea* (monotypique), *Tetraena* (monotypique), *Fagonia* (30 espèces), et *Zygophyllum* (150 espèces), les quatre autres sous-familles restantes sont : *Larreoideae*, *Morkillioideae*, *Seetzenioideae* et *Tribuloideae* (Sheahan et Chase, 1996 ; Takhtajan, 1997).

1.2.3.Répartition géographique

De distribution assez restreinte l'espèce *Zygophyllum cornutum*, est confinées en Algérie précisément dans les Wilaya de Biskra et Elouad et sur les deux pays maghrébins limitrophes, la Tunisie et le Maroc (fig.6); ce qui souligne son importance. Elle est représentée principalement dans les régions arides et semi arides : ainsi au Sahara Algérien, on observe 7 genres et 27 espèces (Ozenda, 1987), elle constitue plus de 3% de la flore du désert dont plus du tiers est endémique (Smati et al., 2004). Le genre *Zygophyllum* est le plus répandu de la famille(Hussein et al., 2011) . Ce sont des plantes très adaptées au milieu désertique par leur système de racines horizontales qui parcourent de longs chemins pour atteindre les nappes souterraines.



Figure N° 6 : Répartition géographique de l'espèce *Zygophyllum cornutum* Coss.

I.2.4. Présentation de l'espèce *Zygophyllum cornutum* (Cosson)

En Algérie, plusieurs plantes sont traditionnellement utilisées pour traiter le diabète sucré, parmi lesquelles on note *Zygophyllum cornutum* Coss, plante médicinale traditionnellement utilisée et scientifiquement évaluée pour son activité antidiabétique : *Zygophyllum cornutum* (Perez, 1958), connue sous le non de « Bougriba » l'espèce appartient au genre *Zygophyllum* de la famille des *Zygophyllaceae*, elle est distribuée dans les régions arides et semi arides de l'Afrique. Elle est répandue principalement en Algérie (Biskra, Elouad), au Maroc et en Tunisie (fig.7).

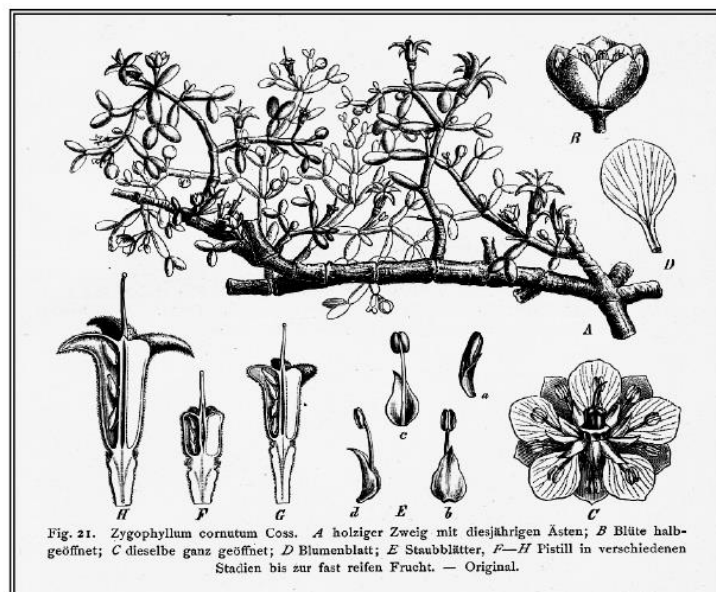


Figure N°7: Les différentes parties constituant la plante de l'espèce *Zygophyllum cornutum* Coss. (Quezel et Santa , 1963).

I.2.4.1. Description botanique

Sous-arbrisseaux, rarement plantes annuelles, les feuilles de cette espèce sont simples ou bifoliées, avec des fleurs axillaires de tétra- à pentamères, et 10 étamines. Les fruits sont non cornus à l'apex, simplement dilatés en 5 lobes plus ou moins saillants.

Elle est largement distribuée dans les terrains salés ou gypseux, ainsi les pâturages désertiques (Elgamal et al., 1995)(Fig.8).



Figure N°8: arbrisseaux représentant l'espèce *Zygophyllum cornutum* Coss.
(Elgamal et al., 1995).

I.2.4.2. Classification botanique

Nous présentons ci-dessous deux classifications de [Quezel et Santa, 1963].

Règne :	<i>Plantae</i>
Sous-règne:	<i>Tracheophyta</i>
Superdivision :	<i>Spermatophyta</i> (seed plant)
Division:	<i>Magnoliophyta</i> (flowering plants)
Classe :	<i>Magnoliopsida</i> (Eudicotylédones)
Sous-classe :	<i>Rosidae</i> II
Ordre :	<i>Zygophyllales</i>
Famille :	Zygophyllaceae
Genre :	<i>Zygophyllum</i>
Espèce :	<i>Zygophyllum cornutum</i> .

I.2.5. Utilisations ethnopharmacologiques du genre Zygophyllum

Beaucoup d'espèces appartenant au genre et à la famille, sont utilisées comme remèdes dans différentes affections. Notamment *Balanites aegyptiaca* : une plante riche en saponosides (Liu et Nakanishi, 1982), elle a plusieurs activités : Anti-inflammatoires, anti-oxydantes, anti-nociceptives (Speroni et al., 2005), anti-fongiques (Bishnu et al., 2007), antiseptiques, anti-malaria, anti-syphilitiques et anti-virales(Duke, 1983 ; Kokwano, 1976), traditionnellement, ses extraits aqueux sont utilisés dans le traitement de la jaunisse et le

diabète (Kamel, 1991). *Larrea divaricata* : plante populaire en médecine, elle est utilisée dans le traitement des tumeurs, des maladies inflammatoires, des rhumatismes et de la fièvre (Anesini et al., 1997 ; Anesini et al., 1999). *Larrea tridentata* : plante désertique (Van Auken, 2000), elle est largement utilisée dans la thérapeutique, ses extraits peuvent soigner l'acné et les psoriasis et en même temps ont des effets cicatrisants, anti-fongiques et anti-viral (Brent, 1999), elle a aussi des activités analgésiques, anti-inflammatoires et anti-oxydantes (Kay, 1996 ; Abbou-Gazar et al., 2004). *Peganum harmala* : ses extraits sont utilisés dans le traitement, de diabète et l'hypertension artérielle (Tahraoui et al., 2007). Des études faites sur *Tribulus terrestris* espèces de la même famille ont montré une activité larviscide (El-Sheikh et al.) antidiabétique et antihyperlipidémique.

De nombreux métabolites ont été isolés à partir des plantes appartenant à cette famille, mais dans le genre *Zygophyllum* nous citons ceux testés par Perez C. pour l'activité antidiabétique de *Zygophyllum cornutum*, collectée de Tunisie, en 1958, où son efficacité remarquable testée sur le lapin a été rapportée.

La zygophylle ou *Zygophyllum gaetulum* qui est très utilisé au Maroc contre le diabète sucré. utilisée traditionnellement comme anti-inflammatoire, antidiabétique, antispasmodique et anti-diarrhéique (Ait El Cadi et al., 2012), des études réalisées sur cette plante montrent que l'extrait aqueux peut diminuer la glycémie des rats rendus diabétiques (El Hamsas et al., 2010). Il est également efficace chez des patients souffrant du diabète de type 2 (Smati et al., 1993).

Zygophyllum eichwaldii : cette espèce a de nombreuses propriétés, anti-septiques, antieczéma, anti-diabétiques, anti-bactériennes et anti-fongiques (Sasmakov et al., 2001).

Zygophyllum coccineum : plante commune en médecine traditionnelle dans les pays méditerranéens, elle est utilisée contre le rhumatisme, la goutte et l'hypertension (Saber et al., 1960), et le diabète (Eskander et Won Jun , 1995), testée sur des rats diabétiques par voie orale , l'extrait était considérablement hypoglycémique avec un effet bénéfique sur le dysfonctionnement rénal et inhibiteur des dommages du foie associés au diabète. (Ben Jannet et al., 2001)

Zygophyllum geslini : cette espèce est utilisée contre le diabète, elle possède également des activités cytotoxiques. (Smati et al., 2004),

Zygophyllum propinquum (Khan et al., 2014)

Zygophyllum album : les extraits éthanoliques ont un effet contre le diabète de type II, l'hypertension et les maladies cardiaques (Ghoul et al., 2012). Les résultats d'une autre étude, suggèrent que l'extrait de *Zygophyllum album* pourrait exercer des activités antidiabétiques par sa propriété antioxydante (El Ghoul et al., 2011). Concernant les constituants phytochimiques, de la plupart de ces espèces de *Zygophyllum*: elles sont constituées majoritairement de zygophylline, d'acide quinovique et de Zygophylosides, des composés décrits chez ces espèces (Smati et al., 2004).

CHAPITRE II : PHYTOCHIMIE

.Introduction

L'évolution des sciences biotechnologiques des produits naturels, tout spécialement des biomolécules d'origine végétale, est étroitement liée aux développements des méthodes de la chimie expérimentale et elle n'a pu éclore véritablement que dans la seconde moitié du XVIII^{ème} siècle dès lors que des techniques douces d'extraction par différents solvants ont remplacé la méthode alors couramment utilisée de distillation sèche des plantes et des matières organiques en général.

Des liens étroits unissaient la chimie extractive, la biologie végétale et la pharmacie puisque de nombreuses préparations médicamenteuses avaient comme source dans les siècles passés des organismes vivants végétaux, pour ces derniers, les décoctions, macérations et autres opérations ont prélué à cette époque où pharmaciens, botanistes et chimistes ont, après de nombreux tâtonnements, mis au point des méthodes qui permettaient de reconnaître les plantes médicinales, d'en extraire les premières biomolécules individualisées. Par ailleurs, si la chimie des produits naturels, et plus spécialement la phytochimie, n'a dû sa naissance et son développement qu'à l'évolution des techniques extractives et analytiques, elle a eu par elle-même une influence profonde sur la pharmacognosie, la biologie structurale (biosynthèse des **biomolécules**) et la phylogénie des plantes.

II.1.Généralités sur les biomolécules

Une biomolécule est une molécule qui participe au processus métabolique et à l'entretien d'un organisme vivant végétal ou animal, par exemple les glucides, les lipides, les protéines, l'eau et les acides nucléiques (fig.9). On parle aussi de biomolécules pour des molécules dites **métabolites secondaires**, elles sont trouvées dans les différentes parties d'un être vivant, par exemple chez les plantes on les retrouve dans ses différentes parties (racine, feuille, tige...), mais obtenues par des techniques de biotechnologie (Extraction par solvant, chromatographies sur colonne (Lubert et *al.*, 2003).

Elles peuvent être macromolécules et classées en tant que biopolymères (lignine, cellulose,...) ou en tant que macromolécules naturelles, tels que les protéines, les glucides, ou encore les hétérosides. Ces macromolécules peuvent avoir une structure primaire, secondaire, tertiaire, quaternaire (Lubert et *al.*, 2003).

II.1.1.Métabolites secondaires chez les végétaux

Les plantes possèdent des métabolites dits « secondaires » par opposition aux métabolites primaires que sont les protéines, les glucides et les lipides. On appelle métabolites

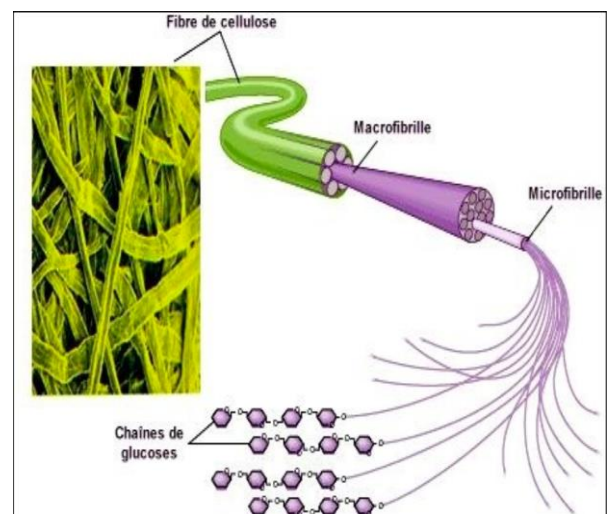


Figure N°9 : Exemple sur l'ultra structure d'une biomolécule « la fibre de cellulose »(Lu et Hsieh, 2012).

secondaires des composés biosynthétisés naturellement. Nombreux ceux qui possèdent des propriétés thérapeutiques et sont (ou ont été) utilisés en médecine traditionnelle et moderne (Nguyen et al., 2013). On distingue classiquement plusieurs catégories de métabolites secondaires en fonction de leur nature biochimique et de leur origine biosynthétique (fig.10). La classification proposée ici concerne seulement la catégorie des **hétérosides**, celle qui inclut les **saponosides/saponines**, une classe qui nous a intéressé dans notre étude.



Figure N°10 : Localisation des saponines

En fonction des techniques d'extraction et de révélation nous pouvons accéder à cette classe et éliminer les autres classes, ces techniques permettent de caractériser chimiquement nos composés (Cheok et al., 2014). Elles présentent évidemment des limites, un certain nombre de composés sont mixtes, présents dans un mélange, il faut savoir que la catégorie des hétérosides pose un certain nombre de problèmes quant à sa classification, puisque en général on n'y inclut pas les dérivés glycosylés des composés aromatiques mais ceci ne concerne pas les saponosides (Touitou, 2007).

II.1.2. Hétérosides

Les hétérosides (ou glycosides) sont des molécules nées de la condensation d'un sucre, alors qualifié de **glycone** et d'une substance non glucidique appelées **aglycone** ou **génine** (Fig.11).

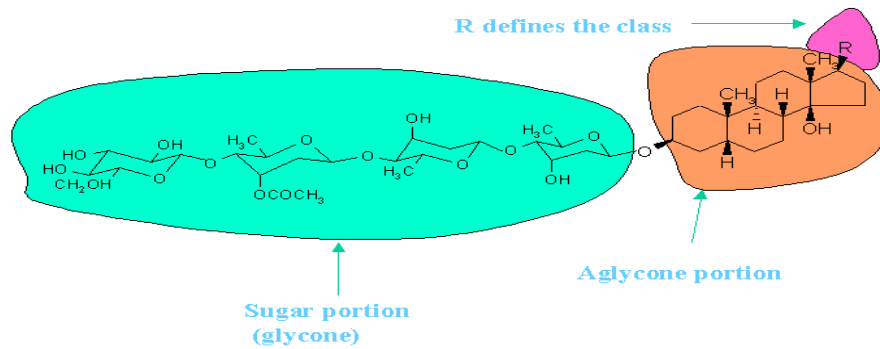


Figure N° 11 : Les différentes portions d'un hétéroside.

L'aglycone (partie non sucrée = génine) peut être de nature chimique très variée : il peut s'agir d'un alcool, d'un phénol, d'une substance à fonction aminée ou à fonction thiol, d'un stéroïde, ou d'un triperpénoïde. C'est elle qui confère à l'hétéroside l'essentiel de ses propriétés spécifiques, thérapeutiques ou toxiques par exemple (Chevallier, 2009).

II.2. Généralités sur les saponosides

II.2.1. Définition

Le saponoside (ou saponine) est un hétéroside généralement d'origine végétale formé d'une génine de type triterpène ou stéroïde appelée sapogénine, possédant un ou des groupements osidiques. Les saponosides sont un vaste groupe de glycosides, largement distribués chez les plantes supérieures, leurs propriétés tensio-actives les distinguent des autres glycosides. Ils se dissolvent dans l'eau pour former des solutions moussantes colloïdales par agitation (Tyler et al., 1981). Ils sont capables d'agir par la perméabilité des membranes cellulaires.

Les saponosides sont généralement connues en tant que composés non-volatils, tensio-actifs, elles sont largement distribués dans la nature, survenant principalement dans le règne végétal (Lasztity et al., 1998; Oleszek, 2002; Hostettmann et Marston, 2005). Le nom « saponine » est dérivé du mot latin *sapo*, qui signifie « savon », parce que les molécules de saponoside forment des solutions moussantes quand on les mélange avec de l'eau. Structuellement et chimiquement, ce sont des molécules glycosidiques triterpéniques et stéroïdiques. Cette combinaison structurale d'éléments polaires et non polaires (caractère amphiphile), explique leur comportement de savon dans les solutions aqueuses (Oleszek, 2002).

Les saponosides ont un large éventail de propriétés, qui incluent leur goût doux et amer (Grenby, 1991; Kitagawa, 2002; Heng et al., 2006), des propriétés émulsifiantes à travers leur capacité de former des mousses (Price et al., 1987), et des propriétés pharmacologiques telles que les effets analgésiques et antidépresseurs, d'extrait méthanolique de quelques espèces appartenant au genre *Zygophyllum*, (Attele et al., 1999), des propriétés hémolytiques (Oda et al., 2000; Sparg et al., 2004), ainsi que des activités antimicrobiennes, insecticides, molluscicides (Sparg et al., 2004). Les saponosides ont de nombreuses applications, on les retrouve dans les boissons et les confiseries, ainsi que dans

les cosmétiques (Price et al., 1987; Petit et al., 1995; Uematsu et al., 2000) et dans les produits pharmaceutiques (Sparg et al., 2004).

Leur diversité structurale est énorme, par conséquent, lorsque le terme " saponoside" est employé, il doit continuer à refléter une certaine valeur dans la classification du produit naturel, et il doit être défini plus précisément. Parce que les connaissances des structures chimiques des produits naturels (par exemple des saponosides) et leurs voies biosynthétiques, ont considérablement avancé, il est devenu possible, de nos jours d'avoir une classification plus précise. Ces progrès ont stimulé la classification des produits naturels à partir de la voie biosynthétique de leur squelette de carbone (Devon et Scott, 1972; Connolly et Hill, 1991; Xu et al., 2004) . En outre la classification peut être basée sur les transformations ultérieures de la voie de biosynthèse des principaux squelettes de ces carbones, tels que des réarrangements mineurs, type d'oxydation, homologation des modèles, ou de dégradation, conduisant au réarrangement, seco/homo/ni-composés. Plusieurs commentaires ont été publiés au cours des deux dernières décennies, en mettant l'accent sur la biosynthèse, l'isolement, la structure, élucidation, et les activités biologiques des saponines Kulshreshtha et al., 1972; . Mahato et al., 1992 ; . Mahato et Nandy, 1991 ; Mahato et Sen, 1997; . Tan et al.,1999; Connolly et Hill, 2000; Sparg et al., 2004).

II.2.2.Classification des saponosides

Les saponosides peuvent être classés en deux groupes en fonction de la nature de leur squelette aglycone. Le premier groupe est constitué des saponosides stéroïdiques, qui sont presque exclusivement présents dans les angiospermes monocotylédones. Le second groupe constitué par les saponosides (Chomsky, 2012) triterpéniques, qui sont les plus courants et surviennent surtout chez les angiospermes dicotylédones (Bährle-Rapp, 2007). Certains auteurs distinguent un troisième groupe appelé amines stéroïdiques, qui sont classée par d'autres auteurs comme alcaloïdes stéroïdiques. On distingue :

- Les saponosides à génine stéroïdique ou **Saponines stéroïdiques**.
- Les saponosides à génine triterpénique pentacyclique ou **Saponines triterpéniques**.
- Les saponosides à alcaloïde stéroïdique qui correspondent aux glucoalcaloïdes qu'on retrouve chez les Solanacées.

II.2.2.1.Saponosides stéroïdiques

Ils sont constitués d'un aglycone stéroïdique, un squelette en C27 spirostane, comprenant généralement une structure de six anneaux (figure C). Dans certains cas, quand la matière végétale est fraîche, le groupement hydroxyle en position C26 est engagé dans une liaison glycosidique, et ainsi la structure d'aglycone devient pentacyclique. Ceci est considéré comme un squelette furostane (Fig.12.B).

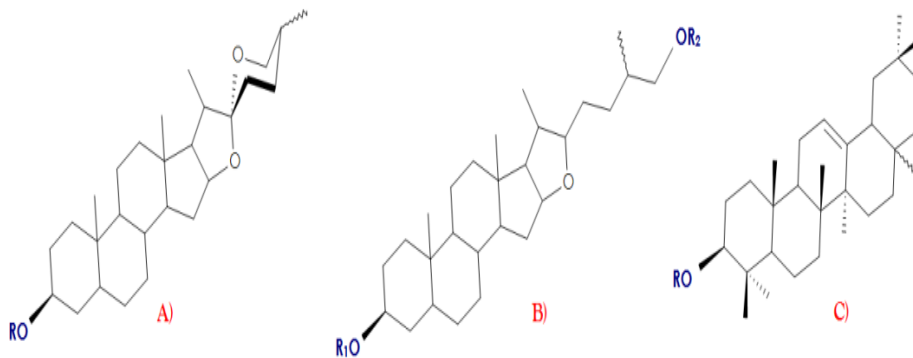


Figure N°12 : Différentes formes de squelette d'un aglycone.

(A) spirostane, (B) furostane (C) triterpénoïde.

R = chaîne glycosidique

II.2.2.2.Saponosides triterpéniques

Ils sont constitués d'un aglycone triterpénique, qui se compose d'un squelette C₃₀, comprenant une structure pentacyclique (fig.13.C). On les trouve principalement dans les Angiospermes dicotylédones, par exemple, *Rosaceae*, *Liliaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Primulaceae*, *Ranunculaceae*, et *Sapindaceae*. Les saponosides à aglycone triterpénique, présentent une cyclisation de (35) -2,3-époxy-2,3-dihydrosqualène (fig.15). Cette cyclisation donne surtout naissance à trois types de saponosides triterpéniques et qui sont :

Les saponosides de type dammarane tétracyclique (fig.13.B), que l'on trouve dans les genres *Panax*, *ginseng*, *Araliaceae*. Les saponosides triterpéniques pentacycliques (fig.13.A.), dans ce cas la sapogénine est attaché à une chaîne de sucre ou d'unités d'acide uronique, ou des deux, souvent dans la position 3. Les principaux représentants du type, sont l'Aescine, la cyclamine, l'acide glycyrrhizique, l'Hederine.

Les acides triterpéniques des saponosides (fig.13.C), qui sont l'acide glycyrrhétinique, l'acide oléanolique, hédéragénine, acide quillaïque.

Les sapogénines triterpéniques (des aglycones ou unités non-sucre), de loin les plus courantes, sont en fait des composés pentacycliques: les oléananes (aussi connu comme les dérivés β -amyrine), les ursanes (aussi connu comme les dérivés α -amyrine), les lupanes, les hopane et les fridelane, qui représentent les cinq squelettes les plus courants. Le groupe triterpénique du lupane comprend : lupeol, bétuline et l'acide bétulinique. La Frideline, un saponoside représentant dutype fridelane. Les triterpènes de type ursane comprennent un α -amyrine, l'acide ursulique, l'acide Chinique, l'acide tormentillique et l'acide crataégique. Le type oléanane est représenté par l'acide glycyrrhétinique, la β -amyrine, l'acide oléanolique, l'hipsogénine, l'hédéragénine et la protoaesciginine. Enfin, les groupes spéciaux comprennent cucurbitacines et limonoïdes, ceux sont les triterpènes des *Asteraceae* (taraxastérol, arnidiol, faradiol).

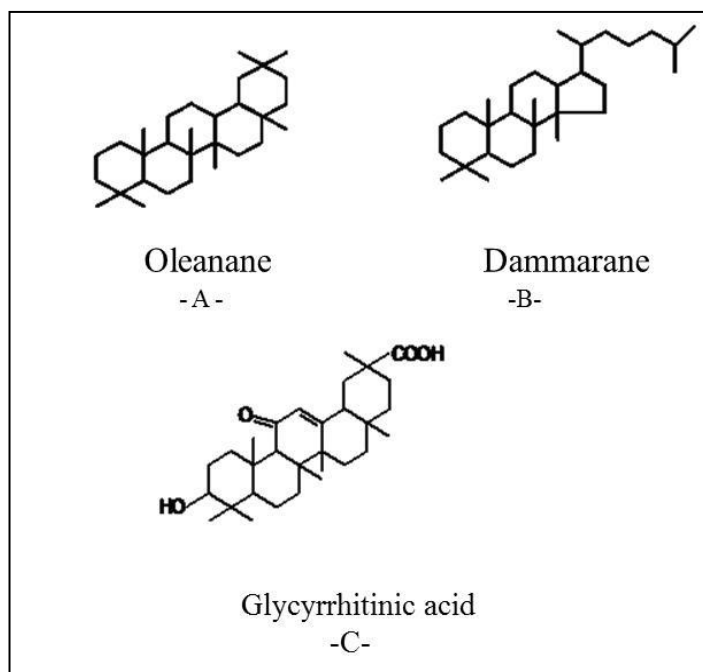


Figure N° 13: Les principaux aglycones triterpéniques.

II.2.3. Biosynthèse de saponosides à partir de l'oxydosqualène

Les saponosides sont le produit de la biosynthèse, de la voie des isoprénoïdes dans laquelle trois des unités d'isoprène (molécules contenant 5C-atomes) sont d'abord liées les uns aux autres de la manière « tête -à-queue », aboutissant à une molécule à 15 atomes de carbone-farnésyle pyrophosphate. Deux molécules de farnésyle pyrophosphate, sont par la suite liées de manière queue-à-queue pour obtenir un composé de 30 atomes de carbone, appelés squalène (Holstein et Hohl, 2004). Le squalène est oxydé en oxydosqualène (fig.14), qui est le point commun de départ pour les réactions de cyclisation dans la biosynthèse de triterpénoïde (fig.14)(Abe et al., 1993; Haralampidis et al., 2002). L'oxydosqualène est converti en dérivés cycliques *via* la protonation et l'ouverture du cycle époxyde, ce qui crée un carbocation (Fig.15.C.), qui peut subir plusieurs types de réactions de cyclisation.

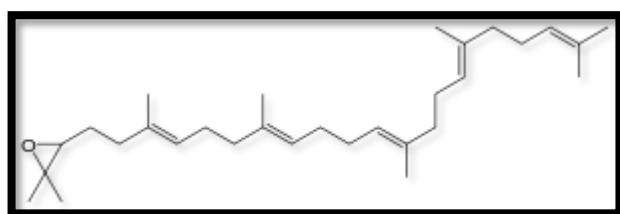


Figure N°14: structure chimique de l'oxydosqualène.

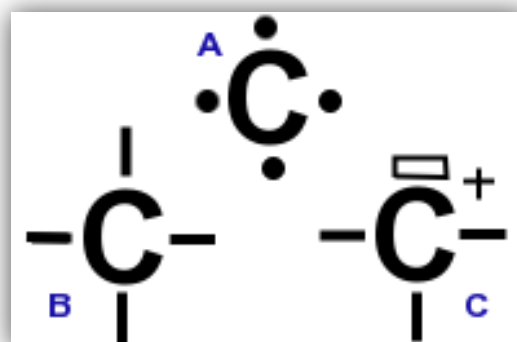


Figure N°15: Formule de Lewis.

A: formule de Lewis de l'atome de carbone
B: carbone non chargé
C: carbocation

Après ces cyclisations, des réarrangements ultérieurs peuvent être occasionnés de différentes manières par une série de changements d'hydrures et / ou par la migration de méthyle, qui conduit à la formation de nouveaux carbocations. Enfin, les carbocations sont neutralisés par un proton engendrant une élimination de la double liaison ou un anneau cyclopropanyle, sinon par réaction avec l'eau pour donner un groupe hydroxyle. Dans la Figure 16, la cyclisation principale et les réactions des réarrangements conduisent aux squelettes triterpéniques et stéroïdiques. Dans la littérature, le type d'enzyme telles que les cyclases, qui sont impliquées dans la réaction de cyclisation, détermine principalement le squelette qui est formé (Fig.). De nombreux types de cyclase (par exemple cycloarténol synthase, lanosterol synthase, β - amyrine synthase) ont été décrites , avec leurs mécanismes d'action (Abe et al. , 1993; Wendt et al. , 2000; Wendt , 2005 ; Haralampidis et al. , 2002 ; Thoma et al., 2004).

La cyclisation de l'oxydosqualène en saponine tritèrpenique/stéroïdique, peut se produire de deux façons, soit par l'intermédiaire de la conformation «chaise – fauteuil-chaise » ou par le « chaise - bateau –chaise ». Une différence importante entre les deux squelettes résultant, se situe dans la stéréochimie, qui est le plus clairement illustré par les configurations du proton du carbone C8 et le carbone C 14.

Après cyclisation de la conformation «chaise - fauteuil - chaise », le groupe méthyle sur l'atome du carbone C8 est pointé vers le haut et l'autre sur l'atome du carbone C14 est tourné vers le bas, alors que le contraire se produit, après cyclisation la conformation " chaise - bateau - chaise » (voir le carbocation du dammarenyle et du protosteryle, respectivement, sur la Fig. 15).

Une cyclisation du protons initié de la «chaise - fauteuil - chaise » est le résultat de la conformation en dammarene tétracyclique, due au carbocation du carbone C20, et toutes les saponines issues de ce carbocation sont classées comme des saponines de type dammarane (Ryu et al., 1997 ; Ma et al , 1999 ; Chakravarty et al., 2001).

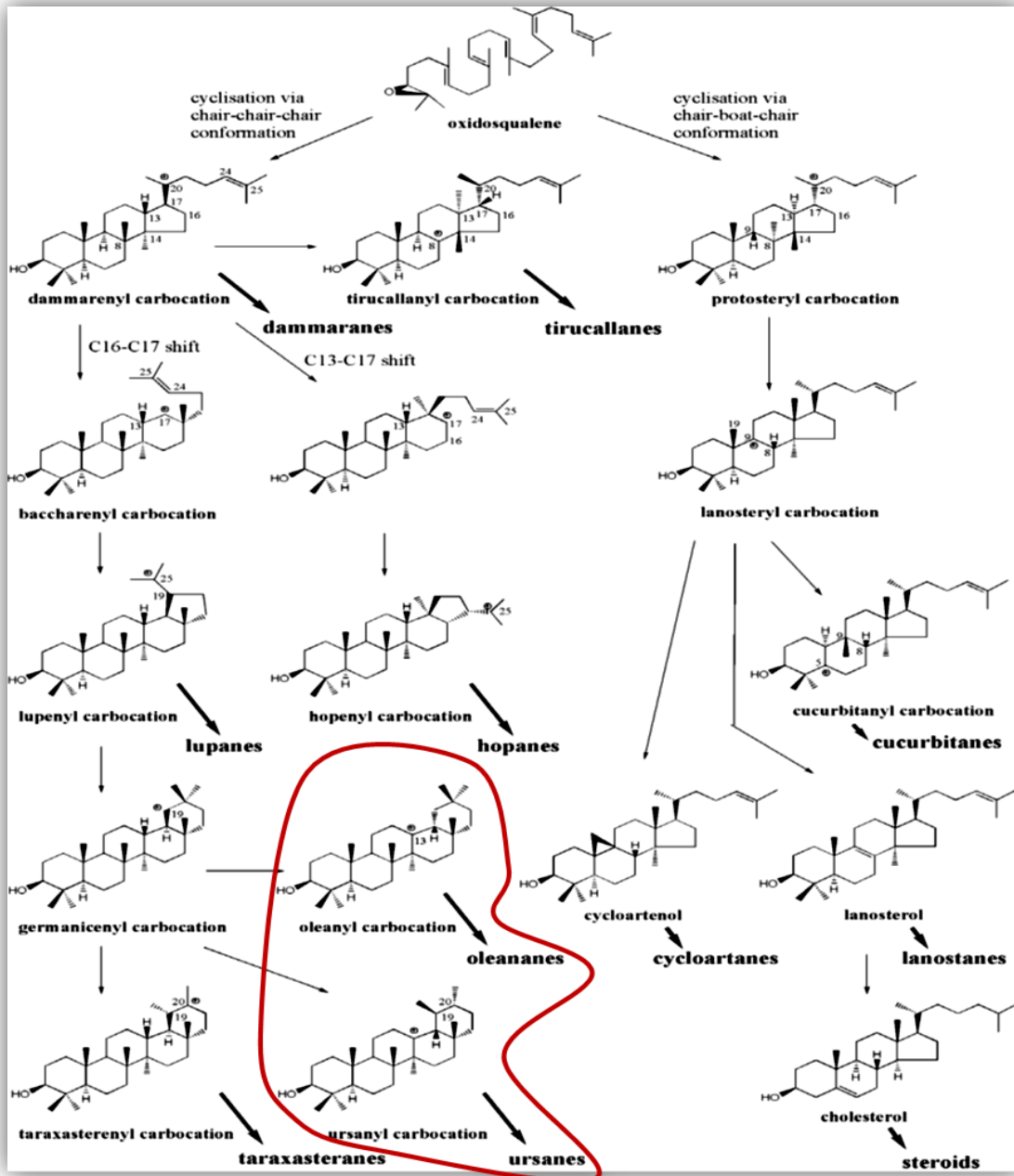


Figure N° 16 : Onze (11) structures, des principales classes de squelettes carbonés triterpeniques après cyclisation, et leurs divers dérivés (Vincken et al., 2007).

NB: les deux génines encadrées représentent les composés isolés des deux espèces étudiées.

Une série de changements de l'hydrure et du méthyle dans le carbocation dammarenyle, conduit au carbocation C8 du tirucallenyle, et toutes les saponines dérivées de ce carbocation sont classées comme tirucallane (Teng et al., 2003). Le cycle à 5 chaînons correspondant au carbocation C20 du dammarenyle, peut augmenter soit par un décalage de la liaison C16-C17, ou par un changement de la liaison C13-C17. Un changement de la liaison C16-C17 conduit au carbocation C17 du baccharenyle tetracyclique et peut être suivie

d'une réaction avec la double liaison C24-C25 pour produire le carbocation C25 du lupenyle pentacyclique. Toutes les saponines dérivées de ce carbocation sont classées, comme des saponines de type lupane (Pambou et al., 1990; Elgamal et al., 1998; Xiang et al., 2000 ; Yook et al., 2002). Le carbocation du lupenyle peut être réorganisé, d'abord en carbocation C18 du germanicenyle, et ensuite par l'intermédiaire d'une série de déplacements au carbocation C13 de l'hydrure oleanyle. Toutes les saponines issues de ce carbocation en oleanyle sont classées comme des saponines de type oléanane (Sparg et al., 2004) . Les saponines de type oléanane ont été isolées à partir d'un large éventail de plantes (Osborn, 1996, 2003; Woldemichael et Clin 2002 ; Treyvaud et al., 2000; Voutquenne et al., 2003; Wandji et al., 2003) , et ce squelette est également dénommé squelette β -amyrine (Haralampidis et al., 2002). Un déplacement de l'un des groupements méthyle dans le carbocation du germanicenyle produit le taraxasterenyle, qui peut être déprotoné pour obtenir des saponines de type taraxasterane (Yahara et al. , 1997; Cheng et al., 2002.) . Un méthyle peut passer au carbocation germanicenyle , suivi par plusieurs changements hydrure , et finit par produire le carbocation C13 , qui peut être déprotoné en un squelette saponine de type ursane (Babady et al., 1991; Amimoto et al., 1993; Zhao et al., 1997 ; Sanoko et al., 1999 ; Sahpaz et al., 2000). Le squelette ursane est aussi appelé le squelette α - amyrine.

les squelettes α -amyrine et la β - amyrine sont les produits de cyclisation des enzymes suivants : cyclase, α -amyrin synthase et β - amyrine synthase, respectivement (Haralampidis et al., 2002). Un changement de la liaison C13-C17 dans le carbocation C20 du dammarenyle conduit à un carbocation C17, qui peut être cyclisé par une réaction avec la double liaison dans la chaîne latérale et former le carbocation C25 de hopenyle pentacyclique. Toutes les saponines dérivées de ce carbocation sont classées comme des saponines hopane (Hamed et al., 1996; Meselhy et Aboutabl, 1997; Meselhy, 1998; Hamed et El - Emary, 1999; Sahu et al., 2001; Biswas et al., 2005). Il a été démontré que, dans des bactéries, l'hopane est cyclisé en squalène par l'enzyme « squalène hopene cyclase » vérifié par Wendt (2005).

Toutes les saponines de type hopane décrites dans les plantes contiennent un groupe hydroxyle sur l'atome C3. A partir de la cyclisation du proton initié de la conformation « chaise - bateau –chaise » de oxydosqualène, on obtient un carbocation C20 donnant un protosteryle tetracyclique, qui subit une série de changements hydrure et méthyle conduisant finalement à l'intermédiaire du carbocation en C9 lanosteryle. Ce carbocation peut subir d'autres changements d'un groupe méthyle et un hydrure au carbocation C5 en cucurbitanyle. Toutes les saponines dérivées de ce carbocation, sont classées comme des saponines de type cucurbitane (Oobayashi et al., 1992) . Le carbocation en lanosteryle peut également subir une déprotonation du groupement méthyle C19, conduisant à la formation d'un cyclopropane, comme on en trouve dans cycloarténol.

Enfin, toutes les saponines issues du cycloarténol sont classées comme des saponines de type cycloartane (Choi et al., 1989; . Xu et al., 1992; . Xu et Xu, 1992; Kennelly et al. , 1996; . Sun et Chen, 1997; Zhao et al., 1997; Verotta et al., 1998, 2001 ; Radwan et al., 2002).

II.2.4. Distribution des saponosides dans le règne végétal

Avec les aglycones isolés, résumés en squelettes de base dans la Figure N°17, il est intéressant d'étudier l'éventuelle relation entre l'origine végétale (taxonomie) et le type de saponine.

Les plantes peuvent être classées en fonction de leurs caractéristiques physiques et sont hiérarchiquement divisées en règne, sous-règne, division, classe, sous-classe, ordre, famille, genre et espèce. La figure 8, montre l'arbre phylogénétique des différentes plantes à partir desquelles ont été isolées les saponines. Nombreuses sont les espèces de plantes qui ont été identifiées à ce jour, l'arbre phylogénétique présenté dans la Figure 17, couvre seulement une sous-classe du royaume. Dans le tableau 1, on a représenté seulement les saponosides d'une grande catégorie dans le règne végétal, *Magnoliopsida* qui représente la classe à laquelle nos deux espèces : *Cyclamen africanum* Et *Zygophyllum cornutum* appartiennent.

Les classes appartiennent au sous- règne, *Tracheobionta*, qui sont toutes des plantes vasculaires, et de la division, *Magnoliophyta*, qui sont des plantes à fleurs ou des angiospermes.

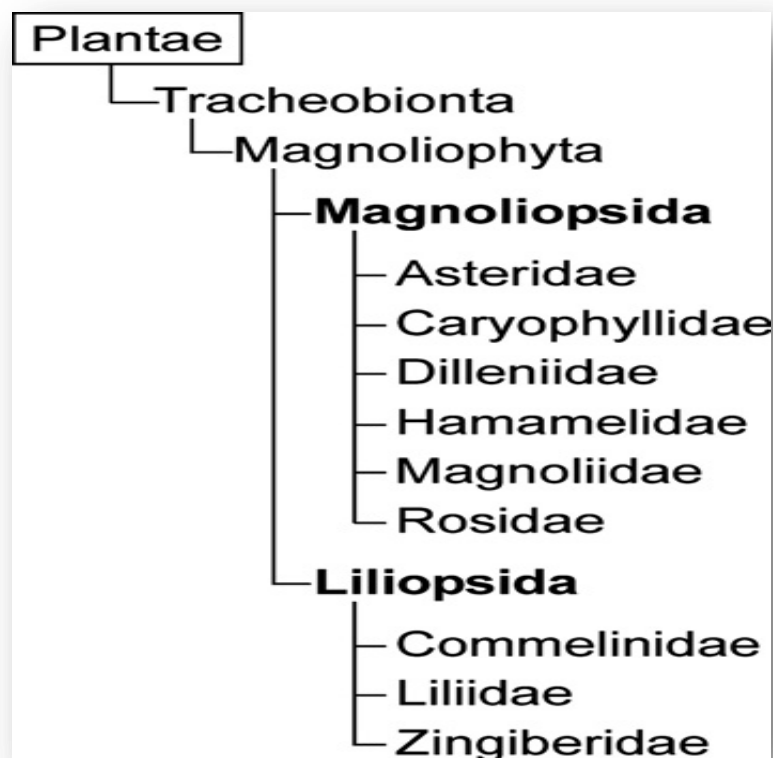


Figure N° 17 : Arbre phylogénétique montrant les sous-classes de plantes à partir desquelles les saponosides ont été isolés et caractérisés (Vincken et al., 2007).

Dans la classe des *Magnoliopsida*, il y a six sous-classes, à savoir, *Asteridae*, *Caryophyllidae*, *Dilleniidae*, *Hamamelidae*, *Magnoliidae* et *Rosidae*. Par exemple, *Asteridae* et *Dilleniidae* se composent de 8 et 5 ordres, respectivement. La répartition des différents squelettes de saponine dans les ordres différents de plantes est représentée dans le tableau 1.

Le nombre d'espèces de plantes à partir desquels, les saponosides ont été isolés est indiqué pour chaque ordre. On peut voir que « oléanane » (5) est le squelette le plus commun existant dans presque tous les ordres, à l'exception Solanales (Vincken et al., 2007).

Tableau N°1: Répartition des différents squelettes de carbone de saponines dans la classe des magnoliopsida (Vincken et al., 2007)

Plant Subclass	Order*	No. of species	Skeletons										
			Dam	Tir	Lup	Hop	Ole	Tar	Urs	Cd	Lan	Cuc	Ste
<i>Class of Magnoliopsida</i>													
Asteridae	Asterales	18					5,5c	6	7				
	Campanulales	1					5						
	Dipsacales	5		3			5		7				
	Gentianales	1					5						
	Lamiales	6					5	7b					
	Rubiales	11					5,5d,5f	6	7	8			
	Scrophulariales	6	1				5,5b,5f		7				
	Solanales	4											11,11b
Caryophyllidae	Caryophyllales	23		3		4,4a,4b	5,5c,5f		7				
Dilleniidae	Ebenales	9					5		7				
	Lecythidales	1					5						
	Primulales	8	1				5						11
	Theales	1					5						
	Violales	4					5		7		10		
Hamamelidae	Juglandales	1	1a										
Magnoliidae	Nymphaeales	1					5						
	Ranunculales	11					5,5f						11
	Apiales	26	1	3,3a			5,5a,5f		7				
Rosidae	Celastrales	7					5		7,7a	8	9		11
	Fabales	42					5						
	Myrtales	3		3			5						
	Polygalales	2					5						
	Rhamnales	3	1,1b				5						
	Rosales	5					5		7				
	Santalales	1					5						
	Sapindales	23		2			5,5f		7				11,11b
<i>Class of Liliopsida</i>													
Commelinidae	Cyperales	2					5				9		11,11a
Liliidae	Liliales	46					5		8				11,11b,11c
Zingiberidae	Zingiberales	2											11

II.2.5.Méthodes de phytochimie extractive et structurale des saponosides

Les techniques employées pour l'extraction des saponosides peuvent être classées en deux catégories, la technique d'extraction classique et les technologies vertes.

*Les techniques d'extraction classiques sont : la macération au Soxhlet et l'extraction de reflux.

*Les technologies vertes sont les ultrasons assistés, les micro-ondes assistées, et l'extraction par solvant accélérée (Heng et al., 2013).

Dans ce qui suit, nous allons présenter sommairement, les techniques de base utilisées pour l'extraction des saponosides à partir des plantes en général et les méthodes modernes d'analyse pour élucider leur structure.

II.2.5.1.Extraction

Les molécules de saponines sont extrêmement complexes elles sont composées schématiquement d'un noyau lipophile (aglycone, sapogénine) et d'une ou plusieurs chaînes de sucres hydrophiles (glycone) (fig.18), variables selon le type de saponine. Les saponines triterpéniques sont acides et les stéroïdes sont neutres (Benaiges et Guillén, 2007).

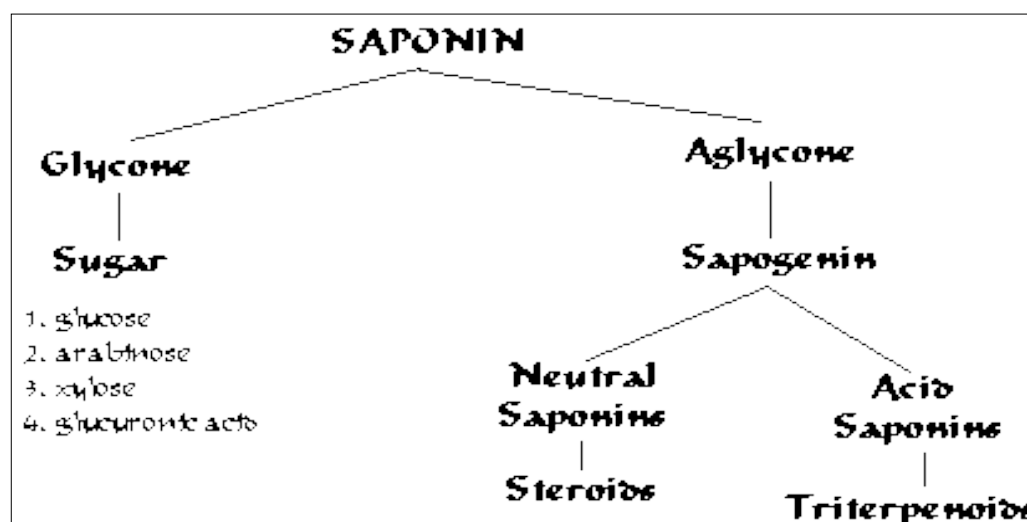


Figure N°18: Les parties constituant un saponoside (Benaiges et Guillén, 2007)

Les saponosides (saponines) ont un caractère détergent et donnent naissance à des mousses généralement stables. Elles sont très fréquentes dans les végétaux supérieurs, surtout dans les tissus riches en substance nutritive, les tubercules, les feuilles, les fleurs et les graines. La première indication de la présence de saponines dans les extraits végétaux et/ou fractions brutes de saponines peut être obtenue à l'aide de la pulvérisation de réactifs. Les saponines de type stéroïdique donnent des taches jaunes sur une plaque de chromatographie surcouche mince (CCM) avec l'anisaldéhyde, vertes avec le réactif de Komarowski qui fait apparaître en violet les taches liées aux saponines de type triterpénique (Hiai et al., 1976). Le travail de purification de saponines commence naturellement par l'obtention d'un mélange de saponines brutes.

Chaque protocole d'extraction des saponines est à adapter en fonction de la plante à étudier et de sa composition en saponines (stéroïdes ou triterpènes). En règle générale, tout commence par l'extraction de la matière végétale avec un solvant polaire, ou des solvants de polarité croissante suivant le schéma global d'extraction (Cheok et al., 2014).

II.2.5.2.Purification

La séparation d'un mélange de saponines en différents composants est une tâche difficile qui nécessite l'application combinée de plusieurs techniques chromatographiques. La chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC pour *Thin Layer Chromatography*) et la chromatographie sur couche mince haute performance (CCMHP) ou *High Performance Thin layer chromatography*(HPTLC), elles sont souvent utilisées pour les analyses qualitatives de routine (Zhang et al., 2013). La purification qui est ensuite réalisée, peut impliquer la chromatographie liquide à pression atmosphérique sur une colonne de gel de silice, la chromatographie Flash, la chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC) ou la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) qui est devenue la technique la plus puissante et la plus couramment employée. Dans la plupart des cas, certaines de ces étapes doivent être répétées avec un changement de support ou d'éluant afin d'atteindre un niveau de pureté élevé. Trois types de support sont souvent utilisés, notamment la silice en phase normale, la silice en phase inverse (RP-18) et le gel de Sephadex LH-20. Des solvants variés mettent en jeu la plupart du temps des mélanges de chloroforme-méthanol-eau sur silice normale, des mélanges méthanol-eau sur silice en phase inverse et des mélanges acétonitrile-eau en HPLC (Cheok et al., 2014).

II.2.5.3.Détermination structurale des saponosides

La détermination structurale des saponines est basée sur deux étapes :

-L'analyse chimique préliminaire par l'intermédiaire d'hydrolyses acides et alcalines fortes et/ou douces, permettant d'obtenir des informations sur la nature de l'aglycone et des sucres (schéma n°1).

-Puis des méthodes spectroscopiques (spectrométrie de masse et spectroscopie de RMN mono et bidimensionnelle) permettent d'attribuer la structure complète du composé.

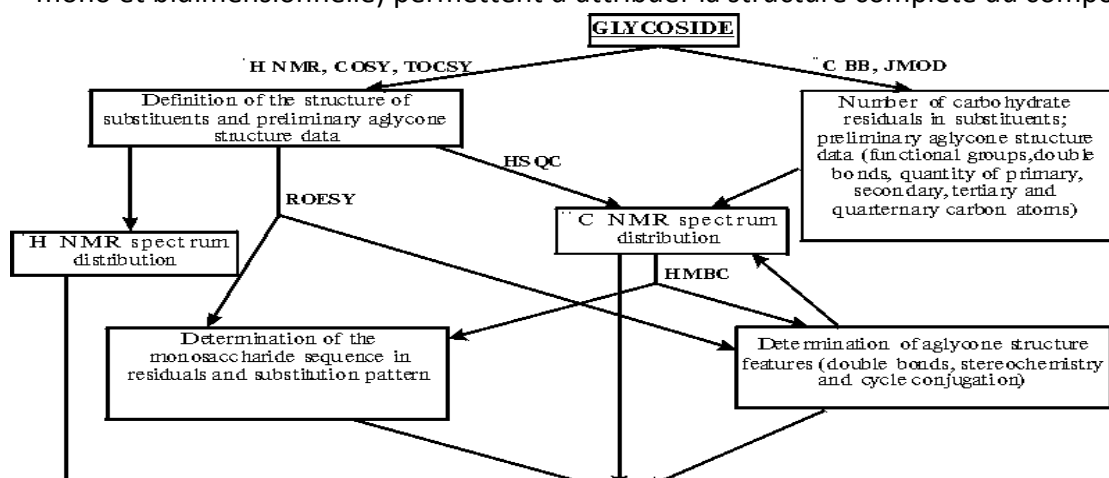


Schéma N°1 : Les expériences spectrales de la RMN -1D, -2D, utilisées pour la détermination structurale d'un glycoside, (Cai et al., 2008).

II.2.5.3.1. Méthode chimiques

***Hydrolyse acide et analyse par chromatographie à phase gazeuse**

La configuration absolue D ou L des sucres peut être déterminée par chromatographie en phase gazeuse de dérivés chiraux des sucres issus de l'hydrolysat acide par comparaison des temps de rétention obtenus avec ceux observés pour les dérivés d'échantillons témoins (Hara et al., 1987). Une méthode de détermination des configurations absolues des sucres consiste en la détermination du pouvoir rotatoire de ceux-ci après hydrolyse acide de la molécule et la séparation par CCM préparatives des sucres. Dans ce cas, il faut des quantités importantes de saponines. Cependant, généralement la configuration absolue L pour le rhamnose et arabinose, D pour le glucose, le xylose, le fucose et le quinovose est admise puisqu'il s'agit des sucres les plus fréquemment rencontrés dans la nature (Haddad et al., 2003).

II.2.5.3.2.Méthodes spectroscopiques

Différentes méthodes physico-chimiques et instrumentales parmi lesquelles les méthodes spectroscopiques et la spectrométrie de masse sont employées dans la procédure d'établissement de la structure de nouvelles sapogénines stéroïdiques et triterpéniques.

II.2.5.3.2.1.Spectrométrie de masse

À l'origine la spectrométrie de masse servait à détecter et à séparer les différents isotopes d'un élément. Elle est maintenant utilisée pour élucider la structure d'une substance en l'introduisant directement dans l'appareil ou en analysant les produits de séparation provenant de la chromatographie gazeuse, chromatographie liquide ou électrophorèse capillaire.

La spectrométrie de masse est impliquée dans de nombreux domaines de la chimie et son champ d'application, va en croissant grâce aux avancées instrumentales et théoriques qu'elle connaît depuis quelques années. La qualité première de la spectrométrie de masse est qu'elle utilise des quantités infimes de matière. Elle tient toujours une place de choix en chimie organique où elle s'est parfaitement adaptée aux analyses à haut débit (Chimie combinatoire et Chimiothèques), sous la forme d'appareils automatisés. La spectrométrie de masse, par sa sensibilité intervient également dans le développement de la chimie environnementale. Mais c'est sans conteste son implication en biologie qui a suscité, dans ces 10 dernières années, une explosion d'applications spectaculaires : depuis l'étude structurale de macromolécules isolées (modifications post-traductionnelles, complexes macro-moléculaires non-covalents, oligosaccharides, polynuléotides, etc.) jusqu'aux études menées nanomolécules (Cai et al., 2008) schéma n°2.

***.Composition d'un spectrometre de masse**

C'est un instrument qui comprend différentes parties placées en série et qui permettent successivement, après introduction de l'échantillon, l'évaporation et l'ionisation des molécules de l'échantillon (source), l'accélération des ions formés, la séparation de ces ions

en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) (analyseur) et enfin leur détection (Menet, 2011).

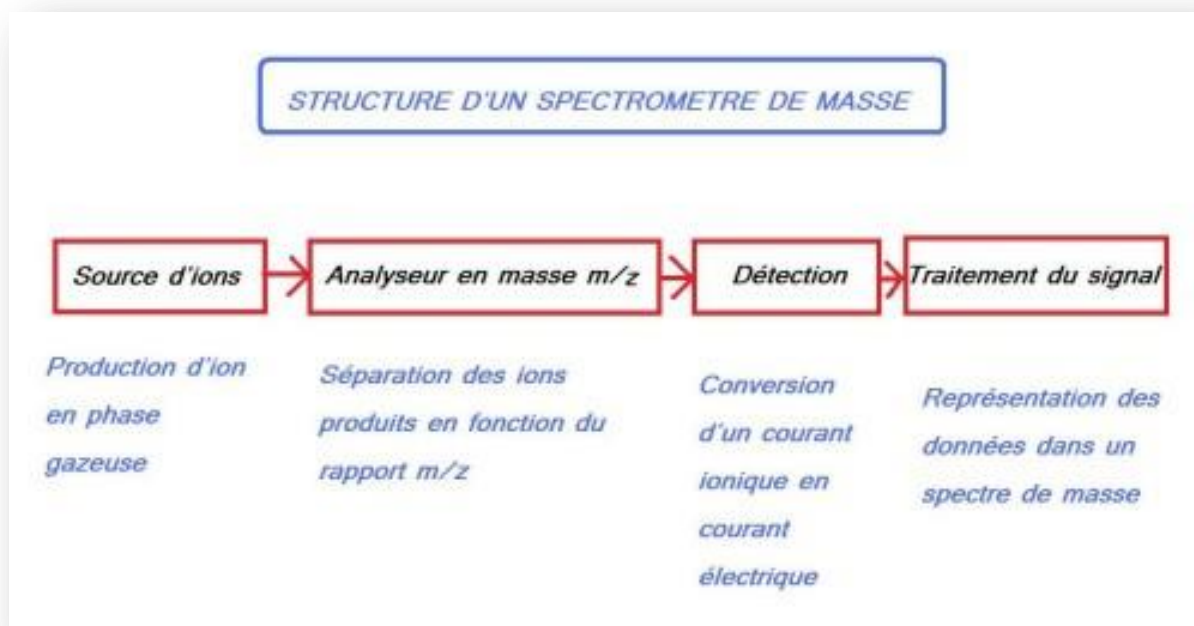


Schéma N°2 : Les étapes que suit une molécule, dans un spectromètre de masse (Menet, 2011).

***.Principe:**

Un composé organique introduit dans le spectromètre de masse est ionisé par bombardement électronique à 70 eV. L'ion ainsi obtenu, appelé ion moléculaire, permet la détermination de la masse molaire du composé. Il peut y avoir des ruptures des liaisons chimiques au sein de l'ion moléculaire, formant ainsi des ions fragments caractéristiques puisque cette dissociation éventuelle ne se fait pas au hasard mais selon des mécanismes bien déterminés. Ces ions fragments sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse/charge par l'application d'un champ magnétique et/ou électronique, puis collectés par un détecteur. L'ensemble de ces ions fragments constitue le spectre de masse dont la lecture permet l'identification de la structure moléculaire (Menet, 2011).

***. Modes d'ionisation**

Plusieurs type de sources existent et sont utilisées en fonction des modes d'ionisations, du résultat recherché et des molécules à analyser. Les principales et les plus utilisées sont :

*L'impact électronique (EI-MS) consiste à obtenir, sous vide, l'interaction d'une molécule et d'un électron accéléré à quelques dizaines de volts.

*La ionisation chimique (CI-MS) est une méthode qui utilise un gaz réactif (à la pression d'environ 1 mm Hg) qui est ionisé par un faisceau d'électrons et donne une série d'ions qui à leur tour réagissent avec les substances à analyser. On peut utiliser divers gaz, parmi lesquels l'ammoniac, le méthane et l'isobutane.

*L'electrospray est une technique qui permet de désolvater et d'ioniser, sous pression atmosphérique, les molécules d'échantillons dissoutes dans un solvant sous l'influence d'un champ électrique.

*La spectrométrie de masse à ions secondaires avec cible liquide (L.S.I.M.S) est une technique de désorption-ionisation par des ions rapides (Cs^+ accélérés à 30kV) en présence d'une matrice liquide.

*Le bombardement par atomes rapides (F.A.B) est une technique dont le matériau à analyser est dissout dans une matrice liquide puis bombardé sous vide avec une énergie élevée par un faisceau d'atomes.

*La désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) est une technique permettant de ioniser un échantillon solide préalablement dispersé dans une grande quantité de matrice en l'irradiant par des photons émis par un laser dont la longueur d'onde est située dans la bande d'absorption de la matrice(Menet, 2011).

***.Les ions**

L'ion moléculaire : c'est l'ion produit quand une molécule introduite dans la source d'un spectromètre de masse perd (M^+) ou acquiert un électron (M^-) L'ion moléculaire est toujours union à nombre impair d'électrons, de masse égale à celle de la substance neutre introduite dans la source. Il permet la détermination de la masse moléculaire. Cette masse est impaire si la molécule présente dans sa formule un nombre impair d'azote (comme par exemple, NH_3 de masse moléculaire 17 Da), elle est paire si la molécule ne présente pas d'azote ou contient dans sa formule un nombre pair d'azote (comme par exemple, C_6H_6 de masse moléculaire 78 Da et N_2H_4 de masse moléculaire 32 Da). La « règle de l'azote » énoncée ci-dessus s'applique parceque les isotopes les plus abondants des éléments usuels ont une masse et une valence de même parité exceptée l'azote (masse 14 Da).

L'ion pseudo-moléculaire : c'est l'ion résultant de la perte ou de l'addition d'atomes chargés à la molécule pour former un ion (comme par exemple $\text{M}^+ \text{H}^+$ pour donner MH^+ , ou $\text{M}^+ \text{Na}^+$ pour donner MNa^+). Il permet la détermination de la masse moléculaire.

L'ion parent ou précurseur : c'est un ion qui engendre un ion fils ou fragment. Ce terme est applicable à tout ion susceptible de se fragmenter.

L'ion fils ou fragment (ou ion fils, F^+ ou F^\dagger) : c'est l'ion produit par la perte d'un ou plusieurs fragments d'un ion précurseur. Si cet ion est issu d'un réarrangement (rétroDiels-Alder, Mc Lafferty) qui conduit à la perte d'un fragment neutre (H_2O (18 Da) ou NH_3 (17 Da), par exemple), sa parité est identique à celle de l'ion précurseur à condition que le fragment perdu ne contienne pas d'atome d'azote (Menet, 2011).

II.2.5.3.2. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire, RMN, est l'une des méthodes spectroscopiques d'analyse de la matière. Par rapport aux autres méthodes spectroscopiques, la RMN se situe à l'échelon le plus bas de l'échelle des énergies mises en jeu. En conséquence la RMN permet un examen extrêmement détaillé et non destructif de l'échantillon. Le phénomène physique de base est le magnétisme nucléaire. La très grande majorité des éléments

possède cette propriété au moins sous certaines formes isotopiques. Le champ d'investigation de la RMN est exceptionnellement large. Citons l'étude des molécules organiques, biologiques, inorganiques, l'étude des solides, l'étude des êtres vivants. Il est possible d'examiner quelques milligrammes voire microgrammes d'une molécule en solution ou bien un fragment. La RMN est un moyen d'investigation très puissant (fig.19)(Laurence et Nicole, 2006).

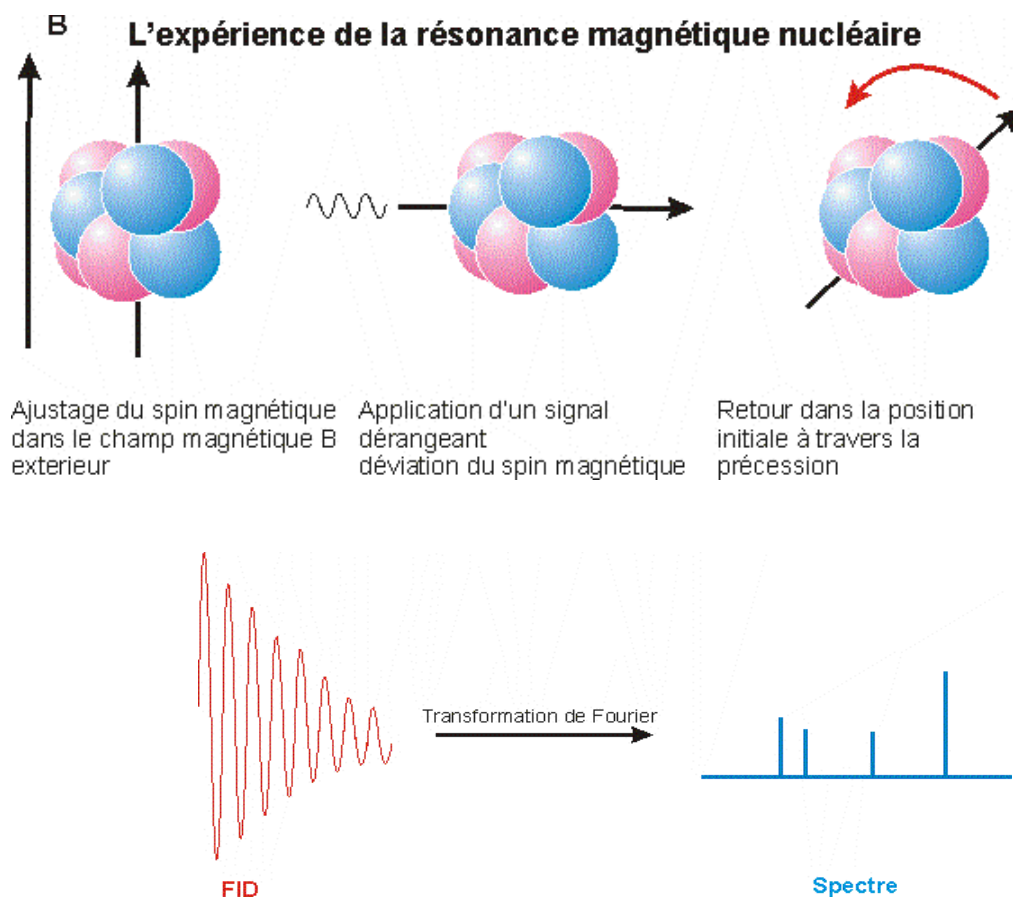


Figure N° 19 : Transformation de Fourier d'une molécule «B» sous l'effet d'un champ magnétique (Laurence et Nicole 2006).

Les informations correspondant à des noyaux de types différents, par exemple ^1H et ^{13}C ou ^1H et ^2H sont totalement distinctes. Dans les milieux liquides isotropes (RMN haute résolution), les différents noyaux d'un même type, par exemple ^1H ou ^{13}C ou ^{15}N , donnent chacun une réponse individuelle en fonction des caractéristiques de leur environnement. En analyse structurale il est possible de repérer l'enchaînement des atomes, leurs positions relatives dans l'espace. La proximité des noyaux à travers l'espace, soit à l'intérieur d'une molécule soit entre entités distinctes, peut être établie. De nombreux phénomènes d'échange sont détectés et analysés. Les mouvements moléculaires, mouvement global d'une molécule, mouvement interne d'une partie de la molécule ou mouvements relatifs d'entités distinctes (diffusion) peuvent être étudiés.

Dans les milieux anisotropes, liquides orientés et solides, la RMN présente des contraintes supplémentaires liées en particulier à la mobilité réduite des noyaux. Elle a néanmoins de nombreux intérêts : détermination de paramètres non accessibles en milieu isotrope, observation de substances insolubles, de l'intégrité structurale lorsque la dissolution dans un solvant ne permet pas de la conserver. La RMN *in vivo* permet de distinguer les tissus en fonction de leur teneur en noyaux ^1H (H_2O et/ou autres molécules), en fonction de paramètres liés à la mobilité de ces molécules, et d'obtenir des images des différents constituants d'une structure telle qu'une articulation ou des vaisseaux sanguins.

Outre ^1H , d'autres noyaux : ^{31}P , ^{13}C , ^{23}Na ... peuvent être exploités. Il est également possible de suivre l'évolution des molécules présentes dans les tissus (Laurence et Nicole 2006).

***.Interpretation des spectres R.M.N.**

La réalisation d'un spectre proton à une dimension est systématique. Elle permet de connaître plusieurs paramètres. Deux cas peuvent se présenter :

- La molécule a déjà été isolée et, dans ce cas, les déplacements chimiques de ses protons sont strictement identiques à ceux déjà publiés. L'analyse est alors facilitée.

-La molécule est nouvelle, la comparaison des déplacements chimiques avec la banque de données ne permet pas d'identifier les liaisons du composé. Dans ce cas, les analyses R.M.N. doivent être approfondies par la réalisation d'expériences à deux dimensions. Les expériences COSY homo et hétéronucléaire et ROESY permettent, dans la majorité des cas, d'identifier et d'élucider la structure primaire de différentes biomolécules tels que, des monosaccharides ou d'oligosaccharides (Wong et Poli, 2014).

***.Spectroscopie de RMN monodimensionnelle (^1H et ^{13}C)**

-Spectre du proton (^1H)

Ce type d'expérience apporte de nombreux renseignements à l'interprétation des spectres et qui sont (Maes et al., 1995) :

-La valeur des déplacements chimiques de chaque proton identifiable.

-Le nombre de résidus monosaccharidiques (nombre de protons anomères).

-La présence ou non d'acide sialique (présence des protons axial et équatorial).

-Le nombre d'osamines (nombre de raies correspondants aux groupements acétamides).

-Le nombre de résidus de 6-deoxyose et notamment de fucose (nombre de doublets caractéristiques dans les hauts champs ($1.1 < \delta_{\text{CH}_3} < 1.3$)).

-Accessoirement, l'état de pureté de la molécule (intensité relative des signaux).

Le spectre à une dimension peut être scindé en trois régions distinctes, comme l'indique la figure(20).

La région des protons anomères est importante (comprise entre 6 à ~ 4.5 ppm), elle permet de déterminer le nombre de résidus monosaccharidiques qui constituent l'oligosaccharide.

Les constantes de couplage peuvent être mesurées discriminant l'anomérie α ou β des sucres.

La "bulk region" (~ 3.6 à 3.2 ppm) renferme de nombreux protons qui possèdent une fréquence de résonance proche, ce qui rend leur distinction très difficile. Mais les protons portés par des carbones impliqués dans une liaison O-glycosidique sont très souvent

déblindés, ils peuvent alors glisser vers les bas champs. Par conséquent, ils peuvent être distingués. Enfin la région comprise entre 1 et 3 ppm correspond à différents protons qui apportent de nombreuses indications (présence des protons équatoriaux et étamides des osamines, etc. ...) (Maes et al., 1995).

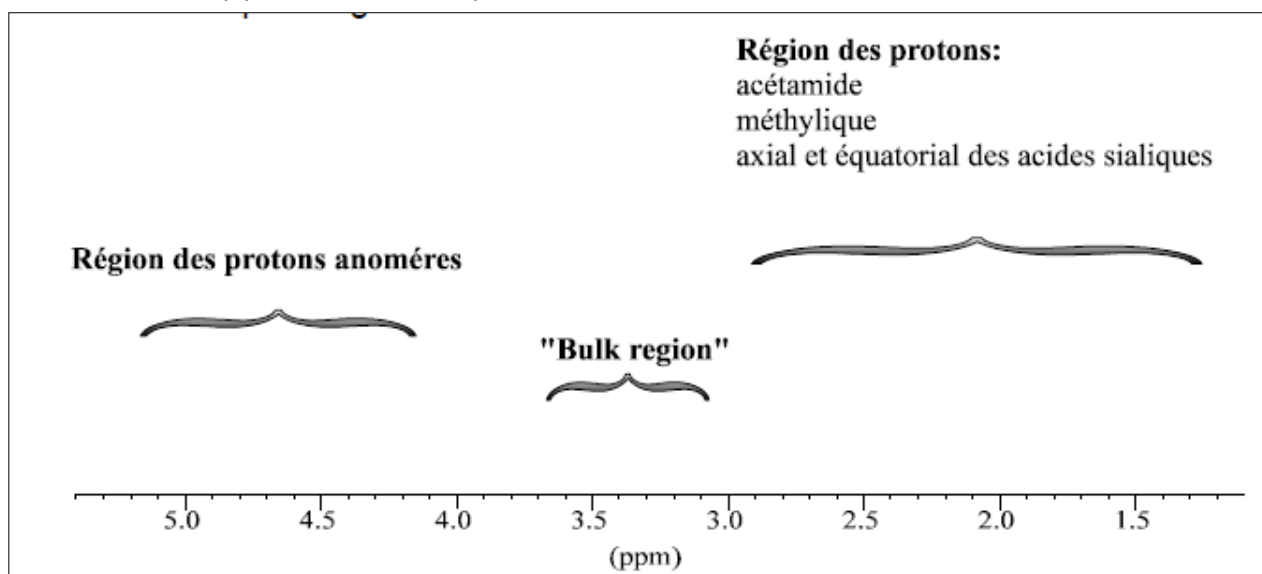


Figure N°20 : Le spectre une dimension (RMN-¹H), scindé en trois régions.
(Laurence et Nicole, 2006)

*Spectre du carbone ¹³C

Les ¹³C et ³¹P possèdent un moment magnétique nucléaire et il est donc possible de réaliser les expériences R.M.N. Tandis que l'abondance naturelle du ¹³C est de 1/100 par rapport au ¹²C, les expériences seront alors plus longues et les quantités de matériels devront être plus conséquentes. Alors que l'abondance naturelle du ³¹P est de 100%, les expériences seront plus facilement réalisables. De la même manière que pour le proton, la position et l'implication de ces noyaux dans une fonction chimique particulière influenceront leurs déplacements chimiques (constante d'écran), (Rouessac et al., 2004).

La fenêtre spectrale de l'observation des carbones se situe entre 0 et 200 ppm. Ainsi les carbones anomères se situent entre 90 et 110 ppm, les autres carbones résonnant entre 50 et 90 ppm.

Des signaux de carbones des groupes méthylènes (R-CH₂-R) sont observés aux environs des 60-70 ppm, les carbones méthyliques (R-CH₃) aux environs de 30 ppm et enfin le carbone d'une fonction carboxyle à environ 180 ppm. Une différence de $\Delta\delta = +10$ ppm est significative d'une substitution sur le carbone observé (Laurence et Nicole, 2006).

*.RMN Bidimensionnelle Homonucléaire

-Spectre COSY (Correlated Spectroscopy) ¹H/¹H

Le COSY 90 permet d'obtenir des informations importantes. Cette expérience permet de corréler les protons qui sont couplés scalairement, en d'autres termes celle-ci permet de transférer la magnétisation d'un proton sur un proton voisin et permet donc de visualiser les

constantes de couplage 3J entre 2 protons. Il existe plusieurs expériences COSY := $6.72 \cdot 10^7 \times 9.4 / 2\pi \sim 100\text{MHz}$.

- COSY 90 : Il y a transfert de magnétisation entre le proton H1 et H2.

- COSY R1 : COSY un relais, la magnétisation est transférée du H1 à H3 via H2.

- COSY R2 : La magnétisation va jusqu'au proton H4. Il existe également le COSY R3 et le TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY où COSY multirelayé).

Cette dernière expérience permet de transférer la magnétisation sur la totalité des protons d'un monosaccharide. Néanmoins, la visualisation des constantes de couplage y est beaucoup moins aisée (Maes et al., 1995).

Les expériences COSY sont fondamentales puisqu'elles permettent de mesurer toutes les constantes de couplage vicinales entre les différents protons et donc de déterminer la nature du monosaccharide (tab. 2). Cette expérience permet, en plus, de déterminer les déplacements chimiques des protons qui résonnent dans la "bulk region" (fig.12, tab.2), (Laurence et Nicole, 2006).

-Spectres NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY)

L'expérience NOE (Nuclear Overhauser Enhancement) met en évidence la proximité des protons. Les signaux de corrélation sont observés dans un spectre NOESY entre les paires de protons qui sont proches dans l'espace (Wong et Poli, 2014).

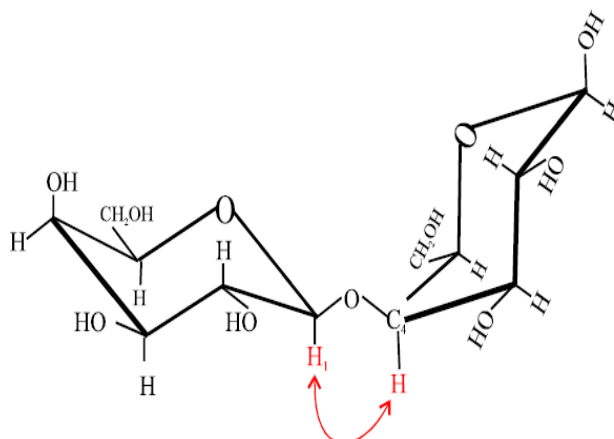
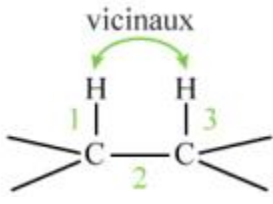
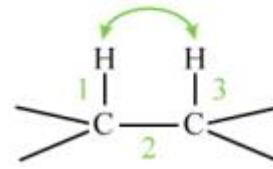
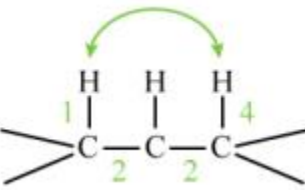
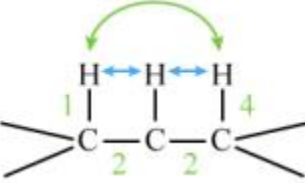
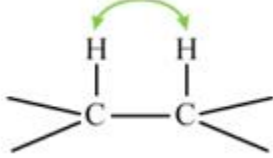


Figure N° 21 : Corrélation NOESY observée entre le proton anomérique H1 et le proton H4 de deux hexoses.

En général, on observe des corrélations 1,3-diaxiales et équatoriale-axiales entre les paires de protons distants de moins 4.5 Å (Fig.21). Si le NOESY intramoléculaire est un des outils importants dans l'attribution des signaux d'un résidu saccharidique, le NOESY intermoléculaire est essentiellement utilisé pour déterminer la séquence des sucres et leurs points de jonction (Wong et Poli, 2014).

Lorsqu'on observe une corrélation NOESY entre le proton anomère d'un sucre et un proton appartenant à un autre sucre, ces deux protons définissent la liaison entre les deux sucres. Les corrélations NOE sont les plus souvent observées entre le proton anomère et le proton relié à l'atome de carbone de la liaison avec l'hydrogène, (tab.2), (Wong et Poli, 2014).

Tableau 2: Corrélations observées dans l'expérience RMN Bidimensionnelle Homonucléaire, (Wong et Poli, 2014).

Expériences :	Dimension F2	Dimension F1	Exemples: D'information où n est le nombre de liaisons.
Corrélations Homonucléaires:			
<u>2D Homonucléaire J-résolue</u>	δ_H	J_{HH}	 $n_{J_{HH}}$ ($n \leq 3$)
<u>COSY 45</u> <u>COSY 90</u> <u>COSY DQF</u> <u>TOCSY</u>	δ_H, J_{HH}	δ_H, J_{HH}	 $n_{J_{HH}}$ ($n \leq 3$)
<u>COSY L.R.</u> <u>TOCSY</u>	δ_H, J_{HH}	δ_H, J_{HH}	 $n_{J_{HH}}$ ($n \leq 3$)
<u>COSY relayé</u> (avec un Relais Homonucléaire).	δ_H, J_{HH}	δ_H, J_{HH}	 $n_{J_{HH}}$ ($n \leq 3$)
<u>NOESY</u> <u>ROESY</u>	δ_H, J_{HH}	δ_H, J_{HH}	 N.O.E

***.RMN Bidimensionnelle Hétéronucléaire**

***HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)**

Cette expérience permet d'obtenir les corrélations et les couplages (${}^3J_{H,P} \sim {}^3J_{H,C} \sim 8\text{Hz}$) entre un proton et l'hétéroatome voisin (Fig.21). Ces informations sont d'autant plus importantes qu'elles permettent de déterminer la séquence de l'oligosaccharide (Wong et Poli, 2014)

En effet, les couplages en 3J , permettent de corréliser les noyaux distants de trois liaisons covalentes, il sera donc observé, pour un monosaccharide, les corrélations suivantes: $^3J_{H1,C3}$, $^3J_{H1,C5}$, $^3J_{H2,C4}$, $^3J_{H3,C5}$, $^3J_{H3,C1}$, $^3J_{H4,C2}$, $^3J_{H4,C6}$, $^3J_{H5,C3}$, $^3J_{H5,C1}$, mais surtout $^3J_{H1,CX}$ où X est la position du carbone du monosaccharide inclus dans la liaison O-glycosidique.,(Tab.3)(Wong et Poli, 2014).

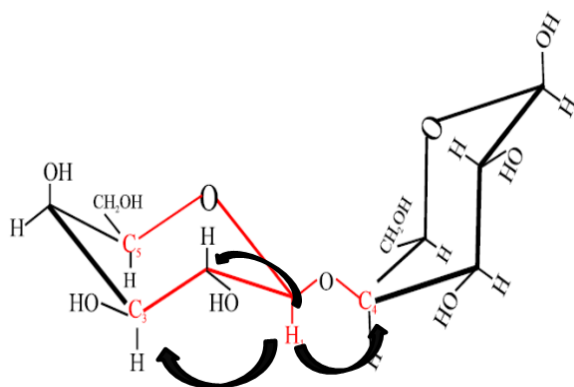
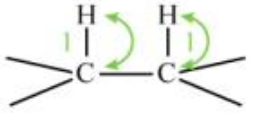
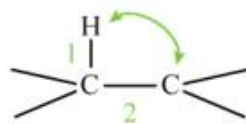


Figure N°22: Corrélations HMBC observées entre le proton anomérique et les carbones voisins

***HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)**

Les séquences de pulses permettent d’observer le couplage direct 1J entre un proton 1H et le carbone ^{13}C qui le porte. Les taches de corrélations apparaissent à l’intersection des déplacements chimiques des ^{13}C et des 1H qui sont directement liés les uns aux autres. Cette expérience permet, à partir du spectre proton, d’attribuer sans doute la majorité des carbones protonés de la saponine (Jaeger et Aspers, 2014) (tab.3).

Tableau 3 : Corrélations observées dans l’expérience RMN Bidimensionnelle Hétéronucléaire (Wong et Poli, 2014).

Expériences :	Dimension F2	Dimension F1	Exemples: D'information où « n » est le nombre de liaisons.
Corrélations Hétéronucléaires:			
XHCORR HSQC (inverse) 2D J-résolue	δ_C	δ_H, J_{HH}	 $^1J_{CH}$
HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)	δ_C	δ_H, J_{HH}	 $^1J_{CH}$ (n > 1)

II.3. Travaux phytochimiques antérieurs sur les saponosides des genres *Cyclamen* et *Zygophyllum*

Les deux genres des espèces étudiées, on fait l'objet de plusieurs travaux chimiques et pharmacologiques soulignant la présence de deux grands groupes de métabolites secondaires tels que les glycosides triterpéniques modesmosidiques et bidesmosidiques.

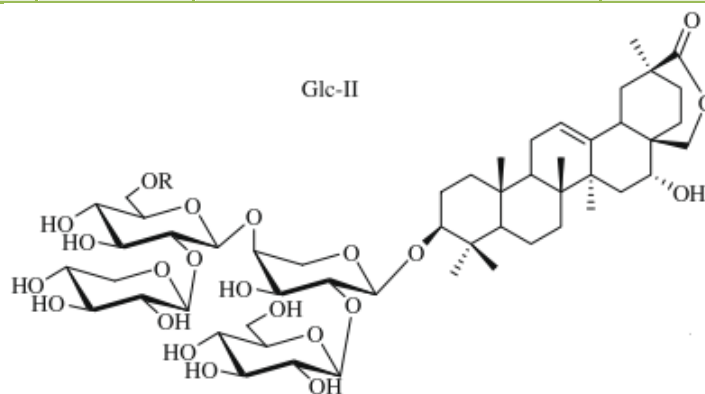
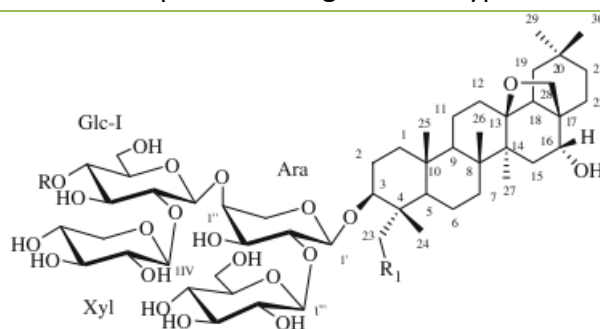
III.1. Genre *Cyclamen*

Les saponosides triterpéniques se retrouvent pour la plus part des plantes, dans la partie souterraine (racines bulbeuses) mais ils sont présents également dans les parties aériennes (feuilles, tiges). Les recherches se sont focalisées sur les saponosides triterpéniques contenues dans le genre. Ainsi, on note plusieurs articles scientifiques décrivant l'isolement et la caractérisation de plusieurs saponosides extraits de plusieurs espèces de ce genre. On notera que ces divers travaux décrivent des types de saponosides avec les génines suivantes : l'acide oléanolique, l'acide ursolique et la Cyclamigenin B. Les différents saponosides isolés de quelques espèces étudiées sont consignés dans les tableaux n°3, 4, 5 et 6.

Tableau N°4 : Saponosides à génine de type oléanane.

N°	R	R1	espèce	Référence
1	Glc	H	<i>Cyclamen repandum</i> tubers	Dall'Acqua et al.,(2010)
2	H	H	<i>Cyclamen repandum</i> tubers	Dall'Acqua et al.,(2010)
3	Glc	OH	<i>Cyclamen repandum</i> tubers	Dall'Acqua et al.,(2010)
4	H	OH	<i>Cyclamen repandum</i> tubers	Dall'Acqua et al.,(2010)

N°	R	R1	espèce	Référence
5	Glc	H	<i>Cyclamen repandum</i> tubers	Dall'Acqua et al.,(2010)



6	H	<i>Cyclamen repandum</i> tubers	Dall'Acqua et al.,(2010)
---	---	---------------------------------	--------------------------

Tableau N°4: Saponosides à génine de type oléanane (suite).

Structure	espèce	référence
	<i>Cyclamen repandum</i> tubers	Dall'Acqua et al .,(2010)

--

N°	R1	R2	R3	R4	Espèce	Référence
1	CH ₂ OH	H	CH ₃	Y	<i>Lysimachia.</i>	Podolak et al .,(2013)
2	CH ₃	OAc	CH ₃	Y	<i>Lysimachia.</i>	Podolak et al .,(2013)
3	CH ₃	H	CHO	Y	<i>L. thysiflora</i> <i>L.clethroides</i>	Podolak et al .,(2013)
4	CH ₃	H	CH ₃	X	<i>L.clethroides</i>	Podolak et al.,(2013)
5	CH ₃	H	CH ₃	Y	<i>L.clethroides,</i> <i>L. vulgaris</i>	Podolak et al.,(2013)
6	CH ₃	H	CH ₂ OH	Y	<i>Lysimachia.</i> <i>Vulgaris</i>	Podolak et al .,(2013)
7	CH ₃	H	CHO	H	<i>Lysimachia.</i> <i>Vulgaris</i>	Podolak et al .,(2013)

NB:X= alpha-L-rhamnopyranose, Y= beta-D-xylopyranose

Tableau N°5: Saponosides à génine de type oléanane.

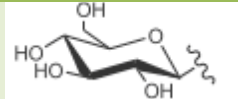
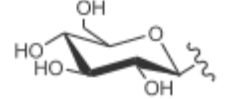
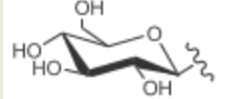
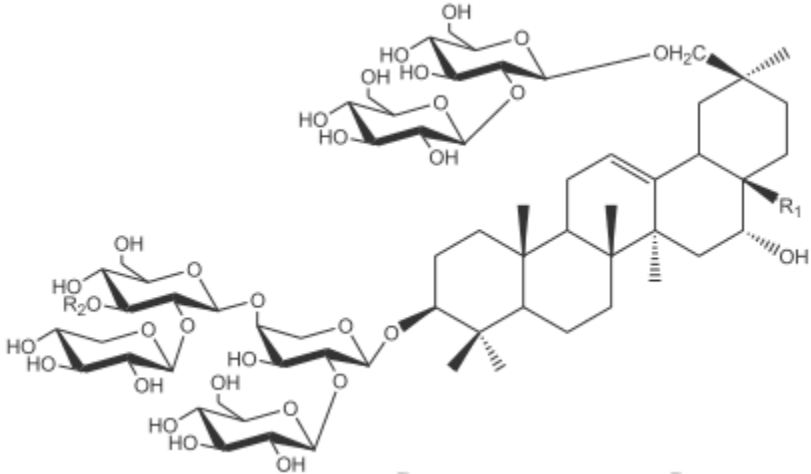
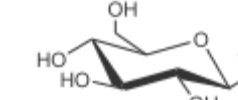
N°	R1	R2	R3	espèce	référence
1	COOH	H	H	<i>Cyclamen hederifolium</i>	Altunkeyik et al., 2012.
2	COOH		H	<i>Cyclamen hederifolium</i>	Altunkeyik et al., 2012.
3	CHO			<i>Cyclamen hederifolium</i>	Altunkeyik et al., 2012.
					
N°	R1	R2	Espèce	référence	
4	CHO	H	<i>Cyclamen hederifolium</i>	Altunkeyik et al., 2012.	
5	CH ₂ OH		<i>Cyclamen hederifolium</i>	Altunkeyik et al., 2012.	

Tableau N°6 : Saponosides à génine de type oléanane.

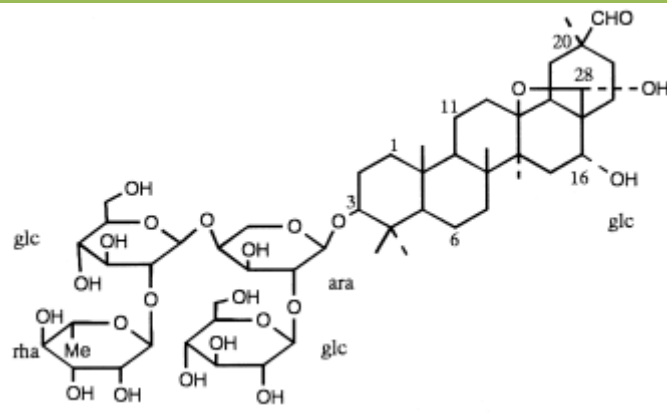
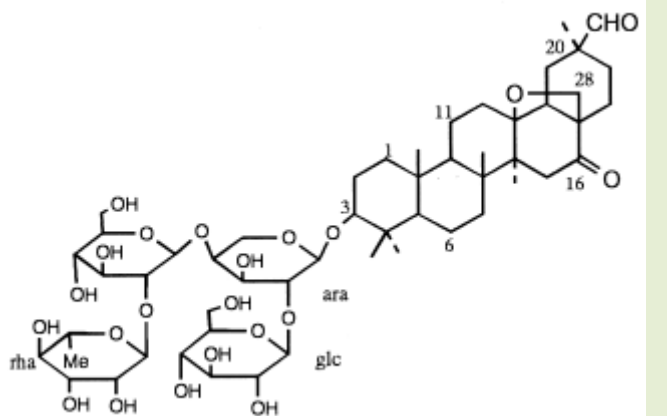
N°	Structure	espèce	référence
1	 <p>ardisimamilloside A</p>	<i>Ardisia mamillata</i>	Huang et al., 2000
2	 <p>ardisimamilloside B</p>	<i>Ardisia mamillata</i>	Huang et al., 2000

Tableau N°7: Saponosides à génine de type oléanane.

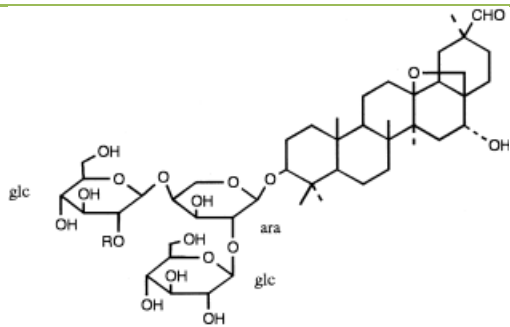
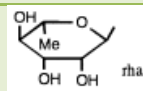
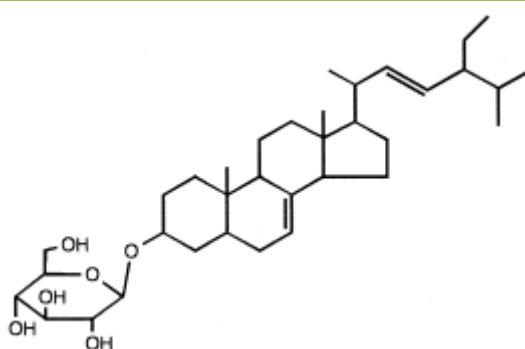
			
N°	R	Espèce	Référence
3		<i>Ardisia mamillata</i>	Huang et al., 2000
4	H	<i>Ardisia mamillata</i>	Huang et al., 2000

Tableau N°8 : Cas de saponosides stéroïdiques, à génine de type cholestane.

N°	Structure	Espèce	Référence
5		<i>Ardisia mamillata</i>	Huang et al., 2000

III.2.Genre *Zygophyllum*

Beaucoup d'espèces de cette famille ont des propriétés thérapeutiques remarquables, et sont utilisées en médecine traditionnelle. Dans ce qui suit, nous allons citer quelques recherches qui ont conduit à l'isolement et la caractérisation des glycosides ayant des structures de saponosides triterpéniques (aglycone=acide quinovique) qui se rapprochent le plus des saponosides isolés dans cette étude (tableau N° 9 et 10 page 39 –page 46).

Tableau N°9 : Saponosides triterpéniques à génine de type acide quinovique.

N°	R				Espèce	Référence
N°	R1	R2	R3	Espèce	Référence	
2	H	Glc (2-1)GLC	H	<i>Zygophyllum album</i>	Abdel-Aty & Ali.,(2009)	
3	D-quinovose	H	H	<i>Zygophyllum album</i>	Abdel-Aty & Ali.,(2009)	
4	H	H	Glc (2-1)GLC	<i>Zygophyllum album</i>	Abdel-Aty & Ali .,(2009)	
5	D-quinovose(3-6) β -D-xylose	H	H	<i>Zygophyllum album</i>	Abdel-Aty & Ali .,(2009)	
6	D-quinovose	H	D-quinovose	<i>Zygophyllum album</i>	Abdel-Aty & Ali .,(2009)	

Tableau N°10: Saponosides triterpéniques à génine de type acide quinovique.

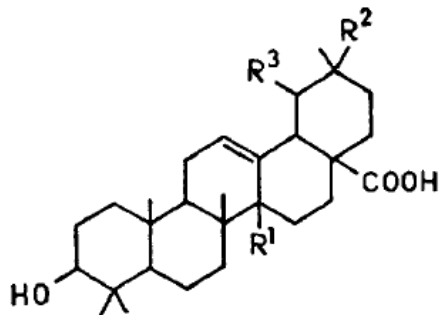
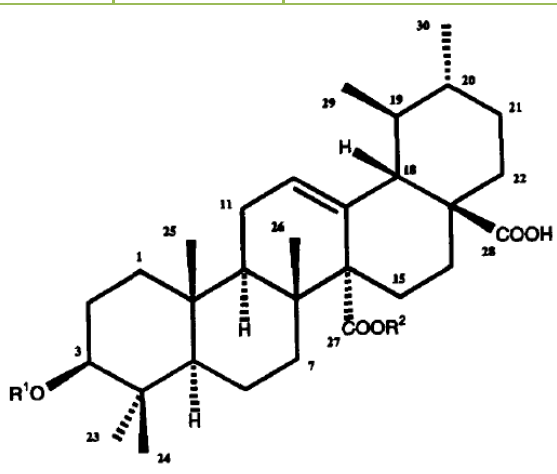
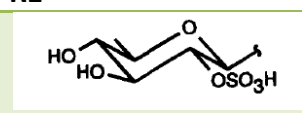
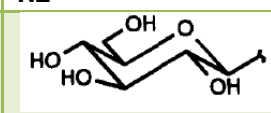
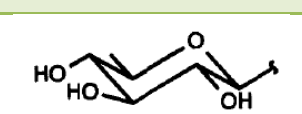
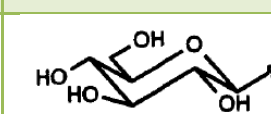
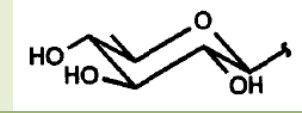
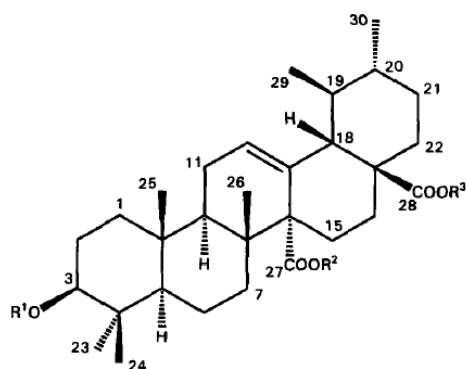
					
N°	R1	R2	R3	Espèce	Référence
1	COOH	H	Me	<i>Zygophyllum coccineum</i> <i>Z. album</i>	(Ouf et al., 1994)
2	Me	Me	H	<i>Zygophyllum dumosum</i>	(Ouf et al., 1994)
3	Me	H	Me	<i>Zygophyllum dumosum</i>	(Ouf et al., 1994)
					
N°	R1	R2	Espèce	Référence	
1			<i>Zygophyllum coccineum</i> <i>Z. album</i> <i>Z. dumosum</i>	(Elgamal et al., 1995)	
2			<i>Zygophyllum dumosum</i>	(Elgamal et al., 1995)	
3		H	<i>Zygophyllum dumosum</i>	(Elgamal et al., 1995)	
4	H	H	<i>Zygophyllum Sp</i>	(Elgamal et al., 1995)	

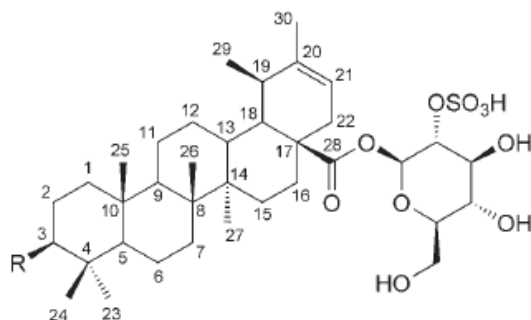
Tableau N°10: Saponosides triterpéniques à génine de type acide quinovique (suite).



N°	R1	R2	R3	Espèce	Référence
1		H	β -D-Glucopyranosyl	<i>Zygophyllum dumosum</i> <i>Zygophyllum coccineum</i>	(Pöllmann <i>et al.</i> , 1997)
2	β -D-Glucopyranosyl	H	β -D-Glucopyranosyl	<i>Zygophyllum dumosum</i> <i>Zygophyllum coccineum</i>	(Pöllmann <i>et al.</i> , 1997)
3		Me	β -D-Glucopyranosyl	<i>Zygophyllum Sp</i>	(Pöllmann <i>et al.</i> , 1997)
4		H	β -D-Glucopyranosyl	<i>Zygophyllum dumosum</i> <i>Zygophyllum coccineum</i>	(Pöllmann <i>et al.</i> , 1997)
5		H	H	<i>Zygophyllum coccineum</i>	(Pöllmann <i>et al.</i> , 1997)
6		H	β -D-Glucopyranosyl	<i>Zygophyllum dumosum</i>	(Pöllmann <i>et al.</i> , 1997)
7		H	H	<i>Zygophyllum coccineum</i>	(Pöllmann <i>et al.</i> , 1997)
8	β -D-Glucopyranosyl	H	H	<i>Zygophyllum coccineum</i>	(Pöllmann <i>et al.</i> , 1997)
9	β -D-Quinovopyranosyl	H	β -D-Glucopyranosyl	<i>Zygophyllum coccineum</i>	(Pöllmann <i>et al.</i> , 1997)

10	β -D-Quinoyopyranosyl	H	H	<i>Zygophyllum coccineum</i>	(Pöllmann <i>et al.</i> , 1997)
----	-----------------------------	---	---	------------------------------	---------------------------------

Tableau N° 10: Saponosides triterpéniques à génin de type ursane-20 β , 28-olide.



N°	R	Espèce	Référence	
1		<i>Zygophyllum geslini</i>	(Smati <i>et al.</i> , 2007)	
2		<i>Zygophyllum geslini</i>	(Smati <i>et al.</i> , 2007)	
N°	R1	R2	Espèce	Référence
1		H	<i>Zygophyllum geslini</i>	(Smati <i>et al.</i> , 2007)
2		β -D-Glucopyranosyl	<i>Zygophyllum geslini</i>	(Smati <i>et al.</i> , 2007)

Tableau N°10: Saponosides triterpéniques à génine de type acide quinovique (suite).

N°	Structure	Espèce	Référence		
N°	R1	R2	R3	Espèce	Référence
1	OH	OH		<i>Zygophyllum decumbens</i>	(Pöllmann <i>et al.</i> , 1998)
2	OH	OH		<i>Zygophyllum decumbens</i>	(Pöllmann <i>et al.</i> , 1998)
3	H	H		<i>Zygophyllum decumbens</i>	(Pöllmann <i>et al.</i> , 1998)
		<i>Zygophyllum gaetulum</i>	(Aquino <i>et al.</i> , 2001)		

Tableau N°10: Saponosides triterpéniques à génine de type oléanane.(suite).

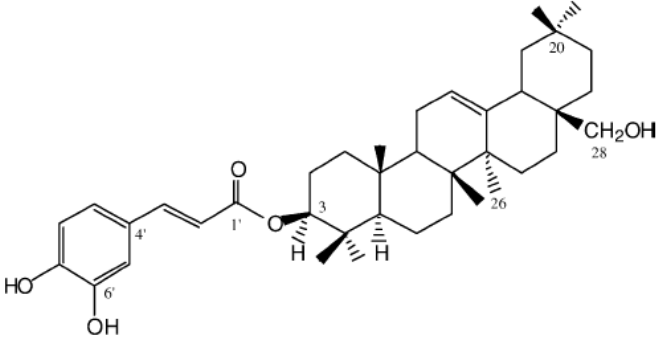
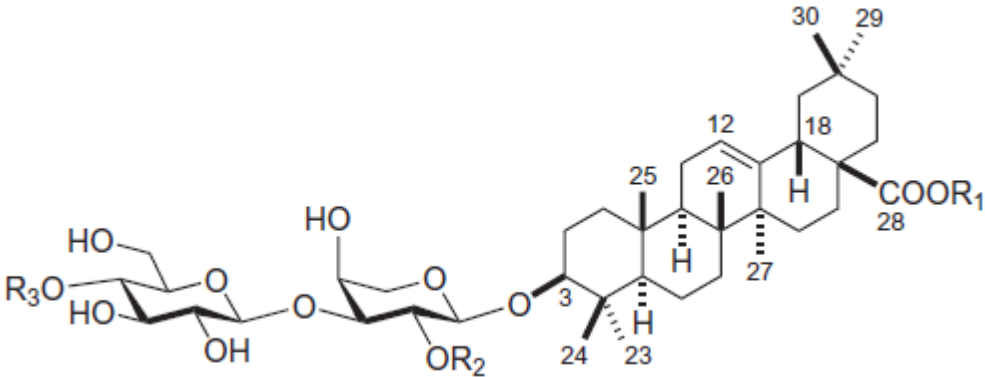
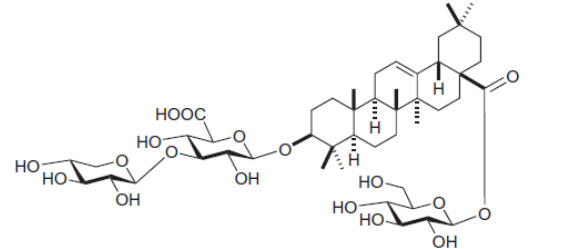
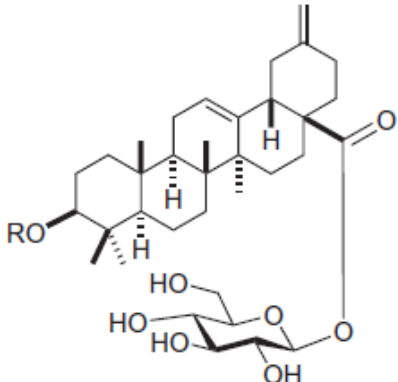
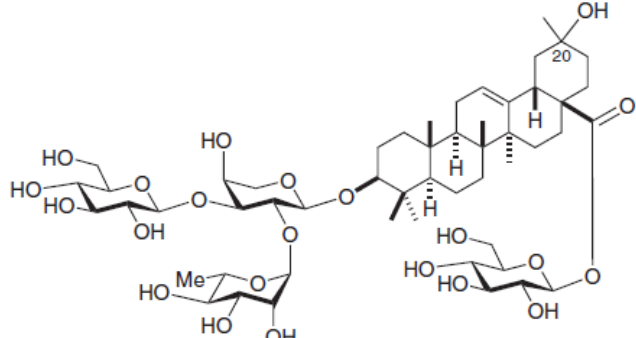
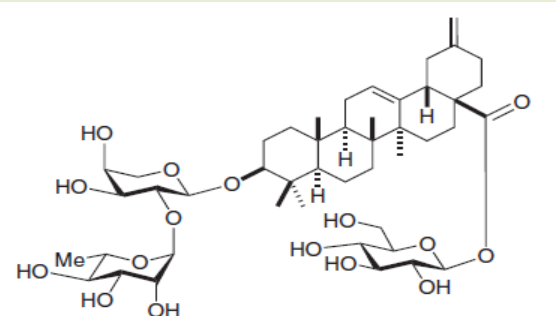
1				<i>Zygophyllum geslini</i>	(Smati <i>et al.</i> , 2004)
					
N°	R1	R2	R3	Espèce	Référence
1	Glc	H	SO ₃ Na	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
2	Glc	SO ₃ Na	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
3	H	H	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
4	Glc	H	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
6	H	Rha	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
7	Glc	Rha	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
8	Glc-(1→6)-Glc	Rha	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
5				<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)

Tableau N°10: Saponosides triterpéniques à génine de type oléanane.(suite).

N°	R1	R2	Espèce	Référence
9	Glc	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
10	H	Glc	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
11	H	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)

N°	R1	R2	R3	R4	R5	Espèce	Référence
12	H	H	H	H	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
14	Glc	H	Ac	H	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
15	Glc	H	H	H	Ac	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
16	Glc	H	H	SO ₃ Na	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
17	Glc	Rha	H	SO ₃ Na	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
18	Glc-(1→6)-Glc	Rha	H	H	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
22	Glc	H	H	H	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
24	H	Rha	H	H	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
25	Glc	Rha	H	H	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)

Tableau N°10: Saponosides triterpéniques à génine de type oléanane.(suite).

N°	R	Espèce	Référence
			
13	Ara	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
21	H	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
			
19	20 β -OH	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
20	20 α -OH	<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
21		<i>Larrea tridentata</i>	(Jitsuno & Mimaki, 2010)
			

CHAPITRE III : PHARMACOLOGIE

III.1. Réaction inflammatoire

III.1.1. Définition

L'inflammation est l'ensemble des mécanismes réactionnels de défense par lesquels l'organisme reconnaît, détruit et élimine toutes les substances qui lui sont étrangères. La réaction inflammatoire dépasse parfois ses objectifs, responsable d'effets délétères, mais il s'agit là du prix que l'organisme doit parfois payer pour assurer le maintien de son intégrité. Les causes de l'inflammation sont nombreuses et variées : agent infectieux, substance étrangère inerte, agent physique, lésion cyto-tissulaire post-traumatique. L'inflammation commence par une réaction de « reconnaissance » faisant intervenir certaines cellules de l'organisme (monocytes, macrophages, lymphocytes) ou des protéines circulantes (Protéines de la Réactions Inflammatoire (PRI), anticorps, protéines du complément, facteur de Hageman...). A la phase de reconnaissance fait suite la mise en jeu séquentielle de tout un ensemble de cellules et de médiateurs dont l'ordre d'intervention est complexe et variable. Certains médiateurs, comme les prostaglandines et les cytokines, sont produites par différents types cellulaires, agissent sur plusieurs types cellulaires et contrôlent parfois leur propre production par régulation rétroactive. C'est dire la complexité des mécanismes de la réaction inflammatoire, empêchant la description d'un schéma d'ensemble et obligeant à une description analytique et individuelle des cellules et des médiateurs qui la composent (Okoli et Akah, 2004).

on distingue plusieurs phases successives dans la réaction inflammatoire, congestive, exsudative, proliférative, nécrotique (Engler, 1995). Sous l'influence d'un agent phlogogène, la réaction inflammatoire classique se développe en quatre phases plus ou moins distinctes et d'importance variable.

III.1.1.1. Première phase est une vasodilatation artériolaire qui entraîne un érythème, un dégagement de chaleur locale, une hyperesthésie. La peau de la zone enflammée est rouge, la douleur apparaît à la pression (*rubor, calor, dolor*). En même temps l'observation démontre une stase du sang dans les vaisseaux capillaires, une augmentation de la perméabilité capillaire, un afflux des leucocytes par diapédèse.

III.1.1.2. Deuxième phase est caractérisée par la formation d'un œdème. Le liquide plasmatique passe dans le compartiment interstitiel du derme. Les cavités séreuses (plèvre, péritoine, synovie) se remplissent de liquide.

III.1.1.3. Troisième phase consiste en la formation d'un tissu de granulation. Les leucocytes affluent, des macrophages et des fibroblastes apparaissent. Le tissu de granulation est un tissu conjonctif jeune, riche en fibroblastes et en capillaires, pauvre en fibres conjonctives. Ce tissu nouvellement formé peut s'individualiser en granulome.

III.1.1.4. Quatrième phase est une phase de sclérose du tissu nouvellement formé, qui, envahi par des fibres conjonctives, perd son élasticité et se sclérose.

III.2. Cellules de l'inflammation

Les cellules qui interviennent dans les mécanismes de l'inflammation sont à la fois des cellules circulantes qui migrent vers le tissu interstitiel et des cellules résidentes des tissus interstitiels (Tableau 11).

Tableau N°11 : Les différentes cellules intervenant dans la réaction inflammatoire (Amoros et al., 1987).

Cellules sanguines circulantes	Cellules résidentes tissulaires
Polynucléaires neutrophiles	Macrophages
Monocytes	Histiocytes
Polynucléaires éosinophiles	Mastocytes
Basophiles	Cellules endothéliales
Plaquettes	Fibroblastes
Lymphocytes	
Plasmocytes	

III.2.1. Polynucléaires neutrophiles (PNN)

La production des polynucléaires est médullaire à partir de cellules souches pluripotentes. Leur maturation et leur prolifération est contrôlée principalement par 2 cytokines : GM-CSF et G-CSF. Il existe une production basale de PNN, production qui augmente en cas de besoin. La maturation des PNN nécessite environ 5 jours et la durée de vie d'un PNN est de 2 jours. Leur action dans l'inflammation s'exerce par l'intermédiaire de récepteurs de surface :

- Différents récepteurs chimiotactiques (pour LTB₄, C5a). L'activation de ces récepteurs génère la migration des PNN vers le site de l'inflammation mais aussi la production de radicaux libres oxygénés et l'expression de molécules d'adhésion.
- Récepteurs pour les opsonines : récepteurs Fc pour le fragment Fc des IgG, récepteurs pour les fragments du complément activé.
- Récepteurs pour les molécules d'adhésion des cellules endothéliales.

Une fois activés, les PNN synthétisent des produits d'abord stockés dans des granules primaires (lyzosomes) ou secondaires, puis libérés soit à l'intérieur même de la cellule et agissant sur les substances phagocytées, soit dans le milieu extra-cellulaire. Ces produits sont nombreux : cathepsine G, myéloperoxydase, protéinase-3, chondroïtine-sulfate, héparine-sulfate, collagenase, phosphatase acide et alcaline, lactoferrine, PAF, eicosanoïdes (TXB₂, LTB₄, 5-HETE), radicaux libres oxygénés.(Park et al., 2009).

III.2.2 . Les monocytes et macrophages

Monocytes, macrophages circulants et macrophages tissulaires (tableau 12) constituent le système des phagocytes mononucléés. Toutes ces cellules dérivent des monocytes circulants d'origine médullaire. Les monocytes ont une durée de vie courte : environ 24 heures. A l'inverse, les macrophages tissulaires ont une durée de vie longue : 2 à 4 mois.

De nombreuses situations engendrent l'activation des macrophages : rencontre avec un micro-organisme, avec une particule inerte, avec un produit de dégradation tissulaire ou liaison avec un ligand naturel pour un de leurs récepteurs : anticorps (fixation par leur Fc), hydrates de carbone, thrombine, fibrine, facteurs de croissance (CSF, M-CSF, GM-CSF), cytokines (IL1, IL6, IL10, TNF α , Interférons), parathormone, calcitonine...

L'activation des macrophages a pour conséquences :

- la phagocytose, qui est un processus beaucoup plus lent que celle des polynucléaires neutrophiles. La digestion du matériel phagocyté est souvent incomplète et des peptides sont apprêtés dans les phagosomes et les phagolysosomes pour être ultérieurement présentés aux lymphocytes T par des molécules HLA de classe II exprimés à la surface de la cellule.
- la libération de nombreux produits de sécrétion intervenant dans les mécanismes de l'inflammation : enzymes, cytokines, composants du complément, composants de la coagulation, radicaux libres (Okoli et Akah, 2004).

Tableau N° 12: principaux phagocytes mononucléés intra-tissulaires

Localisation	Dénomination
Foie	Cellules de Küpfer
Os	Ostéoclastes
Système nerveux	Cellules microgliales
Poumons	Macrophages alvéolaires
Organes lymphoïdes	Macrophages, Cellules dendritiques
Séreuses	Macrophages pleuraux, péritonéaux...
Foyers inflammatoires	Macrophages mobiles, cellules géantes, cellules épithélioïdes
Membrane synoviale	Synoviocytes ou cellules bordantes A
Tissu conjonctif	Histiocytes

III.2.3 .Les cellules endothéliales

Les cellules de l'endothélium des vaisseaux de petit et moyen calibre jouent un rôle actif important au cours de l'inflammation.

- L'état de jonction des cellules entre elles et avec la matrice extra-cellulaire contrôle le passage des liquides et des macromolécules de l'espace intra-vasculaire vers les tissus interstitiels. Cet état de jonction fait intervenir de nombreuses protéines trans-membranaires ou intra-cellulaires : connexines, cadhérines, protéines du cytosquelette, intégrines de surface (Okoli et Akah, 2004).
- Le tonus vasculaire et la vasomotricité sont assurés par les fibres musculaires lisses de la paroi des vaisseaux et sont régulés par des molécules produites par les cellules endothéliales elles-mêmes. Ces molécules favorisent soit la vasoconstriction (endothéline-1, thromboxane A2) soit la vasodilatation (NO, PGI-2). La production de ces molécules vasoactives est elle-même soumise à l'action de différents médiateurs de l'inflammation : thrombine,

bradykinine, histamine, eicosanoïdes, cytokines et facteurs de croissance (IL1, TNF, TGF β , PDGF, EGF...).

- Leur production à la fois de molécules prothrombiniques (facteur VIII, PAF, TXA2, facteur V) et de molécules anti-thrombotiques (héparanesulfate, PGI-2, NO, thrombomoduline, protéine S, activateurs du plasminogène) permet le contrôle de l'équilibre fibrinogenèse/fibrinolyse. De plus les cellules endothéliales sont capables de lier et d'activer certains facteurs plasmatiques de la coagulation (facteur IX, X, XII, facteur tissulaire).
- La migration des leucocytes de l'espace vasculaire vers les espaces interstitiels est modulée par leur sécrétion de chimiokines : IL8, IL10, RANTES, MCP-1...
- Les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhésion qui interviennent dans la diapédèse : sélectines E et P, ICAM-1, VCAM-1...
- Elles participent aux phénomènes de réparation post-inflammatoire par la production de protéines matricielles et de différentes protéases (Okoli et Akah, 2004).

III.2.4 .Autres cellules

Les plaquettes sont activées dès qu'elles passent dans des vaisseaux situés au sein d'un foyer inflammatoire. Elles produisent alors des médiateurs à activité proinflammatoires : eicosanoïdes, thromboxane A-2, 12 HETE, PAF. Elles participent aussi aux phénomènes de réparation par la production de fibronectine, de TGF β (Transforming Growth Factor), d'EGF (Epidermal Growth Factor) et de PDGF (Platelet Derived Growth Factor).

Les fibroblastes de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif produisent au cours de la réaction inflammatoire des enzymes de destruction de la matrice : collagénases, gélatinase, stromélysine, cathepsines, sérine protéase. Ils participent aussi aux phénomènes de cicatrisation par la production de différents constituants de la matrice : collagènes, protéoglycanes, fibronectine, élastine.

Les polynucléaires éosinophiles agissent au cours des phénomènes allergiques mais aussi au cours des processus inflammatoires. Activés alors par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques de médiateurs de l'inflammation, ils produisent à leurs tours différentes molécules favorisant l'inflammation : eicosanoïdes, PAF, phospholipase, cytokines (IL1, TNF α).

Les basophiles, cellules circulantes, et les mastocytes, cellules tissulaires, ont à leur surface des récepteurs de haute affinité pour le Fc des IgE. Ils sont capables de libérer plusieurs médiateurs importants de la réaction immuno-allergique et inflammatoire : histamine, sérotonine, leucotriène, PAF

Les lymphocytes interviennent principalement dans les mécanismes de l'immunité mais ils participent à la réaction inflammatoire par leur production de différentes cytokines.

III.3 .Médiateurs de l'inflammation

La description des cellules intervenant au cours de l'inflammation laisse imaginer le nombre important de médiateurs intervenant dans les différentes étapes de l'inflammation. Ces médiateurs peuvent être décrits sous la forme d'une part de systèmes d'activation plasmatique et d'autre part de médiateurs cellulaires.

III.3.1. Systèmes d'activation plasmatique

Il s'agit de systèmes multiprotéiques dont les composants sont produits à distance du foyer inflammatoire. Les différents composants de ces systèmes sont présents dans le sang circulant où ils demeurent à l'état de précurseurs inactifs, jusqu'à ce qu'ils soient mis en présence d'un activateur spécifique. Ces systèmes ont entre eux des relations fonctionnelles étroites. On en décrit 3

- le système contact
- le système coagulation-fibrinof formation et fibrinolyse
- le système du complément.

III.3.1.1. Le système contact

Les protéines du système contact sont au nombre de 4:

- le facteur de Hageman (FH) ou facteur XII
- la prékallibréine (PK)
- le Kininogène de poids moléculaire élevé (HMWK)
- le facteur XI

Conséquences de l'activation du système contact :

Le facteur de Hageman activé (FHa) stimule l'agrégation et la dégranulation des polynucléaires neutrophiles. La kallibréine active le chimiotactisme.

Mais surtout, la bradykinine déclenche la production par les cellules endothéliales de PGI₂, de thromboxane A₂, d'activateur tissulaire du plasminogène. C'est ainsi un puissant médiateur de l'inflammation à l'origine de la douleur, de la vasodilatation, de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, de la margination des leucocytes.

- Inhibition du système contact :

Trois inhibiteurs régulent le système contact :

- l'inhibiteur de la C1-estérase qui bloque le facteur de Hageman activé et la kallibréine
- l'alpha-2-macroglobuline qui bloque la kallibréine
- l'alpha-1-antitrypsine qui bloque le facteur XI activé

III.3.1.2. Les systèmes coagulation-fibrinof formation et fibrinolyse

La présence de dépôts de fibrine intravasculaires et extravasculaires interstitiels est quasi constante au cours de l'inflammation. La formation de ces dépôts et leur importance relèvent d'un déséquilibre entre :

- le système de la coagulation dont la mise en jeu aboutit à la formation de thrombine qui déclenche la formation de fibrine à partir du fibrinogène
- et le système de la fibrinolyse qui aboutit à la formation de la plasmine qui détruit la fibrine par protéolyse.

Au cours de l'inflammation, le système de la coagulation est principalement activé par sa voie extrinsèque, c'est-à-dire par l'action de la thromboplastine tissulaire exprimée à la faveur d'une lésion tissulaire à la surface des monocytes et des cellules endothéliales. La fibrine intervient dans la réaction inflammatoire en stimulant l'activité des polynucléaires

neutrophiles, des plaquettes et des cellules endothéliales. Les mécanismes de coagulation sont régulés par plusieurs inhibiteurs : surtout antithrombine III mais aussi alpha-2-macroglobuline, héparine, alpha-1-antiprotéase.

Le système de la fibrinolyse assure la dissolution des dépôts de fibrine intravasculaires ou tissulaires. La plasmine est issue de l'activation du plasminogène sous l'action de l'activateur tissulaire du plasminogène (TPA). L'activité du TPA s'exprime dès qu'il est fixé à la fibrine. La formation de produits de dégradation de la fibrine (PDF) participe également à l'activation des différentes cellules de l'inflammation. Le système fibrinolytique est régulé par divers inhibiteurs de l'activation du plasminogène mais aussi par la plasmine elle-même.

III.3.1.3. Le système du complément

Le système du complément est un système multiprotéique fait d'une trentaine de protéines ou composants, intervenant à la fois dans les mécanismes de défense anti-bactérienne en complétant l'action des anticorps et dans les mécanismes de l'inflammation. Les composants du complément s'articulent suivant deux voies dites voie classique (comportant C1, C4 et C2) et voie alterne (C3, B et D) se rejoignant au niveau de C3 en un tronc commun terminal dont l'activation aboutit à la formation du complexe d'attaque membranaire à action cytolytique.

III.4. Médiateurs cellulaires

Ils sont nombreux : histamine, sérotonine, eicosanoïdes, radicaux libres oxygénés et monoxyde d'azote, cytokines, substance P, neurokinine, enzymes de destruction tissulaire. Seuls les importants dans cette seront décrits dans ce chapitre.

III.4.1. Les radicaux libres

Les phénomènes de phagocytose par les polynucléaires neutrophiles induisent une augmentation de la consommation d'oxygène par ces cellules, à l'origine de la formation de radicaux libres oxygénés : superoxydes O_2^- , eau oxygénée H_2O_2 et radicaux hydroxyles OH^- . Ces radicaux libres sont potentiellement toxiques, capables de désorganiser les membranes cellulaires et de favoriser la cytolysse.

- Le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre produit par oxydation de l'arginine sous l'action d'une famille d'enzymes : les NO synthases ou NOS. L'activation de certaines NOS inductibles (iNOS) au cours de l'inflammation génère des quantités importantes de NO. Le NO possède des propriétés inflammatoires : vasodilatation, œdème, érythème (Borgi et al., 2008).

III.4.2. Les Eicosanoïdes

Ce sont des composés à 20 atomes de carbone qui dérivent de l'acide arachidonique. L'acide arachidonique est libéré à partir des phospholipides membranaires des cellules inflammatoires sous l'action des phospholipases A2. Deux grandes variétés d'enzyme interviennent sur le métabolisme de l'acide arachidonique (Fig. 23) :

Les lipooxygénases induisent la formation des leucotriènes: LTB₄, LTC₄, LTD₄ et LTE₄.

Les cyclooxygénases génèrent la formation des prostaglandines (PGI2 ou prostacycline, PGE2, PGD2) et des thromboxanes (TXA2 et TXB2). Il existe de 2 types de cyclooxygénases : La COX1 et la COX2 (Fig.2). La COX1 est dite constitutive. Elle fonctionne en permanence et assure des fonctions physiologiques : agrégabilité plaquettaire, protection de la muqueuse gastro-duodénale, régulation du flux sanguin rénal. A l'inverse, la COX2 est dite inducible. Elle n'est active que lorsque les phagocytes sont exposés à un processus inflammatoire (Borgi et al., 2008).

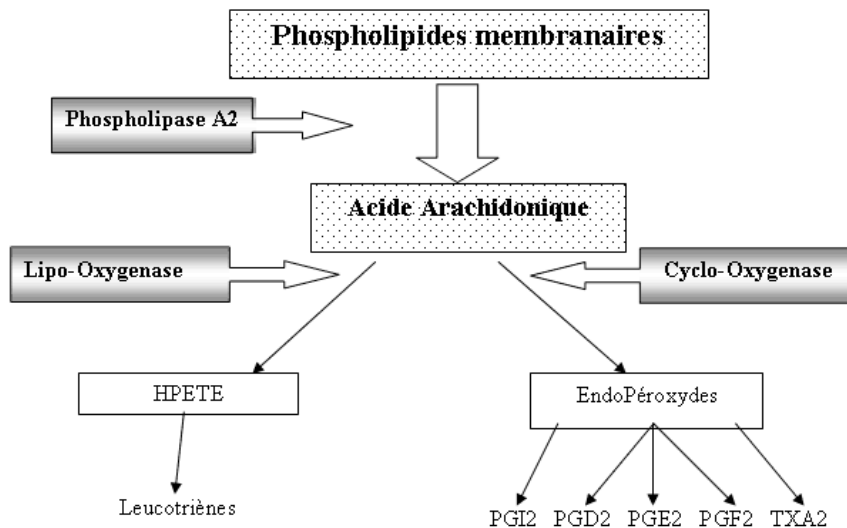


Figure N°23: Synthèse des leucotriènes, des prostaglandines et des thromboxanes à partir des phospholipides membranaires.

Les eicosanoïdes possèdent de nombreuses propriétés biologiques (fig.24), (Borgi et al., 2008):

La PGE2 et la PGI2 agissent sur les fibres musculaires lisses des vaisseaux : vasodilatation, augmentation de la perméabilité, œdème.

La PGE2 facilite l'action des médiateurs de la douleur. Elle inhibe l'activité des lymphocytes T suppresseurs, augmente la production d'immunoglobulines, diminue la production d'IL2 par les lymphocytes.

Le leucotriène B4 est le plus important des leucotriènes. Il est l'agent chimiotactique des polynucléaires le plus puissant. Il active les phagocytes.

Le thromboxane A2 entraîne une vasoconstriction et favorise l'agrégabilité des plaquettes.

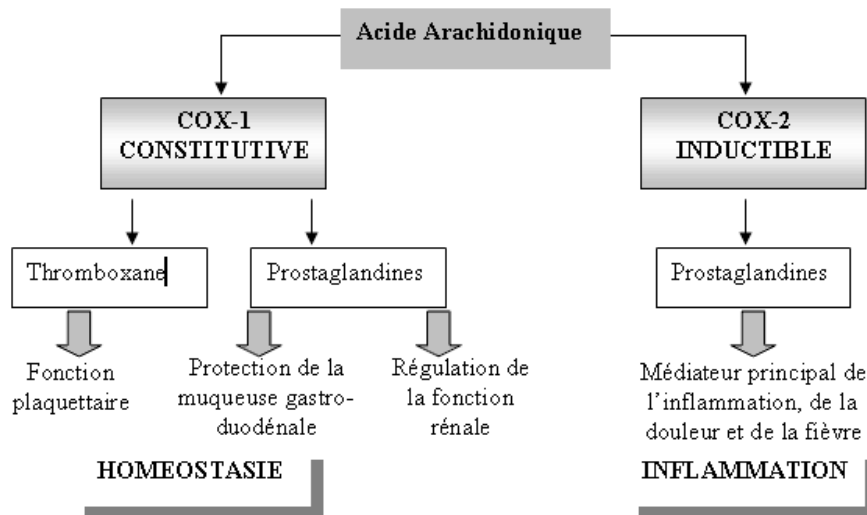


Figure N°24 : Actions respectives des cyclooxygénases 1 et 2.

III.4.3. Les cytokines

Les cytokines sont des glycoprotéines solubles agissant comme des médiateurs intercellulaires. Synthétisées et libérées par leur cellule d'origine sous l'influence de *stimulus* varié, elles délivrent leurs messages en réagissant avec des récepteurs membranaires spécifiques présents à la surface des cellules cibles. Une même cytokine peut être produite par différents types cellulaires et agir sur un nombre important de cibles différentes. La multiplicité de source et de cibles, leurs nombreuses inter-actions entre elles permettent de parler de réseau de cytokines. Elles interviennent dans les mécanismes de l'inflammation et de l'immunité. Au moins 40 cytokines ont été décrites à ce jour et la complexité de leurs actions obligent à ne citer ici que les principales cytokines jouant un rôle majeur dans la réaction inflammatoire (El Hamsas et al., 2010; Skinner et al., 2014), (fig.25).

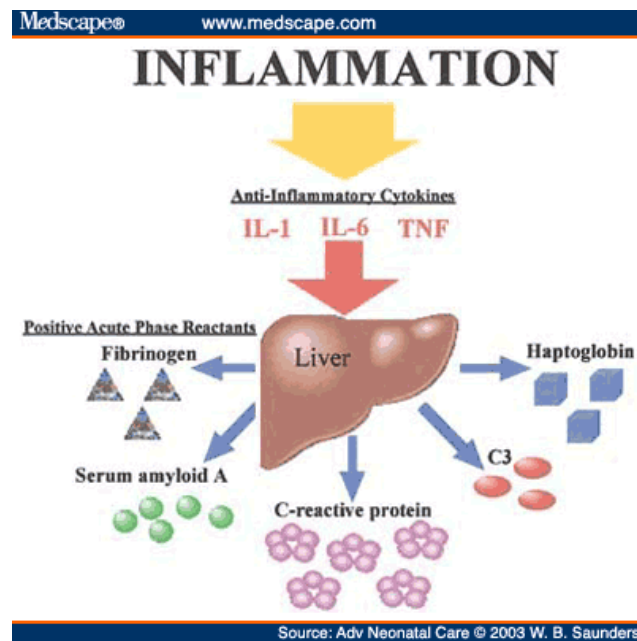


Figure N°25 : Les cytokines anti-inflammatoires IL-1, IL-6 et TNF α .

- **L'interleukine-1 (IL1)**

L'IL1 existe sous deux formes moléculaires, IL1 α et IL1 β différant par leur séquence d'acides aminés mais ayant les mêmes propriétés biologiques (fig.25).

Les activités biologiques de l'IL1 sont nombreuses et importantes, locales et systémiques : l'activation de l'expression et l'inhibition de nombreux gènes qui interviennent dans la synthèse des médiateurs de l'inflammation.

La régulation du système IL1 est assurée par deux grands mécanismes :

Existence d'une forme soluble du récepteur spécifique (sIL1-R). Ce récepteur soluble est capable de bloquer l'IL1 et agit comme un inhibiteur.

Existence d'un antagoniste spécifique du récepteur de l'IL1 (IL1-Ra): IL1 récepteur antagoniste) produit par les monocytes. La production de l'IL1-Ra est sous le contrôle de l'IL1 (système de rétrocontrôle) (Skinner et al., 2014).

- **Les facteurs de nécrose tumorale : TNF α et TNF β**

Le TNF β est produit exclusivement par les lymphocytes. A l'inverse, le TNF α est produit par de nombreuses cellules : macrophages, monocytes, lymphocytes T et B, kératinocytes, cellules mésangiales, épithéliales, endothéliales, basophiles et mastocytes, polynucléaires neutrophiles, et éosinophiles, fibroblastes. Il intervient de façon prépondérante dans l'inflammation et agit par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire spécifique dont il existe deux formes : TNF-R1 et TNF-R2. Les actions du TNF dans les mécanismes de l'immunité et de l'inflammation s'exercent sur de nombreux types cellulaires et sont diverses. Certaines de ces actions sont communes avec celles de l'IL1 et se font en synergie (tab. 13).

- **L'interleukine-6 (IL6)** est produite par la plupart des cellules (monocytes, fibroblastes, synoviocytes, ostéoblastes...) en réponse à des *stimuli* variés dont certains agents infectieux ou leurs composants. Le récepteur pour l'IL6 est exprimé sur de nombreuses cellules lymphoïdes et non lymphoïdes. Elle intervient en stimulant la production hépatocytaire des protéines de la phase aiguë de l'inflammation : CRP, SAA, haptoglobine, C3, fibrinogène, α 1-antitrypsine, α 2-macroglobuline... Cependant l'IL6 diminue la production d'IL1 et stimule la production de molécules intervenant dans les processus de réparation tissulaire : inhibiteurs des collagénases, IL1-Ra...

- **L'interleukine-8 (IL8)** est une chimiokine dont la propriété principale est d'attirer les leucocytes circulants vers un foyer inflammatoire. Les polynucléaires neutrophiles sont la cible privilégiée de l'IL8 par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique, elle induit le chimiotactisme et l'activation des polynucléaires avec induction de cyclooxygénase, de lipooxygénase et de NO-synthase.

- **L'interleukine-10 (IL10)** est une cytokine régulatrice produite à la fois par les lymphocytes T de type Th2 et par les monocytes. Elle inhibe la présentation de l'antigène par les cellules présentatrices d'antigène (macrophages, monocytes) et freine la production de différentes cytokines : TNF α , IL1, IL6, IL8.

Tableau 13 : Principales actions biologiques du TNF α (Skinner et al., 2014)

Actions sur les cellules de l'immunité	Actions sur autres types cellulaires	Actions <i>in vivo</i>
<i>Monocytes-Macrophages</i>	<i>C. endothéliales vasculaires</i>	<i>Système nerveux central</i>
Active et auto-induit la production de TNF. Induit la synthèse de cytokines et de prostaglandines. Induit le chimiotactisme et la transmigration. Stimule le métabolisme. Inhibe la différenciation. Supprime la prolifération.	Module l'angiogénèse. Augmente la perméabilité. Supprime la prolifération. Induit la NO synthèse. Induit la production de diverses cytokines: IL1, IL3, G-CSF, GM-CSF. Induit la prostacycline. Induit E-selectine, ICAM, VCAM.	Fièvre. Anoréxie. Anomalies de la sécrétion des hormones hypophysaires.
<i>Polynucléaires neutrophiles</i>	<i>Fibroblastes</i>	<i>Cardiovasculaire</i>
Augmente la capacité de phagocytose. Augmente la production de superoxyde. Augmente l'adhérence à la matrice extra-cellulaire.	Induit la prolifération. Induit IL1, IL6, LIF. Induit la synthèse de métalloprotéases. Inhibe la synthèse de collagène.	Etat de choc. Fuite capillaire.
<i>Lymphocytes</i>	<i>Adipocytes</i>	<i>Gastro-intestinal</i>
Induit la formation de superoxyde par les B. Induit l'apoptose des lymphocytes T matures. Active la migration des T cytotoxiques.	Augmente la libération d'acides gras libres. Supprime la lipoprotéine lipase.	Ischémie. Colite. Nécrose hépatique. Inhibition de la synthèse de l'albumine. Diminution de la catalase hépatique.
	<i>Cellules endocrines</i>	<i>Métabolique</i>
	Stimule l'ACTH et la prolactine. Inhibe TSH, FSH et GH.	Catabolismes lipidique et protéique accrus. Résistance à l'insuline. Libération des hormones du stress.
		<i>Inflammatoire(Autres)</i>
		Active la cytotoxicité. Augmente la fonction NK. Facilite la toxicité tumorale de l'IL2.

III.5 Marqueurs biologiques de la réaction inflammatoire

La réaction inflammatoire s'accompagne d'une traduction biologique. Certaines molécules plasmatiques connaissent une augmentation de leur taux plasmatiques d'au moins 25% par rapport à leur taux normal ce sont les protéines de la phase aiguë de l'inflammation. Dans ce qui suit nous citerons quelques unes qui ont fait l'objet de cette étude expérimentale, en vu

d'évaluer l'activité anti-inflammatoire de deux fractions saponosidiques extraites des espèces *C.africanum* et *Z.cornutum*.

III.5.1. Protéine-C-réactive (CRP).

Elle a été découverte en 1930, lors de la phase aiguë d'une infection à pneumocoques, car elle réagissait avec le polysaccharide C du pneumocoque, d'où son nom « C-reactive protein ». C'est une glycoprotéine qui reflète l'inflammation aiguë. Elle s'élève très rapidement et est, de ce fait, un marqueur précoce de la réaction inflammatoire. Protéine synthétisée par les hépatocytes (cellules du foie), elle a pour rôle de mobiliser les défenses immunitaires de l'organisme par l'activation de la voie du complément (Le Gall et al., 2011).

*Caractéristiques de la CRP :

-Sa demi-vie est de 6 à 8 heures.

-Sa valeur physiologique est inférieure à 4-6 mg/L (chez le rat).

-Sa concentration s'élève dès la 6ème heure de l'inflammation. En moyenne, elle devient pathologique 24 heures après le début de l'inflammation et se normalise rapidement après la disparition de la source de l'inflammation. Sa concentration peut être multipliée par 500 ou 1000 lors d'une inflammation aiguë. Le retour de la CRP à une valeur physiologique permet de juger de l'efficacité d'un traitement (Le Gall et al., 2011).

III.5.2. Dosage du Fibrinogène (Fib) ou Facteur I

Le fibrinogène (Facteur I) est une protéine soluble, synthétisée par le foie, elle est présente dans le plasma sanguin et dont les taux augmentent dans les états inflammatoires. Sous l'action de la thrombine, le fibrinogène se transforme en fibrine, une protéine insoluble essentielle à la coagulation du sang (Hanss, 2005). Il joue un rôle important dans la formation de caillots.

Cette protéine a une variation relativement modérée (de 200 à 400 fois la norme), ayant un délai de réponse plus long (12 à 14 heures) et une demi-vie allongée (2 à 6 jours), son dosage dans le sang permet de détecter plusieurs syndromes, notamment les syndromes inflammatoires aigus (Hanss, 2005).

III.5.3. Dosage de l'Haptoglobine (Hp)

L'haptoglobine (Hp) a été découverte dans le sérum humain par M.F. Jayle avec M. Polonovski dans le département de biochimie de la faculté de médecine de Paris, ainsi que son rôle comme marqueur du processus inflammatoire en tant que glycoprotéine de la phase aiguë. Jayle a mis au point une technique de détermination basée sur l'activité peroxydasique de son complexe avec l'hémoglobine (Hb-Hp), utilisée au cours des décennies suivantes dans les laboratoires cliniques pour caractériser les processus inflammatoires, ensemble avec le dosage d'autres glycoprotéines de la phase aiguë comme l'orosomucoïde (Robert, 2013). L'haptoglobine est une α_2 -glycoprotéine synthétisée elle aussi par le foie qui présente la propriété de former un complexe stable avec l'hémoglobine libérée dans la circulation.

L'haptoglobine n'est donc pas une protéine de "transport" au sens strict, mais plutôt une forme de "capture" de l'hémoglobine normale évitant son élimination urinaire. En l'absence d'hémolyse *in vivo* ou de déficit de synthèse hépatique, l'augmentation de l'haptoglobine constitue un excellent marqueur d'un syndrome inflammatoire (Robert, 2013).

Au cours de la réaction inflammatoire, l'augmentation de l'haptoglobine est corrélée à celle de l'orosomucoïde (une immunoglobuline α_1).

III.5.4. L'électrophorèse des protéines sériques.

L'étude des protéines de l'inflammation se fait dans le sérum. Il s'agit d'un examen simple qui donne un aperçu de l'état protéique d'un patient. La séparation électrophorétique des protéines plasmatiques donne 5 fractions, chacune d'entre elles contenant des protéines intervenant dans les mécanismes de l'inflammation (De Nadaï et al., 2014) (Fig. N°26, tab.14).

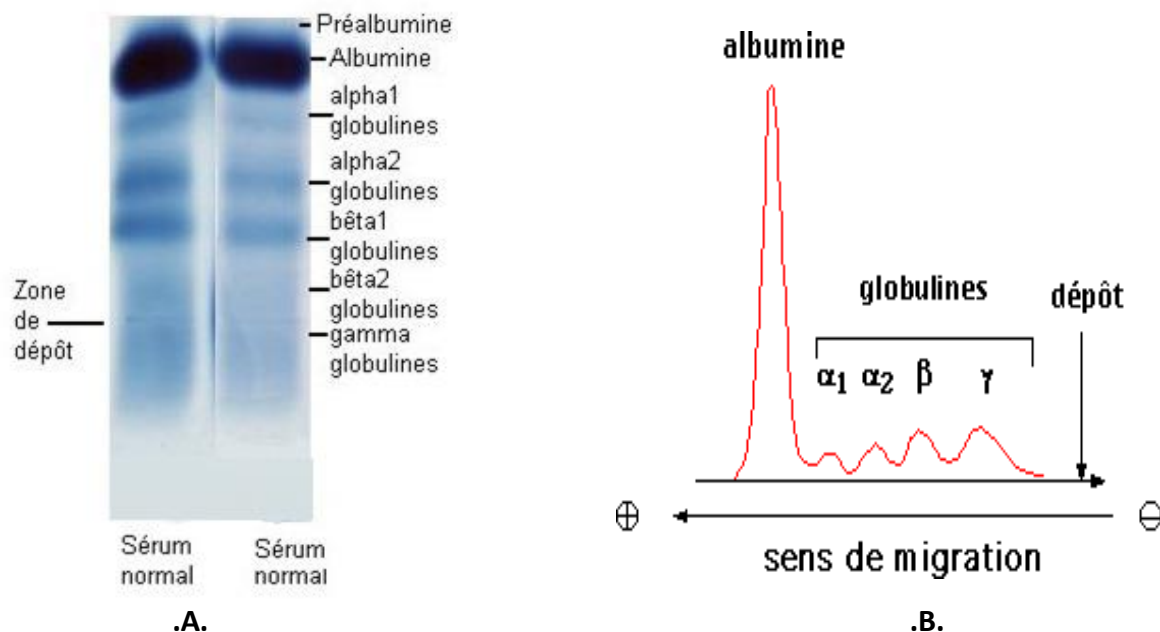


Figure N° 26 : Électrophorèse des protéines sériques

A : Gel représentant les différentes fractions des immunoglobulines et leur migration selon leur poids.

B : Représentation graphique de la migration des fractions des immunoglobulines.

- Une hypoalbuminémie peut être présente lors des syndromes inflammatoires sévères.
- L'élévation de la fraction 1 est observée lors d'un processus inflammatoire à son début, tandis que l'augmentation des 2 évoque un syndrome inflammatoire constitué.
- L'augmentation isolée des globulines est le témoin d'une élévation des taux de transferrine lors d'une carence martiale.
- L'hyperglobulinémie peut être polyclonale ou monoclonale. Polyclonale, elle témoigne soit d'un processus infectieux chronique, soit d'une maladie auto-immune, soit d'une

hépatopathie chronique. Monoclonale, elle doit faire rechercher un myélome(De Nadaï et al., 2014).

Tableau N° 14 : Principales protéines sériques en fonction de leur fraction de migration (Renaudeau et al., 1998).

Fraction de migration	Valeurs normales	Principales protéines de la réaction inflammatoire
albumine	33 à 50 g/l	
α_1 -globulines	1,5 à 4 g/l	α_1 -antitrypsine orosomucoïde α_1 -antichymotrypsine
α_2 -globulines	6 à 10 g/l	α_2 -macroglobuline haptoglobine céruloplasmine
β -globulines	6 à 13 g/l	transferrine fraction C3 β lipoprotéines
γ -globulines	7,5 à 16 g/l	IgA IgM IgG

III.6. Classement des Protéines de la Réaction Inflammatoire (PRI) selon leur cinétique

Les modifications du taux des protéines sériques peuvent être dosées en immunonéphélométrie et l'évaluation dans le temps des taux sériques peut avoir une grande valeur indicative. Trois groupes de protéines de la réponse inflammatoire ou PRI peuvent être individualisés en fonction de leurs propriétés (Dubost et al., 1994, Soubrier et al., 1994) (fig.27).

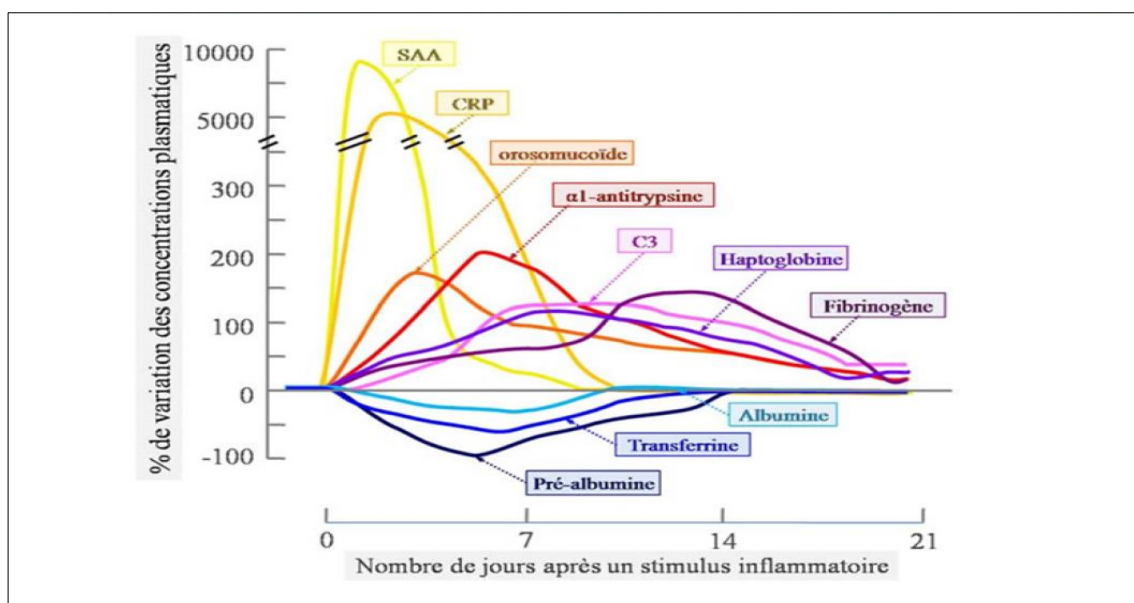


Figure N° 27 : Courbes des différentes Protéines de la Réaction Inflammatoire (Engler, 1989). (PRI positives et PRI négatives).

En réalité, comme le montre le tableau, le problème est complexe car, d'un mammifère à l'autre, la nature et l'état des PRI+ peut changer et il est indispensable de connaître ces résultats pour étudier et suivre l'évolution de la concentration plasmatique de telle ou telle PRI+ au décours d'une inflammation chez des mammifères différents. Chez l'homme, les deux principales PRI+ sont la C-réactive protéine (CRP) et le sérum amyloïde A-protéine (SAA), protéine qui n'existe pas chez le rat. Chez le rat (tab.15), les trois principales PRI+ sont l' α_1 -GPA (orosomucoïde), le T kinogène (T kin), protéine qui n'existe pas chez l'homme et les autres mammifères, et l' α_2 M dont la concentration est apparemment stable chez l'homme après une réaction inflammatoire (Doyen et al., 1992).

Tableau N° 15 : Etat de la concentration plasmatique des PRI + et PRI- chez l'homme et le rat. (Engler 1995).

<i>Protéines plasmatiques</i>	<i>Homme</i>	<i>Rat</i>
α_1 GPA (Om)	++	+++
α_1 PI (α_1 AT)	++	++
α_1 AChy	++	x
α_1 AP (α_1 CPI, Tkin.)	x	+++
Hp	++	++
Cp	+	+
α_2 M	0	+++
Tf	-	-
Hpx	0	++
Fib	++	++
CRP	+++	+
SAP	0	0
SAA	+++	x
Alb	-	-
PreAlb	-	-

Abréviations : α_1 GPA : α_1 -glycoprotéine acide (Om : orosomucoïde); α_1 PI : α_1 -protéinase inhibiteur ou α_1 AT : α_1 - antitrypsine; α_1 AChy : α_1 -antichymotrypsine; α_1 AP : α_1 -acute phase globuline (α_1 CPI : α_1 -cystéine protéinase inhibiteur, T Kin : T kinogène); Hp : haptoglobine; Cp : céruloplasmine; α_2 M : α_2 -macroglobuline; Tf : transferrine; Hpx : hémopexine; Fib : fibrinogène; CRP : C réactive protéine; SAP : sérum amyloïde P protéine; SAA : sérum amyloïde A protéine; Alb : albumine; PréAlb : Préalbumine.

III.6.1. Les PRI à amplitude de variation élevée

Les taux sériques peuvent être très élevés, jusqu'à 1000 fois la normale ; le délai de réponse est rapide (6 à 12 h) et la demi vie courte (1 jour) (Tab.16). Parmi ces PRI, on peut classer la protéine C-réactive ou CRP (la CRP a une action opsonisante favorisant la phagocytose des cellules apoptotiques et active le complément) (Engler, 1995); la protéine sérique amyloïde A ou SAA ; la procalcitonine. Le dosage de la CRP est justifié pour la recherche et le suivi d'un processus inflammatoire débutant, (Engler, 1995).

Tableau N°16 : Principales propriétés des Protéines de la Réaction Inflammatoire (PRI)(Engler, 1995).

Protéines	Concentration plasmatique (g/l)		Masse moléculaire	Demi-vie
	Normal (adulte)	Réaction inflammatoire		
α 1GPA (Om)	0,4-0,8	1,2-2,5	44 000	3 jours
α 1PI (α 1AT)	2-2,5	4-6	54 000	3 jours
α 1AChy	0,3-0,6	1-2	68 000	2 jours
Hp	0,6-1,8	3-8	85 000 (Hp1-1)	3 jours
Cp	0,2-0,5	0,8-1,2	132 000	4 jours
Fib	2,5-4,5	6-10	340 000	2 à 6 jours
CRP	< 0,006	0,030-0,400	125 000 (5 sous-unités)	6 à 12 h
SAA	< 0,010	0,05-1,00	12 000	6 à 10 h

α 1GPA : α 1 glycoprotéine acide (ou Om : orosomucoïde)
 α 1PI : α 1 protéinase inhibiteur (ou α 1AT : α 1 antitrypsine)
 α 1AChy : α 1 antichymotrypsine
Hp : haptoglobine
Cp : céruloplasmine
Fib : fibrinogène
CRP : C-réactive protéine
SAA : sérum amyloïde A-protéine

III.6.2. Les PRI à amplitude de variation modérée

Les taux sériques sont de 200 à 400 fois la normale ; le délai de réponse est plus long (12 à 14 h) et la demi-vie plus longue (2 à 6 jours). Parmi ces PRI, on peut classer les anti-protéases (α ₁-antitrypsine, α ₁-antichymotrypsine), l'orosomucoïde, l'haptoglobine, le fibrinogène. A noter que l'haptoglobine se lie avec l'hémoglobine libre et permet son élimination (Engler, 1989 ; Skinner et al., 2014).

III.6.3. Les PRI à amplitude de variation faible

Les taux sériques sont de 0.5 fois la normale, le délai de réponse est plus long (plus de 48 h) et la demi-vie est longue (3 à 5 jours). Parmi ces PRI, on peut classer la céruléoplasmine, la fraction C3 du complément (Engler, 1989; Skinner et al., 2014).

III.4. Interprétation des variations des Protéines de la Réaction Inflammatoire (PRI)

Pour interpréter la variation des PRI dans le contexte d'une étude expérimentale sur animale, réalisée pour évaluer l'effet anti-inflammatoire d'une substance, il faut juger ces variations de taux mesurés en fonction de la PRI dosée et des normes de PRI du mammifère

sur lequel ont été réalisés ces dosages (étude comparative). Dans ce contexte, on notera, comme l'indique le tableau N° 17, les concentrations des différentes protéines de la réaction inflammatoire du rat, varient parallèlement à celles de l'humain, notamment pour les protéines choisies dans cette présente étude, qui sont : CRP, Fibrinogène, Albumine, Haptoglobine, α_1 -globuline.

Tableau N°17 : Concentrations plasmatiques des protéines chez quatre mammifères après une réaction inflammatoire (Boffa et al., 1964).

Protéines plasmatiques	Humain	Rat	Souris	Lapin
α_1 GPA (Om)	++	+++	+	++
α_1 PI (α_1 AT)	++	++	+	+
α_1 AChy	++	...	+	?
α_1 AP (α_1 CPI, T-kin)	...	+++
Hp	++	++	++	+++
Cp	+	+	+	+
α_2 M	0	+++	0	0
Tf	-	-	-	+
Hpx	0	++	+	0
Fib	++	++	++	++
CRP	+++	+	0	+++
SAP	0	0	+++	0
SAA	+++	...	+++	?
Alb	-	-	-	-
PréAlb	-	-	?	-

+++ , ++ , + : augmentation
 0 : pas de changement
 - : diminution
 ... : n'existe pas

α_1 GPA : α_1 glycoprotéine acide (ou Om : orosomucoïde)
 α_1 PI : α_1 protéinase inhibiteur (ou α_1 AT : α_1 antitrypsine)
 α_1 AChy : α_1 antichymotrypsine
 α_1 AP : α_1 acute phase (ou α_1 CPI : α_1 cystéine protéinase inhibiteur ou T-kin : T-kininogène)

Hp : haptoglobine
 Cp : céruloplasmine
 α_2 M : α_2 macroglobuline
 Tf : transferrine
 Hpx : hémopexine
 Fib : fibrinogène
 CRP : C-réactive protéine
 SAP : sérum amyloïde P composant
 SAA : sérum amyloïde A protéine
 Alb : albumine
 PréAlb : préalbumine

IV.1. Les anti-inflammatoires

Un anti-inflammatoire est un médicament destiné à combattre une inflammation. Il s'agit d'un groupe de molécules chimiques destinées à traiter, une réaction inflammatoire et les maladies qui en résultent.

Ces médicaments ont des structures chimiques très variées. Toutefois, ils présentent des caractères communs :

-Sur le plan pharmacologique : Tous les anti-inflammatoires, inhibent la synthèse des prostaglandines.

-Sur le plan activité : Ils possèdent, en plus de leurs activités anti-inflammatoires, des effets analgésiques et antipyrétiques.

-Sur le plan chimique : Ils présentent des fonctions acides ou des caractères acides.

IV.1.1. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens

C'est 1860 que l'acide salicylique était synthétisé et en 1875 utilisé pour la première fois dans le traitement du rhumatisme articulaire aigu. En 1946 sont découvertes les pouvoirs anti-inflammatoires de la phénylbutazone, celles de l'indométacine datant de 1963. Ces molécules ouvrent la voie de la classe thérapeutique des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), ainsi dénommés de par leurs propriétés anti-inflammatoires sans avoir l'action des stéroïdes, à la différence des glucocorticoïdes.

Les AINS agissent tous en inhibant une enzyme membranaire, la cyclo-oxygénase (COX). L'inhibition de cette enzyme par les AINS est responsable d'une diminution de production des prostaglandines E2 et I2, médiateurs importants des phénomènes inflammatoires. Mais l'inhibition de ces prostaglandines ainsi que du thromboxane A2 dans l'ensemble des tissus rend compte des effets indésirables potentiels de la plupart des AINS :

Diminution de la protection de la muqueuse gastro-intestinale (responsable d'ulcères gastro-duodénaux) et diminution de l'agrégabilité plaquettaire (responsable d'une augmentation du risque hémorragique).

En 1990, l'équipe de Needleman montre l'existence de deux isoformes de cyclo-oxygénase : la COX-1, constitutive, et la COX-2, inductible sous l'action de certains mécanismes pro-inflammatoires. Moins de 10 ans plus tard apparaissaient les premiers anti-inflammatoires dits anti-COX-2 sélectifs, respectant la COX-1, réduisant les risques d'effets secondaires des AINS « classiques » (Noirez et al., 2000).

IV.1.2. Les anti-leucotriènes.

Leur développement est directement lié à la mise en évidence du rôle de ces médiateurs dans l'inflammation. En effet, ils ont un rôle important sur le recrutement des cellules de l'inflammation (LT B4 surtout) et sur la vasodilatation et l'extravasation plasmatique au site de l'inflammation (LTC4, D4 et E4). Au niveau des bronches, ils ont aussi un effet de stimulation des sécrétions et ce sont de puissants bronchodilatateurs. Les anti-leucotriènes actuellement utilisés en clinique agissent en bloquant les récepteurs cellulaires des cysteinyl-leucotriènes (LTC4, D4 et E4). Ils sont indiqués dans le traitement de fond de l'asthme où ils ont une action complémentaire des corticoïdes inhalés. D'autre voie de blocage, par inhibition de la synthèse, sont à l'essai ainsi que le développement d'inhibiteurs spécifiques du LTB4 qui pourraient être utiles dans d'autres pathologies où les polynucléaires neutrophiles sont impliqués.

IV.1.3. Les inhibiteurs des cytokines pro-inflammatoires

Ils sont directement issus des progrès des connaissances quant au rôle de différentes cytokines dites pro-inflammatoires, en particulier du TNF α et de l'IL-1. Les molécules utiles au blocage de ces cytokines sont essentiellement représentées par des anticorps monoclonaux ou des protéines recombinantes.

- Anticorps monoclonal chimérique (homme-souris) anti-TNF α ou infliximab (Rémicade®). Il s'agit d'un anticorps monoclonal capable de fixer le TNF α libre ainsi que le TNF α engagé sur son récepteur à la surface des cellules. Il est administré en perfusion.
- Récepteur soluble au TNF ou Etanercept (Enbrel®). Il s'agit d'une protéine de fusion du récepteur p75 du TNF ou récepteur de type II. Produit par génie génétique, il s'agit d'une protéine chimérique associant deux domaines de liaison extracellulaire du récepteur II humain au TNF et un domaine FC de l'IgG1 humaine. Il est capable de fixer le TNF α et le TNF β . Il est administré par voie sous-cutanée.
- IL1-Ra recombinante. Cet inhibiteur de l'IL1 est commercialisé sous le nom de Anakinra®. Son injection sous-cutanée quotidienne participe à l'augmentation des taux sérique d'IL1-Ra, inhibiteur naturel de l'IL β . L'anakinra inhibe les réponses induites par l'IL-1 in vitro, y compris la production de monoxyde d'azote et de prostaglandine E2 et/ou celle de collagénase par les cellules synoviales, les fibroblastes et les chondrocytes.

IV.2. Activité anti-inflammatoire des saponosides

L'existence de substance anti-inflammatoire est connue de très longue date puisque c'est à la fin du premier siècle de notre ère qu'un médecin grec avait découvert les vertus antalgiques des feuilles de saule et parmi les catégories des anti-inflammatoires, on retrouve également les anti-inflammatoires dits « naturels », formés par plusieurs groupes chimiques dont les saponosides. En effet, des activités anti-inflammatoires des saponosides, ont été signalées dans plusieurs revues comme celles citées par El Beyrouthy en 2008 (El Beyrouthy et al., 2008) et par Lattanzion en 2011 (Dall'Acqua et al., 2010, Lattanzio et al., 2011).

Les saponosides ont fait l'objet de plusieurs recherches dans l'industrie pharmaceutique, car certains forment le point de départ pour la semi- synthèse de médicaments stéroïdiens (Solignac, 2004). Beaucoup ont des propriétés pharmacologiques et sont utilisées en phytothérapie et dans l'industrie cosmétique. Ils sont soupçonnés de former les principaux constituants de nombreux médicaments de plantes et des médicaments traditionnels. Ils sont considérés comme responsables de nombreuses propriétés pharmacologiques (Estrada et al., 2000). Liu et Henkel (2002) considèrent les saponosides et polyphénols comme étant les principaux ingrédients traditionnels dans les médicaments chinois, ils sont responsables de la plupart des effets biologiques observés. Par exemple, la racine de ginseng (*Panax ginseng* CAMeyer, Araliaceae) est l'un des remèdes des plus importants dans les médecines orientales traditionnelles et il est maintenant utilisé dans le monde entier (Fukuda et al., 2000). Les saponosides constituent les principaux constituants actifs du ginseng.

Le genre *Bupleurum* est officiellement inscrit dans les pharmacopées chinoises et japonaises, les plantes appartenant au genre, sont utilisées dans les médecines traditionnelles asiatiques pour traiter des affections différentes. Les racines sèches de *Bupleurum fruticosens* L. (Apiaceae) sont traditionnellement utilisées pour traiter les troubles associés à l'inflammation. Les constituants actifs de l'espèce *Allium chinense* G. Don et *Allium macrostemon* Bunge (alliées) sont la source principale d'un médicament

traditionnelle chinoise " Xiebai " qui utilisé comme un traitement pour la douleur de la poitrine, sténocardie, l'asthme, ces constitutants se sont révélé être des saponosides (Baba et al., 2000). La plupart des saponosides ont des propriétés hémolytiques et sont toxiques ou anti-inflammatoires (Sparg et al., 2004).

Deux triterpènes, l'acide ursolique et l'acide 23-hydroxyursolique, obtenus à partir de l'espèce de *Cussonia. Bancoensis*, testés *in vivo* pour L'activité anti-nociceptive et anti-inflammatoire, ont montrées des effets très significatifs (Tapondjou et al., 2003). Deux saponosidess isolés par Moharram et al. (2007) à partir des feuilles de *Dracaena ombet*, ont montré des activités analgésiques et anti-inflammatoires significatives.(Shen et al., 2014) ., à la dose 30 mg/kg.

L'extrait hexanique de *Bursera simaruba* (L.) Sarg, a montré un effet anti-inflammatoire sur l'inflammation induite par le carraghénane chez le rat. Deux fractions ont montré une forte activité anti-inflammatoire, comparable à celle de la phénylbutazone médicament de référence. Les stérols et l' α - et β -amyrine ont été isolés et caractérisés à partir de ces fractions, ce qui suggère que ces composés bioactifs ont un effet anti-inflammatoire (Carretero et al., 2008).

Le genre *Ligustrum*, représente des espèces de plantes utilisées par les médecins chinois pour prévenir et guérir l'hépatite et la bronchite chronique. Trois espèces ont fait l'objet d'une étude phytochimique et pharmacologique (*Ligustrum lucidum* Ait. (LL), *Ligustrum pricei* Hayata (LP) et *Ligustrum sinensis* Lour. (LS), afin d'évaluer leur effets analgésiques / anti-inflammatoires sur la nociceptivité induite chimiquement par la carragénine (chez les rongeurs). L'extrait de l'espèce *Ligustrum Mpricei* Hayata (LP) a réduit l'épanchement abdominal bleu d'Evans, causé par le lipopolysaccharide, l'acide lipotéichoïque, l'autocrines et le nitroprussiate de sodium. Le contenu triterpénique, des trois de *Ligustrum spp.* a été mesurée par HPLC, la plus forte teneur en α -amyrine, l'acide bétulinique et lupeol, ont été retrouvés dans l'extrait de *Ligustrum pricei* Hayata (LP). Ce qui suggère que ces trois triterpènes sont responsables de l'activité anti-inflammatoire (Wu et al., 2011).

PARTIE II : TRAVAUX PERSONNELS PHYTOCHIMIQUES

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

I.1. ISOLEMENT ET PURIFICATION DE SAPONOSIDES A PARTIR DE L'ESPECE *cyclamen africanum* Boisson ET Reuter

I.1.1. Matériel végétal

Dans notre étude la plante de *C.africanum* Boiss. & Reuter (partie racinaire) a été collectée à Constantine, en Algérie sur les rochers de Oued du Rumel au mois de Mai 2008, les spécimens ont été identifiés par le Professeur Debellaire, qui appartient à la faculté de Chimie, Université Baji Mokhtar Annaba. Un voucher est attribué au spécimen de *Cyclamen africanum* immatriculé LOST Ca 0508, répertorié au laboratoire d'Obtention des substances thérapeutiques à l'université de Constantine 1.

I.1.2. Méthodes

I.1.2.1. Extraction des métabolites secondaires

L'extraction brute à partir du matériel végétal sec (racine) est réalisée à chaud en utilisant une solution d'extraction au méthanol aqueux (70 :30). Après décantation et refroidissement, le mélange est filtré et l'extrait méthanolique est évaporé à sec. Cette extraction conduit à un extrait brut constitué de plusieurs catégories de composés chimiques, allant de l'apolaire au polaire, c'est dans cet intervalle où se situent les saponosides recherchés, mélangés avec toutes sortes de métabolites secondaires tels que les polyphénols, tanins, saccharides et autres. Le rendement obtenu est de l'ordre de 345 gr/5Kg soit 6.9%.

Pour chaque plante choisie pour une étude phytochimique, avant d'entamer les extractions couteuses sur une grande quantité, on réalise un screening ou un repérage sur une petite quantité de l'extrait méthanolique, pour la recherche des saponosides, en appliquant une chromatographie sur couche mince (CCM) de quelques gouttes de cet extrait, on obtient un profil CCM en phase normale dans un solvant CHCl_3 - MeOH-H₂O (60 :32 :7), qui sera révélé dans une solution de vanilline à 3%. Un profil chromatographique riche en saponosides se caractérisera par une succession de bandes violettes à fushia (fig. 28).

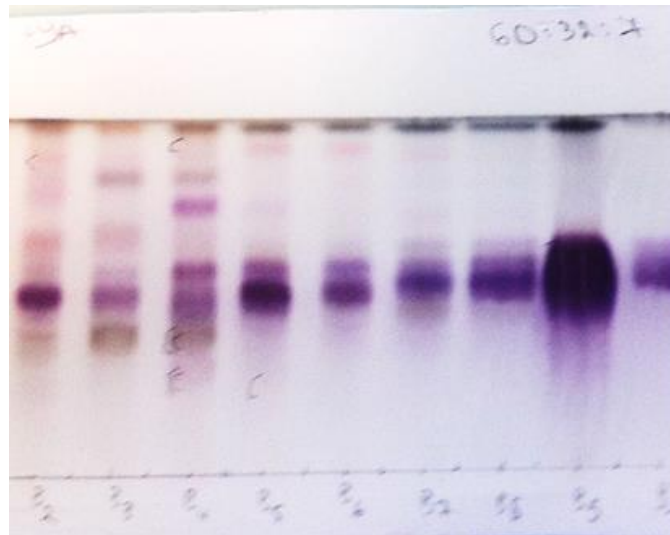


Figure N°28 : Plaque chromatographique sur couche mince après révélation à la vaniline 2% des saponosides de *Cyclamen africanum*.

I.1.2.2. Fractionnement et séparation des métabolites secondaires

Pour le fractionnement, la séparation grossière des saponosides, un protocole adapté à la plante est réalisé au sein du laboratoire, appliqué sur l'extrait brut (extrait méthanolique) de l'espèce *Cyclamen africanum* (Boiss & Reuter) en vue d'isoler un par un les composés recherchés. Nous avons eu recours à quelques techniques de chromatographie, pour pouvoir isoler les saponosides, qui se résument aux étapes du schéma suivant :

L'extrait méthanolique (10 gr) est soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur silice en phase normale avec un gradient d'éluant (CHCl_3 - MeOH- H_2O) (70 :23 :0 à 0 :100 :0) voir annexe. Au terme de la manipulation dix (10) fractions sont obtenues puis réunies et fractionnées en deux lots (N°1, N°2) selon leurs profils CCM. La VLC sur gel de silice en phase normale a pour but d'éliminer les tanins. Le rendement de chaque lot est respectivement $R_1=20,7\%$ et $R_2=56,2\%$.

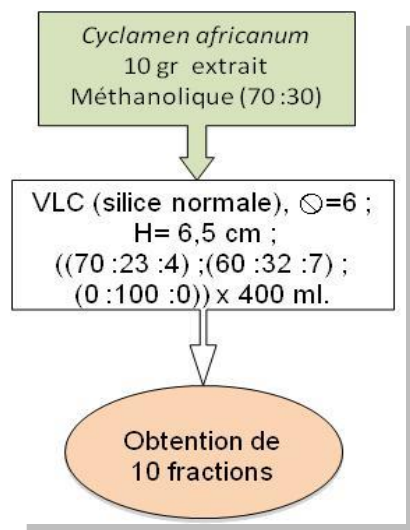


Schéma N°3 : Extraction des saponosides.

Selon le profil Chromatographique le lot N°1 est soumis une deuxième fois à une chromatographie liquide sous vide (VLC), sur gel silice en phase inverse RP 18, avec un gradient d'éluion (MeOH-H₂O ; 0:0:100 à 100:0:0) voir annexe, elle a pour objectif d'éliminer les sucres (Dall'Acqua et al., 2010). A la fin de ces étapes l'extrait obtenu est constitué préférentiellement de saponosides.

I.1.2.3. Isolement et purification des saponosides de *Cyclamen africanum*

L'isolement et la purification sont réalisés, grâce à une série de chromatographies liquides à moyen pression (MPLC) sur gel de silice en phase normale et phase inverse RP18 (Schéma N°4). Le plus grand nombre de composés isolés, s'est effectué par MPLC sur gel de silice en phase inverse RP 18, qui a offert une meilleure séparation. Les produits obtenus sont pesés

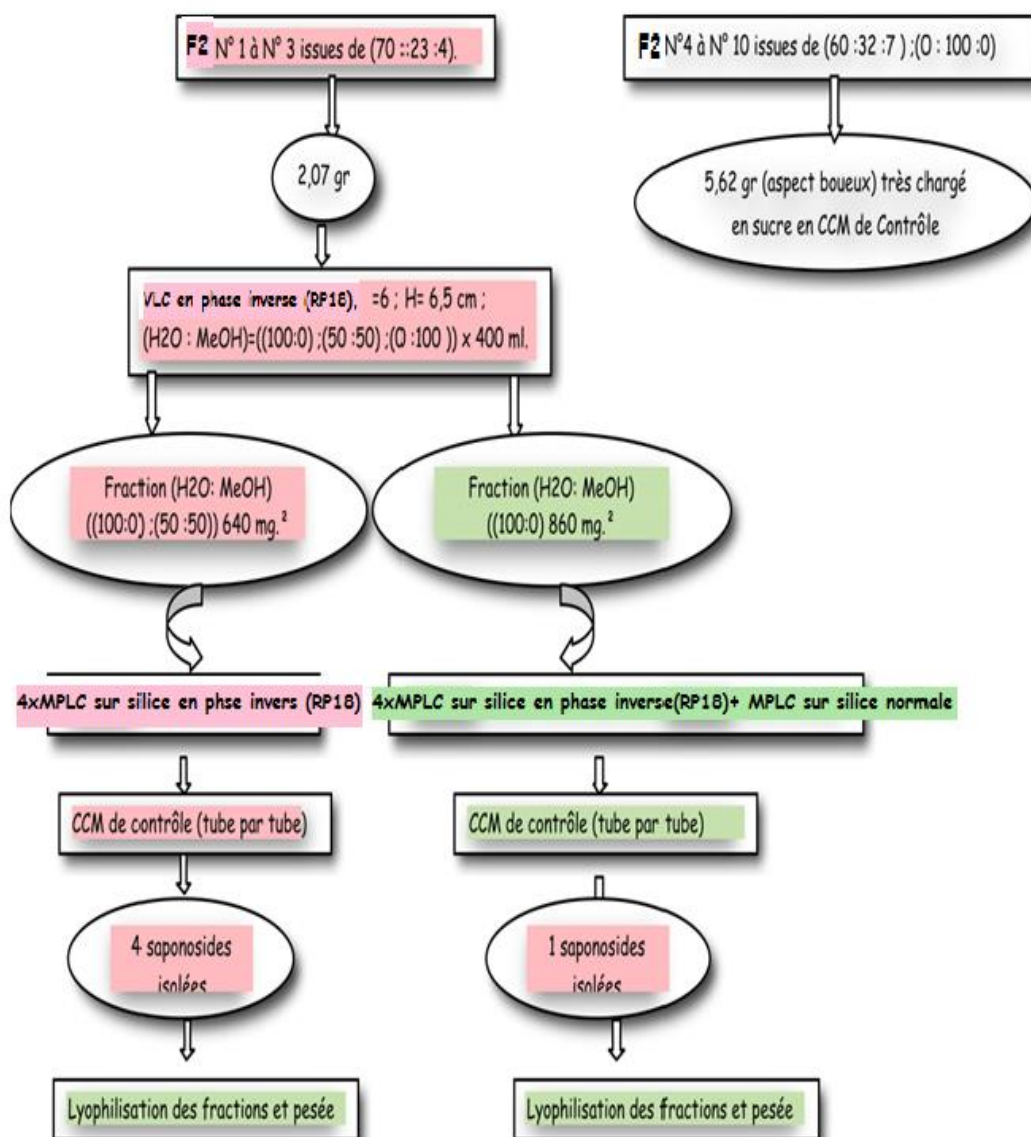


Schéma N°4 : Fractionnement, séparation et isolement, des saponosides de l'extrait méthanolique de l'espèce *Cyclamen africanum*.

avant et après être lyophilisés en poudre blanchâtre, ce qui est caractéristique des saponosides. Cette poudre est analysée structurellement par résonance magnétique nucléaire monodimensionnelle et multidimensionnelle, homonucléaire et hétéronucléaire (RMN¹H, ¹³C, DEPT, HSQC, HMBC, COSY, TOCSY, NOESY) et spectroscopie de masse (HR-ESI-MS ;FAB⁻, FAB⁺).

I.2. Isolement et purification de saponosides à partir de l'espèce *Zygophyllum cornutum* Cosson

I.2.1. Matériel végétal

La plante entière de l'espèce *Zygophyllum cornutum* (Coss.) a été collectée à Tolga, en Algérie au mois de Mars 2008 et l'identification botanique s'est faite par le professeur Debellaire, département de chimie, faculté Baji Mokhtar de ANNABA. Un voucher représentant le spécimen au numéro LOST 03/05 est stocké dans le département de phytochimie, université de Constantine 1 (Algérie).

I.2.2. Méthodes

Elles consistent à extraire les saponosides présents dans notre plante, en faisant appel aux différentes techniques de phytochimie extractive. Elles se basent sur l'affinité structurale de ces molécules avec des solvants possédant différentes polarités, et ceci est réalisé par des chromatographies sur différents supports. Sachant que l'extraction entraîne plusieurs catégories de composés nous avons ciblé, la famille des saponosides contenus dans la plante.

I.2.2.1. Extraction des métabolites secondaires

Cette étape consiste à extraire à partir de la plante entière séchée et broyée au moyen d'un solvant polaire (Méthanol: H₂O, 70:30), les biomolécules dites métabolites secondaires présentes dans cette plante. L'extraction se fait à chaud, après refroidissement le mélange est filtré et évaporé à sec.

Le rendement obtenu au terme de cette opération est le rapport entre le poids de départ du matériel végétal broyé sec 3.8 kg et le poids de la fraction méthanolique obtenue évaporée à sec 209 gr.

$$\text{Rendement} = R = 209 \times 100 / 3008 = 6.94 \%$$

$$R = 6.94 \%$$

I.2.2.2. Fractionnement et séparation des saponosides

Dans cette étape et par rapport à l'espèce précédente nous avons rencontré quelques difficultés quant à la séparation des différentes métabolites secondaires, du fait du mélange des différents constituants de la plantes (feuilles, tige, racines), l'opération s'est trouvée compliquée par la présence de beaucoup de tanins et de polyphénols, qui étaient présents pratiquement dans toutes les fractions et à toutes les étapes.

10 gr de l'extrait méthanolique ont subit une VLC sur gel de silice en phase normale avec un gradient d'éluion (CHCl₃-MeOH-H₂O, 70:23:4 à 0:100:0 (voir annexe), donnant ainsi 10 fractions de F1 jusqu'à F10. En se basant sur les profils chromatographiques obtenus lors des contrôles, les fractions, sont regroupées selon leurs profils ressemblants.

I.2.2.3 Isolement et purification des saponosides de *Z.cornutum*

Deux fractions distinctes sont obtenues après regroupement : la fraction 1 qui comprend les fractions de F1 jusqu'à F5 est retenue et pèse 2.7gr. Elle subira par la suite une série de chromatographies sous haute pression MPLC, sur gel de silice en phase normale et en phase inverse pour donner les composés **1,2,3,4,5**. La fraction 6 de la VLC-MeOH (640mg) issue de la séparation, quant à elle donnera deux composés **6 et 7** (Schéma 5).

Les sept (07) produits isolés, sont lyophilisés et analysés par spectroscopie de masse, RMN 1D-2D.

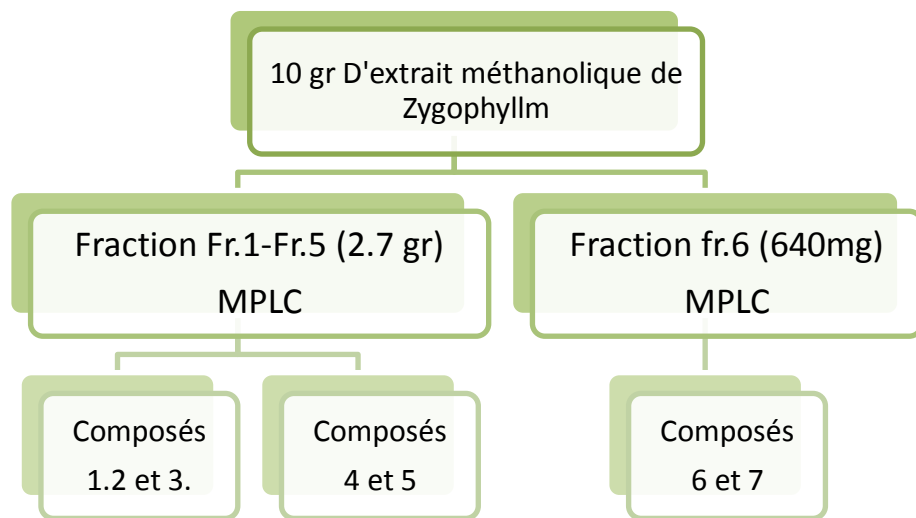


Schéma N°5 : Fractionnement, séparation et isolement, des saponosides à partir de l'extrait méthanolique de l'espèce *Zygothymus cornutum* Coss.

CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSIONS

II.1.ELUCIDATION STRUCTURALE DES SAPONOSIDES DE L'ESPECE *Cyclamen africanun* (Boiss. Et Reuter)

La détermination structurale des saponosides de *Cyclamen africanun*, a été réalisée sur les dérivés natifs purifiés. Elle repose sur les méthodes spectroscopiques RMN-1D, -2D, qui consistent en l'analyse des spectres RMN (^1H , ^{13}C , DEPT, HSQC, HMBC, COSY, TOCSY, NOESY) combinées à la spectroscopie de masse (HR-ESI-MS ;FAB $^-$, FAB $^+$). Ces méthodes permettent de déterminer une structure complexe sans avoir recours aux hydrolyses partielles et/ou dérivatisation.

La détermination structurale d'un saponoside, repose sur la caractérisation

- De la génine (RMN ^1H ; ^{13}C , DEPT, RMN-2D)
- Des sucres (COSY, TOCSY, NOESY, HSQC, HMBC)
- Le séquençage des sucres (HMBC, NOESY)
- Le site de fixation des sucres sur l'aglycone/génine (HMBC, NOESY)

II.1.1.Détermination structurale du composé 1

Après analyse et calcul des données spectrales, les spectres RMN 1D-2D permettent d'établir directement la structure de l'aglycone et la chaîne oligosaccharidique par comparaison des déplacements chimiques des protons et des carbones. En effet il existe dans la littérature des données issues de travaux antérieurs, qui confirment et confortent ou pas, les résultats obtenus lors de cette étude.

Dans notre démarche nous avons choisi de diviser l'interprétation des analyses spectrales, en deux parties, une partie génine et une partie osidique pour tous les composés, sauf pour le composé (3) qui ne présente pas le même aglycone.

II.1.1.1.Spectrométrie de masse

Le spectre de masse obtenu en HR-ESI-MS en mode positif du composé **1** révèle un ion pseudomoléculaire à m/z 1081.5201 [$M+\text{Na}^+$]. Le spectre obtenu en FAB-MS en mode négatif montre un ion pseudomoléculaire à m/z 1057 [$M-\text{H}^-$] (fig.30), suggérant une masse moléculaire de 1058, correspondant à une formule brute de $\text{C}_{52}\text{H}_{82}\text{O}_{22}$.

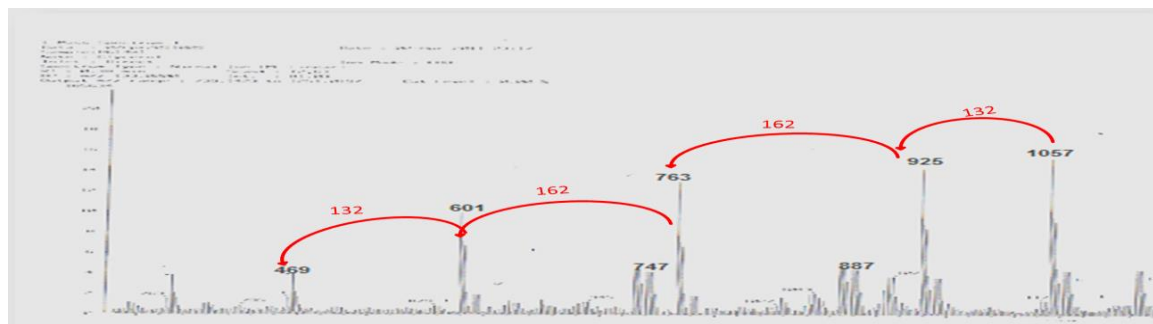


Figure N° 30 : Spectre de masse en source FAB en mode négatif [$M-\text{H}^-$] du composé **1**.

La fragmentation donne des ions observés à m/z 925 $[M-H^- -132]^-$, 763 $[M-H^- -132-162]^-$, 601 $[M-H^- -132-162-162]^-$, 469 $[M-H^- -132-162-162-132]^-$ correspondant à la perte de deux pentosyles et de deux hexosyles avec au moins un pentosyle en position terminale.

Tableau N°17. Déplacements chimiques en RMN 1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie aglycone du composé **1**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) C_5D_5N .

Position	Composé 1	
	δ (H)	δ (C)
CH ₂ (1)	0.74, 1.48	38.8
CH ₂ (2)	1.76, 1.92	26.2
H-C(3)	3.08-3.12 (<i>m</i>)	89.0
C (4)	-	39.1
H-C(5)	0.57 (<i>d</i> , $J=9.5$)	55.0
CH ₂ (6)	1.25 (<i>d</i> , $J=9.2$),	17.0
CH ₂ (7)	nd, nd	33.4
C (8)	-	43.0
H-C(9)	1.02	49.9
C (10)	-	36.3
CH ₂ (11)	1.13	18.3
CH ₂ (12)	1.52, 1.94	31.2
C (13)	-	86.0
C (14)	-	49.5
CH ₂ (15)	1.91(<i>nd</i>)	45.4
C (16)	-	212.4
C (17)	-	54.9
H-C(18)	1.78	55.6
CH ₂ (19)	nd, nd	33.5
C (20)	-	47.8
CH ₂ (21)	1.80, 1.96-1.98 (<i>m</i>)	29.5
CH ₂ (22)		33.2
Me(23)	1.12 (<i>s</i>)	27.3
Me(24)	1.00 (<i>s</i>)	16.0
Me (25)	0.70 (<i>s</i>)	15.5
Me (26)	1.18 (<i>s</i>)	18.0
Me(27)	1.04 (<i>s</i>)	21.9
CH ₂ -O-(28)	3.30 (<i>d</i> , $J=8.0$), 3.82(<i>d</i> , $J=8.0$)	74.3
CHO (29)	9.56 (<i>s</i>)	207.1
Me (30)	0.86 (<i>s</i>)	23.3

II.1.1.2. Spectrométrie de RMN

II.1.1.2.1. Partie génine

*Spectres RMN¹H

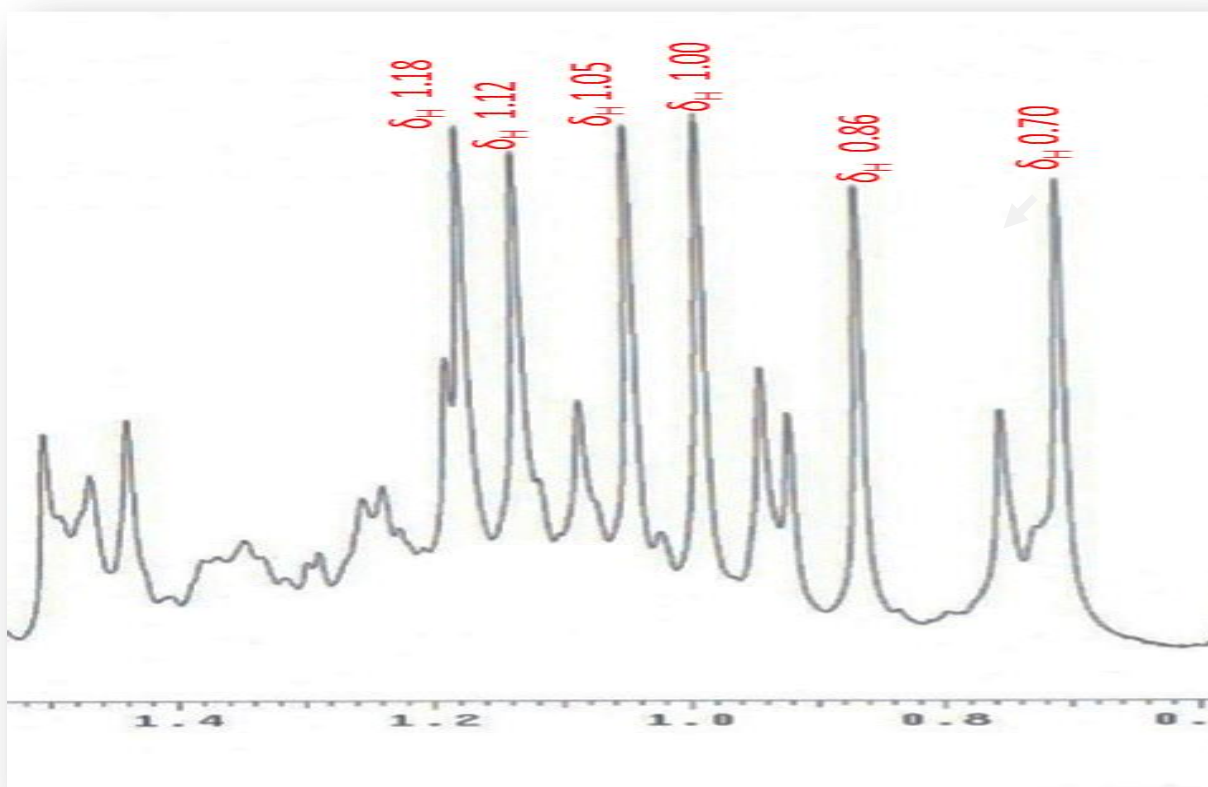


Figure N° 31 : Aggrandissement de la zone 0-1.5 ppm du spectre RMN¹H du composé **1**.

Le spectre de RMN ¹H (fig.31) révèle la présence de signaux caractéristiques qui sont :

Six fins singulets à δ_H 0.70, 0.86, 1.00, 1.05, 1.12, 1.18, correspondant aux signaux des six groupements méthyle Me23, Me 24, Me 25, Me 26, Me 27, Me 30.

Un massif de protons résonnants entre 0.57 et 1.96 ppm correspondant aux groupements CH et CH₂ des cinq cycles tableau (N°17).

Une paire d'atome-H géminaux correspondant au H₂-28, à δ_H 3.30 (d, $J = 8.0$ Hz) et à 3.82 (d, $J = 8.0$ Hz), déblindé du fait de leur position sur le carbone C-28 correspondant à un oxyméthylène, ce qui confirme les suggestions relatives au déblindage du C-13 à δ_C 86.0 ppm.

Le proton H-3 α -axial résonnant sous forme de multiplet δ_{H-3} 3.08-3.12 ppm (tab.17)

Le proton H-29 α -axial résonnant sous forme de singulet ($\delta_{H-29} = 9.56$ ppm), cette position est déblindée du fait de la présence d'un groupement aldéhyde sur le C-29 à δ_C 207.1 ppm.

*Spectres ^{13}C et DEPT

Les spectres de RMN- ^{13}C , affichent 52 signaux correspondant aux atomes de carbones, dont 30 sont attribués à l'aglycone, le reste appartenant à la chaîne osidique (fig. 32). Les signaux caractéristiques suivants sont observés à δ_{C} 15.5 (CH_3 -25), 16.0 (CH_3 -24), 18.0 (CH_3 -26), 21.9 (CH_3 -27), 23.3 (CH_3 -30), 27.3 (CH_3 -23) et révèlent la présence de six signaux de groupements méthyles tertiaires, caractéristiques du squelette triterpénique de type oleanane.

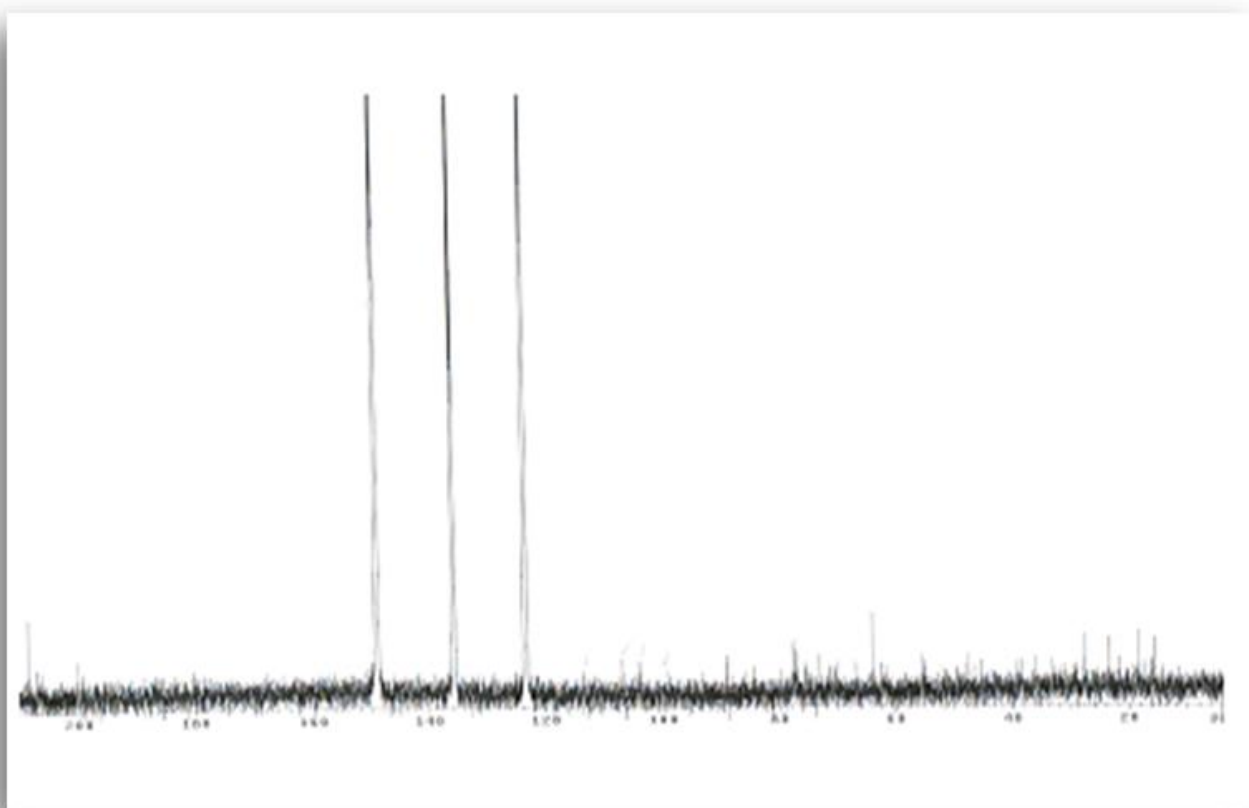
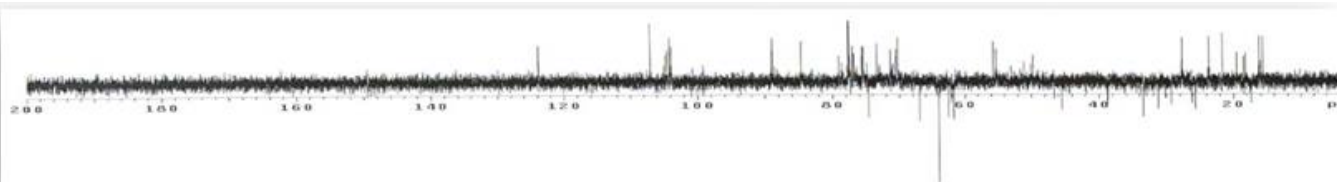


Figure N° 32 : Spectre RMN ^{13}C et DEPT du composé **1** (partie aglycone).

Un ensemble de carbones résonnant entre δ_{C} 17.0 et 55.6 ppm attribuable aux CH, CH_2 , et C quaternaires.

Le signal quaternaire du C-3, déblindé à δ_{C} 89.0 ppm, traduisant une substitution à cet endroit.

Le signal quaternaire du C-13 à δ_{C} 86.0 au lieu de à δ_{C} 142 ppm ; présent dans un oleanane classique, traduit la présence d'une substitution par un oxygène.

Le signal quaternaire du C-16 déblindé à δ_c 212.4 du fait de la présence de la fonction cétone.

Le signal quaternaire du C-29 déblindé à δ_c 207.1 du fait de la présence de la fonction aldéhyde.

* Spectres HSQC :

Les spectres HSQC, permettent par l'analyse des corrélations hétéronucléaires $^1J_{H-C}$, d'attribuer les déplacements chimiques des carbones (δ_c), (figure N° 33) et des protons (δ_H) grâce aux corrélations observées qui sont reportées sur le tableau N°2 .

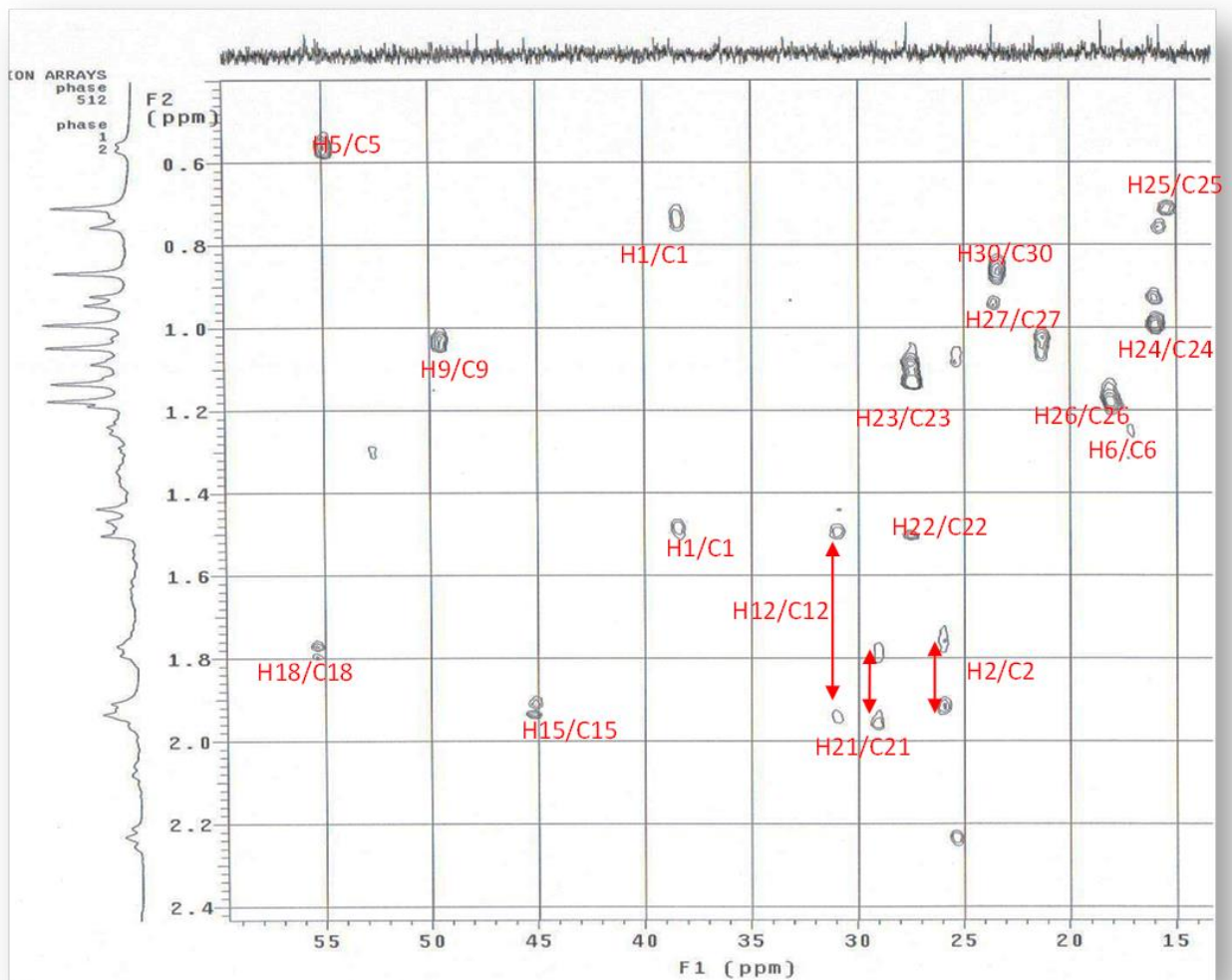


Figure N° 33 : Spectre HSQC du composé 1 (partie aglycone).

* Spectres HMBC

L'expérience HMBC qui visualise les couplages entre protons et carbones distincts à deux et à trois liaisons ($^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$), permet l'attribution des méthyles et des carbones de la génine. Dans cette expérience, les protons des méthyles corréleront au maximum avec quatre carbones constituant le socle de la base carbonée qui le porte (fig.34).

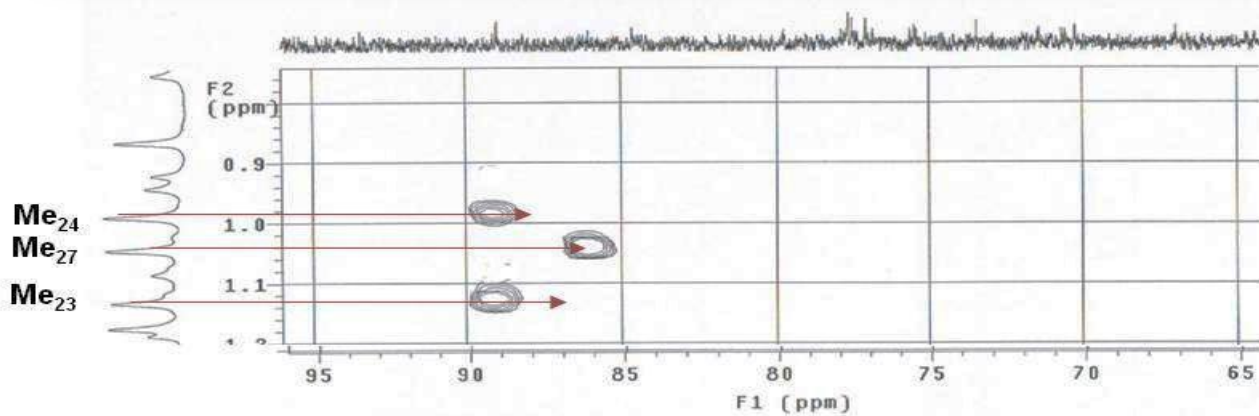
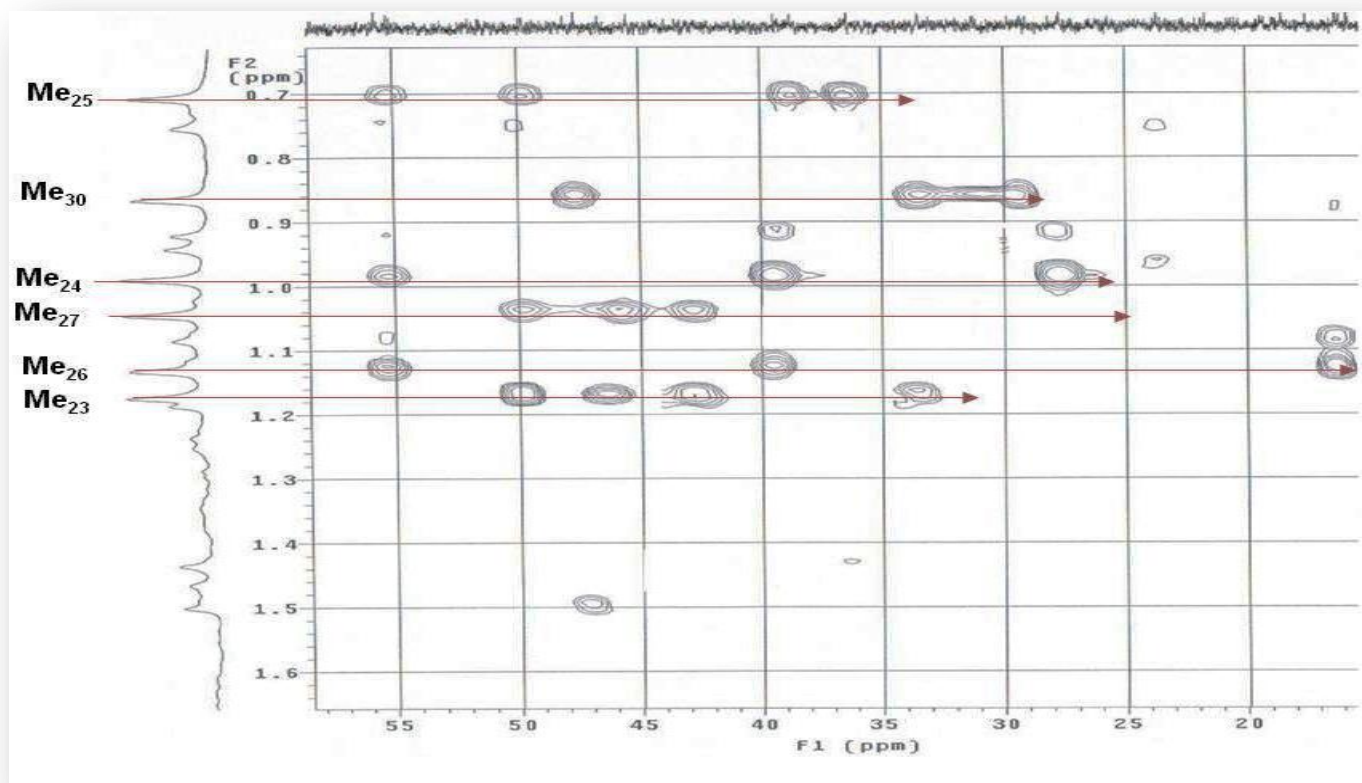


Figure N°34 : Spectre HMBC du composé **1** (partie aglycone, Me N° = méthyle numéroté)

Les protons des méthyles CH₃-23 à δ_H 1.12 et CH₃-24 à δ_H 1.00 se distinguent par leurs corrélations avec le carbone C-3 à δ_C 89.0 connu et les carbones C-4 à δ_C 39.1 et C-5 à δ_C 55.0. Les carbones des méthyles CH₃-23 à δ_H 1.12 et CH₃-24 à δ_H 1.00 sont désignés grâce à la différence de déplacement chimique qui est de l'ordre de 27.3 ppm pour C-23 et de 16.0 ppm pour le C-24, tout ceci s'explique du fait de la position β -équatoriale du C-24 et à sa valeur relativement blindée par rapport au C-23 et sa position α -axiale avec une valeur plus déblindée (Mahato, 1992).

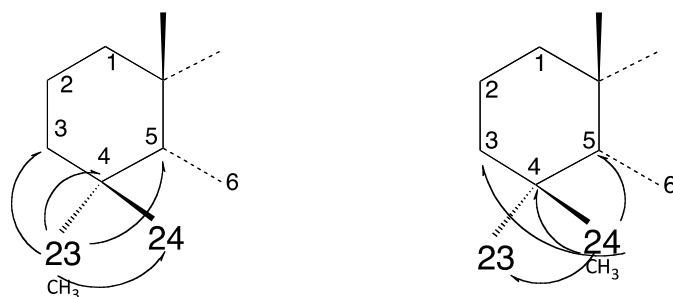


Figure N 35 : Corrélations en $^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$, $^4J_{H-C}$ des protons des méthyles 23 et 24 dans la génine du composé **1**.

Les protons du méthyle CH₃-25 à δ_H 0.70 corrént avec les carbones connus C-1 à δ_c 38.8, C-5 à δ_c 55.0, C-9 à δ_c 49.9 et le carbone quaternaire C-10 à δ_c 36.3 (fig. 34 et fig.36).

Les protons du méthyle CH₃-26 δ_H à 1.18 corrént avec les carbones C-7 à δ_c 33.4, C-8 à δ_c 43.0, C-9 δ_c à 49.9 et C-14 à δ_c 49.5 (Fig.36, tab.17). Ceci est en bon agrément avec les valeurs reportées dans la littérature de l'aglycone de la cyclamigenin B (Dorchai, 1968) et (Reznicek et al., 1989).

Les protons du méthyle CH₃-27 à δ_H 1.04, corrént avec les carbones C-8 à δ_c 43.0, C-13 à δ_c 86.0, C-14 à δ_c 49.5 et C-15 à δ_H 45.4 (fig.36).

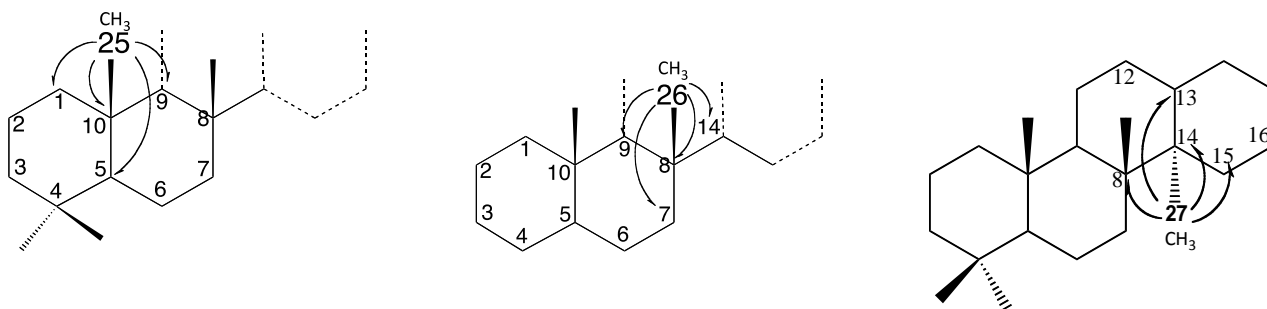


Figure N 36: Corrélations en $^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$, des protons des méthyles CH₃-25, CH₃-26 et CH₃27 du composé **1** .

Les protons du méthyle CH₃-30 à δ_H 0.86 corrént avec les carbones C-20 à δ_c 47.8, C-19 à δ_c 33.5 et C-21 à δ_c 29.1, le CH₃-30 en position α -axiale à δ_c 23.3 ppm (Fig.33), la distinction entre les carbones C-20 quaternaire et CH₂-21 est réalisée à l'aide des spectres ¹³C et HSQC.

Les protons du méthyle CH₃-29 sont oxydés en aldéhyde à δ_H 9.56. La position axiale ou équatoriale du groupement aldéhyde est déterminée par la valeur du carbone C-29 déblindée à δ_c 207.1 ppm.

Dans cette expérience le proton H-15 à δ_H 1.91 corrént avec le carbone C-16, qui se trouve déblindé à δ_c 212.4 ppm, oxydé par la présence d'un atome d'oxygène (fig.32), la comparaison des valeurs des déplacements chimiques des carbones C-17 à δ_c 54.9, C-16 à δ_c 212.4, C-15 à δ_c 45.4, C-14 à δ_c 49.5, sont en accord avec celles de la littérature (Yayli et al., 1998).

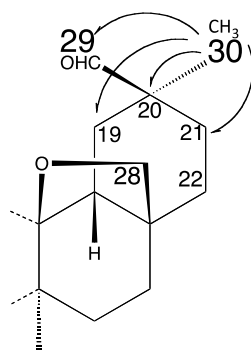


Figure N°37: Corrélations en $^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$, $^4J_{H-C}$ des protons du méthyle CH₃-30 du composé **1**.

À partir des carbones C-15 à δ_c 45.4 et C-21 à δ_c 29.1 ppm, l'analyse de l'expérience HSQC permet d'attribuer leurs protons respectifs, ce qui permettra par la suite de retrouver dans l'expérience COSY les protons manquants (Fig. 38).

La même démarche est suivie pour les carbones C-2, C-21 ce qui permet d'attribuer les protons H₂-2, H₂-21 (tab.2), sur les spectres de l'HSQC (Fig.). Ces attributions seront confirmées par l'expérience COSY. Si cette dernière ne possède pas un bon rapport signal/bruit, tous les protons de la génine ne peuvent être attribués. Dans ce cas on détermine les déplacements chimiques des carbones sur le spectre HSQC en corrélant avec les protons correspondant de la même expérience.

*Spectres RMN- COSY

À partir des protons caractérisés et identifiés précédemment sur les spectres des deux expériences HSQC et HMBC, l'expérience COSY permet de localiser les déplacements chimiques des protons aliphatiques d'une région de la génine, qui en règle générale ne sont pas analysables sur le spectre de RMN-¹H (Fig 38).

Seront identifiées grâce aux corrélations sur les spectres de l'expérience COSY les protons suivants :

- Les protons H₂-2 à δ_H 1.76 et 1.92 ppm entre eux et à partir de leur corrélation avec le proton vicinal H-3 à δ_H 3.08-3.12 ppm.
- Les deux protons vicinaux H₂-1 à δ_H 0.74 et 1.48 ppm entre eux et à partir de leur corrélation avec le proton H-2 à δ_H 1.76 et 1.92 ppm.

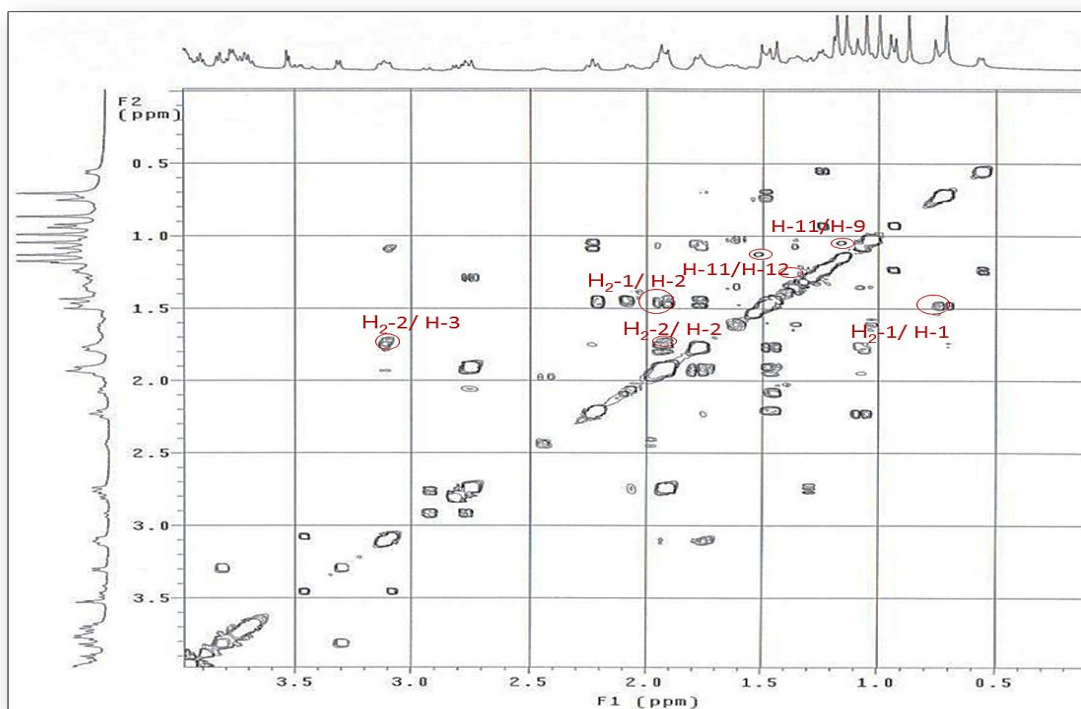


Figure N°38 : Spectre COSY du composé **1** (partie aglycone)

* Spectres NOESY

La stéréochimie des carbones asymétriques dans la génine du composé **1** est déterminée par l'analyse des valeurs des constantes de couplage calculées sur les spectres RMN-¹H et des effets NOESY, visualisant les couplages dipolaires entre les protons proches dans l'espace (spectre NOESY).

La stéréochimie α -axiale du H-3 est confirmée par les effets nOe entre les protons :

-H-3 à δ_H 3.08-3.12 / H-5 à δ_H 0.57 ppm.

-H-3 à δ_H 3.08-3.12 /CH₃-23 à δ_H 1.12 ppm (fig.39).

L'orientation β -axiale du proton H-18, est confirmée par les effets nOe qu'il présente avec le proton H-12 à δ_H 1.52 et 1.94 ppm.

La distinction entre les protons des méthyles CH₃-30 à δ_H 0.86 et CH₃-29 à δ_H 9.56 s'est faite par l'analyse des effets nOE observés pour le méthyle CH₃-30 avec les protons H-21 à δ_H 1.80, H-22 à δ_H 1.92 ppm et les protons du méthyle CH₃-27 à δ_H 1.04 ppm en position α -axiale. (Fig. 10 et 11).

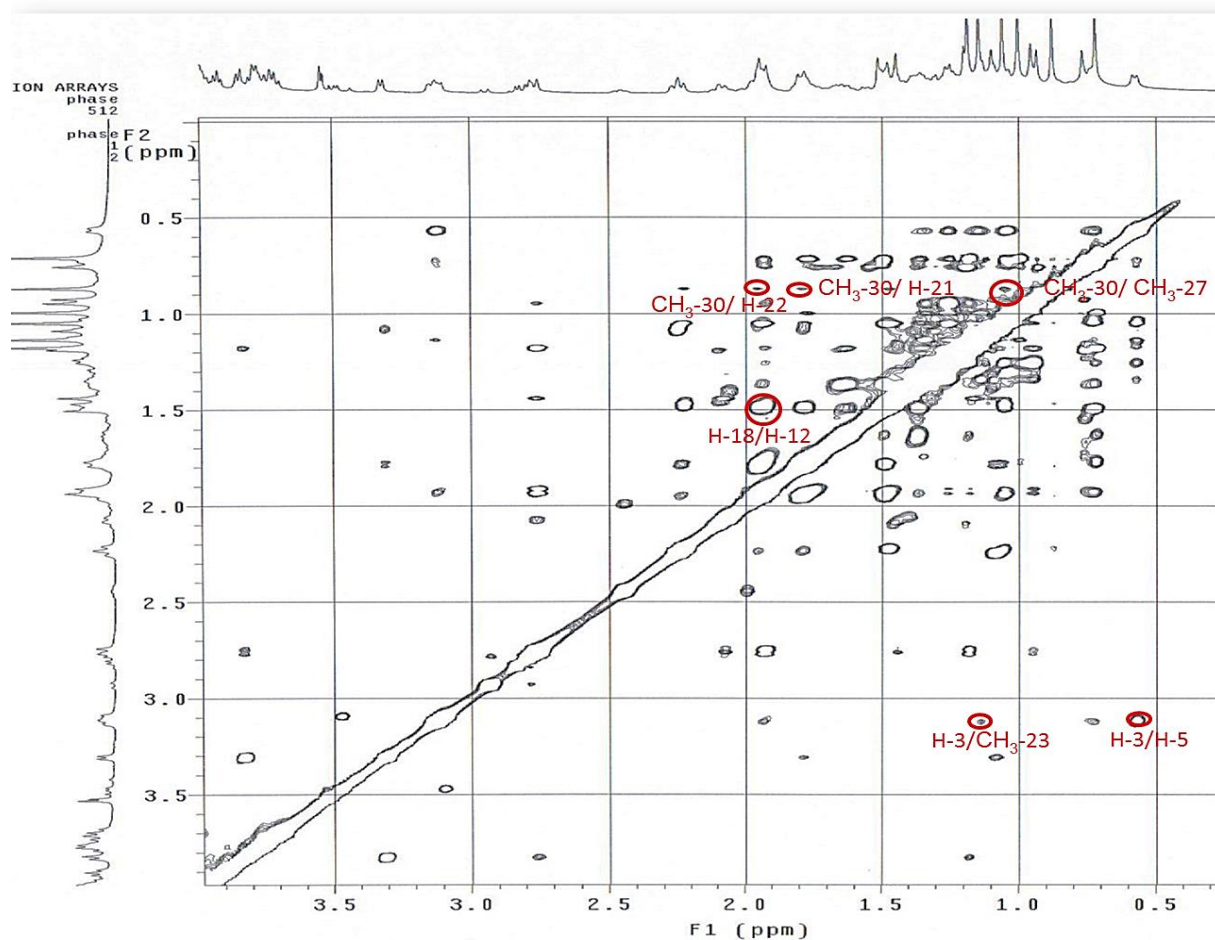


Figure N° 39 : Les effets nOe observés sur les spectres NOESY du composé **1**

*Conclusion (partie aglycone)

L'analyse des données de RMN 1D et 2D ont permis de conclure que la génine du composé **1** est la Cyclamigenin B, auparavant isolée de *Cyclamen europaeum* (DORCHAI, 1968), *Ardisia gigantifolia* (Gong et al., 2010) et *Ardisia mamillata* (Huang et al., 2003). Nos valeurs de déplacement chimiques sont en bonne concordance avec celles rapportées dans les publications précédemment citées.

II.1.1.2.2. Partie osidique

Tous les composés ont présenté la même structure osidique, le même enchainement de sucres (avec plus ou moins un acide dicrotalique) et le même site de fixation à l'aglycone En C-3. De ce fait l'interprétation s'est trouvée facilitée, par simple comparaison des différents spectres de RMN-1D et -2D des différents composés entre eux.

II.1.1.2.2.1. Détermination du nombre et de la nature des sucres

Le spectre RMN-¹H montre les signaux de quatre protons anomériques résonnant sous forme de doublets d et de dd, à δ_H 5.38 (d, $J = 8.0$ Hz), 4.86 (d, $J = 7.6$ Hz), 4.82 (d, $J = 8.6$ Hz), 4.72 (d, $J = 5.9$ Hz) donnant des corrélations sur le spectre HSQC, avec les carbones à δ_C 103.8, 103.4, 106.8 et 104.2, respectivement. (tab 18., fig. 40 et 41).

L'évaluation des couplages spin-spin et des valeurs de déplacements chimiques révélés sur les spectres de RMN-2D, permet d'identifier deux β -glucopyranosyl (Glc I et Glc II), un β -xylopyranosyl (Xyl) et α -arabinopyranosyl (Ara).

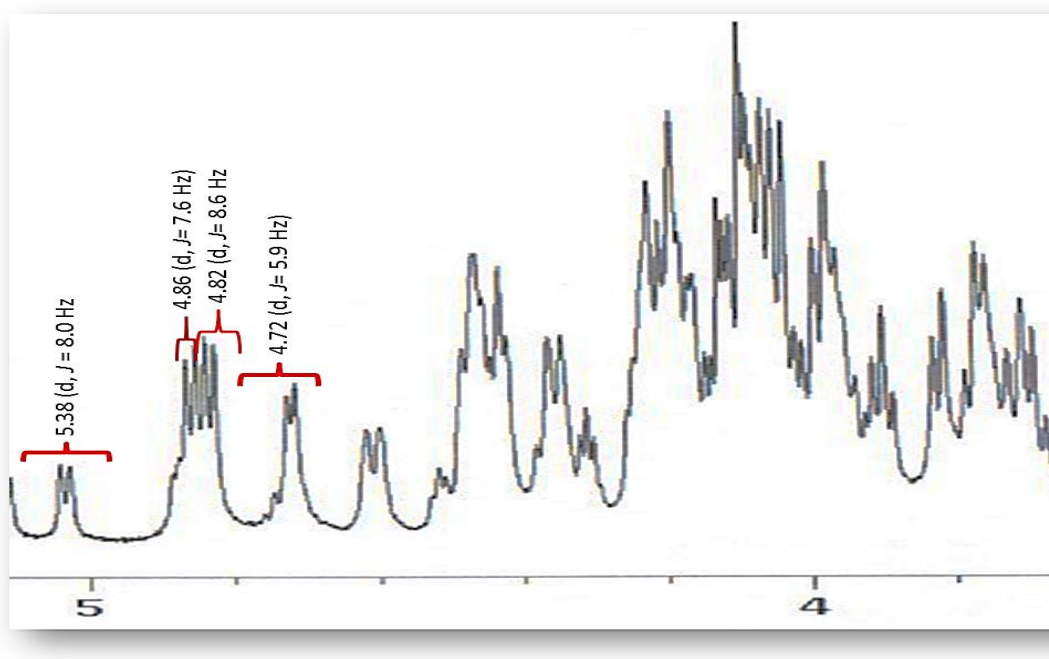


Figure N° 40 : Spectre RMN ¹H des protons anomériques du composé 1.

Tableau N°18. Déplacements chimiques en RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz), dans le C₅D₅N de la partie osidique (glycone) du composés **1**, relevés d'après les expériences RMN -1D et 2D. (δ en ppm, J en Hz).

Position	Composé 1	
	δ (H)	δ (C)
3-O-Sucre:		
Ara		
H-C(1)	4.72 (<i>d</i> , $J=5.9$)	104.2
H-C(2)	4.43	78.8
H-C(3)	4.22	72.9
H-C(4)	4.20	78.2
CH ₂ (5)	4.60(<i>brd</i> , $J=10.4$),3.72	64.0
Glc I		
H-C(1)	5.38(<i>d</i> , $J=8.0$)	103.8
H-C(2)	3.97(<i>t</i>)	75.5
H-C(3)	4.16	76.2
H-C(4)	4.04	71.5
H-C(5)	3.96	77.2
CH ₂ (6)	4.46, 4.24	62.2
Glc II		
H-C(1)	4.86 (<i>d</i> , $J=7.6$)	103.4
H-C(2)	3.77 (<i>d</i> , $J=8.5$)	84.2
H-C(3)	4.10	76.5
H-C(4)	4.05(<i>dd</i> , $J=8.5, 8.3$)	71.5
H-C(5)	4.22	77.0
CH ₂ (6)	4.34(<i>d</i> , $J=10.2$),4.17	61.9
Xyl		
H-C(1)	4.82(<i>d</i> , $J=8.6$)	106.8
H-C(2)	3.90	75.5
H-C(3)	4.00	76.8
H-C(4)	4.03	70.3
CH ₂ (5)	4.47, 3.68	66.9

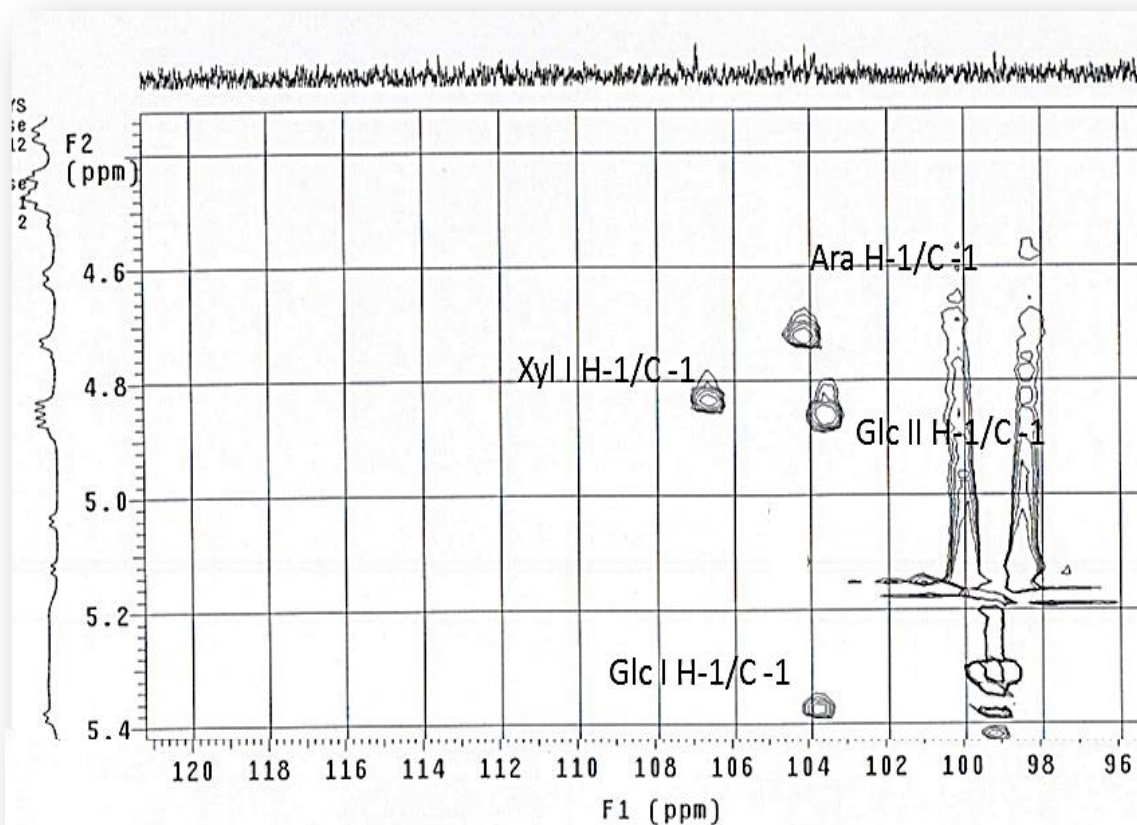


Figure N°41 : Spectre HSQC du composé **1** (Zone des anomères)

La orientation β du proton anomérique des deux glucoses et du xylose, ainsi que l'orientation α du proton anomérique de l'arabinose, sous leur forme pyranose, a été déduite de la constante de couplage relativement large des protons anomériques ($J=7.6$ et 8.6 Hz) (tab.18).

La configuration absolue des sucres a été déterminée D pour Glc, Xyl et L pour Ara par chromatographie en phase gazeuse (voir partie expérimentale).

II.1.1.2.2.2. Détermination de l'enchaînement des sucres et leur fixation sur l'aglycone

La valeur du déplacement chimique du carbone (Ara C-4) déblindé à δ_c 78.8 ppm (Ara C-2), suggère une substitution en cette position.

- une autre valeur déblindée à δ_c 78.2 ppm (Ara C-4) laisse suggérer une autre substitution en C-4.

-La valeur du déplacement chimique du carbone C-2 déblindé à δ_c 84.2 ppm (Glc II C-2), laisse supposer une substitution en cette position.

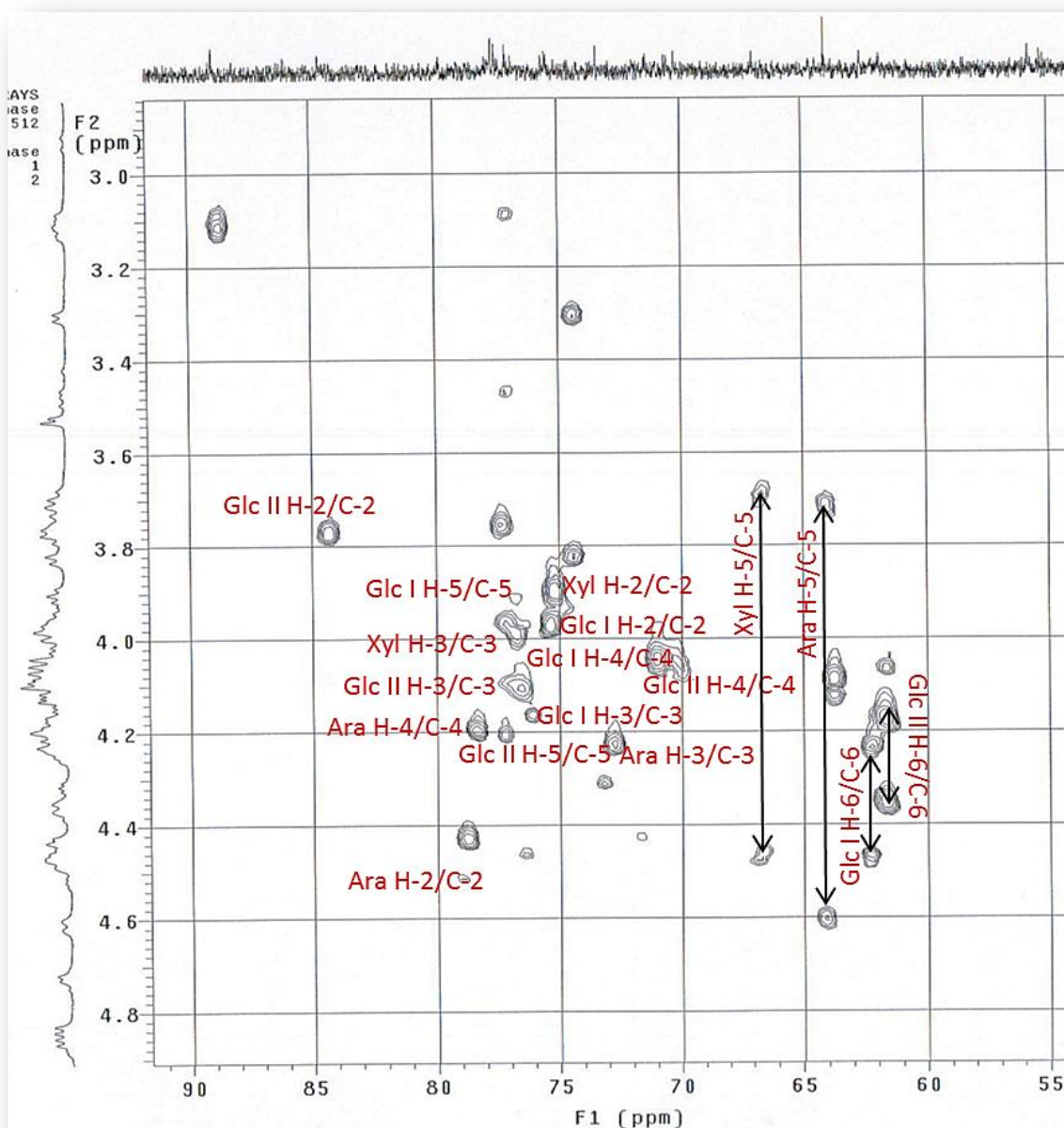


Figure N° 42 : Spectre HSQC du composé **1** (Zone des alcools secondaires).

D'après les analyses des spectres HSQC et HMBC (fig.42 et 43), le glucose (Glc I) et le xylose ont une position terminale confirmée par les corrélations $^3J_{H-C}$ observées sur le spectre entre :

* le proton Glc I H-1 à δ_H 5.38 ppm (d, $J=8.0$) et le Ara C-2 δ_C 78.8 ppm

* entre le proton Xyl H-1 à δ_H 4.82 ppm (d, $J=8.6$) et le Glc II C-2 à δ_C 84.2 ppm.

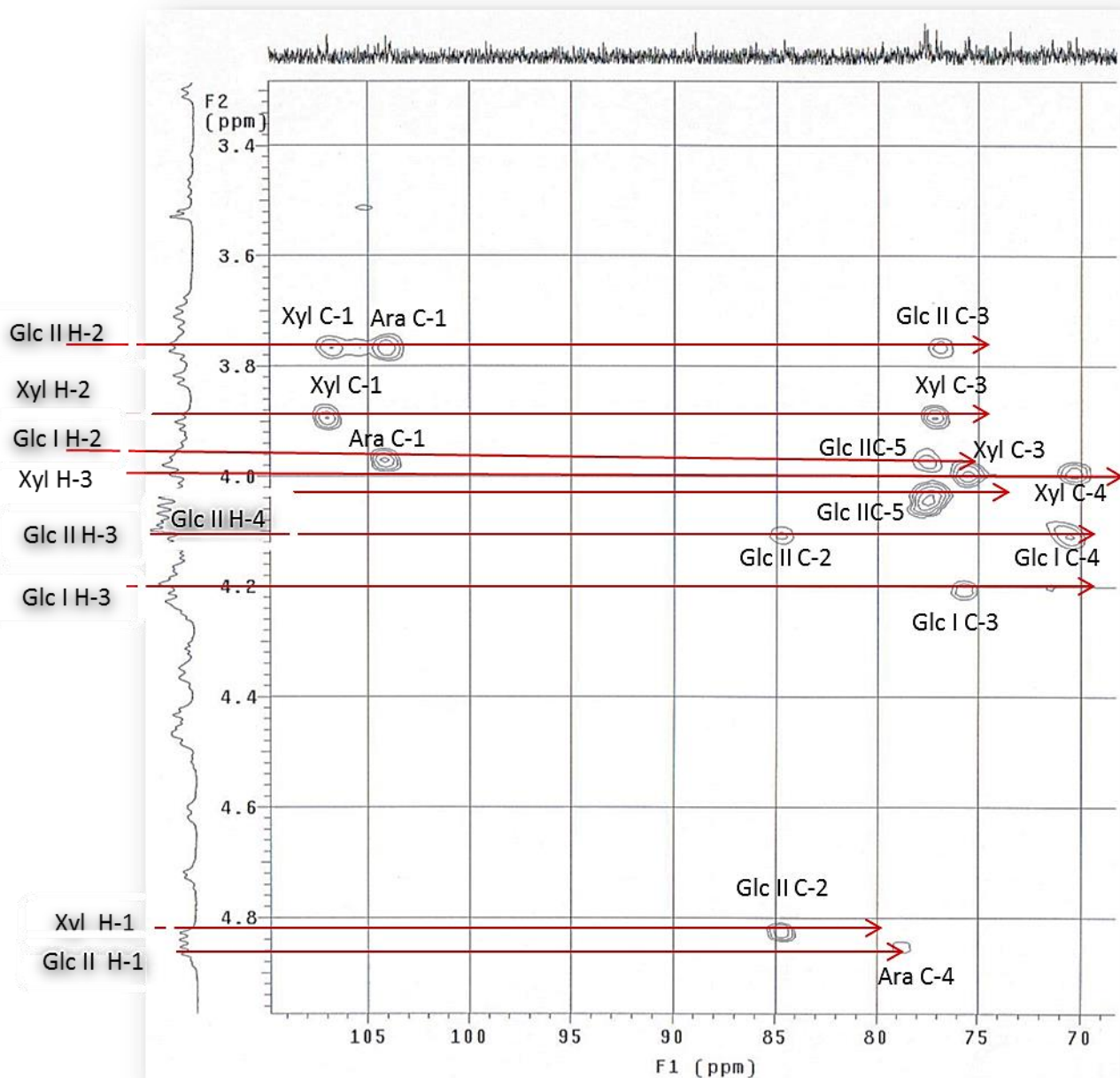


Figure N° 43: Spectre HMBC du composé 1.

L'expérience HMBC (fig.43) a révélé des corrélations interglycosidiques δ_H/δ_C suivantes :

- À δ_H 4.72 Ara H-1 / à δ_C 89.0 aglycone C-3
- À δ_H 5.38 Glc I H-1 / à δ_C 78.8 Ara C-2
- À δ_H 4.86 Glc II H-1/ à δ_C 78.2 Ara C-4
- À δ_H 4.82 Xyl H-1/ à δ_C 84.2 Glc II C-2

Ce qui a permis d'établir la séquence de l'oligosaccharide comme suit :

Xyl-(1→2)-Glc II- (1→4)-[Glc I-(1→2)]-Ara et de déduire le point de fixation de la chaîne osidique en position C-3 (Fig.34) tableau 18.

Ceci a été confirmé par l'expérience NOESY grâce aux corrélations δ_H/δ_H suivantes :

- À δ_H 4.72 Ara H-1/ à δ_H 3.12 H-3 (Agly),
- À δ_H 5.38 Glc I H-1/ à δ_H 4.43 Ara H -2,
- À δ_H 4.86 Glc II H-1/ à δ_H 4.20 Ara H-4,
- À δ_H 4.82 Xyl H-1/ à δ_H 3.90 Glc I H-2.

*Structure du composé 1

Au terme des analyses spectrales RMN-1D et 2D, la structure du composé **1**, a été élucidée comme étant: 3β -O- $\{\beta$ -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- $\{\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranosyl}-13,28-epoxy-oleanan-16-oxo-30-al. Ce composé rencontré pour la première fois dans le règne végétal a été nommé **Afrocyclamin 1** (Fig.44).

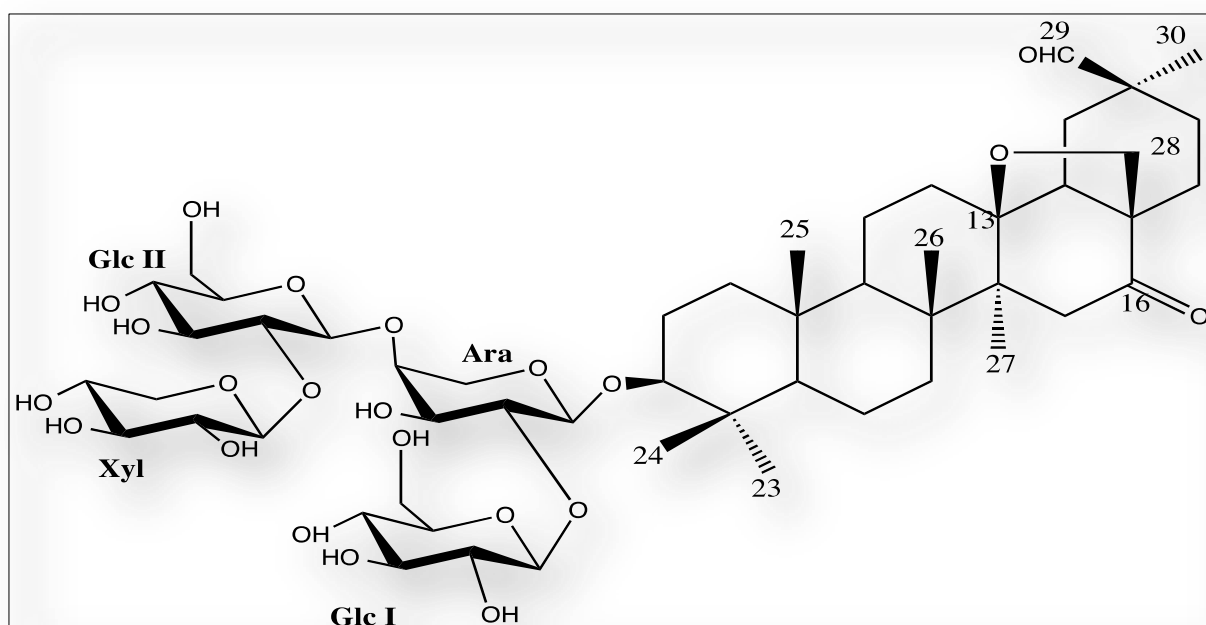


Figure N°44: structure du composé **1** Afrocyclamin A (Bencharif-Betina et al., 2012)

II.1.2.Détermination structurale du composé 2

II.1.2.1.Spectrométrie de masse

Le spectre de masse obtenu par électrobulbation (HR-ESI-MS) en mode positif du composé **2**, donne un ion pseudomoléculaire $[M-Na^+]$ à m/z 1229.6780, ceci suggère la formule chimique suivante $C_{58}H_{94}O_{26}$. Le spectre de masse obtenue par FAB-MS en mode négatif montre un ion pseudo moléculaire $[M-H]^-$ à m/z 1205, traduisant une masse moléculaire de 1206. Les ions fragments suivants à m/z 1061 $[M-H^- -144]$, à m/z 929 $[M-H^- -144 -132]$ à m/z 767 $[M-H^- -144 -132 -162]$, à m/z 605 $[M-H^- -144 -132 -162 -162]$ et à m/z 476 $[M-H^- -144 -132 -162 -162 -132]$ (fig.45), correspondent à l'élimination d'une unité de 144

(C₆H₁₂O₅), correspondant à un acide et de deux hexosyles et deux pentosyles

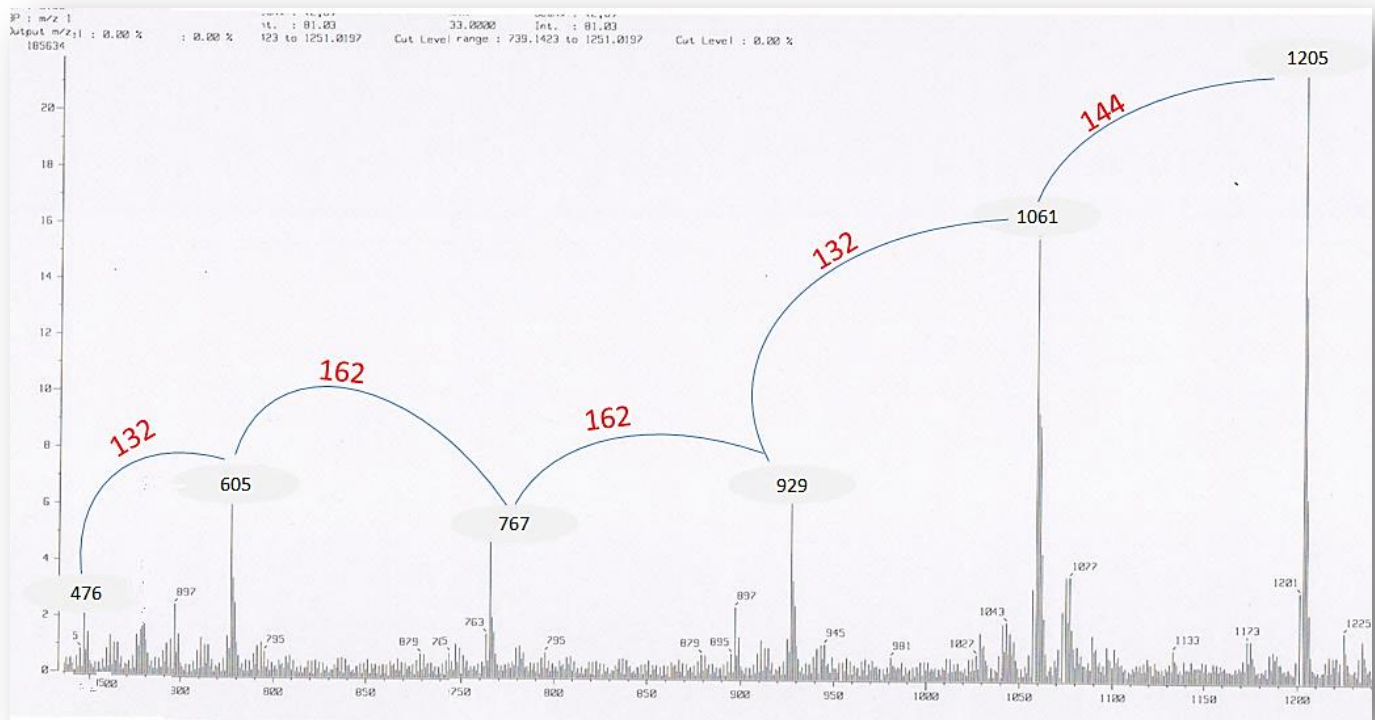


Figure N°45: Spectre de masse en source FAB-MS en mode négatif du composé 2.

II.1.2.2. Spectrométrie de RMN

L'identification de l'aglycone repose directement sur l'étude et l'analyse spectrales RMN-1D, -2D et la masse du composé.

II.1.2.2.1. Partie génine

* Spectre RMN-¹H

Sur le spectre RMN-¹H, les signaux caractéristiques suivants sont repérés :

Six méthyles résonnants en fins singulets, à δ_H 0.74, 0.86, 1.00, 1.12, 1.19 qui correspondent aux déplacements chimiques des protons méthyliques CH₃-23, CH₃-24, CH₃-25, CH₃-26, CH₃-27, CH₃-30 reportés sur le tableau N° 19 Ces derniers ne montrent pas une variation significative, pour tous les composés isolés lors de cette étude (Composés N° 3, 4, 5 voir tableaux /figures).

Un massif de protons résonnant à δ_H 0.62 et 1.92 ppm correspondant aux CH- et CH₂- du triterpène.

Le proton H-3 α -axial, résonnant sous forme de multiplet à δ_H 3.08-3.15 ppm.

Le proton oléfinique H-12 à δ_H 5.36 ppm se trouvant déblindé du fait de la double liaison.

Un proton H-16 à δ_H 4.58 ppm porté par un carbone hydroxylé en cette position.

Un multiplet H-18 à δ_H 2.42-2.44 ppm (*m*) déblindé, du fait de sa position en face du cône d'anisotropie de l'alcool primaire en C-28 (tab19).

Deux paires de protons géminaux portés respectivement par leurs protons oxydés :

- H₂-28 à δ_H 3.56 et à δ_H 3.65 ppm (2*d*, *J*= 11.0 pour les deux protons).

- H₂-29 à δ_H 3.82 (*d*, *J*= 10.4) et à δ_H 3.92 ppm.

* Spectre RMN-¹³C

Le spectre RMN-¹³C montre 58 signaux de carbones, dont 30 carbones sont attribués au squelette du triterpène, le reste appartenant à la chaîne oligosaccharidique et à l'acide dicrotalique.

Des signaux caractéristiques sont observés sur le spectre de l'expérience RMN-¹³C comme suit:

Les carbones des méthyles 25, 26, 24, 30, 23, 27, résonnant à δ_C 0.74, .86, 1.00, 1.12, 1.19, 1.70 respectivement dont deux déblindés, le carbone des méthyles CH₃-23, CH₃-27, du fait de leurs positions équatoriales sur le cyclohexane (tab.19).

Un ensemble de carbones résonnant entre δ_C 18.0 et δ_C 55.5 ppm attribuables aux CH₂, CH- et C- quaternaires.

Les carbones éthyliques C-12 et C-13 de la double liaison $\Delta^{12,13}$ trisubstituée, résonnent respectivement à δ_C 124.0 et à δ_C 144.2 ppm (tab.19).

Le carbone C-16 déblindé à δ_C 73.0 ppm du fait de la présence d'un hydroxyle.

Le carbone C-28 et C-29 résonnant respectivement à δ_C 69.0 et δ_C 66.5 ppm, à cause de l'effet déblindant de leur carbones oxydés.

*Spectre HSQC

L'expérience HSQC (fig.46) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones (δ_C) à partir des protons, par l'analyse des corrélations hétéronucléaires J_{H-C} observées, sur le spectre HSQC (Fig.46), ce qui a conduit aux valeurs (δ_H)/(δ_C) reportées sur le tableau N° 19 qui sont relatifs aux six méthyles δ_H/δ_C : 1.70(s)/27.0 CH₃-27; 1.19(s)/27.7 CH₃-30; 1.12(s)/27.3 CH₃-23; 1.00(s)/16.0 M CH₃-(24); 0.86(s)/16.5 CH₃-(26) et 0.74(s)/15.7 CH₃-(25).

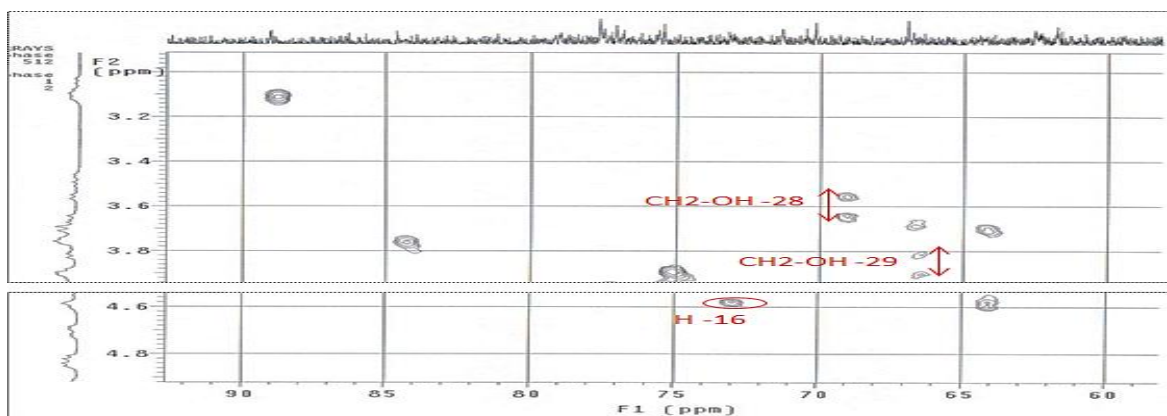


Figure N° 46 : Spectre HSQC du composé 2.

Tableau N°19. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie aglycone du composé 2, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Position	Composé 2	
	$\delta(\text{H})$	$\delta(\text{C})$
CH ₂ (1)	1.53 (s), 0.76 (s)	38.7
CH ₂ (2)	1.76, 1.92	26.2
H- C(3)	3.08-3.15(m)	89.0
C (4)	-	39.2
H- C(5)	0.62-0.64 (m)	55.5
CH ₂ (6)	1.34, nd	18.0
CH ₂ (7)	nd, nd	32.9
C (8)		40.0
H- C(9)	1.56-1.60 (m)	46.7
C (10)		36.0
CH ₂ (11)	0.96, 1.72	23.6
H- C(12)	5.36 (d, $J=8.1$)	124.0
C (13)		144.2
C (14)		41.8
CH ₂ (15)	nd,nd	33.9
H- C(16)	4.58	73.0
C (17)		39.5
H-C(18)	2.40-2.44 (m)	42.0
CH ₂ (19)	2.50-2.54 (m), 1.72	42.7
C (20)		35.7
CH ₂ (21)	2.12-2.16(m), 1.74	31.4
CH ₂ (22)	1.52, 2.28	27.8
Me (23)	1.12 (s)	27.6
Me (24)	1.00 (s)	16.0
Me (25)	0.74 (s)	15.7
Me (26)	0.86 (s)	16.5
Me (27)	1.70 (s)	27.0
CH ₂ -O-(28)	3.56 , 3.65(d, $J=11.0$)	69.0
CH ₂ -O-(29)	3.82 (d, $J=10.4$), 3.92	66.5
Me (30)	1.19 (s)	27.7

* le spectre HMBC

L'expérience HMBC (fig.47), a révélé les corrélations entre protons et carbones distants de une à quatre liaisons ($^2J_{H-C}$, $^4J_{H-C}$), elle permet l'attribution des méthyles qui corrélient au maximum avec quatre carbones constituant la région ou le support qui les porte.

-Les protons des méthyles CH₃-23 à δ_H 1.12 ppm et CH₃-24 à δ_H 1.00 sont détectés sur les spectres HMBC par leurs corrélations, avec les carbones connus C-3 à δ_C 89.0, C-4 quaternaire à δ_C 39.0 et le C-5 à δ_C 55.5 (fig.47). Leur distinction, se fait grâce à la différence de déplacement chimique, des carbones C-23 à δ_C 27.6 ppm et C-24 à δ_C 16.0 ppm à cause de la position α -axiale du C-23 (valeur déblindée) et de la position β -équatoriale du C-24 (Valeur blindée).

-Les protons CH₃-25 à δ_H 0.74 ppm, corrélient avec les carbones connus C-1 à δ_C 38.7, C-5 à δ_C 55.5 ppm, C-9 à δ_C 46.7 ppm et le carbone quaternaire C-10 à δ_C 36.0 ppm.

-Les protons CH₃-26 à δ_H 0.86 corrélient avec les carbones connus C-7 à δ_C 33.2, C-8 à δ_C 42.3, C-9 à δ_C 46.7 ppm et C-14 (quaternaire) à δ_C 40 (fig.47).

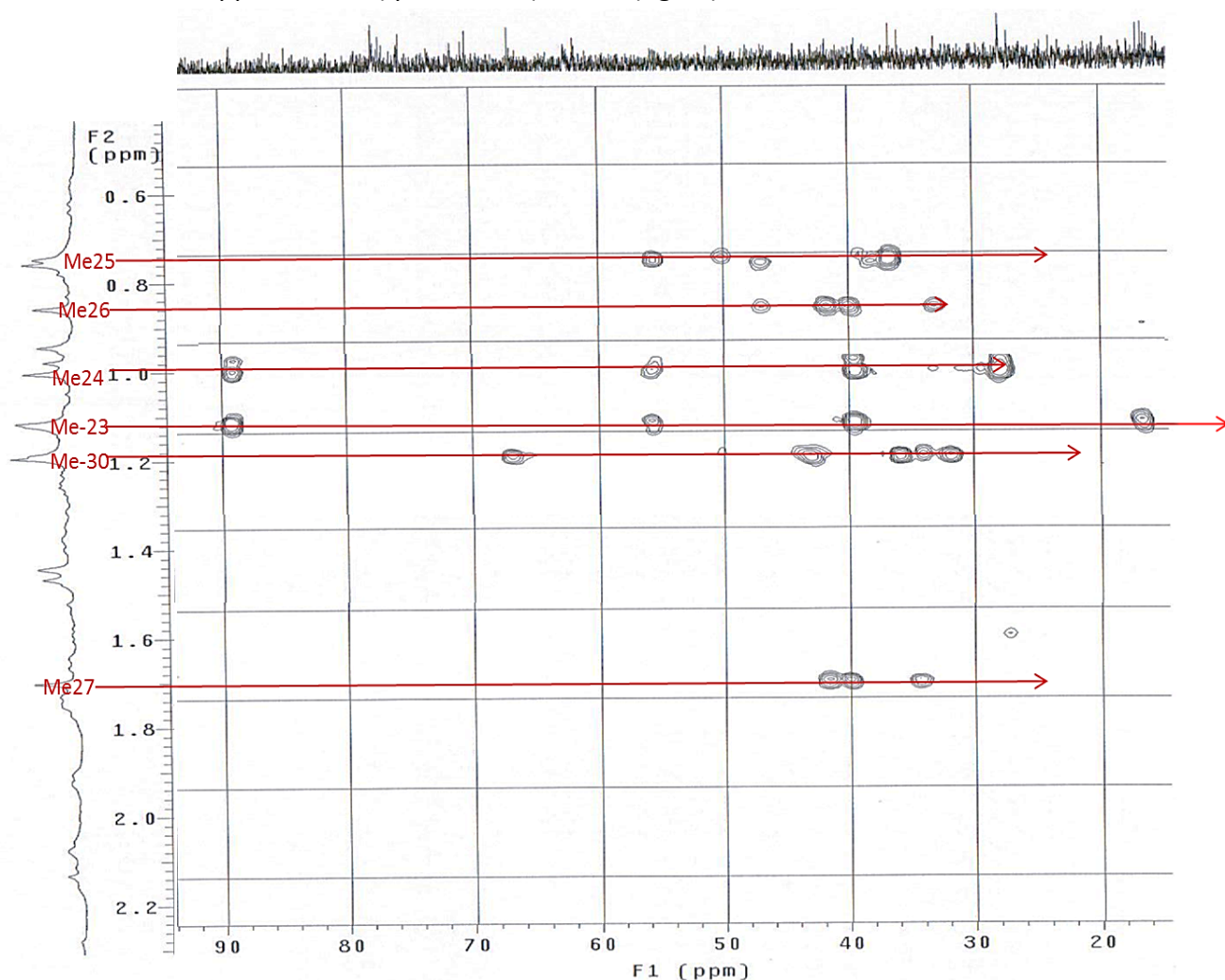


Figure N°47: Spectre HMBC du composé 2.

Les protons du méthyle CH₃-27 à δ_H 1.70 ppm corrént avec les carbones connus C-8, C-13, C-14 et C-15, cette dernière corrélation permet de situer le carbone C-15.

Le CH₃-29 est oxydé en alcool primaire. La position α -axiale ou β -équatoriale du groupement CH₂OH est déterminée par le calcul des valeurs (δ_C) théoriques des méthyles dans les deux cas de figures possibles. La substitution par un hydroxyle mène à un effet blindant de 5 ppm du méthyle adjacent. Les valeurs de références utilisées sont celles des paires de protons géminés connues.

première hypothèse : CH₂OH en C-30

valeur théorique δ_{C-29} est de 28.0 ± 5
=24.0 ppm.

deuxième hypothèse : CH₂OH en C-29

valeur théorique δ_{C-30} est de 32.0 ± 5
=27.0 ppm.

D'après ces résultats et par comparaison aux valeurs retrouvées (Fig.47, Tab.19), la fonction CH₂OH est localisée en position C-29.

Les carbones C-15 et C-21, déjà déterminés grâce aux corrélations révélées par les protons des méthyles CH₃-27 et des protons géminés du C-29, il est possible d'attribuer à ces carbones leurs protons sur les spectres HSQC (spectre HSQC).

À partir des protons H-15 et H-21, les protons adjacents peuvent être localisés sur les spectres COSY, qui sont le H-16 et H-22. La même méthodologie sera suivie pour retrouver leurs carbones respectifs sur le spectre HSQC.

Par cette méthode nous avons pu attribuer les protons des carbones restant, quand les signaux s'accompagnent d'un bruit détectable sur les expériences citées plus haut.

***Le spectre NOESY**

La stéréochimie des carbones asymétriques dans la génine du composé **2**, est établie par l'analyse des constantes de couplage mesurées sur le spectre RMN-¹H et des effets nOe, observés sur le spectre de l'expérience NOESY (fig.48) qui représente la RMN-2D homonucléaire, visualisant ainsi les couplages dipolaires entre les protons proches dans l'espace.

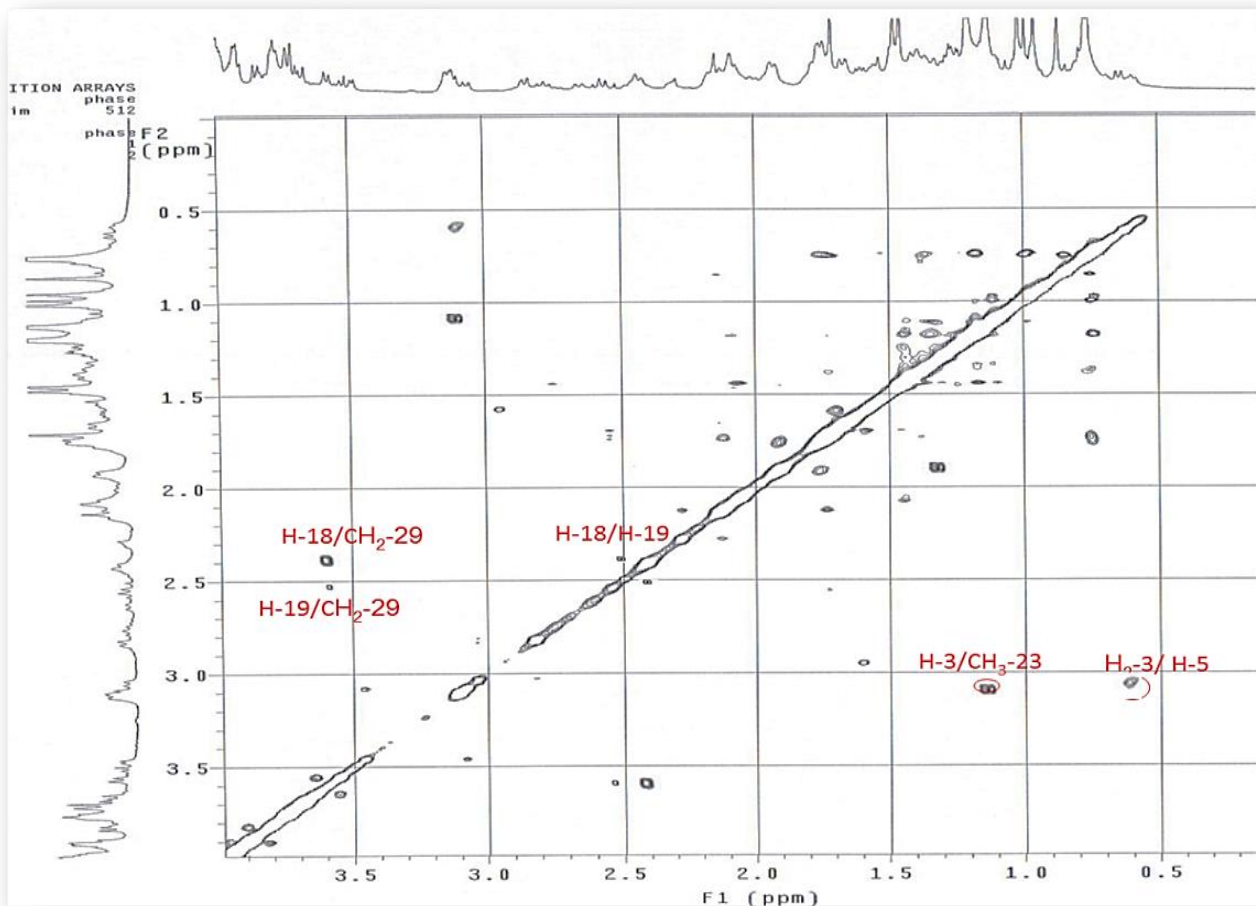


Figure N°48: Spectre NOESY de la partie aglycone du composé **2**.

La stéréochimie α -axiale du proton H-3 est prouvée par les corrélations entre H-3 à δ_H 3.08-3.015 / H-5 à δ_H 0.62-0.64 et H-3 à δ_H 3.08-3.015 / CH₃-23 à δ_H 1.12 (Fig. 48).

L'orientation β -axiale du proton H-18 à δ_H 2.40-2.44 ppm, est confirmée par les corrélations entre les protons géminés du H₂-28 à δ_H 3.56, 3.65 et du proton H-12 à δ_H 5.36 ppm (fig.49).

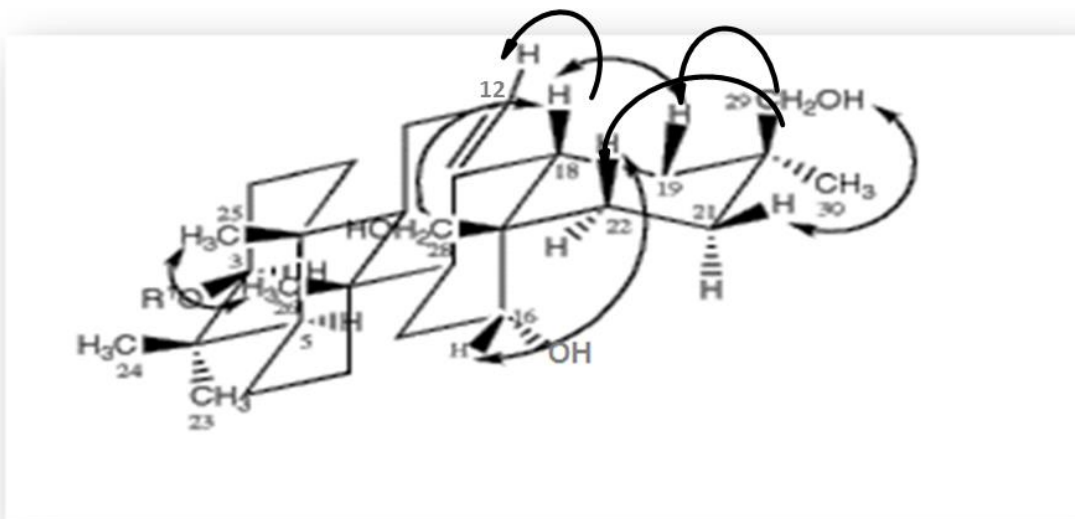


Figure N° 49 : Les effets nOe (H⁺,H⁺), de la partie aglycone du composé **2**.

Les corrélations entre le proton géminé CH₂-OH-29 à δ_H 3.56 et le proton du H-19 à δ_H 2.54 ppm, entre le proton géminé CH₂-OH-29 à δ_H 3.56 et H-18 à δ_H 2.40-2.44 ppm révèlent l'orientation β -axiale du CH₂OH-29 et l'orientation α -axiale du CH₃-30 à δ_H 1.19.

Les protons CH₃-25 à δ_H 0.74 et CH₃-26 à 0.86 ppm prouvent leurs orientations β -équatoriale.

*Structure de l'aglycone du composé 2

Au terme de cette analyse l'aglycone du composé 2, a été identifié comme étant :

(3 β ,16 α ,20 β)-oleane12-ene-3,16,28 ,29 tetrol " ce qui correspond à la génine de l'« hederifolioside E », isolé de l'espèce *Cyclamen hederifolium* (Altunkeyik et al., 2012; Skinner et al., 2014).

II.1.2.2.2. Partie osidique

II.1.2.2.2.1. Détermination de l'enchaînement osidique et de l'unité acide et leur fixation sur l'aglycone

Sur le spectre de RMN-¹H, quatre protons anomériques sont repérés à δ_H 5.38 (d, $J = 7.0$ Hz), 4.84 (d, $J = 7.6$ Hz), 4.82 (d, $J = 8.61$ Hz), 4.72 (d, $J = 5.9$ Hz). Ces protons corrélient sur l'expérience HSQC (fig.50), avec les carbones dans l'ordre suivant : δ_C 103.8, 104.1, 106.5, 104.2 ppm (tab.21).

À partir du proton anomérique à δ_H 5.38 ppm et l'analyse spectrale COSY/ TOCSY, les sept protons d'un hexose peuvent être attribués.

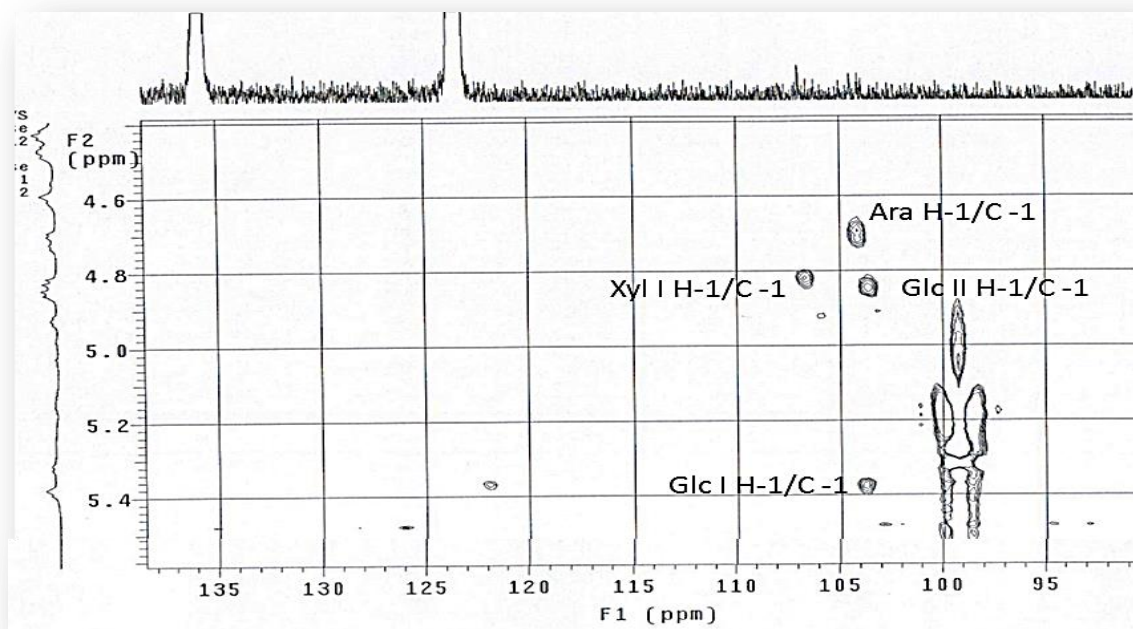


Figure N°50: Spectre HSQC du composé 2
(Zone des anomères)

Les grandes valeurs de couplage (tab.21) déterminent leur orientation et montre qu'il s'agit d'un β -Glucose. La même démarche a permis de déduire l'orientation des oses restant ayant respectivement des protons anomériques à δ_H 4.84, δ_H 4.72, δ_H 4.82 ppm, correspondant à un β -Glucose, à un α -Arabinose et à un β -Xylose.

Le carbone Ara C-2 déblindé à δ_C 78.8 ppm et Ara C-4 à δ_C 78.8 ppm comparativement à la chaîne osidique de "afrocyclamin A", confirme la présence d'une double substitution sur ces deux positions. En partant du proton anomérique de l'arabinose à δ_H 4.72 ppm sur les spectres des expériences COSY/ NOESY, 6 protons peuvent être attribués.

Le proton H-1 résonnant sous forme d'un doublet (d , $J=5.9$ Hz), corrèle sur le spectre de l'expérience HMBC avec le carbone C-3 de l'aglycone et révèle le point de fixation de la chaîne oligosaccharidique. Les déplacements chimiques de la partie osidique attribués d'après les expériences RMN- 1H , - ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY, TOCSY, NOESY, du composé **2**, sont superposables avec ceux du composé **1** "Afrocyclamin A", Xyl-(1 \rightarrow 2)-Glc II-(1 \rightarrow 4)-[Glc I-(1 \rightarrow 2)]-Ara, mis à part l'apparition d'un signal Xyl H-4 déblindé à δ_H 5.18 ppm et à δ_C 72.0, indiquant une acylation en cette position.

La présence d'un acide dicrotalique (=l'acide 3-hydroxy-3-méthylpentanedioïque), qui est révélé par les observations de sept signaux additionnels sur les spectres de RMN-1D, -2D, correspondant au fragment : 4-carboxy-3hydroxy-3-méthyl-1-oxobutyle, ce qui est en total accord avec les observations citées dans la littérature (G.Mihci et al., 2010). Sa fixation sur la position Xyl (H/C)-4 est déduite par l'observation d'une corrélation HMBC entre le signal déblindé à δ_H 5.18 ppm et le groupement carboxyle de l'acide dicrotalique à δ_C 170 ppm.

Tableau N°21. Déplacements chimiques en RMN ¹H (600 MHz) et RMN-¹³ C (150 MHz), dans la partie oligosaccharidique du composé **2**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) C₅D₅N .

Position	Composé 2	
	δ (H)	δ (C)
3-O-Sucre:		
Ara		
H-C(1)	4.72 (<i>d</i> , $J=5.9$)	104.2
H-C(2)	4.42 (<i>t</i>)	78.8
H-C(3)	4.20	72.8
H-C(4)	4.18	78.8
CH ₂ (5)	4.60, 3.70	64.0
Glc I		
H-C(1)	5.38 (<i>d</i> , $J=7.0$)	103.8
H-C(2)	3.97	75.2
H-C(3)	4.16	76.2
H-C(4)	4.04	71.5
H-C(5)	3.96	77.2
CH ₂ (6)	4.46, 4.24	62.2
Glc II		
H-C(1)	4.84 (<i>d</i> , $J=7.6$)	104.1
H-C(2)	3.78	84.8
H-C(3)	4.10	76.5
H-C(4)	4.06	70.5
H-C(5)	4.21	77.0
CH ₂ (6)	4.34 (<i>d</i> , $J=11.6$), 4.17	61.7
Xyl		
H-C(1)	4.82(<i>d</i> , $J=8.6$)	106.5
H-C(2)	3.90	75.5
H-C(3)	4.00	76.7
H-C(4)	5.18	72.0
CH ₂ (5)	4.46, 3.68	66.9
Acide Dicrotalique		
Sur Xyl-4		
H-C(1)	-	170.0
H-C(2)	3.02(<i>d</i> , $J=12.3$), 2.82 (<i>d</i> , $J=12.1$)	46.8
H-C(3)	-	70.0
H-C(4)	nd, nd	47.0
H-C(5)	-	172.3
H-C(6)	1.46	27.5

* structure du composé 2

L'analyse spectrale RMN-1D et 2D, a permis d'élucider la structure du composé **2** comme étant : 3 β -{4-O-[3-hydroxy-3-methylglutaryl]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl- (1 \rightarrow 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopyranosyl}-28,30 dihydroxy-olean-12-ene un composé nouveau qui a été nommé **Afrocyclamin B**. (Fig.51)

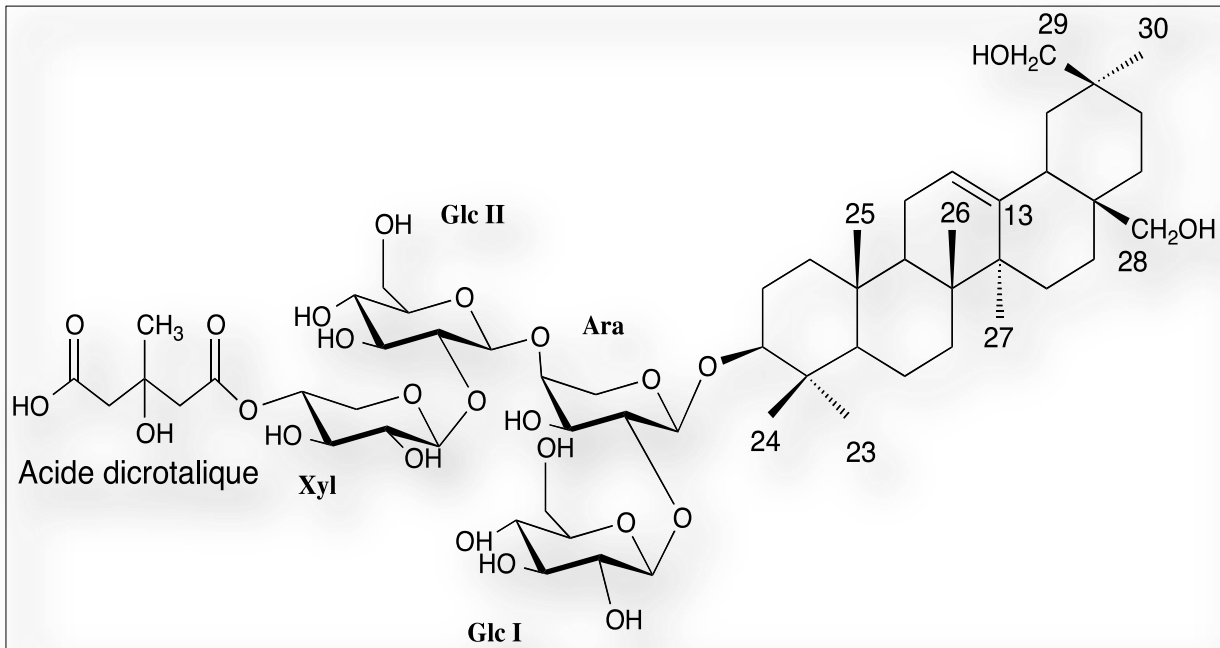


Figure N° 51: structure du composé **2**, Afrocyclamin B (Bencharif-Betina et al., 2012)

II.1.3. Identification des composés 3,4,5

L'interprétation des spectres des composés **3**, **4**, **5**, s'est trouvée facilitée par le fait que ces spectres sont superposables sur ceux déjà interprétés (composés **1**, **2**). Finalement notre démarche a consisté, à comparer les zones et à relever les différences en ce qui concerne les quelques signaux additionnels ou manquant.

II.1.3.1. Identification du composé 3

II.1.3.1.1. Spectrométrie de masse

Le spectre de masse obtenu en HR-ESI-MS en mode positif du composé **3** révèle un ion pseudomoléculaire à m/z 1085.7601 [$M+Na^+$]. Le spectre obtenu en source FAB-MS en mode négatif montre un ion pseudomoléculaire à m/z 1061 [$M-H^-$](fig.52), suggérant une masse moléculaire de 1062, correspondant à une formule brute de $C_{52}H_{86}O_{22}$.

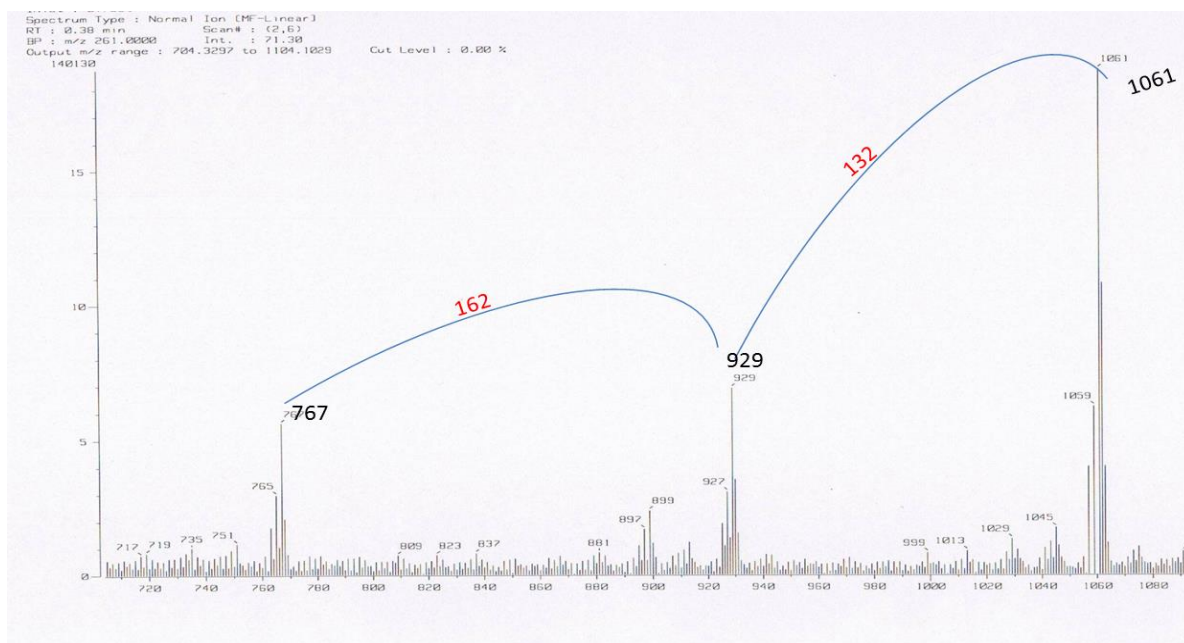


Figure N°52: Spectre de masse en source FAB-MS en mode négatif du composé **3**.

II.1.3.1.2. Spectrométrie de RMN

II.1.3.1.2.1. Partie génine

*Spectre de RMN ^1H

Le spectre de l'expérience RMN ^1H , montre des signaux caractéristiques correspondant aux six méthyles, résonnant sous forme de fins singulets, à δ_{H} 0.96, 0.85, 1.26, 1.40, 0.94, 0.87 ppm (fig.53). Les déplacements de ces protons (24, 25, 26, 27, 29, 30), ne montrent pas de variations significatives (tab.22), comparativement au composé **1** (Afrocyclamin A), mis à part l'apparition des signaux additionnels suivants :

-A δ_{H} 3.60 et 4.19 ppm (t, $J = 9,45$; d, $J = 10,15$) correspondant aux protons géminés du $\text{CH}_2\text{-OH-23}$.

-A δ_{H} 3,26 ppm (d, $J = 7,38$) et 3.52 (d, $J = 7.19$) correspondant aux protons géminés $\text{CH}_2\text{-O-28}$ indiquant la présence du méthylène-oxy (pont 13,28 epoxy) .

-A δ_{H} 0.94 ppm correspondant au méthyle $\text{CH}_3\text{-29}$

-A δ_{H} 3.75 ppm (d, $J = 10,81$) correspondant au proton H-16.

-Un ensemble de protons résonnant à δ_{C} 0.58 et 3.75 ppm correspondant au $-\text{CH}$ et $-\text{CH}_2$ du tritérpène (tab.22). Le proton H-3 α -axial résonne sous forme d'un triplet à δ_{H} 4.05 ppm (t, $J = 7.43$).

Sur le spectre de RMN- ^1H comparativement à celui du composé **1** (afrocyclamin A), un signal additionnel est observé, il résonne à δ_{H} 3.75 ppm (d, $J = 9.05$ Hz), correspond au H-16. Cette position est déblindée, du fait de la présence d'un hydroxyle (Calis et al., 1997).

Un autre signal supplémentaire correspondant à deux protons géminés ($\text{H}_2\text{-23}$) à δ_{H} 3.60 et 4.19 ppm (t, $J = 9,45$; d, $J = 10,15$).

Deux protons géminés $\text{H}_2\text{-28}$ résonnant à δ_{H} 3,26 (d, $J = 7,38$) et 3.52 (d, $J = 7.19$) indiquant la présence du méthylène-oxy (pont 13,28 epoxy).(fig.53).

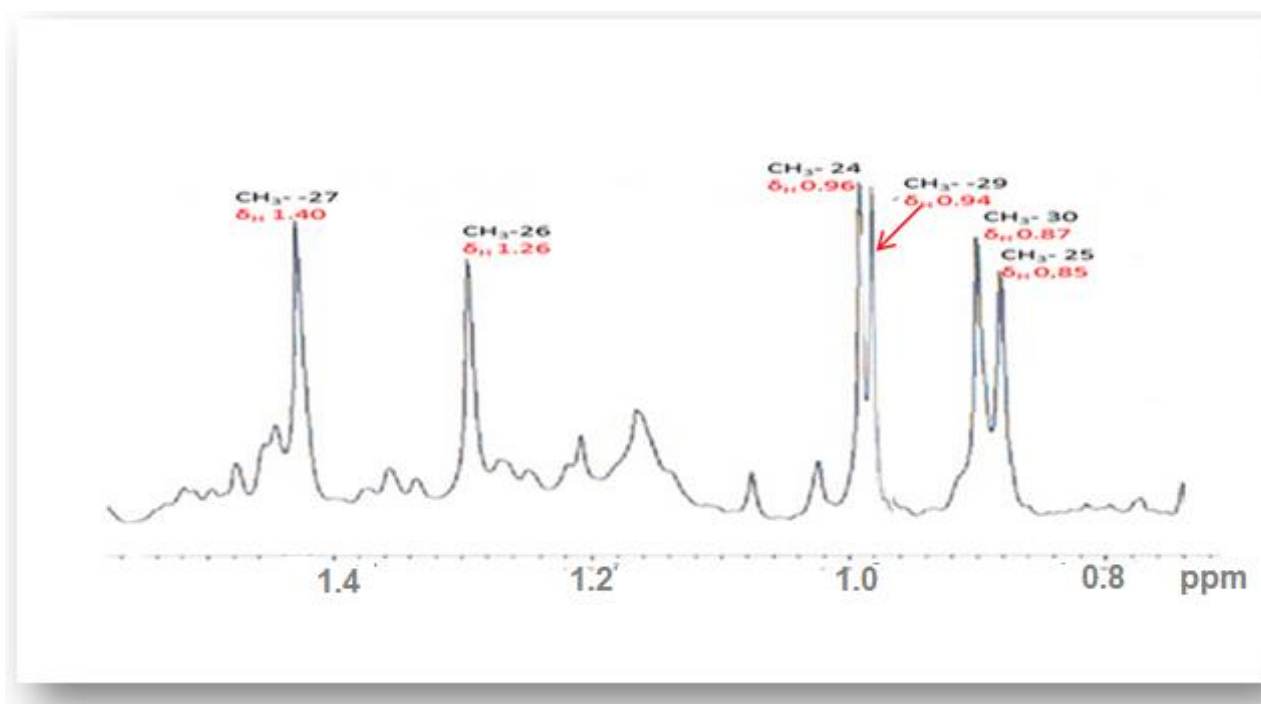


Figure N° 53: Spectre RMN¹H du composé **3** (zone des méthyles).

***Le spectre RMN ¹³C**

Sur le spectre de RMN ¹³C, les signaux caractéristiques suivants sont repérés :

Six méthyles dont les carbones CH₃-24, CH₃-25, CH₃-26, CH₃-27, CH₃-29, CH₃-30 résonnent à δ_c 13.02, 16.92, 18.89, 19.32, 33.40, 24.83 ppm respectivement.

Un ensemble de carbones qui résonnent entre δ_c 17.60 et 55.32 ppm qui sont attribués au CH₂,CH, C quaternaires.

Le C-3 résonnant à δ_c 82.06 ppm du fait de l'effet déblindant du carbone CH₂-OH-23 à δ_c 64.00 ppm , oxydé en alcool primaire.

Le carbone C-13 quaternaire substitué résonnant à δ_c 86.10 du fait du pont 13-28 epoxy.

Le carbone C-16 (oxydé par hydroxyle) résonnant à δ_c 77.80 ppm du fait de l'effet blindant de l'hydroxyle (tab.22). Le carbone CH₂-OH 28 à δ_c 77.60 ppm déblindée par la présence du méthylène oxy.

-Le carbone du CH₃-29 résonnant à δ_c 33.7 ppm.

***Le spectre RMN HSQC**

Dans l'analyse des corrélations hétéronucléaires observées sur le spectre HSQC (Fig.54) et à partir des protons, précédemment identifiés, les déplacements chimiques et corrélations, sont attribuées aux carbones correspondants, les valeurs retrouvées sont reportées sur le tableau N°22.

Sur les figures suivantes nous avons juste indiqué, les corrélations additionnelles correspondant au CH₂-OH-23 et le méthyle CH₃-29 et HO-C16, le restant étant similaires (± 1) ppm aux déplacements chimiques relevés sur le spectre HSQC du composé **1** (Afrocyclamin A).

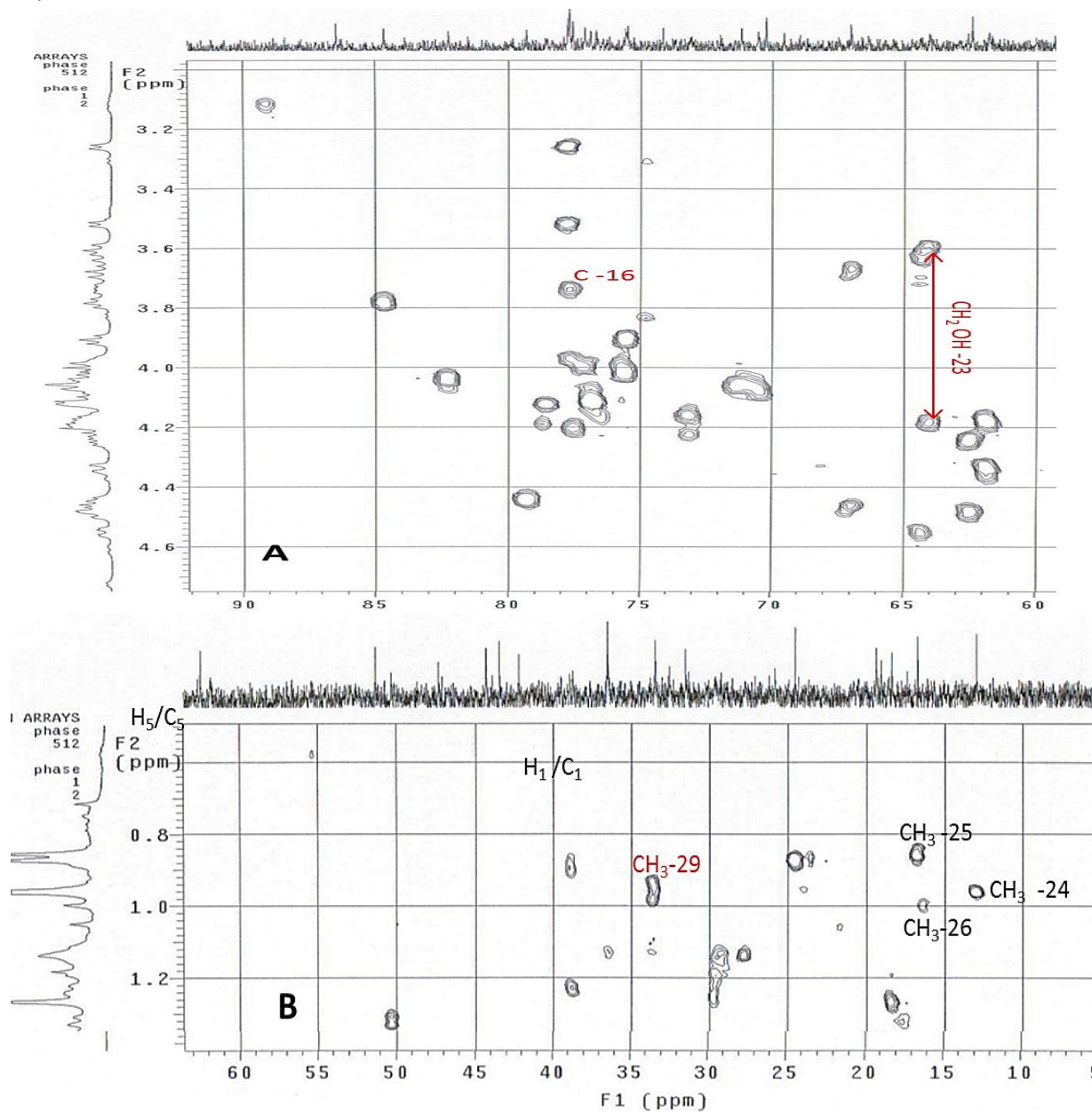


Figure N°54 : Spectre HSQC du composé **3**.

A : les signaux additionnels correspondant au CH₂OH-23.

B : le signal additionnel correspondant au CH₃-29.

Tableau N° 22. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie aglycone du composé **3**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz).

Position	Composé 3	
	δ (H)	δ (C)
CH ₂ (1)	0.89 et 1.60	38.8
CH ₂ (2)	1.04, 1.92	25.7
H-C(3)	4.05 dd (11.5, 4.5)	82.0
C (4)	-	43.2
H-C(5)	0,58 dd (11.3, 8.0)	47.1
CH ₂ (6)	1.32 et 1.36 m	17.3
CH ₂ (7)	1.14	33.8
C (8)	-	42.1
H-C(9)	1.32 m	50.2
C (10)	-	36.1
CH ₂ (11)	1.43 et 1.35 m	19.2
CH ₂ (12)	1.38 et 1.42 m	32.7
C (13)	-	86.1
C (14)	-	44.0
CH ₂ (15)	1.44 m	36.2
H-C (16)	3.75 br d (5.5)	77.8
C (17)	-	44.1
H-C(18)	2.74 m	51.3
CH ₂ (19)	1.21 (m) et 1.62	38.4
C (20)	-	31.8
CH ₂ (21)	2.11 , 2.40	36.2
CH ₂ (22)	1.90 , 2.03	32.1
CH ₂ -O-(23)	3.60 et 4.19 (d , J =10.15)	64.0
Me (24)	0.96(s)	13.0
Me (25)	0.85(s)	16.9
Me (26)	1.26(s)	18.8
Me (27)	1.40(s)	19.3
CH ₂ -O-(28)	3.26 (d , J =7.38)et 3.52 (d , J =7.19)	77.6
Me (29)	0.94(s)	33.4
Me (30)	0.87(s)	24.8

Le spectre RMN HMBC:

La visualisation du couplage (J_{-2} , J_{-3} , J_{-4}) entre protons et carbones distants a permis d'attribuer les méthyles et d'autre carbone avoisinants dans l'aglycone.

Les protons CH₂-23 et CH₃-24 à δ_c 3.60 et 4.19 (d , J =10,15) sont déduits des valeurs de leurs déplacements chimiques et leurs corrélations avec le C-3 à δ_c 82.06 C-4 à δ_c 43.20, C-5 à δ_c 47.16 (Fig. 27).

Pour le composé **3** où la localisation de la fonction alcool primaire sur l'un des deux méthyles CH₃-23 et CH₃-24, a pu se faire sur la base de discussion de deux hypothèses :

La position α -axiale ou équatoriale du groupement CH₂OH est déterminée par un simple calcul des valeurs (δ_C) théoriques des méthyles dans les deux cas de figures possibles.

La substitution par un hydroxyle produit un effet blindant de plus ou moins 5 ppm des méthyles adjacents . Les déplacements chimiques cités dans la littérature, sont celles des paires de protons géminés connus

Première hypothèse : CH₂OH en C-23

Deuxième hypothèse : CH₂OH en C-24

Valeurs théoriques δ_{C-24} est de 16.0 ± 5
=21.0 ppm.

Valeurs théoriques δ_{C-23} est de 23.0 ± 5
=28.0 ppm.

D'après ces résultats et par comparaison aux valeurs retrouvées (Fig.55, Tab.22), la fonction CH₂OH est localisée en position CH₃-23, ($\delta_{CH_3-24} = 13.02$ ppm). Les protons du méthyle CH₃-25 corrélerent avec les carbones C-1 à δ_C 38.80, C-5 à δ_C 47.16, C-9 à δ_C 50.23 et le carbone quaternaire C-10 à δ_C 36.15, (fig.55).

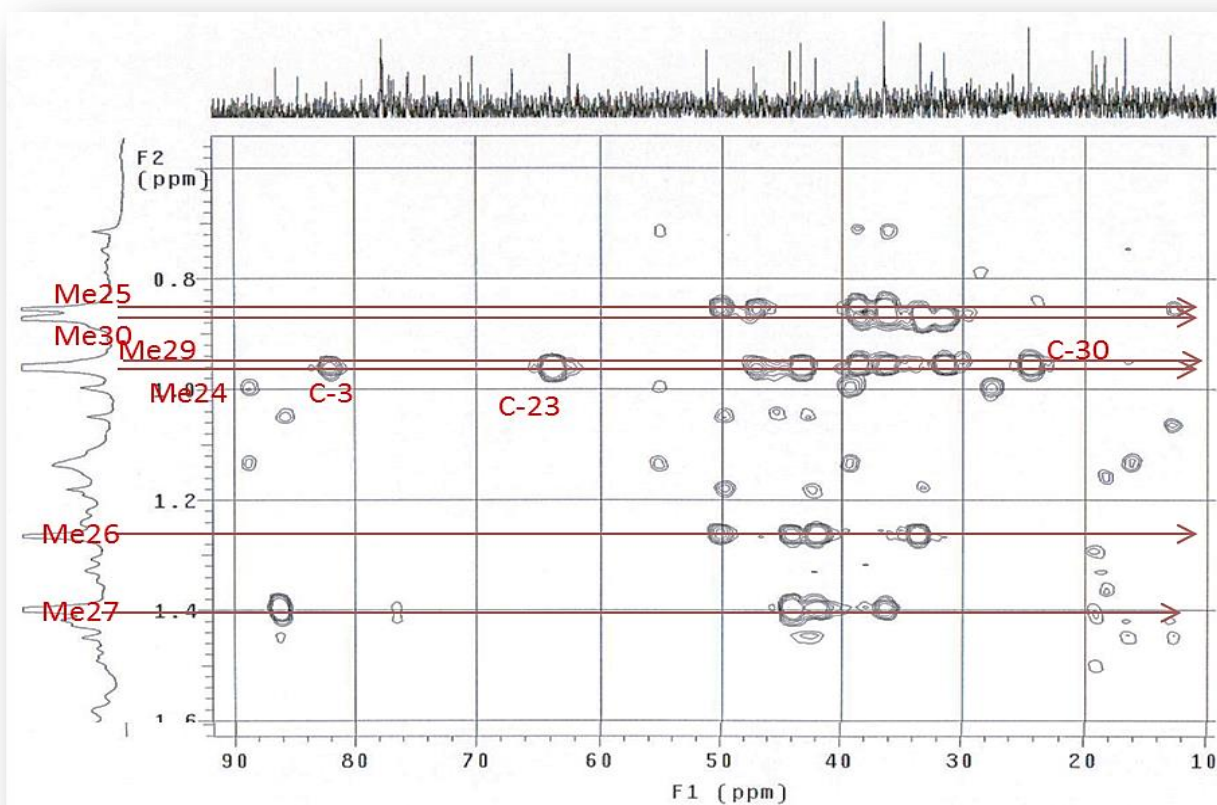


Figure N°55: Spectre HMBC révélant les corrélations des méthyles du composé **3**

Les protons du méthyle CH₃-26 corrélient avec les carbones C-7 à δ_C 33.81, C-8 à δ_C 42.10, C-9 à δ_C 50.23 et C-14 à δ_C 44.06, les carbones quaternaires sont difficilement distinguables, ils sont déterminés par rapport aux valeurs citées dans la littérature.

Les protons du méthyle CH₃-27 à δ_H 1.40(s) couplent avec les carbones C-8 C-8 à δ_C 42.10, C-13 C-8 à δ_C 86.10, C-14 à δ_C 44.06 et C-15 à δ_C 36.20, ces corrélations permettent de localiser le carbones C-15 et de lui attribuer ses protons par l'expérience HSQC (fig.56).

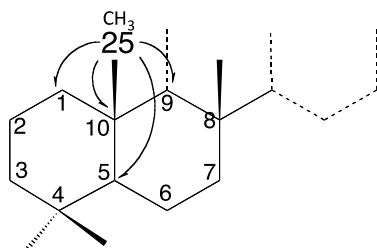


Figure N°56: Corrélations en $^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$, $^4J_{H-C}$ des protons des méthyles CH₃-25, CH₃-26 et CH₃-27.

Un des protons géminés H₂-28 à δ_H 3,26 (d, $J=7,38$) corrélie avec le carbone C-13 et l'autre proton à δ_H 3.52 (d, $J=7.19$) corrélie avec le carbone C-16 à δ_C 77.80.

Les protons du méthyle CH₃-29 résonnant à δ_H 0,94(s) ppm, corrélient avec les carbones C-19 à δ_C 38.41, C-20 à δ_C 31.83, C-21 à δ_C 36.20 et C-30 à δ_C 24.83 ppm. Les protons du méthyle CH₃-30 (fig. 57) résonnant à δ_H 0.87 ppm corrélient avec les carbones C-19 à δ_C 38.41, C-20 à δ_C 31.83, C-21 δ_C 36.20 et C-29 δ_C 33.40 ppm. La distinction entre les carbones C-20 quaternaires et CH₂-21 est réalisée grâce aux spectres de l'expérience RMN-¹³C et HSQC.

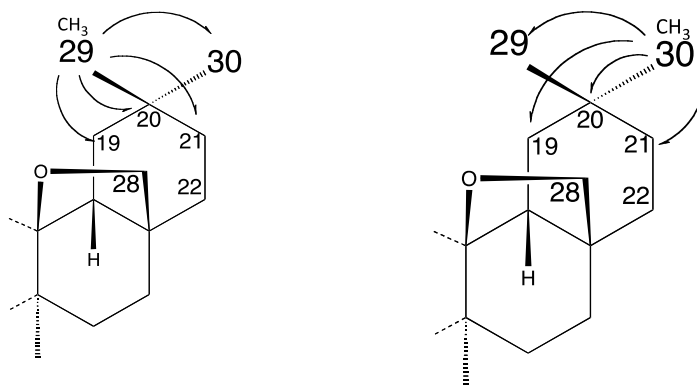


Figure N°57: Corrélations en $^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$, $^4J_{H-C}$ des protons des méthyles CH₃-29, CH₃-30 de la génine du composé **3** d'après le spectre HMBC.

À partir des carbones C-15 et C-21, l'analyse de l'expérience HSQC permet d'attribuer leurs protons correspondant résonnant respectivement à δ_H 1.44 (d, $J=10,24$) et à δ_H 2.11 (dd, $J=9.29$), 2.40. Ils permettent d'identifier d'après les spectres de l'expérience COSY les protons H-16 à δ_H 3.75 ppm (d, $J=10.81$) et H₂-22 à δ_H 1.90 (s) et 2.03 ppm (d, $J=10,00$).

La même procédure est employée pour déterminer les protons des carbones C-5 et C-7 qui résonnent à δ_H 0,58 (d, J=11,91) et 1.14 ppm.

Lorsque cette expérience ne possède pas un bon rapport signal/bruit, et que tous les protons de la région ne peuvent être attribués, alors on aura recours pour l'attribution des valeurs δ_C/δ_H , aux autres expériences RMN -1D et -2D et aux valeurs mentionnées dans la littérature.

***Le spectre RMN NOESY :**

Les analyses effectuées sur le spectre RMN-¹H, concernant les constantes de couplage, ont permis d'établir la stéréochimie des carbones asymétriques par lesquelles seront identifiées les différentes positions des protons (α -axiale et β -équatoriale) :

La position α -axiale du proton H-3 est confirmée par l'effet nOe sur l'expérience NOESY (fig.58), entre les protons à δ_H 4.05 H-3 / à δ_H 0.58 H-5.

La position α -axiale du groupement hydroxyle du CH₂-OH -23 est confirmée par l'effet nOe d'après l'expérience NOESY, entre un des protons géminés à δ_H 3.60 H₂-23 / à δ_H 4.05 H-3 (Fig.58).

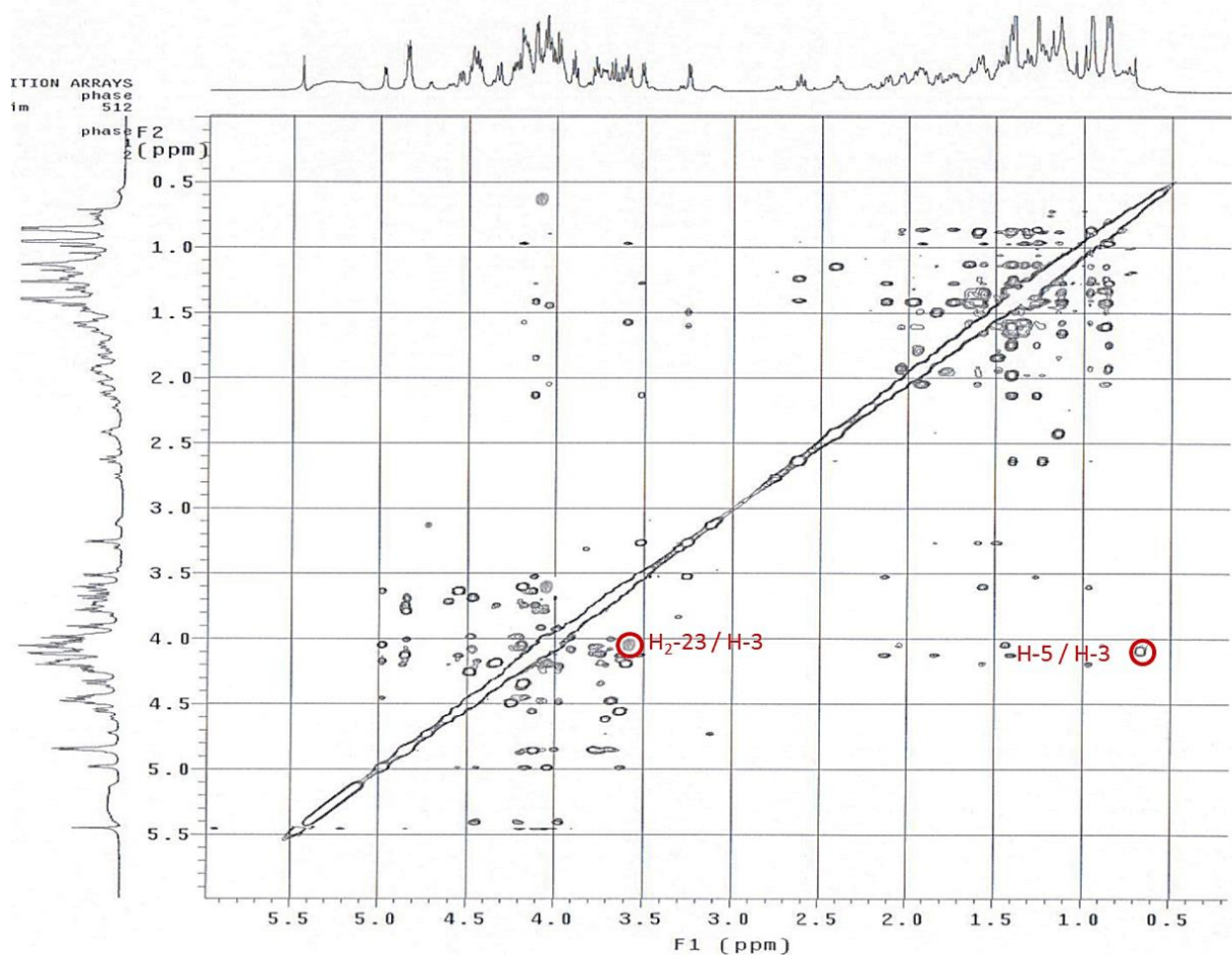


Figure N°58: Les corrélations relevées sur le spectre NOESY du composé 3

II.1.3.1.2.1. Partie osidique

*Détermination du nombre et de la nature des sucres

L'ensemble des déplacements chimiques relevés des spectres RMN 1D,- 2D de la partie osidique du composé **3** (tab.30), sont superposables à ceux précédemment identifiés dans les composés **1** et **2**. Il s'agit donc de la chaîne saccharidique Xyl-(1→2)-Glc II- (1→4)-[Glc I-(1→2)]-Ara et sa fixation sur la génine, est déduite par les corrélations HMBC entre H-3 et Ara C-1 (Tab.23).

Tableau N°23. Déplacements chimiques en RMN ¹H (600 MHz) et RMN-¹³C (150 MHz), dans la partie oligosaccharidique du composé **3**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) C₅D₅N.

Position	Composé 3	
	δ (H)	δ (C)
3-O-Sucre : Ara		
H-C(1)	4.76	104.2
H-C(2)	4.45 (nd)	79,9
H-C(3)	4.22	73.0
H-C(4)	4.12	78.5
CH ₂ (5)	4.62 (nd) 3.72 (d, $J=9,05$)	64.3
Glc I		
H-C(1)	5.37 (nd)	104.2
H-C(2)	3.98 (t)	75.6
H-C(3)	4.16	76.8
H-C(4)	4.06	71.3
H-C(5)	3.98	77.0
CH ₂ (6)	4.46 (nd), 4.26 (d, $J=12,57$)	62.2
Glc II		
H-C(1)	4.91 (d, $J=7.6$)	103.8
H-C(2)	3.81	84.4
H-C(3)	4.15	77.5
H-C(4)	4.06	70.5
H-C(5)	4.22	77.0
CH ₂ (6)	4.36 (d, $J=12.62$), 4.18 (nd)	61.9
Xyl		
H-C(1)	4.87 (dd, $J=12,91$)	106.8
H-C(2)	3.92 (t, $J = 7,90$)	75.5
H-C(3)	4.02 (d, $J= 8,81$)	77.3
H-C(4)	4.05	70.2
CH ₂ (5)	4.46 (nd), 3.69 (nd)	67.0

* Identification du composé 3

À l'issue de ces analyses du composé **3** a été identifiée comme étant :

3 β ,4 α ,16 α ,3- β -O-{ β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopyranosyl}-13,28-epoxy-16 α ,23-dihydroxyoleanane(fig.59), qui est **lysikokianoside 1** précédemment isolé a partir de *Cyclamen persicum* (Mihci-Gaidi et al., 2010) et *Lysimachia sikokiana* (Kohda, et al., 1989).

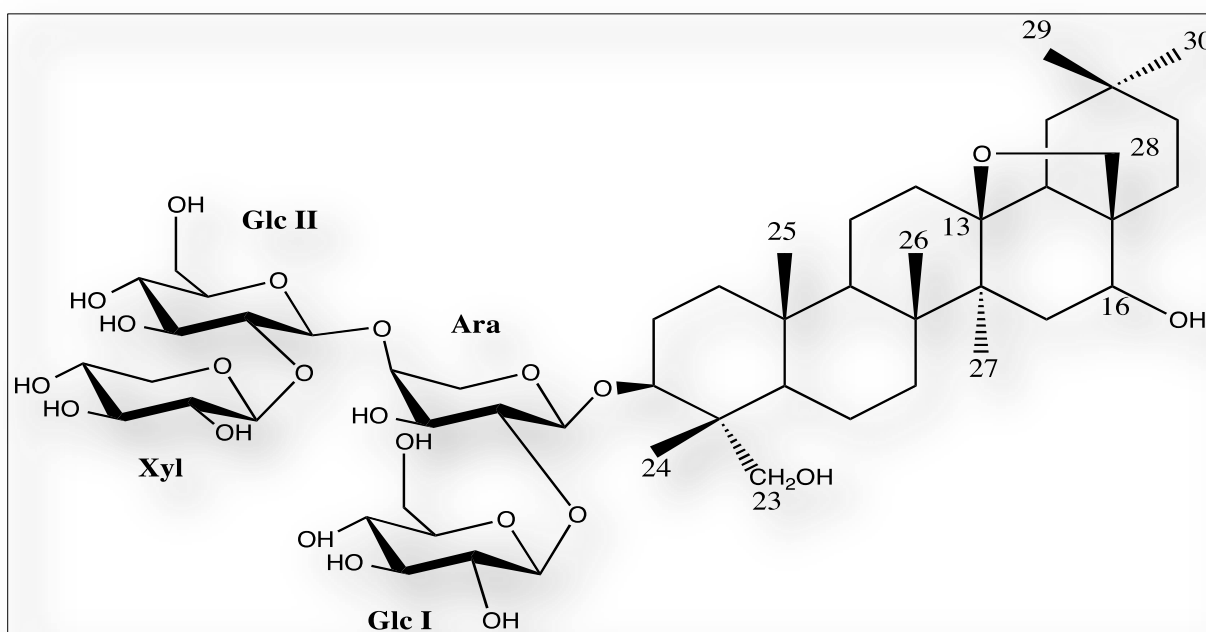


Figure N° 59: structure du Composé **3**, le lysikokianoside 1 (Bencharif-Betina et al., 2012 ; Mihci-Gaidi et al., 2010 ; Kohda, et al., 1989).

II.1.3.2. Identification du composé 4

II.1.3.2.1. Spectrométrie de masse

L'analyse du spectre de masse obtenu en HR-ESI-MS en mode positif du composé **4** révèle un ion pseudomoléculaire à m/z 1082.86 [$M+Na^+$]. Le spectre obtenu en source FAB (mode négatif) du composé **4** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à m/z 1059 [$M-H^-$] suggérant une masse de 1060 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{52}H_{86}O_{22}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à m/z 927 [$M-H^- -132$], 765 [$M-H^- -132-162$], 603 [$M-H^- -132-162-162$], 471 [$M-H^- -132-162-162-132$], correspondant à la perte de deux hexosyles et de deux pentosyles successivement (fig.60). Le pic observé à m/z 471 correspondant au pic de l'ion pseudomoléculaire de l'aglycone, la cyclamirétine A (Dorchaí, et al. 1968).

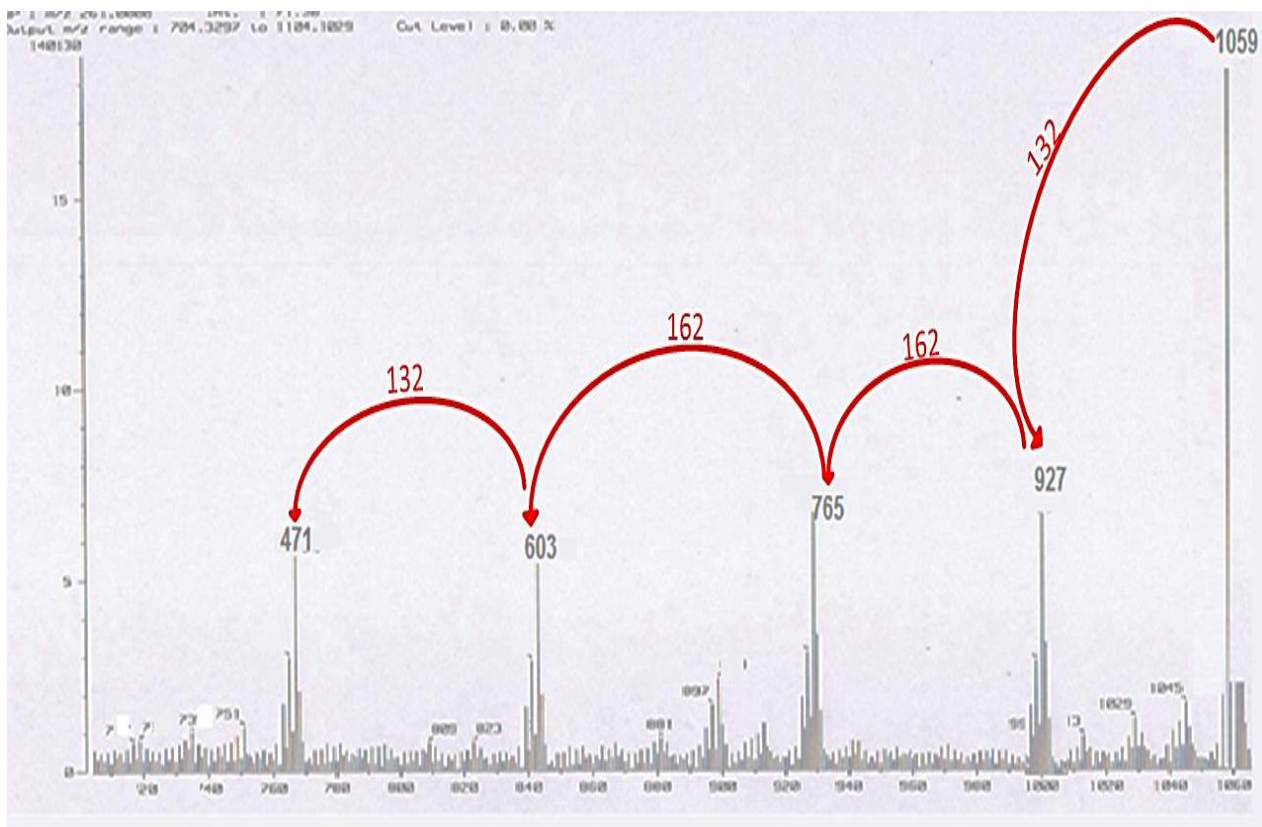


Figure N°60: Spectre de masse en source FAB (en mode négatif) composé **4**.

II.1.3.2.2. Spectrométrie de RMN

II.1.3.2.2.1. Partie génine

Les déplacements chimiques et les corrélations relevés sur les spectres de RMN 1D et 2D ne montrent pas de variations significatives comparativement au composé **1** (Afrocyclamin A) (tab.17 et 24).

L'apparition d'un signal (blindé) à δ_H/δ_C 3,78 (brd, $J=5,5$) / 77.50 ppm au lieu de δ_C 212.0 ppm, correspondant au H-16/C-16, indique la présence d'un hydroxyle en cette position. Le reste des déplacements chimiques (tab.24), sont identiques à ceux du composé **1**.

Tableau N°24. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie aglycone du composé **4**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Position	Composé 4	
	δ (H)	δ (C)
CH ₂ (1)	0.77 et 1.54 m	39.0
CH ₂ (2)	1.76 , 1.92	25.7
H- C(3)	3.13 dd (11.5, 4.0)	89.0
C (4)	-	39.1
H- C(5)	0.58 dd (11.5, 3.0)	55.2
CH ₂ (6)	1.26 et 1,34 m	17.5
CH ₂ (7)	1.42	34.0
C (8)	-	42.1
H- C(9)	1.19 m	50.0
C (10)	-	36.2
CH ₂ (11)	1.42 m	19.5
CH ₂ (12)	1.36 et 2.00 m	32.0
C (13)	-	86.2
C (14)	-	44.0
CH ₂ (15)	1.46 , 2.08 m	36.2
H-C(16)	3.78 brd (5.5)	77.5
C (17)	-	44.5
H-C(18)	1.30 m	53.0
CH ₂ (19)	2.02, 2.74 m	33.0
C (20)	-	48.0
CH ₂ (21)	1.43 et 2,45	30.5
CH ₂ (22)	1.88, 1.92 m	32.1
Me-(23)	1.27 (s)	27.8
Me (24)	1.00 (s)	16.7
Me (25)	1.16 (s)	16.0
Me (26)	1.18 (s)	18.2
Me (27)	1.43(s)	19.2
CH ₂ -O-(28)	3.11 (d, J=7.1); 3.46 (d, J=7.1)	77.5
CHO-(29)	9.56 (s)	208.0
Me (30)	0.94 (s)	23.8

II.1.3.2.2. 2.Partie osidique

*Détermination du nombre et de la nature des sucres

L'étude du spectre RMN ^1H permet de distinguer dans la zone des sucres quatre signaux attribuables aux protons anomériques qui résonnent à 4.72 (d, $J=5.9$) (Ara I H-1) à 5.38 (d, $J=7.0$) (Glcl H-1), 4.84 (d, $J=7.6$) (Glcll H-1) et à 4.82 (d, $J=8.6$) (Xyl H-1).

Ces protons corrélient sur le spectre HSQC avec les carbones anomériques résonnant respectivement à δ_c 104.2, 103.8, 104.1, 106.5 ppm. L'analyse des spectres de RMN 1D et

2D de la partie osidique du composé **4** révèle des déplacements chimiques (tab.25) et des corrélations superposables à ceux précédemment identifiés pour les deux composé **1** et **3**.

Tableau N°25 . Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie oligosaccharidique du composé **4**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Position	Composé 4	
	δ (H)	δ (C)
3-O-Sucre:		
Ara		
H-C(1)	4.75 (d, $J=6.0$)	104.4
H-C(2)	4.44 (t)	79.0
H-C(3)	4.24	73.0
H-C(4)	4.23	78.5
CH ₂ (5)	4.62, 3.73	64.3
Glc I		
H-C(1)	5.40 (d, $J=7.0$)	104.2
H-C(2)	4.02	75.5
H-C(3)	4.18	76.5
H-C(4)	4.07	71.5
H-C(5)	3.96	77.5
CH ₂ (6)	4.27, 4.48	62.0
Glc II		
H-C(1)	4.87 (d, $J=7.6$)	103.9
H-C(2)	3.80	84.6
H-C(3)	4.12	77.0
H-C(4)	4.06	70.5
H-C(5)	4.18	77.0
CH ₂ (6)	4.18, 4.36 (d, $J=10.6$)	61.8
Xyl		
H-C(1)	4.84 (d, $J=8.6$)	107.0
H-C(2)	3.92	75.5
H-C(3)	4.00	77.5
H-C(4)	4.05	70.2
CH ₂ (5)	3.70 (nd), 4.22 (nd),	67.6

*.Identification du composé 4

L'ensemble des données spectrales nous permet d'identifier le composé **4** comme étant la Deglucocyclamin I : (3 β ,16 α ,3- β -O-{\mathbf{\beta-D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopyranosyl]-16-hydroxy-13 β ,28-epoxyolean-30-al (fig.61), précédemment isolé à partir de *Cyclamen trocopteranthum* (Bencharif-Betina et al., 2012; Dall'Acqua et al. 2010 ; G.Mihci-Gaidi et al., 2010).

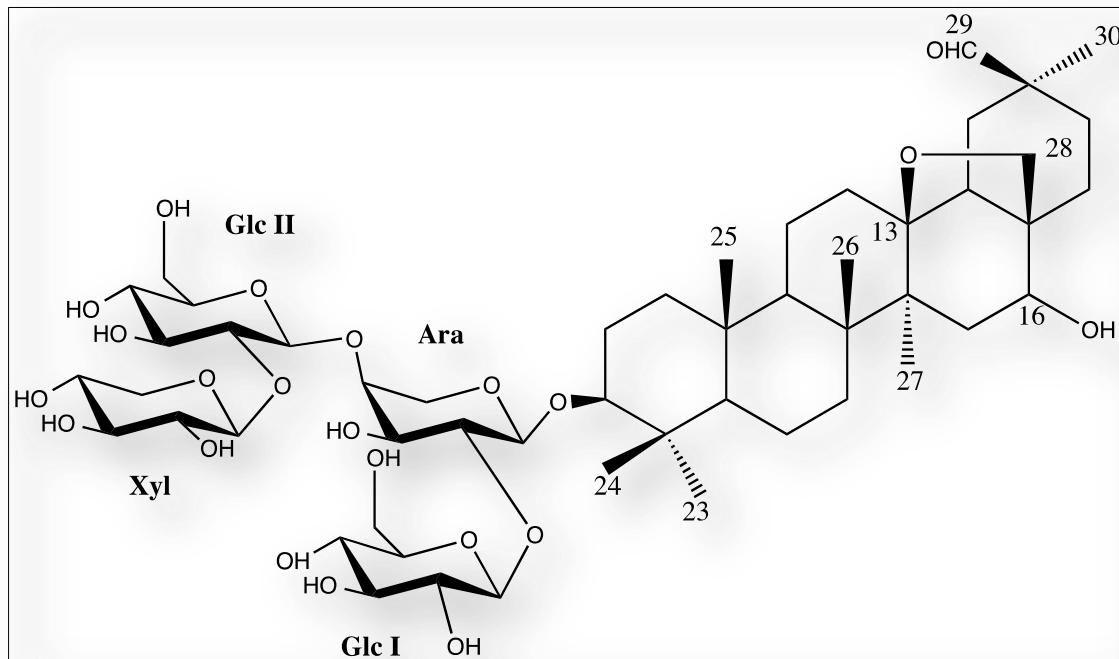


Figure N° 61: Structure du Composé **4**, la Deglucocyclamin I
(Bencharif-Betina et al., 2012; Dall'Acqua et al., 2010 ; Mihci-Gaidi et al., 2010).

II.1.3.3. Identification du composé 5

II.1.3.3.1. Spectrométrie de masse

Le spectre de masse obtenu en HR-ESI-MS en mode positif du composé **5** révèle un ion pseudomoléculaire à m/z 1227.863 [$M+Na^+$]. Le spectre obtenu en FAB-MS en mode négatif montre un ion pseudomoléculaire à m/z 1203 [$M-H^-$](fig.62), suggérant une masse moléculaire de 1204, correspondant à une formule brute de $C_{58}H_{96}O_{26}$.

D'autres pics des ions fragments ont été observés à m/z 1059 [$M-H^- -144$], à m/z 927 [$M-H^- -144-132$], 765 [$M-H^- -144-132-162$], 603 [$M-H^- -144-132-162-162$], 471 [$M-H^- -144-132-162-162-132$], correspondant à la perte d'une unité de 144 u.m.a correspondant à l'acide dicrotalique et de deux hexosyles et de deux pentosyles successivement. Le pic observé à m/z 471 correspondant au pic de l'ion pseudomoléculaire de l'aglycone, la cyclamirétine A (Dorchaí et al., 1968) comme c'était le cas dans la structure du composé **2**.

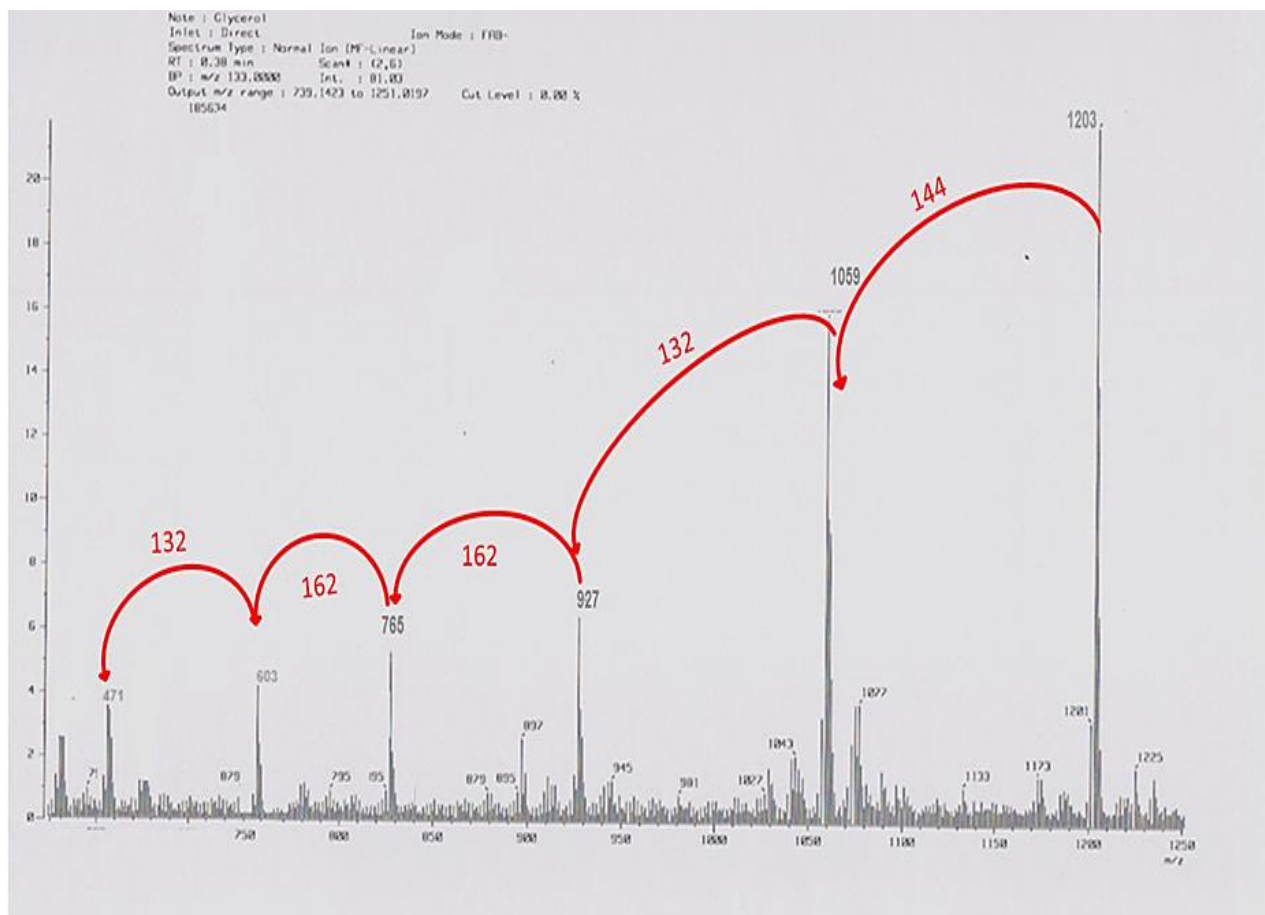


Figure N°62 : Spectre de masse en source FAB (en mode négatif) composé 5

II.1.3.3.2. Spectrométrie de RMN

II.1.3.3.2.1. Partie génine

Une comparaison des déplacements chimiques de la partie aglycone du composé 5 et 4 obtenus à partir de données RMN 1D et 2D a montré que la totalité des signaux de ces deux composés sont superposables. En conséquence l'aglycone du composé 5 a été identifié à la cyclamirétine A (Castells et al., 2002) (tab.26).

Tableau N° 26. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie génine du composé **5**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D.
(δ en ppm, J en Hz) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Position	Composé 5	
	δ (H)	δ (C)
CH ₂ (1)	0.78 et 1.55	39.0
CH ₂ (2)	1.77 (d, $J= 13.1$) ; 1.92(t, $J=11.3$)	26.2
H- C(3)	3.12 (d, $J= 8.12$)	89.0
C (4)	-	39.4
H- C(5)	0.58 (d, $J=6,73$)	55.3
CH ₂ (6)	1.32 (s)	17.6
CH ₂ (7)	1.39	34.1
C (8)	-	42.2
H- C(9)	1.17	50.5
C (10)	-	36.5
CH ₂ (11)	1.42 (s)	19.5
CH ₂ (12)	1.36 (s)	32.0
C (13)	-	86.2
C (14)	-	44.2
CH ₂ (15)	1.46(s) et 2.07(d, $J=11.3$)	36.5
H-C(16)	3.70 (d, $J=9.0$)	77.2
C (17)	-	43.6
H- C(18)	1.30 (d, $J= 15.4$)	53.2
CH ₂ (19)	2.00 (d, $J=10.9$)	33.0
C (20)	-	48.0
CH ₂ (21)	1.43	36.1
CH ₂ (22)	1.44	31.9
Me-(23)	1.13 (s)	27.0
Me (24)	0.99 (d, $J=9.45$)	16.2
Me (25)	0.74 (s)	16.0
Me (26)	1.19 (s)	18.2
Me (27)	1.45 (s)	19.5
CH ₂ -O-(28)	3.05 (d, $J= 12.28$) et 3.47 (ls)	77.2
CHO-(29)	9.56 (s)	207.9
Me (30)	0.94 (s)	23.8

II.1.3.3.2. Partie osidique

*.Détermination du nombre et de la nature des sucres

Pour le composé **5** comparativement aux spectres du composé **4**, quatre protons anomériques sont identifiés appartenant à la chaîne oligosaccharique, Il s'agit de l'enchaînement saccharidique Xyl-(1→2)-Glc II- (1→4)-[Glc I-(1→2)]-Ara et sa fixation sur la génine, est déduite par les corrélations HMBC entre H-3 et Ara C-1, avec un signal supplémentaire appartenant à l'acide dicrotalique. En effet l'analyse des spectres de RMN HMBC et HSQC du composé **5** a permis de caractériser un acide dicrotalique, celui-ci comme dans le cas du composé **2** est fixé sur la position Xyl-4 d'après l'observation des corrélations HMBC, le proton H-4 du Xylose et le C-1 de l'acide dicrotalique (Fig.63).

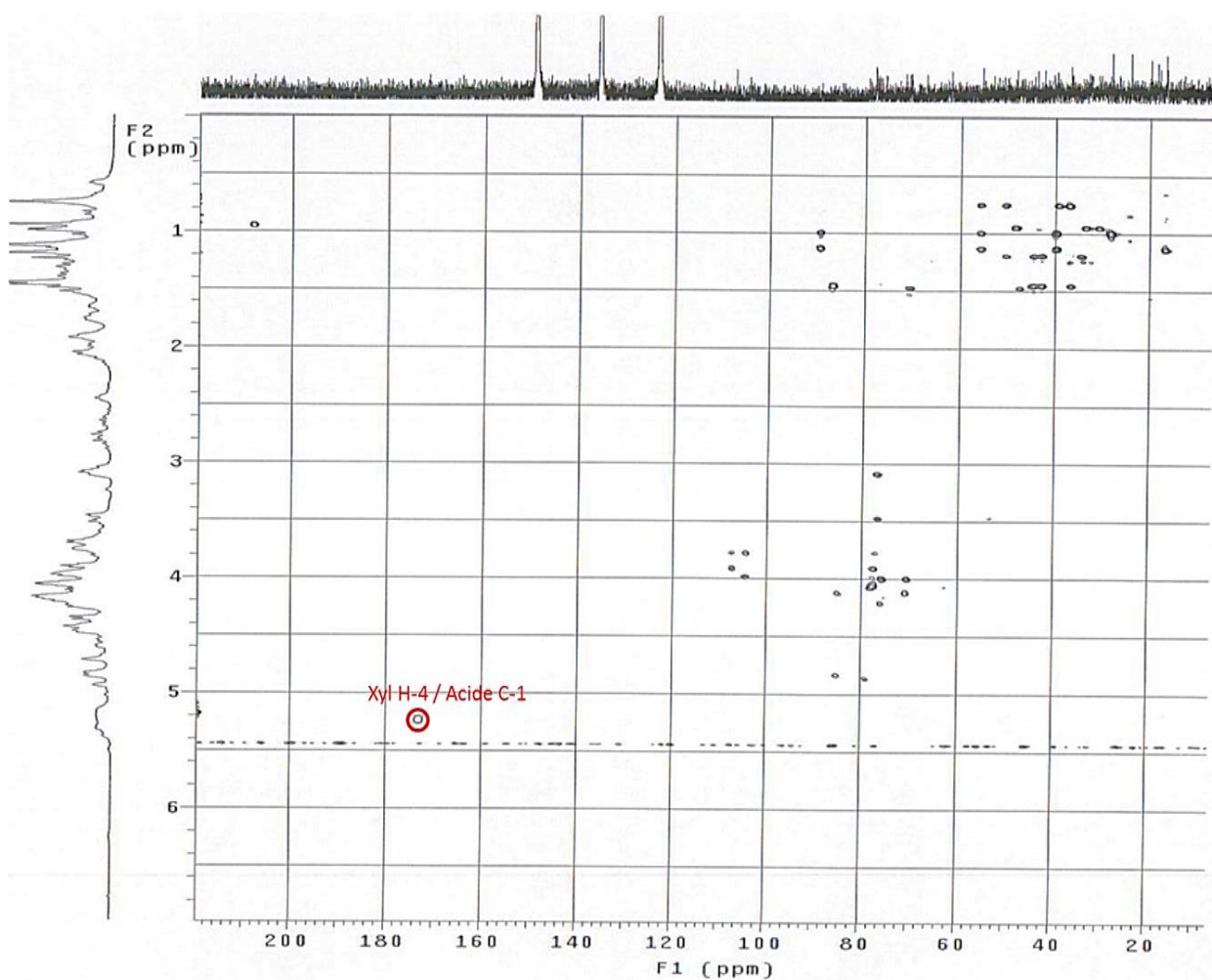


Figure N°63: Spectre HMBC révélant le point de fixation de l'acide dicrotalique sur le Xylose

Tableau N°27. Déplacements chimiques en RMN ¹H (600 MHz) et RMN-¹³ C(150 MHz), dans la partie oligosaccharidique du composé **5**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) C₅D₅N .

Position	Composé 5	
	δ (H)	δ (C)
3-O-Sucre:		
Ara		
H-C(1)	4.72 (d, J=5.9)	104.2
H-C(2)	4.42 (t)	78.8
H-C(3)	4.20	72.8
H-C(4)	4.18	78.8
CH ₂ (5)	4.60, 3.70	64.0
Glc I		
H-C(1)	5.38 (d, J=7.0)	103.8
H-C(2)	3.97	75.2
H-C(3)	4.16	76.2
H-C(4)	4.04	71.5
H-C(5)	3.96	77.2
CH ₂ (6)	4.46, 4.24	62.2
Glc II		
H-C(1)	4.84 (d, J=7.6)	104.1
H-C(2)	3.78	84.8
H-C(3)	4.10	76.5
H-C(4)	4.06	70.5
H-C(5)	4.21	77.0
CH ₂ (6)	4.34 (d, J=11.6), 4.17	61.7
Xyl		
H-C(1)	4.82 (d, J=8.6)	106.5
H-C(2)	3.90	75.5
H-C(3)	4.00	76.7
H-C(4)	5.18	72.0
CH ₂ (5)	4.46, 3.68	66.9
Acide Dicrotalique		
à Xyl-4		
H-C(1)	-	170.0
H-C(2)	2.84 (d, J=13.10)	47.5
H-C(3)	-	70.0
H-C(4)	3,05 2,86	47.4
H-C(5)	-	174.3
H-C(6)	1.49 1,24	28.5

*.Identification du composé 5

L'analyse des spectres de RMN 1D et 2D permet d'identifier le composé 5 comme étant (3 β -[4-O-[3-hydroxy-3-methylglutaryl]- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopyranosyl]-3 β ,16 α -hydroxy-13 β ,28-époxyoléan-30-al (fig.64), précédemment isolé à partir de *Cyclamen repandum* (Bencharif-Betina et al., 2012; Mihci-Gaidi et al., 2010; Dall'Acqua et al., 2010).

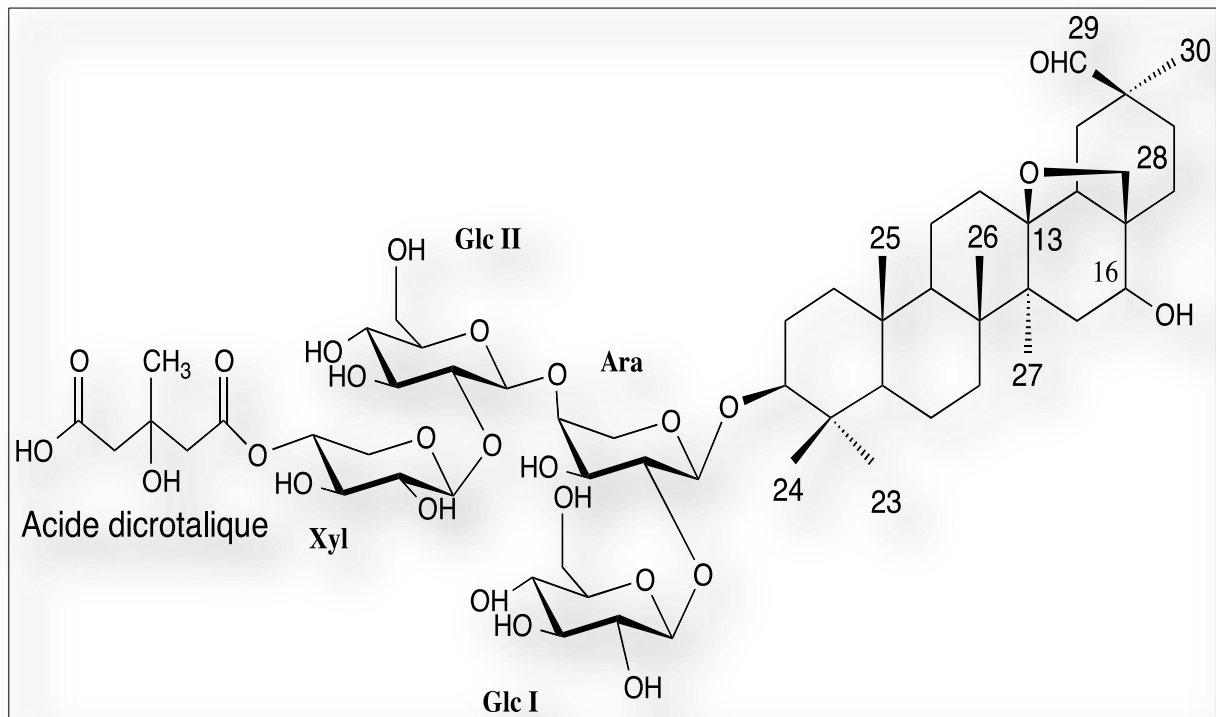


Figure N°64: Structure du Composé 5 : dérivé acylé de la deglucocyclamin I (Bencharif-Betina et al., 2012 ; Mihci-Gaidi et al., 2010; Dall'Acqua et al., 2010).

*Conclusion 1

Sur les cinq (5) saponosides isolés à partir de l'extrait méthanolique des racines de *Cyclamen africanum*, deux sont de nouvelles molécules, et ont été baptisées «Afrocyclamin A» et «Afrocyclamin B» (Fig. N°.65)

Les deux composés sont des glycosides constitués d'une chaîne tétra-osidique, la génine est un triterpène de type oléanane (Altunkeyikl et al., 2012), dans les deux cas le saponoside est un monodesmoside. L'analyse structurale s'est avérée compliquée à cause de la chaîne osidique disposée de façon superposée, constituée de quatre sucres Xyl- 1 \rightarrow 2)-Glc II-(1 \rightarrow 4)-[Glc I-(1 \rightarrow 2)]-Ara, et de la présence de l'acide dicrotalique dans le composé 2 (Afrocyclamin B).

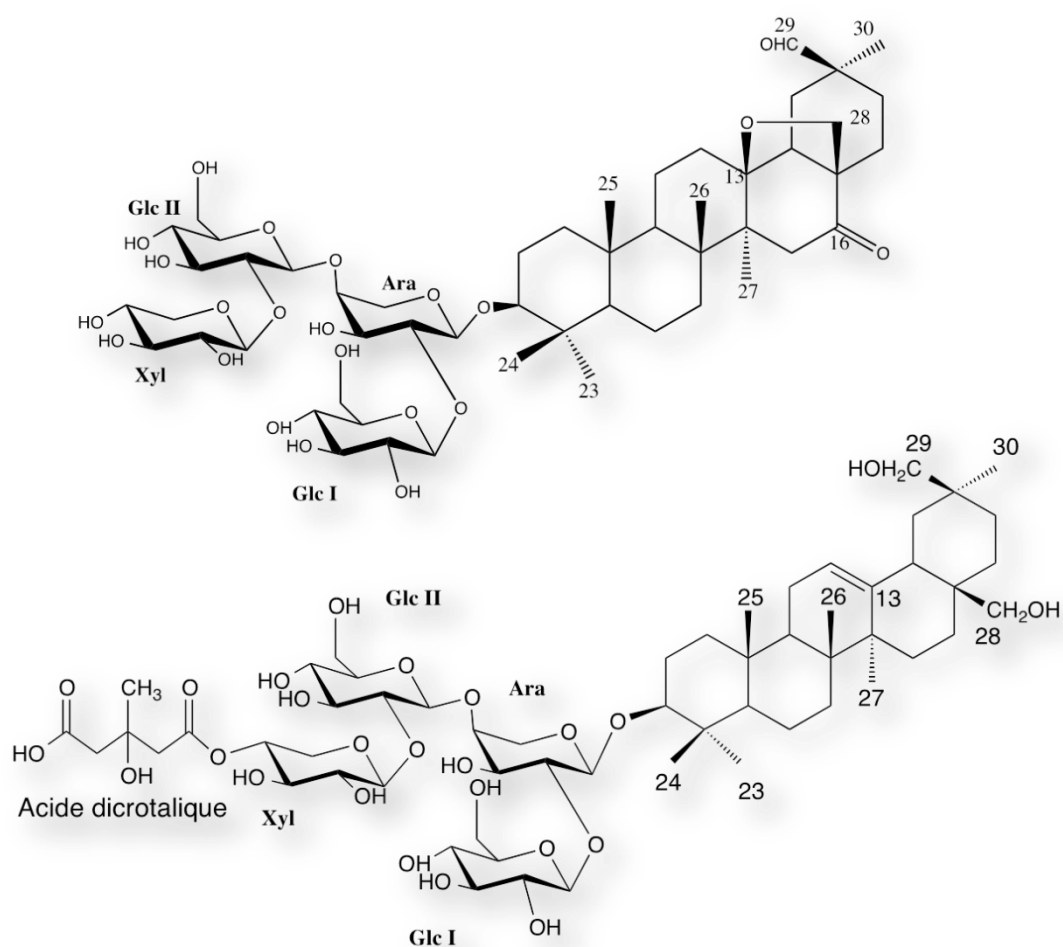
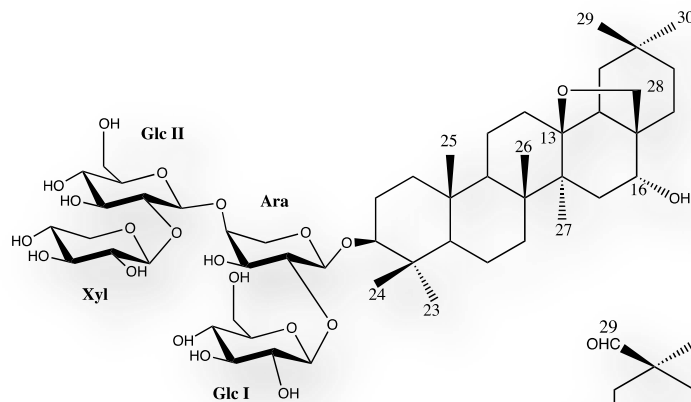


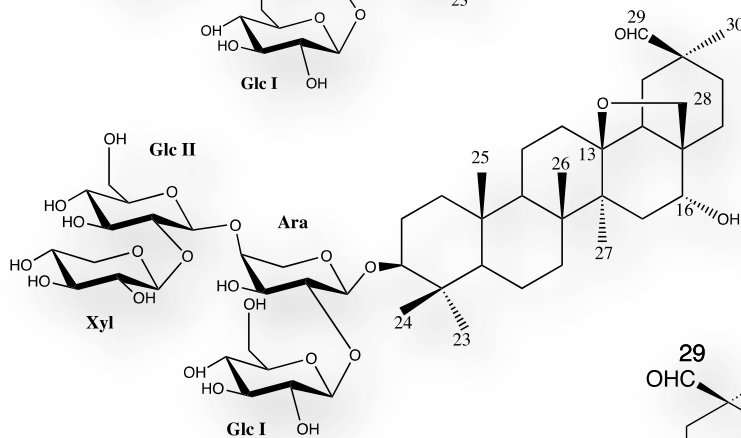
Figure N°65: Structures des nouveaux saponosides «Afrocyclamin A et Afrocyclamin B» (Bencharif-Betina et al., 2012).

Les composés **3**, **4**, **5**, (fig.66) sont isolés pour la première fois dans l'espèce *C. africanum*, néanmoins chacun a été isolé auparavant dans des espèces appartenant au genre *Cyclamen*, ils existent sous l'appellation, lysikokianoside 1 (**3**) isolé a partir de l'espèce *Lysimachia sikokiana* (Kohda et al., 1989), déglucocyclamin I (**4**) isolé a partir de l'espèce *Cyclamen Europeum*, *Cyclamen trocopteranthum* (Mihci-Gaidi et al., 2010 ; Dall'Acqua et al., 2010) et son dérivé acylé par l'acide dicrotonique (**5**) isolé a partir de l'espèce *Cyclamen trocopteranthum* (Mihci-Gaidi et al., 2010).

Composé 1
Lysikokianoside



Composé 2
Deglucocyclamin I



Composé 3
Le dérivé acylé de la
Deglucocyclamin I

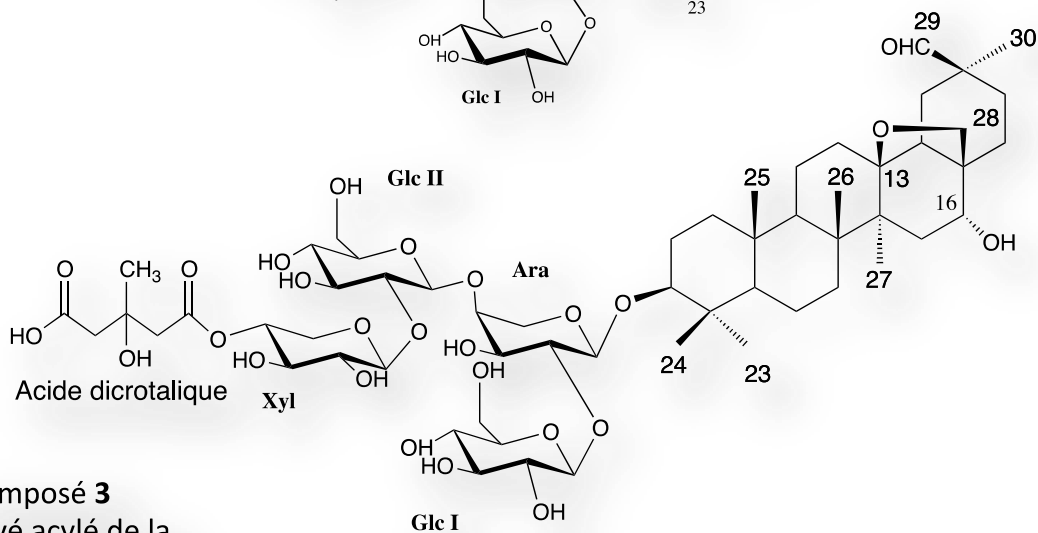


Figure N °66: Structures des saponosides connus de l'espèce *Cyclamen africanum* (Bencharif-Betina et al., 2012).

II.2. IDENTIFICATION DES SAPONOSIDES A PARTIR DE L'ESPECE *Zygodhllum cornutum* Cosson.

Les dérivés natifs purifiés de l'espèce *Z. cornutum*, sont au nombre de sept, ils ont été identifiés par l'analyse des spectres RMN-1D et 2D, en particulier par l'étude des corrélations observées sur les spectres HSQC, HMBC, COSY, TOCSY et NOESY et les déplacements chimiques ont été comparés avec les données de la littérature. L'analyse a permis d'identifier les génines des composés et de révéler la nature des sucres, leur enchainement et leur fixation sur l'aglycone. Ces génines sont des triterpènes pentacycliques du type ursane, monodesmosidique ou bidesmosidique avec la présence ou l'absence d'un soufre. Dans ce chapitre, pour une meilleure présentation des résultats, nous avons choisi dans un premier temps de présenter l'aglycone du composé **1**, dans le détail étant donné que c'est le même pour les sept composés et dans un deuxième temps de déterminer le nombre de sucres, d'identifier leur nature, l'enchainement et leur fixation pour chaque composé, en ce basant sur une comparaison entre les spectres de RMN 1D et 2D.

II.2.1. Identification du composé **1**

II.2.1.1. Spectrométrie de masse

L'analyse du spectre de masse en source FAB en mode négatif, du composé **1** permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à m/z 711 $[M-H]^-$ (fig.67) suggérant une masse de 712 *u.m.a*, en accord avec la formule brute $C_{36}H_{56}O_{12}S$.

Des ions fragments observés à m/z 567 $[M-H^-146]$ et à m/z 485 $[M-H^-146-80]$, correspondant à la perte séquentielle d'un déoxyhexose et d'un groupement sulfate respectivement.

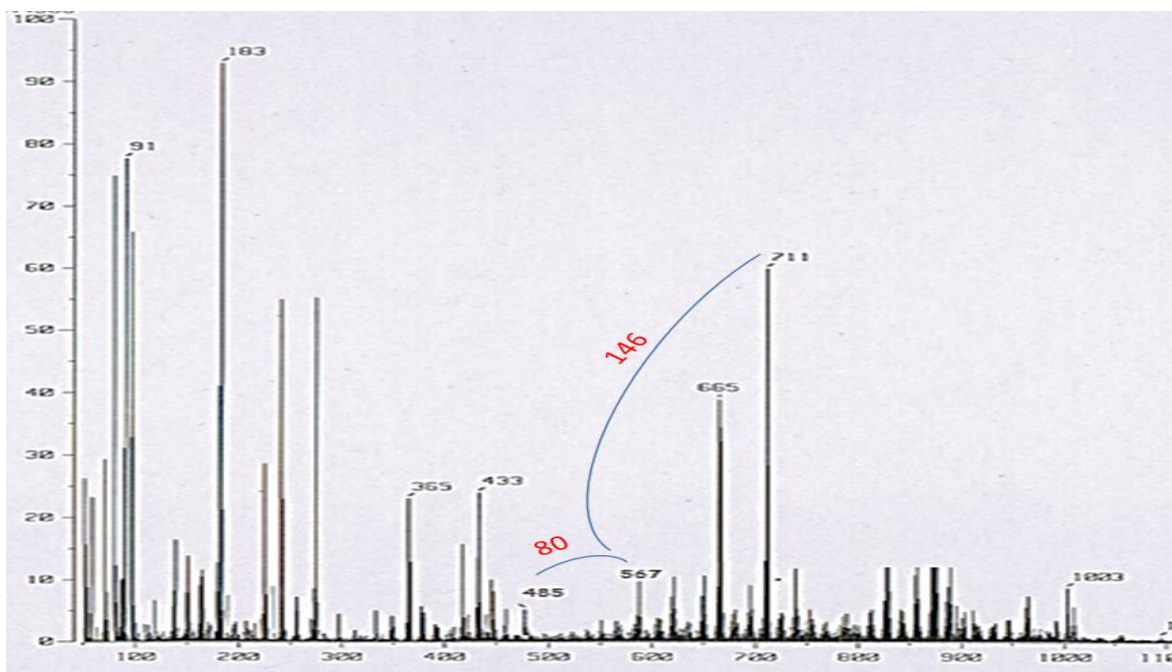


Figure N°67 spectre de masse en source FAB-MS en mode négatif du composé **1**

II.2.1.2. Spectrométrie RMN

II.2.1.2.1. Partie aglycone

- le spectre RMN-¹H

L'analyse du spectre RMN-¹H (fig.68), montre quatre fins singulets qui résonnent à δ_H 0.86, 0.96, 1.06, 1.14, et deux doublets résonnant à δ_H 1.15 (d, $J=6.0$) et 0.73 (d, $J=5.8$), correspondant à six méthyles 23, 24, 25, 26, 29, 30.

Le proton H-3 α -axial résonne à δ_H 3.16 ppm (*m*).

Un ensemble de protons entre 1.39 et 2.75 ppm relatifs aux CH- et CH₂ du squelette.

Un proton oléfinique H-12 (br s) déblindé à δ_H 5.88 ppm.

Un proton H-18 à δ_H 2.75 (*m*) déblindé à cause de sa position en face du cône d'anisotropie du carbonyle C-28 (fig.67).

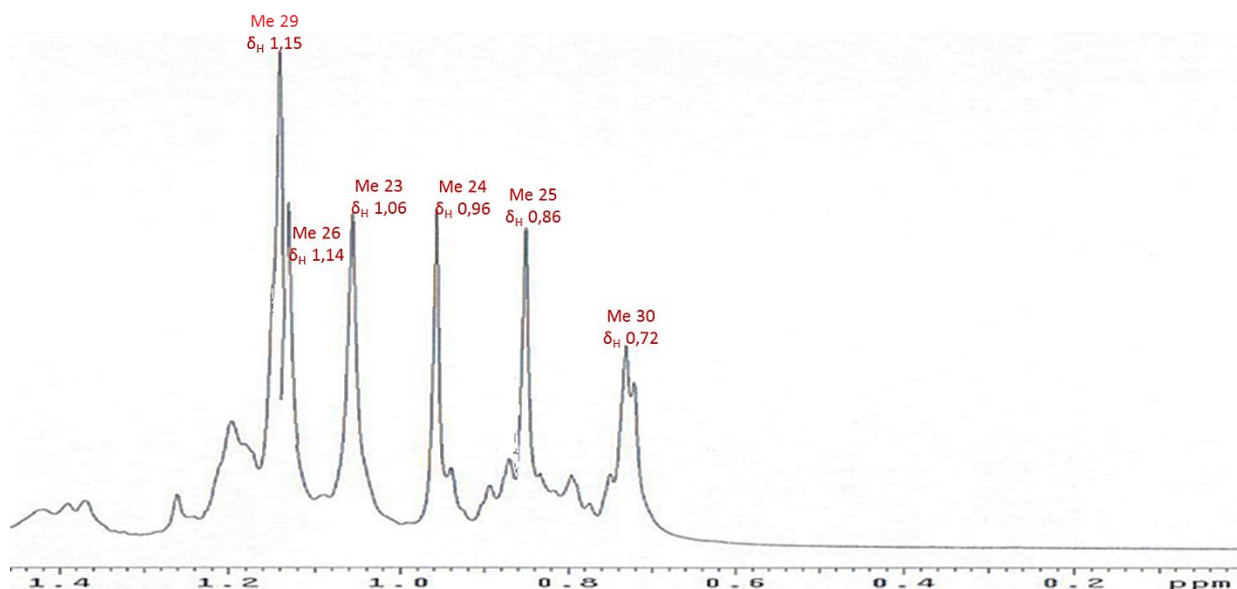


Figure N°68: Spectre RMN ¹H du composé 1 (zone des protons 0.2-1.40)

*Le spectre RMN-¹³C

Le spectre de l'expérience de RMN-¹³C (fig.69), révèle la présence de six carbones à δ_C 16.1, 16.8, 18.3, 18.7, 21.1 et 27.9 ppm correspondant aux méthyles CH₃-25, CH₃-24, CH₃-29, CH₃-26, CH₃-30 et CH₃-23.

Un massif de carbones résonnant entre δ_C 30.7 et 57.2 ppm attribuable aux CH- et CH₂- et C-quaternaire.

Le carbone C-3 est déblindé à δ_C 89.9 ppm du fait de la présence d'une substitution osidique.

Deux signaux trisubstitués, relatifs aux carbones éthyléniques de la double liaison C-12 et C-13, résonnent à δ_C 128.7 et 134.0 ppm respectivement.

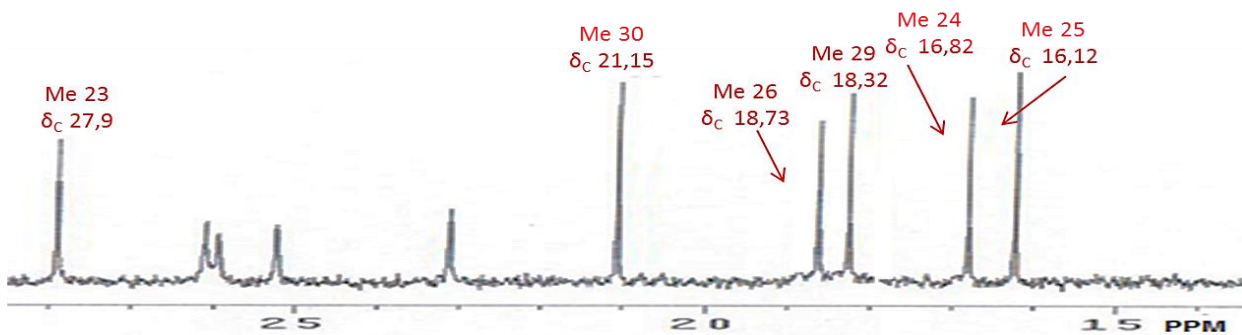


Figure N°69: Spectre RMN ^{13}C du composé **1** (zone des carbones de 15.0-27.0 ppm)

Deux autres signaux caractéristiques, relevés correspondant aux groupements carbonyles, dans le cas d'un acide libre à la position C-28 à δ_c 180.3 ppm et C-27 à δ_c 178.7 ppm dans le cas d'un ester. Ces déplacements chimiques permettent d'avancer que la génine du composé **1** et **2** est, de « type ursane » avec un squelette pentacyclique et la double liaison C=C localisée entre les carbones à δ_c 128.7 (C-12) et à δ_c 134.06 (C-13). Aussi les deux fonctions COOH localisées sur les carbones C-27 et C-28 indiquent qu'il s'agit de l'acide quinovique (Miana et Al-Hazimi, 1986). Les déplacements chimiques sont en accord avec la littérature (Hassanean et al. 1993).

*Le spectre HSQC

L'expérience RMN-HSQC (fig.70) permet d'attribuer les corrélations hétéronucléaires $J_{\text{H-C}}$, observées sur les spectres d'après les déplacements chimiques des carbones, portant les protons ou groupements correspondant (tab.28, Fig.70).

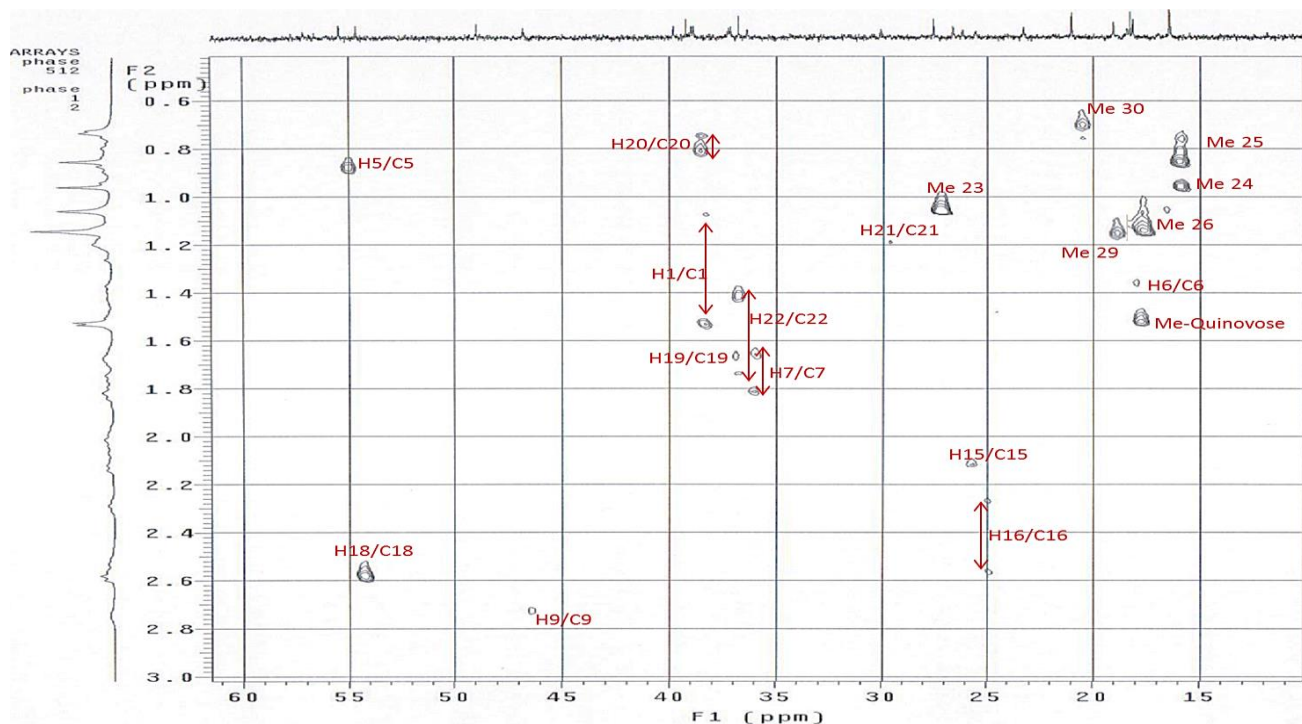


Figure N° 70 : Spectre HSQC du composé **1**

L'analyse du spectre HSQC-, à partir des carbones identifiés dans l'HMBC tels que C-1, C-5, C-7, C-14, C-12, C-18 a permis d'attribuer les protons respectifs sur le spectre HSQC et de localiser d'après l'expérience COSY, les protons des carbones (tab.28).

Les autres valeurs des carbones à δ_c 26.0 C-2, à δ_c 18.0 C-6, à δ_c 36.0 C-7, à δ_c 23.9 C-11, à δ_c 26.05 C-15 et à δ_c 48.66 ppm C-17 sont déterminées sur les spectres des différentes expériences RMN¹³ C en accord avec les données spectrales de littérature (Aquino et al., 1997; Cheng et al., 2002; Dietrich et al., 2014) (Fig.71, tab.28).

Tableau N°28. Déplacements chimiques en RMN ¹H (600 MHz) et RMN-¹³ C (150 MHz), dans la partie génine du composé **1**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, *J* en Hz) C₅D₅N.

Position	Composé 1	
	δ (H)	δ (C)
CH ₂ (1)	1,08 et 1.52	38.1
CH ₂ (2)	1.76 m , nd	26.0
H-C(3)	3.16 m	89.9
C (4)	-	39.0
H-C(5)	0,85 m	55.1
CH ₂ (6)	1.35 m, nd	18.0
CH ₂ (7)	1.64 m et 1.81 m	36.0
C (8)	-	39.0
H-C(9)	2.72 (m)	46.2
C (10)	-	36.5
CH ₂ (11)	1.92, nd	23.9
H-C(12)	5.88 (br s)	128.7
C (13)	-	134.0
C (14)	-	57.2
CH ₂ (15)	2.30 (m), nd	26.0
CH ₂ (16)	2.24 et 2.56 m	25.0
C (17)	-	48.6
H-C(18)	2.56 m	54.2
H-C(19)	1.66 (m)	36.9
H-C(20)	0.80	38.0
CH ₂ (21)	1,19(nd)	29.9
CH ₂ (22)	1.85 (m), nd	37.1
Me (23)	1.06 (s)	27.9
Me (24)	0.96 (s)	16.8
Me (25)	0.86(s)	16.1
Me (26)	1.14 (s)	18.7
COOH (27)	-	178.7
COOH (28)	-	180.3
Me (29)	1.15 (d, <i>J</i> = 6.0)	18.3
Me (30)	0.73(d, <i>J</i> =5.8)	21.1

*Le spectre HMBC

L'analyse du spectre HMBC (fig.70) a révélé des corrélations entre les protons des méthyles avec les carbones à 2J et 3J :

Les protons des méthyles CH₃-23 à δ_H 1,06 (s) et CH₃-24 à δ_H 0,96 (s) corrélient respectivement avec les carbones C-3 à δ_C 89,9 ; C-4 à δ_C 39,0; C-5 à δ_C 55,1 et entre eux H₃-23 à δ_H 1,06/C-24 à δ_C 16,8 et H₃-24 à δ_H 0,96/ C-23 à δ_C 27,9.

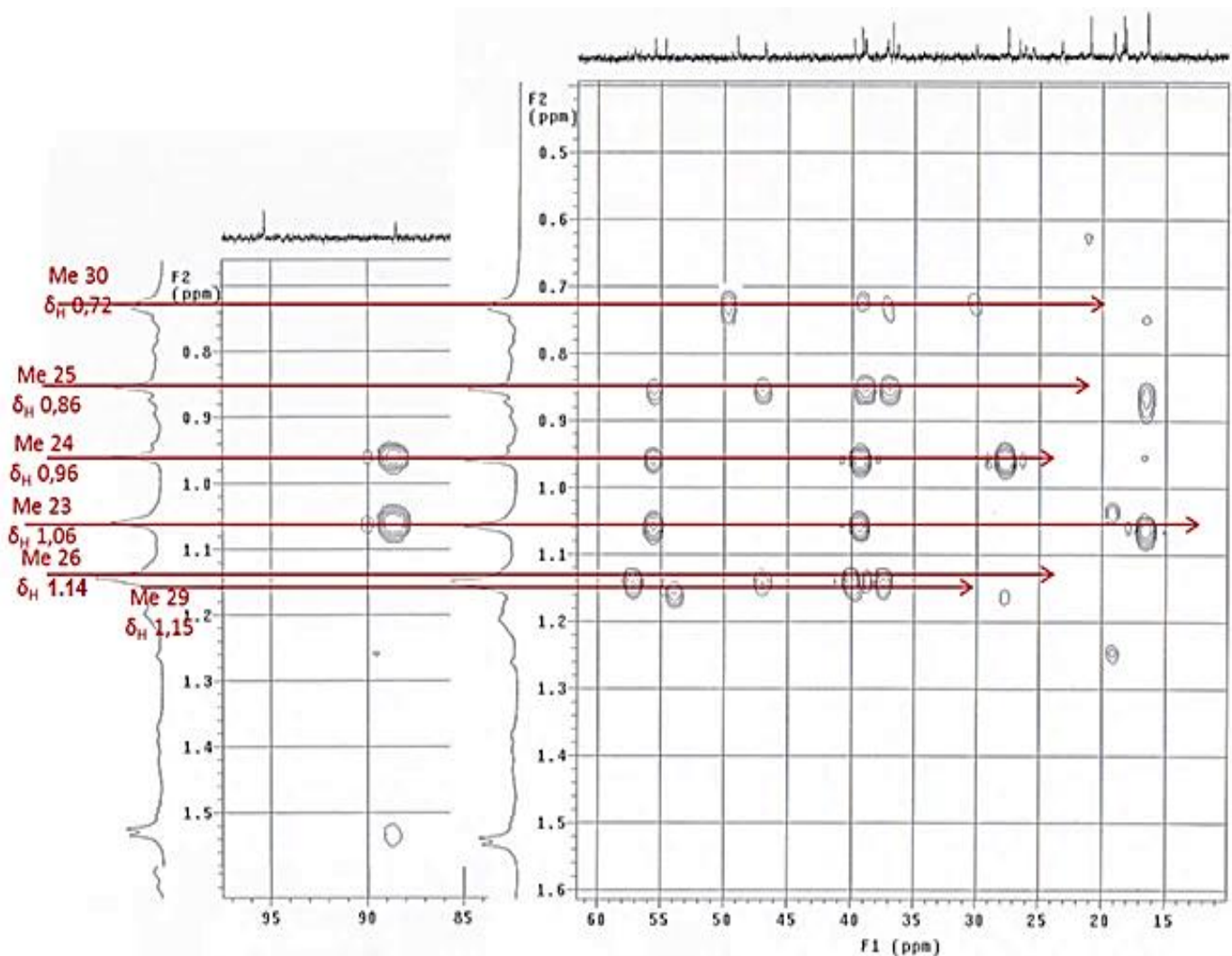


Figure N°70: Spectre HMBC du composé 1

La distinction des deux carbones s'est trouvée aisée à cause de la différence du déplacement chimique du carbone CH₃-23 à δ_C 27,9 ppm et du carbone CH₃-24 à δ_C 16,8 ppm, du fait de la position β -axiale du CH₃-24 (valeur blindée) et α -équatoriale du CH₃ (valeur déblindée) (Aquino et al., 1988, Aquino et al., 1989).

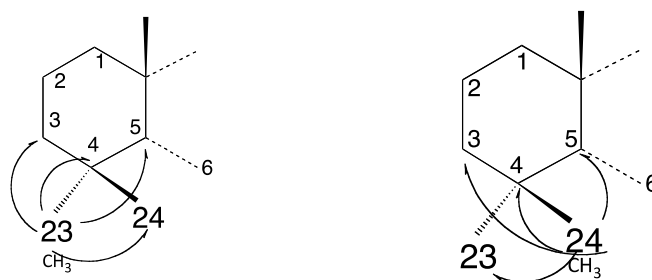


Figure N°71: Corrélations en $^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$, $^4J_{H-C}$ des protons des méthyles CH₃-23 et CH₃-24.

Les protons du méthyle CH₃-25 à δ_H 0.86 (s) corrélient avec les carbones connus C-1 à δ_C 38.1, C-5 à δ_C 55.1, C-9 à δ_C 46.2 ppm et le carbone quaternaire C-10 à δ_C 36.5 ppm (fig.71).

Les protons du méthyle CH₃-26 à δ_H 1.14 (s) corrélient avec les carbones connus C-7 à δ_C 36.0, C-8 à δ_C 39.0, C-9 à δ_C 46,6 et C-14 à δ_C 57,2. La détection du carbone C-8 à δ_C 39,0 et C-14 à δ_C 57,2 se fait selon la corrélation en $^3J_{H-C}$ avec les protons H-12 à δ_H 5,88 (s) ppm et le C-14 à δ_C 57,2 ppm (fig.72).

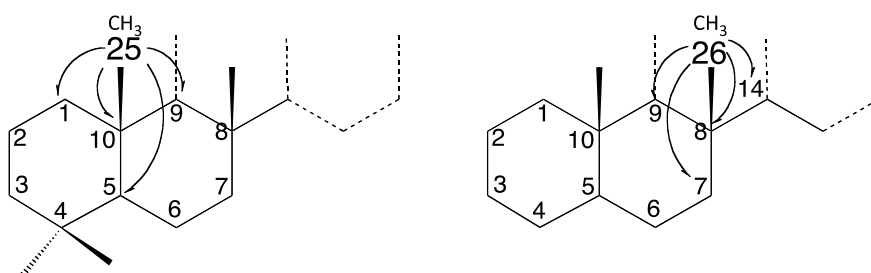


Figure N°72: Corrélations en $^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$, $^4J_{H-C}$ des protons des méthyles CH₃-25 et CH₃-26.

-Les protons du méthyle CH₃-29 à δ_H 1.15 ppm dans le squelette ursane est porté par le carbone C-19 de ce fait les corrélations relevées sont observées entre les protons de ce méthyle et les carbones à δ_C 54.2 C-18, à δ_C 36.9 C-19 et à δ_C 38.0 ppm C-20.

Les protons du méthyle CH₃-30 à δ_C 0.73ppm corrélient avec les carbones à δ_C 36.9 C-19, à δ_C 38.0 C-20 et à δ_C 29.9 ppm C-21 (fig.73).

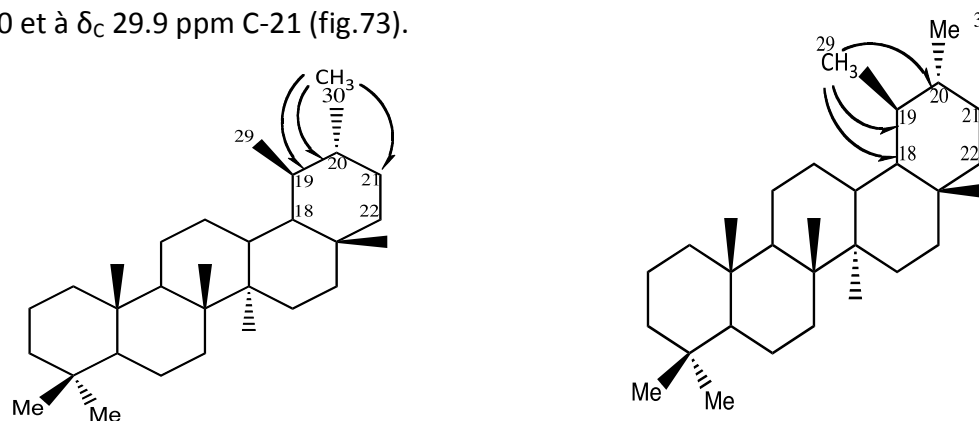


Figure N°73: Corrélations en $^2J_{H-C}$, $^3J_{H-C}$, $^4J_{H-C}$ des protons des méthyles CH₃-29 et CH₃-30.

* Le spectre NOESY

La stéréochimie des carbones asymétriques est déterminée, par l'étude des valeurs des constantes de couplage, mesurées sur le spectre RMN- ^1H et les effets nOe observés sur le spectre obtenu à partir de l'expérience de RMN bidimensionnelle homonucléaire (spectre NOESY), qui permet de visualiser les couplages dipolaires entre les protons proches dans l'espace (fig.74.)

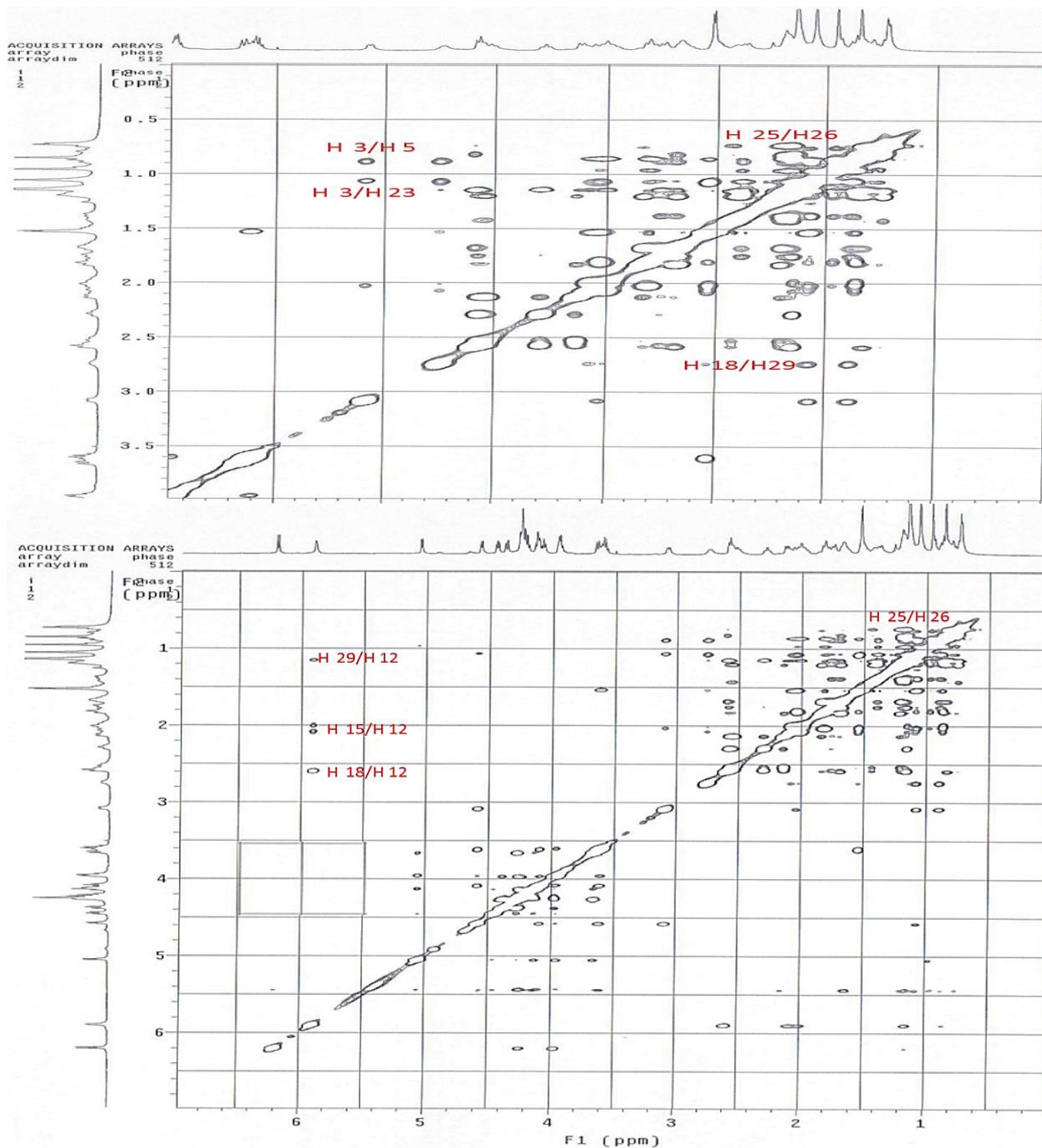


Figure N°74: Spectre NOESY révélant les effets nOe entre les protons de la partie aglycone du composé 1

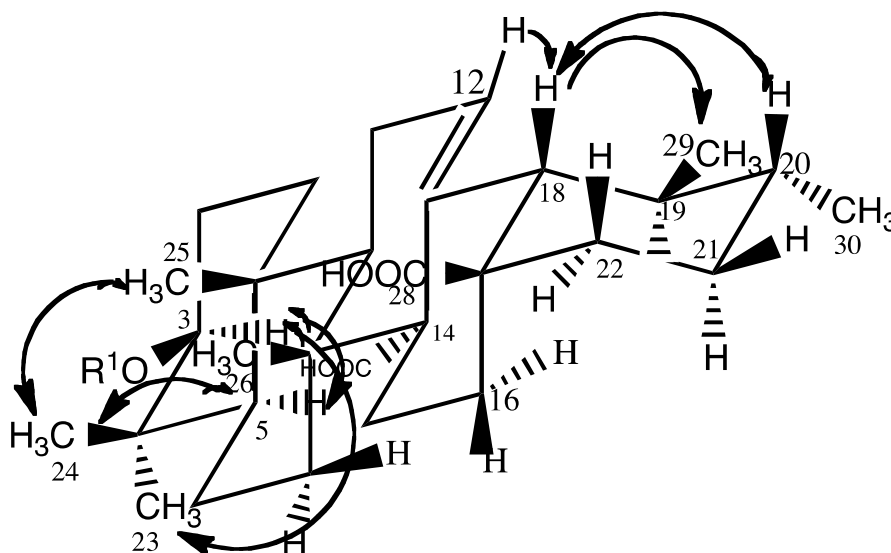


Figure N° 75 : Stéréochimie de l'aglycone du composé 1, NOESY Correlation

La stéréochimie (fig.75) α -axiale du proton H-3 est confirmée par l'effet nOe, entre les protons H-3 à δ_H 3.16 (m) /H-5 à δ_H 0.85 ppm et entre H-3 à δ_H 3.16 (m) /H-23 à δ_H 1.06 (s) , -L'orientation β -axiale du proton H-18 à δ_H 2.56 (m) ppm est confirmée par l'effet nOe qu'il présente avec le proton H-12 à δ_H 5.88 ppm (br s) et les protons du méthyle CH₃-29 à δ_H 1.15 ppm en position β -équatoriale sur les spectres RMN-NOESY et par la grande constante de couplage transdixial $^3J_{18ax-19ax} = 13,0$ Hz. De plus la corrélation NOESY H-18/H-20 permet de conclure à l'orientation β -axiale du proton H-20 et donc le méthyleCH₃ -30 a une orientation α -équatoriale.

La distinction entre les protons des méthyles CH₃-23 à δ_H 1.06. et CH₃-24 à δ_H 0.96 est possible grâce a l'analyse des effets nOe observés par le méthyle CH₃-23 α -axiale et les protons H-3 et H-5 α -axiaux.

.Ainsi, l'aglycone du composé 1 a été identifié à l'acide quinovique (acide 3 β -hydroxyurs-12-ene 27,28 dioïque, présent dans le genre *Zygophyllum* (Aquino et al., 1988, Aquino et al., 1989, Aquino et al., 1997).

L'analyse structurale des composés 2-7 a montré que les déplacements chimiques (δ_H / δ_C) étaient similaires à ceux de l'aglycone du composé 1 et donc qu'il s'agit également d'acide quinovique.

II.2.1.2.2. Partie osidique

*Détermination du nombre et de la nature des sucres

Le spectre des expériences RMN¹H a permis de repérer un proton anomérique résonnant à δ_H 4.56 ppm, sous forme d'un doublet (d, $J = 8.0$ Hz) qui corrèle sur le spectre HSQC (fig.76, 77) avec un carbone à δ_C 104.5 ppm et un méthyle caractéristique à 1.58 ppm corrélant avec le carbone d'un groupement méthyle CH₃ à δ_C 18.4 ppm (d, $J = 5.71$ Hz).

L'ensemble des déplacements chimiques et constantes de couplage attribués par l'analyse de RMN 2D (les correlations HMBC, COSY, TOCSY, $\text{CH}_3 \rightarrow \text{C-3}'$, $\text{C-4}'$) permet d'identifier le sucre à du quinoose. Ces valeurs sont en parfaite concordance avec celles de la littérature (Aquino et al. 1997).

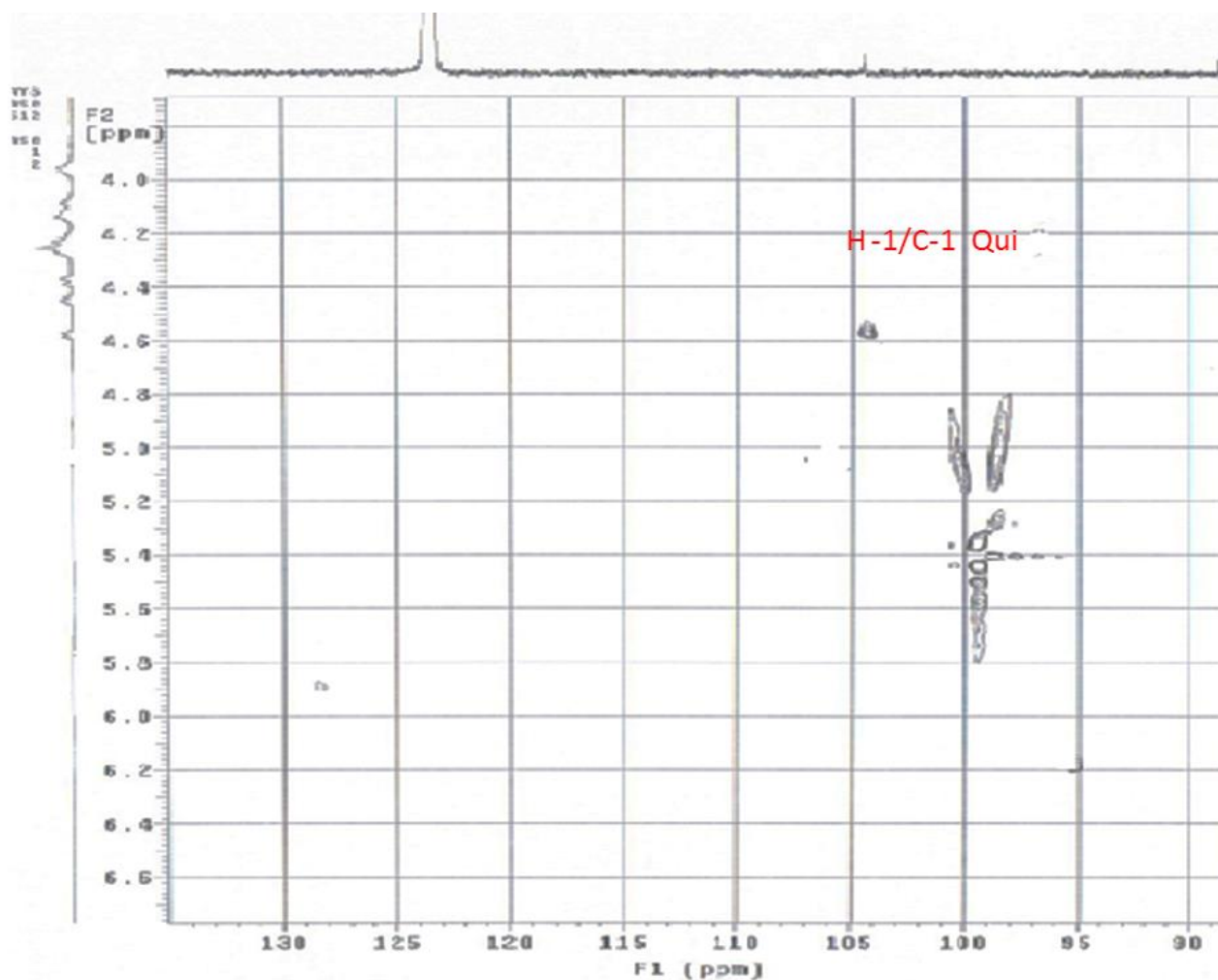


Figure N°76: Spectre HSQC du composé 1 (zone des anomères).

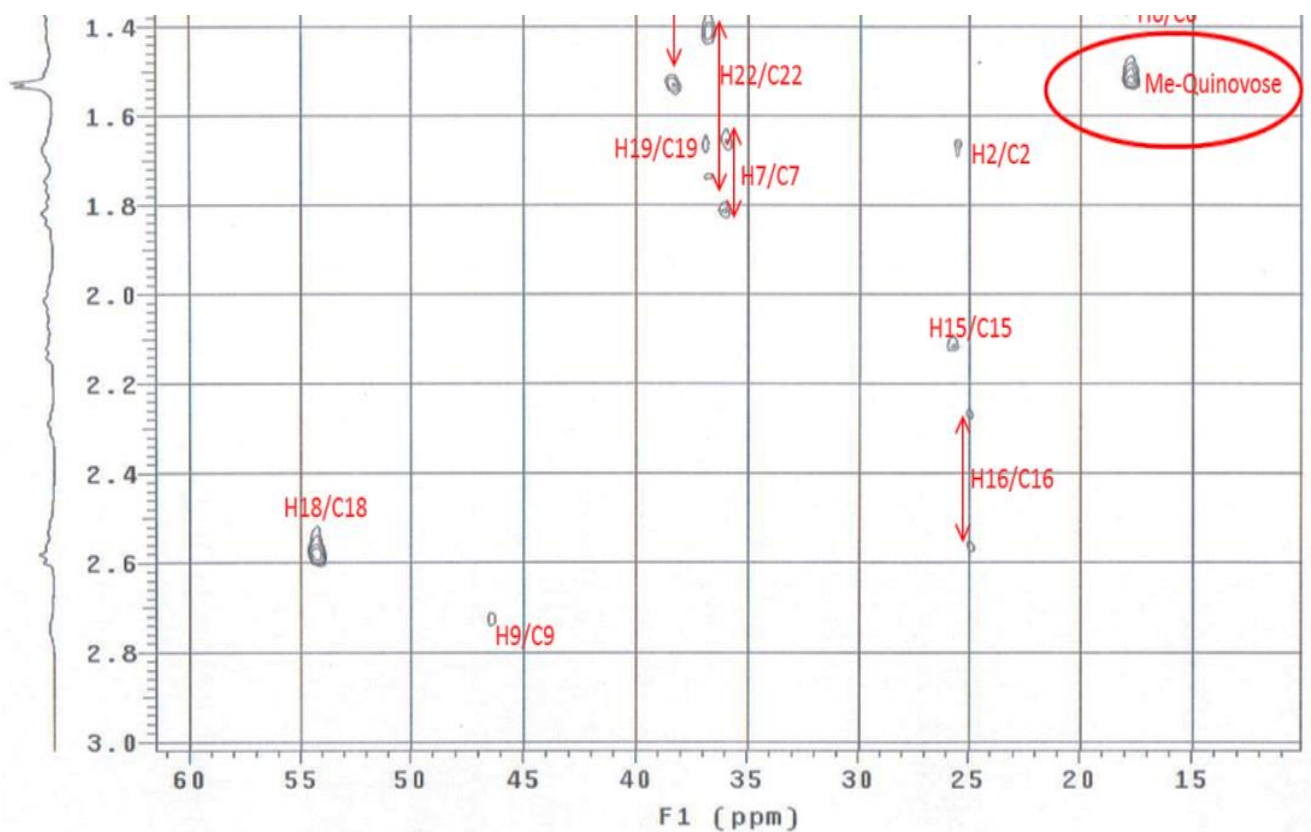
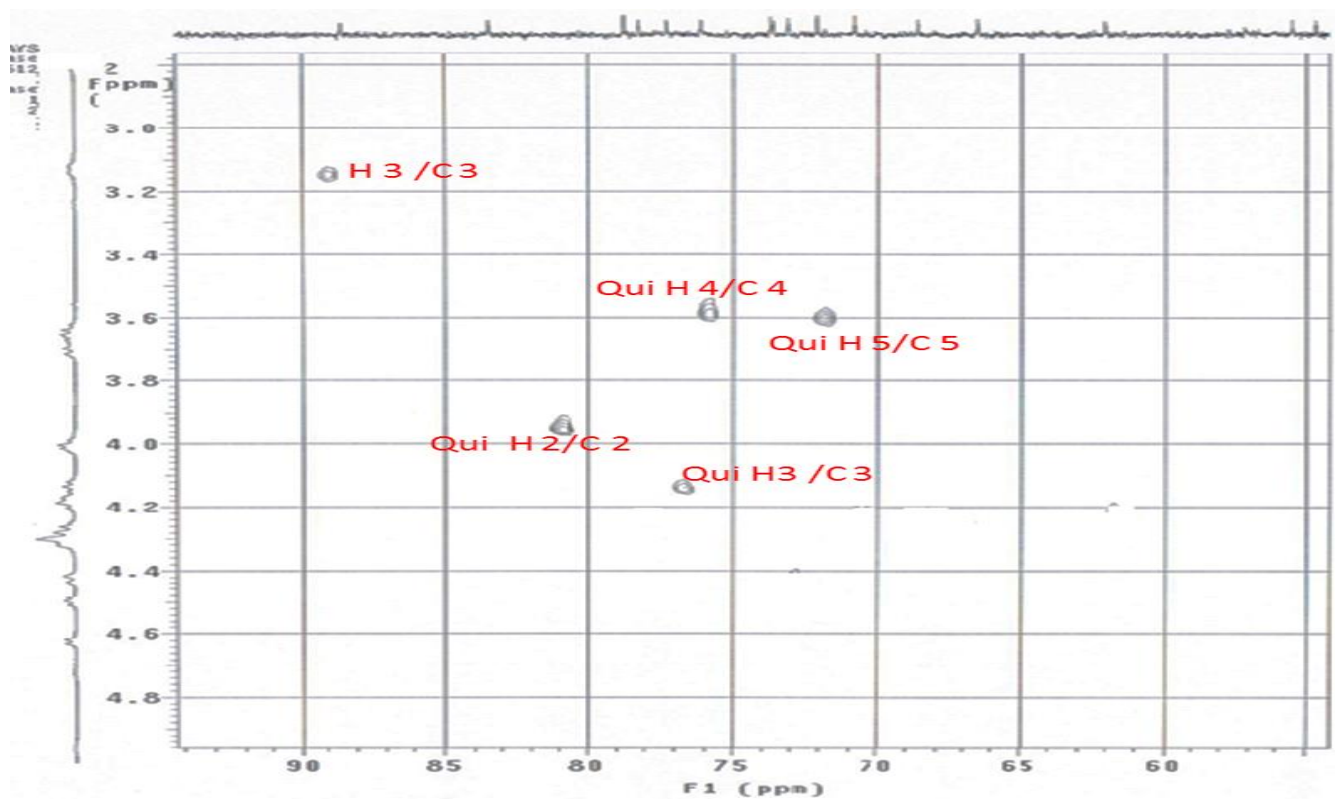


Figure N°77: Spectres HSQC du composé 1 (zone des alcools secondaires et zone des méthyles du sucre)

Dans l'expérience HMBC (fig.78) le proton anomérique C1-Qui à δ_H 4.85 ppm corrèle avec le carbone C-3 à δ_C 89.9 ppm de l'aglycone, indiquant la fixation du sucre en C-3 de l'aglycone. Par ailleurs, le signal C2-Qui à δ_C 80.1 ppm (valeur déblindée), révèle une substitution par le groupement sulfaté à cette position, caractéristique des saponosides rencontrés dans le genre *Zygophyllum* (Hassanean et al.,1993).

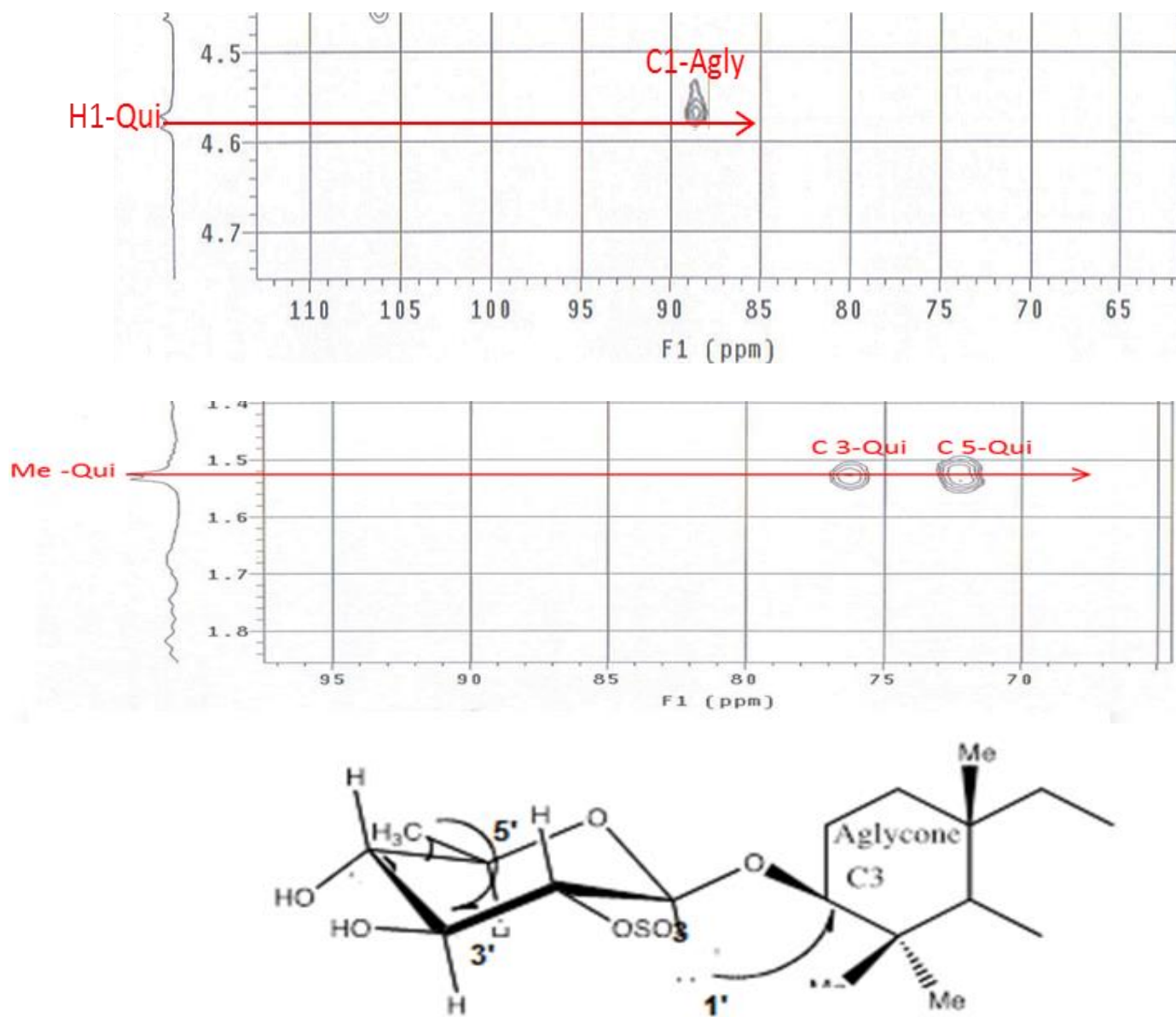


Figure N° 78: les Correlatins en $^3J_{H-C}$ dans l'expérience HMBC du composé 1.

Ainsi dans les expériences COSY, TOCSY, un système de spins à cinq protons d'un 6-désoxyhexose a été identifié à partir du proton anomérique résonnant à 4.58 ppm (Fig.78, tab.29) et du méthyle à δ_H 1.58 ppm. Les constantes de couplage (tab.29) indiquent qu'il s'agit d'un β -sulfoquinovose.

Tableau N°29. Déplacements chimiques en RMN 1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie oligosaccharidique du composé **1**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) C_5D_5N .

Position	Composé 1	
	δ (H)	δ (C)
3-O(2-O-sulfo)-β-D-Quinovopyranosyle		
H-C(1)	4.58 (d, $J=8.0$)	104.5
OSO ₃ H-C(2)	3.93(d, $J=8.09$)	81.0
H-C(3)	4.14(m)	77.0
H-C(4)	3.60 (t) $J= 9.5$)	76.1
H-C(5)	3.62 (d, $J=8.12$)	71.9
CH ₃ (6)	1.58 (d, $J=5.71$)	18.4

A partir des valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones osidiques qui ont été attribués, grâce aux corrélations exprimées dans l'expérience HSQC, COSY, TOCSY et NOESY, celles-ci ont correspondues à celles d'un β -D-quinovose (Aquino et al., 1997).

***Identification du composé 1**

D'après ces résultats, le composé **1** est identifié comme étant un monodesmoside avec la formule chimique : 3-O-(2-O-sulfonyl- β -D-quinovopyranosyl) acide quinovique (fig.79), isolé précédemment à partir de l'espèce *Zygophyllum coccineum* L., *Zygophyllum fabago* L. *Zygophyllum propinquum* (Attia AA., 1999 ; Ahmad VU et al., 1990).

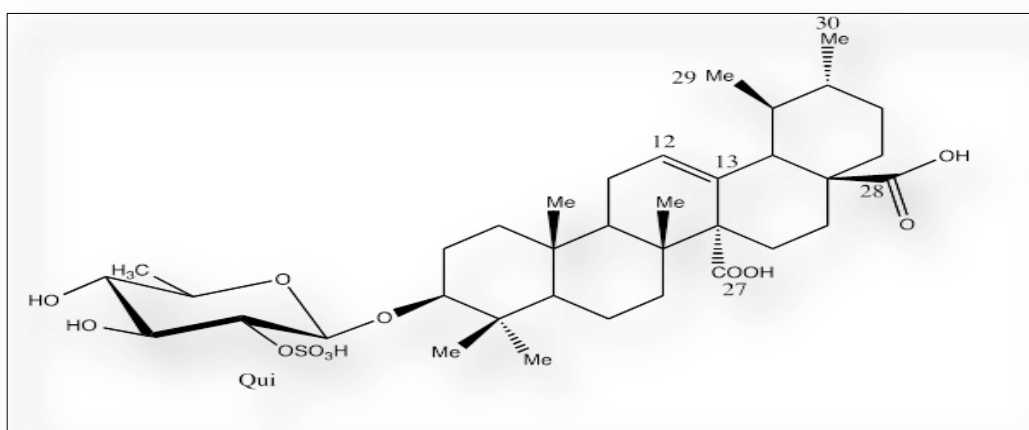


Figure N°79: structure chimique du composé **1** (Attia, 1999 ; Ahmad VU et al., 1990; Bencharif-Betina et al., 2013).

* II.2.2. Identification du composé 2

II.2.2.1. Spectrométrie de masse

L'analyse du spectre de masse obtenu en source FAB-MS en mode négatif, donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 727 $[M-H]^-$ (fig.80). La fragmentation de cet ion conduit à la formation de fragment à m/z 565 $[M-H-162]^-$ et à m/z 486 $[M-H-162-80]^-$ correspondant au départ d'un sulfohexose présent dans plusieurs espèces du genre, notamment l'**acide quinovique** (Elgamal et al., 1995) qui représente l'aglycone du composé **2** (tab.30), précédemment identifié (voir identification du composé **1**).

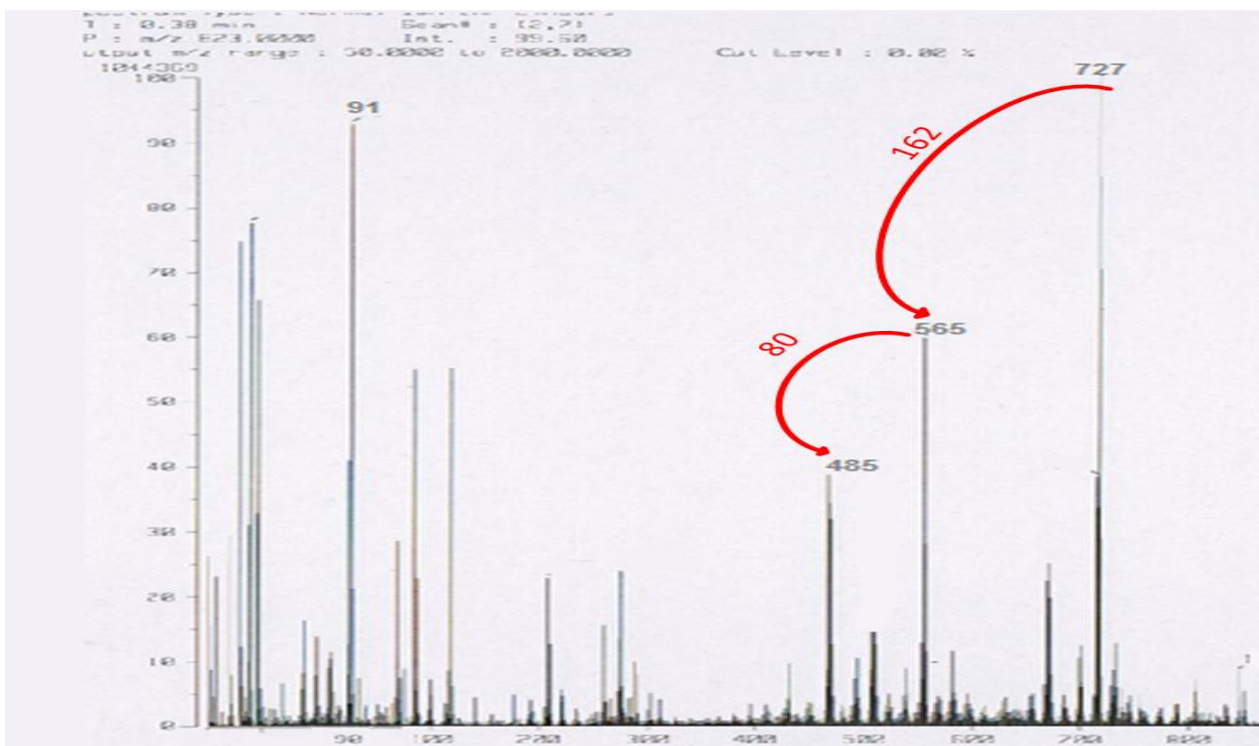


Figure N°80: Spectre de masse en source FAB-MS en mode négatif du composé **2**.

Tableau N°30. Déplacements chimiques en RMN ¹H (600 MHz) et RMN ¹³C (150 MHz), dans la partie génine du composé **2**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D.
(δ en ppm, J en Hz) C₅D₅N.

Position	Composé 2	
	δ (H)	δ (C)
CH ₂ (1)	1.37, nd	38.6
CH ₂ (2)	1.74, nd	26.1
H-C(3)	3.10 m	89.4
C (4)	-	39.4
H-C(5)	0.80 m	55.5
CH ₂ (6)	1.35, nd	18.3
CH ₂ (7)	1.67 m, nd	37.1
C (8)	-	38.9
H-C(9)	2.55 m	46.7
C (10)	-	36.6
CH ₂ (11)	2.00, nd	24.9
H-C(12)	5.90 (br s)	128.2
C (13)	-	134.1
C (14)	-	56.6
CH ₂ (15)	2.12 m et 2.42 m	25.7
CH ₂ (16)	2.46 m, nd	25.0
C (17)	-	48.6
H-C(18)	2.70 (d, $J=10.9$)	55.0
H-C(19)	1.34 m	37.4
H-C(20)	0.80	39.4
CH ₂ (21)	1.20, 1.30	33.0
CH ₂ (22)	1.86, nd	36.9
Me (23)	1.22 (s)	27.8
Me (24)	1.04 (s)	16.8
Me (25)	0.71 (s)	16.7
Me (26)	0.92(s)	18.6
COOH (27)	-	178.2
COOH (28)	-	182.0
Me (29)	1.14 (d, $J=6.0$)	18.0
Me (30)	0.72 (d, $J=6.0$)	21.0

II.2.2.2. Spectrométrie de RMN

II.2.2.2.1. Partie osidique

*.Détermination du nombre et de la nature des sucres

Les spectres de RMN¹H et RMN¹³C (fig.81), dans la zone des protons et des carbones anomériques, montrent un proton à δ_H 4.72 ppm sous forme d'un doublet (d, $J = 7.62$ Hz). Son carbone est attribué à l'aide du spectre HSQC, il résonne à δ_H 103.6 ppm.

Dans le spectre HMBC, l'anomère H-1 à δ_H 4.72 ppm corrèle en $^3J_{H-C}$ avec le carbone C-3 de l'aglycone à δ_C 89,4 ppm, ce qui indique la position du point de fixation du sucre sur l'aglycone.

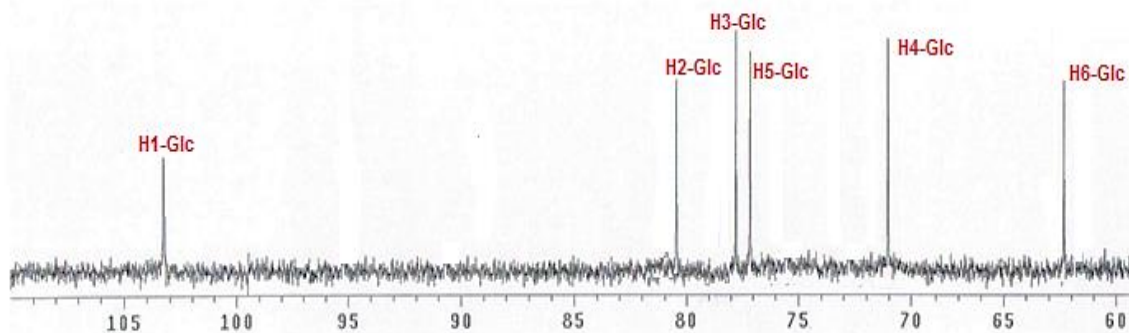


Figure N°81: Spectre de RMN ^{13}C de la partie osidique du composé **2**

Le spectre HSQC (fig.84), présente également six corrélations hétéronucléaires en $^1J_{H-C}$ nettes, entre les protons et leurs carbones respectifs d'un hexose (Fig.82, fig.82 bis ; tab.31), à l'exception d'un signal émis par un proton à δ_H 4.90 ppm une valeur relativement déblindée, qui corrèle avec un carbone à δ_C 80.2 ppm, une valeur également déblindée, qui suggère une substitution du carbone par la présence d'un groupement sulfaté, un cas très fréquent dans le genre *Zygophyllum*. Ces valeurs des déplacements chimiques des carbones sont en accord avec celles décrites dans la littérature (Smati et al. 2007; Ahmad V.U. et al., 2007 ; Iqbal S et al., 2011), ceci permet d'identifier ce sucre à un sulfoglucose.

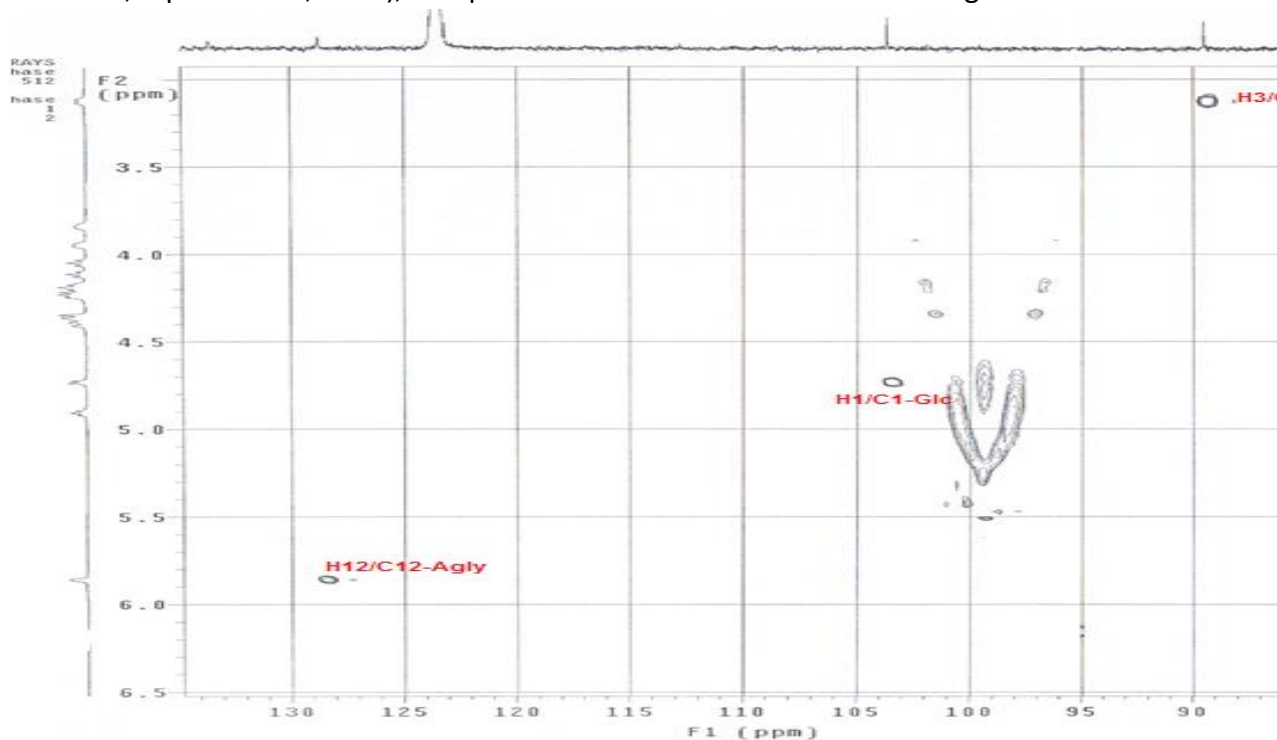


Figure N° 82 : Spectre HSQC du composé **2** (zone des anomères).

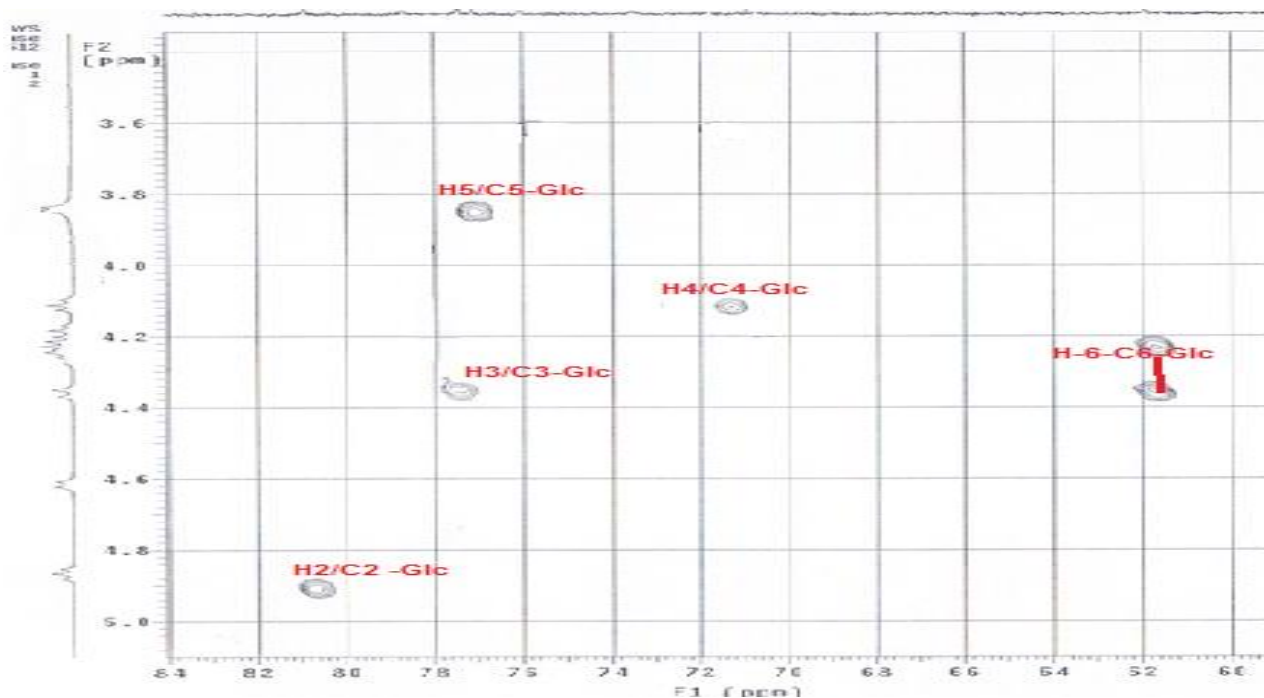


Figure N° 82 bis: Spectre HSQC du composé **2** (zone des alcools secondaires du sucre).

A partir du proton anomérique, l'analyse des spectres HMBC, COSY et TOCSY, permet d'identifier clairement un système de spin-spin, attribué respectivement aux sept protons en faveur d'un glucose.

Tableau N°31. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie osidique du composé **2**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Position	Composé 2	
	δ (H)	δ (C)
3-O(2-O-sulfo)-β-D-Glucopyranosyl		
H-C(1)	4.72 (<i>d</i> , $J=7.6$)	103.3
OSO ₃ H-C(2)	4.90 (<i>t</i> , $J= 7.9$)	80.6
H-C(3)	4.36 (<i>d</i> , $J= 8.8$)	77.8
H-C(4)	4.05 (<i>t</i> , $J= 9.2$)	71.2
H-C(5)	3.84 (<i>d</i> , $J= 8.5$)	77.2
CH-2(6)	4.22 (<i>m</i>) et 4.34(<i>m</i>)	62.1

Les valeurs des constantes de couplages (tab.31) sont toutes supérieures à 7 Hz, indiquant une position transdiaxiale de ces protons, caractéristique d'un β -D-glucopyranosyle.

*Identification du composé 2

Au terme de ces conclusions, le composé **2** a été identifié comme étant un saponoside **monodesmosidique** qui correspond à la formule chimique suivante :

3-O-(2-O-sulfo-β-D-glucopyranosyle) acide quinovique, figure N°83 (Bencharif-Betina et al., 2013 ; Smati et al., 2007; Ahmad V.U.et al., 2007 ; Iqbal et al., 2011.). Ce saponoside a été isolé précédemment des

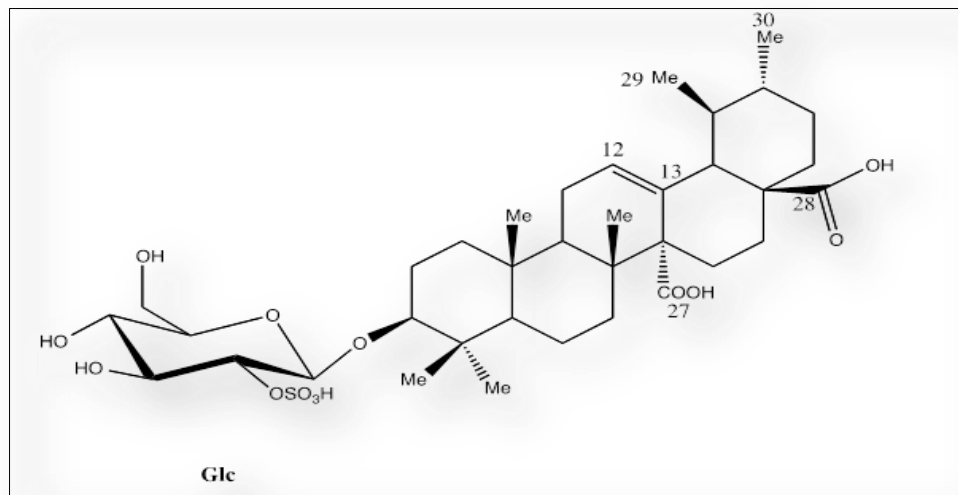


Figure N°83: structure du composé **2** (Smati et al., 2007; Ahmad V.U.et al., 2007 ; Iqbal et al., 2011; Bencharif-Betina et al.2013).

I.2.3. Identification du composé 3

II.2.3.1. Spectrométrie de masse

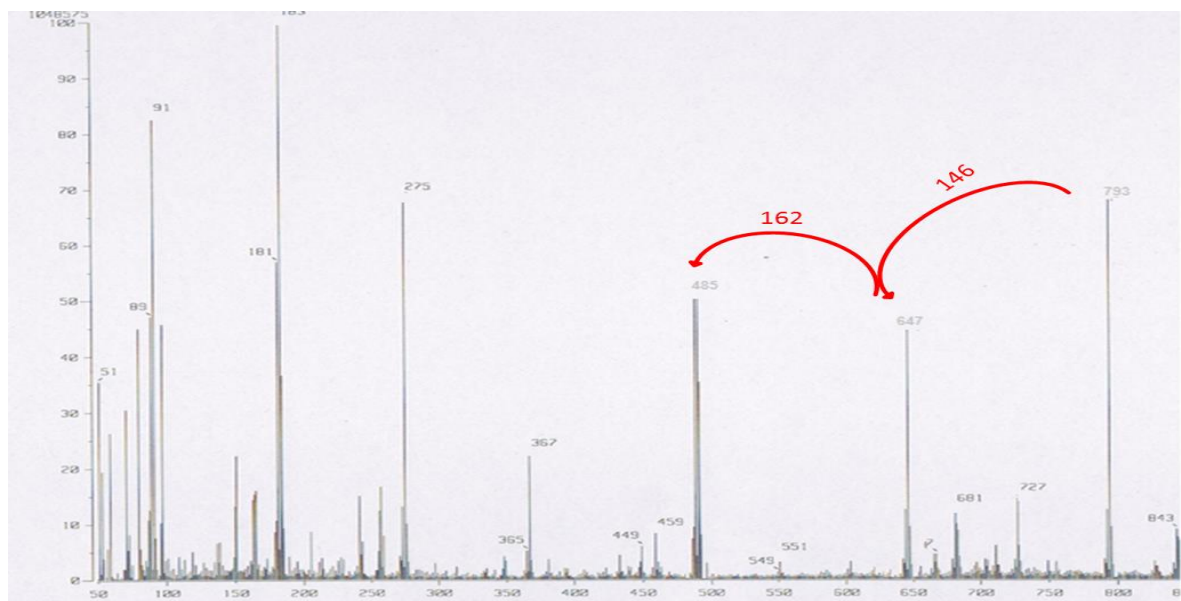


Figure N°84: Spectre de masse en source FAB-MS en mode négatif du composé **3**.

La spectroscopie de masse, en source FAB-MS, en mode négatif donne un ion pseudomoléculaire à m/z 793 $[M-H]^-$ (fig.84), ce qui correspond à la formule chimique suivante $C_{42}H_{66}O_{14}$. D'autres pics d'ions fragments observables à m/z 647 $[M-H-146]^-$, à m/z 485 $[(M-H)-146-162]^-$ correspondent à la perte successive d'un déoxyhexose et d'un hexose. Le pic à m/z 485 correspond au pic de l'aglycone, notamment l'acide quinoïque (Aquino et al., 1988). Les déplacements chimiques relevés sur les spectres de RMN 1D et 2D (tab.32) sont en totale concordance avec ceux cités dans la littérature (Hassanean et al., 1993 ; Aquino et al., 1989).

Tableau N°32. Déplacements chimiques en RMN 1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie aglycone du composé 3, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) C_5D_5N .

Position	Composé 3	
	$\delta(H)$	$\delta(C)$
CH ₂ (1)	0.82 et 1.00	38.6
CH ₂ (2)	2.07, nd	26.1
H- C(3)	3.09 m	89.4
C (4)	-	39.4
H- C(5)	0.84	55.5
CH ₂ (6)	nd	18.3
CH ₂ (7)	1.65, 1.80	37.1
C (8)	-	38.9
H- C(9)	2.56 m	46.7
C (10)	-	36.6
CH ₂ (11)	1.92, nd	24.9
H- C(12)	5.90 (br s)	128.2
C (13)	-	134.1
C (14)	-	56.6
CH ₂ (15)	2.48, nd	25.7
CH ₂ (16)	nd	25.0
C (17)	-	48.6
H- C(18)	2.58 m	55.0
H- C(19)	1.74 m	37.4
H- C(20)	0.81	39.4
CH ₂ (21)	1.20, nd	33.0
CH ₂ (22)	1.66 et 1.82	36.9
Me (23)	1.03 (s)	27.8
Me (24)	0.86 (s)	16.8
Me (25)	0.80 (s)	16.7
Me (26)	1.11 (s)	18.6
COOH (27)	-	178.2
COOH (28)	-	176.6
Me (29)	1.07 (d, $J=6.2$)	18.0
Me (30)	0.67 (d, $J=6.0$)	21.0

II.2.3.2. Spectrométrie de RMN

II.2.3.2.1 Partie osidique

Pour la détermination de la composition et la nature chimique des oses du composé **3**, nous avons suivi la même démarche que pour les autres, qui consiste à relever les différences aux niveaux de tous les spectres des expériences RMN-1D et 2D.

*Détermination du nombre et de la nature des sucres

L'étude du spectre de RMN ^1H permet de distinguer dans la zone des sucres deux doublets, signaux attribuables aux protons anomériques qui résonnent à δ_{H} 4,59 (d, $J = 6.09$ Hz) et l'autre à δ_{H} 6,17 (d, $J = 7.86$ Hz). Ces protons corrélient sur le spectre HSQC (fig.85, 85 bis) avec les deux carbones anomériques résonnant respectivement à δ_{C} 106,0 et à δ_{C} 95,2 ppm (fig.87). L'analyse détaillée des spectres de RMN 1D et 2D a permis d'identifier la nature des sucres. L'évaluation des déplacements et des constantes de couplage spin-spin a permis de caractériser un β -D-quinovopyranosyle et un β -D-glucopyranosyle (tab.33). Ces conclusions sont en accord avec la littérature (Hassanean et al., 1993 ; Aquino et al., 1989).

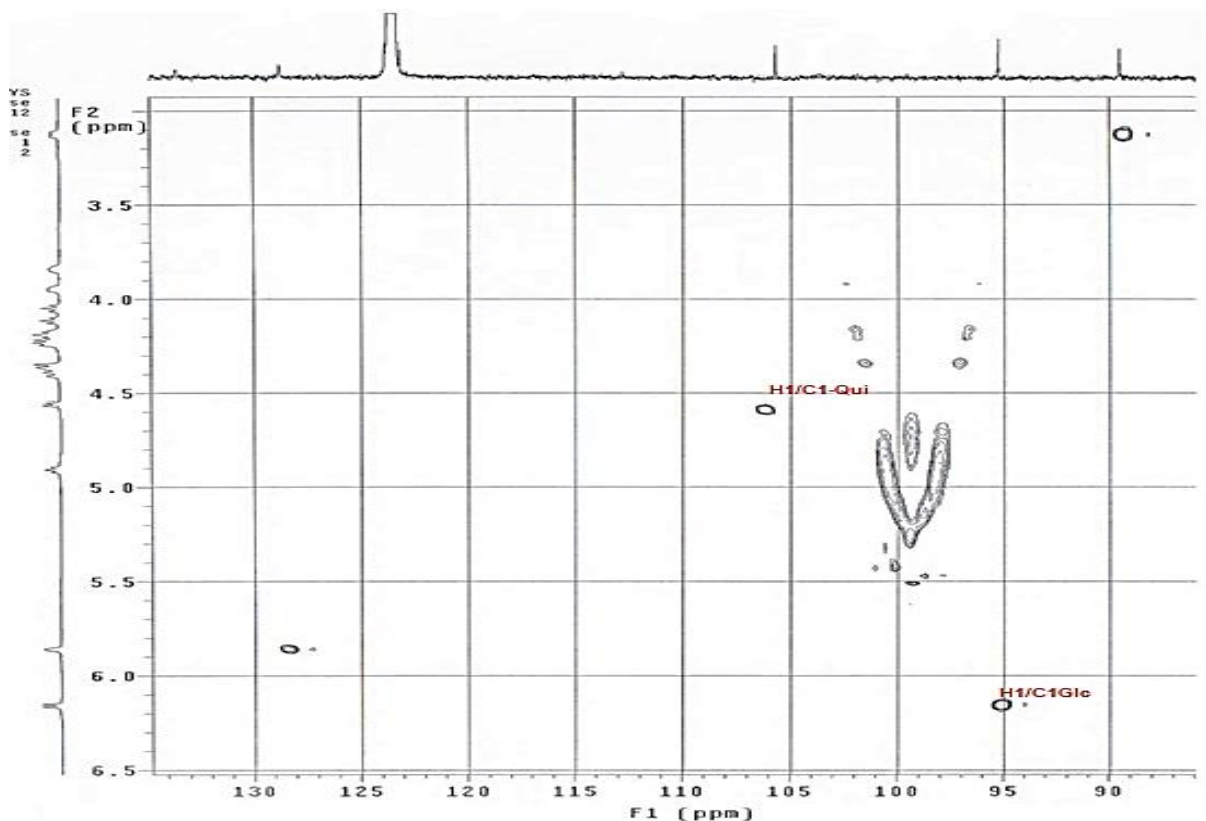


Figure N°85 : Spectre HSQC du composé **3** (zone des anomères)

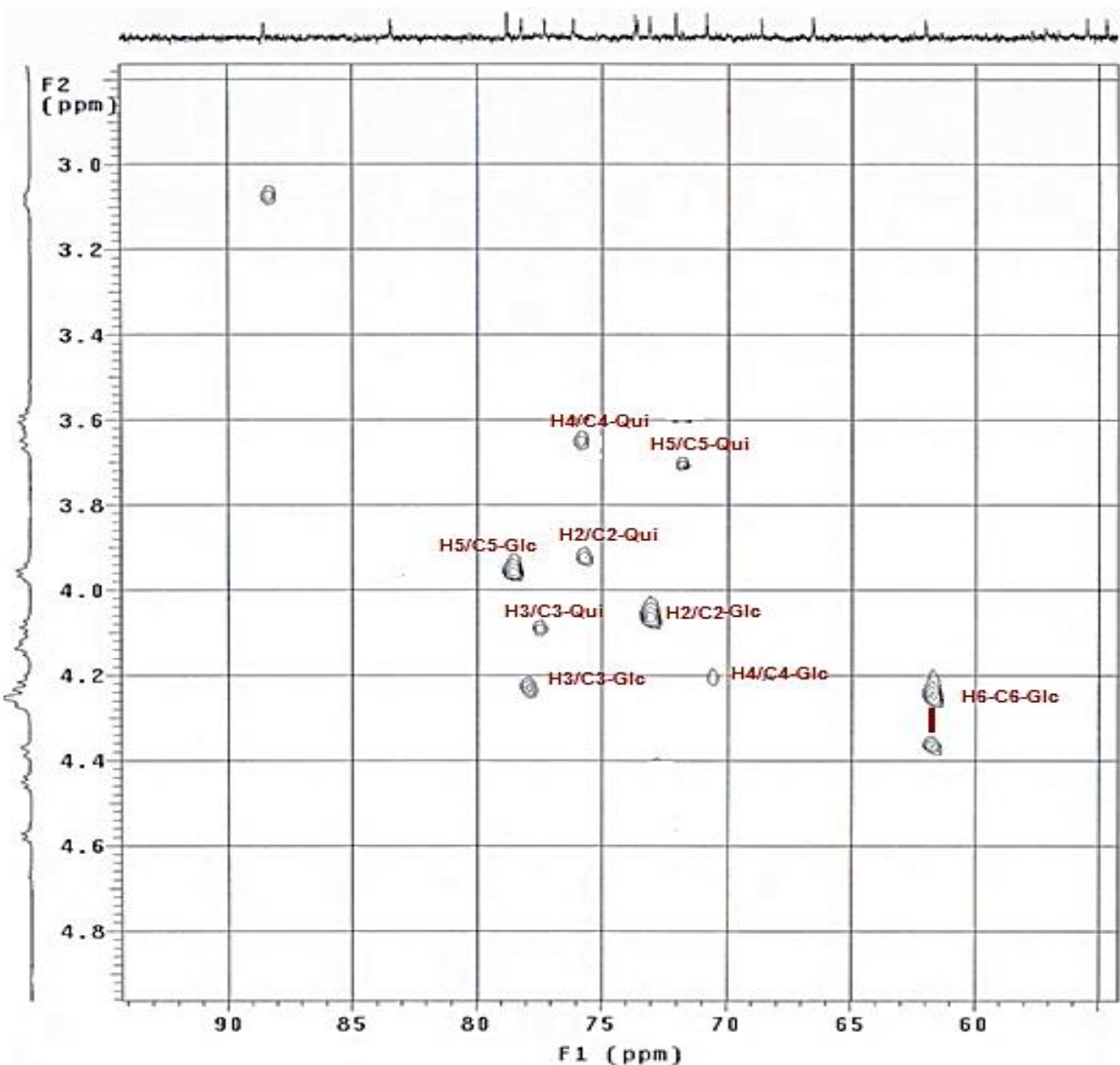


Figure N°85 bis : Spectre HSQC du composé **3** (zone des alcools secondaires des sucres)

Le proton anomérique H1-Qui à δ_H 4.59 ppm corrèle sur le spectre HMBC avec le C3-Agly à δ_C 89,4 ppm (fig.86). Le proton anomérique H1-Glc détecté à δ_H 6,17 ppm fortement déblindé et son carbone anomérique C1-Glc correspondant résonne à δ_C 95,2 ppm une valeur relativement blindée et caractéristique d'une unité osidique impliquée dans une liaison ester avec un carbonyle C-28 de l'acide quinovique ou un zygophylloside, ce qui a engendré une position relativement blindée du C-28 à δ_C 176.6 ppm (tab.32).

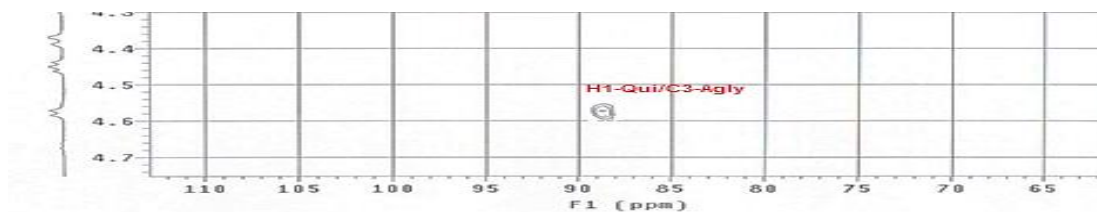


Figure N°86: Spectre HMBC révélant le point de fixation du quinovose sur l'aglycone du composé **3**.

Tableau N°33. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie oligosaccharidique du composé **3**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Position	δ (H)	δ (C)	Position	δ (H)	δ (C)
3-O-β-D-Quinovopyranosyl			28-O-β-D-Glucopyranosyl		
H-C(1)	4.59(d, $J=6.1$)	106.0	H-C(1)''	6.17 (d, $J= 7.86$)	95.2
H-C(2)	3.90	75.2	H-C(2)''	4.13 (t)	73.4
H-C(3)	4.06(t, 11.9, 4.2)	77.1	H-C(3)''	4.24 (t)	77.6
H-C(4)	3.62(m)	76.0	H-C(4)''	4.20 (t)	70.7
H-C(5)	3.70(t,10.8, 4.0)	72.1	H-C(5)''	3.97 (t)	78.0
CH ₃ (6)	1.55 (s)	18.3	CH ₂ -(6)'	4.25 (m) et 4.37 (t,10.24 ; 4.0)	61.8

*Identification du composé **3**

Au terme de cette comparaison la formule chimique du composé **3** s'écrit de la manière suivante : 3-O-(β -D- quinovopyranosyl) acide quinovique-28-(O- β -D-glucopyranosyl) ester (**3**)(fig.87). Ce saponoside a été déjà isolé à partir des parties aériennes de *Zygophyllum album*, *Zygophyllum gesllini*, *Zygophyllum fabago*, *Zygophyllum eurypterum* (Smati et al., 2007; Ahmad V.U.et al., 2007; Iqbal et al., 2011; Hassanean et al., 1993 ; Aquino et al., 1989).

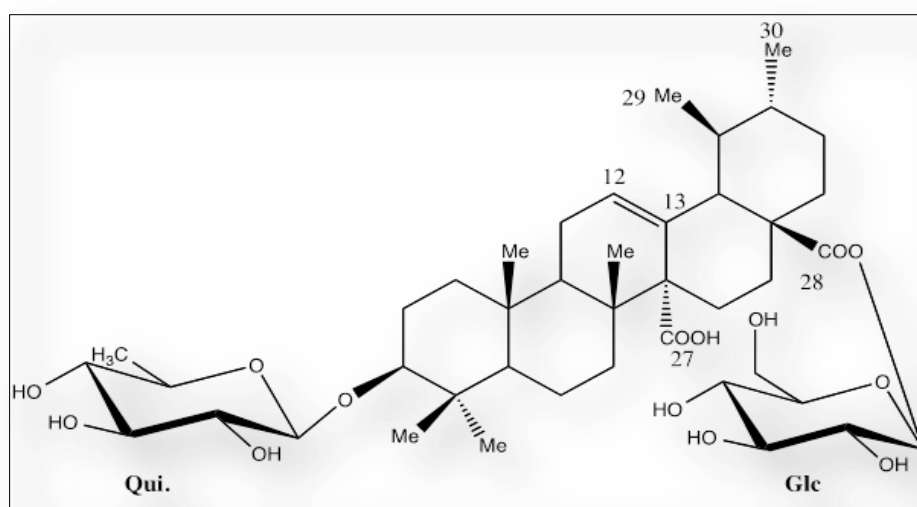


Figure N°87 : structure du composé **3** (Smati et al., 2007; Ahmad V.U.et al., 2007; Iqbal et al., 2011 ; Hassanean et al., 1993; Aquino et al., 1989; Bencharif-Betina et al.2013).

II.2.4. Identification du composé 4

II.2.4.1. Spectrométrie de masse

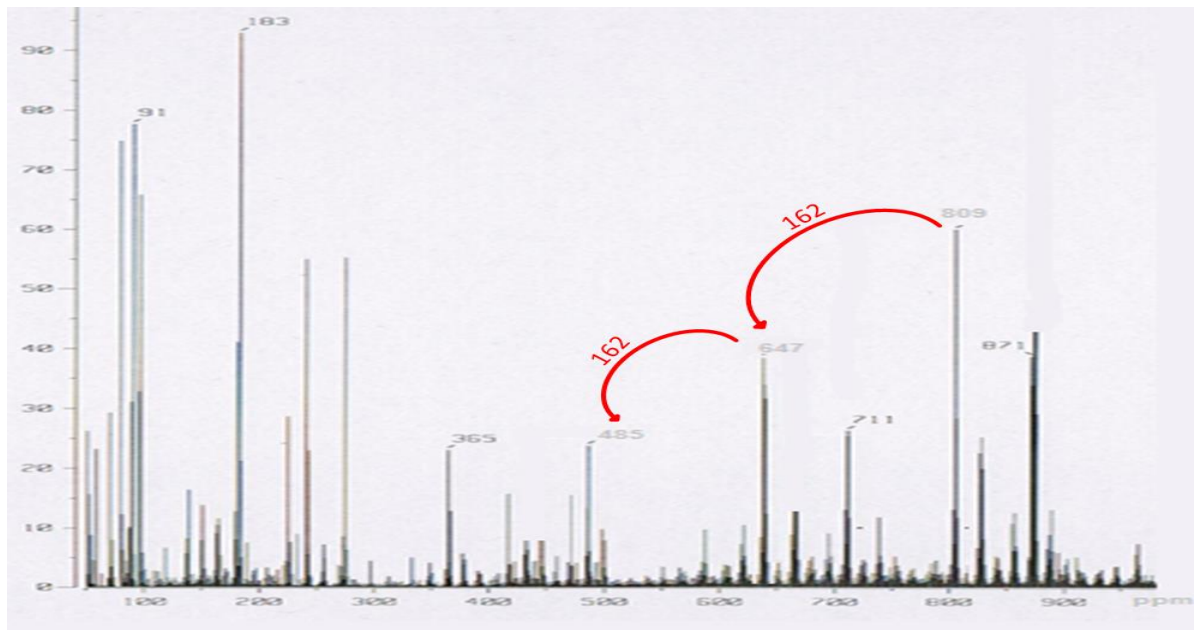


Figure N°88: Spectre de masse en source FAB-MS en mode négatif du composé 4.

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) du composé 4 permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à m/z 809 $[M-H]^-$, suggérant une masse de 810 u.m.a, en accord avec la formule brute $C_{42}H_{66}O_{15}$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à m/z 647 $[M-H-162]^-$ et à m/z 485 $[M-H-162-162]^-$, correspondant à la perte de deux hexoses. Le pic observé à m/z 485 correspond au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, l'acide quinovique (fig.88, tab.34)(Aquino et al., 2001, Cheng et al., 2002) .

Tableau N°34. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie aglycone du composé **4**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D.
(δ en ppm, J en Hz.) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$

Position	Composé 4	
	$\delta(\text{H})$	$\delta(\text{C})$
CH ₂ (1)	0.82 et 1.44	38.7
CH ₂ (2)	1.74 m, nd	26.2
H- C(3)	3.16 m	88.8
C (4)	-	39.0
H- C(5)	0.86 m	55.4
CH ₂ (6)	1.34 m et 1.62	18.1
CH ₂ (7)	nd	37.1
C (8)	-	39.8
H- C(9)	2.59 m	46.8
C (10)	-	36.6
CH ₂ (11)	1.92, nd	23.0
H- C(12)	5.90 (br s)	128.0
C (13)	-	133.2
C (14)	-	56.6
CH ₂ (15)	2.11 et 2.46	25.3
CH ₂ (16)	nd	37.0
C (17)	-	48.6
H- C(18)	2.58 m	54.4
H- C(19)	1.82 m	36.2
H- C(20)	0.81	39.0
CH ₂ (21)	1.20, nd	29.8
CH ₂ (22)	1.67 m, nd	36.1
Me (23)	1.04 (s)	27.7
Me (24)	0.87 (s)	16.8
Me (25)	0.79 (s)	16.2
Me (26)	1.12 (s)	18.8
COOH (27)	-	179.0
CO-O- (28)	-	176.2
Me (29)	1.10 (d, $J=6.0$)	17.9
Me (30)	0.69 (d, $J=5.9$)	20.9

II.2.4.2. Spectrométrie de RMN

II.2.4.2.1. Partie osidique

*.Détermination du nombre et de la nature des sucres

Le spectre de RMN- ^1H a révélé, deux signaux relatifs aux protons anomériques, résonnant à δ_{H} 4.69 ppm et à δ_{H} 6.19 ppm, ils corrélient sur le spectre HSQC avec les carbones anomériques à δ_{C} 106.3 ppm et à δ_{C} 95.3 ppm respectivement (fig.89 et 89 bis).

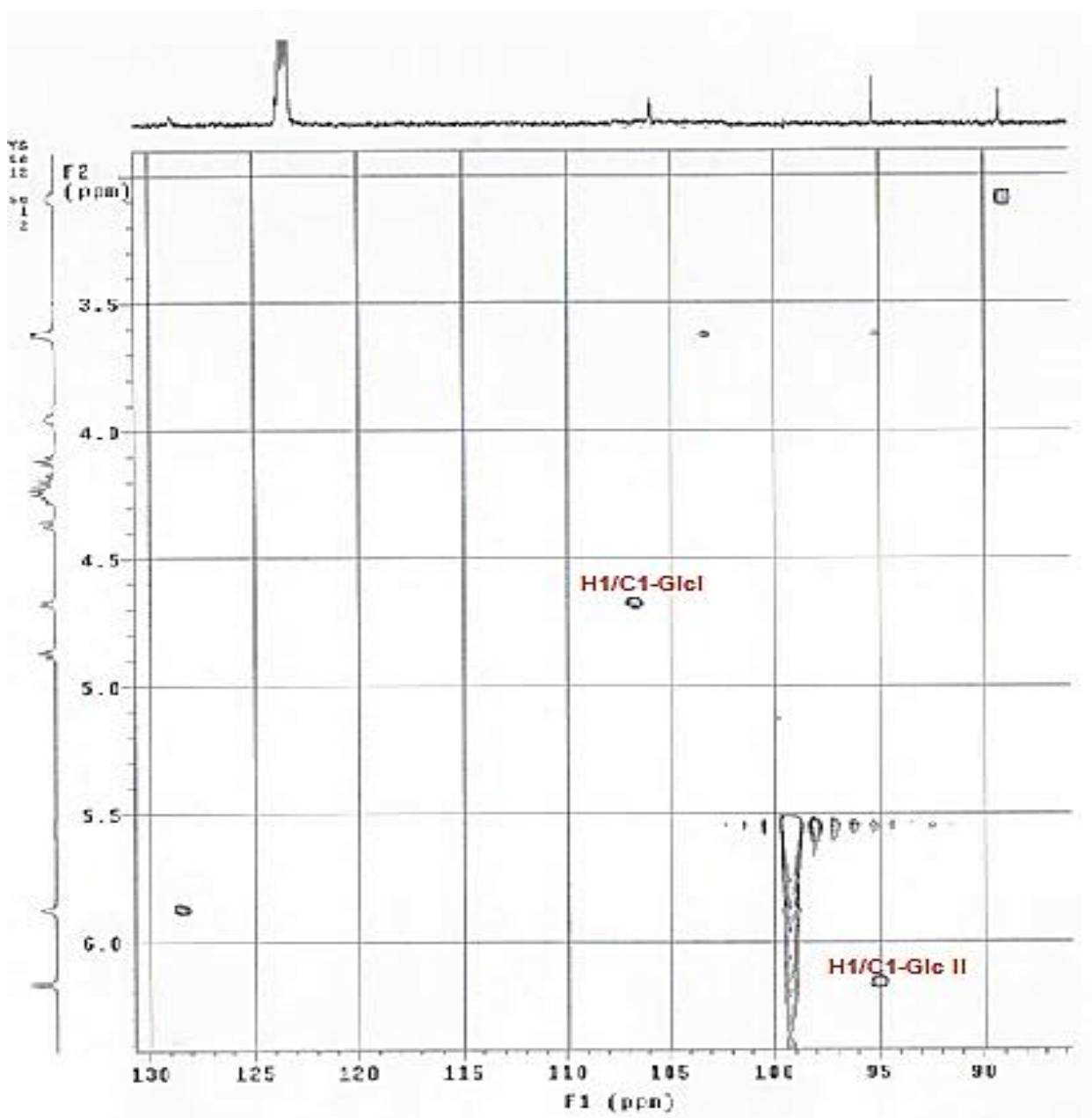


Figure N°89: Spectre HSQC du composé 4 (zone des anomères).

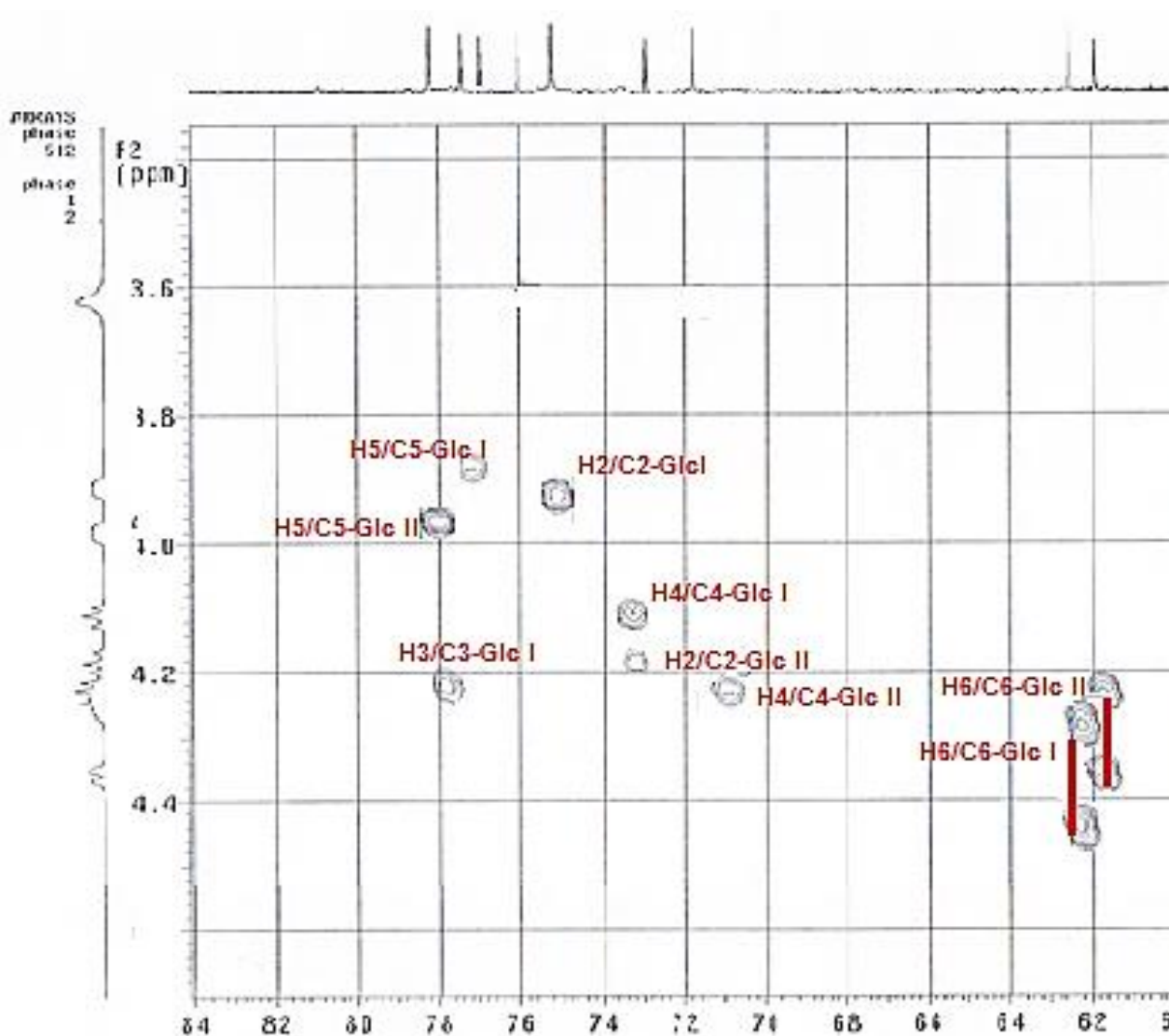


Figure N°89 bis: Spectres HSQC du composé **4** (zone des alcools secondaires des sucres).

Par comparaison des données spectrales à celles du composé **3**, et en partant des protons anomériques à δ_H 4,69 ppm et à δ_H 6.19 ppm, l'analyse des spectres COSY et TOCSY, NOESY, permet d'identifier quatorze protons caractéristiques de deux β -D-glucopyranosyle terminaux (fig.89 et 89 bis ; tab.35), (Aquino et al., 2001, Cheng et al., 2002). Les corrélations HMBC entre H1-Glc I à δ_H 4.69 ppm / à δ_C 88,84 ppm H3-Agly et entre H1-Glc II à δ_H 6.19 ppm ($d, J= 7,86$) / à δ_C 176,24 ppm (Agly C-28) et les corrélations NOESY ont permis d'établir les point de fixation des deux sucres.

Tableau N°35. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie oligosaccharidique du composé **4**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Position	δ (H)	δ (C)	Position	δ (H)	δ (C)
3-O-β-D-Glucopyranosyl			28-O-β-D-Glucopyranosyl		
H-C(1)	4.69 (d, $J=7.62$)	106.3	H-C(1)''	6,19 (d, $J= 7,86$)	95,3
H-C(2)	3.92 (m)	75.2	H-C(2)''	4,14 t (11.1, 4.3)	73,5
H-C(3)	4.23 t (10,58, 4.2)	78.1	H-C(3)''	4,16 t (11.0, 4.1)	78,0
H-C(4)	4.08 t,10.2 ,4.0)	71,3	H-C(4)''	4,21 (s)	70,8
H-C(5)	3.88 (m)	77.0	H-C(5)''	3,97 (m)	78,8
CH₂-(6)	4.25 et 4.46	62.4	CH₂-(6)'	4. 26 (m) et 4.38 (dd, $J =11.9$)	62.0

*.Identification du composé **4**

Ceci nous a conduit à identifier le composé **4** comme étant, le bidesmoside **zygophyloside E** avec la structure (fig.90) et la formule suivante : 3-(O- β -D-glucopyranosyle) acide quinovique-28-(O- β -D-glucopyranosyle) ester (**4**) (Smati et al., 2007 ; Ahmad VU et al., 2007; Iqbal et al.,2011 ; Ahmad V.U. et al.,1993 ; Safir et al., 1998).

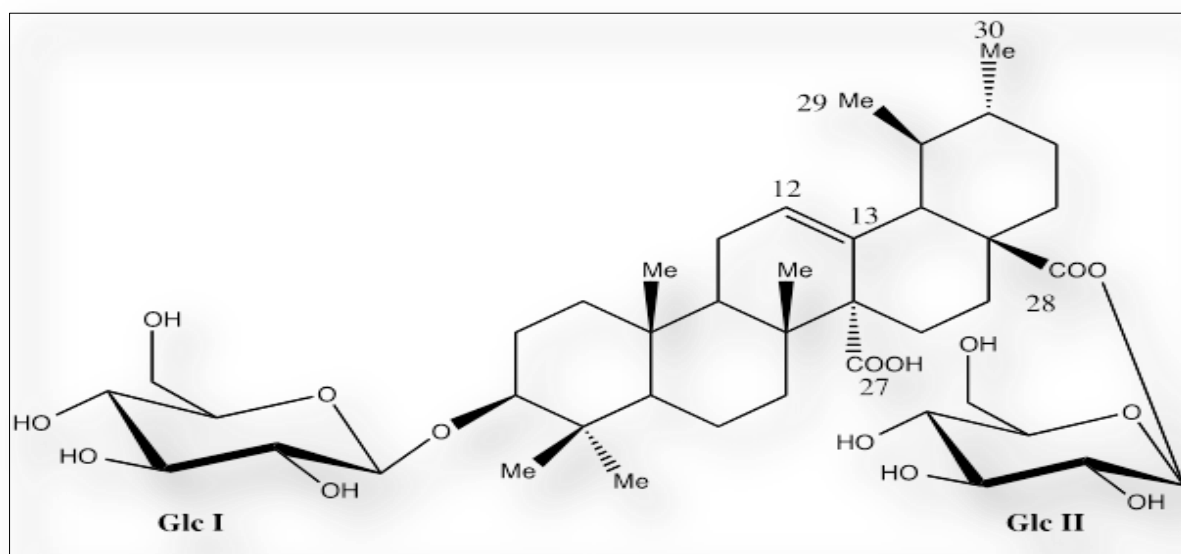


Figure N° 90 : structure du composé **4** (Smati et al., 2007 ; Ahmad VU et al., 2007; Iqbal et al.,2011 ; Ahmad V.U. et al.,1993 ; Safir et al., 1998 ; Bencharif-Betina et al., 2013).

Ce saponoside a été précédemment isolé des espèces *Zygophyllum eurypterum*, *Zygophyllum geslini*, *Zygophyllum fabago*.

II.2.5. Identification du composé 5

II.2.5.1. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse obtenus en source FAB-MS, en mode ion négatif, montrent un ion pseudomoléculaire à m/z 873 [$M-H$]⁻ (fig.91), correspondant à la masse 874 et à la formule chimique $C_{42}H_{66}O_{17}S_7$. La fragmentation de cet ion conduit à la répartition suivante à m/z 727 [$M-H-146$]⁻, à m/z 647 [$M-H-146-80-162$]⁻, à m/z 485 [$M-H-146-80-162$]⁻, correspondant à la perte d'un déoxyhexose, d'un groupement de soufre et d'un hexose, respectivement (fig.91, tab.36). L'ion à 485 correspond à l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, notamment l'acide quinovique.

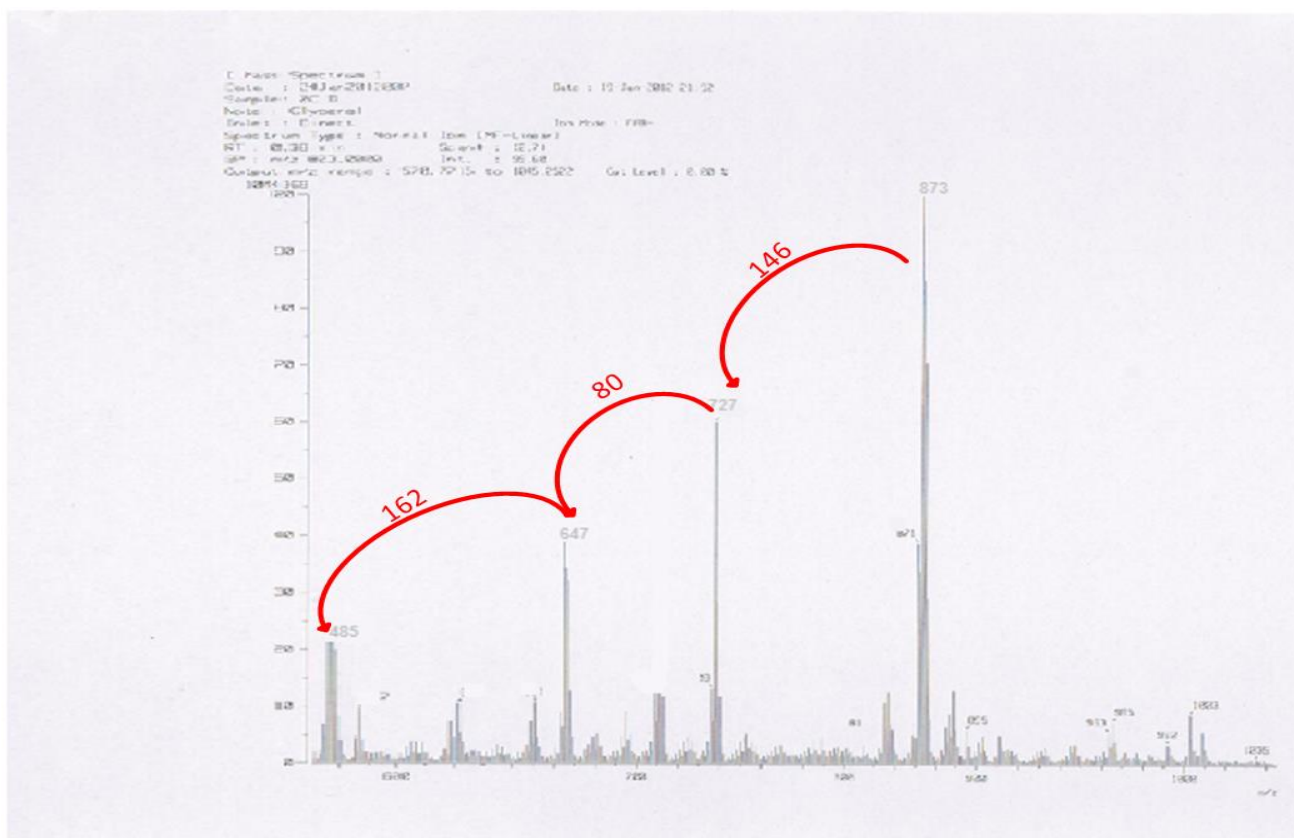


Figure N°91: Spectre de masse en source FAB-MS en mode négatif du composé 5.

Cette fragmentation comparativement au composé **3**, révèle la même composition de la chaîne osidique à l'exception d'un petit fragment de 80 *uma*, une unité supplémentaire, qui correspond à un groupement sulfaté déjà rencontré dans le composé **1**.

Tableau N°36. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie aglycone du composé **5**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Position	Composé 5	
	δ (H)	δ (C)
CH ₂ (1)	0.79 et 1.48	38.6
CH ₂ (2)	1.94 m, nd	26.0
H- C(3)	3.07 m	89.1
C (4)	-	39.0
H- C(5)	0.85 m	55.2
CH ₂ (6)	1.66, nd	18.1
CH ₂ (7)	1.84 et 1.64 m	37.0
C (8)	-	39.7
H- C(9)	2.62 m	46.9
C (10)	-	36.6
CH ₂ (11)	1.92, nd	23.1
H- C(12)	5.93 (br s)	128.4
C (13)	-	133.7
C (14)	-	56.8
CH ₂ (15)	2.09 et 2.45	25.9
CH ₂ (16)	nd	26.0
C (17)	-	48.7
H- C(18)	2.58 m	54.4
H- C(19)	1.80	36.9
H- C(20)	0.82	38.8
CH ₂ (21)	nd	29.9
CH ₂ (22)	1.66 m et 1.78 m	36.0
Me (23)	1.22 (s)	27.8
Me (24)	1.01 (s)	16.7
Me (25)	0.77 (s)	16.2
Me (26)	1.07 (s)	18.1
COOH (27)	-	179.0
CO-O- (28)	-	176.8
Me (29)	1.08 (d, $J=5.7$)	17.9
Me (30)	0.72 (d, $J=6.0$)	20.7

1. II.2.5.2. Spectrométrie de RMN

II.2.5.2.1. Partie osidique

*.Détermination du nombre et de la nature des sucres

L'analyse du spectre RMN¹H du composé **5**, révèle deux protons anomériques résonnant sous forme de doublets à δ_H 4,60 ppm (d, $J= 7,62$) et à δ_H 6,16 ppm (d, $J= 8,1$ Hz). Leurs carbones anomériques ont été attribués sur le spectre HSQC à δ_C 103,0 ppm et à δ_C 95,0 ppm (fig.92 et 92 bis). Sur le spectre HSQC et comparativement à celui du composé **3**, on a détecté la présence d'un signal correspondant au carbone d'un ose, avec une valeur relativement déblindée à δ_C 80,4 ppm (+5ppm), traduisant une position substituée notamment par la présence du groupement sulfaté.

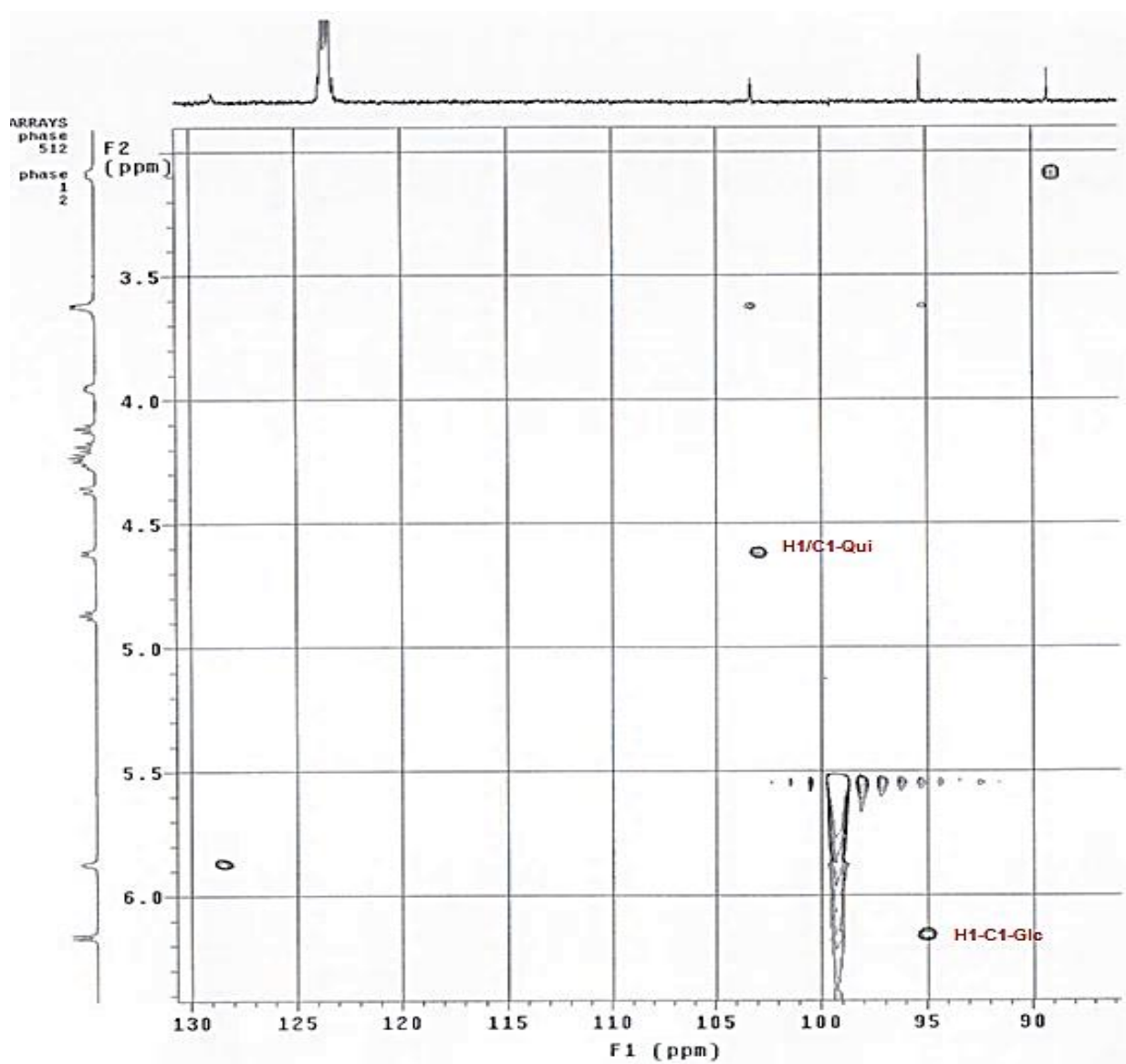


Figure N°92: Spectre HSQC du composé **5** (zone des anomères)

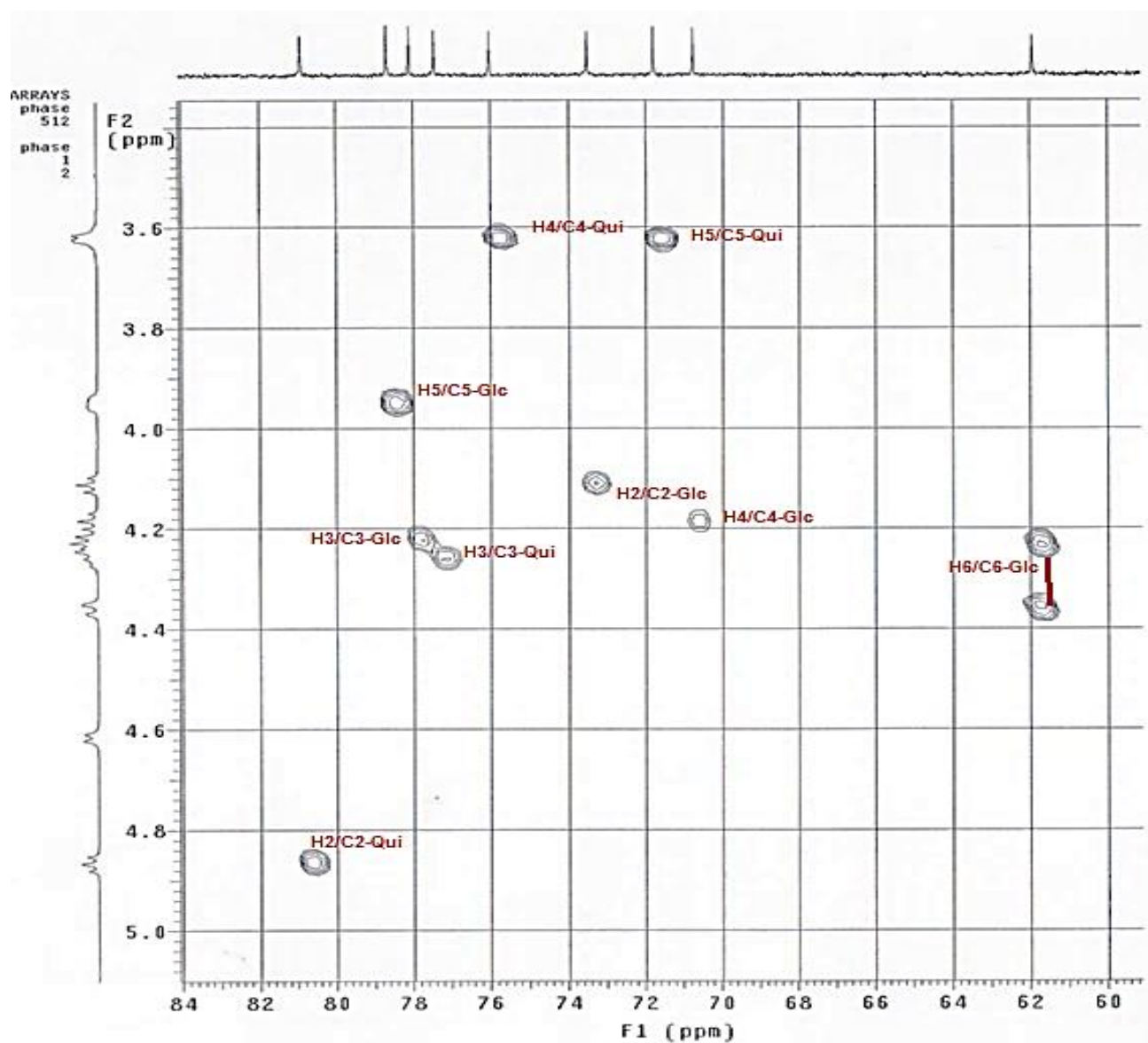


Figure N° 92 bis: Spectre HSQC du composé **5** (zone des alcools secondaires des sucres).

A partir des protons anomériques à δ_H 4,60 ppm et à δ_H 6,16 ppm, on a pu identifier sur les spectres de COSY et TOCSY, NOESY deux systèmes de spin de onze protons couplés, appartenant à un β -D-Sulfoquinovopyranosyle et un β -D-glucopyranosyle (tab.37). Ces conclusions sont en accord avec la littérature (Hassanean et al., 1993 ; Aquino et al., 1989). La substitution par un groupement sulfurique a pu être localisée sur le carbone C2-Qui, grâce aux corrélations en $^3J_{H-C}$, relevées entre δ_H 4,60 H1-Qui et δ_C 80.4 C2-Qui (fig.93).

Tableau N°37. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie oligosaccharidique du composé **5**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Position	δ (H)	δ (C)	Position	δ (H)	δ (C)
3-O-β-D-Quinovopyranosyle			28-O-β-D-Glucopyranosyle		
H-C(1)	4.60 (d, $J=7,62$)	103.0	H-C(1)	6,16 (d, $J= 8,10$)	95,2
H-C(2)	4.86	80.4	H-C(2)	4,11 (dd , 8.10 ;8.5)	73,4
H-C(3)	4.25	77.4	H-C(3)	4.22 (m)	77,8
H-C(4)	3.62(m)	75.9	H-C(4)	4.19 (t ; 9.05)	70,7
H-C(5)	3.63 (m)	71.9	H-C(5)	3.94 (m)	78,6
CH₃(6)	1.48 (d, $J=6.04$)	18.1	CH₂-(6)	4, 23 (m) et 4,36 (ld) $J=11,67$)	61,8

L'analyse du spectre HMBC montre des corrélations en $^3J_{\text{H-C}}$, indiquant la fixation des deux sucres sur le C-3 et le C-28 de l'aglycone. A l'identique du composé **3**, les protons anomériques à δ_{H} 4,60 ppm et à δ_{H} 6,16 ppm, corrélient respectivement avec les carbones C-3 à δ_{C} 89,1 ppm et C-28 à δ_{C} 176.8 ppm (fig.93). Ces valeurs sont caractéristiques d'unités osidiques impliquées dans des liaisons avec les carbones C-3 et le carbonyle C-28 de l'acide quinovique (Elgamal et al. 1995).

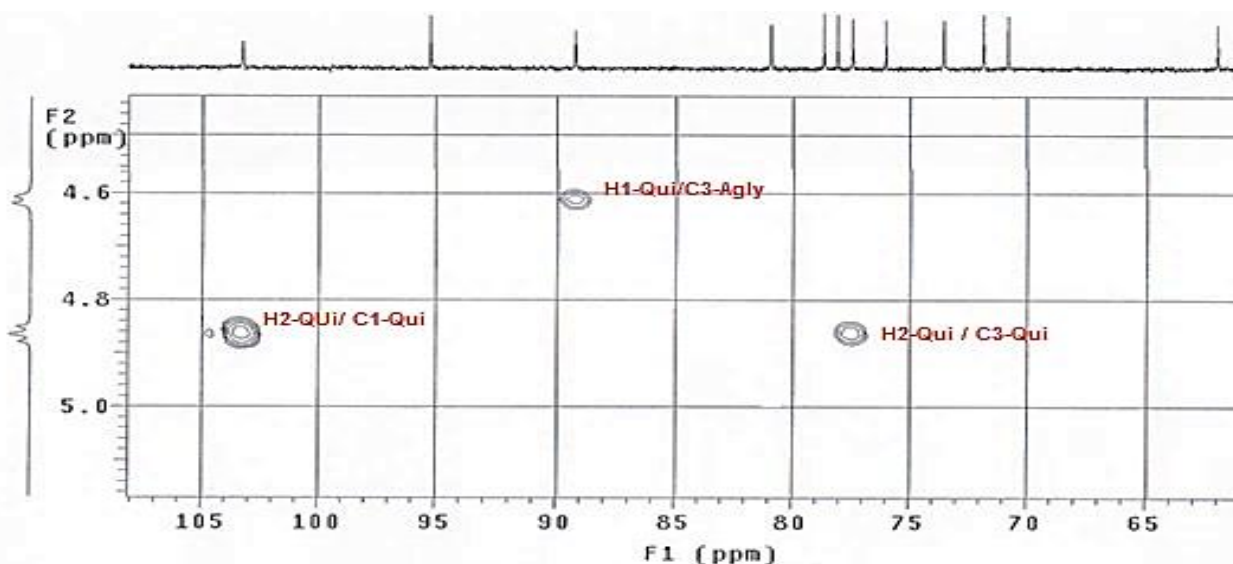


Figure N°93: Spectre HMBC révélant les corrélations du point de fixation de la chaîne osidique sur l'aglycone du composé **5**.

*.Identification du composé 5

Les précédentes conclusions permettent d'identifier le composé 5 au :

3-*O*-(β -D-2-*O*-sulfo-quinovopyranosyle) acide quinovique-28-(*O*- β -D-glucopyranosyle) ester (fig.94) précédemment isolé des espèce du genre, *Zygophyllum gaetulum* et *Guettarda angelica* (Bencharif-Betina et al., 2013 ; Safir et al., 1998 ; Matos et al., 1986).

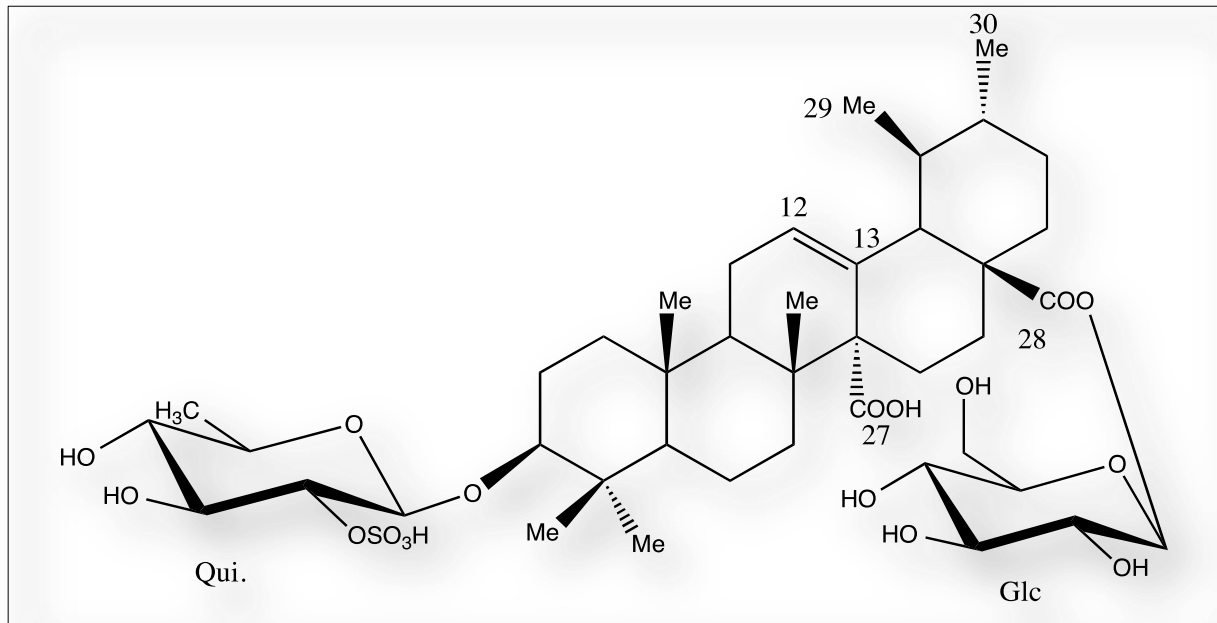
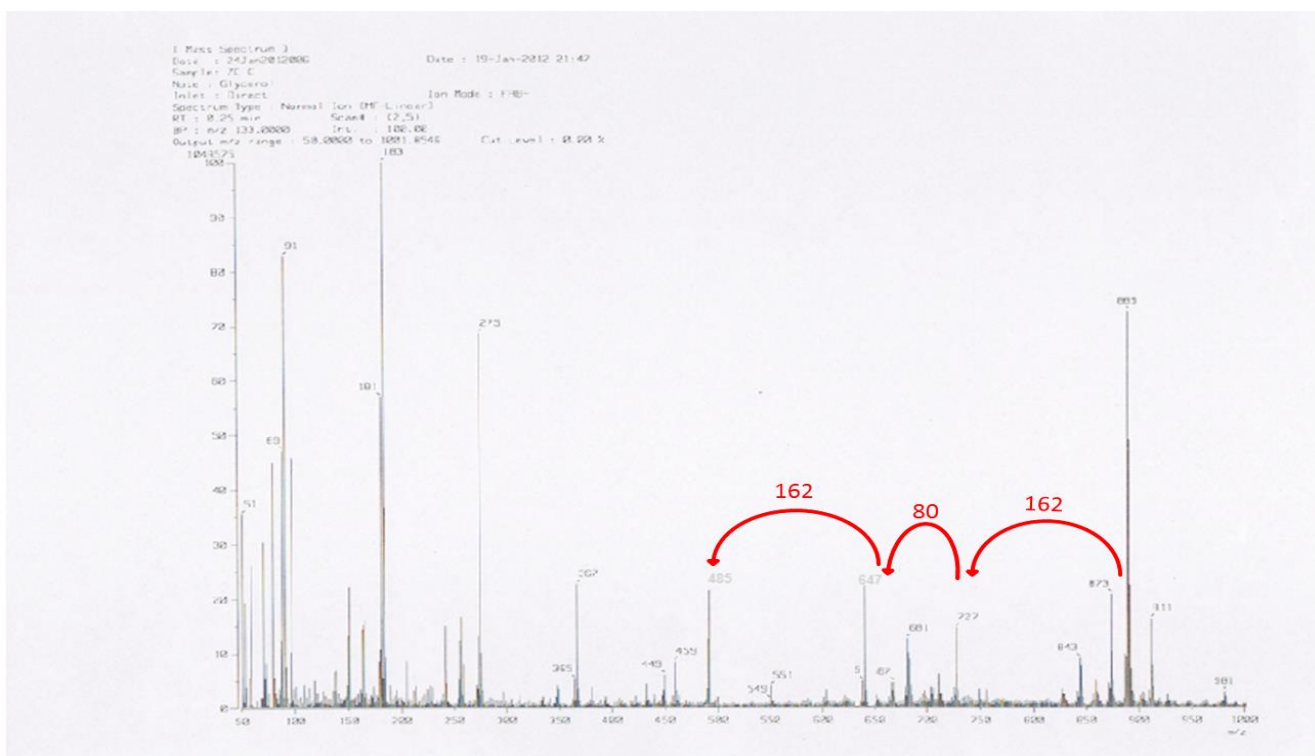


Figure N°94: Structure du composé 5 (Safir et al., 1998; Matos et al., 1986; Bencharif-Betina et al., 2013).

II.2.6. Identification du composé 6

II.2.6.1. Spectrométrie de masse

Le spectre de masse en source FAB-MS en mode négatif du composé 6 révèle un ion pseudomoléculaire à m/z 889 $[M-H]^-$ (fig.97), ce qui suggère une masse moléculaire de 890 *uma* et la formule chimique suivante $C_{42}H_{66}O_{18}S$. D'autres pics des ions fragments ont été observés à m/z 727 $[M-H-162]^-$, à m/z 647 $[M-H-162-80]^-$, m/z 485 à m/z $[(M-H)-162-80-162]^-$ correspondant à la perte de deux hexoses et d'un groupement sulfaté, un cas déjà rencontré dans les composés 1 et 5. Le pic observé à m/z 485 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone (fig.95, tab.38), notamment l'acide quinovique (Dietrich et al., 2014).



•Figure N°95: Spectre de masse en source FAB-MS en mode négatif du composé 6.

Par comparaison avec le spectre du composé 4, l'apparition d'un fragment de 80 *uma*, ce qui correspond à la présence d'un groupement sulfaté supplémentaire sur un carbone d'un sucre.

Tableau N°38. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie aglycone du composé **6**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Position	Composé 6	
	δ (H)	δ (C)
CH ₂ (1)	0.81 nd	38.8
CH ₂ (2)	1.74 et 2.11 m	26.1
H- C(3)	3.12 m	89.4
C (4)	-	39.1
H- C(5)	0.83 m	55.2
CH ₂ (6)	1.38 m; nd	18.0
CH ₂ (7)	1.64 m, 1.81 m	37.1
C (8)	-	39.7
H- C(9)	2.62 m	46.6
C (10)	-	36.6
CH ₂ (11)	1.90, nd	23.1
H- C(12)	5.85 brs	128.6
C (13)	-	135.4
C (14)	-	56.8
CH ₂ (15)	2.24 m, 2.50	25.3
CH ₂ (16)	2.25 m, 2.56 m	25.0
C (17)	-	48.8
H- C(18)	2.56 m	54.4
H- C(19)	1.66 m	36.2
H- C(20)	0.80 m	38.8
CH ₂ (21)	1.17, nd	29.9
CH ₂ (22)	1.34 m, nd	37.1
Me (23)	1.22 (s)	27.8
Me (24)	1.03 (s)	16.8
Me (25)	0.72 (s)	16.1
Me (26)	1.06 (s)	18.8
COOH (27)	-	179.9
CO-O- (28)	-	176.7
Me (29)	1.12 (d, $J=5.72$)	17.9
Me (30)	0.71 (d, $J=6.0$)	20.8

II.2.6.2. Spectrométrie de RMN

II.2.6.2.1. Partie osidique

*.Détermination du nombre et de la nature des sucres

L'étude du spectre de RMN ^1H permet de distinguer dans la zone des sucres deux signaux attribuables aux protons anomériques résonnant sous formes de doublets à δ_{H} 4,73 ppm (d, $J=7,62$) et à δ_{H} 6,12 ppm (d, $J= 7,86$). Ces protons corrélient sur le spectre HSQC (fig.96), avec deux carbones anomériques résonnant à δ_{H} 103,6 ppm et à δ_{H} 95,3 ppm respectivement.

L'analyse des spectres de RMN 1D et 2D a montré que les signaux de RMN du composé **6** sont superposables à ceux du composé **2** à l'exception d'un β -glucopyranosyle supplémentaire dans le composé **6** (fig.96 et 97 ; tab.39). La corrélation observée entre le proton à δ_H 6.12 ppm H1-Glc II et le carbone à δ_C 176.7 ppm C28- Agly, montre que le glucopyranosyle est sur la génine en C-28.

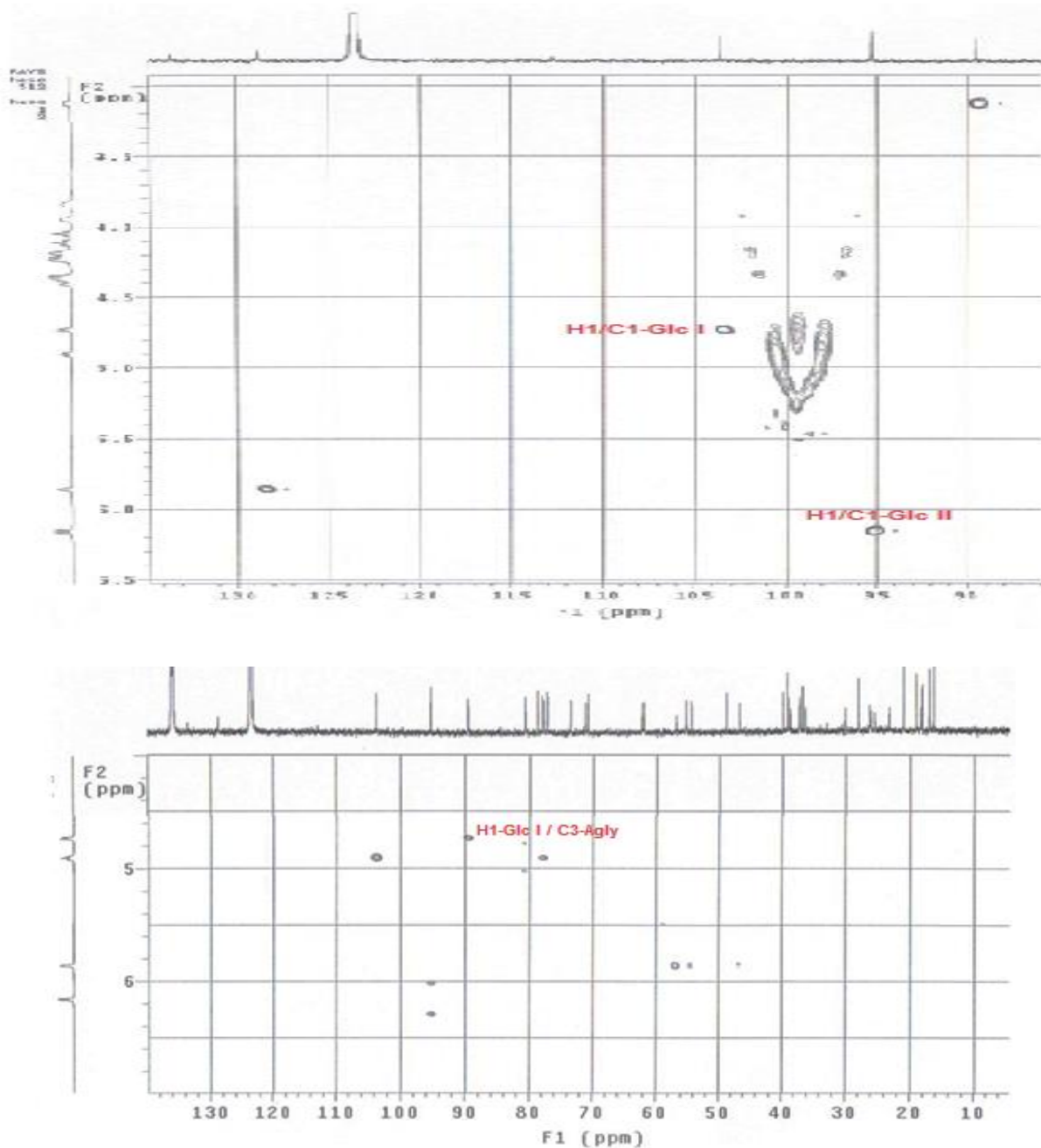


Figure N°96: Spectres HSQC du composé **6** (zone des anomères et du point de fixation du sucre sur l'aglycone).

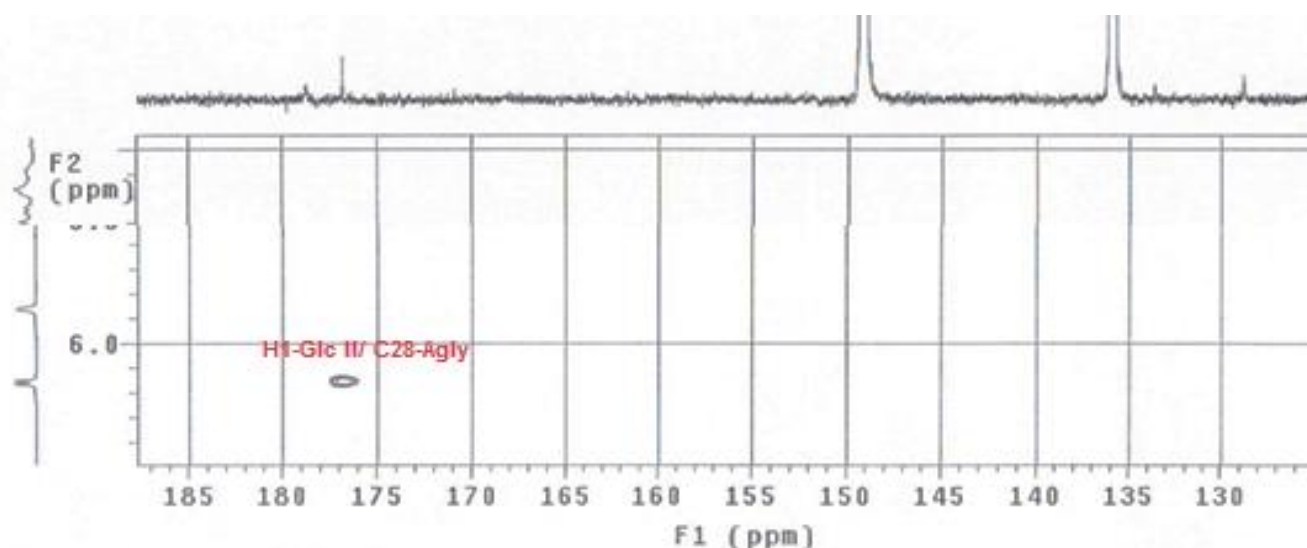


Figure N°97: Spectres HMBC révélant le point de fixation de la chaîne osidique sur l'aglycone du composé **6**.

Tableau N°39. Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans le $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ de la partie osidique du composé **6** des expériences RMN -1D et - 2D. (δ in ppm, J in Hz).

Position	δ (H)	δ (C)	Position	δ (H)	δ (C)
3-O-β-D-Glucopyranosyl			28-O-β-D-Glucopyranosyl		
H-C1	4.73 (<i>d</i> , $J=7.62$)	103.6	H-C1	6.12 (<i>d</i> , $J= 7.86$)	95.3
H-C2	4.90 (<i>dd</i> , 8.10 ; 8.58)	80.6	H-C2	4.11 (<i>dd</i> , 8.10, 8.85)	73.5
H-C3	4.36	77.7	H-C3	4.22 (<i>t</i> , $J=8,57$)	78.0
H-C4	4.05 (<i>dd</i> , 8.57 ; 9.05)	71.1	H-C4	4.20 (<i>t</i> , $J= 9.05$)	70.7
H-C5	3.84 (<i>m</i>)	77.1	H-C5	3.94 (<i>m</i>)	78.6
CH₂-6	4.17 et 4.40 (<i>ld</i> , $J= 11.91$)	62.1	CH₂-6	4.24 et 4,35 (<i>ld</i> , $J= 11.67$)	61.6

*Identification du composé **6**

Au vu de ce qui précède le composé **6** est identifié comme étant un **bidesmoside**, constitué d'un 2-*O*-sulfoglucose et d'un glucose avec la formule suivante : 3-*O*-(2-*O*-sulfonyle- β -D-glucopyranosyle) acide quinovique-28-(*O*- β -D-glucopyranosyle) ester (fig.98), (Pöllmann et al., 1997 ; Safir et al., 1998 ; Bencharif-Betina et al., 2013). un composé naturel dénommé, **zygophyloside G**, isolé des parties aériennes des espèces *Z. propinquum*, *Z. coccineum*, *Z. album*, *Z. dumosum* et *Z. geslini* .

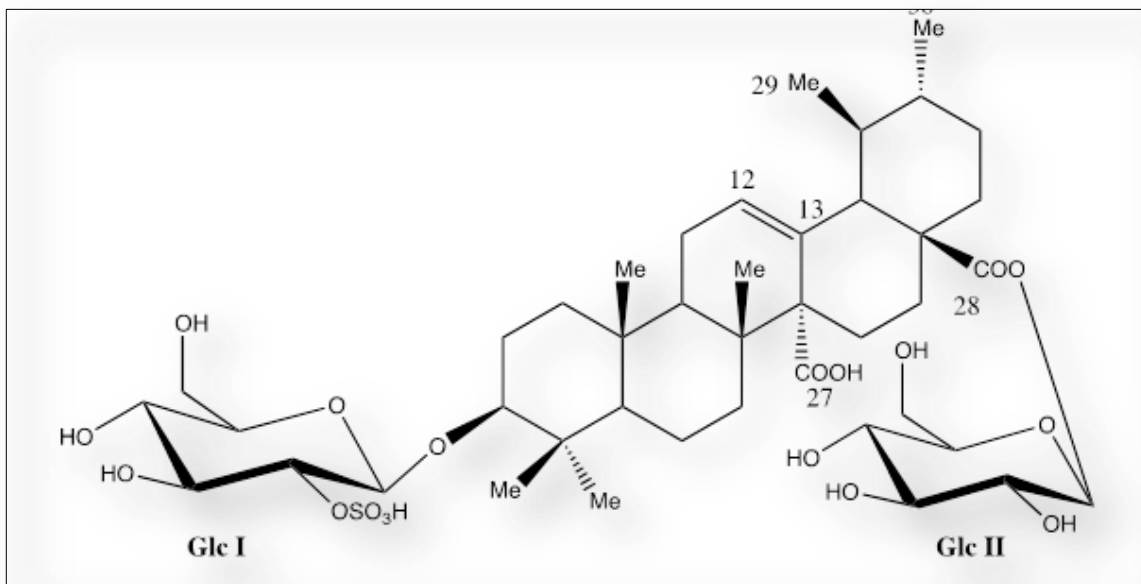


Figure N°98: Structure du composé **6** zygophyloside **G** (Pöllmann et al., 1997 ; Safir et al., 1998; Bencharif-Betina et al., 2013).

II.2.7. Identification du composé 7

II.2.7.1. Spectrométrie de masse

L'analyse du spectre de masse en source FAB (mode négatif) permet d'observer le pic de l'ion quasi-moléculaire à m/z 925 $[M-H]^-$ (fig.99), suggérant une masse de 926 *u.m.a*, en accord avec la formule brute $C_{47}H_{74}O_{18}$.

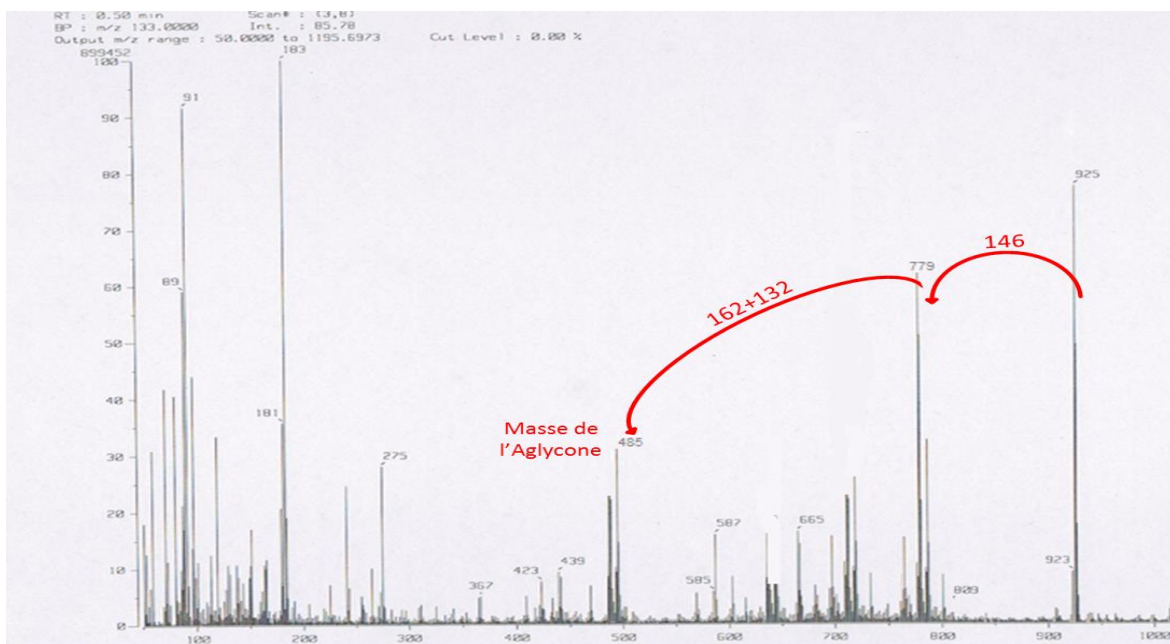


Figure N°99: Spectre de masse en source FAB-MS en mode négatif du composé **7**.

D'autres pics des ions fragments ont été observés à m/z 727 $[M-H-146]^-$, et à m/z 485 $[M-H-146-132-162]^-$, correspondant à la perte successive d'un déoxyhexose, d'un pentose et d'un hexose (fig.99). Le pic observé à m/z 485 correspondant au pic de l'ion pseudo-moléculaire de l'aglycone, l'acide quinovique (fig.99, tab.40) (Dall'Acqua et al., 2010; Dietrich et al., 2014).

Tableau N°40. Déplacements chimiques en RMN 1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie aglycone du composé **7**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D.

(δ en ppm, J en Hz) C_5D_5N .

Position	Composé 7	
	δ (H)	δ (C)
CH ₂ (1)	1,07 et 1,079	38.9
CH ₂ (2)	2.12 m, nd	26.1
H- C(3)	3.08 (d, $J=7.85$)	88.4
C (4)	-	39.7
H- C(5)	0.87 m	55.4
CH ₂ (6)	1.30	18.1
CH ₂ (7)	1.62 et 1.79	37.0
C (8)	-	38.8
H- C(9)	2.72	46.7
C (10)	-	36.7
CH ₂ (11)	0.89 m	23.2
H- C(12)	5.89 (br s)	128.2
C (13)	-	134.0
C (14)	-	57.2
CH ₂ (15)	2.28 m, nd	25.0
CH ₂ (16)	2.52 m et 2.72	25,5
C (17)	-	46.7
H- C(18)	2.58 m	54.6
H- C(19)	1.82 m	36.3
H- C(20)	0.79 m	39.1
CH ₂ (21)	1.20 m, nd	30.4
CH ₂ (22)	1.66 m, nd	36.0
Me (23)	1.05 (s)	27.1
Me (24)	0.96 (s)	16.3
Me (25)	0.85(s)	16.3
Me (26)	1.14 (s)	18.0
COOH (27)	-	178.0
CO-O- (28)	-	176.8
Me (29)	1.15 (d, $J=6.00$)	18.0
Me (30)	0.72 (d, $J=5.76$)	20.9

II.2.7.2. Spectrométrie de RMN

II.2.7.2.1. Partie osidique

*.Détermination du nombre et de la nature des sucres

Sur le spectre HSQC (fig.100), dans la zone des protons anomériques on retrouve des signaux attribuables aux protons anomériques à (δ_H 4.58 (d, $J= 7.38$ Hz) / δ_C 104.3), à δ_H 6.20 (d, $J= 8.09$ Hz) / δ_C 95.2 et à δ_H 5.04 ppm/ δ_C 106.0 ppm (d, $J= 6.43$ Hz) un signal supplémentaire comparativement au spectre du composé **3**.

L'évaluation des constantes de couplages spin-spin et des déplacements chimiques ont permis de caractériser :

-à δ_H 4.58 (d, $J= 7.38$ Hz) / δ_C 104.3), un β -D-quinovopyranosyle,

-à δ_H 6.20 (d, $J= 8.09$ Hz) / δ_C 95.2 un β -D-glucopyranosyl

-à δ_H 5.04 (d, $J= 6.43$ Hz) / δ_C 106.0 un α -L-arabinopyranosyl (tab.41).

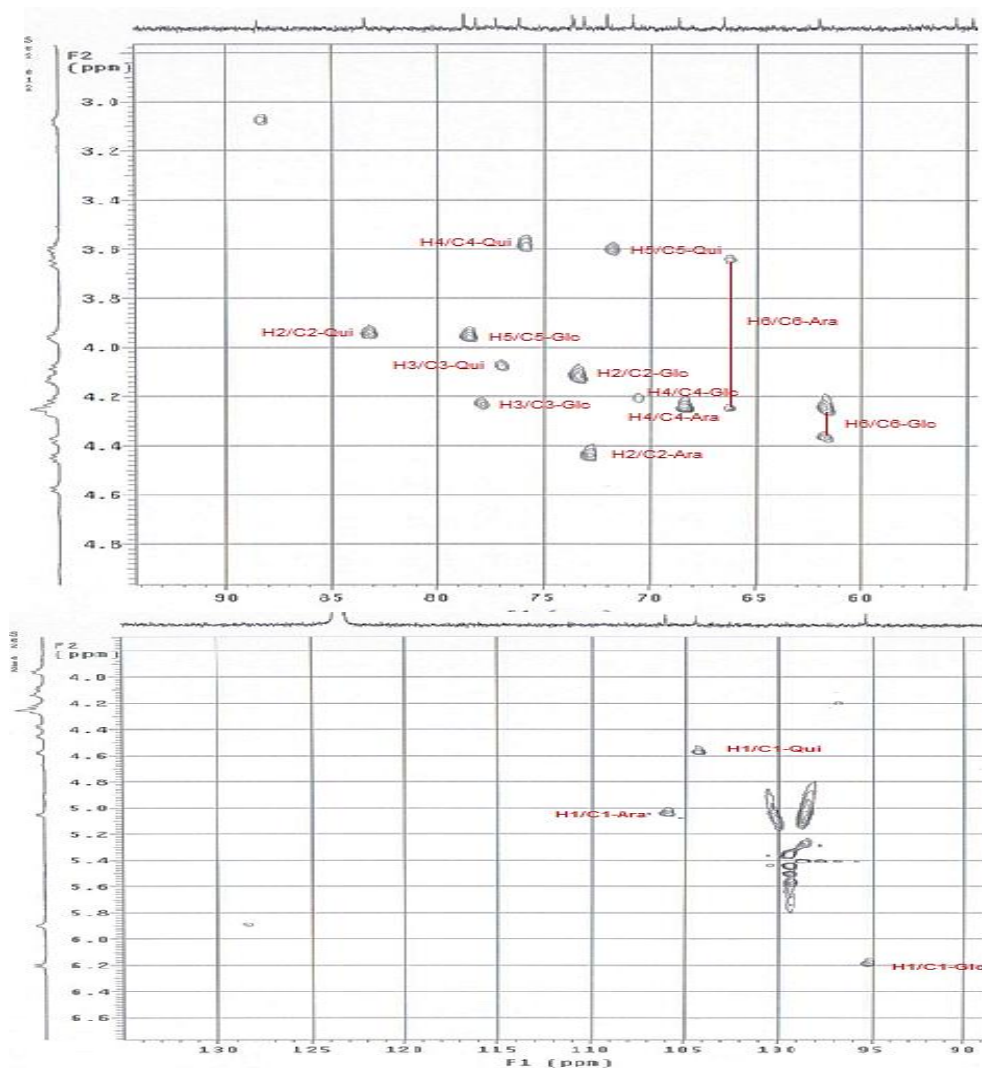


Figure N°100 Spectre HSQC du composé **7** (zone des anomères et des alcools secondaires des sucres).

Tableau N°41 Déplacements chimiques en RMN ^1H (600 MHz) et RMN- ^{13}C (150 MHz), dans la partie oligosaccharidique du composé **7**, relevés d'après les expériences RMN -1D et -2D. (δ en ppm, J en Hz) $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Position	δ (H)	δ (C)	Position	δ (H)	δ (C)
3-O- β-D-Quinovopyranosyle			28-O-β-D-Glucopyranosyle		
H-C(1)	4.58 (d, $J=7.38$)	104.3	H-C(1)	6.20 (d, $J= 8.09$)	95.2
H-C(2)	3.95	83.4	H-C(2)	4.10 (m)	73.5
H-C(3)	4.07	77.2	H-C(3)	4.22	78.1
H-C(4)	3,58	76.1	H-C(4)	4.20	70.8
H-C(5)	3.61 (m)	72.0	H-C(5)	3.95 (m)	78.7
CH_3 (6)	1.52 (d, $J= 6.00$)	18.2	CH_2 -(6)	4.25 et 4.38 (ld, $J =10.0$)	61.9
2-O- α-D-Arabinopyranosyle					
H-C(1)	5.04 (d, $J=7,38$)	106.0			
H-C(2)	4.45	72.5			
H-C(3)	4.11	73.5			
H-C(4)	4,26	68.6			
CH_2 -(5)	3.66 (ld, $J =9.29$) et 4.25	66.5			

Les corrélations relevées sur le spectre HMBC suggèrent les points de fixation des sucres sur l'aglycone et l'enchaînement de la chaîne osidique (fig.101, 102), elles sont les suivantes :

- à δ_{H} 4.58 (d, $J= 7.38$ Hz) H1-Qui / δ_{C} 89.9 C3-agly,
- à δ_{H} 6.20 (d, $J= 8.09$ Hz) H1-Glc / δ_{C} 178.0 C28-Agly,
- à δ_{H} 5.04 (d, $J= 6.43$ Hz) H1-Ara / δ_{C} 83.4 H2-Qui.

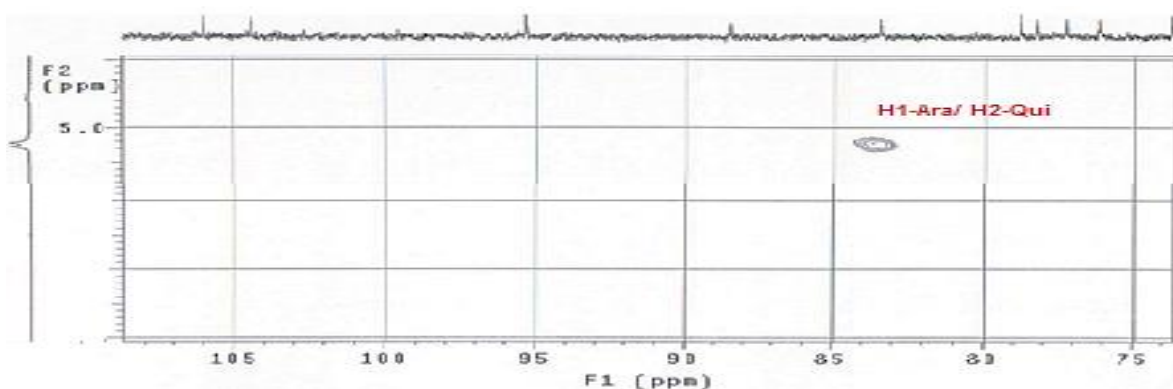


Figure N°101: Spectre HMBC du composé **7**.

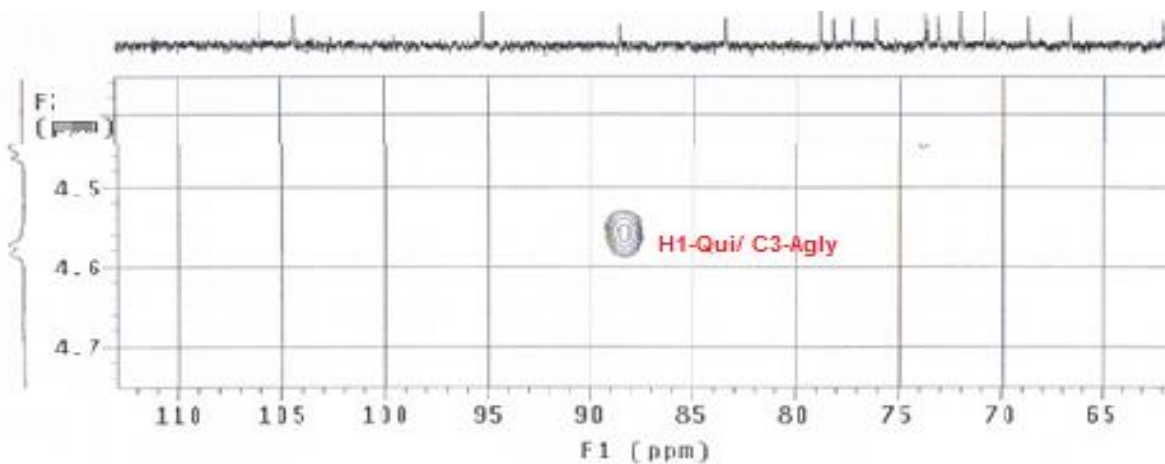
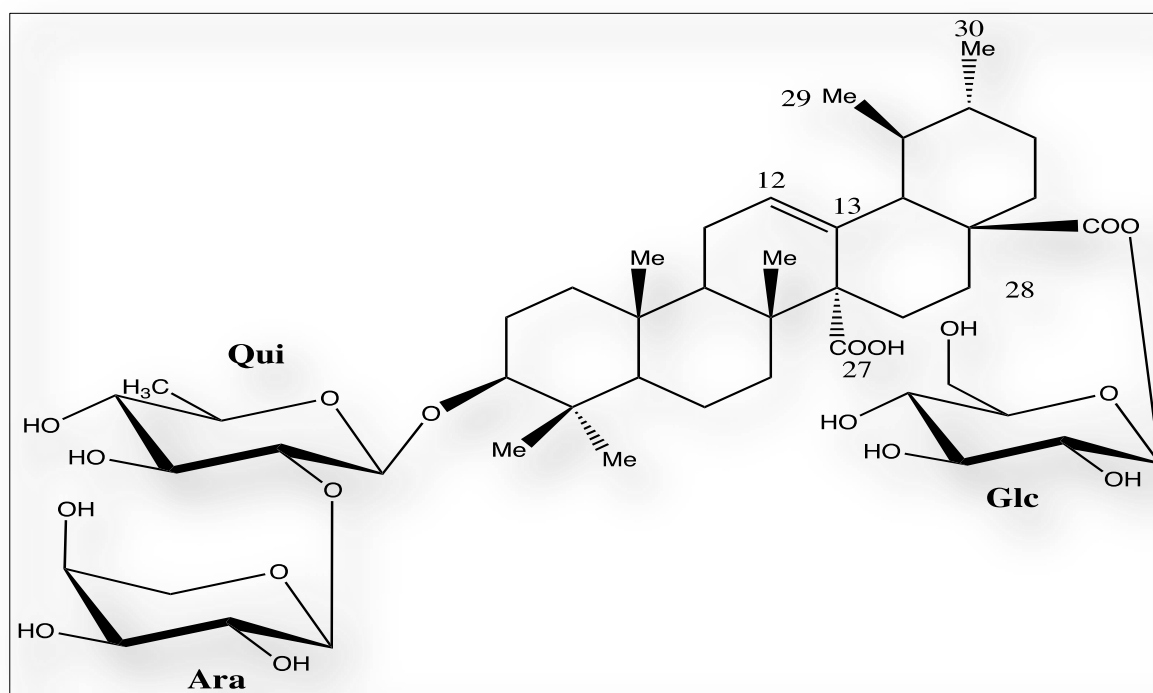


Figure N°102: Spectre HMBC du composé 7.

***.Identification du composé 7**

Au terme de cette analyse, le saponoside du composé **7** est reconnu comme étant un **bidesmoside**, 3-*O*-(α -L-arabinopyranosyle-(1 \rightarrow 2)- β -D-quinovopyranosyle) quinovique acide-28-(*O*- β -D-glucopyranosyle) ester.(fig.103). Un composé naturel dénommé **zygophyloside H**, un saponoside précédemment isolé des parties aériennes des espèces *Zygophyllum geslini*, *Zygophyllum fabago*, *Zygophyllum eurypterum* (fig.103) (Pöllmann et al.,1997 ;Smati et al., 2007; Ahmad V.U.et al., 2007 ; Bencharif-Betina et al., 2013).



FigureN°103 Structure du composé 7 (Smati et al., 2007; Ahmad V.U.et al., 2007 (Pöllmann et al., 1997; Bencharif-Betina et al., 2013).

*Conclusion 2

A l'issue de ces analyses, les saponosides isolés à partir des parties aériennes de l'espèce *Zygophyllum cornutum* Coss., sont au nombre de sept (fig.104), ils ont été identifiés comme étant:

- Composé **1**, monodesmoside avec la formule chimique: 3-O-(2-O-sulfonyl- β -D-quinovopyranosyl) acide quinovique (Attia, 1999; Ahmad VU et al., 1990; Bencharif-Betina et al.,2013).
- Composé **2**, monodesmoside correspondant à la formule chimique: 3-O-(2-O-sulfo- β -D-glucopyranosyle) acide quinovique (Smati et al., 2007; Ahmad V.U.et al., 2007; Iqbal et al., 2011; Bencharif-Betina et al.2013.).
- Composé **3**, bidesmoside avec le formule structurale : 3-O-(β -D- quinovopyranosyl) acide quinovique-28-(O- β -D-glucopyranosyle) ester (3), (Smati et al., 2007; Ahmad V.U.et al., 2007; Iqbal et al., 2011 ; Hassanean et al., 1993; Aquino et al., 1989; Bencharif-Betina et al.2013).
- Composé **4**, le zygophyloside E, un bidesmoside avec la formule chimique: 3-(O- β -D-glucopyranosyle) acide quinovique-28-(O- β -D-glucopyranosyle) ester, (Smati et al., 2007 ; Ahmad VU et al., 2007; Iqbal et al.,2011 ; Ahmad V.U. et al.,1993 ; Safir et al., 1998, Bencharif-Betina et al.,2013).
- Composé **5**, un bidesmoside qui s'écrit de la façon suivante : 3-O-(β -D-2-O-sulfo-quinovopyranosyle) acide quinovique-28-(O- β -D-glucopyranosyle) ester, (Safir et al., 1998 ; Matos et al., 1986, Bencharif-Betina et al.2013).
- Composé **6**, le zygophyloside G, un bidesmoside avec la formule chimique : 3-O-(2-O-sulfonyl- β -D-glucopyranosyle) acide quinovique-28-(O- β -D-glucopyranosyle) ester; (Pöllmann et al., 1997 ; Safir et al., 1998, Bencharif-Betina et al.2013).
- Composé **7**, le zygophyloside H, un bidesmoside avec la formule chimique : 3-O-(α -L-arabinopyranosyle-(1 \rightarrow 2)- β -D-quinovopyranosyle) quinovique acide-28-(O- β -D-glucopyranosyle) ester, (Pöllmann et al. 1997 ; Smati et al., 2007; Ahmad V.U. et al., 2007 ; Bencharif-Betina et al.2013).

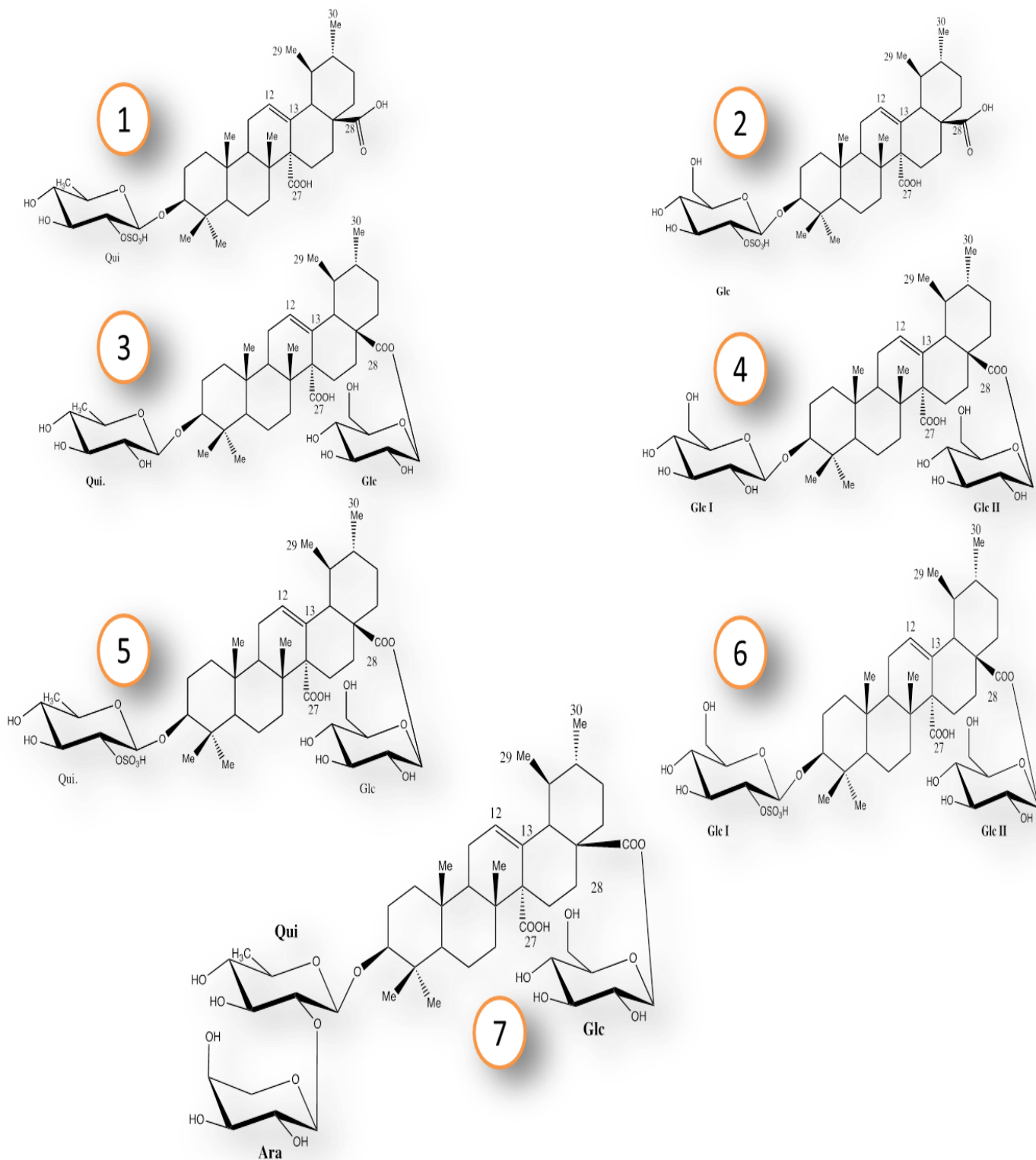


Figure N°104: Structures des sept composés (1-7), isolés à partir des parties aériennes de l'espèce *Zygophyllum cornutum* Coss. (Bencharif-Betina et al., 2013).

PARTIE III: TRAVAUX PERSONNELS PHARMACOLOGIQUES

CHAPITRE I : MATERIEL ET METHODES

I.1.Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de deux fractions saponosidiques issues respectivement des espèces *Cyclamen africanum* et *Zygophyllum cornutum*

L'étude de l'activité anti-inflammatoire des fractions saponosidiques (**Fr.1** et **Fr.2**) des deux espèces *Cyclamen africanum* et *Zygophyllum cornutum* a été réalisée au laboratoire des sciences de la nature et de la vie de l'Université de Jijel.

I.1.1.Matériel végétal

Les fractions utilisées pour cette partie sont :

1-/ La fraction issue des produits de la VLC (Partie phytochimie); contenant exclusivement le groupe de saponosides présents dans la plante *Cyclamen africanum* Boiss & Reuter, représenté par **Fr.1** (schéma N°6).

2-/ Les fractions issues des produit de la VLC (Partie phytochimie), contiennent le groupe de saponosides de la plante *Zygophyllum cornutum* Coss. , représentant **Fr.2** (schéma N°6).

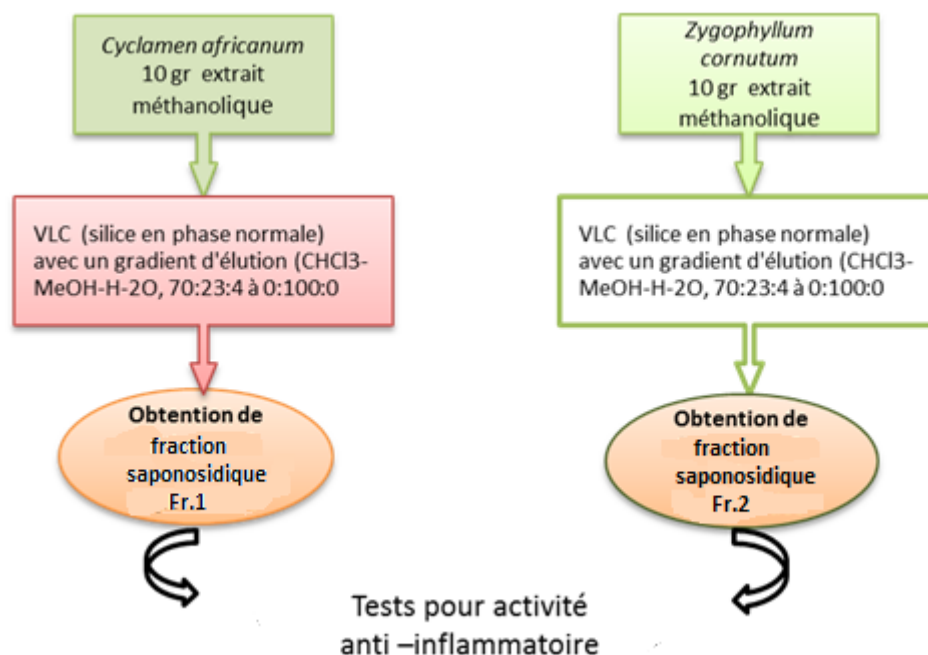


Schéma N°6 : Les fractions saponosidiques **Fr.1** et **Fr.2**, testées pour l'activité anti-inflammatoire.

*Préparation des fractions:

Sous forme de lyophilisat, les frctions ont été dissoutes dans l'eau distillée pour réalisé des solutions à 5 mg /ml et à 20 mg /ml pour le **Fr.1** et à 20 mg /ml pour la **Fr.2**.

I.1.2.Animaux

Des rats albinos, mâles et femelles, de la race Winstar (180-220 g) ont été utilisés dans cette expérience, ils proviennent de l'institut Pasteur Alger (Algérie). Les animaux ont été logés dans des cages standard (48 cm x 35 cm x 22 cm) avec de la nourriture et l'eau, à la température de la pièce (20 ± 2 OC) avec la lumière naturelle au sein de l'animalerie de l'Université de JIJEL (Algérie).

I.1.3.Produits chimiques

Les médicaments suivants ont été utilisés Lambda-carraghénine à 1 % pour induire l'inflammation et Diclofenac Sandoz à 75 mg/ 3 ml, solution injectable : la solution injectable contient 75 mg diclofénac sodique par 3 ml., un anti-inflammatoire non stéroïdien, utilisé comme produit de référence (le témoin positif). Le produit est sous forme d'ampoule, il a été dilué à 1/10 avec de l'eau distillée soit 2.5 mg/ ml/ kg (posologie de 2 à 3 mg / Kg / jour).

I.1.4. Méthodes

I.1.4.1.Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

I.1.4.1.1.Protocole expérimental

Le Test d'inhibition de l'œdème de la patte des rats à la carraghénine par l'injection de deux solutions des fractions saponosidiques Fr .1 (de *Cyclamen africanum*.) à 5 mg et Fr.2 (de *Zygophyllum cornutum*) à 20 mg est pratiqué selon la méthode de (WINTER et al., 1962).

- Les rats ont été utilisés dans ces expériences, avec l'accès libre à l'eau au cours de la nuit (18h). Ils ont reçu une injection sous plantaire de 0.1 ml de suspension de 1% de carraghénine dans l'eau physiologique dans le tissu plantaire dans la patte postérieure, 100µl / patte droite. Un volume égal de l'eau physiologique a été injecté dans l'autre patte servant de contrôle (100 µl /patte gauche).

Les mesures des volumes de la patte postérieure droite de chaque rat ont été effectuées avant l'induction de l'œdème après 30 minutes et 3 heures après l'injection de la carraghénine.

Une heure après l'injection de la carraghénine, les différents lots des rats ont reçu, des injections intra-péritonéales (IP) de différents traitements :

- Le lot témoin négatif de 5 rats a reçu 0.1 ml de l'eau physiologique.
- le lot expérimental de 5 rats chacun a reçu de la fraction saponosidique Fr.1 de *Cyclamen africanum* à la dose 5 mg/kg.
- le lot expérimental de 5 rats chacun a reçu de la fraction saponosidique Fr.2 de *Zygophyllum cornutum* à la dose 20 mg/Kg.
- Le lot témoin positif de 5 rat ont reçu par injection intra-péritonéale le Diclofénac comme produit de référence à la dose de 5mg/kg.

Les pattes des animaux ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse avant et après traitement.

I.1.4.1.2. Calcul du pourcentage d'inhibition

*Pourcentage d'inhibition (%INH)

Pour chaque lot traité, nous avons calculé le pourcentage d'inhibition (%INH) de l'œdème des pattes traitées par rapport au lot témoin, en utilisant la formule suivante:

$$\%INH = \frac{\%AUG \text{ témoin} - \%AUG \text{ traité}}{\%AUG \text{ témoin}}$$

Ce % INH exprime le pouvoir d'inhibition de l'œdème par une substance, donc l'activité anti-inflammatoire de cette substance.

Le pourcentage d'augmentation du volume de la patte (% AUG) enflammée pour chaque rat est donné par la formule suivante:

AUG : Pourcentage d'augmentation de la patte.

V₀ : Volume initial de la patte avant de provoquer l'œdème (sans traitement)

V_t : Volume de la patte après l'injection de carraghénine et traitement.

L'activité anti-inflammatoire est exprimée en variation de volume (V_t - V₀) ± DS (déviatiion standard) et en pourcentage d'inhibition de l'œdème pour chaque groupe traité par l'eau physiologique, les extraits et le Diclofénac.

Les moyennes des groupes traités par les fractions **Fr.1**, **Fr.2** et le Diclofénac (T.posi.) ont été comparées avec celles du groupe témoin traité par l'eau physiologique. Le calcul du pourcentage d'inhibition de l'inflammation est donné par la formule suivante :

% d'inhibition = 100 [(% moyen d'augmentation du volume de la patte du lot témoin (V₀)) - % moyen d'augmentation du volume de la patte du lot traité) V_t / % moyen d'augmentation du volume de la patte du lot témoin (V₀)].

$$\%AUG = \frac{V_0 - V_t}{V_0} \times 100$$

I.1.4.1.3. Prélèvement sanguin

Des prélèvements au niveau de la veine oculaire sont pratiqués sur les rats, pour tous les lots (témoins négatifs, témoins positif, extrait N°1 et extrait N°2) avant et après traitement afin de suivre l'inflammation et l'effet anti-inflammatoire à travers les changements des

paramètres sanguins (bilan biologique), causés par les fractions **Fr.1 et Fr.2** testées et l'anti-inflammatoire de référence (Diclofénac).

Une série de prélèvements sanguins est effectuée, sur différents types de tubes selon la cinétique des différentes protéines sériques de l'inflammation. (Tableau N°42).

Tableau N°42 d'examens effectués selon la cinétique des protéines de l'inflammation (pré- et post-traitement)

Type de tube	Examen effectué	Temps de prélèvement après traitement
anticoagulant EDTA	CRP	24 heures
	2l'électrophorèse protéines sériques	des 3 jours
Sec	Haptoglobuline	15 jours
Citraté	Fibrinogène	3 jours (72 heure)
		13 jours

I.1.4.1.4. Dosages des protéines de la réaction inflammatoire (PRI), la Protéine C-Reactive (CRP), Fibrinogène, Haptoglobine

Les différents dosages des PRI, se font sur automates (BRIEFFMAN model 5.2.014 et 20.5695/ KZ 196...), au laboratoire privé IBN SINA Constantine et au laboratoire privé de JIJEL . 1 ml du sérum est introduit dans l'automate et après un traitement spécifique les résultats sont obtenus sur support papier.

I.1.5. Traitement des résultats et analyses statistiques

Les données sont présentées comme moyenne \pm S EM. Les analyses ont été traitées grâce au logiciel "XL stat" et "excel 2010". Toutes les données étaient normalement distribuées. Des comparaisons multiples dans des groupes ont été exécutées par des mesures répétées ANOVA, suivi par le post-test de Tukey. La signification statistique a été acceptée à $p < 0,05$.

CHAPITRE II: RESULTATS ET DISCUSSIONS

II.1.Evaluation de l'activité anti-inflammatoire

II.1.1.Evaluation de la toxicité aiguë

Dans l'objectif de définir le seuil infratoxique et l'intervalle d'efficacité des fractions saponosidiques **Fr.1** et **Fr.2** (*Cyclamen africanum* et *Zygophyllum cornutum* respectivement), nous avons testé une seule dose par voie « i.p », à 20 mg/kg selon les travaux antérieurs réalisés sur les fractions saponosidiques (Gepdiremen et al., 2005). Ce test vise d'une part à rechercher la dose létale 100% d'autre part à observer le comportement général de l'animal : agitation, asthénie ; aspect des yeux « lacrymaux, à moitié fermés », ischémie (Dubost et al., 1994).

*Pour la fraction **Fr.1**:

-à la dose 20 mg, une mortalité de 100% est obtenue au bout de 30 minutes, après l'injection de la fraction. Pendant cette durée de temps une asthénie sur tous les rats du lot est observée, avec une bradycardie. La mort est survenue au bout de 30 minutes (Fig.105).



Figure N°105: Aspect général des rats après injection de la **Fr 1**. (fraction saponosidique de *Cyclamen africanum*) .

-à la dose 5 mg/kg, aucune modification du comportement général n'est observée, sauf au niveau de l'aspect (fig.106), une ischémie des extrémités des oreilles et de la queue est apparue au bout de 60 minutes après l'injection (fig.106).

*Pour la fraction **Fr.2** :

À la dose 20 mg/kg, aucune modification du comportement général n'est observée, sauf au niveau de l'aspect (fig.106), une ischémie des extrémités des oreilles et de la queue est apparue au bout de 60 minutes après l'injection, c'est la situation que subissent des tissus irrigués par une artère terminale où la circulation est interrompue par manœuvre expérimentale (prélèvement, clampage de l'artère).



Figure N 106 : Aspect Ischémique des extrémités des oreilles et de la queue.

Nb : les rat traités et non traités ont présentés les même symptômes.

II.1.2.Mesures de l'œdème de la patte

L'étude de l'activité anti-inflammatoire des différentes fractions saponosidiques **Fr.1** et **Fr.2** des deux espèces de plantes, est réalisée par la mesure du volume de l'œdème induit par la carragénine chez 4 lots de rats (témoins négatif, fraction 1, fraction 2, témoin positif /de référence) en absence et en présence d'un traitement anti-inflammatoire. Les résultats sont représentés sous forme d'histogrammes et de courbes mettant en valeur l'évolution du volume de l'œdème en fonction du temps (fig.107).

Une réduction significative du volume de la patte par rapport au lot témoin a été considérée comme effet anti-inflammatoire.

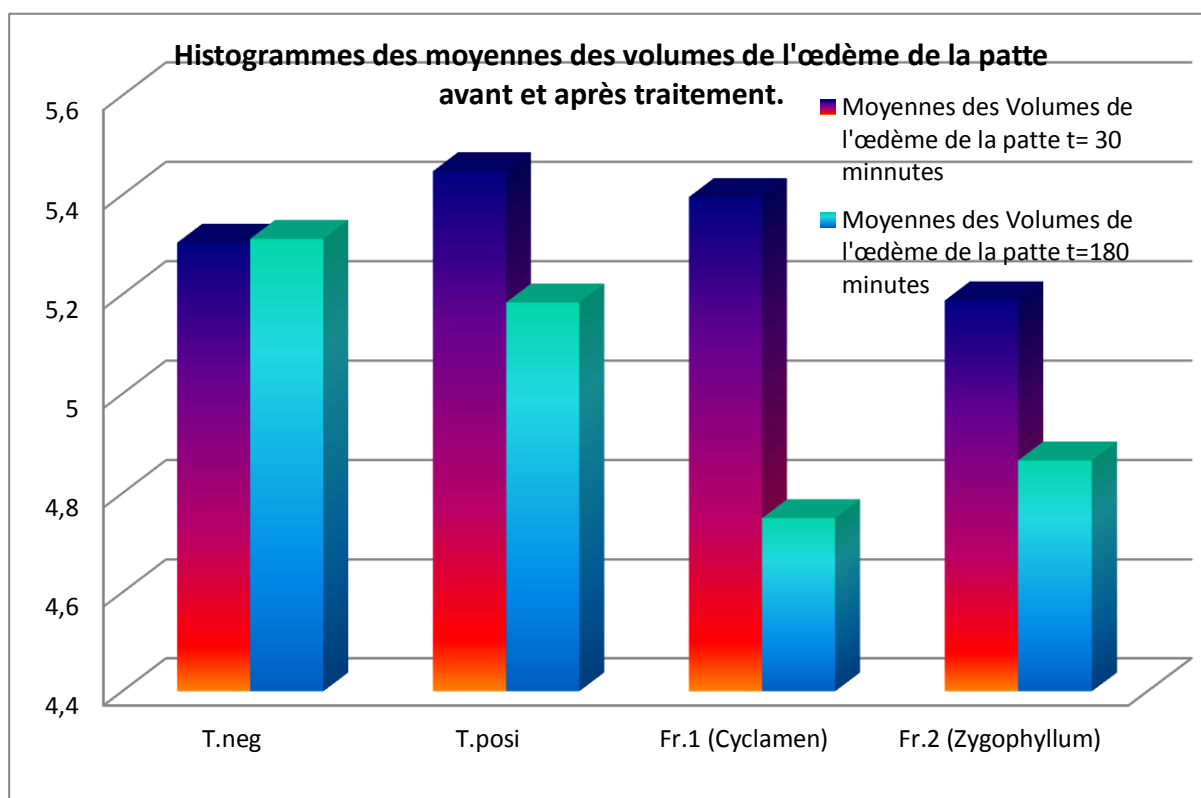


Figure N°107 : Histogrammes de comparaison entre les moyennes des volumes de l'œdème de la patte avant et après traitements.

L'évolution de l'œdème après une injection de la carragénine s'effectue selon une cinétique dépendante du temps et des volumes de la patte, elle se divise en deux phases : la première phase se situe entre 0h et 1h ; la deuxième phase se situe entre 1h et 3h. Des études antérieures ont indiqué que la troisième heure après administration de la carragénine représente son effet maximal (Park et al., 2009). L'injection provoque une inflammation visible dans la demi-heure qui suit le volume de l'œdème est de 5,302 mm, L'œdème augmente progressivement et atteint une intensité au bout de trois heures, le volume de l'œdème des lots témoins atteint 5.312 mm (fig.107 et 108). Administré préventivement, l'effet de la molécule de référence (DICLOFENAC) se traduit par une réduction de l'œdème de façon progressive. Le prétraitement des rats, par les fractions saponosidiques **Fr.1** et **Fr.2** à 5 mg/kg et à 20 mg /Kg respectivement entraîne un changement de l'évolution du volume de l'œdème.

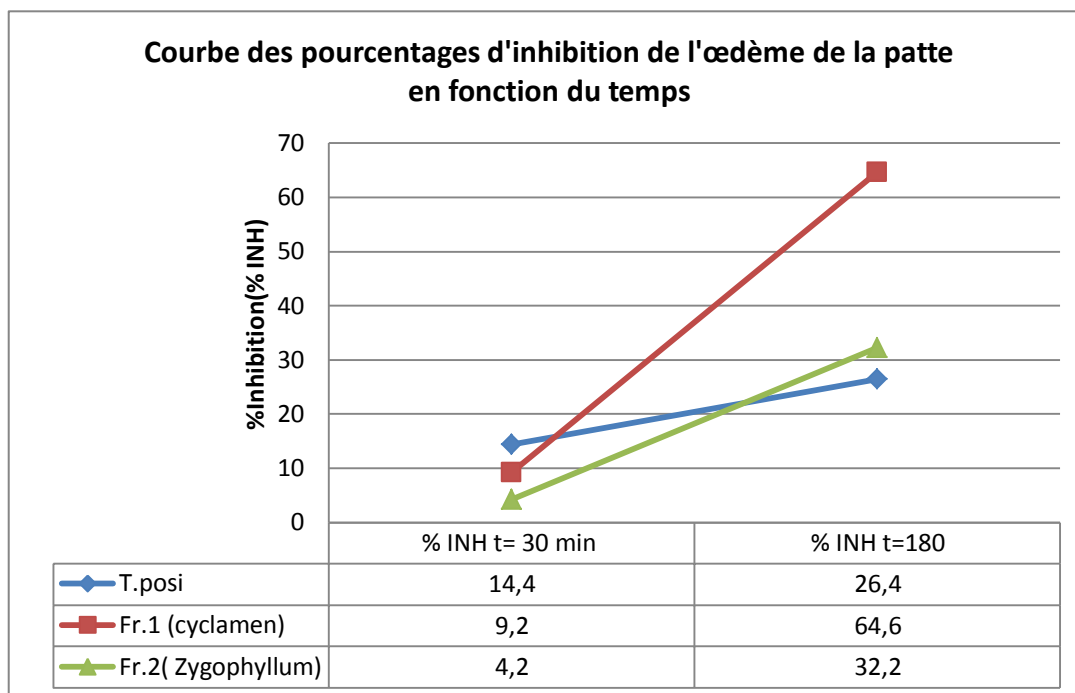


Figure N°108: Courbe des pourcentages d'inhibition de l'œdème de patte avant et après traitements.

L'essai le plus répandu pour évaluer l'activité d'un nouvel agent anti-inflammatoire est l'estimation de sa capacité à réduire l'œdème local induit dans la patte de rat par l'injection d'un agent irritant. Cet œdème dépend de la participation des kinines et des leucocytes nucléaires avec leurs facteurs pro-inflammatoires comprenant des prostaglandines (Damas et Remacle-Volon, 1986). Le développement de l'œdème dans la patte du rat après l'injection de carragénine a été décrit comme événement biphasique (Vinegar et al., 1969). La phase initiale, observée autour de la première heure, est attribuée à la libération de l'histamine et de la sérotonine (Crunkhorn et Meacock, 1972). La deuxième, phase de gonflement, est due à la libération des substances prostaglandin-like. On a signalé que la deuxième phase de l'œdème est sensible aux agents anti-inflammatoires stéroïdiens et non stéroïdiens (Vinegar et al., 1976 ; DiRosa et al., 1971) ce qui expliquerai l'effet du Diclofénac , le témoin de référence. Cet effet est du à l'inhibition de la cyclooxygénase (COX-2), qui représente le mécanisme action des AINS (Diclofénac) (Seibert et al. 1994). Les deux fractions ont montré une inhibition de l'inflammation similaire à l'activité du témoin de référence à 30 minutes et à 180 minutes.

La **Fr.1** s'est distinguée par son effet anti-inflammatoire prononcé, son pourcentage d'inhibition atteint 64.6 % à 3 heures du traitement, il est supérieur au pourcentage de la **Fr.2** (32.2 %) et du Diclofénac (26.4%) (fig.108).

II.1.3. Résultats des dosages des protéines de la réaction inflammatoire (PRI)

Il est bien connu que l'injection chez l'animal d'agents irritants, induit une importante réaction inflammatoire et conduit à un profil protéique plasmatique appelé « profil

protéique inflammatoire ». Chez le rat, il a été montré qu'après injection d'essence de térébenthine par voie sous-cutanée, le maximum de la concentration de trois protéines positives de la réponse inflammatoire (PRI+) (α_1 IGPA (orosomucoïde), α_2 M, Haptoglobine et Fibrinogène.) se situait à 40 h après l'injection. Le dosage immunochimique de ces mêmes protéines dans un extrait hépatique montre que leur maximum de concentration est observé 24 h après l'injection (Engler 1989).

Dans cette optique, les prélèvements réalisés dans ce travail, se sont basés essentiellement sur la cinétique et l'amplitude des variations de ces protéines (Kushner et al.,1982). Il s'agit de combiner les résultats du dosage de plusieurs PRI, comme le préconise Giraudet (Frot et al.1984), 8 huit protéines habituellement dosées dans l'exploration de l'inflammation, notamment la CRP, le fibrinogène, l'haptoglobine et Les immunoglobulines (protéines du profil électrophorétique).

L'évaluation de l'effet anti-inflammatoire des fraction **Fr.1** et **Fr.2**. testées se basera sur les réductions du taux de PRI.Toutes ces protéines plasmatiques varient d'au moins 25% dans les 3 à 7 jours qui suivent le début d'une inflammation traumatique ou endogène (Dubost et al. 1994).

II.1.3.1. Résultats du Dosage de la protéine C-réactive (CRP)

D'après les résultats obtenus (tab.43, fig.109) il semblerait que la valeur de la CRP ne soit pas affectée par l'agent phlogogène (Carragénine) dans les quatre lots de rats.

Tableau N°43: Résultats du dosage de la protéine C-réactive (CRP) à 3 jours des traitements.

.échantillon	Moyennes des CRP après 3 jours après traitement	norme en mg/l
T.neg	5,08 (\pm 0.2)	(4.00-6.00)
T.posi(Diclofénac)	3,125(\pm 0.2)	(4.00-6.00)
Fr. 1 (Cyclamen)	4,325(\pm 0.2)	(4.00-6.00)
Fr. 2 (Zygophyllum)	6,175(\pm 0.2)	(4.00-6.00)

Si on considère que la valeur normal d'une CRP est de l'ordre de 8 à 12 mg/l chez l'humain, elle est de moitié chez les rats c'est-à-dire entre 4-6 mg/l (Engler, 1989), ceci conduit à dire qu'aucune variation statistiquement significative n'est observée, même si la valeur de la CRP chez les rats traités par la **Fr.2** (zygophyllum) est légèrement augmentée (6.175 mg/l), elle sera admise dans l'erreur standard.

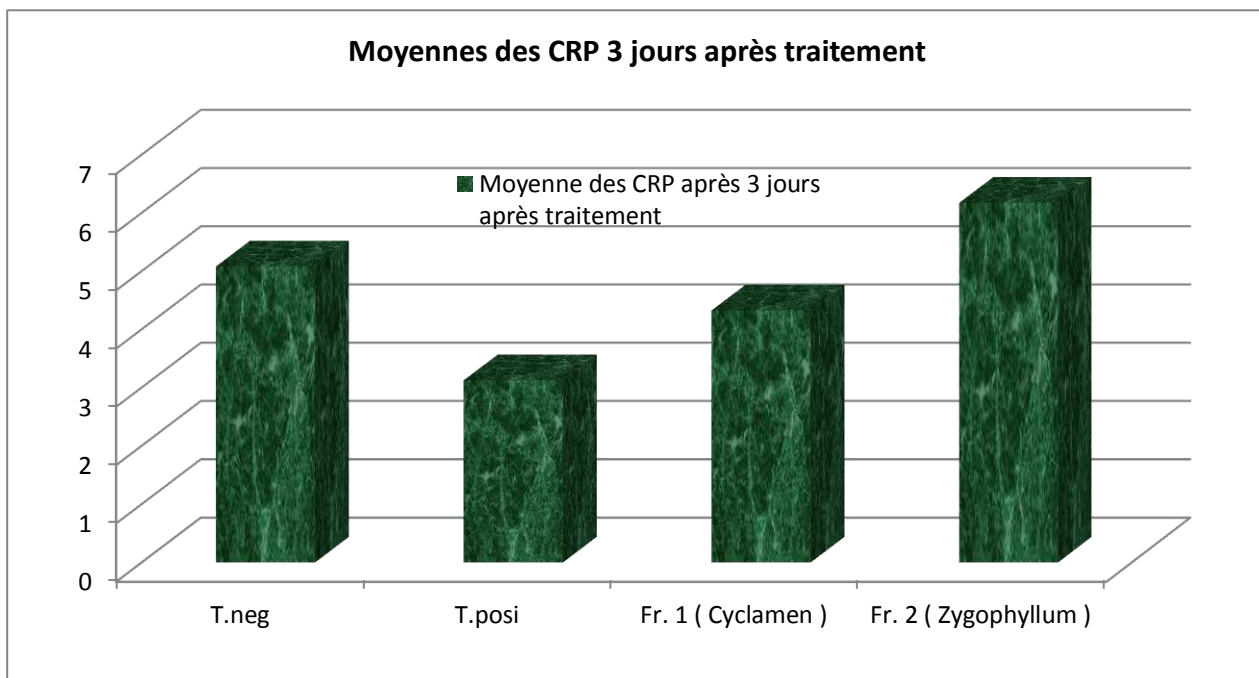


Figure N°109 : Histogrammes de comparaison des moyennes des dosages de la protéine C-réactive (CRP) à 3 jours des traitements.

Chez le lot de rats **T.posi** (Diclofénac), on observe une baisse relative de la concentration de la CRP, qui peut être attribuée à l'effet anti-inflammatoire du Diclofénac, il agirait sur l'action des enzymes Cyclo-oxygénase (COX-2) intervenant dans la biosynthèse hépatique de la CRP et réduisant le taux en dessous de sa valeur normale.

Ces résultats sont en accord avec les travaux menés par Engler, qui stipulent que les principales protéines de la réaction inflammatoire (PRI) chez le rat sont l' α_2 macroglobuline (α_2 M), le T kininogène (T- kin) et l' α_1 - glycoprotéine acide (α_1 .GPA (Orosomucoïde)) (Engler, 1989).

II.1.3.2.Résultats du Dosage du fibrinogène

D'après le résultats obtenus à partir de l'analyse par le test de Tukey et l'ANOVA (tab.44), il apparait clairement que la **Fr.1** (*cyclamen africanum*) à la dose 5 mg/Kg, a un effet sur le taux du fibrinogène.

Tableau N°44: Résultats du dosage du fibrinogène

temps après traitement	3 ^{ième} jour mg/l	13 ^{ième} jour mg/l	Normes en mg/l
T.neg	5,660	1,637	1.60-4.00
T.posi	2,600	1,650	1.60-4.00
Fr. 1 (Cyclamen)	2,065	2,055	1.60-4.00
Fr. 2 (Zygophyllum)	8,020	1,560	1.60-4.00

À partir du 3^{ème} jour le taux du fibrinogène dans le lot traité par la **Fr.1**, et le témoin de référence le Diclofénac (à la dose 2.5 mg/Kg), les concentrations sériques sont à 2.065 mg/l, le taux le plus bas et à 2.600 mg/l, respectivement (tab.44, fig.110).

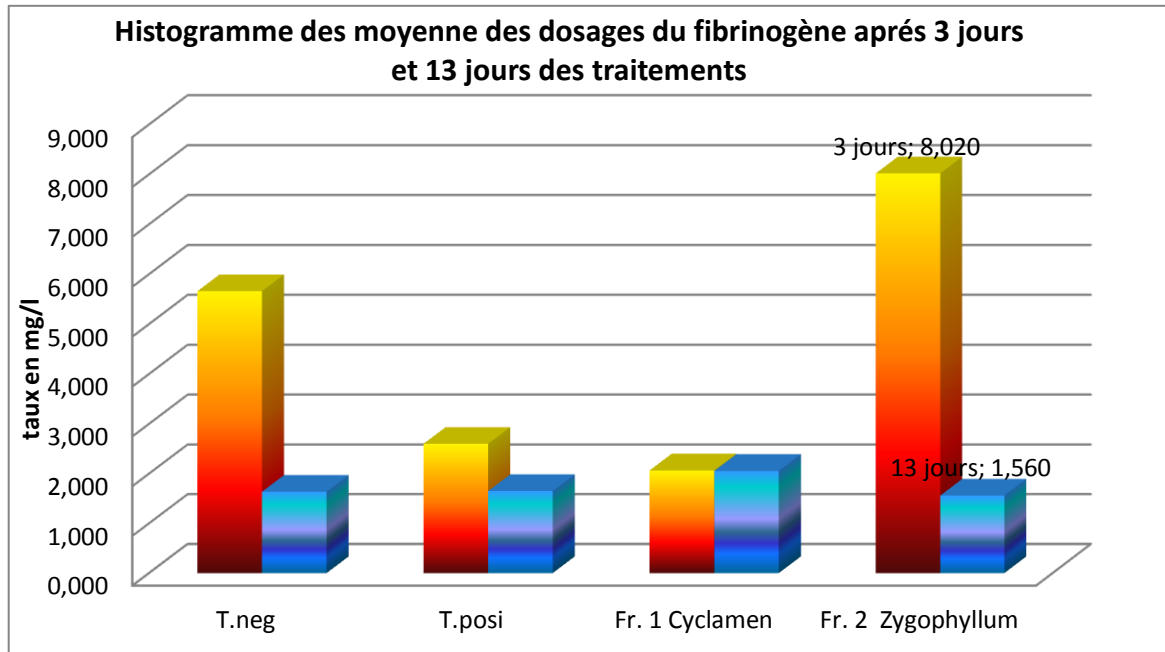


Figure N°110: Histogrammes de comparaison des dosages du fibrinogène après différents traitements à 3 jours et 13 jours.

L'effet précoce de la **Fr.1** sur le taux du fibrinogène à 3 jours du traitement, pourrait se traduire à travers une action régulatrice, par un blocus sur la synthèse de médiateurs de l'inflammation tels que l'oxyde nitrique (NO), le facteur- α de nécrose tumorale, ou de la prostaglandine E2 (PGE2). La **Fr.1** régule à la baisse l'expression de l'ARNm des gènes répondant : NO synthase inductible (iNOS), le facteur- α de nécrose tumorale, et la cyclo-oxygénase (COX-2), son mécanisme d'action, agirait sur l'expression induite des LPS-macrophages via les iNOS, des médiateurs pro-inflammatoires. (Wang et al., 2008). Par conséquent l'action de la **Fr.1** empêcherait la voie de synthèse du fibrinogène par les hépatocytes (NANTEL et al., 1999 ; (Posadas et al., 2003)

Des études antérieures ont montré que le mécanisme d'action des saponosides dans l'activité anti-inflammatoire peuvent être en inhibant l'activation du facteur nucléaire-kB (Nuclear factor KappaB), ainsi entraînant une diminution de l'expression de NF-kB une protéine régulatrice des enzymes telles que la synthétase de l'oxyde nitrique inductible de (iNOS) (Haridas et al., 2001; You et al., 2001).

L'effet de la **Fr.2** sur le taux du fibrinogène à 3 jours du traitement est représenté dans le tableau N°44, le taux à 8.020 mg/l est nettement supérieur à la norme (1.60-4.00 mg/l), ce

qui indique l'absence d'effet anti-inflammatoire, son effet est similaire au témoin négatif qui est de l'ordre de 5.660 mg/l.

A partir du 13^{ième} jours, la concentration sérique du fibrinogène dans tous les lots de rats traités et non traités tend à se normaliser (tab.44, fig.110) ce qui correspond à la stabilisation des médiateurs inflammatoires.

II.1.3.3.Résultats du Dosage de l'haptoglobine

En se basant sur les résultats des analyses statistiques (test Tukey, Anova), le taux d'haptoglobine à 0.184 g/l dans le lot traité par la **Fr.1** à la dose 5 mg/Kg, est statistiquement significatif, il est bas par rapport aux normes 0.2g/l -0.3g/l et au témoin de référence le Diclofénac (0.232 g/l). Cette baisse traduit un effet anti-inflammatoire remarquable et un mode d'action similaire à l'AINS de référence (tab.45, fig.111).

Tableau N°45: Résultats du dosage de l'Haptoglobine après 15 jours du traitement.

échantillon	Haptoglobine (norme 0.2-0.3-g/l) après 15 jours du traitement
T.neg	0,505
T.posi(Diclofénac)	0,232
Fr. 1 (Cyclamen)	0,184
Fr. 2 (Zygophyllum)	0,510

L'effet anti-inflammatoire de la **Fr.1** comme le Diclofénac est du à leur mode d'action qui passe par l'inhibition de la prostaglandine par stimulation de la COX-1 et inhibition de la COX-2(VERGNE et al., 2005), ou par l'inhibition de l'IL6 intervenant dans la réponse en stimulant la production hépatocytaire des protéines de la phase aiguë de l'inflammation: CRP, SAA, haptoglobine, C3, fibrinogène, α 1-antitrypsine, α 2-macroglobuline.

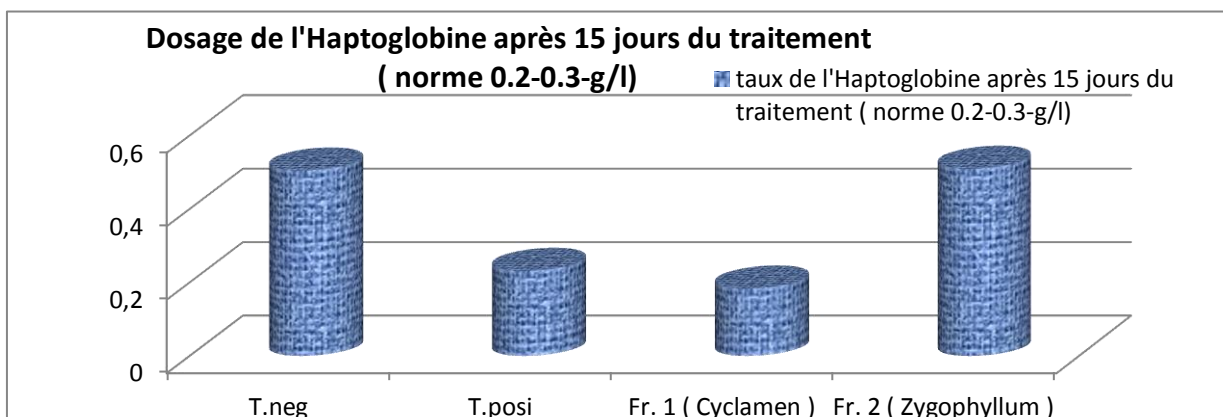


Figure N°111 : Histogrammes de comparaison, des dosages de l'haptoglobine Après 15 jours du traitement.

L'effet anti-inflammatoire de la **Fr.2** et du témoin négatif est pratiquement identique, leurs concentrations sont à 0. 510 g/l et à 0.505 g/l respectivement. Le taux de l'haptoglobine est supérieur à la norme, ce qui indique l'absence d'effet anti-inflammatoire.

II.1.3.4.Eléctrophrèses des protéines sériques (après 15 jours du traitement)

Au vu des résultats de l'analyse des variances, réalisée par le test TuKey et ANOVA, il apparait clairement qu'il n'existe pas de différences significatives entre les groupes : **T.neg**, **T.posi**, **Fr.1** et **Fr.2** (tab.46 et tab.47).

Cela signifie que les effets anti- inflammatoires attendus des fractions testées **Fr.1**, **Fr.2** et du témoin de référence "Diclofénac ", ne se traduisent plus par la variation des concentrations des protéines sériques. L'analyse indique que les quatre modalités testées et comparées entre elles appartiennent à un seul et même groupe A (tab.46).

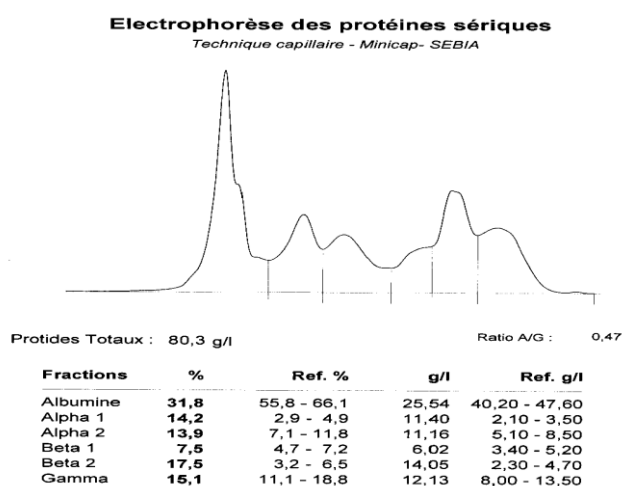
Tableau N° 46: Analyse des différents groupes de modalité.

Modalité	Moyenne estimée	Groupes
T.neg	37,600	A
T.posi	27,800	A
Fr. 1 (Cyclamen)	33,250	A
Fr. 2 (Zygophyllum)	19,750	A

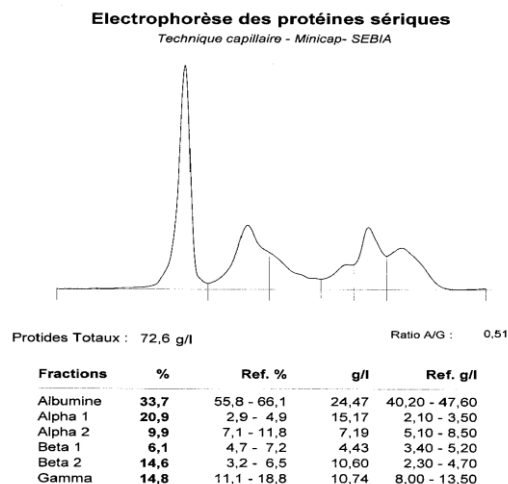
Cela peut être expliqué par le fait que, l'inflammation induite par l'agent phlogogène telle la carragénine sur le rat, n'affectent pas le groupes de protéines sériques dosées par l'électrophrèse, ou bien les paramètres de l'inflammation n'y sont plus et le bilan biologique tend à se normaliser (il n'est plus question d'inflammation).

Tableau N°47 : Analyse de variance des différences entre les modalités avec un intervalle de confiance à 95%.

Contraste	Différence	Différence standardisée	Valeur critique	Pr > Diff	Significatif
T.neg vs Fr. 2 (Zygophyllum)	17,850	1,618	3,149	0,512	Non
T.neg vs T.posi	9,800	0,888	3,149	0,896	Non
T.neg vs T.neg	6,100	0,535	3,149	0,982	Non
T.neg vs Fr. 1 (Cyclamen)	4,350	0,408	3,149	0,993	Non
Fr. 1 (Cyclamen) vs Fr. 2 (Zygophyllum)	13,500	2,120	3,149	0,269	Non
Fr. 1 (Cyclamen) vs T.posi	5,450	0,856	3,149	0,908	Non
Fr. 1 (Cyclamen) vs T.neg	1,750	0,251	3,149	0,999	Non
T.neg vs Fr. 2 (Zygophyllum)	11,750	1,559	3,149	0,546	Non
T.neg vs T.posi	3,700	0,491	3,149	0,987	Non
T.posi vs Fr. 2 (Zygophyllum)	8,050	1,154	3,149	0,776	Non
Valeur critique du d de Tukey :			4,453		



Fraction N°1 *Cyclamen*



Fraction N°2 *Zygophyllum*

Figure N°114 : échantillons de deux électrophèses des protéines sériques après 3 jours du traitement **Fr.1** et **Fr.2**.

***Conclusion 3**

Les fractions saponosidiques, **Fr.1** extraite de l'espèce *Cyclamen africanum* (Boiss. Et Reuter) et **Fr.2** extraite de *Zygophyllum cornutum* (Coss.), laissent voir un effet anti-inflammatoire, sur l'inflammation induite par la carraghénine chez le rat, elles réduisent l'œdème mais de manière très différente.

La dose létale de la **Fr.1** a été estimée à 20 mg/Kg. ; à la dose 5 mg/Kg, la fraction saponosidique a montré la plus forte activité anti-inflammatoire qui se prolonge dans le temps (15 jours après traitement), comparable à celle du Diclofénac à la dose 2.5mg/Kg, le médicament de référence. Ce résultat montre que la **Fr.1** pourrait être responsable de l'inhibition de la voie de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2). L'inhibition de cette enzyme par les AINS est responsable d'une diminution de production des prostaglandines E2 et I2 (PGE2, PG I2), des médiateurs importants des phénomènes inflammatoires du métabolisme de l'acide arachidonique. D'autre mécanisme d'action peuvent être proposé ceux de l'inhibition de la production du monoxyde nitrique (NO), ou du facteur- α de nécrose tumorale (TNF- α) par LPS-macrophage (Wang et al., 2008 ; Yu et al., 2012, Yang et al., 2013 ; Gepdiremen et al., 2005, Speroni et al., 2005; Dall'Acqua et al., 2010). Par conséquent, on peut supposer que la **Fr.1** peut avoir un mécanisme d'action similaire, aux AINS ou aux anti-Cyclo-oxygénase, probablement en raison de la présence prédominante de l'acide oléanolique, et de la présence de la chaîne osidique en position C3 responsables de l'activité anti-inflammatoire (Gepdiremen et al., 2005), qui a été isolé et caractérisé à partir de cette fraction dans la partie phytochimique, ce qui est en totale concordance avec la littérature (Bulani et al., 2011). Ces éléments de preuve suggèrent, que ces composés bioactifs peuvent jouer un rôle clé dans l'activité anti-inflammatoires.

Par ailleurs la **Fr.2** à la dose 5 mg/Kg, a montré un effet anti-inflammatoire sur l'œdème de la patte, seulement dans les premières heures de l'inflammation (t= 30 min et t=180 min), elle a donc une action locale et courte dans le temps comparativement à **Fr.1** et l'AINS de référence. Les saponosides bioactifs composants la **Fr.2**, agiraient seulement sur la voie de la biosynthèse de l'histamine médiateurs de l'inflammation qui participe aux phénomènes de vasodilatation, d'augmentation de la perméabilité capillaire et d'œdème (Wu et al., 2011).

D'après les résultats des dosages du fibrinogène et de l'Haptoglobine il est évident que ce sont des protéines positives de la réaction inflammatoire (PRI) chez le rat, leurs taux augmentent lors d'une inflammation et baissent après un traitement. A *contrario* la CRP n'est pas une PRI (Protéine de la Réponse inflammatoire) chez le rat, ce qui en accord avec la littérature (Engler, 1995).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail présente une étude sur l'isolement, la purification et l'identification des saponosides de deux plantes médicinales endémiques à l'Algérie, des parties racinaires de l'espèce *Cyclamen africanum* Boiss. et Reuter et de la plante entière de l'espèce *Zygophyllum cornutum* Coss. Elle a été réalisée au Laboratoire de Pharmacognosie (EA 4267) faculté de pharmacie Dijon, Université de Bourgogne, France. Elle est complétée par une étude biologique réalisée séparément au laboratoire de pharmacologie et toxicologie de l'Université de Jijel (Algérie) pour une évaluation de l'activité anti-inflammatoire des fractions saponosidiques.

Au cours des investigations phytochimiques, qui ont contribué à compléter les connaissances des constituants chimiques des plantes des familles *Primulaceae* et des *Zygophyllaceae* 13 saponosides triterpéniques ont été isolés dont 2 dérivés triterpéniques nouveaux. L'extrait méthanolique des racines de *Cyclamen africanum* Boiss. et Reuter a fourni cinq saponosides triterpéniques parmi lesquelles deux nouveaux saponosides dénommés **Afrocyclamin A** et **Afrocyclamin B**, et trois isolées pour la première fois de cette espèce qui sont respectivement la **Lysikokianosiede 1**, la **Deglucocyclamin I**, et le dérivé acylé de la **Deglucocyclamin I**, tandis que l'extrait méthanolique de la plante entière de *Zygophyllum cornutum* Coss., a fourni sept 7 saponosides triterpéniques connus mais isolés pour la première fois de cette espèce, on compte parmi ces composés les **zygophyloside H, E, G**. L'élucidation des structures de ces composés a été réalisée au moyen des méthodes modernes d'analyse spectroscopique, particulièrement la RMN 1D (^1H et ^{13}C) et 2D (COSY, HSQC, HMBC, TOCSY, ROESY ou NOESY) et la spectrométrie de masse. Cette étude qui complète celle déjà réalisée sur certaines espèces de ces deux familles de plantes a montré une fois de plus que les saponosides triterpéniques, notamment les dérivés de l'acide dicrotalique et son isomère l'acide ursolique la Cyclamigenin B demeurent les constituants dominants de la famille de *Primulaceae* et du genre *Cyclamen* en particulier. Il apparaît que la chaîne oligosaccharidique composant ce genre, se retrouve en position C-3 avec un enchaînement précis composé de quatre sucres caractéristiques, avec la même séquence osidique. Il est à noter que deux saponosides de l'espèce présentent une substitution sur le sucre terminal Xylose par l'acide dicrotalique.

Sur les sept composés isolés de l'espèce *Zygophyllum conutum* Coss. quatre possèdent un groupement sulfaté sur la chaîne osidique en C-3 de l'aglycone et une autre substitution sur le carbone C-28 de l'aglycone à savoir 28-O- β 1-D-Glc-(1). Il serait donc intéressant d'entreprendre des études sur d'autres espèces de ce genre afin d'évaluer le rôle de cette séquence sur la signification chimiotaxonomique et les activités pharmacologiques de ces molécules.

La fraction saponosidique **Fr.1** extraite de l'espèce *Cyclamen africanum*, à la dose 20 mg/Kg a provoqué une mortalité 100% chez le lot de rat traité. À la dose 5 mg/Kg, la **Fr.1** a montré l'effet anti-inflammatoire le plus fort, traduit par le plus grand pourcentage d'inhibition de

l'œdème de la patte (64.6%) et la baisse du taux des protéines de l'inflammation (PRI) chez le rat, notamment le fibroinogène et l'haptoglobine. Cet effet sur le profil protéique est similaire à celui des molécules appartenant à la classe des AINS, en favorisant les réponses spécifiques, essentiellement sur la synthèse des dérivés de l'acide arachidonique, dont les prostaglandines et les leucotriènes qui sont des médiateurs de l'inflammation, en bloquant la cyclooxygénase COX-2.

Cet effet sur le profil protéique est similaire à celui des molécules appartenant à la classe des AINS, en favorisant les réponses spécifiques, essentiellement sur la synthèse des dérivés de l'acide arachidonique, dont les prostaglandines et les leucotriènes en sont médiateurs, en bloquant la cyclooxygénase COX-2 responsable du processus inflammatoire.

La fraction saponosidique **Fr.2** extraite de l'espèce *Zygophyllum Cornutum* Coss., à la dose 20 mg/Kg est dotée d'un effet anti-inflammatoire de courte durée, qui apparaît dès la première heure. Tandis que la fraction saponosidique **Fr.1** de l'espèce *Cyclamen africanum* Boiss.et Reuter à la dose 5 mg/kg est dotée d'un effet anti-inflammatoire lent et prolongé dans le temps jusqu'à 15 jours après le traitement.

Ces résultats ouvrent la porte sur une voie négligée, celles du dosage des PRI chez le rat. L'évaluation du potentiel et de l'effet anti-inflammatoire d'une substance naturelle doit se traduire à travers le bilan biologique notamment les PRI (- et +).

Les saponosides triterpéniques obtenus à partir des parties aériennes de l'espèce *Zygophyllum cornutum* Coss. ont exprimé un effet moins remarquable, ce qui est en désaccord avec les données de la littérature. Il serait donc intéressant de déterminer si la synergie des molécules a pu affecter l'effet anti-inflammatoire de ces composés et de déterminer le type d'activité qu'elle possède, telles que les activités antiparasitaires, antimicrobiennes et anti-virales, citées dans des travaux antérieurs dans le genre.

Cette étude a permis d'isoler et d'évaluer le potentiel anti-inflammatoire de deux fractions saponosidiques de deux espèces de plantes endémiques à l'Algérie, et de mieux expliquer leur mécanisme d'action. Elle a en outre démontré leur intérêt comme source potentielle de nouvelles substances naturelles biologiquement actives. Nous envisageons d'étendre ces études sur les cellules de l'inflammation, notamment les cellules résidentes et circulantes dans le sang, par la réalisation de la formule de numération sanguine (FNS) et de déterminer l'action individuelle de chaque composé isolé afin de déterminer la structure chimique responsable de l'effet anti-inflammatoire.

Références bibliographiques

- Abdel-Aty, A. S. and S. E. Ali . 2009. Insecticidal activity of *Zygophyllum album* constituents on *Spodoptera littoralis* (Boisd.) larvae. *Academic Journal of Entomology*, 2 (2): 43-51.
- Abe, I., Rohmer, M., Prestwich, G.C., 1993. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chem. Rev.* 93, 2189–2206.
- Abou-Gazar, H., Bedir, E., Takamatsu, S., Ferreira, D., Khan, I.A., 2004. Antioxidant lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 65, 2499–2505.
- A-C., Lacaille-Dubois M-A., *Planta Med.* **2010**, 76, 218.
- Ahmad VU, Iqbal S, Kousar F, Bader S, Arshad S, Tareen RB. 2005. Two new saponins from *Zygophyllum atriplicoides*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 53: 1126–1130.
- Ait El Cadi, M., S. Makram, M. Ansar, Y. Khabbal, K. Alaoui, M. A. Faouzi, Y. Cherrah and J. Taoufik (2012). "Activité anti-inflammatoire des extraits aqueux et éthanolique de *Zygophyllum gaetulum*." *Annales Pharmaceutiques Françaises* 70(2): 113-116.
- Altunkeyik, H., D. Gülcemal, M. Masullo, O. Alankus-Caliskan, S. Piacente and T. Karayildirim (2012). "Triterpene saponins from *Cyclamen hederifolium*." *Phytochemistry* 73(0): 127-133.
- Amimoto, K., Yoshikawa, K., Arihara, S., 1993. Triterpenes and triterpene glycosides from the leaves of *Ilex rotunda*. *Phytochemistry* 33, 1475–1480 [Celastrales – *Ilex rotunda*].
- Amoros, M., B. Fauconnier and R. L. Girre (1987). "In vitro antiviral activity of a saponin from *Anagallis arvensis*, Primulaceae, against herpes simplex virus and poliovirus." *Antiviral Research* 8(1): 13-25.
- Anesini ,C., Boccio, J., Cremaschi ,G., Genaro, A.S., Zubillaga, M., Sterin, B. L., et al. , 1997. "In vivo" antitumoral and acute toxicity study of *Larrea divaricata* Cav. extract. *Phytother Res.* 11,521–3.
- Anesini ,C., Genaro, A., Cremaschi, G., Sterin, B. L., Borda ,E., 1999. Antimitogenic effect of *Larrea divaricata* Cav. Participation in arachidonate metabolism. *Comp Biochem Physiol C.* 122,245–52.
- Aquino, R., F. De Simone, C. Pizza and J. F. De Mello (1989). "Further quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*." *Phytochemistry* 28(1): 199-201.
- Aquino, R., F. De Simone, C. Pizza, R. Cerri and J. F. De Mello (1988). "Quinovic acid glycosides from *Guettarda platypoda*." *Phytochemistry* 27(9): 2927-2930.

Aquino, R., N. De Tommasi, F. De Simone and C. Pizza (1997). "Triterpenes and quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*." *Phytochemistry* 45(5): 1035-1040.

Aquino, R., S. Tortora, S. Fkih-Tetouani and A. Capasso (2001). "Saponins from the roots of *Zygophyllum gaetulum* and their effects on electrically-stimulated guinea-pig ileum." *Phytochemistry* 56(4): 393-398.

Attia AA. (1999) Triterpenoidal saponins from the aerial parts of *Zygophyllum coccineum* L. and *Zygophyllum fabago* L. *Pharmazie*, 54, 931–934. (2000). Antiproliferative triterpene saponins from *Trevesia palmata*. *J. Nat. Prod.*, 68, 1022-1023.

Augusti, K.T., Roy, V.C.M., Semple, M. 1974: Effect of allyl propyl disulphide isolated from onion (*Allium cepa* L.) on glucose tolerance of alloxan diabetic rabbits. *Experientia* 30: 119-120.

Babady-Bila, Ngalamulume, T., Kilonda, A., Toppet, S., Compennolle, F., Hoornaert, G., 1991. An ursadienedioic acid glycoside from *Crossopteryx febrifuga*. *Phytochemistry* 30, 3069–3072 [Rubiaceae – *Crossopteryx febrifuga*].

Bährle-Rapp, M. (2007). Saponins. Springer Lexikon Kosmetik und Körperpflege, Springer Berlin Heidelberg: 490-490.

Ben Jannet, H., F. H-Skhiri, Z. Mighri, M. S. J. Simmonds and W. M. Blaney (2001). "Antifeedant activity of plant extracts and of new natural diglyceride compounds isolated from *Ajuga pseudoiva* leaves against *Spodoptera littoralis* larvae." *Industrial Crops and Products* 14(3): 213-222.

Benaiges, A. and P. Guillén (2007). 8.5 - Botanical Extracts. Analysis of Cosmetic Products. A. Salvador, A. Chisvert, A. S. Carreño, A. Townshend and A. S. Carreño. Amsterdam, Elsevier: 345-363.

Bennett S.T., J.M. Grimshaw, *Plant Syst. Evol.* **1991**, 176,135.

Bishnu ,P.C.,Zeev,W.,Leah,T.(Lahkim),2007. *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 26, 109–115.

Biswas, T., Gupta, M., Achari, B., Pal, B.C., 2005. Hopane-type saponins from *Glinus lotoides* Linn. *Phytochemistry* 66, 621–626 [Caryophyllales – *Glinus lotoides*].

Boffa, G. A., Y. Jacquot-Armand and J. M. Fine (1964). "Constantes de sédimentation, caractères électrophorétiques et immunologiques de deux protéines isolées du sérum de rat: L'albumine et L' α 1-macroglobuline." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 86(3): 511-518.

- Boisson et Reuter, Pugill. *Plantes Africaines*. Bor. Hispan., 75, 1852. Botanic Gardens, Kew.
- Borgi, W., M. C. Recio, J. L. Ríos and N. Chouchane (2008). "Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Zizyphus lotus* (L.) Lam." *South African Journal of Botany* 74(2): 320-324.
- Brent, J., 1999. Three new herbal hepatotoxic syndromes. *Journal of Toxicology and Clinical Toxicology* 37, 715–719.
- Bulani, V., Biyani, K., Kale, R., Joshi, U., Charhate, K., Kumar, D. & Pagore, R. (2011). Inhibitory effect of *Calotropis gigantea* extract on ovalbumin-induced airway inflammation and Arachidonic acid induced inflammation in a murine model of asthma, *International Journal of Current Biological and Medical Science* 1(2): 19-25. ISSN 2231-6256.
- Cai, C., M. Lin, Z. Chen, X. Chen, S. Cai and J. Zhong (2008). "SPROM – an efficient program for NMR/MRI simulations of inter- and intra-molecular multiple quantum coherences." *Comptes Rendus Physique* 9(1): 119-126.
- Çalış İ., M. E. Şatana, A. Yürüker, P. Kelican, R. Demirdamar, R. Alaçam, N. Tanker, H. Rügger, O. Sticher, Triterpene saponins from *Cyclamen mirabéle* and their biological activities, *J. Nat. Prod* (1997). 60: 315-318.
- Castells, T., E. Arcalís, S. Moreno-Grau, J. Bayo, B. Elvira-Rendueles, J. Belchí, J. A. Seoane-Camba and M. Suárez-Cervera (2002). "Immunocytochemical localization of allergenic proteins from mature to activated *Zygophyllum fabago* L. (Zygophyllaceae) pollen grains." *European Journal of Cell Biology* 81(2): 107-115.
- Ceriello, A., Giugliano, D., Quatraro, A., Donzella, C., Dipalo, G., Lefebvre, P. (1991). Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. *Diabetes Care* 14: 68-72.
- Chakravarty, A.K., Sarkar, T., Masuda, K., Shiojima, K., Nakane, T., Kawahara, N., 2001. Bacopaside I and II: two pseudojubilogenin glycosides from *Bacopa monniera*. *Phytochemistry* 58, 553–556 [Scrophulariales – *Bacopa monniera*].
- Cheng, Z.-H., B.-Y. Yu and X.-W. Yang (2002). "27-Nor-triterpenoid glycosides from *Mitragyna inermis*." *Phytochemistry* 61(4): 379-382.
- Cheok, C. Y., H. A. K. Salman and R. Sulaiman (2014). "Extraction and quantification of saponins: A review." *Food Research International* 59(0): 16-40.
- Chevallier, L. (2009). 1 - Les glucides. *Nutrition : principes et conseils* (3e édition). L. Chevallier. Paris, Elsevier Masson: 1-13.

- Choi, Y.H., Hussain, R.A., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., Morton, J.F., 1989. Abrusosides A–D, four novel sweet-tasting triterpene glycosides from the leaves of *Abrus precatorius*. *J. Nat. Prod.* 52, 1118–1127 [Fabales – *Abrus precatorius*].
- Chomsky, N. (2012). What is Special About Language? SBS Lecture Series: Noam Chomsky, University of Arizona.
- Connolly, J.D., Hill, R.A., 1991. In: *Dictionary of Terpenoids*. Chapman and Hall, vol. I, pp. xliii–xlvi and vol. II, pp. 1121–1415.
- Connolly, J.D., Hill, R.A., 2000. Triterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* 17, 463–482.
- Corner, E. J. H. (1961). "Traité de Botanique Systématique, Tome I, M. Chadeaud, L. Emberger, I Tome, in: *Les Végétaux non Vasculaires (Cryptogamie)*. Masson et Cie, Paris (1960), xv." *Transactions of the British Mycological Society* 44(3): 461.
- Crunkhorn, P., Meacock, S.C.R., 1972. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenan. *British Journal of Pharmacology* 42, 392–402.
- Dall'Acqua, S., I. Castagliuolo, P. Brun, F. Ditadi, G. Palu and G. Innocenti (2010). "Triterpene glycosides with in vitro anti-inflammatory activity from *Cyclamen repandum* tubers." *Carbohydr Res* 345(5): 709-714.
- Damas, J. and G. Remacle-Volon (1986). "Mast cell amines and the oedema induced by zymosan and carrageenans in rats." *European Journal of Pharmacology* 121(3): 367-376.
- De Nadaï, T., S. Hadj Khelifa, L. Astudillo, P. Arlet, L. Sailler and G. Pugnet (2014). "Une électrophorèse des protéines pour éviter une transfusion !" *La Revue de Médecine Interne* 35, Supplement 1(0): A98.
- Desgrouas, C., N. Taudon, S.-S. Bun, B. Baghdikian, S. Bory, D. Parzy and E. Ollivier (2014). "Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Stephania rotunda* Lour." *Journal of Ethnopharmacology* 154(3): 537-563.
- Devon, T.K., Scott, I.A., 1972. In: *Handbook of naturally occurring compounds*, vol. II. Academic Press, Terpenes, pp. 281–478.
- Dietrich, F., S. Kaiser, L. Rockenbach, F. Figueiró, L. S. Bergamin, F. M. d. Cunha, F. B. Morrone, G. G. Ortega and A. M. O. Battastini (2014). "Quinovic acid glycosides purified fraction from *Uncaria tomentosa* induces cell death by apoptosis in the T24 human bladder cancer cell line." *Food and Chemical Toxicology* 67(0): 222-229.

- DiRosa, M., Giroud, J.P., Willoughby, D.A., 1971. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* 104, 15–29.
- Dorchaí, R. Ó., H. E. Rubalcava, J. B. Thomson and B. Zeeh (1968). "Triterpenoids—IV: The cyclamigenins A1, A2, C, and D." *Tetrahedron* 24(16): 5649-5654.
- Doyen, C., M. Vernet and J. L. Bertrand (1992). "Etude des variations comparées de 4 protéines de l'inflammation, de la vitesse de sédimentation et de la leucocytose en pathologie infectieuse de l'adulte." *Médecine et Maladies Infectieuses* 22(12): 1152-1158.
- Dubost, J. J., M. Soubrier, M. N. Meunier and B. Sauvezie (1994). "De la vitesse de sédimentation au profil inflammatoire." *La Revue de Médecine Interne* 15(11): 727-733.
- Dubost, J. J., M. Soubrier, M. N. Meunier and B. Sauvezie (1994). "De la vitesse de sédimentation au profil inflammatoire." *La Revue de Médecine Interne* 15(11): 727-733.
- Duke, J.A., 1983. *Medicinal Plants in the Bible*. Trado-Medic Books, New York, Chapter 28.
- Eddouks, M. and M. Maghrani (2004). "Phlorizin-like effect of *Fraxinus excelsior* in normal and diabetic rats." *Journal of Ethnopharmacology* 94(1): 149-154.
- El. Beyrouthy M., Arnold N., Delelis.-Dusollier. A. and Dupont.F (2008). "Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon." *Journal of Ethnopharmacology* 120(3): 315-334.
- El Ghoul, J., N. Ghanem-Boughanmi and M. Ben-Attia (2011). "Biochemical study on the protective effect of ethanolic extract of *Zygophyllum album* on streptozotocin-induced oxidative stress and toxicity in mice." *Biomedicine & Preventive Nutrition* 1(2): 79-83.
- El Hamsas El Youbi, A., D. Boustia, I. Ouahidi and L. Aarab (2010). "Criblage pharmacologique primaire d'une plante endémique originaire du Sud Marocain (*Tetraena gaetula* [Emb. & Maire] Beier & Thulin)." *Comptes Rendus Biologies* 333(10): 736-743.
- Elgamal, M. H. A., K. H. Shaker, K. Pöllmann and K. Seifert (1995). "Triterpenoid saponins from *Zygophyllum* species." *Phytochemistry* 40(4): 1233-1236.
- Elgamal, M.H.A., Soliman, H.S.M., Elmunajjed, D.T., To' th, G., Simon, A., Duddeck, H., 1998. Two triterpene saponins from *Arenaria filicaulis*. *Phytochemistry* 49, 189–193 [Caryophyllales – *Arenaria filicaulis*].
- El-Sheikh, T. M. Y., Z. I. A. Al-Fifi and M. A. Alabboud "Larvicidal and repellent effect of some *Tribulus terrestris* L., (*Zygophyllaceae*) extracts against the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)." *Journal of Saudi Chemical Society*(0).

Engler, R. (1989). "Monokines et protéines de la réaction inflammatoire I. Aspect fondamental." *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 4(2): 9-16.

Engler, R. (1995). "Protéines de la réaction inflammatoire." *Revue Française des Laboratoires* 1995(276): 93-99.

Eskander, E.F., Won Jun, H., 1995. Hypoglycemic and hyperinsulinic effects of some Egyptian herbs used for the treatment of diabetes mellitus (type II) in rats. *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences* 36, 331–342.

Feng YL, Xie B, Li HR, Xu QM, Zhang XJ, Wang YS, Yang SL. 2010. A new sulfated triterpenoid from the bark of *Zygophyllum fabago* L. *Chinese Chemical Letters* 21: 1100–1102.

Feng, P.C , Patrick , S. 1958. Studies of the action of hypoglycin-A, an hypoglycaemic substance. *Brit. j. Pharmacol.* 13: 125-130.

Frot JC, Hofmann H, Muller F, Benazet MF, Giraudet P. Le concept du profil protéique. *Ann Biol Clin* 1984; 42: 1-8.

Fukuda, N., Tanaka, H., Shoyama, Y., 2000. Isolation of the pharmacologically active saponin Ginsenoside Rb1 from ginseng by immunoaffinity column chromatography. *Journal of Natural Products* 63, 283–285.

Gearien, J.E., Mede, K.A. 1981. Cholinergics, anticholinesterases, and antispasmodics. In: *Principles of Medicinal Chemistry*, 2nd ed. (W.O. Foye, ed.), pp. 353 -376. Lea and Febiger, Philadelphia.

Gepdiremen, A., V. Mshvildadze, H. Süleyman and R. Elias (2005). "Acute anti-inflammatory activity of four saponins isolated from ivy: alpha-hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside-F in carrageenan-induced rat paw edema." *Phytomedicine* 12(6–7): 440-444.

Ghosal, S., Srivastava, R.S., Chatterjee, D.C., Dutta, S.K. 1974. Fenugreekine, a new steroidal saponin-peptide ester of *Trigonella foenum-graecum*. *Phytochemistry* 13: 2247- 2251.

Gong Q. Q., Mu L. H., Liu P., Yang S. L., Wang B., L. Feng Y., *Chinese Chem. Lett.* **2010**, 21,449.

Gonnet, J. S and B. Fenet. 2000. "Cyclamen Red" Colors Based on a Macrocyclic Anthocyanin in Carnation Flowers. *J. Agric. Food Chem.* 48: 22 – 26.

Grenby, T.H., 1991. Intense sweeteners for the food industry: an overview. *Trends Food Sci. Technol.* 2, 2–6.

- Haddad, M., Miyamoto, T., Laurens, V., Lacaille-Dubois, M.-A. (2003). Two new biologically active triterpenoidal saponins acylated with salicylic acid from *Albizzia adianthifolia*. *J. Nat. Prod.* 66, 372-377.
- Hamed, A.I., El-Emary, N.A., 1999. Triterpene saponins from *Glinus lotoides* var. *dictamnoides*. *Phytochemistry* 50, 477–480.
- Hamed, A.I., Springuel, I., El-Emary, N.A., Mitome, H., Miyaoka, H., Yamada, Y., 1996. Triterpenoidal saponin glycosides from *Glinus lotoides* VAR. *DICTAMNOIDES*. *Phytochemistry* 43, 183–188 [Caryophyllales – *Glinus lotoides*].
- Hammouda, Y., Amer, M.S. 1966. Antidiabetic effect of tecomine and tecostanine. *J. Pharm. Sci.* 55: 1452-1454.
- Hammouda, Y., Rashid, A.-K., Amer, M.S. 1964. Hypoglycaemic properties of tecomine and tecostanine. *Letters to the Editor. Pharm. Pharmacol.* 16: 833-834.
- Hanss, M. (2005). "Anomalies du fibrinogène, une thrombophilie d'actualité." *Journal des Maladies Vasculaires* 30(4, Part 2): 7.
- Hara S., Okabe H., Mihashi K., *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, 35, 501.
- Haralampidis, K., Trojanowska, M., Osbourn, A.E., 2002. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* 75, 31–49.
- Haridas, V., Arntzen, C.J., Gutterman, J.U., 2001. Avicins, a family of triterpenoid saponins from *Acacia victoria* (Benth), inhibit activation of nuclear factor- κ B by inhibiting both its nuclear localization and ability to bind DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11557–11562.
- Hassanean, H. H., E. K. Desoky and M. M. A. El-Hamouly (1993). "Quinovic acid glycosides from *Zygophyllum album*." *Phytochemistry* 33(3): 663-666.
- Heng, L., Vincken, J.-P., van Koningsveld, G.A., Legger, L., Gruppen, H., van Boekel, M.A.J.S., Roozen, J.P., Voragen, A.G.J., 2006 b. Bitterness of saponins and their content in dry peas. *J. Sci. Food Agric.* 86, 1225–1231.
- Heng, M. Y., Tan, S. N., Yong, J.W. H., & Ong, E. S. (2013). Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *Trends in Analytical Chemistry*, 50, 1–10.
- Henquin, J.C, Charles, S., Nenquin, M., Mathot, E, Tamagawa, T. 1982. Diazoxide and D600 inhibition of insulin release. Distinct mechanisms explain the specificity for different stimuli. *Diabetes* 31: 776- 783.

Hiai, S., H. Oura and T. Nakajima (1976). "COLOR REACTION OF SOME SAPOGENINS AND SAPONINS WITH VANILLIN AND SULFURIC ACID." *Planta Med* 29(02): 116-122.

Hii, CS.T., Howell, S.L. 1984. Effects of epicatechin on rat Islets of Langerhans. *Diabetes* 33: 291-296.

Hill, R.S., Oberwetter, J.M., Boyd, A.E.III. 1987. Increase in cAMP levels in β -cell line potentiates insulin secretion without altering cytosolic free-calcium concentration. *Diabetes* 36: 440-446.

Holstein, S.A., Hohl, R.J., 2004. Isoprenoids: remarkable diversity of form and function. *Lipids* 39, 293–309.

Hostettmann, K., Marston, A., 2005. Saponins. Chemistry and pharmacology of natural products. Cambridge University Press, Cambridge, isbn-10: 0521020174.

Huang, J., a, Y. Ogihara, H. Zhang, N. Shimizu, T. Takeda. 2000. Triterpenoid saponins from *Ardisia mamillata*. *Phytochemistry* 54:817–822.

Hui W-H., Li M-M., *Phytochemistry* **1977**, 16, 1309.

Hussein, S. R., M. M. Marzouk, L. F. Ibrahim, S. A. Kawashty and N. A. M. Saleh (2011). "Flavonoids of *Zygophyllum album* L.f. and *Zygophyllum simplex* L. (Zygophyllaceae)." *Biochemical Systematics and Ecology* 39(4–6): 778-780.

Jaeger, M. and R. L. E. G. Aspers (2014). Chapter Five - Covariance NMR and Small Molecule Applications. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. A. W. Graham, Academic Press. Volume 83: 271-349.

Jalali, N., R. Naderi, A. Shahi-Gharahlar and J. A. T. d. Silva (2012). "Tissue culture of *Cyclamen* spp." *Scientia Horticulturae* 137(0): 11-19.

Jia Z., Koike K., Ohmoto T., Ni M., *Phytochemistry* **1994**, 37, 1389.

Jitsuno M, Mimaki Y. 2010. Triterpene glycosides from the aerial parts of *Larrea tridentata*. *Phytochemistry* 71: 2157–2167.

Jouad, H., M. Haloui, H. Rhiouani, J. El Hilaly and M. Eddouks (2001). "Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez–Boulemane)." *Journal of Ethnopharmacology* 77(2–3): 175-182.

Kallersjö M., Bergquist G. & Anderberg A.. Generic realignment .New York. on morphological, anatomical and rbcL DNA sequence data. *Bot. J. Linn. Soc.* 122:In primuloïd families in the Ericales s.l. *Am. J. Bot.* 87 (9) : 1335-1341, 2000.

- Kamel, M.S., 1991. Studies on *Balanites aegyptiaca* fruits, an antidiabetic Egyptian folk medicine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 39,1229–1233.
- Kaoru K., Michiko A., Masaaki S., Yang Y., Kiyotaka K., Kunio T., Norio K., Hiroshi Y., *Pharm.Biol.*, **1998**, 36, 50.
- Kay, M., 1996. *Healing with Plants in the American and Mexican West*. University of Arizona Press, Tucson, pp. 178–181.
- Kennelly, E.J., Cai, L., Long, L., Shamon, L., Zaw, K., Zhou, B.-N., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D., 1995. Novel highly sweet secodammarane glycosides from *Pterocarya paliurus*. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2602–2607 [Juglandales – *Pterocarya paliurus*].
- Khan, S. S., A. Khan, A. Khan, A. Wadood, U. Farooq, A. Ahmed, A. Zahoor, V. U. Ahmad, B. Sener and N. Erdemoglu (2014). "Urease inhibitory activity of ursane type sulfated saponins from the aerial parts of *Zygophyllum fabago* Linn." *Phytomedicine* 21(3): 379-382.
- Khorolragchaa, A., Y.-J. Kim, S. Rahimi, J. Sukweenadhi, M.-G. Jang and D.-C. Yang (2014). "Grouping and characterization of putative glycosyltransferase genes from *Panax ginseng* Meyer." *Gene* 536(1): 186-192.
- Kitagawa, I., 2002. Licorice root. A natural sweetener and an important ingredient in Chinese medicine. *Pure Appl. Chem.* 74, 1189–1198.
- Kohda H., Takeda O., Tanaka S., Molluscicidal triterpenoidal saponin from *Lysimachia sikokiana*. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 3304.
- Kokwano, J.O., 1976. *Medicinal plants of East Africa*. East Africa Literature Bureau. Dar es Salaam, Kampala, Nairobi, Chapter 34.
- Kulshreshtha, M.J., Kulshreshtha, D.K., Rastogi, R.P., 1972. The triterpenoids. *Phytochemistry* 11, 2369–2381.
- Kushner I. The phenomenon, O f the acute phase response. In: C-reactive protein and the plasma protein response to tissue injury. Kushner I, Volanakis JE, Gewurz H; eds *Ann NY Acad Sci* 1982;389:39-48.
- Lasztity, R., Hidvegi, M., Bata, A., 1998. Saponins in food. *Food Rev. Int.* 14, 371–390.
- Lattanzio, F., E. Greco, D. Carretta, R. Cervellati, P. Govoni and E. Speroni (2011). "In vivo anti-inflammatory effect of *Rosa canina* L. extract." *Journal of Ethnopharmacology* 137(1): 880-885.

Laurence, D. and P. Nicole (2006). "Résonance magnétique nucléaire Aspects théoriques." Techniques de l'ingénieur Spectrométries base documentaire : TIB390DUO (ref. article : p2880).

Le Gall, C., C. Désidéri-Vaillant and X. Nicolas (2011). "Significations d'une protéine C-réactive supérieure à 500 mg/l : à propos de 91 prélèvements dans un centre hospitalier brestois." Pathologie Biologie 59(6): 319-320.

Liu, H., Nakanishi, K., 1982. The structures of balanitins, potent molluscicides isolated from *Balanites aegyptiaca*. Tetrahedron 38, 513–519.

Liu, J., Henkel, T., 2002. Traditional Chinese medicine (TCM): arepolyphenols and saponins the key ingredients triggering biological activities. Current Medicinal Chemistry 9, 1483–1485.

Lotlikar, M.M., Rajarama Rao, M.R. 1966: Pharmacology of a hypoglycemic principle isolated from the fruits of *Momordica charantia*. Indian J. Pharmacy 28:129.

Lu, P. and Y.-L. Hsieh (2012). "Preparation and characterization of cellulose nanocrystals from rice straw." Carbohydrate Polymers 87(1): 564-573.

Lubert Stryer, Jeremy Mark Berg, John L. Tymoczko (trad. Serge Weinman), Biochimie, éditions Flammarion, collection « Médecine-Sciences », 2003, 5e éd. (ISBN 978-2-257-171160).

Ma, W.-G., Mizutani, M., Malterud, K.E., Lu, S.L., Ducrey, B., Tahara, S., 1999. Saponins from the roots of *Panax notoginseng*. Phytochemistry 52, 1133–1139 [Apiales – *Panax notoginseng*].

Maes, E., J.-M. Wieruszkeski, Y. Plancke and G. Strecker (1995). "Structure of three Kdn-containing oligosaccharide-alditols released from oviducal secretions of *Ambystoma tigrinum*: characterization of the carbohydrate sequence Fuc (α 1–5) [Fuc (α 1–4)] Kdn (α 2–3/6)." FEBS Letters 358(2): 205-210.

Mahato, S.B., Nandy, A.K., 1991. Review article number 60. Triterpenoid saponins discovered between 1987 and 1989. Phytochemistry 30, 1357–1390.

Mahato, S.B., Nandy, A.K., Roy, G., 1992a. Review article number 67. Triterpenoids. Phytochemistry 31, 2199–2249.

Mahato, S.B., Pal, B.C., Nandy, A.K., 1992b. Structure elucidation of two L. Affre, J.D. Thomson, M. Debussche, *Bot. J. Linn. Soc.* 118, 309.

- Mahato, S.B., Sen, S., 1997. Review article number 118. Advances in triterpenoid research, 1990–1994. *Phytochemistry* 44, 1185–1236.
- Matos MEO, Sousa MP, Machado MLL, Filho RB. (1986) Quinovic acid glycosides from *Guettarda angelica*. *Phytochemistry*, 25, 1419–1422.
- Menet, M.-C. (2011). "Principes de la spectrométrie de masse." *Revue Francophone des Laboratoires* 2011(437): 41-53.
- Meselhy, M.R., 1998. Hopane-type saponins from *Polycarpon succulentum*—II. *Phytochemistry* 48, 1415–1421.
- Mihci-Gaidi G1, Pertuit D, Miyamoto T, Mirjolet JF, Duchamp O, Mitaine-Offer AC, Lacaille-Dubois MA. 2010. Triterpene saponins from *Cyclamen persicum*. *Nat Prod Commun.* 5(7): 1023-5.
- Mihci-Gaidi G, Ozbey S, Orhan I, Sener B, Miyamoto T, Mirjolet JF, Duchamp O, Mitaine-Offer AC, Lacaille-Dubois MA., 2010. Triterpene saponins from *Cyclamen trocopteranthum* 76(8):818-21.
- Meselhy, M.R., Aboutabl, E.-S.A., 1997. Hopane-type saponins from *Polycarpon succulentum* growing in Egypt. *Phytochemistry* 44, 925–929 [Caryophyllales – *Polycarpon succulentum*].
- Miana, G. A. and H. M. G. Al-Hazimi (1986). "Assignment of the ¹³C NMR spectrum of quinovic acid." *Phytochemistry* 26(1): 225-227.
- Nguyen, T. K. O., R. Dauwe, F. Bourgaud and E. Gontier (2013). Chapter Eight - From Bioreactor to Entire Plants: Development of Production Systems for Secondary Metabolites. *Advances in Botanical Research*. G.-G. h. Nathalie, Academic Press. Volume 68: 205-232.
- Noirez, P., O. Agbulut and A. Ferry (2000). "Effet d'un médicament anti-inflammatoire non-stéroïdien sur la régénération musculaire chez le rat." *Science & Sports* 15(3): 165-167.
- Oda, K., Matsuda, H., Murakami, T., Katayama, S., Ohgitani, T., Yoshikawa, M., 2000. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biological Chemistry*, 381, 67–74.
- Okoli, C. O. and P. A. Akah (2004). "Mechanisms of the anti-inflammatory activity of the leaf extracts of *Culcasia scandens* P. Beauv (Araceae)." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 79(3): 473-481.
- Oleszek, W., Stochmal, A., 2002. Triterpene saponins and flavonoids in the seeds of *Trifolium* species. *Phytochemistry* 61, 165–170.

Oliver-Bever, B., Zahnd, G.R. 1979: Plants with oral hypoglycaemic action. *Quart. J. Crude Drug Res.* 17: 139-196.

Oobayashi, K., Yoshikawa, K., Arihara, S., 1992. Structural revision of bryonoside and structure elucidation of minor saponins from *Bryonia dioica*. *Phytochemistry* 31, 943–946 [Violales – *Bryonia dioica*].

Osbourn, A.E., 1996. Saponins and plant defense – a soap story. *Trends Plant Sci.* 1, 4–9.

Ouf SA, Hady FKA, ElGamal MH, Shaker KH. 1994. Isolation of antifungal compounds from some *Zygophyllum* species and their bioassay against two soil-borne plant pathogens. *Folia Microbiologica* 39: 215–221.

Ozden, I., Deniz, G., Tasali, E., Ulusarac, A., Altun, T., Buyukdevrim, S. 1989. The effect of vitamin E on glycosylated hemoglobin levels in diabetic rats: A preliminary report. *Diabetes Res.* 12: 123-124.

Ozenda, P., 1983. *Flore du Sahara*, Editions du CNRS, Paris, p. 320.

Pambou Tchivounda, H., Koudogbo, B., Tabet, J.C., Casadevall, E., 1990. A triterpene saponin from *Cylicodiscus gabunensis*. *Phytochemistry* 29, 2723–2725 [Fabales – *Cylicodiscus gabunensis*].

Park, J.-S., E.-M. Park, D.-H. Kim, K. Jung, J.-S. Jung, E.-J. Lee, J.-W. Hyun, J. L. Kang and H.-S. Kim (2009). "Anti-inflammatory mechanism of ginseng saponins in activated microglia." *Journal of Neuroimmunology* 209(1–2): 40-49.

Petit, P.R., Sauvaire, Y.D., Hillaire-Buys, D.M., Leconte, O.M., Baissac, Y.G., Posin, G.R., Ribes, G.R., 1995. Steroid saponins from fenugreek seeds: extraction, purification, and pharmacological investigation on feeding behaviour and plasma cholesterol. *Steroids* 60, 674–680.

Podolak, I., P. Koczurkiewicz, A. Galanty, M. Michalik .2013. Cytotoxic triterpene saponins from the underground parts of six *Lysimachia* L. species. *Biochemical Systematics and Ecology* 47.116–120.

Pöllmann K, Schaller K, Schweizer U, Elgamal MHA, Shaker KH, Seifert K. 1998. Triterpenoid saponins from *Zygophyllum decumbens*. *Phytochemistry* 48: 875–880.

Pöllmann, K., S. Gagel, M. H. A. Elgamal, K. H. Shaker and K. Seifert (1997). "Triterpenoid saponins from the roots of *Zygophyllum* species." *Phytochemistry* 44(3): 485-489.

- Posadas, I., M. C. Terencio, A. Randazzo, L. Gomez-Paloma, M. Payá and M. J. Alcaraz (2003). "Inhibition of the NF- κ B signaling pathway mediates the anti-inflammatory effects of petrosaspongiolide M." *Biochemical Pharmacology* 65(5): 887-895.
- Price, K.R., Johnson, I.T., Fenwick, G.R., 1987. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedstuffs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 26, 27–135.
- Pueschel A.- K., Schwenkel H.-G., Winkelmann T., *Plant Cell Tiss. Org.* **2003**, 72, 43.
- Punt, W., J. S. De Leeuw Van Weenen and W. A. P. Van Oostrum (1974). "Primulaceae." *Review of Palaeobotany and Palynology* 17(3–4): 31-70.
- Radwan, M.M., Luo, Y.-D., Pezzuto, J.M., 2002. Cycloartane andoleanane saponins from Egyptian *Astragalus* spp. as modulators of lymphocyte proliferation. *Planta Medica* 68, 986–994.
- Renaudeau, C., J.-F. Vigezzi, J. Ramirez-Martinez, A.-V. Deshayes, M. Chaillou and R. Faudon (1998). "Evaluation de l'automate d'électrophorèse polyslit™." *Revue Française des Laboratoires* 1998(306): 41-46.
- Reznicek, G., J. Jurenitsch, W. Robien and W. Kubelka (1989). "Saponins in *Cyclamen* species: Configuration of cyclamiretin C and structure of isocyclamin." *Phytochemistry* 28(3): 825–828.
- Rhinehart, B.L., Robinson, K.M., Payne, A.J., Wheatly, M.E., Fisher, L., Liu, P.S., Cheng, W. 1987. Castanospermine blocks the hyperglycemic response to carbohydrates in vivo: a result of intestinal disaccharidase inhibition. *Life Sci.* 41: 2325 -2331.
- Robert, L. (2013). "Serum haptoglobin in clinical biochemistry: Change of a paradigm." *Pathologie Biologie* 61(6): 277-279.
- Roland, D., 2005. *Les plantes supérieures : divines et / ou diaboliques, Les débats scientifiques du 21^{ème} siècle, Conférences et débats.*
- Rouessac F, Rouessac A, Cruché D. 6e éd. Science Sup, Dunod, 2004. *Analyse chimique – Méthodes et techniques instrumentales modernes. Current practice of gas chromatography-mass spectrometry.* Niessen WMA. *Chromatographic Science Series* (86), CRC, 2001.
- Ryu, J.-H., Park, J.-H., Eun, J.-H., Jung, J.-H., Sohn, D.H., 1997. A dammarane glycoside from Korean red ginseng. *Phytochemistry* 44, 931–933 [Apiales – *Panax ginseng*].
- Safir O, Fkih-Tetouani S, De Tommasi N, Aquino R. 1998. Saponins from *Zygophyllum gaetulum*. *Journal of Natural Products*, 61, 130–134.

- Sahpaz, S., Gupta, P.M., Hostettmann, K., 2000. Triterpene saponins from *Randia formosa*. *Phytochemistry* 54, 77–84 [Rubiales – *Randia formosa*].
- Sahu, N.P., Koike, K., Banerjee, S., Achari, B., Nikaido, T., 2001. Triterpenoid saponins from *Mollugo spargula*. *Phytochemistry* 58, 1177–1182 [Caryophyllales – *Mollugo spargula*].
- Sanoko, R., Speranza, G., Pizza, C., De Tommasi, N., 1999. Triterpene saponins from *Alternanthera repens*. *Phytochemistry* 51, 1043–1047 [Caryophyllales – *Alternanthera repens*].
- Sasmakov, S.A., Putieva, M. Zh., Saatov, Z., Kachala, V.V., Shashkov, A.S., 2001. Triterpene glycosides of *Zygophyllum eichwaldii* C.A.M. *Chemistry of Natural Compounds* 37, 91–92.
- Seibert, K., J. Masferrer and P. Isakson (1994). "Role of cyclooxygenase-2 in inflammation." *Pathophysiology* 1, Supplement 1(0): 34.
- Sheahan M. C., Chase M. W., 2000. Phylogenetic relationships within Zygophyllaceae based on DNA sequences of three plastid regions, with special emphasis on Zygophylloideae. *Syst. Bot.* 25: 371–384.
- Sheahan MC, Chase MW. 1996. A phylogenetic analysis of Zygophyllaceae based morphological, anatomical and rbc L DNA sequence data. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 122, 279–300.
- Shen, H.-Y., W.-J. Zuo, H. Wang, Y.-X. Zhao, Z.-K. Guo, Y. Luo, X.-N. Li, H.-F. Dai and W.-L. Mei (2014). "Steroidal saponins from dragon's blood of *Dracaena cambodiana*." *Fitoterapia* 94(0): 94-101.
- Skinner, M., B. L. Parker and J. S. Kim (2014). Chapter 10 - Role of Entomopathogenic Fungi in Integrated Pest Management. *Integrated Pest Management*. D. P. Abrol. San Diego, Academic Press: 169-191.
- Smati D, Mitaine-Offer A-C, Miyamoto T, Hammiche V, Lacaille-Dubois M-A. 2007. Ursane-Type Triterpene Saponins from *Zygophyllum geslini*. *Helvetica Chimica Acta* 90: 712–719.
- Smati, D., A. Longeon and M. Guyot (2004). "3 β -(3,4-Dihydroxycinnamoyl)-erythrodiol, a cytotoxic constituent of *Zygophyllum geslini* collected in the Algerian Sahara." *Journal of Ethnopharmacology* 95(2–3): 405-407.
- Smati, D., Hammiche, V., Nehari, H., Alamir, B., Merad, R., 1993. *Zygophyllum geslini* coss.: chemical investigation of hypoglycemic activity. In: Schilcher, H., Phillipson, J.D., Loew, D. (Eds.), *ISHS Acta Horticulturae* 29 332:WOCMAP I—Medicinal and Aromatic Plants Conference. Maastricht, Netherlands (CD-rom).

- Solignac, M. (2004). "Apport d'un anti-inflammatoire non stéroïdien bioadhésif dans le traitement des pathologies articulaires et péri-articulaires." *La Presse Médicale* 33(14, Part 2): 3-4.
- Sparg, S. G., M. E. Light and J. van Staden (2004). "Biological activities and distribution of plant saponins." *Journal of Ethnopharmacology* 94(2–3): 219-243.
- Speroni, E., Cervellati, R., Innocenti, G. , Costa, S., Guerra, M.C., Dall' Acqua, S., Govoni, P., 2005. Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antioxidant activities of *Balanites aegyptiaca* (L.) Delile. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 117–125.
- Sun, R.-Q., Chen, J.-C., 1997. Saponins from *Oxytropis bicolor*. *Phytochemistry* 44, 505–507 [Fabales – *Oxytropis bicolor*].
- Tahraoui, A. , El-Hilaly, J. , Israili, Z.H. , Lyoussi, B. ,2007. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). *Journal of Ethnopharmacology* 110, 105–117.
- Takhtajan A. ,1996. Diversity and classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Tan, N., Zhou, J., Zhao, S., 1999. Advances in structural elucidation of glucuronide oleanane-type triterpene carboxylic acid 3, 28-O-bisdesmosides (1962–1997). *Phytochemistry* 52, 153–192.
- Tapondjou, L.A., Lontsi, D., Sondengam, B.L., Shaheen, F., Choudhary, M.I., Atta-ur-Rahman, , Van Heerden, F.R., Park, H.-J., Lee, K.-T. 2003. Saponins from *Cussonia bancoensis* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Journal of Natural Products* 66, 1266–1269.
- Teng, R.-W., Ni, W., Hua, Y., Chen, C.-X., 2003. Two new tirucallanetype triterpenoid saponins from *Sapindus mukorossi*. *Acta Bot. Sin.* 45, 369–372 [Sapindales – *Sapindus mukorossi*].
- Thoma, R., Schulz-Gasch, T., D'Arcy, B., Benz, J., Aebi, J., Dehmlow, H., Hennig, M., Stihle, M., Ruf, A., 2004. Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase. *Nature* 432, 118–122.
- Touitou, Y. (2007). 1 - Introduction aux Médicaments Définitions et Buts de la Pharmacologie. *Pharmacologie* (11e édition). Y. Touitou. Paris, Elsevier Masson: 3-8.
- Treyvaud, V., Marston, A., Dyatmiko, W., Hostettmann, K., 2000. Molluscicidal saponins from *Phytolacca icosandra*. *Phytochemistry* 55, 603–609 [Caryophyllales – *Phytolacca icosandra*].

- Tyler, N. J., L. V. Gusta and D. B. Fowler (1981). "the influence of nitrogen, phosphorus and potassium on the cold acclimation of winter wheat (*Triticum aestivum* L.)." *Canadian Journal of Plant Science* 61(4): 879-885.
- Uematsu, Y., Hirata, K., Saito, K., 2000. Spectrophotometric determination of saponin in *Yucca* extract used as food additive. *J. AOAC Int.* 83, 1451–1454.
- Van, Auken, O.W., 2000. Shrub invasions of North American semiarid grasslands. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31, 197–215.
- Vergne-Salle Pascale, Yannick Léger David, Bertin Philippe, Trèves Richard, Beneytout Jean-Louis, Liagre Bertrand. Effects of the active metabolite of leflunomide, A77 1726, on cytokine release and the MAPK signalling pathway in human rheumatoid arthritis synoviocytes. *Cytokine*, Volume 31, Issue 5, 7 September 2005, Pages 335-348.
- Verotta, L., Guerrini, M., El-Sebakhy, N.A., Assad, A.M., Toaima, S.M., Radwan, M.M., Luo, Y.-D., Pezzuto, J.M., 2002. Cycloartane and oleanane saponins from Egyptian *Astragalus* spp. as modulators of lymphocyte proliferation. *Planta Medica* 68, 986–994.
- Verotta, L., Guerrini, M., El-Sebakhy, N.A., Assad, A.M., Toaima, S.M., Radwan, M.M., Luo, Y.-D., Pezzuto, J.M., 2002. Cycloartane and oleanane saponins from Egyptian *Astragalus* spp. as modulators of lymphocyte proliferation. *Planta Medica* 68, 986–994.
- Vincken, J.-P., L. Heng, A. de Groot and H. Gruppen (2007). "Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom." *Phytochemistry* 68(3): 275-297.
- Vinegar Ralph, Truax James F., Selph Jeffrey L.; May 1976. Quantitative comparison of the analgesic and anti-inflammatory activities of aspirin, phenacetin and acetaminophen in rodents. *European Journal of Pharmacology*, Volume 37, Issue 1, , Pages 23-30.
- Voutquenne, L., Guinot, P., Thoison, O., Sevenet, T., Lavaud, C., 2003. Oleanolic glycosides from *Pometia ridleyi*. *Phytochemistry* 64, 781–789.
- Wandji, J., Tillequin, F., Mulholland, D.A., Shirri, J.C., Tsabang, N., Seguin, E., Verite, P., Libot, F., Fomum, Z.T., 2003. Pentacyclic triterpenoid and saponins from *Gambeya boukokoensis*. *Phytochemistry* 64, 845–849.
- Wang, H., J. Gao, J. Kou, D. Zhu and B. Yu (2008). "Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from *Polygala japonica*." *Phytomedicine* 15(5): 321-326.
- Wendt, K.U., 2005. Enzyme mechanisms for triterpene cyclization: new pieces of the puzzle. *Angew. Chem., Int. Ed.* 44, 3966–3971.

- Wendt, K.U., Schulz, G.E., Corey, E.J., Liu, D.R., 2000. Enzyme mechanisms for polycyclic triterpene formation. *Angew. Chem.* 39, 2812–2833.
- Widmer, R. E. (1992). 15 - Cyclamen. *Introduction to Floriculture (Second Edition)*. R. A. Larson. New York, Academic Press: 385-407.
- Winter CA, Risley EA, Nuss GW, 1962. Carrageenan-induced edema in the hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory activity drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*;111:544–7.
- Woldemichael, G.M., Wink, M., 2002. Triterpene glycosides of *Lupinus angustifolius*. *Phytochemistry* 60, 323–327 [Fabales – *Lupinus angustifolius*].
- Wong, A. and F. Poli (2014). Chapter Three - Solid-State ¹⁷O NMR Studies of Biomolecules. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*. A. W. Graham, Academic Press. Volume 83: 145-220.
- Wu, C., Hseu, Y., Lien, J., Lin, L., Lin, Y. & Ching, H. (2011). Triterpenoid contents and anti-inflammatory properties of the methanol extracts of *Ligustrum* species leaves, *Molecules*, 16: 1-15. ISSN: 1420-3049.
- Xiang, T., Tezuka, Y., Wu, L.-J., Banskota, A.H., Kadota, S., 2000. Saponins from *Lonicera bournei*. *Phytochemistry* 54, 795–799 [Dipsacales– *Lonicera bournei*].
- Xu, J.-P., Xu, R.-S., 1992. Cycloartane-type saponins and their glycosides from *Curculigo orchioides*. *Phytochemistry* 31, 2455–2458 [Liliales – *Curculigo orchioides*].
- Xu, J.-P., Xu, R.-S., Li, X.-Y., 1992. Glycosides of a cycloartane saponin from *Curculigo orchioides*. *Phytochemistry* 31, 233–236 [Liliales – *Curculigo orchioides*].
- Xu, R., Fazio, G.C., Matsuda, P.T., 2004. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry* 65, 261–291.
- Yahara, S., Ding, N., Nohara, T., Masuda, K., Ageta, H., 1997. Taraxastane glycosides from *Eclipta alba*. *Phytochemistry* 44, 131– 135 [Asterales – *Eclipta alba*].
- Yayli, N., C. Baltacı, A. Zengin, M. Kuçukislamoglu and H. Genc (1998). "A triterpenoid saponin from *Cyclamen coum*." *Phytochemistry* 48(5): 881-884.
- You, H.J., Choi, C.Y., Kim, J.Y., 2001. Ursolic acid enhances nitric oxide and tumor necrosis factor- α production via nuclear factor- κ B activation in the resting macrophages. *FEBS Lett.* 509, 156–160.
- Zhang, Y., C. Liu, Y. Qi, S. Li and J. Wang (2013). "Application of accelerated solvent extraction coupled with counter-current chromatography to extraction and online isolation

of saponins with a broad range of polarity from *Panax notoginseng*." *Separation and Purification Technology* 106(0): 82-89.

Zhao, J., Yang, X.-W., Hattori, M., 2001. Three new triterpene saponins from the seeds of *Aesculus chinensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 49, 626–628.

ANNEXES

PARTIE EXPERIMENTALE

I.1 Matériel Végétal et extraction

Les plantes utilisées dans cette étude, appartiennent aux familles des Primulacea et des Zygophyllacea, toutes originaires d'Algérie du Nord et du Sud et récoltées en avril 2007. L'identification des différentes plantes a été faite en collaboration avec un botaniste de l'herbier National du Pr.DEBELLAIRE d'où les échantillons sont répertoriés. Après récolte, le matériel végétal est séché par terre à l'air libre, ensuite écrasé en poudre afin qu'il présente une grande surface de contact avec le solvant extracteur, permettant ainsi d'augmenter le rendement lors de l'extraction. La méthode d'extraction employée est l'amacération à froid dans du méthanol. La drogue broyée est mis en contact avec le méthanol à raison de 3L pour 500 g de drogue dans un percolateur à température ambiante. Après 48 h, l'extrait est recueilli et le résidu est à nouveau extrait jusqu'à épuisement. Les filtrats sont ensuite réunis, le solvant évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Buchi rotavapor, max.50°C). On obtient l'extrait brut méthanolique qui est pesé et conservé dans des bocaux

.III.2 Techniques chromatographiques

III.2.1 Chromatographie sous couche mince (CCM).

Pour les analyses qualitatives et quantitatives des extraits, nous utilisons dans notre Laboratoire des plaques de gel de silice (silicagel F254) prêtes l'emploi à support en verre. Celles-ci sont développées dans des cuves de chromatographie en verre. Les systèmes de solvants couramment utilisés pour la CCM sont les suivants :

CHCl₃-MeOH-H₂O-AcOH: 80-20-2-0,5 ; 70-30-5-, 62-32-5-0,5

III.2.2 Réactifs de révélation

Les réactifs de révélation utilisés lors des expériences sont le réactif de Komarowsky (mélange de V/V: 5/1 de p-hydroxybenzaldehyde à 2% dans le MeOH et H₂SO₄ à 50% dans l'EtOH) et la vanilline sulfurique (50 ml de solution de vanilline à 1% + 1 ml d'acide sulfurique) pour les saponines.

III.2.3 Chromatographie sur colonne ouverte (CC).

Utilisée pour les fractionnements des extraits bruts et des purifications. Les phases stationnaires utilisées dans notre Laboratoire pour la CC sont le gel de silice et le sephadex LH-20. Les phases mobiles sont des mélanges binaires ou tertiaires à base du chloroforme, du méthanol et de l'eau dans le cas du gel de silice, et le méthanol dans le cas du Sephadex LH-20. La composition de l'éluant du départ est déterminée par la CCM. Le débit varie en fonction du type de séparation souhaitée. Les fractions sont recueillies dans des tubes à essai disposés dans un collecteur de fractions (PHARMACIA, BUCHI) et sont analysées par CCM, regroupées et le solvant évaporé à l'aide d'évaporateur rotatif (Buchii).

III.2.4 Chromatographie liquide à moyenne pression (MPLC).

Cette technique permet de fractionner et de purifier plusieurs grammes de mélanges. Dans notre laboratoire, nous disposons des installations de MPLC constituées des colonnes Buchi (460x25 mm; 460x 15 mm) remplies de gel de silice 60 (15-40 μ M, Merck) ou de gel de silice RP-18 (15-40 μ M). Elles sont reliées à des pompes (Gilson M303, Buchi) les systèmes de solvants utilisés sont les suivants : CHCl₃-MeOH-H₂O : 80-20-2 ; 70-30-5 ; 62-32-5.

III.2.5 Chromatographie Liquide sous Vide (VLC)

Il s'agit d'une technique de fractionnement « grossière » préliminaire. Elle permet d'éliminer les sucres et les tanins contenus dans l'échantillon. L'appareillage est constitué d'un verre fritté relié à une pompe à vide. Le verre fritté est une petite colonne (de diamètre et de hauteur variant suivant la quantité de produit déposé) qui contient la phase stationnaire (silice à phase inverse et silice normale). Avant de faire le dépôt de l'échantillon, on conditionne la phase stationnaire par lavage avec du méthanol. Une fois la silice imbibée de méthanol, l'échantillon sous forme de poudre très fine est déposé à la surface du support. L'élution est réalisée dans l'ordre avec les mélanges suivants : MeOH / H₂O, 0 /100 (V/V), MeOH / H₂O 50:50 (V/V) et MeOH/ H₂O: 100/0 (V/V). On récupère ainsi trois fractions (la fraction aqueuse qui contient essentiellement les sucres, la fraction Méthanol/Eau et Méthanol qui contient nos composés d'intérêt).

III.3 Méthodes physico-chimiques

III.3.1. Spectrométrie de Masse (MS).

Les spectres de masse ont été enregistrés sur un spectromètre de masse en mode FAB (FAB-, FAB+) (JEOL SX 102) ou ESI-TOF (Q-TOF-1-Micromasse spectromètre).

III.3.3 Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone (RMN 1H et 13C) ont été respectivement enregistrés à 600 et 125 MHz dans la pyridine deutériée (C₅D₅N) ou dans le diméthylsulfoxyde deutérié (DMSO-d₆). Les expériences de RMN multidimensionnelles (DEPT, HSQC, HMBC, COSY, TOCSY, NOESY et ROESY) sont effectuées sur un appareil Varian INOVA 600 équipé d'un système SUN 4 L-X computer. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm.

III.4 Méthodes chimiques et biologiques.

III.5 Données spectrales et constantes physiques des nouveaux composés isolés de *Cyclamen africanum*

***Afrocyclamin A(1)** (= {(3 β)-16-oxo-30a1-13,28-epoxyoleanan-3-yl}-O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopyranoside;1).

Poudre blanchâtre. $[\alpha]_D^{25} = -2.5$ (c = 0.50, MeOH). 1H- and 13C-NMR (C₅D₅N): voir partie résultats et discussion. FAB-MS (neg.): 1057 ([M-H]⁻), 925 ([M-H-132]⁻), 763 ([M-H-132-162]⁻), 601 ([M-H-132-162-162]⁻), 469 ([M-H-132-162-162-132]⁻). HR-ESI-MS(pos.): 1081.5201, ([M+Na]⁺, C₅₂H₈₂O₂₂Na⁺; calc.: 1081.5195).

***Afrocyclamin B(2)** (= {(3 β , 20 β)-28,30-Dihydroxy-olean-12-ene-3-yl}O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[(4-O-3-Hydroxy-3-methylglutaryl)- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]- α -L-arabinopyranoside; 3). poudre blanchâtre. $[\alpha]_{D25} = -17.0$ (c = 0.43, MeOH). ^1H - and ^{13}C -NMR: voir partie résultats et discussion. FAB-MS (neg.): 1203, 1059 ([M-H-144]-), 927 ([M-H-144-132]-), 765 ([M-H-144-132-162]-), 603 ([M-H-144-132-162-162]-), 471 ([M-H-144-132-162-162-132]-). HR-ESI-MS (pos.): 1227.6780, ([M+Na]⁺, C₅₈H₉₂O₂₆Na⁺; calc.: 1227,6786).