

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE

N° d'ordre :

Série :

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat de troisième cycle (LMD)
Spécialité : Chimie pharmaceutique
Option : Analyses physicochimiques, contrôle de la qualité et synthèse de substances
bioactives

Par

Yasmine CHEMAM

**Valorisation de plantes sahariennes endémiques du
genre *Helianthemum* – Activité antioxydante**

Devant le jury :

Pr. BENAYACHE Samir	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Président
Pr. BENAYACHE Fadila	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Directrice de thèse, Rapporteur
Pr. MARCHIONI Eric	Université Louis Pasteur, Strasbourg, France	Co-directeur de Thèse, Co-rapporteur
Pr. MEKKIOU Ratiba	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Examinatrice
Pr. ZAMA Djamilia	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Examinatrice
Pr. KHELILI Smaïn	Université Mohamed Seddik Benyahia, Jijel	Examineur

09 Juillet 2017

Dedicace

Je dédie ce travail :

Aux personnes les plus chères à mon cœur et qui ont attendu avec patience les fruits de leur bonne éducation, à mes chers parents :

Mr CHEMAM Abdelouaheb et Mme ZAOUALI Soraya

J'espère avoir répondu aux espoirs que vous avez fondés en moi et réalisé aujourd'hui l'un de vos rêves.

A ma chère sœur Khaoula

A mes chers frères Mohamed et Anis Omar.

A la mémoire de mes grands parents maternels et paternels

A tous mes oncles et tantes

A toute la famille CHEMAM et à toute la famille ZAOUALI

A mon amie intime Hasna SELLAHI

A tous mes enseignants tout au long de mes études

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail

A toutes mes amies et à tous ceux qui me connaissent.

A tou(te)s les ami(e)s que le destin a arrachés à la vie pendant que j'étais loin du pays.

Yasmine

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier la Professeure BENAYACHE Fadila, ce fût un grand honneur pour moi que d'être encadrée par elle tant pour ses qualités professionnelles incontestables que pour son soutien et son encadrement scientifique. Elle a toujours été pour moi une lumière pour comprendre un peu plus de ces merveilles que le monde des plantes porte en lui.

Mes vifs remerciements vont également au Professeur MARCHIONI Eric de l'université Louis Pasteur Strasbourg France qui m'a accueillie au sein de son laboratoire pour une durée de 14 mois durant laquelle j'ai bien avancé dans ma thèse, pour son aide et ses conseils et sa disponibilité malgré ses nombreuses responsabilités.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur BENAYACHE Samir de l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour avoir donné la vie à ce projet de thèse de doctorat et pour m'avoir accordé un stage de deux mois dans le cadre de son accord-programme Tassili 12 MDU 856 Code Égide : 27025YJ, titre : Valorisation des extraits végétaux, étude phytochimique et pharmacologique, applications socio-économiques, entre l'université Frères Mentouri Constantine 1 (responsable du projet Pr. BENAYACHE Samir) et l'université de Strasbourg (responsable du projet Pr. MARCHIONI Eric) . Ce travail n'aurait pas pu voir le jour sans son aide. Je tiens également à le remercier pour l'insigne honneur qu'il nous fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance.

Je tiens à remercier l'Égide et le ministère algérien de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique pour m'avoir permis de bénéficier d'une bourse de 11 mois dans le cadre Profas B+.

Je remercie aussi les membres de jury, les Professeurs MEKKIOU Ratiba et ZAMA Djamila de l'université Frères Mentouri Constantine 1 ainsi le Professeur KHELILI Smaïn de l'université Mohamed Seddik Benyahia, Jijel, qui m'ont honorée en acceptant de faire partie du jury de ma thèse

Je ne manquerai pas de remercier tout les membres de l'équipe CAMBA qui ont toujours été présents pour m'aider et à trouver des solutions au travers des discussions pendant les réunions.

Merci aux doctorants de l'équipe de chimie analytique des molécules bioactives, Ikram et Michel qui m'ont permis d'être rapidement à l'aise au sein de l'équipe.

Je remercie particulièrement Mamadou qui m'a tout appris pour l'ORAC et le TEAC et pour les longues heures de travail et d'interprétation des analyses biologiques malgré ses occupations avec sa thèse. Merci Kamar, Ye, Genildo, Mohamed, Naima et Rana pour m'avoir soutenue ces derniers mois.

Et bien sûr merci à mes collègues de l'unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques particulièrement Naouel et Hichem qui ont toujours su donner une touche d'humour et de bonne humeur au quotidien.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin, tout au long de mon parcours scientifique.

Table des matières

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

Chapitre I : la famille Cistaceae et le genre *Helianthemum*

I.1.Introduction.....	3
I.2.Etude botanique de la famille Cistaceae.....	3
I.2.1.Introduction.....	3
I.2.2.Classification botanique.....	5
I.2.3.Utilisation traditionnelles.....	5
I.2.4.Activité biologique.....	5
I.3.Le genre <i>Helianthemum</i>	6
I.3.1.Description Botanique du genre <i>Helianthemum</i>	6
I.3.2.Toxicité.....	7
I.3.3.Activité biologique.....	7
I.3.4.Etude chimique du genre <i>Helianthemum</i>	8
I.4.L'espèce <i>Helianthemum ruficomum</i>	16
I.5.L'espèce <i>Helianthemum confertum</i>	16

Chapitre II : métabolites secondaires

II.1.Introduction.....	18
II.2.Les familles des métabolites secondaires.....	18
II.3.Généralité sur les polyphénols.....	19
II.4.Principaux groupes des polyphénols.....	19
II.4.1.Acides phénoliques.....	19
II.4.2.Les coumarines.....	20
II.4.3.Les lignanes.....	21
II.4.4.Les stilbènes.....	21
II.4.5.Les flavonoides.....	22
II.4.5.A.Classification.....	23
II.4.5.B.La biosynthèse des flavonoides.....	25
II.4.5.C.Localisation des flavonoides.....	26

II.4.5.D. L'intérêt des flavonoïdes.....	28
II.5. Intérêt des polyphénols.....	29
II.6. Relation structure-activité.....	29
Chapitre III : Partie expérimentale	
III. Etude chimique des deux espèces de la famille cistaceae.....	31
III.1. Récolte du matériel végétal.....	31
III.2. Protocole expérimentale d'extraction.....	31
III.3. Etude des extraits.....	34
III.3.1. Etude de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Helianthemum ruficomum</i>	36
III.3.1.A. Analyse de l'extrait acétate d'éthyle par HPLC-ABTS ⁺⁺ , détermination de ses composants antioxydants.....	36
III.3.1.B. Séparation et purification des composants de l'extrait AcOEt de <i>Helianthemum ruficomum</i>	37
III.3.2. Séparation et purification des composants de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	40
III.3.2.A. Analyse de l'extrait <i>n</i> -butanol par HPLC-ABTS ⁺⁺ , détermination de ses composants antioxydants.....	40
III.3.2.B. Fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	41
III.3.3. Séparation et purification des composants de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Helianthemum confertum</i>	57
III.3.3.A. Analyse de l'extrait acétate d'éthyle par HPLC-ABTS ⁺⁺ , détermination de ses composants antioxydants.....	57
III.3.3.B. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle.....	58
III.3.4. Analyse de l'extrait <i>n</i> -butanol et chloroforme de <i>H. confertum</i> par LC-UV..	64
Chapitre IV : Interprétation des résultats	
IV.1. Introduction.....	69
IV.2. Elucidation structurale des produits isolés de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Helianthemum ruficomum</i>	69
IV.2.1. Elucidation structurale du composé 1(A12-8).....	69
IV.2.2. Elucidation structurale du composé 3(A17-2).....	73
IV.2.3. Elucidation structurale du composé 2(A16-5B).....	99

IV.2.4. Elucidation structurale du composé 4(A17-3B).....	103
IV.3.Elucidation structurale des produits isolés de l'extrait <i>n</i> -butanol de <i>Helianthemum ruficomum</i>	113
IV.3.1.Elucidation structurale du composé 5 et composé 6 (F-4).....	113
IV.3.2. Elucidation structurale du composé 7(B9-1).....	119
IV.3.3. Elucidation structurale du composé (B9-2).....	129
IV.3.4. Elucidation structurale du composé 8 (B11-2).....	130
IV.3.5. Elucidation structurale du composé 9(B11-3).....	140
IV.3.6. Elucidation structurale du composé 10(B13-1).....	151
IV.3.7. Elucidation structurale du composé 11(B13-4).....	159
IV.3.8. Elucidation structurale du composé 12(B14-3).....	173
IV.3.9. Elucidation structurale du composé 13(B24-1).....	186
IV.3.10. Elucidation structurale du composé 14(B32-3).....	198
IV.4.Elucidation structurale des produits isolés de l'extrait acétate d'éthyle de <i>Helianthemum confertum</i>	211
IV.4.1. Elucidation structurale du composé (A9-1).....	211
IV.4.2. Elucidation structurale du composé (A10-1).....	220
IV.4.3. Elucidation structurale du composé (A14-3).....	221
IV.4.4. Elucidation structurale du composé 17(B25-5).....	222
Chapitre V : Activité antioxydante	
V.1. Introduction.....	237
V.2. Analyse des composés identifiés des deux plantes par HPLC-ABTS en ligne.....	238
V.3. Matériels et méthode.....	239
V.3.1. Préparation de la solution PBS (Tampon phosphate salin) 10 x	239
V.4. Résultats et discussion.....	240
V.5.ORAC.....	246
V.6.TEAC.....	247
Conclusion générale	256
Références	258
Résumé	268

Introduction générale

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. A l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria [1]. Aujourd'hui, les plantes sont de plus en plus utilisées par l'industrie pharmaceutique, il est impossible d'imaginer le monde sans la quinine qui est employée contre la malaria ou sans la digoxine qui soigne le cœur, ou encore l'éphédrine que l'on retrouve dans de nombreuses prescriptions contre les rhumes.

Un grand nombre de plantes, aromatiques médicinales, des plantes épicées et autres, possèdent des propriétés biologiques très intéressantes, qui trouvent application dans divers domaines à savoir en médecine, pharmacie, cosmétologie et dans l'agriculture.

Cependant l'évaluation des propriétés phytothérapeutiques comme antioxydante et antimicrobienne, demeure une tâche très intéressante et utile, en particulier pour les plantes d'une utilisation rare ou moins fréquente ou non connue dans la médecine et les traditions médicinales. Ces plantes représentent une nouvelle source de composés actifs. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vivo* comme *in vitro*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels les composés phénoliques, les flavonoïdes, les saponosides et les huiles essentielles.

Pendant longtemps et même de nos jours des remèdes traditionnels à base de plantes sont employés sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. En effet, il reste difficile de définir les molécules responsables de l'action bien que certains effets pharmacologiques prouvés sur l'animal aient été attribués à des composés tels que les alcaloïdes et dérivées, des terpènes, stéroïdes et des composés polyphénoliques [2].

Beaucoup de métabolites secondaires sont importants pour notre alimentation (goût, couleur...), alors que d'autres parmi lesquels les alcaloïdes, les flavonoïdes, les quinine, les stéroïdes et les terpenoïdes ont une application commerciale dans les domaines pharmaceutiques et biomédicaux et font partie des drogues, colorants, arômes, parfums et des insecticides [3].

Le continent africain bénéficie de la biodiversité la plus riche dans le monde, avec un nombre très important de plantes utilisées comme herbes, aliments naturels et pour des buts thérapeutiques [4]. De même, la flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale : méditerranéenne, saharienne et une flore paléo tropicale, estimée 3139 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques (5402 taxons en comptant les sous-espèces, les variétés et les

formes) [5]. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (12.6%) d'espèces endémiques en Algérie [5]. C'est dans ce contexte que nous menons ces travaux axés sur la valorisation des ressources végétales algériennes.

Le but de cette thèse est de continuer les investigations phytochimiques que les chercheurs de notre laboratoire mènent sur des espèces sahariennes. En effet, étant donné leur écosystème, ces plantes sont soumises à un stress oxydatif intense (rayons UV) et une insuffisance hydrique. Ces conditions font qu'elles sont susceptibles de développer des mécanismes de défense engendrant l'accumulation de métabolites secondaires particuliers tant du point de vue structural que du point de vue activité biologique. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à deux espèces endémiques du Sahara septentrional de la famille Cistaceae du genre *Helianthemum*, *H. ruficomum* et *H. confertum*. Nos études ont porté sur l'évaluation de l'activité antioxydante d'extraits et de constituants chimiques de ces deux espèces.

Une partie de ces travaux a été réalisée au sein de notre unité de recherche (Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques. Université Frères Mentouri, Constantine 1), l'autre a été réalisée au laboratoire de l'Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bioactives, Faculté de Pharmacie, Illkirch, Cedex, France, lors d'un stage Tassili de 2 mois et d'une bourse Profas b+ de 12 mois.

Les principales parties de ce travail sont reportées dans ce manuscrit sous forme de cinq chapitres, d'une introduction générale et d'une conclusion générale.

- ❖ **Le premier chapitre** renferme la présentation botanique et des données bibliographiques de la famille Cistaceae et du genre *Helianthemum*.
- ❖ **Le second chapitre** est consacré à l'étude des métabolites secondaires.
- ❖ **Le troisième chapitre** reporte le travail expérimental et personnel. Il consiste en l'extraction, la séparation, la purification de métabolites secondaires des deux espèces étudiées.
- ❖ **Le quatrième chapitre** reporte les résultats obtenus notamment les discussions et déterminations structurales des constituants chimiques isolés des deux espèces.
- ❖ **Le cinquième chapitre** présente les résultats des tests biologiques réalisés sur les extraits et les produits isolés des deux espèces étudiées.

I.1. Introduction

Malgré l'apparition de nombreuses monographies et de très nombreux travaux, la famille Cistaceae est l'une des plus difficiles à étudier. Elle renferme un grand nombre d'espèces médicinales et aromatiques, dont plusieurs sont réputées pour accumuler des métabolites secondaires bioactifs. C'est dans ce sens que s'inscrit notre travail, qui concerne deux espèces du genre *Helianthemum* à la recherche de molécules nouvelles susceptibles de présenter des activités biologiques intéressantes à développer.

I.2. ETUDE BOTANIQUE DE LA FAMILLE CISTACEAE

I.2.1. Introduction

La famille Cistaceae est une famille de plantes dicotylédones qui comprend environ 180 espèces et huit genres [6] ; incluant, *Cistus*, *Crocanthemum*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Hudsonia*, *Lechea*, *Tuberaria*. Herbes, subshrubs, ou des arbustes. Les feuilles généralement opposées, rarement alternées, stipulent ou estipulent; Lime de lame simple. Inflorescence 1 fleurie ou cymose, parfois racémique ou panicule. Fleurs bisexuelles, actinomorphes. Sepals 5; Extérieur 2 plus petit, parfois absent. Pétales (3 ou 5), blanc, rose, jaune ou orange, parfois avec des taches ± noir à la base, froissé en bourgeon [7].

Le genre *Cistus* : selon NCBI le genre *Cistus* comporte les espèces suivantes : *C. albidus* L, *C. creticus* L, l'espèce *C. creticus* (synonyme : *C. incanus*), *C. creticus* L, *C. heterophyllus*, *C. monspeliensis*, *C. ladanifer*, *C. laurifolius*, *C. populifolius*, *C. salvifolius*, *C. clusi*, *C. inflatus* (synonyme *Cistus hirsutus*).



Figure 1. *Cistus creticus* L.

➤ Le genre *Halimium* : le genre *Halimium* comporte les espèces suivantes : *Halimium alyssoides*, *H. atriplicifolium*, *H. commutatum*, *H. halimifolium*, *H. lasianthum*, *H. ocymoides*, *H. umbellatum*, *H. verticillatum*, et *H. viscosum*.



Figure 2. *Halimium commutatum*.

- Le genre *Crocianthemum* : il comporte deux espèces *C. argenteum* et *C. pringlei*



Figure 3. *Crocianthemum argenteum*.

- Le genre *Fumana* : il comporte trois espèces *F. ericoides*, *F. fontanesii*, et *F. thymifolia*.
- Le genre *Helianthemum* : il comporte les espèces *H. aegyptiacum*, *H. almerianse*, *H. apenninum*, *H. canum*, *H. grandiflorum*, *H. kahiricum*, *H. ledifolium*, *H. marifolium*, *H. nummularium*, *H. oelandicum*, *H. scopulicola*, *H. squamatum*, *H. udsonia tomentosa*, *H. ruficomum* et *H. confertum*.



Figure 4. *Helianthemum aegyptiacum*.

- Le genre *Lechea* : il comporte une seule espèce *lecheatripetala*.
- Le genre *Tuberaria* : il comporte deux espèces *T. globulariifolia*, *T. guttata* [8].



Figure 5. *Tuberaria aglobulariifolia*.

I.2.2. Classification botanique

Selon la classification classique réalisée en 1996 (Tableau 1), cette famille est située dans l'ordre des Malvales [8].

Tableau 1. Classification botanique de la famille Cistaceae.

Classification	
règne	Plantae
Sous- règne	Tracheobionta
Division	Tracheobionta ou Angiospermes
Classe	Magnoliopsida ou Dicotylédones
Sous-classe	Dilleniidae
Ordre	Malvales
Famille	Cistaceae

I.2.3. Utilisations traditionnelles

Plusieurs espèces et hybrides de genre *Cistus*, *Halimium* et *Helianthemum* sont cultivés comme plantes ornementales.

Les feuilles de plusieurs espèces du genre *Cistus* produisent le ladanum, une résine aromatique jadis utilisée en médecine [9].

Au Maroc les feuilles sont utilisées, en infusion dans du thé, comme digestif par exemple : *Cistus albidus* L.

Les graines apprêtées avec des épices, s'emploient comme apéritif, par exemple : *Cistus monspeliensis* L ou Ciste de Montpellier.

Les feuilles de *Cistus salviifolius* L., en décoction, sont efficaces contre les coliques et les feuilles de *Cistus villosus* L en décoction, agissent contre le maux des intestins [10].

I.2.4. Activité biologique

Toutes les espèces de la famille Cistaceae sont fréquemment employées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés antimicrobienne, antitumorale, antivirale

anti-inflammatoire, antifongique, antiulcer, antioxydante, et activités spasmolytique et hypotensive [9,11].

Les investigations pharmacologiques réalisées sur le ciste de Montpellier ont prouvé des propriétés anti-inflammatoires et ses feuilles sont utilisées pour arrêter les hémorragies, comme cicatrisant, et en tisane en cas de fatigue et de diarrhée et encore les maux de tête [12].

I.3. Le genre *Helianthemum*

Le genre *Helianthemum* contient environ 110 espèces [13] qui se répartissent en majorité dans le bassin méditerranéen. Toutefois certaines d'entre elles ont une distribution plus excentrique, les unes vers l'Asie centrale (*H. songoricum* Schrank), les autres vers le nord de l'Europe: *H. nummularium* (L.) Mill., *H. oelandicum* (L.) DC. Ce genre important a été divisé en deux sous-genres par Willkomm (1852): le sous-genre *Helianthemum* (= *Ortholobum* Willk.) et le sous-genre *Plectolobum* Willk. Bien que *Flora Europaea* (1968) les séparent par des caractères liés à la présence ou à l'absence de stipules, caractère pratique et bien visible, la définition de Willkomm pour distinguer ces deux taxons s'appuie sur des descriptions relatives à la forme des cotylédons de la graine, et à la position de l'embryon [14].

I.3.1. Description botanique du genre *Helianthemum*

Les *Hélianthemum*, comme toute la famille Cistaceae, sont des plantes de souche méditerranéenne et ce genre, encore assez bien représenté dans le Sahara septentrional, fait presque défaut dans le Sahara méridional et occidental où il n'est représenté que par *H. Lippii* (Figure 6).

Les *Hélianthemum* sont des arbustes souvent très petits, à feuilles opposées ou rarement alternes à fleurs jaunes ou jaunâtres (dans les espèces sahariennes) portant 5 sépales dont deux plus petits, 5 pétales qui tombent très vite après la floraison, de nombreuses étamines, un ovaire formé de 3 carpelles soudés et coiffé d'un style unique coudé.

La détermination, toujours difficile, repose en grande partie sur les caractères des sépales et notamment sur leurs dimensions ; par convention, celles-ci sont toujours données pour les sépales au stade fructifère, car ils s'accroissent après la floraison en persistant autour de la capsule [15].

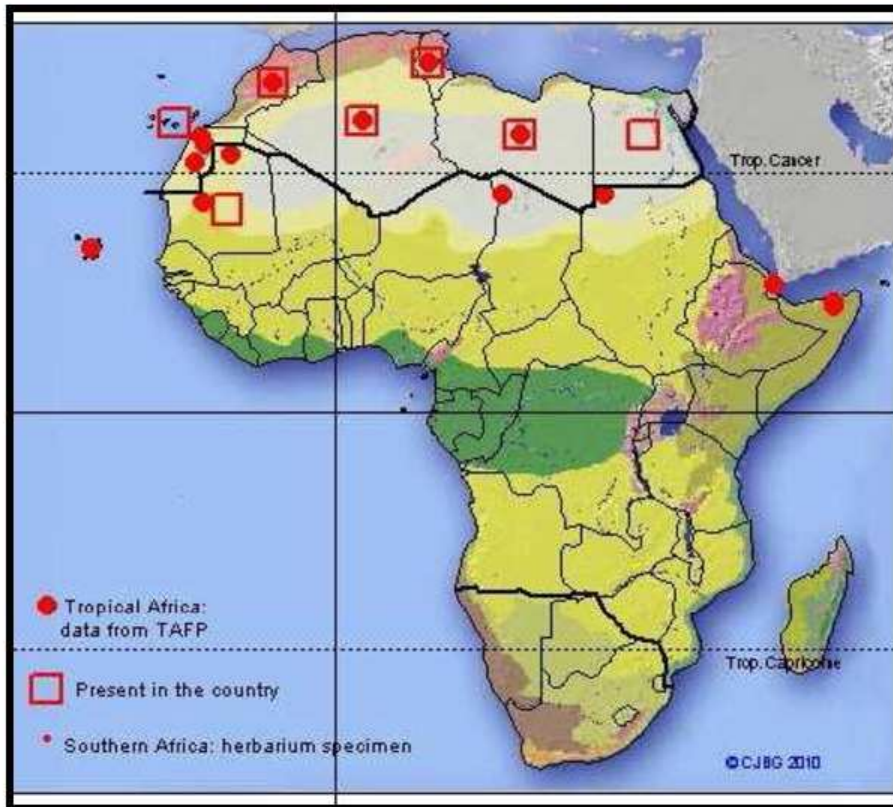


Figure 6. Distribution géographique des espèces du genre *Helianthemum*.

I.3.2. Toxicité

D'après la littérature, *H. lippii* var. *sessiliflorum* (Desf.) Murb. ainsi que des espèces voisines tel que *H. tunetanum* Coss., Pers. et *Helianthemum kahiricum* Del. Sont réputées toxiques pour le chameau, sont accusées de provoquer dans l'Est algérien une maladie du chameau, le « ghaf », (qui serait du rhumatisme et de la paralysie) due à l'absorption des ces Cistaceae à l'état sec. Les chamelles seraient plus sensibles à cette maladie, mais la toxicité de cette plante est loin d'être clairement établie [16,17,18].

I.3.3. Activité biologique

Certains d'entre elles sont des plantes médicinales importantes utilisées dans plusieurs pays à des fins différentes [19-23]. On dit que ce genre possède des propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antiprotozoaires et antioxydantes [24-28]. Même si ce genre n'a pas été beaucoup étudié du point de vue phytochimique, certaines espèces ont déjà été examinées pour des composants bioactifs comme les flavonoïdes, les phénoliques, les lignanes et les huiles essentielles [11], [29-33].

La médecine mexicaine traditionnelle utilise une grande variété de plantes dans le traitement des troubles gastro-intestinaux tels que la diarrhée. Afin de comprendre les propriétés de

certaines constituants chimiques de quelques espèces utilisées dans ce contexte, trois flavonoïdes (kaempférol, tiliroside et (-) épicatechine) isolés de *Geranium mexicanum*, *Cupheapi netorum*, *Helianthemum glomeratum* et *Rubus coriifolius* ont été testés et ont montré une activité anti-giardial [11].

I.3.4. Etude chimique du genre *Helianthemum*

Ce genre fait partie des genres les plus importants de la famille Cistaceae avec environ 110 espèces et variétés [31]. Contrairement à d'autres genres de cette famille comme *Cistus* et *Halimium* qui ont fait l'objet de plusieurs études phytochimiques depuis le début des années 60 [34], peu de travaux ont été consacrés à la composition chimique des espèces *Helianthemum*. Ces études ont été menées par le groupe de F. Clazada [24,32], au milieu des années 90, ont porté uniquement sur l'espèce *H. glomeratum*.

Le tableau 2 et la figure 7 présentent des composés isolés de ce genre.

Tableau 2. Composés isolés du genre *Helianthemum*.

Composés	Espèces	Références
3-O-[(3",6"-di-O-para coumaroyl)- β -D glucopyranosyl]-Kaempférol 1	<i>H. kahiricum</i>	[35]
Tiliroside 2	<i>H. kahiricum</i> <i>H. glomeratum</i> <i>H. sissiliflorum</i>	[35] [25,32,30,36] [29,31]
Cis-tiliroside 3	<i>H. glomeratum</i>	[30]
Quercétine 4	<i>H. violaceum</i> <i>H. syriacum</i> <i>H. squamatum</i> <i>H. polygonoides</i> <i>H. oelandicum</i> <i>H. alypoides</i> <i>H. glomeratum</i> <i>H. apenninum</i> <i>H. asperum</i>	[20] [20] [20] [20] [20] [20] [30,32,36] [20] [20]

	H. cinereum H. hirtum H. marifolium	[20] [20] [20]
Kaempférol 5	H. violaceum H. syriacum H. squamatum H. polygonoides H. oelandicum H. alypoides H. glomeratum H. apenninum H. asperum H. cinereum H. hirtum	[20] [20] [20] [20] [20] [20] [25,32,36] [20] [20] [20] [20]
Isorhamnétine 6	H. oelandicum H. squamatum H. syriacum H. lavandulaefolium	[20] [20] [20] [37]
Lutéoline 7	H. oelandicum	[20]
(-)-épicatchine 8	H. glomeratum H. sissiliflorum	[25] [31]
Isolaricireinol 9'-O-β-D-glucopyranoside 9	H. sissiliflorum	[29]
Nicotiflorine 10	H. sissiliflorum	[29]
Kaempférol-3-O-vicianoside 11	H. sissiliflorum	[29]

Rutine 12	H. sissiliflorum	[29]
Néoisorutine 13	H. sissiliflorum	[29]
Vicénine-2 14	H. sissiliflorum	[29]
Hovétrichoside 15	H. sissiliflorum	[29]
Astragaline 16	H. sissiliflorum H. glomeratum	[31] [30]
Quercétrine 17	H. sissiliflorum H. glomeratum	[31] [30]
Isoquercitrine 18	H. sissiliflorum H. glomeratum	[31] [30]
1-O-acétyl prinsepiol 19	H. sissiliflorum	[31]
1 α -hydroxypinorésinol 20	H. sissiliflorum	[31]
(+)-cyclooolivil 21	H. sissiliflorum	[31]
Acide (-)-pinéllique 22	H. sissiliflorum	[31]
Acide benzoïque 23	H. sissiliflorum	[31]
Acide p-hydroxybenzoïque 24	H. sissiliflorum	[31]
Acide Protocatéchuique 25	H. sissiliflorum	[31]
Acide Vanilique 26	H. sissiliflorum	[31]
Acide Gallique 27	H. sissiliflorum	[31]
(-)-catechine 28	H. sissiliflorum	[31]
(-)-épigallocatechine 29	H. sissiliflorum H. glomeratum	[31] [36]

Myricitrine 30	H. sissiliflorum	[31]
β -sitostérol 31	H. sissiliflorum	[31]
Daucostérol 32	H. sissiliflorum	[31]
(-)-épigallocatechine gallate 33	H. glomeratum H. sissiliflorum	[36] [31]
(-)-gallocatechine 34	H. sissiliflorum	[31]
β -D-fructofuranose 35	H. sissiliflorum	[29]
1-O-éthyl- β -D-glucopyranoside 36	H. sissiliflorum	[29]
β -D-fructofuranosyl-(2 \blacktriangleright 1)- α -D-glucopyranoside 37	H. sissiliflorum	[29]
β -D-fructofuranosyl-(2' \blacktriangleright 1')- β -D-fructofuranosyl-(2'-1)- α -D-glucopyranoside 38	H. sissiliflorum	[29]

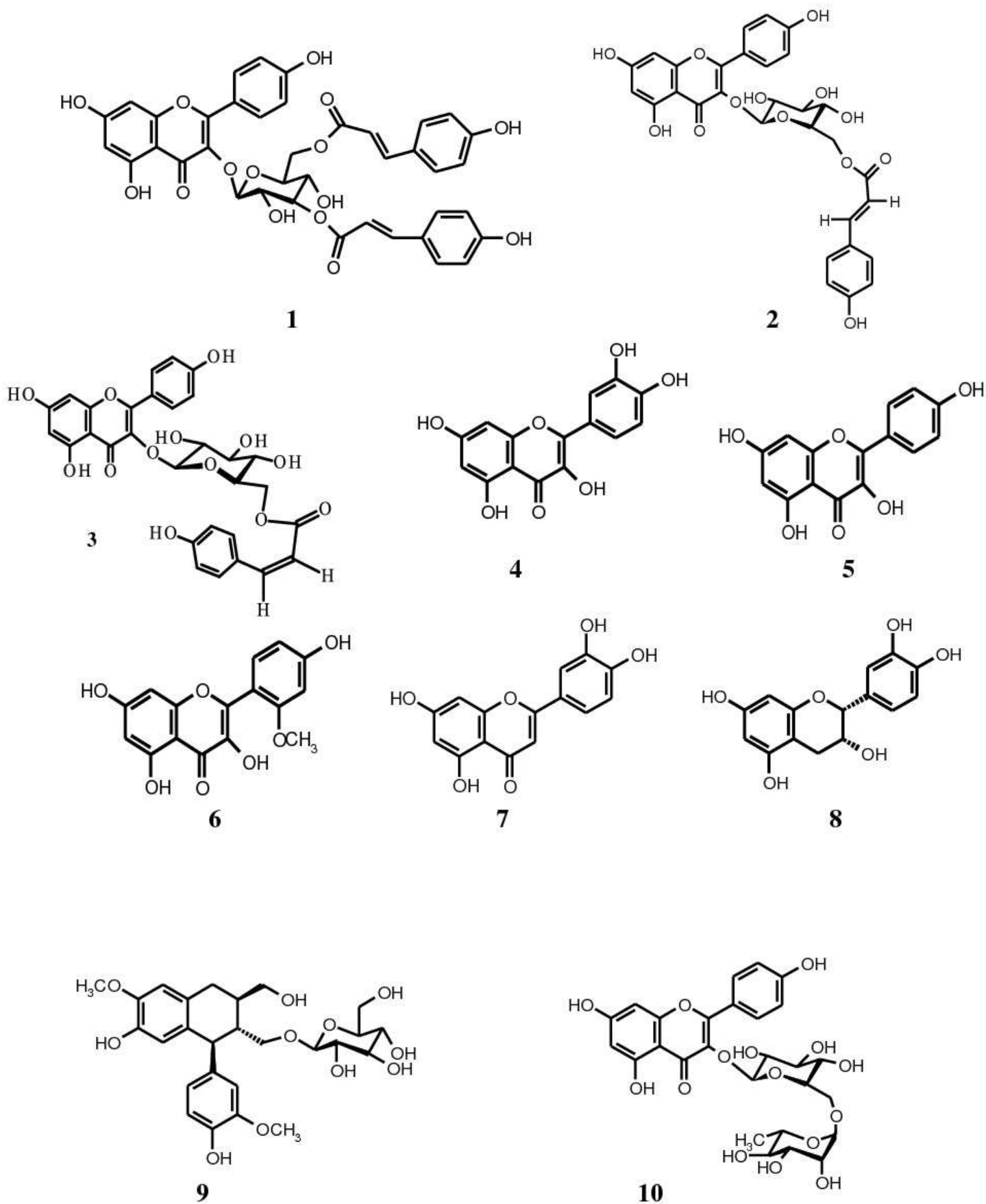
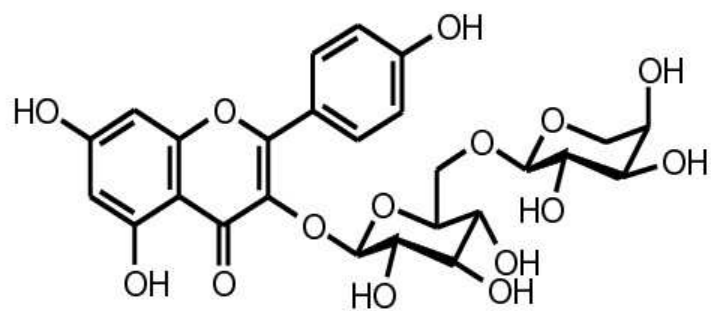
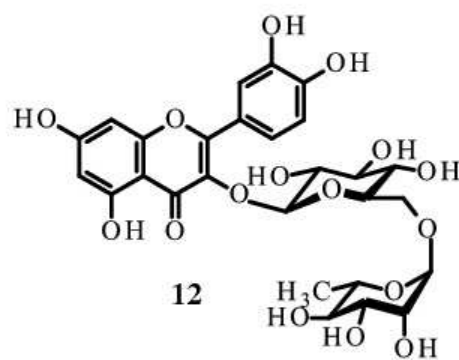


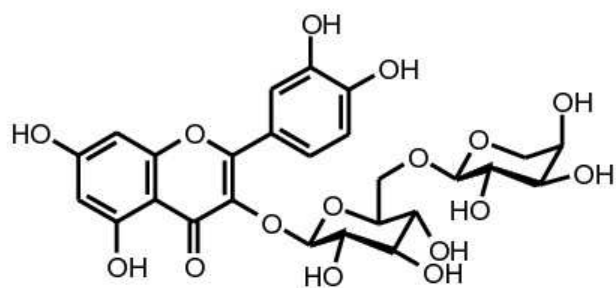
Figure 7. Les structures des composés isolés des espèces du genre *Helianthemum*.



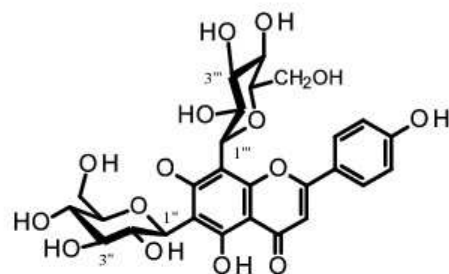
11



12

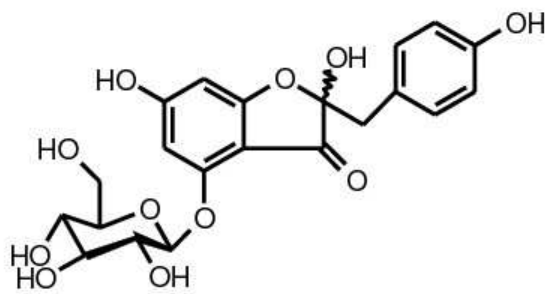


13

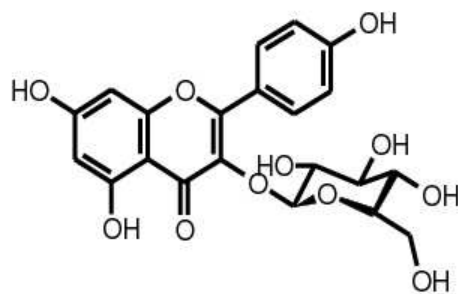


14

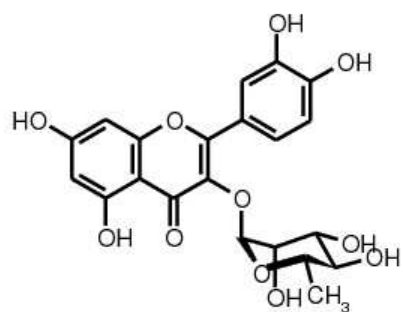
13



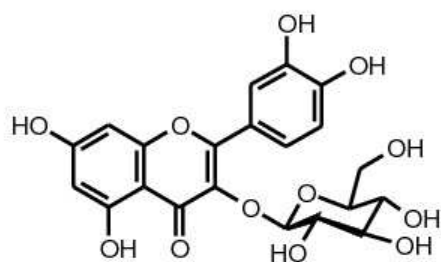
15



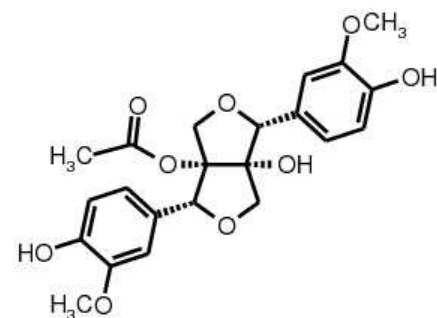
16



17



18



19

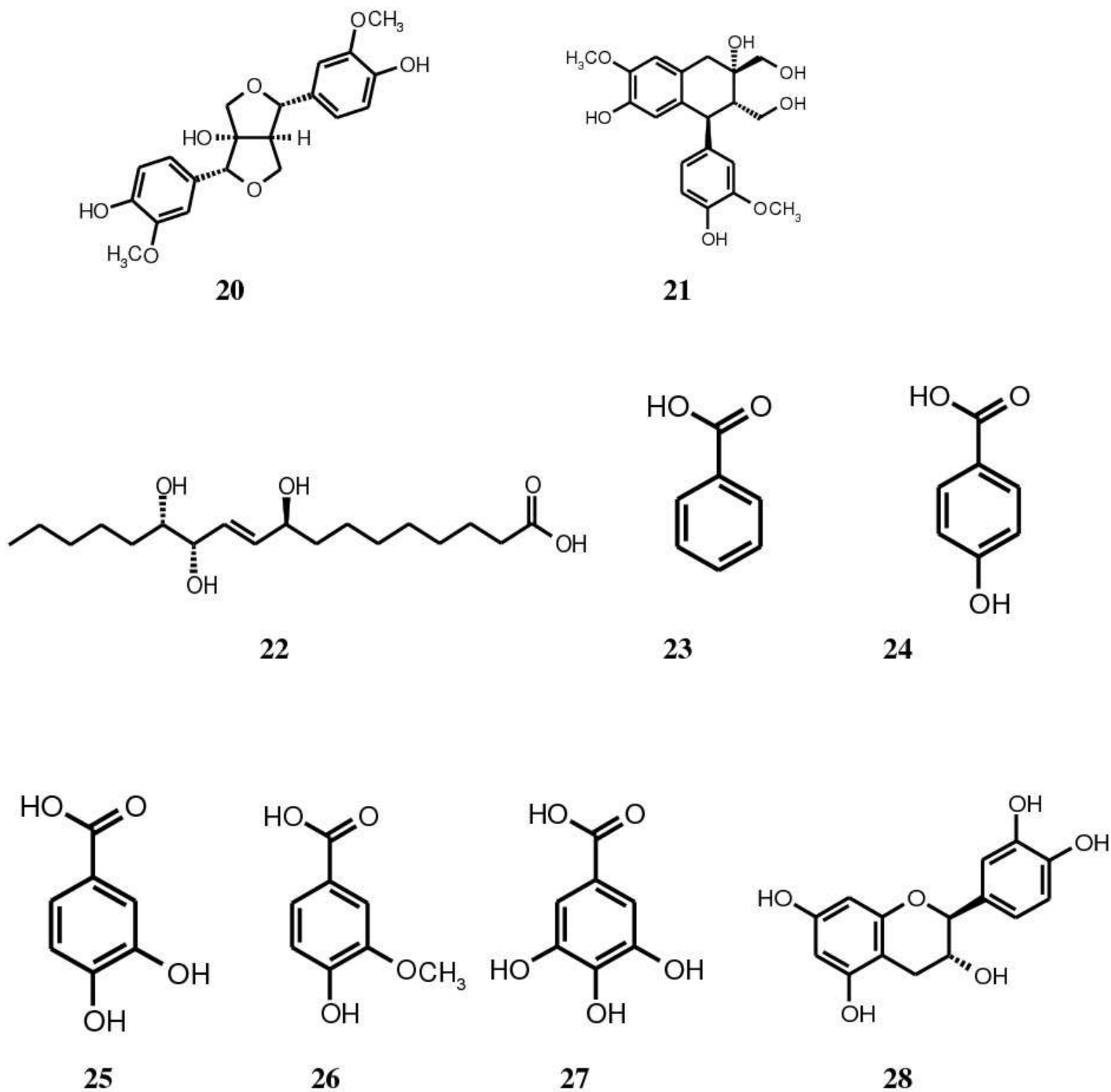


Figure 7. Les structures des composés isolés des espèces du genre *Helianthemum* (suite).

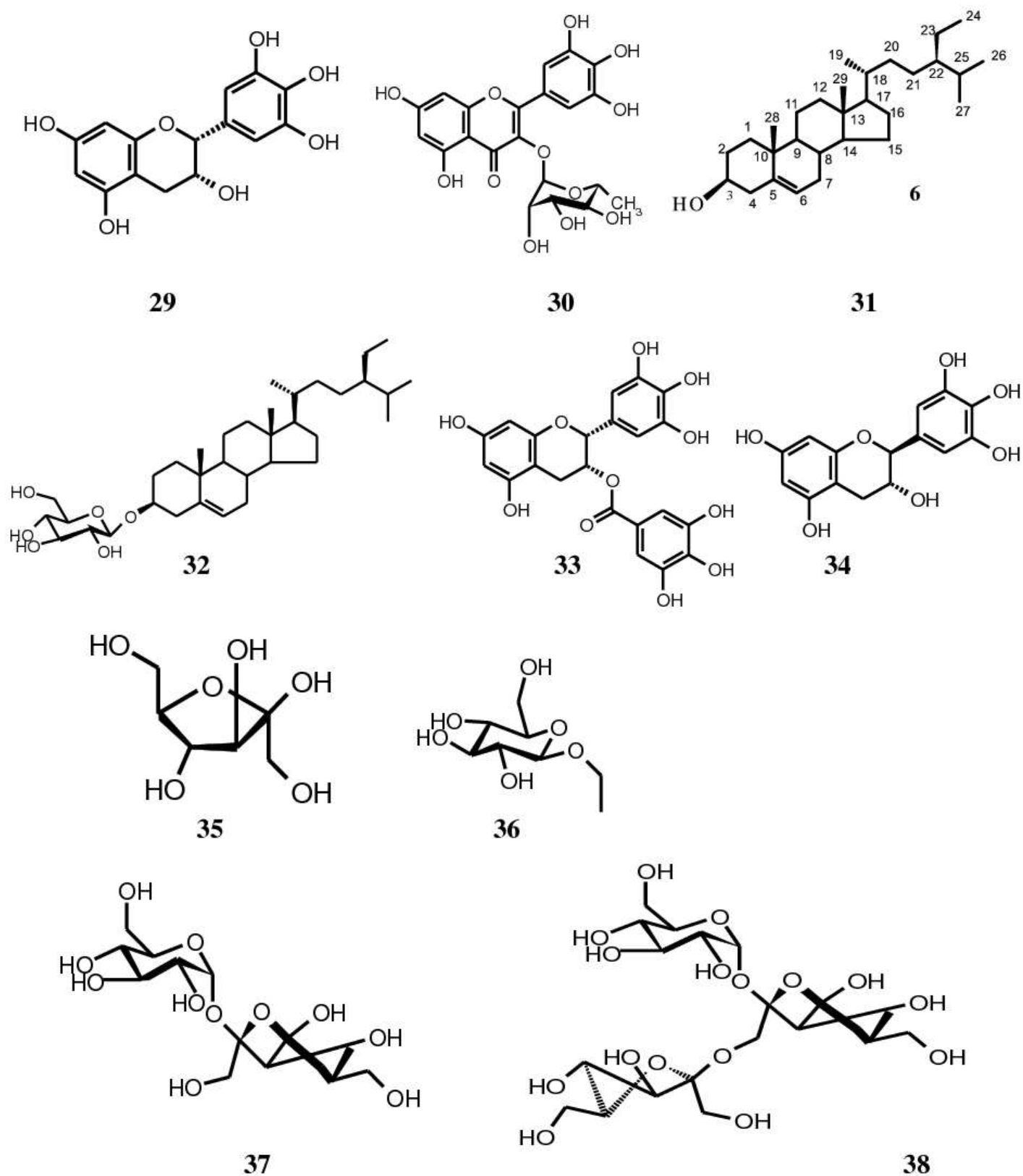


Figure 7. Les structures des composés isolés des espèces du genre *Helianthemum* (suite).

I.4. L'espèce *Helianthemum ruficomum*

Helianthemum ruficomum est une espèce endémique du Sahara septentrional sur lequel aucun rapport n'est disponible jusqu'à présent.

Feuilles petites (1,20. cm de long au plus), les inférieures obovales, les supérieures linéaires ou linéaires-lancéolées. Sépales présentant sur les nervures des poils raides et naissants en faisceau d'un tubercule. Calice nettement tordu. Feuilles vertes en dessus et canescentes en dessous. Grappes simples ou, le plus souvent, géminée [38].

Les synonymes de l'espèce *Helianthemum ruficomum* (Viv.) Spreng : *Cistus ruficomus* Viv., *Helianthemum arnaizii* Sennen, *H. desiderii* Semen, *H. hirtum* subsp. *ruficomum* (Viv.) Maire, *H. eremophilum* Pomel, *H. hirtum* var. *deserti* Coss., *H. desertorum* Willk [38,39]. Un spécimen de cette espèce est présenté dans la figure 8.



Figure 8. *Helianthemum ruficomum*.

I.5. L'espèce *Helianthemum confertum*

Sépales ovales ou ovales-lancéolés, s'atténuant graduellement en pointe aiguë et un peu allongée, intérieurement à soies apprimées. Plante à tiges ligneuses dressées pouvant atteindre 150 cm. Capsule mûre plus courte que les sépales [38].

Les synonymes de l'espèce *Helianthemum confertum* : *Helianthemum confertum* Dunal, *Helianthemum confertum* Willk, *H. ellipticum* (Desf.) Pers. [38,39]. Un spécimen de cette espèce est présenté dans la figure 9.

II.1. Introduction

Les plantes synthétisent les éléments du sol et de l'atmosphère qu'elles absorbent par les racines et par les feuilles, l'eau, l'acide carbonique et les matières minérales et inorganiques.

Le processus de base est l'assimilation photosynthétique du gaz carbonique appelé photosynthèse. Les premiers produits de la photosynthèse sont des substances à basse molécularité appelés métabolites primaires : les saccharides (sucres), puis les acides gras, les acides aminés. En suite sont produits les métabolites spécialisés ou secondaires. Certaines possèdent des vertus thérapeutiques.

Parmi les métabolites spécialisés, les principaux sont les flavonoïdes, qui renforcent les parois des capillaires sanguins, les corps terpéniques (le terpène se trouve dans le menthol, le camphre etc....) eux même forment la base des stéroïdes qu'on retrouve dans de nombreuses vitamines. Les principes amers permettant la digestion des matières grasses, les saponines (sapo=savon) sont employés comme expectorants et diurétiques ; les alcaloïdes à effets thérapeutiques nombreux peuvent être aussi des poisons mortels ; on pourrait prolonger l'énumération : d'autres métabolites spécialisés agissent contre les allergies, l'hypertension, les maladies infectieuses et forment même la base de produits anticonceptionnels.

II.2. Les familles des métabolites secondaires

Les familles des métabolites secondaires sont nombreuses et très diversifiées. Chaque famille est répartie en sous famille selon leur squelette de base. Quelques-unes sont reportées dans le tableau 3.

Tableau 3. Quelques familles des métabolites secondaires.

Famille	Sous famille
Composés phénoliques	Coumarines, Flavonoïdes, Tannins, Anthraquinones
Terpénoïdes	Monoterpènes, Sesquiterpènes, Diterpènes, Triterpènes, Polyterpènes
Composés azotes	Acides aminés non protéiques, Amines, Alcaloïdes

II.3. Généralités sur les polyphénols

Les polyphénols se définissent par des structures chimiques comptant au moins un cycle aromatique portant un ou plusieurs groupements hydroxyles.

Les polyphénols sont le plus grand groupe de substances d'origine végétale, et beaucoup d'entre eux ont été trouvés dans les aliments à base de plantes. Les régimes riches en polyphénols ont été liés à de nombreux avantages pour la santé. Plus de 8000 structures phénoliques sont actuellement connues, et parmi elles plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés [40]. Bien que les polyphénols soient caractérisés chimiquement en tant que composés à caractéristiques structurales phénoliques, ce groupe de produits naturels est très divers et contient plusieurs sous-groupes de composés phénoliques. Fruits, légumes, grains et d'autres types d'aliments et de boissons comme le thé et le chocolat sont riches en polyphénols. La diversité et la large distribution des polyphénols dans les plantes ont conduit à différentes façons de catégoriser ces composés naturels. Les polyphénols ont été classés selon leur source d'origine, leur fonction biologique et leur structure chimique. En outre, la majorité des polyphénols dans les plantes existent sous forme de glycosides avec différentes unités de sucre et sucres acylés à différentes positions des squelettes de polyphénols [40].

II.4. Principaux groupes des polyphénols

La structure, le nombre de noyaux aromatiques et les éléments structuraux qui lient ces noyaux sont les caractères dominants de la classification des polyphénols dont on peut distinguer les principaux groupes suivants :

II.4.1. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés polyphénoliques non flavonoïdes qui peuvent être subdivisés en deux types principaux, l'acide benzoïque (Figure 10) et les dérivés d'acide cinnamique (Figure 11) basés sur les squelettes C-1-C-6 et C-3-C-6. Alors que les fruits et les légumes contiennent beaucoup d'acides phénoliques libres, dans les grains, les acides phénoliques sont souvent sous la forme liés. Ces acides phénoliques ne peuvent être libérés ou hydrolysés que par hydrolyse acide ou alcaline, ou par des enzymes [40].

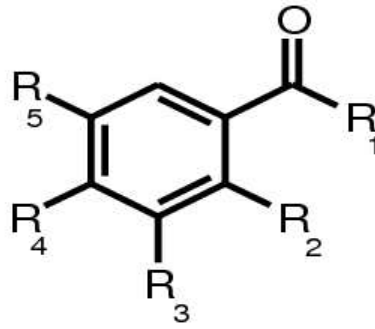


Figure 10. Squelette des dérivés de l'acide benzoïque.

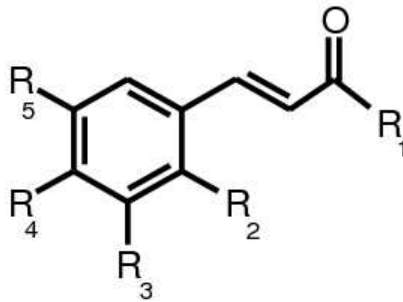


Figure 11. Squelette des dérivés de l'acide cinnamique.

II.4.2. Les Coumarines

Les coumarines, qui sont des dérivés du benzopyrane et dont le squelette de base est reporté dans la figure 12 sont largement distribuées dans les plantes et les huiles essentielles. Ils sont utilisés comme composants de parfum dans les parfums, dentifrices et produits du tabac. De plus, les coumarines sont pharmacologiquement actives et ont été utilisés dans le traitement de diverses maladies, telles que : Les brûlures, les maladies rhumatismales et même le cancer [41].

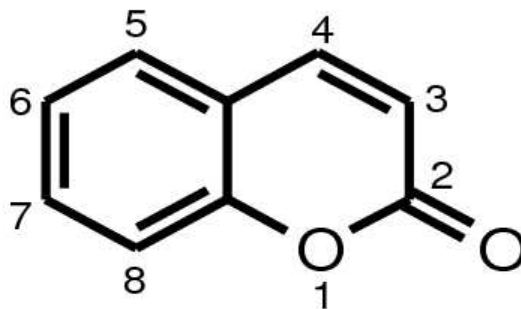


Figure 12. Coumarine.

II.4.3. Les Lignanes

Le terme de lignane désigne historiquement, il a été introduit par Haworth en 1937 et habituellement sont des composés dont le squelette résulte de l'établissement d'une liaison entre les carbones 8 des chaînes latérales de deux unités dérivées du 1-phénylpropane (liaison 8-8') (Figure 13). On dit aussi que ce sont des dimères d'alcools ou d'acides cinnamiques [42]. Selon Gordaliza et al (2004), les lignanes peuvent être trouvés dans plus de 60 familles de plantes vasculaires et ont été isolées à partir de différentes parties de plantes exsudats et résines [43].

Les données expérimentales sont incomplètes et l'on ne peut donc présenter, sauf pour quelques molécules particulières, que des hypothèses partiellement vérifiées. Les lignanes étant optiquement actifs, ils résultent d'un couplage stéréospécifique des carbones C-8 (cela a d'ailleurs été démontré la première fois chez des *Forsythia* spp.) [42].

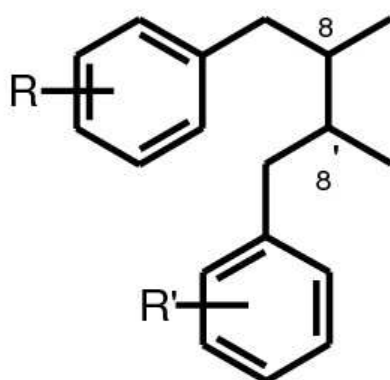


Figure 13. Structure générale des lignanes.

II.4.4. Les Stilbènes

Les stilbènes existent sous deux formes (Figure 14) et sont une classe de polyphénols végétaux et ont suscité un intérêt intense pour leurs structures complexes et diverses activités biologiques. Ces composés et leurs dérivés sont un intérêt considérable pour la recherche et le développement en leur potentiel dans des applications thérapeutiques ou préventives. Cependant, les stilbènes n'ont pas une large distribution dans le règne végétal, et l'étude phytochimique jusqu'à maintenant porté principalement sur quelques familles.

De nombreuses études concernant le resvératrol et ses analogues ont été rapportées, et elles portent principalement sur leurs mécanisme et applications cliniques. La distribution et la

biosynthèse de 22 stilbènes oligomériques a été examinée par Sotheeswaran en 1993, et des chercheurs chinois concernant la distribution et la biosynthèse des stilbènes oligomères est apparue récemment. En outre, un examen axé sur les caractéristiques spectrales, bioactivités et la biosynthèse mimétique des oligostilbènes était publié en 2006. Actuellement, la synthèse du resvératrol et de ses analogues reste un sujet brûlant. Cependant, seuls quelques stilbènes oligomériques ont été préparé en laboratoire en raison de la complexité moléculaire et l'architectures d'oligomères et de stilbène, et donc leur synthèse totale demeure largement inexplorée [44].

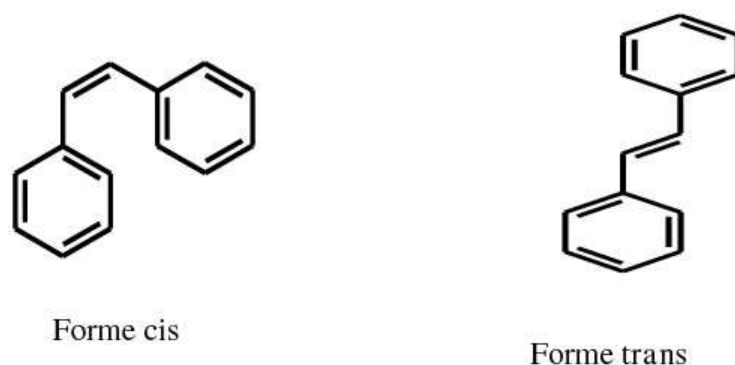


Figure 14. Structures générales des stilbènes.

II.4.5. Les Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des composés naturels de la famille des polyphénols présents en quantités importantes dans une grande variété de fruits et de légumes consommés quotidiennement par l'homme. Les flavonoïdes sont des substances phénoliques isolées à partir d'un large éventail de plantes vasculaires, avec plus de 8000 composés connus [45].

Le tableau 4 reporte quelques types de flavonoïdes présents dans des fruits et des légumes.

Tableau 4. Quelques flavonoïdes présents dans des fruits et des légumes.

Les flavonoïdes	Légumes et fruits
Flavonols (quercétine)	Brocoli, pomme
Flavonones	Citron
Catéchines	Thé vert et noir
Anthocyanines	Fruits rouges, raisin

Les flavonoïdes jouent différents rôles dans l'écologie des plantes. En raison de leurs couleurs attirantes les flavones, flavonols, et les anthocyanidines peuvent agir comme des signaux visuels pour les insectes et les catéchines et les flavanols peuvent représenter un système de défense contre les insectes nocifs pour la plante [45]. Le squelette de base des flavonoïdes est constitué de deux noyaux aromatiques en C₆ reliés par une chaîne en C₃ (Figure 15).

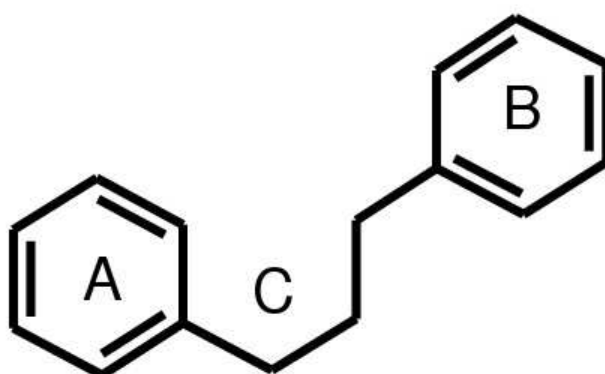


Figure 15. Squelette de base des flavonoïdes

II.4.5.A. Classification

Tous les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation du cycle pyranique central (la chaîne en C₃), le noyau B est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2,3 ou 4 (Figure 16).

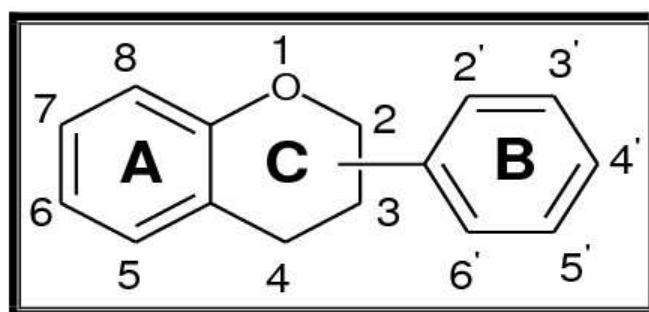


Figure 16. Différentes positions du cycle B sur l'hétérocycle C.

Les flavonoïdes ont le squelette structural général C₆-C₃-C₆ dans lequel les deux unités C₆

(noyau A et noyau B) sont de nature phénolique. En raison du modèle d'hydroxylation et des variations du cycle chromane (noyau C), les flavonoïdes peuvent être divisés en différents sous-groupes tels que les anthocyanes, les flavan-3-ols, les flavones, les flavanones et les flavonols. Bien que la grande majorité des flavonoïdes aient leur noyau B attaché à la position C-2 de noyau C, certains flavonoïdes tels que les isoflavones et les néoflavonoïdes, dont noyau B est relié aux positions C-3 et C-4 du Cercle C, respectivement, se trouvent également dans les plantes. Les chalcones, bien que dépourvus de noyau C hétérocyclique, sont toujours classées comme membres de la famille des flavonoïdes. Ces structures basiques des flavonoïdes sont des aglycones; cependant, dans les plantes, la plupart de ces composés existent sous forme de glycosides. Les activités biologiques de ces composés, y compris l'activité antioxydante, dépendent à la fois de la différence de structure et des motifs de glycosylation [40] (Figure 17).

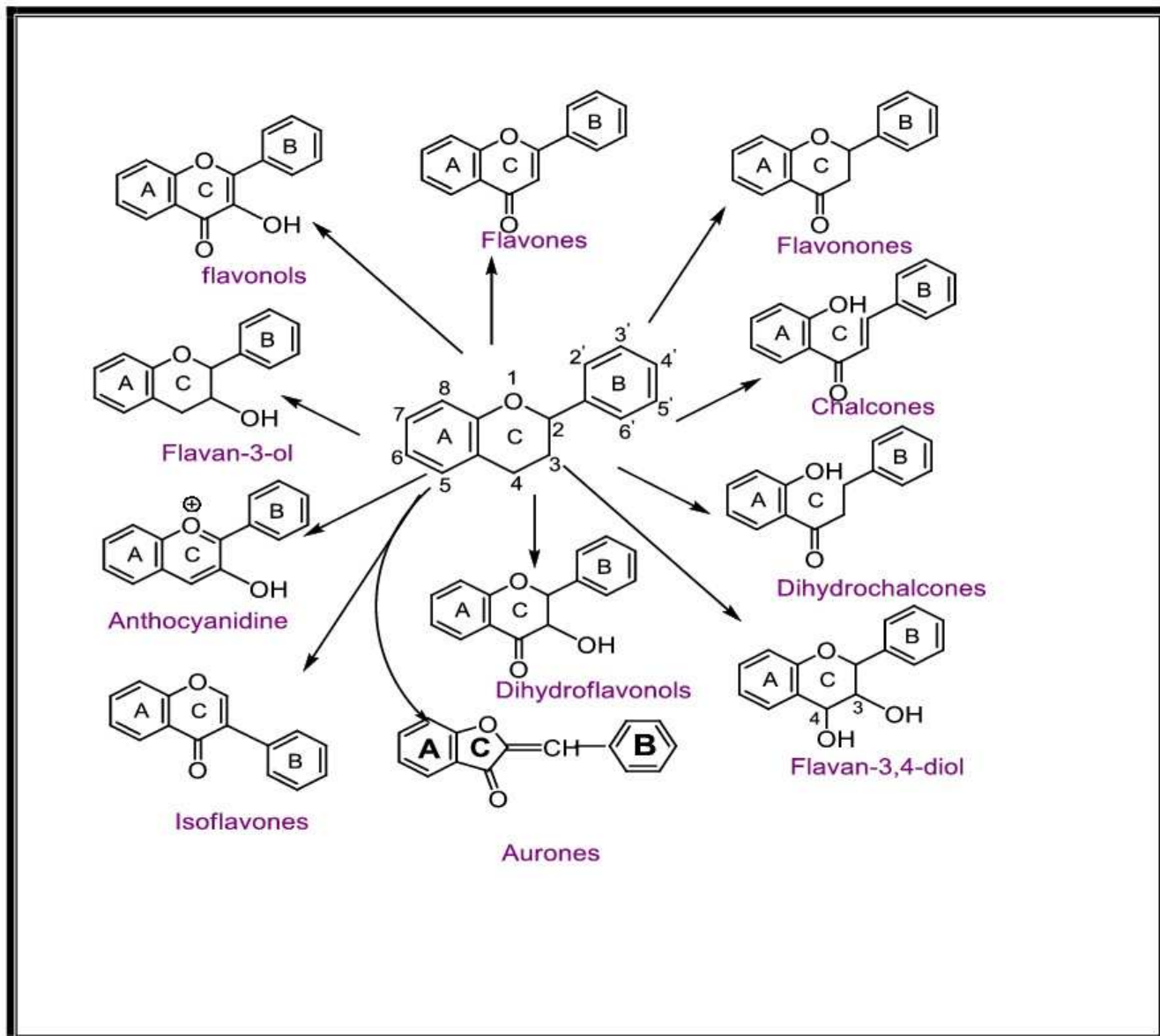


Figure 17. Classification des flavonoïdes.

II.4.5.B. La biosynthèse des flavonoïdes

L'enzyme clé pour la formation du squelette flavonique est la chalconesynthase (CHS) qui catalyse l'étape de condensation de trois unités acétate à partir du malonyl-CoA avec la 4-coumaroyl-CoA pour donner l'intermédiaire en C₁₅, la 4,2',4',6'-tétrahydrochalcone. Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la synthèse des différentes classes de flavonoïdes (Figure 18).

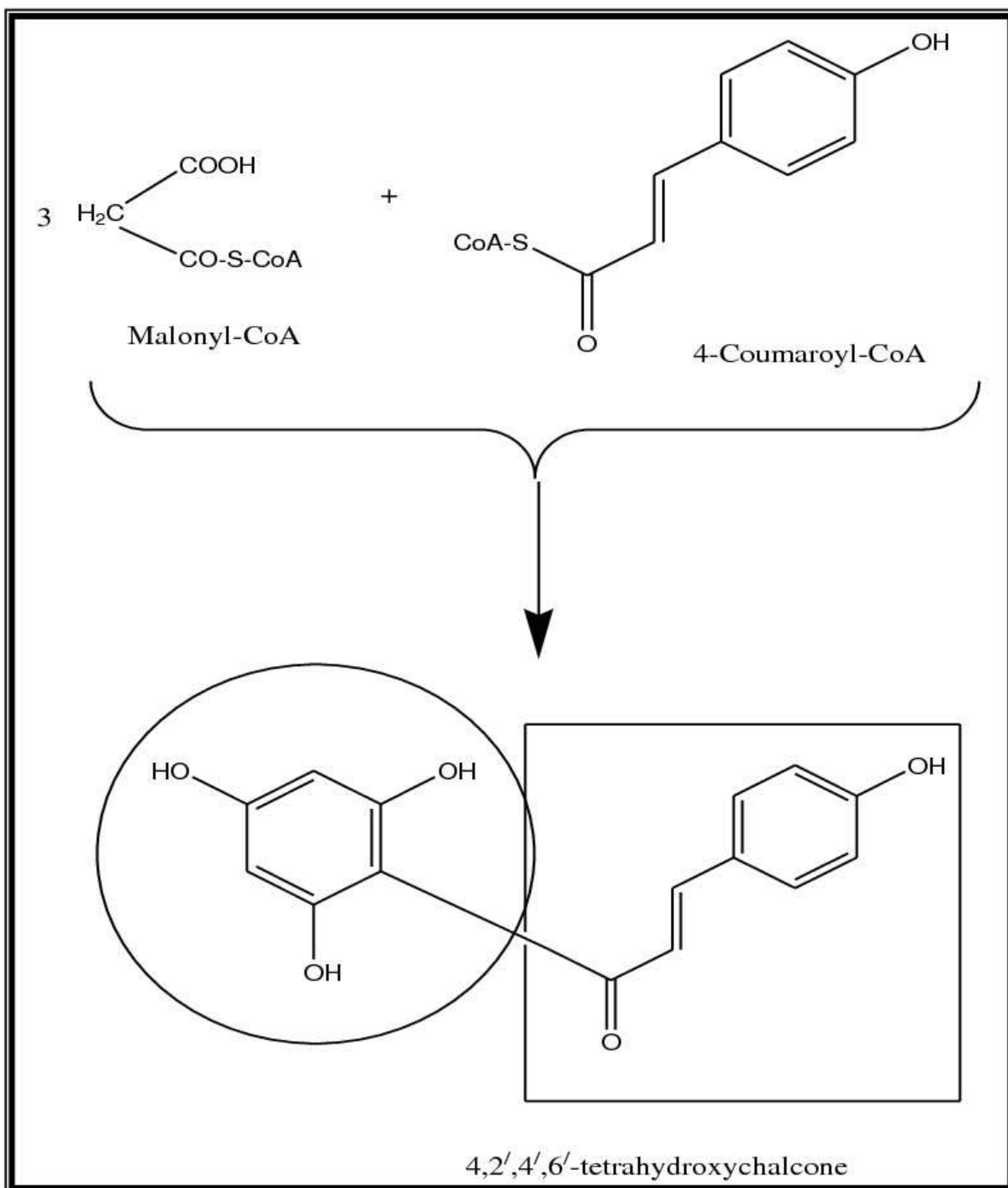


Figure 18. Voie biosynthétique conduisant aux chalcones.

II.4.5.C. Localisation des flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des membres d'une classe de composés naturels répandue dans le règne des végétaux. Largement distribué dans les feuilles, les graines, l'écorce et les fleurs des plantes [46], abondant dans les légumes, présents dans les aliments de nature végétale (légumes, céréales, légumineuses, fruits....) [47]. Cette présence est en grande partie influencée par des facteurs génétiques et des conditions environnementales.

.La plupart des flavonoïdes diététiques dans les aliments sont sous forme de 3-O glycosides et de polymères, mais ils peuvent également exister sous des formes d'aglycones [46].

L'apport moyen en flavonoïdes chez les humains a été estimé à 25mg / jour à 1 g / jour [47].

Le tableau 5 regroupe la distribution nutritionnelle des certains flavonoïdes.

Tableau 5. Sources alimentaires des flavonoïdes [48].

Flavonoïdes	Aliments
Flavanones	Fruits du genre citrus
Flavones	Persil, thym
Flavonols	Brocoli, thé , oignon, pomme, cerise
Catechines	Pomme, thé
Isoflavones	Soja, legumes
Anthocyanidines	Cerise, raisins

La teneur en flavonol et en flavone des aliments végétaux est fortement influencée par des facteurs tels que la variation du type et la croissance, la saison et le climat.

Le tableau 6 montre la composition en flavonoïdes de quelques fruits et légumes.

Tableau 6. Teneur en flavonoïdes de certains aliments végétaux (mg / kg) de poids frais [49].

Echantillon vegetal	Total des flavonoïdes
Légumes	
Brocoli	46.2
Chou blanc	17.7
Oignon rouge	124.1
Oignon pourpre	195.6
Poivre	20.1
Epinard	338.6
Persil feuilles	80.8
Céleri feuilles	402.8
Céleri racine	25.9

II.5. Intérêts des polyphénols

Les polyphénols sont des métabolites secondaires que les plantes produisent pour se protéger d'autres organismes. Il a été démontré que les polyphénols alimentaires jouent un rôle important dans la santé humaine. La consommation élevée de fruits, de légumes et de céréales complètes, riches en polyphénols, a été liée à la réduction des risques de nombreuses maladies chroniques, y compris le cancer, les maladies cardiovasculaires, l'inflammation chronique et de nombreuses maladies dégénératives.

Les polyphénols se sont révélés être de puissants antioxydants qui peuvent neutraliser les radicaux libres en donnant un électron ou un atome d'hydrogène. Le système hautement conjugué et certains motifs d'hydroxylation tels que le groupe 3-hydroxy dans les flavonols sont importants dans les activités antioxydantes et ils suppriment aussi les radicaux libres, réduisant ainsi la vitesse d'oxydation en inhibant la formation ou la désactivation des espèces actives et des précurseurs des radicaux libres. Plus fréquemment, ils agissent comme capteurs de radicaux directs des réactions en chaîne de la peroxydation lipidique (disjoncteurs de chaîne) [40].

II.6. Relation structure-activité

* Cas des flavones et flavonols

La preuve des effets protecteurs des antioxydants est fondée sur diverses études. Il a été montré que les flavonoïdes agissent comme des fixateurs de plusieurs espèces oxydantes ; tel que l'anion peroxyde (O₂⁻), le radical hydroxyle ou les radicaux peroxydes.

Les données de la littérature montrent une mise en évidence de certaines relations entre la structure chimique du flavonoïde et l'activité antioxydante :

- En général, les flavonoïdes qui ont des groupes ortho-hydroxyle ou quatre groupes hydroxyles libres présentent une forte activité inhibitrice et la glycosylation et la méthylation peuvent réduire notablement leur activité.
- Comparé à d'autres positions, le groupe 3-oxo sur le squelette d'une flavone semble avoir plus d'influence, tandis que le groupe 5-hydroxyle semble n'avoir aucune action.
- D'autre part, il est intéressant de noter que tous les flavonoïdes testés dans des études ont une liaison C-2-C-3 non saturée. La double liaison C-2-C-3 est essentielle pour

l'effet antioxydant des flavonols. Il a également été rapporté qu'une liaison C-2-C-3 saturée présente une capacité antioxydante plus élevée qu'une liaison insaturée [50].

- La relation structure-activité des flavonoïdes en tant qu'inhibiteurs de la xanthine oxydase et des piègeurs du radical superoxyde, produits par l'action de l'enzyme xanthine oxydase, a été étudiée. Les groupes hydroxyles en C-5 et C-7 et la double liaison entre C-2 et C-3 étaient essentiels pour une activité inhibitrice élevée sur la xanthine oxydase. Les flavones ont montré une activité inhibitrice légèrement plus élevée que les flavonols [51].

III. Etude chimique des deux espèces de la famille Cistaceae

Les espèces que nous avons sélectionnées pour étude appartiennent à la famille Cistaceae du genre *Helianthemum*. Une étude bibliographique approfondie sur les espèces de ce genre a montré qu'elles n'ont fait l'objet d'aucune investigation phytochimique auparavant.

III.1. Récolte du matériel végétal

Le matériel végétal (parties aériennes) a été cueilli de la zone de Mogheul (Sud ouest de l'Algérie) et a été authentifié par Mr. Mohamed Benabdelhakem, directeur de l'agence de protection de la nature à Bechar sur la base de Quezel et Santa [38]. Un spécimen (HCC0512-MOG-ALG-60) a été déposé à l'Herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri Constantine 1. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, ces parties aériennes ont été coupées en petits morceaux et pesées.

- Masse *Helianthemum ruficomum* = 1448,02 g.
- Masse *Helianthemum confertum* = 2278,87g.

III.2. Protocole Expérimental d'extraction

Les parties aériennes (1448.02 g de *Helianthemum ruficomum*) et (2278.87g de *Helianthemum confertum*) sont broyées puis mises à macérer dans une solution Ethanol/Eau (80 : 20 v/v) pour la première espèce et Méthanol/Eau (80 : 20 v/v) pour la deuxième espèce pendant 72 heures. L'opération a été répétée trois fois avec renouvellement du solvant.

Après filtration, les trois solutions hydroalcooliques de chaque espèce sont réunies puis concentrées sous vide à une température n'excédant pas 35⁰ C. Les deux extraits obtenus séparément sont dilués avec l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1 Kg de matière sèche sous agitation magnétique. Les solutions ainsi obtenue sont laissées pendant une nuit au frais puis filtrées. Les filtrats subissent une extraction de type liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants de polarité croissante, en commençant par l'éther de pétrole puis le chloroforme, ensuite l'acétate d'éthyle et enfin le n-butanol.

Les phases organiques récupérées sont séchées avec Na₂SO₄ Anhydre puis filtrées, concentrées sous pression réduite à sec et pesées. Ce protocole expérimental est représenté dans les figures 19 et 20.

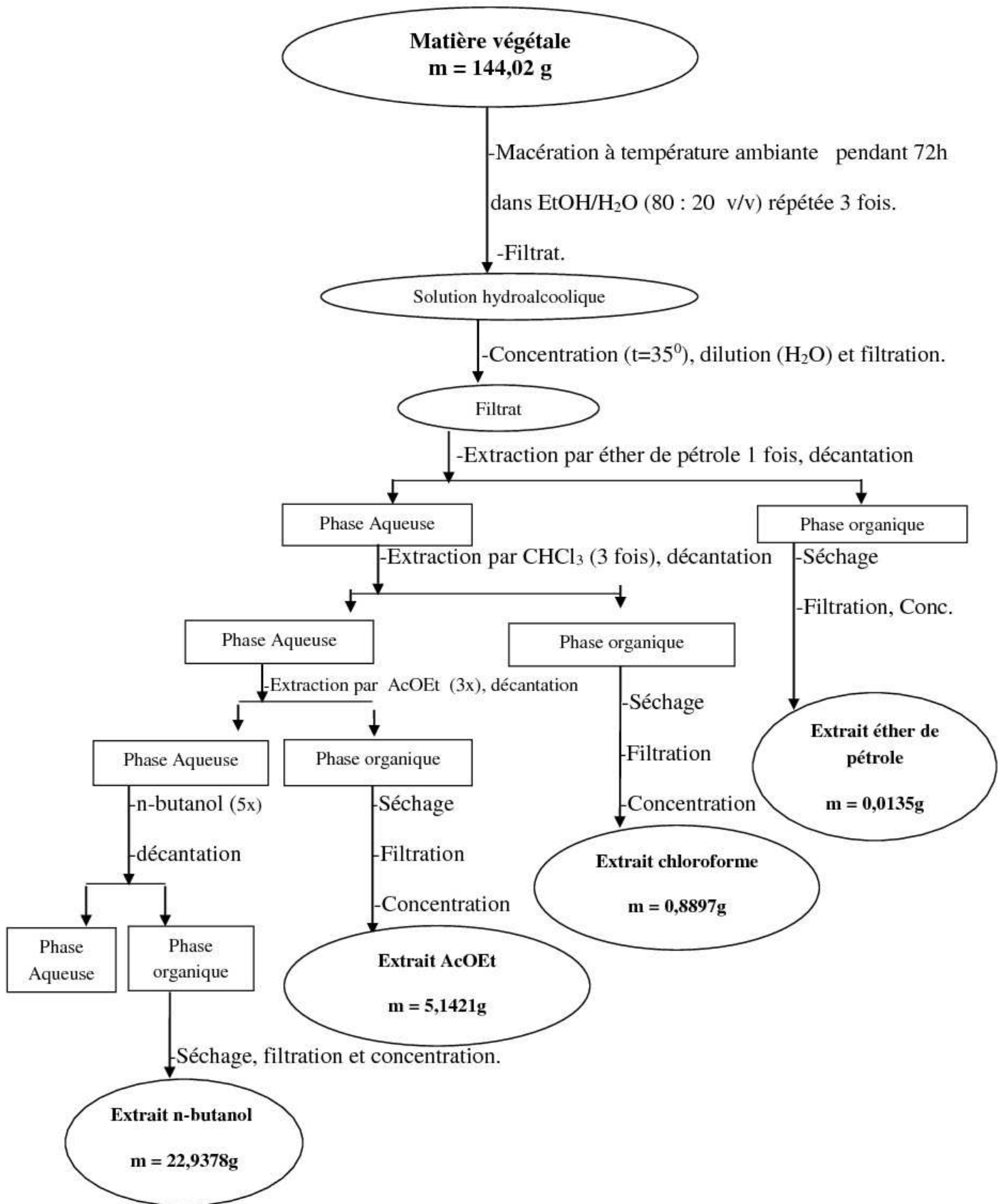


Figure 19. Protocole d'extraction de *Helianthemum ruficomum*.

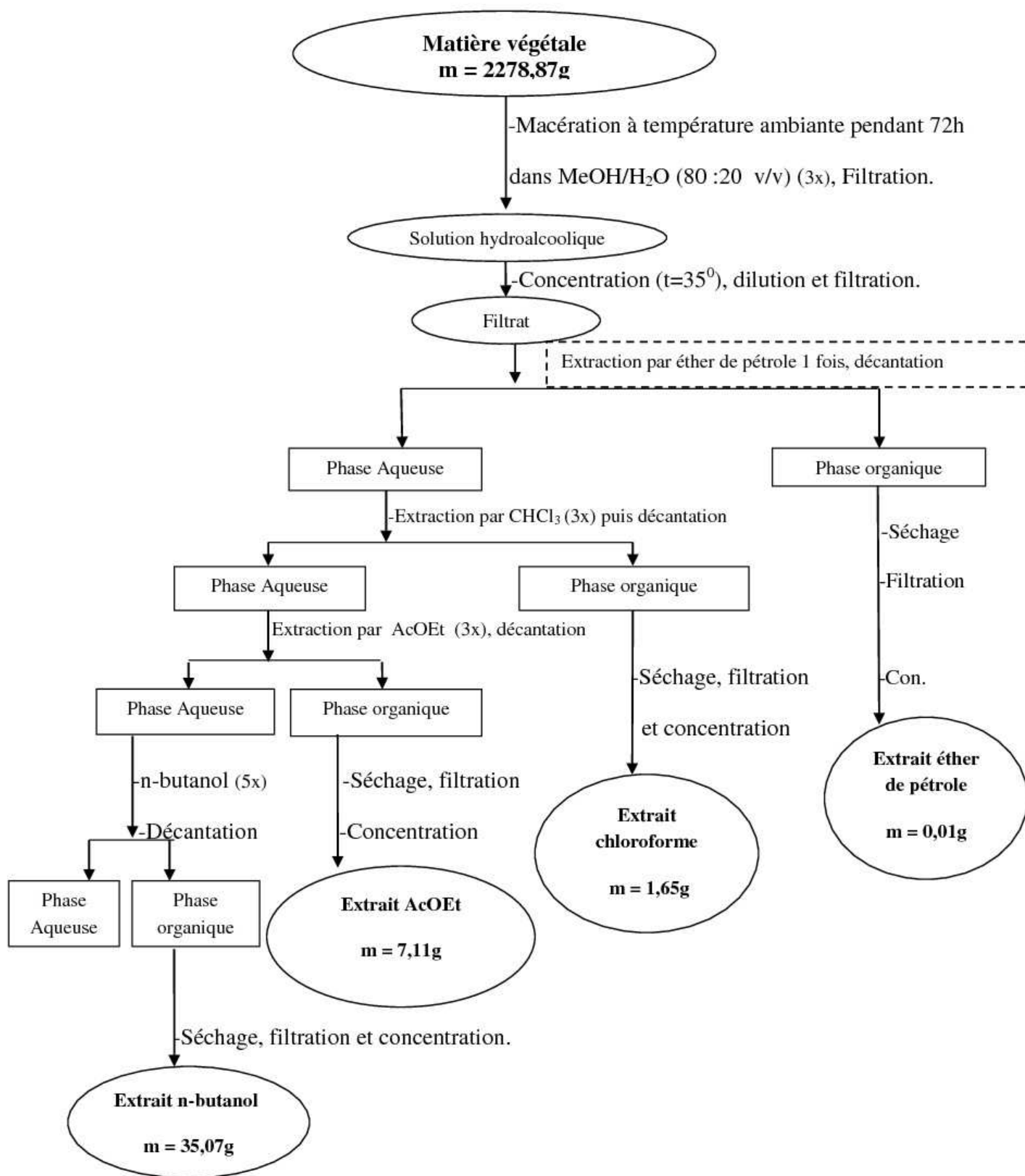


Figure 20. Protocole d'extraction de *Helianthemum confertum*.

III.3. Etude des extraits

Les extraits obtenus sont étudiés par deux méthodes :

1- les extraits sont injectés dans l'appareil HPLC-ABTS en ligne pour analyser de manière spécifique les composés anti-radicalaires en utilisant la méthode HPLC couplée avec le dosage ABTS en ligne.

2- les extraits sont soumis à un traitement par chromatographie analytique sur couche mince de gel de silice déposé sur une feuille d'aluminium, pour mettre au point l'éluant ou le système d'éluant qui donnerait les meilleurs résultats de séparation en chromatographie sur colonne.

✚ Principe de la méthode HPLC-ABTS en ligne

La détermination des molécules anti-radicalaires au sein d'un échantillon complexe a été réalisée par l'association d'une technique séparative, la chromatographie liquide à haute performance, et d'un système de détection mettant en évidence de manière spécifique, la capacité des molécules individuelles à réduire une espèce radicalaire grâce à un système de réaction post-colonne (Figure 21). Ainsi, les composés d'un échantillon sont séparés sur une colonne chromatographique grâce à un premier groupe de pompes, puis sont détectés dans un premier temps par un détecteur à barrette de diodes. En sortie du premier détecteur, la phase mobile, véhiculant les composés séparés, est ensuite mélangée au réactif ABTS^{•+} apporté par la 2^{ème} pompe. Le mélange phase mobile/ABTS^{•+} est ainsi acheminé à travers une boucle de réaction jusqu'au deuxième détecteur destiné à enregistrer la décoloration du radical. La présence d'une molécule peut donc être détectée par absorbance classique dans l'UV-visible (conditionné par la présence d'un chromophore au sein de sa structure), et l'activité anti-radicalaire se manifestera par l'apparition d'un pic négatif au niveau du 2^{ème} détecteur, traduisant la décoloration du réactif.

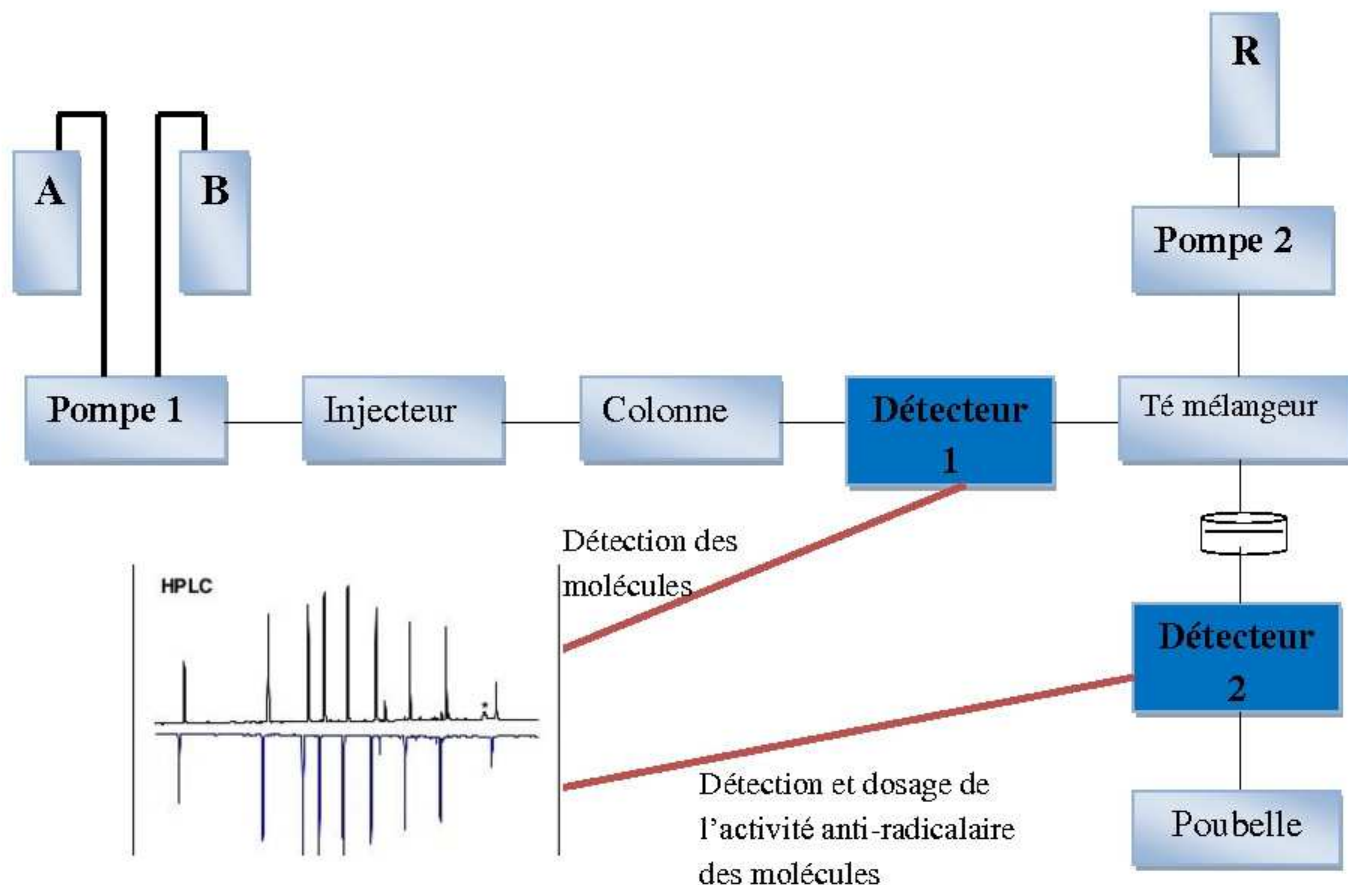


Figure 21. Montage du couplage HPLC– ABTS⁺

✚ Protocole

Le système utilisé pour analyser les extraits est composé d'un système chromatographique classique et d'autre part d'un système permettant la réaction post-colonne. La chaîne chromatographique est constituée d'une pompe water 600S Controller, d'un Autosampler, un détecteur à barrette de diodes DAD 3000 (RS) (Dionex Ultimate 3000 series Diodes Array Detectors) et un deuxième détecteur VWD 3000 (Variable Wavelength Detectors). Le réactif ABTS⁺ est délivré avec 0.5 ml/min comme débit et mélangé avec la phase mobile sortant du premier détecteur au moyen d'une jonction-T. L'ensemble est acheminé jusqu'au second détecteur, au travers d'une boucle de réaction PEEK mesurant 20 m de long avec un diamètre interne de 0.25 mm. La détection de la décoloration du radical ABTS⁺ est suivie à 412 nm.

La colonne chromatographique utilisée dans la séparation des phases est de type Kromasil C₁₈ (4.60 mm x 250 mm) avec une taille des particules de 5µm. La température de la colonne est 25°C. La phase mobile, délivrée avec un débit de 1ml/min, est composée de deux voies : 0,1% acide formique dans H₂O Milli-Q (solvant A) et 100% acétonitrile (solvant B) avec le gradient présenté dans le tableau 7.

Tableau 7. Gradient de la phase mobile pour l'analyse des extraits.

Temps (min)	Voie A %	Voie B%
0	90	10
10	80	20
20	80	20
50	50	50
55	50	50
56	20	80
66	20	80
67	90	10
80	90	10

III.3.1. Etude de l'extrait acétate d'éthyle de *Helianthemum ruficomum*

III.3.1.A. Analyse de l'extrait acétate d'éthyle par HPLC-ABTS⁺, détermination de ses composants antioxydants

Injecté dans les conditions précédemment décrites, cet extrait montre d'une part une composition chimique riche (Figure 22) et d'autre part plusieurs constituants doués d'activité antioxydante (Figure 23).

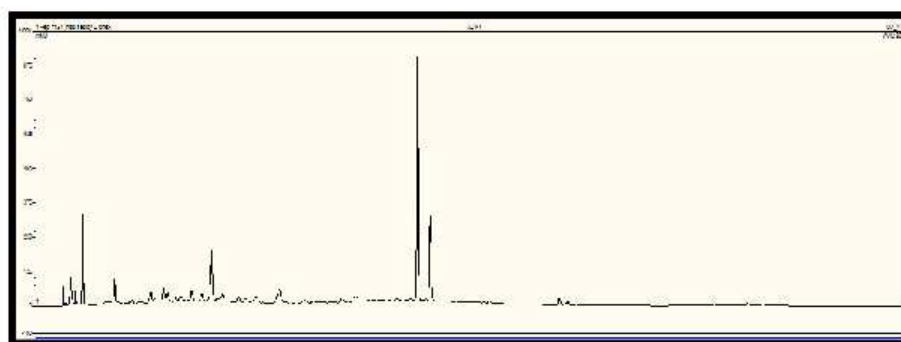


Figure 22. Chromatogramme HPLC-DAD de l'extrait acétate d'éthyle de *H. ruficomum*.

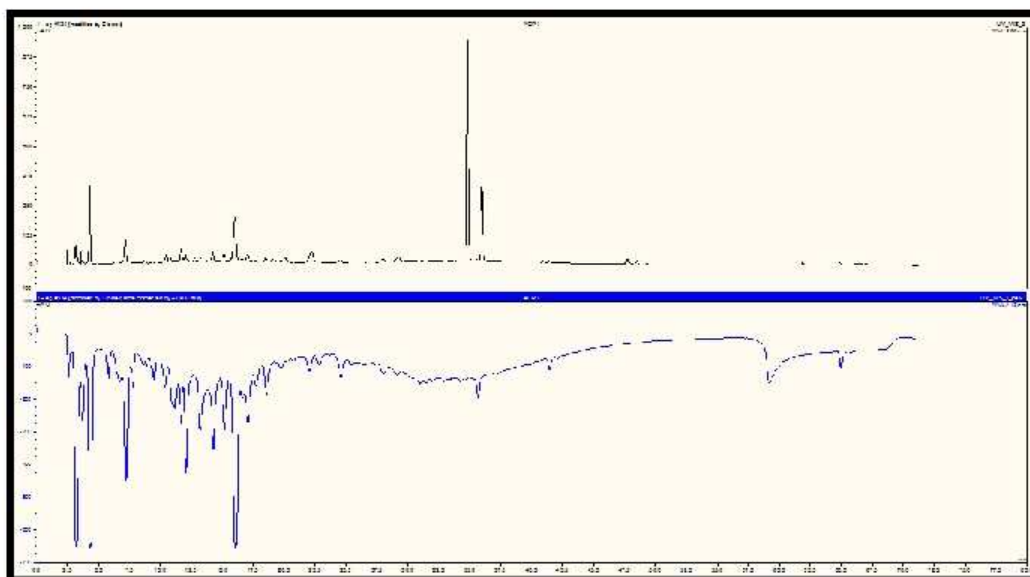


Figure 23. Détermination chromatographique des composés de l'extrait AcOEt (chromatogramme supérieur) et leur activité antioxydante correspondante (chromatogramme inférieur) par HPLC- ABTS⁺

III.3.1.B. Séparation et purification des composants de l'extrait AcOEt de *Helianthemum ruficomum*

Grâce à des tests effectués sur les plaques CCM analytiques, le système chloroforme/ méthanol a été retenu. Ainsi, 4 g de l'extrait acétate d'éthyle de *Helianthemum ruficomum* ont subi un fractionnement par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice (Si gel Fluka, cat. 60737, 40-63 µm). Les 4 g de cet extrait ont été dissous dans 5 ml de méthanol est mélangés à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur une colonne de gel de silice (160 g), préparée dans le chloroforme. L'élution a été réalisée par du chloroforme avec introduction progressive de méthanol. Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couches minces de gel de silice déposées sur feuilles d'aluminium (TLC Si gel 60 F₂₅₄, 0,2 mm) qui après développement dans des cuves en verre avec des systèmes adéquats, ont été visualisées sous lampes UV à 254 et 365 nm, puis révélées avec l'anisaldéhyde et chauffées pendant 3 min à 100°C. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 8.

Tableau 8. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait AcOEt de *Helianthemum ruficomum*

Chloroforme (%)	Méthanol (%)	Nombre de V (420 ml) de la colonne	Lots (100 ml)	Fractions (masse, mg)
100	0	3V	1-17	F1 (1,66)
99	1	3V	18	F2 (1,3)
98	2	3V	19-21	F3 (6)
98	2	3V	22-24	F4 (30)
98	2	3V	25-26	F5 (5,1)
98	2	3V	27	F6 (3,79)
98	2	3V	27	F7 (9,8)
98	2	3V	28-29	F8 (22,4)
97	3	3V	30-33	F9 (63,4)
97	3	3V	34-43	F10 (145)
96	4	3V	44-48	F11 (76,4)
96	4	3V	49-52	F12 (57,8)
95	5	3V	53-56	F13 (48,3)
95	5	3V	57-60	F14 (69,3)
95	5	3V	61-66	F15 (78,7)
94	6	3V	67	F16 (113,7)
93	7	3V	68-84	F17 (930,6)
92	8	3V	85-99	F18 (382,9)
90	10	3V	100-114	F19 (136,6)
89	11	3V	115-128	F20 (177,1)
86	14	12V	129-159	F21 (260,6)
86	14	3V	160-163	F22 (49,7)
83	17	9V	164-194	F23 (258,1)
82	18	3V	195-211	F24 (108,1)
81	19	3V	212-215	F25 (17,5)
70	30	3V	216-269	F26 (428)
65	35	3V	270-295	F27 (82,2)
60	40	3V	296-320	F28 (62,5)
58	42	3V	321-335	F29 (16,3)
58	42	3V	336-340	F30 (58)
55	45	3V	341-348	F31 (10,8)
53	47	3V	349-359	F32 (6,2)
53	47	3V	360-365	F33 (3,8)

Tableau 8. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait AcOEt de *Helianthemum ruficomum* (suite)

50	50	3V	366-378	F34 (10)
45	55	3V	379-393	F35 (15,2)
40	60	3V	394-403	F36 (15,5)
35	65	3V	404-414	F37 (15)
30	70	3V	415-426	F38 (27,2)
20	80	3V	427-440	F39 (16,2)
0	100	3V	441-463	F40 (18,6)

✓ **Etude de la fraction F12**

La fraction 12 (57,8 mg) a été rechromatographiée sur une plaque préparative de gel de silice (Si gel 60 PF₂₅₄+₃₆₆ (20 x 20 cm, 1 mm d'épaisseur, Analtech cat. 02014). élue par le système : chloroforme/ méthanol (12 :1), pour donner le produit **A12-8** (composé 1) (m=1 mg), d'une couleur orange sous lampe UV 365 nm et invisible à 254 nm.

✓ **Etude de la fraction F16**

Poids de cette fraction = 113,7 mg.

Après des tests sur plaques analytiques de cette fraction nous avons opté pour le système convenable : chloroforme/ méthanol : 7/1 (2 éluions). Ainsi cette fraction a été déposée sur plaques préparatives de gel de silice. Visionnées après élution par la lumière de Wood, ces plaques montrent plusieurs taches. Nous nous sommes intéressées à la plus intense d'entre elles notamment **A16-5** de fluorescence noir-violette.

Cette sous-fraction a subi une purification sur plaques analytiques pour donner le produit que nous avons noté **A16-5b** (1,7 mg) (composé 2).

✓ **Etude de la fraction F17**

Le poids de la fraction = 930,6 mg.

Après des tests sur plaques analytiques de gel de silice en vue de la sélection du système d'élution, nous avons retenu le système : CHCl₃/ MeOH : 2/0,5. La plaque a montré une tache intense avec une fluorescence noir-violette sous les radiations UV 254 et 365 nm et Après révélation avec l'ammoniac et l'anisaldéhyde, cette fraction a montré une tache de couleur jaune intense et une autre tache noire. La fraction a alors été déposée sur plaques préparatives de gel de silice normale. La bande N°2, plus intense que les autres, a donné après élution avec un mélange de méthanol et de chloroforme : 2/0,5 le composé **A17-2** (80 mg)

noté composé 3. La bande N^o3, a donné après élution avec le même mélange, le composé A17-3 (5 mg). La purification de ce dernier sur plaques analytiques avec Acétate d'éthyle/ méthanol/ eau : 9/1/1 a permis d'isoler un produit pur le A17-3B (3 mg) noté composé 4.

III.3.2. Séparation et purification des composants de l'extrait n-butanol

III.3.2.A. Analyse de l'extrait n-butanol par HPLC-ABTS⁺, détermination de ses composants antioxydants

Comme l'extrait AcOEt, l'extrait n-BuOH a été injecté dans les conditions précédemment décrites, cet extrait montre également d'une part, une composition chimique riche (Figure 24) et d'autre part plusieurs constituants doués d'activité antioxydante (Figure 25).

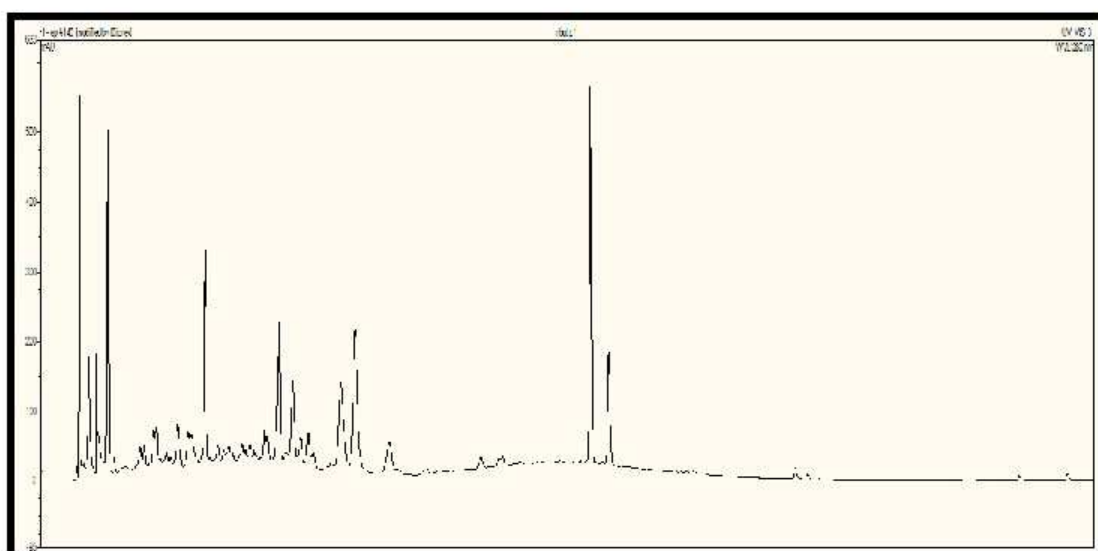


Figure 24. Chromatogramme HPLC-DAD de l'extrait n-BuOH de *H. ruficomum*.

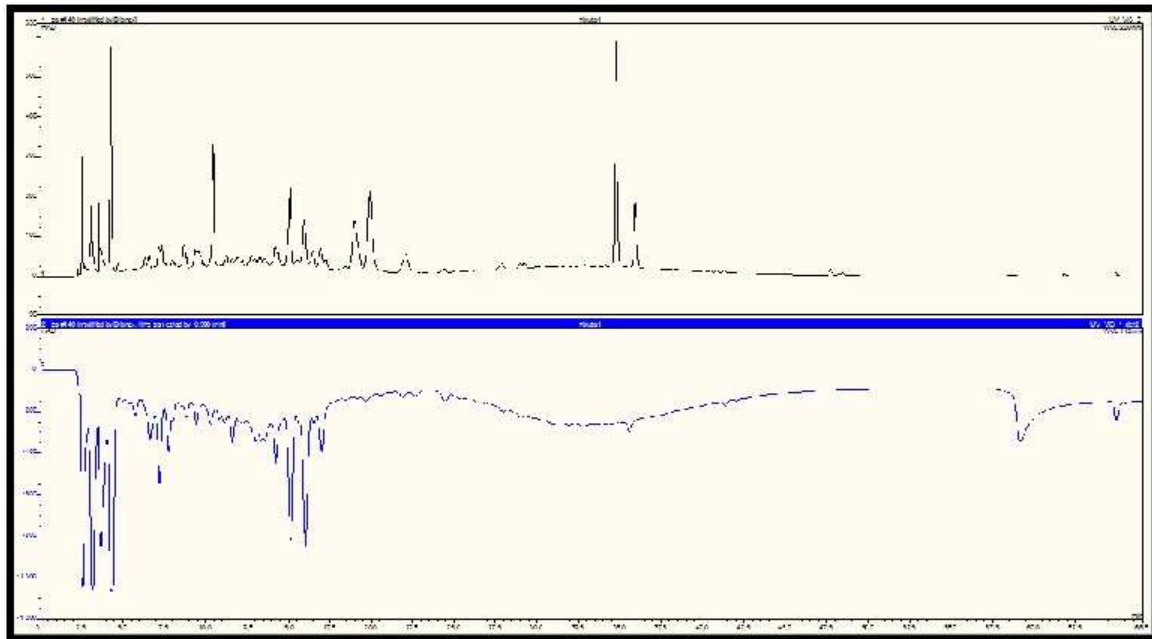


Figure 25. Détermination chromatographique des composants de l'extrait n-BuOH de *H. ruficomum* (chromatogramme supérieur) et leur activité antioxydante correspondante (chromatogramme inférieur) par HPLC- ABTS⁺

III.3.2.B. Fractionnement de l'extrait n-butanol

L'extrait n-butanol de *Helianthemum ruficomum* (16 g) a été fractionné par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice 60, 63-200 μm (70-230 mesh). L'extrait dissout dans le méthanol est mélangé à une quantité de gel de silice (13 g), l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur une colonne de gel de silice (478 g) préparée dans le dichlorométhane. L'élution a été réalisée par du dichlorométhane avec introduction progressive de méthanol. Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couches minces de gel de silice déposées sur feuilles d'aluminium (TLC Si gel 60 F₂₅₄, 0,2 mm) qui après développement dans des cuves en verre avec des systèmes adéquats, ont été visualisées sous lampe UV (254 et 365 nm), puis révélées avec l'anisaldéhyde et chauffées pendant 3 min à 100°C. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 9.

Tableau 9. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait n-butanol de *Helianthemum ruficomum*

Dichlorométhane (%)	Méthanol (%)	Nombre de V (1190 ml) de la colonne	Lots (100 ml)	Fractions (masse, mg)
100	0	5V	1-25	F1 (57,2)
100	0	1V	26-35	F2 (8,2)
100	0	1V	36-49	F3 (10,6)
100	0	1V	50-60	F4 (29,2)
95	5	3V	61-69	F5 (47,9)
95	5	1V	70-75	F6 (228,5)
95	5	1V	76-96	F7 (180,6)
90	10	3V	97-122	F8 (617,2)
90	10	1V	123-127	F9 (288,2)
85	15	3V	128-130	F10 (351,6)
85	15	1V	131-141	F11 (1281,7)
85	15	1V	142-145	F12 (296)
85	15	1V	146-159	F13 (2837,3)
80	20	3V	160-177	F14 (2054)
80	20	1V	178-187	F15 (415,8)
75	25	3V	188-202	F16 (1303,7)
75	25	1V	203-206	F17 (267,4)
75	25	1V	207-215	F18 (354)
70	30	1V	216-222	F19 (262,4)
70	30	1V	223-231	F20 (281,5)
70	30	1V	232-243	F21 (248,6)
70	30	1V	244-254	F22 (202,7)
65	35	3V	255-263	F23 (239)
65	35	1V	264-273	F24 (211)
65	35	1V	274-284	F25 (104,9)
60	40	3V	285-298	F26 (143,7)
60	40	1V	299-309	F27 (79,2)
60	40	1V	310-321	F28 (179,2)
55	45	3V	322-334	F29 (13,3)
55	45	1V	335-347	F30 (77,1)
50	50	3V	348-351	F31 (15,2)
50	50	3V	352-358	F32 (77,1)
0	100	3V	359-372	F33 (22,1)

✓ Etude de la fraction F4

Cette fraction a montré la formation d'un précipité blanc que nous avons filtré (29,2 mg) et lavé avec du méthanol pour donner un mélange de deux produits F4-1 (composé 5) et F4-2 (composé 6).

✓ Etude de la fraction F9

Poids de la fraction= 288,2 mg

Une aliquote d'environ 100 mg de cette fraction est injectée en HPLC semi-préparative en phase inverse, dans une colonne C₁₈, 250 x 10 mm, 5µm, thermo scientific, , avec une phase mobile délivrée à 5 ml/min constituée d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique (solvant A) et d'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique (solvant B). Le gradient était le suivant: 0 min, 0% B; 30 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min. Deux produits sont séparés avec cette méthode, B9-1 a été élué au bout de 14,25 min et B9-2 a été élué au bout de 31 min (Figure 26). La collection de ces deux produits après plusieurs injections a permis l'isolement de B9-1 (2.1 mg) noté composé 7 et B9-2 (2,8 mg) noté composé 4.

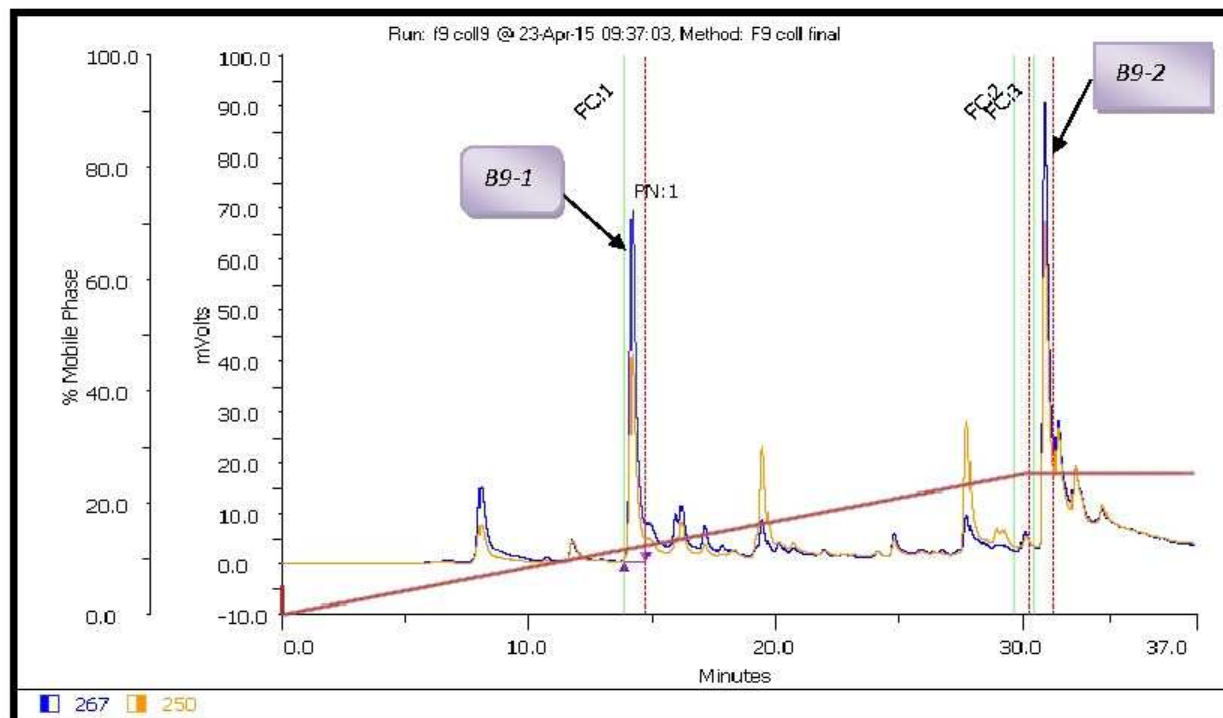


Figure 26. Chromatogramme HPLC semi-préparative en phase inverse de la fraction F9.

Après séparation et afin de vérifier la pureté ultime des composés isolés, ces produits (composés 4 et 7) sont réinjectés en HPLC Analytique (Varian, Model 410 Varian Prostar),

La colonne chromatographique utilisé étant bien entendu la Kromasil C₁₈ avec une taille de particules de 5µm, 4.60 mm*250 mm (cette colonne a été utilisé pour tous les produits isolés), la détection est assurée par un détecteur UV à barrettes de diodes. La phase mobile est composé de deux voies : **A** : H₂O Milli-Q/Acide formique (99,9/0,1) (V/V) ; **B** : Acétonitrile/Acide formique (99,9/0,1) (V/V), sont délivrées avec un débit de 1ml/min, avec le gradient présenté dans le tableau 10. Les chromatogrammes relatifs à ces deux composés sont représentés dans les figures 27 et 28 respectivement.

Tableau 10. Gradient de la phase mobile pour l'analyse des produits séparés.

Temps (min)	Voie A %	Voie B%
0	95	5
18	63	37
20	63	37
21	95	5
33	50	5

*Ce gradient a été utilisé pour tous les produits séparés.

Tous les produits séparés sont injectés dans la même HPLC Analytique (Varian) sauf B13-1 et B13-3 ont été injecté dans Dionex Ultimate 3000 series Diodes Array Detectors.

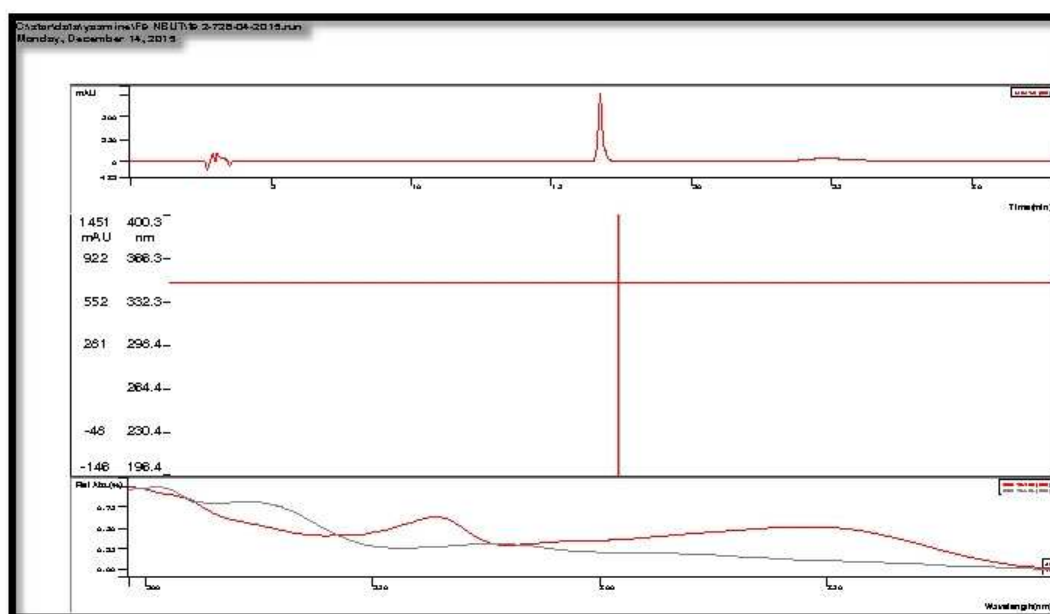


Figure 27. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de composé 4.

B9-2 : Tr =16,82 min, longueur d'onde = 346 nm, Absorbance = 758 mAU

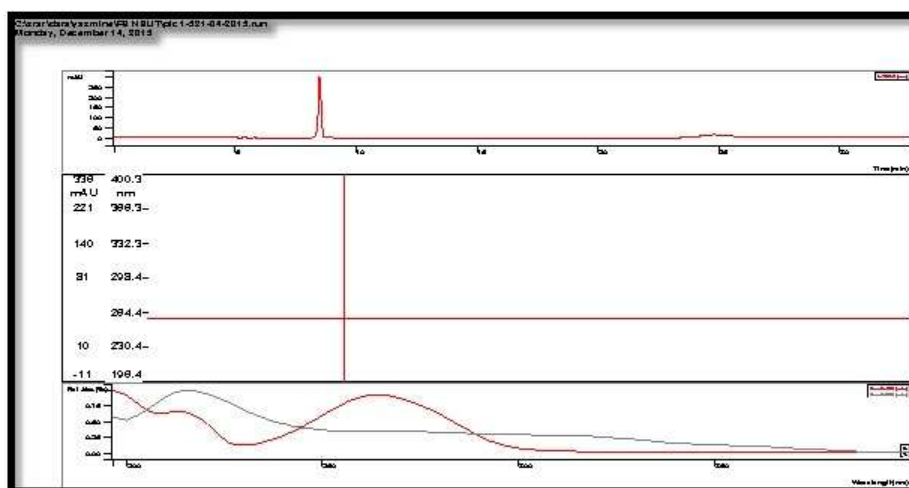


Figure 28. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de composé 7.

B9-1 : Tr = 8,51 min, longueur d'onde = 258 nm, Absorbance = 9 mAU.

✓ Etude de la fraction F11

Poids de la fraction= 1281,7 mg.

Une quantité de la fraction est injectée en HPLC semi-préparative en phase inverse , dans une colonne C₁₈, 250*10 mm, 5µm, thermo scientific, avec une phase mobile délivrée à 5 ml / min constituée d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique (solvant A) et d'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique (solvant B). Le gradient était le suivant: 0 min, 0% B; 30 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min. Quatre produits sont séparés avec cette méthode, B11-1, B11-2, B11-3 et B11-4. Ils ont été élué au bout de 7,5 min, 12,5 min, 17,75min et 28 min respectivement (Figure 29). La collection de ces produits après plusieurs injections a permis l'isolement de **B11-1** (3 mg), **B11-2** (8 mg) (composé **8**), **B11-3** (1,2 mg) (composé **9**) et **B11-4** (5 mg).

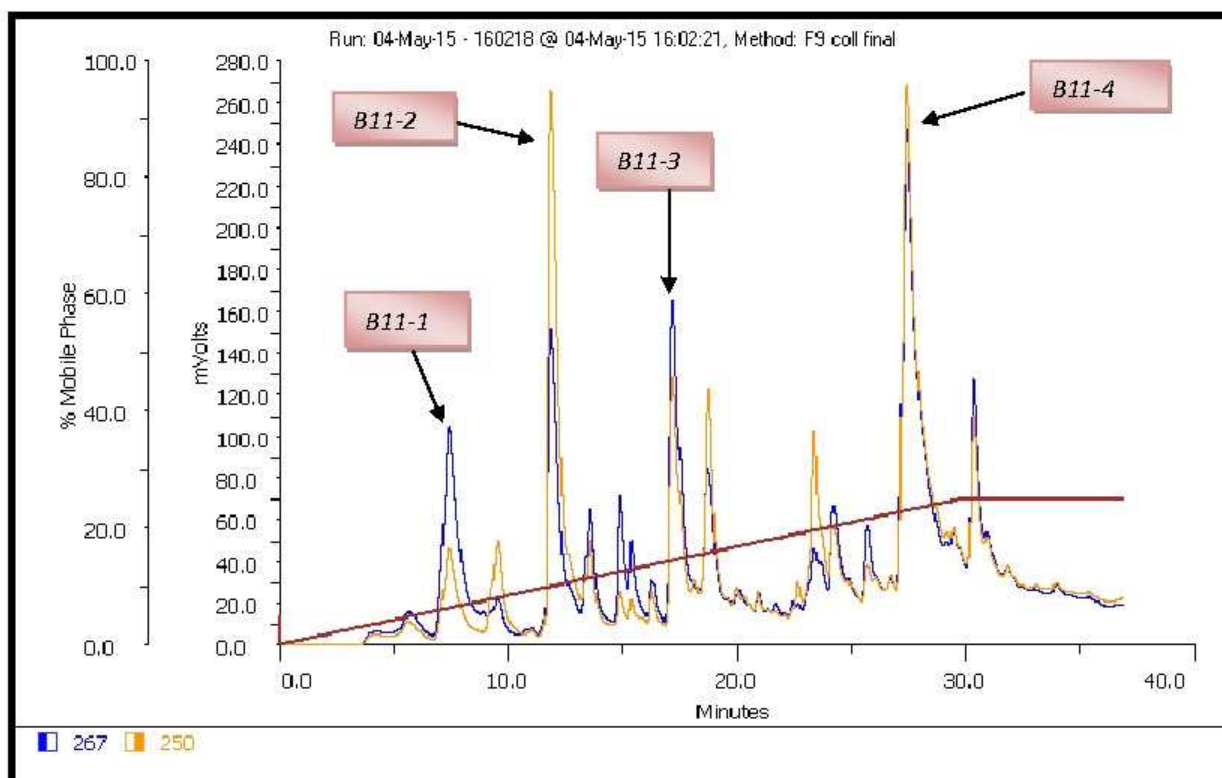


Figure 29. Chromatogramme HPLC semi-préparative phase inverse de la fraction F11.

Après séparation, ces quatre produits ont été injectés en HPLC analytique pour les mêmes raisons et dans les mêmes conditions que précédemment reporté. Les chromatogrammes obtenus montrent que seuls les deux produits **B11-2** (composé **8**) et **B11-3** (composé **9**), sont à l'état pur (Figures 30 à 32).

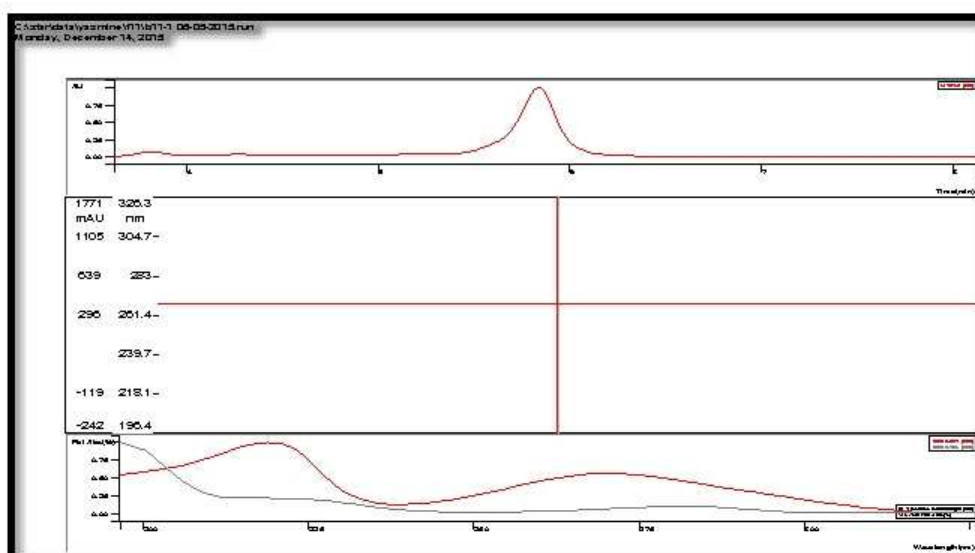


Figure 30. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de la B11-1.

B11-1 : Tr = 5,92 min, longueur d'onde = 267 nm.

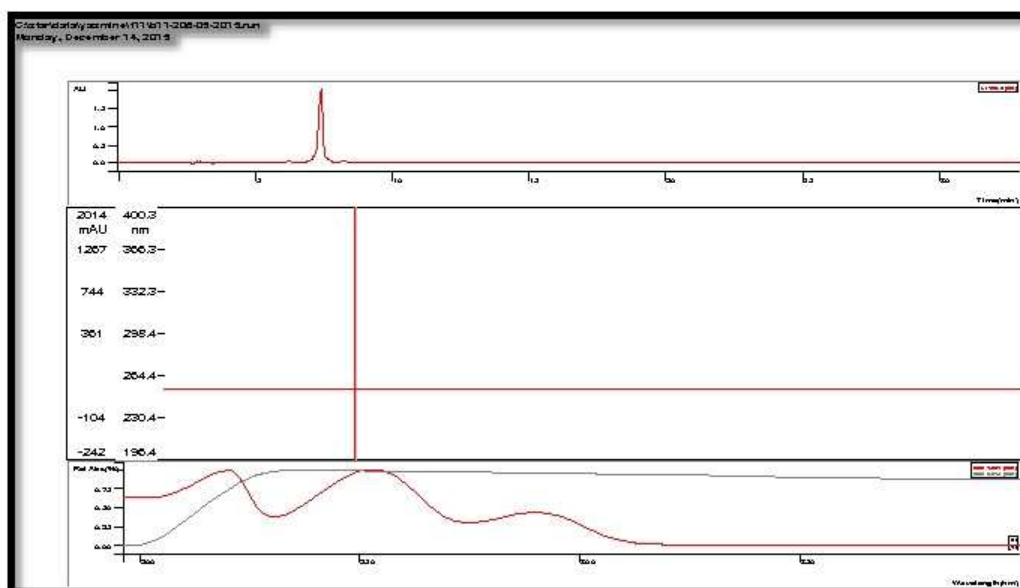


Figure 31. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de composé 8.

B11-2 : Tr = 7,47 min, longueur d'onde = 252 nm, Absorbance =164 mAU.

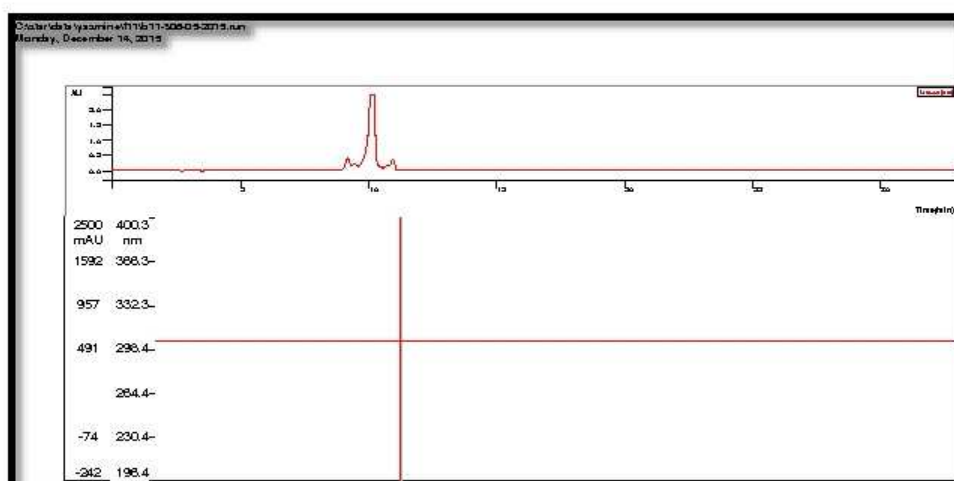


Figure 32. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de composé 9.

B11-3 : Tr =10,22 min, longueur d'onde = 305 nm.

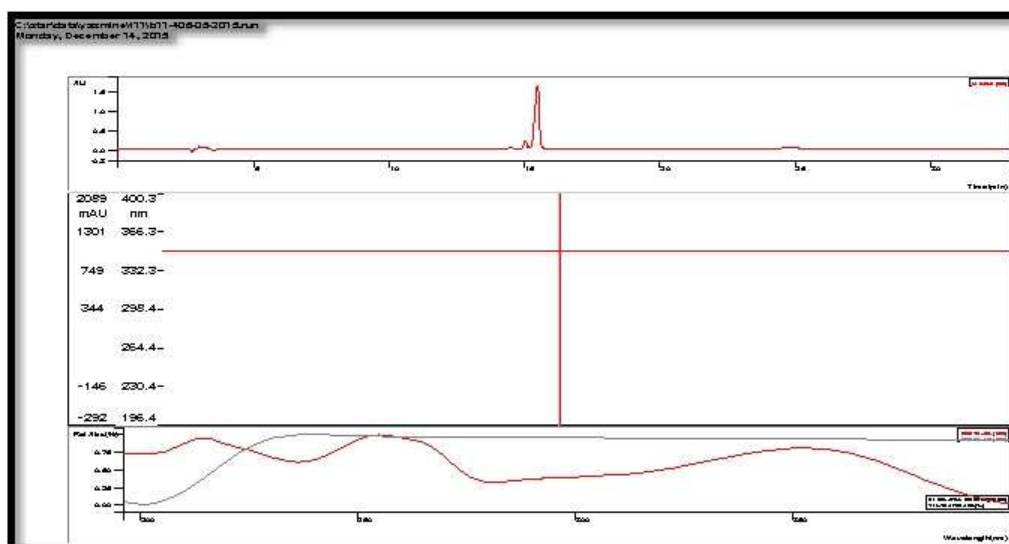


Figure 33. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de la B11-4.

B11-4 : Tr =15,54 min, longueur d'onde = 350 nm.

✓ Etude de la fraction F13

Poids de la fraction= 2837,3 mg.

Une quantité de la fraction est injectée en HPLC semi-préparative en phase inverse, dans une colonne C₁₈, 250*10 mm, 5µm, thermo scientific, avec une phase mobile délivrée à 5 ml / min constituée d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique (solvant A) et d'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique (solvant B). Le gradient était le suivant: 0 min, 0% B; 30 min, 25% de B; maintenue pendant 17 min. Quatre produits sont séparés avec cette méthode, **B13-1**, **B13-2**, **B13-3** et **B13-4**. Ces produits ont été élués au bout de 10, 13, 28 et 30 min respectivement (Figure 34). La collection de ces produits après plusieurs injections a permis l'isolement de **B13-1** (1,6 mg) (composé 10), **B13-2** (1,2 mg), **B13-3** (2,8 mg) et **B13-4** (2 mg) (composé 11).

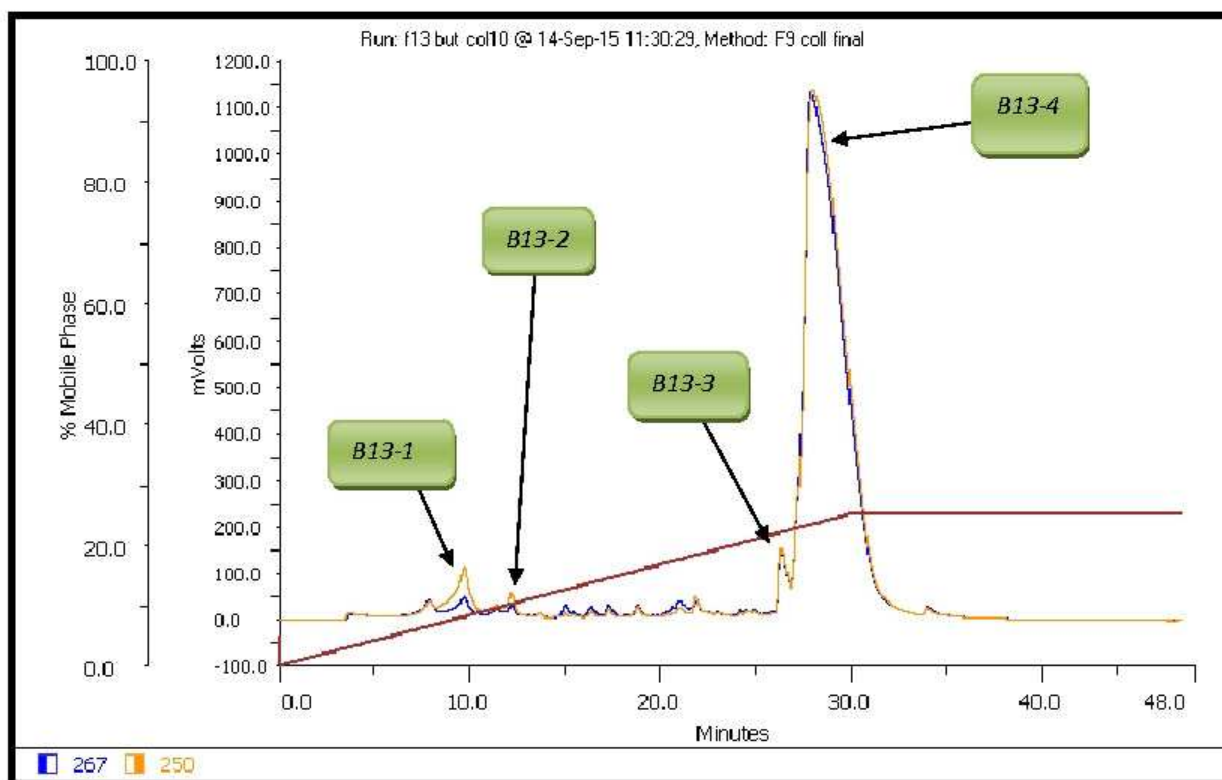


Figure 34. Chromatogramme HPLC semi-préparative phase inverse de la fraction F13.

Après séparation, les produits B13-1 (composé **10**) et B13-3, sont réinjectés et détectés par le Dionex Ultimate 3000 series Diodes Array Detector (Figures 35 et 37, respectivement), par contre les produits B13-2 et B13-4 (composé **11**) ont été réinjectés et détectés dans les mêmes conditions que les produits précédents (Figures 36 et 38, respectivement). D'après ces chromatogrammes, les produits B13-2 et B13-3 s'avèrent être des mélanges. Par ailleurs, l'allure du spectre UV du composé **11** est en faveur d'un flavonoïde de type flavonol.

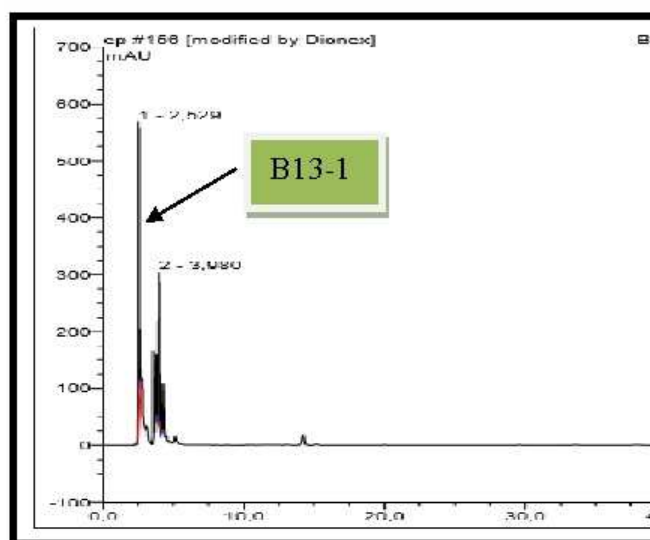


Figure 35. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de composé **10**.

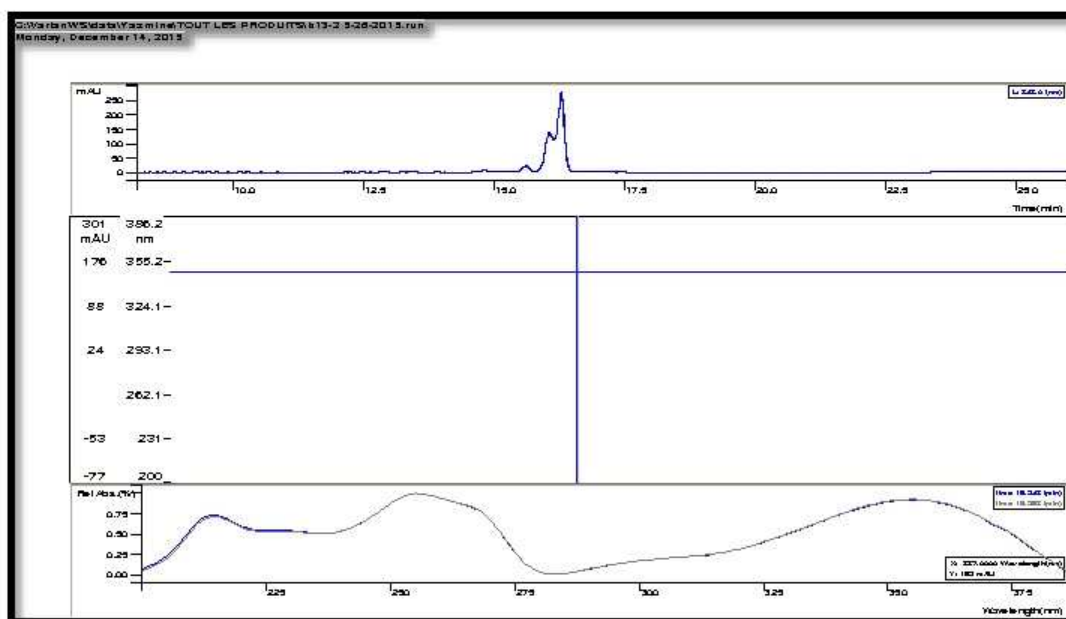


Figure 36. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de la B13-2.

B13-2 : Tr = 16,32 min, longueur d'onde = 346 nm, Absorbance = 254 mAU.

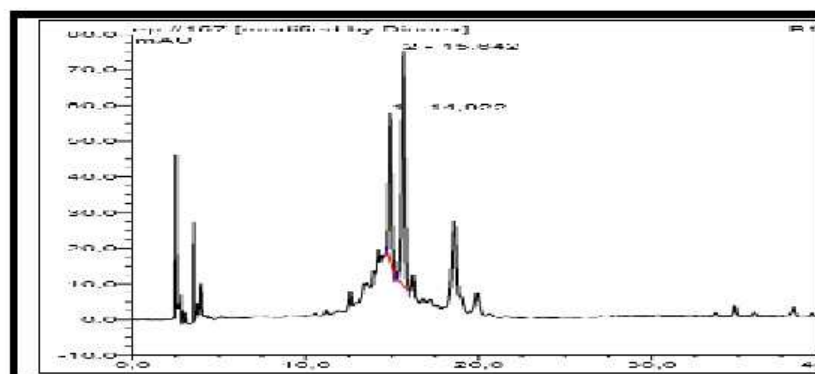


Figure 37. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de la B13-3.

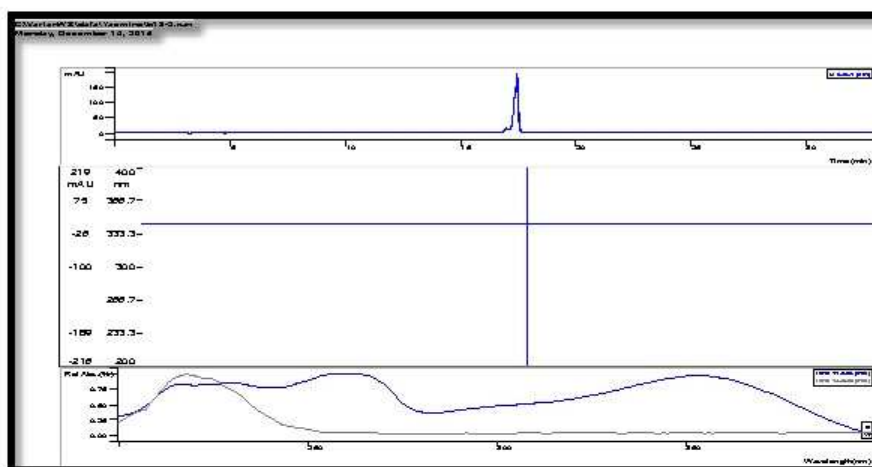


Figure 38. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de composé 11.

B13-4 : Tr = 17,45 min, longueur d'onde = 343 nm, Absorbance = 173 mAU.

✓ Etude de la fraction F14

Poids de la fraction= 2054 mg.

Une quantité de cette fraction est injectée en HPLC semi-préparative en phase inverse, dans une colonne C₁₈, 250*10 mm, 5µm, thermo scientific, avec une phase mobile délivrée à 5 ml / min constituée d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique (solvant A) et d'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique (solvant B). Le gradient était le suivant: 0 min, 0% B; 30 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min. un produit est séparé avec cette méthode, **B14-3** (Figure 39), a été élué au bout de 26.5min. La collection de ce composé après plusieurs injections a permis l'isolement de **B14-3** (70 mg) (composé **12**).

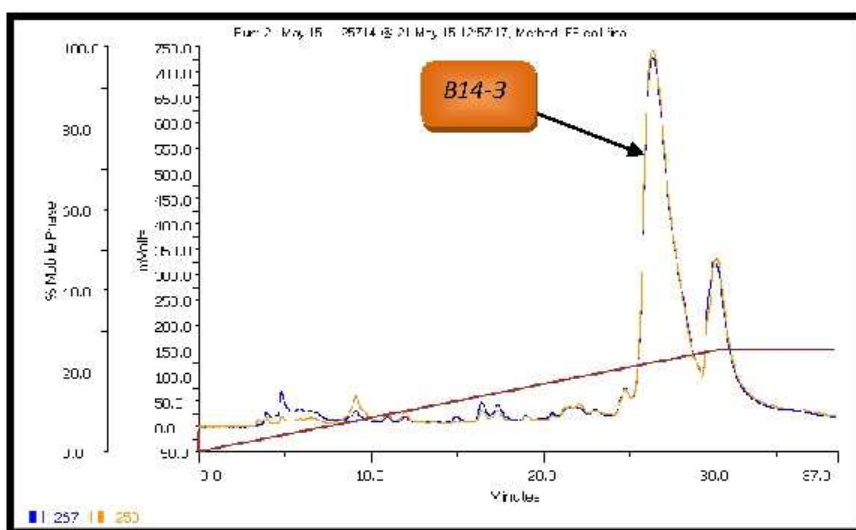


Figure 39. Chromatogramme HPLC semi-préparative phase inverse de la fraction F14.

Après séparation, ce produit B14-3 (composé **12**) a été réinjecté dans les mêmes conditions que le produit précédent B13-4 (Figure 40 et 41).

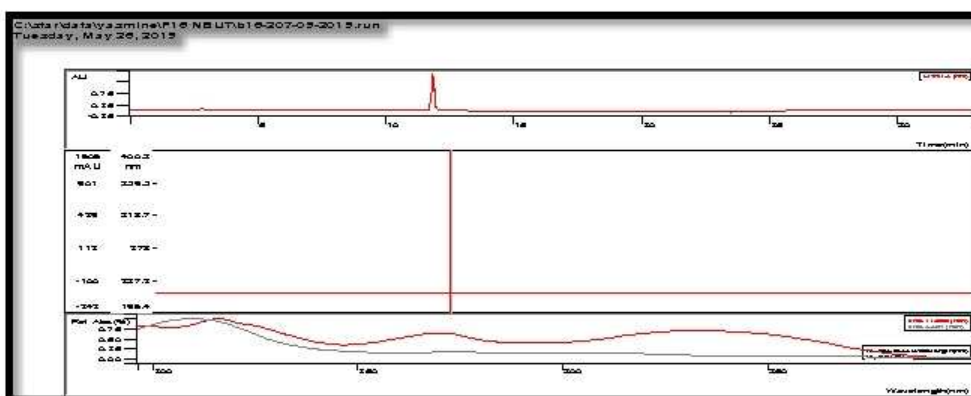


Figure 40. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de composé 12.

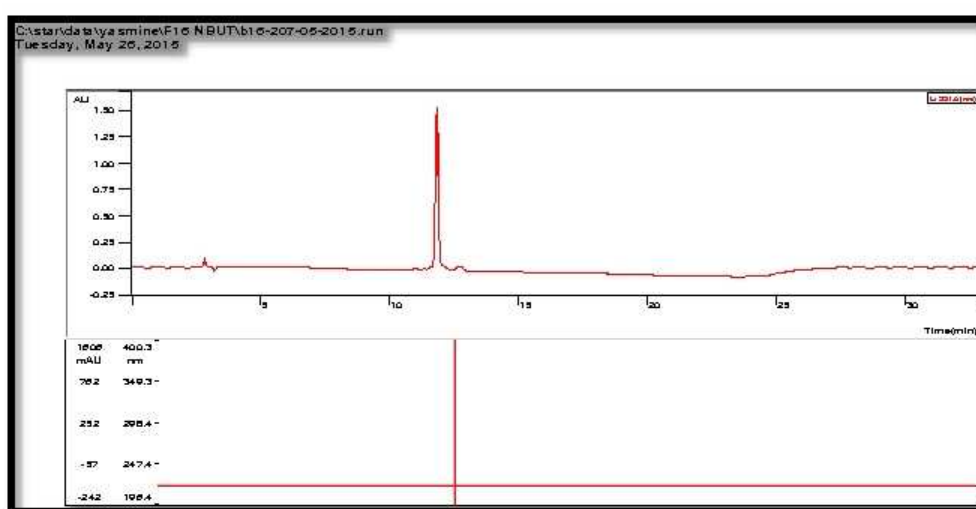


Figure 41. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de composé 12 (étalement).

B14-3 : Tr = 11,89 min, longueur d'onde = 223 nm.

Au vu des résultats des chromatogrammes HPLC analytique et semi-préparative en phase inverse, la composition chimique de la fraction F14 est similaire à celle des fractions F15, F16, F17, F18, F19 et 20 (Figures 42 à 44). Cette observation indique une forte accumulation du composé 12 par *Helianthemum ruficomum*. D'après son spectre d'absorption UV et son temps de rétention, ce composé est un flavonoïde hétéroside.

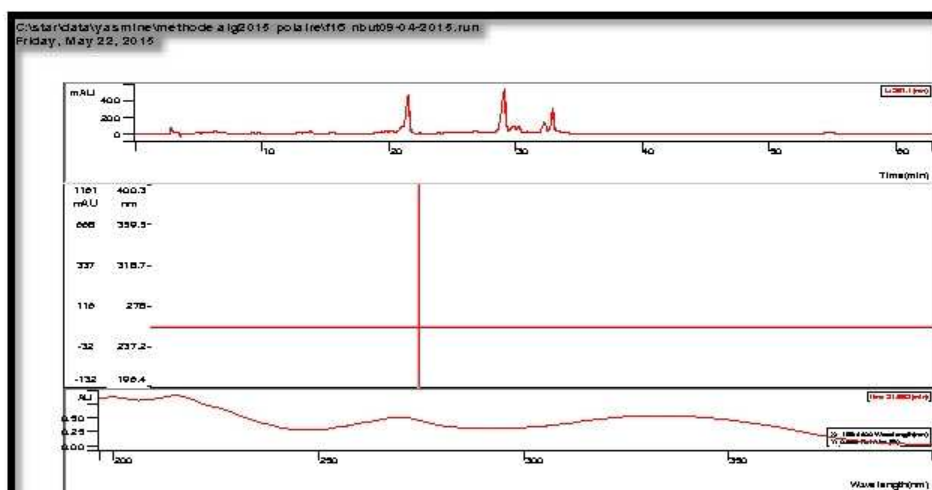


Figure 42. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de la fraction F16.

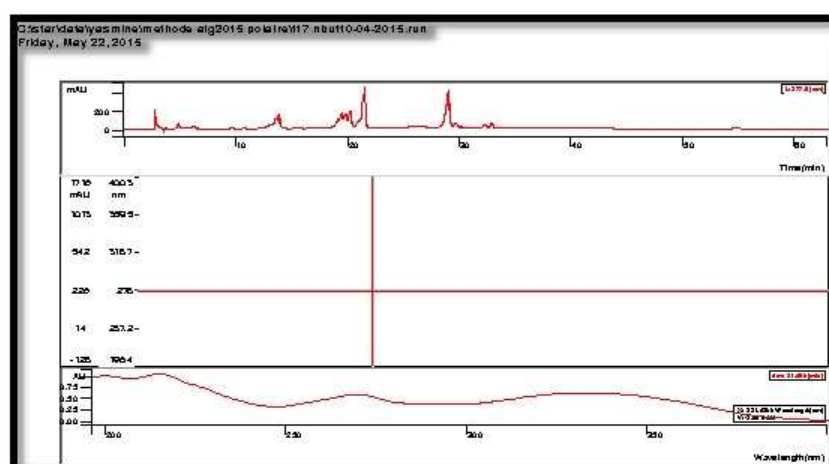


Figure 43. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de la fraction F17.

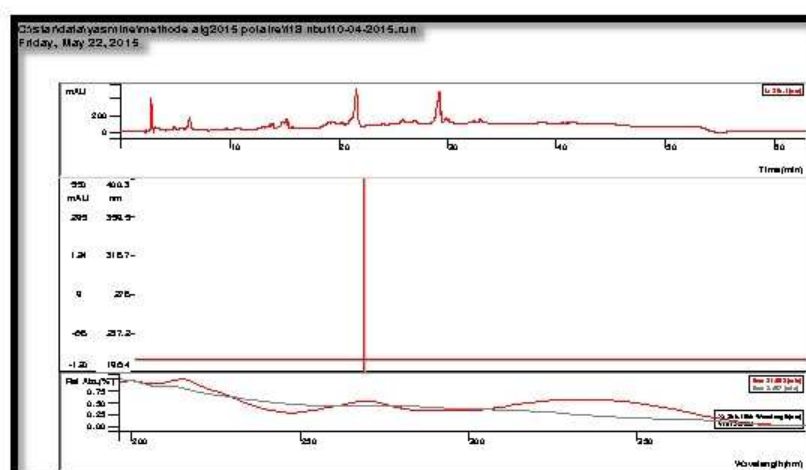


Figure 44. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de la fraction F18.

Toutes les fractions ont été analysées par le gradient d'élutions reporté dans le tableau 11.

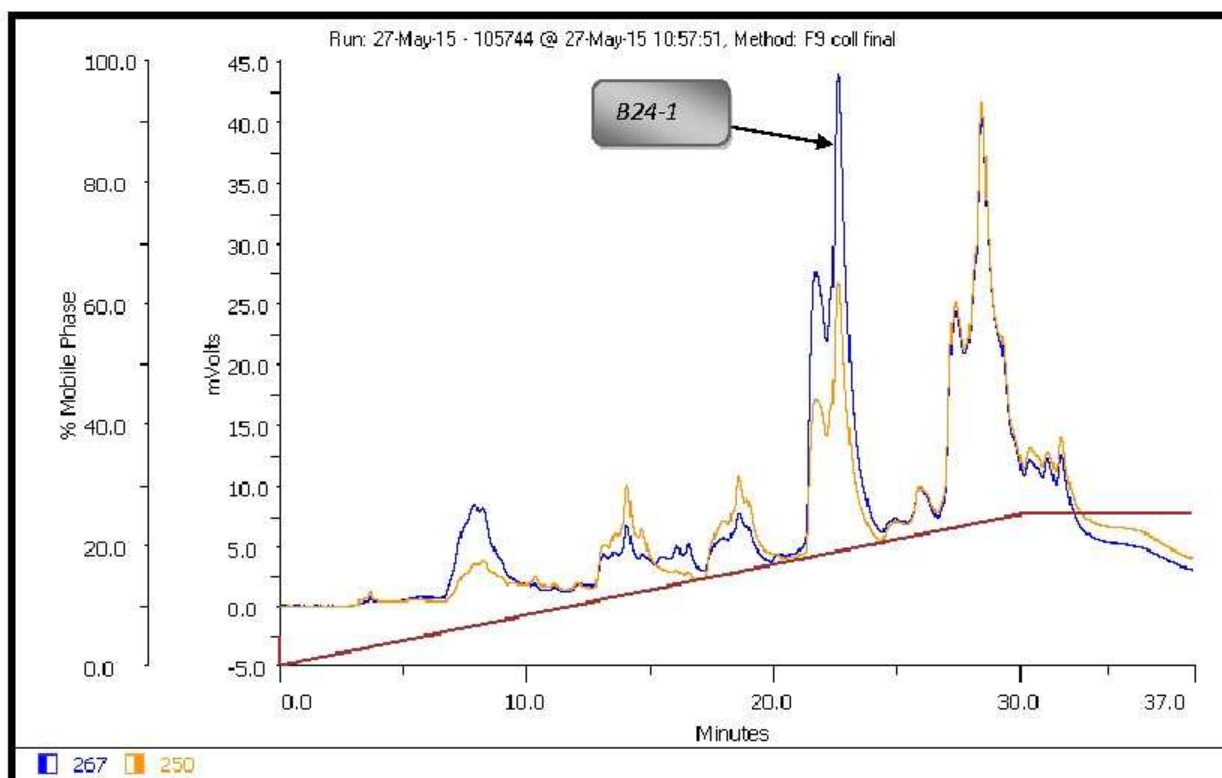


Figure 45. Chromatogramme HPLC semi-préparative phase inverse de la fraction F24.

Après séparation, ce produit (composé 13) est réinjecté dans les mêmes conditions que les produits isolés précédents. D'après l'allure de son spectre UV, il s'agit d'un flavonoïde (Figure 46).

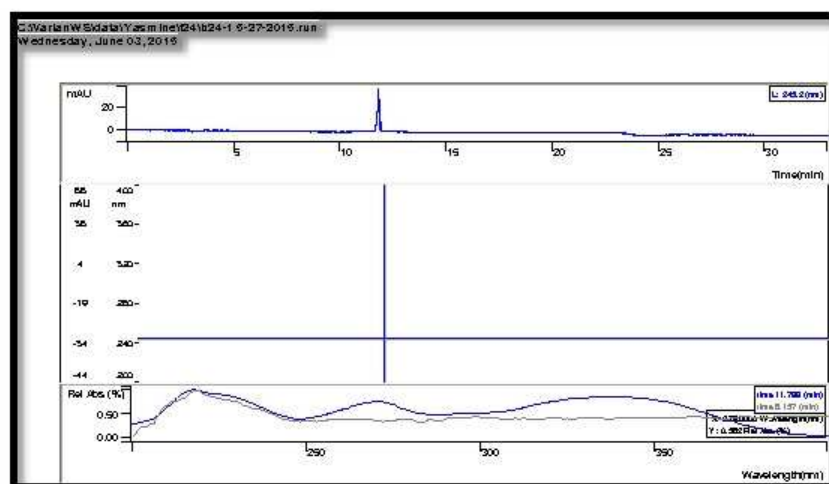


Figure 46. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de composé 13.

B24-1 : Tr = 12,01 min, longueur d'onde = 241 nm.

✓ Etude de la fraction F32

Poids de la fraction= 77,1 mg.

Une aliquote de cette fraction est injectée en HPLC semi- préparative dans les mêmes conditions que la fraction précédente y compris le gradient d'éluion mis en jeu. Un produit est séparé avec cette méthode, **B32-3**. Il a été élué au bout de 31 min. La collection de ce composé après plusieurs injections a permis l'isolement de **B32-3** (1,2 mg) (composé 14) (Figure 47).

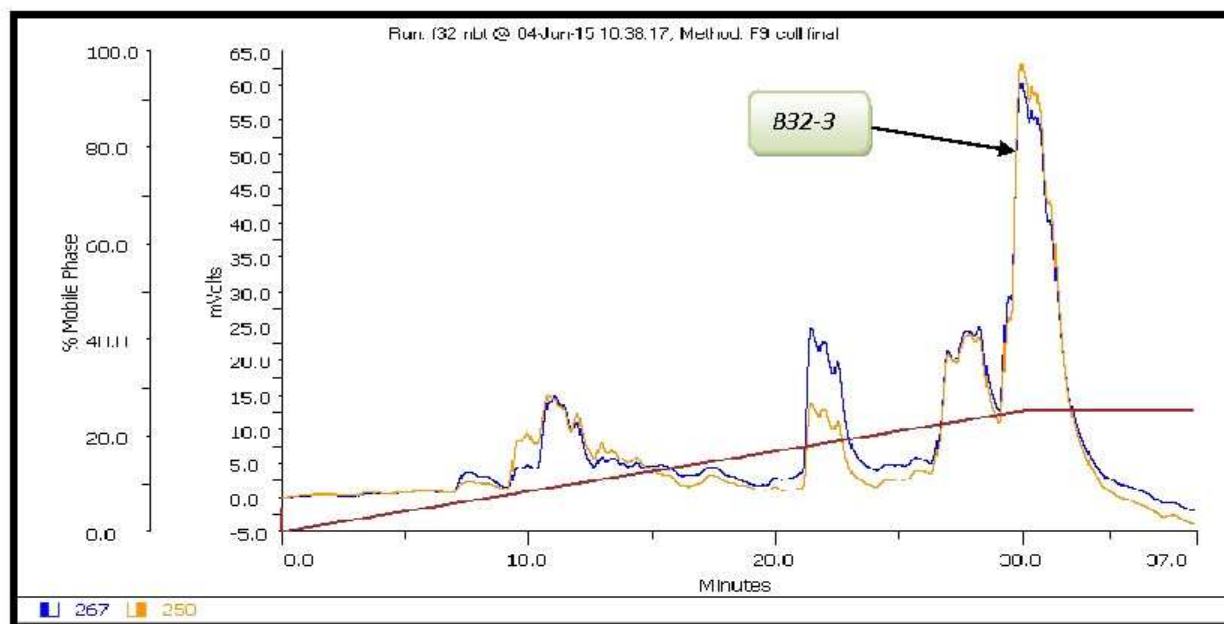


Figure 47. Chromatogramme HPLC semi-préparative phase inverse de la fraction F32.

Après séparation, ce produit a été réinjecté dans les mêmes conditions que les produits isolés précédents. D'après l'allure de son spectre UV, il s'agit d'un flavonoïde (Figure 48).

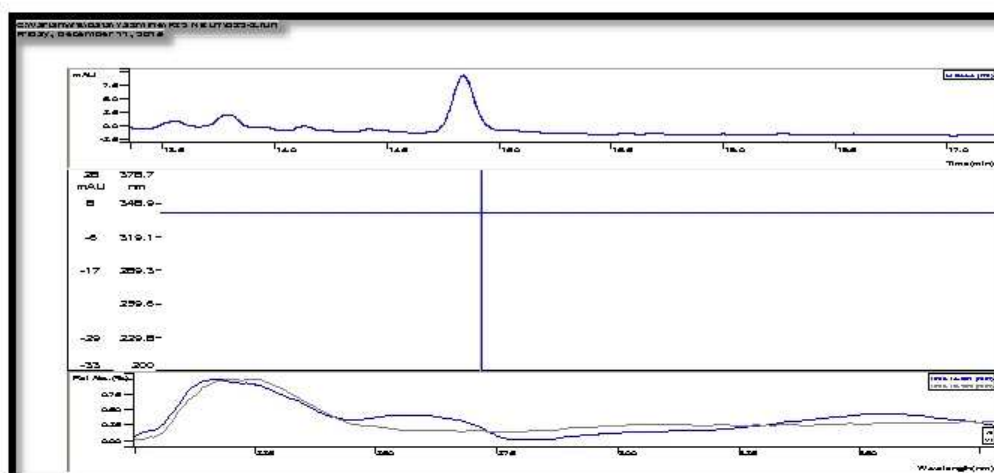


Figure 48. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de composé 14.

B32-3 : Tr = 14,83 min, longueur d'onde = 339 nm, Absorbance = 9 mAU.

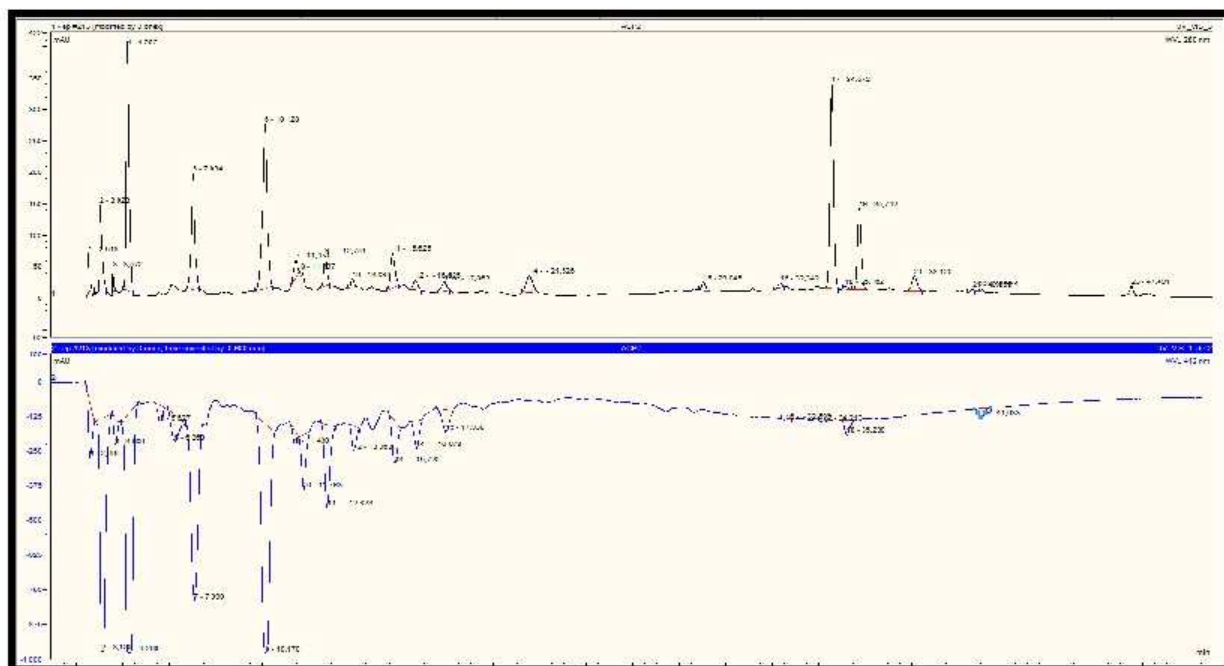


Figure 50. Détermination chromatographique des composés de l'extrait AcOEt de *H. confertum* (chromatogramme supérieur) et leur activité antioxydante correspondante (chromatogramme inférieur) par HPLC- ABTS⁺

Suite à ces résultats encourageants, l'extrait acétate d'éthyle est soumis à un fractionnement suivi de séparations et de purifications successives par différentes méthodes chromatographiques en vue de l'isolement de molécules antioxydantes pures.

III.3.3.B. Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle

Un premier fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle de *Helianthemum confertum* (6 g) a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice : (60-200 mesh). L'extrait acétate d'éthyle dissout dans de le méthanol est mélangé à quantité de gel de silice (5g), l'ensemble est séché sous pression réduite, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur une colonne de gel de silice, préparée dans le chloroforme. La masse de silice utilisée correspond approximativement à 32 fois le poids de l'extrait à séparer (192g). L'élution a été réalisée par du chloroforme, puis introduction du méthanol. Les fractions recueillies sont regroupées suivant la similitude de leur profil chromatographique sur couches minces de gel de silice déposées sur feuilles d'aluminium (TLC Si gel 60 F₂₅₄, 0,2 mm) qui après développement dans des cuves en verre avec des systèmes adéquats, ont été visualisées sous lampe UV à 254 et 365 nm, puis révélées avec l'anisaldéhyde et chauffées pendant 3 min à 100°C. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 12.

Tableau 12. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de *Helianthemum confertum*.

Chloroforme (%)	Méthanol (%)	Nombre de V (477 ml) de la colonne	Lots (100 ml)	Fractions (masse, mg)
100	0	3V	1-15	F1 (4,2)
99	1	3V	16-34	F2 (7,2)
98	2	3V	35-36	F3 (41,4)
98	2	3V	37-46	F4 (64,4)
97	3	3V	47-48	F5 (21,5)
97	3	3V	49-52	F6 (88,6)
96	4	3V	53-54	F7 (75,4)
96	4	3V	55-59	F8 (91)
96	4	3V	60-77	F9 (217,7)
95	5	3V	78-81	F10 (110,3)
94	6	3V	82-88	F11 (88)
94	6	3V	89-93	F12 (52)
93	7	3V	94-122	F13 (202,2)
92	8	3V	123-127	F14 (133,6)
91	9	3V	128-137	F15 (96,5)
90	10	3V	138-148	F16 (153,2)
85	15	3V	149-164	F17 (75,3)
85	15	3V	165-174	F18 (165)
80	20	3V	175-181	F19 (133,1)
80	20	3V	182-188	F20 (13,2)
75	25	3V	189-196	F21 (15,7)
75	25	3V	197-200	F22 (7,6)
70	30	3V	201-219	F23 (23,4)
65	35	3V	220-235	F24 (56,9)
60	40	3V	236-251	F25 (123,8)
50	50	3V	252-278	F26 (42,1)
30	70	3V	179-294	F27 (33,7)
0	100	3V	295-311	F28 (59)

✓ **Etude de la fraction F9**

Poids de la fraction= 217,7 mg.

Une quantité de la fraction est injectée en HPLC semi-préparative en phase inverse, dans une colonne C₁₈, 250 x 10 mm, 5 µm, thermo scientific, avec une phase mobile délivrée à 5 ml /

min constituée d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique (solvant A) et d'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique (solvant B). Le gradient était le suivant: 0 min, 0% B; 30 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min. Un produit est séparé avec cette méthode, **A9-1**. Il a été élué au bout de 12 min (Figure 51). La collection de ce composé après plusieurs injections a permis l'isolement de **A9-1** (8 mg) noté composé **15**.

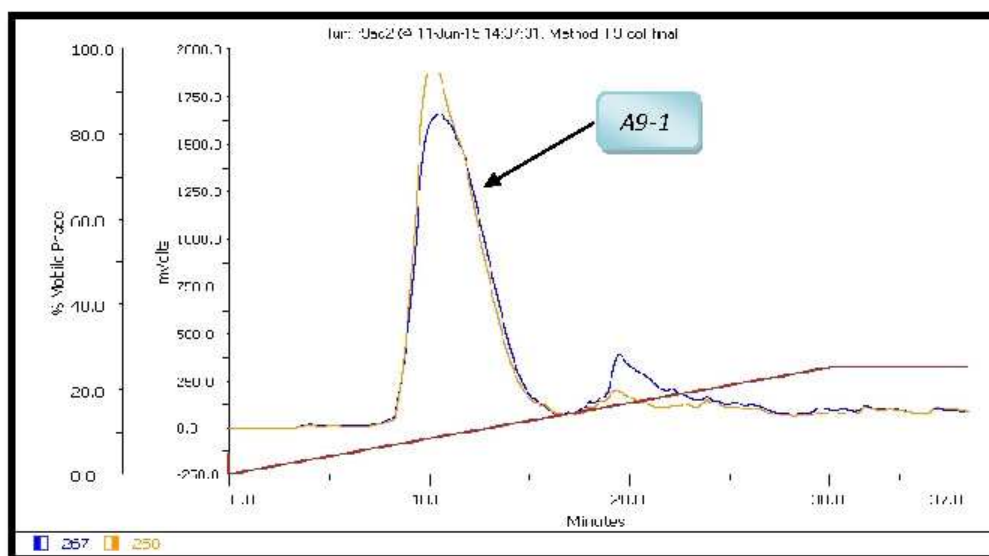


Figure 51. Chromatogramme HPLC semi-préparative phase inverse de la fraction F9.

Comme pour les composés de la première plante et suivant le même protocole pour vérifier l'état de la pureté des produits, le composé **15** issu de la deuxième plante (*H. confertum*) a été injecté en HPLC analytique après séparation (Figure 52). Le chromatogramme montre un produit relativement pur.

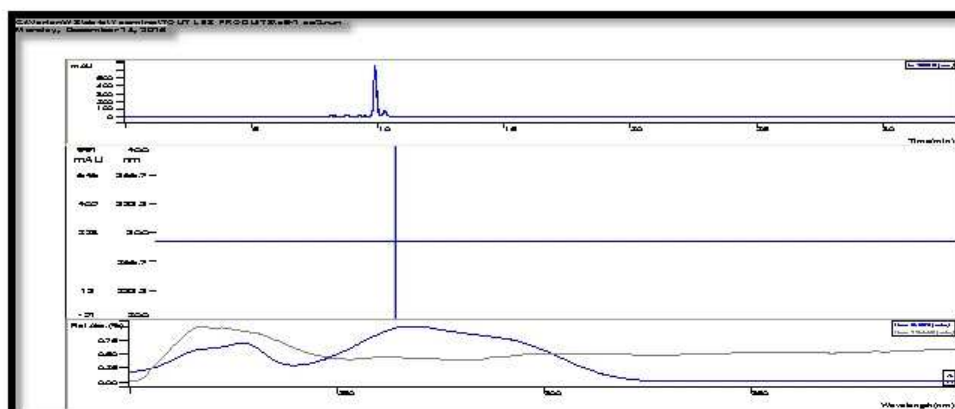


Figure 52. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de composé A9-1.

A9-1 : Tr = 9,91 min, longueur d'onde = 287 nm, Absorbance = 172 mAU.

✓ Etude de la fraction F10

Poids de la fraction=110,3 mg

Le traitement de la fraction F10 a été réalisé selon exactement le même protocole que celui suivi pour la fraction F9 un produit a été séparé avec cette méthode, **A10-1**. Il a été élué au bout de 9,6 min (Figure 53). La collection de ce composé après plusieurs injections a permis de récupérer après évaporation de la phase mobile, un précipité blanc (10 mg).

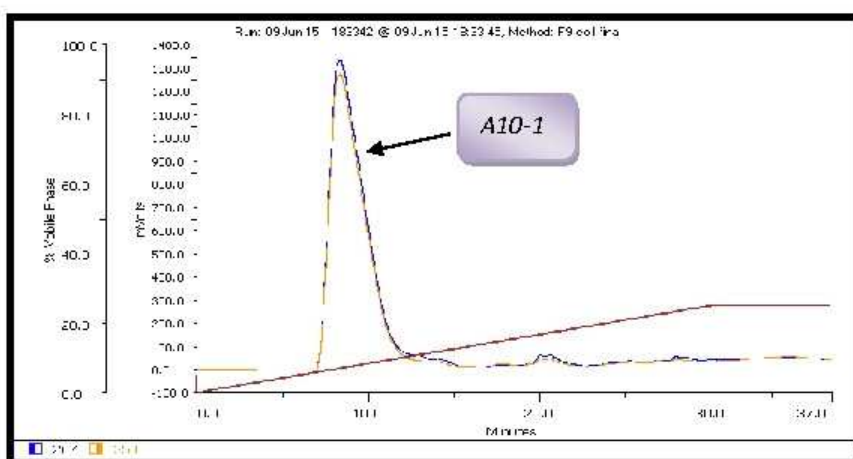


Figure 53. Chromatogramme HPLC semi-préparative phase inverse de la fraction F10.

Après séparation, et suivant la même méthode et pour les mêmes raisons, ce produit a été réinjecté en HPLC analytique (Figure 54). D'après son temps de rétention et son spectre d'absorption UV, ce produit se trouve être le même que le composé **1** isolé de la première espèce. Cette observation sera confirmée par l'analyse approfondie des spectres de RMN.

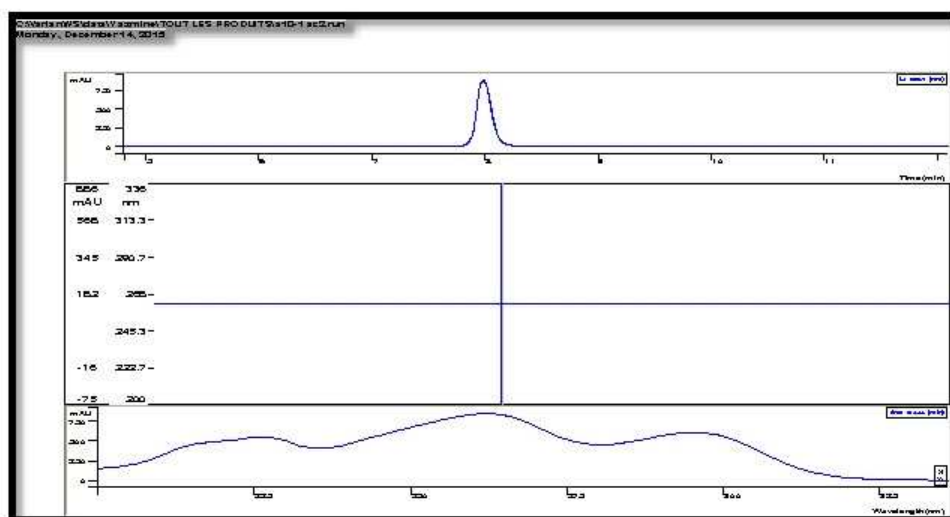


Figure 54. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de composé A10-1.

A10-1 : Tr = 8,04 min, longueur d'onde = 263 nm, Absorbance = 846 mAU.

✓ Etude des fractions F11 et F12

Les fractions F11 (88 mg) et F12 (52 mg) présentant une parfaite similitude avec F10, indiquent une forte accumulation du composé A10-1 par *H. confertum*.

✓ Etude de la fraction F14

Poids de la fraction = 133,6 mg

Une aliquote de la fraction F14 a été injectée dans la même chaîne HPLC semi préparative, utilisant la même colonne et la même phase mobile que pour les fractions F9 et F10 précédentes. Le gradient d'élution était: 0 min, 0% B; 30 min, 25% de B; maintenue pendant 31 min. deux produits sont séparés avec cette méthode, **A14-2** et **A14-3**. Ils ont été élués au bout de 27 et 47 min, respectivement (Figure 55). La collection de ces composés après plusieurs injections a permis l'isolement de 2 composés notés **A14-2** (1,8 mg) et **A14-3** (1,2 mg). Le produit **A14-3** est isolé à l'état pur. Le produit A14-2 se trouve être en mélange de plusieurs produits.

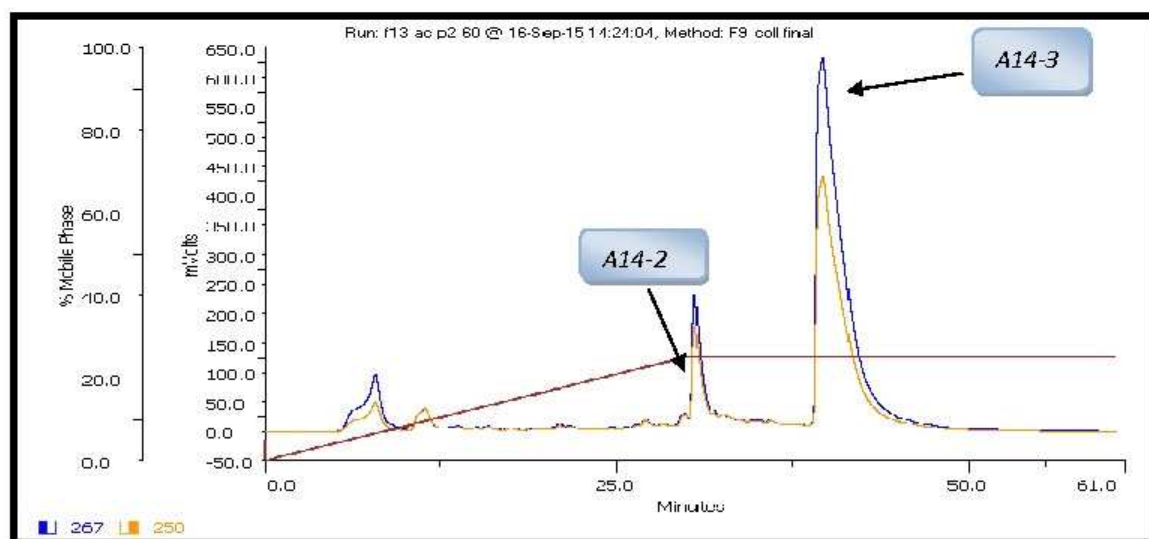


Figure 55. Chromatogramme HPLC semi-préparative phase inverse de la fraction F14.

Après séparation, et suivant la même méthode et pour les mêmes raisons que précédemment, ce produit a été réinjecté en HPLC analytique munie d'un détecteur à barrettes de diodes (Figure 56). Ce produit **A14-3** isolé à l'état pur, est en fait d'après son temps de rétention et son spectre d'absorption UV, identique au composé **3** isolé de la première espèce. Cette remarque sera confirmée par l'analyse approfondie des spectres de RMN.

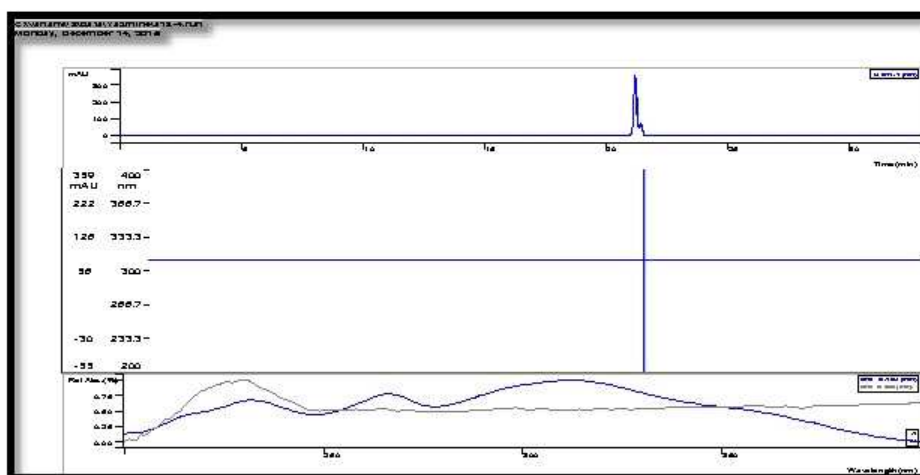


Figure 56. Chromatogramme HPLC analytique phase inverse de composé A14-3.

A14-3 : longueur d'onde = 310 nm, Absorbance = 51 mAU.

✓ Etude des fractions F13 et F15

Les fractions F13 (202,2 mg) et F15 (96,5 mg) étant identiques entre elles et identiques à F14 indiquent une forte accumulation du produit A14-3 par cette espèce.

✓ Etude de la fraction F28

Poids de la fraction = 59 mg

Une aliquote de la fraction F28 est injectée en HPLC semi-préparative en phase inverse dans les mêmes conditions en utilisant la même phase mobile et le même gradient d'éluion que pour la fraction précédente. Une seul produit a été séparé B28-5 (Figure 57). La collection de ce produit après plusieurs injections a permis l'isolement du produit B28-5 (0,8 mg) noté composé 17.

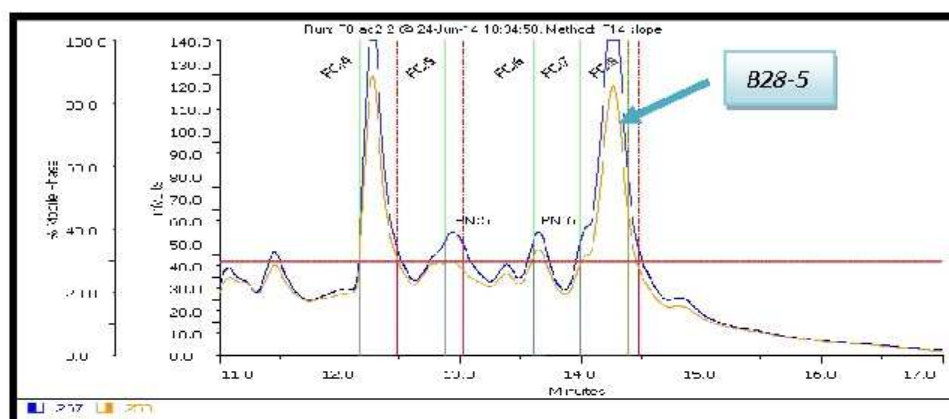


Figure 57. Chromatogramme HPLC semi-préparative phase inverse de la fraction F28.

Après séparation, et suivant la même méthode et pour les mêmes raisons que précédemment, ce produit a été réinjecté en HPLC analytique munie d'un détecteur à barrettes de diodes. Ce produit B28-5 est isolé à l'état pur (composé 17).

III.3.4. Analyse de l'extrait n-butanol et chloroforme de *H. confertum* par LC-UV

Les deux extraits ont été injectés dans les conditions précédemment décrites, ces extraits montrent d'une part une composition chimique riche (Figures 58, 59) et d'autre part plusieurs constituants doués d'activité antioxydante (Figures 60, 61).

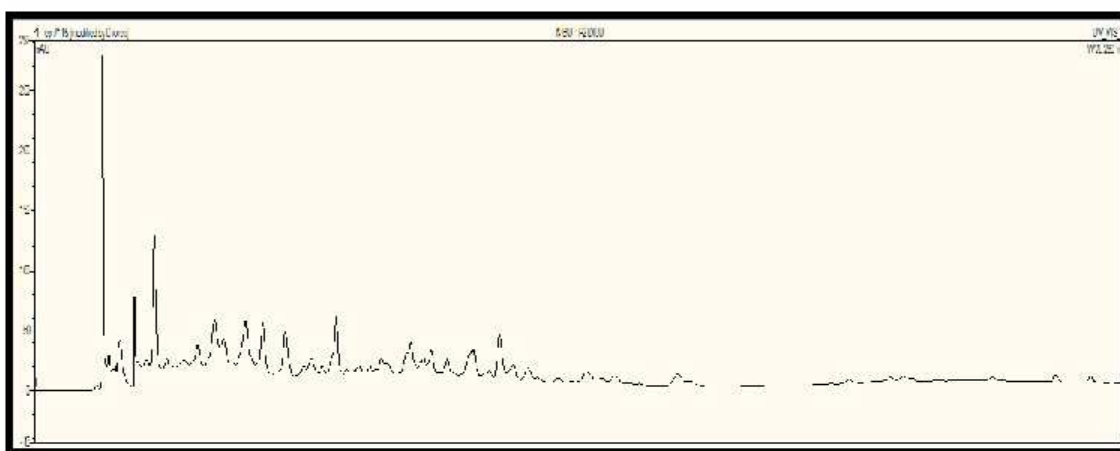


Figure 58. Chromatogramme HPLC-DAD de l'extrait n-BuOH de *H. confertum*.

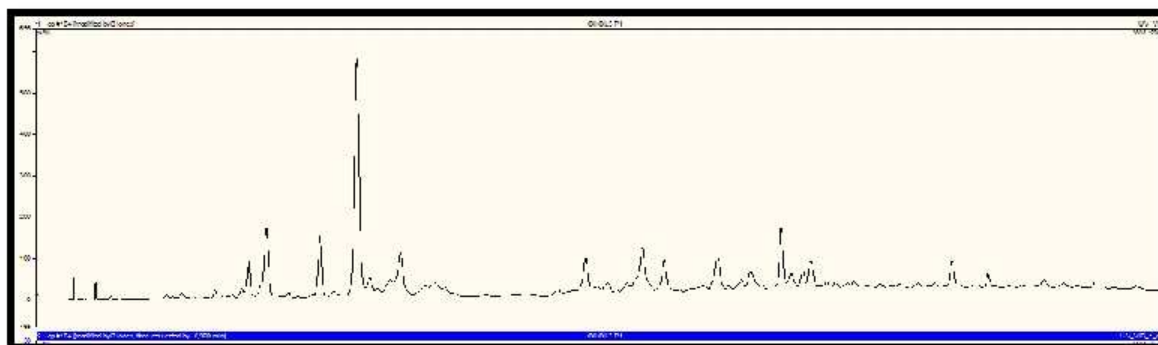


Figure 59. Chromatogramme HPLC-DAD de l'extrait chloroforme de *H. confertum*.

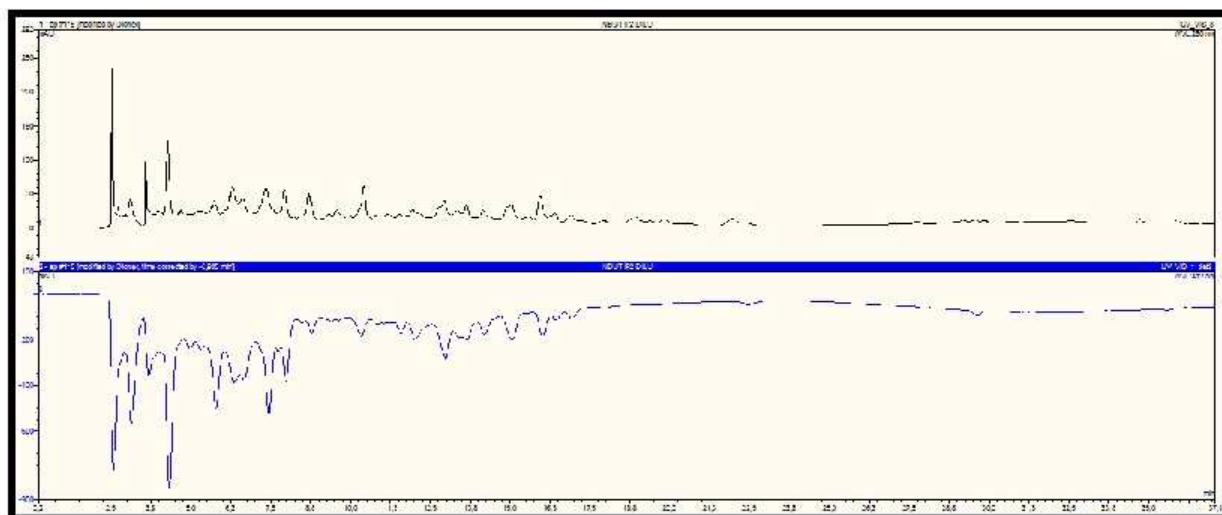


Figure 60. Détermination chromatographique des composés de l'extrait n-BuOH de *H. confertum* (chromatogramme supérieur) et leur activité antioxydante correspondante (chromatogramme inférieur) par HPLC- ABTS⁺

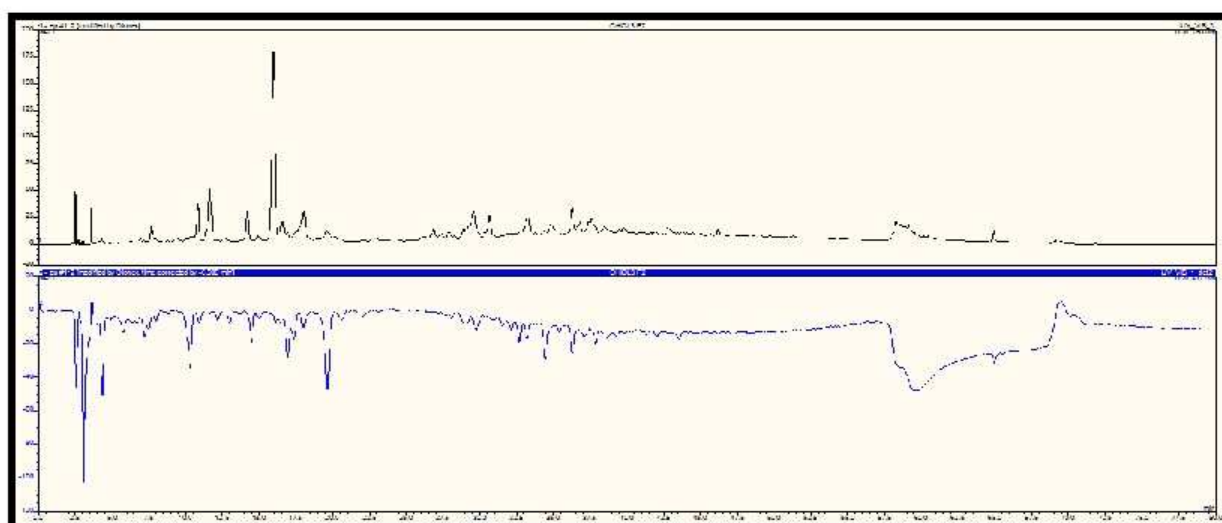


Figure 61. Détermination chromatographique des composés de l'extrait chloroforme de *H. confertum* (chromatogramme supérieur) et leur activité antioxydante correspondante (chromatogramme inférieur) par HPLC- ABTS⁺

Les travaux de séparation des composants de ces deux extraits sont en cours et feront l'objet de résultats à part.

Les travaux de séparation effectués sur les extraits acétate d'éthyle des deux plantes et la phase n-butanol de la première plante sont récapitulés dans les figures 62,63 et 64.

IV.1. Introduction

Les produits obtenus des espèces étudiées sont soumis à des analyses structurales pour identifier et déterminer leur structure chimique.

IV.2. Elucidation structurale des produits isolés de la phase Acétate d'éthyle de *Helianthemum ruficomum*

IV.2.1. Elucidation structurale du composé 1 (A12-8)

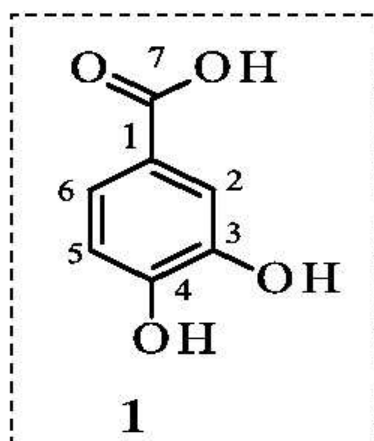
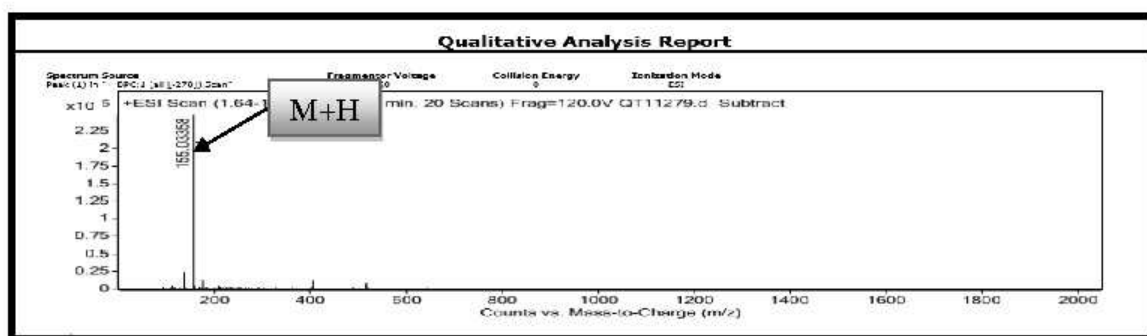


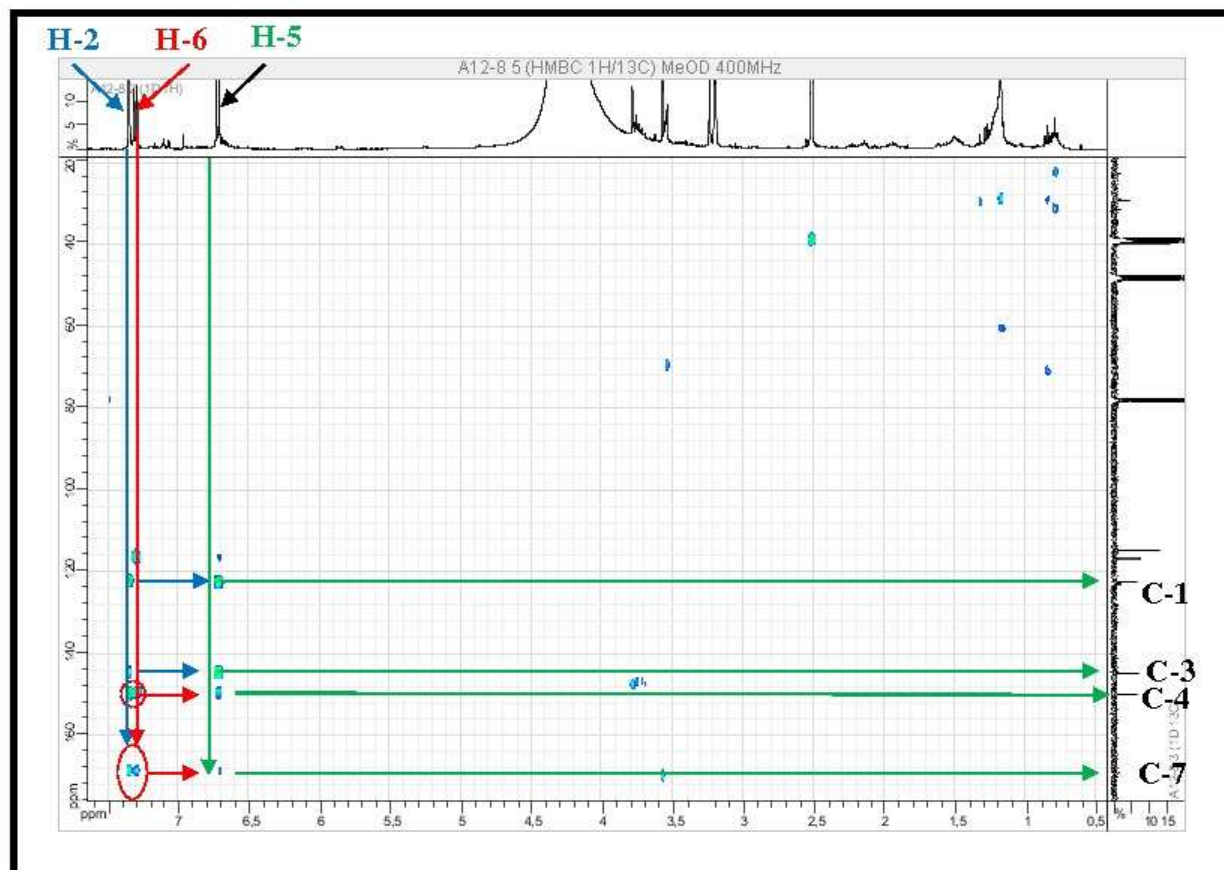
Figure 65. Structure du composé 1, A12-8.

L'examen du spectre de masse à haute résolution en mode electrospray positif (spectre 1) du composé 1 montre un pic quasi-moléculaire à $m/z = 155,03358$ correspondant à $[M+H]^+$ et une masse exacte $m/z = 154,0263$ (Tableau 13) indiquant une formule brute $C_7H_6O_4$ soit un composé comportant 5 degrés d'insaturation.



Spectre 1: spectre HR-ESI-MS (+) du composé 1

formule brute $C_7H_6O_4$ de cette molécule sont indicatrices d'une fonction acide carboxylique en position C-1 de ce noyau aromatique. La formule brute de cette molécule permet également de déduire la présence de deux hydroxyles substituant ce noyau aromatique dans les positions C-3 et C-4.



Spectre 4 : Spectre HMBC (400 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 1

Toutes ces données sont reportées sur le spectre ^{13}C (Spectre 5). L'ensemble de ces données mènent à la structure reportée sur la figure 66. Il s'agit de l'acide protocatechuique [52].

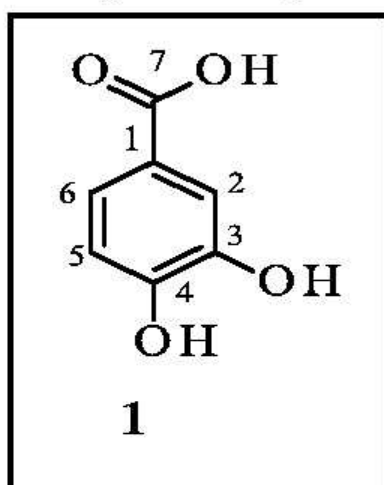
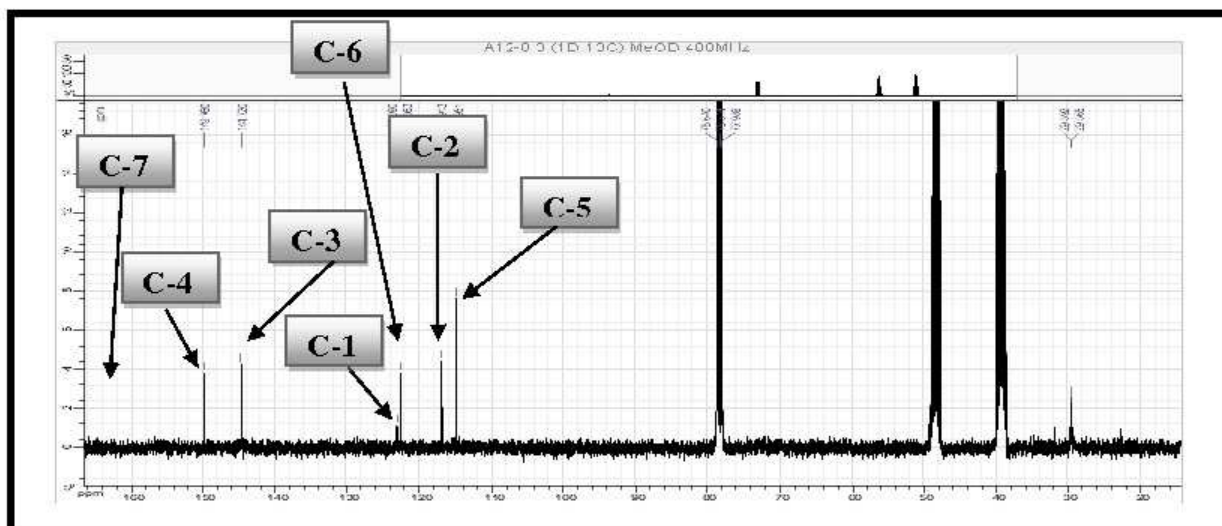


Figure 66. Structure du composé 1, acide protocatechuique.



Spectre 5 : Spectre ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 1

Les données relatives aux analyses des spectres de RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau 14.

Tableau 14. Données relatives aux analyses des spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé 1

Composé 1		
Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	/	123,09
2	7,35 (d ; 1,8 Hz)	116,91
3	/	144,72
4	/	149,76
5	6,72 (d ; 8,0 Hz)	114,95
6	7,30 (dd ; 8,0 ; 1,8 Hz)	122,56
7	/	168,87

IV.2.2. Elucidation structurale du composé 3 (A17-2)

Après purification sur plaque préparatives de gel de silice, l'échantillon obtenu est injecté en CLHP, dans une colonne C_{18} , 250 x 4 mm, 5 μm , Macherez Nagel, phase mobile: H_2O (0,1% acide formique)-ACN (0,1% d'acide formique ; 5-30-90-90-5-5%ACN; 0-25-35-47-49-61 min. Débit: 1 ml/min. Détection 250 nm, détecteur UV à barrette de diodes. Le composé 3 a été élué au bout de 7,5 min. On remarque cependant sur le chromatogramme obtenu (Figure 67), la présence d'un deuxième produit dont le temps de rétention est très proche ($T_r = 7,66$ min).

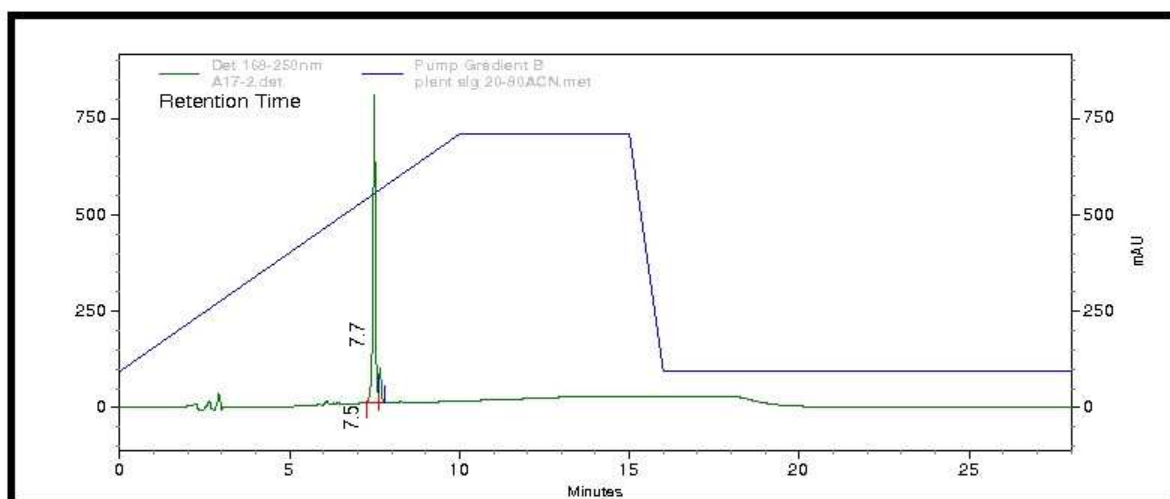
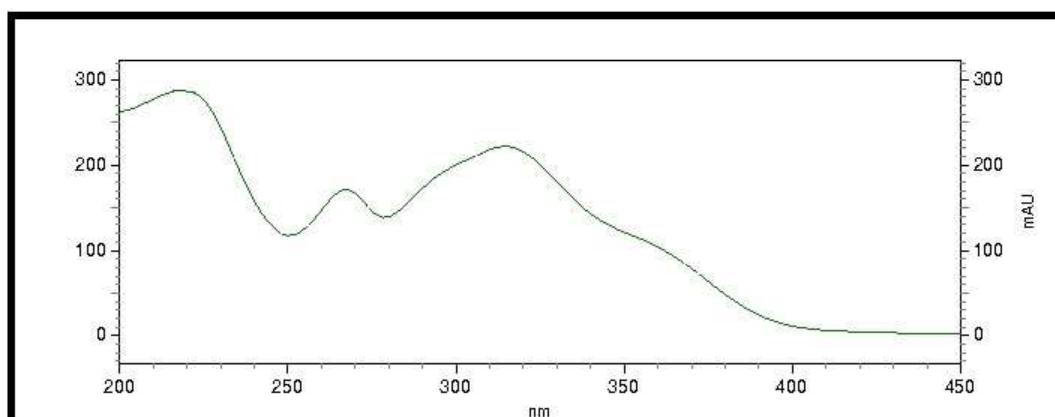
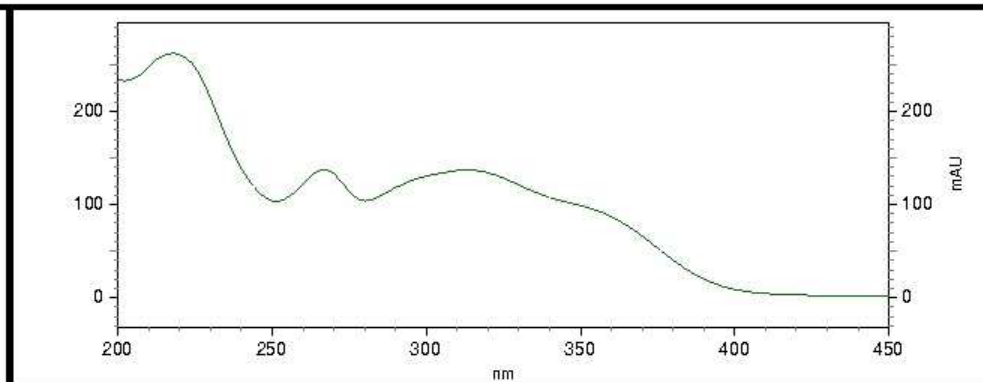


Figure 67. Chromatogramme CLHP phase inverse du composé **3**.

L'enregistrement du spectre d'absorption ultraviolette des deux produits de notre chromatogramme (Spectre 6 et Spectre 7), montre que ces deux produits comportent les mêmes chromophores, car leurs spectres UV sont très similaires. Il est donc clair d'après le chromatogramme, que le composé **3** ($T_R = 7,5$ min) est très majoritaire par rapport à l'autre. Aussi nous avons décidé de passer à l'analyse structurale de notre composé qui est en fait légèrement contaminé par un composé très similaire.



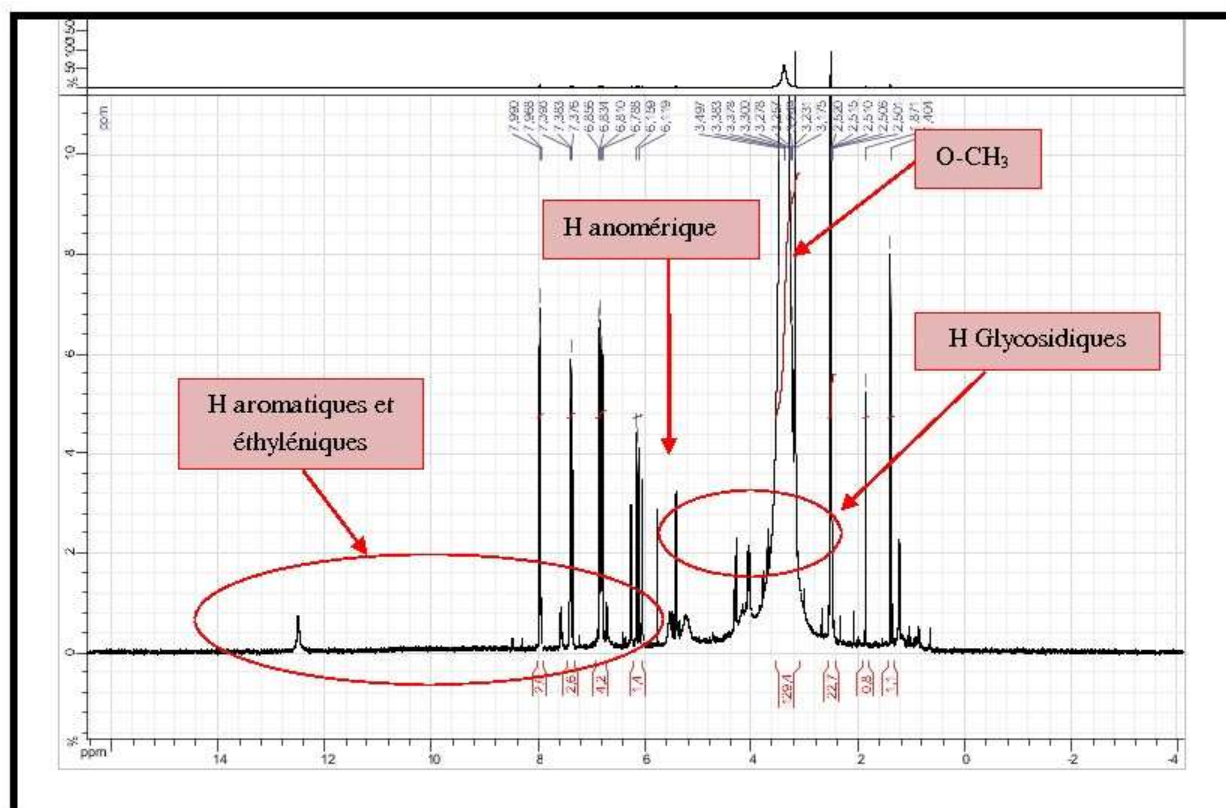
Spectre 6 : Spectre d'absorption ultraviolette du composé majoritaire ($T_R = 7,5$ min)



Spectre 7 : Spectre d'absorption ultraviolette du composé très minoritaire ($T_R = 7,66$ min)

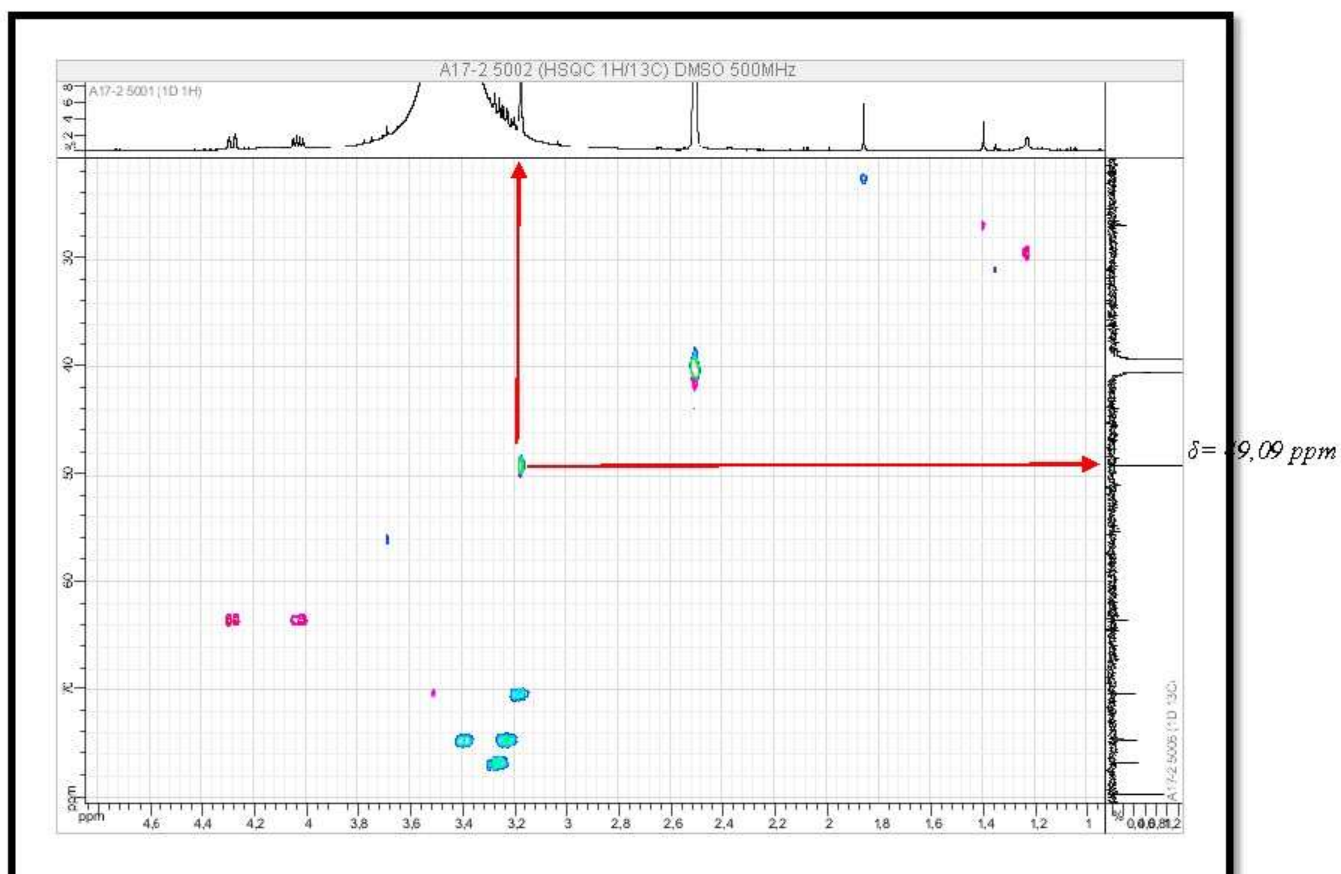
Notre analyse structurale a débuté par l'étude du spectre UV-Vis qui montre des bandes caractéristiques d'un flavonoïde notamment la bande I à λ_{\max} 350 nm et la bande II à λ_{\max} 267 nm ainsi qu'une troisième bande sous forme d'un épaulement à λ_{\max} 302 nm et une quatrième à λ_{\max} 315 nm. Ces deux dernières bandes indiquent la présence d'un groupement phénolique dans cette molécule.

Le spectre proton (Spectre 8) du composé **3** montre un ensemble de signaux dans la zone des protons aromatiques et éthyléniques et un ensemble de signaux rappelant un glycoside dont le signal d'un proton anomérique.



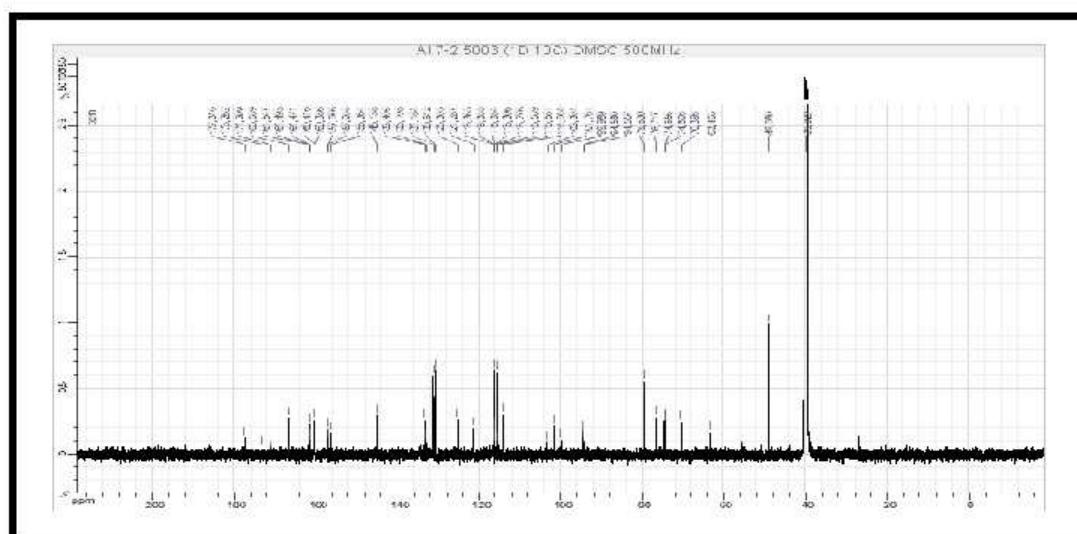
Spectre 8 : spectre RMN ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé **3**

Ce spectre montre également un signal d'un groupement O-CH₃ corrélant sur le spectre HSQC au carbone a $\delta_{\text{C}} = 49,09$ ppm (spectre 9-1).



Spectre 9-1 : spectre HSQC (étalement 1) (500 MHz, DMSO-d₆, δppm) du composé 3

Le déplacement chimique anormalement bas pour ce groupement O-CH₃ et la complexité des spectres RMN¹H et RMN¹³C (Spectre 10) nous ont incités à enregistrer un spectre DOSY/RMN (Diffusion Order Spectroscopy) afin de nous assurer que notre composé n'est pas contaminé par un produit qui n'absorbe pas dans le proche UV (rappelons que dans notre cas, la détection a été effectuée à $\lambda = 250$ nm).



Spectre 10 : Spectre RMN¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) du composé 3

L'expérience Diffusion Order Spectroscopy est une méthode basée essentiellement sur la mesure de la diffusion des molécules en solution, cette technique est un élargissement du champ d'application de la mesure de la diffusion par RMN, méthode décrite en 1965 par Stejskal et Tanner [53]. L'élargissement du champ d'application de cette technique à été réalisé en 1992 par Morris et Johnson [54] en proposant une nouvelle approche de la mesure de diffusion par RMN à laquelle ils donnèrent le nom de DOSY pour (Diffusion Order Spectroscopy). Sur un spectre DOSY, les spectres de RMN des composants d'un mélange sont discriminés le long de l'axe de diffusion (axe des ordonnées), l'axe des abscisses comporte les déplacements chimiques des protons des molécules présentes dans le mélange. Grâce à un logiciel les spectres RMN¹H de chaque composant du mélange sont extraits du spectre DOSY.

Cette technique s'apparente très bien à une chromatographie analytique, puisqu'elle permet de faire une séparation virtuelle d'un ensemble de molécule dans un échantillon.

La figure 68, montre une analyse complète d'un mélange, équimoléculaire de glucose, de sodium dodecyl sulfate de (SDS), d'adénosine tri -phosphate (ATP) dans l'eau deutérée.

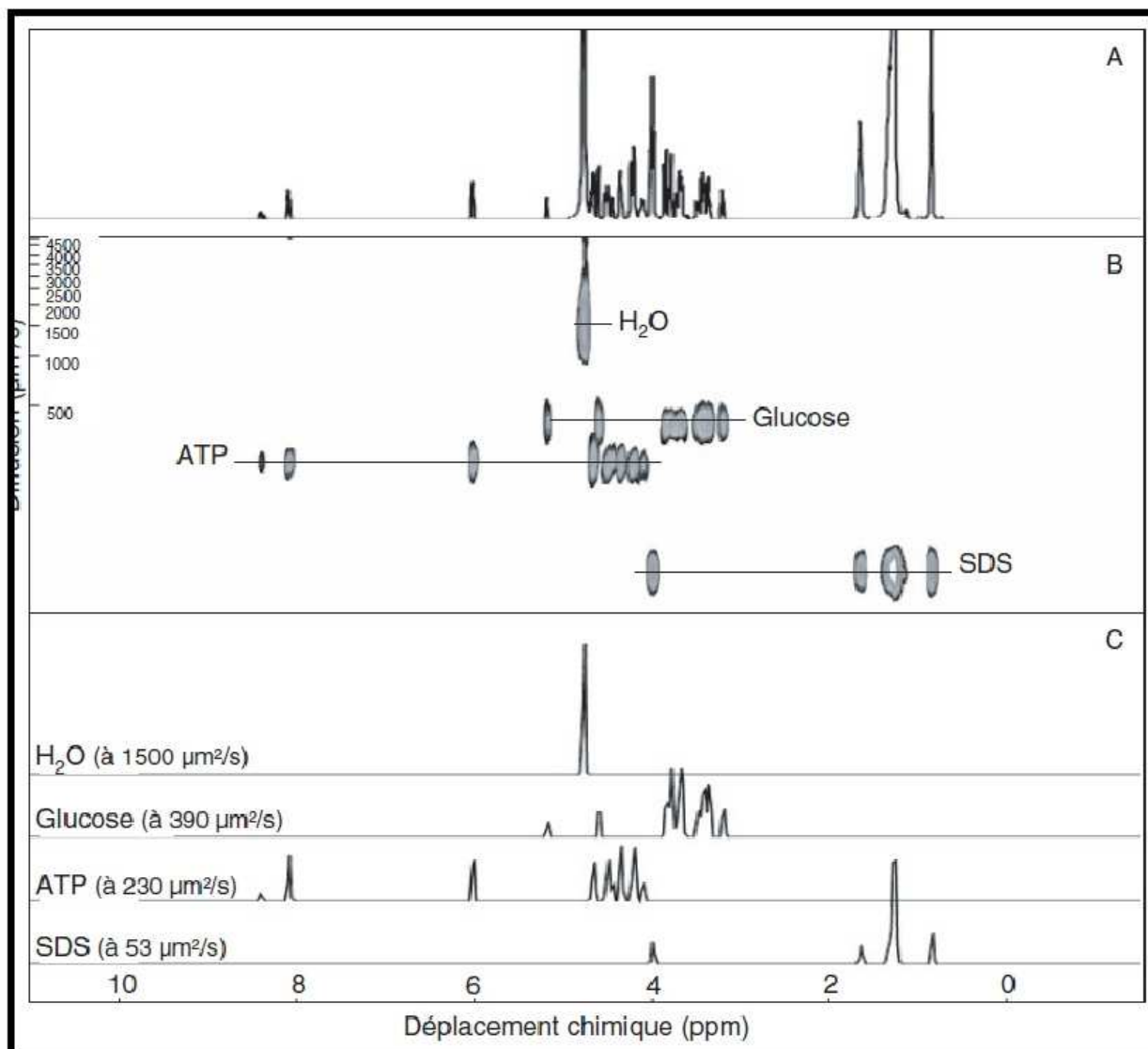


Figure 68. Analyse d'un mélange de glucose, de sodium dodecyl sulfate de (SDS), d'adénosine tri-phosphate (ATP)

Le spectre A représente le spectre RMN 1D du mélange, le spectre B représente le spectre DOSY¹H du mélange, il montre l'ensemble des fréquences de chacun des composant du mélange le long de l'axe des fréquences RMN (déplacements chimiques) (axe horizontal) et y associe le coefficient de diffusion de chaque molécule présente dans le mélange, le long de l'axe de diffusion (axe vertical). Le spectre C représente les spectres RMN¹H de chaque composant du mélange extraits un spectre DOSY(B) [55].

Concernant notre travail nous avons donc enregistré le spectre DOSY ¹H (Spectre 11) de notre produit. Sur ce spectre, on remarque que la totalité des signaux aromatiques intenses appartiennent à la même molécule. Par contre le signal à 3,20 ppm correspondant au groupement méthoxyle précédemment signalé n'appartient pas à notre molécule mais

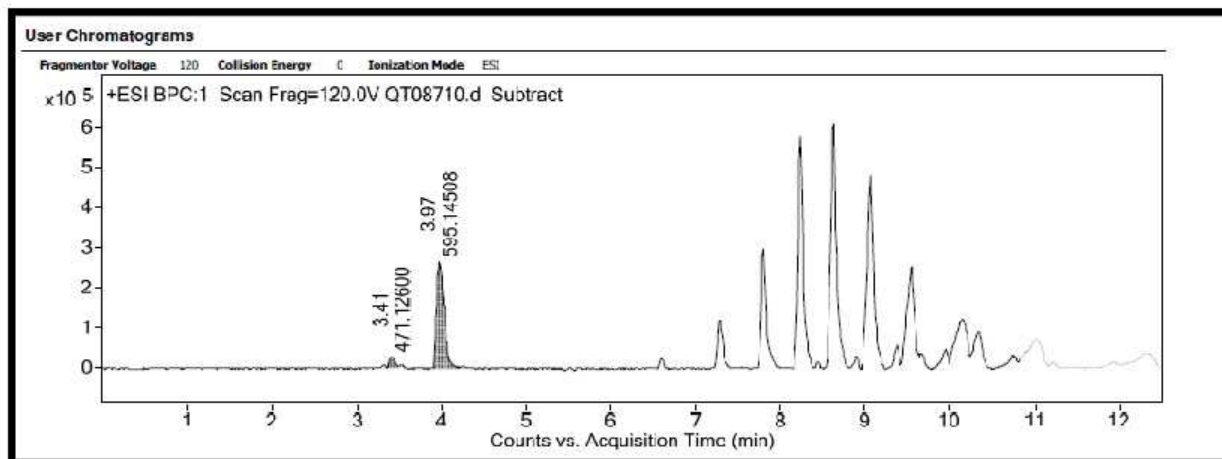
appartient à une autre dont le coefficient de diffusion dans le DMSO-d₆ est beaucoup plus petit. Ainsi nous avons attribué ce signal à du méthanol resté dans notre échantillon durant les travaux de purification, on remarque également dans la zone des déplacements chimiques de notre molécule, la présence de signaux appartenant à la molécule précédemment signalée en traces dans notre échantillon. Par ailleurs et avec un coefficient de diffusion beaucoup plus faible apparait le DMSO non deutéré, contaminant du DMSO-d₆ utilisé comme solvant.



Spectre 11: Spectre DOSY ¹H du composé 3

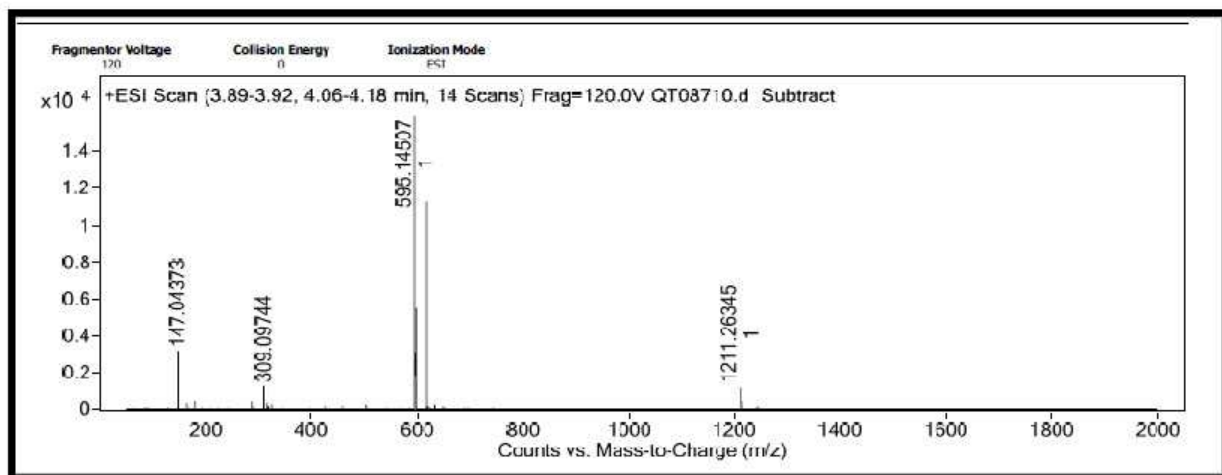
La détermination de la structure de la molécule A17-2 a donc débuté par une analyse en LC-MS, sur un spectromètre de masse à ionisation par électrospray (ESI) couplé à une CLHP.

Le spectre haute résolution a été obtenu sur un 6520 accurate Mass Q-TOF spectromètre après passage sur une colonne C₁₈ HPLC. Le chromatogramme obtenu montre, notre composé avec un temps de rétention de 3,97 mn avec TIC à 595,14568 (Spectre 12).



Spectre 12 : HPLC-MS du composé 3

Le spectre ESI-HRMS montre les ions quasi moléculaires à $m/z = 1211,2645 [2M+Na]^+$, $m/z = 617,12741 [M+Na]^+$, $m/z = 595,14507 [M+H]^+$ orientant vers une formule brute de $C_{30}H_{26}O_{13}$ pour cette molécule qui doit alors comporter 18 insaturations (Spectre 13 et Tableau 15).

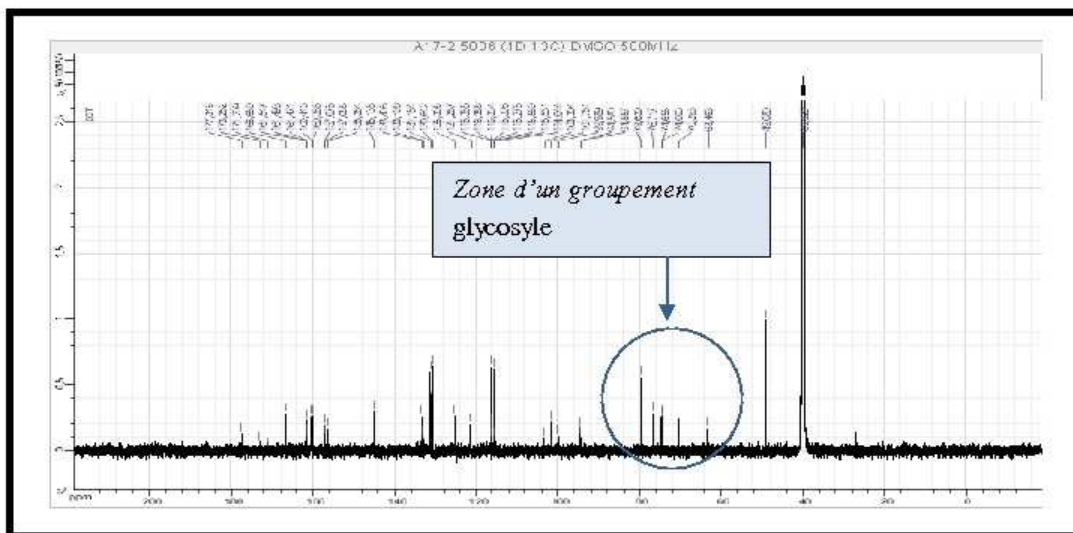


Spectre 13 : Spectre ESI-HRMS (+) du composé 3

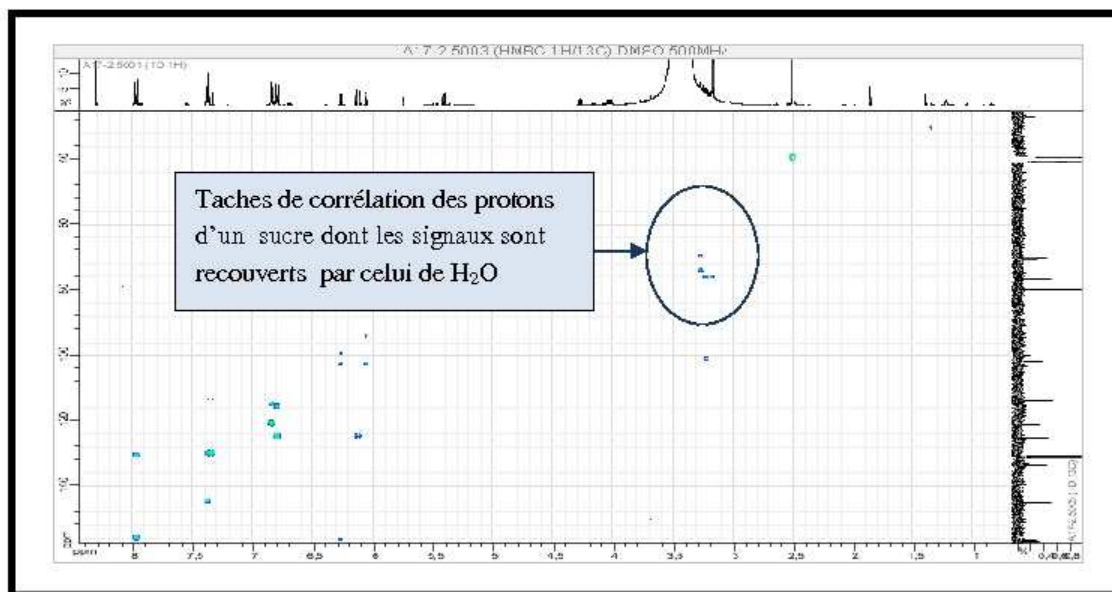
Tableau 15. Résultats de l'analyse de la composition élémentaire des ions obtenus du composé 3 par ESI-HRMS

Peak List				
m/z	z	Abund	Formula	Ion
147.04373		3180.1		
309.09744		1248.3		
595.14507	1	16194.9	C30 H27 O13	(M+H)+
596.14891	1	5553.2	C30 H27 O13	(M+H)+
597.15199	1	1212.3	C30 H27 O13	(M+H)+
617.12741	1	11326.5	C30 H26 Na O13	(M+Na)+
618.13033	1	3927.6	C30 H26 Na O13	(M+Na)+
619.13269	1	998.9	C30 H26 Na O13	(M+Na)+
1211.26345	1	1207.7		
1212.26741	1	916.3		

L'examen simultané des spectres RMN ^{13}C (spectre 10) et HMBC (spectre 14) permet de repérer un groupement glycosyle de type hexose.



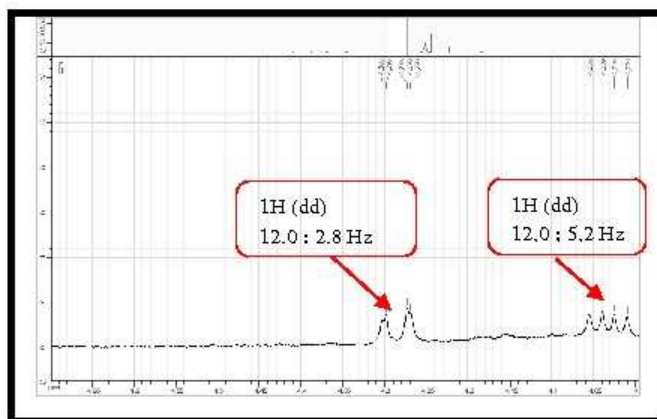
Spectre 10 : Spectre RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d6) du composé 3



Spectre 14: Spectre HMBC (500 MHz, DMSO-d₆) du composé 3

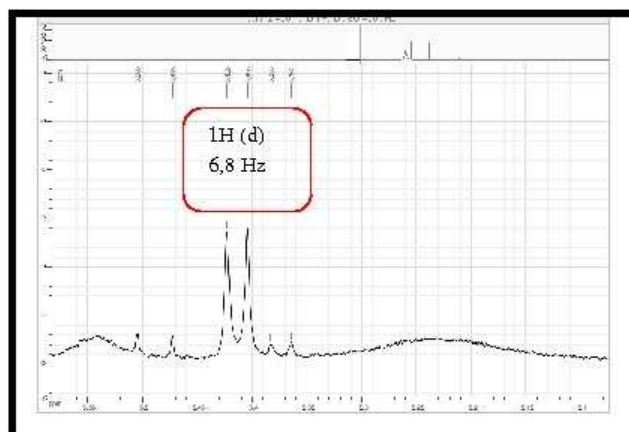
Cet hexose comporte :

- ✓ un CH₂ à $\delta_H = 4,28$ ppm (1H; dd ; J = 12,0 ; 2,8 Hz) attribuable à H-6''a et $\delta_H = 4,03$ ppm (1H; dd ; J = 12,0 ; 5,2 Hz) attribuable à H-6''b, $\delta_C = 63,46$ ppm, attribuable au CH₂ de la position C-6 de l'hexose.



Spectre 8-1 : spectre RMN ¹H (étalement 1) du composé 3

- ✓ quatre groupements CH dans les signaux des 4 atomes d'hydrogène sont recouverts par le signal de l'eau de contamination du DMSO-d₆ et dont les signaux des carbones apparaissent à 70,39 ppm ; 74,60 ppm ; 74,66 ppm et 76,71 ppm.
- ✓ Un groupement CH à $\delta_H = 5,41$ ppm, J = 6,8 Hz, $\delta_C = 101,79$ ppm attribuable à la position anomérique C-1''.

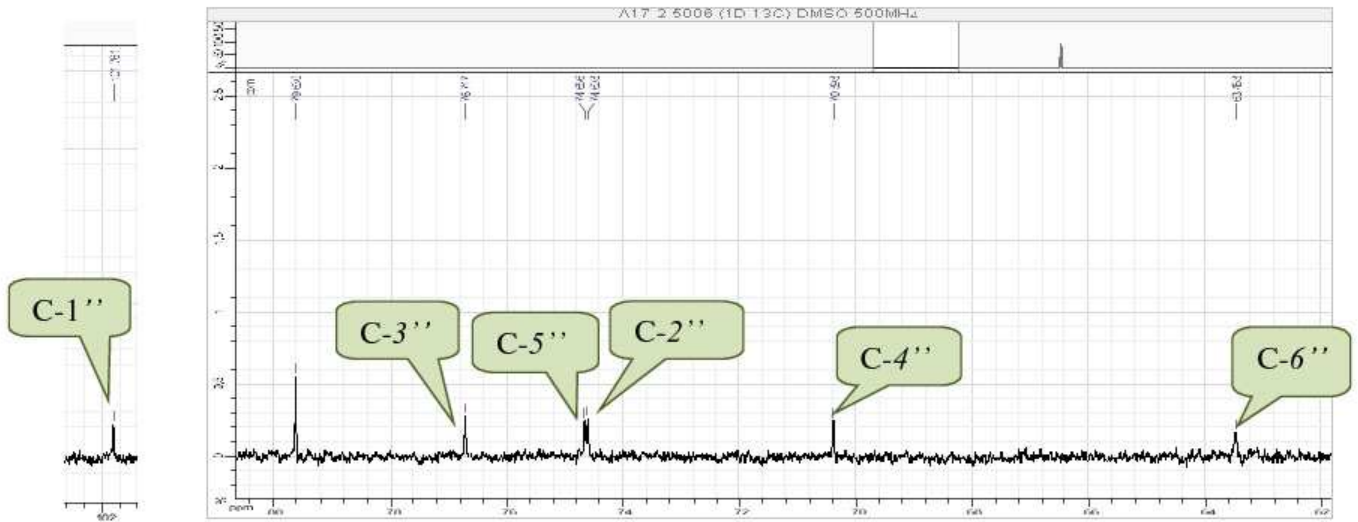


Spectre 8-2 : spectre RMN ^1H (étalement 2) du composé 3

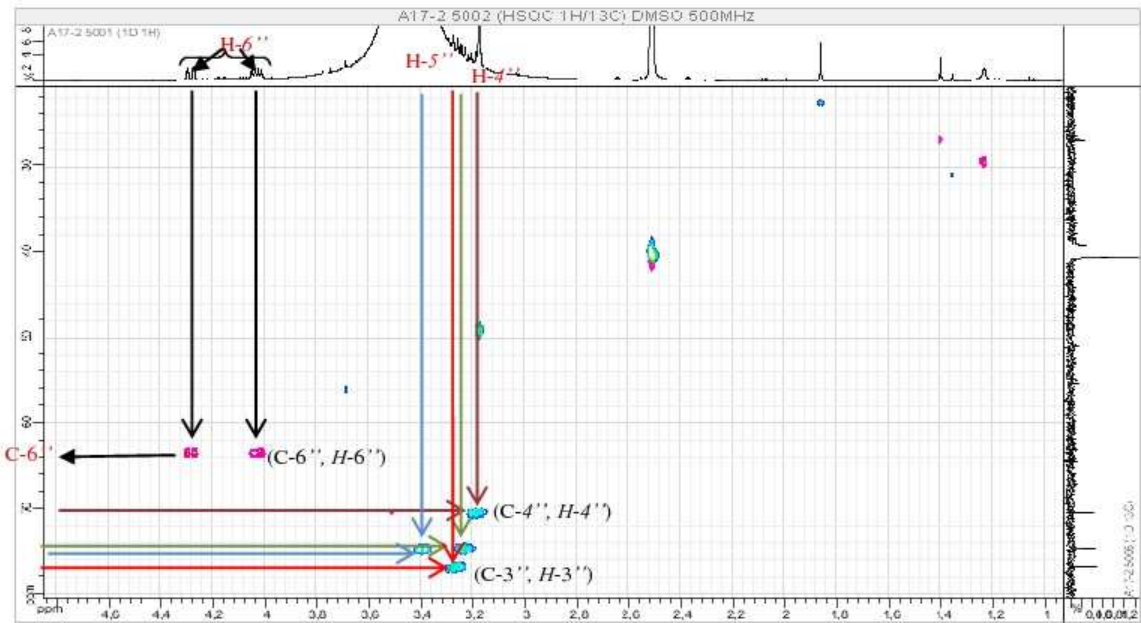
La valeur de la constante de couplage du proton anomérique et la valeur du déplacement chimique de son carbone indiquent une jonction -O- β - glycosidique.

Les valeurs des déplacements chimique des 4 autres méthynes de ce sucre : 70,39 ; 74,60 ; 74,66 et 76,71 ppm orientent vers un substituant glucopyranoside. En tenant compte des résultats bibliographique [56] et de l'analyse des spectres COSY (Spectre 15) et HSQC (Spectre 9-2), HMBC (Spectre 14-1), les atomes de carbone de ce groupement glucopyranoside sont attribués comme suit :

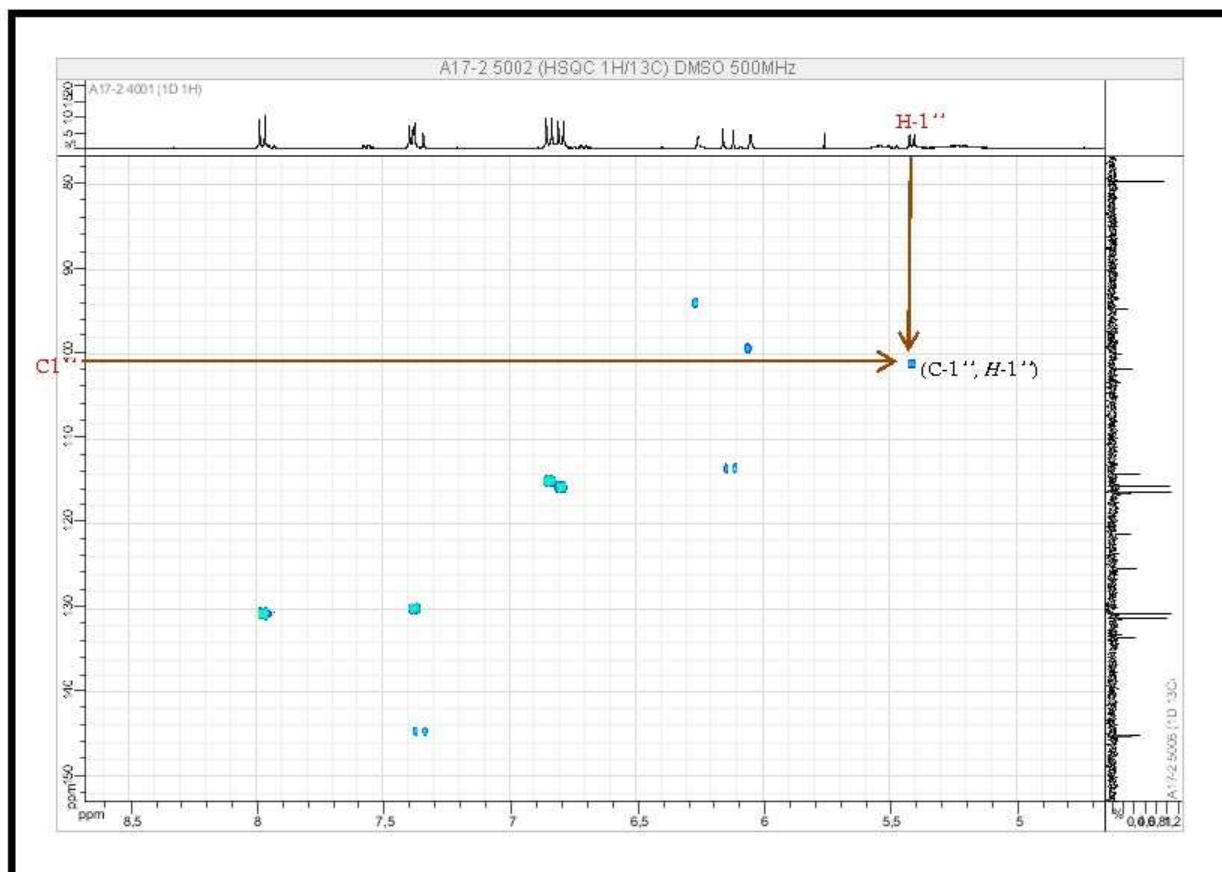
- ✓ C-1'', carbone anomérique à $\delta_{\text{C}} = 101,79$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 5,41$ ppm.
- ✓ C-2'', $\delta_{\text{C}} = 74,60$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 3,25$ ppm.
- ✓ C-3'', $\delta_{\text{C}} = 76,71$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 3,30$ ppm.
- ✓ C-4'', $\delta_{\text{C}} = 70,39$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 3,19$ ppm.
- ✓ C-5'', $\delta_{\text{C}} = 74,66$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 3,40$ ppm.



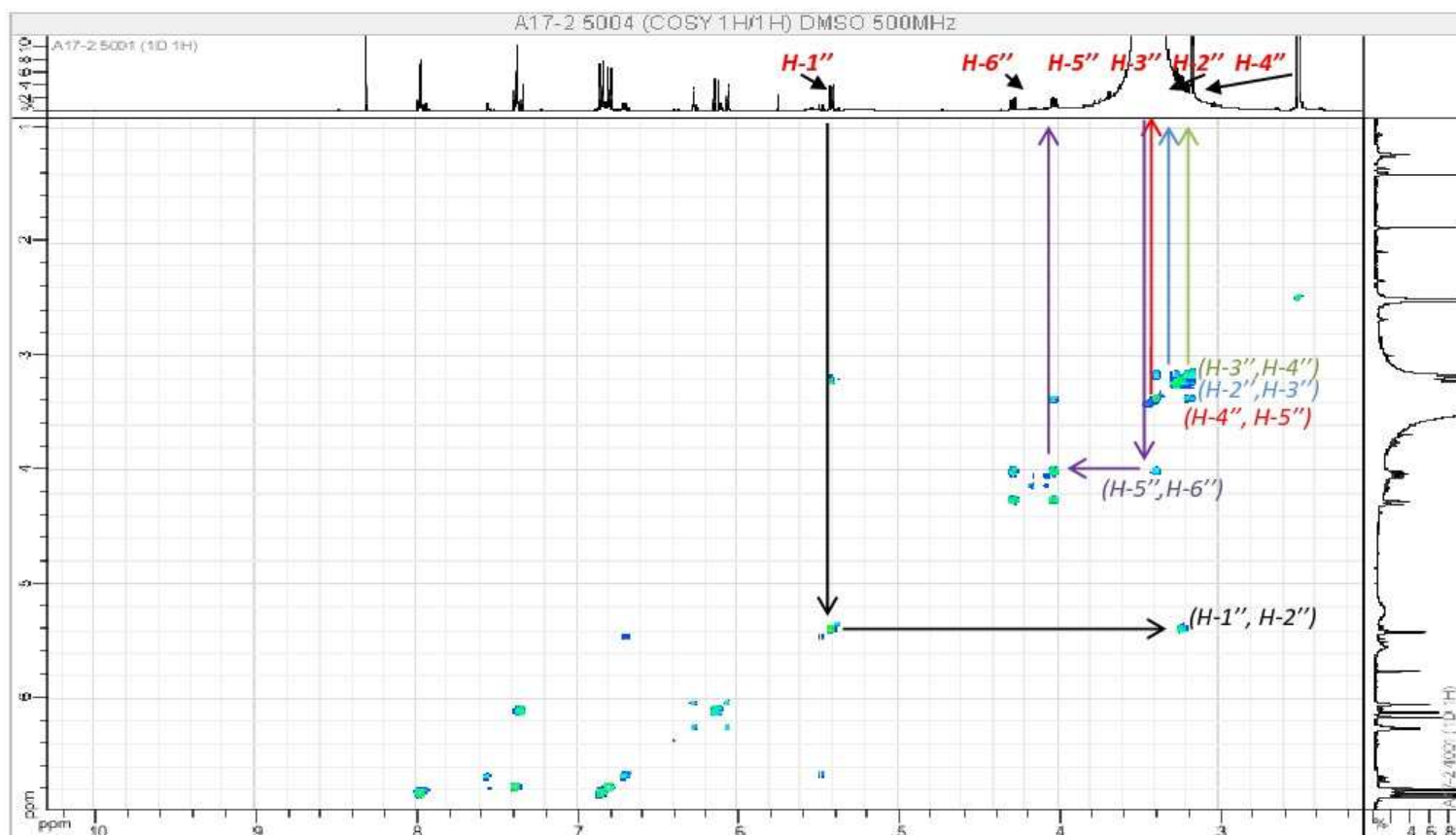
Spectre 10-1: spectre RMN ¹³C (étalement 1) (125 MHz, DMSO-d₆) du composé 3



Spectre 9-2: Spectre HSQC (étalement 2) (500 MHz, DMSO-d₆) du composé 3



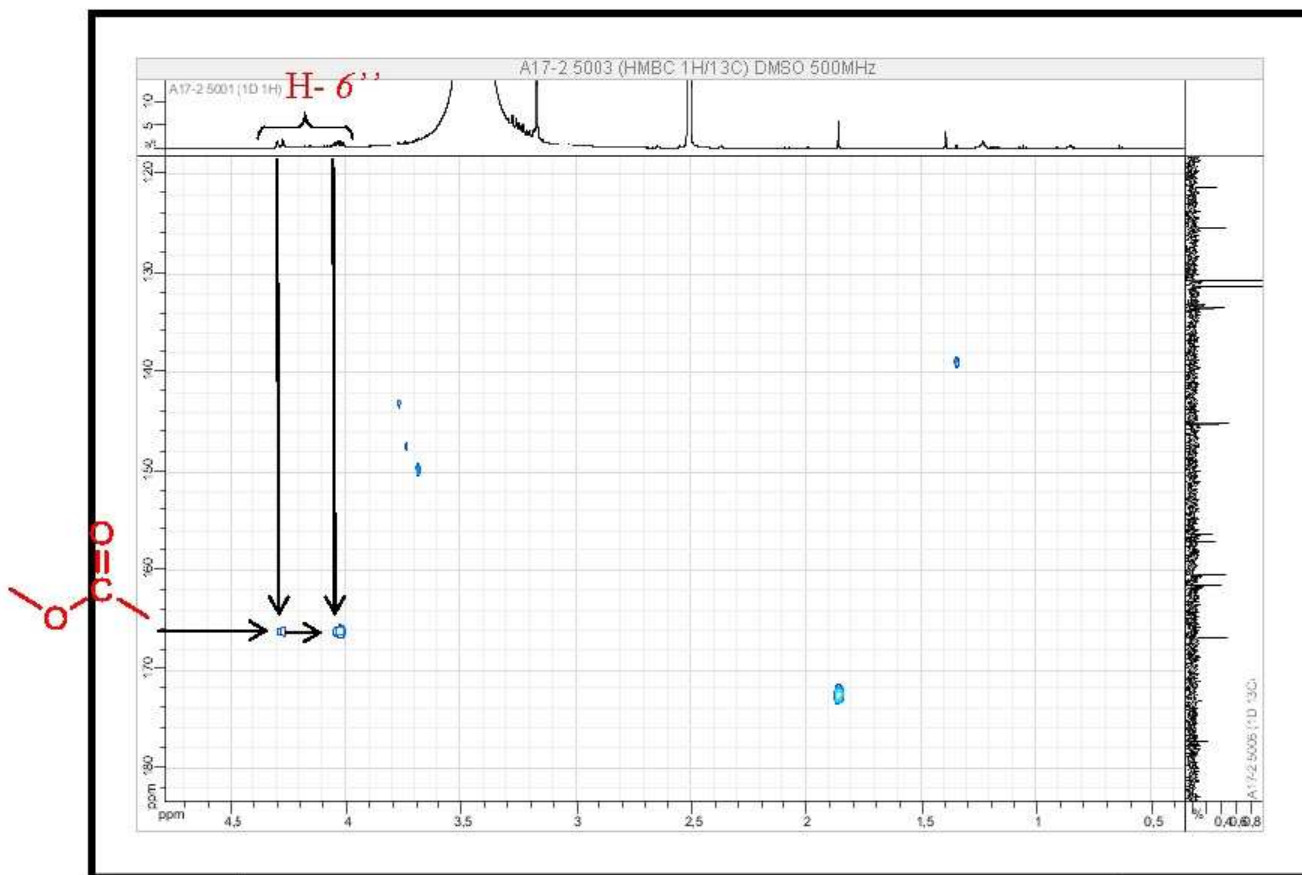
Spectre 9-3: Spectre HSQC (étalement 3) (500 MHz, DMSO-d₆) du composé 3



Spectre 15: Spectre COSY (500 MHz, DMSO-d₆) du composé 3

Comme signalé plus haut le carbone du groupement CH₂ de la position 6 de ce glucopyranoside que nous numérotons C-6'' résonne à 63,46 ppm. La valeur du déplacement chimique de ce carbone indique clairement une acylation de cette position.

Cette hypothèse est rapidement vérifiée sur le spectre HMBC (Spectre 14-1), qui montre en effet, une corrélation entre les protons H₂-6'' et le carbonyle d'ester à $\delta_C = 166,69$ ppm.



Spectre 14-1 : spectre HMBC (étalement 1) du composé 3

A ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer la présence de l'entité reportée dans la figure 69 dans notre molécule.

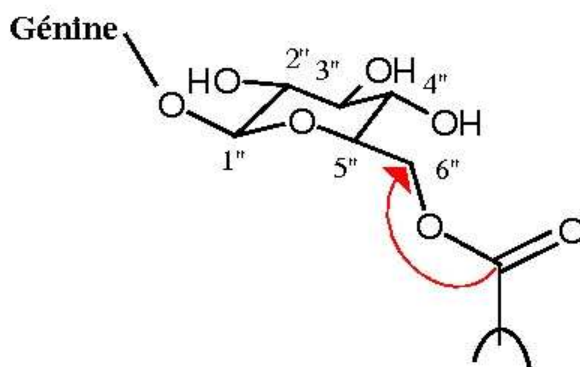
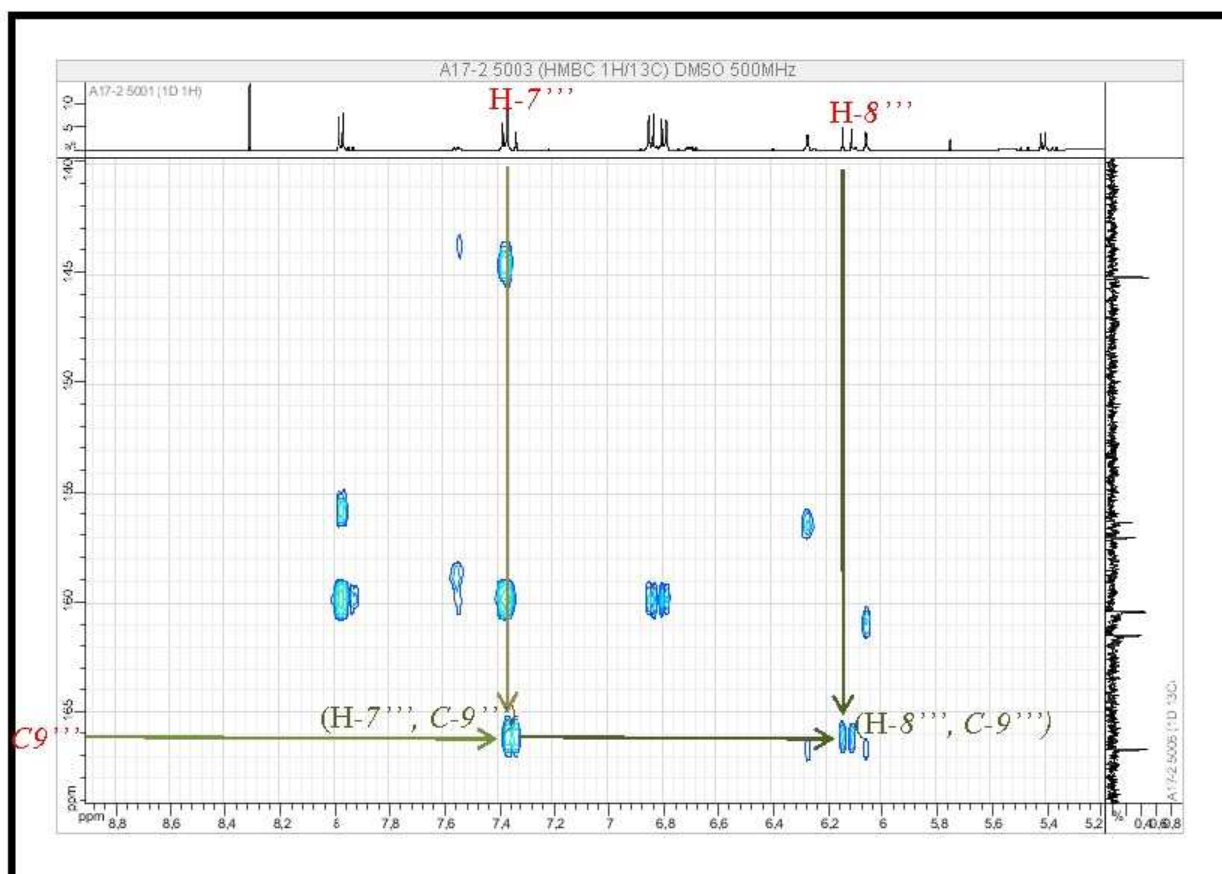


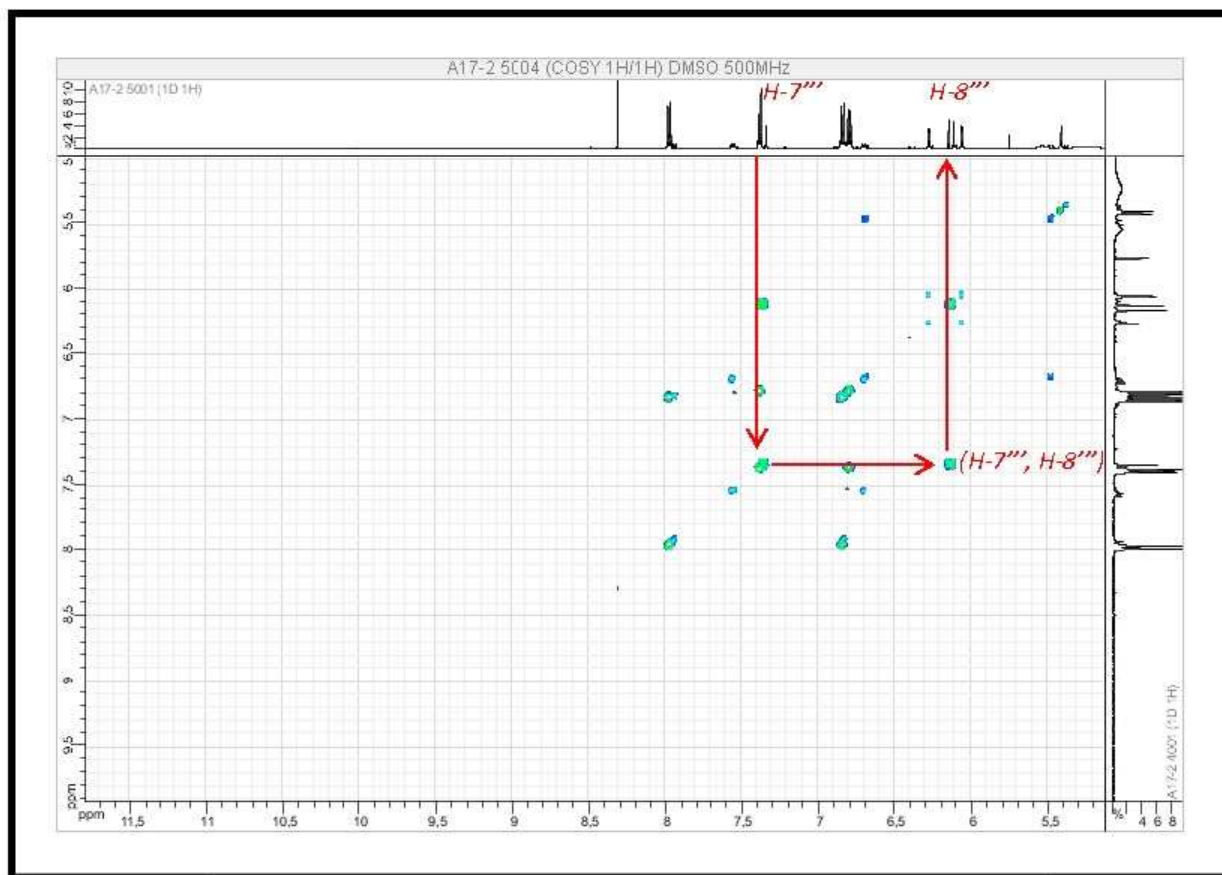
Figure 69. Structure partielle-1 du composé 3

Le spectre HMBC (Spectre 14-2) montre également des taches de corrélation entre ce carbonyle et les protons éthyléniques résonant sous forme d'un doublet chacun à $\delta_H = 6,13$ ppm et $\delta_H = 7,36$ ppm ($J = 16,0$ Hz).



Spectre 14-2 : spectre HMBC (étalement 2) du composé 3

Cette observation oriente vers la présence d'un groupement $-\text{CH}=\text{CH}-$ avec une configuration trans en position vicinale par rapport au carbonyle d'ester. Ceci est d'ailleurs vérifié sur le spectre COSY (Spectre 15-1) qui montre une corrélation nette entre ces deux protons.



Spectre 15-1: Spectre COSY (étalement 1) du composé 3

Ces observations mènent à ce stade, à la structure partielle-2 reportée dans la figure 70.

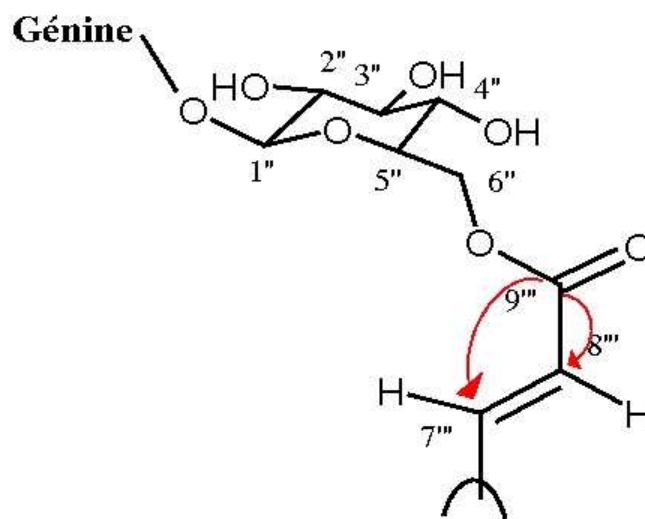
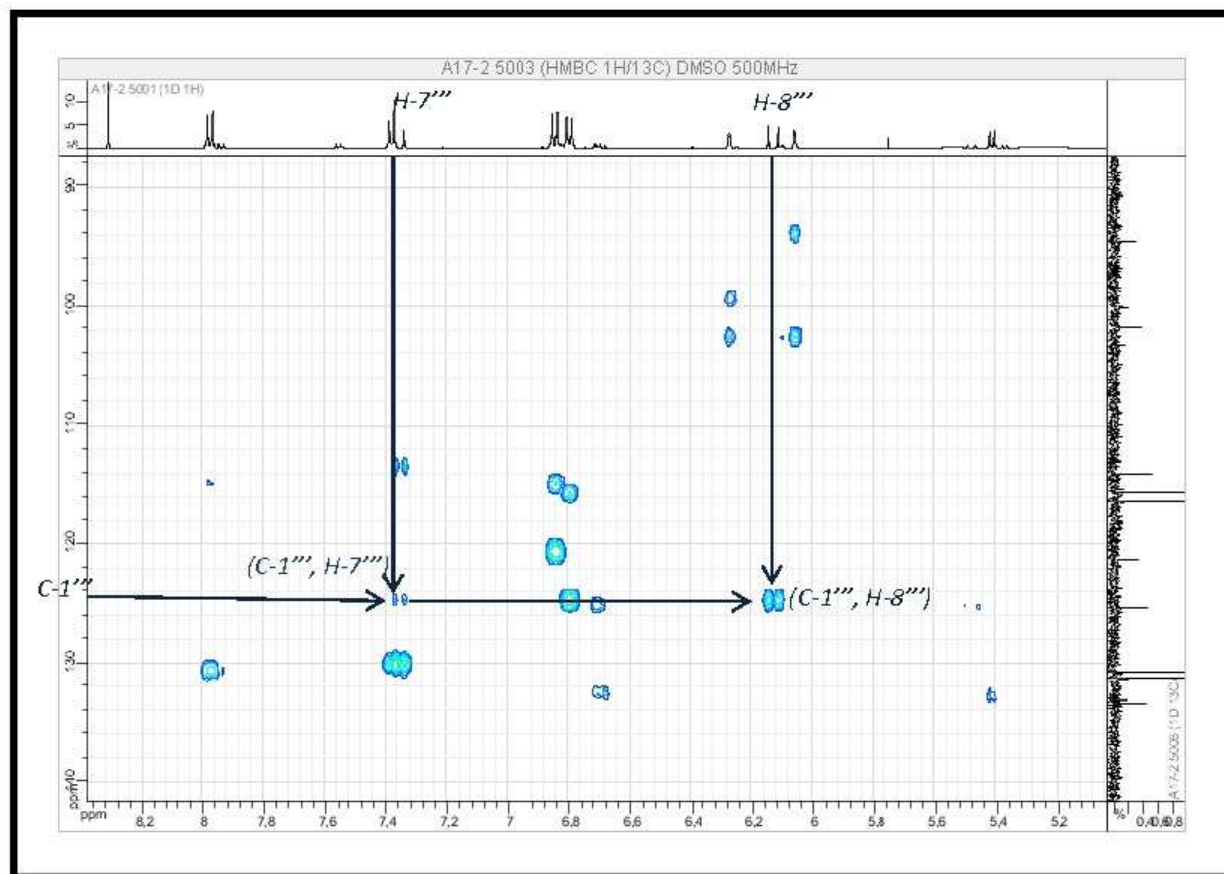


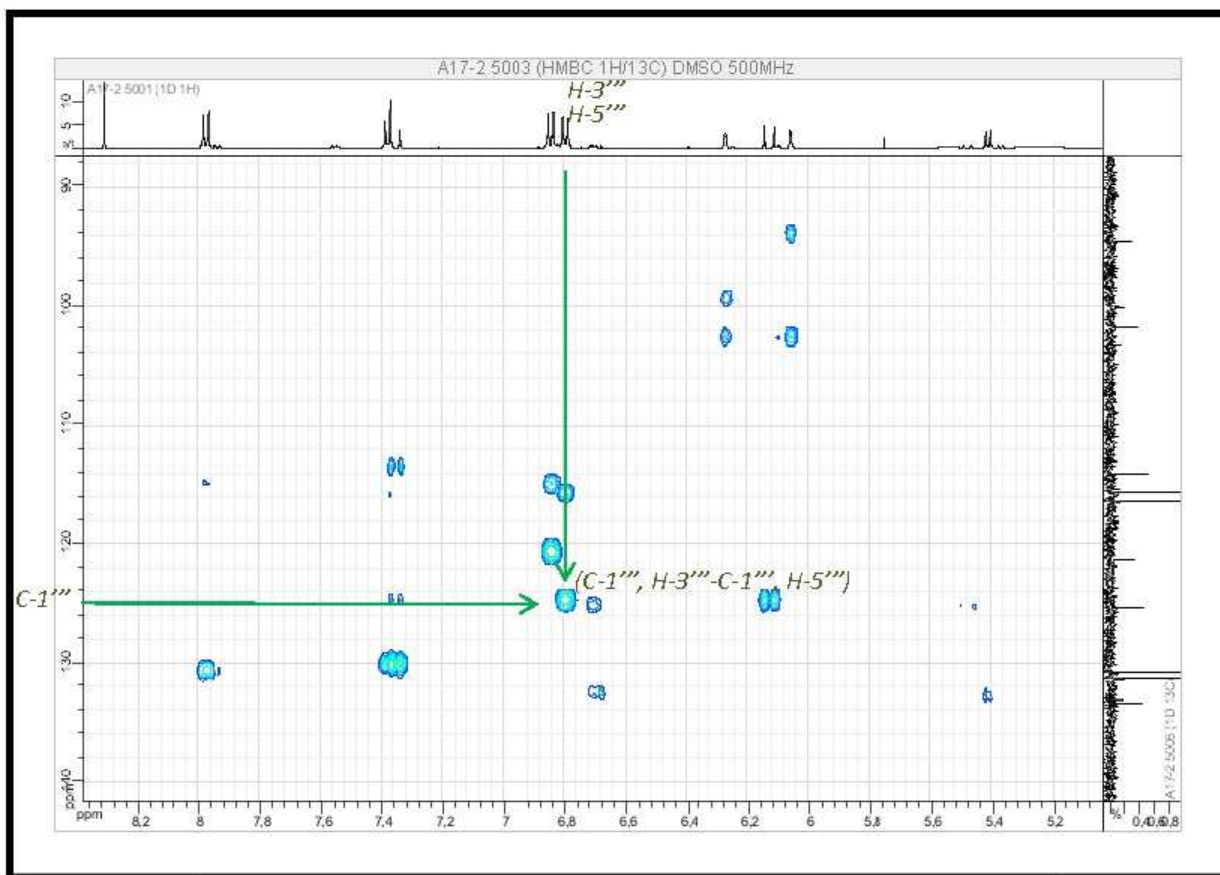
Figure 70. Structure partielle-2 du composé 3

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre 14-3), ces deux derniers protons montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire aromatique à $\delta_C = 125,30$ ppm.

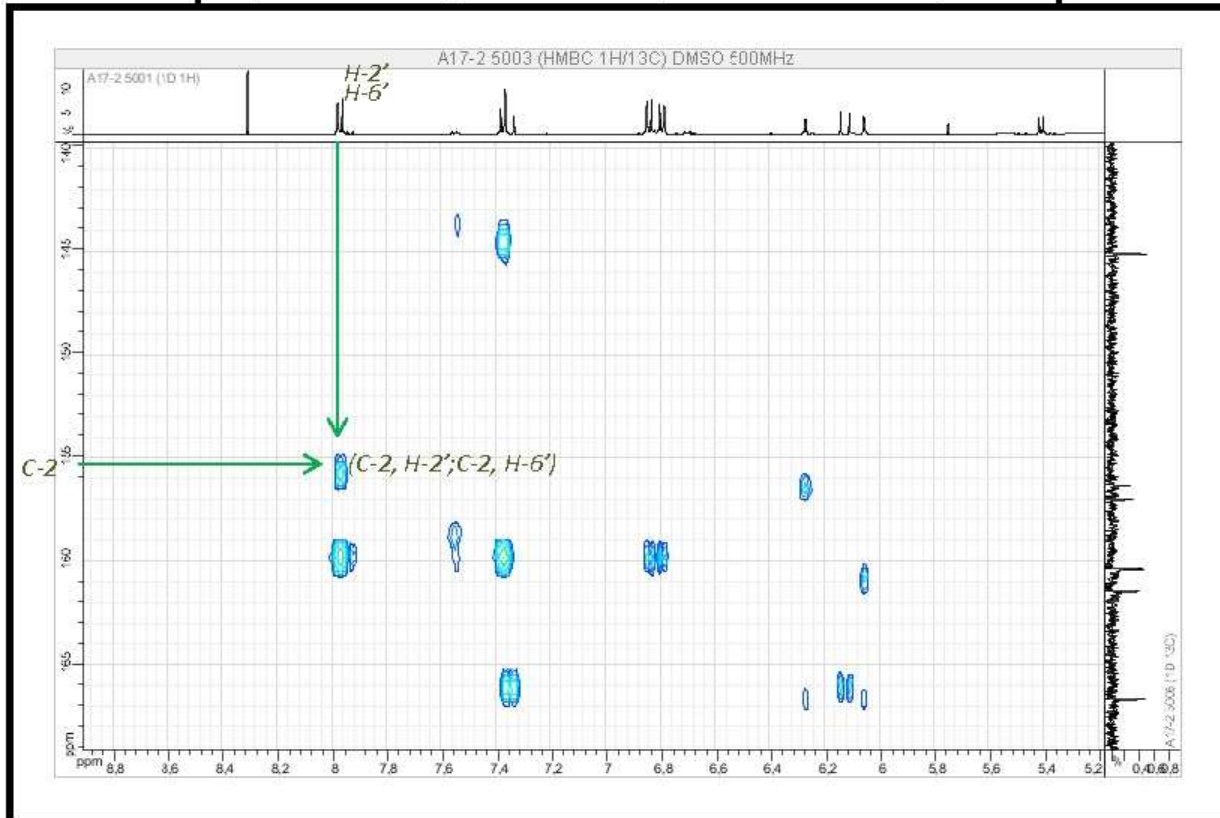


Spectre 14-3: spectre HMBC (étalement 3) du composé 3

Toujours sur le même spectre HMBC, ce carbone aromatique quaternaire ($\delta_C = 125,30$ ppm) que nous numérotions C-1''' montre une tache de corrélation avec les protons résonant sous forme d'un doublet d'intégration 2H à $\delta_H = 6,79$ ppm, $J = 8,8$ Hz ($\delta_C = 116,31$ ppm) caractéristiques d'un noyau aromatique para-substitué. Nous numérotions alors ces protons H-3''' et H-5''' (spectre 14-4). Les protons H-2''' et H-6''' de ce noyau aromatique sont repérés à $\delta_H = 7,38$ ppm ($\delta_C = 130,64$ ppm). Sur le spectre HMBC, ces deux derniers protons corrélient avec le carbone quaternaire à $\delta_C = 156,36$ ppm, permettant son attribution au C-4''' (spectre 14-5). La valeur de son déplacement chimique est en faveur d'une oxygénation de cette position. Cette analyse nous permet de proposer la présence de l'entité reportée dans la figure 71 dans notre molécule.



Spectre 14-4 : Spectre HMBC (étalement 4) du composé 3



Spectre 14-5 : Spectre HMBC (étalement 5) du composé 3

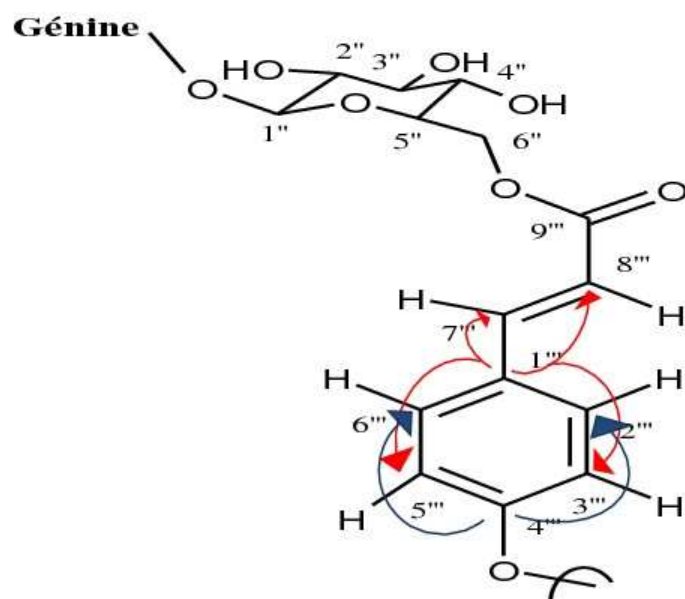


Figure 71. Structure partielle-3 du composé **3**

En revenant à la formule brute $C_{30}H_{26}O_{13}$ de notre molécule, Il se trouve que l'entité précédemment décrite dans cette molécule a consommé 15 atomes de carbone et 7 insaturations. Comme reporté plus haut d'après les résultats de l'analyse du spectre d'absorption UV, le composé **3** renferme un squelette flavonique, ainsi les 15 atomes de carbone restants ne peuvent être que dans la partie flavonique qui doit forcément représenter la génine ou l'aglycone de cette molécule. En effet, en faisant abstraction des signaux de la partie osidique et de la partie phénolique, le spectre RMN 1H permet de relever :

- Un singulet large d'intégration 1H à 12,45 ppm attribuable au OH en position C-5 d'un flavonoïde.
- Deux doublets d'intégration 1H chacun, formant un système AM à $\delta_H = 6,26$ ppm et $\delta_H = 6,05$ ppm, ($J = 1,6$ Hz) caractéristiques des protons H-8 et H-6 respectivement, du noyau A d'un flavonoïde.
- Deux doublets d'intégration 2H chacun, formant un système AM à $\delta_H = 7,98$ ppm et $\delta_H = 6,84$ ppm, ($J = 8,8$ Hz) attribuables à H-2', H-6' et à H-3', H-5' respectivement, indiquant ainsi une substitution para du noyau B oxygéné en position 4' d'un flavonoïde.

La présence de ces signaux oriente vers un squelette flavonique de type kaempférol.

La synthèse de l'ensemble de notre analyse mène au kaempférol substitué par un glucosyle acylé en C-6'''. En revenant à la formule brute de notre molécule, on en déduit que le groupement oxygéné de l'acyle en C-6''' du glucopyranosyle ne peut être qu'un hydroxyle.

Le composé **3** est par conséquent le kaempférol substitué par un [6''-O-(E)-coumaroyl]- β -D-glucopyranoside, comme reporté dans la figure 72.

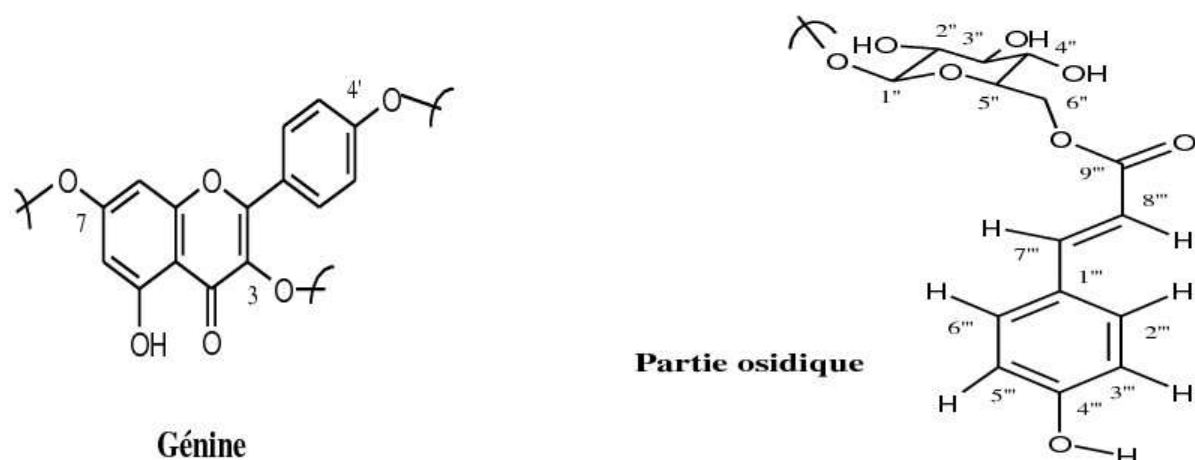
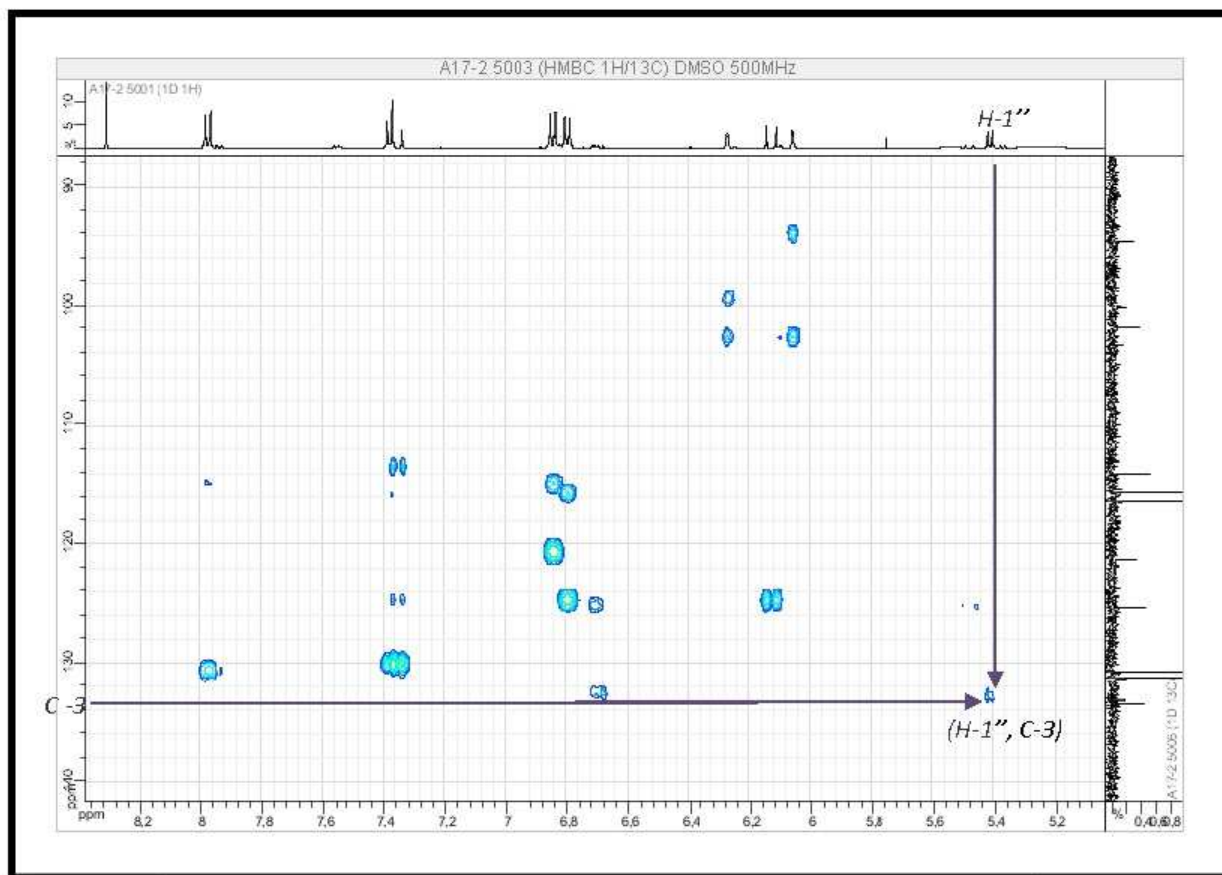
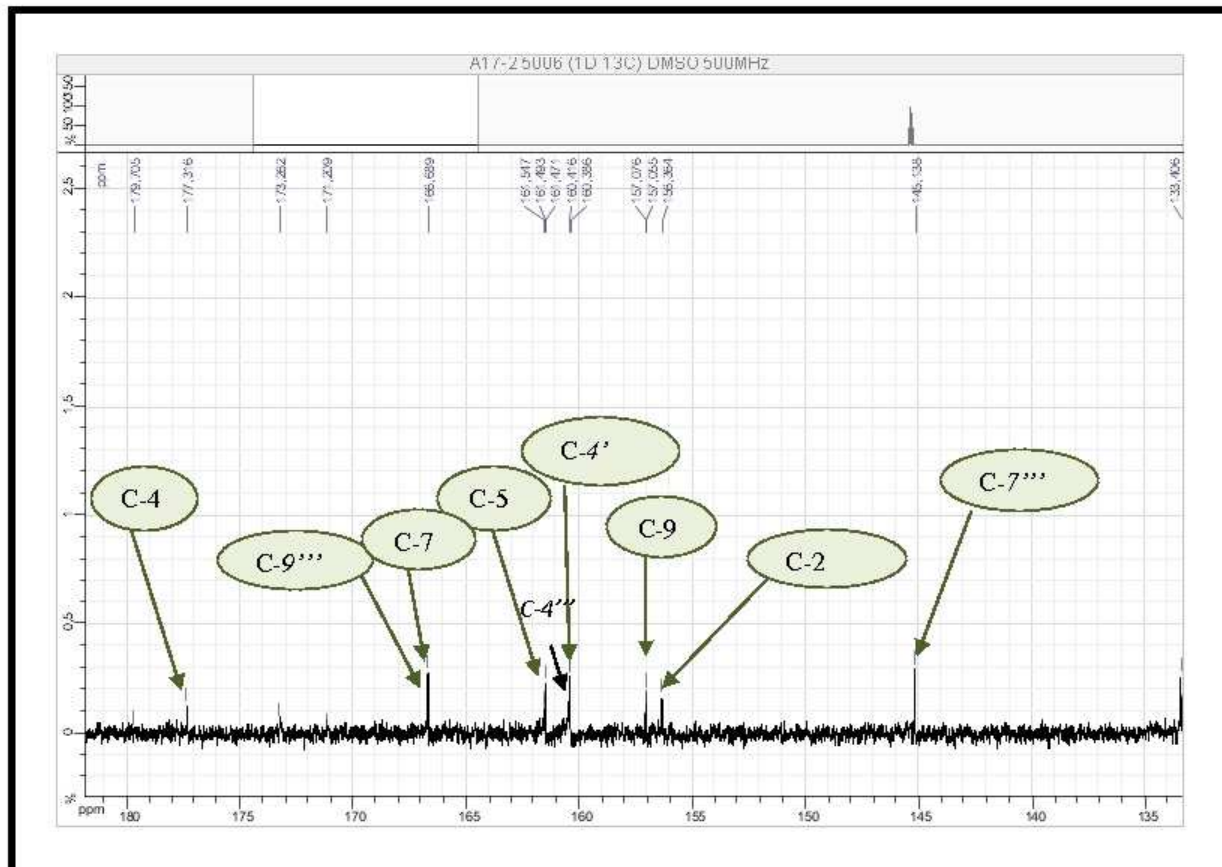


Figure 72. Génine et partie osidique du composé **3**

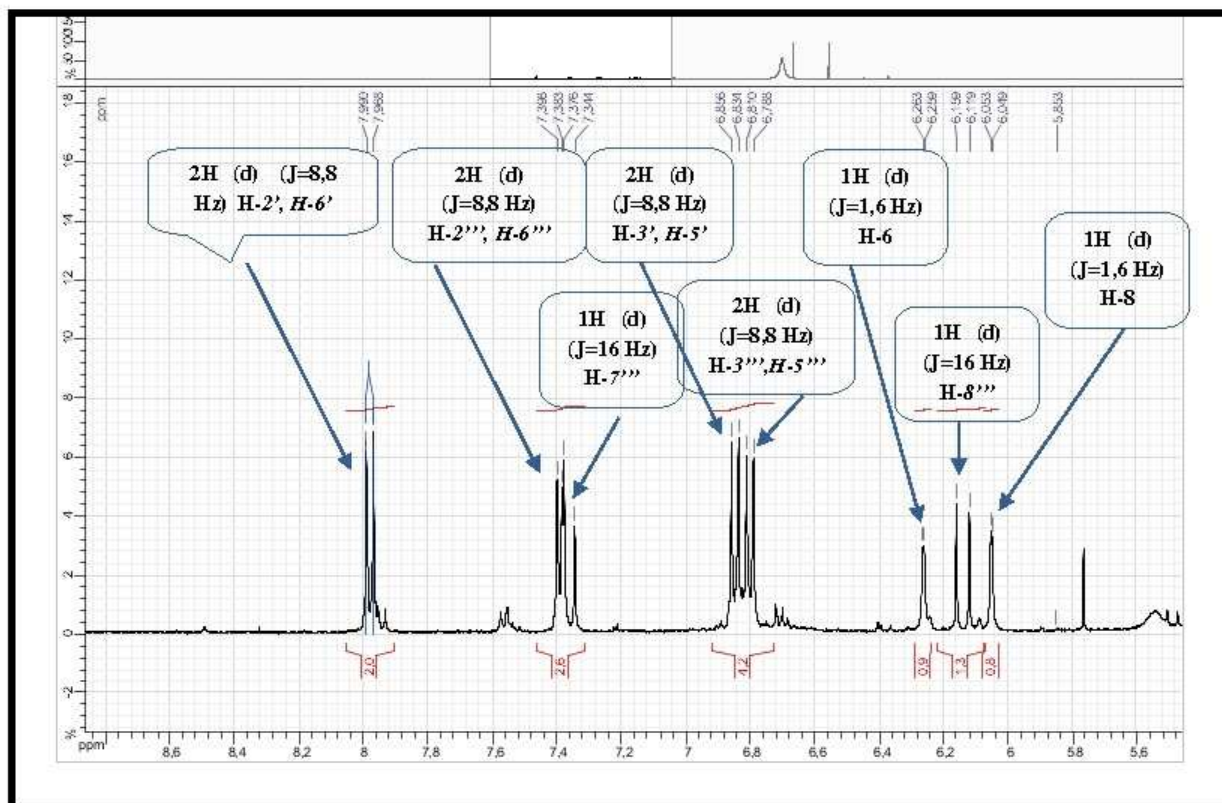
Pour avoir la structure finale du composé **3**, il suffit de placer la partie osidique sur la génine. On constate que la génine qui est le kaempférol peut être substituée en position 4' ou en position 7 ou en position 3. Pour cela nous avons réexaminé le spectre HMBC (Spectre 14-6). Sur ce spectre, le proton anomérique montre une tache de corrélation claire et nette avec le carbone résonant à $\delta_C = 133,40$ ppm. La valeur du déplacement chimique de ce carbone, indique qu'il s'agit de C-3 et non pas des deux autres. En effet, toujours sur le spectre HMBC (Spectre 14-7), C-4' est relevé à $\delta_C = 160,38$ ppm grâce sa corrélation avec H-6', H-2' et H-3', H-5' ; alors que C-7 est relevé superposé à C-9''' à $\delta_C = 166,69$ ppm grâce a sa corrélation avec H-8 et H-6.



Spectre 14-6 : Spectre HMBC (étalement 6) du composé 3



Spectre 10-4: Spectre RMN ¹³C (étalement 4) du composé 3



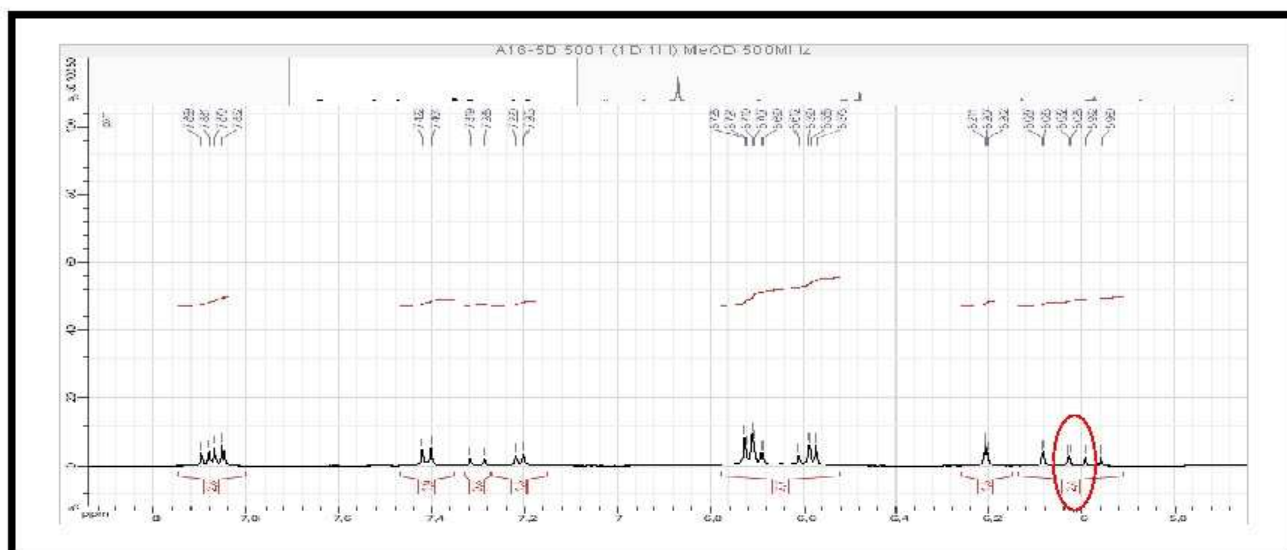
Spectre 8-3 : spectre RMN ¹H (étalement 3) du composé 3

*signal recouvert par le signal de H₂O de contamination du DMSO-d₆

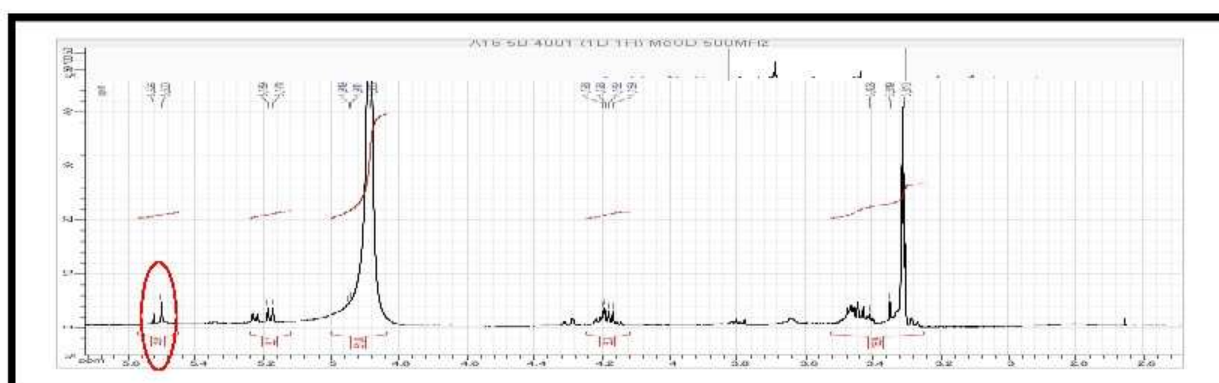
IV.2.3. Elucidation structurale du composé 2 (A-16-5B)

L'examen des spectres proton (Spectres 16-1 et 16-2) montre la présence de la totalité des signaux attribués au composé précédent le trans-tiliroside et montre d'autres signaux que nous avons attribués au composé A16-5B.

Autrement dit, le composé A16-5B est en fait obtenu en mélange avec le composé précédent 3 ou A17-2.



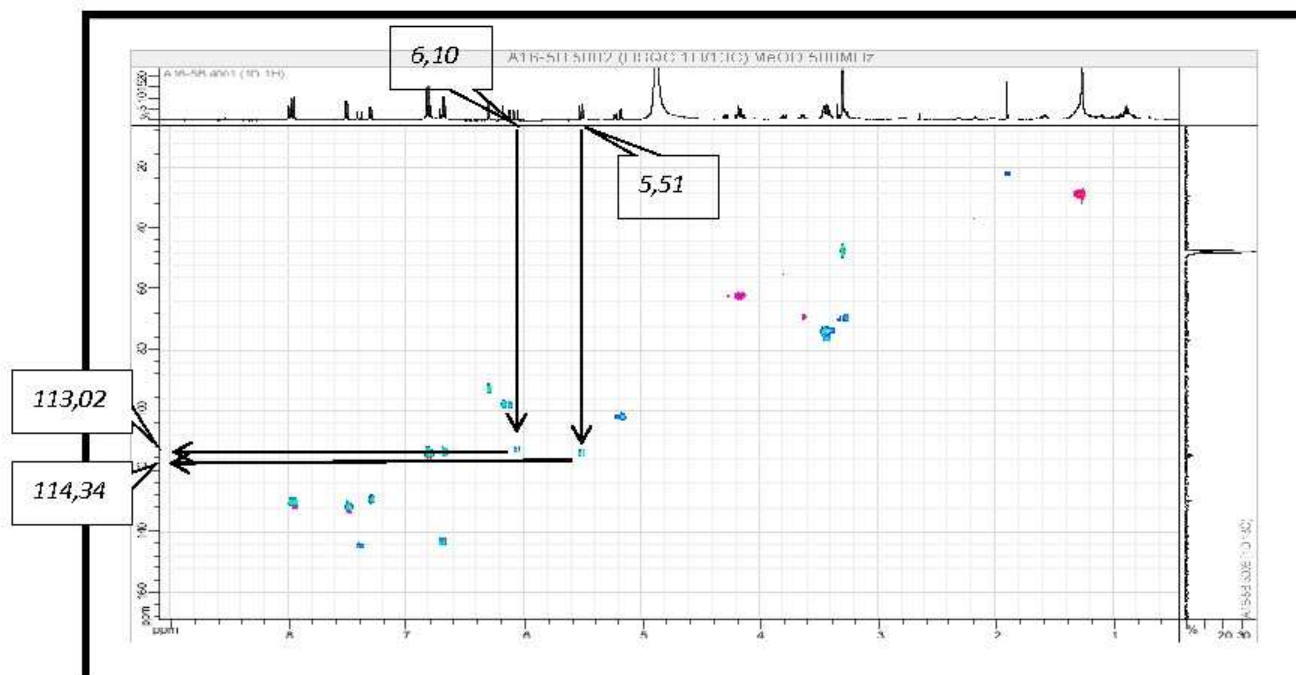
Spectre 16-1 : Spectre RMN ¹H (étalement-1) (CD₃OD, 500 MHz) du composé 2



Spectre 16-2 : Spectre RMN ¹H (étalement-2) (CD₃OD, 500 MHz), du composé 2

L'analyse de ce spectre proton, montre que A-17-2(3) et A16-5B (2) ont des structures très similaires. La différence entre les deux molécules réside dans la stéréochimie de la double liaison du groupement p-coumaroyle. En effet, le spectre étalé montre la présence d'un doublet à $\delta_H = 5,51$ ppm ($J = 12,3$ Hz) ($\delta_C = 114,34$ ppm) caractéristique d'un proton

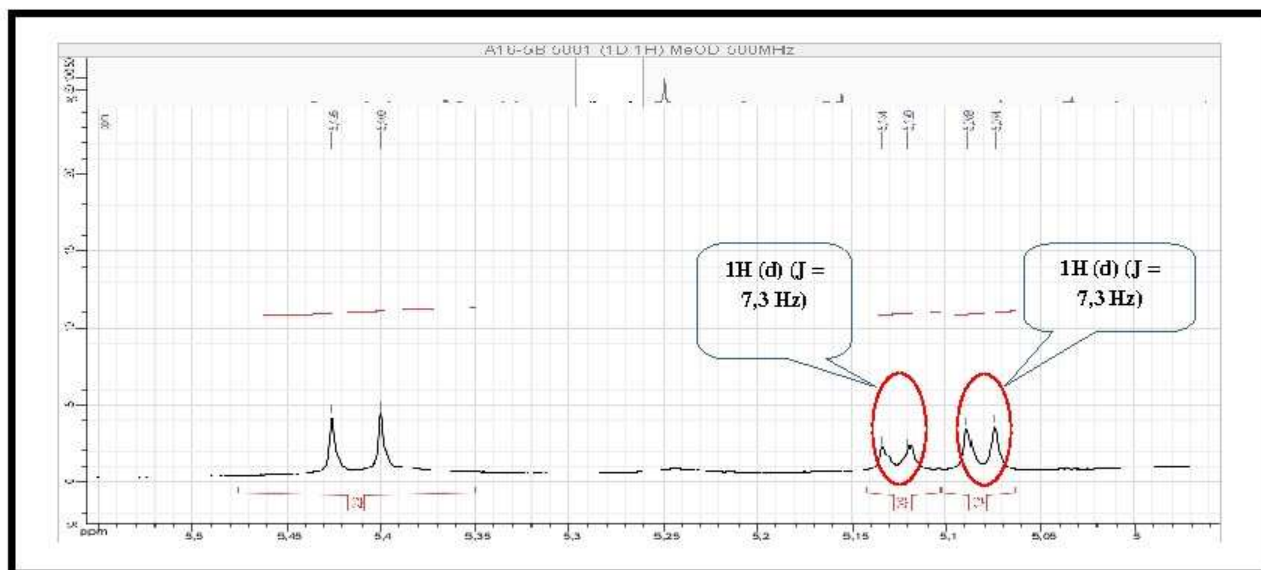
éthylénique en position cis par rapport à un autre. Le proton correspondant à celui-ci dans le composé isomère en l'occurrence A17-2 soit le composé **3** apparaît à $\delta_H = 6,10$ ppm ($J = 17,5$ Hz) et $\delta_C = 113,02$ ppm (Spectre 17).



Spectre 17 : Spectre HSQC (CD₃OD, 500 MHz) du composé 2

Ce spectre montre la totalité des signaux des deux molécules avec des intensités différentes. On remarque en effet, que le composé (Z) (cis-titliroside) est majoritaire par rapport au composé (E) (composé **3** ou trans-titliroside). Ceci est clair sur les intensités des signaux des deux composés sur le spectre proton où les intensités relatives permettent de déduire les proportions 58 et 42% en faveur du composé (Z).

Cette proportion est calculée à partir des intégrations des signaux des protons anomériques des deux molécules résonant sous forme de deux doublets à $\delta_H = 5,08$ ppm, ($J = 7,3$ Hz) pour le cis-titliroside et $\delta_H = 5,13$ ppm, ($J = 7,3$ Hz) (Spectre 10-3) pour le trans-titliroside.



Spectre 17-3 : Spectre RMN ^1H (étalement-3) (CD_3OD , 500 MHz) du composé 2

Les signaux des protons anomériques des deux molécules en mélange ont été choisis pour le calcul de notre pourcentage car dans leur zone de déplacement chimique, le spectre ne comporte d'autres signaux.

Ces données mènent à la structure reportée dans la figure 74.

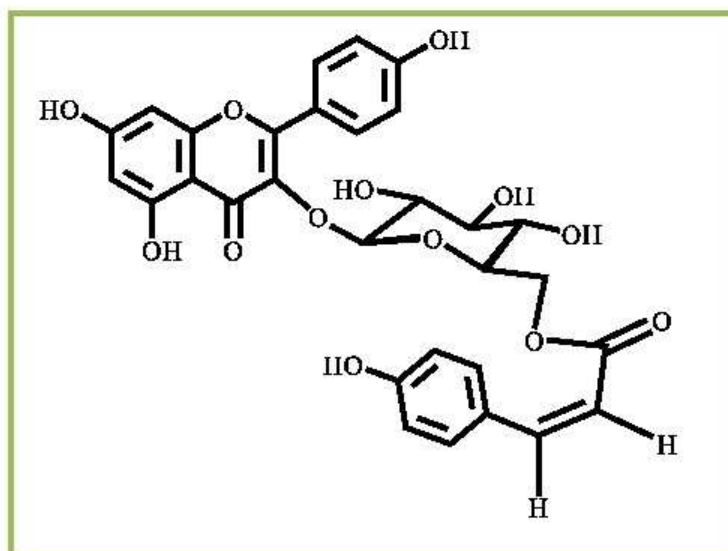
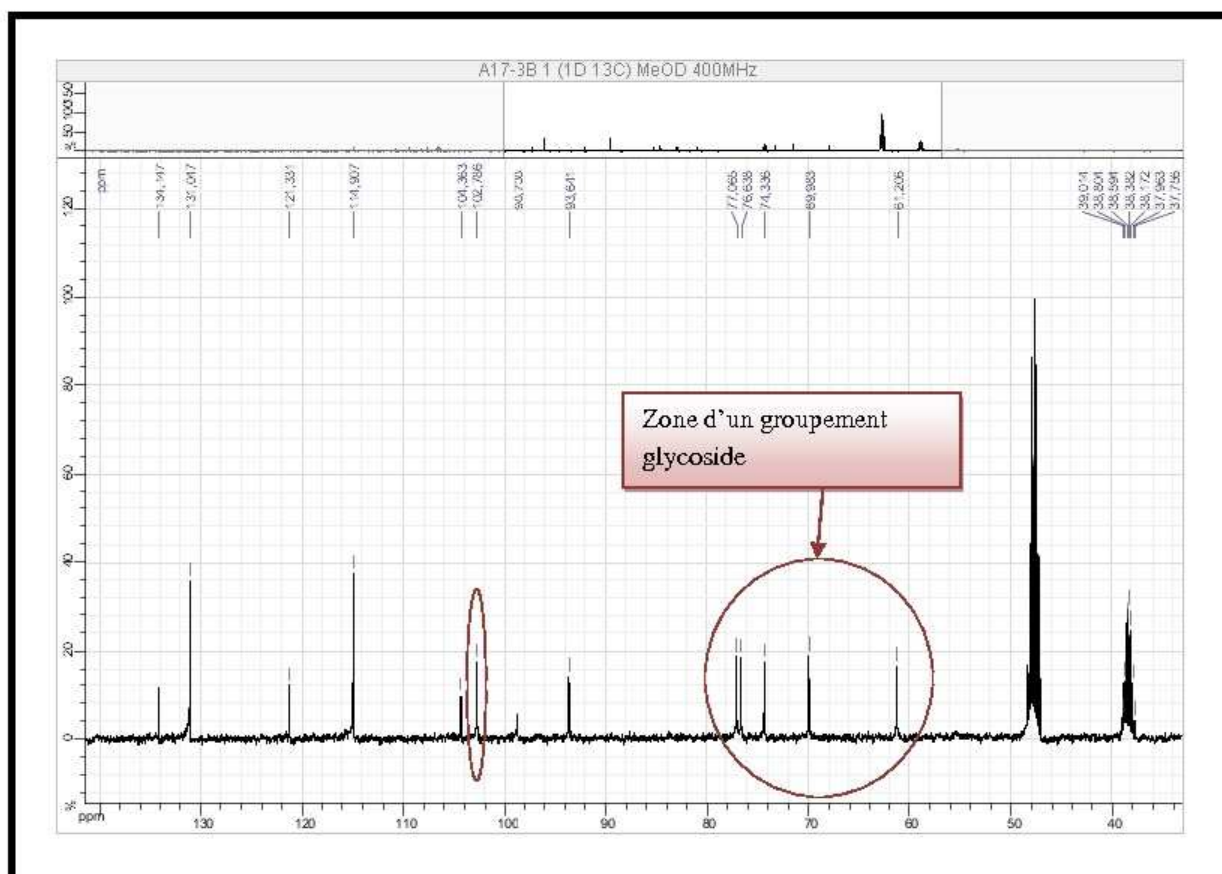


Figure 74. Structure finale du composé 2, cis-tiliroside [58, 60].

L'analyse de la totalité des spectres de cette molécule, notamment les spectres ^{13}C , nous a permis de reporter l'ensemble des données de spectroscopie de RMN dans le tableau 17.

Tableau 17. Attribution des signaux de RMN ^{13}C et RMN ^1H

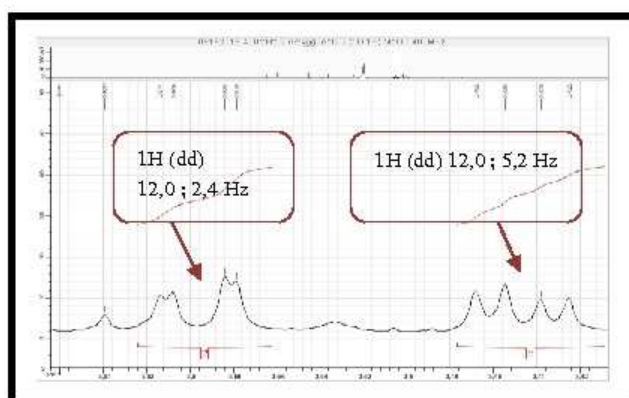
Sucre		
Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1''	5,08 (d ; 7,3 Hz)	101,94
2''	3,40 (m)	74,15
3''	3,43 (m)	76,61
4''	3,28 (m)	70,30
5''	3,45 (m)	74,27
6''	4,28 (dd ; 12,0 ; 2,8 Hz) 4,18 (dd ; 12,0 ; 5,2 Hz)	62,65
cis-p-Coumaroyle		
1'''	/	126,15
2'''	7,51 (d ; 8,8 Hz)	132,37
3'''	7,31 (d ; 8,0 Hz)	129,80
4'''	/	159,68
5'''	7,31 (d ; 8,0 Hz)	129,80
6'''	7,51 (d ; 8,8 Hz)	132,37
7'''	6,80 (d ; 12,3 Hz)	114,65
8'''	5,51 (d ; 12,3 Hz)	114,34
9'''	/	166,35
Flavonoïde		
2	/	157,24
3	/	133,78
4	/	177,98
5	/	161,54
6	6,18 (d ; 2,0 Hz)	97,40
7	/	163,61
8	6,31 (d ; 2,0 Hz)	94,91
9	/	157,18
10	/	102,71
1'	/	121,34
2'	7,99 (d ; 8,9 Hz)	130,87
3'	6,80 (d ; 8,9 Hz)	115,42
4'	/	160,38
5'	6,80 (d ; 8,9 Hz)	115,42
6'	7,99 (d ; 8,9 Hz)	130,87



Spectre 20 : Spectre RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 4

Cet hexose comporte :

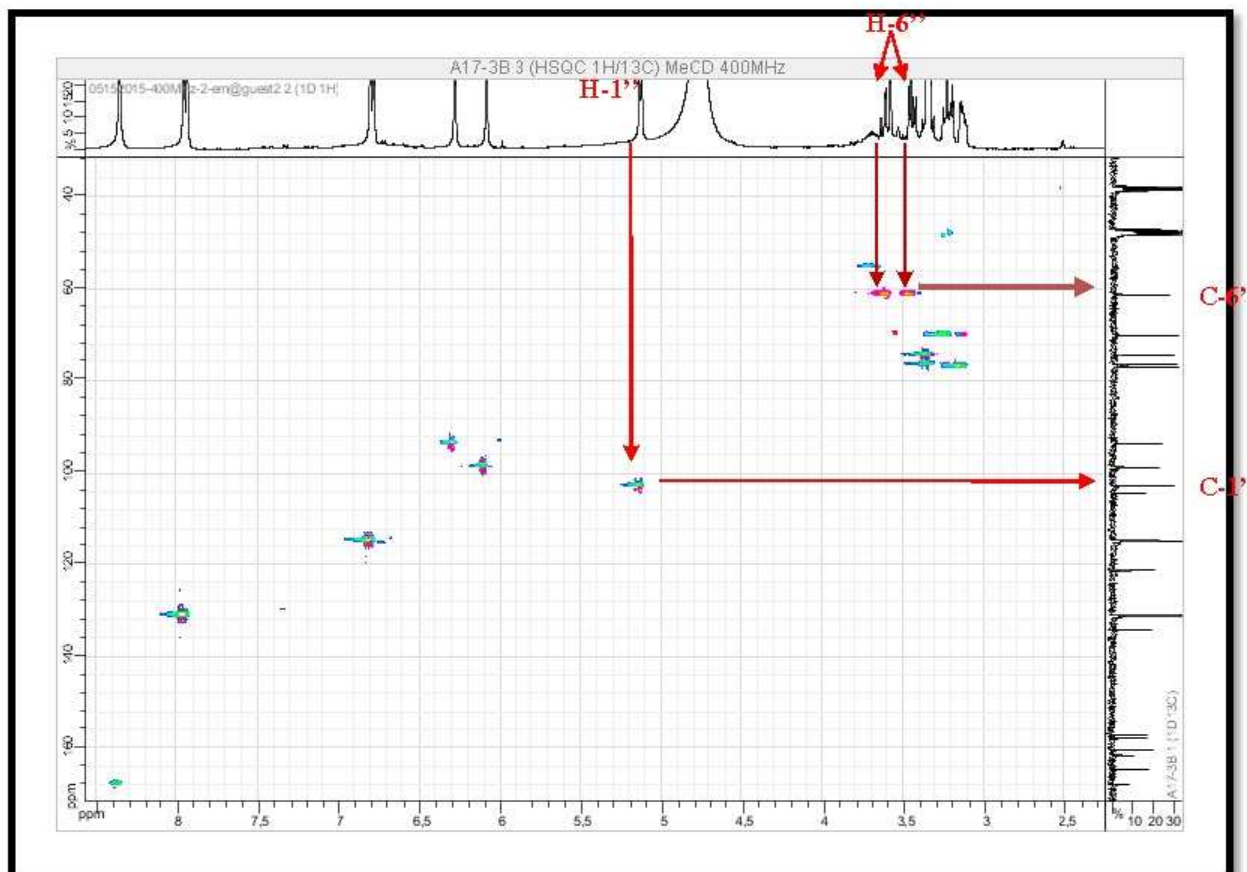
- ✓ un CH_2 à $\delta_{\text{H}} = 3,61$ ppm (1H; dd ; $J = 12,0 ; 2,4$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 3,46$ ppm (1H; dd ; $J = 12,0 ; 5,2$ Hz), $\delta_{\text{C}} = 61,21$ ppm, attribuable au CH_2 de la position C-6'' de l'hexose.



Spectre 19-1: Spectre RMN ^1H (étalement 1) (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 4

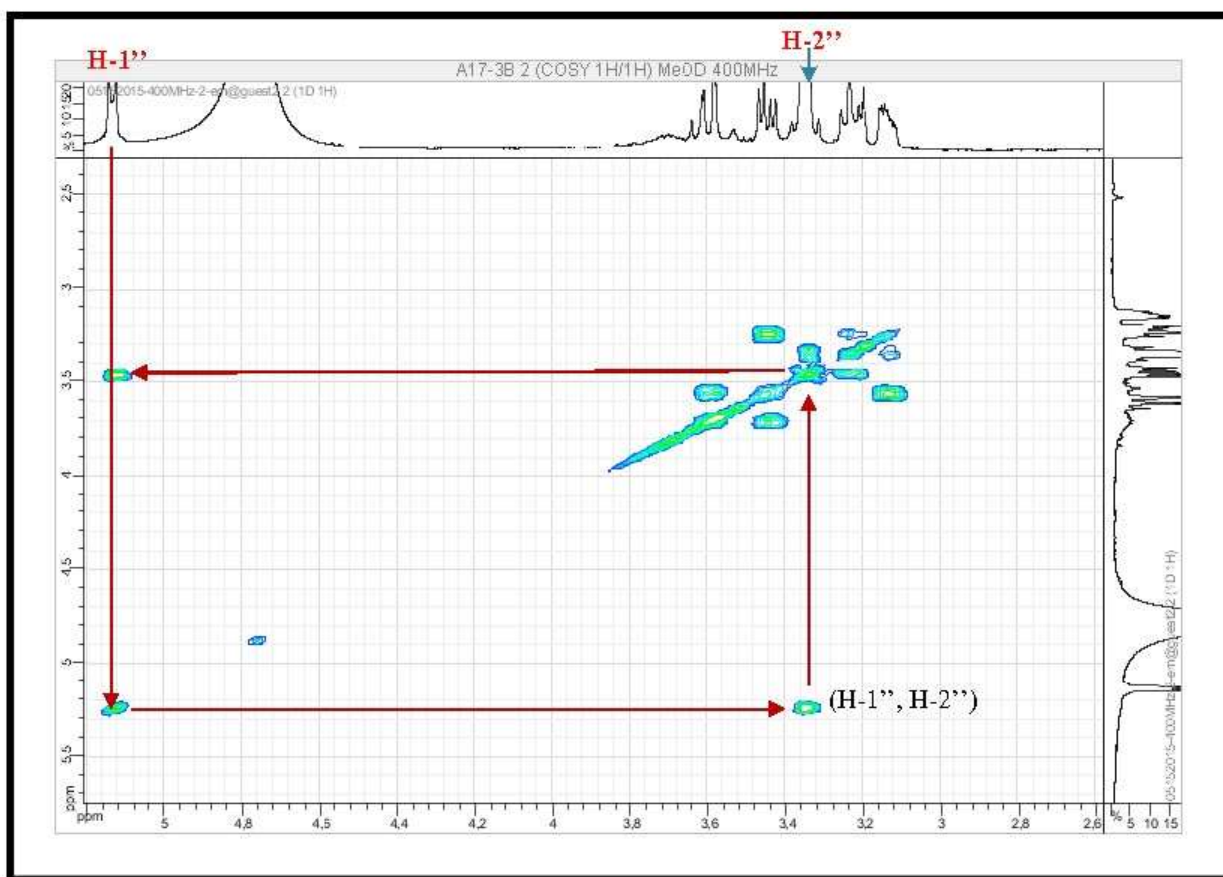
- ✓ Un groupement CH à $\delta_{\text{H}} = 5,13$ ppm, $J = 7,3$ Hz, $\delta_{\text{C}} = 102,79$ ppm attribuable à la position anomérique C-1''.

La valeur de la constante de couplage du proton anomérique et la valeur du déplacement chimique de son carbone indiquent une jonction -O-β- glycosidique. La valeur 7,3 Hz de la constante de couplage, indique également une orientation axiale du proton H-2'' du groupement glycosyle.



Spectre 21: Spectre HSQC (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 4

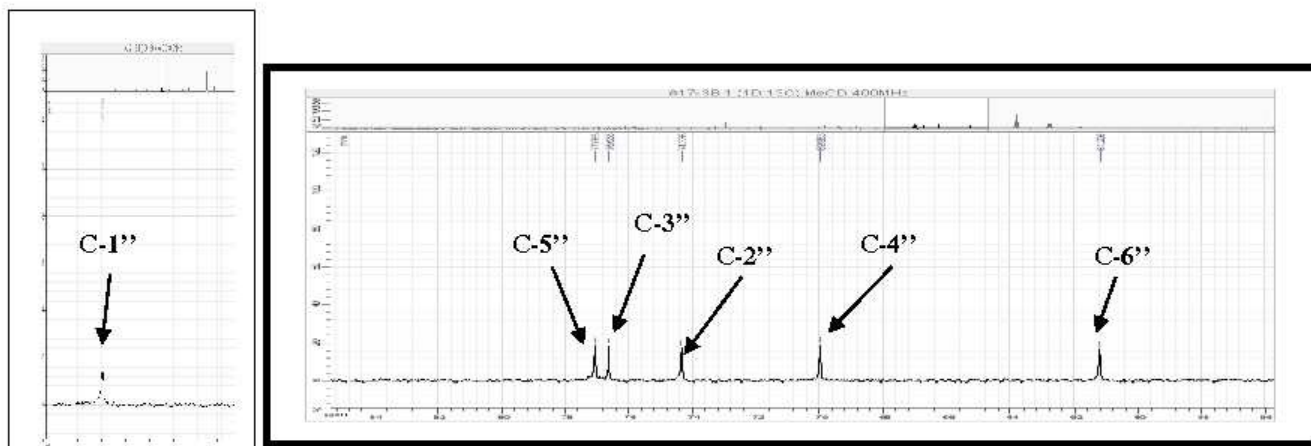
Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre 22), le proton anomérique H-1'' montre une tache de corrélation avec le signal d'un proton très proche de ceux de deux autres. A $\delta_H = 3,35$ ppm ce proton est attribuable à H-2'' ($\delta_C = 74,34$ ppm). Toujours sur le spectre relatif à l'expérience COSY, ce proton corrèle avec le proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,34$ ppm attribuable à H-3'' ($\delta_C = 76,64$ ppm). Ensuite ce dernier corrèle avec un proton sous forme d'un triplet ($J = 8,0$ Hz) à $\delta_H = 3,24$ ppm attribuable à H-4'' ($\delta_C = 69,98$ ppm). La multiplicité de ce signal « triplet » et la valeur de la constante de couplage « 8,0 Hz » supposent des interactions axiale-axiale entre H-3''/H-4'' ; H-4''/ H-5'' et indiquent une orientation axiale de H-5'', ce qui oriente vers un glucosyle. Toujours sur le spectre relatif à l'expérience COSY, le proton H-6'' corrèle avec un multiplet à $\delta_H = 3,12$ ppm attribuable à H-5'' ($\delta_C = 77,06$ ppm).



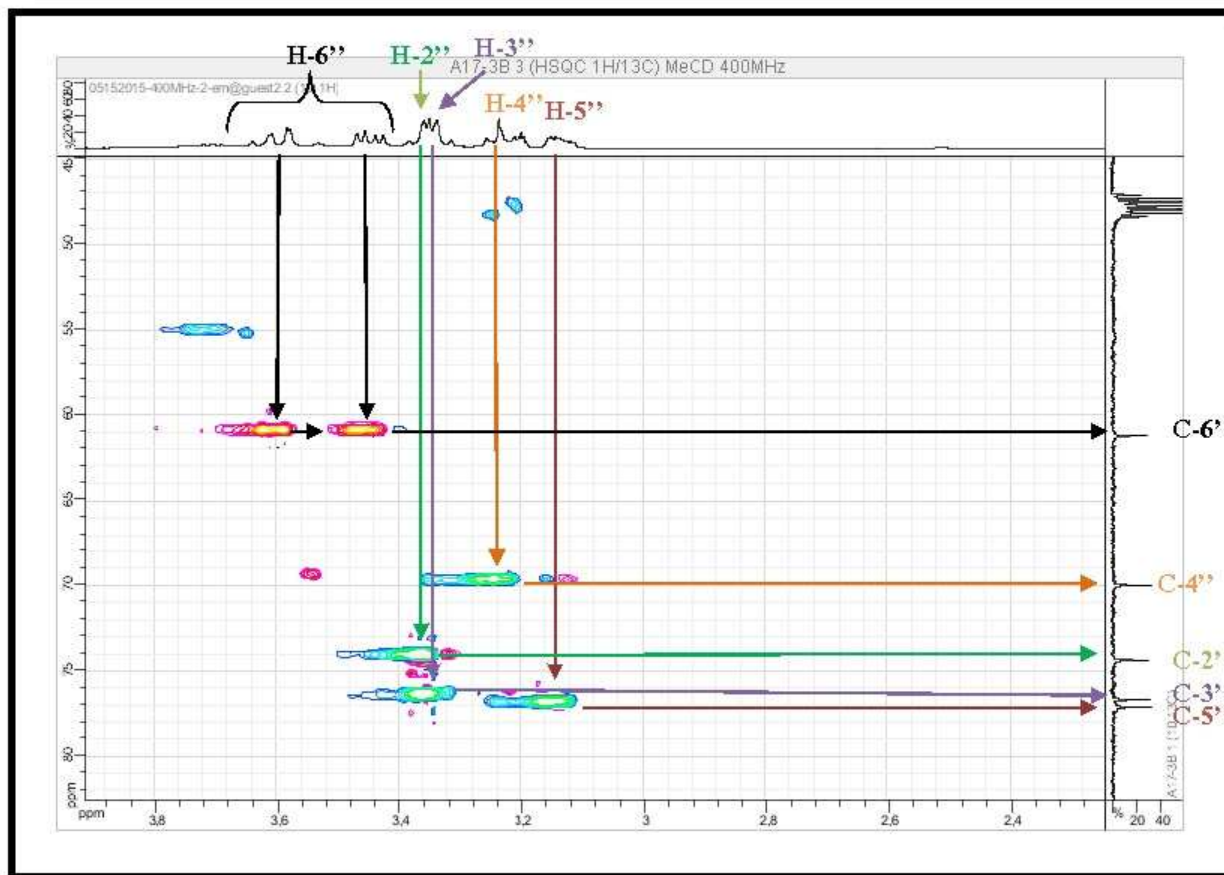
Spectre 22: Spectre COSY (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 4

D'après l'analyse de spectre HSQC (Spectre 21-1), les atomes de carbone de ce groupement glucopyranosyle sont attribués comme suit :

- ✓ C-1'', carbone anomérique à $\delta_C = 102,79$ ppm, $\delta_H = 5,13$ ppm.
- ✓ C-2'', $\delta_C = 74,34$ ppm, $\delta_H = 3,35$ ppm.
- ✓ C-3'', $\delta_C = 76,64$ ppm, $\delta_H = 3,34$ ppm.
- ✓ C-4'', $\delta_C = 69,98$ ppm, $\delta_H = 3,24$ ppm.
- ✓ C-5'', $\delta_C = 77,06$ ppm, $\delta_H = 3,12$ ppm.



Spectre 20-1: Spectre RMN ¹³C (étalement 1) (100 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 4



Spectre 21-1: Spectre HSQC (étalement 1) (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 4

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre 23-1), la corrélation entre H-5' et H-3' et le carbone à $\delta_C = 121,33$ ppm permet son attribution au carbone C-1' ; la corrélation entre H-5' et H-3' et le carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 160,27$ ppm permet l'attribution de ce carbone à C-4' ; ce même carbone corrèle avec H6' et H-2' ; les corrélations entre H-6' et H-2' et le carbone quaternaire à $\delta_C = 157,73$ ppm permettent son attribution à C-2. Cette analyse permet enfin de localiser le C-3 à $\delta_C = 134,15$ ppm.

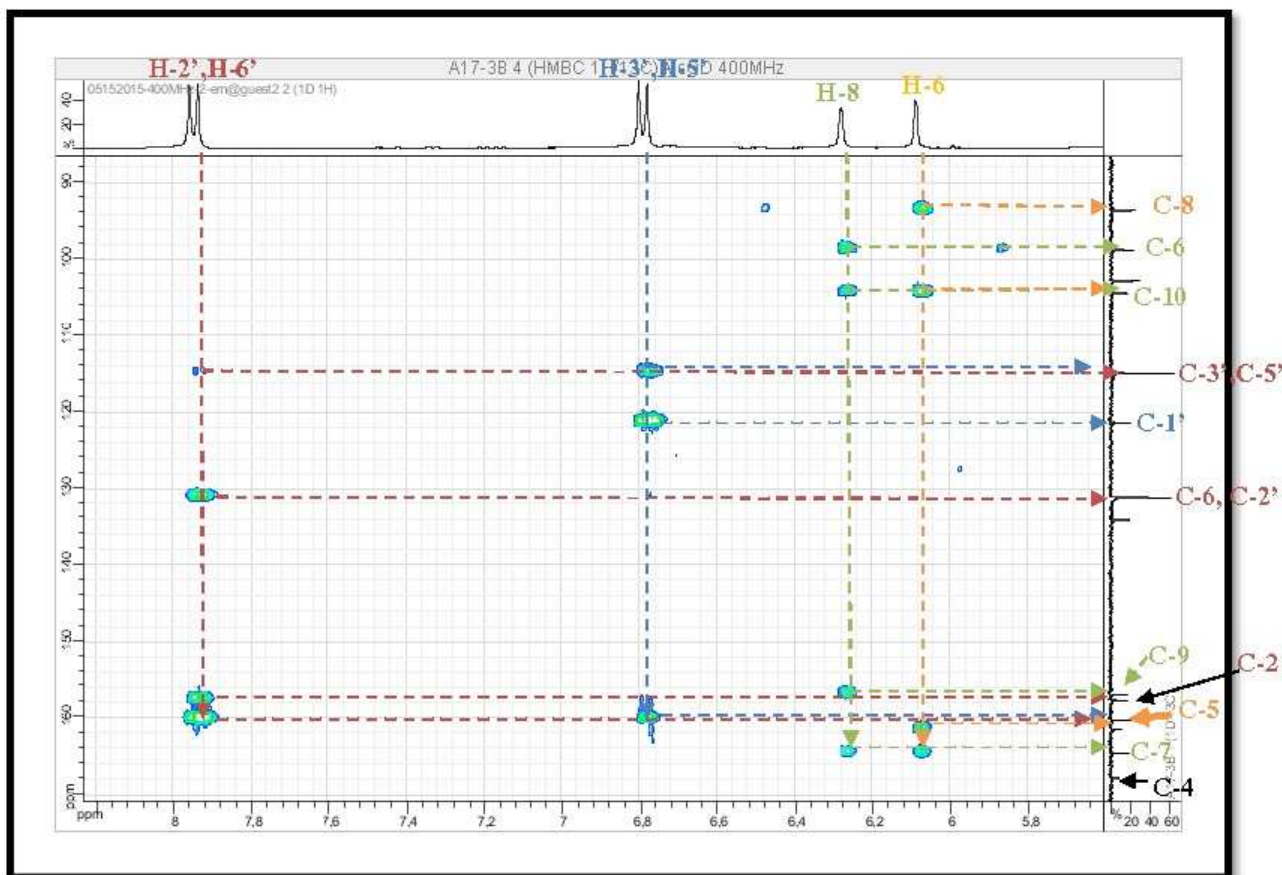
Par ailleurs, le proton H-1'' montre une tache de corrélation dans le spectre relatif à l'expérience HMBC avec le carbonyle à $\delta_C = 134,15$ ppm attribuable à C-3.

Toujours sur le spectre relatif à l'expérience HMBC on observe une tache de corrélation entre H-8 et le carbone à 164,65 ppm attribuable à C-7 vue la valeur de son déplacement chimique, la plus élevée des carbones oxygénés quaternaires autre que le C-4 de la molécule qui est localisé à $\delta_C = 178,06$ ppm. Par ailleurs et toujours sur le même spectre (HMBC), ce proton ne montre aucune corrélation avec le carbone à $\delta_C = 161,52$ ppm attribuable à C-5. Ce même proton nous a permis la localisation de C-9 à $\delta_C = 157,04$ ppm vue la tache de corrélation observée entre ce carbone et le proton H-8, ce proton permet également la localisation de C-10 à $\delta_C = 104,36$ ppm.

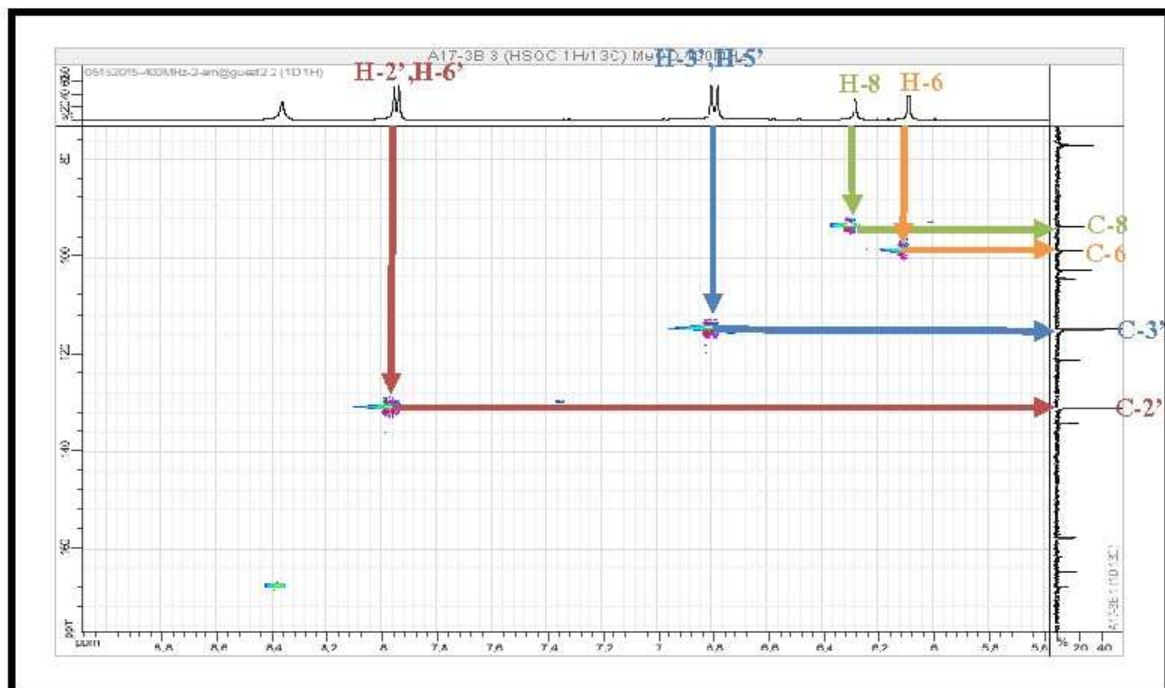
Les valeurs attribuées à C-5, C-7 et C-10 sont confirmées par la corrélation de ces carbones avec le proton H-6 dans le spectre relatif à l'expérience HMBC.

Le carbone à 167,87 ppm montre une tache de corrélation avec le proton à 8,36 ppm dans le spectre relatif à l'expérience HSQC, mais ce proton ne montre aucune tache de corrélation avec les carbones de notre molécule dans le spectre relatif à l'expérience HMBC donc ce carbone et ce proton n'appartiennent pas à notre molécule.

Les autres carbones C-2', C-3', C-5', C-6', C-6 et C-8 sont attribués sur la base de l'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectre 21-2) qui montre en effet, une corrélation entre H-2' et H-6' et le carbone à $\delta_C = 131,05$ ppm attribuable à C-2' et C-6' ; une corrélation entre H-3' et H-5' le carbone à $\delta_C = 114,91$ ppm attribuable à C-3' et C-5' ; une corrélation entre H-6 avec le carbone à $\delta_C = 98,74$ ppm attribuable à C-6 ; une corrélation entre H-8 et le carbone à $\delta_C = 93,64$ ppm attribuable à C-8.

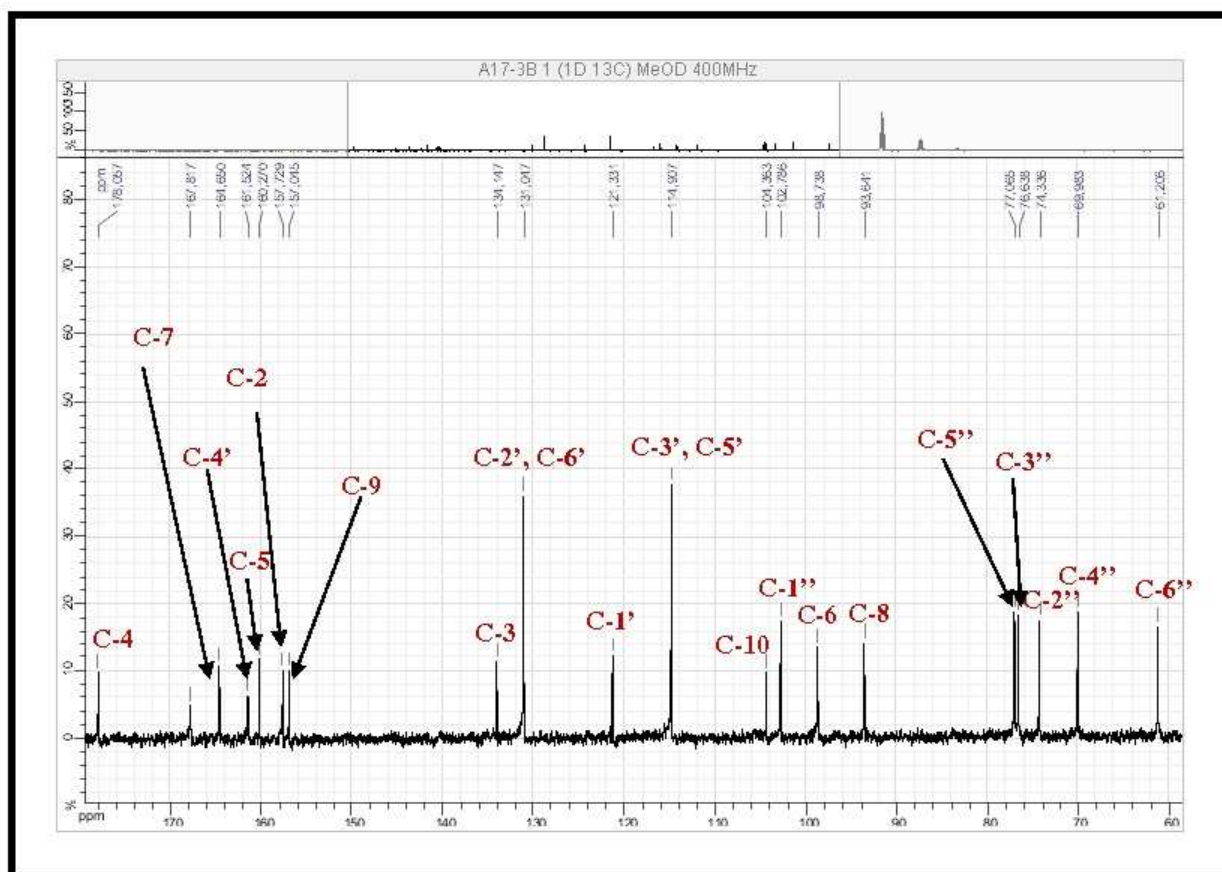


Spectre 23-1: Spectre HMBC (étalement 1) (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 4

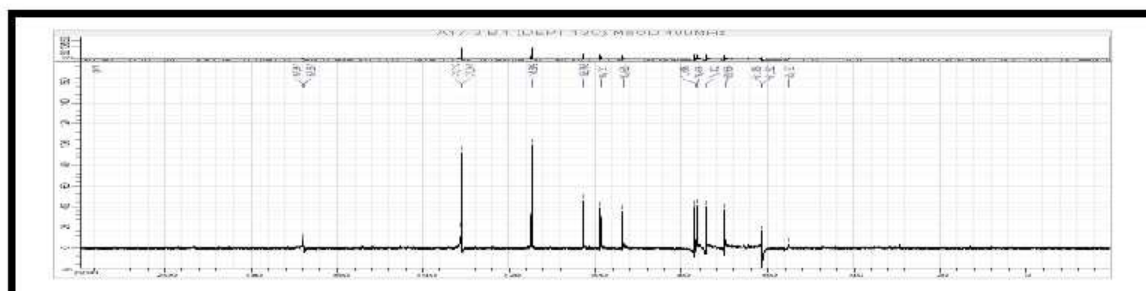


Spectre 21-2: Spectre HSQC (étalement 2) (400 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 4

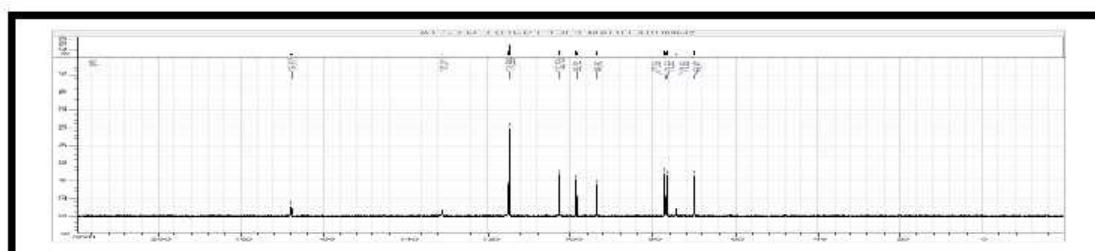
Toutes ces données sont reportées sur le spectre de ^{13}C .



Spectre 20-2: spectre RMN ^{13}C (étalement 2) (100 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 4



Spectre 24: Spectre du RMN ^{13}C DEPT 135 du composé 4



Spectre 25: Spectre du RMN ^{13}C DEPT 90 du composé 4

Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau 19.

Tableau 19. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **4**.

Sucre		
Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1''	5,13 (d; 7,3 Hz)	102,79
2''	3,35 (m)	74,34
3''	3,34 (m)	76,64
4''	3,24 (t; 8,0 Hz)	69,98
5''	3,12(m)	77,06
6''	3,61(dd; 12,0 ; 2,4 Hz) 3,46 (dd; 12,0 ; 5,2 Hz)	61,21
Flavonoïde		
2	/	157,73
3	/	134,15
4	/	178,06
5	/	161,52
6	6,09 (d; 2,0 Hz)	98,74
7	/	164,65
8	6,28 (d; 2,0 Hz)	93,64
9	/	157,04
10	/	104,36
1'	/	121,33
2'	7,94 (d; 8,8 Hz)	131,05
3'	6,79 (d; 8,8 Hz)	114,91
4'	/	160,27
5'	6,79 (d; 8,8 Hz)	114,91
6'	7,94 (d; 8,8 Hz)	131,05

L'ensemble de ces données mènent à la structure reportée sur la figure 75. Il s'agit de l'astragaline [61].

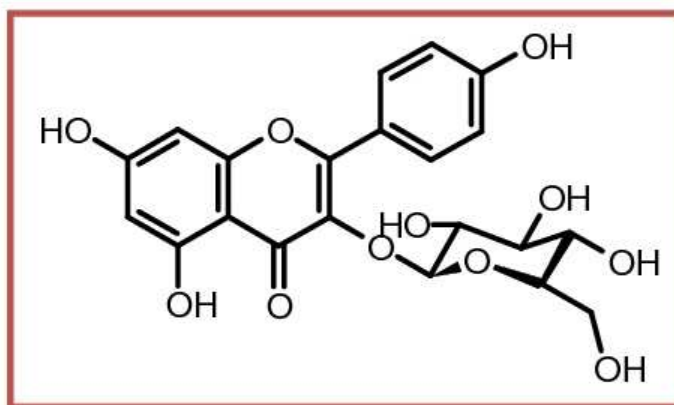
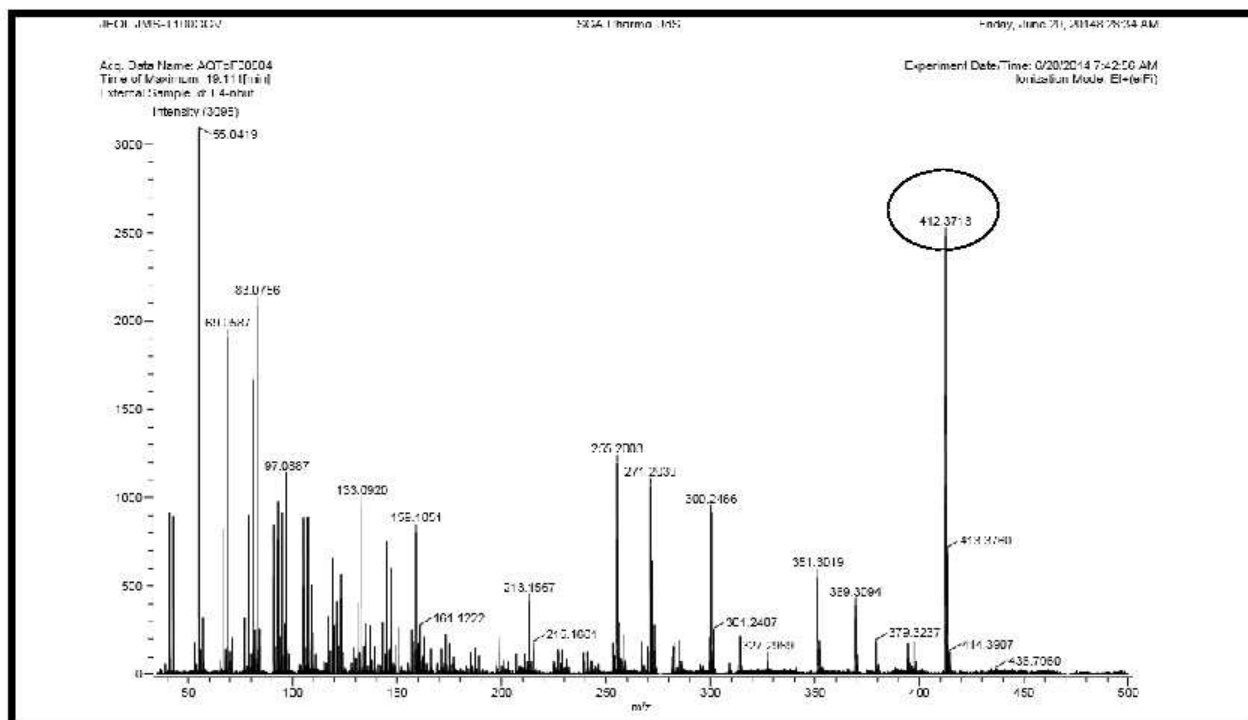


Figure 75. Structure du composé 4, astragaline.

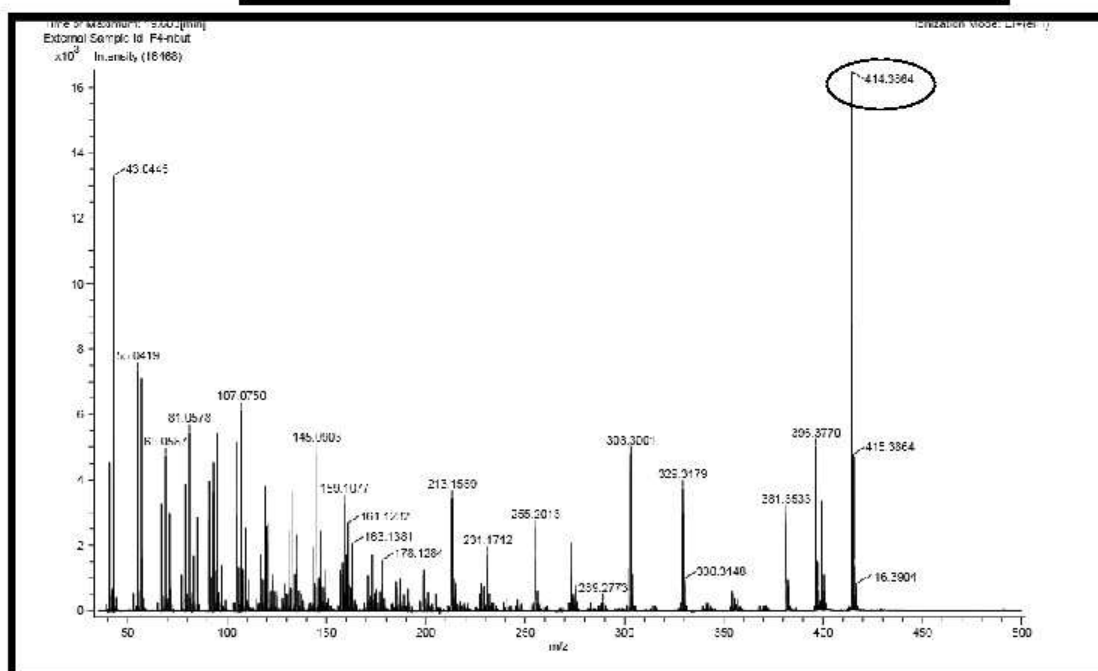
IV.3. Elucidation structurale des produits isolés de la phase n-butanol de *Helianthemum ruficomum*

IV.3.1. Elucidation structurale du composé 5 (F4-1) et composé 6 (F4-2)

En se basant sur les spectres de masse, RMN ^1H , RMN ^{13}C indiquent la présence de deux produits. En effet, injecté en LC-HRMS, ce produit montre qu'il renferme en fait deux produits en mélange donnant les spectres 26 et 27. Nous avons numéroté ces deux composés **5** et **6** respectivement. Le spectre, EI-HRMS (+) du composé **5** (Spectre 26) montre un ion moléculaire à $m/z = 412,3713$ indiquant une formule brute $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$ quant au spectre EI-HRMS (+) du composé **6** (Spectre 27), il montre un ion moléculaire à $m/z = 414,3864$ correspondant à la formule brute et $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$. Ces formules brutes sont en faveur de structures apparentées aux stéroïdes.



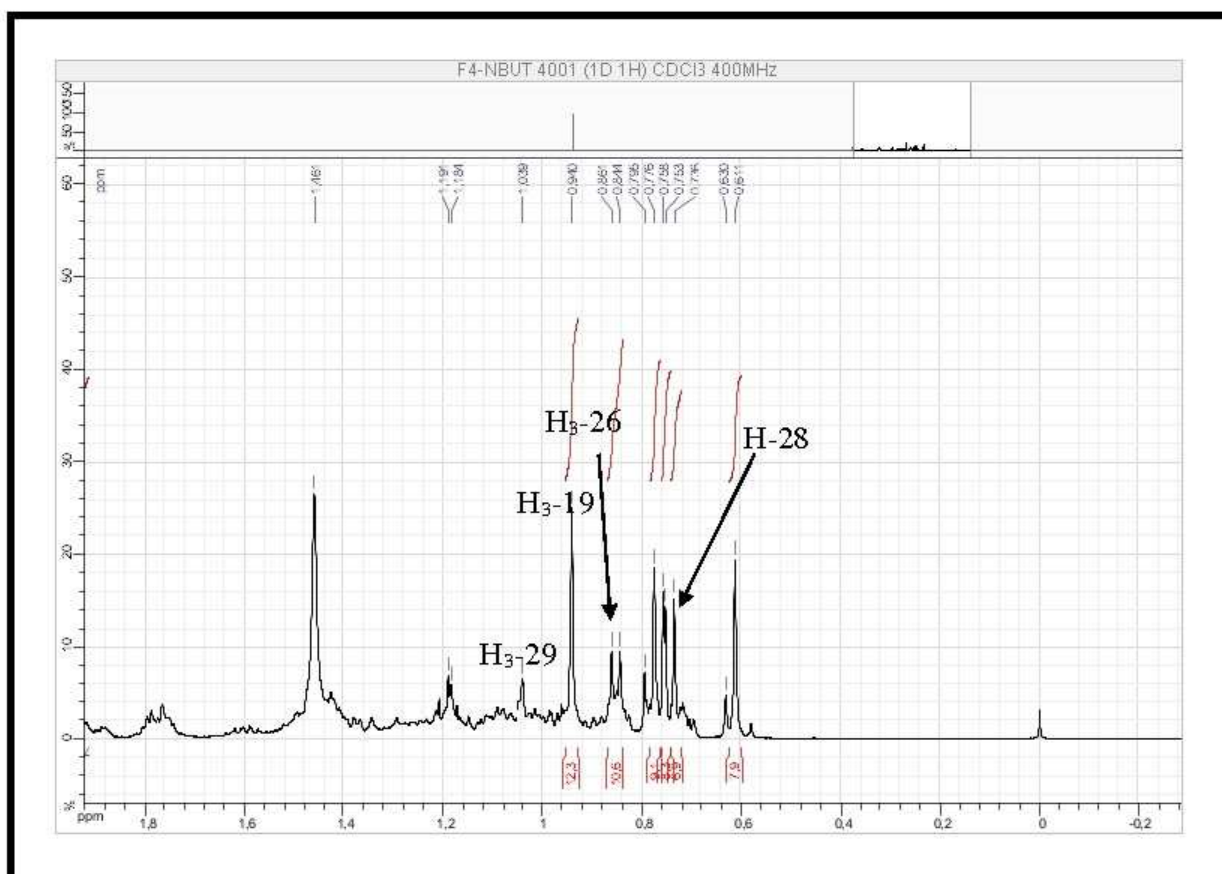
Spectre 26: Spectre HRMS (EI +) du composé 5



Spectre 27: Spectre HRMS (EI +) du composé 6

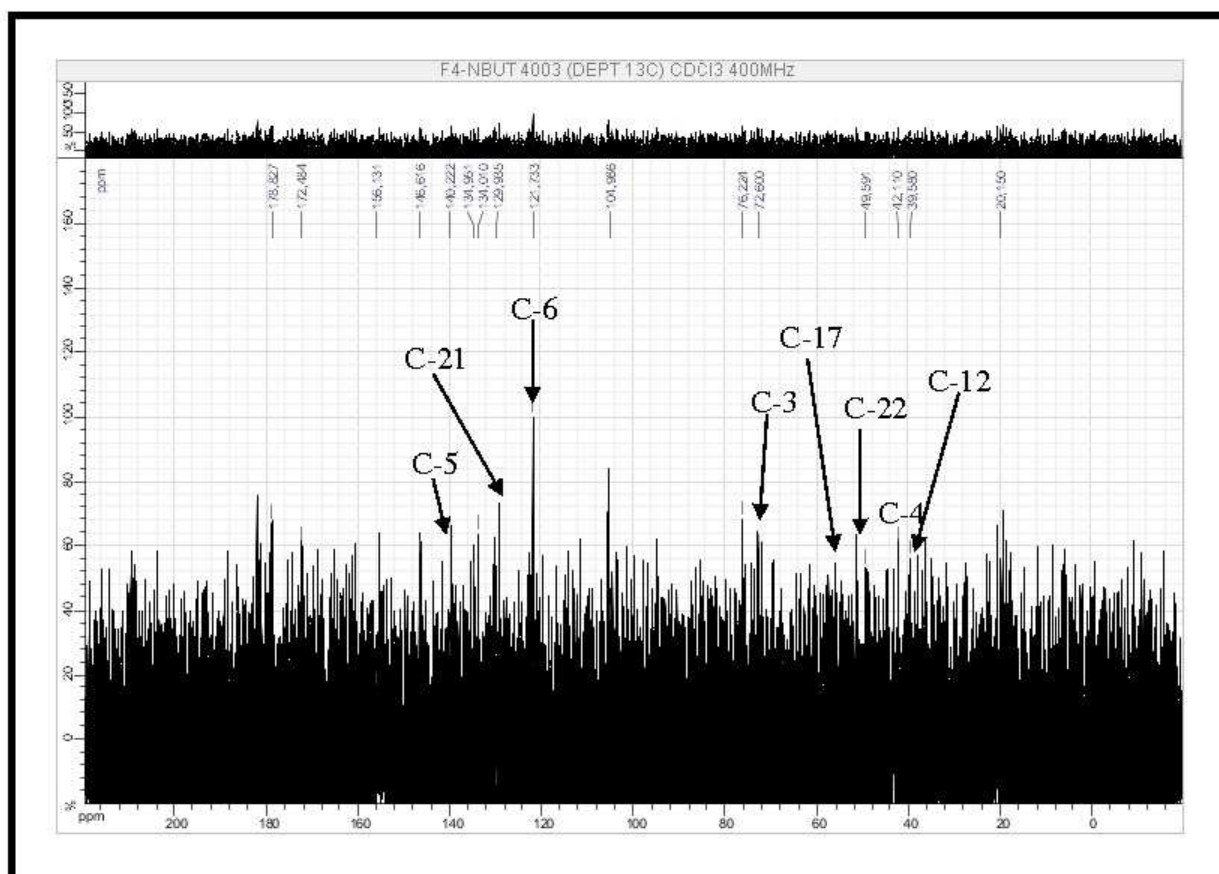
L'étude du spectre RMN¹H dans le CDCl₃ montre (spectre 28) la présence de:

- Un doublet large d'intégration 1H à $\delta_H = 5,28$ ppm ($J = 5,2$ Hz) attribuable à H-6.
- Un doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_H = 5,08$ ppm ($J = 15,2$ Hz ; 8,4 Hz) attribuable à H-21.
- Un doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_H = 4,94$ ppm ($J = 14,8$; 8,4 Hz) attribuable à H-20.



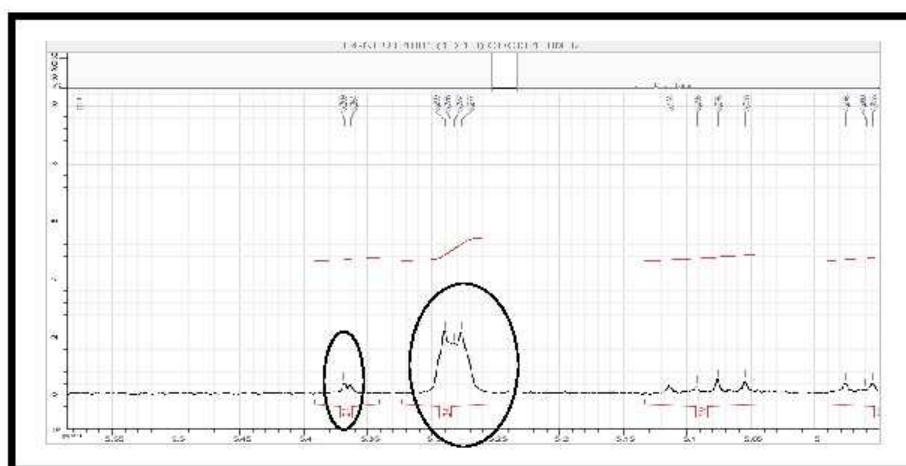
Spectre 28-2: Spectre RMN ¹H (étalement 2) (400MHz, CDCl₃, δ ppm)du composé 5

Le spectre RMN¹³C (Spectre 29) confirme une fois de plus, la présence de deux doubles liaisons à δ_C = 141,02 ppm, δ_C = 121,73 ppm relatives au C-5 et C-6 et à δ_C = 129,93 ppm et δ_C = 137,95 ppm relatif au C-21 et C-20. Un autre déplacement chimique à δ_C = 72,60 ppm du à la présence d'un hydroxyle lié à C-3.



Spectre 29 : Spectre RMN ¹³C (100MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé 5

Une comparaison entre les intégrales des déplacements chimiques dans le spectre proton (Spectre 28-3) nous permet de déduire la présence de deux types de stérols qui sont le Stigmastérol et β-Sitostérol 89% et 11% respectivement.



Spectre 28-3: Spectre RMN ¹H (étalement 3) (400MHz, CDCl₃, δ ppm) du composé 5 et 6

Toutes ces données sont rassemblées dans les tableaux 20 et 21.

Tableau 20. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **5**.

Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	/	37,28
2	/	31,94
3	3,45 (m)	72,60
4	/	41,34
5	/	141,02
6	5,28 (d; 5,2 Hz)	121,73
7	/	31,92
8	/	31,92
10	/	36,60
13	/	42,38
14	/	55,11
17	/	54,79
18	/	40,18
19	0,94 (d; 6,2 Hz)	21,73
20	4,94 (dd; 14,8 ; 8,4 Hz)	137,95
21	5,08 (dd; 15,2 ; 8,4 Hz)	129,93
22	/	46,66
24	0,88 (t; 7,1 Hz)	12,14
26	0,86 (d; 6,8 Hz)	20,23
27	0,82 (d; 6,6 Hz)	19,62
28	0,73 (s)	18,93
29	1,03 (s)	12,25

Tableau 21. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **6**.

Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	/	37,28
2	/	31,92
3	3,54 (m)	71,84
4	/	42,34
5	/	140,57
6	5,36 (d; 6,4 Hz)	120,88
7	/	31,92
8	/	31,92

Tableau 21. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **6** (suite)

10	/	36,53
13	/	42,34
18	/	36,16
19	0,94 (d; 6,2 Hz)	29,62
26	0,84 (d; 6,4 Hz)	20,23
29	1,03 (s)	12,25

L'ensemble de ces données mènent aux structures reportées sur les figures 76 et 77. Il s'agit de Stigmastérol et β -sitostérol [62]. Stigmastérol est isolée pour la première fois de ce genre.

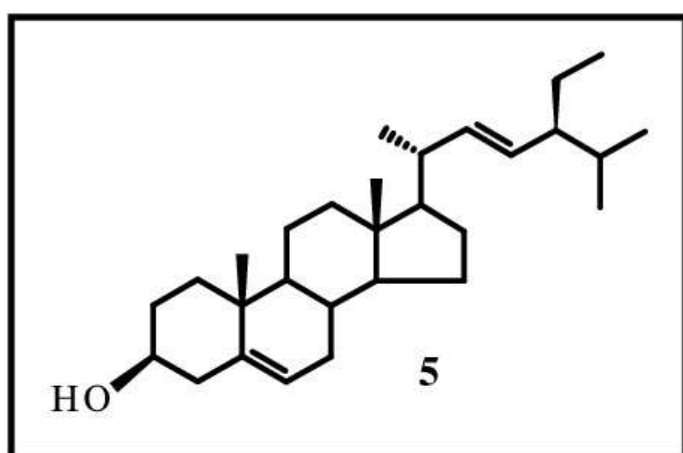


Figure 76. Structure de stigmastérol.

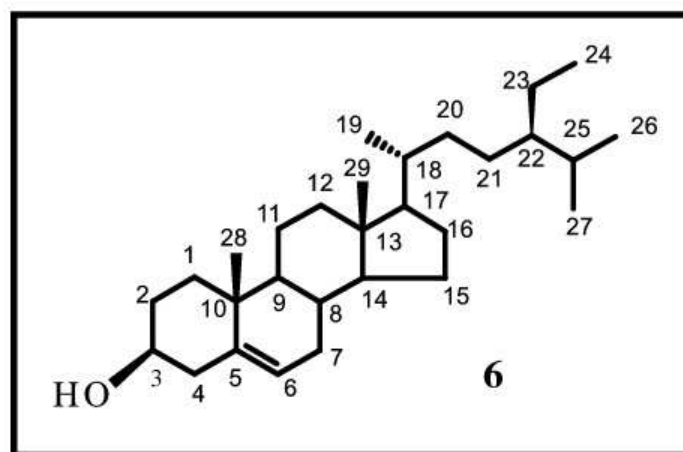


Figure 77. Structure de β -sitostérol.

IV.3.2. Elucidation structurale du composé **7** (B9-1)

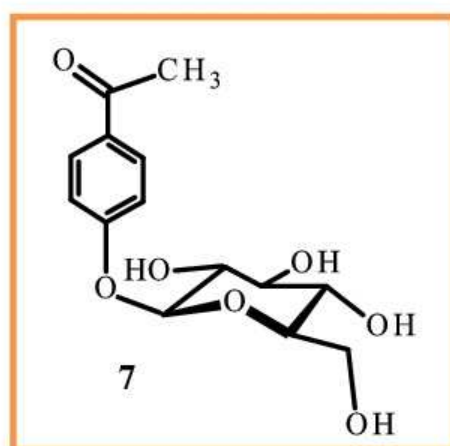
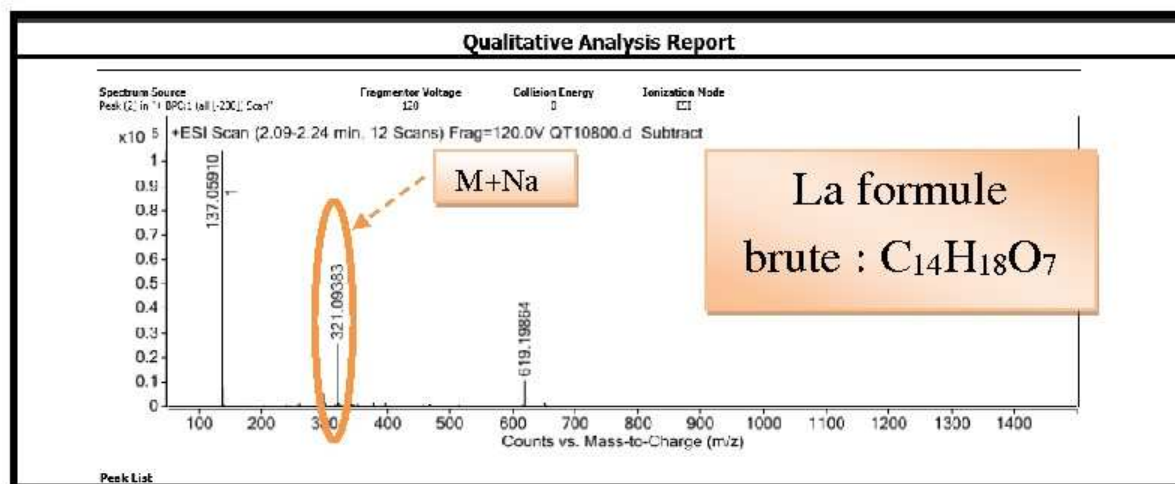


Figure 78. Structure de composé **7**, B9-1

L'examen du spectre de masse à haute résolution en mode electrospray positif (Spectre 30) du composé **7** montre deux pics relatifs à deux ions adduits à $m/z = 321,09383$ et $m/z =$

619,19864 correspondant à $[M+Na]^+$ et $[2M+Na]^+$, respectivement. Ce résultat est appuyé sur le calcul de la masse exacte (Tableau 22) qui donne une valeur à $m/z = 298,10461$ (calculé pour $C_{14}H_{18}O_7$: 298,10525). Ce spectre HR-ESI-MS montre également un ion à $m/z = 137,05910$ correspondant à $[M+H-162]^+$ indiquant la présence d'un groupement hexose lié au reste de la molécule par une liaison O-glycosidique. Ce résultat est également confirmé par le calcul de la masse exacte de l'aglycone qui montre une valeur à $m/z = 136,05183$ (calculé pour $C_8H_8O_2$: 136,05243) orientant vers la formule brute : $C_8H_8O_2$



Spectre 30: Spectre HR-ESI-MS (+) du composé 7

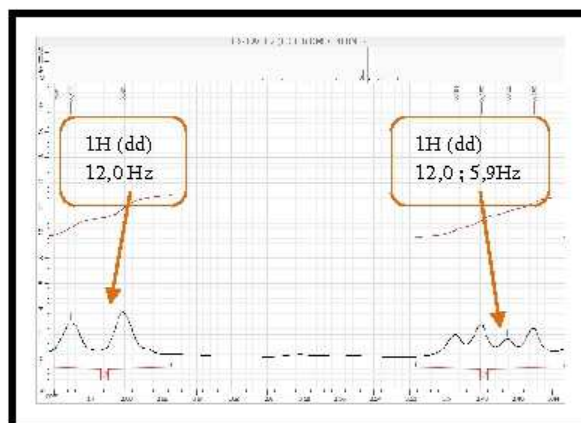
Tableau 22. Analyse de la composition élémentaire des différents ions.

Formula Calculator Results							
Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Mz	Ion Species	Score
C14 H18 O7		298.10461	298.10525	2.17	321.09383	C14 H:8 Na O7	97.95
C11 H10 N10 O		298.10461	298.10391	-2.37	321.09383	C11 H:0 N10 Na O	94.62
C8 H8 O2		136.05183	136.05243	4.44	137.05910	C8 H9 O2	85.03

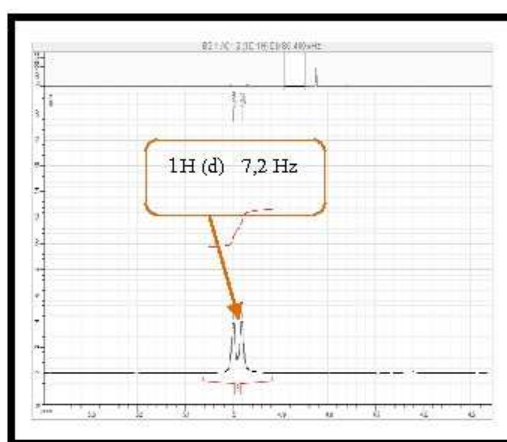
L'examen du spectre RMN 1H (Spectre 31-1) de ce composé, montre des signaux caractéristiques d'un noyau aromatique par a-substitué, notamment :

- Un doublet d'intégration 2H, à $\delta_H = 7,91$ ppm ($J = 8,6$ Hz) attribuable à H-2, H-6.
- Un doublet d'intégration 2H, à $\delta_H = 7,11$ ppm ($J = 8,6$ Hz) attribuable à H-3 et H-5.

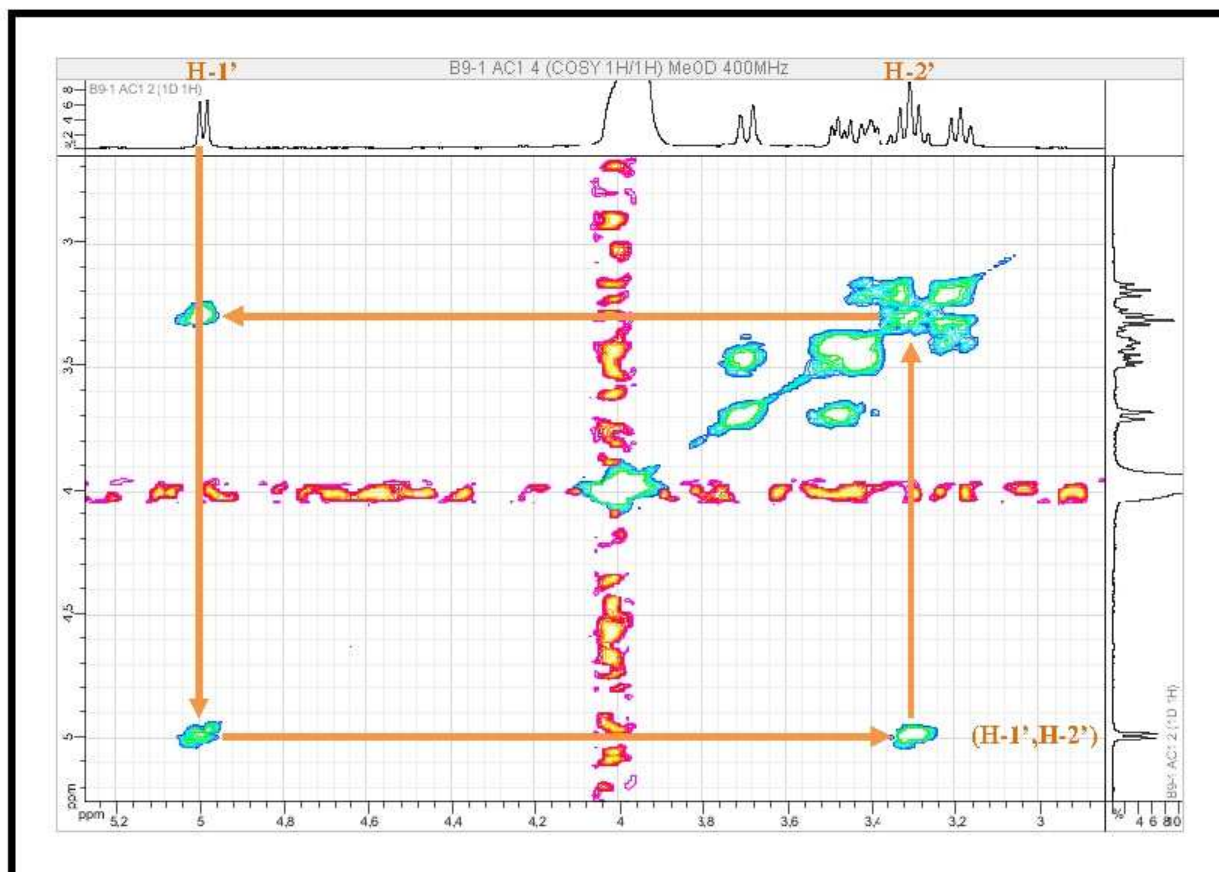
Ce spectre montre également un singulet d'intégration 3H à $\delta_H = 2,51$ ppm attribuable à un groupement méthyle voisin d'un carbonyle.



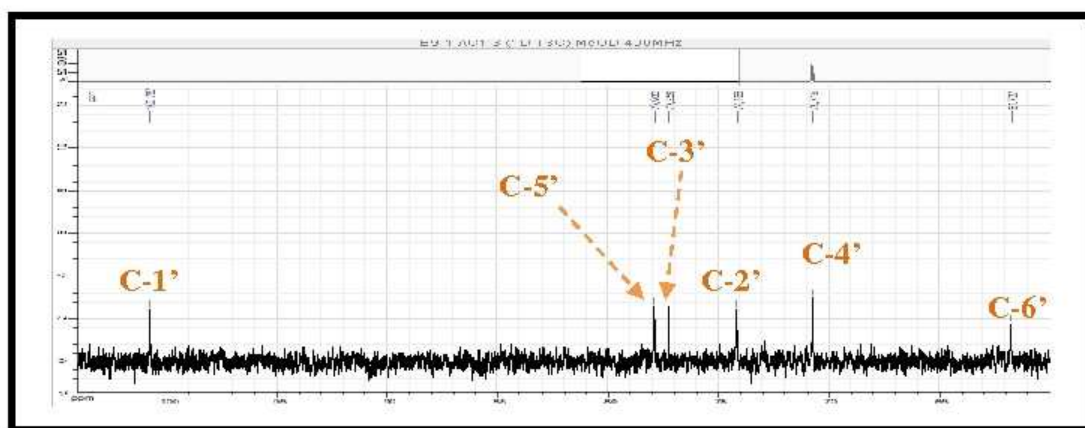
Spectre 31-2: Spectre RMN ^1H (étalement 2) (400MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé 7



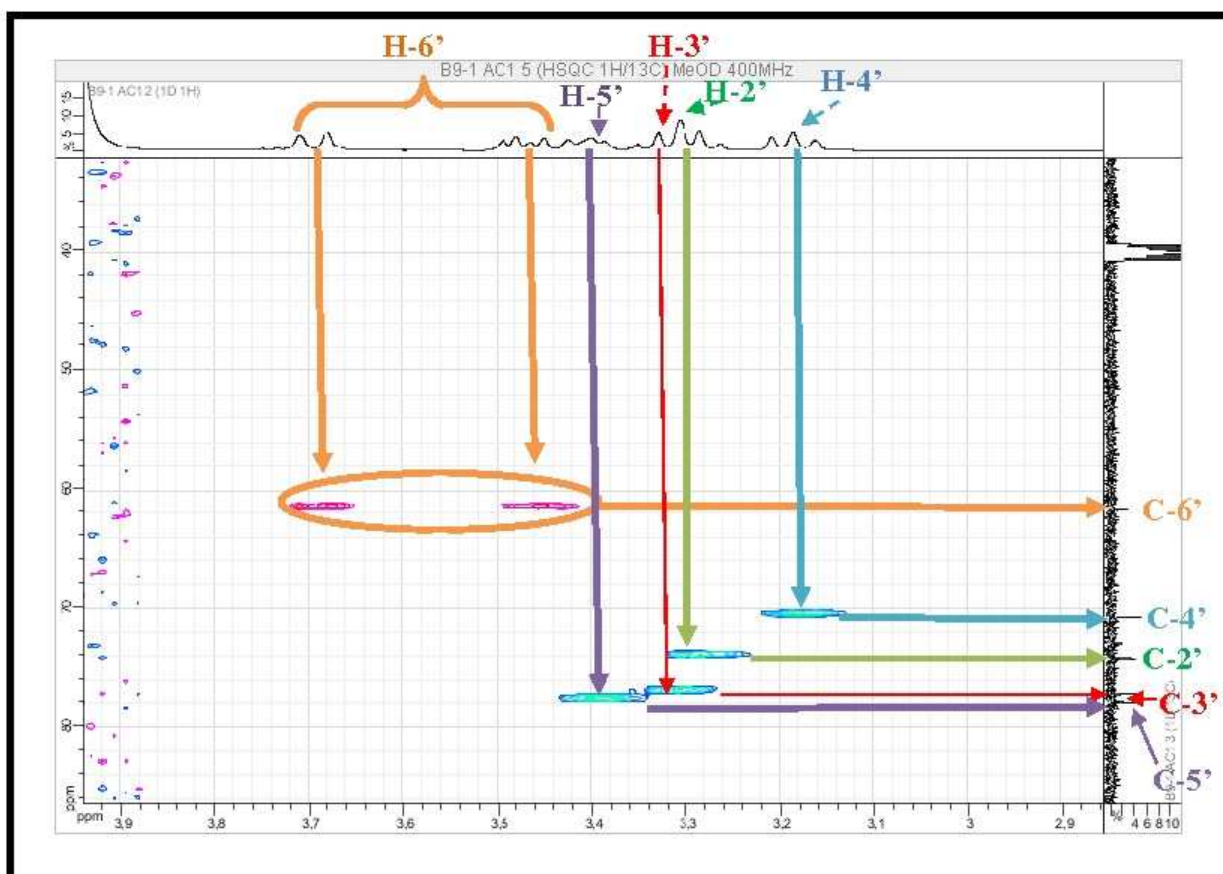
Spectre 31-3: Spectre RMN ^1H (étalement 3) (400MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé 7



Spectre 33-1: Spectre COSY (étalement 1) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 7

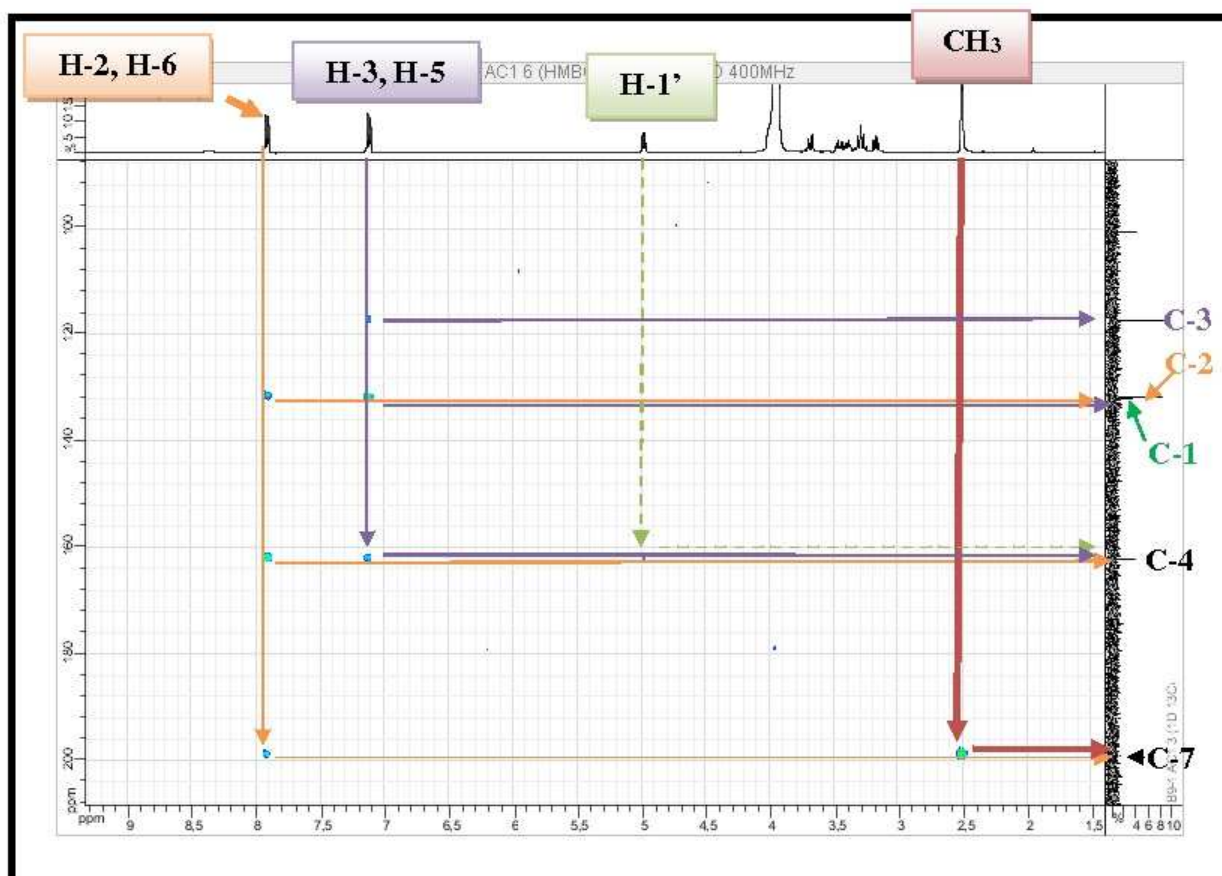


Spectre 34-1: Spectre RMN ¹³C (étalement 1) (100MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 7



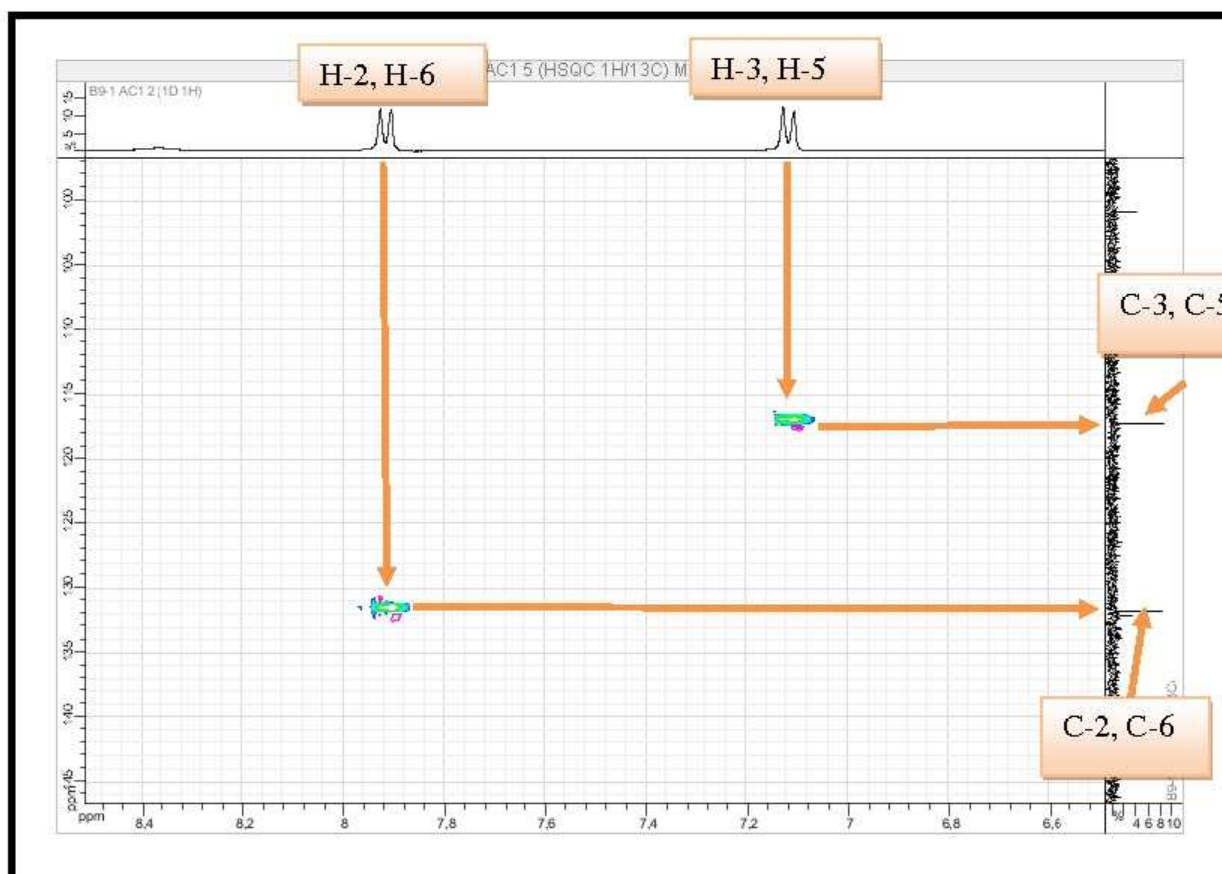
Spectre 32-2: Spectre HSQC (étalement 2) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 7

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre 35), la corrélation entre H-5 et H-3 et le carbone à $\delta_C = 132,07$ ppm permet son attribution au carbone C-1 ; la corrélation entre H-2 et H-6 et le carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 162,25$ ppm permet l'attribution de ce carbone à C-4 ; ce même carbone corrèle avec H-3 et H-5. Par ailleurs, les corrélations entre H-2 et H-6 et le carbone quaternaire à $\delta_C = 198,99$ ppm dont la valeur du déplacement chimique indique un carbonyle de cétone conjugué permettent de le placer en C-1 et de ce fait lui attribuer la numérotation C-7. Le spectre de l'expérience HMBC montre une corrélation nette entre les protons du méthyle signalé plus haut ($\delta_H = 2,51$ ppm, $\delta_C = 27,64$ ppm) et le carbone C-7 indiquant alors qu'il s'agit d'une acétophénole substituée en C-4 du phényle par le groupement O-glucopyranoside. Ceci est confirmé par la corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton anomérique du glucose et le carbone C-4 ($\delta_C = 162,25$ ppm).



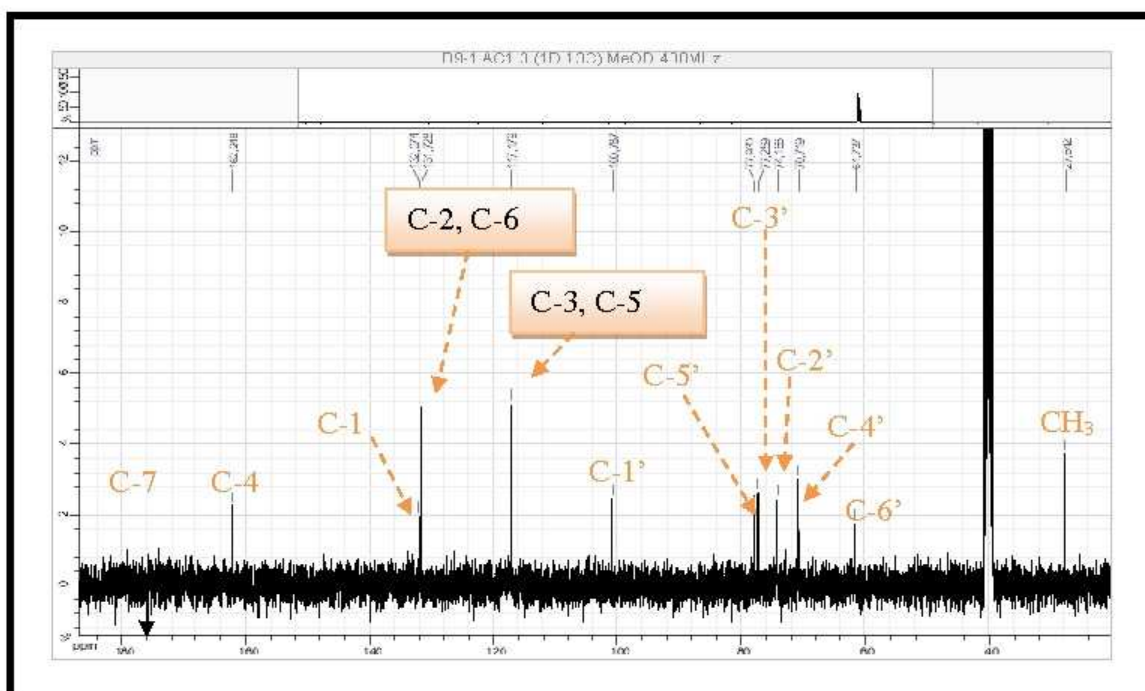
Spectre 35: Spectre HMBC (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 7

Les déplacements chimiques des carbones C-2, C-3, C-5 et C-6 ont été évalués par l'analyse du spectre HSQC où l'on relève des corrélations entre H-2 et H-6 et les carbones à $\delta_C = 131,73$ ppm et entre H-3 et H-5 et les carbones à $\delta_C = 117,18$ ppm.

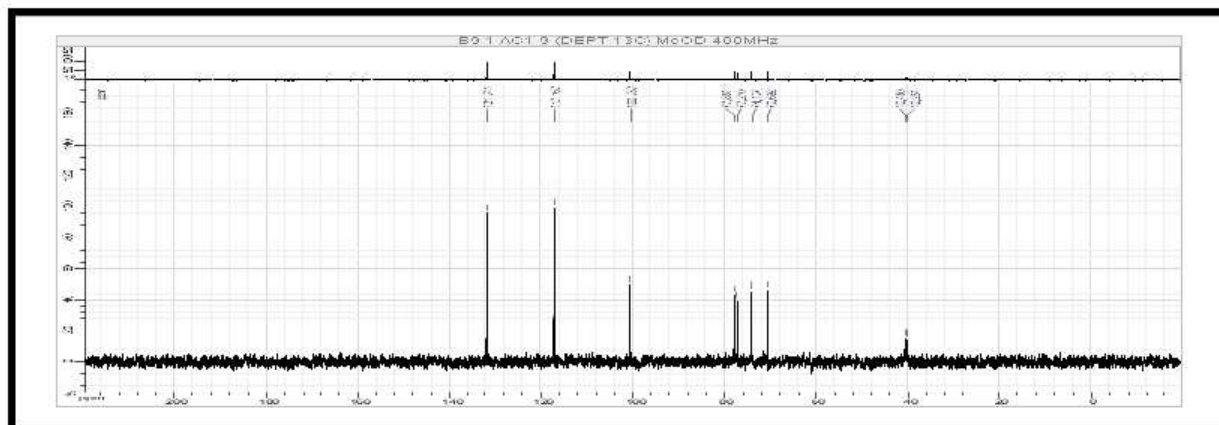


Spectre 32-3: Spectre HSQC (étalement 3) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 7

Toutes ces données sont reportées sur le spectre le ¹³C.



Spectre 34-2: Spectre RMN ¹³C (étalement 2) (100MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 7



Spectre 36: Spectre RMN ^{13}C DEPT 90 (100MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé 7

Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau 23.

Tableau 23. Données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé 7

Sucre		
Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1'	4,99 (d ; 7,2 Hz)	100,79
2'	3,29 (dd ; 8,8 ; 7,2 Hz)	74,16
3'	3,34 (t ; 8,8 Hz)	77,26
4'	3,19 (t ; 8,8 Hz)	70,71
5'	3,42 (m)	77,93
6'	3,69 (d large; 12,0 Hz)	61,74
	3,48 (dd; 12,0 ; 5,9 Hz)	
Flavonoïde		
1	/	132,07
2	7,91 (d ; 8,6 Hz)	131,73
3	7,11 (d ; 8,6 Hz)	117,18
4	/	162,25
5	7,11 (d ; 8,6 Hz)	117,18
6	7,91 (d ; 8,6 Hz)	131,73
7	/	198,99
8	2,51(s)	27,64

L'ensemble de ces données mènent à la structure reportée sur la figure 79. Il s'agit de la piceine [63]. Cette molécule est nouvelle pour le genre *Helianthemum*.

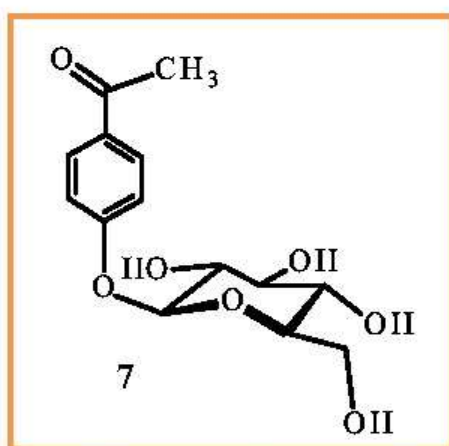
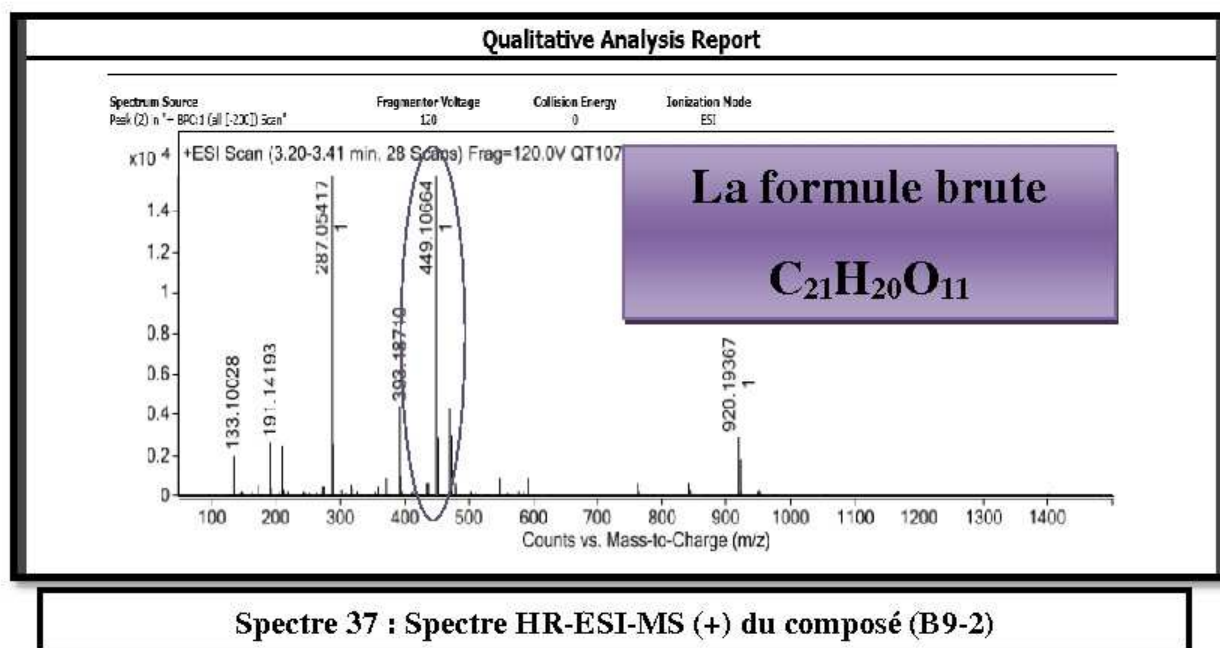
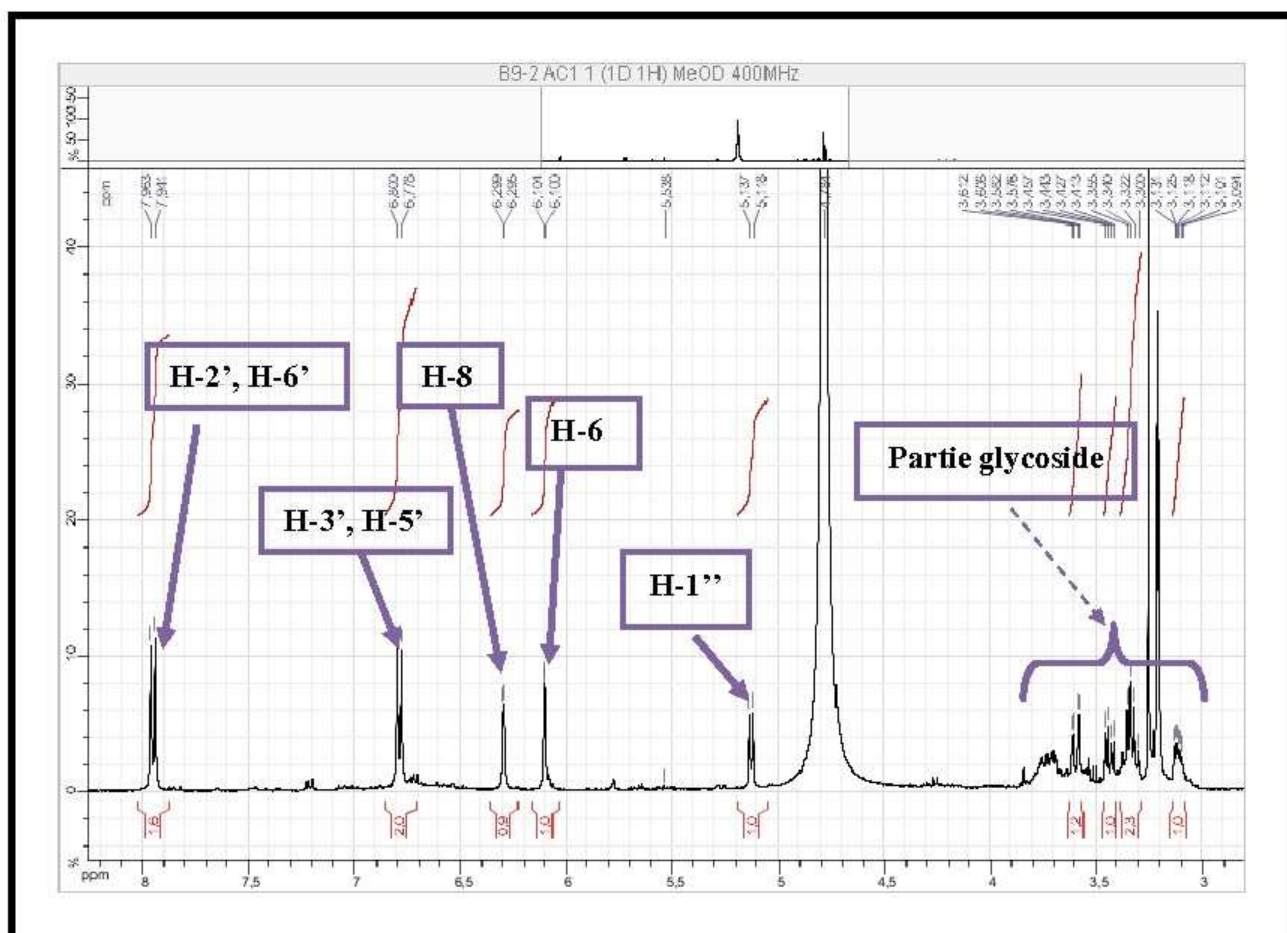


Figure.79. Structure du composé 7, picéine.

IV.3.3. Elucidation structurale du composé B9-2

D'après les spectres de masse (Spectre 37), proton (Spectre 38-1), ce composé est le même que celui isolé de la phase acétate d'éthyle de *Helianthemum ruficomum* composé 4 : astragaline.





Spectre 38-1: Spectre RMN ^1H (étalement 1) (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé B9-2

IV.3.4. Elucidation structurale du composé 8 (B11-2) :

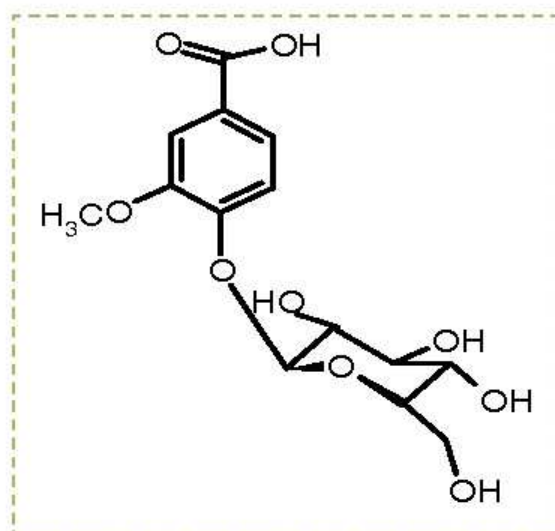
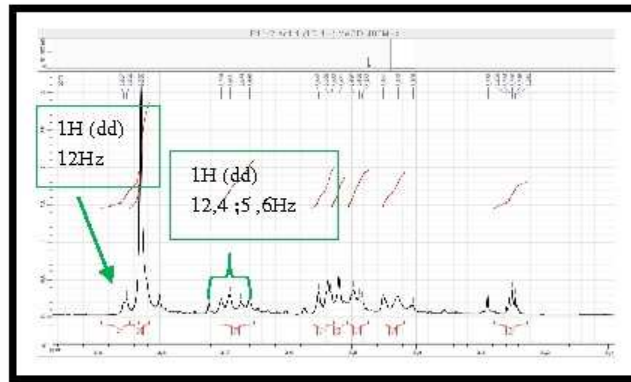
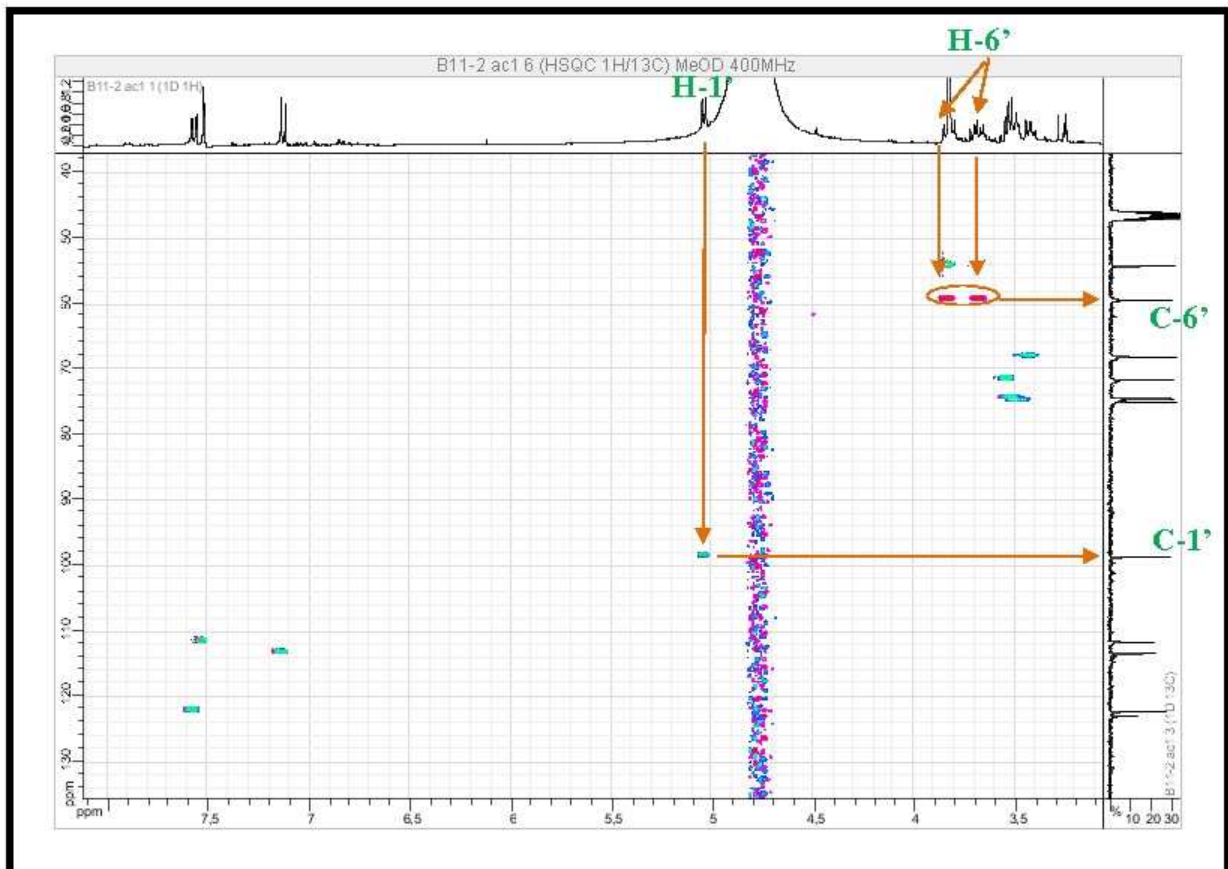


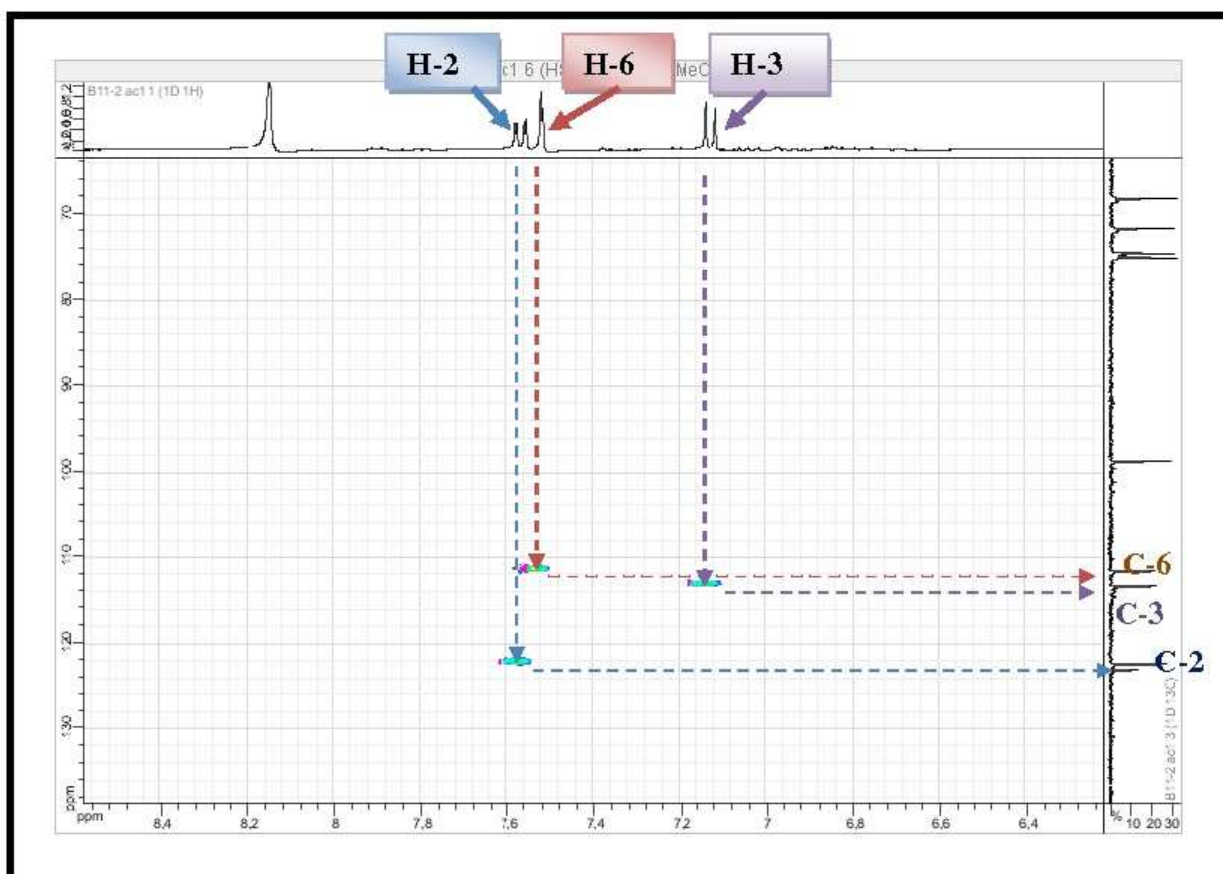
Figure 80. Structure du composé 8, B11-2.



Spectre 40-2: Spectre RMN ^1H (étalement 2) (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 8

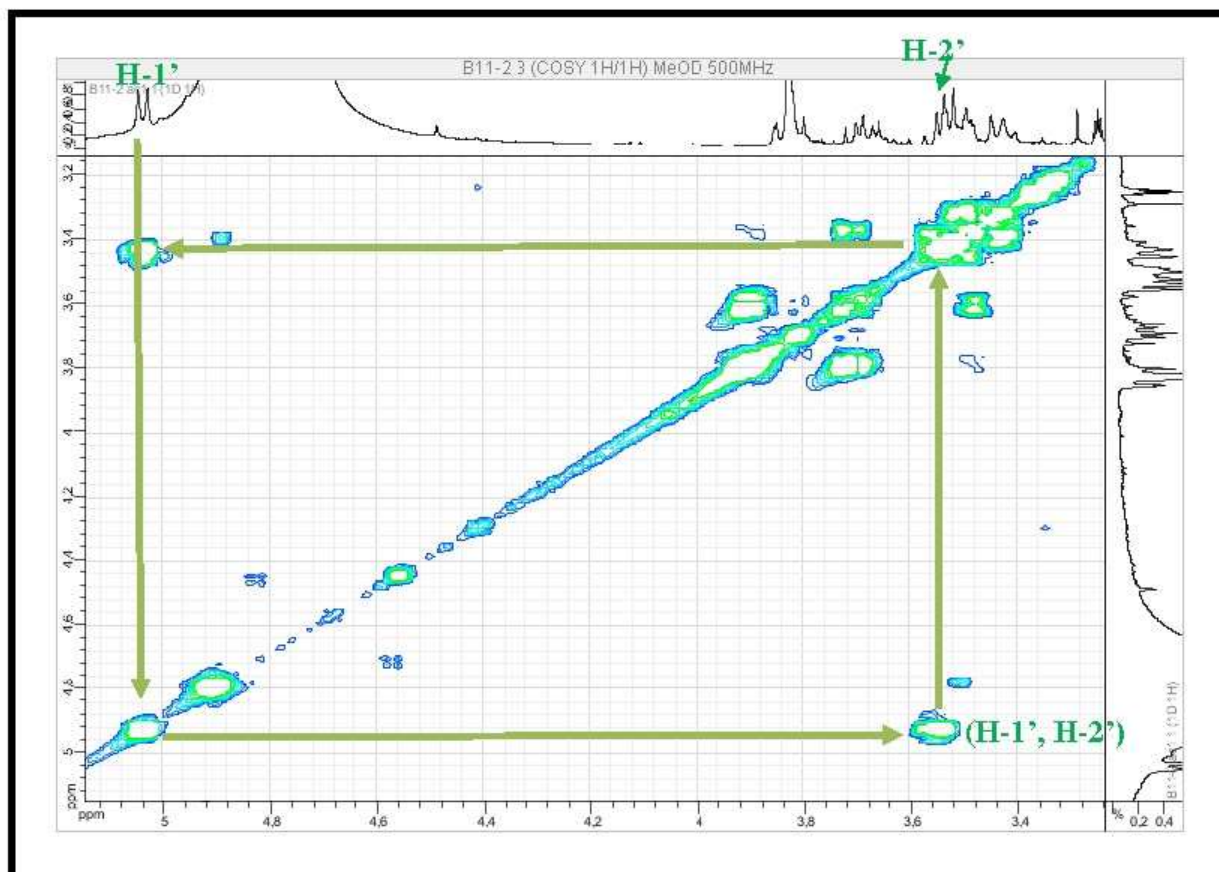


Spectre 41-1: Spectre HSQC (étalement 1) (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 8

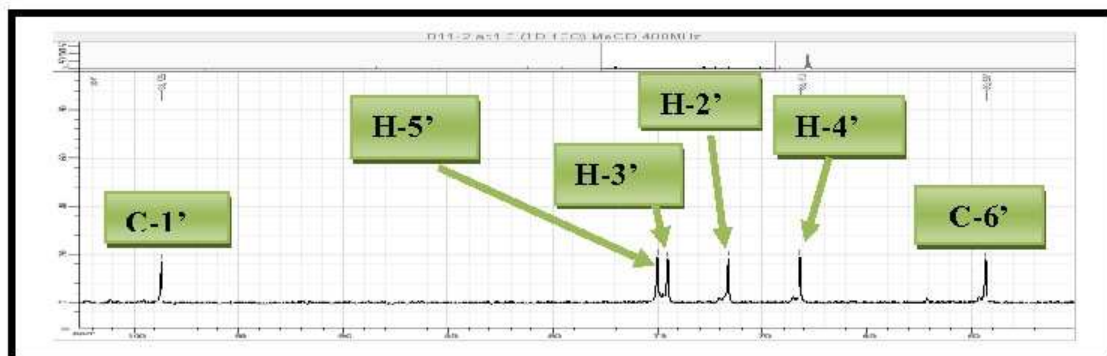


Spectre 41-2: Spectre HSQC (étalement 2) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 8

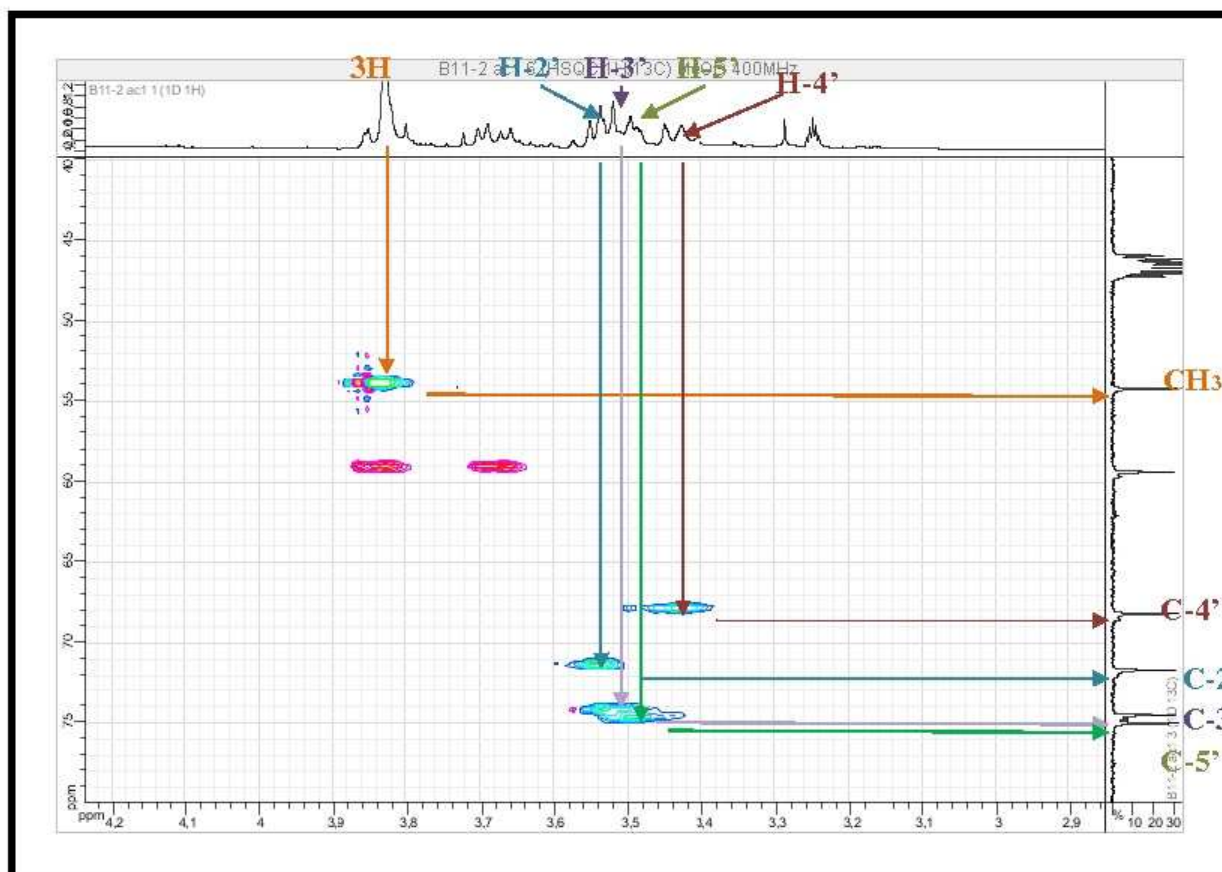
Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre 42-1), le proton anomérique H-1' montre une tache de corrélation avec le proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,55$ ppm ($\delta_C = 71,64$ ppm) partiellement recouvert par un autre multiplet ($\delta_H = 3,53$ ppm, $\delta_C = 74,49$ ppm). Ces deux noyaux sont attribuables à H-2' et H-3', respectivement car les deux signaux restants sont attribués à H-5' (multiplet à $\delta_H = 3,48$ ppm, $\delta_C = 75,01$ ppm) grâce à sa corrélation sur le spectre COSY avec H-6'b et à H-4'(t; $J = 8,6$ Hz, $\delta_H = 3,42$ ppm, $\delta_C = 68,17$ ppm) grâce à sa corrélation avec H-5'. La multiplicité du signal de H-4' (t) et la valeur de la constante de couplage (8,6 Hz) supposent des interactions axiale-axiale entre H-3'/H-4' et H-4'/H-5' et indiquent des orientations axiales de H-3', H-4' et H-5' ce qui oriente vers un groupement glucopyranoside.



Spectre 42-1: Spectre COSY (étalement 1) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 8



Spectre 43-1: Spectre RMN ¹³C (étalement 1) (100MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 8

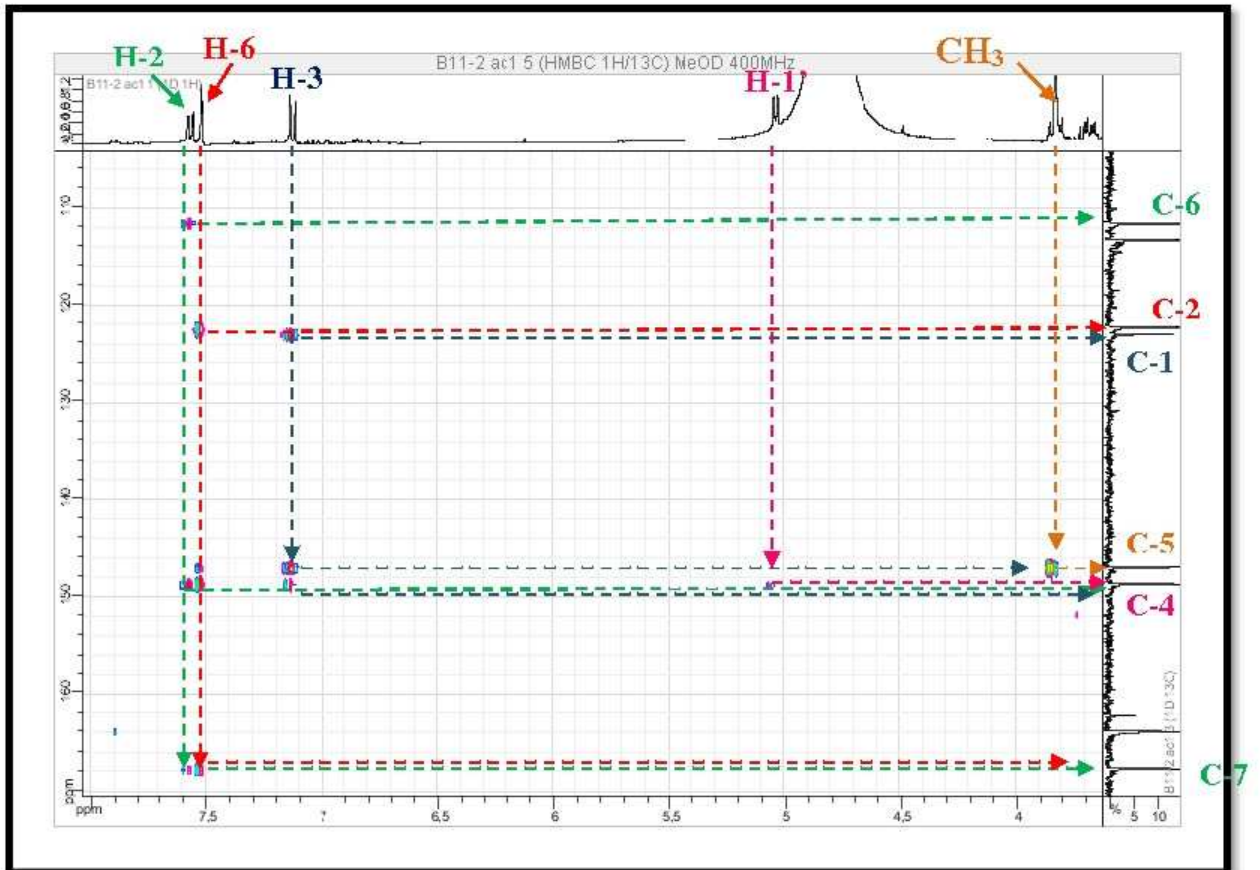


Spectre 41-3: Spectre HSQC (étalement 3) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 8

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre 44-1), la corrélation observée entre H-2, H-6 et le carbone à $\delta_C = 123,03$ ppm permet l'attribution de ce carbone au C-1 ; la corrélation entre H-5, H-2 et le carbone à $\delta_C = 146,96$ ppm permet son attribution au carbone à C-3, ceci est appuyé par le fait que ce carbone ne montre aucune corrélation avec le proton H-6. Par contre les trois protons H-2, H-5 et H-6 montrent des corrélations nettes avec le carbone quaternaire aromatique oxygéné résonant à $\delta_C = 148,67$ ppm permettant ainsi son attribution sans aucune ambiguïté à C-4.

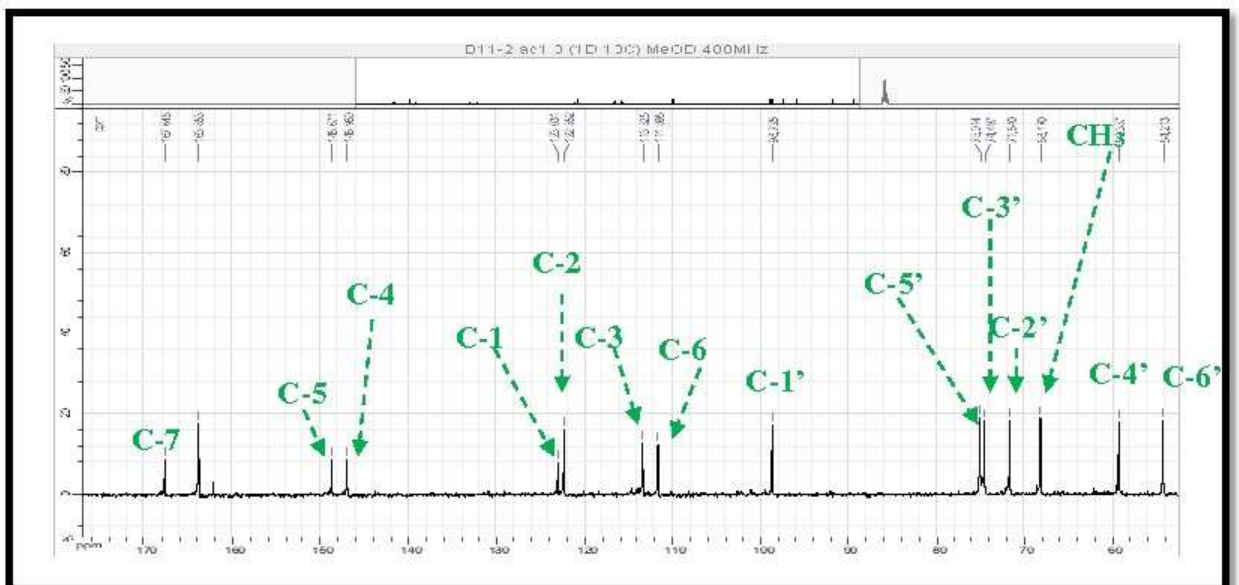
Par ailleurs, sur le même spectre (HMBC), les protons du méthoxyle montrent une tache de corrélation avec le carbone à $\delta_C = 146,96$ ppm attribué à C-3, ce qui indique la substitution de ce dernier par le groupement méthoxyle. Quant au carbone C-4, il montre une corrélation claire et nette avec le proton anomérique du groupement glucopyranoside, ce qui permet de placer ce groupement en cette position.

Toujours sur le spectre HMBC H-2 et H-6 montrent une tache de corrélation avec le carbone à $\delta_C = 167,65$ ppm. Vu le déplacement chimique de ce carbone il s'agit d'un groupement carbonyle. La présence de ces corrélations suppose qu'il est placé en C-1. La combinaison des

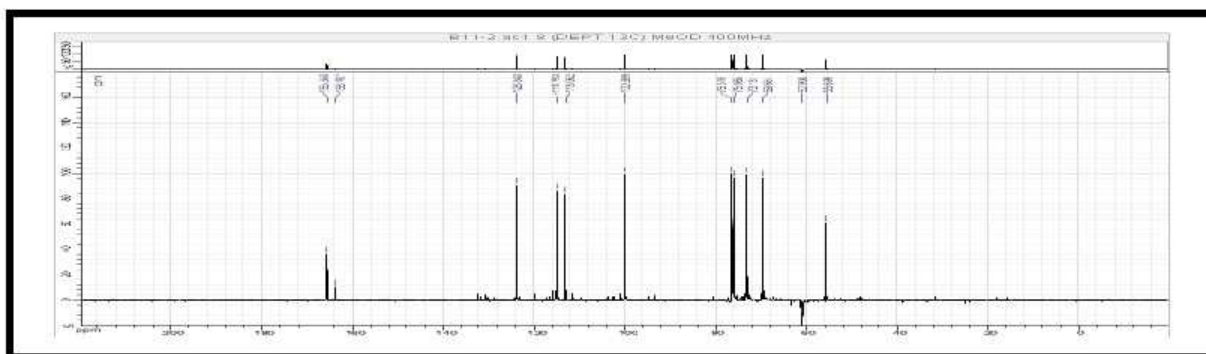


Spectre 44-1: Spectre HMBC (étalement 1) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 8

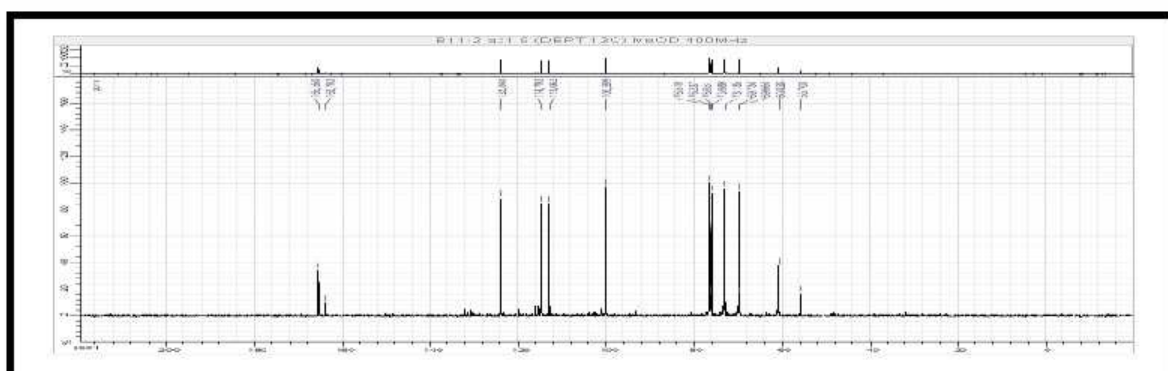
Toutes ces données sont reportées sur le spectre le ¹³C.



Spectre 43-2: Spectre RMN ¹³C (étalement 2) (100MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 8



Spectre 45: Spectre RMN ^{13}C DEPT 135 (100MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 8



Spectre 46: Spectre RMN ^{13}C DEPT 90 (100MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 8

Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau 25.

Tableau 25. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé 8.

Sucre		
Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1'	5,04 (d ; 7,2 Hz)	98,72
2'	3,55 (m)	71,64
3'	3,53 (m)	74,49
4'	3,42 (t ; 8,6 Hz)	68,17
5'	3,48 (m)	75,01
6'	3,85 (d large; 12,0 Hz) 3,67 (dd; 12,0 ; 5,6 Hz)	59,34
Composé phénolique		
1	/	123,03
2	7,51 (d ; 2,0 Hz)	111,59
3	/	146,96
4	/	148,67
5	7,12 (d ; 8,4 Hz)	113,32

Tableau 25. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **8** (suite).

6	7,56 (dd ; 8,4 ; 2,0 Hz)	122,35
7	/	167,65
OCH₃	3,83 (s)	54,21

IV.3.5. Elucidation structurale du composé **9** (B11-3)

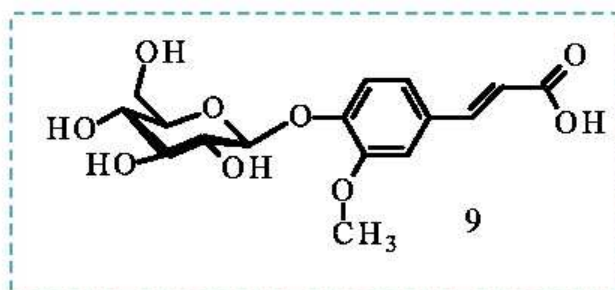
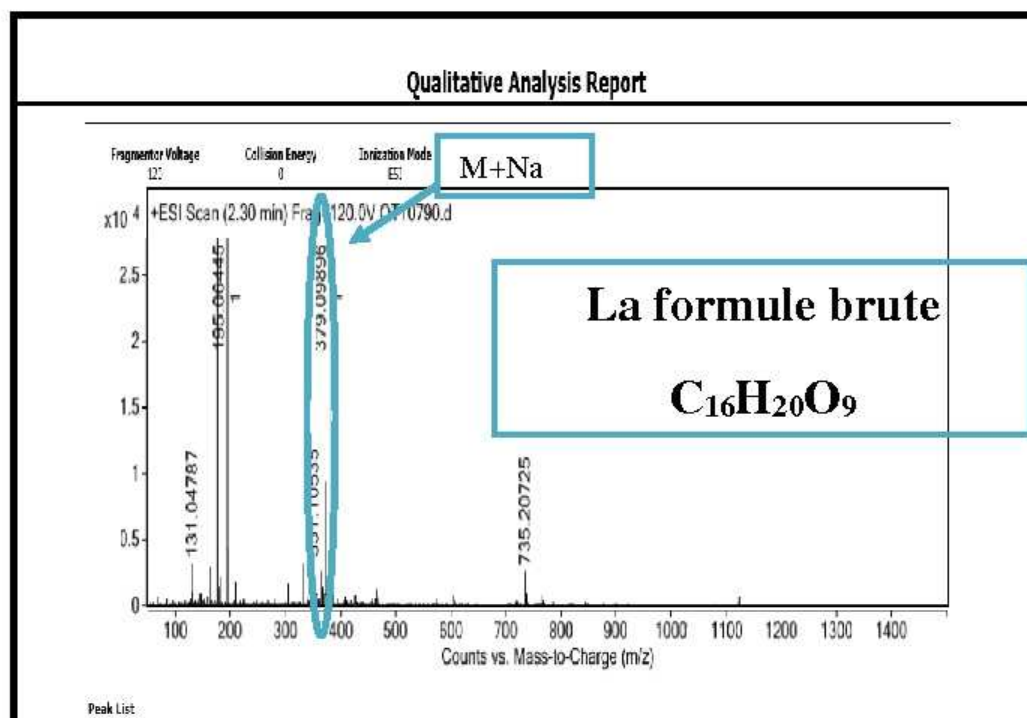


Figure 82. Structure du composé **9**, B11-3.

L'examen du spectre de masse à haute résolution en mode electrospray positif (Spectre 47) du composé **9** montre deux pics relatifs à deux ions adduits à $m/z = 379,09896$ et $m/z = 735,20725$ correspondant à $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, respectivement. Ce résultat est appuyé par le calcul de la masse exacte (Tableau 26) qui donne une valeur $m/z = 356,1098$ (calculé pour $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_9$: $m/z = 356,11073$). Ce spectre HR-ESI-MS montre également un ion à $m/z = 137,05923$ correspondant à $[\text{M}+\text{H}-162]^+$ indiquant la présence d'un groupement hexose lié au reste de la molécule par une liaison O-glycosidique.



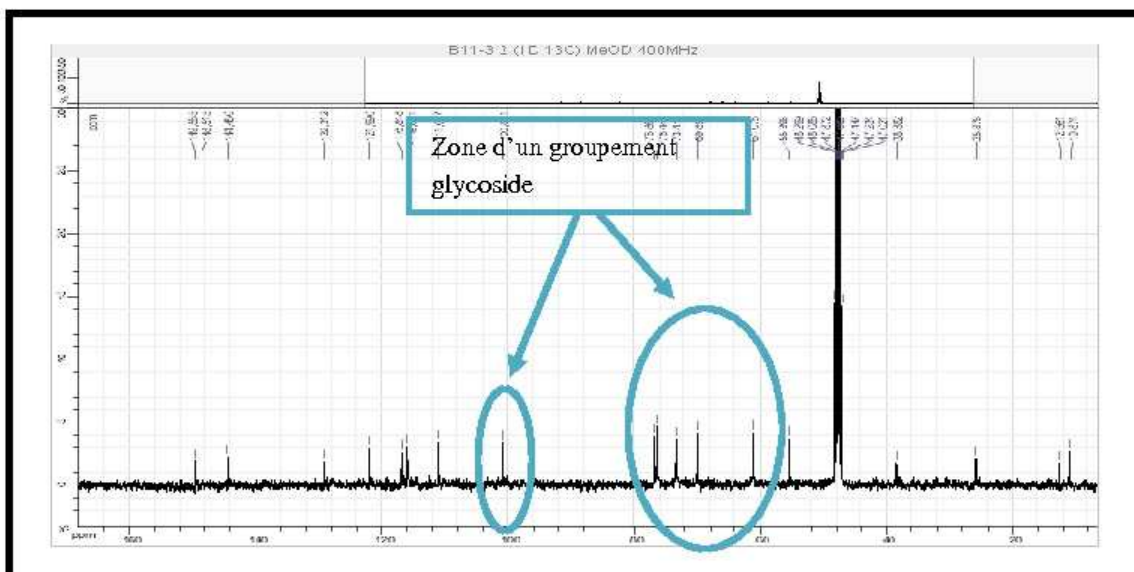
Spectre 47: Spectre HR-ESI-MS (+) du composé **9**

Tableau 26. Analyse de la composition élémentaire des différents ions.

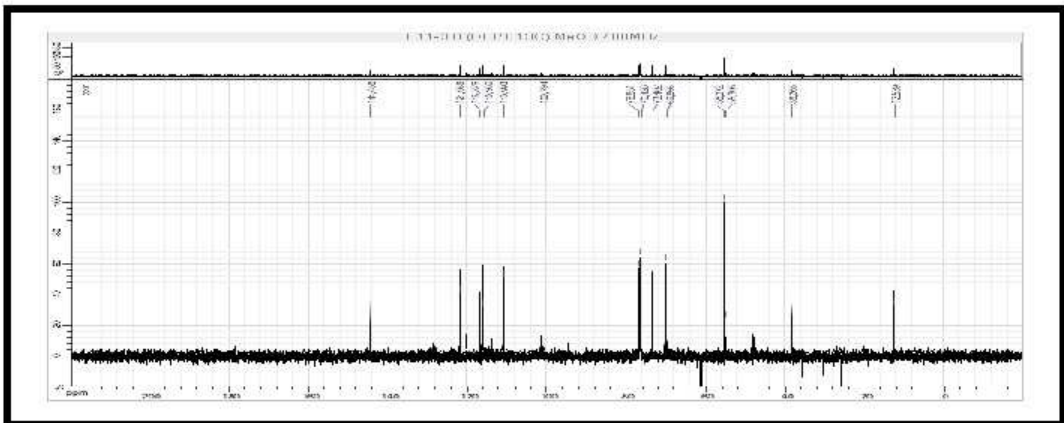
Qualitative Analysis Report							
Formula Calculator Results							
Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Mz	Ion Species	Score
C16 H20 O9		356.1098	356.11073	2.63	379.09996	C16 H20 Na O9	61.36
C13 H12 N10 O3		355.10961	356.10936	-1.19	379.09996	C13 H12 N10 Na O3	57.51
C12 H16 N6 O7		356.1098	356.10835	-4.93	379.09996	C12 H16 N6 Na O7	54.01
C17 H16 N4 O5		356.1098	356.11237	6.38	379.09996	C17 H16 N4 Na O5	49.42
C11 H20 N2 O11		356.1098	356.10671	-8.68	379.09996	C11 H20 N2 Na O11	46.34
C24 H12 N4		355.10979	356.1052	-10.1	379.09996	C24 H12 N4 Na	35.42
C18 H12 N8 O		356.1098	356.11341	10.13	379.09996	C18 H12 N8 Na O	35.22
C27 H40 N2 O20		712.21793	712.21744	-0.69	735.20725	C27 H40 N2 Na O20	54.8

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre 48-1) de ce composé, montre des signaux caractéristiques d'un acide phénolique notamment :

- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 7,62$ ppm et un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 6,41$ ppm formant un système AM ($J = 16,4$ Hz) attribuable à H-7 et H-8, respectivement de la double liaison reliant le noyau aromatique au carbonyle. Vu la valeur de la constante de couplage entre ces deux noyaux, cette double liaison admet une configuration trans.
- Trois signaux orientant vers un noyau aromatique trisubstitué dans les positions 1,3 et 4. Le premier, un singulet large d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 7,25$ ppm attribuable à H-2.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 7,19$ ppm ($J = 8,5$ Hz) correspondant au signal d'un proton présentant un fort couplage vicinal avec son voisin, lequel résonne sous forme d'un doublet large à $\delta_{\text{H}} = 7,18$ ppm ($J = 8,5$ Hz). Les signaux de ces deux protons montrent un effet de toit justifiant ce fort couplage et par conséquent une portion de spectre du second ordre. Ces signaux sont attribuables à H-5 et H-6, respectivement.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 4,99$ ppm ($J = 7.3$ Hz) attribuable au proton anomérique H-1' d'un sucre.
- Un singulet d'intégration 3H, à $\delta_{\text{H}} = 3,91$ ppm, vu la valeur de son déplacement chimique il s'agit d'un groupement méthoxyle.

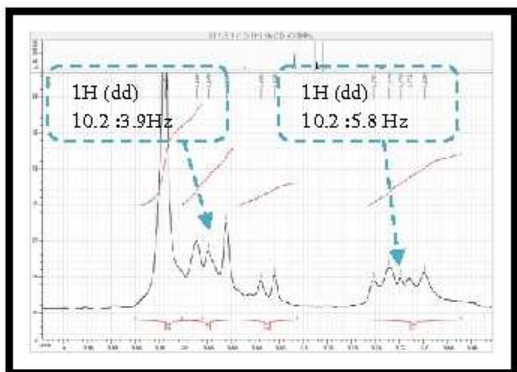


Spectre 49-1: Spectre RMN ¹³C (étalement 1) (100MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 9



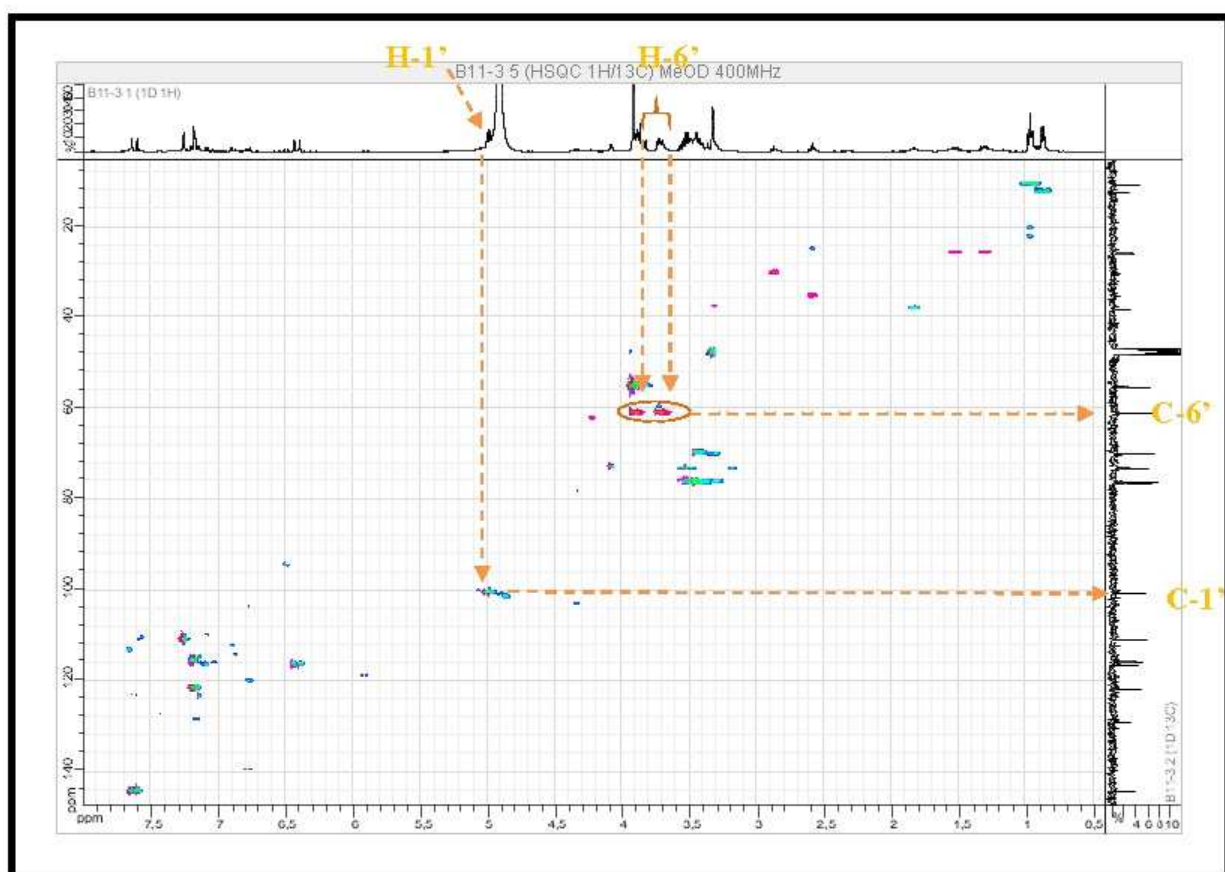
Spectre 50: Spectre RMN ¹³C DEPT 135 (100MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 9

- ✓ un CH₂ à δ_C = 61,07 ppm dont les protons résonnent sous forme de deux doublets de doublets à δ_H = 3,89 ppm (1H ; J = 10,2 ; 3,9 Hz) et δ_H = 3,71ppm (1H; J = 10,2 ; 5,8 Hz), attribuable au CH₂ de la position C-6' de l'hexose.



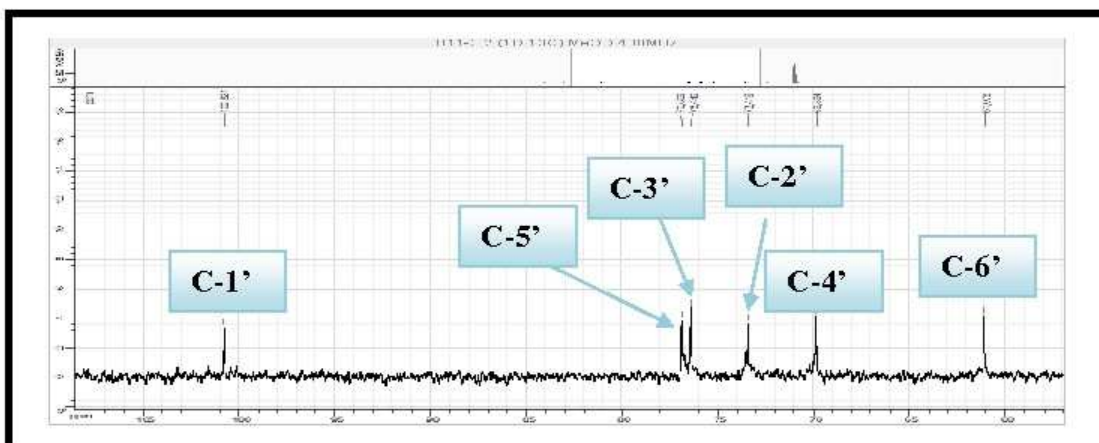
Spectre 48-3: Spectre RMN ¹H (étalement 2) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 9

- ✓ Un groupement CH à $\delta_C = 100,82$ ppm ($\delta_H = 4,99$ ppm, $J = 7,3$ Hz) attribuable à la position anomérique C-1' de l'hexose. La valeur du déplacement chimique de ce carbone et celle de la constante de couplage de son proton indiquent une jonction -O- β -glycosidique. Quant à la valeur de la constante de couplage, elle permet également de déduire une orientation axiale du proton H-2' de l'hexose.

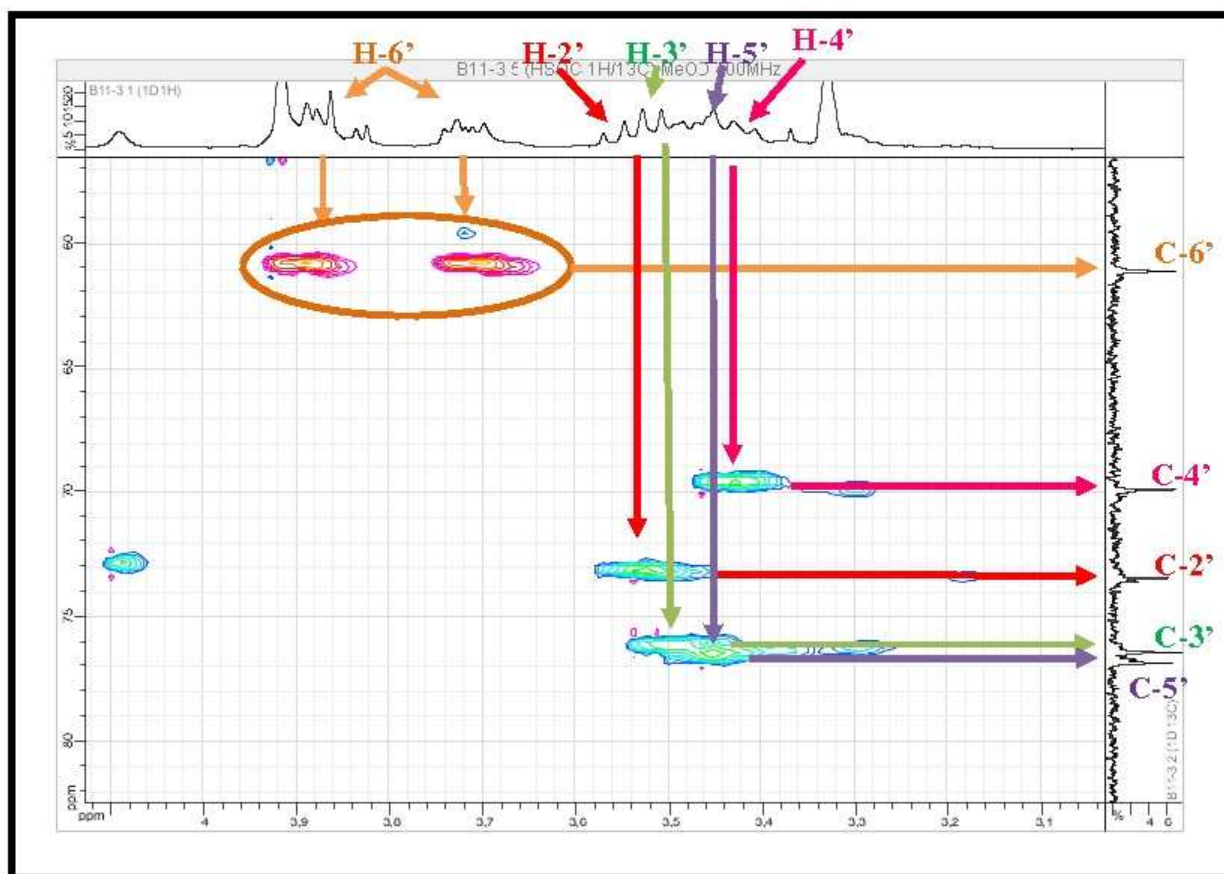


Spectre 51-1: Spectre HSQC (étalement 1) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 9

Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre 52-1), le signal de ce proton H-2' est repéré à $\delta_H = 3,54$ ppm (multiplet) grâce à sa corrélation avec le proton anomérique H-1', quant à son carbone il résonne à $\delta_C = 73,42$ ppm (HSQC). Toujours sur le spectre relatif à l'expérience COSY, le proton H-2' corrèle avec le proton résonant sous forme d'un triplet ($J = 8,0$ Hz) à $\delta_H = 3,52$ ppm attribuable à H-3' ($\delta_C = 76,44$ ppm). La multiplicité de ce signal « triplet » et la valeur de la constante de couplage « 8,0 Hz » supposent des interactions axiale-axiale entre H-2'/H-3' ; H-3'/H-4' et indiquent par conséquent des orientations axiales de H-3' et H-4'. Ces observations orientent vers un groupement glucopyranoside. Le signal du proton H-5' de ce groupement glucopyranoside est repéré à $\delta_H = 3,45$ ppm (multiplet, $\delta_C = 76,87$ ppm) grâce aux corrélations observées entre ce proton et les protons H-2-6'.

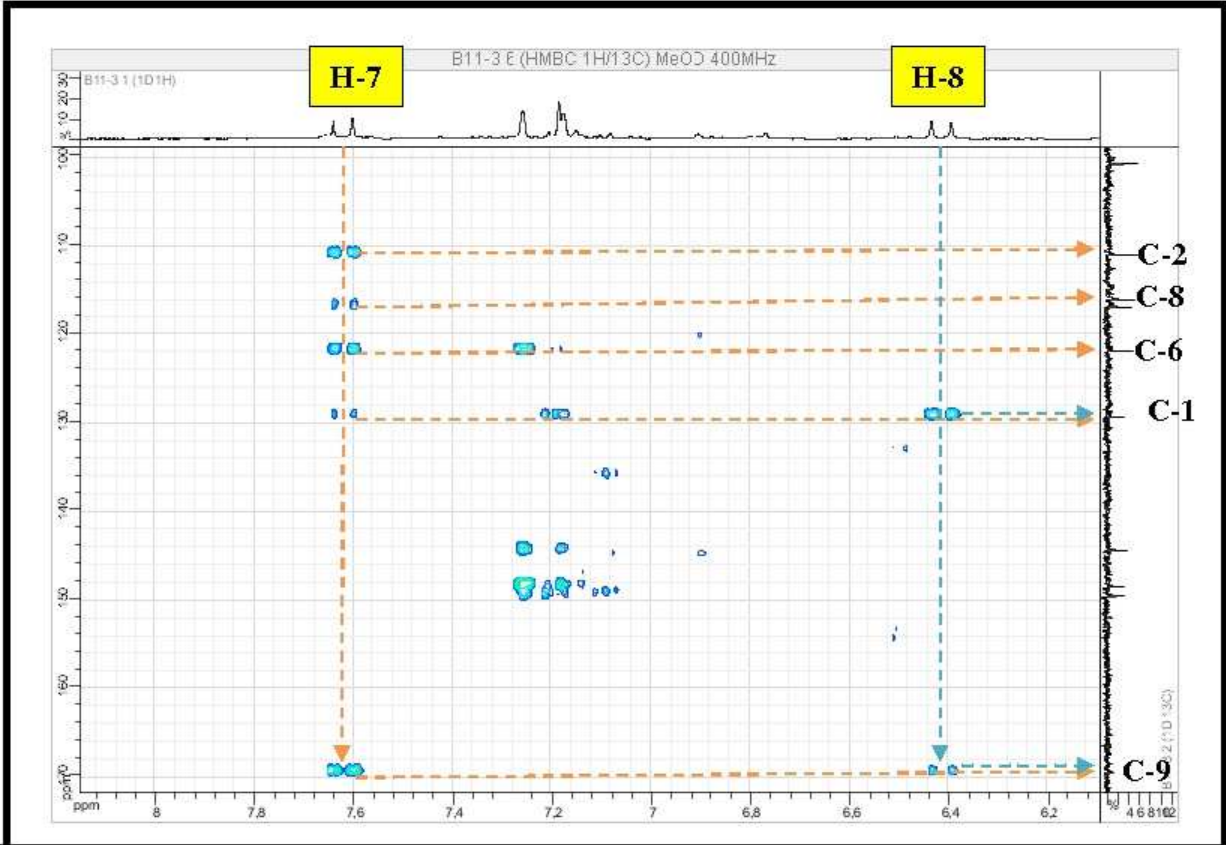


Spectre 49-2: Spectre RMN ¹³C (étalement 2) (100MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 9

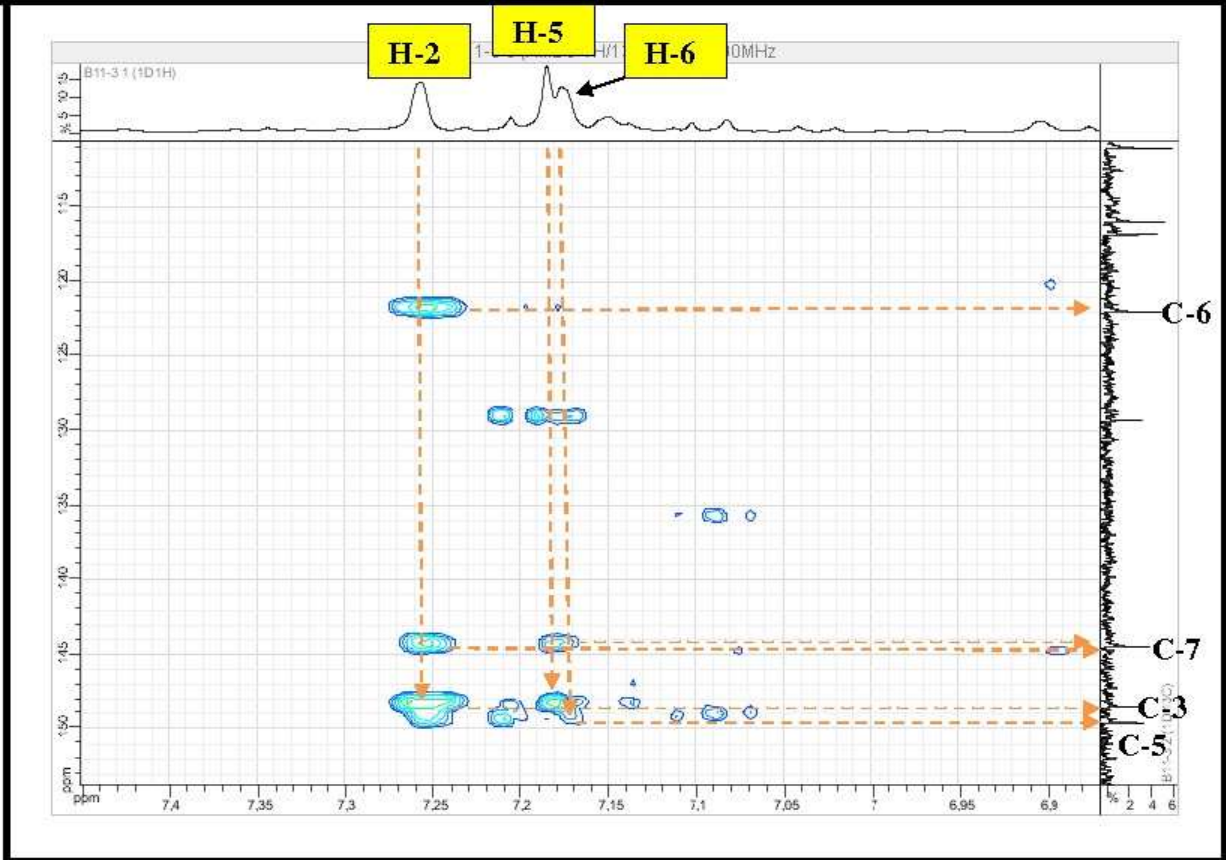


Spectre 51-2: Spectre HSQC (étalement 2) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 9

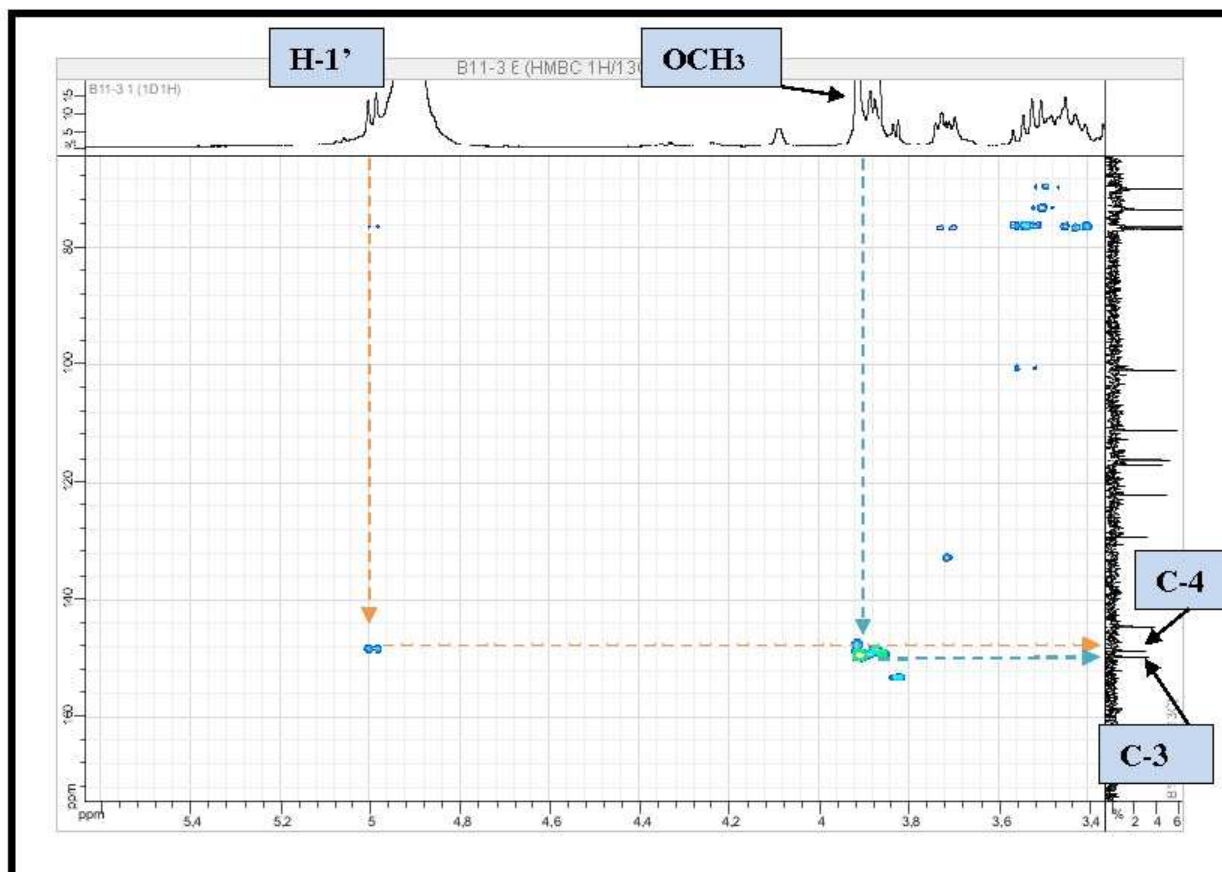
Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre 53-1), les corrélations observées entre H-2, H-5, H-6, H-7 et H-8 et le carbone à $\delta_C = 129,31$ ppm permet son attribution au carbone C-1 du noyau aromatique ; les corrélations entre H-2 et H-6 et le carbone à $\delta_C = 144,45$ ppm confirment l'attribution de ce carbone à C-7.



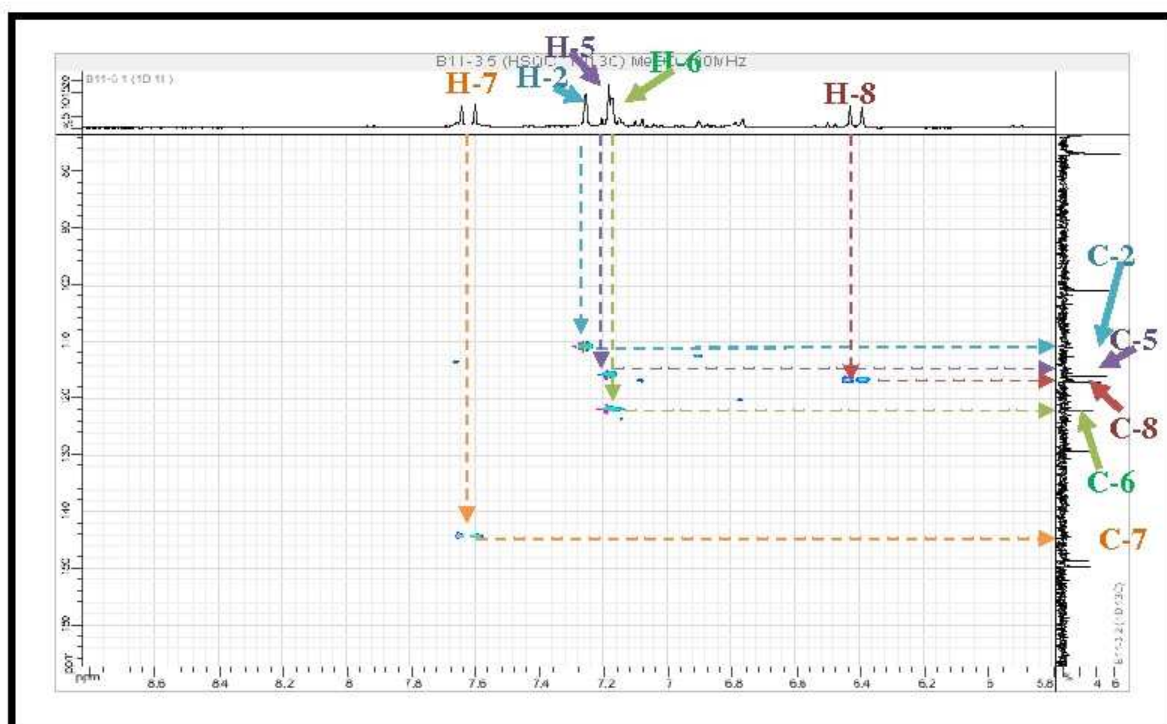
Spectre 53-1: Spectre HMBC (étalement 1) (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 9



Spectre 51-3: Spectre HSQC (étalement 3) (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 9

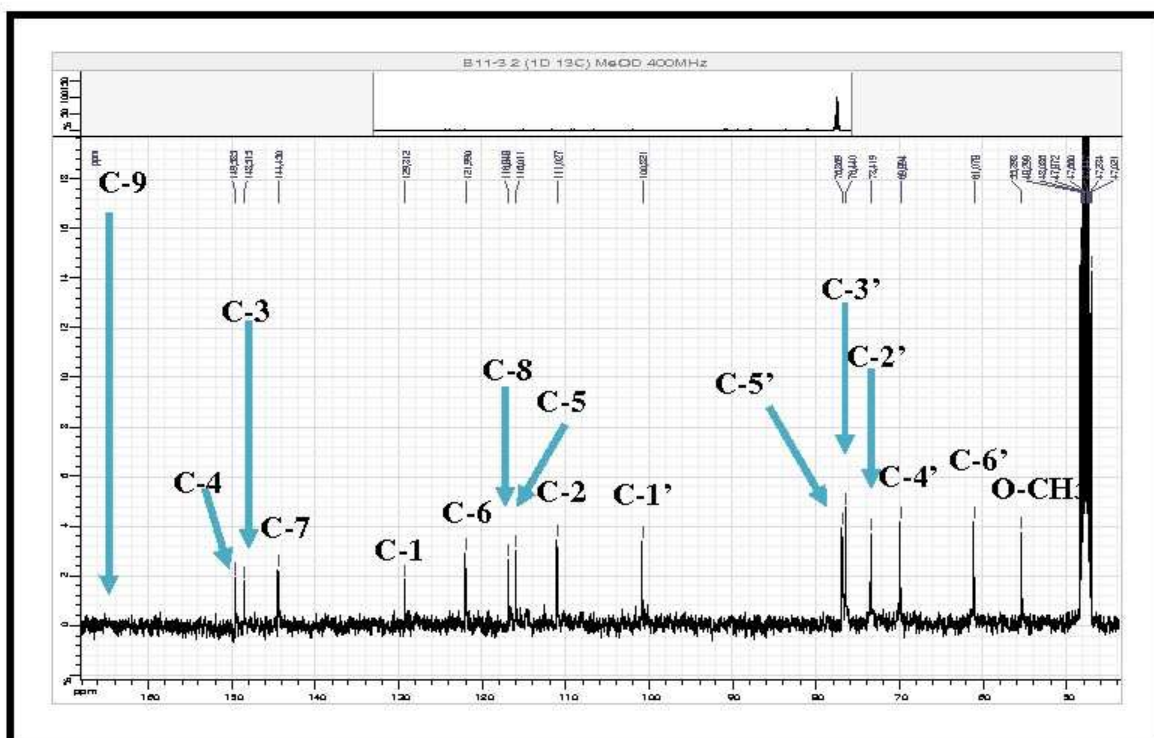


Spectre 53-2: Spectre HMBC (étalement 2) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 9



Spectre 51-4: Spectre HSQC (étalement 4) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 9

Toutes ces données sont reportées sur le spectre le ^{13}C .



Spectre 49-3: Spectre RMN ^{13}C (étalement 3) (100MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 9

Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau 27.

Tableau 27. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé 9

Glucopyranosyle		
Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1'	4,99 (d ; 7,3 Hz)	100,82
2'	3,54 (m)	73,42
3'	3,52 (t ; 8,0 Hz)	76,41
4'	3,43 (m)	69,89
5'	3,45 (m)	76,87
6'	3,89 (dd ; 10,2 ; 3,9 Hz) 3,71 (dd ; 10,2 ; 5,8 Hz)	61,07
aglycone		
1	/	129,31
2	7,25 (s)	111,03
3	/	149,58
4	/	148,51
5	7,19 (d ; 8,5 Hz)	116,01
6	7,18 (d large ; 8,5 Hz)	121,99

Tableau 26. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **9** (suite)

7	7,62 (d ; 16,4Hz)	144,45
8	6,41 (d ; 16,4Hz)	116,84
9	/	169,39
OCH_3	3,91 (s)	55,40

IV.3.6. Elucidation structurale du composé **10** (B13-1)

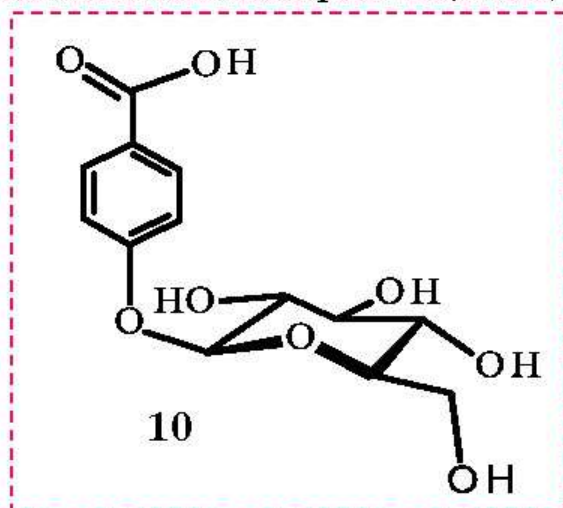
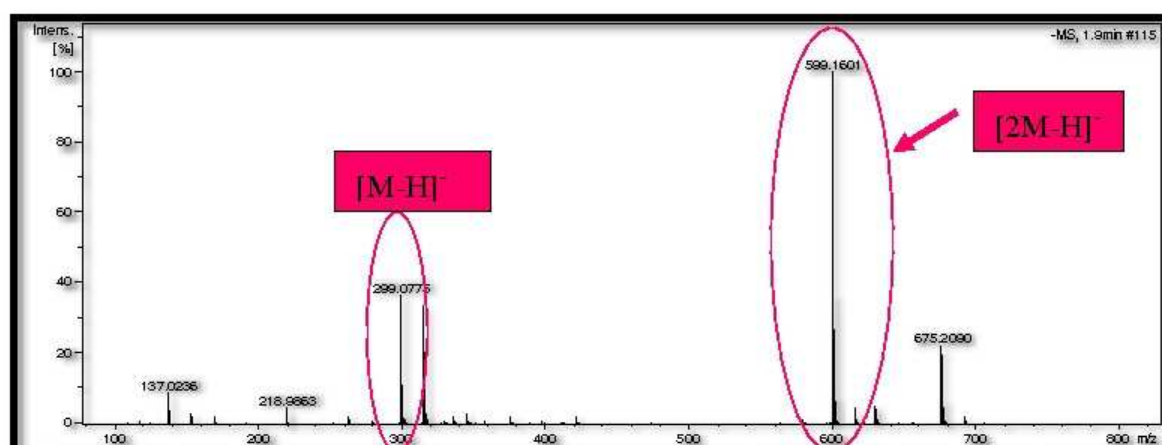
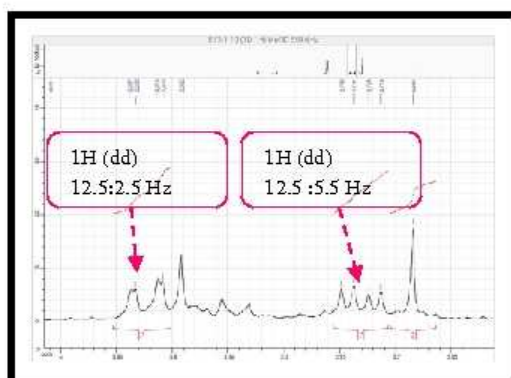


Figure 84. Structure du composé **10**, B13-1.

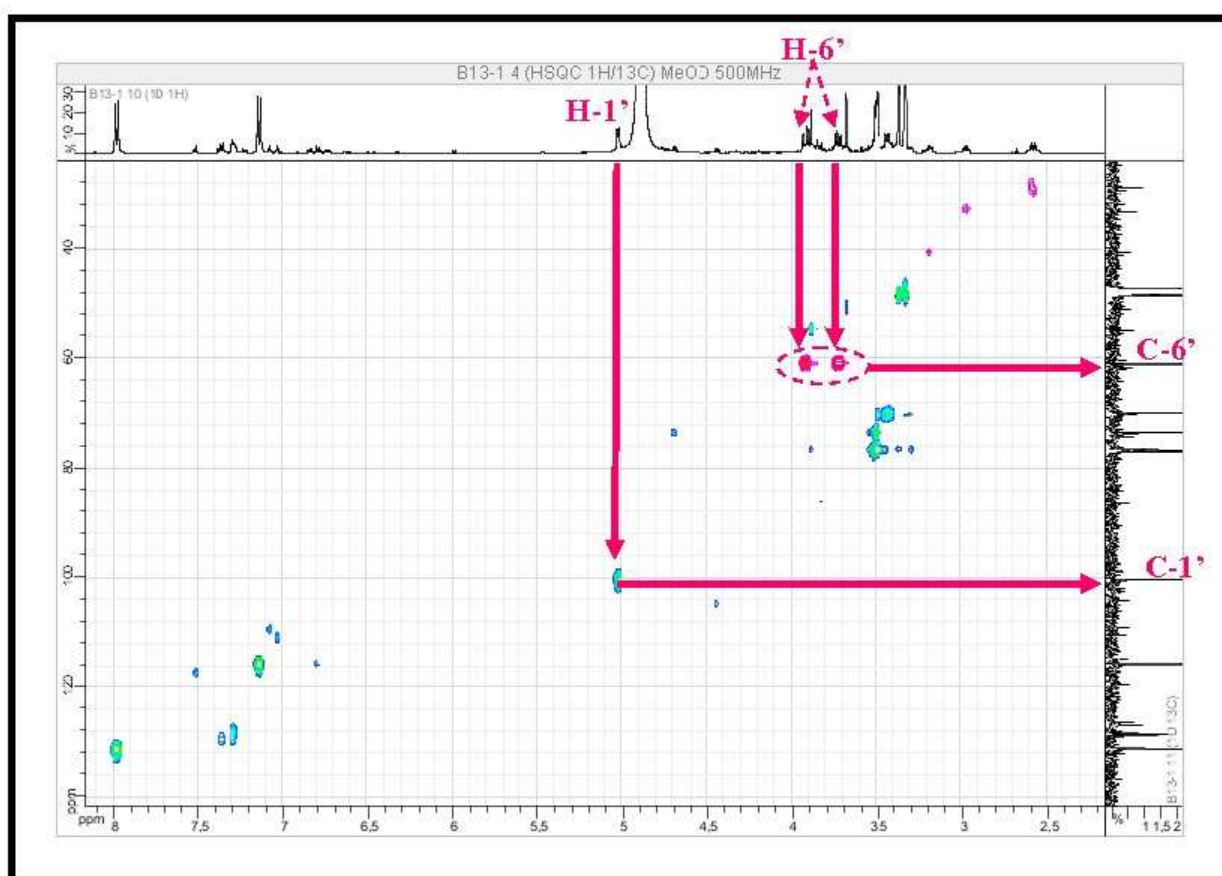
L'examen du spectre de masse à haute résolution en mode electrospray négatif (Spectre 54) du composé **10** montre un pic quasi moléculaire à $m/z = 299,0775$ correspondant à $[\text{M}-\text{H}]^-$, en faveur de la formule brute $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_8$ pour cette molécule, soit une molécule comportant 6 insaturations.



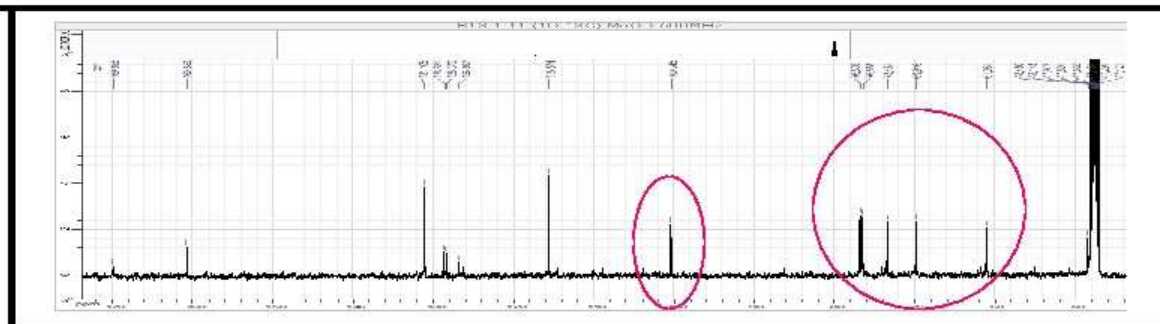
Spectre 54: Spectre HR-ESI-MS (-) du composé **10**



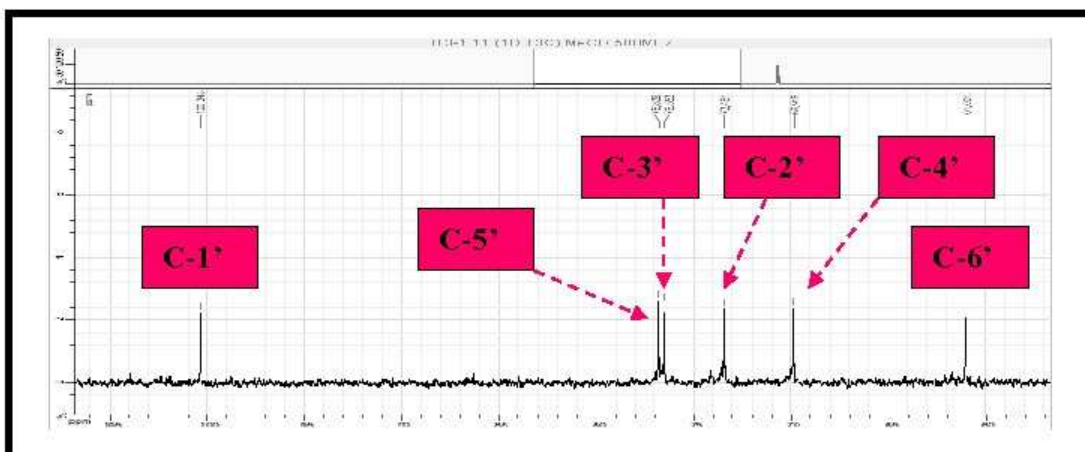
Spectre 55-2: Spectre RMN ^1H (étalement 2) (500MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 10



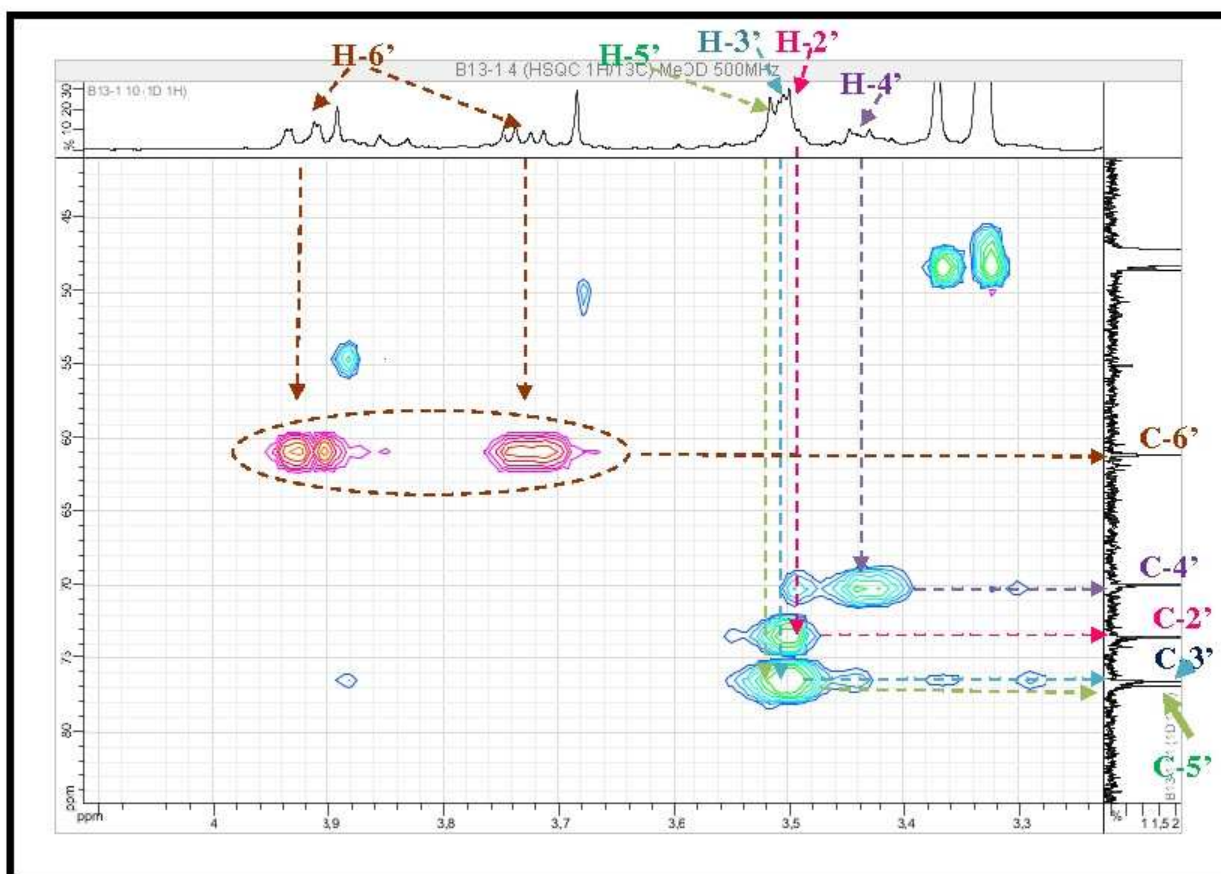
Spectre 56-1: Spectre HSQC (étalement 1) (500MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 10



Spectre 57-1: Spectre RMN ^{13}C (étalement 2) (125 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 10

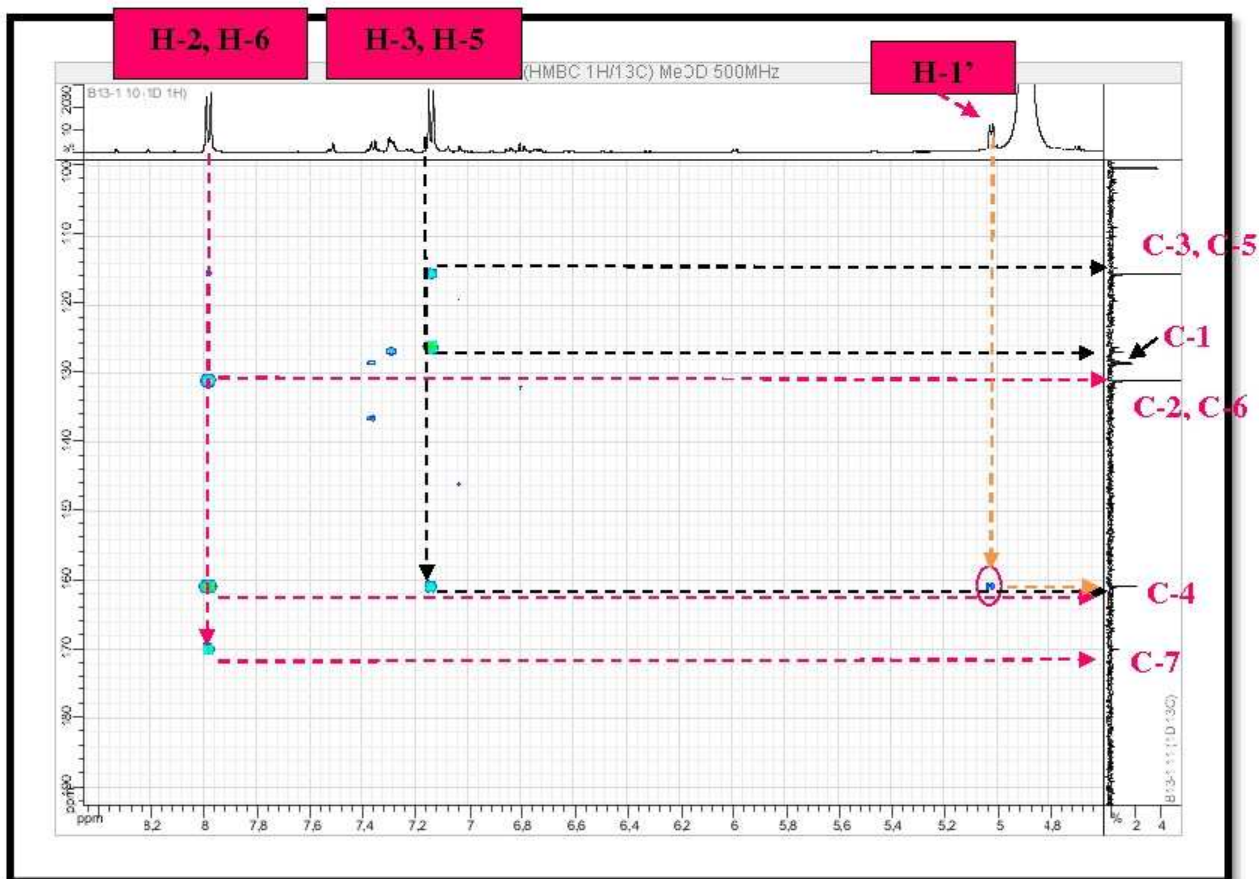


Spectre 57-2: Spectre RMN ^{13}C (étalement 2) (125 MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 10

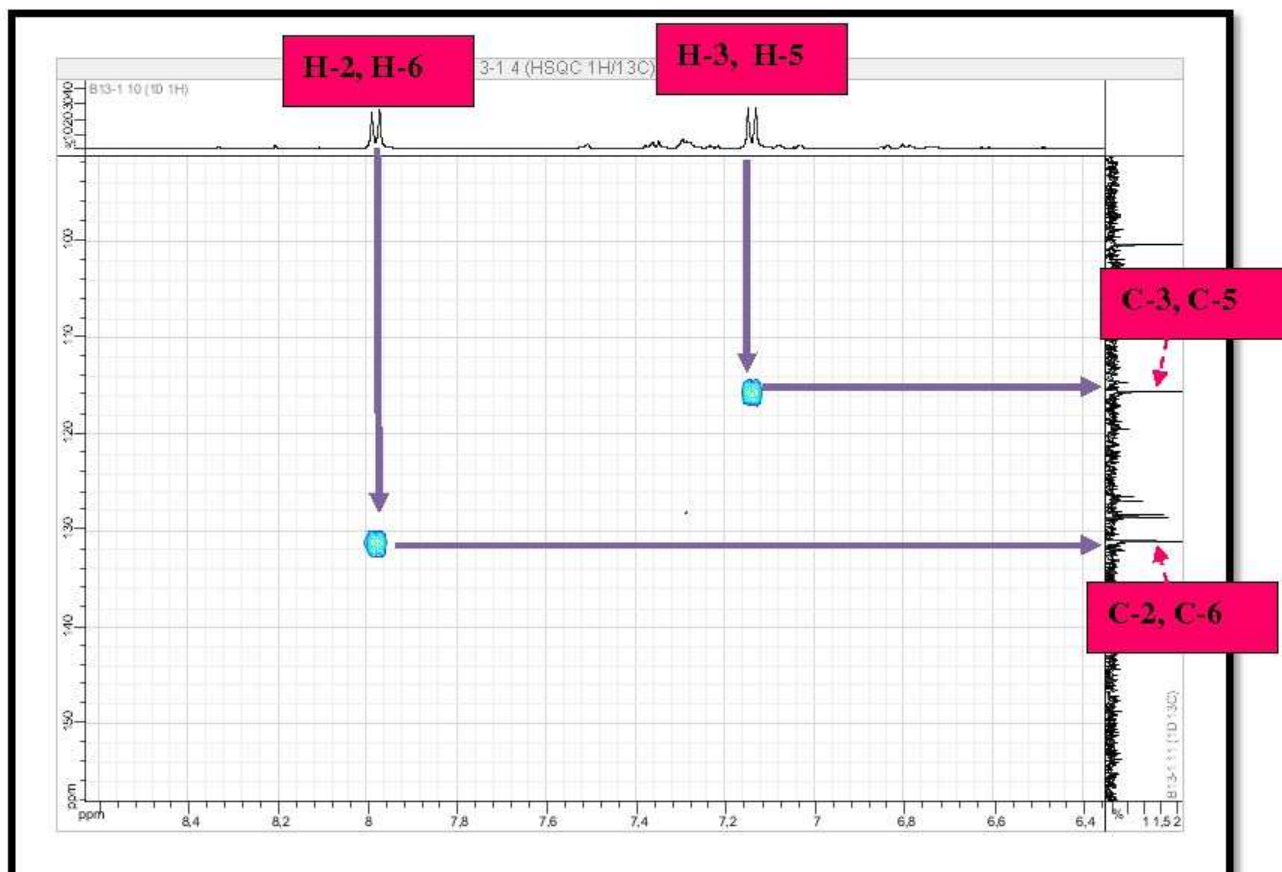


Spectre 56-2: Spectre HSQC (étalement 2) (500MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 10

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre 60-1), la corrélation entre H-5 et H-3 et le carbone à $\delta_{\text{C}} = 126,89$ ppm permet son attribution au carbone C-1 ; les corrélations entre H-5, H-3, H-2 et H-6 et le carbone quaternaire oxygéné à $\delta_{\text{C}} = 160,86$ ppm permettent l'attribution de ce carbone à C-4 ; les corrélations entre H-6 et H-2 et le carbone quaternaire à

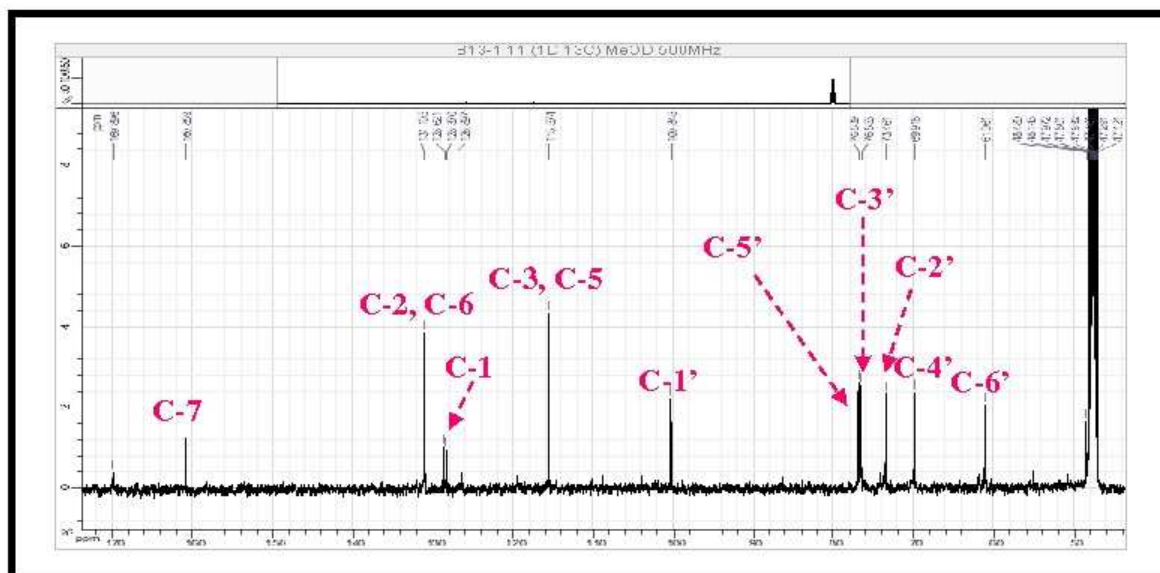


Spectre 60-1: Spectre HMBC (étalement 1) (500MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 10



Spectre 56-3: Spectre HSQC (étalement 3) (500MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 10

Toutes ces données sont reportées sur le spectre le ¹³C.

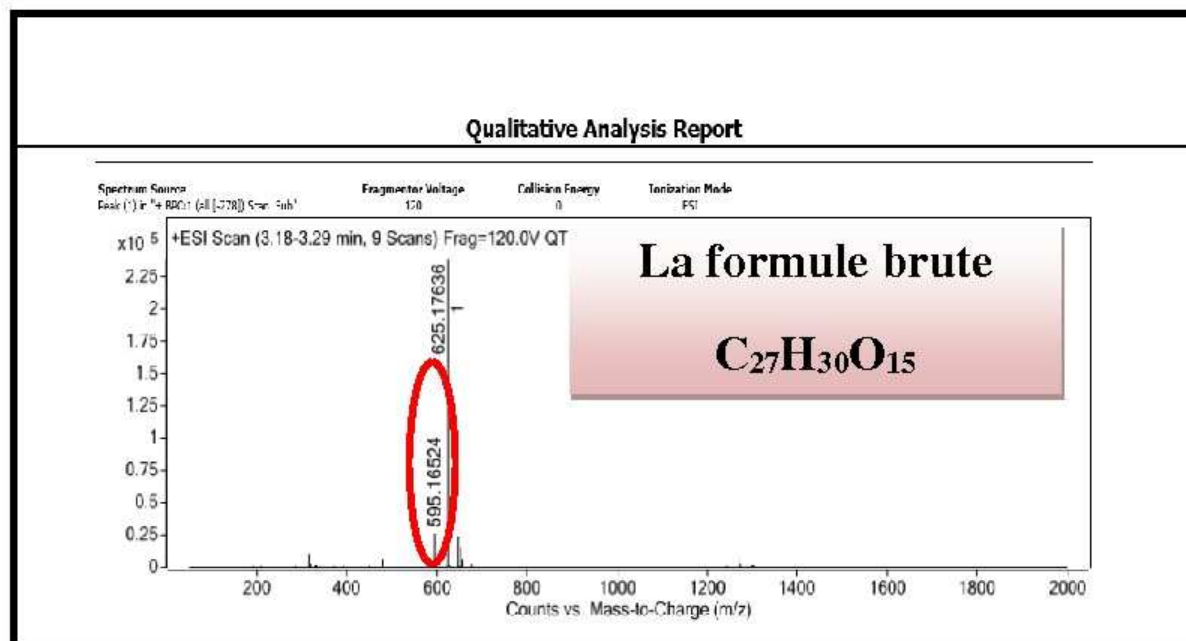


Spectre 57-3: Spectre RMN ¹³C (étalement 3) (125 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 10

Les données relatives aux spectres de RMN ¹H et ¹³C de ce composé sont reportées dans le tableau 28.

$C_{27}H_{30}O_{15}$: 594,15847) orientant donc vers la formule brute $C_{27}H_{30}O_{15}$ soit une molécule comportant 13 insaturations.

Exposé à la lumière de Wood ($\lambda = 365\text{nm}$), ce composé montre une fluorescence noir-violette orientant vers un composé flavonique de type flavone ou flavonol 3-OR.



Spectre 61: Spectre HR-ESI-MS (+) du composé 11

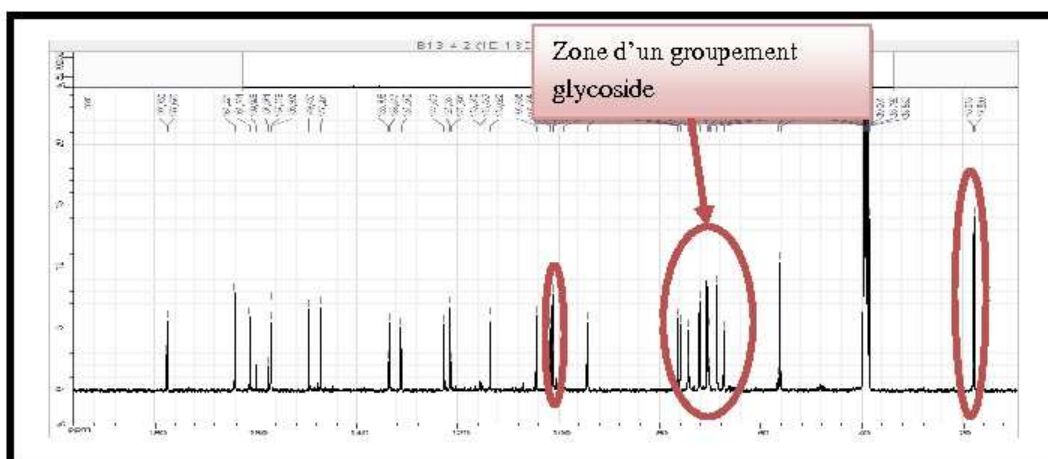
Tableau 29. Analyse de la composition élémentaire des différents ions.

Qualitative Analysis Report

Formula Calculator Results							
Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Mz	Ion Species	Score
C26 H20 N14 O6		624.16974	624.16902	-1.14	625.17701	C26 H21 N14 O6	98.4
C28 H32 O16		624.16977	624.16901	-1.09	625.17701	C28 H33 O16	98.34
C29 H20 N4 O12		624.16972	624.17037	1.04	625.17701	C29 H20 N4 O12	90.25
C25 H21 N10 O10		624.16973	624.16769	-3.28	625.17701	C25 H25 N10 O10	91.21
C30 H24 N8 O8		624.16973	624.17171	3.17	625.17701	C30 H25 N8 O8	93.26
C42 H20 N6 O		624.16977	624.16986	0.72	625.17701	C42 H21 N6 O	92.79
C11 H24 N2 O5		624.16972	624.16852	-1.92	625.17701	C11 H25 N2 O5	91.81
C46 H24 O3		624.16972	624.17254	4.53	625.17701	C46 H25 O3	81.64
C27 H30 O15		594.15911	594.15847	-1.08	595.1664	C27 H31 O15	98.65
C20 H20 N4 O11		594.15912	594.15901	-1.10	595.1664	C20 H22 N4 O11	90.22
C25 H18 N14 O5		594.15912	594.15946	3.13	595.1664	C25 H19 N14 O5	98.12
C24 H22 N10 O9		594.15912	594.15712	-3.37	595.1664	C24 H23 N10 O9	94.04
C29 H22 N8 O7		594.15912	594.16115	3.41	595.1664	C29 H23 N8 O7	92.63
C11 H18 N6		594.15912	594.15929	0.3	595.1664	C11 H19 N6	92.46
C40 H22 N2 O4		594.15911	594.15796	-1.94	595.1664	C40 H23 N2 O4	91.71
C45 H22 O2		594.15911	594.16198	4.83	595.1664	C45 H23 O2	80.65

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre 62-1) de ce composé, montre qu'il s'agit bien d'un flavonoïde de type flavone ou flavonol caractérisé par :

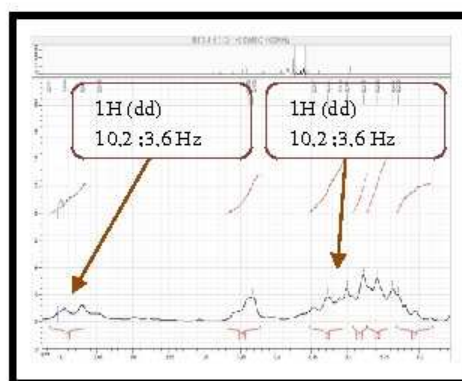
- Un doublet d'intégration 2H, à $\delta_{\text{H}} = 7,94$ ppm ($J = 8,8$ Hz) attribuable à H-2'et H-6'.
- Un doublet d'intégration 2H, à $\delta_{\text{H}} = 6,88$ ppm ($J = 8,8\text{Hz}$) attribuable à H-3' et H-5'.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 6,38$ ppm ($J = 2,0$ Hz) attribuable à H-8.



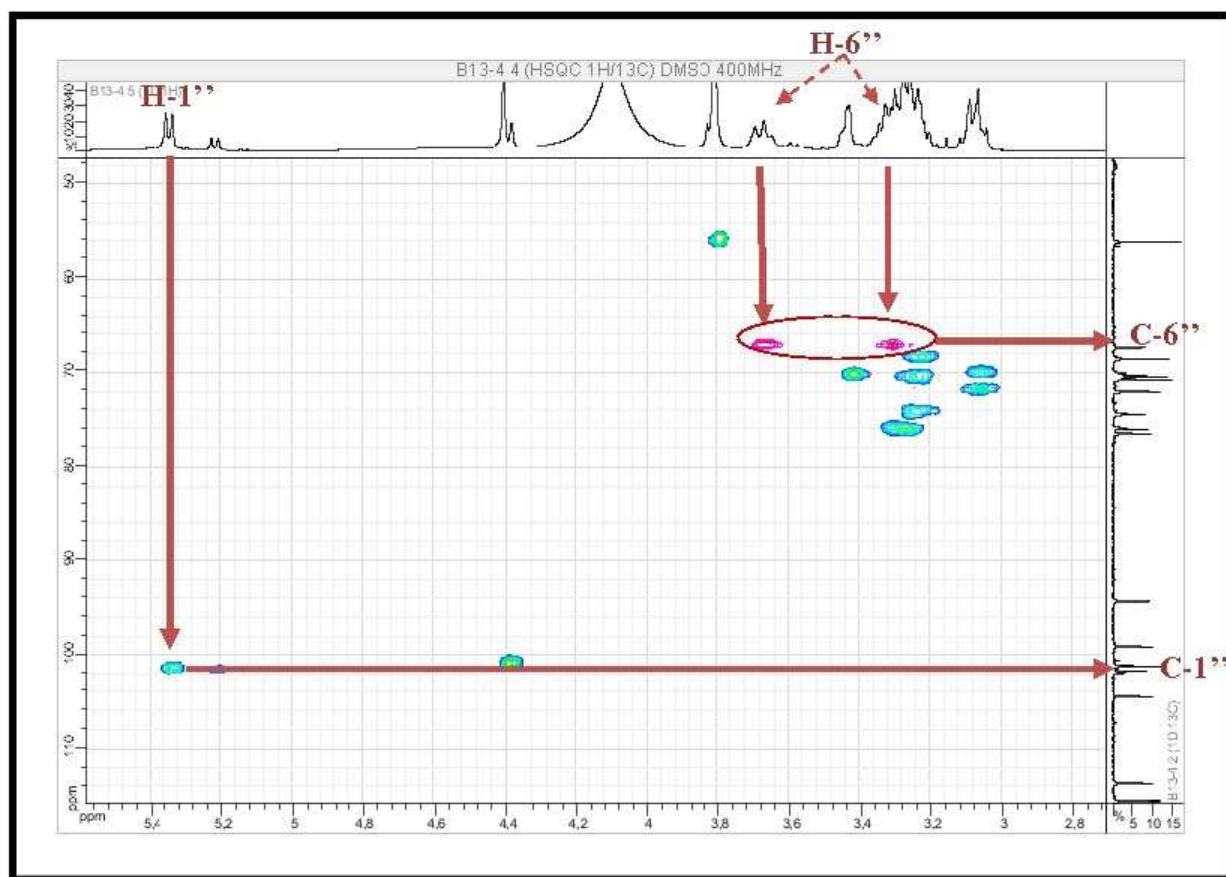
Spectre 63-1: Spectre RMN ^{13}C (étalement 1) (100MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé 11

Le premier hexose comporte en plus du proton anomérique H-1'' ($\delta_{\text{H}} = 5,34$ ppm ; d ($J = 7,6$ Hz) ; $\delta_{\text{C}} = 101,70$ ppm) dont les valeurs de son déplacement chimique et celle de son carbone ainsi que de sa constante de couplage avec le proton H-2'', son voisin sont en faveur d'un sucre relié à l'aglycone par une jonction O- β -glycosidique :

- ✓ un CH_2 à $\delta_{\text{H}} = 3,67$ ppm (1H; dd ; $J = 10,2 ; 3,6$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 3,31$ ppm (1H ; dd ; $J = 10,2 ; 3,6$ Hz) $\delta_{\text{C}} = 67,43$ ppm, attribuable au proton H-6''a et H-6''b de la position C-6'' de cet hexose.



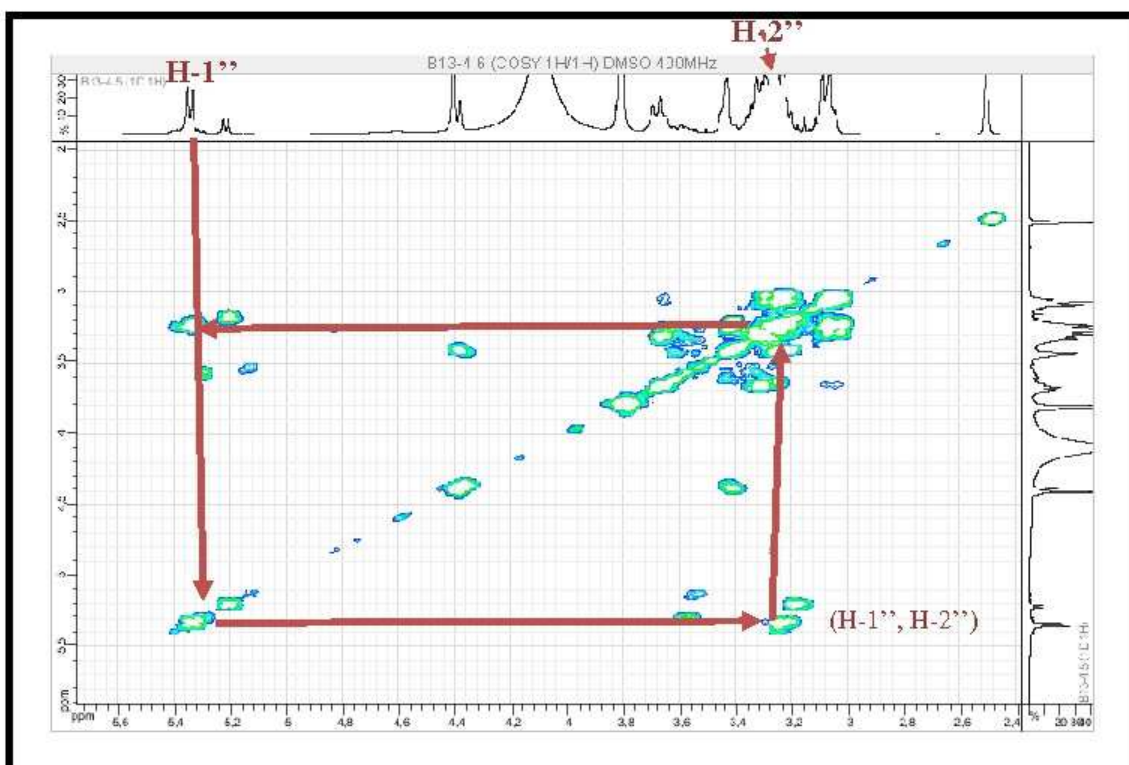
Spectre 62-2: Spectre RMN ^1H (étalement 2) (400MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé 11



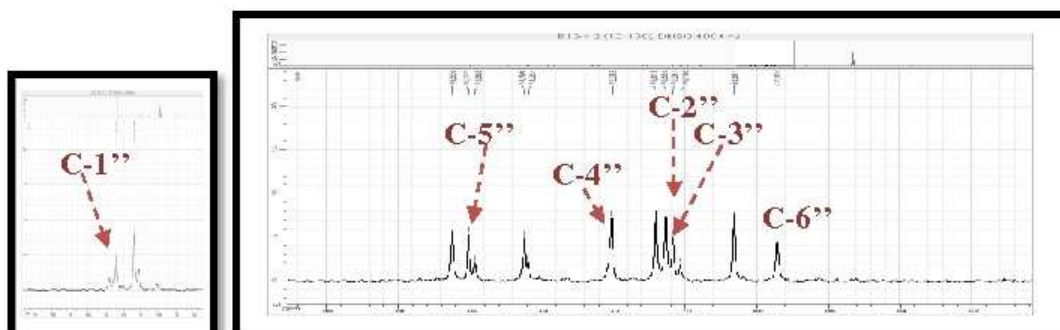
Spectre 64-1: Spectre HSQC (étalement 1) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 11

Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre 65-1), le proton anomérique H-1'' montre une tache de corrélation avec le signal d'un proton à $\delta_H = 3,23$ ppm ce proton est attribuable à H-2'' ($\delta_C = 70,53$ ppm). Toujours sur le spectre relatif à l'expérience COSY, ce proton corrèle avec le proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,42$ ppm attribuable à H-3'' ($\delta_C = 70,34$ ppm). Le spectre relatif à l'expérience COSY montre également des taches de corrélation entre les protons H-6''a et H-6'' b et le proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,25$ ppm attribuable à H-5'' ($\delta_C = 76,03$ ppm). Ce dernier corrèle avec un proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,04$ ppm attribuable à H-4'' ($\delta_C = 72,05$ ppm).

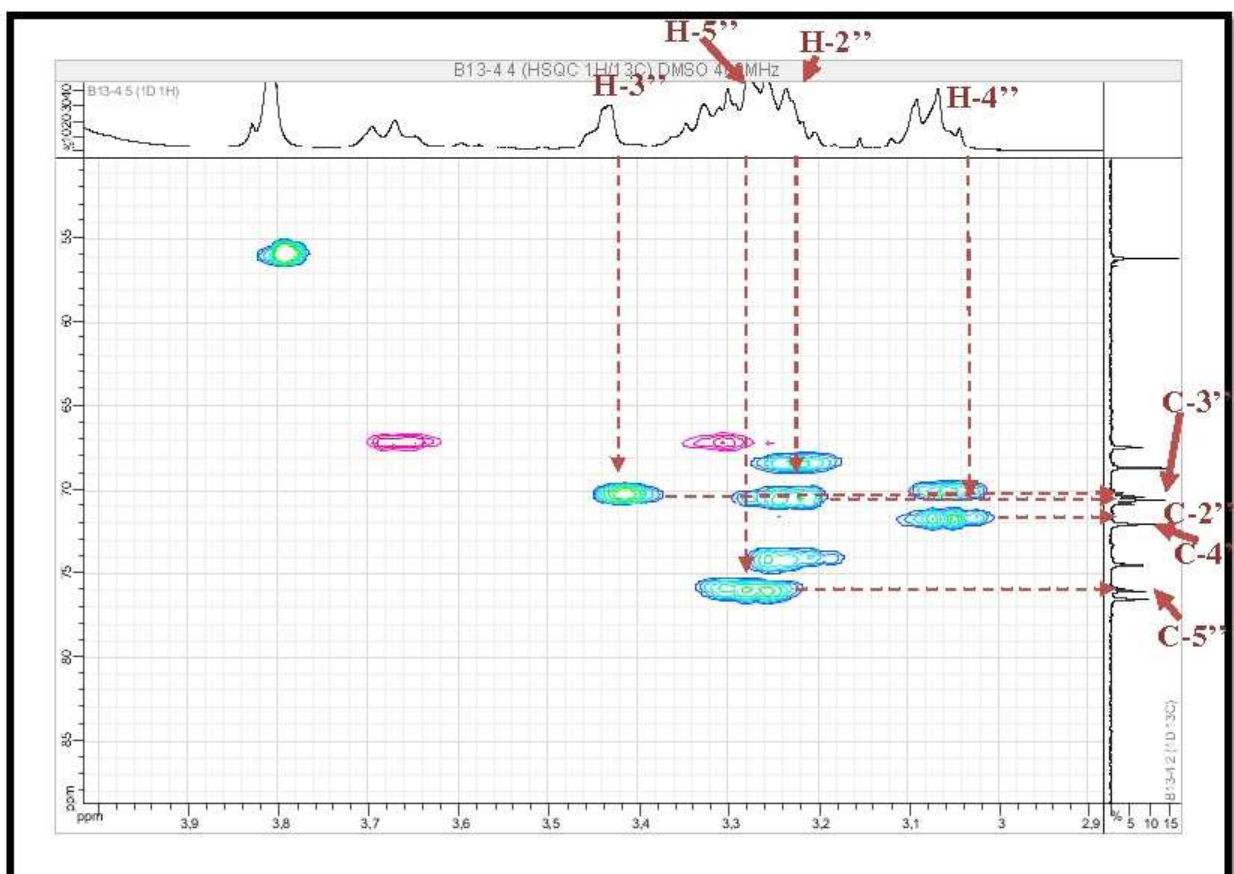
Les valeurs des déplacements chimiques des carbones de cet hexose sont en accord avec celles connues dans la littérature pour le groupement glucopyranosyle [56].



Spectre 65-1: Spectre COSY (étalement 1) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 11



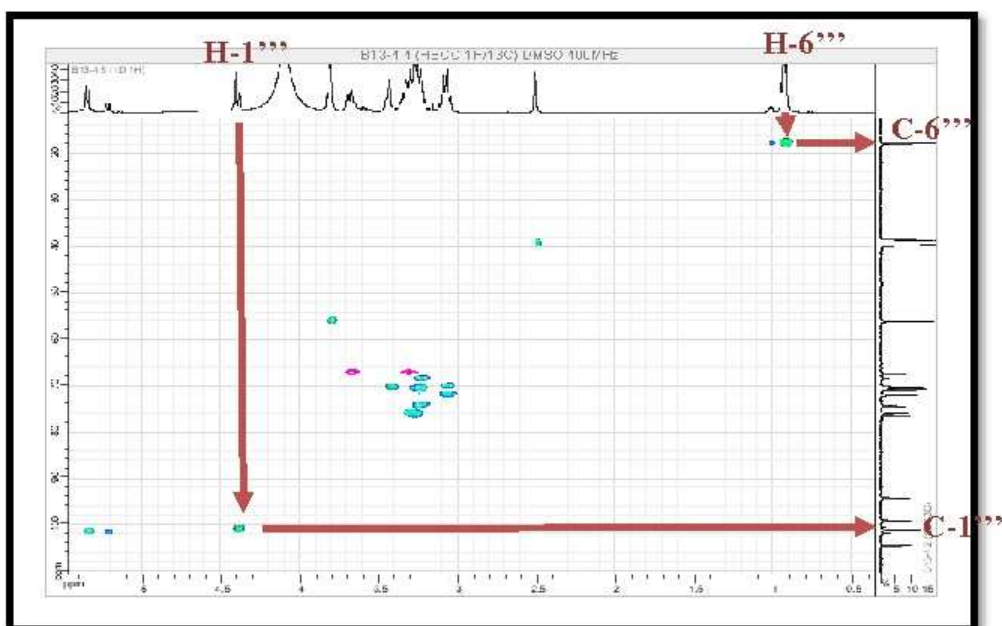
Spectre 63-2: Spectre RMN ¹³C (étalement 2) (100MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 11



Spectre 64-2: Spectre HSQC (étalement 2) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 11

Le deuxième hexose comporte :

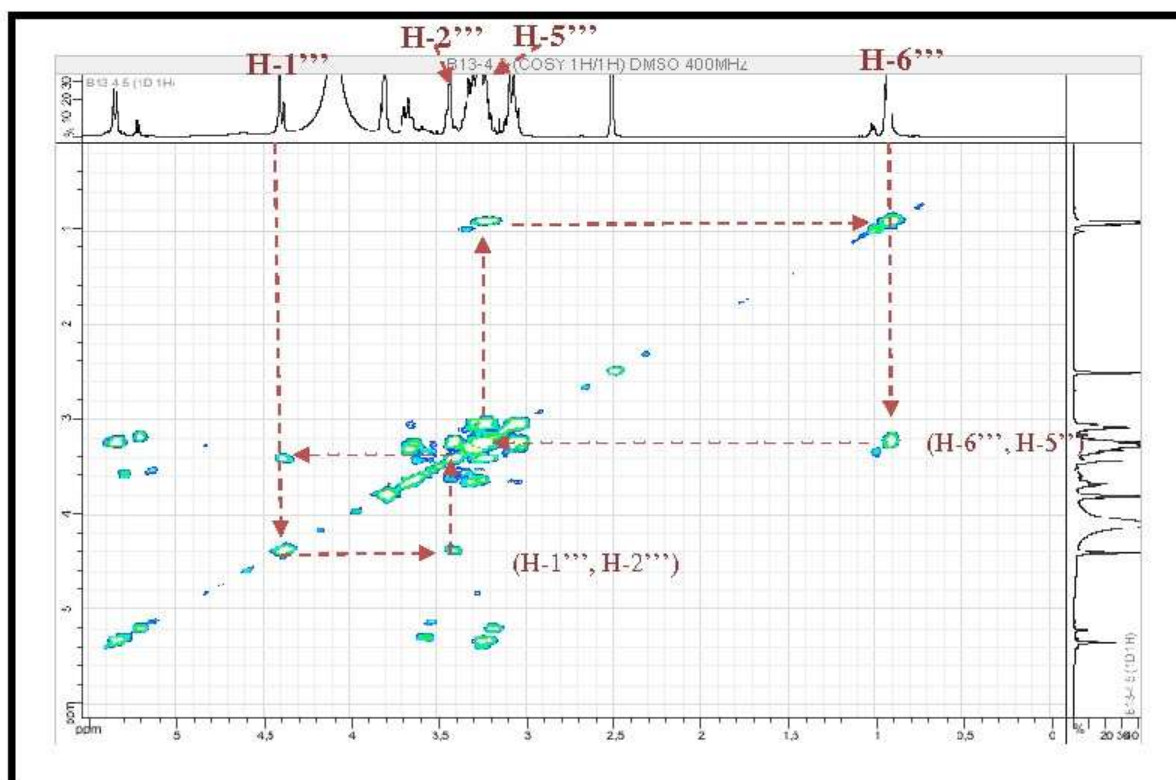
- ✓ comme signalé plus haut, un CH₃ à $\delta_H = 0,92$ ppm (3H; d ; J = 6,4 Hz) $\delta_C = 17,83$ ppm, attribuable au H₃-6'''.
- ✓ comme signalé plus haut, un groupement CH à $\delta_H = 4,40$ ppm, J = 1,2 Hz, $\delta_C = 101,19$ ppm attribuable à la position anomérique C-1'''. La valeur très faible de la constante de couplage du proton anomérique et la valeur du déplacement chimique de son carbone indiquent la présence d'une jonction O- α -L-glycosidique et une orientation équatoriale du proton H-2'''.



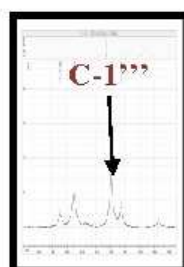
Spectre 64-3: Spectre HSQC (étalement 3) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 11

Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre 65-2), le proton anomérique H-1''' montre une tache de corrélation avec le signal d'un proton à $\delta_H = 3,42$ ppm ce proton est attribuable à H-2''' ($\delta_C = 70,34$ ppm). Toujours sur le spectre relatif à l'expérience COSY, ce proton corrèle avec le proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,24$ ppm attribuable à H-3''' ($\delta_C = 70,81$ ppm). Le spectre COSY montre également une tache de corrélation entre les protons H-6''' et le proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,21$ ppm attribuable à H-5''' ($\delta_C = 68,64$ ppm). Grâce à ce dernier, le signal du proton H-4''' est repéré sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,06$ ppm ($\delta_C = 70,53$ ppm) sur le spectre COSY.

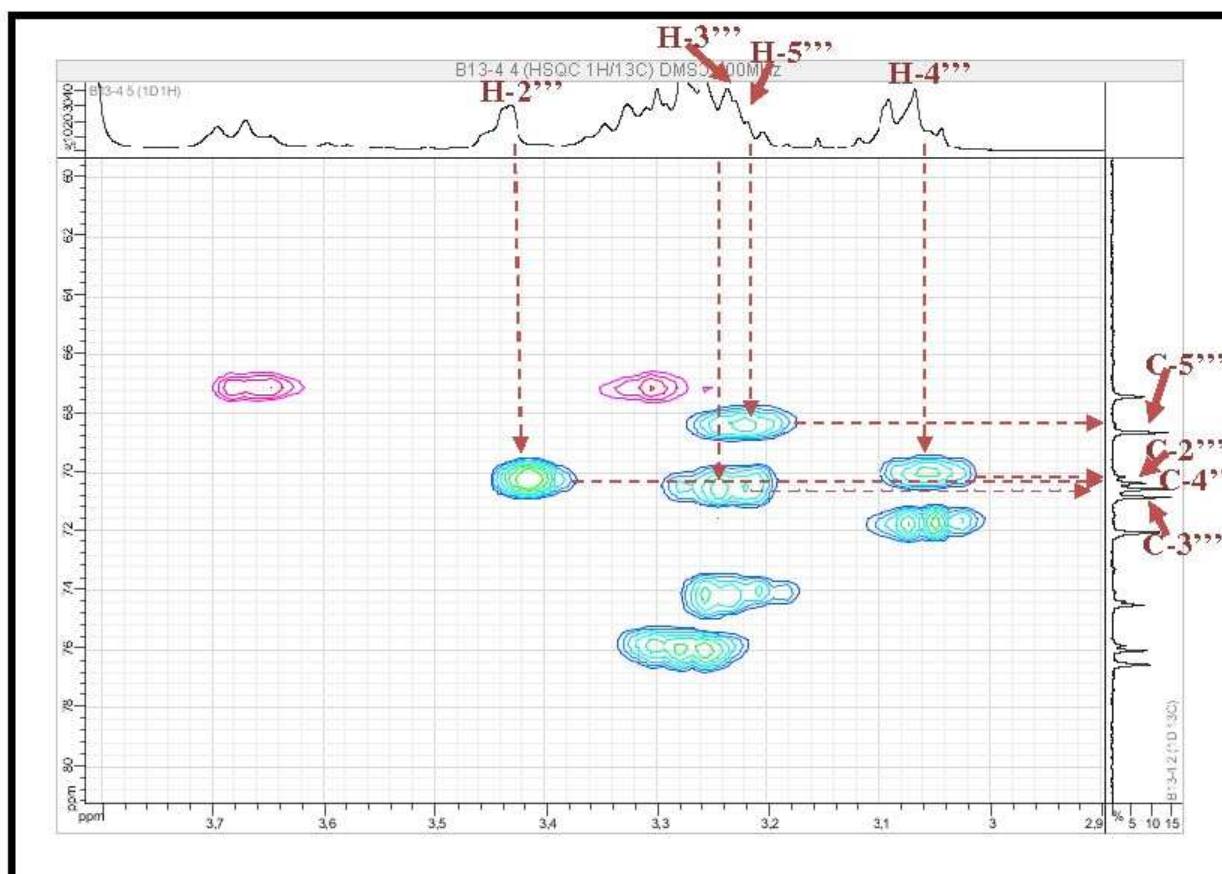
Les valeurs des déplacements chimiques des carbones de cet hexose sont en accord avec celles connues dans la littérature pour le groupement rhamnopyranosyle [56].



Spectre 65-2: Spectre COSY (étalement 2) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 11



Spectre 63-3: Spectre RMN ¹³C (étalement 3) (100MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 11

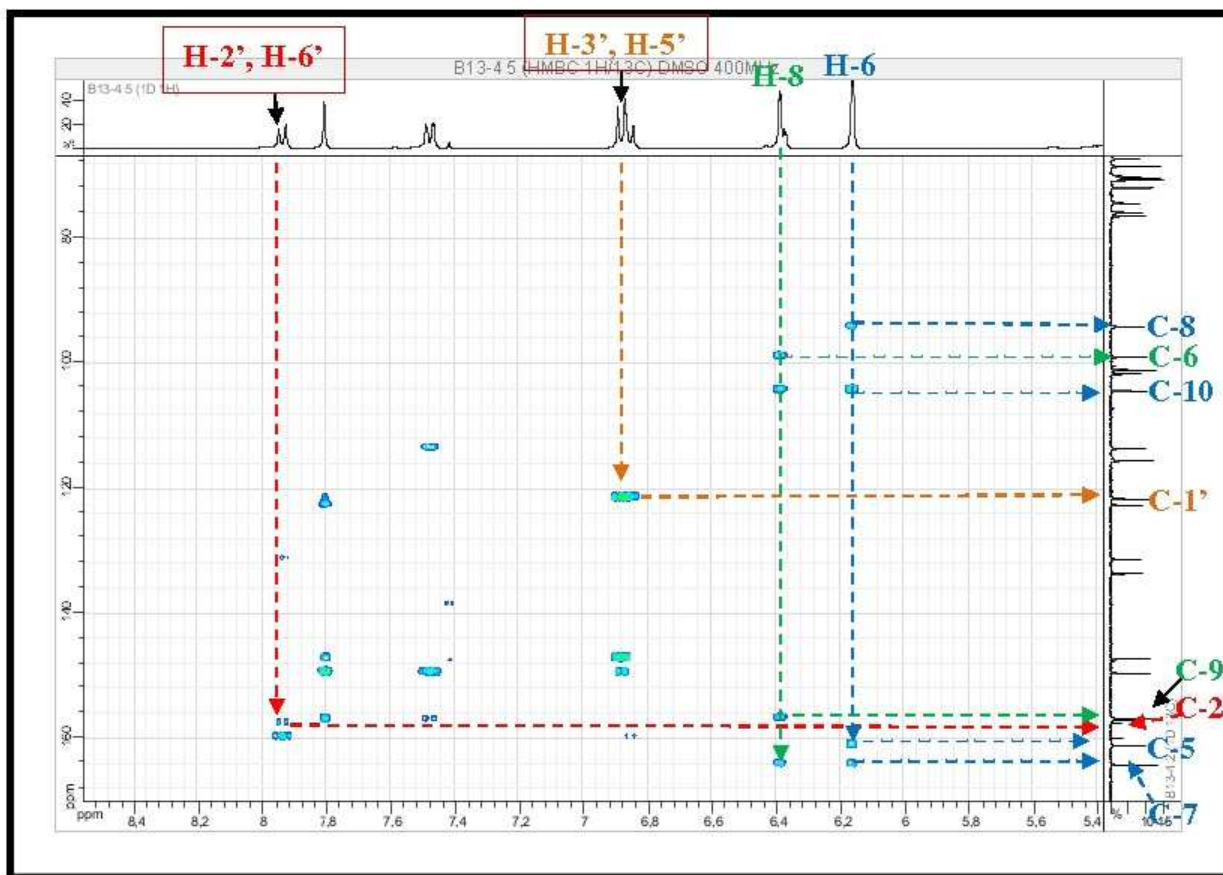


Spectre 64-4: Spectre HSQC (étalement 4) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 11

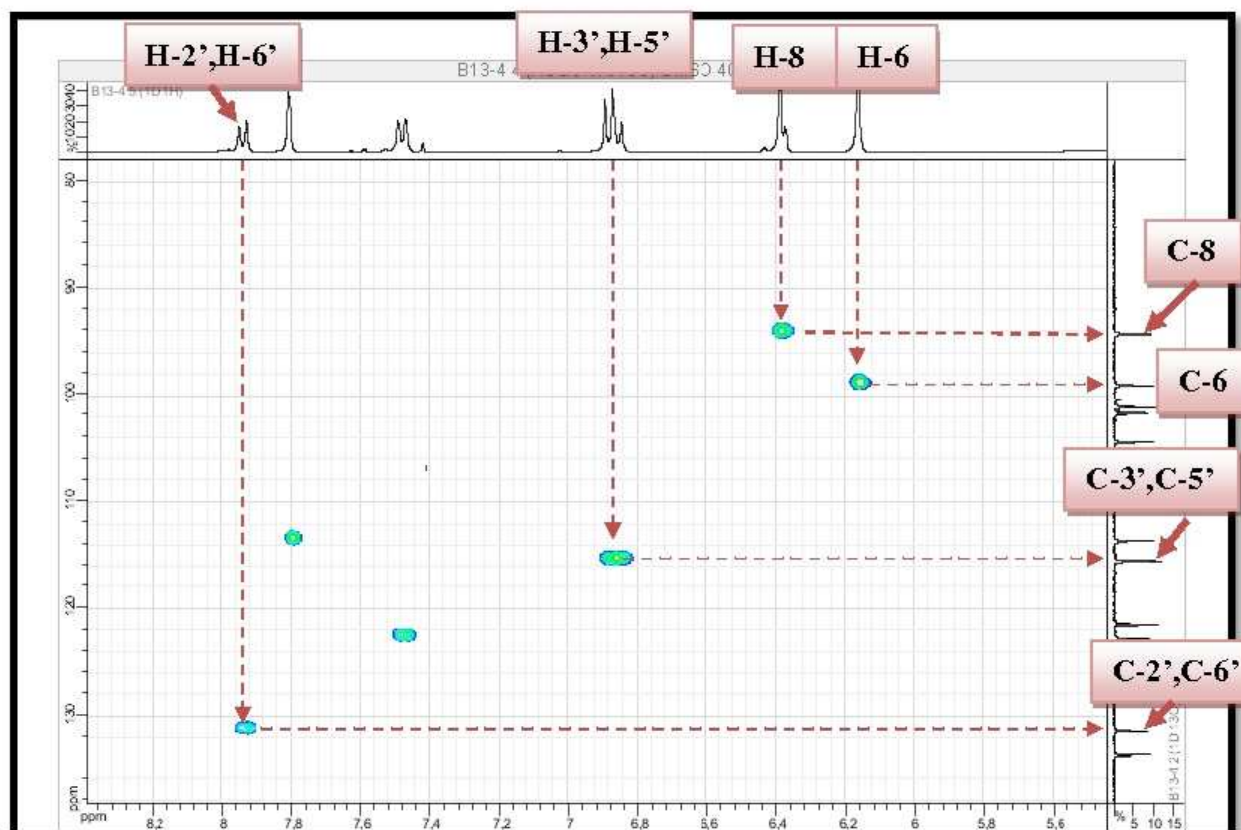
Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre 66-1), la corrélation observée entre H-5' et H-3' et le carbone à $\delta_C = 121,58$ ppm permet son attribution au carbone C-1' du squelette flavonique; les corrélations relevées entre H-2' et H-6', H-3' et H-5' et le carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 159,92$ ppm permettent l'attribution de ce carbone à C-4'; les corrélations entre H-6' et H-2' et le carbone quaternaire à $\delta_C = 157,11$ ppm permettent son attribution à C-2.

Toujours sur le spectre relatif à l'expérience HMBC on observe une tache de corrélation entre H-8 et H-6 et le carbone à 164,22 ppm que nous pouvons alors attribuer à C-7.-Par ailleurs et toujours sur le même spectre (HMBC), le proton H-6 montre une tache de corrélation avec le carbone à $\delta_C = 161,14$ ppm que nous pouvons par conséquent attribuer à C-5. Quant au carbone C-9, son signal est localisé à $\delta_C = 156,90$ ppm grâce à la corrélation observée entre ce carbone et le proton H-8.

Les protons H-8 et H-6 corrélient également avec le carbone quaternaire résonant à $\delta_C = 104,45$ ppm qui ne peut être attribué qu'au C-10 vue la valeur de son déplacement chimique. Cette analyse permet enfin de localiser le C-3 à $\delta_C = 133,55$ ppm dont la valeur du déplacement chimique suppose sa substitution par un groupement oxygéné. En effet on retour

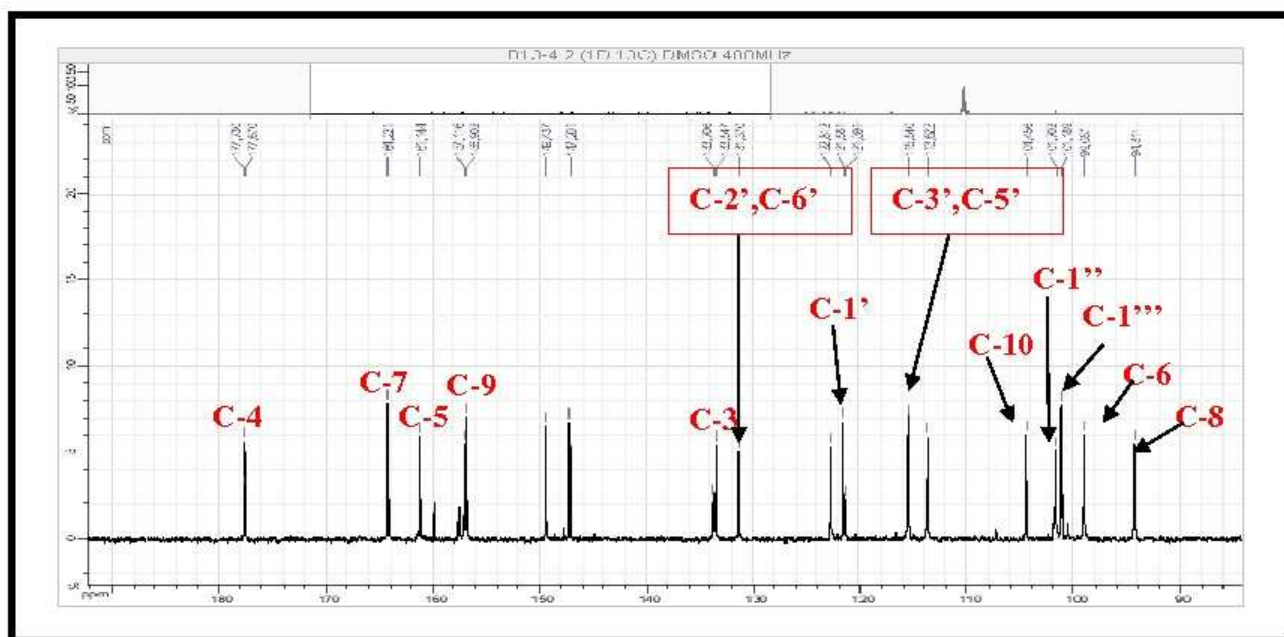


Spectre 66-1: Spectre HMBC (étalement 1) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 11

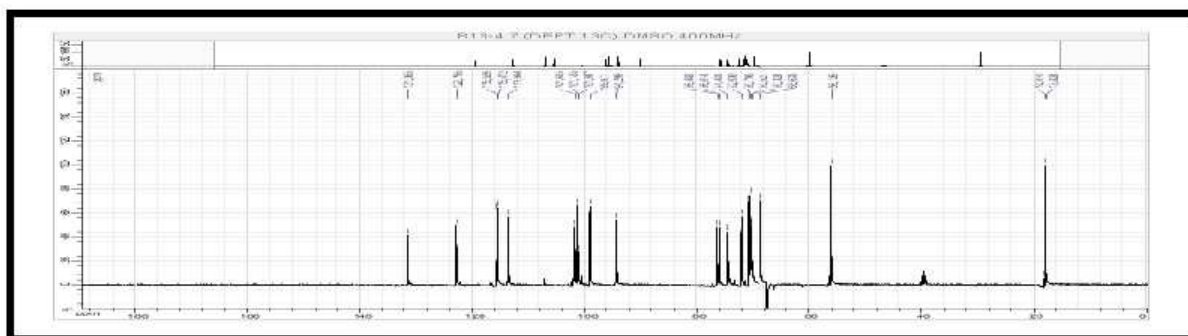


Spectre 64-5: Spectre HSQC (étalement 5) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 11

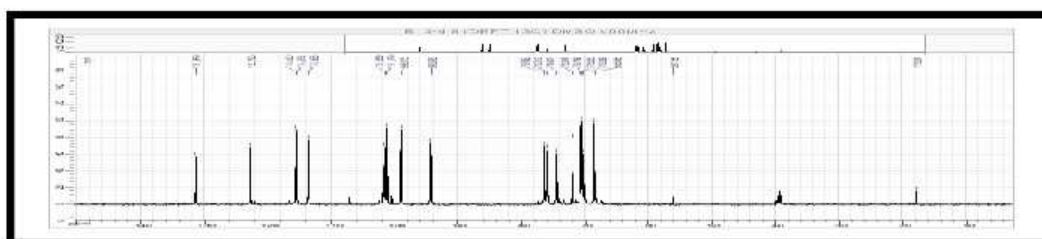
Toutes ces données sont reportées sur le spectre le ^{13}C .



Spectre 63-4: Spectre RMN ^{13}C (étalement 4) (100MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé 11



Spectre 67: Spectre RMN ^{13}C 135 (100MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé 11



Spectre 68: Spectre RMN ^{13}C 90 (100MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé 11

Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau 30.

Tableau 30. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **11**

Glucose		
Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1''	5,34 (d ; 7,6Hz)	101,70
2''	3,23 (m)	70,53
3''	3,42 (m)	70,34
4''	3,04 (m)	72,05
5''	3,25 (m)	76,03
6''	3,67 (dd ; 10,2 ; 3,6 Hz) 3,31 (dd ; 10,2 ; 3,6 Hz)	67,43
Rhamnose		
1'''	4,40 (d ; 1,2 Hz)	101,19
2'''	3,42 (m)	70,34
3'''	3,24 (m)	70,81
4'''	3,06 (m)	70,53
5'''	3,21 (m)	68,64
6'''	0,92 (d ; 6,4 Hz)	17,83
Flavonoïde		
2	/	157,11
3	/	133,55
4	/	177,67
5	/	161,14
6	6,16 (d ; 2,0 Hz)	99,08
7	/	164,22
8	6,38 (d ; 2,0 Hz)	94,31
9	/	156,90
10	/	104,45
1'	/	121,58
2'	7,94 (d ; 8,8 Hz)	131,37
3'	6,88 (d ; 8,8 Hz)	115,54
4'	/	159,92
5'	6,88 (d ; 8,8 Hz)	115,54
6'	7,94 (d ; 8,8 Hz)	131,37

IV.3.8. Elucidation structurale du composé 12 (B14-3)

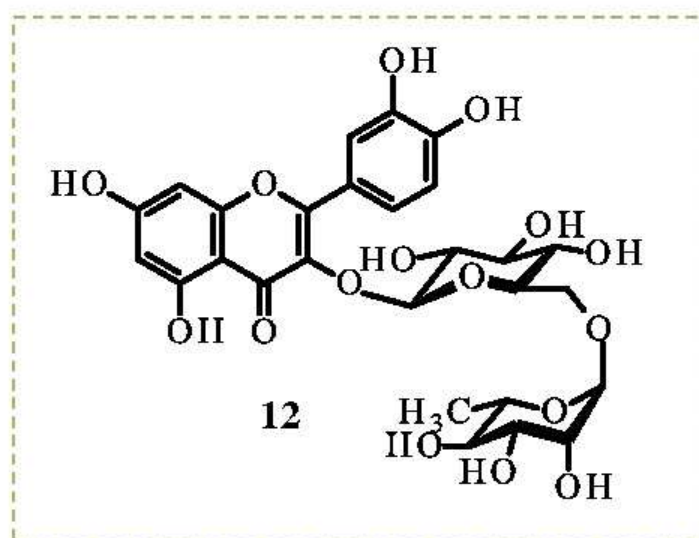


Figure 88. Structure du composé 12, B14-3.

L'examen du spectre de masse à haute résolution en mode electrospray positif (Spectre 69) du composé 12 montre deux pics relatifs à deux ions adduits à $m/z = 611,15894$ et $m/z = 633,1404$ correspondant à $[M+H]^+$ et $[M+Na]^+$, respectivement. Ce résultat est appuyé par le calcul de la masse exacte (Tableau 31) qui donne une valeur $m/z = 610,1534$ (calculé pour $C_{27}H_{30}O_{16}$: 610,15338). Orientant avec certitude vers la formule brute $C_{27}H_{30}O_{16}$. Exposé à la lumière de Wood ($\lambda = 365\text{nm}$), ce composé montre une fluorescence noir-violette orientant vers un composé flavonique de type flavone ou flavonol 3-OR. On peut remarquer d'ores et déjà que ce flavonoïde comporte un atome d'oxygène de plus que le flavonoïde précédent (nicotiflorine).

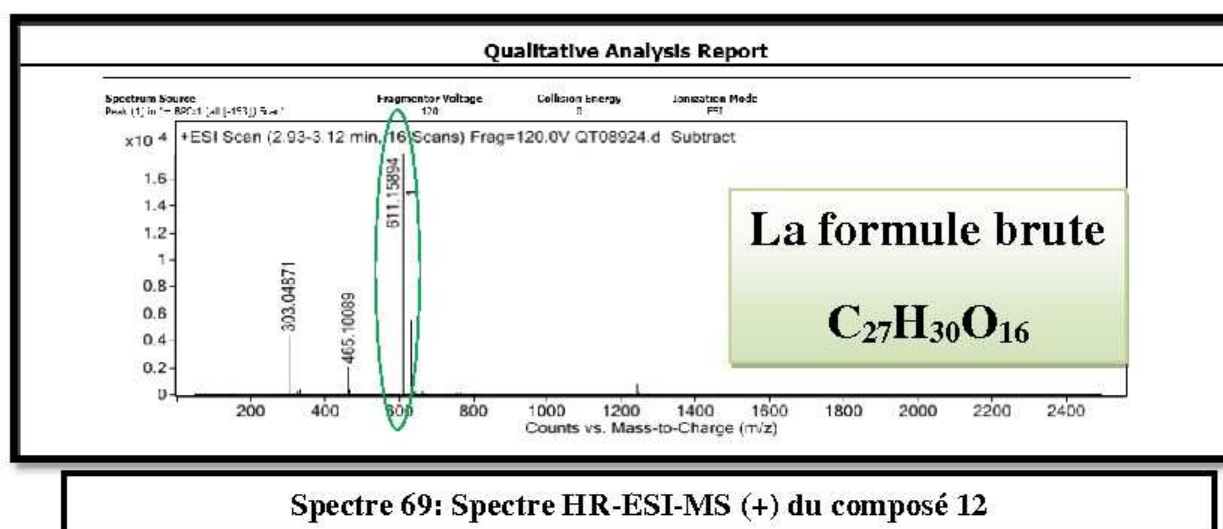


Tableau 31. Analyse de la composition élémentaire des différents ions.

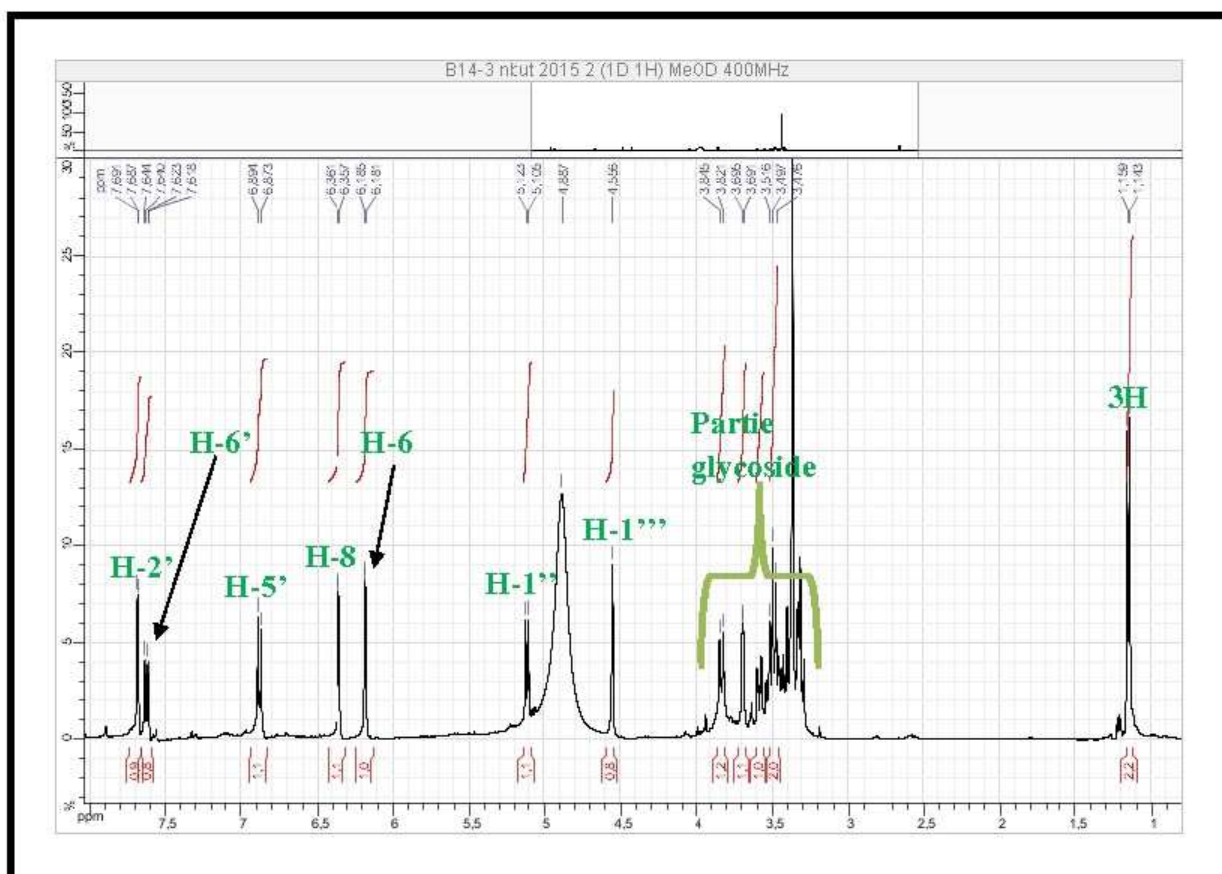
Formula Calculator Results								
Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Mz	Ion Species	Score	
C22 H30 N2 O10		610.15110	610.14926	2.08	633.1404	C22 H30 N2 Na O10	95.5	
C27 H30 O16	TRUE	610.15118	610.15338	-2.22	633.1404	C27 H30 Na O16	91.97	
C31 H30 O11 S		610.15118	610.15088	-0.49	633.1404	C31 H30 Na O11 S	88.51	
C19 H34 N2 O18 S		610.15119	610.15273	-2.54	633.1404	C19 H34 N2 Na O18 S	87.51	
C32 H26 N4 O7 S		610.15110	610.15222	-1.60	633.1404	C32 H26 N4 Na O7 S	84.10	
C23 H34 N2 O13 S2		610.15119	610.15073	-1.57	633.1404	C23 H34 N2 Na O13 S2	82.51	
C27 H30 O16	TRUE	610.15166	610.15338	-2.83	611.15894	C27 H31 O16	93.54	
C22 H20 N2 O18		610.15166	610.14926	-2.76	611.15894	C22 H21 N2 O18	92.68	
C19 H34 N2 O18 S		610.15166	610.15273	-1.76	611.15894	C19 H35 N2 O18 S	88.65	
C31 H30 O11 S		610.15166	610.15088	-1.27	611.15894	C31 H31 O11 S	87.09	
C32 H26 N4 O7 S		610.15166	610.15222	-0.91	611.15894	C32 H27 N4 O7 S	84.82	
C23 H34 N2 O13 S2		610.15166	610.15023	-2.35	611.15894	C23 H35 N2 O13 S2	80.33	
C21 H20 O12	TRUE	464.09361	464.09548	-4.07	465.10089	C21 H21 O12	93.13	
C25 H20 O7 S		464.09361	464.09297	-1.38	465.10089	C25 H21 O7 S	89.29	
C16 H20 N2 O14		464.09361	464.09145	-4.66	465.10089	C16 H21 N2 O14	89.1	
C26 H16 N4 O3 S		464.09362	464.09431	-1.5	465.10089	C26 H17 N4 O3 S	86.05	
C13 H24 N2 O14 S		464.09362	464.09482	-2.6	465.10089	C13 H25 N2 O14 S	83.01	
C15 H10 O7	TRUE	302.04144	302.04265	-4.03	303.04871	C15 H11 O7	95.28	
C19 H10 O2 S		302.04144	302.04015	-4.26	303.04871	C19 H11 O2 S	93.84	
C7 H14 N2 O9 S		302.04144	302.042	-1.06	303.04871	C7 H15 N2 O9 S	80.40	

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre 70-1) de ce composé, montre qu'il s'agit bien d'un flavonoïde dont le cycle B est trisubstitué dans les positions : 1', 3' et 4' contrairement au précédent dont le cycle B est para-substitué (position : 1' et 4') en effet ce spectre montre :

- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 7,68$ ppm ($J = 2,4$ Hz) attribuable à H-2'.
- Un doublet de doublets d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 7,62$ ppm ($J = 8,4 ; 2,4$ Hz) attribuable à H-6'.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 6,88$ ppm ($J = 8,4$ Hz) attribuable à H-5'.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 6,36$ ppm ($J = 2,0$ Hz) attribuable à H-8.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 6,18$ ppm ($J = 2,0$ Hz) attribuable à H-6.

A ce stade de notre analyse il apparait clairement que cette molécule est un dérivé de la quercétine substitué par deux entités sucre de type hexose vue sa formule brute. En effet sur le spectre proton on observe :

- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 5,11$ ppm ($J = 7.2$ Hz) attribuable au proton anomérique H-1'' de la première entité, $\delta_{\text{C}} = 103,48$ ppm.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_{\text{H}} = 4,55$ ppm ($J = 1,2$ Hz) attribuable au proton anomérique H-1''' de la seconde entité.
- Un doublet d'intégration 3H, à $\delta_{\text{H}} = 1,15$ ppm ($J = 6,4$ Hz) attribuable à H₃-6''' d'une des deux entités.



Spectre 70-1: Spectre RMN ^1H (étalement 1) (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 12

L'examen approfondi des spectres proton, DEPT (Spectre 71), ^{13}C (Spectre 72), HSQC (Spectre 73), COSY (Spectre 74) et HMBC (Spectre 75) a permis de mettre en évidence la présence des groupements glucopyranosyle et rhamnopyranosyle dans cette molécule par la valeur des déplacements chimiques de leurs atomes de carbone. En effet grâce à l'analyse des corrélations relevées sur ces spectres les cinq autres atomes de carbone de la première entité résonnent à :

$\delta_{\text{C}} = 74,38$ ppm, C-2'' ($\delta_{\text{H}} = 3,50$ ppm).

$\delta_{\text{C}} = 75,77$ ppm, C-3'' ($\delta_{\text{H}} = 3,35$ ppm)

$\delta_{\text{C}} = 70,03$ ppm, C-4'' ($\delta_{\text{H}} = 3,29$ ppm).

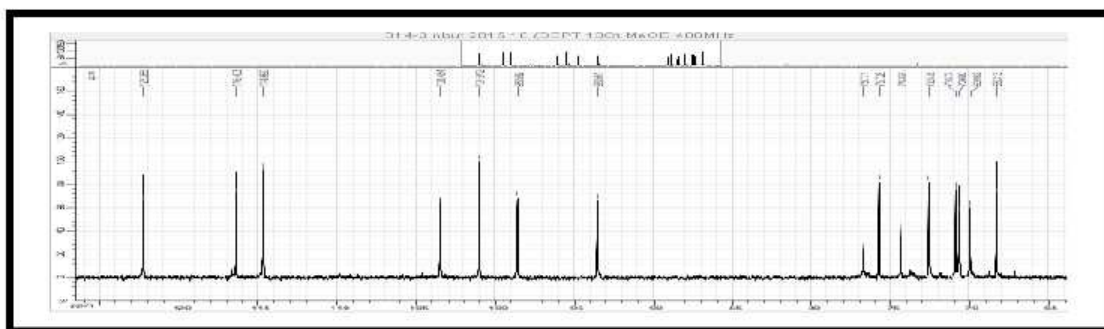
$\delta_{\text{C}} = 76,81$ ppm, C-5'' ($\delta_{\text{H}} = 3,43$ ppm)

$\delta_{\text{C}} = 67,23$ ppm, C-6'' ($\delta_{\text{H}} = 3,82$ ppm (1H; dd ; $J = 9,6 ; 3,6$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 3,39$ ppm (1H ; m) attribuable au proton H-6''a et H-6''b, respectivement.

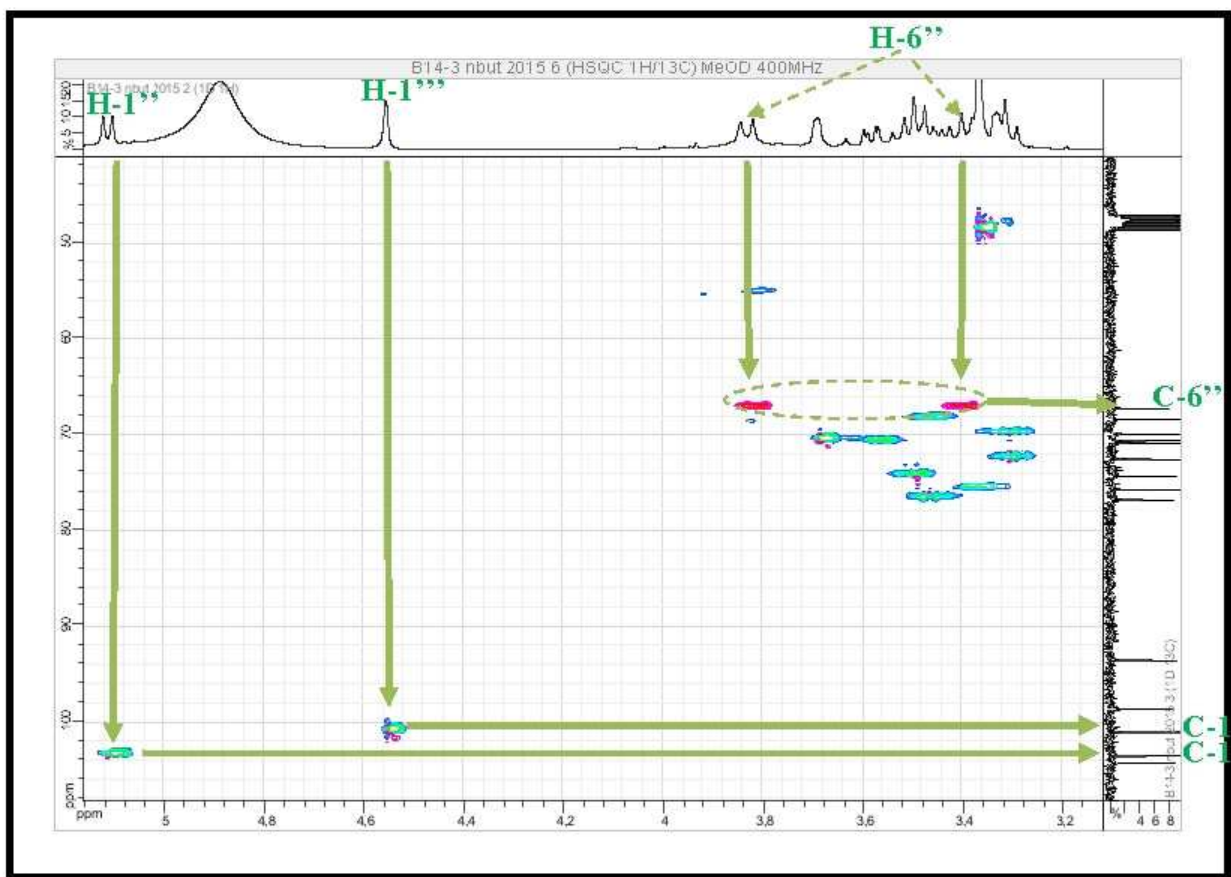
Les cinq autres carbones de la deuxième entité résonnent à :

$\delta_{\text{C}} = 70,71$ ppm, C-2''' ($\delta_{\text{H}} = 3,68$ ppm)

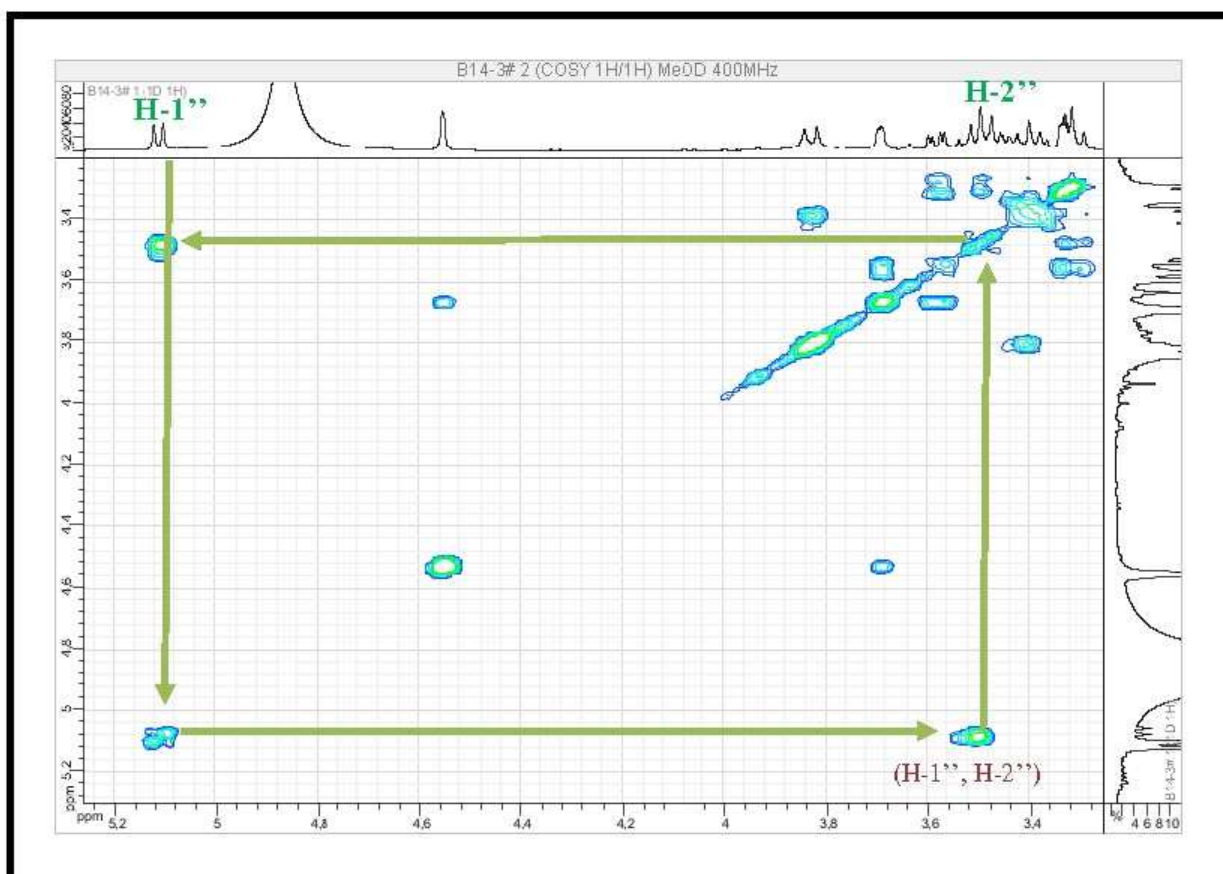
$\delta_{\text{C}} = 70,92$ ppm, C-3''' ($\delta_{\text{H}} = 3,57$ ppm)



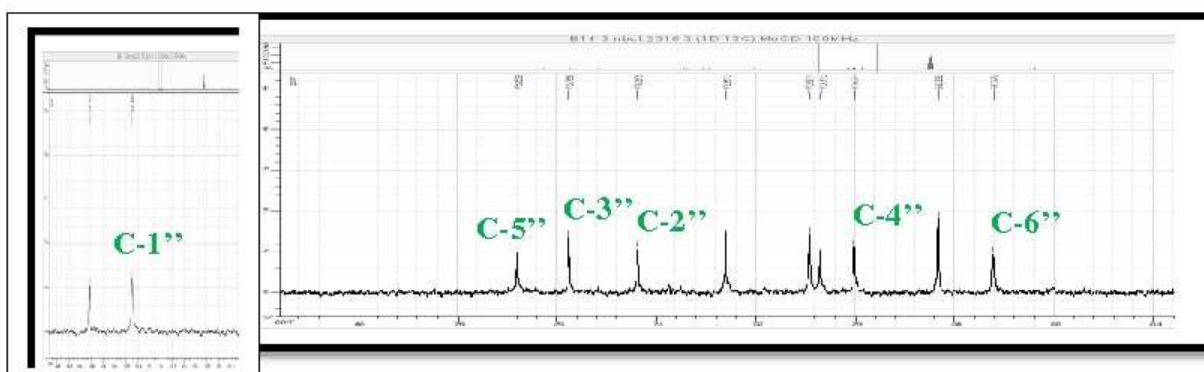
Spectre 71-b: Spectre RMN DEPT ^{13}C 90 (100MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 12



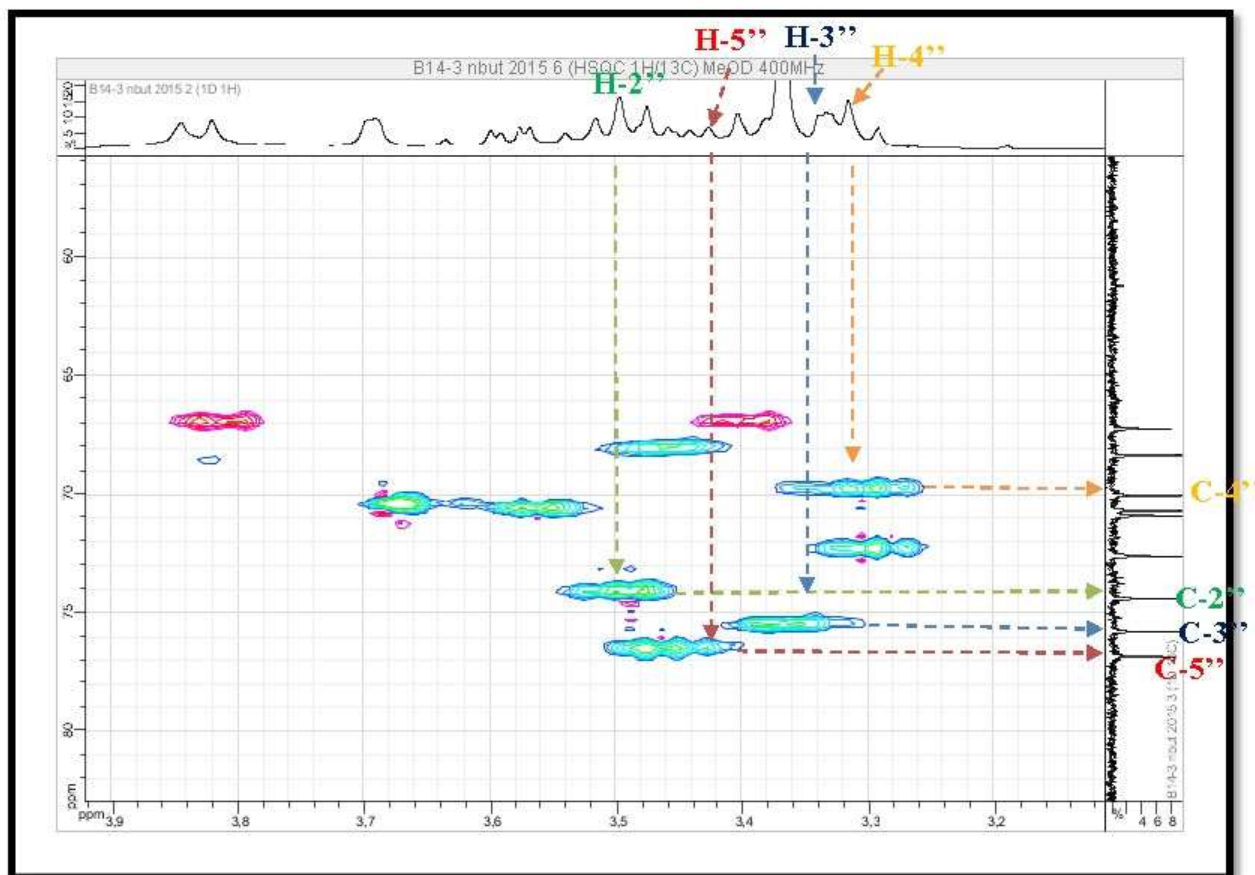
Spectre 73-1: Spectre HSQC (étalement 1) (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 12



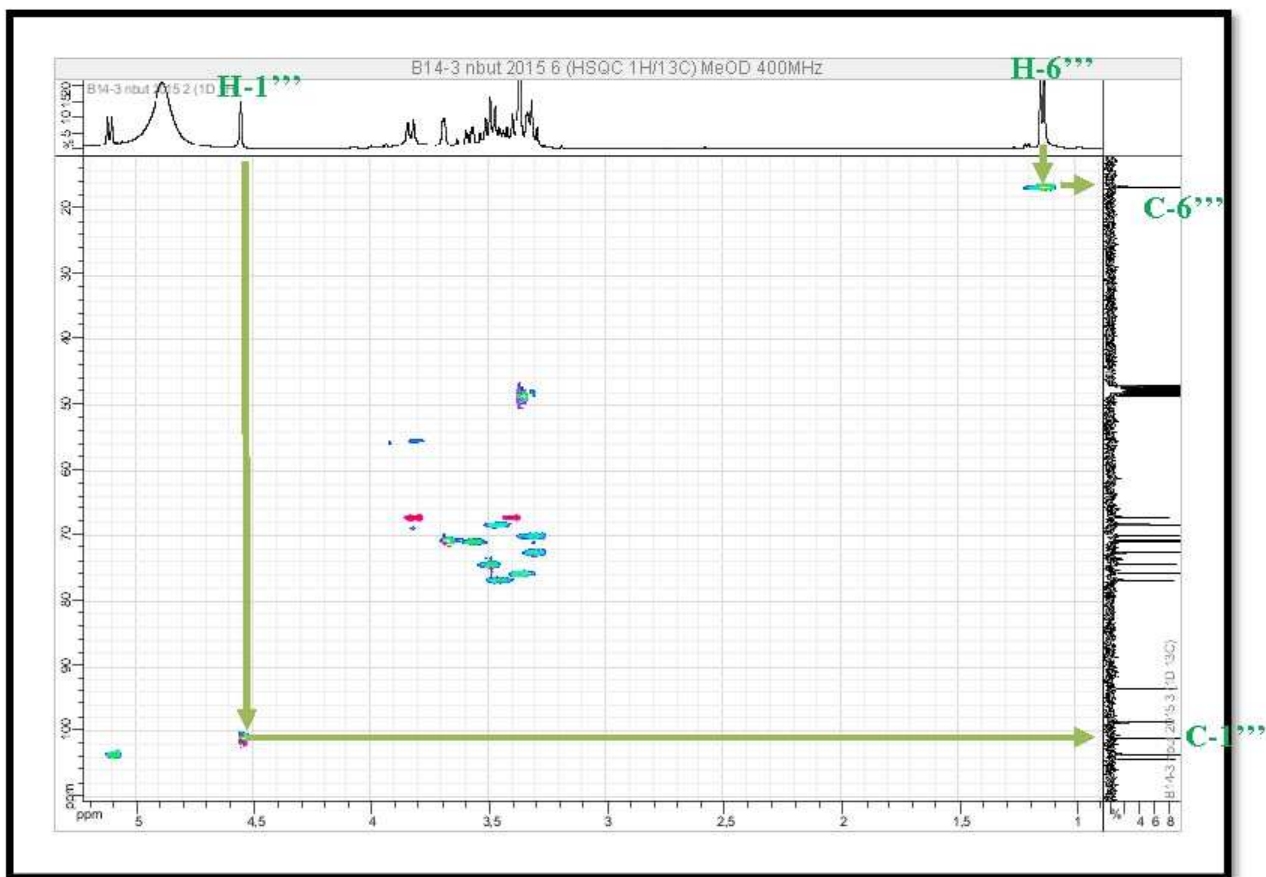
Spectre 74-1: Spectre COSY (étalement 1) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 12



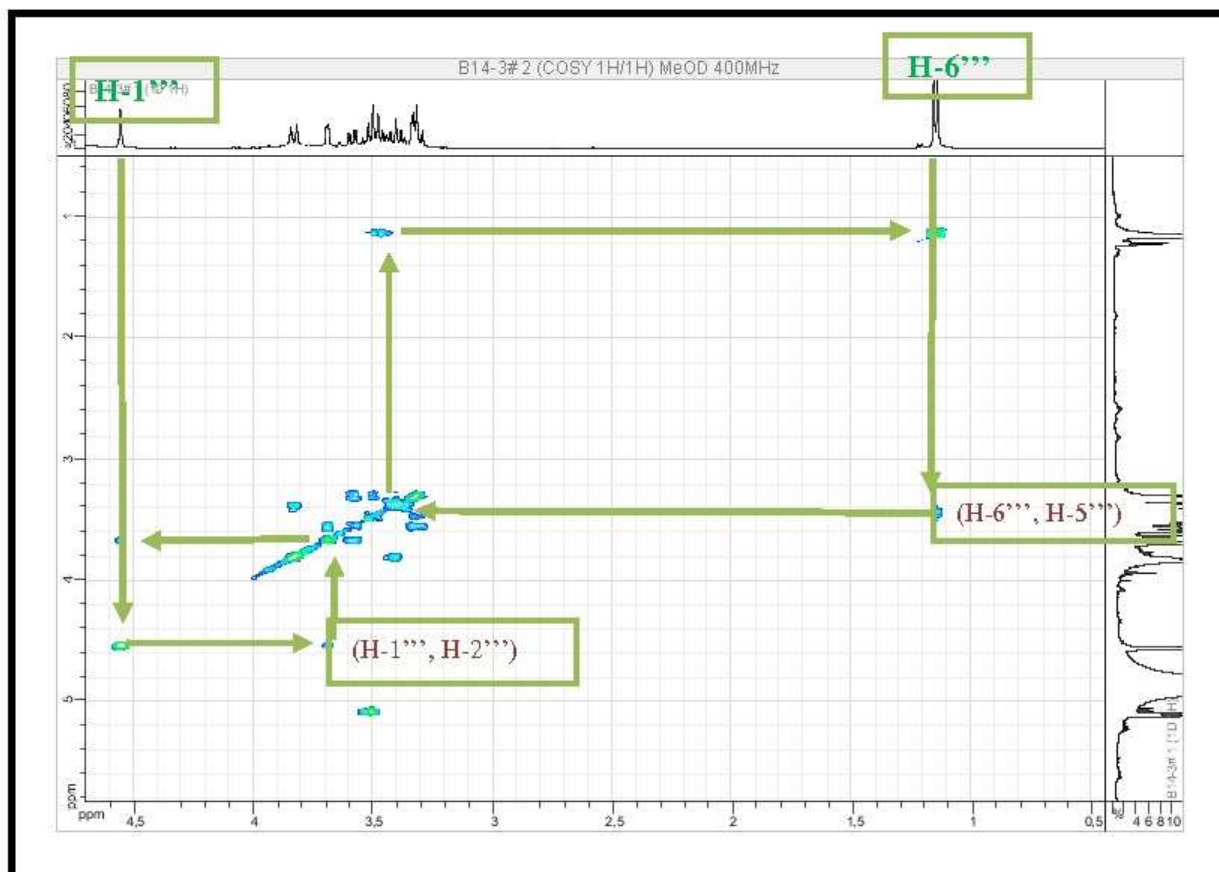
Spectre 72-2: Spectre RMN ¹³C (étalement 2) (100MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 12



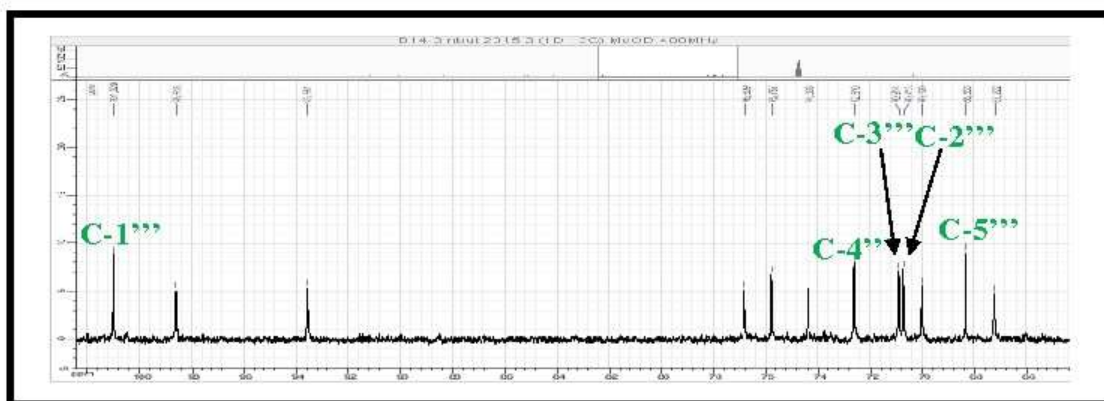
Spectre 73-2: Spectre HSQC (étalement 2) (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 12



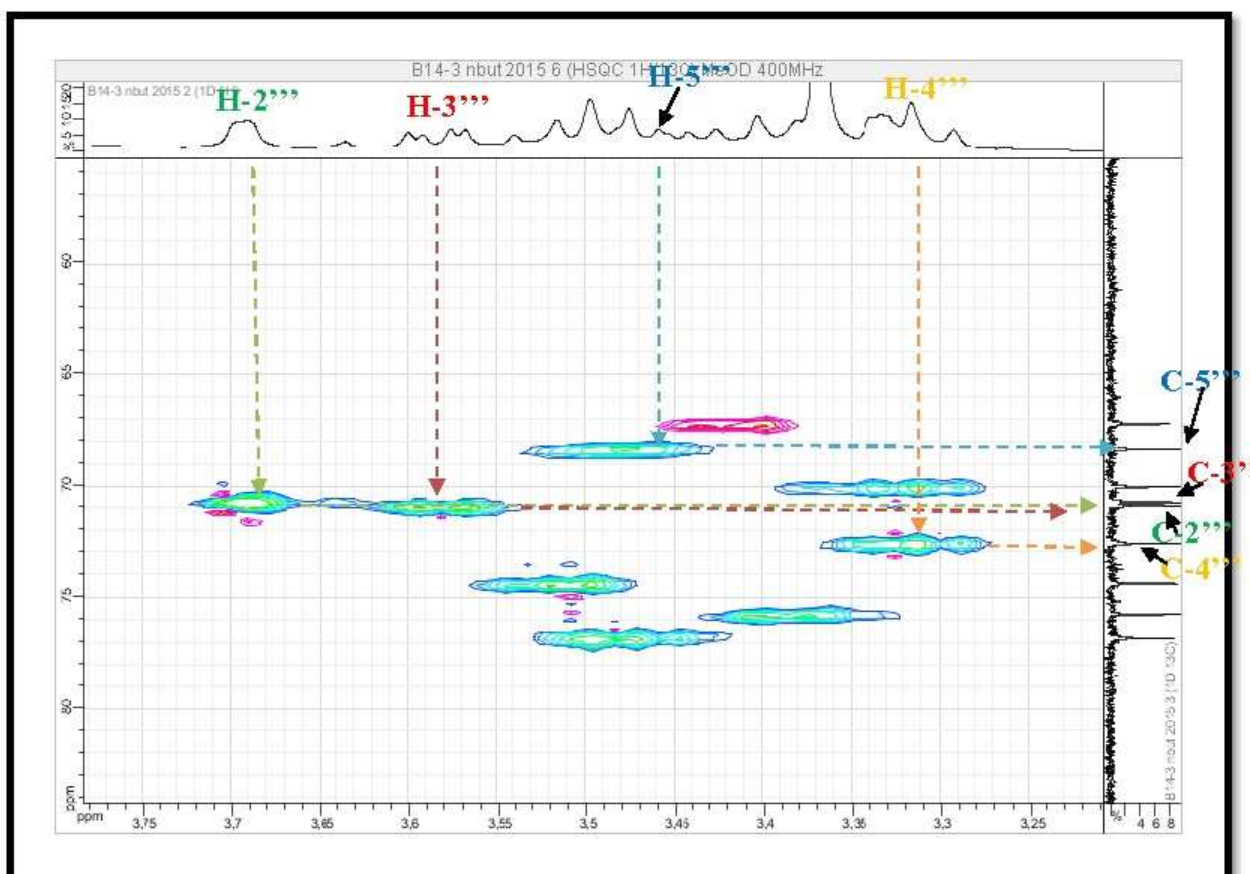
Spectre 73-3: Spectre HSQC (étalement 3) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 12



Spectre 74-2: Spectre COSY (étalement 2) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 12



Spectre 72-3: Spectre RMN ¹³C (étalement 3) (100MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 12

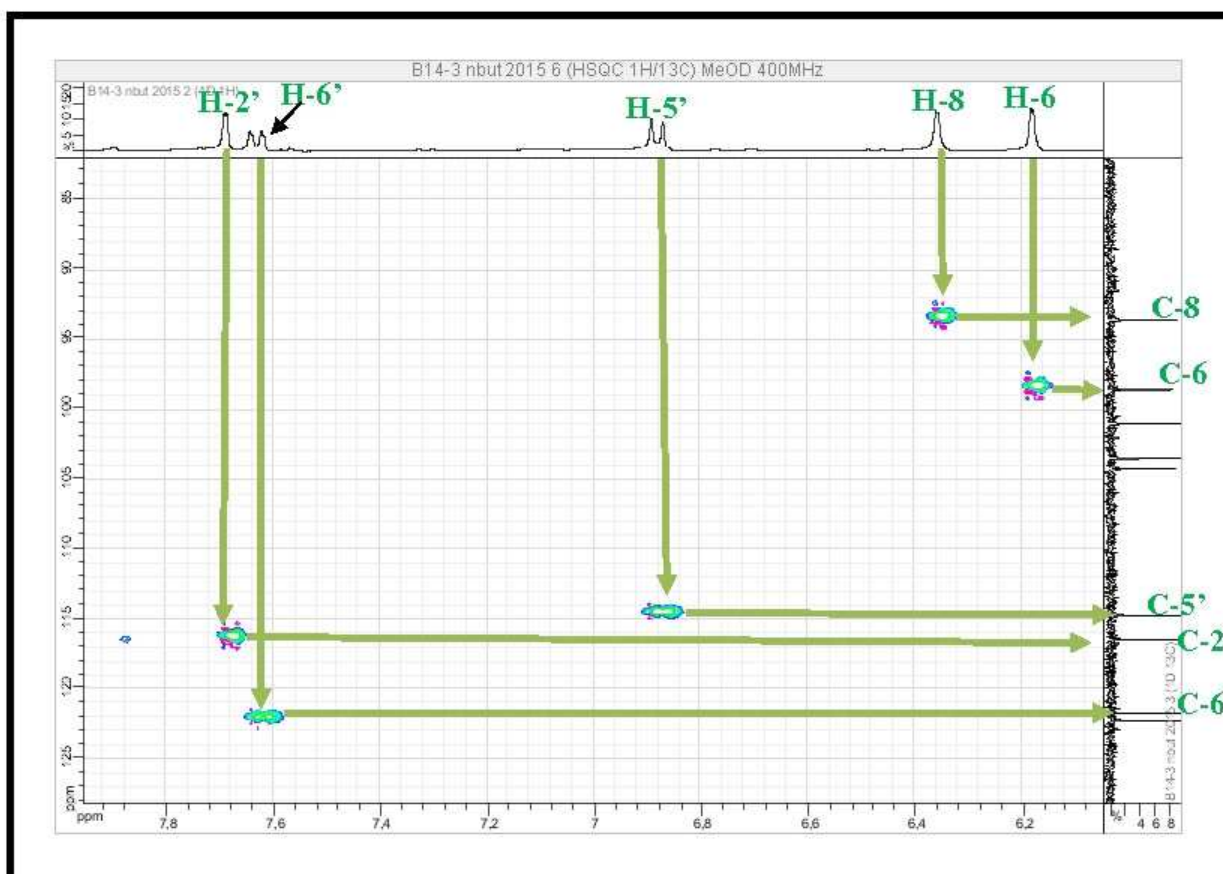


Spectre 73-4: Spectre HSQC (étalement 4) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 12

Comme dans la molécule précédente (nicotiflorine), ces deux entités sucres sont liés entre eux dans les positions 1 \rightarrow 6. En effet, ceci est clair sur le spectre HMBC qui montre comme dans le cas précédent une corrélation entre le proton anomérique H-1''' et le carbone C-6'' indiquant la présence d'un groupement O-rutinosyle. La jonction avec l'aglycone est établie par la corrélation observée entre le proton H-1'' et le carbone à $\delta_C = 134,32$ ppm qui ne peut être attribué qu'au C-3 car d'une part il ne corrèle ni avec les protons du cycle A ni avec les protons du cycle B et d'autre part, vu la valeur de son déplacement chimique car les autres carbones oxygénés de cette molécule (C-3', C-4', C-5, C-7) admettent des déplacements chimiques beaucoup plus important.

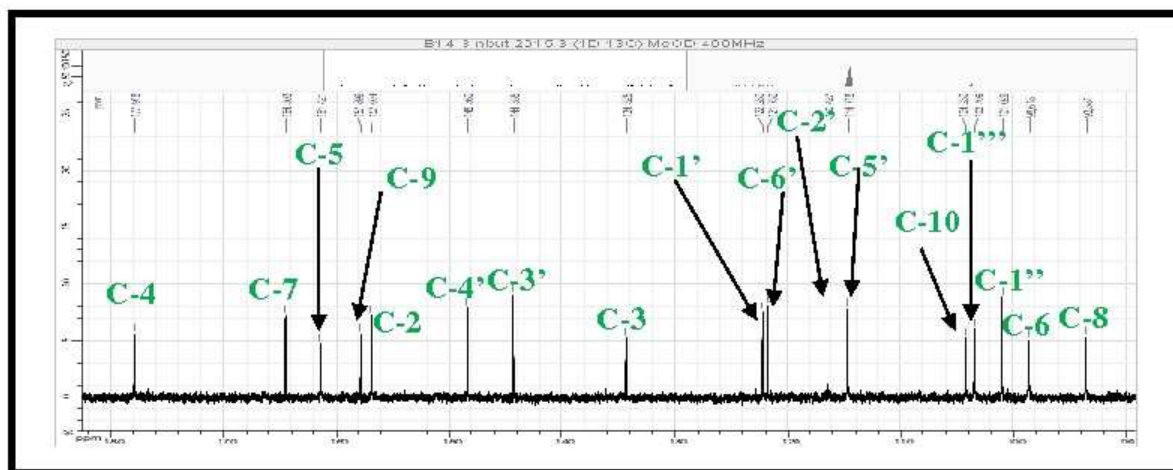
Un retour vers la formule brute de cette molécule, permet de placer des groupements hydroxyles dans les positions C-3', C-4', C-5 et C-7.

L'ensemble de ces données mènent à la structure reportée sur la figure 89. Il s'agit de la Rutine [68].



Spectre 73-5: Spectre HSQC (étalement 5) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 12

Toutes ces données sont reportées sur le spectre le ¹³C.



Spectre 72-4: Spectre RMN ¹³C (étalement 4) (100MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 12

Les données relatives aux spectres de RMN ¹H et ¹³C de ce composé sont reportées dans le tableau 32.

Tableau 32. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **12**.

Glucose		
Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1''	5,11(d ; 7,2 Hz)	103,48
2''	3,50 (m)	74,38
3''	3,35 (m)	75,77
4''	3,29 (m)	70,03
5''	3,43(m)	76,81
6''	3,82 (dd ; 9,6 ; 3,6 Hz) 3,39 (m)	67,23
Rhamnose		
1'''	4,55 (d ; 1,2 Hz)	101,03
2'''	3,68 (m)	70,71
3'''	3,57 (m)	70,92
4'''	3,33(m)	70,03
5'''	3,45 (m)	68,34
6'''	1,15 (d ; 6,4 Hz)	16,55
Flavonoïde		
2	/	157,01
3	/	134,32
4	/	177,93
5	/	161,42
6	6,18 (d ; 2,0 Hz)	98,64
7	/	164,50
8	6,36 (d ; 2,0 Hz)	93,60
9	/	157,92
10	/	104,25
1'	/	122,29
2'	7,68 (d ; 2,4 Hz)	116,44
3'	/	144,36
4'	/	148,36
5'	6,88 (d ; 8,4 Hz)	114,74
6'	7,62 (dd ; 8,4 ; 2,4 Hz)	121,77

IV.3.9. Elucidation structurale du composé 13 (B24-1)

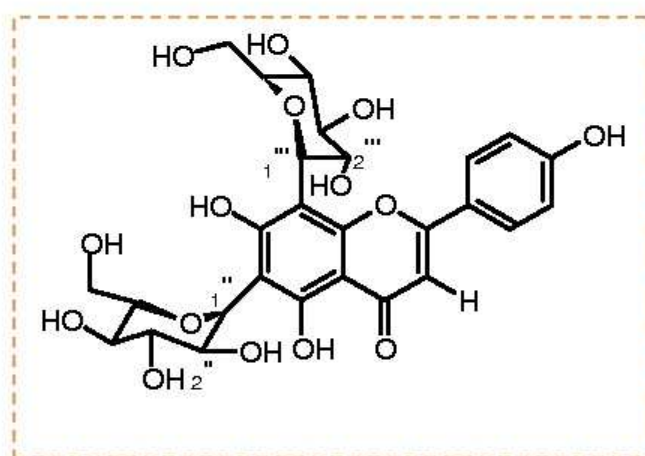
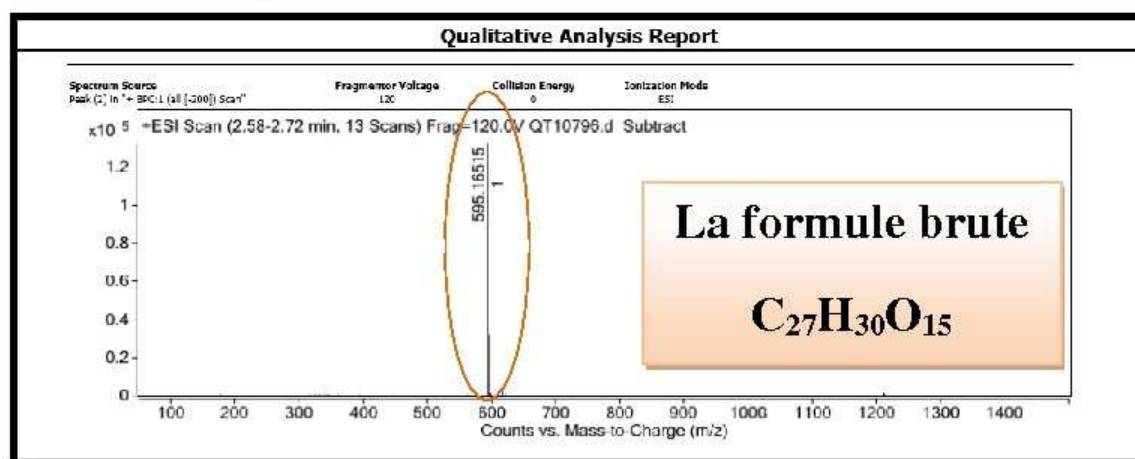


Figure 90. Structure du composé 13, B24-1.

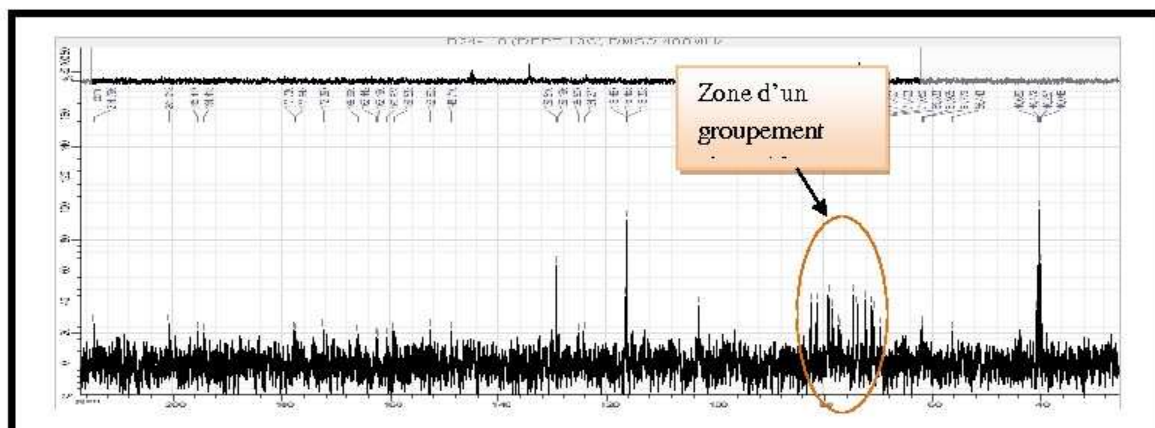
L'examen du spectre de masse à haute résolution en mode electrospray positif (Spectre 76) du composé 13 montre un pic quasi moléculaire à $m/z = 595,16515$ correspondant à $[M+H]^+$. Ce résultat est appuyé par le calcul de la masse exacte (Tableau 33) qui donne une valeur $m/z = 594,15787$ (calculé pour $C_{27}H_{30}O_{15}$: $594,15847$).



Spectre 76: Spectre HR-ESI-MS (+) du composé 13

Tableau 33. Analyse de la composition élémentaire des différents ions.

Formula Calculator Results							
Formula	Ratio	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Mz	Ion Species	Score
C27 H30 O15		594.15787	594.15847	1.01	595.16515	C27 H31 O15	95.32
C24 H22 N10 O9		594.15788	594.15712	-1.27	595.16515	C24 H23 N10 O9	95.21
C25 H18 N14 O5		594.15788	594.15846	0.97	595.16515	C25 H19 N14 O5	92.45
C23 H26 N6 O13		594.15788	594.15578	-3.52	595.16515	C23 H27 N6 O13	92.29
C28 H26 N4 O11		594.15787	594.15981	3.26	595.16515	C28 H27 N4 O11	88.25



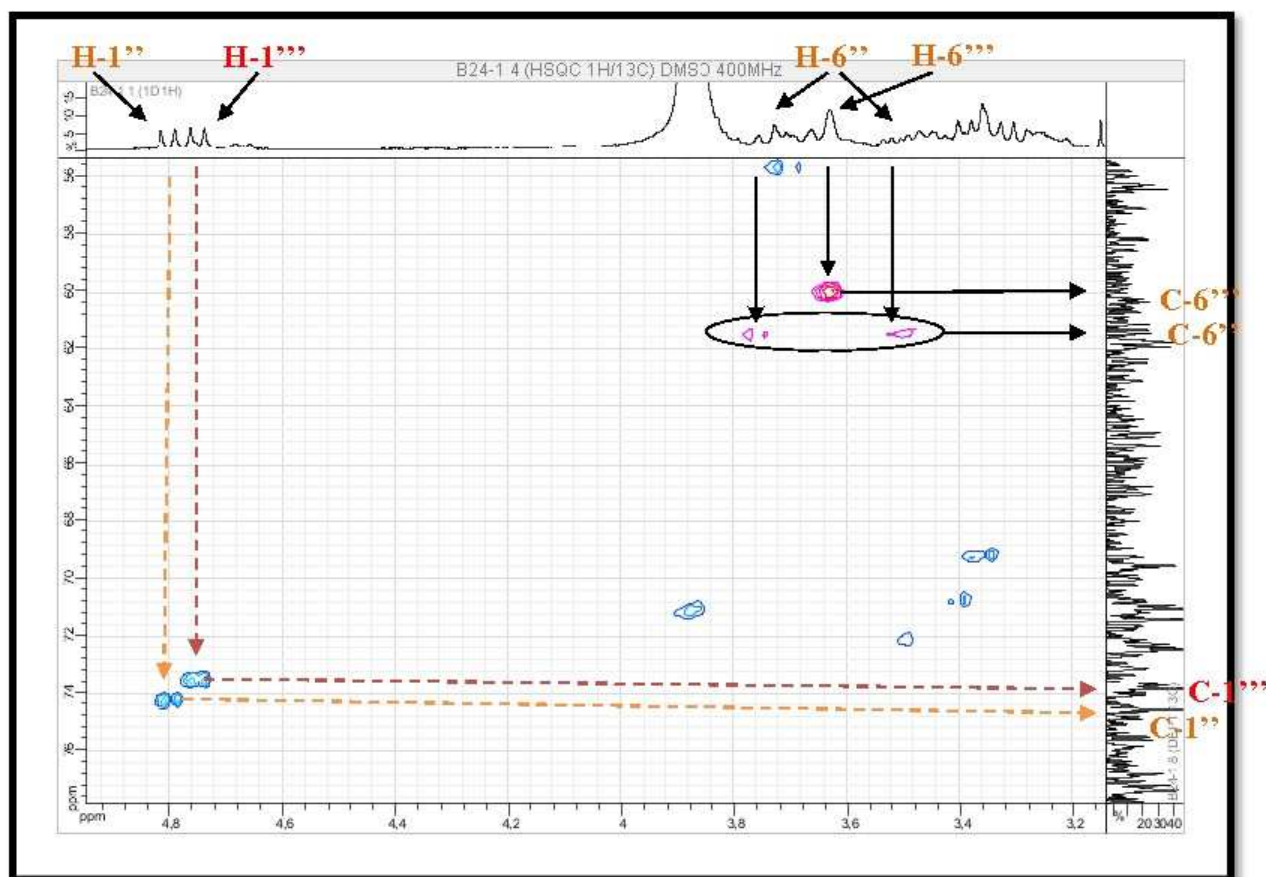
Spectre 78-1: Spectre RMN ^{13}C (étalement 1) (100MHz, DMSO- d_6 , δ ppm) du composé 13

Le premier hexose comporte comme indiqué plus haut un proton anomérique H-1'' ($\delta_{\text{H}} = 4,80$ ppm ; d ($J = 9,7$ Hz) ; $\delta_{\text{C}} = 74,56$ ppm) dont les valeurs de son déplacement chimique, du déplacement chimique de son carbone et de la constante de couplage 9,7 Hz relevée dans son signal sont en faveur d'une jonction C- β -glycosidique entre l'aglycone et l'hexose.

- ✓ un CH_2 à $\delta_{\text{H}} = 3,75$ ppm (1H; dd ; $J = 10,9 ; 3,4$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 3,50$ ppm (1H ; dd ; $J = 10,9 ; 6,2$ Hz) $\delta_{\text{C}} = 61,92$ ppm, attribuables H-6''a et H-6''b de la position C-6'' de cet hexose.

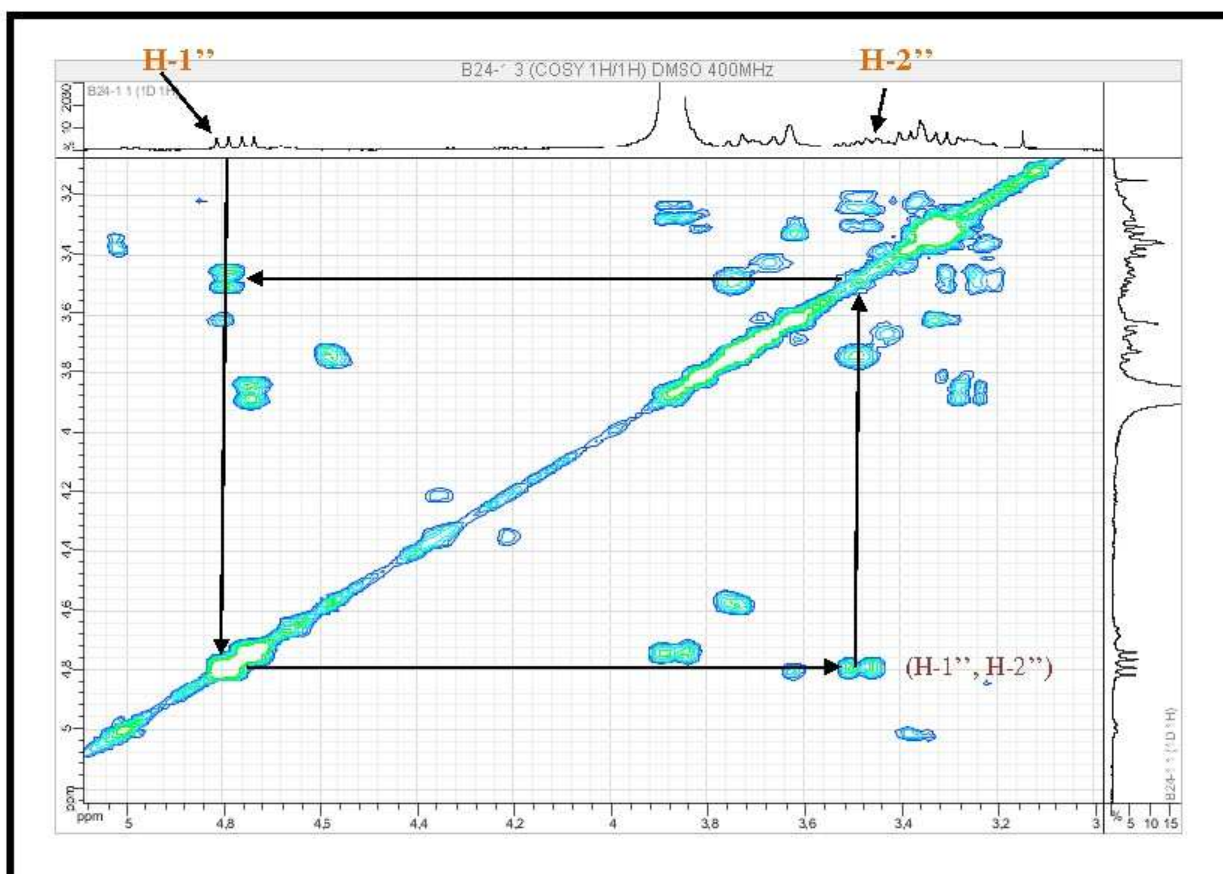
Le deuxième hexose comporte comme indiqué plus haut un proton anomérique H-1''' ($\delta_{\text{H}} = 4,75$ ppm ; d ($J = 9,7$ Hz) ; $\delta_{\text{C}} = 73,82$ ppm) dont les valeurs de son déplacement chimique, du déplacement chimique de son carbone et de la constante de couplage 9,7 Hz relevée dans son signal, sont en faveur d'un sucre relié à l'aglycone par une jonction C- β -glycosidique.

- ✓ un CH_2 à $\delta_{\text{H}} = 3,63$ ppm (2H; m), $\delta_{\text{C}} = 61,78$ ppm, attribuable H-6''a et H-6''b de la position C-6'' de cet hexose.

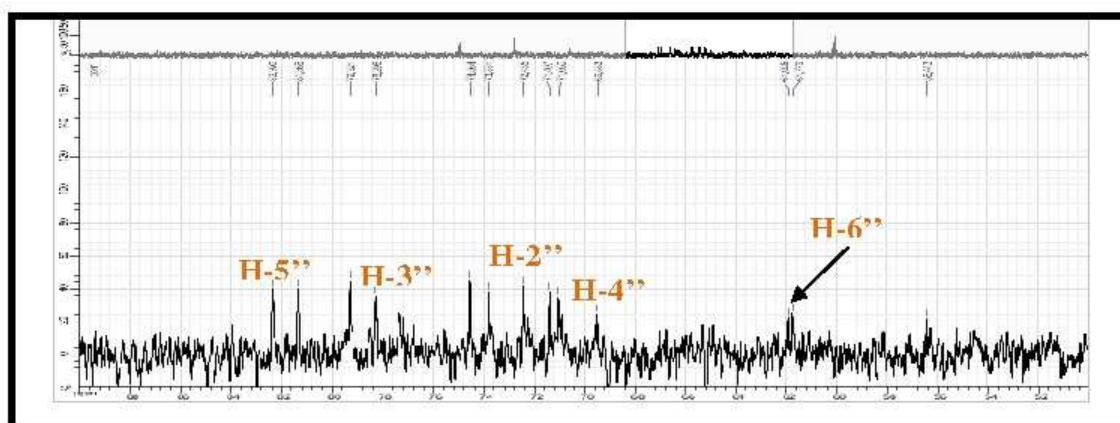


Spectre 79-1: Spectre HSQC (étalement 1) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 13

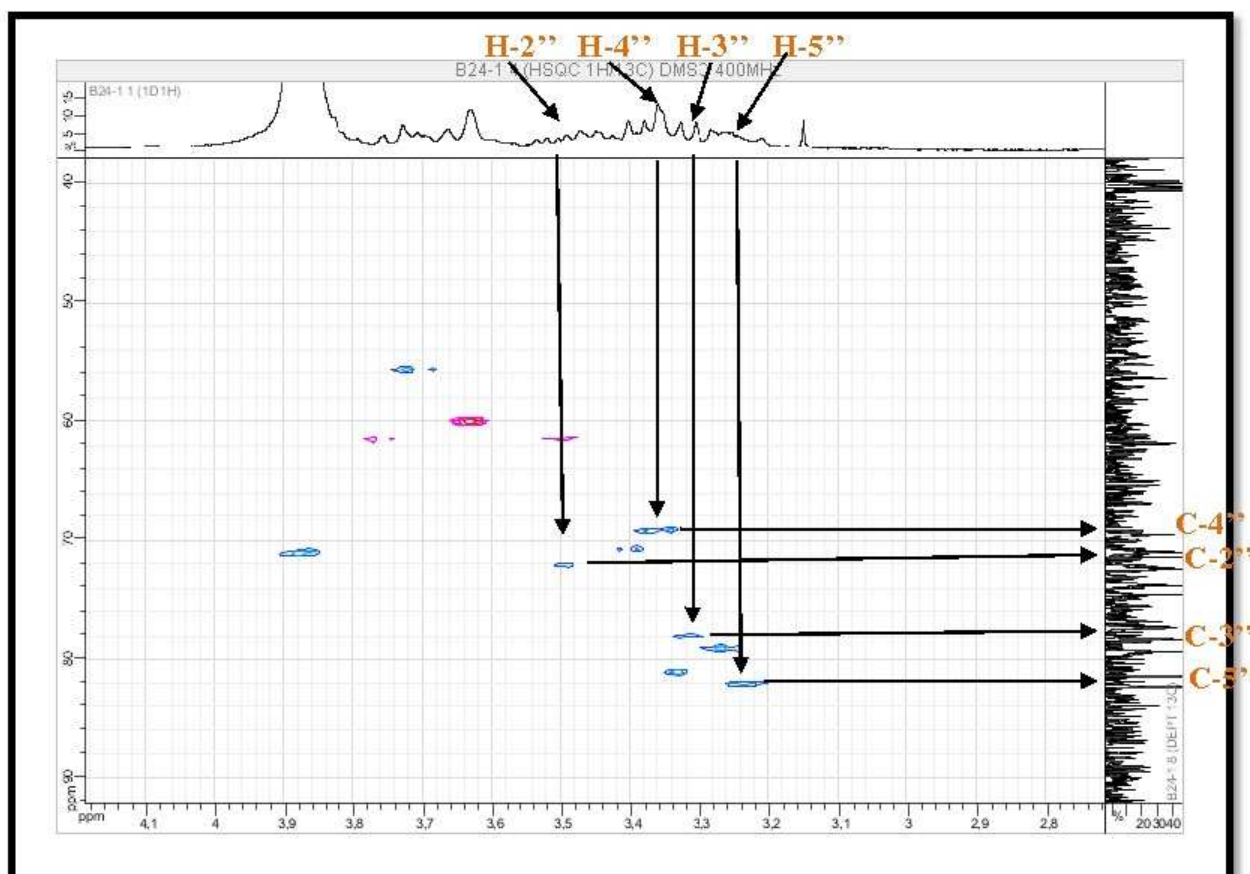
Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre 80-1), le proton anomérique H-1'' montre une tache de corrélation avec un proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,48$ ppm. Ce proton est attribuable à H-2'' ($\delta_C = 72,43$ ppm). Toujours sur le spectre relatif à l'expérience COSY, ce proton corrèle avec le proton résonant sous forme d'un triplet à $\delta_H = 3,30$ ppm attribuable à H-3'' ($J = 8,6$ Hz) ($\delta_C = 79,32$ ppm). La multiplicité de ce signal « triplet » et la valeur de la constante de couplage « 8,6 Hz » supposent des interactions axiale-axiale entre H-3''/H2'' ; H-3''/ H-4''. Toujours sur le spectre relatif à l'expérience COSY, le proton H-6'' corrèle avec un proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,23$ ppm attribuable à H-5'' ($\delta_C = 82,39$ ppm). Ce dernier corrèle avec un proton résonant sous forme d'un triplet ($J = 8,6$ Hz) à $\delta_H = 3,37$ ppm attribuable à H-4'' ($\delta_C = 69,53$ ppm). La multiplicité de ce signal « triplet » et la valeur de la constante de couplage « 8,6 Hz » supposent des interactions axiale-axiale entre H-4''/H-3'' ; H-4''/ H-5'' et indiquent une orientation axiale de H-5''.



Spectre 80-1: Spectre COSY (étalement 1) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 13

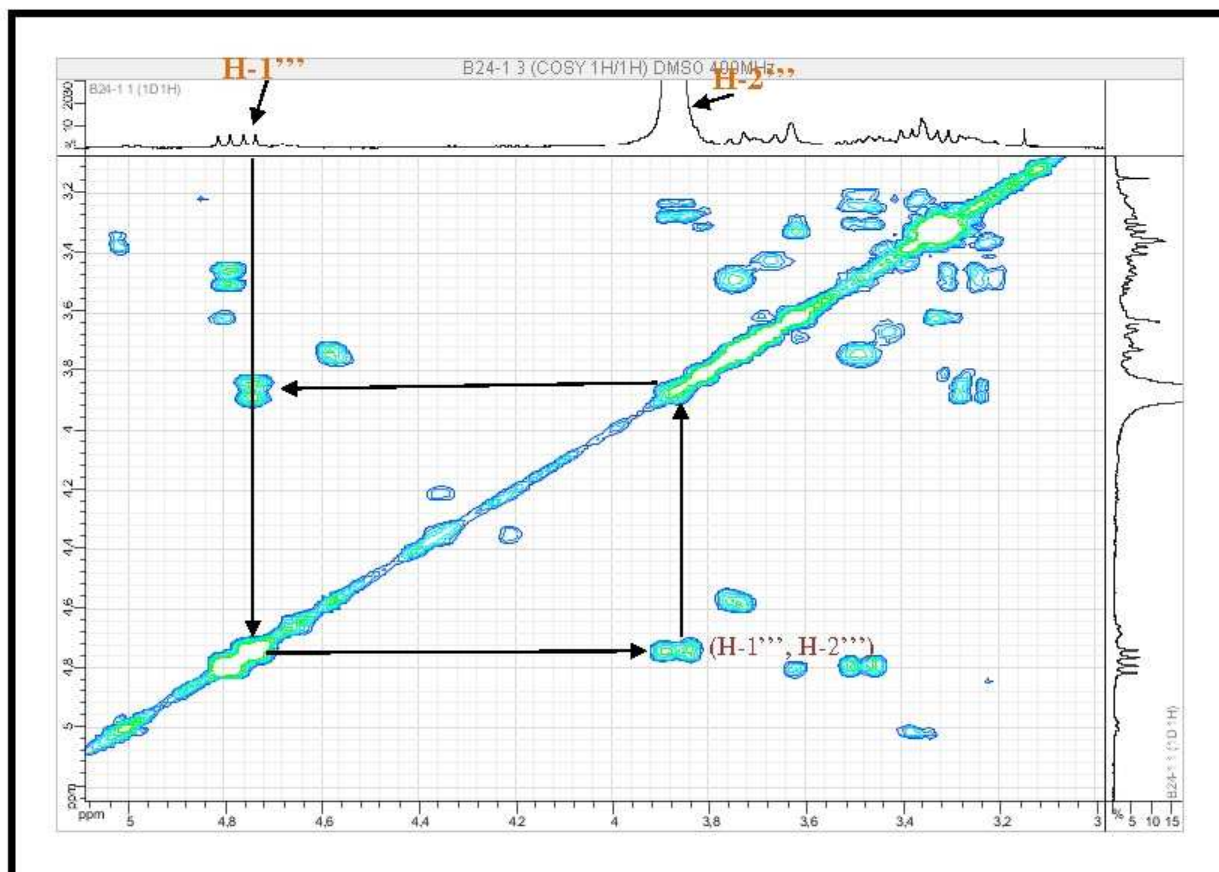


Spectre 78-2: Spectre RMN ¹³C (étalement 2) (100MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 13

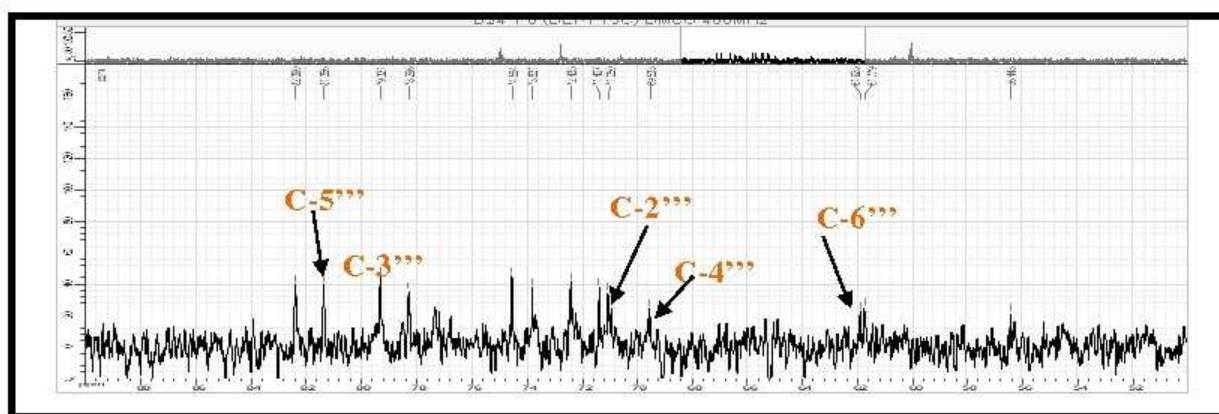


Spectre 79-2: Spectre HSQC (étalement 2) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 13

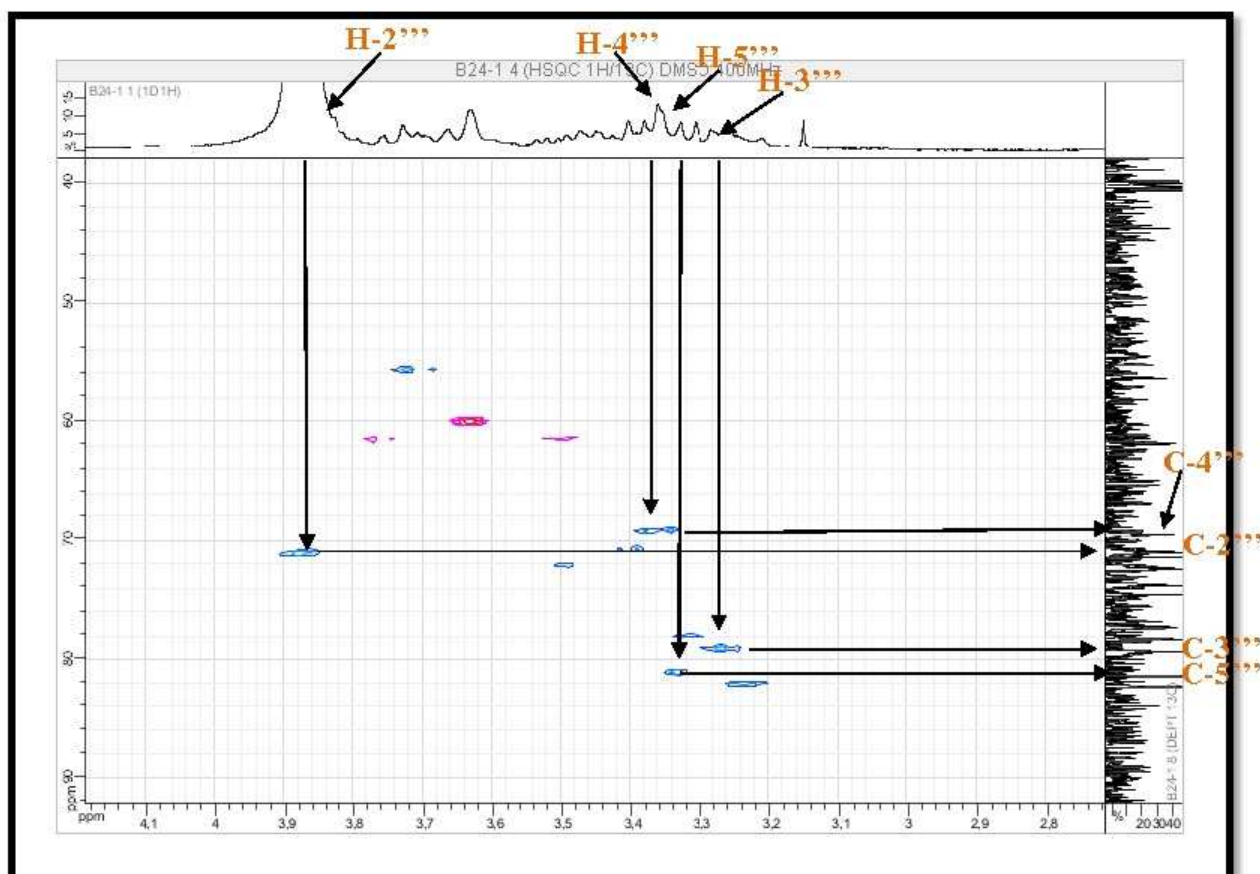
Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre 80-2), le proton anomérique H-1''' montre une tache de corrélation avec le signal d'un proton à $\delta_H = 3,87$ ppm ce proton est attribuable à H-2''' ($\delta_C = 70,98$ ppm). Toujours sur le spectre relatif à l'expérience COSY, ce proton corrèle avec le proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,28$ ppm attribuable à H-3''' ($\delta_C = 79,32$ ppm). Toujours sur le spectre relatif à l'expérience de COSY, le proton H-6''' corrèle avec un proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,33$ ppm attribuable à H-5''' ($\delta_C = 81,36$ ppm). Ce dernier corrèle avec un proton résonant sous forme d'un triplet à $\delta_H = 3,36$ ppm ($J = 8,6$ Hz) attribuable à H-4''' ($\delta_C = 69,53$ ppm). La multiplicité de ce signal « triplet » et la valeur de la constante de couplage « 8,6 Hz » supposent des interactions axiale-axiale entre H-4'''/H-3''' ; H-4'''/ H-5''' et indiquent une orientation axiale de H-5''' , ce qui oriente vers un glucosyle et non pas un galactosyle.



Spectre 80-2: Spectre COSY (étalement 2) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 13



Spectre 78-3: Spectre RMN ¹³C (étalement 3) (100MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 13

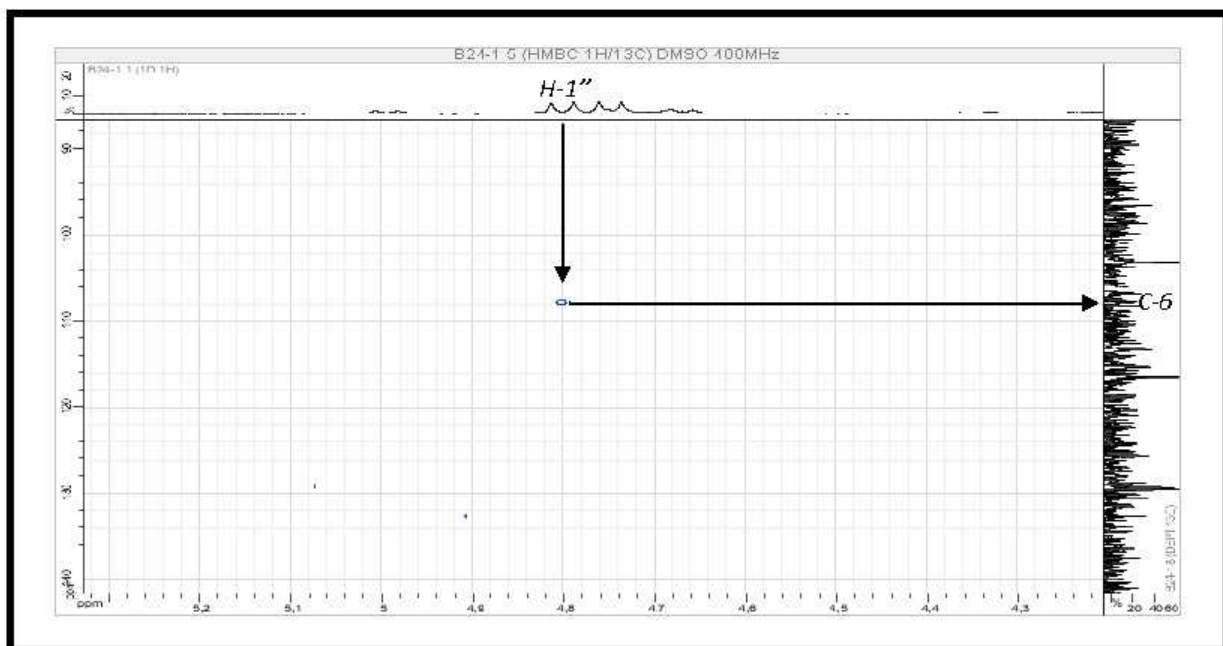


Spectre 79-3: Spectre HSQC (étalement 3) (400 MHz, DMSO-d₆, δ_{ppm}) du composé 13

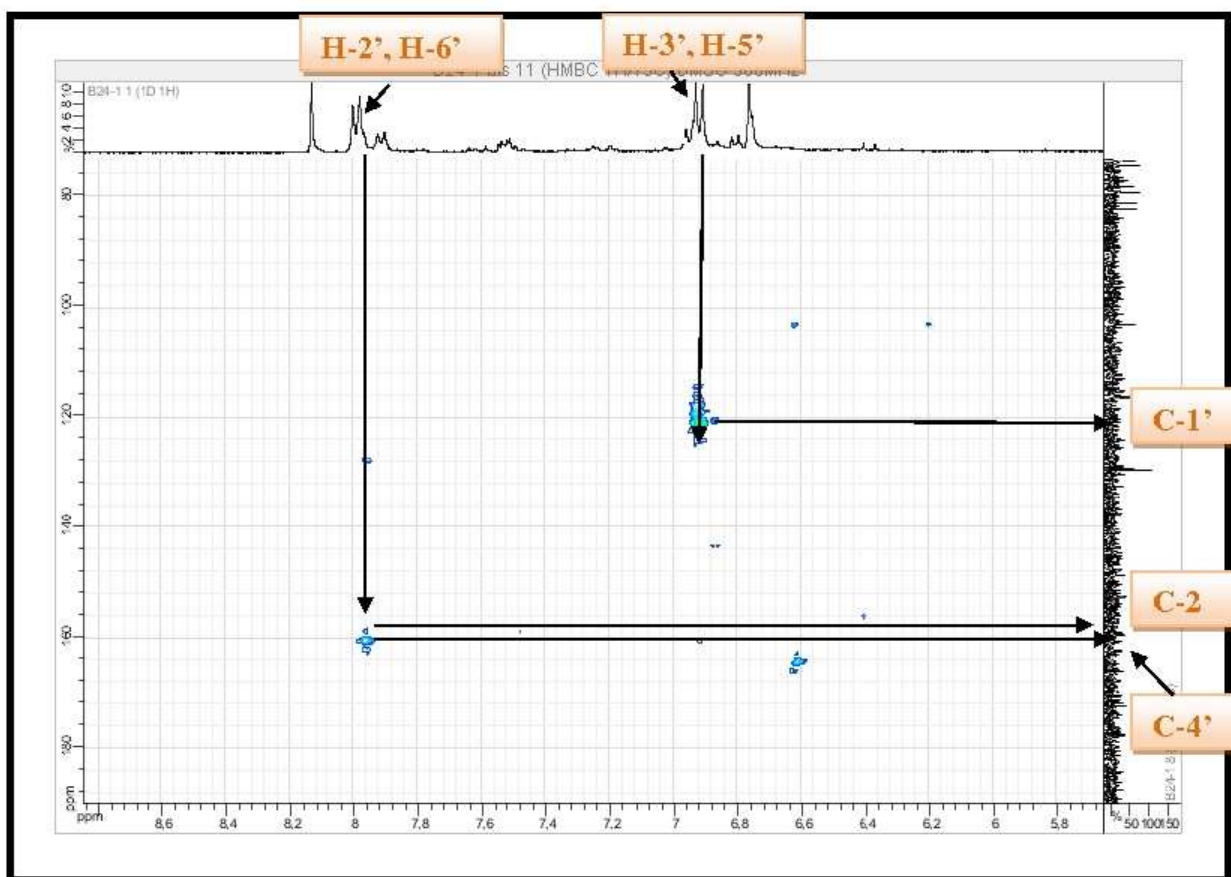
Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre 81-3), la corrélation entre H-3' et H-5' et le carbone à $\delta_C = 121,70$ ppm permet son attribution au carbone C-1' du squelette flavonique; la corrélation entre H-3' et H-5' ; H-2' et H-6' et le carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 160,67$ ppm permet l'attribution de ce carbone à C-4' ; les corrélations entre H-2' et H-6' et le carbone quaternaire à $\delta_C = 161,60$ ppm permettent son attribution à C-2.

Les autres carbones C-2', C-3', C-5', C-6', C-3 sont attribués sur la base de l'analyse du spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectre 78-3) qui montre en effet, une corrélation entre H-2', H-6' et le carbone à $\delta_C = 129,51$ ppm attribuable à C-2', C-6'; une corrélation entre H-5' et H-3' et le carbone à $\delta_C = 116,25$ ppm attribuable à C-3', C-5' ; une corrélation entre H-3 avec le carbone à $\delta_C = 103,08$ ppm attribuable à C-3 . Il ne nous reste plus qu'à affecter les deux signaux restants ($\delta_C = 105,3$ ppm et $\delta_C = 107,3$ ppm) à C-8 et C-6. D'après ces valeurs des déplacements chimiques le premier sera affecté à C-8 et le second à C-6 [69].

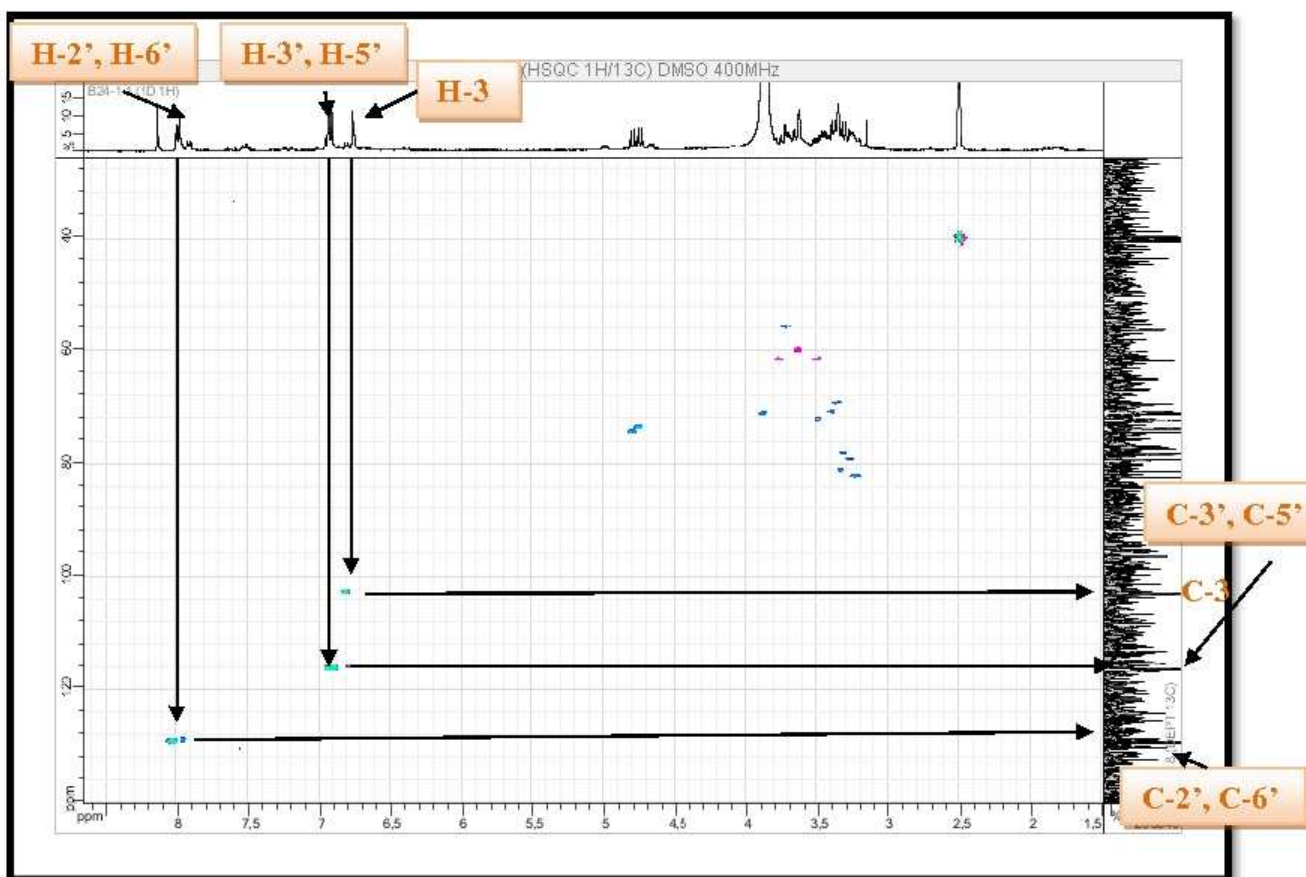
L'examen du spectre HMBC permet de relier le C-1'' en C-6 et le C-1''' en C-8, ceci grâce aux corrélations observées entre le proton anomérique H-1'' ($\delta_H = 4,80$ ppm et C-6 et le proton anomérique H-1''' ($\delta_H = 4,75$ ppm) et C-8.



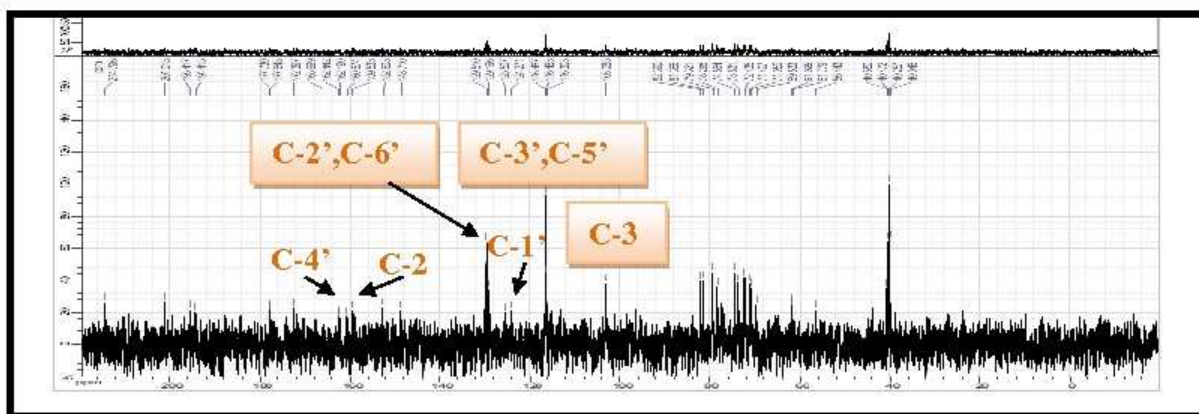
Spectre 81-2: Spectre HMBC (étalement 2) (400 MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 13



Spectre 81-3: Spectre HMBC (étalement 3) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 13



Spectre 79-4: Spectre HSQC (étalement 4) (400MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 13



Spectre 78-4: Spectre RMN ¹³C (étalement 4) (100MHz, DMSO-d₆, δ ppm) du composé 13

Les données relatives aux spectres de RMN ¹H et ¹³C de ce composé sont reportées dans le tableau 34.

Tableau 34. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **13**.

Glucose		
Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1''	4,80 (d ; 9,7 Hz)	74,56
2''	3,48 (m)	72,43
3''	3,30 (t ; 8,6 Hz)	79,32
4''	3,37 (t ; 8,6 Hz)	69,53
5''	3,23 (m)	82,39
6''	3,75 (dd ; 10,9 ; 3,4 Hz) 3,50 (dd ; 10,9 ; 6,2 Hz)	61,92
Rhamnose		
1'''	4,75 (d ; 9,7 Hz)	73,82
2'''	3,87 (m)	70,98
3'''	3,28 (m)	79,32
4'''	3,36 (t ; 8,6 Hz)	69,53
5'''	3,33 (m)	81,36
6'''	3,63 (m)	61,78
Flavonoïde		
2	/	161,60
3	6,76 (s)	103,08
4	/	182,78
5	/	159,07
6	/	103,16
7	/	159,53
8	/	101,27
9	/	155,49
10	/	103,61
1'	/	121,70
2'	7,99 (d ; 8,4 Hz)	129,51
3'	6,91 (d ; 8,4 Hz)	116,25
4'	/	160,67
5'	6,91 (d ; 8,4 Hz)	116,25
6'	7,99 (d ; 8,4 Hz)	129,51

IV.3.10. Elucidation structurale du composé **14** (B32-3)

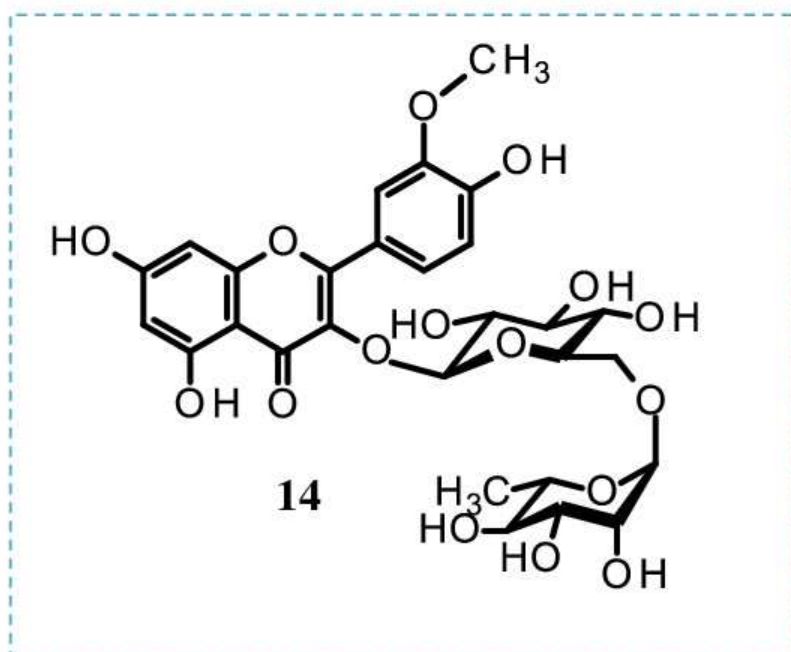
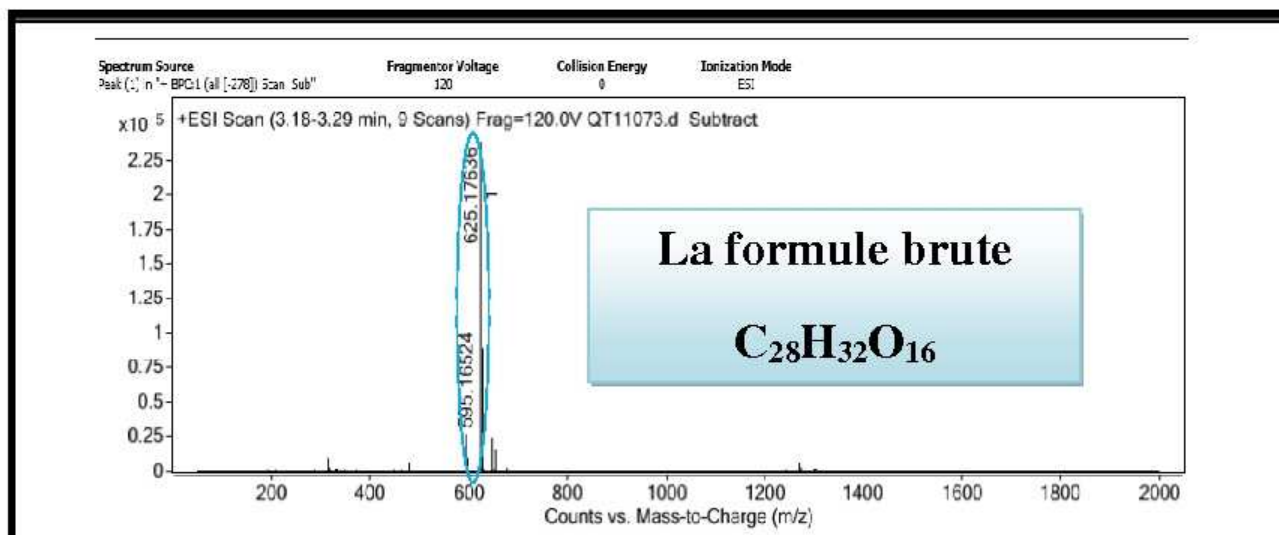


Figure 92. Structure du composé **14**.

L'examen du spectre de masse à haute résolution en mode electrospray positif (Spectre 82) du composé **14** montre un pic quasi moléculaire à $m/z = 625,17636$ correspondant à $[M+H]^+$. Ce résultat est appuyé par le calcul de la masse exacte (Tableau 35) qui donne une valeur $m/z = 624,16909$ (calculé pour $C_{28}H_{32}O_{16}$: 624,16903). Exposé à la lumière de Wood ($\lambda = 365\text{nm}$), ce composé montre une fluorescence noir-violette orientant vers un composé flavonique de type flavone ou flavonol 3-OR. La comparaison de la formule brute de ce composé à celle de la rutine (composé **12**) montre qu'il renferme un atome de carbone et deux atomes d'hydrogène de plus. Cette observation prévoit alors le remplacement d'un groupement hydroxyle de la rutine par un groupement méthoxyle pour ce composé **14**.



Spectre 82: Spectre HR-ESI-MS (+) du composé 14

Tableau 35. Analyse de la composition élémentaire des différents ions.

Formula Calculator Results							
Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Mz	Ion Species	Score
C28 H32 O16	TRUE	624.16909	624.16903	-0.09	625.17636	C28 H33 O16	99.04

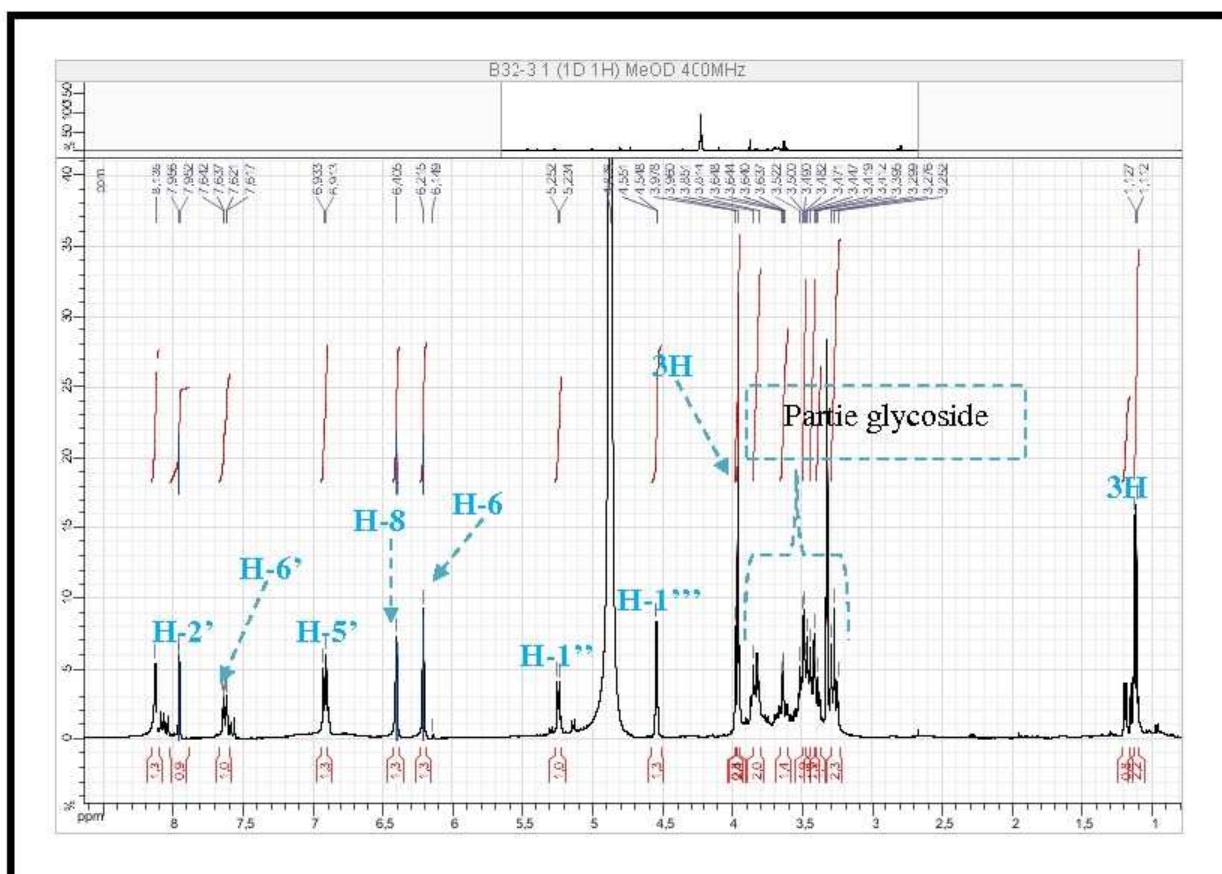
L'examen du spectre RMN ¹H (Spectre 82-1) de ce composé, permet rapidement de confirmer cette hypothèse grâce au signal sous forme d'un singulet d'intégration 3H à $\delta_H = 3,96$ ppm.

Les autres signaux de l'aglycone restent très similaires à ceux de l'aglycone de la rutine notamment le squelette quercétine où l'en trouve :

- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_H = 7,95$ ppm ($J = 1,6$ Hz) attribuable à H-2'.
- Un doublet de doublets d'intégration 1H, à $\delta_H = 7,63$ ppm ($J = 8,0 ; 1,6$ Hz) attribuable à H-6'.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_H = 6,92$ ppm ($J = 8,0$ Hz) attribuable à H-5'.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_H = 6,40$ ppm ($J = 1,5$ Hz) attribuable à H-8.
- Un doublet d'intégration 1H, à $\delta_H = 6,21$ ppm ($J = 1,5$ Hz) attribuable à H-6.

Comme dans le cas de la rutine (composé 12) la présence de deux hexoses attendus d'après les données et bien claire d'après l'étude du spectre de RMN ¹³C (Spectre 83) qui montre douze signaux caractéristiques de deux hexoses. On y observe en effet :

- Un CH à $\delta_C = 103,11$ ppm ($\delta_H = 5,24$ ppm ; $J = 7,2$ Hz) caractéristique de la position anomérique C-1'' d'un O- β -glycoside.
- Un CH à $\delta_C = 101,11$ ppm ($\delta_H = 4,55$ ppm ; $J = 1,2$ Hz) caractéristique de la position anomérique C-1''' d'un O- α -glycoside.



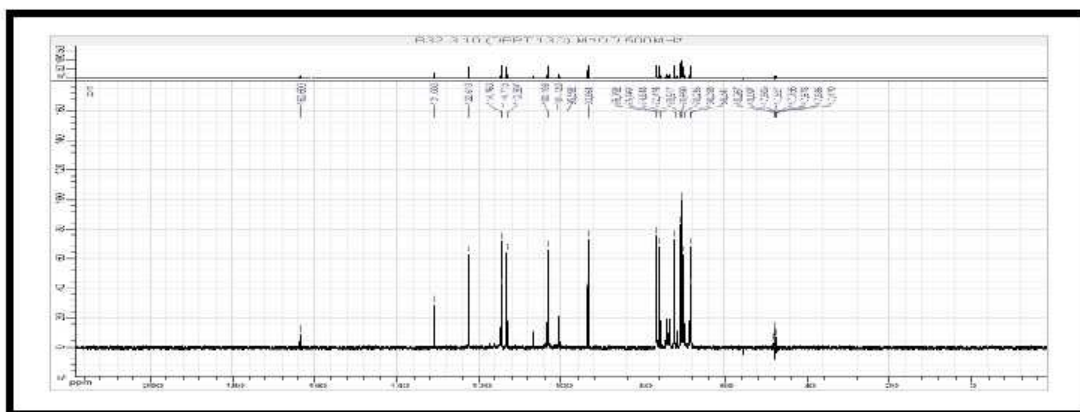
Spectre 83-1: Spectre RMN ^1H (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 14

L'examen approfondi des spectres proton, DEPT ^{13}C 90 (Spectre 85), DEPT ^{13}C 135 (Spectre 86), ^{13}C , HSQC (Spectre 87), COSY (Spectre 88) et HMBC (Spectre 90) a permis de confirmer ces données par la mise en évidence de la présence des groupements glucopyranosyle et rhamnopyranosyle dans cette molécule ; par la valeur des déplacements chimiques de leurs atomes de carbone. En effet grâce à l'analyse des corrélations relevées sur ces spectres les cinq autres atomes de carbone de la première entité résonnent à :

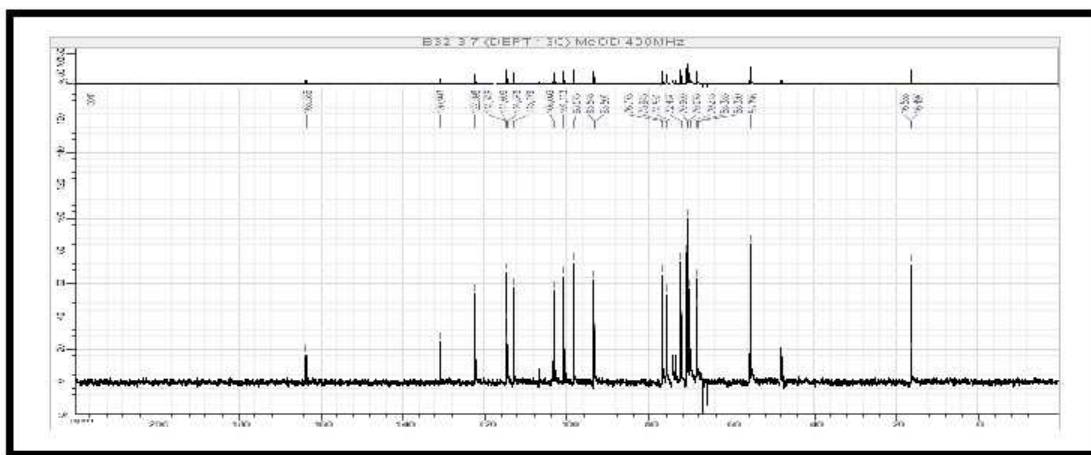
- $\delta_{\text{C}} = 74,38$ ppm, C-2'' ($\delta_{\text{H}} = 3,47$ ppm).
- $\delta_{\text{C}} = 75,97$ ppm, C-3'' ($\delta_{\text{H}} = 3,39$ ppm).
- $\delta_{\text{C}} = 74,54$ ppm, C-4'' ($\delta_{\text{H}} = 3,28$ ppm).
- $\delta_{\text{C}} = 76,80$ ppm, C-5'' ($\delta_{\text{H}} = 3,45$ ppm).
- $\delta_{\text{C}} = 67,16$ ppm, C-6'' ($\delta_{\text{H}} = 3,41$ ppm (1H, dd ; J = 10,4 ; 6,5 Hz) et $\delta_{\text{H}} = 3,81$ ppm (1H, dd ; J = 10,4 ; 3,4 Hz) attribuable au proton H-6'' a et H-6'' b, respectivement).

Les cinq autres carbones de la deuxième entité résonnent à :

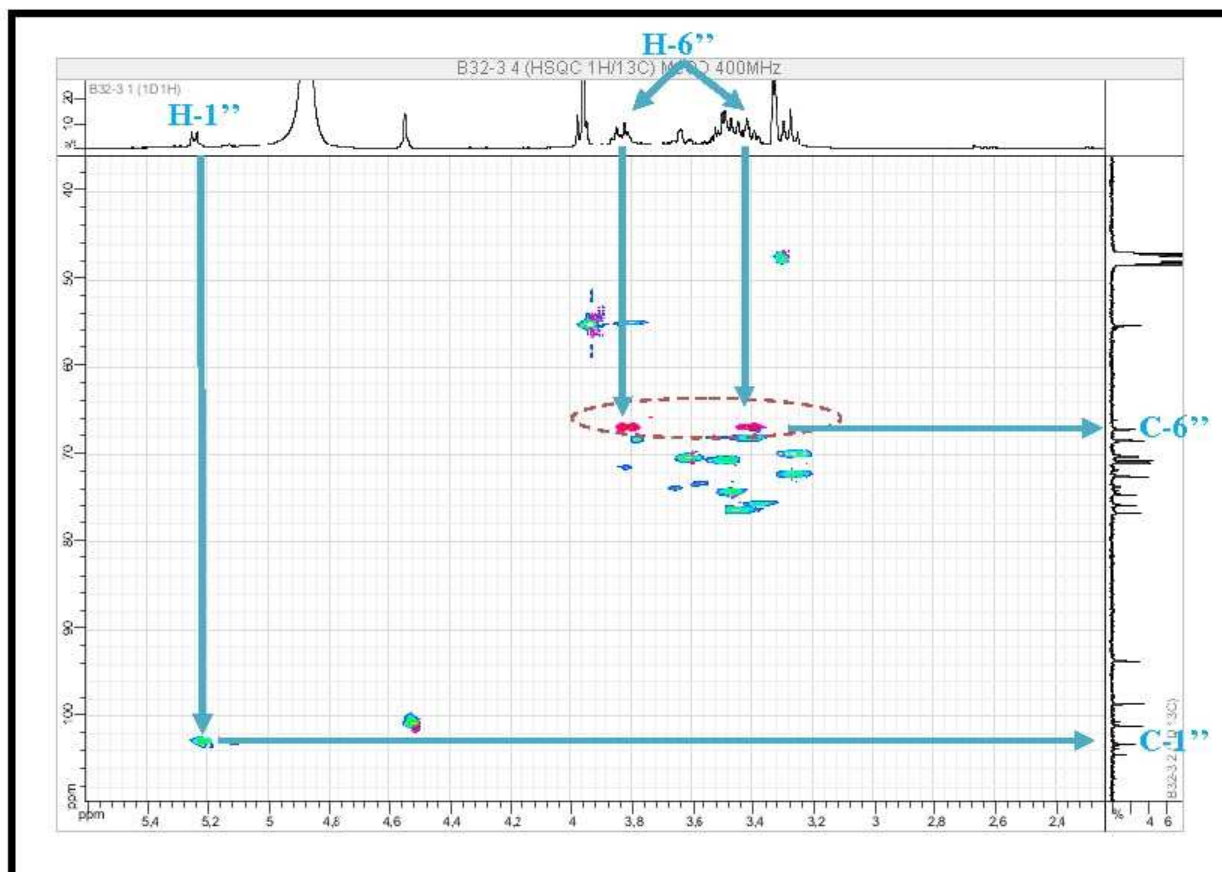
- $\delta_{\text{C}} = 70,24$ ppm, C-2''' ($\delta_{\text{H}} = 3,63$ ppm).
- $\delta_{\text{C}} = 70,69$ ppm, C-3''' ($\delta_{\text{H}} = 3,48$ ppm).



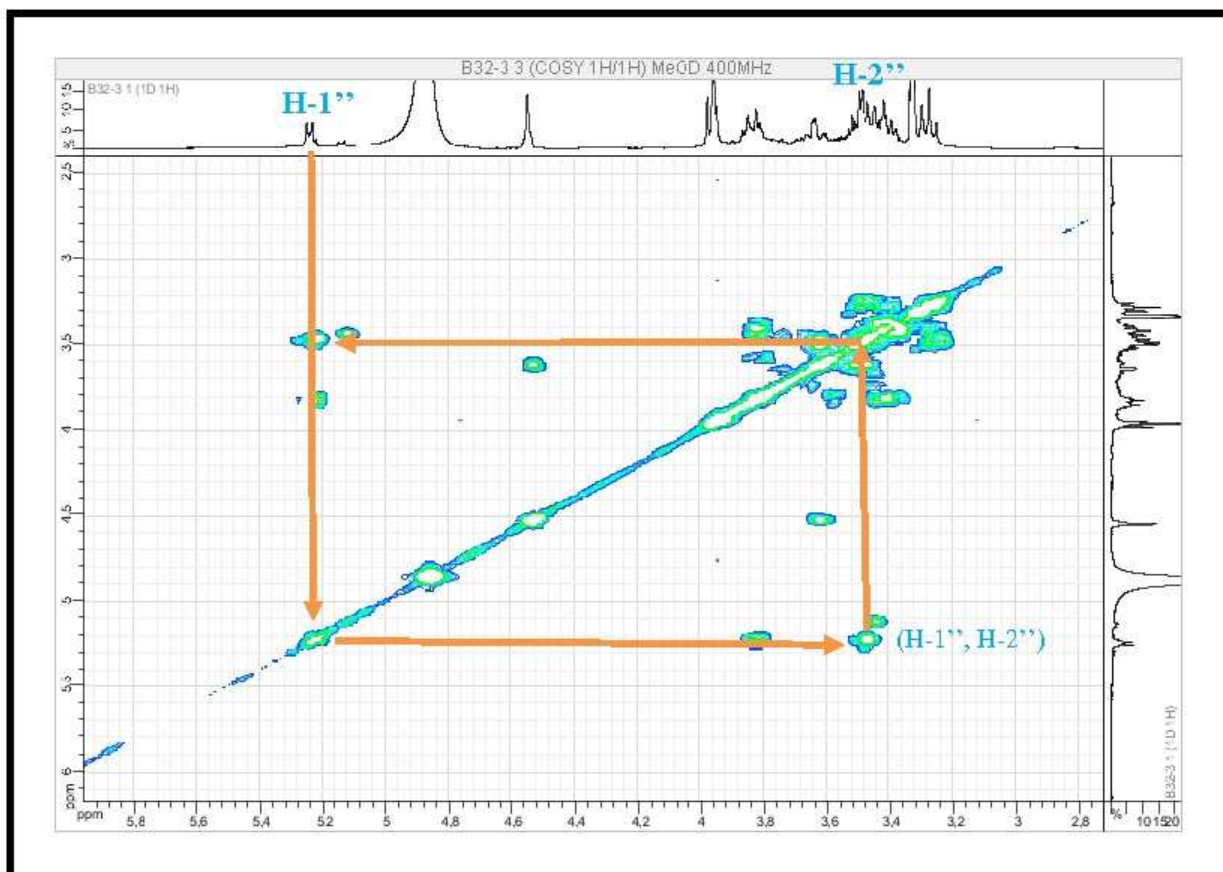
Spectre 85: Spectre RMN ¹³C DEPT 90 (100MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 14



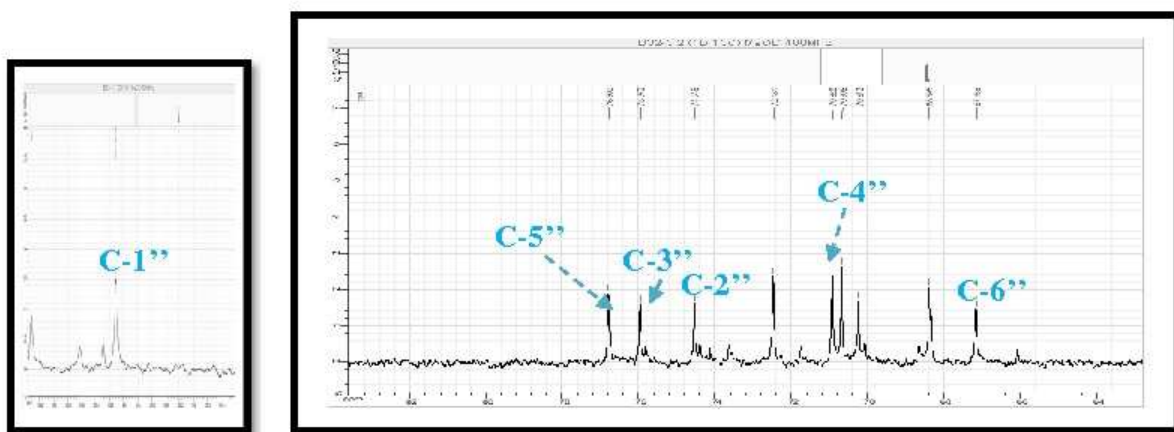
Spectre 86: Spectre RMN ¹³C DEPT 135 (100MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 14



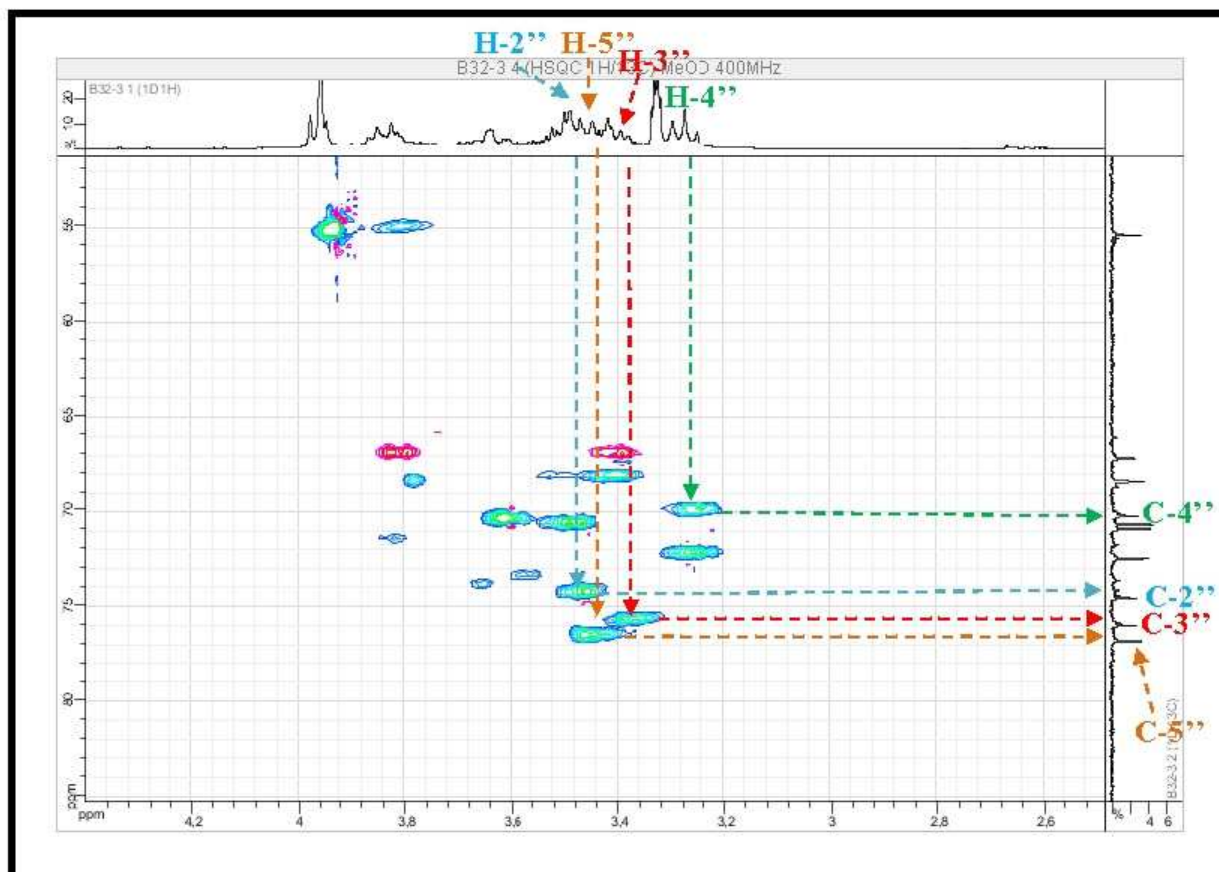
Spectre 87-1: Spectre HSQC (étalement 1) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 14



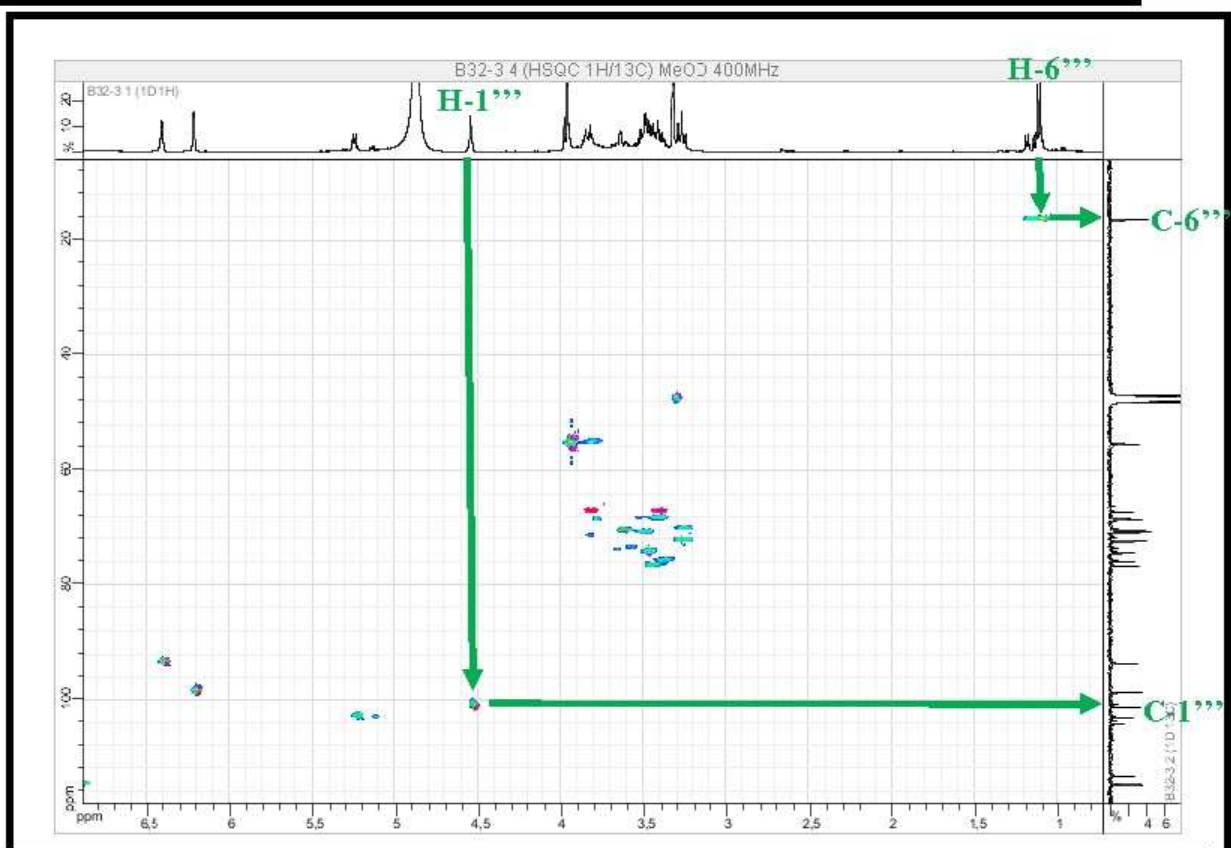
Spectre 88-1: Spectre COSY (étalement 1) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 14



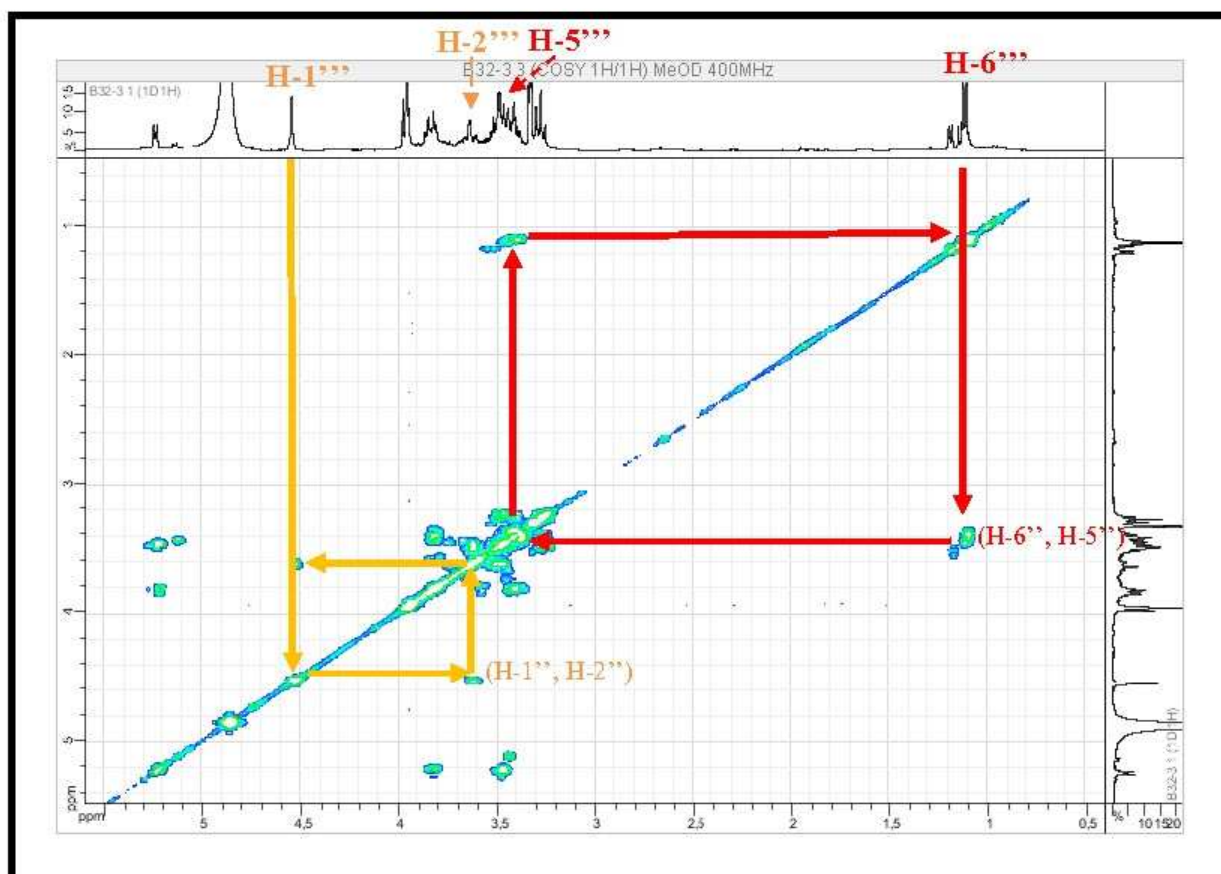
Spectre 84-2: Spectre RMN ¹³C (étalement 3) (100MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 14



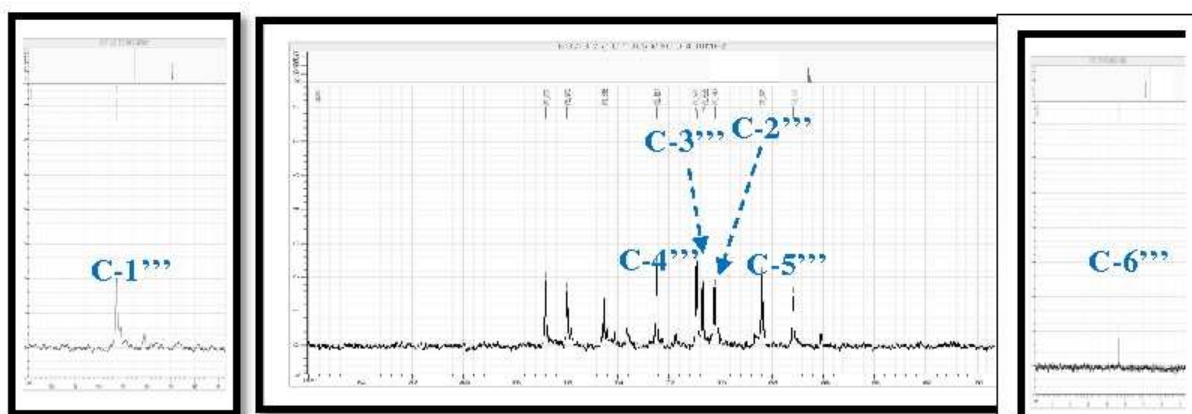
Spectre 87-2: Spectre HSQC (étalement 2) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 14



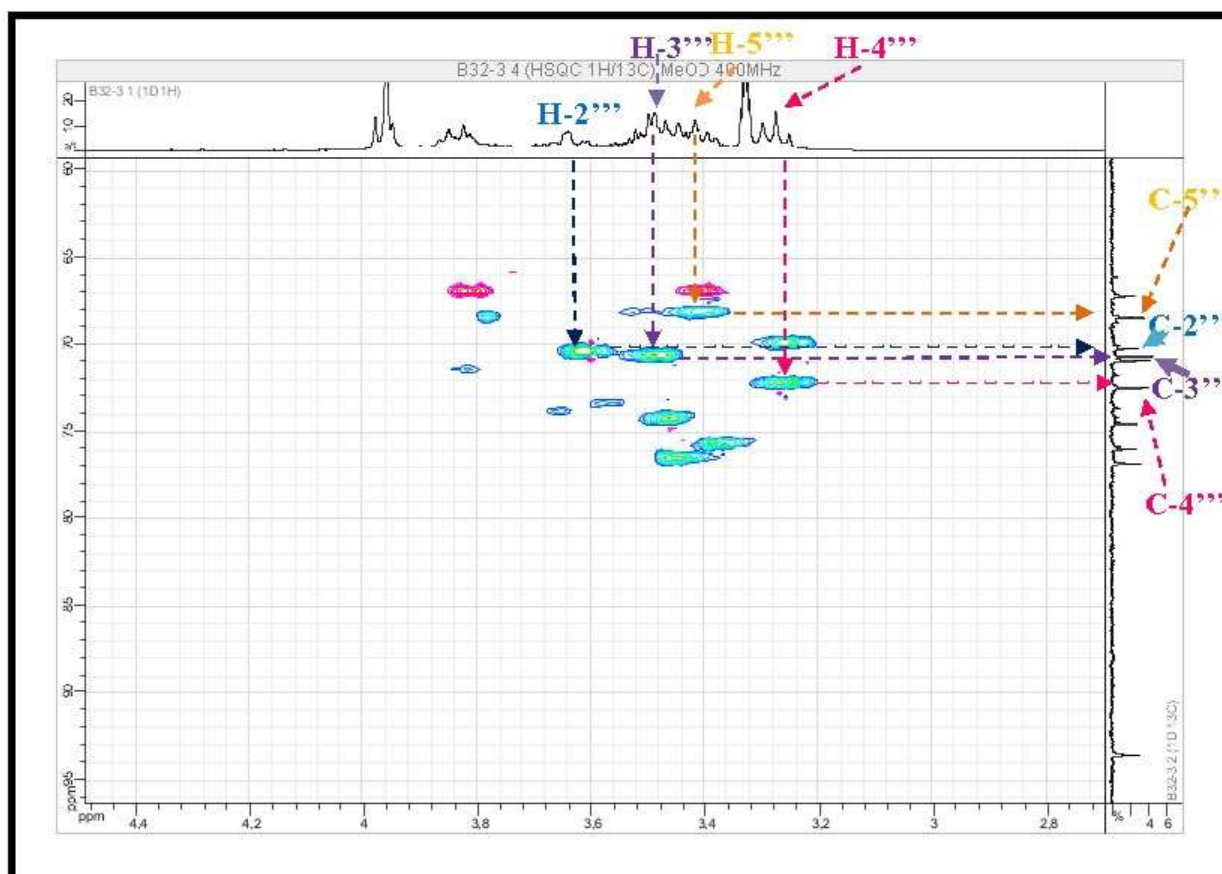
Spectre 87-3: Spectre HSQC (étalement 3) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 14



Spectre 88-2: Spectre COSY (étalement 2) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 14



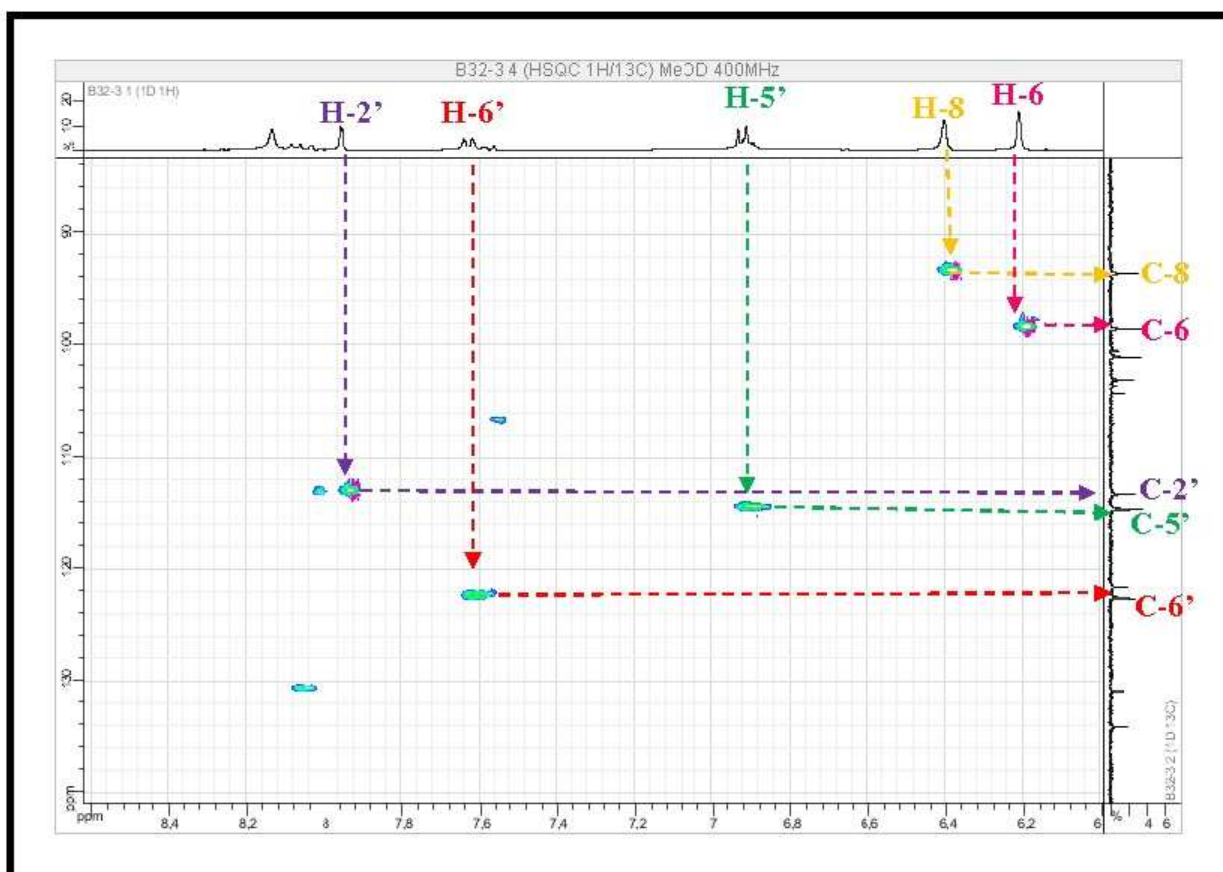
Spectre 84-3: Spectre RMN ¹³C (étalement 4) (100MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 14



Spectre 87-4: Spectre HSQC (étalement 4) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 14

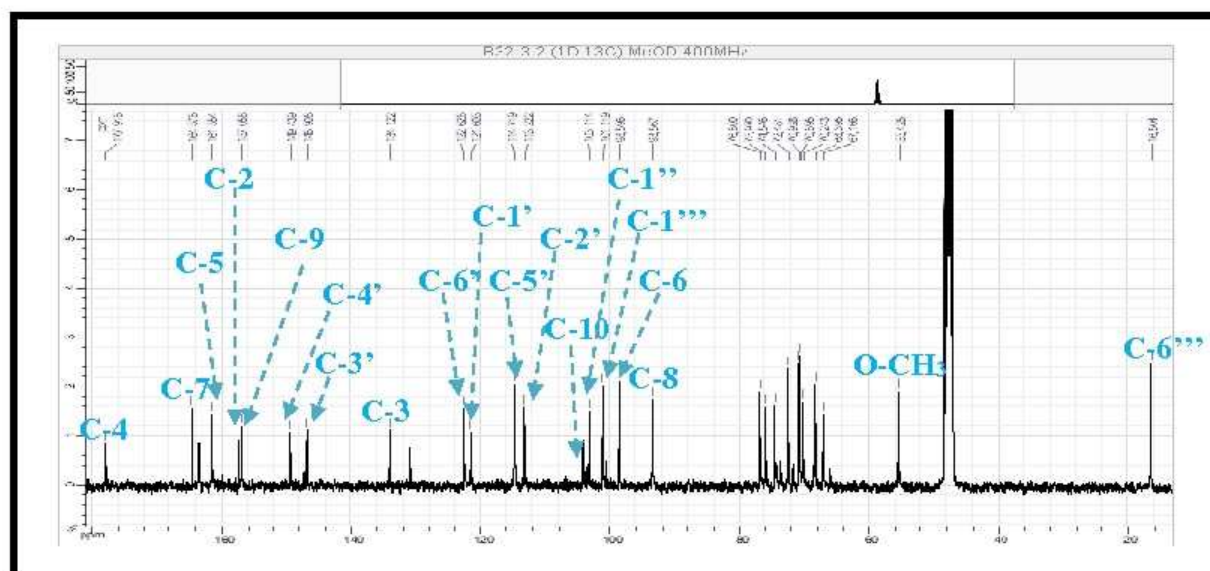
Comme dans les deux molécules précédentes (nicotiflorine et la rutine), ces deux entités sucres sont liés entre eux dans les positions 1 → 6. Ceci est clair sur le spectre HMBC qui montre comme dans le cas précédent une corrélation entre le proton anomérique H-1''' et le carbone C-6'' indiquant la présence d'un groupement O-rutinosyle. La jonction avec l'aglycone est établie par la corrélation observée entre le proton H-1'' et le carbone à $\delta_C = 134,12$ ppm qui ne peut être attribué qu'au C-3 car d'une part il ne corrèle ni avec les protons du cycle A ni avec les protons du cycle B et d'autre part, vu la valeur de son déplacement chimique car les autres carbones oxygénés de cette molécule (C-3', C-4', C-5, C-7) admettent des déplacements chimiques beaucoup plus important.

Le spectre HMBC permet de positionner le groupement méthoxyle précédemment invoqué en position C-3' ($\delta_C = 146,90$ ppm) grâce à la corrélation observée entre les protons de ce méthoxyle et ce carbone lui même attribué grâce à ses corrélations avec H-2' et H-5'. L'ensemble de ces données mènent à la structure reportée sur la figure 93. Il s'agit de Narcissine [68].

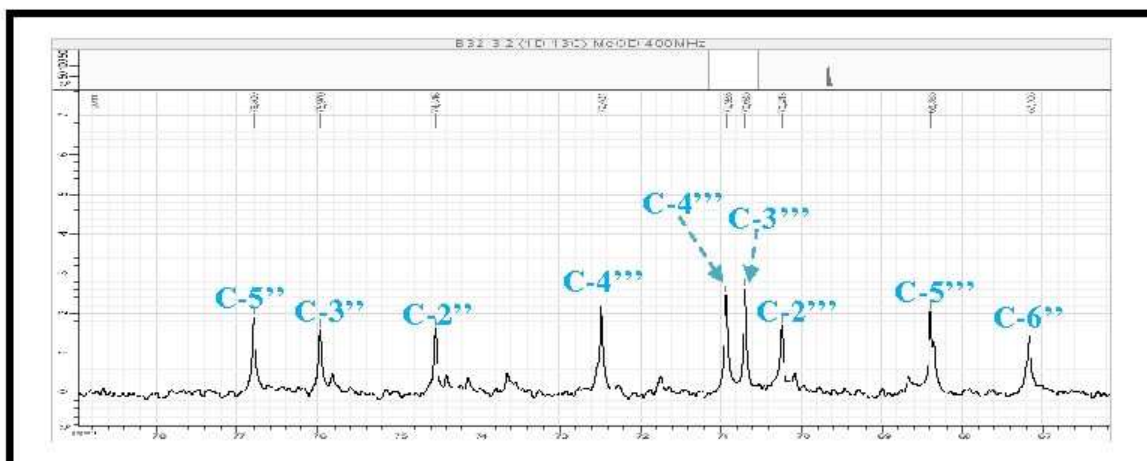


Spectre 87-5: Spectre HSQC (étalement 5) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 14

Toutes ces données sont reportées sur le spectre le ¹³C.



Spectre 84-4: Spectre RMN ¹³C (étalement 4) (100MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 14



Spectre 84-5: Spectre RMN ^{13}C (étalement 5) (100MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 14

Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau suivant 36.

Tableau 36. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé 14.

Glucose		
Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1''	5,24 (d ; 7,2 Hz)	103,11
2''	3,47 (m)	74,38
3''	3,39 (m)	75,97
4''	3,28 (m)	74,54
5''	3,45 (m)	76,80
6''	3,81 (dd ; 10,4 ; 3,4 Hz) 3,41 (dd ; 10,4 ; 6,5 Hz)	67,16
Rhamnose		
1'''	4,55 (d ; 1,2 Hz)	101,11
2'''	3,63 (m)	70,24
3'''	3,48 (m)	70,69
4'''	3,27 (m)	72,38
5'''	3,40 (m)	68,39
6'''	1,12 (d ; 6,2 Hz)	16,50
Flavonoïde		
2	/	157,46
3	/	134,12
4	/	177,91
5	/	161,55
6	6,21 (d ; 1,5 Hz)	98,59

Tableau 36. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **14** (suite).

7	/	164,57
8	6,40 (d ; 1,5 Hz)	93,56
9	/	157,05
10	/	104,32
1'	/	121,60
2'	7,95 (d ; 1,6 Hz)	113,22
3'	/	146,90
4'	/	149,43
5'	6,92 (d ; 8,0 Hz)	114,72
6'	7,63 (d ; 8,0; 1,6 Hz)	122,62
OCH_3	3,96 (s)	55,42

IV.4. Elucidation structurale des produits isolés de la phase Acétate d'éthyle de *Helianthemum confertum*

IV.4.1. Elucidation structurale du composé (A9-1)

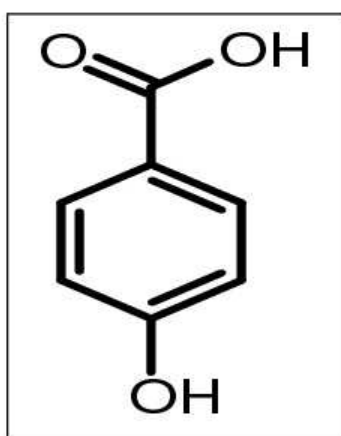


Figure 94. Structure du composé **15**.

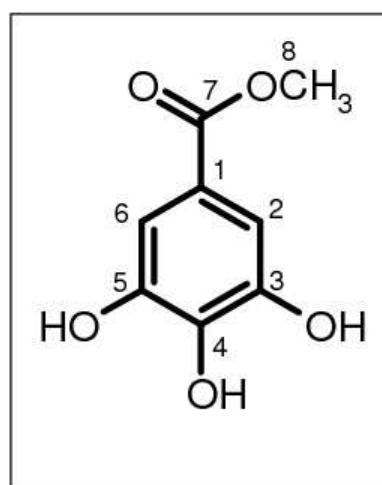


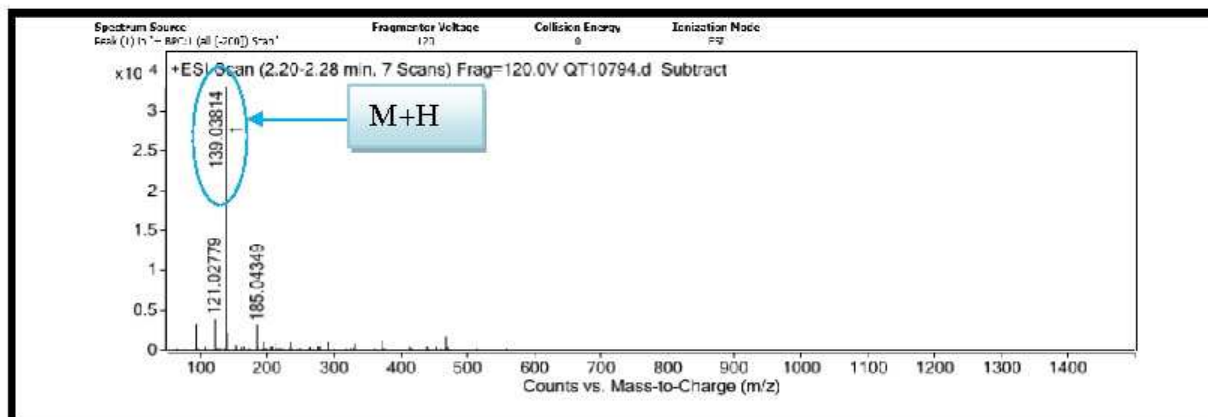
Figure 95. Structure du composé **16**.

Injecté en LC/MS (colonne C_{18}) ce produit montre deux pics : $T_r = 2,25$ min et $T_r = 2,31$ min signifiant que ce produit est sous forme d'un mélange.

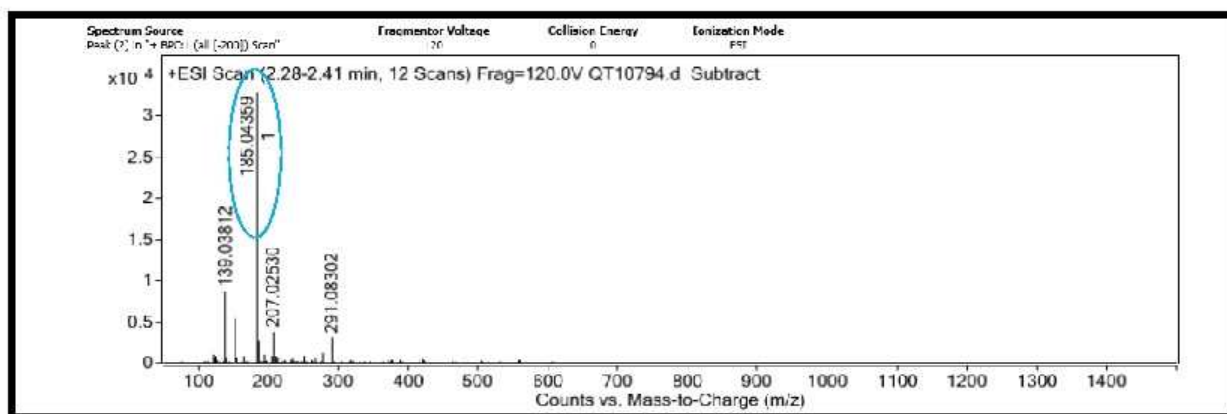
Le spectre de masse à haute résolution en mode electrospray positif (Spectre 90) du premier montre un pic quasi moléculaire à $m/z = 139,03814$ correspondant à $[\text{M}+\text{H}]^+$ indiquant une formule brute $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$.

L'examen du spectre de masse à haute résolution en mode electrospray positif (Spectre 91) du deuxième montre un pic quasi moléculaire à $m/z = 185,04359$ correspondant à $[\text{M}+\text{H}]^+$. Ce

résultat est appuyé par le calcul de la masse exacte (Tableau 37) qui donne une valeur $m/z = 184,03632$ (calculé pour $C_8H_8O_5$: 148,03717).



Spectre 90: Spectre HR-ESI-MS (+) du composé 15



Spectre 91: Spectre HR-ESI-MS (+) du composé 16

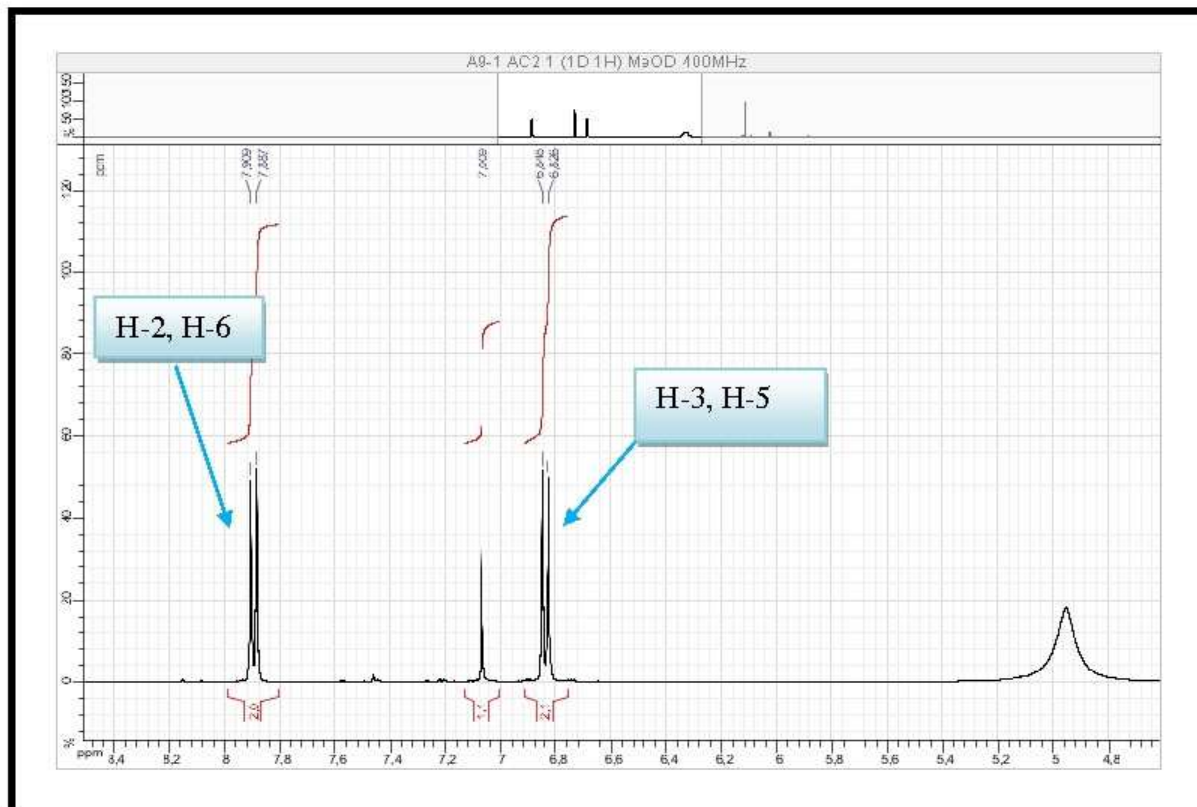
Tableau 37. Analyse de la composition élémentaire des différents ions.

Formula Calculator Results							
Formula	Best	Mass	Tgt Mass	Diff (ppm)	Mz	Ion Species	Score
$C_8H_8O_5$		184.03632	184.03717	4.66	185.04359	$C_8H_9O_5$	83.56

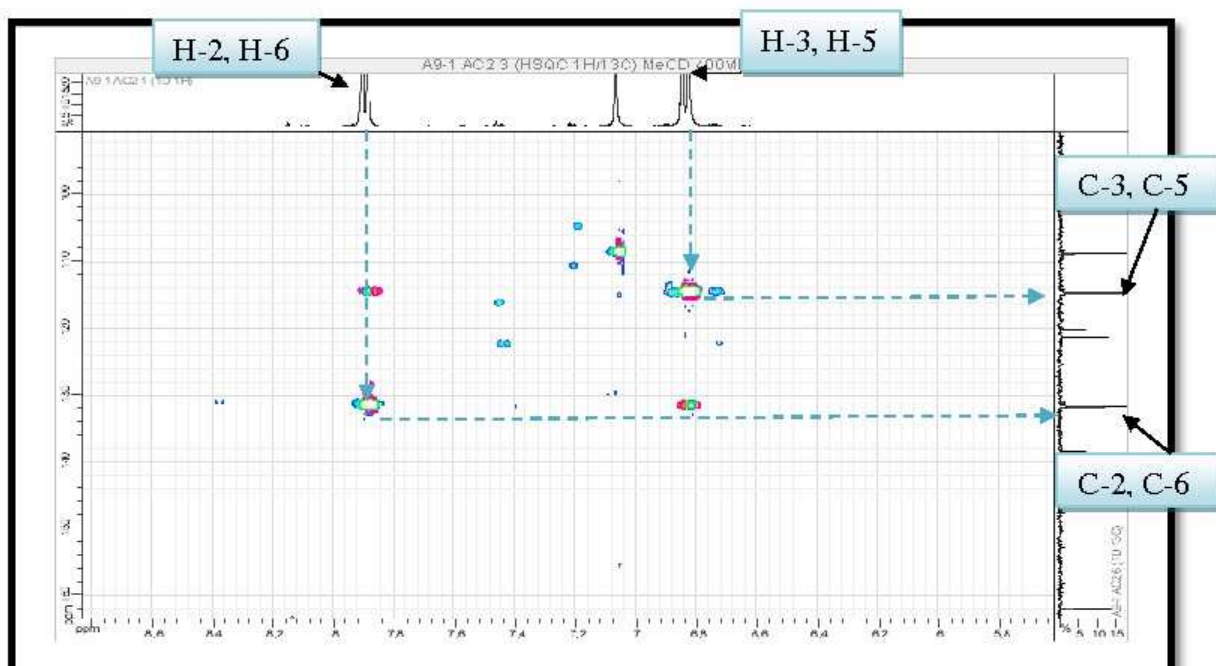
La combinaison des données des spectres proton (Spectre 92), ^{13}C (Spectre 93), COSY (Spectre 94), HSQC (Spectre 95) et HMBC (Spectre 96) permet de répartir les différents signaux en deux lots.

Le premier lot comportant des signaux caractéristiques d'un noyau aromatique substitué dans les positions C-1 et C-4. En effet, on y relève :

- Un doublet d'intégration 2H, à $\delta_H = 7,89$ ppm ($J = 8,8$ Hz) attribuable à H-2 et H-6 ($\delta_C = 131,64$ ppm).
- Un doublet d'intégration 2H, à $\delta_H = 6,83$ ppm ($J = 8,8$ Hz) attribuable à H-3 et H-5 ($\delta_C = 114,68$ ppm).



Spectre 92-1: Spectre RMN ^1H (étalement 1) (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 15



Spectre 95-1: Spectre HSQC (étalement 1) (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 15

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (spectre 96-1), les corrélations entre H-2 et H-6 ; H-3 et H-5 et le carbone à $\delta_C = 121,35$ ppm permettent son attribution au carbone C-1 ; les corrélations entre H-2, H-6, H-3 et H-5 et le carbone quaternaire à $\delta_C = 161,94$ ppm permettent l'attribution de ce carbone à C-4 ; les corrélations entre H-2 et H-6 et le carbone quaternaire à $\delta_C = 168,76$ ppm permettent son attribution à C-7, substituant ce noyau aromatique en position C-1. La valeur du déplacement chimique de ce carbone (C-7) indique qu'il s'agit d'un groupement carboxyle.

L'ensemble des données de ce premier lot de signaux mènent à la structure reportée dans la figure 96. Il s'agit de l'acide para-hydroxybenzoïque [70]. Cette molécule est nouvelle pour le genre *Helianthemum*.

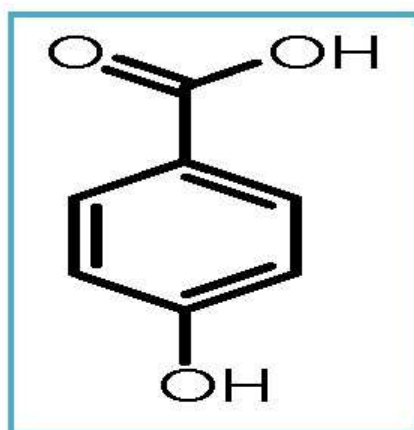
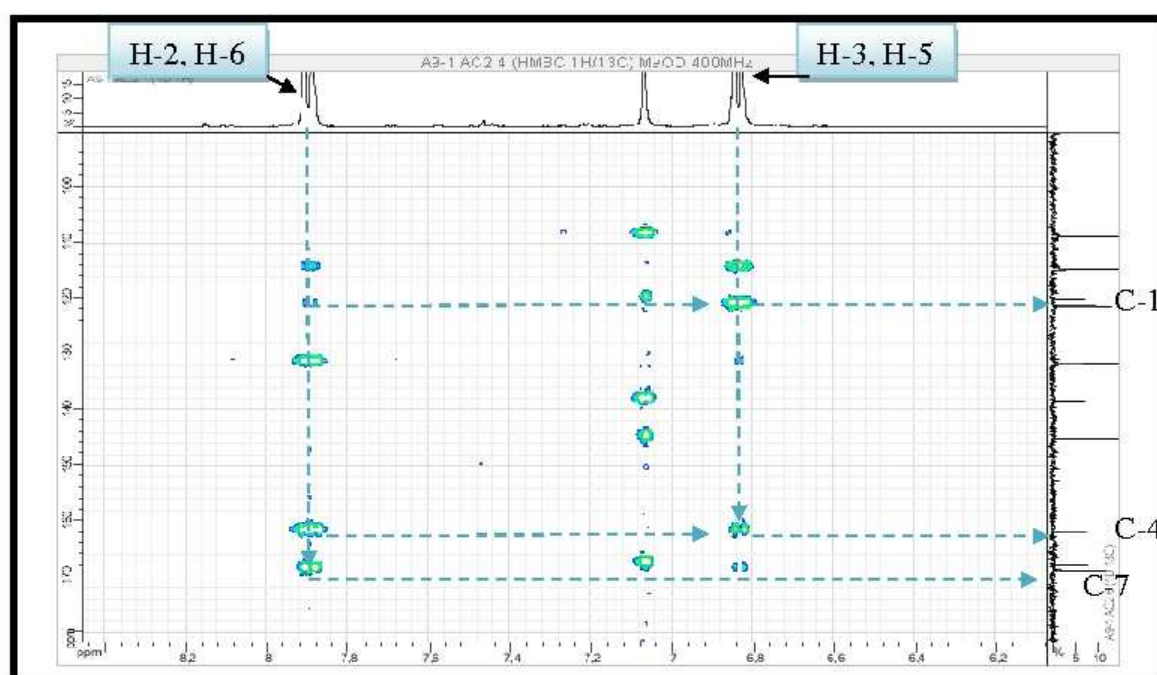
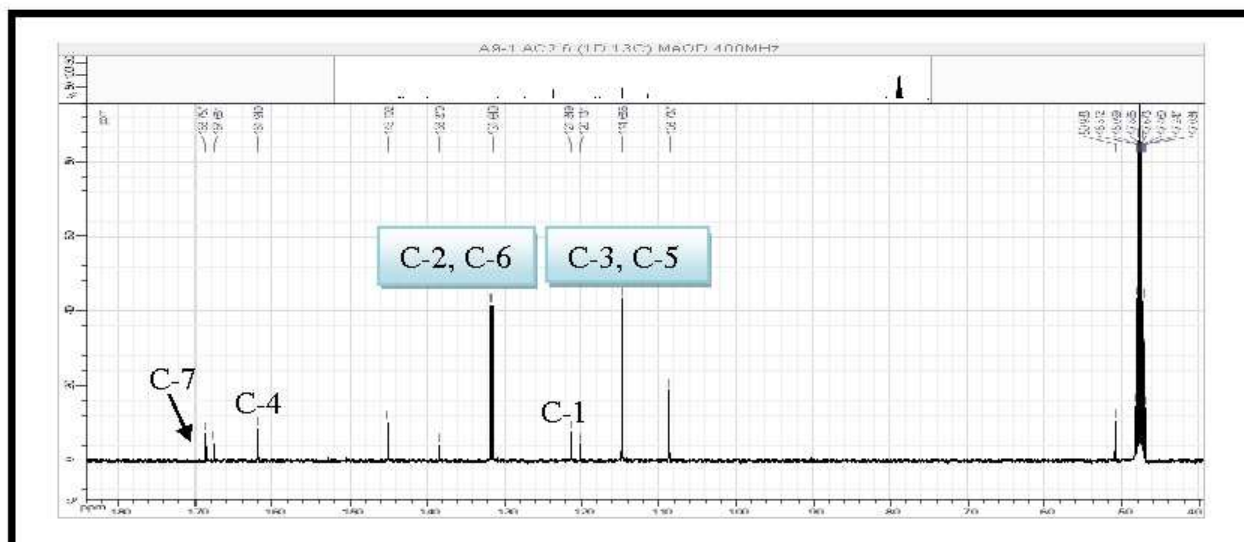


Figure 96. Structure du composé 15, acide para-hydroxybenzoïque.

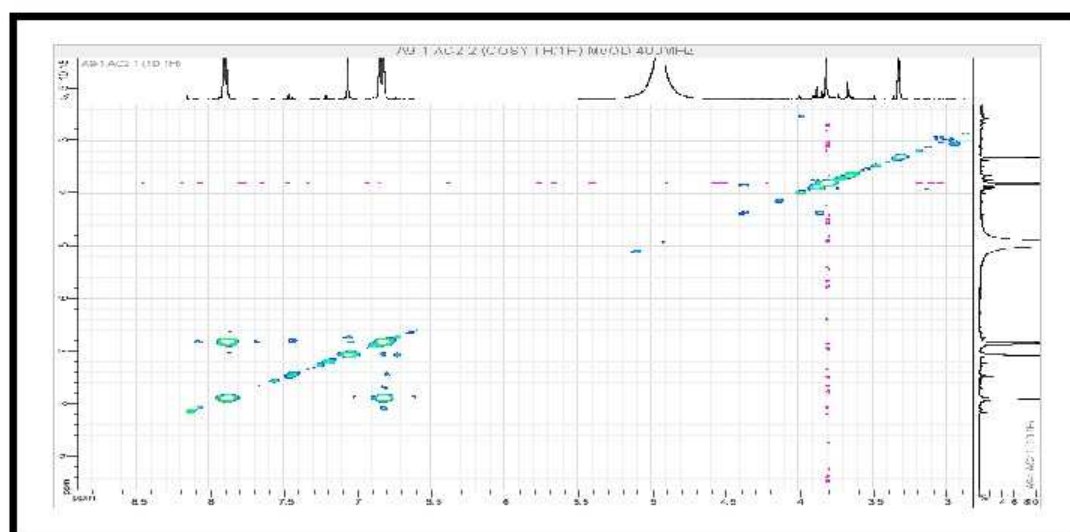


Spectre 96-1: Spectre HMBC (étalement 1) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 15

Toutes ces données sont reportées sur le spectre le ^{13}C .



Spectre 93-1: Spectre RMN ^{13}C (étalement 1) (100MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 15



Spectre 94: Spectre COSY (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 15

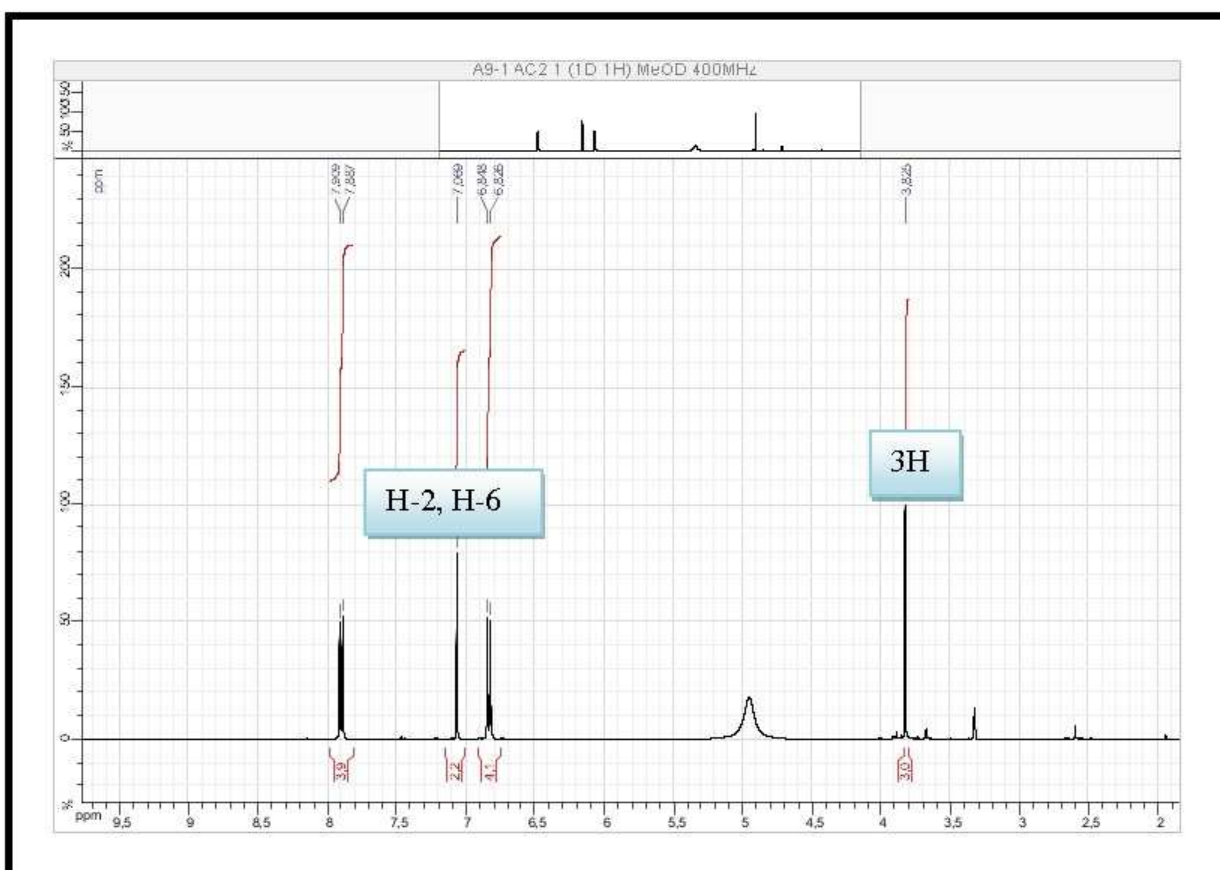
Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau 38.

Tableau 38. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **15**.

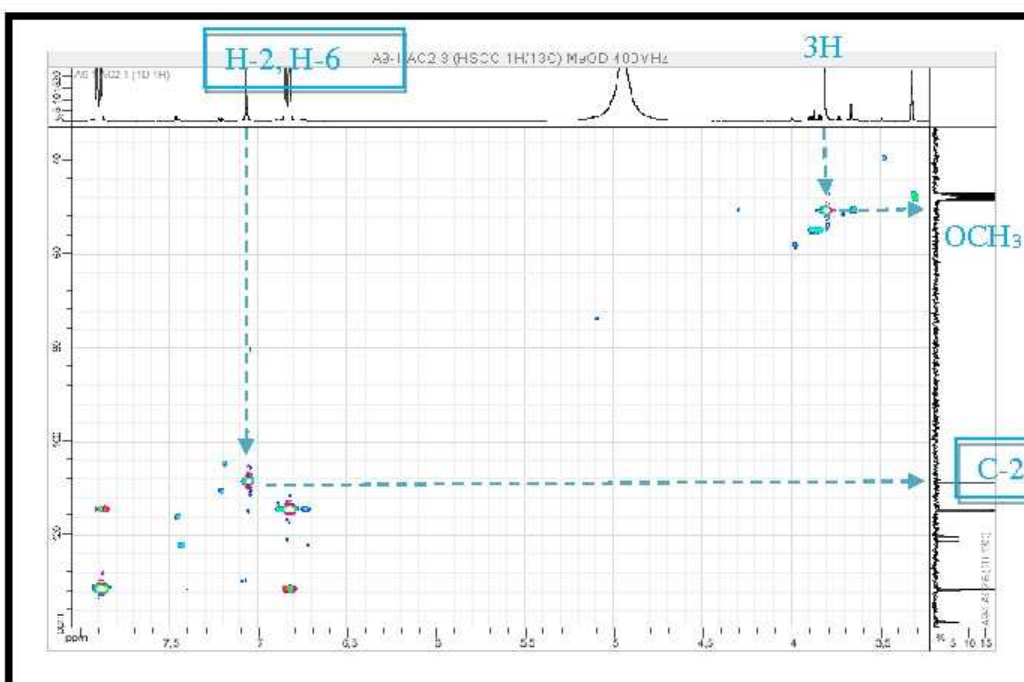
Composé		
Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	/	121,35
2	7,89 (d ; 8,8 Hz)	131,64
3	6,83 (d ; 8,8 Hz)	114,68
4	/	161,94
5	6,83 (d ; 8,8 Hz)	114,68
6	7,89 (d ; 8,8 Hz)	131,64
7	/	168,76

Conformément aux données de la spectrométrie de masse et en faisant abstraction des signaux du premier lot, l'examen du spectre RMN ^1H (Spectre 92-2), montre des signaux caractéristiques d'un noyau aromatique substitué dans les positions C-1, C-3, C-4 et C-5 ou dans les positions C-1, C-2, C-4 et C-6. En effet, on y relève un singulet d'intégration 2H à 7,07 ppm ($\delta_{\text{C}} = 108,74$ ppm.)

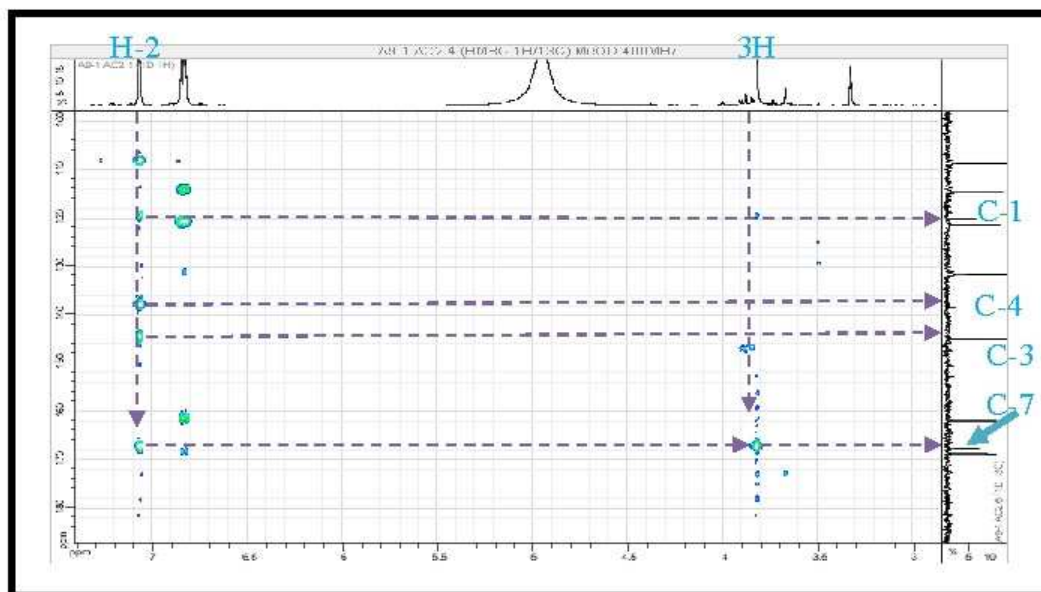
Par ailleurs ce spectre montre un singulet d'intégration 3H à 3,82 ppm. Ce signal peut être attribué sans ambiguïté à un groupement méthoxyle ($\delta_{\text{C}} = 50,93$ ppm.).



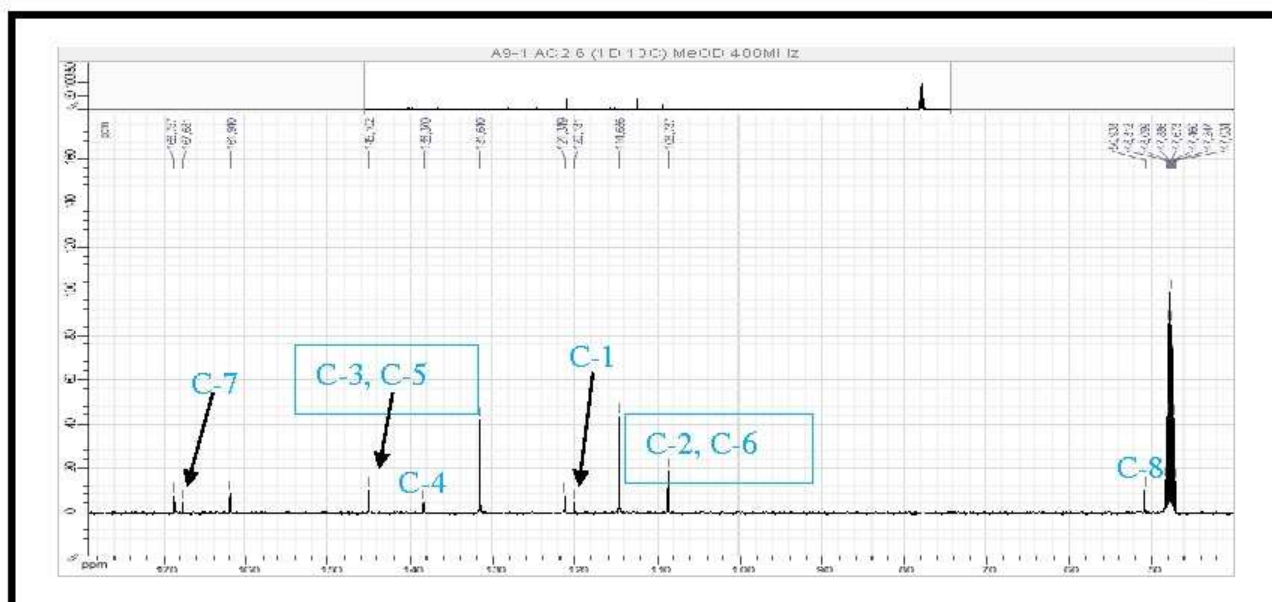
Spectre 92-2: Spectre RMN ^1H (étalement 2) (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 16



Spectre 95-2: Spectre HSQC (étalement 2) (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé 16



Spectre 96-2: Spectre HMBC (étalement 2) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 16



Spectre 93-2: Spectre RMN ¹³C (étalement 2) (100MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 16

Les données relatives aux spectres de RMN ¹H et ¹³C de ce composé sont reportées dans le tableau 39.

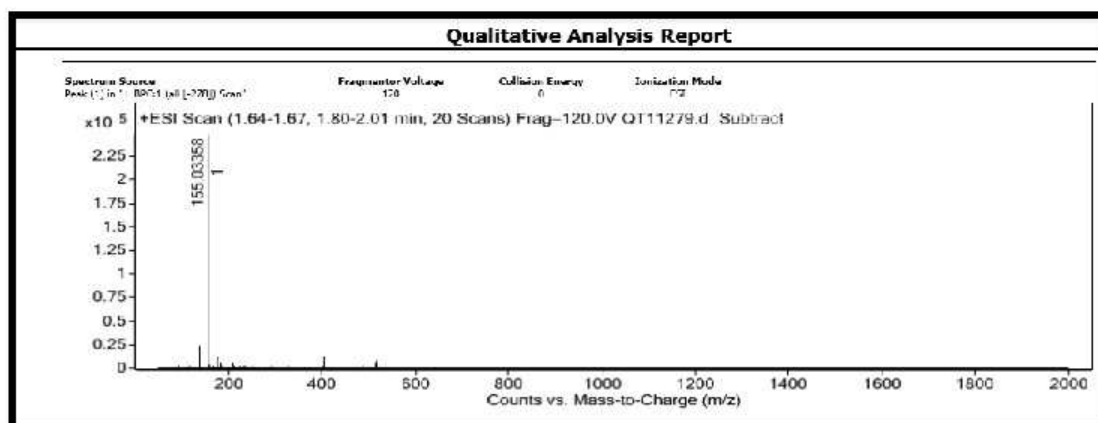
Tableau 39. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **16**.

Composé		
Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1	/	120,13
2	7,07(s)	108,74
3	/	145,10
4	/	138,37
5	/	145,10
6	7,07(s)	108,73
7	/	167,68
8	3,82 (s)	50,93

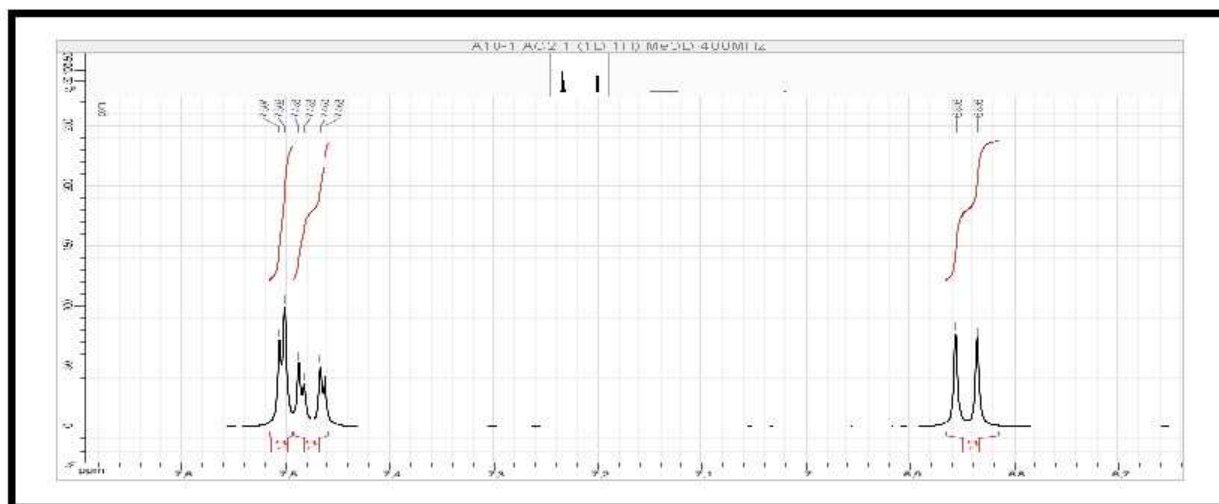
D'après l'intégration des pics nous avons un mélange de 66% d'acide para hydroxybenzoïque et 34% de méthyle gallate.

IV.4.2. Elucidation structurale du composé (A10-1)

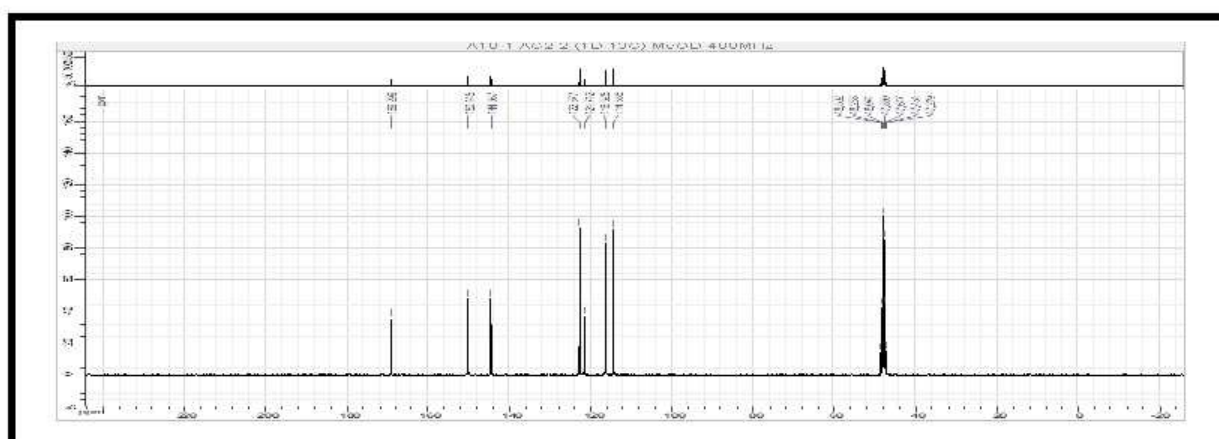
D'après les spectres de masse (Spectre 97), proton (Spectre 98) et carbone 13 (Spectre 99), ce composé est le même que celui isolé de la phase acétate d'éthyle de *Helianthemum ruficomum* composé **1** : acide protocatechique.



Spectre 97: Spectre HR-ESI-MS (+) du composé A10-1



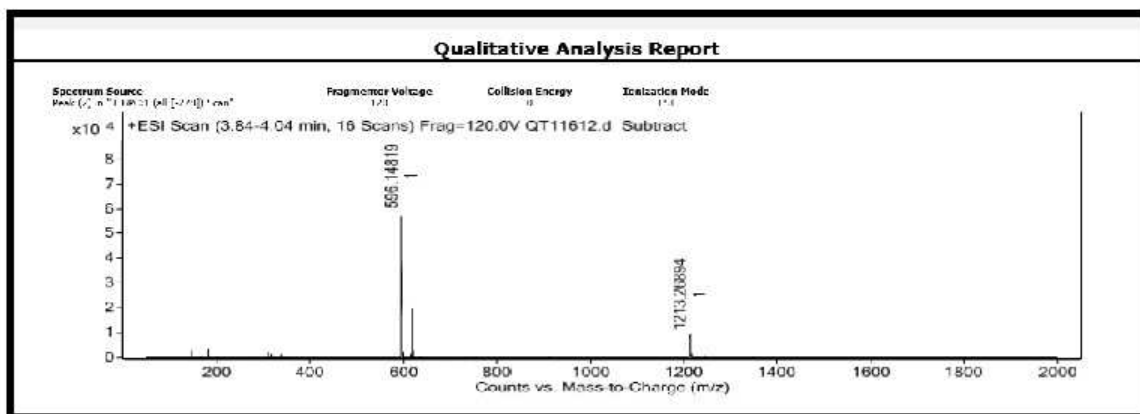
Spectre 98-1: Spectre RMN ^1H (étalement 1) (400MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé A10-1



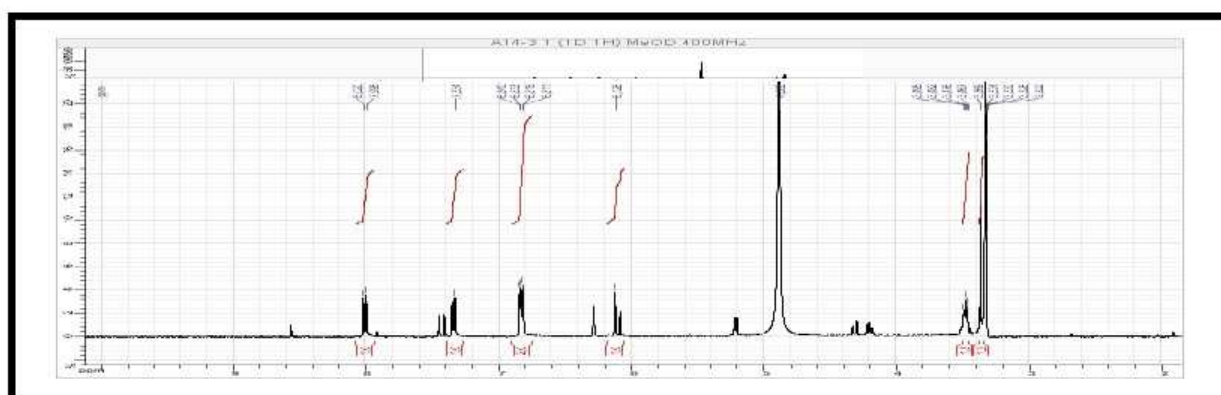
Spectre 99: Spectre RMN ^{13}C (100MHz, CD_3OD , δ ppm) du composé A10-1

IV.4.3. Elucidation structurale du composé (A14-3)

D'après les spectres de masse (Spectre 100) et proton (Spectre 101), ce composé est le même que celui isolé de la phase acétate d'éthyle de *Helianthemum ruficomum* composé **3** : trans-tiliroside contaminé par son stéréoisomère composé **2** : cis-tiliroside. Dans ce cas le pourcentage trans-cis tiliroside est de : 80% de trans-tiliroside et 20% de cis-tiliroside.



Spectre 100: Spectre HR-ESI-MS (+) du composé A14-3



Spectre 101: Spectre RMN ¹H (étalement 1) (400MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé A14-3

IV.4.4. Elucidation structurale du composé (B28-5) :

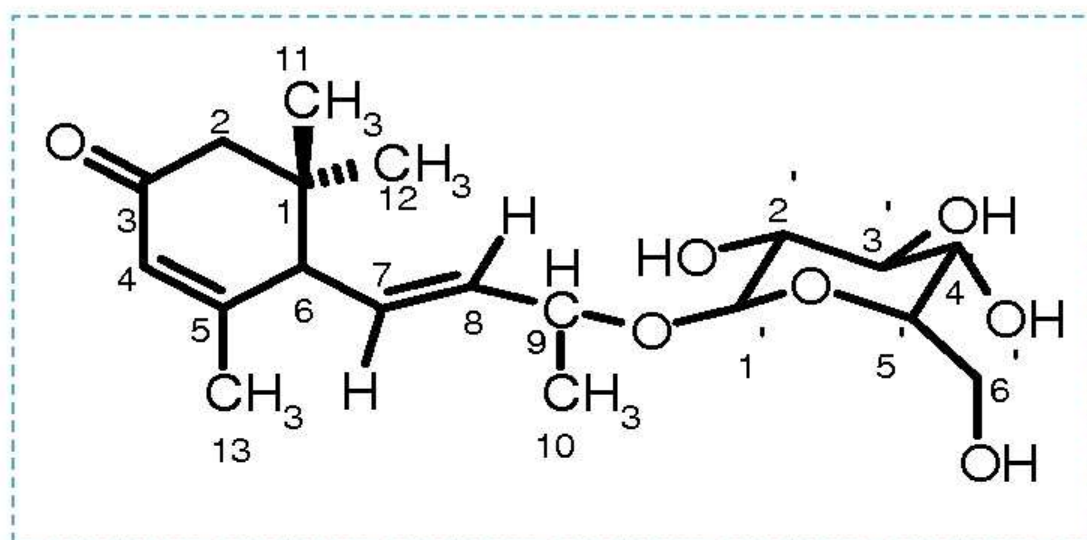
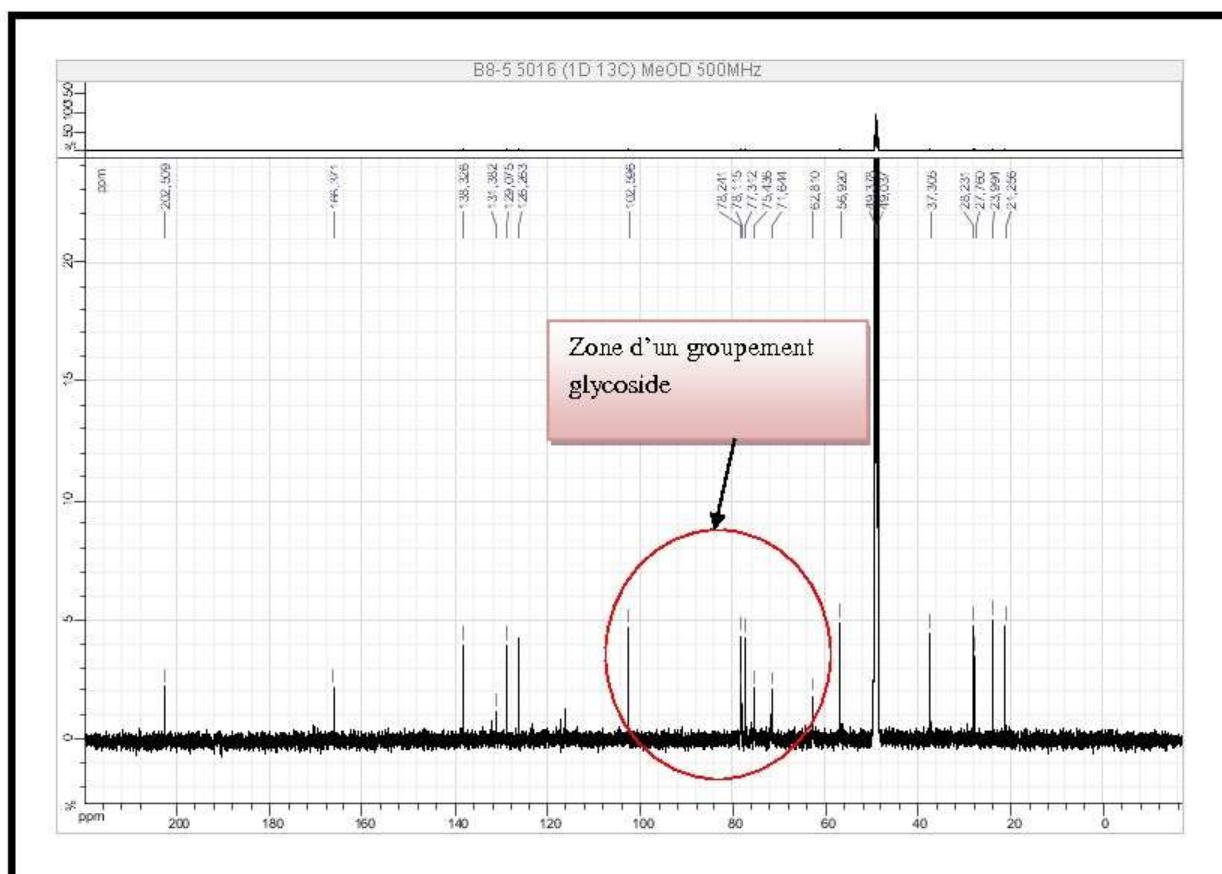
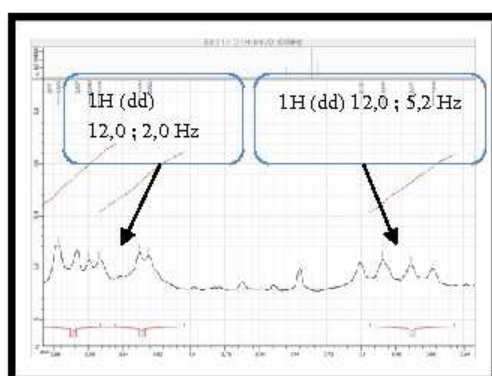


Figure 98. Structure du composé 17, B28-5.



Spectre 103 : Spectre RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 17

✓ un CH₂ à δ_H = 3,84 ppm (1H; dd ; J = 12,0 ; 2,0 Hz) et δ_H = 3,68 ppm (1H; dd ; J = 12,0 ; 5,2 Hz), δ_C = 62,81 ppm, attribuable au CH₂ de la position C-6' de l'hexose.

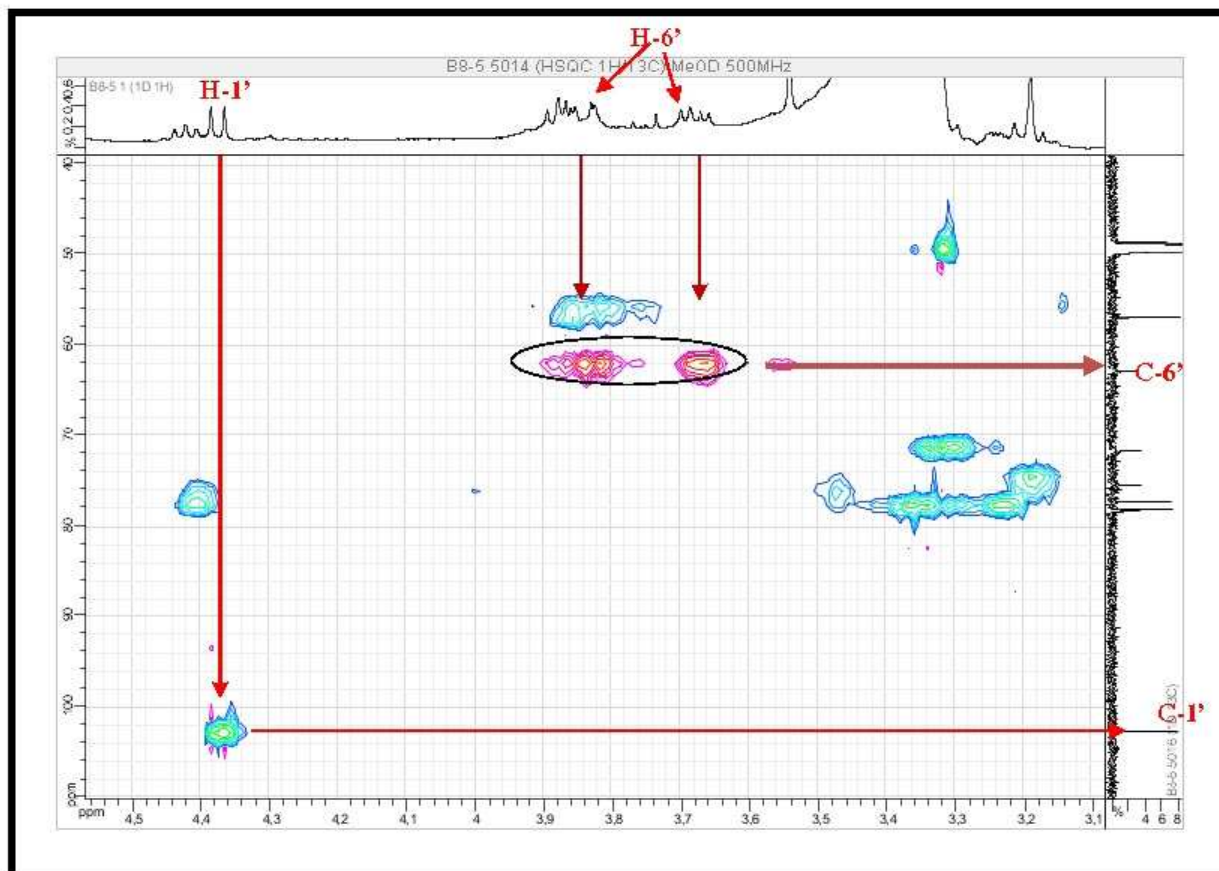


Spectre 104-1: Spectre RMN ¹H (étalement 1) (500MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé B28-5

✓ Un groupement CH à δ_H = 4,37 ppm J = 7,7 Hz, δ_C = 102,60 ppm attribuable à la position anomérique C-1'.

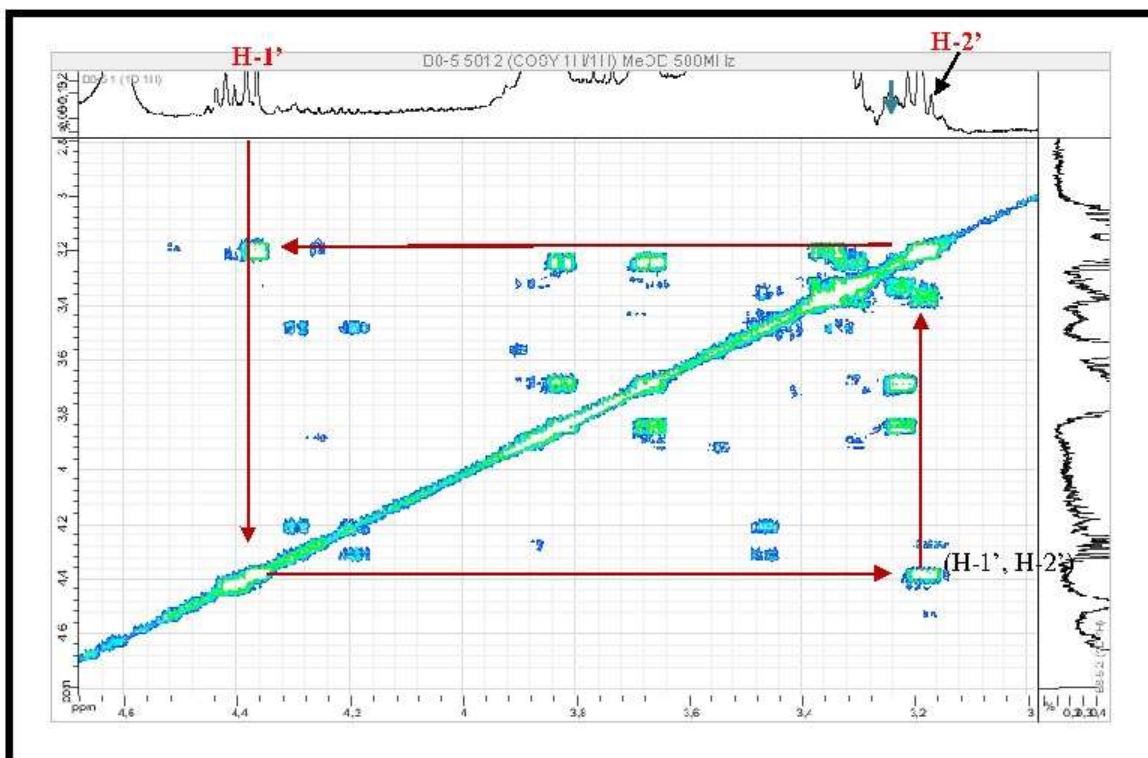
La valeur de la constante de couplage du proton anomérique et la valeur du déplacement chimique de son carbone indiquent une jonction -O-β- glycosidique. La valeur 7,7 Hz de la

constante de couplage, indique également une orientation axiale du proton H-2' du groupement glycosyle.

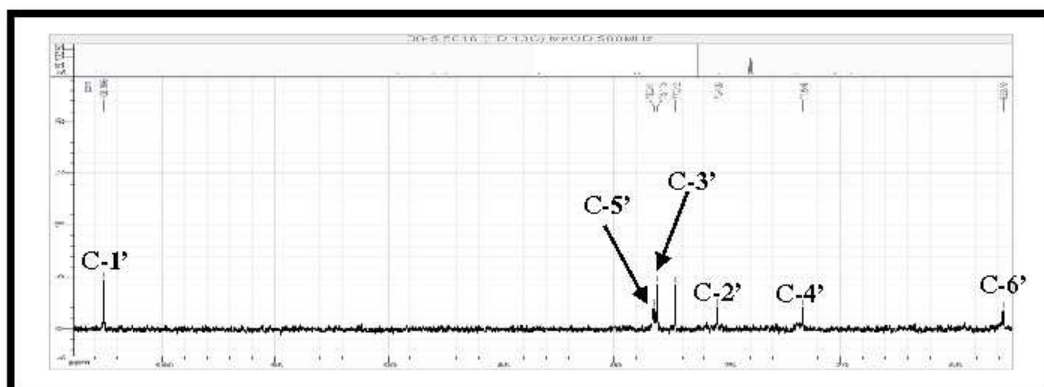


Spectre 105-1: Spectre HSQC (étalement 1) (500 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 17

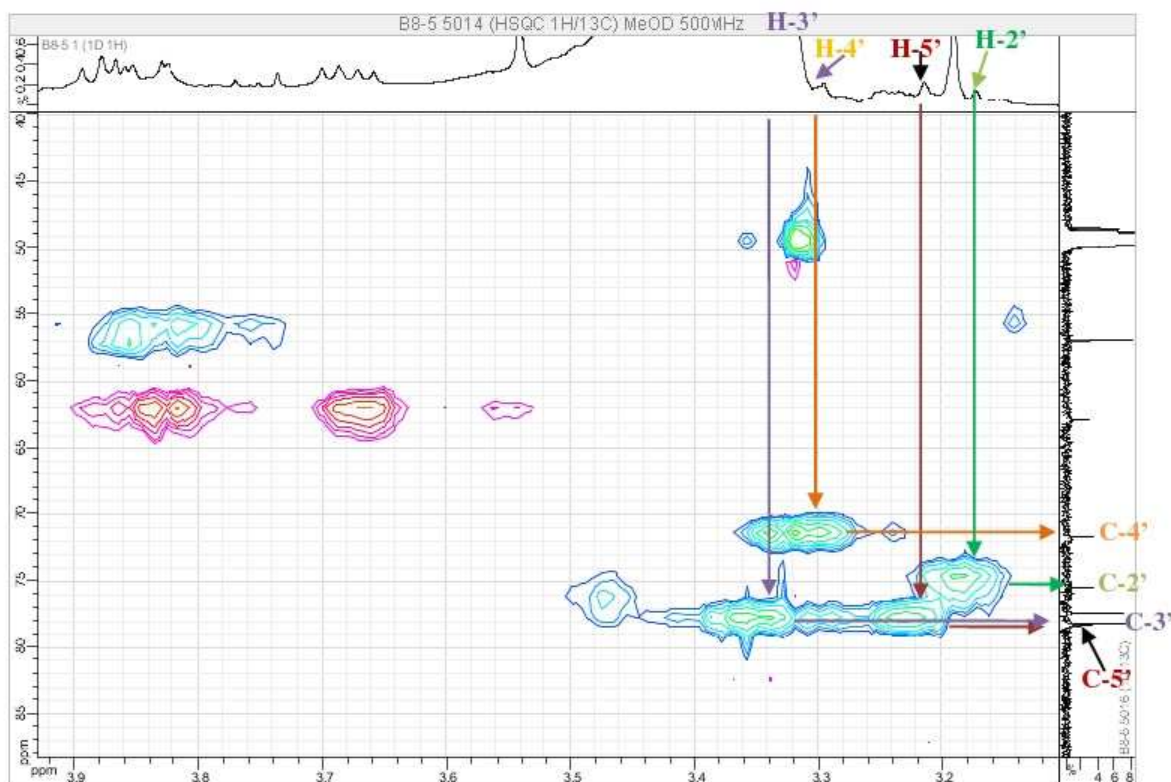
Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre 106), le proton anomérique H-1' montre une tache de corrélation avec le signal d'un proton très proche de ceux de deux autres à $\delta_H = 3,18$ ppm ce proton est attribuable à H-2' ($\delta_C = 75,44$ ppm). Toujours sur le spectre relatif à l'expérience COSY, ce proton corrèle avec le proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,34$ ppm attribuable à H-3' ($\delta_C = 78,11$ ppm). Le spectre relatif à l'expérience COSY montre également que le proton H-6' corrèle avec un multiplet à $\delta_H = 3,23$ ppm attribuable à H-5' ($\delta_C = 78,24$ ppm). Ce dernier proton corrèle avec un proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,30$ ppm attribuable H-4' ($\delta_C = 71,64$ ppm). Les valeurs des déplacements chimiques des carbones et protons de se sucre, sont en faveur d'un groupement de type glucopyranosyle.



Spectre 106-1: Spectre COSY (étalement 1) (500 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 17



Spectre 103-1: Spectre RMN ¹³C (étalement 1) (125 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé B28-5



Spectre 105-2: Spectre HSQC (étalement 2) (500 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 17

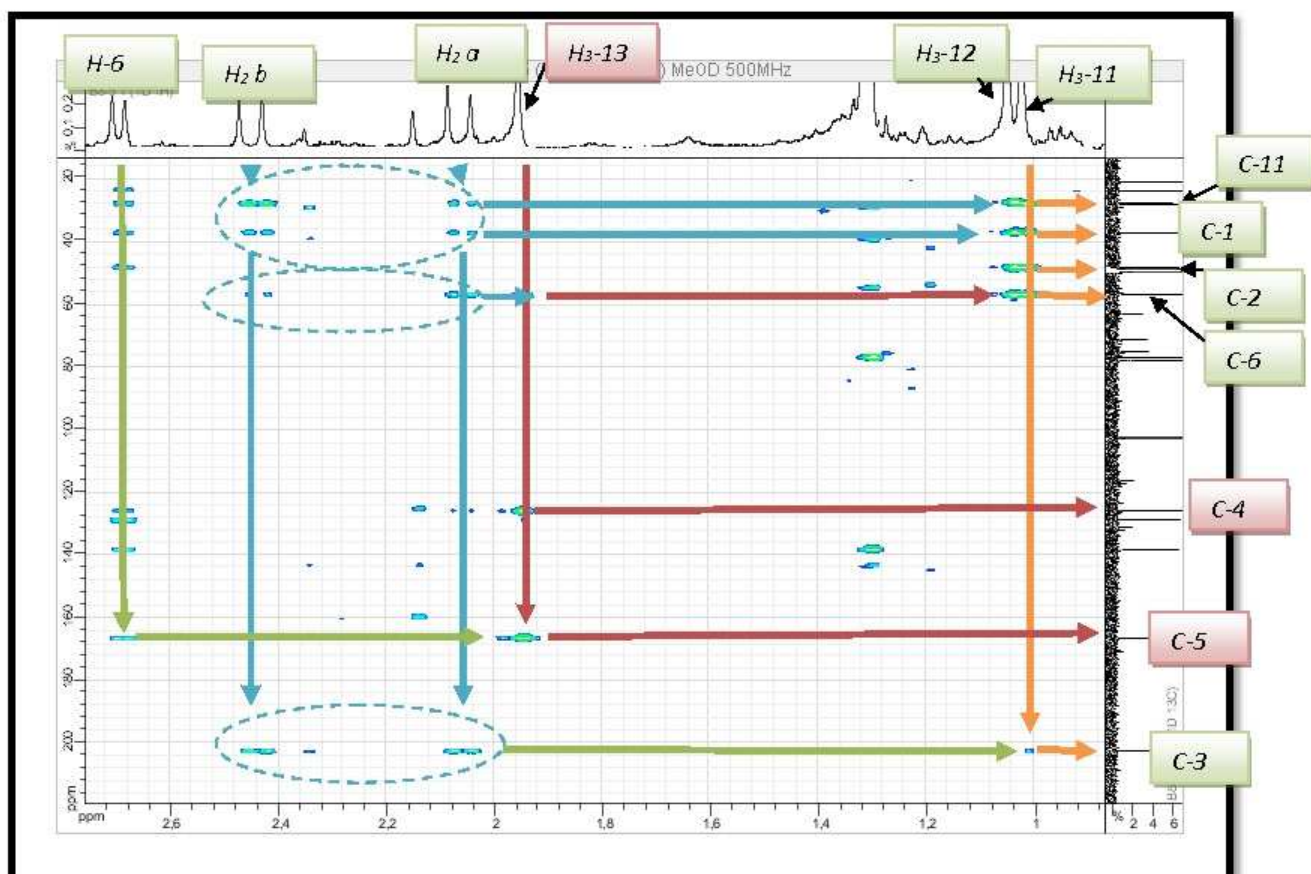
- En faisant abstraction des signaux du groupement glucopyranosyle les spectres RMN ¹H, ¹³C, COSY, HSQC et HMBC (Spectre 107) de ce composé, montrent deux singlets d'intégration 3H chacun à $\delta_H = 1,02$ ppm ($\delta_C = 27,76$ ppm) et $\delta_H = 1,05$ ppm ($\delta_C = 28,23$ ppm). Les protons de chacun de ces deux méthyles corrélient avec le carbone de l'autre signifiant que ces deux méthyles sont portés par le même atome de carbone qui doit être quaternaire vu la multiplicité des signaux de ces deux méthyles et hybridé Sp³ vu les valeurs des déplacements chimiques de leur protons et leur carbones. Nous numérotions ce carbone quaternaire Sp³ C-1 ($\delta_C = 37,30$ ppm). Sur le spectre HMBC les carbones de ces deux méthyles montrent des corrélations avec les protons du groupement CH₂ résonant sous forme de deux doublets à $\delta_H = 2,45$ ppm ($\delta_C = 48,45$ ppm) et $\delta_H = 2,07$ ppm ($\delta_C = 48,45$ ppm) ($J = 16,8$ Hz). nous numérotions ce carbone C-2. Toujours sur le spectre HMBC, les protons H₂-2 montrent une corrélation en ²J avec le carbone d'un carbonyle résonant à $\delta_C = 202,51$ ppm d'après la valeur du déplacement chimique de ce carbonyle il s'agit d'un carbonyle de cétone probablement conjugué avec une double liaison ceci est confirmé par la corrélation en

3J observée entre les protons H₂-2 et le carbone du CH éthylénique résonant à $\delta_C = 126,26$ ppm ($\delta_H = 5,90$ ppm). Nous numérotions alors le carbone du carbonyle C-3 et le carbone du CH éthylénique C-4. Toujours sur le spectre HMBC, le proton H-4 montre une tache de corrélation nette avec le carbone du méthyle résonant à $\delta_C = 23,95$ ppm ($\delta_H = 1,95$ ppm, singulet) signifiant la substitution de la double liaison par ce groupement méthyle en C-5 ($\delta_C = 166,37$ ppm). Le proton H-4 montre également une corrélation avec le carbone du méthyne à $\delta_C = 56,92$ ppm ($\delta_H = 2,70$ doublet, $J = 7,7$ Hz) permettant alors de numérotier le carbone de ce méthyne C-6. Le spectre HMBC montre par ailleurs une corrélation entre H-6 et les carbones des méthyles portés par C-1. Cette corrélation signifie que le carbone C-6 est lié au carbone C-1 aboutissant donc à un cycle en C₆.

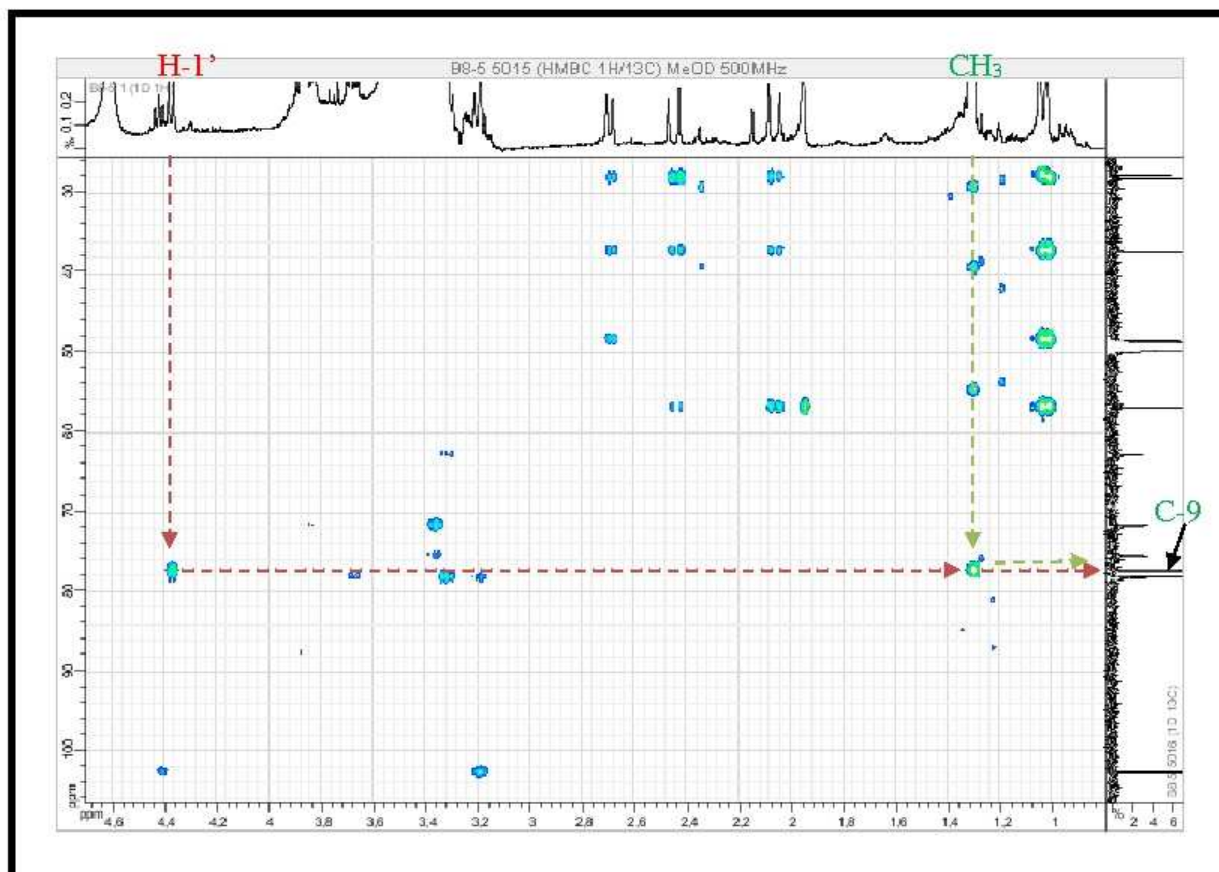
Sur le spectre relatif à l'expérience COSY le proton H-6 montre une tache de corrélation avec le proton d'un CH éthylénique résonant sous forme d'un doublet de doublets ($J = 15,5 ; 7,7$ Hz) à $\delta_H = 5,67$ ppm ($\delta_C = 129,07$ ppm) signifiant la substitution de ce cycle en C-6 par une double liaison. Nous numérotions ce carbone de la double liaison C-7. Comme attendu d'après la multiplicité du H-7, le spectre COSY montre une corrélation entre H-7 et le proton du CH éthylénique résonant sous forme d'un doublet de doublets ($J = 15,5 ; 8,8$ Hz) à $\delta_H = 5,79$ ppm ($\delta_C = 138,33$ ppm). Nous numérotions le carbone porteur de ce proton C-8. La valeur de constante de couplage relevée dans les signaux des H-7 et H-8 indique une configuration trans de cette double liaison. Toujours sur le spectre COSY, H-8 montre comme attendu, une corrélation avec le proton d'un méthyne résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 4,41$ ppm ($\delta_C = 77,31$ ppm). Nous numérotions alors le carbone de ce méthyne C-9. Par ailleurs et toujours sur le spectre COSY H-9 montre une tache de corrélation avec les protons du méthyle résonant sous forme d'un doublet ($J = 6,4$ Hz) à $\delta_H = 1,31$ ppm ($\delta_C = 21,26$ ppm). Nous numérotions alors le carbone de ce méthyle C-10.

L'ensemble de cette analyse nous permet de déduire que l'aglycone de ce composé est de type 3-oxo-ionol. De ce fait les méthyles en C-1 seront numérotés C-11 pour le méthyle ayant une orientation β et C-12 pour le méthyle ayant une orientation α . Le méthyle en C-5 sera numéroté C-13.

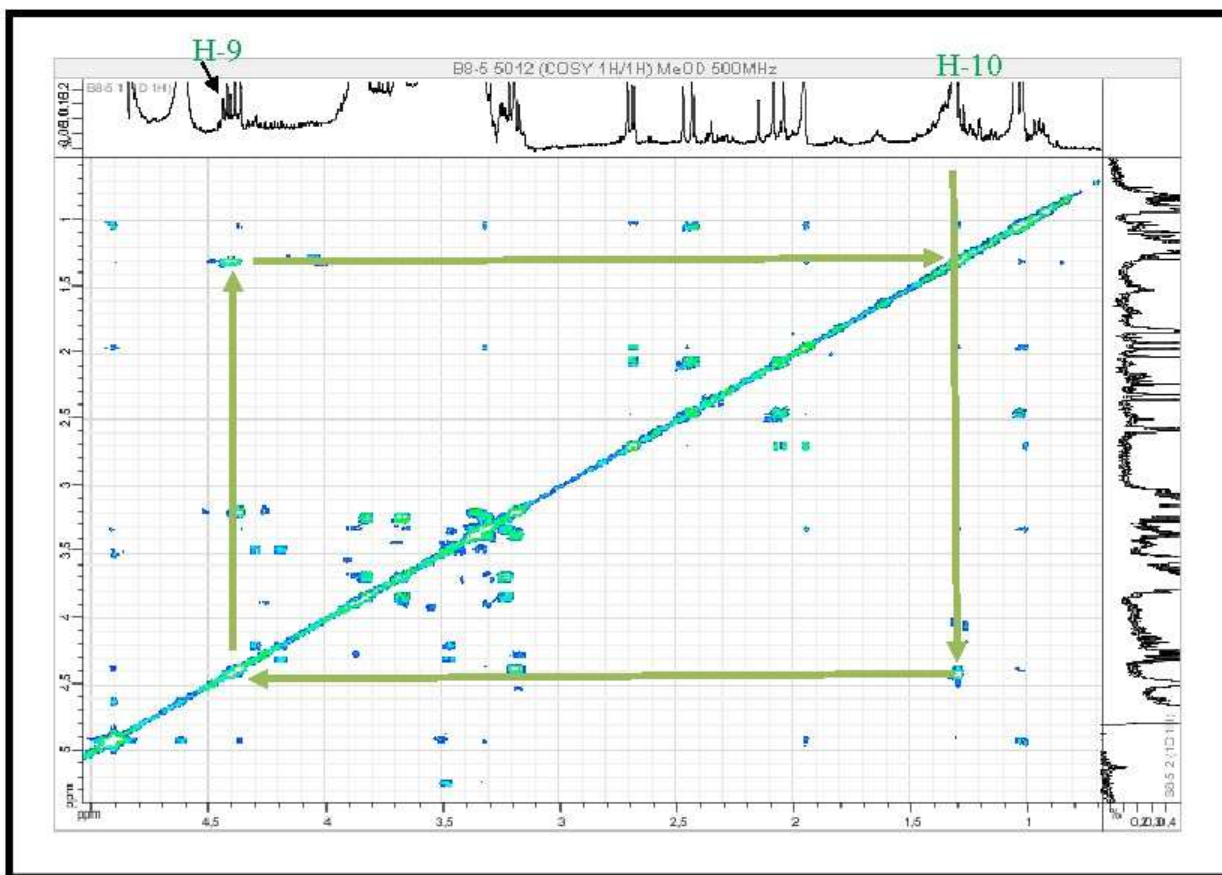
Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC, le proton anomérique montre une tache de corrélation avec le carbone à $\delta_C = 77,31$ ppm ($\delta_H = 4,41$ ppm) signifiant la glucosylation de l'aglycone en C-9.



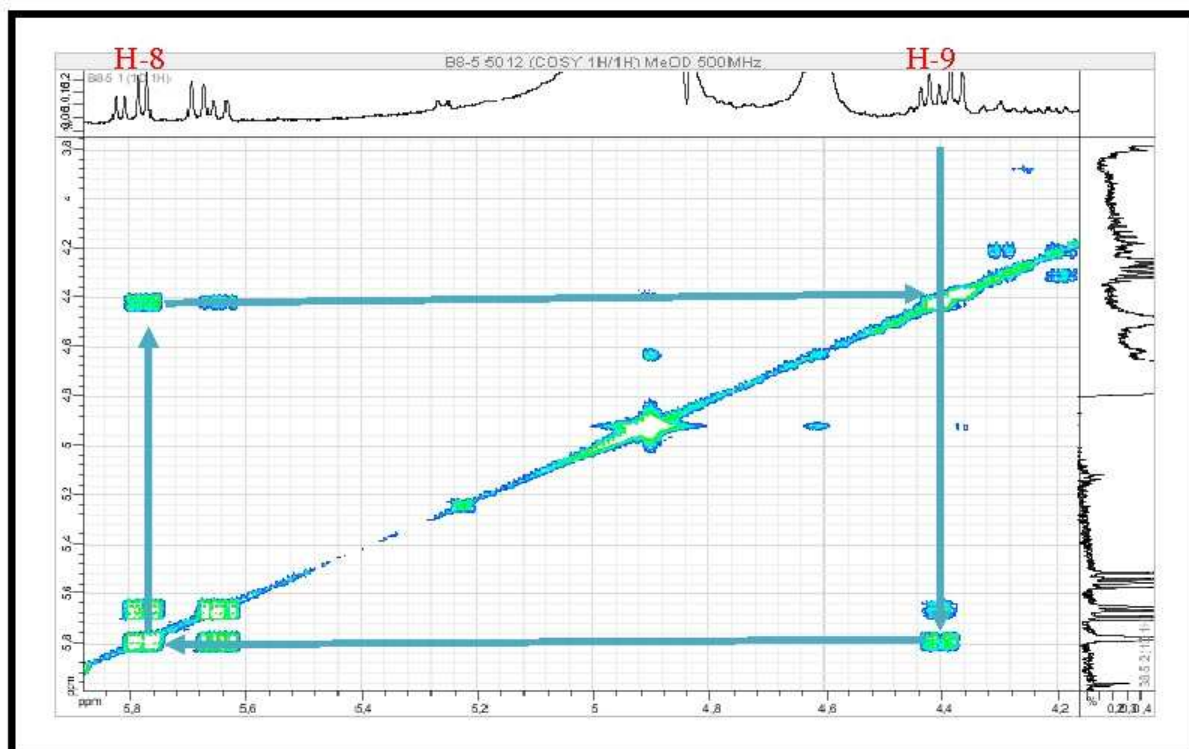
Spectre 107-1: Spectre HMBC (étalement 1) (500 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 17



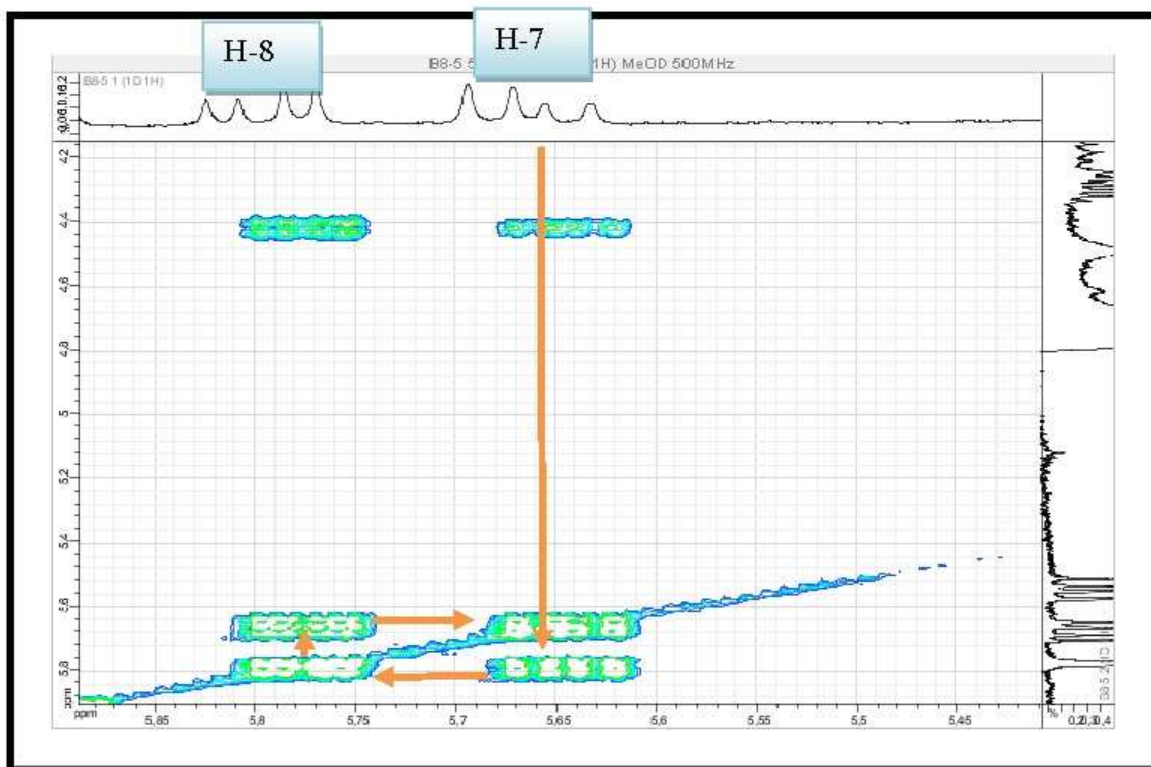
Spectre 107-1: Spectre HMBC (étalement 2) (500 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé B28-5



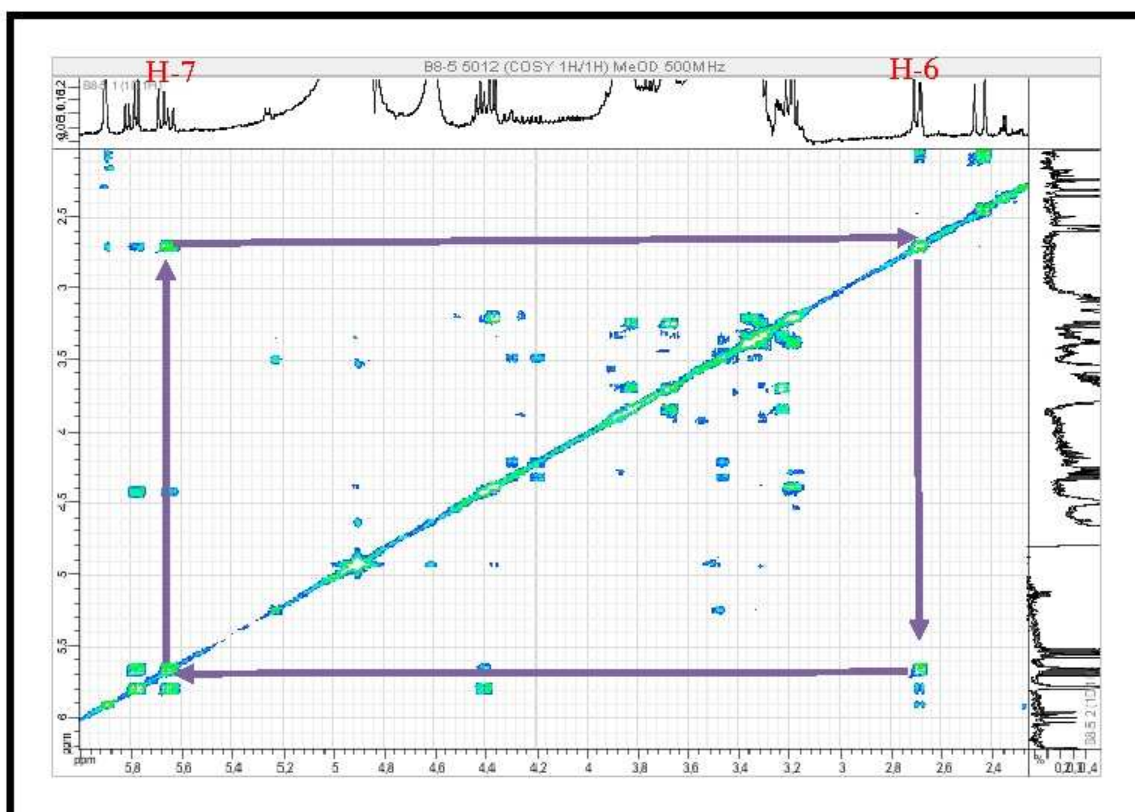
Spectre 106-2: Spectre COSY (étalement 2)(500 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 17



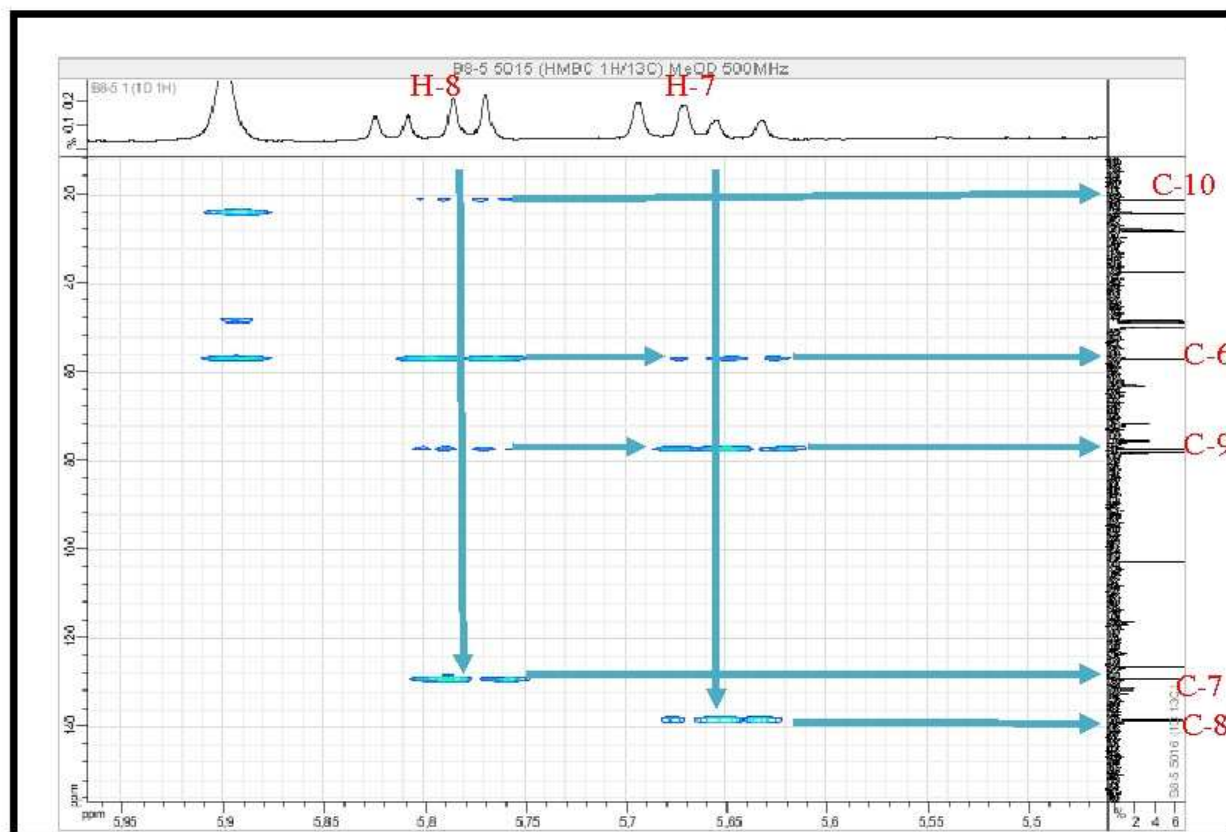
Spectre 106-3: Spectre COSY (étalement 3) (500 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 17



Spectre 106-4: Spectre COSY (étalement 4) (500 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 17



Spectre 106-5: Spectre COSY (étalement 5) (500 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 17



Spectre 107: Spectre HMBC (500 MHz, CD₃OD, δ ppm) du composé 17

Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau 41.

Tableau 41. Les données relatives aux spectres de RMN ^1H et ^{13}C du composé **17**.

Sucre		
Numérotation	δ_{H} (ppm)	δ_{C} (ppm)
1'	4,37 (d; 7,7 Hz)	102,60
2'	3,18 (m)	75,44
3'	3,34 (m)	78,11
4'	3,30 (m)	71,64
5'	3,23(m)	78,24
6'	3,84(dd; 12,0 ; 2,0 Hz) 3,68 (dd; 12,0 ; 5,2 Hz)	62,81
Aglycone		
1	/	37,30
2	2,07 (2H ; d ; 16,8 Hz) 2,45 (2H ; d ; 16,8 Hz)	48,45
3	/	202,15
4	5,90 (s)	126,26
5	/	166,77
6	2,70 (d ; 7,7 Hz)	56,92
7	5,67 (dd ; 15,5 ; 7,7 Hz)	129,07
8	5,79 (dd ; 15,5 ; 8,8 Hz)	138,33
9	4,41 (m)	77,31
10	1,31 (3H ; d ; 6,4 Hz)	21,26
11	1,02 (3H ; s)	27,76
12	1,05 (3H ; s)	28,23
13	1,95 (3H ; s)	23,95

Conclusion

L'identification structurale des métabolites secondaires isolés dans le cadre de ce travail de recherche est rendue possible grâce à l'utilisation combinée des différentes méthodes d'analyses spectroscopiques modernes particulièrement la RMN 1D et 2D, la spectrométrie de masse à haute résolution par ionisation douce (electrospray) et par la comparaison avec les données de littérature.

Cette étude a mené à des résultats en accord avec ceux de la littérature et souligne notamment la richesse des espèces du genre *Helianthemum* en polyphénols particulièrement les flavonoïdes considérés comme antioxydants reconnus et constituants typiques de la famille Cistaceae.

Activité antioxydante des produits isolés des deux espèces par la méthode HPLC-ABTS

V.1. Introduction

Actuellement, il y'a un intérêt croissant pour la recherche et la prospection de nouvelles sources d'antioxydants naturels non nocifs afin d'être utilisés comme additifs dans l'industrie alimentaire ou comme ingrédients dans les aliments fonctionnels, nutraceutiques et pharmaceutiques. Les radicaux libres sont des contributeurs importants dans le vieillissement et occupent une place importante dans les processus dégénératifs et les maladies qui en résultent [73-75]. Les plantes du Sahara étant soumises à la sécheresse et à l'insuffisance hydrique, peuvent développer des réponses métaboliques pour lutter et résister contre les espèces oxygénées réactives (ROS) dont la concentration est augmentée par l'exposition prolongée aux UV [56], [76-77]. Selon ces résultats et ceux de nos travaux sur les espèces sahariennes qui ont montré un contenu élevé en composés bioactifs et des propriétés antioxydantes et antiproliférative positives [78-81], nous nous sommes intéressés à deux espèces endémiques du Sahara septentrional, *Helianthemum ruficomum* et *Helianthemum confertum* de la famille de Cistaceae. Cette étude concerne l'évaluation de l'activité antioxydante d'extraits de ces deux espèces.

Comme reporté au chapitre III, les extraits sont préparés par macération hydroalcoolique des parties aériennes suivie d'affrontements par des solvants de polarité croissante (chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol). Les extraits ont été évalués pour analyser de manière spécifique les composés anti-radicalaires en utilisant la méthode HPLC couplée avec le dosage ABTS en ligne. Tous les extraits ont montré une richesse du point de vue composition chimique et une composante antioxydante importante (voir chapitre III). Ces résultats intéressants nous ont encouragés à procéder à l'investigation phytochimique des extraits acétate d'éthyle des deux espèces sélectionnées et l'extrait n-butanol de la première espèce (*H. ruficomum*).

Ainsi, après fractionnement et purification par la combinaison de diverses méthodes chromatographiques, les constituants chimiques isolés des trois extraits ont été soumis à l'identification structurale par les méthodes spectroscopiques notamment les expériences de RMN 1D et 2D et la spectrométrie de masse à haute résolution et en mode électronebulisation. Les métabolites secondaires ainsi déterminés ont subi des tests de

recherche d'activité antioxydante par la méthode ABTS en ligne. Les résultats ont été confirmés par les méthodes ABTS hors ligne, ORAC et TEAC.

V.2. Analyse des composés identifiés des deux plantes par HPLC-ABTS en ligne

Le principe de la méthode pour analyser les produits isolés est le même que pour des extraits (voir chapitre III).

Chaque produit est dilué dans du méthanol, puis injecté à travers la boucle d'injection. Chaque produit est transporté par les phases mobiles à travers la colonne pour atteindre le détecteur [détecteur à réseau de diodes (DAD)]. Chaque produit détecté donnera un signal qui sera enregistré par le système de traitement des données sous forme d'un pic. Le détecteur à réseau de diodes est connecté à un T mélangeur suivi d'une bobine de réaction (Peek, 20 m x 0,25 mm) chargée dans un four à température contrôlée. La réaction post-colonne est effectuée en distribuant (0,5 mL/min) le réactif ABTS^{•+}. Le réactif ABTS^{•+} est mélangé avec la phase mobile et le produit sortant du premier détecteur au moyen de la jonction-T. L'ensemble est acheminé jusqu'au second détecteur, au travers de la boucle de réaction PEEK. La détection de la décoloration du radical ABTS^{•+} est suivie à 412 nm avec le second détecteur (Ultimate 3000 variable wavelength detector).

Le résultat est présenté sous forme d'un double chromatogramme, la partie supérieure représente le composé phénolique testé et détecté par son absorbance à 280 nm, tandis que la partie inférieure représente l'activité de piégeage des radicaux libres de ce composé phénolique. Un pic négatif indique que le composé correspondant a réagi avec le cation radical ABTS^{•+} et qu'il admet une activité de piégeage de radicaux libres. L'intensité du pic chromatographique négatif donne une indication sur l'activité de piégeage de radicaux du composé considéré. Chaque composé phénolique a été injecté dans le LC-ABTS^{•+} et quantifié par référence à son standard authentique approprié par absorption à 280 nm, alors que le potentiel antioxydant a été calculé comme la concentration de trolox nécessaire pour produire une aire de pic négative équivalente par absorption à 412 nm et exprimée en capacité antioxydante équivalente au trolox (TEAC) ou $\mu\text{Mol}_{\text{eqT}}/\text{mg}$.

La colonne chromatographique qui a été utilisé pour tous ces produits isolés est la même colonne utilisée pour les extraits : Kromasil C₁₈ avec une taille de particules de 5 μm , 4,60 mm x 250 mm. La température de la colonne est de 25°C.

Les phases mobiles : **A** : H₂O Milli-Q/Acide formique (99,9/0,1) (V/V) ; **B** : Acétonitrile, sont délivrées avec un débit de 1ml/min, avec le gradient présenté dans le tableau 42.

Tableau 45. Activité antioxydante des composés purs, basée sur le test ABTS

Pics	Produits Purs	ABTS ($\mu\text{g}_{\text{eqT}}/\text{mL}$)	Activité anti- radicalaire (mAU)
1	Acide protocatechique	47,59	202
4	Astragaline	1,48	13
8	acide vanillique 4-O- β -D- glucopyranoside	16,49	75
9	Lavandoside	91,49	381
10	acide 4-hydroxybenzoïque 4-O- β -D- glucopyranoside	60,45	254
12	Rutine	155,66	644

Les profils en HPLC-ABTS $^{*+}$ en ligne des extraits d'acétate d'éthyle et de n-butanol de *H. ruficomum* sont reportés sur la figure 101 et 102, respectivement. Ces profils montrent que les composés qui ont montré une activité antioxydante sont : acide protocatechique (1), astragaline (4), acide vanillique 4-O- β -D-glucopyranoside (8), lavandoside (9), acide 4-hydroxybenzoïque 4-O- β -D-glucopyranoside (10) et rutine (12). Les composés (8) et (10) ont été les plus actifs (833 et 823 mAU respectivement) (Tableau 44).

L'activité antioxydante de l'extrait n-BuOH est largement due à la présence des trois composés phénoliques (8), (9), (10) et le flavonoïde glycoside (la rutine) (12) qui représentent 88,15% de l'activité totale (tableau 44).

Les composés antioxydants : l'acide protocatéchique (1) et l'astragaline (4) (Figures 101, 103 et 106) ne représentent que 10,34% de l'activité antioxydante totale de l'extrait acétate d'éthyle (Tableau 43) car les composés A, B, C, D et E qui présentaient une activité antioxydante élevée (Figure 101) n'ont pas pu être isolés à l'état pur et n'ont donc pas pu être identifiés. Ces cinq composants représentent 62,21% de l'activité antioxydante de l'extrait d'acétate d'éthyle (Tableau 43). Le trans-tiliroside (3), le cis-tiliroside (2), la nicotiflorine (11) et la narcissine (14) qui présentaient une absorbance moléculaire relativement élevée sur le chromatogramme supérieur (figures 101 et 102), présentaient peu ou pas de capacités antioxydante (Figures 101, 102, 104 et 105). Ainsi on relève que l'acide protocatéchique (1), l'acide vanillique 4-O- β -D-glucopyranoside (8), le lavandoside (9), l'acide 4-hydroxybenzoïque 4-O- β -D-glucopyranoside (10) et la rutine (12) sont les antioxydants les plus efficaces de cette espèce ((Figures 101, 102, 103, 107, 108, 109 et 110 et Tableaux 43, 44 et 45). Ces résultats ont été confirmés hors ligne par les dosages ABTS, ORAC et TEAC.

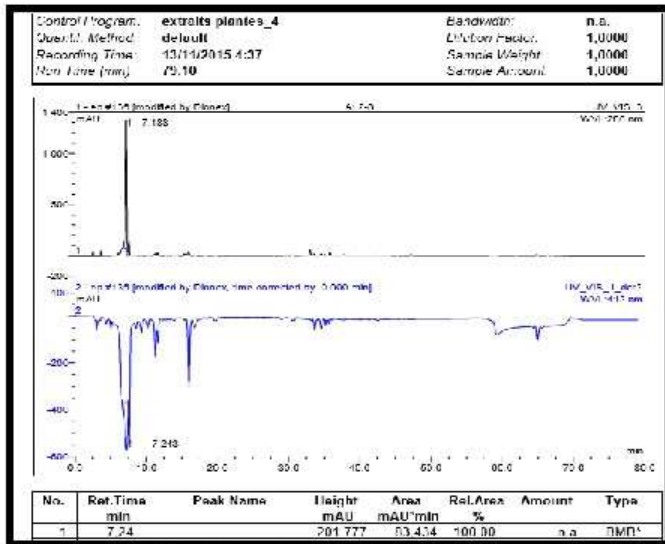


Figure 103. Chromatogramme d'acide protocatechuique.

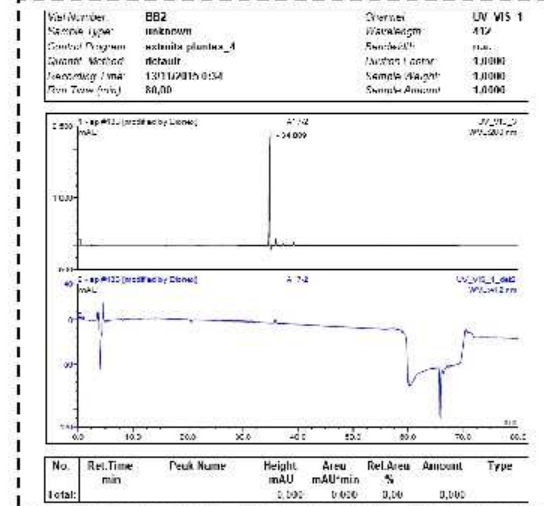


Figure 104. Chromatogramme de trans-tiroside

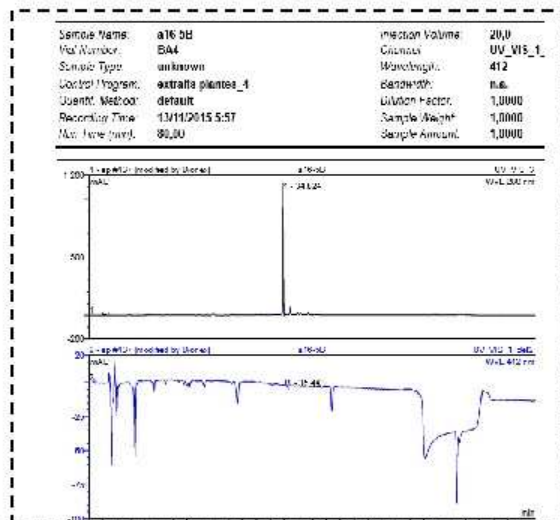


Figure 105. Chromatogramme de cis-tiroside.

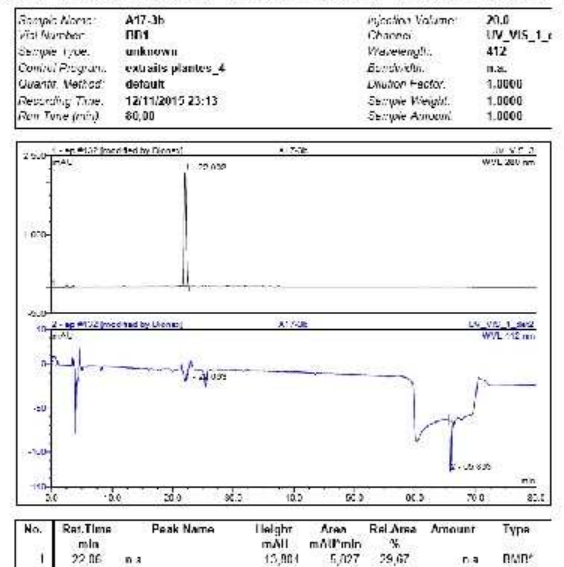


Figure 106. Chromatogramme de l'astragaline

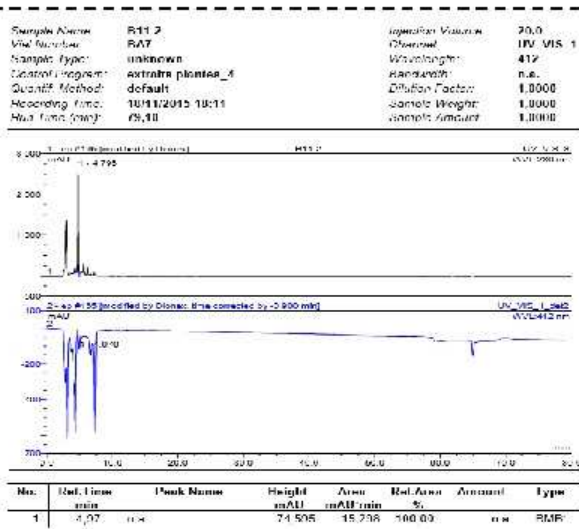


Figure 107. Chromatogramme de l'acide vanillique 4-O-β-D-glucopyranoside.

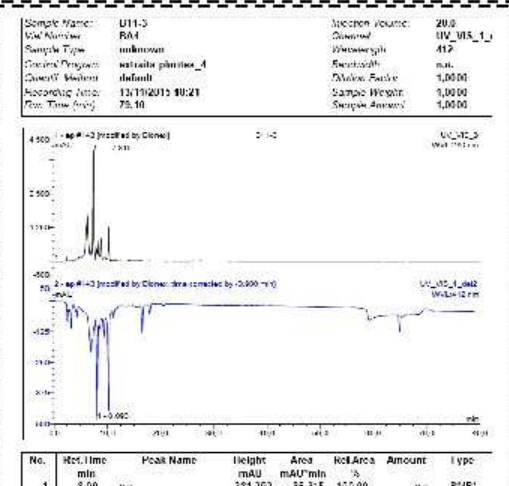


Figure 108. Chromatogramme de Lavandoside.

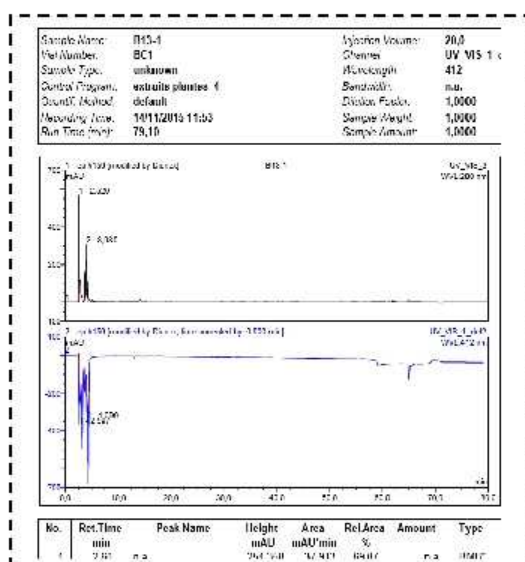


Figure 109. Chromatogramme de l'acide 4-hydroxybenzoïque 4-O-β-D-glucopyranoside.

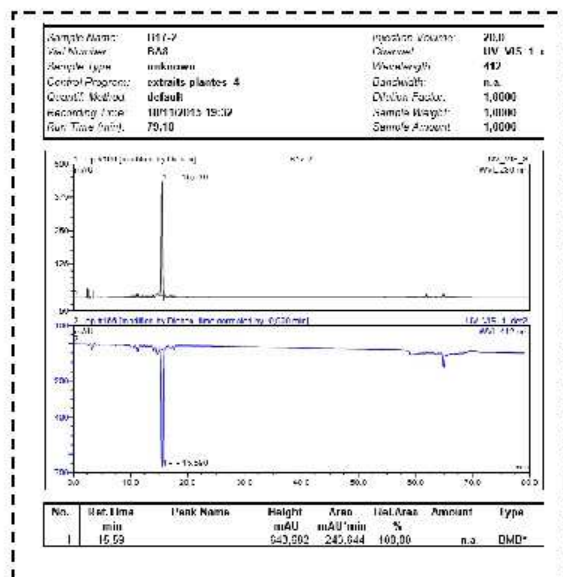


Figure 110. Chromatogramme de la rutine.

B- Helianthemum confertum

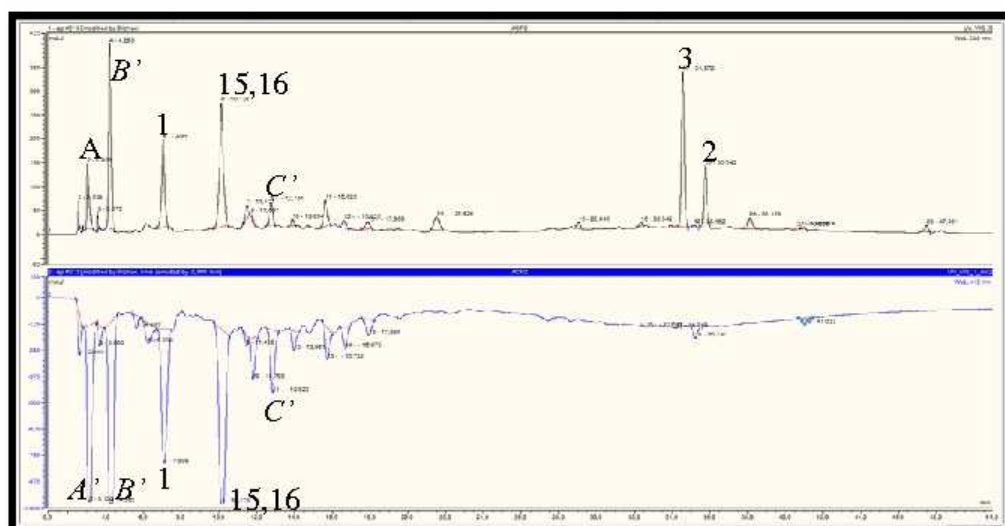


Figure 111. Détermination chromatographique des composés de l'extrait acétate d'éthyle de Helianthemum confertum et leurs activités antioxydante.

Pic 1: L'acide protocatechuique .

Pic 15,16: mélange de deux composés : Acide para-hydroxy benzoïque et gallate de méthyle.

Pic 3: Trans-tiliroside.

Pic 2: Cis-tiliroside.

Tableau 46. L'activité antioxydante des composés et leurs pourcentages de participation dans la capacité antioxydante totale de l'extrait acétate d'éthyle de *Helianthemum confertum* avec le test ABTS.

Pics	Produits purs	ABTS ($\mu\text{g}_{\text{eqT}}/\text{mL}$)	Activité anti-radicalaire (mAU)	Pourcentage de l'activité anti-radicalaire (%)
A'	Non identifié	204,17	842	16,80
B'	Non identifié	209,50	864	20,36
1	Acide Protocatechuique	155,19	642	15,09
15,16	Acide para-hydroxy benzoïque et gallate de méthyle	200,84	828	23,00
C'	Non identifié	71,70	300	5,14

Tableau 47. Activités antioxydante des composés purs de *Helianthemum confertum*, basées sur ABTS.

Pics	Produits Purs	ABTS ($\mu\text{g}_{\text{eqT}}/\text{mL}$)	Activité anti-radicalaire (mAU)
1	Acide protocatechuique	137,39	569
15,16	Acide para-hydroxybenzoïque et gallate de méthyle	153,93	637

Le profil en HPLC-ABTS • + en ligne de l'extrait d'acétate d'éthyle de *H. confertum* est représenté respectivement sur la Figure 111. Ses composants qui ont montré une activité antioxydante : acide protocatechuique (**1**) et le mélange : acide para-hydroxybenzoïque et gallate de méthyle (**15,16**) (642 et 828 mAU respectivement) (tableau 35).

Les composés phénoliques (**1**) et (**15,16**) ne représentent que 38,09% de l'activité antioxydante totale de l'extrait acétate d'éthyle (Tableau 46) car les composés A', B', C' qui présentaient également une activité antioxydante élevée (Figure 111) n'ont pas pu être isolés à l'état pur et donc n'ont pas pu être identifiés. Ces trois composants représentent 42,3% de l'activité antioxydante de l'extrait d'acétate d'éthyle (Tableau 46). Trans-tiliroside (**3**), le cis-tiliroside (**2**) qui présentaient une absorbance moléculaire relativement élevée sur le chromatogramme supérieur (Figures 111 et 114), présentaient peu ou pas de capacités de

balayage radicalaire. Ces résultats ont été confirmés hors ligne par les dosages ABTS, ORAC et TEAC.

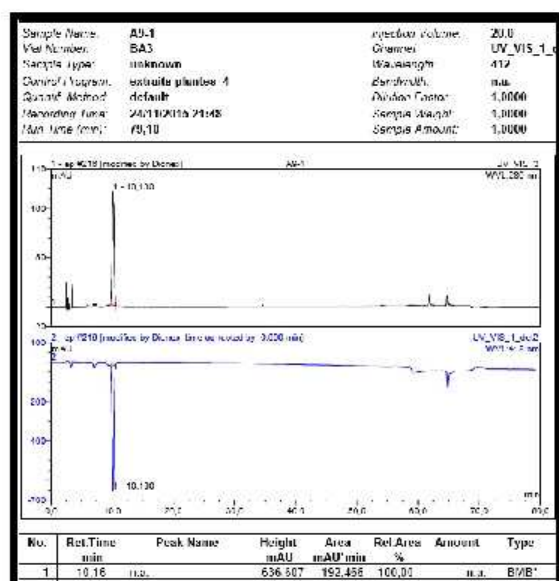


Fig 112. Chromatogramme de 15+16

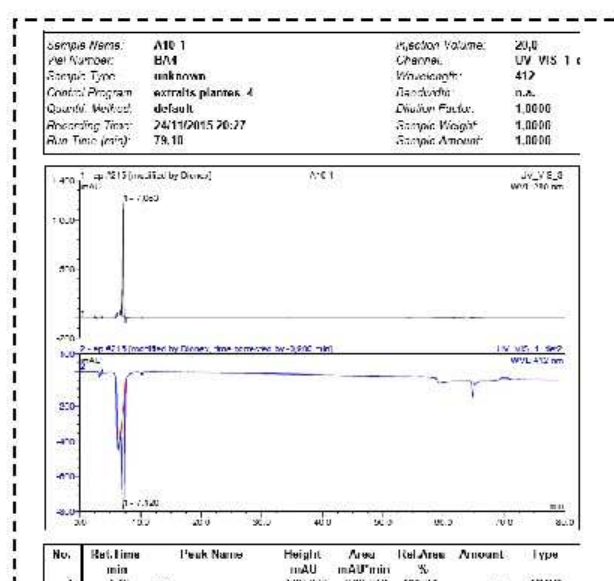


Fig 113. Chromatogramme de l'acide protocatechique

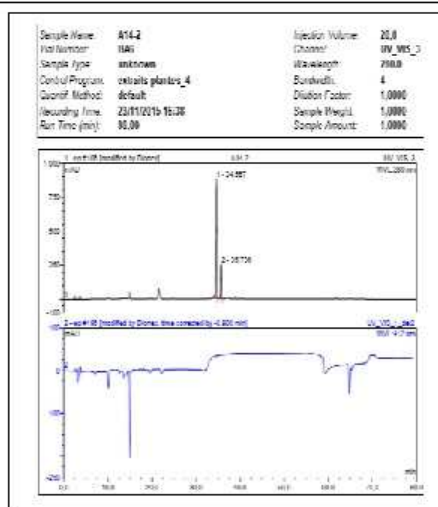


Fig 114. Chromatogramme de trans-tiliroside et cis-tiliroside

V.5. ORAC

La méthode ORAC se base sur un principe de compétition pour des radicaux peroxydes entre les molécules anti-oxydantes et une sonde fluorescente [82]. En effet, la fluorescéine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) est utilisée dans cet essai, car elle est dégradée par les espèces radicalaires à travers des réactions d'oxydation, résultant en l'extinction de sa fluorescence. Le 2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) (Sigma-Aldrich,

Steinheim, Allemagne) se dissocie à 37 °C en libérant des radicaux peroxydes. Il sert donc d'initiateur à la réaction d'oxydation. Les anti-oxydants protégeant la fluorescéine, et jusqu'à leur épuisement, ralentissent la baisse du signal de fluorescence en induisant un temps de latence (Figure 115). L'aire sous la courbe de la cinétique de fluorescence est donc directement proportionnelle à la quantité et à l'efficacité des composés anti-oxydants présents dans un échantillon. Les résultats sont exprimés en μmole d'équivalence Trolox/g d'extrait sec.

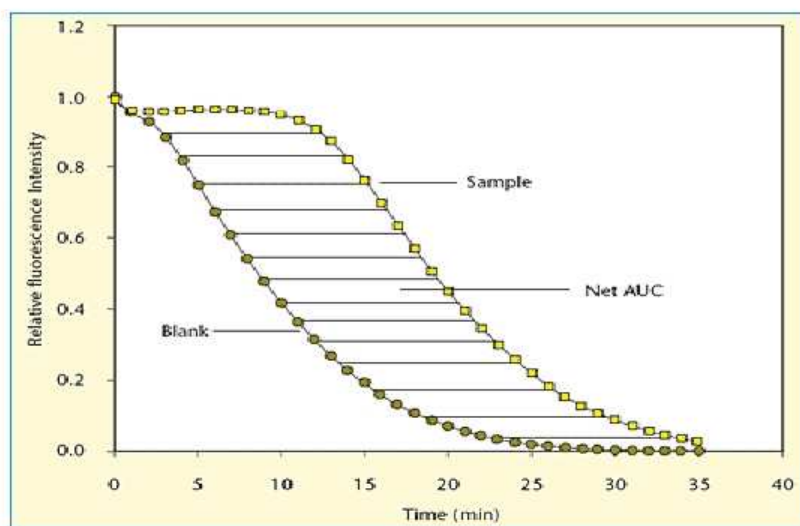


Figure 115. Principe de mesure de l'activité antioxydante par ORAC.

Les produits sont dissous dans un mélange d'eau / méthanol (70/30) à 1 mg / ml (1000 ppm), puis doivent être dilués avec de l'eau distillée (entre 25 et 400 ppm) avant d'être placés en triplicat dans des plaques à 96 puits à la hauteur de 10 μL / puits. Une gamme standard de trolox comprise entre 25 et 400 μmol / L a également été déposée en triplicat. Une solution aqueuse de 150 μL de fluorescéine ($8,5 \times 10^{-6}$ mol / L) a été ajoutée par puits. Un distributeur automatique permet alors l'initiation de la réaction par addition d'AAPH (30 μL , 153 μmol / L) à chaque puits à partir de l'initiation de la génération des radicaux par addition d'AAPH, l'intensité de fluorescence émise est mesurée tous les 5 min pendant 2 h avec une longueur d'onde d'excitation comprise entre 400 et 600 nm.

V.6. TEAC

La méthode TEAC est une technique spectrophotométrique basée sur l'utilisation d'un radical cationique coloré (bleu-vert) stable l'ABTS^{•+} (acide 2,2'-Azino-bis-(3éthylbenthioazoline-6-sulfonique), qui se décolore lorsque qu'il est réduit par un antioxydant, suite à un transfert

La mesure de la capacité de piégeage des radicaux libres des deux extraits étudiés d'*Helianthemum ruficomum* par le test TEAC hors ligne a confirmé les résultats précédents et a montré que les extraits d'acétate d'éthyle et de n-BuOH présentaient des activités comparables (TEAC 432 et 431 $\mu\text{Mol}_{\text{eqT}} / \text{mg}$ respectivement, tableau 48). Cela peut être en relation avec la plus forte quantité de composés phénoliques et flavonoïdes dans ces extraits. Le dosage de l'ABTS hors ligne des composés isolés a également montré que l'acide protocatechuique (**1**), acide vanillique 4-O- β -D-glucopyranoside (**8**) acide 4-hydroxybenzoïque 4-O- β -D-glucopyranoside (**10**) et la rutine (**12**) étaient l'antioxydant le plus puissant avec les valeurs du test ABTS en ligne: 341, 833, 823 et 594 mAU respectivement (Tableaux 43 et 44), des valeurs ABTS hors ligne: 202, 75, 254 et 644 mAU respectivement (Tableau 45).

Valeurs du test ORAC: 690, 733, 435 et 613 $\mu\text{Mol}_{\text{eqT}} / \text{mg}$ respectivement (Tableau 48) et TEAC: 469, 106, 408 et 556 $\mu\text{Mol}_{\text{eqT}} / \text{mg}$ (Tableau 48). L'activité la plus élevée est celle de la rutine (**12**) par rapport aux autres composés présents dans ces extraits cette activité est peut favorisée par la présence du système ortho di-OH sur le noyau B de cette molécule [83]. En outre, l'activité plus élevée de l'acide protocatéchuique (**1**) par rapport à l'acide vanillique 4-O- β -D-glucopyranoside (**8**) et au acide 4-hydroxybenzoïque 4-O- β -D-glucopyranoside (**10**) peut être à la glycosylation qui s'est avérée diminuer l'activité de piégeage de radicaux [84]. Ceci est également observé pour le glucoside d'acide ferrulique (**9**) qui a montré une activité antioxydante relativement faible en comparaison avec l'acide ferulique [85,86].

Tableau 49. Activités antioxydante des composés purs et des extraits de *Helianthemum confertum*, basées sur les tests ORAC et TEAC.

Pics	Extraits et produits purs	ORAC ($\mu\text{Mol}_{\text{eqT}}/\text{mg}$)	TEAC ($\mu\text{Mol}_{\text{eqT}}/\text{mg}$)
	Extrait acétate d'éthyle	557,9	664,43
	Extrait n-butanol	101,5	719,17
	Extrait CHCl_3	363,8	518,93
15,16	Acide para-hydroxybenzoïque et gallate de méthyle	156,82	387,97
1	Acide protocatechuique	158,21	345,48

La mesure de la capacité de piégeage des radicaux libres de l'extrait étudié de *Helianthemum confertum* par test TEAC hors ligne a confirmé les résultats précédents et a montré que

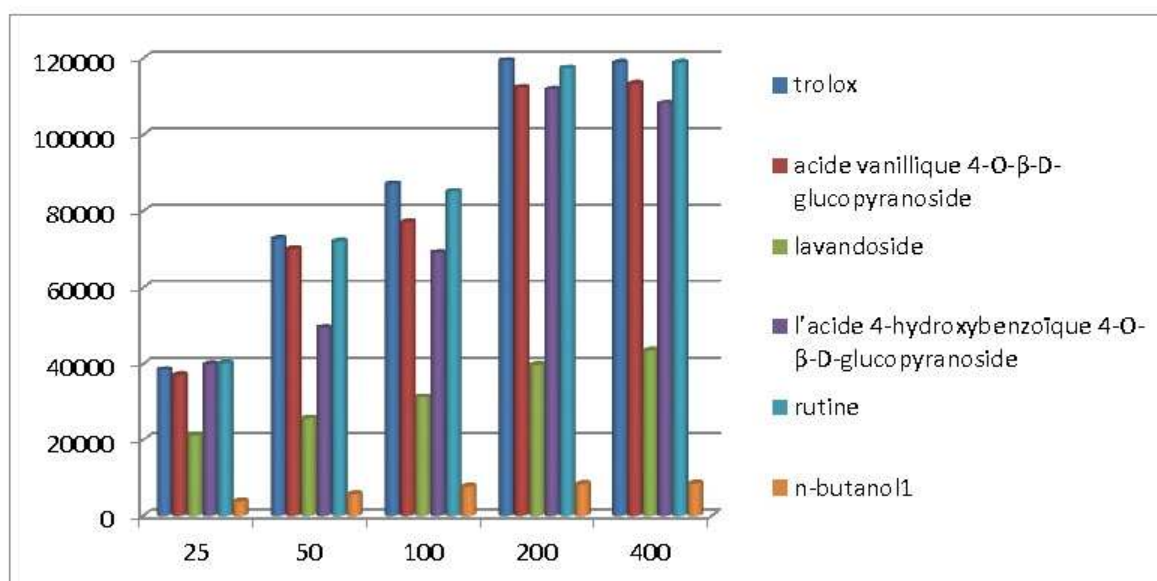


Figure 121. Histogramme d'ORAC de la phase n-butanol et les produits actifs dans cet extrait de *Helianthemum ruficomum*.

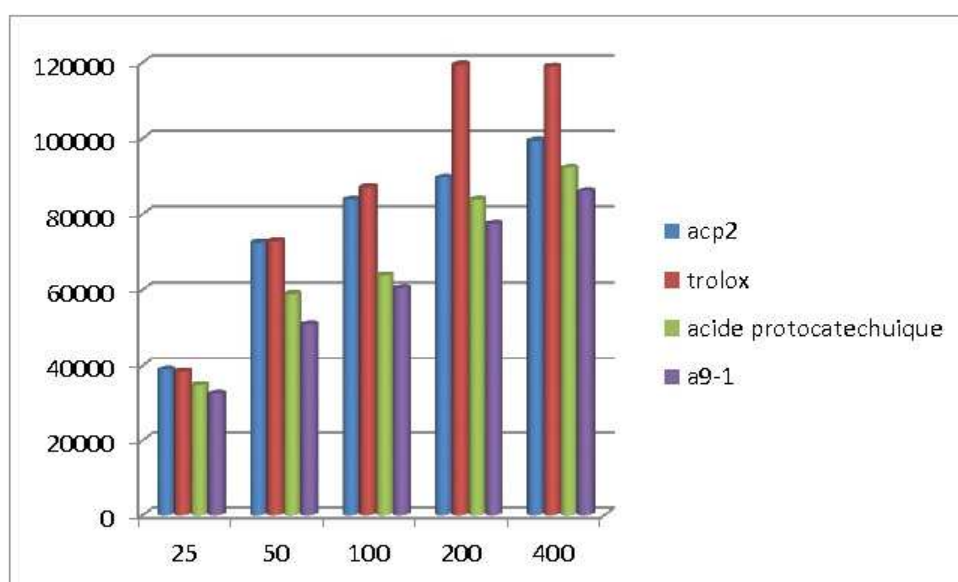


Figure 122. Histogramme d'ORAC de la phase acétate d'éthyle et les produits actifs dans cet extrait de *Helianthemum confertum*.

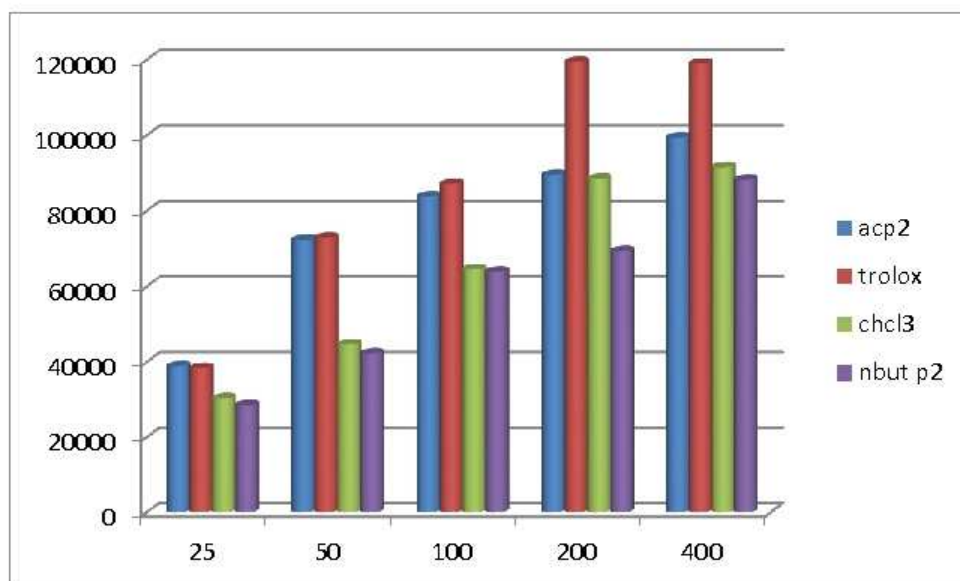


Figure 123. Histogramme d'ORAC des extraits acétate d'éthyle, n-butanol et chloroforme de *Helianthemum ruficomum*.

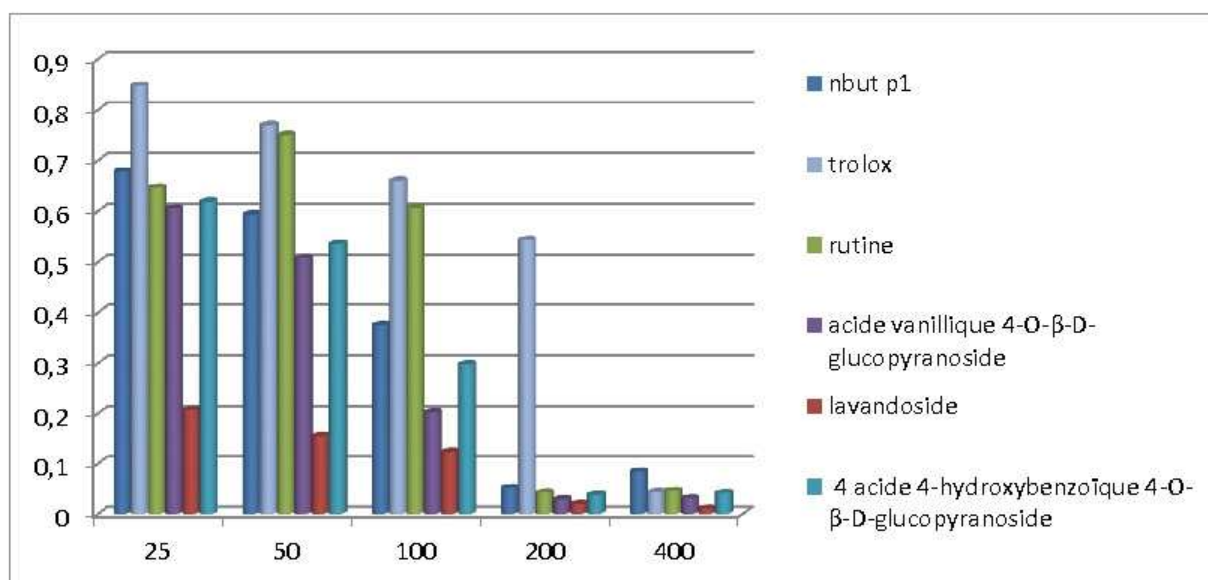


Figure 124. Histogramme de TEAC de la phase n-butanol et les produits actifs dans cet extrait de *Helianthemum ruficomum*.

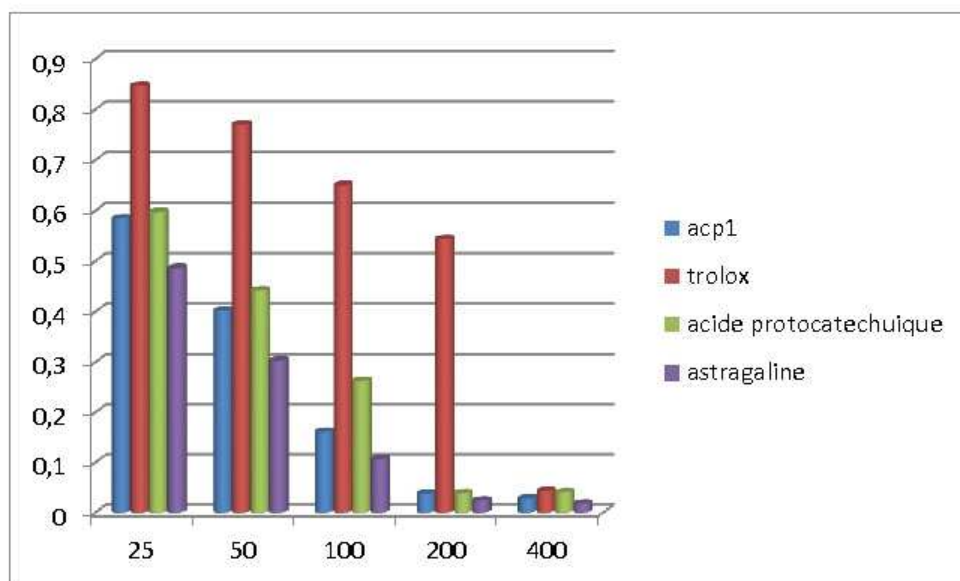


Figure 125. Histogramme de TEAC de la phase acétate d'éthyle et les produits actifs dans cet extrait de *Helianthemum ruficomum*.

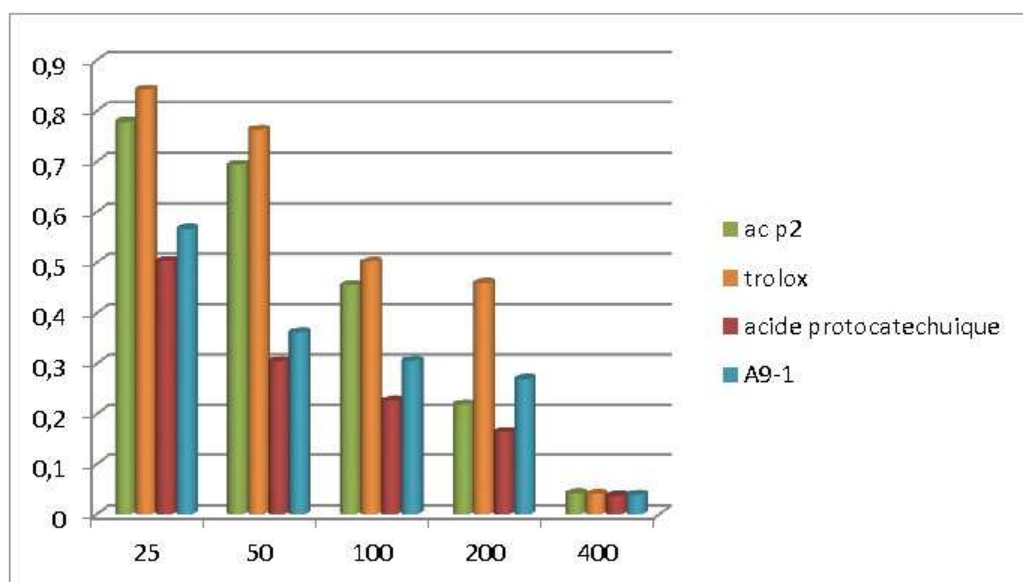


Figure 126. Histogramme de TEAC de la phase acétate d'éthyle et les produits actifs dans cet extrait de *Helianthemum confertum*.

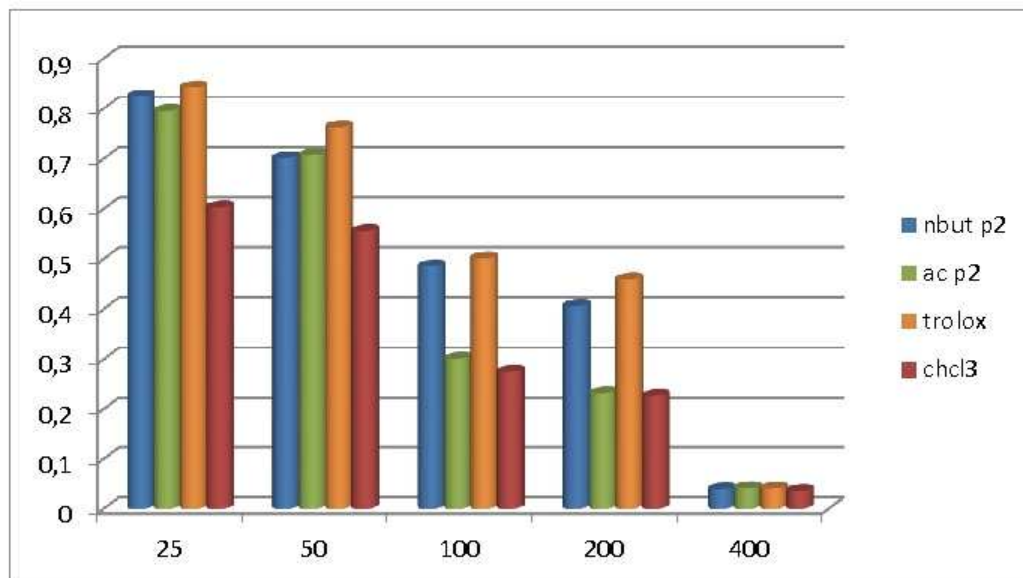


Figure 127. Histogramme de TEAC des phases acétate d'éthyle, n-butanol et chloroforme de *Helianthemum confertum*.

Conclusion

Le travail que nous avons réalisé dans cette partie de notre étude a pour objectif l'évaluation de l'activité antioxydante des extraits et des composants chimiques isolés des deux espèces sélectionnées : *Helianthemum ruficomum* et *Helianthemum confertum*.

Les résultats obtenus par la méthode HPLC-ABTS⁺⁺ en ligne ont été confirmés par les tests ORAC et TEAC.

Nos travaux ont montré une activité anti radicalaire remarquable pour les extraits des deux plantes. Les composés : acide protocatechuique, astragaline, acide vanillique 4-O- β -D-glucopyranoside, lavandoside, acide 4-hydroxybenzoïque 4-O- β -D-glucopyranoside, rutine et le mélange acide para-hydroxybenzoïque et gallate de méthyle ont été les plus actifs.

Conclusion générale

Nos travaux ont porté essentiellement sur l'évaluation de l'activité antioxydante d'extraits et de constituants chimiques (phénoliques et flavonoïdes) de deux espèces endémiques sahariennes de la famille Cistaceae, *Helianthemum ruficomum* et *Helianthemum confertum* qui n'ont l'objet d'aucune étude de ce type à ce jour. Notre étude a débuté par une évaluation de l'activité des phases acétate d'éthyle et n-butanol des extraits hydroalcooliques des parties aériennes des deux espèces par la méthode ABTS^{•+}. Les résultats encourageants obtenus nous ont incités à effectuer un screening en utilisant la méthode HPLC-ABTS^{•+} en ligne pour déterminer les composants actifs de nos extraits. Ces tests ont révélé une richesse en antioxydants pour l'ensemble des extraits. De ce fait et en vue de l'isolement et de l'identification structurale de leurs composants antioxydants, nos extraits ont subi des fractionnements par chromatographie sur colonne de gel de silice 60, suivis de séparation et de purification par chromatographie sur couches minces de gel de silice 60 et/ou par HPLC semi-préparative en phase inverse. Les structures des produits isolés ont été établies par analyse spectrale, principalement des expériences de RMN (¹H, ¹³C, DEPT, DOSY, COSY, NOESY, HSQC et HMBC), de spectrométrie de masse à haute résolution avec ionisation par électrospray (HR-ESI-MS), UV et la comparaison de leurs données spectroscopiques avec celles rapportées dans la littérature. Les produits isolés sont :

a) *Helianthemum ruficomum*, extraits AcOEt et n-BuOH, 14 composés

- ✚ Acide protocatechuique (1)
- ✚ Cis-tiliroside contaminé par trans-tiliroside (2)
- ✚ Trans-tiliroside légèrement contaminé par son stéréoisomère cis-tiliroside (3)
- ✚ Astragaline (4)
- ✚ Stigmasterol (5) } Mélange 89-11%
- ✚ β-Sitosterol (6) }
- ✚ Picéine (7)
- ✚ Acide vanillique 4-O-β-D-glucopyranoside (8)
- ✚ Lavandoside (9)
- ✚ Acide 4-hydroxybenzoïque 4-O-β-D-glucopyranoside (10)
- ✚ Nicotiflorine (11)
- ✚ Rutine (12)
- ✚ Vicenine-2 (13)
- ✚ Narcissine (14)

b) *Helianthemum confertum*, extrait acétate d'éthyle, 6 composés

- ✚ Acide protocatechuique (1)
 - ✚ Cis-Tiliroside (2)
 - ✚ Trans-Tiliroside (3)
 - ✚ Acide para-hydroxybenzoïque (15)
 - ✚ Gallate de méthyle (16)
 - ✚ 3-oxo- α -ionol- β -D-glucopyranoside (17)
- } Mélange 66-34%

Les composés **5**, **7**, **8**, **9**, **10**, **14**, **15**, **16** et **17** sont nouveaux pour le genre *Helianthemum*.

Comme pour les extraits, les composés isolés ont été évalués pour leur capacité de piégeage de radicaux libres par HPLC-ABTS•+ en ligne. Pour l'ensemble, les propriétés antioxydantes ont été confirmées par les dosages ORAC et TEAC. Les résultats indiquent clairement un potentiel antioxydant élevé des extraits et des composés testés de ces espèces et concordent avec la littérature que l'activité de piégeage des radicaux libres dépend de la structure moléculaire, du nombre et de la position des groupes hydroxyles des composés testés. En outre, étant donné les grandes quantités de trans-tiliroside et de rutine isolées et purifiées dans ce travail, et sachant que la première molécule est douée d'effets biologiques diverses [87,88] et que la seconde est utilisée comme complément oral en plus du fait qu'elle soit reconnue pour de multiples activités biologiques, il est important de noter que l'espèce *Helianthemum ruficomum* pourrait être développée industriellement pour son contenu riche de ces composants bioactifs. Pour cette raison, cette plante pourrait être une bonne candidate pour la culture et l'exploitation industrielle.

Références

- [1] Iserin, P.; Masson, M.; Restellini, J. *Larousse encyclopédie des plantes médicinales: identification, préparations, soins*. Larousse, Paris, 2001, P.10.
- [2] Bahorun, T. *Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle*. AMAS. Food and Agriculture Research Council, Réduit, Mauritius **1997**, 83-94.
- [3] da Silva, J. A. T., Mining the essential oils of the Anthemideae. *African Journal of biotechnology* **2004**, 3, 706-720.
- [4] Farombi, E. O., African indigenous plants with chemotherapeutic potentials and biotechnological approach to the production of bioactive prophylactic agents. *African journal of biotechnology* **2003**, 2, 662-671.
- [5] Chouaki, S.; Bessedik, F.; Chebouti, A.; Maamri, F.; Oumata, S.; Kheldoun, S.; Hamana, M.; Douzene, M.; Bellah, F.; Kheldoun, A., Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques. *INRAA/FAO/Juin* **2006**.
- [6] Guzmán, B.; Vargas, P. Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid *rbcL* and *trnL-trnF* sequences. *Org. Divers. Evol.* **2009**, 9, 83-99.
- [7] Yang, Q. ; Gilbert, M.G., *Flora of China*. Edition. Fl. Reipubl. Popularis Sin, 1990, 13, 70.
- [8] Heywood, V., *Les plantes à fleurs*. Editions Nathan, Paris, 1996.
- [9] Bouamama, H.; Noel, T.; Villard, J.; Benharref, A.; Jana, M., Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. *Journal of ethnopharmacology* **2006**, 104, 104-107.
- [10] Bammi, J.; Douira, A., *Les plantes médicinales dans la forêt de l'achach (plateau central, Maroc)*. Acta Botanica Malacitana, 2002, 27, 131-145.

- [11] Barbosa, E.; Calzada, F.; Campos, R., In vivo anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of ethnopharmacology* **2007**, *109*, 552-554.
- [12] Chorfi, A. ; Ziriati, A. ; Aberkane, K. ; Belaidi, N. ; Kadri, S. ; Rekik, D. ; Belhedi, F. ; Aknouche, L. ; Bagot, A. ; Boulé, S. ; Bray, L. ; Chaboche, M. ; Lainé, E. *Guide illustré de la flore algérienne*. Paris, 2012, 11-95.
- [13] Mabberly, D.J. *The plant book*. Cambridge University Press: Cambridge, 1997.
- [14] Raynaud, C. *Contribution à l'étude de certaines espèces du genre " Helianthemum" sect. " Helianthemum": note préliminaire*, Anales del Jardín Botánico de Madrid, 1984; Real Jardín Botánico, P.303-311.
- [15] Ozenda P. *Flore du Sahara Septentrional et Central*. CNRS. 1958, P. 349.
- [16] Cauvet, C. *Le chameau*. J.-B. Baillié et Fils. Paris, 1925, *1*, P.784.
- [17] Durand, M. *Une ostéopathie atrophique chez le chameau: le kraff*. Bull Acad Vét 1958, *31*, P.159-160.
- [18] Le Floc'h, E. *Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne*. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique: 1983, P.158-161.
- [19] Meckes, M.; Torres, J.; Calzada, F.; Rivera, J.; Camorlinga, M.; Lemus, H.; Rodríguez G. Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum*, a plant used in Maya traditional medicine to treat diarrhea. *Phytother. Res.* **1997**, *11*, 128– 131.
- [20] Rubio-Moraga, Á.; Argandoña, J.; Mota, B.; Pérez, J.; Verde, A.; Fajardo, J.; Gómez-Navarro, J.; Castillo-López, R.; Ahrazem, O.; Gómez-Gómez, L. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. *J. Ethnopharmacol.* **2013**, *148*, 287-296.

- [21] Meckes, M.; Villarreal, M.L.; Tortoriello, J.; Berlin, B.; Berlin E.A. A microbiological evaluation of medicinal plants used by the Maya people of Southern Mexico. *Phytother. Res.* **1995**, *9*, 244–250.
- [22] Calzada, F.; Alanís, A.D.; Meckes, M.; Tapia-Contreras, A.; Cedillo-Rivera R. *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to some medicinal plants used by the people of Southern Mexico. *Phytother Res.* **1998**, *12*, 70–72.
- [23] Rigat, M.; Bonet, M.A.; Garcia, S.; Garnatje, T.; Vallès J. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the high river Tervalley (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *113*, 267–277.
- [24] Meckes, M.; Calzada, F.; Tapia-Contreras, A.; Cedillo-Rivera, R. Antiprotozoal properties of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother. Res.* **1999**, *13*, 102–105.
- [25] Barbosa, E.; Calzada, F.; Campos, R. Antigiardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum* Lag. and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *108*, 395-397.
- [26] Tawaha, K. ; Alali, F.Q.; Gharaibeh, M.; Mohammad M.; El-Elimat T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chem.* **2007**, *104*, 1372–1378.
- [27] Bouzergoune, F.; Bitam, F.; Aberkane, M.C.; Mosset, P. Preliminary phytochemical and antimicrobial activity investigations on the aerial parts of *Helianthemum kahiricum*. *Chem. Nat. Compd.* **2013**, *49*, 751-752.
- [28] Alsabri, S.G.; Rmeli, N.B.; Zetrini, A.A.; Mohamed, S.B.; Meshri, M.I.; Aburas, K.M.; Bensaber, S.M.; Mrema, I.A.; Mosbah, A.A.; Allahresh, K.A.; Hermann, A.; Gbaj, A. Phytochemical, anti-oxidant, anti-microbial, anti-inflammatory and anti-ulcer properties of *Helianthemum lippii*. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2013**, *2*, 86-96.

- [29] Benabdelaziz, I.; Marcourt, L.; Benkhaled, M.; Wolfender, J.L.; Haba, H. Antioxidant and antibacterial activities and polyphenolic constituents of *Helianthemum sessiliflorum* Pers. *Nat. Prod. Res.* **2016**, *15*, 1-5.
- [30] Calzada, F.; Alanis, A.D. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother. Res.* **2007**, *21*, 78–80.
- [31] Benabdelaziz, I.; Haba, H.; Lavaud, C.; Harakat, D.; Benkhaled, M. Lignans and Other Constituents from *Helianthemum sessiliflorum* Pers. *Rec. Nat. Prod.* **2015**, *9*, 342-348.
- [32] Calzada, F.; Lopez, R.; Meckes, M.; Cedillo-Rivera, R. Flavonoids of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Int. J. Pharmacogn.* **1995**, *33*, 351–352.
- [33] Javidnia, K.; Nasiri, A.; Miri R. ; Jamalian A. Composition of the Essential Oil of *Helianthemum kahiricum* Del. from Iran. *J. Essent. Oil Res.* **2007**, *19*, 52-53.
- [34] Berti, G.; Livi, O.; Segnini, D.; Cavero, I., Determination of constitution and synthesis of a new flavone from *Cistus monspeliensis* L. *Tetrahedron* **1967**, *23*, 2295-2300.
- [35] Aberkane, Mc.; Bouzergoune, F.; Mosset, P.; Bitam, F. *Phytochemical study of Helianthemum karihicum*. International Conference on Chemical, Environmental and Biological Sciences .Penang, Malaysia, 2012, P. 33.
- [36] Amaral, F. M.; Ribeiro, M. N. S.; Barbosa-Filho, J. M.; Reis, A. S.; Nascimento, F. R.; Macedo, R. O., Plants and chemical constituents with giardicidal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2006**, *16*, 696-720.
- [37] Ferreres, F.; Tomáas-Barberáan, F. A.; Gil, M. I.; Tomáas-Lorente, F., An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1991**, *56*, 49-56.
- [38] Quezel, P.; Santa, S. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Editions du C.N.R.S, Paris, France, 1963, Tome II pp. 710, 714.

[39] The Plant List (2010). Version 1. Published on the Internet <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).

[40] Tsao, R., Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients* **2010**, *2*, 1231-1246.

[41] Ochocka, R. J.; Rajzer, D.; Kowalski, P.; Lamparczyk, H., Determination of coumarins from *Chrysanthemum segetum* L. by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* **1995**, *709*, 197-202.

[42] Bruneton, J. *Pharmacognosie: phytochimie plantes médicinales*. 5^{ème} édition. 2016, P.389.

[43] Cunha, W. R.; Bastos, J. K.; e Silva, M. L. A.; Veneziani, R. C. S.; Ambrósio, S. R. Phytochemicals- A Global perspective- *Lignans: Chemical and Biological Properties*. INTECH Open Access Publisher: 2012, P.213.

[44] Shen, T.; Wang, X.-N.; Lou, H.-X., Natural stilbenes: an overview. *Natural product reports* **2009**, *26*, 916-935.

[45] Pietta, P.-G., Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products* **2000**, *63*, 1035-1042.

[46] Medić-Šarić, M.; Jasprica, I.; Smolčić-Bubalo, A.; Mornar, A., Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. *Croatica chemica acta* **2004**, *77*, 361-366.

[47] Wang, J.; Mazza, G., Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor α in LPS/IFN- γ -activated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 4183-4189.

[48] Holiman, P. C.; Hertog, M. G.; Katan, M. B., Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry* **1996**, *57*, 43-46.

- [49] Lugasi, A.; Hóvári, J.; Sági, K. V.; Bíró, L., The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta Biologica Szegediensis* **2003**, *47*, 119-125.
- [50] Yokozawa, T.; Chen, C. P.; Dong, E.; Tanaka, T.; Nonaka, G.-I.; Nishioka, I., Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochemical pharmacology* **1998**, *56*, 213-222.
- [51] Cos, P.; Ying, L.; Calomme, M.; Hu, J. P.; Cimanga, K.; Van Poel, B.; Pieters, L.; Vlietinck, A. J.; Berghe, D. V., Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products* **1998**, *61*, 71-76.
- [52] An, L.J.; Guan, S.; Shi, G.F.; Bao, Y.M.; Duan, Y.L.; Jiang, B. Protocatechuic acid from *Alpinia oxyphylla* against MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells. *Food chem. toxicol.* **2006**, *44*, 436-443.
- [53] Stejskal, E. O.; Tanner, J. E., Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *The journal of chemical physics* **1965**, *42*, 288-292.
- [54] Morris, K. F.; Johnson Jr, C. S., Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 3139-3141.
- [55] Gostan, T.; Tramesel, D.; Brun, E.; Prigent, Y.; Delsuc, M.-A., L'expérience Dosy, une puissante méthode RMN pour l'analyse de mélanges complexes et la détection de traces. *Spectra analyse* **2004**, *33*, 26-32.
- [56] Agrawal, P. K., NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3307-3330.
- [57] Schinor, E. C.; Salvador, M. J.; Ito, I. Y.; Dias, D. A., Evaluation of the antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents from *Chresta scapigera*. *Brazilian Journal of Microbiology* **2007**, *38*, 145-149.

- [58] Mekhelfi, T.; Kerbab, K.; Guella, G.; Zaiter, L.; Benayache, S.; Benayache, F. Phytochemical constituents of *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. from Algeria. *Der pharmacia lettre* **2014**, *6*, 152-156.
- [59] Hua, Y.; Wang, H. Q., Chemical components of *Anaphalis sinica* Hance. *Journal of the Chinese Chemical Society* **2004**, *51*, 409-415.
- [60] Kumarasamy, Y.; Cox, P. J.; Jaspars, M.; Rashid, M. A.; Sarker, S. D., Bioactive flavonoid glycosides from the seeds of *Rosa canina*. *Pharmaceutical biology* **2008**, *41*, 237-242.
- [61] Wei, Y.; Qianqian Xie, Q.; Fisher, D.; Sutherland, I. A. Separation of patuletin-3-*O*-glucoside, astragalín, quercetin, kaempferol and isorhamnetin from *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze by elution-pump-out high-performance counter-current chromatography. *J. Chromatography* **2011**, *1218*, 6206–6211.
- [62] Chaturvedula, V.S.P.; Prakash, I. Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal* **2012**, *1*, 239-242.
- [63] Ushiyama, M.; Furuya, T. Glycosylation of phenolic compounds by root culture of *Panax ginseng*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 3009-3013.
- [64] Cui, C.B.; Tezuka, Y.; Kikuchi, T.; Nakano, H.; Tamaoki, T.; Park, J.H. Constituents of a fern, *Davallia mariesii* Moore. IV.¹⁾ Isolation and structures of a novel norcarotane sesquiterpene glycoside, a chromone glucuronide, and two epicatechin glycosides. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 2035-2040.
- [65] Kurkin, V.A.; Lamrini, M.; Klochkov, S.G. Lavandoside from *Lavandula spica* flowers. *Chem. Nat. Compd.* **2008**, *44*, 169-170.
- [66] Yang, F.; Chen, R.; Feng, L.; Li, H.D.; Zhang, H.; Liang, J.Y. Chemical constituents from the aerial part of *Peganum nigellatrum*. *Chin. J. Nat. Med.* **2010**, *8*, 199-201.

- [67] Strack, D.; Heilemann, J.; Wray, V.; Dirks, H. Structures and accumulation patterns of soluble and insoluble phenolics from Norway spruce needles. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 2071-2078.
- [68] Olennikov, D.N.; Tankhaeva, L.M.; Partilkaev, V.V.; Rokhin A.V. Chemical constituents of *Caragana bungei* shoots. *Rev. Bras. Farmacogn. / Braz. J. Pharmacogn.* **2012**, *22*, 490-496.
- [69] Xie, C.; Veitch, N.C.; Houghton, P.J.; Simmonds, M.S.J. Flavone C-Glycosides from *Viola yedoensis* Makino. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 1204-1207.
- [70] Jeong-Yong, C.; Jae-Hak, M.; Seong, K.-Y.; Keun-Hyung, P., Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **1998**, *62*, 2273-2276.
- [71] Ma, X.; Wu, L.; Ito, Y.; Tian, W., Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation of methyl gallate from *Acer truncatum* Bunge. *Journal of Chromatography* **2005**, *1076*, 212-215.
- [72] Sun, J.; Xia, F.; Wang, S.; Wang, K.-Y.; Chen, J.-M.; Tu, P.-F., Structural elucidation of two new megastigmane glycosides from the leaves of *Aquilaria sinensis*. *Chinese journal of natural medicines* **2015**, *13*, 290-294
- [73] Singh, R.; Singh, B.; Singh, S.; Kumar, N.; Kumar, S.; Arora, S. Umbelliferone—An antioxidant isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd. *Ex. Del. Food. Chem.* **2010**, *120*, 825–830.
- [74] Deshpande, S. Role of antioxidants in prevention of age-related macular degeneration. *J. Med. Nutr. Nutraceut.* **2012**, *1*, 83–86.
- [75] Neera, J.P.; Singh, S.; Singh, J. Role of free radicals and antioxidants in human health and disease. *Int. J. Curr. Res. Rev.* **2013**, *5*, 14–22.
- [76] Simova-Stoilova, L.; Vaseva, I.; Grigorova, B.; Demirevska, K.; Feller, U. Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery. *Plant Physiol. Biochem.* **2010**, *48*, 200–206.
- [77] Zlatev, Z.S.; Lidon, F.C.; Ramalho, J.C.; Yordanov, I.T. Comparison of resistance to drought of three bean cultivars. *Biol. Plant.* **2006**, *50*, 389–39.

- [78] Boussaha, S.; Bekhouche, K.; Boudjerda, A.; León, F.; Koldas, S.; Yaglioglu, A.S.; Demirtas, I.; Brouard, I.; Marchioni, E.; Zama, D.; et al. Chemical constituents, in vitro antioxidant and antiproliferative activities of *Perralderia coronopifolia* Coss. subsp. *eu-coronopifolia* M. var. *typica* M. extract. *Rec. Nat. Prod.* **2015**, *9*, 312–32.
- [79] Mohamadi, S.; Zhao, M.; Amrani, A.; Marchioni, E.; Zama, D.; Benayache, F.; Benayache, S. On-line screening and identification of antioxidant phenolic compounds of *Saccocalyx satureioides* Coss. et Dur. *Ind. Crop. Prod.* **2015**, *76*, 910–919.
- [80] Bougandoura, A.; D'Abrosca, B.; Ameddah, S.; Scognamiglio, M.; Mekkiou, R.; Fiorentino, A.; Benayache, S.; Benayache, F. Chemical constituents and in vitro anti-inflammatory activity of *Cistanche violacea* Desf. (Orobanchaceae) extract. *Fitoterapia* **2016**, *109*, 248–253.
- [81] Djebbari, R.; Chemam, Y.; Amrani, A.; Lassed, S.; Boubekri, N.; Zama, D.; Benayache, F.; Benayache, S. In vitro antioxidant activities of *n*-butanol extract of *Helianthemum confertum*. *Int. J. Phytomed.* **2015**, *7*, 119–122.
- [82] Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of agricultural and food chemistry* **2001**, *49*, 4619-4626.
- [83] Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine* **1995**, *20*, 933-956.
- [84] Pratt, D.E. Natural antioxidants of soybean oil seeds. In: Simic, M.G., Karel, M.(Eds.), *Autoxidation in Food and Biological Systems*. Plenum Press, New York, 1980, P. 283–293.
- [85] Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* **1997**, *2*, 152–159.
- [86] Wojdylo, A.; Oszmiański, J.; Czemerys, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* **2007**, *105*, 940-949.

[87] Goto, T.; Teraminami, A.; Lee, J.Y.; Ohyama, K.; Funakoshi, K.; Kim, Y.I.; Hirai, S.; Uemura, T.; Yu R. ; Takahashi, N.; Kawada, T. Tiliroside, a glycosidic flavonoid, ameliorates obesity-induced metabolic disorders via activation of adiponectin signaling followed by enhancement of fatty acid oxidation in liver and skeletal muscle in obese-diabetic mice. *J. Nutr. Biochem* **2012**, *23*, 768-776.

[88] Schinella, G.R. ;Tournier, H.A.; Máñez, S.; De Buschiazzo, P.M.; Del Carmen Recio, M.; Ríos, J.L. Tiliroside and gnaphaliin inhibit human low density lipoprotein oxidation. *Fitoterapia* **2007**, *78*, 1–6.

Résumé

Le présent travail est le bilan d'une étude que nous avons menée sur deux plantes endémiques du Sahara septentrional de la famille Cistaceae qui, à notre meilleure connaissance n'ont jamais fait l'objet d'études auparavant: *Helianthemum ruficomum* et *Helianthemum confertum*. Il concerne l'investigation de la composition chimique et de la capacité de piégeage des radicaux libres, de ces deux espèces et de leurs constituants chimiques isolées.

Les tests d'évaluation de l'activité antioxydante des phases acétate d'éthyle et *n*-butanol des extraits hydroalcooliques des parties aériennes des deux espèces par la méthode ABTS^{•+} ont montré des pouvoirs antioxydants importants. Ces résultats ont été confirmés par les tests ORAC et TEAC. Le screening de ces extraits par HPLC-ABTS^{•+} en ligne a révélé une richesse remarquable en antioxydants. Ces résultats ont justifié le fractionnement de ces extraits qui a été réalisé par chromatographie sur colonne de gel de silice 60. Les fractions obtenues, purifiées par chromatographie sur plaques préparatives de gel de silice normale et/ou par HPLC semi-préparative en phase inverse, ont mené à l'isolement et à la détermination de 14 composés à partir de *H. ruficomum* et de 6 composés à partir de *H. confertum*. L'élucidation structurale des composés isolés a été réalisée grâce à l'analyse des spectres de masse haute résolution en mode ESI positif [HRESI-MS(+)], RMN 1D (¹H, ¹³C et DEPT) et RMN 2D (DOSY, COSY, NOESY, HSQC and HMBC) et par la comparaison avec les données de la littérature.

Le pouvoir antioxydant des composés isolés a également été évalué par HPLC-ABTS^{•+}, TEAC et ORAC. Les résultats indiquent clairement un potentiel antioxydant élevé des extraits et des composés testés, isolés de ces deux espèces.

Ce travail a fait l'objet d'une publication parue et de deux autres publications en cours.

Mots clés : Cistaceae, *Helianthemum ruficomum*, *Helianthemum confertum*, RMN 1D, RMN 2D, TEAC, ORAC, HPLC-ABTS^{•+}, Activité antioxydante, Piégeage radicalaire.

Abstract

This work is the assessment of a study that we conducted on two endemic plants of the septentrional Sahara from the Cistaceae family: *Helianthemum ruficomum* and *Helianthemum confertum*. To our best knowledge, no studies are reported so far for these species. The purpose of this work was to investigate the chemical composition and the radical scavenging capacity of these species and their isolated components.

The ethyl acetate and *n*-butanol soluble parts of the aqueous-ethanol extracts of the aerial parts of these species were evaluated for their free radical scavenging capacity by ABTS^{•+} assay. The obtained data which showed important antioxidant powers were confirmed by TEAC and ORAC assays. On-line HPLC- ABTS^{•+} assays were then applied to screen the extracts. The results which revealed remarkable wealth in antioxidants allowed guiding the fractionation of the extracts by column chromatography on silica gel 60. The obtained fractions were purified by chromatography on preparative plates of silica gel 60 and/or by semi-preparative reverse phase HPLC leading to the isolation and the identification of 14 compounds from *H. ruficomum* and 6 compounds from *H. confertum*. The compounds were identified by spectral analyses, mainly ESI-HRMS (+), UV, 1D NMR (¹H, ¹³C, DEPT) and 2D NMR (DOSY, COSY, NOESY, HSQC and HMBC) and comparison of their spectroscopic data with those reported in the literature.

The antioxidant power of the isolated compounds was also evaluated by on-line HPLC-ABTS^{•+}, TEAC and ORAC. The results clearly indicate high antioxidant potential of the extracts and tested compounds isolated from these two species.

This work was the object of a published paper and two other in progress.

Keywords: Cistaceae, *Helianthemum ruficomum*, *Helianthemum confertum*, 1D NMR, 2D NMR, TEAC, ORAC, HPLC-ABTS^{•+}, Antioxidant activity, Radical scavenging activity.

ملخص

هذا العمل هو نتيجة لدراسة فيتوكيميائية لنببتين من عائلة Cistaceae و هما: *Helianthemum ruficomum* و *Helianthemum confertum*.

وكان الهدف من هذا العمل هو دراسة التركيبية الكيميائية و الفعالية البيولوجية لهاتين النببتين.

أظهرت الدراسات أن مستخلصي الأسيئات الايثيل و البوتانول للأجزاء الهوائية للنببتين لهم تأثير مضاد للأكسدة باستعمال HPLC-ABTS و تم التحقق من النتائج باستعمال طريقتين : ORAC و TEAC ما أكد غنى هذين المستخلصين بالمواد المضادة للأكسدة.

في هذا السياق تمت تجزئة المستخلصات العضوية باستعمال الطرق الكروماتوغرافية (CC , CCM, HPLC)، و منه تم عزل و تحديد 20 مركب حيث 14 مركب من المستخلصين العضويين أسيئات الأيثيل و البوتانول لنبتة *H. ruficomum* و 6 مركبات من المستخلص العضوي أسيئات الايثيل للنبتة الثانية *H. confertum*.

تم خضع هذه المركبات للتحاليل المطيافية للتعرف البنوي للمركبات المفصولة بواسطة مختلف الطرق كمطيافية الرنين النووي المغناطيسي ذات بعد واحد و ذات بعدين و تطبيقاته

RMN ID (^1H , ^{13}C et DEPT) et RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY et DOSY)

ومطيافية الكتلة الى جانب مقارنة النتائج مع مختلف المراجع.

دراسة التأثير المضاد للأكسدة للمركبات المفصولة تم التأكد منها عن طريق الطرق التالية: $^+$ ORAC، HPLC-ABTS، TEAC. النتائج تبين تأثير مضاد للأكسدة عالي بالنسبة للمستخلصات و المركبات المفصولة من النببتين.

لقد تم نشر هذا العمل و نحن نعمل الآن على نشر منشورين آخرين.

الكلمات المفتاحية: Cistaceae, *Helianthemum ruficomum*, *Helianthemum confertum* TEAC,

$^+$ RMN ID, RMN 2D، ORAC, HPLC-ABTS