



Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté Des Sciences Exactes
Département de Chimie

N° de Série : 02/CH/2024
N° d'Ordre :29/D3C/2024

ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DE L'ESPECE *HELIANTHEMUM GETULUM* POMEL

THÈSE

Présentée pour l'obtention du diplôme de

Doctorat troisième cycle (LMD) en Analyse physicochimique, contrôle de la qualité et
synthèse de substances bioactives

Par

Siham TERFASSI

Devant le jury Composé de :

Djamila ZAMA	Présidente	Professeur	Université Constantine 1
Youcef MECHEHOUD	Rapporteur	Professeur	Université Constantine 1
Narimane SEGUENI	Examinatrice	Professeur	Université Constantine 3
Ahmed TOUIL	Examineur	Professeur	Université Constantine 1
Farouk ZAIDI	Examineur	Professeur	Université de Sétif
Rachid BENKINIOUAR	Examineur	Professeur	Université Constantine 1
Samir BENAYACHE Membre invité	Directeur	Professeur	Université Constantine 1

Soutenance publiquement
Le 01/07/2024

Dédicaces

Louange à Dieu tout puissant, qui m'a donné la volonté, le courage pour réaliser ce travail et qui m'a permis de voir ce jour tant attendu.

Je dédie cette thèse à mes très chers parents pour leur soutien infaillible face à tous les obstacles et à toute ma famille.

Je dédie aussi ce travail à tous mes enseignants qui ont contribué à ma formation et tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Siham

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, le professeur Samir BENAYACHE, de l'université de Frères Mentouri Constantine 1 pour sa disponibilité, sa patience et son soutien tout au long de ce travail de recherche, en exprimant mes sentiments de reconnaissance et de gratitude à son égard.

Je le remercie également pour m'avoir fait le grand honneur de m'encadrer.

Mes vifs remerciements à Madame la professeur Fadila BENAYACHE, pour son assistance, ses précieux conseils au fil de mon parcours universitaire durant lequel elle fût une source d'inspiration pour moi.

Je tiens également à remercier tout les membres du jury, Professeur Djamila ZAMA, Professeur Narimane SEGUENI, Professeur Farouk ZAIDI, Professeur Ahmed Touil, et Professeur Rachid BENKINIOUARE pour leur présence et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture de ma thèse et pour toutes remarques qu'ils m'adresseront lors de cette soutenance afin que je puisse avancer et améliorer mon travail.

Je souhaiterais aussi remercier Professeur Youcef MECHEHOUD pour son bienveillance et son aide.

Je voudrais de même exprimer mes sincères remerciements et ma gratitude à Mr Christian MAGNE, Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale, Brest-France, pour son accueil, sa disponibilité et ses conseils durant mon stage de courte durée au sein de son laboratoire EA 7462 Géoarchitecture_Territoires, Urbanisation, Biodiversité, Environnement.

Je remercie également Mr. Xavier DAUVERGNE Maître de conférences à l'Université de Bretagne Occidentale, Brest-France, qui m'a aidé à intégrer rapidement leur équipe pour son soutien et son accueil chaleureux dans son laboratoire EA 7462 Géoarchitecture_Territoires, Urbanisation, Biodiversité, Environnement, durant mon stage de courte durée.

Mes vifs remerciements à Mr. Stephane CERONTOLA Responsable plateforme RMN-RPE à l'Université de Bretagne Occidentale, pour son soutien et ses efforts qui m'ont permis d'avancer dans ma recherche.

Mes remerciements s'adressent aussi aux membres du laboratoire Plateforme RMN-RPE, Université de Bretagne Occidentale, CS, Brest-France.

Mes remerciements les plus sincères à Mr. MARCHIONI Eric Professeur à l'université Louis Pasteur Strasbourg France qui m'a accueilli au sein de son laboratoire pour un stage de courte durée.

J'exprime ma gratitude et ma reconnaissance au directeur du laboratoire de biochimie du centre national de biotechnologie Mr. Chawki BENSOUICI, pour son encadrement au sein de son laboratoire.

Mes remerciements vont aussi à tous mes collègues de l'unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques.

Je tiens à remercier de même 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
Références	3
Chapitre I Aperçu bibliographique sur la famille Cistaceae et le genre <i>Helianthemum</i>.....	5
I. 1. Introduction	5
I. 2. Etude botanique de la famille Cistaceae.....	7
I. 3. Classification botanique	8
I. 4. Utilisations traditionnelles.....	8
I. 5. Activités biologiques	9
I. 6. Etude chimique de la famille Cistaceae.....	9
I. 7. Le genre <i>Helianthemum</i>	10
I. 7. 1. Description botanique du genre <i>Helianthemum</i>	10
I. 7. 2. Utilisations traditionnelles.....	11
I. 7. 3. Activités biologiques	11
I. 7. 4. Etude chimique du genre <i>Helianthemum</i>	13
I. 7. 5. L'espèce <i>Helianthemum getulum</i>	24
I. 7. 5. A. Place dans la systématique :	25
Références	26
Chapitre II Propriétés Biologiques des flavonoïdes	32
II. 1. Introduction	32
II. 2. Métabolites secondaires.....	32
II. 2. 1. Les familles des métabolites secondaires	33
II. 3. Les composés phénoliques	33
II. 3. 1. Définition.....	33
II. 3. 2. Les principales classes de composés phénoliques dans les plantes	33
II. 3. 2. A. Présentation des Flavonoides.....	34
Classification et structure	34
II. 3. 2. A. 1. Pharmacologie des flavonoïdes	36
II. 3. 2. A. 2. Relation structure activité des flavonoïdes	39
II. 3. 2. B. D'autres classes de composés phénoliques	39
II. 3. 2. B. 1. Les acides phénoliques	39
II. 3. 2. B. 2. Les lignanes	40
Références	42

Chapitre III Etude phytochimique de l'espèce <i>Helianthemum getulum</i>	47
III. 1. 1. Place dans la systématique	47
III. 1. 2. Description botanique :	47
III. 1. 3. Matériel Végétal	48
III. 1. 4. Matériels et méthodes	48
III. 1. 4. A. Chromatographiques	48
III. 1. 4. B. Méthodes physico-chimiques	50
III. 1. 4. B. 1. Hydrolyse acide	50
III. 1. 4. B. 2. Spectrométrie Ultra-violette-visible (UV)	50
III. 1. 4. B. 3. Spectrométrie de Masse (SM)	50
III. 1. 4. B. 4. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)	50
III. 1. 4. C. Activités biologiques	50
III. 1. 4. C. 1. Évaluation de l'activité antioxydante	51
III. 1. 4. C. 2. Évaluation de l'activité antidiabétique	52
III. 1. 4. C. 3. Évaluation de l'activité anticholinestérase	52
III. 1. 4. C. 4. Évaluation de l'activité antityrosinase	53
III. 1. 4. C. 5. Évaluation de l'activité antiélastase	53
III. 1. 4. D. Analyses statistiques	54
III. 1. 5. Extraction et purification	54
III. 1. 5. A. Etude des extraits	56
III. 1. 5. B. Fractionnement de l'extrait AcOEt	57
III. 1. 5. C. Fractionnement de l'extrait n-BuOH	65
III. 1. 6. Conclusion	68
Références	69
Chapitre IV Identification structurale	71
IV. 1. Identification des composés isolés à partir de l'extrait AcOEt (fraction C)	71
IV. 1. 1. Elucidation structurale du composé P1 issu de la fraction F5	71
IV. 1. 2. Elucidation structurale du composé P2 issu de la fraction F7	76
IV. 1. 3. Elucidation structurale du composé P3 issu de la fraction F7	81
IV. 1. 4. Elucidation structurale du composé P4 issu de la fraction F9	101
IV. 1. 5. Elucidation structurale du composé P5 issu de la fraction F9	115
IV. 1. 6. Elucidation structurale du composé P6 issu de la fraction F9	125
IV. 1. 7. Elucidation structurale du composé P7 issu de la fraction F9	129
IV. 1. 8. Elucidation structurale du composé P8 issu de la fraction F9	135
IV. 1. 9. Elucidation structurale du composé P9 issu de la fraction F10	150

IV. 1. 10.	Elucidation structurale du composé P10 issu de la fraction F10	157
IV. 1. 11.	Elucidation structurale du composé P11 issu de la fraction F11	164
IV. 2.	Identification des composés isolés à partir de l'extrait n-BuOH (fraction D)	168
IV. 2. 1.	Elucidation structurale du composé P12 issu de la fraction F15	168
IV. 2. 2.	Elucidation structurale du composé P13 issu de la fraction F17	181
IV. 3.	Conclusion.....	191
Références		195
Chapitre V Etude des propriétés biologiques de l'espèce <i>Helianthemum getulum</i>		198
V. 1.	Évaluation de l'activité antioxydante	198
V. 1. 1.	Introduction	198
V. 1. 2.	Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de l'espèce <i>Helianthemum getulum</i>	198
V. 1. 2. A.	L'effet scavenger du radical DPPH	198
V. 1. 2. B.	Activité du piégeage de l'ABTS•+	201
V. 1. 2. C.	Dosage de piégeage des radicaux galvinoxyle (GOR)	203
V. 1. 2. D.	Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	205
V. 1. 3.	Évaluation de l'activité antioxydante des composés identifiés de l'espèce <i>Helianthemum getulum</i>	207
V. 1. 3. A.	Effet scavenger du radical DPPH	208
V. 1. 3. B.	Activité du piégeage de l'ABTS•+	210
V. 1. 3. C.	Dosage de piégeage des radicaux galvinoxyle (GOR)	212
V. 1. 3. D.	Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	214
V. 1. 4.	Corrélation des résultats de l'activité antioxydante des extraits et des composés identifiés	216
V. 2.	Évaluation de l'activité antidiabétique	218
V. 2. 1.	Introduction	218
V. 2. 2.	Évaluation de l'activité antidiabétique des extraits, fractions et composés identifiés de l'espèce <i>Helianthemum getulum</i>	218
V. 3.	Évaluation de l'activité anticholinestérase	221
V. 3. 1.	Introduction	221
V. 3. 2.	Évaluation de l'activité anticholinestérase des extraits et fractions de l'espèce <i>Helianthemum getulum</i>	221
V. 3. 3.	Évaluation de l'activité anticholinestérase des composés isolés de l'espèce <i>Helianthemum getulum</i>	225
V. 4.	Évaluation de l'activité antityrosinase.....	226
V. 4. 1.	Introduction	226
V. 4. 2.	Évaluation de l'activité antityrosinase des extraits.....	226

V. 4. 1. Évaluation de l'activité antityrosinase des composés isolés.....	227
V. 5. Évaluation de l'activité antiélastase	229
V. 5. 1. Introduction	229
V. 5. 2. Évaluation de l'activité antiélastase des extraits et fractions de l'espèce <i>H. getulum</i> .	229
V. 6. Conclusion.....	230
Références	232
Conclusion générale	234
Publication scientifique	

Abstract

الملخص

Résumé

Liste des Tableaux

Chapitre I Aperçu bibliographique sur la famille Cistaceae et le genre *Helianthemum*

Tableau I.1. Classification de Cronquist.	8
Tableau I.2. Classification phylogénétique APG III (2009).....	8
Tableau I.3. Flavonoïdes isolés du genre <i>Helianthemum</i>	13
Tableau I.4. Acides Phénoliques isolés du genre <i>Helianthemum</i>	18
Tableau I.5. Acides gras isolés du genre <i>Helianthemum</i>	20
Tableau I.6. Lignanes isolés du genre <i>Helianthemum</i>	20
Tableau I.7. Phytostérols isolés du genre <i>Helianthemum</i>	21
Tableau I.8. Saccharides isolés du genre <i>Helianthemum</i>	22

Chapitre III Etude phytochimique de l'espèce *Helianthemum getulum*

Tableau III.1. Gradient CLHP phase mobile CLHP analytique.	49
Tableau III.2. Activité antioxydante de l'extrait M80 et des fractions.	56
Tableau III.3. Fractionnement par chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait AcOEt de l'espèce <i>Helianthemum getulum</i>	57
Tableau III.4. Fractionnement par chromatographie sur colonne de l'extrait n-BuOH de <i>Helianthemum getulum</i>	65

Chapitre IV Identification structurale

Tableau IV.1. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , J-mode du composé P1.	76
Tableau IV.2. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , J-mode du composé P2.	81
Tableau IV.3. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P3.	100
Tableau IV.4. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P4.	114
Tableau IV.5. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P5.	124
Tableau IV.6. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P6.	129
Tableau IV.7. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P7.	134
Tableau IV.8. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P8.	149
Tableau IV.9. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P9.	156
Tableau IV.10. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P10.	163
Tableau IV.11. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P11.	167
Tableau IV.12. Données spectrales UV du composé P12.	170
Tableau IV.13. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P12.	180
Tableau IV.14. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P13.	190
Tableau IV.15. Les différents composés isolés de l'espèce <i>Helianthemum getulum</i>	192

Chapitre V Etude des propriétés biologiques de l'espèce *Helianthemum getulum*

Tableau V.1. Activité antioxydante évaluée par le dosage DPPH.	199
Tableau V.2. Activité antioxydante évaluée par le dosage ABTS.	201
Tableau V.3. Activité antioxydante évaluée par le dosage GOR.	203
Tableau V.4. Activité antioxydante évaluée par le test CUPRAC.	205
Tableau V.5. Activité antioxydante évaluée par le dosage DPPH.	208
Tableau V.6. Activité antioxydante évaluée par le dosage ABTS.	210
Tableau V.7. Activité antioxydante par le dosage GOR.	212
Tableau V.8. Activité antioxydante évaluée par le dosage CUPRAC.....	214
Tableau V.9. Activité antioxydante de l'extrait, des fractions et des composés isolés de l'espèce <i>Helianthemum getulum</i> par les tests DPPH, ABTS+, GOR et CUPRAC.	217
Tableau V.10. Activité inhibitrice de l'alpha-glucosidase de l'extrait M80, des fractions B, C et D et de certains composés purs isolés de l'espèce <i>Helianthemum getulum</i>	219
Tableau V.11. Activité inhibitrice de l'alpha-glucosidase.....	220
Tableau V.12. Activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase de l'extrait M80, fractions et des composés isolés.....	224
Tableau V.13. Activité inhibitrice de la butyrylcholinestérase des extraits fractions et composés isolés.	225
Tableau V.14. Activité antityrosinase des extraits et fractions de l'espèce <i>Helianthemum getulum</i> . .	227
Tableau V.15. Activité antityrosinase des composés identifiés de l'espèce <i>Helianthemum getulum</i> . .	228
Tableau V.16. Activité anti-élastase des extraits et fractions de l'espèce <i>Helianthemum getulum</i>	230

Liste des Figures

Chapitre I Aperçu bibliographique sur la famille Cistaceae et le genre *Helianthemum*

Figure I.1. <i>Cistus creticus</i>	6
Figure I.2. <i>Cistus ladanifer</i>	6
Figure I.3. Répartition des genres de la famille Cistaceae.	6
Figure I.4. Représentation schématique des différents organes de plantes Cistaceae.	7
Figure I.5. Distribution géographique des espèces du genre <i>Helianthemum</i>	10
Figure I.6. Diversité (nombre) des espèces et sous-espèces d' <i>Helianthemum</i> dans l'espace floristique méditerranéen au niveau des pays.	11
Figure I.7. Structures des flavonoides isolés des espèces du genre <i>Helianthemum</i>	15
Figure I.8. Structures des acides phénoliques isolés des espèces du genre <i>Helianthemum</i>	19
Figure I.9. Structure de l'acide gras isolé du genre <i>Helianthemum</i>	20
Figure I.10. Structures des lignanes isolés des espèces du genre <i>Helianthemum</i>	21
Figure I.11. Structures des Phytostérols isolés des espèces du genre <i>Helianthemum</i>	22
Figure I.12. Structures des Saccharides isolés des espèces du genre <i>Helianthemum</i>	23
Figure I.13. <i>Helianthemum getulum</i> (synonyme: <i>Helianthemum metilense</i>).	24

Chapitre II Propriétés Biologiques des flavonoïdes

Figure II.1. Squelette de phénylbenzopyrane, structure de base des flavonoïdes.	34
Figure II.2. Représentation structurale des principales classes de flavonoïdes.	35
Figure II.3. Structure de la Quercétine.	37
Figure II.4. Structure du Kaempférol.	37
Figure II.5. Structure de la (+)-Catéchine.	38
Figure II.6. Structure de la Naringénine.	39
Figure II.7. Structures de base des acides phénoliques.	40
Figure II.8. Structure des lignanes.....	40

Chapitre III Etude phytochimique de l'espèce *Helianthemum getulum*

Figure III.1. <i>Helianthemum getulum</i> (synonyme: <i>Helianthemum metilense</i>).....	47
Figure III.2. Protocole d'extraction de la plante <i>Helianthemum getulum</i>	55
Figure III.3. Chromatogramme CLHP analytique de la phase AcOEt.	57
Figure III.4. Chromatogramme CLHP semi préparative de la fraction F7 de l'extrait acétate d'éthyle.	58
Figure III.5. Chromatogramme analytique phase inverse du composé P5.	59
Figure III.6. Chromatogramme semi préparative de la fraction F9 de l'extrait acétate d'éthyle.	60
Figure III.7. Chromatogramme analytique phase inverse du composé P6.	60
Figure III.8. Chromatogramme analytique phase inverse du composé P7.	61
Figure III.9. Chromatogramme analytique phase inverse du composé P8.	61
Figure III.10. Chromatogramme CLHP semi préparative de la fraction F10 de l'extrait acétate d'éthyle.	62
Figure III.11. Chromatogramme analytique phase inverse du composé P9.	62

Figure III.12. Chromatogramme analytique phase inverse du composé P10.....	63
Figure III.13. Chromatogramme CLHP semi préparative de la fraction F11 de l'extrait acétate d'éthyle.....	63
Figure III.14. Chromatogramme analytique phase inverse du composé P11.....	64
Figure III.15. Chromatogramme obtenu à partir d'un extrait à l'acétate d'éthyle de <i>H. getulum</i>	64
Figure III.16. Chromatogramme CLHP semi préparative de la fraction F15 de l'extrait n-BuOH.....	66
Figure III.17. Chromatogramme analytique phase inverse du composé P12.....	67

Chapitre IV Identification structurale

Figure IV.1. Structure de l'acide vanillique P1.....	71
Figure IV.2. Structure de l'acide protocatéchique P2.....	76
Figure IV.3. Structure de Cyclooolivil P3.....	81
Figure IV.4. Cycles aromatiques A et B du composé P3.....	86
Figure IV.5. Cycles aromatiques A et B du composé P3.....	90
Figure IV.6. Structure partielle du composé P3.....	93
Figure IV.7. Structure partielle du composé P3.....	95
Figure IV.8. Structure plane du composé P3.....	98
Figure IV.9. Structure du Cyclooolivil P 3.....	99
Figure IV.10. Structure du Trans-tiliroside P 4.....	101
Figure IV.11. Structure d'un aglycone de type Kaempférol.....	102
Figure IV.12. Structure de l'astragaline.....	109
Figure IV.13. Structure partielle du composé P4.....	110
Figure IV.14. Structure partielle de composé P4.....	112
Figure IV.15. Structure du composé Trans tiliroside P4.....	113
Figure IV.16. Structure de l'astragaline P5.....	115
Figure IV.17. Structure d'un aglycone de type Kaempférol.....	119
Figure IV.18. Structure de l'astragaline P5.....	122
Figure IV.19. Structure du gallate de méthyle P6.....	125
Figure IV.20. Structure de Dulcisflavane P7.....	129
Figure IV.21. Structure de Cis tiliroside P8.....	135
Figure IV.22. Structure d'un aglycone de type Kaempférol.....	136
Figure IV.23. Structure de l'astragaline.....	144
Figure IV.24. Structure partielle du composé P8.....	145
Figure IV.25. Structure partielle du composé P8.....	147
Figure IV.26. Structure du composé Cis tiliroside P8.....	148
Figure IV.27. Structure du Gallocatéchine P9.....	150
Figure IV.28. Structure de l'Epigallocatéchine P10.....	157
Figure IV.29. Structure de l'acide gallique P11.....	164
Figure IV.30. Structure du nouveau flavonoïde 5,7, 2', 4', 5 ' pentahydroxyflavone 3-O- β -D-galactopyranoside P12.....	168
Figure IV.31. Spectroscopie UV du composé 12.....	169
Figure IV.32. Spectroscopie UV du composé P12.....	178
Figure IV.33. Structure du composé P 12.....	180
Figure IV.34. Structure du scutellarein 8-C- β -D-glucopyranoside P13.....	181

Figure IV.35. Structure composé P13.	188
---	-----

Chapitre V Etude des propriétés biologiques de l'espèce *Helianthemum getulum*

Figure V.1. Piégeage du radical DPPH par les extraits de <i>H.getulum</i> , du BHT, du BHA et du Trolox.	200
Figure V.2. Valeurs des IC ₅₀ des extraits de <i>H.getulum</i> et des standards BHA, BHT et Trolox (Test du DPPH).	200
Figure V.3. Piégeage du radical ABTS par les extraits de <i>H.getulum</i> , du BHT, du BHA et du Trolox.	202
Figure V.4. Valeurs des IC ₅₀ des extraits de l'espèce <i>H.getulum</i> et des standards BHA, BHT et Trolox (Test du radical-cationABTS).	202
Figure V.5. Piégeage du radical GOR par des extraits de l'espèce <i>H.getulum</i> , du BHT, du BHA et du Trolox.	204
Figure V.6. Valeurs des IC ₅₀ des extraits de l'espèce <i>H.getulum</i> et des standards BHA, BHT et Trolox (Test de piégeage des radicaux galvinoxyle GOR).	204
Figure V.7. Piégeage du radical CUPRAC par des extraits de l'espèce <i>H. getulum</i> , du BHT, du BHA et du Trolox.	206
Figure V.8. Valeurs des A _{0.50} des extraits de l'espèce <i>H.getulum</i> et des standards BHA, BHT et Trolox (Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre CUPRAC).	206
Figure V.9. Piégeage du radical DPPH par les composés isolés de l'espèce <i>H.getulum</i> , du BHT, du BHA et du Trolox.	209
Figure V.10. Valeurs des IC ₅₀ des produits de <i>H.getulum</i> et des standards BHA, BHT et Trolox (Test du piégeage de DPPH).	209
Figure V.11. Piégeage du radical ABTS par les composés isolés de <i>H.getulum</i> , du BHT, du BHA et de Trolox.	211
Figure V.12. Valeurs des IC ₅₀ des produits de <i>H.getulum</i> et des standards BHA, BHT et Trolox (Test du piégeage de l'ABTS).	211
Figure V.13. Piégeage du radical GOR par les composés isolés de l'espèce <i>H.getulum</i> , du BHT, du BHA et du Trolox.	213
Figure V.14. Valeurs des IC ₅₀ des produits de l'espèce <i>H.getulum</i> et des standards BHA, BHT et Trolox (Test de piégeage des radicaux galvinoxyle GOR).	213
Figure V.15. Piégeage du radical CUPRAC par les composés isolés de l'espèce <i>H.getulum</i> , du BHT, du BHA et du Trolox.	215
Figure V.16. Valeurs des A _{0.50} des extraits de l'espèce <i>H.getulum</i> et des standards BHA, BHT et Trolox (Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre CUPRAC).	216
Figure V.17. Valeurs des IC ₅₀ des extraits, composés identifiés de l'espèce <i>H.getulum</i> et du standard acarbose (Test de l'alpha-glucosidase).	219
Figure V.18. Valeurs des IC ₅₀ des extraits, composés identifiés de <i>H.getulum</i> et de standard galantamine (activité inhibitrice d'acétylcholinestérase).	223
Figure V.19. Valeurs des IC ₅₀ des extraits, composés identifiés de <i>H.getulum</i> et de standard galantamine (activité inhibitrice de butyrylcholinestérase).	223

Introduction générale

Depuis des millénaires, l'homme utilise les propriétés des plantes non seulement pour se nourrir et confectionner ses abris, mais aussi pour sa santé et son bien-être. Les extraits et préparations à base de plantes ont constitué pendant longtemps les éléments principaux des guérisseurs et des médecins, ils figurent encore parmi les soins de santé primaires. La médecine traditionnelle de toutes les civilisations du monde repose sur des remèdes à base de plantes pour soigner de nombreux maux, particulièrement les maladies infectieuses, la diarrhée, la fièvre et les douleurs rhumatismales.

De nos jours, les plantes représentent une source importante de métabolites secondaires à valeur médicinale, ces molécules qui jouent un rôle majeur dans l'adaptation des plantes au sein de leur environnement, représentent également une source importante d'actifs pharmaceutiques. Elles constituent l'une des principales matières premières de l'industrie pharmaceutique malgré plusieurs avancées dans le domaine des drogues de synthèse.

Selon les données de la littérature, les métabolites secondaires, notamment les composés phénoliques et particulièrement les flavonoïdes, sont responsables de plusieurs effets thérapeutiques chez l'homme, grâce à leurs activités antioxydante, anticancéreuse, antibactérienne et anti-inflammatoire [1], [2]. C'est la raison pour laquelle, les études sur les métabolites secondaires des plantes se sont multipliées au cours des cinquante dernières années.

Selon les statistiques de l'OMS, environ 80% des populations Africaines utilisent la médecine traditionnelle pour les soins de santé. En Algérie, les plantes médicinales sont utilisées depuis des siècles pour traiter différentes affections, la flore algérienne est connue par sa richesse en biodiversité avec 3164 espèces végétales, par conséquent il est considéré comme l'un des pays arabes les plus riches [3]. La phytothérapie fait partie intégrante de la culture locale, elle se propage par la transmission des connaissances au sein des populations, les données recueillies dans différents pays rapportent des enquêtes ethnopharmacologiques sur l'utilisation des plantes médicinales.

Les investigations phytochimiques et pharmacologiques ont apporté une meilleure connaissance sur les métabolites secondaires des végétaux et leurs propriétés biologiques. La chimie analytique et l'isolement et la purification des principes actifs des plantes médicinales, se sont multipliés à partir du XIXe siècle. Ceci a contribué avec l'avènement de la synthèse organique et la fermentation microbienne au développement de l'industrie du médicament à l'orée du vingtième siècle. Le recours aux substances naturelles s'est poursuivi et même accentué au cours de la seconde moitié du vingtième siècle.

Notre travail s'inscrit dans une démarche instaurée par notre laboratoire depuis plusieurs années, d'investigation phytochimique des espèces à intérêt thérapeutique. Dans le cadre de la valorisation des plantes sahariennes médicinales, nous avons sélectionné l'espèce endémique *Helianthemum getulum* qui appartient à la famille des Cistaceae pour une étude phytochimique consistant à la séparation, la purification et la caractérisation structurale des différents métabolites secondaires et ensuite l'évaluation de leurs activités biologiques.

La famille des Cistaceae est connue pour son grand potentiel et ses nombreuses utilisations en médecine traditionnelle en raison de ses nombreuses propriétés biologiques, notamment, ses propriétés antioxydante, antihyperglycémiant, anti-inflammatoire Au sein de cette famille, le genre *Helianthemum* a été utilisé pour le traitement de nombreuses maladies : Diabète sucré [4], maladies diarrhéiques infectieuses et diarrhée aiguë sanglante [5], [6], brûlures, troubles digestifs, gastro-intestinaux et respiratoires, troubles inflammatoires [7]. Ce genre est largement distribué en Afrique du Nord, en Europe centrale et du Nord et en Asie [8]. Environ 30 espèces poussent en Algérie, dont trois sont endémiques [9]. Jusqu'à présent, les investigations chimiques sur les taxons du genre *Helianthemum* ont principalement révélé la présence de flavonoïdes, d'acides phénoliques, de lignanes et des phytostérols [10-13].

Notre étude rapporte les premières investigations phytochimiques et biologiques de l'espèce *Helianthemum getulum* Pomel une espèce endémique du Sahara septentrional. Elle est utilisée dans la pharmacopée traditionnelle, pour traiter les infections parasitaires intestinales [14]. Certaines données de la littérature suggèrent que cette espèce est synonyme de *Helianthemum metilense* Coss & Durieu [5], [9].

Cette étude comprend cinq chapitres. Le premier aborde l'étude botanique, les utilisations traditionnelles, les activités biologiques et l'étude chimique de la famille Cistaceae et du genre *Helianthemum*, ainsi qu'un aperçu sur l'espèce *Helianthemum getulum*. Le deuxième chapitre s'intéresse à l'étude des métabolites secondaires notamment les composés phénoliques, particulièrement les flavonoïdes et leurs propriétés pharmacologiques. Dans le troisième chapitre nous décrivons le travail expérimental et les différentes étapes d'extraction et de purification des constituants chimiques de l'espèce *Helianthemum getulum* ainsi que les protocoles de détermination des activités biologiques. Le quatrième chapitre reporte les résultats et les discussions sur l'élucidation structurale des composés identifiés par des méthodes spectroscopiques (RMN 1D et 2D, Maldi-Tof, UV). Le cinquième chapitre est consacré à l'évaluation du potentiel biologique des extraits, fractions et composés identifiés de l'espèce *Helianthemum getulum* par l'étude des activités antioxydante, antidiabétique, anticholinestérase, antityrosinase et antiélastase.

Références

- [1] R. E. Mutha, A. U. Tatiya, and S. J. Surana, "Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: An overview," *Futur. J. Pharm. Sci.*, 2021, 7, 1–13.
- [2] D. Tungmunthum, A. Thongboonyou, A. Pholboon, and A. Yangsabai, "Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview," *Medicines.*, 2018, 5(3), 93.
- [3] K. Vasisht and V. Kumar, "Compendium of medicinal and aromatic plants– vol. 1: Africa," *Trieste, Italy United Nations Ind. Dev. Organ. Int. Cent. Sci. High Technol.*, 2004.
- [4] N. Hamza, B. Berke, A. Umar, C. Cheze, H. Gin, and N. Moore, "A review of Algerian medicinal plants used in the treatment of diabetes," *J. Ethnopharmacol.*, 2019, 238, 111841.
- [5] F. Calzada, R. López, M. Meckes, and R. Cedillo-Rivera, "Flavonoids of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*," *Int. J. Pharmacogn.*, 1995, 33(4), 351–352.
- [6] M. Meckes *et al.*, "Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum*, a plant used in Maya traditional medicine to treat diarrhoea," *Phyther. Res. An Int. J. Devoted to Med. Sci. Res. Plants Plant Prod.*, 1997, 11(2), 128–131.
- [7] Á. Rubio-Moraga *et al.*, "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(1), 287–296.
- [8] D. J. Mabberley, *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge university press., 1997.
- [9] P. Quézel and S. Santa, "Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.," 1962.
- [10] F. Calzada and A. D. Alanís, "Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*," *Phyther. Res. An Int. J. Devoted to Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.*, 2007, 21(1), 78–80.
- [11] I. Benabdelaziz, "Etude chimique des espèces *Helianthemum sessiliflorum* et *Euphorbia pterococca*." UB1., 2015.
- [12] Y. Chemam, S. Benayache, E. Marchioni, M. Zhao, P. Mosset, and F. Benayache, "On-line screening, isolation and identification of antioxidant compounds of *Helianthemum ruficomum*," *Molecules.*, 2017, 22(2), 239.
- [13] N. Djemam *et al.*, "Characterization of ethyl acetate and n-butanol extracts of *Cymbopogon schoenanthus* and *Helianthemum lippii* and their effect on the smooth muscle of the rat distal colon," *J. Ethnopharmacol.*, 2020, 252, 112613.
- [14] L. El Rhaffari and A. Zaid, "Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet): Un savoir empirique pour une pharmacopée renouvelée.," 2002.

Chapitre I

Aperçu bibliographique sur la famille Cistaceae et le genre *Helianthemum*

Chapitre I Aperçu bibliographique sur la famille Cistaceae et le genre *Helianthemum*

I. 1. Introduction

La famille des Cistaceae comprend 8 genres (*Cistus*, *Crocanthemum*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Hudsonia*, *Lechea* et *Tuberaria*) et environ 180 espèces, retrouvées principalement dans les zones tempérées et subtropicales, les régions de l'hémisphère nord, en particulier les régions de la Méditerranée et l'est des États-Unis [1]. En fait, cinq des huit genres (*Cistus*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Tuberaria*) sont originaires de la Méditerranée tandis que les trois autres (*Crocanthemum*, *Hudsonia*, *Lechea*) sont retrouvés dans les régions tempérées d'Amérique du Nord [2].

Certaines de ces plantes sont autochtones et répandues dans le sud-est de la péninsule ibérique, le nord-ouest de l'Afrique, la Grèce et le Portugal [3], [4]. L'Algérie, le Maroc et la péninsule ibérique, constituent le territoire de prédilection des Cistacées de l'Ancien Monde.

Le genre *Helianthemum* contient environ une centaine de taxons [5], le genre *Cistus* contient environ 20 espèces réparties en trois sous-genres [6], le genre *Fumana* comprend environ 20 espèces distribuées principalement dans la région méditerranéenne [7], le genre *Halimium* contient environ 9 à 14 espèces limitées au bassin méditerranéen [8] et le genre *Tuberaria* regroupe environ 12 espèces [9].

La famille des Cistaceae est connue par son grand potentiel et ses nombreuses utilisations en médecine traditionnelle en raison de ses nombreuses propriétés biologiques, notamment, antioxydante, antihyperglycémiant, anti-inflammatoire, antiulcérogène, cicatrisant, antimicrobien, cytotoxique, vasodilatatrice et antispasmodique [10]. De nombreuses maladies sont traitées avec ces herbes, les problèmes respiratoires et digestifs étant les plus courants [11]. Les composants de certaines plantes de cette famille sont connus pour leur application dans l'industrie de la parfumerie et des produits pharmaceutiques. L'espèce *Cistus ladanifer* produit une résine appelée labdanum riche en composés utilisés dans l'industrie du Parfum en France, Espagne et Portugal, principalement en raison de leurs propriétés fixantes et aromatiques [12]. La résine ladano produite par *C. creticus* et *C. ladanifer* est utilisée comme encens dans les pays arabes [13].



Figure I.1. *Cistus creticus* [14].



Figure I.2. *Cistus ladanifer* [15].

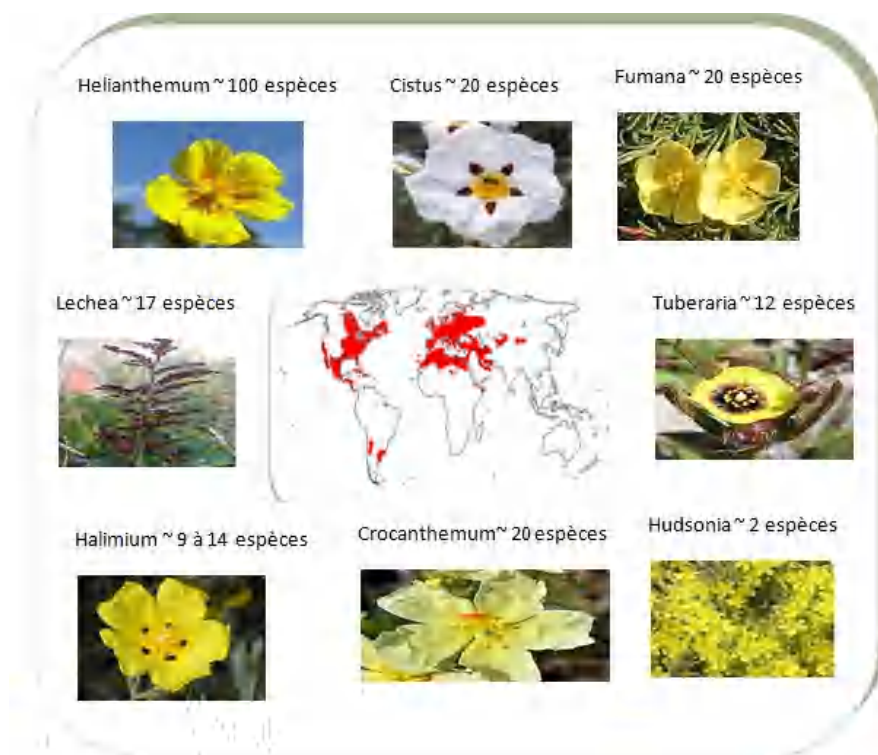


Figure I.3. Répartition des genres de la famille Cistaceae.

I. 2. Etude botanique de la famille Cistaceae

La famille des Cistaceae est l'une des plus difficiles à étudier, elle est constituée généralement d'arbustes héliophytes, sous-arbrisseaux et herbes présents dans les zones ouvertes sur sols [2], connue pour ses beaux arbustes, couverts d'abondantes fleurs. Elles se caractérisent toujours par leurs cinq pétales de couleur blanche à violacée, ainsi que leurs capsules de fruits composées de cinq, six ou dix soupapes [16], à tige et rameaux arrondis ou sub-tétragone. Les feuilles simples, opposées, rarement alternes, quelquefois verticillées, entières, sessiles ou pétiolées, non inflorescences auxiliaires ou terminales, parfois uniflores [17].

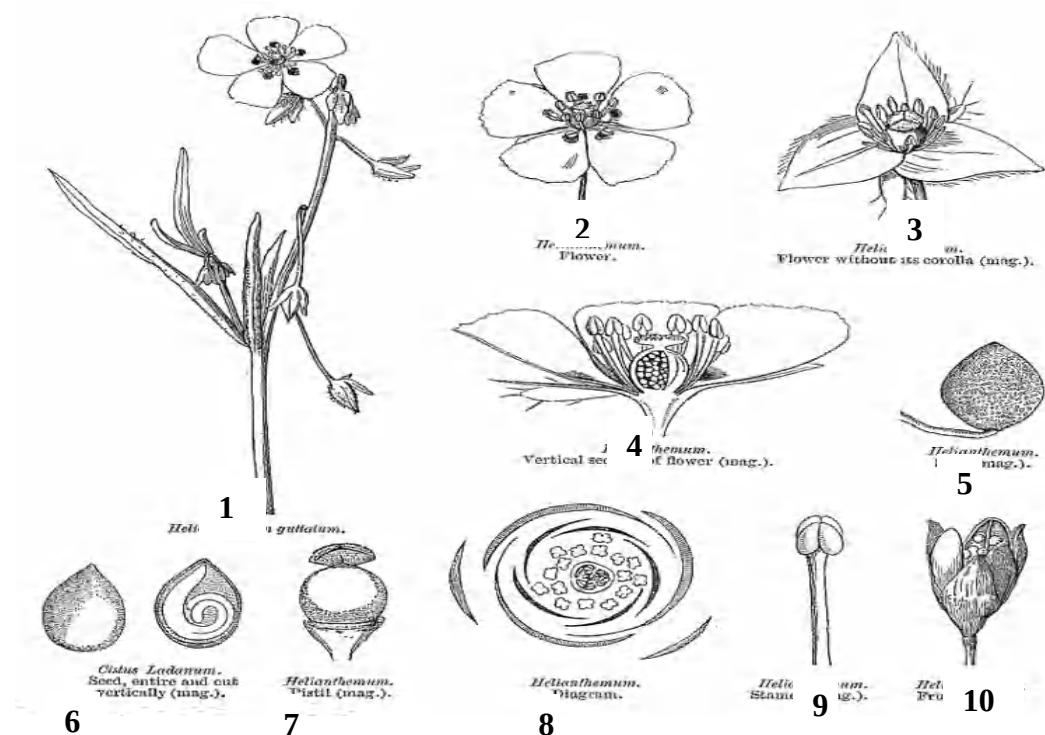


Figure I.4. Représentation schématique des différents organes de plantes Cistaceae [17].

1. Partie aérienne *Helianthemum guttatum*. 2. Fleur *Helianthemum*. 3. *Helianthemum* fleur sans corolle. 4. *Helianthemum* coupe verticale de la fleur. 5. Graine d'*helianthemum*. 6. Graine de *Cistus Ladanum*, coupe verticale. 7. *Helianthemum* Pistil. 8. Diagramme de fleur de *Helianthemum vulgare*. 9. Etamine d' *Helianthemum*. 10. Fruit d' *Helianthemum*.

I. 3. Classification botanique

Selon la classification classique des angiospermes de Cronquist ainsi que la classification phylogénétique, cette famille se situe dans l'ordre des Malvales [18].

Tableau I.1. Classification de Cronquist.

Classification de Cronquist	
Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Malvales
Famille	Cistaceae

Tableau I.2. Classification phylogénétique APG III (2009).

Classification phylogénétique APG III (2009)	
Clade	Angiospermes
Clade	Dicotylédones vraies
Clade	Rosidées
Clade	Malvidées
Ordre	Malvales
Famille	Cistaceae

I. 4. Utilisations traditionnelles

Les humains ont toujours cherché à utiliser les plantes pour se soigner. Les cistaceae sont une famille de plantes utilisées dans la médecine traditionnelle pour le traitement de diverses maladies telles que le rhumatisme et comme antimicrobiens, antiulcérogènes et vasodilatateurs [19].

Les différents taxons de la famille Cistaceae sont traditionnellement utilisés comme antitussif, diurétiques, et contre les troubles cutanés [20]. Ils sont utilisés également comme un cataplasme appliqué localement sur la peau contre les blessures, ou sous forme d'une décoction par voie orale contre les troubles des voies respiratoires [21]. Ils ont également un

intérêt dans le traitement des ulcères gastro-duodénaux et comme agents anti-inflammatoires et antispasmodiques [22].

Plusieurs espèces de *Cistus* sont utilisées en médecine traditionnelle à diverses fins comme antidiarrhéique, antiulcérogène, antispasmodique, antiacide, anti-inflammatoires [23], [24] et antidiabétiques [25]. La décoction de feuilles de l'espèce *Cistus albidus* est utilisée comme hypoglycémiant et contre les douleurs gastriques. Les feuilles sont utilisées pour traiter les abcès et comme cataplasme. Infusées dans du thé, elles sont utilisées comme digestif [26].

La plupart des membres de cette famille sont très parfumés et odorants, très appréciés dans l'industrie du parfum et à des fins ornementales ainsi utilisé pour le bois de chauffage [27].

I. 5. Activités biologiques

Des études antérieures ont signalées les propriétés biologiques des espèces de Cistaceae : Les effets antihypertenseur et vasodilatateur [28], les activités antioxydante [29], antidiarrhéique [30], antimicrobienne [31], anti-inflammatoire [32], analgésique [33], antivirale [34] et antidiabétique [35].

I. 6. Etude chimique de la famille Cistaceae

Les investigations chimiques des taxons des Cistaceae ont principalement révélé la présence de phytostérols et terpènes, de polyphénols, flavonoïdes, tanins et lignanes.

De nombreuses études chimiques menées sur des espèces de *Cistus*, ont montré la prédominance des terpènes et composés phénoliques principalement des flavonoïdes et des tanins, *Cistus libanotis* a permis l'identification de terpènes et de flavonoïdes [36]. Les études des deux espèces *Cistus ladanifer* et *Cistus populifolius* ont mis en évidence la présence de composés phénoliques, terpènes, alcaloïdes, polyacétylènes, acides gras et stéroïdes [37].

Les investigations chimiques sur les taxons d'*Helianthemum* ont majoritairement révélées la présence de flavonoïdes, d'acides phénoliques, de lignanes et de phytostérols [38]–[41].

Peu d'études chimiques ont été menées sur le genre *Fumana*. Deux espèces : *Fumana procumbens* et *Fumana montana* ont montré la présence de polyphénols et de flavonoïdes [42], [43].

I. 7. Le genre *Helianthemum*

I. 7. 1. Description botanique du genre *Helianthemum*

Helianthemum est le genre le plus important, le plus répandu et le plus complexe sur le plan taxonomique des Cistaceae, il comprend environ 180 espèces dans le monde [44], héliophytes et sous-espèces d'arbustes, de sous-arbustes et d'herbes annuelles [45]. Subdivisé en deux taxons au rang de sous-genres, *Ortholobum* Willk et *Plectolobum* Willk [46]. Il est largement répandu en Afrique du Nord, en Europe, en Amérique et en Asie centrale [47]. Environ 30 espèces poussent en Algérie, dont trois y sont endémiques [48].

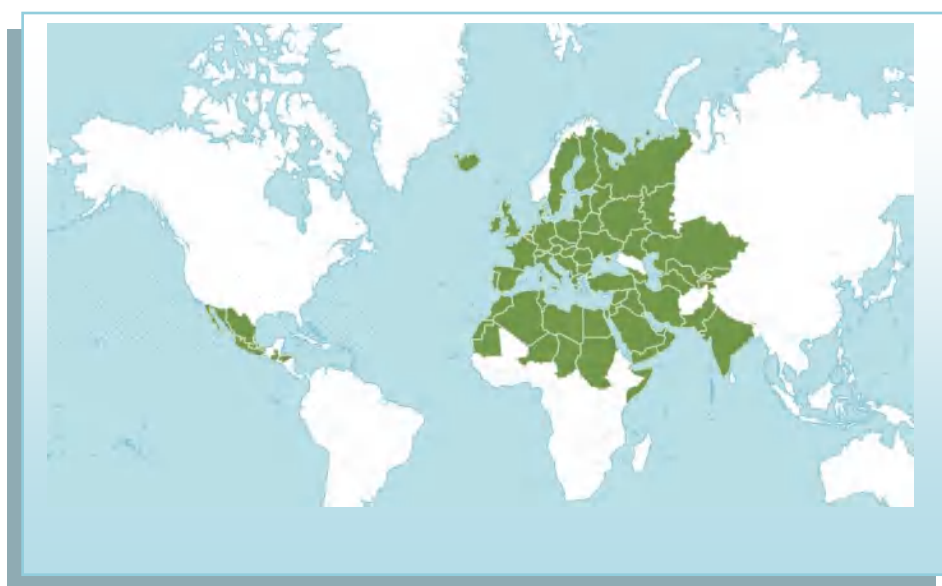


Figure I.5. Distribution géographique des espèces du genre *Helianthemum*.

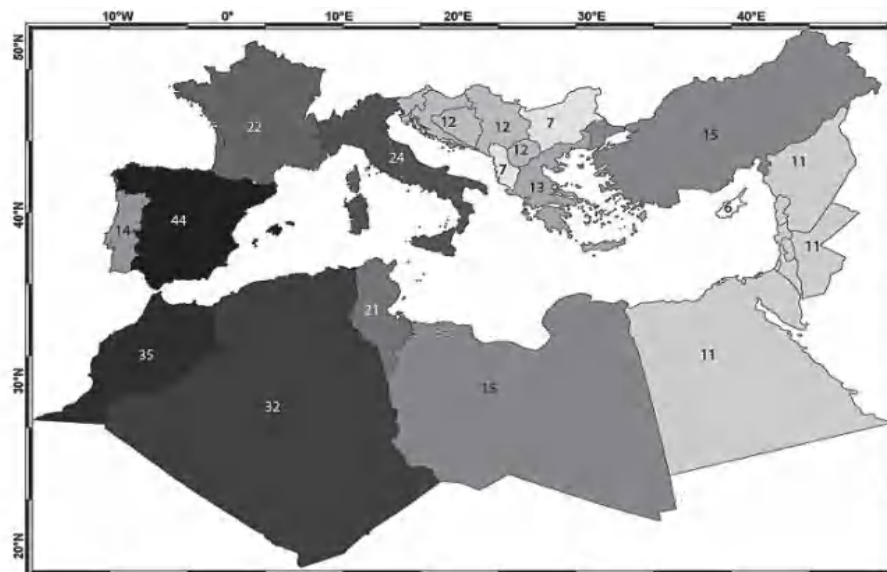


Figure I.6. Diversité (nombre) des espèces et sous-espèces d'*Helianthemum* dans l'espace floristique méditerranéen au niveau des pays [49].

I. 7. 2. Utilisations traditionnelles

Les taxons d'*Helianthemum* (Cistaceae) sont traditionnellement utilisés comme remède naturel en médecine populaire par les habitants, les feuilles et les fleurs de différents taxons d'*helianthemum* sont traditionnellement utilisés comme anti-inflammatoire, antiulcérogène, comme remèdes curatifs pour les plaies, comme antiparasitaires, antimicrobiens, analgésiques, cytotoxiques et vasodilatateurs [38], [50]–[54]. Ces plantes sont ingérées sous forme de décoctions et de thés pour les problèmes gastro-intestinaux. Ils sont également transformés en cataplasmes et onguents et appliqués directement sur les plaies ou brûlures infectées [55].

Helianthemum glomeratum est fréquemment utilisée pour le traitement des troubles gastro-intestinaux. Les décoctions de feuilles et de racines sont conseillées en cas de diarrhée, de douleurs abdominales et épigastriques, comme remède pour traiter les infections par les vers [52]. *Helianthemum lippii* est utilisée pour soulager les affections gastro-intestinales et contre les douleurs abdominales ou la diarrhée [41], [56]

I. 7. 3. Activités biologiques

Un grand nombre d'espèces du genre *Helianthemum* (famille des Cistaceae) ont montré des activités biologiques :

Activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits de l'espèce *Heliantemum sessiliflorum* réalisée *in vitro* par la méthode DPPH montrait une activité plus élevée de l'extrait acétate d'éthyle (IC₅₀

=32,75 ± 2,07 µg / ml) par rapport à l'extrait n-butanol (IC₅₀ = 94,03 ± 1,52 µg / ml), la quercétine a été utilisée comme référence (IC₅₀ = 8,5 ± 1,45 µg / ml) [57].

Les extraits et les composés isolés de l'espèce *Helianthemum ruficomum* ont été évalués pour leur capacité de piégeage des radicaux libres par la méthode HPLC-ABTS^{•+} en ligne, les résultats indiquent un fort potentiel antioxydant des extraits et composés testés. [40].

Activité antibactérienne

Les extraits acétate d'éthyle et n-butanol de l'espèce *Heliantemum sessiliflorum* ont montré une activité antibactérienne modérée [57].

L'extrait méthanol et l'extrait acétate/eau de l'espèce *Helianthemum glomeratum* étaient très actifs contre *shigella spp*, *vibrio cholerae*, *Salmonella spp* et *Escherichia coli*. Un fractionnement chimique supplémentaire a indiqué que l'activité antibactérienne était associée aux fractions polyphénoliques [51].

L'activité antimicrobienne d'*Helianthemum kahiricum* a été déterminée par la technique de diffusion sur supports solides contre les souches de microorganismes suivants : *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* et *Staphylococcus multirésistant* et *Pseudomonas*. L'extrait n-butanol a présenté une très forte activité antimicrobienne contre toutes les souches testées, alors que l'extrait chloroformique a montré des activités modérées contre toutes les souches testées, tandis que l'extrait ether de pétrole était inactif [58].

Activités analgésique et anti-inflammatoire

L'espèce *Helianthemum virgatum* a un effet analgésique raisonnable par rapport à l'acide acétyl salicylique utilisé comme standard [59]. Il a été rapporté que les extraits méthanol et chloroforme de l'espèce *Helianthemum lippii* présentaient des activités analgésiques et anti-inflammatoires significatives [60].

Activité cytotoxique

L'extrait des racines de l'espèce *Helianthemum confertum* a montré un effet cytotoxique considérable contre la lignée cellulaire du cancer de l'ovaire [61].

Activité anti-Giardia

Des études *in vivo* ont démontré que l'extrait méthanolique de l'espèce *Helianthemum glomeratum* est efficace contre le modèle animal de la giardiose avec une valeur ED₅₀ de 0,125 mg/kg et son activité est comparable au métronidazole et à l'émétine [62]. Des études ont indiquées que l'activité giardicide était associée à la présence des flavonols [63], [64].

Propriétés antiprotozoaire

Un extrait méthanol et acétone/eau de l' *Helianthemum glomeratum* a présenté des propriétés antiprotozoaires. [51], [52].

I. 7. 4. Etude chimique du genre *Helianthemum*

Ce genre est représenté par environ 180 espèces de la famille *Cistaceae*, très peu d'études chimiques sont rapportées dans la littérature. Les investigations phytochimiques ont été faites sur les espèces *Helianthemum glomeratum*, *Helianthemum sessiliflorum*, *Helianthemum ruficomum*, *Helianthemum Kahiricumum* et *H. nummularium* [38,40], [57, 58], [65-67], ces recherches chimiques sur les taxons d'*Helianthemum* ont principalement révélé la présence de flavonoïdes, d'acides phénoliques, de lignanes et de phytostérols.

Flavonoïdes :

Tableau I.3. Flavonoïdes isolés du genre *Helianthemum*.

	Composés	Sources	Références
<u>1</u>	Astragaline	<i>H. glomeratum</i> <i>H. sessiliflorum</i> <i>H. ruficomum</i> <i>H. nummularium</i>	[38-40], [65]
<u>2</u>	Kaempférol	<i>H. nummularium</i> <i>H. glomeratum</i>	[65-67]
<u>3</u>	Kaempférol 3-O-vicianoside	<i>H. sessiliflorum</i>	[57]
<u>4</u>	kaempférol-3-O-(3', 6''-di-O-E-p coumaroyl) -β-D glucopyranoside	<i>H. glomeratum</i> <i>H. kahiricum</i>	[38], [58]
<u>5</u>	Quercétine-3-O-glucoside	<i>H. nummularium</i>	[65]
<u>6</u>	Nicotiflorine	<i>H. ruficomum</i> <i>H. sessiliflorum</i>	[40], [57]

<u>7</u>	Vicénine-2	<i>H. ruficomum</i> <i>H. sessiliflorum</i>	[40], [57]
<u>8</u>	Quercétine	<i>H. glomeratum</i> <i>H. nummularium</i>	[65], [67]
<u>9</u>	Quercitrine	<i>H. glomeratum</i> <i>H. sessiliflorum</i>	[38-39]
<u>10</u>	Quercétine-3-O-glucuronide	<i>H. nummularium</i>	[65]
<u>11</u>	Isoquercétrine	<i>H. glomeratum</i> <i>H. sessiliflorum</i>	[38-39]
<u>12</u>	Rutine	<i>H. ruficomum</i> <i>H. sessiliflorum</i>	[40], [57]
<u>13</u>	Narcissine	<i>H. ruficomum</i>	[40]
<u>14</u>	Myricitrine	<i>H. sessiliflorum</i>	[39]
<u>15</u>	Trans tiliroside	<i>H. glomeratum</i> <i>H. sessiliflorum</i> <i>H. ruficomum</i> <i>H. nummularium</i>	[38-40], [65]
<u>16</u>	Cis tiliroside	<i>H. glomeratum</i> <i>H. ruficomum</i>	[38], [40]
<u>17</u>	Catéchine	<i>H. sessiliflorum</i>	[39]
<u>18</u>	Epicatéchine	<i>H. sessiliflorum</i>	[39]

19 Gallocatéchine *H. sessiliflorum* [39]

20 Epigallocatechine *H. sessiliflorum* [39]

21 Hovetrichoside C *H. sessiliflorum* [66]

22 Néoisorutine *H. sessiliflorum* [66]

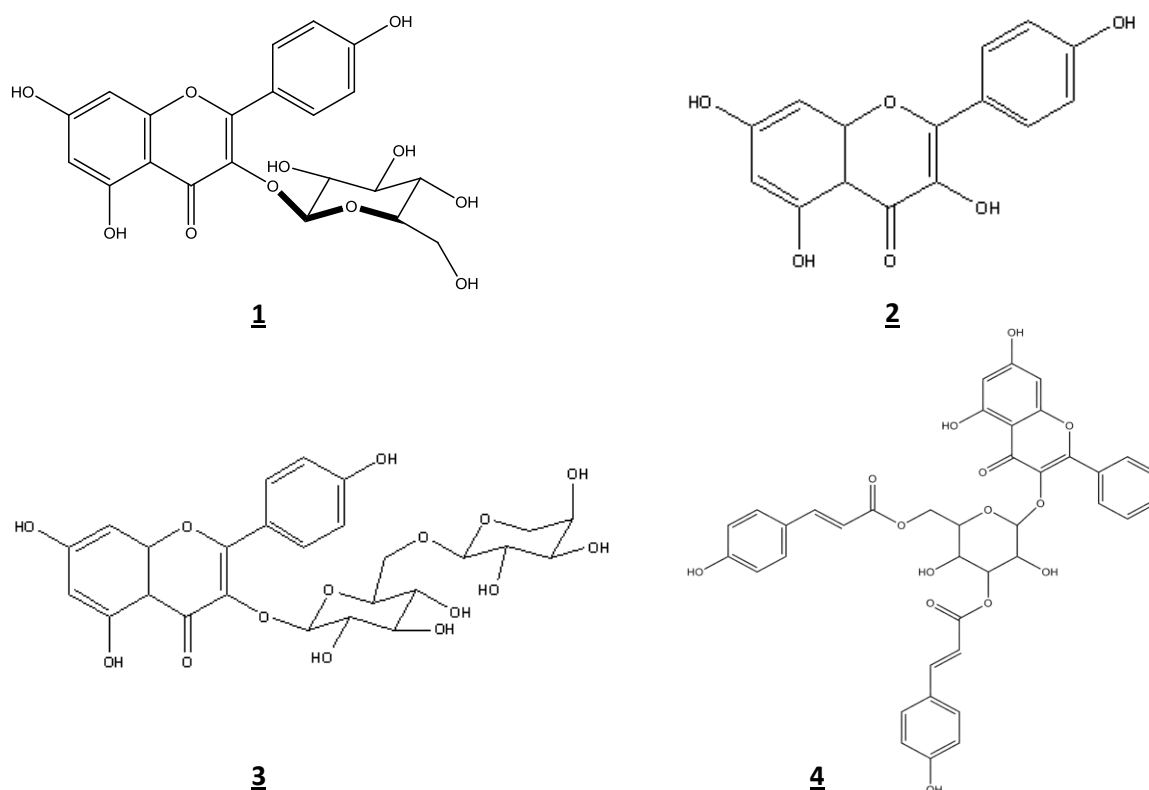


Figure I.7. Structures des flavonoides isolés des espèces du genre *Helianthemum*.

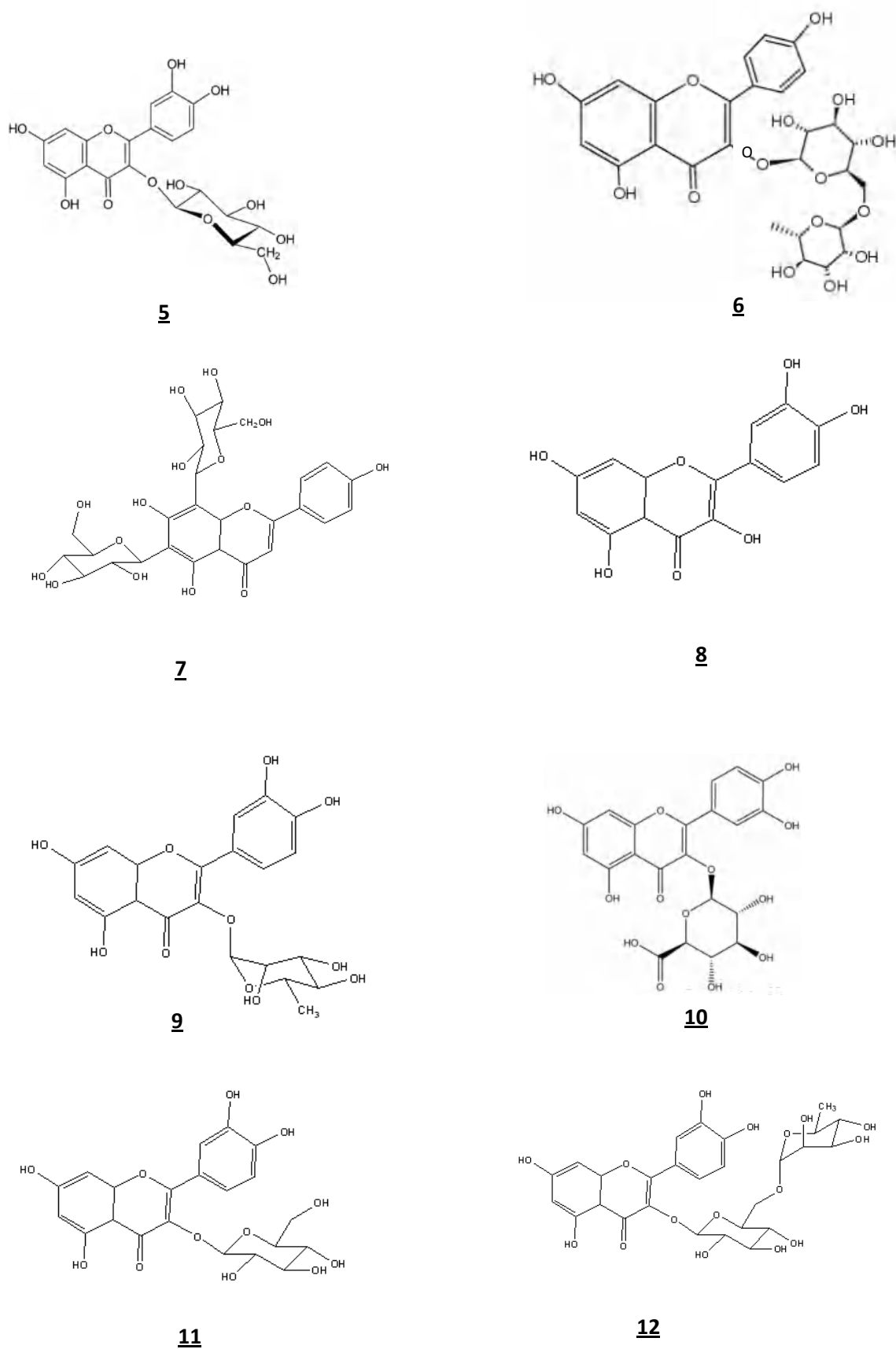
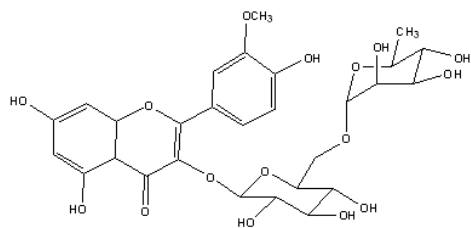
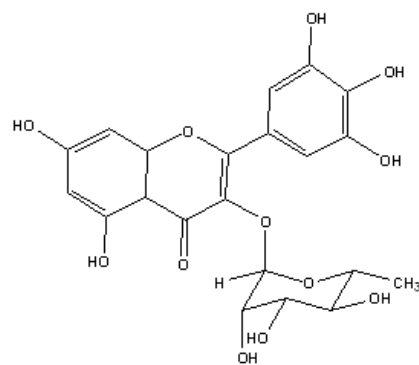


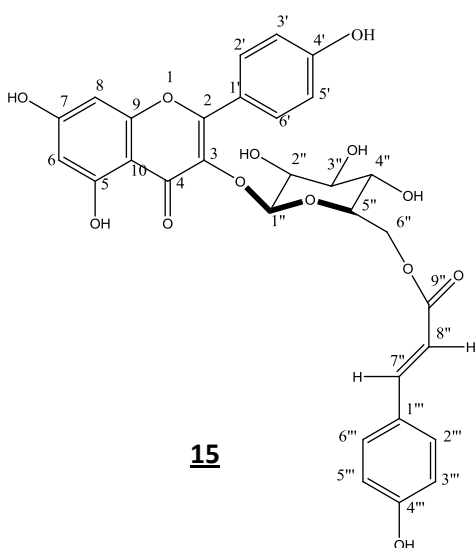
Figure I.7. Structures des flavonoides isolés des espèces du genre *Helianthemum* (suite)



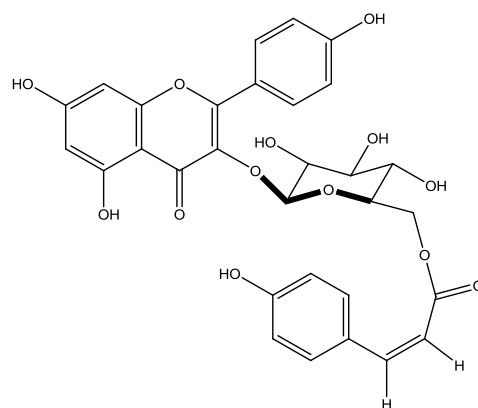
13



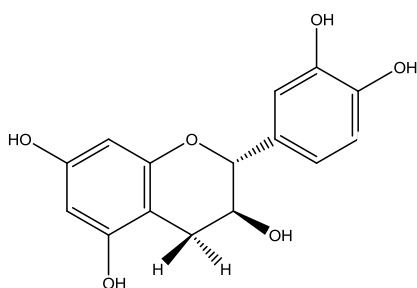
14



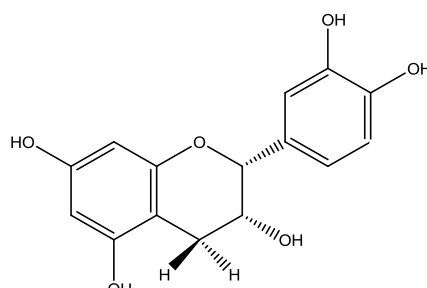
15



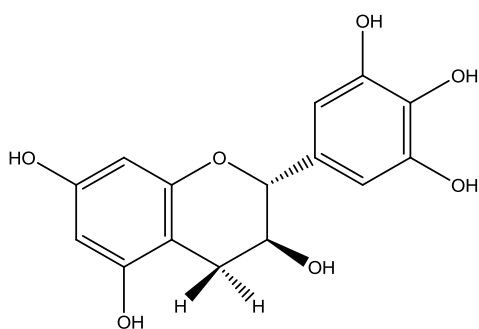
16



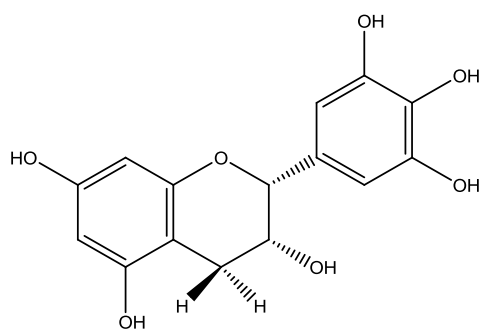
17



18

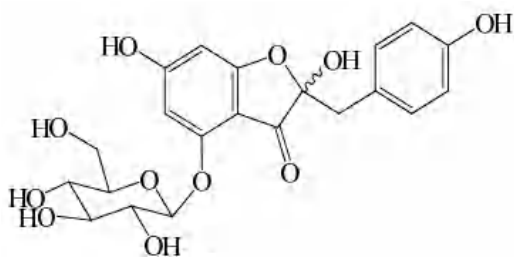


19

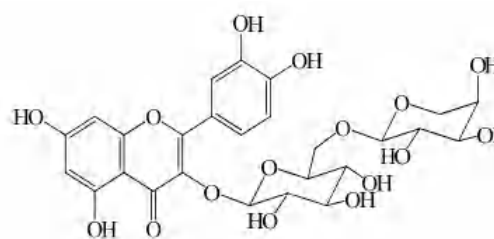


20

Figure I.7. Structures des flavonoides isolés des espèces du genre *Helianthemum* (suite).



21



22

Figure I.7. Structures des flavonoides isolés des espèces du genre *Helianthemum* (suite).

Acides Phénoliques :

Tableau I.4. Acides Phénoliques isolés du genre *Helianthemum*.

	Composée	Sources	Références
<u>23</u>	Acide benzoïque	<i>H. sessiliflorum</i>	[39]
<u>24</u>	Acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	<i>H. sessiliflorum</i> <i>H. nummularium</i>	[39], [65]
<u>25</u>	Acide protocatéchique	<i>H. ruficomum</i> <i>H. sessiliflorum</i>	[40], [39]
<u>26</u>	Acide vanillique	<i>H. sessiliflorum</i>	[39]
<u>27</u>	Acide vanillique 4- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>H. ruficomum</i>	[40]
<u>28</u>	Acide gallique	<i>H. sessiliflorum</i>	[39]
<u>29</u>	Picéine	<i>H. ruficomum</i>	[40]
<u>30</u>	Lavandoside (<i>trans</i> -Ferulic acid 4- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside)	<i>H. ruficomum</i>	[40]

31 Acide 4-hydroxybenzoïque 4-O- β -D-glucopyranoside *H. ruficomum* [40]

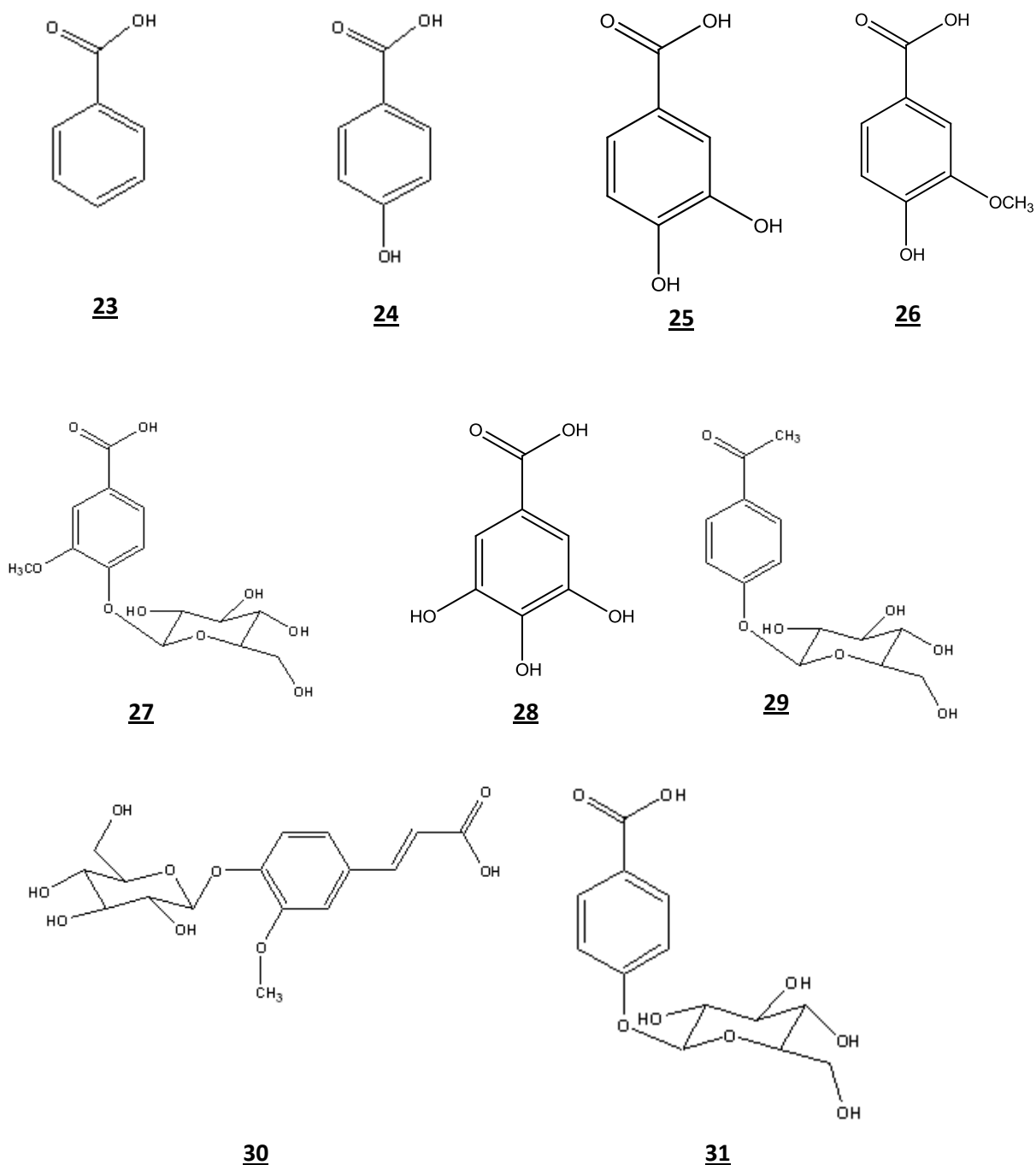
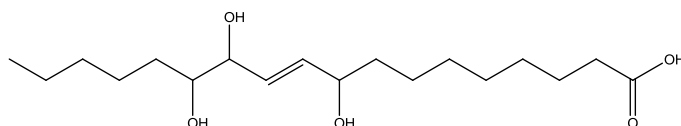


Figure I.8. Structures des acides phénoliques isolés des espèces du genre *Helianthemum*.

Acide gras :

Tableau I.5. Acides gras isolés du genre *Helianthemum*.

	Composés	Sources	Références
32	Acide (-) -pinellique	<i>H. sessiliflorum</i>	[39]



32

Figure I.9. Structure de l'acide gras isolé du genre *Helianthemum*.

Lignanes :

Tableau I.6. Lignanes isolés du genre *Helianthemum*.

	Composés	Sources	Références
33	1-O-acétyl prinsepiol	<i>H. sessiliflorum</i>	[39]
34	1 α -hydroxypinoresinol	<i>H. sessiliflorum</i>	[39]
35	(+)-cyclooolivil	<i>H. sessiliflorum</i>	[39]
36	Isolaricirésinol 9'-O- β -D-glucopyranoside	<i>H. sessiliflorum</i>	[66]

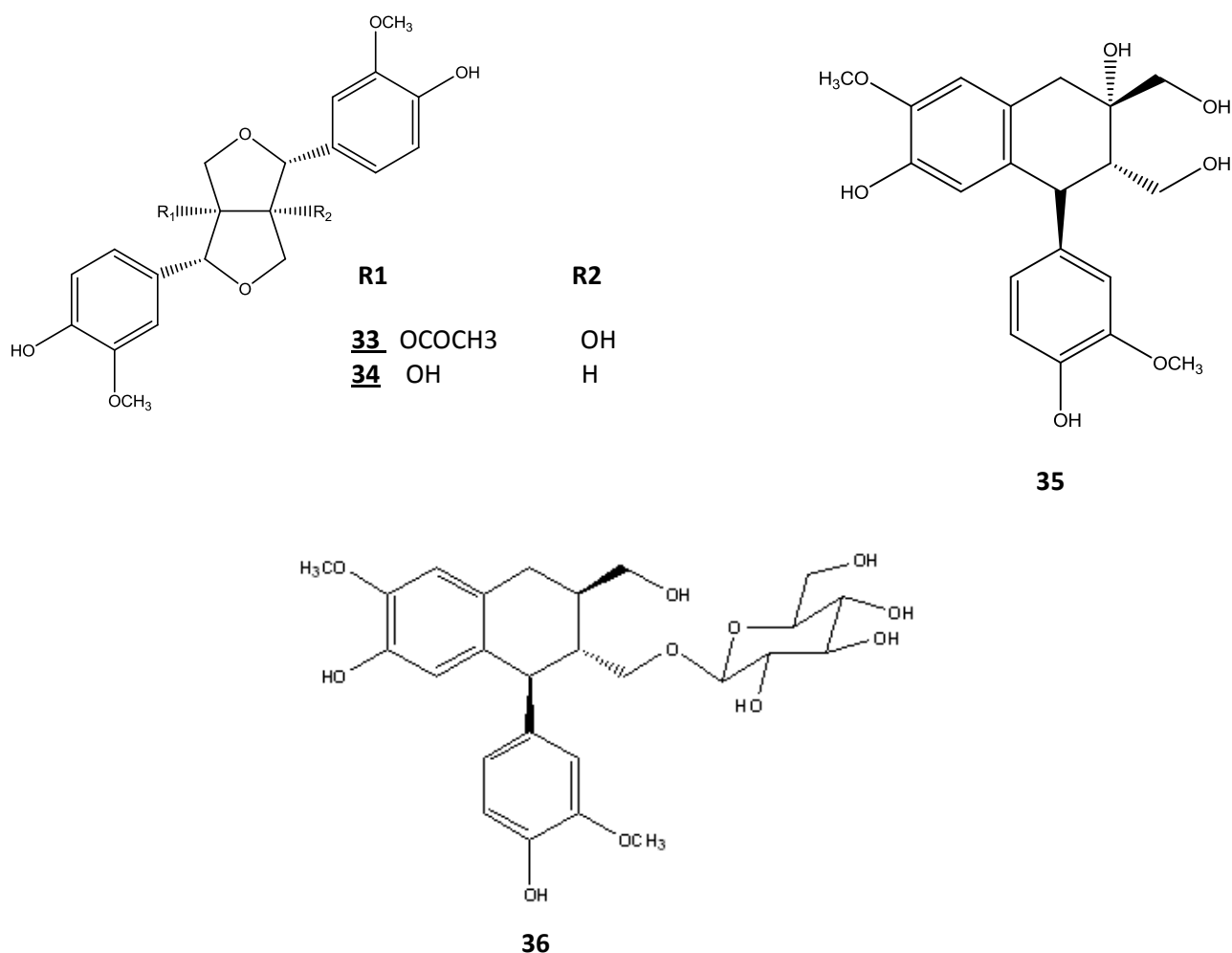


Figure I.10. Structures des lignanes isolés des espèces du genre *Helianthemum*.

Phytostérols :

Tableau I.7. Phytostérols isolés du genre *Helianthemum*.

	Composés	Sources	Références
37	β-sitostérol	<i>H. sessiliflorum</i> <i>H. ruficomum</i>	[39], [40]
38	Stigmastérol	<i>H. ruficomum</i>	[40]
39	Daucostérol	<i>H. sessiliflorum</i>	[39]

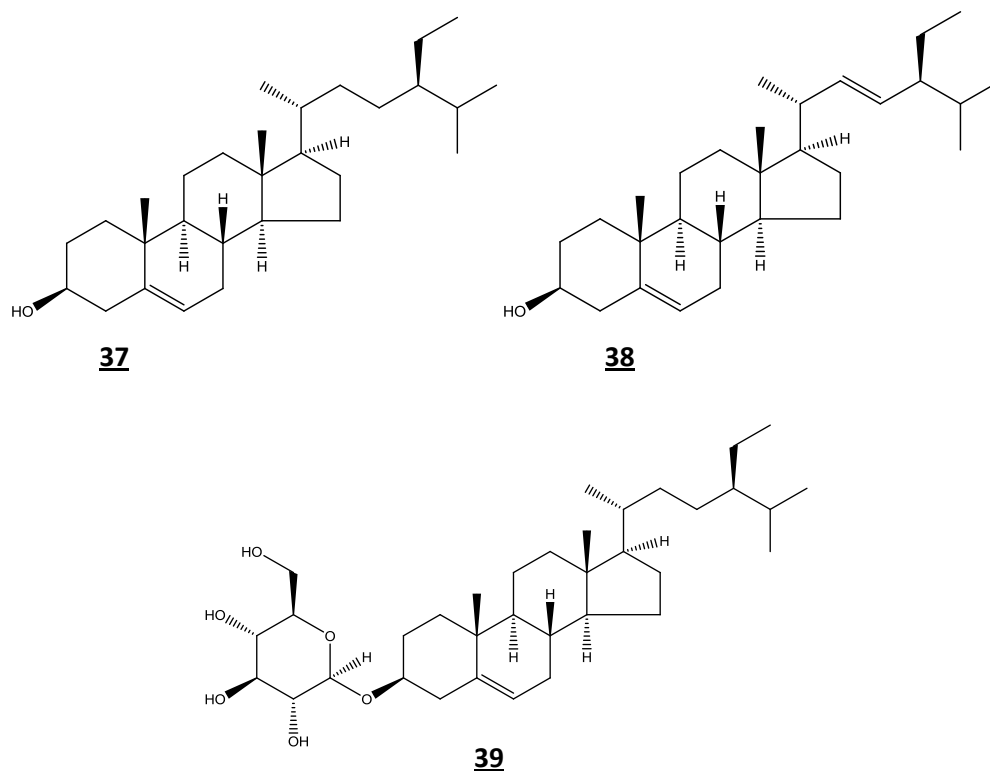
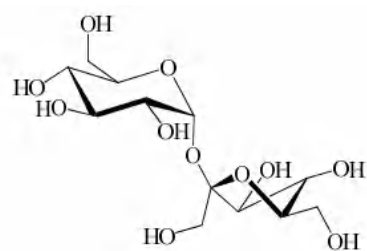


Figure I.11. Structures des Phytostérols isolés des espèces du genre *Helianthemum*.

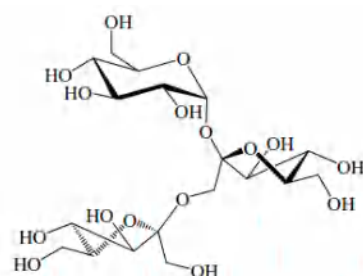
Saccharides :

Tableau I.8. Saccharides isolés du genre *Helianthemum*.

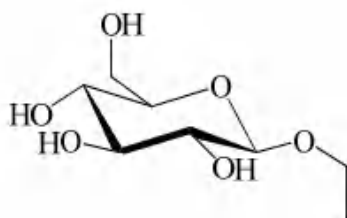
	Composés	Sources	Références
40	β -D-fructofuranosyl-(2 $\rightarrow$ 1)- α -D-glucopyranoside	<i>H. sessiliflorum</i>	[66]
41	β -D-fructofuranosyl-(2'' $\rightarrow$ 1')- β -D-fructofuranosyl-(2' $\rightarrow$ 1)- α -D-glucopyranoside	<i>H. sessiliflorum</i>	[66]
42	1-O-éthyl- β -D-glucopyranoside	<i>H. sessiliflorum</i>	[66]
43	β -D-fructofuranose	<i>H. sessiliflorum</i>	[66]



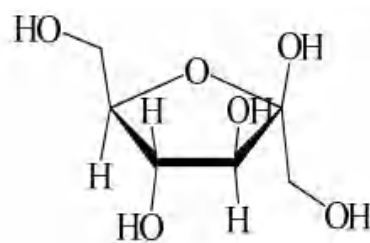
40



41



42



43

Figure I.12. Structures des Saccharides isolés des espèces du genre *Helianthemum*.

I. 7. 5. L'espèce *Helianthemum getulum*

Helianthemum getulum (synonyme : *Helianthemum metilense*) est une espèce endémique du Sahara septentrional qui est étudiée pour la première fois dans ce travail. Dans la pharmacopée traditionnelle, elle est utilisée pour traiter les infections par les vers intestinaux [68].

Helianthemum getulum sub genre ortholobum et section eriocarpon Dunal est une plante velue-laineuse avec des feuilles lancéolées obtuses aux deux extrémités, jusqu'à 25 mm de long et des graines roses compressées et papilleuses [48].



Figure I.13. *Helianthemum getulum* (synonyme: *Helianthemum metilense*) [69-70].

I. 7. 5. A. Place dans la systématique :

- ❖ **Embranchement :** Magnoliophyta
- ❖ **Classe :** Magnoliopsida
- ❖ **Ordre :** Malvales
- ❖ **Famille :** Cistaceae
- ❖ **Genre :** *Helianthemum*
- ❖ **Espèce :** *Helianthemum getulum*
- ❖ **Nom :** *Helianthemum getumum* Pomel
- ❖ **Synonyme :** *H. metlilense* Coss. et Durieu

Références

- [1] J. M. Arrington and K. Kubitzki, “Cistaceae,” in *Flowering Plants· Dicotyledons*, Springer., 2003, 62–70.
- [2] B. Guzmán and P. Vargas, “Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid rbcL and trnL-trnF sequences,” *Org. Divers. Evol.*, 2009, 9(2), 83–99.
- [3] D. Andrade, C. Gil, L. Breitenfeld, F. Domingues, and A. P. Duarte, “Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L.,” *Ind. Crops Prod.*, 2009, 30(1), 165-167.
- [4] S. Teixeira, A. Mendes, A. Alves, and L. Santos, “Simultaneous distillation–extraction of high-value volatile compounds from *Cistus ladanifer* L.,” *Anal. Chim. Acta.*, 2007, 584(2), 439–446.
- [5] Á. Rubio-Moraga *et al.*, “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(1), 287–296.
- [6] E. Barrajón Catalán *et al.*, “A systematic study of the polyphenolic composition of aqueous extracts deriving from several *Cistus* genus species: evolutionary relationship,” *Phytochem. Anal.*, 2011, 22(4), 303–312.
- [7] S. Bogdanović, I. Boršić, I. Rešetnik, and T. Šegedin, “Taxonomic revision of the genus *Fumana* (Cistaceae) in Croatia,” *Plant Biosyst. Int. J. Deal. with all Asp. Plant Biol.*, 2012, 146(1), 69–85.
- [8] L. Civeyrel *et al.*, “Molecular systematics, character evolution, and pollen morphology of *Cistus* and *Halimium* (Cistaceae),” *Plant Syst. Evol.*, 2011, 295(1), 23–54.
- [9] M. J. Gallego and A. Aparicio, “Karyological study in the genus *Tuberaria* sect. *Scorpioides* (Cistaceae): Taxonomic and evolutionary inferences,” *Plant Syst. Evol.*, 1993, 184(1), 11–25.
- [10] G. Attaguile, G. Perticone, G. Mania, F. Savoca, G. Pennisi, and S. Salomone, “*Cistus incanus* and *Cistus monspeliensis* inhibit the contractile response in isolated rat smooth muscle,” *J. Ethnopharmacol.*, 2004, 92(2-3), 245–250.
- [11] M. Hitl *et al.*, “Phytochemistry and Antihyperglycemic Potential of *Cistus salviifolius* L., Cistaceae,” *Molecules.*, 2022, 27(22), 8003.
- [12] D. F. Frazão, J. R. Raimundo, J. L. Domingues, C. Quintela-Sabarís, J. C. Gonçalves, and F. Delgado, “*Cistus ladanifer* (Cistaceae): a natural resource in Mediterranean-type ecosystems,” *Planta.*, 2018, 247(2), 289–300.
- [13] D. Papaefthimiou, A. Papanikolaou, V. Falara, S. Givanoudi, S. Kostas, and A. K. Kanellis, “Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes’ biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties,” *Front. Chem.*, 2014, 2, 35.

- [14] M. Karaköse, R. Polat, M. O. Rahman, and U. Çakılcıoğlu, "Traditional honey production and bee flora of Espiye, Turkey," *Bangladesh J. Plant Taxon.*, 2018, 25(1), 79–91.
- [15] M. Díaz-Carro, J. A. Martínez, J. M. Serrano, and J. A. Delgado, "Subindividual variation accounts for most of the variability in two reproductive traits in *Cistus ladanifer*," *Acta Oecologica.*, 2022, 117, 103864.
- [16] T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. H. Valentine, S. M. Walters, and D. A. Webb, *Flora Europaea: Plantaginaceae to Compositae (and Rubiaceae)*, Cambridge university press., 1964, 4.
- [17] E. Le Maout, *Traité général de botanique descriptive et analytique...* Firmin Didot frères, fils et cie., 1868.
- [18] A. Cronquist and A. L. Takhtadzhian, *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia university press., 1981.
- [19] U. Lendeckel, M. Arndt, C. Wolke, D. Reinhold, T. Kähne, and S. Ansorge, "Inhibition of human leukocyte function, alanyl aminopeptidase (APN, CD13) and dipeptidylpeptidase IV (DP IV, CD26) enzymatic activities by aqueous extracts of *Cistus incanus* L. ssp. *incanus*," *J. Ethnopharmacol.*, 2002, 79(2), 221–227.
- [20] S. Akbulut, "Differences in the traditional use of wild plants between rural and urban areas: the sample of Adana," *Stud. Ethno-Medicine.*, 2015, 9(2), 141–150.
- [21] A. Bouyahya, J. Abrini, A. Et-Touys, Y. Bakri, and N. Dakka, "Indigenous knowledge of the use of medicinal plants in the North-West of Morocco and their biological activities," *Eur. J. Integr. Med.*, 2017, 13, 9–25.
- [22] L. M. Bedoya, P. Bermejo, and M. J. Abad, "Anti-infectious activity in the Cistaceae family in the Iberian Peninsula," *Mini Rev. Med. Chem.*, 2009, 9(5), 519–525.
- [23] H. Zidane, F. Aouniti, A. Tahani, M.-L. Fauconnier, and A. Elbachiri, "Screening of mineral elements in *Cistus ladanifer* and *Cistus libanotis* essential oils and their leaves," *Orient. J. Chem.*, 2013, 29(4).
- [24] M. Aziz *et al.*, "Relaxant effect of aqueous extract of *Cistus ladaniferus* on rodent intestinal contractions," *Fitoterapia.*, 2006, 77(6), 425–428.
- [25] R. Polat and F. Satıl, "An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir–Turkey)," *J. Ethnopharmacol.*, 2012, 139(2), 626–641.
- [26] L. Bendifallah, S. Alouan, S. Drah, and F. Z. Dougarem, "Phytochemical study of *Cistus albidus* (Cistaceae) in a northern mountainous region of Algeria," in *I International Symposium on Medicinal, Aromatic and Nutraceutical Plants from Mountainous Areas (MAP-Mountain 2011).*, 2011, 955, 79–82.
- [27] M. Ben Jemia *et al.*, "Antiproliferative activity of hexane extract from Tunisian *Cistus libanotis*, *Cistus monspeliensis* and *Cistus villosus*," *Chem. Cent. J.*, 2013, 7, 47.
- [28] M. Belmokhtar *et al.*, "Antihypertensive and endothelium-dependent vasodilator effects of aqueous extract of *Cistus ladaniferus*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2009, 389(1), 145–149.

- [29] A. Rebaya *et al.*, “Total phenolic, total flavonoid, tannin content, and antioxidant capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae),” *J. Appl. Pharm. Sci.*, 2015, 5(1), 52–57.
- [30] M. Aziz *et al.*, “Antidiarrhoeal activity of *Cistus ladaniferus* aqueous extract,” *Spat. DD.*, 2011, 1(3), 175–179.
- [31] A. Güvenç *et al.*, “Antimicrobiological studies on turkish *Cistus*. species,” *Pharm. Biol.*, 2005, 43(2), 178–183.
- [32] E. Küpeli and E. Yesilada, “Flavonoids with anti-inflammatory and antinociceptive activity from *Cistus laurifolius* L. leaves through bioassay-guided procedures,” *J. Ethnopharmacol.*, 2007, 112(3), 524–530.
- [33] M. Ark, O. Üstün, and E. Yeşilada, “Analgesic activity of *Cistus laurifolius* in mice,” *Pharm. Biol.*, 2004, 42(2), 176–178.
- [34] K. Droebner, C. Ehrhardt, A. Poetter, S. Ludwig, and O. Planz, “CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice,” *Antiviral Res.*, 2007, 76(1), 1–10.
- [35] K. Sayah, H. N. Mrabti, B. Belarj, F. Kichou, Y. Cherrah, and M. E. A. Faouzi, “Evaluation of antidiabetic effect of *Cistus salviifolius* L.(Cistaceae) in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic mice,” *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 2021, 32(2), 121–127.
- [36] A. Venditti, A. Bianco, M. Bruno, M. Ben Jemia, and M. Nicoletti, “Phytochemical study of *Cistus libanotis* L.,” *Nat. Prod. Res.*, 2015, 29(2), 189–192.
- [37] E. Barrajón-Catalán *et al.*, “Cistaceae aqueous extracts containing ellagitannins show antioxidant and antimicrobial capacity, and cytotoxic activity against human cancer cells,” *Food Chem. Toxicol.*, 2010, 48(8–9), 2273–2282.
- [38] F. Calzada and A. D. Alanís, “Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*,” *Phyther. Res. An Int. J. Devoted to Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.*, 2007, 21(1), 78–80.
- [39] I. Benabdelaziz, H. Haba, C. Lavaud, D. Harakat, and M. Benkhaled, “Lignans and Other Constituents from *Helianthemum sessiliflorum* Pers.,” *Rec. Nat. Prod.*, 2015, 9(3), 342.
- [40] Y. Chemam, S. Benayache, E. Marchioni, M. Zhao, P. Mosset, and F. Benayache, “On-line screening, isolation and identification of antioxidant compounds of *Helianthemum ruficomum*,” *Molecules.*, 2017, 22(2), 239.
- [41] N. Djemam *et al.*, “Characterization of ethyl acetate and n-butanol extracts of *Cymbopogon schoenanthus* and *Helianthemum lippii* and their effect on the smooth muscle of the rat distal colon,” *J. Ethnopharmacol.*, 2020, 252, 112613.
- [42] P. Gürbüz and Ş. D. Doğan, “Biflavonoids from *Fumana procumbens* (Dunal) Gren. & Godr,” *Biochem. Syst. Ecol.*, 2017, 74, 57–59.
- [43] H. Laraoui, H. Haba, C. Long, and M. Benkhaled, “A new flavanone sulfonate and other phenolic compounds from *Fumana montana*,” *Biochem. Syst. Ecol.*, 2019, 86,

103927.

- [44] D. J. Mabberley, *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge university press, 1997.
- [45] C. Parejo Farnés, R. González Albaladejo, J. Arroyo Marín, and A. Aparicio Martínez, “A phylogenetic hypothesis for *Helianthemum* (Cistaceae) in the Iberian Peninsula,” 2013.
- [46] A. Aparicio *et al.*, “Phylogenetic reconstruction of the genus *Helianthemum* (Cistaceae) using plastid and nuclear DNA sequences: Systematic and evolutionary inferences,” *Taxon.*, 2017, 66(4), 868–885.
- [47] E. B. Yeşilyurt, S. Erik, E. Özmen, and G. Akaydin, “Comparative morphological, palynological and anatomical characteristics of Turkish rare endemics *Helianthemum germanicopolitanum* and *Helianthemum antitauricum* (Cistaceae),” *Plant Syst. Evol.*, 2015, 301(1), 125–137.
- [48] P. Quézel and S. Santa, “Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques méridionales,” 1962.
- [49] W. Greuter, H. M. Burdet, and G. Long, *Med-checklist*. Secretariat Med-Checklist, Botanischer Garten & Botanisches Museum Berlin-Dahlem, 1984.
- [50] M. Meckes *et al.*, “Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum*, a plant used in Maya traditional medicine to treat diarrhoea,” *Phyther. Res. An Int. J. Devoted to Med. Sci. Res. Plants Plant Prod.*, 1997, 11(2), 128–131.
- [51] D. Rivera and C. O. de Castro, *Ethnopharmacology of Murcia (SE Spain)*. 1993.
- [52] M. Meckes, F. Calzada, A. Tapia-Contreras, and R. Cedillo-Rivera, “Antiprotozoal properties of *Helianthemum glomeratum*,” *Phyther. Res. An Int. J. Devoted to Pharmacol. Toxicol. Eval. Nat. Prod. Deriv.*, 1999, 13(2), 102–105.
- [53] A. M. F. Ocaña, *Estudio etnobotánico en el Parque Natural de las Sierras de Cazorla, Segura y Las Villas. Investigación química de un grupo de especies interesantes*. Universidad de Jaén, 2000.
- [54] M. Rigat, M. À. Bonet, S. Garcia, T. Garnatje, and J. Valles, “Studies on pharmaceutical ethnobotany in the high river Ter valley (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula),” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 113, no. 2, pp. 267–277, 2007.
- [55] A. Verde, “Guía de las plantas medicinales de Castilla-La Mancha,” 2008.
- [56] F. A. Badria, M. H. Hetta, R. M. Sarhan, and M. H. E. El-Din, “Lethal effects of *Helianthemum lippii* (L.) on *Acanthamoeba castellanii* cysts *in vitro*,” *Korean J. Parasitol.*, 2014, 52(3), 243.
- [57] I. Benabdelaziz, L. Marcourt, M. Benkhaled, J.-L. Wolfender, and H. Haba, “Antioxidant and antibacterial activities and polyphenolic constituents of *Helianthemum sessiliflorum* Pers.,” *Nat. Prod. Res.*, 2016, 31(6), 686–690.
- [58] F. Bouzergoune *et al.*, “Preliminary phytochemical and antimicrobial activity investigations on the aerial parts of *Helianthemum kahiricum*,” *Chem. Nat. Compd.*,

2013 , 49(4), 751–752.

- [59] A. A. Alzetrini, S. A. Mohamed, S. J. Alsabri, A. A. Elkilany, F. M. Sherif, and A. M. Gbaj, “*Helianthemum virgatum* has analgesic-like effect in mice,” *LIBYAN J. Med. Res.*, 2009, 14.
- [60] S. G. Alsabri, A. Zetrini, S. Fitouri, and A. Hermann, “Screening of analgesic and anti-inflammatory activities for two Libyan medicinal plants: *Helianthemum lippii* and *Launaea residifolia*,” *J. Chem. Pharm. Res.*, 2012, 4(9), 4201–4205.
- [61] I. F. Palici *et al.*, “Study of *in vitro* antimicrobial and antiproliferative activities of selected Saharan plants,” *Acta Biol. Hung.*, 2015, 66(4), 385–394.
- [62] S. Alnomasy *et al.*, “Systematic review on medicinal plants used for the treatment of Giardia infection,” *Saudi J. Biol. Sci.*, 2021, 28(9), 5391–5402.
- [63] F. Calzada and E. Bautista, “Plants used for the treatment of diarrhoea from Mexican flora with amoebicidal and giadicidal activity, and their phytochemical constituents,” *J. Ethnopharmacol.*, 2020, 253, 112676.
- [64] R. Kaur Bhatia, “Anti-Protozoal Potential of Heterocyclic Compounds Against Giardiasis,” *Curr. Bioact. Compd.*, 2019, 15(3), 280–288.
- [65] M. Agostini *et al.*, “Phytochemical and Biological Investigation of *Helianthemum nummularium*, a High-Altitude Growing Alpine Plant Overrepresented in Ungulates Diets,” *Planta Med.*, 2020, 86(16), 1185–1190.
- [66] I. Benabdelaziz, “Etude chimique des espèces *Helianthemum sessiliflorum* et *Euphorbia pterococca*.” UB1., 2015.
- [67] F. Calzada, R. López, M. Meckes, and R. Cedillo-Rivera, “Flavonoids of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*,” *Int. J. Pharmacogn.*, 1995, 33(4), 351–352.
- [68] L. El Rhaffari and A. Zaid, “Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet): Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée,” 2002.
- [69] P. Ozenda, “Flore du Sahara septentrional et central. 3 ème Edition, CNRS, Paris, France”, 2004.
- [70] Atlas Sahara <https://atlas-sahara.org/Cistaceae/Helianthemum%20getulum/Helianthemum%20getulum.html?cat=Cistaceae>

Chapitre II

Propriétés biologiques des flavonoïdes

Chapitre II Propriétés Biologiques des flavonoïdes

II. 1. Introduction

À travers les âges, les humains ont puisé dans la nature les solutions pour satisfaire leurs besoins fondamentaux : la production de nourriture, d'abris, de vêtements, le transport, les engrais, arômes, parfums et soins. Les plantes ont longtemps été une source d'agents thérapeutiques utilisés par l'homme, le lien entre l'homme et la recherche de remèdes dans la nature remonte à un passé lointain, la prise de conscience de l'utilisation des plantes médicinales est le résultat de nombreuses années de lutte contre les maladies grâce auxquelles l'homme a appris à rechercher des remèdes dans les écorces, les graines, les fructifications et d'autres parties des plantes.

Au cours de ces dernières années, l'importance des métabolites secondaires isolés des plantes a augmenté car ils sont utilisés industriellement pour leurs propriétés médicinales, comme pesticides, additifs alimentaires, et conservateurs et en cosmétique.

Les plantes possèdent des métabolites primaires et des métabolites secondaires :

Les métabolites primaires jouent un rôle clé dans la survie de l'espèce, dans la photosynthèse et la respiration, ils remplissent des rôles métaboliques essentiels en participant à la nutrition et à la reproduction [1].

Les métabolites secondaires sont des composés biosynthétisés à faible concentration (composés phénoliques, terpénoïdes alcaloïdes et phénylpropanoïdes), ils contribuent à la survie de l'espèce, ils jouent un rôle dans l'interaction de la cellule (organisme) avec son environnement [2].

Parmi les principales classes des métabolites secondaires identifiées dans notre espèce *Helianthemum getulum* (Cistaceae), on trouve les composés phénoliques et particulièrement les flavonoïdes qui sont la classe de métabolites secondaires la plus répandue.

Les produits naturels jouent un rôle important dans notre santé. Parmi ceux-ci, les flavonoïdes dont plus de 9000 structures ont été structurellement identifiés dans les extraits végétaux. Les effets pharmacologiques de nombreuses plantes dépendent de leur teneur en flavonoïdes. Ces composés se caractérisent par des propriétés antioxydantes, pharmacologiques, anti-inflammatoires, antiallergiques, antivirales et anti cancérigènes. Ils possèdent une large gamme d'applications, y compris dans divers domaines de l'industrie, comme ingrédients actifs pharmaceutiques efficaces, comme colorants naturels, dans l'industrie agroalimentaire et en cosmétiques [3-5].

II. 2. Métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont connues pour jouer un rôle majeur dans l'adaptation des plantes à leur environnement, mais représentent également une source importante d'actifs pharmaceutiques, ils sont des sources uniques de produits pharmaceutiques, additifs alimentaires, arômes et industriels biochimiques importants [6], [7].

II. 2. 1. Les familles des métabolites secondaires

Les produits naturels peuvent être divisés en trois grands groupes [8]:

- Les terpénoïdes et les alcaloïdes.
- Les phénylpropanoïdes.
- Les composés phénoliques apparentés.

II. 3. Les composés phénoliques

II. 3. 1. Définition

Les composés phénoliques sont les métabolites secondaires les plus largement distribués, omniprésents dans le règne végétal, les composés phénoliques et les polyphénols des végétaux sont des métabolites naturels secondaires synthétisés biogénétiquement à partir de la voie shikimate/phénylpropanoïde, qui fournit des phénylpropanoïdes, ou la voie polykétide acétate/malonate, qui peut produire des phénols simples, ou les deux, produisant ainsi des monomères et des polymères, les phénols et les polyphénols, qui remplissent une très large gamme de rôles physiologiques dans les plantes [9].

Les composés phénoliques peuvent être classés en différents groupes en fonction du nombre de cycles phénoliques qu'ils contiennent et sur la base des éléments structuraux qui lient ces anneaux l'un à l'autre [10]. Les composés phénoliques végétaux sont classés en phénols simples ou en polyphénols en fonction du nombre d'unités phénol dans la molécule. Ainsi, les composés phénoliques comprennent les phénols simples, les coumarines, les lignines, les lignanes, les tanins condensés et hydrolysables, les acides phénoliques et les flavonoïdes [11].

II. 3. 2. Les principales classes de composés phénoliques dans les plantes

Plusieurs classes de composés phénoliques ont été classées sur la base de leur squelette de base : C_6 (phénols simples, benzoquinones), C_6-C_1 (acides phénoliques et aldéhydes), C_6-C_2 (acétophénone, acides phénylacétiques), C_6-C_3 (acides hydroxycinnamiques, coumarines, phénylpropanes, chromones), C_6-C_4 (naphtoquinones), $C_6-C_1-C_6$ (xanthones), $C_6-C_2-C_6$ (stilbènes, anthraquinones), $C_6-C_3-C_6$ (flavonoïdes, isoflavonoïdes, néoflavonoïdes), $C_6-C_3-C_6$ (bi-, triflavonoïdes, dimères de proanthocyanidines, trimères), $(C_6-C_3)_2$ (lignanes, néolignanes), $(C_6-C_3)_n$ (lignines), $(C_6)_n$ (catéchol mélanines, phlorotanins), $(C_6-C_3-C_6)_n$ (tanins condensés) [12].

II. 3. 2. A. Présentation des Flavonoïdes

Classification et structure

Les flavonoïdes sont les composés phénoliques les plus abondants dans les fruits et légumes, ils sont les plus bioactifs. Ils contiennent un squelette phényl benzopyrane : deux cycles phényle (A et B) reliés par un cycle pyrane hétérocyclique C₆-C₃-C₆. Les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes, en fonction de leur structure et du degré d'oxydation et d'insaturation de la chaîne de liaison en C-3 du cycle pyrane. Dans chaque classe, les composés individuels diffèrent par leur schéma d'hydroxylation et de méthylation des cycles A et B [13]. Le squelette de base et la numérotation des atomes C dans les flavonoïdes sont représenté dans la Figure II.1.

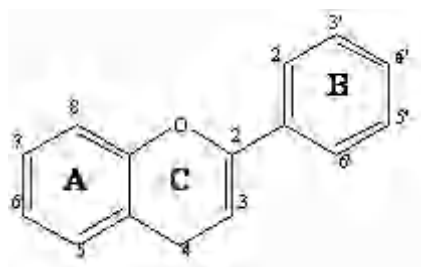


Figure II.1. Squelette de phénylbenzopyrane, structure de base des flavonoïdes.

Les variations structurelles au sein des noyaux subdivisent les flavonoïdes en sept grands groupes :

- Flavonols : avec le 3-hydroxy dans le cycle C (pyran-4-one).
- Flavanone : dépourvus de la double liaison 2,3 et du groupe 3-hydroxyle.
- Flavones : dépourvues du groupe 3-hydroxyle.
- Flavanols : dépourvus de la double liaison 2,3 et de la fonction 4-one dans la structure.
- Les isoflavones : la position du groupe phényle, lié au carbone 3 au lieu du carbone 2.
- Les anthocyanes : dans lesquelles la bague B est située en position 3 sur le noyau C.
- Les chalcones.

Ces flavonoïdes se présentent souvent sous forme de glycosides, la glycosylation rendant la molécule moins réactive vis-à-vis des radicaux et plus solubles dans l'eau et lorsqu'ils ne sont pas liés à une molécule de sucre, ils sont appelés aglycones [14].

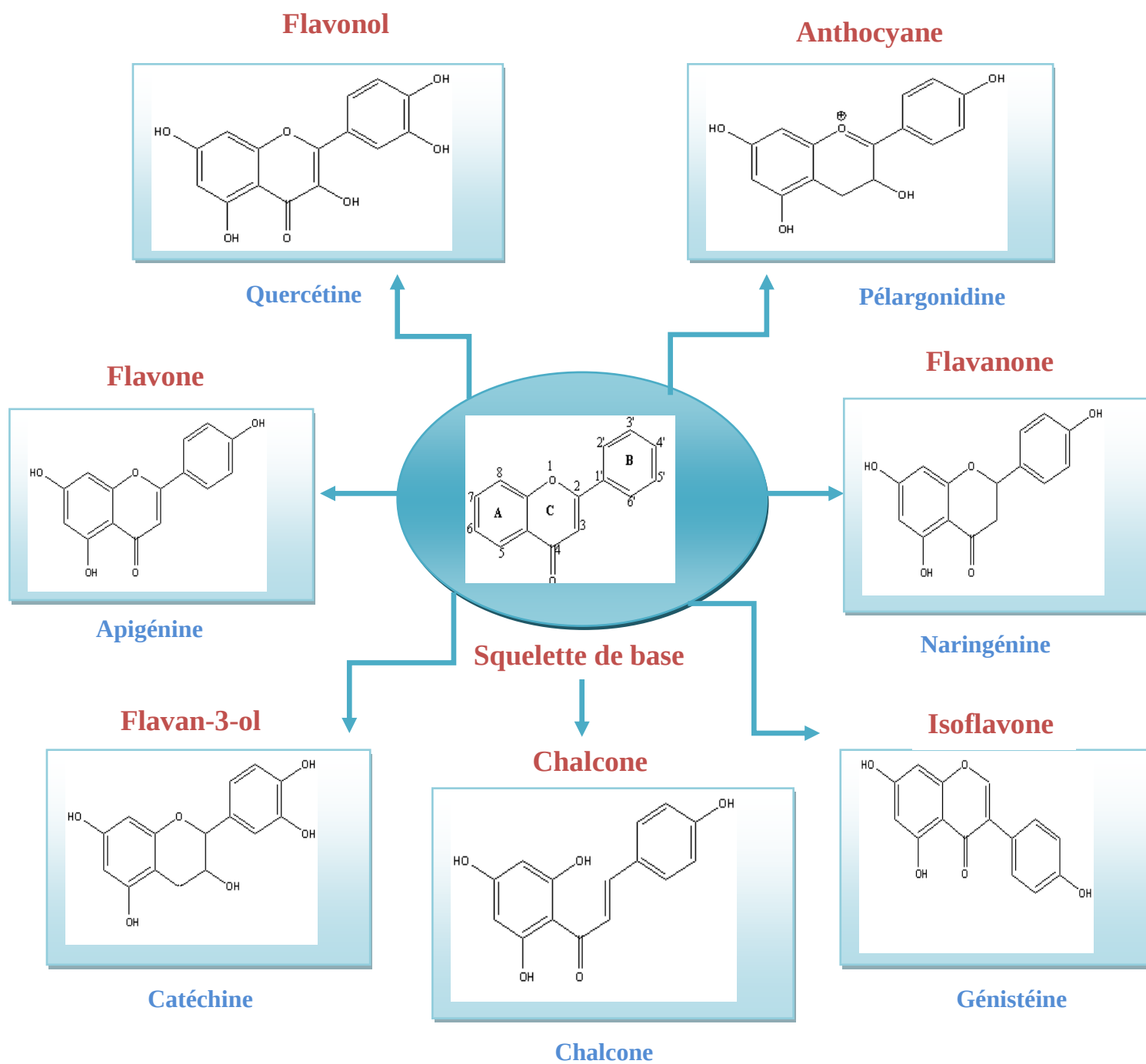


Figure II.2. Représentation structurale des principales classes de flavonoïdes.

II. 3. 2. A. 1. Pharmacologie des flavonoïdes

Le potentiel pharmacologique des flavonoïdes les a rendus intéressants pour la recherche, les flavonoïdes sont des antioxydants végétaux bien connus et largement utilisés, ils protègent les cellules contre l'effet oxydatif causé par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), les flavonoïdes possèdent diverses activités biologiques, se concentrant principalement sur les activités antibactériennes, anticancéreuses et anti-inflammatoires, antifongiques, et antivirales respectivement, des propriétés antiproliférative, antipaludéenne, antibactérienne, antivenimeuse, antiulcéreuse, antidépressive, antimicrobienne et anti-hépatique, Des études épidémiologiques ont montré que l'apport en flavonoïdes est inversement proportionnel au taux de mortalité correspondant aux maladies coronariennes et les crises cardiaques. Les flavonoïdes sont considérés important pour la santé humaine y compris la prévention des maladies, Ils sont également utilisés comme colorants naturels ainsi qu'en cosmétique. Ils ont été signalés dans les légumes telles que le brocoli, les oignons, les légumes-feuilles, céleri, chou rouge, dans les fruits comme les agrumes, raisins, cerises et baies, dans le thé et le chocolat [15–18].

Les flavonols

Les flavonols jouent un rôle important dans le règne végétal car ils sont responsables de la couleur, du goût, de la prévention de l'oxydation des graisses, de la protection des vitamines et des enzymes, de la protection contre les rayonnements ultraviolets (UV) et les parasites [19].

La quercétine, le kaempférol, la morine, la myricétine et la rutine, sont les représentants les plus importants des flavonols comme antioxydant, anti-inflammatoire, antiallergique, antiviral et anticancéreuse. Ils ont également été suggérés de jouer un rôle protecteur dans les maladies du foie, cataractes et maladies cardiovasculaires [20]. Le modèle de substitution du cycle B de divers flavonols (kaempférol, quercétine, myricétine, galangine et glycoside) a été observé comme une caractéristique structurelle importante pour leur comportement de piègeurs de radicaux libres et d'antioxydants, Les effets anticancéreux et anti-inflammatoires de ces molécules sont dues à leur action pro-oxydante [21].

Le potentiel antioxydant des flavonoïdes est dans l'ordre suivant :

Myricétine>Quercétine >Rhamnétine>Morine >Diosmétine>Naringénine>Apigénine>

Catéchine > 5,7-dihydroxy-3',4',5'-triméthoxyflavone >Robinine>Kaempférol>Flavanones

La quercétine est l'un des représentants les plus importants des flavonols et l'un des plus abondants qui est largement distribué dans les pommes, les baies, les oignons, le thé et les légumes verts. De ce fait, une quantité suffisante peut être consommée quotidiennement. La quercétine est capable de piéger les réactives espèces d'oxygène ce qui lui confère un potentiel antioxydant remarquable. Au cours des dernières années, plusieurs études ont rapporté des

effets bénéfiques de la quercétine dans les maladies cardiovasculaires, telles que l'hypertension, l'athérosclérose, lésion d'ischémie-reperfusion ou cardiotoxicité [22]. La quercétine s'est avérée être l'agent actif antiviral le plus important parmi les bioflavonoïdes, elle est connue pour ses activités biologiques comme anti inflammatoire, antimicrobienne, antidiabétique et anti cancer et bien d'autres [23]. Dans les essais cliniques (phase I), il a été rapporté que la quercétine présentait un effet inhibiteur sur la tyrosine kinase qui suggère qu'il a un potentiel thérapeutique anti tumorale [24].

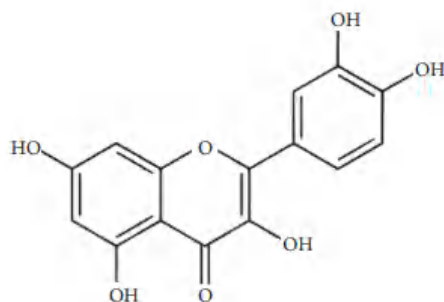


Figure II.3. Structure de la Quercétine.

Le kaempférol, un flavonol largement trouvé dans différents légumes comme l'oignon le fenouil, les tomates, il est connu pour être l'un des composés anti-inflammatoires naturels les plus actifs et les plus importants [25]. De nombreux rapports scientifiques ont montré que le kaempférol a un rôle bénéfique sur différentes maladies inflammatoires telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives [26]. Le kaempférol a des effets antioxydants, antiviraux et anti-inflammatoires chez différents organes et tissus, tels que le cœur, le foie, le cerveau, les poumons, les muscles, et tissus mous [27] .

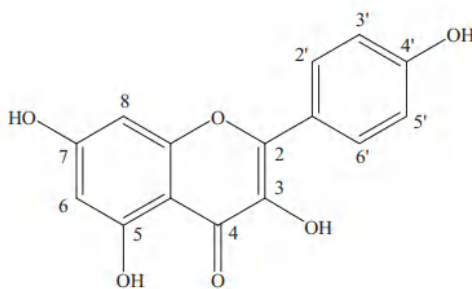


Figure II.4. Structure du Kaempférol.

Les flavanols

Les flavanols constituent un groupe très complexe de polyphénols allant des flavan-3-ols monomères par exemple catéchine, épicatechine et des polymères connues sous le nom de tanins condensés. Généralement trouvés dans le thé, le cacao et le raisin, dans les fruits et les produits dérivés comme les jus de fruits ou les confitures, également dans les céréales, ils sont cependant quasi inexistants dans les légumes et les légumineuses, avec à l'exception notable des lentilles et fèves, Ce groupe apparaît également dans le thé, le cacao, les pommes, le kiwi, les fraises et les céréales [28]. De nombreuses études ont montré que les flavanols, ont une variété d'activités telles que l'atténuation des dommages causés par les radicaux libres, les effets antioxydants, antitumoraux, anti-inflammatoires, anti-fongique, hypolipémique, protection du foie, protection cardiovasculaire et bien d'autres [29].

Les catéchines, les sources alimentaires de catéchines sont le thé, cacao, chocolat, pommes, poires et raisins. Elles sont très appréciées et très consommées [30], Les catéchines possèdent divers effets bénéfiques dans le système cardiovasculaire [31], la catéchine a le potentiel d'avoir un impact sur une variété de maladies humaines, elle fonctionne comme un puissant antioxydant, prévenant les dommages oxydatifs dans les cellules saines, mais aussi comme agent antiangiogénique et antitumoral et comme modulateur de la réponse des cellules tumorales à la chimiothérapie [32].

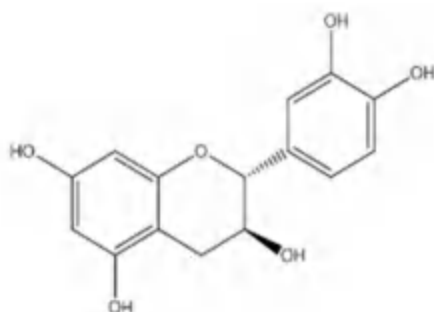


Figure II.5. Structure de la (+)-Catéchine.

Les flavanones

Les flavanones constituent la majorité des flavonoïdes dans les agrumes telles que les oranges, les mandarines et les citrons, ces flavanones sont l'hespérétine, la naringine, la narirutine, l'ériocitrine, la néohespéridine, la didymine, la néoériocitrine et la poncirine [33], les flavanones présentent une efficacité du traitement des maladies dentaires, elles ont des effets anti-inflammatoires et sont efficaces dans le piégeage des radicaux libres et une forte activité antifongique [34].

La naringénine est une flavanone majeure dans les pamplemousses et les tomates, elle est un puissant anti-inflammatoire, elle a d'autres propriétés pharmacologiques, notamment anticancéreuse, antimutagène et antiathérogénique [35].

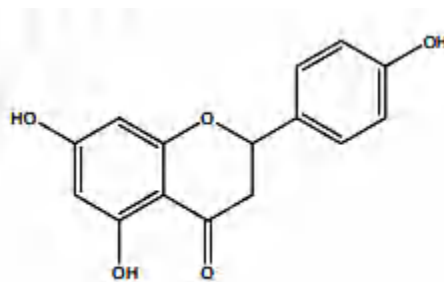


Figure II.6. Structure de la Naringénine.

II. 3. 2. A. 2. Relation structure activité des flavonoïdes

En raison de leur importance dans les propriétés organoleptiques des aliments et la santé humaine, une meilleure compréhension de leur structure et de leurs activités biologiques est primordiale.

La propriété antioxydante des flavonoïdes est principalement liée avec le degré d'hydroxylation dans les cycles A et B [36]. D'autres déterminants de l'activité antioxydante sont la présence du groupe 4-céto et de l'hydroxyle en position 3 ou 5. Alors que la glycosylation diminue l'activité des composés. Notons l'importance de l'insaturation aux positions 2 et 3, citant la quercétine qui peut fonctionner comme un piègeur efficace de superoxyde et les radicaux hydroxyles [37].

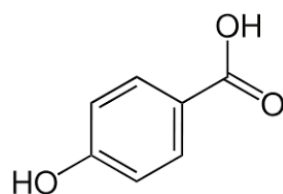
Les études de relation structure-activité ont montré que la méthylation des groupes hydroxyle sur C-3 ou C-7 réduit les activités tandis que la glycosylation perd de l'activité [18].

L'absence du groupe hydroxyle en position 3 dans les flavanones et les flavones diminue leur pouvoir antioxydant [38].

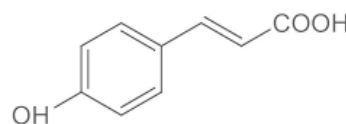
II. 3. 2. B. D'autres classes de composés phénoliques

II. 3. 2. B. 1. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont l'une des principales classes de composés phénoliques du règne végétal et se présentent sous la forme d'esters, de glycosides ou d'amides, mais rarement sous forme libre. La variation des acides phénoliques réside dans le nombre et l'emplacement de groupes hydroxyles sur le cycle aromatique. Les acides phénoliques ont deux structures mères : l'acide hydroxycinnamique et l'acide hydroxybenzoïque. Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique ayant un squelette (C₆- C₃) comprennent les acides : férulique, caféique, p-coumarique et sinapique, tandis que les dérivés de l'acide hydroxybenzoïque(C₆-C₁) sont constitués des acides : gallique, vanillique, syringique et protocatéchique [39].



Acide parahydroxybenzoïque



Acide hydroxycinnamique

Figure II.7. Structures de base des acides phénoliques.

Les acides phénoliques font l'objet d'une attention particulière en raison de leur forte activité antioxydante. Des études pharmacologiques récentes ont montré un certain nombre d'activités des acides phénoliques, y compris des propriétés : anti-inflammatoire, antioxydante, anti-hyperglycémique, antibactérienne, anticancéreuse, anti-âge, anti-athrogène, anti-tumorale, anti-asthmatique, antiulcéreuse, antispasmodique et neurologique, ils se trouvent dans les fruits, comme les prunes, les raisins et les noisettes, dans les légumes, l'oignon, les épices comme l'anis, mélisse, romarin et cannelle et dans le riz brun [40–42].

II. 3. 2. B. 2. Les lignanes

Les lignanes sont un grand groupe de produits naturels caractérisés par le couplage de deux unités C₆-C₃. À des fins de nomenclature, l'unité C₆-C₃ est assimilée au propylbenzène et numéroté de 1 à 6 dans le cycle, en partant du groupe propyle et avec le groupe propyle numéroté de 7 à 9 à partir du cycle benzénique. Avec la deuxième unité C₆-C₃, les nombres sont primés. Quand les deux unités C₆-C₃ sont liées par une liaison entre les positions 8 et 8' le composé est appelé et nommé comme un lignane [43].

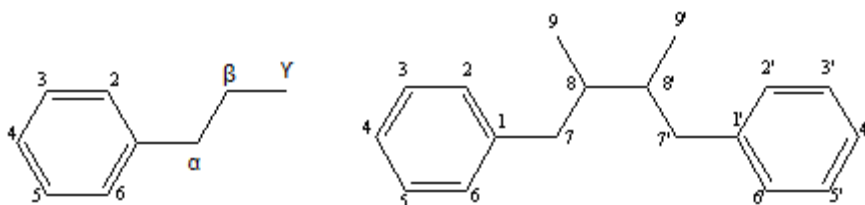


Figure II.8. Structure des lignanes.

Les lignanes peuvent être classées en cinq grands types selon leurs structures : les lignanes, les néolignanes, les norlignanes, les lignanes hybrides et les lignanes oligomères.

Les lignanes classiques sont des dimères de phénylpropane qui ont une liaison β - β' et il y a six sous-types principaux de lignanes classiques : les dibenzylbutanes, les dibenzylbutyrolactones, les arylnaphtalènes/aryltétralines, les dibenzocyclooctadiènes, les tétrahydrofuranes substitués et les 2,6-s [44].

Les lignanes sont largement répandus dans les plantes, ils ont attiré une attention considérable en raison de leurs propriétés pharmacologie, telles que les propriétés antitumorale, hépatoprotecteur, activités antagonistes, activités antivirales, insecticides, œstrogéniques, antifongiques, antibactériennes, antihypertensives, sédatives et antioxydantes [45,46].

Références

- [1] H. R. Bizzo, D. Silveira, and M. A. Gimenes, “Tânia da S. Agostini-Costa¹, Roberto F. Vieira¹, Humberto R. Bizzo², Dâmaris Silveira³ and Marcos A. Gimenes¹,” *Chromatogr. Its Appl.*, 2012, 131.
- [2] S. Pagare, M. Bhatia, N. Tripathi, S. Pagare, and Y. K. Bansal, “Secondary metabolites of plants and their role: Overview,” *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.*, 2015, 9(3), 293–304.
- [3] Y. Wang, S. Chen, O. Yu, Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 91, 949–956.
- [4] K.M. Brodowska, Natural flavonoids: classification, potential role, and application of flavonoid analogues, *Eur. J. Biol. Res.*, 2017, 7, 108–123.
- [5] P. Karak, Biological activities of flavonoids: An overview, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 2019, 10, 1567–1574.
- [6] F. Bourgaud, A. Gravot, S. Milesi, and E. Gontier, “Production of plant secondary metabolites: a historical perspective,” *Plant Sci.*, 2001, 161(5), 839–851.
- [7] R. Akula and G. A. Ravishankar, “Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants,” *Plant Signal. Behav.*, 2011, 6(11), 1720–1731.
- [8] R. Croteau, T. M. Kutchan, and N. G. Lewis, “Natural products (secondary metabolites),” *Biochem. Mol. Biol. plants.*, 2000, 24, 1250–1319.
- [9] V. Lattanzio, “Phenolic Compounds: Introduction,” *Nat. Prod.*, 2013, 1543–1580.
- [10] R. Chirinos, I. Betalleluz-Pallardel, A. Huamán, C. Arbizu, R. Pedreschi, and D. Campos, “HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity,” *Food Chem.*, 2009, 113(4), 1243–1251.
- [11] A. Soto-Vaca, A. Gutierrez, J. N. Losso, Z. Xu, and J. W. Finley, “Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits,” *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60(27), 6658–6677.
- [12] V. Cheynier, G. Comte, K. M. Davies, V. Lattanzio, and S. Martens, “Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology,” *Plant Physiol. Biochem.*, 2013, 72, 1–20.
- [13] A. Laura, J. O. Moreno-Escamilla, J. Rodrigo-García, and E. Alvarez-Parrilla, “Phenolic compounds,” in *Postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables*, Elsevier., 2019, 253–271.
- [14] C. W. I. Haminiuk, G. M. Maciel, M. S. V Plata-Oviedo, and R. M. Peralta, “Phenolic compounds in fruits—an overview,” *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2012, 47(10), 2023–2044.

- [15] A. D. Agrawal, "Pharmacological activities of flavonoids: a review," *Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol.*, 2011, 4(2), 1394–1398.
- [16] S.-H. Wang, Y.-L. Hu, and T.-X. Liu, "Plant distribution and pharmacological activity of flavonoids," *Tradit. Med. Res.*, 2019, 4, 269–287.
- [17] A. Ekalu and J. D. Habila, "Flavonoids: isolation, characterization, and health benefits," *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.*, 2020, 9(1), 1–14.
- [18] D. K. Magozwi *et al.*, "Flavonoids from the Genus *Euphorbia*: Isolation, Structure, Pharmacological Activities and Structure–Activity Relationships," *Pharmaceuticals.*, 2021, 14(5), 428.
- [19] A. Sharma, P. Sharma, H. S. Tuli, and A. K. Sharma, "Phytochemical and pharmacological properties of flavonols," *eLS.*, 2018, 2018, 1–12.
- [20] A. R. Tapas, D. M. Sakarkar, and R. B. Kakde, "Flavonoids as nutraceuticals: a review," *Trop. J. Pharm. Res.*, 2008, 7(3), 1089–1099.
- [21] J. Xiao, "Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance?," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2017, 57(9), 1874–1905.
- [22] M. Ożarowski *et al.*, "Pharmacological effect of quercetin in hypertension and its potential application in pregnancy-induced hypertension: review of *in vitro*, *in vivo*, and clinical studies," *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, 2018, 2018.
- [23] B. Havsteen, "Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency," *Biochem. Pharmacol.*, 1983, 32(7), 1141–1148.
- [24] A. T. Jan, M. R. Kamli, I. Murtaza, J. B. Singh, A. Ali, and Q. M. R. Haq, "Dietary flavonoid quercetin and associated health benefits—an overview," *Food Rev. Int.*, 2010, 26(3), 302–317.
- [25] I. Crespo, M. V Garcia-Mediavilla, B. Gutiérrez, S. Sánchez-Campos, M. J. Tunon, and J. González-Gallego, "A comparison of the effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pro-inflammatory status of cultured human endothelial cells," *Br. J. Nutr.*, 2008, 100(5), 968–976.
- [26] K. P. Devi *et al.*, "Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine," *Pharmacol. Res.*, 2015, 99, 1–10.
- [27] W. Cai and S.-L. Zhang, "Anti-inflammatory mechanisms of total flavonoids from mosla scabra against influenza A virus-induced pneumonia by integrating network pharmacology and experimental verification," *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, 2022, 2022.
- [28] S. de Pascual-Teresa, D. A. Moreno, and C. García-Viguera, "Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence," *Int. J. Mol. Sci.*, 2010, 11(4), 1679–1703.
- [29] Y. Zhang, B. Xiong, N. Yi, H. Su, and H. Liu, "Advances in research on pharmacological activities of flavanol compounds.," *J. Food Saf. Qual.*, 2015, 6(3), 1055–1060.

- [30] C. Manach, G. Williamson, C. Morand, A. Scalbert, and C. Rémésy, "Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies," *Am. J. Clin. Nutr.*, 2005, 81(1), 230S-242S.
- [31] K. Ferenczyová, L. Kindernay, J. Vlkovičová, B. Kaločayová, T. Rajtík, and M. Barteková, "Pharmacology of catechins in ischemia-reperfusion injury of the heart," *Antioxidants*, 2021, 10(9), 1390.
- [32] B. N. Singh, S. Shankar, and R. K. Srivastava, "Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications," *Biochem. Pharmacol.*, 2011, 82(12), 1807–1821.
- [33] J. J. Peterson *et al.*, "Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature," *J. Food Compos. Anal.*, 2006, 19, S66–S73.
- [34] J. Ramirez, L. Cartuche, V. Morocho, S. Aguilar, and O. Malagon, "Antifungal activity of raw extract and flavanons isolated from Piper ecuadorensis from Ecuador," *Rev. Bras. Farmacogn.*, 2013, 23(2), 370–373.
- [35] C. Bodet, V. D. La, F. Epifano, and D. Grenier, "Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models," *J. Periodontal Res.*, 2008, 43(4), 400–407.
- [36] J. P. Brown, "A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds," *Mutat. Res. Genet. Toxicol.*, 1980, 75(3), 243–277.
- [37] M. J. Alcaraz and M. L. Ferrandiz, "Modification of arachidonic metabolism by flavonoids," *J. Ethnopharmacol.*, 1987, 21(3), 209–229.
- [38] C. V Umesh, A. M. Jamsheer, and M. A. Prasad, "The role of flavonoids in drug discovery—review on potential applications," *Res J Life Sci Bioinforma. Pharm Chem Sci.*, 2018, 4, 70–77.
- [39] A. Khoddami, M. A. Wilkes, and T. H. Roberts, "Techniques for analysis of plant phenolic compounds," *Molecules*, 2013, 18(2), 2328–2375.
- [40] A. K. Khan *et al.*, "Pharmacological activities of protocathechuic acid," *Acta Pol. Pharm.*, 2015, 72(4), 643–650.
- [41] S. Khatri, A. Paramanya, and A. Ali, "Phenolic acids and their health-promoting activity," in *Plant and Human Health, Volume 2*, Springer., 2019, 661–680.
- [42] A. Pieczykolan, W. Pietrzak, U. Gawlik-Dziki, and R. Nowak, "Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Anti-Diabetic Activity of Phenolic Acids Fractions Obtained from Aerva lanata (L.) Juss.," *Molecules*, 2021, 26(12), 3486.
- [43] G. P. Moss, "Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000)," *Pure Appl. Chem.*, 2000, 72(8), 1493–1523.
- [44] L. I. Pilkington, "Lignans: A chemometric analysis," *Molecules*, 2018, 23(7), 1666.

- [45] Q. Cui, R. Du, M. Liu, and L. Rong, “Lignans and their derivatives from plants as antivirals,” *Molecules.*, 2020, 25(1), 183.
- [46] J. Zhang, J. Chen, Z. Liang, and C. Zhao, “New lignans and their biological activities,” *Chem. Biodivers.*, 2014, 11(1), 1–54.

Chapitre III

Étude phytochimique de l'espèce *Helianthemum getulum*

Chapitre III Etude phytochimique de l'espèce *Helianthemum getulum*

Cette étude rapporte les premières investigations phytochimiques et biologiques de l'espèce *Helianthemum getulum* Pomel, une espèce endémique du Sahara septentrional, les données suggèrent que cette espèce est synonyme de *Helianthemum metlilense* Coss&Durieu [1], [2]. Dans la pharmacopée traditionnelle, elle est utilisée pour traiter les infections par les vers intestinaux[3].

III. 1. 1. Place dans la systématique

- ❖ **Embranchement** : Magnoliophyta
- ❖ **Classe** : Magnoliopsida
- ❖ **Ordre** : Malvales
- ❖ **Famille** : Cistaceae
- ❖ **Genre** : *Helianthemum*
- ❖ **Espèce** : *Helianthemum getulum*
- ❖ **Nom** : *Helianthemum getulum* Pomel
- ❖ **Synonyme** : *H. metlilense* Coss. et Durieu.

III. 1. 2. Description botanique :

Helianthemum getulum, synonyme : *Helianthemum metilense* sub genre *ortholobum* et section *eriocarpon* Dunal est une plante velue-laineuse avec des feuilles lancéolées obtuses aux deux extrémités, jusqu'à 25 mm de long et des graines roses compressées et papilleuses [1].

Helianthemum getulum une espèce endémique du Sahara septentrional qui est étudiée pour la première fois dans ce travail.



Figure III.1. *Helianthemum getulum* (synonyme: *Helianthemum metilense*).

III. 1. 3. Matériel Végétal

Le matériel végétal a été récolté dans la région de Moughel dans le sud-ouest de l'Algérie, en avril 2011, il a été authentifié par Monsieur Mohamed Benabdelhakem, directeur de l'agence de protection des ressources naturels à Bechar, sur la base de la flore d'Algérie selon Quezel et Santa [1]. Un spécimen de référence CP 148/11 a été déposé dans l'Herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri, Constantine 1.

La plante a été séchée dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires pendant plusieurs jours. Les parties aériennes ont été coupées en petits morceaux et pesées.

III. 1. 4. Matériels et méthodes

III. 1. 4. A. Chromatographiques

Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince CCM (TLC Thin layer chromatography) est une technique chromatographique planaire, utilisée pour isoler les composés des fractions, comprenant une phase stationnaire, feuille de papier d'aluminium, de plastique ou de verre recouverte d'une fine couche de matériau adsorbant (gel de silice, de l'oxyde d'aluminium, polyamide ou de la cellulose) et une phase mobile comme système d'élution.

Les extraits et les fractions de la colonne ont été contrôlés par CCM de Si gel 60 F254, 0,2 mm, Merck).

Les fractions et les composés ont été observés sous lumière UV à 254 et 365 nm ou visualisés en pulvérisant les plaques séchées avec le système $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}/\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$ 80:16:4(v/v/v), suivi d'un chauffage à 100°C.

Chromatographie sur colonne

La séparation sur colonne se fait par l'écoulement d'un système de solvants sur une phase stationnaire (gel de silice, polyamide.. etc), qu'il s'agisse de chromatographie d'adsorption, de partage ou d'échange d'ions.

La chromatographie sur colonne (CC) a été réalisée avec du gel Si (cat. 60737, 40–63 μm , Fluka) ou du polyamide MN SC6 (Macherey Nagel).

Chromatographie liquide haute performance (CLHP)

CLHP analytique

Les analyses par CLHP (chromatographie en phase liquide à haute performance), ont été réalisées sur Varian, Model 410 Varian Prostar, dotée d'un détecteur UV à barrettes de diodes dans les conditions suivantes :

- La colonne chromatographique utilisée est de type Kromasil C₁₈ avec une taille de particules de 5µm, 4,60 mm*250 mm.
- Débit de 1ml/min
- Température ambiante
- Phase mobile composée du solvant A qui est constitué d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique et du solvant B : acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique.

Le gradient est le suivant :

Tableau III.1. Gradient CLHP phase mobile CLHP analytique.

Temps (min)	Gradient de l'ACN contenant 0,1% d'acide formique (%)
0	5
40	30
50	90
70	90
71	5
83	5

Nous avons utilisé les mêmes conditions pour tous les échantillons dans toutes les analyses réalisées.

CLHP semi-préparative

La purification des produits par CLHP semi-préparative a été effectuée en phase inverse, dans les conditions suivantes :

- Une colonne C₁₈, 250 x 10 mm, 5µm, thermo scientific, ,
- Une phase mobile 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).
- Débit de 5 ml/min.
- Le gradient était le suivant: 0 min, 5% B; 15 min, 25%, 35 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min.

Nous avons utilisé les mêmes conditions pour tout les échantillons dans toutes les analyses réalisées.

III. 1. 4. B. Méthodes physico-chimiques

III. 1. 4. B. 1. Hydrolyse acide

Le produit est chauffé à 100°C en présence d'acide chlorhydrique (HCl 2M) dans un bain marie pendant une heure.

L'identification du sucre a été faite sur une couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium en présence des sucres témoins, imprégnée d'une solution de NaH_2PO_4 (0,2M), l'élution a été effectuée avec un mélange acétone/eau (9 :1). La révélation des sucres a été faite par pulvérisation de la plaque avec une solution de malonate d'aniline suivie de la comparaison des valeurs des R_f avec les sucres témoins.

III. 1. 4. B. 2. Spectrométrie Ultra-violet-visible (UV)

Les spectres UV ont été enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre de type Shimadzu UV/Vis U-2450, double faisceau, avec des cuves en quartz à trajet optique de 1 cm.

III. 1. 4. B. 3. Spectrométrie de Masse (SM)

Les spectres de masse MALDI-TOF ont été réalisés avec un appareil Brüker Daltonics autoflex TOF/TOF.

III. 1. 4. B. 4. Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un modèle Brüker Avance 400 et AMX-500. Spectromètres (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Allemagne) avec des séquences d'impulsions standards et Bruker modèle Avance III HD500 avec une cryosonde TCI 5 mm (Bruker Biospin, Wissembourg, France) en utilisant le MeOH-d_4 , CDCl_3 et DMSO-d_6 comme solvant. Le TMS a été utilisé comme référence interne.

Les structures ont été déterminées par des analyses spectroscopiques 1D et 2D (expériences RMN ^1H et ^{13}C , J-mod, COSY, HSQC, HMBC, NOESY et ROESY).

III. 1. 4. C. Activités biologiques

Les mesures et les calculs des activités antioxydantes, antidiabétiques, anticholinestérase, antityrosinase et antiélastase ont été effectués sur un lecteur de microplaques 96 puits (Multimode Plate Reader EnSpire, Perkin Elmer).

III. 1. 4. C. 1. Évaluation de l'activité antioxydante

Activité de piégeage des radicaux DPPH

L'activité antioxydante a été estimée à l'aide d'un protocole rapporté par Blois (1958) [4] avec quelques modifications. Le radical 1,1-diphényl-2 picrylhydrazyl (DPPH[•]) a une couleur violet foncé et vire au jaune pâle en présence de produits antioxydants. Cet évanouissement a été suivi par la diminution de l'absorbance à 517 nm. Les tests ont été réalisés dans des microplaques 96 puits, en mélangeant 40 µl de fractions à différentes concentrations, 160 µl d'une solution méthanolique de DPPH (0,1 mM). Le mélange réactionnel a été incubé dans l'obscurité pendant 30 min et l'absorbance a été enregistrée à 517 nm contre le blanc. Trolox, BHT et BHA ont été utilisés comme contrôles positifs. Chaque essai a été réalisé en triple exemplaire. La diminution de l'absorbance lors de l'ajout d'échantillons à tester par rapport au contrôle a été utilisée pour calculer l'activité antioxydante, exprimée en pourcentage d'inhibition (% IP) du radical DPPH, comme suit :

$$\% \text{ PI} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Où A_0 et A_1 sont les absorbances du contrôle et de l'échantillon à 30 min, respectivement. La courbe du pourcentage d'activité de piégeage par rapport à la concentration de l'échantillon a été préparée en utilisant le programme basé sur MS Excel pour obtenir l'IC₅₀. Les tests ont été réalisés par spectrophotométrie dans une plaque 96 puits à des concentrations de 1,5625 ; 3,125 et 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 100 µg/ml.

Activité du piégeage de l'ABTS^{•+}

L'activité de piégeage de l'ABTS a été estimée à l'aide d'un protocole rapporté par Re et al. (1999) [5], modifié et adapté aux microplaques. Il mesure l'activité anti-radicalaire contre le radical acide 2,2'azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+}). Une solution d'ABTS (7 mM) est préparée dans de l'eau distillée additionnée de persulfate de potassium (2,45 mM) puis diluée dans de l'eau distillée pour obtenir une absorbance de 0,7 à 734 nm. Le Trolox, le BHT et la BHA ont été utilisés comme contrôles positifs. Les tests ont été effectués dans des microplaques à 96 puits, où 160 µl de la solution d'ABTS ont été ajoutés à 40 µl d'échantillon ou de standards. Après mélange, l'absorbance a été mesurée à 734 nm. Tous les tests ont été effectués en triplicat. La courbe du pourcentage d'activité de piégeage par rapport à la concentration de l'échantillon a été préparée en utilisant le programme basé sur MS Excel pour obtenir l'IC₅₀. Les tests ont été réalisés par spectrophotométrie dans une plaque 96 puits à des concentrations de 1,5625 ; 3,125 et 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 100 µg/ml

Dosage de piégeage des radicaux galvinoxyle (GOR)

Le dosage de piégeage des radicaux galvinoxyle (GOR) a été estimé à l'aide d'un protocole rapporté par Shi, Noguchi et Niki (2001) [6] . 160 µl de solution de galvinoxyle (0,1 mM dans MeOH) ont été ajoutés à 40 µl de l'échantillon dans du méthanol. Après 120 min, l'absorbance a été mesurée à 428 nm. Le Trolox, BHT et BHA ont été utilisés comme contrôles positifs.

Tous les tests ont été réalisés en triplicat. La courbe du pourcentage d'activité de piégeage par rapport à la concentration de l'échantillon a été obtenue en utilisant le programme basé sur MS Excel pour obtenir l'IC₅₀. Les tests ont été réalisés par spectrophotométrie dans une plaque 96 puits à des concentrations de 1,5625 ; 3,125 et 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 100 µg/ml

Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La capacité antioxydante réductrice cuivrique a été estimée à l'aide d'un protocole rapporté par Apak et al (2004) [7]. 60 µl de tampon d'acétate d'ammonium (1 M, pH 7,0) ont été ajoutés à 40 µl de l'échantillon. Ensuite, 50 µl de solution de néocuproïne (7,5 mM) et 50 µl de solution de CuCl₂ (10 mM) ont été ajoutés. Après 60 min, l'absorbance a été mesurée à 450 nm. Les résultats ont été donnés sous la forme A_{0,50} correspondant à la concentration de l'échantillon donnant 50 % de l'intensité d'absorbance maximale. Le Trolox, BHT et BHA ont été utilisés comme contrôles positifs. La courbe du pourcentage d'activité de piégeage par rapport à la concentration de l'échantillon a été obtenue en utilisant le programme basé sur MS Excel pour obtenir l'A_{0,50}. Les tests ont été réalisés par spectrophotométrie dans une plaque 96 puits à des concentrations de 1,5625 ; 3,125 et 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 et 100 µg/ml.

III. 1. 4. C. 2. Évaluation de l'activité antidiabétique

L'activité inhibitrice de l' α -glucosidase a été réalisée en utilisant le protocole rapporté par Lordan et al. (2013) [8]. Un volume de 50 µl de l'échantillon à différentes concentrations et 100 µl de solution d'enzyme α -glucosidase (0,1 U/ml) (1 mg d'enzyme α -glucosidase dans 9,8 ml de tampon phosphate 100 mM, pH 6,9) a ensuite été ajouté à chaque puits suivi par l'addition de 50 µl de solution 5 mM de p-nitrophényl- α -D-glucopyranoside dans un tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 6,9) ont été mélangés dans une microplaque à 96 puits. Après incubation, l'absorbance a été mesurée à 405 nm à 37°C. Tous les tests ont été effectués en triple exemplaire. La courbe du pourcentage d'activité inhibitrice de l' α -glucosidase par rapport à la concentration de l'échantillon a été préparée par le programme basé sur MS Excel pour obtenir l'IC₅₀. L'acarbose pharmacologique a été inclus comme témoin positif. Les tests ont été réalisés par spectrophotométrie dans une plaque 96 puits à des concentrations de 0,97 ; 1,95 ; 3,90 ; 7,81 ; 15,62 ; 31,25 ; 62,5 et 125 µg/ml.

III. 1. 4. C. 3. Évaluation de l'activité anticholinestérase

L'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et de butyrylcholinestérase a été déterminée par la méthode d'Ellman et al. (1961) [9]. Un volume de 150 µl de tampon phosphate de sodium 100 mM (pH 8,0) et 10 µl de la solution d'extrait dissous dans l'éthanol à différentes concentrations et 20 µl de la solution d'acétylcholinestérase ($5,32 \times 10^{-3}$ U) ou butyrylcholinestérase ($6,85 \times 10^{-3}$ U) ont été mélangés dans une microplaque à 96 puits et incubé à 25°C pendant 15 min. 10 µl de DTNB (0,5 mM) et 10 µl d'acétylthiocholine iodide (0,71 mM) ou 10 µl de butyrylthiocholine chloride (0,2 mM) ont été ajoutés à chaque puits.

L'absorbance a été mesurée à 412 nm. A 0 min, 5 min, 10min et 15 min. Tous les tests ont été effectués en triple exemplaire. La courbe du % d'activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase et de butyrylcholinestérase par rapport à la concentration de l'échantillon a été préparée par le programme basé sur MS Excel pour obtenir l'IC₅₀. La galantamine est utilisé comme référence. Les tests ont été réalisés par spectrophotométrie dans une plaque 96 puits à des concentrations de 0,781 ; 1,562 ; 3,125 ; 6,25 ; 12,5 et 50 µg/ml

III. 1. 4. C. 4. Évaluation de l'activité antityrosinase

L'activité inhibitrice d'antityrosinase a été déterminée en utilisant la méthode de Masuda et al (2005) [10], avec L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) et la méthode de Moon et al (2010) [11] avec la L-tyrosine comme substrat.

Avec la L-3,4-dihydroxyphénylalanine (L-DOPA) comme substrat, les tests ont été effectués en microplaques de 96 puits, l'absorbance a été mesurée à 475 nm. Les échantillons ont été dilués dans du DMSO à 50%. Chaque puit contenait 40 µl d'échantillon, 80 µl de tampon phosphate (0,1M, pH=6,8), 40 µl de tyrosinase (31 U/mL) et 40 µl de L-DOPA (2,5 mM).

Avec la L-tyrosine comme substrat, la réaction a été réalisée dans un tampon phosphate de potassium 100 mM (pH 6,7) contenant 1,5 mM de l-tyrosine et 100 U/ml de tyrosinase à 37°C. Le mélange réactionnel a été pré-incubé pendant 15 min avant d'ajouter le substrat. Le changement de l'absorbance à 490 nm a été mesuré.

La courbe du pourcentage d'activité inhibitrice de la tyrosinase par rapport à la concentration de l'échantillon a été préparée par le programme basé sur MS Excel pour obtenir l'IC₅₀. Les tests ont été réalisés par spectrophotométrie dans une plaque 96 puits à des concentrations de 125 ; 250 et 500 µg/ml

III. 1. 4. C. 5. Évaluation de l'activité antiélastase

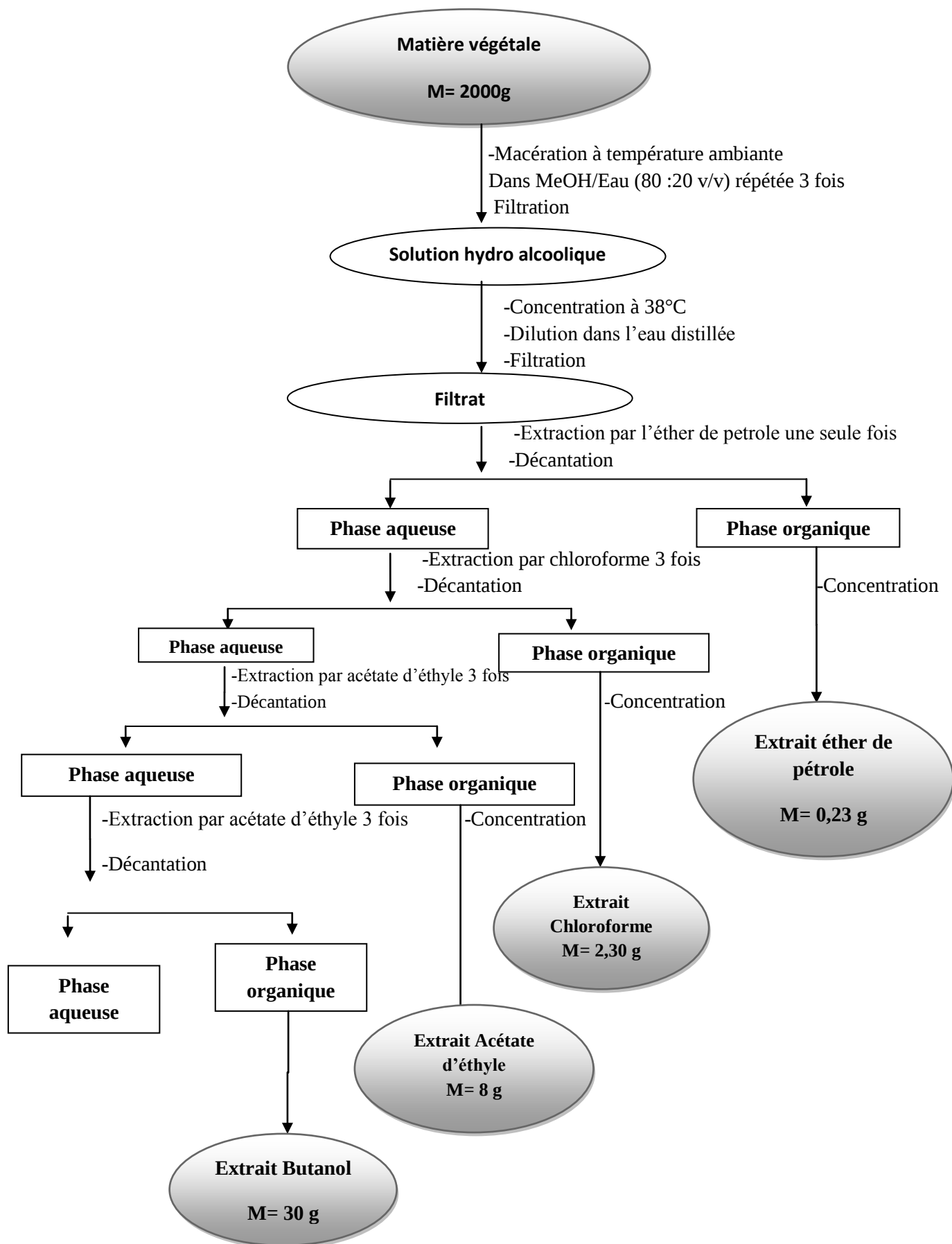
L'activité antiélastase a été déterminée en utilisant la méthode de (Kalyana Sundaram et al. 2018) [12]. L'élastase a été dissous dans un tampon Tris-HCl 0,2 M froid (pH 8,0) pour préparer 100 µg/mL de solution mère d'enzyme, puis dilué pour obtenir 10 µg/ml. Le substrat 0,22 mM de N-succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide a été dissous dans du tampon Tris-HCl 0,2 M (pH 8,0) pour préparer 1 mg/ml de solution de substrat. Différentes concentrations des extraits de plantes ont été incubées avec l'enzyme pendant 20 min à température ambiante avant d'ajouter le substrat pour commencer l'expérience. Le mélange réactionnel final consistait en 25 µl d'extraits de plantes à diverses concentrations, 25 µl de substrat, 25 µl d'enzyme et 175 µl de tampon Tris-HCl. Solution de sulfate de cuivre (100 mM) a été utilisé comme contrôle positif et le contrôle négatif consistait en un tampon Tris-HCl. L'absorbance a été mesurée immédiatement à 405 nm puis en continu pendant 20 min. La courbe du % d'activité antiélastase par rapport à la concentration de l'échantillon a été préparée par le programme basé sur MS Excel pour obtenir l'IC₅₀. Les tests ont été réalisés par spectrophotométrie dans une plaque 96 puits à des concentrations de 125 ; 250 et 500 µg/ml.

III. 1. 4. D. Analyses statistiques

Toutes les données sur les tests d'activité étaient les moyennes d'analyses en triple. Les données ont été enregistrées sous forme de moyennes $\pm$ l'écart-type. Les différences significatives entre les moyennes ont été déterminées par le test de Student ; les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

III. 1. 5. Extraction et purification

Les parties aériennes séchées à l'air (2000 g) de l'espèce *Helianthemum getulum* (Cistaceae) ont été macérées à température ambiante avec le système MeOH/H₂O (80:20, v/v) pendant 72 h, puis filtrées. L'extrait a été concentré par évaporation rotative à 38°C sous pression réduite. Le résidu a été dissous avec de l'eau sous agitation magnétique, mis à 4°C pendant une nuit et filtré, puis successivement extrait avec de l'éther de pétrole, CHCl₃, AcOEt et n-BuOH. Après évaporation des solvants à 35°C sous pression réduite, les extraits suivants ont été obtenus : la fraction A : éther de pétrole (0,23 g), la fraction B : CHCl₃ (2,3 g), la fraction C : AcOEt (8 g) et la fraction D : n-BuOH (30 g).

Figure III.2. Protocole d'extraction de la plante *Helianthemum getulum*.

III. 1. 5. A. Etude des extraits

Les extraits de l'espèce ont été fractionnés par une procédure de séparation bioguidée, les fractions purifiées C et D (AcOEt et n-BuOH) ont été caractérisées en dosant leur pouvoir antioxydant (DPPH, ABTS, GOR piégeant les radicaux libres) et leur pouvoir réducteur (dosage CUPRAC) et les principaux composés dans les fractions actives (AcOEt et n-BuOH) ont été isolés en utilisant une méthodologie de purification impliquant une combinaison de méthodes chromatographiques.

Les activités antioxydante (dosages DPPH, ABTS, GOR et CUPRAC) *in vitro* de l'extrait brut et des fractions (AcOEt et n-BuOH) ont montré une activité antioxydante significative. Il est à noter que certains d'entre eux ont démontré une meilleure activité que le standard antioxydant BHT Tableau III. 2.

Tableau III.2. Activité antioxydante de l'extrait M80 et des fractions B, C et D.

		DPPH IC ₅₀ (μM)	ABTS ⁺ IC ₅₀ (μM)	GOR IC ₅₀ (μM)	CUPRAC A _{0.50} (μM)
Extrait	M80	21,25±0,10	25,77±0,52	20,79±0,64	26,82±2,11
Fractions	B	46,92±1,12	33,27±0,51	59,50±2,06	18,07 ±0,48
	C	9,34±0,07	10,40±0,52	8,27±0,36	8,04 ±0,59
	D	11,65±0,28	11,25±0,13	10,93±0,39	11,92±0,43
Standards	Trolox ^b	2,60±0,09	1,30±0,34	2,33±0,45	5,28±0,38
	BHA ^b	6,27±0,86	2,25±0,05	4,87±0,11	4,49±0,10
	BHT ^b	48,70±0,62	2,09±0,09	8,91±0,23	9,62±0,87

^bComposé de référence.

Des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium ou sur plaque en verre de polyamide et papier watman en parallèle, ont été procédés afin de choisir la phase stationnaire convenable et le bon système d'élution convenant à une meilleure séparation.

III. 1. 5. B. Fractionnement de l'extrait AcOEt

Une partie de l'extrait AcOEt (6 g) a été soumise à une chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice, les six grammes sont dissous dans du méthanol et mélangés à une petite quantité de gel de silice, le mélange est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur une colonne de gel de silice (60–200 mesh, 180 g), confectionnée de gel de silice, préparée dans le chloroforme, éluée avec des gradients $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ avec des pourcentages croissants de MeOH, pour donner 16 fractions (F1–F16) obtenues par combinaison des éluats sur la base d'une analyse de leur profil chromatographique sur couches minces de gel de silice. Les plaques ont été visualisées sous lampes UV à 254 et 365 nm, puis révélées avec le système $\text{H}_2\text{O}-\text{H}_2\text{SO}_4-\text{HOAc}$ (80:16:4) et chauffées pendant 3 min à 100°C. Les résultats sont regroupés dans le tableau III.3.

Représentation chromatographique (Figure III.3) des composés de l'extrait AcOEt dans les conditions mentionnées ci-dessus.

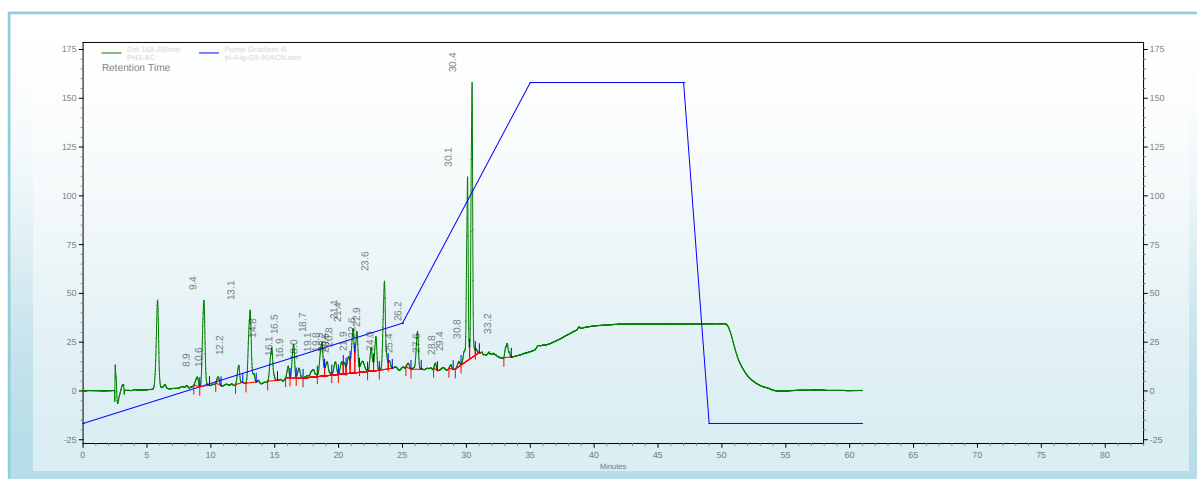


Figure III.3. Chromatogramme CLHP analytique de la phase AcOEt.

Tableau III.3. Fractionnement par chromatographie sur colonne de gel de silice de l'extrait AcOEt de l'espèce *Helianthemum getulum*.

Fraction	Masse (mg)	Chloroforme (%)	MeOH (%)
F1	40	99	1
F2	70	99	1
F3	30	99	1
F4	85	98	2
F5	94	98	2
F6	50	97	3
F7	527	96	4
F8	640	95	5
F9	1001	94	6
F10	930	94	6

F11	670	93	7
F12	650	90	10
F13	630	86	14
F14	130	84	16
F15	182	82	18
F16	310	60	40

➤ **Fractionnement de la fraction F5**

La fraction F5 (94 mg) ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 98:2 v/v) a montré la formation d'un précipité blanc, qui a été isolé et lavé avec du chloroforme pour donner le composé **P1** (15 mg).

➤ **Fractionnement de la fraction F7**

Une quantité d'environ 100 mg a été injectée sur CLHP semi préparative en phase inverse, dans une colonne C_{18} , 250 x 10 mm, 5 μm , thermo scientific, à température ambiante et une phase mobile composée du solvant A constitué d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique et du solvant B constitué d'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique. Avec un débit de 5ml/min en utilisant le gradient suivant : 0 min, 5% B; 15 min, 25%, 35 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min. Le chromatogramme de CLHP semi préparative suivant montre la composition de la fraction F7 et la séparation faite (Figure III. 4).

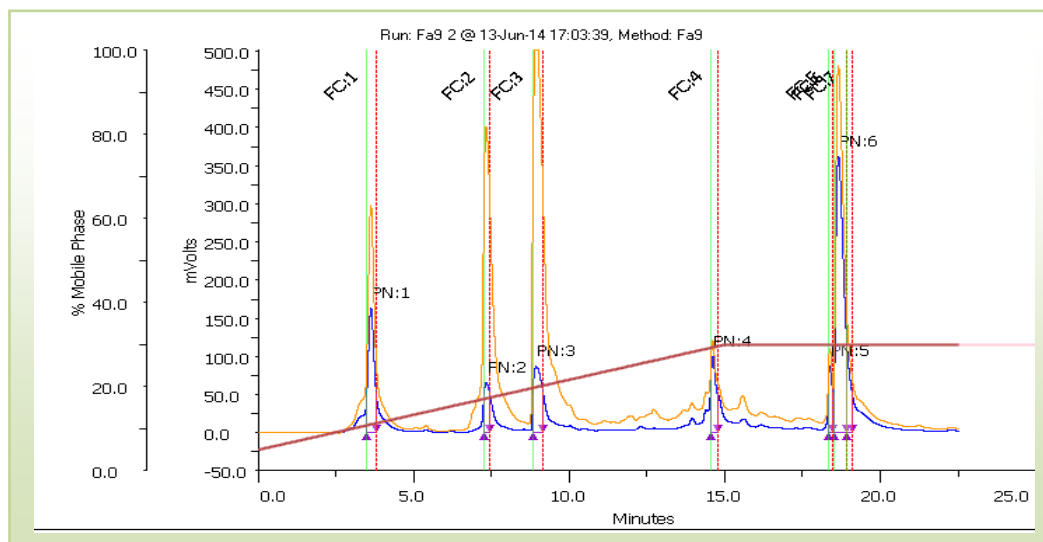


Figure III.4. Chromatogramme CLHP semi préparative de la fraction F7 de l'extrait acétate d'éthyle.

Une collection des fractions a été faite après plusieurs injections et après avoir réalisé une analyse sur CLHP analytique (Varian, Model 410 Varian Prostar) dans les conditions suivantes, la Kromasil C₁₈ avec une taille de particules de 5µm, 4,60 mm*250 mm à température ambiante et une phase mobile composée du solvant A qui est constitué d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique et du solvant B (acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique) avec un débit de 1ml/min et le gradient suivant : 0 min, 5% B; 15 min, 25%, 35 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min. Pour obtenir le composé **P2** (8 mg) et le composé **P3** (3 mg).

➤ **Fractionnement de la fraction F9**

La fraction F9 (1001 mg) (CHCl₃/MeOH, 94:6 v/v) a montré la formation d'un précipité jaune qui a été filtré (300 mg) et lavé avec de l'acétate d'éthyle. Une partie de ce précipité a été soumise à des plaques préparatives de gel de silice et le système d'élution (CHCl₃/MeOH, 8:2 v/v) pour donner le composé **P4** (25 mg) et le composé **P5** (10 mg).

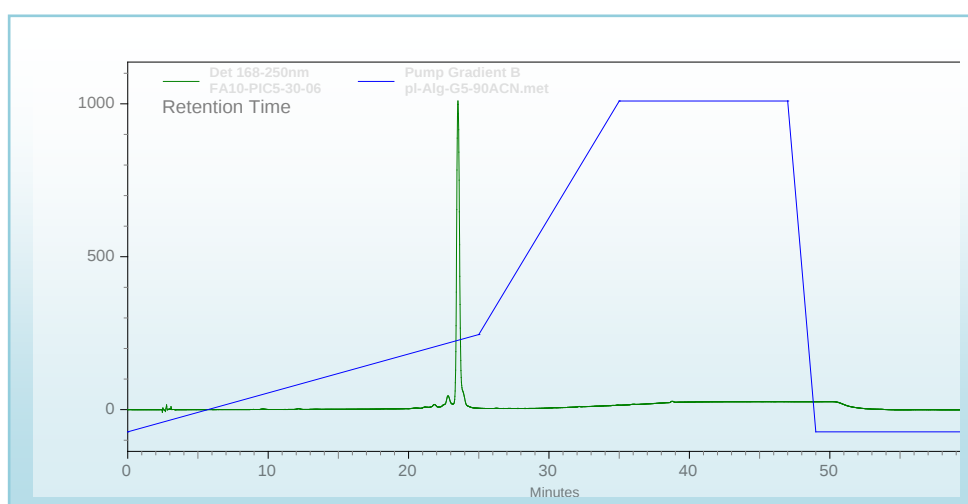


Figure III.5. Chromatogramme CLHP analytique en phase inverse du composé P5.

200 mg du filtrat de la fraction F9 a été injecté sur CLHP semi préparative en phase inverse,

Le chromatogramme de CLHP semi préparative suivant montre la composition de la fraction F9 et la séparation faite (Figure III. 6).

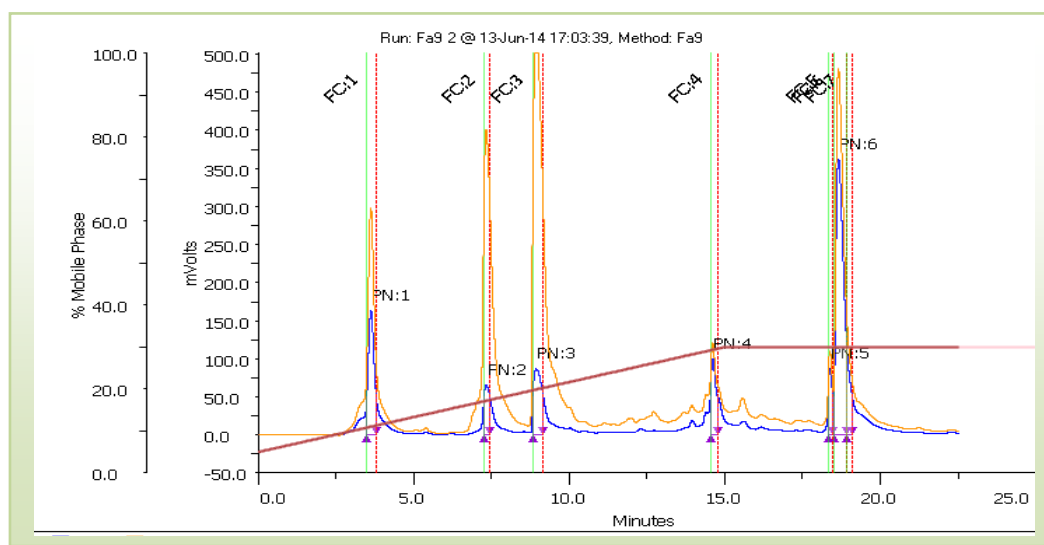


Figure III.6. Chromatogramme semi préparative de la fraction F9 de l'extrait acétate d'éthyle.

Une collection des fractions a été faite après plusieurs injections et pour obtenir le composé **P6** (1 mg), le composé **P7** (3 mg) et le composé **P8** (4 mg).



Figure III.7. Chromatogramme CLHP analytique en phase inverse du composé P6.

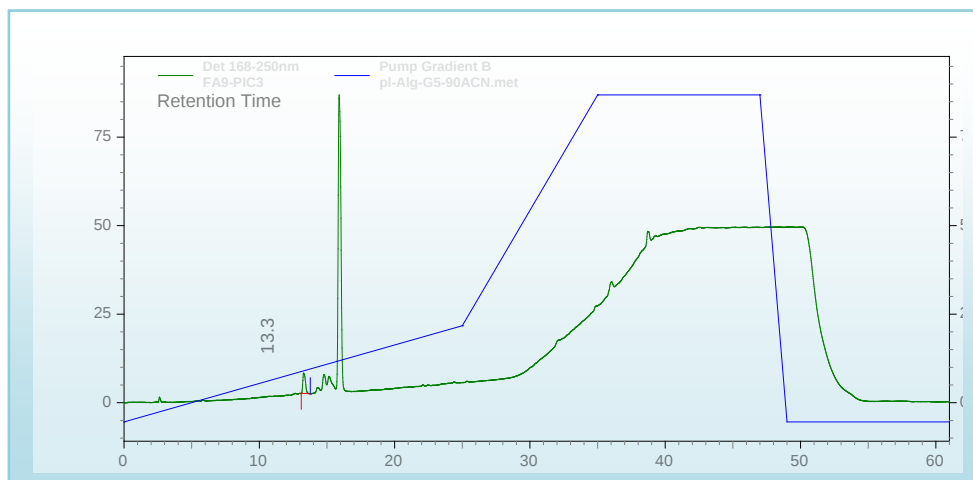


Figure III.8. Chromatogramme CLHP analytique en phase inverse du composé P7.

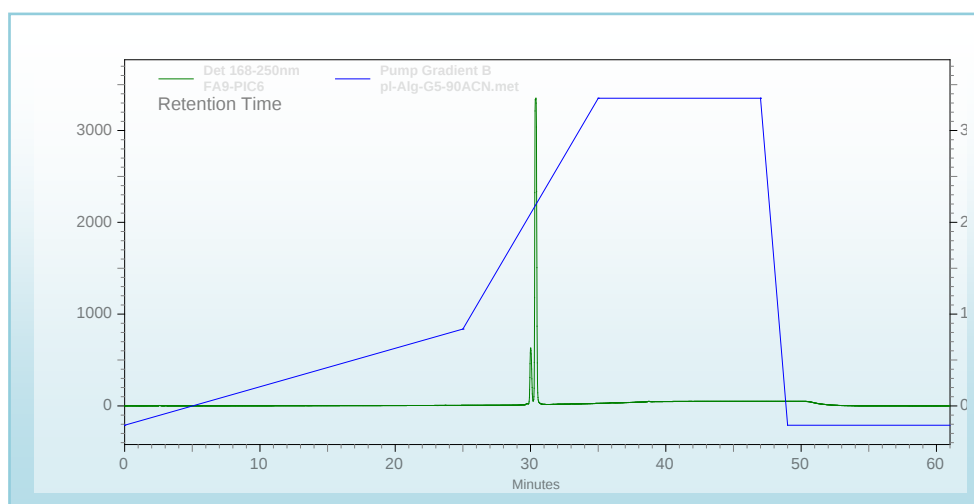


Figure III.9. Chromatogramme CLHP analytique en phase inverse du composé P8.

➤ Fractionnement de la fraction F10

La fraction F10 (930 mg) ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 94 :6 v/v) a montré la formation d'un précipité jaune qui a été filtré (500 mg) et lavé avec de l'acétate d'éthyle. Une partie de ce précipité a été soumise à des plaques préparatives de gel de silice et le système d'élution ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 8:2 v/v) pour donner P4.

200 mg du filtrat de la fraction F10 ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 94:6 v/v) a été injectée sur CLHP semi préparative en phase.

Le chromatogramme de CLHP semi préparative suivant montre la composition de la fraction F10 et la séparation faite (Figure III. 10).

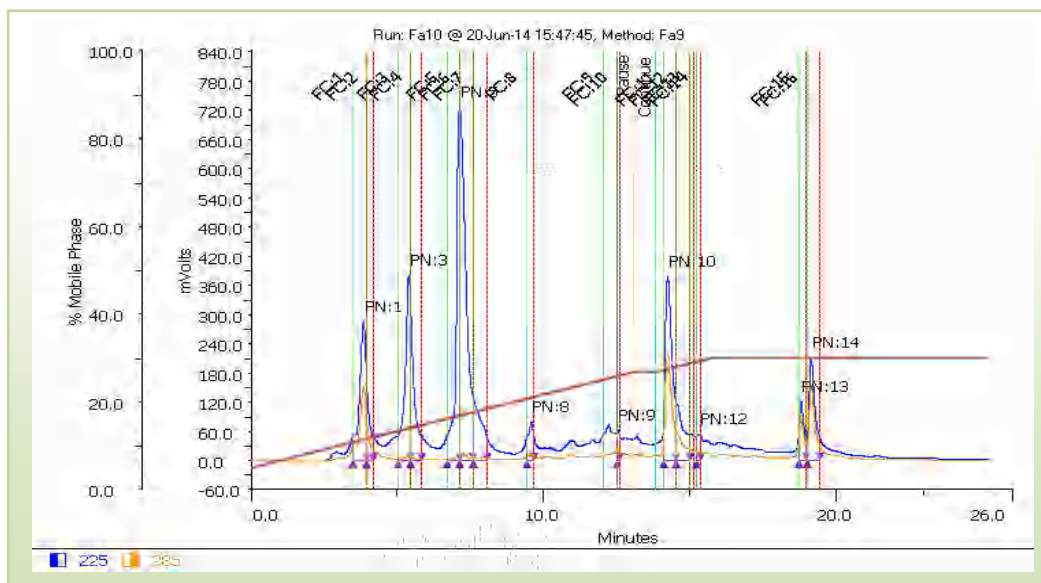


Figure III.10. Chromatogramme CLHP semi préparative de la fraction F10 de l'extrait acétate d'éthyle.

Une collection des fractions a été faite après plusieurs injections et après avoir réalisé une analyse sur CLHP analytique en utilisant la même colonne et les mêmes conditions que celles mentionnées ci-dessus pour obtenir le composé **P9** (4 mg) et le composé **P10** (6 mg).

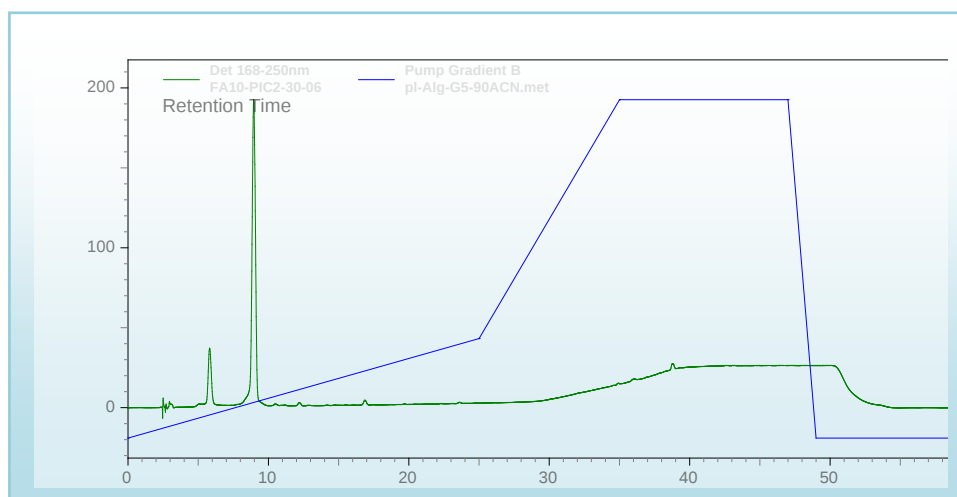


Figure III.11. Chromatogramme de CLHP analytique en phase inverse du composé P9.

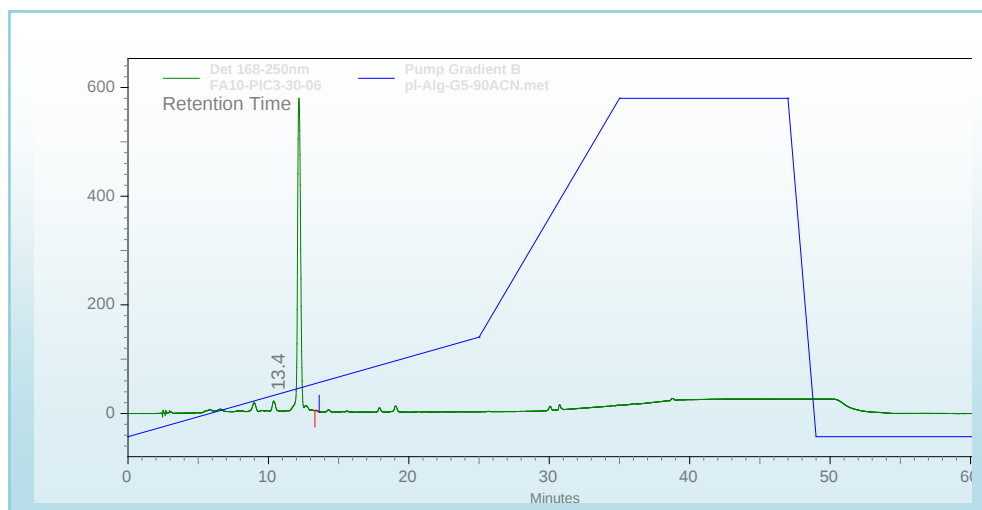


Figure III.12. Chromatogramme CLHP analytique en phase inverse du composé P10.

➤ Fractionnement de la fraction F11

200 mg de la fraction F11(670 mg) ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 91:9 v/v), a été injectée sur CLHP semi préparative en phase inverse, dans une colonne C_{18} , 250 x 10 mm, 5 μm , thermo scientific, à température ambiante et une phase mobile composée du solvant A constitué d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique et du solvant B (acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique) avec un débit de 5ml/min et le gradient suivant : 0 min, 5% B; 15 min, 25%, 35 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min.

Le chromatogramme de CLHP semi préparative suivant montre la composition de la fraction F11 et la séparation faite (Figure III. 13).

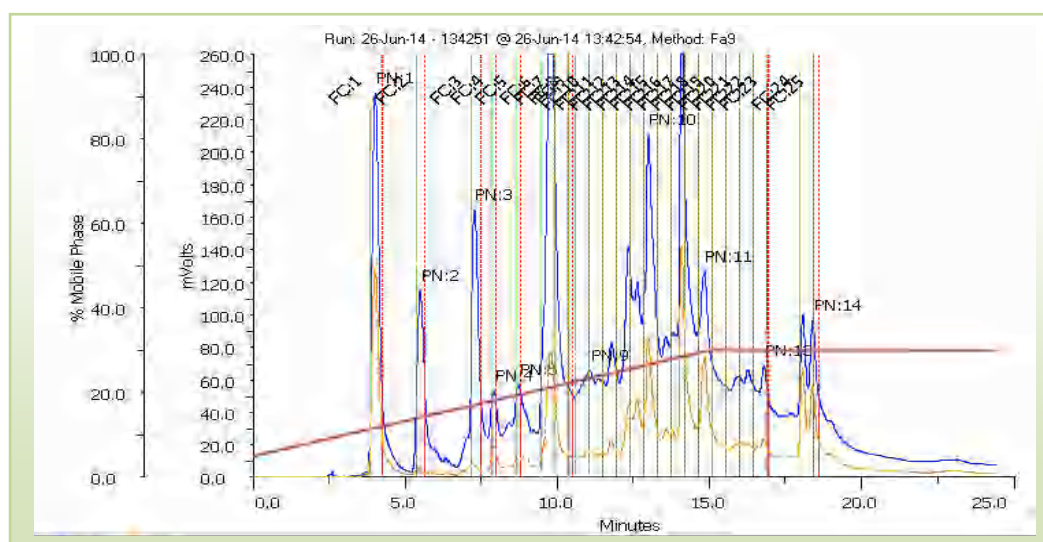


Figure III.13. Chromatogramme CLHP semi préparative de la fraction F11 de l'extrait acétate d'éthyle.

Une collection des fractions a été faite après plusieurs injections et après avoir réalisé une analyse sur CLHP analytique en utilisant la même colonne et les mêmes conditions que celles mentionnées ci-dessus pour obtenir le composé **P11** (2 mg).

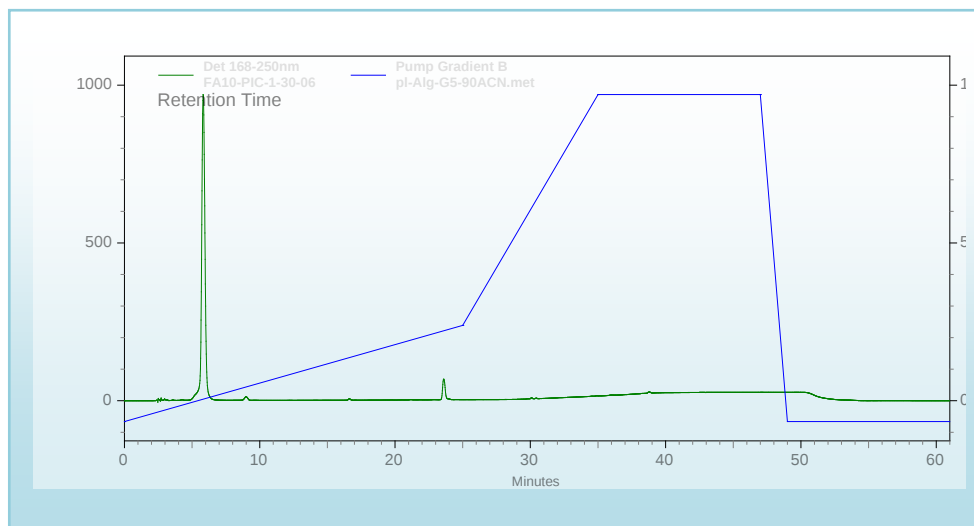


Figure III.14. Chromatogramme CLHP analytique en phase inverse du composé P11.

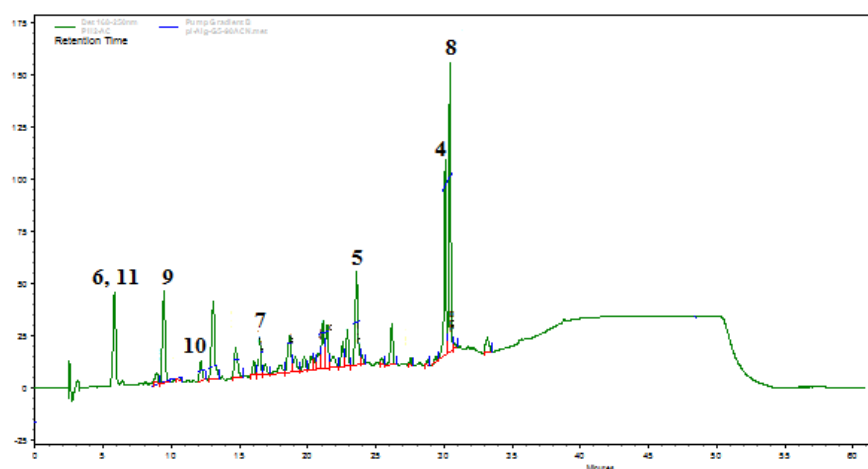


Figure III.15. Chromatogramme CLHP analytique reconstitué de l'extrait acétate d'éthyle à partir des composés isolés des différentes fractions de l'espèce *Helianthemum getulum*.

III. 1. 5. C. Fractionnement de l'extrait n-BuOH

Une partie de l'extrait n-BuOH (4 g) a été soumise à une chromatographie sur colonne de polyamide, les quatre grammes sont dissous dans du méthanol et mélangés à une petite quantité de polyamide, le mélange est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette poudre est déposée sur une colonne polyamide SC6 (90 x 5,5 mm), préparée dans le toluène. L'élution s'est déroulée en augmentant le pourcentage de MeOH dans des mélanges toluène-MeOH pour donner 21 fractions obtenues (F1–F21) en combinant les éluats sur la base de l'analyse TLC.

Les plaques ont été visualisées sous lampes UV à 254 et 365 nm, puis révélées avec H₂O-H₂SO₄-HOAc (80:16:4) et chauffées pendant 3 min à 100°C. Les résultats sont regroupés dans le (tableau III.4).

Tableau III.4. Fractionnement par chromatographie sur colonne de l'extrait n-BuOH de *Helianthemum getulum*.

Fraction	Masse	Toluene (%)	MeOH (%)
F1	10	100	0
F2	54	99	1
F3	80	95	5
F4	342	90	10
F5	95	85	15
F6	128	80	20
F7	179	80	20
F8	190	80	20
F9	100	78	22
F10	134	75	25
F11	571	70	30
F12	265	70	30
F13	107	65	35
F14	116	60	40
F15	130	60	40
F16	391	50	50
F17	430	40	60
F18	30	30	70
F19	28	20	80
F20	40	20	80
F21	10	0	100

➤ **Fractionnement de la fraction F15**

La fraction F15 (130 mg) (toluène/MeOH, 60:40 v/v) a été injectée sur CLHP semi préparative en phase inverse, dans une colonne C₁₈, 250 x 10 mm, 5µm, thermo scientific, à température ambiante et une phase mobile composée du solvant A constitué d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique et du solvant B (acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique) avec un débit de 5ml/min et le gradient suivant : 0 min, 5% B; 15 min, 25%, 35 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min.

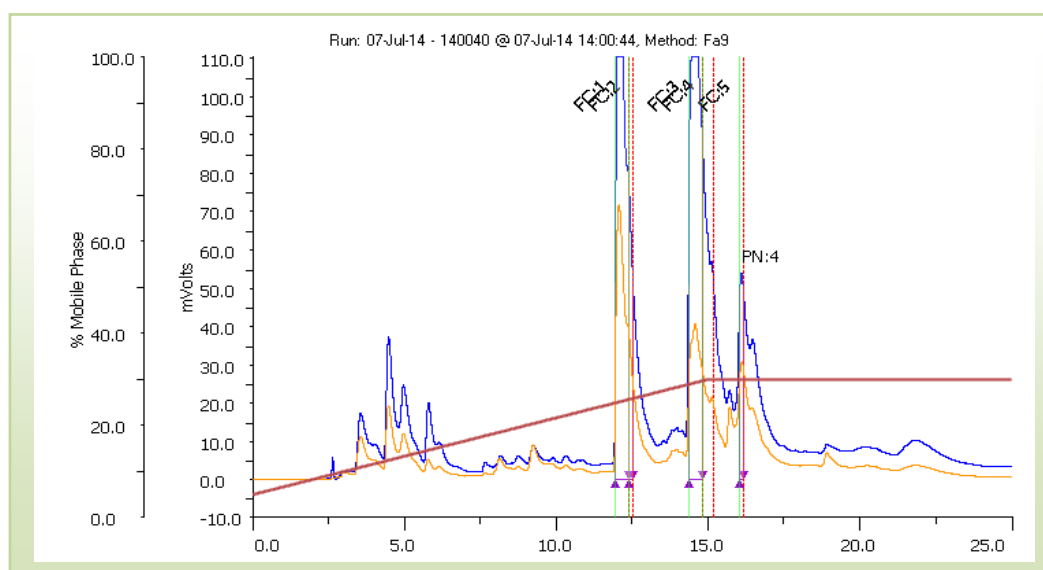


Figure III.16. Chromatogramme CLHP semi préparative de la fraction F15 de l'extrait n-BuOH.

Une collection des fractions a été faite après plusieurs injection et après avoir réalisé une analyse sur CLHP analytique (Varian, Model 410 Varian Prostar) dans les conditions suivantes, une colone Kromasil C₁₈ avec une taille de particules de 5µm, 4,60 mm*250 mm, à température ambiante et une phase mobile composée du solvant A constitué d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique et du solvant B (acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique) avec un débit de 1ml/min et le gradient est le même que celui mentionné précédemment, pour donner un nouveau flavonoïde le composé **P12**.



Figure III.17. Chromatogramme analytique phase inverse du composé P12.

➤ **Fractionnement de la fraction F17**

La fraction F17 a montré la formation d'un précipité jaune, qui a été filtré et lavé avec du MeOH (60 mg) pour donner le composé **P13**.

III. 1. 6. Conclusion

Il s'agit du premier rapport sur l'investigation phytochimique de l'espèce *Helianthemum getulum*, les composés isolés par fractionnement guidé par l'activité de piégeage des radicaux *in vitro* (DPPH, ABTS•+ et GOR) et le test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC), dans le but d'obtenir une meilleure évaluation du potentiel antioxydant.

Leurs structures ont été déterminées par des analyses spectroscopiques UV_Visible, de masse (MALDI TOF), d'RMN (expériences RMN ^1H et ^{13}C , J-mod, COSY, HSQC, HMBC et NOESY) et par comparaison avec les données de la littérature.

Références

- [1] P. Quézel and S. Santa, Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales., 1962, 2.
- [2] F. Calzada, R. López, M. Meckes, and R. Cedillo-Rivera, "Flavonoids of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*," *Int. J. Pharmacogn.*, 1995, 33(4), 351–352.
- [3] L. El Rhaffari and A. Zaid, "Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet): Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée., 2002.
- [4] M. S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical," *Nature.*, 1958, 181(4617), 1199–1200.
- [5] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, and C. Rice-Evans, "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free Radic. Biol. Med.*, 1999, 26(9–10), 1231–1237.
- [6] H. Shi, N. Noguchi, and E. Niki, "Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity," *Methods in enzymology.*, 2001, 335, 157–166.
- [7] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, and S. E. Karademir, "Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method," *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52(26), 7970–7981.
- [8] S. Lordan, T. J. Smyth, A. Soler-Vila, C. Stanton, and R. P. Ross, "The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts," *Food Chem.*, 2013, 141(3), 2170–2176.
- [9] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres Jr, and R. M. Featherstone, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity," *Biochem. Pharmacol.*, 1961, 7(2), 88–95.
- [10] T. Masuda, D. Yamashita, Y. Takeda, and S. Yonemori, "Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, 69(1), 197–201.
- [11] J.-Y. Moon, E.-Y. Yim, G. Song, N. H. Lee, and C.-G. Hyun, "Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju Island plants., 2010, 4.
- [12] I. Kalyana Sundaram, D. D. Sarangi, V. Sundararajan, S. George, and S. Sheik Mohideen, "Poly herbal formulation with anti-elastase and anti-oxidant properties for skin anti-aging," *BMC Complement. Altern. Med.*, 2018, 18, 1–12.

Chapitre IV

Identification structurale

Chapitre IV Identification structurale

IV. 1. Identification des composés isolés à partir de l'extrait AcOEt (fraction C)

IV. 1. 1. Elucidation structurale du composé P1 issu de la fraction F5

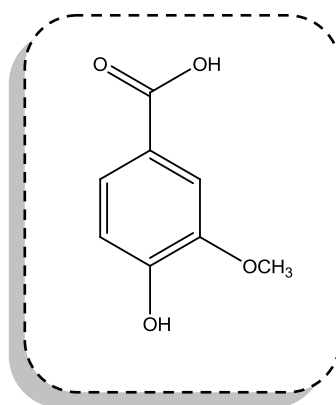


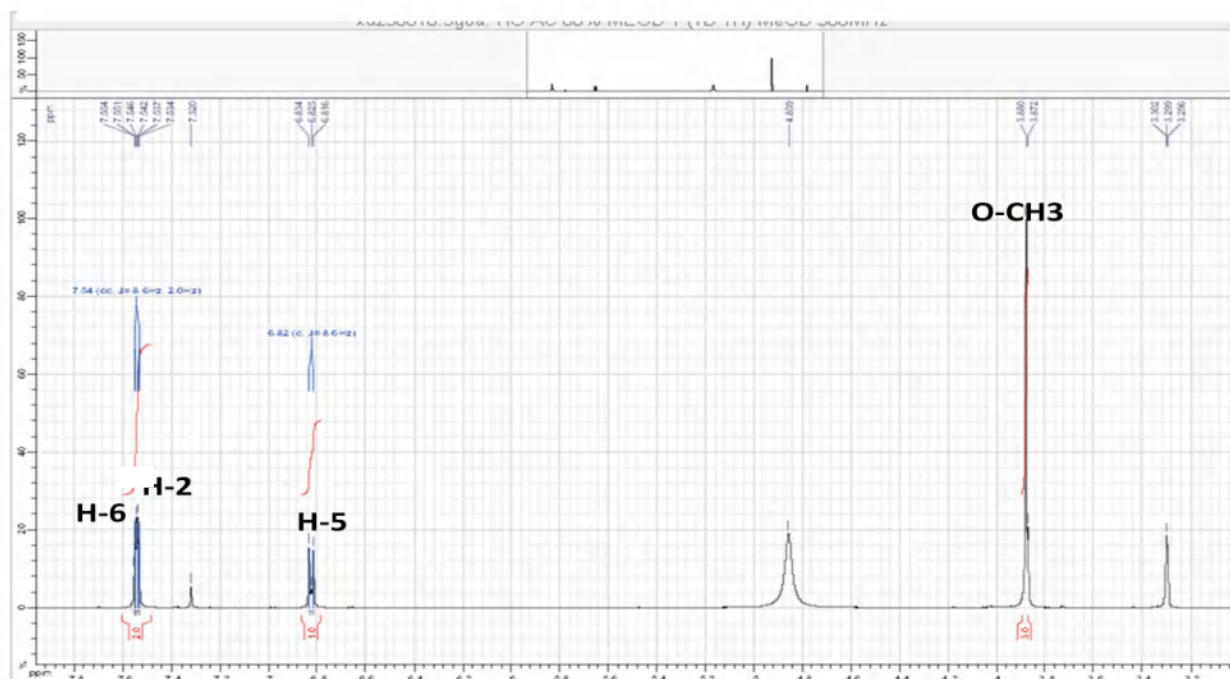
Figure IV.1. Structure de l'acide vanillique P1.

Ce produit est sous forme d'un précipité blanc, qui a été isolé à partir de la fraction **F5** ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 98:2 v/v) et lavé avec du chloroforme CHCl_3 pour donner de l'acide vanillique **P1**.

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre IV.1), montre qu'il s'agit d'un noyau aromatique substitué montrant les signaux suivants :

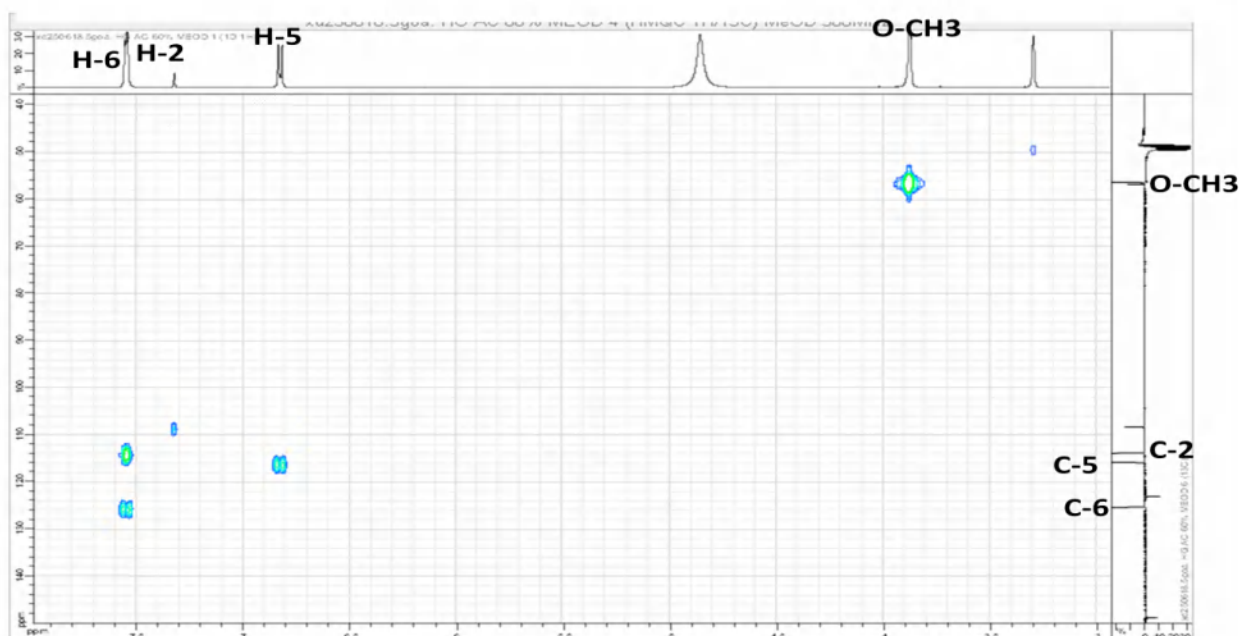
- Un singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,88$ ppm attribuable à un groupement $\text{O}-\text{CH}_3$.
- Un doublet d'intégration 1H ($J=8,6$ Hz) à $\delta_{\text{H}} 6,82$ ppm .
- Un doublet de doublets d'intégration 2H ($J=8,6$; $2,0$ Hz) à $\delta_{\text{H}} 7,54$ ppm.

L'ensemble des informations indique qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique est tri substitué, la présence d'un doublet d'intégration 1H ($J=8,6$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 6,82$ ppm attribuable à H-5 et un doublet de doublets d'intégration 2H ($J=8,6$; $2,0$ Hz) à $\delta_{\text{H}} = 7,54$ ppm attribuable à H-2 et H6 indique la présence d'un système de spins ABX pour le cycle benzénique et la présence d'un singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,88$ ppm est attribuable à un groupement méthoxyle $\text{O}-\text{CH}_3$.



Spectre IV.1. Spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz, δ ppm) du composé P1.

Le spectre de l'expérience HMQC (Spectre IV.2), permet de localiser le carbone du méthoxy à $\delta_{\text{C}} = 56,38$ ppm et les noyaux C-2, C-5 et C-6 à $\delta_{\text{C}} = 113,80$; $115,82$; $125,26$ ppm successivement.



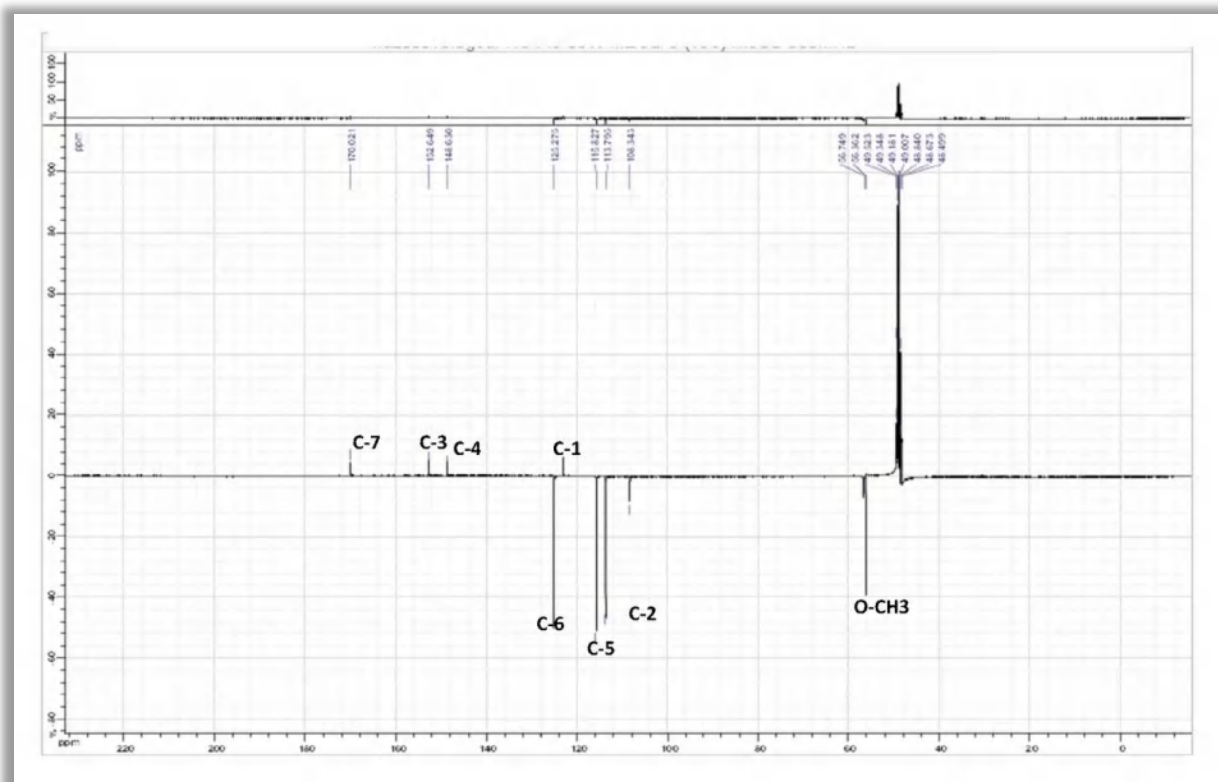
Spectre IV. 2. Spectre RMN HMQC (MeOH- d_4 , 500 MHz, δ ppm) du composé P1.

Le spectre RMN J-mode (Spectre IV.3) de ce composé montre :

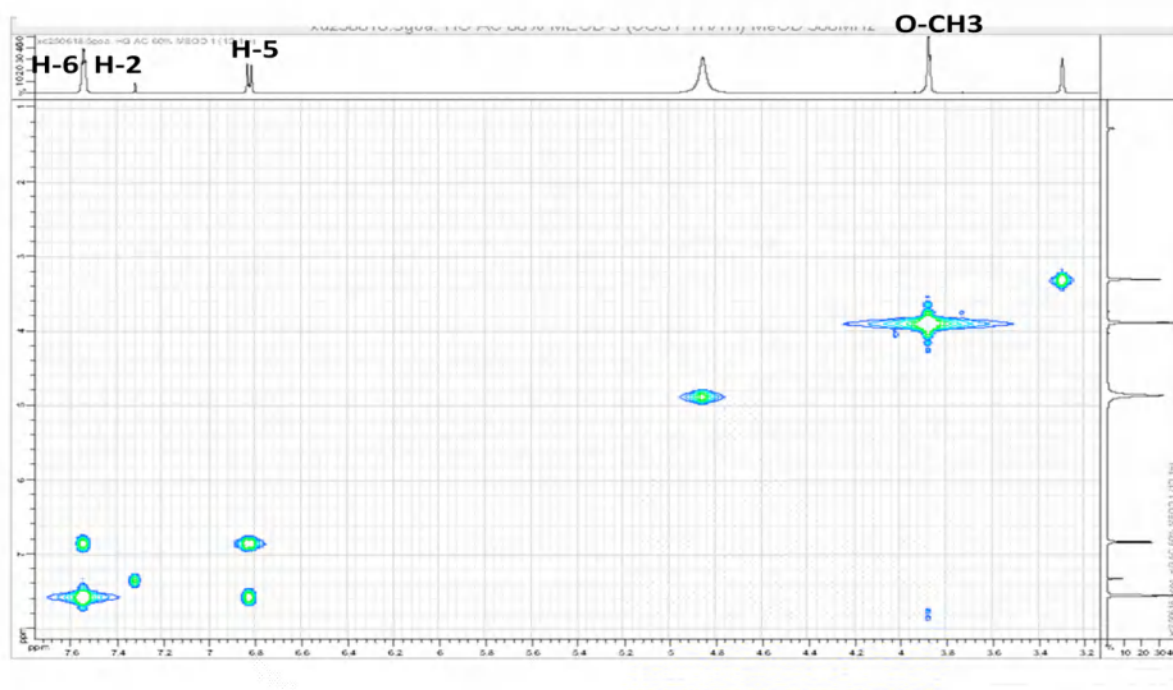
- Un carbonyle à $\delta_C=170,01\text{ppm}$.
- Un groupement méthoxy à $\delta_C =56,38\text{ ppm}$.
- Des carbones CH sp_2 caractéristiques d'un noyau aromatique tri substitué à $\delta_C= 113,80$; $115,82$ et $125,26\text{ ppm}$ attribuables aux C-2, C-5 et C-6 respectivement.
- Un carbone quaternaire sp_2 oxygéné à $\delta_C =148,64\text{ ppm}$ attribuable à C-4.

L'analyse de spectre RMN J-mode (Spectre IV.3) confirme la présence du groupement méthoxy à $\delta_C = 56,38\text{ ppm}$ et six atomes de carbone dans la zone aromatique orientant vers un cycle benzylique substitué, dont trois CH sp_2 à δ_C ($113,80$; $115,82$ et $125,26\text{ ppm}$) et trois carbones quaternaires sp_2 dont deux oxygénés à δ_C ($152,66$ et $148,64\text{ ppm}$) et une fonction d'acide carboxylique à $\delta_C = 170,01\text{ ppm}$. Toutes ces données cumulées indiquent que cette molécule est un acide carboxylique substitué par un groupement méthoxyle et un hydroxyle.

Ces données sont en faveur d'un noyau aromatique tri substitué par un groupement COOH, O-CH₃ et un hydroxyle OH.

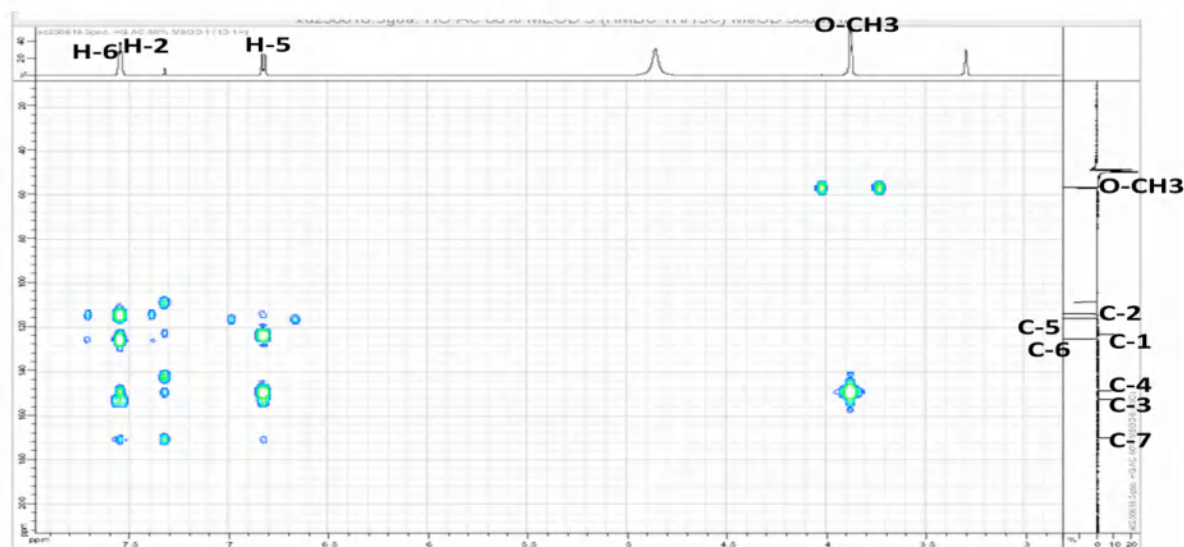


Spectre IV. 3. Spectre RMN J-mode (MeOH-d₄, 125 MHz, δ ppm) du composé P1.



Spectre IV.4. Spectre RMN COSY (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P1.

Le spectre HMBC montre une tache de corrélation entre les protons du groupement O-CH₃ et le carbone C-3 à $\delta_C = 152,66$ ppm indiquant la substitution du méthoxyle en position C-3. Le doublet de doublets d'intégration 2H ($J = 8,6$; $2,0$ Hz) à $\delta_H 7,54$ ppm attribuable à H-2 et H-6 corréle avec le carbone C-7 à $\delta_C = 170,01$ ppm indiquant la présence d'un groupement carboxyle. Le Carbone C-4 à $\delta_C = 148,64$ ppm indique la présence d'un hydroxyle libre. Le proton H-5 montre des corrélations avec C-6, C-3, C-4 et C-7 à $\delta_C = 125,26$; $152,66$; $148,64$ et $170,01$ ppm.



Spectre IV. 5. Spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P1.

L'ensemble de ces données permet de déduire la présence d'une fonction acide carboxylique en position C-1 de ce noyau aromatique, un méthoxyle et un hydroxyle substituant ce noyau aromatique dans les positions C-3 et C-4 respectivement. Ces données mènent à la structure de l'acide vanillique [1].

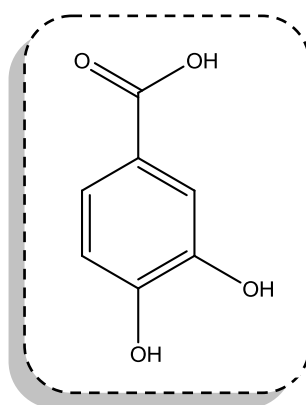
Les données relatives aux analyses des spectres de RMN ¹H et J-mode de ce composé sont reportées dans le tableau IV.1.

Les données de la RMN ¹H, J-mode sont rassemblées dans le tableau IV.1.

Tableau IV.1. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , J-mode du composé P1.

1	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
1	123,07	-
2	113,80	7,54 (2H, dd, 8,6 ; 2,0)
3	152,66	-
4	148,64	-
5	115,82	6,82 (1H, d, 8,6)
6	125,26	7,54 (2H, dd, 8,6; 2,0)
7	170,01	-
3-O-CH ₃	56,38	3,88 (3H,s)

IV. 1. 2. Elucidation structurale du composé P2 issu de la fraction F7

**Figure IV.2.** Structure de l'acide protocatéchique P2.

Ce produit a été isolé à partir de la fraction **F7** ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 96:4 v/v), par CLHP semi préparative en phase inverse pour donner de l'acide protocatéchique **P2**.

Conditions CLHP semi préparative en phase inverse

Colonne C18, 250 x 10 mm, 5 μm , thermo scientific, à température ambiante

Phase: solvant A constitué d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique et du solvant B (acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique).

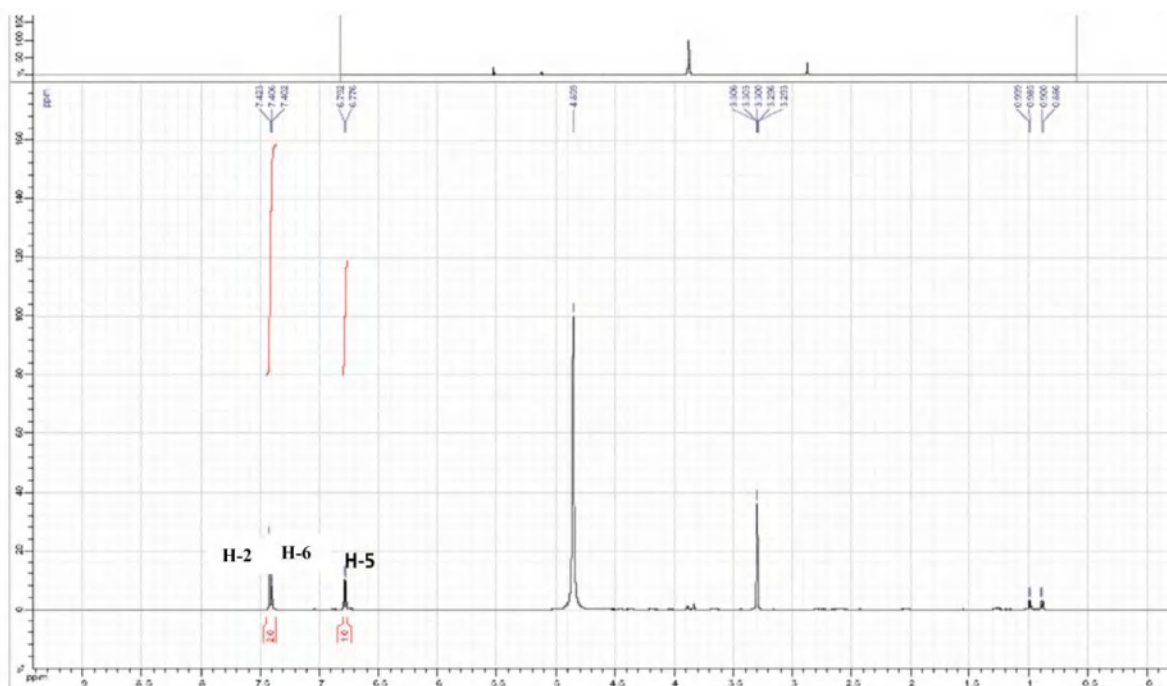
Débit: 5ml/min.

Profile gradient suivant : 0 min, 5% B; 15 min, 25%, 35 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min.

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre IV.6) montre qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique substitué, caractérisé par :

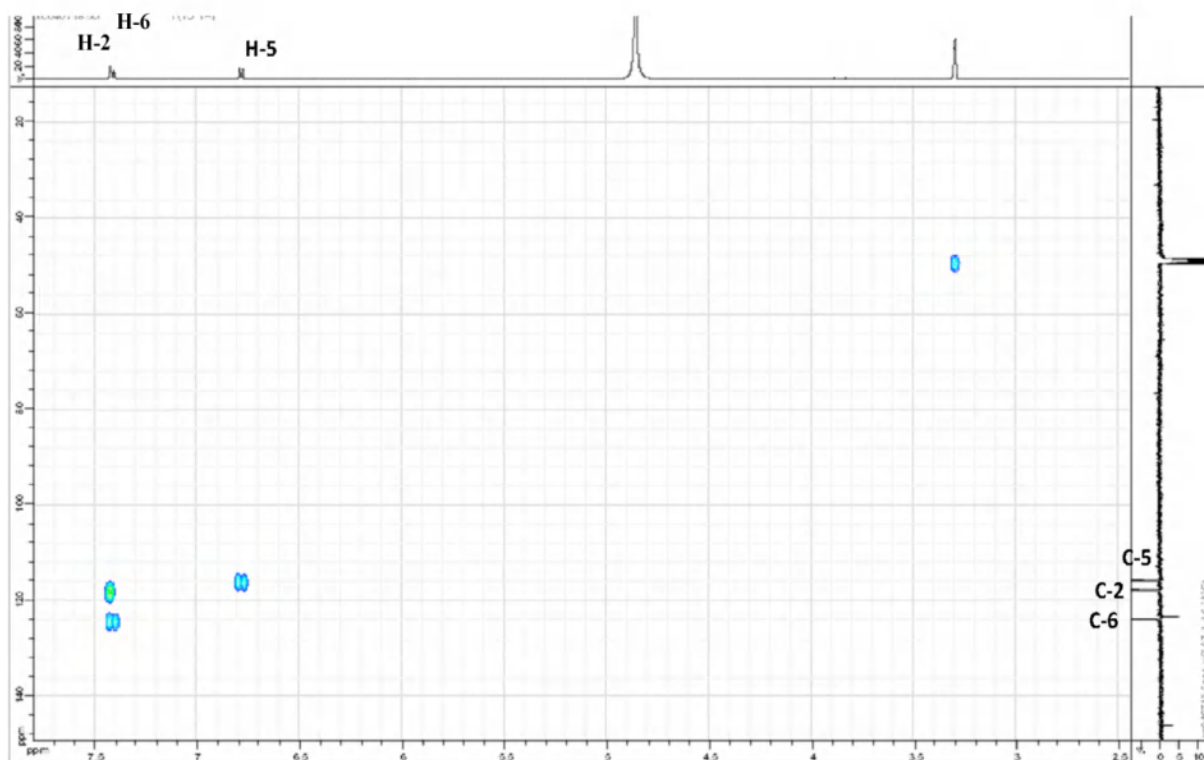
- Un doublet d'intégration 1H ($J=8,2$ Hz) à δ_H 6,78 ppm.
- Un doublet de doublets d'intégration 1H ($J=8,2$; 1,6 Hz) à δ_H 7,40 ppm.
- Un doublet d'intégration 1H ($J=1,6$ Hz) à δ_H 7,41 ppm.

L'ensemble des informations indique qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique est tri substitué, la présence d'un doublet d'intégration 1H ($J = 8,2$ Hz) à δ_H 6,78 ppm attribuable à H-5, un doublet de doublets d'intégration 1H ($J = 8,2$; 1,6 Hz) à δ_H 7,40 ppm attribuable à H-6 et un doublet d'intégration 1H ($J = 1,6$ Hz) à δ_H 7,41 ppm attribuable à H-2 indique la présence d'un système de spins ABX pour le cycle benzénique.



Spectre IV.6. Spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz, δ ppm) du composé P2.

Le spectre de l'expérience HMQC (Spectre IV.7), permet de localiser les noyaux C-5, C-2 et C-6 à $\delta_C = 115,76$; $117,72$ et $123,87$ ppm successivement.

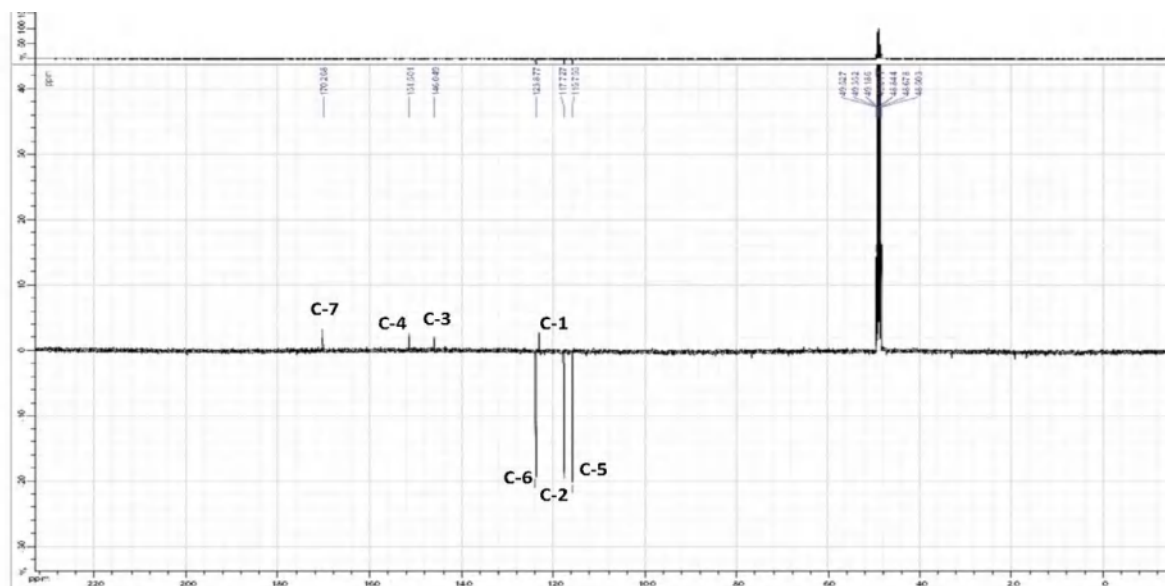


Spectre IV.7. Spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P2.

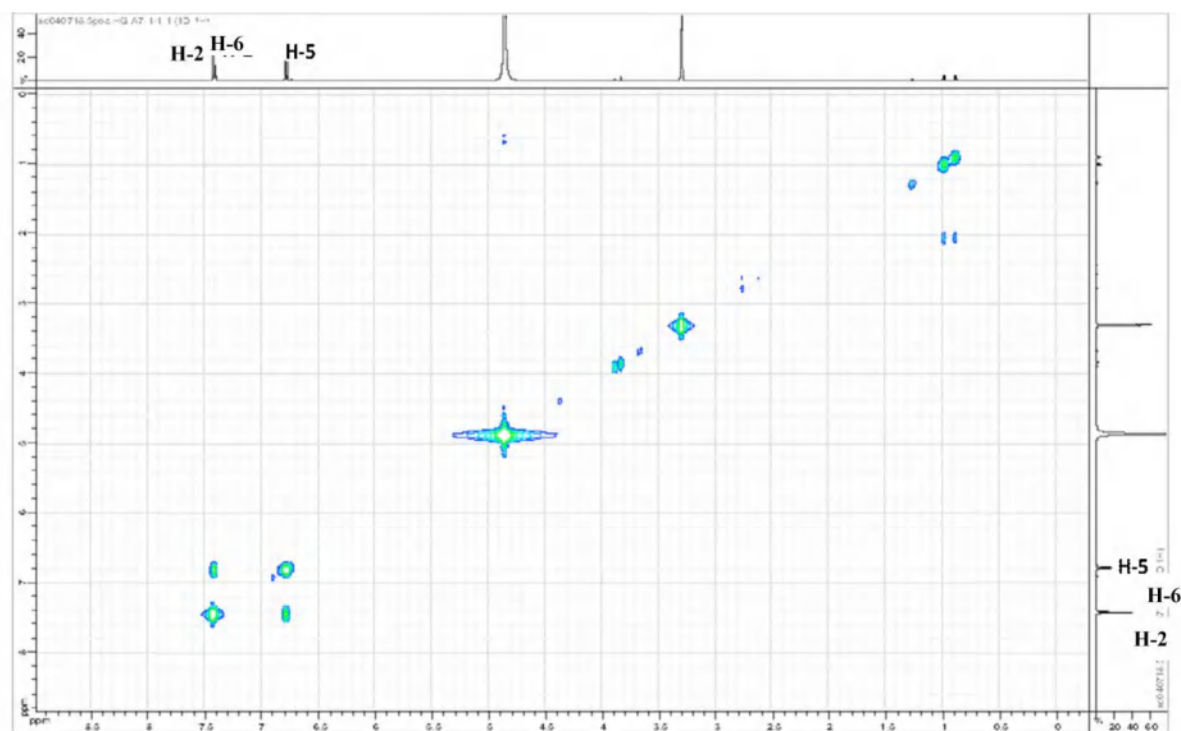
Le spectre RMN J-mode (Spectre IV.8) de ce composé montre :

- Un carbonyle à δ_C 170,27ppm.
- Des carbones CH sp_2 caractéristiques d'un noyau aromatique tri substitué à δ_C = 117,72; 115,76 et 123,87 ppm attribuables aux C-2, C-5 et C-6 respectivement.
- Deux carbones quaternaire sp_2 oxygénés à δ_C = 146,05 et 151,48 ppm attribuable à C-3 et C-4 respectivement.

Ces données sont en faveur d'un noyau aromatique tri substitué par un groupement COOH et deux groupements OH.



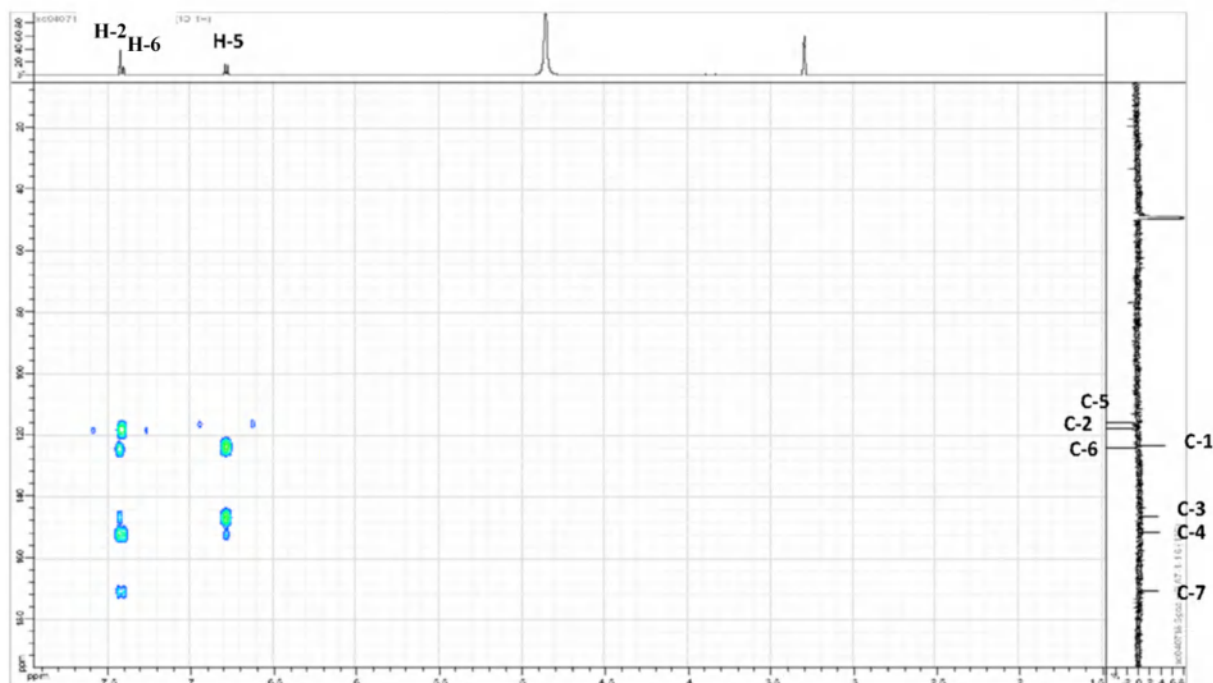
Spectre IV. 8. Spectre RMN J-mode (MeOH-d₄, 125 MHz, δ ppm) du composé P2.



Spectre IV. 9. Spectre RMN COSY (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P2.

Le spectre HMBC montre des corrélations entre les deux signaux résonant $\delta_H = 7,40$ ppm attribuable à H-6 et $\delta_H = 7,41$ ppm attribuable à H-2 avec le noyau C-7 à $\delta_C = 170,27$ ppm indiquant la présence d'un carboxyle et avec le C-4 à $\delta_C = 151,48$ ppm indiquant la présence

d'un hydroxyle libre, sur le même spectre le proton H-5 montre des corrélations avec C-6, C-3 et C-4 à $\delta_C = 123,87$; 146,05 et 151,48 ppm.



Spectre IV. 10. Spectre RMN HMBC (MeOH-d4, 500 MHz, δ ppm) du composé P2.

Sur la base de l'ensemble de ces données, le composé P2 est identifié comme étant l'acide protocatéchique.

L'ensemble de ces données permet de déduire la présence d'une fonction acide carboxylique en position C-1 de ce noyau aromatique et deux hydroxyles substituant ce noyau aromatique dans les positions C-3 et C-4. Ces données mènent à la structure de l'acide protocatéchique [2].

Les données relatives aux analyses des spectres de RMN ^1H et J-mode de ce composé sont reportées dans le tableau IV.2.

Tableau IV.2. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , J-mode du composé P2.

2		
	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
1	123,19	-
2	117,72	7,41 (1H, d, 1,6)
3	146,05	-
4	151,48	-
5	115,76	6,78 (1H, d, 8,2)
6	123,87	7,40 (1H, dd, 8,2 ; 1,6)
7	170,27	-

IV. 1. 3. Elucidation structurale du composé P3 issu de la fraction F7

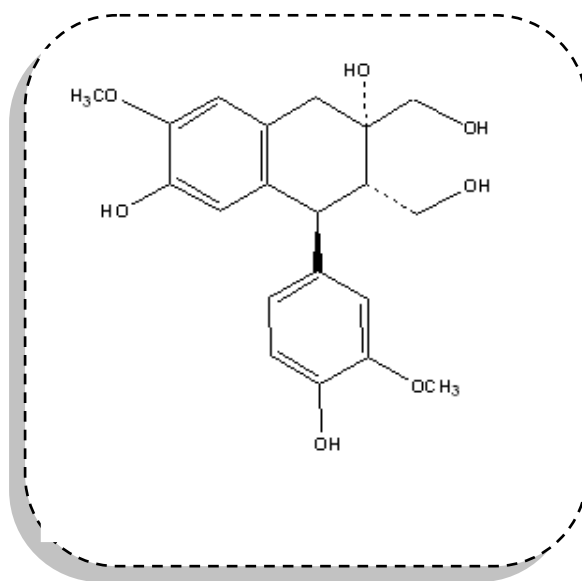


Figure IV.3. Structure de Cyclooolivil P3.

Ce produit a été isolé à partir de la fraction **F7** ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 96:4 v/v), par CLHP semi préparative en phase inverse pour donner le cyclooolivil **P3**.

Conditions CLHP semi préparative en phase inverse

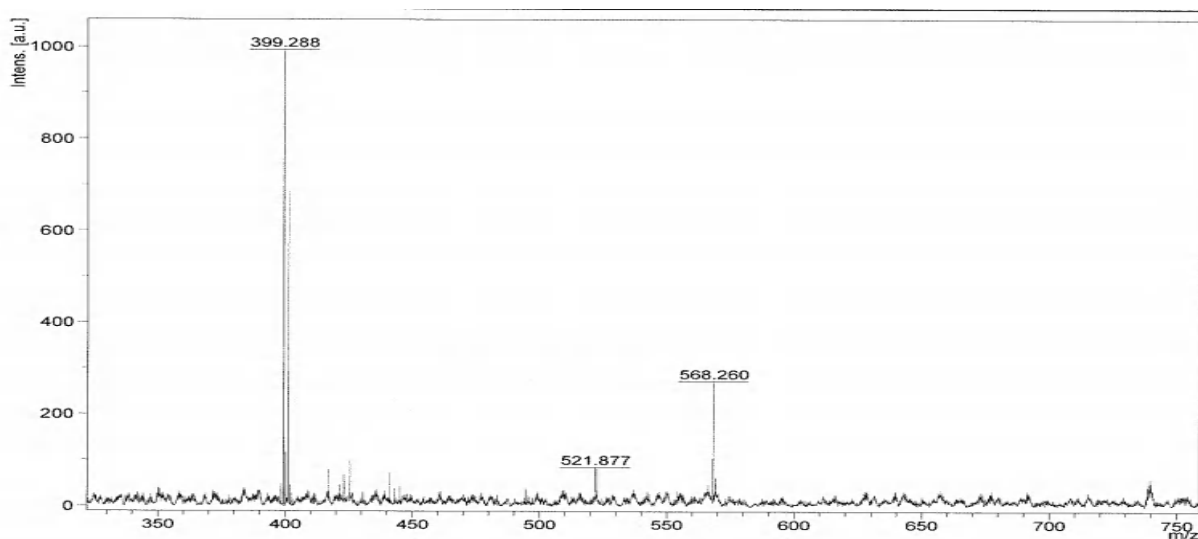
Colonne C-18, 250 x 10 mm, 5 μ m, thermo scientific, à température ambiante

Phase: solvant A, constitué d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique et du solvant B (acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique).

Débit: 5ml/min.

Profile gradient suivant : 0 min, 5% B; 15 min, 25%, 35 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min.

L'examen du spectre de masse MALDI-TOF du composé 3 montre un pic d'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 399,28$ correspondant à une formule brute en $C_{20}H_{24}O_7$.

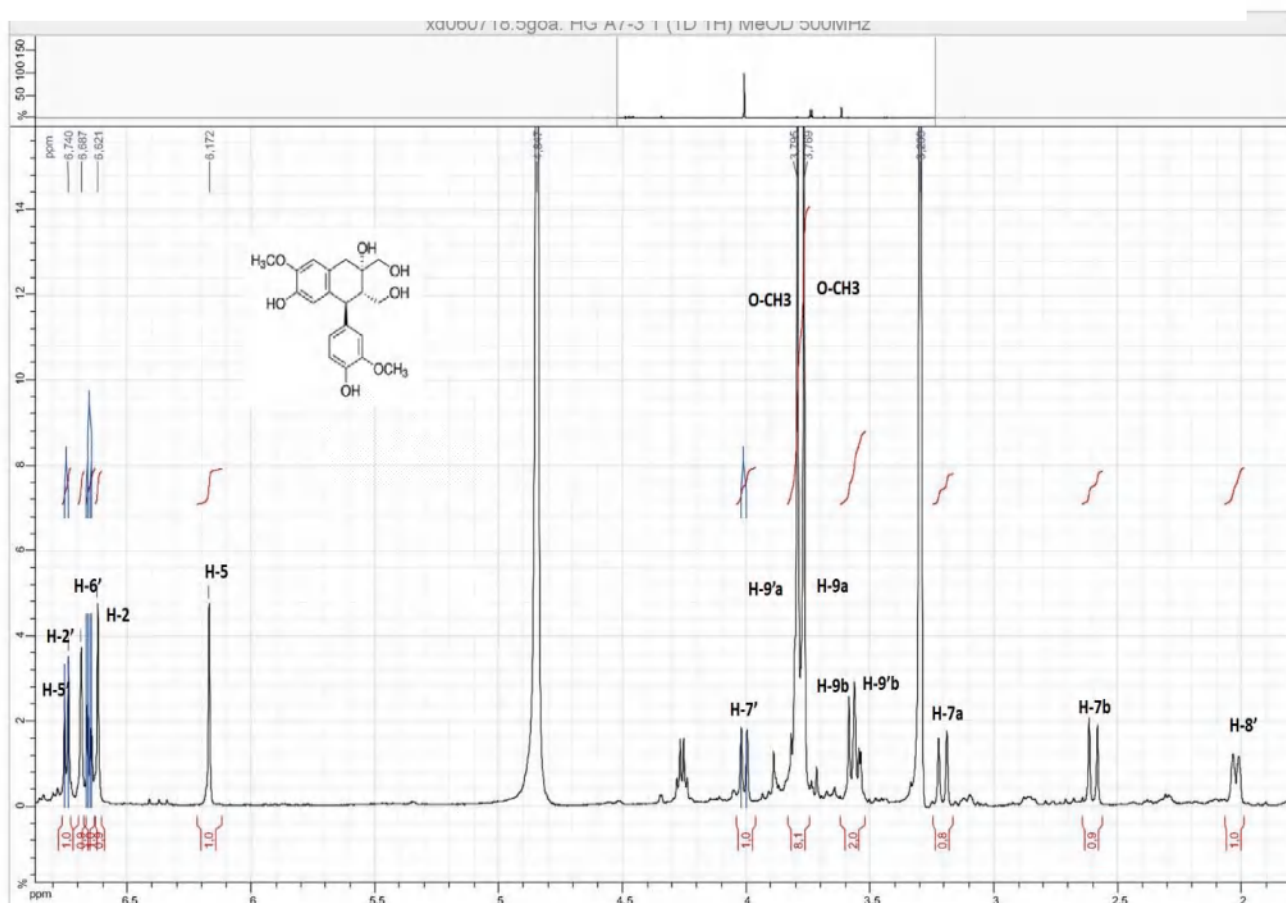


Spectre IV. 11. Spectre de masse Maldi-Tof du composé P3.

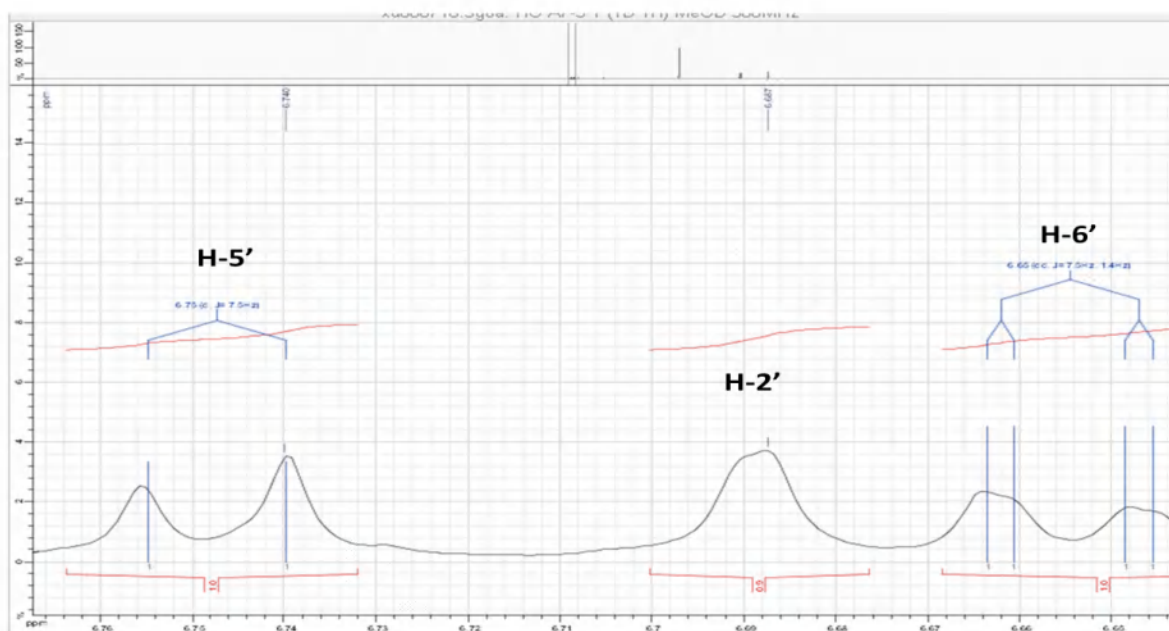
L'examen du spectre RMN 1H (Spectre IV. 12) montre qu'il s'agit d'un lignane de type aryltétraline caractérisé par :

- La présence de deux noyaux aromatiques cycle A et B.
- Trois signaux pour le cycle A, désignant des protons aromatiques du système de spins ABX pour le cycle A à $\delta_H = 6,69$ ppm (1H, s large), $\delta_H = 6,75$ ppm (1H, d, $J = 7,5$ Hz) et $\delta_H = 6,65$ ppm (1H, dd, $J = 7,5 ; 1,4$ Hz) attribuable à H-2', H-5' et H-6'.
- Deux signaux désignant des protons aromatiques du cycle B résonant à $\delta_H = 6,62$ ppm (1H, s) et $\delta_H = 6,17$ ppm (1H, s) attribuable à H-2 et H-5.

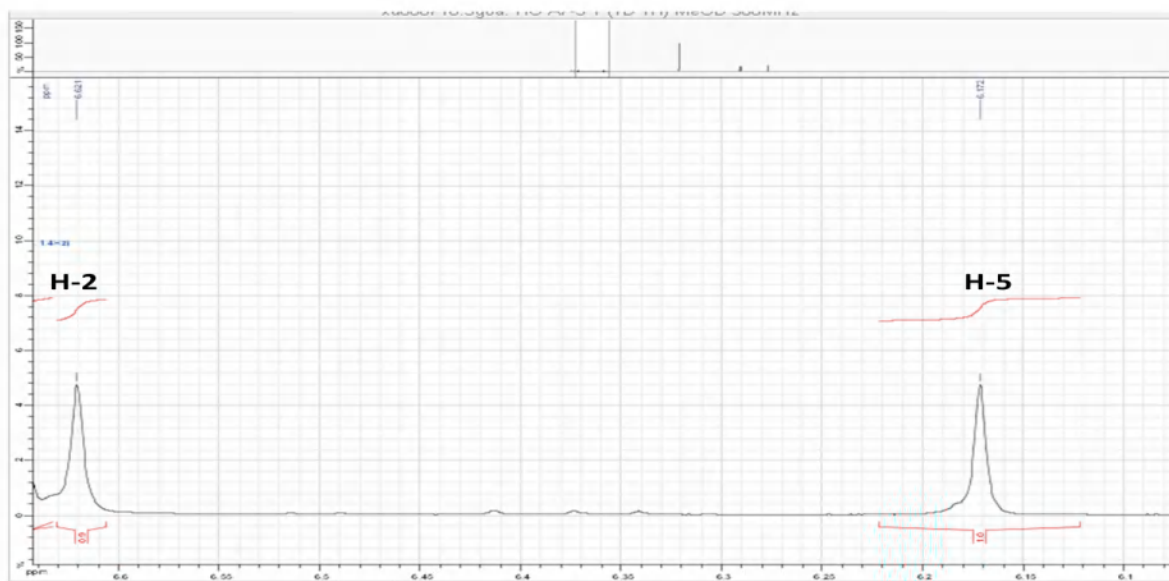
- Deux signaux sous forme de singulet d'intégration 3H chacun à $\delta_H = 3,77$ et $3,99$ ppm attribuables à deux groupement méthoxyles.
- Un doublet d'intégration 1H caractéristique d'un proton aliphatique résonant à $\delta_H = 4,01$ ppm attribuable à H-7'.
- Un doublet de triplet d'intégration 1H d'un proton aliphatique résonant à $\delta_H = 2,02$ ppm, $J = 11,0$; $2,7$ Hz attribuable à H-8'.
- Deux signaux désignant deux protons aliphatiques géminés non équivalents résonant à $\delta_H = 2,60$ ppm et $3,20$ ppm ($J = 16,3$ Hz) attribuable à H-7b et H-7a successivement.
- Deux signaux d'intégration 1H sous forme de singulet chacun résonant à $\delta_H = 3,78$ ppm et $3,57$ ppm attribuable à H-9a et H-9b successivement.
- Deux signaux d'intégration 1H sous forme de singulet chacun résonant à $\delta_H = 3,79$ ppm et $3,55$ ppm attribuable à H-9'a et H-9'b successivement.



Spectre IV. 12. Spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P3.



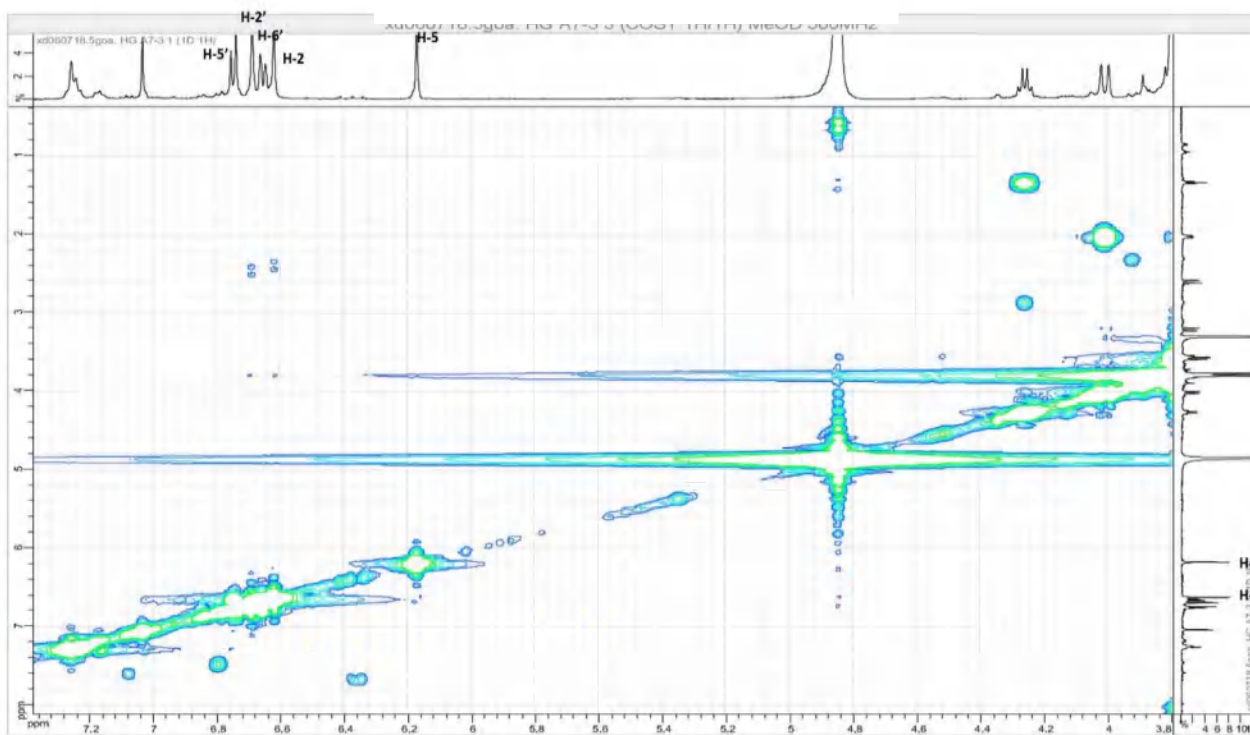
Spectre IV. 13. Etallement 1 spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P3.



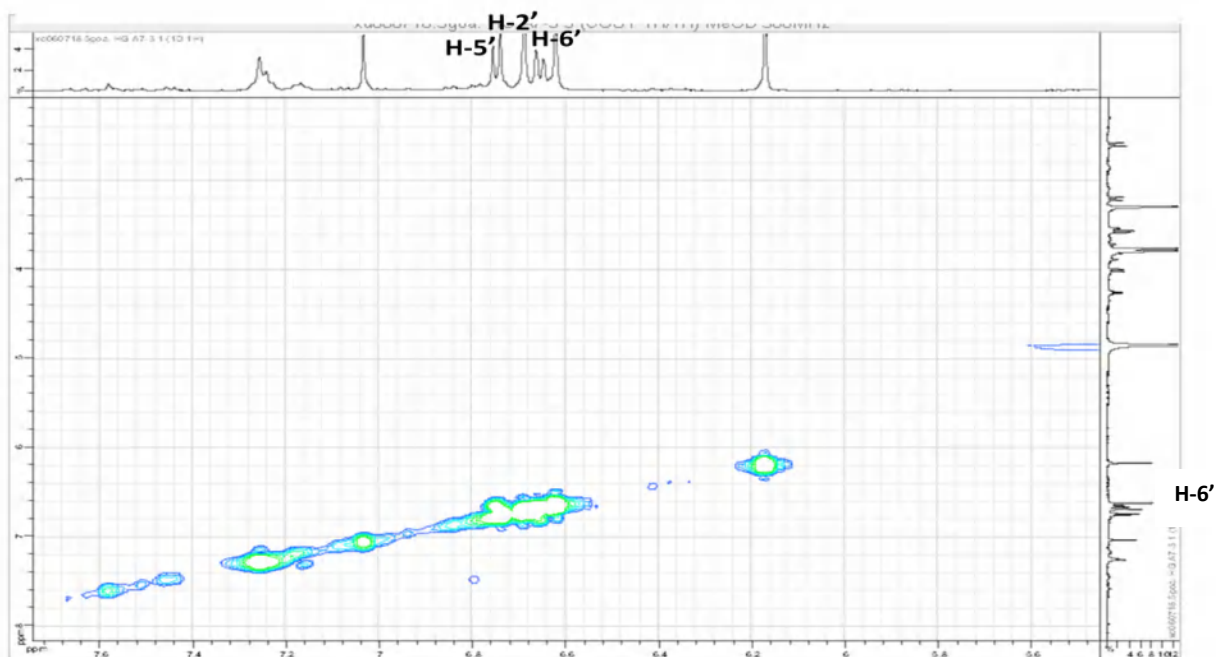
Spectre IV.14. Etallement 2 spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P3.

Les spectres RMN ^1H (Spectre IV. 12), COSY (Spectre IV. 15) et son étalement (Spectre IV. 16) permettent de visualiser les couplages entre les protons H-2' et H-6' qui résonnent sous forme de doublet avec une constante de couplage $J = 1,4$ Hz indiquant une position meta pour ces protons. Par ailleurs, sur les mêmes expériences on peut visualiser les couplages entre les protons H-5' et H-6' qui résonnent sous forme de doublet avec une constante de couplage $J = 7,5$ Hz, ce qui montre une position ortho pour ces deux protons.

Les deux signaux singulet désignant des protons aromatiques du cycle B résonant à $\delta_H = 6,62$ ppm (1H, s) et $\delta_H = 6,17$ ppm (1H, s), montrent l'absence de couplage de ces deux protons et une position para de ces deux protons.



Spectre IV.15. Spectre RMN COSY (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P3.



Spectre IV.16. Etalement 1 spectre RMN COSY (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P3.

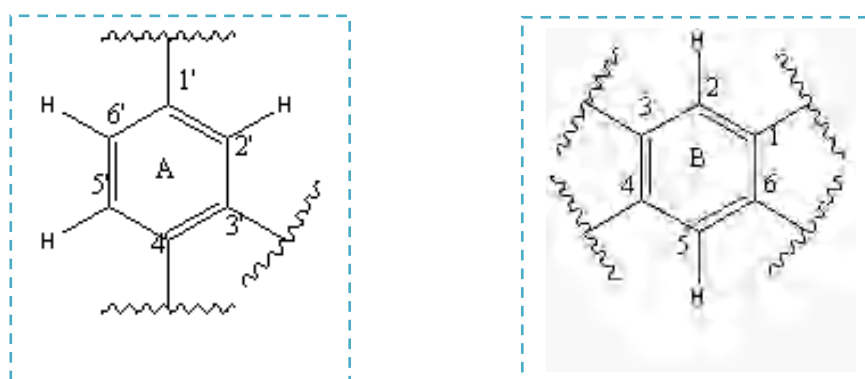
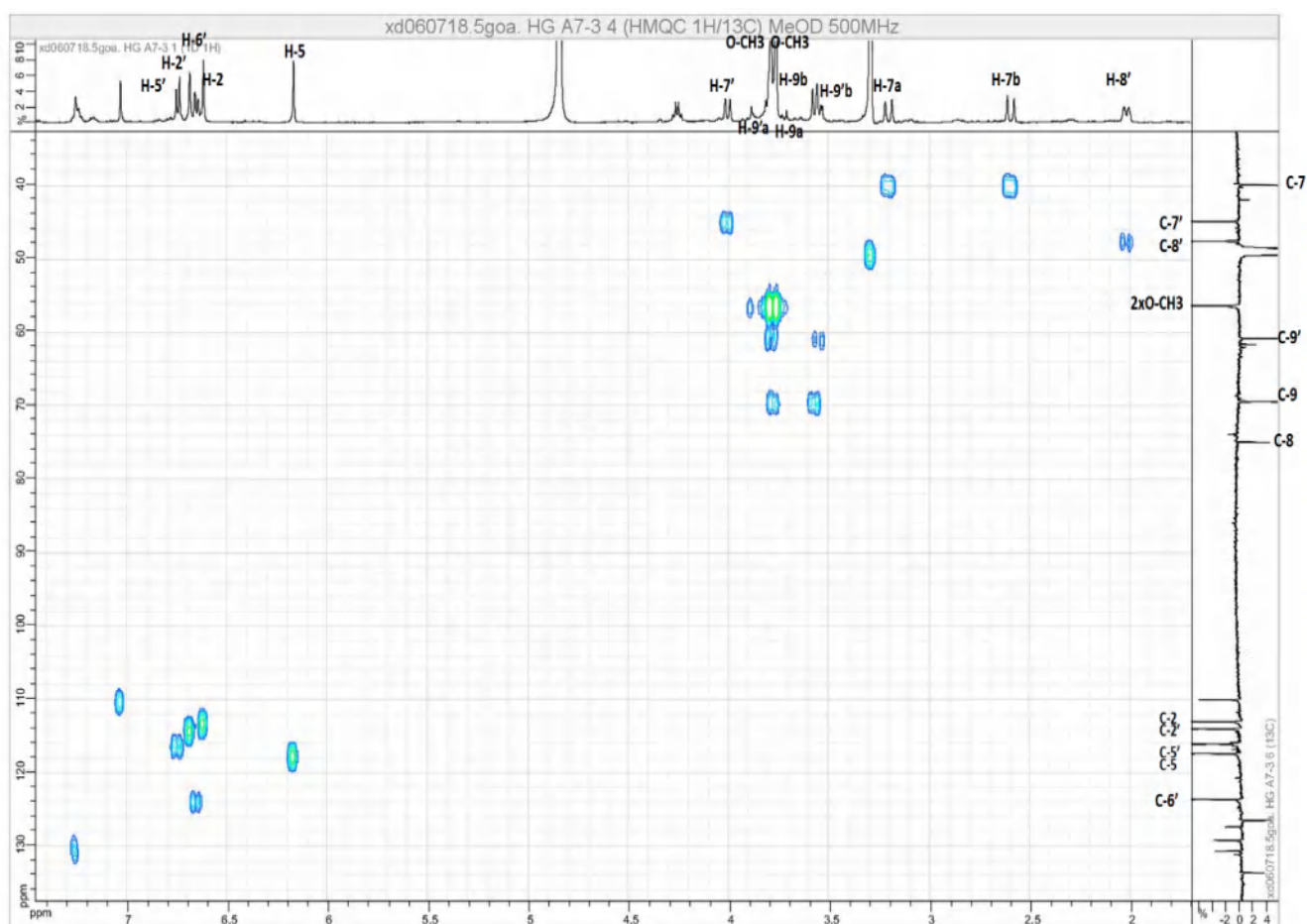
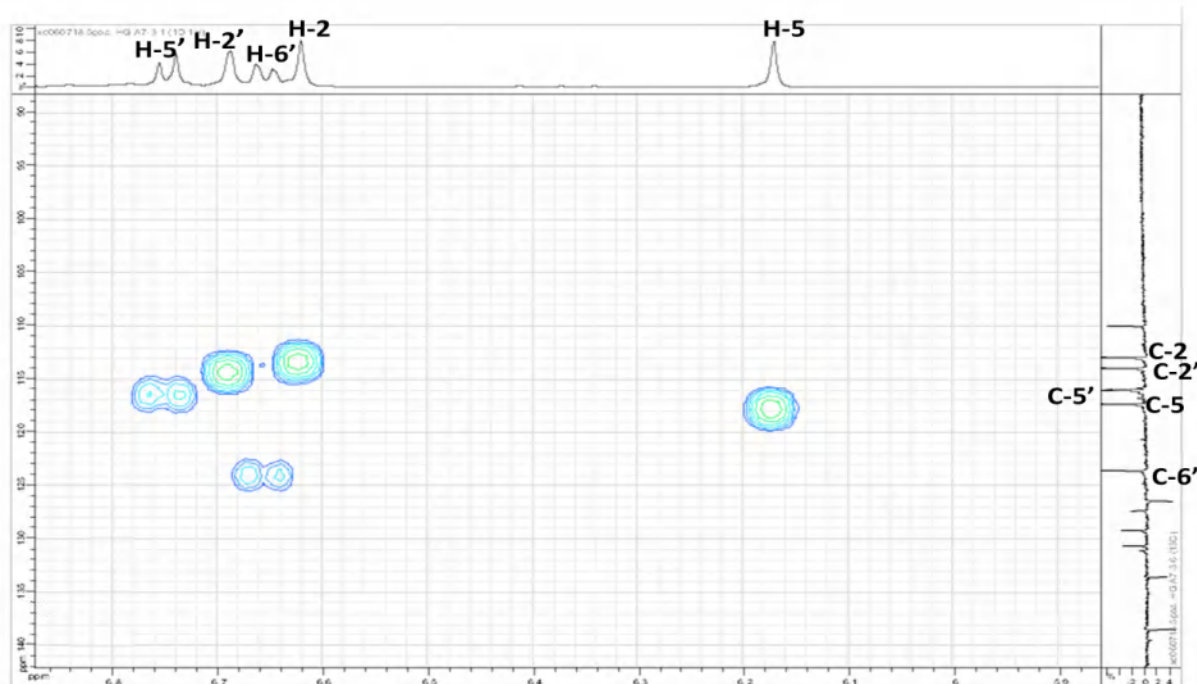


Figure IV.4. Cycles aromatiques A et B du composé P3.

Le spectre de l'expérience HMQC (Spectre IV. 17) et son étalement (Spectre IV. 18) permettant de localiser les noyaux des deux cycles A et B, C-5' ; C-2' ; C-6' et C-2 ; C-5 résonant à $\delta_C = 116,02$; $113,97$; $123,57$ ppm et $112,98$; $117,35$ ppm successivement.



Spectre IV.17. Spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P3.



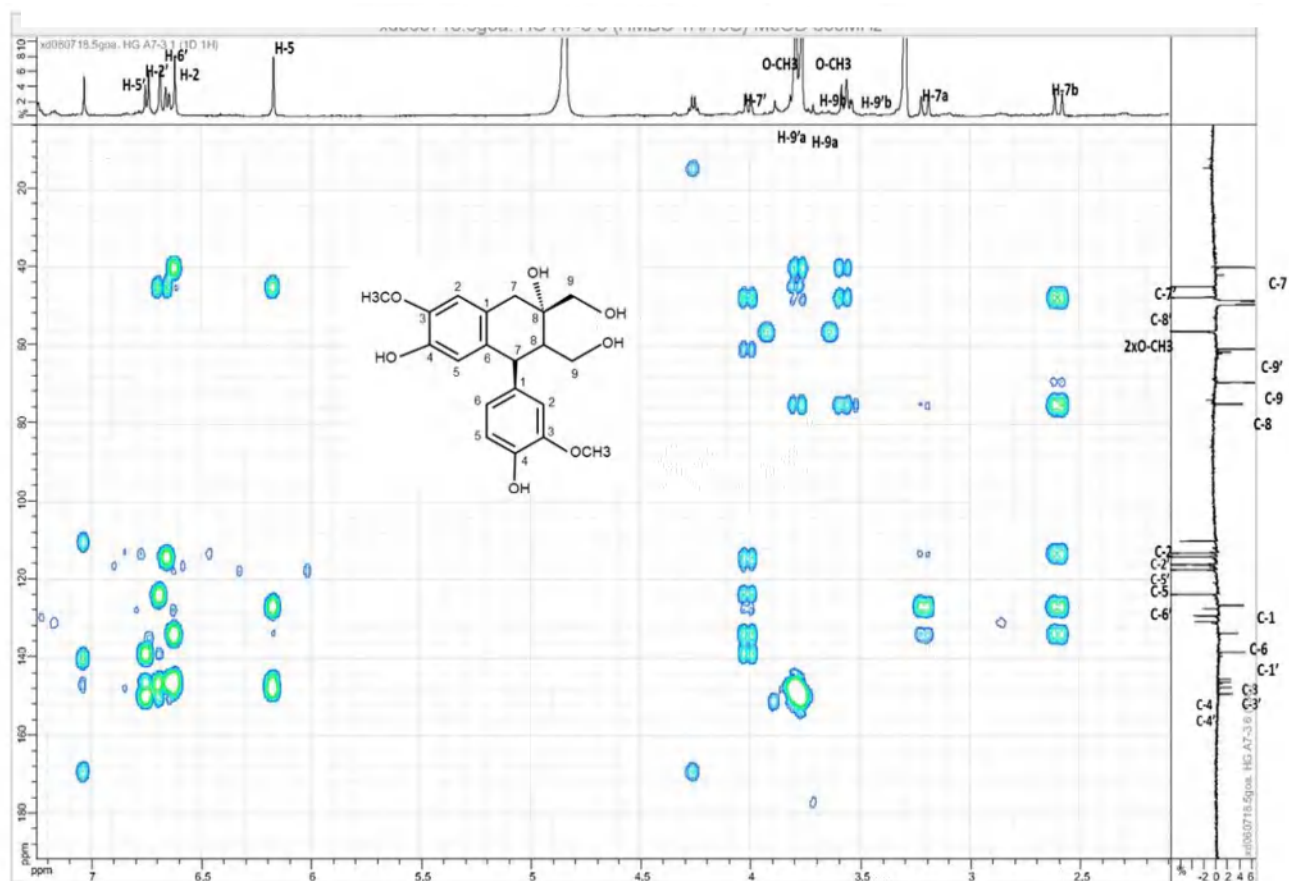
Spectre IV.18. Etalement 1 spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P3.

Le proton H-5' montre sur le spectre relatif à l'expérience HMBC une corrélation avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 138,49$ ppm attribuable à C-1' et une corrélation avec un carbone quaternaire hydroxylé à $\delta_C = 149,13$ ppm attribuable à C-4'.

Le proton H-2' montre sur le spectre HMBC une corrélation avec le carbone à $\delta_C = 123,57$ ppm attribuable à C-6' et une corrélation avec un carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 146,12$ ppm attribuable à C-3', tandis que le proton H-6' montre une corrélation à $\delta_C = 113,97$ ppm attribuable à C-2'.

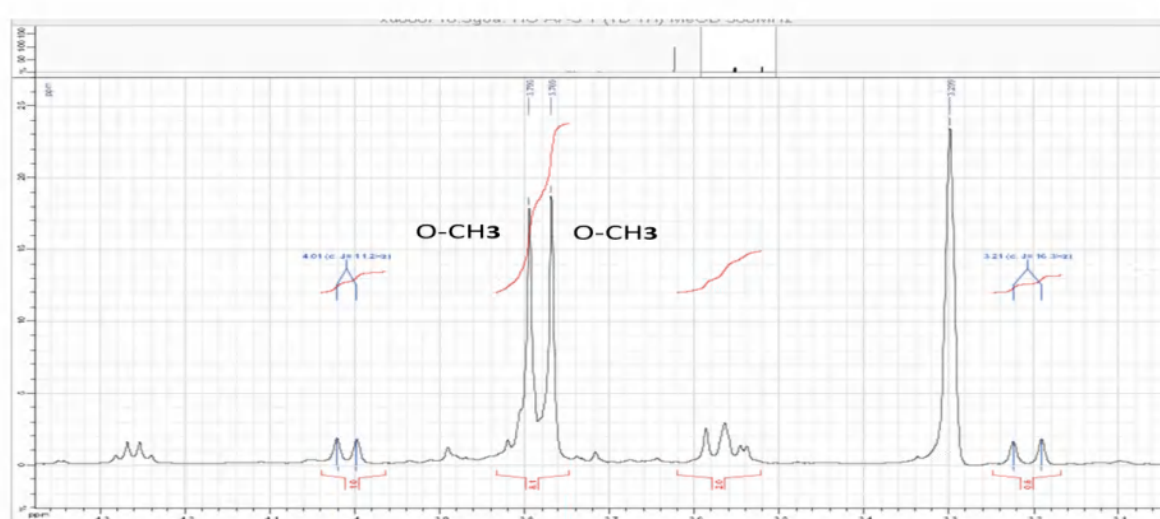
Le signal du proton aromatique pour le cycle B résonant à $\delta_H = 6,62$ ppm (1H, s) attribuable à H-5 montre sur spectre HMBC une corrélation avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 126,44$ ppm attribuable à C-1 et une corrélation avec un carbone quaternaire hydroxylé à $\delta_C = 147,50$ ppm attribuable à C-4.

Le proton H-2 résonant à $\delta_H = 6,17$ ppm (1H, s) montre sur le spectre HMBC une corrélation avec un carbone à $\delta_C = 133,57$ ppm attribuable à C-6 et une corrélation avec un carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 147,50$ ppm attribuable à C-4.



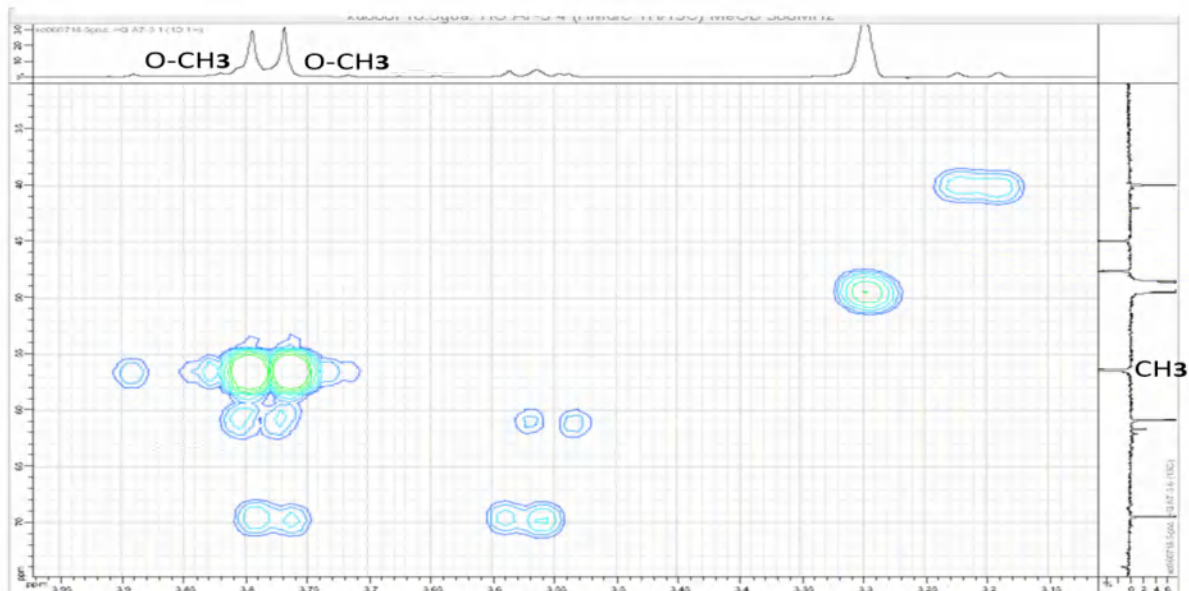
Spectre IV.19. Spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P3.

Le spectre RMN ¹H (Spectre IV. 12) et son étalement (Spectre IV. 20) montrent deux signaux sous forme de singulet d'intégration 3H chacun à $\delta_H = 3,77$ et 3,99 ppm attribuable à deux groupement méthoxyles.



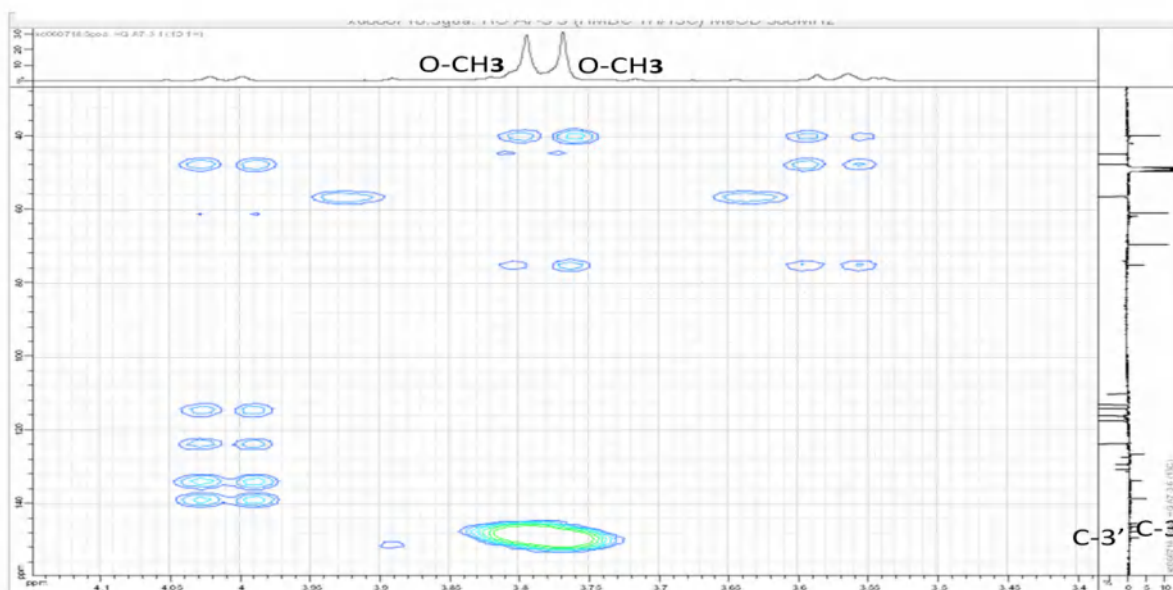
Spectre IV. 20. Etalement 3 spectre RMN ¹H (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P3.

Le spectre de l'expérience HMQC (Spectre IV. 17) et son étalement (Spectre IV.21) permettent de localiser les noyaux carbones des deux méthoxyles à $\delta_C = 56,40$ ppm, l'intensité de ce dernier indique l'existence de deux atomes de carbones superposés.



Spectre IV. 21. Étalement 2 spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P3.

Le spectre HMBC (Spectre IV. 19) et son étalement (Spectre IV. 22) permet de localiser la position des méthoxy sur les deux cycles aromatique A et B, les corrélations entre les protons des méthoxy résonant à $\delta_H = 3,77$ ppm et $3,79$ ppm avec les carbones C-3 et C-3'.



Spectre IV.22. Étalement 1 spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P3.

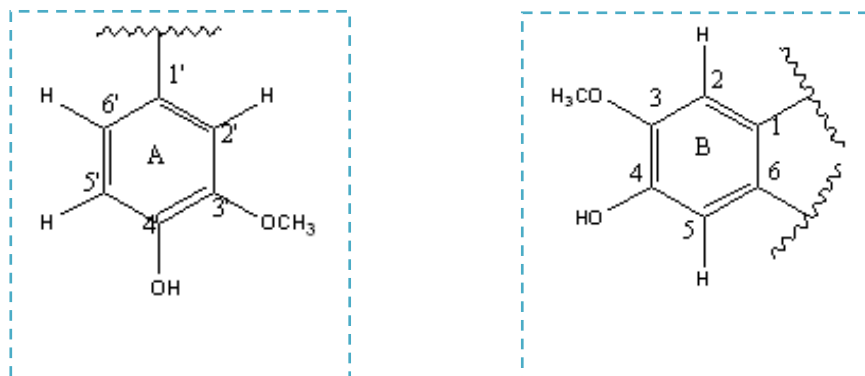
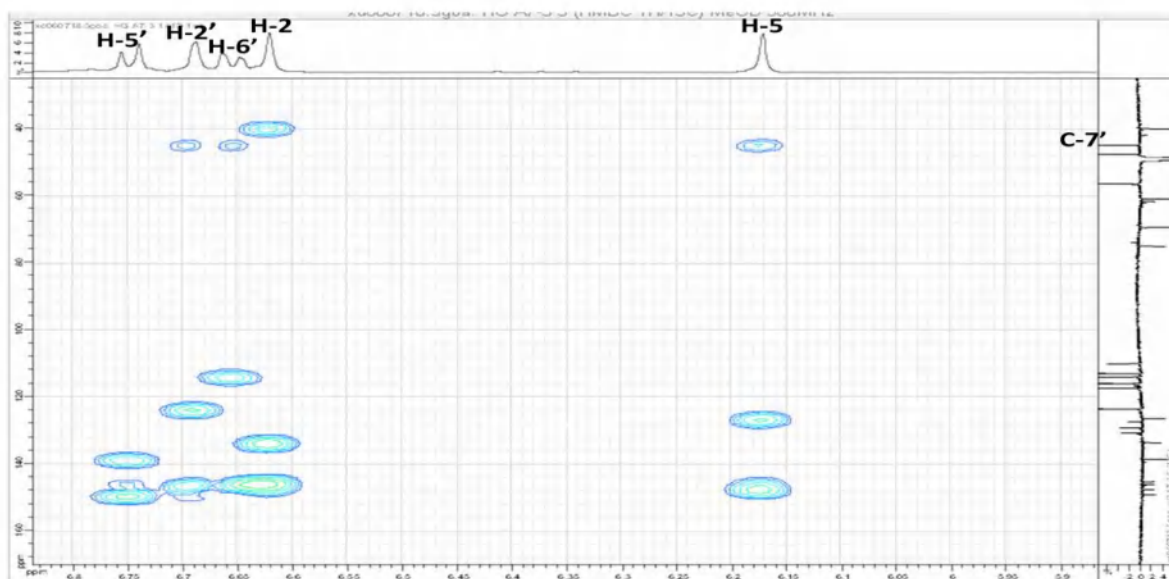


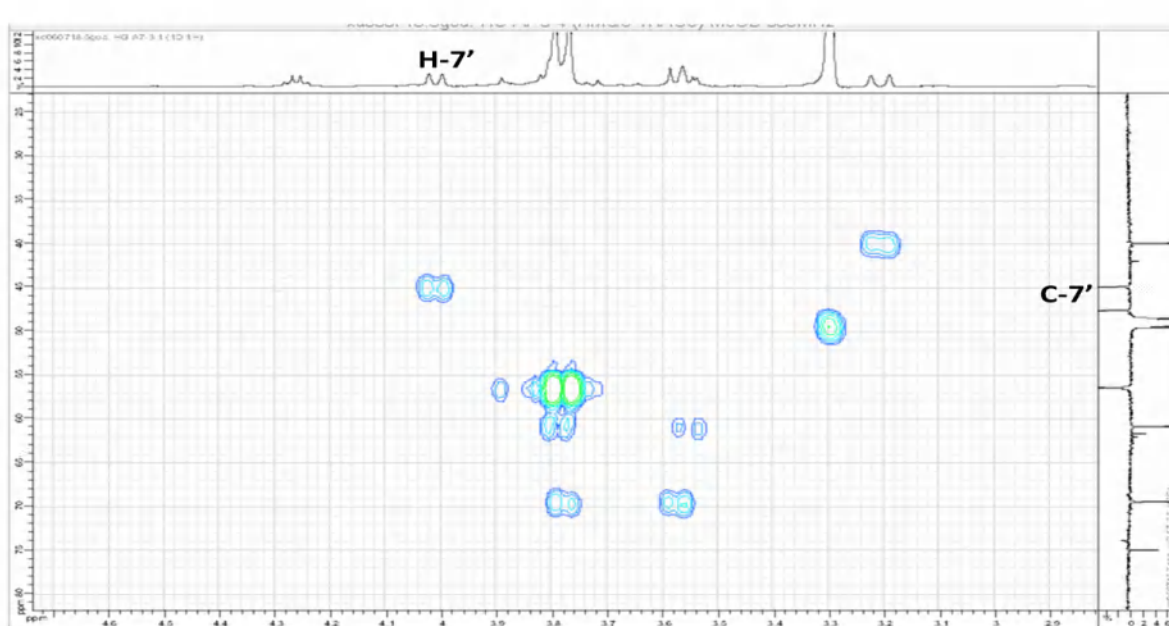
Figure IV.5. Cycles aromatiques A et B du composé P3.

Sur le spectre relative à l'expérience HMBC (Spectre IV. 19) et son étalement (Spectre IV. 23), les protons H-6' et H-2' montrent une corrélation avec un carbone aliphatique résonant à $\delta_C = 44,91$ ppm, attribuable à C-7'.

Ce carbone aliphatique montre sur le spectre HMQC (Spectre IV. 24) une corrélation avec le proton résonant à $\delta_H = 4,01$ ppm attribuable à H-7'.



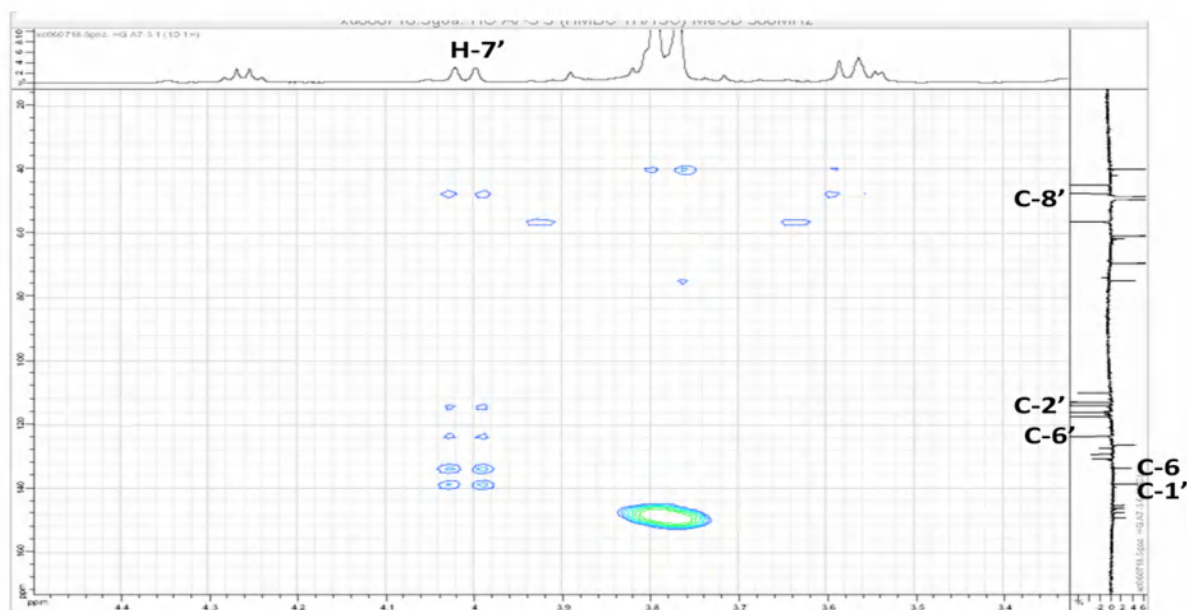
Spectre IV. 23. Etalement 2 spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P3.



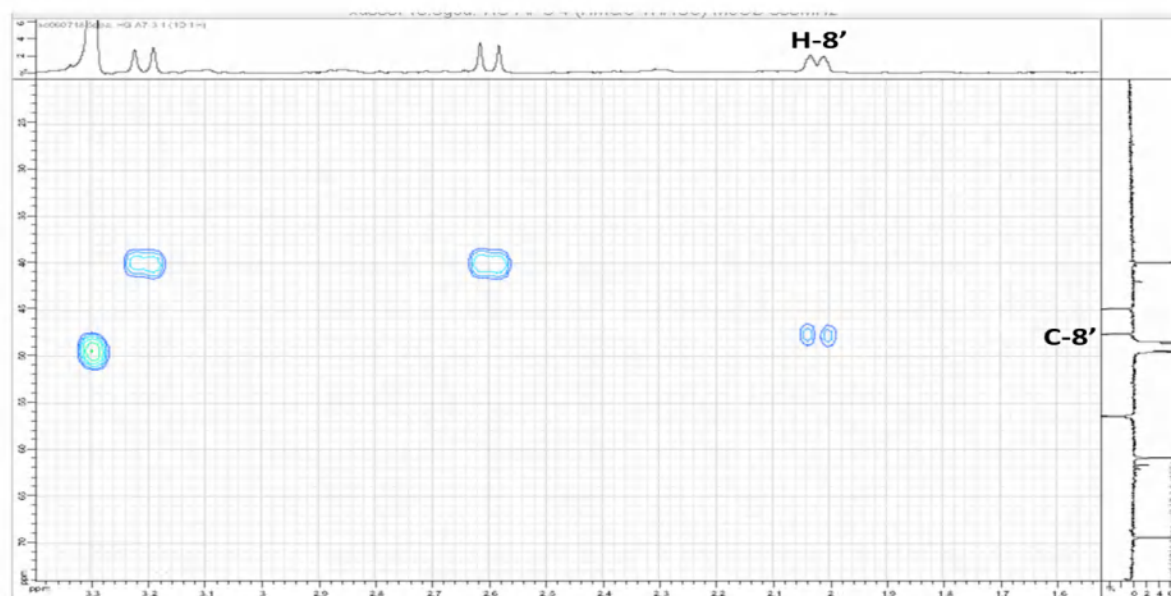
Spectre IV. 24. Etalement 3 spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P3.

Le doublet d'intégration 1H résonant à $\delta_H = 4,01$ ppm attribuable à H-7' montre sur le spectre HMBC (Spectre IV. 25) une corrélation avec un carbone aliphatique résonant à $\delta_C = 47,60$ ppm attribuable à C-8', ce carbone aliphatique montre sur le spectre HMQC (Spectre IV. 26) une corrélation avec le proton résonant à $\delta_H = 2,02$ ppm.

Le proton H-7' montre aussi sur le spectre HMBC des corrélations avec les noyaux C-2', C-6' et C-1' à $\delta_C = 113,97$; 123,57 et 138,49 ppm successivement ce qui confirme son attachement au cycle A. Sur le même spectre le proton H-7' montre une corrélation avec un carbone quaternaire aromatique à $\delta_C = 133,57$ ppm attribuable à C-6 ce qui indique son attachement au carbone quaternaire du cycle B.



Spectre IV.25. Etalement 3 spectre RMN HMBC (MeOH- d_4 , 500 MHz, δ ppm) du composé P3.



Spectre IV. 26. Etalement 4 spectre RMN HMBC (MeOH- d_4 , 500 MHz, δ ppm) du composé P3.

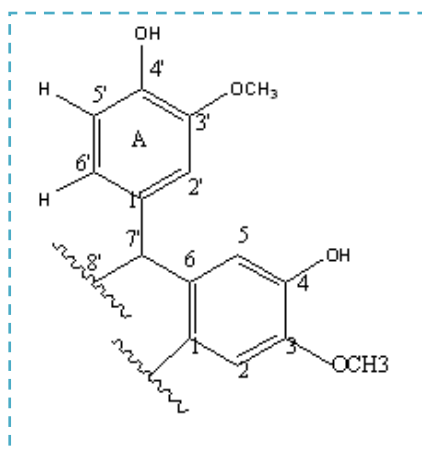
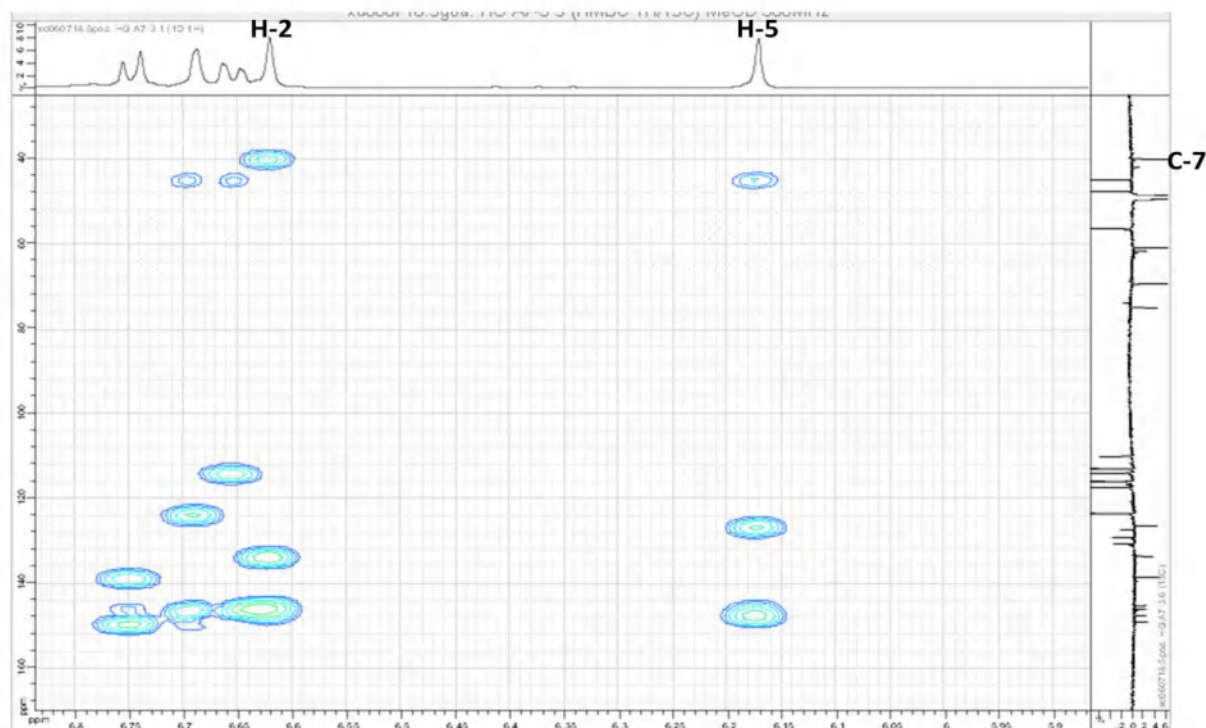
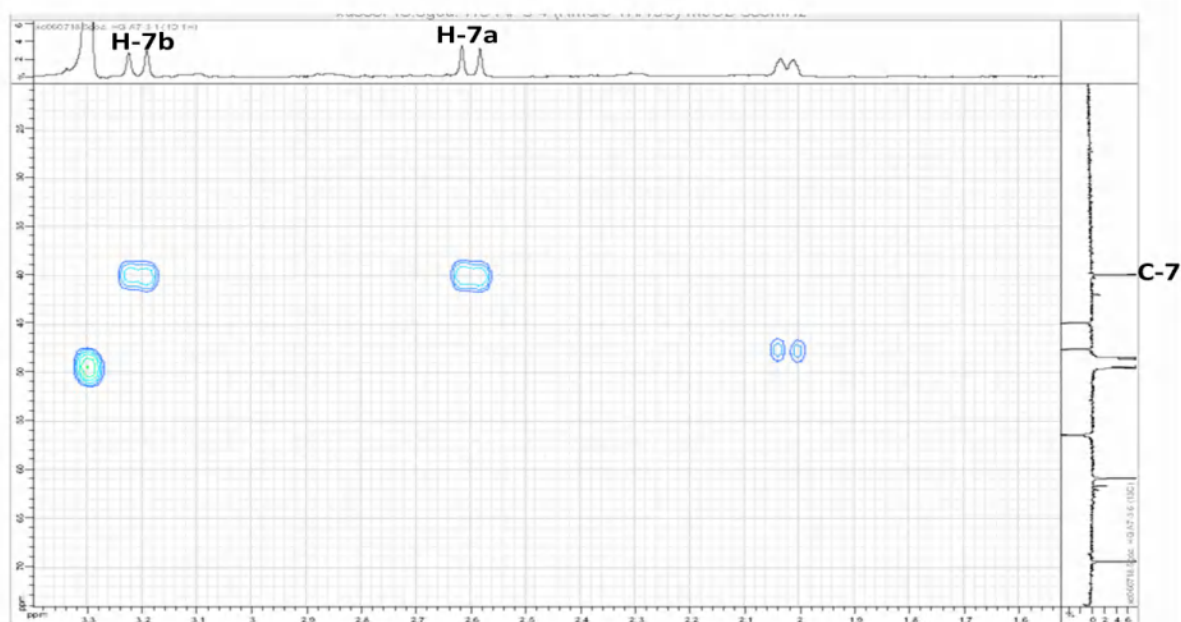


Figure IV.6. Structure partielle du composé P3.

Le proton H-2 montre sur le spectre HMBC (Spectre IV. 27) une corrélation avec un carbone C-H₂ résonant à $\delta_C = 39,93$ ppm, ce carbone montre sur le spectre HMQC (Spectre IV. 28) une corrélation avec deux protons géminés non équivalents résonant à $\delta_H = 2,60$ ppm et 3,20 ppm ($J = 16,3$ Hz) attribuable à H-7b et H-7a successivement.



Spectre IV.27. Etallement 4 spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P3.

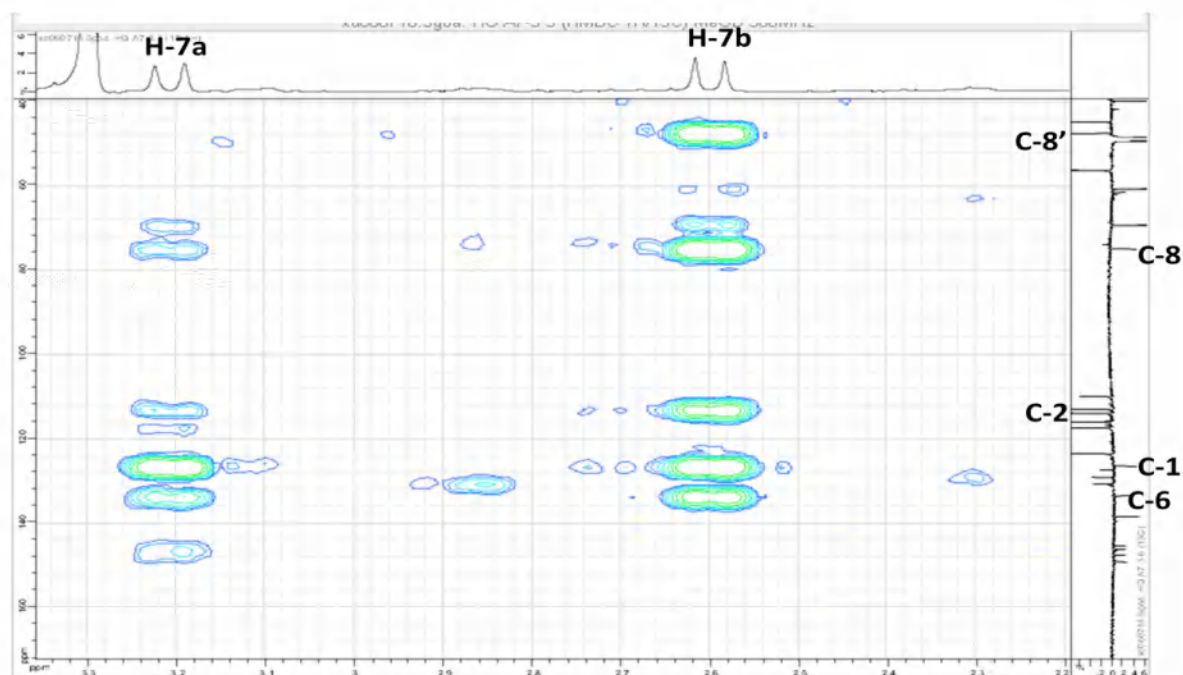


Spectre IV.28. Etalement 5 spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P3.

Les deux protons résonant à $\delta_H = 2,60$ ppm et $3,20$ ppm attribuable à H-7b et H-7a montrant une corrélation sur spectre HMBC (Spectre IV. 29) avec le noyau C-1 à $\delta_C = 126,44$ ppm, indiquant l'attachement des deux protons H-7b et H-7a porté par le carbone C-7 résonant à $\delta_C = 39,93$ ppm au carbone C-1 du cycle B.

Le spectre HMBC montre aussi des corrélations entre le H-7b avec les noyaux C-2 et C-6 résonant à $\delta_C = 112,98$ ppm et $133,57$ ppm respectivement ce qui confirme l'attachement des deux protons H-7 portés par le carbone C-7 au cycle B.

Sur le même spectre HMBC, le H-7b montre des corrélations avec un carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 74,96$ ppm attribuable à C-8 et avec le carbone C-8' à $\delta_C = 47,60$ ppm.



Spectre IV.29. Etalement 5 spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P3.

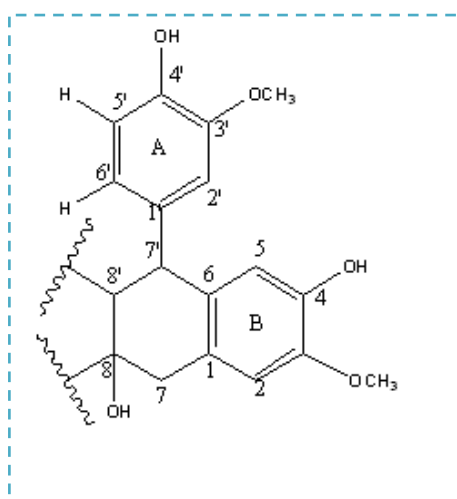


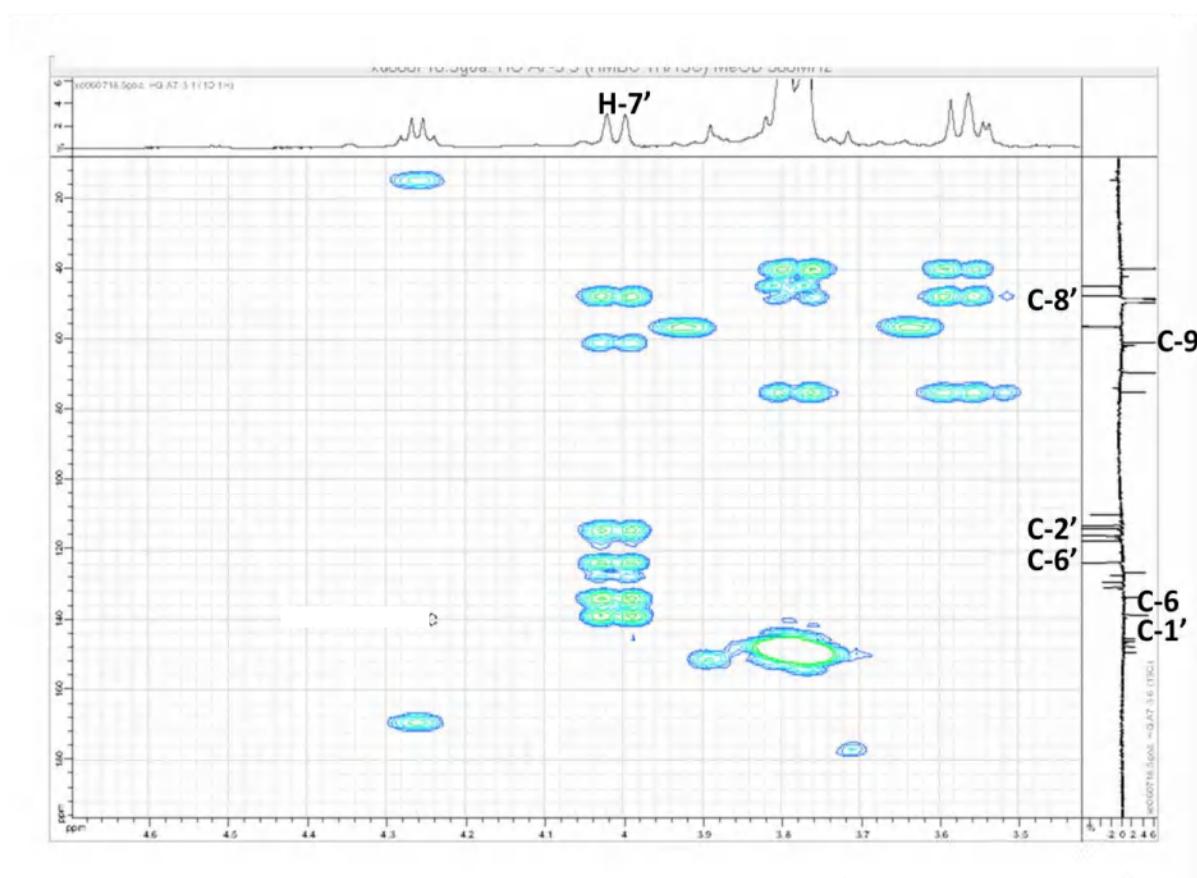
Figure IV.7. Structure partielle du composé P3.

Le proton aliphatique H-7' résonant à $\delta_H = 4,01$ ppm montre sur le spectre de l'expérience HMBC (Spectre IV. 30) une corrélation avec un carbone C-H₂ hydroxylé résonant à $\delta_C = 60,85$ ppm attribuable à C-9', ce carbone montre sur le spectre HMQC (Spectre IV. 32) une

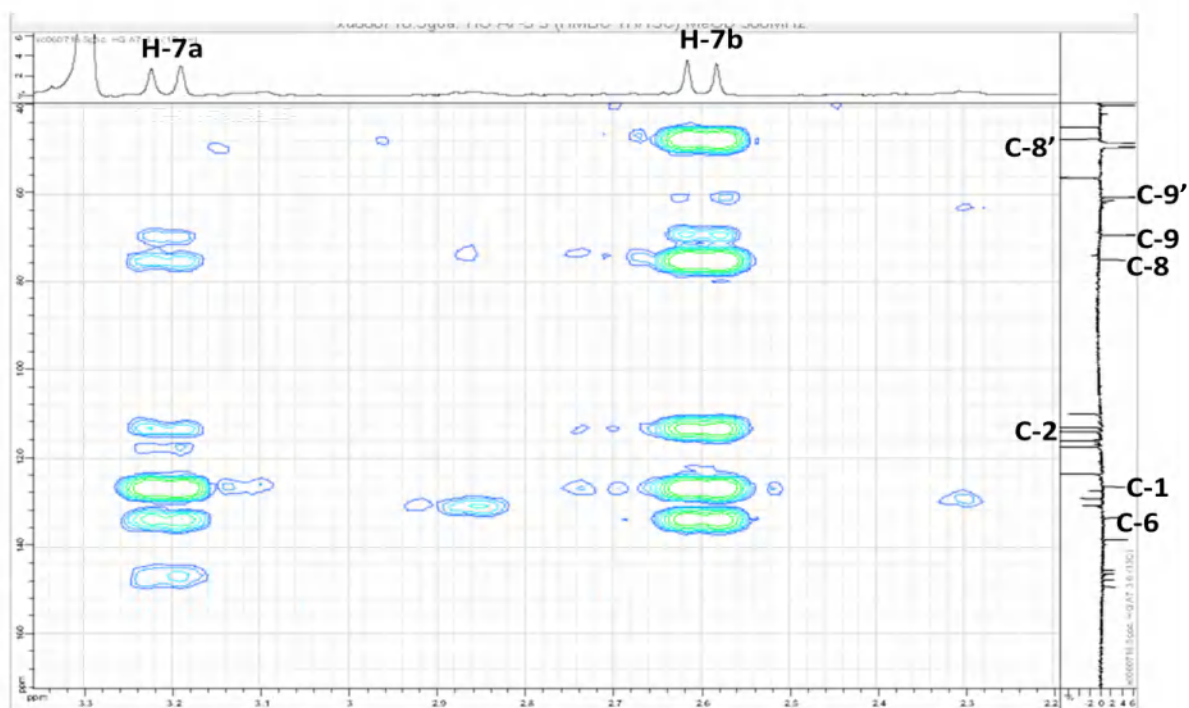
corrélation avec deux protons sous forme d'un singulet chacun résonant à $\delta_H = 3,79$ ppm et 3,55 ppm attribuable à H-9'a et H-9'b successivement.

Le spectre HMBC (Spectre IV. 31) montre aussi des corrélations entre le H-7b avec deux noyaux résonant à $\delta_C = 60,85$ ppm et 69,43 ppm attribuable à C-9' et C-9 respectivement, la tache de corrélation entre H-7b et C-9' est de type J^4 alors celle avec C-9 est J^3 .

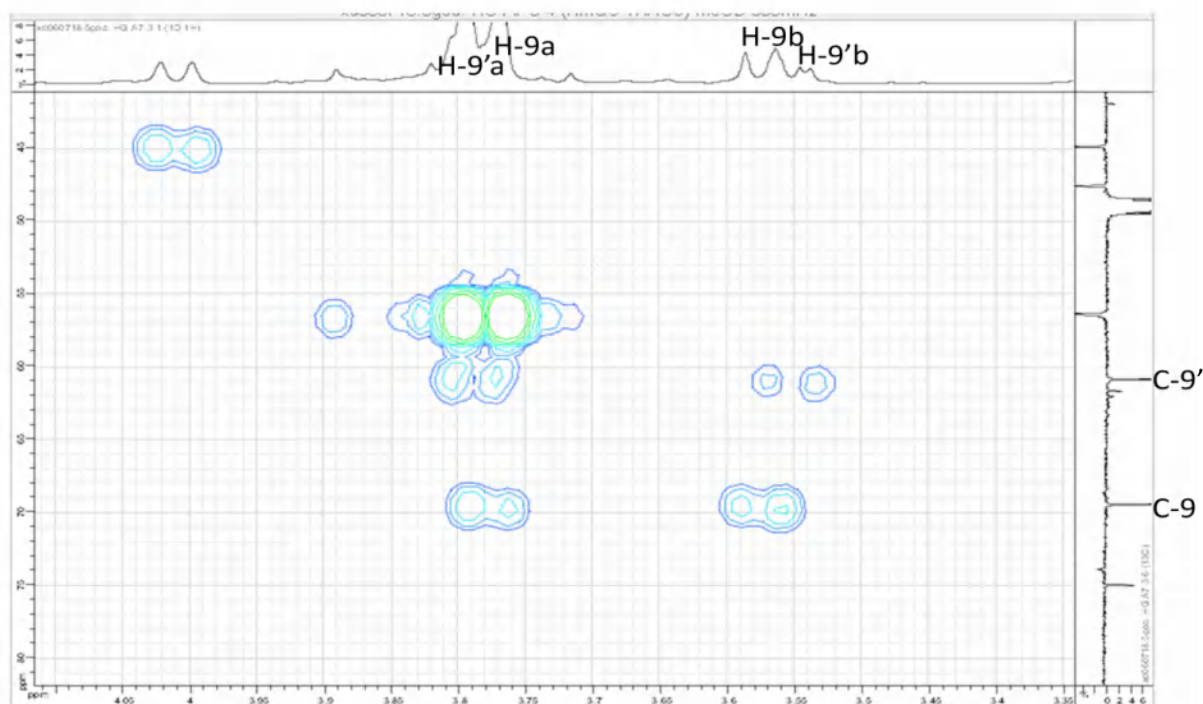
Le carbone C-9 montre sur le spectre HMQC (Spectre IV. 32) une corrélation avec deux protons sous forme d'un singulet chacun résonant à $\delta_H = 3,78$ ppm et 3,57 ppm attribuable à H-9a et H-9b successivement.



Spectre IV. 30. Etalement 6 spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P3.



Spectre IV. 31. Etalement 7 spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P3.



Spectre IV. 32. Etalement 6 spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P3.

L'ensemble de ces données mènent à la structure suivante :

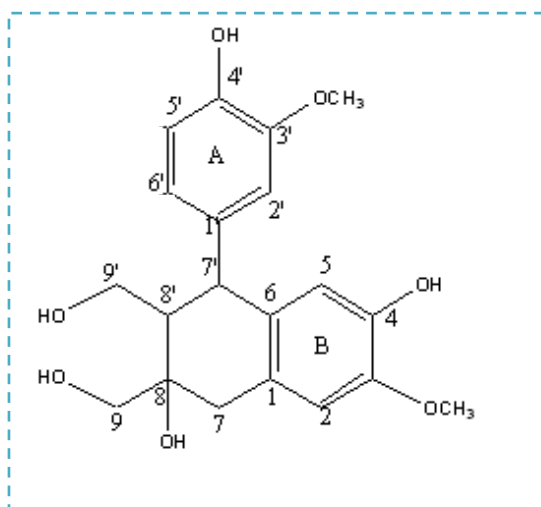
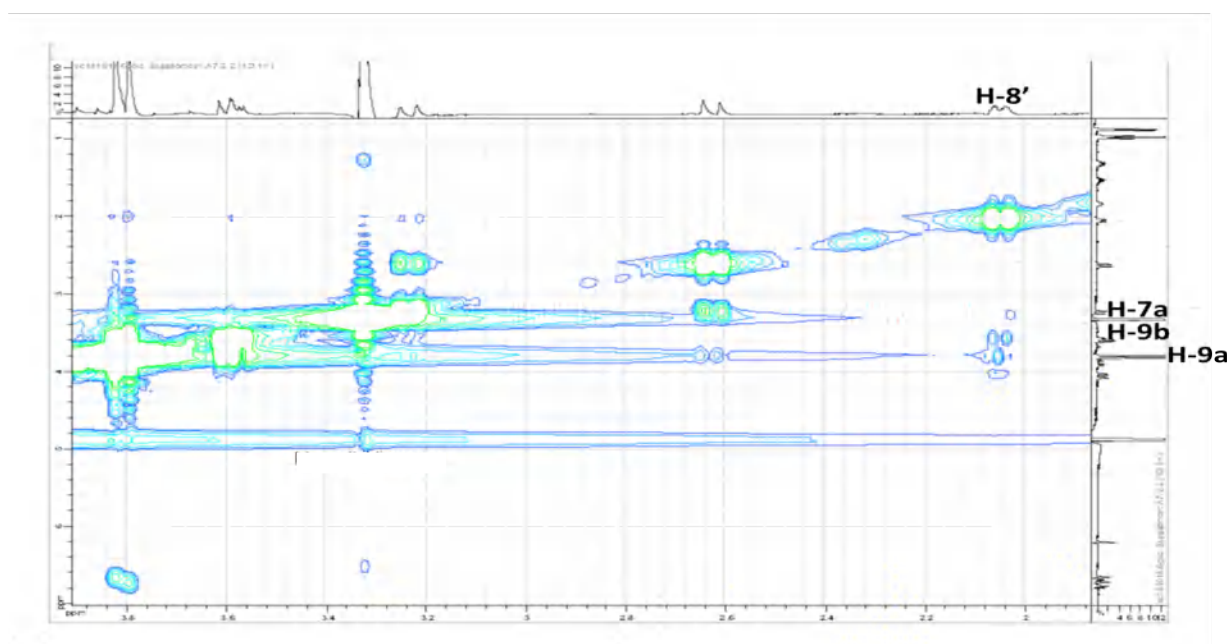


Figure IV.8. Structure plane du composé P3.

La constante de couplage des protons vicinaux H-7' et H-8' est égale à 11Hz ($J = 11\text{Hz}$), ce qui indique un couplage trans, c'est à dire une orientation axiale des deux protons. Une orientation axiale pour H-8' donne une configuration β pour ce dernier, une configuration α pour le H-7', ainsi une configuration β pour le cycle aromatique A et une configuration α pour 9'-CH₂OH.

Le spectre ROESY montre une corrélation dipolaire entre H-8' et (H-9a ; H-9b), ce qui indique que le 9-CH₂OH est en configuration β et 8-COH est en configuration α .



Spectre IV. 33. Spectre RMN ROESY (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P3.

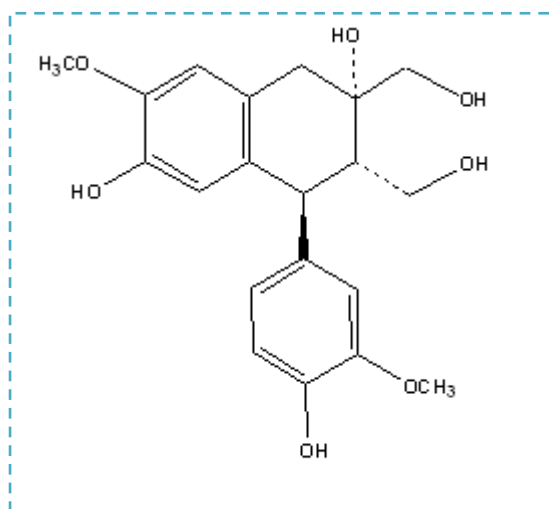
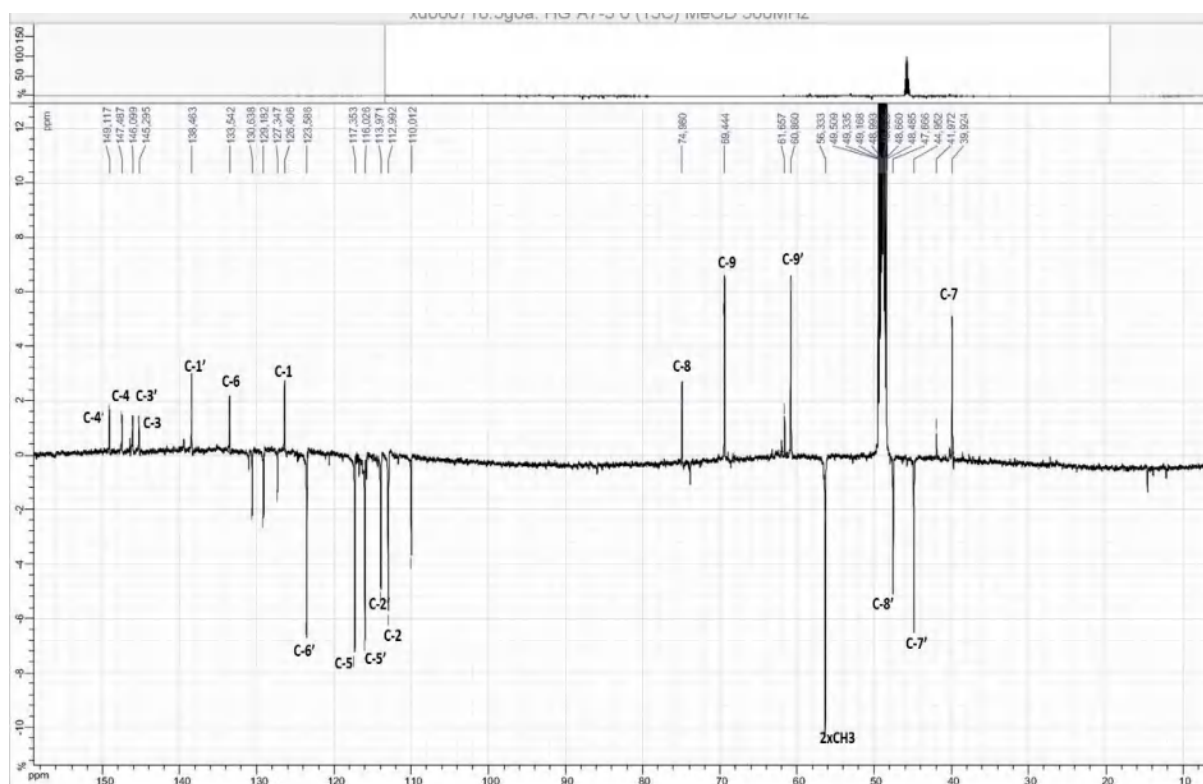


Figure IV.9. Structure du Cyclooolivil P 3.

Spectre IV. 33. Spectre RMN J-mode (MeOH-d₄, 125 MHz, δ ppm) du composé P3.

Toutes ces données sont en faveur d'une structure d'un lignane aryltétraline.

L'ensemble de ces données mènent à la structure de cyclooolivil [3].

Les données relatives aux analyses des spectres de RMN ^1H et ^{13}C J-modulé de ce composé sont reportées dans le tableau IV.3.

Tableau IV.3. Données de la spectroscopie de RMN ^1H et ^{13}C J-modulé du composé P3.

3		
	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
1	126,44	-
2	112,98	6,62 (1H, s)
3	145,32	-
4	147,50	-
5	117,35	6,17 (1H, s)
6	133,57	-
7-a	39,93	3,20 (1H, d, 16,3)
7-b	39,93	2,60 (1H, d, 16,3)
8	74,96	-
9-a	69,43	3,78 (1H, s)
9-b	69,43	3,57 (1H, s)
1'	138,49	-
2'	113,97	6,69 (1H, s large)
3'	146,12	-
4'	149,13	-
5'	116,02	6,75 (1H, d, 7,5)
6'	123,57	6,65 (1H, dd, 7,5 ; 1,4)
7'	44,91	4,01 (1H, d, 11,0)
8'	47,60	2,02 (1H, dt, 11,0 ; 2,7 Hz)
9'-a	60,85	3,79 (1H, s)
9'-b	60,85	3,55 (1H, s)
3-O-CH ₃	56,40	3,77 (3H, s)
3'-O-CH ₃	56,40	3,79 (3H, s)

IV. 1. 4. Elucidation structurale du composé P4 issu de la fraction F9

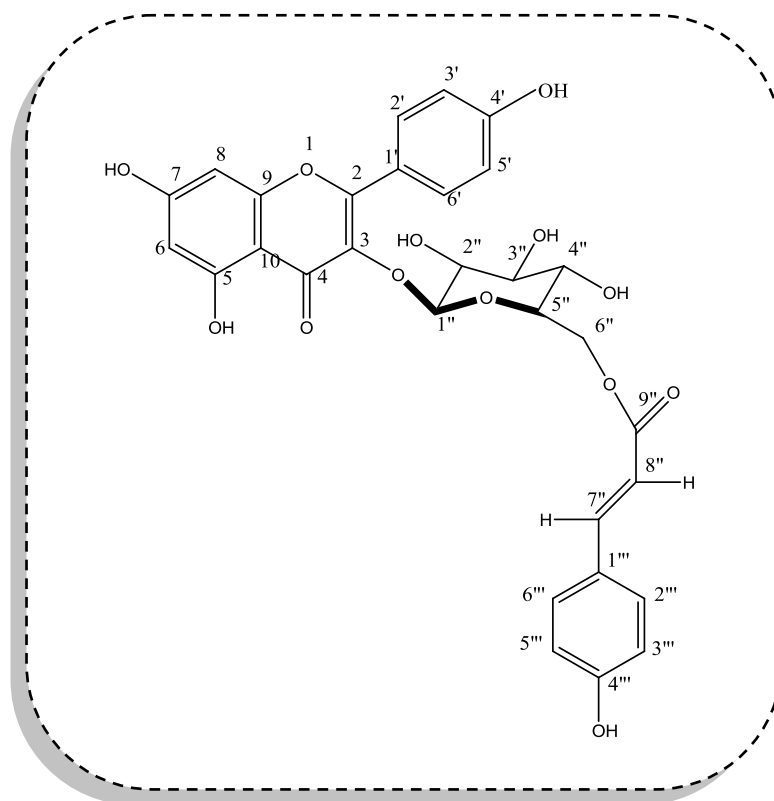


Figure IV.10. Structure du Trans-tiliroside P 4.

Ce produit a été isolé à partir de la fraction **F9** (CHCl₃/ MeOH, 94:6 v/v), par purification d'un précipité jaune sur des plaques préparatives de gel de silice (CHCl₃/MeOH, 8:2 v/v) pour donner de trans-tiliroside **P4**.

L'examen des spectres RMN ¹H (Spectre IV. 34) est son étalement (Spectre IV. 35) montrent des signaux caractéristiques d'un flavonoïde :

- Deux signaux sous forme de doublet d'intégration 1H chacun l'un à $\delta_H = 6,15$ ppm et l'autre à $\delta_H = 6,33$ ppm avec une constante de couplage ($J = 2,5$ Hz) attribuables à H-6 et H-8 successivement.
- Deux doublets intégrant chacun pour 2H à $\delta_H 6,82$ ppm ($J = 8,9$ Hz) et $\delta_H 8,01$ ppm ($J = 8,9$ Hz) attribuables respectivement aux protons H -3', H-5' et H-2', H-6' du cycle B du noyau flavonique.

- Un doublet intégrant pour 1H à δ_H 5,27 ppm ($J = 7$ Hz) caractéristique du proton anomérique de l'hexose.
- Deux doublets intégrant chacun pour 2H à δ_H 7,33 ppm ($J = 8,6$ Hz) et δ_H 6,84 ppm ($J = 8,6$ Hz) indiquant la présence d'un cycle aromatique d'un système A_2B_2 où les protons sont symétriques H-2''', H-6''' ; H-3''' , H-5'''.
- Deux doublets intégrant chacun pour 1H à δ_H 6,09 ppm ($J = 15,4$ Hz) et δ_H 7,42 ppm ($J = 15,4$ Hz) indiquant la présence d'une configuration géométrique trans de deux protons oléfiniques.

Les données relatives à la RMN 1H sont reportées sur le tableau (Tableau IV.4).

Les signaux observés sur le spectre RMN 1H (Spectre IV. 33) révèlent deux signaux sous forme de doublet d'intégration 1H chacun sont attribués aux protons H-6 à $\delta_H = 6,15$ ppm ($J = 2,5$ Hz) et H-8 à $\delta_H = 6,33$ ppm ($J = 2,5$ Hz) du cycle A du noyau flavonique, ainsi que deux doublets intégrant chacun pour 2H à δ_H 6,82 ppm ($J = 8,9$ Hz) et δ_H 8,01 ppm ($J = 8,9$ Hz) attribuables respectivement aux protons H -3', H-5' et H-2', H-6' du cycle B. Les valeurs des constantes de couplages et les résultats du spectre COSY suggèrent la présence d'un aglycone de type Kaempférol.

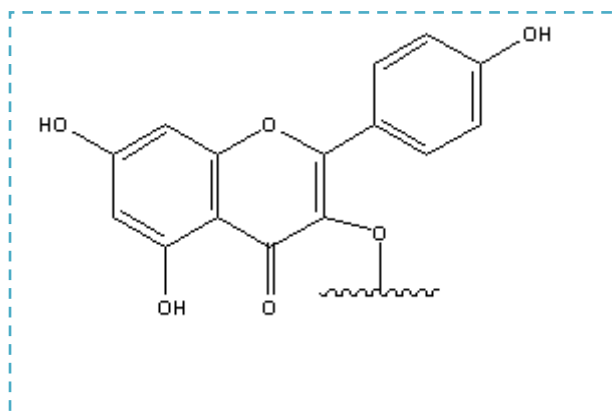
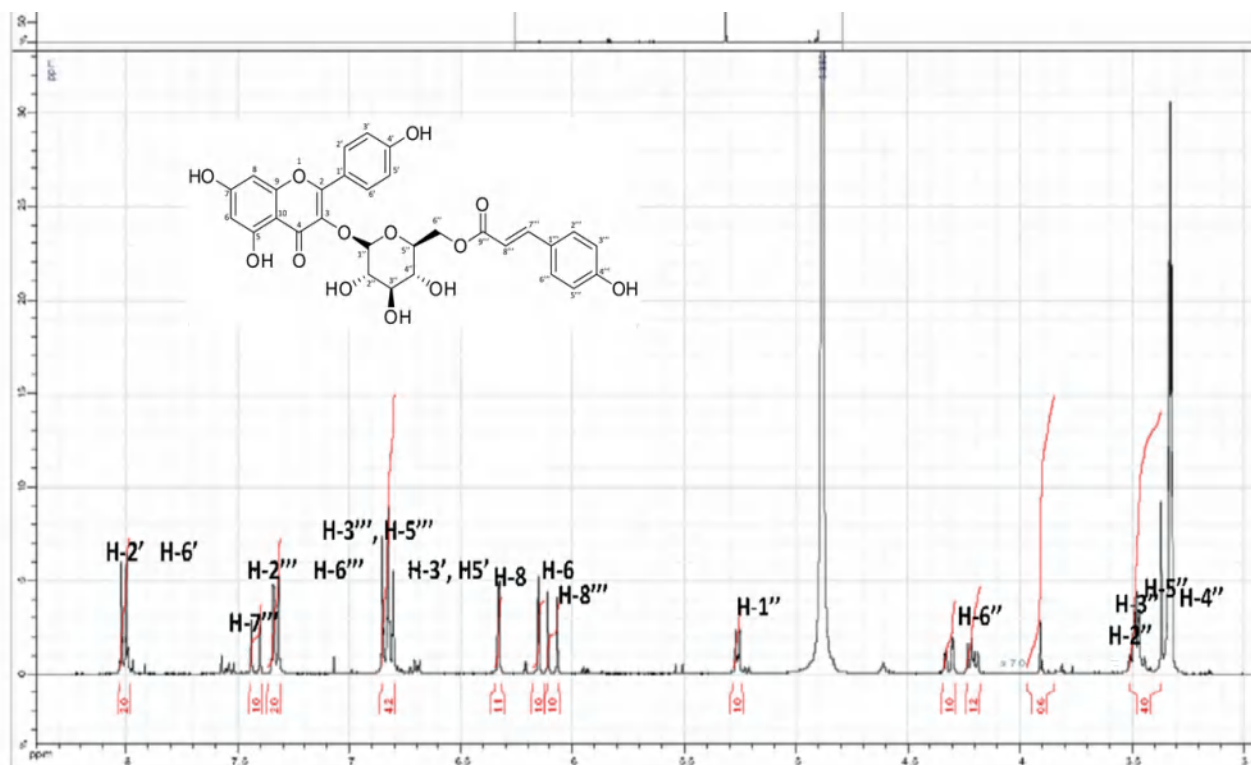
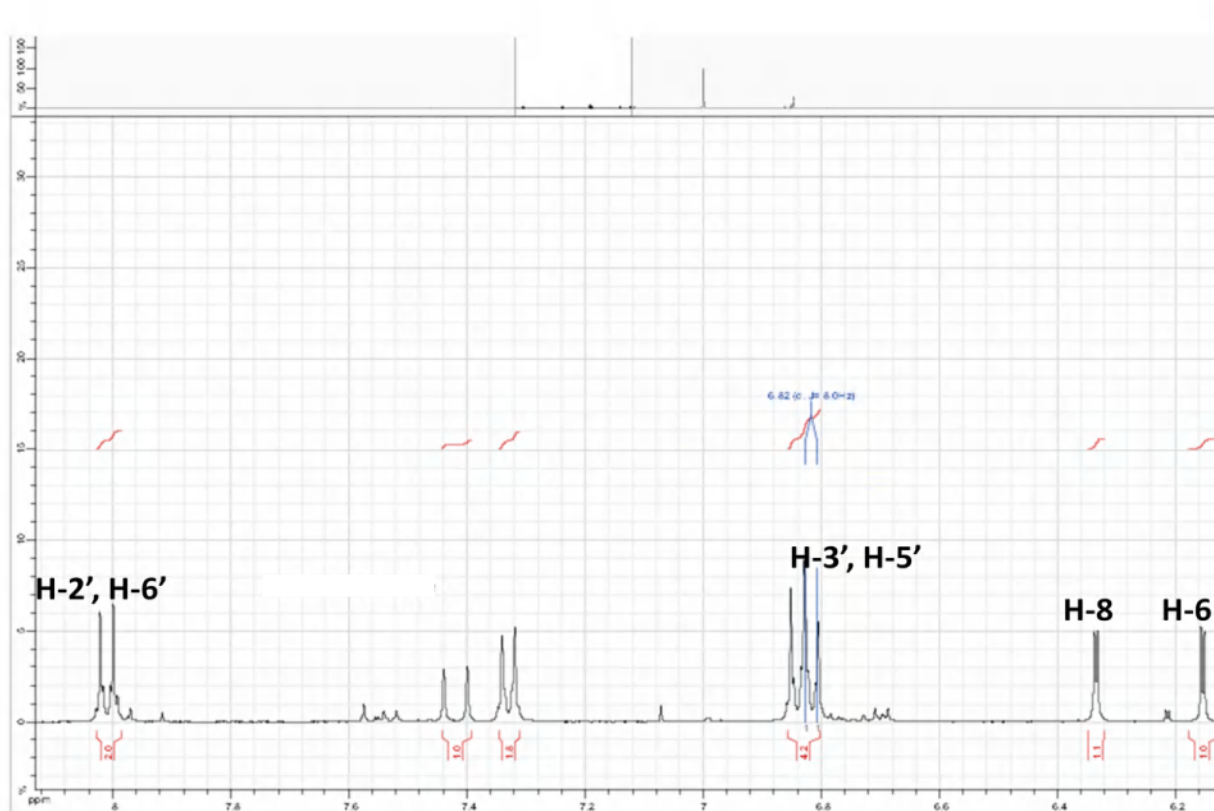


Figure IV.11. Structure d'un aglycone de type Kaempférol.

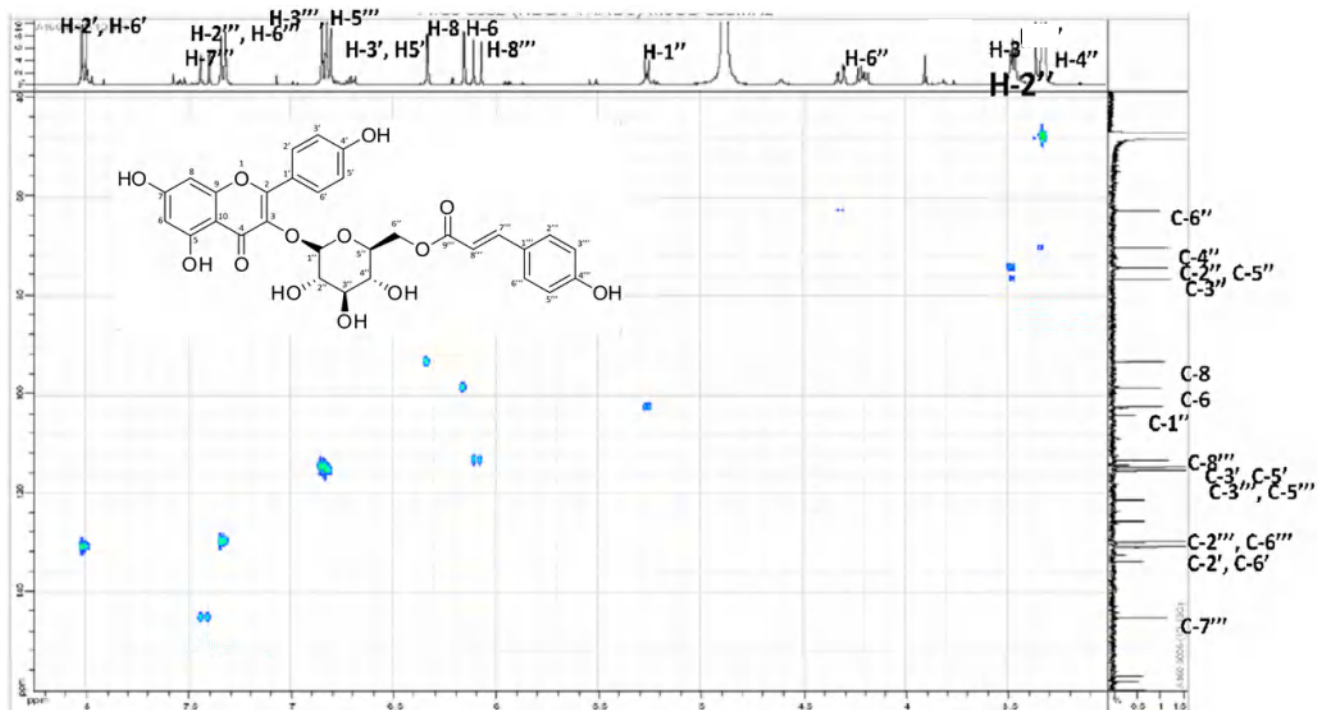


Spectre IV. 34. Spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz, δ ppm) du composé P4

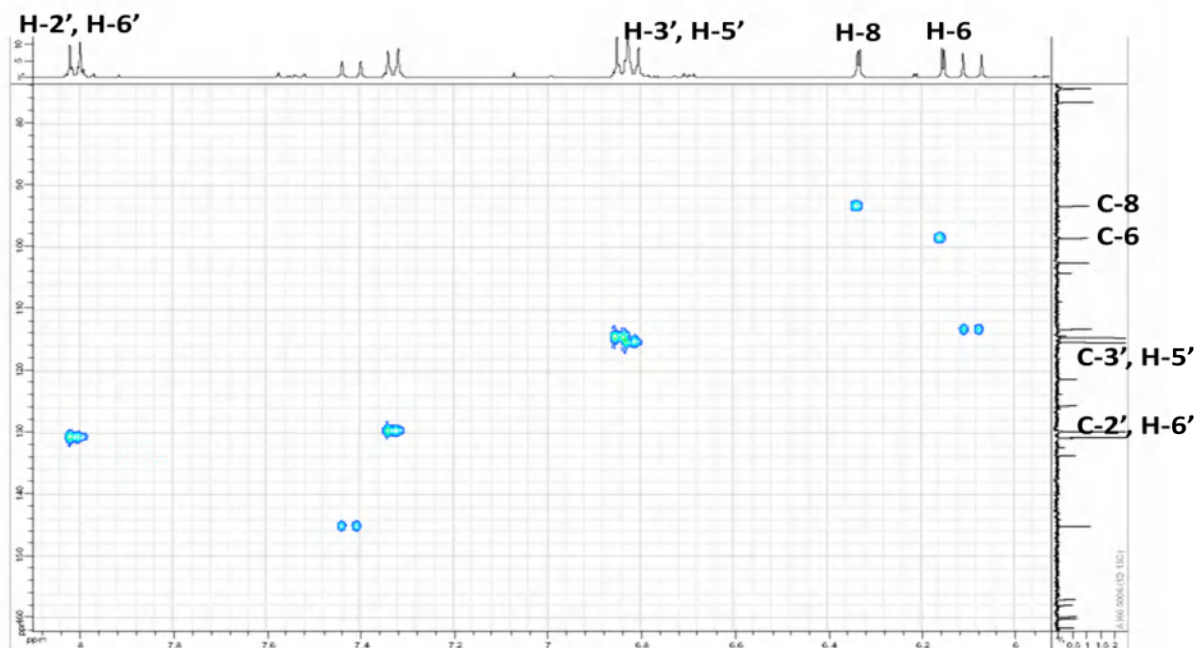


Spectre IV.35. Etalement 1 spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz, δ ppm) du composé P4

Le spectre RMN de l'expérience HMQC (Spectre IV. 36) et son étalement (Spectre IV. 37) permettent de localiser les noyaux du cycle flavonique A et B, C-6, C-8 et C-2', C-6' et C-3', C-5' à δ_C (98,58 ; 93,41 ; 130,81 ; 114,64 ppm) respectivement.



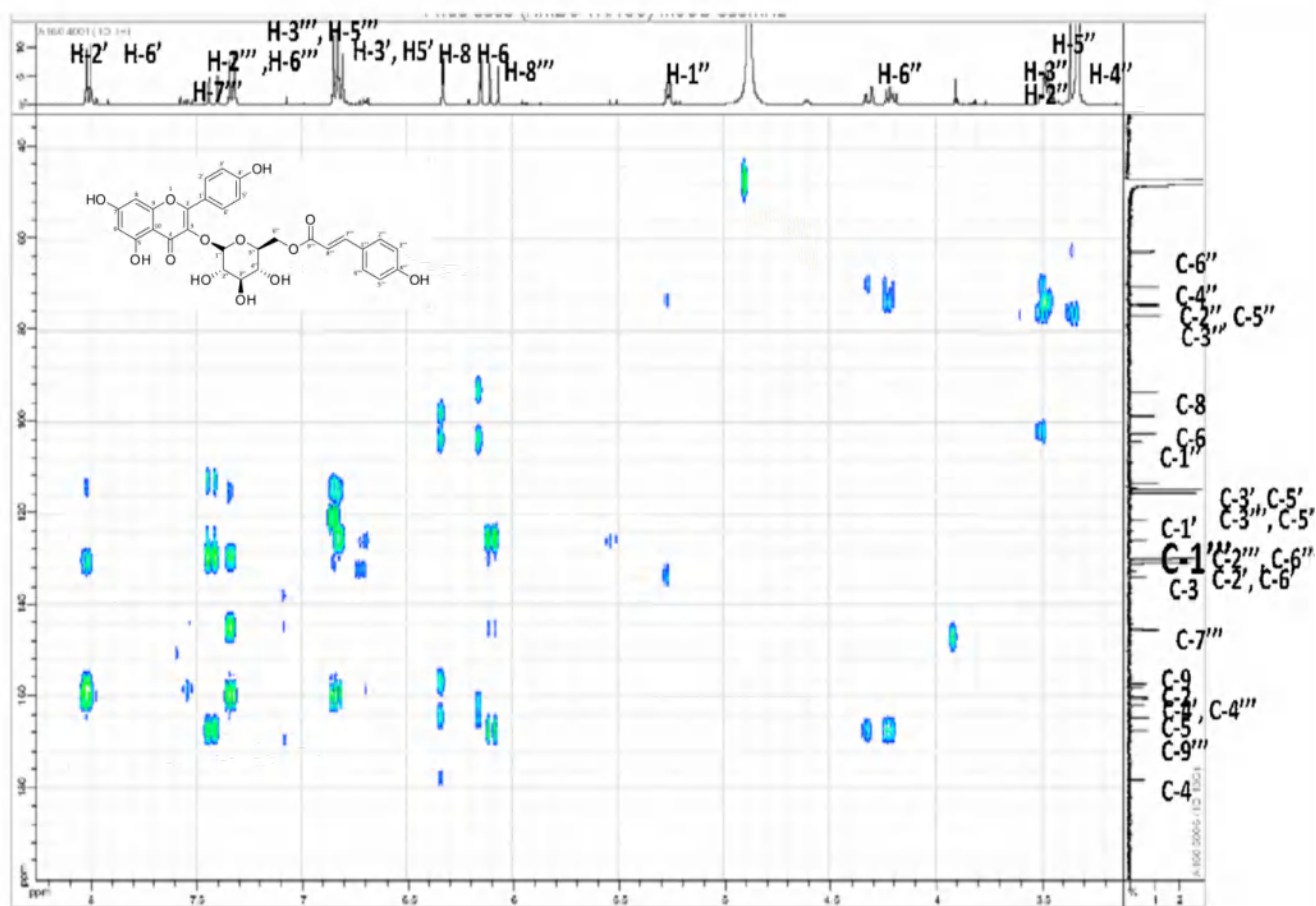
Spectre IV.36. Spectre RMN HSQC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P4.



Spectre IV.37. Etalement 1 spectre RMN HSQC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P4.

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre IV. 38), le proton H-6 montre une tache de corrélation avec les carbones à δ_C (164,53 ; 170,13 ; 102,51 ppm) ce qui permet de positionner les noyaux C-5, C-7 et C-10 respectivement. Le proton H-8 montre une tache de corrélation avec un carbone résonant à δ_C = 170,13 ppm attribuable à C-7, une tache de corrélation avec un carbone quaternaire oxygéné à δ_C = 178,03 ppm attribuable à C-4, deux taches de corrélation avec deux carbones quaternaires à δ_C = (157,03 ; 102,51 ppm) attribuables à C-9 et C-10 respectivement.

Les protons aromatiques H-2' et H-6' montre une corrélation avec le carbone quaternaire oxygéné à δ_C = 160,13 ppm attribuable à C-4' et un carbone quaternaire à δ_C = 157,95 ppm permettant son attribution à C-2 et les protons H-3' et H-5' corrélient avec le carbone à δ_C = 121,32 ppm permet son attribution au carbone C-1'.



Spectre IV. 38. Spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P4.

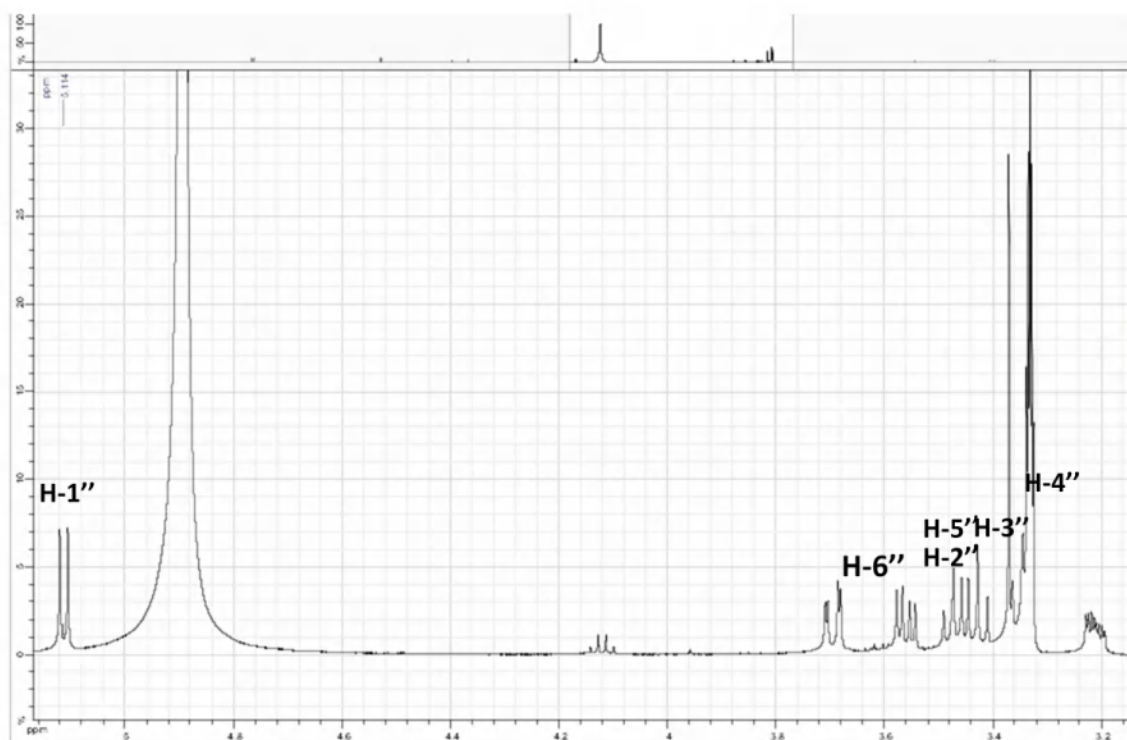
La présence d'un doublet intégrant pour 1H à δ_H 5,27 ppm (J = 7 Hz) est caractéristique du proton anomérique de l'hexose, cet hexose comporte :

Un CH₂ à $\delta_H = 4,32$ ppm (1H, dd, $J = 12,0$; 2,6 Hz) et $\delta_H = 4,21$ (1H, dd, $J = 12,0$; 6,0 Hz), $\delta_C = 62,88$ ppm, attribuable au CH₂ de la position C-6'' de l'hexose (Spectre IV. 39. Étalement 2 spectre RMN ¹H).

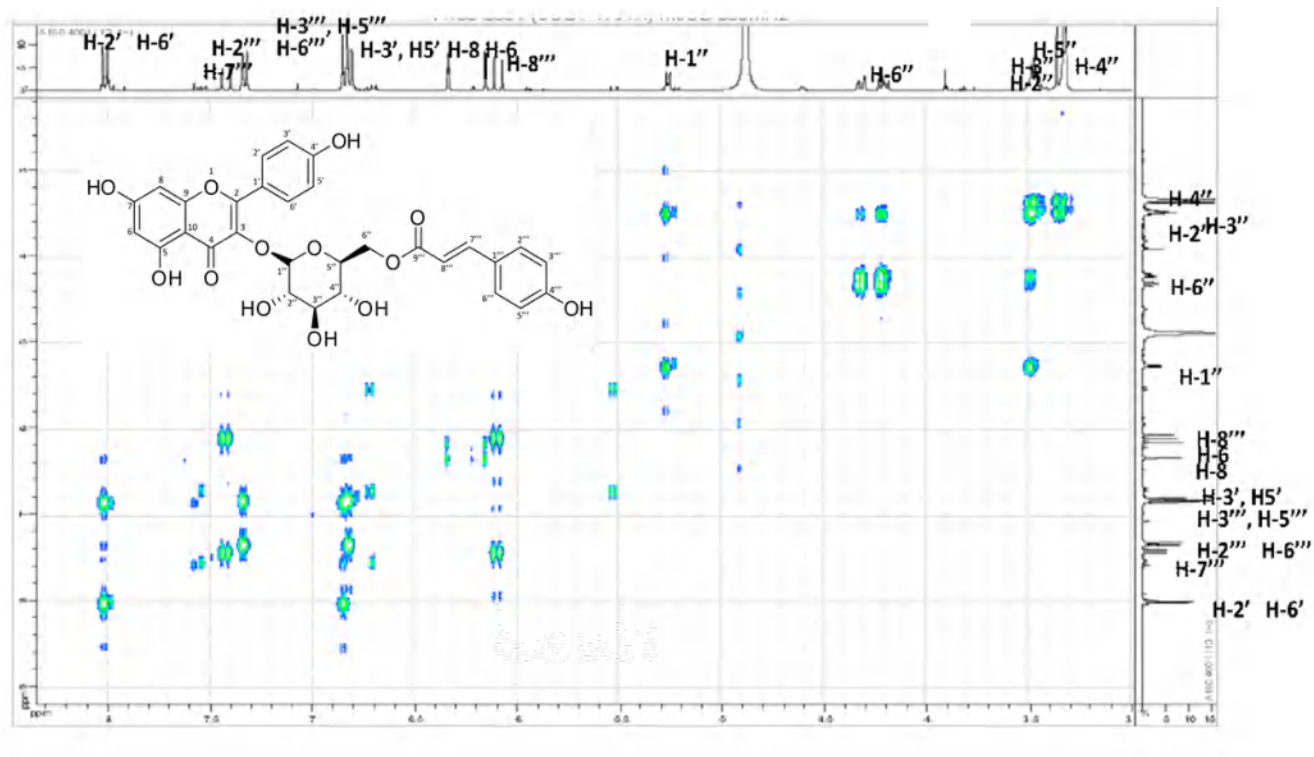
Le spectre de l'expérience COSY (Spectre IV. 40) et son étalement (Spectre IV. 41), permettent de localiser les protons de l'hexose, le proton anomérique H-1'' montre une tache de corrélation avec un proton à $\delta_H = 3,49$ ppm (1H, m), ce proton est attribuable à H-2'' ($\delta_C = 74,32$ ppm). Ce dernier corréle avec le proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,48$ ppm (1H, m) attribuable à H-3'' ($\delta_C = 76,60$ ppm).

Le proton H-3'' corréle avec un proton sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,34$ ppm (1H, m) attribuable à H-4'' ($\delta_C = 70,32$ ppm), la valeur de la constante de couplage $J = 8,0$ Hz entre ces deux protons, suggère une interaction axiale-axiale entre H-3''/H-4'' ; H-4''/ H-5'' et indique une orientation axiale de H-4'', ce qui oriente vers un glucosyle.

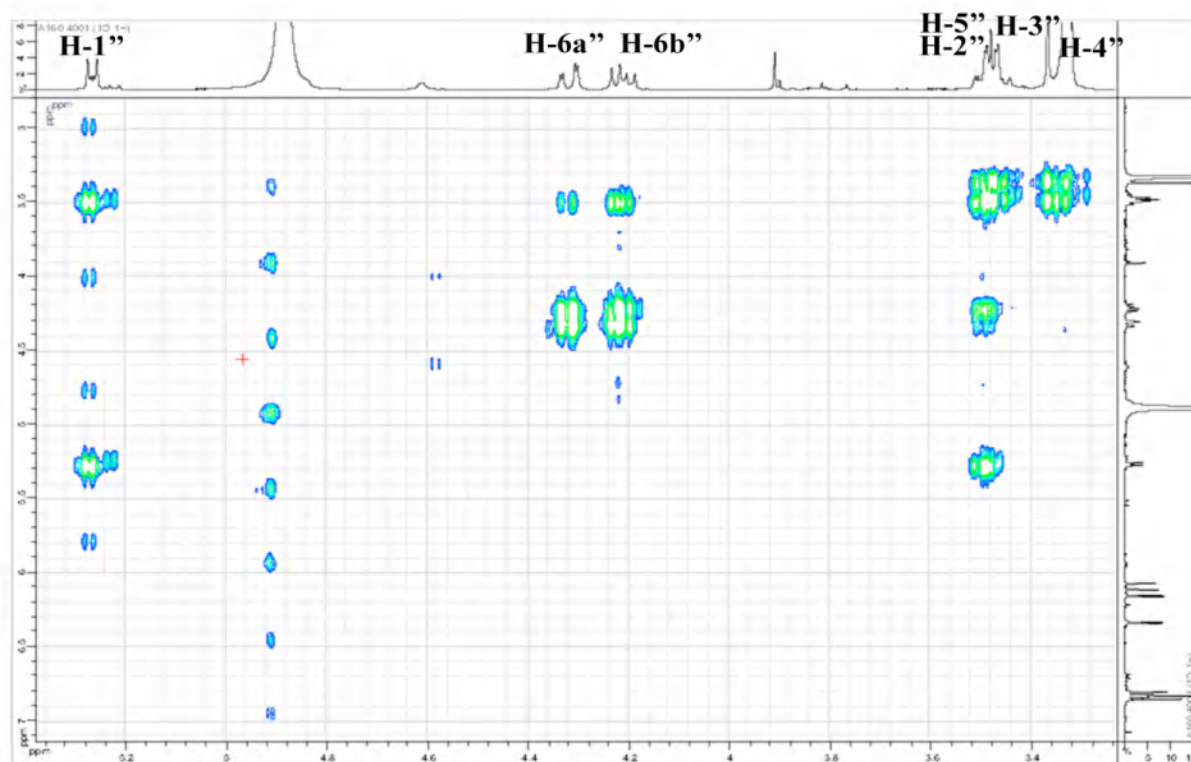
Le proton H-6'' corréle avec un multiplet à $\delta_H = 3,49$ ppm (1H, m) attribuable à H-5'' ($\delta_C = 74,42$ ppm), ce qui indique que l'hexose est un β -glucose.



Spectre IV. 39. Étalement 2 spectre RMN ¹H (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P4.

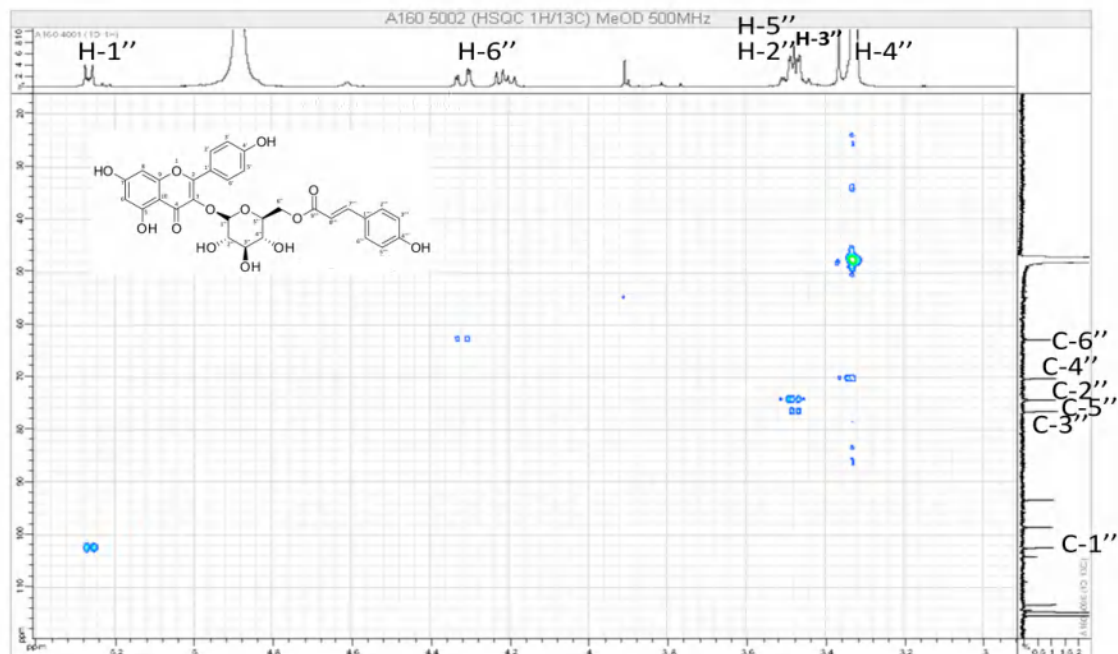


Spectre IV. 40. Spectre RMN COSY (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P4.



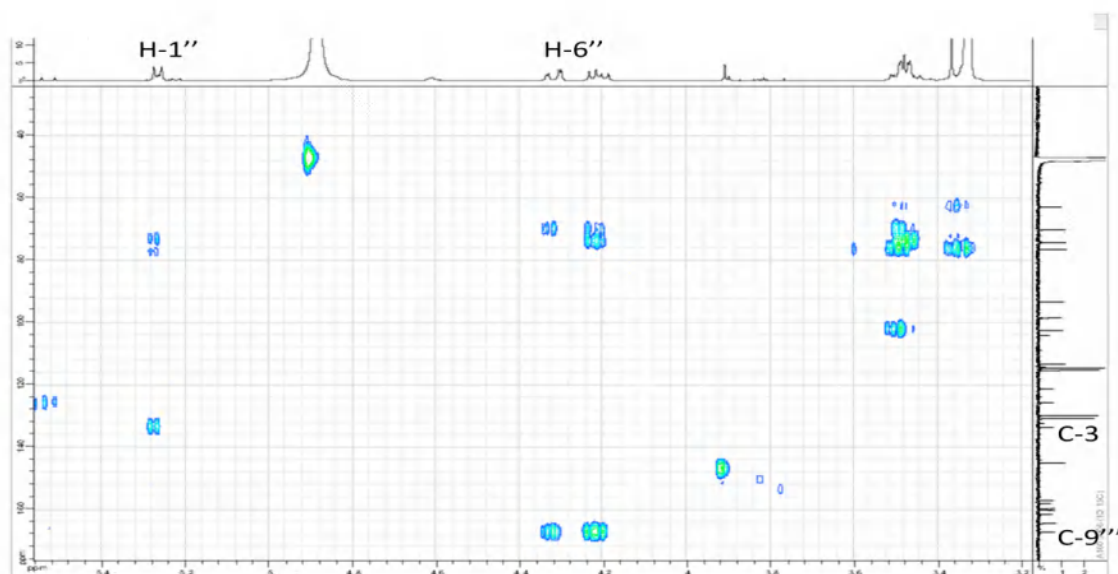
Spectre IV. 41. Etalement 1 spectre RMN COSY (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P4.

Le spectre de l'expérience HMQC (Spectre IV. 42) permet de localiser les noyaux C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'' du glucose à δ_C (104,21 ; 74,32; 76,60 ; 70,32 ; 74,42 et 62,88 ppm) successivement.



Spectre IV. 42. Etallement 2 spectre RMN HSQC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P4.

Le proton H-1'' montre une tache de corrélation dans le spectre relatif à l'expérience HMBC avec le carbonyle à $\delta_C = 133,77$ ppm attribuable à C-3 (Spectre IV. 43), ce qui indique l'attachement de ce glucose au carbone C-3 de l'aglycone Kaempférol.



Spectre IV. 43. Etallement 1 spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P4.

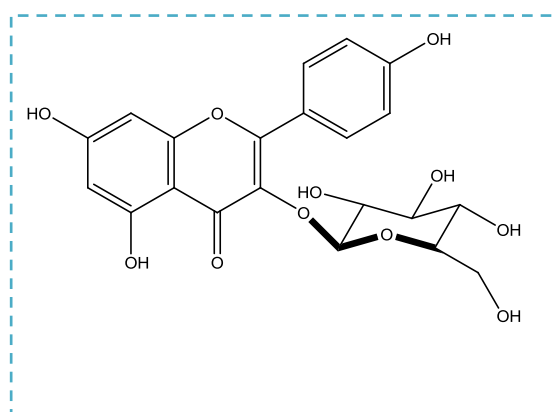
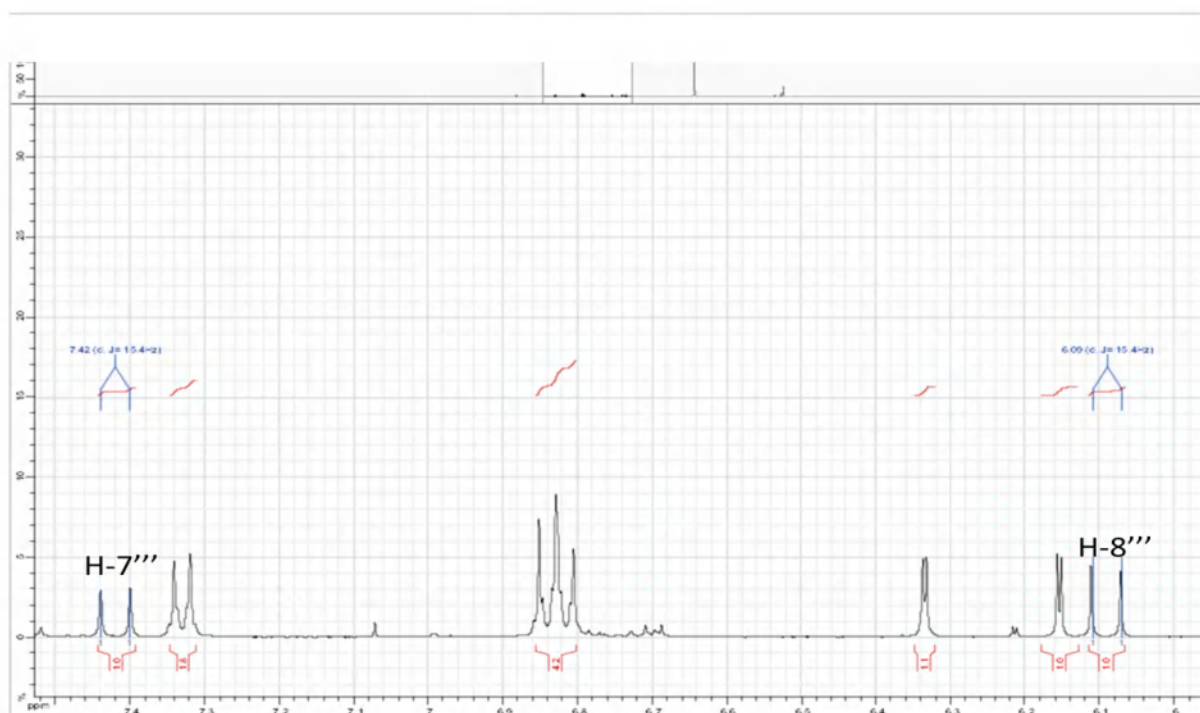


Figure IV.12. Structure de l'astragaline.

Le spectre RMN ^1H montre deux doublets intégrant chacun pour 1H à δ_{H} 6,09 ppm ($J = 15,4$ Hz) et δ_{H} 7,42 ppm ($J = 15,4$ Hz) indiquant la présence d'une configuration géométrique trans de deux protons oléfiniques.

Le spectre HMBC (Spectre IV. 44) montre aussi une corrélation du proton H-6'' de l'hexose avec le carbone quaternaire résonant à $\delta_{\text{C}} = 167,38$ ppm, ce dernier montre aussi des corrélations avec le proton sous forme de doublet d'intégration 1H à une constante de couplage $J = 15,4$ Hz résonant à $\delta_{\text{H}} = 6,09$ ppm.

Les données du spectre COSY et la constante de couplage $J = 15,4$ Hz indiquant que ces deux protons sont des protons oléfiniques d'une configuration géométrique trans.



Spectre IV. 44. Etalement 4 spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz, δ ppm) du composé P4.

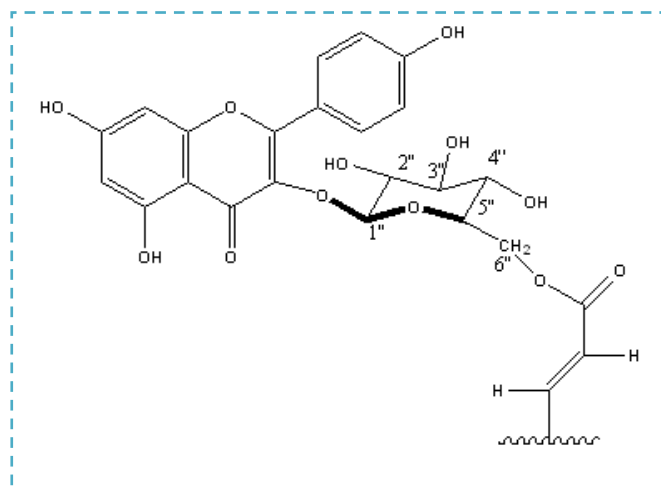
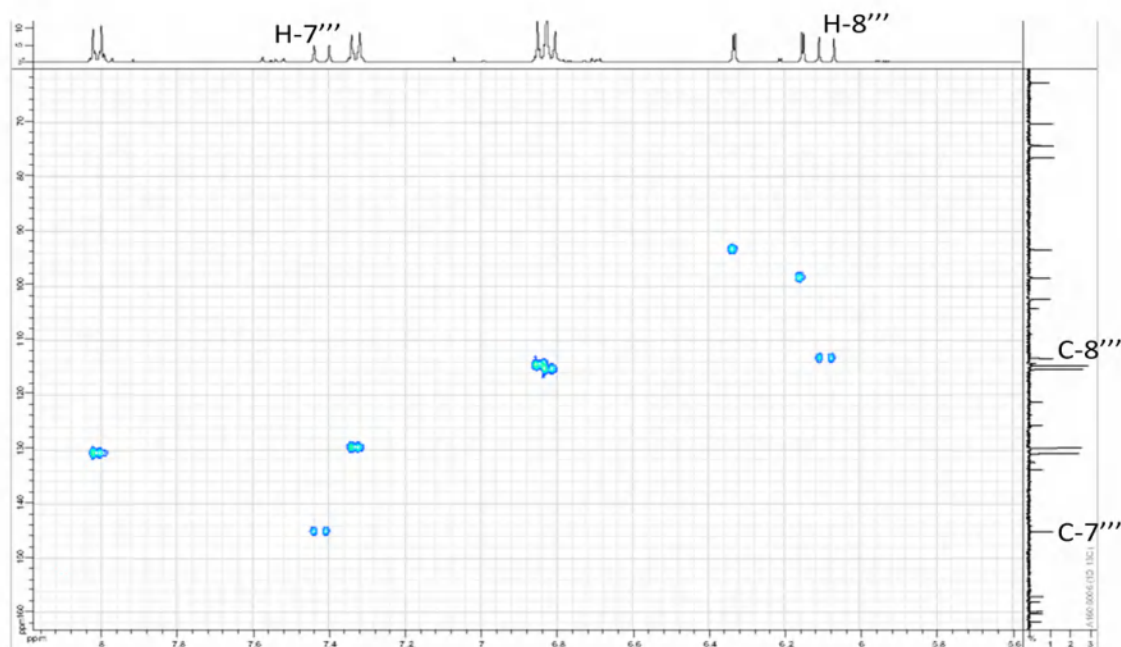


Figure IV.13. Structure partielle du composé P4.

Le spectre HSQC (Spectre IV. 45) permet de localiser les carbones des deux protons oléfiniques sous forme de doublets d'intégration 1H chacun attribuables à H-7''' et H-8''' résonant à $\delta_H = 7,42$ ppm et $\delta_H = 6,09$ ppm respectivement à $\delta_C = 145,15$ ppm et $\delta_C = 113,32$ ppm.



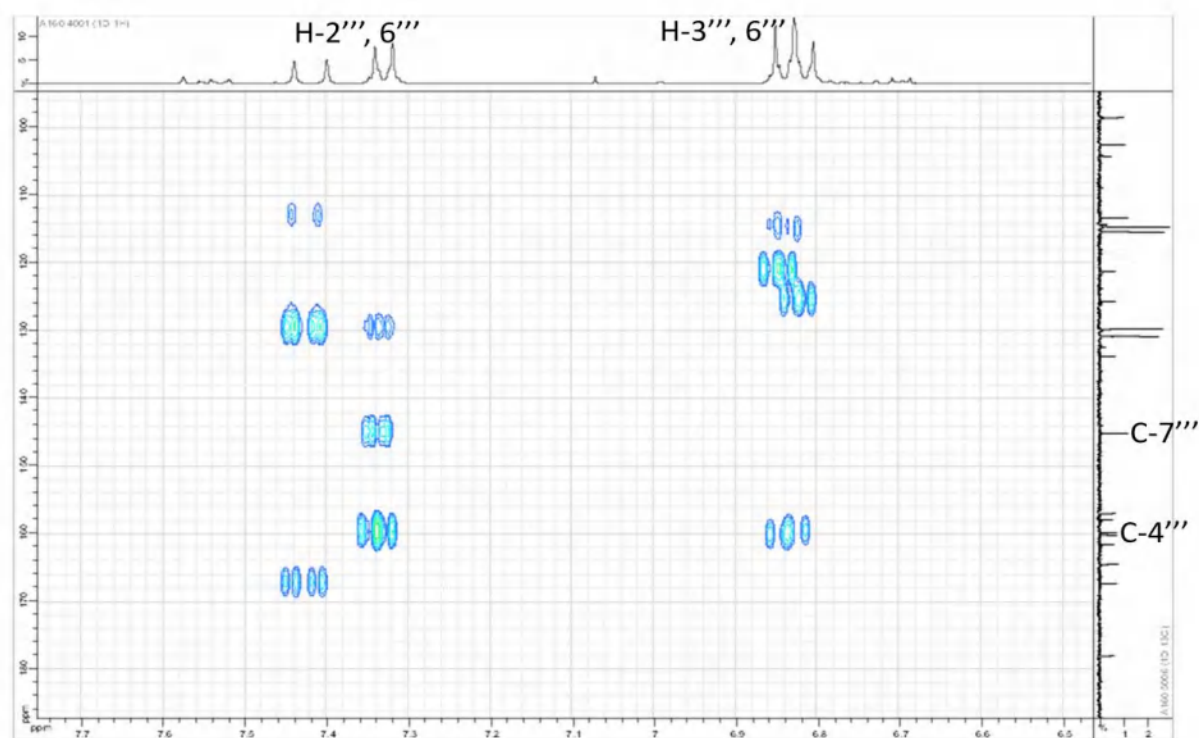
Spectre IV.45. Etalement 3 spectre RMN HSQC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P4.

Le spectre RMN ^1H montre deux doublets intégrant chacun pour 2H à δ_{H} 7,33 ppm ($J = 8,6$ Hz) et δ_{H} 6,84 ppm ($J = 8,6$ Hz) indiquant la présence d'un cycle aromatique d'un système A_2B_2 dans lequel les protons sont symétriques, H-2''', H-6''' d'une part et H-3'''-H-5''' d'autre part.

Le spectre RMN de l'expérience HMQC permet de localiser les noyaux C-2''', C-6''' et C-3''', C-5''' à δ_{C} (129,80 ; 115,39 ppm) respectivement

Les deux doublets intégrant chacun pour 2H à δ_{H} 7,33 ppm ($J = 8,6$ Hz) et δ_{H} 6,84 ppm ($J = 8,6$ Hz) attribuables à H-2''', H-6''' et H-3''', H-5''' donnent des corrélations sur le spectre de l'expérience HMBC (Spectre IV. 46) avec un carbone quaternaire oxygéné résonnant à $\delta_{\text{C}} = 159,80$ ppm attribuable à C-4'''.

Le spectre HMBC montre aussi des corrélations entre les deux protons H-2''', H-6''' à δ_{H} 7,33 ppm et les noyaux C-7''' résonnant à $\delta_{\text{C}} = 145,15$ ppm, ce qui indique l'attachement de ce cycle aromatique au carbone méthine C-7'''.



Spectre IV.46. Etallement 2 spectre RMN HMBC (MeOH- d_4 , 500 MHz, δ ppm) du composé P4.

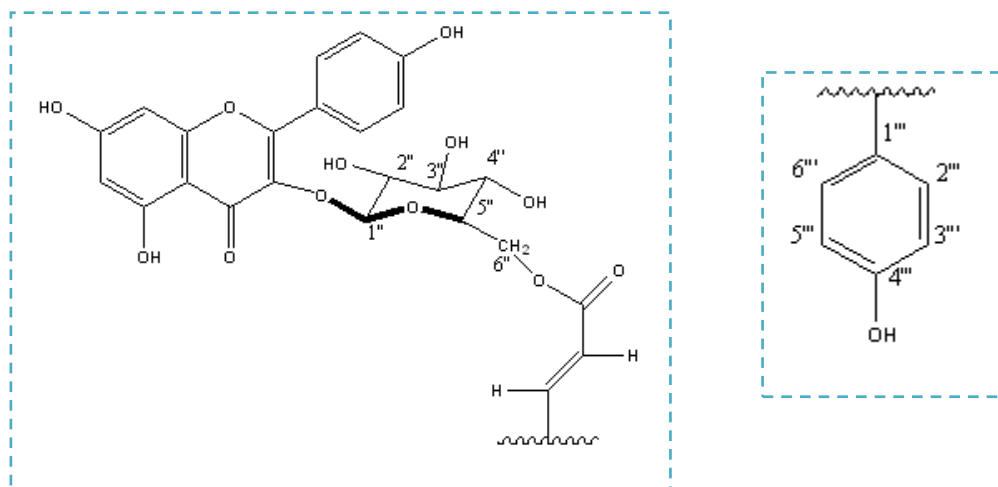
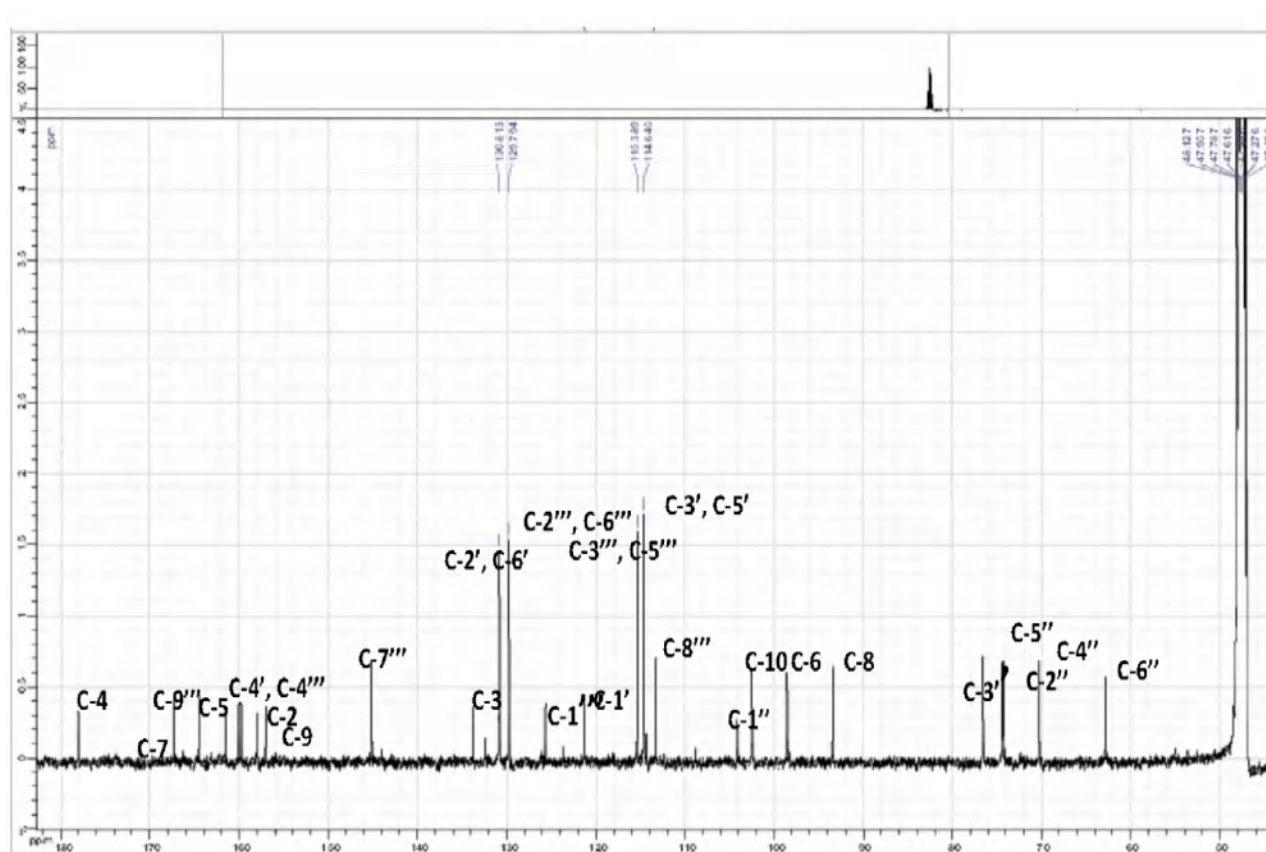


Figure IV.14. Structure partielle de composé P4.

Spectre IV. 47. Spectre RMN ¹³C (MeOH-d₄, 125 MHz) du composé P4.

L'ensemble de ces données mènent à la structure suivante :

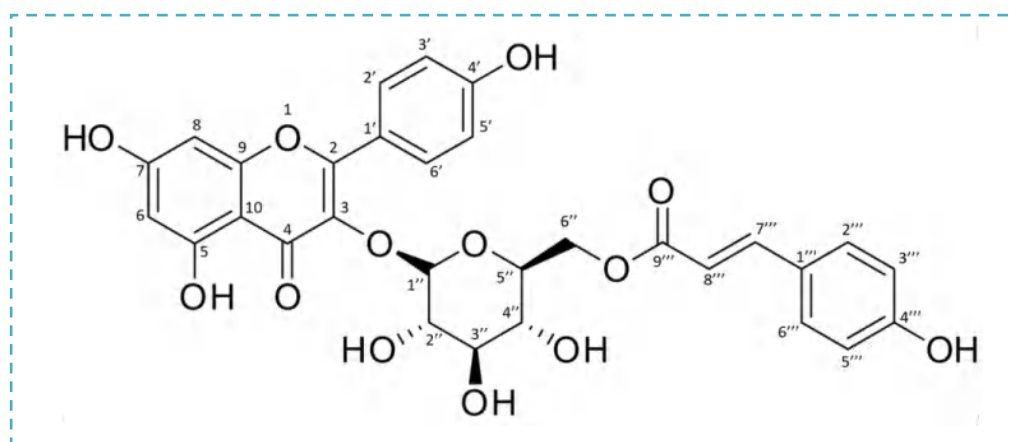


Figure IV.15. Structure du composé Trans tiliroside P4.

Toutes ces données sont en faveur d'une structure de Kaempférol-3-O-[6''-O-(E)-p-coumaroyl]- β -D-glucopyranoside connu sous le nom Tiliroside.

L'ensemble de ces données mènent à la structure de Tiliroside [4].

Les données relatives aux analyses des spectres de RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau IV.4.

Tableau IV.4. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P4.

4		
4	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
2	157,95	-
3	133,77	-
4	178,03	-
5	164,53	-
6	98,58	6,15 (1H, d, 2,5)
7	170,13	-
8	93,41	6,33 (1H, d, 2,5)
9	157,03	-
10	102,51	-
1'	121,32	-
2'	130,81	8,01(2H, d, 8,9)
3'	114,64	6,82 (2H, d, 8,9)
4'	160,13	-
5'	114,64	6,82 (2H, d, 8,9)
6'	130,81	8,01 (2H, d, 8,9)
1''	104,21	5,27 (1H, d, 7)
2''	74,32	3,49 (1H, m)
3''	76,60	3,48 (1H, m)
4''	70,32	3,34 (1H, m)
5''	74,42	3,49 (1H, m)
6''	62,88	4,32 (1H, dd, 12,0 ; 2,6) 4,21 (1H, dd, 12,0 ;6,0)
1'''	125,68	-
2'''	129,80	7,33 (2H, d, 8,6)
3'''	115,39	6,84 (2H, d, 8,6)
4'''	159,80	-
5'''	115,39	6,84 (2H, d, 8,6)
6'''	129,80	7,33 (2H, d, 8,6)
7'''	145,15	7,42 (1H, d, 15,4)
8'''	113,32	6,09 (1H, d,15,4)
9'''	167,38	-

IV. 1. 5. Elucidation structurale du composé P5 issu de la fraction F9

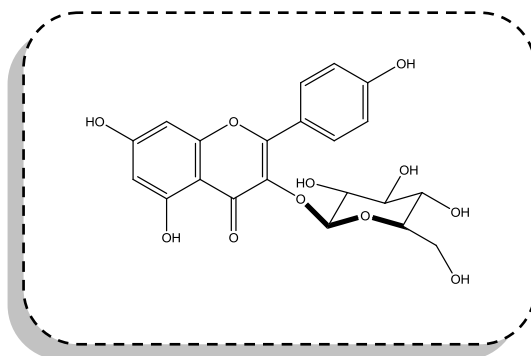


Figure IV.16. Structure de l'astragaline P5.

La fraction F9 (1001 mg) ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 94:6 v/v) a montré la formation d'un précipité jaune qui a été filtré (300 mg) et lavé avec de l'acétate d'éthyle. Une partie de ce précipité a été soumise à des plaques préparatives de gel de silice ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 8:2 v/v) pour donner du trans-tiliroside **P4** et de l'astragaline **P5**.

L'examen des spectres RMN ^1H (Spectre IV. 48) et ses étalements (Spectre IV. 49) (Spectre IV. 50) montrent qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone caractérisé par:

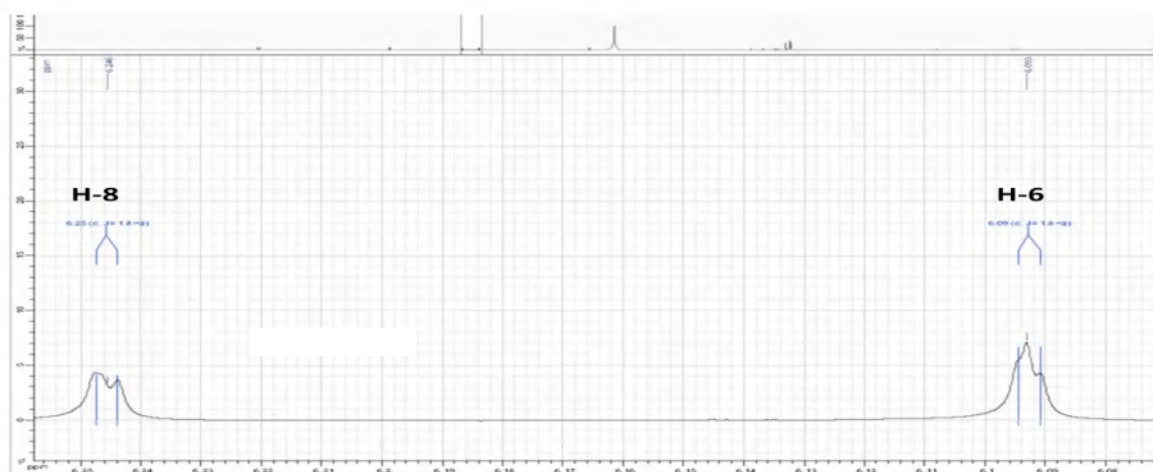
- Deux signaux sous forme de doublet d'intégration 1H chacun l'un à δ_{H} 6,09 ppm et l'autre à δ_{H} 6,25 ppm avec une constante de couplage ($J = 1,8 \text{ Hz}$) attribuable à H-6 et H-8 successivement.
- Deux doublets intégrant chacun pour 2H à δ_{H} 6,89 ppm ($J = 8,9 \text{ Hz}$) et δ_{H} 8,05 ppm ($J = 8,9 \text{ Hz}$) attribuables respectivement aux protons H-3', H-5' et H-2', H-6' du cycle B du noyau flavonique.
- Un doublet intégrant pour 1H à δ_{H} 5,11 ppm ($J = 7,5 \text{ Hz}$) caractéristique du proton anomérique de l'hexose.

Les données relatives à la RMN ^1H sont reportées sur le tableau (tableau IV.5).

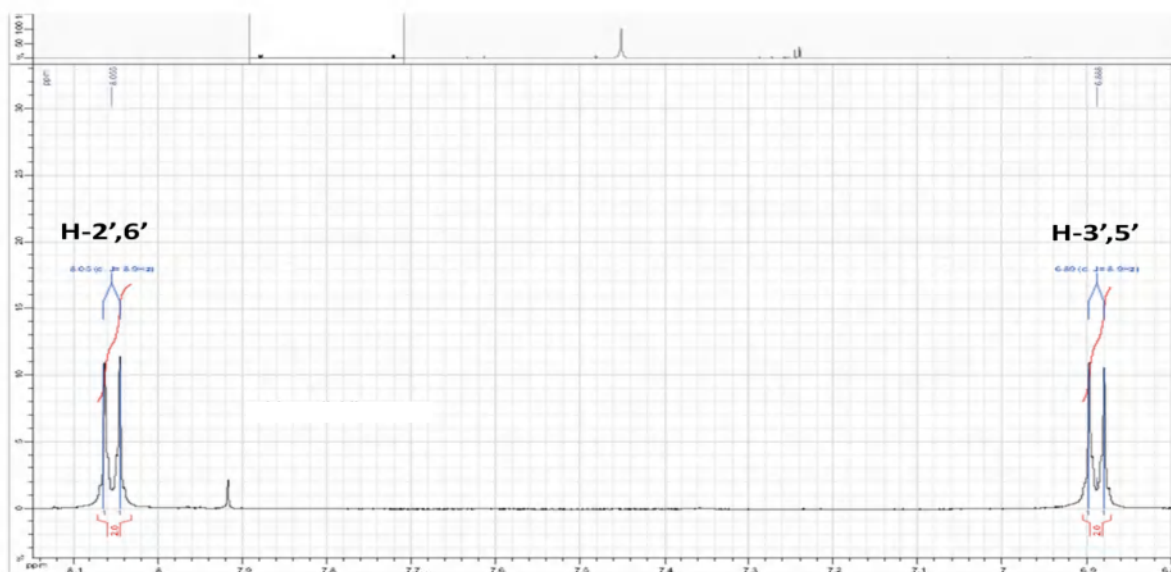
Les signaux observés sur le spectre RMN ^1H (Spectre IV. 48) et ses étalements (Spectre IV. 49) et (Spectre IV. 50) révèlent deux signaux sous forme de doublet d'intégration 1H chacun sont attribués aux protons H-6 à $\delta_{\text{H}} = 6,09 \text{ ppm}$ ($J = 1,8 \text{ Hz}$) et H-8 à $\delta_{\text{H}} = 6,25 \text{ ppm}$ ($J = 1,8 \text{ Hz}$) du cycle A du noyau flavonique et deux doublets intégrant chacun pour 2H à $\delta_{\text{H}} 6,89 \text{ ppm}$ ($J = 8,9 \text{ Hz}$) et $\delta_{\text{H}} 8,05 \text{ ppm}$ ($J = 8,9 \text{ Hz}$) attribuables respectivement aux protons H-3', H-5' et H-2', H-6' du cycle B.



Spectre IV. 48. Spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P5.

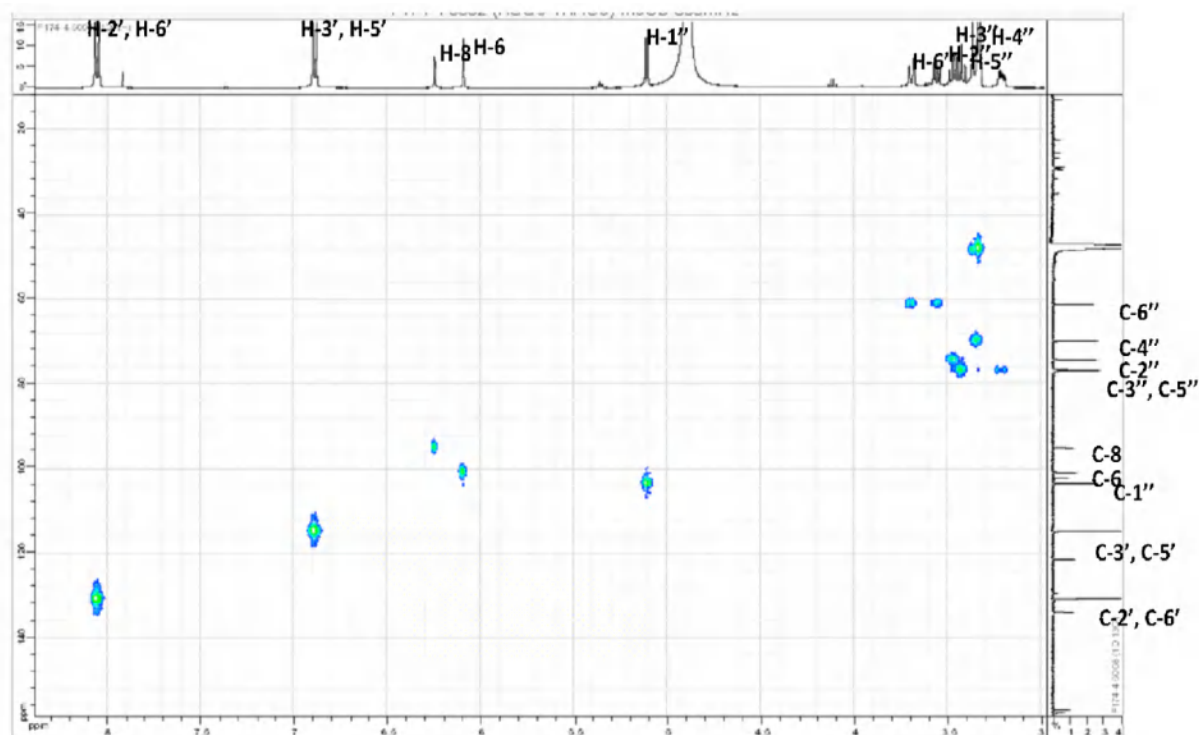


Spectre IV. 49. Étalement 1 spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P5.



Spectre IV.50. Etalement 2 spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P5.

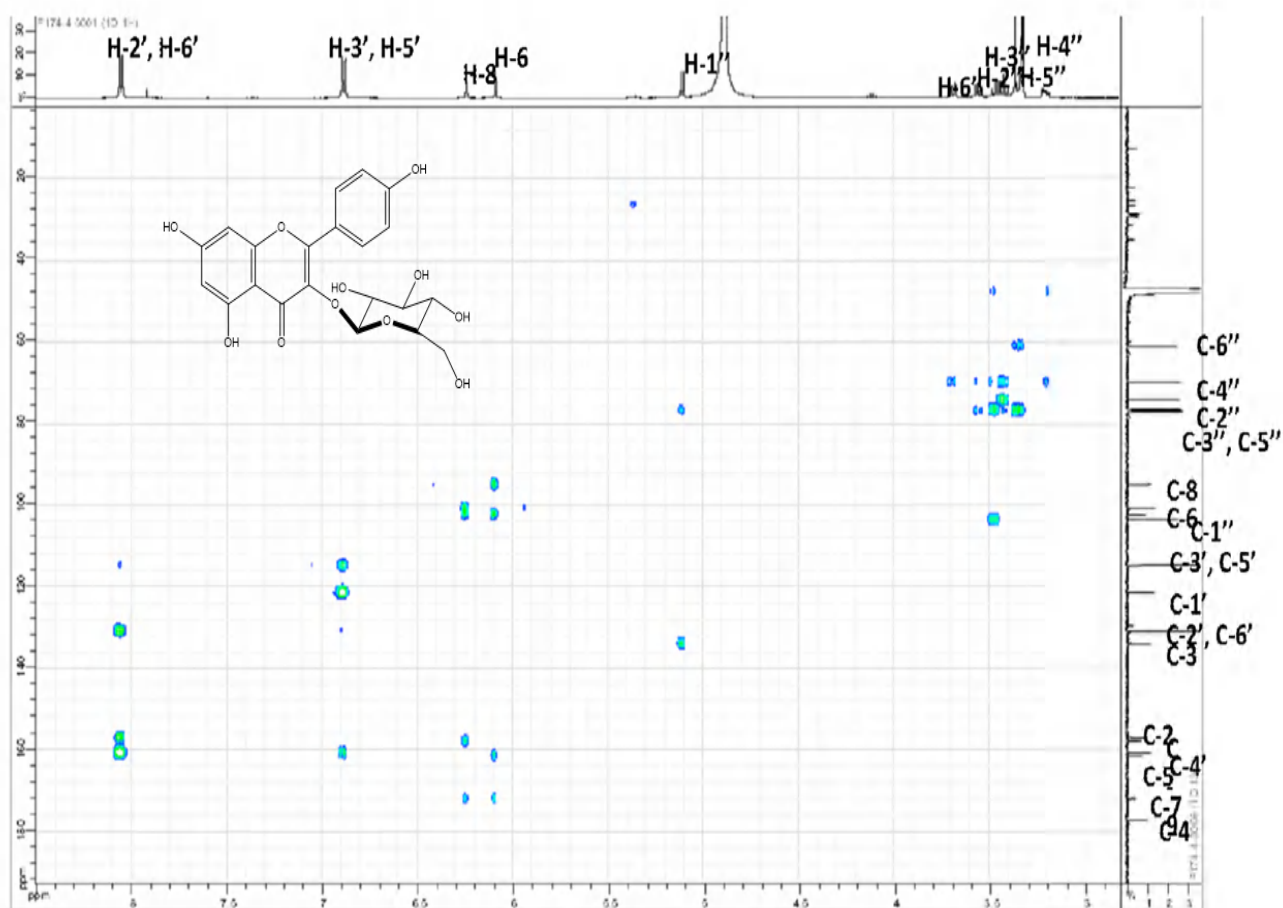
Le spectre RMN de l'expérience HMQC (Spectre IV. 51) permet de localiser les noyaux du cycle flavonique A et B, C-6, C-8 et C-2', C-6' et C-3', C-5' à δ_C (100,89 ; 95,06 ; 130,78 ; 114,80 ppm) respectivement.



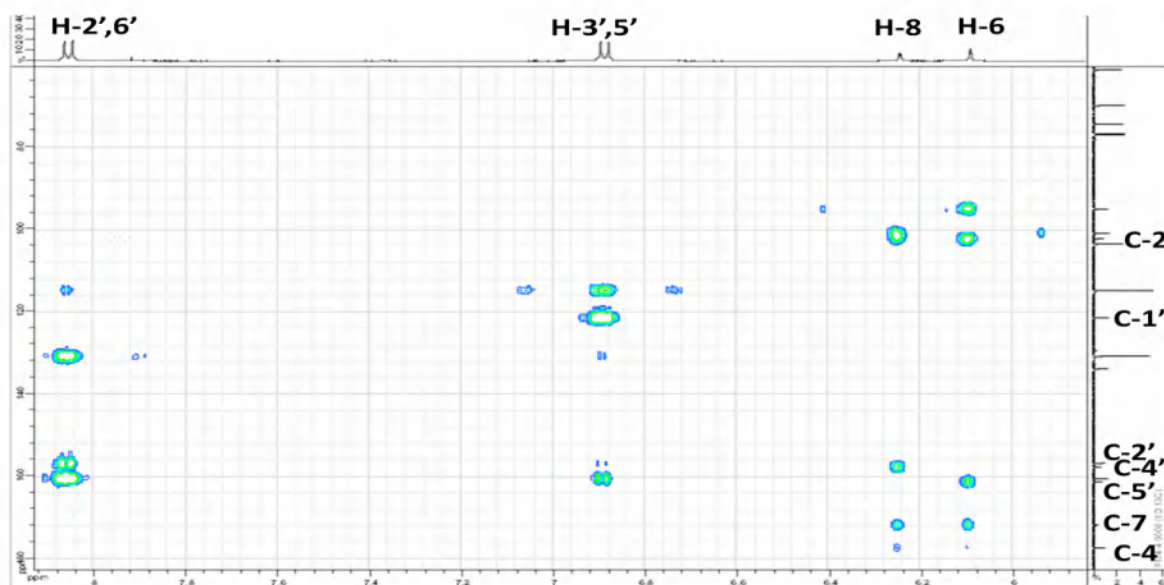
Spectre IV. 51. Spectre RMN HMQC (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P5.

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre IV. 52) et son étalement (Spectre IV. 53), le proton H-6 montre une tache de corrélation avec les carbones C-5, C-7 et C-10 à δ_C (161,24 ; 171,82 ; 102,27 ppm) respectivement. Le proton H-8 montre une tache de corrélation avec un carbone résonant à δ_C = 171,82 ppm attribuable à C-7, une tache de corrélation avec un carbone quaternaire oxygéné à δ_C = 177,25 ppm attribuable à C-4, deux taches de corrélation avec deux carbones quaternaires à δ_C = (157,66 ; 102,27 ppm), attribuables à C-9 et C-10 respectivement.

Les protons aromatiques H-2' et H-6' montrent une corrélation avec le carbone quaternaire oxygéné à δ_C = 160,45 ppm attribuable à C-4' et un carbone quaternaire à δ_C = 156,81 ppm attribuable à C-2. Les protons H-3' et H-5' corrélient avec le carbone à δ_C = 121,40 ppm attribuable au carbone C-1'.



Spectre IV. 52. Spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P5.



Spectre IV. 53. Etallement 1 spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P5.

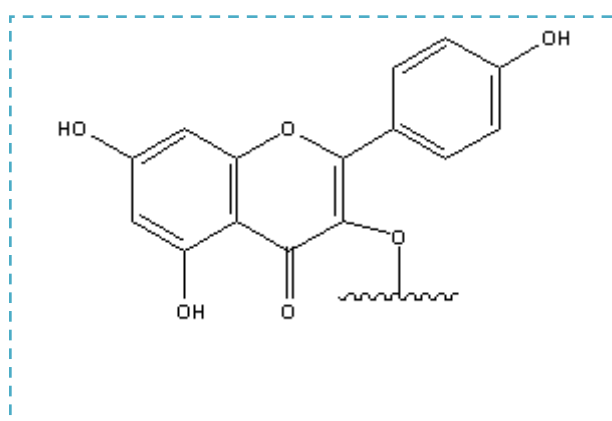


Figure IV.17. Structure d'un aglycone de type Kaempférol.

La présence d'un doublet intégrant pour 1H à δ_H 5,27 ppm ($J = 7,5$ Hz) est caractéristique du proton anomérique de l'hexose.

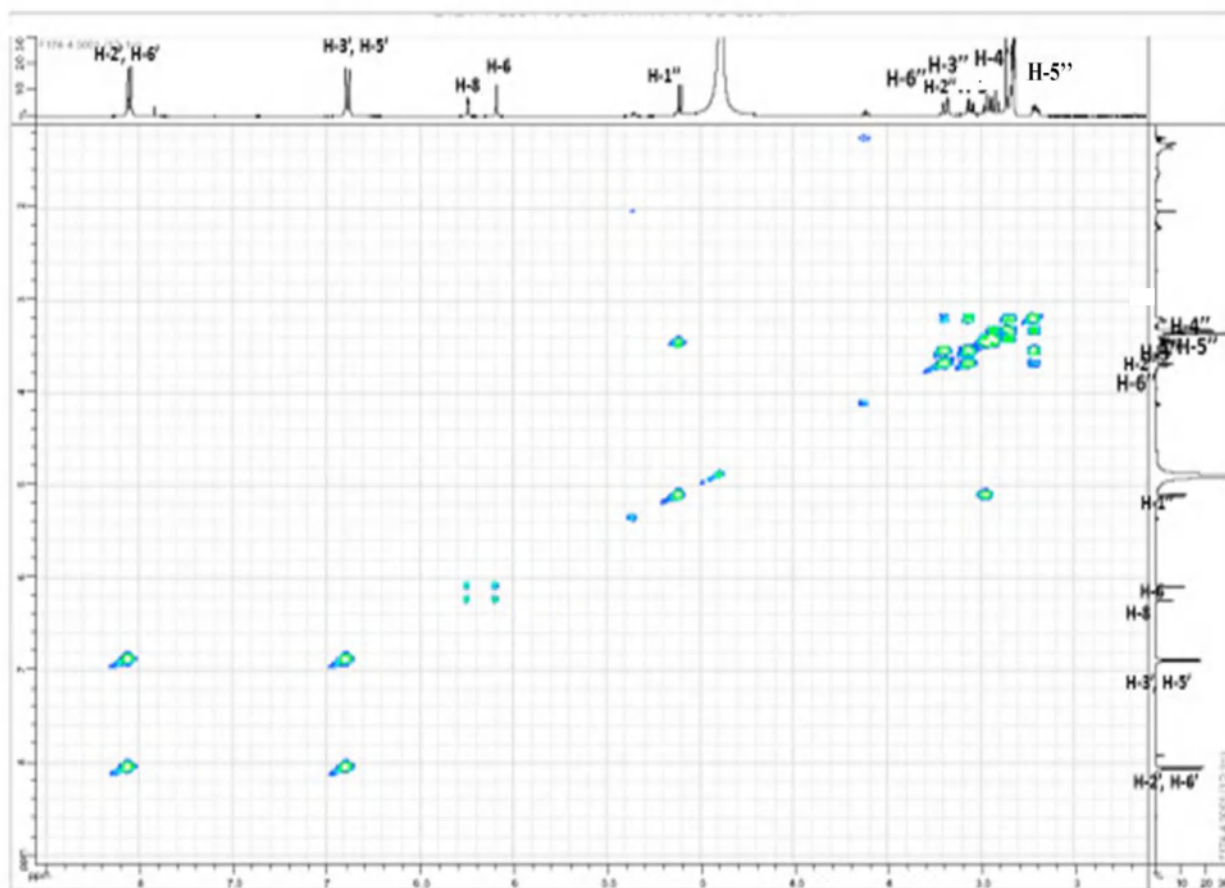
Cet hexose comporte :

Un CH₂ à $\delta_H = 3,70$ ppm (1H, dd, $J = 11,4 ; 2,4$) et $\delta_H = 3,56$ (1H, dd, $J = 11,4 ; 5,4$), $\delta_C = 61,21$ ppm, attribuable au CH₂ de la position C-6'' de l'hexose.

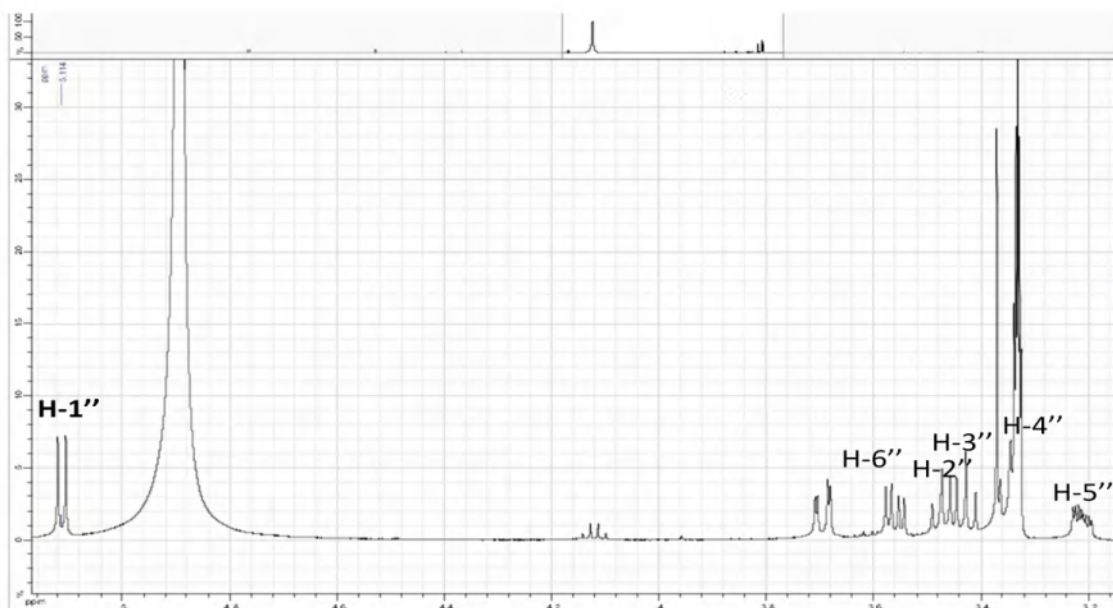
Le spectre de l'expérience COSY (Spectre IV. 54) et son étalement (Spectre IV. 56), permettent de localiser les protons de l'hexose, le proton anomérique H-1'' montre une tache de corrélation avec un proton à $\delta_H = 3,47$ ppm (1H, m), ce proton est attribuable à H-2'' ($\delta_C = 74,32$ ppm). Ce dernier corrèle avec le proton résonant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,45$ ppm (1H, m) attribuable à H-3'' ($\delta_C = 76,94$ ppm).

Le proton H-3'' corrèle avec un proton sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,35$ ppm (1H, m) attribuable à H-4'' ($\delta_C = 69,89$ ppm), la constante de couplage ($J = 8,0$ Hz) laisse supposer des interactions axiale-axiale entre H-3''/H-4'' ; H-4''/ H-5'' et indique une orientation axiale de H-4'', ce qui oriente vers un glucosyle. Le proton H-6'' corrèle avec un multiplet à $\delta_H = 3,22$ ppm (1H, m) attribuable à H-5'' ($\delta_C = 76,74$ ppm), ce qui indique que l'hexose est un β -glucose.

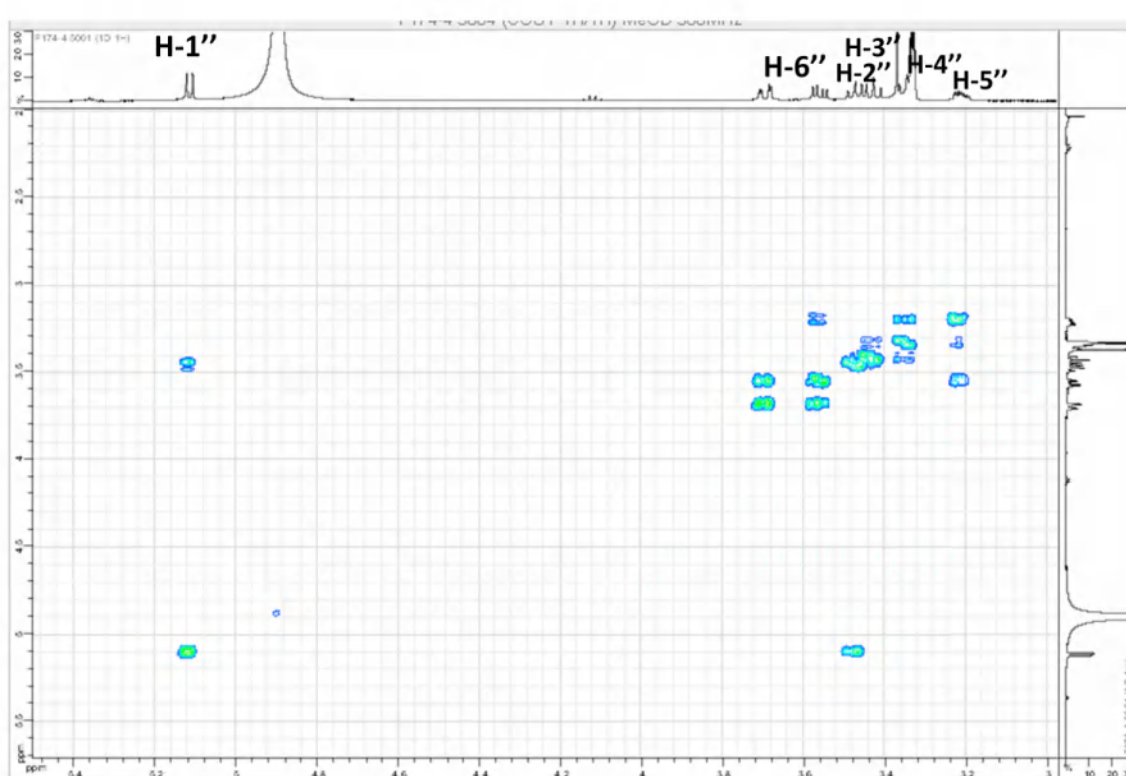
Le proton H-1'' montre une tache de corrélation dans le spectre relatif à l'expérience HMBC avec le carbonyle à $\delta_C = 133,87$ ppm attribuable à C-3 (Spectre IV. 58).



Spectre IV. 54. Spectre RMN COSY (MeOH-d4, 500 MHz) du composé P5.

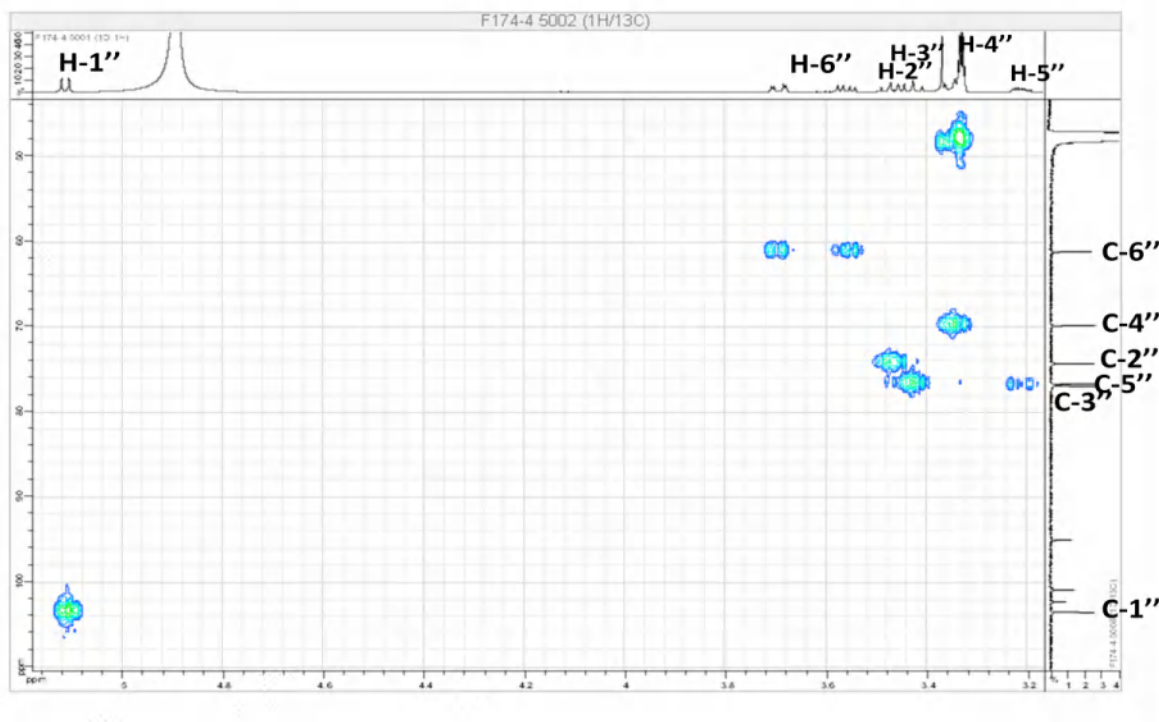


Spectre IV. 55. Etalement 3 spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P5.



Spectre IV. 56. Etalement 1 spectre RMN COSY (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P5.

Le spectre de l'expérience HMQC (Spectre IV. 57), permet de localiser les noyaux C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'' du glucose à δ_C (103,50 ; 74,32 ; 76,94 ; 69,89 ; 76,74 et 61,21 ppm) respectivement.



Spectre IV. 57. Etallement 1 spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P5.

Les valeurs des constantes de couplages et les résultats du spectre COSY suggèrent la présence d'un aglycone de type Kaempférol.

Le proton H-1'' montre une tache de corrélation dans le spectre relatif à l'expérience HMBC avec le carbonyle à $\delta_C = 133,87$ ppm attribuable à C-3 (Spectre IV. 58), ce qui indique l'attachement de ce glucose au carbone C-3 de l'aglycone Kaempférol.

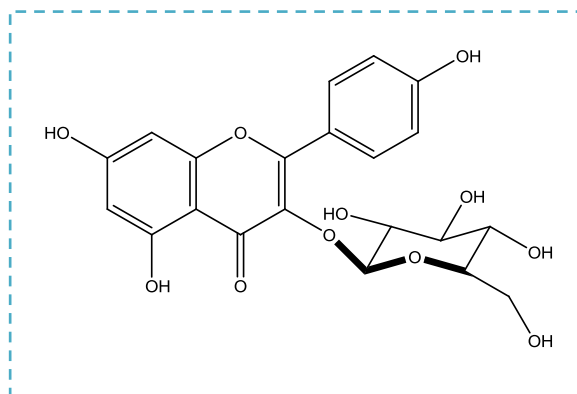
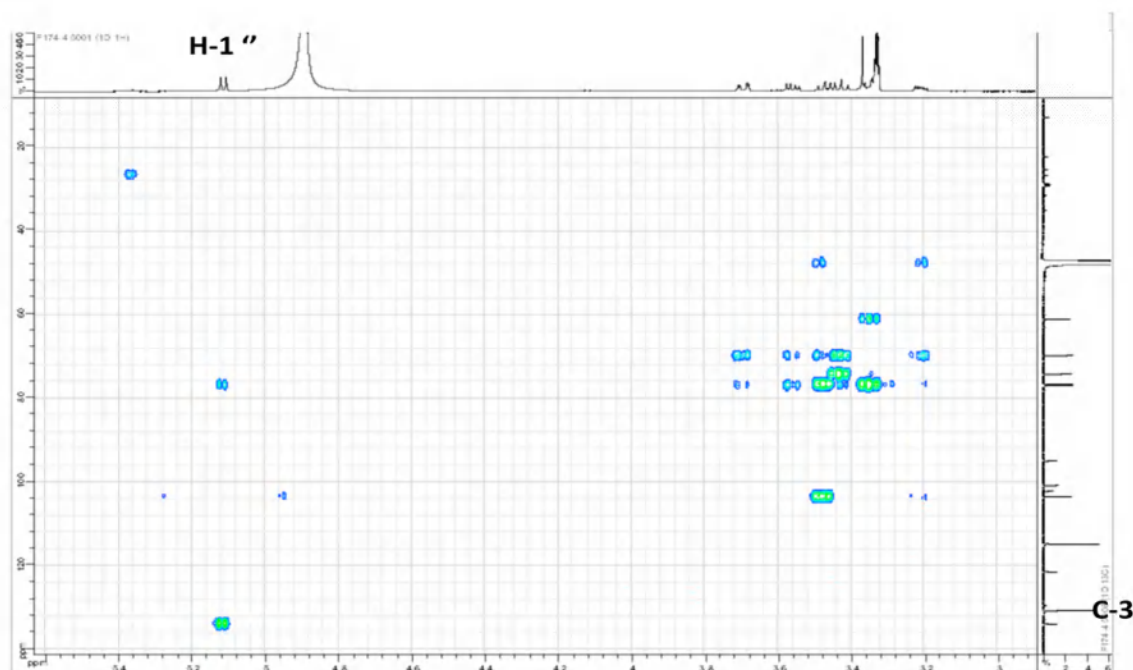
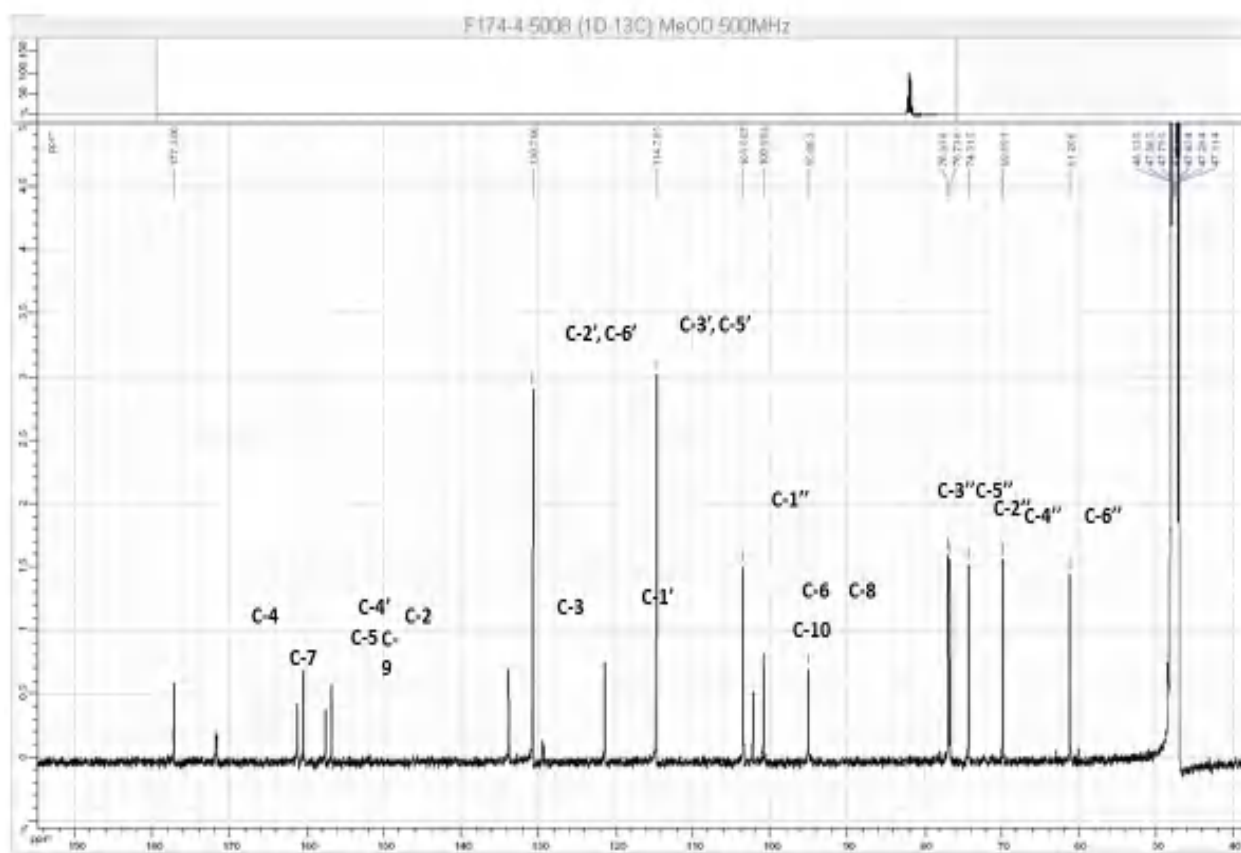


Figure IV.18. Structure de l'astragaline P5.



Spectre IV. 58. Etalement 2 spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P5.



Spectre IV. 59. Spectre RMN ¹³C (MeOH-d₄, 125 MHz) du composé P5.

Toutes ces données sont en faveur d'une structure de l'astragaline [5].

Les données relatives aux analyses des spectres de RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau IV.5.

Tableau IV.5. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P5.

5	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
2	156,81	-
3	133,87	-
4	177,25	-
5	161,24	-
6	100,89	6,09 (1H, d, 1,8)
7	171,82	-
8	95,06	6,25 (1H, d, 1,8)
9	157,66	-
10	102,27	-
1'	121,40	-
2'	130,78	8,05 (2H,d, 8,9)
3'	114,80	6,89 (2H, d, 8,9)
4'	160,45	-
5'	114,80	6,89 (2H, d, 8,9)
6'	130,78	8,05 (2H, d, 8,9)
1''	103,50	5,11 (1H, d, 7,5)
2''	74,32	3,47 (1H, m)
3''	76,94	3,45 (1H, m)
4''	69,89	3,35 (1H, m)
5''	76,74	3,22 (1H, m)
6''	61,21	3,70 (1H, dd,11,4 ; 2,4) 3,56 (1H, dd, 11,4 ; 5,4)

IV. 1. 6. Elucidation structurale du composé P6 issu de la fraction F9

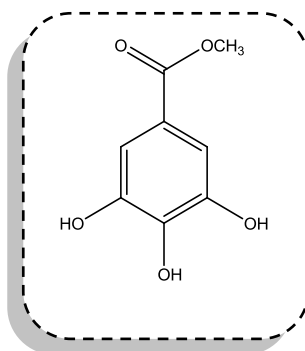


Figure IV.19. Structure du gallate de méthyle P6.

Ce produit a été isolé à partir de la fraction **F9** ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 94:6 v/v), par CLHP semi préparative en phase inverse pour donner le galate de méthyle **P6**.

Conditions CLHP semi préparative en phase inverse

Colonne C18, 250 x 10 mm, 5 μm , thermo scientific, à température ambiante

Phases: solvant A constitué d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique et solvant B (acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique).

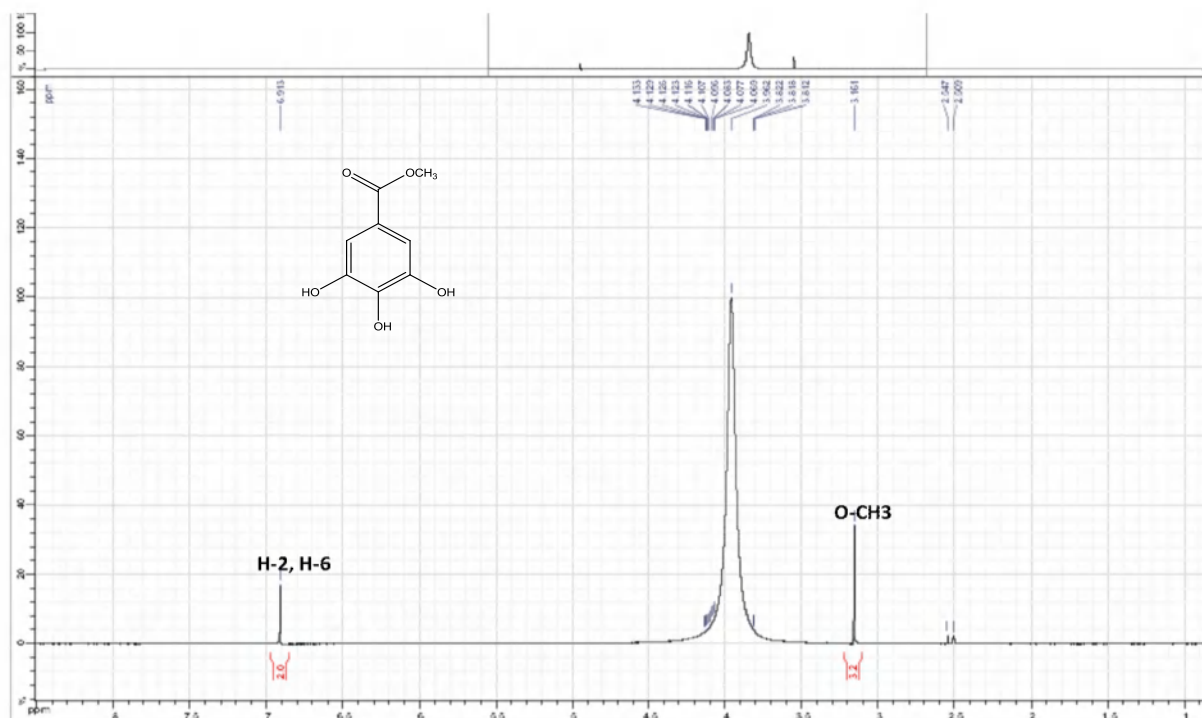
Débit: 5ml/min.

Profile gradient suivant : 0 min, 5% B; 15 min, 25%, 35 min, 25% de B; maintenu pendant 7 min.

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre IV. 60), montre qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique est tetrasubstitué, ces signaux apparaissent sous forme de:

- Un singulet d'intégration 3H à δ_{H} 3,16 ppm attribuable à un groupement méthoxy $\text{O}-\text{CH}_3$.
- Un singulet à δ_{H} 6,91 ppm d'intégration 2H attribuables à H-2 et H-6.

L'ensemble des informations indique qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique est tetrasubstitué, la présence d'un singulet d'intégration 2H indique une symétrie et la présence d'un singulet d'intégration 3H à $\delta_{\text{H}} = 3,16$ ppm indique la présence d'un groupement méthoxy.

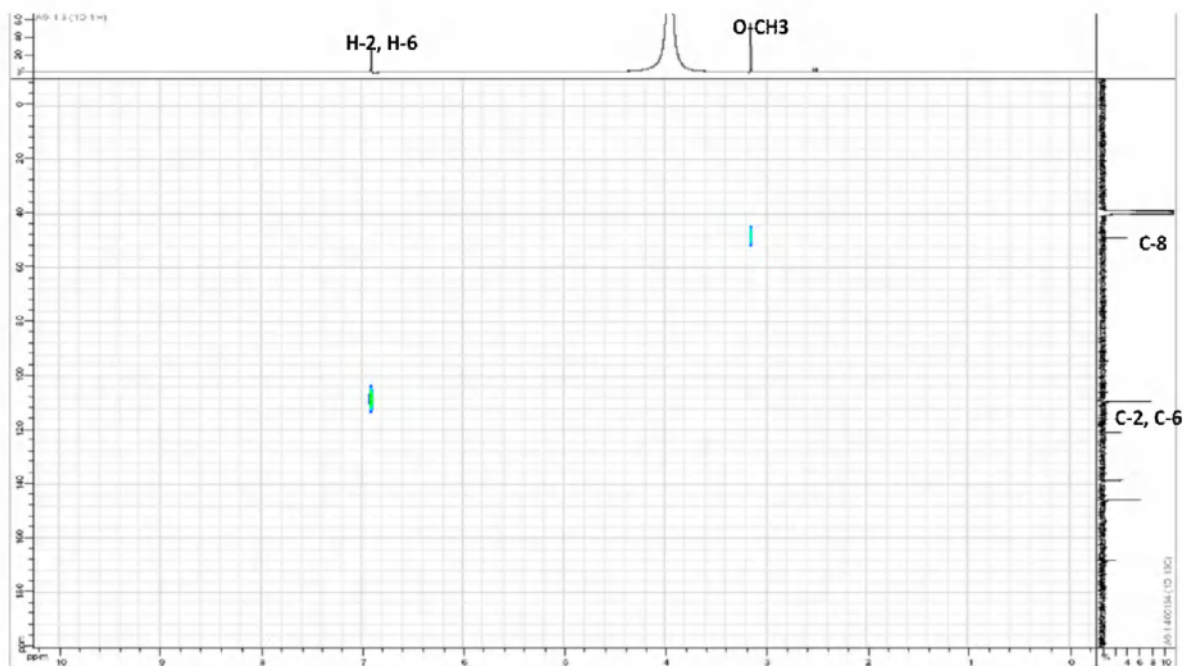


Spectre IV. 60. Spectre RMN¹H (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P6.

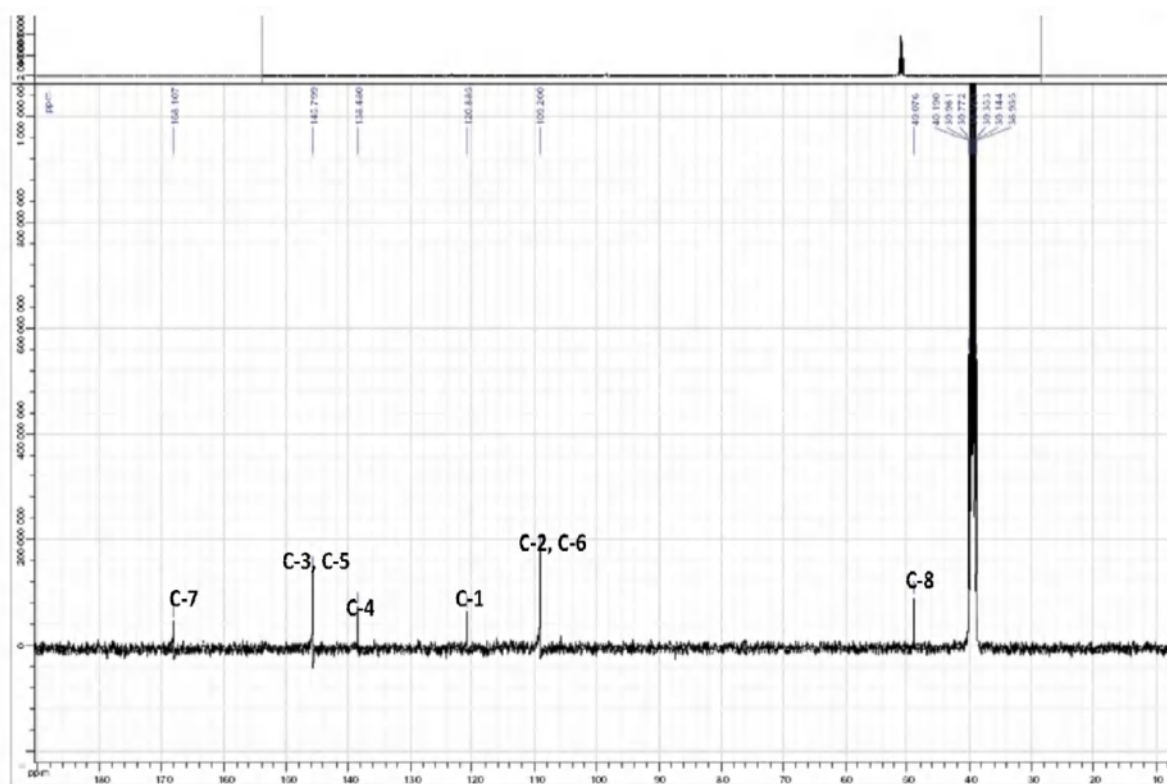
L'examen du spectre RMN ^{13}C (spectre IV. 62), montre la présence :

- Un carbonyle d'une fonction ester à δ_C 168,10 ppm.
- Deux carbones quaternaire sp^2 oxygénés à δ_C 145,80 ppm attribuable à C-3 et C-5 respectivement.
- Un carbone quaternaire sp^2 oxygénés à δ_C 138,47 ppm attribuable à C-4.
- Un carbone quaternaire à δ_C 120,88 ppm attribuable à C-1.

Le spectre de l'expérience HMQC permet également de localiser les noyaux de carbones C-2, C-6 et celui de méthoxyle à $\delta_C = 109,20$ ppm et 49,07 ppm respectivement (Spectre IV.61).



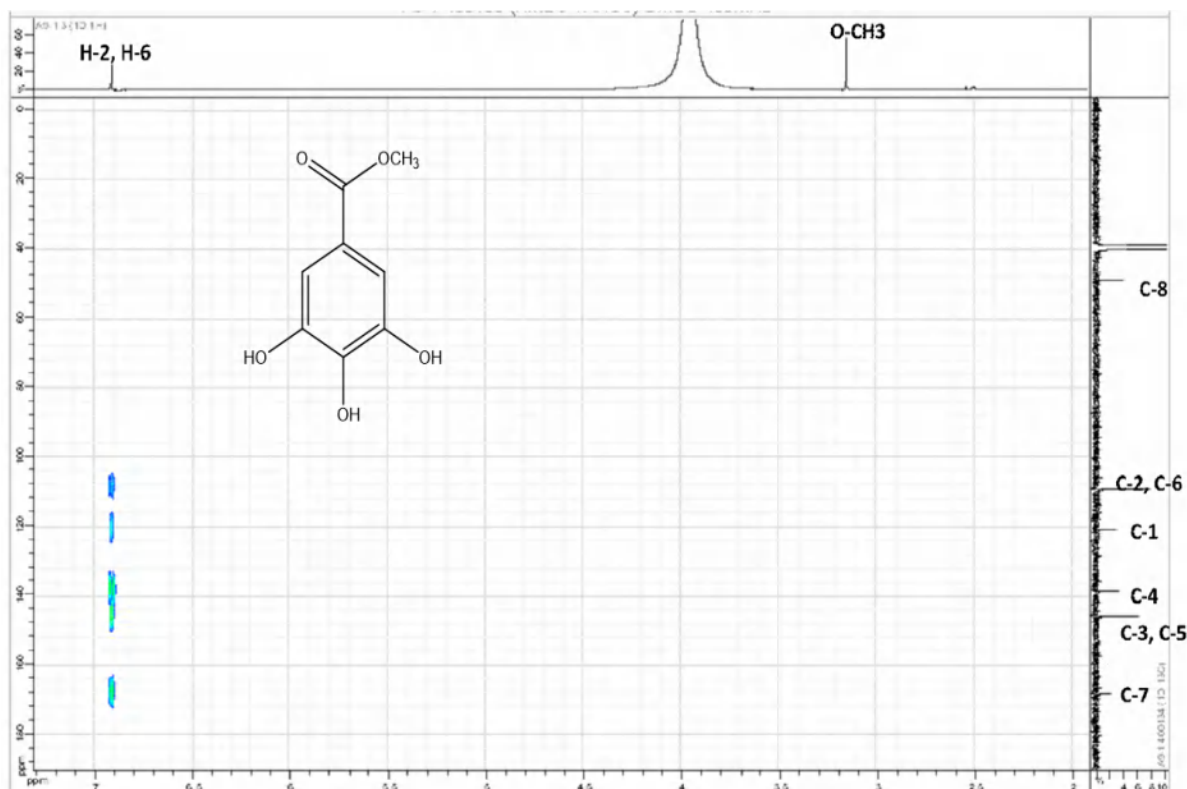
Spectre IV.61. Spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P6.



Spectre IV. 62. Spectre RMN ^{13}C (MeOH-d₄, 125 MHz, δ ppm) du composé P6.

On peut hésiter à ce stade entre soit une substitution des positions C-1, C-3, C-4 et C-5 ou les positions C-1, C-2, C-4 et C-6. Cette ambiguïté est levée par les résultats de l'expérience du spectre HMBC.

Le spectre HMBC (Spectre IV. 63) permet de localiser la position des hydrogènes et du méthoxy sur le cycle aromatique, les corrélations entre les protons du méthoxy avec le C-7 indique que le carbone C-7 porte une fonction ester, d'autre part les protons H-2, H-6 corrélient avec C-1 ; C-4 ; C-3, C-5 et C-7 ce qui confirme l'hypothèse que le noyau aromatique est substitué dans les positions C-1, C-3, C-4 et C-5.



Spectre IV. 63. Spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P6.

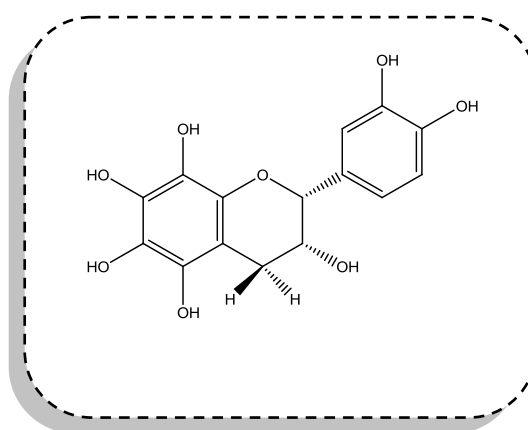
L'ensemble de ces données permet de déduire la présence d'une fonction ester en position C-1 de ce noyau aromatique et trois hydroxyles substituant ce noyau aromatique dans les positions C-3, C-4 et C-5. Ces données mènent à la structure d'un Méthyl gallate, un dérivé méthylé de l'acide gallique [6].

Les données relatives aux analyses des spectres de RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau IV.6

Tableau IV.6. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P6.

6		
	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
1	120,88	-
2	109,20	6,91(2H, s)
3	145,80	-
4	138,47	-
5	145,80	-
6	109,20	6,91(2H, s)
7	168,10	-
8	49,07	3,16 (3H, s)

IV. 1. 7. Elucidation structurale du composé P7 issu de la fraction F9

**Figure IV.20.** Structure de Dulcisflavane P7.

Ce produit a été isolé à partir de la fraction **F9** ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 94:6 v/v), par CLHP semi préparative en phase inverse pour donner dulcisflavane **P7**.

Conditions CLHP semi préparative en phase inverse

Colonne C-18, 250 x 10 mm, 5 μ m, thermo scientific, à température ambiante

Phases: solvant A constitué d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique et solvant B (acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique).

Débit: 5ml/min.

Profile gradient suivant : 0 min, 5% B; 15 min, 25%, 35 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min.

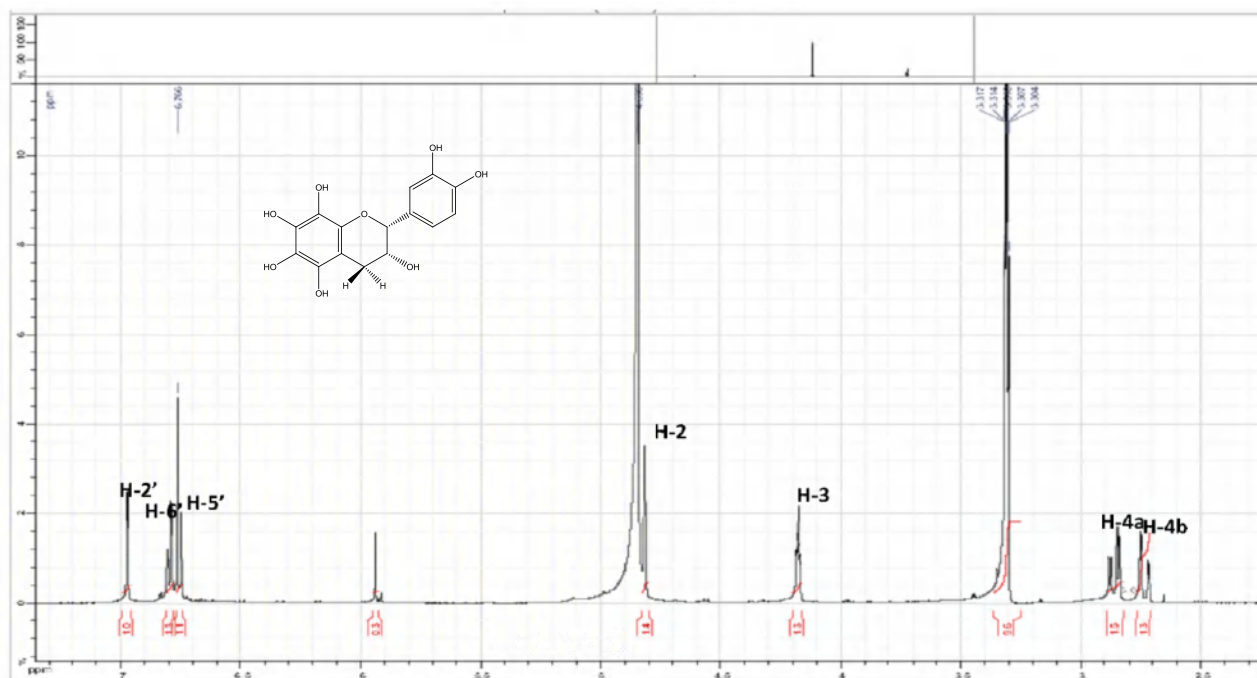
Le spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) (Spectre IV. 64) et ses étalements (Spectre IV. 65) et (Spectre IV. 66) montre qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavanol caractérisé par :

- Un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,97$ ppm ($J = 2$ Hz) attribuable à H-2'.
- Un doublet d'intégration de 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,76$ ppm ($J = 8$ Hz) attribuable à H-5'.
- Un doublet de doublets d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,80$ ppm ($J = 8,0 ; 2,0$ Hz) attribuable à H-6'.

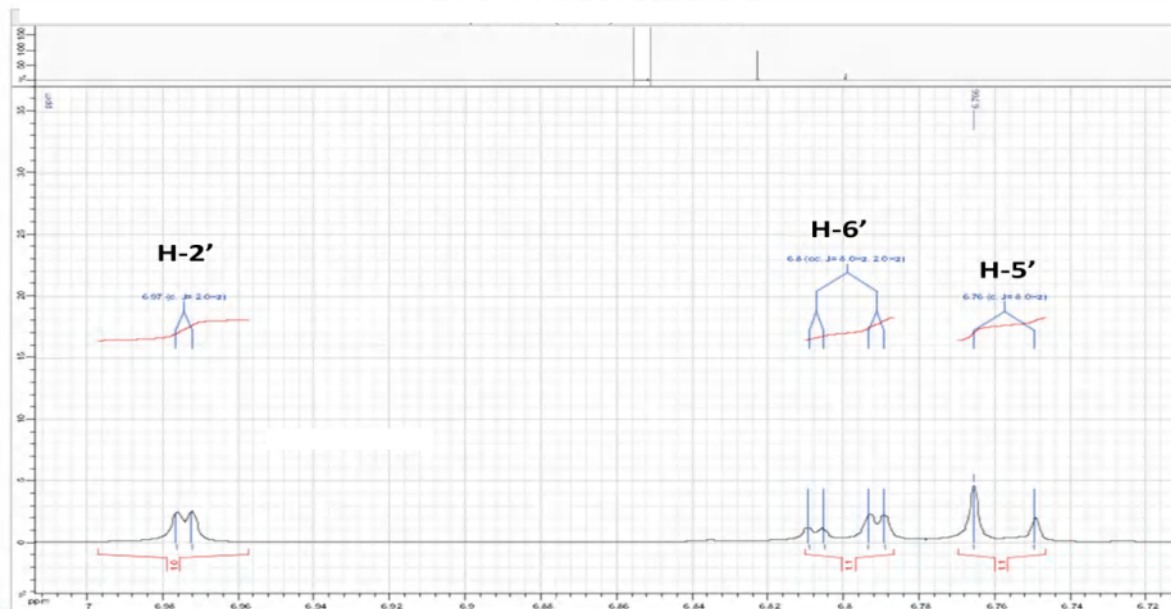
Ces signaux indiquent qu'il s'agit d'une disubstitution du noyau B, trois signaux désignant des protons aromatiques du système de spins ABX pour le cycle B.

- Quatre protons aliphatiques résonnant à δ_{H} (4,82 ; 4,18 ; 2,82 ; 2,74 ppm).

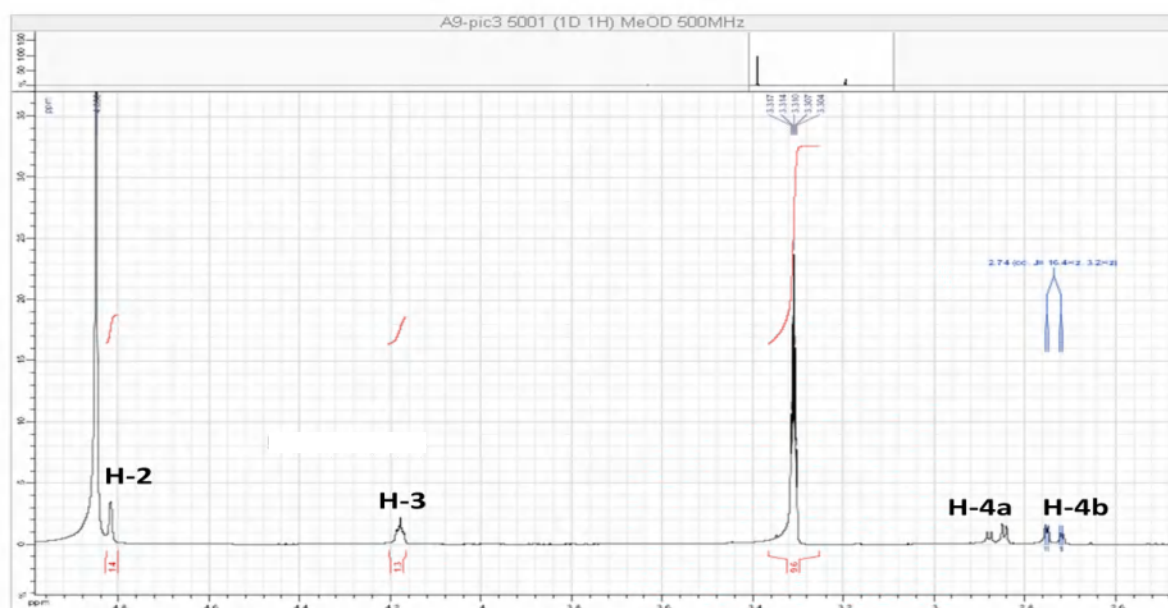
Les quatre protons aliphatiques sont ceux du cycle C d'une flavane. Un singulet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 4,82$ ppm attribuable à H-2, un multiplet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 4,18$ ppm attribuable à H-3, deux doublets de doublets d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 2,82 ; 2,74$ ppm ($J = 16,4 ; 4,6$ Hz) ; ($J = 16,4 ; 3,2$ Hz) attribuables aux H-4a et H-4b respectivement.



Spectre IV. 64. Spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P7.

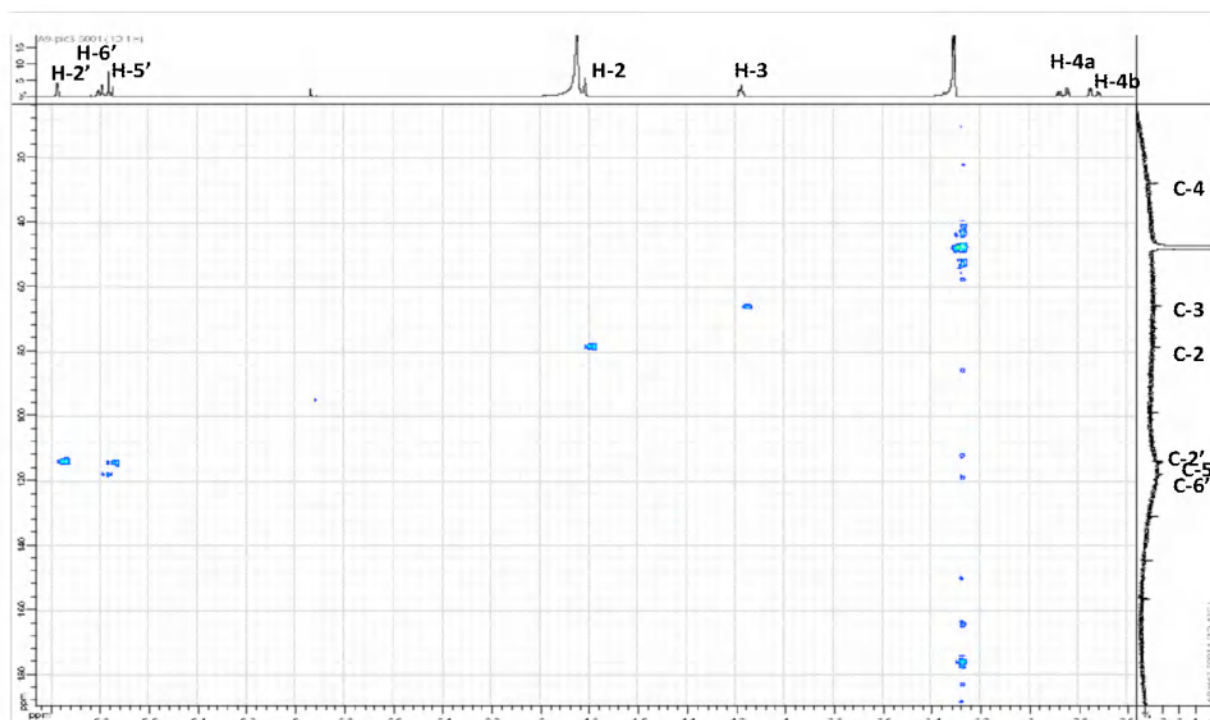


Spectre IV. 65. Etalement 1 spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P7.



Spectre IV. 66. Etallement 2 spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P7.

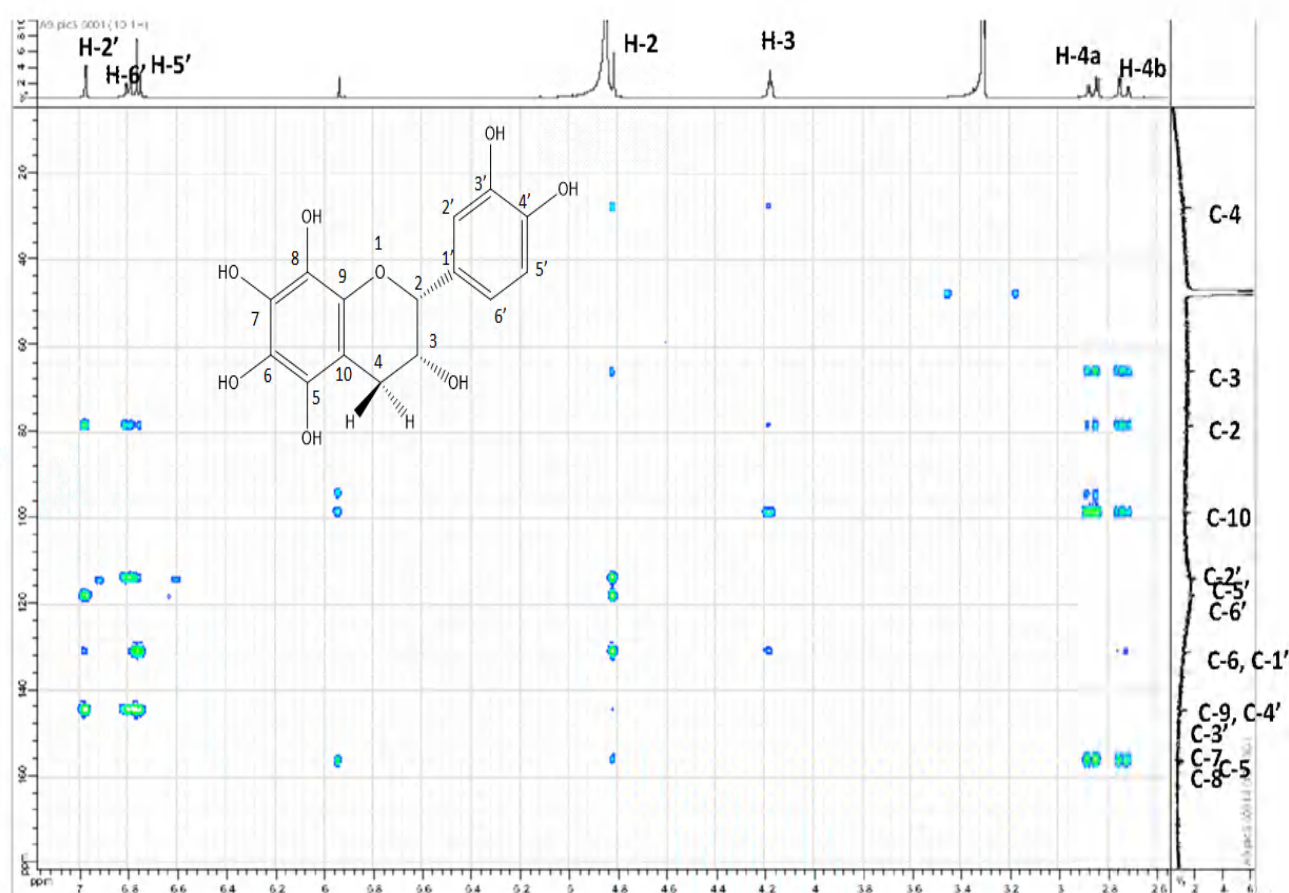
L'examen du spectre RMN HMQC (Spectre IV. 67) ainsi que le spectre ^{13}C (Spectre IV. 69) permettent de localiser les noyaux C-2', C-5' et C-6' du noyau flavonique à δ_{C} (113,82 ; 114,03 et 118,17 ppm) respectivement et les carbones C-2, C-3 et C-4 à δ_{C} (78,41 ; 65,87 et 27,88 ppm) respectivement.



Spectre IV. 67. Spectre RMN HMQC (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P7.

L'analyse du spectre HMBC (Spectre IV. 68) montre des taches de corrélation entre les trois hydrogènes H-2', H-5' et H-6', leurs carbones respectifs et les carbones voisins. Les protons H-2', H-5' et H-6' corrélient avec les noyaux à $\delta_C = 78,41$; $130,91$; $144,57$ ppm attribuables à C-2, C-1' et C-4' respectivement.

L'analyse du spectre HMBC (Spectre IV. 68) montre des taches de corrélation entre les protons aliphatiques H-2, H-3, H-4a et H-4b et leurs carbones voisins, le proton aliphatique H-2 montre des corrélations avec les carbones C-4, C-3, C-2', C-6', C-1' et C-3'. Le proton H-3 montre des corrélations avec C-10, C-4, C-2 et C-1', tandis que les protons H-4a et H-4b montrent des taches de corrélations avec les carbones C-3, C-2, C-10, C-5 et C-1'. Les valeurs de déplacements chimiques des carbones sont mentionnées dans le tableau IV. 7.

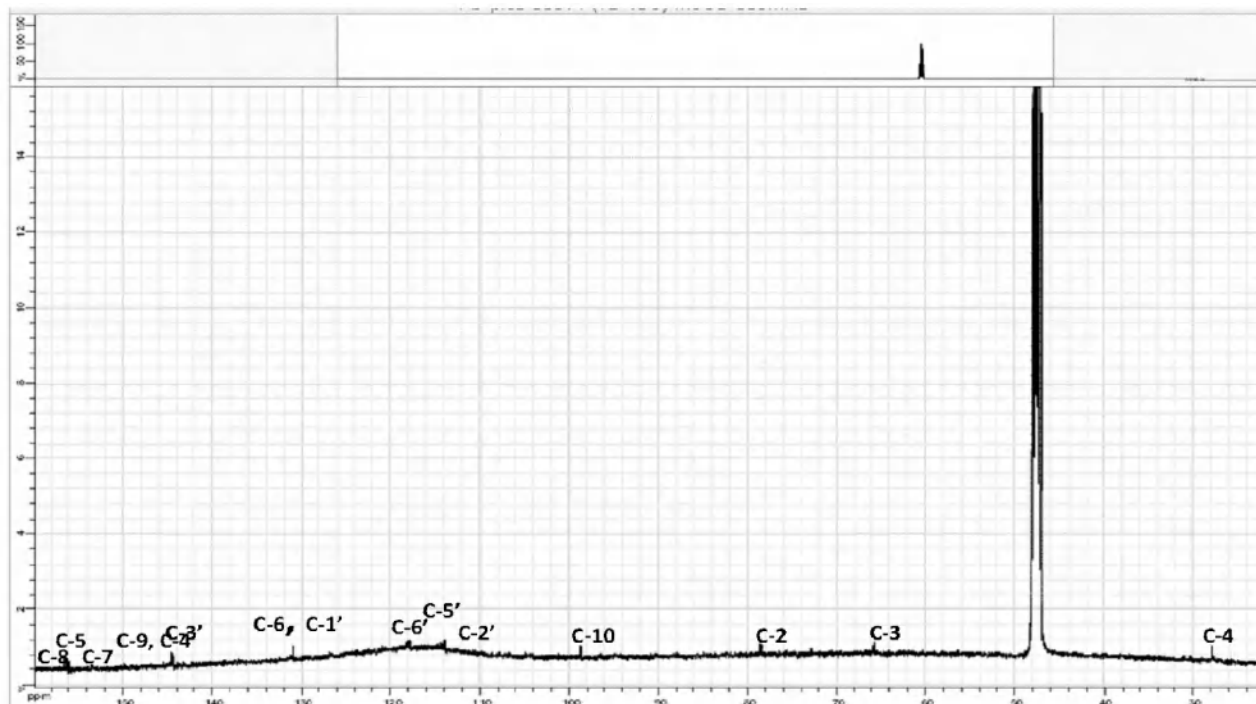


Spectre IV. 68. Spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P7.

L'absence des signaux caractéristiques du cycle aromatique A, indique sa substitution par des hydroxyles, cette hypothèse est confirmée par les données du spectre RMN ¹³C et le spectre HMBC désignant des carbones quaternaires substitués par des hydroxyles libres.

Les valeurs de déplacement chimique des carbones C-5, C-6, C-7 et C-8 à $\delta_C = 156,22$; $130,91$; $155,92$; $156,56$ ppm respectivement du cycle A et C-3' ; C-4' à $\delta_C = 144,40$; $144,57$

ppm respectivement du cycle B indiquent leurs substitutions par des groupements hydroxyles libres (Spectre IV. 69).



Spectre IV. 69. Spectre RMN ^{13}C (MeOH- d_4 , 125 MHz) du composé P7.

Sur la base de cette analyse et par comparaison avec les données de la littérature ,le composé P7 est identifié comme étant le dulcisflavane[7].

Tableau IV.7. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P7.

7		
	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
2	78,41	4,82 (1H, s large)
3	65,87	4,18 (1H, m)
4	27,88	2,82 (1H, dd, 16,4 ; 4,6) 2,74(1H, dd, 16,4 ; 3,2)
5	156,22	-
6	130,91	-
7	155,92	-
8	156,56	-
9	144,57	-
10	98,65	-
1'	130,91	-
2'	113,82	6,97 (1H, d, 2,0 Hz)
3'	144,40	-
4'	144,57	-
5'	114,03	6,76 (1H, d, 8,0)
6'	118,17	6,80 (1H, dd, 8,0 ; 2,0)

IV. 1. 8. Elucidation structurale du composé P8 issu de la fraction F9

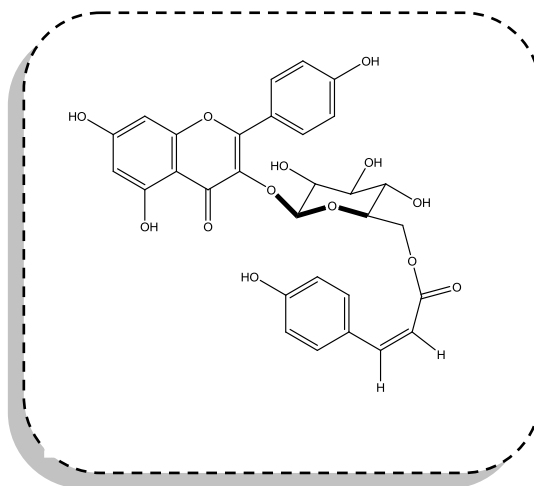


Figure IV.21. Structure de Cis tiliroside P8.

Ce produit a été isolé à partir de la fraction **F9** (CHCl₃/ MeOH, 94:6 v/v), par CLHP semi préparative en phase inverse pour donner cis-tiliroside **P8**.

Conditions CLHP semi préparative en phase inverse

Colonne C18, 250 x 10 mm, 5µm, thermo scientific, à température ambiante

Phases : solvant A constitué d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique et solvant B (acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique).

Débit: 5ml/min.

Profile gradient suivant : 0 min, 5% B; 15 min, 25%, 35 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min.

Le spectre RMN ¹H de ce composé montre une grande similitude avec celui du composé P4 trans tiliroside. En effet, ils se différencient seulement par les signaux relatifs aux protons H-7''' et H-8'''.

L'examen des spectres RMN ¹H (Spectre IV. 70) et ses étalements (Spectre IV. 71) et (Spectre IV. 72) montrent :

- Deux signaux sous forme de doublet d'intégration 1H chacun l'un à δ_H = 6,20 ppm et l'autre à δ_H = 6,36 ppm avec une constante de couplage (J= 2,4 Hz) attribuable à H-6 et H-8 successivement.

- Deux doublets intégrant chacun pour 2H à $\delta_H = 6,85$ ppm ($J = 8,4$ Hz) et $\delta_H = 7,95$ ppm ($J = 8,4$ Hz) attribuables respectivement aux protons H-3', H-5' et H-2', H-6' du cycle B du noyau flavonique.
- Un doublet intégrant pour 1H à $\delta_H = 5,41$ ppm ($J = 7,2$ Hz) caractéristique du proton anomérique de l'hexose.
- Deux doublets intégrant chacun pour 2H à $\delta_H = 7,55$ ppm ($J = 8,9$ Hz) et $\delta_H = 6,70$ ppm ($J = 8,6$ Hz) indiquant la présence d'un cycle aromatique d'un système A_2B_2 où les protons sont symétriques H-2'', H-6'' et H-3'', H-5''.
- Deux doublets intégrant chacun pour 1H à $\delta_H = 6,68$ ppm ($J = 12$ Hz) et $\delta_H = 5,47$ ppm ($J = 12$ Hz) indiquant la présence d'une configuration géométrique cis de deux protons oléfiniques.

Les données relatives à la RMN 1H sont reportées sur le tableau (Tableau IV.8).

Les signaux observés sur le spectre RMN 1H révèlent deux signaux sous forme de doublet d'intégration 1H chacun sont attribués aux protons H-6 à $\delta_H = 6,20$ ppm ($J = 2,4$ Hz) et H-8 à $\delta_H = 6,36$ ppm ($J = 2,4$ Hz) du cycle A du noyau flavonique, ainsi deux doublets intégrant chacun pour 2H à $\delta_H = 6,85$ ppm ($J = 8,4$ Hz) et $\delta_H = 7,95$ ppm ($J = 8,4$ Hz) attribuables respectivement aux protons H-3', H-5' et H-2', H-6' du cycle B. Les valeurs des constantes de couplages et les résultats du spectre COSY suggèrent la présence d'un aglycone de type Kaempférol.

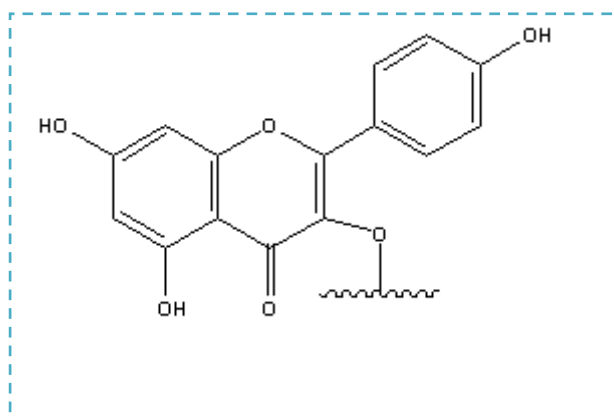
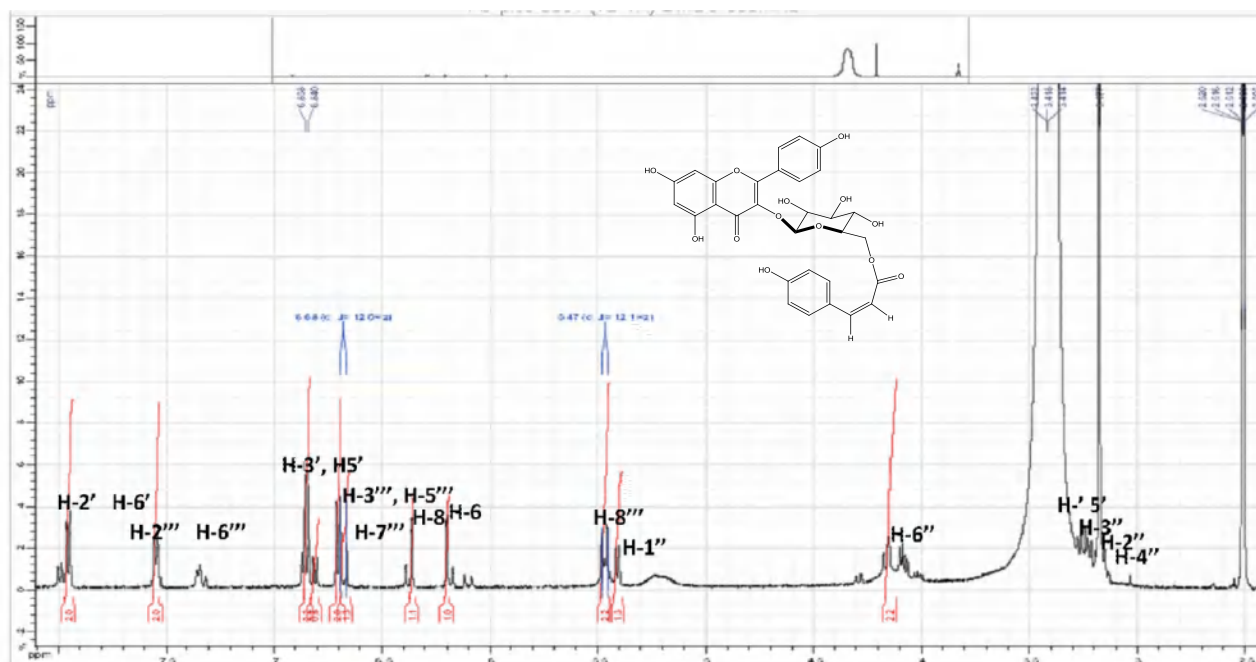
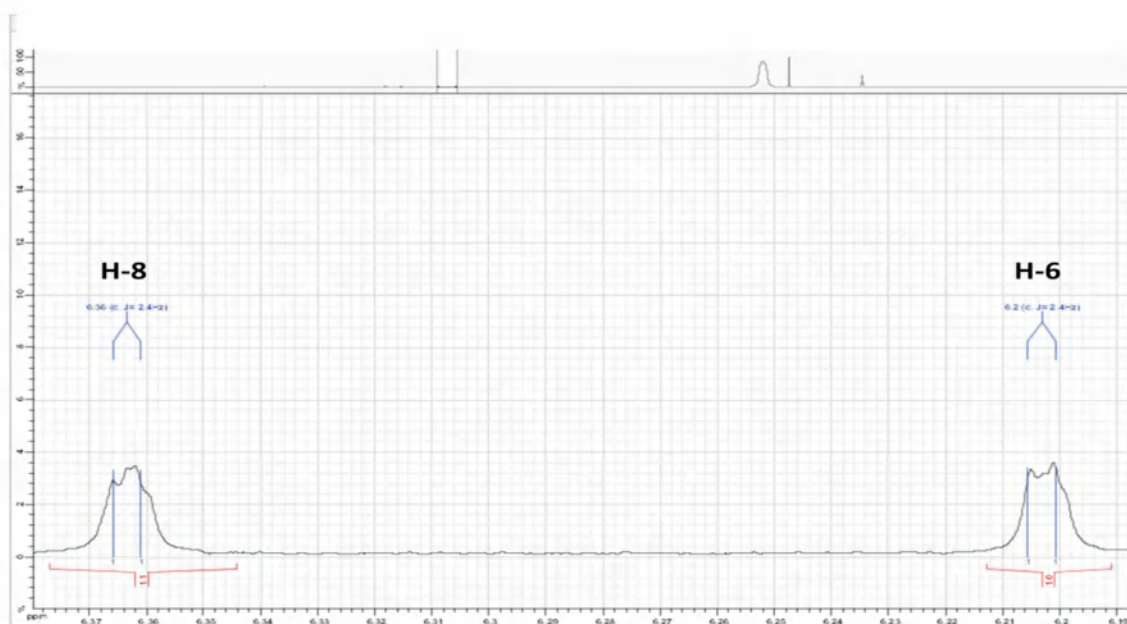


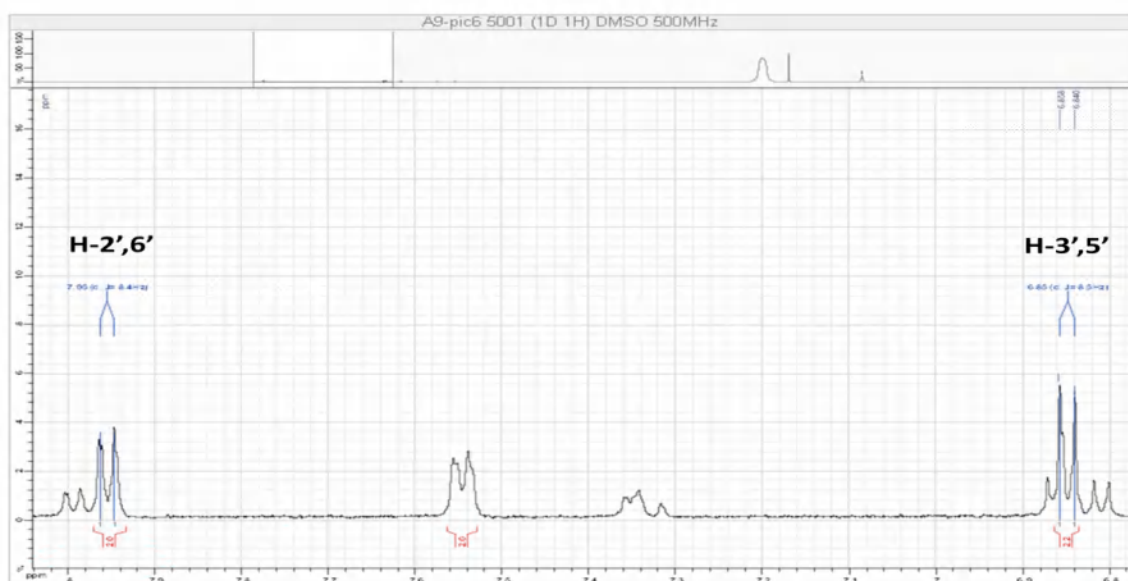
Figure IV.22. Structure d'un aglycone de type Kaempférol.



Spectre IV. 70. Spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) du composé P8.

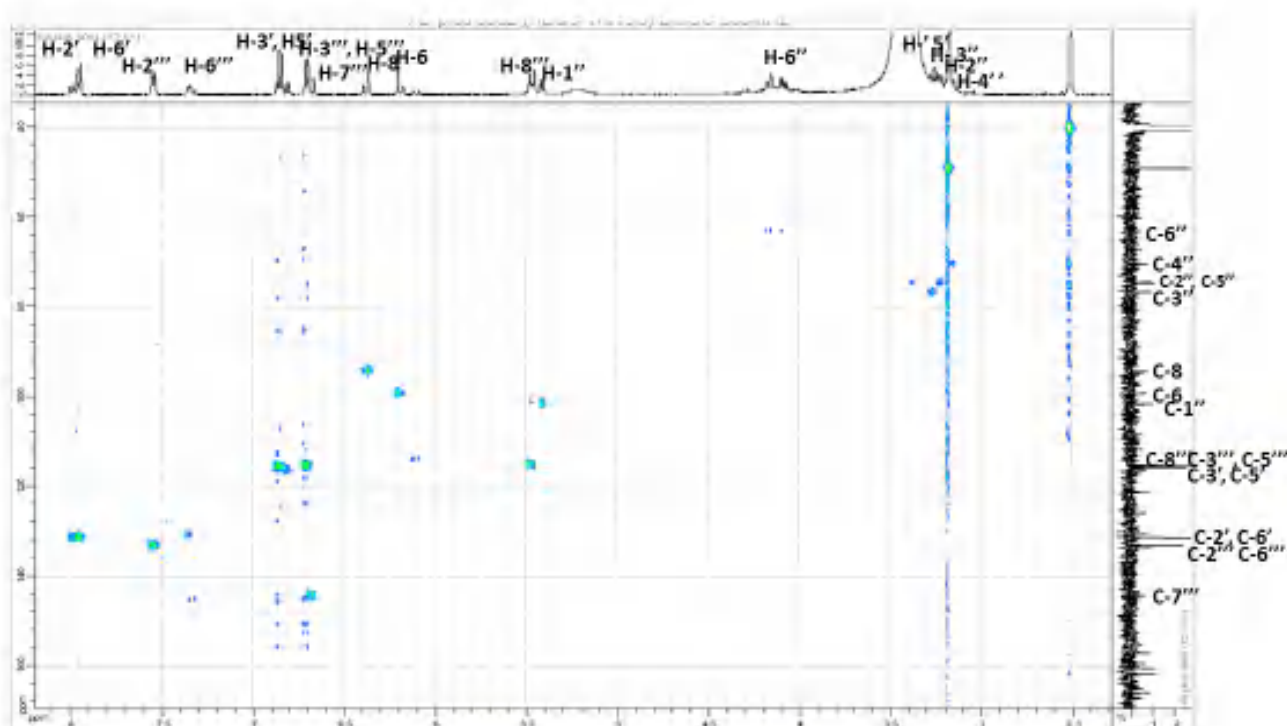


Spectre IV.71. Etallement 1 spectre RMN ^1H (DMSO, 500 MHz, δ ppm) du composé P8.

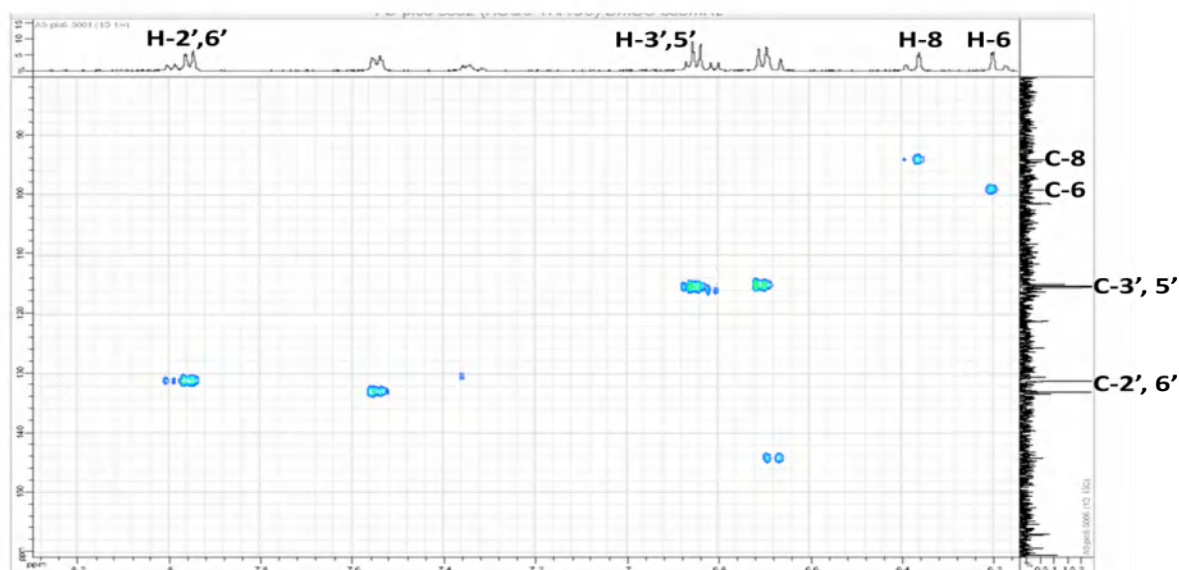


Spectre IV.72. Étalement 2 spectre RMN ^1H (DMSO, 500 MHz, δ ppm) du composé P8.

Le spectre RMN de l'expérience HMQC (Spectre IV. 73) et son étalement (Spectre IV. 74) permettent de localiser les noyaux du cycle flavonique A et B ; C-6, C-8 et C-2', C-6' et C-3', C-5' à δ_{C} (99,18 ; 94,16 ; 131,26 ; 115,24 ppm) respectivement.



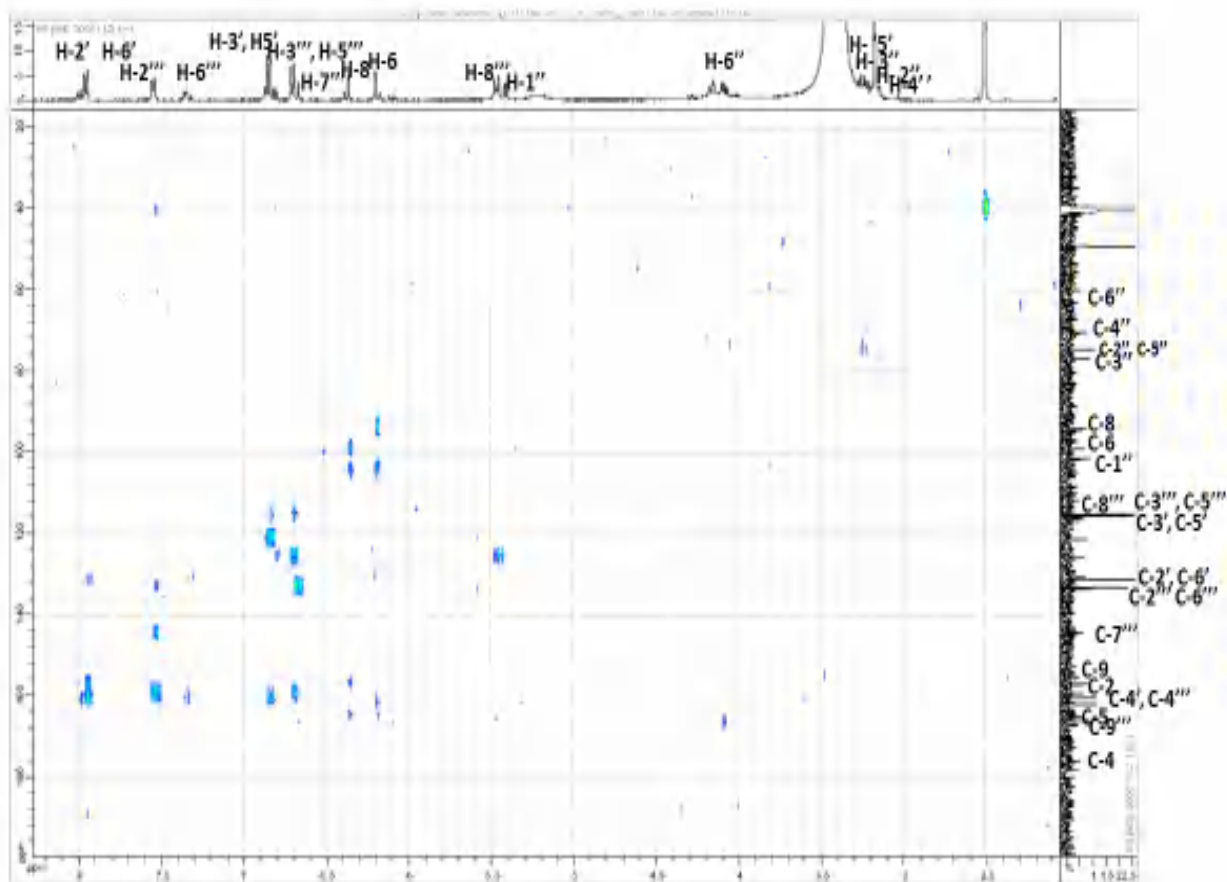
Spectre IV.73. Spectre RMN HSQC (DMSO-d₆, 500 MHz) du composé P8.



Spectre IV. 74. Etalement 1 spectre RMN HSQC (DMSO-d₆, 500 MHz) du composé P8.

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre IV. 75), le proton H-6 montre une tache de corrélation avec les carbones à $\delta_C = 164,64$; $104,75$ ppm ce qui permet de positionner les noyaux C-5, et C-10 respectivement. Le proton H-8 montre une tache de corrélation avec un carbone quaternaire résonnant à $\delta_C = 104,75$ ppm attribuable à C-10, deux taches de corrélation avec deux carbone quaternaire à $\delta_C = (164,64 ; 155,71$ ppm) attribuable à C-5 et C-9 respectivement.

Les protons aromatiques H2' et H-6' montre une corrélation avec le carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 160,22$ ppm attribuable à C-4' et un carbone quaternaire à $\delta_C = 156,85$ ppm permettent son attribution à C-2 et les protons H-3' et H-5' corrélient avec le carbone à $\delta_C = 121,21$ ppm permet son attribution au carbone C-1'.



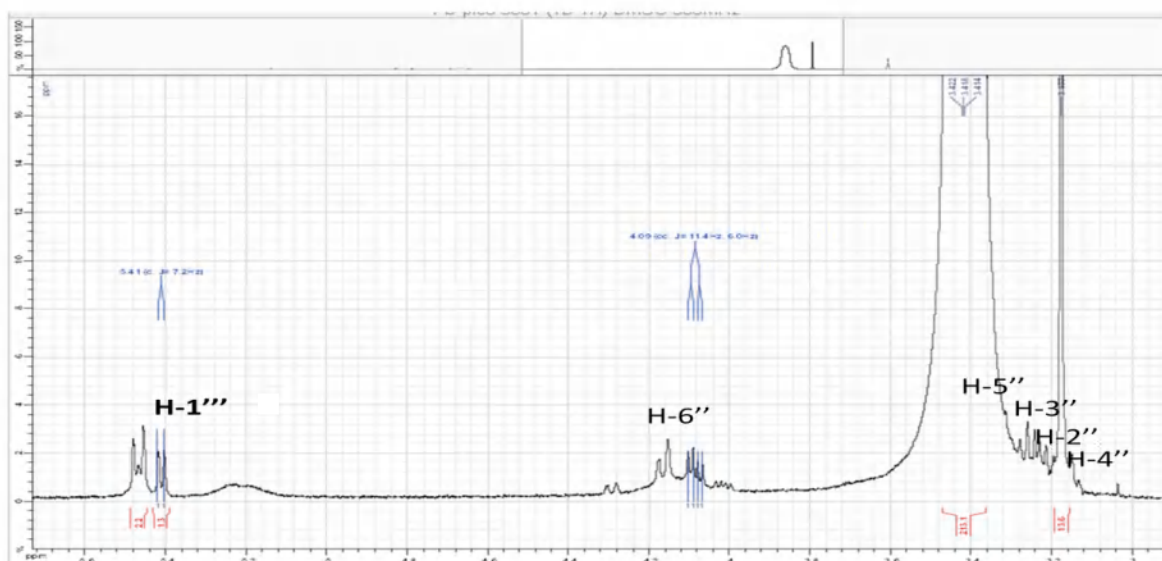
Spectre IV. 75. Spectre RMN HMBC (DMSO, 500 MHz, δ ppm) du composé P8.

La présence d'un doublet intégrant pour 1H à δ_H 5,41 ppm ($J = 7,2$ Hz) caractéristique du proton anomérique de l'hexose, cet hexose comporte :

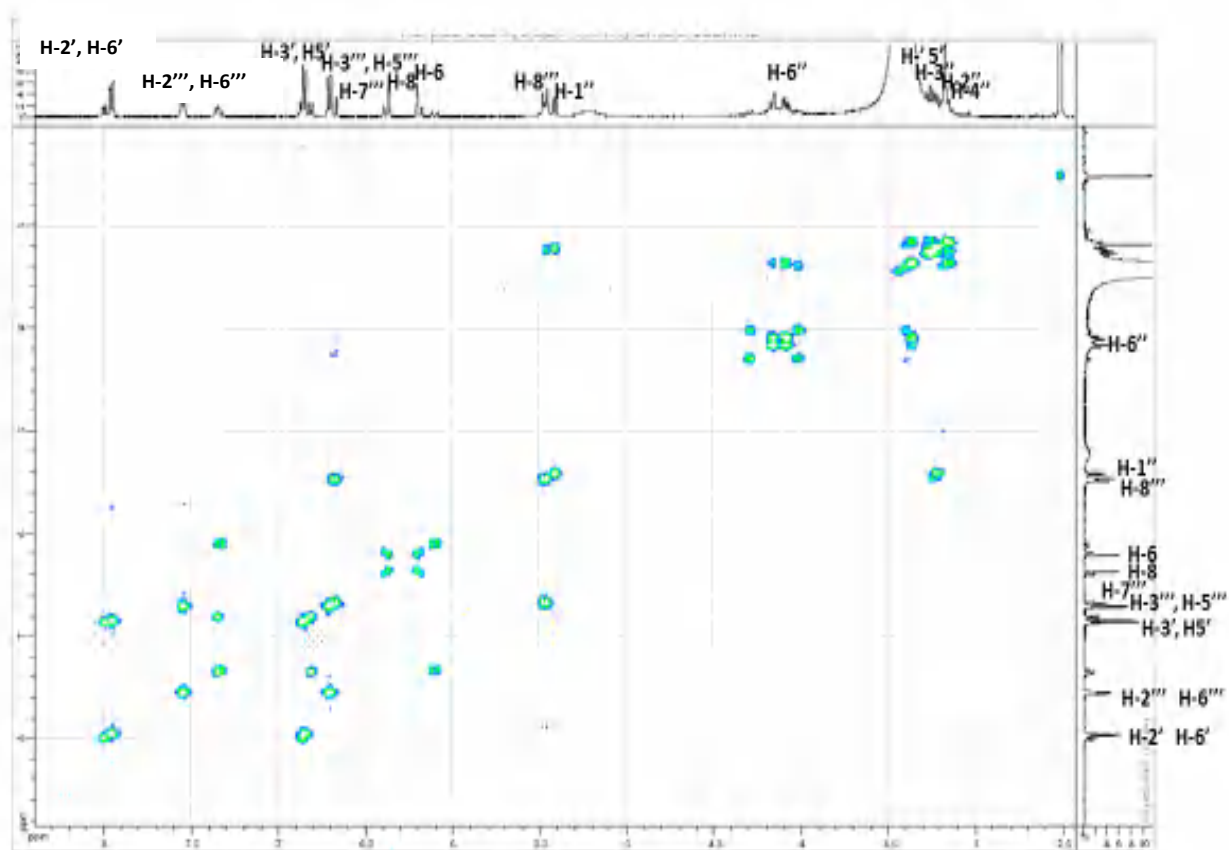
Un CH_2 à $\delta_H = 4,16$ ppm (1H, dd, $J = 11,4 ; 2,4$) et $\delta_H = 4,09$ (1H, dd, $J = 11,4 ; 6$), $\delta_C = 60,00$ ppm, attribuable au CH_2 de la position C-6'' de l'hexose (Spectre IV. 76). Étalement 3 spectre RMN ^1H).

Le spectre de l'expérience COSY (Spectre IV. 77) et son étalement (Spectre IV. 78), permettent de localiser les protons de l'hexose, le proton anomérique H-1'' montre une tache de corrélation avec un proton à $\delta_H = 3,22$ ppm (1H, m), ce proton est attribuable à H-2'' ($\delta_C = 74,57$ ppm). Ce dernier corrèle avec le proton résonnant sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,27$ ppm (1H, m) attribuable à H-3'' ($\delta_C = 76,66$ ppm).

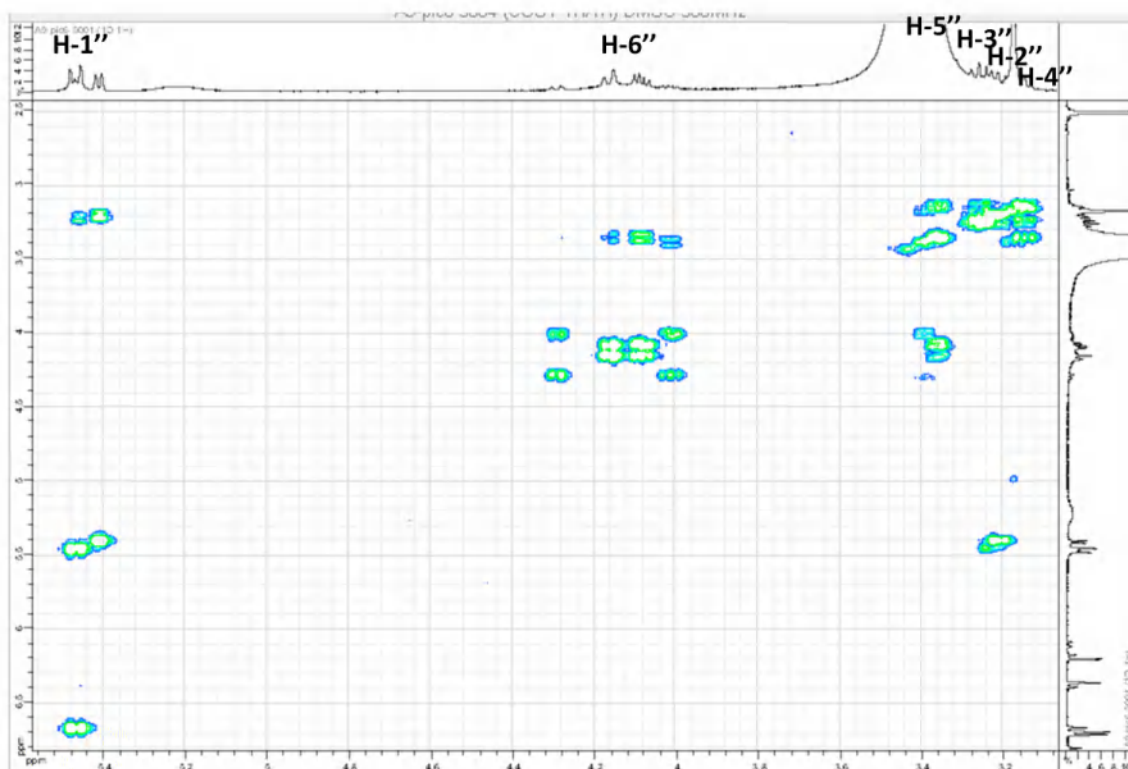
Le proton H-3'' corrèle avec un proton sous forme d'un multiplet à $\delta_H = 3,16$ ppm (1H, m) attribuable à H-4'' ($\delta_C = 70,41$ ppm), la constante de couplage « 8,0 Hz » supposent des interactions axiale-axiale entre H-3''/H-4'' ; H-4''/H-5'' et indiquent une orientation axiale de H-4'', ce qui oriente vers un glucosyle. Le proton H-6'' corrèle avec un multiplet à $\delta_H = 3,37$ ppm (1H, m) attribuable à H-5'' ($\delta_C = 74,39$ ppm), ce qui indique que l'hexose est un β -glucose.



Spectre IV. 76. Etalement 3 spectre RMN ^1H (DMSO, 500 MHz, δ ppm) du composé P8.

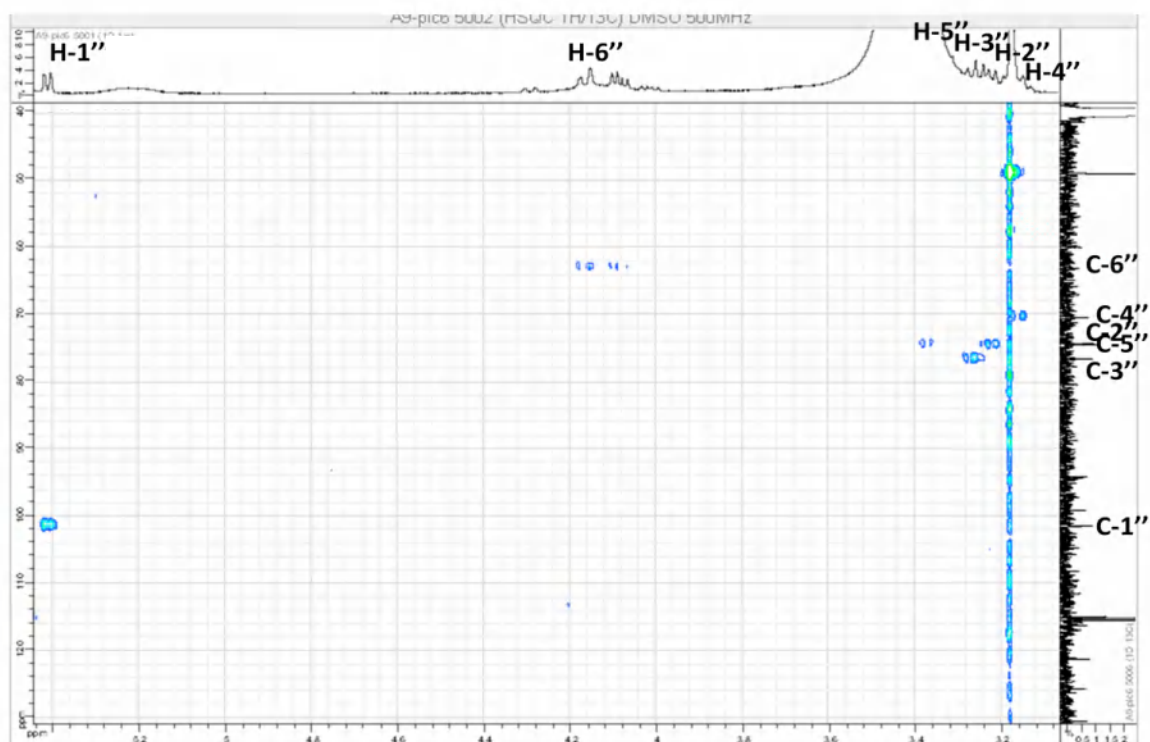


Spectre IV. 77. Spectre RMN COSY (DMSO, 500 MHz, δ ppm) du composé P8.



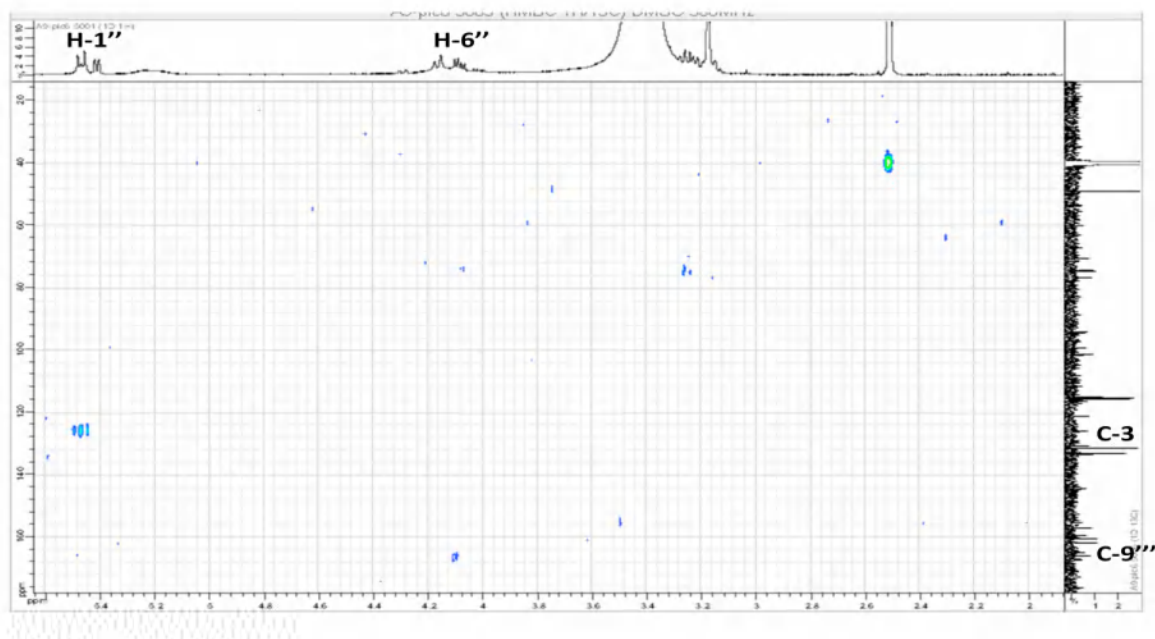
Spectre IV. 78. Etallement 1 spectre COSY (DMSO, 500 MHz, δ ppm) du composé P8.

Le spectre de l'expérience HMQC (Spectre IV. 79) permet de localiser les noyaux C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'' du glucose à δ_C (101,43; 74,57; 76,66 ; 70,41; 74,39 et 60,00 ppm) successivement.



Spectre IV. 79. Etallement 2 spectre HSQC (DMSO, 500 MHz, δ ppm) du composé P8.

Le proton H-1'' montre une tache de corrélation dans le spectre relatif à l'expérience HMBC avec le carbonyle à $\delta_c = 139,52$ ppm attribuable à C-3 (Spectre IV. 80), ce qui indique l'attachement de ce glucose au carbone C-3 de l'aglycone Kaempférol.



Spectre IV. 80. Etallement 1 spectre RMN HMBC (DMSO, 500 MHz, δ ppm) du composé P8.

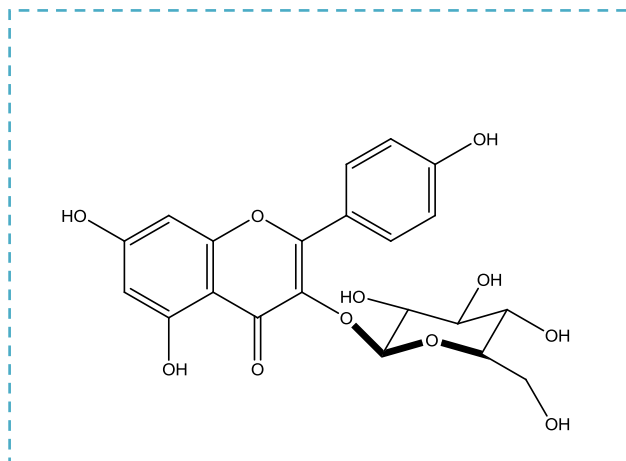
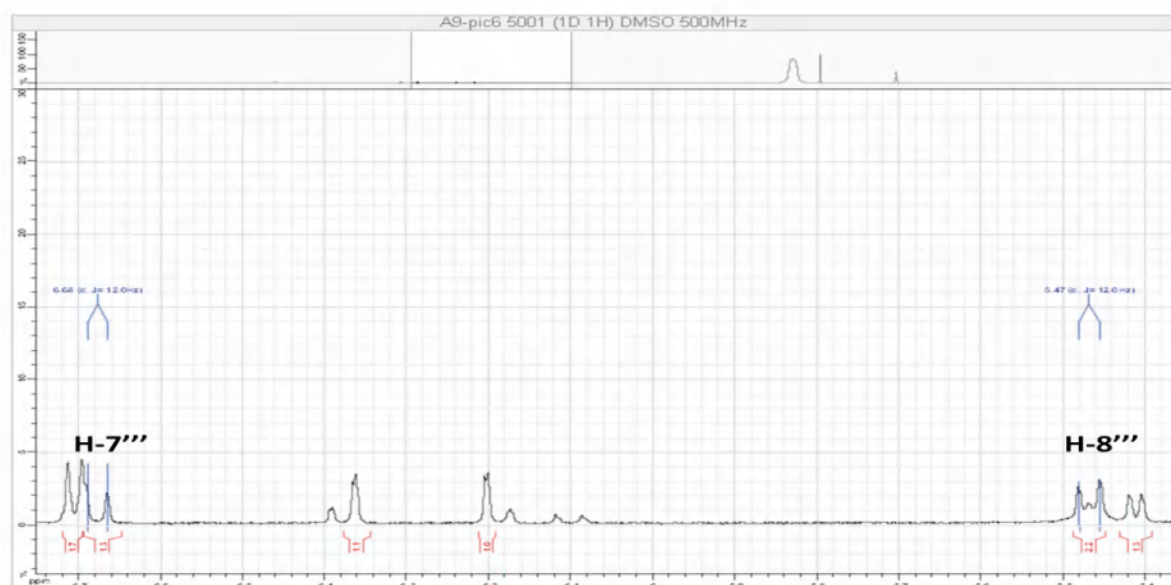


Figure IV.23. Structure de l'astragaline.

L'étalement 4 du spectre RMN ^1H (Spectre IV. 81) montre deux doublets intégrant chacun pour 1H à δ_{H} 6,68 ppm ($J = 12$ Hz) et δ_{H} 5,47 ppm ($J = 12$ Hz) attribuable à C-7''' et C-8'''.

Les données du spectre COSY et la constante de couplage $J = 12$ Hz indiquant que ces deux protons sont des protons oléfiniques d'une configuration géométrique Cis.

Le spectre HMBC (Spectre IV. 80) montre aussi une corrélation du proton H-6'' de l'hexose avec le carbone quaternaire résonant à $\delta_{\text{C}} = 165,78$ ppm attribuable à C-9'''.



Spectre IV. 81. Etalement 4 spectre RMN ^1H (DMSO- d_6 , 500 MHz) du composé P8.

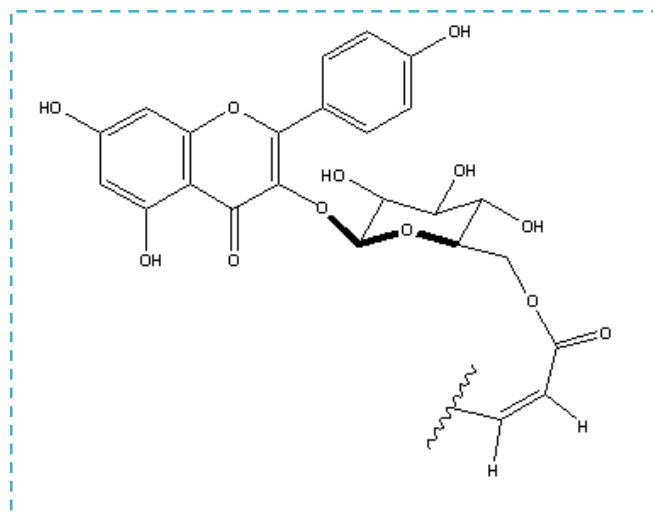
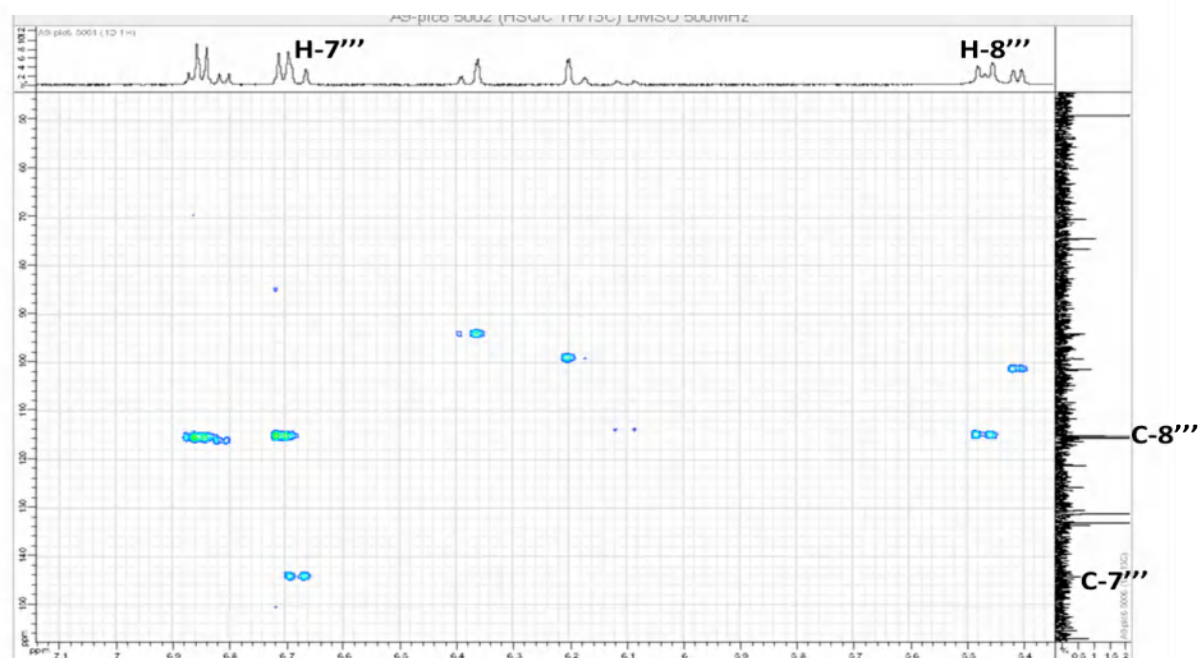


Figure IV.24. Structure partielle du composé P8.

Le spectre HSQC (Spectre IV. 82) permet de localiser les carbones des deux protons oléfiniques sous forme de doublets d'intégration 1H chacun résonnant à $\delta_H = 6,68$ ppm et $\delta_H = 5,47$ ppm attribuable à C-7''' et C-8''' à $\delta_C = 144,13$ ppm et $\delta_C = 115,02$ ppm.



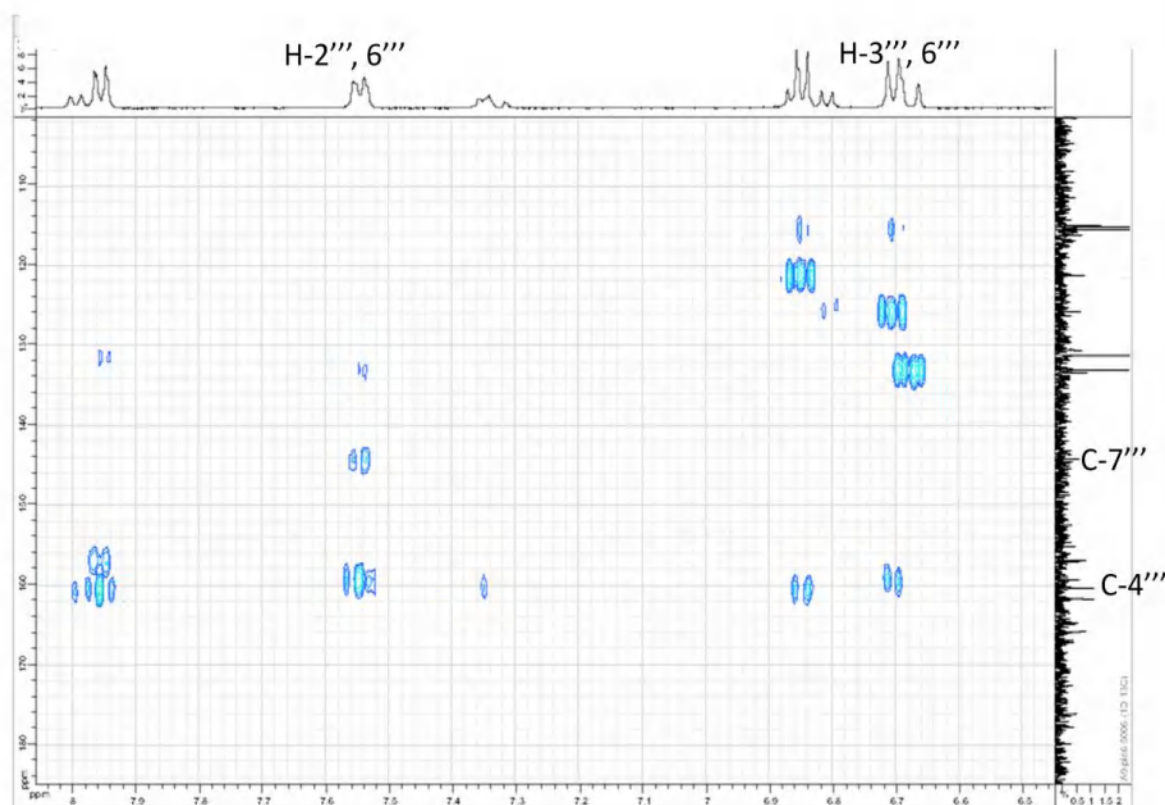
Spectre IV. 82. Etalement 3 spectre RMN HSQC (DMSO-d₆, 500 MHz) du composé P8.

Le spectre RMN ^1H montre deux doublets intégrant chacun pour 2H à $\delta_{\text{H}} = 7,55$ ppm ($J = 8,9$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 6,70$ ppm ($J = 8,9$ Hz) indiquant la présence d'un cycle aromatique d'un système A_2B_2 où les protons sont symétriques $\text{H-2}'''$, $\text{H-6}'''$; $\text{H-3}'''$ - $\text{H-5}'''$.

Le spectre RMN de l'expérience HMQC permet de localiser les noyaux $\text{C-2}'''$, $\text{C-6}'''$ et $\text{C-3}'''$, $\text{C-5}'''$ à δ_{C} (133,09 ; 115,53 ppm) respectivement.

Les deux doublets intégrant chacun pour 2H à $\delta_{\text{H}} = 7,55$ ppm ($J = 8,9$ Hz) et $\delta_{\text{H}} 6,70$ ppm ($J = 8,9$ Hz) attribuable aux $\text{H-2}'''$, $\text{H-6}'''$ et $\text{H-3}'''$ - $\text{H-5}'''$ montrant des corrélations sur le spectre de l'expérience HMBC (Spectre IV. 83) avec un carbone quaternaire oxygéné résonnant à $\delta_{\text{C}} = 161,69$ ppm attribuable à $\text{C-4}'''$.

Le spectre HMBC montre aussi des corrélations entre les deux protons $\text{H-2}'''$, $\text{H-6}'''$ à $\delta_{\text{H}} = 7,55$ ppm et les noyaux $\text{C-7}'''$ résonnant à $\delta_{\text{C}} = 144,13$ ppm, ce qui indique l'attachement de ce cycle aromatique au carbone méthine $\text{C-7}'''$.



Spectre IV. 83. Etalement 2 spectre RMN HMBC (DMSO- d_6 , 500 MHz) du composé P8.

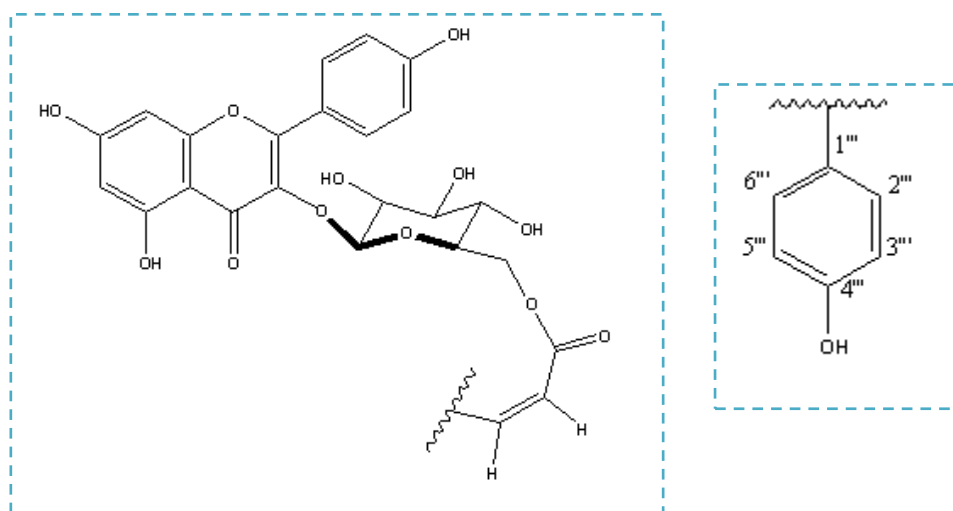
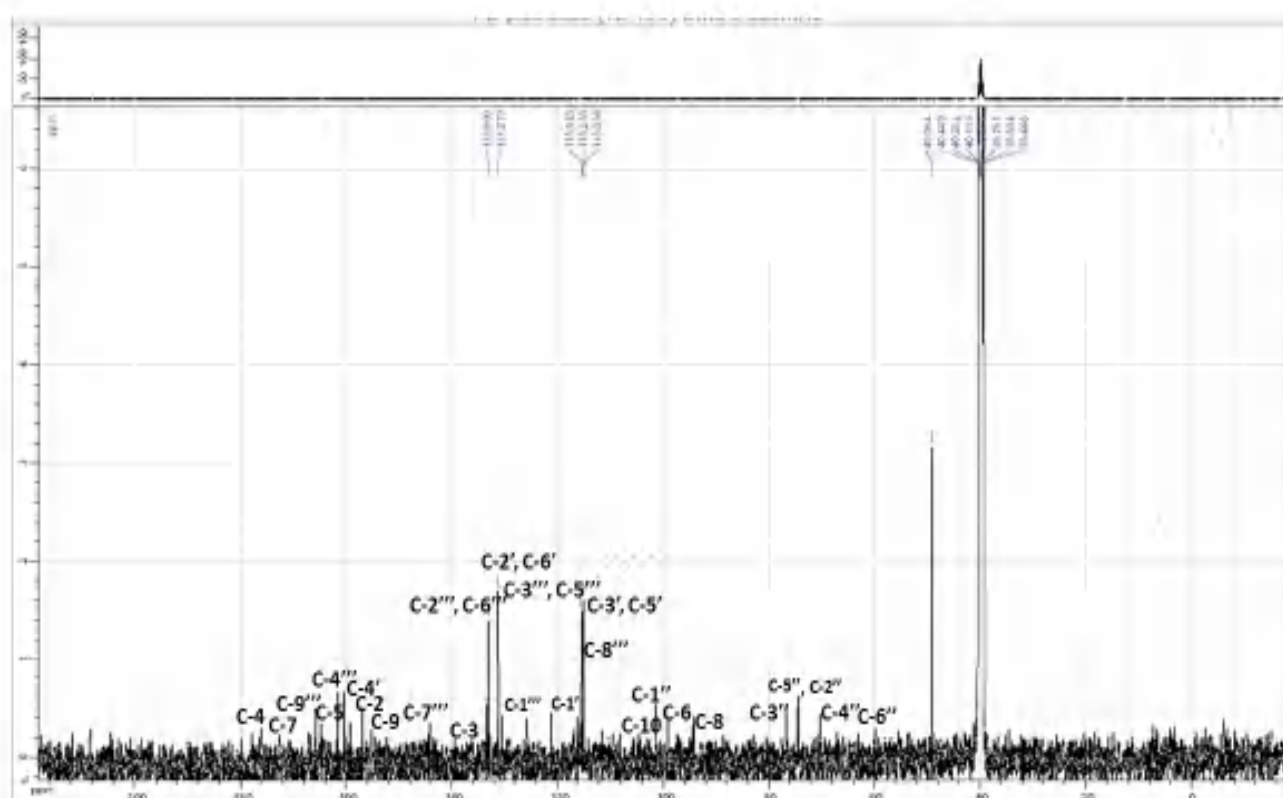


Figure IV.25. Structure partielle du composé P8.



Spectre. IV. 84. Spectre RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz) du composé P8.

L'ensemble de ces données mènent à la numérotation suivante :

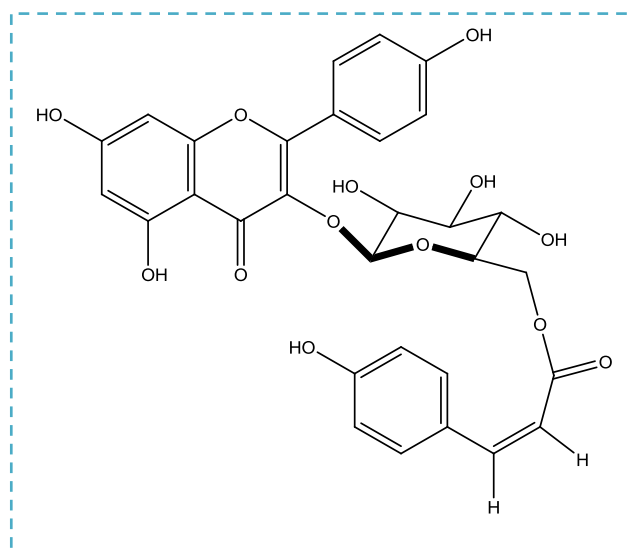


Figure IV.26. Structure du composé Cis tiliroside P8.

Toutes ces données sont en faveur d'une structure de Kaempférol-3-O-[6''-O-(Z)-p-coumaroyl]- β -D-glucopyranoside connu sous le nom Cis-tiliroside.

L'ensemble de ces données mènent à la structure de Cis-tiliroside [4].

Les données relatives aux analyses des spectres de RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau IV.8.

Tableau IV.8. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P8.

8		
	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
2	156,85	-
3	126,42	-
4	176,01	-
5	164,64	-
6	99,18	6,20 (1H, d, 2,4)
7	172,64	-
8	94,16	6,36 (1H, d, 2,4)
9	155,716	-
10	104,75	-
1'	121,21	-
2'	131,26	7,95 (2H, d, 8,4)
3'	115,24	6,85(2H, d, 8,4)
4'	160,22	-
5'	115,24	6,85 (2H, d, 8,4)
6'	131,26	7,95 (2H, d, 8,4)
1''	101,43	5,41 (1H, d, 7,2)
2''	74,57	3,22 (1H, m)
3''	76,66	3,27 (1H, m)
4''	70,41	3,16 (1H, m)
5''	74,39	3,37 (1H,m)
6''	60,00	4,16 (dd, 11,4 ; 2,4) 4,09(dd,11 ;4, 6)
1'''	125,72	-
2'''	133,09	7,55 (2H, d, 8,9)
3'''	115,53	6,70 (2H, d,8,9)
4'''	161,69	-
5'''	115,53	6,70 (2H, d, 8,9)
6'''	133,09	7,55 (2H, d, 8,9)
7'''	144,13	6,68 (1H, d, 12,0)
8'''	115,02	5,47 (1H, d, 12,0)
9'''	165,78	-

IV. 1. 9. Elucidation structurale du composé P9 issu de la fraction F10

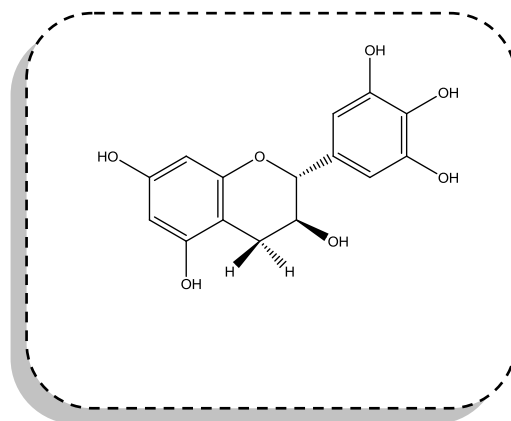


Figure IV.27. Structure du Gallocatechine P9.

Ce produit a été isolé à partir de la fraction **F10** (CHCl₃/MeOH, 94:6 v/v), par CLHP semi préparative en phase inverse pour donner gallocatechine **P9**.

Conditions CLHP semi préparative en phase inverse

Colonne C-18, 250 x 10 mm, 5µm, thermo scientific, à température ambiante

Phases : solvant A constitué d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique et solvant B (acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique).

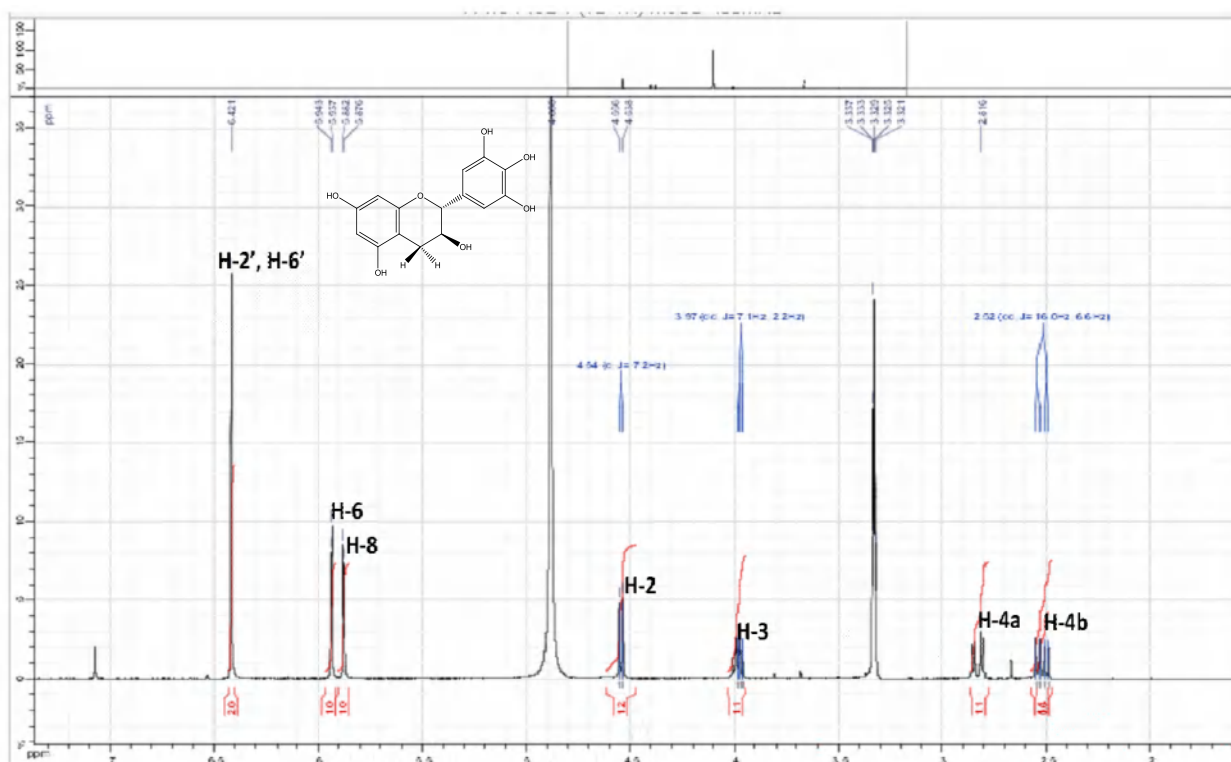
Débit: 5ml/min.

Profile gradient suivant : 0 min, 5% B; 15 min, 25%, 35 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min.

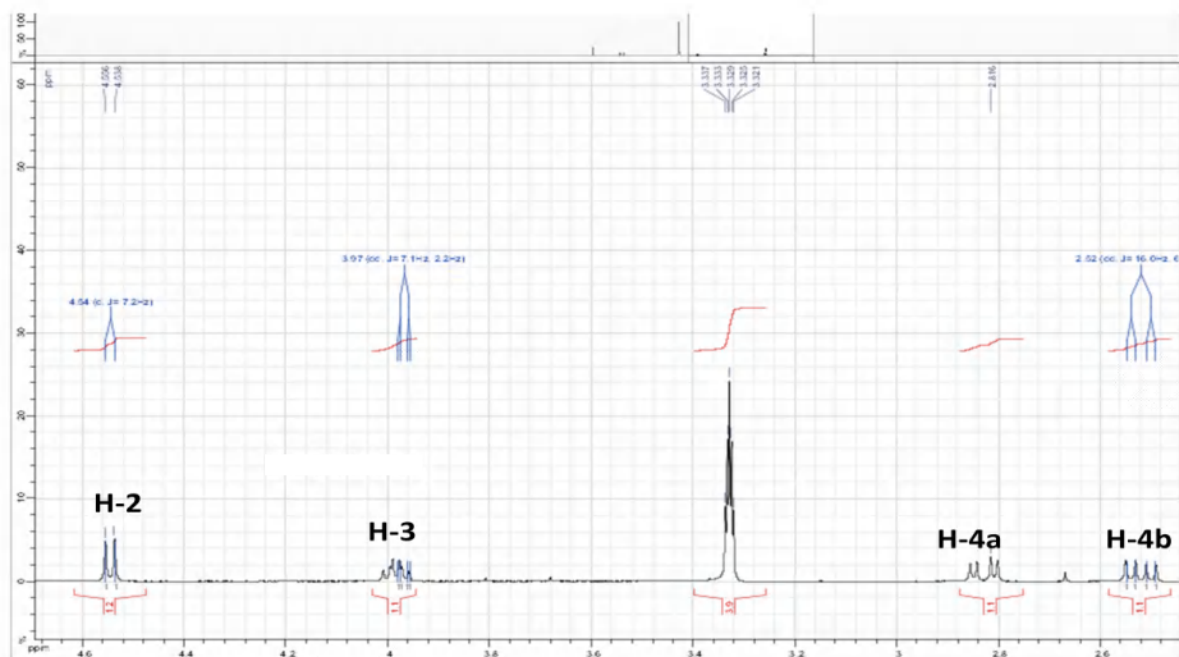
L'examen des spectres RMN ¹H (Spectre IV. 85) et ses étalements (Spectre IV. 86) et (Spectre IV. 87) montrent qu'il s'agit d'un flavonoïde de type favanol caractérisé par:

- Deux signaux sous forme de doublet d'intégration 1H chacun l'un à $\delta_H = 5,94$ ppm et l'autre à $\delta_H = 5,88$ ppm avec une constante de couplage ($J = 2,3$ Hz) attribuables à H-6 et H-8 successivement du cycle A.
- Un singulet intégrant pour 2H à $\delta_H = 6,42$ ppm attribuable aux protons H-2', H-6' du cycle B.
- Quatre protons aliphatiques, résonnent à δ_H (4,55 ; 3,98 ; 2,52 ; 2,83 ppm) attribuables aux protons H-2, H-3, H-4b et H-4a du cycle C.

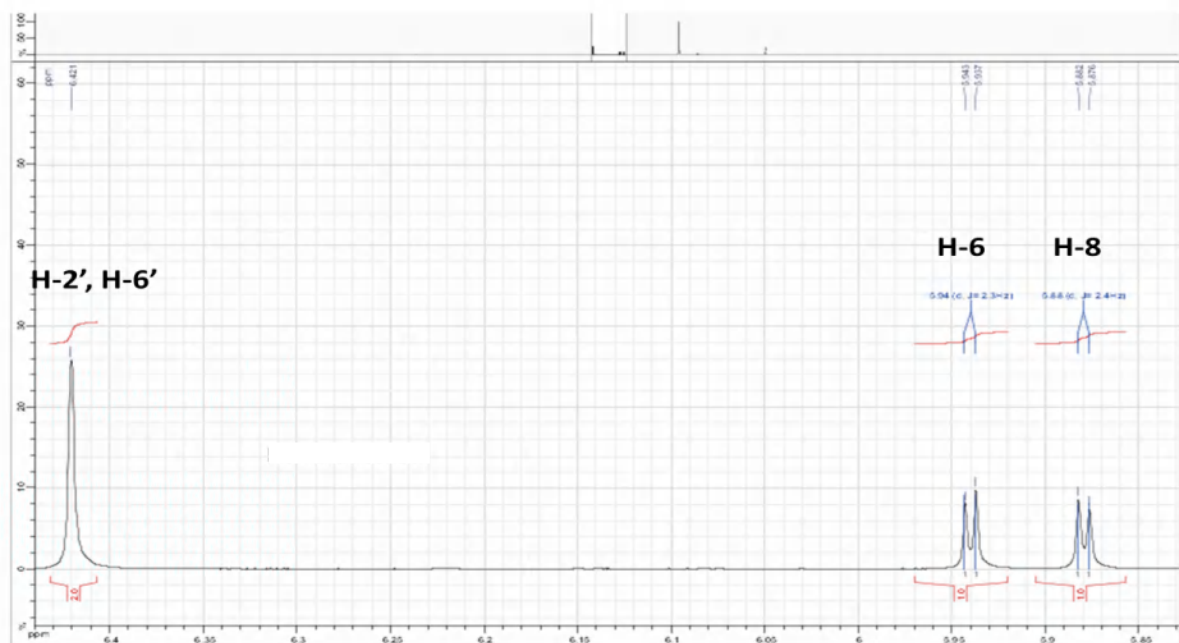
Les signaux observés sur le spectre RMN ^1H révèlent deux signaux sous forme de doublet d'intégration 1H chacun sont attribués aux protons H-6 à $\delta_{\text{H}} = 5,94$ ppm ($J = 2,3$ Hz) et H-8 à $\delta_{\text{H}} = 5,88$ ppm ($J = 2,3$ Hz) du cycle A, ainsi un singulet intégrant pour 2H à $\delta_{\text{H}} = 6,42$ ppm attribuable aux protons H-2', H-6' du cycle B et quatre protons aliphatiques, un doublet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 4,55$ ppm ($J = 7,2$ Hz) attribuable à H-2, un multiplet d'intégration 1H à $\delta_{\text{H}} = 3,98$ ppm attribuable à H-3, deux doublets de doublet d'intégration 1H chacun à $\delta_{\text{H}} = 2,52$ et $2,83$ ppm ($J = 16,0 ; 7,7$ Hz) ; ($J = 16,0 ; 6,6$ Hz) attribuables aux H-4b et H-4a respectivement.



Spectre IV. 85. Spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P9.



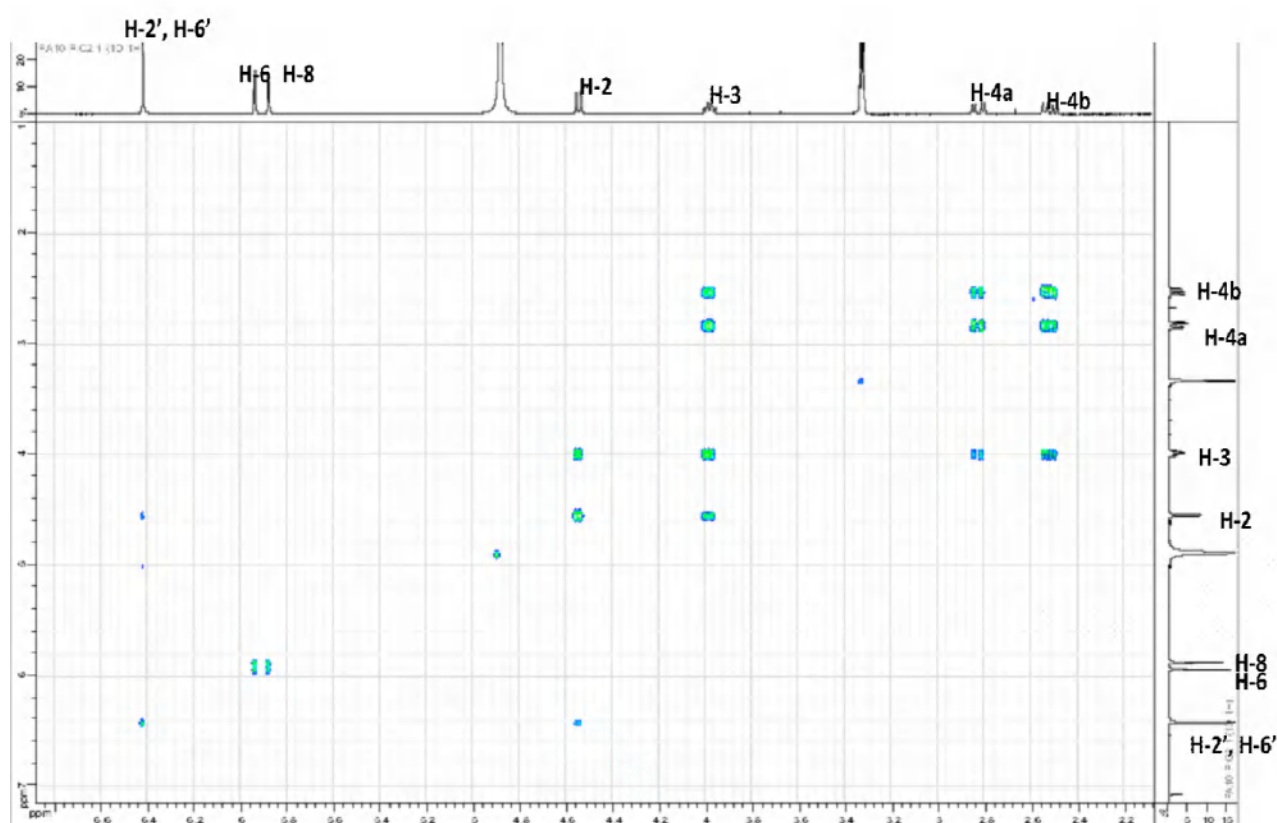
Spectre IV. 86. Etalement 1 spectre RMN ¹H (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P9.



Spectre IV. 87. Etalement 2 spectre RMN ¹H (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P9.

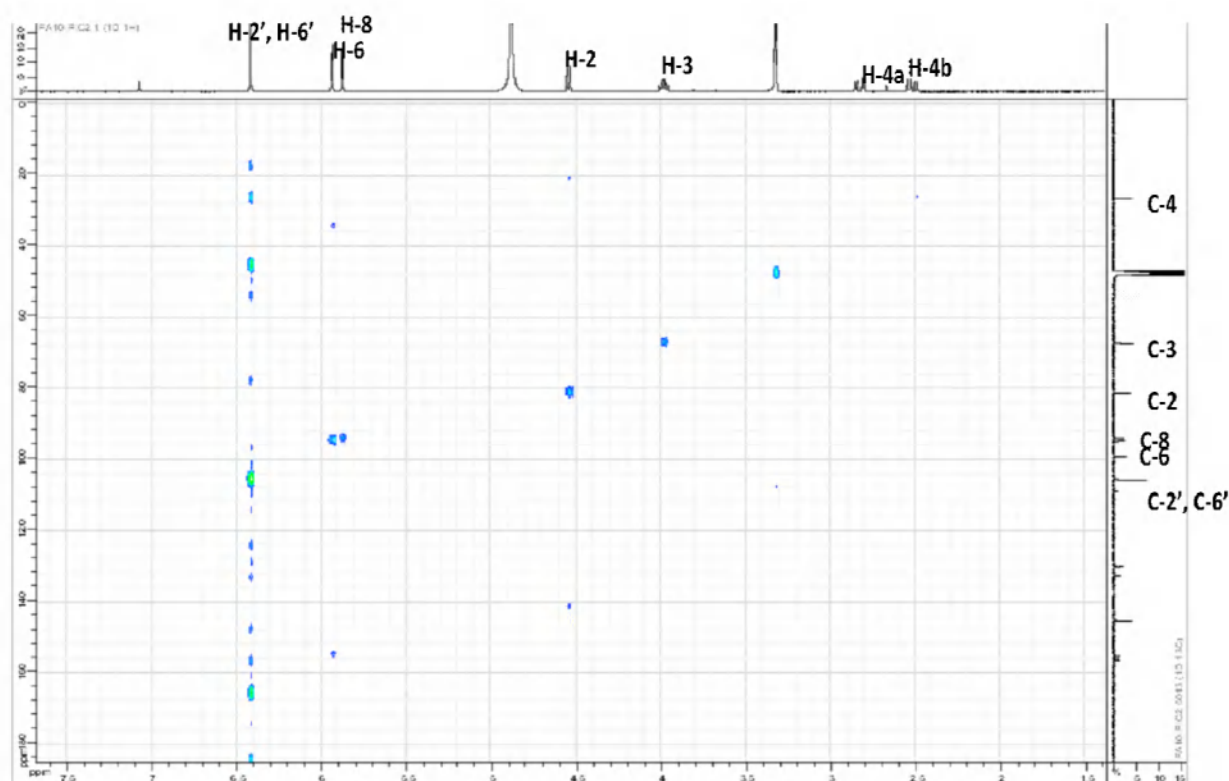
Le spectre COSY (Spectre IV. 88) permet de visualiser les couplages entre les protons H-6 et H-8 qui résonnent sous forme de doublet avec une constante de couplage $J = 2,3$ Hz indiquant une position ortho pour ces protons. Par ailleurs, sur la même expérience on peut visualiser les couplages entre les protons aliphatiques, le (Spectre IV. 88) montre une corrélation entre le proton H-2 et H-3, le proton H-3 montre une corrélation entre H-2 et H-4a et H-4b et ces derniers corrélient avec le H-3.

Toutes ces données sont en faveur d'une structure d'un flavanol. La grande valeur de la constante de couplage $J_{H-2/H-3} = 7,2$ Hz traduit une configuration trans des protons H-2 et H-3.



Spectre IV. 88. Spectre RMN COSY (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P9.

Le spectre RMN de l'expérience HMQC (Spectre. 89) permet de localiser les noyaux C-2, C-3, C-4b et C-4a du cycle C du noyau flavonique à δ_C (81,48 ; 67,38 ; 27,76 ppm) respectivement ainsi que les carbones du cycle A et B, C-6, C-8 et C-2', C-6' à δ_C (94,88 ; 94,12 ; 105,80 ppm) respectivement.

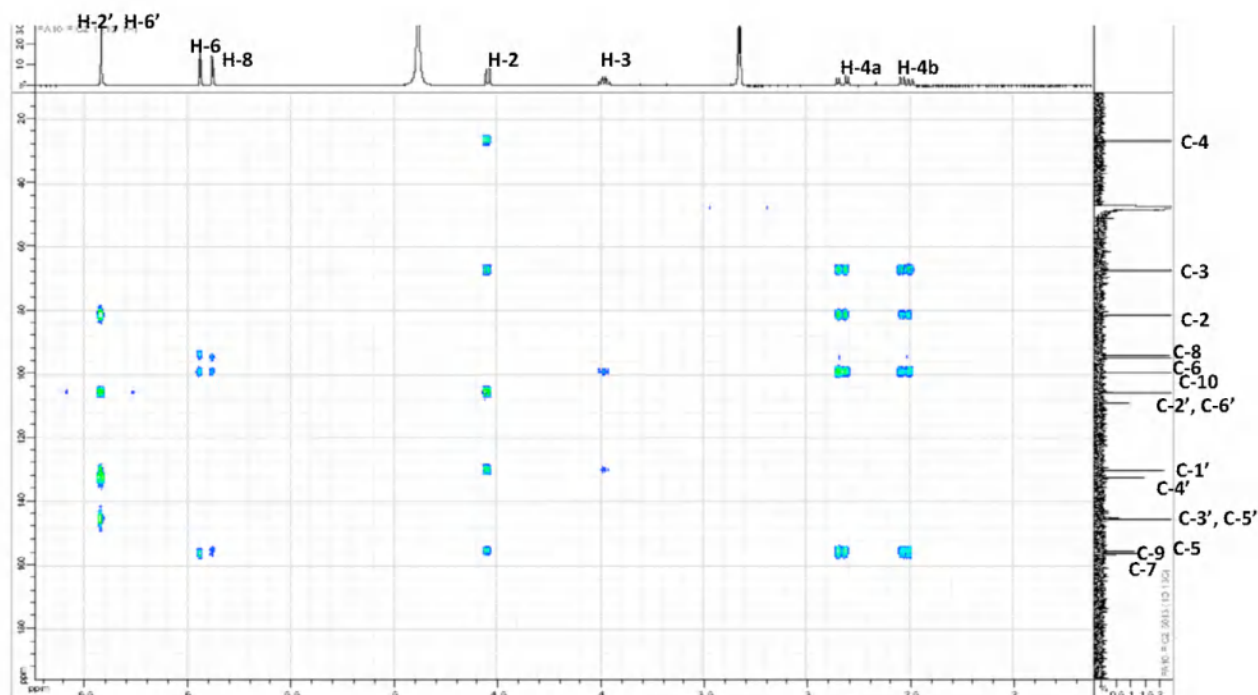


Spectre IV. 89. Spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P9.

L'expérience HMBC (Spectre IV. 90) permet de localiser les carbones C-2, C-4' et C-3', qui montrent des corrélations avec le signal résonant sous forme de singulet à $\delta_H = 6,42$ ppm attribuable à H-2' et H-6'.

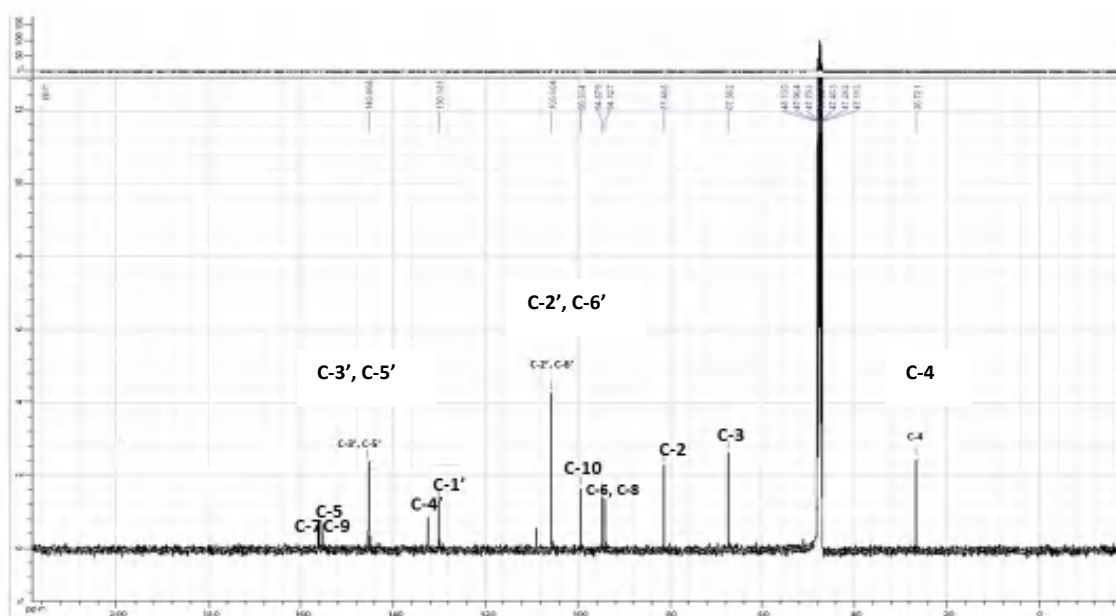
Les deux signaux sous forme de doublets d'intégration 1H chacun à $\delta_H = 5,94$ ppm et $\delta_H = 5,88$ ppm avec une constante de couplage ($J = 2,3$ Hz) attribuable à H-6 et H-8 permettent de localiser les carbones C-10 et C-5.

Les valeurs des déplacements chimiques de l'ensemble des carbones du composé 9 sont mentionnées dans le tableau IV. 9.



Spectre IV. 90. Spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P9.

Les valeurs des déplacements chimiques des carbones C-5 et C-7 à $\delta_C = 156,19$; $156,40$ ppm respectivement du cycle A et C-3', C-4' et C-5' à $\delta_C = 145,47$; $132,62$; $145,47$ ppm respectivement du cycle B indiquent leurs substitutions par des groupements hydroxyles libres (Spectre IV. 91).



Spectre IV. 91. Spectre RMN ^{13}C (MeOH-d₄, 125 MHz) du composé P9.

Sur la base de cette analyse et par comparaison avec les données de la littérature, le composé P9 est identifié comme étant la gallocatéchine [8].

Tableau IV.9. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P9.

9	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
2	81,48	4,55 (1H, d, 7,2)
3	67,38	3,98 (1H, m)
4	27,76	2,83 (1H, dd, 16,0 ; 6,6) 2,52 (1H, dd, 16,0 ; 7,7)
5	156,19	-
6	94,88	5,94 (1H, d, 2,3)
7	156,40	-
8	94,12	5,88 (1H, d, 2,3)
9	155,42	-
10	99,33	-
1'	130,17	-
2'	105,80	6,42 (2H, s)
3'	145,47	-
4'	132,62	-
5'	145,47	-
6'	105,80	6,42 (2H, s)

IV. 1. 10. Elucidation structurale du composé P10 issu de la fraction F10

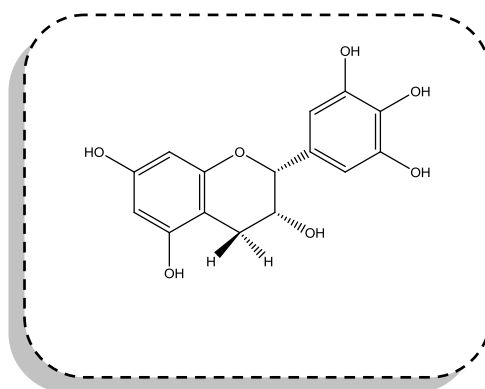


Figure IV.28. Structure de l'Epigallocatechine P10.

Ce produit a été isolé à partir de la fraction **F10** (CHCl₃/MeOH, 94:6 v/v), par CLHP semi préparative en phase inverse pour donner l'épigallocatechine **P10**.

Conditions CLHP semi préparative en phase inverse

Colonne C18, 250 x 10 mm, 5µm, thermo scientific, à température ambiante

Phases: solvant A constitué d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique et solvant B (acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique).

Débit: 5ml/min.

Profile gradient suivant : 0 min, 5% B; 15 min, 25%, 35 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min.

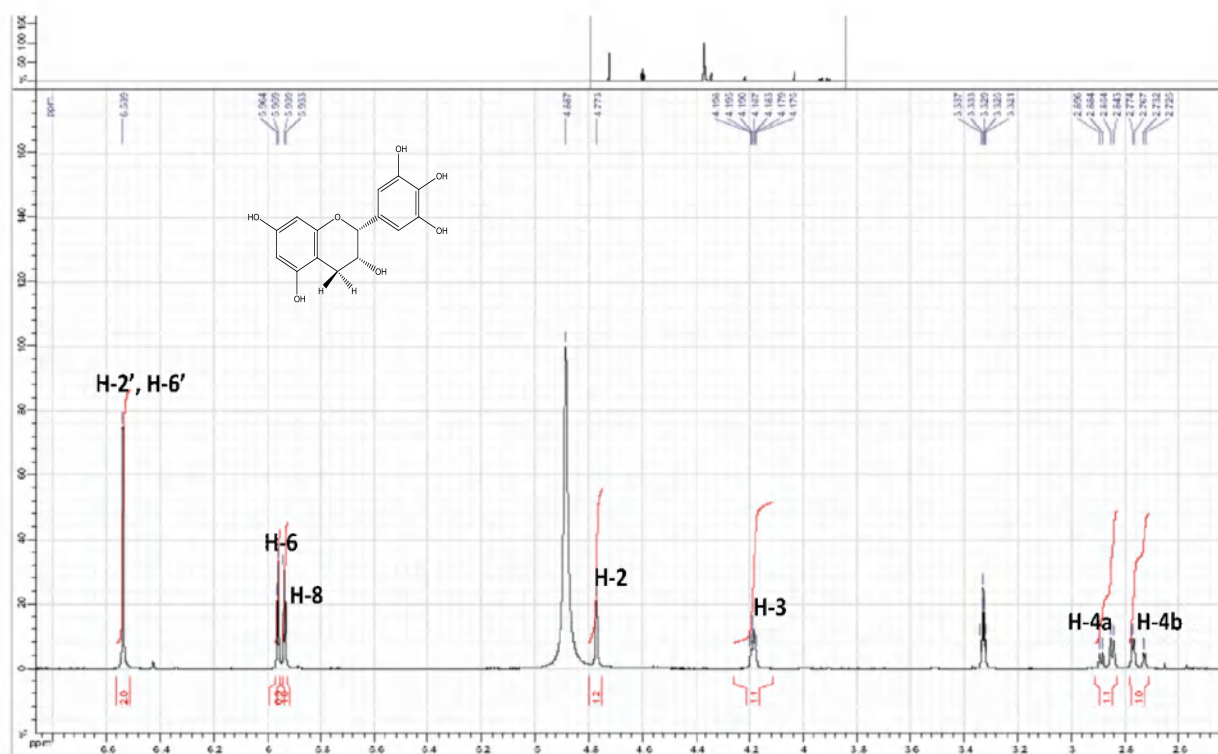
Le spectre RMN ¹H de ce composé montre une grande similitude avec celui du composé P9 gallocatechine. En effet, ils se différencient seulement par les signaux des deux protons oléfiniques H-2 et H-3.

L'examen des spectres RMN ¹H (Spectre IV. 92) et ses étalements (Spectre IV. 93) et (Spectre IV. 94) montrent qu'il s'agit d'un flavonoïde de type favanol caractérisé par:

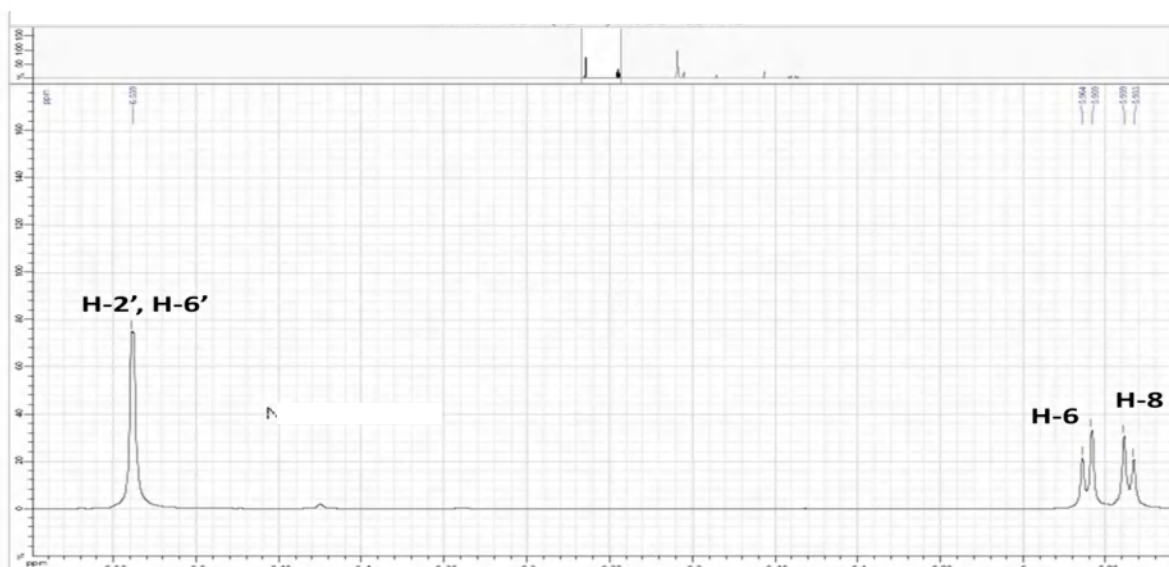
- Deux signaux sous forme de doublet d'intégration 1H chacun l'un à $\delta_H = 5,96$ ppm et l'autre à $\delta_H = 5,94$ ppm avec une constante de couplage ($J = 2,3$ Hz) attribuables à H-6 et H-8 successivement du cycle A.

- Un singulet intégrant pour 2H à $\delta_H = 6,54$ ppm attribuable aux protons H-2', H-6' du cycle B.
- Quatre protons aliphatiques, résonnent à δ_H (4,77 ; 4,19 ; 2,75; 2,87 ppm) attribuables aux protons H-2, H-3, H-4b et H-4a successivement du cycle C.

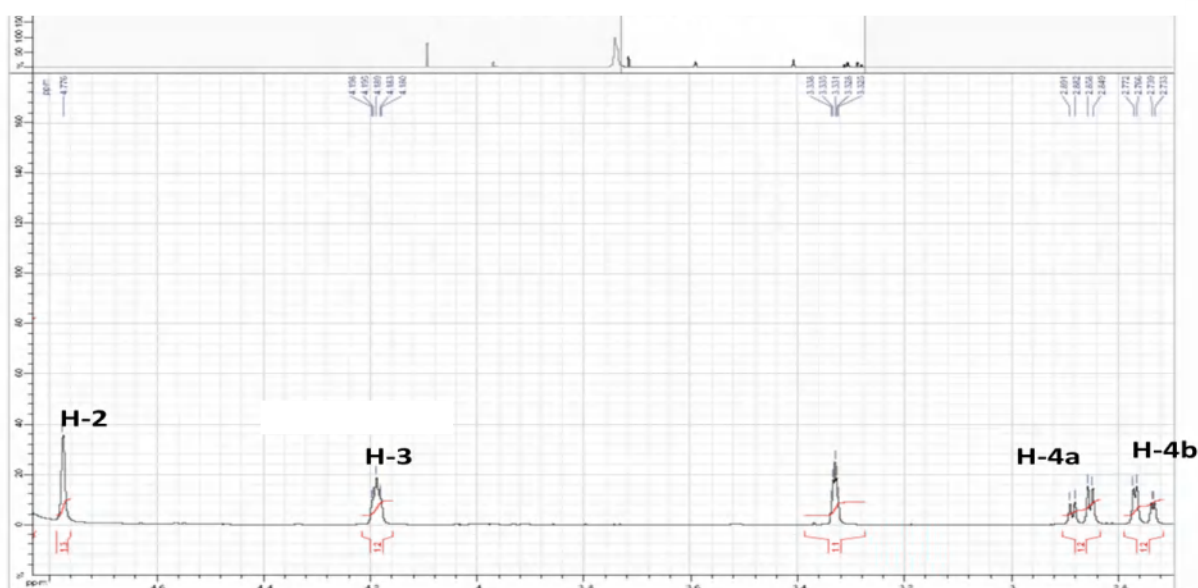
Les signaux observés sur le spectre RMN 1H révèlent deux signaux sous forme de doublets d'intégration 1H chacun sont attribués aux protons H-6 à $\delta_H = 5,96$ ppm ($J = 2,3$ Hz) et H-8 à $\delta_H = 5,94$ ppm ($J = 2,3$ Hz) du cycle A, ainsi un singulet intégrant pour 2H à $\delta_H = 6,54$ ppm attribuable aux protons H-2', H-6' du cycle B en raison des corrélations observées sur le spectre de l'expérience HMBC en 3J entre ces protons et le carbone C-2 de l'hétérocycle C, le singulet intégrant pour 2H indique que le cycle B est tri substitué. Par ailleurs, la présence de quatre protons aliphatiques sur le spectre RMN 1H , un singulet d'intégration 1H à $\delta_H = 4,77$ ppm attribuable à H-2, un multiplet d'intégration 1H à $\delta_H = 4,19$ ppm attribuable à H-3, deux doublets de doublet d'intégration 1H chacun à $\delta_H = 2,75$; 2,87 ppm ($J = 16,2$; 3,9 Hz) ; ($J = 16,2$; 3,9 Hz) attribuables aux H-4b et H-4a respectivement.



Spectre IV. 92. Spectre RMN 1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P10.



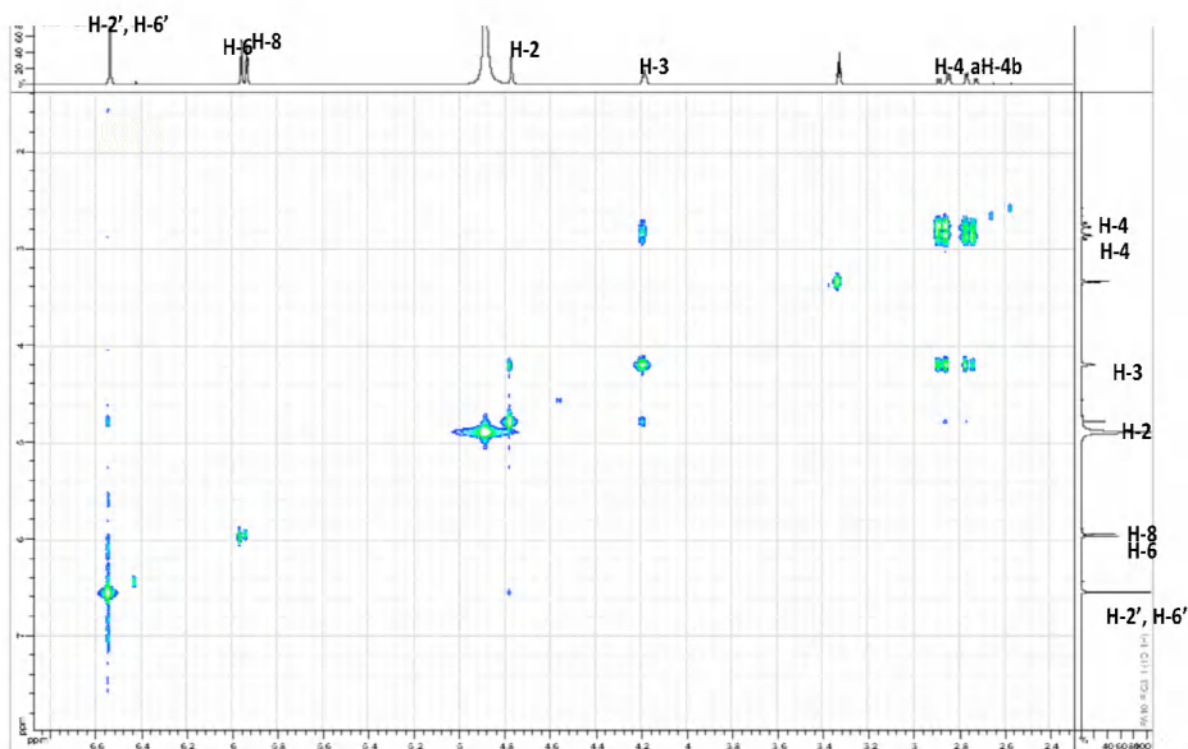
Spectre IV. 93. Etalement 1 spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P10.



Spectre IV. 94. Etalement 2 spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) du composé P10.

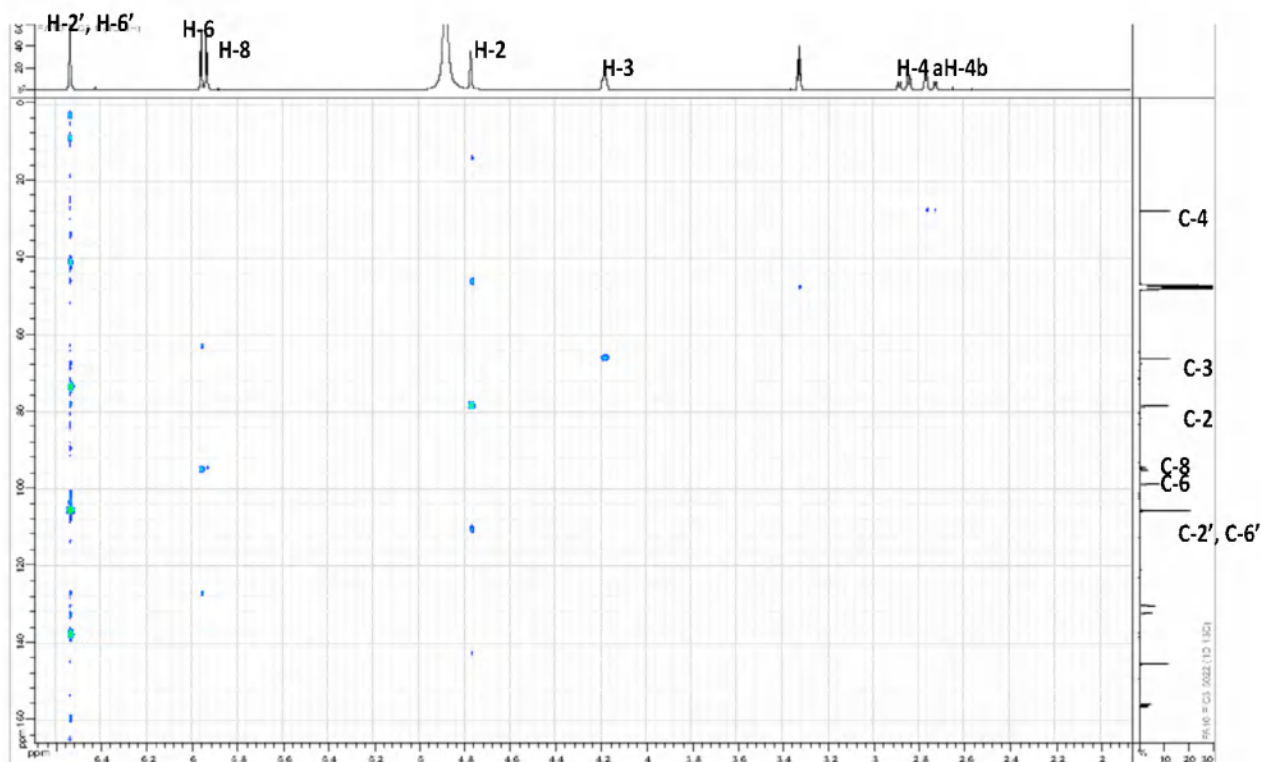
Le spectre COSY (Spectre IV. 95) permet de visualiser les couplages entre les protons H-6 et H-8 qui résonnent sous forme de doublet avec une constante de couplage $J = 2,3$ Hz indiquant une position ortho pour ces protons. Par ailleurs, sur la même expérience on peut visualiser les couplages entre les protons aliphatiques, le (Spectre IV. 95) montre une corrélation entre le proton H-2 et H-3, le proton H-3 montre une corrélation entre H-2 et H-4a et H-4b et ces derniers corrélient avec le H-3.

Toutes ces données sont en faveur d'une structure d'un flavanol. Un proton H-2 singulet traduit une configuration cis des protons H-2 et H-3.



Spectre IV. 95. Spectre RMN COSY (MeOH-d4, 500 MHz) du composé P10.

Le spectre RMN de l'expérience HMQC (Spectre IV. 96) permet de localiser les noyaux C-2, C-3 et C-4 du cycle C du noyau flavonique à δ_C (78,49 ; 66,13 ; 27,76 ppm) respectivement ainsi que les carbones du cycle A et B, C-6, C-8 et C-2', C-6' à δ_C (95,04 ; 94,52 ; 105,62 ppm) respectivement, le spectre montre un pic intense des deux carbones C-2', C-6' indique la présence de deux carbones superposables ceci est dû à une symétrie au niveau du cycle B.

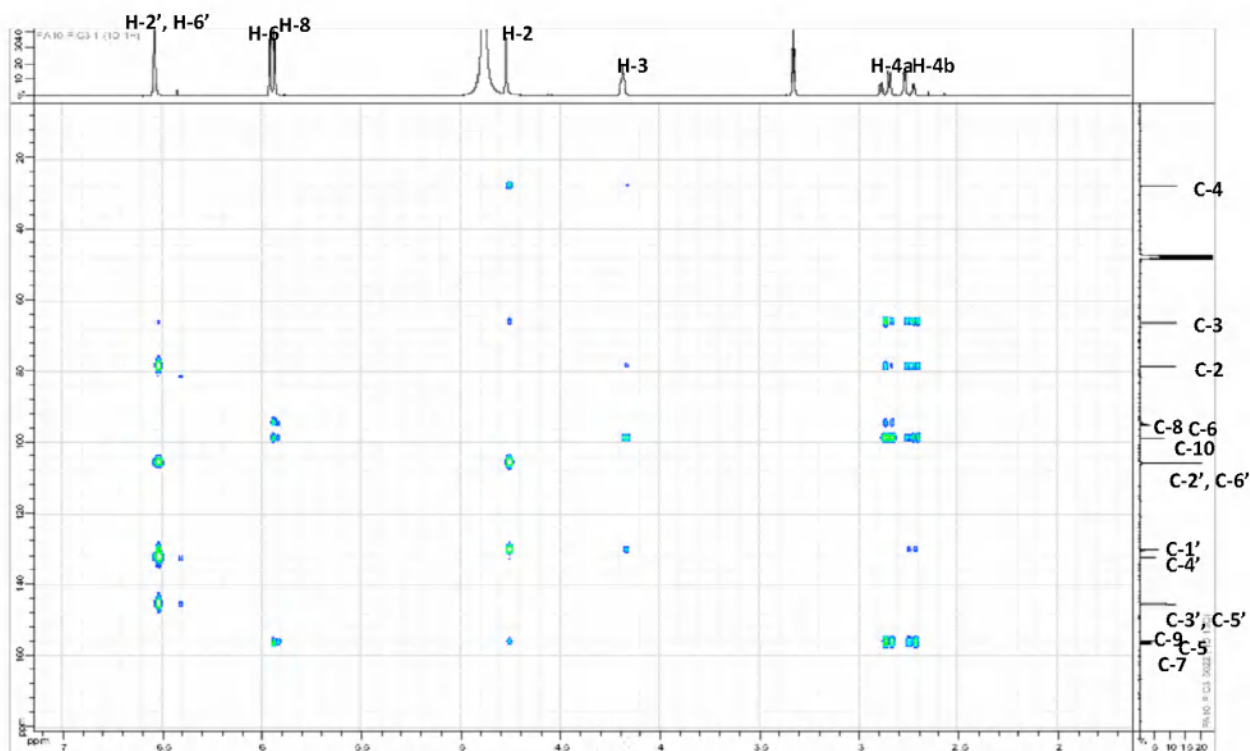


Spectre IV. 96. Spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P10.

L'expérience HMBC (Spectre IV. 97) permet de localiser les carbones C-2, C-4' et C-3', qu'ils montrent des corrélations avec le signal résonant sous forme de singulet à $\delta_H = 6,54$ ppm attribuable à H-2', H-6'.

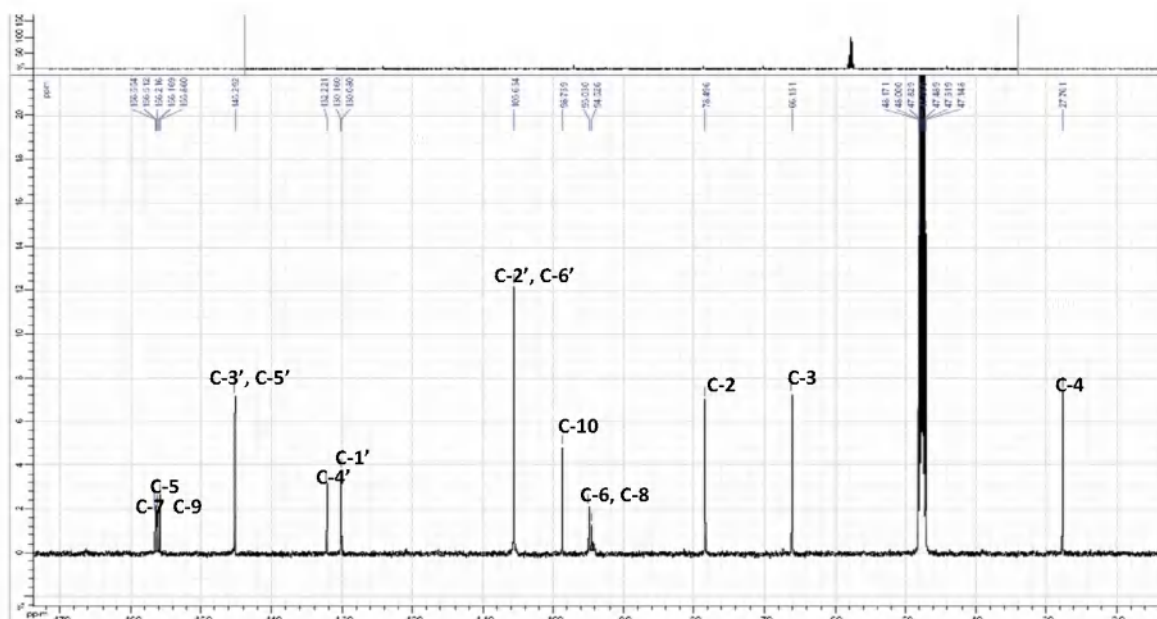
Les deux signaux sous forme de doublets d'intégration 1H chacun à $\delta_H = 5,96$ ppm et $\delta_H = 5,94$ ppm avec une constante de couplage ($J = 2,3$ Hz) attribuable à H-6 et H-8 permettent de localiser les carbones C-10, C-5 dans le spectre HMBC.

Les valeurs des déplacements chimiques de l'ensemble des carbones du composé 10 sont mentionnées dans le tableau IV. 10.



Spectre IV. 97. Spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P10.

Les valeurs de déplacement chimique des carbones C-5 et C-7 à $\delta_C = 156,19$; $156,53$ ppm respectivement du cycle A et C-3'; C-5' et C-4' à $\delta_C = 145,29$; $132,21$ ppm respectivement du cycle B indiquent leurs substitutions par des groupements hydroxyles libres (Spectre IV. 98).



Spectre IV. 98. Spectre RMN ¹³C (MeOH-d₄, 125 MHz) du composé P10.

Sur la base de cette analyse et par comparaison avec les données de la littérature, le composé P10 est identifié comme étant l' épigallocatechine [9].

Tableau IV.10. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P10.

10		
	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
2	78,49	4,77(1H, s)
3	66,13	4,19 (1H, m)
4	27,76	2,87(1H, dd, 16,2, 3,9)
	27,76	2,75(1H, dd, 16,2, 3,9)
5	156,19	-
6	95,04	5,96(1H, d,2,3)
7	156,53	-
8	94,52	5,94(1H, d, 2,3)
9	155,86	-
10	98,73	-
1'	130 ,15	-
2'	105,62	6,54(2H, s)
3'	145,29	-
4'	132,21	-
5'	145,29	-
6'	105,62	6,54(2H, s)

IV. 1. 11. Elucidation structurale du composé P11 issu de la fraction F11

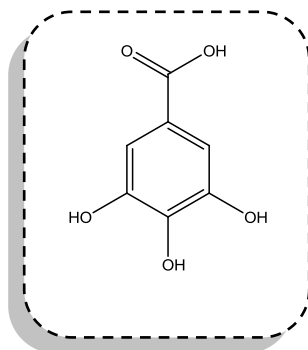


Figure IV.29. Structure de l'acide gallique P11.

Ce produit a été isolé à partir de la fraction **F11** ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 91:9 v/v), par CLHP semi préparative en phase inverse pour donner l'acide gallique **P11**.

Conditions CLHP semi préparative en phase inverse

Colonne C-18, 250 x 10 mm, 5 μm , thermo scientific, à température ambiante

Phases: solvant A constitué d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique et solvant B (l'acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique).

Débit: 5ml/min.

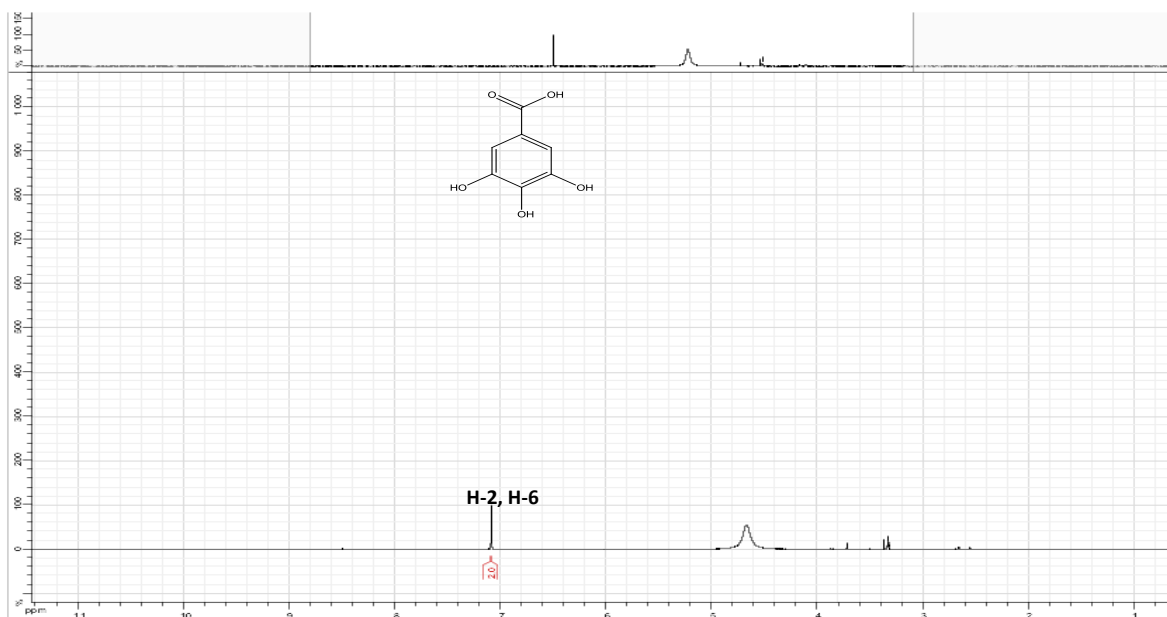
Profile gradient suivant : 0 min, 5% B; 15 min, 25%, 35 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min.

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre IV.99), montre qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique tetrasubstitué.

- Un singulet à δ_{H} 7,09 ppm d'intégration 2H attribuables à H-2 et H-6.

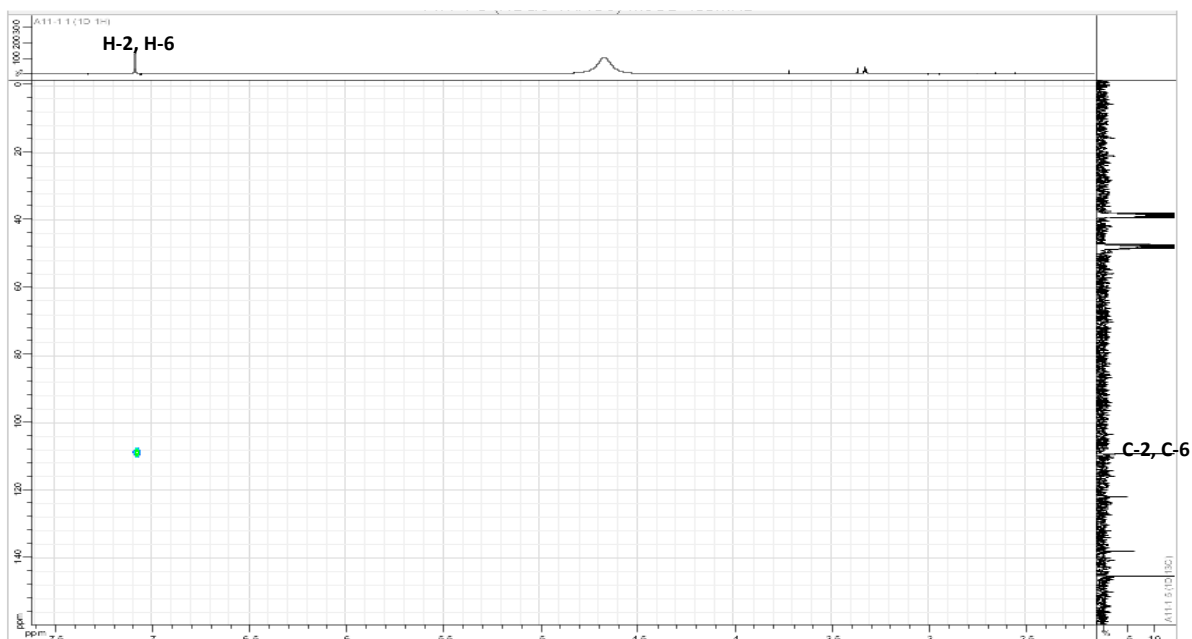
L'ensemble des informations indique qu'il s'agit d'un composé aromatique dont le cycle benzénique est tetrasubstitué, la présence d'un singulet d'intégration 2H indique une symétrie dans le cycle benzénique.

En effet, ceci suppose une hypothèse que le noyau aromatique est 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. Cette ambiguïté est levée par les résultats de l'expérience du spectre HMBC.



Spectre IV. 99. Spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz, δ ppm) du composé P11.

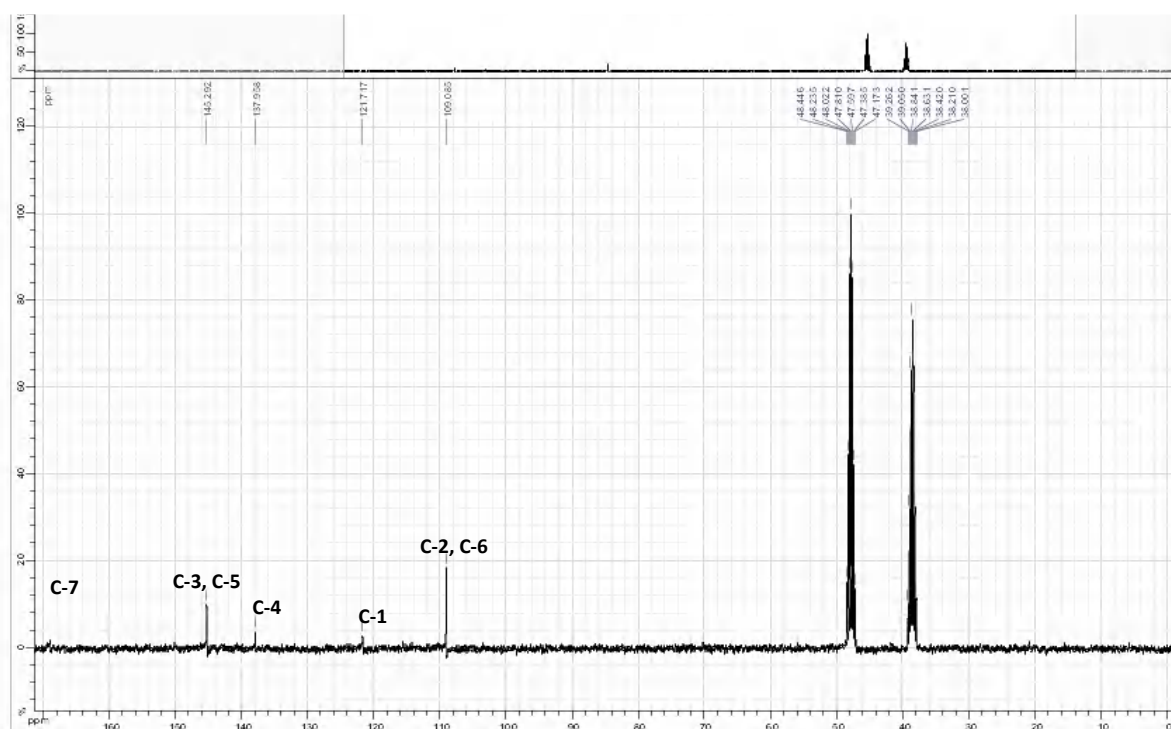
Le spectre de l'expérience HMQC (Spectre IV. 100), permet de localiser les noyaux C-2, C-6 à $\delta_{\text{C}} = 109,08$ ppm.



Spectre IV. 100. Spectre RMN HMQC (MeOH- d_4 , 500 MHz, δ ppm) du composé P11.

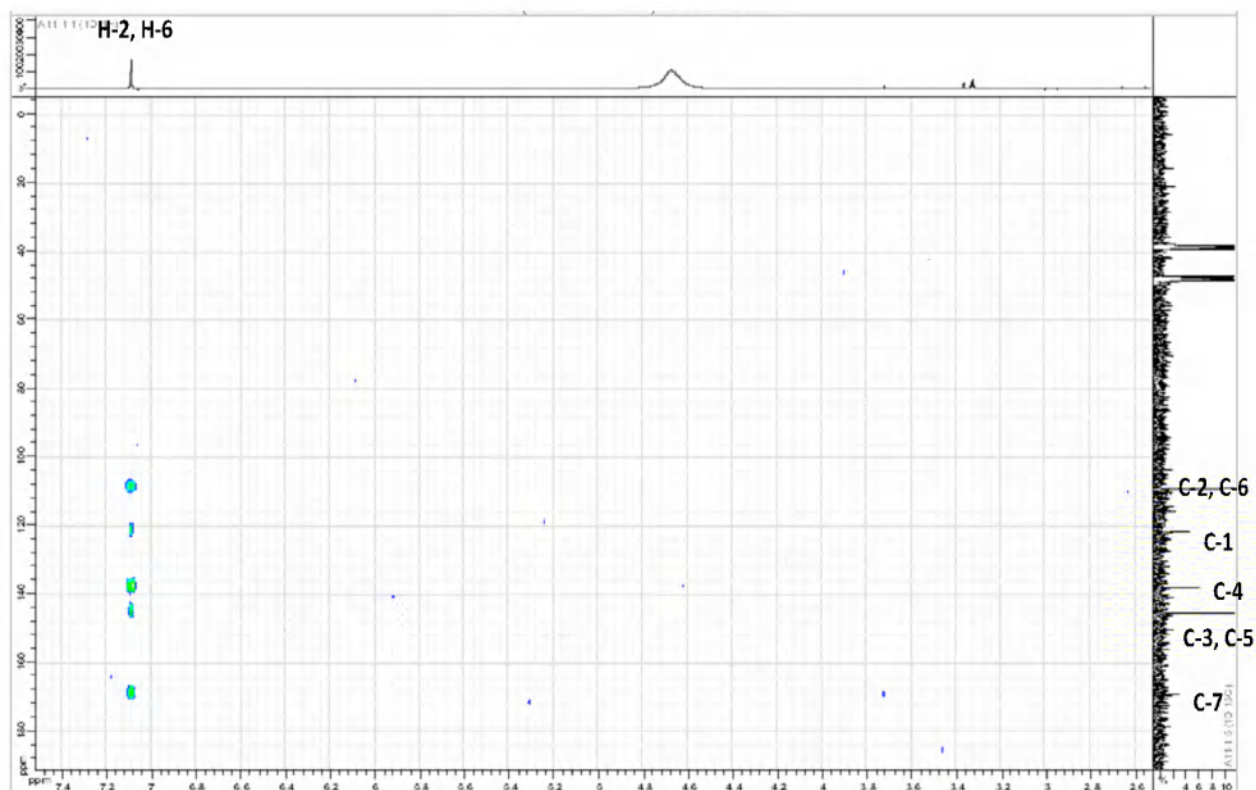
L'examen du spectre RMN ^{13}C (spectre IV. 101), montre la présence :

- Un carbonyle d'une fonction acide à $\delta_{\text{C}} = 169,02$ ppm.
- Deux carbones CH à $\delta_{\text{C}} = 109,08$ ppm.
- Deux carbones quaternaire sp^2 oxygénés à $\delta_{\text{C}} = 145,29$ ppm attribuable à C-3 et C-5 respectivement.
- Un carbone quaternaire sp^2 oxygénés à $\delta_{\text{C}} = 137,95$ ppm attribuable à C-4.



Spectre IV. 101. Spectre RMN ^{13}C (MeOH- d_4 , 125 MHz, δ ppm) du composé P11.

Le spectre HMBC (Spectre IV. 102) permet de localiser la position des hydrogènes sur le cycle aromatique les protons H-2, H-6 corrélient avec C-1 ; C-4 ; C-3, C-5 et C-7 ce qui confirme l'hypothèse que le noyau aromatique est substitué dans les positions C-1, C-3, C-4 et C-5.



Spectre IV. 102. Spectre RMN HMBC(MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P11.

L'ensemble de ces données permet de déduire la présence d'une fonction acide carboxylique en position C-1 de ce noyau aromatique et tri hydroxyles substituant ce noyau aromatique dans les positions C-3, C-4 et C-5 respectivement. Ces données mènent à la structure de l'acide gallique [10].

Les données relatives aux analyses des spectres de RMN ^1H et ^{13}C de ce composé sont reportées dans le tableau IV.11.

Tableau IV.11. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P11.

11		
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	121,72	-
2	109,08	7,09 (2H, s)
3	145,29	-
4	137,95	-
5	145,29	-
6	109,08	7,09 (2H, s)
7	169,02	-

IV. 2. Identification des composés isolés à partir de l'extrait n-BuOH (fraction D)

IV. 2. 1. Elucidation structurale du composé P12 issu de la fraction F15

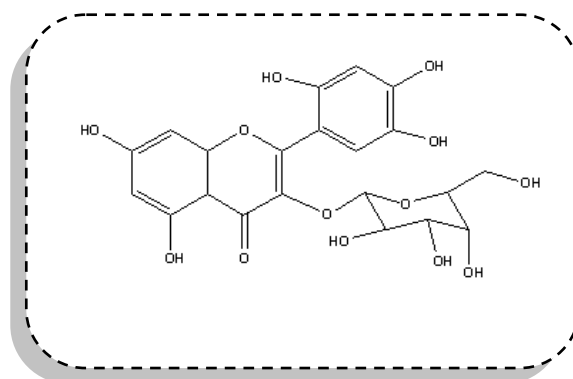


Figure IV.30. Structure du nouveau flavonoïde 5,7, 2', 4', 5 ' pentahydroxyflavone 3-O- β -D-galactopyranoside P12.

Ce produit a été obtenu sous forme de solide jaunâtre, il a été isolé à partir de la fraction **F15** (toluène/MeOH, 60:40 v/v), par CLHP semi préparative en phase inverse pour donner un nouveau flavonoïde 5,7, 2', 4', 5 ' pentahydroxyflavone 3-O- β -D-galactopyranoside **P12**.

Conditions CLHP semi préparative en phase inverse

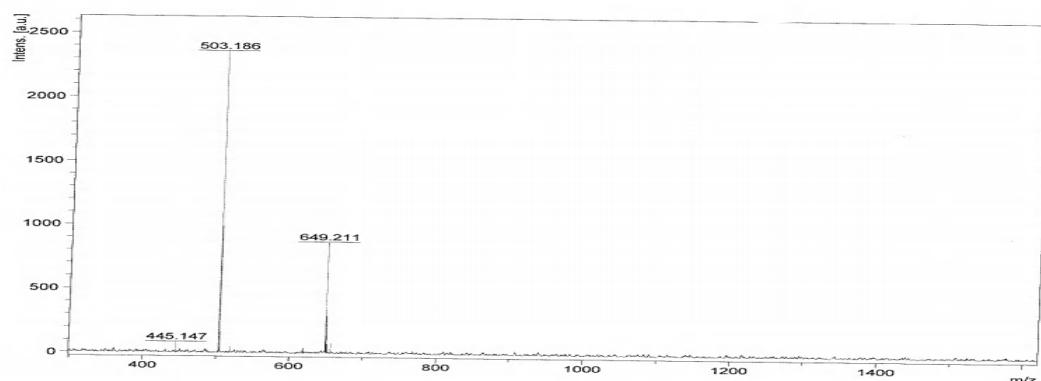
Colonne C-18, 250 x 10 mm, 5 μ m, thermo scientific, à température ambiante

Phases: solvant A constitué d'un mélange d'eau Milli-Q contenant 0,1% d'acide formique et solvant B (acétonitrile contenant 0,1% d'acide formique).

Débit: 5ml/min.

Profile gradient suivant : 0 min, 5% B; 15 min, 25%, 35 min, 25% de B; maintenue pendant 7 min.

L'examen du spectre de masse MALDI-TOF du composé 12 montre un pic d'ion pseudo-moléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 503,186$ correspondant à une formule brute en $C_{21}H_{20}O_{13}$.



Spectre IV.103.Spectre Maldi_Tof du composé P12.

L'examen de la série spectrale UV (Tableau IV.12) et (Figure IV.31) montrent :

La présence de deux bandes d'absorption à 259 nm (bande II) et 365 nm (bande I) dans le Spectre UV du composé 12 dans le MeOH (Figure IV.31) et la fluorescence violet foncé de ce composé sous la lumière du Wood indiquait un composé de type flavonol 3-O-substitué [11].

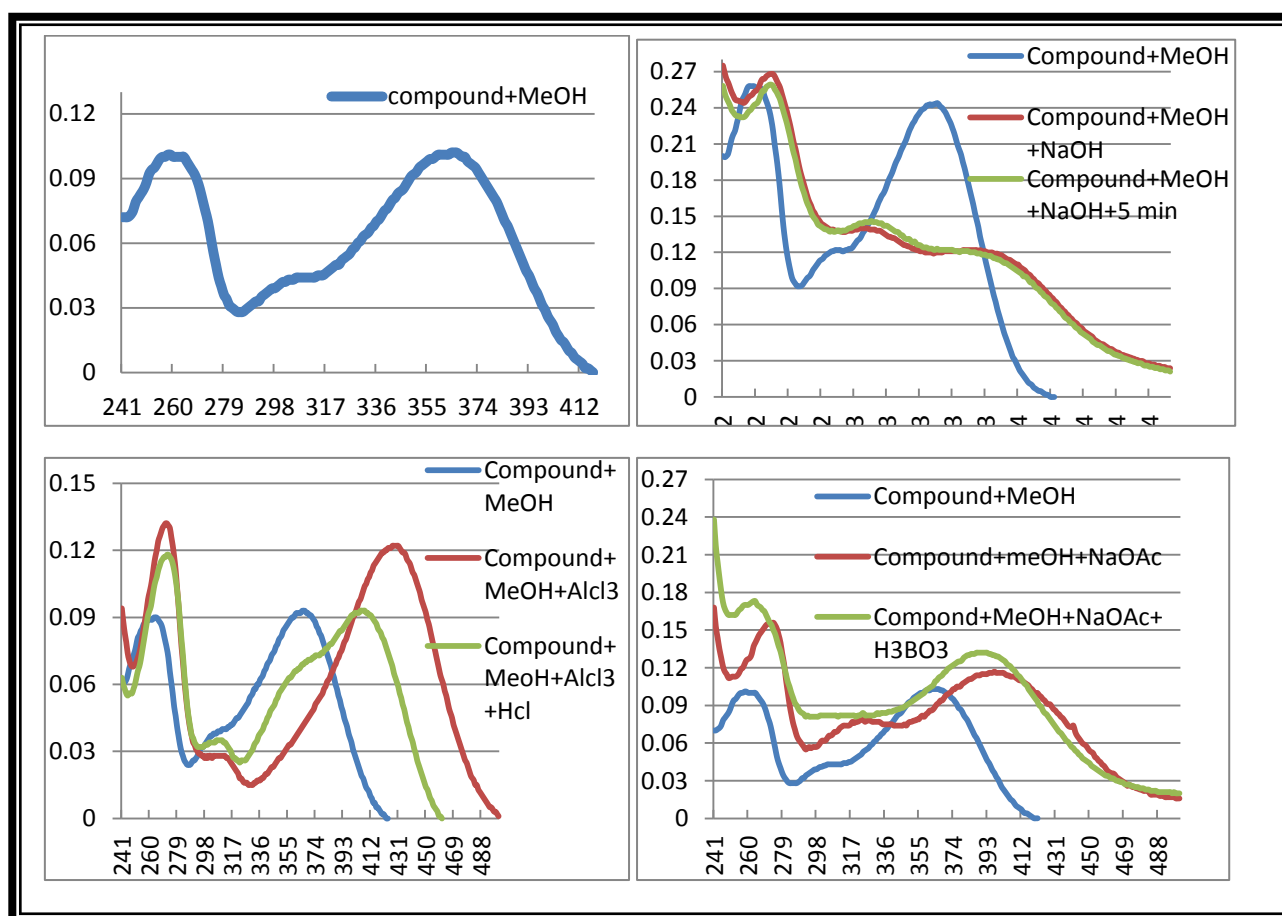


Figure IV.31. Spectroscopie UV du composé 12.

Tableau IV.12. Données spectrales UV du composé P12.

Réactifs	Bande I λ_{max} (nm)	Autres Bandes λ_{max} (nm)	Bande II λ_{max} (nm)	Observations
MeOH	365	306	259	Flavonol substitué en position 3
NaOH	Diminution d'intensité après 5 mn et décomposition	-	269	3',4' OH, trisubstitution dans le cycle B
AlCl ₃	427	296	272	OH libre en 5
AlCl ₃ + HCl	407	360	273	5OH et 3-OMe Ortho-di-OH sur le cycle B ou tri- OH dans le cycle B
NaOAc	397	-	273	7-OH
NaOAc + H ₃ BO ₃	388	-	264	3', 4'-di-OH dans le cycle B

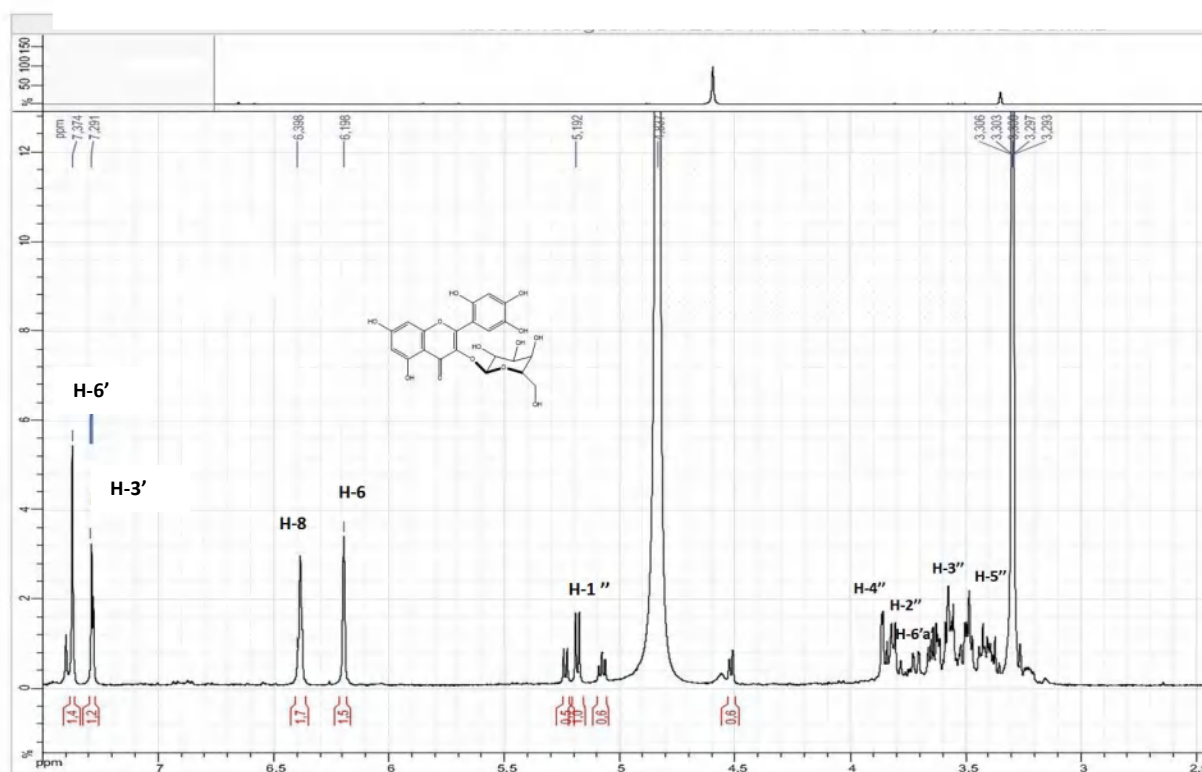
Cette hypothèse a été confirmée par le Spectres RMN ¹H (Spectre IV. 104) qui montre la présence de deux signaux sous forme de doublet des protons caractéristiques du cycle A du noyau flavononique attribuable à H-6 et H-8 à δ_{H} = 6,19 ppm et 6,39 ppm respectivement avec une constante de couplage (J = 2,0 Hz).

Le spectre RMN ¹H montre également deux singulets à δ_{H} = 7,29 ppm et 7,37 ppm attribuable à H-3' et H-6' successivement indiquant que le cycle B du flavonoïde est trisubstitué en positions 2', 4' et 5'. Cela a été confirmé par la diminution de l'intensité de la bande I du spectre UV du composé dans le MeOH après ajout du NaOH indiquant une trihydroxylation du cycle B [12].

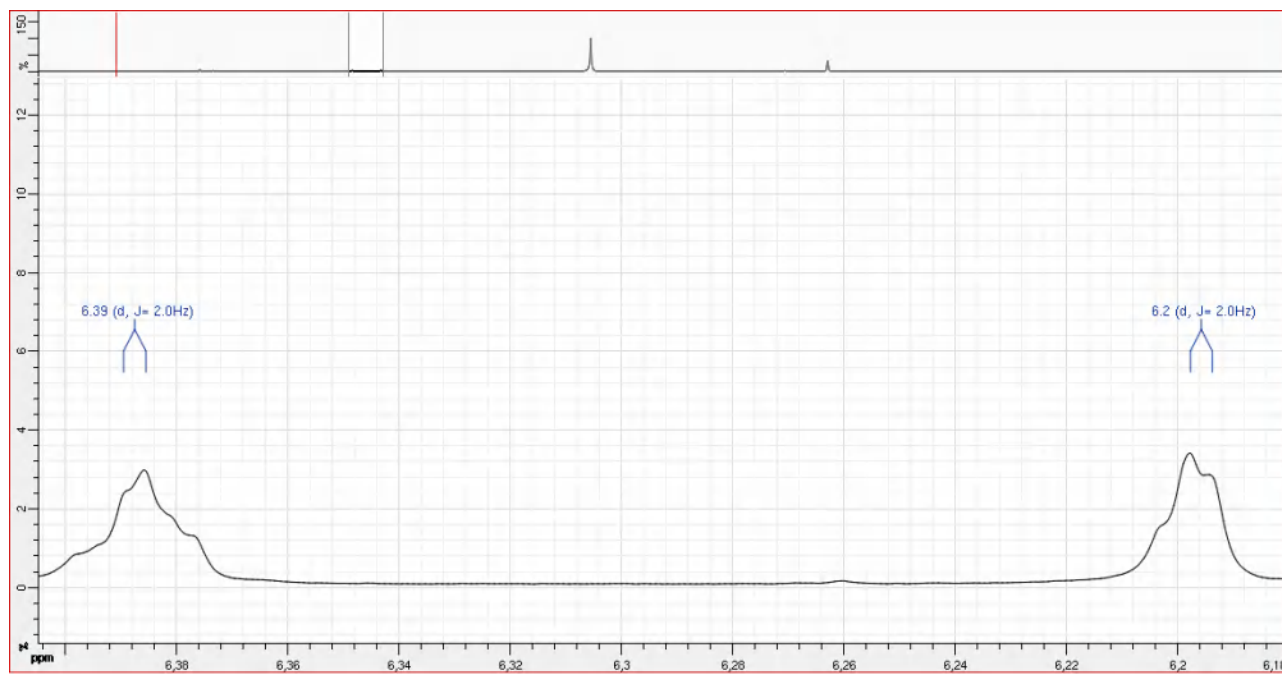
Les données relatives à la RMN ¹H sont reportées sur le tableau (Tableau IV.12).

Le déplacement bathochrome de la bande II (14 nm) en présence de NaOAc indique un 7-OH libre.

De plus, le déplacement bathochromique de la bande I (23 nm), lorsque H₃BO₃ était ajouté à cette solution, ainsi que la comparaison des spectres enregistrés dans le MeOH/AlCl₃ et dans MeOH/AlCl₃ + HCl ont montré l'ortho-hydroxylation du cycle B, ce qui suggère également, la présence d'un 5-OH libre (Tableau IV.12) [11].

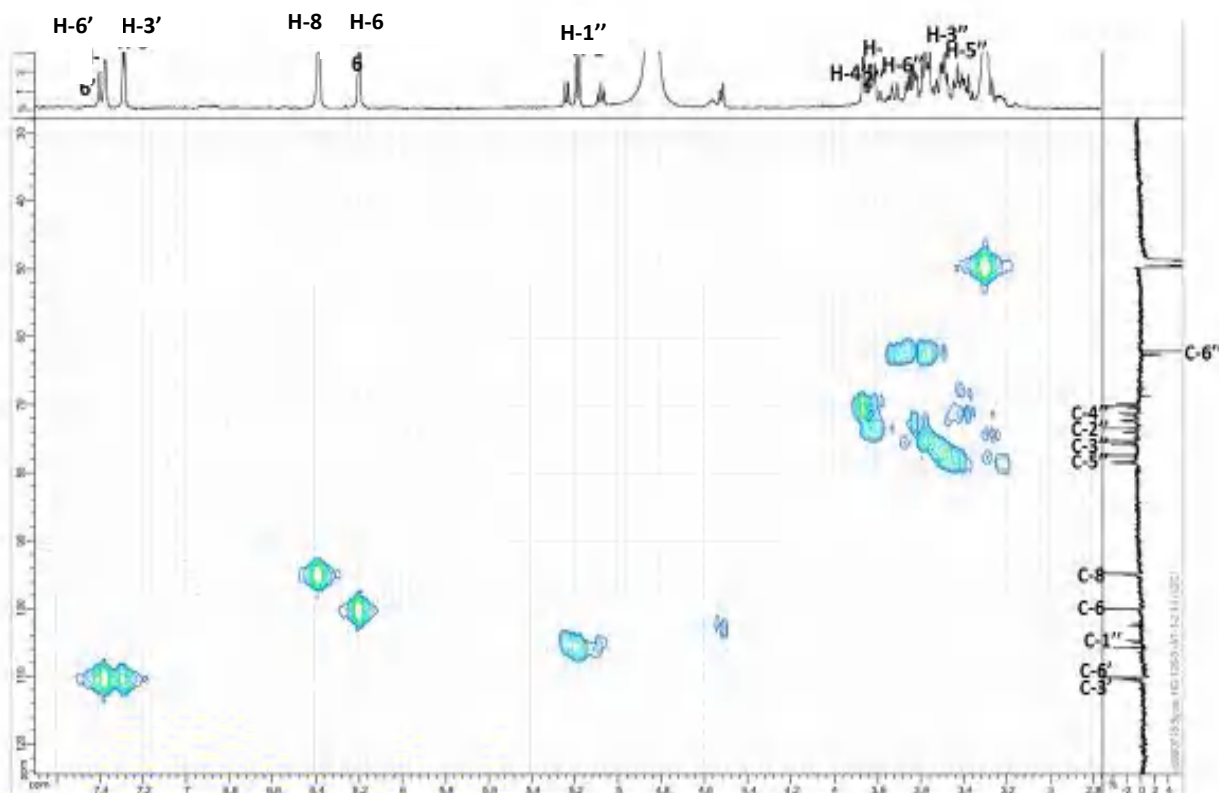


Spectre IV. 104. Spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz, δ ppm) du composé P12.

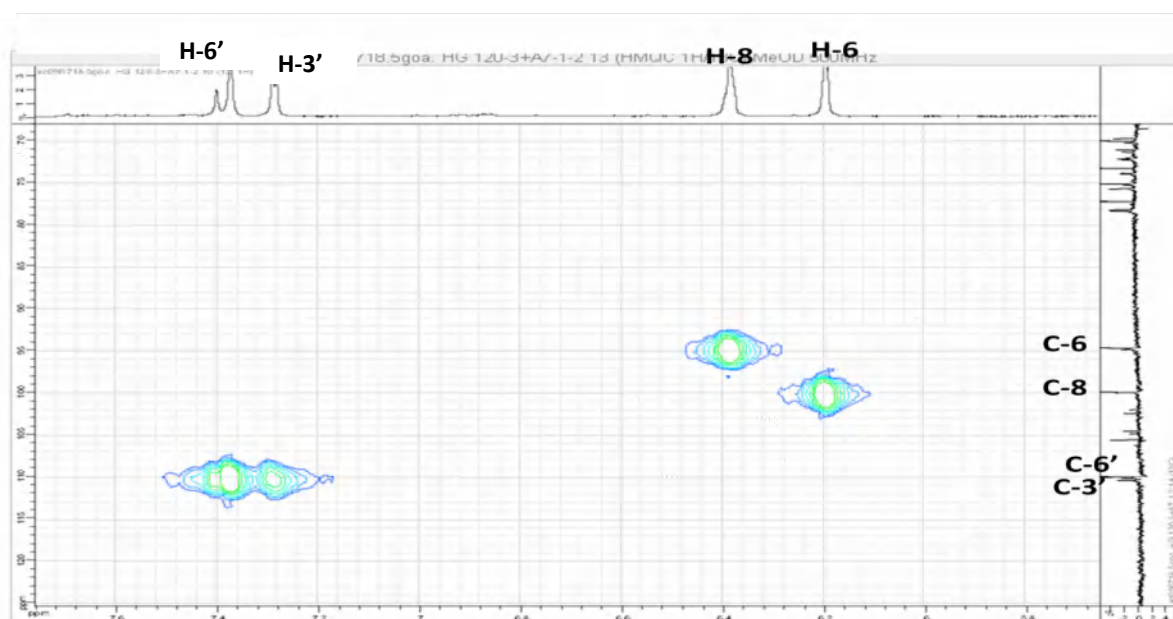


Spectre IV. 105. Etallement 1 spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz, δ ppm) du composé P12.

Le spectre RMN de l'expérience HMQC (Spectre IV. 106) et son étalement (Spectre IV. 107) permettent de localiser les noyaux du cycle flavonique A et B, C-3', C-6' et C-6, C-8 à δ_C (110,36 ; 109,94 ; 99,91 ; 94,66 ppm) respectivement.



Spectre IV. 106. Spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P12.

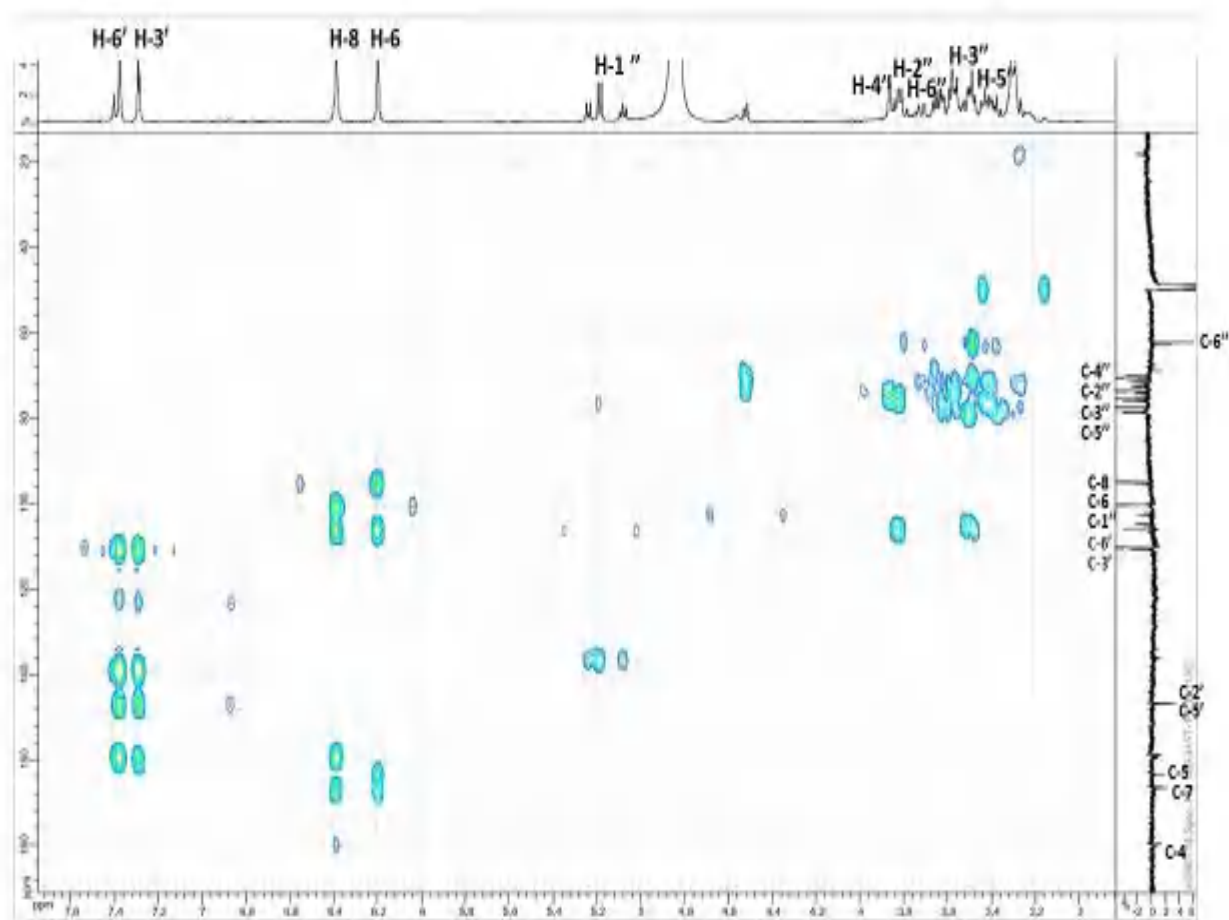


Spectre IV. 107. Étalement 1 spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P12.

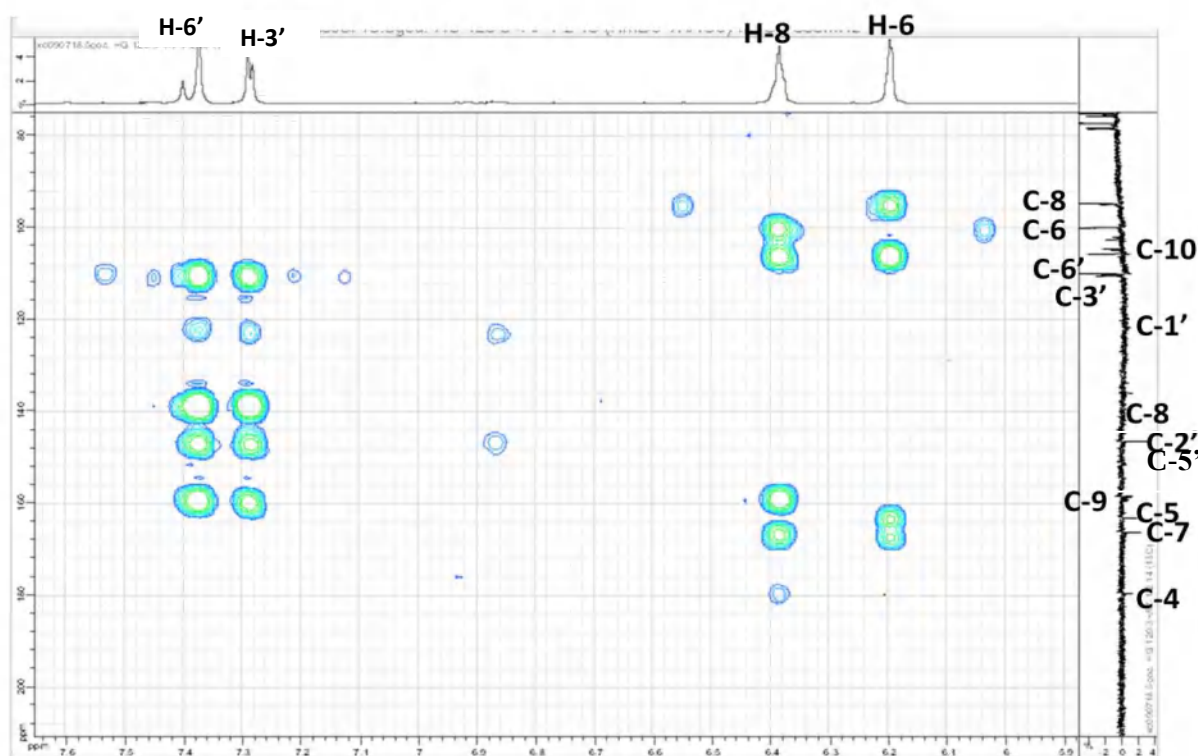
Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre IV. 108) et son étalement (Spectre IV. 109), le proton H-6 montre une tache de corrélation avec les carbones C-5, C-7 et C-10 à δ_C (163,00; 166,12; 105,66 ppm) respectivement. Le proton H-8 montre une tache de corrélation avec un carbone résonant à $\delta_C = 166,12$ ppm attribuable à C-7, une tache de corrélation avec un carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 179,42$ ppm attribuable à C-4, deux taches de corrélation avec deux carbones quaternaires à $\delta_C = (158,39 ; 105,66 \text{ ppm})$ attribuables à C-9 et C-10 respectivement.

Les protons aromatiques H3' et H-6' montrent une corrélation avec le carbone quaternaire oxygéné à $\delta_C = 159,06$ ppm attribuable à C-4' et avec un carbone quaternaire à $\delta_C = 158,68$ ppm permettant son attribution à C-2.

Les protons aromatiques H3' et H-6' montre une corrélation à $\delta_C = 121,60$ ppm attribuable à C-1' et avec deux carbones quaternaires oxygénés à $\delta_C = 146,40$ et $146,45$ ppm attribuables à C-2' et C-5'.



Spectre IV. 108. Spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P12.



Spectre IV. 109. Etalement 1 spectre HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P12.

Les données du spectre proton montrent une substitution de la position C-3 par un hexose, cela a été confirmé par la présence de signaux caractéristiques dans RMN ¹H et ¹³C, par l'absence du proton H-3 et la présence du carbone anomérique C-1'' à $\delta_C = 105,57$ ppm (δ_H 5,19 ppm, d, $J = 7,5$ Hz) et le groupe CH₂OH à δ_C 61,95 ppm (δ_H 3,72 ppm, dd, H6''a, δ_H 3,65 ppm, dd, H6''b) attribué à C-6''. Les autres protons de sucre ont été déterminés sur la base de leurs corrélations sont apparus sur le spectre DQF-COSY (Spectre IV. 110).

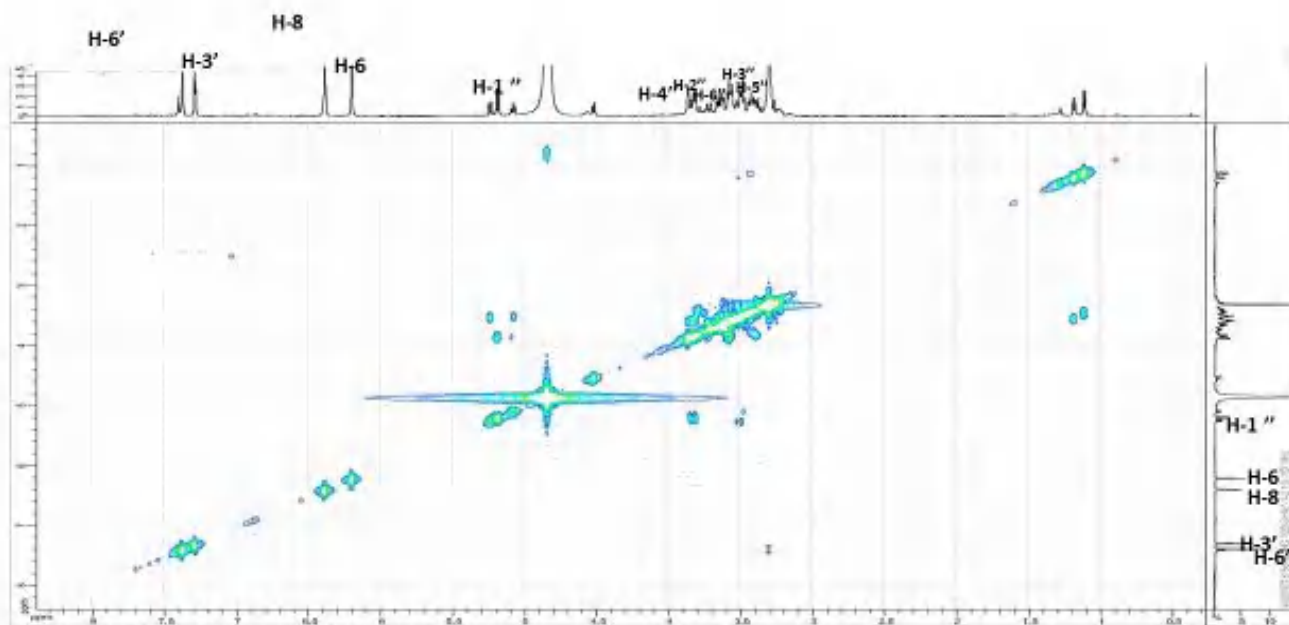
Cet hexose comporte :

Un CH₂ à $\delta_H = 3,65$ ppm (1H, dd, $J = 11 ; 5,0$) et $\delta_H = 3,72$ (1H, dd, $J = 11,6 ; 2,4$), $\delta_C = 61,95$ ppm, attribuable au CH₂ de la position C-6'' de l'hexose.

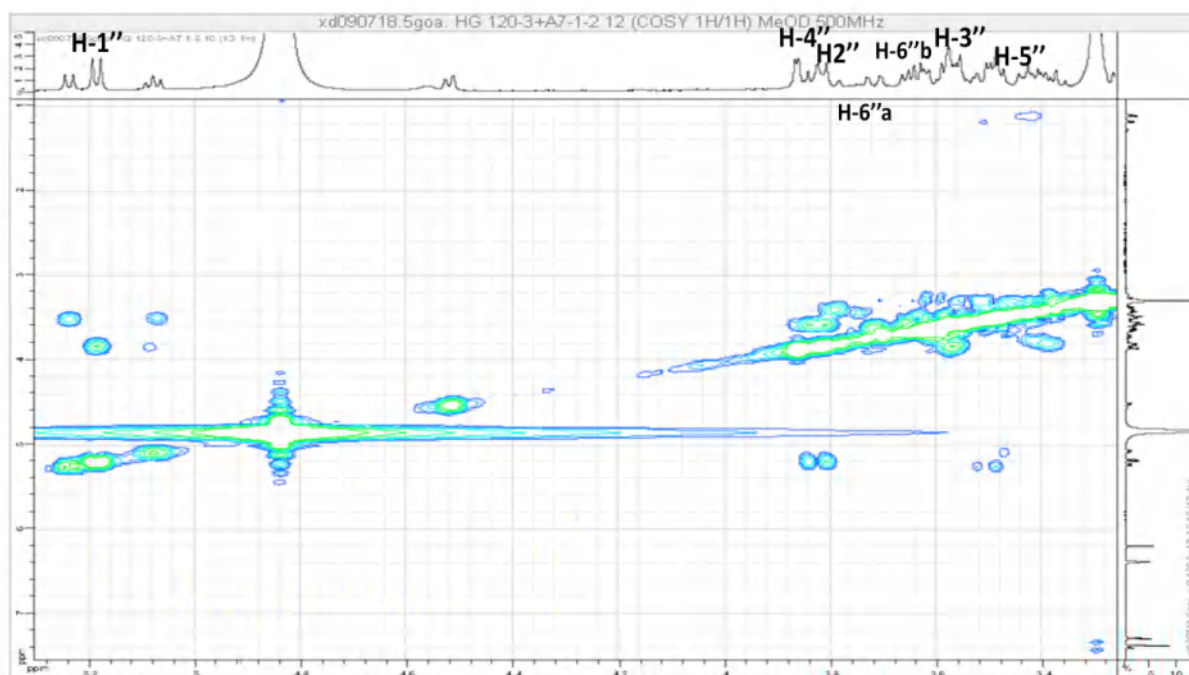
En effet, le proton anomérique H-1'' (d, $J = 7,5$ Hz) montre une corrélation avec H-2'' (dd, $J = 9,0 ; 7,5$ Hz) à $\delta_H = 3,82$ ppm. Ce dernier corréle avec le proton résonant sous forme d'un doublet de doublets à $\delta_H = 3,57$ ppm attribuable à H-3''.

Le proton H-3'' (dd, $J = 9 ; 2,9$ Hz) corréle avec un proton sous forme d'un large doublet à $\delta_H = 3,86$ ppm attribuable à H-4'' (large doublet, $J = 2,9$ Hz), les faibles constantes de couplage entre H-4''/H-3'' et H-4''/H-5'' indiquent que H-4'' est en position équatoriale ainsi que les indications des déplacements chimiques des carbones ont permis d'identifier le fragment sucre comme un β -galactopyranosyl [13].

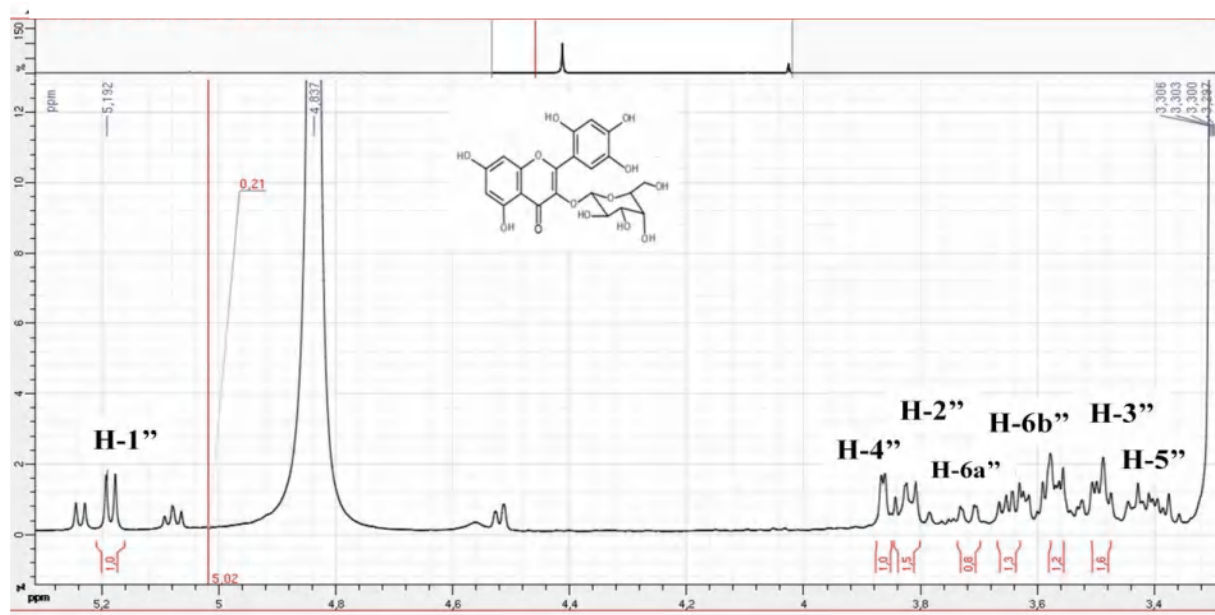
Le proton H-6'' corrèle avec un multiplet à $\delta_H = 3,48$ ppm (1H, m) attribuable à H-5'', ce qui indique que l'hexose est un β -galactose.



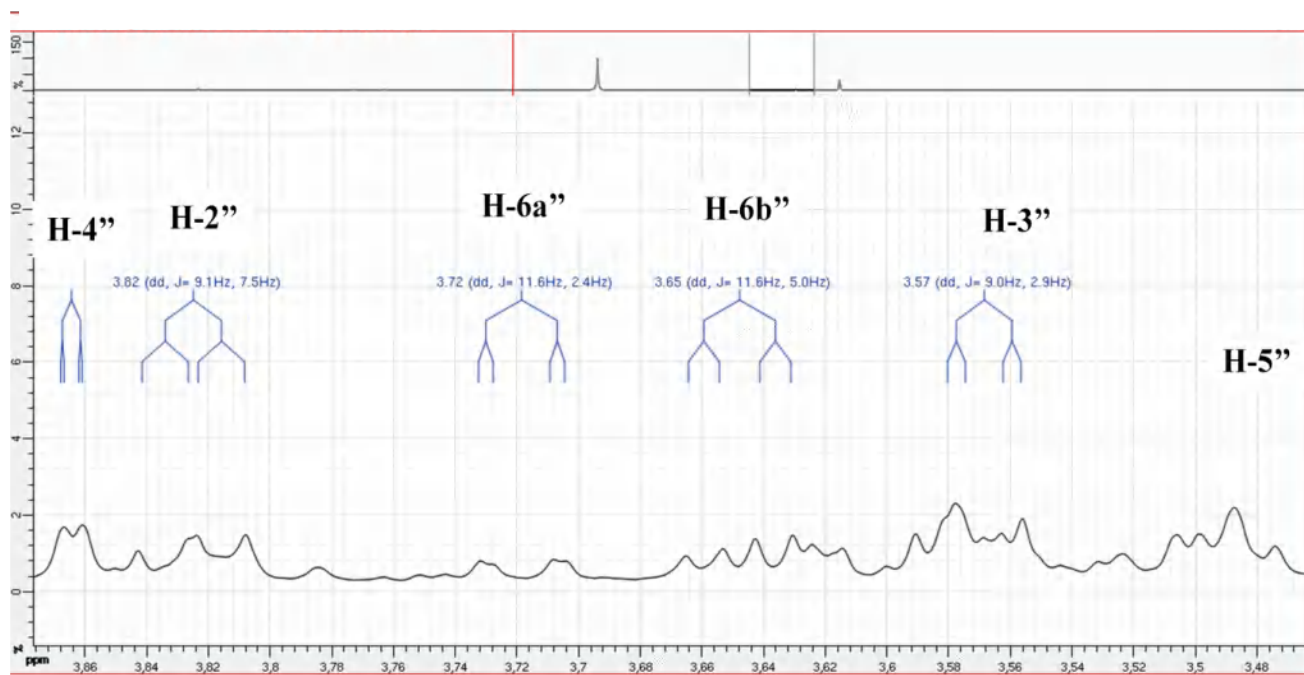
Spectre IV. 110. Spectre RMN COSY (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P12.



Spectre IV. 111. Etallement 1 spectre RMN COSY (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P12.

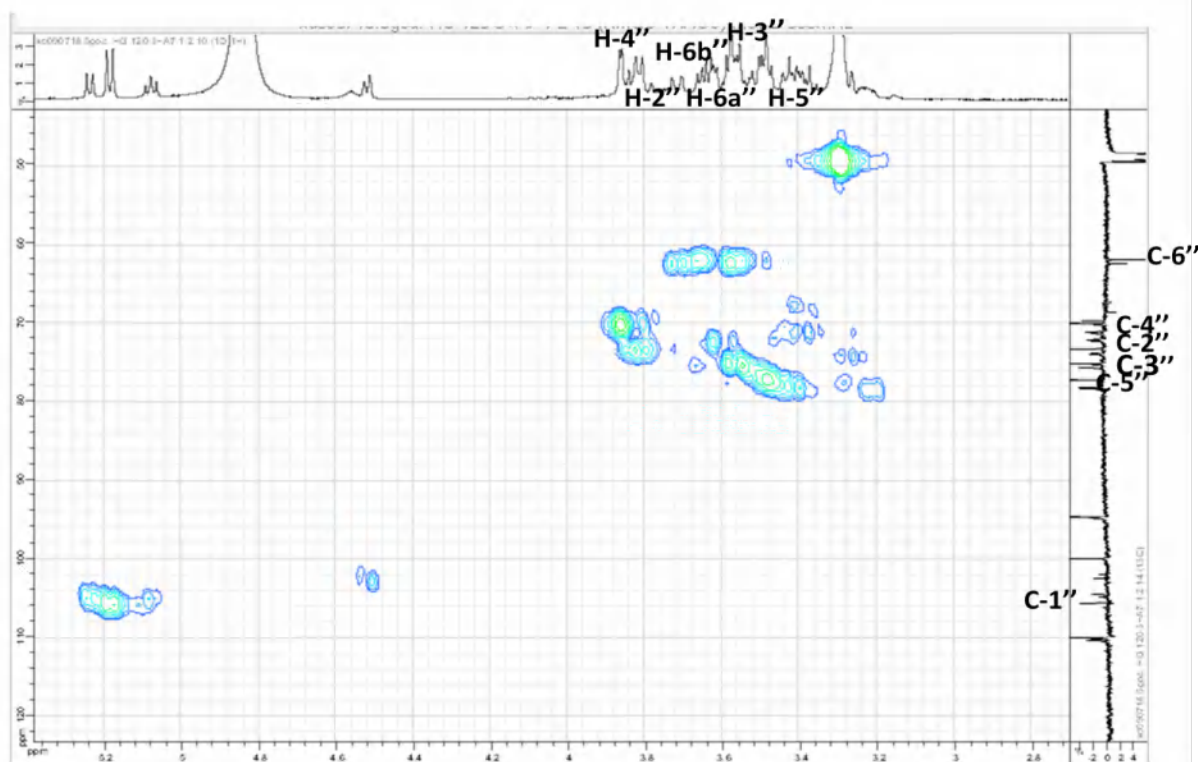


Spectre IV. 112. Etalement 2 spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz, δ ppm) du composé P12.



Spectre IV. 113. Etalement 3 spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz, δ ppm) du composé P12.

Le spectre de l'expérience HMQC (Spectre IV. 114), permet de localiser les noyaux C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'' et C-6'' du galactose à δ_C (105,57 ; 73,29 ; 75,14 ; 70,05 ; 77,25 et 61,95 ppm) respectivement.



Spectre IV. 114. Etalement 2 spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P12.

L'hydrolyse acide (HCl 2 M à 100°C pendant 1h) du composé 12 a confirmé ces conclusions, conduisant au galactopyranose identifié par co-chromatographie avec des sucres témoins. L'aglycone obtenu a donné une fluorescence jaune sous la lumière du Wood et les mêmes données UV que 5'-hydroxymorine (Figure IV. 32).

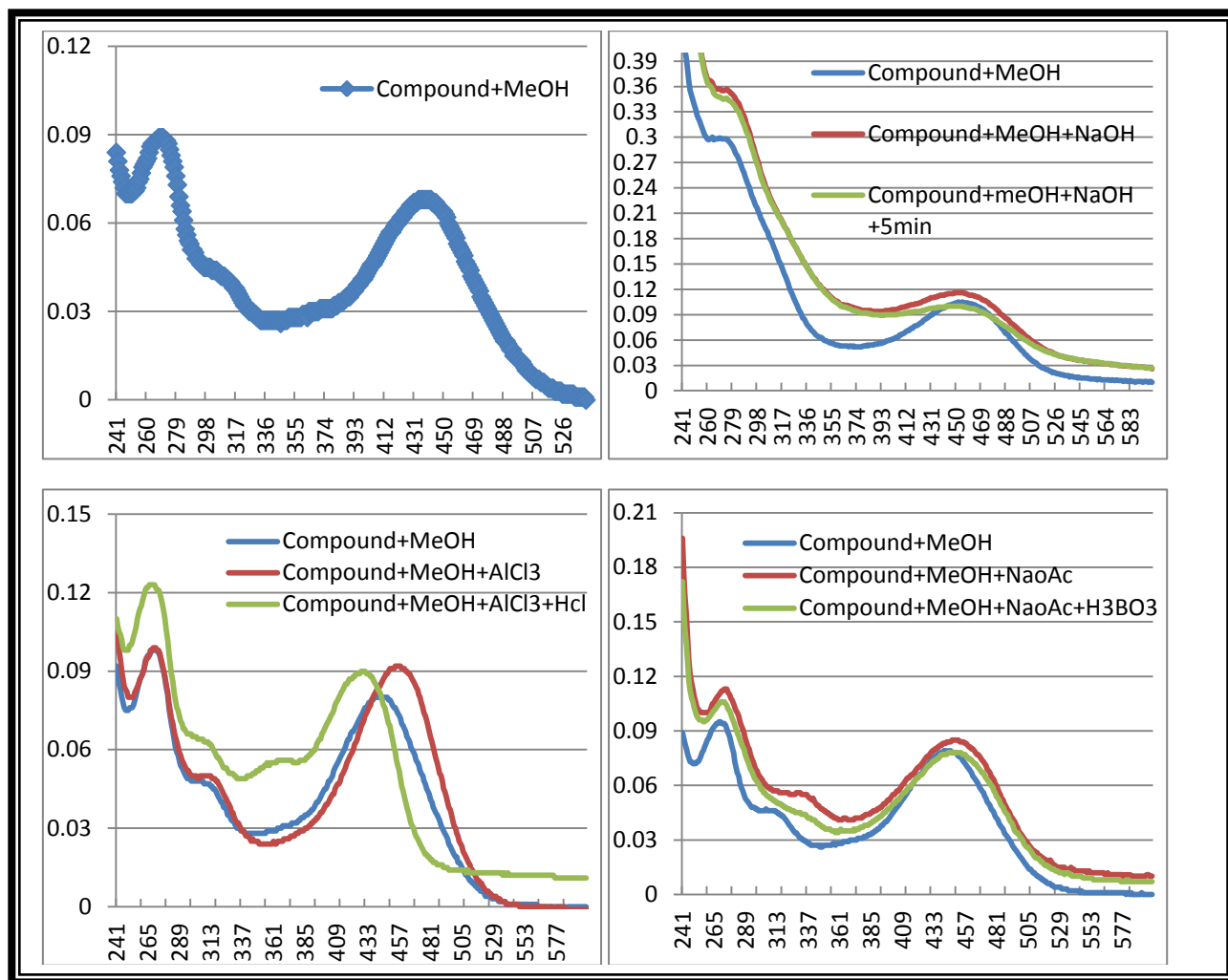
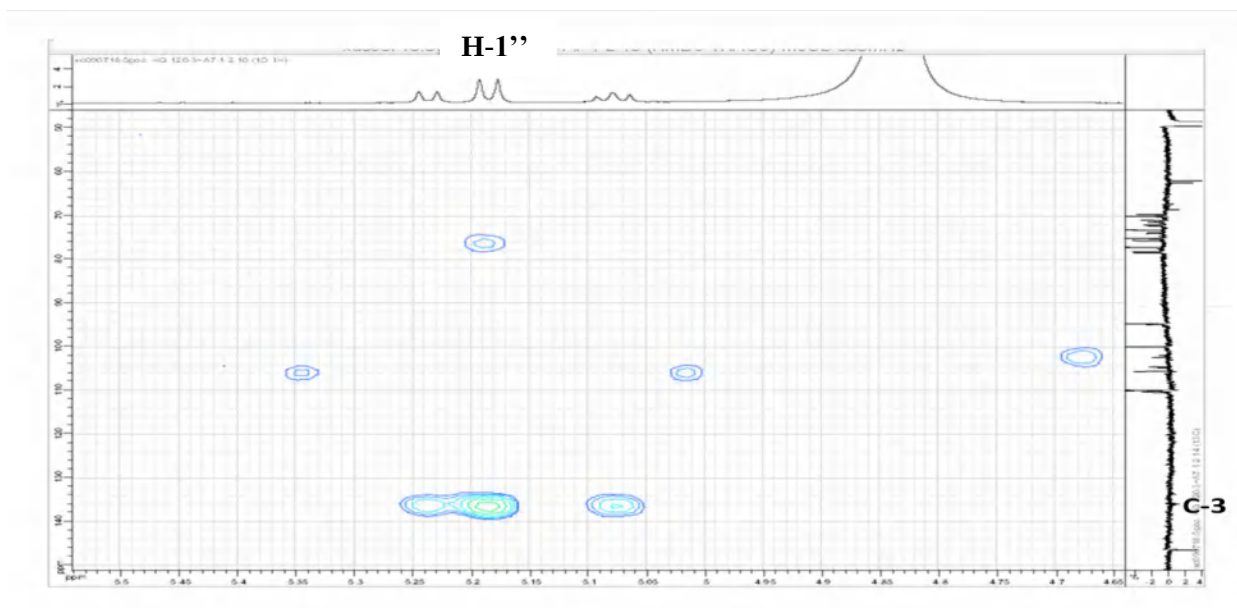
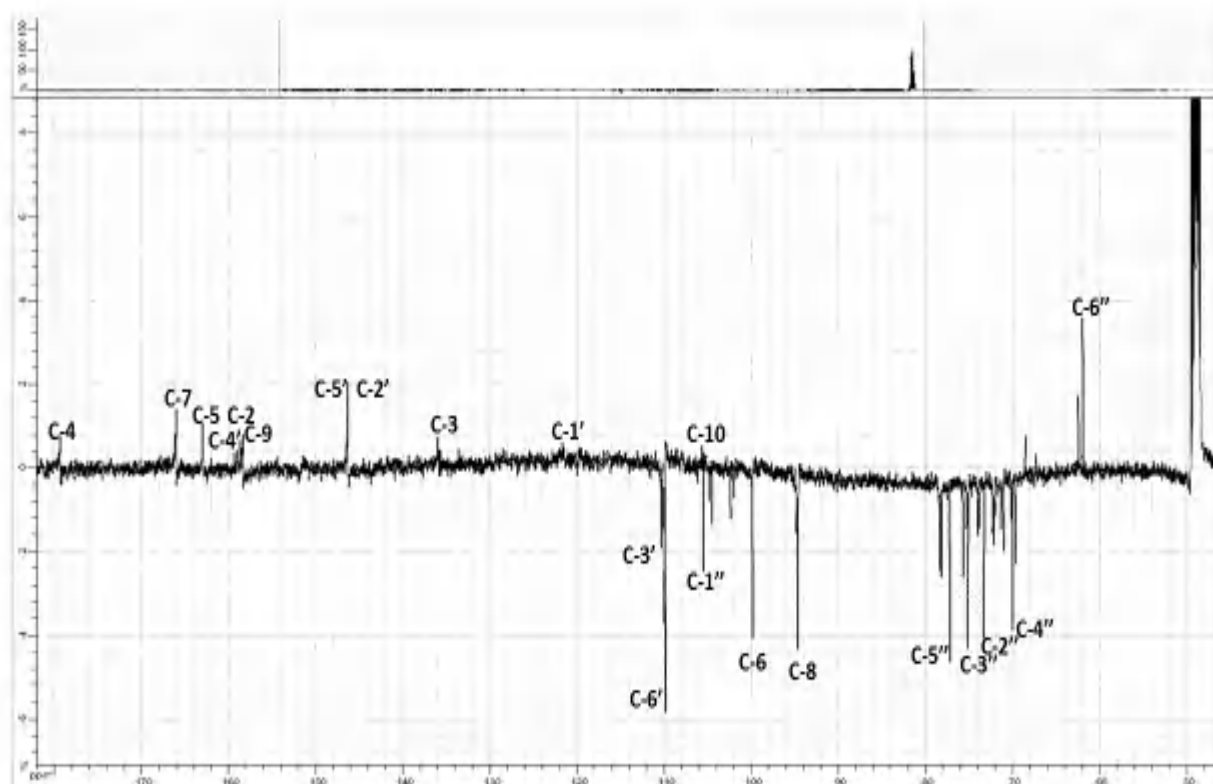


Figure IV.32. Spectroscopie UV du composé P12.

Le proton H-1'' montre une tache de corrélation dans le spectre relatif à l'expérience HMBC avec le carbonyle à $\delta_c = 135,97$ ppm attribuable à C-3 (Spectre IV. 115), ce qui confirme l'attachement de ce galactose au carbone C-3 de l'aglycone.



Spectre IV. 115. Etalement 2 spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz, δ ppm) du composé P12.



Spectre IV. 116. Spectre RMNJ-mode (MeOH-d₄, 125 MHz, δ ppm) du composé P12.

Toutes les affectations ont été confirmées par les interactions HMBC, le composé 12 a donc été identifié comme 5,7, 2', 4', 5' -penta hydroxyflavone 3-O- β -D-galactopyranoside et nommé gétuline.

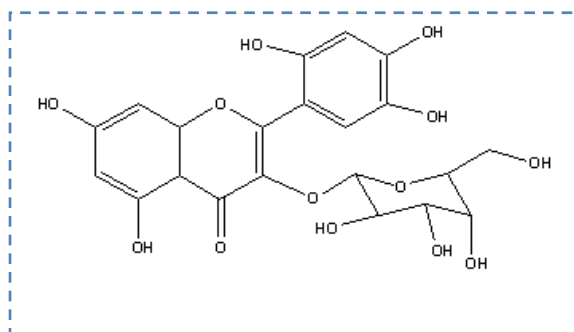


Figure IV.33. Structure du composé P 12.

Tableau IV.13. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C du composé P12.

12		
	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
1	-	-
2	158,68	-
3	135,97	-
4	179,42	-
5	163,00	-
6	99,91	6,19 (1H, d, 2,0)
7	166,12	-
8	94,66 158,39	6,39 (1H, d, 2,0)
9	105,66	-
10		-
1'	121,60	-
2'	146,40	-
3'	110,36	7,29 s
4'	159,06	-
5'	146,45	-
6'	109,94	7,37 s
1''	105,57	5,19 (1H, d, 7,5)
2''	73,29	3,82 (1H, dd, 9,0 ; 7,5)
3''	75,14	3,57 (1H,dd, 9,0 ; 2,9)
4''	70,05	3,86 (1H, d, 2,9)
5''	77,25	3,48 (1H,m)
6a''	61,95	3,72 (1H, dd, 11,6 ; 2,4)
6b''		3,65 (1H, dd, 11 ; 5,0)

IV. 2. 2. Elucidation structurale du composé P13 issu de la fraction F17

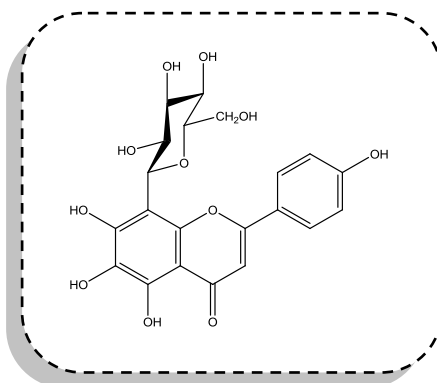


Figure IV.34. Structure du scutellarein 8-C- β -D-glucopyranoside P13.

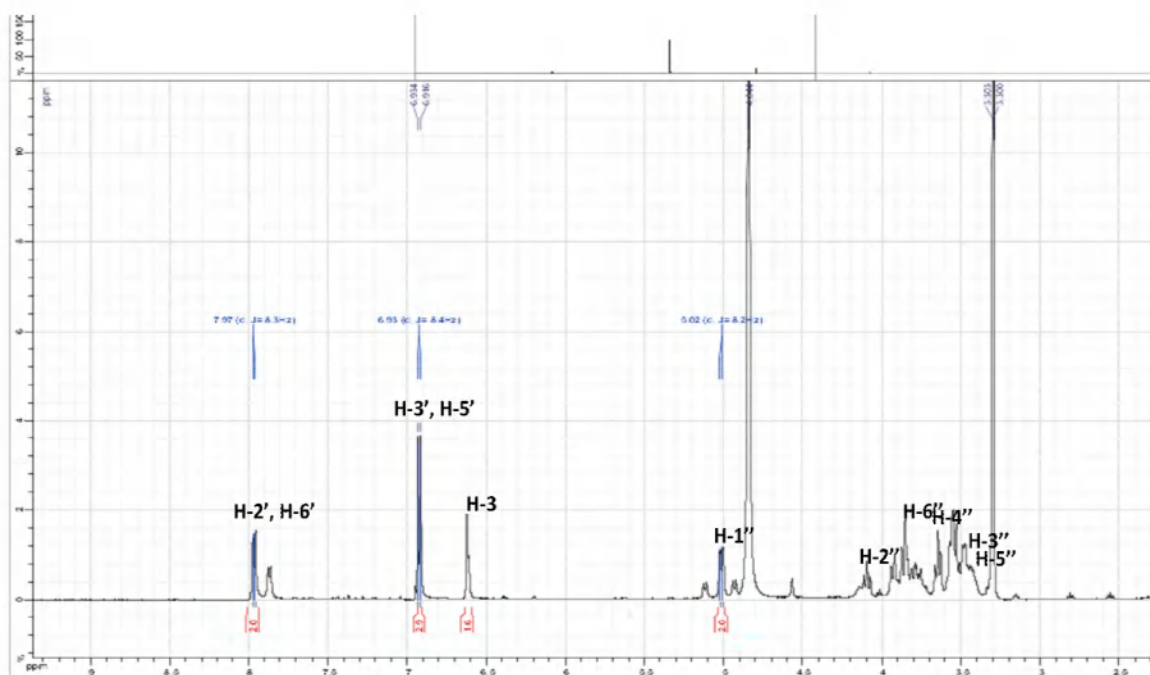
Ce produit est un précipité jaune, qui a été isolé à partir de la fraction **F17** et lavé avec du MeOH pour donner de scutellarein 8-C- β -D-glucopyranoside **P13**.

Le spectre RMN ^1H (MeOH- d_4 , 500 MHz) (Spectre IV. 117) et ses étalements (Spectre IV. 118), (Spectre IV. 119) montre qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavone ou flavonol (3-OR) :

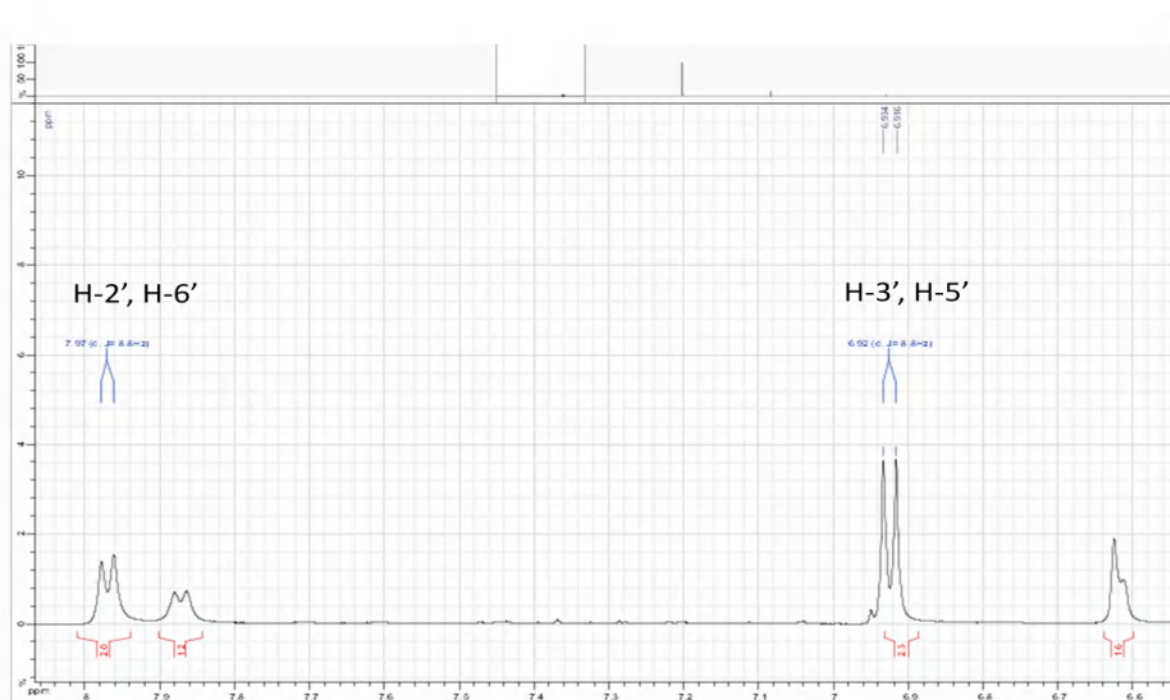
- Deux doublets intégrant chacun pour 2H à $\delta_{\text{H}} = 6,92$ ppm ($J = 8,5$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 7,96$ ppm ($J = 8,5$ Hz) attribuables respectivement aux protons H-3', H-5' et H-2', H-6' du cycle B du noyau flavonique.
- Un singulet intégrant pour 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,62$ ppm attribuable à H-3, H-6 ou H-8.
- Un doublet intégrant pour 1H à $\delta_{\text{H}} = 5,02$ ppm ($J = 8,5$ Hz) caractéristique du proton anomérique de l'hexose.

Les données relatives à la RMN ^1H sont reportées sur le tableau (Tableau IV.14).

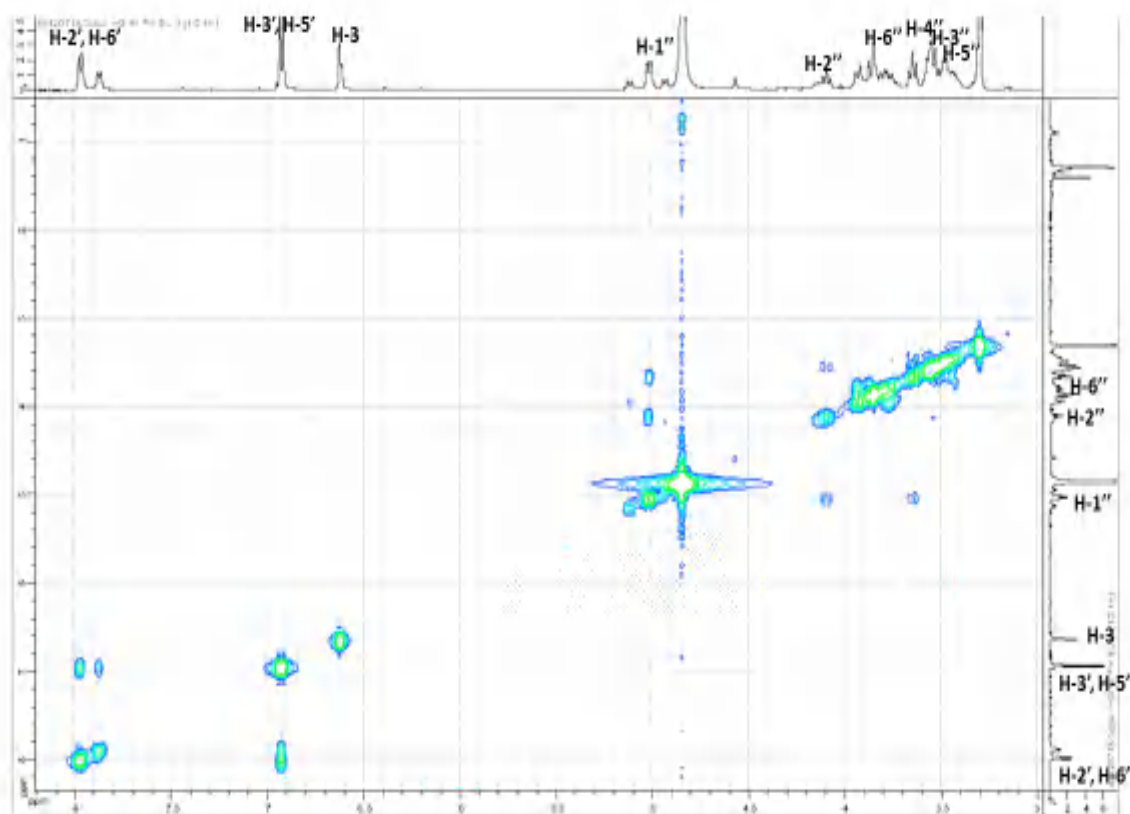
Les signaux observés sur le spectre RMN ^1H (Spectre IV. 117) révèlent deux doublets d'intégration 2H chacun à $\delta_{\text{H}} = 6,92$ ppm ($J = 8,5$ Hz) et $\delta_{\text{H}} = 7,96$ ppm ($J = 8,5$ Hz) attribuables respectivement aux protons H-3', H-5' et H-2', H-6' du cycle B du noyau flavonique et un singulet intégrant pour 1H à $\delta_{\text{H}} = 6,62$ ppm attribuable à H-3, H-6 ou H-8.



Spectre IV. 117. Spectre RMN ¹H (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P13.



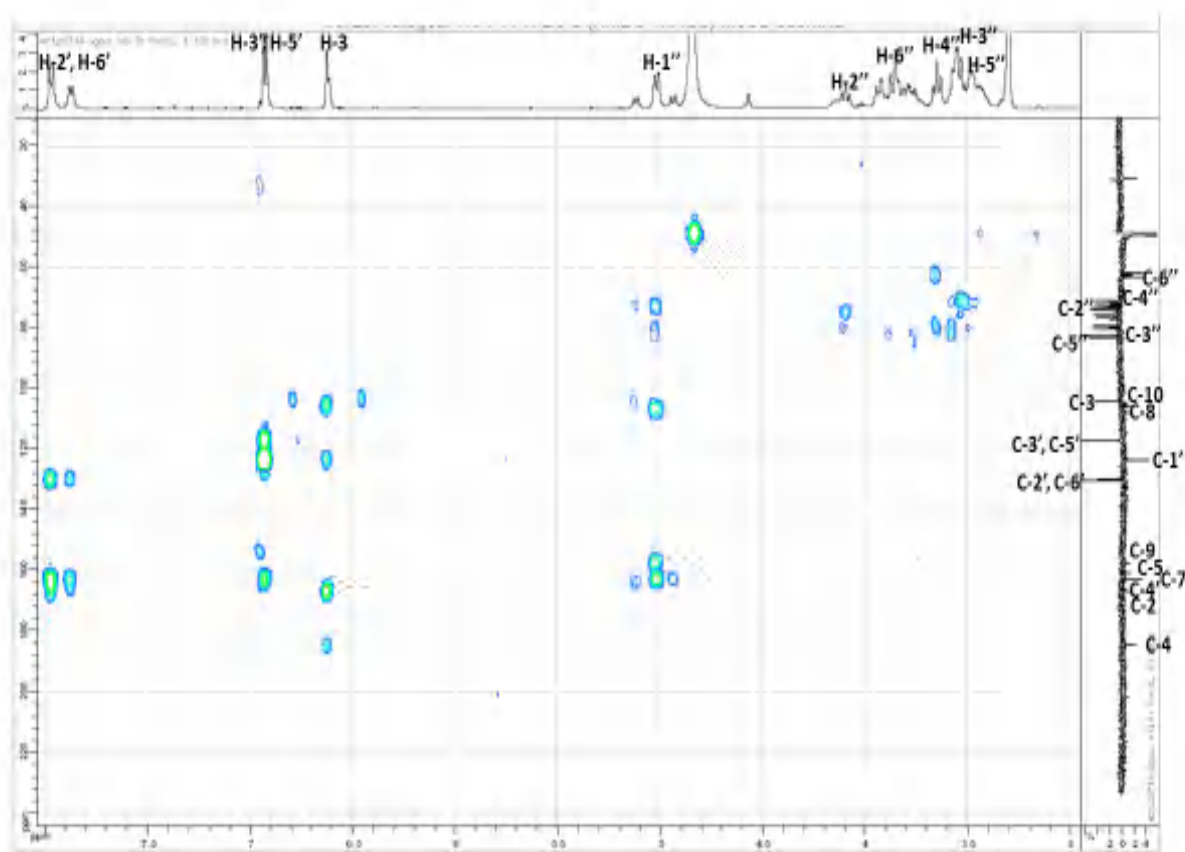
Spectre IV. 118. Etalament 1 spectre RMN ¹H (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P13.



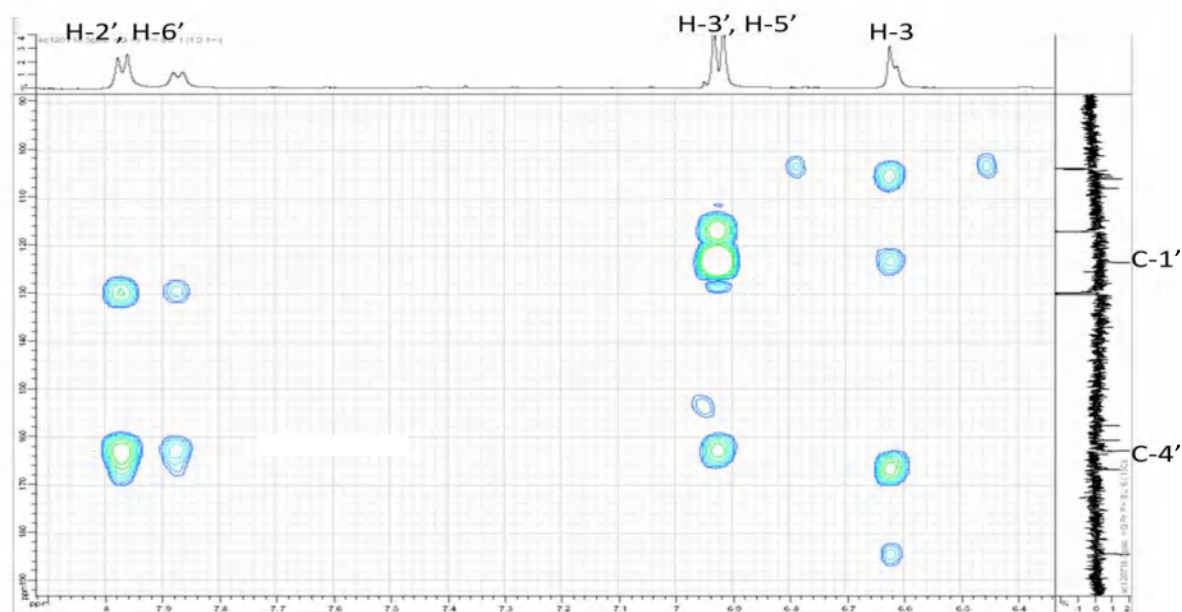
Spectre IV. 119. Spectre COSY (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P13.

Le spectre HMBC montre une tache de corrélation entre le signal observé sous forme de doublet attribuable pour H-3', H-5' et le carbone résonant à $\delta_c = 123,43$ ppm attribuable à C-1'.

Les deux doublets intégrant chacun pour 2H à δ_H 6,92 ppm et δ_H 7,96 ppm attribuables respectivement aux protons H-3', H-5' et H-2' et H-6' montrent sur le spectre de l'expérience HMBC une corrélation avec le carbone résonant à $\delta_c = 166,76$ ppm attribuable à C-4'.



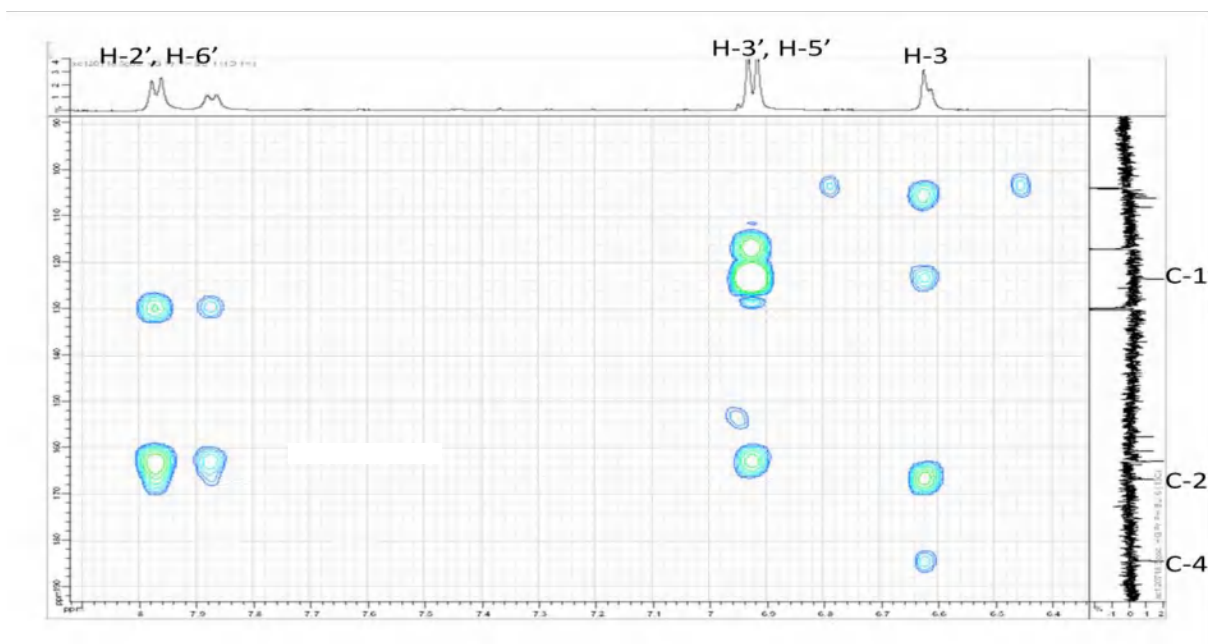
Spectre IV. 120. Spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P13.



Spectre IV. 121. Etatement 1 spectre HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P13.

L'ambiguïté concernant l'attribution du proton résonant à δ_H 6,62 ppm est levée par le spectre HMBC qui montre une corrélation de ce dernier avec le carbone à δ_C = 123,43 ppm attribuable à C-1', ce proton correspond donc au proton H-3.

Le singulet intégrant pour 1H à δ_H = 6,62 ppm montre une tache de corrélation sur le spectre HMBC avec C-1', indiquant son attribution à H-3, ce dernier montre des corrélations avec des carbones quaternaires résonant à δ_C = 166,39 ppm et 184,30 ppm attribuable à C-2 et C-4 successivement.



Spectre IV. 122. Etallement 2 spectre HMBC (MeOH-d4, 500 MHz) du composé P13.

La présence d'un doublet intégrant pour 1H à δ_H = 5,02 ppm (J = 8,5 Hz) caractéristique du proton anomérique de l'hexose.

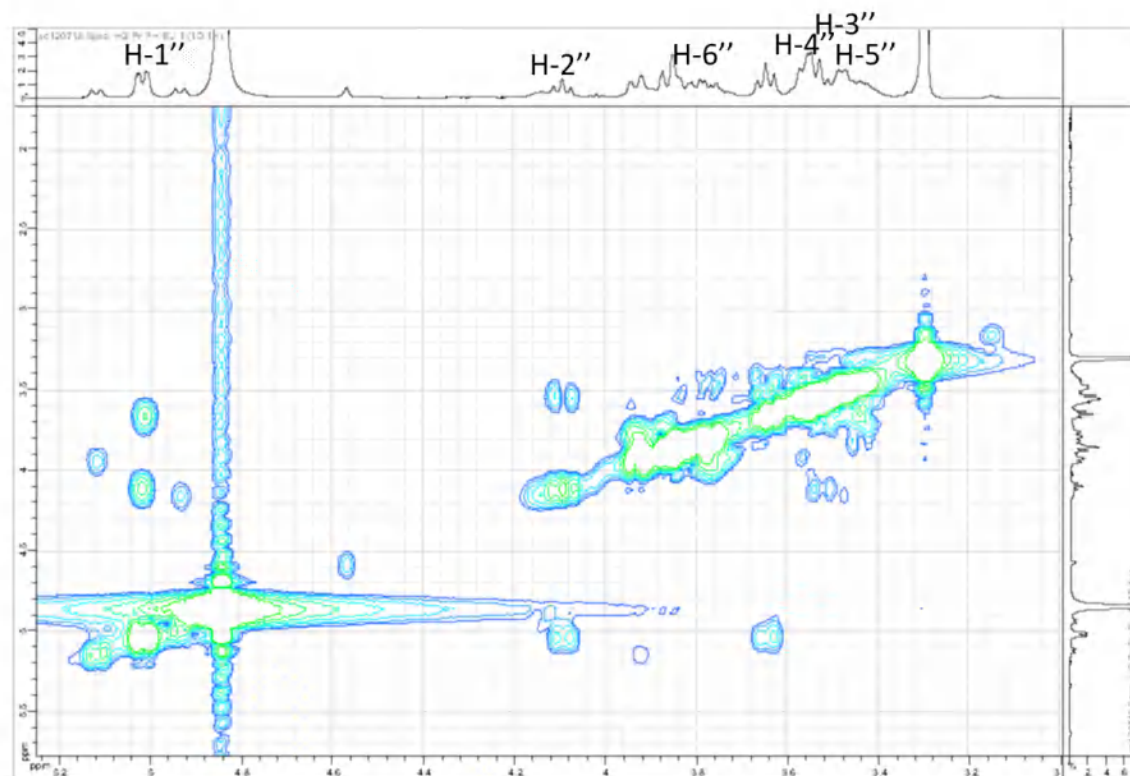
Cet hexose comporte :

Un CH_2 à δ_H = 3,86 ppm (1H, dd, J = 11,6 ; 2,3) et δ_H = 3,77 (1H, dd, J = 11,6 ; 5,8), δ_C = 61,76 ppm, attribuable au CH_2 de la position C-6'' de l'hexose.

Le spectre de l'expérience COSY (Spectre IV. 123), permet de localiser les protons de l'hexose, le proton anomérique H-1'' montre une tache de corrélation avec un proton à δ_H = 4,09 ppm (1H, m), ce proton est attribuable à H-2'' (δ_C = 73,10 ppm). Ce dernier corrèle avec le proton résonant sous forme d'un multiplet à δ_H = 3,53 ppm (1H, m) attribuable à H-3'' (δ_C = 79,14 ppm).

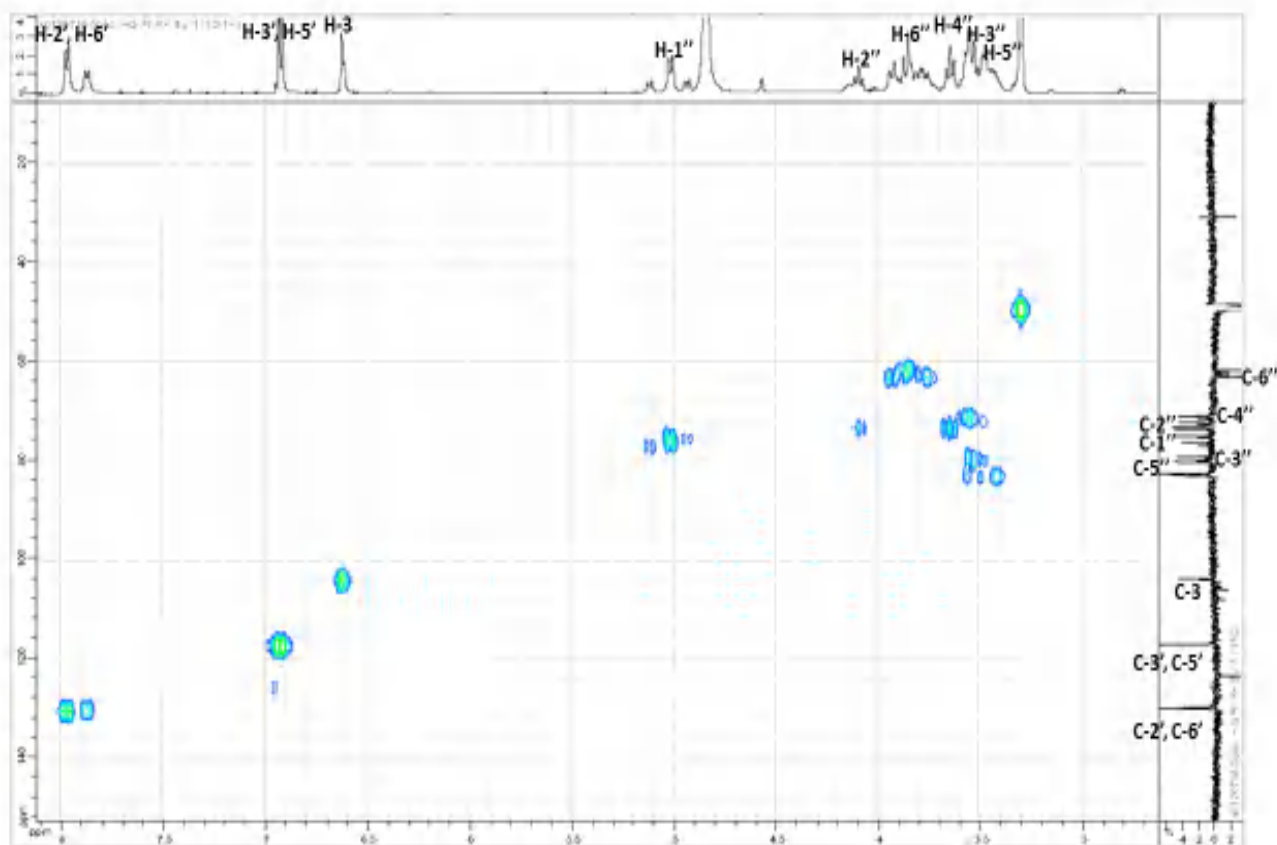
Le proton H-3'' corrèle avec un proton sous forme d'un multiplet à δ_H = 3,56 ppm (1H, m) attribuable à H-4'' (δ_C = 70,99 ppm), la constante de couplage J = 8,0 Hz supposent des interactions axiale-axiale entre H-3''/H-4'' ; H-4''/H-5'' et indiquent une orientation axiale de

H-4'', ce qui oriente vers un glucosyle. Le proton H-6'' corrèle avec un multiplet à $\delta_H = 3,48$ ppm (1H, m) attribuable à H-5'' ($\delta_C = 80,31$ ppm), ce qui indique que l'hexose est un β -glucose.

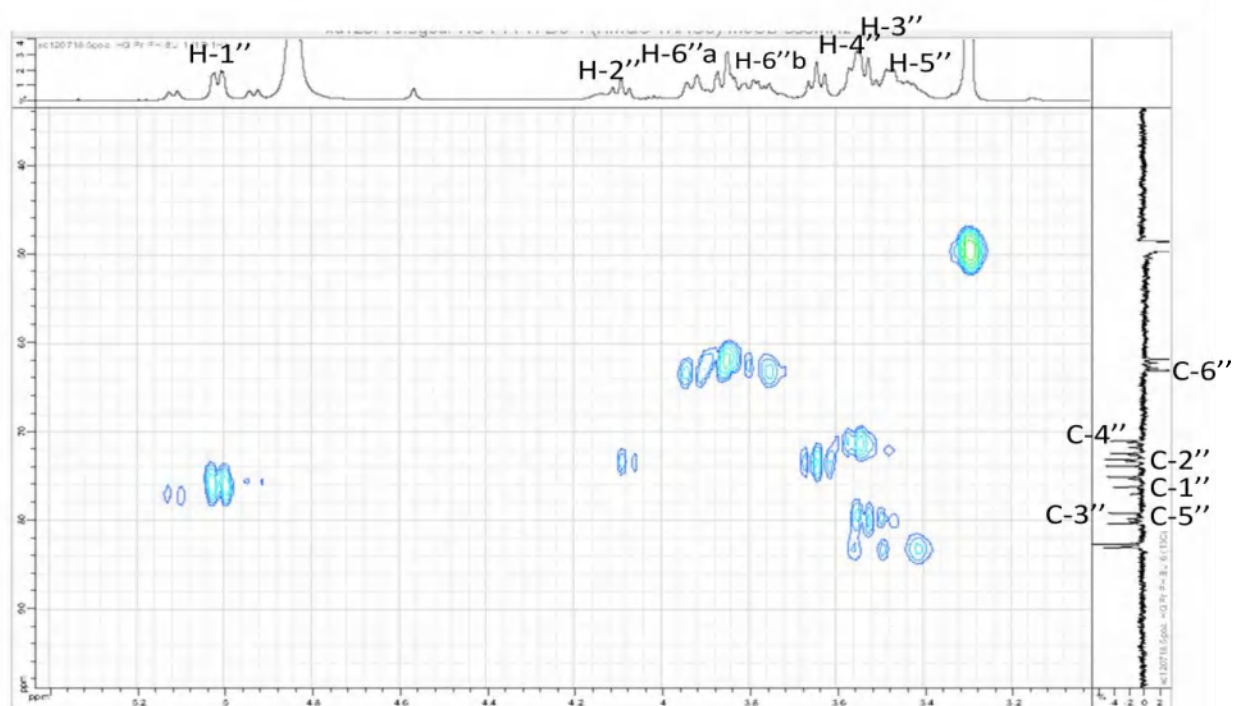


Spectre IV. 123. Etallement 1 spectre COSY (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P13.

Le spectre de l'expérience HMQC (Spectre IV. 124) et (Spectre IV. 125), permet de localiser les noyaux C-2' ; C-6' et C-3' ; C-5' du noyau flavonique à δ_C (130,16 et 117,02 ppm) respectivement et les C-1'' , C-2'' , C-3'' , C-4'' , C-5'' et C-6'' du glucose à δ_C (75,02 ; 73,10 ; 79,14 ; 70,99 ; 80,31 et 61,76 ppm) respectivement.



Spectre IV. 124. Spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P13.



Spectre IV. 125. Etallement 1 spectre RMN HMQC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P13.

Le proton H-1'' montre une tache de corrélation dans le spectre relatif à l'expérience HMBC avec le carbone à $\delta_c = 107,98$ ppm attribuable à C-8 (Spectre IV.126) ce qui indique l'attachement de ce glucose au carbone C-8 du cycle A de l'aglycone.

L'absence des signaux C-H sp^2 caractéristiques du cycle aromatique A, indique leurs substitution par des hydroxyles, cette hypothèse est confirmée par les données du spectre RMN *J*-mode et le spectre HMBC désignant des carbones quaternaires substitués par des hydroxyles libres.

Le spectre relatif à l'expérience HMBC montre aussi des corrélations du proton H-1'' avec des carbones résonant à $\delta_c = 106,03$; $157,47$ ppm et $162,84$ ppm attribuable à C-10, C-9 et C-7 successivement.

Le spectre RMN *J*-mode montre la présence de trois carbones hydroxylés à $\delta_c = 160,54$; $136,94$; $162,84$ ppm du cycle A attribuable à C-5, C-6 et C-7 successivement.

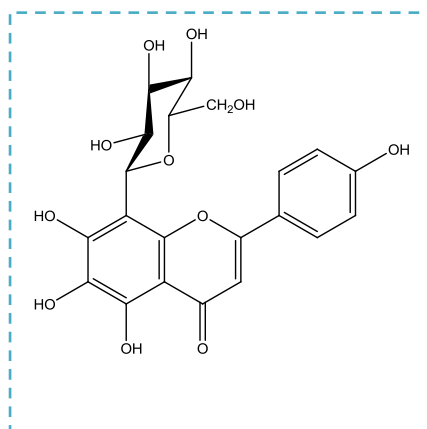
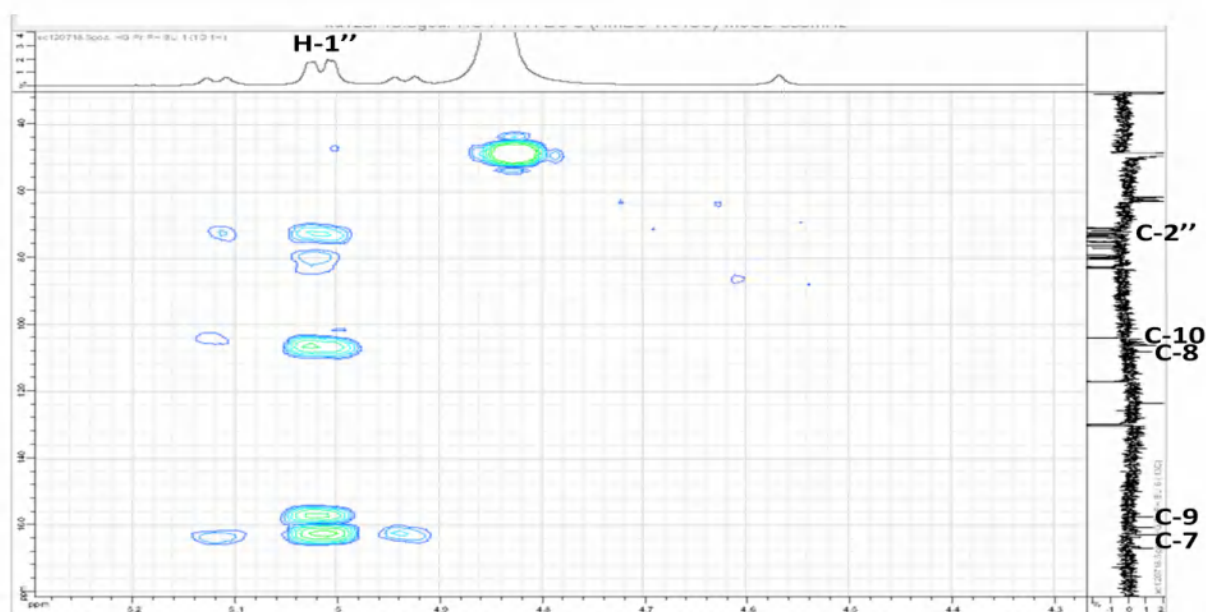
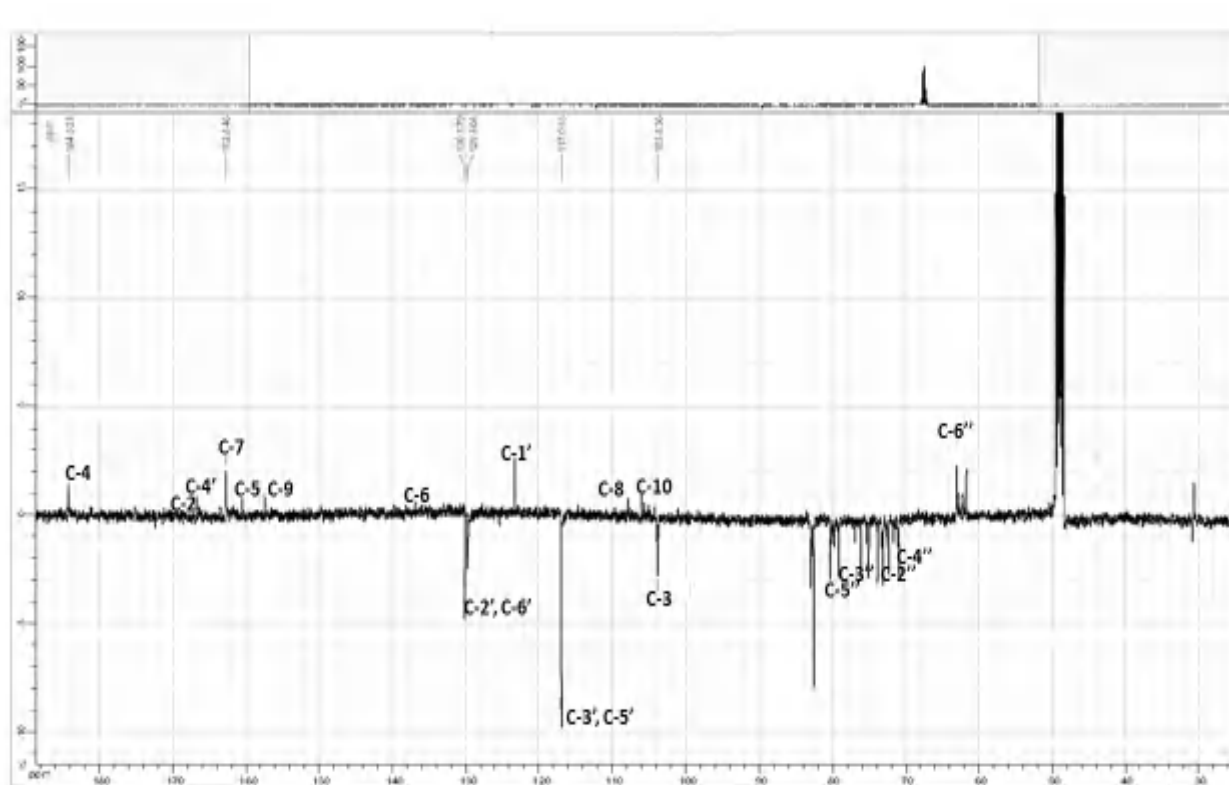


Figure IV.35. Structure composé P13.



Spectre IV. 126. Etalement 3 spectre RMN HMBC (MeOH-d₄, 500 MHz) du composé P13.

Le spectre HMBC et le spectre *J*-mode permettent d'attribuer les autres carbones de la molécule. Le spectre RMN *J*-mode montre l'ensemble des déplacements chimiques des carbones du composé 13.



Spectre IV. 127. Spectre RMN *J*-mode (MeOH-d₄, 125 MHz, δ ppm) du composé P13.

L'ensemble des données de RMN ^1H , ^{13}C , HMQC et HMBC mènent à la structure finale du composé confirmant que la molécule P13 est un scutellaréine substituée en position 8 par une unité de glucose.

Toutes ces données sont en faveur d'une structure de scutellaréine 8-*C*- β -D-glucopyranoside [14].

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

Tableau IV.14. Données de la spectroscopie de RMN ^1H , ^{13}C *J*-modulé du composé P13.

13		
	δ_{C}	δ_{H} (J en Hz)
1	-	-
2	166,39	-
3	103,83	6,62 (1H, s)
4	184,30	-
5	160,54	-
6	136,94	-
7	162,84	-
8	107,98	-
9	157,47	-
10	106,03	-
1'	123,43	-
2'	130,16	7,96 (2H, d, 8,5)
3'	117,02	6,92 (2H, d, 8,5 Hz)
4'	162,81	-
5'	117,02	6,92 (2H, d, 8,5 Hz)
6'	130,16	7,96 (2H, d, 8,5 Hz)
1''	75,02	5,02 (1H, d, 8,5Hz)
2''	73,10	4,09 (1H, m)
3''	79,14	3,53 (1H, m)
4''	70,99	3,56 (1H, m)
5''	80,31	3,48 (1H, m)
6''	61,76	3,86 (1H, dd, 11,6 ; 2,3) 3,77 (1H, dd, 11,6 ; 5,8 Hz)

IV. 3. Conclusion

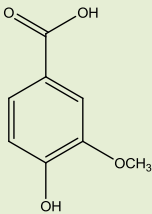
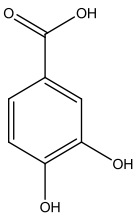
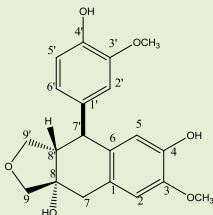
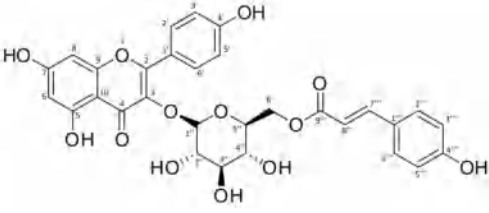
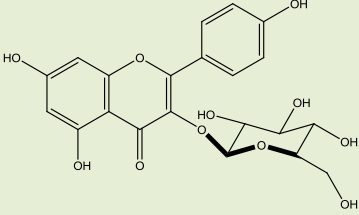
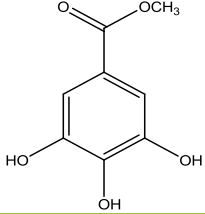
Treize composés ont été isolés et identifiés dans les fractions acétate d'éthyle et n-butanol de l'extrait M80, à partir des parties aériennes (feuilles et fleurs) de l'espèce *Helianthemum getulum*. Parmi ceux-ci, un nouveau flavonoïde est rapporté ici pour la première fois : le 5,7,2',4',5'-pentahydroxyflavone 3-O- β -D-galactopyranoside (**12**) et douze composés connus : un lignane de type aryltétraline: cycloolivil (**3**), sept flavonoïdes: trans-tiliroside (**4**), astragaline (**5**), dulcisflavane (**7**), cis-tiliroside (**8**), gallocatéchine (**9**), épigallocatéchine (**10**) et scutellaréine 8-C- β -D-glucopyranoside (**13**), trois acides phénoliques: l'acide vanillique (**1**), l'acide protocatéchique (**2**) et l'acide gallique (**11**), et un ester méthylique : méthyle gallate (**6**). Les composés **6**, **7** et **13** étaient nouveaux dans le genre *Helianthemum*. Toutes les structures ont été déterminées par des analyses spectroscopiques (expériences RMN ^1H et ^{13}C , J-mode, COSY, HSQC, HMBC, NOESY et ROESY), des méthodes chimiques et une comparaison avec les données de la littérature. Tous les composés isolés ont été décrits pour la première fois à partir de cette espèce.

Cette étude a montré une fois de plus que le genre *Helianthemum* est riche en polyphénols particulièrement les flavonoïdes qui sont la classe de métabolites secondaires la plus répandue.

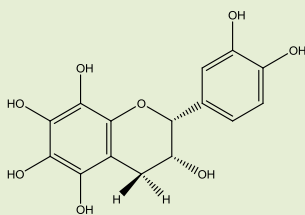
En effet, cette espèce est connue pour son utilisation en médecine traditionnelle pour traiter les infections par les vers intestinaux [15]. A noter que la majorité des composés isolés présente un potentiel biologique notamment l'activité antioxydante.

Les structures précédentes sont reportées dans le tableau IV.14.

Tableau IV.15. Les différents composés isolés de l'espèce *Helianthemum getulum*.

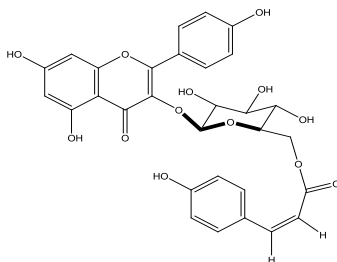
Composé	Formule brute	Structure du composé	Nom du composé
P1	$C_8H_8O_4$		Acide vanillique
P2	C_7H_6O		Acide protocatéchique
P3	$C_{20}H_{24}O_7$		Cyclooolivil
P4	$C_{30}H_{26}O_{13}$		Trans-tiliroside
P5	$C_{21}H_{20}O_{11}$		Astragaline
P6	$C_8H_8O_5$		Methyl gallate

P7

 $C_{15}H_{14}O_8$ 

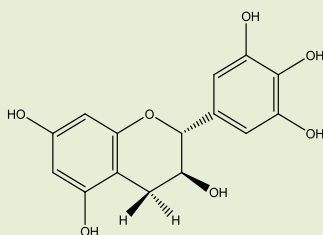
Dulcisflavane

P8

 $C_{30}H_{26}O_{13}$ 

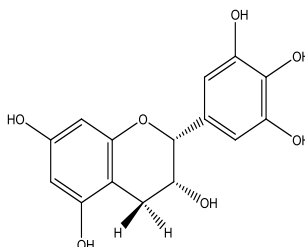
Cis-tiliroside

P9

 $C_{15}H_{14}O_7$ 

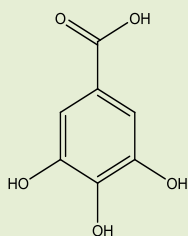
Gallocatéchine

P10

 $C_{22}H_{18}O_{11}$ 

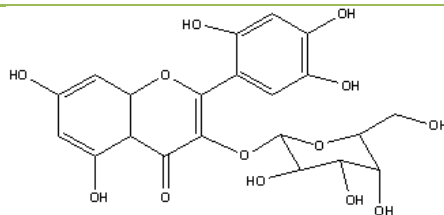
Epigallocatéchine

P11

 $C_7H_6O_5$ 

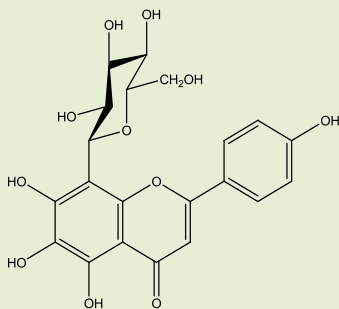
Acide gallique

P12

 $C_{21}H_{20}O_{13}$ 

5,7,2',4',5'-
pentahydroxyflavone
3-O- β -D-
galactopyranoside

P13

 $C_{21}H_{20}O_{11}$ 

Scutellarein 8-C- β -
D-glucopyranoside

Références

- [1] S. W. Chang, K. H. Kim, I. K. Lee, S. U. Choi, S. Y. Ryu, and K. R. Lee, "Phytochemical constituents of *Bistorta manshuriensis*," *Nat. Prod. Sc.*, 2009, 15(4), pp. 234–240.
- [2] D. Gutzeit, V. Wray, P. Winterhalter, and G. Jerz, "Preparative isolation and purification of flavonoids and protocatechuic acid from sea buckthorn juice concentrate (*Hippophaë rhamnoides* L. ssp. *rhamnoides*) by high-speed counter-current chromatography," *Chromatographia*, 2007, 65, pp. 1–7.
- [3] BA. wahab Sab, J. Jacob, GG. Manjunath, VK. Singh, Mundkinajeedu D, S. Shankarappa, "Cycloolivil, a lignan from the roots of *Stereospermum suaveolens*," *Pharmacognosy Research*, 2015, 7(1), pp. 45–48.
- [4] S. Tsukamoto *et al.*, "Isolation of cytochrome P450 inhibitors from strawberry fruit, *Fragaria ananassa*," *J. Nat. Prod.*, 2004, 67(11), pp. 1839–1841.
- [5] Y. Wei, Q. Xie, D. Fisher, and I. A. Sutherland, "Separation of patuletin-3-O-glucoside, astragalin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin from *Flaveria bidentis* (L.) Kuntze by elution-pump-out high-performance counter-current chromatography," *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218(36), pp. 6206–6211.
- [6] D. M. N. Hisham, J. M. Lip, J. M. Noh, A. Normah, & M. F. N. Nabilah, "Identification and isolation of methyl gallate as a polar chemical marker for *Labisia pumila Benth*," *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 2011, 39, pp. 279–284.
- [7] S. Deachathai, W. Mahabusarakam, S. Phongpaichit, W. C. Taylor, Y.-J. Zhang, and C.-R. Yang, "Phenolic compounds from the flowers of *Garcinia dulcis*," *Phytochemistry*, 2005, 66, pp. 2368–2375.
- [8] A. L. Davis, Y. Cai, A. P. Davies, and J. R. Lewis, "¹H and ¹³C NMR assignments of some green tea polyphenols," *Magn. Reson. Chem.*, 1996, 34(11), pp. 887–890.
- [9] R. Seto, H. Nakamura, F. Nanjo, and Y. Hara, "Preparation of epimers of tea catechins by heat treatment," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1997, 61(9), pp. 1434–1439.
- [10] I. Wawer and A. Zielinska, "¹³C-CP-MAS-NMR studies of flavonoids. I. Solid-state conformation of quercetin, quercetin 5'-sulphonic acid and some simple polyphenols," *Solid State Nucl. Magn. Reson.*, 1997, 10(1–2), pp. 33–38.
- [11] T. J. Mabry, K. R. Markham, and M. B. Thomas, "The ultraviolet spectra of flavones and flavonols," in *The systematic identification of flavonoids*, Springer, 1970, pp. 41–164.
- [12] B. Voirin, "UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3', 4') or tri-(3', 4', 5')-substituted B rings," *Phytochemistry*, 1983, 22(10), pp. 2107–2145.
- [13] P. K. Agrawal, "NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides," *Phytochemistry.*, 1992, 31(10), 3307–3330.

- [14] SH. Lee, GU. Park, JM. Jung, SY. Lee, inventors; Korea National Arboretum, assignee, 2015 Feb 11, *Saussurea grandifolia* extracts and substances isolated from the extracts for treating diabetic complications, Republic of Korea patent KR, 2015, 015611.
- [15] L. El Rhaffari and A. Zaid, “Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet): Un savoir empirique pour une pharmacopée renouvelée,” 2002.

Chapitre V

**Etude des propriétés biologiques de
l'espèce *Helianthemum getulum***

Chapitre V Etude des propriétés biologiques de l'espèce *Helianthemum getulum*

V. 1. Évaluation de l'activité antioxydante

V. 1. 1. Introduction

Dans cette étude, Nous avons mesuré le potentiel antioxydant par une technique spectrophotométrique *in vitro*, plusieurs méthodes ont été utilisées pour déterminer le potentiel antioxydant de l'extrait méthanolique M80, des fractions B, C et D et des composés isolés de l'espèce *Helianthemum getulum*, l'activité de piégeage des radicaux DPPH, l'activité du piégeage de l'ABTS•+, le dosage de piégeage des radicaux galvinoxyle (GOR) et le test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).

Dans le but d'obtenir une meilleure évaluation du potentiel antioxydant, le Trolox, le BHA et le BHT ont été utilisés comme étalons positifs.

Les valeurs des IC₅₀ ou A_{0,5} exprimées en µg/ml ont été déterminées graphiquement à partir de la droite de régression de pourcentage d'inhibition ou d'absorbance en fonction de la concentration pour chaque extrait, composé isolé ou standard testé.

Toutes les extraits et les composés isolés ont montré une bonne activité antioxydante, certains d'entre eux présentant une activité supérieure aux standards antioxydants utilisés.

V. 1. 2. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de l'espèce *Helianthemum getulum*

V. 1. 2. A. L'effet scavenger du radical DPPH

Le tableau V. 1 représente les pourcentages d'inhibitions pour les différentes concentrations des extraits testés et les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (IC₅₀) pour les tests au DPPH.

Le radical libre DPPH absorbe à 517 nm sous forme radicalaire. Celui-ci vire du violet au jaune en présence d'antioxydants, lorsque ces radicaux sont réduits par un antioxydant, leurs absorptions diminuent. Ainsi, une absorbance plus faible indique une activité antioxydante plus élevée de la molécule testée.

L'activité antioxydante des extraits testés a été comparée avec à celles des standards (BHA, BHT et Trolox).

L'extrait méthanolique brut (M80) a présenté une activité de piégeage radicalaire intermédiaire dans le test DPPH (IC₅₀ = 21,25 ± 0,10 µg/ml) par rapport à celle du BHA (IC₅₀ = 6,27 ± 0,86 µg/ml) et meilleure que celle du BHT (IC₅₀ = 48,70 ± 0,62 µg/ml) utilisé comme témoin positif.

L'extrait acétate d'éthyle a montré un pouvoir antioxydant puissant avec un ($IC_{50} = 9,34 \pm 0,07 \mu\text{g/ml}$) et une meilleure activité que celle du standard BHT ($IC_{50} = 48,70 \pm 0,62 \mu\text{g/ml}$). Cette activité est suivie de celle de l'extrait n-BuOH ($IC_{50} = 11,65 \pm 0,28 \mu\text{g/ml}$) puis par celle des extraits M80 et chloroformique ($IC_{50} = 21,25 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}$) et ($IC_{50} = 46,92 \pm 1,12 \mu\text{g/ml}$) respectivement.

De plus, une telle activité antioxydante semble être concentrée dans les extraits C et D. Pour cette raison, des séparations et des purifications ont été effectuées sur ces fractions et d'autres tests d'activité antioxydante ont été effectués sur des composés isolés. Les composés phénoliques sont connus pour agir comme des puissants antioxydants briseurs de chaîne [1]. Par conséquent, certains des composés (1-13), en particulier les dérivés de la catéchine, sont susceptibles d'être responsables de l'activité antioxydante de la fraction C. En conséquence, presque tous les composés isolés ont montré une activité antioxydante. Les composés (2, 7, 9), le nouveau dérivé de flavonol (12) et l'aryllignane (3) se sont avérés les plus actifs.

Tableau V.1. Activité antioxydante évaluée par le dosage DPPH.

Extraits	Pourcentage d'inhibition % (DPPH)							
	1,5625 μg	3,125 μg	6,25 μg	12,5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Extrait M80	4,87 $\pm$ 1,13	9,25 $\pm$ 1,01	21,04 $\pm$ 1,05	29,91 $\pm$ 1,46	57,95 $\pm$ 0,96	82,65 $\pm$ 1,04	87,23 $\pm$ 0,30	21,25 $\pm$ 0,10
Extrait chloroformique	0,58 $\pm$ 0,73	7,36 $\pm$ 0,94	13,12 $\pm$ 1,57	17,41 $\pm$ 0,73	33,01 $\pm$ 0,42	51,42 $\pm$ 0,52	76,30 $\pm$ 0,38	46,92 $\pm$ 1,12
Extrait Acétate d'éthyle	9,25 $\pm$ 0,17	20,96 $\pm$ 2,61	37,89 $\pm$ 0,84	62,37 $\pm$ 0,10	84,56 $\pm$ 0,81	SAT	SAT	9,34 $\pm$ 0,07
Extrait butanolique	6,74 $\pm$ 0,68	16,45 $\pm$ 1,31	29,46 $\pm$ 0,82	53,27 $\pm$ 1,05	78,56 $\pm$ 0,21	86,25 $\pm$ 0,64	86,56 $\pm$ 0,88	11,65 $\pm$ 0,28
BHT	NA	NA	3,66 $\pm$ 0,00	16,57 $\pm$ 0,87	34,06 $\pm$ 0,83	50, 91 $\pm$ 0, 43	73,76 $\pm$ 0,71	48,70 $\pm$ 0,62
BHA	19,54 $\pm$ 3,33	27,95 $\pm$ 1,88	53,88 $\pm$ 1,45	77,45 $\pm$ 0,29	84,97 $\pm$ 0,63	85,17 $\pm$ 0,31	88,47 $\pm$,00	5,78 $\pm$ 0,18
Trolox	29,47 $\pm$ 2,15	59,95 $\pm$ 1,33	88,39 $\pm$ 0,25	SAT	SAT	SAT	SAT	2,60 $\pm$ 0,09

SAT: Saturation, NA: No absorbance (Pas d'absorbance).

Les courbes montrant le pourcentage d'inhibition (%) du radical libre DPPH en fonction des concentrations des extraits de l'espèce *H.getulum* et des standards (BHA, BHT et Trolox), sont représentées dans la figure V. 1.

Selon la figure V. 1, les courbes des pourcentages d'inhibition des extraits ainsi que les standards ont la même allure, plus la concentration est élevée, plus l'activité antiradicalaire est élevée jusqu'à atteindre un plateau.

La figure V. 1 montre que l'extrait acétate d'éthyle présente un pourcentage d'inhibition élevé de 84,56 % qui est voisin de celui standard BHA 84,97 % à la concentration de 25 $\mu\text{g/ml}$ et plus important que celui du standard BHT 34,06 % à la même concentration.

Les extraits butanolique et M80 présentent un pourcentage d'inhibition de 78,56 % et 57,95 % respectivement. Ils sont plus importants que ceux des standards BHT 34,06 % à la concentration 25 $\mu\text{g/ml}$, tandis que l'extrait chloroformique 33,01% présente presque le même pourcentage d'inhibition que le standard BHT 34,06 %.

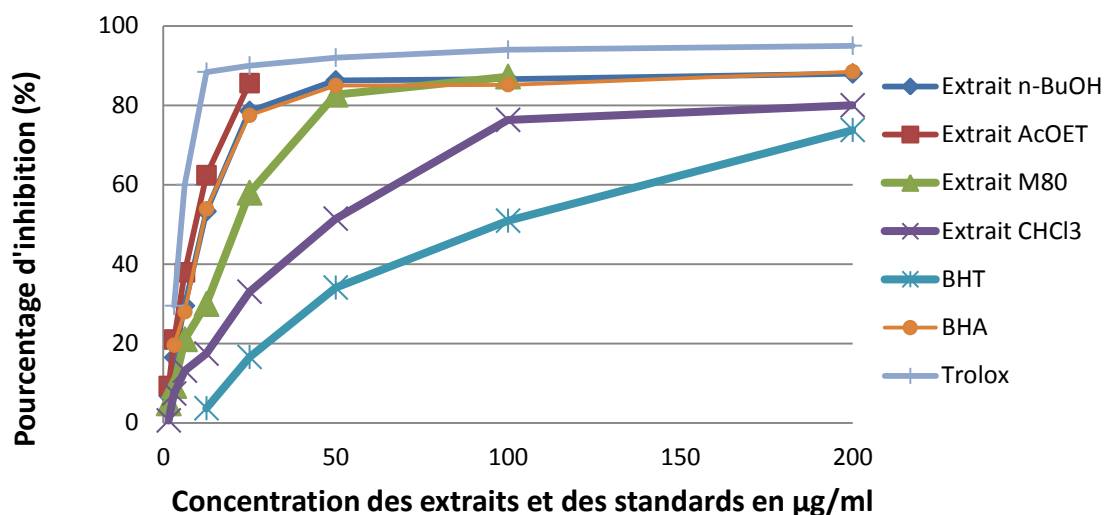


Figure V.1. Piégeage du radical DPPH par les extraits de *H.getulum*, du BHT, du BHA et du Trolox.

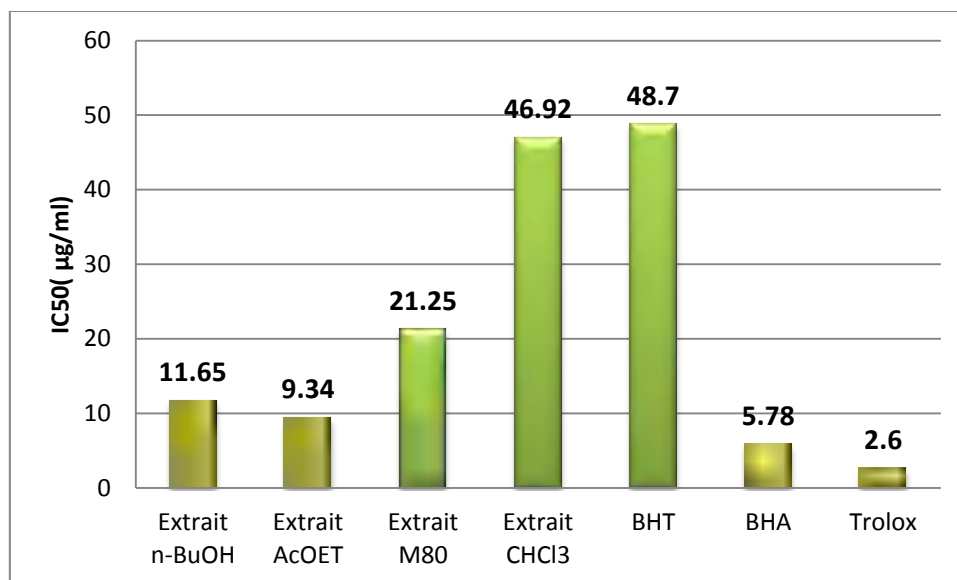


Figure V.2. Valeurs des IC₅₀ des extraits de *H.getulum* et des standards BHA, BHT et Trolox (Test du DPPH).

Chaque valeur représente une moyenne $\pm$ SD ($n = 3$), $P < 0,05$

V. 1. 2. B. Activité du piégeage de l'ABTS•+

Le test ABTS•+, est un dosage colorimétrique dans lequel le radical ABTS se décolore en présence d'antioxydants, le radical cationique ABTS absorbe à 734 nm sous sa forme radicalaire. Les extraits M80, CHCl₃, AcOEt et n-BuOH, ont donné une bonne activité au test du radical-cation ABTS. L'activité antioxydante des extraits testés a été comparée avec celles des standards (BHA, BHT et Trolox).

Le tableau V.2 représente les pourcentages d'inhibition pour différentes concentrations des extraits testés et les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (IC₅₀) pour les tests d'ABTS. Les résultats obtenus dans ce test sont concordants avec les résultats de l'essai précédant DPPH, l'échantillon le plus intéressant est celui de l'extrait acétate d'éthyle suivi par l'extrait butanolique (IC₅₀ = 10,40 ± 0,52 µg/ml) (IC₅₀ = 11,25 ± 0,13 µg/ml) respectivement et en dernier, on trouve les extraits M80 et chloroformique (IC₅₀ = 25,77±0,52 µg/ml) (IC₅₀ = 33,27±0,51 µg/ml) respectivement.

Tableau V.2. Activité antioxydante évaluée par le dosage ABTS.

Extraits	Pourcentage d'inhibition % (ABTS)							
	1,5625 µg	3,125µg	6,25 µg	12,5 µg	25µg	50 µg	100 µg	IC ₅₀ (µg/ml)
Extrait M80	NA	4,69±0,57	13,43±0,67	23,65±3,61	48,92±0,76	84,05±0,28	89,78±0,95	25,77±0,52
Extrait chloroformique	NA	9,73± 1,24	17,80±0,86	32,79±1,52	46,90±0,57	57,45±1,05	72,71±0,62	33,27±0,51
Extrait Acétate	7,18±1,24	19,17±0,21	30,84±0,48	57,79±0,57	89,78±0,97	94,15±0,10	94,19±0,38	10,40±0,52
Extrait butanolique	7,85±0,29	11,48±1,81	25,87±2,00	55,51±2,09	82,79±1,71	93,08±0,29	SAT	11,25±0,13
BHT	30,20±2,30	52,21±0,45	72,34±0,36	89,61±0,77	92,98±0,30	93,84±0,20	SAT	2,09±0,09
BHA	35,60±0,73	68,37±0,6	92,98±0,51	93,03±0,26	93,09±0,20	93,21±0,49	SAT	2,25±0,05
Trolox	55,26±6,17	91,43±1,25	SAT	SAT	SAT	SAT	SAT	1,30±0,34

SAT: Saturation, NA: No absorbance (Pas d'absorbance).

Les courbes montrant le pourcentage d'inhibition (%) du radical cation ABTS en fonction de la concentration des extraits de *H.getulum* et des standards (BHA, BHT et Trolox), représentées dans la figure V. 3. Le pourcentage d'inhibition de DPPH augmente avec l'augmentation de la concentration pour les standards et les extraits testés.

La figure V. 3 montre que les deux extraits acétate d'éthyle et butanolique présentent des pourcentages d'inhibition voisins de 89,78 % et 82,79±1,71% respectivement à la

concentration 25 $\mu\text{g/ml}$, ces pourcentages d'inhibition puissants sont très proches de ceux des standard BHA et BHT 93,09 % et 92,98 %.

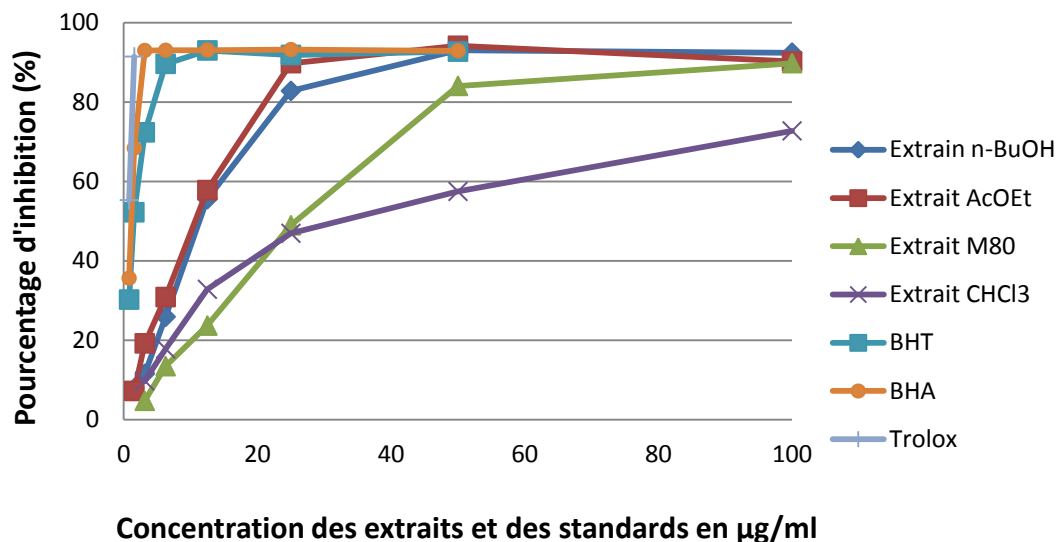


Figure V.3. Piégeage du radical ABTS par les extraits de *H.getulum*, du BHT, du BHA et du Trolox.

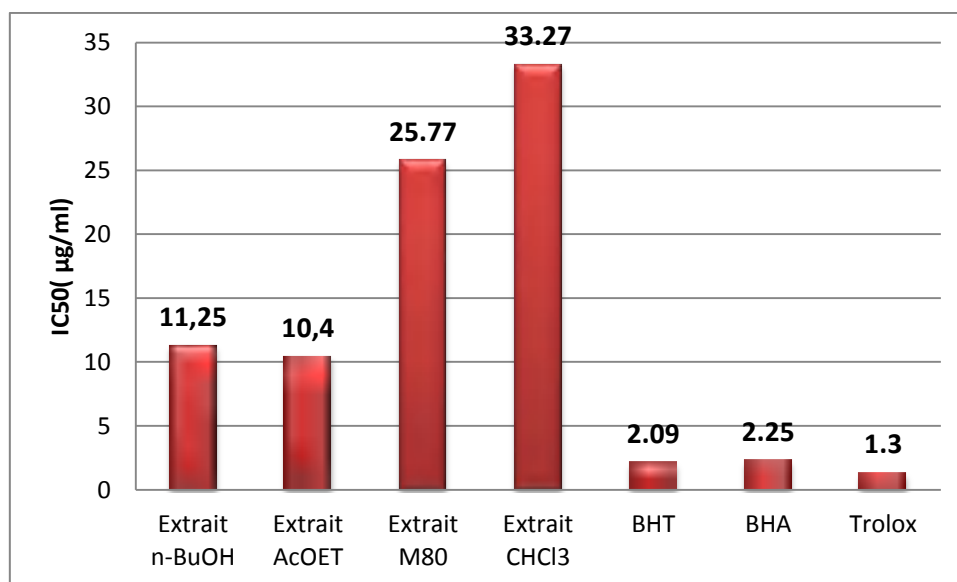


Figure V.4. Valeurs des IC₅₀ des extraits de l'espèce *H.getulum* et des standards BHA, BHT et Trolox (Test du radical-cationABTS).

Chaque valeur représente une moyenne $\pm$ SD ($n = 3$), $P < 0,05$

V. 1. 2. C. Dosage de piégeage des radicaux galvinoxyle (GOR)

Le tableau V.3 représente les pourcentages d'inhibitions pour différentes concentrations des extraits testés et les valeurs de la concentration d'inhibition de 50% (IC₅₀).

L'extrait d'acétate d'éthyle d'*H.getulum* s'est avéré être le meilleur extrait actif dans cet essai (IC₅₀ = 8,27 ± 0,36 µM), il est proche de celui du BHT (IC₅₀ = 8,91±0,23µM), suivi par l'extrait n-BuOH, M80 et chloroformique (IC₅₀ = 10,93 ± 0,39 µg/ ml) (IC₅₀ = 20,79 ± 0,64 µg/ml) (IC₅₀ = 59,50 ± 2,06 µg/ml) respectivement.

Les résultats obtenus avec les tests DPPH, ABTS et GOR sont concordants. Ils ont montré que c'est toujours l'extrait d'acétate d'éthyle d'*H.getulum* qui a l'activité antioxydante la plus puissante suivi par l'extrait n-BuOH comparativement aux extraits M80 et chloroformique et les standards. Cette activité est due à la présence de molécules polaires à savoir les polyphénols comme les flavonoïdes, les acides phénoliques et les lignanes. Selon les études antérieures, les composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques et les tanins sont connus pour être de puissants antioxydants briseurs de chaîne [1]. L'origine de l'activité antioxydante des composés phénoliques est due à la présence et au positionnement des groupements hydroxyles dans ces molécules [2].

Tableau V.3. Activité antioxydante évaluée par le dosage GOR.

Extraits	Pourcentage d'inhibition % (GOR)							
	1,5625 µg	3,125µg	6,25 µg	12,5 µg	25µg	50 µg	100 µg	IC ₅₀ (µg/ml)
Extrait M80	4,90±0,72	7,68±0,50	12,91±0,75	31,81±0,82	60,64±0,35	74,4±0,78	SAT	20,79±0,64
Extrait chloroformique	NA	4,04±1,90	8,27±1,85	13,63±1,26	30,39±0,89	46,93±1,37	66,75±1,71	59,50±2,06
Extrait Acétate	11,61±1,26	21,45±1,63	41,05±1,57	67,79±1,66	77,77±0,50	79,46±1,12	80,60±0,91	8,27± 0,36
Extrait butanolique	7,33±0,51	14,68±0,11	31,09±1,14	56,40±1,73	74,55±0,50	75,90±0,70	76,01±0,60	10,93±0,39
BHT	15,05±0,65	24,05±1,21	42,27±0,00	60,63±1,15	68,69±0,50	71,09±0,36	SAT	8,91± 0,23
BHA	21,47±1,17	40,12±0,73	57,11±1,02	67,22±0,40	71,62±0,44	SAT	SAT	4,87± 0,11
TROLOX	23, 73±0,02	62,85±1,98	76,34±0,28	81,19±0,22	SAT	SAT	SAT	2,33± 0,45

SAT: Saturation, NA: No absorbance (Pas d'absorbance).

Les courbes montrant le pourcentage d'inhibition (%) des radicaux galvinoxyle GOR en fonction des concentrations des extraits de *H.getulum* et des standards (BHA, BHT et Trolox) sont représentées dans la figure V. 5. Le pourcentage d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration pour les standards et les extraits testés.

La figure V. 5 montre que l'extraits acétate d'éthyle présente un pourcentage d'inhibition élevé de 67,79 % à la concentration 12,5 µg/ml, ce pourcentage d'inhibition est très proche de ceux des standards BHA et BHT 67,22 % et 60,63 %.

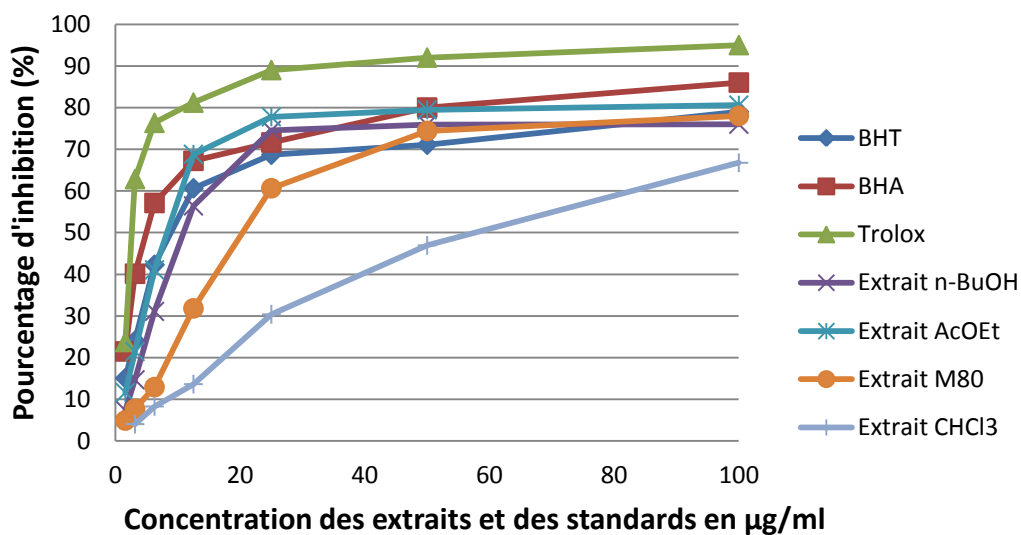


Figure V.5. Piégeage du radical GOR par des extraits de l'espèce *H.getulum*, du BHT, du BHA et du Trolox.

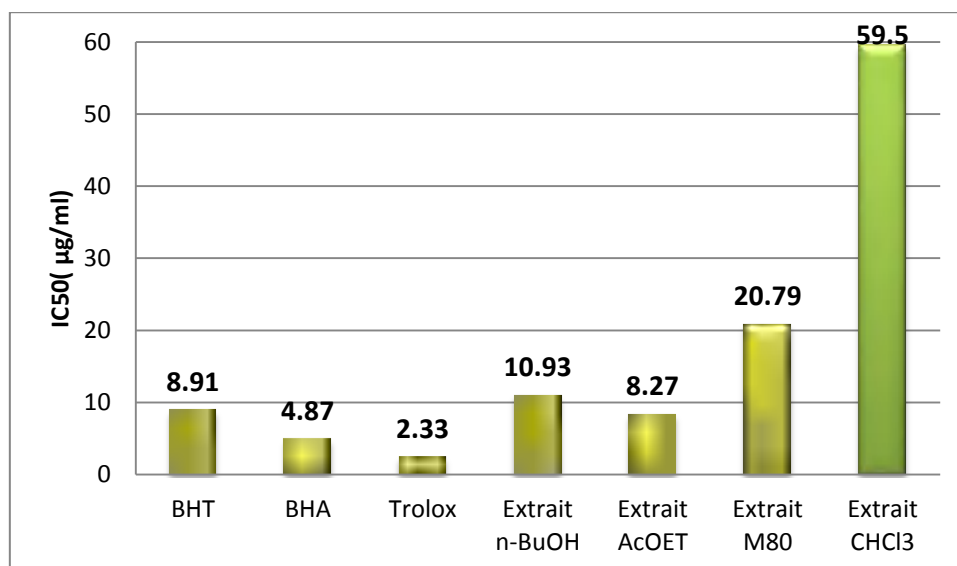


Figure V.6. Valeurs des IC₅₀ des extraits de l'espèce *H.getulum* et des standards BHA, BHT et Trolox (Test de piégeage des radicaux galvinoxyle GOR).

Chaque valeur représente une moyenne $\pm$ SD (n = 3), P < 0,05.

V. 1. 2. D. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

Le test CUPRAC est basé sur la mesure de l'absorbance à 450 nm, le sel cuivrique est réduit en sel cuivreux par un électron libéré par un antioxydant. Ensuite, le cuivreux forme un complexe stable avec la néocuproïne, qui augmente l'absorbance à 450 nm. Une absorbance plus élevée indique une capacité de réduction plus élevée de l'antioxydant.

Le tableau V.4 représente les pourcentages d'inhibition pour les différentes concentrations des extraits testés et les valeurs par 0,50 d'absorbance ($A_{0,50}$) pour le test CUPRAC, les résultats obtenus sont comparés avec ceux des étalons (BHA, BHT et Trolox).

Les résultats obtenus ont permis de déduire que l'extrait acétate d'éthyle est le meilleur réducteur ($A_{0,50} = 8,04 \pm 0,59$) présentant une meilleure activité que celle du standard BHT, suivi de l'extrait n-BuOH ($A_{0,50} = 11,92 \pm 0,43 \mu\text{g/mL}$) et en dernier, on trouve les extraits chloroformique et M80 ($A_{0,50} = 18,07 \pm 0,48 \mu\text{g/mL}$) ($A_{0,50} = 23,89 \pm 2,32 \mu\text{g/mL}$) respectivement.

Tableau V.4. Activité antioxydante évaluée par le test CUPRAC.

Extraits	Absorbances CUPRAC							
	1,5625 μg	3,125 μg	6,25 μg	12,5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	$A_{0,50}$ ($\mu\text{g/mL}$)
Extrait butanolique	0,16 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,01	1,51 $\pm$ 0,17	2,66 $\pm$ 0,14	11,92 $\pm$ 0,43
Extrait Acétate	0,18 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,00	0,42 $\pm$ 0,03	0,70 $\pm$ 0,03	1,21 $\pm$ 0,03	2,10 $\pm$ 0,15	3,56 $\pm$ 0,16	8,04 $\pm$ 0,59
Extrait M80	0,13 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,01	0,51 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,02	1,59 $\pm$ 0,03	23,89 $\pm$ 2,32
Extrait chloroformique	0,13 $\pm$ 0,00	0,18 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,02	1,11 $\pm$ 0,06	1,91 $\pm$ 0,07	18,07 $\pm$ 0,48
BHA	0,28 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,03	1,15 $\pm$ 0,09	1,94 $\pm$ 0,03	3,15 $\pm$ 0,26	3,65 $\pm$ 0,19	4,49 $\pm$ 0,10
BHT	0,11 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,04	0,66 $\pm$ 0,07	1,03 $\pm$ 0,07	1,48 $\pm$ 0,09	2,04 $\pm$ 0,14	9,62 $\pm$ 0,87
TROLOX	0,20 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,02	0,58 $\pm$ 0,04	1,05 $\pm$ 0,03	1,83 $\pm$ 0,02	2,91 $\pm$ 0,33	SAT	5,28 $\pm$ 0,38

Les courbes montrant l'absorbance A qui correspond à la réduction du cuivre en fonction de la concentration des extraits de l'espèce *H.getulum* et des standards (BHA, BHT et Trolox) sont représentées dans la figure V. 7.

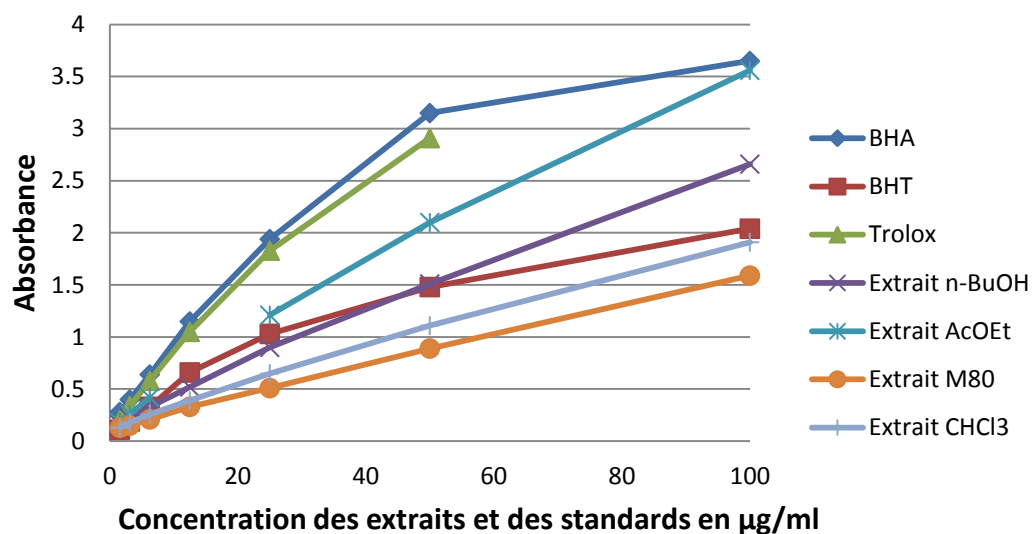


Figure V.7. Piégeage du radical CUPRAC par des extraits de l'espèce *H. getulum*, du BHT, du BHA et du Trolox.

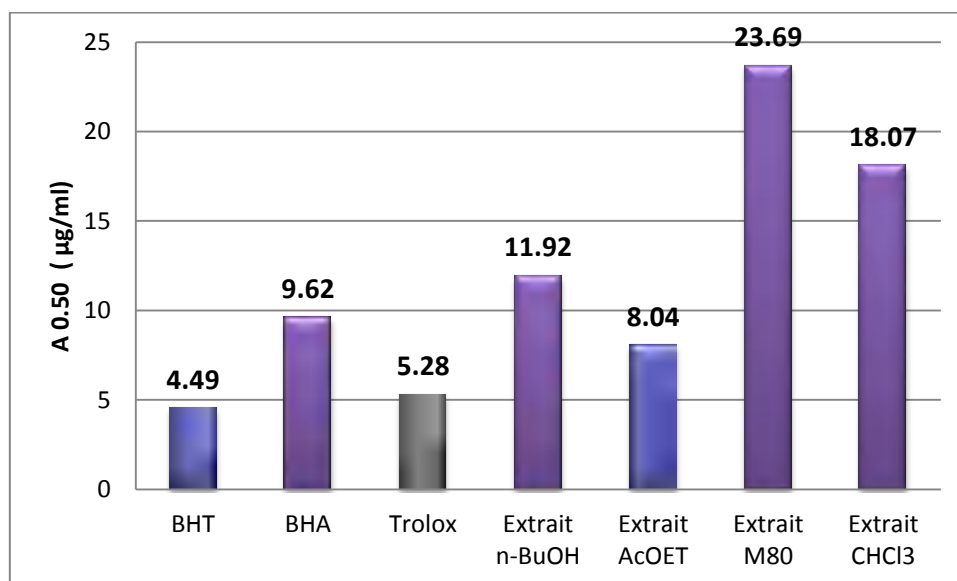


Figure V.8. Valeurs des $A_{0.50}$ des extraits de l'espèce *H. getulum* et des standards BHA, BHT et Trolox (Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre CUPRAC).

Chaque valeur représente une moyenne $\pm$ SD ($n = 3$), $P < 0,05$.

V. 1. 3. Évaluation de l'activité antioxydante des composés identifiés de l'espèce *Helianthemum getulum*

Dans cette étude, nous avons mesuré le potentiel antioxydant par une technique spectrophotométrique *in vitro*, plusieurs méthodes ont été utilisées pour déterminer l'activité des composés isolés de la phase acétate d'éthyle et butanolique de l'espèce *Helianthemum getulum*, l'activité de piégeage des radicaux DPPH, l'activité du piégeage de l'ABTS•+, le dosage de piégeage des radicaux galvinoxyle (GOR) et le test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).

Dans le but d'obtenir une meilleure évaluation du potentiel antioxydant, le Trolox, le BHA et le BHT ont été utilisés comme étalons positifs.

Les valeurs des IC₅₀ ou A_{0,50} exprimées en µg/ml ont été déterminées graphiquement à partir de la droite de régression de pourcentage d'inhibition ou d'absorbance en fonction de la concentration pour chaque extrait ou standard testé.

Tout les composés isolés ont montré une activité antioxydante, certains d'entre eux présentant une activité antioxydante supérieure aux standards Trolox, BHT et BHA.

Les composés phénoliques sont connus comme étant de puissants antioxydants briseurs de chaîne [3]. Par conséquent, certains des composés 1 à 13, en particulier les dérivés de la catéchine, sont susceptibles d'être responsables de l'activité antioxydante de la fraction C. En conséquence, presque tous les composés isolés présentent une activité antioxydante.

Les composés (2, 7, 9), le nouveau dérivé de flavonol (12) et l'aryl lignane (3) se sont avérés les plus actifs.

L'activité antioxydante des composés phénoliques est directement liée aux groupements hydroxyles. Ainsi, les flavonoïdes en général et les flavanols en particulier sont de bons piégeurs de radicaux libres grâce à l'hydroxyle en position 3 (3-OH) du cycle C et également à la présence de 3', 4'-dihydroxy (structure catéchol) du cycle B. Les hydroxyles du cycle B sont les plus actifs par rapport aux hydroxyles du cycle A et le niveau de l'activité est conditionné par la localisation des groupes -OH, le composé ayant des hydroxyles en position méta présentant une activité antioxydante plus faible comparativement aux positions ortho ou para. De plus, la présence de la double liaison C2-C3 conjuguée à la fonction 4-oxo est responsable de la délocalisation des électrons du cycle aromatique B [4]–[6].

V. 1. 3. A. Effet scavenger du radical DPPH

Dans le test DPPH, les composés (**2, 7, 9 et 12**) ont montré une forte activité ($IC_{50} = 5,37 \pm 0,10 \mu\text{g/ml}$, $5,71 \pm 0,31 \mu\text{g/ml}$, $5,37 \pm 0,13 \mu\text{g/ml}$ et $6,21 \pm 0,20 \mu\text{g/ml}$, respectivement), encore plus importante que celle du BHT ($48,70 \pm 0,62 \mu\text{g/ml}$) et très proche à celui de l'étalons BHA ($5,78 \pm 0,86 \mu\text{g/ml}$) (Tableau V. 5. Et la figure V. 10).

Tableau V.5. Activité antioxydante évaluée par le dosage DPPH.

Produits	Pourcentage d'inhibition % (DPPH)							
	1,5625 μg	3,125 μg	6,25 μg	12,5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	$IC_{50}(\mu\text{g/ml})$
3	8,29 $\pm$ 2,29	27,14 $\pm$ 0,55	33,74 $\pm$ 3,80	45,10 $\pm$ 1,34	67,21 $\pm$ 2,29	85,30 $\pm$ 0,87	SAT	15,30 $\pm$ 0,88
4	NA	4,02 $\pm$ 0,98	6,97 $\pm$ 0,40	11,54 $\pm$ 0,74	26,11 $\pm$ 0,63	46,17 $\pm$ 0,78	76,15 $\pm$ 0,37	57,59 $\pm$ 0,10
7	18,01 $\pm$ 1,44	32,35 $\pm$ 0,00	51,26 $\pm$ 0,25	69,47 $\pm$ 0,52	81,79 $\pm$ 0,30	84,74 $\pm$ 0,35	SAT	5,71 $\pm$ 0,31
8	NA	NA	NA	4,60 $\pm$ 1,21	7,63 $\pm$ 0,86	11,42 $\pm$ 1,55	19,92 $\pm$ 1,64	>100
12	13,08 $\pm$ 1,91	27,22 $\pm$ 0,76	50,49 $\pm$ 4,44	79,32 $\pm$ 0,10	85,31 $\pm$ 1,03	SAT	SAT	6,21 $\pm$ 0,20
13	NA	NA	NA	NA	3,90 $\pm$ 1,59	5,98 $\pm$ 1,39	14,60 $\pm$ 0,70	>100
BHT	NA	NA	3,66 $\pm$ 0,00	16,57 $\pm$ 0,87	34,06 $\pm$ 0,83	50,91 $\pm$ 0,43	73,76 $\pm$ 0,71	48,70 $\pm$ 0,62
BHA	19,54 $\pm$ 3,33	27,95 $\pm$ 1,88	53,88 $\pm$ 1,45	77,45 $\pm$ 0,29	84,97 $\pm$ 0,63	85,17 $\pm$ 0,31	88,47 $\pm$ 0,00	5,78 $\pm$ 0,18
Trolox	29,47 $\pm$ 2,15	59,95 $\pm$ 1,33	88,39 $\pm$ 0,25	SAT	SAT	SAT	SAT	2,60 $\pm$ 0,09
Produits	3,125 μg	6,25 μg	12,5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	200 μg	$IC_{50}(\mu\text{g/ml})$
1	5,18 $\pm$ 1,56	10,11 $\pm$ 1,03	14,47 $\pm$ 1,15	30,54 $\pm$ 0,81	43,16 $\pm$ 1,99	57,82 $\pm$ 0,65	69,60 $\pm$ 0,10	71,71 $\pm$ 0,97
2	37,45 $\pm$ 0,00	55,66 $\pm$ 1,26	82,88 $\pm$ 0,00	83,70 $\pm$ 0,62	85,52 $\pm$ 0,10	86,06 $\pm$ 0,10	SAT	5,37 $\pm$ 0,10
5	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	N.A	>100
9	36,97 $\pm$ 1,38	65,33 $\pm$ 0,85	84,26 $\pm$ 1,10	84,44 $\pm$ 0,28	SAT	SAT	SAT	5,37 $\pm$ 0,13

Les courbes montrant le pourcentage d'inhibition (%) du radical libre DPPH en fonction de la concentration des composés isolés de l'espèce *H.getulum* et des standards (BHA, BHT et Trolox) sont représentées dans la figure V. 9.

Selon la figure V. 9, les courbes des pourcentages d'inhibition des composés isolés ainsi que des standards ont la même allure: plus la concentration est élevée, plus l'activité antiradicalaire est élevée jusqu'à atteindre un plateau.

La figure V. 9 montre que les quatre composés 2, 7, 9 et 12 présentent des pourcentages d'inhibition assez voisins de 82,88%, 69,47%, 84,44% et 79,32% respectivement à la concentration 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Ces pourcentages d'inhibition puissants sont très proches à celui du

standard BHA 77,45% à la même concentration et plus important par rapport au standard BHT 16,57%.

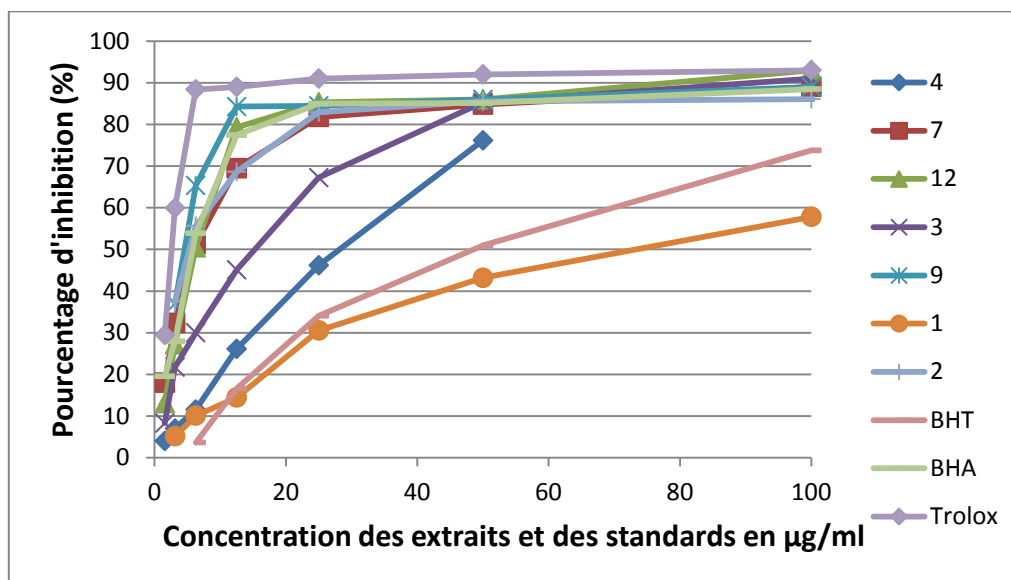


Figure V.9. Piégeage du radical DPPH par les composés isolés de l'espèce *H.getulum*, du BHT, du BHA et du Trolox.

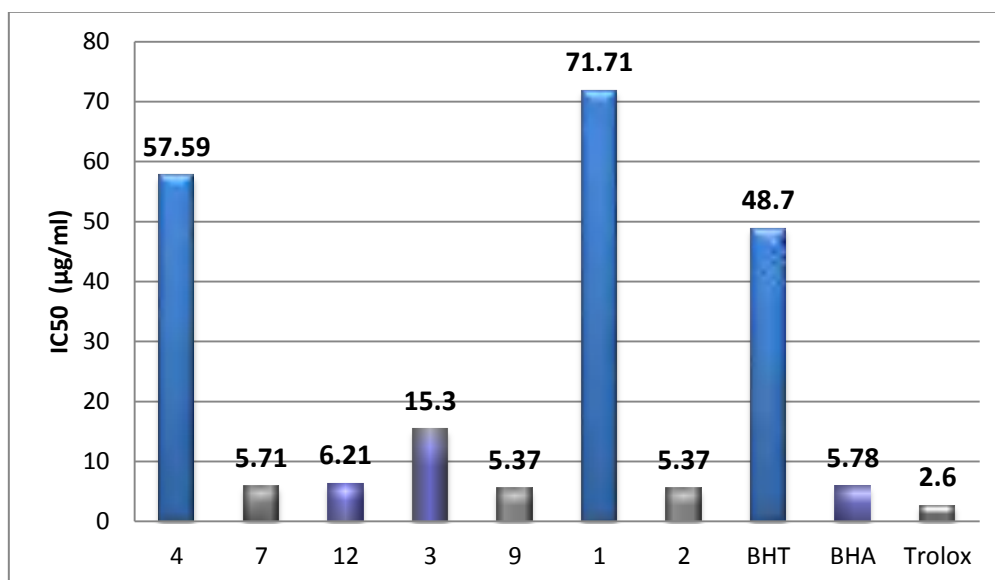


Figure V.10. Valeurs des IC_{50} des produits de *H.getulum* et des standards BHA, BHT et Trolox (Test du piégeage de DPPH).

Chaque valeur représente une moyenne $\pm$ SD ($n = 3$), $P < 0,05$.

V. 1. 3. B. Activité du piégeage de l'ABTS•+

Dans le test ABTS, le composé (9) ($IC_{50} = 1,30 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$) était le plus puissant, avec une activité similaire à celle du trolox ($IC_{50} = 1,30 \pm 0,34 \mu\text{g/ml}$) et une meilleure activité que celle du BHT ($IC_{50} = 2,09 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$) et BHA ($IC_{50} = 2,25 \pm 0,05 \mu\text{g/ml}$). Les composés (7) ($IC_{50} = 2,09 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$), (2) ($IC_{50} = 2,19 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$) et (3) ($IC_{50} = 2,39 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$) ont montré une activité similaire à celle du BHT et du BHA.

Tableau V.6. Activité antioxydante évaluée par le dosage ABTS.

Produits	Pourcentage d'inhibition % (ABTS)							
	1,5625 μg	3,125 μg	6,25 μg	12,5 μg	25 μg	50 μg	100 μg	$IC_{50}(\mu\text{g/ml})$
1	37,64 $\pm$ 0,13	52,94 $\pm$ 0,81	56,44 $\pm$ 0,35	71,66 $\pm$ 0,48	82,99 $\pm$ 1,02	87,58 $\pm$ 0,82	SAT	2,83 $\pm$ 0,07
2	36,32 $\pm$ 0,67	73,09 $\pm$ 1,81	90,06 $\pm$ 0,36	90,22 $\pm$ 0,40	SAT	SAT	SAT	2,19 $\pm$ 0,08
3	34,95 $\pm$ 0,13	52,32 $\pm$ 1,31	76,22 $\pm$ 1,07	90,74 $\pm$ 0,96	SAT	SAT	SAT	2,39 $\pm$ 0,12
4	9,68 $\pm$ 1,35	24,84 $\pm$ 0,23	31,22 $\pm$ 3,39	40,72 $\pm$ 0,11	52,85 $\pm$ 1,47	80,13 $\pm$ 1,24	92,18 $\pm$ 0,00	21,49 $\pm$ 1,15
7	36,81 $\pm$ 2,48	64,97 $\pm$ 0,56	83,24 $\pm$ 0,90	91,33 $\pm$ 0,37	92,55 $\pm$ 0,37	92,71 $\pm$ 0,64	SAT	2,09 $\pm$ 0,35
8	17,87 $\pm$ 1,24	21,49 $\pm$ 1,12	25,48 $\pm$ 1,24	32,77 $\pm$ 1,20	36,25 $\pm$ 0,34	40,53 $\pm$ 0,34	42,47 $\pm$ 0,34	>100
12	20,59 $\pm$ 1,59	39,24 $\pm$ 1,90	64,33 $\pm$ 0,82	91,43 $\pm$ 0,57	SAT	SAT	SAT	4,46 $\pm$ 0,17
13	NA	4,04 $\pm$ 0,51	8,24 $\pm$ 1,13	6,49 $\pm$ 0,84	15,90 $\pm$ 2,48	12,79 $\pm$ 0,79	27,39 $\pm$ 0,64	>100
Produits	0,78125 μg	1,5625 μg	3,125 μg	6,25 μg	12,50 μg	25 μg	50 μg	$IC_{50}(\mu\text{g/ml})$
9	33,73 $\pm$ 1,33	57,70 $\pm$ 1,64	85,29 $\pm$ 1,41	91,02 $\pm$ 0,30	92,02 $\pm$ 0,66	SAT	SAT	1,30 $\pm$ 0,02
Standards	1,5625 μg	3,125 μg	6,25 μg	12,50 μg	25 μg	50 μg	100 μg	$IC_{50}(\mu\text{g/ml})$
BHT	30,20 $\pm$ 2,30	52,21 $\pm$ 0,45	72,34 $\pm$ 0,36	89,61 $\pm$ 0,77	92,98 $\pm$ 0,30	91,84 $\pm$ 0,20	SAT	2,09 $\pm$ 0,09
BHA	35,60 $\pm$ 0,73	68,37 $\pm$ 0,36	92,98 $\pm$ 0,51	93,03 $\pm$ 0,26	93,09 $\pm$ 0,20	93,21 $\pm$ 0,49	SAT	2,25 $\pm$ 0,05
Trolox	55,26 $\pm$ 6,17	91,43 $\pm$ 1,25	SAT	SAT	SAT	SAT	SAT	1,30 $\pm$ 0,34

La figure V. 11 montre que les quatre composés 2, 3, 7 et 9 présentent presque le même pourcentage d'inhibition de 90,22%, 90,74%, 91,33% et 92,02% respectivement à la concentration 12,5 $\mu\text{g/ml}$, ces pourcentages d'inhibition puissants sont très proches à celui du standard BHA 93,03% et BHA 89,61% à la même concentration .

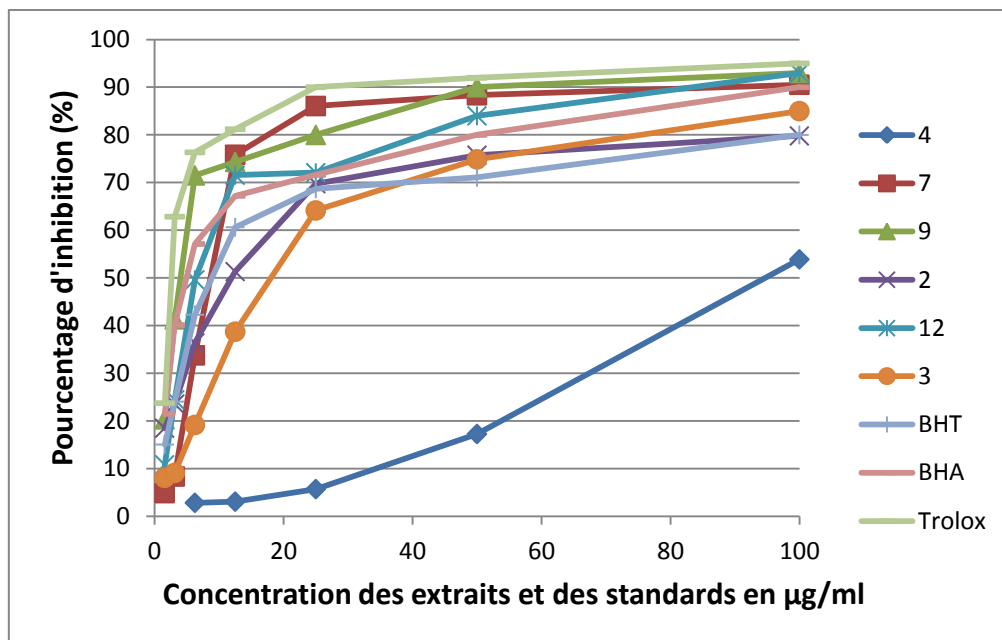


Figure V.11. Piégeage du radical ABTS par les composés isolés de *H.getulum*, du BHT, du BHA et de Trolox.

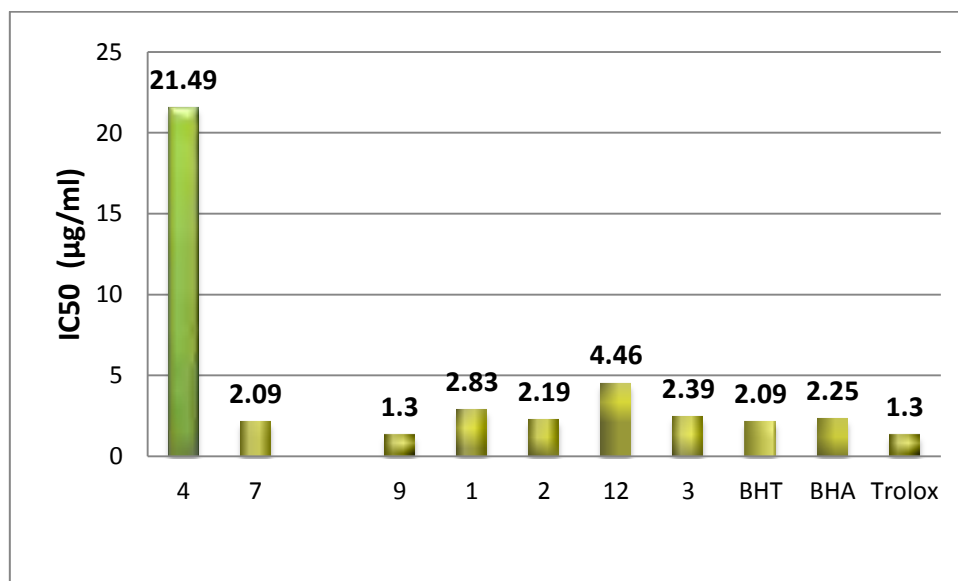


Figure V.12. Valeurs des IC₅₀ des produits de *H.getulum* et des standards BHA, BHT et Trolox (Test du piégeage de l'ABTS).

Chaque valeur représente une moyenne $\pm$ SD (n = 3), P <0,05

V. 1. 3. C. Dosage de piégeage des radicaux galvinoxyle (GOR)

Dans le test GOR, le composé (9) était le plus actif ($IC_{50} = 4,08 \pm 0,09 \mu M$) présentant une activité proche de celle du standard antioxydant BHA ($IC_{50} = 4,87 \pm 0,11 \mu g/ml$) et une meilleure activité que celle du BHT ($IC_{50} = 8,91 \pm 0,23 \mu g/ml$) suivi du nouveau composé (12) et des composés (7, 2 et 3).

Tableau V.7. Activité antioxydante par le dosage GOR.

Produits	Pourcentage d'inhibition % (GOR)							IC ₅₀ ($\mu g/ml$)
	1,5625 μg	3,125 μg	6,25 μg	12,50 μg	25 μg	50 μg	100 μg	
1	NA	2,62 $\pm$ 1,37	6,17 $\pm$ 0,72	9,77 $\pm$ 0,68	16,61 $\pm$ 0,23	28,6 $\pm$ 0,25	45,75 $\pm$ 1,09	>100
2	18,47 $\pm$ 0,90	23,55 $\pm$ 0,53	36,36 $\pm$ 1,60	51,32 $\pm$ 0,58	69,77 $\pm$ 1,07	75,75 $\pm$ 0,21	79,79 $\pm$ 0,31	11,61 $\pm$ 0,25
3	8,06 $\pm$ 1,16	9,11 $\pm$ 0,42	19,15 $\pm$ 0,41	38,72 $\pm$ 0,34	64,15 $\pm$ 0,19	74,87 $\pm$ 0,25	SAT	18,05 $\pm$ 0,11
4	NA	NA	2,83 $\pm$ 1,34	3,07 $\pm$ 1,29	5,70 $\pm$ 0,69	17,26 $\pm$ 0,89	53,89 $\pm$ 0,40	95,67 $\pm$ 1,62
5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	4,86 $\pm$ 0,36	8,34 $\pm$ 0,52	33,76 $\pm$ 0,70	75,83 $\pm$ 0,36	86,06 $\pm$ 0,25	88,32 $\pm$ 0,16	90,53 $\pm$ 0,06	8,66 $\pm$ 0,04
8	3,86 $\pm$ 0,47	3,86 $\pm$ 0,47	2,89 $\pm$ 0,75	4,13 $\pm$ 0,00	6,56 $\pm$ 1,17	16,53 $\pm$ 0,74	30,76 $\pm$ 1,08	>100
9	20,33 $\pm$ 1,79	41,31 $\pm$ 1,21	71,51 $\pm$ 0,83	74,33 $\pm$ 0,40	Sat	Sat	Sat	4,08 $\pm$ 0,09
12	10,81 $\pm$ 1,46	24,44 $\pm$ 0,76	49,62 $\pm$ 0,40	71,54 $\pm$ 0,30	72,08 $\pm$ 0,50	SAT	SAT	6,36 $\pm$ 0,11
13	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	>100
BHT	15,05 $\pm$ 0,65	24,05 $\pm$ 1,21	42,27 $\pm$ 0,00	60,63 $\pm$ 1,15	68,69 $\pm$ 0,50	71,09 $\pm$ 0,36	SAT	8,91 $\pm$ 0,23
BHA	21,47 $\pm$ 1,17	40,12 $\pm$ 0,73	57,11 $\pm$ 1,02	67,22 $\pm$ 0,40	71,62 $\pm$ 0,44	SAT	SAT	4,87 $\pm$ 0,11
TROLOX	23,73 $\pm$ 0,02	62,85 $\pm$ 1,98	76,34 $\pm$ 0,28	81,19 $\pm$ 0,22	SAT	SAT	SAT	2,33 $\pm$ 0,45

Les courbes montrant le pourcentage d'inhibition (%) des radicaux galvinoxyle GOR en fonction des concentrations des composés isolés de *H.getulum* et des standards (BHA, BHT et Trolox) sont représentées dans la figure V.13.

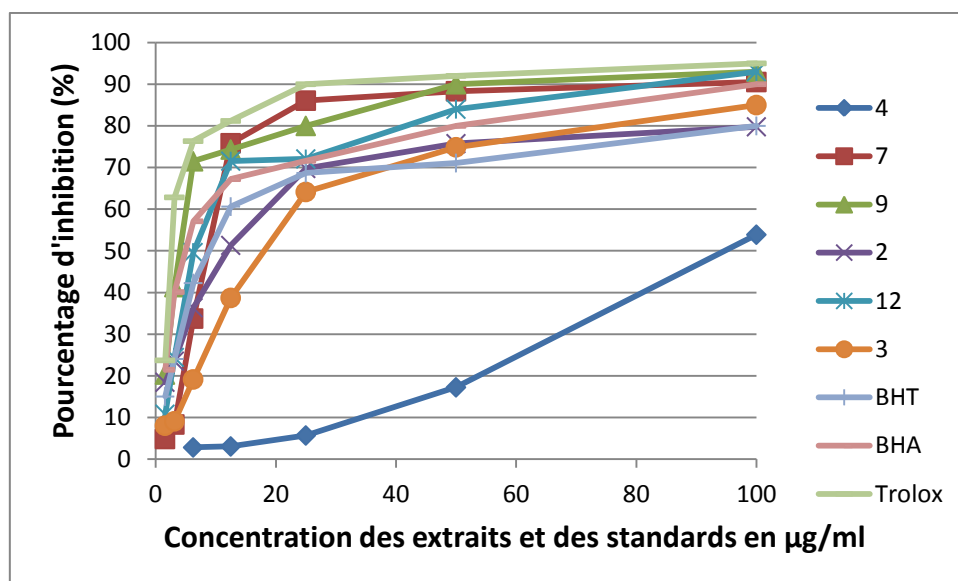


Figure V.13. Piégeage du radical GOR par les composés isolés de l'espèce *H.getulum*, du BHT, du BHA et du Trolox.

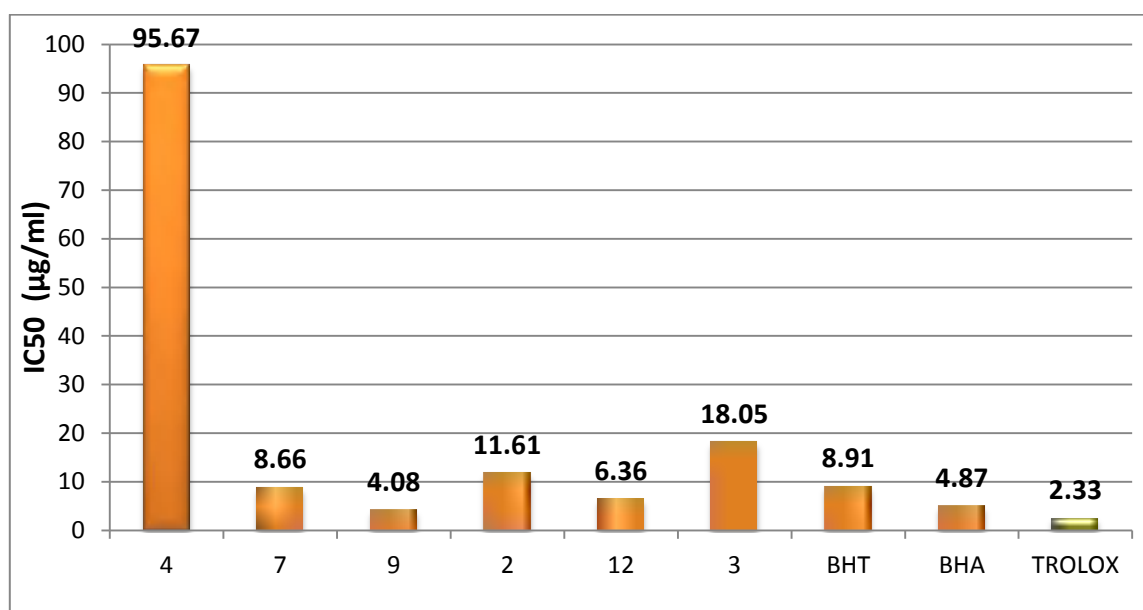


Figure V.14. Valeurs des IC_{50} des produits de l'espèce *H.getulum* et des standards BHA, BHT et Trolox (Test de piégeage des radicaux galvinoxyle GOR).

Chaque valeur représente une moyenne $\pm$ SD (n = 3), P < 0,05

V. 1. 3. D. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

Ces observations sur les activités de piégeage des radicaux ont été étayées par le test CUPRAC. Les résultats obtenus dans ce test sont en accord avec les résultats précédents, les composés (2, 7, 9, 12 et 3) ont présenté une forte activité réductrice, parmi lesquels le composé (2) était le plus puissant, présentant une meilleure activité par rapport à tous les standards utilisés. Les composés (7) et (9) sont aussi actifs que l'étalon le plus puissant suivis des composés (12) et (3).

L'origine de l'activité antioxydante des composés phénoliques est représentée par leurs groupements hydroxyles. Selon l'emplacement du -OH, les groupes hydroxyles peuvent augmenter ou diminuer l'activité. Notamment, les composés ayant un deuxième -OH en position ortho ou en para présentent une activité antioxydante plus élevée qu'en position méta. [2].

Tableau V.8. Activité antioxydante évaluée par le dosage CUPRAC.

Produits	Absorbances CUPRAC							
	1,5625 µg	3,125µg	6,25 µg	12,50 µg	25µg	50 µg	100 µg	A _{0.50} (µg/mL)
1	0,25±0,00	0,40±0,01	0,67±0,01	1,13±0,05	1,92±0,06	2,95±0,12	3,85±0,05	4,30±0,07
2	0,32±0,02	0,63±0,03	1,22±0,06	2,11±0,03	3,57±0,04	4,01±0,08	4,17±0,08	2,35±0,17
3	0,17±0,01	0,24±0,00	0,37±0,00	0,57±0,03	0,99±0,08	1,79±0,04	2,46±0,37	10,60±0,88
4	0,13±0,01	1,14±0,01	0,18±0,00	0,24±0,00	0,37±0,02	0,60±0,03	1,07±0,08	38,89±1,89
5	0,11±0,01	0,12±0,01	0,13±0,01	0,16±0,00	0,19±0,00	0,26±0,01	0,39±0,02	>100
7	0,25±0,01	0,40±0,00	0,67±0,01	1,17±0,02	1,99±0,05	3,32±0,13	4,01±0,02	4,29±0,02
8	0,11±0,00	0,13±0,00	0,15±0,01	0,20±0,01	0,25±0,01	0,36±0,00	0,57±0,01	87,50±0,35
9	0,23±0,00	0,38±0,02	0,67±0,03	1,09±0,01	1,88±0,03	3,18±0,04	4,17±0,03	4,42±0,31
12	0,18±0,02	0,25±0,00	0,38±0,01	0,67±0,03	1,20±0,03	2,14±0,07	3,51±0,32	8,98±0,13
13	0,10±0,00	0,10±0,00	0,11±0,00	0,14±0,02	0,16±0,00	0,21±0,01	0,31±0,01	>100
BHA	0,28±0,06	0,40±0,01	0,64±0,03	1,15±0,09	1,94±0,03	3,15±0,26	3,65±0,19	4,49±0,10
BHT	0,11±0,04	0,19±0,01	0,33±0,04	0,66±0,07	1,03±0,07	1,48±0,09	2,04±0,14	9,62±0,87
TROLOX	0,20±0,01	0,34±0,02	0,58±0,04	1,05±0,03	1,83±0,02	2,91±0,33	SAT	5,28±0,38

Les courbes montrant l'absorbance A qui correspond à la réduction du cuivre en fonction

des concentrations des composés isolés de l'espèce *H.getulum* et des standards (BHA, BHT et Trolox) sont représentées dans la figure V. 15.

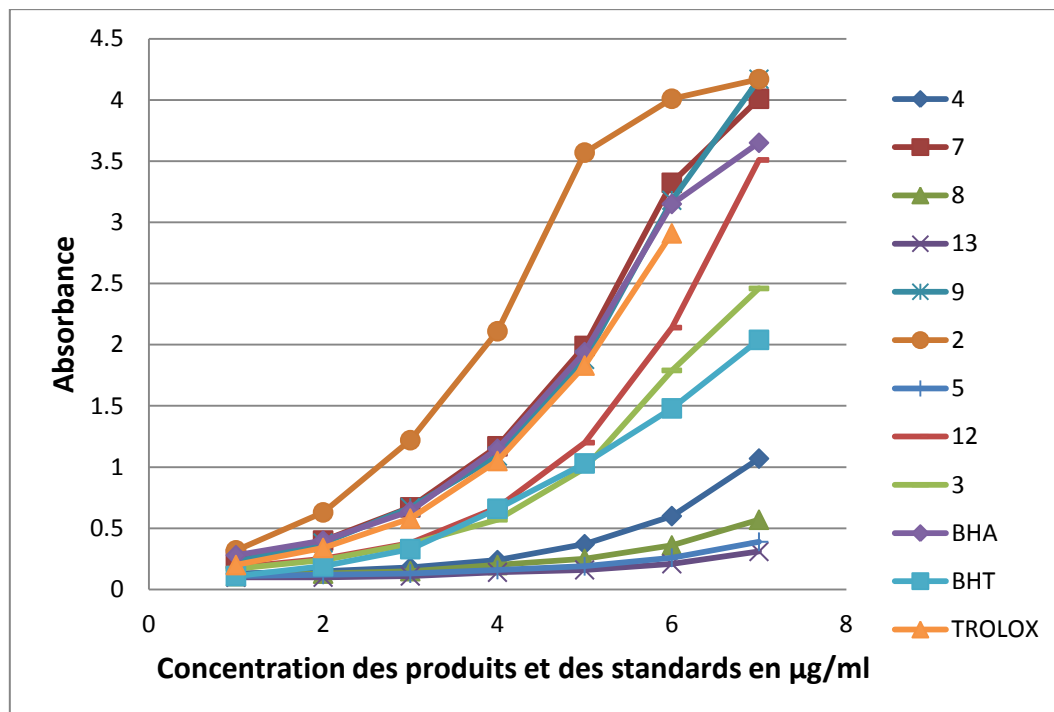


Figure V.15. Piégeage du radical CUPRAC par les composés isolés de l'espèce *H.getulum*, du BHT, du BHA et du Trolox.

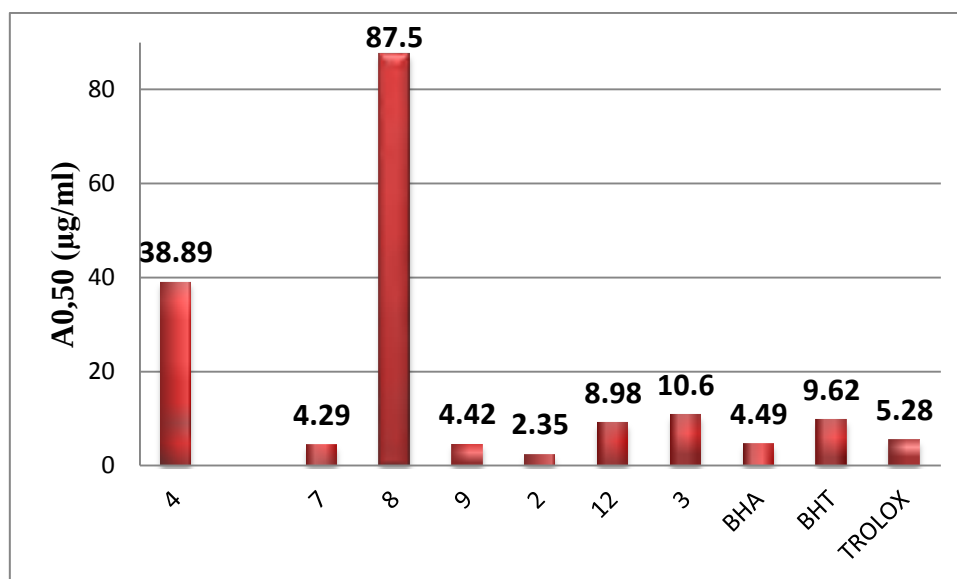


Figure V.16. Valeurs des A_{0.50} des extraits de l'espèce *H.getulum* et des standards BHA, BHT et Trolox (Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre CUPRAC).

Chaque valeur représente une moyenne $\pm$ SD (n = 3), P < 0,05

V. 1. 4. Corrélation des résultats de l'activité antioxydante des extraits et des composés identifiés

L'activité antioxydante semble être importante dans les extraits C et D. Pour cette raison, des séparations et des purifications ont été effectuées sur ces fractions et d'autres tests d'activité antioxydante ont été effectués sur des composés isolés. Les composés phénoliques sont connus pour agir comme de puissants antioxydants briseurs de chaîne [3]. Par conséquent, certains composés (1-13), en particulier les dérivés de la catéchine, sont susceptibles d'être responsables de l'activité antioxydante de la fraction C. En conséquence, presque tous les composés isolés ont montré une activité antioxydante. Les composés (2, 7, 9), le nouveau dérivé de flavonol (12) et l'aryl lignane (3) se sont avérés les plus actifs.

Tableau V.9. Activité antioxydante de l'extrait, des fractions et des composés isolés de l'espèce *Helianthemum getulum* par les tests DPPH, ABTS⁺, GOR et CUPRAC.

		DPPH IC ₅₀ (μM)	ABTS ⁺ IC ₅₀ (μM)	GOR IC ₅₀ (μM)	CUPRAC A _{0.50} (μM)
Extraits	M80	21,25±0,10	25,77±0,52	20,79±0,64	26,82±2,11
Fractions	B	46,92±1,12	33,27±0,51	59,50±2,06	18,07 ±0,48
	C	9,34±0,07	10,40±0,52	8,27±0,36	8,04 ±0,59
	D	11,65±0,28	11,25±0,13	10,93±0,39	11,92±0,43
Composés	1	71,71±0,97	2,83±0,07	>100	4,30±0,07
	2	5,37±0,13	2,19±0,08	11,61±0,25	2,35±0,17
	3	15,30±0,88	2,39±0,12	18,05±0,11	10,60±0,88
	4	57,59±0,10	21,49±1,15	95,67±1,62	38,89±1,89
	6	>100	>100	>100	>100
	7	5,71±0,31	2,09±0,35	8,66±0,04	4,29±0,02
	8	>100	>100	>100	87,50±0,35
	9	5,37±0,13	1,30±0,02	4,08±0,09	4,42±0,31
	11	NT	NT	NT	NT
	12	6,21±0,20	4,46±0,17	6,36±0,11	8,98±0,13
	13	>100	>100	>100	>100
Standards	Trolox	2,60±0,09	1,30±0,34	2,33±0,45	5,28±0,38
	BHA	6,27±0,86	2,25±0,05	4,87±0,11	4,49±0,10
	BHT	48,70±0,62	2,09±0,09	8,91±0,23	9,62±0,87

NT: non testé.

Les composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques sont connus comme de puissants antioxydants briseurs de chaîne qui peuvent contribuer de manière prépondérante à l'action antioxydante des extraits dont ils sont issus [1]. L'origine de l'activité antioxydante des composés phénoliques est due à leurs groupements hydroxyles ainsi qu'à leur positionnement [2].

Les flavonoïdes en général et les flavanols en particulier sont de bons piègeurs de radicaux libres grâce au cycle C3-OH et également à la présence de 3', 4'-dihydroxy (structure catéchol) sur le cycle aromatique B. Les hydroxyles du cycle B sont les plus actifs comparativement aux hydroxyles du cycle A. De plus, la présence de la double liaison C2-C3 conjuguée à la fonction 4-oxo est responsable de la délocalisation des électrons du cycle aromatique B [4]–[6].

V. 2. Évaluation de l'activité antidiabétique

V. 2. 1. Introduction

Le diabète sucré est connu comme l'un des troubles métaboliques chroniques et l'un des problèmes de santé les plus importants.

Dans cette étude, nous avons mesuré l'activité antidiabétique par une technique spectrophotométrique *in vitro*.

Les valeurs des IC_{50} exprimées en $\mu\text{g/ml}$ ont été déterminées graphiquement à partir de la droite de régression de pourcentage d'inhibition ou d'absorbance en fonction de la concentration pour chaque extrait, composé isolé ou standard testé.

V. 2. 2. Évaluation de l'activité antidiabétique des extraits, fractions et composés identifiés de l'espèce *Helianthemum getulum*

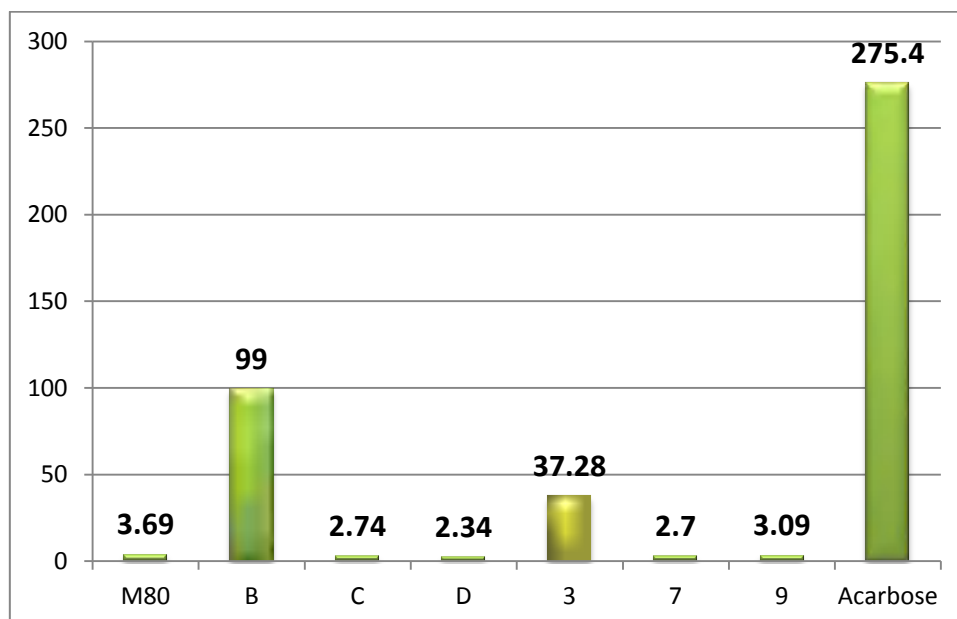
Dans la présente étude, l'extrait, les fractions et certains composés isolés d'*Helianthemum getulum* ont été étudiés pour leur pouvoir d'inhibition *in vitro* de l' α -glucosidase (tableau V. 10). L'extrait brut a montré une très forte activité inhibitrice contre l' α -glucosidase ($IC_{50} = 3,69 \pm 0,14 \mu\text{g/ml}$) par rapport à l'acarbose ($IC_{50} = 275,43 \pm 1,59 \mu\text{g/ml}$) utilisé comme standard positif. Ici, nous avons constaté que les fractions C ($IC_{50} = 2,74 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$) et D ($IC_{50} = 2,34 \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$) présentaient une activité meilleure que la fraction B ($IC_{50} = 99,00 \pm 0,62 \mu\text{g/ml}$) (Tableau V. 10).

Cette forte activité inhibitrice observée dans l'extrait et les fractions C et D peut être expliquée par leur richesse en composés phénoliques, comme le prouve la purification de 13 composés phénoliques dans les fractions butanol et acétate d'éthyle. Les composés (3, 7 et 9) sont probablement responsables de l'activité antidiabétique de l'ensemble de l'extrait d'acétate d'éthyle (fraction C). Parmi ceux-ci, le composé (7) ($IC_{50} = 2,70 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$) était le plus actif, suivi du composé (9) ($IC_{50} = 3,09 \pm 0,03 \mu\text{g/ml}$), et (3) ($IC_{50} = 37,28 \pm 1,20 \mu\text{g/ml}$), tous supérieurs à l'acarbose ($IC_{50} = 275,43 \pm 1,59 \mu\text{g/ml}$) utilisé comme étalon positif. Cette activité est étudiée pour la première fois dans cette espèce et met en évidence son potentiel antidiabétique.

De nombreuses études ont prouvé que différents composés phénoliques qui ont une activité antioxydante issus de produits naturels ont la capacité d'inhiber l'activité α -glucosidase intestinale comme les acides phénoliques [7-9] .

Tableau V.10. Activité inhibitrice de l'alpha-glucosidase de l'extrait M80, des fractions B, C et D et de certains composés isolés de l'espèce *Helianthemum getulum*.

Dosage inhibiteur de l' α -glucosidase		
IC ₅₀ (μ g/ml)		
Extrait	M80	3,69 $\pm$ 0,14
Fractions	B	99,00 $\pm$ 0,62
	C	2,74 $\pm$ 0,17
	D	2,34 $\pm$ 0,39
Composés	3	37,28 $\pm$ 1,20
	7	2,70 $\pm$ 0,03
	9	3,09 $\pm$ 0,03
	12	> 250
Standard	Acarbose	275,43 $\pm$ 1,59

**Figure V.17.** Valeurs des IC₅₀ des extraits, composés identifiés de l'espèce *H.getulum* et du standard acarbose (Test de l'alpha-glucosidase).

Chaque valeur représente une moyenne $\pm$ SD (n = 3), P < 0,05

Tableau V.11. Activité inhibitrice de l'alpha-glucosidase.

Extraits	% d'inhibition							
	0,97µg/ml	1,95µg/ml	3,90µg/ml	7,81µg/ml	15,62µg/ml	31,25µg/ml	62,5µg/ml	IC ₅₀ (µg/ml)
M80								
	2,32±2,24	9,25±1,08	56,67±1,01	99,41±0,17	SAT	SAT	SAT	3,69±0,14
AcOEt								
	6,99±0,95	39,54±2,21	76,56±9,14	99,02±0,34	SAT	SAT	SAT	2,74±0,17
n-BuOH								
	2,16±2,24	40,97±2,04	85,73±3,25	99,15±0,31	SAT	SAT	SAT	2,34±0,39
7	NA	29,35±1,12	83,69±1,05	99,13±0,05	SAT	SAT	SAT	2,70±0,03
9	NA	15,34±0,50	75,91±1,66	95,88±2,16	99,23±0,22	SAT	SAT	3,09±0,03
Extraits	3,90µg/ml	7,81µg/ml	15,62µg/ml	31,25µg/ml	62,5µg/ml	125µg/ml	250µg/ml	IC₅₀(µg/ml)
CHCl3	NA	NA	NA	NA	23,66±0,08	74,65±0,85	99,40±0,76	99,00±0,62
3	NA	NA	NA	36,52±1,36	75,22±1,47	92,81±0,79	97,02±0,44	37,28±1,20
Acarbose	19,53 µg/ml	39, 06 µg/ml	78,125µg/ml	156, 25µg/ml	312,5 µg/ml	625 µg/ml	1250 µg/ml	IC₅₀(µg/ml)
	NA	NA	27,43±2,18	38,91±3,20	54,86±1,79	67,29±2,63	80,19±1,66	275,43±1,59

Références

- [1] F. Shahidi, P. K. Janitha, and P. D. Wanasundara, "Phenolic antioxidants," *Crit. Rev. food Sci. Nutr.*, 1992, 32(1), 67–103.
- [2] K. H. S. Farvin and C. Jacobsen, "Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast," *Food Chem.*, 2013, 138(2–3), 1670–1681.
- [3] A. Muhammad *et al.*, "Phytochemicals from *Dodonaea viscosa* and their antioxidant and anticholinesterase activities with structure–activity relationships," *Pharm. Biol.*, 2016, 54(9), 1649–1655.
- [4] M. Leopoldini, I. P. Pitarch, N. Russo, and M. Toscano, "Structure, conformation, and electronic properties of apigenin, luteolin, and taxifolin antioxidants. A first principle theoretical study," *J. Phys. Chem. A.*, 2004, 108(1), 92–96.
- [5] V. A. Roginsky, T. K. Barsukova, A. A. Remorova, and W. Bors, "Moderate antioxidative efficiencies of flavonoids during peroxidation of methyl linoleate in homogeneous and micellar solutions," *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1996, 73(6), 777–786.
- [6] M. S. Alhadramy, "Diabetes and oral therapies: a review of oral therapies for diabetes mellitus," *J. Taibah Univ. Med. Sci.*, 2016, 11(4), 317–329.
- [7] D. Lin *et al.*, "An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes," *Molecules.*, 2016, 21(10), 1374.
- [8] S. S. Isbilir, S. I. Kabala, and H. Yagar, "Assessment of *in vitro* Antioxidant and Antidiabetic Capacities of Medlar (*Mespilus germanica*)," *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca*, 2019, 47(2), 384–389.
- [9] M. S. Blois, "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical," *Nature.*, 1958, 181(4617), 1199–1200.
- [10] F. S. Şenol, İ. Orhan, G. Yilmaz, M. Çiçek, and B. Şener, "Acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and tyrosinase inhibition studies and antioxidant activities of 33 *Scutellaria L.* taxa from Turkey," *Food Chem. Toxicol.*, 2010, 48(3), 781–788.
- [11] B. Sørholm, "Clinical improvement of memory and other cognitive functions by Ginkgo biloba: review of relevant literature.," *Adv. Ther.*, 1998, 15(1), 54–65.
- [12] M. Öztürk, M. E. Duru, Ş. Kivrak, N. Mercan-Doğan, A. Türkoglu, and M. A. Özler, "In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms," *Food Chem. Toxicol.*, 2011, 49(6), 1353–1360.
- [13] M. I. Choudhary, "Bioactive natural products as a potential source of new pharmacophores. A theory of memory," *Pure Appl. Chem.*, 2001, 73(3), 555–560.
- [14] M. Öztürk, İ. Tümen, A. Uğur, F. Aydoğmuş-Öztürk, and G. Topçu, "Evaluation of fruit extracts of six Turkish *Juniperus* species for their antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activities," *J. Sci. Food Agric.*, 2011, 91(5), 867–876.

- [15] M. A. Papandreou *et al.*, “Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity,” *Behav. Brain Res.*, 2009, 198(2), 352–358.
- [16] M. Chatatikun and A. Chiabchalard, “Thai plants with high antioxidant levels, free radical scavenging activity, anti-tyrosinase and anti-collagenase activity,” *BMC Complement. Altern. Med.*, 2017, 17(1), 1–9.
- [17] M. B. Mapunya, R. V. Nikolova, and N. Lall, “Melanogenesis and antityrosinase activity of selected South African plants,” *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, 2012, 2012.
- [18] I. Corradi, E. De Souza, D. Sande, and J. A. Takahashi, “Correlation between phenolic compounds contents, anti-tyrosinase and antioxidant activities of plant extracts,” *Chem. Eng. Trans.*, 2018, 64, 109–114.
- [19] T. Masuda, D. Yamashita, Y. Takeda, and S. Yonemori, “Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, 69(1), 197–201.
- [20] J.-Y. Moon, E.-Y. Yim, G. Song, N. H. Lee, and C.-G. Hyun, “Screening of elastase and tyrosinase inhibitory activity from Jeju Island plants,” *Eurasian J. Biosci.*, 2010, 4.
- [21] D. Bissett, D. Hannonand, and T. Orr, “An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin,” *Photochem. Photobiol.*, 1987, 46(3), 367–378.
- [22] I. Kalyana Sundaram, D. D. Sarangi, V. Sundararajan, S. George, and S. Sheik Mohideen, “Poly herbal formulation with anti-elastase and anti-oxidant properties for skin anti-aging,” *BMC Complement. Altern. Med.*, 2018, 18, 1–12.
- [23] N. Azmi, P. Hashim, D. M. Hashim, N. Halimoon, and N. M. N. Majid, “Anti-elastase, anti-tyrosinase and matrix metalloproteinase-1 inhibitory activity of earthworm extracts as potential new anti-aging agent,” *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2014, 4, S348–S352.
- [24] A. Kanashiro, J. G. Souza, L. M. Kabeya, A. E. CS Azzolini, and Y. M. Lucisano-Valim, “Elastase release by stimulated neutrophils inhibited by flavonoids: importance of the catechol group,” *Zeitschrift für Naturforsch. C.*, 2007, 62(5–6), 357–361, 2007.



First report on phytochemical investigation, antioxidant and antidiabetic activities of *Helianthemum getulum*

Siham Terfassi, Xavier Dauvergne, Stéphane Cérantola, Clément Lemoine, Chawki Bensouici, Benayache Fadila, Magné Christian, Eric Marchioni & Samir Benayache

To cite this article: Siham Terfassi, Xavier Dauvergne, Stéphane Cérantola, Clément Lemoine, Chawki Bensouici, Benayache Fadila, Magné Christian, Eric Marchioni & Samir Benayache (2021): First report on phytochemical investigation, antioxidant and antidiabetic activities of *Helianthemum getulum*, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2021.1928664](https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1928664)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1928664>



View supplementary material [↗](#)



Published online: 27 May 2021.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 70



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



First report on phytochemical investigation, antioxidant and antidiabetic activities of *Helianthemum getulum*

Siham Terfassi^a, Xavier Dauvergne^b, Stéphane Cérantola^c, Clément Lemoine^b, Chawki Bensouici^d , Benayache Fadila^a, Magné Christian^b, Eric Marchioni^e and Samir Benayache^a

^aUnité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques, Université des Frères Mentouri, Constantine, Algeria; ^bEA 7462 Géoarchitecture_Territoires, Urbanisation, Biodiversité, Environnement, Université de Bretagne Occidentale, Brest Cedex 3, France; ^cPlateforme RMN-RPE, Université de Bretagne Occidentale, CS, Brest Cedex 3, France; ^dBiotechnology Research Center, Ali Mendjli Nouvelle Ville UV03, Constantine, Algeria; ^eChimie Analytique des Molécules Bioactives, Institut pluridisciplinaire Hubert Curien (UMR 7178 CNRS/UDS), Illkirch, France

ABSTRACT

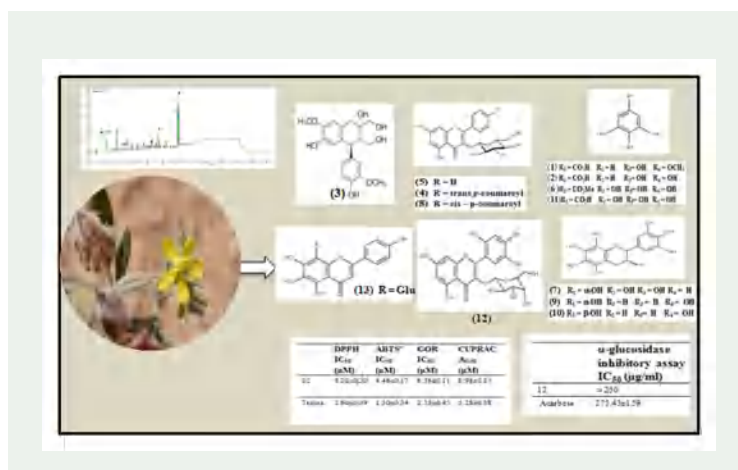
A new flavonoid, 5,7,2',4',5'-pentahydroxyflavone 3-O-β-D-galactopyranoside (**12**) and twelve known derivatives: an aryltetralin-lignan (**3**), seven flavonoids (**4-5**, **7-10**, **13**) and four phenolic acids (**1-2**, **6**, **11**) have been isolated from the aerial parts of *Helianthemum getulum* Pomel. (*Cistaceae* family) an endemic species to the septentrional Sahara that is being studied for the first time. Structure elucidation of the isolated compounds was established by means of spectroscopic methods especially NMR and Mass Spectrometry. *In vitro* antioxidant (DPPH, ABTS, GOR and CUPRAC assays) and antidiabetic (micro-dilution method) activities of the crude extract, fractions and isolated compounds were performed. The new flavonol (**12**) and Compounds (**2**, **3**, **7**, **9**) were found to be the most active, some of them exhibiting better activity than the antioxidant standards. Compounds **7**, **9** and **3** showed higher α-glucosidase inhibitory activity compared to standard acarbose (IC₅₀= 2.70 ± 0.03 μM, 3.09 ± 0.03 μM, 37.28 ± 1.20 μM and 275.43 ± 1.59 μM, respectively).

ARTICLE HISTORY

Received 14 December 2020
Accepted 5 May 2021

KEYWORDS

Helianthemum getulum;
NMR; Lignan; Phenolic
compounds; Antioxidant
and Antidiabetic activities



1. Introduction

Plants have been used since ancient times by humans for food and healing and still many of actual drugs are plant derived natural compounds or their derivatives (Dias et al. 2012). Today the effectiveness of synthetic drugs is more and more questioned and because of the impact of their many side effects on health, research is focused towards the development of more effective and safer natural agents (Can et al. 2020). Plants have been targeted to source for new antioxidant and antidiabetic agents based on their traditional use (Sekhon-Loodu and Rupasinghe 2019). The Cistaceae family has been pointed out for its great potential and its many uses in traditional medicine (Azab 2021). Within this family, the genus *Helianthemum* has been used to treat many diseases: Diabete mellitus (Hamza et al. 2019), infectious diarrheal diseases and acute bloody diarrhea (Calzada et al. 1995; Meckes et al. 1997), burns, digestive disorders, inflammatory, gastrointestinal, and respiratory problems (Rubio-Moraga et al. 2013). This genus is widely distributed in North Africa, Central and Northern Europe and Asia (Mabberley 1997). About 30 species grow in Algeria, of which three are endemic (Quézel and Santa 1962). Until now, chemical investigations of *Helianthemum* taxa have predominantly revealed the presence of flavonoids, phenolic acids, lignans and phytosterols (Calzada and Alanís 2007; Benabdelaziz et al. 2015; Chemam et al. 2017; Djemam et al. 2020).

This study report the first phytochemical and biological investigations of *Helianthemum getulum* Pomel an endemic species to the septentrional Sahara. Some data suggest that this species is synonymous with *Helianthemum metlilense* Coss & Durieu (Quézel and Santa 1962; Calzada et al. 1995). In traditional pharmacopoeia, it is used to treat intestinal worm infections (El Rhaffari and Zaid 2002).

2. Results and discussion

A new compound, 5,7,2',4',5'-pentahydroxyflavone 3-O-β-D-galactopyranoside (12) named getulin, and twelve known compounds were isolated from the extract of *H.*

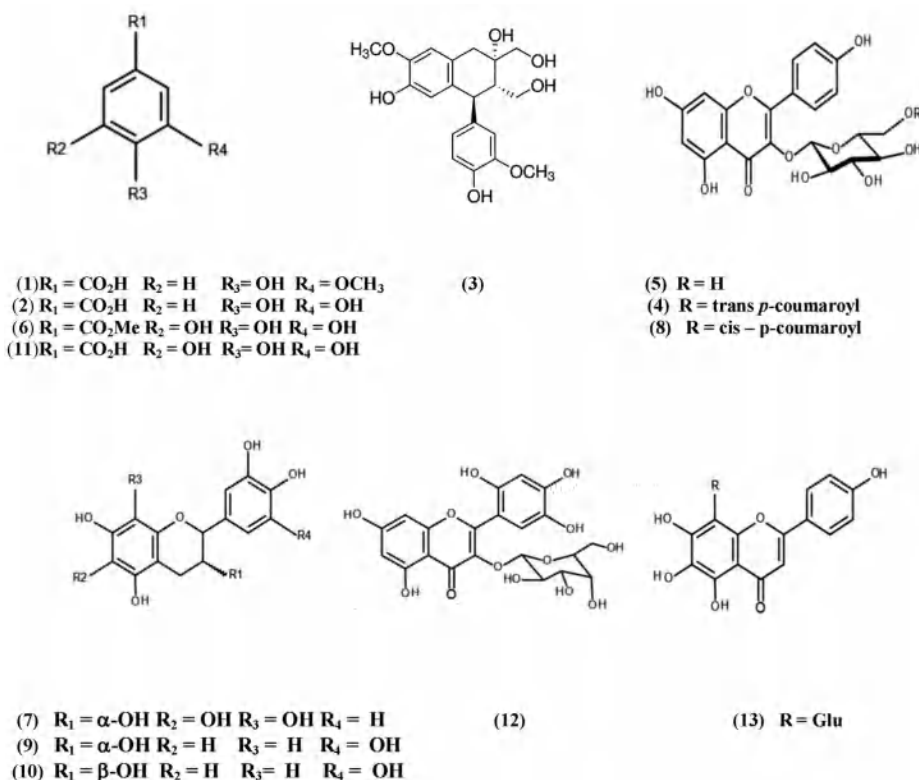


Figure 1. Chemical structures of compounds (1-13) from *Helianthemum getulum*.

getulum, among which: the aryltetralin-lignan cyclooolivil **3** (Zbidi et al. 2009), seven flavonoids: trans-tiliroside (**4**), astragalin (**5**), cis-tiliroside (**8**) (Chemam et al. 2017), dulcisflavan (**7**) (Deachathai et al. 2006), gallicocatechin (**9**), epigallocatechin (**10**) (Plumb et al. 2002), scutellarein 8-C- β -D-glucopyranoside (**13**) (Lee et al. 2015), four phenolic compounds: vanillic acid (**1**), protocatechuic acid (**2**), gallic acid (**11**) (Achili et al. 2020) and methyl gallate (**6**) (Boudermine et al. 2014) (Figure 1). Those structures were determined by spectroscopic analyses (^1H and ^{13}C NMR, J-mode, COSY, HSQC, HMBC and NOESY experiments), chemical methods and comparison with literature data.

Compound (**12**) was obtained as yellowish solid, whose molecular formula was determined to be $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{13}$ deduced by MALDI-TOF analysis (m/z $M + \text{Na}^+$: 503.186). The presence of two absorption bands at 259 nm (band II) and 365 nm (band I) in the UV spectrum of (**12**) in MeOH (Figure S1) and the deep purple fluorescence of this compound under wood light indicated a 3-O-substituted flavonol type compound (Mabry et al. 1970). This assumption was confirmed by the ^1H NMR spectra which showed the presence of characteristic protons of cycle A of the flavonoid H6 and H8 at 6.19 ppm and 6.39 ppm which appeared after extension of the spectrum as doublets ($J = 2.0\text{ Hz}$). The spectrum showed also two singlets at 7.29 ppm (H3'), and 7.37 ppm (H6') indicating that cycle B of the flavonoid was trisubstituted in 2', 4' and 5' positions. This was confirmed by diagnostic UV shifts by the disappearance of the UV spectrum in MeOH after adding NaOH indicating a trihydroxylation in ring B (Voinin

1983). The bathochromic shift of band II (14 nm) in presence of NaOAc indicated a free 7-OH. Moreover, the bathochromic shift for band I (23 nm), when H_3BO_3 was added to this solution, as well as the comparison of the spectra recorded in MeOH/ AlCl_3 and in MeOH/ $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ showed the ortho-hydroxylation of ring B, this last case suggested also, the presence a free 5-OH (Table S1) (Mabry et al. 1970). All these data pointed to a substitution of the C-3 position by a hexose. This was confirmed by the presence of characteristic signals in ^1H and ^{13}C NMR of the anomeric carbon C-1'' at δ_{C} 105.60 ppm (δ_{H} 5.18, d, $J=7.5$ Hz) and the CH_2OH group at δ_{C} 61.9 ppm (δ_{H} 3.72, m, H6''a, δ_{H} 3.65, m, H6''b) assigned to C-6''. The other sugar protons were ascertained on the basis of their correlations appeared on the DQF-COSY spectrum. Indeed, the anomeric proton H1'' (d, $J=7.5$ Hz) correlate with H2'' (dd, $J=9.0$; 7.5 Hz) at $\delta_{\text{H}} = 3.82$ ppm and the cross-peaks which appeared between the other neighboring protons allowed to assign successively H3'' (dd, $J=9.0$; 2.9 Hz) at $\delta_{\text{H}} = 3.57$ ppm, H4'' (broad doublet $J=2.9$ Hz) at $\delta_{\text{H}} = 3.86$ ppm and H5'' (m) at $\delta_{\text{H}} = 3.48$ ppm. The chemical shifts of their respective carbons have been unambiguously assigned from the HSQC spectrum. The weak coupling constants between H4/H3 and H4/H5 indicated that H4'' is in equatorial position. These indications added to the values of the chemical shifts of the carbons, allowed to identify the sugar moiety as a β -galactopyranosyl (Agrawal 1992). All the assignments were confirmed by the HMBC interactions. Compound (**12**) was thus, identified as 5,7, 2',4',5'-penta hydroxyflavone 3-O- β -D-galactopyranoside. Acid hydrolysis (2 M HCl at 100 °C for 1 h) of compound (**12**) confirmed these conclusions, leading to galactopyranose identified by co-chromatography with authentic sample. The obtained aglycone gave a yellow fluorescence under wood light and the same UV data as 5'-hydroxymorin.

The antioxidant activity of extract, fractions and the isolated compounds from *Helianthemum getulum* was determined using different bioassays, namely DPPH, ABTS and GOR for radical-scavenging activity and CUPRAC for reducing antioxidant activity (Table S2). In the purpose of obtaining a better assessment of antioxidant potential, Trolox, BHA and BHT were used as positive standards. All the fractions and isolated compounds showed antioxidant activity, some of them exhibiting higher activity than antioxidant standards. Crude methanolic extract (M80) exhibited intermediate radical scavenging activity in DPPH test ($\text{IC}_{50} = 21.25 \pm 0.10 \mu\text{M}$) compared to that of BHA ($\text{IC}_{50} = 6.27 \pm 0.86 \mu\text{M}$) and BHT ($\text{IC}_{50} = 48.70 \pm 0.62 \mu\text{M}$). Moreover, such antioxidant activity appeared to be concentrated in C and D extracts. For this reason, separations and purifications were carried out on these fractions, and further antioxidant activity tests were performed on isolated compounds.

Phenols are known to act as strong chain-breaking antioxidants (Shahidi et al. 1992). Accordingly, most of the isolated compounds (**1-13**) exhibited antioxidant activity in all tests. Compounds (**2**, **7**, **9**), the new flavonol derivative (**12**) and the aryl lignan (**3**) were found to be the most actives with similar or better activity than that of the standards used (Table S2).

These properties were already highlighted for these compounds in the literature (Plumb et al. 2002; Deachathai et al. 2006; Zbidi et al. 2009; Kakkar and Bais 2014).

Diabetes mellitus is known as one of the most important chronic metabolic disorders and a growing health problem. Since diabetes and its complications are

intimately linked to oxidative stress, it seemed obvious to us that the remarkable anti-oxidant potential of *H. getulum* species could be extended to anti-diabetic effects. Furthermore, several studies indicated that there is a great correlation between the antidiabetic potential of plant extract and their richness in phenolic compounds and that phenolic extracts inhibit activities of α -amylase and α -glucosidase (Asgar 2013).

In the present study, extract, fractions and some pure derivatives isolated from *Helianthemum getulum* were investigated for their *in vitro* α -glucosidase inhibition power (Table S3). Crude extract showed a very strong inhibitory activity against α -glucosidase ($IC_{50} = 3.69 \pm 0.14 \mu M$) compared to acarbose ($IC_{50} = 275.43 \pm 1.59 \mu M$). Here, we found that fractions C ($IC_{50} = 2.74 \pm 0.17 \mu M$) and D ($IC_{50} = 2.34 \pm 0.39 \mu M$) showed a much better activity than fraction B ($IC_{50} = 99.00 \pm 0.62 \mu M$) (Table S3). The strong enzymatic inhibitory activity observed against α -glucosidase in the extract and fractions C and D may be due to their richness in phenolic compounds indicating that *H. getulum* could be used to control blood glucose level in type 2 diabetes, as substantiated by the purification of 13 pure phenolic compounds concentrated in the butanol (**12**, **13**) and ethyl acetate fractions (**1-11**). This is evidenced by the fact that most of the isolated compounds are well established antidiabetic properties. The dietary phenolic acids (**1-2**, **4**, **6**, **9-11**), Cyclooolivil (**3**), Dulcisflavan (**7**), Kaempferol and iso scutellarin derivatives (**4-5**, **8**, **13**) are widely cited in the literature for their properties on carbohydrate metabolism and in inhibition of alpha-glucosidase and alpha-amylase (Deachathai et al. 2006; Zbidi et al. 2009; Asgar 2013; Kakkar and Bais 2014; Lee et al. 2015; Grochowski et al. 2018).

In addition: **3**, **7**, and **9** are in part, likely responsible for the antidiabetic activity of the ethyl acetate extract (fraction C). Of these, compound **7** ($IC_{50} = 2.70 \pm 0.03 \mu M$) was the most active, followed by compounds **9** ($IC_{50} = 3.09 \pm 0.03 \mu M$) and **3** ($IC_{50} = 37.28 \pm 1.20 \mu M$), all being much more active than acarbose. This activity is reported here for the first time in that species and highlights its remarkable antidiabetic potential.

3. Experimental

Air-dried aerial parts (2000 g) of *Helianthemum getulum* (Cistaceae) were macerated at room temperature with MeOH/H₂O (80:20, v/v) for 72 h, and then filtered. Extract was concentrated by rotary evaporation at 38 °C under reduced pressure. The residue was dissolved with water under magnetic stirring, put at 4 °C for one night and filtered, then successively extracted with petroleum ether, CHCl₃, EtOAc and *n*-BuOH. After evaporation of the solvents at 35 °C under reduced pressure, the following dry extracts were obtained: petroleum ether (0.23 g), CHCl₃ (2.3 g), EtOAc (8 g) and *n*-BuOH (30 g). (see details in supplementary materials).

5,7,2',4',5'-pentahydroxyflavone 3-O- β -D-galactopyranoside (getulin) (12): MALDI-TOF: *m/z* 503.186 [*M* + Na]⁺; formula: C₂₁H₂₀O₁₃; UV (λ_{max} nm) MeOH: 259, 365, NaOMe/MeOH: 269, dec,

AlCl₃/MeOH: 272, 296sh, 427, AlCl₃/HCl/MeOH: 273, 360sh, 407, NaOAc/MeOH: 273, 397, NaOAc/H₃BO₃/MeOH: 264, 388. ¹H-NMR (500 MHz, MeOH-d₄) δ H (ppm) aglycone: 7.37 (1H, s, H6'), 7.29 (1H, s, H3'), 6.39 (1H, d, *J* = 2.0 Hz, H8), 6.19 (1H, d, *J* = 2.0 Hz H6),

sugar moiety: 5.18 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H1''), 3.86 (1H, br d, $J = 2.9$ Hz, H4''), 3.82 (1H, dd $J = 9.0$; 7.5 Hz, H2''), 3.72 (1H, dd, $J = 11.6$; 2.4 Hz, H6''a), 3.65 (1H, dd, $J = 11.6$, 5.0 Hz, H6''b), 3.57 (1H, dd, $J = 9.0$; 2.9 Hz, H3''), 3.48 (1H, m, H5''); ^{13}C -NMR (125 MHz, MeOH-d₄) δC (ppm) aglycone: 179.30 (C4), 166.10 (C7), 163.00 (C5), 159.06 (C4'), 158.70 (C2), 158.40 (C9), 146.45 (C2') 146.40 (C5'), 136.00 (C3), 121.60 (C1'), 110.00 (C3'), 109.90 (C6'), 105.60 (C10), 99.90 (C6), 94.70 (C8), sugar moiety: 105.60 (C1''), 77.30 (C5''), 75.20 (C3''), 73.40 (C2''), 70.00 (C4''), 61.90 (C6'').

4. Conclusion

This study is the first report on the chemical and biological investigations on *Helianthemum getulum* Pomel. Thirteen phenolic compounds were described from this species among which 5, 7, 3', 4', 6'-pentahydroxyflavone 3-O- β -D-galactopyranoside (getulin) (**12**) is new, while cyclooolivil (**3**), methyl gallate (**6**), dulcisflavan (**7**) and scutellarein 8-C- β -D-glucopyranoside (**13**) were new in *Helianthemum* genus. Extracts, fractions and isolated compounds were evaluated for their antioxidant capacity assay, in vitro radical scavenging (DPPH, ABTS and GOR) assays and reducing power activity (CUPRAC). Compounds (**7**), (**9**) and the new compound (**12**) were found to have a strong antioxidant, even stronger than the antioxidant standards. Moreover, extract and fractions showed a marked inhibitory activity against α -glucosidase, as substantiated by the isolation of thirteen phenolic compounds from which compounds (**7**) and (**9**) appeared remarkably powerful. These results suggest that *Helianthemum getulum* is a new and promising source of safe antioxidant and antidiabetic agents.

Acknowledgements

The General Directorate carried out this work with the support for Scientific Research and Technological Development (DGRSDT), Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS), Algeria.

Disclosure statement

The authors declare no conflict of interest.

ORCID

Chawki Bensouici  <http://orcid.org/0000-0003-4612-4642>

References

- Achili I, Amrani A, Bensouici C, Gül F, Altun M, Demirtas I, Zama D, Benayache F, Benayache S. 2020. Chemical constituents, antioxidant, anticholinesterase and antiproliferative effects of algerian *Pistacia atlantica* Desf. extracts. Recent Pat Food Nutr Agric. 11(3):249–256.
- Agrawal PK. 1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. Phytochemistry. 31(10):3307–3330.
- Asgar MA. 2013. Anti diabetic potential of phenolic compounds: A review. Int. J. Food Prop. 16: 91–103.

- Azab A. **2021**. Cistaceae plants of Israel and Palestine. Under-investigated family with great potential. *Eur Chem Bull.* 10(4):210–217.
- Benabdelaziz I, Haba H, Lavaud C, Harakat D, Benkhalel M. **2015**. Lignans and Other Constituents from *Helianthemum sessiliflorum* Pers. *Rec Nat Prod.* 9(3):342.
- Boudermine S, Malafronte N, Mencherini T, Esposito T, Aquino RP, Beghidja N, Benayache S, D'Ambola M, Vassallo A. **2014**. Phenolic Compounds from *Limonium pruinosum*. *Nat Prod Commun.* 10 (2):319–321.
- Calzada F, Alanís AD. **2007**. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *H. glomeratum*. *Phytother Res.* 21(1):78–80.
- Calzada F, Lopéz R, Meckes M, Cedillo-Rivera R. **1995**. Flavonoids of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Int J Pharmacogn.* 33(4):351–352.
- Can TH, Tufekci EF, Altunoglu YC, Baloglu MC, Llorent-Martinez EJ, Stefanucci A, Mollica A, Cichelli A, Zenghin G. **2020**. Chemical characterization, computational analysis and biological views on *Daphne gnidioides* Jaub. & Spach extracts: Can a new raw material be provided for biopharmaceutical applications? *Comput Biol Chem.* 87(107293).
- Chemam Y, Benayache S, Marchioni E, Zhao M, Mosset P, Benayache F. **2017**. On-line screening, isolation and identification of antioxidant compounds of *Helianthemum ruficommum*. *Molecules.* 22(2):239.
- Deachathai S, Mahabusarakam W, Phongpaichit S, Taylor W, Zhang Y-J, Yang C-R. **2006**. Phenolic compounds from the flowers of *Garcinia dulcis*. *Phytochemistry.* 67(5):464–469.
- Dias DA, Urban S, Roessner U. **2012**. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites.* 2(2):303–336.
- Djemam N, Lassed S, Gül F, Altun M, Monteiro M, Menezes-Pinto D, Benayache S, Benayache F, Zama D, Demirtas I, et al. **2020**. Characterization of ethyl acetate and *n*-butanol extracts of *Cymbopogon schoenanthus* and *Helianthemum lippii* and their effect on the smooth muscle of the rat distal colon. *J Ethnopharmacol.* 252(112613):112613.
- El Rhaffari L, Zaid A. **2002**. Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet): Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. (Practice of herbal Medicine in the South east of Morocco: Tafilalet, a empirical knowledge for a renovated pharmacopeae). In Fleurentin J, Pelt JM, Mazard G, editors. *Des sources du savoir aux médicaments du futur. proceedings of the 4th European Congress on Ethnopharmacology.* Marseille: IRD Editions; p. 293–318.
- Grochowski DM, Locatelli M, Granica S, Cacciagranò F, Tomczyk M. **2018**. A review on the dietary flavonoid Tiliroside. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 17(5):1395–1421.
- Hamza N, Berke B, Umar A, Cheze C, Gin H, Moore N. **2019**. A review of Algerian medicinal plants used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol.* 238(111841):111841.
- Kakkar S, Bais S. **2014**. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential. *ISRN Pharmacol.* 2014:952943.
- Lee SH, Park GU, Jung JM, Lee SY, inventors; Korea National Arboretum, assignee. 2015 Feb 11. *Saussurea grandifolia* extracts and substances isolated from the extracts for treating diabetic complications. Republic of Korea patent KR 2015015611.
- Mabberley DJ. **1997**. *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants.* New York (NY): Cambridge University Press.
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. **1970**. *The systematic identification of flavonoids.* New York (NY): Springer.
- Meckes M, Torres J, Calzada F, Rivera J, Camorlinga M, Lemus H, Rodríguez G. **1997**. Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum*, a plant used in Maya traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytother Res.* 11(2):128–131.
- Plumb GW, de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC, Williamson G. **2002**. Antioxidant properties of gallic catechin and prodelphinidins from pomegranate peel. *Redox Rep.* 7(1):41–46.
- Quézel P, Santa S. **1962**. *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales* [New flora of Algeria and southern desert regions]. Paris: CNRS. French.

- Rubio-Moraga Á, Argandoña J, Mota B, Pérez J, Verde A, Fajardo J, Gómez-Navarro J, Castillo-López R, Ahrazem O, Gómez-Gómez L. 2013. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. *J Ethnopharmacol.* 148(1):287–296.
- Sekhon-Loodu S, Rupasinghe HPV. 2019. Evaluation of antioxidant, antidiabetic and antiobesity potential of selected traditional medicinal Plants. *Front Nutr.* 6(53).
- Shahidi F, Janitha P, Wanasundara P. 1992. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 32(1): 67–103.
- Voirin B. 1983. UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3', 4') or tri-(3', 4', 5')-substituted B rings. *Phytochemistry.* 22(10):2107–2145.
- Zbidi H, Salido S, Altarejos J, Perez-Bonilla M, Bartegi A, Rosado JA, Salido GM. 2009. Olive tree wood phenolic compounds with human platelet antiaggregant properties. *Blood Cells Mol Dis.* 42(3):279–285.



Siham TERFASSI

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE ET BIOLOGIQUE
DE L'ESPECE *HELIANTHEMUM GETULUM* POMEL**

Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de

**Doctorat troisième cycle (LMD) en Analyse physicochimique, contrôle de
la qualité et synthèse de substances bioactives**

Résumé

L'étude phytochimique de l'espèce *Helianthemum getulum* a permis d'isoler un nouveau flavonoïde le 5,7,2',4',5'-pentahydroxyflavone 3-O- β -D-galactopyranoside (**12**) à l'aide de différentes méthodes chromatographiques de séparation et purification et de caractérisation par les méthodes spectroscopiques (RMN, Masse et UV), ainsi que douze composés dont sept flavonoïdes (**4-5**, **7-10**, **13**), quatre acides phénoliques (**1-2,6,11**), un lignane de type aryltétraline (**3**) et un methyl gallate (**6**).

Le nouveau flavonol (**12**) et les composés (**2**, **3**, **7**, **9**) se sont avérés les plus actifs, certains d'entre eux présentant une meilleure activité que les standards antioxydants.

L'extrait M80, les fractions et les composés isolés ont été évalués *in vitro* par les activités anti-tyrosinase, anti-élastase, anticholinestérase et l' α -glucosidase.

Mots clés: *Helianthemum getulum*, 5,7,2',4',5'-pentahydroxyflavone 3-O- β -D-galactopyranoside, flavonoïdes, acides phénoliques, lignane de type aryltétraline, activité antioxydante, activité anti-tyrosinase, activité anti-élastas, activité anticholinestérase, α -glucosidase.

Directeur de thèse : Samir BENAYACHE- Université : Constantine1 Frères Mentouri

Année Universitaire : 2023-2024

Abstract

The phytochemical study of *Helianthemum getulum* led to the isolation of a new flavonoid 5,7,2',4',5'-pentahydroxyflavone 3-O- β -D-galactopyranoside (**12**) named getulin, by the use of different chromatographic methods of separation and purification and characterization by spectroscopic methods (NMR, Mass and UV) besides twelve compounds distributed through seven flavonoids (**4-5**, **7-10**, **13**), four phenolic acids (**1-2,6,11**), An aryltetralinlignan (**3**) and a methyl gallate (**6**).

The new flavonol (**12**) and Compounds (**2, 3, 7, 9**) were found to be the most actives, some of them exhibiting better activity than the antioxidant standards.

M80 extract, fractions and isolated compounds were evaluated *in vitro* by anti-tyrosinase, anti-elastase, anticholinesterase and α -glucosidase activities.

Key words: *Helianthemum getulum*, 5,7,2',4',5'-pentahydroxyflavone 3-O- β -D-galactopyranoside, flavonoids, phenolic acids, aryltetralinlignan, antioxidant activity, anti-tyrosinase activity, anti-elastase activity, anticholinesterase activity, α -glucosidase.

ملخص

أدت الدراسة الفيتوكيميائية للنبة *Helianthemum getulum* ، الى فصل مركب جديد تم التعرف عليه لأول مرة في المملكة النباتية (12) 5,7,2',4',5'-pentahydroxyflavone 3-O-β-D-galactopyranoside حيث تمت تنقيتها باستعمال تقنيات كروماتوغرافية مختلفة و باستعمال طرق التحليل الطيفي، بالإضافة إلى 12 مركب منها 7 flavonoïdes (4-5, 7- 10, 13) و 4 acides phénoliques (1-2,6,11) و lignane de type aryltétraline (6) methyl gallate. تم تحديد هياكل هذه المركبات بواسطة التحليل الطيفي NMR 1D-2D وكذلك مطياف الكتلة والبيانات الطيفية في الأشعة فوق البنفسجية.

المركب جديد (12) بالإضافة إلى المركبات (2, 3, 7, 9) تظهر فعالية جيدة مضادة للأكسدة.

تمت دراسة الفعالية البيولوجية للمستخلصات والمركبات المعزولة النقية عن طريق تقنية مضاد التيروزيناز، مضاد الإيلاستاز، مضادات الكولين إستراز و ألفا غلوكوزيداز.

الكلمات المفتاحية: الفعالية البيولوجية، مضادة للأكسدة، تقنية مضاد التيروزيناز، مضاد الإيلاستاز، مضادات الكولين إستراز و ألفا غلوكوزيداز،

Helianthemum getulum, 7,2',4',5'-pentahydroxyflavone 3-O-β-D-galactopyranoside, flavonoïdes, acides phénoliques, lignane de type aryltétraline.