

**République algérienne démocratique et populaire**  
**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique**

UNIVERSITE HADJ LAHKDAR-BATNA  
FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE

**MEMOIRE**

*POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE*

**MAGISTER**

*EN CHIMIE*

*PRESENTEE PAR*

**M<sup>me</sup> BOUZERGOUNE FOUZIA**

**ETUDE PHYTOCHIMIQUE DE LA PLANTE**

***HELIANTHEMUM KAHIRICUM***

Devant la commission d'examen :

- Dibi Ammar  
- Aberkane Mohamed Cherif  
- Habab Hamada  
- Boukhari Abbas  
- Smail Fadhel

Pr. U. Batna  
M.C. U. Batna  
M.C. U. Batna  
M.C. U. Annaba  
M.C. U. Annaba

Président  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur

## *Remerciement*

Avant toute chose, je tiens à remercier dieu le tout puissant, pour m'avoir donnée la force et la patience.

Ce travail a été effectué au laboratoire de chimie et chimie de l'environnement, au département de chimie, à la faculté des sciences de l'université de Batna, sous la direction de monsieur *Aberkane Med cherif*, maître de conférences à l'université de Batna.

Je tiens à lui remercier tout particulièrement pour tous ses efforts et pour le soutien qui m'a témoigné tout au long de cette étude placée sous sa direction.

Je tiens à remercier monsieur le professeur *Dibi Amar* de l'université de Batna pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de mémoire et pour ces nombreux conseils.

J'exprime également ma gratitude à monsieur *Boukhari abbes* maître de conférences de l'université de Annaba pour avoir accepté de faire partie de mon jury de mémoire.

Je remercie également monsieur *Smail fadhel* maître de conférences de l'université de Annaba d'avoir accepté de faire partie de ce jury de mémoire.

J'aimerais également remercier vivement monsieur le docteur *Haba hamada*, maître de conférences de l'université de Batna pour avoir accepté de faire partie de ce jury de mémoire et pour ses conseils et son aide.

J'exprime mes sincères remerciements à monsieur *Paul Mosset* professeur de ENSC de l'université de Renne pour son aide et disponibilité en me permettant la réalisation des spectres.

Mes vifs remerciements et reconnaissance vont également à mademoiselle *Bitam Fatima* maître de conférences de l'université de Batna, pour son soutien et ses spéciaux conseils, son aide, et sa disponibilité.

Un merci collectif a tous les membres du laboratoire de synthèse organique et phytochimie de l'université de Batna.

## *Dédicace*

Je dédie tout particulièrement cette thèse à l'être le plus cher à mon cœur ma mère symbole de sacrifice pour son soutien morale et assistance inestimable pendant toute mes longues années d'études et pour tout l'amour qu'elle m'a donnée pour tout ça Merci maman et que dieu te garde pour moi.

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes chers frères Hassen , mahfoud et rafik*

*A toutes mes sœurs, ainsi que leurs petites familles pour leur aide et  
leur soutien moral.*

*A mon mari Rabie*

*A mon cher enfant : Monsif.*

*A toute ma famille et à toutes mes amies et collègues*

# Abréviations

°C	Degré Celsius
$\delta$	Déplacement chimique
<u>1</u> , <u>2</u> ...	Symboles utilisés pour les composés mentionnés dans la littérature
1D	monodimensionnelle
2D	bidimensionnelle
A, B	symboles utilisés pour les composés identifiés dans cette étude
AcOEt	Acétate d'éthyle
CC	Chromatographie sur colonne
CCM	Chromatographie sur couche mince
CDCl <sub>3</sub>	Chloroforme deutéré
CHCl <sub>3</sub>	Chloroforme
Cinn	Cinnamoyle
COSY	Spectroscopie de Corrélation H-H
d	doublet
dd	doublet de doublets
ESI	Electrospry Ionisation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
Hz	Hertz
IR	Infra- Rouge
J	constantes de couplage (RMN)
m	multiplet
<i>m/z</i>	masse / charge électronique

Me	Méthyle
CD <sub>3</sub> OD	méthanol deutéré
MeOH	méthanol
MS	spectrométrie de masse
nm	nanomètre
ppm	partie par million
Rf	facteur de rétention
RMN	résonance magnétique nucléaire
TMS	Tetramethylsilane
UV	Ultraviolet

# Sommaire

Introduction.....	1
<b>Chapitre I : Travaux antérieurs</b>	
1- Etude botanique de la famille <i>Cistaceae</i> .....	3
1.1- Introduction.....	3
1.2- Classification botanique.....	4
1.3- Utilisation en médecine traditionnel.....	4
1.4- Activités biologiques.....	5
2- Etudes chimiques sur la famille des <i>Cistaceae</i> .....	5
2.1- Le genre <i>Cistus</i> .....	5
2.1.1- Les diterpènes isolés du genre <i>Cistus</i> .....	6
2.1.2 Flavonoïdes isolés du genre <i>Cistus</i> .....	11
2.2- Le genre <i>Halimium</i> .....	15
2.2.1- Diterpènes isolés du genre <i>Halimium</i> .....	15
3- Etude botanique du genre <i>Helianthemum</i> .....	26
3.1- Description botanique .....	26
3.2- Toxicité.....	27
3.3- Activité biologique.....	27
4- Etude chimique du genre <i>Helianthemum</i> .....	27
5- L'espèce <i>Helianthemum Kahiricum</i> .....	28
5.1- Description botanique.....	28
5.2- Mode d'adaptation.....	28
5.3- Etude chimique.....	29
<b>Chapitre II : Etudes des Flavonoïdes</b>	
2.1- Introduction .....	30
2.2- Structure chimique .....	30
2.3- Classification .....	31
2.4- La biosynthèse .....	34
2.5- Le kaempferol .....	36

2.5.1- Biosynthèse de kaempferol .....	37
2.5.2- Biosynthèse de kaempferol glycoside .....	38
2.6- Substitution du squelette flavonique .....	39
2.6.1- La O-substitution .....	39
2.6.1a-L'hydroxylation .....	39
2.6.1b-La méthylation.....	40
2.6.1c- La glycosylation .....	41
2.6.2- La C-substitution .....	41
2.6.2a- La C-méthylation .....	41
2.6.2b- La C-glycosylation .....	41
2.7- Propriétés de flavonoïdes.....	42
2.8- Emploi en thérapeutiques.....	43
2.9- Relation structure activité .....	44
2.10- Analyse structurale des flavonoïdes .....	45

### **Chapitre III : Isolation des composés et détermination de leurs structures**

3.1-Extraction .....	51
3.2- Séparation et purification.....	53
3.3-Détermination des structures .....	53
3.3.1- le composé A .....	53
3.3.2- le composé B .....	64
Conclusion.....	72

### **Chapitre IV : Partie expérimentale**

4.1- Matériel et méthodes .....	73
4.1.1- Méthodes Chromatographiques analytiques .....	73
4.1.1.1- Chromatographies sur couche mince (CCM) .....	73
4.1.2- Méthodes préparatives .....	73
4.1.2.1- Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC).....	73
4.1.2.2- Chromatographie préparative sur couche épaisse (CCE) .....	73
4.1.2.3 - Chromatographie liquide sous vide (VLC).....	73
4.1.3- Méthodes physico chimiques.....	74
4.1.3.1- Spectres infra rouge (IR).....	74
4.1.3.2- Spectres de masse (SM) .....	74

4.1.3.3- Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN). .....	74
4.1.3.4- Spectrométrie UV-Visible.....	74
4.1.3.5- Pouvoir rotatoire.....	75
4.2- Extraction .....	75
4.3- Contrôle chromatographique des extraits .....	75
4.4- Séparation et purification .....	75
4.4.1- Extrait chloroformique .....	75
4.4.2.1- Purification .....	77
4.4.1.2- Purification du lot N=°19 .....	77
4.4.2- Extrait butanolique .....	78
5- Caractéristiques spectrales des composés .....	79
5.1- Composé A .....	79
5.2- Composé B .....	81
Références bibliographiques.....	82
Résumé.....	93

## Introduction

Malgré les énormes progrès réalisés par la médecine moderne, la phytothérapie offre de multiples avantages. N'oublions pas que de tout temps, à l'exception de ces cent dernières années, les hommes n'ont eu que les plantes pour se soigner, qu'il s'agisse de maladies bénignes, rhume ou toux, ou plus sérieuses, telles que la tuberculose ou la malaria [1].

Aujourd'hui, les traitements à base de plantes reviennent au premier plan, car l'efficacité des médicaments tels que les antibiotiques (considérés comme la solution quasi universelle aux infections graves) décroît. Les bactéries et les virus se sont peu à peu adaptés aux médicaments et leur résistent de plus en plus, C'est pourquoi, on utilise à nouveau l'absinthe chinoise et surtout son principe actif pour soigner la malaria [1].

La phytothérapie, qui propose des remèdes naturels et bien acceptés par l'organisme, est souvent associée aux traitements classiques. Elle connaît de nos jours un renouveau exceptionnel en Occident, spécialement dans le traitement des maladies chroniques [1].

La flore algérienne est caractérisée par sa diversité florale : Méditerranéenne, Saharienne et une flore paléo tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques [2]. Ces espèces sont pour la plupart spontanées avec un nombre non négligeable (15%) d'espèces endémiques [2], ce qui a donné à la pharmacopée traditionnelle une richesse inestimable.

Dans le cadre de la recherche des principes actifs extraits des plantes, il nous a paru intéressant d'étudier cette plante pour confirmer ou infirmer les vertus médicinales qu'on lui prête.

Nous nous proposons des recherches de nouvelles activités biologiques éventuelles ; enfin nous avons abordé cette étude pour compléter si nécessaire les données structurales qui sont rapportées dans la littérature concernant *l'helianthemum kahiricum*.

Les principales parties de ce travail sont traitées selon les chapitres suivants :

- ❖ Le premier chapitre est consacré aux études antérieures incluant: la présentation botanique de la famille des cistacées et l'espèce *Helianthemum kahiricum*, ces principaux métabolites secondaires, les usages traditionnels et les activités biologiques, ainsi que la toxicité de quelques espèces appartenant à cette famille.
- ❖ Le deuxième chapitre contient une étude chimique impliquant la définition, la structure, la classification, la biosynthèse et l'activité biologique des flavonoïdes.
- ❖ Le troisième chapitre décrivant nos travaux personnels allant de la séparation, à la détermination de structures des produits isolés.

Enfin, une conclusion générale qui résume l'ensemble de résultats obtenus.

# Chapitre I

Travaux antérieurs

## 1-ETUDE BOTANIQUE DE LA FAMILLE CISTACEAE

### 1.1. Introduction

La famille des Cistacées est une famille de plantes dicotylédones qui comprend moins de 200 espèces et maximum dix (10) genres ; selon le centre national de l'information biotechnologique (NCBI), cette famille présente (8) genres incluant, *Cistus*, *Crocanthemum*, *Fumana*, *Halimium*, *Helianthemum*, *Hudsonia*, *Lechea*, *Tuberaria*. Ce sont des arbustes, des plantes herbacées, poilues ou velues, pérennes ou annuelles, à feuilles simples souvent opposées, à fleurs solitaires ou en cymes, à cinq pétales libres des régions tempérées à sub-tropicales surtout présents autour du bassin méditerranéen [1].

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

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

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

-**Le genre *Fumana*** : il comporte trois espèces *F. ericoides*, *F. fontanesili*, et *F. thymifolia*.

-**Le genre *Helianthemum*** : il comporte les espèces *H. aegyptiacum*, *H. almerianse*, *H. apenninum*, *H. canum*, *H. grandiflorum*, *H. kahiricum*, *H. ledifolium*, *H. marifolium*, *H. nummularium*, *H. oelandicum*, *H. scopulicola*, *H. squamatum*, *Hudsonia*, et *tomentosa*.

-**Le genre *Lechea*** : il comporte une seule espèce *lechea tripetala*.

-**Le genre *Tuberaria*** : il comporte deux espèces *T. globulariifolia*, *T. guttata* [5].

L'Algérie constitue avec le Maroc et la péninsule ibérique, le territoire de prédilection des Cistacées de l'ancien monde [2].

Malgré l'apparition de nombreuses monographies et de très nombreux travaux de détail, la famille des cistacées est l'une des plus difficiles à étudier [1].

## 1.2. Classification botanique

Selon la classification classique réalisée en 1996, cette famille est située dans l'ordre des Malvales [5].

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
division	Tracheobionta ou Angiospermes
classe	Magnoliopsida ou Dicotylédones
Sous-classe	Dilleniidae
ordre	Malvales
famille	Cistacées

## 1.3. Utilisations traditionnelles

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

Les feuilles de plusieurs espèces de genre *Cistus* produisent le ladanum, une résine aromatique jadis utilisée en médecine [5].

A Marrakech, les graines de quelques espèces du genre *Cistus* sont apprêtées avec des épices, s'emploient comme aliment apéritif. On les prescrit aussi comme aphrodisiaque.

A Rabat, les feuilles de *Cistus albidus* L sont utilisées comme agent digestif et sont consommées sous forme des tisanes.

Dans le nord du Maroc (douar Agan, région de Talambot), les fruits des cistes (*âmerîl*) servent à confectionner le harkûs (fard à tatouage). Les fruits de cistes mélangés à des fruits de *iuniperus phoenicea* sont enveloppés dans un tissu humecté d'huile puis flambés sous une assiette ; le noir de fumée ainsi obtenue est récupérée pour faire les tatouages.

Les graines pilées de la plupart des cistes sont consommées dans les campagnes marocaines, comme amuse-gueule. Dans la région de Taineste, ses graines sont utilisées comme chapelure dans la préparation des gâteaux.

Le bétail apprécie les pousses de *C. salvifolius* [6].

#### **1.4. Activités biologiques**

Toutes les espèces de la famille Cistaceae sont fréquemment employées dans la médecine traditionnelle pour leurs propriétés antimicrobienne, antitumorale, antivirale anti-inflammatoire, antifongique, antiulcer, anti oxydante, et activités spasmolytique et hypotensive [7].

Diverses espèces de *Cistus* sont employées en Italie, en Grèce, en Espagne et en Turquie pour le traitement de la diarrhée et des ulcères peptiques ; en tant que remèdes généraux pour traiter plusieurs maladies de peau et comme agents anti-inflammatoires et antispasmodiques [8].

Les investigations pharmacologiques réalisées sur les extraits de feuille de *Cistus* ont prouvé des propriétés antimicrobiennes, contre beaucoup de bactéries et mycètes responsables des infections humaines [9].

### **2-Etudes chimiques de la famille des Cistaceae**

La majorité des études phytochimiques effectuées sur un nombre important d'espèces de la famille des Cistacées montre la richesse ainsi que la diversité structurale de ces dernières en métabolites secondaires incluant en particulier les terpènes, les composés phénoliques constituant principalement les flavonoïdes, et les tanins en faibles quantités.

#### **2.1. Le genre *Cistus***

Le genre *Cistus* comporte plusieurs plantes sous forme d'arbustes éternels. Ces arbustes sauvages se développent dans les bords marocains et méditerranéens avec 16 espèces de *Cistus* [5].

Les études phytochimiques réalisées sur ces espèces révèlent une grande richesse en huiles essentielles, en particulier le ladanum, le labdanum (ladano) , et les flavonoides (comme aglycones et glycosides), les pro-anthocyanidines, les terpenoides et les tannins [10].

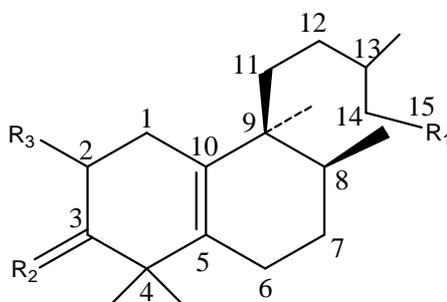
Le genre *cistus* est le plus étudié sur le plan phytochimique, et les diverses études montrent la présence de terpenoïdes et de flavonoïdes.

### 2.1.1 Diterpènes isolés du genre *Cistus*

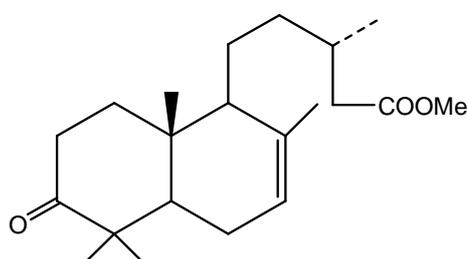
Ces composés sont les constituants majoritaires des extraits des espèces de genre *Cistus*. Les labdanes bicycliques de la série normale sont les plus décrits dans la littérature. Certains labdanes réarrangés appartenant à la série antipode sont également présents, c'est le cas de l'espèce *C.laurifolius* dans laquelle les *ent*-labdanes et les *ent*-labdanes réarrangés (*cis*-clerodanes) ont été isolés [10,11].

L'acide acétylaurifolique est le *ent*-labdane majoritaire (ester méthylique **1** de l'acide salmantique **2**, et l'acide 3-oxo-cativique **4**) isolé de l'espèce *C. laurifolius* et dont la structure a été déterminée par synthèse et qui a été confirmée récemment par les rayons X [11].

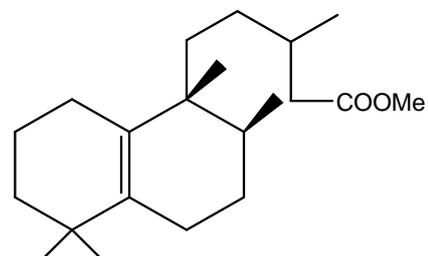
D'autres composés minoritaires avec un squelette *ent*-labdane réarrangé : l'acide salmantique **1**, le 3,15-diol correspondant (salmantidiol) **3**, et les deux énantiomères l'acide labdanolique **5** et l'acide populifolique **6** [12].



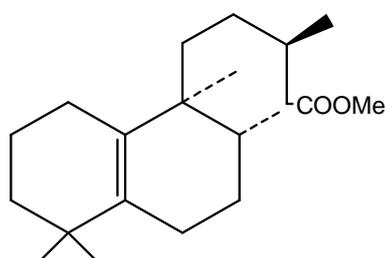
	R1	R2
<b>1</b>	COOH	O
<b>2</b>	COOMe	O
<b>3</b>	CH <sub>2</sub> OH	H    OH



4

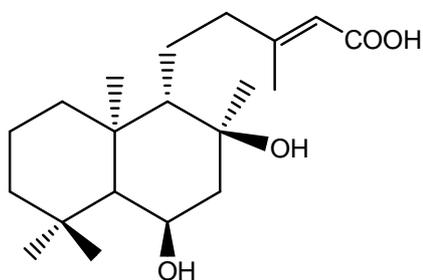


5

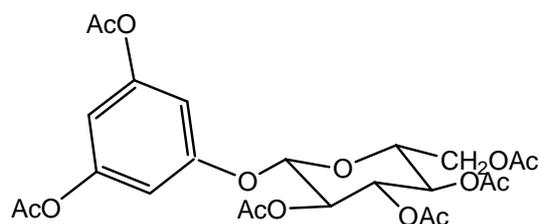


6

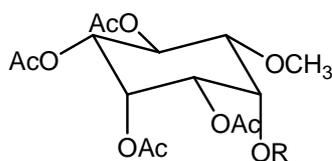
Une étude récente effectuée par G. Julio et collaborateurs sur l'extrait éthanolique de l'espèce *C. laurifolius* a permis l'isolement d'un acide diterpénique, l'acide  $6\beta$ ,  $8\beta$ -dihydroxy-*ent*-13-*E*-labden-15-oïque, (l'acide laurifolique) **7**, la séparation a permis aussi l'isolement de trois composés glycosylés de dérivés du  $\beta$ -D-glucopyranosiloxyéthane 1,3-Diacetoxy-5-(tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosiloxy)-benzene **8** et deux dérivés inositol, 1-O-méthyl 3, 4, 5, 6, pentacetyl-*epi*-inositol **9**, 1-O-méthyl 3, 4, 5, 6,tetraacetyl-*epi*-inositol **10** [13].



7

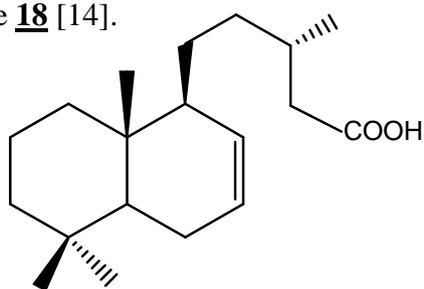


8

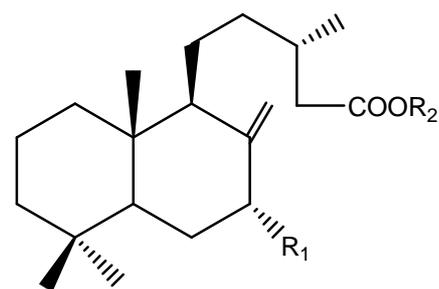


9- R = Ac  
10- R = H

L'investigation chimique menée sur les parties aériennes de l'espèce *C. symphytifolius* a donné en plus de, l'acide cativique **11**, l'acide labdenique **12**, l'acide labdanolique **13** et labdan-8 $\alpha$ ,15-diol **14** ; trois diterpenes bicycliques qui sont l'acide Cistadienique **15**, l'ester de méthyle de l'acide cistenolique **16**, et labd-13(E)-ene-8 $\alpha$ ,15-diol **17**. Les structures de ces derniers ont été déterminées par des études et des corrélations spectrales. Les études basés sur les techniques de dichroïsme circulaire ont prouvé que l'acide cistenolique et l'acide salvique sont des énantiomères, et la structure de l'acide salvique a été déterminé comme suit : acide 7 $\alpha$ -hydroxy-labd-8(17)-en-15-oïque **18** [14].



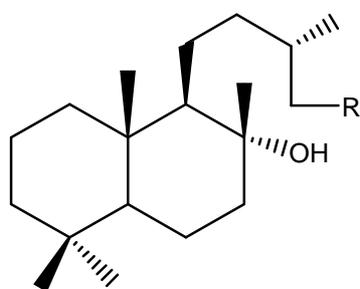
**11**



**12** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H

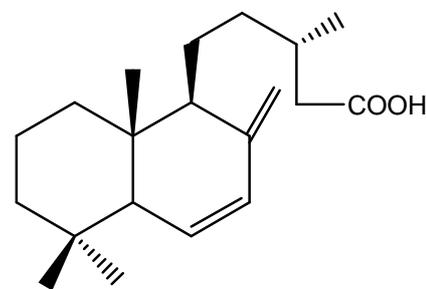
**16** R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = Me

**18** R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = H

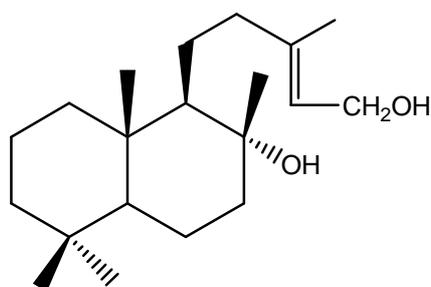


**13** R = COOH

**14** R = CH<sub>2</sub>OH

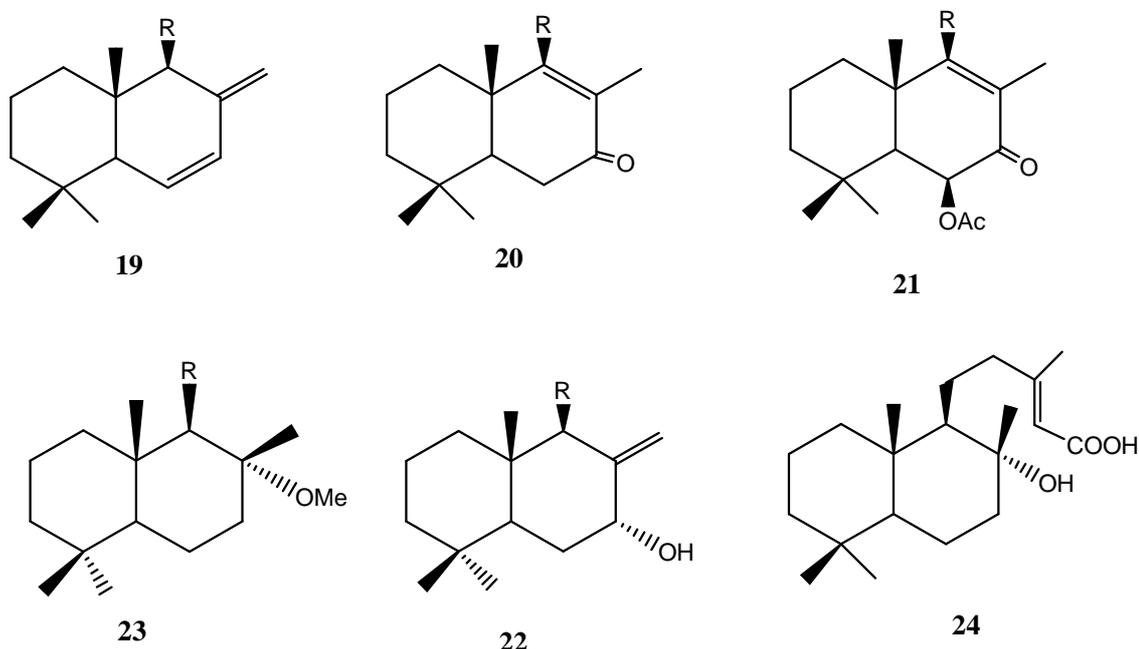


**15**

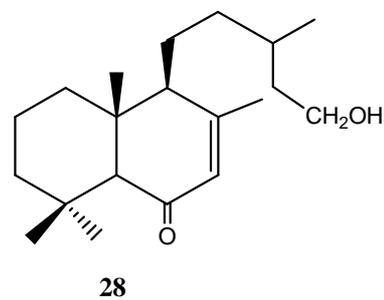
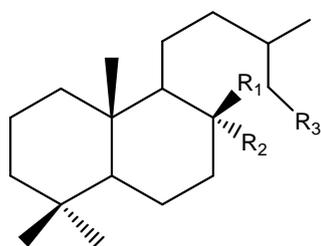
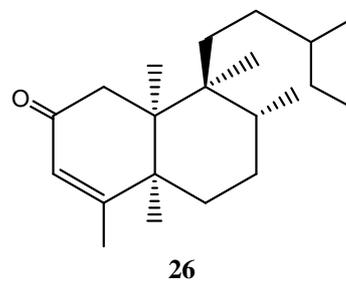
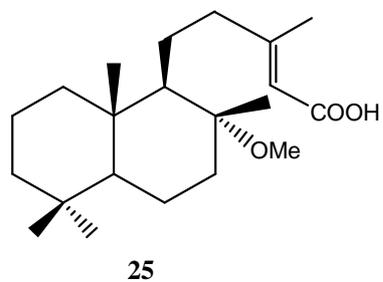


**17**

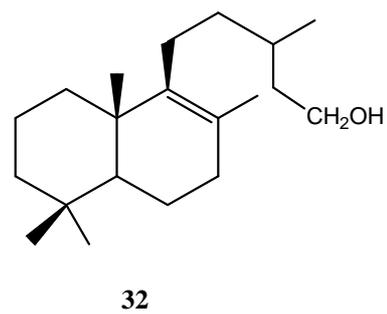
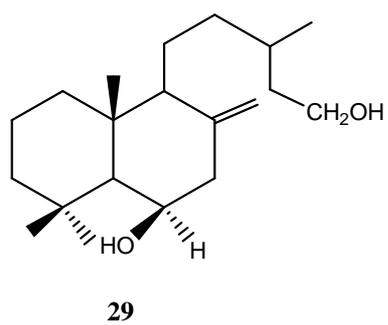
L'étude phytochimique récente de l'espèce *C. ladaniferus* a fourni trois acides diterpéniques à squelette labdene : l'acide 6,8(17)-labdadien-15-oïque **19**, l'acide 7-oxo-8-labden-15-oïque **20** et l'acide 6 $\beta$ -acétoxy-7-oxo-8-labden-15-oïque **21**, en plus des acides labdanoliques : l'acide 7 $\alpha$ -hydroxy-8(17)-labden-15-oïque **22**, l'acide 8 $\alpha$ -méthoxy-labda-15oïque **23** et 8 $\alpha$ -hydroxy-13(E)-labden-15-oïque **24** qui ont été isolés de l'extrait hexanique [15].



L'étude phytochimique de l'espèce *C. palinhae* a permis d'isoler deux acides L'acide 8 $\alpha$ -méthoxy-labden-15-oïque **25** et l'acide (5R, 8R, 9S, 10S)-2-oxo-3-cis-celeroden-15-oïque **26**. D'autres dérivés hydroxylés sont aussi identifiés dans cette espèce à savoir : 8,15 labdane-15-diol **27**, 6-oxo-7-labden-15-ol **28** 6 $\beta$ -hydroxy-8(17)-labden-15-ol **29**, 8-hydroxy-15 $\beta$ -phenylpropionoxy-labdane **30**, 8-hydroxy-15-acétoxy-labdane **31**, 8-labden-15-ol **32** et 8-Epi-15-labdane-15-diol **33** [16].



	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>
27	Me	OH	CH <sub>2</sub> OH
30	Me	OH	CH <sub>2</sub> OCO(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> H <sub>5</sub>
31	Me	OH	CH <sub>2</sub> OAc
33	OH	Me	CH <sub>2</sub> OH

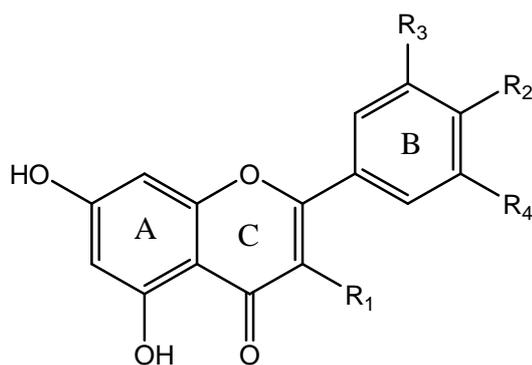


### 2.1.2 Flavonoïdes isolés du genre *cistus*

Une étude quantitative et qualitative des flavonoïdes aglycones et glycosyles a été réalisée sur les différentes parties de l'espèce *C. laurifolius* [17]. Cette étude a permis la détection des flavonoïdes dérivés quercétine, myricétine, apéginine, lutéoline, et kaempferol, il s'agit des composés :

Le dérivé méthyle éther quercétine est le composé majoritaire de ces composés, par contre le quercétine 3-galactoside est le composé glycoside prédominant dans les jeunes feuilles.

En outre le composé myricétine glucoside est le composé majoritaire détecté dans les tissus mûrs.

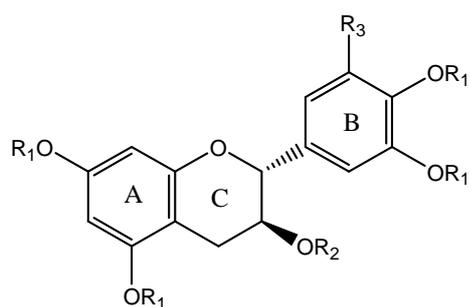


		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
33	Kaempferol	OH	OH	H	H
34	Quercétine	OH	OH	OH	H
35	Myricétine	OH	OH	OH	OH
36	Apéginine	H	OH	H	H
37	Luéoline	H	OH	OH	H

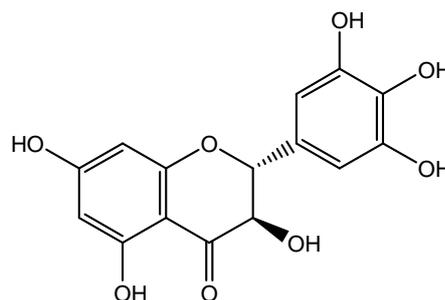
L'espèce *C. incannus* est une plante très utilisée dans la médecine traditionnelle dans le nord de la Grèce comme un traitement général anti-inflammatoire des maladies de la peau.

Deux études phytochimiques réalisées par Frank Petereit et ses collaborateurs [18] ont permis l'isolement et la caractérisation des flavonoïdes possédant le squelette

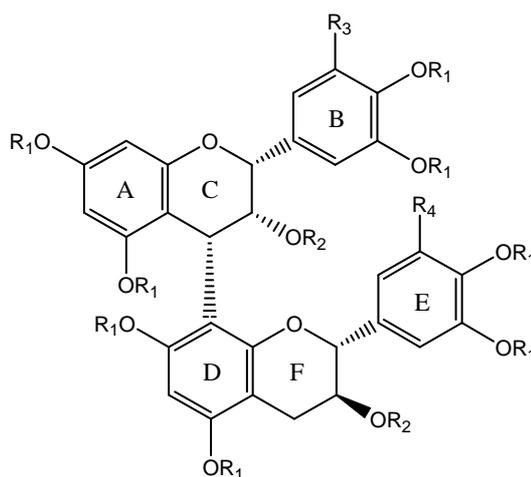
flavan-3-ol, il s'agit monomère flavan-3-ol : (+) catechine **38** (+)-gallocatechine **39**, (+)-catechin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside **40**, gallocatechin 3-O-gallate **41**, 2R,3R-dihydromyricetine **42**, dimer flavan3-ol : procyanidine B-1 **43**, procyanidine B-3 **44**, gallocatechine-(4 $\alpha$ —8)-catechine **45**, gallocatechine-(4 $\alpha$ —8)-gallocatechine **46**, gallocatechine-(4 $\alpha$ —6)-gallocatechine **47**, catechine-(4 $\alpha$ —8)-gallocatechine **48**, trimere flavan-3-ol gallocatechine-(4 $\alpha$ —8)-gallocatechine-(4 $\alpha$ —8)-catechine **50**.



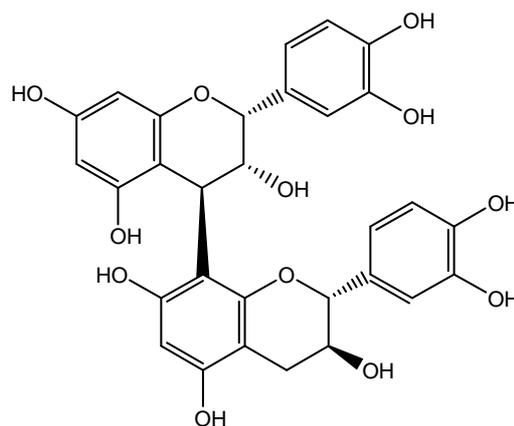
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>38</b>	H	H	H
<b>39</b>	H	H	OH
<b>40</b>	H	H	Rhamnosyl
<b>41</b>	H	Galloyl	OH



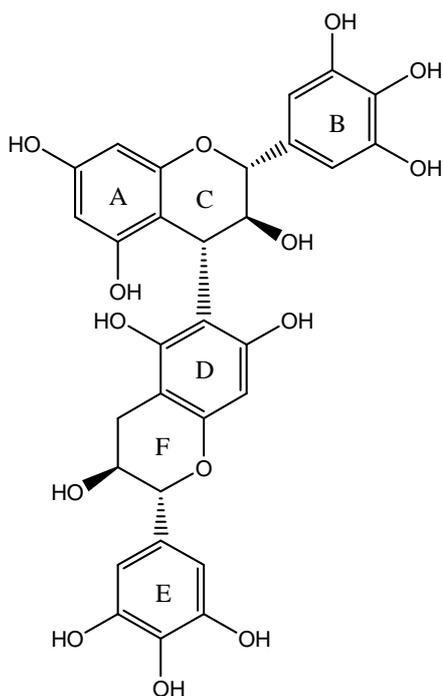
**42**



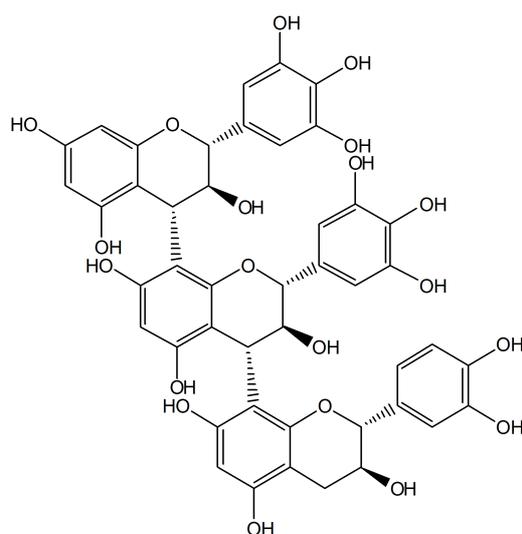
	R1	R2	R3	R4
<b>44</b>	H	H	H	H
<b>46</b>	H	H	OH	OH
<b>45</b>	H	H	OH	H
<b>48</b>	H	H	H	OH



**43**

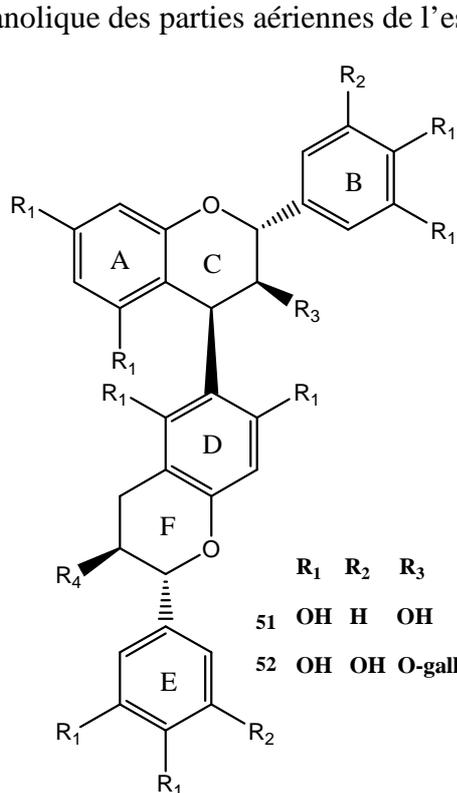


47

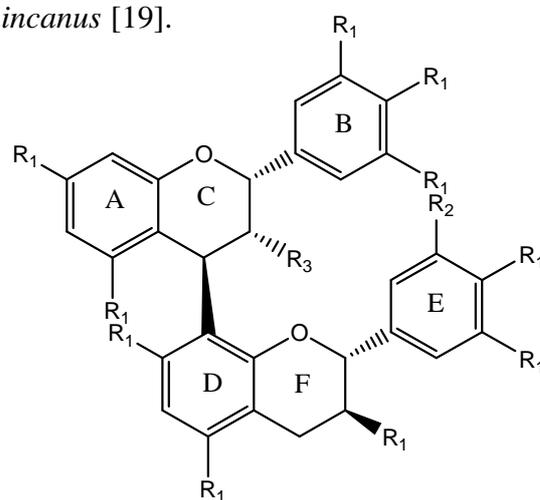


50

En plus, de protocatechinique acide et (-) shikimique acide six dérivés flavonoidiques appartenant au groupe cyanidine, epicatechine-(4 $\beta$ —6)-catechine **51**, epigallocatechine-3-O-gallate-(4 $\beta$ —6)-gallocatechine **52**, epigallocatechine-(4 $\beta$ —8)-catechine **53**, epigallocatechine-(4 $\beta$ —8)-gallocatechine **54**, epigallocatechine-3-O-gallate-(4 $\beta$ —8)-gallocatechine **55**, tous ces composés ont été isolés de l'extrait méthanolique des parties aériennes de l'espèce *C. incanus* [19].

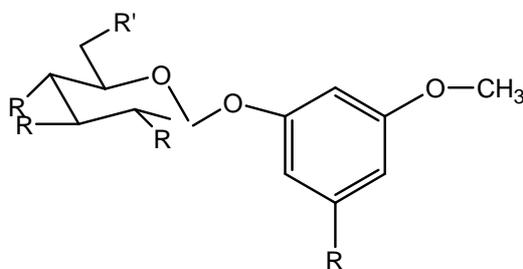
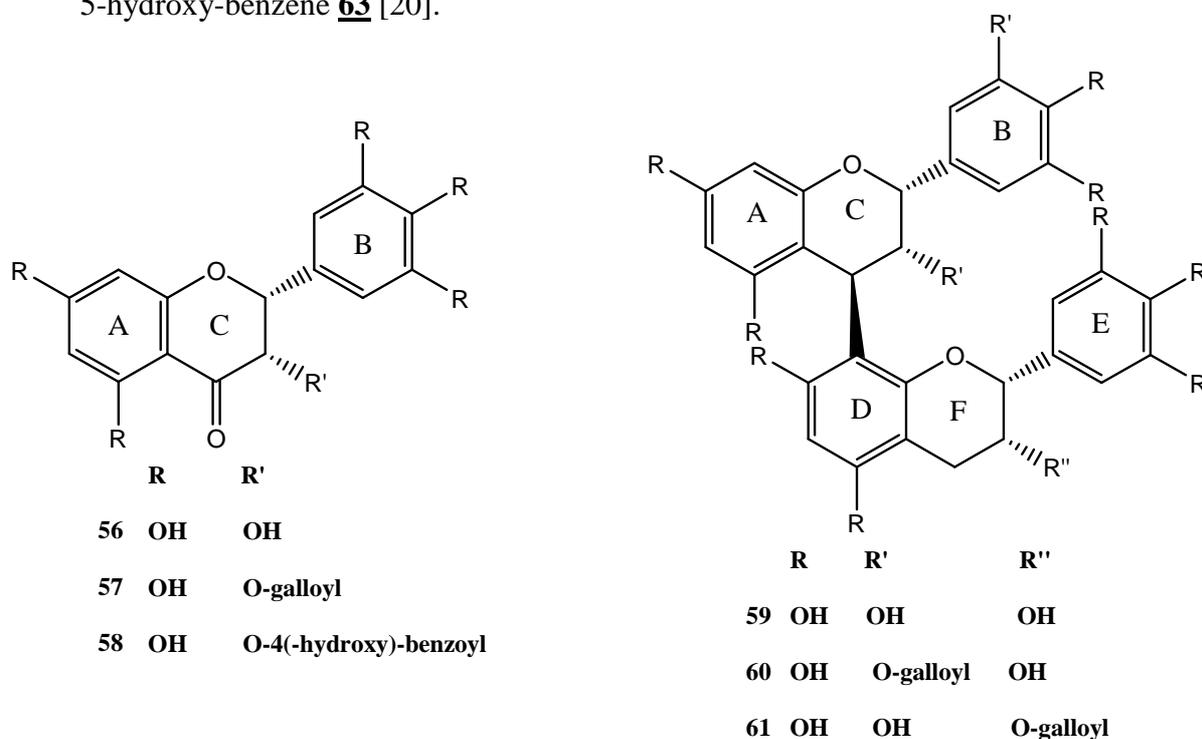


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
51	OH	H	OH	OH
52	OH	OH	O-galloyl	OH



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
53	OH	H	OH
54	OH	OH	OH
55	OH	OH	O-galloyl

L'extrait acétate d'éthyle de la fraction aqueuse acétonique (3/7) des parties aériennes de l'espèce *C. salvifolius* a été chromatographié sur séphadex LH-20, après une série de purification sur colonne les composés ont été isolés. Ces composés sont des dérivés de flav-3-ol, catechine, epicatechine, gallo catechine, epigallocatechine **56**, epicatechine 3-O-gallate, gallo catechine 3-O-gallate, epigallocatechine 3-O-gallate **57**, epigallocatechin3-O-p-hydroxy benzoate **58**, prodilphinidine epigallocatechine(4β—8)-epigallocatechine **59**, epigallocatechine 3-O-gallate-(4β—8)-epigallocatechine **60**, epigallocatechine-(4β—8)-epigallocatechine-3-O-gallate **61**, epigallocatechine-(4β—6) epigallocatechine-3-O-gallate, et phloroglucinol glucosides : 1-O-β-D-glucopyranosyl-3-O-methoxy-5-hydroxy benzene **62**, 1-O-β-D-(6'O-galloyl)-glucopyranosyl-3-methoxy-5-hydroxy-benzène **63** [20].



	R	R'
<b>62</b>	OH	OH
<b>63</b>	OH	O-Galloyl

## 2.2 Le genre *Halimium*

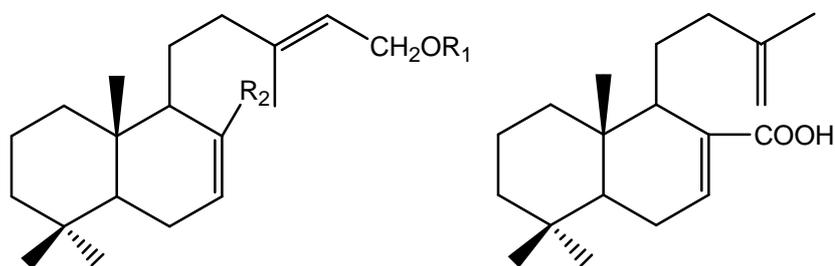
### 2.2.1 Diterpenoides isolés du genre *Halimium*

Une variété de structures de diterpénoïdes décrite pour la première fois, ont été isolés durant les dernières années de l'espèce *H. viscosium* dans la péninsule ibérique [21].

Plusieurs études phytochimiques effectuées par J. G. Urones et ses collaborateurs sur l'espèce *H. viscosium* ont permis d'isoler plusieurs composés à squelettes diterpéniques appartenant aux groupes : labdane, halimane, valparane, et tormesane.

Le traitement chimique de l'espèce *H. viscosium* collectée de Fregenda (salamanque, Espagne) a mené à l'isolement des acides terpéniques avec un squelette labdane décrits pour la première fois dans le genre *Halimium* [22].

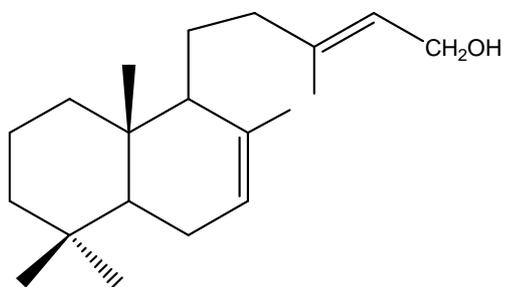
Un ester et deux acides diterpéniques ont été identifiés : acide 15-acétoxy-7,13E-labdadien-17-oïque **64**, acide 15-hydroxy-7,13E-labdadien-17-oïque **65** et l'acide 14,15-dinor-13-oxo-7-labdan-17-oïque **66** [23].



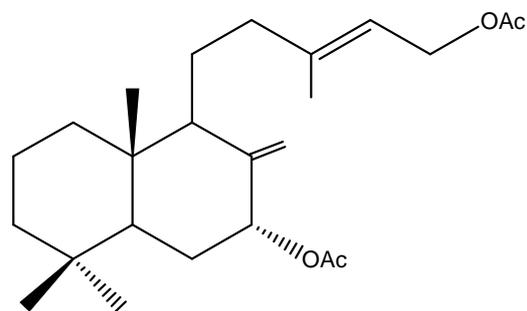
	R1	R2
<b>65</b>	H	COOH
<b>64</b>	H	COOMe

Une première étude phytochimique effectuée par J. G. Urones et ses collaborateurs sur l'extrait hexanique de l'espèce *H. viscosium* a mené à l'isolement des dérivés diacétylés à squelette labdane, il s'agit des composés : 15-hydroxy-7,13<sup>E</sup>-labdadiène **67**, 7 $\alpha$ ,16-diacétoxy-8(17),13<sup>E</sup>-labdadiène **68** [24]. Neuf composés diterpéniques ont été également isolés du *H. viscosium* : 13,14,15,16-tetranor-7-labden-17,12-olide **69**, 14,15-diacétoxy-7,13(16)-labdadiène **70**, 15-acétoxy-7,13E-labdadien-17-al **71**, 15,17-diacétoxy-7,13E-labdadiène **72**, 13, 14, 15,16 tetranor-12,17-diacétoxy-

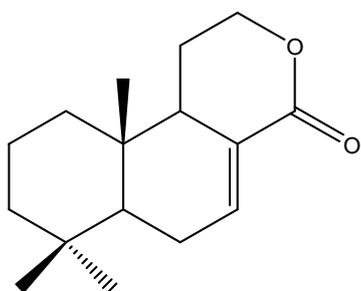
7-labdène **73**, 13(S)-hydroxy-17-acétoxy-7,14-labdadiène **74**, 17-Acétoxy-13(R)-hydroxy-7,14-labdadiène **75**, méthyle 13R-hydroxy-14S,15-diacétoxy-7-labden-17-oate **76**, Méthyle 13S-hydroxy-14R,15-diacétoxy-7-labden-17-oate **77** [25].



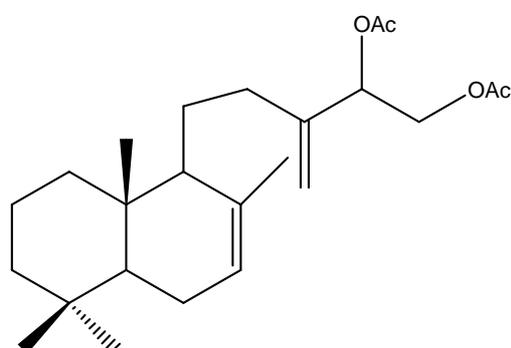
67



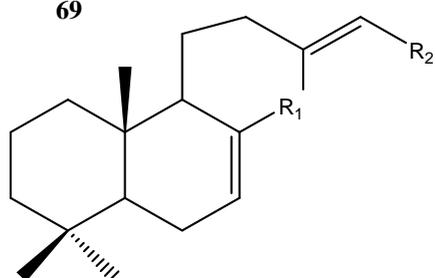
68



69

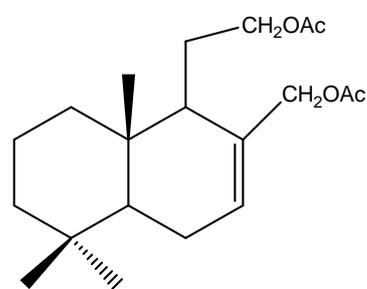


70

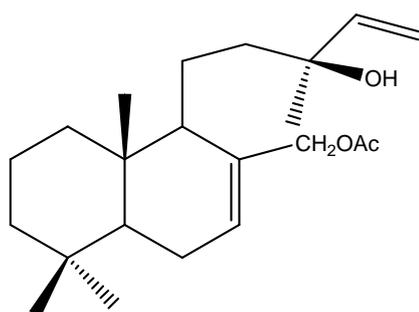


**71**     $R_1$      $R_2$   
          CHO     $CH_2OAc$

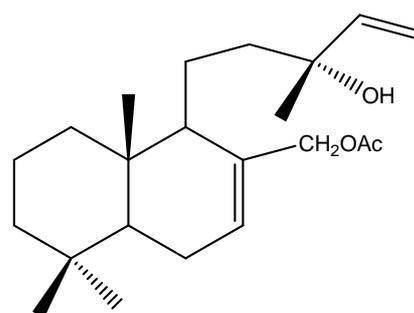
**72**     $CH_2OAc$      $CH_2OAc$



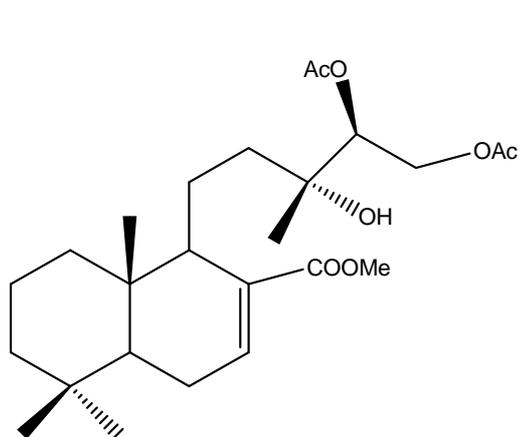
73



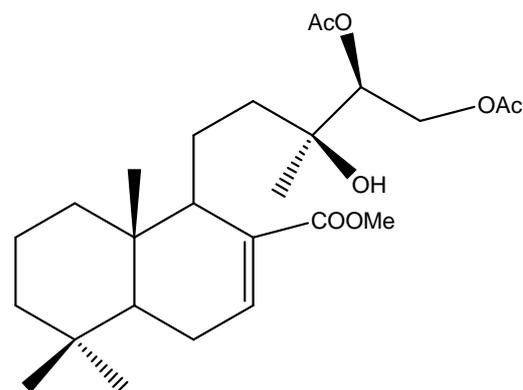
74



75

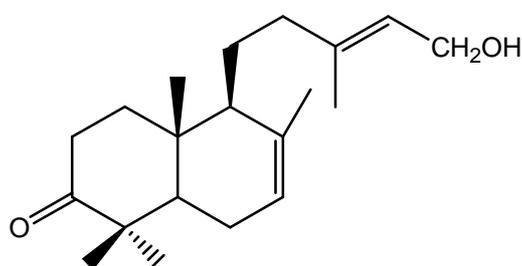


76

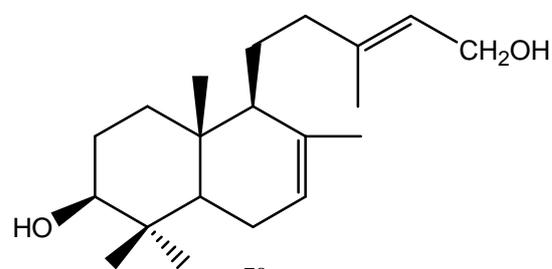


77

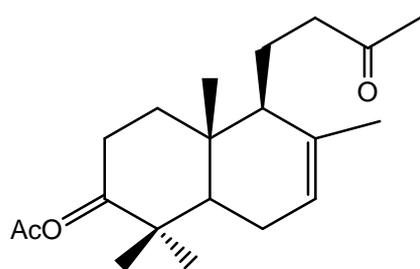
Une deuxième étude phytochimique a donné les diterpènes : 3-oxo-7,13E-labdadiène-15-ol **78**, 7,13E-labdadiène-3 $\beta$ ,15-diol **79**, 14,15-dinor-3 $\beta$ -acétoxy-7-labdène-13-one **80**, 7-labdène, 3 $\beta$ ,15-diol **81** [27].



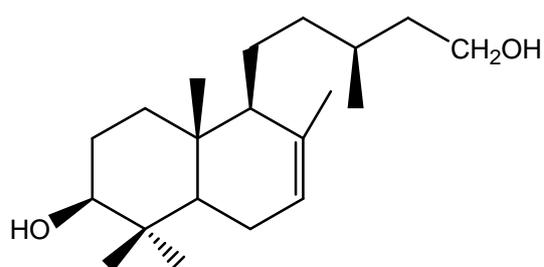
78



79

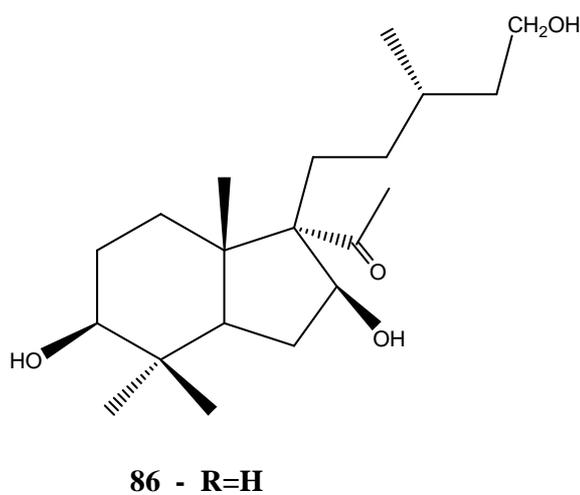
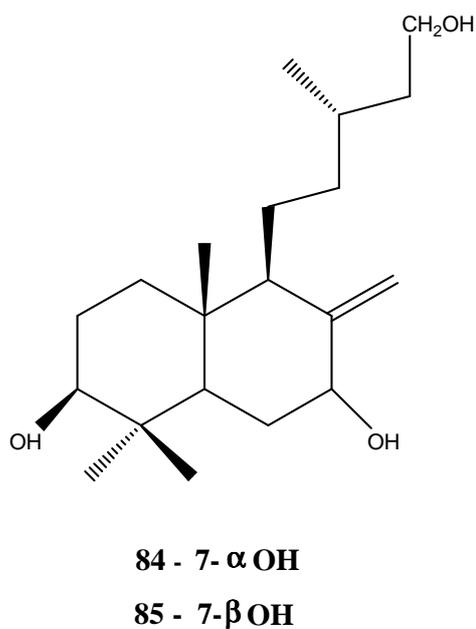
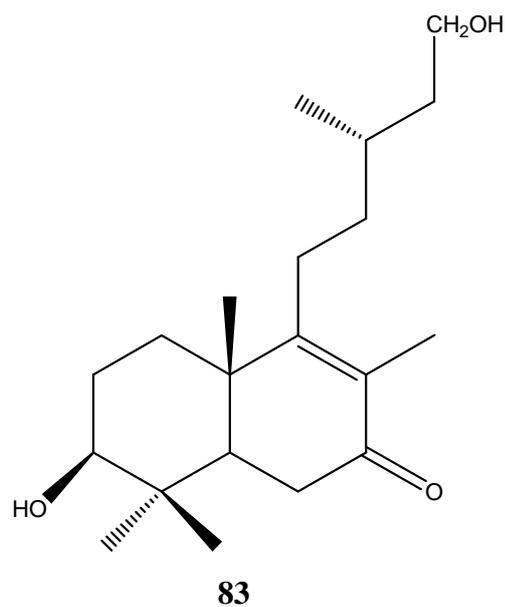
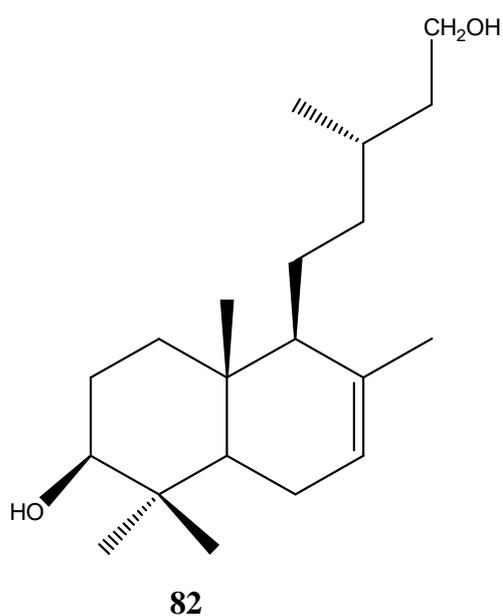


80

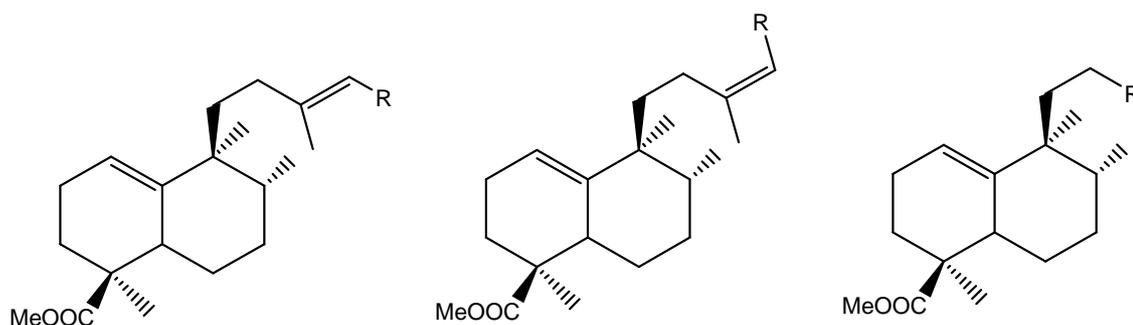


81

Les diterpénoides à squelette covilanone ont été aussi détectés dans l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *H. viscosium*. En effet, l'étude récente effectuée par Rodilla et collaborateurs a permis l'isolement des composés : **82-84**, le composé **85** est un épimère du composé **84** décrit pour la première fois dans cette espèce ; le composé **86** possède un nouveau squelette labdenique et sa structure a été établie par les différentes méthodes spectroscopiques [28].



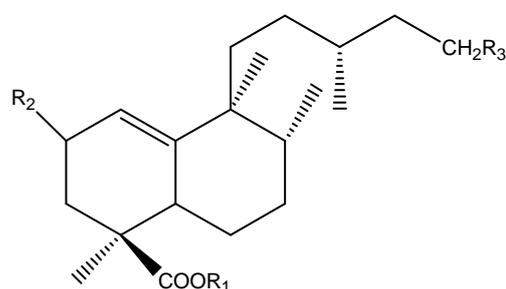
La présence des diterpenoides à squelette *ent*-halimane a été détectée aussi dans l'espèce *H. viscosium*. En effet, l'étude phytochimique de l'extrait hexanique des parties aériennes de l'espèce *H. viscosium* a permis l'isolement des diterpenoides esters de squelette *ent*-halimane, il s'agit des composés : diméthyle 1(10),13*Z*-*ent*-halimadiène-15,18-dioate **87**, diméthyle 1(10),13*E*-*ent*-halimadiène-15,18-dioate **88**, méthyle 15-acétoxy-1(10),13*E*-*ent*-halimadiène-18-oate **89**, méthyle 12-acétoxy-13,14,15,16-tetronor-1(10) *ent*-halimène-18-oate **90**, méthyle 15-al-1(10),13*Z*-*ent*-halimadiène-18-oate **91**, méthyle 15-al-1(10),13*E*-*ent*-halimadiène-18-oate **92**, méthyle 13-oxo-14,15-dinor-1(10)-*ent*-halimène-18-oate **93**, méthyle 15-hydroxy-1(10), 13*E*-*ent*-halimadiène-18-oate **94** [29], méthyle 15-*Z*-cinnamoyloxy-1(10)-*ent*-halimène-18-oate **95**, méthyle 15-hydroxy-2-oxo-1(10)-*ent*-halimène-18-oate **96**, et méthyle 15-méthoxy-1(10)-*ent*-halimène-18-oate **97** [30].



R  
**88-** COOMe  
**89-** CH<sub>2</sub>OAc  
**92-** CHO  
**94-** CH<sub>2</sub>OH

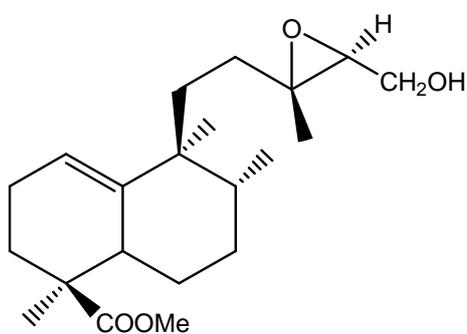
R  
**87-** COOMe  
**91-** CHO

R  
**90-** OAc  
**93-** COMe

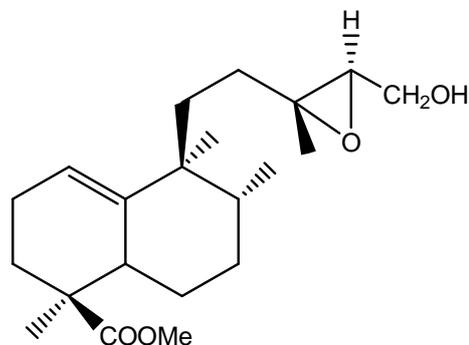


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>95-</b>	Me	H	OCOCH=CHC <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
<b>96-</b>	Me	=O	OH
<b>97-</b>	Me	H	OMe

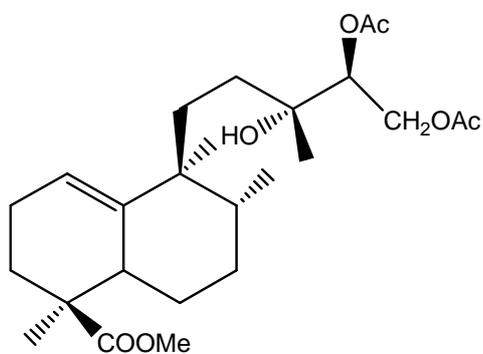
Une autre étude effectuée par J. G Urones et ses collaborateurs permis aussi d'isoler une série des diterpenes esters à squelette *ent*-halimane et sont les suivants ; méthyle(13S,14S)-époxy-15-hydroxy-1(10)-*ent*-halimen-18-oate **98**, méthyle (13R,14R)-epoxy-15-hydroxy-1(10)-*ent*-halimen-18-oate **99**, méthyle 13R-hydroxy-14S,15-diacétoxy-1(10)-*ent*-halimen-18-oate **100**, méthyle-13S-hydroxy-14R,15-diacétoxy-1(10)-*ent* halimen-18-oate **101**, et méthyle-13S,15-dihydroxy-14-R-acétoxy-1(10)-*ent*-halimen-18-oate **102** [31]. En plus, deux diterpènes majoritaires **103** et **104** et six nouveaux esters isolés et identifiés pour la première fois, quatre d'entre eux possèdent une chaîne latérale insaturée ; méthyle 15-formyloxy-1(10)-13E-*ent*-halimadièn-18-oate **105**. méthyle 15-propionyloxy-1(10) ,13E-*ent*-halimadièn-18-oate **106**, méthyle 15-Z-cinnamoyloxy-1(10),13E-*ent*-halimadièn-18-oate **107**, méthyle 15-cinnamoyloxy-1( 10),13E-*ent*-halimadièn-18-oate **108**, méthyle 15-acétoxy-1(10)-*ent*-halimadièn-18-oate **109**, méthyle 13R-hydroxy-1(10) ,14-*ent*-halimadièn-18-oate **110**, méthyle 13S-hydroxy-1(10) ,14-*ent*-halimadièn-18-oate **111** [32].



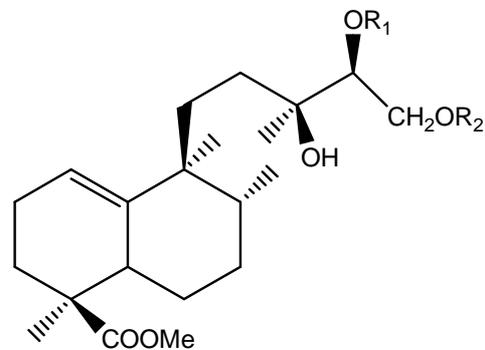
**98**



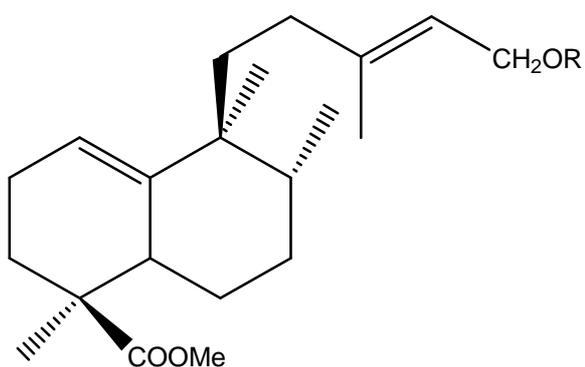
**99**



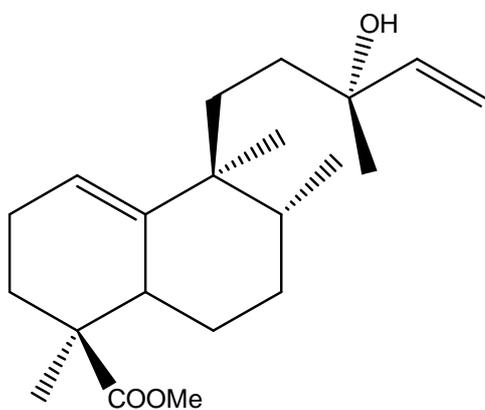
**100**



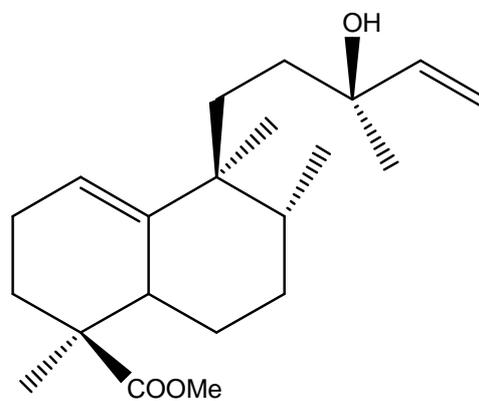
	R1	R2
<b>101</b>	Ac	Ac
<b>102</b>	Ac	H



	R
105	CHO
106	COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
107	<sup>Z</sup> CO-HC=CH-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
104	<sup>E</sup> CO-HC=CH-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>
109	Ac 13(14)-DIHYDRO
103	Ac
104	H

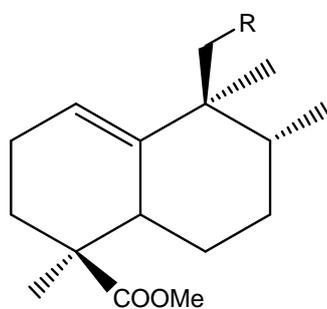


110



111

Deux autres diterpènes à squelette *nor-ent-halimane* ont été identifiés dans l'espèce *H. viscosium* méthyle 13,14,15,16-tetranor-12-hydroxy-1(10)-*ent*-halimen-18-oate **112**, et méthyle 14,15,16-trinor-1(10)-*ent*-halimen-13,18-dioate **113** [33].

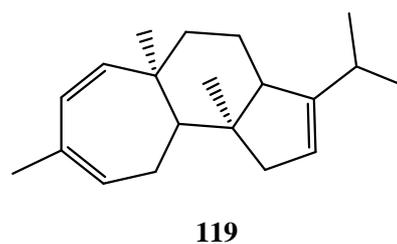
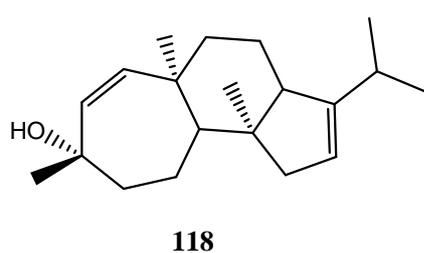
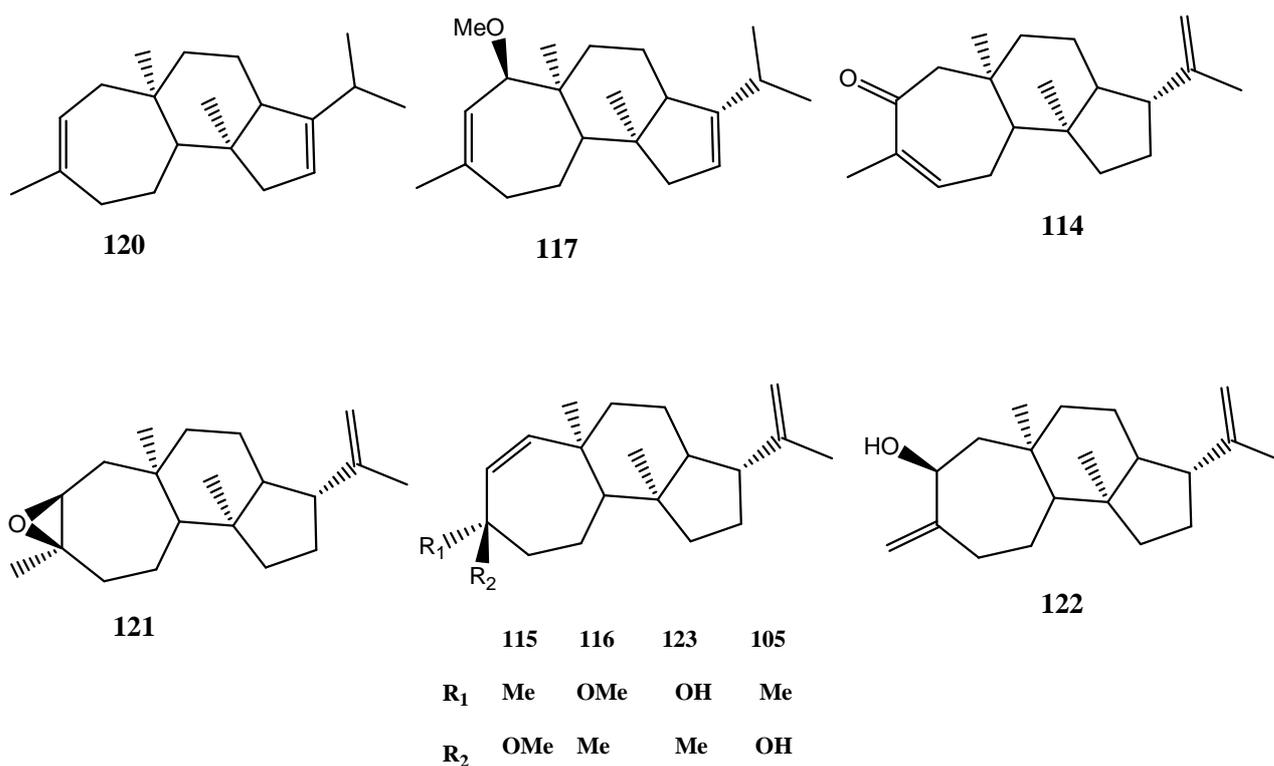


112 R = CH<sub>2</sub>OH

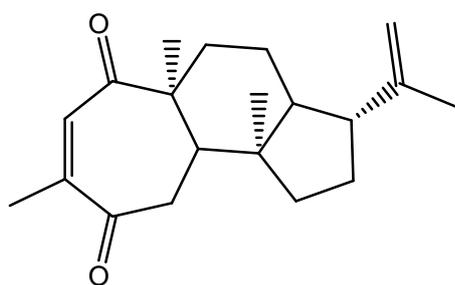
113 R = CH<sub>2</sub>COOMe

Plusieurs terpenoïdes di- et tri-cycliques à squelette valparane ont été isolés des parties aériennes de l'espèce *H. viscosium* ; ces terpenoïdes diffèrent par la position de doubles liaisons. Un autre diterpène tricyclique à squelette valparolane a été également identifié [34].

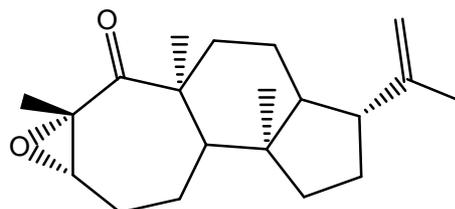
L'étude effectuée par J. G. Urone et ses collaborateurs a permis l'isolement des diterpenoïdes à squelette valparane, ils s'agit des: 3,15-valparadien-2-one **114**, 3 $\beta$ -méthoxy-1-15-valparadiène **115**, 3 $\alpha$ -méthoxy-1,15-valparadiène **116**, 1 $\beta$ -méthoxy-2,15-valparadiène **117**, deux à la deuxième série : 1,13-valparadien-3 $\alpha$ -ol **118**, 1,3,13-valparatriène **119**; 2,13-valparadiène **120**, 2,3 $\beta$ -époxy-15-valparène **121**, 3(19),15-valparadien-2 $\beta$ -ol **122**, 1,15-valparadien-3 $\beta$ -ol **123** [35].



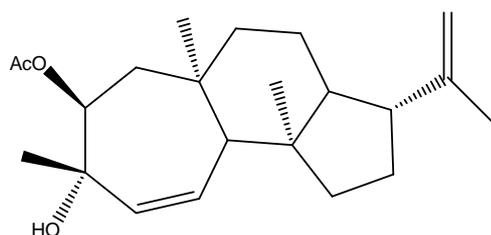
L'investigation chimique de l'espèce *H. viscosium* collectée du Portugal par L. Rodilla et ses collaborateurs a mené à l'isolement des diterpènes tricycliques à squelette valparane sont : valpara-2,15-diène-1,4-dione **124** et 3 $\alpha$ ,4 $\alpha$ -époxyvalpar-15-en-2-one **125** [42]. valpara-1,15-diène-3 $\alpha$ -ol **126**, valpara-3,15-diène-2 $\beta$ -ol **127**, 3 $\alpha$ -hydroxyvalpara-4,15-diène-2-one **128**, (4S)-2 $\beta$ -acétoxyvalparol-15-en-2-one **129**; 3 $\beta$ -acétoxyvalpara 4,15-diène-3 $\beta$  ol **130** ; valparola-2(4),15-diène-3-one **131**; 2 $\beta$ -acétoxyvalparol-8(14)-èn-3-one **132** [36].



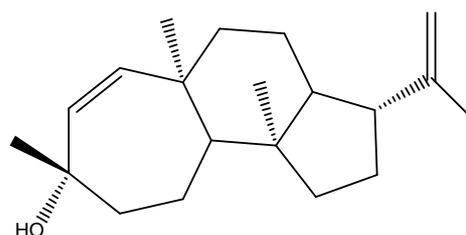
124



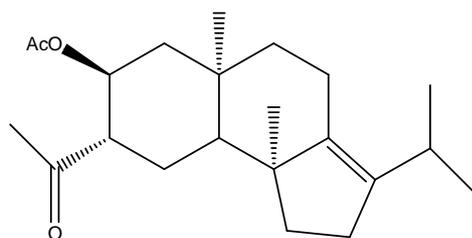
125



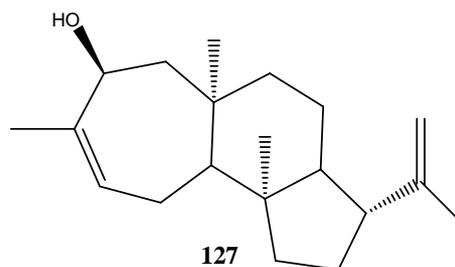
130



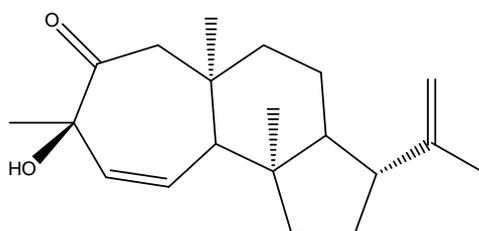
126



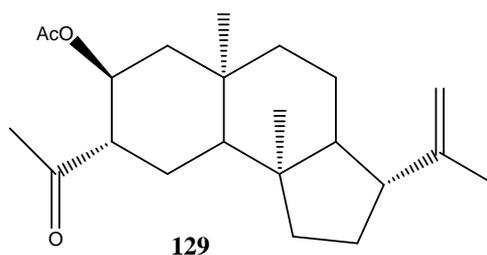
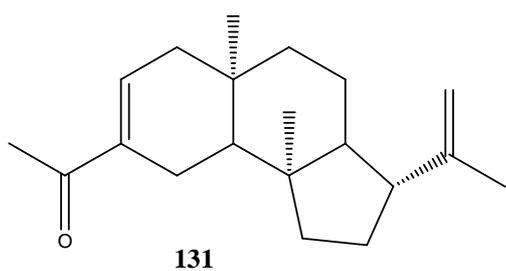
132



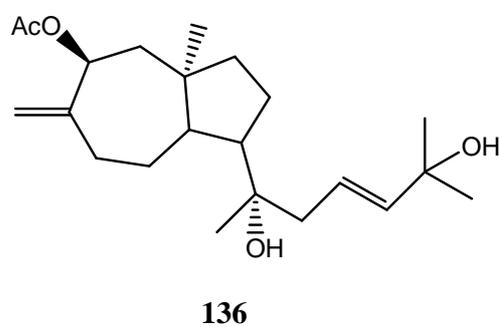
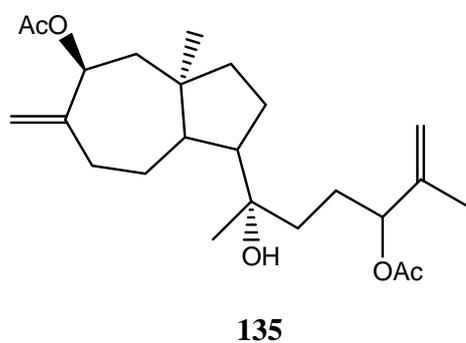
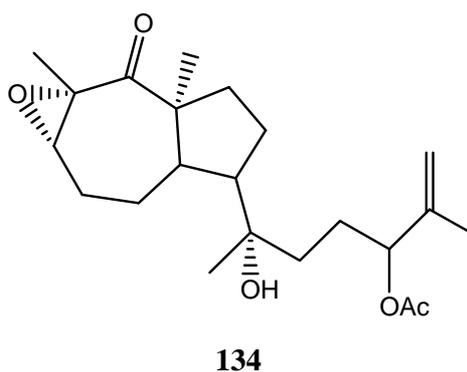
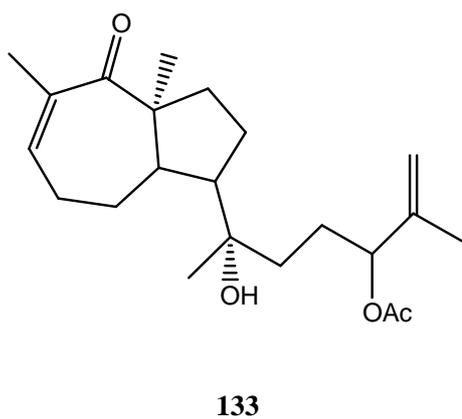
127



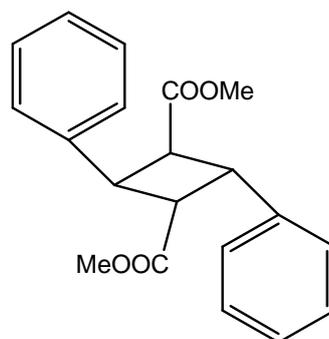
128



D'autres diterpènes à tormesane ont été isolés dans la fraction apolaire de l'espèce *H. viscosium* collectée à Fregeneda (Salamanque, Espagne) et sont : 15-acétoxy-8-oxo-6,16-tormesadièn-11-ol **133**, 15-acétoxy-8-oxo-6,7 $\alpha$ -epoxy-16-tormesen-11-ol **134**, 8,15-diacétoxy-7(20),16-tormesadièn-11-ol **135**, 8-acétoxy-7(20),14-tormesadiène-11,16-diol **136** [37].

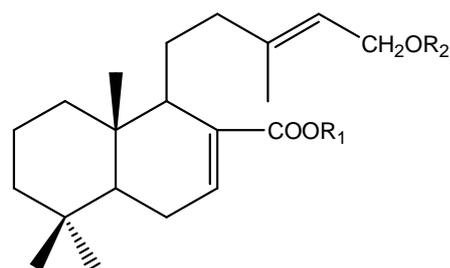
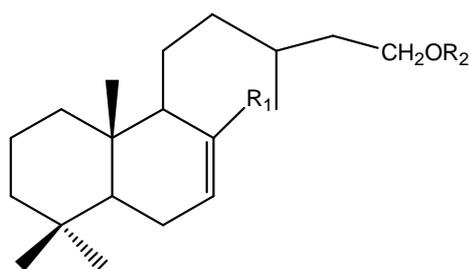


L'investigation phytochimique de l'extrait hexanique de l'espèce *H.verticillatum* a permis l'isolement de l'acide *trans*-cinnamique **137**, sa structure a été établie par les rayons X [38].



137

La présence des acides diterpéniques avec un squelette labdane a été aussi détectée. En effet, l'étude phytochimique de la fraction polaire de l'espèce *H.verticillatum*, a donné une série des esters labdaniques il s'agit les composés : 15-hydroxy-7-labden-17-oate **138**, methyl-15-hydroxy-7-labden-17-oate **139**, methyl-15-cinnamoyloxy-7-labden-17-oate **140**, methyl-15-isobutyloxy-7-labden-17-oate **141**, methyl-15-formyloxy-7-labden-17-oate **142**, methyl-15-isobutyloxy-7-13E-labdadien-17-oate **143** [39].



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
138	COOH	H

139	COOMe	H
-----	-------	---

140	COOMe	Cinn
-----	-------	------

141	COOMe	OCCH(Me) <sub>2</sub>
-----	-------	-----------------------

142	COOMe	OCH
-----	-------	-----

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
143	Me	OCCH(Me)

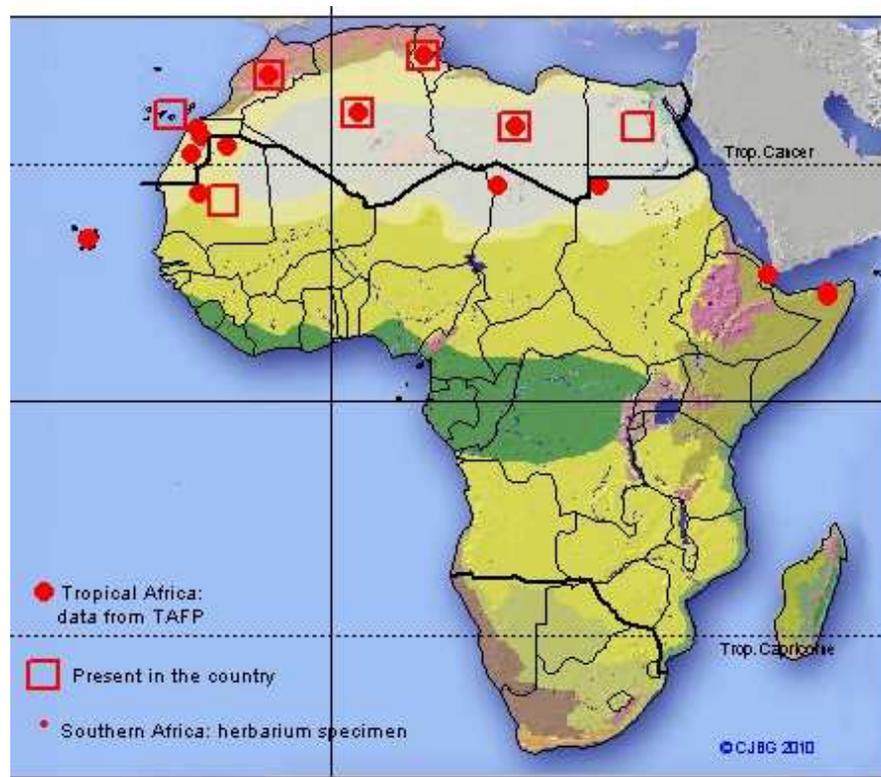
### 3. Etude botanique du genre *Helianthemum*

#### 3.1 Description botanique

Les hélianthèmes, comme toute la famille des Cistacées, sont des plantes de souche méditerranéenne et ce genre, encore assez bien représenté dans le Sahara septentrional, fait presque défaut dans le Sahara méridional et occidental où il n'est représenté que par *H. Lippi* [2] (figure 1.1).

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

La détermination, toujours difficile, repose en grande partie sur les caractères des sépales et notamment sur leurs dimensions ; par convention, celles-ci sont toujours données pour les sépales au stade fructifère, car ils s'accroissent après la floraison en persistant autour de la capsule [3].



**Figure.1.1** Distribution géographique des *hélianthemum*

### 3.2 Toxicité

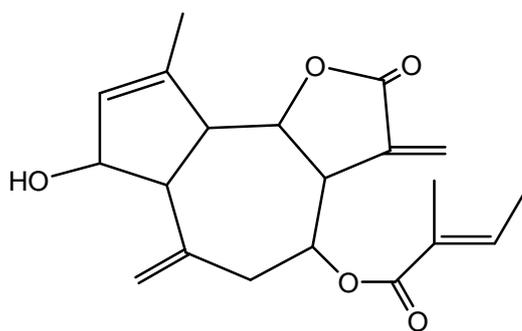
D'après les nomades, *H. lippii* ainsi que des espèces voisines-*H. tunetanum* Coss et *H. kahiricum* Del provoqueraient chez les dromadaires des boiteries. Cette maladie que les nomades connaissent sous le nom de *gaf* ou de *kraft* serait une sorte de rhumatisme du dromadaire (le FLOC'H, 1983, n° 269). Mais la toxicité de cette plante n'est pas bien établie. [6]

### 3.3 Activité biologique

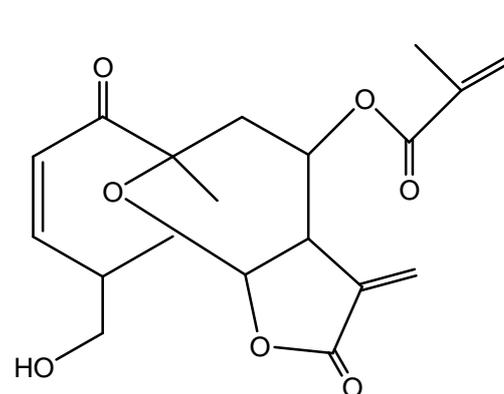
La médecine mexicaine traditionnelle utilise une grande variété de plantes dans le traitement des troubles gastro-intestinaux tels que diarrhée. Afin de comprendre les propriétés de certains constituants chimiques, trois flavonoïdes (kaempférol, tiliroside et (-)-épicatéchine) ont été isolés de *géranium mexicainum*, *pinetorium cuphea*, *glomeratum helianthemum* et *corrifolius rubus*, ont été analysés afin de démontrer leur activité anti-giardial [40].

### 4. Etude chimique du genre *Helianthemum*

L'étude phytochimique de l'espèce *H. Annum* a permis d'isoler les composés suivants : 2,8-dihydroxy-3-10(14), 11(13)-guaïatrien-12,6-olide ; (1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 6 $\alpha$ , 7  $\beta$ , 8 $\alpha$ )-form, 8-Angeloyl ( **141** [41] ; 5, 10-époxy-8, 15-dihydroxy-1-oxo-2,11(13)-germacradien-12,6-olide ; (2 $\beta$ , 4 $\beta$ , 5 $\beta$ , 6 $\alpha$ , 8 $\beta$ , 10 $\beta$ )-form, 8-angeloyl **142** [42].



141



142

## 5-L'espèce *Helianthemum Kahiricum*

### 5.1. Description botanique

C'est une chaméphyte très rameuse avec des tiges atteignant 40 à 50 cm de hauteur. Les feuilles petites sans pétioles, lancéolées ou très en moyenne, ressemblant à des feuilles de thym. Les sépales sont lancéolés aigus, de 4- 5 mm (parfois obtus, variété *libycum* pomel) (figure1.2).

Les fleurs apparaissent en grappes denses par comparaison aux autres espèces de même genre. La corolle est jaune et reste incluse dans le calice. C'est une espèce très répandue sur la steppe à armoise blanche dégradée [45].

### 5.2. Mode d'adaptation

Cette espèce s'adapte à la sécheresse par la réduction de la surface foliaire .En effet les feuilles très petites offrent à la plante l'occasion de minimiser les pertes d'eau par transpiration [45]



**Figure 1.2** *Helianthemum kahiricum*

### 5.3. Etude chimique

Une recherche bibliographique exhaustive réalisée sur l'espèce *Helianthemum kahiricum* a montré que cette dernière est très peu étudiée. La seule étude chimique concernant cette espèce réalisée par Javidinia. K se rapporte à la composition chimique d'huile essentielle obtenue à partir des parties aériennes de *H. kahiricum* Del. L'huile consiste principalement en acides gras (56,0%), l'acide hexadecanoïque (36,2%), l'acide tétradecanoïque (7,3%), l'acide linoléique (6,5%) et l'acide dodécanoïque (4,7%). avec les composés non terpéniques du total 69,2%. Les monoterpènes (14,0%) et les sesquiterpènes (9,8%) étaient présents dans l'huile en tant que composés minoritaires [4].

# Chapitre II

Etude des Flavonoïdes

## 2.1 Introduction

Le terme flavonoïde désigne une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux, structurellement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les antocyanes, et les tanins.

Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides [46].

Ils dérivent tous de la flavone (ou 2- phenylchromone) et existent le plus souvent à l'état naturel sous forme d'hétérosides (les flavonosides) [47].

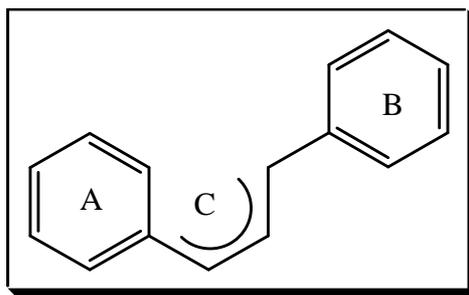
On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, ou ils peuvent être localisés dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs, et fruits [46].

Les flavonoïdes présentent une diversité structurale très importante. Ils sont reconnus pour leurs nombreuses activités biologiques, citons par exemple les activités antivirale, anti-inflammatoire, et anticancéreuse. Ces activités sont attribuées en partie, à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxydes ( $\cdot\text{H}$ ) et superoxydes ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) [46].

Les flavonoïdes constituent l'une des classes de composés les plus caractéristiques dans les plantes supérieures. Beaucoup de flavonoïdes sont facilement reconnus comme des pigments de fleurs dans la plupart des familles angiospermes (plantes à fleurs). Cependant leur présence n'est pas restreinte aux fleurs mais elle inclut toutes parties de la plante [48].

## 2.2 Structure chimique et classification

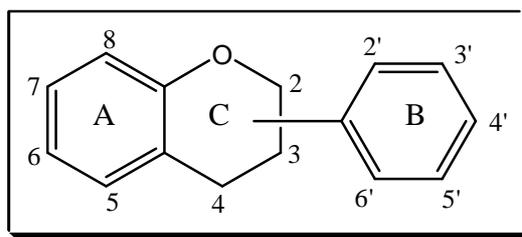
De nos jours, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils ont une origine biosynthétique commune et par conséquent, possèdent, tous un même squelette de base à quinze atomes de carbones, constitué de deux unités aromatiques, deux cycles en  $\text{C}_6$  (A et B), reliés par une chaîne en  $\text{C}_3$  (figure 1) [49].



**Figure 1: squelette de base des flavonoïdes**

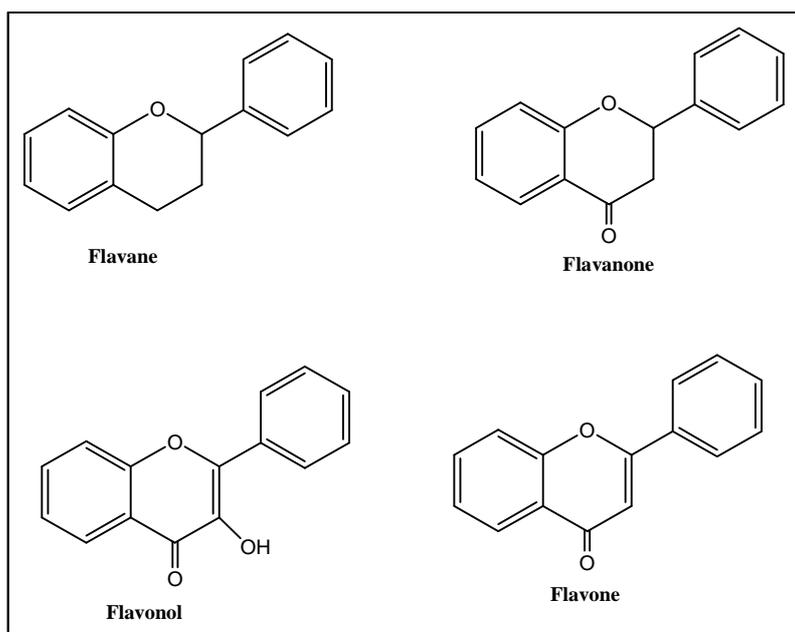
### 2.3 Classification

Tous les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes selon le degré d'oxydation du cycle pyranique central (la chaîne en C3 [49], le noyau B est relié à l'hétérocycle C dans les positions 2, 3 ou 4 (figure 2)



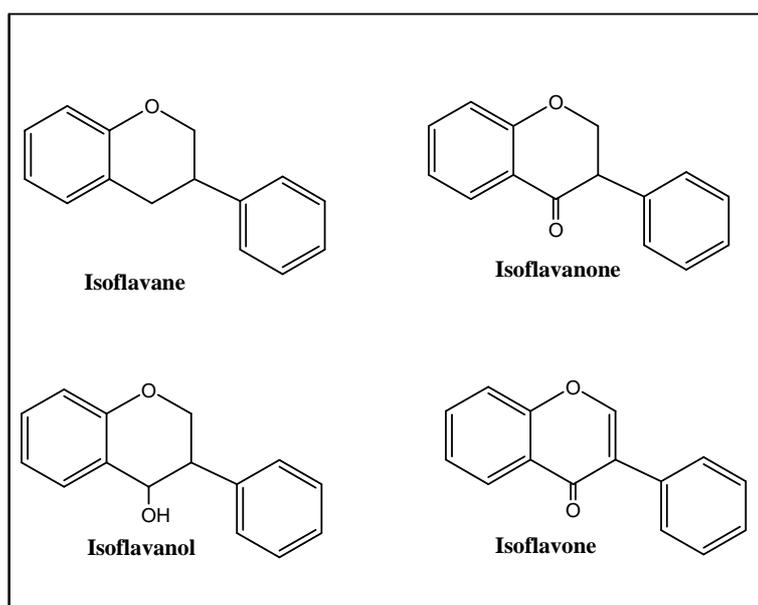
**Figure 2 : différentes positions du cycle B sur l'hétérocycle C**

- Dans la position 2, le flavonoïde est appelé **flavane**.
  - Si la position 4 de la flavane porte un groupement carbonyle, le flavonoïde est appelé **flavanone**.
  - Si la liaison C2-C3 dans le squelette de la flavanone est insaturée le composé est nommé **flavone**.
  - Si ce dernier est substitué en position 3 par un groupement hydroxyle, il est désigné par le nom de **flavonol** (figure 3).



**Figure 3 : structures de base de principaux types de flavonoïdes**

- Dans la position 3, le flavonoïde est désigné par le terme **isoflavone**
- Si la position 4 de l'isoflavane porte un groupement hydroxyle, le composé est désigné par le nom **isoflavanol**.
  - Si la position 4 de l'isoflavane porte un groupement carbonyle, le composé est appelé **isoflavanone**.
  - Si la liaison C2-C3 dans le squelette de l'isoflavanone est insaturée le composé est nommé **isoflavone** (figure 4).



**Figure 4 : structures de base de principaux types d'isoflavonoïdes.**

- Dans la position 4 avec un carbonyle en C-2 et une insaturation entre C-3 et C-4, le composé est dit néoflavone, ce type de composés est également appelé 4-aryl coumarine.

Par ailleurs, selon le degré d'hybridation des carbones de la chaîne en C-3 et le mécanisme de cyclisation de cette chaîne, on distingue d'autres squelettes flavoniques telles que les chalcones, les dihydrochalcones et les auronnes (figure 5).

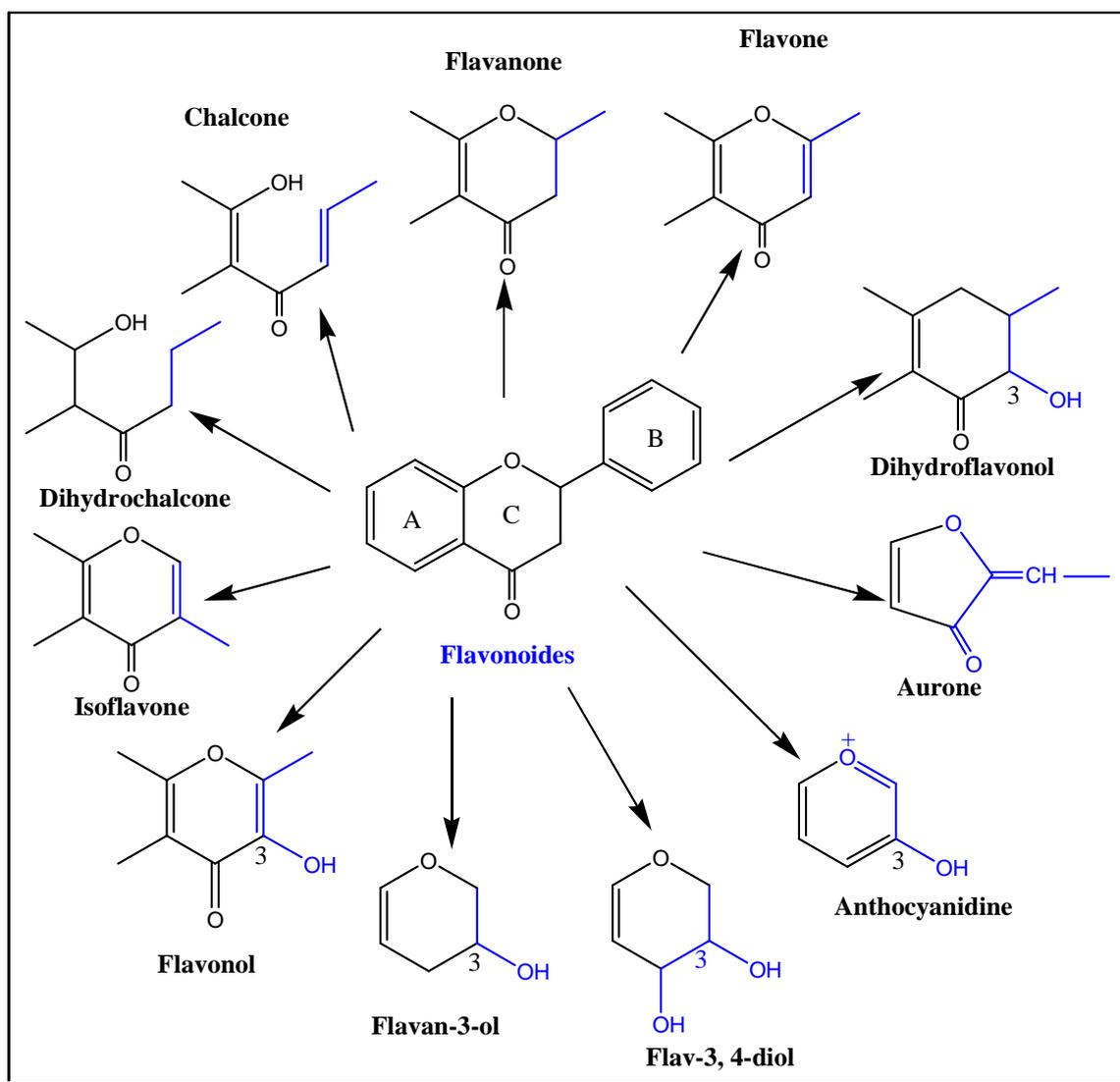


Figure 5 : Représentation des principaux groupes de flavonoïdes

## **2.4 La biosynthèse des flavonoïdes**

La biosynthèse des flavonoïdes (figure 6) se fait à partir d'un précurseur commun, la 4, 2',4',6'-tétrahydrochalcone. Cette chalcone de couleur jaune est métabolisée sous l'action d'une enzyme, la chalcone isomérase, en flavanone (1) : naringénine. C'est sur cette dernière qu'agit ensuite la flavone synthase ou la (2S)-flavanone-3-hydroxylase pour donner la formation de la flavone (2) : apéginine ou le dihydroflavonol (3) : (2R, 3R)-dihydrokampférol, respectivement. Les deux enzymes fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les carbones C-2 et C-3, tandis que la deuxième catalyse l'hydroxylation du carbone C-3. Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol (4) : kampferol ou en flavan-3,4-diol (5) : leucoanthocyanidol (7), (figure 6) sous l'action de la 3-O-glycosyl-transférase, se transforme en anthocyanoside(8) : pélargonidol-3- glucoside (figure 6).

Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles, et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire.

A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs de leurs fonctions hydroxyles sont alors glycosylées. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone [49].

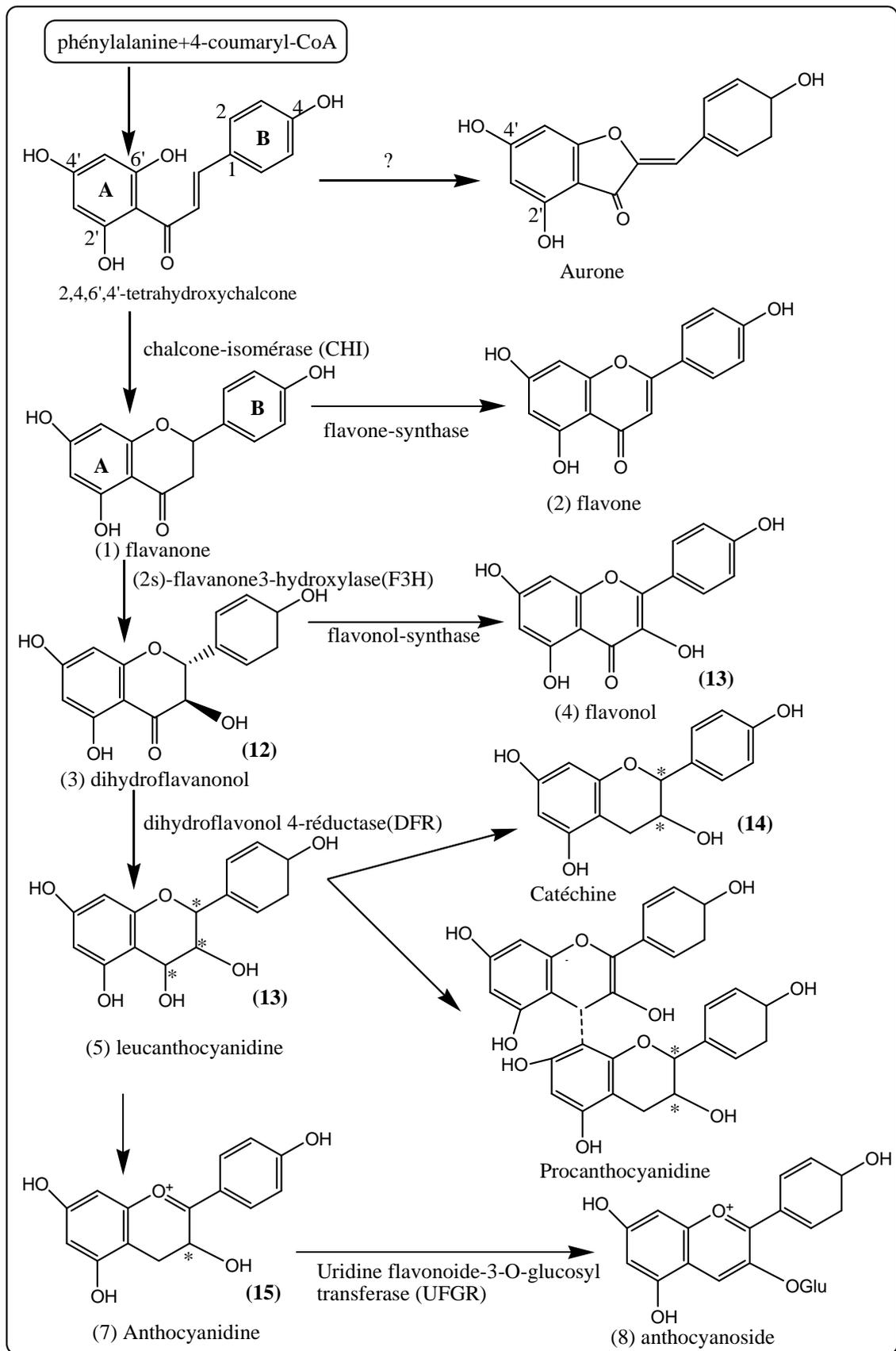


Figure 6 : la biosynthèse des flavonoides (bruneton, 1999)

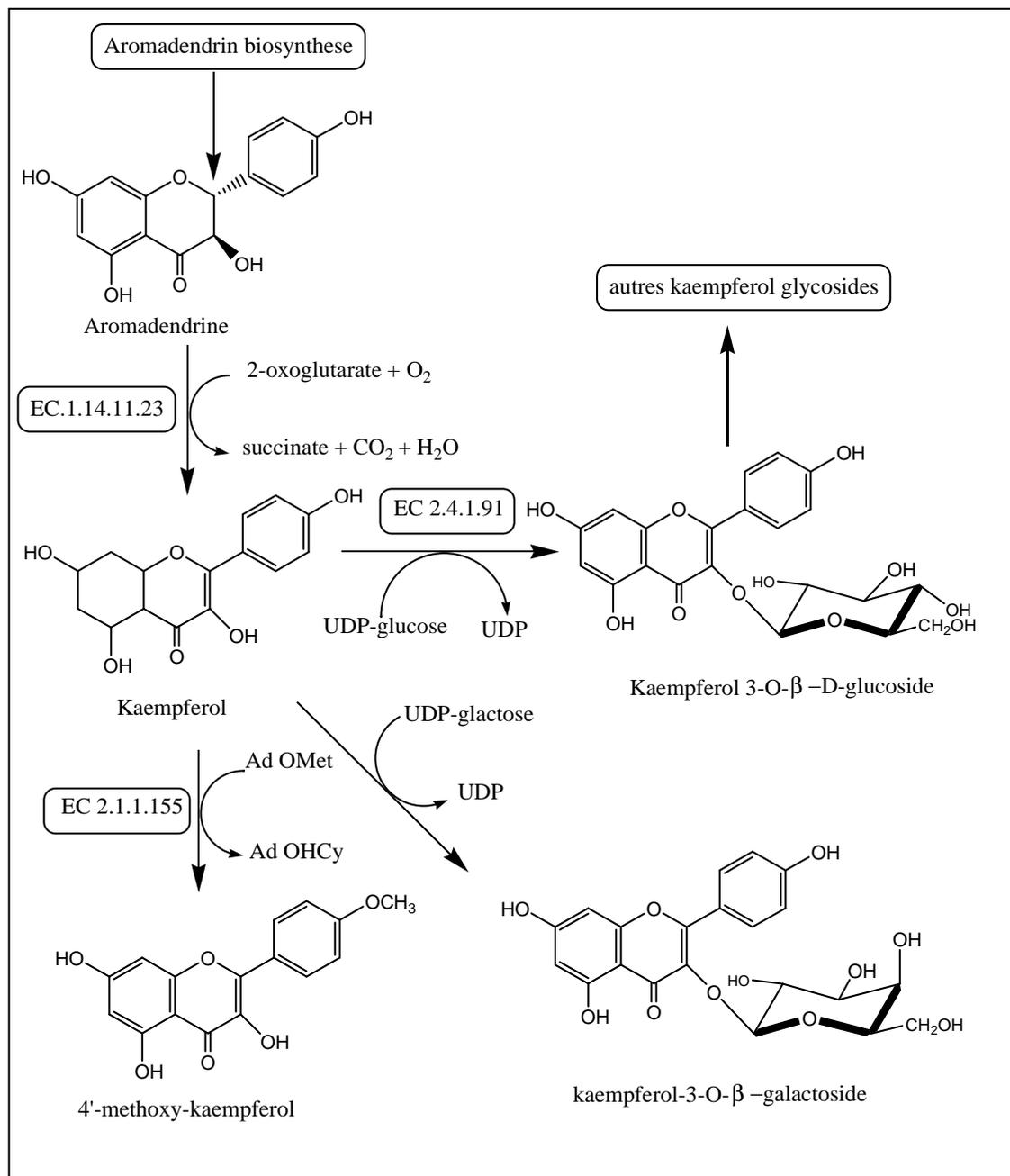
## 2.5 Le Kæmpferol

Le kaempferol est un flavonoïde naturel, dérivé de 3-hydroxy-2-phenylchromen-4-one, peut se trouver principalement dans le thé, le brocoli, le ginkgo [49], le pamplemousse. Il s'agit d'un cristal jaune, il donne aux fleurs d'*Acacia decurrens* et *Acacia longifolia* leur couleur. Il a un point de fusion 276-278 °C et il est peu soluble dans l'eau.

Le Kæmpferol est un puissant antioxydant et aide à prévenir les dommages oxydatifs de nos cellules, des lipides et l'ADN. Kaempferol semble prévenir l'artériosclérose en inhibant l'oxydation des lipoprotéines de basse densité et la formation de plaquettes dans le sang.

Des études ont également confirmé que les actes kaempferol comme agent chimio-prévention, ce qui signifie qu'il inhibe la formation de cellules cancéreuses [49] (figure 7) et (figure 8).

## 2.5.1 Biosynthèse du Kaempferol



**Figure7 : schéma illustrant les différentes réactions enzymatiques conduisant aux Kaempferols**

## 2.5.2 Biosynthèse de Kaempferol Glycoside

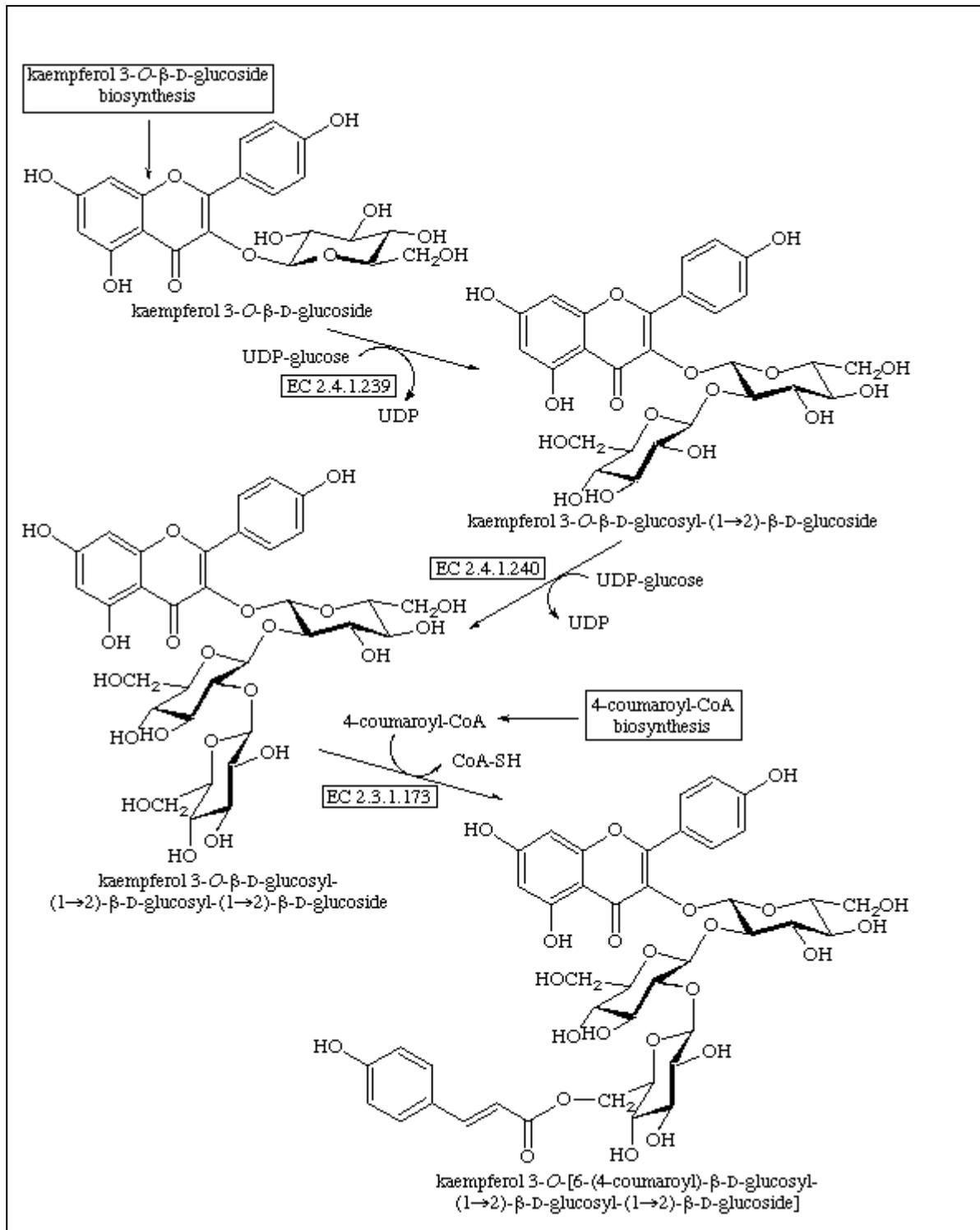


Figure 8 : schéma illustrant les différentes réactions enzymatiques conduisant à la Biosynthèse de Kaempferol Glycoside

## 2.6 Substitution du squelette flavonique

Les substitutions du squelette flavonique sont très diversifiées, on y trouve notamment des hydroxylations, des méthoxylations et des glycosylations. Les composés de chaque sous-groupe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C-3 intermédiaire [45].

### 2.6.1. La O- substitution

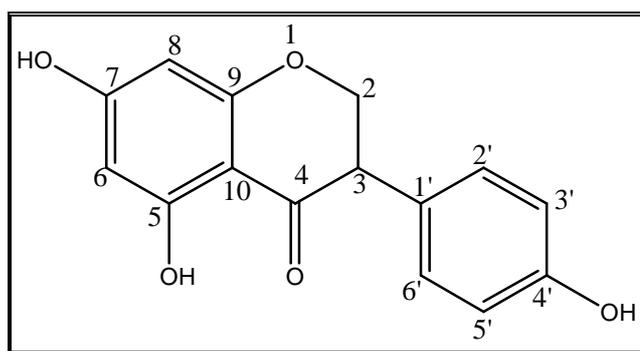
#### 2.6.1. a. L'hydroxylation

D'une manière générale pour les flavones et les flavonols, et d'après les réactions de biogénèse, les hydroxyles en positions 5 et 7 du noyau A et l'hydroxyle en position 4' du noyau B sont considérés comme originaux et existent avant la constitution du noyau chalcone [50].

L'hydroxylation du noyau B dans la position 3' se fera après la fermeture de l'hétérocycle C, c'est –à-dire après la formation du squelette chalcone, tandis que la polyhydroxylation sur le noyau B (les positions 3', 4', 5') se fera par le biais des enzymes (hydroxylases) [51].

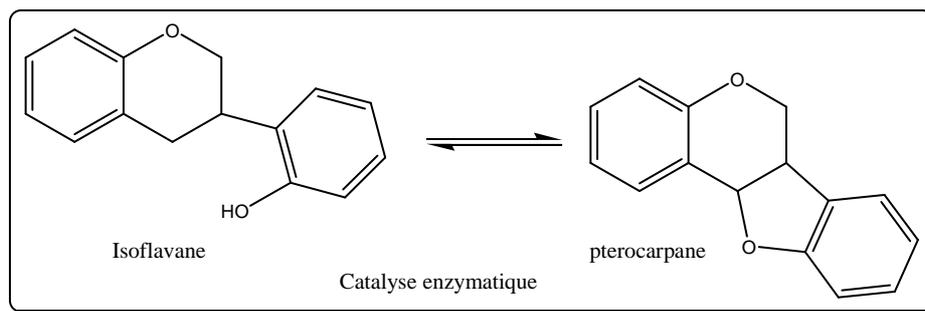
Les positions 2' et 6' du cycle B sont rarement hydroxylées [52].

#### Exemple



**4', 5,7–trihydroxyisoflavone (génistéine) [53].**

Dans le cas des isoflavones, l'hydroxylation de la position 2' du cycle B conduit le plus souvent en présence des enzymes spécifiques à la formation du ptérocarpane (figure 9) [54].



**Figure 9 : transformation de l'isoflavane en pterocarpane**

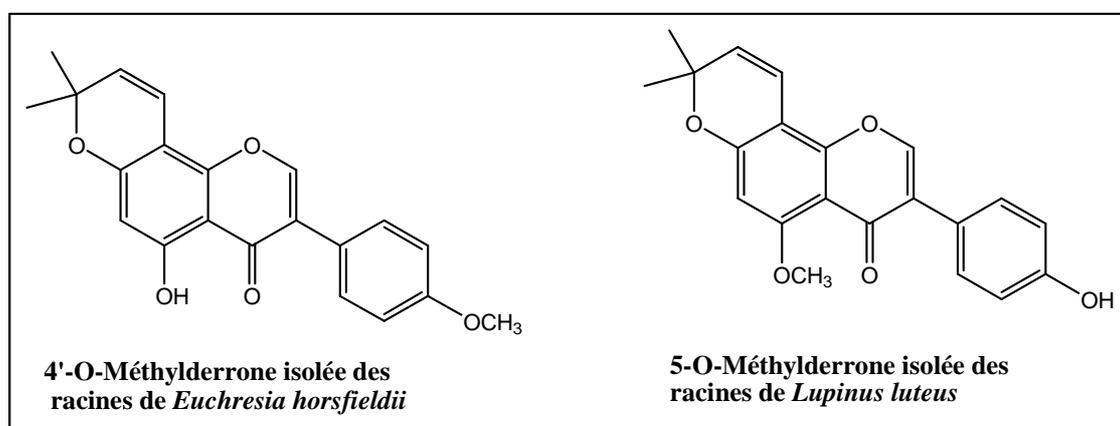
### 2.6.1b La méthylation

La fixation du groupement méthyle se fait après celle du groupement hydroxyle et nécessite la présence d'une enzyme (O-méthyltransferase) qui joue le rôle de transporteur à partir de la S-adenosyl-méthionine (SAM) qui représente le donneur du radical méthyle. Cette transformation se fera avant la formation du noyau chalcone [55-56].

Cette réaction de méthylation peut également se faire sur le noyau A (carbones 5, 6, 7, 8), noyau B (carbones 2', 3', 4', 5') et l'hétérocycle C (carbone 3) après la formation du noyau chalcone dans le cas de flavones et flavonols [55].

Cependant, très peu de rapports parlent de la relation isoflavone-méthyltransferase. Par ailleurs la méthylation de la position 5 du cycle A et la position 4' du cycle B dans le cas de l'isoflavone se fait grâce à une enzyme séparée et purifiée par Khouri [57], on peut citer à titre d'exemple les deux isoflavones méthoxylés en positions 4' et 5' [58-59].

#### Exemple :



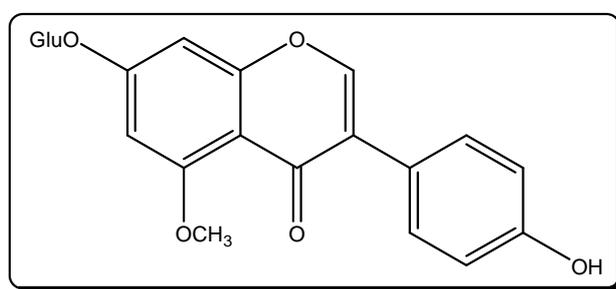
### 2.6.1c La O-glycosylation

La liaison s'établit entre un hydroxyle phénolique et un autre hydroxyle alcoolique d'un sucre tel que le glucose, le rhamnose, le xylose, l'arabinose, le mannose, le fructose etc....

Un deuxième sucre peut se rattacher à la structure flavonique soit avec un autre OH phénolique soit avec le OH alcoolique du sucre déjà fixé.

La O-glycosylation se fait préférentiellement avec l'hydroxyle de la position 7 qui constitue le site préférentiel de la glycosylation dans le cas des flavones et les flavanones et en position 3 chez les flavonols [60].

### Exemple :



**5-O-methylgenistein-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside**

## 2.6.2 La C- substitution

### 2.6.2.a. La C-méthylation

Le méthyle est lié au cycle benzénique par une liaison carbone-carbone, cette liaison est rencontrée en position 6 ou en position 8, ou encore en positions C-6 et C- 8. L'enzyme catalysant la C-méthylation en positions 6 et /ou 8 est toujours inconnue [61].

### 2.6.2c La C- glycosylation

Le sucre est lié directement au cycle benzénique par une liaison carbone- carbone la liaison se fait entre le carbone du sucre et celui en positions 6 ou 8 de la génine qui est le plus souvent une isoflavone. Cette liaison résiste à l'hydrolyse acide [62].

## 2.7 Propriétés des flavonoïdes

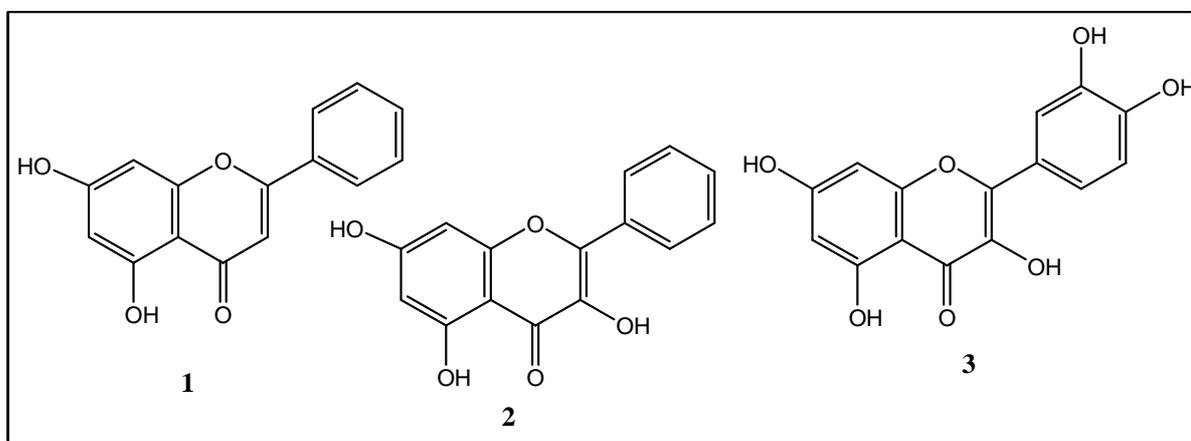
Les flavonoïdes sont présents dans toutes les parties des végétaux supérieurs : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollens, fruits, graines, bois... . Certains flavonoïdes sont plus spécifiques de certains tissus. Les anthocyanes sont plutôt localisés dans les parties externes des fruits, des fleurs et des feuilles. Les chalcones se trouvent plus fréquemment dans les pétales des fleurs [63].

Une des propriétés majeures des flavonoïdes est de contribuer à la couleur des plantes et notamment à celle des fleurs. Or, c'est par la couleur de ses fleurs que la plante exerce un effet attracteur sur les insectes et les oiseaux pollinisateurs, assurant par ce biais une étape fondamentale de sa reproduction. On peut également noter que les flavonoïdes, en repoussant certains insectes par leur goût désagréable, peuvent jouer un rôle dans la protection des plantes [64].

Les flavonoïdes montrent d'autres propriétés intéressantes dans le contrôle de la croissance et du développement des plantes en interagissant d'une manière complexe avec les diverses hormones végétales de croissance. Certains d'entre eux jouent également un rôle de phytoalexines, c'est-à-dire de métabolites que la plante synthétise en grande quantité pour lutter contre une infection causée par des champignons ou par des bactéries.

Par ailleurs, les flavonoïdes présentent un intérêt thérapeutique qui date de la découverte de la vitamine C par Szent Gyorgyi (prix Nobel, 1937), chercheur de l'université de Szeged (Hongrie).

Le monde animal est lui aussi très concerné par les flavonoïdes. On trouve par exemple de la chrysin (**1**), de la galangine (**2**) de la quercétine (**3**), dans la propolis des abeilles.



Si tous les flavonoïdes n'absorbent pas dans le domaine visible, ils présentent tous une bande dans l'ultraviolet proche du visible [65].

Certains dont l'absorption en UV est importante, protègent la plante vis-à-vis des rayons UV-B de la lumière du soleil [66].

Les flavonoïdes sont essentiellement des médicaments de l'insuffisance veineuse par action sur la microcirculation. Ils diminuent la perméabilité des capillaires sanguins et augmentent leur résistance. Cette action est appelée «vitaminique P».

Différents mécanismes sont évoqués pour expliquer cette activité :

- Des propriétés antioxydantes, piègeurs de radicaux libres.
- Des propriétés inhibitrices d'enzymes...

À coté de cette action principale « vitamine P», les flavonoides présentent plusieurs activités : anti-virales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, anti-allergiques, anti-cancéreuses [65] ainsi que d'autres activités particulières : diurétiques, et antispasmodiques.

## 2.8 Emplois en thérapeutique

Les flavonoides, seuls ou associés, sont prescrits dans les indications suivantes : traitement de troubles en rapport avec une insuffisance veineuse : jambes lourdes, crampes, œdèmes, varices...etc.

- traitement de la crise hémorroïdaire.
- en ophtalmologie lors de troubles liés à la circulation rétinienne.
- métrorragies liées à la présence d'un dispositif intra-utérin.
- traitement de la fragilité capillaire au niveau de la peau et des muqueuses [67].

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'une alimentation riche en polyphénols diminue le risque de cancers, d'affections cardiovasculaires et d'autres maladies chroniques.

Ces effets sont confirmés dans diverses études :

- En ce qui concerne le cancer, il est établi qu'une consommation régulière de fruits et de légumes diminue le risque de cancer jusqu'à 50 % [68]
- En ce qui concerne les maladies cardiovasculaires, les données relatives à l'influence des flavonoïdes restent fragmentaires [69], et les résultats ne sont pas concluants [70].

- Leur intérêt comme antioxydants se manifeste également dans le domaine de la protection contre le stress photo-oxydant cutané induit par l'exposition aux rayons solaires [71].

De plus en plus de travaux tentent à l'heure actuelle de cerner les effets protecteurs de certains aliments particuliers. C'est ainsi que le thé est l'objet de plusieurs études [72], c'est l'une des principales sources d'apport de flavonoïdes [73].

Parmi les flavonoïdes dont les activités sont reconnues, on a des flavonols comme la quercétine, le kaempferol, la myricétine et des flavones comme l'apéginine et la lutéoléine. Ces composés existent dans 28 légumes et 9 fruits dont les pommes, les oignons... etc. [74].

Des études épidémiologiques sur des femmes chinoises (400 personnes saines et 200 malades ayant le cancer du sein) ont montré qu'une alimentation riche en Soja diminue considérablement les risques d'attaque du cancer du sein [75].

Ces maladies, appelées aussi phyto-œstrogènes, ont fait l'objet de nombreux travaux de recherche. En effet, des études épidémiologiques ont prouvé l'action de ce type de molécules sur les risques de certains cancers et maladies du cœur [76].

## 2.9 Relation structure-activité

### 2.9.1 Cas des flavones flavonol

La preuve des effets protecteurs des anti-oxydants est fondée sur diverses études. Il a été montré que les flavonoïdes agissent comme des fixateurs de plusieurs espèces oxydantes ; tel que l'anion peroxyde ( $O_2^-$ ), le radical hydroxyle ou les radicaux peroxydes.

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

- La présence du groupe hydroxyle 3-OH lié à la double liaison C-2=C-3, et son emplacement adjacent au groupement carbonyle de l'hétérocycle (C) en position C-4 est exigé pour la grande efficacité de l'activité antioxydante [77]. Cette activité atteint son maximum quand le noyau B est substitué par un système orthodihydroxyle.
- La O-méthylation des substituants hydroxyles du squelette flavonique réduit l'activité antioxydante des flavonoïdes [78-79].

- Les groupements hydroxyles en positions 3, 5, 7, 3', 4' participent dans l'inhibition de la peroxydation lipidique [73]
  - La capacité antioxydante des flavonoïdes revient à leurs aptitude à former des chélates métal-ion, par l'ensemble (3-hydroxy, 4-oxo) ou (5-hydroxy, 4-oxo) [80].
- Les groupes hydroxyles 5-OH, 7-OH, et la double liaison C-2=C-3 qui sont des sites potentiels de réactivité, sont essentiels pour l'activité inhibitrice des flavonoïdes de l'enzyme xanthine oxydase et du radical peroxyde produit par ce dernier [81].

### 2.8.2 Autres activités des polyphénols

Les polyphénols, métabolites exclusivement d'origine végétale, apparaissent comme des molécules d'un grand intérêt. Ils démontrent des propriétés préventives contre un nombre important de maladies. En effet, un nombre considérable d'études a mis en évidence leurs diverses activités : anti-oxydantes ; antiradicalaires [82-83], anti-inflammatoire [84-85], antihypertenseurs [86], anticancéreux [87], anti allergique [88], antivirales [89], et activité phytoestrogène [90].

## 2.10 Analyse structurale des flavonoïdes

### 2.10.1 Généralités

L'identification des structures flavoniques est basée essentiellement sur les différentes techniques spectroscopique telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN) avec ses différents techniques ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, etc....), la spectrométrie de masse (SM) avec différents type d'ionisation : impact électronique (IE), ionisation chimique (IC) et bombardement des atomes accélérés (FAB) ainsi que la spectrophotométrie UV-visible qui reste la méthode de choix pour ce type de composés [91-92]. Elle donne des indications importantes sur la nature du flavonoïde. Toutefois, la fluorescence sous lumière UV et les valeurs de leur  $R_f$  dans différents systèmes de solvants donnent des informations utiles.

### 2.10.2 Facteur de retardement et comportement chromatographique

Ce facteur symbolisé par  $R_f$  est défini comme étant le rapport de la distance entre la tâche du produit et l'origine d'une part et la distance entre l'origine et le front de solvant d'autre part.

La valeur du Rf varie avec la nature du solvant utilisé (organique ou aqueux), le type de support chromatographique (gel de silice, polyamide, cellulose), la forme du produit lui-même (aglycone ou glycosyle), ainsi que de la disposition des différentes substitutions du squelette flavonique [91-93].

### 2.10.3 La fluorescence sous lumière de wood

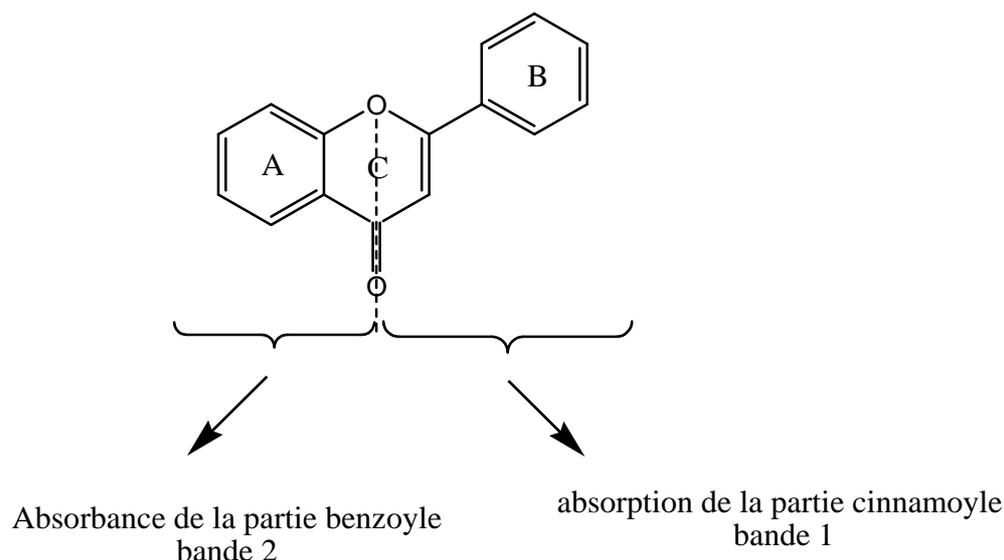
L'absorption des substances flavoniques sous lumière de wood à la longueur d'onde de 365 nm donne des renseignements préliminaires sur la structure chimique. Le tableau suivant montre la relation entre la fluorescence et la structure chimique [91]

La fluorescence	Les structures possibles
Violette noire	Flavones avec 5,6, 7 ou 5, 7, 8 trihydroxy-flavone Flavonol avec 3-OR Chalcones
Bleue	Flavone ou flavonol sans OH en 5 Flavanone avec OH en 3 ou flavanol Flavonol avec 3-OH et sans 5-OH
Jaune ou jaune terne	Flavonol avec 3-OH, et avec ou sans 5-OH
Orange fluorescente	Isoflavones
Jaune-verte	Aurones
Bleue-verte	Flavanone sans 5-OH

### 2.10.4 La spectrophotométrie UV-Visible

C'est la méthode la plus importante pour l'identification des structures flavoniques.

Elle est basée essentiellement sur l'enregistrement d'un spectre dans un milieu alcoolique (méthanol ou éthanol) qui sera caractérisé par deux bandes d'absorption principales [94].



- **Bande 1**: présentant un maximum d'absorption entre 300 et 400 nm, elle est attribuée à l'absorption du système cinnamoyle qui résulte de la conjugaison du groupement carbonyle avec la double liaison (C2=C3) et le noyau B, elle donne donc, des renseignements sur les variations structurales du cycle B et l'hétérocycle C.
- **Bande 2**: présentant un maximum d'absorption entre 240 et 280 nm, elle est attribuée à l'absorption du système benzoyle qui dérive de la conjugaison du groupement carbonyle avec le noyau A et donne des informations sur les variations structurales du cycle A [95].

Le tableau donne l'intervalle du maximum d'absorption des deux bandes en milieu méthanolique pour quelques types de flavonoïdes.

Type de compos flavonique	Bande 1	Bande 2
Flavone	320-350	250-270
Flavonol	352-385	250-280
Flavanone	300-330	245-275
isoflavone	300-330 EP	245-275

Le maximum d'absorption d'une telle ou telle bande dépend du nombre et de la position des groupements hydroxyles ou méthoxyles sur le squelette flavonique.

L'augmentation du nombre de groupements hydroxyles fait déplacer le maximum d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevées, par contre la substitution des groupements hydroxyles par des groupements méthoxyles ou glycosyles fait déplacer ce maximum vers des longueurs d'onde plus faibles [95].

### 2.10.4.1 Addition de réactifs (série spectrale UV)

Le spectre méthanolique d'un composé flavonique sera modifié par addition d'un certain nombre de réactifs tels que NaOH, NaOAc, AlCl<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> et HCl. ces derniers réagissent avec les groupements hydroxyles par formation de complexes qui se traduira sur le spectre UV par des déplacements bathochromiques ou hypsochromiques des bandes d'absorption, permettant la localisation des hydroxyles libres sur le squelette flavonique.

#### 2.10.4 1a Spectre en présence de NaOH

NaOH ou NaOMe, une base forte, ionise tous les hydroxyles phénoliques du squelette flavonique. Il en résulte un effet bathochrome sur les deux bandes 1 et 2. Cet effet est plus important sur la bande 1. Les flavonoïdes très hydroxylés sont instables en présence de ce réactif, particulièrement pour les flavonols ayant un hydroxyle libre en 4'. Ce déplacement bathochrome suivi d'une variation de l'intensité lumineuse de la bande 1 renseigne sur le nombre et la position des hydroxyles libres [75]. L'apparition d'une nouvelle bande entre 320 et 335 nm par rapport au spectre MeOH, indique l'existence d'un OH libre en C7.

#### 2.10.4.1b Spectre en présence de NaOAc

L'acétate de sodium, NaOAc, base faible ionise les hydroxyles phénoliques les plus acides de la molécule, soit les groupes 7-OH, 4'-OH et 3-OH.

Un faible déplacement bathochrome de la bande 2 des flavones, et des flavonols traduit la présence d'un hydroxyle libre en 7. Cet effet peut être perturbé par la présence d'autres substituants en 6 ou en 8 [80].

#### 2.10.4.1c Spectre en présence de NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Pour réaliser ce spectre, l'acide borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) est additionné à l'échantillon en présence de NaOAc. Ce spectre renseigne sur la présence ou l'absence de système orthodihydroxyle sur le cycle B (3', 4') ou sur le cycle A (6, 7 ou 7, 8) suite à la formation des chélates dont l'effet se manifeste par un déplacement bathochrome de la bande 1 [91].

#### 2.10.4.1d Spectre en présence de $\text{AlCl}_3$ et $\text{AlCl}_3+\text{HCl}$

La présence du chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) dans la solution méthanolique mène à la formation de complexes entre les hydroxyles ortho du flavonoïde d'une part et les hydroxyles des positions 3 et 5 et la fonction carbonyle d'autre part. La formation de ces complexes se traduit par un effet bathochrome de la bande 1 par rapport au spectre pris dans le MeOH. Les complexes formés entre  $\text{AlCl}_3$  et les groupes ortho dihydroxyles des noyaux aromatiques A et B sont instables et se décomposent en présence de HCl [95], par contre, ceux formés entre  $\text{AlCl}_3$  et les hydroxyles 5-OH ou 3-OH et la fonction carbonyle sont stables [96-97]. Ces effets se manifestent sur le spectre UV par un déplacement hypsochrome de la bande 1, par rapport au spectre après addition de  $\text{AlCl}_3$  et un déplacement bathochrome moins important par rapport au spectre dans le MeOH

#### 2.10.4.2 L'hydrolyse acide des hétérosides

Cette manipulation concerne dans un premier temps les flavonoïdes O-glycosylés, elle renseigne sur la nature du sucre qui peut être étudié une fois détaché ainsi que celle de l'aglycone. L'identification du sucre se fait par co-chromatographie avec des échantillons authentiques.

Les hétérosides C-glycosylés résistent à l'hydrolyse acide, cette propriété permet de différencier ce type de liaison dans les flavonoïdes glycosylés.

#### 2.10.5 La spectrométrie de masse

Cette technique permet la détermination du pic moléculaire des aglycones qui donne globalement le nombre et la nature des substituants hydroxyles ou méthoxyles [98-99]

Les pics de fragmentation caractéristiques fournissent des renseignements utiles, notamment sur les structures de substitution des noyaux A et B [100]. Cette technique connaît un véritable succès dans ce domaine avec le développement de divers mode d'ionisation permettant l'analyse des structures glycosylées à l'état natif tels que la FAB, et l'électro-spray.

### 2.10.6 La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La spectroscopie de résonance magnétique nucléaire trouve un grand emploi pour la détermination des structures flavoniques. C'est une méthode précise et efficace, mais nécessite une grande quantité du produit ce qui limite son utilisation par rapport aux autres méthodes d'analyses.

- **La RMN du proton (RMN<sup>1</sup> H)** informe sur l'environnement des différents protons flavoniques qui résonnent généralement entre 6 et 8 ppm elle permet de connaître [99-100].

- La position et le nombre de divers protons portés par le flavonoïde,
- Le nombre de substituants méthoxylés porté par le squelette flavonique,
- Le nombre et la nature des sucres liés à l'aglycone.

- **La RMN du carbone 13 (RMN <sup>13</sup>C)** donne des informations utiles et parfois nécessaires pour mieux identifier la molécule telles que [95] :

- Le nombre total d'atomes de carbone du composé flavonique ainsi que leur environnement
- La connaissance de type des liaisons -C et / ou -O sucre.

# Chapitre III

**Isolement des composés et  
détermination de leurs structures**

### **3.1. Extraction**

Les parties aériennes (feuilles et tiges) de la plante sont séchées puis finement broyées. Un kilogramme (01 kg) de la poudre obtenue est mis à macérer pendant 48 heures dans un mélange méthanol-eau (80/20 : v/v). Cette opération est répétée trois fois avec un renouvellement du solvant. Après filtration et concentration à chaque fois, la phase aqueuse obtenue subit une série d'extraction liquide-liquide par des solvants non miscibles à l'eau et de polarité croissante ; d'abord par l'éther de pétrole qui élimine la chlorophylle et les lipides, puis par le chloroforme qui extrait les produits peu polaires et enfin par le n-butanol qui entraîne les composés polaires et la majorité des hétérosides. Les phases organiques sont séchées sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrées et évaporées à sec.

Ainsi, il a été récupéré 2 g de l'extrait éthéropétrolique, 6 g de l'extrait chloroformique et 15 g de l'extrait butanolique ; l'ensemble de ces opérations d'extraction est résumé dans le schéma 3-1.

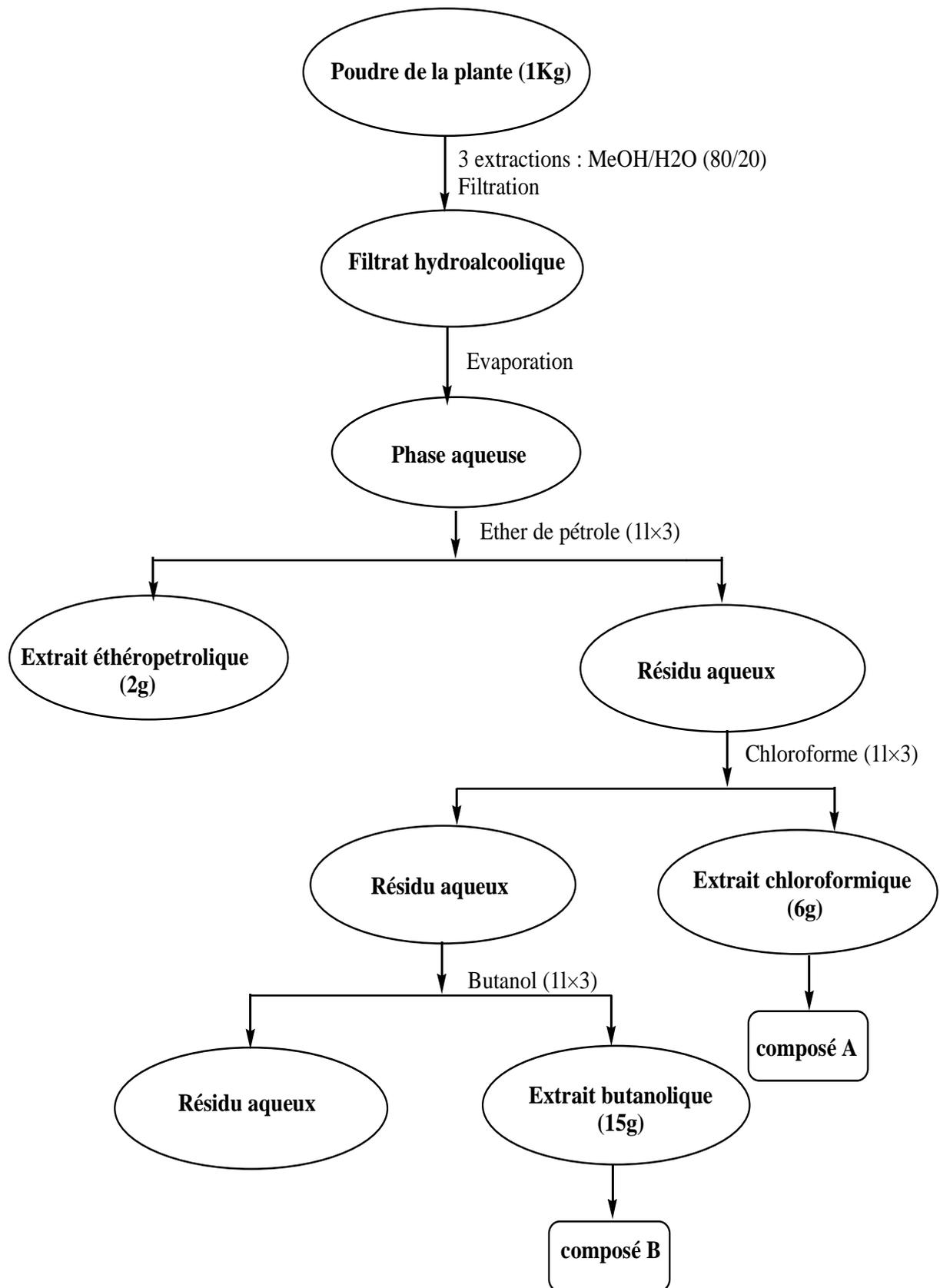


Schéma 3-1 : Schéma général d'extraction

## 3.2 Séparation et purification

Les trois extraits obtenus sont analysés par chromatographie sur couche mince (CCM), les plaques CCM sont examinées sous la lumière UV (254 et 365 nm). Différents réactifs ont été utilisés pour la révélation des CCM : les vapeurs d'iode, la vanilline sulfurique et une solution diluée d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

L'étude chimique est portée sur les extraits chloroformique et butanolique.

## 3.3 Détermination des structures

Les deux composés isolés **A** et **B** ont été identifiés par les analyses spectroscopiques, particulièrement la RMN 1D et 2D, UV, IR, et la spectrométrie de masse.

### 3.3.1 Le composé A

Le produit **A** a été obtenu à l'état pur après une ultime filtration par chromatographie sur colonne, l'éluant utilisé est un mélange du chloroforme / méthanol (90/10).

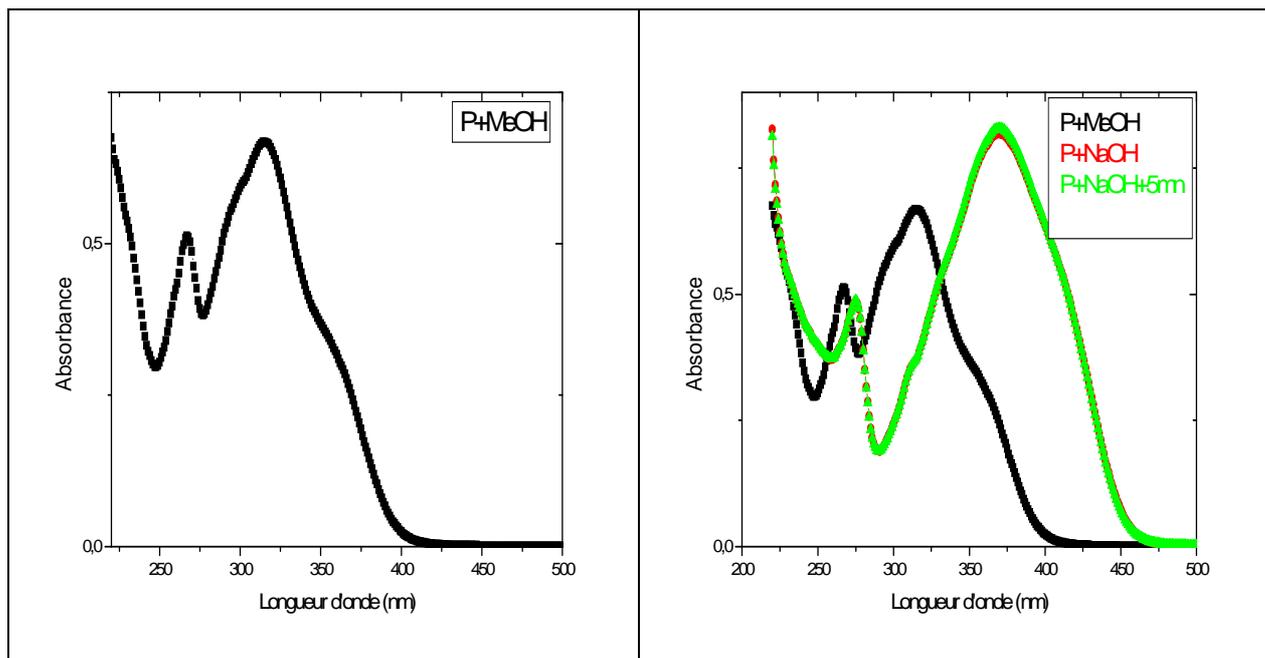
Le spectre d'absorption UV (figure 3.1) enregistré dans le méthanol, montre des bandes d'absorption maximales à 365 de la bande I, et 260 nm de la bande II caractéristiques d'une structure de type flavonol [101].

L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +16$ ) révèle la présence d'un OH libre en C4'. L'apparition d'une nouvelle bande à 316 nm dans le même réactif montre la présence d'un OH libre en C7, ceci est confirmé par le déplacement bathochrome de la bande II remarqué après addition de NaOAc ( $\Delta\lambda = + 8$ ) comparativement au spectre pris dans le MeOH.

L'ensemble des données de la série spectrale UV est reporté dans le tableau 3.1 :

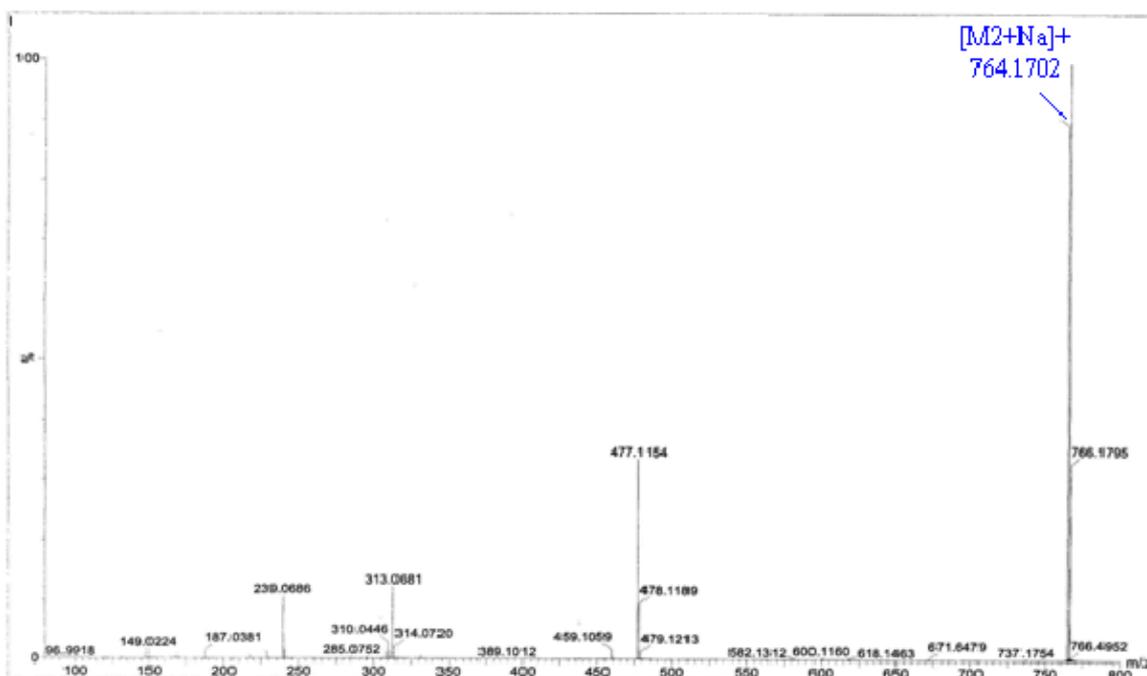
Réactifs	Bande 1	2 Bande	Autres bandes
MeOH	354	267	316
MeOH + NaOH	370	275	./
MeOH + NaOH+5mn	370	275	/
MeOH + NaOAc	366	275	314
MeOH + NaOAc+H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	357	270	313

Tableau 3.1 : Données de la série spectrale UV



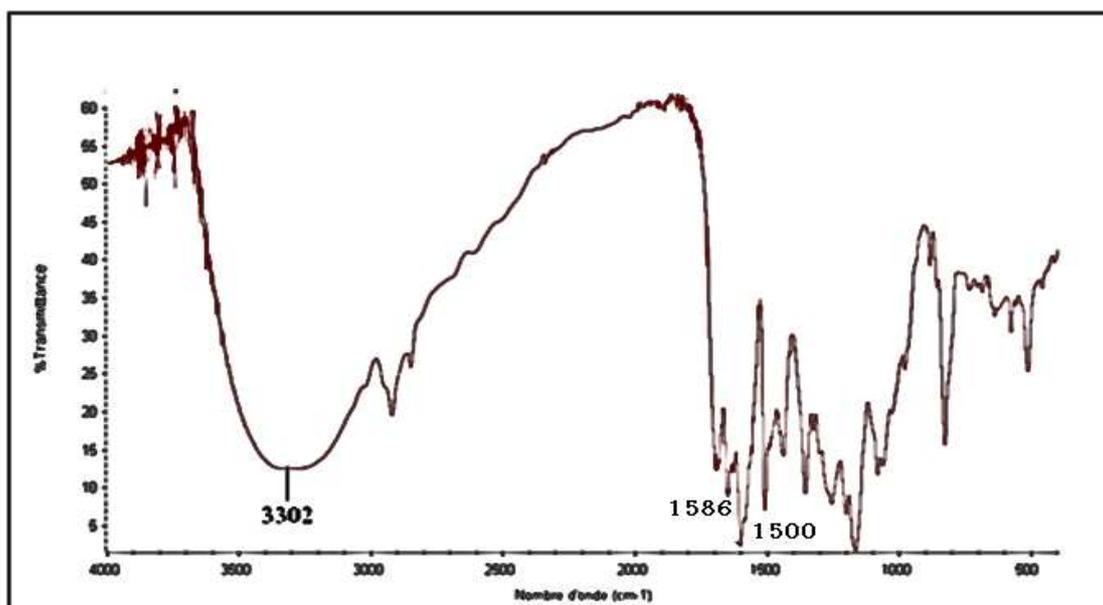
**Figure 3.1 : spectre UV du composé A**

Le spectre de masse en electrospray (ESI) enregistré en mode positif (Figure 3.2), présente un pic d'ion pseudo moléculaire à  $m/z = 764$   $[M+Na]^+$ , soit une masse moléculaire égale à 740 et correspondant à une formule brute en  $C_{39}H_{32}O_{15}$



**Figure 3.2 : spectre de masse du composé A**

Le spectre IR (Figure 3.3) de ce composé montre des bandes d'absorption à 3302, 1685, et 1500  $\text{cm}^{-1}$  correspondant à la présence des groupements hydroxyle, carbonyle, et double liaison.



**Figure 3.3 : Spectre infra-rouge de produit A**

Le spectre RMN<sup>1</sup>H (figure 3.4) et le spectre RMN<sup>13</sup>C (figure 3.5) du composé **A** montrent la présence d'un ensemble de signaux caractérisant dans un premier point de vue ; un squelette flavonoïque de type flavonols reconnaissable par un système AB caractéristique d'une oxygénation en position 4' sur le noyau B. En effet les doublets à  $\delta = 6,78$  ppm et  $\delta = 8,00$  ppm ( $J = 8,1$  Hz) d'intégration 2H chacun, sont attribuables à H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement.

Le spectre montre également les signaux suivants :

deux doublets ( $J = 2,3$  Hz) d'intégration 1H, correspondant aux deux protons aromatiques méta couplés résonant respectivement à  $\delta = 6,14$  ppm et  $\delta = 6,32$  ppm et qui sont attribuables aux protons H-6 et H-8 respectivement du noyau A.

un doublet ( $J = 7,6$  Hz) intégrant pour un proton et résonant à  $\delta = 5,36$  ppm est attribuable à un proton anomérique. La présence de l'unité sucre est confirmée par une série des signaux résonant dans l'intervalle de [ $\delta = 3,6$  et  $\delta = 4,24$  ppm].

des protons résonant dans les champs faibles allant de 6.80, 7.49 ppm sont observés également.

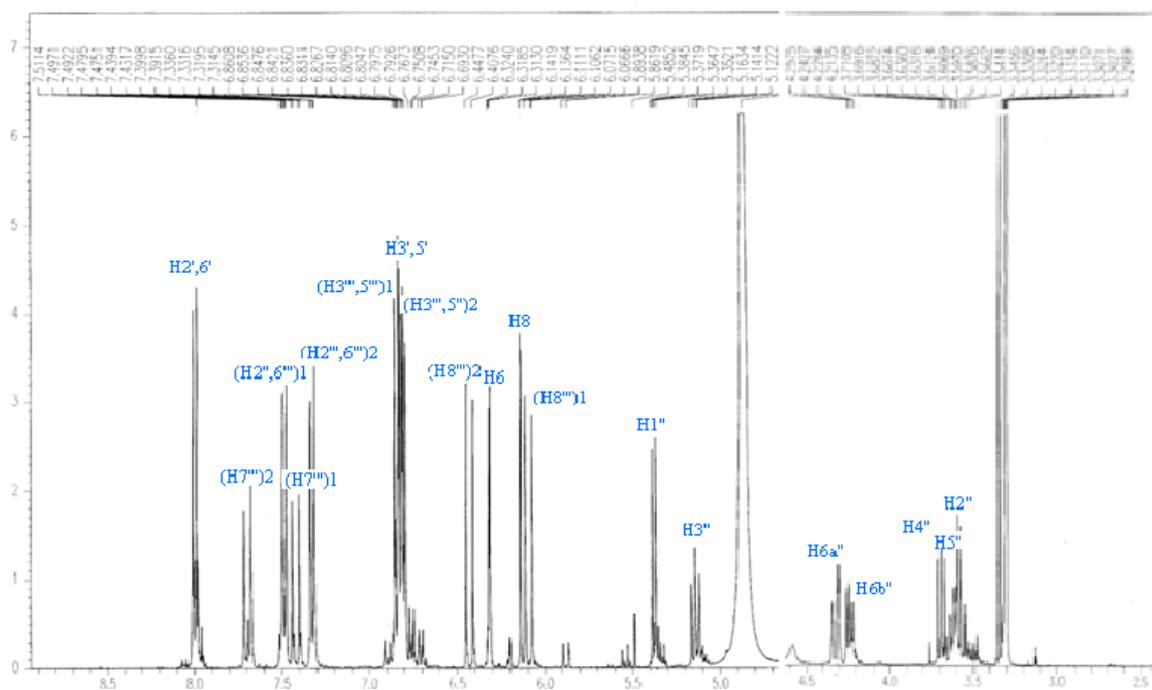
Le spectre RMN <sup>1</sup>H montre également, à part les signaux des protons du squelette flavonol, d'autres signaux aromatiques. En effet, les quatre doublets ( $J = 9,3$  Hz)

observés à  $\delta = 6,80, 6,82, 7,31$  et  $7,49$  sont attribuables à la présence de deux noyaux aromatiques para substitués. Ces protons sont nommés  $(H3''', 5''')_1$ ,  $(H3''', 5''')_2$ ,  $(H2''', 6''')_2$ ,  $(H2''', 6''')_1$  respectivement.

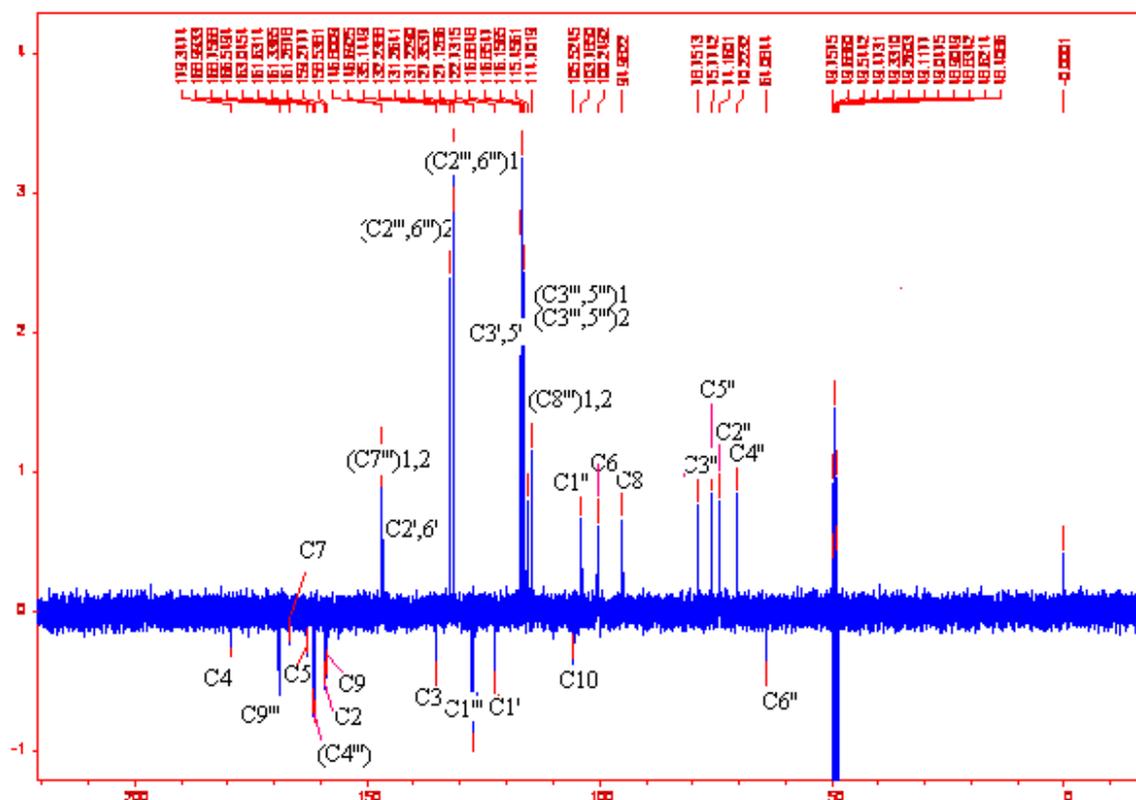
Le spectre RMN  $^{13}C$  (figure 3.5) permet d'attribuer tous les carbones secondaires (CH) du squelette flavonol le CH-8, CH-6, CH-3',5', CH-2',6',  $\delta = 94,9, 100,0, 116,8, 132,2$  ppm respectivement.

Toutes ces données spectrales sont en accord avec le squelette flavonol.

Quatre doublets ( $J = 16,0$  Hz) s'intégrant chacun pour un proton et résonant à  $\delta = 6,14, 6,42, 7,43, 7,68$  respectivement. Ces quatre protons sont caractéristiques au proton oléfinique et la molécule présente deux doubles liaisons, la valeur de la constante de couplage indique une géométrie *w* pour chacun des doubles liaisons.



**Figure 3.4 Spectre RMN  $^1H$  du composé A**



**Figure 3.5 Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  ( $J$ -mod) du composé A**

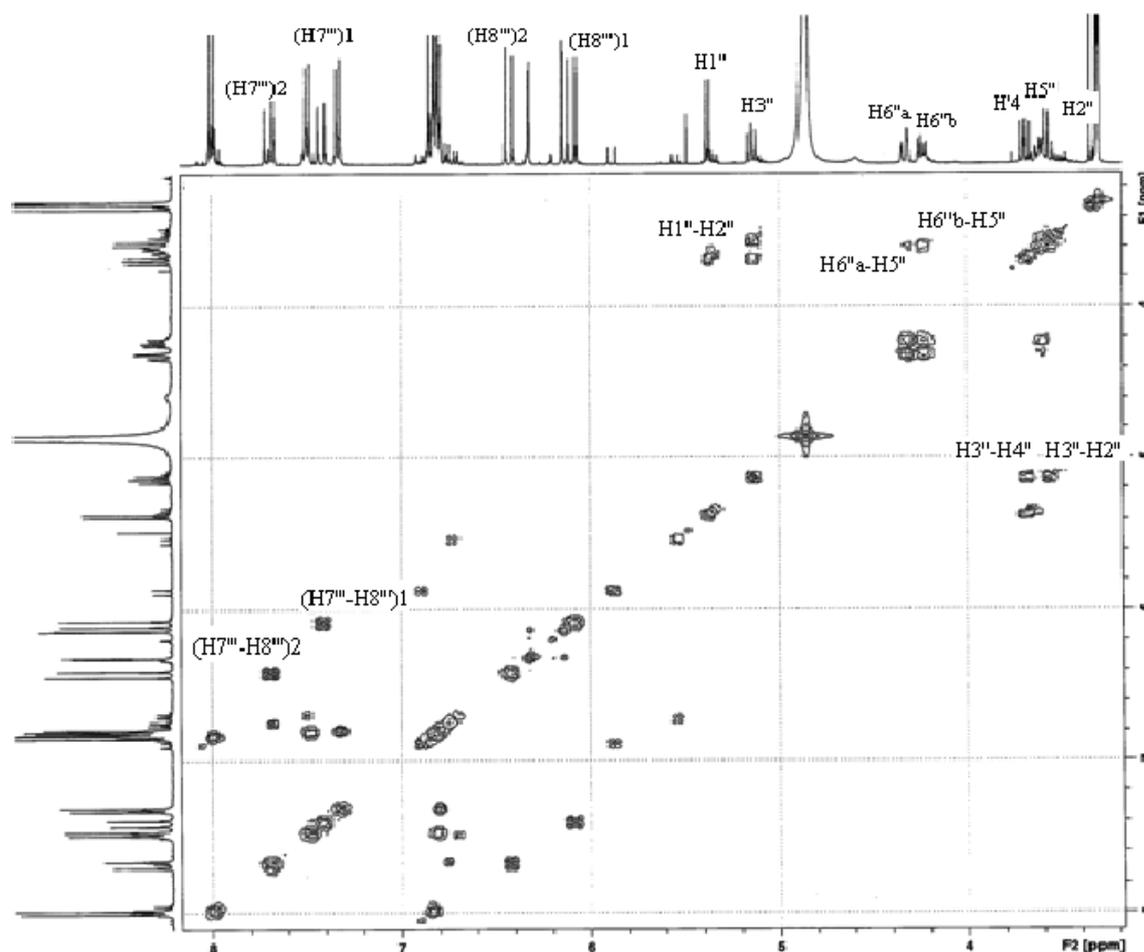
En effet, l'expérience COSY H-H (figure 3.6) montre les couplages entre les deux protons oléfiniques résonant à  $\delta = 6,14$  et  $7,43$  et les deux protons résonant à  $\delta = 6,42$  et  $\delta = 7,68$  ppm. Ces quatre protons sont nommés  $(\text{H-8}''')$ <sub>1</sub>,  $(\text{H-7}''')$ <sub>1</sub>,  $(\text{H-8}''')$ <sub>2</sub>,  $(\text{H-7}''')$ <sub>2</sub>, respectivement.

Les couplages entre les protons du partie sucre sont aussi observés

Partant du proton anomère de sucre cité précédemment et résonant à  $\delta = 5,36$  ppm, l'expérience Cosy H-H (figure 3.6) permet d'observer les corrélations suivantes :

- le proton anomère H-1'' et le proton résonant à  $\delta = 3,71$  ppm correspondant au proton H-2''
- le proton H-2'' et le proton H-3'' résonant sous forme de triplet à  $\delta = 5,12$  ppm lui-même corrélant avec un signal multiplet à  $\delta = 3,60$  ppm correspondant au proton H-4'', ce dernier donnant une tache de corrélation avec le proton H-5'' résonant sous forme de multiplet à  $\delta = 3,69$  ppm.
- le proton H-5'' et les deux protons résonant sous forme de doublet de doublets ( $J = 11,8, 6,1$  Hz) à  $\delta = 4,21$  ppm et  $4,24$  ppm correspondant respectivement aux protons H-6'b et H-6'a, ces deux protons constituant la partie AB d'un système ABX d'un hexose.

Les déplacements chimiques de tous les protons et tous les carbones de la partie sucre, ainsi la constante de couplage  $J = 7,6$  Hz du proton anomérique sont en accord avec un D-glucose.



**Figure 3.6 Spectre COSYH-H du composé A**

L'expérience de corrélation directe carbone-proton ou HSQC (figure 3.7) montre les couplages entre :

- Le proton H-6 et son carbone C-6 résonant à  $\delta = 100,0$  ppm
- Le proton H-8 et son carbone C-8 résonant à  $\delta = 94,9$  ppm
- Les protons H-2', H-6' et leur carbones C-2', C6' résonant à  $\delta = 132,2$  ppm
- Les protons H-3' et H-5' et leur carbones C-3', C-5' résonant à  $\delta = 116,8$  ppm
- Le proton H-1'' et son carbone C-1'' résonant à  $\delta = 103,7$  ppm
- Le proton H-2'' et son carbone C-2'' résonant à  $\delta = 74,1$  ppm
- Le proton H-4'' et son carbone C-4'' résonant à  $\delta = 70,1$  ppm

Les deux protons H-6'' et leur carbone C-6'' résonant à  $\delta = 64,1$  ppm

Toutes ces données spectrales nous orientent vers un squelette d'un kaempferol glycosylé.

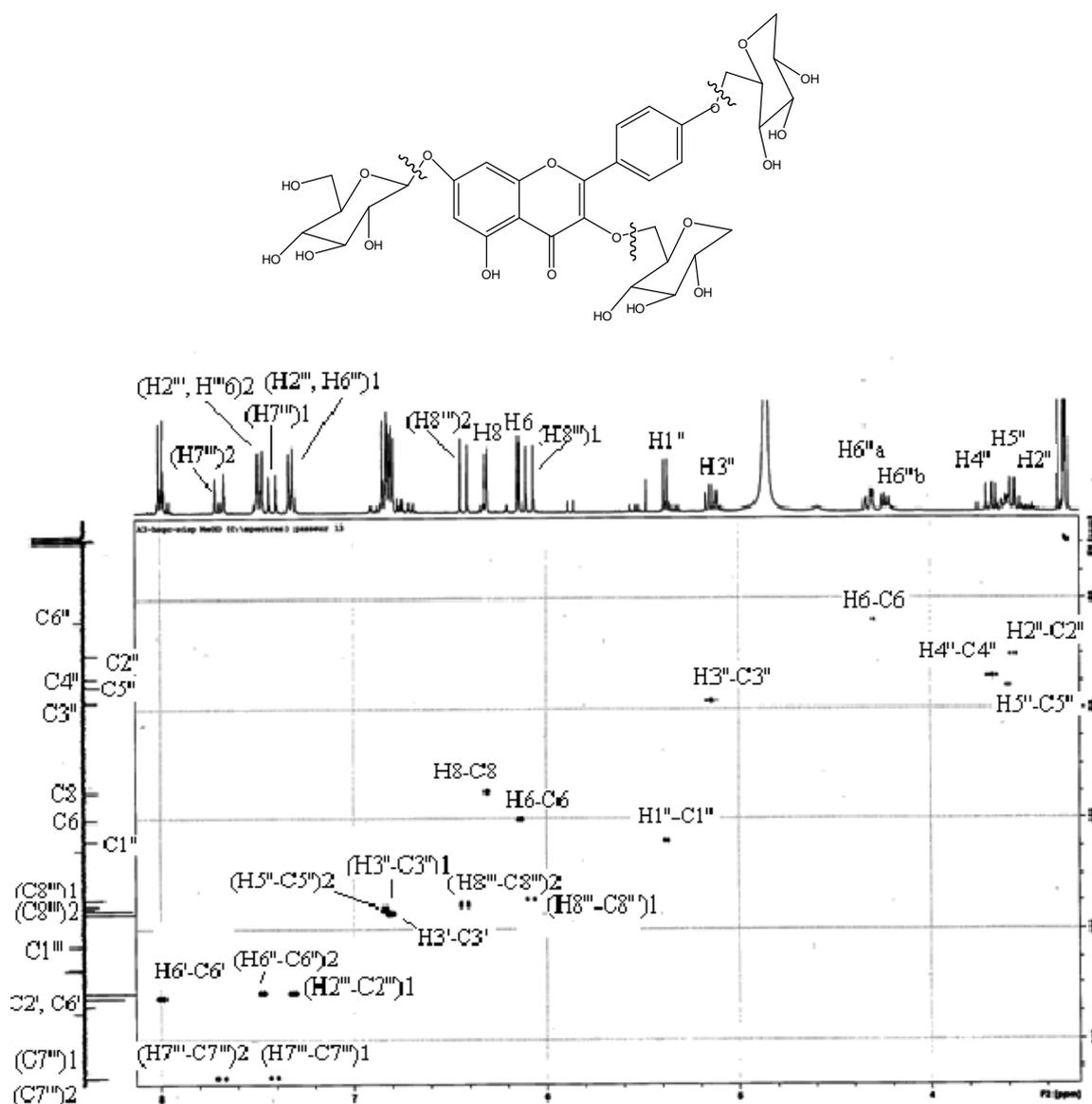


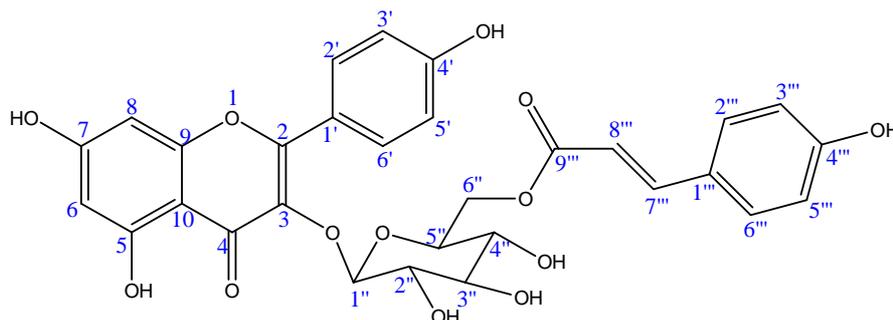
Figure 3.7 spectre HSQC du composé A

La comparaison des données spectrales de ce composé avec celles reportées dans la littérature laisse supposer que le glucose est attaché au carbone C-3 dans la mesure où les carbones C-3 et C-2 sont à 135,1 et 149,5 respectivement si le carbone C-3 est un porteur d'un OH libre, et à 131,1, 159,5 si le carbone C-3 est substitué [101-102].

La présence de deux doubles liaisons et deux noyaux aromatique nous oriente vers la présence de deux groupements cinnamoyles. En effet, les deux protons H6a'' et H6b'' sont déblindés  $\delta = 4,24$ , et  $4,21$  ppm, ce qui suppose que la fonction OH porteuse de ses deux protons est estérifiée, cette supposition est confirmée par la tache

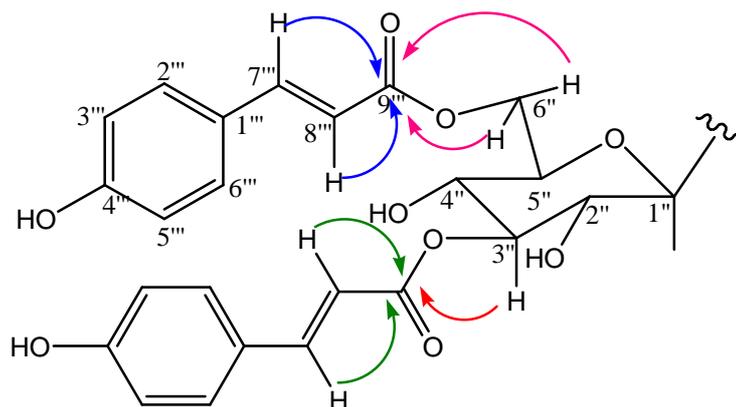
de corrélation observée dans l'expérience HMBC (figure 3.9) entre les deux protons H6a', H6b' et le carbone quaternaire résonant à  $\delta = 168,7$  ppm, et qui est attribué à un carbonyle, et les protons oléfiniques H8''', H7''' résonant à  $\delta = 6,10, 7,43$  ppm avec le même carbonyle.

Cela suggère que la fonction alcool primaire du glucose est estérifiée par le 1<sup>er</sup> groupement hydroxy cinnamoyle (coumaroyle), donc on a une partie de la structure suivante :

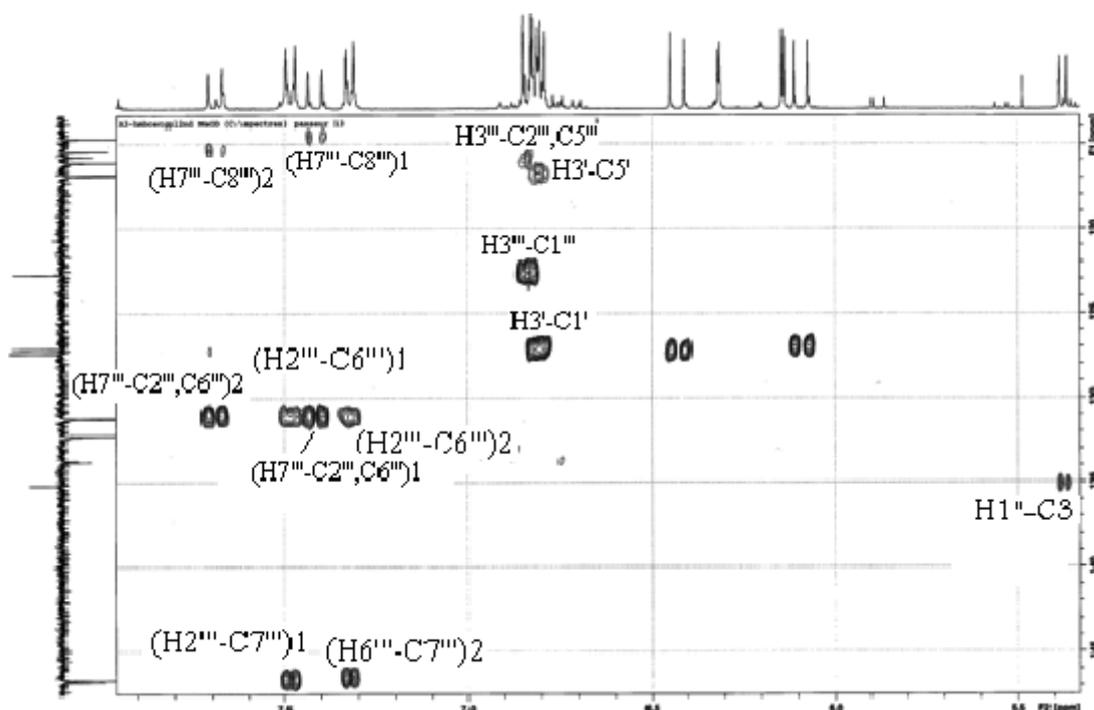


Le signal du proton H3''' résonant à  $\delta = 5,12$  ppm ( $\delta = 78,7$  ppm) est déblindé, ce qui suppose que la fonction OH du carbone C-3''' est estérifiée. La tache de corrélation observé dans l'expérience HMBC (figure 3.9) entre le proton H3''' et le carbone quaternaire résonant à  $\delta_C = 169,0$  ppm confirme que l'estérification est en C-3'''.

Les deux protons H-6'' du glucose et le carbonyle résonant à  $\delta = 168,7$  ppm, confirmant ainsi la substitution du glucose en C6'' par un groupement coumaroyle.



**Shema3.2** Corrélation C-H en  $^2J$  et  $^3J$  mettant en évidence la position des substituants au niveau du glucose

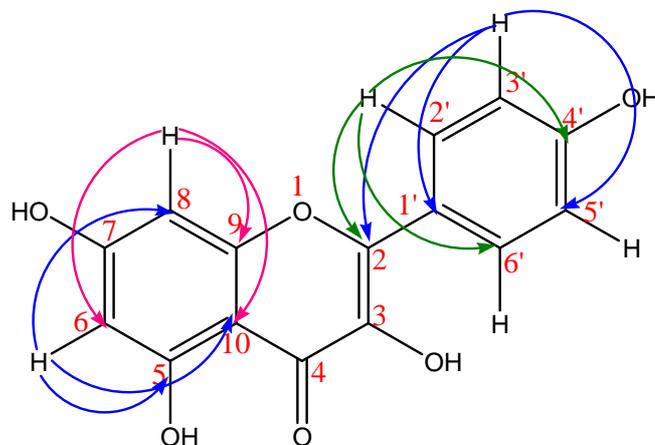


**Figure 3.8 Spectre HMBC mettant en évidence les positions des groupements coumaroyles**

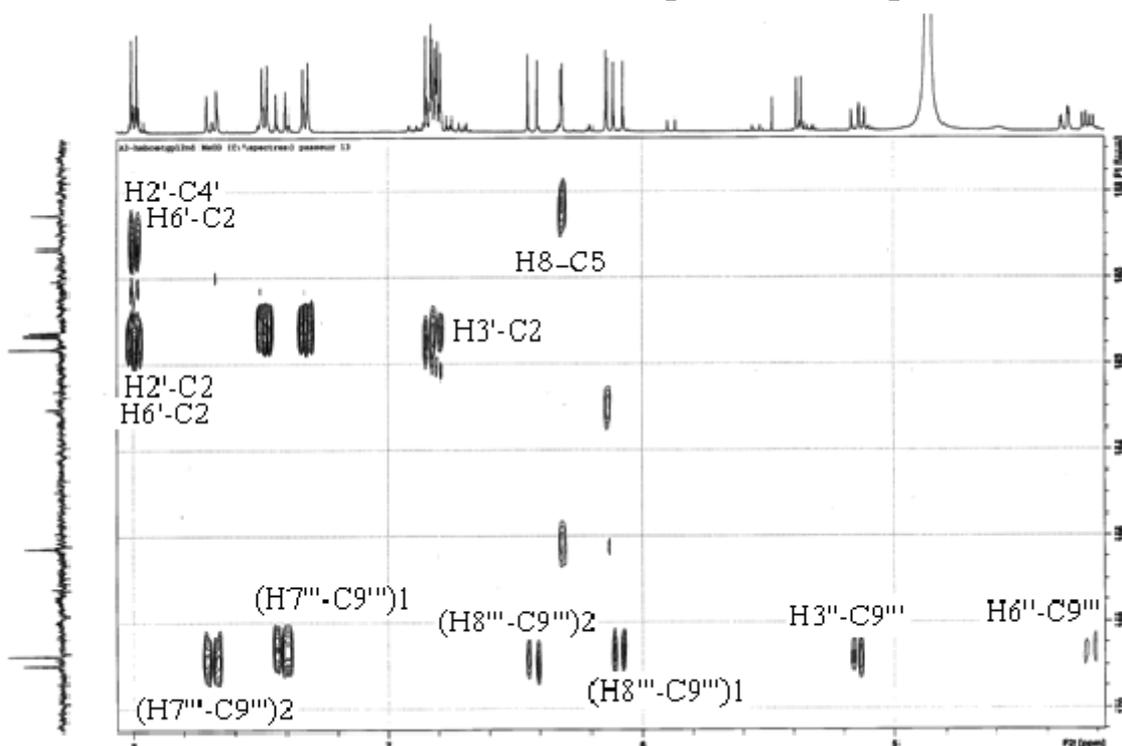
L'expérience HMBC montre aussi les couplages suivants :

- Le proton H-6 et des carbones résonant à  $\delta = 94,9, 105,6$  ppm correspondant respectivement aux carbones C-8, C-10.
- Le proton H-8 et des carbones résonant à  $\delta = 100,0, 163,0, 105,6$  ppm correspondant respectivement aux carbones C-6, C-5, et C-10.
- Le proton H-2' et des carbones résonant à  $\delta = 159,3, 161,3, 132,2$  ppm correspondant respectivement aux carbones, C-2, C-4' et C-6'.
- Le proton H-3' et des carbones résonant à  $\delta = 122,7, 116,8, 159,3$  ppm correspondant respectivement aux carbones, C-1', C-5' et C-2.
- La tache de corrélation observé dans l'expérience HMBC (figure 3.8) entre le proton anomérique H1'' et le carbone résonant à  $\delta C = 135,1$  ppm confirme que le glucose est attaché au carbone C3 de kaempferol.

Les corrélations C-H sont résumées dans le (schéma 3.2)



**Shema3.2** Corrélation C-H en  $^2J$  et  $^3J$  mettant en évidence la position des substituants au niveau du squelette Kaempferol



**Figure 3.9** Spectre HMBC mettant en évidence la position des substituants au niveau du squelette Kaempferol

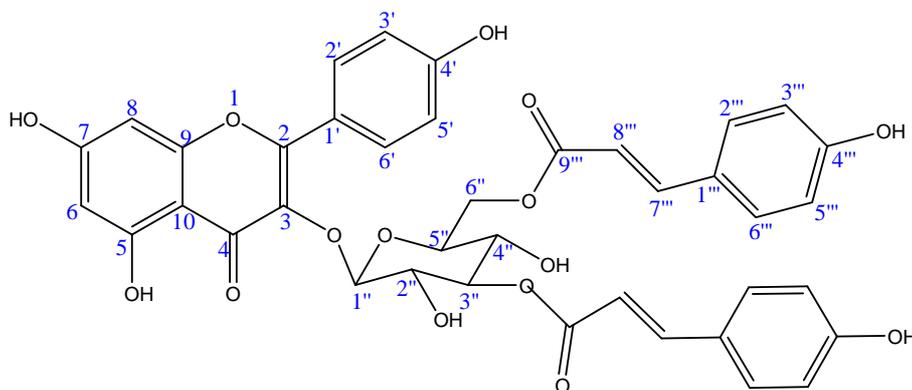
Le tableau 3.1 résume tous les déplacements chimiques des protons et carbones du composé A :

N°	$\delta C$ (ppm)	$\delta H$ (ppm)	$J$ (Hz)
<b>Aglycone</b>			
1 (O)	-	-	-
2 (C)	159,3	-	-
3 (C)	135,1	-	-
4 (CO)	179,4	-	-
5 (C)	163,0	-	-
6 (CH)	100,0	6,14 d	2,0
7 (C)	166,0	-	-
8 (CH)	94,9	6,32 d	2,3
9 (C)	158,5	-	-
10 (C)	105,6	-	-
1' (C)	122,7	-	-
2', 6' (CH)	132,2	8,00 d	9,6
3', 5' (CH)	116,8	6,78 d	8,1
4' (C)	161,6	-	-
<b>Glucose</b>			
1" (CH)	103,7	5,36 d	7,6
2" (CH)	74,1	3,69 dd	9,5 ; 7,9
3" (CH)	78,7	5,12 t	9,0
4" (CH)	70,1	3,71 m	-
5" (CH)	75,7	3,6 m	-
6a" (CH)	64,1	4,24 dd	11,8 ; 2,1
6b" (CH)	-	4,21 d	11,8 ; 6,0
<b>Coumaroyle I</b>			
1''' (C)	127,1*	-	-
2''' , 6''' (CH)	131,2	7,49 d	8,1
3''' , 5''' (CH)	115,4	6,80 d	9,3
4''' (C)	161,3	-	-
7''' (CH)	146,6	7,43 d	16,0
8''' (CH)	114,6	6,10 d	16,0
9''' (CO)	168,7	-	-
<b>Coumaroyle II</b>			
1''' (C)	127,3*	-	-
2''' , 6''' (CH)	13,0	7,31 d	8,1
3''' , 5''' (CH)	11,7	6,82 d	9,3
4''' (C)	161,3	-	-
7''' (CH)	146,6	7,68 d	16,0
8''' (CH)	114,6	6,42 d	16,0
9''' (CO)	169,0	-	-

**Tableau 3.2 : Déplacement chimiques des protons et carbones du produit A**

Ainsi, toute cette analyse spectrale permet d'attribuer la structure suivante au Composé A :

Il s'agit de : **3-O-[(3'', 6''-di-O-para coumaroyl)- $\beta$ -D glucopyranosyl ]-Kaempferol** Ce composé a été antérieurement isolé des feuilles de *Stenochlaena palustris* [103].



### 3.3.2 Le composé B

Le composé **B** a été obtenu également sous forme d'une poudre jaune, et qui présente une formule moléculaire en  $(C_{30}H_{26}O_{13})$  ; formule déterminée grâce au spectre de masse ESI (figure 3.10) enregistré en mode positive, présentant un pic d'ion pseudo moléculaire à  $m/z = 617 [M+Na]^+$  correspondant à une masse moléculaire égale à 594.

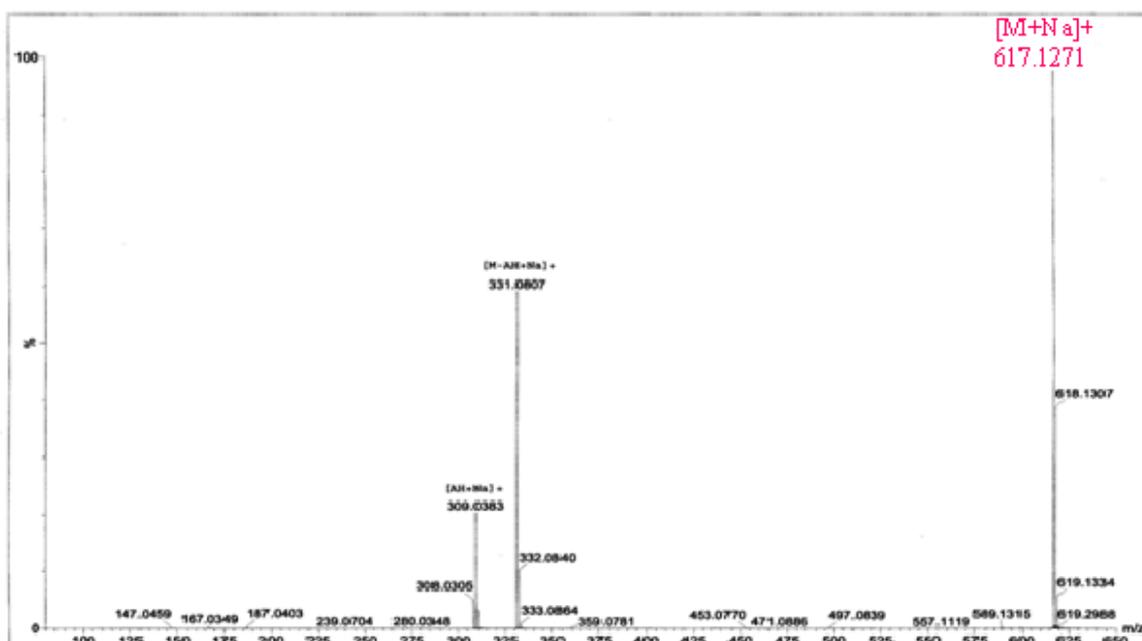
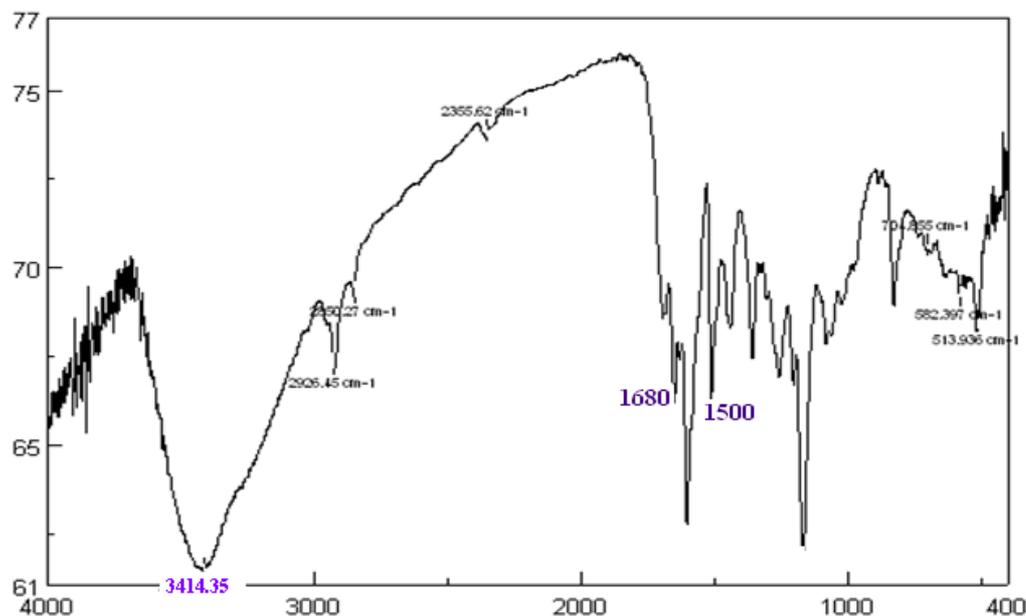


Figure 3.10 : Spectre de masse du composé B

Les diverses techniques spectroscopiques mises en œuvre pour établir la structure du composé **B**, montrent une similitude structurale avec le composé **A** décrit précédemment.

Le spectre infra-rouge (figure 3.11) de ce composé indique la présence de groupements hydroxyles ( $3414\text{ cm}^{-1}$ ), carbonyle ( $1680\text{ cm}^{-1}$ ) et oléfinique ( $1500\text{ cm}^{-1}$ ).



**Figure 3.11 : Spectre IR du composé B**

L'allure générale des spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **B** montre une grande ressemblance avec ceux du composé **A**.

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  de ce composé (figure 3.12 et 3.13) présentent des signaux caractérisant un squelette Kaempferol.

En effet, les deux doublets ( $J = 8,1\text{ Hz}$ ) sont attribuables aux protons aromatiques H3', H5' et H2', H6' para couplés et caractérisant le noyau B et qui résonnent respectivement à  $\delta = 6,80$  et  $7,97\text{ ppm}$ . Leurs carbones résonnent respectivement à  $\delta_c = 116,1$  et  $132,2\text{ ppm}$ , par addition deux doublets ( $J = 2,3\text{ Hz}$ ) correspondant aux signaux de deux protons aromatiques méta couplés, H-6 et H-8 résonant à  $\delta = 6,13$  et  $6,30\text{ ppm}$  respectivement et caractérisant les protons du squelette A du kaempferol.

La présence d'un seul groupement coumaroylé est aussi confirmé par l'apparition des signaux des protons oléfiniques à  $\delta = 6,06$  et  $\delta = 7,39\text{ ppm}$  et les protons aromatiques para substitué à  $\delta = 6,80$  et  $\delta = 7,30\text{ ppm}$ . La constante de couplage  $J = 16,1\text{ Hz}$  indique une géométrie *trans* comme dans le cas du composé **A**.

Le signal du proton anomère et les signaux des protons de la partie sucre apparaissent respectivement à  $\delta_{H1''} = 5,24$ ,  $\delta_{H4'',3'',2'',5''} = 3,32, 3,44, 3,45, 3,45$  ppm et leurs carbones à  $\delta_{C1''} = 104,0$ ,  $\delta_{C4'',3'',2'',5''} = 71,8, 75,7, 75,8, 78,0$  ppm. Ce qui indique que le kaempferol est substitué aussi par un sucre, les mêmes déplacements chimique de cette partie sont identiques avec ceux du composé **A**, confirmant ainsi que le kaempferol est substitué par un sucre de type D-glucose, et ce dernier est attaché au carbone C-3 du squelette Kaempferol.

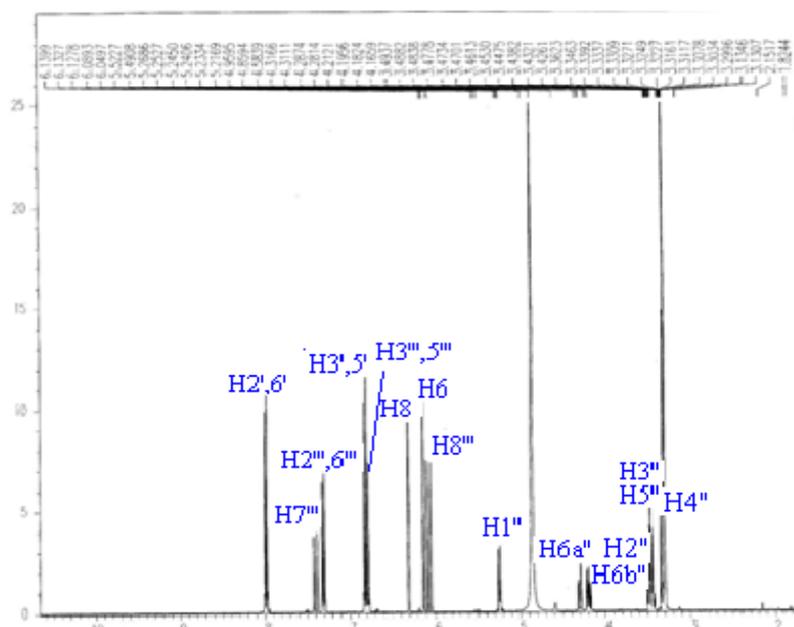


Figure 3.12 : Spectre RMN<sup>1</sup>H du composé B

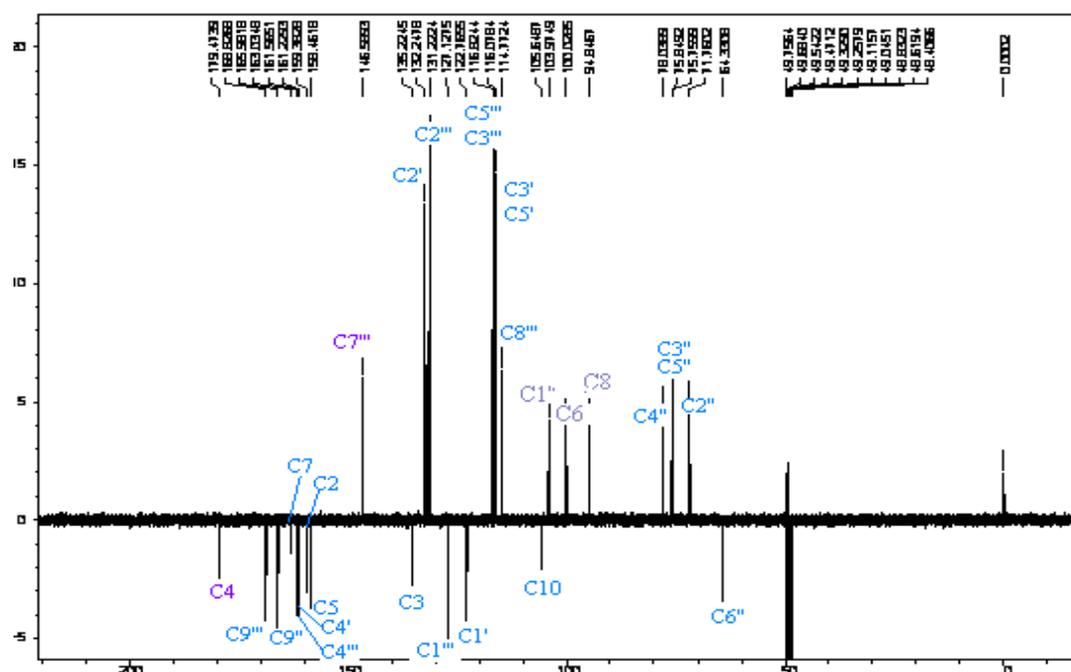
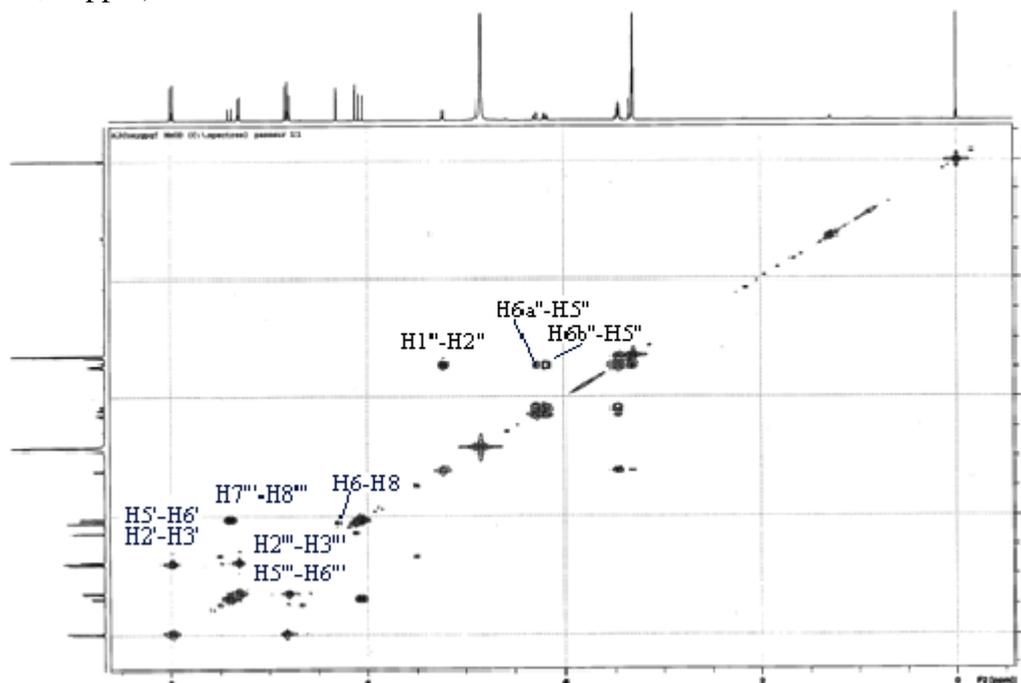


Figure 3.13 : Spectre RMN<sup>13</sup>C (*J-mod*) du composé B

L'enchaînement est confirmé par l'expérience COSY (figure 3. 14). En effet, le spectre montre des couplages entre :

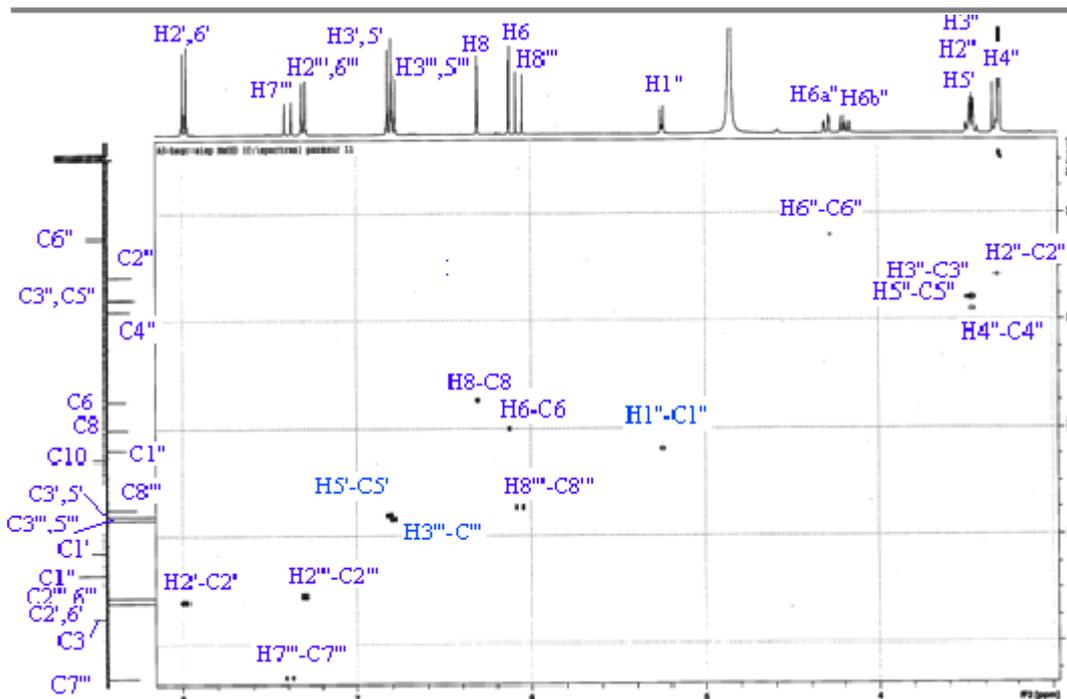
- Le proton H-6 ( $\delta = 6,30$  ppm) et le proton H-8 ( $\delta = 6,13$  ppm).
- Les deux protons H-3', H-5' ( $\delta = 6,80$  ppm) et les protons H -2', H-6' ( $\delta = 7,97$  ppm). Le proton H-8''' ( $\delta = 6,06$  ppm) et le proton H7''' ( $\delta = 7,39$  ppm).
- Les deux protons H-3''', H-5''' ( $\delta = 6,80$  ppm) et les protons H-2''', H-6''' ( $\delta = 7,30$  ppm).



**Figure 3.14 : Spectre COSY H-H du composé B**

L'expérience HSQC (figure 3.15) montre les couplages directes entre :

- Le proton H-6 et son carbone C-6 résonant à  $\delta = 100,0$  ppm.
- Le proton H-8 et son carbone C-8 résonant à  $\delta = 94,9$  ppm.
- Les protons H-2', H-6' et leur carbone C-2', C-6' résonant à  $\delta = 132,2$  ppm.
- Les protons H-3', H5' et leur carbones C - 3', C - 5' résonant à  $\delta = 116,1$  ppm.
- Les protons H-2''', H-6''' et leur carbone C-2''', C-6''' résonant à  $\delta = 131,2$  ppm.
- Les protons H-3''', H5''' et leur carbone C-3''', C-5''' résonant à  $\delta = 116,8$  ppm.
- Le proton H-7''' et son carbone C-7''' résonant à  $\delta = 146,6$  ppm.
- Le proton H-8''' et son carbone C-8''' résonant à  $\delta = 114,8$  ppm.



**Figure 3.15 Spectre HSQC du composé B**

Les carbones quaternaires du noyau Kaempferol sont identifiés par l'expérience HMBC En effet, le spectre (figure 3.16) montre les corrélations entre :

- Le proton H-6 et les carbones C-5 ( $\delta = 163,0$  ppm), C-7 ( $\delta = 166,0$  ppm) et un carbone résonant à 105.6 ppm correspondant à C-10.
- Le proton H-3' et les carbones C-1', C-4' et C-5' résonant à 122,8, 161,6 et 116,1 ppm respectivement.
- Le proton H-2' et les carbones C-4' ( $\delta = 161,6$  ppm) et C-6' ( $\delta = 132,2$  ppm).
- Le proton H-6''' et les carbones C-2''' ( $\delta = 131,2$  ppm) et C-4''' ( $\delta = 161,2$  ppm).
- Le proton H-8''' et les carbones C-1''' ( $\delta = 127,1$  ppm) et C-9''' ( $\delta = 168,8$  ppm).

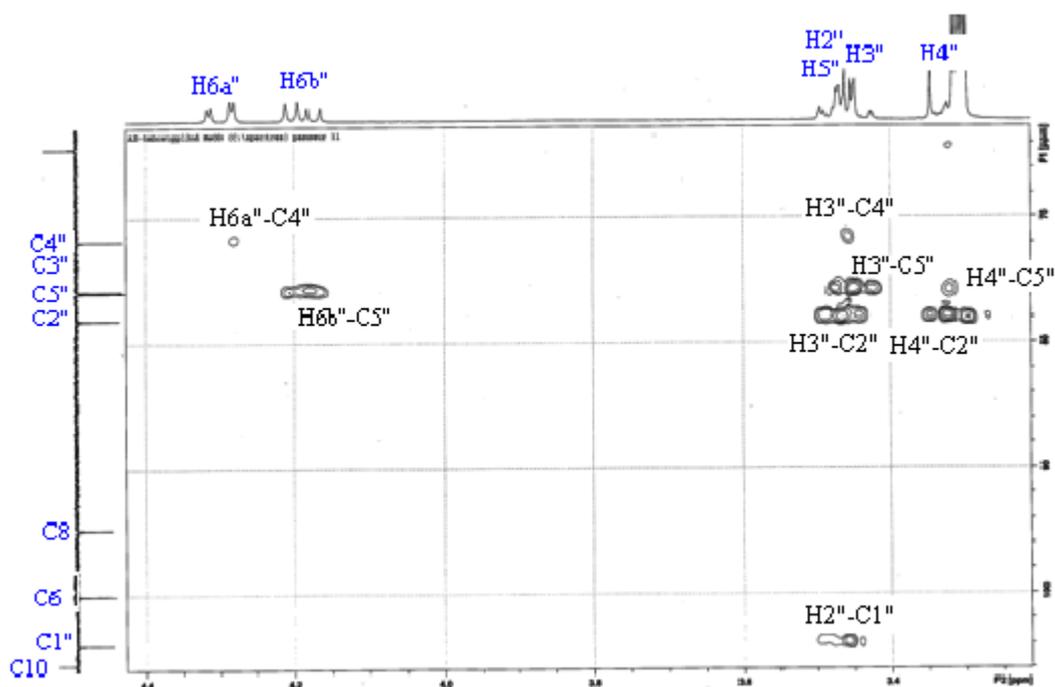


Figure 3.19 Spectre HMBC (partie glucose) du composé B

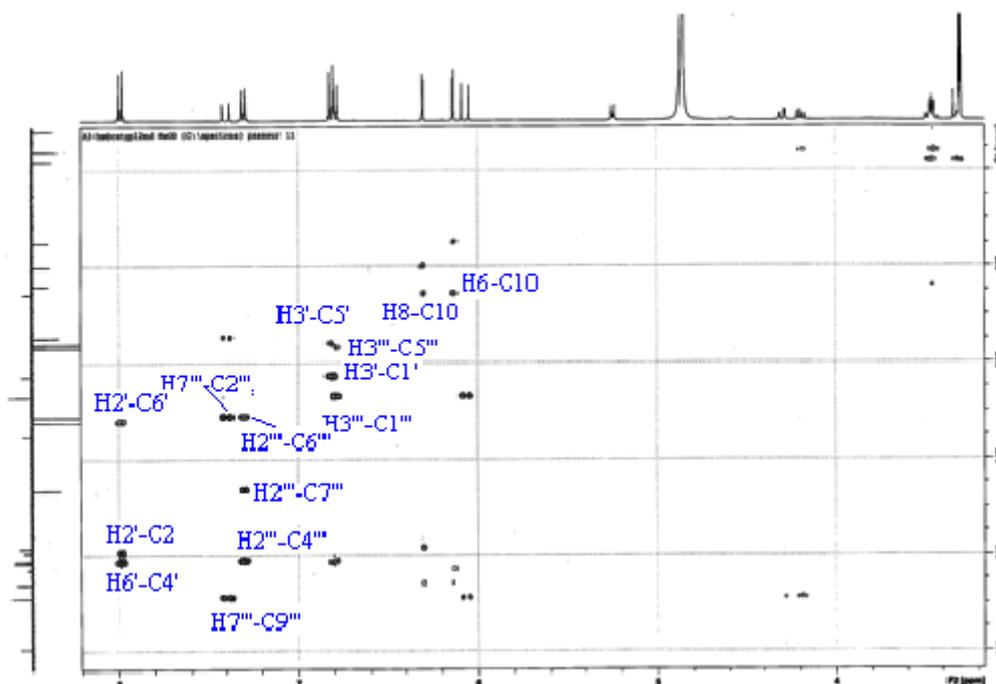


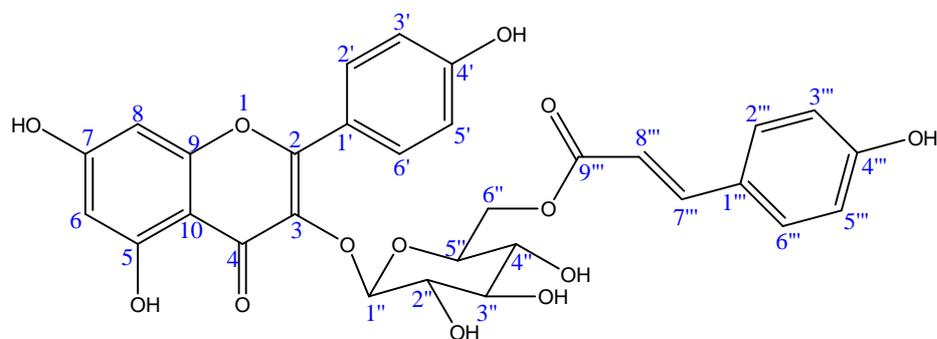
Figure 3.19 Spectre HMBC (partie aglycone) du composé B

Toutes les expériences spectrales COSYH-H, HSQC et HMBC permettent d'assigner tous les signaux des protons et carbones de la molécule, et les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones sont récapitulées dans (le tableau 3.2) :

N°	$\delta C$ (ppm)	$\delta H$ (ppm)	$J$ (Hz)
<b>Aglycone</b>			
1 (O)	-	-	-
2 (C)	158,5	-	-
3 (C)	135,2	-	-
4 (CO)	179,5	-	-
5 (C)	163,0	-	-
6 (CH)	100,0	6,13 d	2,3
7 (C)	166,0	-	-
8 (CH)	94,0	6,30 d	2,3
9 (C)	159,4	-	-
10 (C)	105,6	-	-
1' (C)	122,8	-	-
2', 6' (CH)	132,2	7,97 d	8,1
3', 5' (CH)	116,1	6,80 d	8,1
4' (C)	161,6	-	-
<b>glucose</b>			
1'' (CH)	104,0	5,24 d	7,6
2''(CH)	78,0	3,45 m	-
3'' (CH)	75,7	3,42 m	-
4''(CH)	71,8	3,32 m	-
5''(CH)	75,8	3,45 m	-
6a''(CH)	64,3	4,28 dd	12,0, 6,1
6b''(CH)		4,21 dd	12,0, 6,1
<b>Cinnamoyle</b>			
1'''(C)	127,1	-	-
2''', 6'''(CH)	131,2	7,30 d	8,1
3''', 5'''(CH)	116,8	6,80 d	8,1
4'''(C)	161,2	-	-
7'''(CH)	146,6	7,39 d	16,1
8'''(CH)	114,8	6,06 d	16,1
9'''(CO)	168,8	-	-

**Tableau 3.2 : déplacements chimiques des protons et carbones du produit B**

L'analyse spectrale réalisée permet de proposer la structure suivante pour le composé **B**.



Il s'agit de : **3-O-[(6''-O- trans-*p*-coumaroyl)-β-D-glucopyranosyl]-Kaempferol**.

Ce composé a été antérieurement isolé des feuilles de *Stenochlaena palustris* [103], et des fruits de *Fragaria ananassa* [104].

## Conclusion

L'étude phytochimique réalisée sur l'espèce *Helianthemum kahiricum* Del, plante endémique à l'Algérie appartenant à la famille cistaceae a abouti à l'isolement de deux composés. Ces composés ont été obtenus à l'état pur par l'utilisation souvent combinée des différentes méthodes chromatographiques à savoir la chromatographie sur colonne de gel de silice normale et sur plaque préparative de silice normale, et la chromatographie liquide sous vide.

L'identification des métabolites isolés est rendue possible grâce aux méthodes d'analyse spectroscopiques modernes particulièrement la RMN 1D (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C J-modulé) et 2D (COSY H-H, HSQC, HMBC), IR, UV, et la spectrométrie de la masse haute résolution (HR-ESI-MS) et par la comparaison avec les données de la littérature.

Les composés isolés et identifiés appartiennent à la classe des flavonoïdes de type flavonol, ce qui montre la richesse de la famille cistaceae en composés phénoliques.

Les deux structures de ces deux composés sont inédites dans la famille des cistaceae et dans le genre *helianthemum*.

# Chapitre IV

Partie expérimentale

## **4.1 Matériel et méthodes**

La plante *Helianthemum kahiricum* Dell a été récoltée dans la région de Biskra près du barrage de l'Outaya (Sud –Est algérien) au mois de Mai 2003, et identifiée par le professeur Bachir Oudjehih du département d'Agronomie faculté des sciences universités de Batna. Après séchage dans un endroit sec et à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes ont été broyées (1Kg).

### **4.1.1 Méthodes Chromatographiques analytiques**

#### **4.1.1.1 Chromatographies sur couche mince (CCM)**

Les analyses par chromatographie sur couche mince sont effectuées sur des plaques de silice Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 250 µm à support aluminium (Merck). Les plaques sont observées sous la lampe UV à 254 et 366 nm, révélées par la vanilline sulfurique et chauffées jusqu'à apparition de taches de diverses couleurs.

### **4.1.2 Méthodes préparatives**

#### **4.1.2.1 Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)**

Des colonnes ouvertes de gel de silice en phase normale (60-320 mesh) ont été utilisées dans la deuxième étape de fractionnement des extraits. La taille des colonnes, le débit de la phase mobile et le volume des fractions ont été adaptés à la quantité et à la nature des échantillons à séparer. Le choix des conditions d'élution, le suivi de la séparation et le rassemblement final des fractions ont été effectués sur la base d'analyse sur CCM.

#### **4.1.2.3 Chromatographie préparative sur couche épaisse (CCE)**

Les chromatographies préparatives sur couche épaisse (CCE) sont effectuées sur des plaques de silice kiesel gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), ensuite, elles sont observées sous la lampe UV à 254 et 366 nm.

#### **4.1.2.4 Chromatographie liquide sous vide (VLC)**

Cette technique est utilisée pour obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut. Elle est rapide et a l'avantage de consommer moins de solvants que les méthodes de chromatographies classiques. La silice Kieselgel merck (70-230 mesh, 63-200 µm) est mise dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n°4.

### **4.1.3 Méthodes physico chimiques**

#### **4.1.3.1 Spectres infra rouge (IR)**

Les spectres infra rouges ont été réalisés sur les produits préalablement mis sous forme de pastille de KBr sur un appareil de type Shimatzu IR 470 du département de chimie de l'université de Batna.

#### **4.1.3.2 Les spectres de masse (SM)**

Les spectres de masse des produits isolés sont enregistrés sur un spectromètre de masse (waters Q-TOF2), du centre de recherche école nationale supérieure de chimie de RENNES Avenue du général Leclerc Campus de Beaulieu France.

La technique electrospray en mode positif à basse et haute résolutions a été utilisée.

#### **4.1.3.3 Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Les spectres de résonance magnétique nucléaire RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  (RMN 1D et RMN 2D) sont enregistrés dans  $\text{CD}_3\text{OD}$  sur un appareil Bruker à 400 MHz, du centre de recherche école nationale supérieure de chimie de RENNES Avenue du général Leclerc Campus de Beaulieu France.

Les déplacements chimiques ont été exprimés en ppm par rapport au signal de tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne, et les constantes de couplage sont exprimées en Hz

#### **4.1.3.4 Spectrométrie UV-Visible**

Les spectres UV-Visible des composés isolés sont enregistrés dans le MeOH sur un spectrophotomètre UV KONTRON. Les solutions sont mises dans quatre puits avec 400 microlitres de solution par puits et les longueurs d'ondes sont variées entre 200 et 800 nm.

#### **4.1.3.5 Pouvoir rotatoire**

Les pouvoirs rotatoires spécifiques sont mesurés sur un polarimètre électronique Perkin-Elmer 241 à 22,5 °C. La source de la lumière utilisée est la raie D du sodium (589 nm) et les raies du mercure (578, 546 nm). La cuve employée est de 1 ml, le solvant de solubilisation est le MeOH avec concentration (0,34g / 100 ml).

## 4. 2 Extraction

Le protocole d'extraction des parties aériennes a été antérieurement décrit dans la partie résultat et discussion (page 53).

## 4.3 Contrôle chromatographique des extraits

L'examen en chromatographie sur couche mince (CCM) des trois extraits éthero pétrolique, chloroformique et butanolique des parties aériennes dans des différents systèmes d'élution montre, après la révélation par la vanilline sulfurique et chauffage à 100°C, plusieurs taches à Rf voisins et incluses dans des traînées.

## 4.4 Séparation et purification

### 4.4.1 Extrait chloroformique

Six grammes de l'extrait chloroformique sont traités par chromatographie sur une colonne de gel de silice, l'élution est faite initialement au moyen d'un mélange de solvants : éther de pétrole/acétate d'éthyle 90/10, 85/15, 80/20, 75/25, 70/30, 60/40, 50/50, 40/60, et 20/80. Les fractions de 50 ml recueillies à chaque fois, sont soumises à une chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques sont examinées sous la lumière UV à 254 et 366 nm, révélées par la vanilline sulfurique et chauffées à 100°C.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :

fraction	Eluant (EP/AcOEt)	Examen CCM
1-3	90/10	Néant
4-8	"	Néant
9-14	"	Une tache
15-26	85/15	"
27-34	"	Deux taches
35-46	"	"
47-70	80/20	Une petite tache
71-84	"	"
85-120	80/20	Deux taches voisines
121-126	"	Deux taches+traînée
127-152	75/25	Mélange complexe
153-168	"	"
169-190	"	"
191-210	70/30	Traînée
211-240	"	Mélange complexe
241-260	"	"
261-281	"	"

282-328	65/35	Une tache +traînée
326-378	"	"
379-406	"	"
407-426	60/40	Traînée
427-452	"	2 taches+traînée
453-474	50/50	Traînée
475-488	"	"
489-493	"	"
494-500	40/60	Néant
500-510	20/80	"

**Tableau 4.1 : fractionnement de l'extrait chloroformique**

Ces différentes fractions récupérées subissent une chromatographie sur CCM, puis examinées sous la lumière UV et révélées par la vanilline sulfurique ; les fractions qui possèdent des similitudes sont réunies en 20 lots. Le tableau suivant regroupe ses 20 lots:

lots	fractions	Poids (mg)	observations
1	1-8	/	Néant
2	9-26	314	Une tache rose
3	27-46	150	Trois tâche +traînée
4	47-84	190,5	Mélange
5	85-126	108,6	Trois tâches noires
6	127-148	59,8	"
7	149-174	103,3	Traînée
8	175-198	118,4	Mélange complexe
9	199-210	155,9	Trois taches+traînée
10	211-230	57,0	2 taches
11	231-250	230,4	Mélange complexe
12	251-281	176,3	2 petites tâches
13	282-305	35,0	Traînée
14	306-340	41,1	Mélange complexe
15	341-366	142,1	"
16	367-400	186,1	Traînée "
17	401-414	62,4	Deux petites taches
18	415-426	36,5	Deux tâches traînée

19	427-452	153,6	Traînée
20	453-474	186,1	

**Tableau 4.2 : rassemblement des fractions de l'extrait chloroformique**

#### 4.4.1.1- Purification

Les lots, qui nous semblent intéressants, sont examinés par chromatographie sur CCM. les systèmes d'éluion utilisés sont : éther de pétrole / Acétate d'éthyle et chloroforme / méthanol dans différentes proportions. Le lot 19 présente plusieurs tâches visibles, ce qui nous a encouragés à purifier cet extrait.

#### 4.4.1.2 Purification du lot N=°19 :

La masse de 153,6 mg est chromatographie sur colonne de gel de silice (6 g). Les résultats de cette colonne sont représentés dans le tableau suivant :

Fraction	Eluant de la colonne EP/AcOEt	Observation en CCM
1-4	95/5	Néant
5-12	95/5	Deux petites taches
13-29	90/10	traînée
30-36	85/15	mélange
37-41	80/20	deux taches+traînée
42-60	75/25	Néant
61-73	75/25	Néant
74-86	70/30	deux taches
87-116	70/30	deux taches+traînée

**Tableau 4.3 Fractionnements du lot 19 de l'extrait chloroformique**

Les fractions similaires sont regroupées en sous lots selon le tableau suivant :

eluant		fractions collectées		Masse en mg
Sous lot	Fractions	Poids (mg)	Observations	
1	1-4	/	Néant	
2	5-29	35.1	deux taches +traînée	
3	3-36	33.5	Traînée	
4	37-41	23.2	Deux taches + traînée	
5	42-73	15.5	Néant	
6	74-116	25	deux taches	

**Tableau 4-4 Rassemblement des sous lots du lot 19**

Le sous lot N°=6 soumis à une chromatographie préparative sur plaque de silice (CCE) l'éluant étant CHCl<sub>3</sub> /MeOH (90/10)

On a abouti à l'isolement de produit A du poids 5,6 mg.

Sous lot 6	Poids du composé HK2	observations	Rf
m = 25 mg	m = 5,6 mg	Une Tache jaune observable en UV Jaunâtre après révélation à la vanilline sulfurique	Rf = 0,4

**Tableau 4-5 : résultat de la purification de sous lot N°=6**

#### 4.4.2 Extrait butanolique :

6 g de l'extrait butanolique sont fractionnés sur silice normale par chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice normale (60 g). L'élution est effectuée en premier lieu avec le chloroforme puis un gradient chloroforme/méthanol/eau et enfin avec le méthanol pur. A l'issue de ce fractionnement primaire (tableau) ; 8 Fractions ont été recueillies.

CHCl <sub>3</sub>	F1	-
CHCl <sub>3</sub> -MeOH-H <sub>2</sub> O		
60-40-0	F2	698,2
60-40-1	F3	734,6
60-40-2	F4	900
60-40-4	F5	872,6
60-40-7	F6	433,2
60-40-10	F7	842,3
MeOH	F8	622,4

**Tableau 4.6 fractionnement de l'extrait butanolique**

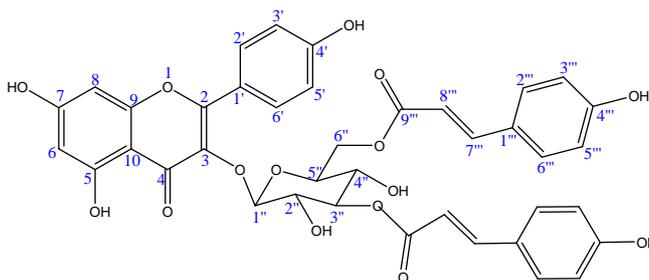
La fraction F3 (734,6 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normal (30 g) avec l'éluant chloroforme-méthanol : 100-0 à 0-100.

des fractions de 20 ml ont été récupérées et rassemblées en fonction de leur profil en CCM réalisée en phase normale dans le solvant chloroforme –méthanol 95-5 et 80-20, pour donner 15 fractions.

La fraction F6 (9-27) purifiée sur une colonne de gel de silice en phase normale avec l'éluant CHCl<sub>3</sub>-MeOH (90-10), a abouti à l'isolement du composé B à l'état pur (8,2 mg).

## 5. Caractéristiques spectrales des composés isolés

### 5.1. Composé A



**Formule brute :** C<sub>39</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub>

**Nom systématique :** 3-O-[(3'',6''-di-O-para coumaroyl)-β-D glucopyranosyl]-Kaempferol

**Masse moléculaire :** 763.1639 [M+Na]<sup>+</sup>

**Poids du produit :** 5,6 mg

**Comportement chromatographique :**

- Rf = 0,4 (système d'élution : CHCl<sub>3</sub>-MeOH 90-10 v/v)
- Visible sous la lumière UV
- Coloration avec la vanilline sulfurique : jaune

$$[\alpha]_{\text{D}}^{22,5} = -79 ; [\alpha]_{578}^{22,5} = -89,5 ; [\alpha]_{546}^{22,5} = -109$$

**Spectre IR:** OH (3302), CO (1685), C=C (1500).

**Spectre de masse (m/z)**

[M+Na]<sup>+</sup> : m/z théorique 763.1639 ; m/z trouvé 763.1639.

[M<sub>2</sub>+Na]<sup>+</sup> : m/z théorique 764.1702 ; m/z trouvé 764.1697.

[M<sub>2</sub>-H+2Na]<sup>+</sup> : m/z théorique 786.1521 ; m/z trouvé 786.1550.

[M<sub>3</sub>+Na]<sup>+</sup> : m/z théorique 765.1764 ; m/z trouvé 765.1754.

**Spectre RMN <sup>1</sup>H :(400 MHz, MeOH, TMS) :**

6,14 (1H, d, H-6)

6,32 (1H, d, H-8)

8,00 (2H, d, H-2', H-6')

6,78 (2H, d, H-3'-H-5')

5,36 (1H, d, H-1'')

3,69 (1H, dd, H-2'')

5,12 (1H, t, H-3'')

3,71 (1H, m, H-4'')

3,60 (1H, m, H-5'')

4,32 (1H, dd, H-6a'')

4,23 (1H, d, H-6b'')

7,49 (2H, d, H-2''', H-6''')

6,80 (2H, d, H-3''', H-5''')

7,43 (1H, d, H-7<sub>(1)</sub>''')

6,10 (1H, d, H-8<sub>(1)</sub>''')

7,31 (2H, d, H-2'''; H-6''')

6,82 (2H, d, H-3<sub>(2)</sub>''', H-5<sub>(2)</sub>''')

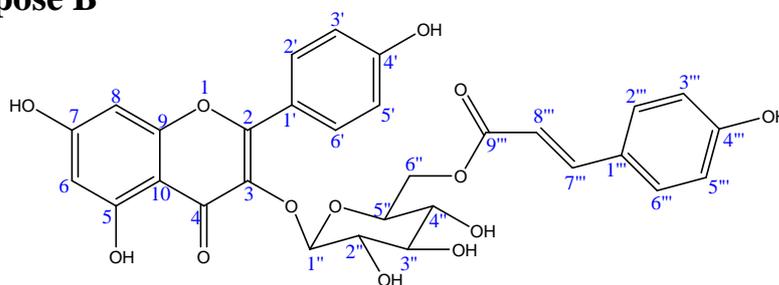
7,68 (1H, d, H-7<sub>(2)</sub>''')

6,42 (1H, d, H-8<sup>'''</sup>)

### Spectre RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS)

159,3 (C-2) ; 135,1 (C-3) ; 179,4 (C-4) ; 163,0 (C-5) ; 100,0 (CH-6) ; 166,0 (C-7) ; 94,9 (CH-8) ; 158,5 (C-9) ; 105,6 (C-10) ; 122,7 (C'-1) ; 132,2 (CH'-2, CH'-6) ; 116,8 (CH'-3, CH'-5) ; 161,6 (C'-4) ; 103,7 (C''-1) ; 74,1 (C''-2) ; 78,7 (C''-3) ; 70,1 (C''-4) ; 75,7 (C''-5) ; 64,1 (C''-6) ; 127,1 (C'''-1)<sub>(1)</sub> ; 131,2 (CH'''-2, CH'''-6)<sub>(1)</sub> ; 115,4 (CH'''-3, CH'''-5)<sub>(1)</sub> ; 161,3 (C'''-4)<sub>(1)</sub> ; 146,6 (CH'''-7)<sub>(1)</sub> ; 114,6 (CH'''-8)<sub>(1)</sub> ; 168,7 (C'''-9)<sub>(1)</sub> ; 127,3 (C'''-1)<sub>(2)</sub> ; 131,0 (C'''-2, C'''-6)<sub>(2)</sub> ; 115,7 (C'''-3, C'''-5)<sub>(2)</sub> ; 161,6 (C'''-4)<sub>(2)</sub> ; 146,6 (C'''-7)<sub>(2)</sub> ; 114,6 (C'''-8)<sub>(2)</sub> ; 169,0 (C'''-9)<sub>(2)</sub>.

## 5.2. Composé B



**Formule brute :** C<sub>30</sub>H<sub>26</sub>O<sub>13</sub>

**Nom:** 3-O-[(6''-O-trans-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranosyl]-Kaempferol.

**Autre nom (systématique):** 4H-1-Benzopyran-4-one, 3,5-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3-[[6-O-[(2E)-3-(4-hydroxyphenyl)-1-oxo-2-propen-1-yl]-β-D-glucopyranosyl] oxy]

**Masse moléculaire :** 617.1268 [M+Na]<sup>+</sup>

**Poids du produit :** 8,2 mg

### Comportement chromatographique

- R<sub>f</sub> = 0,6 (système d'élution : CHCl<sub>3</sub> / MeOH / H<sub>2</sub>O 80/20/2 v/v)
- Visible sous la lumière UV
- Coloration avec la vanilline sulfurique : jaune

### Spectre RMN <sup>1</sup>H :( 400 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS)

6,13 (1H, d, H-6)

6,30 (1H, d, H-8)

7,97 (2H, d, H-2', H-6')

6,80 (2H, d, H-3'-H-5')

5,24 (1H, d, H-1<sup>''</sup>)  
3,45 (1H, m, H-2<sup>''</sup>)  
3,44 (1H, m, H-3<sup>''</sup>)  
3,32 (1H, m, H-4<sup>''</sup>)  
3,45 (1H, m, H-5<sup>''</sup>)  
4,28 (1H, dd, H-6a<sup>''</sup>)  
4,21 (1H, d, H-6b<sup>''</sup>)  
7,30 (2H, d, H-2<sup>'''</sup>, H-6<sup>'''</sup>)  
6,80 (2H, d, H-3<sup>'''</sup>, H-5<sup>'''</sup>)  
7,39 (1H, d, H-7<sup>'''</sup>)  
6,06 (1H, d, H-8<sup>'''</sup>)

**Spectre RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD, TMS)**

158,5 (C-2) ; 135,2 (C-3) ; 179,5 (C-4) ; 163,0 (C-5) ; 100,0 (CH-6) ; 166,0 (C-7) ;  
94,8 (CH-8) ; 159,4 (C-9) ; 105,6 (C-10) ; 122,8 (C'-1) ; 132,2 (CH'-2, CH'6) ; 116,1  
(CH'-3, CH'-5) ; 161,6 (C'-4) ; 104,0 (C''-1) ; 78,0 (C''-2) ; 75,7 (C''-3) ; 71,8 (C''-4) ;  
75,8 (C''-5) ; 64,3 (C''-6) ; 127,1 (C'''-1) ; 131,2 (CH'''-2, CH'''-6) ; 116,8 (CH'''-3, CH'''-  
5) ; 161,2 (C'''-4) ; 146,6 (CH'''-7) ; 114,8 (CH'''-8) ; 168,8 (C'''-9)

**Spectre IR:** OH (3414 cm<sup>-1</sup>), CO (1680 cm<sup>-1</sup>) C=C (1500cm<sup>-1</sup>).

**Spectre de masse (m/z)**

[M+Na]<sup>+</sup>: m/z 617.1271

[M-AH+Na]<sup>+</sup>: m/z 331.0774

[AH+Na]<sup>+</sup>: m/z 309.0383

[M-H+2Na]<sup>+</sup>: m/z 619.1347

## Références bibliographiques :

[1] : **Paul. Iserin**

Larousse Encyclopédie des plantes médicinales, 2eme édition, Parie, France  
10,11 1997

[2] : **P. Ozenda**

Flore du Sahara, Ed, CNRS, Paris, France, 349-350, 1977

[3] : **P. Quezel, S. Santa,**

Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales,  
Tomme 2 CNRS, Paris France, 693-694, 1963

[4] : **K. Javidinia.**

Journal of Essentiel Oil Research, JEOR,  
Composition of the essentiel oil of *Helianthemum kahiricum* jan/ fev 2007.

[5] : **V. Hywood**

Les plantes à fleurs, Nathan, 1996.

[6] : **J. Bellakhdar**

Médecine arabe ancienne et savoir populaires  
La pharmacopée marocaine traditionnelle, Ibris Press, 254, 1997.

[7] : **H. Bouamama, T. Noel , J. Villard , A. Benharref , M. Jana**

Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species.  
Journal of Ethnopharmacology ,104–107 (2006)

[8] : **Elisabeth Basaba, Fernando Calzada, Rafael Compos**

In vivo anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal  
plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea.  
Journal of Ethnopharmacology 109, 552-554,2007.

[9] : **Elizabeth Barbosa , Fernando Calzada , Rafael Campos.**

Anti-giardial activity of methanolic extracts from *Helianthemum glomeratum*  
Lag. and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1. Journal of  
Ethnopharmacology 108 (2006) 395–397

[10]: **J.De Pascual Teresa, P. Basabe., I. S. Marcos, F. Bermejo. et J. G. Urones.**

(1981) An. Quim. 77C, 184.

[11]: **J.De Pascual Teresa, J. G. Urones, P. Basabe, F.Bermejo, et I. S. Marcos.,**

(1981) An. Quim. 77C, 290.

[12]: **J.DE Pascal Teresa, J.G.Urones, I. S Marcos, F. Bermejo et basabe**

- Rearranged labdane salmantic acid from *Cistus Laurifolius*. phytochemistry, vol .22. (22) 2783-2785 1983
- [13]: **J.DE Pascal Teresa, J.G.Urones , Marcos, I. S, P. B. Barcala et M. Narciso**  
 Diterpenoid and other components of *Cistus Laurifolius*. Phytochemistry vol. 25 (5) 1185-1187. 1986.
- [14]: **M. T. Calabuig, M.Cortés, C. G. Francisco, r. hernandez et E.Suarez**  
 Labdane diterpenes from *cistus symphytifolius*. phytochemistry, vol. 20. 9. 2255-2258, 1981
- [15]: **J.DE Pascal Teresa, I. S. Billido, P.Bsabe, I. S. Marcos, L. F. Ruano et J. G. Urones.**  
 Labdane diterpenoids from *cistus ladiniferus*. Phytochemistry, vol. 21. 4. 899-901, 1982
- [16]: **J.DE Pascal Teresa, J. G. Urones, I. S Marcos, P.Bsabe et L. Nunez**  
 Diterpenoids and flavonoids from *cistus palinhea*. Phytochemistry, vol. 22. 12. 2805-2808, 1983.
- [17]: **Tomas Vogt et Paul Gerhard Gultez .**  
 Accumulation of flavonoids during leaf development in *cistus laurifolius*. Phytochemistry, vol. 36. 3. 591-597, 1994.
- [18]: **Frank petereit, Herbert Kolodziej et Adolf Nahrested**  
 Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *cistus incanus*. Phytochemistry, vol. 30. 3. 981-985, 1991.
- [19]: **Andreas Danne, Frank Peterteit et Adolf Nahrestedt**  
 Proanthocyanidins from *cistus incanus*. Phytochemistry, vol. 34.4. 1129-1133, 1993.
- [20]: **Andreas Danne, Frank Petereit et Adolf Nahrsted**  
 Flavan-3-ols, prodelphinidins and further polyphenols from *cistus salvifolius*. Phytochemistry, vol. 37.2. 533-538, 1994.
- [21]: **Dina I.M.D. De Mendonça, Jusus M.L. Rodilla, Anna M.Lithgow et Isidr6o S.Marcos**  
 Hydrohalimic acids from *halimium viscosium*. Phytochemistry, vol. 44. 7. 1301-1307, 1997.
- [22]: **J.De Pascual Teresa, J. G. Urones, S. H. Carrillo, and Muiloz,**  
 M. A. G. (1979) An. Qufm. 75, 140

- [23]: **De Pascual Teresa, J. Urones, J. G. et Carrillo, S. H.**  
An. Quim. 74, 489, (1978).
- [24]: **De Pascual Teresa, J. Urones, J. G, I.S.Marcos, D.Diez Martin et V. Alvarez. M.**  
Labdane diterpenoids from *halimium viscosium*. Phytochemistry, vol. 25. 3. 711-713, 1986.
- [25]: **J.G. Urones, I.S. Marcos, N.M. Garrido, et P.B. Barcala**  
Diterpenoids of *halimium viscosium*. Phytochemistry, vol. 29. 9.2927-2930, 1990.
- [26]: **J.G. Urones, I.S. Marcos et N.M. Garrido**  
Tormesane derivatives of *halimium viscosium*. Phytochemistry, vol. 29. 10. 3243-3246, 1990.
- [27]: **J.G. Urones, I .S. Marcos, D.D. MARTIN, F. M. S. Britopalma and J.M. Rodlla**  
Labdane diterpenoids from *halimium viscosium* and *halimium verticilatum*. Phytochemistry, vol. 26, 11, pp. 3037-3040,1987.
- [28]: **J. M. L. Rodilla, M. I. Ismael, L. A. Silva, J. P. Cesario Serrano, J. G. Urones and F. Sanzc.**  
Covilanone a new rearranged labdane type diterpene. Tetrahedron Letters 43 (2002) 4605–4608
- [29]: **J.G. Urones, I.S. Marcos, D.D.Martin, N.M. Garrido et R.Alfayate. Guerra.**  
Diterpenoids from *halimium viscosium*. Phytochemistry, vol. 26. 4. 1077-1079, 1987.
- [30]: **I.M.D. Dina, De Mendonça, M.L. Jesus, Rodilla, Anna M.Lithgow et Isidro S.M.**  
Hydrohalimic acids from *halimium viscosium*. Phytochemistry, vol. 44. 7. 1301-1307, 1997.
- [31]: **j.G.Urones, I.S.Marcos, M.J.S.Cuadrado, P.Besabe et Anna M, L.Bertelloni.**  
*Ent*-halimane diterpenes from *halimium viscosium*. Phytochemistry, vol. 29. 4. 1247-1251, 1990.

- [32]: **J.G.Urone, Isidro S.Marcos, P.Basabe, M.J.Sexmero, H.Carrillo et M.Jose Melchor.**  
 Minor diterpenoids from *halimium viscosium*. *Phytochemistry*, vol. 37. 5. 1359-1361, 1994.
- [33]: **J.G.Urones, I.S.Marcos, M.J.S.Cuadrado, P.Basabe et Anna.M.L.**  
 Nor-*ent*-halimanes from *halimium viscosium*. *Phytochemistry*, vol. 29. 11. 3597-3600, 1990.
- [34]: **Urones, J. G., Basabe, P., Marcos, I. S., Alonso, C. Oliva, I. M., Garrido, N. M., Diez, D. and Lithgow, A. M.**  
*Tetrahedron* 19, 4051. (1993)
- [35]: **Urones J. G, Marcos.i.S. Basabe.P, Alonso. C, A.Diez, D.Garrido, N. M. and Oliva. I. M.**  
*Tetrahedron Letters* 31, 5665, (1992).
- [36]: **J.G.Urone, Isidro S.Marcos, P.Basabe, Conception .A, Isabel. M. Oliva,Narcio. M, D.D Martin et Anna .M .L**  
 Diterpenes with a valparane skeleton. *Phytochemistry*, vol. 34. 3. 747-750, 1993.
- [37]: **Jesus.M.L.Rodilla, Dina I. M.DeMendonça, J.G.Urones, R.F.Moro et D.J.Williams.**  
 Tricyclic diterpenes from *halimium viscosium*. *Phytochemistry*, vol. 47. 8. 1545-1549, 1998.
- [38]: **Jesus.M.L.Rodilla, Dina I. M.DeMendonça, J.G.Urones, R.F.Moro**  
 Hydroxylated diterpenoids from *halimium viscosium*. *Phytochemistry*, vol. 47.8. 1545-1549, 1998.
- [39]: **Julio .G.Urones, I.S.Marcos et N.M.Garrido**  
 $\alpha$ -Truxillic acid from *halimium verticillatum*. *Phytochemistry*, vol.29. 10. 3243-3246, 1990.
- [40]: **J. G. Urone, I.S.Marcos , D.D.Martin, J.M.L.Rodilla .D.I.M.Dinsdemen et D.J.Williams**  
 $\alpha$ -truxillic acid from *halimium verticillatum* *Phytochemistry*, vol.36. 2. 529-530, 1994.
- [41]: **J. G. Urone, I.S.Marcos, D. MARTIN, F. M. S. Britopalma et J. M. Rodilla.**  
 Labdane diterpenoids from *halimium verticillatum*. *Phytochemistry*, vol.26. 11. 3037-3040, 1987.
- [42]: **Elisabeth Basaba, Fernando Calzada, Rafael Compos**

In vivo anti-giardial activity of three flavonoids isolated from some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea.

Journal of Ethnopharmacology 109, 552-554, 2007.

**[43],[44] : Chapman et Hall.**

DNP dictionary of natural products on CD-ROM, version 13.2., CRC, LONDON, UK July 2010.

**[45]: I, Litton Educational Publishing.**

MV.H.Hywood, les plantes à fleurs, Nathan, 1996

**[46]: A. Merfak, 2003**

Thèse d'état (biophysique). Radiolyse Gamma des flavonoïdes, université de Limoges, France.

**[47]: Axel Ghestem, Elisabeth Seguin, Michel Paris, Anne-Marie Oricchioni.**

Le préparateur en pharmacie, Ed France, 108, 2001

**[48]: Dewick.P.M. 1993.**

Isoflavonoïdes, the flavonoïdes advances in research since 1986 ed by Harborne, Chapman. London, 117-238,

**[49]: Brunton,j 1999.**

Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales.ed (3) Tech et Doc Paris.

**[50]: Harborne J.B (1991).**

Flavonoïdes in phytochemistry, Vol II, Edition Lawrence, P.L., Vol. II, Litton Educational Publishing .

**[51]: Richter G. (1993),**

Métabolisme des végétaux (Physiologie et Biochimie). Presses polytechniques et universitaires romande, Lansanne CH-1015.

**[52]: Iinuma, M. and Mizuno,H. (1989),**

Phytochemistry, 28,681

**[53]: Dixon, R. A, et steele C.L 1999,**

Flavonoïdes et isoflavonoïdes. Usine Sci. 4.2 De tendance : 394-400.

**[54]: Kochs, G. and Grisebach, H. 1986.**

*Eur.J.Biochem.* 155, 311

**[55]: Heller, W. and Forkmann, G. 1988.**

In the flavonoïdes advances in research since 1980.ed.J.B. Harborne, Chapman and Hall, London, 399-425.

**[56]: Ebel J. and Jahlbrock, K. 1982,**

In the flavonoides advances in research eds.J.B. Harborne, and T. J.Mabry,  
Chapman and Hall, London pp.641-659.

[57]: **Khouri, H.E, Tahara, S., and Ibrahim .R.K.1988**

J.Chromatography, 487, p.291.

[58]: **Tahra.S, Hachidoko,Y, Ingham. J.L, and Mizutani.J.1986**

Agric.Biol.Chem.50, 1899

[59]: **Muzino, M, Tanaka. T, Tamura.K, Matsuura.N, Linnuma.M and  
phengklai.C, 1990**

Phytochemistry 29, 2663

[60]: **Harbone.j.b. and Williams.C.A 1988.**

In the flavonoids advances in research since 1986.ed.J.B.harborne, champan  
Ltd.303.

[61]: **Heller, W and Fokmann, G.1993**

The flavonoides advances in reseach since 1986, ed J.B.Haborne. Chapmen and  
hall London, pp 499-535.

[62]: **Cmopin.J.1966**

Actualité de phytochimie fondamentale, IIème série, iddition Masson, Parid,  
P.119

[63]: **Nitsh.J.P, et Nitsh.C, 1961**

Synergistes naturels des auxines et des giberlilines.Bull.soc.Fr.26 : pp.2237-  
2240

[64]: **Alibert .G Rangiva.R et Boudet.M.A 1977**

Organistion subcellulaire res vois de synthèse des composés phynolique.  
Physiol. Veg.15 :pp.279-301.

[65]: **Middelton.Jr.E, ET Kardasnam.C, 1993**

The flavonoides, advances in research since 1986.ed.J.B.Harborn, Chapman and  
Hall, London, 617-652.

[66]: **Harborne, J.B. and Williams, C.A 200**

Advances in Research Since 1992. Phytochemistry , 55. pp 481-564.

[67]: **Axel Ghestem, Elisabeth Seguin, Michel Paris, Anne-Marie Oricchioni 2001.**

Le préparateur en pharmacie, ed Tec et Doc Paris,France, 110,

[68]: **Faggioto.A, Poli.A, et Catapano.A,**

Anti-oxidants and coronary artery disease.Curr Opin Lipidol ; 9 :541, 1998

**[69]: Van de Vijer.LP, Kardinaal.A.F, Grobbee.D.E, Princen, H.m.et Vanden Poppel.G.**

Lipoprotein oxidation, anti oxidants and cardiovascular risk : epidemiologic evidence.

Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids,57, 479-487. 1997.

**[70]: Fuchs, J. (1998).**

Potentials and limitations of the natural anti-oxidants RRR-alpha-tocophérol, l-ascorbic acid and  $\beta$ - carotene in cutaneous photoprotection.Free Rad Biol Med. 25, pp. :848-873.

**[71]: Weisburger, J. (1998),**

Chemoprevention of cancer by tea. In : Prasad KN, Cole WC, editors. Cancer and nutrition. New York : IOC Press ; p.167-71.

**[72]: Cook, N.C, and Samman, S. (1996).**

Flavonoids-chemis. try, Metabolism, cardioprotectives effects and dietary sources,J.

Nutr.Biochem., vol.7 (février).

**[73]: Hertog, M.G.L, Hollmann, P.C.H., Katan, M.B, and Kromhout,D. ( 1993),**

Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands.Nutr.Cancer, 20, pp. 21-99.

**[74]: Lee,H.P., gourley,L., Duffyn, S.W., Esteve,J., Lee, J. and Day , N.A. (1991),**

Dietary effects on breast cancer risk in Singapores. Lancet 337,pp. 1197-1200.

**[75]: Clarkson, T.B., Anthony, M.S. and Hughes, C.L., (1995),**

Estrogenic soybean isoflavones and chronic -risks and benefits. Trends Endocrin Met 6 ; 11-16

**[76]: Hahida. F, and wanaundara, P.K.G.P.D. (1998).**

Phenolic antioxydants, Crit. Rev. Food Sci. Nutr, 32(1), pp.67-103.

**[77]: Yokozawa.T,Chen.C.P, Dong, Tanka.T.Nonaka, G.I, and Nishioka.I.1998.**

Study in the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, Biochem.Pharmacol, 56,2,pp.213-222

**[78]: Cao, G, Sofic.E, and prior.R.L.1997**

Antiosidant and proxydant behavior of flavonoids : Structure-activity relationships, Free Rdic.Biol.Med, 22,5, pp.749-760

- [79]: **Kitta.K, Hagiwara.Y, and Shilamoto.T, 1992**  
 Antioxidative activity of an Isoflavonoid, 2''-O-Glycosylisovitexin Isolated from green barley leaves, *J.Agric.Food.Chem*, 40, pp.1843-1845
- [80]: **Cos.P., Ying.L, Calomme.M, Hu.J.P, Cimanga.K, poel.B.V, Pieters.L, Vlietinck .A.J and Berphe.D.V, 1998**  
 Structure-Activity relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide scavengers.*J.Nat.Prod*, 61, pp71-76.
- [81]: **Getteridge.J.M.L, and Halliwell.B.1994**  
 Antioxidants in nutrition, Health and Disease.Oxford University Press.Oxford
- [82]: **Colette.N, Bernier.J.L, Henichart.J.P, Catteau.J.P, GyadouE.M, Wallt.J.C, 1992**  
 Scavenger and antioxidant properties of ten synthetic flavones. *Free Radical Biology and Medicine*.13, pp.211-219
- [83]: **Nukujima, T., Manishi, I., Yamamoto,K ., Cyong, J.C. and Hiaria , K. (2001),**  
 Inhibitory effects of Baicalein, A Flavonoid in Scutellaria Root, On Eotaxin production by human Dermal Fibroblasts, *Plant Med.*, 67,pp. 132-135.
- [84]: **Emin, J.A., Oliveira, A.B. and Iapa, A.J (1994).**  
 Pharmacological Evaluation of the anti-Inflammatory activity of a citrus bioflavonoids, Hesperidin, and isoflavonoids, Durtin and Claussequinone in rats and mice,*J.Pharmacol.*, 46,pp.118-122
- [85]: **Eibi,G, Wagner,H .( 1991),**  
 A new method for the in vivo screening of inhibitors of Angiotensin converting Enzyme (ACE), Using the chromophore labeled Substrate Dansyltriglycine, *Plant Med.*57, pp. 137-141
- [86]: **Gordon, H.M. (1996),**  
 Dietary Antioxidants in Disease Prevention. *Natural Product reports*,pp.265-273.
- [87]: **Matsuda.H, Yano.M, Kubo.M, Linuma.M, Oyama.M and Mizuno.M, 1991**  
 Pharmacological Study on Cistus Fruits Unshiu Marcovich (2) on Flavonoid Components, *Yacogata Zasshi*, 111, pp, 193-198
- [88]: **Shahat.A.A, Cos.P, Bruyene.T.D, Apers.S,Hammouda.F.M, Ismail.S.I,**

Azzam.S, Claeys.M,Goovaets.E, Pieters.I, Bergue,.D.V, and Vlietinck.A.J 2002  
Antiviral and antioxidant activity of flavonoids and Proanthocyanidins from  
*Crataegus simaica*, Planta Med, 68, pp, 539-541

**[89] : Dixon. R.A 2004**

Phytoestrogens. Annus. Rev. PlantBiol.55, pp, 225-261

**[90]: Mabry.T.J, Markham.K.R, and Thomasm.b 1970**

The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag New York,  
Heidelberg, 254p

**[91]: Harborne, J.B. 1966**

In « Comparative Phytochemistry » (Goodwig,T.W.ed), Academic press  
London.

**[92]: Berthilier.A. 1972**

La Chromatographie et ses applications, Dunod Paris

**[93]: Jurd.L, and Horwitz.R, 1962**

Spectral properties of flavonoids compounds, pergmon press, Oxford, 107-2055

**[94]: Markham.K.R, and Mabry.T.J, 1968**

Phytochemistry, 7, pp.1197.

**[95]: Horhammer.L.and Hansel.R 1952**

Arch.pharm, 285, 438.J.

**[96]: Jurd.L and Geissman.T.A, 1956**

J.Org.chem, 21, 1395

**[97]: Audier. H, 1966.**

Etude des composés flavoniques par spectrometrie de masse

**[98]: Neilsen. J.G et Moller J 1970**

Acta Chem.Scand, 24 ,2665

**[99]: Markham. K.R, and Geiger.H 1993**

The flavonoids advances in research since 1986. Edited by J.B Haborne,  
chapman and hall. London.

**[100]: Mekkiou.R**

These de doctorat (phytochimie) université Constantine.

Recherche et détermination structural des métabolites secondaires du genre  
*Genesta*

**[101]: Fathy.M.Solaiman, Afaf.HShehata, Amal.E.Khalil, et Shahira .M.Ezzat.**

Molecules 2002,7,245-251

**[102]: Felice Senator, Mario D'Agostino, and Irene Dini. 2000**

J.Agric.Food Chem.84, 2659-2662

**[103]: Sachiko.T, Koyoko.T, Maki.A, Hiroyuki.O, Hiroshi.H, Eiji I, Tomihisa O.2004.**

Isolation of cytochromeP450 inhibitors from strawberry fruit, fragaria ananassa

J. Nat. prod.67, 1839-1841.

**[104]: Hongmei Liu, Jimmy Orjala, Otto Sticher, Topul Rali.1998**

Acylated flavonol glycosides from leaves of Stenochlaena palustris

J. Nat. prod.62, 70-75.

## Résumé

Le présent travail est le bilan d'une étude phytochimique, que nous avons menée sur *l'Hélianthemum Kahiricum* (Del) (famille Cistaceae), plante endémique subsaharienne.

Nos investigations ont été portées sur les extraits chloroformiques et butanolique des parties aériennes de cette plante. Deux métabolites secondaires ont été caractérisés et sont de composés flavoniques.

Les structures de ces deux composés sont élucidées sur la base des méthodes spectroscopiques notamment la spectrométrie de masse, IR, UV, la RMN dans ses multiples techniques, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, et RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC)

Les résultats de ce travail seront présentés comme suit :

- ❖ une première partie appelée travaux antérieurs consacrés à la description botanique de la plante aux propriétés biologiques du genre (*Helianthemum*) qu'aux études chimiques antérieures réalisées sur la famille et le genre.
- ❖ une seconde partie consacrée à une étude impliquant la structure, classification, activité biologique, et biosynthèse des flavonoïdes.
- ❖ une troisième partie décrivant nos travaux personnels allant de la séparation à la détermination de structures des produits isolés.
- ❖ une quatrième partie constituant la partie expérimentale.

**Mots clés :** phytochimie, Cistaceae, *helianthemum kahiricum* Del, composé flavoniques, RMN 1D et 2D, spectrométrie de masse.

## ملخص

هذا العمل عبارة عن حصيلة للدراسة الفيتو كيميائية التي أنجزت على نبتة شبه

### صحراوية *Helianthemum Kahiricum*

أبحاثنا متعلقة بالمستخلص الكلوروفورمي و البوتانولي للجزء الهوائي لهذه النبتة حيث تم تمييز مركبين عضويين من الايض الثانوي وهما مركبان فلافونيان تم عزل المركبين العضويين بواسطة مختلف طرق الفصل الكروماتوغرافي و حددت بنيتهما على أساس الطرق المطيافية لا سيما مطيافية الكتلة مطيافية تحت الحمراء والرنين المغناطيسي النووي بمختلف تقنياته.

نتائج هذا العمل ستوضح كما يلي :

الفصل الأول : بعنوان الأعمال المقدمة مخصصة للوصف النباتي للنبتة الخصائص البيولوجية للنوع وكذلك الدراسة الكيميائية حول العائلة و النوع

الفصل الثاني : مخصص لدراسة متضمنة البنية التصنيف والنشاط

البيولوجي و الخلق الحيوي للفلافونيدات

الفصل الثالث: يضم الأعمال الشخصية المتعلقة بفصل و تحديد بنية المركبات

المعزولة

الفصل الرابع: مخصص للجزء العملي