

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

**UNIVERSITE DES FRERES MENTOURI-CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES EXACTES
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

N° d'ordre :

N° de série :

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme du Doctorat 3^{ème} cycle (LMD)

Spécialité : Chimie pharmaceutique

Par

M^{lle} Khawla KERBAB

Thème

Validation scientifique de l'utilisation traditionnelle des plantes médicinales algériennes : *Halimium halimifolium* (L.)Wilk et *Thymelaea microphylla* Coss.et Dur., composition chimique et activité biologique

Devant le jury

BENAYACHE Fadila	Pr. Université des frères Mentouri, Constantine1	Présidente
ZAITER Lahcene	Pr. Université des frères Mentouri, Constantine1	Directeur de thèse
BENAYACHE Samir	Pr. Université des frères Mentouri, Constantine1	Examineur
RASTRELLI Luca	Pr. Université Salerno, Italie	Examineur
BOUDJERDA Azzedine	Pr. Université Mohamed seddik Benyahya, Jijel	Examineur
BENTHAMENE Ali	Pr. Université des frères Mentouri, Constantine1	Examineur

Soutenue : 2017

Dédicace

Cette thèse est dédiée à mes chers parents,

à mes sœurs Hadya, Nouhad, Nerdjis,

à mon frère Abdellah.

Pour leurs soutien et encouragements qu'ils m'ont

prodigués tout au long de ma scolarité.

Qu'ils en soient remerciés par cette sincère dédicace.

Remerciements

*En préambule à l'exposé des travaux ayant conduit à la réalisation de ce mémoire, je tiens à remercier, en premier lieu ; Monsieur **Lahcene ZAITER**, Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine1, pour son encadrement, sa patience et sa disponibilité tout au long des étapes ayant conduit à la réalisation de ce travail.*

Et je remercie également les membres du jury

*Madame **Fadila BENAYACHE**, Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine1, pour avoir su m'inculquer la passion de la chimie organique, ses judicieux conseils, son aide précieuse et surtout de m'avoir fait l'honneur de présider le jury désigné pour cette thèse.*

*Monsieur **Samir BENAYACHE**, Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine1, et directeur de L'unité de Recherche VARENBIOMOL pour son aide logistique pendant mes années de recherche ainsi que pour son acceptation d'être parmi le jury.*

*Monsieur **Azzedine BOUDJERDA**, Professeur à l'université Mouhamed seddik Benyahya de Jijel, pour son acceptation d'être parmi le jury.*

*Monsieur **Ali BENTHAMENE**, Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine1, également pour son acceptation d'être parmi le jury.*

*Monsieur **Luca RASTRELLI**, Professeur à l'université Salerno, Italie et directeur de laboratoire de Food and phytochemistry, de m'avoir accueillie dans son groupe et de m'avoir donné l'opportunité de me former en phytochimie avec des appareils modernes. Je le remercie également de m'avoir donné la possibilité de présenter mes résultats dans différentes publications scientifiques, pour ses nombreux conseils et suggestions tant scientifiques que techniques et pour avoir accepté de faire partie du jury.*

Enfin, j'adresse mes plus sincères remerciements pour toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

AcOEt	: Acétate d'éthyle.
CC	: Chromatographie sur Colonne ouverte.
CAP	: Cellulose acétate phthalate.
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince.
Cosy	: Correlation spectroscopy.
d	: Doublet.
DAD	: Détecteur de diodes.
dd	: Doublet de doublet.
DPPH	: 1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyle.
ESI	: Electro Spray Ionisation.
Hh-1, Hh-2,..	: Les composés isolés de l'espèce <i>H.halimifolium</i> .
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity.
HSQC	: Heteronuclear Single Quantum Connectivity.
HPLC	: Chromatographie Liquide Haute Performance.
IC₅₀	: Concentration Inhibitrice à 50%.
Infusé Hh	: Infusé préparés à partir de la plante <i>Halimium halimifolium</i> .
J (Hz)	: Constante de couplage exprimée en Hertz.
LC/MS	: Chromatographie Liquide couplée à la spectromètre de masse.
LC/MS/MS	: Chromatographie Liquide couplée à deux spectromètres de masse.
MeOD	: Méthanol deutéré.
MeOH	: Méthanol.
MPHh	: Microparticules préparés à partir de l'infusé Hh.
MS	: Spectrométrie de masse.
M/Z	: Masse sur charge d'ion.
ppm	: Partie par millions.

RMN ¹H : Résonance Magnétique Nucléaire du proton.
RMN ¹³C : Résonance Magnétique Nucléaire du carbone.
RP : Phase inverse.
Tm-1, Tm-2,.. : Les composés isolés de l'espèce *T.microphylla*.
tR : Temps de rétention.
UV : Ultra-Violet.

Sommaire

Introduction générale.....	1
Références.....	3

Partie I. Généralités et données bibliographiques

Chapitre 1. Composés phénoliques des plantes

1. Généralités	4
2. Biosynthèse.....	5
2.1. Par la voie de shikimate.....	5
2.2. Par la voie d'acétyl-CoA	6
3. Classification	6
3.1. Flavonoïdes	6
3.2. Acides phénoliques	7
3.2.1. Acide phénols dérivés de l'acide benzoïque.....	8
3.2.2. Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique	8
3.2.3. Phénols simples.....	8
3.3. Coumarines	9
3.4. Lignanes et composés apparentés.....	9
3.5. Quinones.....	10
3.6. Stilbènes.....	10
3.7. Tannines.....	11
Conclusion.....	11
Références	12

Chapitre 2. Aspect botanique et présentation des plantes étudiées

Introduction.....	14
1. Les Cistacées.....	15
1.1. Généralités sur la famille Cistaceae.....	15
1.1.1. Introduction.....	15
1.1.2. Classification botanique	15
1.1.3. Description botanique	15
1.1.4. Utilisation traditionnelles de Cistaceae.....	16

1.1.5. Propriétés biologique de Cistaceae.....	16
1.1.6. Etude chimique de la famille Cistaceae.....	16
1.2. Le genre <i>Halimium</i>	17
1.2.1. Les principaux constituants chimiques du genre <i>Halimium</i>	17
1.2.1.1. L'espèce <i>H. viscosium</i>	17
1.2.1.2. L'espèce <i>H. verticillatum</i>	23
1.2.1.3. Espèce <i>H. voldii</i>	24
1.2.2. Etude biologique du genre <i>Halimium</i>	25
1.3. Etude de l'espèce <i>Halimium halimifolium</i>	25
1.3.1. Place dans la systématique.....	25
1.3.2. Synonymes	25
1.3.3. Description botanique	26
1.3.4. Travaux antérieurs.....	26
Références.....	28
2. Les Thymelacées.....	31
2.1. Généralité sur la famille Thymelaceae	31
2.1.1. Répartition géographique et taxonomie	31
2.1.2. Description et Caractères morphologique.....	32
2.1.3. Utilisations traditionnelles de Thymelaceae	33
A. Utilisations non-médicinales	33
B. Utilisations médicinales	34
2.2. Le genre <i>Thymelaea</i>	35
2.2.1. Généralité sur le genre <i>Thymelaea</i>	35
2.2.2. Les constituants chimiques du genre <i>Tyhmelaea</i>	35
2.2.3. Propriétés thérapeutiques et usage	36
2.3. Etude de l'espèce <i>Thymelaea microphylla</i> Coss. et Dur.	37
2.3.1. Position systématique	37
2.3.2. Noms vernaculaires	37
2.3.3. Description botanique de l'espèce <i>Thymelaea microphylla</i>	37
2.3.4. Propriétés et usages thérapeutiques	38
2.3.5. Travaux antérieurs	38
Conclusion.....	40
Références.....	41

Partie II. Etude phytochimique et biologique de deux espèces

Chapitre 1. Investigation phytochimique de l'espèce *Halimium halimifolium*

1. Etude phytochimique de l'espèce <i>Halimium halimifolium</i>	44
1.1. Matériel végétale.....	44
1.2. Macération et extraction.....	44
1.3. Etude chimique de l'extrait acétate d'éthyle	46
1.3.1. Analyse qualitative de la phase acétate d'éthyle.....	46
1.3.2. Séparation chromatographique.....	47
1.3.3. Purification des fractions.....	49
1.4. L'étude phytochimique de l'extrait n-butanol.....	50
1.4.1. Colonne chromatographique et fractionnement.....	50
1.4.2. Purification.....	51
2. Elucidation structurale des composés isolés	51
2.1. Détermination structurale des composés de type flavonoïdes	52
2.1.1. Identification du composé Hh-3	52
2.1.2. Identification du composé Hh-8.....	54
2.1.3. Identification du composé Hh-4.....	58
2.1.4. Identification du composé Hh-10.....	62
2.1.5. Identification du composé Hh-12.....	64
2.1.6. Identification du composé Hh-18.....	71
2.1.7. Identification du composé Hh15- et Hh-16.....	74
2.2. Détermination structurale des composés de type acides phénoliques	75
2.2.1. Identification du composé Hh-1.....	75
2.2.2. Identification du composé Hh-2.....	77
2.2.3. Identification du composé Hh-14.....	79
2.2.4. Identification des composés Hh-5 et Hh-6.....	83
2.2.5. Identification du composé Hh-13.....	89
2.2.6. Identification du composé Hh-7.....	91
2.2.7. Identification du composé Hh-9.....	92
2.2.8. Identification du composé Hh-19.....	94
Conclusion.....	95
Références.....	96

Chapitre 2. Investigation phytochimique de l'espèce *Thymelaea microphylla* Coss.et Dur

1. Etude phytochimique de l'espèce <i>Thymelaea microphylla</i>	98
1.1. Matériel végétal.....	98
1.2. Extraction.....	98
1.3. Etude phytochimique de l'extrait <i>n</i> -butanol.....	100
1.3.1. Fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanol	100
1.3.2. Séparation des fractions obtenues.....	101
2. Elucidation structurale des composés isolés.....	103
2.1. Détermination structurale des composés de type monoterpène glucosides.....	103
2.1.1. Détermination structurale du composé Tm-1.....	103
2.1.2. Détermination structurale du composé Tm-2.....	107
2.1.3. Détermination structurale du composé Tm-3.....	112
2.2. Détermination structurale des composés de type phénylpropanoïde glucosides.....	117
2.2.1. Détermination structurale du composé Tm-5.....	117
2.2.2. Détermination structurale du composé Tm-6.....	121
2.3. Détermination structurale des composés de type flavonoïdes.....	123
2.3.1. Détermination structurale du composé Tm-7.....	123
2.3.2. Détermination structurale du composé Tm-11.....	127
2.3.3. Détermination structurale du composé Tm-10.....	132
2.4. Détermination structurale benzyle glucoside Tm-12.....	137
2.5. Détermination structurale des composés de type ionol glucosides.....	141
2.4.1. Détermination structurale du composé Tm-14.....	141
2.4.2. Détermination structurale du composé Tm-13.....	146
2.4.3. Détermination structurale du composé Tm-15.....	148
2.4.4. Détermination structurale du composé Tm-16.....	149
2.6. Détermination structurale des composés de type lignanes.....	154
2.6.1. Détermination structurale du composé Tm-17.....	154
2.6.2. Détermination structurale du composé Tm-18.....	159
2.6.3. Détermination structurale du composé Tm-19.....	163
2.7. Détermination structurale des composés de type biscoumarine Tm-20.....	168
2.8. Détermination structurale des composés de type acide phénolique.....	172
2.8.1. Détermination structurale du composé Tm-4.....	172

2.8.2. Détermination structurale des composés Tm-8 et Tm-9.....	177
Conclusion.....	179
Référence.....	180
Chapitre 3. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de plantes	
1. Généralités.....	182
2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)	182
3. Détermination des concentrations EC ₅₀ des extraits de plante	183
3.1. Piégeage du radical libre (DPPH test) par <i>H. halimifolium</i>	183
3.2. Piégeage du radical libre (DPPH test) par <i>T. microphylla</i>	184
Conclusion.....	185
Référence.....	186

Partie III. Validation de l'usage traditionnelle de *Halimium halimifolium* et la formulation des extraits

Chapitre 1. Criblage chimique (HPLC-UV-MS) et pouvoir antioxydant des extraits aqueux

Introduction.....	187
1. Criblage chimique et biologique des extraits aqueux.....	188
2. Préparation des extraits.....	188
3. Pouvoir antioxydant des préparations traditionnelles.....	189
4. Analyse qualitative par HPLC-UV-MS.....	190
5. Identification des produits	192
5.1. Identification du produit 1	192
5.2. Identification des produits 2, 3	193
5.3. Identification du produit 4	194
5.4. Identification des produits 5, 6 et 7	195
5.5. Identification du produit 8	196
6. Analyse quantitative.....	198
Conclusion.....	200
Chapitre 2. Test de dissolution et formulation de l'infusé Hh	
Introduction	201
1. Amélioration de la biodisponibilité de l'infusé Hh	201
2. Préparation des microparticules à partir de l'infusé Hh	202
3. Le test de dissolution des microparticules	203
4. Le développement de la matrice gastro-résistante.....	204
4.1. Le test de MP-Hh dans les fluides gastriques et intestinaux (<i>in vitro</i>).....	204

4.2. Préparation de la matrice gastro-résistante MP-CAPHh.....	205
4.3. Test de dissolution du MP-CAPHh.....	205
5. Le dosage des microparticules par la méthode UV (analyse quantitative).....	207
6. Caractérisation de la matrice polymérique.....	208
Conclusion.....	210
Références.....	211
Conclusion générale.....	212
Résumé	
Abstract	

Introduction Générale

Introduction générale

La nature, ou comme l'appelle *Pierre Potier* « le Magasin du Bon Dieu », avec 250000 à 500000 espèces de plantes [1], ses micro-organismes et ses produits marins, est la source d'une formidable diversité de molécules, possédant parfois des propriétés thérapeutiques, mais servant aussi de modèles à l'imagination des chimistes, pour créer des molécules plus actives. Seule une poignée de ces richesses a été explorée [2].

L'Algérie, comprenait plus de 600 espèces de plantes médicinales et aromatiques. L'Hoggar comprenait une flore de 300 espèces dont plus d'un quart ont un usage médicinal traditionnel [3], mais plusieurs sont encore méconnues et exploitées de façon artisanale [4].

Grand nombre de la population algérienne utilise la médecine et la pharmacopée traditionnelles pour des raisons d'ordre socio-culturel, socio-économique et sanitaire. Pour ces raisons, l'opportunité offerte par la recherche sur l'ethno-médecine algérienne, qui utilise une grande variété de plantes pour le traitement des pathologies les plus fréquentées dans notre pays [5], est évidente. Dans le contexte socio-économique des pays en cours de développement, ce type d'étude peut aboutir à l'obtention de réponses thérapeutiques adéquates et de faible prix, joignant à une efficacité scientifiquement prouvée une acceptabilité culturelle optimale. Dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules bioactives d'origine végétale, il est donc préférable de ne pas baser le choix des plantes à étudier sur le seul hasard, mais de le circonscrire selon divers critères. Le plus utilisé est celui de leur emploi en médecine traditionnelle ou populaire qui valorise l'expérience accumulée par les autochtones dans le monde entier.

La valorisation des ressources de la médecine traditionnelle passe nécessairement par une expérimentation scientifique, utilisant des procédures scientifiques. Le point de départ fondamental est l'identification correcte de la plante objet de cette étude. Il est ensuite extrêmement important de confirmer l'efficacité thérapeutique et l'innocuité des recettes traditionnelles.

Inscrit dans le cadre d'une étude approfondie, ce travail de thèse avait pour objectif de réaliser une investigation chimique et une évaluation biologique des espèces appartenant à la flore algérienne afin d'optimiser l'usage traditionnel.

Ce travail est le résultat d'une recherche scientifique, effectuée auprès de l'unité de recherche «VARENBIOMOL», au département de chimie, l'université de Constantine-1, sous la direction de Pr. Samir BENAYACHE et le laboratoire de « Food and phytochemistry », département de pharmacie à l'université de Salerne, sous la direction de Pr. Luca RASTRELLI dont trois parties essentielles ont été planifiées :

- La première partie est particulièrement consacrée aux résultats décrits dans la littérature, avec un support bibliographique à base de quelques exemples de l'incroyable diversité des composés secondaires de type phénolique et ainsi leurs effets pharmacologiques que l'homme a pu exploiter afin de nous baser sur la présentation botanique et l'étude d'intérêt pharmacologique et l'usage phytothérapeutique des espèces : *Halimium halimifolium* (Cistaceae) et *Thymelaea microphylla* (Thymelaeaceae).
- La deuxième partie implique la présentation des résultats issus de la purification et la caractérisation des molécules obtenues lors de l'étude phytochimique des parties aériennes de *H. halimifolium*, *T. microphylla*, et aussi l'évaluation du pouvoir antioxydant en utilisant la méthode de DPPH *in vitro*.
- La troisième partie est réservée sur la validation de l'usage traditionnel de l'espèce *H. halimifolium* par le criblage chimique des constituants des préparations utilisées en médecine traditionnelle en utilisant la méthode de LC/ UV/ MS, puis la formulation des microparticules de l'extrait préparé afin d'obtenir un médicament à base de cette plante.

Références

1. Pierre, P., (2001). Dans Le Magasin du Bon Dieu. *Les extraordinaires richesses thérapeutiques des plantes et des animaux*.
2. Newmann, D., Cragg, G.M., (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, 70, 461- 477.
3. Mokkadem A., (1999). Cause de Dégradation des plantes médicinales et aromatiques d'Algérie. *Revue Vie et Nature* ,7, 24 - 26.
4. Abdelguerfi, A., Ramdane, M., (2003). Évaluation des besoins en matière de renforcement des capacités nécessaires à la conservation et l'utilisation durable de la biodiversité importante pour l'agriculture. Projet ALG/97/G31. *Plan d'action et stratégie nationale sur la biodiversité*. Tome XI, 230.
5. Reguieg, L., (2011). Using medicinal plants in Algeria. *American Journal of Food and Nutrition*, 1: (3), 126 – 127.

Partie I

Généralités et données bibliographiques

Chapitre 1. Composés phénoliques des plantes

1. Généralités

Les polyphénols ou composés phénoliques, sont des molécules spécifiques du règne végétal. Cette appellation générique désigne un vaste ensemble de substances de structures variées [1]. A l'heure actuelle, plus de 8000 molécules ont été isolées et identifiées [2]. Selon leurs caractéristiques structurales, ils se répartissent en une dizaine de classes chimiques, qui présentent toutes un point commun : la présence dans leur structure d'au moins un cycle aromatique à 6 carbones, lui-même porteur d'un nombre variable de fonctions hydroxyles (OH) [3]. Ces espèces sont des monomères, des polymères ou des complexes dont la masse moléculaire peut atteindre 9000 [4].

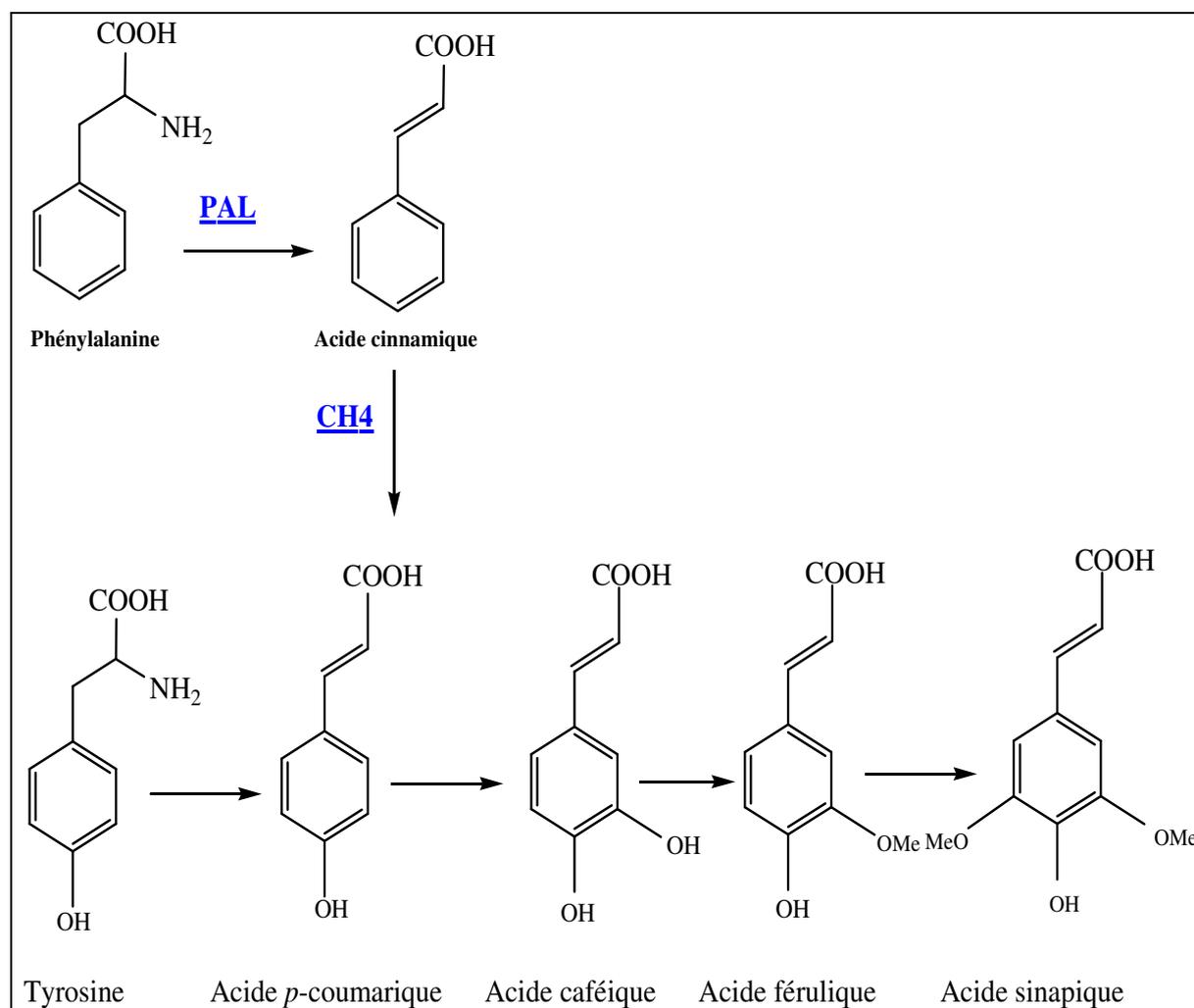
Les recherches pendant les quinze dernières années ont démontré que les composés phénoliques ne sont pas des produits inertes du métabolisme. Ils subissent dans les tissus végétaux d'importantes variations quantitatives, qualitatives et interviennent dans divers processus vitaux. Le mode de leur action physiologique n'est pas encore clair. Un rôle important est attribué aux phénols dans la résistance des plantes aux maladies, comme c'est le cas de la résistance du cotonnier à la maladie de flétrissement et la verticilliose. Le phénomène d'accumulation des substances phénoliques dans les tissus végétaux infectés est observé à la suite de blessures causées par des facteurs mécaniques et dans le cas de carence en certains éléments minéraux comme l'azote et le soufre.

Les polyphénols sont présents partout dans les racines, les tiges, les fleurs, les feuilles de tous les végétaux. Les principales sources alimentaires sont les fruits et légumes, les boissons (vin rouge, thé, café, jus de fruits), les céréales, les graines oléagineuses et les légumes secs. Les fruits et légumes contribuent environ pour moitié à notre apport en polyphénols, les boissons telles que jus de fruits et surtout café et thé [5].

2. Biosynthèse

2.1. Par la voie de shikimate

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est proche, tous dérivant de la l'acide shikimique (**Figure I.1**). Cette voie shikimate conduit à la formation des acides aminés aromatiques (phénylalanine et tyrosine) puis par désamination de ces derniers, aux acides cinnamiques et à leurs très nombreux dérivés : acide benzoïques, acétophénones, lignanes et lignines, coumarines [1].



PAL : phénylalanine ammonia-lyase

CH4 : cinnamate 4-hydroxylase.

Figure I.1. Biosynthèse des composés phénoliques le plus largement distribué par la voie de shikimate [6]

2.2. Par la voie d'acétyl-CoA

L'union de plusieurs unités d'acétyl-CoA conduit à la formation des polyacétates y compris les quinones, leur réarrangement conduit à de nombreux métabolites importants. Les acétogénines dérivent de l'acétyl-CoA et sont apparentés aux acides gras. Ce sont des composés aliphatiques à longue chaîne (35 à 37 carbones) terminée par une lactone. Rencontrées quasi-exclusivement dans la famille des Annonaceae, les acétogénines ont des propriétés pharmacologiques variées.

3. Classification

Ils sont divisés en plusieurs catégories : anthocyanes, coumarines, lignanes, flavonoïdes, tannins, quinones, acides phénoliques, xanthones et autres phloroglucinols.

3.1. Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante [7]. Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques [8], dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance [9].

Actuellement, environ 4000 composés flavoniques sont connus [10] et ont tous le même squelette de base à quinze atomes de carbones qui sont arrangés à une configuration (C6-C3-C6) de type phényl-2-benzopyrane ce qui est synonyme avec la structure 2-phényle chromane [11] (**Figures I.2 et I.3**).

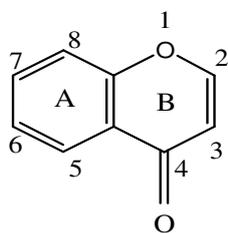


Figure I.2. Structure du 2-phénylchromane.

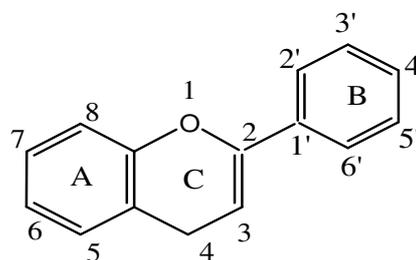


Figure I.3. Structure générale des flavonoïdes.

La nature chimique des flavonoïdes dépend de leur classe structurale, du degré d'hydroxylation et de méthylation, du degré de polymérisation, des substitutions et des conjugaisons sur le cycle (C) [7, 11]. En se basant sur leur squelette, les flavonoïdes peuvent être divisés en différentes classes: anthocyanidines ; flavonoles ; isoflavonoles ; flavones ; isoflavones ; flavanes ; isoflavanes ; flavanols ; isoflavanols ; flavanones ; isoflavanones ; auronnes.

Les flavonoïdes sont des pigments végétaux, simples ou glycosylés, responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. Les flavones (telle que, l'apigénol) et flavonols (comme le quercétol), incolores ont un rôle de co-pigment et de protection alors que les flavonoïdes jaunes (chalcones comme l'isoliquiritigénine, auronnes dont l'hispidol, et flavonols jaunes) et les anthocyanosides bleus et rouges sont directement visibles. Certains ne sont visibles que par les insectes, assurant la signalisation pour les pollinisateurs. Ces composés sont considérés comme responsables de l'activité antioxydante ; ils peuvent empêcher les dommages oxydatifs par différents mécanismes d'actions : soit par capture des radicaux hydroxyles, superoxydes, alkoxydes et peroxydes [12], soit par chélation des métaux (le fer et le cuivre) qui sont d'importance majeure dans l'initiation des réactions radicalaires ; soit l'inhibition des enzymes responsables de la génération des radicaux libres [13, 14]. Ils jouent un rôle très important dans le traitement du diabète (inhibant l'aldose réductase), de la goutte (inhibant la xanthine oxydase), des inflammations (inhibition de la lipoxygénase, la phospholipase et la cyclooxygénase), des hépatites, des tumeurs, de l'hypertension (quercétine), des thromboses (flavonols).

3.2. Acides phénoliques

Le terme d'acide phénolique peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. En phytochimie, l'emploi de cette dénomination est réservé aux seuls dérivés de l'acide benzoïque ou de l'acide cinnamique (**Figure I.4**).

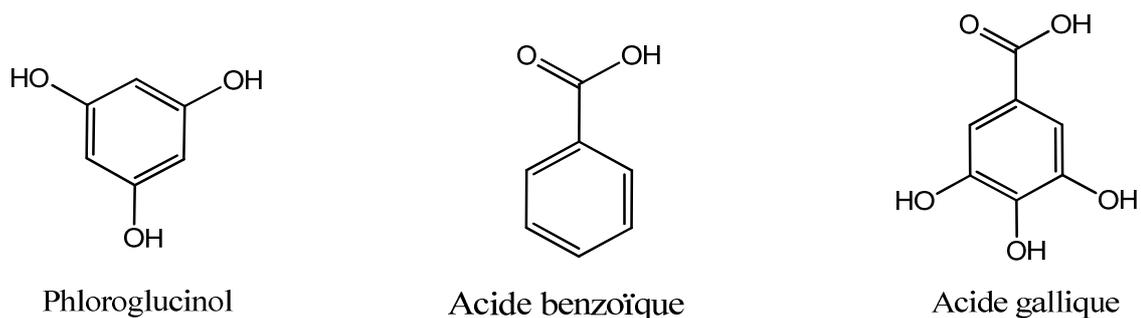


Figure I.4. Quelques phénols et acides phénoliques

3.2.1. Acide phénolique dérivés de l'acide benzoïque : les acides phénols en C6-C1, dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque, sont très communs, aussi bien sous forme libre ou ester d'hétéroside. L'acide gallique et son dimère (l'acide hexahydroxydiphénique) sont les éléments constitutifs des tannins hydrolysables. D'autres aldéhydes correspondants à ces acides, comme la vanilline, est très utilisé dans le secteur pharmaceutique [1].

3.2.2. Acide phénols dérivés de l'acide cinnamique : la plupart des acides phénols en C6-C3 (acides p-coumarique, caféique, férulique, sinapique) ont une distribution très large; les autres (acides o-coumarique, o-férulique) sont peu fréquents [1]. Les acides cinnamiques et caféiques sont des représentants communs du groupe de dérivés phénylpropaniques qui diffère par son degré d'hydroxylation et de méthylation [15].

3.2.3. Phénols simples : représentés par le catéchol, guaiacol, phloroglucinol... sont plutôt rares dans la nature à l'exception de l'hydroquinone qui existe dans plusieurs familles (Ericaceae, Rosaceae...). Les deux phénols hydroxylés, le catéchol avec deux groupes OH et le pyrogallol avec trois, ont été montré pour sa toxicité vis-à-vis des microorganismes [15].

L'artichaut (*Cynara scolymus* L., Asteraceae) ou encore le romarin (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae) contiennent des esters de l'acide caféique. L'acide chlorogénique, ester, l'acide quinique, largement présent dans le règne végétal.

Les acides phénols et ces dérivés sont considérés comme responsables de l'activité cholérétique de l'artichaut et les propriétés antipyrétiques et anti-inflammatoires des dérivés salicylés [3].

Les composés possédant les activités antioxydantes et antiradicalaires sont l'acide caféique, l'acide gallique et l'acide chlorogénique [16]. Pour l'acide caféique, il se montre très efficace contre les virus, bactéries et champignons [15]. Alors, l'acide gallique a pour pouvoir de réduire la viabilité des cellules cancéreuses du poumon chez les souris *in vitro* et que la combinaison de cet acide avec les médicaments anticancéreux tels la cisplatine peut être un traitement efficace pour ce type de cancer [17].

3.3. Coumarines

Les coumarines sont des 2H-1-benzopyran-2-ones, lactones des acides *ortho*-hydroxyZ-cinnamiques (**Figure I.5**) [18]. L'isomérisation de la double liaison E en Z est réalisée par la lumière à 320 nm. Elles se trouvent dans la nature soit à l'état libre ou bien combinés avec des sucres. Les coumarines sont utilisées pour leurs propriétés vasculoprotectrices, neurosédatives, diurétiques, stomachiques et carminatives [3].

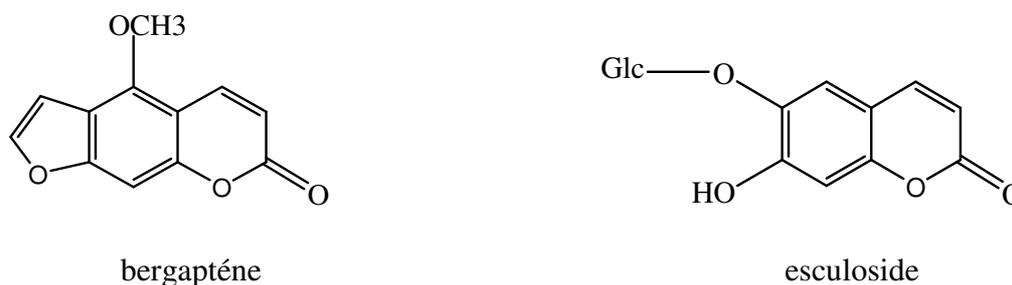


Figure I.5. Deux exemples de coumarines

3.4. Lignanes et composés apparentés

Les lignanes résultent de la condensation d'unités phénylpropaniques. Quatre groupes peuvent être considérés : les lignanes (liaison entre deux carbones ; des chaînes latérales de deux unités dérivées du phénylpropane), les néolignanes (un seul carbone est en jeu), les "oligomères", (condensation de 2 à 5 unités phénylpropaniques) et enfin les norlignanes avec un squelette en C17 (**Figure I.6**).

3.7. Tannins

Cette classe désigne le nom général descriptif du groupe des substances phénoliques polymériques, ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 qui présente, à côté des réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter les alcaloïdes, la gélatine et d'autres protéines [19]. Les tannins sont caractérisés par une saveur astringente et sont trouvés dans toutes les parties de la plante : l'écorce, le bois, les feuilles, les fruits et les racines [20]. On distingue deux groupes de tannins différents par leur structure et par leur origine biogénétique.

Conclusion

Ces quelques exemples traduisent la variété importante des métabolites secondaires qu'offre la nature. La part de plantes inexplorées à la fois en chimie et en biologie est encore immense. Ceci offre l'espoir de découvrir des traitements pour des maladies encore dévastatrices et de proposer des thérapeutiques avec le minimum d'effets secondaires.

L'objectif de ces études est la recherche de différents métabolites secondaires et leurs activités pharmacologiques d'origine végétale. Le chapitre suivant présente quelques données bibliographiques sur deux plantes appartenant à la flore algérienne.

Références

1. Bruneton, J., (1993). Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes médicinales. *Lavoisier Techniques Et Documentation, Paris, 2^{ème} édition.*
2. Mompon, B., Lemaire, B., Mengal, P., Surbled, M., (1998). Extraction des polyphénols : Du laboratoire à la production industrielle. *Ed. INRA, Paris* (les Colloques : 87).
3. Hennebelle, T., Sahpaz, S., Bailleul, F., (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*, 1: 3-6.
4. Harbone, J.B., (1993). Introduction to Ecological Biochemistry, 4th Ed; Academic Press:London.
5. Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacology Review*, 52: 673-839.
6. Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H., (2006). Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. Edt Blackwell Publishing Ltd.
7. Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V., (2006). The contribution of flavonoid C-ring on DPPH Free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 7: 140-146.
8. Mukohata, Y., Nakabayashi, S., & Higashida, M., (1978). Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Letters*, 85: 215– 218.
9. Havsteen, B.H., (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96: 67– 202.
10. Edenharder, R., Grünhage, D., (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Resrsearch*, 540 : 1–18.
11. Yao, L.H., Jiang, Y.M., SHI, J., Tomas-Barberan, F.A., Datta, N., Singanusong, R., Chen, S.S. (2004). Flavonoids in Food and their health benefits. *Plant Foods Human Nutrition*, 59 : 113-122.
12. Hodek, P., Trefil, P., Stiborova, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chem. Biol. Interact*, 139: 1–21.
13. Van Acker, S., van Balen, G.P., van den Berg, D.J., van der Vijgh, W.J.F., (1996). Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemistry & Pharmacology*, 56 :935– 943.

14. Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuno, A., Del Rio, J.A., (1997). Uses and properties of *Citrus* flavonoïdes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45 : 4505–4515.
15. Cowan, M.M., (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol Rev*, 12 (4): 564- 582.
16. Bossokpi, I.P.L., (2002). Etude des activités biologiques de *Fagara xanthoxyloïdes* LAM (Rutaceae). *Thèse de pharmacie, Bamako*, 133.
17. Rangkadilok, N., Sitthimonchai, S., Worasuttayangkurn, L., Mahidol, C., Ruchirawat, M., Satayavivad, J., (2007). Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruits extract. *Food and Chemical Toxicology*, 45: 328-336.
18. O’Kennedy, R., and Thornes, R.D., (1997). Coumarins : Biology, Applications and Mode Of Action. *John Wiley & Sons Inc. New York. N.Y.*
19. Haslam, E., (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59: 205-215.
20. Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30: 3875-3883.

Chapitre 2. Aspect botanique présentation des plantes étudiées

Introduction

Depuis longtemps, les plantes médicinales présentent une source inépuisable afin de traiter certaines maladies et pathologies souvent mortelles.

En Algérie, les plantes médicinales forment un groupe relativement important et un réservoir inestimable de molécules bioactives mais un nombre limité d'espèces qui sont étudiées en termes d'investigation phytochimique et valorisation biologique.

Au cours des missions de notre équipe de l'unité de recherche (VARENBIOMOL), deux espèces ont été récoltées : *Halimium halimifolium* et *Thymelaea microphylla* ; appartenant aux familles botaniques Cistaceae et Thymelaeaceae respectivement. Le choix de deux plantes est basé sur une enquête ethnopharmacologique auprès de la population ayant connaissance de leur usage en médecine traditionnelle.

Ce chapitre présente une étude approfondie à propos de ces deux plantes en mettant en valeur des données bibliographiques issues de leurs genres et leurs familles.

1. Les Cistacées

1.1. Généralités sur la famille Cistaceae

1.1.1. Introduction

La famille Cistaceae est l'une des plus difficiles à étudier. Leur nom provient de celui des Cistes donné à ces plantes par Joseph Pitton de Tournefort du mot grec : « *kisthos* » signifiant capsule [1].

Cistaceae est une famille de plantes dicotylédones originaire du bassin méditerranéen, d'Asie occidentale, d'Afrique du nord, et secondairement des Amériques. Elle était classée dans l'ordre des Violales puis dans celui des Malveles qui comprend 8 genres (180 espèces) incluant : *Halimium*, *Cistus*, *Crocyanthemum*, *Fumana*, *Helianthemum*, *Hudsonia*, *Lechea*, *Tuberaria* [2].

1.1.2. Classification botanique

La position taxonomique des Cistacées [3] est :

Embranchement	—————▶	Phanérogames ou Spermaphytes
Sous embranchement	—————▶	Angiospermes
Classe	—————▶	Eudicots
Sous classe	—————▶	Rosidées
Ordre	—————▶	Malvales
Famille	—————▶	Cistacées

1.1.2. Description botanique

Les plantes de cette famille sont des arbustives ou herbacées pérennes ou annuelles poilues ou velues, avec un réceptacle en forme de cône surbaissé, portant de bas en haut périlanthe, l'androcée et le gynécée. Portant des feuilles souvent opposées, entières ou ordinairement stipulées. Les fleurs sont généralement hermaphrodites bisexuées. Le fruit est une capsule globuleuse coriace ou ligneuse enveloppée [1, 2].

1.1.4. Utilisation traditionnelle de Cistaceae

Plusieurs espèces et hybrides de genre *Cistus*, *Halimium* et *Helianthemum* sont cultivés comme plantes ornementales[4].

Les feuilles de plusieurs espèces de genre *Cistus* produisent le ladanum, une résine aromatique utilisée en médecine [4].

Le genre *Cistus* est largement utilisée en médecine traditionnelle pour ses propriétés biologiques comme :

Cistus albidus : les feuilles sont utilisées à Rabat sous forme de tisanes comme agent digestif.

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

En plus des espèces de *Cistus* sont employées en Italie, en Grèce, en Espagne et en Turquie pour le traitement de la diarrhée et des ulcères gastriques, en tant que remèdes généraux pour traiter plusieurs maladies de peau, comme agents anti-inflammatoires et antispasmodiques [5].

Dans le nord du Maroc (douar Agan, région de Talambot), les fruits des cistes (âmerîl) servent à confectionner le HARKOUS (fard à tatouage).

1.1.5. Propriétés biologique de Cistaceae

Certaines espèces de la famille Cistaceae possèdent des propriétés antimicrobienne, antitumorale, antivirale anti-inflammatoire, antifongique, antiulcer, anti oxydante, et activités spasmolytique et hypotensive [6]. 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 [7].

1.1.6. Etudes chimiques de la famille Cistaceae

Les études phytochimiques réalisées sur un nombre important d'espèces de la famille des Cistacées révèlent une grande richesse en métabolites secondaires incluant en particulier les terpènes, les composés phénoliques, plus précisément les dérivés diterpéniques [8,9]; et flavonoïdiques [10, 11]. Cependant, seulement les genres *Cistus* [12] et *Halimium* sont bien exploités sur le plan phytochimique.

1.2. Le genre *Halimium*

Halimium est un genre de la famille des cistacées se rencontre en Europe méridionale, Afrique du nord et principalement dans la région méditerranéenne occidentale qui comporte 8 espèces : *Halimium alyssoides*, *H. atriplicifolium*, *H. commutatum*, ***H. halimifolium***, *H. lasianthum*, *H. ocymoides*, *H. umbellatum*, *H. verticillatum*, et *H. viscosium* [13].

1.2.1. Etude chimique du genre *Halimium*

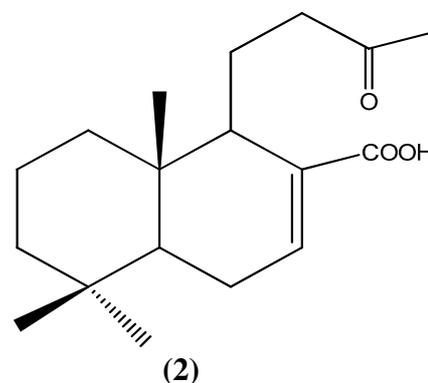
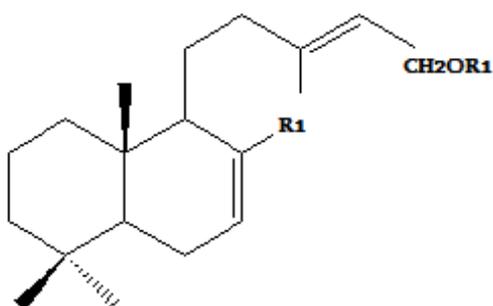
Ce genre est rarement étudié, les travaux phytochimiques sont concentrés seulement sur les parties aériennes des espèces *H. viscosium*, *H. verticillatum* et les huiles essentielles extraites de la plante *H. voldii*. Par ailleurs, ces études ont permis d'isoler des composés à squelettes diterpéniques appartenant aux groupes : labdane, halimane, valparane, et tormesane.

1.2.1.1. L'espèce *H. viscosium*

➤ Squelette labdane

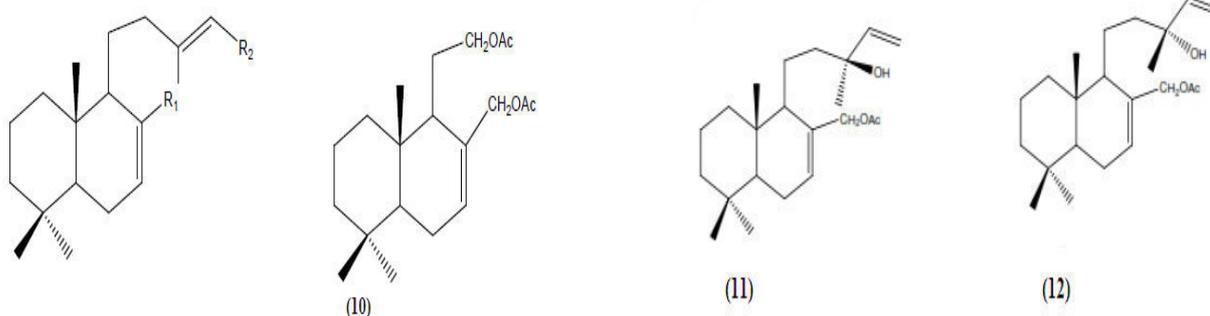
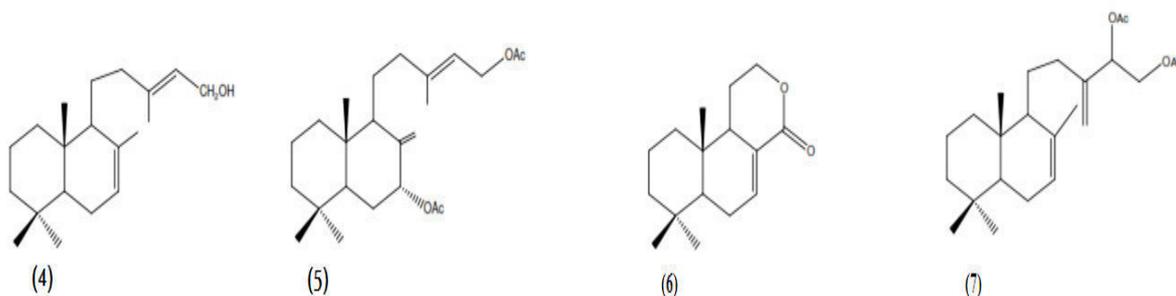
L'investigation phytochimique de l'espèce *H. viscosium* collectée de Fregenda (salamanque, Espagne) [14] a mené à l'isolement d'un ester et deux acides diterpéniques :

acide 15-acétoxy-7,13E-labdadien-17-oïque (**1**), acide 15-hydroxy-7,13E-labdadien-17-oïque (**2**) et l'acide 14,15-dinor-13-oxo-7-labdan-17-oïque (**3**). Ces structures ont été décrites pour la première fois dans le genre *Halimium*.

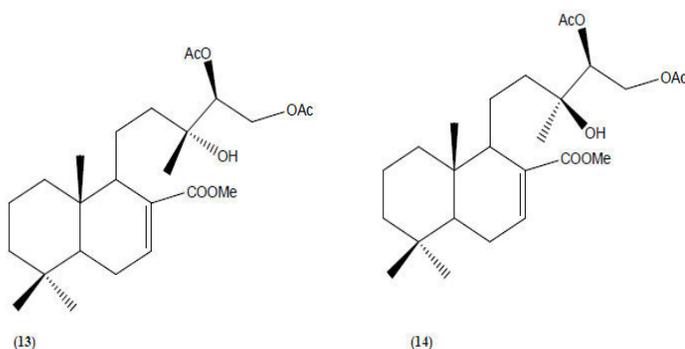


	R_1	R_2
(1)	H	COOH
(3)	Ac	COOH

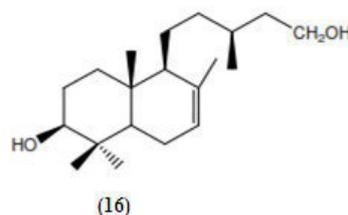
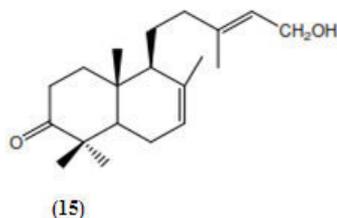
L'étude phytochimique effectuée par J. G. Urones et al. sur l'extrait n-hexane de l'espèce *H. viscosium* a permis l'identification de douze produits naturels [15], il s'agit des composés : 15-hydroxy-7,13E-labdadiène (**4**), 7 α , 16-diacétoxy-8(17), 13E-labdadiène (**5**), 13,14,15,16-tetranor-7-labden-17-labden-17,12-olide (**6**), 14,15-diacétoxy-7,13(16)-labdadiène (**7**), 15-acétoxy-7,13E-labdadien-17-al (**8**), 15,17-diacétoxy-7,13E-labdadiène (**9**), 13,14,15,16-tetranor-12,17-diacétoxy-7,13E-labdadiène (**10**), 15,17-Diacétoxy-7,13E-labdadiène (**11**), 13(S)-hydroxy-17-acétoxy-7,14-labdadiène (**12**), 17-Acétoxy-13(R)-hydroxy-7,14-labdadiène, méthyl-13(R)-hydroxy-14(S), 15-diacétoxy-7-labden-17-oate(**13**), Méthyl 13S-hydroxy-14R, 15-diacétoxy-7-labden-17-oate (**14**).



	R ₁	R ₂
(8)	CHO	CH ₂ OAc
(9)	CH ₂ OAc	CH ₂ OAc

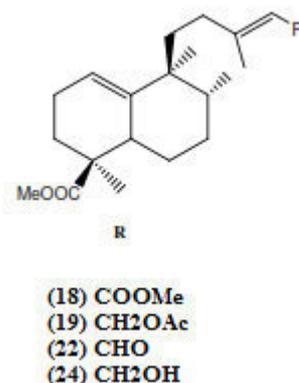
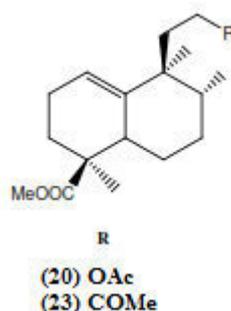
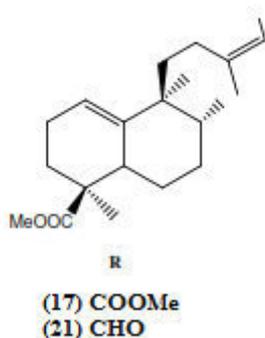


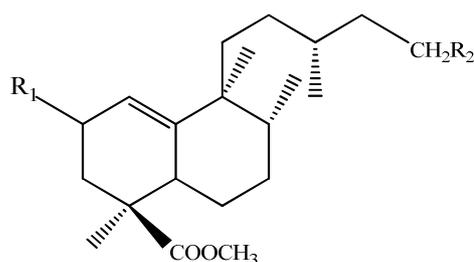
Autre étude phytochimique [16] a révélé les diterpènes: 3-oxo-7,13E-labdadièn-15-ol (**15**) et 7-labdène, 3 β , 15-diol (**16**).



➤ Squelette halimane

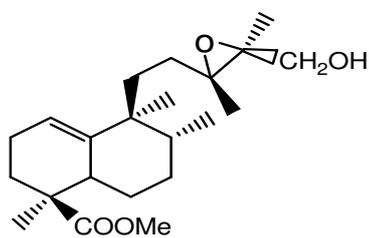
J. G Urones et al. ont réussi à isoler une série d'esters diterpéniques à squelette *ent*-halimane [18], dans l'extrait n-hexane des parties aériennes de l'espèce *H. viscosium*, ces structures ont été élucidées sur la base des expériences de RMN 1D et 2D : diméthyl-1(10), 13Z-*ent*-halimadiène-15,18-dioate (**17**), diméthyl-1(10),13E-*ent*-halimadiène-15,18-dioate (**18**), méthyl-15-acétoxy(10), 13E-*ent*-halimadien-18-oate (**19**), méthyl-12-acétoxy-13.14, 15,16-tetronor(10) *ent*-halimen-18-oate (**20**), méthyl- 15-al-1 (10),13Z-*ent*-halimadien-18-oate (**21**), méthyl-15-al-1(10), 13E-*ent*-halimadien-18-oate(**22**), méthyl-13-oxo-14,15dinor-1 (10)-*ent*-halimen-18-oate (**23**), méthyl-15-hydroxy-1 (10), 13E-*ent*-halimadien-18-oate (**24**) [17], méthyl-15-Z-cinnamoyloxy-1-(10)- *ent*-halimen-18-oate (**25**), méthyl-15-hydroxy-2-oxo-1(10)-*ent*-halimen-18-oate (**26**) et méthyl- 15-méthoxy-1(10)-*ent*-halimen-18-oate (**27**).



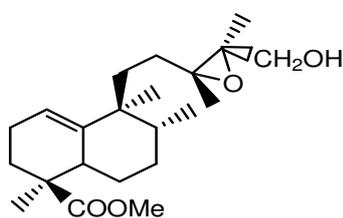


	R ₁	R ₂
(25)	H	OCOCH=CHC ₆ H ₅
(26)	=O	OH
(27)	H	OMe

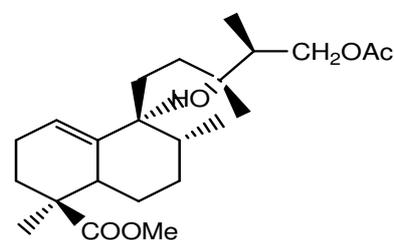
Les mêmes auteurs ont isolé une autre série d'esters diterpéniques [19], à squelette *ent*-halimane : méthyl(13*S*,14*S*)-époxy-15-hydroxy-1(10)-*ent*-halimen-18-oate (28), méthyl(13*R*,14*R*)-époxy-15-hydroxy-1(10)-*ent*-halimen-18-oate (29), méthyl(13*R*)-hydroxy-(14*S*),15-diacétoxy-1(10)-*ent*-halimen-18-oate (30), méthyl(13*S*)-hydroxy-(14*R*),15-diacétoxy-1(10)-*ent*-halimen-18-oate (31) et méthyl(13*S*),15-dihydroxy-(14*R*)-acétoxy-1(10)-*ent*-halimen-18-oate (32).



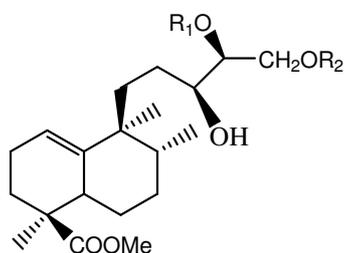
(28)



(29)



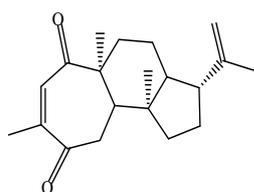
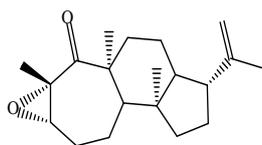
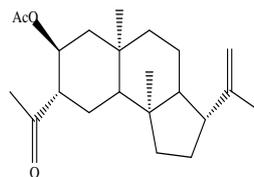
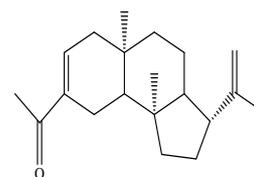
(30)



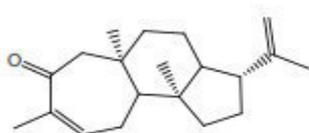
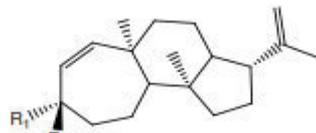
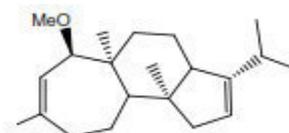
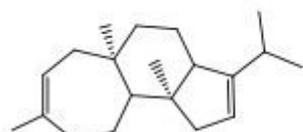
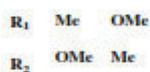
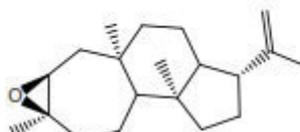
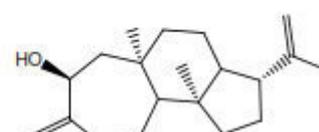
	R ₁	R ₂
(31)	Ac	Ac
(32)	Ac	H

➤ Squelette valparane

Les investigations phytochimiques de l'espèce *H. viscosium* collectée du Portugal par L.Rodilla et al. [20] ; J. G. Urone et al. [21], ont conduit à isoler des diterpènes tricycliques à squelette valparane : valpara-2,15-diène-1,4-dione (**33**), 3 α , 4 α -epoxyvalpar-15-en-2-one (**34**), (4S)-2- β -acétoxyvalparol-15-en-2-one (**35**) et (4S)-2- β -acétoxyvalparol-8(14)-èn-3-one (**36**).

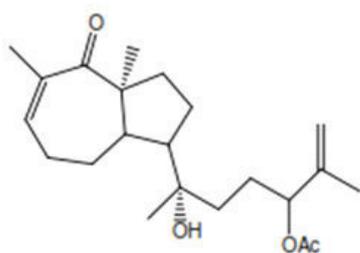
**(33)****(34)****(35)****(36)**

Et 3,15-valparadièn-2-one (**37**), (3 β -méthoxy-1-15-valparadiène(**38**), (3 α -méthoxy-1,15 valparadiène(**39**), 1 β -methoxy-2,15-valparadiene(**40**), 1,13-valparadien-3 α -ol,1,3,13-valpartriene (**41**), 2,13-valparadiene (**42**), 2,3 β -epoxy-15-valparene (**43**), 15-valparadien-2 β -ol, 1,15-valparadien-3 β -ol [22].

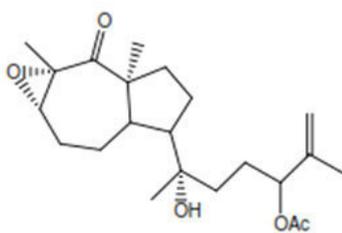
**(37)****(38) (39)****(40)****(41)****(42)****(43)**

➤ Squelette tormesane

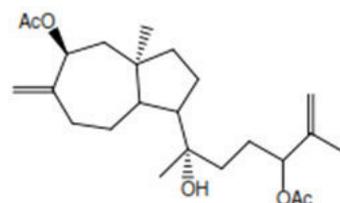
D'autres diterpènes à squelette tormesane ont été isolés dans la fraction apolaire de l'espèce *H. viscosium* collectée à Fregeneda (Salamanque, Espagne) [23] : 15-acétoxy-8-oxo-6,16-tormesadièn-11-ol (**44**), 15-acétoxy-8-oxo-6,7 α -époxy-16tormesen-11-ol (**45**), 8,15-diacétoxy-7(20),16-tormesadièn-11-ol (**46**), 8-acétoxy-7(20),14-tormesadiène-11,16 diol (**47**), 8-acétoxy-7(20), 14-tormesadiène-11,16-diol.



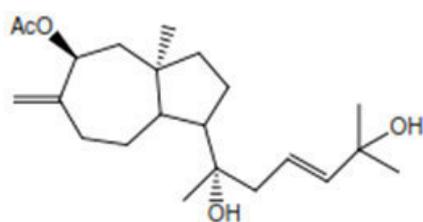
(44)



(45)



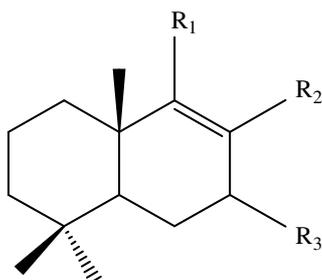
(46)



(47)

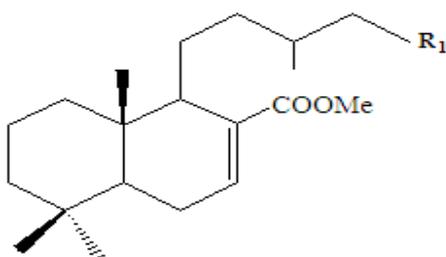
1.2.1.2. L'espèce *H.verticillatum*

L'étude phytochimique de cette espèce [24] a montré des esters labdaniques, il s'agit de : 15-hydroxy-7-oxo-8-labdèn-17-oate (**48**), méthyl-7 α ,15-dihydroxy-8-labdèn-17-oate (**49**), méthyl-7 β ,15-dihydroxy-8-labdèn-17-oate (**50**) et 17-nor-15-acétoxy-7-oxo-8-labdène (**51**).



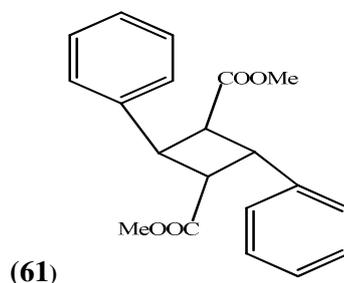
	R ₁	R ₂	R ₃
(48)	CH ₂ CH ₂ CH(Me) CH ₂ CH ₂ OAc	COOMe	O
(49)	CH ₂ CH ₂ CH(Me) CH ₂ CH ₂ OAc	COOMe	α OH
(50)	CH ₂ CH ₂ CH(Me) CH ₂ CH ₂ OH	COOMe	β OH
(51)	CH ₂ CH ₂ CH(Me) CH ₂ CH ₂ OAc	H	O

Une autre série des labdanes est isolé à partir de la plante *H.verticillatum* effectuée par J. G. Urones et son groupe : 15-Zcinnamoyloxy-7-labdèn-17-oate (**52**), méthyl-15-méthoxy-7-labdèn-17-oate (**53**), méthyl-7-labdèn-15,17-dioate (**54**), méthyl-15-hydroxy-7 α -méthoxy-8-labdèn-17-oate (**55**), méthyl-6 β ,15-dihydroxy-7-labdèn-17-oate, méthyl-7 β -15-diacétoxy-8-labdèn-17-oate et 15,17-diacétoxy-7-labdène [25], méthyl-15-acétoxy-7-labdèn-17-oate (**56**), méthyl-15-hydroxy-7-labdèn-17-oate (**57**), méthyl-15-cinnamoyloxy-7-labdèn-17-oate (**58**), méthyl-15-isobutyloxy-7-labdèn-17-oate (**59**), méthyl-15-formyloxy-7-labdèn-17-oate (**60**) [26].

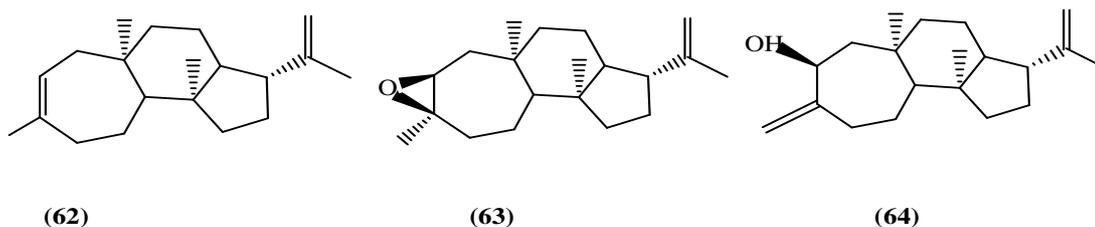


	R ₁
(52)	Z—CH ₂ OCO—C ₈ H ₇
(53)	CH ₂ OMe
(54)	COOMe
(55)	CH ₂ OH
(56)	CH ₂ Ac
(57)	CH ₃
(58)	CH ₂ Cinn
(59)	CH ₂ OCCH(Me) ₂
(60)	CH ₂ OCH

L'investigation phytochimique de l'extrait hexanique de l'espèce *H. verticillatum* a permis d'isoler l'acide *trans*-cinnamique (**61**), sa structure a été établie par les rayons X [27].

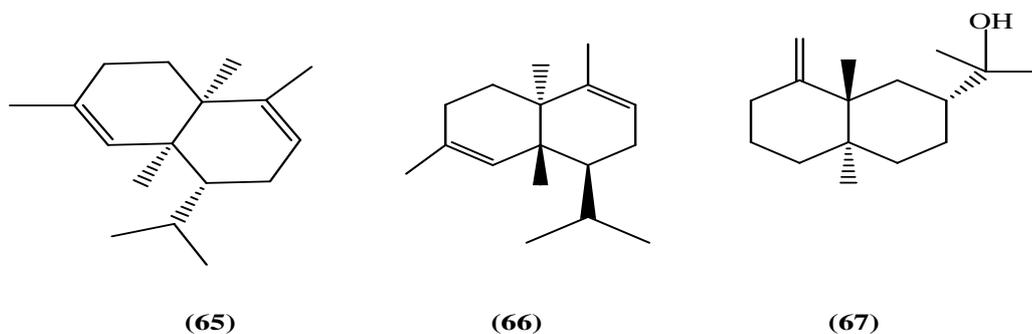


L'étude phytochimique de l'extrait n-hexane de la plante *H. verticillatum* [28] a révélé la présence de trois produits à squelette valparane : 2,15-valparadine (**62**), 2,3 β -époxy-15-valparène (**63**) et 3(19),15-valparadiène-2 β -ol (**64**).



1.2.1.3. Espèce *H. voldii*

Les huiles essentielles obtenues à partir des feuilles de la plante *H. voldii* [29] ont été étudiées par GC/MS dont les huiles essentielles majoritairement extraites sont de pourcentages : (12.8%) nonanal, (10.6%) dodécane, (8.2%) *E*- β -caryophyllène, (19.9%) γ -muroloène (**65**), (3.5%) β -cadinène (**66**), (5.1%) l'oxyde de caryophyllène, (3.6%) β -eudésmol (**67**) et (5.5%) oxyde de manoylé



1.2.2 Etude biologique du genre *Halimium*

La seule étude biologique à propos du genre *Halimium* est reportée sur l'activité anti bactérienne des huiles essentielles de l'espèce *H.voldii* [29], cette étude a montré une activité modérée sur les Gram (+) et Gram (-).

1.3. Etude de l'espèce *Halimium halimifolium* (L.) Willk

En Algérie, *H.halimifolium* est communément appelée « El-méllia », les feuilles de cette plante sont utilisées en médecine traditionnelle sous forme d'infusé afin de traiter des maladies digestives et gastro-intestinales.

1.3.1. Place dans la systématique

Halimium halimifolium occupe la place systématique [30] :

Règne :	Plantae
Ordre :	Malvales
Famille:	Cistaceae
Genre :	<i>Halimium</i>
Espèce :	<i>Halimium halimifolium</i>

Nom botanique : *Halimium halimifolium* (L.) Willk

1.3.2. Synonymes

- *Halimium halimifolium* subsp. lepidotum (Spach) Maire, *Cistus halimifolius* L.
- *Helianthemum halimifolium* Willk; *Halimium lepidotum* (Spach).

1.3.3. Description botanique

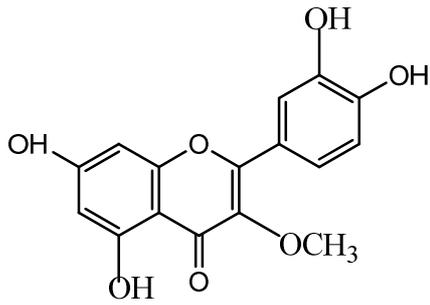
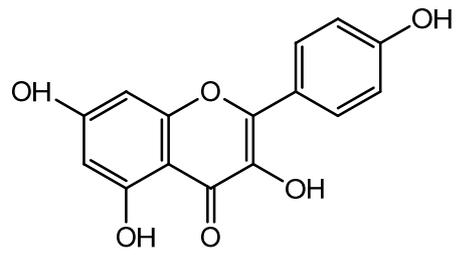
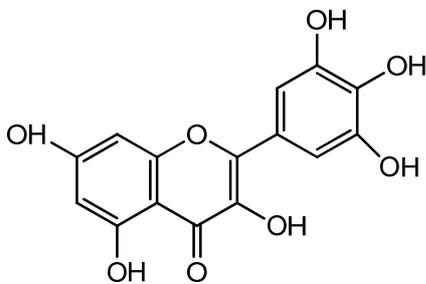
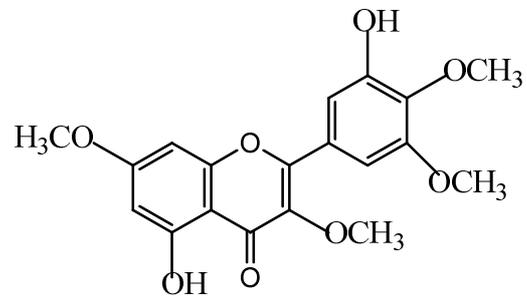
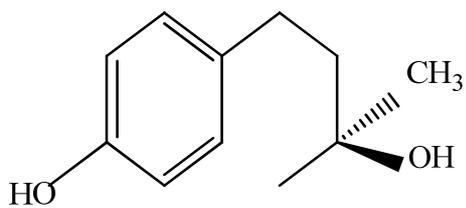
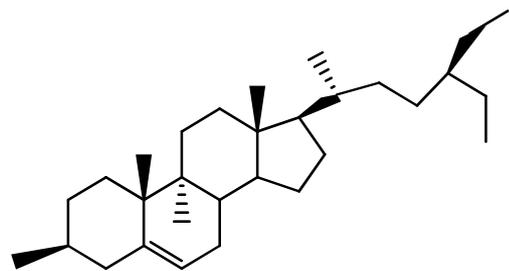
Halimifolium Halimium (L.) Willk. (Cistaceae) ; est un arbuste (**Figure I.7**) qui pousse sur les sols sableux intérieures et côtières dans la région méditerranéenne [30]. Il est de taille moyenne, à hauteur de la couronne entre 60 et 120 cm. Les fleurs sont grandes et jaune. Les feuilles sont elliptiques, tomenteux blanc sur les deux surfaces, couverte de poils blancs, trichomes, qui fournissent réluctance élevée de la feuille [31].



Figure I.7. Partie aérienne de l'espèce *Halimium halimifolium*

1.3.4. Travaux antérieurs

Une recherche bibliographique exhaustive réalisée sur l'espèce *Halimium halimifolium* a montré que cette dernière est très peu étudiée. La seule étude chimique a conduit à l'isolement de la quercétine-3-méthyl ether, kaempférol et la myricétine [32]. En outre, l'étude de l'extrait chloroforme de cette plante par notre équipe [33] a donné le β -sitostérol, la 3,7,4',5'- tétraméthyl myricétine et le buteligenol(-).

**Quercétine-3-méthyl eter****Kaempférol****Myricétine****3, 7, 4', 5'-tétraméthylmyricétine****Buteligenol(-)****β -Sitostérol**

Références

1. Baillon, H., (1872). Histoire des plantes, monographie des Biacées : Cistacées et Violacées. *Librairie Hachette, Paris*, 356.
2. Beatriz, G., (2009). Historical biogeography and character evolution of Cistaceae (Malvales) based on analysis of plastid rbcL and trnL-trnF sequences *Organisms. Diversity & Evolution.*, 9: 83- 99.
3. Guinard, J.L., (2001). Botanique systématique moléculaire. *Ed. Masson (12^{ème} Édition), Paris*, 290.
4. Hywood, V., (1996). Les plantes à fleurs. Nathan.
5. Elisabeth, B., Fernando, C., Rafael, C., (2007). *In vivo* Antigiardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*, 552-554.
6. Bouamama, H., Noel, T., Villard, J., Benharref, A., J ana, M., (2006). Antimicrobial activities of The leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species, *Journal of Ethnopharmacology*, 104–107.
7. Elizabeth, B., Fernando, C., Rafael, C., (2006). Antigiardial activity of methanolic extract from *Helianthemum glomeratum* Lag and *Rubus coriifolius* Focke in suckling mice CD-1. *Journal of Ethnopharmacology*, 108 : 395–397.
8. Kalpoutzakis ,E., Aligiannis , N., Skaltsounis, A. L., Mitakou ,S. (2003). *Cis*-clerodane ty diterpenes from *Cistus monspeliensis*. *Journal of Natural Products*, 66 : 316-319.
9. Angelopoulou, D., Demetzos, C., Perdetzoglou, D., (2002). Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. *Biochemical systematic and Ecology*, 30 : 189-203.
10. Lorente, F. T., Garcia-Grau, M. M., Nieto, J. L., Barberan, F. A. T., (1992). Flavonoids from *Cistus ladanifer* bee pollen. *Phytochemistry*, 31: 2027-2029.
11. Barros, L., Duenas, M., Alves, C. T., Silva, S., Henriques, M., Buelga, C. S., Ferreira, I.C.F.R., (2013). Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* Phenolic extracts. *Industrial Crops and Products*, 41: 41-45.
12. Papaefthimiou, D., Papanikolaou, A., Falara, V., Givanoudi, S., Kostas, S., Kanellis, A. K., (2014). Genus *Cistus*: a model for exploring labdane-type diterpenes biosynthesis and a natural source of high value products with biological, aromatic, and pharmacological properties. *Frontiers in Chemistry*, 2: 1-19.
13. Zunzunegui, M., Baco, F.L., Diaz Barradas, M.C., Novo, F.G., (1999). Seasonal changes in phytochemical efficiency in leaves of *Halimium halimifolium* a mediterranean semideciduous shrub. *Photosynthetica*, 37(1) : 17-31.

14. Teresa, D.P., Urones, J. G., Marcos, I.S., Diez Martin, D., Alvarez. M. V., (1986). Labdane diterpenoids from *halimium viscosium*. *Phytochemistry*, 25(3) : 711-713.
15. Urones,J.G.,Marcos,I.S. , Basabe,P., David, D., Garrido,N.M.Alonso,C.,Oliva,I.M.,Lithgow, A.M., Moro,R.F., M Jose Sexmero,M.J.,Lopez,C.,(1994). Compounds with the labdane skeleton from *Halimuim viscoum*. *Phytochemistry*, 35(3) : 713-719.
16. Urones,J.G.,Marcos,I.S.,Oliva,I.M.,Garrido,N.M.,Hagget,J., Vanessa M. H., (1995).Labdane diterpene from *Halimium viscosum*. *Phytochemistry*, 38(3): 663-666.
17. Urones, J.G., Marcos, I.S., Martin, D.D., Garrido, N.M., Guerra,R.A., (1987). Diterpenoids from *Halimium viscosium*. *Phytochemistry*, 26(4) : 1077-1079.
18. Dina, I.M.D., De Mendonça, I.M., Rodilla, J.M.L., Anna M., Isidro, S.M., (1997). Hydrohalimic acids from *Halimium viscosium*. *Phytochemistry*, 44(7) : 1301-1307.
19. Urones,J.G., I.S.Marcos, I.S., Cuadrado, M.J.S., Besabe, P., Anna Bertelloni, M.L., (1990). *Ent*-halimane diterpenes from *Halimium viscosium*.*Phytochemistry*, 29(4) : 1247-1251.
20. Rodilla, J.M.L., DeMendonça,I.M.D., Urones, J.G., Moro,R.F., (1998). Tricyclic diterpenes from *Halimium viscosium*. *Phytochemistry*, 47(8) : 1545-1549.
21. Rodilla, J.M.L., DeMendonça,I.M.D., Urones, J.G., Moro,R.F., (1998). Hydroxylated duterpenoids from *halimium viscosium*. *Phytochemistry*, 49(3) : 817-822.
22. Urone, J.G., Marcos, I. S., Basabe, P., Conception,A., Oliva, I. M.,Narcio. M, Martin, D.D., Anna, M.L., (1993). Ditrpenes with avalparane skeleton.*Phytochemistry*, 34(3) : 747-750.
23. Urones,J.G., Marcos,I.S., Narciso,M., 1990.Tormesane derivatives from *Halimium viscosum*. *Phytochemistry*, 29 (10) : 3243-324.
24. Urone, J.G., Marcos, I.S., Moro,R.F., Rodilla,J.M.L.,Mendonça,A.G.,(1993). Labdanes from *Halimium verticillatum*. *Phytochemistry*,32(2):401-405.
25. Urones, J.G., Marcos,I.S., Martin,D.D.,Alonso,M.C.A.,Brito Palma,F.M.S.,Rodilla,J.M.L., (1989). Minor labdane diterpanoids from *Halimium verticillatum*.*phytochemistry*, 28(2):557-560.
26. Urones, J.G., Marcos,I.S., Martin,D.D., Brito Palma,F.M.S.,Rodilla,J.M.L., (1987).Labdane diterpanoids from *Halimium viscosum* and *verticillatum*. *phytochemistry*, 26(11): 3037-3040.
27. Urones, J.G., Marcos,I.S., Martin,D.D.,Rodilla,J.M.L., Dinsdemen,D.I.M.,Williams,D.J., (1994). α -truxillic acid from *halimium verticilatium*. *Phytochemistry*, 36(2) : 529-530.
28. Urone, J.G., Marcos, I.S.,Alonso,C.A., Moro,R.F., Rodilla,J.M.L.,(1993).Diterpenes with a Valparane skeleton from *Halimium verticillatum*.*phytochemistry*, 34(2): 569-571.
29. Demetzos,C.,Perdetzoglou,D.,Tan,K.,(2001) .Chemical analysis and antimicrobial activity of *Halimium voldii*. *Zitschrift Fur Naturforschung C*, 56: 979-982

30. Quezel, P., Santa, S., (1963). Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Desertiques Meridionales, Tome II, ed. CNRS, Paris, 700.
31. Zunzunegui, M., Diaz Baradas, M. C., Garcia Novo, F., (2000). *Plant Ecology*, 148-165.
32. Poetsch, I., Reznik, H., (1972). In *Berichte der Deutsch. Bot. Ges.*, 85-209.
33. Zaiter, L., Bouheroum, M., Hammoud, L., Sarri, D., Benayache, S., Leon, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, F., (2012). Phytochemical of *Halimium halimifolium*. *Chemistry of Natural Compounds*, 47 (6).

2. Les Thymelacées

2.1. Généralités sur la famille Thymelaceae

2.1.1. Répartition géographique et taxonomie

Thymelaeaceae est une petite famille de dicotylédones, composée de 1200 espèces réparties en 67 genres, bien que certains auteurs n'en répertorient qu'une cinquantaine. Les membres de cette famille sont répandus dans les zones tropicales et tempérées de la planète (**Figure I.8**), particulièrement en Afrique, et sont absents dans les régions aux climats froids [1].

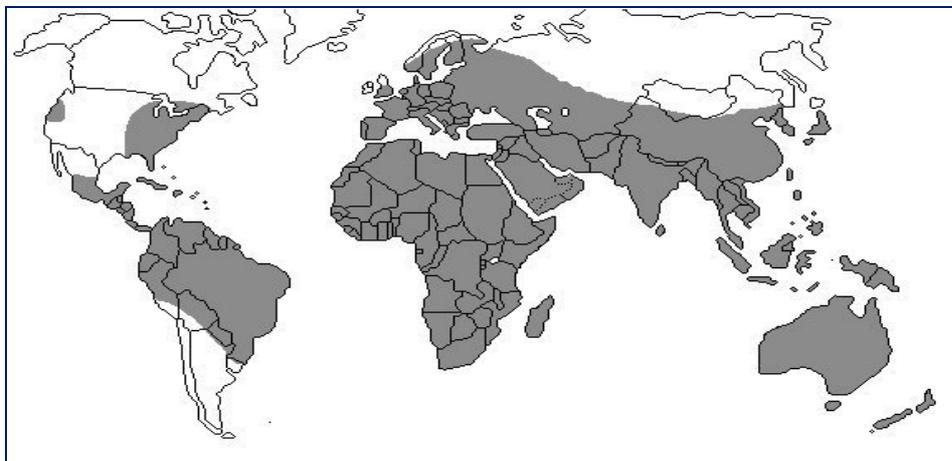


Figure I.8. Carte de répartition géographique des Thymelaeacées [2].

La position taxonomique de Thymelaceae est [2] :

Embranchement	—————>	Phanérogames ou Spermaphytes
Sous embranchement	—————>	Angiospermes
Classe	—————>	Eudicots
Sous classe	—————>	Rosidées
Ordre	—————>	Malvales
Famille	—————>	Thyméléacées

2.1.2. Description et caractères morphologiques

Les Thymelaeacées sont principalement des arbustes (**Figure I.9**), portant des feuilles alternes (rarement opposées), les fleurs sont régulières, bisexuées, pièces florales normalement par 4 ou 5, regroupées en racèmes, en capitules ou en fascicules, en forme de coupe, le réceptacle creux formant un tube profond dont le bord porte généralement les pièces florales, sépales pétaloïdes, apparaissant comme une continuité du tube, des étamines insérées dans le tube et une corolle insignifiante ou absente, un ovaire supère à style simple, fixé à la base du réceptacle, possédant 1 ou 2 (rarement 3 à 8) carpelles soudés, avec autant de loges renfermant chacune 1 ovule pendant axile ou pariétal. Les fruits sont des capsules akènes, baies, drupes ou parfois des graines possédant peu ou pas d'albumen, embryon droit [2].



Figure I.9. Feuille de *Thymelea calycina* (A), Fleurs de *Thymelea lythroides* (B), Fruits de *Daphne alpina* (C)

2.1.3. Utilisations traditionnelles de Thymelaeaceae

A. Utilisations non-médicinales

Vue la richesse de Thymelaeaceae en diterpènes [3], les espèces de cette famille ont été utilisées comme poisons (chasse, pêche). Le bois de certains genres de la famille est, quant à lui, utilisé pour la production de matériaux de construction et d'objets ornementaux. De plus, de nombreuses espèces possèdent une écorce fibreuse qui sert à la fabrication de papier et de corde. En Inde, en Chine et en Indonésie, le bois de certaines espèces d'*Aquilaria* infecté par un champignon est vendu comme bois odorant et on en tire également de l'encens. Le tableau I.1 montre quelques utilisations non-médicinales répertoriées des Thymelaeaceae [1, 4].

Tableau I. 1. Quelques utilisations non- médicinales répertoriées des Thymelaeacées

Plante	Partie	Utilisations	Région
<i>Aquilaria agallocha</i> Roxb	bois	Bois odorant	Inde, chine
<i>Dais glaucescens</i> Decne.	écorce	fabrication de ficelle	Madagascar
<i>D. mezereum</i> L.	fruit	substitut au poivre rouge	Europe
<i>Dirca pallustris</i> L.	écorce	fabrication de sandales, et de paniers	Etats-Unis
<i>Edgeworthia</i> spp.	écorce	fabrication de papier	Japon, Tchéque

B. Utilisations médicinales

Les utilisations médicinales de Thymelaeaceae sont nombreuses, et comme les plantes étudiées dans le présent travail sont toutes d'origine africaine, le tableau I.2 résume surtout les emplois en médecine traditionnels répertoriés dans ce continent [1, 4-6].

Tableau I. 2. Quelques utilisations médicinales répertoriées des Thymelaeacées

Plante	Partie	Utilisations	Région
<i>Aquilaria agallocha</i> Roxb.	bois	aphrodisiaque, stimulant, etc.	Inde, Chine
<i>D. persei</i> Cummins.	/ fleur	troubles hépatiques extrait laxatif	Afrique Ghana
<i>Daphne gnidium</i> L.	écorce	hépatite	Tunisie
<i>G. glauca</i> Steud.	racine	décoction contre l'indigestion	Afrique
<i>Struthiola thomsoni</i> Oliv.	écorce	mâchée contre la toux	Afrique
<i>S. longiflora</i> Gilg feuille	extrait	antituberculeux	Tanzanie
<i>S. kirkii</i> Oliv.	racine	émétique et anti-épileptique	Zimbabwe
<i>W. viridiflora</i> Meissn.	écorce	purgatif et vésicant	Madagascar

2.2. Le genre *Thymelaea*

2.2.1. Généralités sur le genre *Thymelaea*

Thymelaea est un genre d'environ 30 espèces [7], ce genre est représenté par 8 espèces poussant en Algérie [8]. Le nom *Thymelaea* est venu du mot latino-grec « *Daphne gnidium* » désignant une plante à fruits laxatifs. Les plantes du genre *Thymelaea* sont des arbustes sempervirents et herbacés, portant de petites fleurs allant du jaune au vert, unisexuées ou hermaphrodites, généralement sans corolle. Le fruit est une baie sèche, incluse dans le calice. Elles sont originaires des îles Canaries, des régions méditerranéennes, du nord de l'Europe centrale et de l'est de l'Asie centrale.

2.2.2. Les constituants chimiques du genre *Thymelaea*

Du point de vue chimique, les espèces du genre *Thymelaea* constituent une source riche en métabolites secondaires (**Tableau I.3**). Cette diversité chimique est liée à la diversité des voies du métabolisme secondaire présent chez les Thymelaeacées.

2.2.3. Propriétés thérapeutiques et usages

L'étude ethnobotanique nous a permis de retenir une grande utilisation des plantes de ce genre dans différentes régions :

A M'sila l'espèce *T. hirsuta* Endl est utilisée dans le traitement de leishmanicide, vermifuge, eczéma [29].

En Tunisie, le décocté de *T. hirsuta* est utilisé dans le traitement de diabète. En plus ; il a été prouvé que cette espèce possède des propriétés antiseptique, anti inflammatoire, antimelanogenesis, et antihypertensive [30-33].

L'activité antioxydante est aussi établie au Maroc, *Thymelaea lythroides* est largement utilisée pour guérir divers maux (et particulièrement les douleurs du dos, de la vessie, les otites, les fractures...). D'autres études effectuées ont mis en évidence une activité antifongique des extraits naturels obtenus à partir de cette plante [34, 35].

Tableau I.3. Constituants chimiques du genre *Tyhmelaea*

Espèces	Organes étudié	Molécules extraites	Réf.
<i>T. hirsuta</i>	Feuilles.	thyméol .	[9] [10]
	Feuilles.	stigmasterol, β -sitosterol, alcool aliphatique C ₁₂ H ₂₂ O, lactone C ₁₉ H ₁₈ O ₆ .	[11]
	–	daphnoretine, β -sitosterol- β - D-glucoside ; β -sitostérol et campestérol.	[12] [13]
	–	daphnorine, daphnorétine, daphnine, daphnéline, daphnéline-glucoside, ombelliférone, scopolétine et esculétine (coumarines).	[14]
	Partie aérienne.	tannins, alkaloids, steroids, saponins, coumarins, reducteurs compound and anthraquinones.	[15]
	Honey.	benzene propanol, benzylalcohol, nonanol, hexanol and 4-methoxyphenol.	[16]
	Feuilles.	2-vicénine (C-flavone) feuilles	[17]
	/	tiliroside (3- <i>p</i> - coumaroylglucosylkaempférol) (flavanol	[18]
	feuilles.	lupéol, β -sitostérol, phytol, β -amyrine bétuline, erythrodiol, cholestérol et lanostérol.	[19]
	Feuilles Brindilles.	5, 12-dihydroxy-6,7-époxy-résiniféronol.	[20]
<i>T. hirsuta</i>	Graines	protéines ,	[21]
	Feuilles et brindilles.	gnidicine, gniditrine, genkwadaphnine, 12-O heptadécenoyl-5-hydroxy-6,7-époxyrésiniféronol-9, 13,14-orthobenzoate et 12-O butényl-5-hydroxy-6,7-époxy-résiniféronol9, 13,14-orthobenzoate (diterpènes daphnane) .	[22]
	Racines et feuilles.	daphnorétine (éther de dicoumaryl) et tanins.	[23] [24]
<i>T. passerina</i>	parties aériennes.	pentacosane, triacontanol, sitostérol, stigmastérol, β -amyrine, ombelliférone et scopolétine	[25]
<i>T.tartonraira</i>	parties aériennes.	orientine, isoorientine, vitexine, 2-vicénine, kaempférol, daphnorétine, genkwanine, 5-O-D-genkwanine, primevérosyl (flavone coumarine).	[26]
<i>T.lythroides</i>	feuilles tiges et racines.	Lipides, sucres, amidon.	[27]
	feuilles	Kaempférol, quercétine, l'acide caféique, l'acide genticique, la delfenidine, la cyanidine.	[28]

2.3. Etude de l'espèce *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur.

2.3.1. Position systématique [36]

Embranchement	—————>	Phanérogames ou Spermaphytes
Sous embranchement	—————>	Angiospermes
Classe	—————>	Endicots
Sous classe	—————>	Rosidées
Ordre	—————>	Malvales
Famille	—————>	Thyméléacées
Genre	—————>	<i>Thymelaea</i> .
Espèce	—————>	<i>Thymelaea microphylla</i> .

➤ **Nom botanique :** *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur.

2.3.2. Noms vernaculaires

Methnane, el Abiod [36] ou metnen dans le sud oranais, ou metnân dans l'oriental marocain et methnène en Tunisie [37].

2.3.3. Description botanique de l'espèce *Thymelaea microphylla*

C'est un arbrisseau (**Figure I.10**) dioïque à rameaux effilés canes cents. Les feuilles son très petites (14 mm) ovoïdes, éparses et distantes sur les rameaux. Les fleurs glomérulées par 2 - 5 à l'aisselle des feuilles et bien plus longues qu'elles jaunâtres à lobes très courts [36].



Figure I.10. Partie aérienne de l'espèce *Thymelaea microphylla*.

Cette espèce endémique est commune sur les hauts plateaux et dans l'Atlas saharien et dans le nord du Sahara ; elle pousse surtout dans les pâturages arides et désertiques [37].

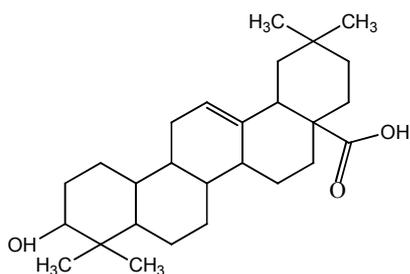
2.3.4. Propriétés et usages thérapeutiques

Suite à une étude des Thyméléacées (*Thymelaea microphylla*) menée auprès des populations locales d'El-Mechria et Nâama, cette plante est utilisée contre certaines infections microbiennes.

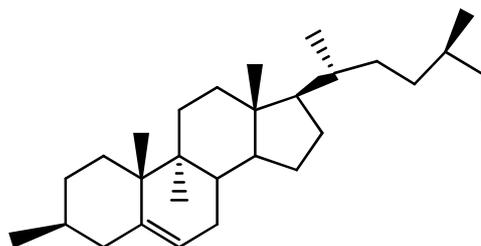
A propos des activités biologiques, le pouvoir antioxydant des extraits de *T. microphylla* est aussi développé [38, 39].

2.3.5. Travaux antérieurs

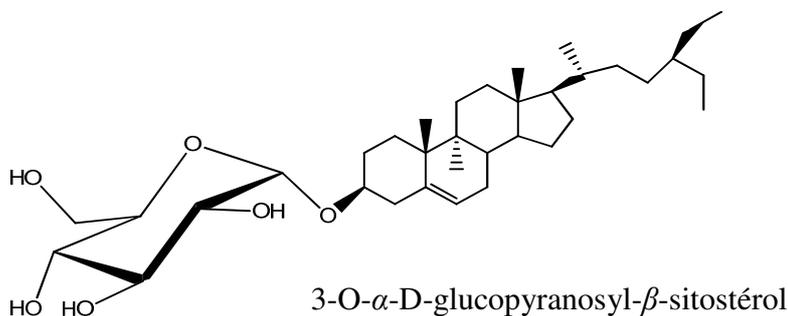
Peu de travaux réalisés sur cette plante ont permis d'identifier l'acide oléanolique, β -sitostérol et 3-O- α -D-glucopyranosyl- β -sitostérol dans les parties aériennes de *T. microphylla* [40].



Acide oléanolique

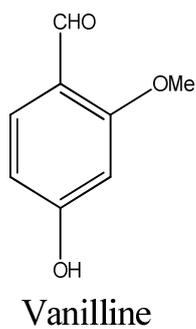
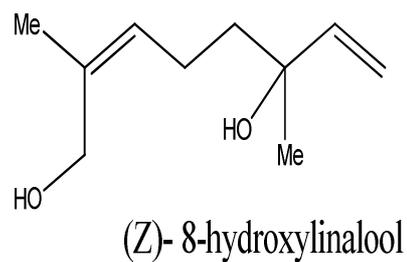
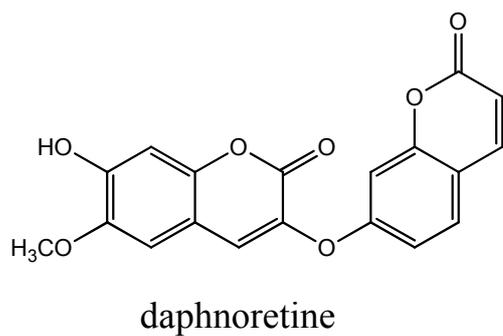
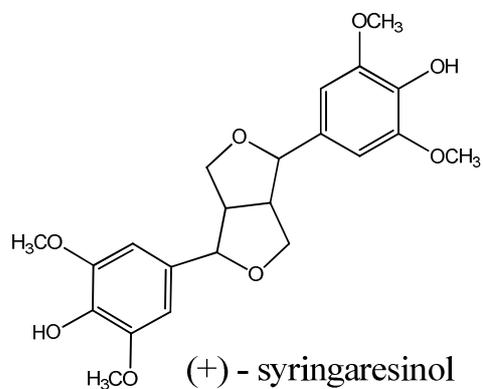
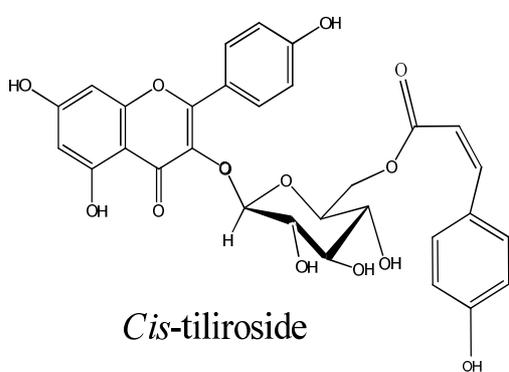
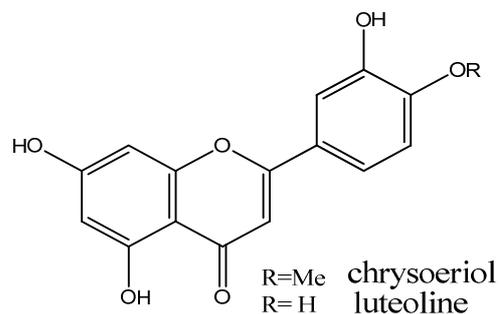
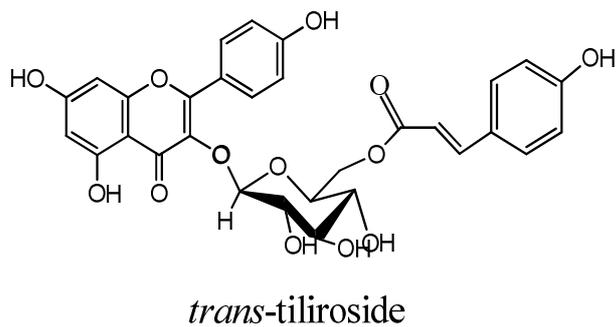


β -sitostérol



3-O- α -D-glucopyranosyl- β -sitostérol

Ainsi que les travaux réalisés par notre équipe sur les phases apolaires de cette espèce [41], ont permis d'isoler 8 composés phénoliques.



Conclusion

L'utilisation intensive de ces plantes en médecine ainsi que la présence de diverses molécules bioactives déversé en plusieurs catégories chimiques nous a incité à réaliser un screening phytochimique afin de mettre en cohérence les prescriptions et les activités potentielles des constituants chimiques. C'est ainsi que les prochains chapitres de la deuxième partie aborderont les études d'évaluations chimique et biologique de *Halimium halimifolium* et *Thymelaea microphylla*.

Références

1. Borris, R.P., Blaskó, G., Cordell, G.A., (1988). Ethnopharmacologic and phytochemical studies Of Thymelaeaceae. *Journal Ethnopharmacology*, 24 :41-91.
2. Heywood, V.H. (1996). Les Plantes à Fleurs. Editions Nathan, Paris, 159-160.
3. Gunasekera, S.P., Kinghorn, A.D., Cordell, G.A., Farnsworth, N.R. (1981). Plant anti-cancer Agents Constituents of *Aquilaria malaccensis*. *Journal of Natural Products*, 44 : 569-572.
4. Gelfand, M., Mavi, S., Drummond, R.B., Ndemera, B. (1985). The Traditional Medical Practitioner in Zimbabwe. *Mambo Press, Gweru*, 191-192, 268-269 et 304.
5. Iwu, M.M., (1993). *Handbook of African Medicinal Plants*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 66-67.
6. Kokwaro, J.O., (1993). *Medicinal Plants of East Africa. 2nd edition*, Kenya Literature Bureau, Nairobi, 228-229.
7. Galicia, D., Herbada, Pl., (2006). *Syst. Evol*, 25(7) : 159-187.
8. Quezel, P., Santa, S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du C.N.R.S, Paris. Tome II; 633.
9. Yanze, L., Ji Chunru, (1987). Chemical constituents and pharmacological actions of Thymelaeaceous plants. *Zhongcaoyao*, 18 (2) : 80-89.
10. Saleh, M.R.I., Haddad, D.Y., SARG, T.M., (1965). Isolation of the crystalline principle, thymelol, from leaves of *Thymelaea hirsuta*. *United Arab Republic Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4 : 49-56.
11. Gharbo, S.A., Khafagy, S.M., Sarg, T.M., (1970). Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. *United Arab Republic Journal of pharmaceutical sciences*, 11 (1) : 101-106.
12. Rizk, A.M., Rimpler, H., (1972). Isolation of daphnoretin and sitosterol -Dglucoside from *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry*, 11 (1) : 473-475.
13. Rizk, A.M. F.M. Hammouda, Ismail, S.I., (1974). Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*. II. Lipid fraction. *Plant Medicinal*, 26 (4) : 346-358.
14. Rizk, A. M., Hamouda, F. M., Ismail, S. I., (1975). Phytochemical investigation of *Thymelaea hirsuta*, III, Coumarins. *Acta chimica Academiae scientiarum Hungarica*, 85(1) : 07-115.
15. Imad, O., Saleh, A., Hasan, D., Ibrahim, A., Amin, I., Valery, M. D., Lumír, O., (2007). A variety of volatile compounds as marker in Palestinian honey from *Thymus capitatus*, *Thymelaea hirsuta*, and *Tolpis virgata*. *Food Chemistry*, 101(4) : 1393-1397.
16. Nawwar, M. A. M., Ishak, M. S., Sherbienny, A. D., Meshaal, S. A., (1977). Flavonoids of *Reaumuria mucronata* and *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry*, 16: 1319-1320.
17. Ismail, S. I., (1978). Tiliroside (kaempferol-3-p-coumaroylglucoside) from *Thymelaea hirsuta*. IV. *Fitoterapia*, 49 (4) : 156-159.

18. Garcí, A., Saenz,A., (1980a). Thymeleaceae photochemistry. I. Diterpenes, triterpenes and sterols of *Thymelea hirsuta* L. leaves. *Anales de química. Serie C, Química orgánica y Bioquímica*, 76 (1) : 94-95.
19. Rizk, A.M., Hammouda, F.M., Ismail, S.E., El-missiry, M.M., Evans, F.J., (1984). Irritant resiniferonol derivatives from Egyptian *Thymelaea hirsuta* L. *Experientia*, 40(8): 808-809.
20. Sammour, R.H., Sharaf,A .E., (1988). Qualitative study on seed proteins of *Thymelaea hirsuta* L. Populations. *Delta Journal of Science*, 12 (1) :290-312.
21. Brooks, G., Evans, A.T., Aitken, A., Evans, F.J., Rizk, A.F.M., Hammouda, F.M.,El-missiry, M.M., Ismail, S.E., (1990).Daphnane diterpenes of *Thymelaea hirsuta*. *Phytochemistry*, 29 (7): 2235-2237.
22. Abou-Karam, M., El-shaer, N.S., Shier , W.T., (1998). Inhibition of oncogene productenzyme activity as an approach to cancerchemoprevention. Tyrosine-specific proteinkinase inhibition by daphnoretin from *Thymelaea hirsuta* root. *Phytotherapy Research*, 12(4) : 282- 284.
23. El-beheiry, M.A.H., (2000). Evaluation of theorganic composition of *Thymelaea hirsuta*populations in Egypt. *Bulletin of the Faculty of Science ,AssiutUniversity, D., Botany*, 29 (1): 375-383.
24. George,V.,Rishi,A.K., (1982). Constituents of *Thymelaea passerina*. *Fitoterapia*, 53 (5-6) : 191-192.
25. Garcia, A., SAENZ, J. M., (1980b). Thymeleacea photochemistry. II. Flavone and coumarin components of *Thymelea tartonraira* L. *Anales de química. Serie C, Química orgánica y Bioquímica*, 76 (1) : 96-97.
26. Meletiou,C. M.S., Banilas, G.P., Diamantoglou,S., (1998). Seasonal trends in energy contents and storagesubstances of the Mediterranean species *Dittrichia viscosa* and *Thymelaea tartonraira*.*Environmental and Experimental Botany* .39(1) : 21-32.
27. Naima, D., Khalid Y., Najib G., Lalla Mina, I. H., (2004). Etude de polyphynols des feuilles d'une endimique ibéro marocaine *Thymelaea lythrdoides*. *Acta botanica Malacitana*, 29: 233-239.
28. Boudjelal, A., Henchiri, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A., Ruberto, G., (2013). *Journal of Ethnopharmacology*, 148 (2): 395-402.
29. Amari, NO., Bouzouina, M., Berkani, A., Lotmani, B., (2014). Phytochemical screening and ntioxidant capacity of the aerial parts of *Thymelaea hirsute* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4:104-109.
30. Trigui, M., Hsouna, AB., Tounsi, S., Jaoua, S., (2013). Chemical composition and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of Tunisian *Thymelaea hirsuta* with special reference to its mode of action. *Industrial Crops and Products*, 41:150-157.
31. Akrou ,A., Gonzalez, L.A., Jani, A.L., Madrid, P.B., (2011). Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 342-347.

32. Miyamae, Y., Villarea, M.O., Abdrabbah, M.B., Hiroko Isoda, H., Shigemori, H., (2009). Hirseins A and B, Daphnane Diterpenoids from *Thymelaea hirsuta* That Inhibit Melanogenesis in B 16 Melanoma Cells. *Journal of Natural Products*, 72 : 938–941.
33. Dohou, N., Doumi, L., Gmira, N., Hmamouchi, M., (2002a). Valorisation Des substances naturelles de *Thymelaea lythroïdes* (Barr. & Murb.). *Symposium International (RPMA). Plantes médicinales, santé, environnement au service du développement*. Université Med V. Faculté de Médecine et de pharmacie de Rabat, 38.
34. Dohou, N., Doumi, L., Gmira, N., Hmamouchi, M., (2002b). Valorisation des substances naturelles de *Thymelaea lythroïdes* (Barr. & Murb.). *3ème Rencontre Andalou – Marocaine sur la Chimie des Produits Naturels*. Université de Cádiz, Espagne, 6.
35. Quezel, P., Santa, S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Editions du Centre National de la recherche scientifique. Tome II.
36. Dupont, F., Guignard, J.L. (2007). Abrèges botanique systématique moléculaire. 14^{ème} édition révisée.
37. Aît Youssef, M., (2006). Plantes médicinales de Kabylie. Ibis Press, Paris. Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97: 654-660.
38. Djeridane, A., Yousfi, Y., Brunel, J.M., Stocker, P., (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 2599–2606.
39. Benhammou, N., Atik Bekkara, F., Coustard, J.M., (2009a). Antioxidant activity of methanolic and water extracts from *Marrubium deserti* de Noë and *Thymelaea microphylla* from Algerian Sahara. *Advance in Food Science*, 31 (4): 194-201.
40. Cheriti, A., Sekkoum, K., (1995). Phytochemical investigation of *Thymelaea microphylla* Growing in Algeria. *Acta Chimica Slovenica*, 42: 373-374.
41. Mekhelfi, T., Kerbab, K., Guella, G., Zaiter, L., Benayache, S., Benayache, F., (2014). Phytochemical constituents of *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. from Algeria. *Der Pharmacia Lettre*, 6, 152-156.

Partie II

Etude chimique et Biologique des *espèces* *Halimium Halimifolium* et *Thymelaea microphylla*

Chapitre 1. Investigation phytochimique de l'espèce
Halimium halimifolium (L.) Wilk.

1. Etude phytochimique de l'espèce *Halimium halimifolium* (L.) Willk

1.1. Matériel végétal

Les parties aériennes de *H. halimifolium* ont été récoltées de la région d'EL-Kala, Nord-Est d'Algérie au mois d'avril en l'an 2000, les parties aériennes de la plante ont été entreposées pour les sécher dans un endroit sec.

1.2. Macération et Extraction

Après le tri de la plante, on a regroupé les feuilles, les tiges et les fleurs, la matière végétale (2000 g) obtenue est mise dans un mélange de EtOH-H₂O (7 : 3, v:v) pendant 24 h trois fois. Après concentration sous vide, l'extrait hydroalcoolique est dilué avec de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1kg de matière sèche, on laisse la solution une nuit puis on filtre. Après filtration, la solution a subi des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par l'éther de pétrole afin d'éliminer les chlorophylles est les lipides puis par le chloroforme, l'acétate d'éthyle et enfin le *n*-butanol. Chaque extraction est répétée trois fois,

Les masses et les rendements de ces extraits sont résumés au tableau II.1.

Tableau II.1. Masse et rendement des différents extraits des parties aériennes de *H.halimifolium*

Extraits obtenus	Masse (g)	Rendement(%)
Extrait chloroforme	3,15	0,15
Extrait AcOEt	37,00	1,85
Extrait <i>n</i> -butanol	97,70	4,88

L'organigramme d'extraction montre les différentes étapes du processus (**Figure II.1**).

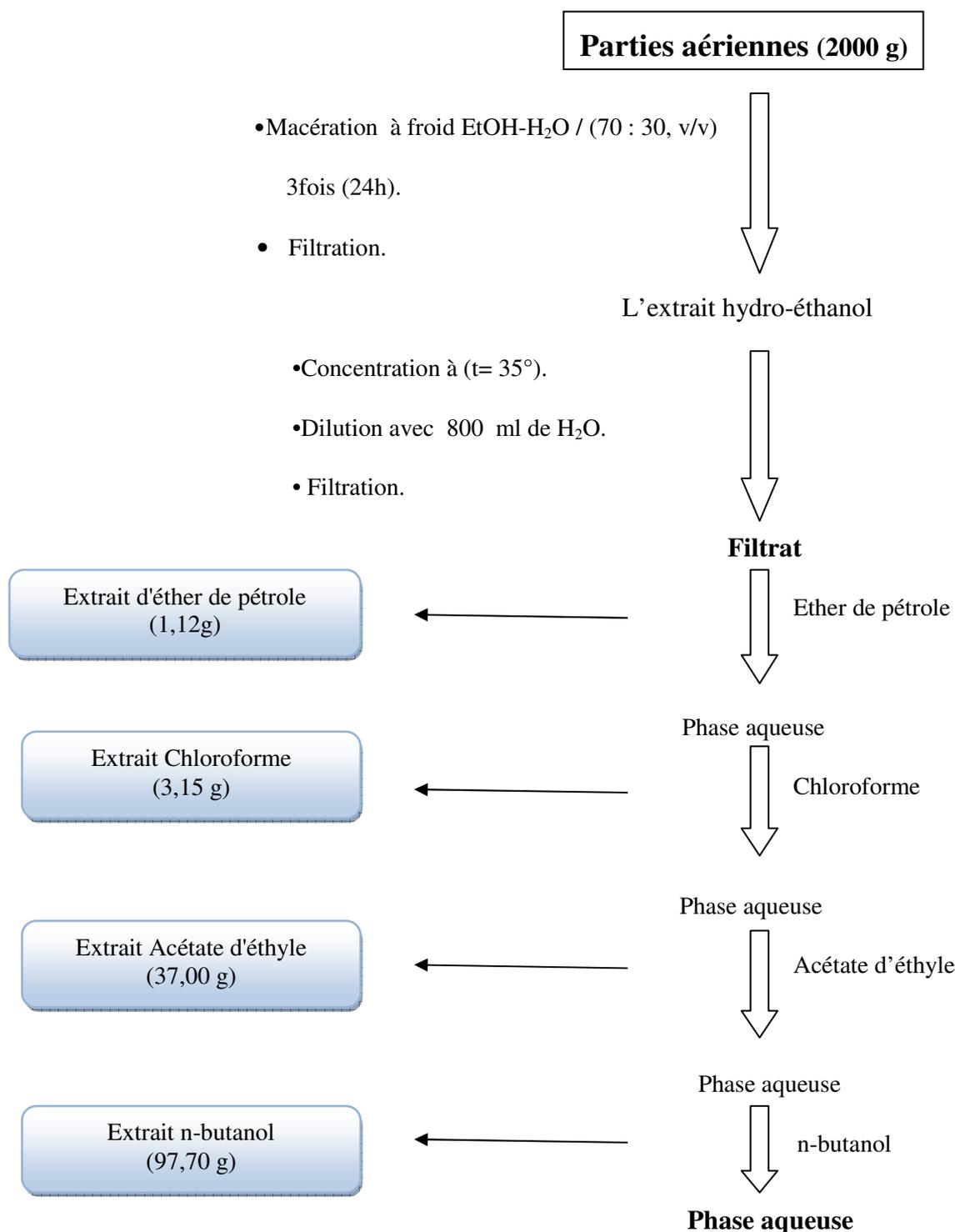


Figure II.1. Diagramme d'extraction des parties aériennes de *Halimium halimifolium* par épuisement avec des solvants de polarité croissante.

L'étude des extraits obtenus sur CCM analytique utilisant différents systèmes d'élution nous a orientés vers l'étude chimique de l'extrait AcOEt et *n*-butanol.

1.3. Etude chimique de l'extrait acétate d'éthyle

1.3.1. Analyse qualitative de la phase acétate d'éthyle

Criblage chimique général et analyses LC/DAD-UV préliminaires

Pour les analyses LC/DAD-UV, une aliquote de l'extrait acétate d'éthyle (10 mg/ ml) a été préalablement solubilisé dans le méthanol. Après centrifugation et décantation, pour ôter les particules en suspension, la solution a été injectée dans un système HPLC dont les paramètres expérimentaux étaient les suivants :

- Concentration d'extrait : 5 µl (2,5 µg/ 5µl)
- Détection : détecteur à barrettes de diodes (DAD G-4212B, 266 nm).
- Colonne : Poroshell 120 EC-C₁₈ (3 x 50 mm).
- Phase mobile : MeOH (B) / H₂O (A), débit 0,5 ml/ min:

Temps (min)	Solvant A%	Solvant B%
0	95	5
2	95	5
10	30	70
12	30	70
14	0	100

Résultats :

- Les analyses LC/DAD-UV ont clairement montré la richesse en métabolites secondaire absorbant en 266 nm, ce qui indique la présence des composés phénoliques.
- Le chromatogramme (**Figure II.2**) présente aussi un pic intense qui suggère la présence d'une molécule majoritaire. Tous ces résultats nous encouragent à faire une étude profonde de cet extrait.

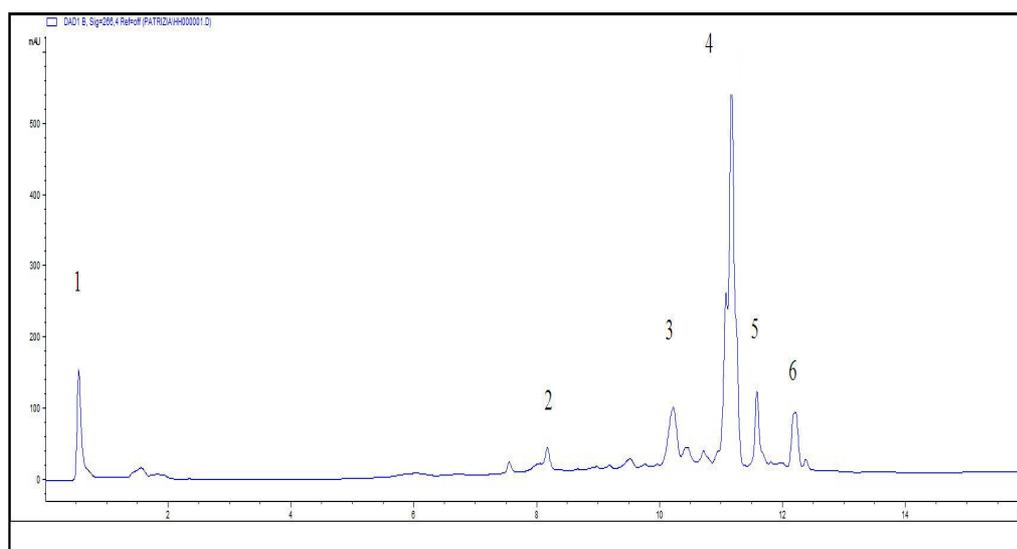


Figure II.2. Chromatogramme LC/DAD-UV de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *H.halimifolium* à 266 nm

1.3.2. Séparation chromatographique

Colonne chromatographique et fractionnement

Cette étude nous a permis une séparation grossière des molécules selon leurs polarités. Les résultats des tests sur CCM nous ont conduit à utiliser Chloroforme / Méthanol comme éluant en gradient de polarité.

L'extrait acétate d'éthyle (15 g), dissous dans le méthanol est mélangé à une petite quantité de gel de silice (40-60 μm) ; l'ensemble est séché sous vide, jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène.

Cette poudre est déposée dans une colonne (h= 80 cm, d= 4 cm), de gel de silice (40-60 μm) préparé dans le chloroforme.

L'élution est commencée par 100% de chloroforme ensuite on augmente le pourcentage du MeOH progressivement jusqu'à ce qu'on arrive à 100% de MeOH avec un fractionnement chaque 50 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par CCM et les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm).

La progression de cette colonne est mise dans le tableau II.2.

Tableau II.2. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait AcOEt des parties aériennes de *H .halimifolium*

Fractions	Lots	Eluant	
		CHCl ₃ %	MeOH%
f0	0-50	100	0
f1	51-160	99,5	0,5
f2	161-180	99	1
f3	181-200	97	3
f4	201- 221	95	5
f5	222-230	95	5
f6	231- 251	93	7
f7	152 -260	90	10
f8	261- 270	89	11
f9	271- 300	89	11
f10	301- 400	85	15
f11	401- 424	83	17
f12	425- 441	80	20
f13	442- 451	75	25
f14	452- 461	70	30
f15	500- 511	65	35
f16	512- 544	65	35
f17	545- 554	62	38
f18	555- 576	60	40
f19	577- 587	55	45
f20	588- 623	55	45
f21	624- 644	50	50
f22	868- 879	40	60
f23	880- 893	0	100

1.3.3. Purification des fractions

La purification des fractions obtenues à partir de la séparation par colonne est basée sur deux méthodes chromatographiques :

- Les fractions : f 1, f 3, f 5 et f 7 ont été chromatographiées sur plaque de gel de silice (HF-254).
- Les fractions (f8-f21) font l'objet d'une séparation semi-préparative par HPLC en phase inverse. Ces fractions sont regroupées en utilisant CCM (silica 60 F254 gel-coated glass sheets), éluées par BAW (Butanol-Acide acétique -H₂O ; 60 :15 :25). On a obtenu 4 fractions majeures F V, F VI, F VII et F VIII.

Les fractions étudiées et leurs masses sont rassemblées dans le tableau II.3.

Tableau II.3. Fractions à purifier

Fractions majoritaires	Masse (mg)
F I (f1)	200,7
F II (f3)	380,0
F III (f5)	364,0
F IV (f7)	308,0
F V (f8-f9)	230,0
F VI (f12-f 13)	93,2
F VII (f14-f17)	389,4
F VIII (f19-f21)	167,3

- Les fractions chromatographiées sur plaque de gel de silice (HF-254) sont éluées par les systèmes ;
F I (200,7 mg) AcOEt-Ether de pétrole (6 : 4), **F II** (380 mg) AcOEt - Ether de pétrole (8 : 2), **F III** (364 mg) CH₃Cl -MeOH (8 : 2) et **FIV**(308 mg) CH₃Cl- MeOH (9 : 1) pour isoler les composés : **Hh-1** (7,2 mg), **Hh-2** (5,4 mg), **Hh-3** (15,1 mg) et **Hh-4** (20 mg) respectivement.
- Les fractions **F V**, **F VI** sont purifiées en utilisant le système MeOH-H₂O (5,0 : 5,0) comme phase mobile ;
- ✓ La fraction **F V** (230,0 mg) a donné les produits: **Hh-5** (6,3 mg), **Hh-6** (6,3 mg) **Hh-7**(8,9mg), **Hh-8** (4,6 mg), **Hh-4** (2,7 mg), **Hh-9** (2.6 mg), **Hh-3** (1,5 mg).

- ✓ La fraction **F VI** (93,2 mg) a donné les composés : **Hh-11**(1,5 mg), **Hh- 10** (0,9 mg), **Hh-4** (mg).
- Les fractions **F VII**, **F VIII** ont été séparées par le système MeOH-H₂O (4,5 : 5,5) comme phase mobile ;
- ✓ La fraction **F VII** (389,4 mg) a donné les composés : **Hh-12** (3 mg), **Hh- 4** (3,5 mg).
- ✓ La fraction **F VIII** (167,3 mg) a donné les produits : **Hh-13** (3,2 mg), **Hh- 12** (1,6 mg).

1.4. L'étude phytochimique de l'extrait *n*-butanol

1.4.1. Colonne chromatographique et fractionnement

Un premier fractionnement de l'extrait brut *n*-butanol (3,49 g) a été réalisé par chromatographie de partage sur une colonne de Sephadex LH -20, éluée par EtOH/H₂O (7: 3) avec un débit de 0, 5 ml/ min.

113 lots de 8 ml sont collectés, les fractions avec les mêmes R_f sont regroupées après une analyse par CCM (gel de silice) utilisant le BAW (*n*-BuOH-AcOH-H₂O, 65 : 15 : 25).

Tableau II.4. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol des parties aériennes de *H. halimifolium*

Fractions	Lot	Masse (mg)
A	8- 15	3,70
B	16- 21	7,60
C	22 -30	356,0
D	31- 32	286,5
E	33 -34	322,5
F	35 -41	173.2
G	42- 44	48,90
H	45 -46	30,10
I	47- 50	50,60
L	51 -54	46,70
M	55 -57	25,80
N	58-113	0,0178

1.4.2. Purification

Les fractions (D, F, H, I et L) font l'objet d'une séparation semi-préparative par HPLC en phase inverse (colonne C-8) utilisant le système (MeOH- H₂O) comme éluant (Tableau II.5).

Tableau II.5. Fractions chromatographiée

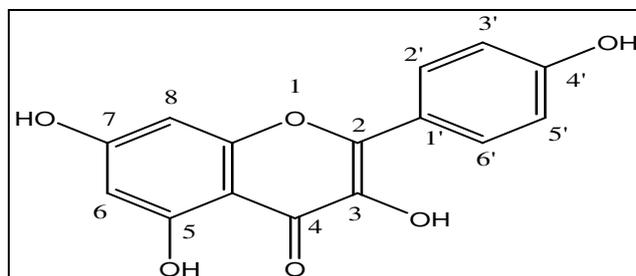
Fractions	Système d'éluion (MeOH - H ₂ O)%	Produits isolés
D	(3,5 : 6,5)	Hh-14 (0,8 mg)
F	(4,5 : 5,5)	Hh -15 (2,5 mg), Hh-16 (1,2 mg)
H	(4,0 : 6,0)	Hh-17 (2,8 mg), Hh-6 (1 mg)
I	(4,0 : 6,0)	Hh-18 (1,6 mg), Hh-19 (2,1 mg),
L	(3,5 : 6,5)	Hh-20 (0,9 mg)

2. Élucidation structurale des composés isolés

Les structures des produits isolés ont été établies par la combinaison des données de RMN 1D et 2D, des expériences de la spectrophotométrie d'absorption ultraviolette.

2.1. Détermination structurale des composés de type flavonoïdes

2.1.1. Identification du composé Hh-3



Kaempférol

Le composé **Hh-3** a été obtenu sous forme d'une poudre jaune, la fluorescence jaune sous lumière de Wood peut nous orienter vers un squelette d'un flavonoïde de type flavonol.

L'étude de la série spectrale UV en présence de plusieurs réactifs est reportée dans le tableau II.6.

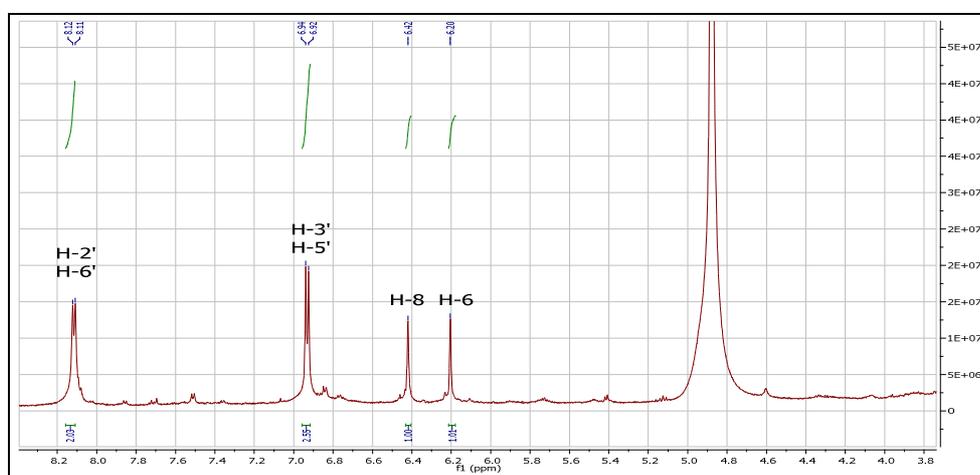
Tableau II.6. Données de la série spectrale UV du produit **Hh-3**

Réactifs de déplacements	Bande I	Autre bande	Bande II	interprétation
MeOH	365	/	265	Flavonol ; OH libre en 3
+NaOH	420 +55nm	320	265	OH libre en 4' OH libre en 7
+NaOH Après 5min	Dégradation		Dégradation	OH libre en 3
+AlCl ₃	420 +60nm	/	265	OH libre en 5
+AlCl ₃ /HCl	420 +60nm	/	265	Pas ortho di OH sur cycle B
+NaOAc	365	/	270	OH libre en 7
+NaOAc/H ₃ BO ₃	370 +5nm	/	270	Pas ortho di OH sur cycle B

D'après ces observations, on remarque que le spectre UV du composé **Hh-3** dans le méthanol est caractéristique un squelette d'un flavonoïde de type flavonol. Grâce au schéma

de substitution déduit de l'analyse des modifications des spectres UV sous l'action des réactifs. L'examen du spectre RMN- ^1H (**Spectre 1.1**) enregistré dans MeOH- d_4 à 600 MHz confirme cette structure par :

- ✓ La présence de deux doublets ($J = 9,0$ Hz) d'intégration 2H pour chacun, caractéristiques d'un noyau B. Le premier à $\delta = 8,05$ ppm est attribué aux noyaux H-2' et H-6'; le second à $\delta = 6,90$ ppm est attribué aux noyaux H-3' et H-5'.
- ✓ Ce spectre renferme également deux doublets formant un système AM ($J = 2,1$ Hz) indicateurs d'un couplage *mé*ta à $\delta = 6,39$ et 6,18 ppm, attribuables à H-8 et H-6 respectivement du cycle aromatique A substitué en 5 et 7.



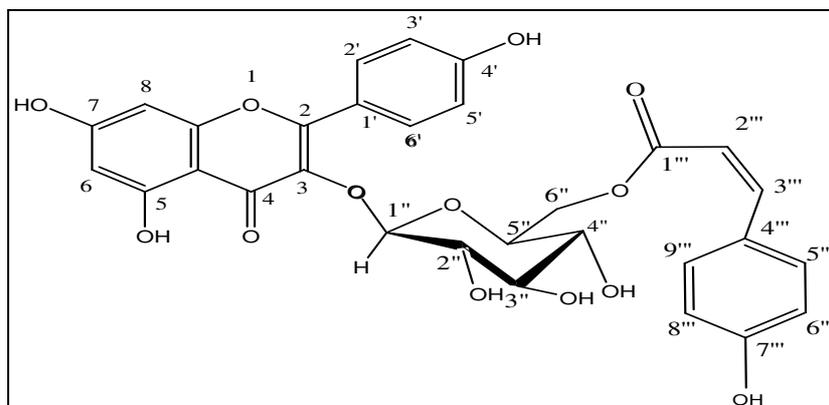
Spectre 1.1. Spectre RMN ^1H du composé **Hh-3** (600 MHz, MeOH- d_4)

Tableau II.7. Données de RMN- ^1H du produit Hh-3

δ H (ppm)	Intégration	Multiplicité J (Hz)	Attribution
8,05	2H	d 9,0	H-2'/6'
6,90	2H	d 9,0	H-3'/5'
6,39	1H	d 2,1	H-8
6,18	1H	d 2,1	H-6

Les données spectrales que nous avons obtenues (**Tableau II.7**) sont en accord avec les données publiées [1] pour cette molécule et nous ont permis d'identifier comme étant : kaempférol.

2.1.2. Identification du composé Hh-8



Kaempférol 3-O-(6''-O- Z-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside.

Cis-tiliroside

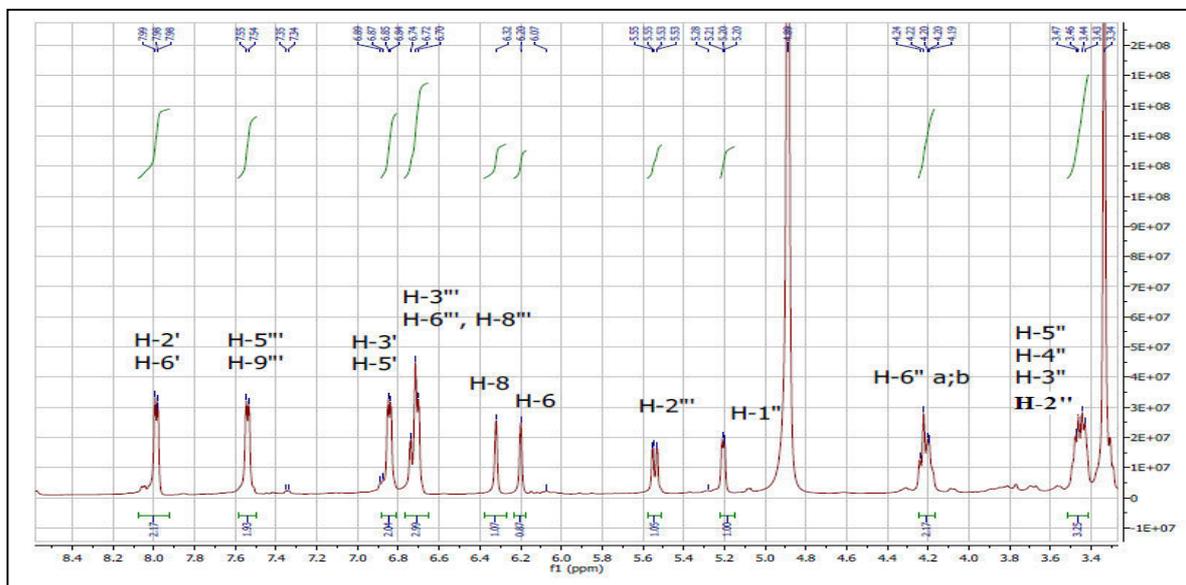
Le composé **Hh-8** a été isolé sous forme d'une poudre jaune, Le spectre de masse obtenu par ESI-MS (mode négatif), donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 593 $[M-H]^-$ en accord avec une masse moléculaire de 594 Da et une formule brute en $C_{30}H_{26}O_{13}$. La fluorescence sous lumière de wood est noire violette, peut orienter vers un squelette d' un flavone ou d'un flavonol substitué en 3.

Le spectre RMN- 1H (**Spectre 1.2**) et le spectre HSQC (**Spectre 1.3**) du composé **Hh-8** montrent :

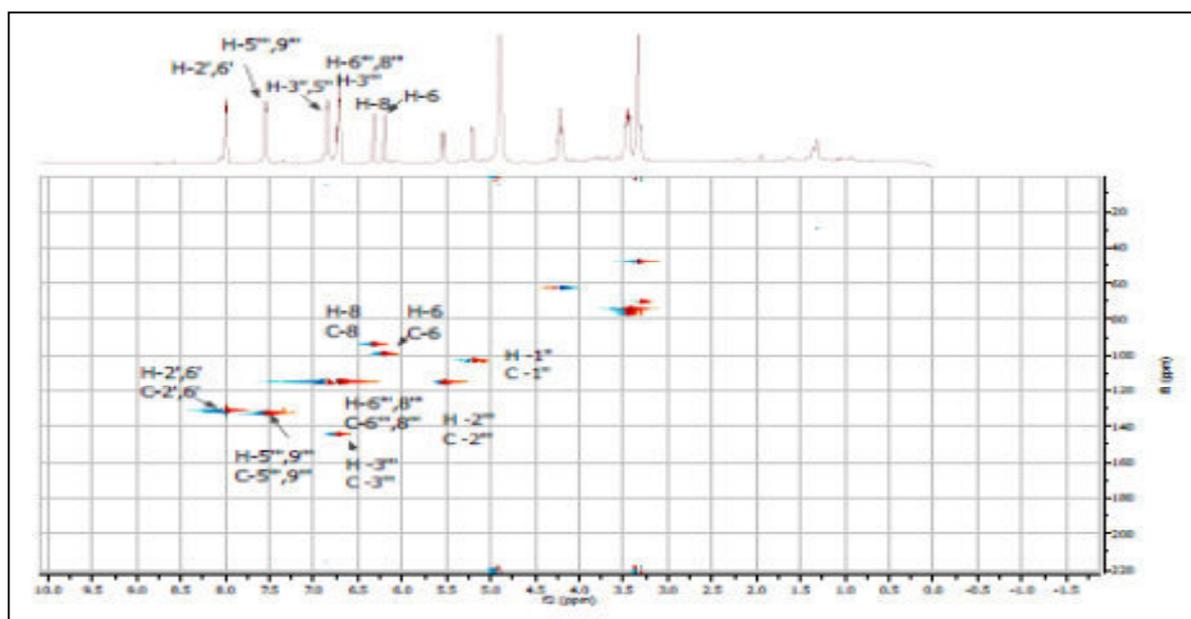
La présence d'un ensemble de signaux caractérisant dans un premier point de vue ; un squelette flavonoïque de type kaempférol reconnaissable par :

- ✓ Deux doublets à $\delta = 7,98$ ppm et $6,85$ ppm ($J = 8,1$ Hz) d'intégration 2H pour chacun, portés respectivement par les carbones situés à $\delta = 131,8$ et à $\delta = 115,6$ ppm ; attribuables à H-2', H-6' et H-3', H-5' respectivement du noyau B. Ces couplages sont bien visibles sur le spectre Cosy 1H - 1H (**Spectre 1.4**).
- ✓ Deux doublets d'intégration 1H, correspondant aux deux protons aromatiques *mé*ta couplés ($J = 2,1$ Hz), résonant respectivement à $\delta = 6,31$ ppm et $\delta = 6,19$ ppm et qui sont liés aux carbones localisés à $\delta = 94,7$ et $\delta = 99,9$ ppm, attribuables aux protons H-8 et H-6 respectivement du noyau A.
- ✓ Un doublet à $\delta = 5,19$ ppm intégrant pour un proton, assigné au proton anomérique H-1'' ($J = 7,6$ Hz) d'un glucose suggère que ce sucre est sous la forme de β -glucose,

Une corrélation hétéronucléaire HSQC (**Spectre 1.3**) permet de définir le carbone porteur de ce proton avec un signal à $\delta = 103,7$ ppm ; déplacement chimique rencontré dans les *O*-glucosides, indique l'attache de glucose à l'aglycone par un pont oxygéné [2].



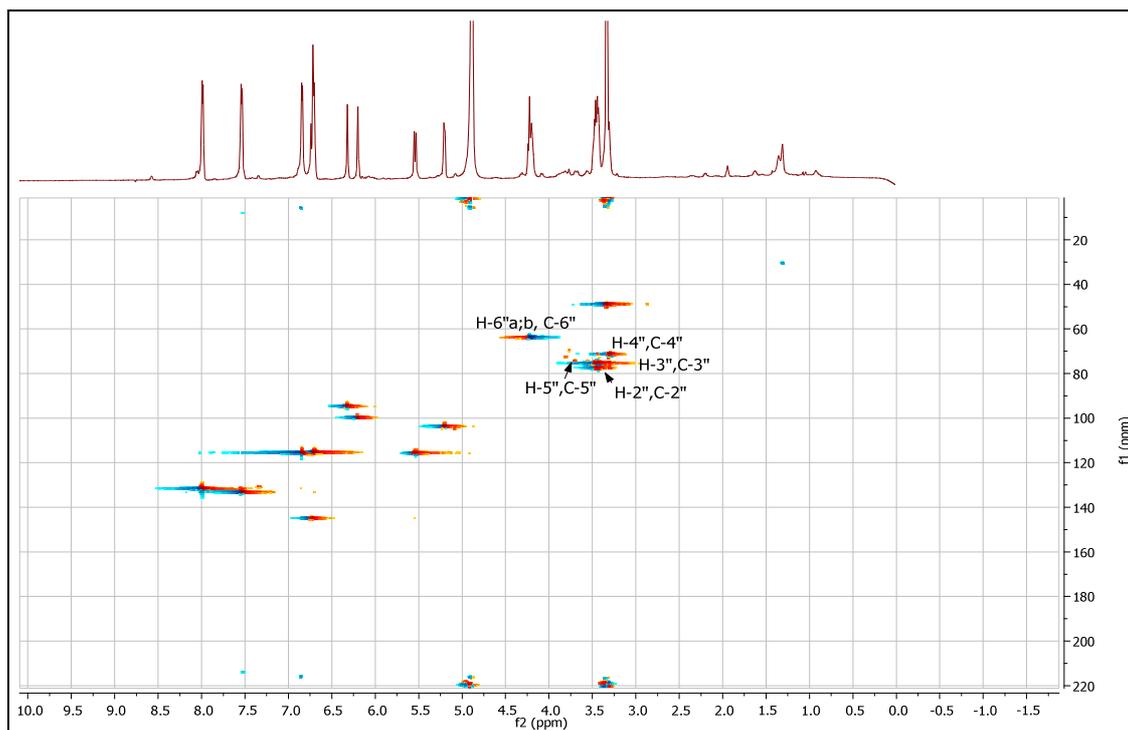
Spectre 1.2. Spectre RMN ^1H du composé **Hh-8** (600 MHz, MeOH- d_4) .



Spectre 1.3. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C du composé **Hh-8** (600 MHz, MeOH- d_4)

La présence de l'unité sucre est confirmée par :

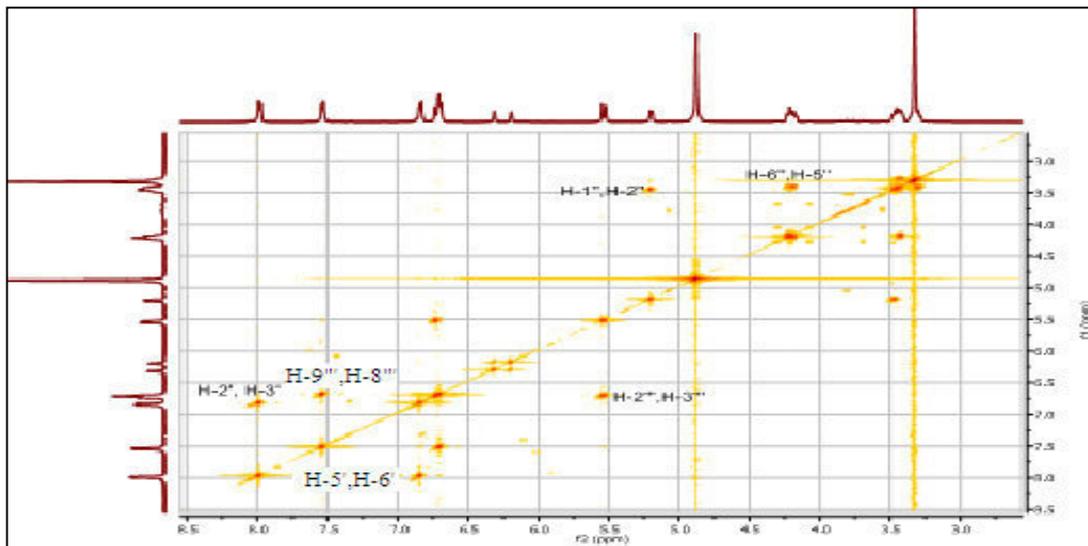
- ✓ Deux signaux d'intégration 1H pour chacun, attribuables à H-6''a, H-6''b à $\delta = 4,21$ ppm ($dd, J = 12,0; 1,8$ Hz) et $\delta = 4,20$ ppm ($dd, J = 12,0; 6,0$ Hz) respectivement.
- ✓ Une série des signaux résonnant dans l'intervalle [$\delta = 3,30 - \delta = 3,45$ ppm] attribuables aux protons 2'', 3'', 4'', 5'' du sucre, localisés aux carbones $\delta = 77,7; 75,3; 71,4$ et $75,2$ ppm selon l'expérience HSQC (Spectre 1.3.1).



Spectre 1.3.1 Spectre HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ du composé **Hh-8** (600 MHz, MeOH- d_4)

Le spectre RMN- ^1H montre également, à part les signaux des protons du squelette flavonol :

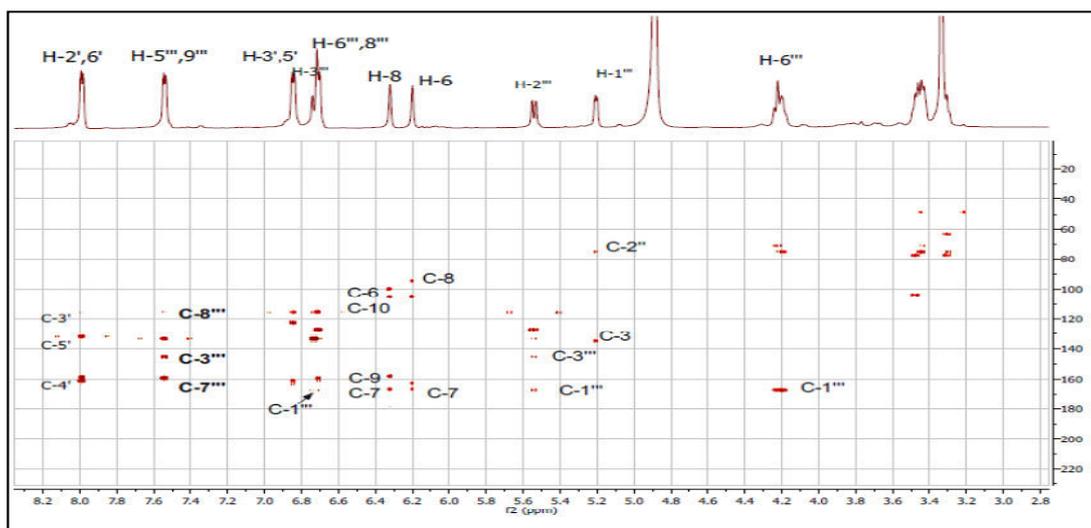
- ✓ Des signaux aromatiques. En effet, les deux doublets ($J = 9,3$ Hz) observés à $\delta = 7,53$ et $6,72$ ppm, sont attribuables au noyau aromatique *para* substitué. Ces protons sont nommés (H-5''', H-9'''), (H-6''', H-8''') respectivement.
- ✓ Des protons résonnant dans les champs faibles allant de $\delta = 5,52; 6,71$ ppm sont observés également, attribuables aux H-2''' et H-3''' éthyléniques, couplés entre eux par un couplage *cis* ($J = 12,2$ Hz), confirmés par la tache de corrélation enregistrée sur le spectre Cosy (Spectre 1.4).



Spectre 1.4. Spectre Cosy ^1H - ^1H du composé **Hh-8** (600 MHz, MeOH- d_4)

Ces données indiquent la présence d'un kaempférol glucosylé avec une entité coumaroylée. L'ensemble de l'enchaînement est prouvé par l'expérience HMBC (**Spectre 1.5**) qui montre :

- ✓ Une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1'' et le carbone à $\delta = 134,7$ ppm attribuable au C-3 de l'aglycone, confirme la substitution de ce dernier par le glucose.
- ✓ Une autre corrélation est observée entre le proton H-6'' du glucose et un carbone quaternaire à $\delta = 167,7$ ppm attribuable à C-1''' qui suggère la présence d'un carbonyle donc le sucre est estérifié à cette position. Le proton éthylénique attribuable au proton H-2''' montre aussi une tache de corrélation avec ce carbonyle ($\delta = 167,7$ ppm). Ces corrélations sont illustrées dans la figure II.3.



Spectre 1.5. Spectre HMBC ^1H - ^{13}C du composé **Hh-8** (600 MHz, MeOH- d_4)

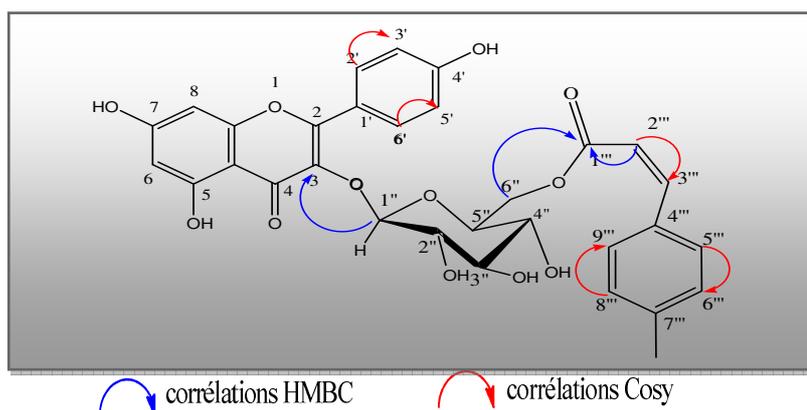
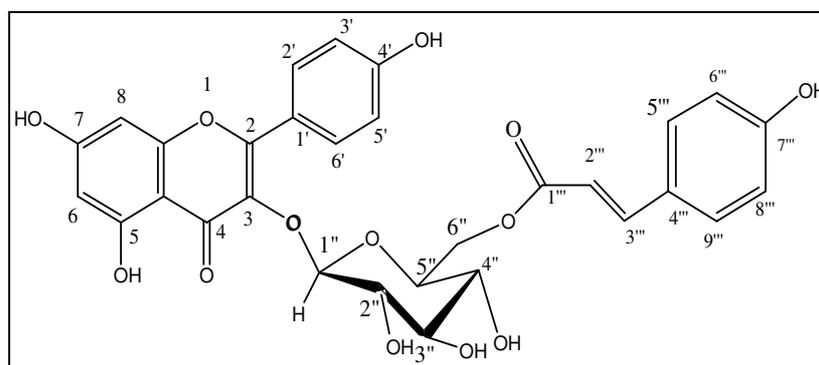


Figure II.3. Corrélations HMBC et Cosy **Hh-8**

Les données spectroscopiques sont regroupées dans le tableau II.8.

Les données spectrales que nous avons obtenues (**tableau II.8**) sont en accord avec celles publiées pour le composé **Hh-8** [3] et nous ont permis d'identifier comme étant : *Cis*-tiliroside.

2.1.3. Identification du composé Hh-4

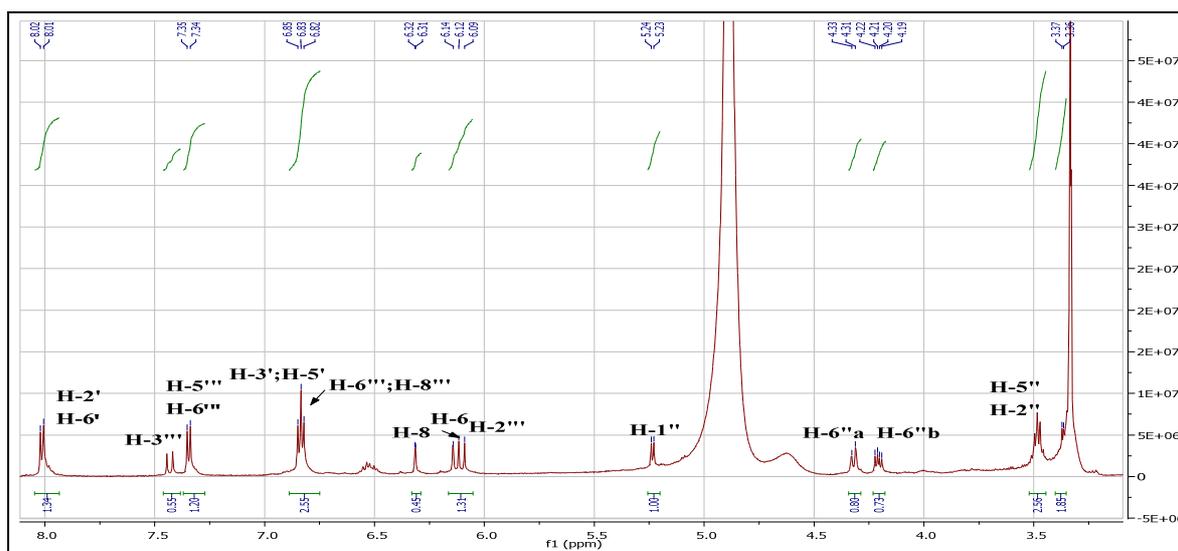


Kaempférol 3-O-(6''-O- *E-p*-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside.
trans-tiliroside.

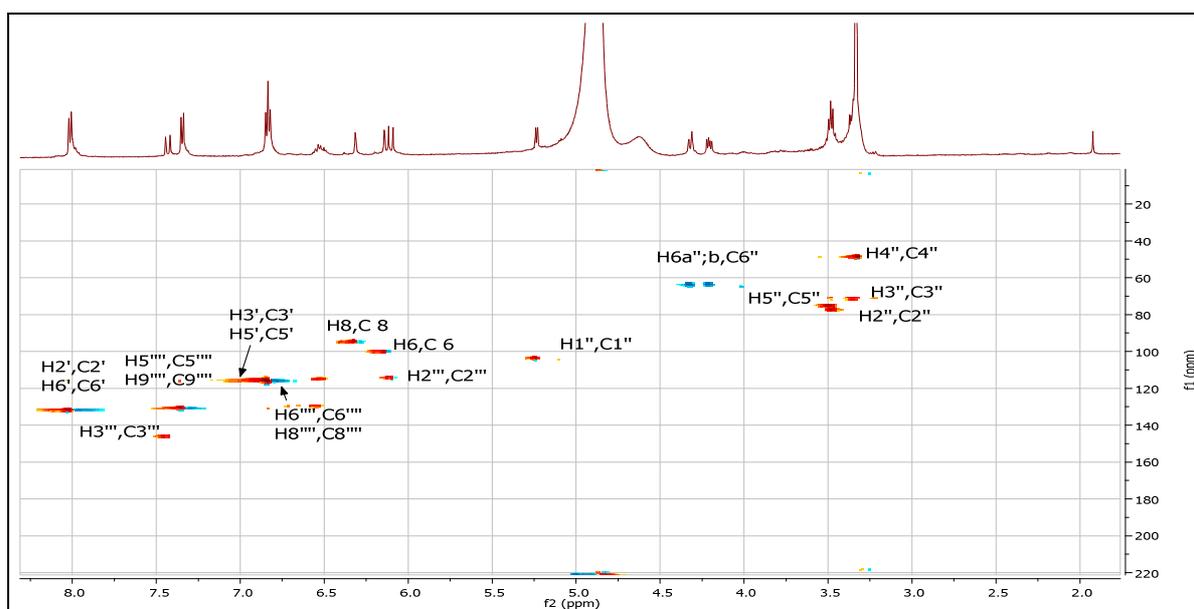
Le composé **Hh-4** a été obtenu sous forme d'une poudre jaune. La fluorescence noir violette sous lumière de wood oriente la présence d'un squelette de type flavone ou d'un flavonol substitué en 3. Le spectre de masse obtenu par ESI-MS (mode négatif), donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 593 $[M-H]^-$ en accord avec une masse moléculaire de 594 Da et une formule brute en $C_{30}H_{26}O_{13}$. C'est un isomère du composé précédent(**Hh-8**) *cis*-tiliroside.

L'étude des spectres RMN- ^1H (**Spectre 1.6**), HSQC (**Spectre 1.7**), à 600 MHz enregistrés dans MeOH- d_4 montrent des signaux similaires à ceux du composé précédent (**Hh-8**), ces expériences mettent en évidence la présence d'un kaempférol glucosylé et un motif coumaroylé avec une différence importante :

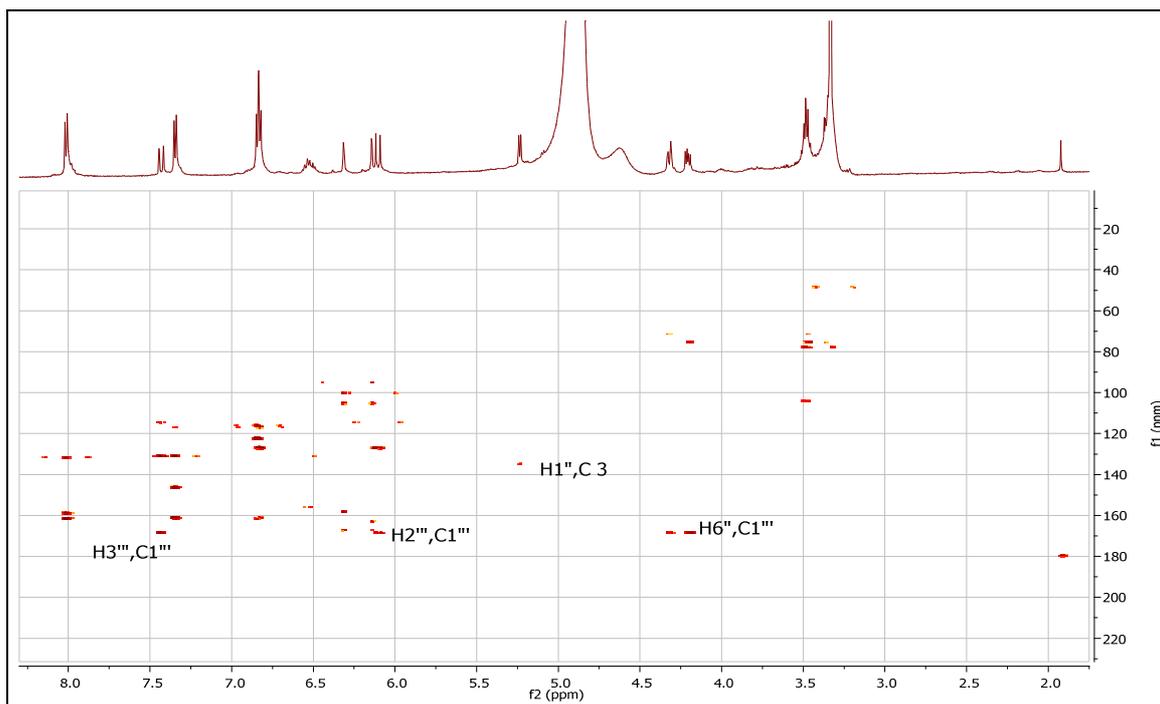
Le déblindage des protons oléfiniques du groupe coumaroylé H-2''' et H-3''' à $\delta = 6,06$ ppm et 7,39 ppm respectivement avec une constante de couplage de ($J=16,1$ Hz) qui donne la géométrie *w trans* de ce dernier.



Spectre 1.6. Spectre RMN ^1H du composé **Hh-4** (600 MHz, MeOH- d_4)



Spectre 1.7. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C du composé **Hh-4** (600 MHz, MeOH- d_4)



Spectre 1.8. Spectre HMBC¹H-¹³C du composé **Hh-4** (600 MHz, MeOH-d₄)

L'enchaînement de cette molécule est confirmé par l'utilisation combinée des mesures sur les expériences HMBC (**Spectre 1.8**) et Cosy (**Spectre 1.9**). Les corrélations sont illustrées dans les figures II.4 et II.5.

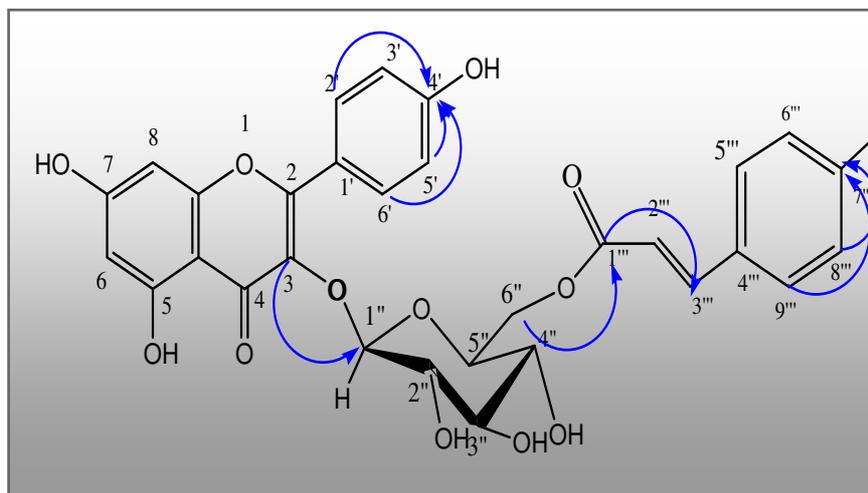
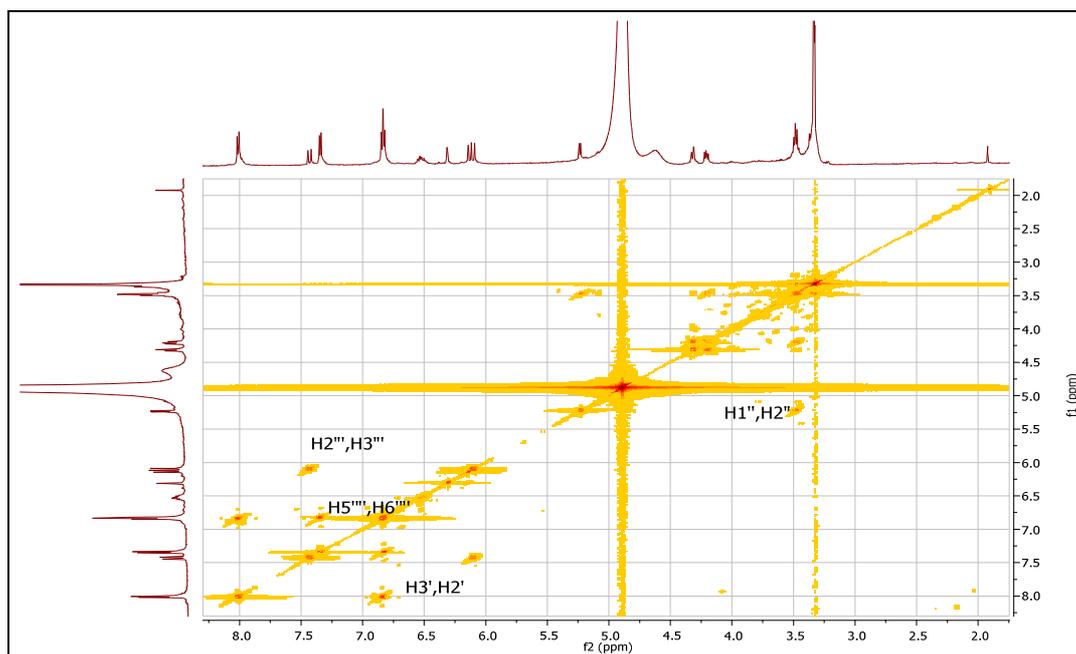


Figure II.4. Corrélations HMBC **Hh-4**



Spectre 1.9. Spectre Cosy ^1H - ^1H du composé **Hh-4** (600 MHz, MeOH- d_4)

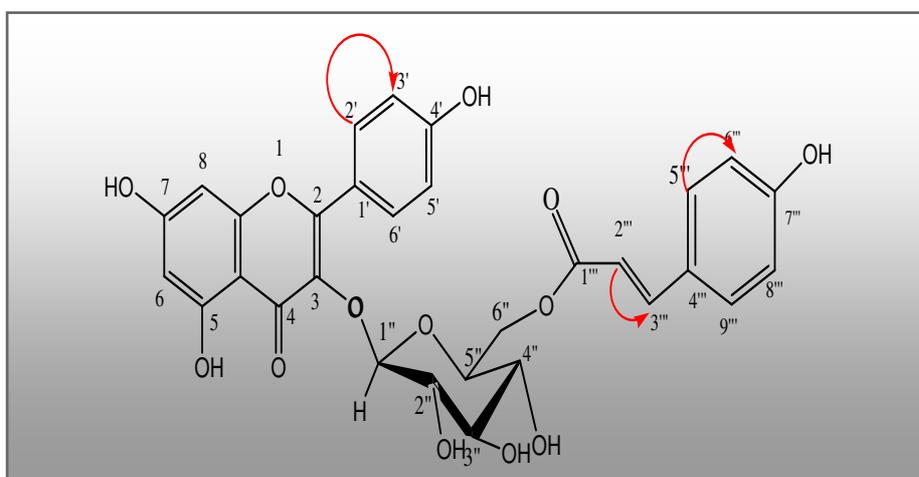
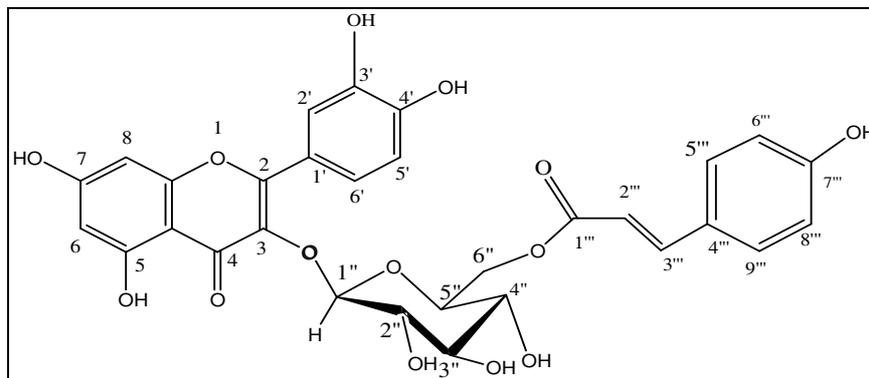


Figure II.5. Corrélations Cosy **Hh-4**

Les données spectrales que nous avons obtenues (**tableau II.8**) sont en accord avec celles publiées pour le composé **Hh-4** [3] et nous ont permis d'identifier comme étant : *trans*-tiliroside .

2.1.3. Identification du composé Hh-10

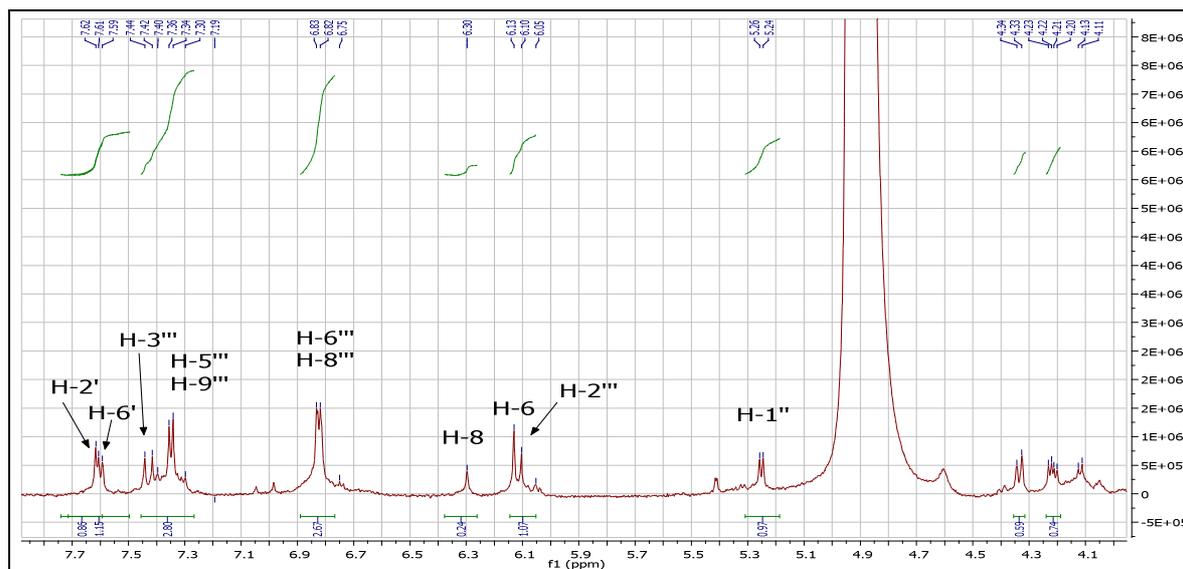


Quercétine 3-O-(6''-O- *trans-p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside.

Le composé **Hh -10** a été isolé sous forme d'une poudre jaune, Le spectre de masse obtenu par ESI-MS (mode négatif), donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 609 $[M-H]^-$ en accord avec une masse moléculaire de 610 Da et une formule brute en $C_{30}H_{26}O_{14}$.

Le spectre RMN- 1H (**Spectre 1.10**) et le spectre HSQC (**Spectre 1.11**) à 600 MHz enregistrés dans MeOH- d_4 du composé **Hh-10** montrent la présence de :

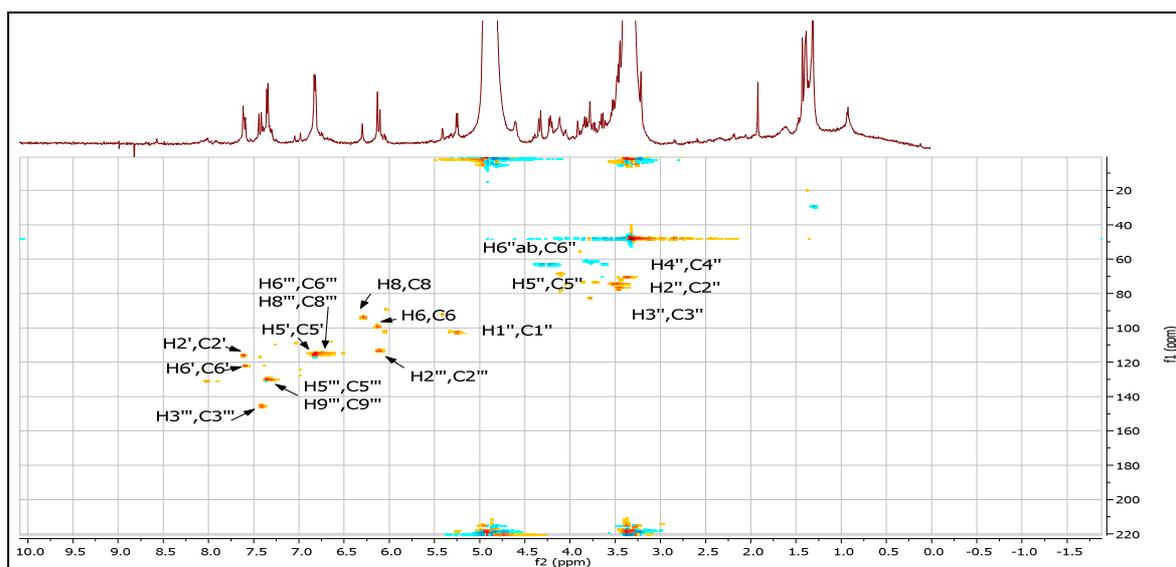
- ✓ Deux doublets ($J=1,9\text{Hz}$) à $\delta = 6,27$ et $6,16$ ppm, attribuables aux protons H-8 et H-6 respectivement d'un noyau A substitué en 5 et 7. un doublet ($J= 8,6\text{Hz}$) à $\delta= 6,81\text{ppm}$ relatif à H-5', illustrant le couplage *ortho* avec H-6' un doublet de doublet à $\delta= 7,59\text{ppm}$ ($J=8,6 ; 1,6$ Hz), attribuable à H-6'et un doublet à $\delta = 7,61\text{ppm}$ ($J=1,6$ Hz) attribuable à H-2' dévoilant le couplage *mé*ta avec H-6'.
- ✓ Un doublet ($J = 7,6$ Hz) résonnant à $\delta = 5,19$ ppm, intégrant pour un proton porté par le carbone localisé à $\delta = 104\text{ppm}$; attribuable à un proton anomérique d'un β -D-glucose.
- ✓ Les signaux des protons 4'', 3'', 2'', 5'' de la partie sucre, apparaissent respectivement à $\delta = 3,32 ; 3,44 ; 3,45 ; 3,45$ ppm et leurs carbones à $\delta = 71,8 ; 75,7 ; 77,7 ; 78,0$ ppm, et qui correspondent bien à ceux des carbones du glucose.



Spctre 1.10.Spctre RMN ^1H du composé **Hh-10** (600 MHz, MeOH- d_4)

Le spectre RMN ^1H montre également La présence d'un groupement coumaroyle est indiqué par l'apparition de :

- ✓ Deux doublets à $\delta = 6,11$ et $\delta = 7,40$ ppm ($J = 16,1$ Hz) attribuable aux protons oléfiniques H-2''' et H-3''' respectivement.
- ✓ Deux doublets à $\delta = 7,33$; $6,81$ ppm ($J = 9,3$ Hz) d'intégration 2H chacun ; attribuables aux protons (H-5''', H-9'''), (H-6''', H-8''') respectivement d'un noyau aromatique *para*substitué.



Spctre 1.11.Spctre HSQC ^1H - ^{13}C du composé **Hh-10** (600 MHz, MeOH- d_4)

Les données spectrales obtenues pour ce composé et par comparaison de celles de la littérature [4] nous a permis de décrire la molécule **Hh-10** comme étant : Quercétine 3-*O*-(6''-*O*-*E*-*p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside.

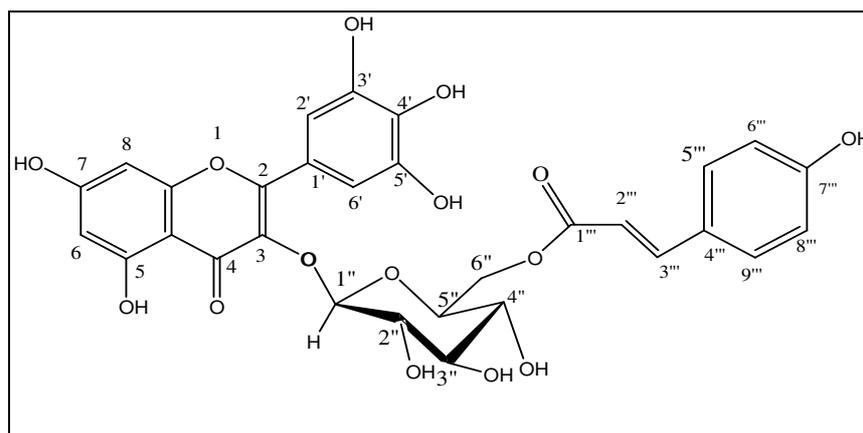
L'enchaînement de cette molécule est confirmé par :

-La fluorescence noir-violette de ce composé sous lumière de Wood et l'absence du signal relatif au H-3 dans le spectre RMN-¹H confirme la présence d'un flavonol substitué en position 3 (3 OR), et l'attachement du glucose par l'aglycone n'est que à cette position,

- Le déblindage du H-6'' (du glucose montre l'estérification par le carbonyle de l'entité coumaroyle, conforte l'attachement de coumaroyle à cette position.

Les données spectroscopiques pour ce composé sont regroupées dans le tableau II.9.

2.1.4. Identification du composé Hh-12

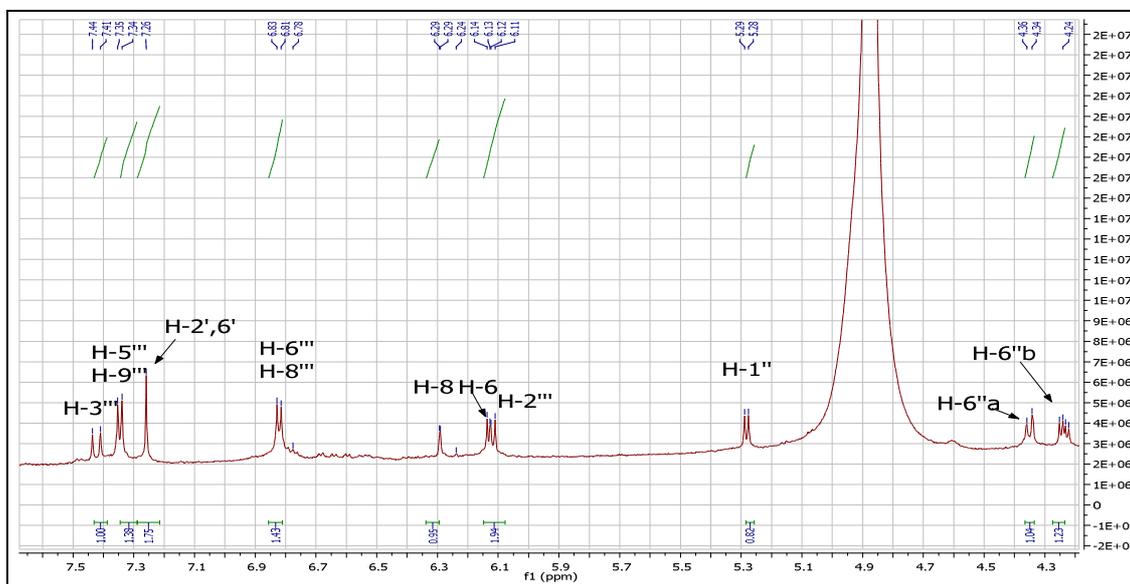


Myricétine 3-*O*-(6''-*O*- *E*-*p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside.

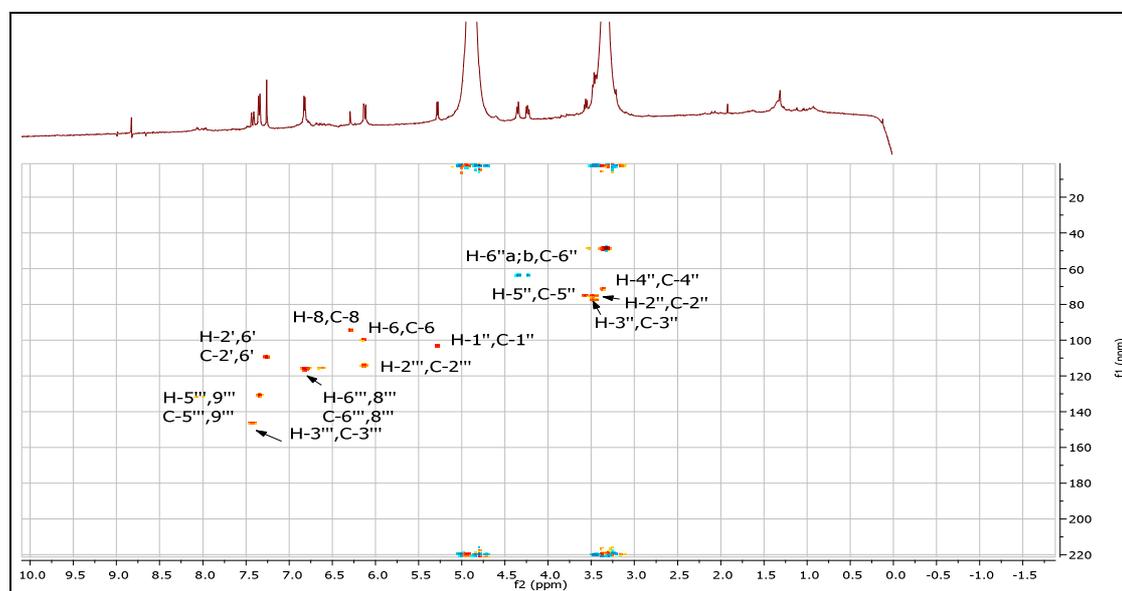
Le composé **Hh-12** a été isolé sous forme d'une poudre jaune ; le spectre de masse obtenu par ESI-MS (mode négatif), donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 625 $[M-H]^-$ en accord avec une masse moléculaire de 526 Da et une formule brute en $C_{30}H_{26}O_{15}$.

Le spectre RMN¹H (**Spectre1.12**) et le spectre HSQC (**Spectre1.13**) du composé **Hh-12** montrent la présence d'un ensemble de signaux caractérisant un squelette flavonol qui présente la myricétine, reconnaissable par :

- ✓ Un singulet à $\delta = 7,26$ ppm d'intégration 2H, caractérisant les H-2' et H-6' du noyau B.
- ✓ Deux doublets à $\delta = 6,16$ ppm et $\delta = 6,31$ ppm d'intégration 1H pour chacun, correspondant aux deux protons aromatiques *mé*ta couplés ($J = 2,3$ Hz), attribuables aux protons H-6 et H-8 du noyau A respectivement.

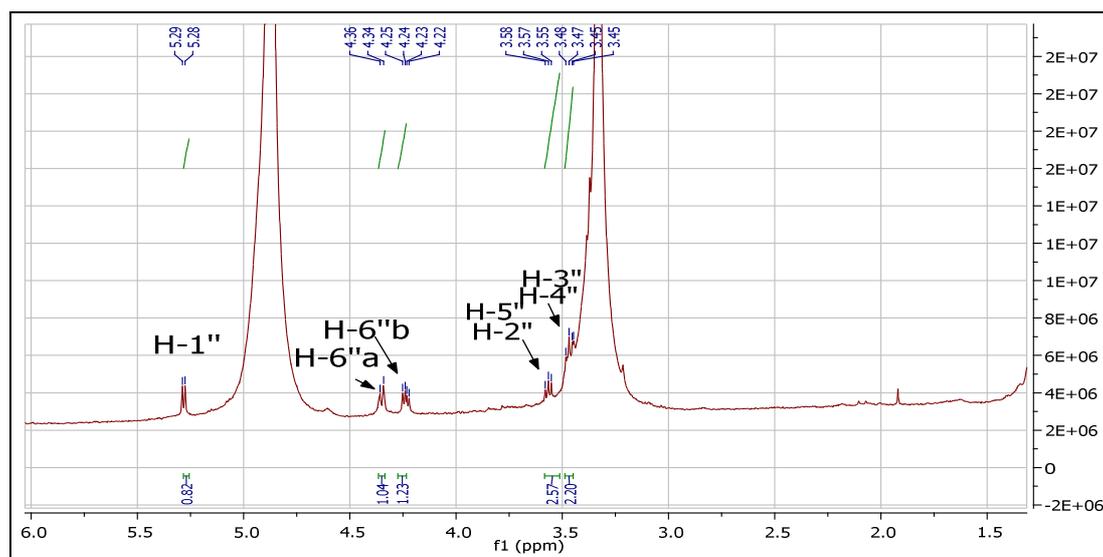


Spectre 1.12. Spectre RMN- ^1H du composé **Hh-12** (600 MHz, MeOH- d_4)



Spectre 1.13. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C du composé **Hh-12** (600 MHz, MeOH- d_4)

- ✓ Ce spectre (**Spectre 1.12.1**) présente par ailleurs ; un doublet centré sur $\delta = 5,28$ ppm ($J=8,1\text{Hz}$) relatif au proton anomérique H-1'', porté par le carbone résonant à $\delta = 103,4$ d'un glucose.
- ✓ Deux doublets de doublet d'intégration 1H pour chacun, attribuables à H-6a'', H-6b'' à $\delta = 4,31$ ppm ($dd ; J = 12,0 ; 1,7$ Hz) et $\delta = 4,22$ ppm ($dd ; J = 12,0 ; 6,4$ Hz) respectivement.
- ✓ Un ensemble de multiplets dans l'intervalle 3,48 – 3,52 ppm, attribuables aux protons 2'', 3'', 4'', 5'' du sucre. L'examen du spectre HSQC (**Spectre 1.13**) relatif à ce composé permet de localiser leurs carbones à :
 - H-2'' (3,48 ppm) est porté par le carbone à $\delta = 75,5$ ppm.
 - H-3'' (3,48 ppm) est porté par le carbone à $\delta = 77,7$ ppm.
 - H-4'' (3,36 ppm) est porté par le carbone résonnant à $\delta = 71,7$ ppm
 - H-5'' (3,52 ppm) est porté par le carbone à $\delta = 75,0$ ppm.

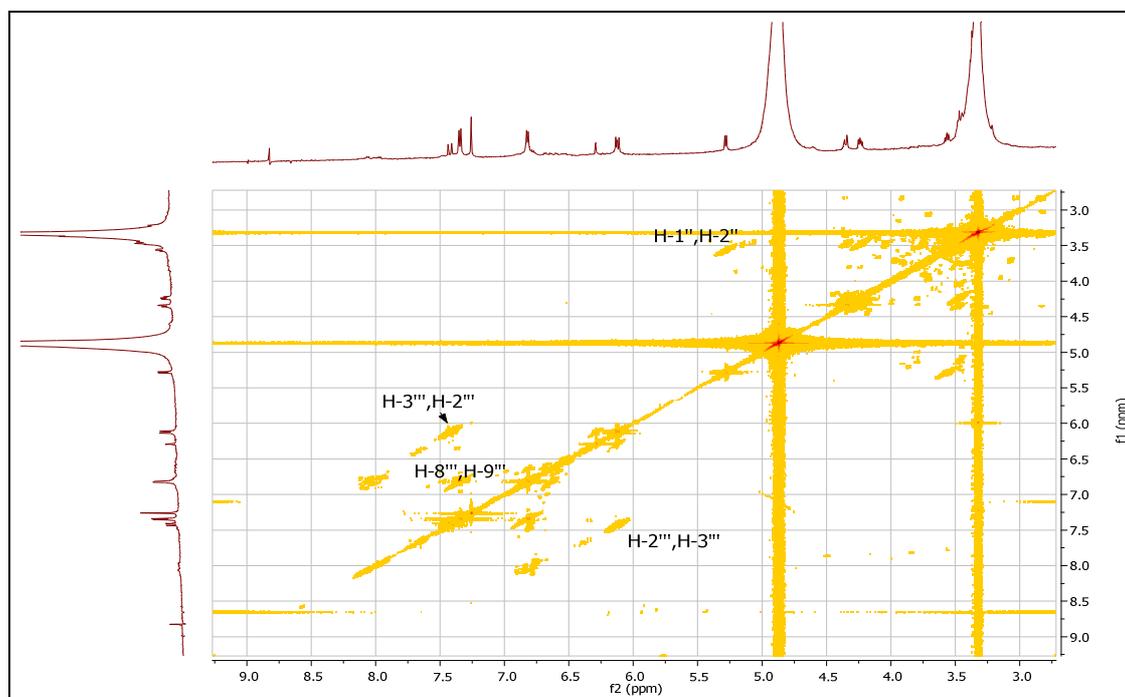


Spectre1.12.1 Spectre RMN-¹H du composé **Hh-12** (600 MHz, MeOH-d₄) ; (partie sucre)

Le spectre RMN¹H montre également la présence d'un groupement coumaroylé indiqué par l'apparition de :

- ✓ Deux doublet à $\delta = 6,12$ et $\delta = 7,43$ ppm d'intégration 1H pour chacun; attribuables aux deux protons éthyléniques H-2''' et H-3''' respectivement, la constante de couplage $J = 16.1$ Hz indique une géométrie *trans*. cet attachement est confirmé le spectre Cosy

Des signaux du cycle aromatique *para* substitué, aux déplacements chimiques $\delta = 7,36$ ppm (2H ; *d* ; *J* = 8,6 Hz) attribuables aux protons H-5'''/H-9''' et à $\delta = 6,82$ (2H ; *d* ; *J* = 8,6 Hz) ppm, attribuable aux protons H-6'''/H-8'''.

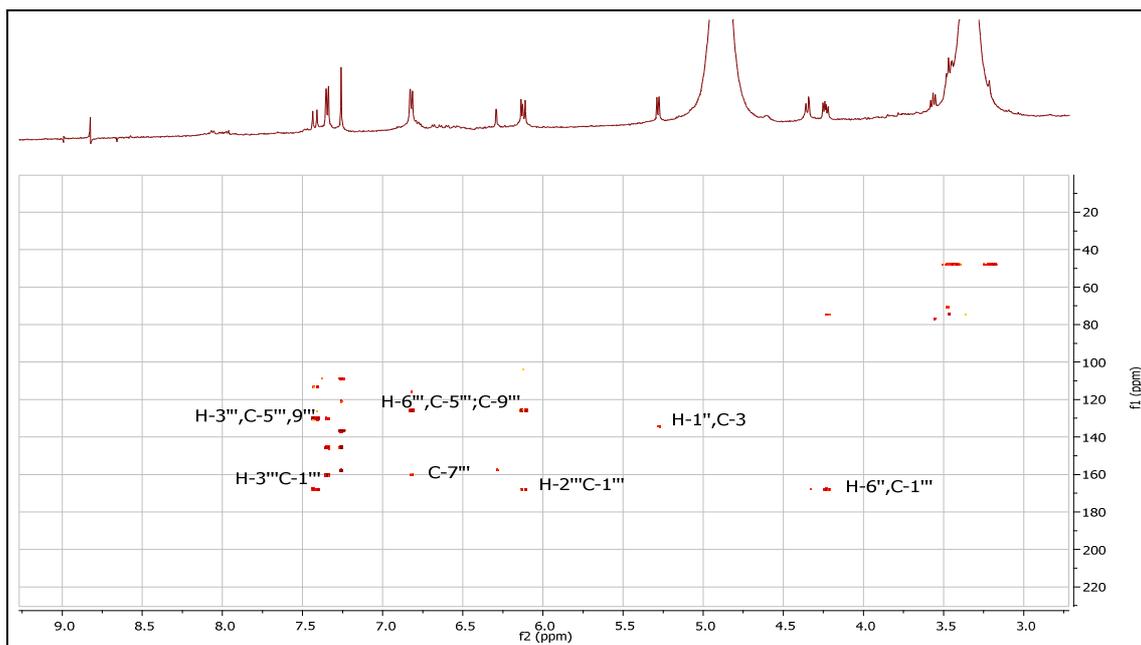


Spectre 1.15. Spectre Cosy ^1H - ^1H du composé **Hh-12** (600 MHz, MeOH- d_4)

L'expérience HMBC (**Spectre 1.14**) révèle :

- Une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1'' et le carbone résonnant à $\delta = 135,0$ ppm attribuable au C-3, conforte la liaison du sucre à l'aglycone par cette position.
- Une autre tache enregistré entre le H-6'' du glucose et le carbone quaternaire à $\delta = 167,7$ ppm C-1''' du coumaroyl révèle l'attachement de ce dernier au glucose à cette position.

Les données spectrales que nous avons obtenues (**Tableau II.9**) sont en accord avec celles publiées pour cette molécule [5] et nous ont permis d'identifier la : 3-O-[(6''-O- *E-p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl]-Myricétine.



Spectre 1.14. Spectre HMBC ^1H - ^{13}C du composé **Hh-12** (600 MHz, MeOH- d_4)

Les corrélations HMBC et Cosy de cette molécule sont présentées dans la figure II.6.

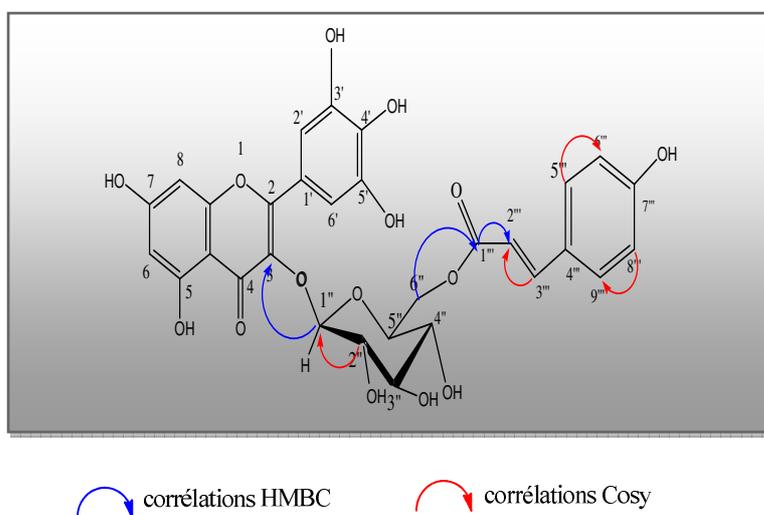


Figure II.6. Corrélations HMBC et Cosy **Hh-12**

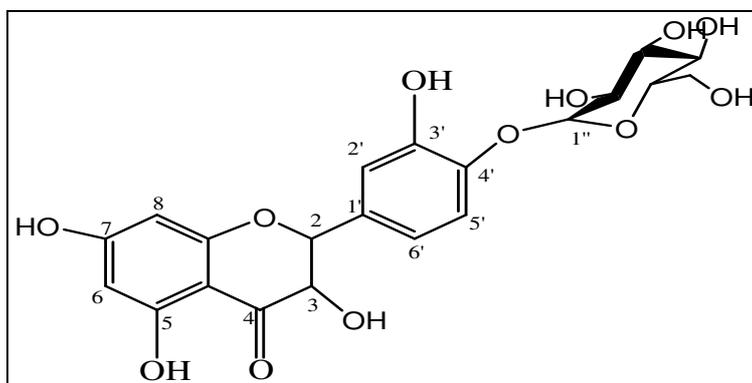
Tableau II.8. Déplacements chimiques en RMN ¹H et RMN ¹³C des produits **Hh-4** et **Hh-8**

Position	Composé Hh-4		Composé Hh-8	
	δH, mult, J(Hz)	δC(ppm)	δH, mult, J(Hz)	δC(ppm)
2	-	158,9	-	158,0
3	-	134,0	-	134,7
4	-	180,1	-	179,5
5	-	163,5	-	162,9
6	6,13, <i>d</i> , 1,8	100,1	6,19, <i>d</i> , 2,1	99,9
7	-	167,7	-	167,5
8	6,30, <i>d</i> , 1,8	95,8	6,31, <i>d</i> , 2,1	94,7
9	-	159,5	-	158,5
10	-	106,0	-	104,9
1'	-	123,6	-	122,4
2'	7,97, <i>d</i> , 8,1	132,2	7,98, <i>d</i> , 8,1	131,8
3'	6,80, <i>d</i> , 8,1	116,1	6,85, <i>d</i> , 8,1	115,6
4'	-	162,3	-	161,0
5'	6,80, <i>d</i> , 8,1	116,1	6,85, <i>d</i> , 8,1	115,6
6'	7,97, <i>d</i> , 8,1	132,2	7,98, <i>d</i> , 8,1	131,8
Glucose				
1''	5,24, <i>d</i> , 7,2	104,0	5,19, <i>d</i> , 7,6	103,1
2''	3,45	75,8	3,44, <i>m</i>	77,7
3''	3,44	75,7	3,44, <i>m</i>	75,3
4''	3,32	71,8	3,30, <i>m</i>	71,4
5''	3,45	78,0	3,45, <i>m</i>	75,2
6''	4,23, <i>dd</i> , 11,8 ; 6,80, <i>dd</i> , 11,8 ;	64,9	4,21, <i>dd</i> , 12,0 : 1,8 4,20, <i>dd</i> , 12,0 ; 6,0	64,9
Coumaroylé				
1'''	-	167,7	-	167,7
2'''	6,06, <i>d</i> , 16,1	115,8	5,52, <i>d</i> , 12,2	115,7
3'''	7,39, <i>d</i> , 16,1	145,0	6,71, <i>d</i> , 12,2	145,1
4'''	-	127,2	-	127,1
5''' , 9'''	7,30, <i>d</i> , 8,1	132,0	7,53, <i>d</i> , 9,3	133,6
7'''	-	159,6	-	159,6
8''' , 6'''	6,80, <i>d</i> , 8,1	117,6	6,72, <i>d</i> , 9,3	115,3

Tableau II.9. Déplacements chimiques en RMN ¹H et RMN ¹³C des produits **Hh-10** et **Hh-12**

Position	Composé Hh-12		Composé Hh-10	
	δ H, mult, J(Hz)	δ C(ppm)	δ H, mult, J(Hz)	δ C(ppm)
2	-	157,8	-	158,0
3	-	135,0	-	134,9
4	-	177,6	-	177,5
5	-	162,7	-	162,7
6	6,16, <i>d</i> , 2,3	100,1	6,16, <i>d</i> , 1,9	100,1
7	-	167,3	-	167,5
8	6,31, <i>d</i> , 2,3	94,9	6,27, <i>d</i> , 1,9	94,9
9	-	157,4	-	157,5
10	-	104,8	-	104,9
1'	-	121,0	-	121,4
2'	7,27, <i>s</i>	108,7	7,61	116,8
3'	-	145,5	-	145,6
4'	-	137,2	-	145,0
5'	-	145,5	6,81, <i>d</i> , 8,6	115,9
6'	7,27, <i>s</i>	108,0	7,59, <i>dd</i> , 8,6	122,8
Glucose				
1''	5,28, <i>d</i> , 8,1	103,4	5,19, <i>d</i> , 7,6	103,5
2''	3,48	75,7	3,45	77,7
3''	3,48	77,7	3,44	75,7
4''	3,36	71,7	3,32	71,8
5''	3,52	75,0	3,45	78,0
6''	4,31, <i>dd</i> , 12,0, 1,7 4,22, <i>dd</i> , 12,0, 6,4	64,0	4,21, <i>dd</i> , 12,0, 1,4 4,20, <i>dd</i> , 12,0, 6,4	64,9
Coumaroyl				
1'''	-	167,7	-	167,7
2'''	6,12, <i>d</i> .16,1	114,6	7,40, <i>d</i> .16	146,0
3'''	7,43, <i>d</i> .16,1	146,4	6,11, <i>d</i> .16	113,1
4'''	-	127,1	-	127,1
5''',9''	7,36 <i>d</i> , 8,6	131,4	7,33, <i>d</i> , 8,1	131,0
7'''	-	161,1	-	159,6
6''',8'''	6,82, <i>d</i> , 8,6	116,8	6,81, <i>d</i> , 8,1	115,1

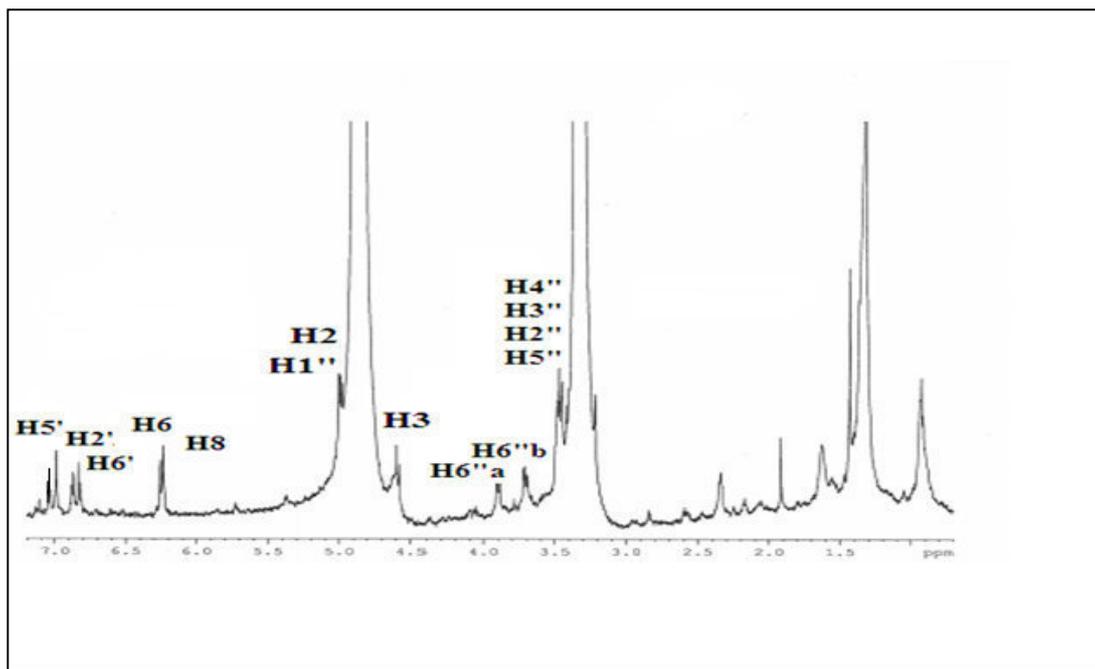
2.1.5. Identification du composé Hh-18



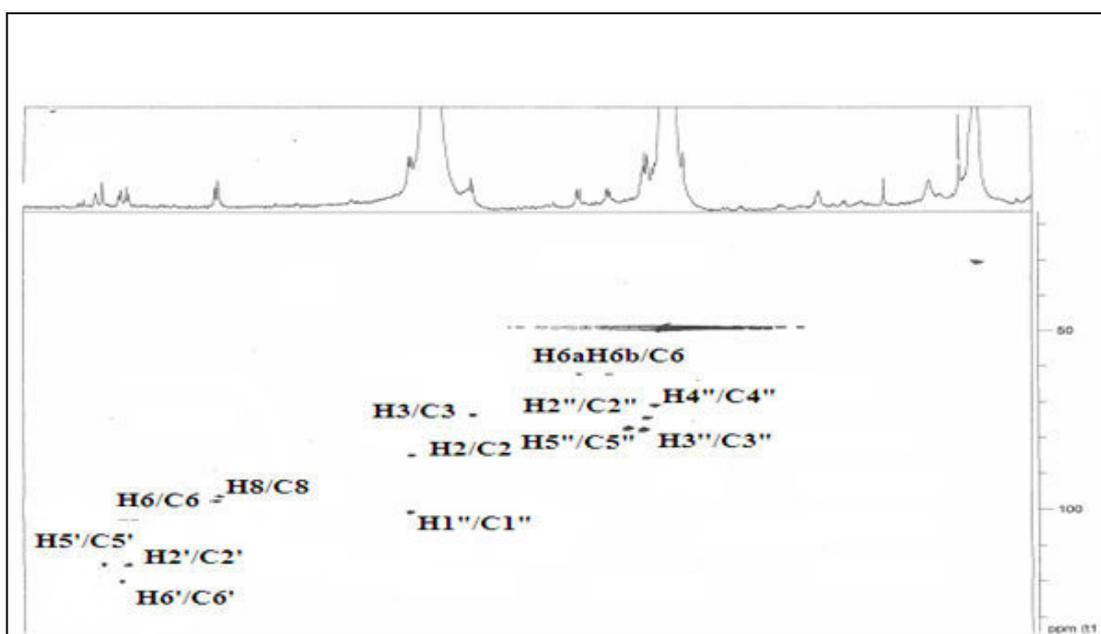
Taxifolin-4'-O- β -D-glucopyranoside.

Le spectre RMN- ^1H (Spectre 1.16) et le spectre HSQC (Spectre 1.17) du composé **Hh-18** montrent :

- ✓ Deux doublets d'intégration 1H chacun, formant un système AM à $\delta = 6,24$ ppm et $\delta = 6,21$ ppm, ($J = 1,8$ Hz) caractéristiques des protons H-8 et H-6 respectivement, du noyau A d'un flavonoïde.
- ✓ Au niveau du cycle B, un doublet de doublets à $\delta = 6,87$ ppm ($J = 8,4 ; 2$ Hz) attribuable à H-6' révélant le couplage en *ortho* avec le proton H-5' à $\delta = 6,98$ ppm dont le signal est un doublet ($J = 8,4$ Hz) et le couplage en *mé*ta avec H-2' à $\delta = 6,82$ ppm ($d ; J = 2$ Hz), formant un système AMX.
- ✓ Un doublet à $\delta = 4,97$ ppm ($J = 11,2$ Hz), d'intégration 1H attribuable à H-2,
- ✓ Un doublet à $\delta = 4,58$ ppm ($J = 11,2$ Hz), d'intégration 1H attribuable à H-3, ce qui oriente vers la structure d'une di-hydroflavonol.
- ✓ Un doublet à $\delta = 4,98$ ppm ($J = 7,4$ Hz), attribuable au proton anomérique H-1'' d'un β -glucose montre un couplage diaxial avec le proton 2''. Ce proton est porté par le carbone résonnant à $\delta = 101,1$ ppm révélant la liaison par un pont oxygène à l'aglycone.



Spectre 1.16. Spectre RMN- ^1H du composé **Hh-18** (600 MHz, MeOH- d_4)



Spectre 1.17. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C du composé **Hh-18** (600 MHz, MeOH- d_4)

L'ensemble de ces données mène à la structure partielle reportée dans la figure II.7

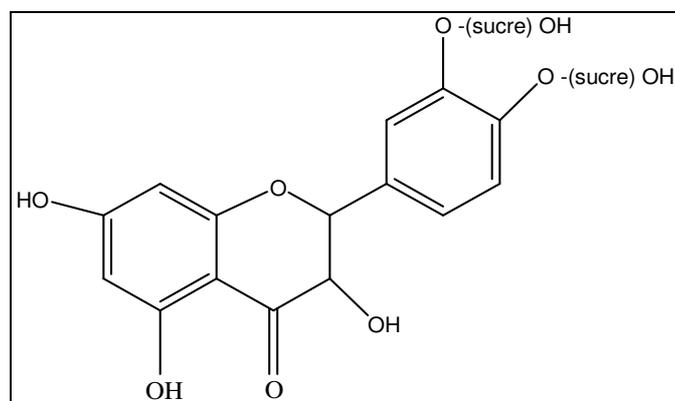
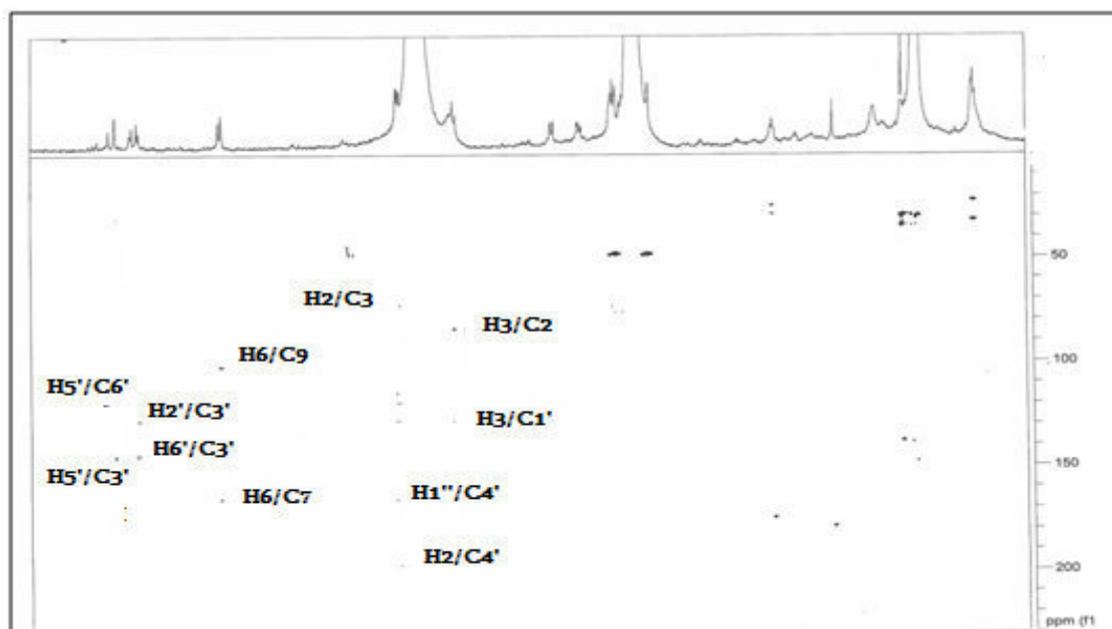


Figure II.7. Structures proposées pour le composé **Hh-18**

L'expérience relatif au spectre HMBC (**Spectre 1.18**) montre une corrélation entre H-1'' et un carbone résonnant à $\delta = 160$ ppm attribuable à C-4' et une autre tache avec un carbone résonnant à $\delta = 115.2$ ppm attribuable à C-5' confirme l'attache du glucose en C-4' les autres corrélations sont illustrées dans le spectre 1.18.



Spectre 1.18. Spectre HMBC ^1H - ^{13}C du composé **Hh-18** (600 MHz, MeOH-d_4)

Tableau II.10. Déplacements chimiques RMN ¹H et RMN ¹³C de produits **Hh-18**

Position	δH, mult, J(Hz)	δC(ppm)
2	4,95, <i>d</i> , 11,2	73,6
3	4,58, <i>d</i> , 11,2	198,0
4	-	164,0
5	-	98,1
6	6,24, <i>d</i> , 1,8	166,0
7	-	96,8
8	6,21, <i>d</i> , 1,8	155,3
9	-	101,4
10	-	128,0
1'	-	115,7
2'	6,98, <i>d</i> , 2,0	146,4
3'	-	160,0
4'	-	115,2
5'	6,98, <i>d</i> , 8,4	120,9
6'	6,85, <i>dd</i> , 8,4 ; 2,0	
Glucose		
1''	4,98, <i>d</i> , 7,2	101,1
2''	3,43	74,5
3''	3,46	77,5
4''	3,39	71,1
5''	3,41	77,0
6''	3,87, <i>dd</i> , 11,2 ; 3,69, <i>dd</i> , 11,2 ;	62,5

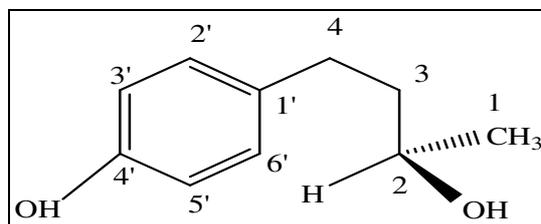
Les données spectrales regroupées dans tableau II.10 du composé **Hh-18** permettent d'attribuer au flavonoïde considéré la structure du taxifolin-4'-*O*-β-D-glucopyranoside. Cette identification est confirmée par comparaison avec celles de la littérature [6].

2.1.6. Identification des composés **Hh-15** et **Hh-16**

Les structures de ces deux composés ne sont élucidées par l'analyse de leurs spectres RMN¹H, permet de caractériser respectivement **Hh-15** comme : myricétine *O*-α-rhamnoside et **Hh-16** : kaempférol 3-*O*-β-D-glucopyranoside.

2.2. Détermination structurale des composés de type acides phénoliques

2.2.1. Identification du composé Hh-1



Betuligenol.

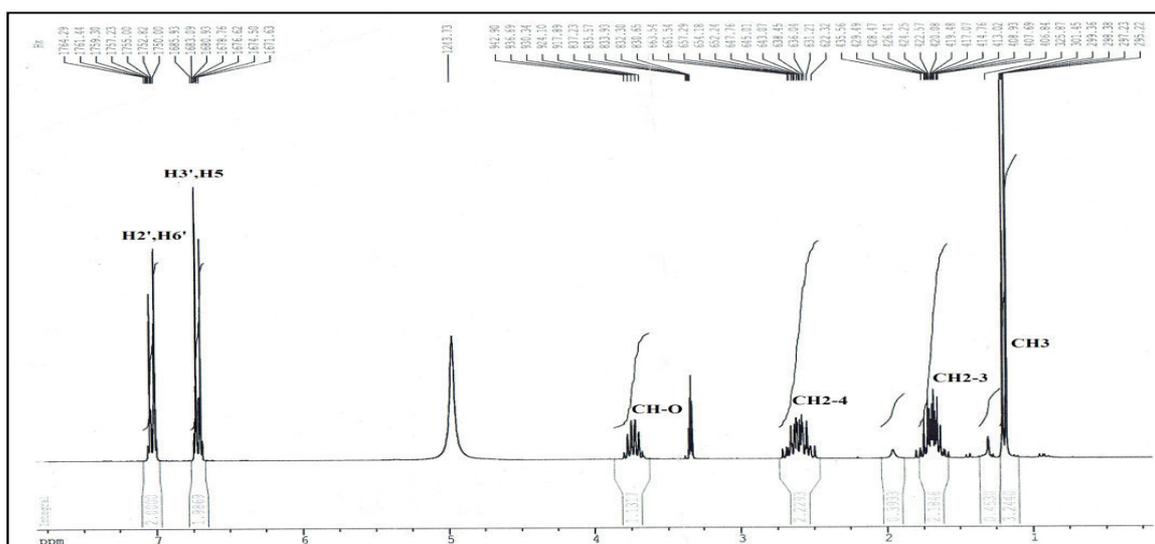
L'examen des spectres RMN ^1H (Spectre 1.19) à 250 MHz et ^{13}C (Spectre 1.20) à 62.5 MHz dans (MeOH- d_4) montrent la présence :

-Un système AB à $\delta = 7,10$ ppm (2H, d , $J = 6,0$ Hz, H-2'/H6') et à $\delta = 6,83$ ppm (2H, d , $J = 6,0$ Hz, H-3'/H5') ; portés par les carbones à $\delta = 114,1$ et $\delta = 128,0$ ppm respectivement, indiquant un cycle aromatique para-substitué.

-Un doublet à $\delta = 1,20$ ppm d'intégration 3H ; porté sur le carbone résonnant à $\delta = 22,1$ ppm, attribuable à un groupement méthyle (CH₃-1).

-Deux multiplets à $\delta = 1,81$ ppm et à $\delta = 2,42$ ppm d'intégration 2H ; portés par les carbones à $\delta = 30,8$ et $\delta = 40,9$ ppm, attribuables à deux groupements méthylènes CH₂-3 et CH₂-4 respectivement.

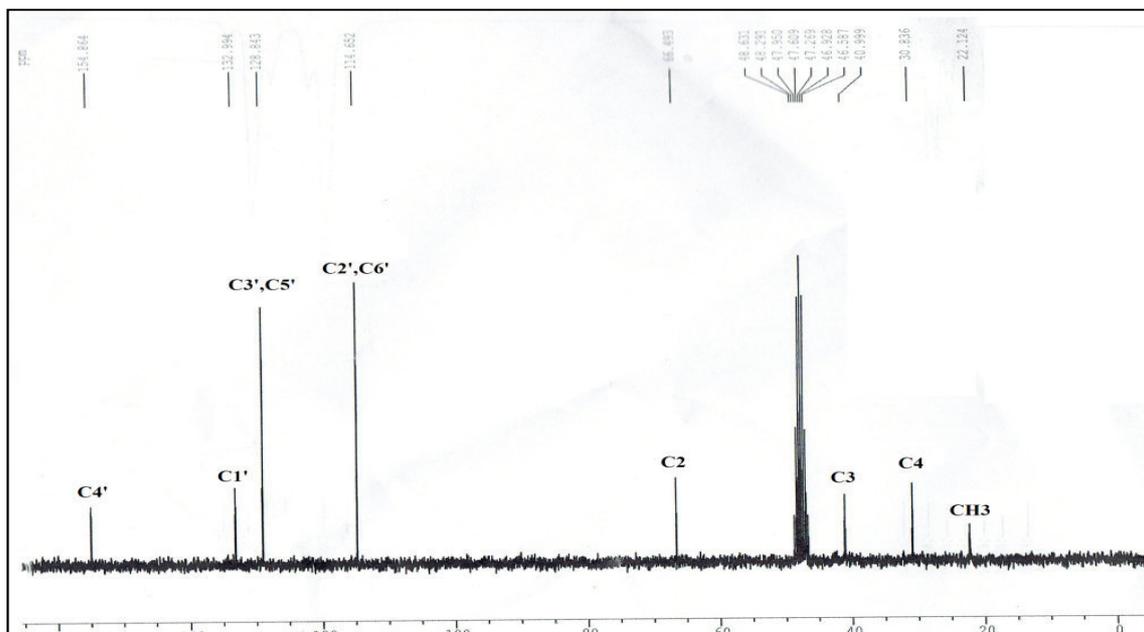
-Un multiplet à $\delta = 3,82$ ppm d'intégration 1H ; porté par le carbone résonnant à $\delta = 66,5$ ppm, correspondant à un groupement méthine oxygéné O-CH-2.



Spectre 1.19. Spectre RMN- ^1H du composé Hh-1 (250 MHz, MeOH- d_4)

Le spectre ^{13}C (**Spectre 1.20**) montre également :

- Un signal à $\delta=132,9$ ppm, attribuable au carbone quaternaire du cycle aromatique (C-1').
- Un signal à $\delta=154,0$ ppm, attribuable au carbone quaternaire du cycle aromatique(C-4') substitué par un groupement hydroxyle à partir de la valeur de son déplacement chimique.



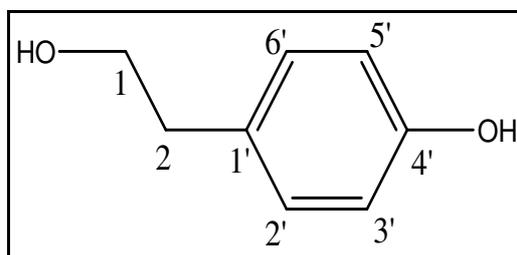
Spectre 1.20. Spectre RMN- ^{13}C du composé **Hh-1** (62.5 MHz, MeOH- d_4)

Les données spectrales regroupées dans le tableau II.11 sont en accord avec celles publiées [7] pour cette molécule et nous ont permis d'identifier le : betuligenol.

Tableau II.11. Déplacements chimiques RMN ^1H et RMN ^{13}C du produit **Hh-1**

Position	$\delta\text{H}(\text{ppm}), \text{mult}, J(\text{Hz})$	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
1-(CH 3)	1,20, <i>d</i>	22,1
2	3,82, <i>m</i>	66,5
3	1,82, <i>m</i>	40,9
4	2,42, <i>m</i>	30,8
1'	-	132,0
2',6'	7,10, <i>d</i> ,6,1	114,1
3' ;5'	6,83, <i>d</i> , 6,1	128,0
4'	-	154,0

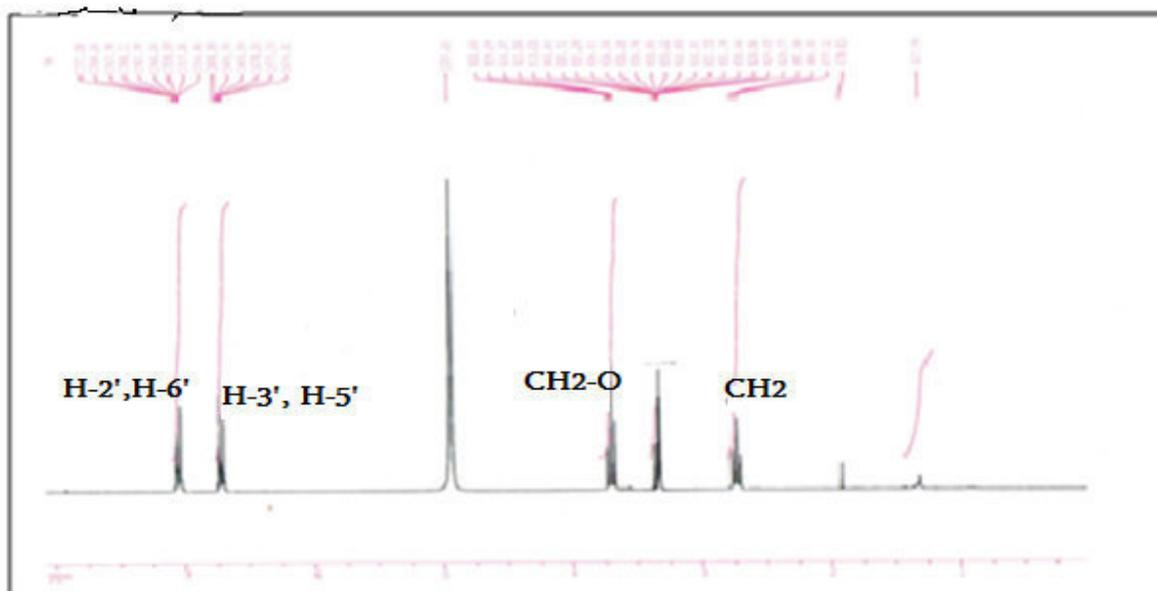
2.2.2. Identification du composé Hh-2



Tyrosol.

Le composé **Hh-2** a été obtenu sous forme des cristaux blancs. Le spectre RMN ^1H (**Spectre 1.21**) enregistré dans MeOH-d_4 à 250 MHz se compose d'une région aromatique et une région aliphatique.

Dans la région aromatique, les deux doublet à $\delta = 7,05$ ppm (2H, *d*, $J = 8,0$ Hz), attribuable aux protons H-2'/H-6' et à $\delta = 6,70$ ppm (2H, *d*, $J = 8$ Hz) attribuable aux H-3'/H-5', du cycle aromatique *para*-substitué.



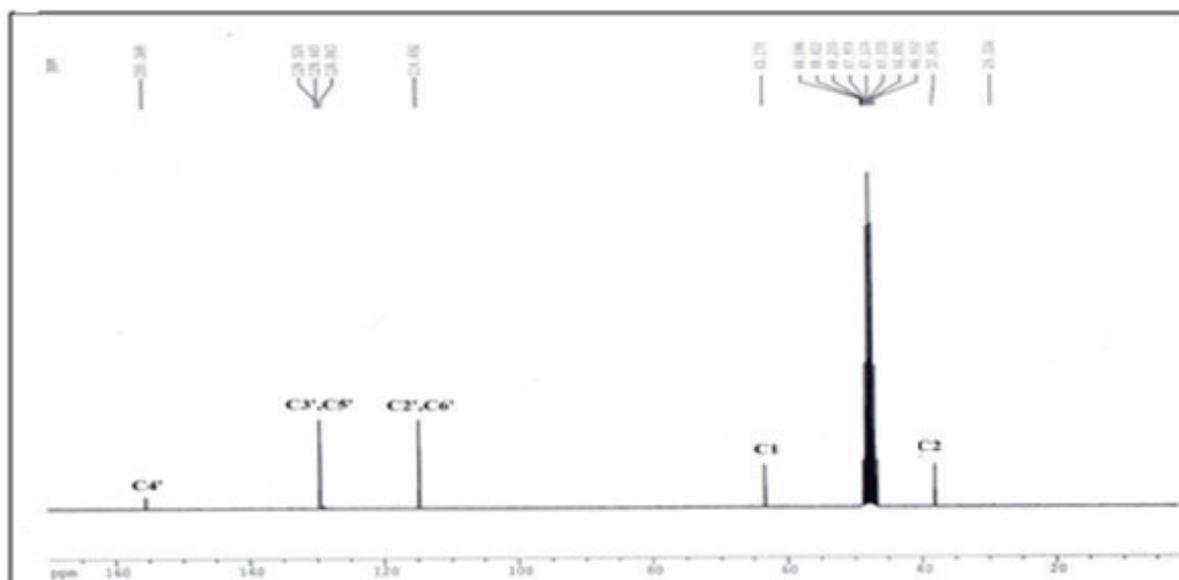
Spectre 1.21. Spectre RMN- ^1H du composé **Hh-2** (250 MHz, MeOH-d_4)

La région aromatique du spectre RMN ^{13}C (**Spectre 1.22**) enregistré dans (MeOH-d_4) à 62.5 MHz indique deux pics intenses à $\delta = 114,6$ ppm et à $\delta = 129,4$ ppm représentent des atomes de carbone portant un atome d'hydrogène, attribuable aux carbones C-2'/C-6' et C-3'/C-5', respectifs, du cycle aromatique.

Le pic le plus déblindé et peu intense à $\delta = 155,3$ ppm, représente l'atome de carbone portant le groupe OH, attribuable au carbone quaternaire du cycle aromatique (C-4').

Les autres substituants dans la région aliphatique sont un groupement méthylène et un groupement CH₂-O, pour confirmation la région aliphatique du spectre proton RMN ¹H (Spectre 1.21) indique :

- ✓ Un triplet à $\delta = 2,72$ ppm d'intégration 2H, attribuable à H-2 du groupement méthylène.
- ✓ Un triplet d'intégration 2H à $\delta = 3,66$ ppm attribuable à H-1 du groupement (CH₂-O).



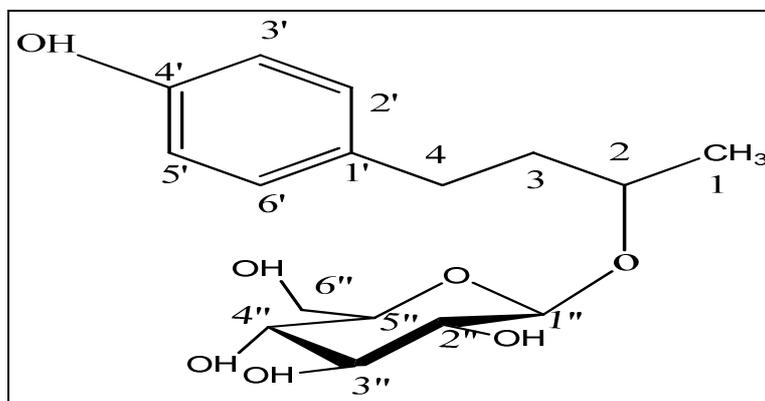
Spectre 1.22. Spectre RMN-¹³C du composé **Hh-2** (62.5 MHz, MeOH-d₄)

Les données spectroscopiques sont rapportées dans le tableau II.12. **Tableau II.12.** Déplacements chimiques en RMN ¹H et RMN ¹³C du produit **Hh-2**

Position	$\delta H(\text{ppm}), \text{mult}, J(\text{Hz})$	$\delta C(\text{ppm})$
1	3,66, <i>t</i>	63,1
2	2,72, <i>t</i>	29,3
1'	-	132,0
2',6'	7,05, <i>d</i> , 8,0	129,4
3',5'	6,70, <i>d</i> , 8,0	114,6
4'	-	155,3

Ces données spectrales sont en accord avec celles publiées [8] pour cette molécule et nous ont permis d'identifier le composé **Hh-2** : tyrosol.

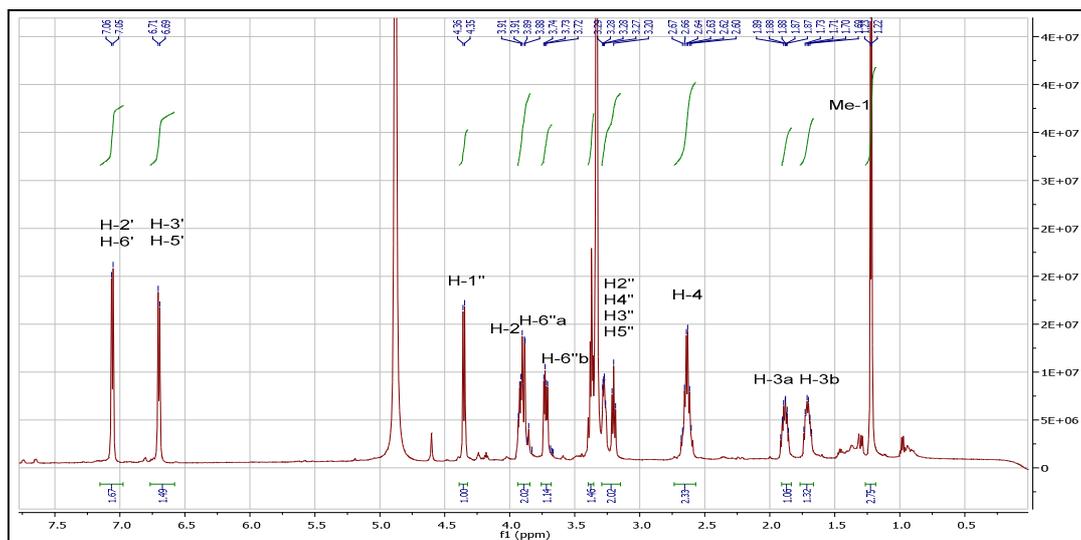
2.2.3. Identification du composé Hh-14



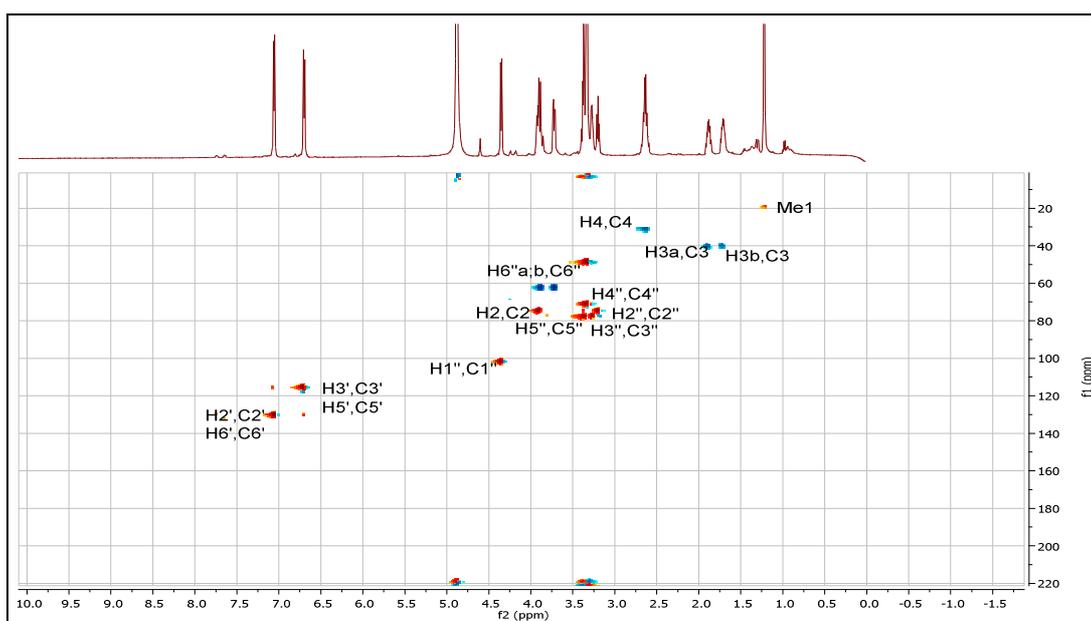
Rhodonderin.

L'allure générale des spectres RMN ^1H (**Spectre 1.23**) et la séquence HSQC (**Spectre 1.24**) de ce composé montrent une grande ressemblance avec ceux du buteligenol (**Hh-1**) avec la présence d'un β -glucose confirmé par :

- Un doublet ($J = 7,6$ Hz) intégrant pour un proton à $\delta = 4,35$ ppm, attribuable au proton anomérique (H-1') ; porté par le carbone résonant à $\delta = 102,8$ ppm, indique la jonction avec un pont oxygéné.
- Deux signaux d'intégration 1H pour chacun, attribuables à H-6a', H-6b' à $\delta = 3,90$ ppm ($dd, J = 12,0 ; 2$ Hz) et $\delta = 3,72$ ppm ($dd, J = 12 ; 5,0$ Hz) respectivement, portés par le carbone résonant à $\delta = 62,6$ ppm.
- D'après le spectre HSQC (**spectre 1.24**) un ensemble de multiplets dans l'intervalle de $\delta = 3,22 - 3,35$ ppm attribuable aux protons 2'', 3'', 4'', 5'' du β -glucose portés par les carbones situés aux 71,71 ; 75,16 ; 77,8 ; 78,1 ppm respectivement.



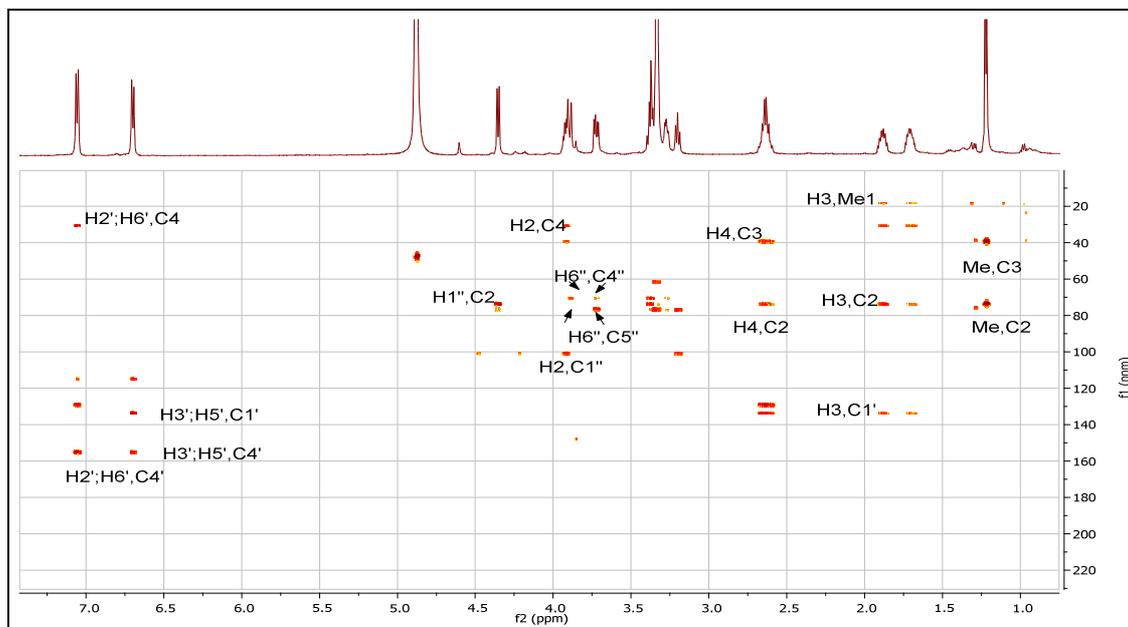
Spectre 1.23. Spectre RMN ^1H du composé **Hh-14** (600 MHz, MeOH- d_4)



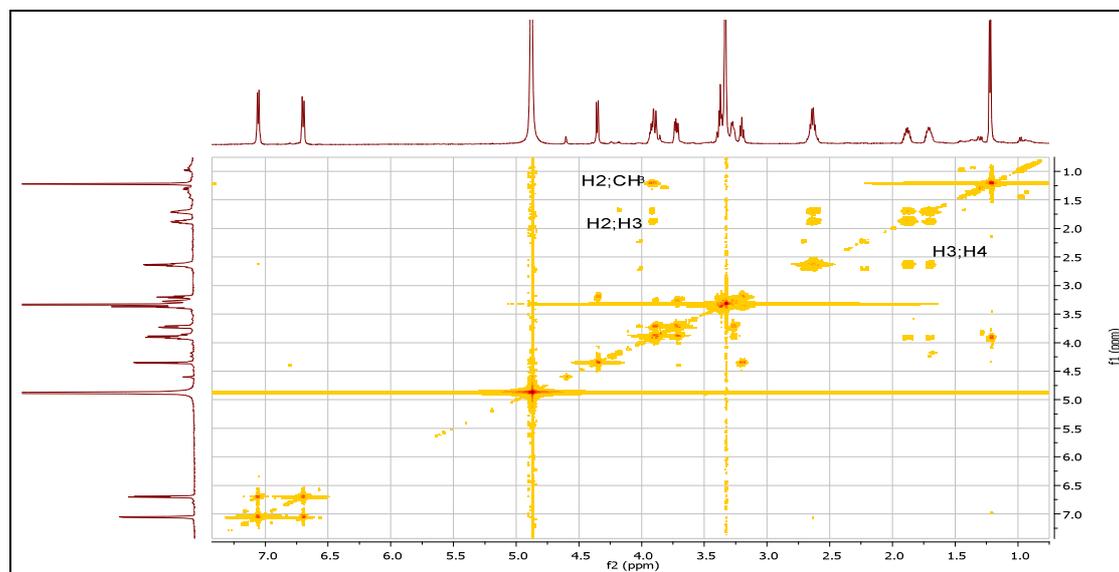
Spectre 1.24. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C du composé **Hh-14** (600 MHz, MeOH- d_4)

Ces données spectrales en comparant à celles de la littérature [9] nous a permis de décrire la molécule : rhodonderin. En outre, l'enchaînement de cette molécule est confirmé par le spectre HMBC (Spectre 1.25) qui révèle :

- Une tache de corrélation entre le proton H-2 à $\delta = 3,91$ ppm et le carbone porteur du proton anomérique.
- Une tache de corrélation entre les protons aromatiques H-2'/H-6' et le carbone résonant à $\delta = 32,0$ ppm attribuable à C-4 confirme l'attachement du cycle aromatique à la partie aliphatique par le carbone C-1' ($\delta = 133,8$ ppm).



Spectre 1.25. Spectre HMBC ^1H - ^{13}C du composé **Hh-14** (600 MHz, MeOH- d_4)



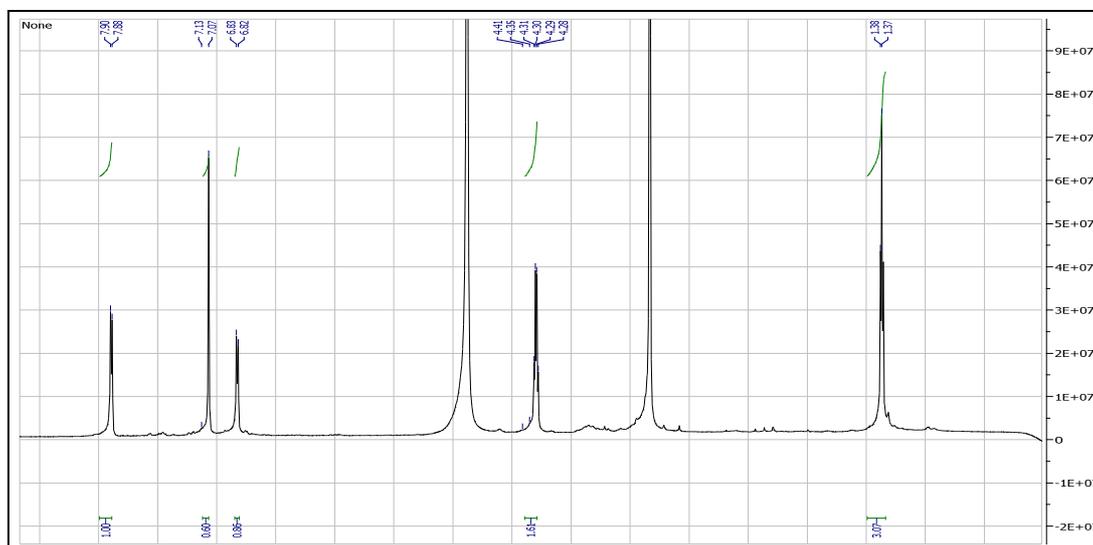
Spectre 1.26. Spectre COSY ^1H - ^1H du composé **Hh-14** (600 MHz, MeOH- d_4)

Tableau II.13. Déplacements chimiques en RMN ¹H, RMN ¹³C et HMBC de produit **Hh-14**

Position	δ H, mult, J(Hz)	δ C(ppm)	HMBC
1-CH ₃	1,21, <i>d</i> , 6,5	19,7	C-3 ,C-2
2	3,91	74,5	C-4,C-1''
3	1,68	39,2	C-2
	1,89	-	
4	2,64	32,0	C-3 ,C-2 .C-1'
1'	-	133,8	
2', 6'	7,06, <i>d</i> , 7,1	130,0	C-4',
3', 5'	6,69, <i>d</i> , 7.1	115,7	C-4', C-1'
4'	-	155,2	C-2, C-2''
1''	4,35, <i>d</i> , 7,6	102,8	
2''	3,16	75,1	
3''	3,75	77,8	
4''	3,30	71,7	
5''	3,25	78,1	
6''	3,72, <i>dd</i> , 12 ; 5	62,6	
	3,90, <i>dd</i> , 12 ; 2		

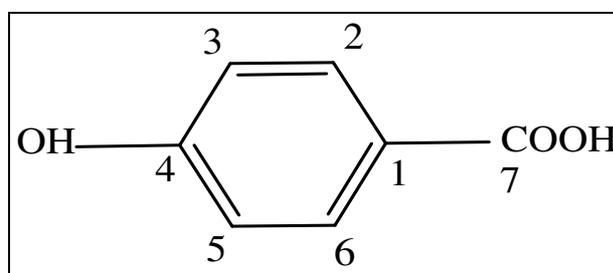
2.2.4. Identification des composés Hh-5 et Hh-6

Les composés **Hh-5** et **Hh-6** ont été isolés sous forme de mélange



Spectre 1.27. Spectre RMN ^1H des composés **Hh-5** et **Hh-6** (600 MHz, MeOH- d_4)

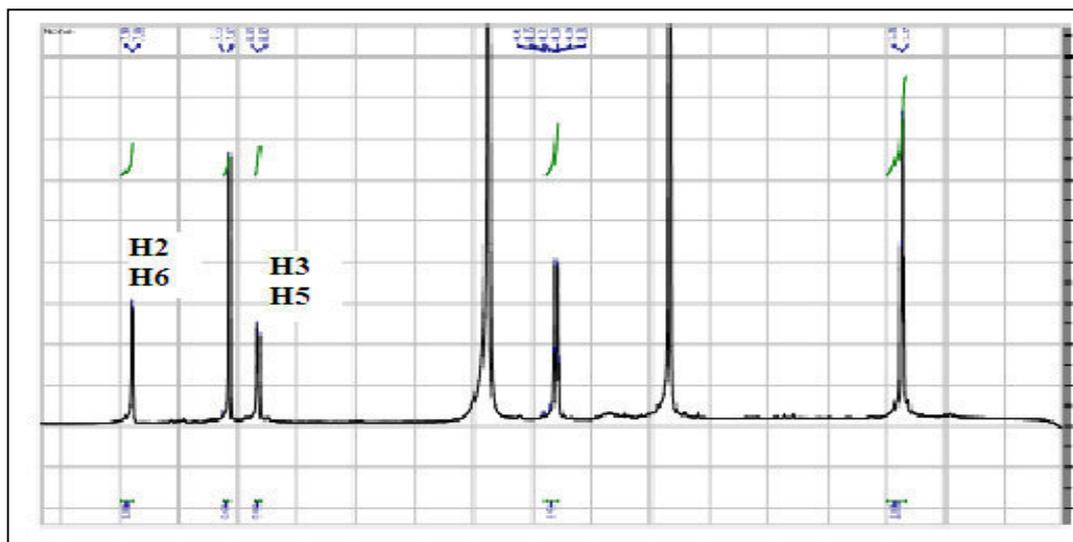
- Le composé **Hh-5**



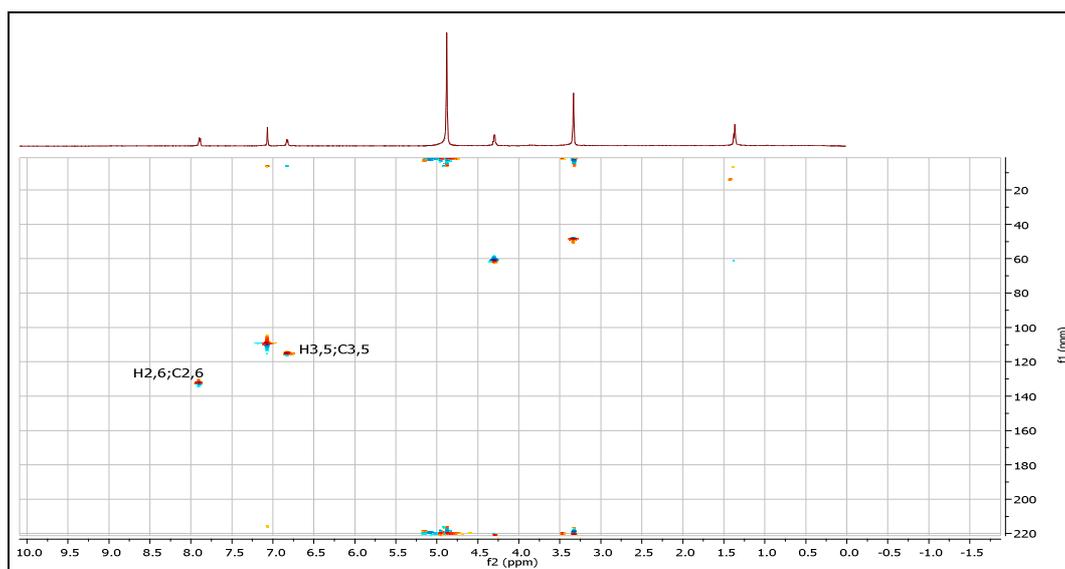
Acide *p*-hydroxybenzoïque.

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre 1.28) montre :

- ✓ Deux doublets d'intégration 2H pour chacun à $\delta = 6,80$ et $7,87$ ppm ($J = 6,4$ Hz), attribuable aux protons éthyléniques (H-3, H-5 et H-2, H-6) d'un cycle aromatique *para* substitué ; portés par les carbones à $\delta = 115,4$ et $132,2$ ppm respectivement selon l'expérience HSQC (Spectre 1.29).



Spectre 1.28. Spectre RMN ^1H (signaux relatif au composé **Hh-5**) (600 MHz, MeOH- d_4)

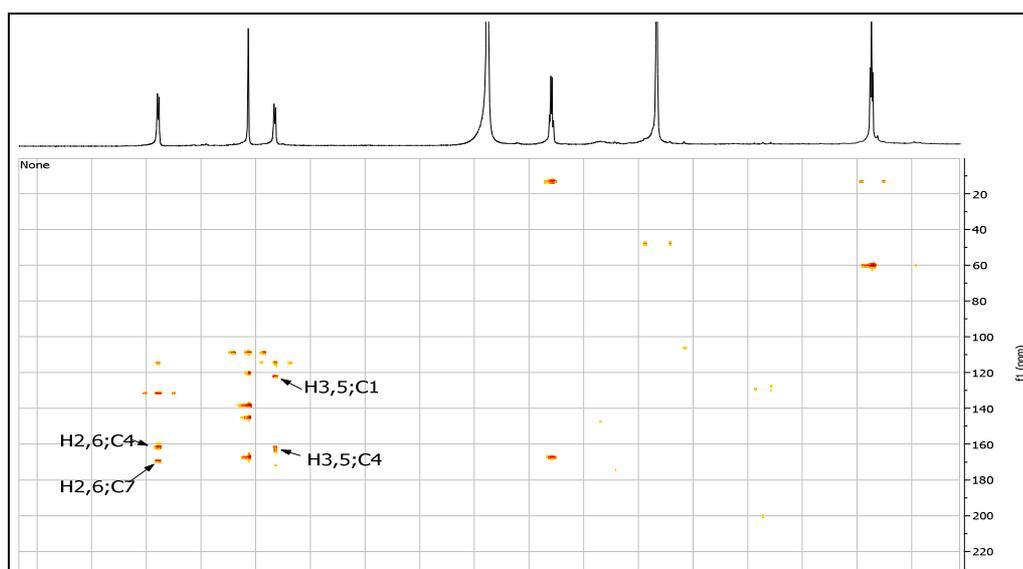


Spectre 1.29. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C du composé **Hh-5 et 6** (600 MHz, MeOH- d_4)

Le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre 1.30) montre des taches de corrélation entre les protons H-3/H-5 ; H-2/H-6 et les carbones quaternaires résonnant à $\delta = 122,8$ et $162,1$ ppm respectivement. Ces corrélations permettent d'une part d'attribuer ces deux carbones quaternaires aux carbones C-1 et C-4 respectivement du noyau aromatique et d'autre part de

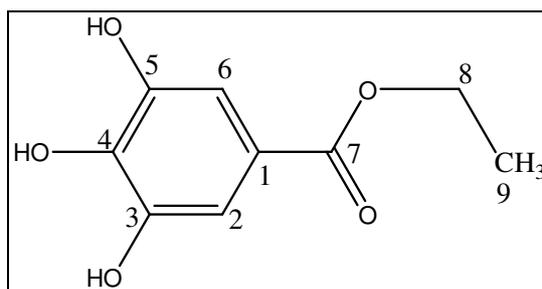
substituer la position C-4 par un groupement oxygéné notamment un groupement hydroxyle vu la valeur de son déplacement chimique.

Le carbone C-1 est substitué par un groupement carboxyle, cette hypothèse est confirmée par la corrélation entre H-2/H-6 ($\delta = 6,80$ ppm) et un carbone quaternaire à $\delta = 170,0$ ppm attribuable à C-7.



Spectre 1.30. Spectre HMBC ^1H - ^{13}C du composé **Hh-5 et 6** (600 MHz, MeOH- d_4)

- **Le composé Hh-6**

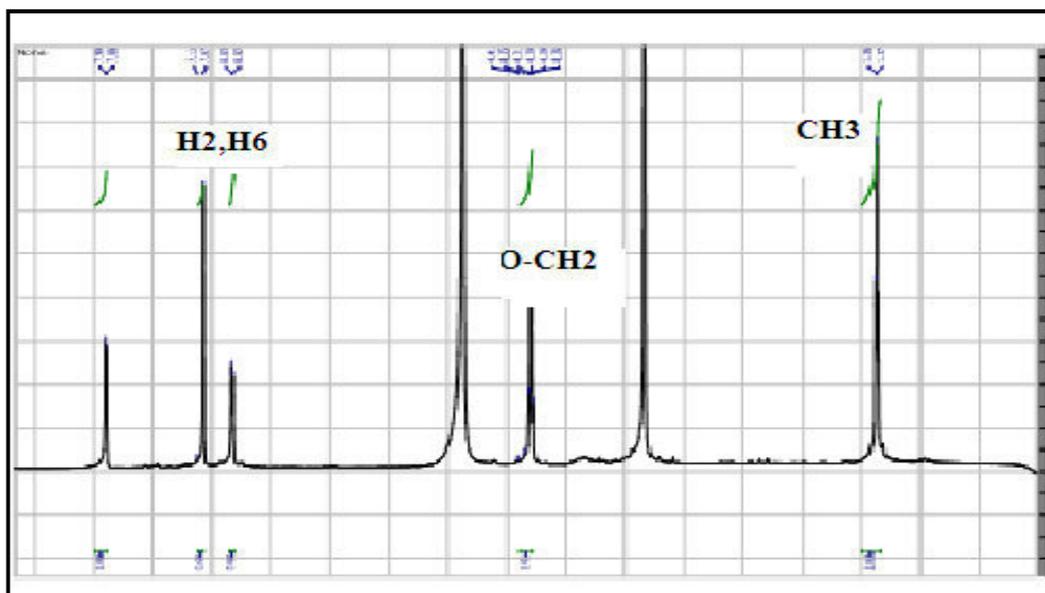


Ethyle gallate.

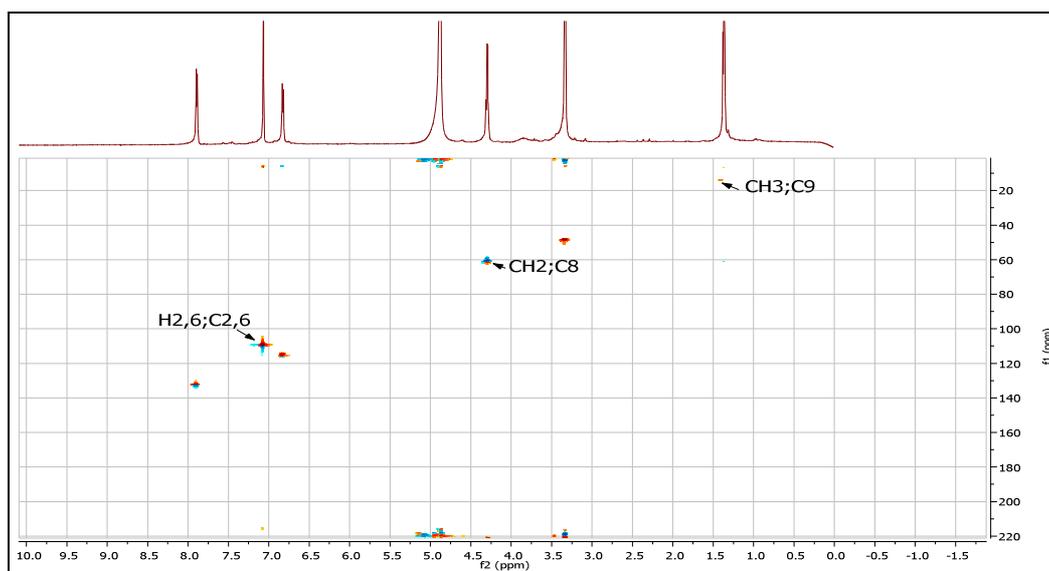
L'examen du spectre RMN ^1H (**Spectre 1.31**) montre un autre motif présenté par :

✓ Un singulet à $\delta = 7,07$ ppm d'intégration 2H, d'un noyau aromatique tétra-substitué.

- ✓ Un quadruplet d'intégration de 2H à $\delta = 4,30$ ppm ($J = 7,2$ Hz), correspondant à un groupement O-CH₂ et un triplet d'intégration 3H à $\delta = 1,34$ ppm ($J = 7,2$ Hz), attribuable au groupement méthyle ; portés par les carbones résonnant $\delta = 61,3$ et 14,5 ppm respectivement selon le spectre HSQC (Spectre 1.32). Les multiplicités et les valeurs des déplacements chimiques de ces deux signaux indiquent la présence d'un groupement éthyloxy dans cette molécule.



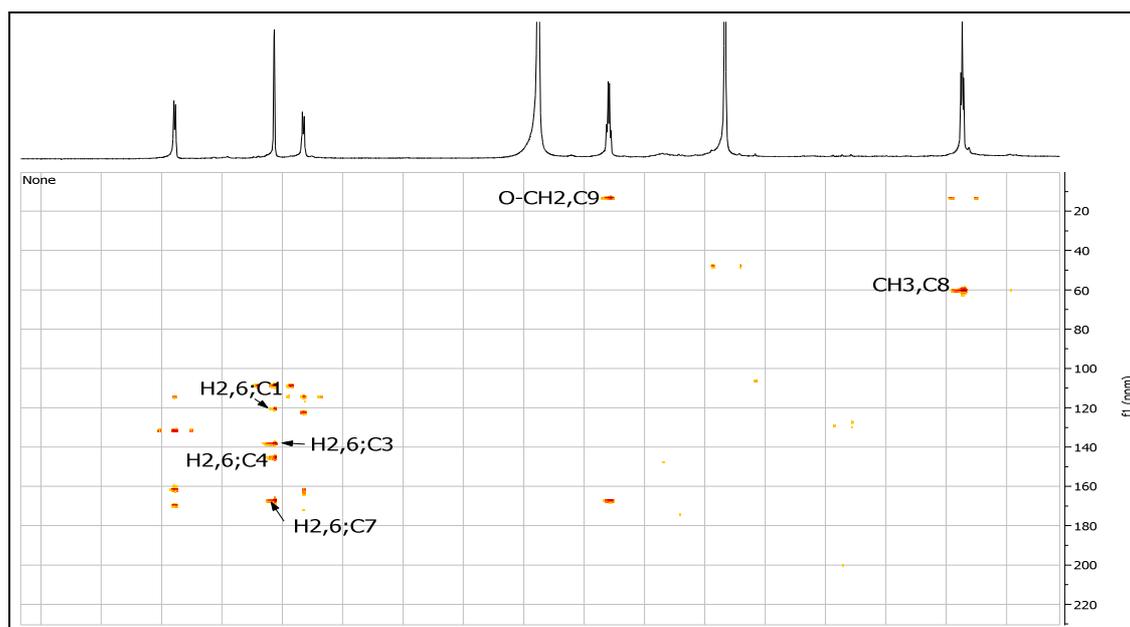
Spectre 1.31. Spectre RMN ¹H (signaux relatif au composé **Hh-6**) (600 MHz, MeOH-d₄)



Spectre 1.32. Spectre HSQC ¹H-¹³C (signaux relatif au composé **Hh-6**) (600 MHz, MeOH-d₄)

Les mesures du spectre HMBC (**Spectre 1.33**) révèle :

- ✓ Une tache de corrélation entre le C-9 ($\delta = 14,8$ ppm) du groupement méthyle et les protons méthylène CH_2 ($\delta = 4,30$ ppm) ; ce dernier montre une corrélation avec le carbone C-7 du groupement carboxyle à $\delta = 168,2$ ppm, cette corrélation constate la présence d'un groupement ester d'éthyle dans cette molécule. D'autre part, ce carboxyle est lié au cycle aromatique par C-1, confirmé par une tache de corrélation entre C-7 et H-2/H-6.
- ✓ Une tache de corrélation entre les protons éthyléniques H-2/H-6 du noyau aromatique et les carbones résonnant à $\delta = 120,7$; $138,9$ et $145,5$ ppm qui correspondent aux carbones quaternaires C-1, C-4 et C-3/C-5 du noyau aromatique respectivement dont les carbones C-4, C-3 et C-5 sont substitués par des groupements oxygénés sous forme des hydroxyles, vu les valeurs de leurs déplacements chimiques.



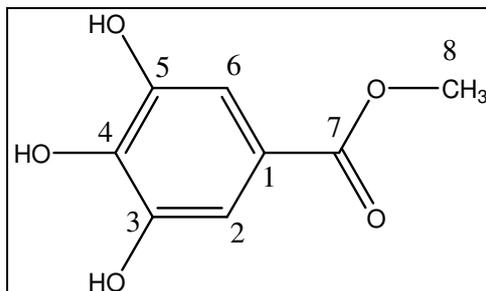
Spectre 1.33. Spectre HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ (signaux relatif au composé **Hh-6**) (600 MHz, MeOH-d_4)

Les données spectrales des produits **Hh-5** et **Hh-6** regroupées dans le tableau II.14 sont en accord avec celles publiées [10], [11] pour ces molécules et nous ont permis d'identifier : acide *p*-hydroxybenzoïque et éthyle gallate respectivement.

Tableau II.14. Déplacements chimiques en RMN ¹H, RMN ¹³C et HMBC des produits **Hh-5** et **Hh-6**

Position	Composé Hh-5			Composé Hh-6		
	δH, mult, J(Hz)	δC(ppm)	HMBC	δH, mult, J(Hz)	δC(ppm)	HMBC
1	-	122,8		-	120,0	
2,6	7,87, <i>d</i> , 6,4	132,2	C-1	7,07, <i>s</i>	109,5	C-1, C-3/5, C-7
3,5	6,80, <i>d</i> , 6,4	115,4	C-7	-	145,5	
4	-	162,1		-	138,0	
7	-	170,0		-	168,2	
8-(CH₂)				4,30, <i>q</i> , 7,2	61,3	C-7, C-9
9-(CH₃)				1,34, <i>t</i> , 7,2	14,5	C-8

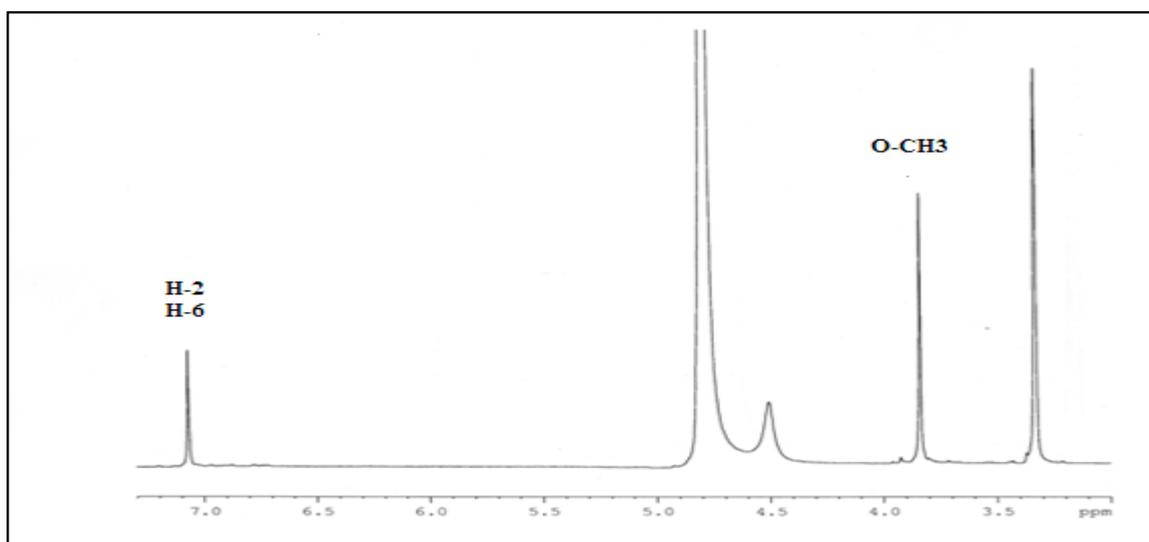
2.2.5. Identification du composé Hh-13



Méthyl 3,4,5- trihydroxy benzoate

Le spectre RMN ^1H (**Spectre 1.34**) enregistré dans MeOH-d_4 à 600 MHz de composé se distingue de celui de composé précédent (**Hh-6**) par l'absence du signal relatif au groupement éthylène ($\delta=4,30$ ppm) ; en effet la présence :

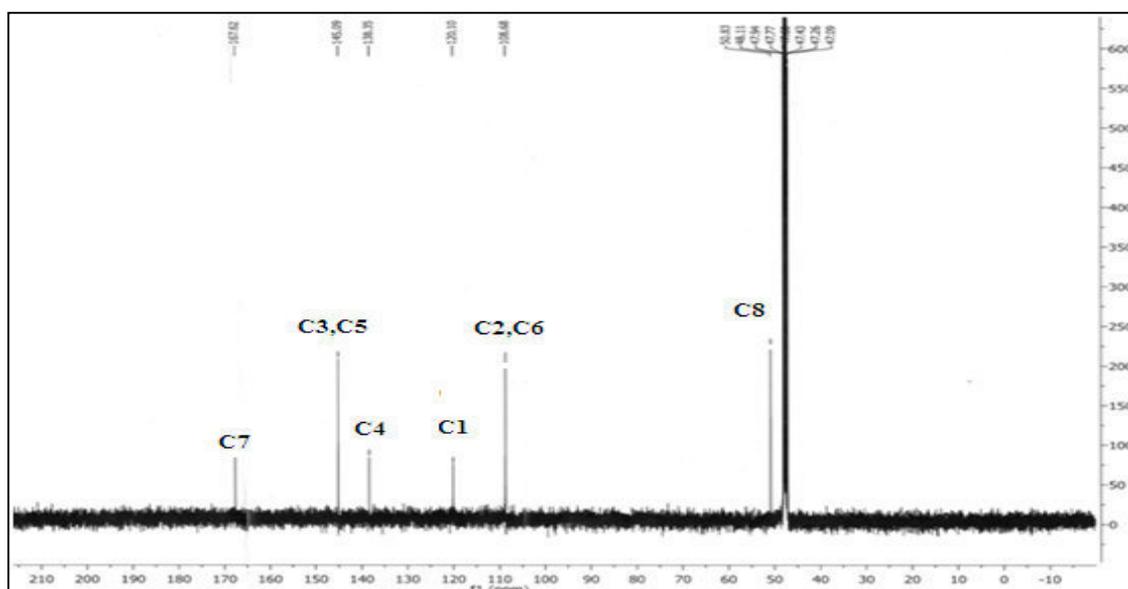
- ✓ Un singulet à $\delta=3,75$ ppm d'intégration 3H, attribuable au groupement méthoxy.
- ✓ Un singulet à $\delta=7,12$ ppm d'intégration 2H, attribuable aux protons H-2/H-6 caractéristiques d'un noyau aromatique.



Spectre 1.34. Spectre RMN ^1H du composé **Hh-13** (600 MHz, MeOH-d_4)

Le spectre RMN ^{13}C (**Spectre 1.35**) enregistré dans MeOH-d_4 à 150 MHz montre :

Deux groupements CH attribuables aux C-2/C-6 du cycle aromatique. Une fonction acide carboxylique conjuguée à $\delta_c = 168,0$ ppm, trois carbones aromatiques oxygénés.



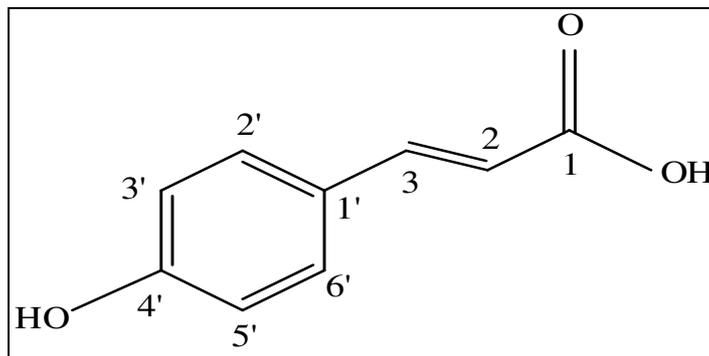
Spectre 1.35. Spectre RMN ^{13}C du composé **Hh-13** (150 MHz, MeOH- d_4)

Le composé **Hh-13** correspond au méthyle gallate. Ces données sont conformes à celles de la littérature [12].

Tableau II.15. Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du produit **Hh-13**

Position	$\delta\text{H}(\text{ppm}), m, J(\text{Hz})$	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
1	-	120,8
2,6	7,12, <i>s</i>	109,2
3,5	-	146,4
4	-	138,0
7	-	168,0
8(CH ₃)	3,75, <i>s</i>	51,5

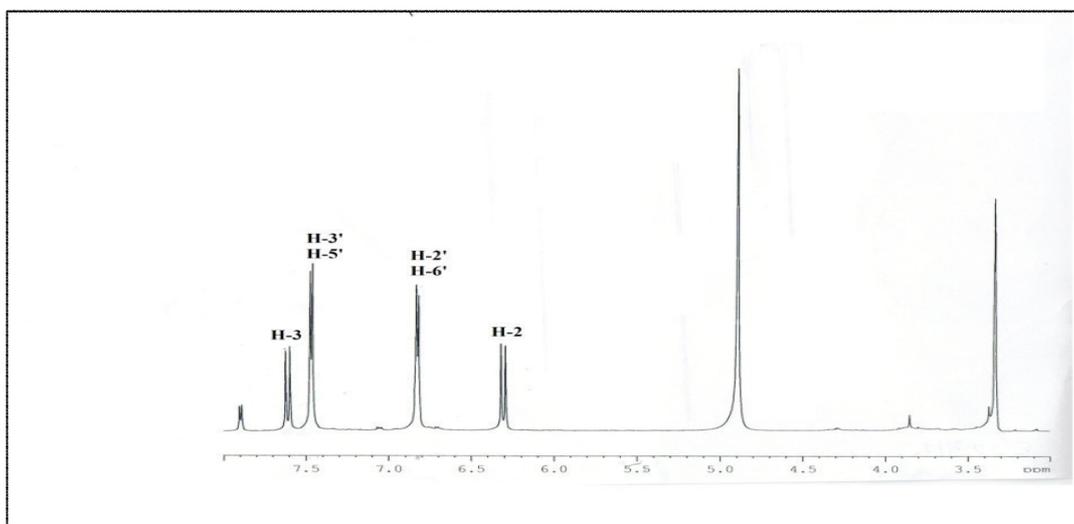
2.2.6. Identification du composé Hh-7

Acide *p*-coumarique.

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre1.36) à 600 MHz dans MeOH- d_4 et par comparaison à celui de la littérature [13] permet de décrire cette molécule comme étant : acide *p*-coumarique confirmé par :

-Un système AB à $\delta = 7,45$ ppm (2H, *d*, $J = 7,91$ Hz), attribuable au H-6'/H-2' et à $\delta = 6,83$ ppm (2H, *d*, $J = 7,91$ Hz) correspondant au H-3'/H-5', ce qui indique la présence d'un cycle aromatique para substitué.

-Deux doublets à $\delta = 6,30$ et $\delta = 7,60$ ppm d'intégration 1H pour chacun, attribuables aux deux protons éthyléniques H-2, H-3 respectivement qui couplent entre eux d'un couplage *trans* à partir de la constante de couplage $J = 16,1$ Hz.

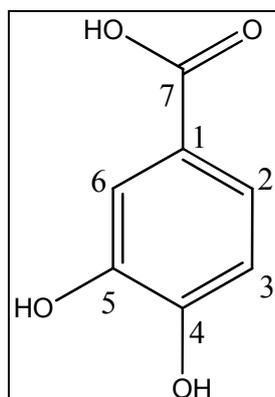
Spectre1.36. Spectre RMN ^1H du composé Hh-10 (600 MHz, MeOH- d_4)

L'ensemble des attributions des signaux RMN¹H est rapporté dans le tableau II.16.

Tableau II.16. Déplacements chimiques en RMN ¹H du produit **Hh-7**

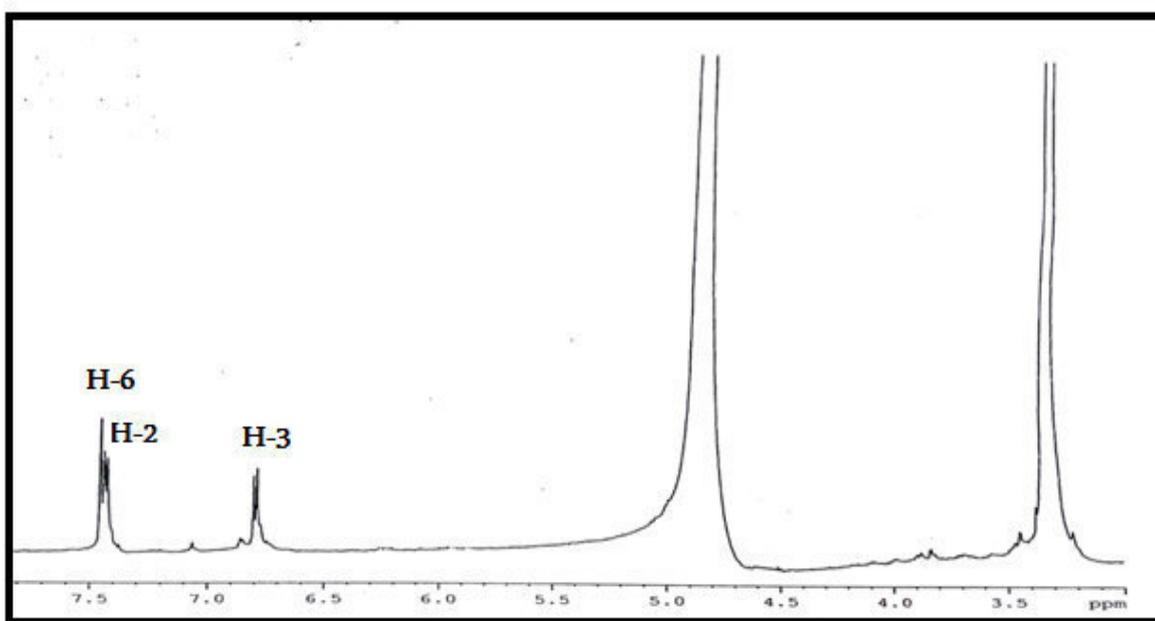
δ (ppm)	intégration	multiplicité	J (Hz)
7,45	2H	<i>d</i>	7,9
6,83	2H	<i>d</i>	7,9
6,30	1H	<i>d</i>	16,1
6,30	1H	<i>d</i>	16,1

2.2.7. Identification du composé Hh-9



Acide protocatéchuïque.

L'examen du spectre RMN ¹H (**Spectre 1.37**) enregistré dans MeOH-d₄ à 600 MHz montre : Un noyau aromatique *tri*-substitué. En effet, les trois protons aromatiques du spectre résonnent sous forme de : deux doublets de doublet ($J = 7,1$ Hz) d'intégration 1H chacun à $\delta = 7,40$ ppm et $\delta 6,80$ ppm attribuable aux protons H-2 et H-3 respectivement. Et un doublet d'intégration 1H à $\delta = 7,49$ ppm attribuable à H-6.



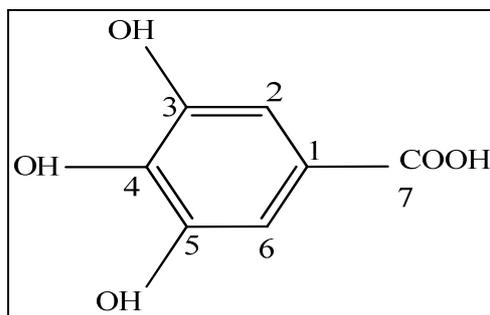
Spectre1.37.Spectre RMN ^1H du composé **Hh-9** (600 MHz, MeOH- d_4)

Tableau II.17. Déplacements chimiques en RMN ^1H du Produit **Hh-9**

δ (ppm)	intégration	mlt, J HZ
7,40	1H	<i>dd, 7,1</i>
6,80	1H	<i>dd, 7,1</i>
7,49	1H	<i>d</i>

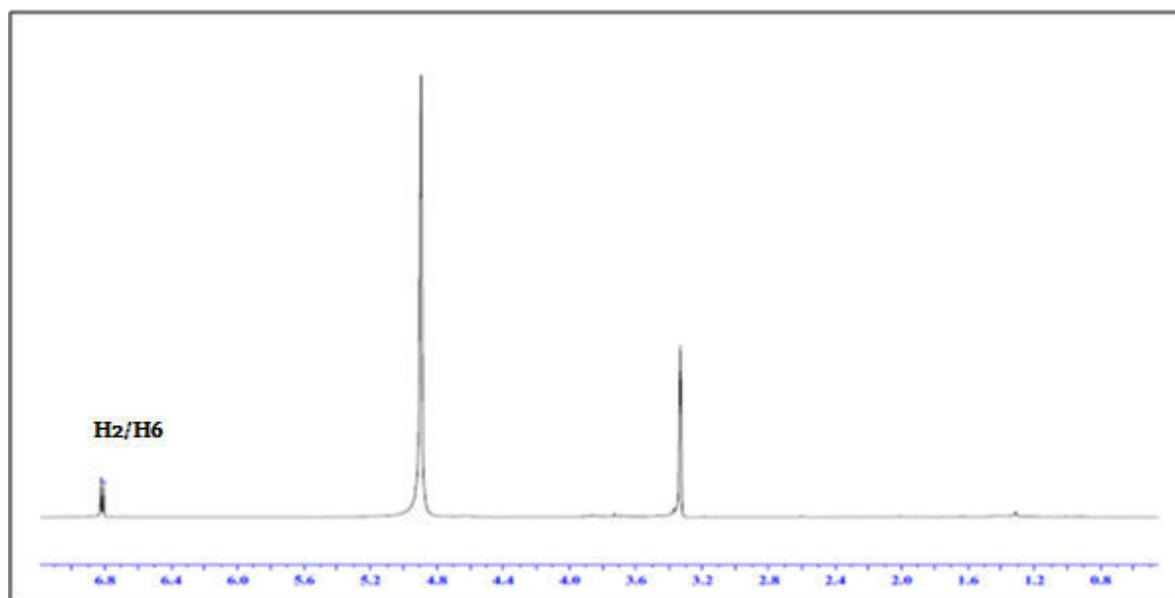
Les données spectrales que nous avons obtenues sont en accord avec celles publiées [11]. pour cette molécule et nous ont permis d'identifier comme étant : acide protocatéchuïque.

2.2.8. Identification du composé Hh-19



Acide gallique.

Le composé **Hh-19** a été isolé sous forme des cristaux blancs, correspond à l'acide gallique. l'examen du spectre RMN ^1H à 600 MHz, réalisé dans (MeOH- d_4) est conformes à celle de la littérature [14].



Spectre1.38.Spectre RMN ^1H du composé **Hh-19** (600 MHz, MeOH- d_4)

Conclusion

L'étude phytochimique de la plante *Halimium halimifolium* s'appuie sur la prise en valeur des phases acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'extrait hydro-alcoolique des parties aériennes (feuilles et fleurs) les travaux de séparation et de purification ont conduit à l'identification de **17 produits**. Il s'agit de deux catégories principales :

1. Huit flavonoïdes

- ✓ Kaempférol .
- ✓ *trans*- tiliroside.
- ✓ *cis*- tiliroside.
- ✓ 3-*O*-[(6"-*O*- *E-p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl]-Quercétine.
- ✓ 3-*O*-[(6"-*O*- *E-p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranosyl]-Myricétine,
- ✓ Taxifoline 4'-*O*- β -D-glucopyranoside.
- ✓ Myricétine 3-*O*- α -rhamnoside.
- ✓ Kaempférol 3-*O*- β -D-glucopyranoside.

2. Neuf acides phénoliques

- ✓ Rhodonderin.
- ✓ Betuligenol.
- ✓ Tyrosol.
- ✓ Ethyle gallate.
- ✓ Méthyle gallate.
- ✓ Acide *p*-hydroxybenzoïque.
- ✓ Acide protocatéchique.
- ✓ Acide *p*-coumarique.
- ✓ Acide gallique.

Références

1. Rajbir, S., Bikram, S., Sukhpreet, S., Neeraj, K., Subodh, K., Saroj, A., (2008). Anti-free radical activities of kaempferol isolated from *Acacia nilotica* (L.) Willd. Ex. Del. *Toxicology in Vitro*, 22 : (8), 1965-1970.
2. Agrawal, P., (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, 31 : (10), 3307-3330.
3. Sachiko.T, Koyoko.T, Maki.A, Hiroyuki.O, Hiroshi.H, Eiji I, Tomihisa, O., (2004). Isolation of cytochrome P450 inhibitors from strawberry fruit, *Fragaria ananassa*. *Journal of Natural product*, 67, 1839-1841.
4. Xuhong, R., Liu,S., Osamu, M., Maosheng, C.,(2011). Synthesis of Quercetin 3-O-[6''-O-(*trans-p*-Coumaroyl)]- β -D-Glucopyranoside. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 30 : (3), 119-131.
5. Awatif, A. E., Catharine, B., Alexander, I. G., Simon, P. M., Graham, G., S., Roger, D. W., (2003). Two very unusual macrocyclic flavonoids from the water lily *Nymphaea lotus*. *Phytochemistry*, 63 : (6), 727-731.
6. Xinya, X., Haihui, XI., Jing, H., Yueming, J., Xiaoyi, W., (2011). Flavonoid Glycosides from the Seeds of *Litchi chinensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: (4), 1205 -1209.
7. Zaiter, L., Bouheroum, M., Hammoud, L., Sarri, D., Benayache, S., Leon, F., Brouard, I., Bermejo, J., Benayache, F., (2012). Phytochemical study of *Halimium halimifolium*. *Chemistry Of Natural Compounds*, 47 (6), 889-890.
8. Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., Scognamiglio, F., (1992). Isolation, Spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste waters. *Phytochemistry*, 31 : (12), 4125- 4128.
9. Kim, M. H., Nugroho, A., Choi, J., Park, H. J. (2011). Rhododendrin, an analgesic/anti-inflammatory arylbutanoid glycoside, from the leaves of *Rhododendron aureum*". *Archives of Pharmacal Research*, 34 : (6), 971-978.
10. Ram Chandra, D., Meena, R. , Surya ,K. K. , Suresh, A., Mohan, B. G., (2008/2009). Phytochemical Constituents of the Bark of *Vitex negundo* L. *Journal of Nepal Chemical Society*, 23, 89-92.
11. Kerbab, K., Mekhelfi, T., Zaiter, L., Benayache, S., Benayache, F., Picerno, P., Mencherini, T., Sansone, S., Aquino, R. P., Rastrelli, L., (2015). Chemical composition and antioxidant activity of polar extract of *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. *Natural Product Research*, 29, 671-675.

12. Boudermine,S., Malafronte,N., Mencherini,T., Esposito,T., Aquino,RP., Beghidja,N., Benayache , S., D'Ambola, M., Vassallo, A., (2015). Phenolic compounds from *Limonium pruinosum*. *Natural Product Communications.*, 10 : (2), 319-321.
13. Chi-Ren,L., Yueh-Hsiung, K., Yu-Ling, Ho., Ching-Ying, W., Chang –Syun, Y.,Cheng-Wen, L., Yuan-Shiun , C.,(2014). Studies on Cytotoxic Constituents from the Leaves of *Elaeagnus oldhamii* Maxim. in Non-Small Cell Lung Cancer AA549Cells. *Molecules*, 19, 9515-9534.
14. Jun-Xi, L., Duo-Long, D., Yan-Ping, S., (2008).Diversity of Chemical Constituents from *Saxifraga montana* H. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 55, 863-870.

Chapitre 2. Investigation phytochimique de l'espèce
Thymelaea microphylla Coss. et Dur.

1. Etude phytochimique de la plante *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur.

1.1. Matériel végétal

Les parties aériennes de *T. microphylla* ont été récoltées de la région de M'Sila au mois d'Avril en 2010. Les parties aériennes de la plante ont été entreposées pour les sécher, dans un endroit sec.

1.2. Extraction

Après séchage, les parties aériennes (2000 g) de la plante *T. microphylla* sont grossièrement broyées et mises dans un erlenmeyer pour les extraire par macération avec le mélange EtOH-H₂O (70:30, v/v) pendant 24 h, trois fois avec renouvellement du solvant. Après filtration, le filtrat est concentré et solubilisé dans 800 ml de H₂O, la solution obtenue est filtrée et extraite par l'ether de pétrole pour éliminer les chlorophylles puis l'augmentation de la polarité en utilisant les solvants CHCl₃, EtOAc et *n*-butanol respectivement pour avoir trois phases (tableau II.18).

Tableau II.18. Masses et rendements des extraits

Extraits obtenus	Masse (g)	Rendement (%)
Extrait chloroforme	8,2	0,41
Extrait AcOEt	14,9	0,70
Extrait <i>n</i>-ButOH	56,0	2,80

L'organigramme d'extraction (**Figure II.8**) montre les différentes étapes du processus.

L'étude chimique est portée sur l'extrait *n*-butanol.

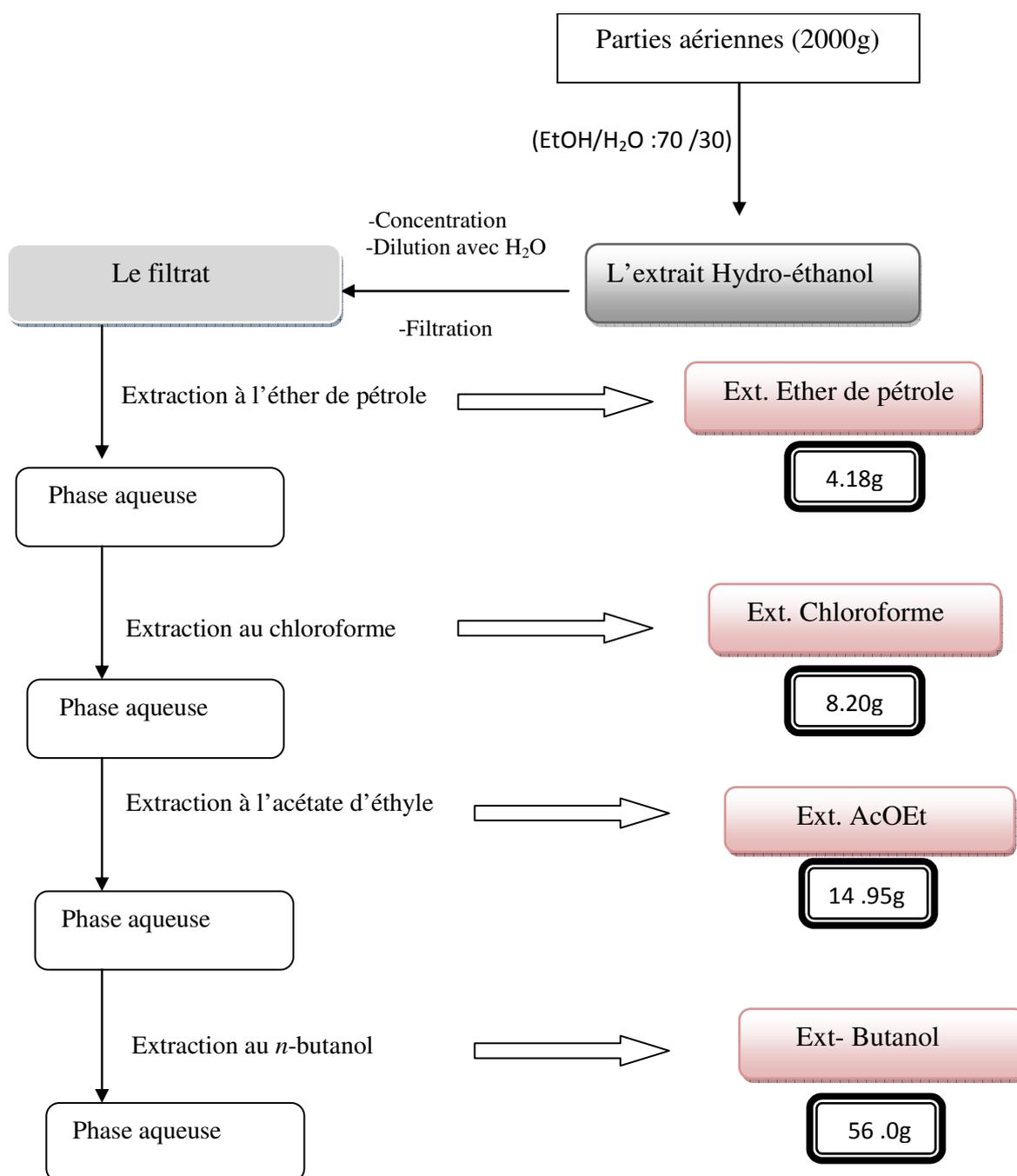


Figure II.8. Diagramme d'extraction des parties aériennes de *Thymelaea microphylla*

1.3. Etude phytochimique de l'extrait *n*-butanol

1.3.1. Fractionnement de l'extrait *n*-butanol

L'extrait Butanol (18 g) sont traités par chromatographie sur colonne de gel de silice (40 - 60 μm), avec le système éluant CHCl_3 -MeOH en gradient de polarité, avec un fractionnement de 50 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par CCM et les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau II.19.

Tableau II.19. Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol des parties aériennes de *T. micropylla*.

Fractions	Lots	Eluant	
		$\text{CHCl}_3\%$	MeOH%
f0	0-100	100	0
f1	101-106	95	5
f2	107- 134	90	10
f3	135- 142	85	15
f4	143- 154	80	20
f5	155- 177	75	25
f6	178- 193	70	30
f7	194- 220	65	35
f8	221- 224	60	40
f9	225- 230	55	45
f10	231- 249	50	50
f11	250- 259	40	60
f12	260- 266	35	65
f13	267-280	30	70

1.3.2. Séparation des fractions obtenues

Les fractions regroupées sont chromatographiées sur CCM (silica 60 F254 gel-coated glass sheets) en utilisant le système BAW (BuOH-Acide acétique -H₂O ; 60 : 15 : 25), 7 fractions majeures ont été obtenues.

Tableau II.20. Fractions regroupées

Fractions majoritaires	Masse (mg)
F I	121,0
F II	256,0
F III	257,7
F IV	127,6
F V	183,1
F VI	99,0
F VII	5,8

Les fractions obtenues de **I** à **VI** ont été purifiées par chromatographie semi-préparative en phase inverse à haute pression (RP-HPLC) :

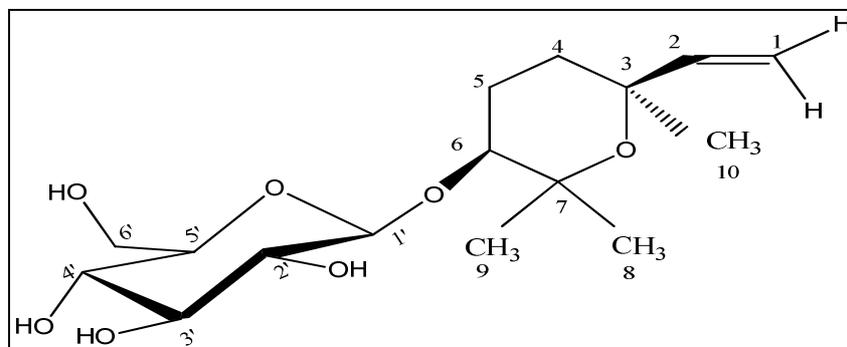
- Les fractions **F I** et **F VI** : sont purifiées en utilisant MeOH-H₂O (4,5 : 5,5) comme phase mobile.
 - ✓ **F I** (121,0 mg) donne les composés : **Tm-4** (4,0 mg), **Tm-12** (5,0 mg), **Tm-14** (0,5 mg).
 - ✓ **F VI** (99,0 mg) donne : **Tm-8** (11,8 mg), **Tm-9** (1,6 mg), **Tm-10** (1,9 mg), et **Tm-11** (0,7 mg).
- La fraction **F II** (256,0 mg) a été séparée par le système MeOH-H₂O (4,0 : 6,0), et nous a permis d'isoler les produits : **Tm-1** (0,8 mg), **Tm-4** (3,0 mg), **Tm-12** (5,7 mg), **Tm-13** (0,7 mg), **Tm-14** (2,7 mg), **Tm-15** (2,0 mg), **Tm-17** (1,0 mg), et **Tm-18** (1,2 mg).
- La fraction **F III** (257,7 mg) a été chromatographiée en utilisant le système MeOH-H₂O (2,5 : 7,5) comme phase mobile, et nous a permis d'obtenir les produits : **Tm-5** (0,5 mg), **Tm-6** (0,7 mg), **Tm-16** (0,8 mg), et **Tm-20** (1,0 mg).

- La fraction **F IV** (1276,0 mg) a été séparée en utilisant MeOH-H₂O (3,0 : 7,0) comme phase mobile et a donné les produits : **Tm-2** (0,3 mg), **Tm-6** (0,8 mg), **Tm-16** (0,5 mg), et **Tm-19** (1,3 mg).
- La fraction **F V** (183,1 mg) a été purifiée en utilisant le système MeOH-H₂O (5,0 : 5,0) pour obtenir les composés : **Tm-3** (1,0 mg), **Tm-4** (2,0 mg), **Tm-8** (0,5 mg), et **Tm-15** (1,0 mg).
- La fraction **F VII** (5,8 mg) a été identifiée à l'état pur en tant que cristaux blancs (**Tm-7**).

2. Éluclation structurale des composés isolés

2.1. Détermination structurale des composés de type monoterpènes

2.1.1. Détermination structurale du composé Tm-1



(3*S*, 6*S*)-*cis*-linalol-3,7-oxyde- β -D-glucopyranoside.

Ce composé a été isolé sous forme des cristaux blancs; Le spectre de masse obtenu par ESI-MS (mode négatif), donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 331 $[M-H]^-$ en accord avec une masse moléculaire de 332 Da et une formule brute en $C_{16}H_{28}O_7$.

L'examen du spectre RMN 1H (**Spectre 2.1**) et la séquence HSQC (**Spectre 2.2**) à 600 MHz réalisés dans $MeOH-d_4$ montrent :

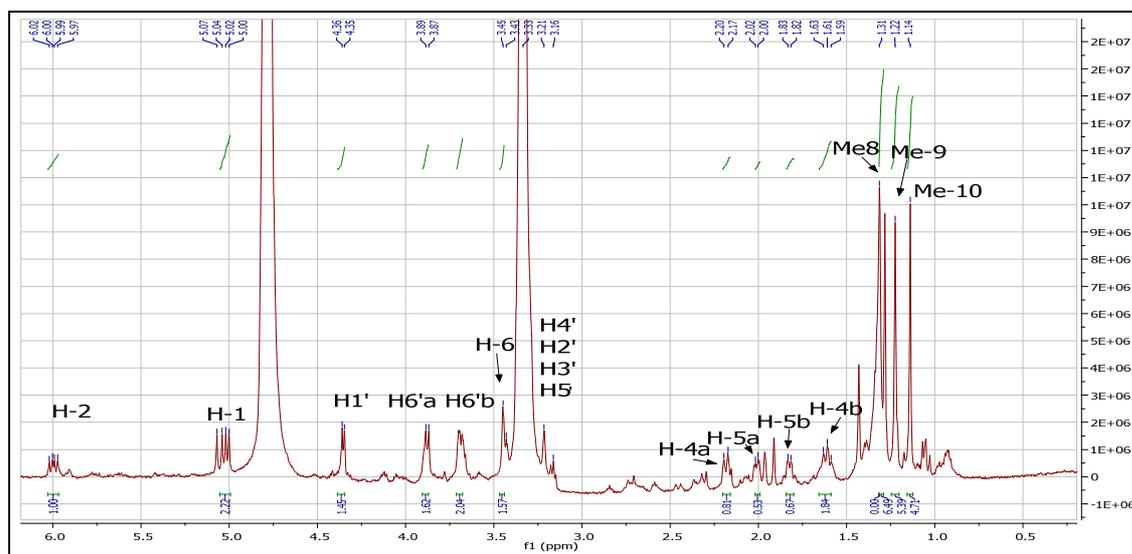
- Trois singulets à $\delta = 1,13$; $1,23$ et $1,27$ ppm d'intégration 3H pour chacun, portés par des carbones résonnant à $\delta = 31,2$; $21,3$ et $29,9$ ppm respectivement, indiquant la présence de 3 groupements méthyles.
- Deux multiplets à $\delta = 1,58$; $2,16$ ppm d'intégration 1H pour chacun, portés par le même carbone à $\delta = 33,6$ ppm, attribuable au groupement méthylène.
- Un autre groupement méthylène (2H, m) enregistré à $\delta = 1,81$ et $2,01$ ppm ; ($\delta_C = 25,2$ ppm).
- Un signal à $\delta = 3,42$ ppm porté par le carbone résonnant à $\delta = 84,5$ ppm, attribuable à un groupe CH-O.

Le spectre montre également :

- Un doublet de doublet d'intégration 2H à $\delta = 5,02$ ppm ($J = 11,2$; $18,0$ Hz) porté par le carbone résonnant à $\delta = 110,6$ ppm, attribuable au CH_2 éthylénique, qui corrèle à un autre doublet de doublets à $\delta = 5,99$ ppm ($J = 11,2$; $18,1$ Hz) d'intégration 1H, porté par le carbone résonnant à $\delta = 146,8$ ppm. Cette corrélation est confirmée par une tache de corrélation dans le spectre Cosy (**Spectre 2.4**) on les notes H-1 et H-2 respectivement (**Figure II.9**).
- Un doublet à $\delta = 4,34$ ppm ($J = 8,0$ Hz), typique du proton anomérique d'une unité β -glucose.

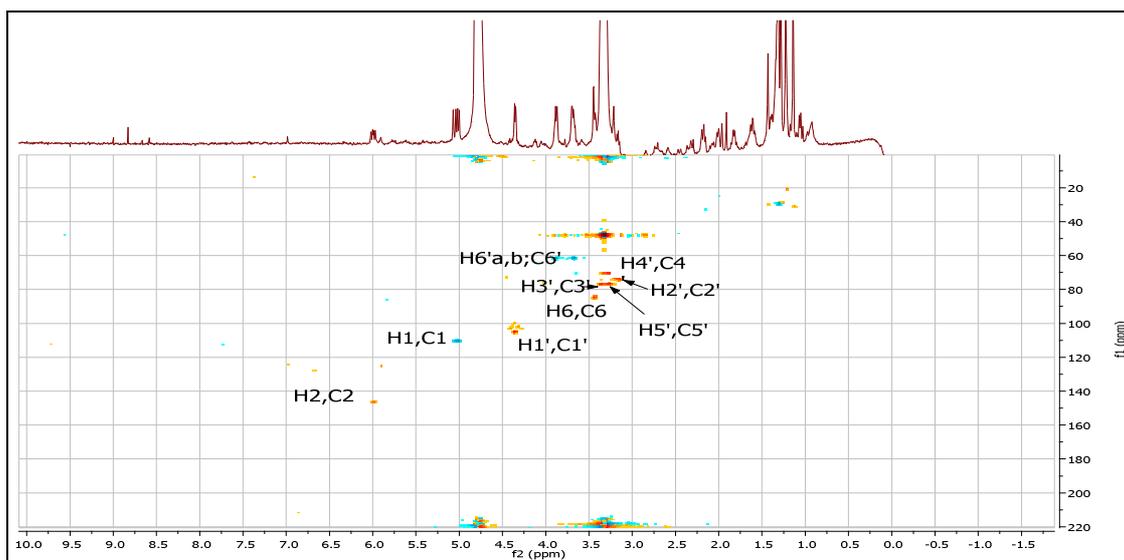
L'expérience HSQC (**Spectre 2.2**) relative à ce composé permet de localiser le signal du carbone anomérique à $\delta_C = 106,0$ ppm. La valeur de son déplacement chimique indique que ce glucose est lié à l'aglycone par une jonction oxygène.

-Deux signaux d'intégration 1H pour chacun, attribuables à H-6a', H-6b' à $\delta = 3,89$ ppm (*dd*, $J = 12,0 ; 1,8$ Hz) et $\delta = 3,66$ ppm (*dd*, $J = 11,7 ; 6,0$ Hz) respectivement.



Spectre 2.1. Spectre RMN ^1H du composé **Tm-1** (600 MHz, MeOH- d_4)

Le spectre HSQC révèle également un ensemble de multiplets dans l'intervalle de 3,17- 3,36 ppm attribuable aux protons 2', 3', 4', 5' du substituant sucre, portés par les carbones à 74,5 ; 77,9 ; 71,5 et 77,5 ppm respectivement.

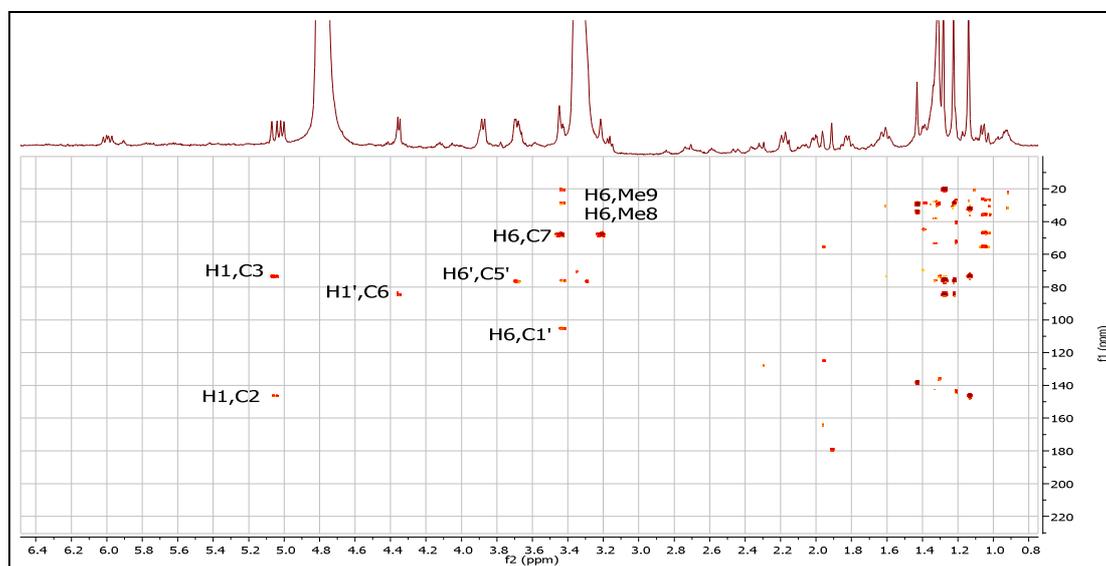


Spectre 2.2. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C du composé **Tm-1** (600 MHz, MeOH- d_4)

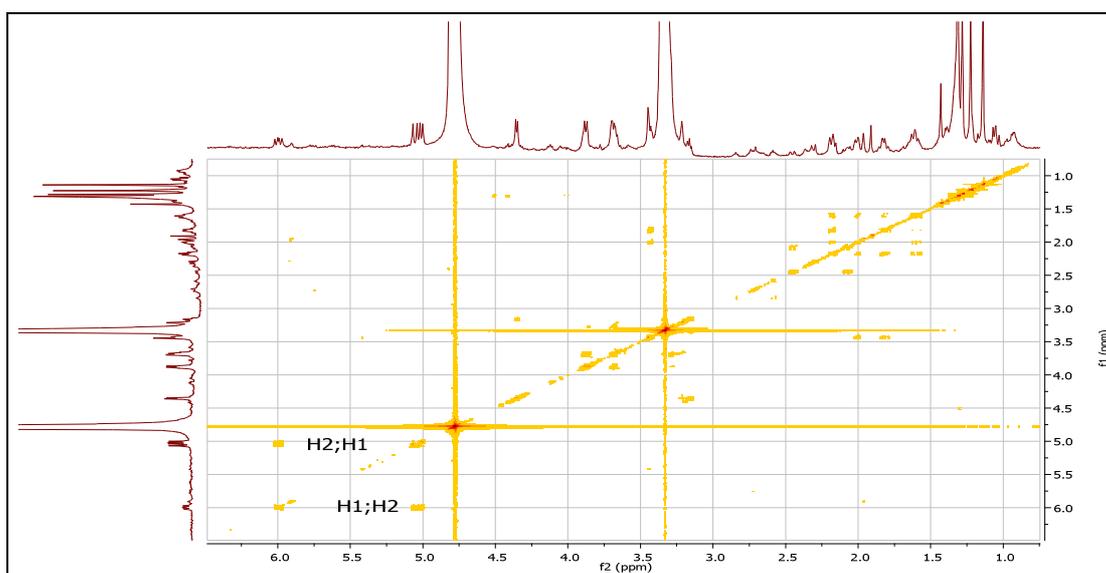
Ces données spectrales et par comparaison de la littérature [1] mènent à l'identification du composé **Tm-1** comme étant : (3S, 6S)-*cis*-linalol-3,7-oxide- β -D-glucopyranoside.

Le spectre relatif à HMBC (**Spectre 2.3**) confirme l'enchaînement de cette molécule par :

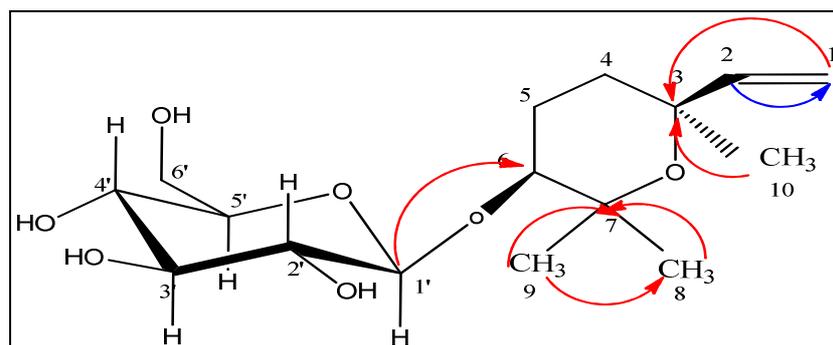
- Une tache de corrélation entre le H-1 et un carbone résonnant à $\delta = 74,2$ ppm attribuable à C-3 ; ainsi que l'attachement de ce carbone et le groupe méthyle résonnant à $\delta = 1,13$ ppm attribuable à CH₃-10 justifié la jonction de ce méthyle au carbone 3.
- Des taches de corrélations entre les groupes méthyles résonnant à $\delta = 1,27$ et $\delta = 1,23$ ppm attribuables à CH₃-8/CH₃-9 et le C-7 ($\delta_C = 76,7$ ppm).
- Une autre tache de corrélation entre le proton anomère H-1' et le carbone résonnant à $\delta = 84,5$ ppm attribuable au C-6 conforte la liaison du sucre à cette position. Ces corrélations sont illustrées dans la figure II.9.



Spectre 2.3. Spectre HMBC ¹H-¹³C du composé **Tm-1** (600 MHz, MeOH-d₄)



Spectre 2.4. Spectre Cosy ¹H-¹H du composé **Tm-1** (600 MHz, MeOH-d₄)



 corrélations COSY
  corrélations HMBC

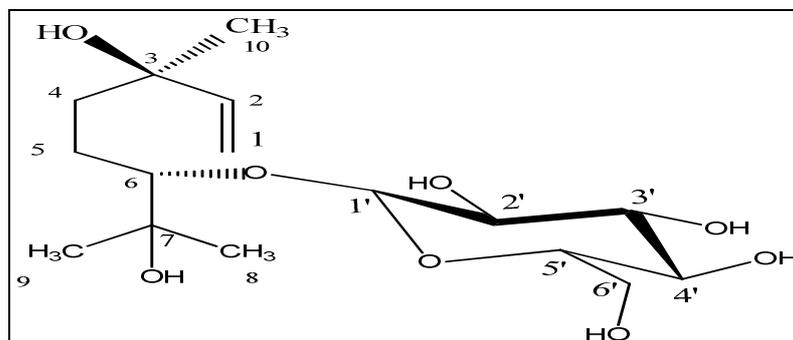
Figure II.9. Corrélations HMBC et Cosy **Tm-1**

L'ensemble des données spectroscopiques est regroupé dans le tableau II.21.

Tableau II.21. Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du produit **Tm-1**

Position	$\delta\text{H}(\text{ppm}), \text{mult}, J(\text{Hz})$	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
1	5,02, <i>dd</i> , 11,2 ; 18,1	110,6
2	5,99, <i>dd</i> , 11.2;18.0	146,8
3	-	74,2
4b	1,58	33,6
4a	2,16	
5b	1,81	25,2
5a	2,01	
6	3,42, <i>dd</i> , 11,2 ; 4,3	84,5
7	-	76,7
8-CH ₃	1,27, <i>s</i>	29,9
9-CH ₃	1,23, <i>s</i>	21,3
10-CH ₃	1,13, <i>s</i>	31,2
Glucose		
1'	4,34, <i>dd</i> , 8	106,4
2'	3,17	73,7
3'	3,36	77,2
4'	3,31	70,3
5'	3;26	76,7
6'	3,66, <i>dd</i> , 11,7;6	62,2
	3,89, <i>dd</i> , 12;1.8	

2.1.2. Détermination structurale du composé Tm-2



3,7- diméthyl-1-octène-3,6,7-triol-6-O- β -D-glucopyranoside.

Ce composé a été isolé sous forme des cristaux blancs. L'examen du spectre RMN¹H (**Spectre 2.5**) et la séquence HSQC (**Spectre 2.6**) à 600 MHz réalisés dans MeOH-d₄ montrent :

-Trois singulets à $\delta = 1,13$; $1,18$ et $1,27$ ppm d'intégration 3H pour chacun, portés par les carbones résonnant à $\delta = 26,5$; $24,3$ et $27,8$ ppm respectivement ; indiquant la présence de 3 groupements méthyles.

-un multiplet à $\delta = 1,46$ ppm porté par le carbone situé à $\delta = 26,5$ ppm d'intégration 2H attribuable à un groupement méthylène.

-Deux multiplets à $\delta = 1,56$ et $2,05$ ppm d'intégration un 1H chacun portés par le même carbone à $\delta = 38,9$ ppm, attribuable au groupement méthylène.

-Un signal à $\delta = 3,47$ ppm porté par le carbone résonnant à $\delta = 90,1$ ppm attribuable à un groupement CH-O.

-Un doublet de doublets résonne à $\delta = 5,93$ ppm (1H, *dd*, $J = 17$; 10 Hz) ($\delta_C = 145,5$ ppm) attribuable au CH éthylénique (H-2).

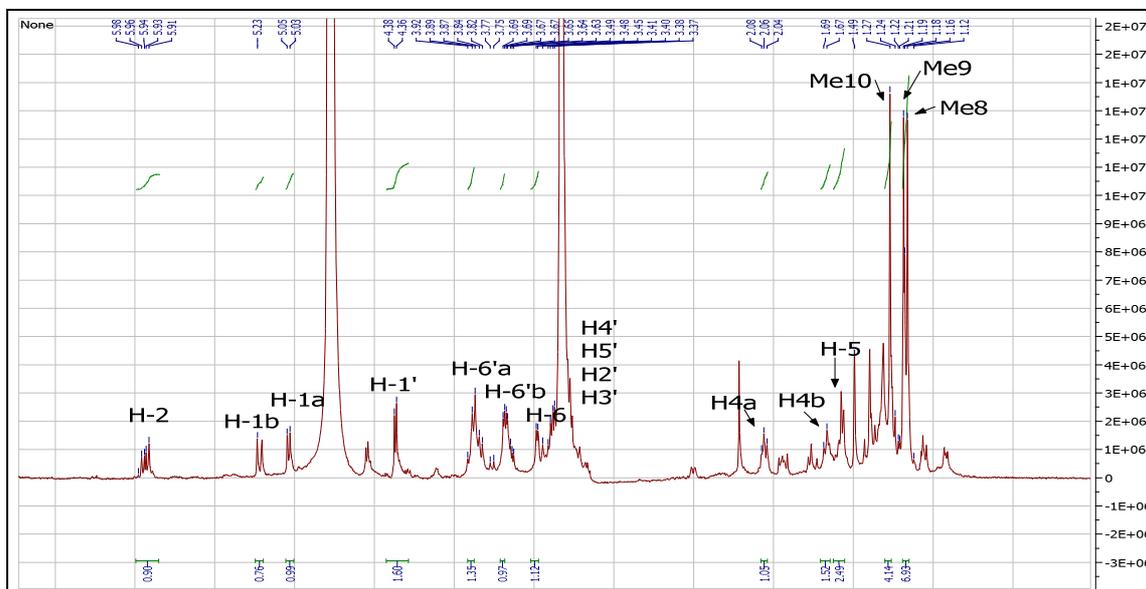
-Deux doublets larges : le premier à $\delta = 5,01$ ppm (1H, *d*, $J = 10$ Hz) et le second à $\delta = 5,20$ ppm (1H, *d*, $J = 17$ Hz) indiquant un groupe éthylénique (CH₂) ($\delta_C = 111,5$ ppm) on les note, H-1a et H-1b respectivement ; montrant un couplage *cis* et *trans* avec le H-2 ($\delta = 5,93$ ppm) éthylénique précédent.

L'expérience Cosy (**Spectre 2.8**) consolide cet attachement par deux taches de corrélation entre ces protons éthyléniques (H-1a/H-2 et H-1b/H-2) (**Figure II.10**).

Le spectre RMN¹H montre également un doublet à $\delta = 4,36$ ppm ($J = 8,0$ Hz), typique du proton anomérique d'un β -glucose.

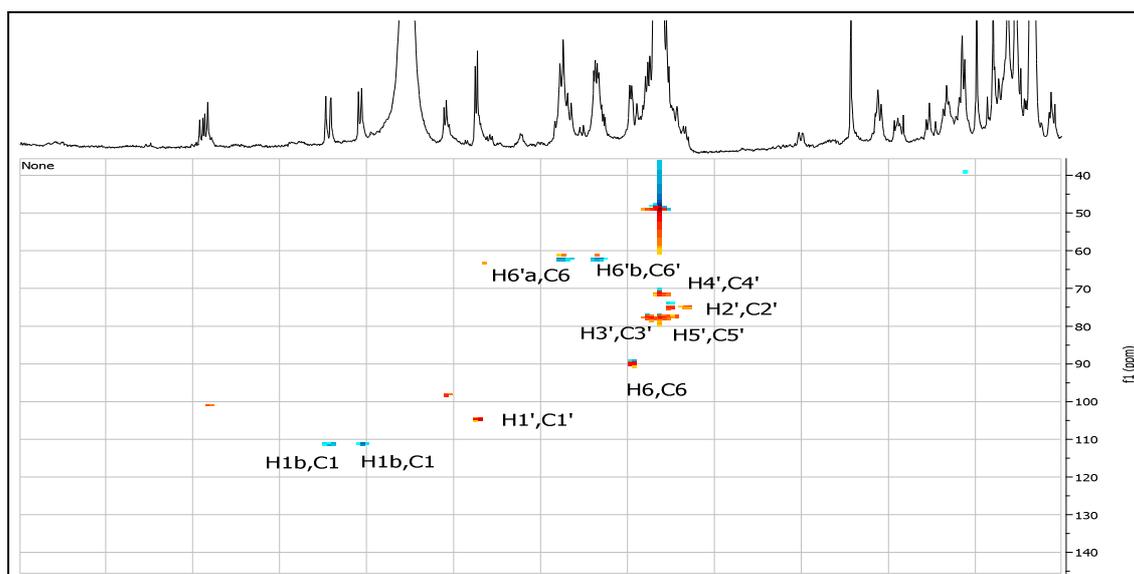
L'expérience HSQC permet de définir le carbone porteur de ce proton avec un signal à $\delta = 105,1$ ppm, ce déplacement chimique correspond aux *O*-glucosides.

Deux signaux d'intégration ^1H chacun, attribuable respectivement à H-6'a, H-6'b à $\delta = 3,7$ ppm (*dd*, $J = 12,0 ; 2,0$ Hz) et $\delta = 3,66$ ppm (*dd*, $J = 11,7 ; 6,2$ Hz).



Spectre 2.5. RMN ^1H du composé **Tm-2** (600 MHz, MeOH- d_4)

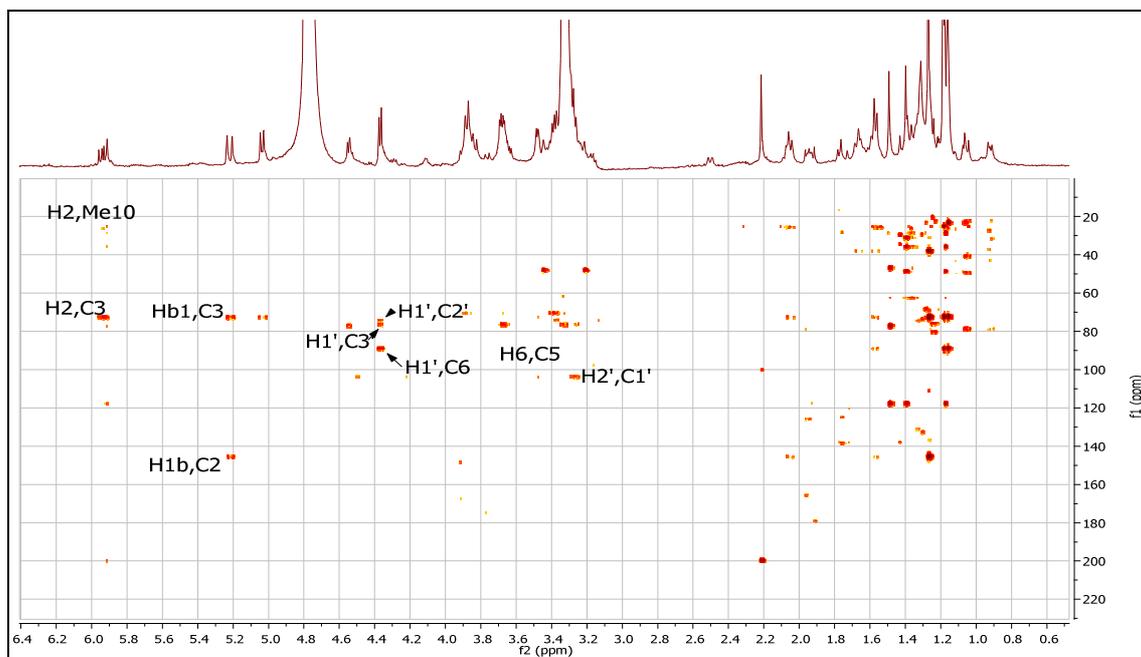
Un ensemble de multiplets dans l'intervalle 3,24 – 3,38 ppm attribuable aux protons 2', 3', 4', 5' du substituant sucre portés par les carbones résonnant à $\delta = 75,0 ; 78,0 ; 71,5$ et 78,0 ppm respectivement selon les mesures sur HSQC (**Spectre 2.6**).



Spectre 2.6. Spectre HSQC ^1H , ^{13}C du composé **Tm-2** (600 MHz, MeOH- d_4)

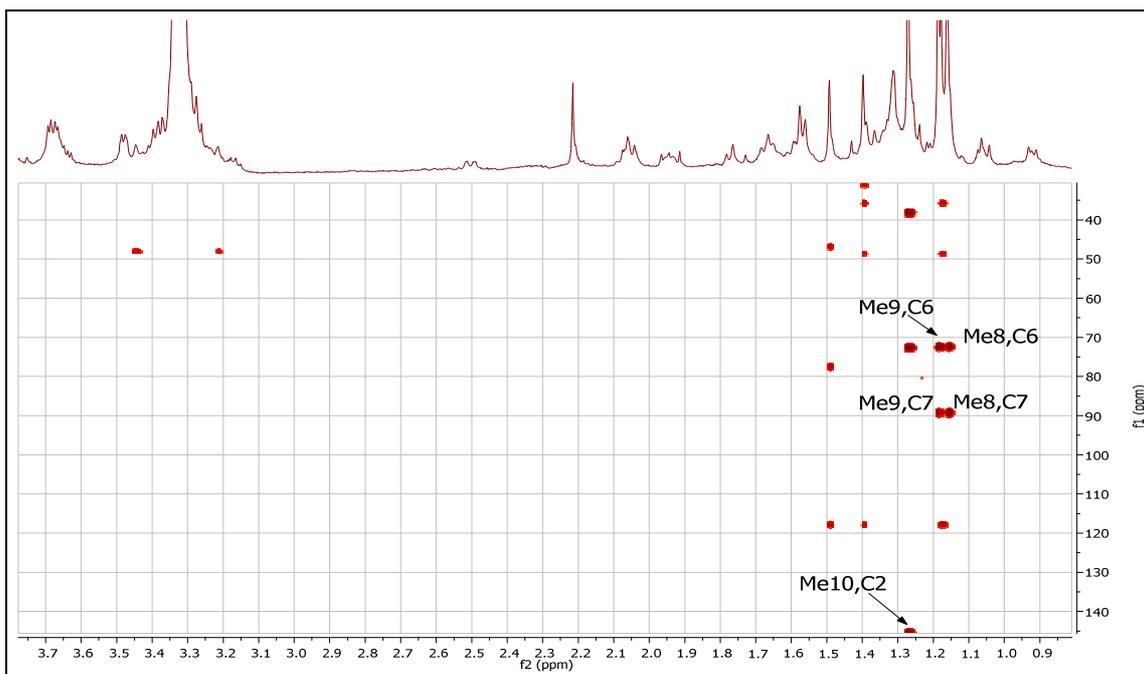
Le spectre relatif à l'expérience HMBC (**Spectre 2.7.1**) montre :

- Une tache de corrélation entre le proton éthylénique H-2 et un carbone quaternaire situé à $\delta = 73,6$ ppm on le note C-3.
- Une autre jonction entre le C-3 et les protons du groupement méthylène à $\delta = 1,56$ et $2,02$ ppm on les note H-4b, H-4a respectivement.
- Ce groupement corréle avec le carbone à $\delta = 26,5$ ppm porteur du proton à $\delta = 1,46$ ppm on le note H-5 , cette corrélation est confirmée dans le spectre Cosy (**Spectre 2.8**) par une tache de corrélation entre les protons H-4 ($1,56$ et $2,02$ ppm) et H-5 ($1,46$ ppm).
- Ce dernier (C-5) montre une autre tache de corrélation avec le proton à $\delta = 3,47$ ppm, ça nous a permis de le noter H-6.
- Une jonction entre le carbone porteur du proton H-6 à $\delta = 90,1$ ppm et le proton anomère H-1', conforte l'attachement du glucose à cette position.

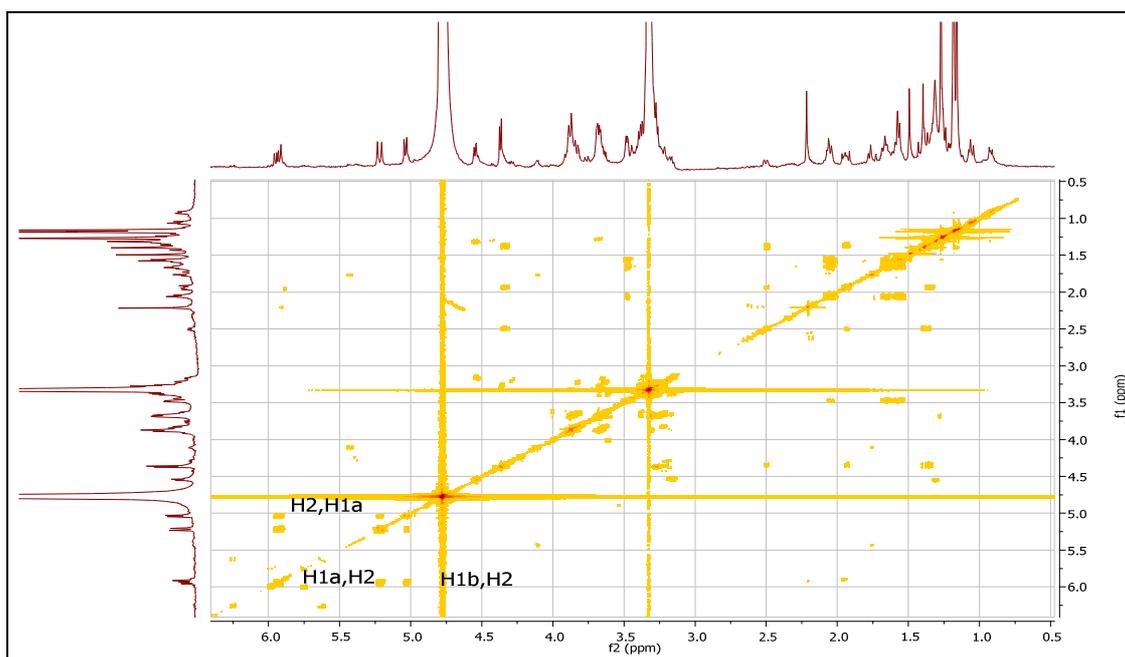


Spectre 2.7.1. Spectre HMBC ^1H , ^{13}C du composé **Tm-2** (600 MHz, MeOH- d_4).

Le spectre HMBC (**Spectre 2.7.1**) révèle aussi des taches de corrélations entre les groupements méthyles $\text{CH}_3\text{-8}$, $\text{CH}_3\text{-9}$ et le carbone localisé à $\delta = 73,6$ ppm attribuable au C-7 et le groupement $\text{CH}_3\text{-10}$ avec le carbone attribuable au C-2.



Spectre 2.7.2. Spectre HMBC ^1H - ^{13}C du composé **Tm-2** (600 MHz, MeOH-d_4)



Spectre 2.8. Spectre Cosy ^1H - ^1H du composé **Tm-2** (600 MHz, MeOH-d_4)

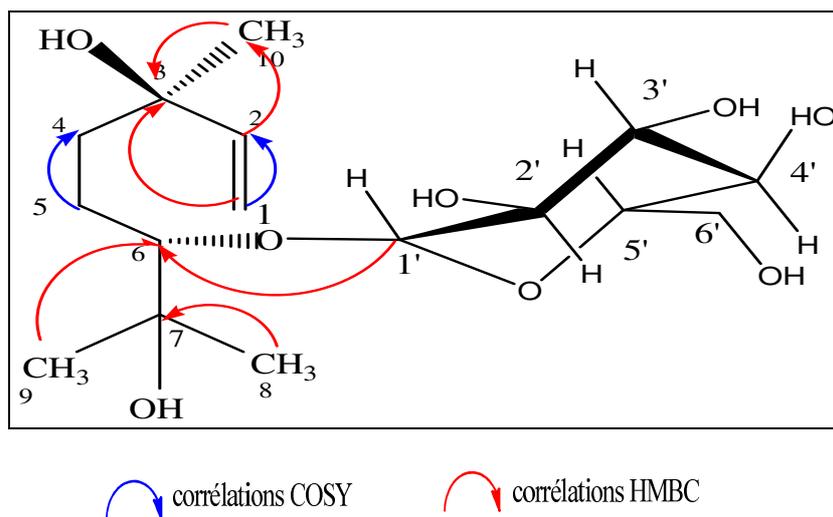


Figure II.10. Corrélations HMBC et Cosy **Tm-2**

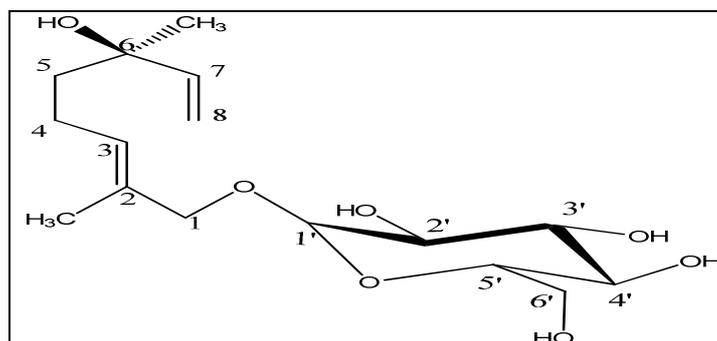
L'ensemble des données spectroscopiques est regroupé dans le tableau II.22.

Tableau II.22. Déplacements chimiques en RMN ^1H , RMN ^{13}C du produit **Tm-2**

Position	$\delta\text{H}(\text{ppm})$, <i>mult</i> , $J(\text{Hz})$	δC (ppm)
1a	5,01, <i>d</i> , 10	111,5
1b	5,20, <i>d</i> , 17	
2	5,93, <i>dd</i> , 17 ; 10	145,5
3	-	73,6
4	1,56, <i>m</i>	38,9
	2,05, <i>m</i>	
5	1,46, <i>m</i>	26,5
6	3,47, <i>m</i>	90,1
7	-	73,6
8	1,18, <i>s</i>	24,3
9	1,10, <i>s</i>	26,5
10	1,27, <i>s</i>	27,8
Glucose		
1'	4,36, <i>d</i> , 8	105,1
2'	3,24	75,0
3'	3,38	78,0
4'	3,31	71,5
5'	3,31	78,0
6'	3,66, <i>dd</i> , 11,7 ; 6,2	62,6
	3,87, <i>dd</i> , 12 ; 2	

Ces données spectrales et par comparaison de la littérature [2] nous ont permis d'identifier le composé **Tm-2** en tant que : 3,7- diméthyl-1-octène-3,6,7-triol-6-*O*- β -D-glucopyranoside.

2.1.3. Détermination structurale du composé Tm-3

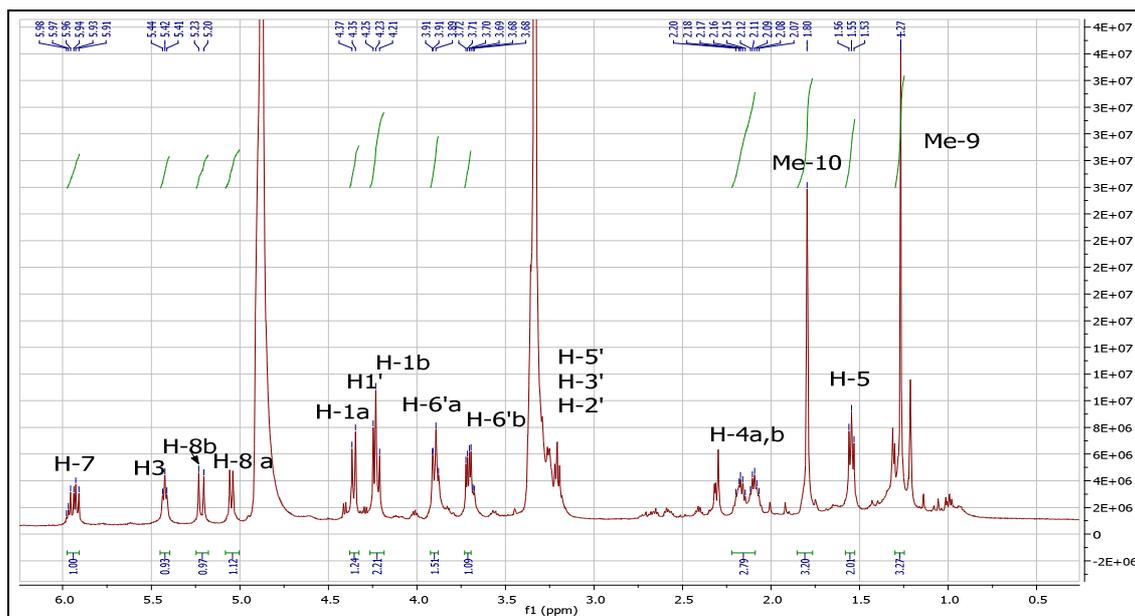


Betulabuside B.

Le spectre de masse obtenu par ESI-MS (mode positif), donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 373 $[M+Na]^+$; en accord avec une masse moléculaire de 350 Da et une formule brute en $C_{16}H_{30}O_8$.

Le spectre RMN¹H (**Spectre2.9**), et le spectre HSQC (**Spectre2.10**) à 600 MHz réalisés dans MeOH-d₄ indiquant la présence de :

- Deux singlets à $\delta = 1,26$ et $1,78$ ppm d'intégration 3H chacun, porté par les carbones $\delta = 26,1$ et $21,3$ ppm respectivement indiquant la présence de deux groupements méthyles.
- Un triplet à $\delta = 1,52$ ppm d'intégration 2H, porté par le carbone $\delta = 44,0$ ppm indiquant la présence d'un méthylène.
- Deux multiplets à $\delta = 2,06$ et $2,16$ ppm d'intégration un 1H chacun, portés par le même carbone à $\delta = 21,2$ ppm, indiquant un groupement méthylène.
- Deux doublets à $\delta = 4,20$ et $4,37$ ppm d'intégration un 1H chacun ($J=11,1$ Hz), portés par le même carbone à $\delta = 67,6$ ppm, attribuable à un CH1a-O et CH1b-O respectivement.
- Un doublet de doublets résonne à $\delta = 5,93$ ppm (1H, *dd*, $J=18 ; 10$ Hz) ($146,2$ ppm) attribuable au CH éthylénique ; deux doublets larges : le premier à $\delta = 5,05$ ppm (1H, *d*, $J=10$ Hz) et le second à $\delta = 5,27$ ppm (1H, *d*, $J=18$ Hz), attribuable au CH₂ ($111,5$ ppm) éthylénique ; montrant un couplage *cis* et *trans* avec le CH ($\delta = 5,93$ ppm) éthylénique précédent.
- Un triplet à $\delta = 5,44$ ppm ($J=7$ Hz) d'intégration 1H, porté par le carbone à $\delta = 131,2$ ppm, attribuable à un CH éthylénique.

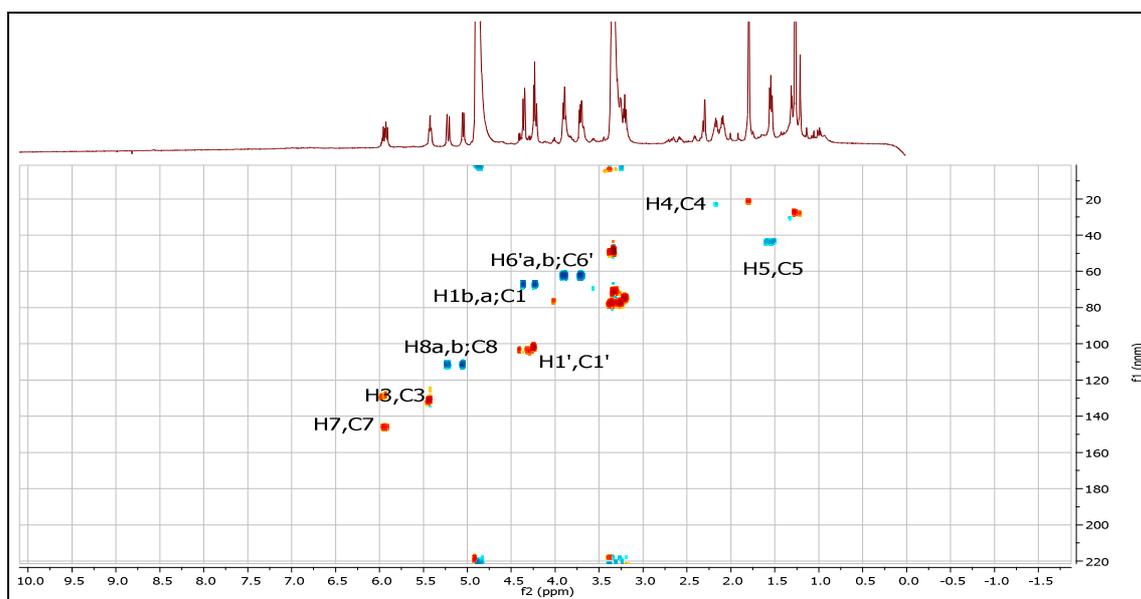


Spectre 2.9. Spectre RMN ^1H du composé **Tm-3** (600 MHz, MeOH- d_4)

Les spectres RMN ^1H et HSQC montrent également :

Un doublet centré à $\delta = 4,25$ ppm (1H, $J = 8$ Hz) porté par le carbone résonant à $\delta = 102,4$ ppm attribuable au proton anomère d'un glucose.

Deux doublet de doublets d'intégration 1H chacun, à $\delta = 3,89$ ppm (dd , $J = 11,8; 1,8$ Hz) et $\delta = 3,70$ ppm (dd , $J = 11,7; 6,2$ Hz), attribuable à H-6'a, H-6'b respectivement



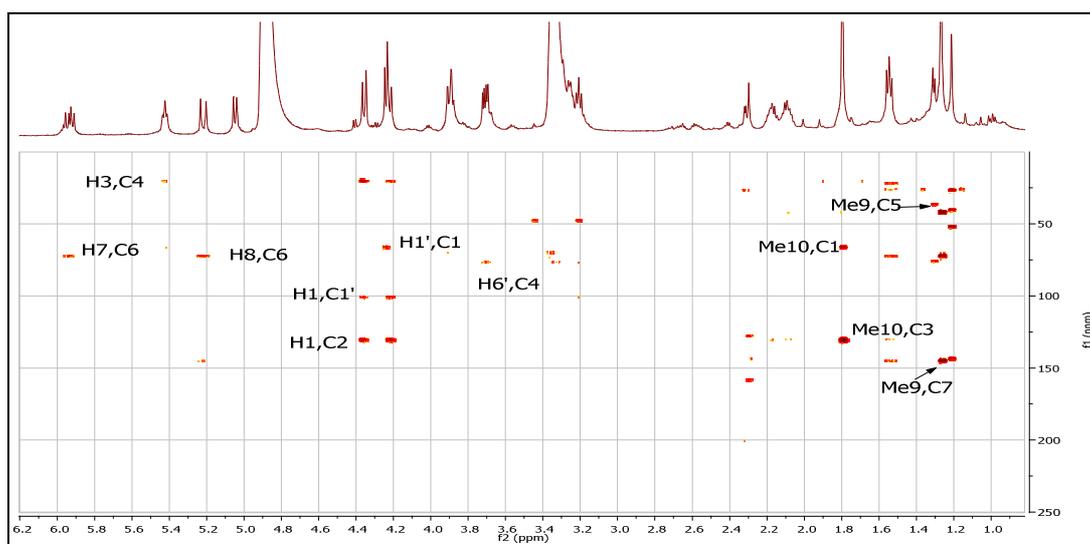
Spectre 2.10. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C du composé **Tm-3** (600 MHz, MeOH- d_4)

Le spectre relatif à l'expérience HMBC (**Spectre 2.11**) montre :

-Une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1' et le carbone à $\delta = 67,6$ ppm attribuable au C-1, la valeur de son déplacement chimique confirme la liaison avec le sucre par un pont oxygéné.

-Des taches de corrélation entre les protons H-1a et H-1b de la fonction alcool et un carbone quaternaire à $\delta = 131,0$ ppm, la présence de ces corrélations permet de noter ce dernier C-2.

Le proton oléfinique à $\delta = 5,44$ ppm est aussi corrélé avec ce dernier ($\delta = 131,0$ ppm) alors que le carbone porteur ($\delta = 131,2$ ppm) de ce proton est noté C-3.



Spectre 2.11. Spectre HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ du composé **Tm-3** (600 MHz, MeOH- d_4)

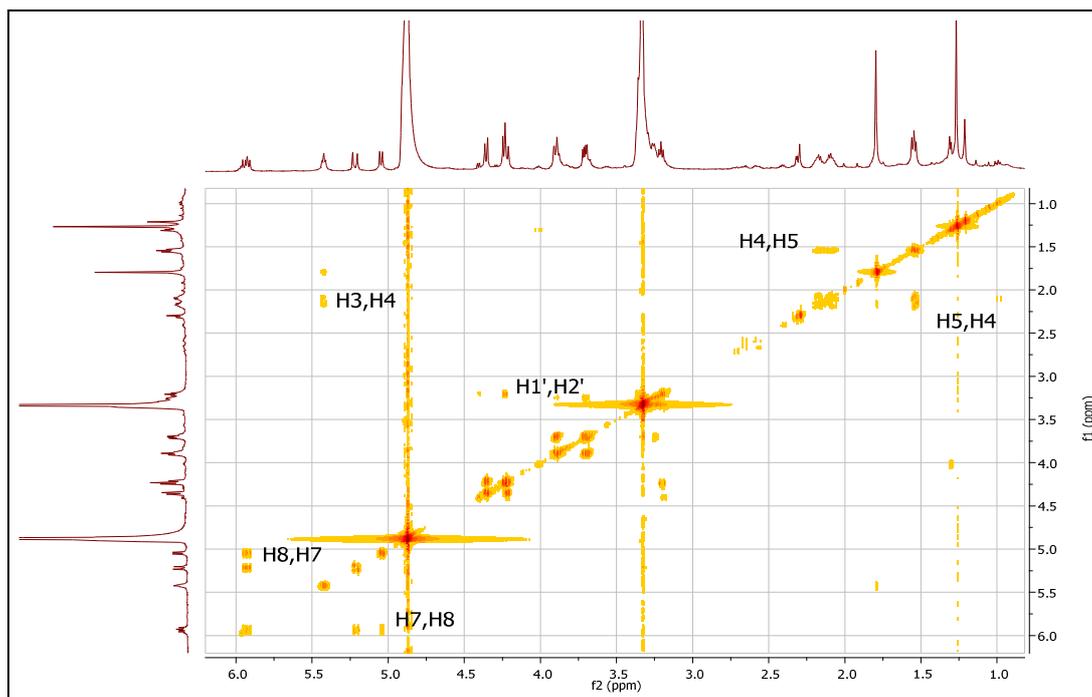
Ainsi l'expérience Cosy (**Spectre 2.12**) révèle :

-Une tache de corrélation entre le proton oléfinique H-3 ($\delta = 5,44$ ppm) et les protons du groupement méthylène ($\delta = 1,78$ et $2,16$ ppm) consolidant l'attribution de ces protons aux H-4a et H-4b.

-Un couplage entre les protons H-4 et le groupement méthylène à $\delta = 1,52$ ppm, qui n'est autre que le H-5.

Cette partie est liée à la deuxième fonction oléfinique par le carbone quaternaire C-6 à $\delta = 73,2$ ppm, cette liaison est confirmée par la tache de corrélation dans la HMBC de C-6 et les protons méthylènes H-5 et éthylénique à $\delta = 5,93$, ppm qui sont attribuables à C-7 et C-8 respectivement, aussi la valeur de déplacement chimique du C-6 montre la substitution de ce dernier par un groupement hydroxyle.

Les deux groupements méthyles sont liés : le premier CH_3 -9 ($\delta = 1,26$ ppm) à C-6 et le second CH_3 -10 ($\delta = 1,78$ ppm) à C-2, confirmés par les taches de corrélations dans la HMBC.



Spectre 2.12. Spectre Cosy ^1H - ^1H du composé **Tm-3** (600 MHz, MeOH- d_4)

La corrélation entre H-8 et H-7 est aussi remarquée dans le spectre Cosy.

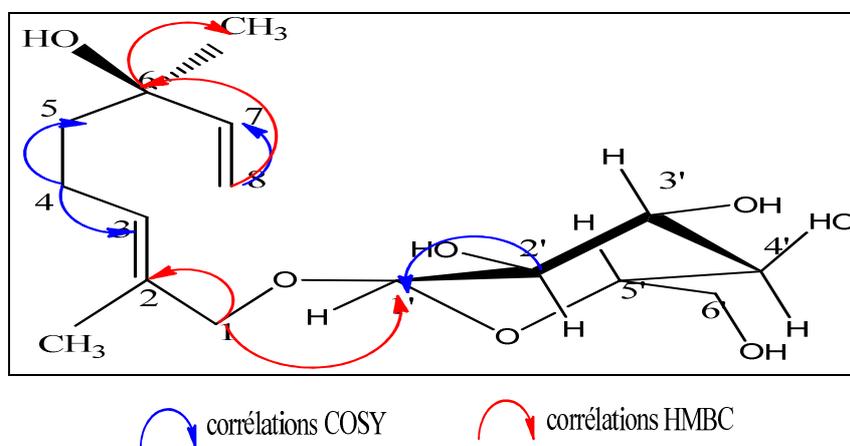


Figure II.11. Corrélations HMBC et Cosy **Tm-3**

L'ensemble des données spectroscopiques est regroupé dans le tableau II.23.

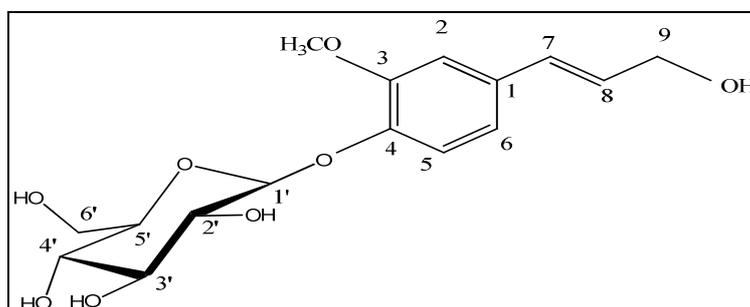
Tableau II.23. Déplacements chimiques en RMN ¹H et RMN ¹³C du produit **Tm-3**

Position	$\delta H(\text{ppm}), \text{mult}, J(\text{Hz})$	$\delta C(\text{ppm})$
1a	4, 20, <i>d</i> , 11,1	67,6
1b	4,37, <i>d</i> , 11,1	-
2	-	131,0
3	5,44, <i>t</i> , 7	131,2
4a	2,08	21,2
4b	2,16	
5	1,52	44,0
6	-	73,2
7	5,93, <i>dd</i> , 18 ; 10	146,2
8a	5,05, <i>d</i> , 10	111,5
8b	5,27, <i>d</i> , 18	
CH ₃ -9	1,26	26,1
CH ₃ -10	1,78	21,3
Glucose		
1'	4,25, <i>d</i> , 8	102,4
2'	3,19	74,5
3'	3,39	77,9
4'	3,32	71,5
5'	3,27	77,5
6'	3,70, <i>dd</i> , 11,7 ; 6,2	63,3
	3,89, <i>dd</i> , 11,8 ; 1,8	

Ces données spectrales et par comparaison de la littérature [3] mènent à l'identification du composé **Tm-3** comme étant : betulabuse B.

2.2. Détermination structurale des composés de type phénylpropanoïde

2.2.1. Détermination structurale du composé Tm-5

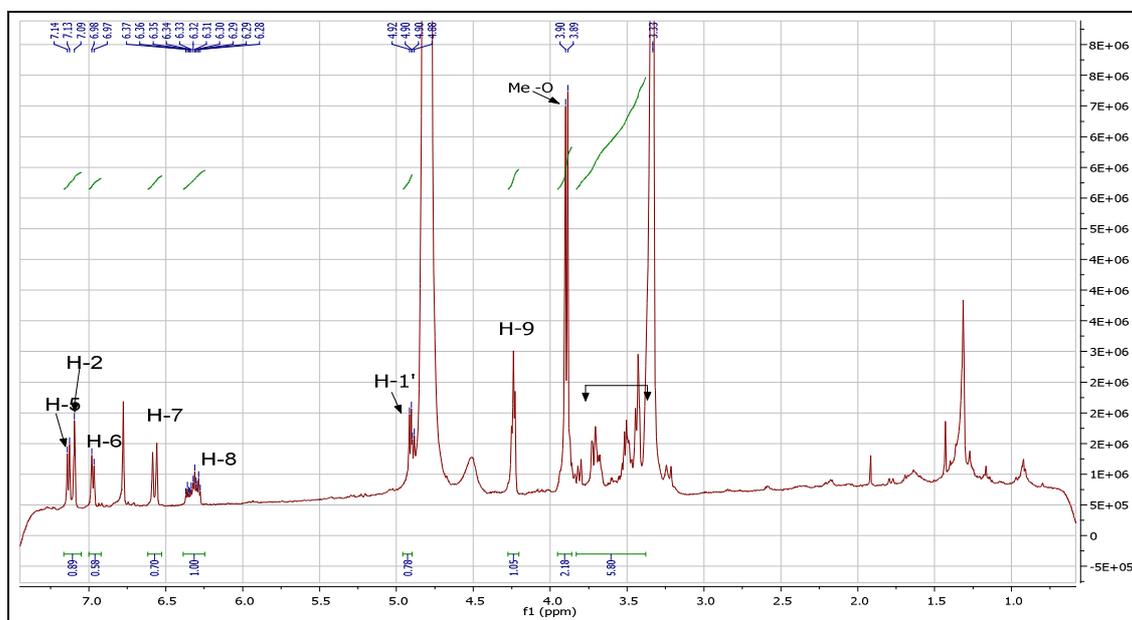


Confirine.

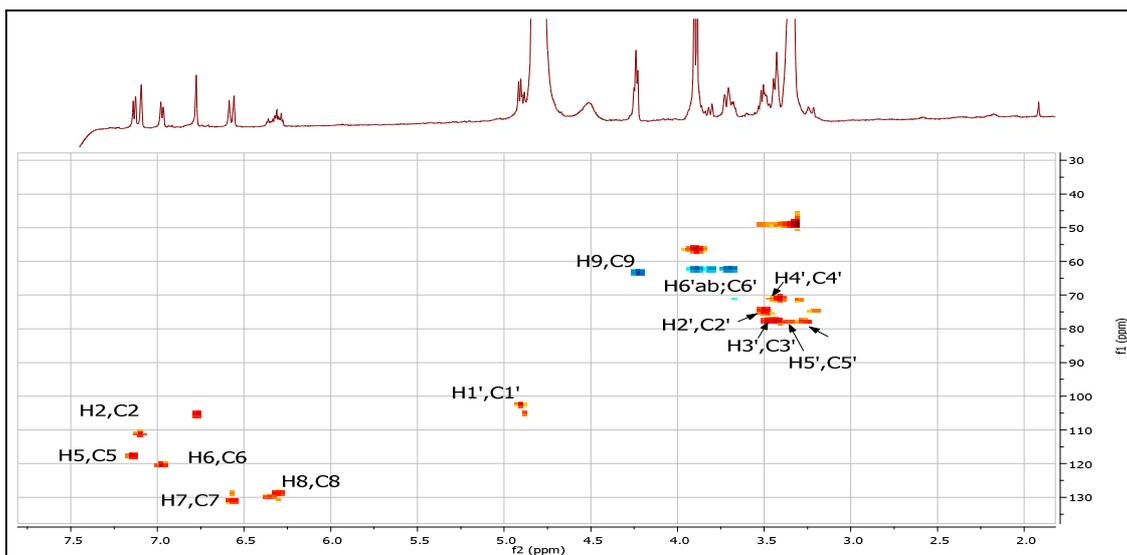
Le composé **Tm-5** a été isolé sous forme de mélange avec le composé **Tm-6**. Les spectres RMN ^1H , HSQC (Spectre 2.14) et HMBC (Spectre 2.15) du mélange ont permis d'extraire les signaux ^1H et ^{13}C spécifiques à **Tm-5** ; Ceux-ci mettent en évidence la présence d'un phénylpropanoïde glucoside.

Les signaux correspondant de ce produit indiquent la présence de :

-Trois signaux à $\delta = 7,14$ ppm (1H, *dd*, $J = 8,1$ et $1,8$ Hz), $7,05$ ppm (1H, *s*) et $6,98$ ppm (1H, *d*, $J = 8,1$ Hz) correspondent à trois protons du cycle aromatique tri-substitué, portés par les carbones résonant à $\delta = 117,7$, $111,3$ et $120,7$ ppm respectivement grâce à l'expérience HSQC.



Spectre 2.13. Spectre RMN ^1H signaux relatifs au composé **Tm-5** (600 MHz, MeOH- d_4)

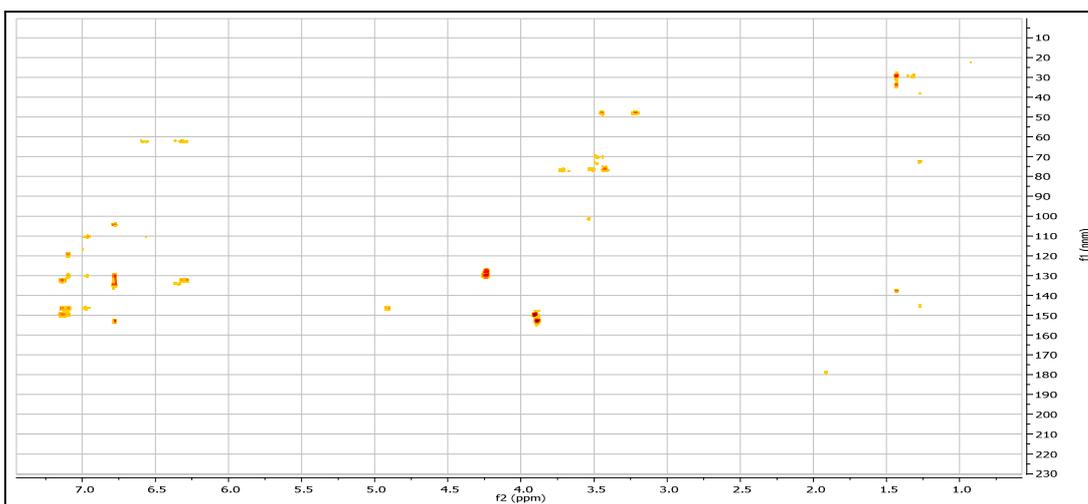


Specre 2.14. Specre HSQC ^1H - ^{13}C ; corrélations relatifs du composé **Tm-5** (600 MHz, MeOH- d_4)

Les mesures sur le spectre HMBC nous ont permis de démontrer que :

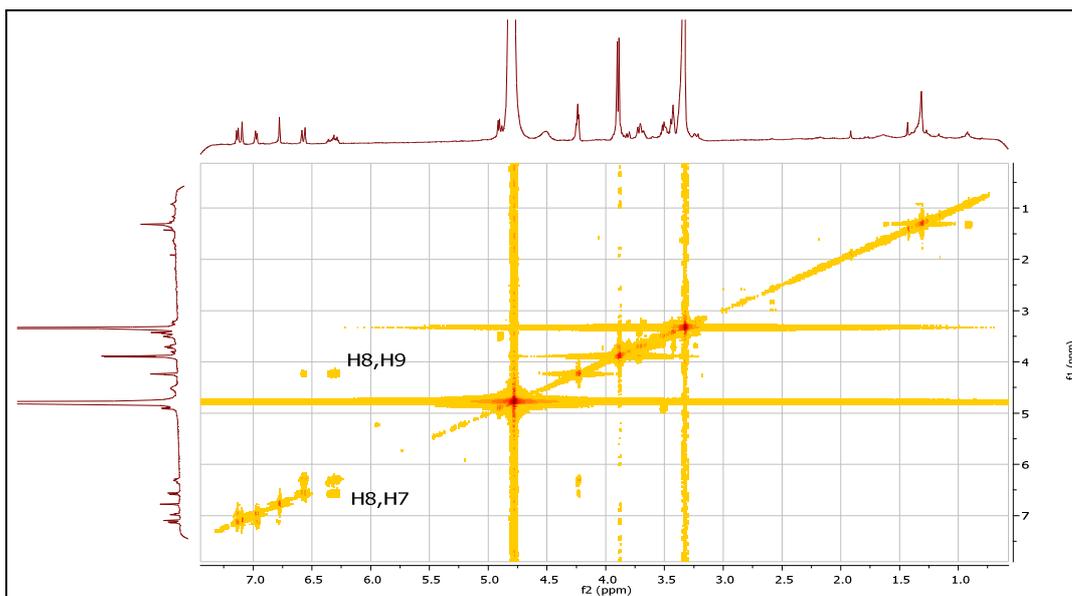
- Le proton éthylénique situé à $\delta = 7,14\text{ppm}$ corrèle avec les carbones à $\delta = 132,7$; $146,7$ et 150 ppm attribuables aux carbones aromatiques C-1, C-4 et C-3 respectivement ; et le proton est noté H-5.
- Une jonction d'attachement entre le proton à $\delta = 7,05\text{ppm}$ et les carbones résonnant à $\delta = 132,7$; $146,7$ et $150,0$ ppm attribuables aux C-1, C-4 et C-3. on le note H-2.
- Le proton éthylénique situé à $\delta = 6,98\text{ppm}$ (H-6) corrèle avec les carbones résonnant à $\delta = 111,3$; $130,0$ et $146,7\text{ppm}$ attribuables aux C-2, C-1 et C-4.
- Un signal à $\delta = 3,85$ ppm (3H) caractéristique d'un groupement méthoxye montre une corrélation avec le carbone à $\delta = 150$ ppm attribuable au C-3.
- Une entité sucre présentée par un doublet à $\delta = 4,90$ ppm (1H, d , $J = 8$ Hz) porté par le carbone résonnant à $\delta = 103,1$ ppm, attribuable à un β -glucose. La tache de corrélation entre H-1' et le carbone localisé à $\delta = 146,7$ ppm (C-4) consolide l'attachement au cycle aromatique par ce carbone et par un pont oxygéné vu la valeur de déplacement chimique du carbone anomère (103,1 ppm).
- Deux signaux d'intégration 1H chacun, attribuables respectivement à H-6'a, H-6'b à $\delta = 3,92$ ppm (dd , $J = 12,0$; $1,8$ Hz) et $\delta = 3,72$ ppm (dd , $J = 12$; $6,0$ Hz).
- Un ensemble de multiplets dans l'intervalle $3,30 - 3,36$ ppm attribuable aux protons 2', 3', 4', 5' du substituant sucre.
- Deux doublets à $\delta = 6,58$ et $6,32$ ppm intégrant chacun pour 1H, apparaissent couplés entre eux ($J = 15,8$ Hz) et correspondent à une double liaison, attribuables aux H-7 et H-8 respectivement.

Ce spectre montre également une jonction entre le carbone C-1 (132,7 ppm) du cycle aromatique et le proton éthylénique H-8, ce dernier présente une tache de corrélation avec le carbone à $\delta = 63,6$ ppm porteur des protons à $\delta = 4,24$ ppm (2H, *dd*, $J = 1,5$ et $5,5$ Hz) attribuable au H-9 qui est substitué par un hydroxyle.

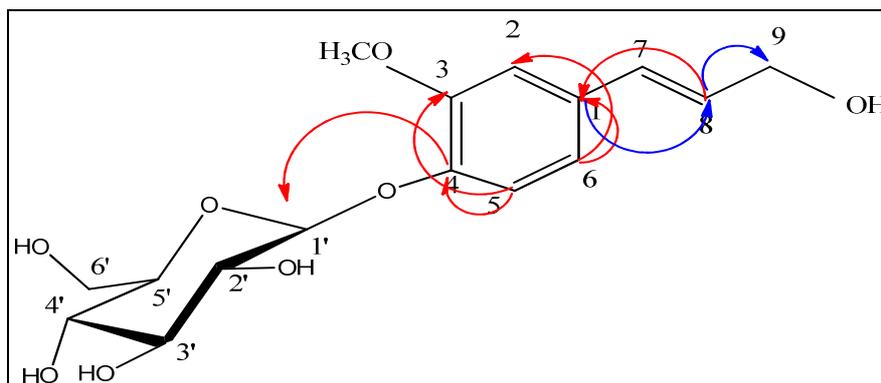


Spectre 2.15. Spectre HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$; corrélations relatifs au composé **Tm-5**
(600 MHz, MeOH- d_4)

- Le spectre relatif à la mesure Cosy (**Spectre 2.16**) confirme cet enchainement par la jonction entre H-7/H-8 et H8/H-9.



Spectre 2.16. Spectre Cosy $^1\text{H}-^1\text{H}$; corrélations relatifs au composé **Tm-5**(600 MHz, MeOH- d_4)

Figure II.12. Corrélations HMBC et Cosy **Tm-5**

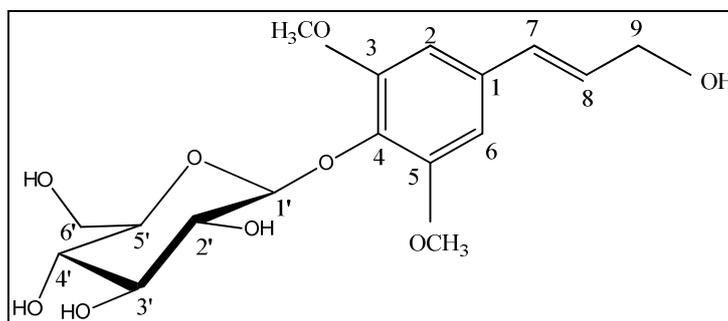
L'ensemble des données spectroscopiques est regroupé dans le tableau II.24

Tableau II.24. Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du produit **Tm-5**

Position	$\delta\text{H}(\text{ppm})$, mult, $J(\text{Hz})$	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
1	-	132,7
2	7,05	111,3
3	-	150,0
4	-	146,7
5	7,14, <i>d</i> , 8,1	117,7
6	6,98, <i>d</i> , 8,1	120,7
7	6,58, <i>d</i> , 15,8	131,1
8	6,32, <i>d</i> , 15,8	128,5
9	4,25, <i>dd</i> , 5,2	63,6
10(O-CH₃)	3,85	55,9
Glucose		
1'	4,90, <i>d</i> , 8,0	102,7
2'	3,50	75,2
3'	3,49	77,8
4'	3,42	70,5
5'	3,42	78,2
6'	3,89, <i>dd</i> , 12 ; 1.8 3,70, <i>dd</i> , 11.7 ; 6	62,7

Les données spectrales que nous avons obtenues sont en accord avec celles de la littérature [4] pour cette molécule et nous ont permis d'identifier le composé **Tm-5** comme étant : la confirine.

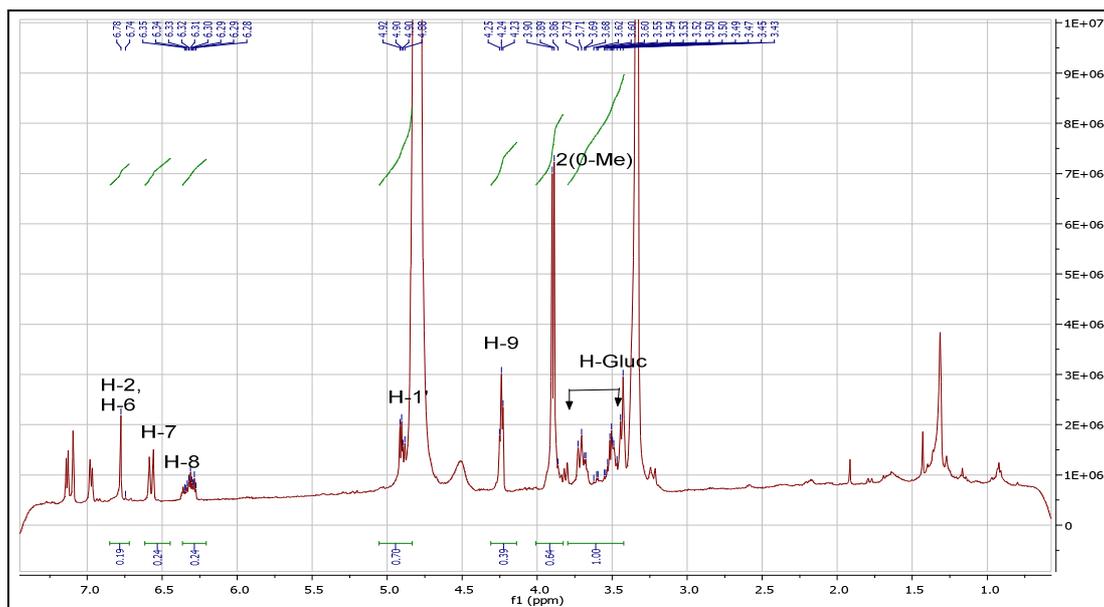
2.2.1. Détermination structurale du composé Tm-6



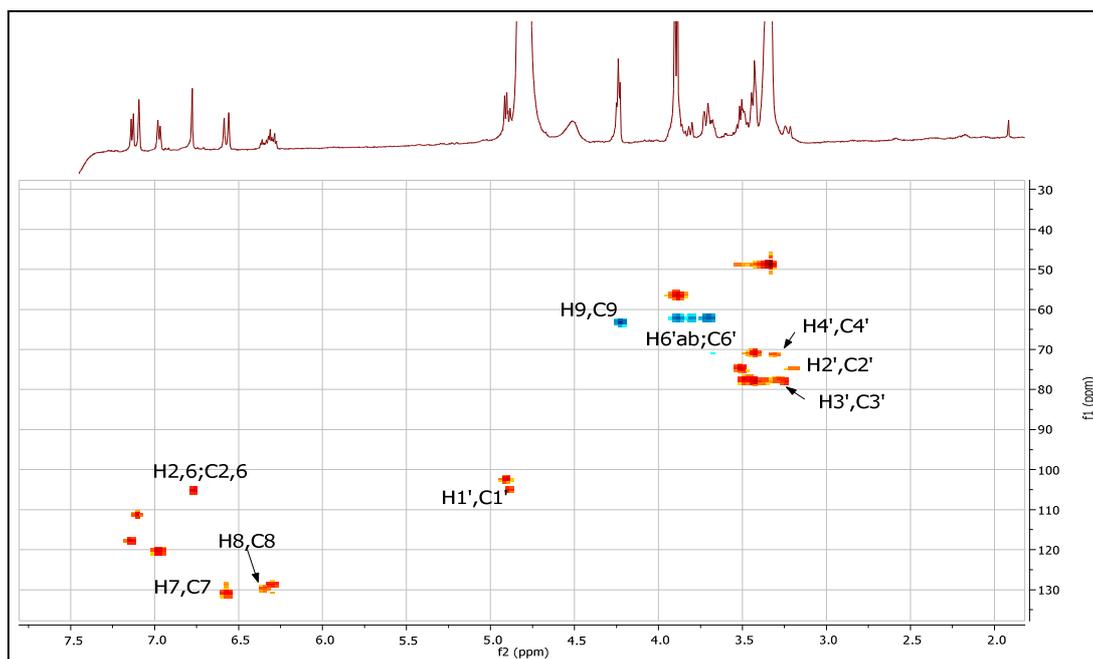
Syringine.

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre 2.17) et la séquence HSQC (Spectre 2.18) à 600 MHz réalisés dans MeOH- d_4 montrent la présence des signaux caractéristiques d'un noyau aromatique tétra-substitué dont :

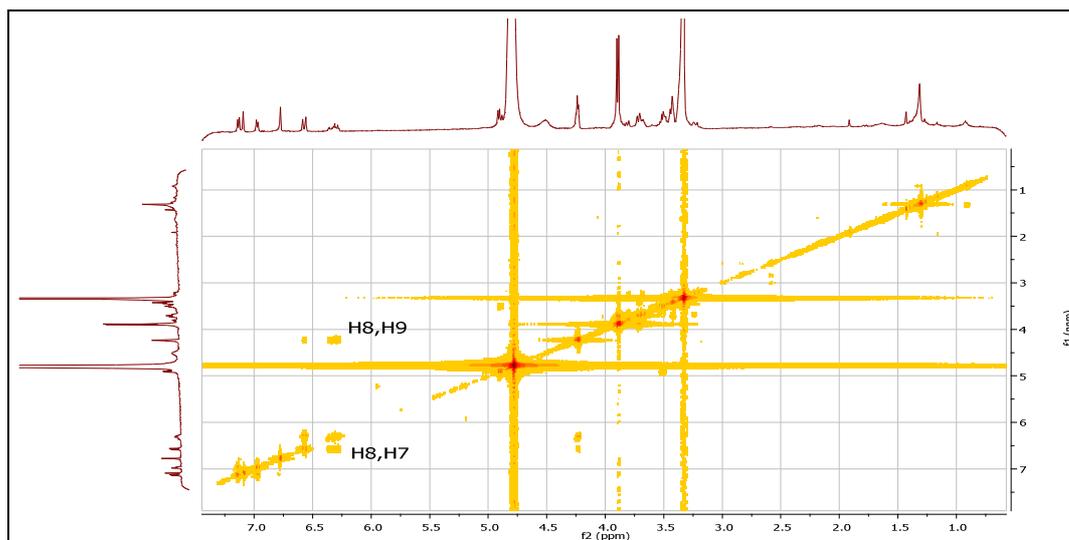
- Un singulet à $\delta = 6,77$ ppm d'intégrations 2 H, attribuable aux protons aromatiques H-2/H-6.
- Un singulet à $\delta = 3,85$ ppm d'intégration 6 H, attribuable aux deux groupements méthoxyles portés par les carbones résonnant à $\delta = 55,9$ ppm.
- Un doublet centré à $\delta = 4,90$ ppm (1H, *d*, $J = 8$ Hz), porté par le carbone résonnant à $\delta = 103,1$ ppm, attribuable au H-1' anomérique d'un β -glucose.
- Un doublet à $\delta = 6,58$ ppm porté par le carbone résonnant à $\delta = 131,1$ ppm d'intégration un H (*d*, $J = 15,8$ Hz), attribuable au CH éthylénique (H-7) ; un autre doublet à $\delta = 6,35$ ppm (*d*, $J = 15,8$ Hz), porté par le carbone résonnant à $\delta = 129,8$ ppm attribuable un CH éthylénique (H-8) montrant un couplage *trans* avec le H-7.
- Un multiplet à $\delta = 4,24$ ppm d'intégration 2H, portés par le carbone résonnant à $\delta = 63,6$ ppm attribuable au CH alcool ; CH₂O (H-9).



Spectre 2.17. Spectre RMN ^1H ; signaux relatifs au composé **Tm-6** (600 MHz, MeOH- d_4)



Spectre 2.18. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C ; corrélations relatifs au composé **Tm-6** (600 MHz, MeOH- d_4)



Spectre 2.19. Spectre Cosy ^1H - ^1H du composé **Tm-6** (600 MHz, MeOH- d_4)

L'ensemble des données spectroscopiques est regroupé dans le tableau II.25

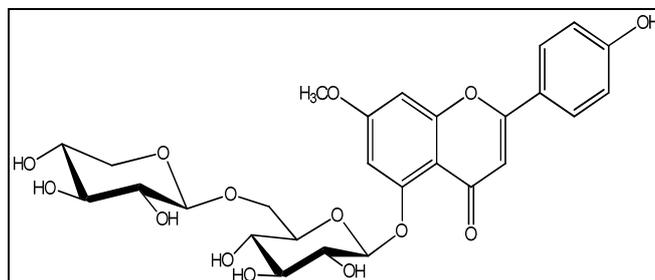
Tableau II.25. Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du produit **Tm-6**

Position	$\delta\text{H}(\text{ppm})(\text{mult}),J(\text{Hz})$	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
1	-	130,0
2	6,77	105,3
3	-	153,0
4	-	135,1
5	-	153,0
6	6,77	105,3
7	6,58, <i>d</i> , 15,8	131,1
8	6,35, <i>d</i> , 15,8	129,8
9	4,25, <i>dd</i> , 5,2	63,6
10(O-CH₃)	3,87	55,9
11(O-CH₃)	3,87	55,9
Glucose		
1'	4,87, <i>d</i> , 8,0	105,3
2'	3,19	75,2
3'	3,24	78,2
4'	3,31	71,8
5'	3,24	78,2
6'	3,63, <i>dd</i> , 11 ; 2 3,88, <i>dd</i> , 11,7 ; 6	62,3

Les données spectrales que nous avons obtenues sont en accord avec celles de la littérature [5] pour cette molécule et nous ont permis d'identifier le composé **Tm-6** comme étant : la syringine.

2.3. Détermination structurale des composés de type Flavonoïdes

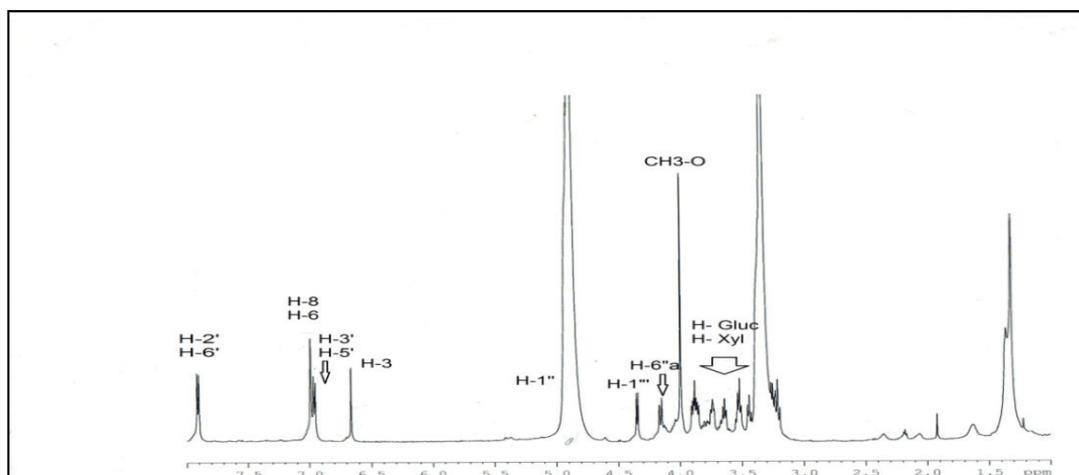
2.3.1. Détermination structurale du composé Tm-7



Yuankanin.

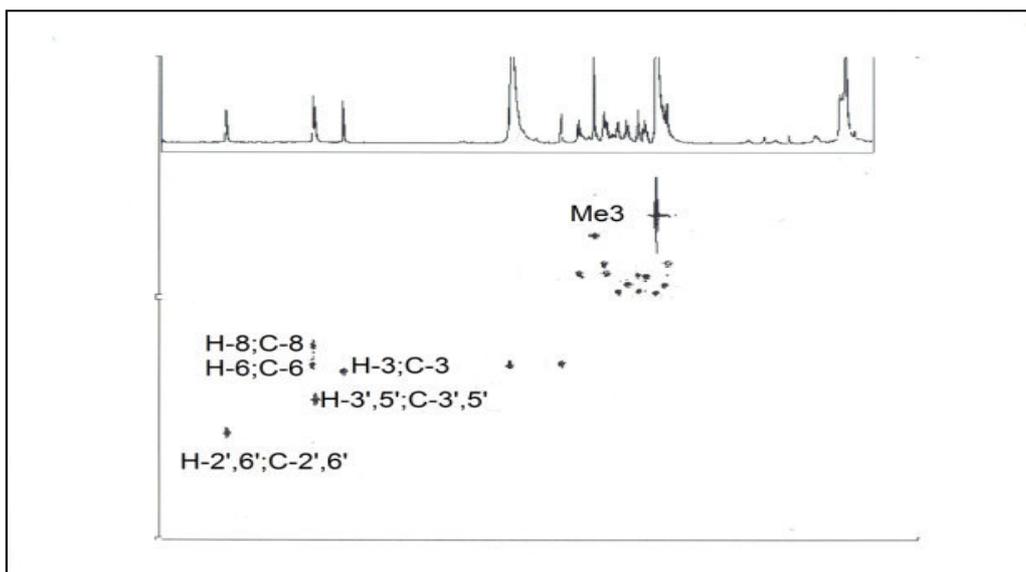
Le composé **Tm-7** a été obtenu à l'état pur sous forme des cristaux blancs. Le spectre de masse réalisé ESI-MS (mode négatif), présente un pic pseudo moléculaire m/z 577 $[M-H]^-$ en accord avec une masse moléculaire de 578 Da qui correspond à une formule brute $C_{25}H_{26}O_6$. La fluorescence noir violet sous lumière de Wood. Le spectre RMN¹H réalisé dans MeOH-d₄ (**Spectre 2.20**) indique la présence:

- Deux doublets à $\delta = 7,90$ ppm ($J = 8,7$ Hz) et à $\delta = 6,94$ ppm ($J = 8,7$ Hz) d'intégration 2H chacun, formant un système AM correspondant respectivement aux protons H-2', H-6' et H-3', H-5', indiquant une oxygénation du noyau B en position 4' d'un flavonoïde.
- Un doublet à $\delta = 6,97$ ppm d'intégration 2H, relatif au H-6 et H-8 du noyau A d'un flavonoïde.
- Un singulet à $\delta = 6,66$ ppm d'intégration 1H attribuable au H-3, ce qui oriente vers la structure d'une flavone confirmé par la fluorescence noir violet sous lumière de Wood.
- Un singulet à $\delta = 3,96$ ppm d'intégration 3H, est typique d'un groupe méthoxyle.

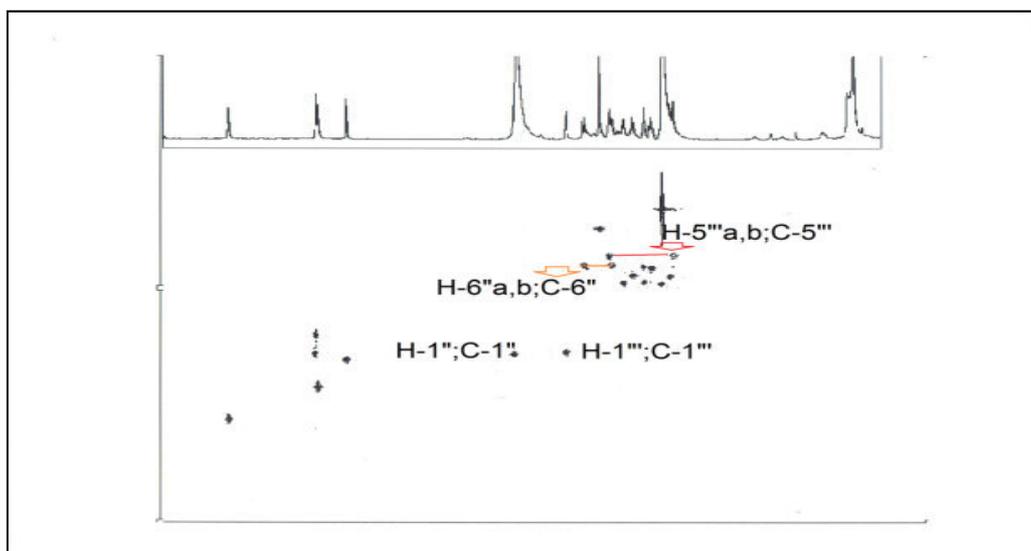


Spectre 2.20. Spectre RMN¹H du composé **Tm-7** (600 MHz, MeOH-d₄)

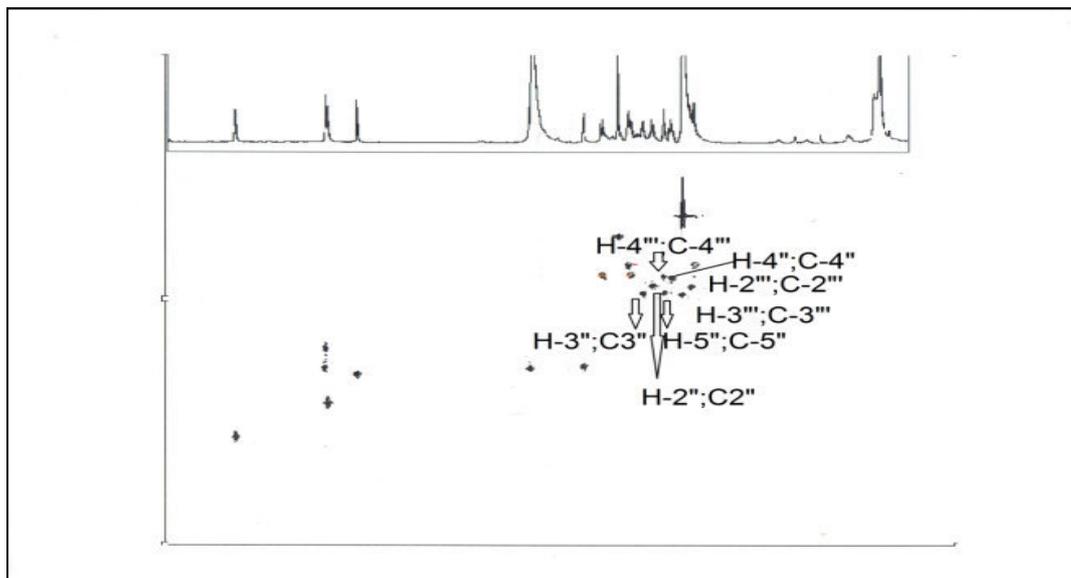
Le spectre montre également un doublet à $\delta = 4,90$ ppm ($J = 7,2$ Hz) et un autre à $\delta = 4,35$ ppm ($J = 7,2$ Hz) ; correspondant aux protons anomérique du glucose et xylose respectivement, la position d'attachement inter glycosidique 1-6 est identifiée par les données spectrales du HSQC (Spectre 2.21), expliqué par le déblindage du carbone C-6'' du glucose par l'effet β ainsi confirmé par la tache de corrélation de ce dernier par le proton anomérique du xylose H-1''' en HMBC (Spectre 2.23).



Spectre 2.21.1. Spectre HSQC¹H-¹³C du composé **Tm-7** (600 MHz, MeOH-d₄)



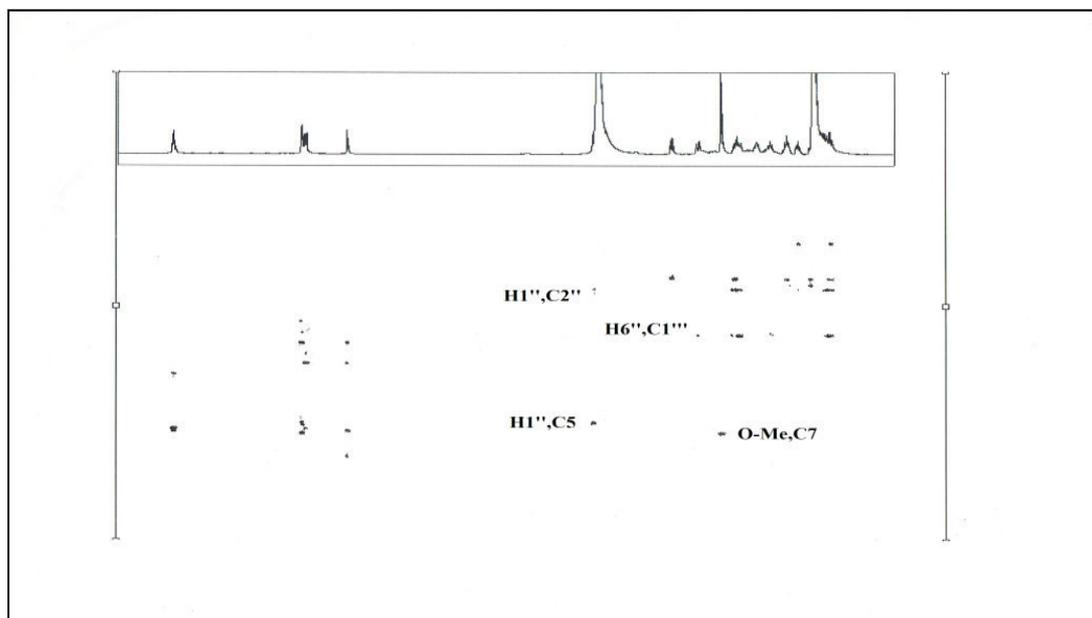
Spectre 2.21.2. Spectre HSQC¹H-¹³C du composé **Tm-7** (600 MHz, MeOH-d₄)



Spectre 2.22. Spectre HSQC¹H-¹³C du composé **Tm-7**(600 MHz, MeOH-d₄)

Par ailleurs; cette expérience montre une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1'' et le carbone localisé à $\delta_c = 159,8\text{ppm}$ attribuable au H-5 du cycle A par un pont oxygéné vu la valeur du déplacement de C-1'' (104,6ppm).

-Une autre tache de corrélation entre le groupe méthoxy et le carbone localisé à $\delta_c = 165,8\text{ppm}$ ce qui indique sa position au C-7 du cycle A de l'aglycone.



Spectre 2.23. Spectre HMBC¹H-¹³C du composé **Tm-7**(600 MHz, MeOH-d₄)

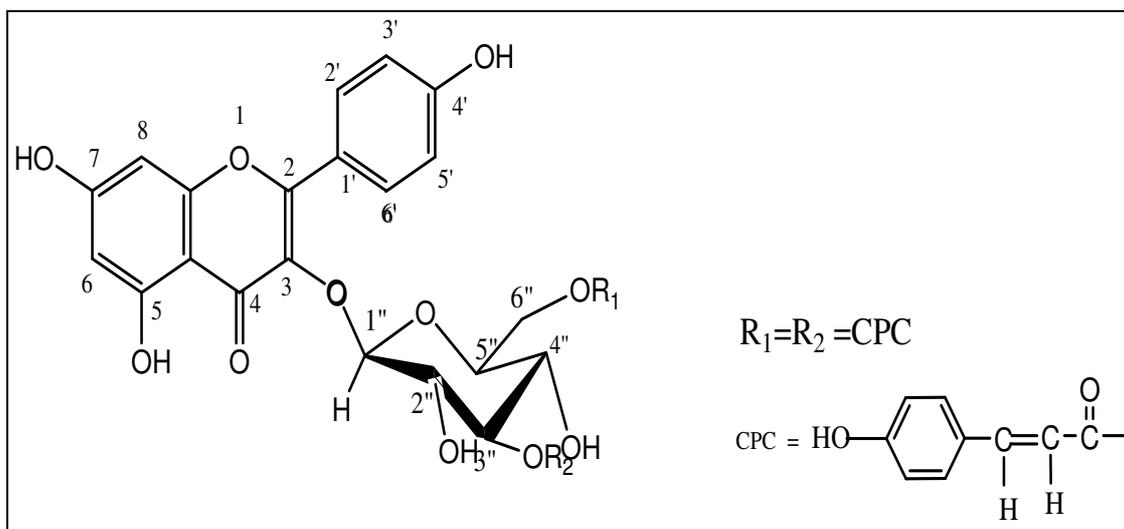
L'ensemble des données spectroscopiques est regroupé dans le tableau II.26

Tableau II.26. Déplacements chimiques en RMN 1H , RMN 13C et HMBC du produit **Tm-7**

Position	$\delta H(\text{ppm}), \text{mult}, J(\text{Hz})$	$\delta C(\text{ppm})$	HMBC
2	-	164,5	
3	6,66	104,5	C-1',C-2,C-3
4	-	180,1	
5	-	159,8	
6	6,97, d, 1,8	104,2	C-8
7-Me	3,97	56,5	C-7
8	6,97, d, 1,8	97,3	C-6
9	-	159,5	
10	-	109,0	
1'		122,7	
2'	7,97, d, 8,1	129,5	C-4', C-5'
3'	6,94, d, 8,1	117,1	
4'		162,7	
5'	6,94, d, 8,1	117,1	C-2', C-4'
6'	7,97, d, 8,1	129,5	
Glucose			
1''	4,90, d, 7,2	104,6	C-2'', C-5
2''	3,64	74,5	
3''	3,74	77,4	
4''	3,43	71,5	
5''	3,50	77,1	
6''	4,16. d. 10,5 3,85. dd. 10,5 ; 6	70,6	C-4'', C-1'''
Xylose			
1'''	4,35, d, 7,2	105,9	C-6''
2'''	3,25	74,5	
3'''	3,34	77,1	
4'''	3,53	70,6	
5'''	3,20, t, 11 3,88, dd, 11 ; 5,6	66,7	

Ces données spectrales et par comparaison de celles de la littérature [6] mènent à l'identification du composé **Tm-7** en tant que : yuankanin.

2.3.2. Détermination structurale du composé Tm-11



Kaempférol 3-O-(3'', 6''-di-O-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside.
Stenopalustroside A.

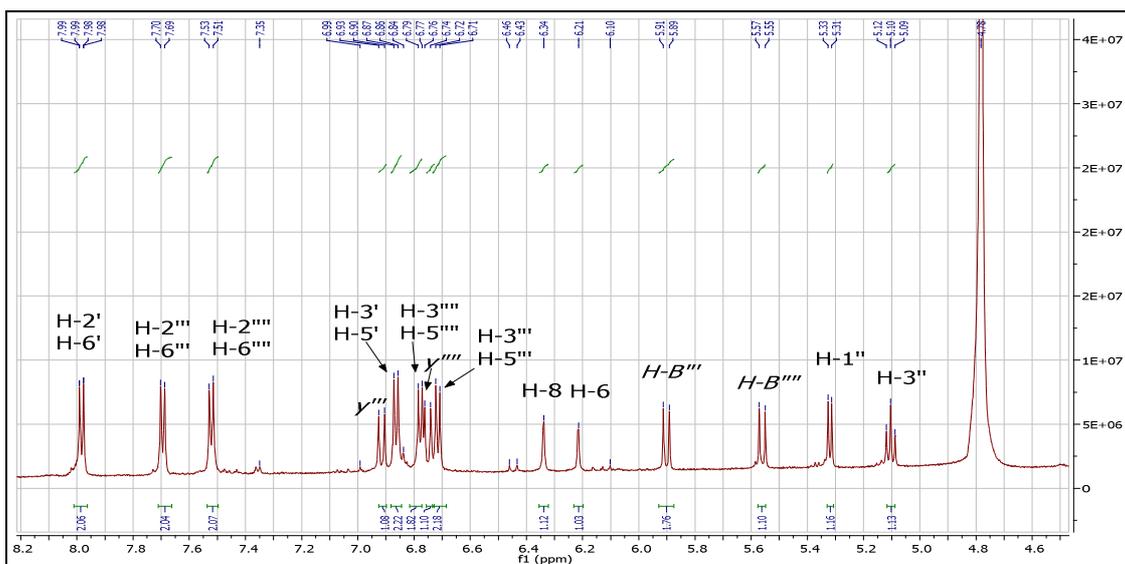
Le spectre de masse obtenu par ESI-MS (mode positif) de composé **Tm-11**, donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 741 $[\text{M}+\text{H}]^+$ en accord avec une masse moléculaire de 740 Da et une formule brute en $\text{C}_{39}\text{H}_{32}\text{O}_{15}$.

L'examen du spectre RMN ^1H (**Spectre 2.24**) et la séquence HSQC (**Spectre 2.25**) à 600 MHz réalisés dans $\text{MeOH}-d_4$ montrent la présence :

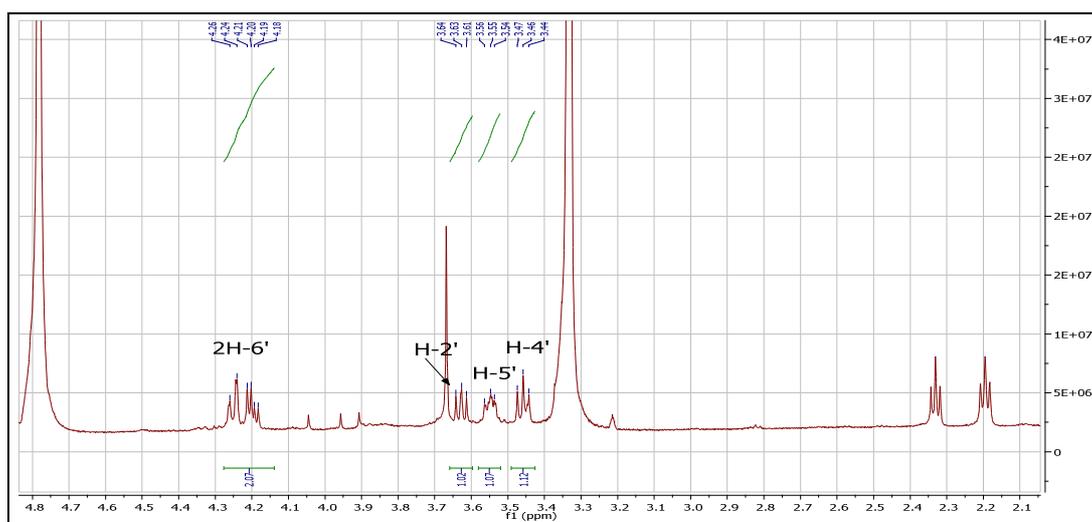
- Des signaux à $\delta = 6,19$ ppm (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz) et $\delta = 6,30$ ppm (1H, *d*, $J = 1,8$ Hz) localisés sur les carbones résonnant à $\delta = 100,4$ ppm et $\delta = 94,8$ ppm relatifs aux protons H-6 et H-8 respectivement et qui couplent en système AX caractéristiques d'un cycle A de flavonoïdes.

En effet les doublets à $\delta = 6,84$ ppm et $\delta = 7,96$ ppm ($J = 8,1$ Hz) d'intégration 2H pour chacun, sont attribuables à H-3', H-5' et H-2', H-6' respectivement, caractéristiques d'un cycle B des flavonoïdes ces données montrent que la partie aglycone est le kaempférol.

Le spectre montre également un doublet centré sur $\delta = 5,30$ ppm (1H, $J = 7,8$ Hz) (104,3 ppm) est attribuable au proton H-1'' d'un glucose la valeur de la constante de couplage observée montre un couplage di-axial avec le proton 2'' et suggère que ce sucre est sous la forme de β-D- glucopyranose.



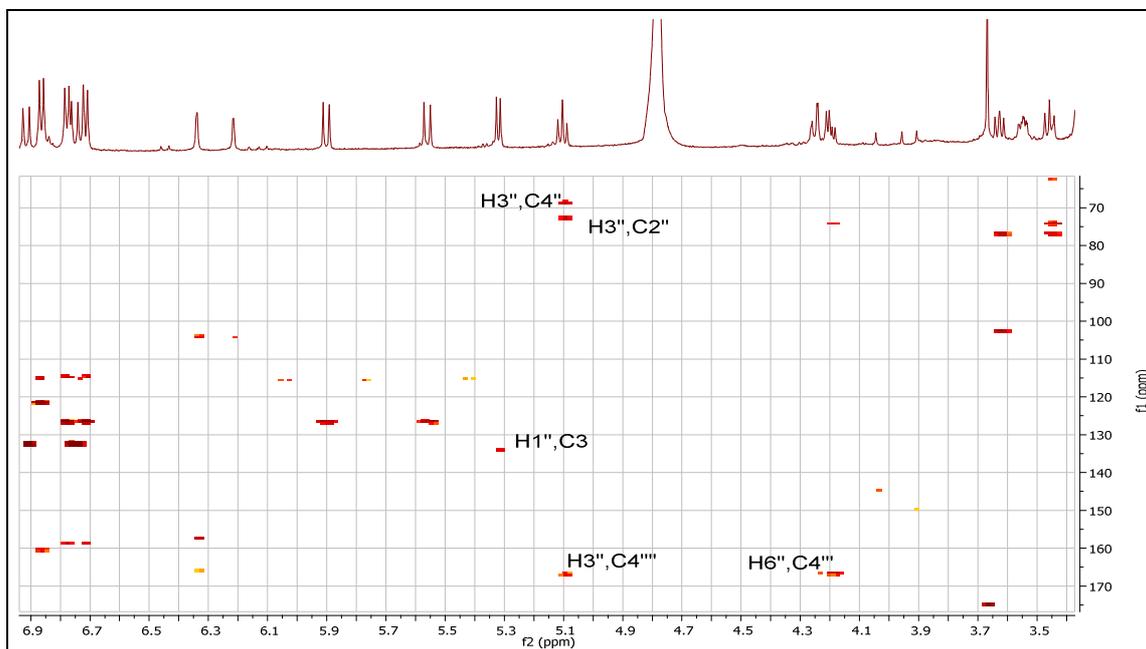
Spectre 2.24. Spectre RMN¹H du composé **Tm-11**(600 MHz, MeOH-d₄)



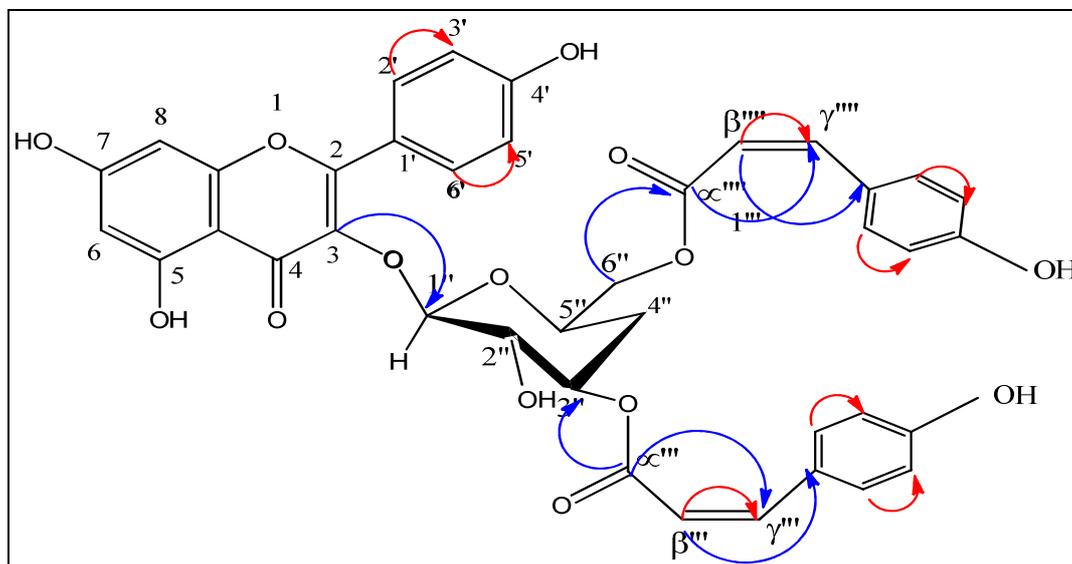
Spectre 2.25. Spectre RMN¹H du composé **Tm-11**(600 MHz, MeOH-d₄)

Le spectre HMBC (**Spectre 2.27**) montre une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1'' et le carbone C-3 (134,2 ppm) révèle l'attachement de l'entité sucre au kaempférol à cette position.

-Le spectre RMN¹H montre également, à part les signaux des protons du squelette flavonol, d'autres signaux aromatiques. En effet, les quatre doublets ($J = 8,8$ Hz) observés à $\delta = 6,71$; $6,78$; $7,50$ et $7,66$ ppm correspondent aux deux noyaux aromatiques *para* substitués.

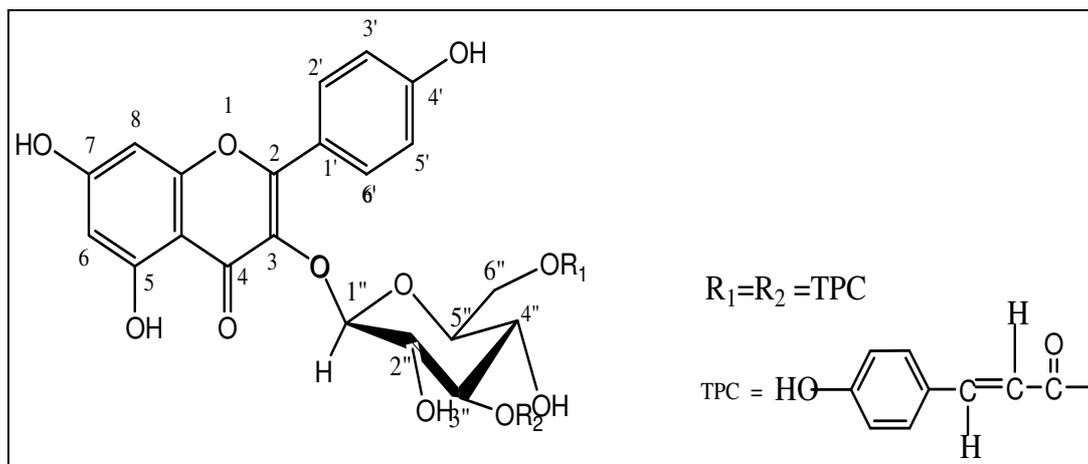


Spectre 2.27. Spectre HMBC¹H-¹³C du composé **Tm-11** (600 MHz, MeOH-d₄)



 corrélations Cosy  corrélations HMBC

Figure II.13. Corrélations HMBC et Cosy **Tm-11**

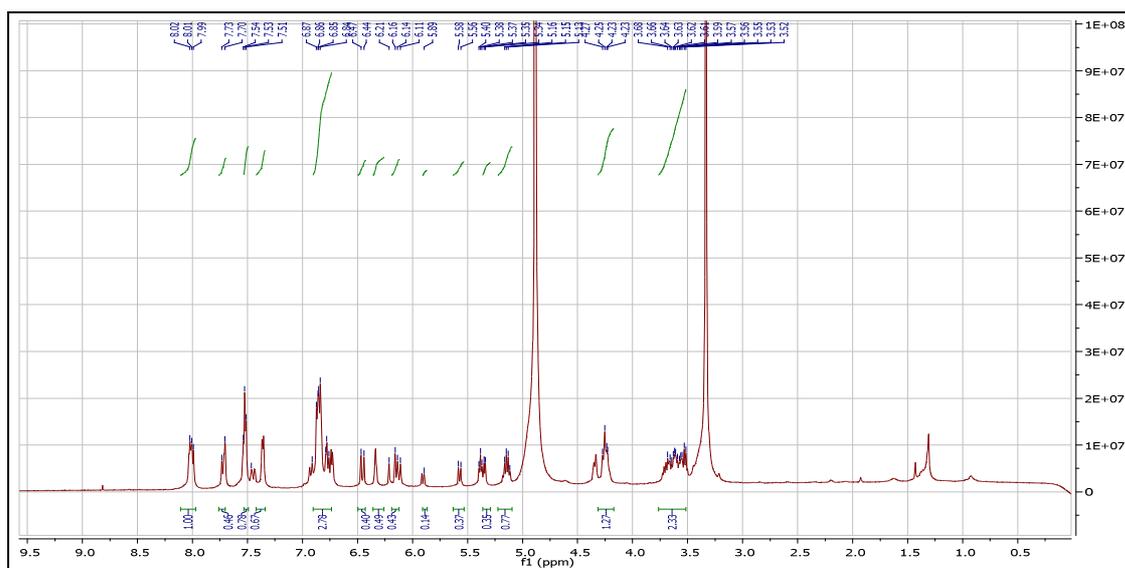
2.3.3. Détermination structurale du composé **Tm-10**

Kaempférol 3-O-(3', 6''-di-O-E-p-coumaroyl)-β-D-glucopyranoside.

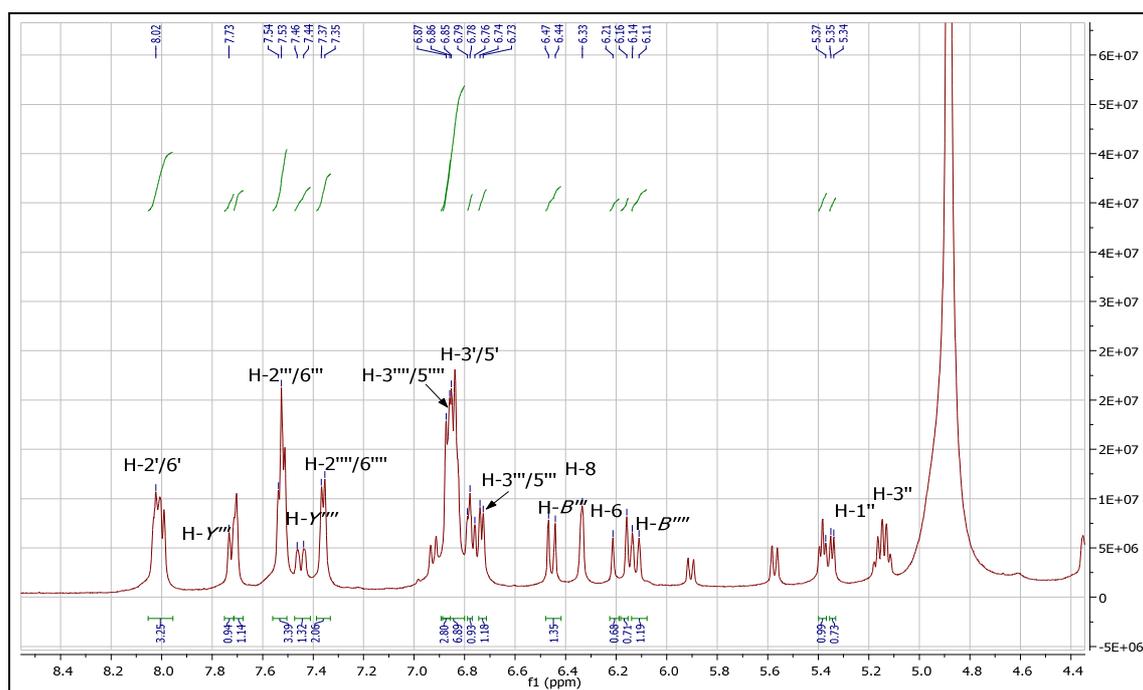
Le composé **Tm-10** a été isolé sous forme de mélange avec le composé **Tm-11**.

L'allure générale du spectre RMN ^1H (Spectre 2.28.1 et 2.28.2) relative au composé **Tm-10** montre une grande ressemblance avec celle du composé **Tm-11**.

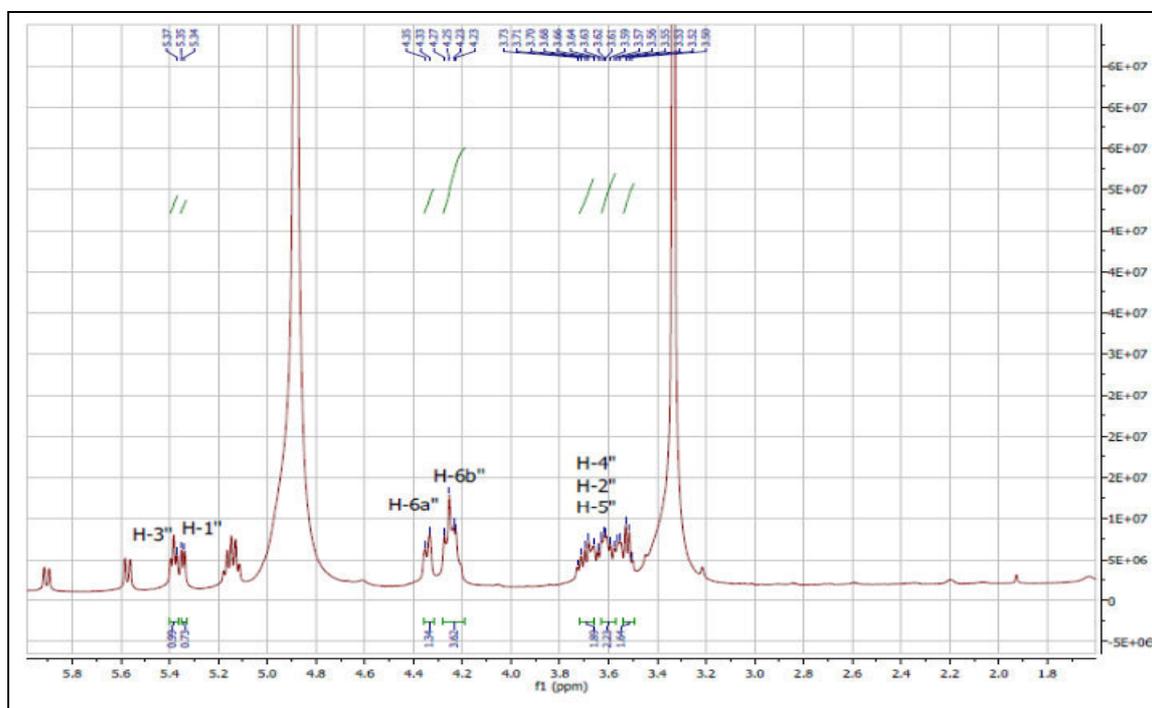
Ceux-ci mettent en évidence la présence d'un flavonoïde caractérisant un squelette kaempférol glucosylé et deux molécules de coumaroyle. Cependant, une différence majeure de constante de couplage des deux groupements coumaroyles est de $J = 16,0\text{Hz}$ qui donne la géométrie *w trans* de ces deux dernier. Les corrélations HMBC et COSY sont illustrés dans la figure II.14 et l'ensemble des attributions des signaux RMN ^1H , ^{13}C est reporté dans le tableau II.10.



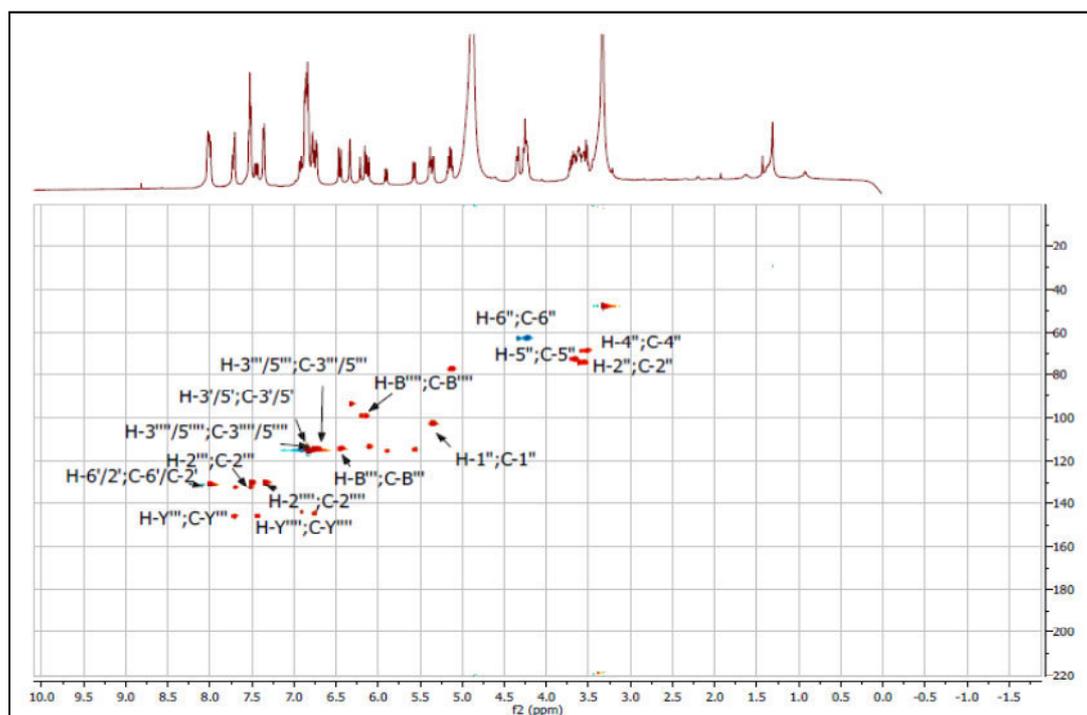
Spectre 2.28. Spectre RMN ^1H du composé **Tm-10** (600 MHz, MeOH- d_4)



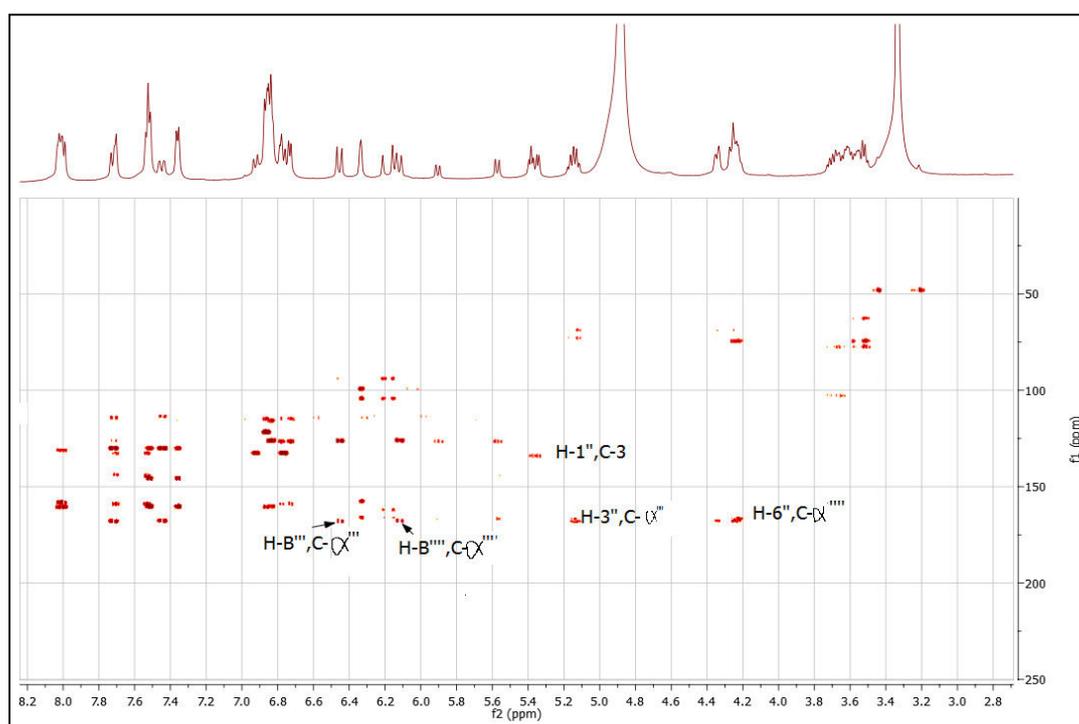
Spectre 2.28.1. Spectre RMN¹H du composé **Tm-10** (600 MHz, MeOH-d₄)



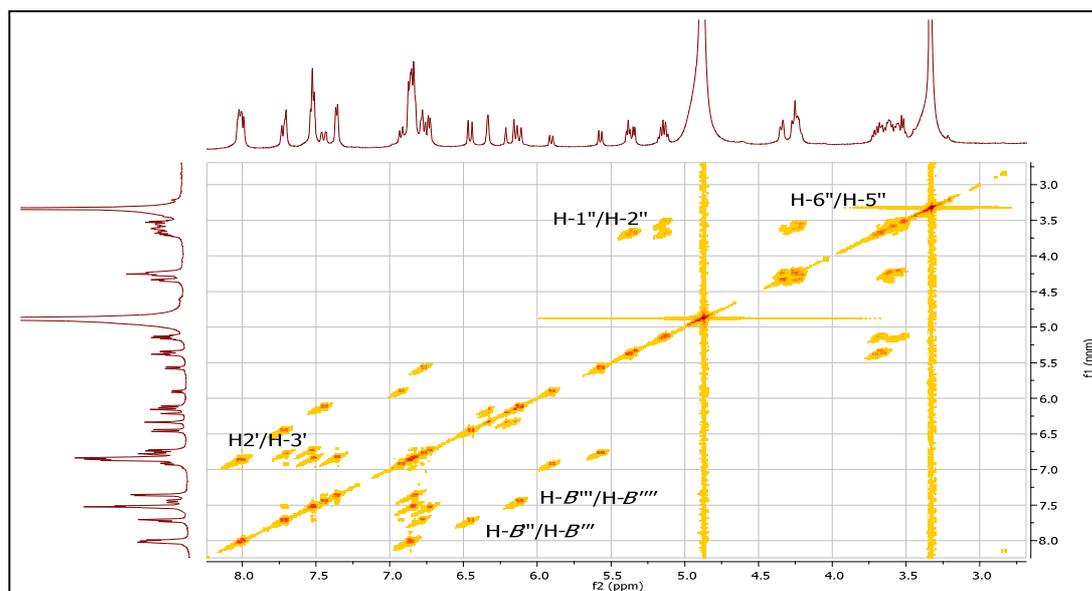
Spectre 2.28.2. Spectre RMN¹H du composé **Tm-10**(signaux relatif au β –glucose)
(600 MHz, MeOH-d₄)



Spectre 2.29. Spectre HSQC¹H-¹³C du composé **Tm-10**(600 MHz, MeOH-d₄)



Spectre 2.30. Spectre HMBC¹H-¹³C du composé **Tm-10**(600 MHz, MeOH-d₄)



Spectre 2.31. Spectre Cosy¹H-¹Hdu composé **Tm-10** (600 MHz, MeOH-d₄)

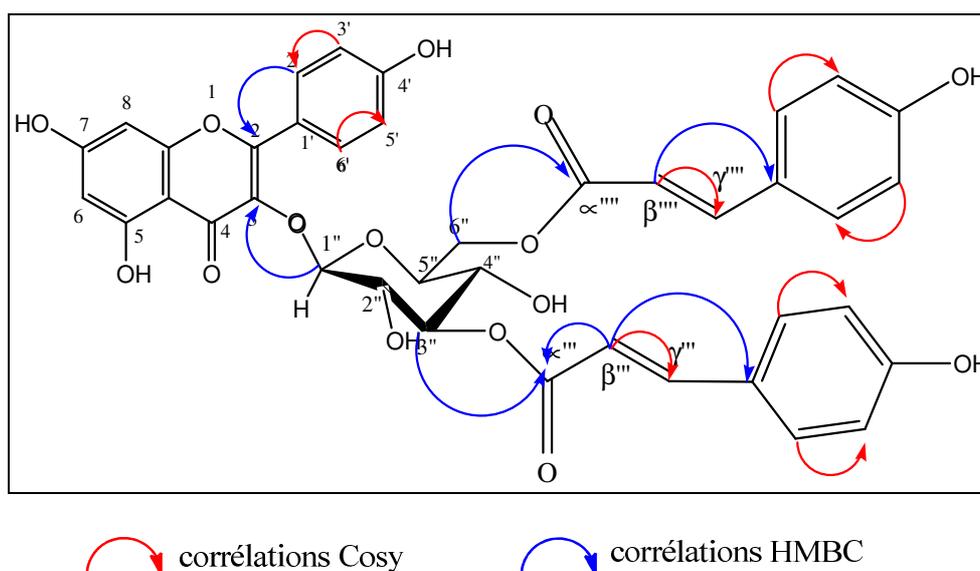


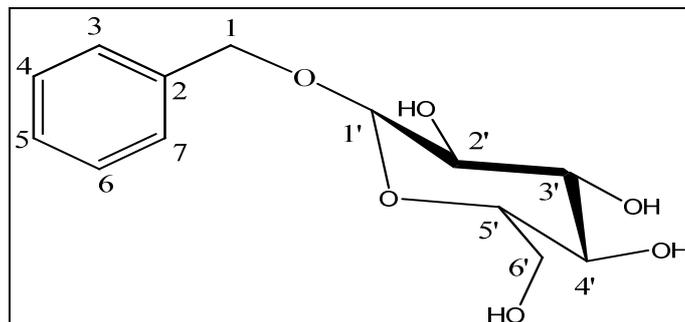
Figure II.14. Corrélations HMBC et COSY **Tm-10**

Les données spectrales reportées dans le tableau II.27 pour les composés **Tm-10** et **Tm-11** sont en accord avec les données publiées [7] pour ces deux molécules et nous ont permis d'identifier le : kaempférol 3-*O*-(3'', 6''-di-*O-E-p*-coumaroyle)- β -D-glucopyranoside et stenopalustroside A respectivement.

Tableau II.27. Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C des produits Tm-11 et Tm-10.

Position	Composé Tm-11		Composé Tm-10	
	$\delta\text{H, mult, J(Hz)}$	$\delta\text{C(ppm)}$	$\delta\text{H, mult, J(Hz)}$	$\delta\text{C(ppm)}$
2	-	158,8	-	158,8
3	-	134,4	-	134,4
4	-	179,9	-	179,9
5	-	162,2	-	162,2
6	6,19, <i>d</i> , 1,8	100,4	6,20, <i>d</i> , 1,7	99,0
7	-	166,1	-	166,1
8	6,30, <i>d</i> , 1,8	94,8	6,32, <i>d</i> , 1,7	95,9
9	-	157,4	-	157,4
10	-	104,0	-	104,4
1'	-	121,7	-	121,2
2',6'	7,96, <i>d</i> , 8,8	132,2	8,00, <i>d</i> , 8,7	131,7
3',5'	6,84, <i>d</i> , 8,8	115,9	6,80, <i>d</i> , 8,7	115,5
4'	-	161,0	-	160,8
1''	5,30, <i>d</i> , 7,8	104,3	5,36, <i>d</i> , 7,6	102,3
2''	3,66	74,1	3,66	74,1
3''	5,07, <i>t</i> , 9,3	78,5	5,15, <i>t</i> , 9,1	77,5
4''	3,54	69,9	3,54	69,9
5''	3,52	75,0	3,52	75,0
6''	4,20, <i>dd</i> , 12 ; 2,2 4,33, <i>dd</i> , 12 ; 5,8	63,9	4,24, <i>dd</i> , 11,7 ; 1,2 4,33, <i>dd</i> , 11,7 ; 6	62,9
α'''	-	167,6	-	167,6
β'''	5,89, <i>d</i> , 12,7	117,1	6,44, <i>d</i> , 16,0	114,6
γ'''	6,89, <i>d</i> , 12,7	145,1	7,71, <i>d</i> , 16,0	145,5
1'''	-	126,1	-	126,1
2''',6'''	7,66, <i>d</i> , 8,6	133,5	7,54, <i>d</i> , 8,1	130,4
4'''	-	160,8	-	160,8
3''',5'''	6,71, <i>d</i> , 8,7	115,4	6,72, <i>d</i> , 8,1	115,8
α''''	-	167,8	-	167,8
β''''	5,53, <i>d</i> , 12,8	115,9	6,10, <i>d</i> , 16,0	113,3
γ''''	6,75, <i>d</i> , 12,8	145,3	7,44, <i>d</i> , 16,0	145,3
1''''	-	126,1	-	126,1
2''',6''''	7,50, <i>d</i> , 8,5	133,4	7,99, <i>d</i> , 9,3	130,4
4''''	-	160,3	-	160,3
3''',5''''	6,78, <i>d</i> , 8,5	115,4	6,82, <i>d</i> , 9,3	115,4

2.4. Détermination structurale des composés de type benzyle glucoside Tm-12

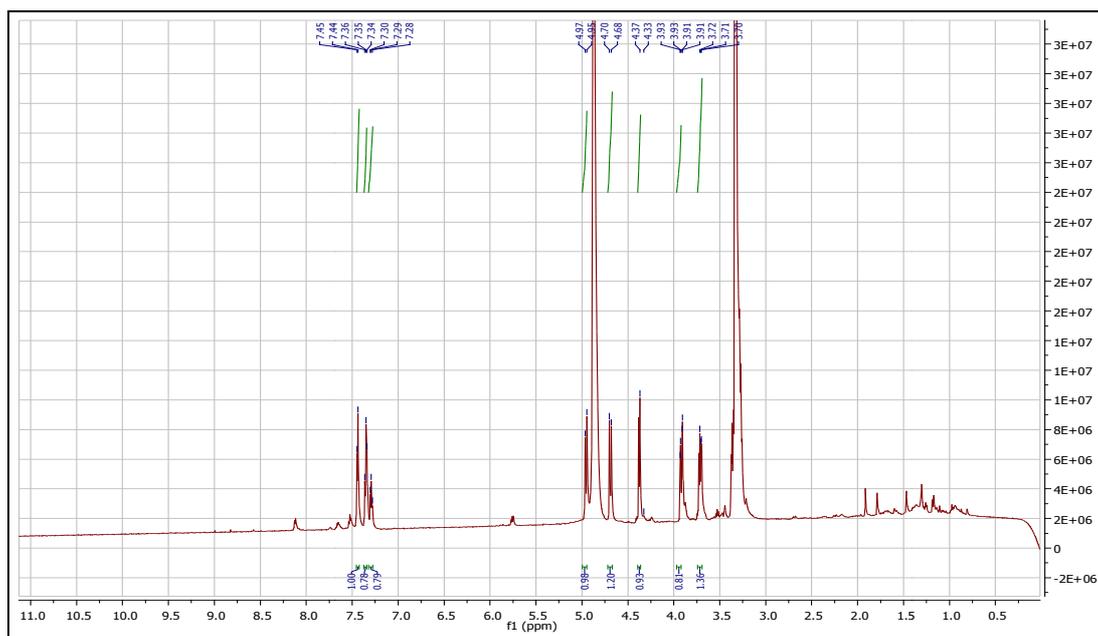


Benzyle-O- β -D-glucopyranoside.

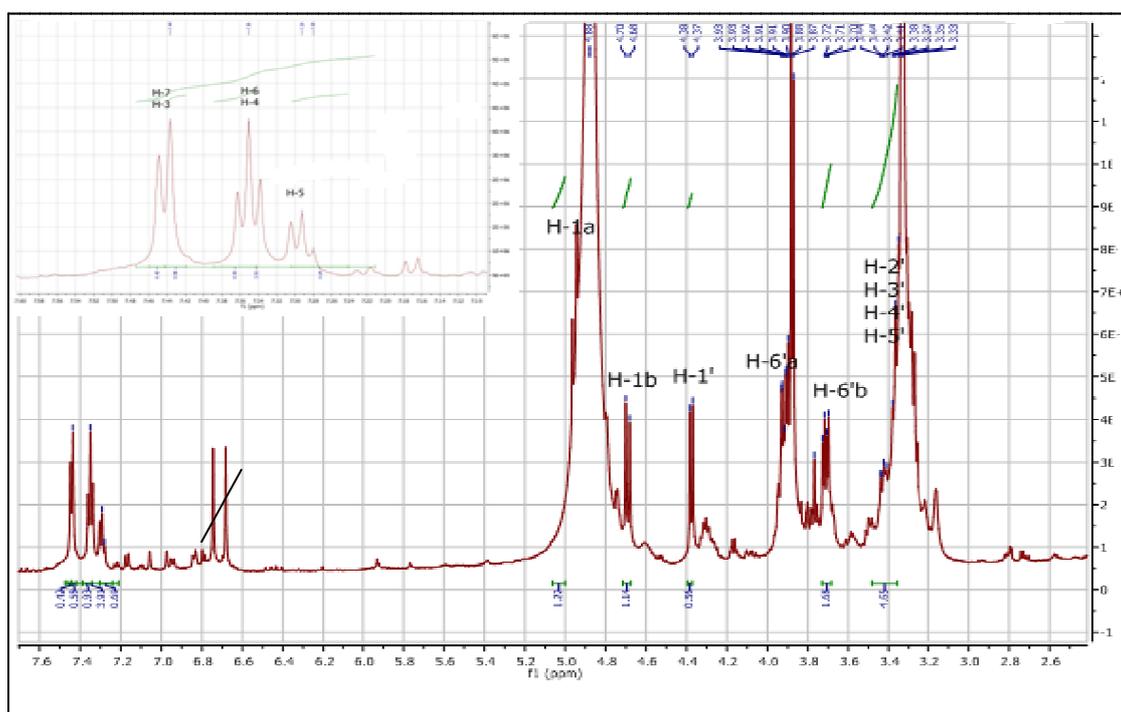
Le spectre de masse obtenu par ESI-MS (mode positif), donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 271 $[M+H]^+$ en accord avec une masse moléculaire de 270 Da et une formule brute en $C_{13}H_{18}O_6$.

L'examen du spectre RMN¹H (**Spectre 2.32**) et la séquence HSQC (**Spectre 2.33**) à 600 MHz réalisés dans MeOH- d_4 montrent la présence des signaux caractéristiques d'un noyau aromatique mono-substitué dont :

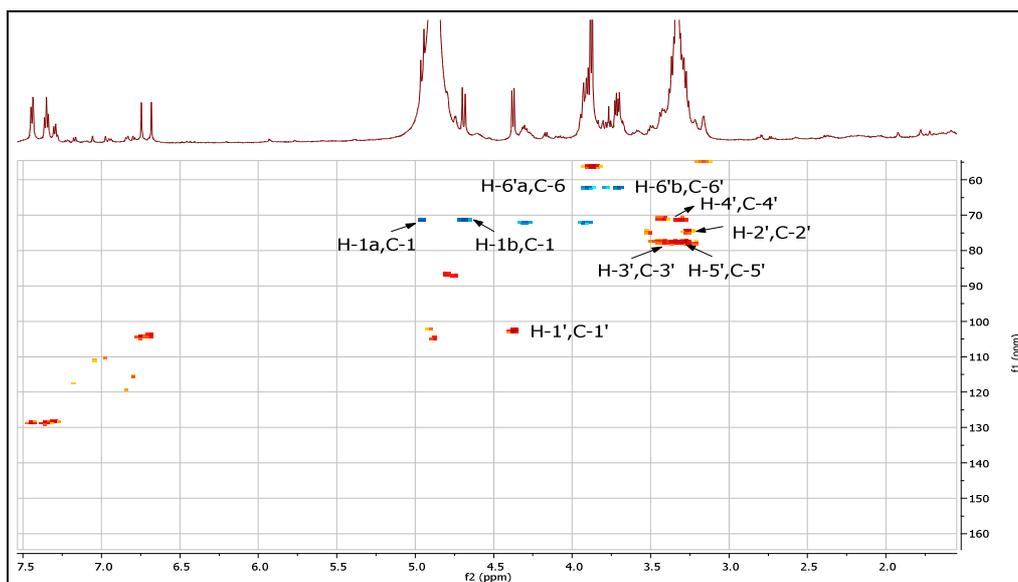
- Un signal d'intégration 2H à $\delta = 7,44$ ppm (*dd*, $J = 8,3, 1,6$ Hz) porté par le carbone $\delta = 128,8$ ppm, attribuable à H-3, H-7.
- Un triplet à $\delta = 7,33$ ppm ($J = 8,2$ Hz) d'intégration 1H porté par le carbone à $\delta = 128,4$ ppm, attribuable à H-5.
- Un triplet à $\delta = 7,19$ ($J = 8,2$ Hz) ppm d'intégration 2H porté par le carbone résonant à $\delta = 127,3$ ppm, attribuable à H-4, H-6.
- Deux doublet d'intégration 1H pour chacun, à $\delta = 4,95$ ppm (1H ; *d* ; $J = 11,7$ Hz) et à $\delta = 4,65$ ppm (1H, *d*, $J = 11,7$ Hz), portés par le même carbone résonant à $\delta = 71,7$ ppm, attribuable au groupement méthylène oxygéné CH_2-O .
- Un doublet centré sur $\delta = 4,36$ ppm ($J = 7,7$ Hz) relatif au proton H-1' d'un β -glucose, porté par le carbone résonant à $\delta = 103,4$ ppm montre sa corrélation par un pont oxygéné.
- Deux signaux d'intégration 1H pour chacun, attribuables à H-6'a, H-6'b à $\delta = 3,90$ ppm (*dd*; $J = 12,0 ; 2,2$ Hz) et $\delta = 3,63$ ppm (*dd*, $J = 12,0 ; 5,5$ Hz) respectivement.
- Un ensemble de multiplets dans l'intervalle $\delta = 3,30 - 3,90$ ppm, attribuable aux protons 2', 3', 4', 5' du sucre, portés par les carbones résonant à $\delta = 74,7, 77,8, 70,8$ et $77,7$ ppm respectivement.



Spectre 2.31 Spectre RMN¹H du composé **Tm-12**(600 MHz, MeOH-d₄)



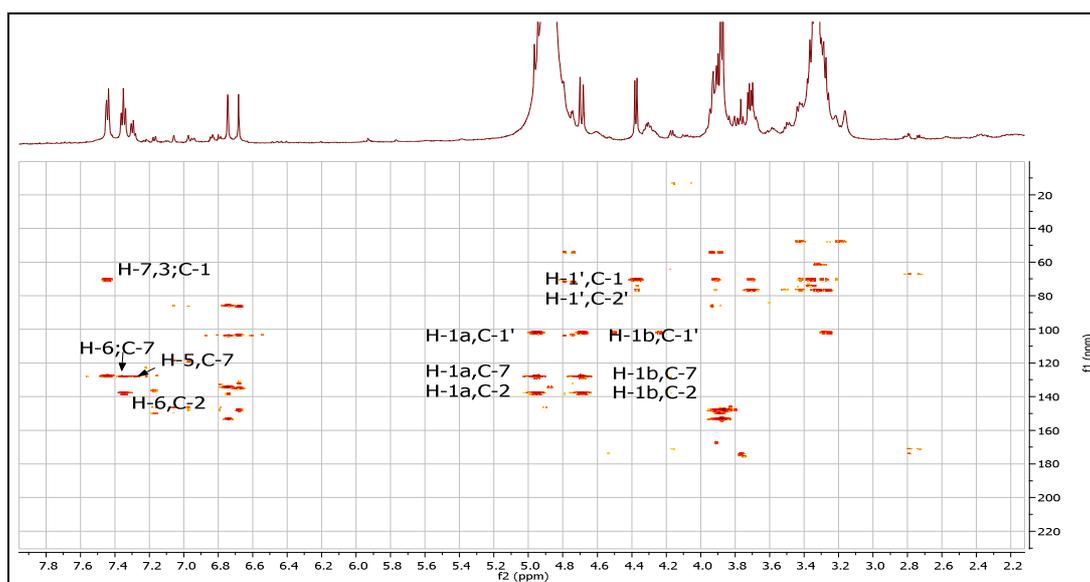
Spectre 2.32 Spectre RMN¹H du composé **Tm-12**(600 MHz, MeOH-d₄)



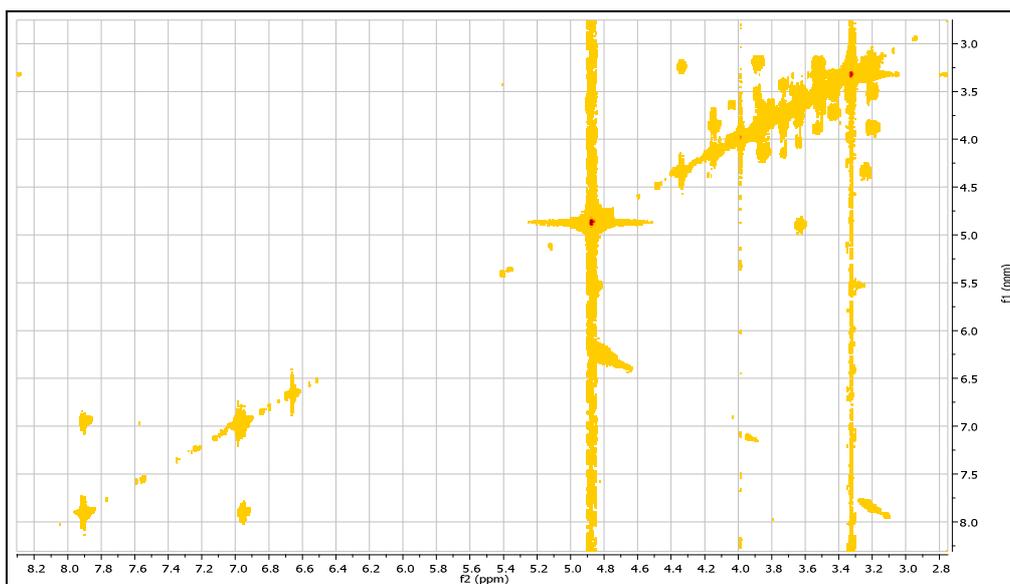
Spectre 2.33. Spectre HSQC¹H-¹³C du composé **Tm-12** (600 MHz, MeOH-d₄).

Le spectre relatif au HMBC (**Spectre 2.34**) montre :

- Une tache de corrélation entre le H-1' du glucose et le carbone du groupement méthylène (C-1) résonnant à $\delta = 71,1$ ppm. Consolide l'attachement par le pont oxygéné à cette position
- Une autre tache de corrélation est observée entre les protons méthylènes (H-1a et H-1b) et le carbone résonnant à $\delta = 137,6$ ppm ; confirme la liaison du groupement méthylènes à ce carbone du cycle aromatique.



Spectre 2.34. Spectre HMBC¹H-¹³C du composé **Tm-12** (600 MHz, MeOH-d₄)



Spectre 2.35. Spectre COSY¹H-¹H du composé **Tm-12**(600 MHz, MeOH-d₄)

L'ensemble des données spectroscopiques est regroupé dans le tableau II.28

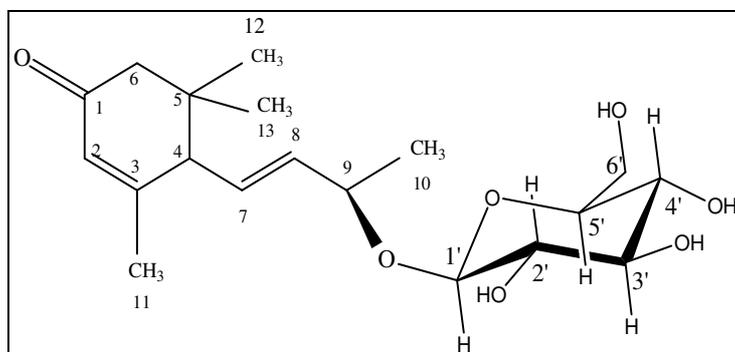
Tableau II.28. Déplacements chimiques en RMN ¹H, RMN ¹³C et HMBC du produit **Tm-12**

Position	$\delta H(\text{ppm}), \text{mult}, J(\text{Hz})$	$\delta C(\text{ppm})$	HMBC
1a	4,95, <i>d</i> , 11,7	71,7	C-1', C-2, C-3
1b	4,65, <i>d</i> , 11,7	-	
2	-	137,6	
3	7,44, <i>dd</i> , 8,3 ; 1,6	128,8	
4	7,19, <i>t</i> , 8,2	127,3	
5	7,33, <i>t</i> , 8,2	128,4	C-7
6	7,19, <i>t</i> , 8,2	127,3	C-2
7	7,44, <i>dd</i> , 8,3 ; 1,6	128,8	C-1
Glucose			
1'	4,36, <i>d</i> , 7,7	103,4	C-1, C-2'
2'	3,26	74,7	
3'	3,36	77,8	
4'	3,31	70,8	
5'	3,29	77,7	
6'	3,63, <i>dd</i> , 12,0 ; 5,5 3,90, <i>dd</i> , 12,0 ; 2,2	62,2	

Les données spectrales que nous avons obtenues sont en accord avec les données publiés [8] pour cette molécule et nous ont permis d'identifier le : benzyle- β -D-glucopyranoside.

2.5. Détermination structurale des composés de type ionol glucosides

2.5.1. Elucidation structurale du composé Tm-14



3-oxo- α -ionol-9-O- β -D-glucopyranoside.

Le spectre de masse obtenu par ESI-MS (mode positif), donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 369 $[M-H]^+$ en accord avec une masse moléculaire de 370 Da et une formule brute en $C_{19}H_{30}O_7$.

L'examen du spectre RMN 1H (Spectre 2.36) et la séquence HSQC (Spectre 2.37) à 600 MHz réalisés dans $MeOH-d_4$ montrent :

-Trois singulets à $\delta = 1,0, 1,06$ et $1,98$ ppm d'intégration 3H pour chacun, portés par les carbones résonnant à $\delta = 27,8, 27,6$ et $23,5$ ppm respectivement indiquant la présence de 3 groupements méthyles.

- Un doublet d'intégration 3H à $\delta = 1,30$ ppm ($d, J=Hz$), portés par le carbone résonnant à $\delta = 22,7$ ppm indiquant la présence d'un quatrième groupement méthyle dans cette molécule.

-Deux doublets à $\delta = 2,05, 2,49$ ppm d'intégration 1H pour chacun, portés sur le même carbone $\delta = 48,5$ ppm, attribuable au groupement méthylène.

-Un doublet à $\delta = 2,70$ ppm d'intégration 1H, porté par le carbone résonnant à $\delta = 57,1$ ppm

-Un multiplet à $\delta = 4,48$ ppm d'intégration 1H, porté par le carbone résonnant à $\delta = 74,7$ ppm indiquant la présence d'une fonction alcool primaire.

- Deux doublets de doublets d'intégration 1H pour chacun :

✓ le premier à $\delta = 5,58$ ppm ($dd, J = 16 ; 6,8$ Hz), porté par le carbone résonnant à $\delta = 137,4$ ppm.

✓ le second à $\delta = 5,74$ ppm ($dd, J = 16 ; 8$ Hz), porté par le carbone résonnant à $\delta = 131,4$ ppm.

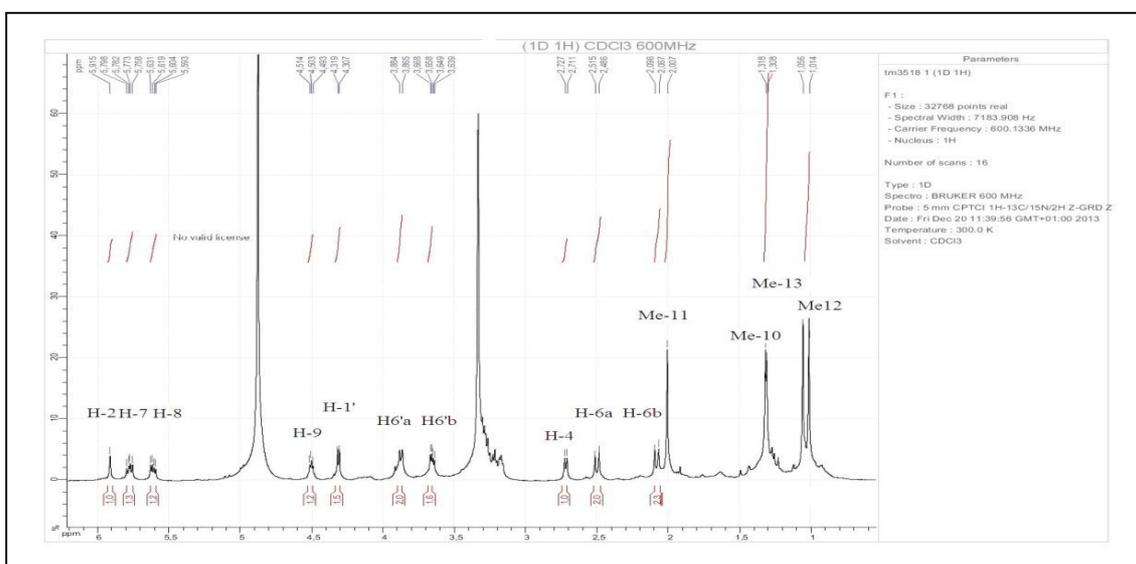
-Un singulet à $\delta = 5,91$ ppm porté par le carbone résonnant à $\delta = 126,2$ ppm, indiquant la présence d'un méthine oléfinique.

Le même spectre montre un ensemble des signaux caractéristiques d'un hexose, notamment le signal à $\delta = 4,27$ ppm sous forme d'un doublet ($J = 7,8$ Hz) porté par le carbone résonnant à $\delta = 101.3$ ppm, attribuable au proton anomérique (H-1') de β -glucose.

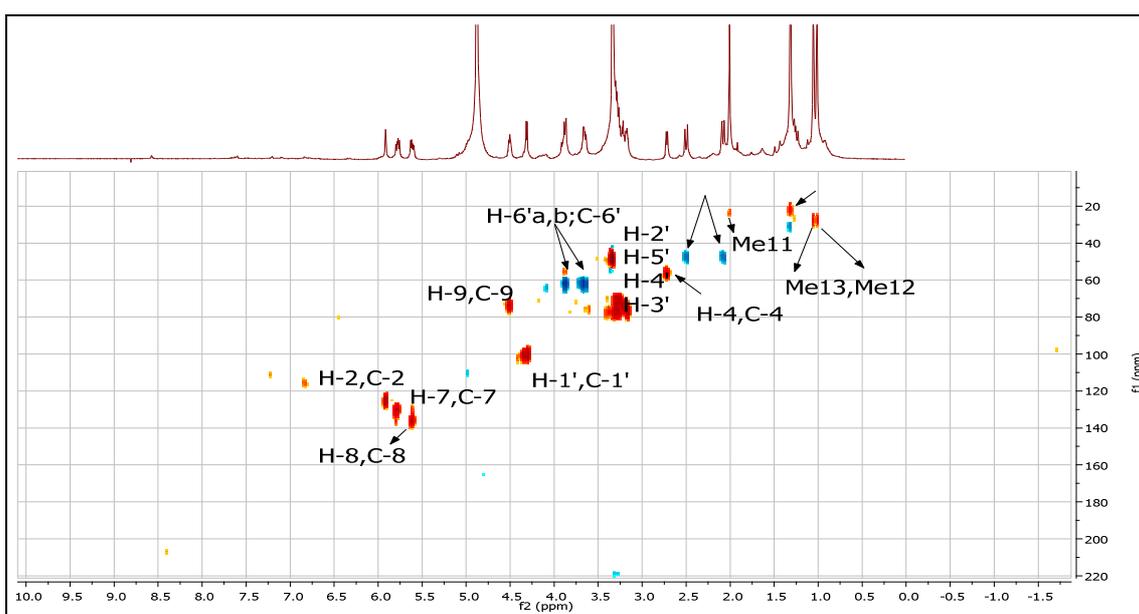
-Deux signaux d'intégration 1H pour chacun, attribuables respectivement à H-6'a, H-6'b à $\delta = 3,85$ ppm ($dd, J = 11,0, 1,8$ Hz) et $\delta = 3,64$ ppm ($dd, J = 11,0, 6,0$ Hz), portés par le carbone résonnant à $\delta_c = 62,2$ ppm.

-Un ensemble de multiplets attribuable aux protons :

H-2' (3,19 ppm), H-3' (3,27 ppm), H-4' (3,26 ppm), H-5' (3,12 ppm) du sucre, portés par les carbones localisés à 74,7 ; 78,0 ; 71,7 et 77,8 ppm respectivement.



Spectre 2.36. Spectre RMN¹H du composé **Tm-14**(600 MHz, MeOH-d₄)

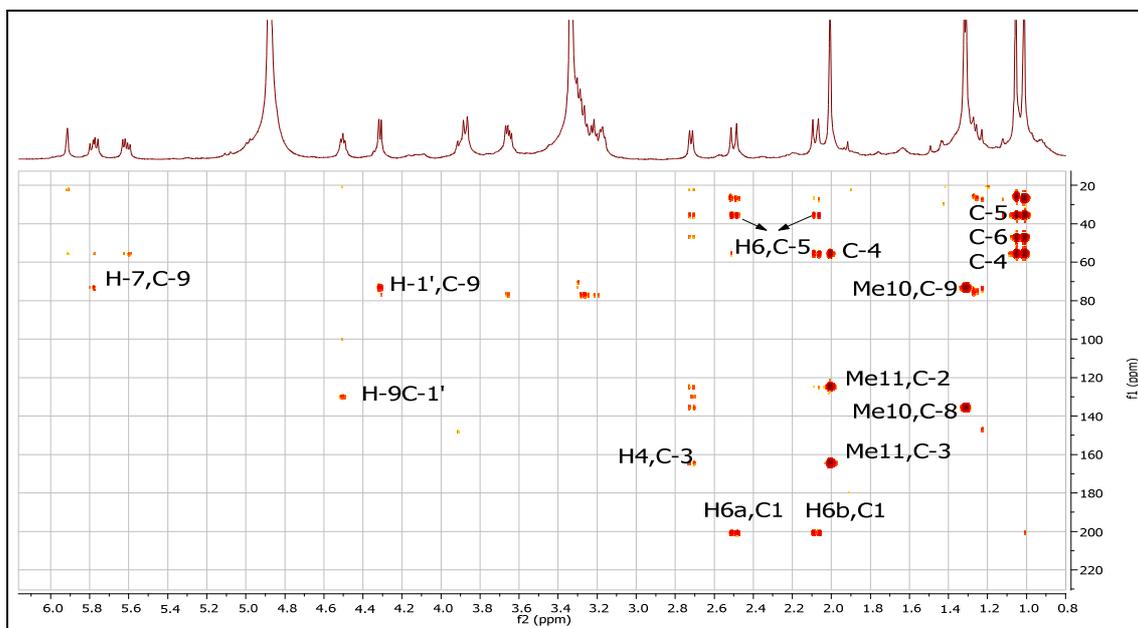


Spectre 2.37. Spectre HSQC¹H-¹³C du composé **Tm-14**(600 MHz, MeOH-d₄)

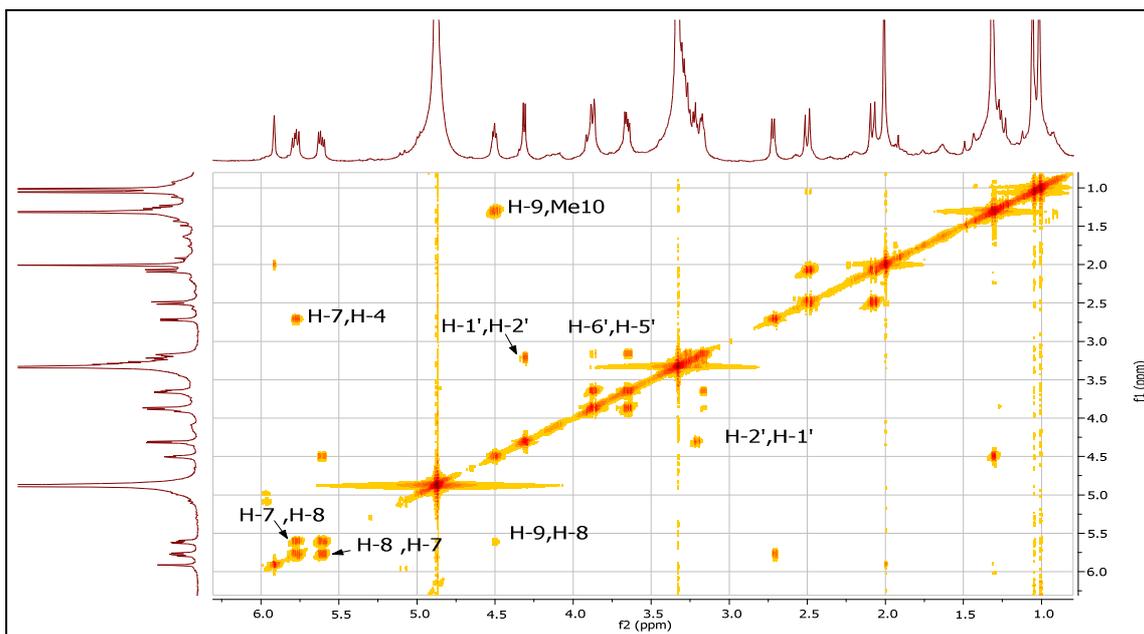
Les données spectrales RMN¹H et l'expérience HSQC et par comparaison avec celles de la littérature [9], nous a permis d'identifier le composé **Tm-14** comme étant : 3 oxo- β -ionol-9-*O*- β -D-glucopyranoside.

L'enchaînement de la molécule est confirmé par les mesures sur le spectre HMBC (**Spectre 2.38**) qui révèlent :

- La jonction du sucre au carbone C-9 par la tache de corrélation de ce dernier et le H-1' du β -glucose.
- Une tache de corrélation entre les protons du groupement méthylène (CH₂-6) et le carbonyle du cétone C-1 (201,9 ppm) confirme sa position .
- Des taches de corrélations entre les groupements méthyles CH₃-10/CH₃-12 avec C-5, CH₃-10 avec C-9 et CH₃-11 avec C-2 . Ces corrélations sont illustrées dans la figure II.15.



Spectre 2.38. Spectre HMBC¹H-¹³C du composé **Tm-14** (600 MHz, MeOH-d₄)



Spectre 2.39. Spectre Cosy ^1H - ^1H du composé **Tm-14** (600 MHz, MeOH- d_4)

- Le spectre Cosy (**Spectre 2.39**) montre une tache de corrélation entre H-8 et H-9 ainsi une corrélation entre H-8 / H-9 et H-7 / H-4 .Ces corrélations sont présentées dans la figure II.15.

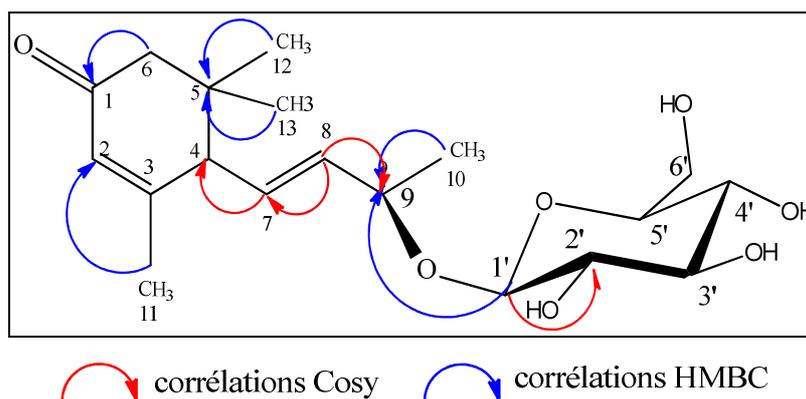
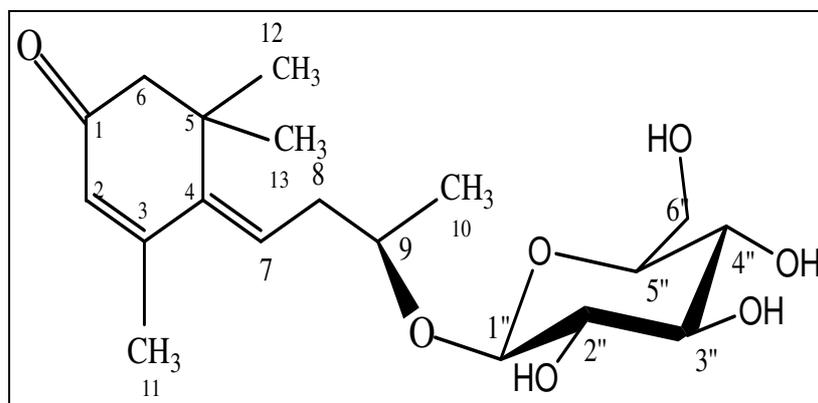
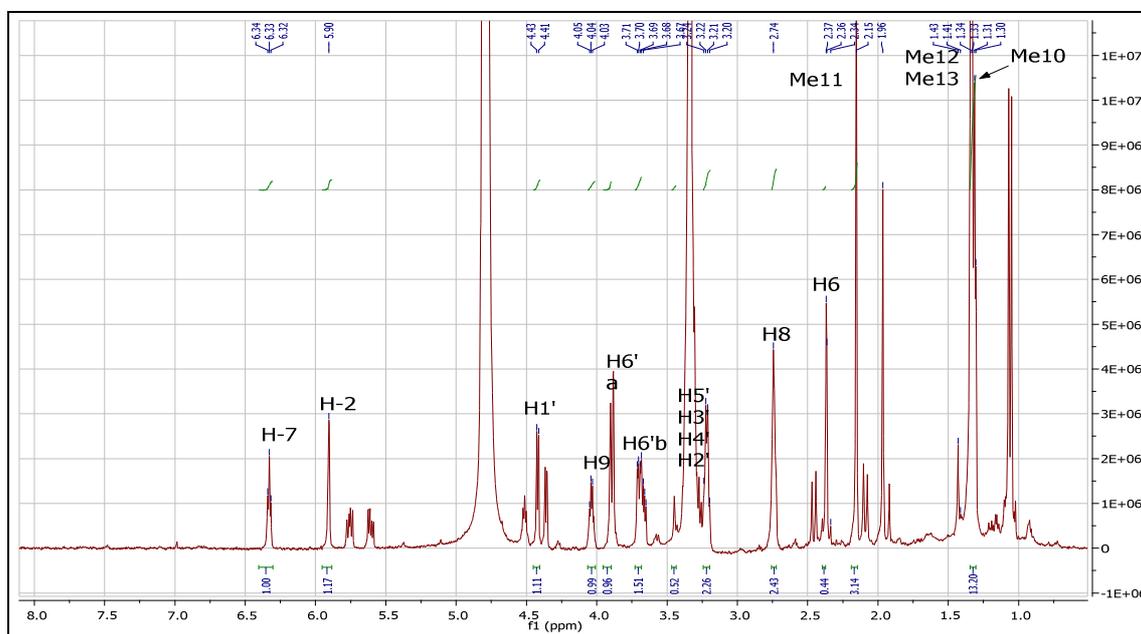


Figure II.15. Corrélations HMBC et Cosy **Tm-14**

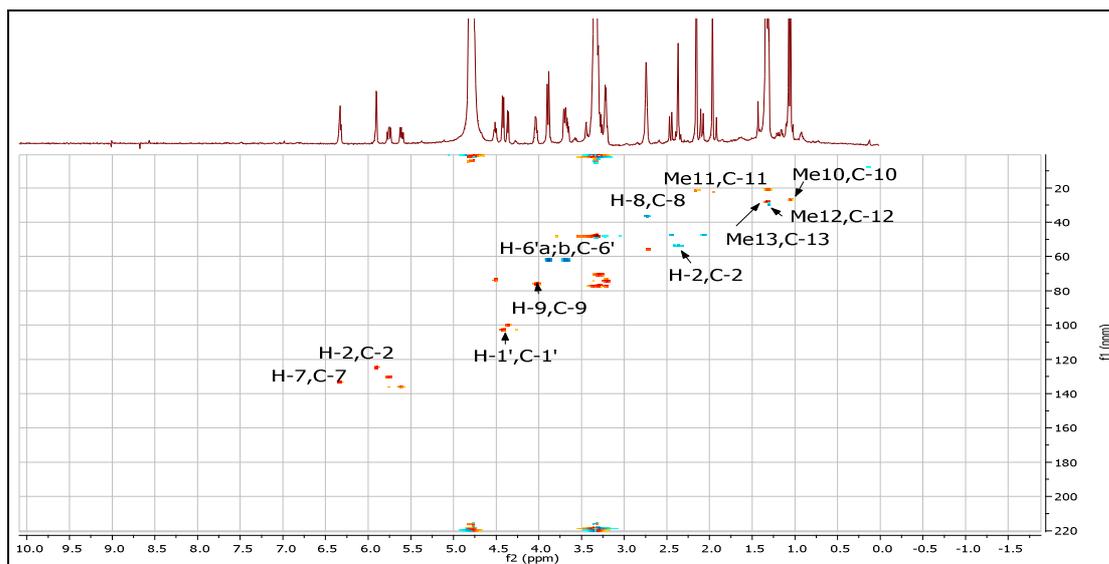
2.5.2. Elucidation structurale du composé **Tm-13**

(*E*)-4-[9-(β -*D*-glucopyranosyloxy)butylidène]-3,5,5-triméthyl-2-cyclohexen-1-one.

Le composé **Tm-13** a été isolé sous forme de mélange avec le composé **Tm-14**. Les spectres RMN¹H, HSQC et Cosy du mélange ont permis d'extraire les signaux relatifs au composé **Tm-13**.



Spectre 2.40. Spectre RMN¹H du composé **Tm-13** (600 MHz, MeOH-*d*₄).



Spectre 2.41. Spectre HSQC¹H-¹³C du composé **Tm-13** (600 MHz, MeOH-d₄)

Ces signaux très semblables à ceux du composé **Tm-14**. Cependant, le changement de la position de la fonction oléfinique entre C-7 et C-8 dans la molécule **Tm-14** à la position entre C-7 et C-4 pour le composé **Tm-13**. Cette hypothèse est confirmée par :

-Le triplet enregistré à $\delta = 6.32$ ppm (t, $J = 6,13$ Hz) correspondant au proton éthylénique H-7 dans la molécule **Tm-13**, ce proton montre des taches de corrélation enregistrées par HMBC (**Spectre 2.41**) avec les carbones résonnant à $\delta = 143,6$ ppm et $\delta = 159,0$ ppm, assignables aux C-4 et C-3 respectivement.

L'expérience Cosy (**Spectre 2.44**) montre une tache de corrélation entre le proton H-7 et le proton à $\delta = 2,75$ ppm, porté par le carbone localisé à $\delta = 38,2$ ppm selon le spectre HSQC (**Spectre 2.41**), attribuable au H-8 du groupement méthylène, ce dernier montre également une tache de corrélation avec le proton à $\delta = 4,01$ ppm qui n'est autre que le proton H-9 ; ce proton corrèle avec un carbone localisé à $\delta = 21,8$ ppm du groupement méthyle (CH₃-10) et un carbone à $\delta = 103,0$ ppm correspondant à un proton H-1' anomérique du β -glucose, ce qui confirme la liaison du sucre par cette position respectivement.

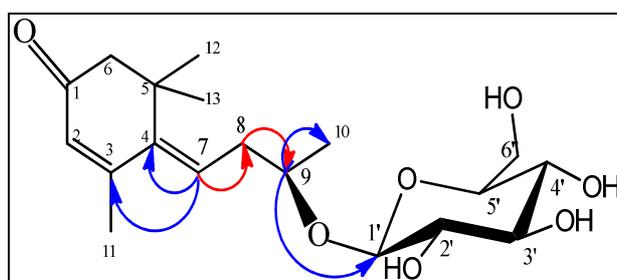
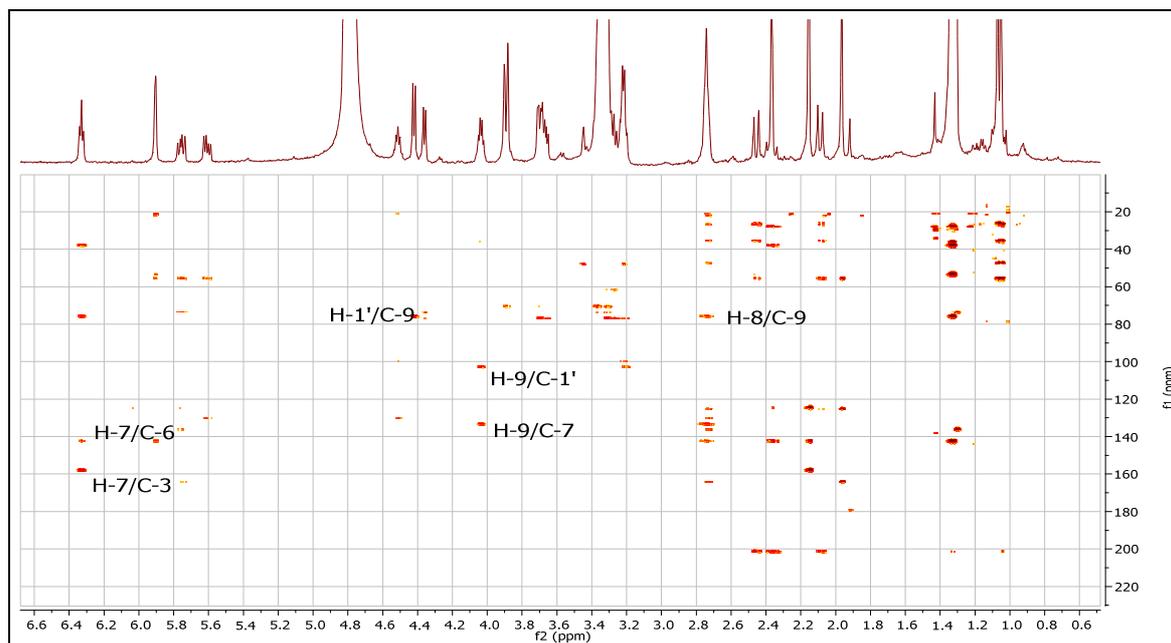
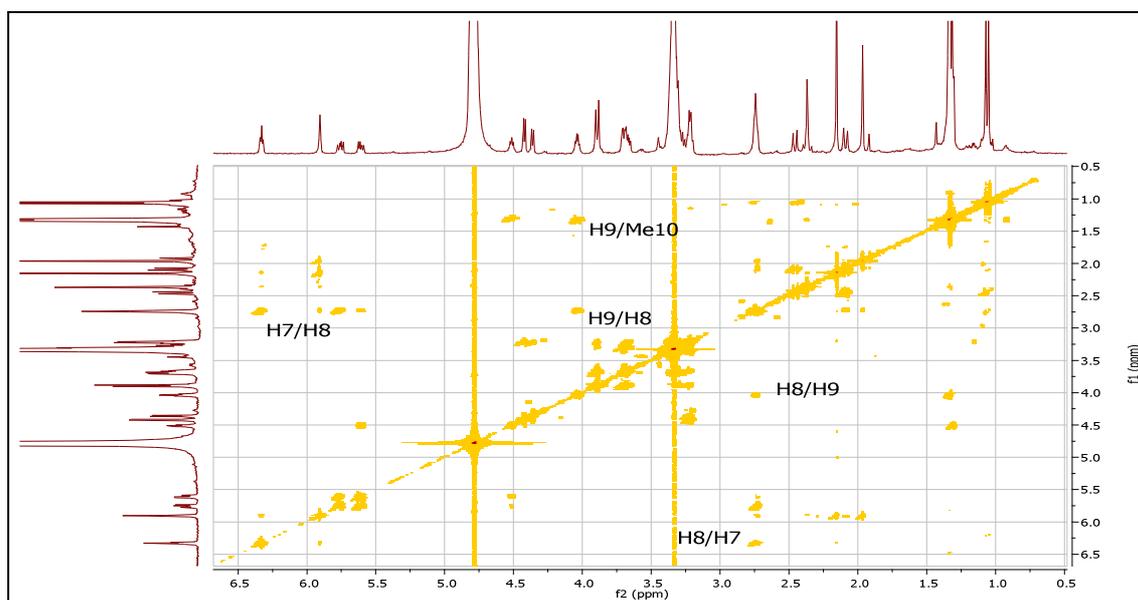


Figure II.16 Corrélations HMBC et Cosy **Tm-13**

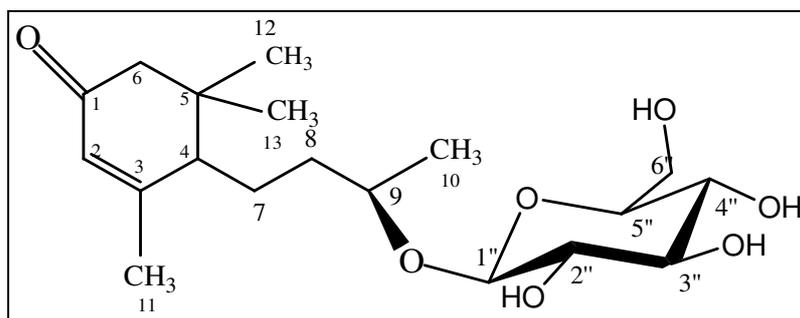


Spectre 2.42. Spectre HMBC¹H-¹³C du composé **Tm-13** (600 MHz, MeOH-d₄)



Spectre 2.43. Spectre COSY¹H-¹H du composé **Tm-13** (600 MHz, MeOH-d₄)

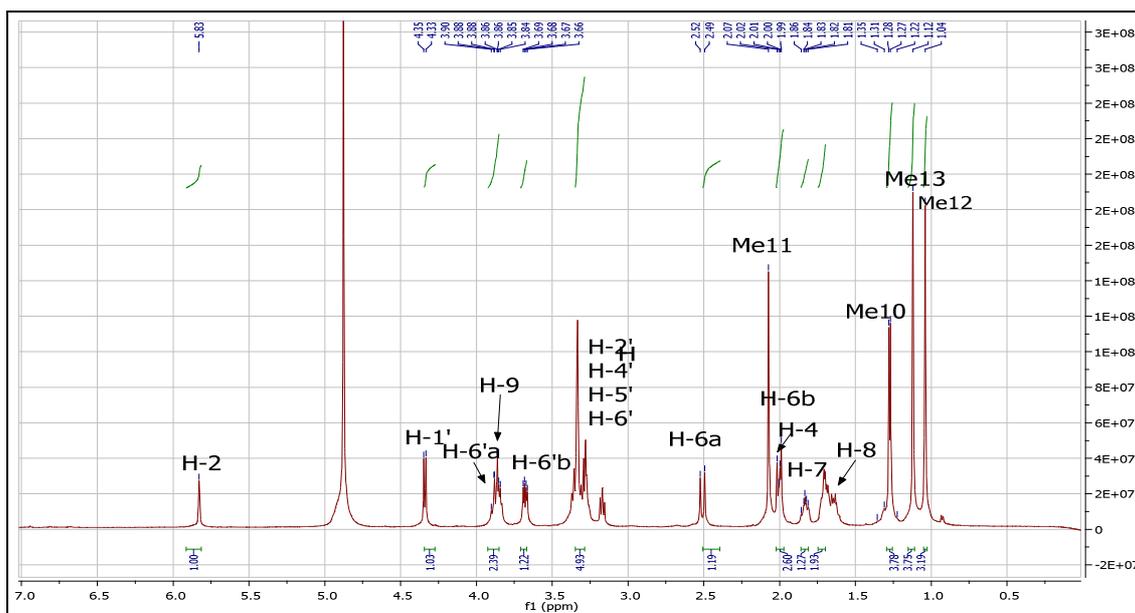
Ces données spectrales et par comparaison des données de la littérature [10], nous a permis de décrire ce composé comme étant : (*E*)-4-[9-(β -*D*-glucopyranosyloxy)butylidène]-3,5,5-triméthyl-2-cyclohexen-1-one.

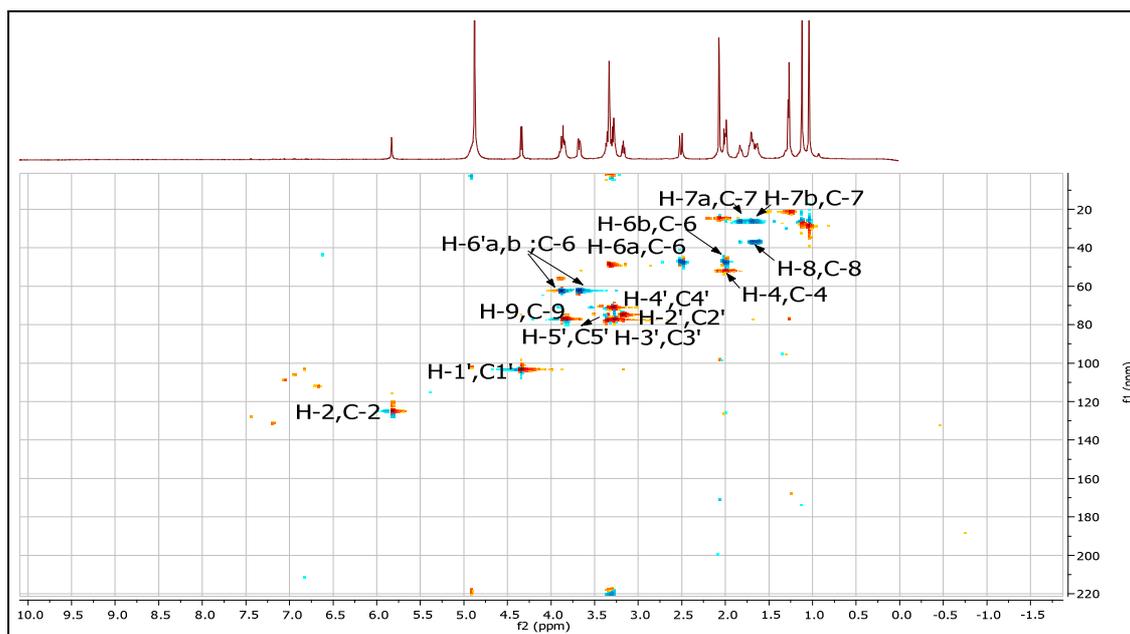
2.5.3. Elucidation structurale du composé **Tm-15****Blumenol C-glucoside.**

Le spectre de masse obtenu par ESI-MS (mode négatif), donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 371 $[M-H]^-$ en accord avec une masse moléculaire de 372 Da et une formule brute en $C_{19}H_{32}O_7$. Le spectre RMN 1H (**Spectre 2.44**) montre des signaux similaires à ceux du produit **Tm-14** avec l'absence des signaux relatifs à la fonction oléfinique en H-7 et H-8.

La disparition de la fonction oléfinique explique les signaux à plus bas champs par rapport au composé **Tm-14** correspondants aux deux groupements méthylènes : le premier à $\delta = 1,5$ ppm et 1,71 ppm ($\delta c = 36,5$ ppm) et le deuxième à $\delta = 1,70$ et 1,86 ppm ($\delta c = 26,1$ ppm), attribuables à H-7 et H-8 respectivement.

Les autres corrélations observées qui correspondent à celles caractéristiques d'un squelette ionol glucosidique, ont été déjà mises en évidence dans l'étude de la molécule **Tm-14**.

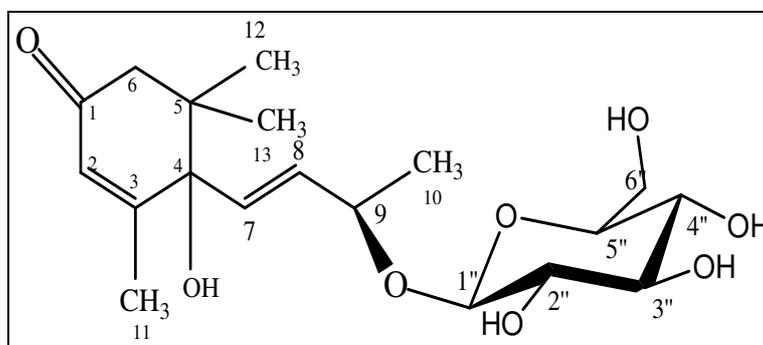
**Spectre 2.44.** Spectre RMN 1H du composé **Tm-15** (600 MHz, MeOH- d_4)



Spectre 2.45. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C du composé **Tm-15** (600 MHz, MeOH- d_4)

Ces données spectrales et par comparaison avec celles de la littérature [11], nous a permis de décrire ce composé comme étant : blumenol C-glucoside.

2.5.4. Elucidation structurale du composé **Tm-16**

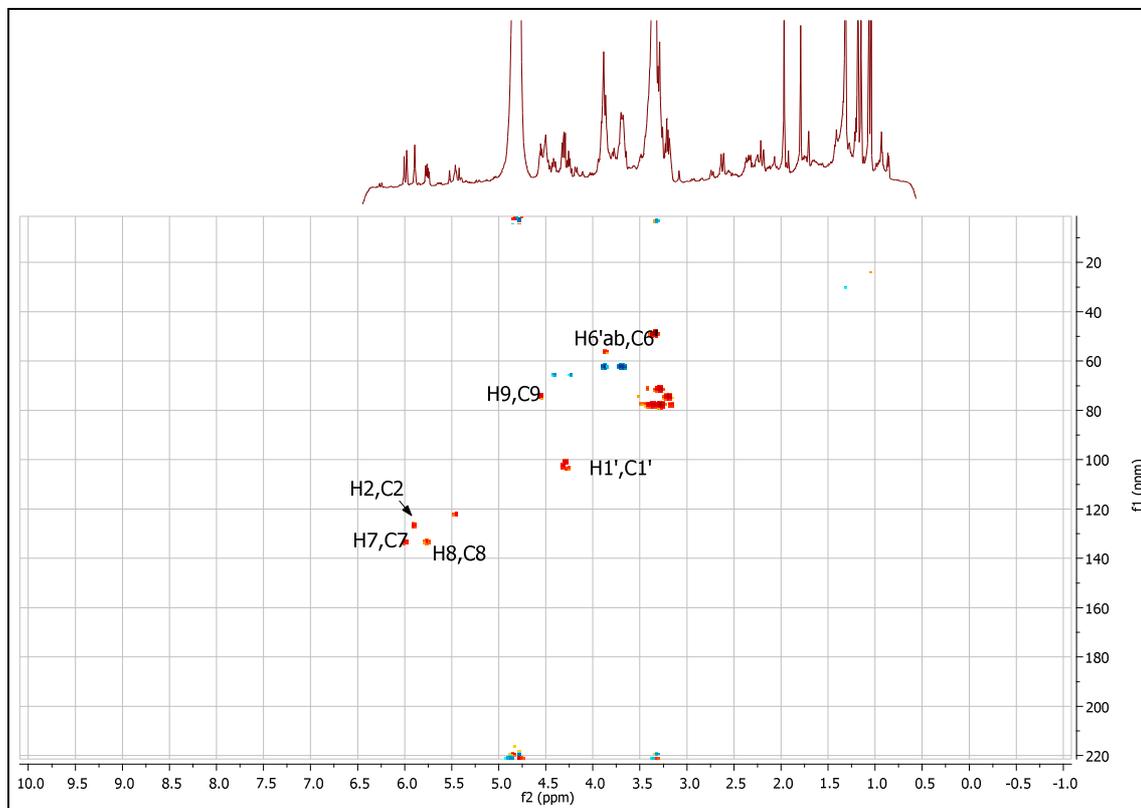


Vomifoliol-9-O- β -D-glucopyranoside.

Le spectre de masse obtenu par ESI-MS (mode négatif), donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 385 $[\text{M-H}]^-$ en accord avec une masse moléculaire de 386 Da et une formule brute en $\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_8$.

Le spectre RMN ^1H (**Spectre 2.44**) montre des signaux très semblables à ceux du composé **Tm-14**, avec l'absence du signal relatif au proton H-4 de ce composé par rapport au composé

précédent (**Tm-14**), ce qui mène à l'apparition d'un doublet à 6.00 ppm ($\delta_c = 133,7\text{ppm}$) attribuable à H-7 du groupement éthylénique.

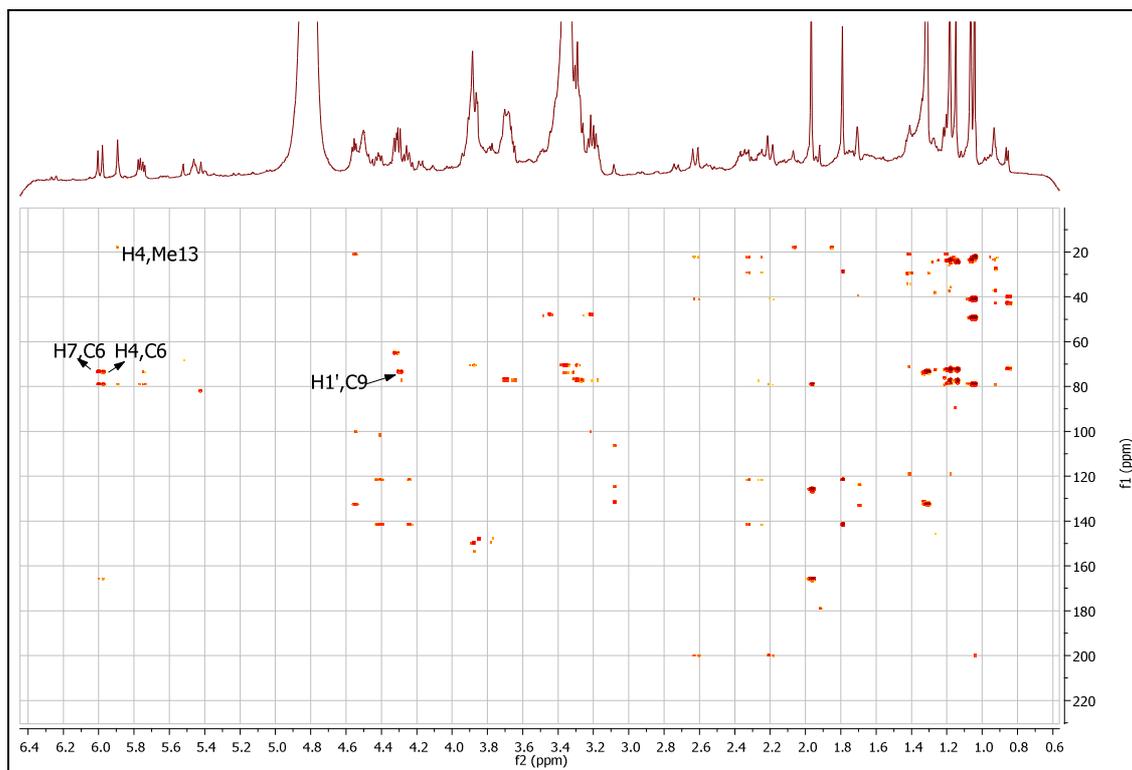


Spectre 2.46. Spectre HSQC¹H-¹³C du composé **Tm-16** (600 MHz, MeOH-d₄)

Cette différence nous a permis de décrire cette molécule comme étant : vomifoliol-9-*O*- β -*D*-glucopyranoside.

L'étude du spectre HMBC (**Spectre 2.47**) va nous permettre de confirmer notre hypothèse, en effet la corrélation entre le proton éthylénique H-7 et le carbone C-4 ($\delta_c = 79.6\text{ ppm}$) vu la valeur de son déplacement chimique au champ fort par rapport au C-4 enregistré dans le composé précédent (**Tm-14**) confirme sa substitution par un groupement hydroxyle.

La corrélation entre C-9 et H-1' anomérique du glucose consolide sa liaison par un pont oxygéné à cette position.



Spectre 2.47. Spectre HMBC¹H-¹³C du composé **Tm-16** (600 MHz, MeOH-d₄)

Ces données spectrales et par comparaison avec celles de la littérature [12], nous a permis de décrire ce composé comme étant : vomifoliol-9-*O*-β-*D*-glucopyranoside.

Les données spectroscopiques des composés **Tm-14**, **Tm-13** et **Tm-15**, **Tm-16** sont reportées dans le tableau II.29 et tableau II.30 respectivement.

Tableau II.29 Déplacements chimiques en RMN ¹H et RMN ¹³C des produits Tm-14 et Tm-13

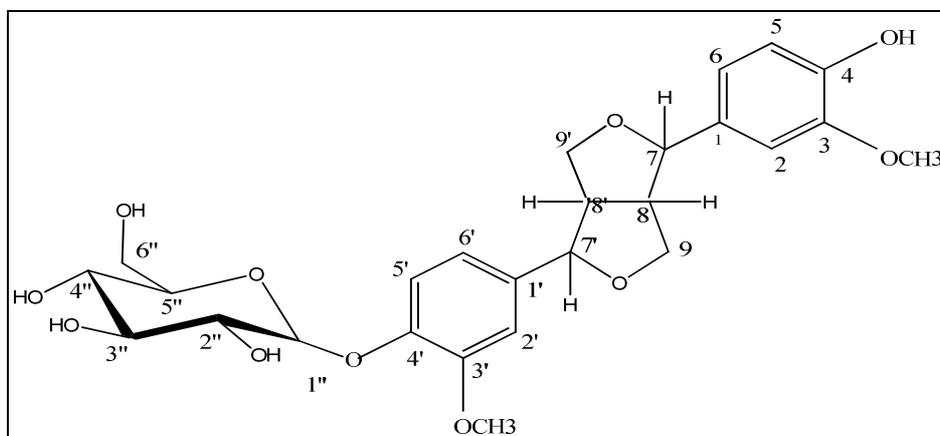
Position	Composé Tm-14		Composé Tm-13	
	δH, mult, J(Hz)	δC(ppm)	δH, mult, J(Hz)	δC(ppm)
1	-	201,9		202,6
2	5,91, <i>s</i>	126,2	5,90, <i>s</i>	125,9
3	-	165,2		159,0
4	2,70, <i>d</i> , 8,7	57,1	-	143,6
5	-	36,9	-	36,9
6	2,05 2,49	48,5	2,37	54,6
7	5,74, <i>dd</i> , 16 ; 8,7	131,4	6,32, <i>t</i> , 6 ; 13	134,0
8	5,78, <i>dd</i> , 16 ; 6	137,4	2,75	38,2
9	4,48, <i>q</i> , 6	74,7	4,01	77,3
10	1,30, <i>d</i> , 6	22,7	1,32, <i>d</i> , 6,3	21,8
11	1,98	23,5	2,16	22,8
12	1,06	27,8	1,34	30,1
13		27,8	1,34	28,8
Glucose				
1'	4,27, <i>d</i> , 7,2	101,3	4,41, <i>d</i> , 7,7	103,4
2'	3,19	74,7	3,21	74,8
3'	3,27	78,0	3,28	78,6
4'	3,26	71,7	3,31	71,7
5'	3,12	77,8	3,34	78,6
6'	3,64, <i>dd</i> , 12; 5 3,85, <i>dd</i> , 12; 2	62,2	3,67, <i>dd</i> , 12 ; 5,5 3,87, <i>dd</i> , 12 ; 2,5	62,6

Tableau II.30. Déplacements chimiques en RMN ¹H et RMN ¹³C des produits Tm-15 et Tm-16

Position	Composé Tm-15		Composé Tm-16	
	δH(ppm), mult, J(Hz)	δC(ppm)	δH(ppm), mult, J(Hz)	δC(ppm)
1	-	37,4	-	42,1
2	2,00, <i>d</i> , 17 2,52, <i>d</i> , 17	47,6	2,19 2,63	50,3
3	-	202,4	-	201,4
4	5,84, <i>s</i>	124,9	5,88	126,9
5	-	166,1	-	166,6
6	1,98	52,3	-	79,6
7	1,70 1,86	26,1	6,00, <i>d</i> , 16 -	133,7
8	1,50 1,70	36,5	5,77, <i>dd</i> , 16,6 -	133,7
9	3,85, <i>m</i>	77,7	4,55	73,9
10	1,28, <i>d</i> , 6	21,9	1,32, <i>d</i> , 6	21,9
11	2,02	24,8	1,95	19,0
12	1,04	28,7	1,07	22,8
13	1,14	27,0	1,16	23,7
Glucose				
1'	4,34, <i>d</i> , 7,8	103,3	4,29, <i>d</i> , 7,7	101,3
2'	3,17	74,2	3,22	74,4
3'	3,29	77,2	3,29	77,8
4'	3,26	71,2	3,29	71,4
5'	3,37	77,7	3,36	77,8
6'	3,69, <i>dd</i> , 12 ; 5 3,87, <i>dd</i> , 12 ; 2	62,6	3,66, <i>dd</i> , 12 ; 5,5 3,87, <i>dd</i> , 12 ; 2,5	62,4

2.6. Détermination structurale des composés de type lignanes

2.6.1. Elucidation structurale du composé Tm-17

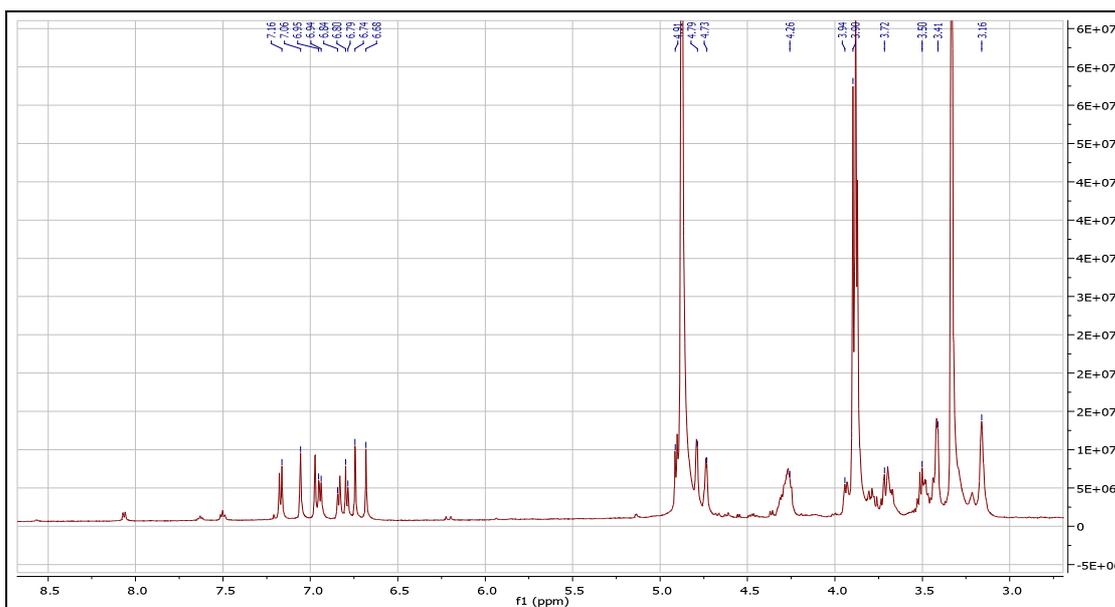


Pinoresinol-4'-O- β -D-glucoside.

Ce composé a été isolé en mélange avec le composé **Tm-18** sous forme de cristaux blancs.

Le spectre de masse obtenu par ESI-MS (mode négatif), donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 533[M-H]⁻ en accord avec une masse moléculaire de 534 Da et une formule brute de C₂₄H₂₀O₁₁.

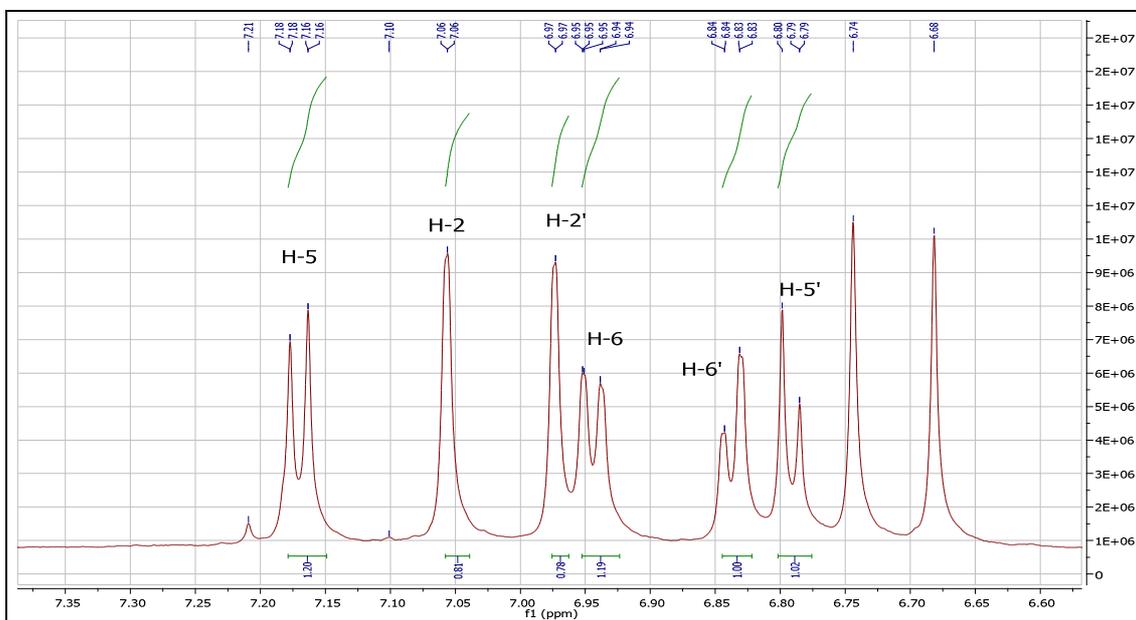
L'examen du spectre RMN ¹H (Spectre 2.48) et les séquences HSQC (Spectre 2.51), HMBC (Spectre 2.52) réalisés dans MeOH-d₄ à 600 MHz nous ont permis d'extraire les signaux attribuables à ce composé qui montrent deux zones aromatique et aliphatique.



Spectre 2.48. Spectre RMN¹H du composé **Tm-17** (600 MHz, MeOH-d₄)

La zone aromatique révèle la présence de six protons aromatiques. La multiplicité observée pour chaque proton aromatique sur le spectre RMN ^1H et la mesure des constantes de couplage indiquent la présence de deux cycles aromatiques : 1-3-4 tri-substitués on les notes A et B. En effet, le doublet à $\delta = 7,07$ ppm avec $J = 1,6$ Hz correspond au proton H-2 est couplé avec H-6 (6,94 ppm) qui est situé en position *mé*ta suite à sa multiplicité (*dd*, $J = 8,3$; $1,6$ Hz), cette dernière indique un autre couplage de H-6 avec un proton en position *ortho* qui est le H-5 à $\delta = 7,17$ ppm (*d*, $J = 8,3$ Hz).

De la même manière, l'attribution des protons du deuxième cycle aromatique B a été faite comme suit : H-2' à $\delta = 6,96$ ppm (*d*, $J = 1,5$ Hz), H-6' à $\delta = 6,84$ ppm (*dd*, $J = 8,6$; $1,5$ Hz) et H-5' à $\delta = 6,77$ ppm (*d*, $J = 8,6$ Hz).

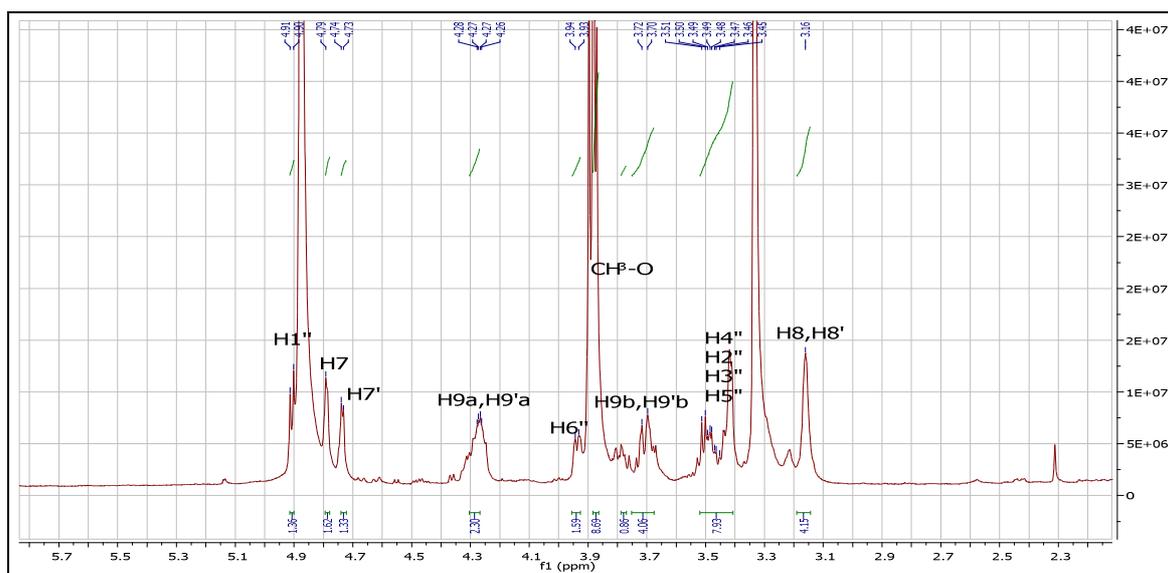


Spectre 2.49. Spectre RMN ^1H ; signaux relatifs au composé **Tm-17** (600 MHz, MeOH- d_4),
(partie aromatique)

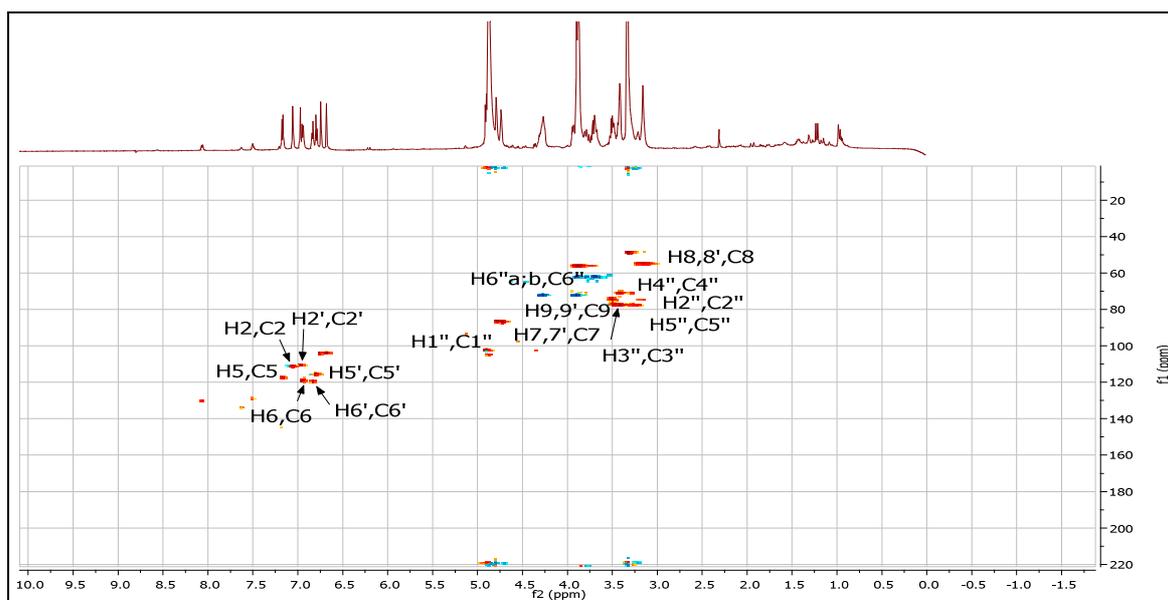
Les autres positions du cycle aromatique sont occupées par des carbones quaternaires, le cycle A : est lié à un méthoxy ($\delta_{\text{H}} = 3,88 / \delta_{\text{C}} = 55,3$) en C-3, hydroxyle en C-4, et au reste de la molécule en C-1.

Le cycle B : est substitué par un méthoxy ($\delta_{\text{H}} = 3,87 / \delta_{\text{C}} = 55,3$) en C-3', par un β -glucose (1H, *d*, $J = 7,5$ Hz, $\delta_{\text{H}} = 4,9$ ppm, $\delta_{\text{C}} = 103,0$ ppm) en C-4' et par le reste de la molécule en C-1', comme le montre le spectre HMBC (**Spectre 2.52**).

En plus des éléments structuraux identifiés précédemment, le spectre RMN ^1H (**Spectre 2.50**) présente une zone aliphatique qui est révélée par la présence de 5 signaux. L'attachement de ces protons à leurs carbones sur le spectre HSQC (**Spectre 2.53**) en formant deux méthylènes (δ_{H} 4,27 et 3,90/ δ_{C} 72,5), (δ_{H} 4,27 et 3,90/ δ_{C} 75,2) attribuables à H-9a/H-9b et H-9'a/H-9'b respectivement et quatre groupements méthines à (δ_{H} 4,78/ δ_{C} 86,9), (δ_{H} 4,74/ δ_{C} 87,1) et (δ_{H} 3,15/ δ_{C} 55,3) attribuables à H-7, H-7' et H-8/H-8' respectivement.



Spectre 2.50. Spectre RMN ^1H ; signaux relatifs au composé **Tm-17** (600 MHz, MeOH- d_4),
(partie aliphatique)



Spectre 2.51. Spectre HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$; corrélations relatifs au composé **Tm-17** (600 MHz, MeOH- d_4)

Le spectre HMBC (**Spectre 2.52**) montre la présence d'un squelette de type furofurane à partir des corrélations observées entre :

H-7 et les carbones C-8 ($\delta_C = 55,3$ ppm), C-9 et C-1 ($\delta_C = 136,5$ ppm).

H-7' et les carbones C-8', C-9' et C-1' ($\delta_C = 132,9$ ppm).

Ces informations renferment l'attachement de l'entité furofurane par le C-7 et le C-7' aux carbones C-1 et C-1' de deux cycle aromatiques A et B respectivement (**Figure II.18**).

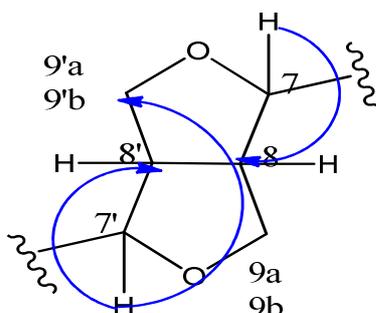
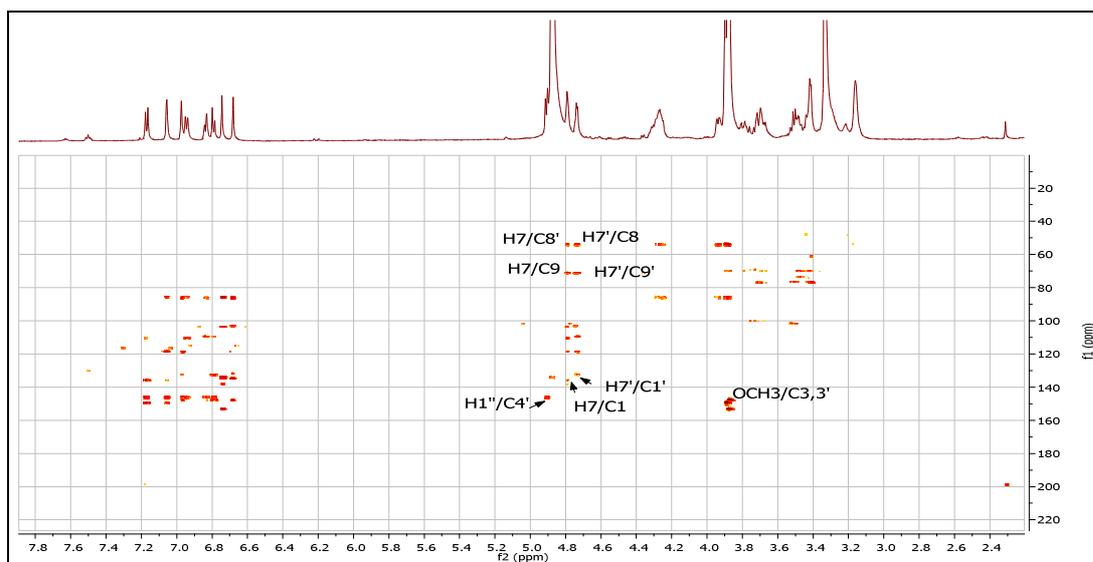


Figure II.17. Corrélations HMBC de la partie furofurane **Tm-17**



Spectre 2.52. Spectre HMBC¹H-¹³C ; corrélations relatifs au composé **Tm-17** (600 MHz, MeOH-d₄)

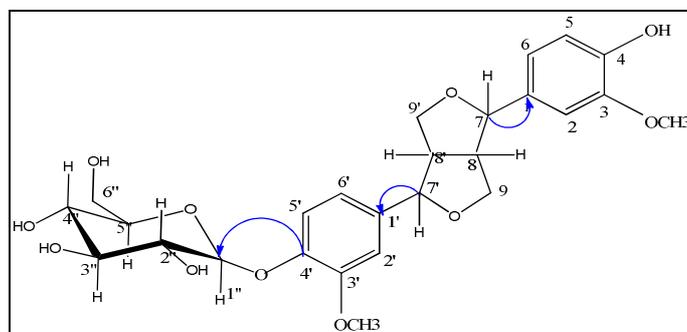
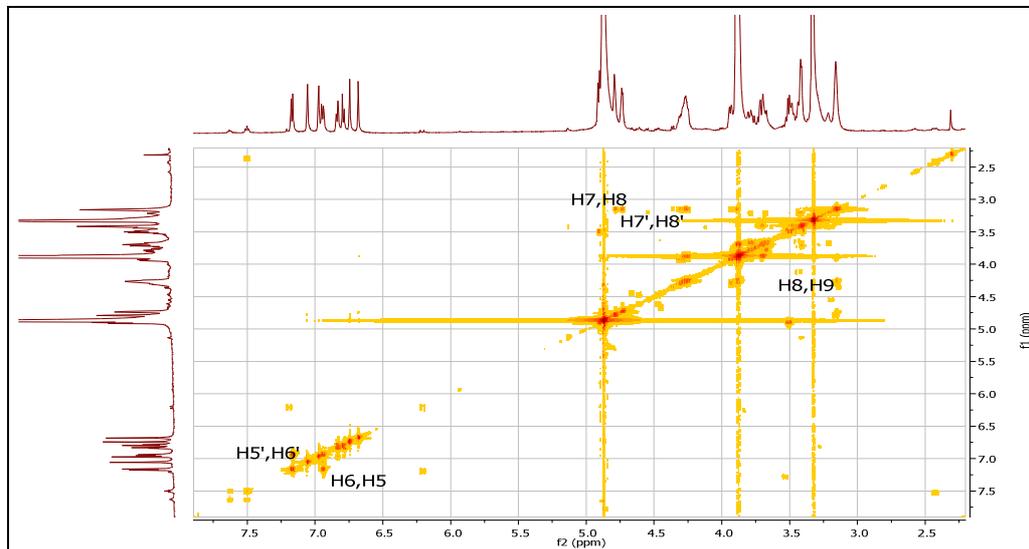


Figure II.18. Corrélations HMBC **Tm-17**

Par ailleurs, le spectre Cosy (**Spectre 2.53**) montre les corrélations attendues entre les protons géminés du groupement oxyméthylènes H-9a et H-9b, ainsi qu'entre les protons :

H-7/H-8, H-7'/H-8', H-9/H-8 et H-9'/H-8' (**Figure II.19**).



Spectre 2.53. Spectre Cosy $^1\text{H}-^1\text{H}$; corrélations relatifs au composé **Tm-17** (600 MHz, MeOH- d_4)

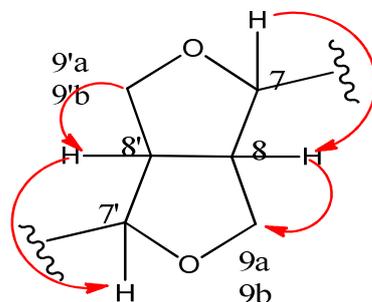
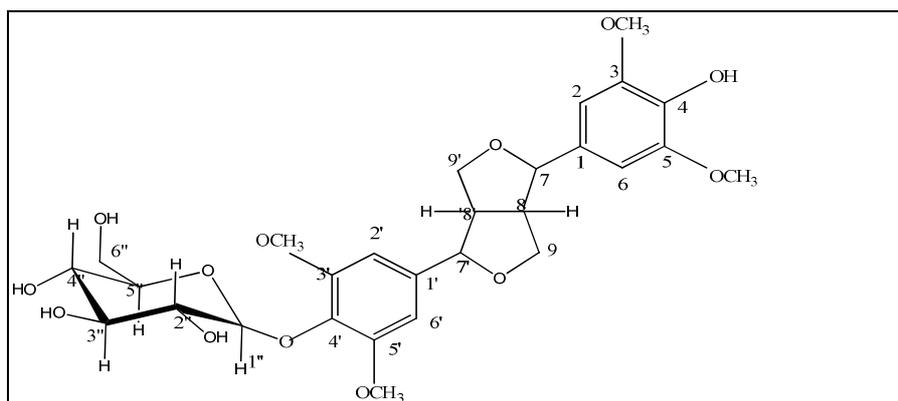


Figure II.19. Corrélations COSY de la partie furofurane **Tm-17**

Ces données spectrales reportés dans (le tableau II.31.) et par comparaison à celles de la littérature [13], nous a permis de décrire ce composé comme étant : Pinoresinol-4'- O - β -D-glucoside.

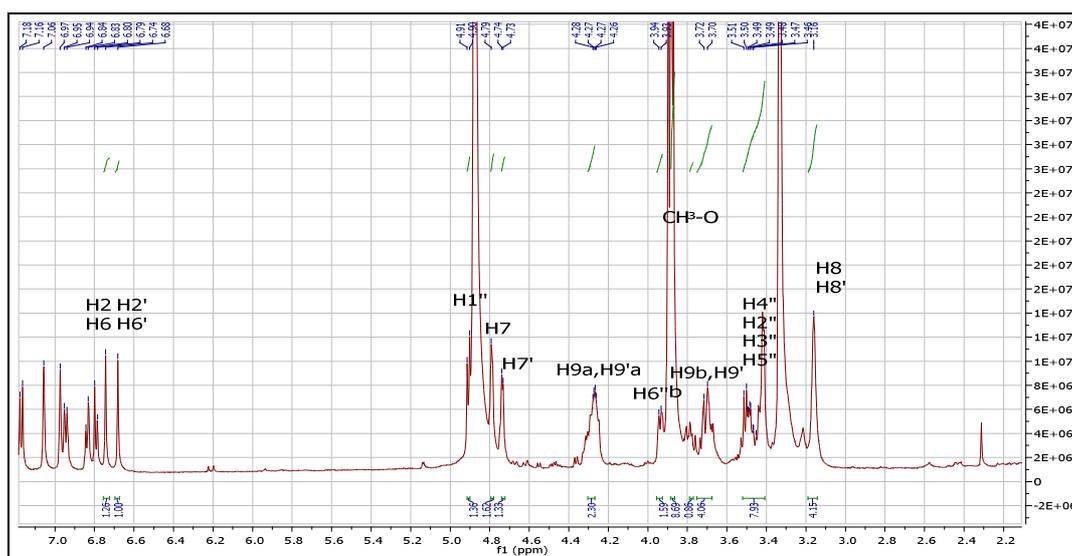
2.6.2. Elucidation structurale du composé Tm-18

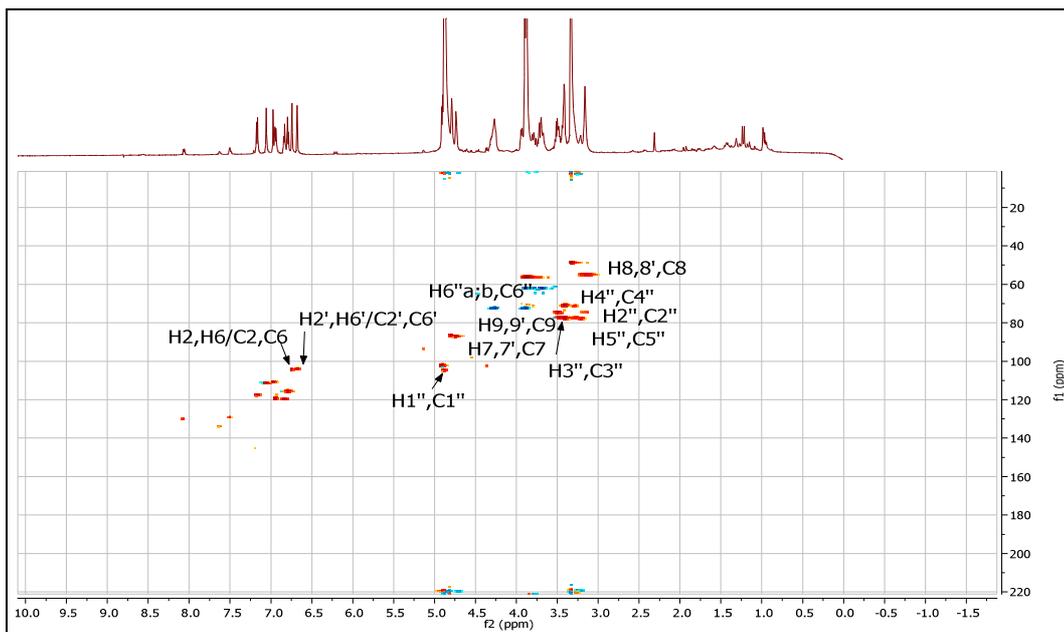
Syringaresinol-4-*O*- β -D-glucopyranoside.

Les signaux attribuables à ce composé montrent une grande ressemblance à ceux de produit **Tm-17**.

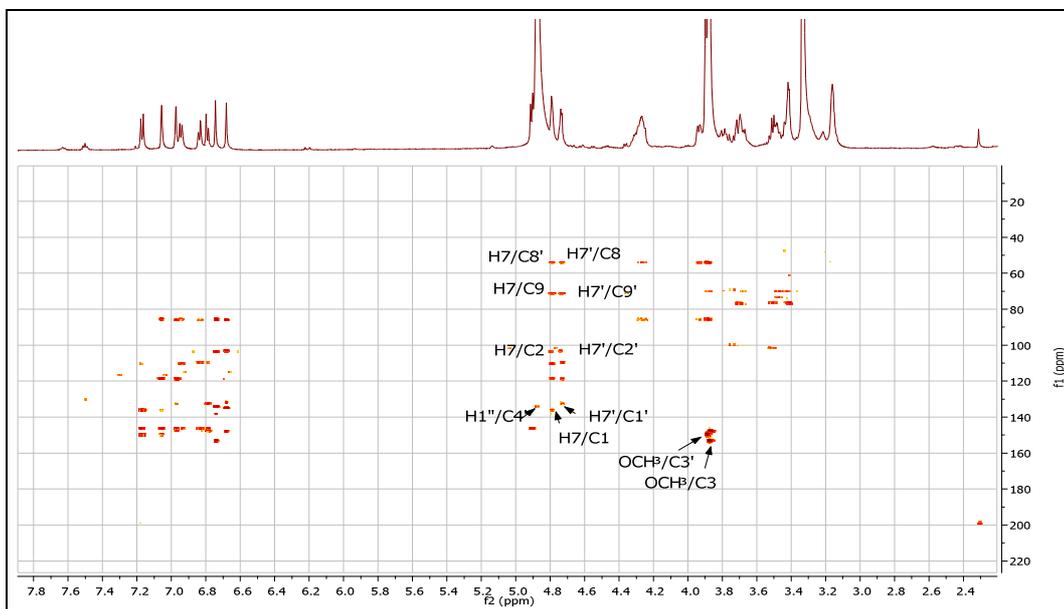
La présence de deux groupements méthoxy en position C-5/ C-5' selon le spectre HMBC (**Spectre 2.56**), conduisent à l'apparition de deux signaux : le premier signal à $\delta = 6,74$ (*d*, $J = 1,4$ Hz) attribuable à H-2 / H-6 du cycle A, et le deuxième à $\delta = 6,68$ ppm (*d*, $J = 1,5$ Hz) attribuable à H-2' / H-6' du cycle B, ce qui indique que les deux cycles aromatiques sont tétra-substitués.

Les autres corrélations observées qui correspondent à celles caractéristiques d'un squelette lignane, sont mises en évidence dans l'élucidation du composé **Tm-17**.

Spectre 2.54. Spectre RMN¹H ; signaux relatifs au composé **Tm-18** (600 MHz, MeOH-*d*₄)



Spectre 2.55. Spectre HSQC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$; corrélations relatifs au composé **Tm-18** (600 MHz, MeOH- d_4)



Spectre 2.56. Spectre HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$; corrélations relatifs au composé **Tm-18** (600 MHz, MeOH- d_4)

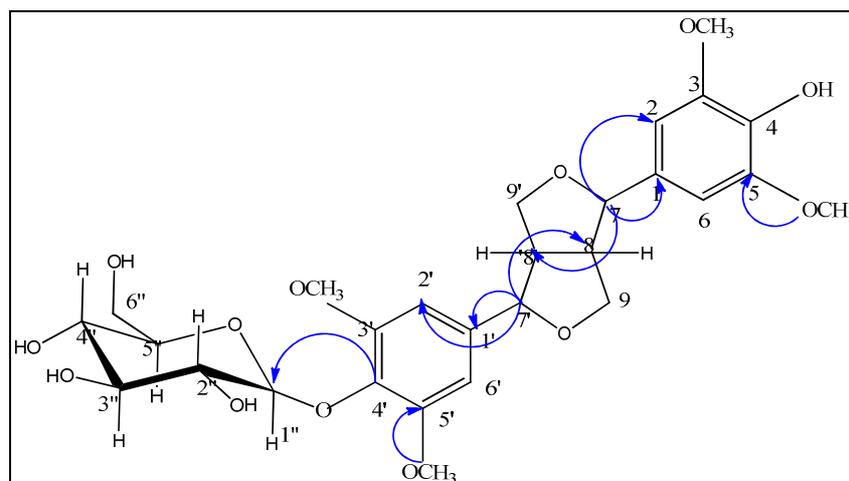


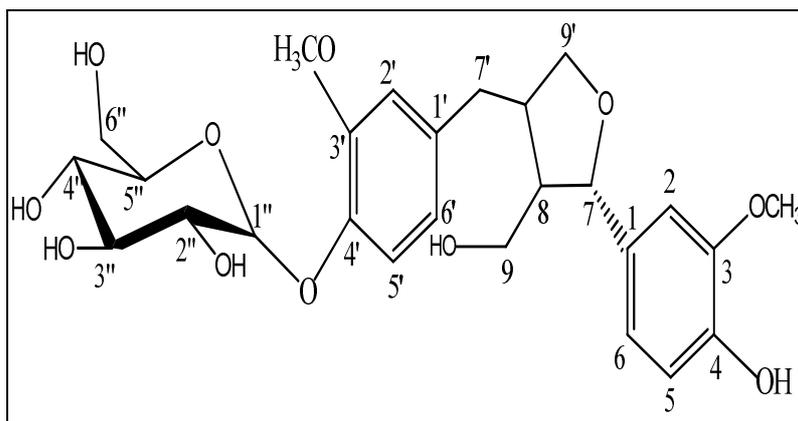
Figure II.20. Corrélations HMBC **Tm-18**

Les données spectrales regroupées dans (tableau II.31) du composé **Tm-18** et par comparaison à celles de la littérature [14], nous a permis de décrire ce composé comme étant : syringaresinol-4-*O*-β-D-glucopyranoside.

Tableau II.31. Déplacements chimiques RMN ¹H et RMN ¹³C des produits Tm-17et Tm-18

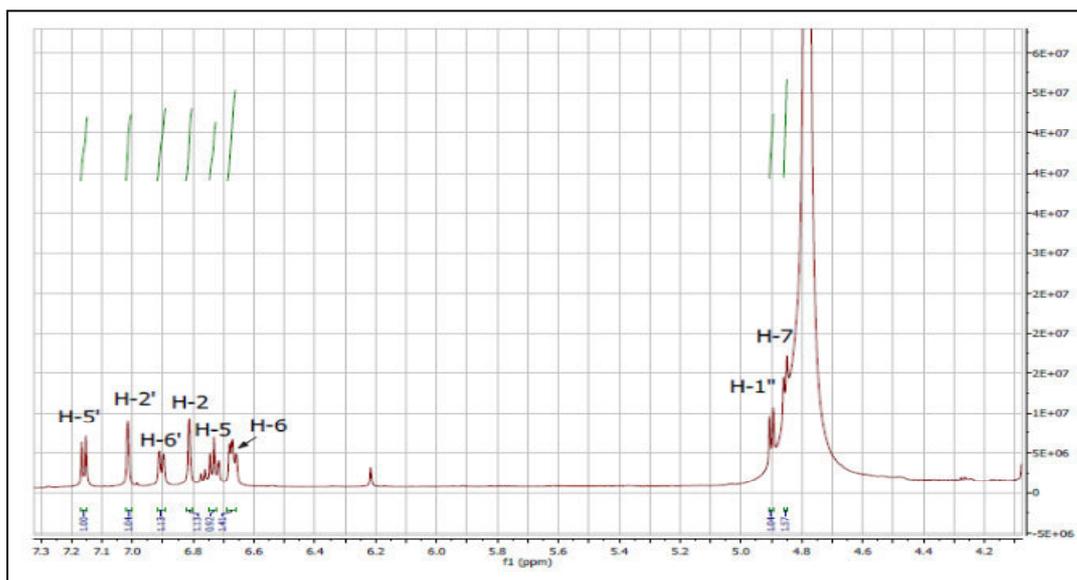
Position	Composé Tm-18		Composé Tm-17	
	δH(ppm), mult, J(Hz)	δC(ppm)	δH(ppm), mult, J(Hz)	δC(ppm)
1	-	138,5	-	136,5
2	6,74, <i>s</i>	103,0	7,07, <i>d</i> , 1,6	118,3
3	-	153,3	-	115,2
4	-	134,4	-	146,6
5	-	153,3	7,17, <i>d</i> , 8,3	149,7
6	6,74, <i>s</i>	103,4	6,94, <i>dd</i> , 8,3	110,8
7	4,78, <i>d</i> , 4	86,9	4,78, <i>d</i> , 4	86,9
8,8'	3,15	55,5	3,15	55,3
9a,	4,27	72,5	4,27	72,5
9'a	4,27	75,5	4,27	75,5
9b	3,90	72,5	3,90	72,5
9'b	3,90	75,5	3,90	75,5
7'	4,74, <i>d</i> , 4.2	87,5	4,74, <i>d</i> , 4	87,1
1'	-	132,0	-	132,9
2'	6,68, <i>s</i>	103,3	6,96, <i>d</i> , 1,5	119,3
3'	-	148,2	-	115,2
4'	-	135,1	-	146,1
5'	-	148,8	6,77, <i>d</i> , 8,6	147,8
6'	6,68, <i>s</i>	103,3	6,96, <i>dd</i> , 8,6	110,3
Glucose				
1''	4,90, <i>d</i> ,7,5	103,0	4,90, <i>d</i> , 7,5	103,0
2''	3,50	73,8	3,50	73,8
3''	3,48	77,1	3,48	77,1
4''	3,41	70,4	3,41	70,4
5''	3,41	77,7	3,41	77,7
6''	3,63, <i>dd</i> , 12,5	62,2	3,63, <i>dd</i> ,11,8	62,2
	3,87, <i>dd</i> , 12,5		3,87, <i>dd</i> , 11,8	
O-CH₃	3,87	55,3	3,87	55,3
O-CH₃				

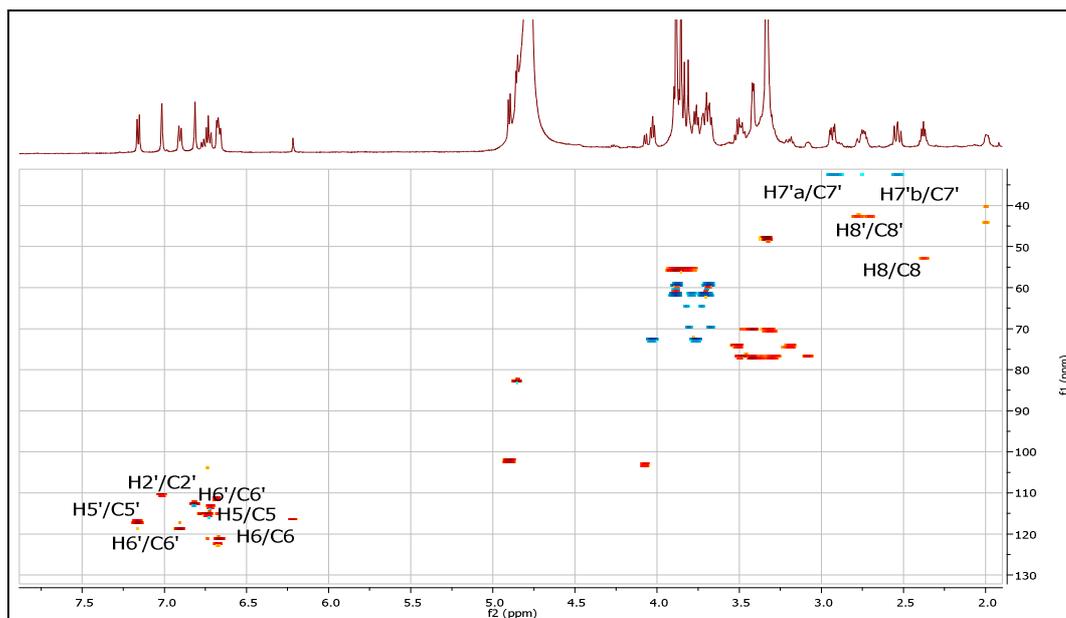
2.6.2. Elucidation structurale du composé Tm-19

Lariciresinol-4'-O- β -D-glucopyranoside.

L'examen du spectre RMN ^1H (Spectre 2.58) et la séquence HSQC (Spectre 2.59), révèlent la présence de :

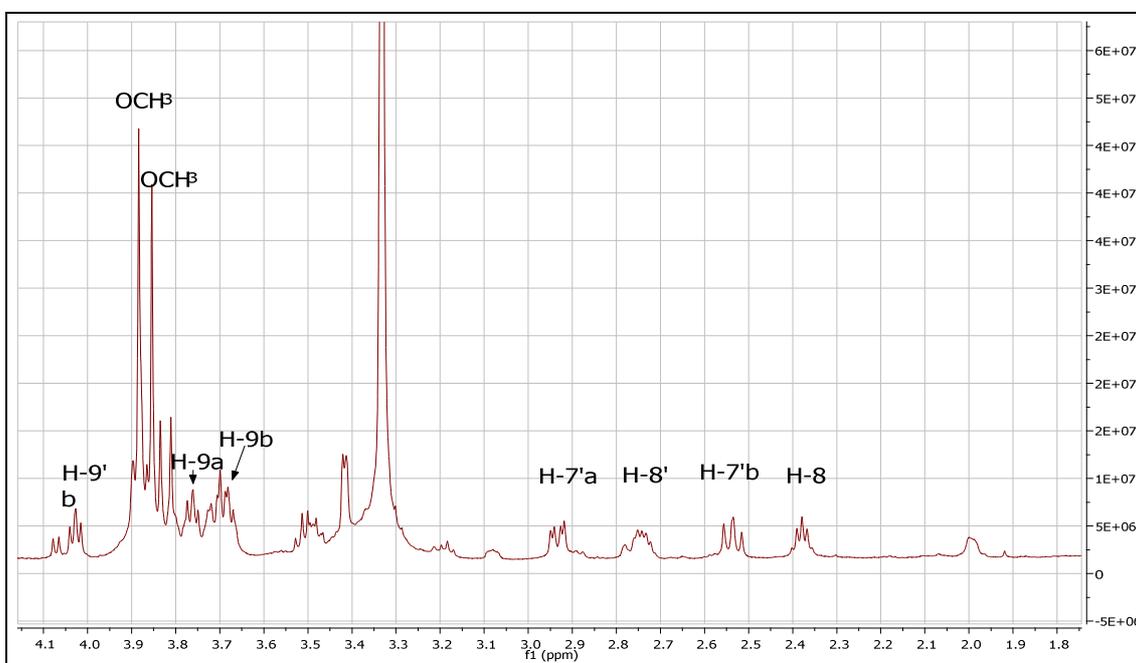
six protons aromatiques à $\delta = 6,74$ ppm (1H, *d*, 8,06 Hz, H-5), $\delta = 6,68$ ppm (1H : *d*, 8,06 Hz, H-6), $\delta = 6,82$ ppm (1H, *s*, H-2) qui correspondent au cycle A et à $\delta = 7,17$ ppm (1H, *d*, 8,30 Hz, H-5'), $\delta = 7,00$ ppm (1H, *s*, H-2') et $\delta = 6,91$ ppm (1H, *d*, 8,30 Hz, H-6') relatifs au cycle B ; ces attributions sont confirmées par les constantes de couplage indiquant la présence de deux cycles aromatiques indépendantes, tri- substitués A et B, ainsi la mesure sur le spectre Cosy (Spectre 2.) qui révèle des taches de corrélation entre les protons H5/H6 et H5'/H6'.

Spectre 2.58. Spectre RMN ^1H du composé Tm-19 (partie aromatique) (600 MHz, MeOH- d_4)

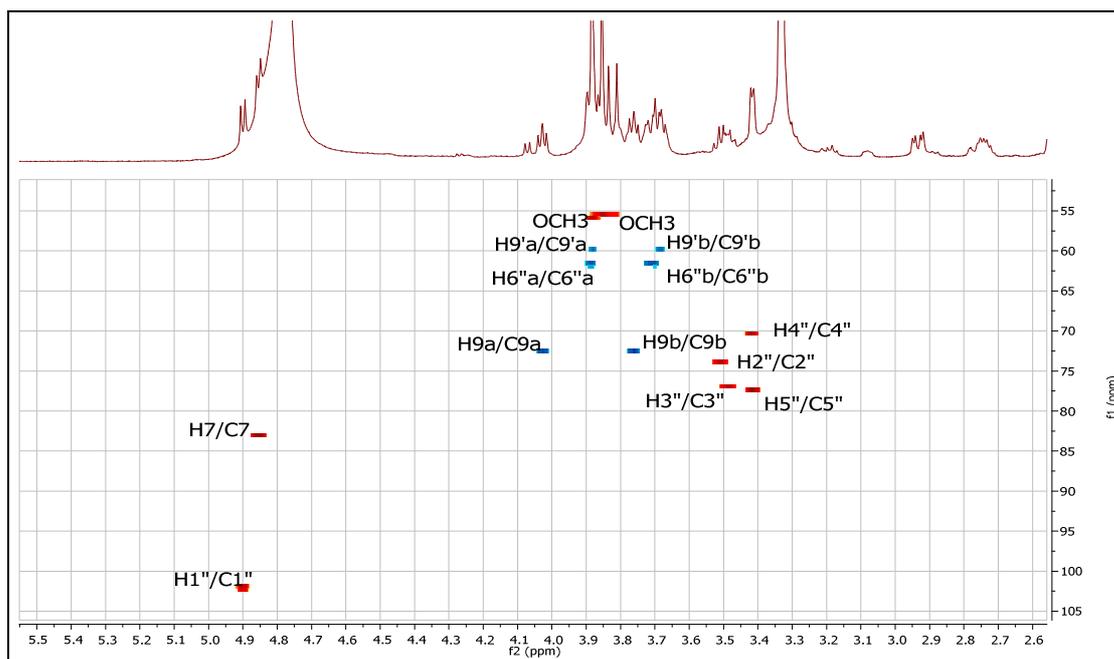


Spectre2.59. Spectre HSQC ^1H - ^1H du composé **Tm-19** (600 MHz, MeOH- d_4)

Les autres positions des deux cycles aromatiques sont occupées par des carbones quaternaires, liés à un méthoxyle en C-3/C-3', hydroxyle en C-4, β -glucose en C-4', et au reste de la molécule en C-1/C-1', comme le montre le spectre HMBC.

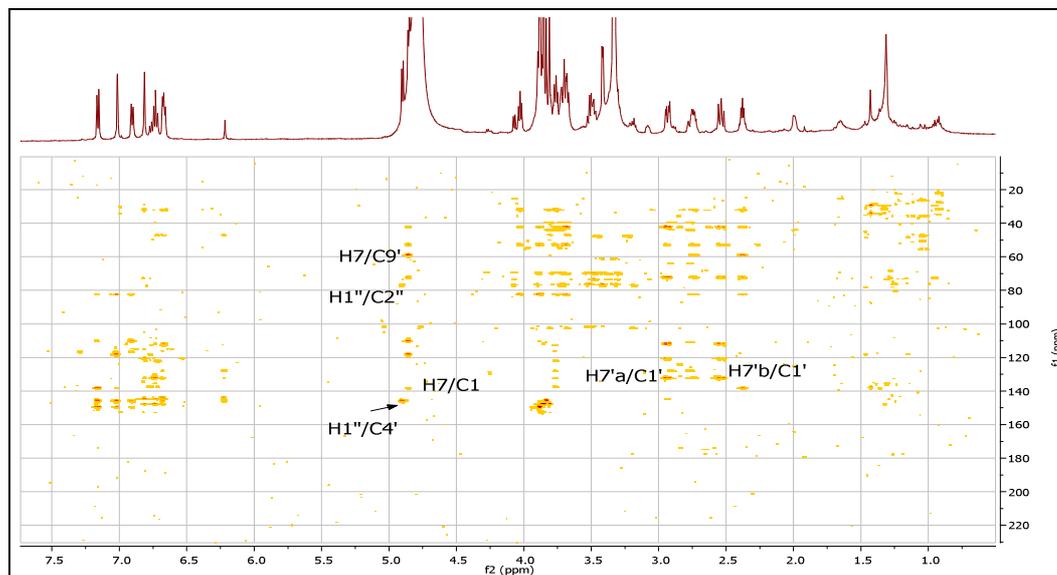


Spectre2.58.1. Spectre RMN ^1H du composé **Tm-19**(partie aliphatique)(600 MHz, MeOH- d_4)



Spectre 2.59.2. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C du composé **Tm-19** (600 MHz, MeOH- d_4)

Les corrélations HMBC (**Spectre 2.60**) indiquent également que la connexion de deux cycles à un motif furane, est effectuée via C-7/ C-7' dont :



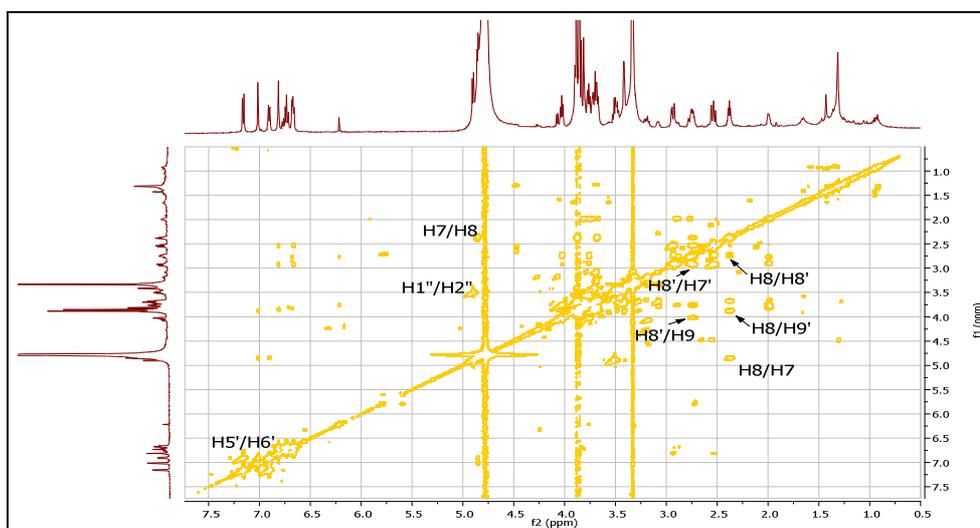
Spectre 2.60. Spectre HMBC du composé **Tm-19** (600 MHz, MeOH- d_4)

Le proton H-7 (4,85ppm) montre une tache de corrélation avec un carbone localisé à $\delta=139,4$ ppm, attribuable à C-1 du cycle A. et une autre tache avec un méthine à $\delta=2,37$ ppm attribuable à H-8 qui corrèle en Cosy avec un proton à $\delta=2,77$ ppm, attribuable à H-8' le même proton corrèle avec groupement méthylène à $\delta=4,03$ et $3,96$ ppm, portés par le carbone résonnant à $\delta=73,5$ ppm, attribuable à un méthylène CH_2 (H-9).

Ce dernier est lié à C-7(83,6ppm) par un pont oxygène pour former le motif furane vu les valeurs de leurs déplacements chimiques.

Le groupement méthylène à $\delta = 2,93$ et $2,54$ ppm, attribuable à H-7' présente une tache de corrélation avec le carbone à $\delta = 133,6$ ppm, attribuable à C-1' de cycle B et une tache en Cosy (Spectre 2.61) par le proton H-8' ; Ces attributions permettent de lier la partie furane au deuxième cycle par ce groupement.

Un autre motif méthylène observé à $\delta = 3,68$ et $3,87$ ppm, porté sur le carbone résonne à $\delta = 60,4$ ppm selon HSQC, corrèle avec le H-8' en Cosy attribuable à H-9' (CH₂-O).



Spectre 2.61. Spectre Cosy ¹H-¹H du composé **Tm-19** (600 MHz, MeOH-d₄)

Les données spectrales RMN ¹H et ¹³C à 600 MHz réalisées dans (MeOH-d₄) sont rassemblées dans le tableau II.32.

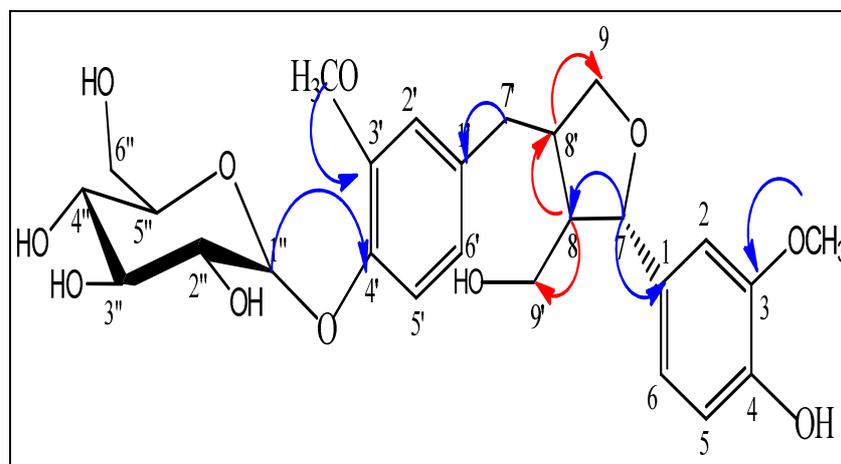


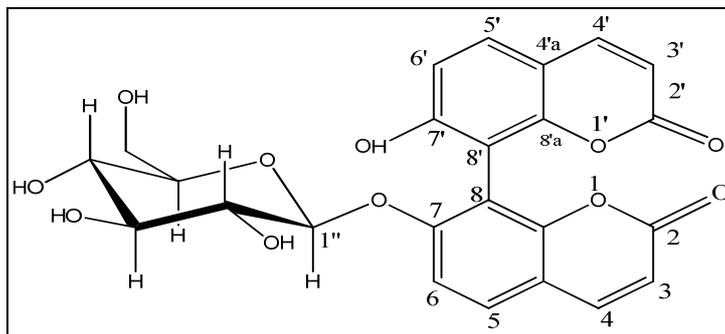
Figure II.19. Corrélations HMBC et Cosy **Tm-19**

Tableau II.32. Déplacements chimiques RMN ¹H, RMN ¹³C du produit **Tm-19**.

Position	δ H(ppm), mult, J(Hz)	δ C(ppm)
1	-	133,5
2	6,82, <i>s</i>	112,8
3	-	148,9
4	-	145,9
5	6,74, <i>d</i> , 8,06	115,8
6	6,68, <i>d</i> , 8,06	122,4
7	4,85	83,6
8	2,37	53,6
9b	3,68	60,4
9a	3,87	
7'b	2,54	33,3
7'a	2,93	
8'	2,99	43,2
9'b	3,96	73,5
9'a	4,03	
1'	-	139,4
2'	7,00, <i>s</i>	111,1
3'	-	151,1
4'	-	146,9
5'	7,17, <i>d</i> , 8,30	117,5
6'	6,91, <i>d</i> , 8,30	119,2
Glucose		
1''	4,89, <i>d</i> , 7,20	102,9
2''	3,52	74,5
3''	3,47	77,5
4''	3,33	71,1
5''	3,40	77,5
6''	3,71, <i>dd</i> , 11,7	62,1
	3,89, <i>dd</i> , 11,7	
O-CH ₃	3,87	56,1
O-CH ₃		

Les données spectroscopiques du composé **Tm-19** et par comparaison à celles de la littérature [15], nous a permis de décrire ce composé comme étant : lariciresinol-4'-*O*- β -D-glucopyranoside.

2.7. Elucidation structurale du composé de type bis coumarine Tm-20



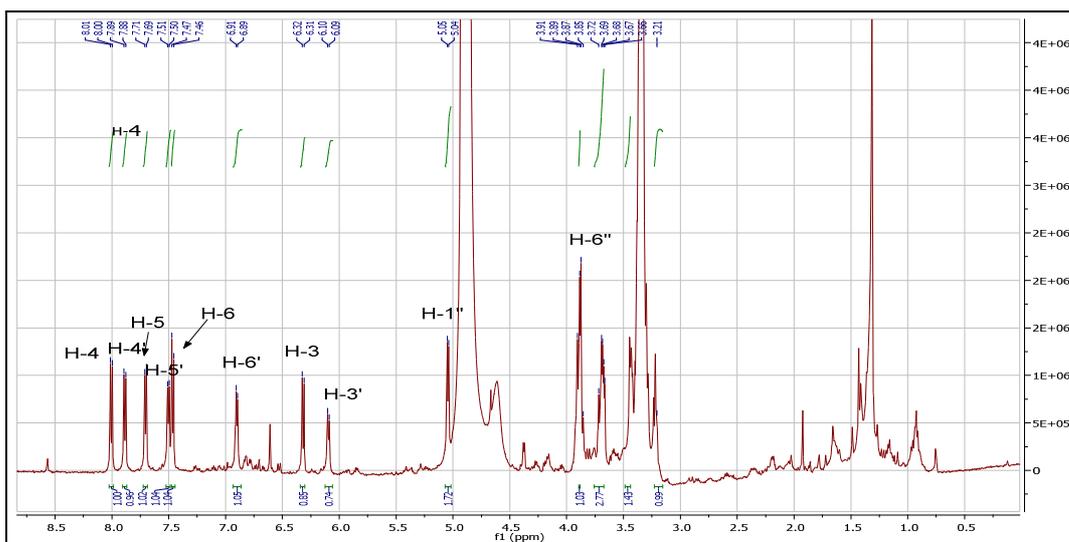
Giraldoide A.

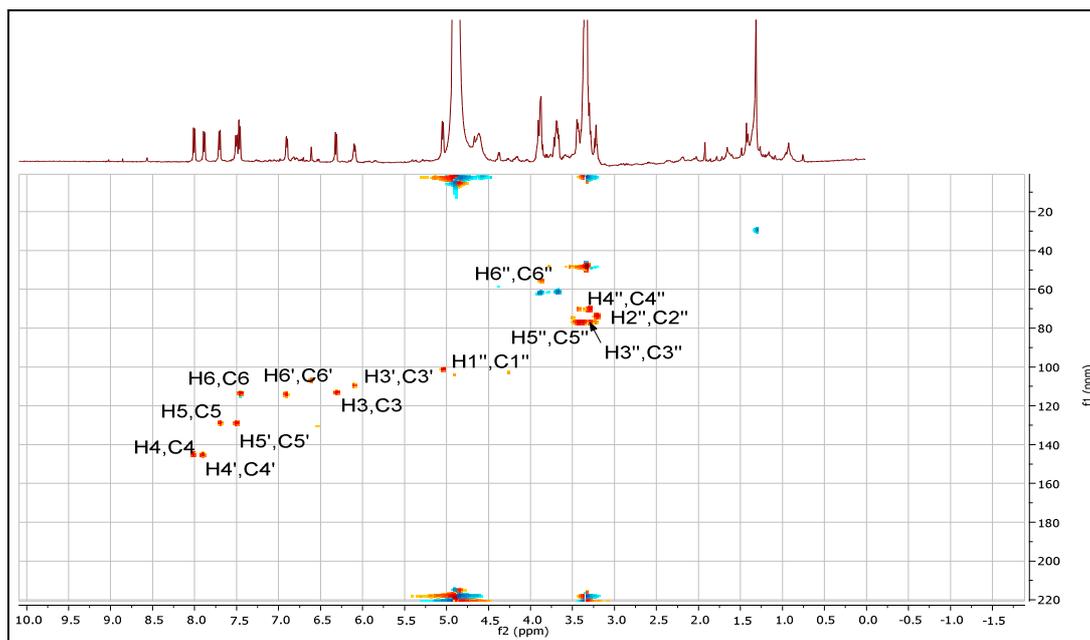
Le composé **Tm-20** a été obtenu sous forme d'une poudre blanche. Le spectre de masse obtenu par ESI-MS (mode positif), donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 507 $[M+Na]^+$ en accord avec une masse moléculaire de 484 Da et une formule brute $C_{24}H_{20}O_{11}$.

L'examen du spectre RMN 1H (**Spectre 2.62**) et la séquence HSQC (**Spectre 2.63**) à 600 MHz réalisés dans $MeOH-d_4$ montrent :

La présence de huit signaux attribuables aux protons aromatiques à : 8,08 (1 H, *d*, $J = 9,5$ Hz), 8,00 (1H, *d*, $J = 9,4$ Hz), 7,78 (1H, *d*, $J = 8,6$ Hz), 7,60 (1H, *d*, $J = 8,8$ Hz), 7,29 (1H, *d*, $J = 8,6$ Hz), 6,94 (1H, *d*, $J = 8,8$ Hz), 6,32 (1H, *d*, $J = 9,5$ Hz) et 6,18 (1H, *d*, $J = 9,4$ Hz).

Le spectre montre aussi la présence d'un doublet à $\delta = 5,04$ ppm ($J = 7,1$ Hz) porté sur le carbone résonnant à $\delta = 102,3$ ppm attribuable au proton anomérique d'un β -glucose.

Spectre 2.62. Spectre RMN 1H du composé **Tm-20** (600 MHz, $MeOH-d_4$)



Spectre 2.63. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C du composé **Tm-20** (600 MHz, MeOH- d_4)

Les constantes de couplage indiquent la présence de deux motifs identiques :

✓ Le premier est caractéristique par :

Un système AB à $\delta = 6,31$ et $8,08$ ppm ($J = 9,5$ Hz) porté par les carbones localisés à $\delta = 113,9$ et $146,1$ ppm caractéristique des protons H-3 et H-4 typiques d'une coumarine. confirmé par la tache de corrélation enregistrée dans l'expérience Cosy (**Spectre 2.64**).

Ce dernier corréle avec un carbone quaternaire à $\delta = 111,0$ ppm attribuable au C-4a, la même expérience montre une corrélation avec le doublet à $\delta = 7,70$ ppm ($J = 8,6$ Hz) attribuable à H-5 qui corréle avec le proton à $\delta = 7,47$ ppm ($J = 8,6$ Hz) selon la mesure en Cosy, on le note H-6.

L'expérience HMBC (**Spectre 2.65**) montre également une tache de corrélation entre le H-6 et un carbone à $\delta = 160$ ppm attribuable à C-7 qui corréle avec un proton à $\delta = 5,04$ ppm attribuable au proton anomérique du β -glucose conforte la liaison de l'unité sucre en cette position.

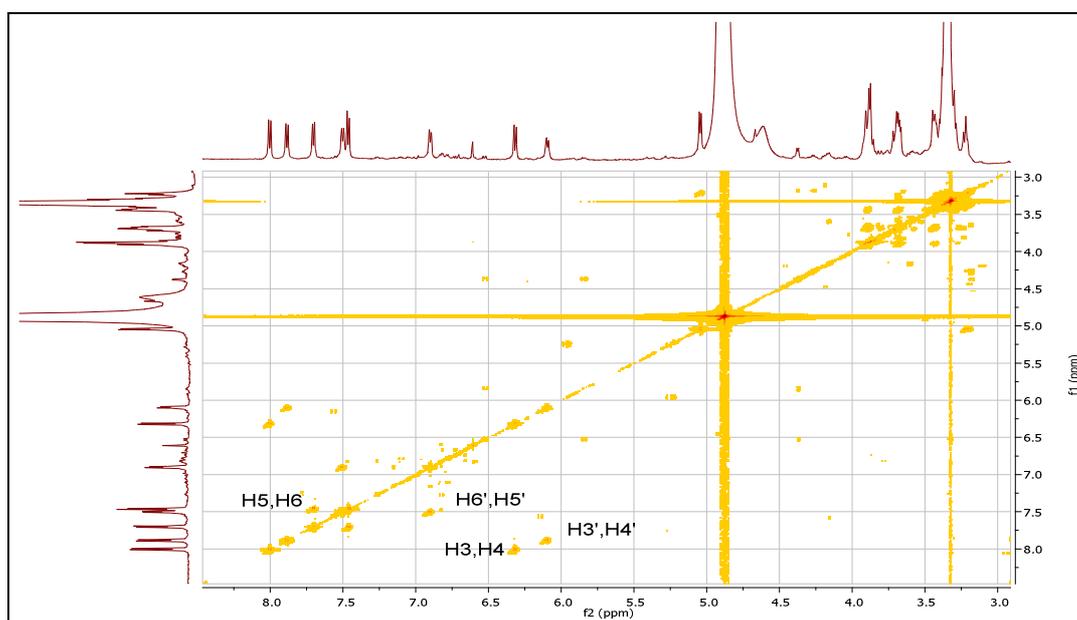
✓ Le deuxième motif montre aussi un squelette d'une coumarine d'après les signaux :

Deux doublets à $\delta = 6,18$ et $7,89$ ppm ($J = 9,5$ Hz) portés par les carbones localisés à $\delta = 111,0$ et $146,1$ ppm caractéristiques des protons H-3' et H-4' de la coumarine. La tache de corrélation dans l'analyse Cosy confirme cet attachement.

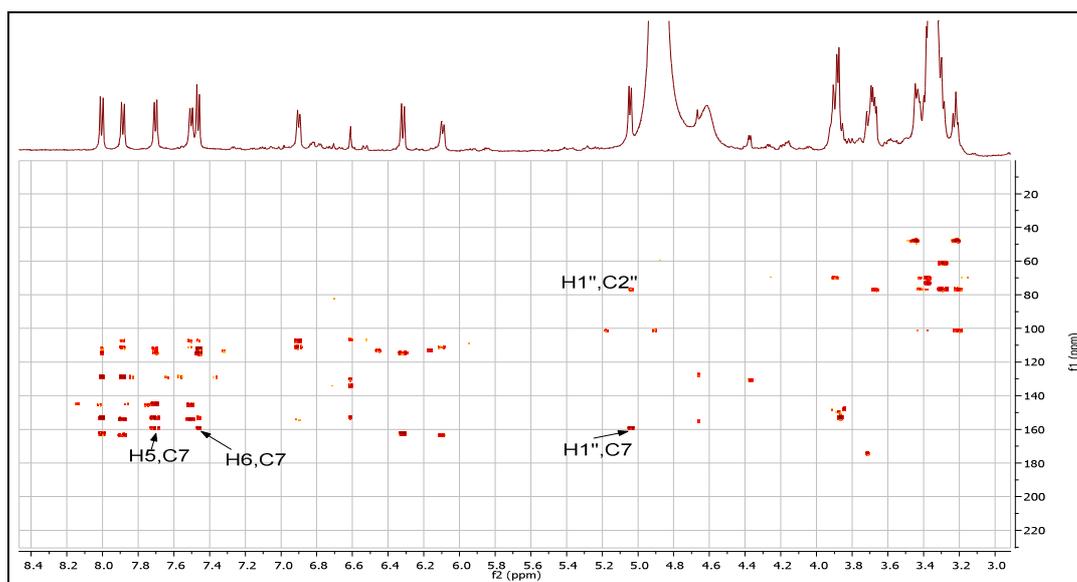
Deux doublets d'intégration 1H pour chacun à $\delta = 7,49$ et $6,91$ ppm ($J = 8,6$ Hz), attribuables aux protons H-5' et H-6'. Cette hypothèse est confirmée par les taches de corrélation entre H-4', H-5', H6' et le carbone localisé à $\delta = 107,5$ ppm qui est attribuable à C-8 dans l'expérience HMBC

Ce motif ne présente aucun substituant, ce qui révèle que le C-7' est hydroxylé.

Tous les sites sont occupés alors que les deux motifs sont liés entre eux par la jonction C-8/C-8'.



Spectre 2.64. Spectre Cosy ^1H - ^1H du composé **Tm-20** (600 MHz, MeOH- d_4)



Spectre 2.65. Spectre HMBC ^1H - ^{13}C du composé **Tm-20** (600 MHz, MeOH- d_4).

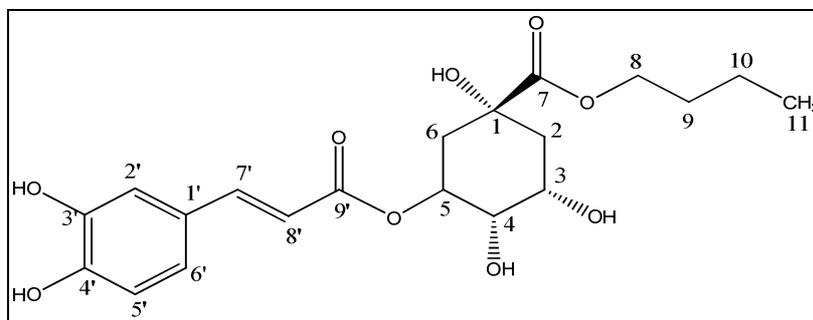
Tableau II.33. Déplacements chimiques en RMN ¹H et RMN ¹³C du produit **Tm-20**.

Position	$\delta\text{H}(\text{ppm}), \text{mult}, J(\text{Hz})$	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
2	-	160,1
3	6,32, <i>d</i> , 9,5	113,1
4	8,08, <i>d</i> , 9,5	144,6
5	7,78, <i>d</i> , 8,6	129,2
6	7,29, <i>d</i> , 8,6	111,7
7	-	157,9
8	-	109,5
10	-	113,3
9	-	153,2
2'	-	160,6
3'	6,18, <i>d</i> , 9,5	111,2
4'	8,00, <i>d</i> , 9,5	145,0
5'	7,60, <i>d</i> , 8,6	129,3
6'	6,94, <i>d</i> , 8,6	128,1
7'	-	158,9
8'	-	106,0
10'	-	111,3
9'	-	153,2
Glucose		
1''	5,04, <i>d</i> , 7,1	102,3
2''	3,21	74,3
3''	3,28	77,8
4''	3,42	70,9
5''	3,43	78,2
6''	3,68, <i>dd</i> , 12	62,3
	3,89, <i>dd</i> , 12	

Le composé **Tm-20** correspond à giraldoïde A. Ces données sont conformes à celles de la littérature [16].

2.8. Détermination structurale des composés de type acides phénoliques

2.8.1. Elucidation structurale du composé Tm-4

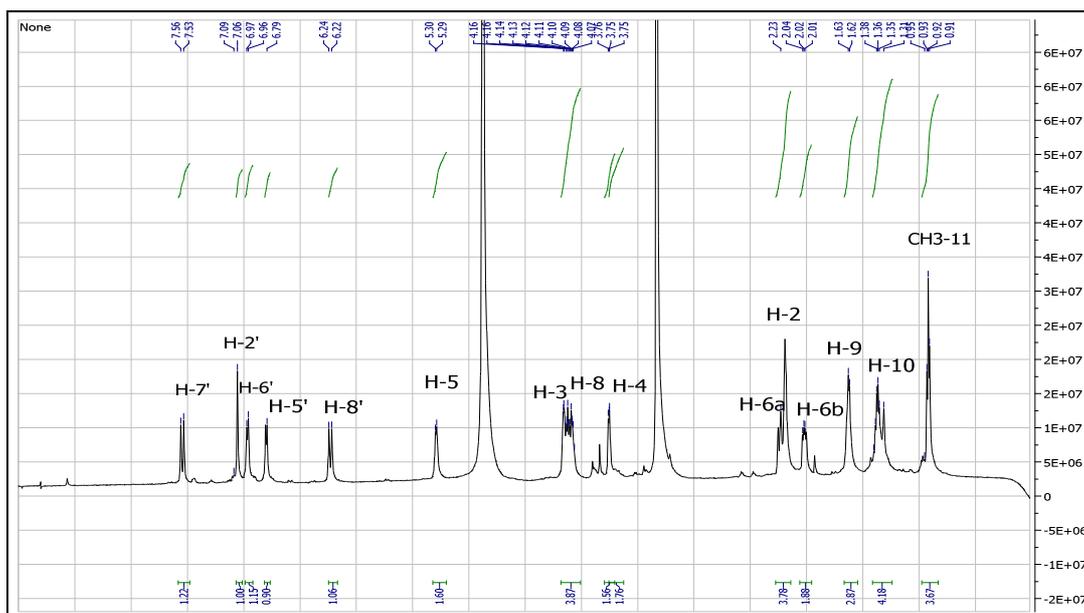


Acide chlorogénique butyle ester

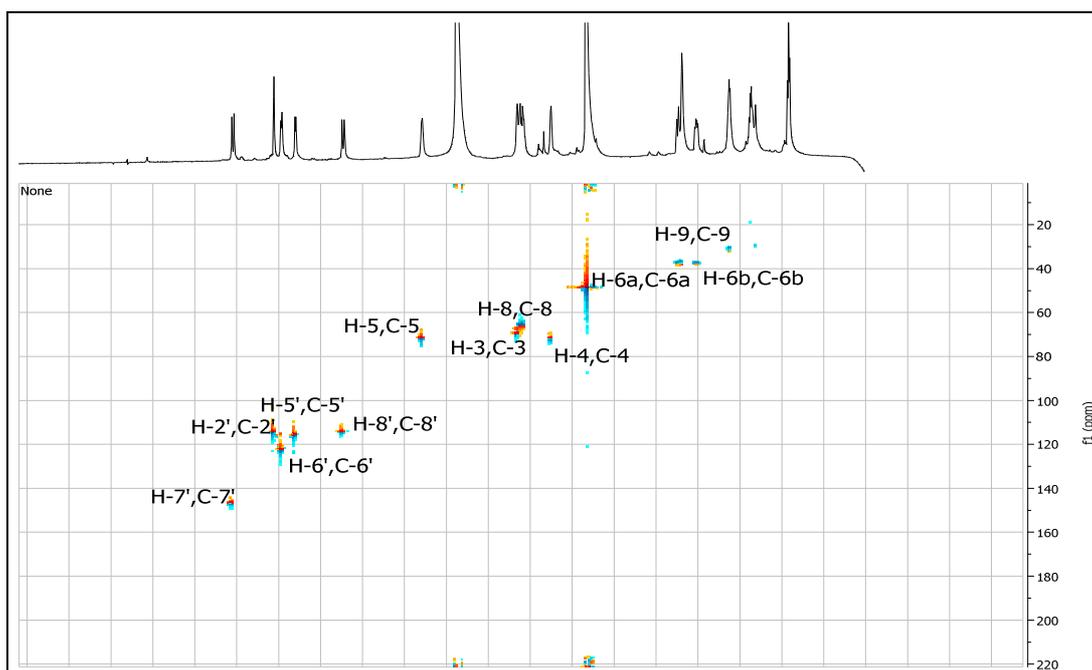
Ce composé est purifié sous forme des cristaux blancs. Le spectre de masse obtenu par ESI-MS (mode négatif) de composé **Tm-4**, donne un ion pseudo-moléculaire à m/z 411 $[M+H]^-$ en accord avec une masse moléculaire de 340 Da et une formule brute en $C_{20}H_{26}O_9$. Les données spectrales ; RMN^1H (**Spectre 2.66**) est l'expérience HSQC (**Spectre 2.67**) et par comparaison avec les données de la littérature [17], nous a permis d'identifier le composé **Tm-4** comme étant : acide Chlorogénique butyl ester dont :

Un système AMX à $\delta = 7,06$ ppm (1H, *s*, H-2'), $\delta = 6,96$ ppm (1H, *d*, $J=9,1$ Hz, H-6') et $\delta = 6,80$ ppm (1H, *d*, $J=9,1$ Hz, H-5') indiquant la présence d'un cycle aromatique tri-substitué par deux groupement hydroxyle en C-3' et C-4' et le reste de la molécule en C-1'.

-Deux doublets à $\delta = 7,52$ et $\delta = 6,21$ ppm d'intégration un 1H pour chacun, attribuables aux deux protons éthyléniques H-7' et H-8' avec une constante de couplage $J = 16,1$ Hz, ce qui indique un couplage *trans* entre eux. Cette connexion est confirmée par une tache de corrélation dans le spectre Cosy (**Spectre 2.69**).



Spectre 2.66. Spectre RMN ^1H du composé **Tm-4** (600 MHz, MeOH- d_4)



Spectre 2.67. Spectre HSQC ^1H - ^{13}C du composé **Tm-4** (600 MHz, MeOH- d_4)

L'examen du spectre HMBC (**Spectre2.68**) montre une liaison entre la fonction oléfinique et le cycle aromatique en C-1' vu la tache de corrélation entre H-7'et C-6'; ainsi que H-8'et C-1' ($\delta_c=127,1$ ppm) du cycle aromatique, le proton éthylénique H-7' corrèle également avec un carbone situé à $\delta=167,6$ ppm attribuable à un carbonyle C-9', qui montre une tache de corrélation avec un proton à $\delta=5,28$ ppm (*q*) noté H-5

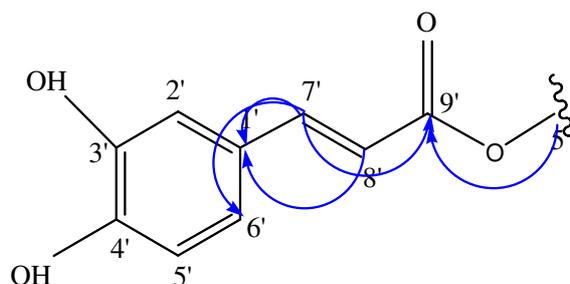
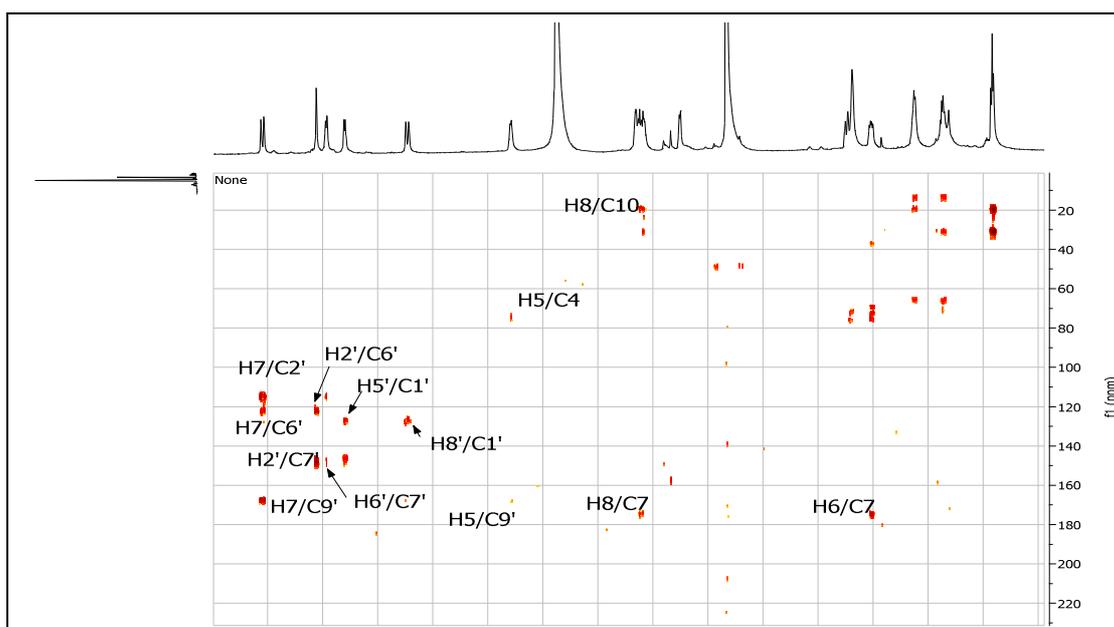


Figure II.21. Corrélations HMBC Tm-4

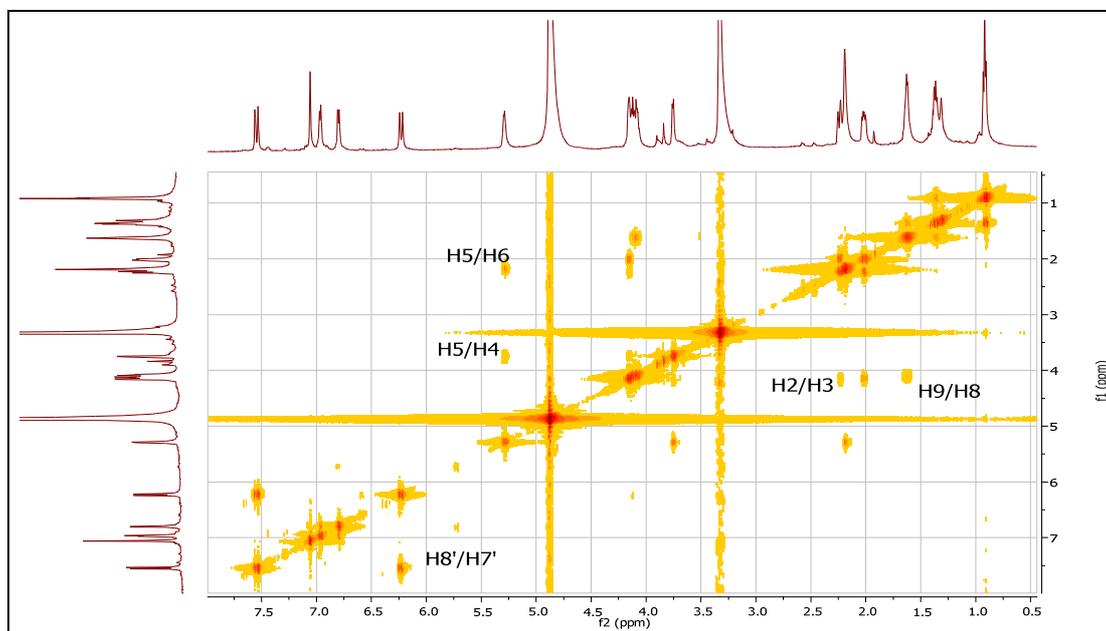


Spectre2.68. Spectre HMBC $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ du composé **Tm-4** (600 MHz, MeOH- d_4).

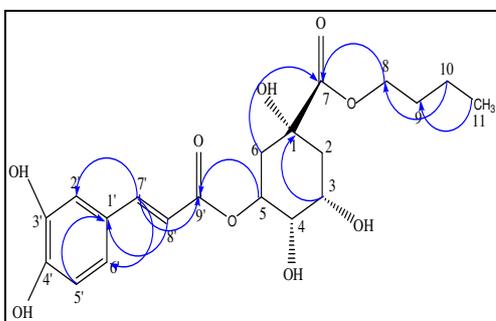
Le H-5 corrèle avec un proton à $\delta=3,74$ ppm en Cosy (**Spectre 2.69**), attribuable à H-4 porté par le carbone localisé à $\delta=71,7$ ppm, cela renferme la substitution de ce dernier par un hydroxyle. le H-5 corrèle également à un autre proton à $\delta=2,22$ et $2,02$ ppm ($\delta_c=37,8$ ppm), attribuable au groupement méthylène H-6a, H-6b respectivement. Ce dernier corrèle avec un carbone à $\delta=174,7$ ppm attribuable à un autre carbonyle C-7.

Le Cosy présente également une tache de corrélation entre H-2 et un proton à $\delta = 4,16$ ppm porté par le carbone à $\delta = 69,5$ ppm attribuable au H-3 suggère la substitution par un hydroxyle vue son valeur de déplacement chimique.

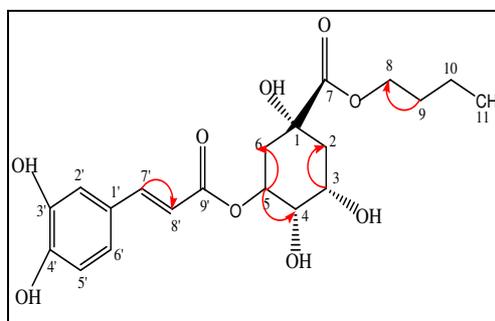
La molécule présente un autre motif caractéristique par un méthyle à $\delta = 0,91$ ppm deux groupement méthylènes à $\delta = 1,37$, $\delta = 1,63$ ppm et un triplet à $\delta = 4,11$ ppm porté par le carbone localisé à $\delta = 67,8$ ppm l'examen en HMBC montre l'attachement de ce dernier par un carbone à $\delta = 174,7$ ppm attribuable au C-7 ces liaison mètre en évidence la présence d'un squelette butyle ester dans la molécule, son enchainement est confirmé par l'irradiation en Toxy.



Spectre 2.69. Spectre Cosy ^1H - ^1H du composé **Tm-4** (600 MHz, MeOH- d_4)



Corrélations HMBC Tm-4



Corrélations Cosy Tm-4

Les données spectroscopiques RMN ^1H et ^{13}C pour le composé **Tm-4** sont regroupées dans le tableau II.34.

Tableau II.34. Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du produit **Tm-4**

Position	$\delta\text{H}(\text{ppm})$ (<i>mult</i>): <i>J</i> (Hz)	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
1	-	75,8
2	2,22	37,8
3	4,16	69,5
4	3,74	71,7
5	5,28	70,8
6	2,01	37,8
	2,22	37,8
7	-	174,7
8	4,11	67,8
9	1,63	31,3
10	1.37	20,0
11	0.90	14,3
1'	-	127,1
2'	7.06	114,2
3'	-	147,3
4'	-	149,1
5'	6,80, <i>d</i> , 9.1	115,9
6'	6,96, <i>d</i> , 9.1	122,4
7'	7,52, <i>d</i> , 16.3	146,4
8'	6,21, <i>d</i> , 16,3	114,7
9'	-	167,5

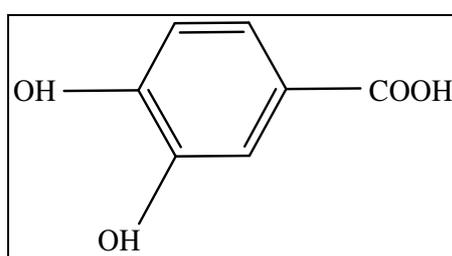
2.8.2. Elucidation structurale des composés Tm-8 et Tm-9

L'élucidation structurale de ces deux composés est illustrée dans le Chapitre 1, Partie 2, ils s'agissent de l'acide protocatéchique (**Tm-8**) et l'éthyle gallate (**Tm-9**). Ils ont été isolés sous forme des cristaux blancs.

Les données spectrales RMN ^1H et ^{13}C à 600 MHz, réalisées dans (MeOH- d_4) sont rassemblées dans les tableaux II.35 et II.36.

Ces données spectrales sont conformes à celles rapportées précédemment [18] et [19] respectivement.

- **Le produit Tm-8 :**

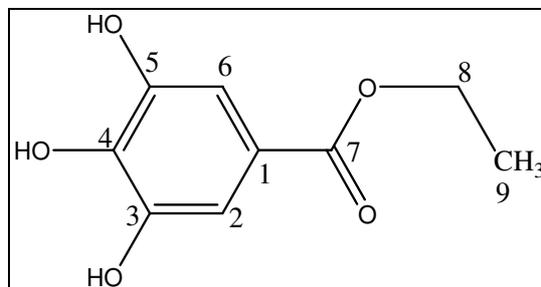


Acide protocatéchuïque.

Tableau II. 35. Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du produit **Tm-8**

Position	$\delta\text{H}(\text{ppm}), \text{mult}, J(\text{Hz})$	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
1	-	122,4
2	7,40, <i>d</i> , 9,1	138,7
3	6,80, <i>d</i> , 9,1	115,0
4	-	145,5
5	-	146,0
6	7,49, <i>s</i>	111,6
7	-	168,7

- Le produit Tm-9



Ethyle gallate.

Tableau II.36. Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du produit Tm-9

Position	$\delta\text{H}(\text{ppm})$ (mult): $J(\text{Hz})$	$\delta\text{C}(\text{ppm})$
1	-	120,0
2,6	7,07, <i>s</i>	109,5
3,5	-	145,5
4	-	138,0
7	-	168,2
8(CH ₂)	4,30, <i>q</i> , 7,2	61,3
9(CH ₃)	1,34, <i>t</i> , 7.2	14,5

Conclusion

L'investigation phytochimique de la phase n-butanol de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes (feuilles et fleurs) de *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur., a permis l'isolement et la détermination structurale de 20 polyphénols distribués dans 8 catégories principales :

- ✓ **Trois monoterpènes glucosides** : (3S, 6S)-*cis*-linalol-3,7-oxide- β -D-glucopyranoside (Tm-1) , 3,7 diméthyl oct-1-ène-3,6,7-triol 6-*O*- β -D-glucopyranoside (Tm-2), Betulabuside B (Tm-3).
- ✓ **Trois acides phynoliques**: Acide Chlorogénique butyl ester (Tm-4), Acide protocatechuique (Tm-8), Éthyle galatte (Tm-9).
- ✓ **Deux phenylpropanoïdes glucosides** : Coniférine (Tm-5) ,Syringine (Tm-6) .
- ✓ **Trois flavonoïdes**: Yuankanine (Tm-7) ,Kaempférol 3-*O*-(3'',6''-Di-*E-p*-coumaroyl)- β -D-glucopyranoside (Tm-10), Stenopalustroside A (Tm-11).
- ✓ **Un alcool de benzyl glucoside** (Tm-12)
- ✓ **Quatre ionoles glucosides**: (*E*)-4-[9-(β -D-glucopyranosyloxy)butylidene]-3,5,5-triméthyl-2-cyclohexen-1-one (Tm-13), 3-Oxo- β -ionol-9-*O*- β -D-glucopyranoside(Tm-14), Blumenol C-glucoside (Tm-15), Vomifoliol-9-*O*- β -D-glucopyranoside (Tm-16).
- ✓ **Trois lignanes**: Pinoresinol-4'-*O*- β -D-glucoside (Tm-17), Syringaresinol-4-*O*- β -glucopyranoside (Tm-18), Lariciresinol-4'-*O*- β -D-glucopyranoside (Tm-19).
- ✓ **Un bis-coumarine** : Giraldoïde A (Tm-20).

Les produits Tm-1 à Tm-4 et Tm-9 à Tm-17 sont des nouveaux produits naturels pour la famille Thymelaeaceae , et ainsi les composés Tm-5 à Tm-8 et Tm-18 à Tm-20 ont été séparés pour la première fois dans le genre *Thymelaea*.

Références

1. Jiang, L., Kojima, H., Yamada, K., Akio Kobayashi, A., Kubota, K., (2001). Isolation of some glycosides as aroma precursors in young leaves of Japanese pepper *Zanthoxylum piperitum* DC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5888-5894.
2. Manns, D., (1995). Linalool and cineole type glucosides from *Cunila spicata*. *Phytochemistry*, 39, 1115-1118.
3. Park, SH., Nguyen, XN., Kiem, PV., Choi, EM., Kim, JH., (2010). A new norlupane triterpene from the leaves of *Acanthopanax koreanum* increases the differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Archives of Pharmacal Research*, 33, 75-80.
4. Huang, SX., Lia, X., Nieb, Q., Dinga, Li-S., Peng, SL., (2004). Phenyl and Phenylethyl Glycosides from *Picrorhiza scrophulariiflora*. *Helvetica Chimica Acta*, 87, 598-604.
5. Kiem, PV., Minh, CV., Dat, NT., Cai, XF., Lee, JJ., Kim, YH., (2003). Two New Phenylpropanoid Glycosides from the Stem Bark of *Acanthopanax trifoliatum*. *Archives of Pharmacal Research*, 26, 1014-1017.
6. Ayers, S., Zink, DL., Mohn, K., Powell, JS., Brown, CM., Murphy, T., Brand, R., Pretorius, S., Stevenson, D., Thompson, D., Singh, S. B., (2008). Flavones from *Struthiola argentea* with anthelmintic activity in vitro. *Phytochemistry*, 69, 541-545.
7. Liu, H., Orjala, J., Sticher, O., Rali, T., (1999). Acylated Flavonol Glycosides from Leaves of *Stenochlaena palustris*. *Journal of Natural Products*, 62, 70-75.
8. Seigler, DS., Pauli, GF., Nahrstedt, A., Leen, R., (2002). Cyanogenic allosides and glucosides from *Passiflora edulis* and *Carica papaya*. *Phytochemistry*, 60, 873-882.
9. De Tommasi, N., Aquino, R., De Simone, F., Pizza, C., (1992). Plant metabolites New sesquiterpene and ionone glycosides from *Eriobotrya japonica*. *Journal of Natural Products*, 55, 1025-1032.
10. Khan, SH., Mosihuzzaman, M., Nahar, N., Rashid, MA., Rokeya, B., Ali, L., Khan, AK., (2003). Three megastigmane glycosides from the leaves of *Pterospermum semisagittatum*. *Pharmaceutical Biology*, 41, 512-515.
11. Matsunami, K., Otsuka, I., Takeda, Y., (2010). Structural revisions of blumenol C glucoside and byzantionoside B. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58, 438-441.
12. Sueyoshi, E., Liu, H., Matsunami, K., Otsuka, H., Shinzato, T., Aramoto, M., Takeda, Y., (2006). Bridelionosides A-F: megastigmane glucosides from *Bridelia glauca* f. *balansae*. *Phytochemistry*, 67, 2483-2493.
13. Dong-Mei, W., Wen-Jun, P., Yong-Hong, W., Yu-Juan Z., Shan-Shan, W., (2012). A New Isorhamnetin Glycoside and Other Phenolic Compounds from *Callianthemum taipaicum*. *Molecules*, 17 : (4), 4595-4603.

14. Gohari, AR., Saeidnia, S., Bayati-Moghadam, M., Amin, G., (2011). Lignans and neolignans from *Stelleropsis antoninae*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 19, 74-79.
15. Shoeb, M., Jaspars, M., MacManus, SM., Majinda ,RR., Sarker, SD., (2004). Epoxy lignans from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 1201-1204.
16. Li,SH., Wu, LJ., Gao, HY., Chen, YH., Li ,Y., (2005). A new dicoumarinoid glycoside from *Daphne giraldii*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 7, 839-842.
17. Osawa, K., Arakawa, T., Shimura, S., Takeya, K., (2001). New Quinic acid derivatives from the fruits of *Chaenomeles sinensis* (Chinese Quince). *Natural Medicines*, 55, 255-257.
18. de Santana Julião, L., Guimarães Leitão, S., Lotti, C., Picinelli ,AL., Rastrelli, L., Fernandes ,PD., Noël, F., Barros Thibaut, JP., Guimarães Leitão, G., (2010). Flavones and phenylpropanoids from a sedative extract of *Lantana trifolia* L. *Phytochemistry*, 71, 294-300.
19. Picerno, P., Mencherini,T., Sansone, F., Del Gaudio, P., Granata, I., Porta, A., Aquino, RP., (2011).Screening of a polar extract of *Paeonia rockii*: Composition and antioxidant and antifungal activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 138, 705-712.

Chapitre 3. Evaluation du pouvoir antioxydant des extraits de plantes

1. Généralités

Un antioxydant est toute molécule endogène ou exogène présente en faible concentration qui est capable de prévenir, de retarder et de réduire l'ampleur de la destruction oxydante des biomolécules [1].

Pour établir cette activité, il existe cinq techniques chimiques : capacité anti-oxydante totale (CAT), la réduction du fer, le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage du radical hydroxyle et le test de blanchiment de β -carotène.

Dans notre étude, la mise en évidence de l'activité anti-oxydante des extraits et des composés purs isolés de deux plantes *H. halimifolium* et *T. microphylla* a été réalisée en utilisant la technique du piégeage du radical libre DPPH.

2. Piégeage du radical libre DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)

L'activité anti-radicalaire a été déterminée à l'aide du radical stable de 2,2-diphényl-1-picrylhydrazil (DPPH[°]), ce dernier est réduit à la forme hydrazine (non radicalaire) en acceptant un atome d'hydrogène. L'effet de chaque extrait sur DPPH est mesuré selon la procédure suivante [2] :

Un volume de (37,5 μ l) de la solution de MeOH, contenant différentes quantités de l'extrait ou de composés a été ajouté à 1,5 ml de DPPH[°] fraîchement préparé à partir de la dissolution de 0,025 g dans un litre de MeOH, la concentration maximale utilisée était 100,0 mg/ml. L'absorbance à 517 nm a été mesurée sur spectrophotomètre UV-visible (un Shimadzu UV-1601), 10 min après le début de la réaction.

La concentration de DPPH[°] dans le milieu réactionnel a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage analysée par régression linéaire. Le pourcentage restant de DPPH[°] (% de DPPH[°] REM) a été calculé comme suit :

$$\text{DPPH}^{\circ}\text{REM}\% = \frac{[\text{DPPH}^{\circ}] \text{ T}}{[\text{DPPH}^{\circ}]} \times 100$$

T est la durée du temps expérimental (10 min)

α -tocophérol et l'acide ascorbique ont été utilisés comme témoins positifs dans le test. Toutes les expériences sont réalisées en triple, et les concentrations effectives moyennes de balayage (IC₅₀) ont été calculées en utilisant le test de Wilcoxon et Litchfield.

3. Détermination des concentrations IC₅₀ des extraits des plantes

3.1. Piégeage du radical libre (DPPH) par *H. halimifolium*

L'étude portée sur l'évaluation de l'activité anti-oxydante de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de l'espèce *H. halimifolium*, montre que cet extrait a manifesté un bon effet scavenger avec IC₅₀= 5,90 µg/ ml, plus fort que celui du produit témoin α-tocophérol IC₅₀= 10,10 µg/ ml.

Les produits isolés méthyle gallate, ethyle gallate, ont également montrés une forte activité anti-oxydante dont IC₅₀ =1,90 et 2,30 µg/ ml respectivement (**Tableau II.37**).

Tableau II.37. Activité anti-radicalaire (DPPH) de l'extrait acétate d'éthyle *Hh* et des composés isolés

Extrait et composés isolés	IC ₅₀ (µg/ ml)
Extrait acétat d'éthyle	5,90 ± 1,40
Méthyle gallate	1,90 ± 0,30
Ethyle gallate	2,30 ± 0,40
Acide <i>p</i> -coumarique	5,10 ± 0,10
Acide protochuitique	2,10 ± 0,10
Acide ascorbique	3,30 ± 0,85
α-tocophérol	10,10 ± 1,30

Cette bonne activité anti-oxydante de l'espèce *H. halimifolium* expliquée par la nature des composés phénoliques qui sont des acides phénoliques tels que l'acide gallique et ses dérivés, l'acide coumarique ; les flavonoïdes comme le kaempférol et la quercétine et la myricétine glycosylée

3.2. Piégeage du radical libre (DPPH test) par *T. microphylla*

L'activité anti-oxydante de l'extrait *n*-butanol, des fractions (I à VII) et les composés phénoliques (Tm4-Tm-11et Tm-20) a été évaluée dans un test de DPPH (**tableau II.38**). L'extrait a montré une concentration significative de IC₅₀ (180,8 µg/ ml). Par rapport à l'ensemble de l'extrait, la fraction VI a présenté une bonne activité du piégeage du radical DPPH* de l'ordre de IC₅₀ (11, 2 µg/ ml), ce qui indique que l'extrait *n*-butanol contient une concentration plus élevée de composés piègeurs des radicaux libres.

Les fractions III et V ont montré une activité anti-oxydante modérée IC₅₀ (79,3 et 52,0 µg/ ml) respectivement, et les fractions I, II, IV et VII sont moins actives avec des valeurs de IC₅₀ de 115,0 à 157µg/ ml (**Tableau II.38**).

Tableau II.38. Activité anti-radicalaire (DPPH) de l'extrait *n*-butanol, des fractions et des composés isolés

Extrait ,fractions et composés	IC ₅₀ µg/ ml
Extrait <i>n</i>-butanol	180,8 ± 3,0
F I	115,0 ± 3,4
F II	117,6 ± 2,9
FIII	79,3 ± 2,5
F IV	157,0 ± 3,6
F V	52,0 ± 2 ,1
F VI	11,2 ± 0,5
F VII	150,8 ± 1,8
Tm-4	16,3 ± 1,1
Tm-5	111,6 ± 1,9
Tm-6	107,0 ± 1,5
Tm-8	5,4 ± 0,1
Tm-9	1,9 ± 0,1
Tm-10	119,7 ± 3,8
Tm-11	109,1 ± 2,9
Tm-20	76,7 ± 2,2
α-tocophérol	10,1 ± 1,3

Les composés phénoliques sont des composants antioxydants puissants. Leur activité est principalement due aux propriétés redox, qui peuvent jouer un rôle important dans la neutralisation des radicaux libres [3]. La forte activité de la fraction VI semble être liée à la présence d'acide protocatéchique (Tm-8) et l'éthyl-gallate (Tm-9), qui ont montré un pouvoir

élevé en piégeage du radical DPPH* $IC_{50} = 5,4$ et $1,9 \mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement, ces résultats sont en accord avec les données de la littérature [4,5].

L'acide chlorogénique ester butylique (Tm-4), isolé de la fraction V, est moins actif ($IC_{50} = 16,3 \mu\text{g}/\text{ml}$) que les composés phénoliques précédents. Enfin, les autres composés testés (Tm-5, Tm-6, Tm-10, Tm-11 et Tm-20) ont montré une faible activité anti-radicalaire *in vitro*.

Conclusion

Très peu de travaux ont été réalisés sur l'étude des propriétés anti-oxydantes des plantes choisies. D'après nos connaissances et à ce jour là, il y'a un deux articles rapportant l'activité anti-oxydante de la plante *T.microphylla* récoltées des régions sahariennes [6, 7]. Pour la plante *H.halimium*, les capacités anti-oxydantes ont été réalisées pour la première fois.

Les valeurs IC_{50} calculées nous ont permis d'évaluer et comparer l'efficacité des extraits (Figure 27). Plus la valeur est basse, plus l'activité anti-oxydante mise en piégeage des radicaux libres est élevée. L'extrait acétate d'éthyle *H. halimifolium* a montré une meilleure activité anti-radicalaire par rapport à l'extrait butanol de *T. microphylla*, ceci nous a encouragés à la formulation d'un médicament à base de cet extrait exploré dans la partie III de cette thèse.

En conclusion, cette étude fournit une base scientifique à l'utilisation de *T. microphylla* et *H. halimifolium* comme plantes médicinales anti-oxydantes en Algérie.

Références

1. Halliwell, B., (1994). Free radicals, antioxidant and human disease: curiosity, cause or Consequence *The Lancet*, 344 (8924): 721-724.
2. Picerno, P., Mencherini, T., Sansone, F., Del Gaudio, P., Granata, I., Porta, A., Aquino, RP., (2011). Screening of a polar extract of *Paeonia rockii*: composition and antioxidant and antifungal activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 138, 705-712.
3. Rice-Evans, Ca., Miller, NJ., Bolwell, PG., Bramley, PM., Pridham, JB., (1995). The Relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. *Free Radical Research*, 22, 375-383.
4. Kalaivani, T., Rajasekaran, C., Mathew L., (2011). Free radical scavenging, cytotoxic, And hemolytic activities of an active antioxidant compound ethyl gallate from leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. Ex. Delile Subsp. *Indica* (Benth.) Brenan, *Journal of Food Science*, 56, 144-149.
5. Akihisa, T., Kawashima, K., Oridoa, M., Akazawa, H., Matsumoto, M., Yamamoto, A., Eri Ogihara, E., Fukatsua, M., Tokuda, H., Fujic, J., (2013). Antioxidative and melanogenesis-inhibitory activities of caffeoylquinic acids and other compounds from Moxa. *Chemistry & Biodiversity*, 10, 313-327.
6. Benhammou, N., Atik Bekkara, F., Coustard, J.M., (2009a). Antioxidant activity of methanolic and water extracts from *Marrubium deserti de Noë* and *Thymelaea microphylla* from Algerian Sahara. *Advance in Food Science*, 31 (4): 194-201.
7. Djeridane, A., Yousfi, Y., Brunel, J.M., Stocker, P., (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2599–2606.

Partie III

**Validation de l'usage traditionnelle de la
plante *Halimium halimifolium* et la
formulation des extraits**

Chapitre 1. Criblage chimique (HPLC-UV-MS) et pouvoir antioxydant des extraits aqueux

Introduction

Les médicaments traditionnels à base de plantes sont encore largement utilisés et sont commercialement importants sur le plan international. La reconnaissance de leurs valeurs clinique, pharmaceutique et économique continue de croître, bien que cela varie fortement selon les pays. Malgré l'utilisation de médicaments à base de plantes pendant des siècles, seul un nombre relativement limité d'espèces de plantes a été étudié pour d'éventuelles applications médicales. Les données relatives à l'innocuité et à l'efficacité sont disponibles pour un nombre encore plus restreint de plantes, leurs extraits et principes actifs et les préparations qui les contiennent. Avec l'objectif d'augmenter ce nombre de plantes, il est nécessaire de pouvoir contrôler et analyser leur composition et les principes actifs qu'elles contiennent. Pour cela, il serait judicieux et important d'établir un profil phytochimique de la plante. Cette « empreinte » devra permettre d'identifier et de quantifier les différents principes actifs présents dans toutes les parties de la plante. L'élaboration de ce profil nous aidera à étudier les variations de la composition chimique selon la période et le lieu de récolte de la plante.

1. Criblage chimique et biologique des extraits aqueux

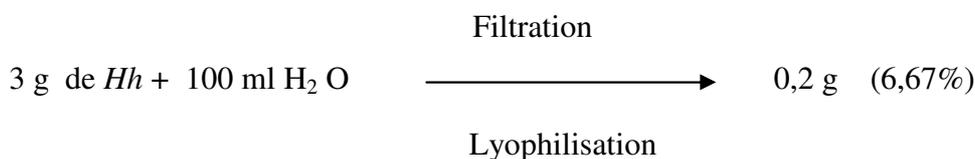
Après des enquêtes ethno-botaniques et ethno-pharmacologiques, nous nous sommes aperçu qu'aucune donnée n'a fait référence à l'usage traditionnel de *Halimium halimifolium*. Dans ce contexte nous nous sommes intéressés à l'analyse de différents extraits aqueux utilisés généralement en médecine traditionnelle (décoction et infusion) et l'extrait hydroalcoolique préparé par macération (7 : 3) de cette plante par HPLC-UV(DAD)-MS(ESI), afin de comparer leurs profils chromatographiques et d'obtenir des informations sur leurs composants chimiques aussi bien qualitativement que quantitativement ainsi que l'évaluation de leur pouvoir antioxydant.

2. Préparation des extraits

Les extraits aqueux sont préparés par deux méthodes différentes utilisées généralement en médecine traditionnelle.

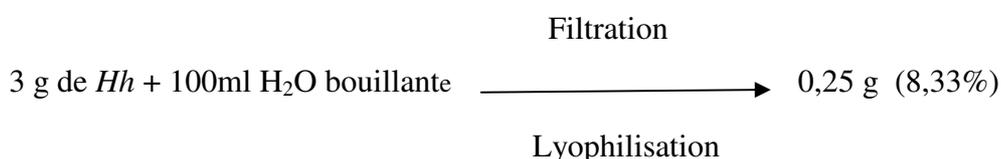
- **Le décocté**

Une aliquote des parties aériennes (3 g) de *Halimium halimifolium* (*Hh*) est introduite dans 100 ml d'eau froide. Le mélange est porté à ébullition pendant une durée de 10 minutes.



- **L'infusé**

Une aliquote des parties aériennes (3 g) de *Halimium halimifolium* (*Hh*) est introduite dans 100 ml de l'eau initialement bouillante pendant une durée de 10 minutes.



3. Pouvoir antioxydant des préparations traditionnelles

L'évaluation du pouvoir anti-radicalaire de deux préparations (infusion et décoction) est réalisée selon la méthode du DPPH *in vitro* décrite dans la partie II, chapitre 3. Les résultats sont reportés dans le tableau III.1 et la figure III.1.

Tableau III.1. Pourcentage d'inhibition des décocté et infusé à (20 µg /ml)

Extrait	Inhibition % (20µg /ml)
Infusé	70.00
Décocté	60 .00

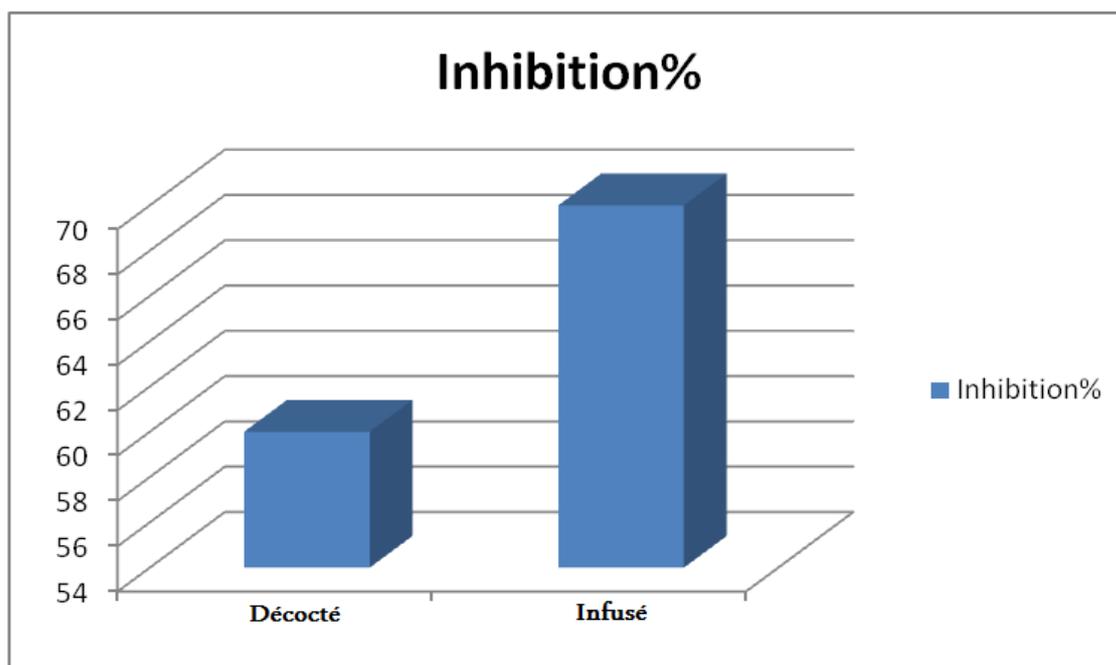


Figure III.1. Inhibition des extraits à 20 µg/ ml

L'infusé a montré une meilleure activité anti-radicalaire par rapport au décocté, ce qui nous oriente vers le choix et la mise en faveur de cette préparation.

4. Analyse qualitative par HPLC-UV-MS

Pour réaliser cette étude par la méthode HPLC, on utilise un spectromètre LC avec :

- une colonne Kinetex 1,7 mm (50 x 2,1 mm) Phenomenex (Torrance, CA, USA).
- un débit de 0,6 ml/min, le volume d'injection était de 10 µl.
- les solvants d'éluion sont : **A** → H₂O + 0,1% HCOOH.

B → AcCN + 0,1% HCOOH.

- Les séparations ont été réalisées à température ambiante par le gradient d'éluion reporté dans le tableau III.2.

Tableau III.2. Gradient d'éluion adopté pour la séparation quantitative

Temps	Solvant A (%)	Solvant B (%)
0	98	2
3	98	2
5	87	13
9	87	13
12	82	18
13	82	18
20	70	30
25	50	50
27	2	98

Après chaque injection, la colonne a été lavée par AcCN + 0,1% HCOOH pendant 4 min et re-équilibrée (5 min).

Conditions MS : LTQ Orbitrap (ThermoElectron Corporation), équipé d'une interface ESI. La source ESI a été réglée en mode ion- négatif. L'azote de haute pureté (N₂) a été utilisé à la fois comme gaz de séchage et gaz nébulisant, et l'hélium pur (He) comme gaz de collision. Les paramètres de fonctionnement ont été optimisés comme suit : tension de source 4 kV, tension capillaire -50 V, tension de tube -131,47 V, température capillaire 280 °C, enveloppe et débit de gaz auxiliaire (N₂) 30 et 10 (unités arbitraires).

Les chromatogrammes obtenus avec une détection UV à 330 nm sont représentés dans la figure III.2.

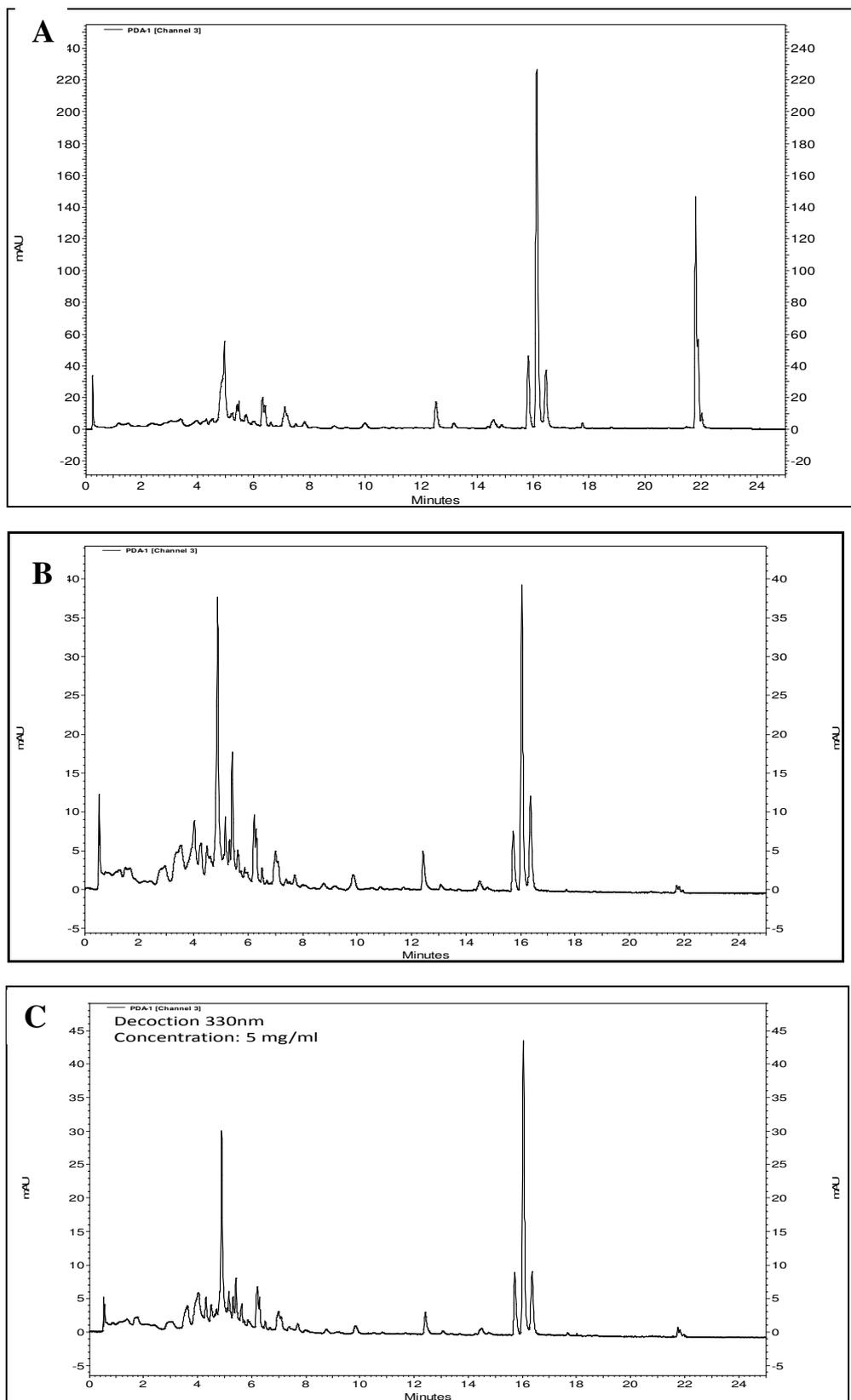


Figure III.2. Chromatogrammes HPLC-UV-MS des différents extraits : EtOH- H₂O (7 : 3) (A), infusion (B) et décoction (C) de *Hh* (détection à 330 nm).

Les profils HPLC des différents extraits apparaissent assez similaires. Ils montrent dans ces extraits la présence au minimum de huit composés communs, et montrent également le même pic majoritaire.

5. Identification des produits contenus dans les extraits

5.1. Identification du produit 1

Ce produit apparaît à un temps de rétention 10,45 min (**Figure III.3**) Son ion quasi-moléculaire $[M-H]^-$ apparaissant à $m/z = 447,0928$ (masse trouvée) et correspondant à la formule brute $C_{21}H_{19}O_{11}$ est en faveur d'une masse de 448 Da et d'une formule brute $C_{21}H_{20}O_{11}$ pour cette molécule.

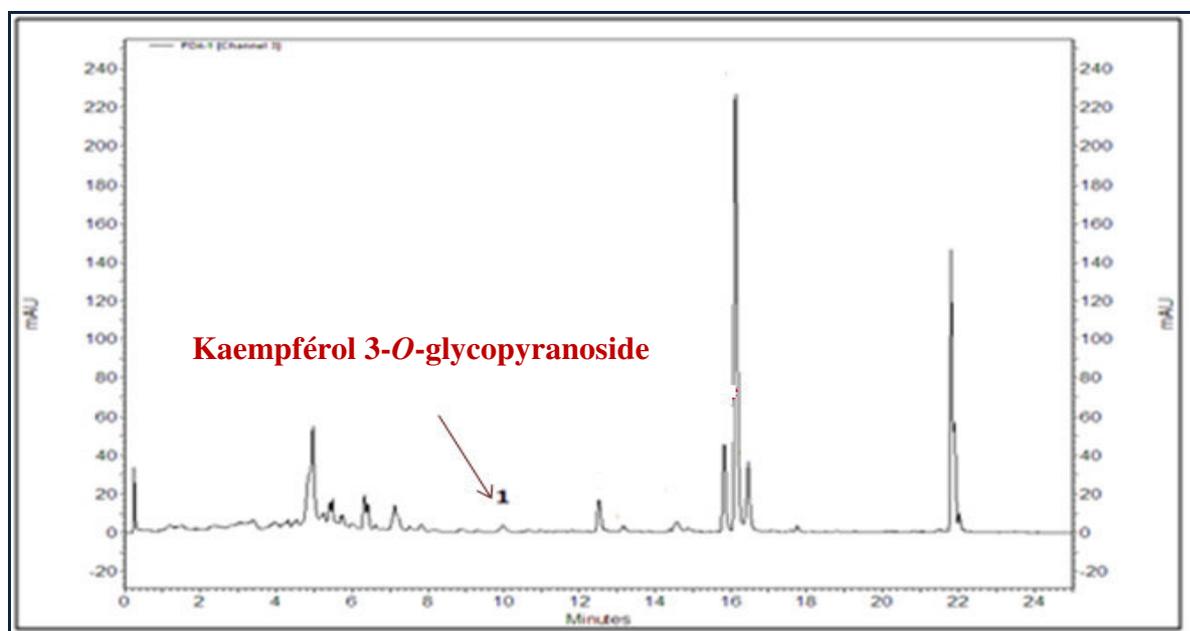


Figure III.3. Chromatogramme LC- UV- MS montrant le produit 1

Le spectre de masse (**Figure III.4**) de ce composé montre des ions caractéristiques d'un flavonoïde *O*-glycoside dont :

- Un fragment à m/z 284.03 $[M-H-163]^-$ correspondant à la perte d'un hexose.
- Un fragment à m/z 327.05 $[M-H-120]^-$ correspondant à la perte de $C_7H_5O_2$ caractéristique de la perte du fragment B^+ d'un flavonoïde comportant un hydroxyle en C-4' orientant vers un flavonol de type kaempférol.

Ce composé a été identifié par cette technique en tant que kaempférol *O*-glycosylé. Les travaux de séparation et d'identification structurale (expériences de RMN 1D et 2D) que nous avons menés sur cet extrait (partie II, chapitre1) ont montré qu'il s'agit du kaempférol 3-*O*-glucopyranoside.

Ceci complète notre analyse et nous permet de décrire le composé **1** comme étant le kaempférol 3-*O*-glucopyranoside.

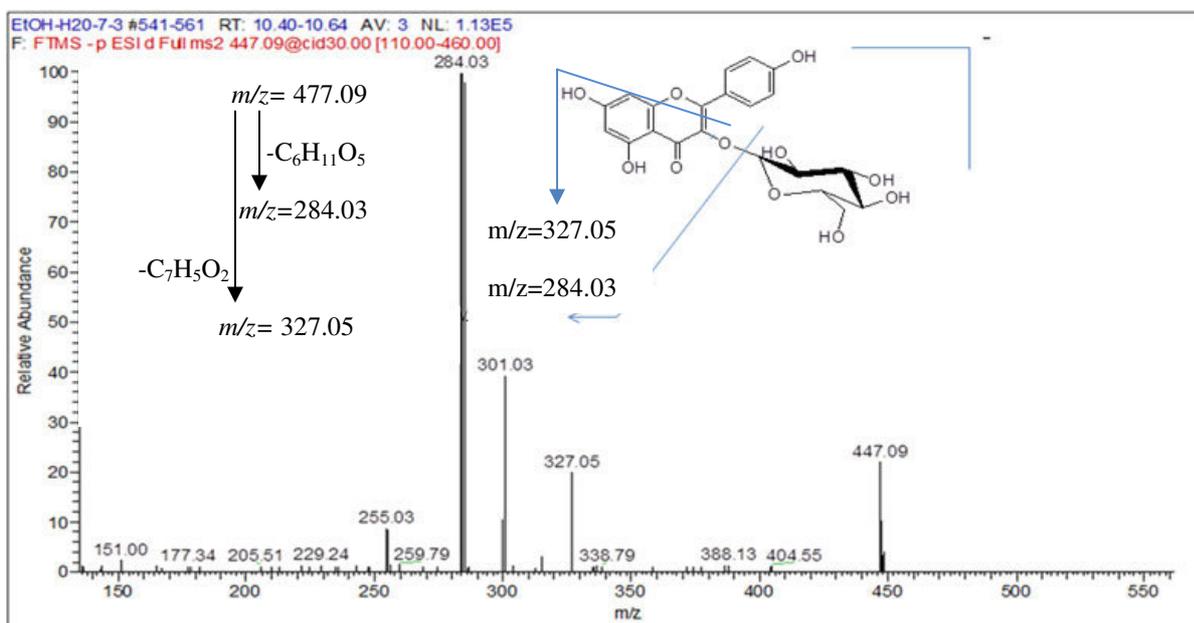


Figure III.4. Spectre MS/MS du produit **1**

5.2. Identification des produits **2** et **3**

Les produits **2** et **3** sont des isomères, ils apparaissent aux temps de rétention 12,82 et 13,53 min respectivement (**Figure III.5**), leurs ions quasi-moléculaires $[M-H]^-$ apparaissant à m/z 625,1201 et 625,1198 (masses trouvées) correspondant à la formule brute $C_{30}H_{25}O_{15}$ sont en faveur d'une masse de 626 Da et d'une formule brute $C_{30}H_{26}O_{15}$ pour ces molécules.

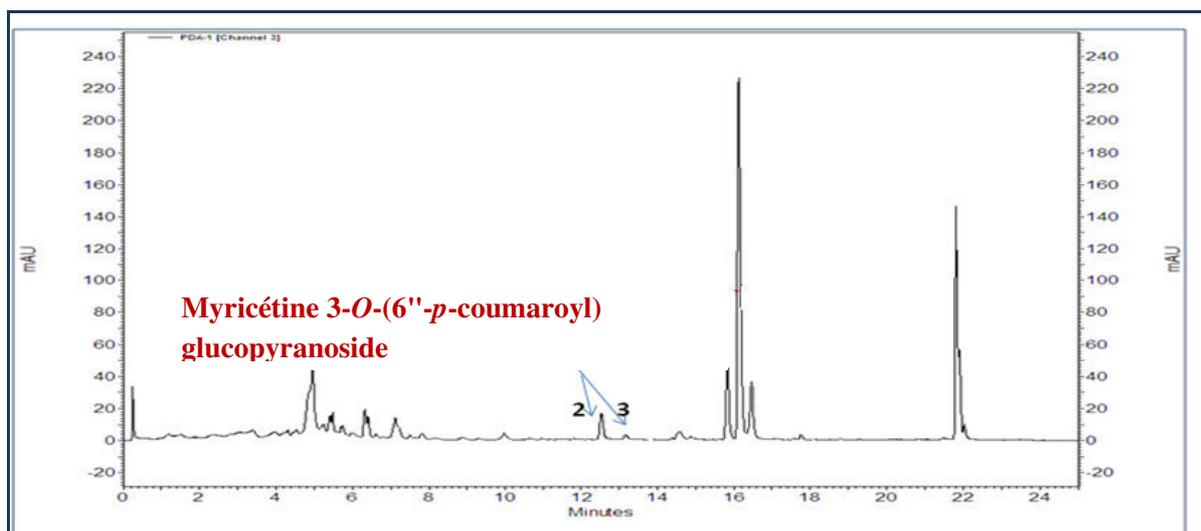


Figure III.5. Chromatogramme LC-UV-MS montrant les produits **2** et **3**

Les deux composés ont été identifiés par cette technique (**Figure III.6**). Cette identification a été complétée par les résultats des travaux de séparation et d'identification structurale (expériences de RMN 1D et 2D) que nous avons menés sur cet extrait (partie II, chapitre1), il s'agit de la myricétine 3-*O*-(6'' -*E*- *p*-coumaroyl) glucopyranoside et son isomère la myricétine 3-*O*-(6'' -*Z*-*p*-coumaroyl) glucopyranoside.

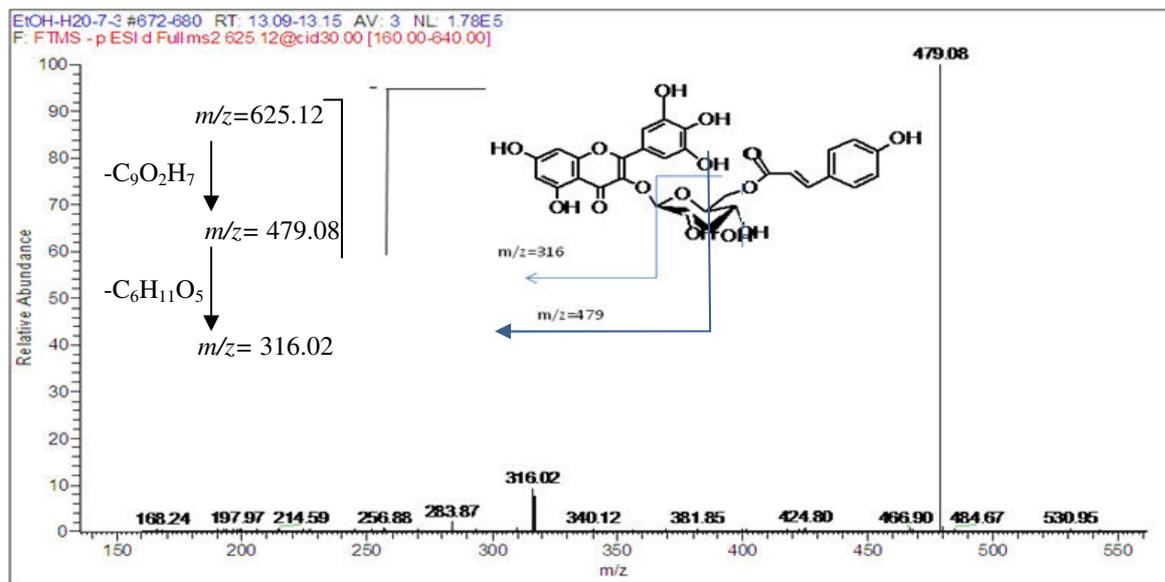


Figure III.6. Spectre MS/MS du produit 2

5.3. Identification du produit 4

Ce produit apparaît à un temps de rétention de 14,89 min (**Figure III.7**) Son ion quasi-moléculaire $[M-H]^-$ apparaissant à m/z 609,1252 (masse trouvée) et correspondant à la formule brute $C_{30}H_{25}O_{16}$ est en faveur d'une masse de 610 Da et d'une formule brute $C_{30}H_{26}O_{15}$ pour cette molécule.

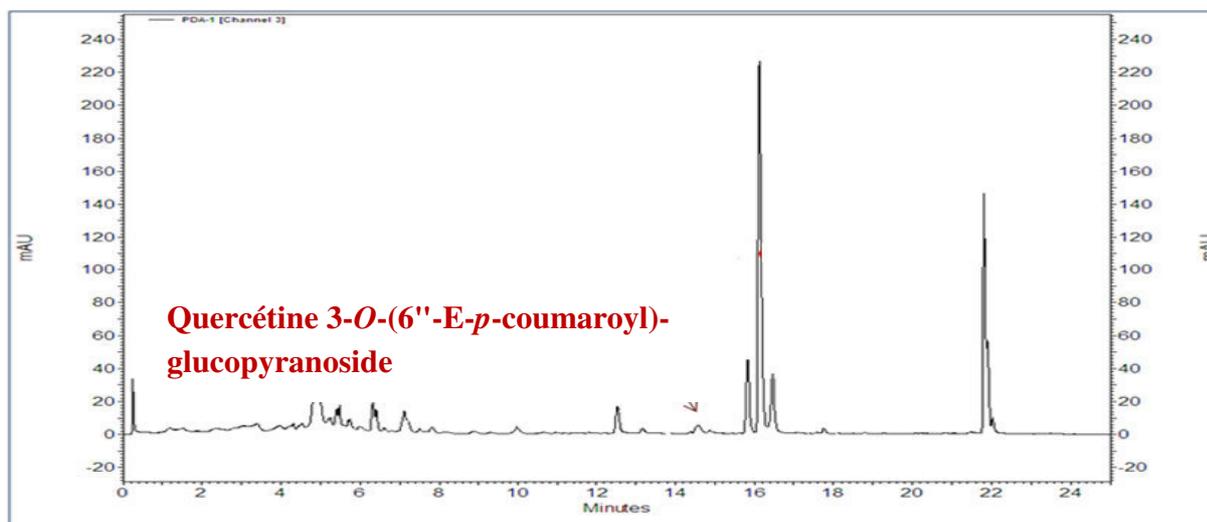


Figure III.7. Chromatogramme LC-UV-MS montrant le produit 4

Le composé **4** a été identifié par cette technique (**Figure III.8**). Cette identification a été complétée par les résultats des travaux de séparation et d'identification structurale (expériences de RMN 1D et 2D) que nous avons menés sur cet extrait (partie II, chapitre1), il s'agit de la quercétine 3-*O*-(6''-*E*-*p*-coumaroyl)-*D*-glucopyranoside.

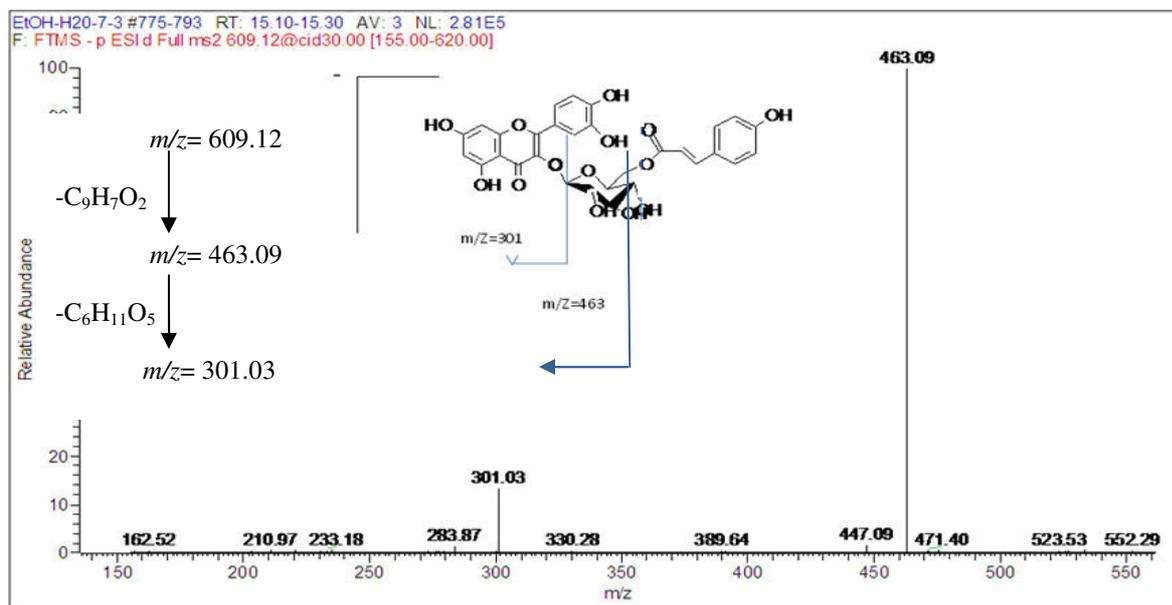


Figure III.8. Spectre MS/MS du produit **4**

5.4. Identification des produits **5**, **6** et **7**

Les produits **5**, **6** et **7** sont des isomères, ils apparaissent à des temps de rétention de 16,08 ; 16,73 et 16,69 min respectivement (**Figure III.9**), leurs ions quasi-moléculaires $[M-H]^-$ apparaissant à m/z 593,1298 ; 593,1296 et 593,1298 (masses trouvées) correspondant à la formule brute $C_{30}H_{25}O_{13}$ et en faveur d'une masse de 626 Da et d'une formule brute $C_{30}H_{26}O_{13}$ pour ces molécule.

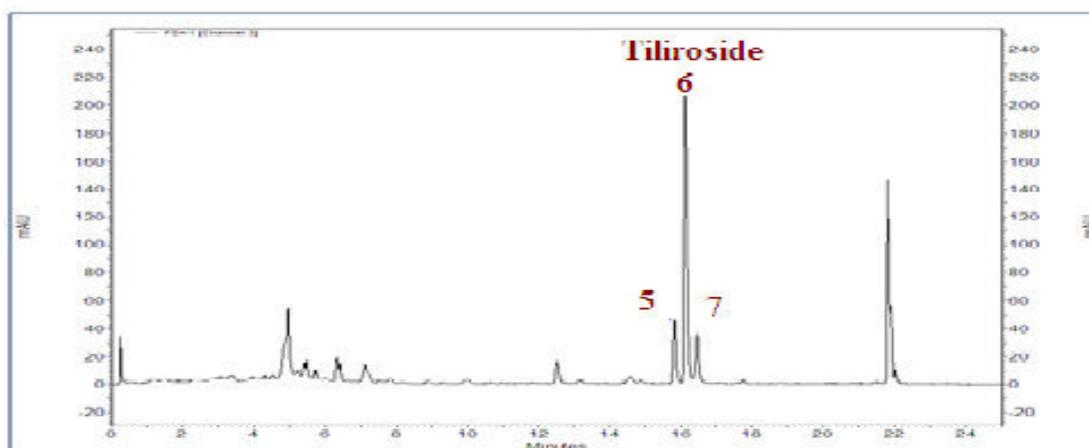


Figure III.9. Profil LC-UV-MS montrant les produits **5**, **6** et **7**

Le composé **6** a été identifié par cette technique (**Figure III.10**). Cette caractérisation a été complétée par les résultats des travaux de séparation et d'identification structurale (expériences de RMN 1D et 2D) que nous avons menés sur cet extrait (partie II, chapitre1). Il s'agit du kaempférol 3-O-(6"-*p*-coumaroyl) glucopyranoside. Cette structure a été confirmée par l'injection d'un échantillon authentique disponible au laboratoire en LC-UV-MS dans les mêmes conditions que l'extrait. Cette échantillon authentique le kaempférol 3-O-(6"- *p*-coumaroyl) glucopyranoside connu également sous le nom de *trans*-tiliroside a montré une similitude avec le composé **6**. De ce fait le composé **6** est bien le *trans*-tiliroside.

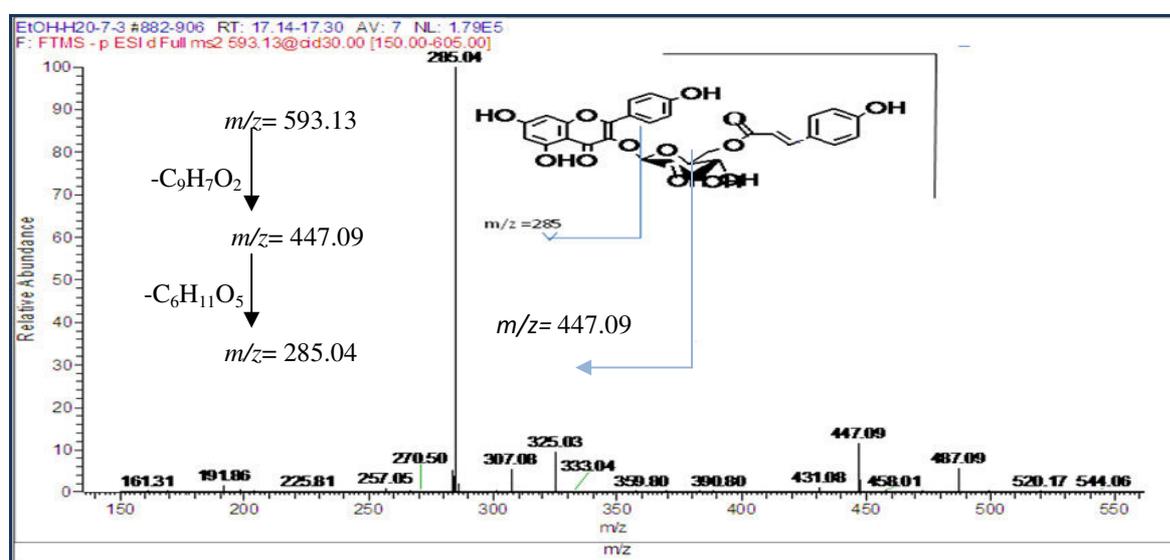


Figure III.10. Spectre MS/MS du produit **6**

5.5. Identification du produit **8**

Ce produit apparaît à un temps de rétention 21,88 min (**Figure III.11**). Son ion quasi-moléculaire [M-H]⁻ apparaissant à m/z 739.1657 (masse trouvée) et correspondant à la formule brute C₃₉H₃₁O₁₅ est en faveur d'une masse de 740 Da et d'une formule brute C₃₉H₃₂O₁₅ pour cette molécule.

Le spectre de masse (**Figure III.12**) montre :

- Un fragment [M-453]⁻ correspondant à la perte de la partie osidique (hexose portant deux groupements para-coumaroyles).
- Un fragment [M-285]⁻ correspondant à la perte de l'aglycone (kaempférol).

Cette technique a permis de montrer que le composé **8** est un kaempférol substitué par un hexose portant deux groupements para-coumaroyles. Des travaux antérieurs menés au laboratoire ont

permis de conclure qu'il s'agit du kaempférol 3-*O*- (3'',6''-di-*p*-coumaroyl)glucopyranoside. Cette structure reste cependant à confirmer par des travaux de séparation et d'identification.

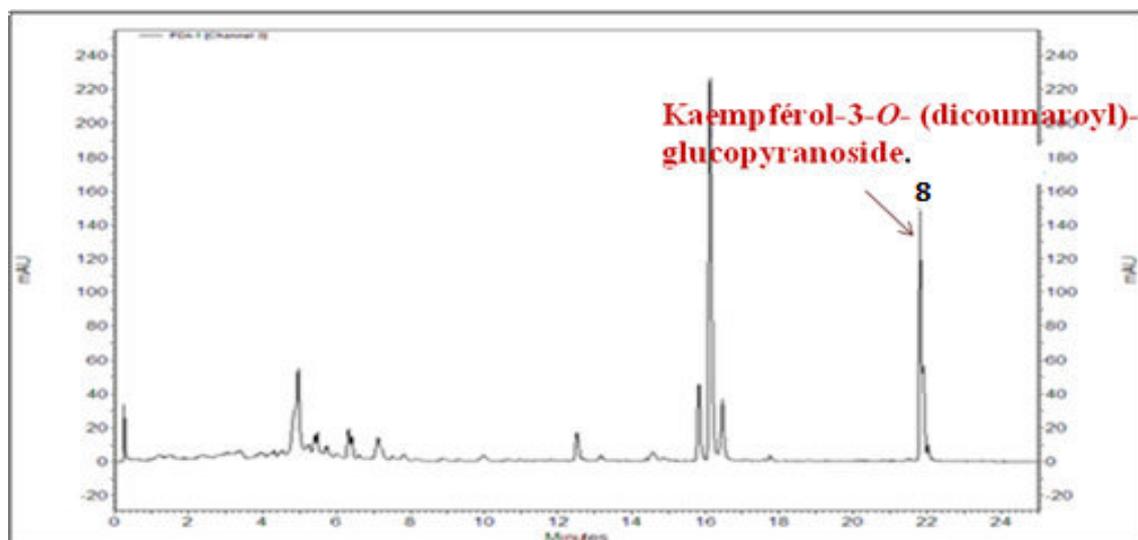


Figure III.11. Profil LC-UV-MS montrant le produit 8

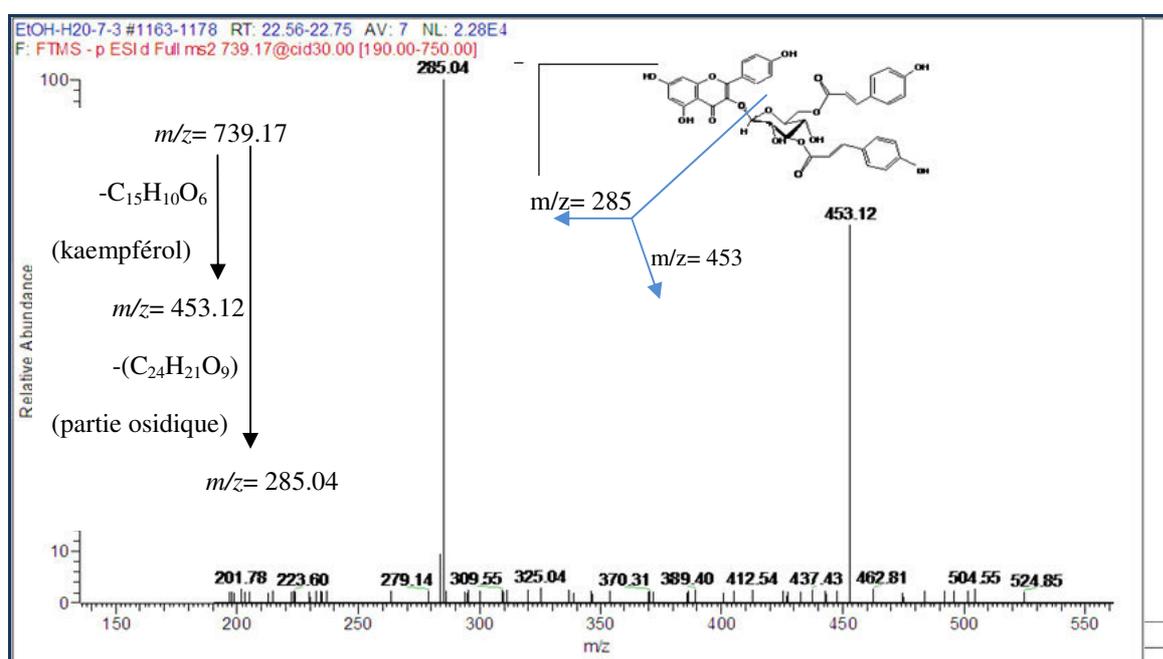


Figure III.12. Spectre MS/MS du produit 8

Cette étude a permis de montrer que les extraits aqueux (décocté et infusé) dont la composition est très similaire à celle de l'extrait hydroalcoolique, renferment des flavonoïdes glucosylés et également des flavonoïdes glucosylés acylés en quantité appréciable. En effet, cette étude par LC-UV-MS a permis d'identifier un total de 8 flavonoïdes dont la plupart ont été isolés et purifiés par les techniques chromatographiques, et identifiés par la combinaison des données de spectrométrie de masse à haute résolution et des expériences de RMN 1D et 2D lors de travaux que nous avons menés sur l'extrait hydro-alcoolique (partie II, chapitre 1). Ces résultats sont reportés dans le tableau III.2.

6. Étude quantitative

L'analyse quantitative nous a permis de calculer la concentration de la molécule majoritaire, le *trans*-tiliroside, ainsi que les concentrations des autres composés en équivalents de tiliroside (**Tableau III.3**) dans 3 mg/ ml pour chaque extraits : décocté, infusé et EtOH-H₂O (7 : 3 ; macération à température ambiante).

Cette méthode a été effectuée en utilisant une courbe d'étalonnage (**Figure III.13**) construite à partir de solutions contenant différentes concentrations du composé authentique, le *trans*-tiliroside fourni par le laboratoire. Dans la gamme de concentrations de 0,01 à 0,3 mg/ ml. Le coefficient R² est linéaire avec une valeur de 0,998.

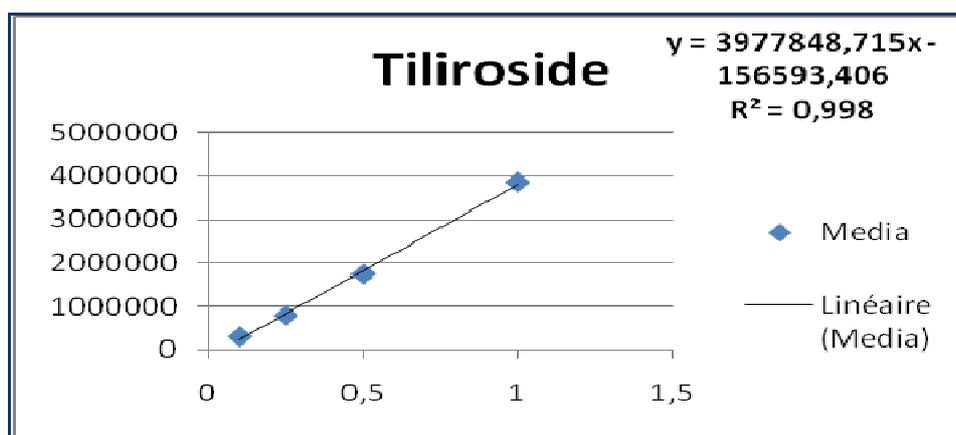


Figure III.13. Courbe d'étalonnage en utilisant le tiliroside

Tableau.III.2. Paramètres et composés identifiés par LC-UV-MS

NO	UV tR (min)	MS tR (min)	<i>m/z</i>	Err	Formule	MS /MS	Structure
1	10,42	10,45	447,0928	1,325	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	285/301 /327	Kaempférol 3- <i>O</i> -glucopyranoside
2	12,82	12,87	625,1201	2,02	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₅	479/317 /316	Myricétine 3- <i>O</i> -(6'' <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl) glucopyranoside
3	13,53	13,58	625,1198	1,638	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₅	479/317 /316	Myricétine 3- <i>O</i> -(6'' <i>Z</i> - <i>p</i> -coumaroyl)glucopyranoside
4	14,89	14,94	609,1252	2,246	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	463/301	Quercétine 3- <i>O</i> -(6''- <i>p</i> -coumaroyl)glucopyranoside
5	16,08	16,14	593,1298	1,337	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	285/447 /325	/
6	16,37	16,43	593,1296	0,848	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	285/447 /325	<i>trans</i> -Tiliroside
7	16,69	16,73	593,1298	1,472	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	285/447 /325	<i>cis</i> - Tiliroside
8	21,88	22	739,1657	-0,063	C ₃₉ H ₃₂ O ₁₅	285/453/ 593/ 575	Kaempférol 3- <i>O</i> -(3'',6''-di- <i>p</i> -coumaroyl) glucopyranoside

Tableau.III.3. Concentrations des composés (mg/ ml) dans les différents extraits

Composés	Concentrations		
	EtOH-H ₂ O (7 : 3)	Infusé	Décocté
Tiliroside	0,181	0,108	0,102
Kaempférol 3- <i>O</i> -glucopyranoside	0,050	0,040	0,031
Myricétine 3- <i>O</i> -(6''- <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)glucopyranoside	0,105	0,090	0,070
Myricétine 3- <i>O</i> -(6''- <i>Z</i> - <i>p</i> -coumaroyl)glucopyranoside (isomère)	0,091	0,040	0,043
Quercétine 3- <i>O</i> -(6''- <i>E</i> - <i>p</i> -coumaroyl)glucopyranoside	0,050	0,020	0,020
Kaempférol 3- <i>O</i> -(3'',6''- <i>p</i> -dicoumaroyl)glucopyranoside	0,232	0,090	0,102

Conclusion

L'étude qualitative et quantitative des préparations traditionnelles présent par la population de la région du lieu de la récolte (El-Kala) de cette plante par la méthode de LC-UV-MS a permis de montrer que les extraits aqueux renferment les mêmes produits que l'extrait hydro-alcoolique avec des concentrations différentes. Ces produits sont en majorité des flavonoïdes glucosylés selon l'analyse des différents fragments MS/MS à haute résolution en mode négatif et les résultats des travaux de séparation chromatographiques et d'identification structurale par les méthodes spectroscopiques.

Cette approche est un bon exemple de déréplication qui est une procédure utilisée en phytochimie afin d'éviter le réisolement des composés connus et de présenter un profil référent qui vise à faciliter l'étude chimiotaxonomique à large échelle des Cistacées.

Cette composition qui montre une richesse en flavonoïdes traduit la forte activité antioxydante que nous avons constatée dans nos expérimentations et qui nous a permis de décrire la préparation infusion de *Halimium halimifolium* comme un antioxydant naturel.

Cette préparation ne va pas être efficace sans avoir une bonne absorption intestinale. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'étude de la biodisponibilité de cette préparation (**Partie III, Chapitre 2**) par voie orale afin de développer une formule pharmaceutique adéquate pour une efficacité optimale des ses principes actifs.

Chapitre 2. Test de dissolution et formulation de l'infusion de Hh

Introduction

Certaines nouvelles molécules à fort potentiel thérapeutique ne sont pas développées en raison de leurs propriétés physico-chimiques qui limitent la fraction circulant sous forme active après leur administration orale. Une alternative technologique consiste à piéger ces molécules dans des vecteurs particuliers afin de modifier leur formulation *in vivo* et d'améliorer leurs performances. Des résultats précliniques prometteurs ont été obtenus grâce à cette technologie qui rend envisageable l'administration orale de ces principes actifs. L'enjeu consiste maintenant à optimiser ces assemblages principe actif/transporteur afin d'améliorer encore les propriétés biopharmaceutiques de ces molécules tout en concevant des procédés de fabrication plus simples et industrialisables.

1. Amélioration de la biodisponibilité de l'infusé Hh

L'infusion de Hh utilisée par les gens de la région d'El-kala a été prouvée riche en composés flavonoidiques selon le profil phytochimique en montrant une forte activité antioxydante.

Généralement, les flavonoïdes après leur administration par voie orale, ils sont hydrolysés dans l'estomac (pH acide) [1,2] et ainsi par des enzymes gastriques. Ces effets limitent l'absorption des flavonoïdes et de l'extrait par voie orale, car il s'agit d'une absorption lente et irrégulière avec une faible biodisponibilité *in vivo* [3].

Pour améliorer la biodisponibilité de l'extrait après l'administration orale, l'une des stratégies possibles est d'encapsuler les poudres issues de cet extrait avec des polymères gastro-résistants, et les transporter directement à l'intestin.

2. Préparation des microparticules à partir de l'infusé Hh

Parmi les méthodes de préparation des microparticules : le séchage par atomisation qui est largement utilisé dans l'industrie pharmaceutique et les champs biochimiques et dans l'industrie alimentaire .Cette technique requiert un équipement assez simple comprenant : un système d'atomisation, une chambre et un système collecteur de séchage (**Figure III.14**).

Le mode opératoire de ce montage se base sur l'évaporation d'une solution contenant l'infusé préparée à partir de la plante *H.halimium* dans la chambre de séchage en formant un aérosol qui entre en contact avec un courant d'air chaud permettant une évaporation rapide du solvant et l'obtention des microparticules solides (MP-Hh). La poudre ainsi formée, passe dans un cyclone afin qu'elle soit récupérée dans un collecteur [4].

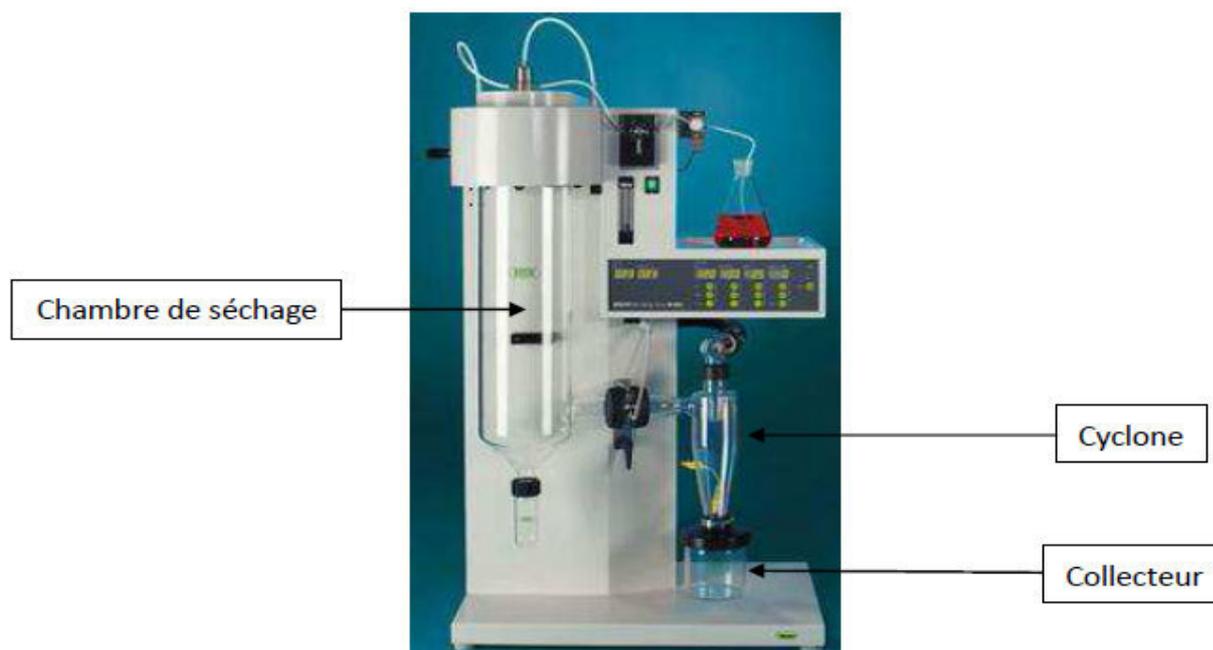


Figure III.14. Séchage par atomisation (spray- dryer)

Cette opération est effectuée aux conditions expérimentales :

- Températures d'entrée / sortie : 100/68 °C
- Débit d'alimentation de flux de pulvérisation est 5 ml/ min.
- Diamètre de buse est 0,7 mm.
- Séchage de flux d'air est de vitesse 600 l/ h.
- Pression d'air est 6 bars, aspirateur 90%.

3. Le test de dissolution des microparticules

L'essai de dissolution *in vitro* est l'aptitude de libérer les principes actifs en solution dans un milieu adéquat. Le passage en solution est déterminé par le dosage du principe actif dans des échantillons prélevés dans le milieu de dissolution à intervalles de temps différents [5].

La pharmacopée européenne préconise 4 types d'appareils pour réaliser le test de dissolution *in vitro* des formes pharmaceutiques orales solides [6] :

- L'appareil à palette tournante.
- L'appareil à panier tournant.
- L'appareil à cylindres réciproques.
- L'appareil à flux continu.

Dans notre travail, on a utilisé l'appareil à palette tournante qui est plus adapté à réaliser la dissolution *in vitro* des formes pharmaceutiques orales solides [7], cet appareil (**Figure III.15**) est constitué de :

Un récipient cylindrique à fond hémisphérique, d'une capacité de 1000 millilitres, en verre borosilicaté ou un autre matériau transparent approprié. Le récipient est muni d'un couvercle empêchant l'évaporation et comportant un orifice central destiné au passage de la tige de l'agitateur ainsi que de plusieurs orifices permettant l'introduction d'un thermomètre et autres des dispositifs pour le prélèvement du liquide.

Un agitateur : constitué d'une tige verticale à la partie inférieure de laquelle est fixée une palette dont la forme correspond à celle de la portion d'un cercle délimitée par deux plans parallèles. La palette est insérée au centre de la tige de façon que sa base soit exactement au niveau de l'extrémité de la tige.

Un bain d'eau thermostaté qui permet de maintenir la température du milieu de dissolution à $37 \pm 0,5$ °C pendant l'essai .



Figure III.15. Appareil à palette tournante

Les tests de dissolution réalisés au cours de cette étude ont été effectués en utilisant un appareil intelligent SOTAX AT (Bâle, Suisse) en ligne avec spectrophotomètre UV / Vis (spectromètre Lambda 25, Perkin-Elmer Instruments, MA, USA).

4. Le développement de la matrice gastro-résistante

4.1. Le test de dissolution de MP-Hh dans les fluides gastriques et intestinaux (*in vitro*)

Avant de procéder à la mise au point des formulations gastro-résistantes contenant de l'infusé Hh avec différents polymères, nous avons effectué la dissolution de la poudre issue de l'infusé Hh (**MP-Hh**) dans les fluides biologiques simulés, selon le procédé de changement de pH.

Dans les tests de dissolution / libération *in vitro* des microparticules MP-Hh.

On a utilisé 750 ml de HCl (0,1 M) pour un pH= 1,2 pendant une durée de 0 à 2 heures, puis l'addition de 250 ml de solution de phosphate de sodium (0,2 M) pour atteindre pH= 6,8 dans un volume total de 1000 ml.

Le profil de dissolution obtenu (**Figure III.18**) montre que **37,64%** de la poudre s'est dissous à pH= 1,2 au bout de deux heures. Cependant, **87,16 %** de MP-Hh s'est dissous après 15 minutes à pH= 6,8.

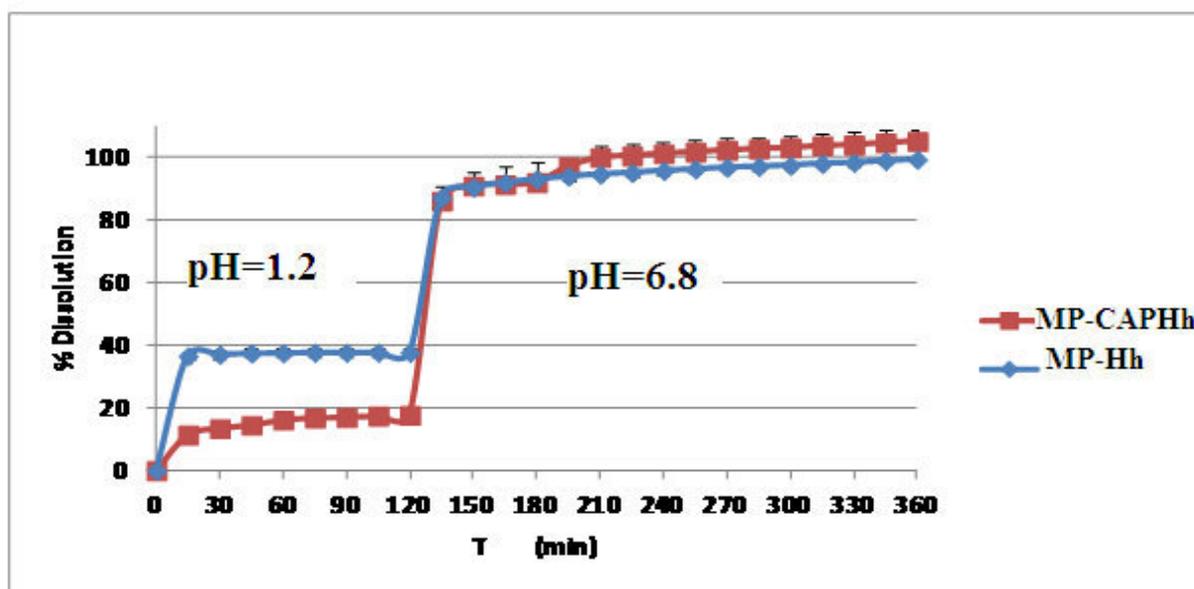


Figure III.18. Profil de dissolution du MP-Hh et MP-CAPHh

4.2. Préparation de la matrice gastro-résistante (MP-CAPHh)

La matrice gastrique est la formulation des microparticules à partir de l'infusion Hh par l'ajout d'un polymère suivi d'un séchage par atomisation en utilisant :

Phtalate acétate de cellulose (CAP) comme polymère gastro-résistant et par l'addition de la solution de l'infusé Hh en rapport (3:1) [8, 9].

En particulier, dans 170 ml (0,425 g) de la solution Hh, 1,7 g de la CAP ont été dissous et pour atteindre un pH = 7,5 ; on utilise le NaOH à 20%.

4.3. Test de dissolution du MP-CAPHh

Le test est effectué selon la méthode précédente (paragraphe 5.1), les résultats sont résumés dans le tableau III.3

Le profil de la dissolution de MP-CAPHh a montré une dissolution de **17,64 %** de la matrice à pH acide et **86,07 %** à pH basique (Figure III.18).

Tableau III.3. Tests de dissolution *in vitro* de MP-Hh et MP-CAPHh

		MP-CAPHh	MP-Hh
Temps (min)	pH	Dissolution(%)	Dissolution(%)
0	1,2	0,00	0,00
15	1,2	11,36	36,56
30	1,2	13,43	37,06
45	1,2	14,50	37,40
60	1,2	16,12	37,46
75	1,2	16,73	37,65
90	1,2	17,00	37,61
105	1,2	17,44	37,70
120	1,2	17,64	37,64
135	6,8	86,07	87,16
150	6,8	90,88	90,43
165	6,8	91,37	91,93
180	6,8	92,01	92,96
195	6,8	97,06	93,93
210	6,8	99,97	94,60
225	6,8	100,51	95,08
240	6,8	101,22	95,71
255	6,8	101,75	96,19
270	6,8	102,31	96,76
285	6,8	102,68	97,04
300	6,8	103,06	97,41
315	6,8	103,73	98,03
330	6,8	103,99	98,30
345	6,8	104,65	98,86
360	6,8	105,16	99,31

- ❖ A pH acide, les résultats ont montré que la vitesse de dissolution de MP-CAPHh pendant deux heures (17,64%) est réduite à 20% par rapport aux taux de dissolution active de MP-Hh (37,64%). Ce comportement est expliqué par la protection des MP-Hh par le polymère gastro-résistant au pH acide alors que la dissolution du principe actif soit minimisée au niveau gastrique.
- ❖ Au niveau intestinal et après 45 min, la dissolution a atteint 91,37%, ce qui montre une amélioration évidente de la vitesse de libération de l'extrait obtenu à partir de MP-CAPHh, cet effet est traduit par la dégradation du polymère à pH basique et puis la libération des principes actifs de l'extrait.

Selon la pharmacopée européenne PE -07, le test de dissolution est satisfaisante, si la teneur en PA dissous dans 45 minutes est supérieure ou égale à 80%.

On constate que nos résultats sont satisfaisants et plus conformes aux normes exigés.

5. Le dosage des microparticules par la méthode UV (l'analyse quantitative)

Le dosage des microparticules dans des échantillons prélevés est le passage en solution de ce dernier dans le milieu de dissolution à intervalles de temps différents, la concentration est calculée en équivalant du produit majoritaire.

La concentration du tiliroside (le composé majoritaire) isolé de l'extrait hydro-alcoolique de la plante *H. halimifolium* est utilisé comme marqueur, a été évaluée en mesurant l'absorbance (UV / VIS Lambda 25, Perkin Elmer Instruments, MA, USA) à 330 nm dans une cuve de 1 cm (Spectracomp 602, Advanced Products srl, Milan, Italie). Les courbes d'étalonnage ont été effectuées à partir des concentrations de tiliroside au niveau de liquide intestinal et le liquide gastrique simulés, la proportionnalité entre l'absorbance et la concentration a été vérifiée dans la gamme de 5-15 mg / l (**Figure III.16 et III.17**) ($R^2 > 0,999$).

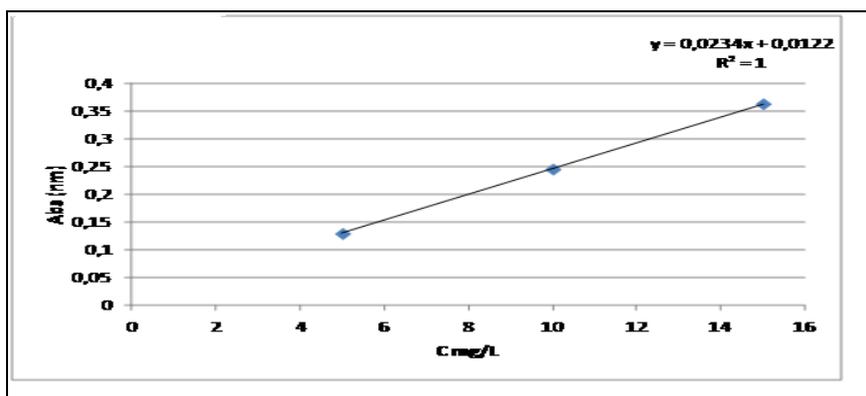


Figure III.16. Courbe d'étalonnage de tiliroside dans le fluide gastrique

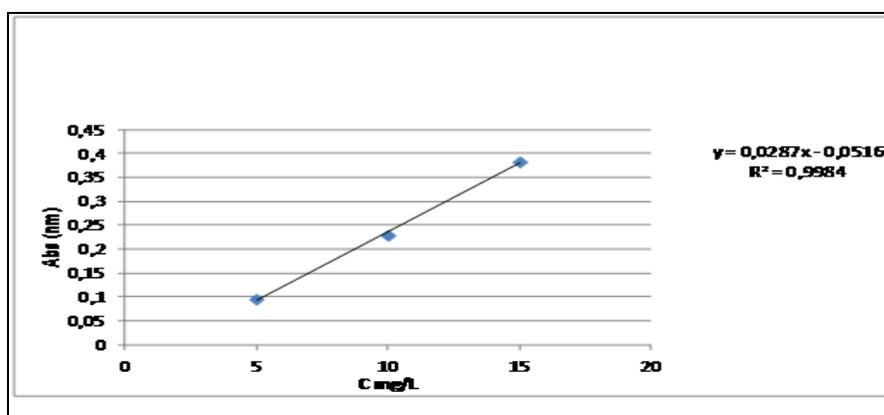


Figure III.17. Courbe d'étalonnage de tiliroside dans le fluide intestinal

6. Caractérisation de la matrice polymérique

- Les rendements de production déterminés par gravimétrie (balance en cristal 100 CAL - Gibertini (max 110 g, d = 0,1 mg; + 15 ° C / 30 ° C) ont été exprimés en pourcentage de poids du produit final par rapport à la quantité totale des matières pulvérisées
- La teneur en extrait théorique (TEC) a été calculée en pourcentage de l'infusion Hh par rapport à la teneur totale initiale des composants (MP-CAPHh) dans l'alimentation avant le séchage par atomisation.

- La teneur réelle en polyphénols (ADC_{MP-Hh}), ($ADC_{MP-CAPHh}$) a été déterminée par la méthode UV telle qu'elle est décrite précédemment et exprimée en équivalents de tiliroside.
- La teneur en extrait réel (AEC) qui est pulvérisé est calculée comme :

$$AEC\% = (ADC_{MP-CAPHh} / ADC_{MP-Hh}) \times 100$$

- L'efficacité d'extrait d'encapsulation (LE%) est le rapport entre l'effectif et la teneur en extrait théorique :

$$LE\% = (AEC / TEC) \times 100$$

La composition et la caractérisation des microparticules issues de l'infusé Hh (MP-Hh) et les microparticules encapsulées par le polymère (CAP-MPHh) sont reportées dans le tableau III.4.

Tableau III.4. Composition et caractérisation.

Composants	CAP-Hh %	Rendement %	TEC %	TDC %	AEC %	ADC %	LE %
MP-Hh						18,64	
MPCAPHh	3:1	67,9	25	4,66	24,14	4,50	96,66

La teneur en extrait réel qui est pulvérisé (AEC Hh) est 24,14%, ce pourcentage entraîné très proche de la quantité d'infusion Hh ajouté au polymère utilisé pour préparer la matrice (teneur en extrait théorique, TECHh) qui est 25%. Expliquant la valeur élevée du rendement d'encapsulation (LE), calculé comme le rapport de l'AEC_{Hh} à TECH_{Hh}, **96,66%**.

La haute teneur en extrait obtenu pour les microparticules produites est encourageant en terme d'effet thérapeutique de la formulation finale à cause de la corrélation entre le contenu actif et l'activité fonctionnelle.

Conclusion

Le but de cette étude était la production des microparticules avec une dissolution améliorée dans le liquide intestinal, destinés à la bonne absorption des flavonoïdes après l'administration par voie orale, cette optimisation a été réalisée grâce au polymère (CAP) qui manifeste une résistance gastrique et une libération prolongée des microparticules dès leur administration.

Références

1. Chebil, L., Humeau, C., Anthoni, J., Dehez, F., Engasser, J.-M., Ghoul, M., (2007). Solubility Of flavonoids in organic solvents. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 52 :1552- 1556.
2. Srinvas, K., King, J.W., Howard, L.R., Monrad, J.K., (2010). Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dehydrate in subcritical water. *Journal of Food Engineering*, 100 :208–218.
3. Lauro, M.R., Maggi, L., Conte, U., De Simone, F., Aquino, R.P., (2005). Rutin and quercetin gastro-resistant microparticles obtained by spray-drying technique. *Journal of Drug Delivery Science and Technologie*, 15(5) :363-369.
4. Sollohub, K., Cal, K., (2010). Spray drying technique: II. Current applications in pharmaceutical technology. *Journal of Pharmaceutical Science*, 99 (2) :587–597.
5. Pharmacopée européenne. (2004).5ème Edition, Version électronique.
6. Wehrlé,P.,(2007).Contrôle biopharmaceutique des formes orales solides. In: Pharmacie galénique, formulation et technologie pharmaceutique. Maloine, 96-105.
7. Le Hir,A.,(2001).Biodisponibilité des formes orales. In : Abrégés de pharmacie galénique, Bonnes pratiques de fabrication des médicaments, 8ème édition. Masson, 290-304.
8. Lauro, MR., De Simone, F., Sansone, F., Iannelli, P., Aquino, RP., (2007). Preparation and release characteristics of naringin and naringenin gastro-resistant microparticles by spray-drying. *Journal of Drug Delivery Science and Technologie*, 17 :119–24.
9. Sansone, F., Esposito, T., Mencherini, M., Piccinelli, A. L., Gazzerro, P., Picerno, P., Russo, P., Del Gaudio, P., Essolito, M., Campiglia, P. & Aquino, R. P. (2015). Annurca peel extract: from the chemical composition, through the functional activity, to the formulation and characterisation of a topical oil-inwater emulsion. *Natural Product Research*, 27 : 1-6.

Conclusion générale

Conclusion générale

Nos travaux sont essentiellement consacrés à la recherche de molécules bioactives des plantes médicinales algériennes : *Halimium halimifolium* (Cistaceae) et *Thymelaea microphylla* (Thymelaeaceae).

Notre critère de sélection de ces deux plantes repose sur des données ethnopharmacologiques. En effet, ces deux plantes sont utilisées en médecine traditionnelle par les populations locales. L'étude que nous avons réalisée dans le cadre de cette thèse consiste d'une part en l'évaluation phytochimique des deux plantes notamment l'extraction hydro-alcoolique, l'isolement et la détermination structurale de leurs métabolites secondaires et d'autre part la valorisation par l'évaluation phytochimique et biologique basée sur l'étude de l'effet scavenger des extraits végétaux, les fractions et les produits purs isolés de l'espèce *Halimium halimifolium* et *Thymelaea microphylla* par la méthode de DPPH *in vitro*.

Le matériel végétal est récolté, puis soumis à des extractions hydro-alcooliques et des affrontements avec des solvants de polarités croissantes (chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol). Les extraits obtenus subissent des investigations chromatographiques et spectroscopiques en vue d'isoler et d'établir les structures des molécules qui les composent en utilisant diverses expériences (UV, RMN 1D et 2D et SM).

Les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de *H. halimifolium* ont permis d'isoler **20 produits** parmi lesquels nous avons établi les structures de **17 d'entre eux**. Tous ces produits sont isolés pour la première fois de cette espèce.

L'étude de l'extrait *n*-butanol de *T. microphylla*, a mené à l'isolement et l'identification de 20 produits dont **7 nouveaux** pour le genre et **13 décrits pour la première** fois dans la famille Thymelaeaceae.

La validation de l'usage médicinal de la plante *H. halimifolium* est effectuée par l'analyse LC-ESI-MS/MS d'infusé et de décocté (préparations utilisées généralement en médecine traditionnelle) pour donner une information sur la nature chimique et la concentration de leurs constituants. L'utilisation de la LC-UV-MS nous a permis de mettre en évidence **8** composés de type *O*-glycosylflavonol également présents dans l'extrait hydroalcoolique (acétate d'éthyle et *n*-butanol). En outre, un nouveau flavonol dans la famille Cistaceae le **kaempférol-3-*O*-(3'',6''-*p*-dicoumaroyl)- β -D-glucopyranoside**) a pu être caractérisé. Cette approche est un bon exemple

de dérégulation qui est un outil de choix pour une étude chimiotaxonomique à large échelle dans la famille des Cistacées.

L'étude de l'évaluation biologique réalisée sur l'infusé et le décocté de *H. halimifolium* et sur, a montré que ces deux espèces avaient un bon effet scavenging vis-à-vis du radical DPPH *in vitro*, cet effet s'est avéré meilleur que celui de l' α -tocophérol utilisé comme standard.

Cette activité remarquable et encourageante nous a incités à faire une formulation de l'infusion à base de *H. halimifolium*, en y ajoutant un polymère qui est un agent protecteur contre la dégradation et qui assure la libération prolongée des molécules bioactives. Pour cet effet, on utilise le spray-drying, confirmé par les tests de dissolution *in vitro* qui est en accord avec les données de la pharmacopée européenne, ce qui nous permet de décrire ces préparations comme étant des additifs alimentaires.

Abstract

The present works concern the study of two medicinal endemic species in Algeria *Halimium halimifolium* (Cistaceae) et *Thymelaea microphylla* (Thymelaeaceae).

Phytochemical investigation of these species using different chromatographic methods (CC, TLC and HPLC) led to the isolation of **37 natural substances**. All the structures were elucidated by spectroscopic methods including 1D and 2D NMR experiments, as well as ESIMS analysis and UV-Vis.

Moreover, the *in vitro* free radical-scavenging activity of the extract, major fractions and isolated phenolic compounds of *Halimium halimifolium* and *Thymelaea microphylla*, species has also been investigated by DPPH test.

The scientific validation of medicinal use of *H. halimifolium* water infusion and decoction has been performed by determination of qualitative and quantitative analysis of phenolic constituents using LC-UV-MS method, However, *H.halimifolium* infusion showed a high concentration of flavonoids that's known by limit their bioavailability as well as therapeutic effect after oral administration and degradation in gastric fluids. In this research, *Hh* infusion was produced by a spray-drying process using a combination of cellulose acetate phthalate (CAP) as coating gastroresistant polymer and swelling or surfactant agents as enhancers of dissolution rate.

Key words : *Halimium halimifolium* ,*Thymelaea microphylla* HPLC-UV- MS free-radical scavenging activity, Gastro-resistant microsystems, Spray-dryer technic

Résumé

Les présents travaux concernent l'étude de deux plantes appartenant à la flore algérienne *Halimium halimifolium* (Cistaceae) et *Thymelaea microphylla* (Thymelaeaceae).

Nos travaux d'extraction sur les parties aériennes de l'espèce *Halimium halimifolium* et *Thymelaea microphylla* et les séparations chromatographiques (CC, CCM et HPLC semi-préparative), nous ont permis d'isoler et d'identifier par les différentes méthodes spectroscopiques (RMN 1D et 2D, MS et UV) **37 métabolites secondaires**.

Cette étude concerne aussi le test de l'activité antioxydante des extraits végétaux, les fractions et les produits purs isolés de l'espèce *Halimium halimifolium* et *Thymelaea microphylla* par la méthode de DPPH *in vitro*.

La validation d'usage traditionnelle de l'espèce *Halimium halimifolium* a été évaluée par l'étude qualitative et quantitative des préparations utilisées en médecine traditionnelle (infusé et décocté) par la méthode de LC-UV-MS, cette étude prouve la richesse de cette plante en polyphénols notamment les flavonoïdes qui nous a orienté à l'étude de la biodisponibilité de ces extraits au niveau gastrique et intestinal par la formulation de l'infusé Hh sous forme de poudre par la micro-encapsulation de ce dernier avec phthalate acétate de cellulose (CAP) comme un polymère gastrorésistant en utilisant la technique de séchage par atomisation .

Mots clés : *Halimium halimifolium*, *Thymelaea microphylla*, HPLC-UV-MS, micro-encapsulation, séchage par atomisation, activité antioxydant, biodisponibilité.

ملخص

تركزت اهتماماتنا في اطار هذا العمل بدراسة نباتين تنتميان الى الغطاء النباتي الجزائري و هما *Halimium halimifolium* (Cistaceae) و *Thymelea microphylla* (Thymelaeaceae). لقد قمنا باستخلاص الاجزاء الهوائية للنوعين *H.halimifolium* و *T.microphylla* وكذا الفصل الكروماتوغرافي (العمود ، الطبقة الرقيقة و HPLC) لمختلف المستخلصات ،التي مكنتنا من عزل و تشخيص 37 ايضا ثانويا باستعمال الطرق الطيفية (SM و UV, RMN 1D,2D).

كما تناولنا بدراسة اختبار النشاط المضاد للتأكسد للمستخلصات النباتية، الكسور وكذلك المركبات النقية المفصولة لكل من النباتين *H.halimifolium* و *T.microphylla* بالاعتماد على طريقة DPPH (*in vitro*) حيث اظهرت نتائج هذا الاختبار فعالية ممتازة ضد الجذور الحرة وخاصة لنبات *H.halimifolium* الذي كان احسن من المرجع (α -tocophérol). كمتابعة للدراسة الكيميائية النباتية و البيولوجية تم التحقق من صحة الاستعمال التقليدي للنوع *H.halimifolium* و ذلك من خلال الدراسة الكيفية و الكمية للمستحضرات المستخدمة في الطب التقليدي لهذه النبتة (منقوع، استخلاص بالإغاء) بواسطة تقنيتي HPLC-UV-DAD و LC/MS/MS، التي أثبتت غنى هذه الاخيرة بالفينولات المتعددة خاصة الفلافونيدات كما توجهنا لدراسة الوفرة البيولوجية لهذه المستخلصات على مستوى المعدة والأمعاء بتشكيلها على هيئة مسحوق و كبسلتها باستعمال سيلولوز خلات الفتلان (CAP) باعتباره بولمر مقاوم لحمض المعدة بالاعتماد على تقنية التجفيف بالرداذ.

الكلمات المفتاحية:

HPLC-UV-DAD و LC/MS/MS, *H.halimifolium*, *T.microphylla*

، الكبسلة الدقيقة، التجفيف بالرداذ ، فعالية مضادة للتأكسد، وفرة بيولوجية.