

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE  
FACULTE DES SCIENCES EXACTES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE**

N° d'ordre.....

Série.....

**THESE**

**Présentée en vue de l'obtention du diplôme de  
Doctorat en Sciences  
en Chimie organique  
Option Phytochimie**

**Par**

**Hanane AISSAOUI**

**Intitulé**

**Investigation phytochimique de plantes médicinales  
sahariennes – Activité biologique**

Devant le jury :

Pr. Ramdane SEGHIRI	Université des frères Mentouri, Constantine1	Président
Pr. MEKKIOU Ratiba	Université des frères Mentouri, Constantine1	Rapporteur
Pr. Souad AMEDDAH	Université des frères Mentouri, Constantine1	Examinatrice
Pr. Mabrouk BELGHOBSI	Université de Jijel	Examineur
Dr. Seloua DRIDI	Université El HadjLakhdar Batna1	Examinatrice
Dr. ChérifaBoubekri	Université Hamma Lakhdar El-oued	Examinatrice

Soutenue le 26/06/2018

# Abréviations et symboles

Les abréviations ont généralement été indiquées sous la forme la plus couramment utilisée dans la littérature, elles sont donc souvent issues de terminologie anglo-saxonne.

ABTS	Acide 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)
Ac	Acétyle
AcOEt	Acétate d'éthyle
AG	Acide galique
APG	<i>Angiosperm Phylogeny Group</i>
APs	Alcaloïdes Pyrrolizidiniques
BAW	<i>n</i> -butanol / Acide acétique/ Eau
CA	Capacité Antioxydante
CC	Chromatographie sur Colonne ouverte
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CDCl <sub>3</sub>	Chloroforme deutéré
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Sulfate de cérium (la solution H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> diluée saturée en sulfate de cérium)
CHCl <sub>3</sub>	Chloroforme
C <sub>18</sub> et C <sub>8</sub>	Silice greffée
COSY	<i>CORrelated SpectroscopY</i>
δ	Déplacement chimique
<i>d</i>	doublet
<i>dd</i>	doublet de doublet
DEPT	Augmentation sans déformation par transfert de polarisation ( <i>Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer</i> )
DLD1	Cellule d'adénocarcinome colorectal humain
DPPH	1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyle
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Diméthylsulfoxyde deutéré
EC50	La concentration efficace médiane
ET	Equivalent Trolox
FBS	Fetal Bovine Serum

FRAP	Ferric Reducing Antioxydant Power
Glu	Glucose
HB1,.. etc	Désignation des composés isolés
HCT116	Cellules de cancer du côlon humain
HDFa	Human Dermal Fibroblasts, adult
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HSQC	<i>Heteronuclear Single-Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	Concentration inhibitrice à 50%
<i>J</i>	Constante de couplage
LPO	Lipid peroxy radicals.
<i>m</i>	multiplet
MeOH	Méthanol
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol- 2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
<i>n</i> -BuOH	Butanol
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Radical superoxide
PBS	Phosphate Buffered Saline
ppm	partie par million
<i>q</i>	quadruplet
<i>quint</i>	quintuplet
RMN <sup>13</sup> C	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
RMN <sup>1</sup> H	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
<i>s</i>	singulet
<i>t</i>	triplet
TBARS	Thiobarbituric acid Reactive Substances
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TFC	Total Flavonoid Content
TPC	Total Phenolic Content
tr	temps de rétention
Trolox	Acide 6- hydroxy-2,5, 7 ,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique
UI	Unité Internationale
UV	Ultraviolet

# Lexique de botanique

- **Conné** : se dit d'éléments végétatifs ou pièces florales semblables soudés par la base. Ex. : feuilles connées du chèvrefeuille.
- **Glabre** : dépourvu de poils.
- **Nucelle** : tissu de réserve, diploïde, d'origine maternelle, il est en général transitoire et disparaît lors de la croissance de l'embryon. S'il persiste dans la graine, il est alors appelé périsperme.
- **paléacé** : la nature et de la consistance de la paille, c'est-à-dire sec, mince, coriace.
- **Scabre** : se dit d'une surface, d'un axe ou d'une arête rude au toucher.
- **Scorpioïde** : se dit d'une cyme unipare en forme de crosse ou de queue de scorpion. Ex. la cyme scorpioïde des myosotis.
- **Stipules** : petites pièces foliacées, à la base du pétiole, au niveau de son insertion sur la tige.

# Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction	1
Bibliographie	3

## Partie I : Synthèse bibliographique

### Chapitre I.1 *Heliotropium bacciferum* Forssk.

I.1.1 Description botanique.	4
I.1.2 Genre <i>Heliotropium</i> (Tourn.) L. "Heliotrope"	4
I.1.3 Espèce <i>Heliotropium baccifrum</i> Forssk.	5
I.1.4 Origine et répartition géographique.	6
I.1.5 Synonyme	6
I.1.6 Nom vernaculaire.	6
I.1.7 Systématique	6
I.1.8 Utilisations traditionnelles	6
I.1.9 Métabolites isolés du genre <i>Heliotropium</i>	7
I.1.9.1 Les alcaloïdes.	7
I.1.9.2 Les flavonoïdes.	17
I.1.9.3 Les terpènes.	23
I.1.9.4 Les stérols	25
I.1.9.5 Autre composés	27
I.1.10. Synthèse biologique.	32
I.1.11. Toxicité de quelques espèces du genre <i>Heliotropium</i> .	33
I.1.12. Conclusion générale.	34

Bibliographie	35
---------------	----

## Chapitre I.2 *Lifago dielsii* Schwein. & Mush.

I.2.1. Généralités. . . . .	46
I.2.2. Distribution. . . . .	47
I.2.3. Description botanique des Astéracées. . . . .	47
I.2.4. Le genre <i>Lifago</i> Asch. & Schwein. . . . .	47
I.2.5. Espèce <i>Lifago dielsii</i> Schwein.& Mush . . . . .	48
I.2.5.1. Discription botanique. . . . .	48
I.2.5.2. Origine et répartition géographique. . . . .	48
I.2.5.3 Synonyme . . . . .	49
I.2.5.4. Place dans la systématique . . . . .	49
I.2.5.5. Usage traditionnel . . . . .	49

Bibliographie	50
---------------	----

## Partie II : Partie expérimentale

### Chapitre II.1 Travaux personnels effectués sur l'espèce *Heliotropium bacciferum* Forssk.

II.1.1. Récolte de la matière végétale. . . . .	51
II.1.2. Extraction. . . . .	51
II.1.3. Séparation de l'extrait chloroforme. . . . .	52
II.1.3.1. Séparation chromatographique sur colonne. . . . .	52
II.1.3.2. Séparation et purification des fractions sélectionnées. . . . .	53
II.1.4. Séparation de l'extrait méthanol. . . . .	56
II.1.4.1. Séparation chromatographique sur colonne. . . . .	56
II.1.4.2. Séparation et purification des fractions sélectionnées. . . . .	57
II.1.5. Détermination quantitative des phénols totaux. . . . .	59
II.1.6. Activité antioxydant des extraits et des composés de <i>H. bacciferum</i> . . .	59
II.1.6.1. Activité antiradicalaire (test du radical DPPH°). . . . .	59
II.1.6.2. Test de capacité antioxydante équivalente de Trolox (TEAC). . .	60
II.1.7. Test de cytotoxicité. . . . .	61
II.1.7.1. Cellules et traitement. . . . .	61
II.1.7.2. Viabilité cellulaire. . . . .	61

Bibliographie	63
---------------	----

## Chapitre II.2 Travaux personnels effectués sur l'espèce *Lifago dielsii* Schwein. & Musch.

II.2.1. Récolte de la matière végétale. . . . .	64
II.2.2. Le screening phytochimique. . . . .	64
II.2.2.1. Recherche des terpènes, stérols insaturés. . . . .	65
II.2.2.2. Recherche des triterpènes. . . . .	65
II.2.2.3. Recherche des saponines. . . . .	66
II.2.2.4. Recherche des coumarines. . . . .	66
II.2.2.5. Recherche des flavonoïdes. . . . .	67
II.2.2.6. Recherche des leucoanthocyanes. . . . .	67
II.2.2.7. Recherche des anthocyanes. . . . .	68
II.2.2.8. Recherche des quinones. . . . .	68
II.2.2.9. Recherche des tanins . . . . .	68
II.2.2.10. Recherche des alcaloïdes. . . . .	69
II.2.3. Extraction. . . . .	69
II.2.4. Séparation de l'extrait acétate d'éthyle. . . . .	70
II.2.4.1. Séparation chromatographique sur colonne. . . . .	70
II.2.4.2. Séparation et purification des fractions sélectionnées . . . . .	72
II.2.5. Evaluation de l'activité antioxydante . . . . .	74
II.2.5.1. Dosage des polyphénols totaux (TPC). . . . .	75
II.2.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux (TFC) . . . . .	76
II.2.5.3. Activité anti radicalaire (test DPPH°) . . . . .	77
II.2.5.4. Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO induite par le système Fe <sup>2+</sup> / acide ascorbique). . . . .	79
Bibliographie	80

## Partie III : Résultats et discussions

### Chapitre III.1 Discussion des résultats de l'espèce *Heliotropium bacciferum* Forssk.

III.1.1. Rendement de l'extraction. . . . .	82
III.1.2. Elucidation structurale des composés isolés. . . . .	82
III.1.2.1. Elucidation structurale des composés HB1 et HB2. . . . .	83
III.1.2.2. Elucidation structurale du composé HB3. . . . .	86
III.1.2.3. Elucidation structurale du composé HB4. . . . .	93
III.1.2.4. Elucidation structurale du composé HB5. . . . .	102
III.1.2.5. Elucidation structurale du composé HB6. . . . .	111

III.1.2.6. Elucidation structurale du composé HB7. . . . .	119
III.1.2.7. Elucidation structurale du composé HB8. . . . .	127
III.1.2.8. Elucidation structurale du composé HB9. . . . .	136
III.1.2.9. Elucidation structurale du composé HB10. . . . .	143
III.1.2.10. Elucidation structurale du composé HB11. . . . .	148
III.1.2.11. Elucidation structurale des composés HB12 et HB13. . . . .	154
III.1.2.12. Elucidation structurale du composé HB14. . . . .	163
III.1.2.13. Elucidation structurale du composé HB15. . . . .	170
III.1.2.14. Elucidation structurale du composé HB16. . . . .	176
III.1.2.15. Elucidation structurale du composé HB17. . . . .	186
III.1.3. Discussion des résultats des de l'activité antioxydante. . . . .	192
III.1.4. Discussion des résultats de l'activité cytotoxique . . . . .	193
<b>Bibliographie</b>	<b>196</b>

## Chapitre III.2 Discussion des résultats de l'espèce *Lifago dielsii* Schweinj & Muschl.

III.2.1. Discussion des résultats du screening phytochimique. . . . .	199
III.2.2. Rendement de l'extraction. . . . .	200
III.2.3. Elucidation structurale des composés isolés. . . . .	200
III.2.3.1. Elucidation structurale du composé LD1. . . . .	201
III.2.3.2. Elucidation structurale du composé LD2. . . . .	214
III.2.3.3. Elucidation structurale du composé LD3. . . . .	224
III.2.4. Discussion des résultats des dosages et l'activité antioxydante. . . . .	234
III.2.4.1. Dosage des polyphénols totaux (TPC) et des flavonoïdes totaux (TFC) . . . . .	234
III.2.4.2. Activité de piégeage de DPPH. . . . .	235
III.2.4.3. Inhibition de la LPO induite par le système Fe <sup>2+</sup> /acide ascorbique	236
III.2.4.4. Conclusion. . . . .	238
<b>Bibliographie</b>	<b>239</b>
<b>Conclusion générale</b>	<b>241</b>

# Liste des tableaux

<b>Tableau I.1.1</b> Les alcaloïdes pyrrolizidiniques isolés du genre <i>Heliotropium</i> . . . . .	9
<b>Tableau I.1.2</b> Les flavonoïdes isolés du genre <i>Heliotropium</i> . . . . .	17
<b>Tableau I.1.3</b> Les terpènes isolés du genre <i>Heliotropium</i> . . . . .	23
<b>Tableau I.1.4</b> Les stérols isolés du genre <i>Heliotropium</i> . . . . .	25
<b>Tableau I.1.5</b> Autres composés isolés du genre <i>Heliotropium</i> . . . . .	27
<b>Tableau II.1.1</b> Résultats des fractions obtenues de l'extrait chloroforme de <i>H. bacciferum</i> . . . . .	53
<b>Tableau II.1.2</b> Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction HBC7. . . . .	54
<b>Tableau II.1.3</b> : Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBC12 . . . . .	54
<b>Tableau II.1.4</b> : Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBC14 . . . . .	55
<b>Tableau II.1.5</b> : Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBC15 . . . . .	55
<b>Tableau II.1.6</b> : Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBC16 . . . . .	55
<b>Tableau II.1.7</b> Résultats des fractions obtenues de l'extrait méthanol de <i>H. bacciferum</i> . . . . .	57
<b>Tableau II.1.8</b> : Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBM1. . . . .	57
<b>Tableau II.1.9</b> : Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBM2. . . . .	57
<b>Tableau II.1.10</b> : Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBM3. . . . .	58
<b>Tableau II.1.11</b> : Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBM4. . . . .	58
<b>Tableau II.2.1</b> Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce <i>L. dielsii</i> . . . . .	71
<b>Tableau II.2.2</b> Résultats des fractions obtenues de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce <i>L. dielsii</i> . . . . .	72
<b>Tableau II.2.3</b> Protocole expérimental (test Folin–Ciocalteu) . . . . .	75
<b>Tableau II.2.4</b> Protocole expérimental (méthode au AlCl <sub>3</sub> ) . . . . .	77

<b>Tableau II.2.5</b> Protocole expérimental (test au DPPH) . . . . .	78
<b>Tableau III.1.1</b> Rendement des extraits de <i>Heliotropium bacciferum</i> . . . . .	82
<b>Tableau III.1.2</b> Données spectrales de RMN du composé <b>HB3</b> . . . . .	92
<b>Tableau III.1.3</b> Données spectrales de RMN du composé <b>HB4</b> . . . . .	101
<b>Tableau III.1.4</b> Données spectrales de RMN du composé <b>HB5</b> . . . . .	110
<b>Tableau III.1.5</b> Données spectrales de RMN du composé <b>HB6</b> . . . . .	118
<b>Tableau III.1.4</b> Données spectrales de RMN du composé <b>HB7</b> . . . . .	126
<b>Tableau III.1.7</b> Données spectrales de RMN du composé <b>HB8</b> . . . . .	135
<b>Tableau III.1.8</b> Données spectrales de RMN du composé <b>HB9</b> . . . . .	142
<b>Tableau III.1.9</b> Données spectrales de RMN du composé <b>HB10</b> . . . . .	147
<b>Tableau III.1.10</b> Données spectrales de RMN du composé <b>HB11</b> . . . . .	153
<b>Tableau III. 1.11</b> Données spectrales RMN du composé <b>HB12</b> . . . . .	157
<b>Tableau III. 1.12</b> Les données spectrales RMN du composé <b>HB13</b> . . . . .	162
<b>Tableau III.1.13</b> Les données spectrales RMN du composé <b>HB14</b> . . . . .	169
<b>Tableau III.1.14</b> Les données spectrales RMN du composé <b>HB15</b> . . . . .	176
<b>Tableau III.1.15</b> Déplacement chimiques RMN du composé <b>HB16</b> . . . . .	185
<b>Tableau III.1.16</b> Données spectrales de RMN du composé <b>HB17</b> . . . . .	191
<b>Tableau III.1.17</b> Acticité antioxydante et teneur totale en phénols des extraits et des composés de <i>H. bacciferum</i> . . . . .	193
<b>Tableau III.1.18</b> IC50 d'extraits de <i>H. bacciferum</i> (mg/ml) et composés purs (mM) dans des variétés de cellule humaines de cancer. . . . .	195
<b>Tableau III.2.1</b> Résultats globaux de la recherche de groupe des substances dans l'espèce <i>L. dielsii</i> . . . . .	199
<b>Tableau III.2.2</b> Rendement des extraits de <i>Lifago dielsii</i> . . . . .	200
<b>Tableau III. 2.3</b> Données spectrales RMN du composé <b>LD1</b> . . . . .	213
<b>Tableau III.2.4</b> Données spectrales RMN du composé <b>LD2</b> . . . . .	223
<b>Tableau III.2.5</b> Données spectrales RMN du composé <b>LD3</b> . . . . .	233
<b>Tableau III.2.6</b> Valeurs de DPPH et de LPO IC50 des activités antioxydantes de <i>L. dielsii</i> et des normes (Trolox et acide ascorbique) . . . . .	237

# Table des figures

<b>Figure I.1.1</b>	Image de <i>Heliotropium bacciferum</i> . . . . .	5
<b>Figure I.1.2</b>	Structure de base des alcaloïdes pyrrolizidiniques : noyau pyrrolizidine. . . . .	8
<b>Figure I.1.3</b>	Base rétronécine des alcaloïdes pyrrolizidiniques. . . . .	8
<b>Figure I.1.4</b>	Les structures des acides néciques acides néciques.. . . .	11
<b>Figure I.2.1</b>	Image de <i>Lifago dielsii</i> Schwenin. & Musch . . . . .	48
<b>Figure II.1.1</b>	Profil chromatographique de l'extrait chloroforme de l'espèce <i>H. bacciferum</i>	52
<b>Figure II.1.2</b>	Profil chromatographique de l'extrait méthanol de l'espèce <i>H. bacciferum</i> . . .	56
<b>Figure II.1.3</b>	Oxydo-réduction de l'ABTS en ABTS <sup>o+</sup> . . . . .	60
<b>Figure II.2.1</b>	Schéma illustrant toutes les étapes de séparation et de purification . . . . .	73
<b>Figure II.2.2</b>	Courbe d'étalonnage de l'acide gallique . . . . .	76
<b>Figure II.2.3</b>	La courbe d'étalonnage de la quercétine . . . . .	77
<b>Figure.II.2.3</b>	Réduction du radical libre DPPH• (1,1 Diphényle-2-Picrylhydrazyl). . . . .	78
<b>Figure III.1.1</b>	Structure des composés <b>HB1</b> et <b>HB2</b> , $\beta$ - sitostérol et Stigmastérol . . . . .	85
<b>Figure III.1.2</b>	Entité 1 présente dans le composé <b>HB3</b> . . . . .	89
<b>Figure III.1.3</b>	Entité 2 présente dans le composé <b>HB3</b> . . . . .	90
<b>Figure III.1.4</b>	Structure partielle du composé <b>HB3</b> . . . . .	91
<b>Figure III.1.5</b>	Structure plane du composé <b>HB3</b> , 3-hydroxy- $\alpha$ -ionone. . . . .	92
<b>Figure III.1.6</b>	Entité 1 présente dans le composé <b>HB4</b> . . . . .	95
<b>Figure III.1.7</b>	Entité 2 présente dans le composé <b>HB4</b> . . . . .	96
<b>Figure III.1.8</b>	Entité 3 présente dans le composé <b>HB4</b> . . . . .	97
<b>Figure III.1.9</b>	Structure partielle du composé <b>HB4</b> . . . . .	98
<b>Figure III.1.10</b>	Structure partielle du composé <b>HB4</b> . . . . .	99
<b>Figure III.1.11</b>	Structure finale du composé <b>HB4</b> , (-)-3-hydroxy- $\beta$ -ionone. . . . .	100
<b>Figure III.1.12</b>	Entité 1 présente dans la molécule . . . . .	105
<b>Figure III.1.13</b>	Entité 2 présente dans la molécule. . . . .	105
<b>Figure III.1.14</b>	Structure partielle du composé <b>HB5</b> . . . . .	106
<b>Figure III.1.15</b>	Structure partielle du composé <b>HB5</b> . . . . .	107
<b>Figure III.1.16</b>	Structure partielle du composé <b>HB5</b> . . . . .	107
<b>Figure III.1.17</b>	Structure partielle du composé <b>HB5</b> . . . . .	108
<b>Figure III.1.18</b>	La structure plane du composé <b>HB5</b> . . . . .	109
<b>Figure III.1.19</b>	Structure du composé <b>HB5</b> , (6S) -6-hydroxy-4,7-mégastigmadiène-3,9-dione. . . . .	110

<b>Figure III.1.20</b>	Entité 1 présente dans le composé <b>HB6</b> .	114
<b>Figure III.1.21</b>	Entité 2 présente dans le composé <b>HB6</b> .	115
<b>Figure III.1.22</b>	Entité 3 présente dans le composé <b>HB6</b> .	116
<b>Figure III.1.23</b>	Entité 4 présente dans le composé <b>HB6</b> .	117
<b>Figure III.1.24</b>	Structure finale du le composé <b>HB6</b> , loliolide.	118
<b>Figure III.1.25</b>	Entité 1 présente dans le composé <b>HB7</b> .	121
<b>Figure III.1.26</b>	Entité 2 présente dans le composé <b>HB7</b> .	122
<b>Figure III.1.27</b>	Entité 3 présente dans le composé <b>HB7</b> .	123
<b>Figure III.1.28</b>	Entité 4 présente dans le composé <b>HB7</b> .	123
<b>Figure III.1.29</b>	Structure partielle du composé <b>HB7</b> .	125
<b>Figure III.1.30</b>	Structure finale du le composé <b>HB7</b> , (3 <i>S</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>S</i> , 7 <i>E</i> )- 3, 5, 6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one.	126
<b>Figure III.1.31</b>	Entité 1 présente dans le composé <b>HB8</b> .	128
<b>Figure III.1.32</b>	Entité présente dans le composé <b>HB8</b> .	131
<b>Figure III.1.33</b>	Structure partielle 1 du composé <b>HB8</b> .	131
<b>Figure III.1.34</b>	Structure partielle 2 du composé <b>HB8</b> .	133
<b>Figure III.1.35</b>	Structure partielle 3 du composé <b>HB8</b> .	134
<b>Figure III.1.36</b>	Structure finale du composé <b>HB8</b> , (3 <i>R</i> )-8-hydroxylinalol.	135
<b>Figure III.1.37</b>	Entité 1 présente dans le composé <b>HB9</b> .	138
<b>Figure III.1.38</b>	Structure partielle du composé <b>HB9</b> .	139
<b>Figure III.1.39</b>	Structure partielle du composé <b>HB9</b> .	140
<b>Figure III.1.40</b>	Structure partielle du composé <b>HB9</b> .	140
<b>Figure III.1.41</b>	Structure du composé <b>HB9</b> , 3-oxo- $\alpha$ -ionol.	141
<b>Figure III.1.42</b>	Les corrélations COSY et ROESY du proton H-3ax.	145
<b>Figure III.1.43</b>	Structure finale du composé <b>HB10</b> , isololiolide.	147
<b>Figure III.1.44</b>	Corrélation HMBC	150
<b>Figure III.1.45</b>	Structure du composé <b>HB11</b> , (+)-Blumenol A	151
<b>Figure III.1.46</b>	Structure partielle du composé <b>HB12</b> .	156
<b>Figure III.1.47</b>	Structure finale du composé <b>HB12</b> , Protocatechualdehyde	157
<b>Figure III.1.48</b>	Structure partielle du composé <b>HB13</b> .	161
<b>Figure III.1.49</b>	Structure finale du composé <b>HB13</b> , Tyrosol	162
<b>Figure III.1.50</b>	Entité 1 présente dans le composé <b>HB14</b>	165
<b>Figure III.1.51</b>	Corrélation HMBC du composé <b>HB14</b>	166
<b>Figure III.1.52</b>	Structure finale plane du composé <b>HB14</b> .	167
<b>Figure III.1.53</b>	Structure finale du composé <b>HB14</b> ; Ethyl- 3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactate.	168

<b>Figure III.1.54</b>	Structure partielle du composé <b>HB15</b> . . . . .	172
<b>Figure III.1.55</b>	Corrélation HMBC entre le proton anomérique et le carbone C-3. . . . .	175
<b>Figure III.1.56</b>	Structure finale du composé <b>HB15</b> ; (3S)-3-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)-3, 7-dimethylocta-1,6- dien-3-ol. . . . .	176
<b>Figure III.1.57</b>	Structure partielle 1 du composé <b>HB16</b> . . . . .	180
<b>Figure III.1.58</b>	Structure partielle 2 du composé <b>HB16</b> . . . . .	182
<b>Figure III.1.59</b>	Corrélations HMBC du composé <b>HB16</b> . . . . .	184
<b>Figure III.1.60</b>	Structure du composé <b>HB16</b> , acide rosmarinique. . . . .	185
<b>Figure III.1.61</b>	Structure partielle du composé <b>HB17</b> . . . . .	187
<b>Figure III.1.62</b>	Structure plane du composé <b>HB17</b> . . . . .	189
<b>Figure III.1.63</b>	Structure finale du composé <b>HB17</b> , Méthyl ester acide rosmarinique. . .	190
<b>Figure III.2.1</b>	Structure partielle du composé <b>LD1</b> . . . . .	204
<b>Figure III.2.2</b>	Entité 1 présente dans le composé <b>LD1</b> . . . . .	210
<b>Figure III.2.3</b>	Groupement caféoyle. . . . .	211
<b>Figure III.2.4</b>	Entité 2 présente dans le composé <b>LD1</b> . . . . .	211
<b>Figure III.2.5</b>	Structure partielle du composé <b>LD1</b> . . . . .	211
<b>Figure III.2.6</b>	Structure finale du composé <b>LD1</b> . . . . .	212
<b>Figure III.2.7</b>	Structure partielle du composé <b>LD2</b> . . . . .	218
<b>Figure III.2.8</b>	Structure finale du composé <b>LD2</b> . . . . .	222
<b>Figure III.2.9</b>	Structure partielle du composé <b>LD3</b> . . . . .	227
<b>Figure III.2.10</b>	Structure partielle du composé <b>LD3</b> . . . . .	231
<b>Figure III.2.11</b>	Structure finale du composé <b>LD3</b> . . . . .	232
<b>Figure III.2.12</b>	TPC (mg EAG/g d'extrait), TFC (mg EQ/g d'extrait) et pourcentage de flavonoïdes (%) d'extraits de <i>L. dielsii</i> . . . . .	234
<b>Figure III.2.14</b>	Activités de piégeage DPPH des extraits de <i>L. dielsii</i> et standard	236
<b>Figure III.2.15</b>	Inhibition de la LPO (%) <i>L. dielsii</i> et standard. . . . .	237

Partie I  
Synthèse bibliographique

# Chapitre I.1

## *Heliotropium bacciferum* Forssk.

### I.1.1. Description botanique

La famille Boraginaceae (les Boraginacées ou Borraginacées ou Boragacées) est une famille de plantes dicotylédones. Ce sont des arbres, des arbustes, des plantes herbacées et plus rarement des lianes, producteurs d'huiles essentielles, largement répandus autour du monde avec concentration autour du bassin méditerranéen.

Plantes herbacées, généralement à poils raides, rarement glabres. Feuilles généralement alternes, à limbe entier ; pas de stipules. Les inflorescences sont toujours des cymes unipares scorpioïdes.

Fleurs généralement à symétrie radiaire ou un peu bilatérales, hermaphrodites, 4-mères ou 5-mères ; calice à pièces libres ou soudées entre elles à la base ; étaminées insérées sur le tube de la corolle (même nombre que les pétales et alternant avec eux) [1].

Il existe environ 2000 espèces dans cette famille, surtout en Asie tempère et région Méditerranéenne

### I.1.2. Genre *Heliotropium* (Tourn.) L. "Heliotrope"

Le nom "heliotrope" dérive de l'ancienne idée que les inflorescences de ces plantes ont transformée leurs rangées de fleurs en soleil. [1] "ἥλιος (helios) est un mot grec pour "solaire", τρέπειν (trepein) signifie "tourner".

Plantes herbacées ou sous-ligneuses, pubescentes hispides. Feuilles entières ou dentées, en général éparses, sans stipules. Fleurs hermaphrodites, sessiles ou presque. Calice 5 parties ou 5 dentés, persistant ou non. Corolle cupuliforme, à tube court, à lobes pourvue dans les sinus de 5 plis terminés en denticulation. Etamines 5, incluses. Carpelles 2, soudés en ovaire à 2-4 loges donnant à la fin 1-4 nucules [1].

Le genre *Heliotropium* est riche de 250 espèces que l'on rencontre dans les zones tropicales et tempérées du monde entier.

### I.1.3. Espèce *Heliotropium bacciferum* Forssk.

*Heliotropium bacciferum* Forssk (figure I.1.1) est une plante des lieux arides et désertiques, à inflorescence en cymes tout au plus géminée. Nucules jaune-brun. Plantes en général ligneuses à la base, à feuilles deux à trois fois plus longues que larges, ondulées ou crispées sur leurs bords, fruits glabres ; plante annuelle, à tiges couchées [1,3].

L'espèce *Heliotropium bacciferum* qu'on rencontre dans le Sahara Algérien est une espèce saharo-sindienne (Sah.Sind) [1,3].



Quézel P. & Santa S. (1963)

<http://www.planetefleurs.fr>

**Figure I.1.1 :** Image de *Heliotropium bacciferum*

### I.1.4. Origine et répartition géographique

*Heliotropium bacciferum* Forssk se rencontre en Afrique du Nord (Algérie, Tunisie, Maroc), Palestine, Mauritanie, Sénégal, Soudan et en Egypte [4], et son aire s'étend à la péninsule arabique et à l'Afghanistan. Elle a été introduite dans certaines régions des Etats-Unis [5].

### I.1.5. Synonyme

*Heliotropium undulatum*. Vahl [1,3]

### I.1.6. Nom vernaculaire

Tahenna (Algérie) [1, 3]

Sedjra tenshama, sga'a, medeb (Arabe) [1], lebalig, lehbaliya (Berbère) [4]

Wavy heliotrope (En) [5].

### I.1.7. Systématique (APGIII) [6]

Règne	Plantae
Division	Tracheophyta
Classe	Equisetopsida C. Agardh.
Sous-Classe	Magnoliidae Novak ex Takht.
Ordre	Boraginales Juss. ex Bercht.& J. Presl
Famille	Boraginaceae Juss.
Genre	<i>Heliotropium</i> L.
Espèce	<i>Heliotropium bacciferum</i> Forssk.

### I.1.8. Utilisations traditionnelles

Une multitude d'utilisations traditionnelles est recensée pour *H. bacciferum*,

- En Algérie

- ✓ Les feuilles de la plante *H. bacciferum* sont séchées et réduite en poudre pour l'utilisation externe comme un remède pour les maladies de la peau « abcès, furoncles, tinea ».
- ✓ La décoction des parties aériennes du *H. bacciferum* pour des usages interne et externe « Amygdalite (gargarisme), piqûre de serpent, gale de chameau »

- En Mauritanie

- ✓ Elle est réputée fournir un bon fourrage pour les chameaux et autres animaux domestiques [5].
- ✓ Un bon médicament pour soigner les brûlures. Le suc de la plante est appliqué directement sur la partie brûlée [4].
- Au Niger, certaines parties de la plante *H. bacciferum* sont séchées, broyées en poudre, diluées dans l'eau et que l'on boit pour combattre la fatigue [5].
- Au Nord du Nigeria, on l'applique localement pour traiter les maux de tête, et en usage interne on l'emploie pour traiter la blennorrhagie et stimuler la lactation [5].
- Au Sénégal, la plante est broutée par les chèvres mais pas par les autres animaux domestiques [5].
- Dans l'ouest du Sahara, cette espèce fournit, par macération, une encre pour l'écriture [5].
- Au Sahara
  - ✓ Au Sahara occidental et dans le Dra, les feuillets d'*H. bacciferum*, séchés, réduits en poudre malaxés avec l'eau, servent à des emplâtres topiques et résolutifs pour abcès, furoncles, entorses, contusions, œdèmes et enflures de toutes sortes. On en fait aussi des cataplasmes sédatifs dans des brûlures
  - ✓ Au Sahara central, les feuillets secs d'*H. bacciferum* sont broyés, mélangés à l'eau ou au lait aigre puis appliqués en emplâtre sur la tête, contre la teigne.

La plante *H. bacciferum* est employée partout au Sahara, en usage externe, dans le traitement d'affections cutanées chez l'animal.

*Heliotropium bacciferum* est un pâturage amer très apprécié des dromadaires et des troupeaux.

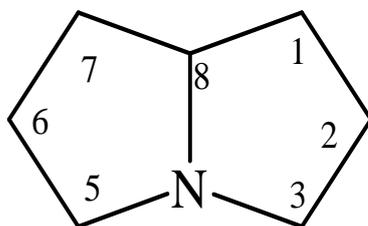
### I.1.9. Métabolites isolés du genre *Heliotropium*

Une trentaine d'espèces appartenant au genre *Heliotropium*, a été étudiée depuis les années 70 et les molécules identifiées peuvent se classer en quatre familles chimiques : les stérols, les terpènes, les polyphénols dont l'acide rosmarinique et les alcaloïdes pyrrolizidiniques qui sont très présents dans ce genre.

#### I.1.9.1. Les alcaloïdes

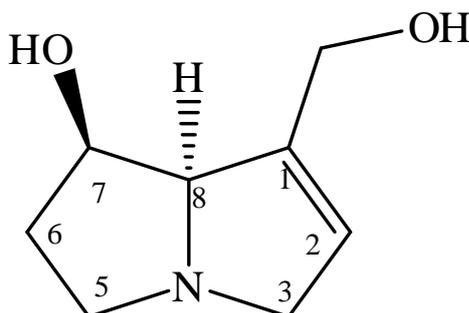
Les alcaloïdes les plus rencontrés dans les espèces du genre *Heliotropium* sont les dérivés de la pyrrolizidine. Du point de vue structural les alcaloïdes pyrrolizidiniques (APs) sont composés d'un noyau pyrrolizidine (figure I.1.2), formé par deux cycles à cinq

carbones qui partagent un atome d'azote en position 4, et de substituants en position 1 et 7 du noyau.



**Figure I.1.2 :** Structure de base des alcaloïdes pyrrolizidiniques : noyau pyrrolizidine.

Les APs trouvés chez le genre *Heliotropium* ont une base rétronécine (figure I.1.3). La base rétronécine peut être estérifiée avec un ou plusieurs acides néciques et peut avoir une insaturation en position 1,2 ou être saturée [7, 8]. Il existe huit types de base nécine qui se différencient par la position de leurs substituants en position 1, 7 et 8 qui se retrouvent en  $\alpha$  ou en  $\beta$  du cycle [8]. Les APs sont généralement retrouvés sous la forme de mélange de la forme classique et de sa dérivée *N*-oxyde qui prédomine le plus fréquemment [9].



**Figure I.1.3 :** Base rétronécine des alcaloïdes pyrrolizidiniques

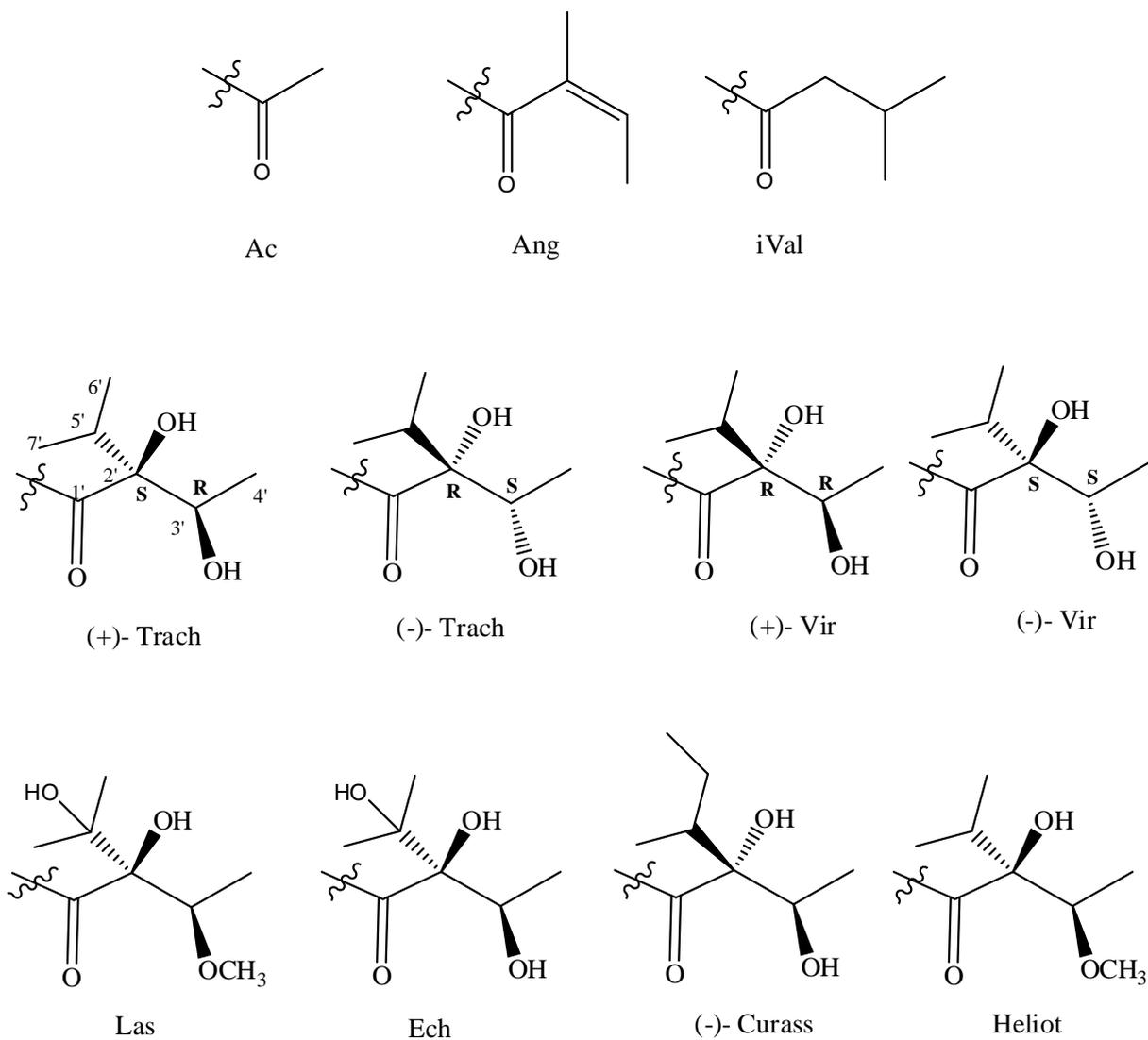
Le tableau I.1.1 rassemble les alcaloïdes isolés et identifiés chez les espèces du genre *Heliotropium*

**Tableau I.1.1** : Les alcaloïdes pyrrolizidiniques isolés du genre *Heliotropium*

Espèces <i>Heliotropium</i>	Alcaloïdes pyrrolizidiniques isolés	Réf
<i>H. acutiflorum</i> Kir.	<u>1d</u>	[10]
<i>H. amplexicaule</i> Vahl.	<u>2f</u>	[7]
<i>H. angiospermum</i> Murr.	<u>15</u> , <u>6</u> , <u>2a</u> , <u>7</u> , <u>3a</u>	[11]
<i>H. arbainense</i> Fres.	<u>1j</u> , <u>1d</u> , <u>1m</u> , <u>1f</u> .	[12, 13]
<i>H. arborescens</i> L. (syn. <i>H. peruvianum</i> L.)	<u>2f</u> , <u>2g</u> , <u>1m</u> .	[14]
<i>H. arguzioides</i> Kir.	<u>1d</u> , <u>20a</u> , <u>22</u>	[15]
<i>H. bacciferum</i> Forssk.	<u>1j</u> , <u>1d</u> , <u>11a</u> , <u>4d</u> , <u>19d</u> , <u>4f</u> , <u>19f</u> .	[16,17]
<i>H. bovei</i> Boiss.	<u>1j</u> , <u>1k</u> , <u>1m</u> , <u>1o</u> , <u>19a</u> , <u>19b</u> .	[18]
<i>H. bracteatum</i> R.	<u>10a</u> , <u>2a</u> , <u>13c</u> , <u>13b</u> , <u>13a</u>	[19, 20]
<i>H. bursiferum</i> C.	<u>2b</u> .	[21]
<i>H. circinatum</i> Griseb.	<u>1f</u> , <u>1c</u> , <u>1j</u> , <u>4d</u> , <u>1d</u> , <u>1m</u> .	[22, 23]
<i>H. confertifolium</i>	<u>6</u> , <u>2a</u> , <u>7</u> , <u>3a</u> .	[11]
<i>H. crassifolium</i> Boiss.	<u>4e</u> , <u>1j</u> , <u>19d</u> , <u>11b</u>	[24]
<i>H. curassavicum</i> L.	<u>3d</u> , <u>4b</u> , <u>3e</u> , <u>4c</u> , <u>12a</u> , <u>5c</u> , <u>18</u> , <u>5a</u> , <u>5b</u> , <u>3i</u> , <u>1b</u> , <u>3a</u> , <u>2a</u> , <u>7</u> .	[11, 25–28]
<i>H. curassavicum</i> . Var. <i>Argentium</i>	<u>2k</u> , <u>2l</u>	[29]
<i>H. curassavicum</i> Var. <i>Curassavicum</i> johnst.	<u>2k</u> , <u>2l</u>	
<i>H. dasycarpum</i> Ledeb.	<u>1d</u>	[30]
<i>H. digynum</i> Forssk. (syn. <i>H. luteum</i> )	<u>1j</u> , <u>1d</u> , <u>1f</u> , <u>1m</u> .	[31]
<i>H. disciforme</i> Akhani.	<u>1d</u> , <u>1e</u> , <u>19f</u> , <u>4d</u> , <u>19f</u>	[32]
<i>H. dissitiflorum</i> Boiss.	<u>1d</u> , <u>19f</u> , <u>1j</u> , <u>1p</u> .	[33]
<i>H. dolosum</i> De Not.	<u>1m</u> , <u>1j</u> , <u>1i</u> <u>1d</u> , <u>2h</u>	[23, 34–36]
<i>H. ellipticum</i> Ledeb.	<u>1j</u> , <u>1a</u> , <u>1m</u> , <u>19a</u> .	[37]
<i>H. eichwaldii</i> Steud.	<u>1d</u> , <u>1f</u> , <u>1m</u> .	[38]
<i>H. esfandiarii</i> A.	<u>1j</u> , <u>19d</u> .	[39]

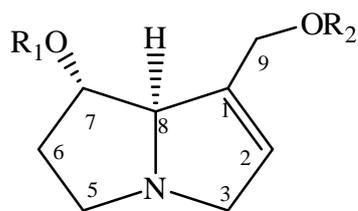
**Tableau I.1.1** : Les alcaloïdes pyrrolizidiniques isolés du genre *Heliotropium* (suite)

Espèces <i>Heliotropium</i>	Les alcaloïdes pyrrolizidiniques isolés	Réf
<i>H. europaeum</i> L.	<u>1j</u> , <u>1k</u> , <u>1l</u> , <u>4d</u> , <u>1d</u> , <u>1f</u> , <u>1m</u> , <u>19a</u> , <u>19f</u> , <u>19b</u> , <u>4f</u>	[40-45]
<i>H. floridum</i> Clos.	<u>3g</u> , <u>3h</u> , <u>3f</u> , <u>3i</u> , <u>3c</u> .	[46]
<i>H. foertherianum</i> Diane & Hilger (syn. <i>H. messerschmidia argentea</i> (L.) I. M. Johnst)	<u>2g</u> , <u>2f</u> , <u>14a</u> , <u>14b</u>	[47, 48]
<i>H. foliosissimum</i>	<u>6</u> , <u>2a</u> , <u>7</u> , <u>3a</u> .	[11]
<i>H. fruticosum</i>	<u>6</u> , <u>2a</u> , <u>7</u> , <u>3a</u> .	[11]
<i>H. hirsutissimum</i> Gr.	<u>1j</u> , <u>1d</u> , <u>1l</u> , <u>4d</u> , <u>1m</u> , <u>19a</u> , <u>1n</u> , <u>4f</u> , <u>1o</u> , <u>19b</u> , <u>19c</u>	[7, 49]
<i>H. indicum</i> L.	<u>1c</u> , <u>2l</u> , <u>1d</u> , <u>4d</u> , <u>2f</u> , <u>2g</u> , <u>1m</u> , <u>2e</u> , <u>1g</u> , <u>4f</u> , <u>6</u> , <u>2a</u> , <u>7</u> , <u>3b</u> .	[11, 50–52]
<i>H. keralense</i> S.	<u>2c</u>	[53]
<i>H. lasiocarpum</i> Fisch. & C.A. Mey.	<u>1d</u> , <u>1m</u> , <u>1j</u> , <u>4d</u> , <u>1d</u>	[54, 55]
<i>H. marifolium</i> Koen. Ex Retz.	<u>1j</u> , <u>1d</u> , <u>1a</u> , <u>1m</u> , <u>19a</u> , <u>14a</u> , <u>1f</u> , <u>19g</u>	[56]
<i>H. maris- mortui</i> Zohary.	<u>1j</u> , <u>1m</u> , <u>19d</u> .	[7, 12, 57]
<i>H. megalanthum</i> Johnst.	<u>2e</u> , <u>9</u> .	[58]
<i>H. olgae</i> B.	<u>1d</u> , <u>20b</u>	[59]
<i>H. ovalifolium</i> Forssk.	<u>8</u> , <u>2a</u> .	[13, 60]
<i>H. rotundifolium</i> Lehm.	<u>1j</u> , <u>1d</u> , <u>1m</u> , <u>19f</u> , <u>19d</u> , <u>19a</u> , <u>1l</u> , <u>1k</u> , <u>19e</u> , <u>1q</u>	[57, 61]
<i>H. scabrum</i> Retz.	<u>10b</u> , <u>2a</u>	[62]
<i>H. spathulatum</i> Rydb.	<u>4a</u> , <u>3d</u> , <u>4b</u> , <u>3i</u> , <u>4c</u> , <u>3e</u> , <u>2j</u> , <u>2i</u> , <u>6</u> , <u>2a</u> , <u>7</u> , <u>3a</u> .	[28,63]
<i>H. strigosum</i> Willd.	<u>3a</u> , <u>3j</u>	[64]
<i>H. subulatum</i> Hochst.	<u>15</u> , <u>2a</u> , <u>1d</u> , <u>1b</u> , <u>16</u>	[65]
<i>H. supinum</i> L.	<u>1c</u> , <u>1i</u> , <u>1d</u> , <u>1b</u> , <u>1m</u> , <u>4f</u> .	[66]
<i>H. transalpinum</i> Vell.	<u>17</u> , <u>2c</u> , <u>2f</u> , <u>2e</u> , <u>1g</u> , <u>2g</u> , <u>2d</u> , <u>1h</u> , <u>4f</u>	[67]
<i>H. transalpinum</i> var. <i>transalpinum</i>	<u>12b</u> , <u>15</u>	[68]
<i>H. transoxanum</i> Bunge.	<u>1d</u> , <u>1m</u> , <u>19f</u>	[69]

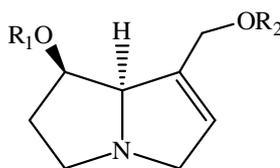


**Ac** = acide acétique ; **Ang** = acide angelique, **iVal** = acide isovalérique ; **Trach** = acide trachelanthique ; **Vir** = acide viridiflorique ; **Las** = acide lasiocarpique ; **Ech** = acide echimidinique ; **Curass** = acide curassavique ; **Heliot** = acide heliotrique.

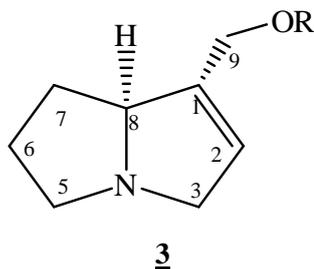
**Figure I.1.3** : Les structures des acides néciques

**1**

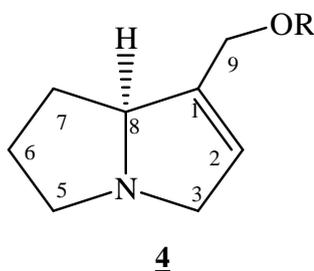
N°	R1	R2	
<b>1a</b>	H	H	Héliotridine
<b>1b</b>	Ang	H	7-Angeloylhéliotridine
<b>1c</b>	H	(-)-Vir	Echinatine
<b>1d</b>	H	Heliot	Héliotrine
<b>1e</b>	H	Heliot, 2'-OAc	2'-acétylhéliotrine
<b>1f</b>	Ang	Heliot	7-Angeloyhéliotrine
<b>1g</b>	H	(+)-Trach	Rindérine
<b>1h</b>	H	(+)-Trach, 3'-OAc	3'-Acétylrindérine
<b>1i</b>	Ang	Ech	Héliosupine
<b>1j</b>	H	Las	Europine
<b>1k</b>	Ac	Las	7-Acétyleuropine
<b>1l</b>	H	Las, 5'-OAc	5'-Acétyleuropine
<b>1m</b>	Ang	Las	Lasiocarpine
<b>1n</b>	Ang	Las, 3'-OAc	3'-acétyllasiocarpine
<b>1o</b>	Ang	Las, 5'-OAc	5'-acétyllasiocarpine
<b>1p</b>	Ang	Las, 5'-deoxy	5'-deoxylasiocarpine
<b>1q</b>	Ac	Las, 5'-OAc	7, 5'-diacétyleuropine

**2**

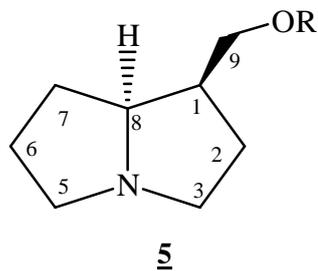
N°	R1	R2	
<b>2a</b>	H	H	Rétronécine
<b>2b</b>	Ang	H	7-Angeloylrétronécine
<b>2c</b>	H	(+)-Trach	Intérmédine
<b>2d</b>	H	(+)-Trach, 3'-OAc	3'-Acétylintermédiine
<b>2e</b>	H	(-)-Vir	Lycopsamine
<b>2f</b>	H	(-)-Trach	Indicine
<b>2g</b>	H	(-)-Trach, 3'-OAc	3'-Acétylindicine
<b>2h</b>	H	Ech	Echimidine
<b>2i</b>	(-)-Vir	H	Héliospathuline
<b>2j</b>	H	(-)-Curss	Héliospathine
<b>2k</b>	H	Vir, 3'-OAc	9-(3'-Acétyl) viridifloryl rétronécine
<b>2l</b>	H	Vir, 3'-iVal	9-(3'-isovaléryl) viridifloryl rétronécine



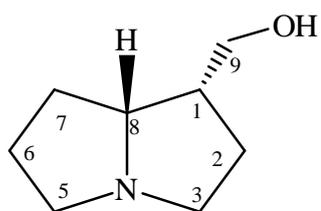
<b>N°</b>	<b>R</b>	
<b>3a</b>	H	(-)-Trachélanthamidine
<b>3b</b>	(+)-Trach	Trachélanthamine
<b>3c</b>	(+)-Trach, 3'-OAc	3'-Acéyltrachélanthamine
<b>3d</b>	(+)-Vir	Coromandaline
<b>3e</b>	(-)-Curass	Curassavine
<b>3f</b>	(-)-Vir, 5'-OH	Floridimine
<b>3g</b>	(-)-Vir, 5'-OH-3'-OAc	Floridine
<b>3h</b>	(-)-Trach, 5'-OH	Floridine
<b>3i</b>	(-)-Trach	Héliovicine
<b>3i</b>	(2R, 3R)-2,3-Dihydroxy-3-methylpentanoyl	Strigosine



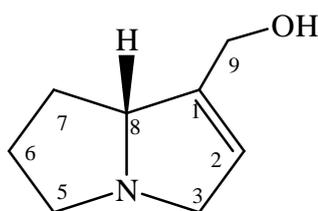
<b>N°</b>	<b>R</b>	
<b>4a</b>	(-)-Vir	Amabiline
<b>4b</b>	(+)-Vir	Coromandalinine
<b>4c</b>	(-)-Curass	Curassavinine
<b>4d</b>	Heliot	Héleurine
<b>4e</b>	Las	Ilamine
<b>4f</b>	(+)-Trach	Supinine



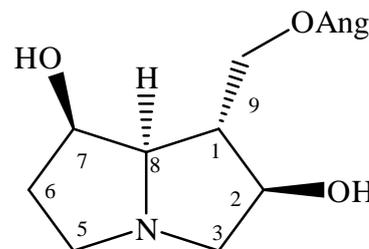
N°	R	
<b>5a</b>	(+)-Vir	Héliocoromandaline
<b>5b</b>	(-)-Curass	Héliocurassavine
<b>5c</b>	(-)-Trach	Héliocurassavicine



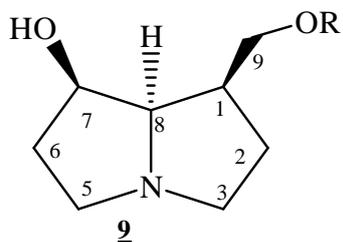
**6** (+)-Isorétronécanol  
[(+)-Lindélofidine]



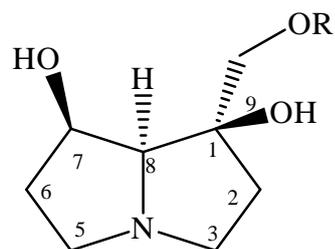
**7** (+)-Supinidine



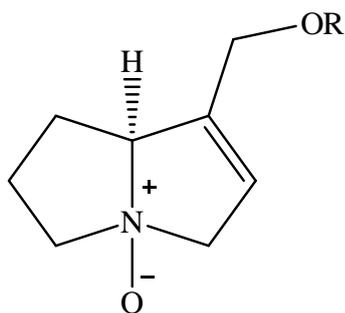
**8** Héliofoline



N°	R	
<b>9</b>	(-)-Vir	Mégalanthonine

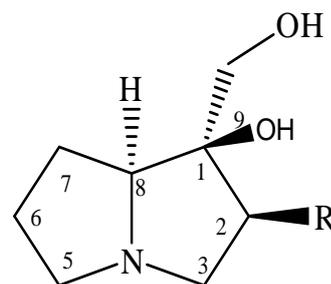


N°	R	
<b>10a</b>	H	Hélibractinécine
<b>10b</b>	Ang	Héliscabine



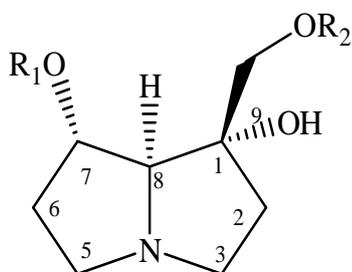
**11**

N°	<b>R</b>	
<b>11a</b>	Heliot	Héleurine- <i>N</i> -oxyde
<b>11b</b>	Las	Ilamine- <i>N</i> -oxyde



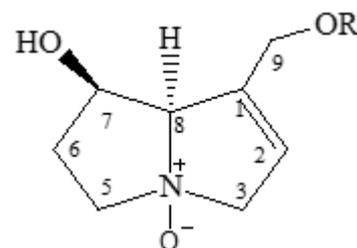
**12**

N°	<b>R</b>	
<b>12a</b>	H	Curassanécine
<b>12b</b>	OH	Transalpinécine



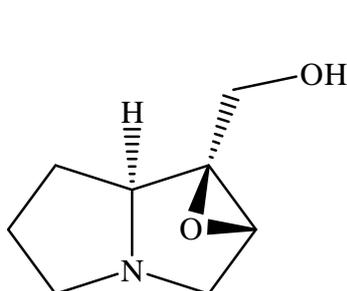
**13**

N°	<b>R1</b>	<b>R2</b>	
<b>13a</b>	H	H	Hélibractéatinécine
<b>13b</b>	H	Ang	Hélibractéatine
<b>13c</b>	Ang	H	Hélibractéatinine

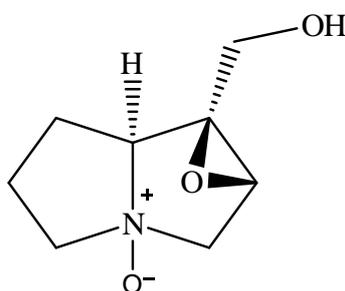


**14**

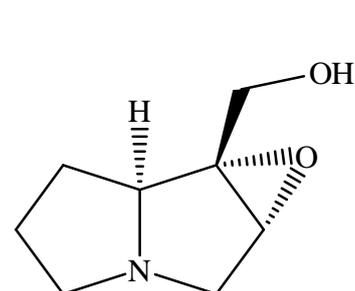
N°	<b>R</b>	
<b>14a</b>	(-)-Trach	Indicine- <i>N</i> -oxyde
<b>14b</b>	(-)-Trach, 3'-OAc	3'-acétylindicine- <i>N</i> -oxyde



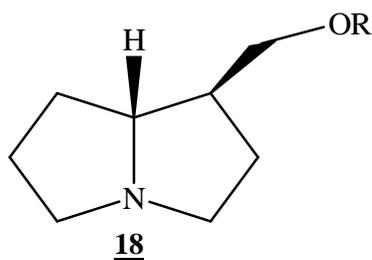
**15** Subulacine



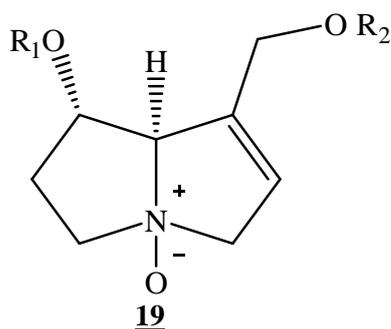
**16** Subulacine-*N*-oxyde



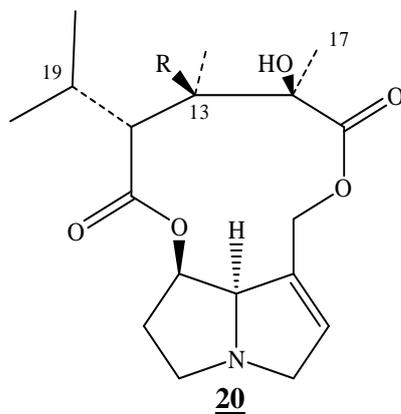
**17** 1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ -époxy-1 $\beta$ -hydroxyméthyl-8 $\alpha$ -pyrrolizidine



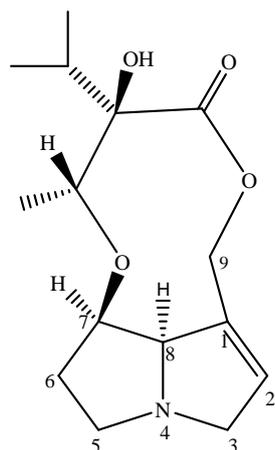
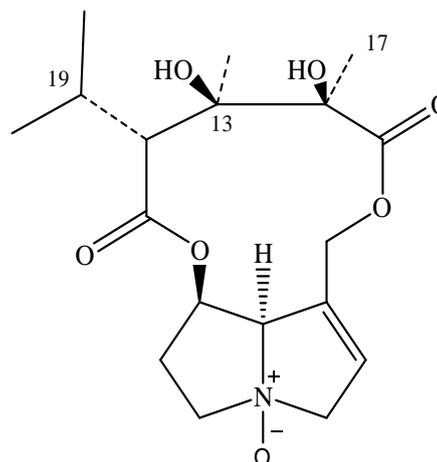
N°	R	
<b><u>18</u></b>	(-)-Trach	Héliocurassavine



N°	R1	R2	
<b><u>19a</u></b>	Ang	Las	Lasiocarpine- <i>N</i> -oxyde
<b><u>19b</u></b>	Ang	Las, 5'-OAc	5'-Acétyllasiocarpine- <i>N</i> -oxyde
<b><u>19c</u></b>	Ang	Las, 3'-OAc	3'-Acétylhéliosupine- <i>N</i> -oxyde
<b><u>19d</u></b>	H	Las	Europine- <i>N</i> -oxyde
<b><u>19e</u></b>	Ac	Las	7-Acétyleuropine- <i>N</i> -oxyde
<b><u>19f</u></b>	H	Heliot	Héliotrine- <i>N</i> -oxyde
<b><u>19g</u></b>	Ang	Heliot	7-angelylhéliotrine- <i>N</i> -oxyde



N°	R	
<b><u>20a</u></b>	OH	Trichodesmine
<b><u>20b</u></b>	H	Incanine

**21** Hélandicine**22** Trichodesmine-N-oxide

### I.1.9.2. Les flavonoïdes

Près de 6500 flavonoïdes repartis en 12 classes sont connus [70] et leur nombre ne cesse d'accroître. Par définition, ce sont les composés qui ont en commun la structure du diphenyl propane C6-C3-C6 ; les trois carbones servant de jonction entre les deux noyaux benzéniques notés A et B forment généralement un hétérocycle oxygéné C [71]. L'existence des différentes classes structurales des flavonoïdes serait fonction des modifications de l'hétérocycle C.

Une caractéristique frappante des espèces *Heliotropium* est la diversité de leur métabolisme flavonoïdique. On y rencontre en effet aussi bien des flavanones, flavanols et flavonols et quelques flavones cités dans la littérature

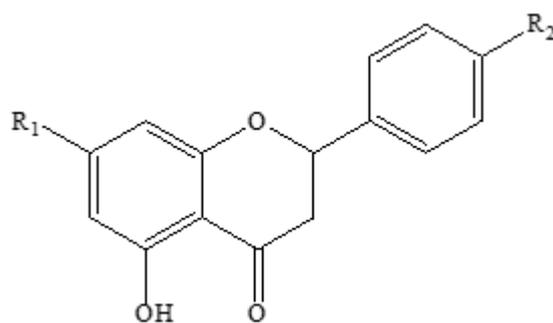
Le tableau I.1.2 rassemble les flavonoïdes isolés et identifiés chez les espèces du genre *Heliotropium*

**Tableau I.1.2 :** Les flavonoïdes isolés du genre *Heliotropium*

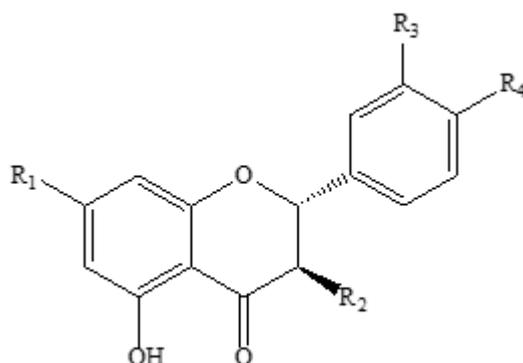
Espèces <i>Heliotropium</i>	Les flavonoïdes isolés	Réf
<i>H. chenopodeaceum</i> var. <i>chenopodeaceum</i> (d.c.) clos.	<u>23b</u> , <u>23c</u> , <u>26b</u> , <u>27d</u> , <u>29c</u> , <u>31c</u> , <u>31d</u>	[72-73]
<i>H. chenopodeaceum</i> var. <i>ericoideum</i> (miers) reiche.	<u>23b</u> , <u>23c</u> , <u>24c</u> , <u>26b</u> , <u>29c</u> , <u>31c</u> , <u>31d</u>	[73]
<i>H. filifolium</i> (Miers) Reiche.	<u>23c</u> , <u>24c</u> , <u>28b</u> , <u>28c</u> , <u>29c</u> , <u>31c</u> , <u>31d</u>	[73]
<i>H. foertherianum</i> (Syn <i>Messerschmidia argentea</i> )	<u>31a</u> , <u>31b</u>	[48, 74]

**Tableau I.1.2 :** Les flavonoïdes isolés du genre *Heliotropium* (suite)

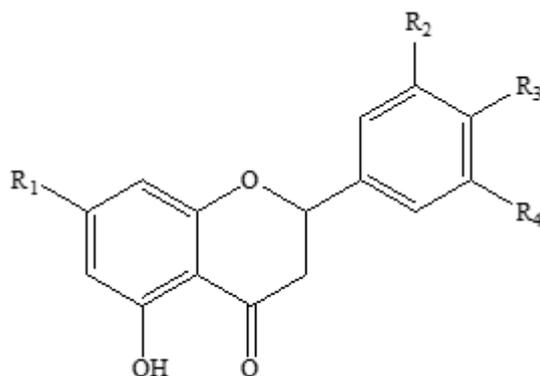
Espèces <i>Heliotropium</i>	Les flavonoïdes isolés	Réf
<i>H. glutinosum</i> Phil.	<u>23c</u> , <u>23d</u> , <u>25d</u>	[75]
<i>H. huascoense</i> Johnston	<u>24a</u> , <u>28c</u> , <u>29a</u>	[76]
<i>H. megalanthum</i> Johnston	<u>25b</u> , <u>25c</u> , <u>25e</u> , <u>30</u>	
<i>H. sclerocarpum</i> Phil.	<u>23b</u>	[77]
<i>H. sinuatum</i> (Miers) I.M. Johnst	<u>23a</u> , <u>23b</u> , <u>24b</u> , <u>25a</u> , <u>26a</u> , <u>27a</u> , <u>27b</u> , <u>27c</u> , <u>27e</u> , <u>28a</u> , <u>28c</u> , <u>28d</u> , <u>29b</u>	[78, 79]
<i>H. stenophyllum</i> H. & A.	<u>23a</u> , <u>23b</u> , <u>23c</u> , <u>23d</u> , <u>27c</u> , <u>27e</u> , <u>28b</u> , <u>28c</u> , <u>32</u>	[78-80]
<i>H. strigosum</i> Willd.	<u>24d</u> , <u>28e</u>	[81]
<i>H. taltalense</i> Phil.	<u>23b</u> , <u>24b</u> , <u>28c</u>	[82]
<i>H. tenellum</i>	<u>27f</u>	[83]

**23**

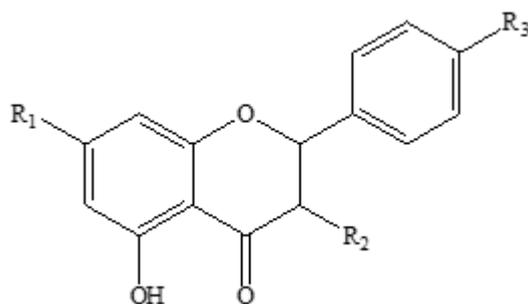
N°	R1	R2	
<u>23a</u>	OH	H	5,7-dihydroxyflavanone (Pinocembrine)
<u>23b</u>	OH	OH	5,7,4'-trihydroxyflavanone (naringénine)
<u>23c</u>	OCH <sub>3</sub>	OH	5,4'-dihydroxy-7-méthoxy flavanone (sakuranétine)
<u>23d</u>	OCH <sub>3</sub>	OAc	4'-acéthyl-5-hydroxy-7-méthoxyflavanone

**24**

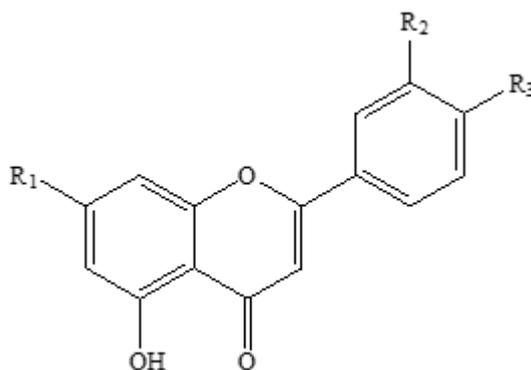
N°	R1	R2	R3	R4	
<b>24a</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	H	H	3,5-dihydroxy-7-méthoxyflavanone (-)-Alpinone
<b>24b</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OH	OH	5,3',4'-trihydroxy-7-méthoxyflavanone (7-O-méthyl ériodictyol)
<b>24c</b>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	7,3'-diméthylériodictyol
<b>24d</b>	OH	OH	OH	OH	Taxifoline ((+)-Dihydroquercétine)

**25**

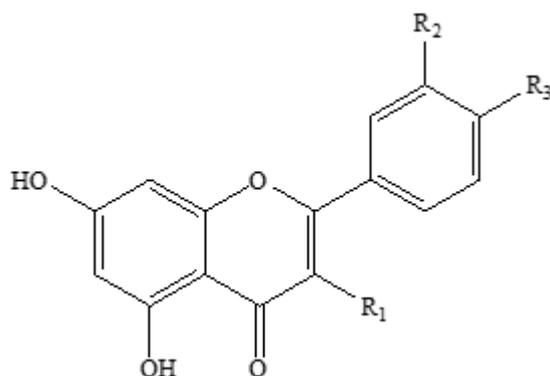
N°	R1	R2	R3	R4	
<b>25a</b>	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	H	5,7,3'-trihydroxy-4'-méthoxyflavanone (Hesperétine)
<b>25b</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	5,3'-dihydroxy-7,4',5'-triméthoxyflavanone
<b>25c</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	5-hydroxy-7,3',4',5'-tetraméthoxyflavanone
<b>25d</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	H	5,3'-dihydroxy-7,4'-diméthoxyflavanone
<b>25e</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>	5,4'-dihydroxy-7,3',5'-triméthoxyflavanone

**26**

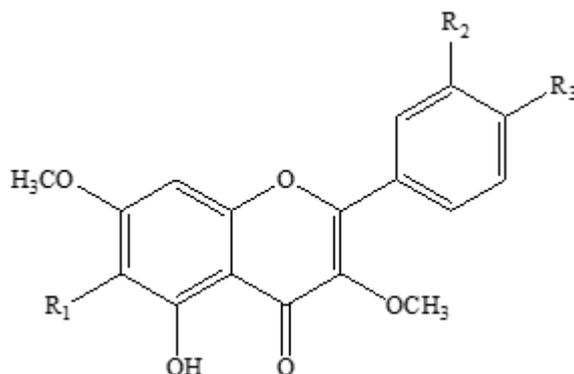
N°	R1	R2	R3	
<b>26a</b>	OH	OAc	H	3-acétoxy-5,7-dihydroxyflavanone (pinobanksin-3-acetate)
<b>26b</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	5,4'-dihydroxy-3,7-diméthoxyflavanone

**27**

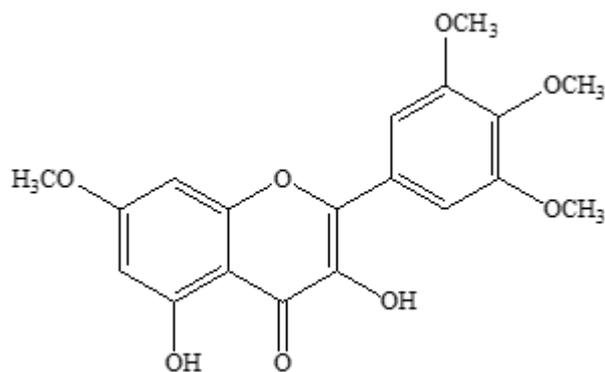
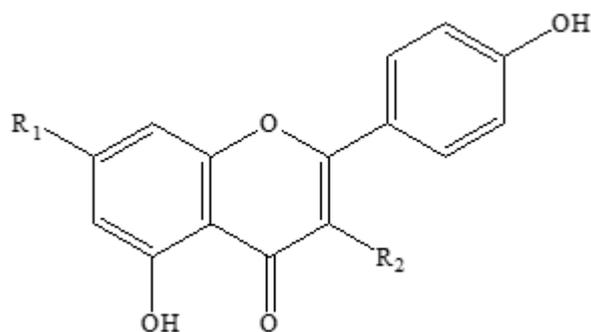
N°	R1	R2	R3	
<b>27a</b>	OH	H	H	5,7-dihydroxyflavone (Chrysin)
<b>27b</b>	OH	H	OH	Apigénine
<b>27c</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	5,3',4'-trihydroxy-7-méthoxyflavone
<b>27d</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	5,4'-dihydroxy-7,3'-diméthoxyflavone (7,3'-diméthyl ériodictiol)
<b>27e</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	5,3',4'-trihydroxy-7-méthoxyflavone (7-O-méthyl ériodictiol)
<b>27f</b>	OGlu	OH	OH	7-O-β-D glucoside lutéoline

**28**

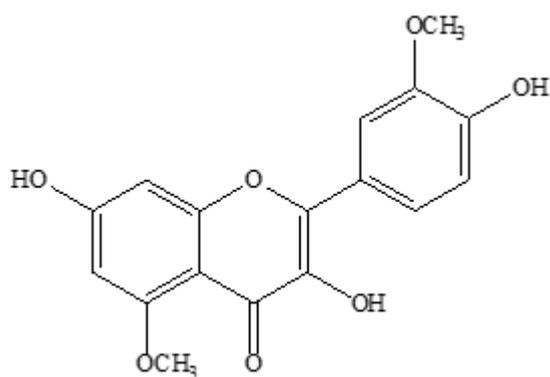
N°	R1	R2	R3	
<b>28a</b>	H	OH	OCH <sub>3</sub>	5, 7, 3'-trihydroxy- 4'-méthoxyflavone
<b>28b</b>	OH	H	H	5,7-dihydroxyflavone (galangine)
<b>28c</b>	OCH <sub>3</sub>	H	H	5,7-dihydroxy-3-méthoxyflavone (3-O-méthylgalangine)
<b>28d</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	5, 7, 4'-trihydroxy-3,3'-diméthoxyflavone (3-O-méthylisorhamnétine)
<b>28e</b>	OH	OH	OH	Quercétine

**29**

N°	R1	R2	R3	
<b>29a</b>	H	H	H	5-hydroxy-3,7-diméthoxyflavone (3,7-diméthylgalangine)
<b>29b</b>	H	OCH <sub>3</sub>	OH	5,4'-dihydroxy-3,7, 3'-triméthoxyflavone (Pachypodol)
<b>29c</b>	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	5, 6, 3'-trihydroxy-3, 7, 4'-triméthoxyflavone (Ayanine)

**30** 3,5-dihydroxy-7,3',4',5'-tetraméthoxyflavonol**31**

N°	R1	R2	
<b>9a</b>	OH	OH	Kaempférol
<b>9b</b>	OH	OGlu	3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glucoside de kaempférol
<b>9c</b>	OCH <sub>3</sub>	OH	kaempférol 7- <i>O</i> -méthyléther (Rhamnocitrine)
<b>9d</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	5,4'-Dihydroxy-3,7-diméthoxyflavone (kumatakénine)

**32** 3,7,4'-trihydroxy-5,3'-diméthoxyflavonol

### I.1.9.3. Les terpènes

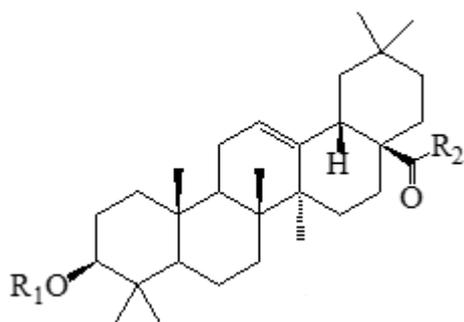
Ces substances appelées également terpénoïdes, constituent une importante classe de produits secondaires, hydrophobes quelquefois volatiles et unis par une origine commune. Ils sont formés d'unités de cinq carbones, unité isoprène, libérée à haute température.

Les terpènes sont subdivisés, selon le nombre d'entités isoprène qui sont incorporés dans leurs structures, en monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30).

Les triterpénoïdes se présentent sous forme d'esters ou de glycosides. Le tableau I.1.3 rassemble les terpènes isolés et identifiés chez les espèces du genre *Heliotropium*

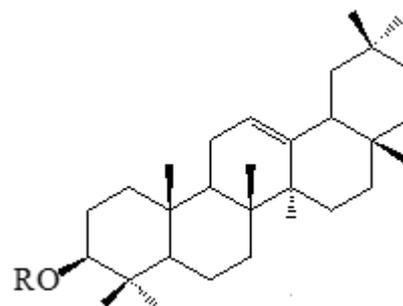
**Tableau I.1.3 :** Les terpènes isolés du genre *Heliotropium*

Espèces <i>Heliotropium</i>	Les terpènes isolés	Réf
<i>H. angiospermum</i> Murray	<u>34a</u> , <u>35</u> , <u>41</u> , <u>42</u> , <u>43</u>	[84]
<i>H. ellipticum</i> ledeb.	<u>34a</u> , <u>34b</u> , <u>36a</u> , <u>37</u> , <u>40</u>	[85]
<i>H. indicum</i> L.	<u>34a</u> , <u>39</u>	[86]
<i>H. foertherianum</i> (Syn <i>Messerschmidia argentea</i> )	<u>33a</u> , <u>33b</u> , <u>38</u>	[87]
<i>H. megalanthum</i> J. M. Johnston	<u>44</u>	[88]
<i>H. marifolium</i> Koen. Ex Retz.	<u>34a</u> , <u>34b</u> , <u>36a</u> , <u>36b</u> , <u>37</u> , <u>39</u> , <u>40</u>	[89, 90]



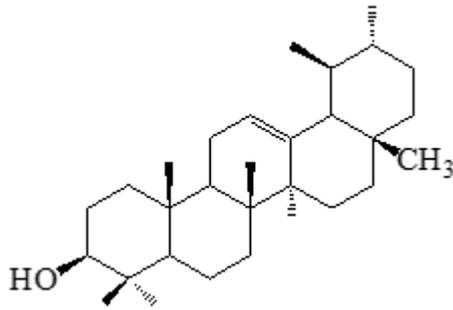
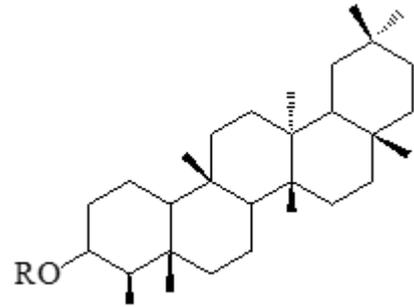
**33**

N°	R1	R2	
<b><u>33a</u></b>	Ac	OH	3-acétate d'acide oléanolique
<b><u>33b</u></b>	Ac	H	Aldéhyde 3-O-acétyloléanolique

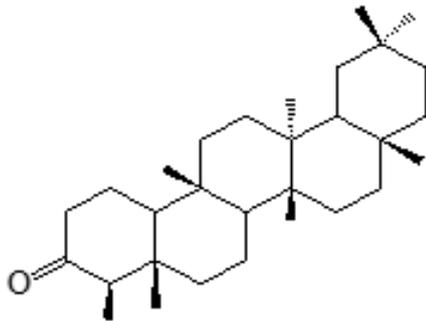
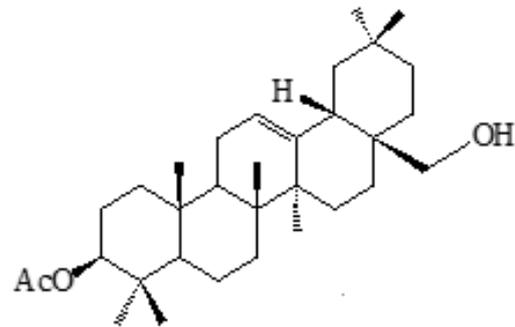
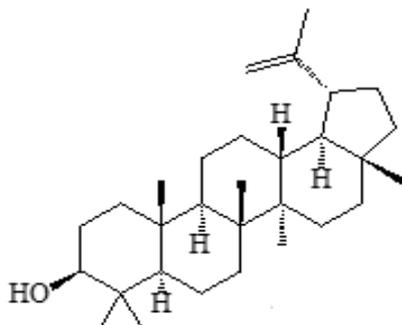
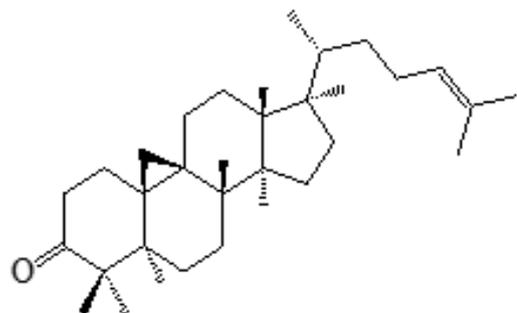


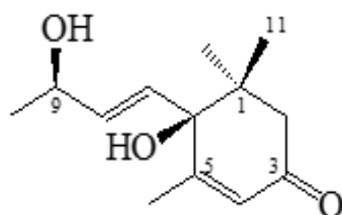
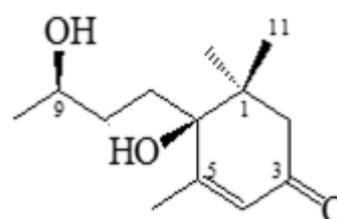
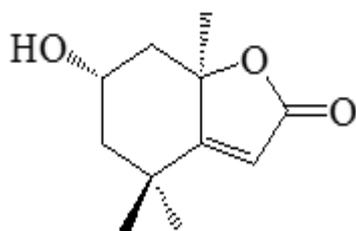
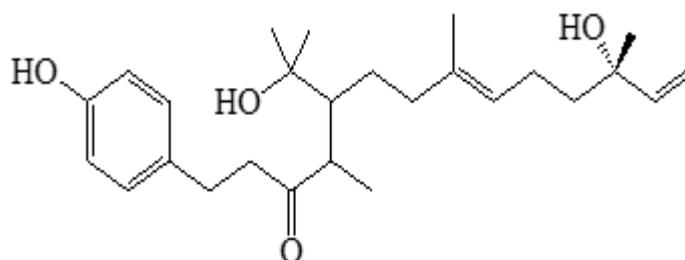
**34**

N°	R	
<b><u>34a</u></b>	H	$\beta$ -amyryne
<b><u>34b</u></b>	Ac	Acétate de $\beta$ -amyryne

**35**  $\alpha$ -amyrine**36**

N°	R
<b>36a</b>	H Épifriedélanol (friedélan-3 $\beta$ -ol)
<b>36b</b>	Ac Acétate d'épifriedényle

**37** Friedéline**38** 3-acétate d'érythrodiol**39** Lupéol**40** Cycloarténone

**41** Bluménol A**42** Bluménol B**43** Loliolide**44** Mégalanthine

#### I.1.9.4. Les stérols

Les stérols sont dérivés des phytostérols qui sont des composés naturellement présents dans la fraction lipidique des plantes. Ils ne sont pas synthétisés par l'homme et l'animal et ne peuvent être apportés que par l'alimentation. Plusieurs études ont démontré que les phytostérols et les phytostanols réduisent l'absorption du cholestérol dans l'intestin grêle [91] et aussi les phytostérols sont efficaces contre les maladies cardiovasculaires [92].

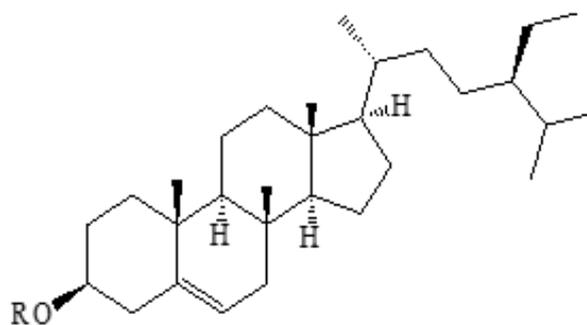
Le tableau I.1.4 rassemble les stérols isolés et identifiés chez les espèces du genre *Heliotropium*.

**Tableau I.1.4** : Les stérols isolés du genre *Heliotropium*

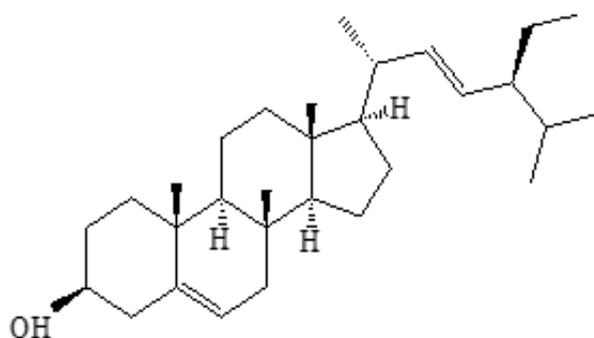
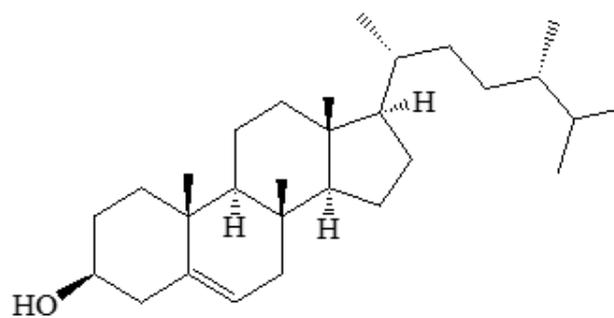
Espèces <i>Heliotropium</i>	Les stérols isolés	Ref
<i>H. angiospermum</i> Murray	<u>45a</u>	[84]
<i>H. ellipticum</i> ledeb.	<u>45a, 46</u>	[85]
<i>H. eichwaldi</i>	<u>45b</u>	[93]

**Tableau I.1.4** : Les stérols isolés du genre *Heliotropium* (suite)

Espèces <i>Heliotropium</i>	Les stérols isolés	Ref
<i>H. indicum</i> L.	<u>45a</u> , <u>46</u> , <u>47</u>	[94]
<i>H. ophioglossum</i> Stocks ex Boiss.	<u>45b</u>	[95]
<i>H. marifolium</i> Koen. Ex Retz.	<u>45a</u> , <u>46</u>	[89]
<i>H. strigosum</i>	<u>45a</u>	[96]

**45**

N°	R
<u>45a</u>	H $\beta$ -sitostérol
<u>45b</u>	Glu 3-O- $\beta$ -D-glucoside $\beta$ -sitosterol

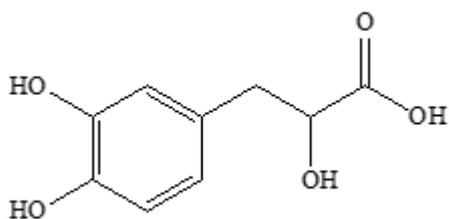
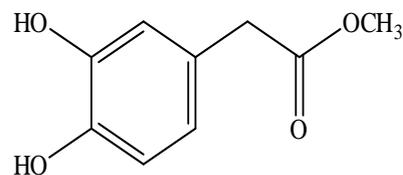
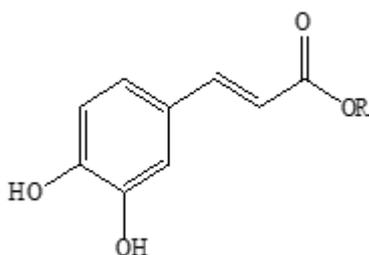
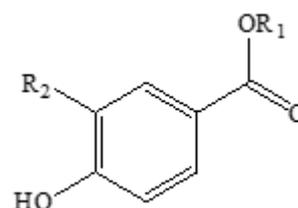
**46** Stigmasterol**47** Campesterol

## I.1.9.5. Autres composés

D'autres composés (Tableau I.1.5) ont été isolés à partir des différentes espèces d'*Heliotropium*.

**Tableau I.1.5 :** Autres composés isolés du genre *Heliotropium*

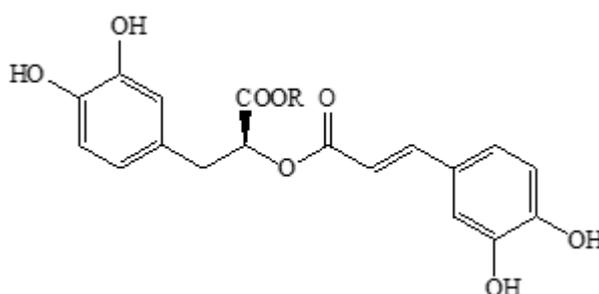
<b>Espèces <i>Heliotropium</i></b>	<b>Autres composés isolés</b>	<b>Réf</b>
<i>H. eichwaldi</i>	<u>74</u>	[93, 97]
<i>H. filifolium</i> miers.	<u>75a, 75b, 75c, 75d, 75e, 75f, 75g, 75h</u>	[98-103]
<i>H. foertherianum</i> (syn <i>Messerschmidia argentea</i> )	<u>48, 49, 50a, 50b, 51a, 52a, 52b</u>	[48, 104-105]
<i>H. huascoense</i> J.M. Johnston	<u>65, 75a</u>	[106]
<i>H. indicum</i> L.	<u>62, 66, 69, 71, 72, 73</u>	[107, 108]
<i>H. glutinosum</i> Phil.	<u>55</u>	[75]
<i>H. ophioglossum</i> Stocks ex Boiss.	<u>63a, 63b, 67</u>	[95]
<i>H. ovalifolium</i> forssk.	<u>56, 57, 58, 59, 60, 61</u>	[109-112]
<i>H. sclerocarpum</i> Phil.	<u>53, 75a</u>	[77]
<i>H. sinuatum</i> Miers.	<u>54, 68, 70</u>	[113, 114]
<i>H. strigosum</i> Willd.	<u>51b, 64</u>	[96]
<i>H. taltalense</i> Phil	<u>75a, 75b</u>	[82]

**48** Acide 3-(3,4-dihydroxyphényl) lactique**49** Dopacétate de méthyle**50****51**

N° R

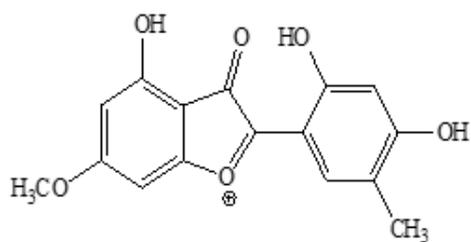
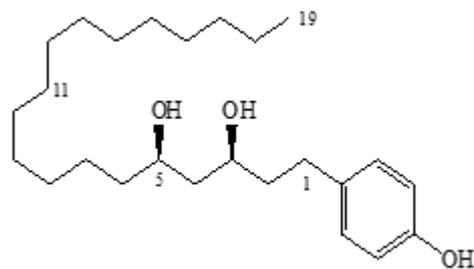
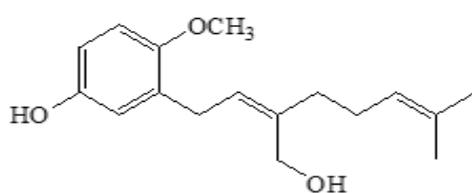
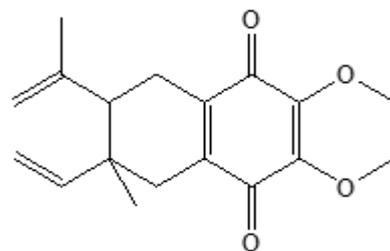
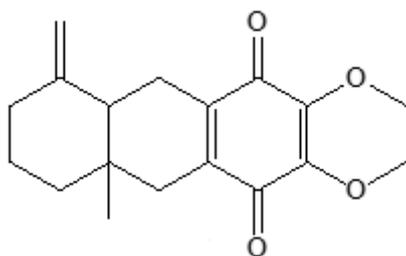
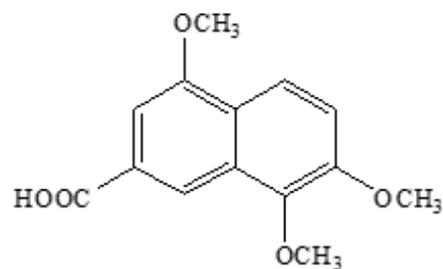
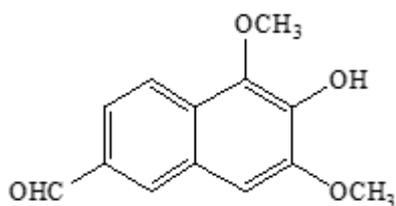
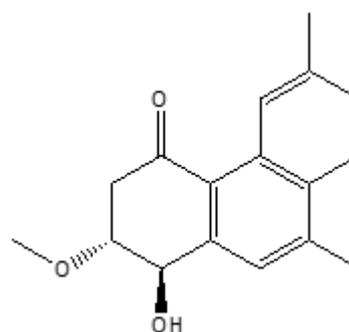
**50a** H Acide caféique**50b** CH<sub>3</sub> Caféate de méthyle

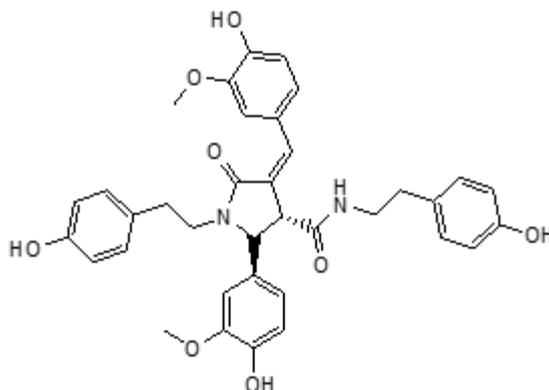
N° R1 R2

**51a** CH<sub>3</sub> OH 3,4-dihydroxybenzoate de méthyle**51b** H H Acide 4-hydroxybenzoïque**52**

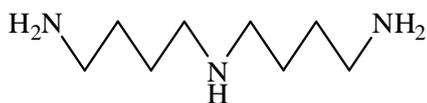
N° R

**52a** H Acide rosmarinique**52b** CH<sub>3</sub> Rosmarinate de méthyle

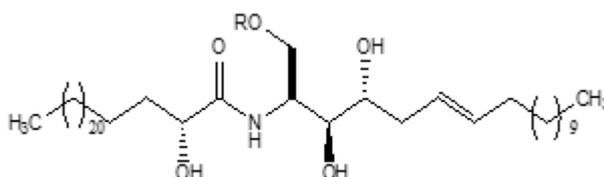
**53** Sclérocarpine**54** 4-(3',5'-dihydroxynonadécyl) phénol**55** 4-méthoxy-3-[7'-méthyl-3'-hydroxyméthyl-2',6'-octadiényl] phénol**56** Héliotropinone A**57** Héliotropinone B**58** Acide 4,7,8-triméthoxy-naphthalène-2-Carboxylique**59** 6-hydroxy-5,7-diméthoxy-naphthalène-2-Carbaldéhyde**60** Héliophénantrone



**61** Héliotropamide

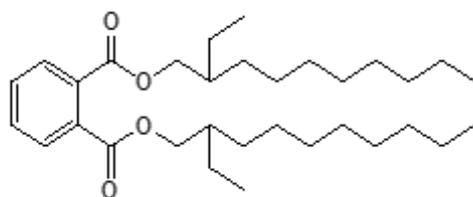


**62** Homospermidine

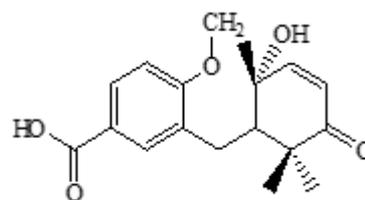


**63**

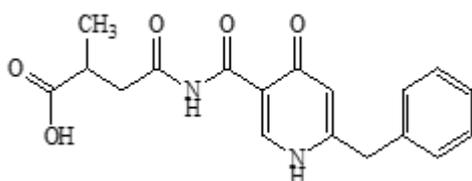
N°	R
<b>63a</b>	H Ophiamide A
<b>63b</b>	Glu Ophiamide B



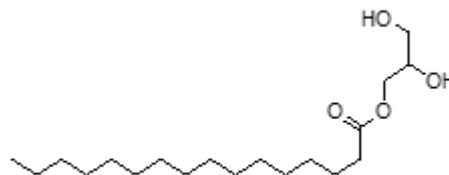
**64** Bis- (2-éthyl-décyl) -ester de l'acide *O*-phthalique



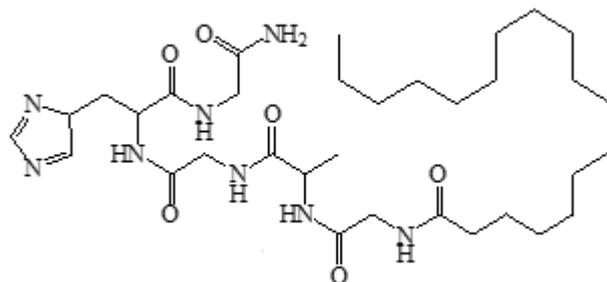
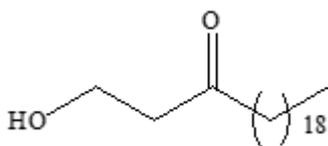
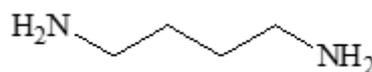
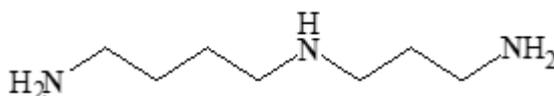
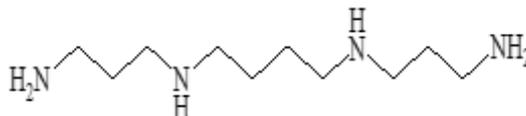
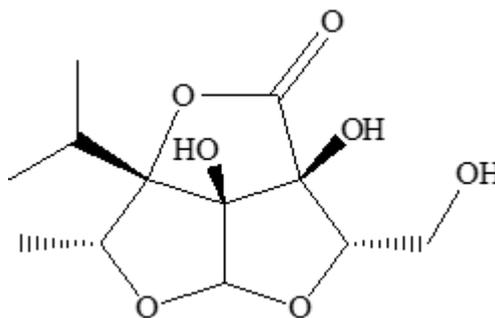
**65** Acide carrizaloïque

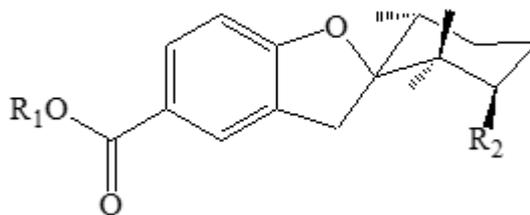


**66** Pestalamide B



**67** Monopalmitate de glycérol

**68** Pentacosanol**69** *N*-(1-oxo-octadécyl) glycyL-L-alanglycyl-L-histidyl glycineamide**70** 1-hydroxy-3-docosanone**71** Putrescine**72** Spermidine**73** Spermine**74** Furo-furan lactone

**75**

N°	R1	R2	
<b>75a</b>	CH3	OH	Filifolinol
<b>75b</b>	CH3	-O-CO-CH=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Sénécionate de filifolinyle
<b>75c</b>	CH3	=O	Filifolinone
<b>75d</b>	OH	OH	Acide filifolinoïque
<b>75e</b>	H	OH	Acide 3'-hydroxy-2',2',6'-triméthyl-3H-spiro [1-benzofurane -2,1'-cyclohexane]-5-carboxylique
<b>75f</b>	CH3	OAc	Méthyl 3'-acétyloxy-2',2',6'-triméthyl-3H-spiro [1-benzofurane -2,1'-cyclohexane]-5-carboxylate
<b>75g</b>	CH3	-OCO-CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Méthyl 3'-isopentanoxyloxy-2',2',6'-triméthyl-3H-spiro [1-Benzofurane-2,1'-cyclohexane]-5-carboxylate
<b>75h</b>	CH3	-O-CO-Ar	Méthyl 3'-benzoyloxy-2',2',6'-triméthyl-3H-spiro [1-benzofurane -2,1'-cyclo-hexane]-5-carboxylate

### I.1.10. Synthèse biologique

Les espèces du genre *Heliotropium* (Boraginaceae) ont été utilisées dans la médecine folklorique pour le traitement des rhumatismes, de la goutte et comme agents anti-inflammatoires [110, 115-116] et aussi pour traiter le paludisme [117-118].

Les principaux constituants des espèces *Heliotropium* sont les alcaloïdes pyrrolizidiniques (APs) comme signalé précédemment qui sont responsables de diverses activités biologiques, y compris les effets : anti-tumoral [65, 119], antimicrobienne et antivirale [37, 65, 120].

Les diverses études biologiques effectuées sur les extraits et les phytoconstituants bioactifs des espèces du genre *Heliotropium* au cours des dernières décennies sont résumé comme suit :

- Activité anti-nourrissante [46].
- Effet anti-inflammatoire [110, 115-116].
- Activités anti-inflammatoire et anti nociceptive [121].
- Activité antimicrobienne [29, 37, 85, 89, 120, 122-127].
- Activité antioxydante [65, 77, 79, 127-128].
- Effets antioxydants et anti-hyperlipidémies [129]
- Activité antiproliférative [130].
- Activité antituberculeuse [131].
- Activité antivirale [100].
- Activité histo-gastroprotective [132].
- Activité immunostimulante [133].
- Activité inhibitrice [105].
- Effet néphroprotecteur [134].
- Activité de la guérison des plaies [135].

### I.1.11. Toxicité de quelques espèces du genre *Heliotropium*

Malgré leurs énormes avantages, quelques espèces du genre *Heliotropium* sont très toxiques en raison de la présence d'alcaloïdes de pyrrolizidine. Les décès humains ont été signalés en raison de la consommation accidentelle de ces espèces dans de nombreux pays. Les dommages au foie ont été causés par les alcaloïdes de la pyrrolizidine car ils étaient responsables de la maladie hépatique veno-occlusive. Une maladie qui est devenue endémique en Afghanistan en raison de la consommation de récolte de blé contaminé par des graines d'espèces d'*Heliotropium* [136].

Les alcaloïdes de pyrrolizidine produisent une nécrose ou une inhibition de la mitose qui dépend de la dose consommée et indépendante de la voie d'administration [137-138].

En Australie, une maladie chez les poulets à griller a été signalée en raison de l'héliotrine, un alcaloïde de pyrrolizidine isolé de *H. indicum*. Les signes cliniques associés à cette maladie étaient la dépression, la dégénérescence hépatique et l'ascite. Le travail

expérimental a montré que la prise de *H. europaeum* en Australie a produit des lésions identiques observées dans ce type de maladie en raison de la présence d'héliotrine et de lasiocarpine dans cette espèce [139].

### I.1.12. Conclusion générale

Cette étude bibliographique a permis de montrer que l'*Heliotropium* est un genre riche en molécules très diverses et qui présente de nombreuses propriétés pharmacologiques. Ainsi cette étude a prouvé que l'espèce *Heliotropium bacciferum* a été étudiée biologiquement pour ses effets antimicrobiens et antioxydants [127-128]. Ces effets sont attribués à la présence de substances bioactives, principalement identifiés comme alcaloïdes pyrrolizidine [16,17].

# Bibliographie

- [1] Quézel. P., Santa. S., (1963). *Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales*. Vol. 2, Ed. CNRS. Paris France.
- [2] Chittenden. Fred J., (1951). *Royal Horticultural Society Dictionary of Gardening*. Ed Oxford.
- [3] Ozenda. P., (1958). *Flore du Sahara septentrional et central*. Ed. CNRS. Paris France
- [4] Naegelé. A., (1958). Contributions à l'étude de la flore et des groupements végétaux de la Mauritanie. *Bulletin de l'I.F.A.N, T. XX*, sér. A, n°2.
- [5] Schmelzer. G. H., Gurib-Fakim. A., (2008). Ressources végétales de l'Afrique tropicale 11(1) : *plantes médicinales I*, Fondation PROTA. Wageningen. Pays-Bas.
- [6] Valdés. B., (2011). Boraginaceae. –In: Euro+Med Plantbase-the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. *Fl. Aegypt.-Arab*, 38. 1775.
- [7] Hartmann. T., Witte. L., (1995). *Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids*, in: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. Pelletier, S. Ed. Pergamon press, Oxford, Vol 9, pp. 155–233.
- [8] Roeder. E., (1995). Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. *Pharmazie*. 50, 83–98.
- [9] Mattocks. A.R., (1986). *Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids*. Academic Press. 369 p.
- [10] Akramov. S., Shadmanov. Z., Samatov. A., Yunusov. SY., (1968). Alkaloids of *Senecio jacobea*, *Heliotropium acutiflorum* and *H. transoxanum*. *Chem Nat Compd*. 4(4), 221-222.
- [11] Birecka. H., Frohlich. M.W., Glickman. M., (1983). Free and esterified necines in *Heliotropium* species from Mexico and Texas. *Phytochemistry*. 22(5), 1167–1171.
- [12] Zalkow. L., Bonetii. S., Gelbaum. L., Gordon. M., Patil. B., Shani. A., Deveer. DV., (1979). Pyrrolizidine alkaloids from Middle Eastern plants. *J Nat Prod*. 42(6), 603-614
- [13] Rizk. A.M., Hammouda. F.M., Hassan. N.M., (1991). Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium arbainense* and *H. ovalifolium*. *Qatar Univ. Sci*. 11, 113–119.
- [14] Marquez. V.C., (1961). Chromatographic separation of *Bulensia retamo*, *Heliotropium arborescens* and *Cestrum auriculatum*. *Bol. Soc. Quim. Peru*. 27, 161–172.

- [15] Rizk. A.F., (1990). *Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids*. Boca Raton. Boston: CRC press.
- [16] Rizk. A.M., Hammouda. F.M., Roeder. E., Wiedenfeld. H., Ismail. S.I., Hassan, N.M., Hosseiny. H.A., (1988). Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in *Heliotropium bacciferum* Forssk. *Sci. Pharm.* 56, 105–110.
- [17] Farrag. N.M., Adel-Aziz. E.M., El-Shafae. A.M., Ateya. A.M., El-Domiaty. M.M., (1996). Pyrrolizidine alkaloids of *Heliotropium bacciferum* Frossk from Egypt. *Int. J. Pharmacogn.* 34, 374–377.
- [18] Reina. M., Mericli. A.H., Cabbera. R., Gonzalez-Coloma. A., (1995). Pyrrolizidine alkaloid from *Heliotropium bovei*. *Phytochemistry.* 38, 355–358.
- [19] Lakshmanan. A.J., Shanmugasundaram. S., (1994). Helibractinecine, a pyrrolizidine alkaloid from *Heliotropium bracteatum*. *Phytochemistry.* 36, 245–248.
- [20] Lakshmanan. A.J., Shanmugasundaram. S., (1995). Ester alkaloid from *Heliotropium bracteatum*. *Phytochemistry.* 40, 291–294.
- [21] Marquina. G., Laguna. A., Velez. H., Ripperger. H., (1988). 9-Angeloylretronecine N-oxide from *Heliotropium bursiferum*. *Pharmazie.* 34, 55–56.
- [22] Eröksüz. H., Eröksüz. Y., Ozer. H., Ceribasi. A.O., Tosun. F., Tamer. U., Kizilay. C.A., (2003). Toxicity of dietary *Heliotropium circinatum* to rats. *Vet. Hum. Toxicol.* 45, 198–201.
- [23] Eröksüz. Y., Ceribasi. A.O., Cevik. A., Eröksüz. H., Tosun. F., Tamer. U., (2008). Toxicity of *Heliotropium dolosum*, *Heliotropium circinatum*, and *Senecio vernalis* in parental quail and their progeny, with residue evaluation of eggs. *Turk. J. Vet. Anim.* 32, 475–482.
- [24] Farsam. H.N., Yassa. N., Sarkhail. P., Shafiee. A., (2000). New pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium crassifolium*. *Planta Med.* 66, 389–391.
- [25] Catalfamo. J.L., Martin. W.B., Birecka. H., (1982). Accumulation of alkaloids and their necines in *Heliotropium curassavicum*, *H. spathulatum* and *H. indicum*. *Phytochemistry.* 21, 2669–2675.
- [26] Mohanraj. S., Subramanian. P.S., Culvenor. C.C., Edgar. J.A., Frahn. J.L., Smith. L.W., Cockrum. P., (1978). Curassavine, an alkaloid from *Heliotropium curassavicum* Linn. with a C8 necic acid skeleton. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 10, 423–424.
- [27] Subramanian. P.S., Mohanraj. S., Cockrum. P.A., Culvenor. C.C.J., Edgar. J.A., Farhn. J.L., Smith. L.W., (1980). The alkaloids of *Heliotropium curassavicum*. *Aust. J. Chem.* 33, 1357–1363.

- [28] Mohanraj. S., Subramanian. P.S., Herz. W., (1982). Minor alkaloids of *Heliotropium curassavicum*. *Phytochemistry*. 21, 1775–1779.
- [29] Davicino. J.G., Pestchanker. M.J., Giodano. O.S., (1988). Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium curassavicum*. *Phytochemistry*. 27, 960–962.
- [30] Akramov. S.T., Kiyamitdinova. F., Yunusov. S.Y., (1967). Alkaloids of *Rinderia cyclodonata*, *Rinderia echinata* and *Heliotropium dasycarpum*. *Khim. Prir. Soedin*. 3, 288–289.
- [31] Hammouda. F.M., Rizk. A.M., Ismail. S.I., Atteya. S.Z., Ghaleb. H.A., Madkour. M.K., Pohland, A.E., Wood. G., (1984). Poisonous plants containing edible ones and toxic substances in plant foods. Part 3, Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium digynum* Forssk (*H. luteum* Poir.). *Pharmazie*. 39, 703–705.
- [32] Farsam. H., Yassa. N., Shafiee. A., Amanlou. M., (1998). Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium disciforme*. *Pharm Pharmacol Lett*. 8, 79–80.
- [33] Shafiee. A., Salimi. M., Farsam. H., Yassa. N., (2002). Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium dissitiflorum* Boiss. *DARU J. Pharm. Sci*. 10, 168–170.
- [34] Eröksüz. Y., Eröksüz. H., Ozer. H., Ilhan. N., Cevik. A., Yaman. I., Ceribasi. A., (2002). Toxicity of dietary *Heliotropium dolosum* seed to Japanese quail. *Vet Hum Toxicol*. 44, 264–268.
- [35] Eröksüz, Y., Eröksüz, H., Ozer, H., Canatan, H., Yaman, I., Cevik, A., (2001). Toxicity of dietary *Heliotropium dolosum* seed to broiler chickens. *Vet Hum Toxicol*. 43, 334–338.
- [36] Eröksüz. Y., Eröksüz. H., Ozer. H., Sener. B., Tosun. F., Akyüz. C., (2001). Toxicity of dietary *Heliotropium dolosum* seed to mice. *Vet Hum Toxicol*. 43, 152–155.
- [37] Jain. S.C., Sharma. R., (1987). Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium ellipticum*. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 35, 3487–3489.
- [38] Suri. O.P., Sawhney. R.S., Atal. C.K., (1975). Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium eichwaldii* and *Lindelofia spectabilis*. *Indian J Chem*. 13, 505–506.
- [39] Yassa. N.H., Farsam. H., Shafiee. A., Rustaiyan. A., (1996). Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium esfandiarrii*. *Planta Med*. 62, 583–584.
- [40] Yassa. N.H., Farsam. H., Rustaiyan. A., Shafiee. A., (1999). Alkaloids of Boraginaceae II pyrrolizidine alkaloids of *Heliotropium europaeum* L. population Garmsar. *J. Sci. Islamic Repub. Iran*. 10, 39–42.
- [41] Tosun. F., Tamer. U., (2004). Determination of pyrrolizidine alkaloids in the seeds of *Heliotropium europaeum* by GC-MS. *J. Fac. Pharm. Ankara*. 33, 7–9.

- [42] Lee. S.T., Knill. A.M., Michalewicz. A., Stevens. V., Colegate. S.M., (2007). Chapter 81 *Heliotropium europaeum* alkaloids: a quaternary pyrrolizidine alkaloid approach to ELISA development, in: *Poisonous Plants: Global Research and Solutions*. pp. 476–480.
- [43] O’Dowd. D.J., Edgar. J.A., (1989). Seasonal dynamics in the pyrrolizidine alkaloids of *Heliotropium europaeum*. *Aust. J. Ecol.* 14, 95–105.
- [44] Culvenor. C.C.J., (1954). The alkaloids of *Heliotropium europaeum* L. II. Isolation and structures of the third major alkaloid and two minor alkaloids, and isolation of the principal N-Oxides. *Aust. J. Chem.* 7, 287–297.
- [45] Culvenor. C.C.J., Johns. S.R., Smith. L.W., (1975). Acetylasiocarpine, an alkaloid from *Heliotropium europaeum*. *Aust. J. Chem.* 28, 2319–2322.
- [46] Reina. M., Gonzalez-Coloma. A., Gutierrez. C., Cabrera. R., Henriquez. J., Villarroel. L., (1997). Bioactive saturated pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium floridum*. *Phytochemistry*. 46, 845–853.
- [47] Ogihara. K., Miyagi. Y., Higa. M., Seiichi Y., (1997). Pyrrolizidine alkaloids from *Messerschmidia argentea*. *Phytochemistry*. 44, 545–547.
- [48] Ogihara. K., Kuwae. M., Suzuka. T., Higa. M., (2012). Constituents from the fruits of *Messerschmidia argentea* (IV). *Bull. Coll. Sci. Ryukyus*. 93, 47–54.
- [49] Constantinidis. T., Harvala. C., Skaltsounis. A.L., (1993). Pyrrolizidine N-oxide alkaloids of *Heliotropium hirsutissimum*. *Phytochemistry*. 32, 1335–1337.
- [50] Souza. J.S.N., Machado. L.L., Pessoa. O.D.L., Braz-Filho. R., Overk. C.R., Yao. P., Cordell. G.A., Lemos. T.L.G., (2005). Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium indicum*. *J. Braz. Chem. Soc.* 16, 1410–1414.
- [51] Singh. J.P., Pandey. D.P., Singh. A., Singh. R., (2005). Alkaloids of *Heliotropium indicum*. *J. Ind. Chem. Soc.* 82, 175–176.
- [52] Dash. G.K., Abdullah. M.S., (2013). A review on *Heliotropium indicum* L. (Boraginaceae). *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 4, 1253–1258.
- [53] Ravi. S., Lakshmanan. A.J., Herz. W., (1990). Isolycopsamine, a pyrrolizidine alkaloid from *Heliotropium keralense*. *Phytochemistry*. 29, 361–364.
- [54] Shakirov. T., Akramov. S., Yunusov. S., (1967). Isolation of heliotrine by the ion-exchange method. *Chem. Nat. Compd.* 3, 411–412.
- [55] Chernenko. T. V., Guskova. S.D., Glushenkova. A.I., (2011). Lipids and alkaloids from *Heliotropium lasiocarpum*. *Chem. Nat. Compd.* 47, 603–605.

- [56] Jain. S.C., Purohit. M., (1986). Antitumor active pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium marifolium* RETZ. *Chem Pharm Bull.* 34, 5154–5156.
- [57] Zalkow. L., Gelbaum. L., Keinan. E., (1978). Isolation of the pyrrolizidine alkaloid europine N-oxide from *Heliotropium maris-mortui* and *H. rotundifolium*. *Phytochemistry.* 17(1), 172.
- [58] Reina. M., Gonzalez-Coloma. A., Gutierrez. C., Cabbera. R., Henriquez. J., Villarroel. L., (1998). Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium megalanthum*. *J. Nat. Prod.* 61, 1418–1420.
- [59] Kiyamitdinova. F., Akramov. S.T., Yunusov. S.Y., (1967). Alkaloids from the family Boraginaceae. *Khim. Prir. Soedin.* 3, 411–412.
- [60] Mohanraj. S., Kulanthaivel. P., Subramanian. P.S., Herz. W., (1981). Helifoline, a pyrrolizidine alkaloid from *Heliotropium ovalifolium*. *Phytochemistry.* 20, 1991–1995.
- [61] Asibal. C.F., Gelaum. L.T., Zalkow. L.H., (1989). Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium rotundifolium*. *J. Nat. Prod.* 52, 726–731.
- [62] Lakshmanan. A.J., Shanmugasundaram. S., (1995). Heliscabine, a pyrrolizidine ester alkaloid from *Heliotropium scabrum*. *Phytochemistry.* 39, 473–475.
- [63] Roeder. E., Breitmaier. E., Birecka. H., Frohlich. M.W., Badzies-Crombach. A., (1991). Pyrrolizidine alkaloids of *Heliotropium spathulatum*. *Phytochemistry.* 30, 1703–1706.
- [64] Mattocks. A.R., (1964). Strigosine, the major alkaloid of *Heliotropium strigosum*. *J. Chem. Soc.* 1974–1977.
- [65] Singh. B., Sahu. P.M., Jain. S.C., Singh. S., (2002). Antineoplastic and antiviral screening of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. *Pharm. Biol.* 40, 581–586.
- [66] Crowley. H.C., Culvenor. C.C.J., (1959). The alkaloids of *Heliotropium supinum* L, with observations on viridifloric acid. *Aust. J. Chem.* 12, 694–705.
- [67] Trigo. J.R., Witte. L., Brown. K.S., Hartmann. T., Barata. L., (1993). pyrrolizidine alkaloids in the acrtiid moth *hyalurga syma*. *J. Chem. Ecol.* 4, 669–679.
- [68] Medina. J.C.M., Gauze. G.F., Vidotti. G.J., Sarragiotto. M.H., Basso. E.A., Peixoto. J.L.B., (2009). Structural characterization of saturated pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium transalpinum* var. *transalpinum* Vell by NMR spectroscopy and theoretical calculations. *Tetrahedron Lett.* 50, 2640–2642.
- [69] Delnavazi. M.R., Banihashem. M., Farsam. H., Shafiee. A., Yassa. N., (2016). Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium transoxanum* Bunge. *RJP.* 3(1), 1-5.

- [70] De Rijke. E., Out. P., Niessen. W. M. A., Ariese. F., Gooijer. C., Brinkman. U.A.T., (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*. 1112 (1-2) : 31-63.
- [71] Bruneton. J., (2009). *Pharmacognosie - Phytochimie, plantes médicinales*. 4<sup>e</sup> Ed. Lavoisier. Paris. 1288 p.
- [72] Urzúa. A., Modak. B., Villarroel. L., Torres. R., Andrade. L., (1998). Comparative flavonoid composition of the resinous exudates from *Heliotropium chenopodiaceum* var. *chenopodiaceum* and *H. chenopodiaceum* var. *ericoideum*. *Biochem. Syst. Ecol.* 26, 130.
- [73] Urzúa. A., Villarroel. L., Torres. R., Teillier. S., (1993). Flavonoids in the resinous exudate of Chilean *Heliotropium* species from Cochranea section. *Biochem. Syst. Ecol.* 21, 744.
- [74] Wu. Y., Inoue. K.-I., (1996). Analyses of flavonoids in leaves of *Messerchmidia argentea* Johnston from Japan. *J. Zhejiang Med. Univ.* 25, 1–3.
- [75] Modak. B., Rojas. M., Torres. R., Rodilla. J., Luebert. F., (2007). Antioxidant activity of a new aromatic geranyl derivative of the resinous exudates from *Heliotropium glutinosum*. *Phil. Molecules.* 12(5), 1057-1063.
- [76] Urzúa. A., Modak. B., Villarroel. L., Torres. R., Andrade. L., Mendoza. L., Wilkens. M., (2000). External flavonoids from *Heliotropium megalanthum* and *H. huascoense* (Boraginaceae). Chemotaxonomic considerations. *Boletín la Soc. Chil. Química.* 45, 23–29.
- [77] Modak. B., Salina. M., Rodilla. J., Torres. R., (2009). Study of the chemical composition of the resinous exudate isolated from *Heliotropium sclerocarpum* and evaluation of the antioxidant properties of the phenolic compounds and the resin. *Molecules.* 14, 4625–4633.
- [78] Torres. R., Modak. B., Villarroel. L., Urzúa. A., delle Monache. F., Sanchez-Ferrando. F., (1996). Flavonoides del exudado resinoso de *Heliotropium Sinuatum*. *Boletín de la Soc. Chil. Química.* 41, 195–197.
- [79] Modak. B., Contreras. M.L., González-Nilo. F., Torres. R., (2005). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from the resinous exudate of *Heliotropium sinuatum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 309–312.
- [80] Villarroel. L., Torres. R., Urzúa. A., (1991). Compuestos fenólicos en el exudado resinoso de *Heliotropium stenophyllum*. Determinación estructural y efectos antialimentario y antioxidantes. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 36,169-174.

- [81] Mughal. TA., (2009). Ethnomedicinal studies of flora of southern Punjab and isolation of biologically active principles. Lahore College for Women University. Lahore.
- [82] Modak. B., Rojas. M., Torres. R., (2009). Chemical analysis of the resinous exudate isolated from *Heliotropium taltalense* and evaluation of the antioxidant activity of the phenolics components and the resin in homogeneous and heterogeneous systems. *Molecules*. 14, 1980–1989.
- [83] Kagan. J., (1968). Luteolin 7-glucoside, the flavonoid pigment of *Heliotropium tenellum*. *Phytochemistry*. 7, 505– 506.
- [84] Ogihara. K., Iraha. R., Higa. M., Yogi. S., (1997). Studies on Constituents from the Twigs of *Messerschmidia argentea* II. *Bull. Coll. Sci. Ryukyus*. 64, 53–59.
- [85] Erosa-Rejón. G., Peña-Rodríguez. L.M., Sterner. Olov., (2009). Secondary metabolites from *Heliotropium angiospermum*. *J. Mex. Chem. Soc.* 53(2), 44-47.
- [86] Pandey. D.P., Singh. J.P, Roy. R., Singh. V.P., Pandey. V.B., (1996). Constituents of *Heliotropium indicum*. *Orient J Chem*. 12(3): 321-322.
- [87] Jain. SC., Singh. B., Jain. R., (2001). Antimicrobial activity of triterpenoids from *Heliotropium ellipticum*. *Fitoterapia*. 72 :666-8.
- [88] Singh. B., Dubey. M.M., (2001). Estimation of triterpenoids from *Heliotropium marifolium* Koen. ex Retz. *In vivo* and *In vitro*. I. Antimicrobial screening. *Phytother Res*. 15:231-4.
- [89] Rastogi. R.P., Mehrotra. B.N., (1980). Compendium of Indian medicinal plants, CDRI: Lucknow; PID. New Delhi, 338-339.
- [90] Macías. F.A., Simonet. A.M., D'Abrosca. B., Maya. C.C., Reina. M., González-Coloma. A., *et al.*, (2009). Megalanthine, a bioactive sesquiterpenoid from *Heliotropium megalanthum*, its degradation products and their bioactivities. *J Chem Ecol*. 35:39-49.
- [91] Goad. J., (1991). Phytosterols in “*Methods in plants biochemistry, 7, terpenoids*”, (B. V. Charlwood, B. et D. V. Banthorpe, éds), Academie press. Londres, 369-434.
- [92] Kris-Etherton. P.M., K.D. Hecker., Bonanome. A., Coval. S.M., Binkoski. A.E., Hilpert. K.F., Griel. A.E., Etherton. T.D., (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 113 (Suppl 9B): 71S–88S.
- [93] Firdous. S., Ansari. N.H., Weng Ng. S., Yousuf. S., Malik. A., (2012). Crystal Structure of a Novel Furo-Furan Lactone from *Heliotropium eichwaldi*. *Z. Naturforsch*. 67b. 269–271.
- [94] Andhiwal. CK., Has. C., Varshney. R.P., (1985). Chemical and Pharmacological studies of *Heliotropium indicum*. *Indian Drugs*. 22(11), 567-569.

- [95] Firdous. S., Ansari. N.H., Fatima. I., Malik. A., Afza. N., Iqbal. L., Lateef. M., (2012). Ophiamides A-B, new potent urease inhibitory sphingolipids from *Heliotropium ophioglossum*. *Arch. Pharm. Res.* 35, 1133–1137.
- [96] Majid Shah. S., Ali Shah. A.U.H., Ullah. F., Hussain. S., Khan. S.B., Asiri. A.M., Ahmad. S., Khan. H., Farooq. U., (2014). A new trypsin inhibitory phthalic acid ester from *Heliotropium strigosum*. *Med Chem Res.* 23:2712–2714.
- [97] Ali A Uddin. J., Ansari. H.N., Firdous. S., Musharraf. S.G., (2015). Electrospray Tandem Mass Spectrometric Study of a Furo-Furan Lactone in *Heliotropium eichwaldi*. *J Chromatogr Sep Tech.* 6:7.
- [98] Torres. R., Villarroel. L., Urzúa. A., Delle-Monache. F., Delle-Monache. G., Gacs-Baitz. E., (1994). Filifolinol, a rearranged geranyl aromatic derivative from the resinous exudate of *Heliotropium filifolium*. *Phytochemistry.* 36, 249–256.
- [99] Urzua. A., Modak. B., Torres. R., (2001). Identification of a new aromatic geranyl derivative in the resinous exudate of *Heliotropium filifolium* (Boraginaceae). *Bol. Soc. Chil. Quim.* 46, 175–178.
- [100] Modak. B., Sandino. A.M., Arata. L., Cárdenas-Jirón. G., Torres. R., (2010). Inhibitory effect of aromatic geranyl derivatives isolated from *Heliotropium filifolium* on infectious pancreatic necrosis virus replication. *Vet Microbiol.* 141(1), 53-8.
- [101] Torres. R., Modak. B., Urzua. A., Delle Monache. F., Damonte. E., Pujol. C., (2002). Propiedades antivirales de compuestos naturales y semi-sintéticos de la resina de *Heliotropium filifolium*. *Bol. Soc. Chil. Quim.* 47, 259–263.
- [102] Modak. B., Galeno. H., Torres. R., (2004). Antiviral activity on hantavirus and apoptosis of Vero cells of natural and semi-synthetic compounds from *Heliotropium filifolium* resin. *J. Chil. Chem. Soc.* 49, 143–145.
- [103] Urzúa. A., Echeverría. J., Rezende. M.C., Wilkens. M., (2008). Antibacterial properties of 3 H-spiro[1-benzofuran-2,1'-cyclohexane] derivatives from *Heliotropium filifolium*. *Molecules.* 13, 2385–2393.
- [104] Ogihara. K., Nakazato. R., Higa. M., (2002). DPPH-radical scavenging constituents from the Twigs of *Messerschmidia argentea* (III). *Bull. Fac. Sci. Univ. Ryukyus.* 74, 73–80.
- [105] Rossi. F., Jullian. V., Pawlowicz. R., Kumar-Roiné. S., Haddad. M., Darius. H.T., *et al.*, (2012). Protective effect of *Heliotropium foertherianum* (Boraginaceae) folk remedy and its active compound, rosmarinic acid against a Pacific ciguatoxin. *J Ethnopharmacol.* 30, 33-40.

- [106] Villarroel. L., Torres. R., Urzúa. A., Reina. M., Cabrera. R., Gonzalez-Coloma. A., (2001). *Heliotropium huascoense* resin exudate: chemical constituents and defensive properties. *J. Nat. Prod.* 64, 20–23.
- [107] Birecka. H., DiNolfo. T.E., Martina. W.B., Frohlich. M.W., (1984). Polyamines and leaf senescence in pyrrolizidine alkaloid-bearing *Heliotropium* plants. *Phytochemistry.* 23, 991–997.
- [108] Yeo. D., Attioua. B., Lehalle. C., Kossi. M., N’guessan. J.D., Djaman. A.J., Lobstein. A., Frossard. N., (2011). Isolation of wound healing compounds from *Heliotropium indicum*. *J. Appl. Pharm. Sci.* 01, 102–106.
- [109] Guntern. A., Ioset. J.R., Queiroz. E.F., Foggin. C.M., Hostettmann. K., (2001). Quinones from *Heliotropium ovalifolium*. *Phytochemistry.* 58, 631–635.
- [110] Kulkarni-Almeida. A., Suthar. A., Goswami. H., Vishwakarma. R., Chauhan. V.S., Balakrishnan. A., Sharma. S., (2008). Novel leads from *Heliotropium ovalifolium*, 4,7,8-trimethoxy-naphthalene-2-carboxylic acid and 6-hydroxy-5,7-dimethoxy-naphthalene-2-carbaldehyde show specific IL-6 inhibitory activity in THP-1 cells and primary human monocytes. *Phytomedicine.* 15, 1079–1086.
- [111] Guilet. D., Guntern. A., Ioset. J.R., Queiroz. E.F., Ndjoko. K., Foggin. C.M., Hostettmann. K., (2003). Absolute configuration of a tetrahydrophenanthrene from *Heliotropium ovalifolium* by LC-NMR of its Mosher esters. *J. Nat. Prod.* 66, 17–20.
- [112] Guntern. A., Ioset. J., Queiroz. E., (2003). Heliotropamide, a novel oxopyrrolidine-3-carboxamide from *Heliotropium ovalifolium*. *J. Nat. Prod.* 66, 1550–1553.
- [113] Modak. B., Torres. R., Lissi. E., delle Monache. F., (2003). Antioxidant capacity of flavonoids and a new arylphenol of the resinous exudate from *Heliotropium sinuatum*. *Nat. Prod. Res.* 17, 403–407.
- [114] Modak. B., Torres. R., Wilkens. M., Urzúa. A., (2004). Antibacterial activity of compounds isolated of the resinous exudate from *Heliotropium sinuatum* on phytopathogenic bacteria. *J. Chil. Chem. Soc.* 49, 5–10.
- [115] Khan. H., Khan. M.A., Gul. F., Hussain. S., Ashraf. N., (2013). Anti-inflammatory activity of *Heliotropium strigosum* in animal models. *Toxicol Ind Health.* 31(12).
- [116] Srinivas. K., Rao. M.E., Rao. S.S., (2003). Anti-inflammatory activity of *Heliotropium indicum* Linn. and *Leucas aspera* spreng in albino rats. *Indian J Pharmacol.* 32 :37-8.
- [117] Simonsen. H.T., Nordskjold. J.B., Smitt. U.W., Nyman. U., Palpu. P., Joshi. P., *et al.*, (2001). *In vitro* screening of Indian medicinal plants for antiplasmodial activit. *J Ethnopharmacol.* 74: 195-204.

- [118] Bero. J., Ganfon. H., Jonville. M.C., Frédéric. M., Gbaguidi. F., DeMol. P., *et al.*, (2009). *In vitro* antiplasmodial activity of plants used in Benin in traditional medicine to treat malaria. *J Ethnopharmacol.* 122:439-44.
- [119] Wassel. G., el-menshawi. B., Saeed. A., Mahran. G., el-merzabani. M., (1987). Screening of selected plants for pyrrolizidine alkaloids and antitumor activity. *Pharmazie.* 42:709.
- [120] Singh. B., Sahu. P.M., Singh. S., (2002). Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*, *Fitoterapia*, 73:153-5.
- [121] Betanabhatla. K.S., Jasmin Sajni. R., Karthik. R., Raamamurthy. J., Christina. A.J., Sasikumar. S., (2007). Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Heliotropium indicum* Linn. in experimental animal models. *Pharmacology online.* 3 :438-45.
- [122] Saeedi. M., Morteza-Semnani. K., (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Heliotropium europaeum*. *Chem Nat Compd.* 45:98-9.
- [123] Rao. P.R., Nammi. S., Routhu. K.V., Vijaya Raju. A.D., (2006). Antimicrobial activity of alcoholic extract of *Heliotropium indicum* *in vitro*. *Asia Pac J Pharmacol.* 16 :121-2.
- [124] Rao. P.R., Nammi. S., Raju. A.D., (2002). Studies on the antimicrobial activity of *Heliotropium indicum* Linn. *J Nat Remedies.* 2 :195-8.
- [125] Radha. R., Lata. T., Rajendran. N.N., (2003). Antimicrobial activity of crude extracts of *Heliotropium marifolium*. *Retz. J Nat Remedies.*3: 208-11.
- [126] Jain. S.C., Singh. B., (1998). Bioefficacy of *Heliotropium ellipticum* Ledeb. I. Antimicrobial screening. *Indian J Pharm Sci.* 60:394-6.
- [127] Ahmad. S., Ahmad. S., Bibi. A., Ishaq. MS., Afridi. MS., Kanwal. F., Zakir. M., Fatima. F., (2014). Phytochemical analysis, antioxidant activity, fatty acids composition, and functional group analysis of *Heliotropium bacciferum*. *Sci World J.* 1–8.
- [128] Ahmad. S., Abdel-Salam. NM., Ullah. R., (2016). *In vitro* antimicrobial bioassays, DPPH radical scavenging activity, and FTIR spectroscopy analysis of *Heliotropium bacciferum*. *Biomed Res Int.* ID 3818945, 12 p.
- [129] Muruges. K., Veerendra. Y., Dash. D.K., Sengupta. P., Maiti. B.C., Maity. T.K., (2006). Antidiabetic, antioxidant and antihyperlipidemic status of *Heliotropium zeylanicum* extract on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Biol Pharm Bull.* 29 :2202-5.

- [130] Moongkarndi. P., Kosem. N., Luanratana. O., Jongsomboonkusol. S., Pongpan. N., (2004). Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia*. 75 :375-7.
- [131] Machan. T., Korth. J., Liawruangrath. B., Liawruangrath. S., Pyne. S.G., (2006). Composition and antituberculosis activity of the volatile oil of *Heliotropium indicum* Linn growing in Phitsanulok, Thailand. *Flavour Fragr J*. 21:265-7.
- [132] Ejiwunmi. A.B., (2008). Evaluation of the histo-gastroprotective and antimicrobial activities of *Heliotropium indicum* Linn (Boraginaceae). *Malays J Med Sci*. 15 :22-30.
- [133] Valenzuela. B., Imarai. M., Torres. R., Modak. B., (2013). Immunomodulatory effects of the aromatic geranyl derivative filifolinone tested by the induction of cytokine expression. *Dev Comp Immunol*. 41:675-82.
- [134] Sharma. S.K., Goyal. N., (2012). Protective effect of *Heliotropium eichwaldi* against cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 10 :555-60.
- [135] Reddy. J.S., Rao. P.R., Reddy. M.S., (2002). Wound healing effects of *Heliotropium indicum* *Plumbago zeylanicum* and *Acalypha indica* in rats. *J Ethnopharmacol*. 79 :249-51.
- [136] Tandon. H., Tandon. B., Mattocks. A., (1978). An epidemic of veno-occlusive disease of the liver in Afghanistan. Pathologic features. *Am J Gastroenterol*, 70(6), 607-13.
- [137] McDermott. W.V., Ridker. P.M., (1990). The Budd-Chiari Syndrome and Hepatic Venocclusive Disease: Recognition and Treatment. *Arch Surg*. 125(4), 525-7.
- [138] Ridker. P.M., Ohkuma. S., McDermott. W.V., Trey. C., Huxtable. R.J., (1985). Hepatic venocclusive disease associated with the consumption of pyrrolizidine-containing dietary supplements. *Gastroenterology*. 88(4), 1050-4.
- [139] Pass. D., Hogg. G., Russell. R., Edgar. J., Tence. I., Rikard-Bell. L., (1979). Poisoning of chickens and ducks by pyrrolizidine alkaloids of *Heliotropium europaeum*. *Aust Vet J*. 55(6), 284-8.

## Chapitre I.2

### *Lifago dielsii* Schwein. & Musch.

#### I.2.1. Généralités

Le mot «Aster» du grec signifie étoile, en relation avec la forme de la fleur. La famille Asteraceae est la plus vaste du groupe des dicotylédones. Plusieurs plantes de cette famille sont cultivées pour leur valeur alimentaire (le tournesol, le topinambour, la laitue, la chicorée, la camomille, etc.) ou comme plantes décoratives (les dahlias, les asters, les rudbeckies, les gaillardes, etc).

En effet, il a été rapporté que les fleurs et les feuilles de ces plantes possèdent des propriétés antibactériennes, antifongiques, antiviraux et anti-inflammatoires [1]. De ce fait, de nombreuses espèces de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle [2].

Les principes amers (sesquiterpènes lactones), les corps insaturés, les flavonoïdes, les coumarines, les polyphénols, les terpènes qui sont les principaux constituants chimiques des Asteraceae expliquent la diversité de leurs activités pharmacologiques [2].

## I.2.2. Distribution

La famille Asteraceae ou Compositae représente la plus importante famille de la division des spermatophytes. Elle comprend près de 25000 espèces connues, groupées en 1500 genres répartis en 17 tribus répandues à travers le monde [3,4]. On y retrouve un grand nombre d'espèces très communes dans les champs et les villes. Ce sont des plantes herbacées pour la plupart. Mais, il existe de rares espèces arborescentes qui peuplent principalement les régions tropicales de la planète.

## I.2.3. Description botanique des Astéracées

Les Astéracées sont caractérisées par la disposition des fleurs en capitule. Les capitules sont constitués du regroupement des fleurs sessiles sur un même réceptacle.

Les fleurs sont de deux types : fleurs tubulées (tubuliflores) et fleurs ligulées (liguliflores). Le tout donnant à l'ensemble l'apparence d'une seule fleur. Le capitule est entouré à la base généralement par 1 à 6 séries de bractées dont l'ensemble forme l'involucre [5].

Les feuilles sont le plus souvent alternes. Elles peuvent aussi être opposées ou réunies en rosette principale (Pâquerette).

Les fruits sont des akènes généralement surmontées d'une aigrette de poils (Pappus) apparaissant sous la forme d'écailles, de soies, d'arêtes ou d'une couronne qui favorise leur dispersion par le vent.

## I.2.4. Le genre *Lifago* Asch. & Schwein.

Ce nouveau genre voisin de *Filago* a été créé par les auteurs pour une plante cueillie près de Colomb Béchar [6].

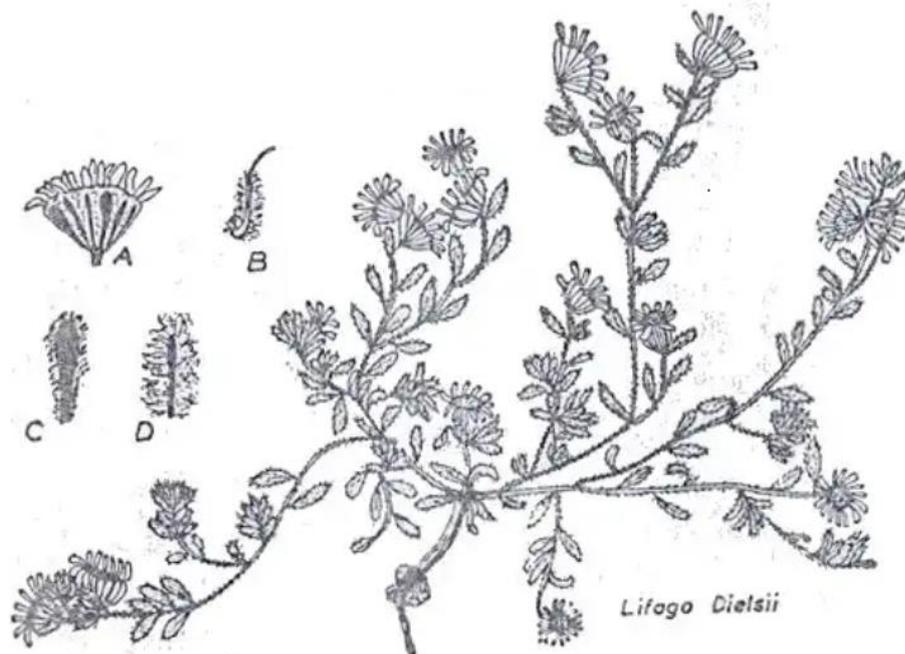
Capitules hétérogames, multiflores. Fleurs du rayon ligulées, femelles ; celles du disque tubuleuses et hermaphrodites. Involucre campanulé, à bractées nombreuses et disposées sur 5-6 rangs. Réceptacle plan puis un peu convexe, paléacé. Akènes dimorphes : ceux du rayon épaissis, triangulaires, tronqués au sommet, pubescents et à aigrette de soies soudées à la base, ceux du disque épais, un peu comprimés, tétragones, hérissés et à aigrette de soies égales, connées à la base et scabres [7].

*Lifago* est un genre monotypique appartenant à la famille Asteraceae et il est représenté par une seule espèce [6,8].

## I.2.5. Espèce *Lifago dielsii* Schwenin. & Musch.

### I.2.5.1. Description botanique

Plante annuelle, entièrement laineuse, à tige couchées et à feuilles lancéolées ; capitules terminaux, de 10-15 cm de large, à bractées vertes bordées d'une abondante laine blanche qui les réunit entre elles, les extérieures spatulées les intérieures étroites presque filiformes ; ligules grandes, jaunes, à trois dents ; fleurs en tube dépassées par de longues paillettes raides et laineuses aux bords ; achaines cylindriques courts, entourés de poils deux fois plus longs qu'eux. Les capitules tombent d'une seule pièce. En retenant les achaines qui germent à leur intérieur de sorte que le collet de la plante est souvent entouré des restes du capitule dont elle est issue (figure I.2.1) [7-8].



**Figure I.2.1** : Image de *Lifago dielsii* Schwenin. & Musch. [8]

### I.2.5.2. Origine et répartition géographique

*Lifago dielsii* est originaire de la partie occidentale du désert du Sahara en Algérie "Saoura, Touat", au Maroc et en Mauritanie [8-9].

### I.2.5.3. Synonyme

*Niclouxia saharae* Batt. [7].

### I.2.5.4. Place dans la systématique

Règne	Plantae
Embranchement	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asterales
Famille	Astéraceae
Genre	<i>Lifago</i>
Espèce	<i>Lifago dielsii</i> Schwenin. & Musch.

### I.2.5.5. Usage traditionnel

Dans le sud de l'Algérie, les parties aériennes de *L. dielsii* sont utilisées en médecine populaire comme antidiabétique.

## Bibliographie

- [1] Matsuda. H., Morikawa. T., Toguchida. I., Harima. S., Yoshikawa. M., (2002). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 50: 972.
- [2] Sarembaud. A., Poitevin B., (1996). Médicament à usage homéopathique. Ed. *Masson*. 256 p. Paris.
- [3] Dupont. F., Guignard. J.L., (2012). Botanique : Les familles de plantes. 15<sup>ème</sup> Ed. *Elsevier Masson*.
- [4] Guignard. J. L., (1994). Abrégé botanique. 9<sup>ème</sup> Ed. 203-204.
- [5] Bremer. K., (1994). Asteraceae, Cladistics and Classification. *Timber Press*. 752 p. Portland. Oregon.
- [6] Battandier. J.A., (1919). Contribution à la flore atlantique. p.46. Paris.
- [7] Quézel. P., Santa. S., (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS. Vol 2, p.952. Paris.
- [8] Ozenda. P., (1983). Flore du Sahara, Ed. 2. CNRS. p.432. Paris.
- [9] Jahandiez. E., Maire. R., (1934). Catalogue des Plantes du Maroc. Eds. *Minerva*. Lechevalier. Vol 3, p.759. Alger.

Partie II

Partie expérimentale

## Chapitre II.1

# Travaux personnels effectués sur l'espèce *Heliotropium bacciferum* Forssk.

### II.1.1. Récolte de la matière végétale

La plante a été récoltée durant le mois d'avril 2015, de la région de Bechar (**Sud-Ouest Algérien**).

Les parties aériennes de cette espèce ont été séchées dans un endroit sec et aéré, à l'abri des rayons solaires.

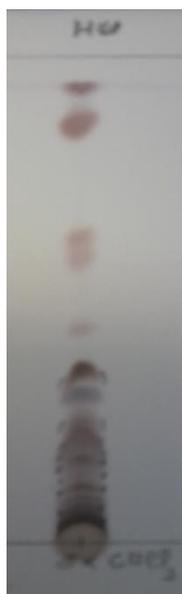
### II.1.2. Extraction

La poudre des parties aériennes de la plante (291,2g) est mise à macérer dans le *n*-hexane durant 24 heures, à la température ambiante du laboratoire. La solution résultante après filtration est concentrée, cette opération est répétée trois fois pour obtenir un extrait *n*-hexane de masse 1,6 g. Le résidu de cette première opération est récupéré puis traité par du chloroforme dans les mêmes conditions que précédemment. Après filtration, la solution

obtenue nous a fourni un extrait chloroforme de masse 2,9 g. Enfin, un troisième traitement par du méthanol nous a permis d'obtenir un extrait méthanol de masse 4,6g.

### II.1.3. Séparation de l'extrait chloroforme

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait chloroforme, nous avons procédé à des tests chromatographique sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium, la meilleure séparation a été obtenue avec le système de solvant *n*-hexane/éther diéthylique dans les proportions (2 :1).



Système d'élution *n*-hexane/éther diéthylique (2 :1)

**Figure II.1.1** : Profil chromatographique de l'extrait chloroforme de l'espèce *H. bacciferum*.

#### II.1.3.1. Séparation chromatographique sur colonne

Un premier fractionnement de l'extrait chloroforme de *H. bacciferum* (2,9 g) a été réalisé par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans le système *n*-hexane/éther diéthylique en gradient de polarité (5:1, 3:1, 1:1). Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière de (254 et 365 nm) puis révélées avec de l'anis-aldéhyde et chauffées pendant trois minutes à 100°C. La progression de cette colonne est donnée dans le tableau II.1.1.

**Tableau II.1.1** : Résultats des fractions obtenues de l'extrait chloroforme de  
*H. bacciferum*

Lots de fraction	N°de la fraction	Poids de la fraction (mg)
1	HBC1	27,1
2	HBC2	73,2
3	HBC3	127,3
4	HBC4	116,6
5	HBC5	160,1
6	HBC6	95,9
7-8	<b>HBC7</b>	<b>398,4</b>
9	HBC8	66,6
10-11	HBC9	109,4
12-14	HBC10	114,4
15	HUC11	158,9
16-17	<b>HBC12</b>	<b>338,3</b>
18-19	HBC13	155,8
20-21	<b>HBC14</b>	<b>130,2</b>
22-23	<b>HBC15</b>	<b>154,9</b>
24	<b>HBC16</b>	<b>403,8</b>
25	HBC17	181,1

La majorité des fractions ont subi une séparation par HPLC préparative en phase inverse. Les six premières fractions sont insolubles dans le MeOH, la raison pour laquelle elles n'ont été pas traitées par HPLC préparative (mélange complexe +chlorophylle).

### II.1.3.2. Séparation et purification des fractions sélectionnées

#### ➤ Fraction HBC7

La fraction HBC7 (398,4mg) a été soumise à un fractionnement par chromatographie d'adsorption sur gel de silice éluée par le système :*n*-hexane/éther diéthylique en gradient de polarité.

Les fractions ont été suivies par CCM sur gel de silice en utilisant les systèmes CHCl<sub>3</sub> pur et CHCl<sub>3</sub> / MeOH (9 : 1) pour donner 3 fractions.

**Tableau II.1.2 :** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction HBC7

N° de la fraction	Système <i>n</i> -hexane – éther diéthylique 800 mL
HBC7.1	5:1
<b>HBC7.2</b>	3:1
HBC7.3	1:1

La sous-fraction HBC7.2 a été recristallisée dans le *n*-hexane avec une petite quantité de chloroforme, après filtration, séchage lent (à l'air libre), des cristaux sous forme d'aiguilles blanches se sont formés. Ces derniers insolubles dans le méthanol, sont purifiés par lavages successifs à l'aide de ce solvant puis pesés (9,7 mg). Un test chromatographique sur CCM montre une tache majoritaire nommée **HB1** et des traces d'un autre produit nommé **HB2**. Les produits **HB1** et **HB2** donnent une coloration violette après révélation par le Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

#### ➤ Fraction HBC12

La fraction HBC12 de masse 338,3 mg, est injectée en HPLC préparative en phase inverse, dans une colonne C8 (250 × 10,0 mm, 10 μm) Phenomenex, avec une phase mobile MeOH/H<sub>2</sub>O 50 :50. La détection est assurée par un détecteur d'indice de réfraction Waters R401. Cette méthode a permis l'isolement de **HB3** et **HB4** dont la collection a été faite après plusieurs injections. Les produits obtenus sont rassemblés dans le tableau II.1.3.

**Tableau II.1.3 :** Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBC12

Produits	t <sub>R</sub> (min)	m (mg)	Remarque après le traitement des spectres RMN
<b>HB3</b>	30	0,4	Un produit pur
<b>HB4</b>	32	1,6	Mélange de deux produits HB3 et HB4

#### ➤ Fractions HBC14, HBC15 et HBC16

Les fractions HBC14, HBC15 et HBC16 ont été traitées dans les mêmes conditions et de la même manière que la fraction HBC12.

- Les produits obtenus de la fraction HBC14 de masse 130,2 mg sont rassemblés dans le tableau II.1.4.

**Tableau II.1.4 :** Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBC14

Produits	t <sub>R</sub> (min)	m (mg)	Remarque après le traitement des spectres RMN
A	12	1,2	Mélange des produits
<b>HB5</b>	14	0,9	Un produit pur
<b>HB6</b>	16	2,6	Un produit pur
<b>HB7</b>	19	1,0	Un produit pur
<b>HB8</b>	30	0,6	Un produit pur
<b>HB9</b>	33	0,5	Un produit pur

- Les produits obtenus de la fraction HBC15 de masse 154,9 mg sont rassemblés dans le tableau II.1.5.

**Tableau II.1.5 :** Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBC15

Produits	t <sub>R</sub> (min)	m (mg)	Remarque après le traitement des spectres RMN
B	10	0,2	Un mélange des produits
<b>HB10</b>	13	0,8	Un produit pur
C	20	0,3	N'a pas été traité par RMN
D	34	0,3	Un produit pur mais sa structure n'est pas encore déterminée

- Les produits obtenus de la fraction HBC16 de masse 403,8 mg sont rassemblés dans le tableau II.1.6.

**Tableau II.1.6 :** Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBC16

Produits	t <sub>R</sub> (min)	m (mg)	Remarque après le traitement des spectres RMN
E	9	0,1	Une faible quantité
<b>HB11</b>	13	4,2	Un produit pur
F	32	0,4	Un mélange des produits

## II.1.4. Séparation de l'extrait méthanol

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait méthanol, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium avec le système de solvant  $\text{CHCl}_3$  /MeOH dans les proportions (8 :2). Le résultat de ce test est illustré dans la figure II.1.2.



Système d'élution  $\text{CHCl}_3$ /MeOH (8 :2)

**Figure II.1.2 :** Profil chromatographique de l'extrait méthanol de l'espèce *H. bacciferum*

### II.1.4.1. Séparation chromatographique sur colonne

L'extrait MeOH (1,5 g) a subi un premier fractionnement sur chromatographie d'exclusion sur gel de Sephadex LH-20 éluée avec le MeOH (débit 1,1 ml/min), avec un fractionnement tous les 10 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice 60 F254 sur support en verre éluée avec le système *n*-BuOH–AcOH–H<sub>2</sub>O (60:15:25 v/v/v). Les plaques sont visualisées sous UV à 254 et 365 nm puis révélées avec du  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  et chauffées pendant trois minutes à 100°C. La progression de cette colonne est donnée dans le tableau II.1.7.

**Tableau II.1.7 :** Résultats du fractionnement de l'extrait méthanol de *H. bacciferum*

Lots de fraction	N°de la fraction	Poids de la fraction (mg)
1-37	<b>HBM1</b>	182,2
38-54	<b>HBM2</b>	161,6
55-91	<b>HBM3</b>	623,4
92-98	<b>HBM4</b>	55,2
99-130	HBM5	445,6

#### II.1.4.2. Séparation et purification des fractions sélectionnées

##### ➤ Fraction HBM1

La fraction HBM1 de masse 182,2 mg, a été purifiée par RP-HPLC en phase inverse, sur une colonne C<sub>18</sub> (300 x 7,8 mm, 10 µm) Waters, avec le système MeOH-H<sub>2</sub>O (40:60) en mode isocratique pour donner le composé **HB12**. Les produits obtenus sont rassemblés dans le tableau II.1.8.

**Tableau II.1.8 :** Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBM1

Produits	tr (min)	m (mg)	Remarque après le traitement des spectres RMN
G	9	0,2	Une faible quantité
<b>HB12</b>	13	4,0	Un mélange de deux produits <b>HB12</b> et <b>HB13</b>
H	30	0,3	Un mélange

##### ➤ Fraction HBM2

La fraction HBM2 de masse 161,6 mg, a subi une séparation sur RP-HPLC dans les mêmes conditions que la fraction HBM1, les produits obtenus sont rassemblés dans le tableau II.1.9.

**Tableau II.1.9 :** Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBM2

Produits	tr (min)	m (mg)	Remarque après le traitement des spectres RMN
I	7	0,2	Une faible quantité
<b>HB13</b>	13	0,3	Un produit pur
J	15	0,3	Un mélange
<b>HB14</b>	17	4,0	Un produit pur

### ➤ Fraction HBM3

La fraction HBM3 de masse 623,4 mg, a été purifiée par RP-HPLC, sur une colonne C<sub>18</sub> (300 x 7,8 mm, 10 µm) Waters, avec le système MeOH-H<sub>2</sub>O (60:40) en mode isocratique. Les produits obtenus sont rassemblés dans le tableau II.1.10.

**Tableau II.1.10 :** Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBM3

Produits	t <sub>R</sub> (min)	m (mg)	Remarque après le traitement des spectres RMN
K	11	1,2	Un mélange des produits
<b>HB15</b>	29	1,6	Un produit pur
L	36	0,3	N'a pas été traité par RMN

### ➤ Fraction HBM4

La fraction HBM4 de masse 55,2 mg, a été purifiée par RP-HPLC en utilisant comme système d'élution le MeOH-H<sub>2</sub>O (50:50), les produits obtenus sont rassemblés dans le tableau II.1.11.

**Tableau II.1.11 :** Tableau indiquant le temps de rétention et la masse des produits isolés de la fraction HBM4

Produits	t <sub>R</sub> (min)	m (mg)	Remarque après le traitement des spectres RMN
G	10	0,2	Une faible quantité
<b>HB16</b>	13	0,5	Un produit pur
H	22	0,3	N'a pas été traité par RMN
<b>HB17</b>	24	0,3	Un mélange de deux produits <b>HB16</b> et <b>HB17</b>

### ➤ Conclusion

La mise à profit des techniques chromatographiques sur les fractions des extraits chloroforme et méthanol des parties aériennes d'*Heliotropium bacciferum* a mené à la séparation et la purification de 20 produits et la détermination de structure de 17 d'entre eux, alors que les trois produits restants n'ont pas été traités à cause de leur faible quantité. Les résultats et la discussion de ces analyses seront développés au chapitre III.1.

## II.1.5. Détermination quantitative des phénols totaux

L'extrait méthanolique de *H. bacciferum* a été analysé pour sa teneur en composés phénoliques totaux selon la méthode colorimétrique Folin-Ciocalteu. Les phénols totaux ont été exprimés en équivalents d'acide gallique (mg/g d'extrait) [1].

## II.1.6. Activité antioxydant des extraits et des composés de *H. bacciferum*.

### II.1.6.1. Activité anti-radicalaire (test du radical DPPH°)

L'activité anti-radicalaire de l'extrait méthanolique de *H. bacciferum*, de l'acide rosmarinique, du quercétine et de l'acide ascorbique a été déterminée en utilisant le radical stable, 1,1 diphénylpicrylhydrazyle (DPPH°), selon les procédures décrites par Esposito et al. 2017 [1]. Sous sa forme radicalaire, le DPPH° possède une bande d'absorption à 517 nm, qui disparaît lors de sa réduction par un composé anti-radicalaire.

Un volume de 37,5 µl de différentes concentrations préparées dans le MeOH des différents échantillons testés a été ajouté à 1,5 ml de solution de DPPH° préparée quotidiennement (0,025 g/l dans le MeOH); la concentration maximale utilisée était de 400 µg/ml. Un volume égal (37,5 µl) du DPPH° seul a été ajouté aux tubes témoins. L'absorbance à 517 nm a été mesurée sur un spectrophotomètre 10 min après le début de la réaction. La concentration en DPPH° dans le milieu réactionnel a été calculée à partir d'une courbe d'étalonnage analysée par régression linéaire. Le pourcentage de DPPH° restant (DPPH° REM%) a été calculé comme suit :

$$\text{DPPH}^{\circ}_{\text{REM}} \% = \frac{[\text{DPPH}^{\circ}]_t}{[\text{DPPH}^{\circ}]_0} \times 100$$

t : La durée de l'expérience (10 min).

La quercétine et l'acide ascorbique ont été utilisés comme témoin positif dans le test. Toutes les expériences ont été effectuées en triple et les concentrations effectives moyennes de piégeage (EC<sub>50</sub>) ont été calculées en utilisant le logiciel GraphPad. Les résultats sont indiqués dans le chapitre III.1.

### II.1.6.2. Test de capacité antioxydante équivalente de Trolox (TEAC)

Cette méthode introduite par Miller et Rice-Evans (1993) [2] est basée sur la capacité des antioxydants à neutraliser le radical ABTS (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique). La solution ABTS est obtenue en mélangeant l'ABTS avec un oxydant (généralement le persulfate de potassium) qui donne une solution d'une couleur bleu intense. La CA est mesurée comme la capacité des composés tests à diminuer l'intensité de la coloration obtenue à partir de l'ABTS en la comparant avec un antioxydant de référence, le Trolox (acide 6-hydroxy-2,5,7,8-tétraméthylchroman-2-carboxylique) dont la structure moléculaire cyclique est similaire à celle de la vitamine E sans la chaîne aliphatique. La réduction de l'ABTS (Figure II.1.3) conduit à une décoloration du bleu de la solution ABTS mesurée à 645 - 734 nm de la solution [3]. Plus l'absorbance finale est faible, plus la valeur TEAC est élevée, c.-à-d. plus l'antioxydant est efficace [4]. Cette méthode a pour avantages sa simplicité à mettre en œuvre et sa rapidité. De plus, la solution d'ABTS est soluble dans l'eau et dans les solvants organiques et n'est pas affectée par la force ionique, elle peut donc déterminer la CA lipophile et hydrophile [5].

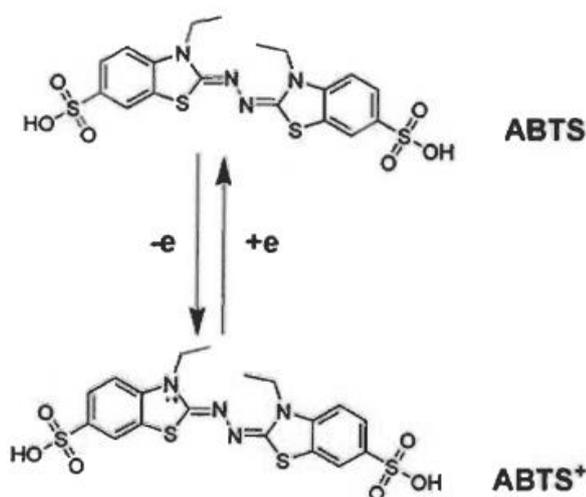


Figure II.1.3 : Oxydo-réduction de l'ABTS en ABTS<sup>•+</sup> [6]

Cependant, le principal inconvénient de la méthode TEAC avec l'ABTS est que la méthode est basée sur l'hypothèse que les réactions d'oxydo-réductions se déroulent rapidement.

Van den Berget et ses collaborateurs (1999) [7] ont conclu que «l'évaluation quantitative de la CA en utilisant la méthode TEAC peut être difficile, voire impossible, mais elle peut être utilisée pour fournir un ordre de classement des antioxydants ».

Le test TEAC a été réalisé selon la méthode de Re et al. 1999 [3]. Le cation radical ABTS a été généré en mélangeant (1:1, v/v) ABTS (7,0 mM) et le persulfate de potassium (2,45 mM). Le mélange a été laissé au repos pendant une nuit à température ambiante dans l'obscurité pour former le radical ABTS, et il a été utilisé en deux jours.

La solution radicalaire de ABTS a été préparée en diluant la solution mère avec du PBS (pH 7,4) jusqu'à une absorbance de  $0,70 \pm 0,05$  à la longueur d'onde de 734 nm. 15  $\mu$ l d'extrait (0,60-0,02 mg/ml) ou de composés (0,01-0,0025 mM) ont été mélangés avec 1485  $\mu$ l d'ABTS<sup>o+</sup>. La diminution de l'absorbance a été mesurée à 734 nm par un spectrophotomètre, après 1 minute d'incubation à température ambiante, en référence à un blanc (PBS sans ABTS<sup>o+</sup>). Le pourcentage de piégeage de ABTS<sup>o+</sup> a été calculé par rapport au Trolox (un analogue hydrosoluble de la vitamine E adopté comme étalon antioxydant). Les résultats ont été exprimés en valeurs de capacité antioxydante équivalente (TEAC) de Trolox et calculés comme valeur moyenne  $\pm$  écart-type, en triplicata.

## II.1.7. Test de cytotoxicité

### II.1.7.1. Cellules et traitement

HCT116 (cancer du côlon humain) et DLD1 (adénocarcinome colorectal humain) ont été obtenues à partir de l'American Type Cell Culture (ATCC) (Rockville, MD, USA). Les cellules ont été maintenues dans du DMEM additionné de 10% de FBS, 100 mg/1 de streptomycine et de pénicilline 100 UI/ml à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub>. Pour assurer une croissance logarithmique, les cellules ont été repiquées tous les deux jours.

Les fibroblastes dermiques humains primaires (HDFa), isolés à partir de peau d'adulte, ont été obtenus auprès de Gibco, Life Technology Corporation. Des cellules HDFa ont été cultivées en milieu M106 additionné de 100 U/ml de pénicilline, 100  $\mu$ g/ml de

streptomycine, de sérum de veau fœtal (2% ; v/v), d'hydrocortisone (1 µg/ml), de facteur de croissance épidermique humain (10 ng/ml) et de facteur de croissance basique des fibroblastes / héparine (10 µg/ml), en cultures monocouches à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO<sub>2</sub> dans l'air. Des HDFa (4 x 10<sup>3</sup> cellules par puits) ont été cultivées en triple dans des plaques à 96 puits dans un volume final de 100 µl de milieu complet M106. Solutions mères d'extraits (5 mg/ml) et de composés purifiés (50 mM) dans du DMSO ont été stockés dans l'obscurité à 4°C. Des dilutions appropriées ont été préparées dans un milieu de culture immédiatement avant utilisation. Dans toutes les expériences, la concentration finale de DMSO ne dépassait pas 0,15% (v/v).

### II.1.7.2. Viabilité cellulaire

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits et incubées pendant les temps établis en l'absence (véhicule uniquement) et en présence de différentes concentrations d'extraits (1,00-0,025 mg/ml) ou de composés (1,0-0,1 mM). Le jour avant les traitements, les cellules ont étéensemencées à une densité cellulaire de 1 x 10<sup>4</sup> cellules / puits.

Le nombre de cellules viables a été quantifié par dosage de MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide) [8]. L'absorption à 550 nm pour chaque puits a été évaluée en utilisant un lecteur de microplaques (Lab Systems, Vienna, VA, USA). Dans certaines expériences, la viabilité cellulaire a également été vérifiée par un essai d'exclusion au bleu de Trypan en utilisant une chambre de comptage de Bürker. Les valeurs de concentration inhibitrice demi-maximale (CI<sub>50</sub>) ont été calculées à partir des courbes dose-réponse de viabilité cellulaire et définies comme étant la concentration entraînant une inhibition de 50% de la survie cellulaire par rapport aux témoins. Les valeurs CI<sub>50</sub> ont été réalisées avec le logiciel GraphPad.

## Bibliographie

- [1] Esposito. T., Sansone. F., Franceschelli. S., Del Gaudio. P., Picerno. P., Aquino. R.P., Mencherini. T., (2017). Hazelnut (*Corylus avellana* L.) shells extract: Phenolic composition, antioxidant effect and cytotoxic activity on human cancer cell lines. *Int J Mol Sci.* 18.
- [2] Miller. N.J., Rice-Evans. C., Davies. M.J., Gopinathan. V., Milner. A., (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science.* 84, 407-412.
- [3] Re. R., Pellegrini. N., Proteggente. A., Pannala. A., Yang. M., Rice-Evans. C., (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine* 26:1231–1237.
- [4] Schlesier. K., Harwat. M., Bohm. V., Bitsch. R., (2002). Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radical Research,* 36, 177-187.
- [5] Awika. J.M., Rooney. L.W., Wu. X., Prior. R.L., Cisneros-Zevallos. L., (2003). Screening Methods to measure antioxidant activity of sorghum (*Sorghum bicolor*) and sorghum products. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6657-6662.
- [6] Christopher. R., Nyandoro. S.S., Chacha. M., De Koning. C.B., (2014). A new cinnamoylglycotlavonoid, antimycobacterial and antioxidant constituents from *Heritiera littoralis* leaf extracts. *Natural Product Research.* 28(6): 351-358.
- [7] Van den Berg. R., Haenen. GRMM., Van den Berg. H., Bast. A., (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chem.* 66, 511-517.
- [8] Bechlem. H., Mencherini. T., Bouheroum. M., Benayache. S., Cotugno. R., Braca. A., De Tommasi. N., (2017). New Constituents from *Gymnocarpos decander*. *Planta Med,* 83: 14-15.

## Chapitre II.2

### Travaux personnels de l'espèce *Lifago dielsii* Schwein. & Musch.

Une recherche bibliographique poussée a montré que l'espèce *Lifago dielsii* Schwein. & Musch. n'a jamais fait d'objet d'étude phytochimique ou biologique

#### II.2.1. Récolte de la matière végétale

L'espèce sélectionnée a été collectée dans son habitat naturel. Les récoltes sont effectuées dans la région de Bechar (Sud- Ouest Algérien) durant le mois d'Avril 2009. Un spécimen (ALD 04/09) a été déposé au niveau de l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, université des frères Mentouri-Constantine. Les parties récoltées ont ensuite été séchées à l'abri de la lumière.

#### II.2.2. Le screening phytochimique

Le screening chimique a été effectué sur les parties aériennes (fleurs et tiges) de la matière sèche, par des réactions usuelles à l'aide des réactifs de caractérisation classiques [1-7].

### II.2.2.1. Recherche des terpènes et stérols insaturés

La présence des stérols et des terpènes a été mise en évidence à l'aide de l'acide sulfurique et de l'anhydride acétique. Les étapes suivantes ont été réalisées :

1. Un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (80/20) est additionné à une quantité de la poudre végétale puis laisser macérer pendant 24h.
2. Agitation, filtration puis évaporation à sec.
3. Addition de 50 ml d'éther à la solution précédente et décantation.
4. Séparation des deux phases.
5. Evaporation de la phase étherée et l'ajout de 15 ml de chloroforme.
6. Répartition du contenu en trois tubes à essai en quantité égale.

#### **Réaction de caractérisation**

- **Tube 1** : utiliser comme témoin.
- **Tube 2** : addition de 3 gouttes de l'acide sulfurique.

L'apparition de la couleur rouge cerise confirme la présence des stérols insaturés.

- **Tube 3** : addition de 3ml d'anhydride acétique.

Changement rapide de la couleur indique la présence des terpènes.

#### **Observation :**

Tiges et fleurs : la couleur ne change pas pour les stérols et les terpènes.

### II.2.2.2. Recherche des triterpènes

La présence des triterpènes est mise en évidence à l'aide de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentré.

1. Un mélange MeOH /H<sub>2</sub>O (80 : 20) est additionné à une quantité de la poudre végétale puis laisser pendant 24h.
2. Agitation puis filtration et évaporation à sec.
3. Dissolution du résidu obtenu dans 1ml d'anhydride acétique puis dans le chloroforme.
4. Division de la solution entre deux tubes à essai dont l'un sert de témoin.
5. Addition de 1ml d'acide sulfurique concentré au fond du tube à l'aide d'une pipette (sans agitation).

La formation d'un anneau rouge brunâtre ou violet à la zone de contact des deux liquides confirme la présence des triterpènes (réaction de Libermann-burchard).

**Observation :**

Tiges : formation d'un anneau rouge brunâtre.

Fleurs : apparition d'une coloration violet foncé.

### II.2.2.3. Recherche des saponines

Les saponines sont caractérisées par leur pouvoir moussant en solution aqueuse.

1. Dissolution de 5g de la poudre végétale à analyser dans 50 ml d'eau distillée dans un erlen Mayer de 250ml.
2. Décoction pendant 30 minutes.
3. Refroidissement du mélange.
4. Filtration puis prélèvement de 5ml du décocté dans un autre tube à essai.
5. Agitation.

L'apparition d'une mousse persistante indique la présence des saponines.

**Observation :**

Tiges et fleurs : l'apparition d'une mousse.

### II.2.2.4. Recherche des coumarines

Les étapes effectuées sont les suivantes :

1. Ajouter 20ml d'éther à 1g de la poudre végétale.
2. Laisser macérer pendant 24h.
3. Filtrer le mélange puis compléter à 20ml avec de l'eau distillée.
4. Evaporer le mélange obtenu à l'air libre jusqu'à l'obtention de 5ml.
5. Ajouter 2ml d'eau distillée chaude.
6. Partager la solution en deux tubes à essai.
7. Ajouter au contenu de l'un des tubes de l'ammoniaque à 25%.
8. Mélanger et observer la fluorescence sous UV à 365 nm.

Une fluorescence intense dans le tube contenant l'ammoniaque confirme la présence des coumarines.

**Observation :**

Tiges : une fluorescence identique à celle du témoin.

Fleurs : une fluorescence intense.

### II.2.2.5. Recherche des flavonoïdes

En présence de NaOH (1N), de HCl concentré et des copeaux de Magnésium, les flavonoïdes donnent des réactions de coloration caractéristique.

1. Dissolution de 5g de la poudre végétale à analyser dans 50 ml d'eau distillée pendant 30 min.
2. Filtration.
3. Prélèvement de 6ml d'infusé et les introduire dans 3 tubes à essai à raison de 2ml par tube.
4. Addition respective de :
  - Dans le premier tube 1ml de NaOH 1N.
  - Dans le deuxième 1ml d'eau distillée.
  - Dans le troisième 1ml de HCl concentré et de copeaux de magnésium.

En présence des flavonoïdes, les colorations suivantes : jaune-rougeâtre, rouge à rouge-violacé, rouge-foncé au violet ou bleu, jaune peuvent être observées. Ces couleurs correspondent respectivement aux flavones, flavonols, flavonones et isoflavones.

#### **Observations :**

**Tiges :** Tube 1 : +NaOH => coloration jaune rougeâtre.

Tube 2 : +H<sub>2</sub>O => coloration jaune.

Tube 3 : +HCl+Mg => coloration rouge + dégagement du gaz d'hydrogène (une réaction exothermique), et la couleur rouge persiste.

**Fleurs :** Tube 1 : +NaOH => coloration jaune rougeâtre.

Tube 2 : +H<sub>2</sub>O => coloration jaune claire.

Tube 3 : +HCl+Mg => coloration jaune claire + dégagement du gaz d'hydrogène (une réaction exothermique) et une coloration rouge apparaît

### II.2.2.6. Recherche des leucoanthocyanes

La même réaction effectuée au bain marie en absence de copeaux de magnésium, indique la présence des leucoanthocyanes par l'apparition de la coloration rouge.

#### **Observation :**

Tiges : coloration rouge.

Fleurs : coloration jaune.

### II.2.2.7. Recherche des anthocyanes

Les étapes réalisées sont :

1. Dissoudre 2,5 g de la poudre végétale à analyser dans 25 ml d'eau distillée bouillante pendant 15 minutes.
2. Filtrer et compléter avec un peu de l'eau chaude jusqu'à 25 ml.
3. Prendre 5ml du filtrat auquel on additionne 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%).
4. Addition de 5ml d'ammoniaque (10%).

Si la coloration se voit par acidification jaune claire et vire au bleu-violacé par addition de 5 ml d'ammoniaque (10%), ceci indique la présence d'anthocyanes.

#### **Observation :**

Tiges : coloration rose.

Fleurs : la couleur ne change pas.

### II.2.2.8. Recherche des quinones

Les étapes effectuées sont :

1. Dissoudre de la poudre végétale à analyser, humecter de quelques gouttes de HCl.
2. Macération pendant 24h dans un erlen Meyer contenant 10 ml d'éther de pétrole.
3. Filtrer.
4. 2 ml de filtrat sont additionnés avec 2 ml de NaOH à 10% puis agitation.

L'apparition de la coloration rouge virant au violet indique la présence des quinones.

#### **Observation :**

Tiges et fleurs : formation de deux phases mais aucune coloration n'est observée.

### II.2.2.9. Recherche des tanins

#### Tanins catéchiques

1. Infusion de 2,5g de matière végétale dans 25ml d'eau bouillante pendant 30 min.
2. Prélèvement de 2 ml de la solution précédente dans un tube à essai.
3. Addition de quelques gouttes (environs 3gouttes) de chlorure ferrique FeCl<sub>3</sub> (1%).

L'apparition de coloration ou la formation d'un précipité indique la

présence des tanins catéchiques.

**Observation :**

Tiges et fleurs : coloration verte.

Tanins galliques

1. Prendre 2ml de l'infusé précédent et les mettre dans un tube à essai.
2. Saturer en acétate de sodium.
3. Ajouter quelques gouttes de  $\text{FeCl}_3$  (1%).

La formation d'un précipité indique la présence des tanins galliques.

**Observation :**

Tiges et fleurs : La formation d'un précipité.

### II.2.2.10. Recherche des alcaloïdes

Le protocole est comme suit :

1. Dissoudre 5 g de la poudre végétale à analyser dans 25 ml d'acide sulfurique dilué à 10% dans un erlen de 250 ml.
2. Agiter et laisser macérer pendant 24h à la température du laboratoire.
3. Filtrer et laver avec de l'eau distillée de manière à obtenir 25ml de filtrat.
4. Introduire 1ml de filtrat dans un tube à essai.
5. Ajouter le réactif de Dragendorff (3 gouttes).
6. Laisser reposer 10 minutes.

L'apparition d'un précipité ou changement de couleur indique la présence d'alcaloïdes.

**Observation :**

Tiges et fleurs : changement de couleur.

### II.2.3. Extraction

Le matériel végétal (2000g) est mis à macérer dans un mélange hydro-alcoolique (Ethanol/Eau ; 80: 20 ; v/v) pendant 48 heures à température ambiante. Le premier extrait récupéré est concentré sous pression réduite à une température modérée (environ 35°C). La macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas de 24 à 48 heures.

Les trois extraits récupérés sont réunis et concentrés. A la solution obtenue, on ajoute sous agitation magnétique, de l'eau distillée (à raison de 400 ml d'eau distillée pour 1kg de matière sèche). La solution ainsi obtenue est laissée au repos à froid pendant une nuit pour décantation. Cette dernière permet le dépôt de la chlorophylle, des cires, du sable.

Au cours de la dissolution de l'extrait brute avec de l'eau distillée il restait une partie insoluble. Cette dernière à former l'extrait MeOH (partie insoluble dans l'eau).

Après filtration on obtient une solution aqueuse de coloration rouge brune. Cette phase aqueuse subit une extraction de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le hexane, chloroforme, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol.

Le filtrat est épuisé par le chloroforme, la phase organique est concentrée à sec à une température n'excédant pas 35°C et donne une masse de 23,14g de l'extrait chloroforme.

La phase aqueuse résiduelle est reprise avec l'acétate d'éthyle. Cette phase acétate est concentrée à sec et donne un extrait de masse 14,61g.

Finalement, en suivant la même procédure avec du *n*-butanol, on obtient un extrait *n*-butanol de masse 46,66g.

L'extrait MeOH brut est de masse 18g.

## II.2.4. Séparation de l'extrait acétate d'éthyle

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle, nous avons procédé à des tests chromatographiques sur chromatographie couche mince de gel de silice déposée sur feuille d'aluminium en utilisant divers systèmes d'élution. La meilleure séparation a été obtenue avec le système de solvant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH dans les proportions (4:1).

### II.2.4.1. Séparation chromatographique sur colonne

Une masse d'environ 14g d'extrait acétate d'éthyle est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans le dichlorométhane. L'élution à été réalisée par du CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> avec un gradient de CH<sub>3</sub>OH en commençant par le dichlorométhane pur et en terminant par le méthanol pur avec un fractionnement tous les 100 ml. Le suivi de ces fractions est effectué par chromatographie sur couche mince

de gel de silice 60 sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de l'anisaldéhyde et chauffées pendant trois minutes à 100°C. La progression de cette colonne est reportée dans le tableau II.2.1.

**Tableau II.2.1** : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *L. dielsii*

<b>Lots de fraction</b>	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	<b>MeOH</b>
1-8	100	0
9-30	99	1
31-49	98	2
50-69	97	3
70-92	96	4
93-113	95	5
114-136	93	7
137-160	90	10
161-184	87	13
185-208	84	16
209-231	80	20
232-254	75	25
255-278	70	30
279-293	65	35
294-303	55	45
304-321	50	50
322-353	45	55
354-369	40	60
370-385	25	75
386-406	5	95
407	0	100

Les fractions présentant la même composition selon leur profil chromatographique sur CCM sont réunies donnant ainsi 17 fractions que nous représentons dans le tableau II.2.2

**Tableau II.2.2** : Résultats des fractions obtenues de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *L. dielsii*

<b>Lots de fraction</b>	<b>N° de la fraction</b>	<b>Poids de la fraction (mg)</b>
1-30	LDA1	56,3
31-49	LDA2	138,5
50-69	LDA3	95,8
70-113	LDA4	344,9
114-148	LDA5	550,1
149-172	LDA6	461,2
173-214	LDA7	2947,4
215-249	LDA8	1901,8
250-263	LDA9	614,1
264-278	LDA10	553,1
279-293	LDA11	606,7
294-307	LDA12	1102,7
<b>308-337</b>	<b>LDA13</b>	<b>2458,2</b>
<b>338-359</b>	<b>LDA14</b>	<b>962,2</b>
360-369	LDA15	278
370-394	LDA16	650,8
395-406	LDA17	248,8

Parmi les 17 fractions obtenues, seules les fractions LDA13 et LDA14 ont subi des séparations sur plaque à cause de leur simplicité.

#### II.2.4.2. Séparation et purification des fractions sélectionnées

##### ➤ Fraction LDA13

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction LDA13, plusieurs tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur feuille d'aluminium ont été effectués, la meilleure séparation a été obtenue avec le système  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (4 :1).

La fraction LDA13 (2458,2 mg), a subi une séparation par chromatographie d'adsorption sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans le système  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  en gradient de polarité (7:1, 4:1, 1:1), le suivi de cette colonne est effectué par CCM. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec de l'anisaldéhyde et chauffées pendant trois minutes à 100°C. Les sous-fractions similaires sont rassemblées, évaporées et pesées donnant 15 sous-fractions, parmi lesquelles les sous-fractions LDA13-7 et LDA13-11 ont subi des purifications.

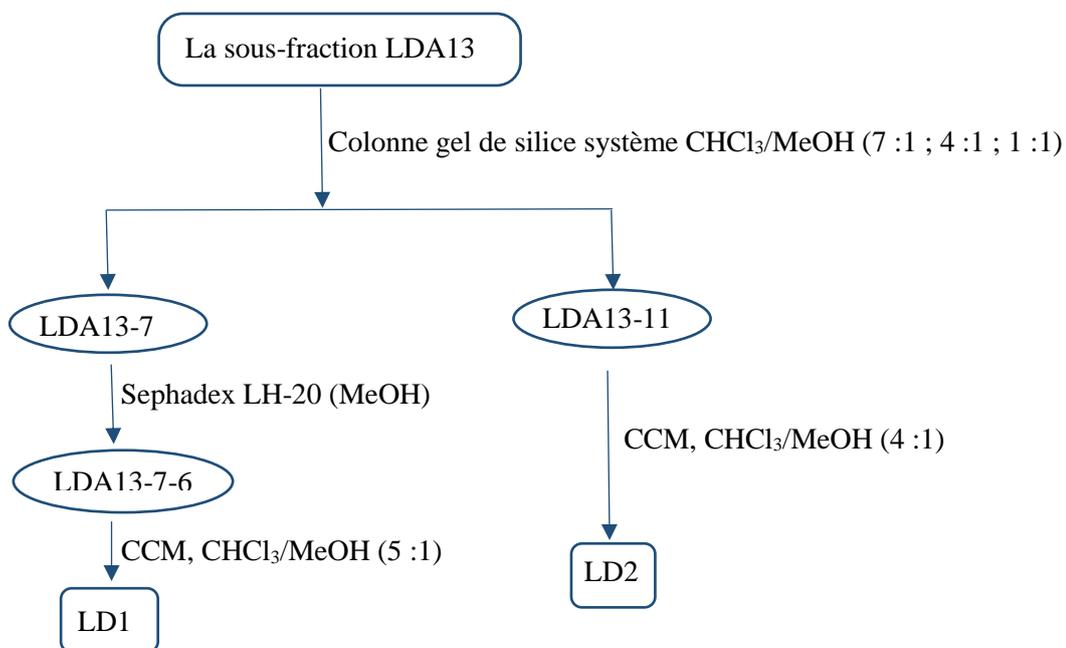
➤ **Purification de la sous-fraction LDA13-7**

Cette sous-fraction a subi un premier fractionnement par chromatographie d'exclusion sur une colonne Sephadex LH-20 éluée par le MeOH donnant 10 sous-fractions. Parmi lesquelles la sous-fraction LDA13-7-6 a été purifiée sur couche mince éluée dans le système  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (5 :1) pour donner le produit **LD1** (1mg).

➤ **Purification de la sous-fraction LDA13-11**

La sous-fraction LDA13-11, a subi une séparation sur plaque de gel de silice avec le système d'élution  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (4:1) et 3 éluions successives. Cette opération a permis l'obtention d'un produit à l'état pur nommé **LD2** (2mg).

Les étapes de séparation et purification sont résumés dans l'organigramme suivant :



**Figure II.2.1 :** Schéma illustrant toutes les étapes de séparation et de purification

➤ **Fraction LDA14**

La fraction LDA14 de masse 962,2 mg, a subi une séparation sur colonne de gel de silice avec le même système d'élution précédent. Les sous-fractions similaires sont rassemblées et évaporées donnant 10 sous-fractions.

Notre choix a porté sur la première sous-fraction LD14-1 à cause de sa richesse, car cette fraction comporte un produit majoritaire.

### ➤ Purification de la sous-fraction LDA14-1

Cette sous-fraction a été traitée sur colonne de gel de Sephadex LH-20 éluée avec le MeOH donnant 6 sous sous-fractions, parmi lesquelles la sous sous-fraction LDA14-1-4 a donné le produit majoritaire nommé **LD3** (1,8mg) à l'état pur.

## II.2.5. Evaluation de l'activité antioxydante

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement.

Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs substances naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires [8].

L'activité antioxydante d'un composé correspond à sa capacité à résister à l'oxydation. Les antioxydants les plus connus sont le  $\beta$ -carotène (provitamine A), l'acide ascorbique (vitamine C), le tocophérol (vitamine E) ainsi que les composés phénoliques. En effet, la plupart des antioxydants de synthèse ou d'origine naturelle possèdent des groupes hydroxyphénoliques dans leurs structures et les propriétés antioxydantes sont attribuées en partie à la capacité de ces composés naturels à piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^{\bullet}$ ) et superoxydes ( $\text{O}_2^{\bullet}$ ) [9].

Plusieurs méthodes sont utilisées pour évaluer l'activité antioxydante par piégeage de différents radicaux, parmi ces méthodes :

- ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) [10].
- TRAP (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter) [10].
- Les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) [11].
- Les radicaux  $\text{ABTS}^{\bullet}$  (sel d'ammonium d'acide 2,2-azinobis-3-thylbenzothiazoline-6-sulfonique) [12].
- La méthode utilisant le radical libre DPPH $^{\bullet}$  (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) [13,14].

Dans le but d'évaluer l'activité antioxydante de nos extraits, nous avons procédé en premier lieu à des tests de quantification de polyphénols et des flavonoïdes et en second lieu l'estimation du pouvoir antioxydant par le test au DPPH et l'inhibition de la peroxydation lipidique (LPO).

## II.2.5.1. Dosage des polyphénols totaux (TPC)

### II.2.5.1.1. Principe

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits sont déterminées au moyen du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et du réactif de Folin-Ciocalteu [15]. Ce dernier est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750 nm. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique (acide gallique), permet de déterminer la quantité de polyphénols totaux présente dans un extrait. Elle est exprimée en mg d'équivalent d'acide gallique par g de matière sèche [15].

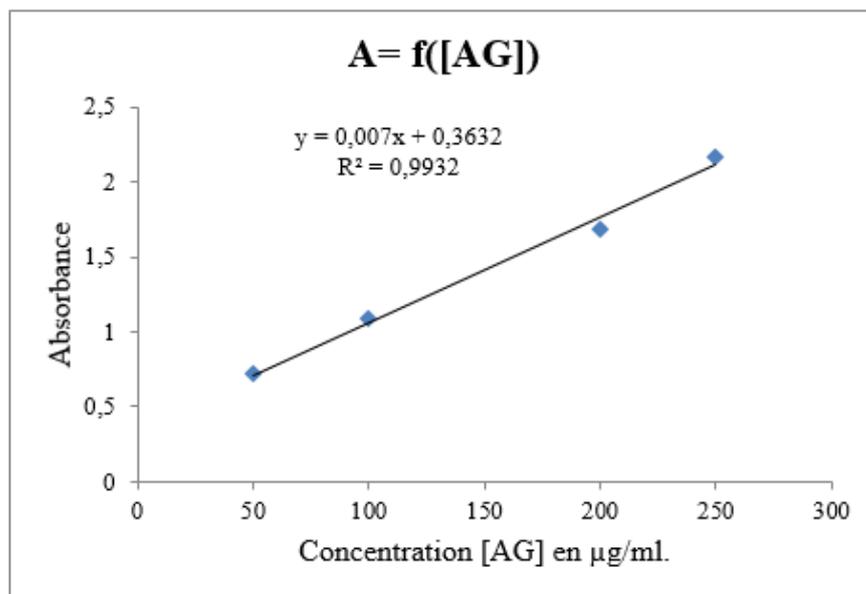
### II.2.5.1.2. Protocole

Le tableau suivant rassemble les étapes d'élaboration de la gamme étalon

**Tableau II.2.3** : Protocole expérimental (méthode Folin–Ciocalteu)

	Blanc	Echantillon
[AG] = 5mg/ml (ml)	-	0,2
H <sub>2</sub> O (ml)	1	0,8
Réactif de Folin 1N (ml)	0,5	0,5
Incuber pendant 5 min		
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 20% (ml)	2,5	2,5
Volume total (ml)	4	4
Agiter, puis incuber pendant 90 min à l'obscurité et à température ambiante, mesurer l'absorbance à 765 nm		

La courbe d'étalonnage d'acide gallique est représentée dans la figure II.2.2



**Figure II.2.2 :** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Concernant les extraits, nous avons suivi les mêmes étapes effectuées pour la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

Les concentrations de ces extraits sont évaluées par rapport à l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique et sont exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique /g d'extrait (mg EAG/g d'extrait)

## II.2.5.2. Dosage des flavonoïdes totaux (TFC)

### II.2.5.2.1. Principe

La méthode de trichlorure d'aluminium est utilisée pour quantifier les flavonoïdes dans les extraits, à 2 ml d'échantillon ou standard (préparé dans le MeOH) est ajouté 2 ml de la solution  $AlCl_3$  (2% dans le MeOH), Après 10 min de réaction l'absorbance est lue à 430 nm. La concentration des flavonoïdes est déduite à partir d'une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (0–40 µg/ml) et est exprimé en microgramme d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait) [10].

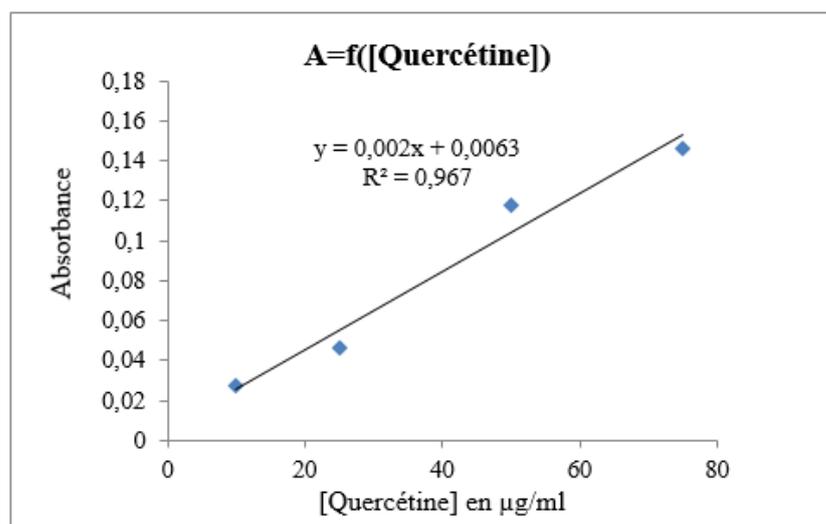
### II.2.5.2.2. Protocole

Les étapes réalisées dans ce dosage sont présentées dans le tableau II.2.4

**Tableau II.2.4 :** Protocole expérimental (méthode au  $\text{AlCl}_3$ )

	Echantillon
[Quercétine] = 5mg/ml (ml)	2
$\text{AlCl}_3$ 2% (ml)	2
Volume total (ml)	4
Agiter, puis incubé pendant 60 min à l'obscurité et à température ambiante, mesurer l'absorbance à 430 nm	

Les résultats sont présentés dans la courbe suivante :



**Figure II.2.3 :** La courbe d'étalonnage de la quercétine.

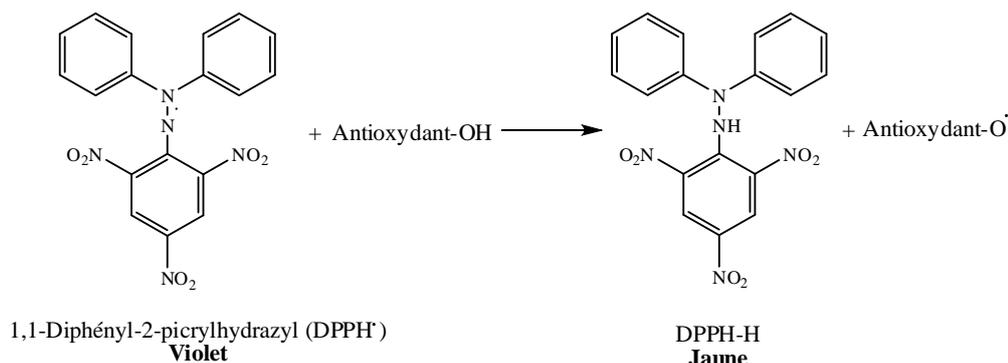
Concernant les extraits, nous avons procédé de la même manière que pour la courbe d'étalonnage de la quercétine.

### II.2.5.3. Activité anti-radicalaire (test DPPH)

#### II.2.5.3.1. Principe

Le DPPH $\cdot$  (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH $\cdot$  est réduit et change de couleur en virant au jaune [16-17].

Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon [15].



**Figure.II.2.4 :** Réduction du radical libre DPPH<sup>•</sup> (1,1 Diphényle-2-Picrylhydrazyl)

L'activité antiradicalaire est exprimée en pourcentage de DPPH réduit selon la formule :

$$I\% = \frac{A_{blanc} - A_{échant}}{A_{blanc}} \times 100$$

$A_{blanc}$ : Absorbance du contrôle réactif (MeOH + réactif DPPH)

$A_{échant}$ : Absorbance de (l'extrait + réactif DPPH)

### II.2.5.3.2. Protocole

Les étapes suivantes sont effectuées :

- On prépare une solution d'acide ascorbique de 5 mg/ml comme solution mère puis on prépare les solutions filles :(5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 100) µg/ml.
- Pour chaque extrait on prépare une solution mère de 5mg /ml à partir de laquelle on prépare des solutions filles : ( 5 ; 10 ; 20 ; 50 ; 100 ; 150 ; 200) µg/ml. Le tableau II.2.5 rassemble les étapes suivies.

**Tableau II.2.5 :** Protocole expérimental (test au DPPH)

	DPPH° (0,2mM)	Echantillon	MeOH /H <sub>2</sub> O
Blanc échantillon	-	1ml	1ml
Blanc DPPH° (100%)	1ml	-	1ml
Echantillon	1ml	1ml	-
Incubation pendant 60 min à l'obscurité et à température ambiante, mesurer l'absorbance à 517 nm			

La valeur IC<sub>50</sub> est la concentration qui assure la réduction de 50% du DPPH, elle est déterminée graphiquement pour chaque extrait à partir de la courbe du pourcentage de

réduction en fonction de la concentration [18].

#### II.2.5.4. Inhibition de la peroxydation lipidique (LPO induite par le système Fe<sup>2+</sup>/ acide ascorbique)

##### II.2.5.4.1. Principe

Le mélange réactionnel contenant l'homogénat de foie de rat (0,1 ml, 25% p/v) dans du Tris-HCl (30 mM), du sulfate d'ammonium ferreux (0,16 mM), de l'acide ascorbique (0,06 mM) et différentes concentrations de l'extrait dans un volume final de 0,5 ml a été incubé pendant 1 heure à 37°C et la substance réactive thiobarbiturique résultante (TBARS) a été mesurée à 532 nm [19]. Trolox a été utilisé comme référence. Les résultats ont été calculés, en pourcentage d'inhibition, selon l'équation suivante :

$$I\% = \frac{A_{blanc} - A_{échant}}{A_{blanc}} \times 100$$

*A<sub>blanc</sub>*: Absorbance du contrôle réactif

*A<sub>échant</sub>*: Absorbance de (l'extrait + réactif)

## Bibliographie

- [1] Bruneton. J., (2009). Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales. Ed.4. *Tec & Doc-Éditions médicales internationales*. Paris. p 128.
- [2] Kolling. M., Winkley. K., Von Deden. M., (2010). "For someone who's rich, it's not a problem." Insights from Tanzania on diabetes health-seeking and medical pluralism among Dar es Salam's urban poor. *Globalization and Health*. 6:8.
- [3] Harborne. J.B., (1998). Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis, 3rd Edn. *Chapman and Hall*. London. p 235.
- [4] Khandelwal. K.R., (2001). Preliminary phytochemical screening, in Practical Pharmacognosy Techniques and Experiments. 8th Ed. *Nirali Publication*. p 149- 156. Pune
- [5] Mouelet. A.M., (2004). Screening phytochimique de deux espèces de plantes : *Crotalaria retusa* L. (Papilionaceae) et *Mitragyna ciliata* Aubrev & Pellegr (Rubiaceae) récoltées au Gabon. Thèse de Doc. en pharmacie. Faculté de Médecine de Pharmacie et D'Odonto-Stomatologie : 88
- [6] Ribéreau-Gayon. J., Peynaud. E., (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Traité d'œnologie. *Édition Dunod*. Paris. 254 p.
- [7] Sofowora. E.A., (1982). Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa. *John Wiley and Sons*. Chichester. p. 256.
- [8] Marc. F., Davin. A., Deglène-Benbrahim. L., Ferrand. C., Baccaunaud. M., (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Erudit. M/S : médecine sci*. 20(4), 458-463.
- [9] Bartosz. G., (2003). Generation of reactive oxygen species in biological systems. *Comments Toxicol*. 9, 5-21.
- [10] Ricardo. Da Silva. J.M., Darmon. N., Fernandez. Y., Mitjavila. S., (1991). Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J. Agri. Food Chem*. 39, 549-1552.
- [11] Benzie. I.F., Strain. J., (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power" : the FRAP assay. *Anal Biochem*. 239(1), 70-76.
- [12] Re. R., Pellegrini. N., Proteggente. A., Pannala. A., Yang. M., Rice-Evans. C., (1999). Antioxidant capacity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 26 (9-10), 1231-1237.

- [13] Sharma. O.P., Bhat. T.K., (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food chem.* 113 (4), 1202- 88
- [14] Popovici. C., Saykova. I., Tylkowski. B., (2009). Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réactivité avec le radical libre DPPH. *Revue de génie industriel.* 4, 25-39.
- [15] Parejo. I., Viladomat. F., Bastida. J., Rosas-Romero. A., Flerlage. N., Burillo. J., et al., (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and no distilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem.* 50(23) :6882-90.
- [16] Molyneux. P., (2004). The use of stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Techno.* 26 (2), 211-219.
- [17] Sanchez-Moreno. C., Larrauri Jose. A., Saura-Calixto. F.A., (1998). Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J. Sci. Food Agri.* 76(2), 270-276.
- [18] Samarth. R.M., Panwar. M., Soni. A., Kumar. M., Kumar. A.; (2008). Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extract. *Food Chem.* 106: 868-873.
- [19] Aiyegoro. O.A., Okoh. A.I., (2010). Preliminary phytochemical screening and *In vitro* antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. *BMC Comp Alter Med.* 10 (21): 1-8.

# Partie III

## Résultats et discussions

## Chapitre III.1

### L'espèce *Heliotropium bacciferum* Forssk.

#### III.1.1. Rendement des extraits

Le calcul du rendement de cette extraction par rapport à la matière sèche est reporté dans le tableau III.1.1

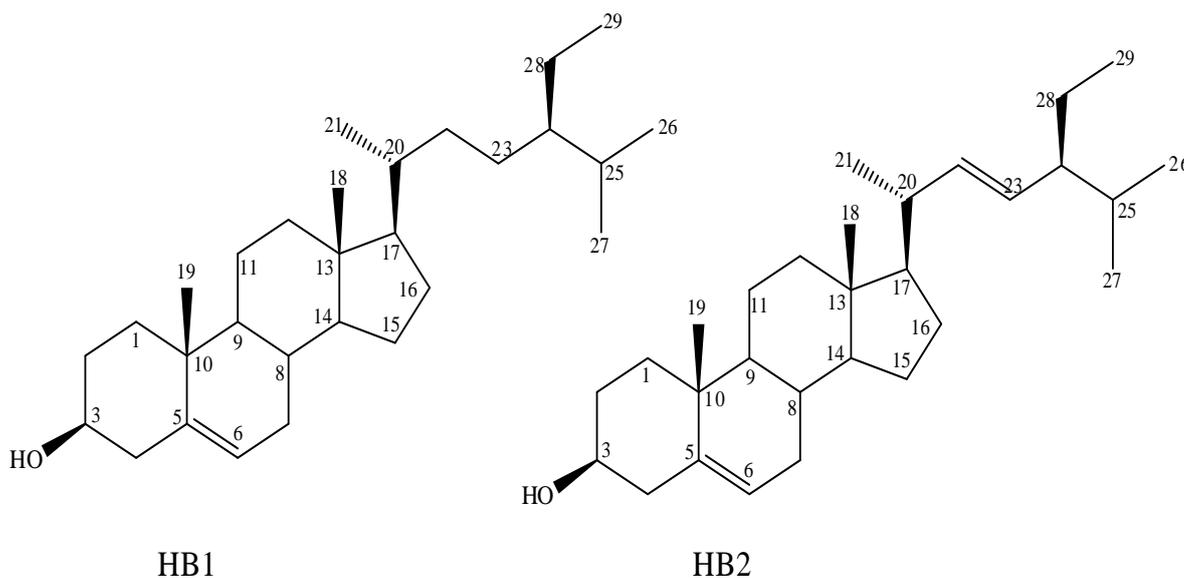
**Tableau III.1.1** : Rendement des extraits de *Heliotropium bacciferum*

	Ext Hexane	Ext CHCl <sub>3</sub>	Ext MeOH
Rend %	0,55	0,99	1,58

#### III.1.2. Elucidation structurale des composés isolés

Les produits isolés ont été caractérisés par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D du proton et du carbone 13, RMN 2D (COSY, ROESY, HSQC, HMBC) et par comparaison avec les données de la littérature.

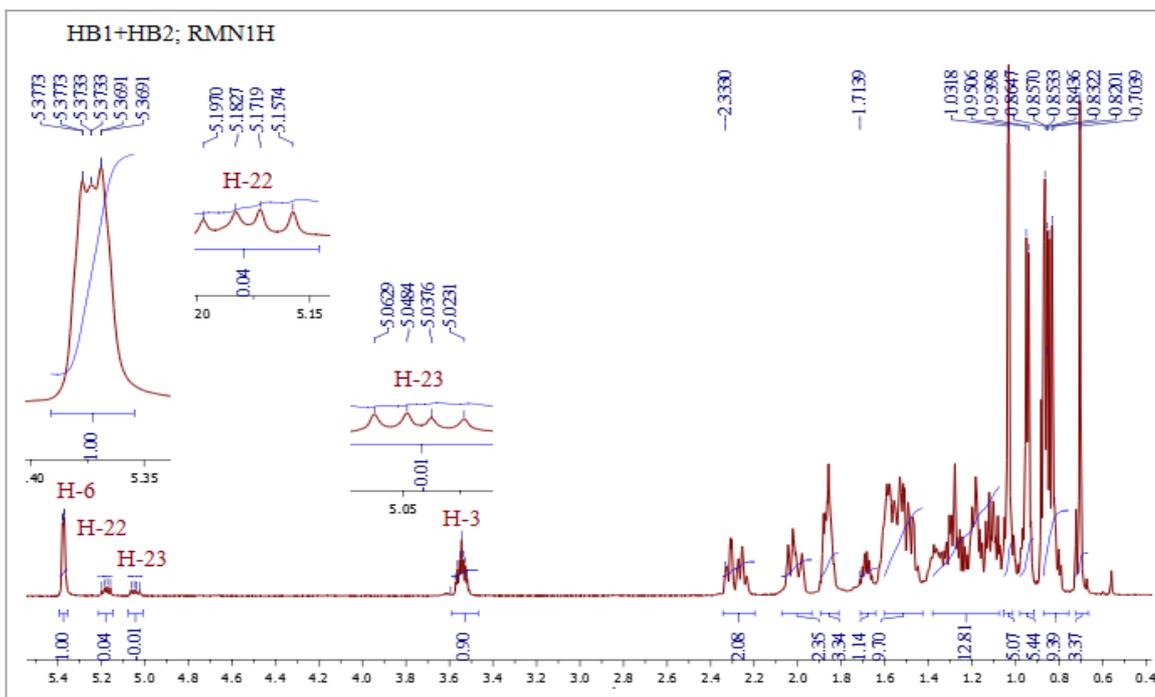
## III.1.2.1. Elucidation structurale des composés HB1 et HB2



Le mélange des composés **HB1** et **HB2**, a été obtenu sous forme de cristaux blancs solubles dans le chloroforme. L'analyse du spectre RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.1.1) enregistré dans le CDCl<sub>3</sub> permet l'observation des signaux caractéristiques des stérols. On retrouve en effet :

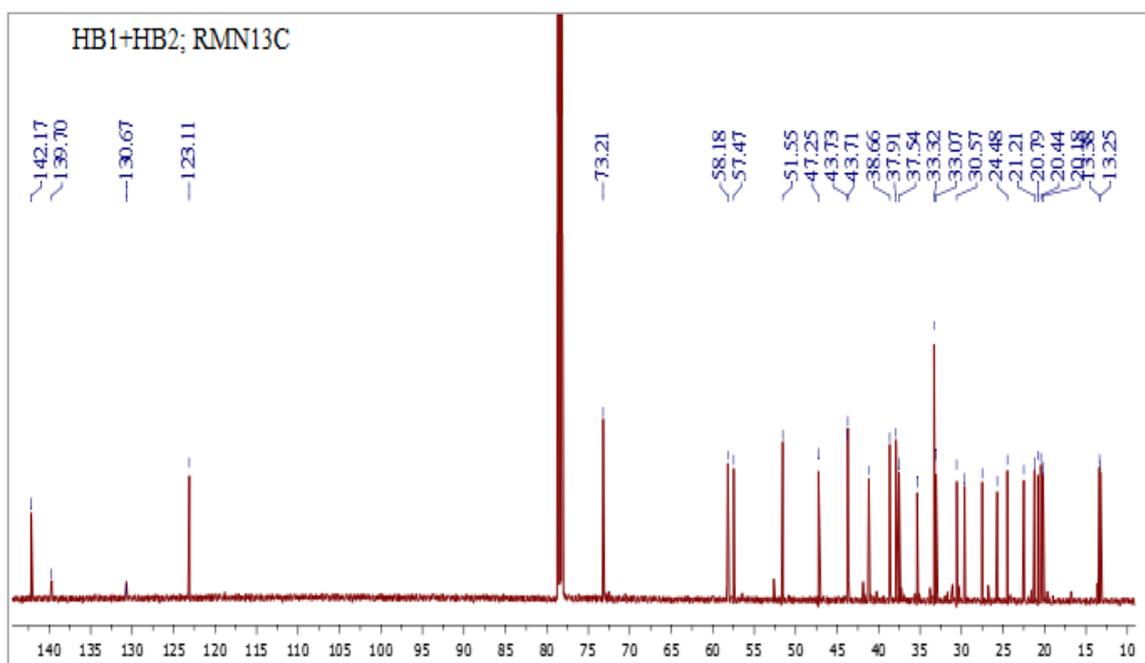
- Une série de pics très dense dans l'intervalle 0,70 ppm à 2,33 ppm, supposant la présence d'un nombre élevé de groupements méthyles, méthylènes et méthynes.
- Un multiplet à  $\delta_H$  3,55 ppm caractéristique du proton geminé à un groupement hydroxyle porté par le carbone C-3 des stérols.
- Un multiplet à  $\delta_H$  5,37 ppm d'intégration un proton, attribuable au proton oléfinique H-6 des stérols.

En plus, le même spectre montre la présence de deux protons éthyléniques à  $\delta_H$  5,18 et 5,04 ppm sous forme de deux doublets dédoublés ( $J = 15,1 ; 8,7$  Hz) qui ne peuvent être attribués qu'aux protons H-22 et H-23 du stigmastérol respectivement.



**Spectre III.1.1** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$  ; 600 MHz) du composé **HB1** et **HB2**

Ceci est confirmé par l'étude du spectre RMN $^{13}\text{C}$  (Spectre III.1.2) qui montre la présence des signaux correspondants aux 4 carbones oléfiniques C-5 et C-6 des deux stéroïdes ainsi qu'à ceux présents dans la chaîne latérale en position C-22 et C-23 du stigmastérol à  $\delta_{\text{C}}$  142,2 ;  $\delta_{\text{C}}$  123,1 ;  $\delta_{\text{C}}$  130,7 et  $\delta_{\text{C}}$  139,7 ppm respectivement.

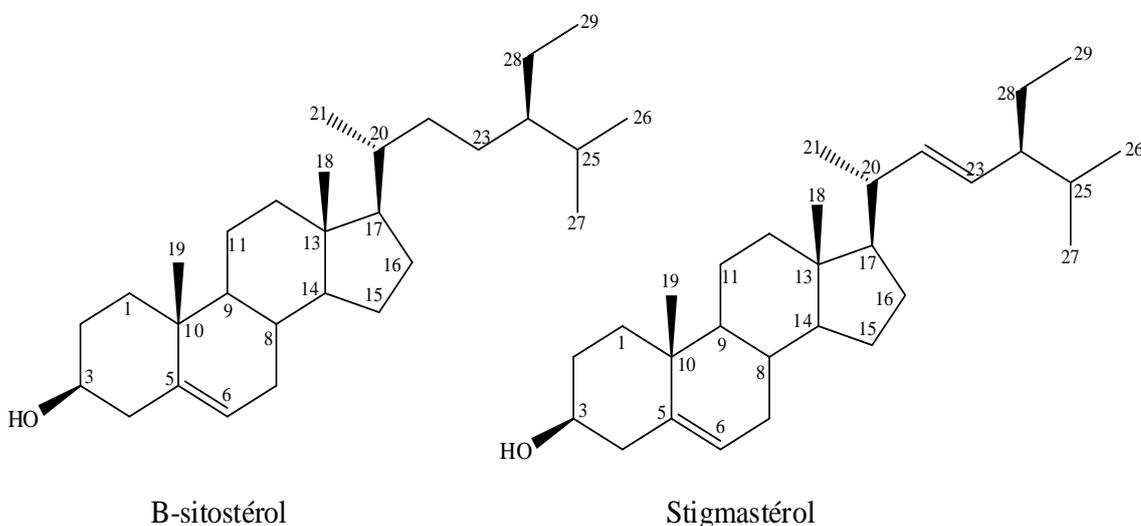


**Spectre III.1.2** : Spectre RMN $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  ; 150 MHz) des composés **HB1** et **HB2**

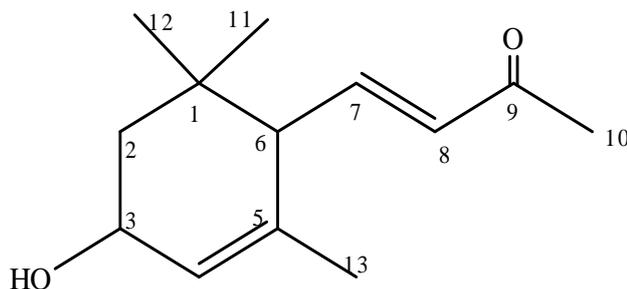
Cette observation oriente vers la présence d'un mélange de  $\beta$ -sitostérol (**HB1**) et de son isomère déshydrogéné en positions C-22 et C-23, le stigmastérol (**HB2**). Un dosage par RMN<sup>1</sup>H permet de conclure que ce mélange renferme environ 96 % du  $\beta$ -sitostérol et 4 % du stigmastérol comme présenté dans la figure III.1.1.

La comparaison des données spectrales de ce spectre avec ceux trouvés dans la littérature ont conduit aux structures ci-dessous qui sont celles du  $\beta$ -sitostérol et du stigmastérol [1].

Ce métabolite secondaire commun à toutes les plantes a été isolé de plusieurs espèces du genre *Heliotropium* (Chapitre I.1 ; p 25).



**Figure III.1.1 :** Structure des composés **HB1** et **HB2**,  $\beta$ - sitostérol et Stigmastérol

III.1.2.2. Elucidation structurale du composé **HB3**

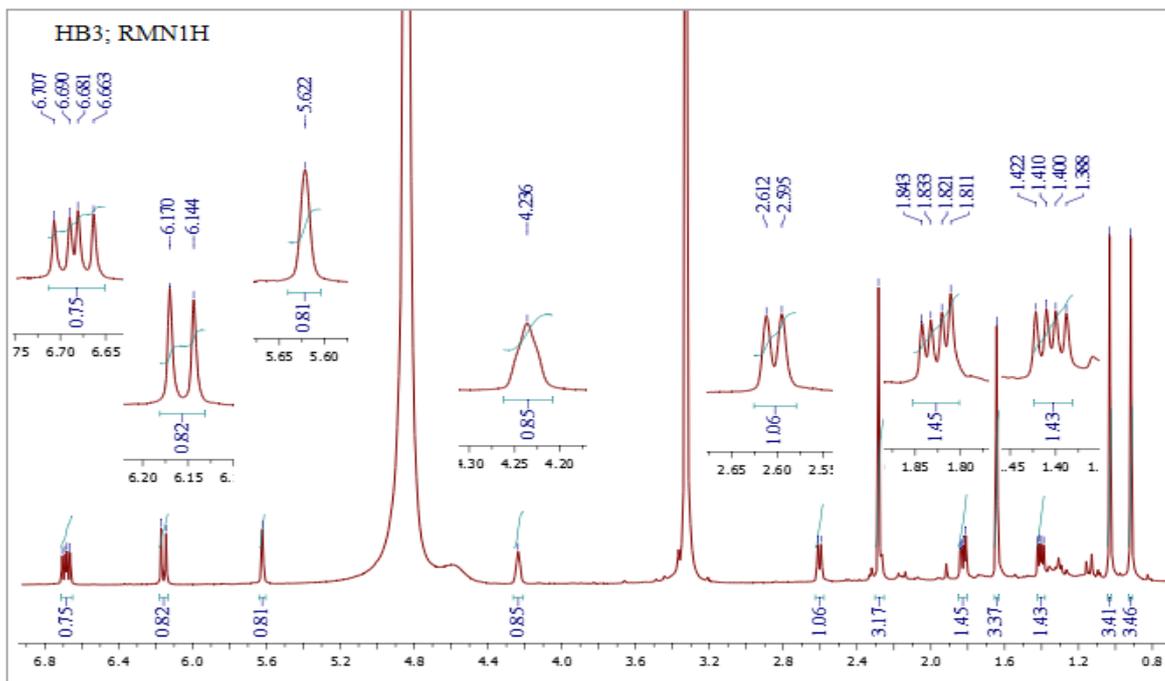
L'examen simultané des spectres RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.1.3) et HSQC (Spectre III.1.4) de ce composé permet de relever, dans cette molécule la présence de :

- Un signal à  $\delta_H$  6,69 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet de doublet ( $J = 15,6 ; 10,2$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  149,5 ppm.
- Un autre signal à  $\delta_H$  6,16 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet ( $J = 15,8$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  134,0 ppm.

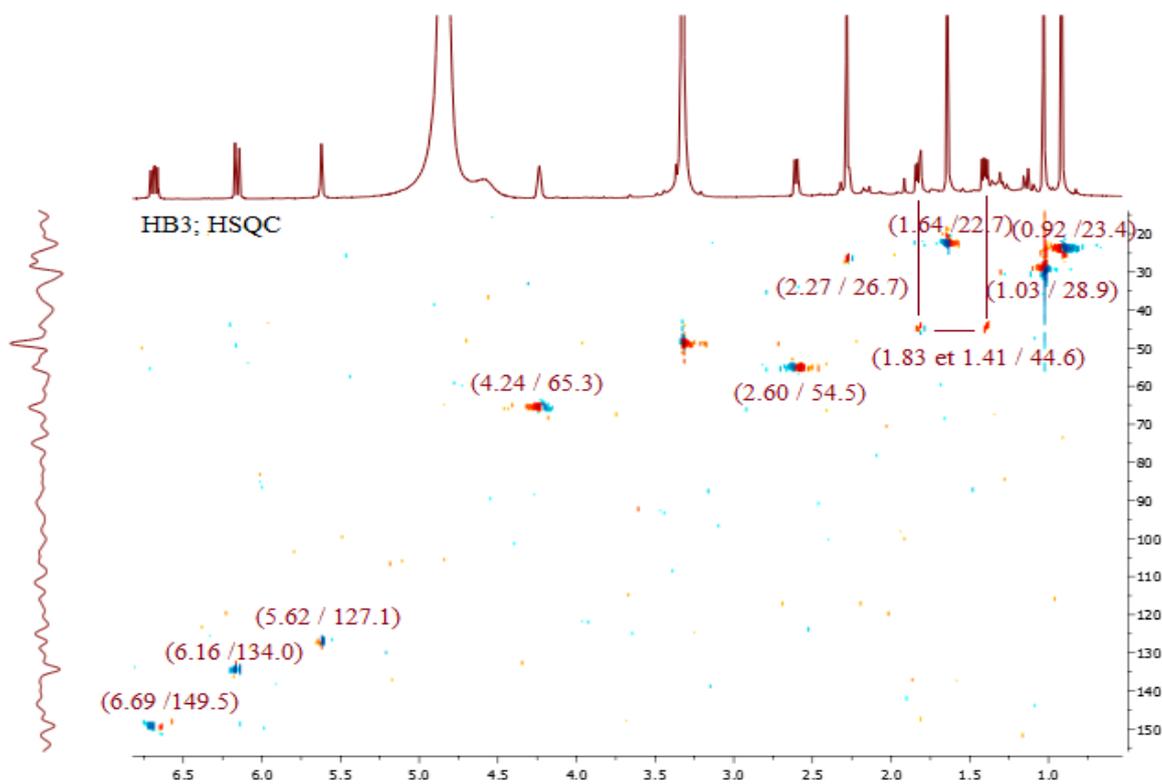
Les déplacements chimiques de ces deux signaux ainsi que la valeur de la constante de couplage ( $J = 15,6$  Hz) indiquent clairement la présence d'un groupement éthylénique de configuration *trans*.

- Un signal à  $\delta_H$  5,62 ppm d'intégration 1H sous forme d'un singulet large corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  127,1 ppm. Les valeurs des déplacements du proton et du carbone de ce signal indiquent qu'il est éthylénique.
- Le signal à  $\delta_H$  4,24 ppm d'intégration 1H sous forme d'un multiplet corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  65,3 ppm. Vu les valeurs des déplacements du proton et du carbone, ce dernier ne peut être qu'oxygéné.
- Un signal à  $\delta_H$  2,60 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet ( $J = 10,2$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  54,5 ppm.
- Un groupement CH<sub>2</sub> dont les protons sont magnétiquement non équivalents (diastéréotopiques) et fortement couplés résonnant sous forme d'un doublet, le premier à  $\delta_H$  1,83 ppm ( $J = 13,2 ; 6,0$  Hz) et le second à  $\delta_H$  1,41 ( $J = 13,2 ; 7,2$  Hz) montrant une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le même carbone à  $\delta_C$  44,6 ppm.
- Quatre CH<sub>3</sub> sous forme de singulet chacun, résonant à  $\delta_H$  1,03 ppm ( $\delta_C$  28,9 ppm),  $\delta_H$  2,27 ppm ( $\delta_C$  26,7 ppm),  $\delta_H$  0,92 ppm ( $\delta_C$  23,4 ppm) et  $\delta_H$  1,64 ppm ( $\delta_C$  22,7

ppm). Le fait que ces groupements apparaissent sous forme de singulet indique clairement qu'ils sont portés par des carbones quaternaires.



**Spectre III.1.3** : Spectre RMN<sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>; 600 MHz) du composé **HB3**



**Spectre III.1.4** : Spectre HSQC du composé **HB3** dans le CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>

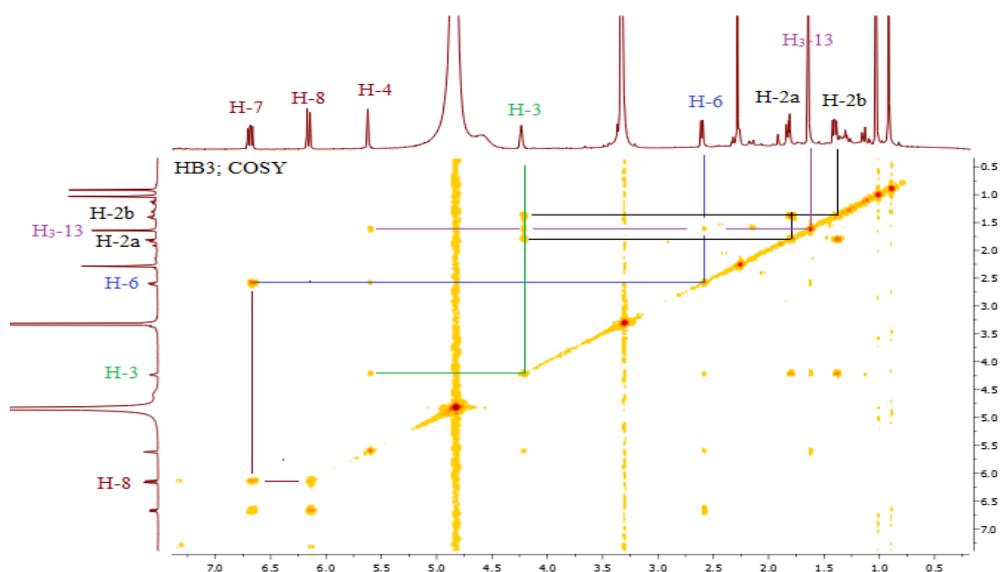
L'analyse simultanée des spectres COSY (Spectre III.1.5) et HMBC étalé (Spectre III.1.6) permet de relever les corrélations suivantes :

- Les protons du groupement CH<sub>2</sub>, unique dans cette molécule, montre sur le spectre COSY une tache de corrélation avec le proton du groupement CH oxygéné résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_H$  4,24 ppm.
- Ce proton corrèle à son tour avec le proton du groupement CH éthylénique résonant sous forme d'un singulet large à  $\delta_H$  5,62 ppm. Ce dernier CH éthylénique montre une tache de corrélation avec les protons du groupement CH<sub>3</sub> résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_H$  1,64 ppm.

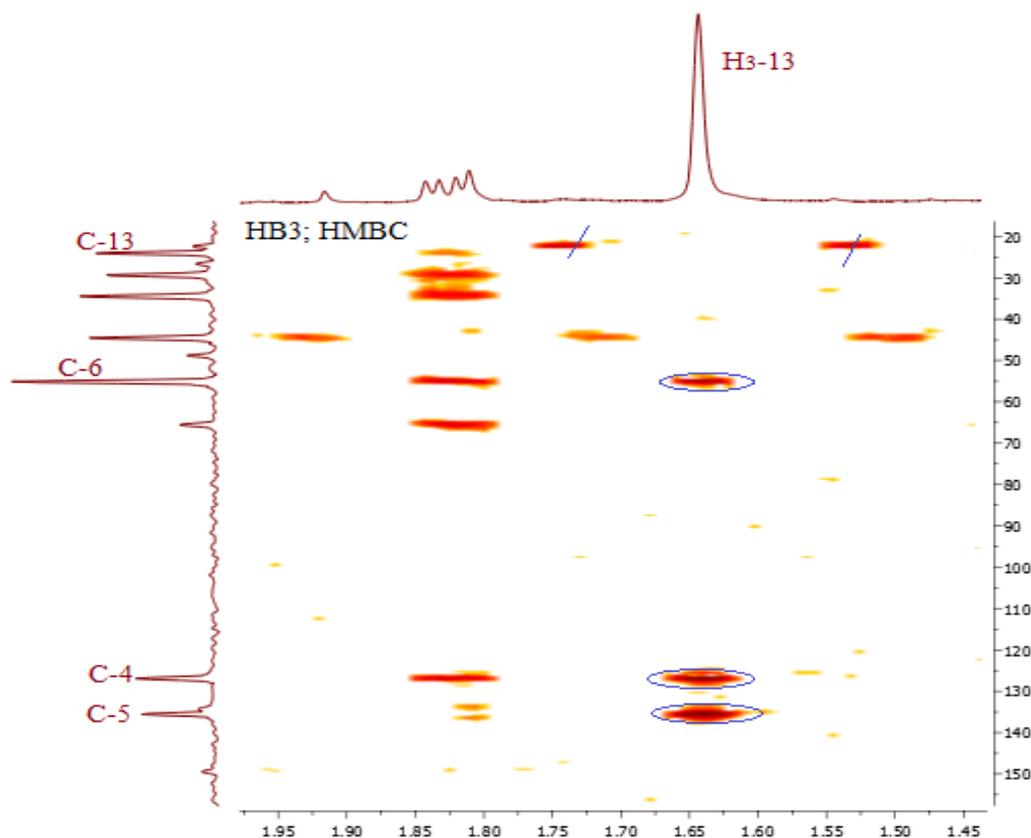
Ceci est vite confirmé par le spectre HMBC (Spectre III.1.6) qui montre la présence des taches de corrélation entre les protons de ce groupement CH<sub>3</sub> et le carbone du groupement CH éthylénique ( $\delta_C$  127,1 ppm) et du carbone quaternaire éthylénique ( $\delta_C$  135,6 ppm).

Un retour vers le spectre COSY permet de relever la présence d'une tache de corrélation entre :

- les protons du CH<sub>3</sub> ( $\delta_H$  1,64 ppm) et le proton du groupement CH résonant sous forme d'un doublet ( $J = 10,2$  Hz) à  $\delta_H$  2,60 ppm.
- Ce proton corrèle à son tour avec le proton du CH éthylénique sous forme d'un doublet de doublet ( $J = 15,6 ; 10,2$  Hz) à  $\delta_H$  6,69 ppm. Ce dernier CH éthylénique montre une tache de corrélation avec le proton du groupement CH éthylénique résonant sous forme d'un doublet ( $J = 15,6$  Hz) à  $\delta_H$  6,16 ppm.

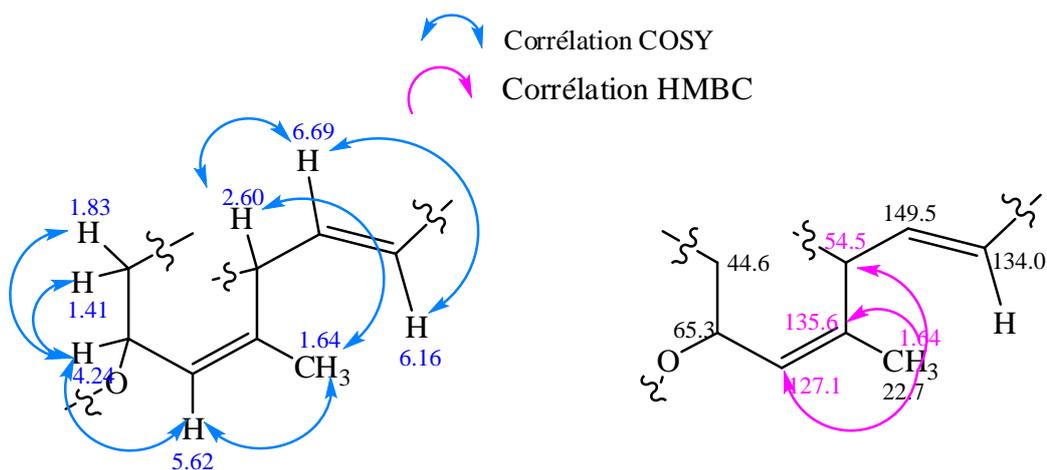


**Spectre III.1.5** : Spectre COSY du composé **HB3** dans le CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>



**Spectre III.1.6** : Spectre HMBC du composé **HB3** dans le  $\text{CH}_3\text{OH-d}_4$ , étalement

Ces observations permettent de proposer la présence dans cette molécule, de l'entité 1, reportée dans la Figure III.1.2.

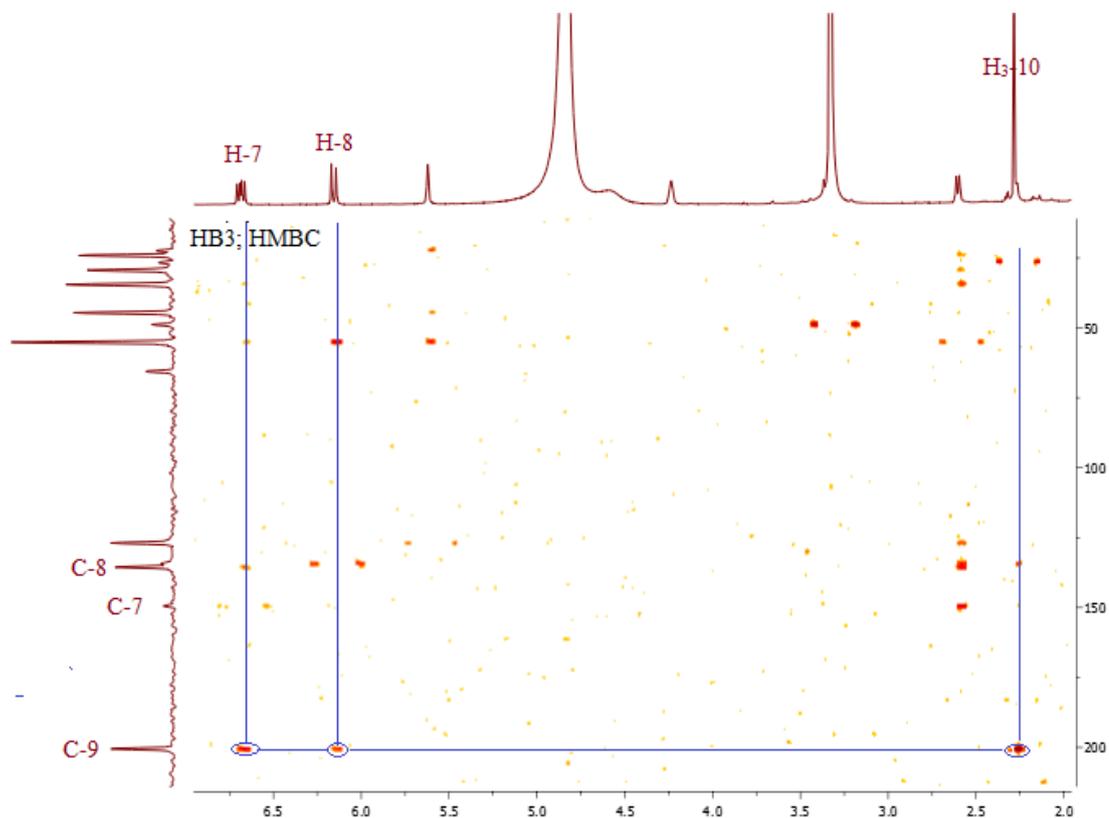


**Figure III.1.2** : Entité 1 présente dans le composé **HB3**

La multiplicité du proton éthylénique à  $\delta_{\text{H}}$  6,16 ppm sous forme de doublet ( $J = 15,6$  Hz) suppose qu'il est porté par un carbone voisin d'un carbone quaternaire. Ceci est confirmé par le spectre HMBC étalé (Spectre III.1.7) qui montre la présence de taches de

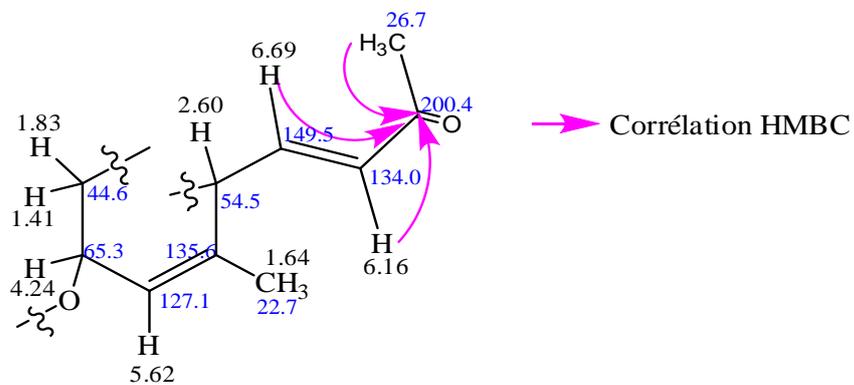
corrélation entre le carbone du carbonyle résonant à  $\delta_C$  200,4 ppm et les deux protons éthyléniques.

Par ailleurs et toujours sur le spectre HMBC (Spectre III.1.7), le carbonyle montre une tache de corrélation avec les protons du méthyle résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_H$  2,28 ppm ( $\delta_C$  26,7 ppm).



**Spectre III.1.7** : Spectre HMBC du composé **HB3** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ , étalement

Ces observations permettent de proposer la présence de l'entité 2, dans cette molécule reportée dans la figure III.1.3.



**Figure III.1.3** : Entité 2 présente dans le composé **HB3**

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre III.1.8), les deux méthyles à  $\delta_H$  1,03 ppm et  $\delta_H$  0,92 ppm montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire résonnant à  $\delta_C$  34,2 ppm ; cette situation suppose qu'ils sont tous les deux portés par ce carbone quaternaire vu leur multiplicité. Les protons de ces deux méthyles montrent également, des corrélations avec les carbones du  $CH_2$  à  $\delta_C$  44,6 ppm et du  $CH$  à  $\delta_C$  54,5 ppm, ce qui indique que le carbone quaternaire précédent est lié à ces groupements  $CH_2$  et  $CH$  comme reporté dans la figure III.1.4.

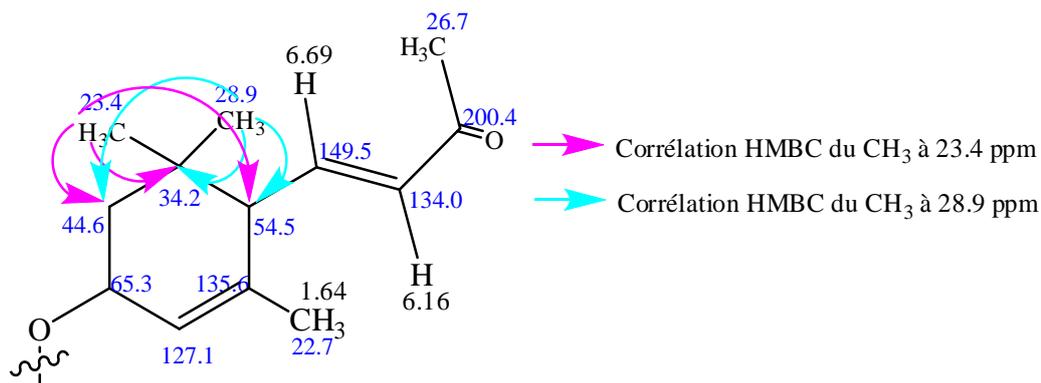
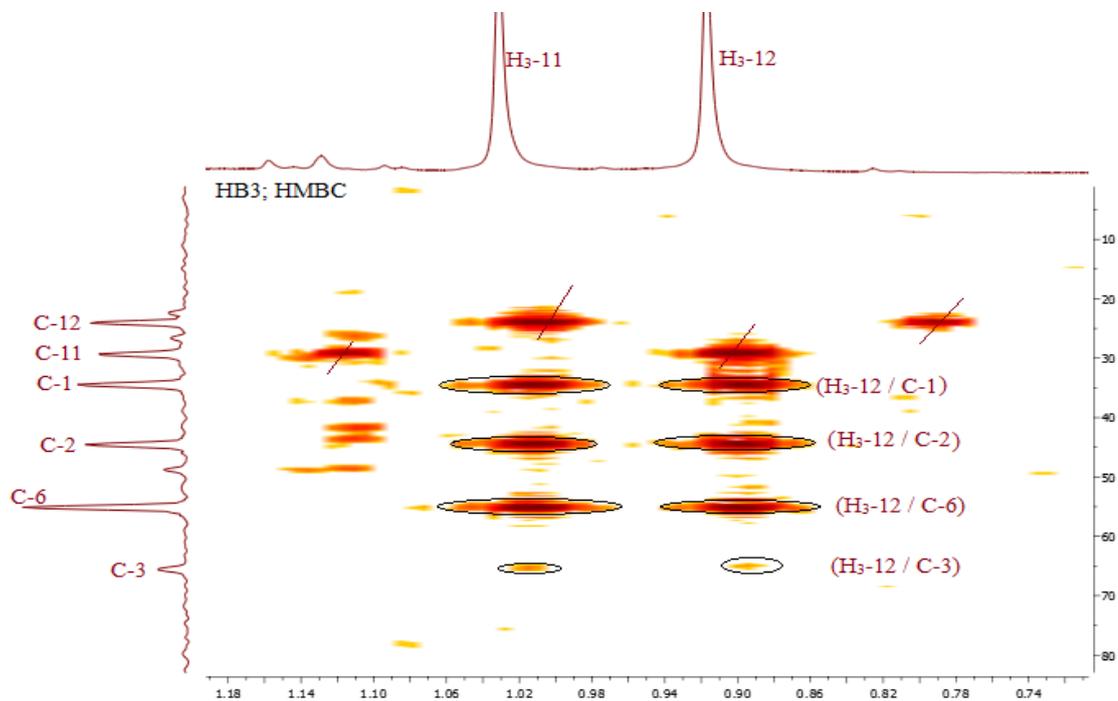


Figure III.1.4 : Structure partielle du composé **HB3**

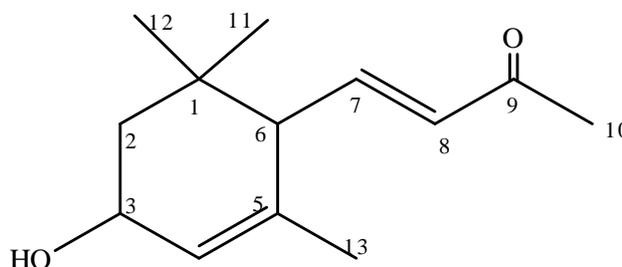


Spectre III.1.8 : Spectre HMBC du composé **HB3** dans le  $CH_3OH-d_4$ , étalement

L'ensemble de cette analyse mène à un squelette méga-stigmane de type  $\alpha$ -ionone, ce squelette étant oxygéné en C-3. Les déplacements chimiques des protons et des carbones

de cette entité, sont en parfait accord avec ceux du **3-hydroxy- $\alpha$ -ionone** [2]. Cette molécule est nouvelle pour le genre *Heliotropium*.

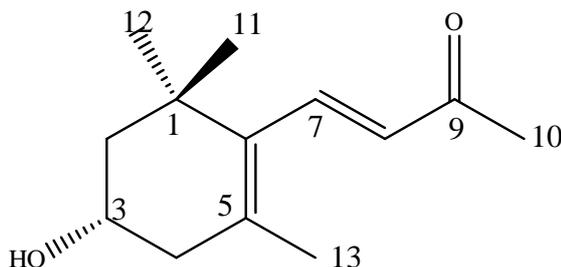
L'ensemble de ces données résumé dans le tableau 2, mène la structure plane reportée dans la figure III.1.5.



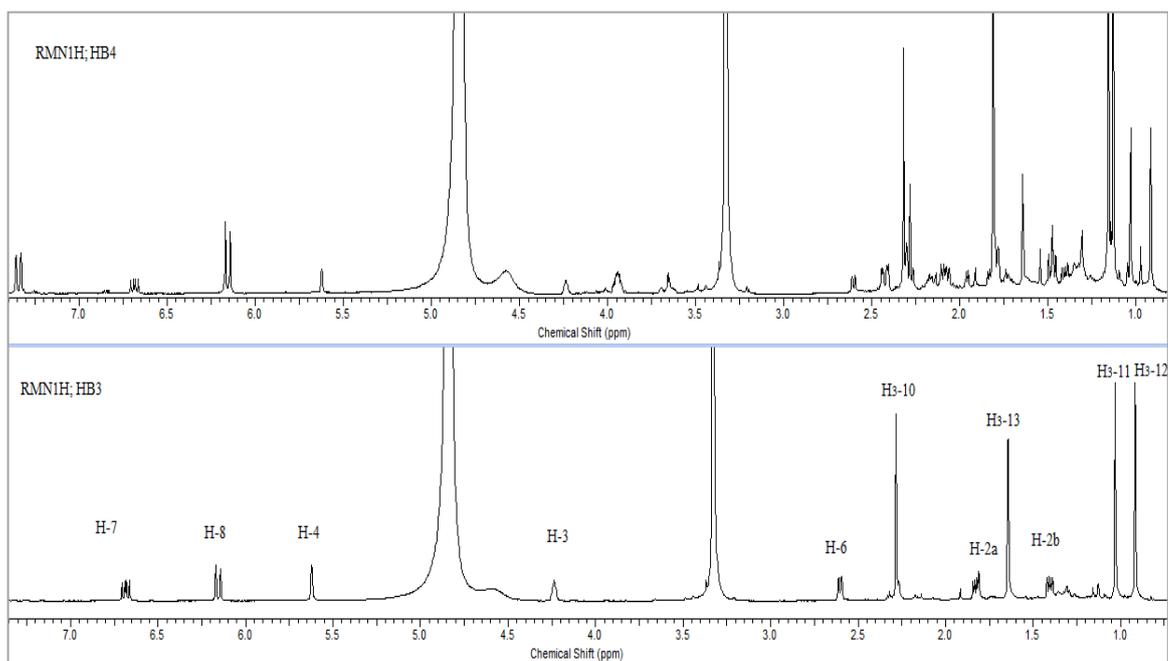
**Figure III.1.5** : Structure plane du composé **HB3**, 3-hydroxy- $\alpha$ -ionone

**Tableau III.1.2** : Données spectrales de RMN du composé **HB3**.

Positions	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, $J$ en Hz)	HMBC (H-C)
1	34,2		
2	44,6	1,83 ( <i>dd</i> ; 13,2 ; 6,0)	12, 11, 1, 6, 3, 4, 8, 5
		1,41 ( <i>dd</i> ; 13,2 ; 7,2)	12, 11, 1, 6, 3, 4
3	65,3	4,24 <i>m</i>	3
4	127,1	5,62 <i>m</i>	13, 2, 6
5	135,6		
6	54,5	2,60 ( <i>d</i> ; 10,2)	12, 11, 1, 4, 8, 7
7	149,5	6,69 ( <i>dd</i> ; 15,6 ; 10,2)	6, 5, 9
8	134,0	6,16 ( <i>d</i> ; 15,6)	6, 9
9	200,4	-	
10	26,7	2,28 (3H ; <i>s</i> )	8, 9
11	28,9	1,03 (3H ; <i>s</i> )	1, 2, 3, 6
12	23,4	0,92 (3H ; <i>s</i> )	1, 2, 3, 6
13	22,7	1,64 (3H ; <i>s</i> )	6, 4, 5

III.1.2.3. Elucidation structurale du composé **HB4**

La comparaison des spectres proton du composé précédent **HB3** et le composé **HB4** (Spectre III.1.9) montre la présence de la totalité des signaux attribués au composé **3-hydroxy- $\alpha$ -ionone** et montre d'autres signaux qui ne peuvent être attribués qu'au composé **HB4**. Un dosage par RMN<sup>1</sup>H permet de conclure que ce mélange renferme environ 71 % du **HB4** et 29 % du **3-hydroxy- $\alpha$ -ionone (HB3)**.



**Spectre III.1.9** : Spectre RMN<sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> ; 600 MHz) du composé **HB3** et **HB4**

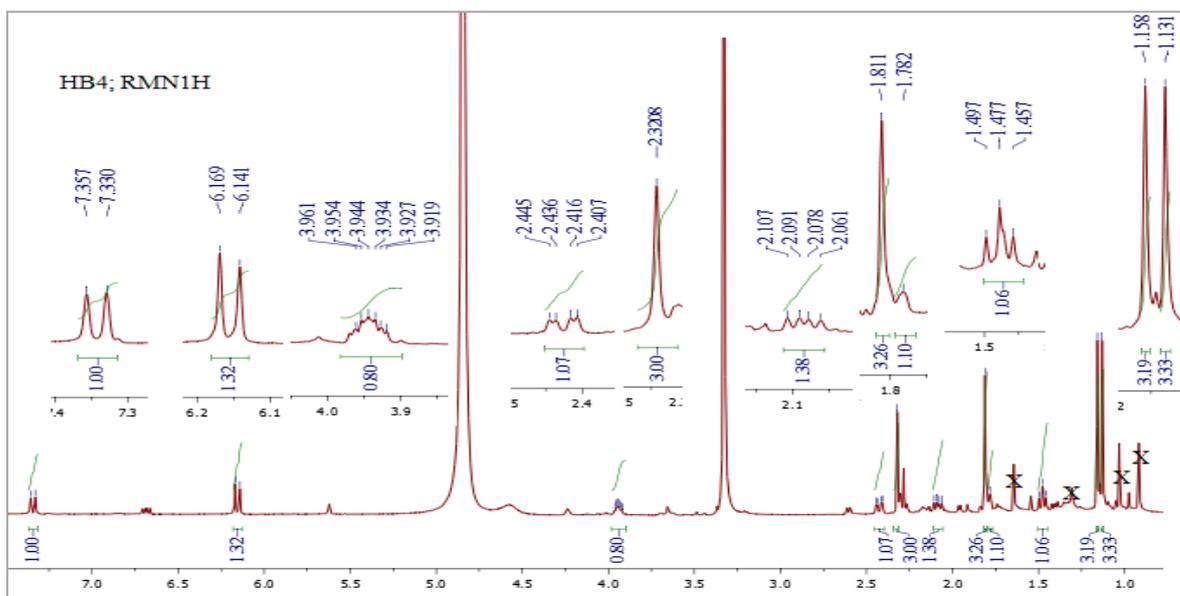
Après élimination des signaux caractéristiques du composé HB3, l'examen simultané des spectres RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.1.10) et HSQC (Spectre III.1.11) du composé **HB4** permet de relever dans cette molécule la présence de :

- Un groupement CH à  $\delta_H$  7,34 ppm sous forme d'un doublet ( $J = 16,2$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  144,1ppm.

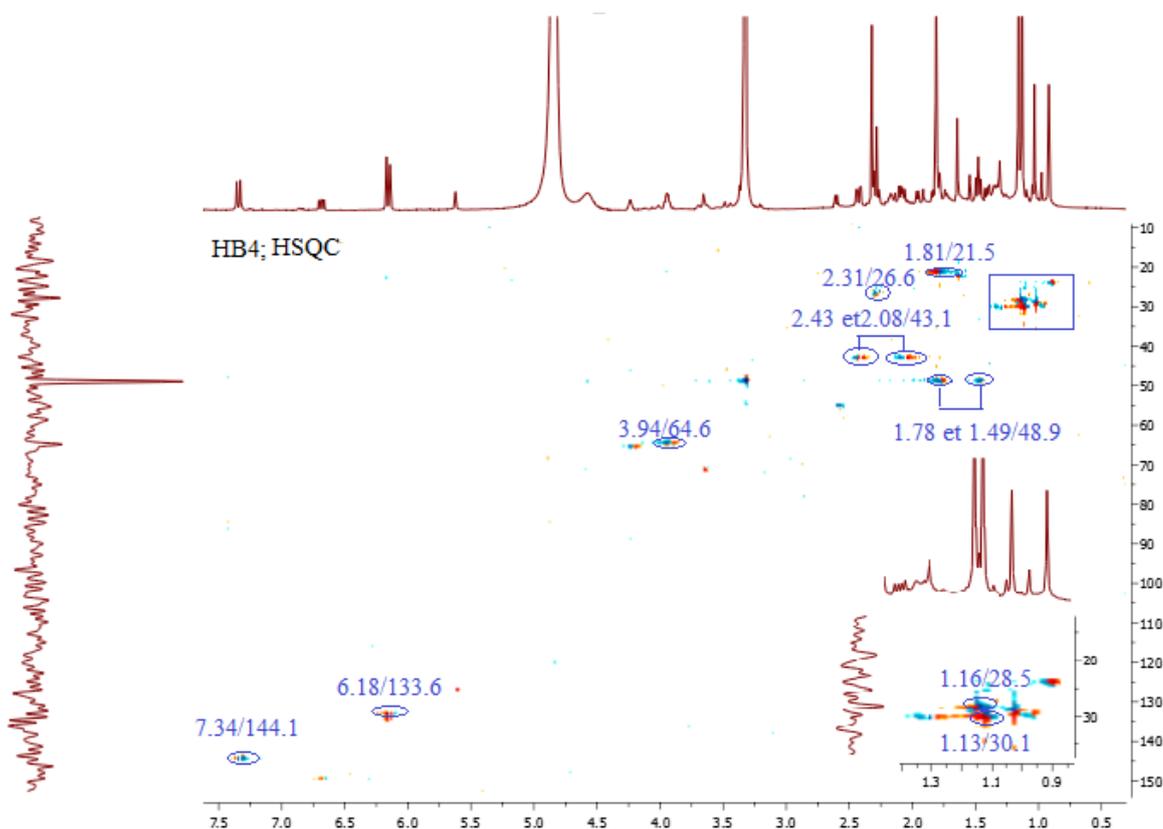
- Un groupement CH à  $\delta_H$  6,16 ppm sous forme d'un doublet ( $J = 16,8$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  133,6 ppm.

Les déplacements chimiques de ces deux signaux ainsi que la valeur de la constante de couplage ( $J = 16,2$  Hz) indiquent clairement la présence d'un groupement éthylénique de configuration *trans*.

- Un groupement CH à  $\delta_H$  3,94 ppm sous forme d'un multiplet corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  64,6 ppm. D'après les valeurs des déplacements du proton et du carbone, ce dernier ne peut être qu'oxygéné.
- Un groupement CH<sub>2</sub> dont les protons sont magnétiquement non équivalents résonnant sous forme d'un doublet de doublet à  $\delta_H$  2,43 ppm ( $J = 17,4 ; 5,4$  Hz) et  $\delta_H$  2,08 ( $J = 17,4 ; 9,6$  Hz) montrant une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  43,1 ppm.
- Un groupement CH<sub>2</sub> dont les protons sont magnétiquement non équivalents, le premier est recouvert par le signal du méthyle à  $\delta_H$  1,78 ppm le second à  $\delta_H$  1,49 ppm sous forme d'un triplet ( $J = 12,0$  Hz), montrant une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  48,9 ppm.
- Quatre CH<sub>3</sub> sous forme de singulet chacun, résonant à  $\delta_C$  30,1 ppm ( $\delta_H$  1,13 ppm),  $\delta_C$  28,5 ppm ( $\delta_H$  1,16 ppm),  $\delta_C$  26,6 ppm ( $\delta_H$  2,32 ppm) et  $\delta_C$  21,5 ppm ( $\delta_H$  1,81 ppm). Leurs multiplicités indiquent qu'ils sont portés par des carbones quaternaires.



**Spectre III.1.10** : Spectre RMN<sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> ; 600 MHz) du composé **HB4**

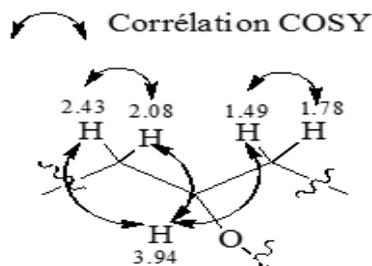


**Spectre III.1.11** : Spectre HSQC du composé **HB4** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$

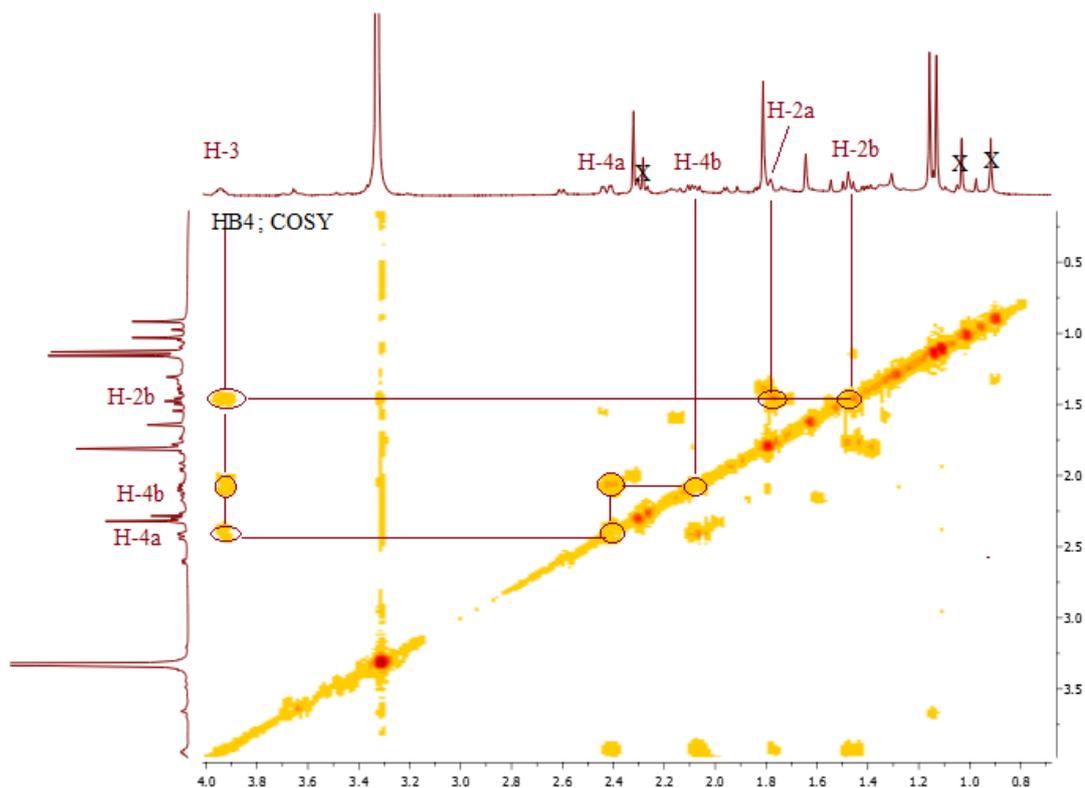
L'analyse du spectre COSY (Spectre III.1.12) montre les corrélations entre :

- Le proton du groupement  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{C}}$  48,9 ppm) résonant sous forme de triplet ( $J = 12,0$  Hz) à  $\delta_{\text{H}}$  1,49 ppm et le proton du groupement CH oxygéné à  $\delta_{\text{H}}$  3,94 ppm (*m*).
- Ce dernier et les protons du groupement  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{C}}$  43,1 ppm) résonant à  $\delta_{\text{H}}$  2,43 ppm (*dd* ;  $J = 17,4$  ; 5,4 Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  2,08 ppm (*dd* ;  $J = 17,4$  ; 9,6 Hz).

D'après ces données les deux groupements  $\text{CH}_2$  sont en position vicinale par rapport à ce CH comme le montre la figure III.1.6



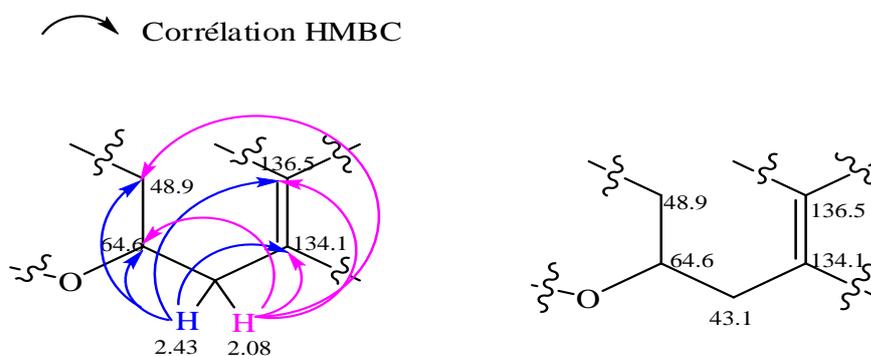
**Figure III.1.6** : Entité 1 présente dans le composé **HB4**



**Spectre III.1.12 :** Spectre COSY du composé **HB4** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$  ; étalement

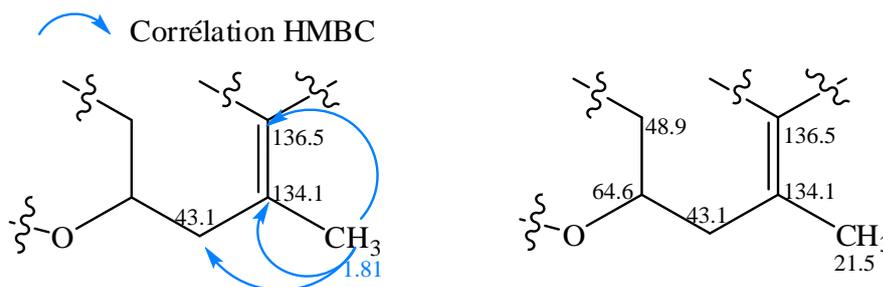
Sur le spectre HMBC (Spectre III.1.13), les protons du groupement  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{C}}$  43,1 ppm) résonant à  $\delta_{\text{H}}$  2,43 ppm ( $dd$  ;  $J = 17,4$  ; 5,4 Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  2,08 ppm ( $dd$  ;  $J = 17,4$  ; 9,6 Hz) montrent des corrélations avec le carbone du groupement CH oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  64,6ppm et un carbone quaternaire à  $\delta_{\text{C}}$  134,1 ppm et des corrélations avec le carbone du groupement  $\text{CH}_2$  à  $\delta_{\text{C}}$  48,9 ppm et un carbone quaternaire résonnant à  $\delta_{\text{C}}$  136,5 ppm.

Les valeurs élevées de déplacement chimique de ces carbones montrent qu'ils sont déblindés et ne peuvent être que des carbones quaternaires éthyléniques. Toutes ces corrélations HMBC sont reportées dans la figure III.1.7

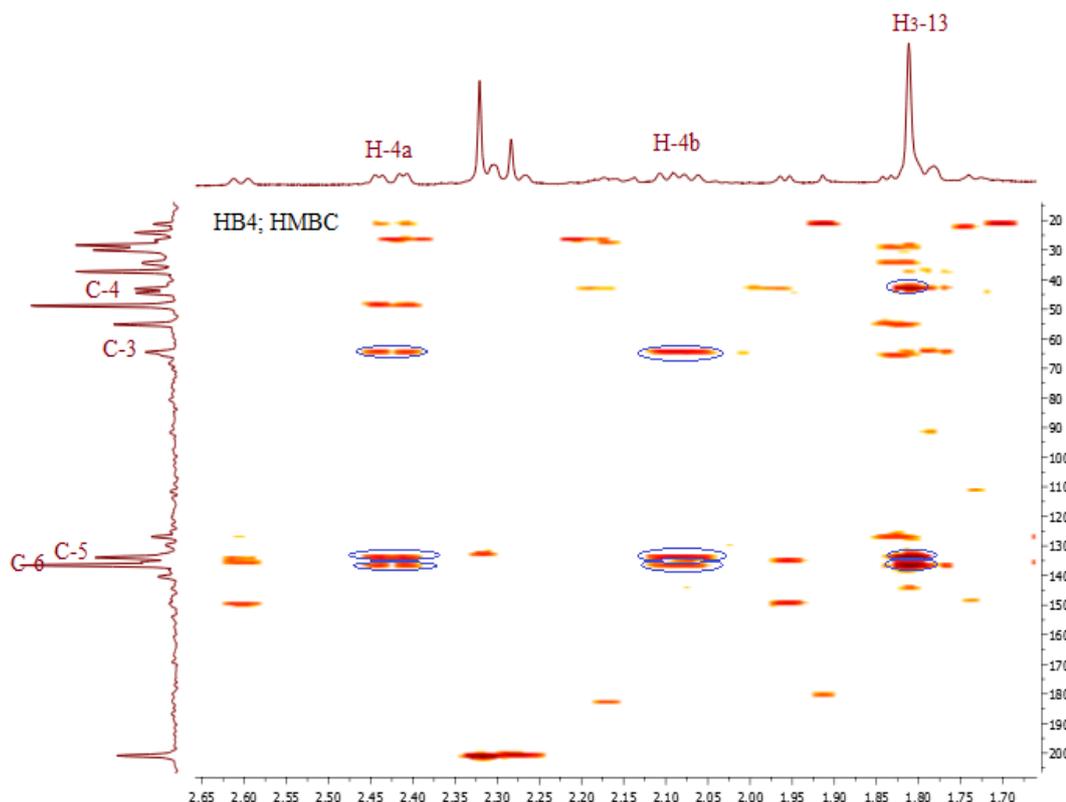


**Figure III.1.7 :** Entité 2 présente dans le composé **HB4**

Par ailleurs, le spectre HMBC montre clairement des corrélations entre les protons du groupement CH<sub>3</sub> résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_H$  1,81 ppm et le carbone quaternaire éthylénique résonant à  $\delta_C$  134,1 ppm et également des corrélations avec le deuxième carbone quaternaire éthylénique résonant à  $\delta_C$  136,5 ppm d'une part et d'autre part avec le carbone du groupement CH<sub>2</sub> résonant à  $\delta_C$  43,1 ppm, suggérant ainsi que le groupement CH<sub>3</sub> est porté par le carbone quaternaire éthylénique à  $\delta_C$  134,1 ppm, comme le montre l'entité 3 reportée dans la figure III.1.8.



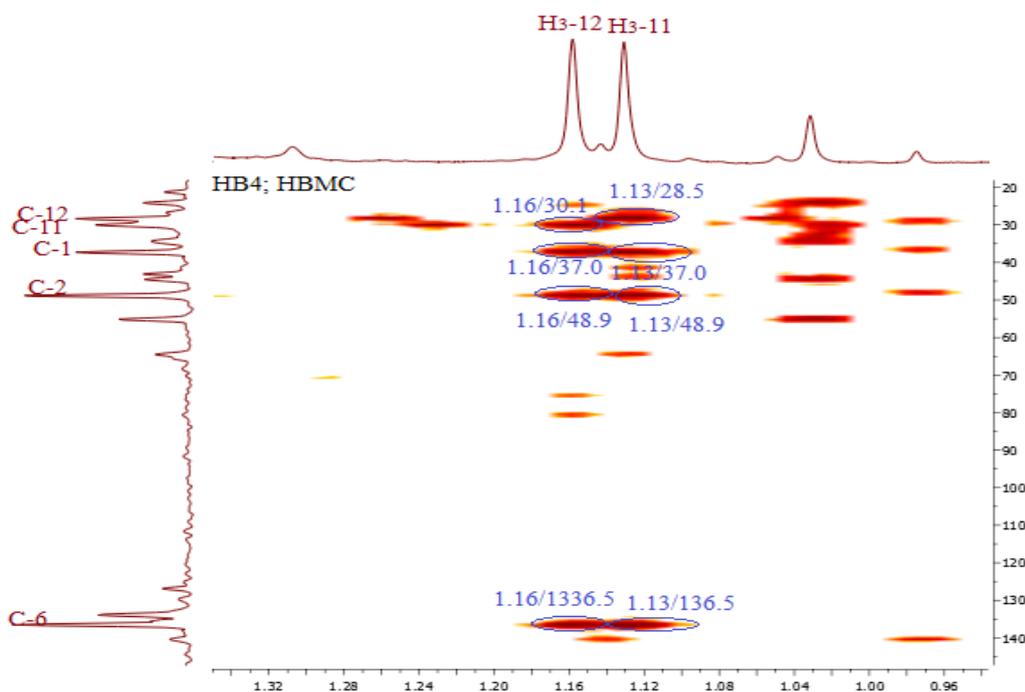
**Figure III.1.8** : Entité 3 présente dans le composé **HB4**



**Spectre III.1.13** : Spectre HMBC du composé **HB4** dans le CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>, étalement

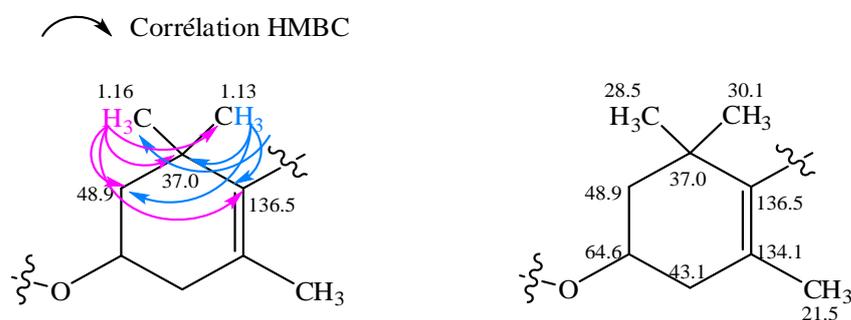
Toujours sur le spectre HMBC (Spectre III.1.14), les deux méthyles à  $\delta_H$  1,16 ppm et  $\delta_H$  1,13 ppm montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire résonant à  $\delta_C$  37,0

ppm ; cette situation suppose qu'ils sont tous les deux portés par ce carbone quaternaire vu leur multiplicité. Les protons de ces deux méthyles montrent des corrélations avec le carbone du CH<sub>2</sub> à  $\delta_C$  48,9 ppm et également le carbone quaternaire éthylénique à  $\delta_C$  136,5 ppm. Ceci permet de placer ce carbone quaternaire ( $\delta_C$  37,0 ppm) entre les deux carbones CH<sub>2</sub> ( $\delta_C$  48,9 ppm) et le carbone quaternaire éthylénique ( $\delta_C$  136,5 ppm).



**Spectre III.1.14** : Spectre HMBC du composé **HB4** dans le CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>, étalement

Ces observations permettent de proposer la structure partielle, reportée dans la figure III.1.9

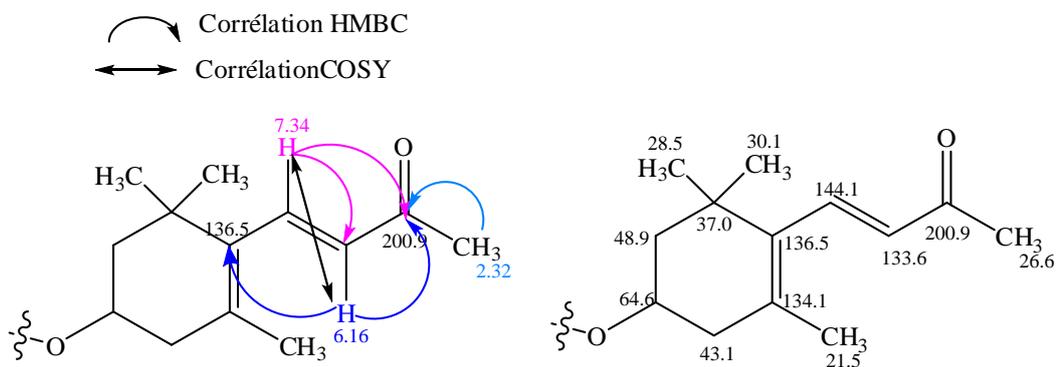


**Figure III.1.9** : Structure partielle du composé **HB4**

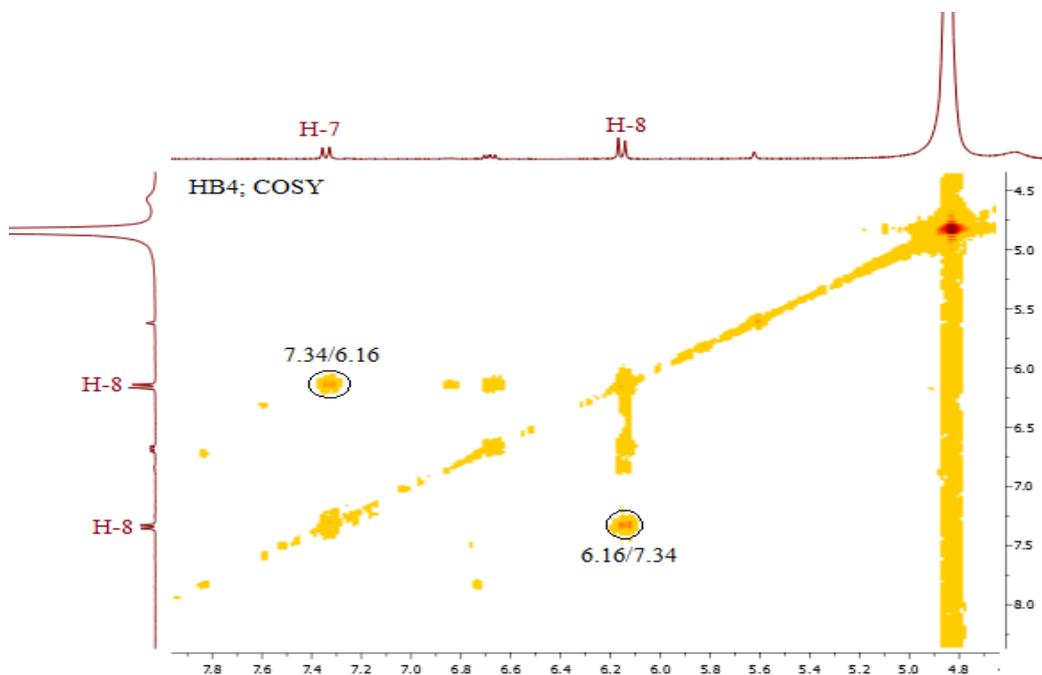
Un retour vers le spectre COSY étalé (Spectre III.1.15), montre une corrélation entre le premier proton éthylénique à  $\delta_H$  7,34 ppm (*d* ; *J* = 16,2 Hz) et le deuxième proton éthylénique à  $\delta_H$  6,16 ppm (*d* ; *J* = 16,8 Hz).

Par ailleurs, ce dernier montre une corrélation sur le spectre HMBC (Spectre III.1.16) avec le carbone quaternaire éthylénique ( $\delta_C$  136,5 ppm), ceci permet de placer le substituant portant la double liaison éthylénique sur ce dernier ( $\delta_C$  136,5 ppm).

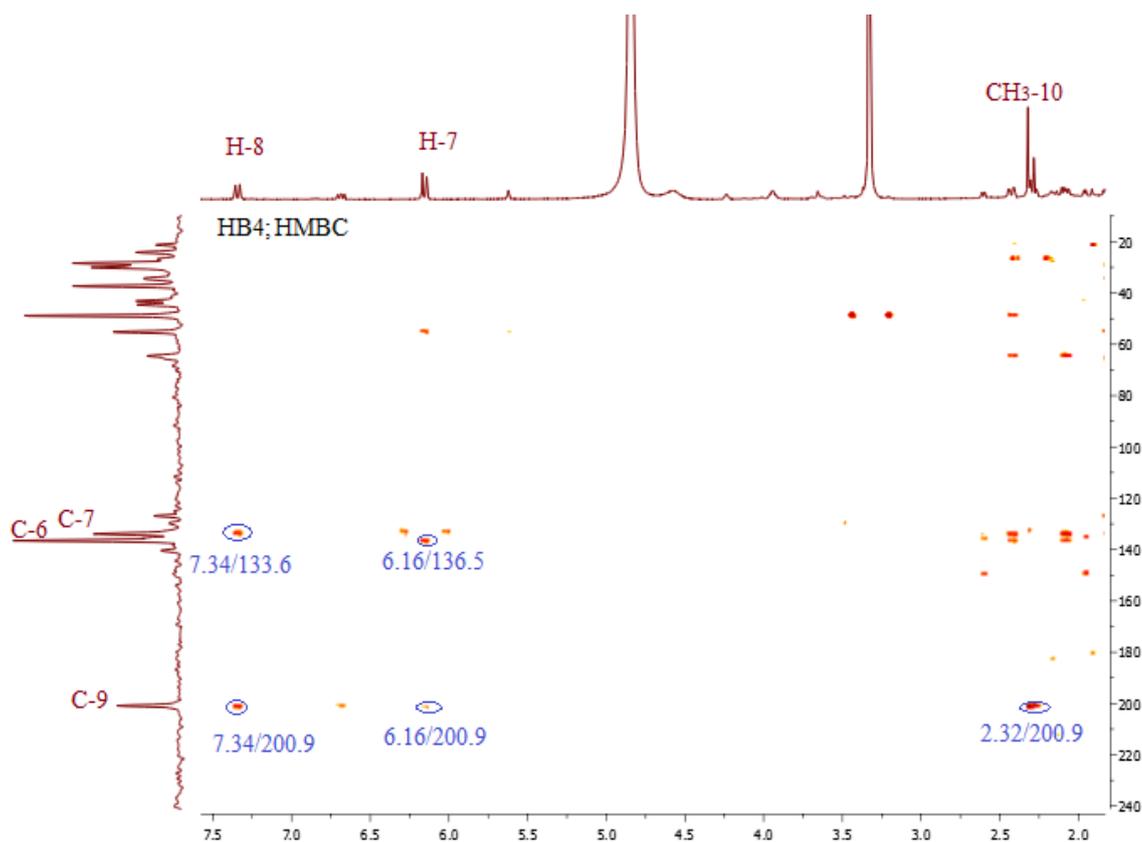
Le même spectre révèle bien que le proton éthylénique à  $\delta_H$  7,34 ppm corréle avec un carbone quaternaire résonant à  $\delta_C$  200,9 ppm. La valeur du déplacement chimique de ce carbone caractérise un carbonyle d'une cétone conjuguée. Ce dernier corréle également avec les protons du groupement  $CH_3$  résonant à  $\delta_H$  2,32 ppm. Ces corrélations permettent de proposer la structure partielle reportée dans la figure III.1.10.



**Figure III.1.10** : Structure partielle du composé **HB4**



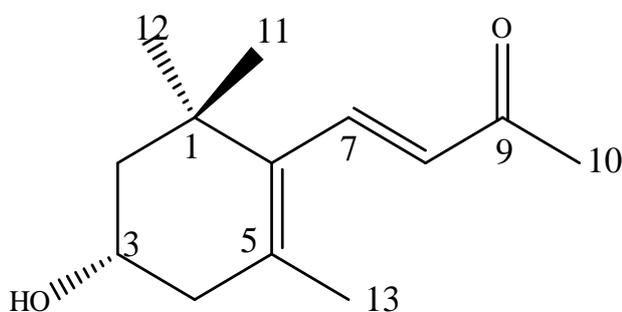
**Spectre III.1.15** : Spectre COSY du composé **HB4** dans le  $CH_3OH-d_4$ , étalement



**Spectre III.1.16** : Spectre HMBC du composé **HB4** dans le  $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$ , étalement

L'ensemble de cette analyse et par comparaison avec les données de la littérature montre qu'il s'agit d'un squelette monoterpénique de type  $\beta$ -ionone, ce squelette étant oxygéné en C-3. Les déplacements chimiques des protons et des carbones de cette entité monoterpénique, sont en parfait accord avec ceux du (-)-**3-hydroxy- $\beta$ -ionone** [3]. Cette molécule est nouvelle pour le genre *Heliotropium*.

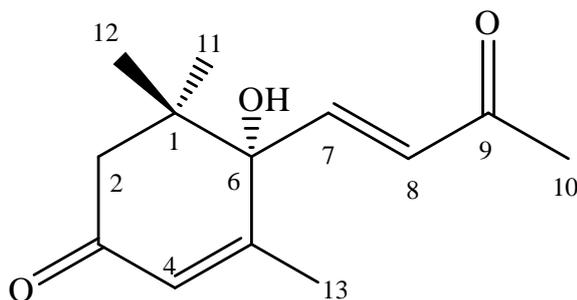
L'ensemble de ces données résumées dans le tableau III.1.3, mène à la structure reportée dans la figure III.1.11



**Figure III.1.11** : Structure finale du composé **HB4**, (-)-**3-hydroxy- $\beta$ -ionone**

Tableau III.1.3 : Données spectrales de RMN du composé HB4

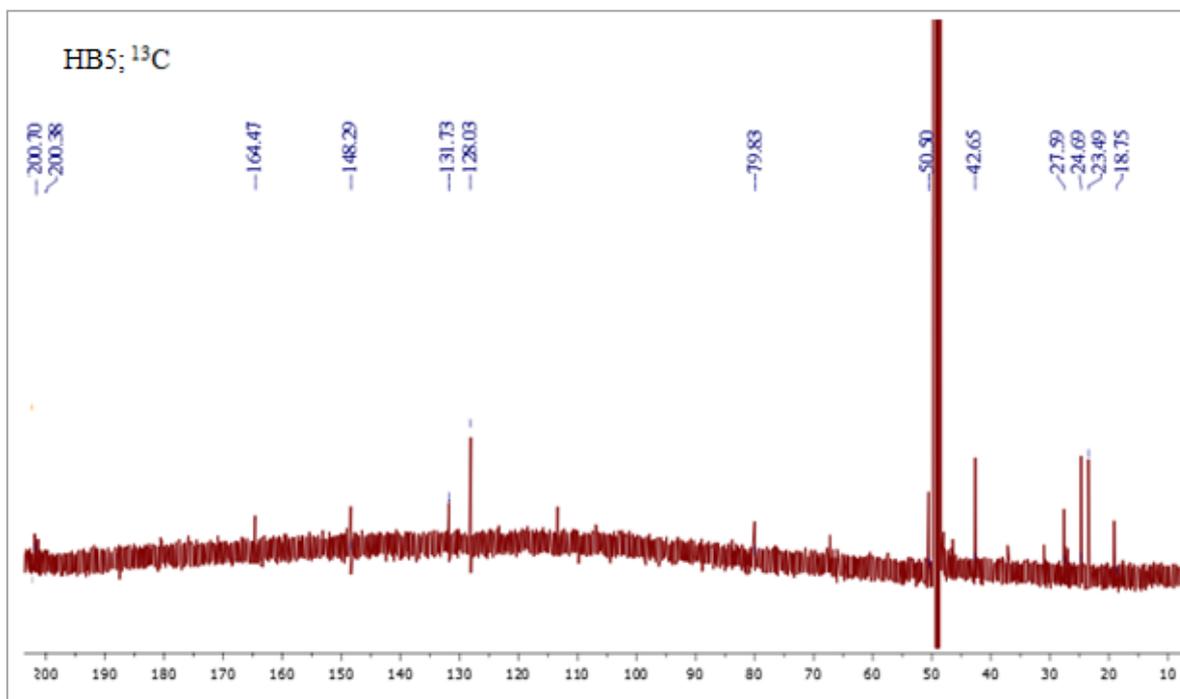
Positions	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, <i>J</i> en Hz)	HMBC (H-C)
1	37,0	-	
2a	48,9	1,78	3, 4, 1, 11
2b		1,49 ( <i>t</i> ; 12,0)	3, 4
3	64,6	3,94 <i>m</i>	
4a	43,1	2,43 ( <i>dd</i> ; 17,4; 5,4)	13, 2, 3, 5, 6
4b		2,08 ( <i>dd</i> ; 17,4; 9,6)	3, 5, 6
5	134,1	-	
6	136,5	-	
7	144,1	7,34 ( <i>d</i> ; 16,2)	8, 9
8	133,6	6,16 ( <i>d</i> ; 16,8)	10, 6, 9
9	200,9	-	
10	26,6	2,32 (3H ; <i>s</i> )	8, 9
11	30,1	1,13 (3H ; <i>s</i> )	1, 2, 6
12	28,5	1,16 (3H ; <i>s</i> )	1, 11
13	21,5	1,81 (3H ; <i>s</i> )	5, 4, 3, 6, 7

III.1.2.4. Elucidation structurale du composé **HB5**

L'examen du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Spectre III.1.17) de ce composé montre la présence de 13 atomes de carbone reportés comme suit :

- Deux groupements carbonyles à  $\delta_{\text{C}}$  200,7 ppm et  $\delta_{\text{C}}$  200,4 ppm.
- Quatre carbone éthyléniques à  $\delta_{\text{C}}$  164,5 ppm,  $\delta_{\text{C}}$  148,3 ppm,  $\delta_{\text{C}}$  131,7 ppm et  $\delta_{\text{C}}$  128,0 ppm.
- Quatre groupements  $\text{CH}_3$  à  $\delta_{\text{C}}$  27,6 ppm,  $\delta_{\text{C}}$  24,7 ppm,  $\delta_{\text{C}}$  23,5 ppm et  $\delta_{\text{C}}$  18,8 ppm.
- Un carbone oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  79,8 ppm.
- Autres carbones à  $\delta_{\text{C}}$  42,7 ppm et  $\delta_{\text{C}}$  50,5 ppm.

Ces informations laissent supposer que ce composé, présente un squelette de type norisoprenoïde  $\text{C}_{13}$ .



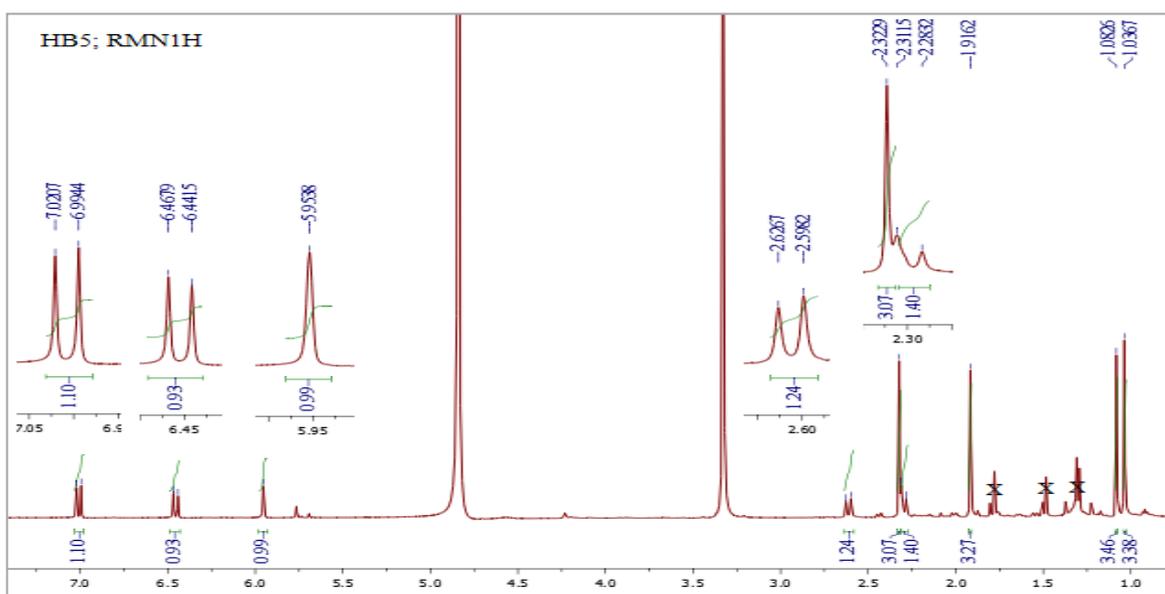
Spectre III.1.17 : Spectre RMN $^{13}\text{C}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ; 150 MHz) du composé **HB5**

L'analyse simultanée des spectres RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.1.18), HSQC (spectre III.1.19) et COSY (Spectre III.1.20) montre la présence de :

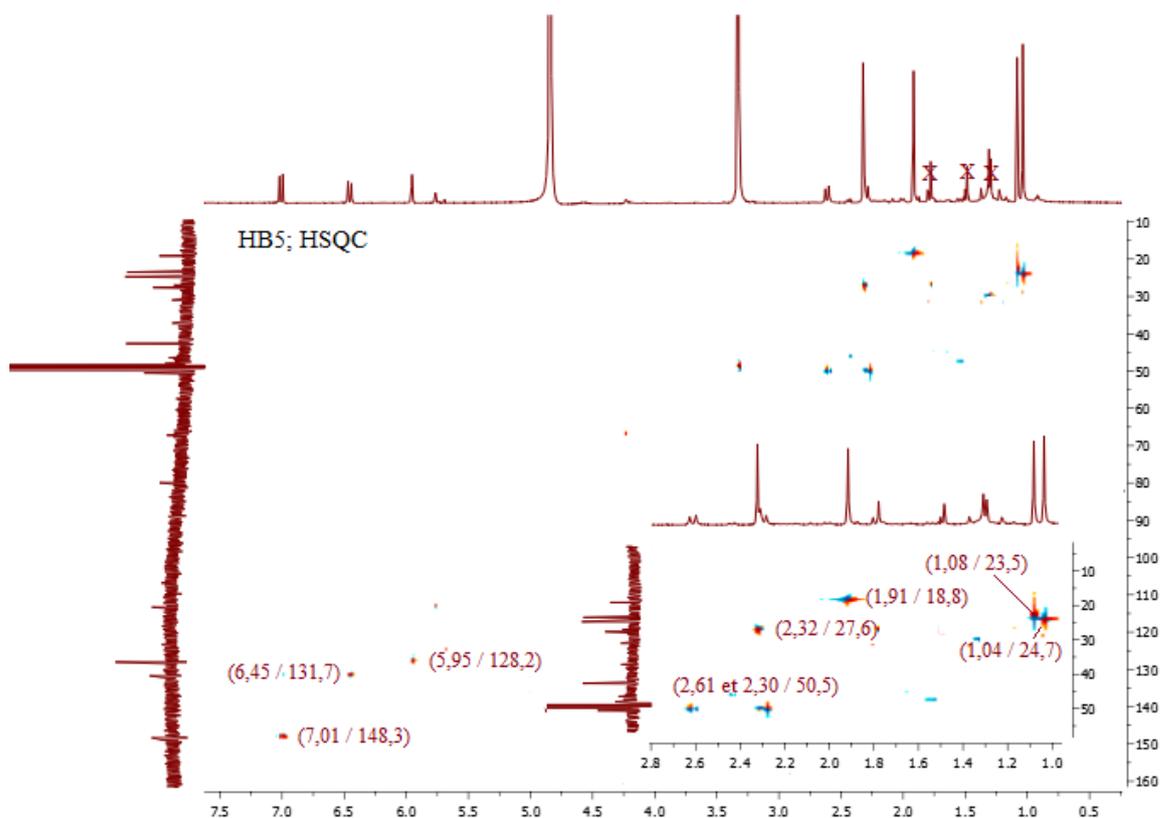
- Un doublet ( $J = 15,8$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  7,01 ppm corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  148,3 ppm
- Un doublet ( $J = 15,8$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  6,45 ppm corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  131,7 ppm

les valeurs des déplacements chimiques des 2H ainsi que la valeur de la constante de couplage ( $J = 15,8$  Hz) indiquent clairement la présence d'un groupement CH=CH de configuration *trans*. Ceci est d'ailleurs confirmé par les taches de corrélation observées sur le spectre COSY.

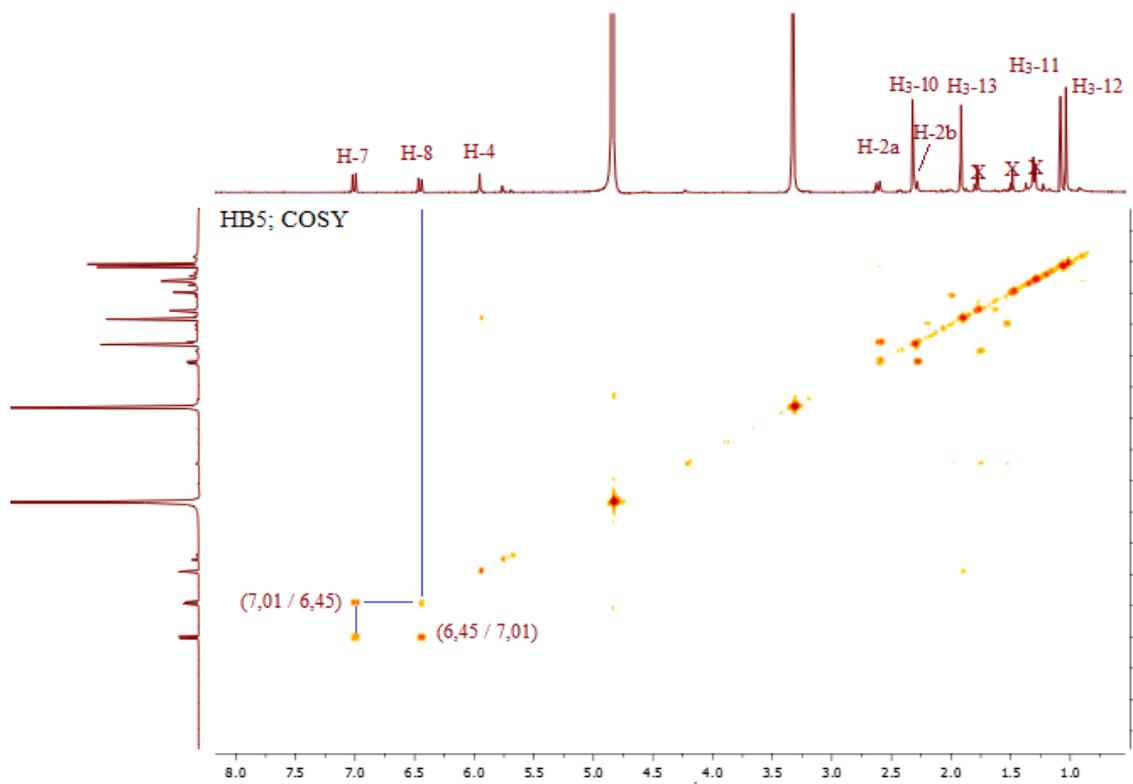
- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à  $\delta_H$  5,95 ppm corrélant sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_C$  128,2 ppm. les valeurs des déplacements chimiques indiquent qu'il est éthylénique.
- Un doublet ( $J = 17,1$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  2,61 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_C$  50,5 ppm. Ce même carbone montre une autre tâche de corrélation avec un deuxième proton qui apparaît sur le spectre RMN<sup>1</sup>H sous forme d'un doublet ( $J = 17,0$  Hz) à  $\delta_H$  2,30 ppm permettant de déduire que ces 2H sont diastérotopiques.
- Quatre signaux d'intégration 3H chacun sous forme d'un singulet indiquant la présence de quatre groupements méthyle à  $\delta_H$  2,32 ppm ( $\delta_C$  27,6 ppm),  $\delta_H$  1,91 ppm ( $\delta_C$  18,8 ppm),  $\delta_H$  1,08 ppm ( $\delta_C$  23,5 ppm) et  $\delta_H$  1,04 ppm ( $\delta_C$  24,7 ppm).



**Spectre III.1.18** : Spectre RMN<sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> ; 600 MHz) du composé **HB5**

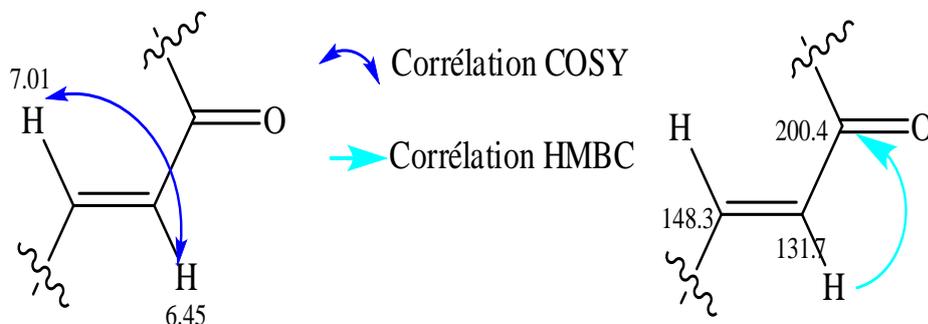


Spectre III.1.19 : Spectre HSQC du composé **HB5** dans le  $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$



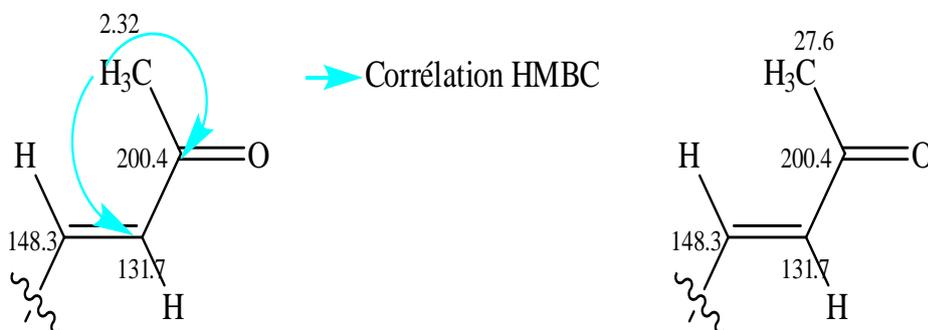
Spectre III.1.20 : Spectre COSY du composé **HB5** dans le  $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$

L'examen du spectre de l'expérience HMBC (Spectre III.1.21) permet d'avoir les corrélations H-C à travers 2 et 3 liaisons. En effet, les deux protons éthyléniques ( $\delta_H$  7,01 et 6,45 ppm) montrent une tache de corrélation avec le carbone du carbonyle à  $\delta_C$  200,4 ppm. Cette observation indique la présence d'un groupement carbonyle conjugué avec la double liaison de configuration *trans* comme reporté dans la figure III.1.12.

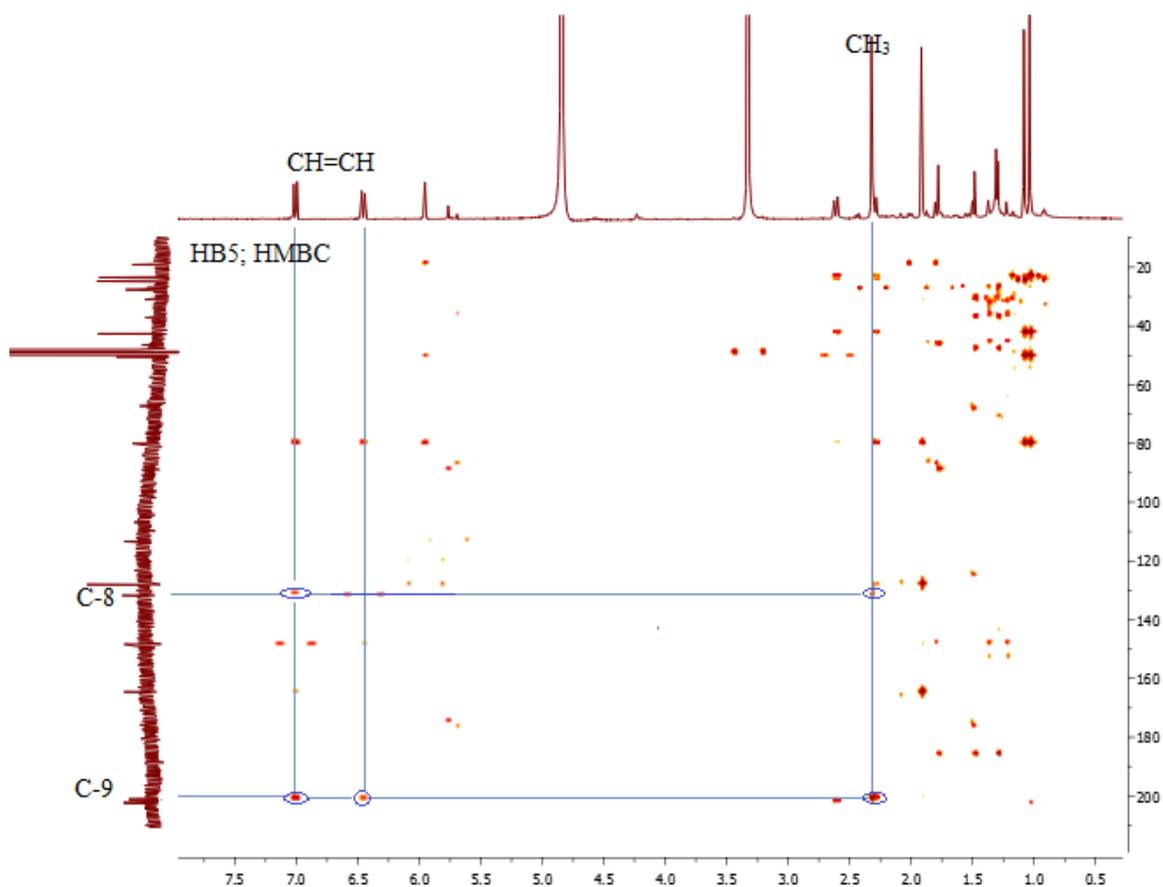


**Figure III.1.12** : Entité 1 présente dans la molécule.

Par ailleurs, le groupement  $\text{CH}_3$  ( $\delta_H$  2,32,  $\delta_C$  27,6) ppm montre sur le spectre HMBC, une corrélation avec le même carbonyle ( $\delta_C$  200,4 ppm) et le carbone du CH éthylénique à  $\delta_H$  6,45 ppm, ceci permet de déduire la présence de l'entité 2 reportée dans la figure III.1.13

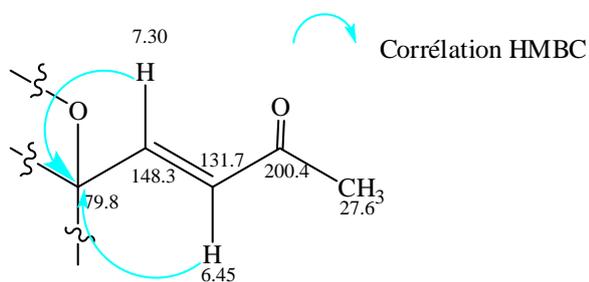


**Figure III.1.13** : Entité 2 présente dans la molécule.



**Spectre III.1.21** : Spectre HMBC du composé **HB5** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$

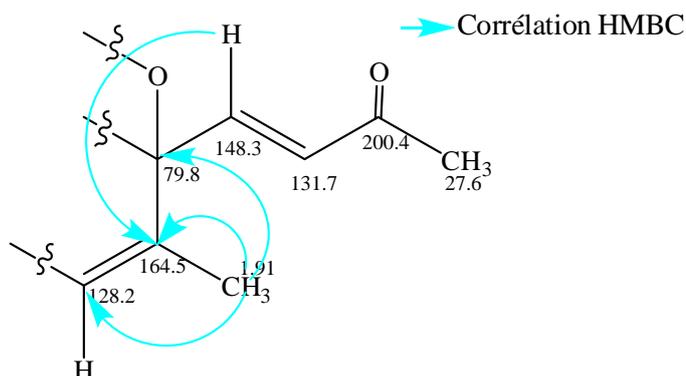
Toujours, sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre III.1.22), les deux protons de groupement  $\text{CH}=\text{CH}$  ( $\delta_{\text{H}}$  7,01 et  $\delta_{\text{H}}$  6,45 ppm) montrent une tache de corrélation avec un carbone quaternaire oxygéné hybridé  $\text{sp}^3$  à  $\delta_{\text{C}}$  79,8 ppm, indiquant que ce groupement éthylénique est lié au carbone quaternaire oxygéné hybridé  $\text{sp}^3$  comme reporté sur la figure III.1.14



**Figure III.1.14** : Structure partielle du composé **HB5**

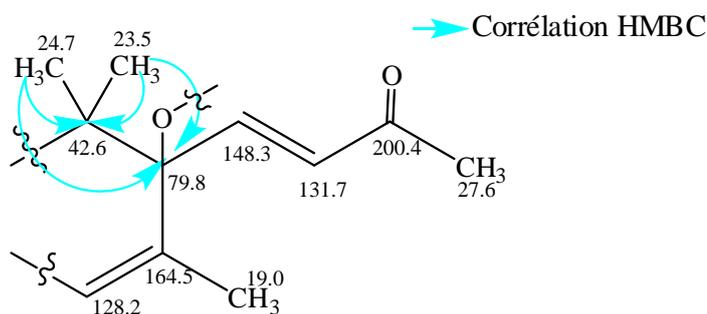
Par ailleurs, le proton éthylénique à  $\delta_{\text{H}}$  7,01 ppm montre une tache de corrélation sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre III.1.22) avec le carbone quaternaire éthylénique à  $\delta_{\text{C}}$  164,5 ppm. Toujours sur le même spectre, ce carbone montre une

corrélation avec les protons du méthyle résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_H$  1,91 ppm ( $\delta_C$  18,8 ppm). Ceci suppose que le groupement  $CH_3$  est porté par le carbone à  $\delta_C$  164,5 ppm. Ainsi, cette attribution est confirmée par les corrélations des protons du  $CH_3$  avec le carbone quaternaire oxygéné hybridé  $sp^3$  à  $\delta_C$  79,8 ppm et le carbone du groupement  $CH$  éthylénique à  $\delta_C$  128,2 ppm. A ce stade, nous proposons la structure partielle du composé **HB5** comme présenté dans la figure III.1.15.



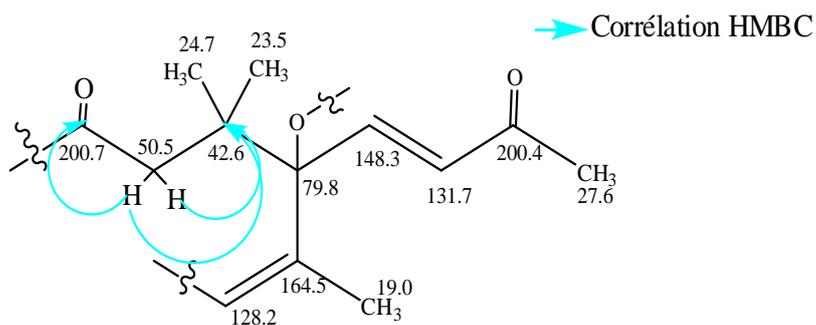
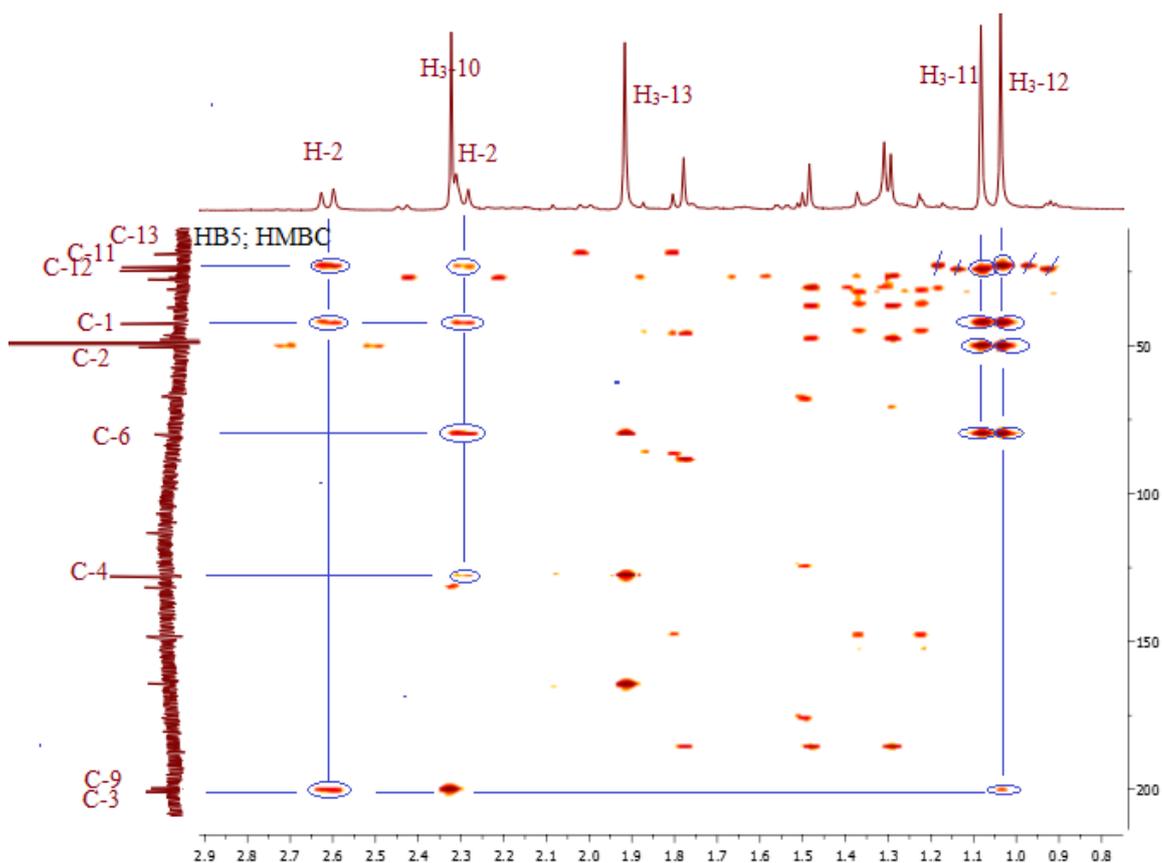
**Figure III.1.15** : Structure partielle du composé **HB5**

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre III.1.22), les deux méthyles ( $\delta_H$  1,08 ppm et  $\delta_H$  1,04 ppm) montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire résonant à  $\delta_C$  42,6 ppm ; cette situation suppose qu'ils sont tous les deux portés par ce carbone quaternaire vu leur multiplicité. Les protons de ces deux méthyles montrent également des corrélations avec le carbone quaternaire à  $\delta_C$  79,8 ppm, ceci indique que ce dernier carbone ( $\delta_C$  79,8 ppm) est lié directement au précédent ( $\delta_C$  42,6 ppm).



**Figure III.1.16** : Structure partielle du composé **HB5**

Les deux protons diastéréotopiques du groupement  $CH_2$  ( $\delta_H$  2,61 ppm et  $\delta_H$  2,30 ppm) montrent sur le spectre HMBC des taches de corrélations avec le carbone précédent à  $\delta_C$  42,6 ppm et le carbone du carbonyle à  $\delta_C$  200,7 ppm comme reporté dans la figure III.1.17.

Figure III.1.17 : Structure partielle du composé **HB5**Spectre III.1.22 : Spectre HMBC du composé **HB5** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$  ; étalement

Par ailleurs, le spectre HMBC (Spectre III.1.23) montre clairement des corrélations entre un des protons ( $\delta_{\text{H}}$  2,30 ppm) du  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{C}}$  50,5ppm) et le CH éthylénique ( $\delta_{\text{C}}$  128,2 ppm). De même, le proton du CH éthylénique ( $\delta_{\text{H}}$  5,95 ppm, 128,2 ppm) avec le carbone du  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{C}}$  50,5ppm). Ceci permet d'avoir la fermeture du cycle comme reporté dans la figure III.1.18

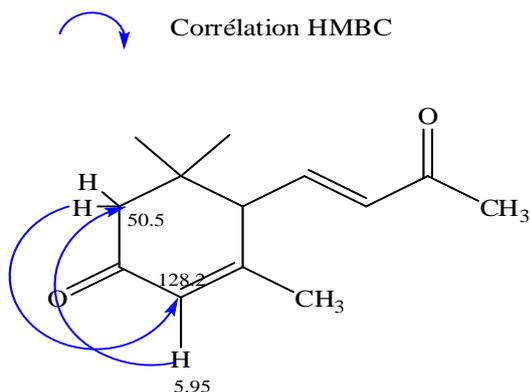
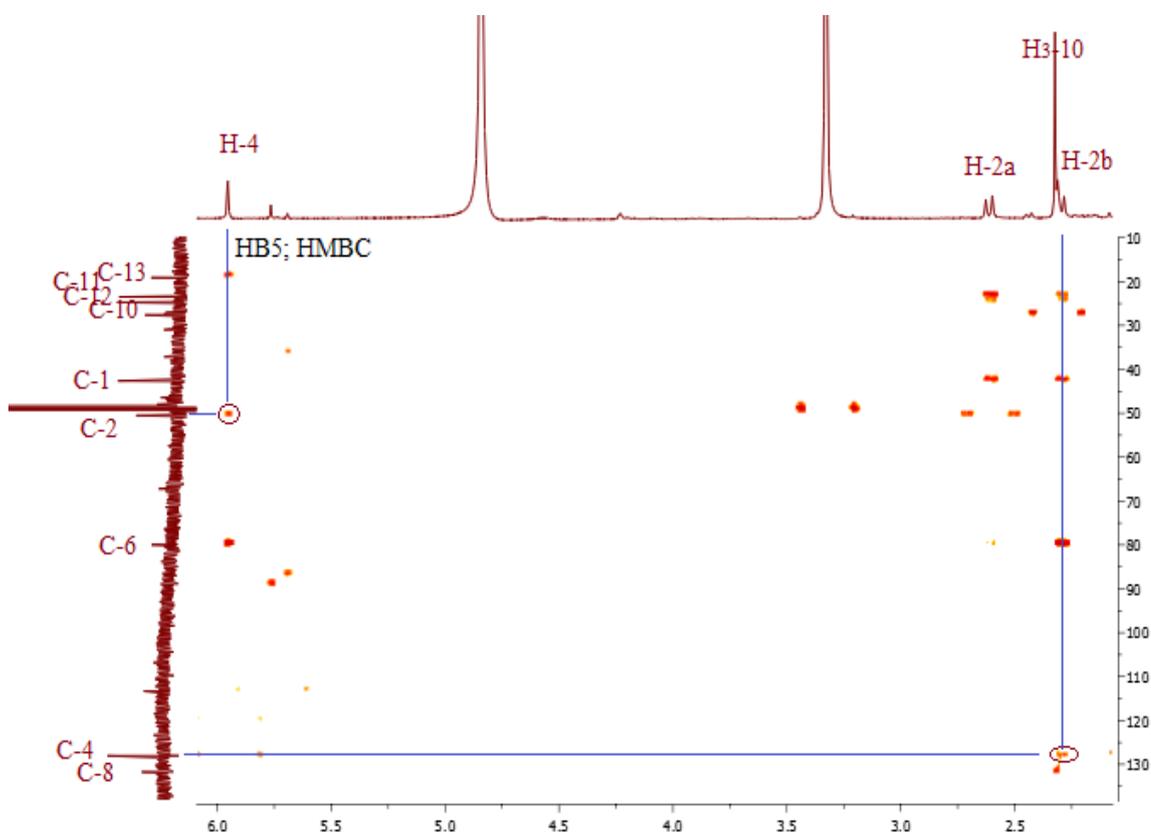


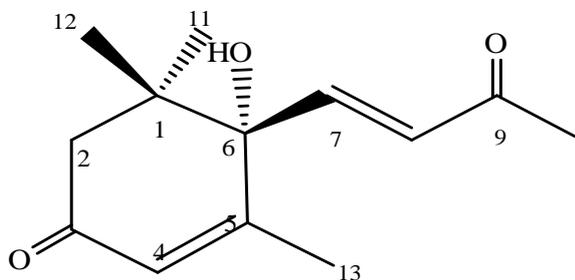
Figure III.1.18 : La structure plane du composé HB5



Spectre III.1.23 : Spectre HMBC du composé **HB5** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$  ; étalement

L'ensemble de cette analyse et toujours en se reportant aux données de la littérature montre qu'il s'agit d'un squelette monoterpénique comportant 13 atomes de carbones nommé nor-isoprenoïde. Les déplacements chimiques des protons et des carbones de cette entité monoterpénique, sont en parfait accord avec ceux du **(6S)-6-hydroxy-4,7-mégastigmadiène-3,9-dione** connu sous le nom **dehydrovomifoliol** [4].

Les données spectroscopiques de cette molécule sont conformes, d'après la littérature au **Dehydrovomifoliol** reportée dans la figure III.1.19. Cette molécule est nouvelle pour le genre *Heliotropium*.

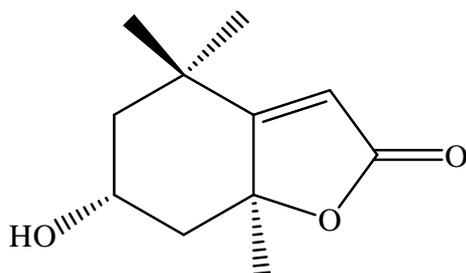


**Figure III.1.19** : Structure du composé **HB5**, (6S)-6-hydroxy-4,7-mégastigmadiène-3,9-dione.

Les données RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C et les corrélations HMBC sont reportées dans le Tableau III.1.4.

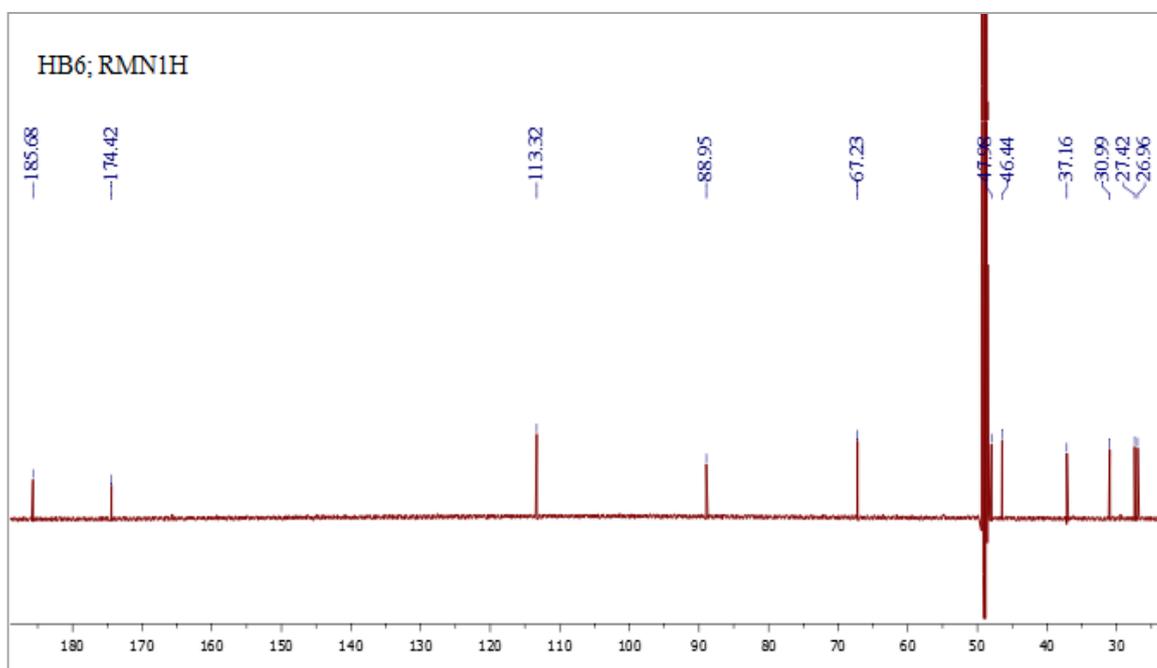
**Tableau III.1.4** : Données spectrales de RMN du composé **HB5**.

Positions	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, <i>J</i> en Hz)	HMBC H-C
1	42,6	-	
2a	50,5	2,61 ( <i>d</i> ; 17,1)	11, 1, 3
2b		2,30 ( <i>d</i> ; 17,0)	11, 1, 6, 4,
3	200,7	-	
4	128,2	5,95 <i>s</i>	13, 2, 6
5	164,5	-	
6	79,8	-	
7	148,3	7,01 ( <i>d</i> ; 15,8)	5, 6, 8, 9
8	131,7	6,45 ( <i>d</i> ; 15,8)	6, 7, 9
9	200,4	-	
10	27,6	2,32 (3H ; <i>s</i> )	8, 9
11	23,5	1,08 (3H ; <i>s</i> )	12, 1, 2, 6
12	24,7	1,04 (3H ; <i>s</i> )	11, 1, 2, 6, 3
13	18,8	1,91 (3H ; <i>s</i> )	6, 4, 5

III.1.2.5. Elucidation structurale du composé **HB6**

Le spectre RMN<sup>13</sup>C (Spectre III.1.24) de ce composé montre la présence de 11 atomes de carbones.

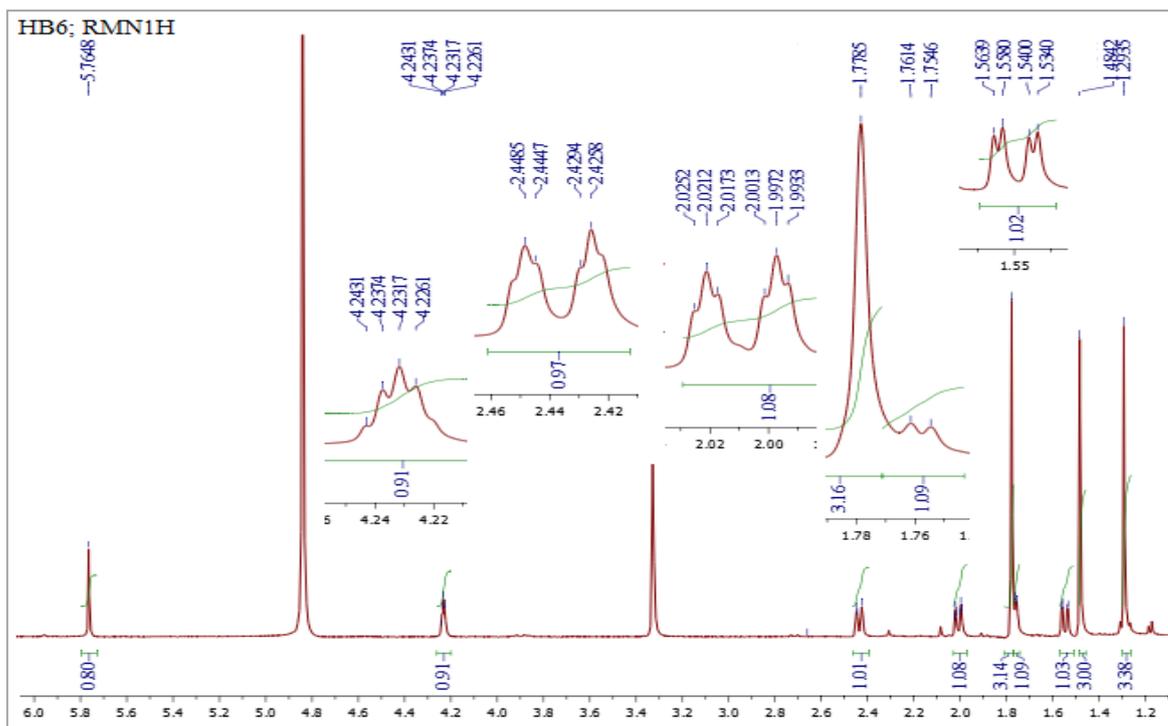
- Un signal à  $\delta_C$  174,4 ppm caractéristique d'une fonction  $\gamma$  lactone
- Un carbone éthylénique à  $\delta_C$  113,3 ppm.
- Trois signaux à  $\delta_C$  31,0 ; 27,4 et 27,0 ppm indiquant la présence de trois groupements méthyle.
- Deux carbones oxygénés à  $\delta_C$  88,9 et 67,3 ppm.
- D'autres carbones à  $\delta_C$  185,7 ; 48,0 ; 46,4 et 37,2 ppm.



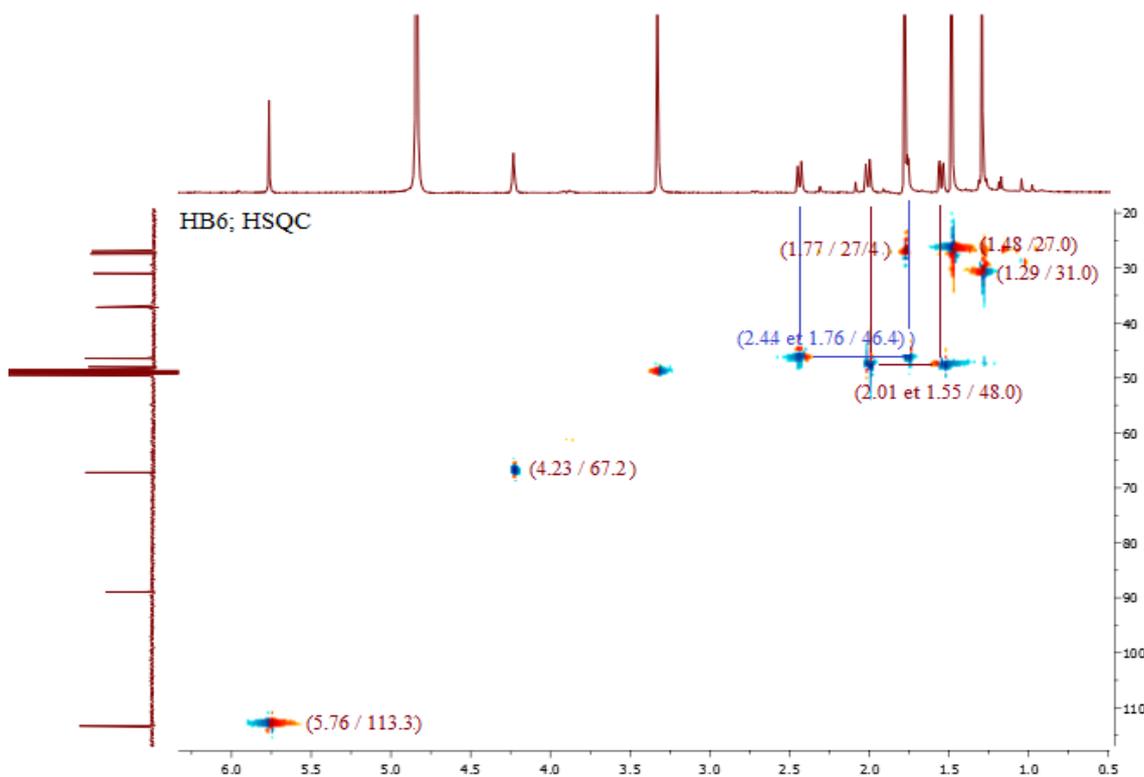
**Spectre III.1.24** : Spectre RMN<sup>13</sup>C (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> ; 150 MHz) du composé **HB6**

L'analyse simultanée des spectres RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.1.25) et HSQC (Spectre III.1.26) permet de relever dans cette molécule la présence de :

- Un signal à  $\delta_H$  5,76 ppm d'intégration 1H sous forme d'un singulet corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  113,3 ppm. Vu les valeurs de déplacement chimique du proton et de son carbone, ce CH ne peut être qu'éthylénique.
- Un quintuplet ( $J=3,4$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  4,23 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_C$  67,2 ppm. La multiplicité de ce proton indique que ce dernier est voisin à deux groupements méthylène.
- Un doublet de triplet ( $J = 13,6 ; 2,2$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  2,44 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_C$  46,4 ppm. Ce même carbone montre une autre tâche de corrélation avec un deuxième proton qui apparaît sur le spectre RMN<sup>1</sup>H sous forme d'un doublet ( $J=4,1$  Hz ;  $\delta_H$  1,8 ppm) permettant de déduire que ces 2H sont diastéréotopiques.
- Un groupement CH<sub>2</sub> dont les deux protons sont magnétiquement non équivalents et résonnent sous forme d'un doublet de triplet ( $J = 14,4 ; 2,4$  Hz) à  $\delta_H$  2,01 ppm pour le premier et sous forme d'un doublet de doublet ( $J = 14,3 ; 3,6$  Hz) à  $\delta_H$  1,55 ppm pour le second, montrant une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le même carbone à  $\delta_C$  48,0 ppm.
- Trois signaux d'intégration 3H chacun sous forme d'un singulet indiquant la présence de trois groupements méthyles à  $\delta_H$  1,29 ppm ( $\delta_C$  31,0 ppm),  $\delta_H$  1,77 ppm ( $\delta_C$  27,4 ppm) et  $\delta_H$  1,48 ppm ( $\delta_C$  27,0 ppm). vu leurs multiplicité (singulet) ces trois groupements ne peuvent être portés que par des carbones quaternaires.
- les trois autres carbones signalés précédemment à  $\delta_C$  185,7 ppm,  $\delta_C$  88,9 ppm et  $\delta_C$  37,2 ppm ne présentent aucune corrélation sur le spectre HSQC et don ne peuvent être que des carbones quaternaires.



Spectre III.1.25 : Spectre RMN<sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> ; 600 MHz) du composé **HB6**



Spectre III.1.26 : Spectre HSQC du composé **HB6** dans le CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>

Sur le spectre COSY (Spectre III.1.27), le proton du CH sp<sup>3</sup> à  $\delta_C$  67,2 ppm résonant sous forme d'un quintuplet à  $\delta_H$  4,23 ppm ( $J = 3,4$  Hz) montre des taches de corrélation avec les

protons du CH<sub>2</sub> ( $\delta_C$  48,0 ppm) résonnant à  $\delta_H$  2,01 ppm (*dt* ;  $J = 14,4$  ; 2,4 Hz) pour le premier, et à  $\delta_H$  1,55 ppm (*dd* ;  $J = 14,3$  ; 3,6 Hz) pour le second. Ce même proton ( $\delta_H$  4,23 ppm) montre deux autres taches de corrélation avec les protons du deuxième CH<sub>2</sub> ( $\delta_C$  46,4 ppm) résonnant à  $\delta_H$  2,44 ppm (*dt* ;  $J = 13,6$  ; 2,2 Hz) pour le premier, et à  $\delta_H$  1,76 ppm (*d* ;  $J = 4,1$  Hz) pour le second.

Les valeurs des déplacements chimiques de ce proton ( $\delta_H$  4,23 ppm) et de son carbone ( $\delta_C$  67,2 ppm) indiquent clairement l'oxygénation de cette position. Alors que la valeur de la constante de couplage ( $J = 3,6$  Hz) indique une interaction axiale-équatoriale avec les protons des deux groupements CH<sub>2</sub>, comme reporté dans la figure III.1.20

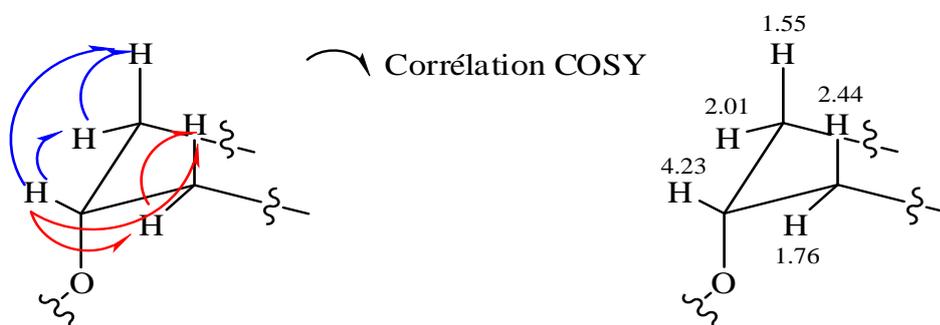
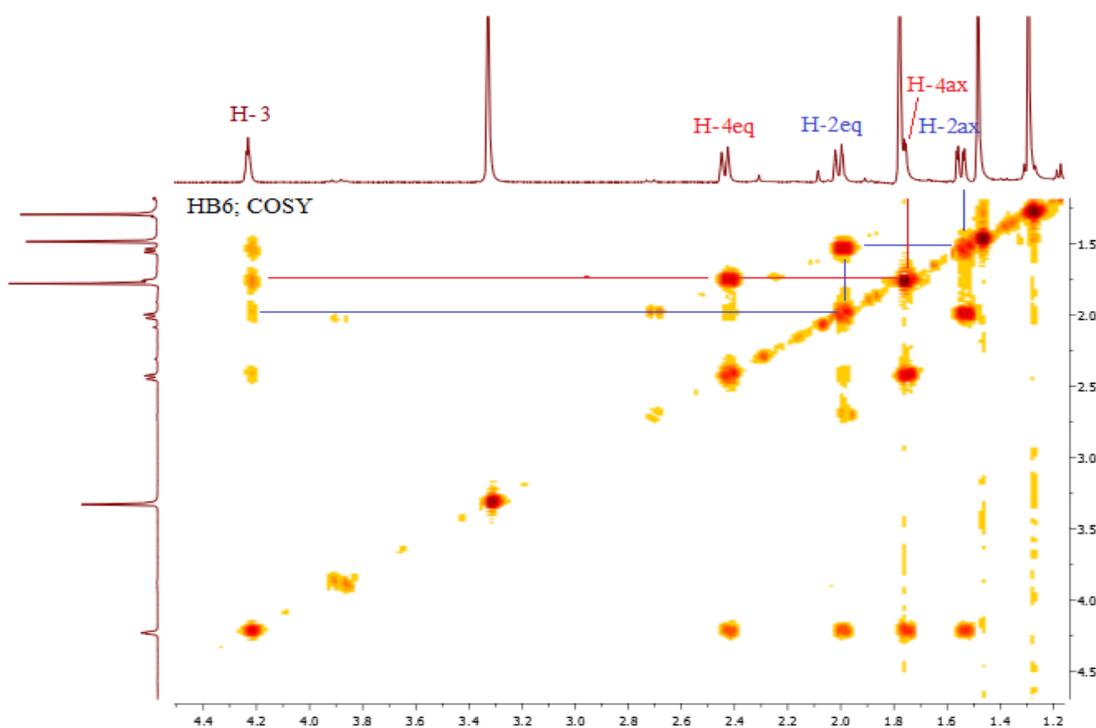


Figure III.1.20 : Entité 1 présente dans le composé **HB6**

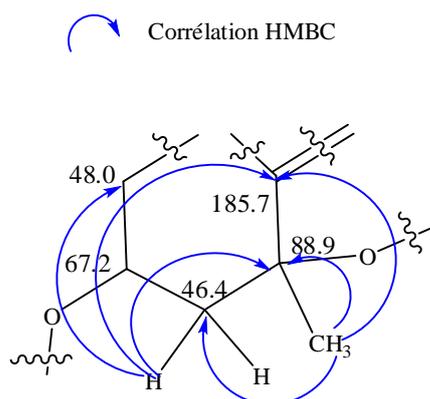


Spectre III.1.27 : Spectre COSY du composé **HB6** dans le CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>, étalement

Sur le spectre HMBC (spectre III.1.28), les protons du CH<sub>2</sub> ( $\delta_C$  46,4 ppm) montrent deux taches de corrélation avec deux carbones quaternaires, le premier hybridé sp<sup>3</sup> et oxygéné à  $\delta_C$  88,9 ppm et le second à  $\delta_C$  185,7 ppm.

Toujours sur le spectre HMBC, le carbone quaternaire oxygéné sp<sup>3</sup> ( $\delta_C$  88,9 ppm) donne une tache de corrélation avec les protons du méthyle résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_H$  1,77 ppm ( $\delta_C$  27,4 ppm), lesquels montrent à leur tour, deux taches de corrélation avec le carbone quaternaire à  $\delta_C$  185,7 ppm et le carbone du CH<sub>2</sub> à  $\delta_C$  46,4 ppm.

L'ensemble des observations récoltées de cette analyse permet de relier le groupement CH<sub>2</sub> ( $\delta_C$  46,4 ppm) avec le carbone quaternaire oxygéné sp<sup>3</sup> à  $\delta_C$  88,9 ppm d'une part, et d'autre part de placer sur ce même carbone, le groupement CH<sub>3</sub> à  $\delta_C$  27,4 ppm. Ce même groupement CH<sub>2</sub> ( $\delta_C$  46,4 ppm) corréle avec le carbone quaternaire à  $\delta_C$  185,7 ppm, ce dernier carbone montre une tache de corrélation avec les protons du CH<sub>3</sub> à 1,77 ppm, comme reporté dans la figure III.1.21.



**Figure III.1.21** : Entité 2 présente dans le composé **HB6**

Par ailleurs et toujours sur le spectre HMBC, les protons du groupement CH<sub>2</sub> ( $\delta_C$  48,0 ppm) montrent des taches de corrélation avec le carbone du groupement CH oxygéné ( $\delta_C$  67,2 ppm), le carbone quaternaire ( $\delta_C$  185,7 ppm) et le carbone quaternaire hybridé sp<sup>3</sup> à  $\delta_C$  37,2 ppm. Ce dernier carbone montre des taches de corrélation avec les protons des deux groupements méthyle résonant sous forme de singulet chacun à  $\delta_H$  1,48 ppm ( $\delta_C$  27, 0 ppm) et à  $\delta_H$  1,29 ppm ( $\delta_C$  31,0 ppm).

Ces données permettent de déduire que ces méthyles sont tous les deux portés par ce carbone quaternaire sp<sup>3</sup> et que ce dernier est lié au carbone quaternaire à  $\delta_C$  185,7 ppm. Vu la valeur de déplacement chimique, ce dernier ne peut être qu'éthylénique, comme reporté dans la figure III.1.22.

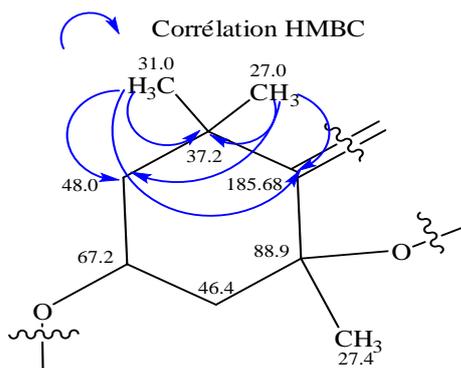
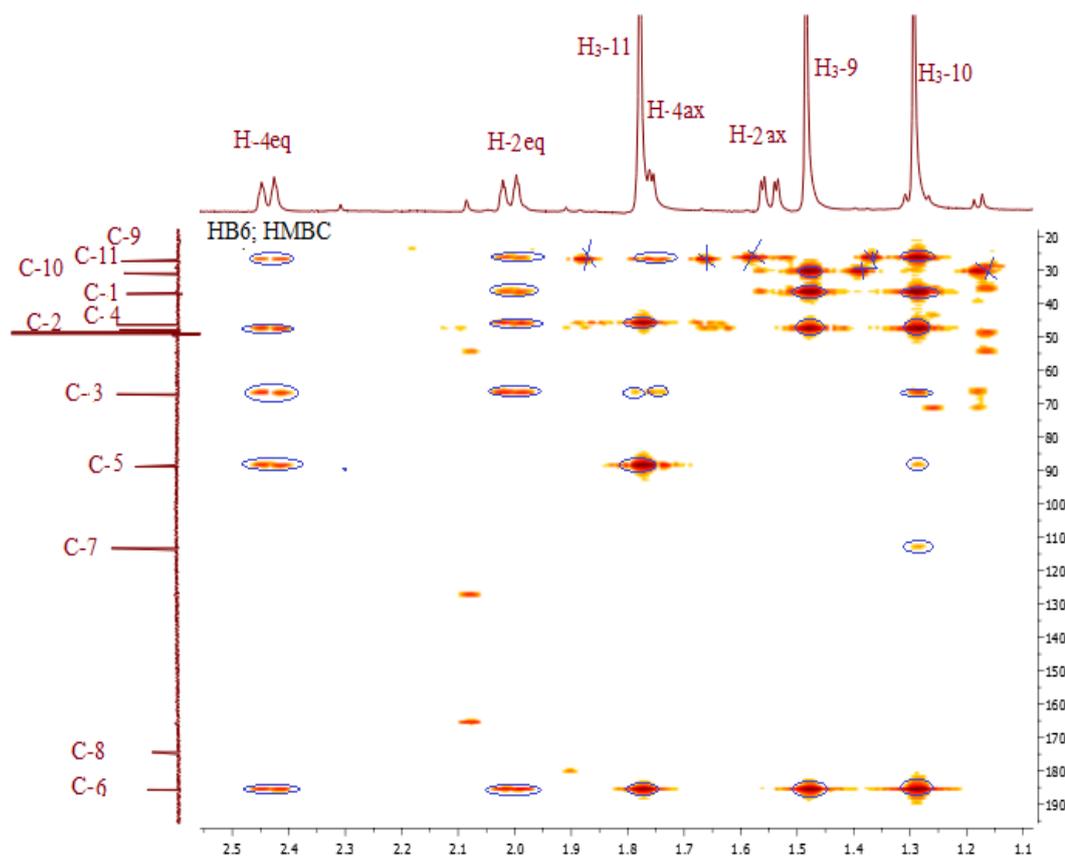


Figure III.1.22 : Entité 3 présente dans le composé **HB6**



Spectre III.1.28 : Spectre HMBC du composé **HB6** dans le CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>, étalement

Un retour au spectre HMBC (Spectre III.1.29) permet de repérer deux taches de corrélation entre le proton éthylénique (*s* ;  $\delta_{\text{H}}$  5,76 ppm ;  $\delta_{\text{C}}$  113,3 ppm) et le carbone quaternaire éthylénique à  $\delta_{\text{C}}$  185,7 ppm d'une part et le carbone du carbonyle d'une lactone à  $\delta_{\text{C}}$  174,4 ppm comme signalé précédemment. Ceci permet de proposer la structure plane reportée dans la figure III.1.23.

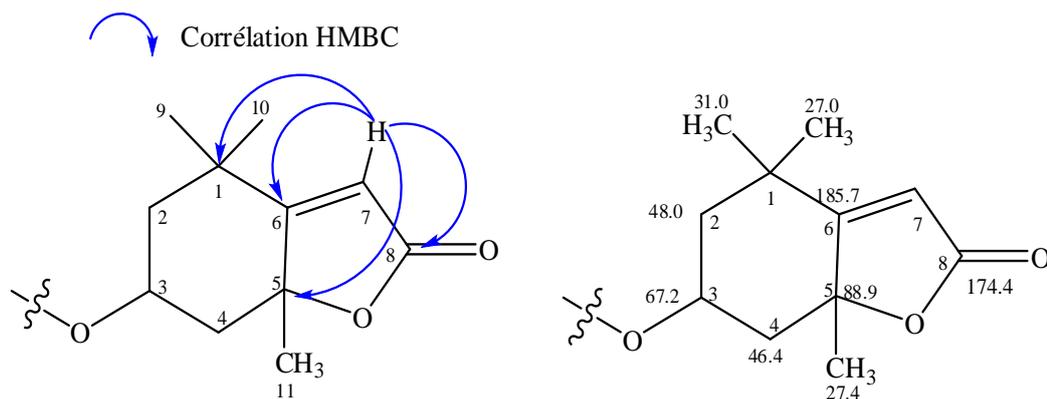
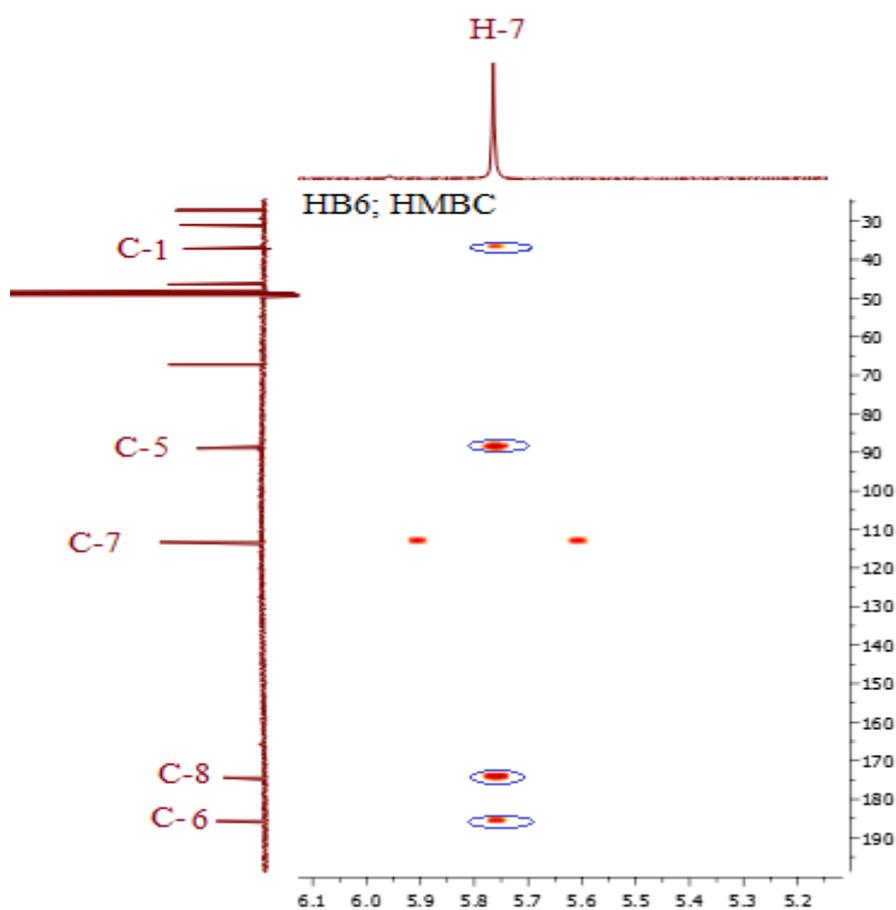


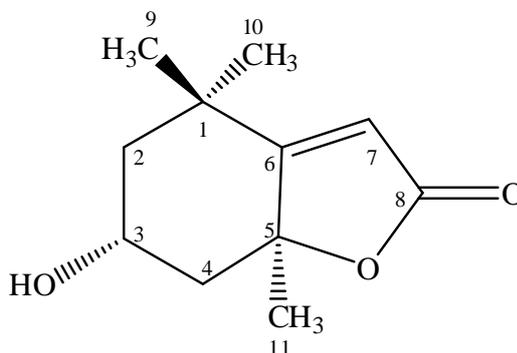
Figure III.1.23 : Entité 4 présente dans le composé **HB6**



Spectre III.1.29 : Spectre HMBC du composé **HB6** dans le  $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$ , étalement

L'analyse des spectres  $\text{RMN}^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC et COSY nous a permis d'identifier le produit **HB6** comme étant une molécule de type C-11 terpène lactone, déjà isolé de l'espèce *Heliotropium angiospermum* [5] et décrite sous le nom de **loliolide**.

L'ensemble des données spectrales est en bon accord avec ceux reportés dans la littérature [5] pour le même produit reporté dans la figure III.1.24.

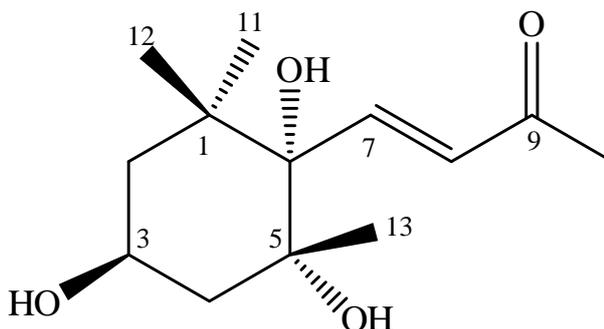


**Figure III.1.24 :** Structure finale du composé **HB6**, loliolide

Toutes ces données sont reportées dans le tableau III.1.5.

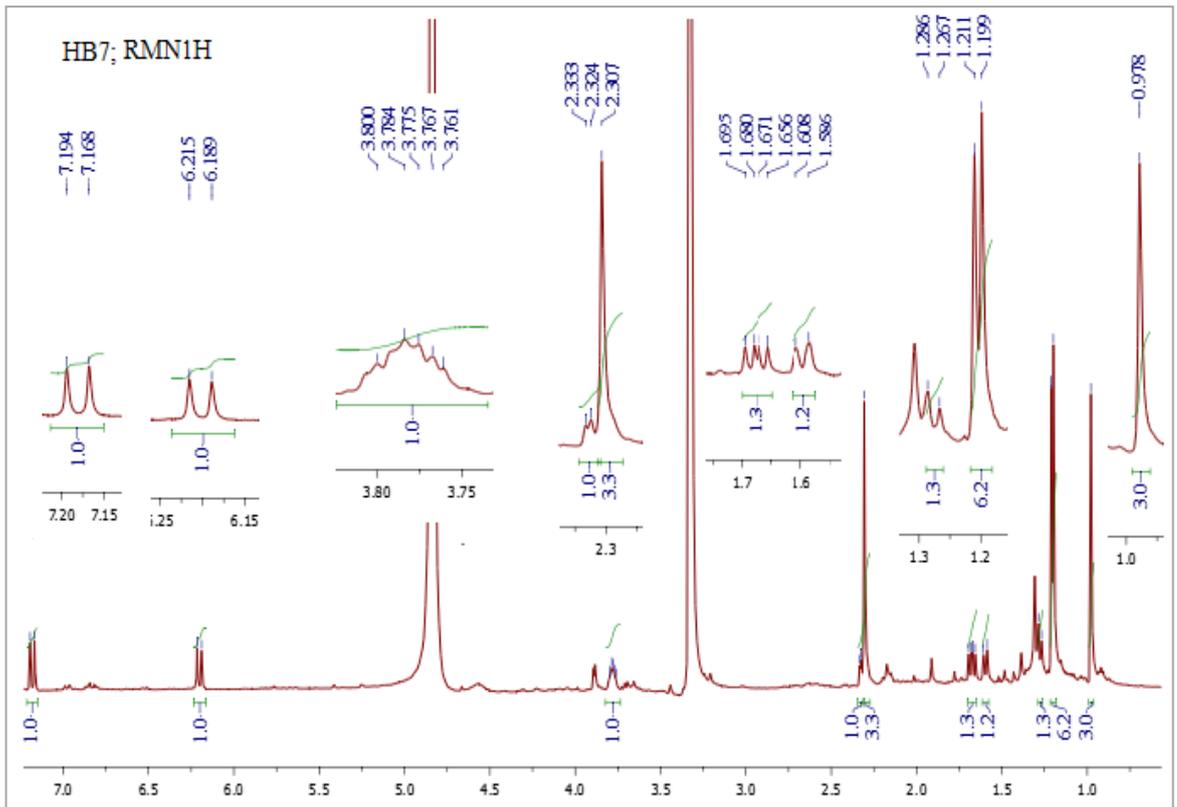
**Tableau III.1.5 :** Données spectrales de RMN du composé **HB6**

Positions	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm ; multiplicité ; $J$ en Hz)	HMBC H-C
1	37,2	-	-
2eq	48,0	2,01 ( <i>dt</i> ; 14,4; 2,4)	3, 4, 6
2ax		1,55 ( <i>dd</i> ; 14,3; 3,6)	9
3eq	67,2	4,23 ( <i>quint</i> ; 3,4)	
4eq	46,4	2,44 ( <i>dt</i> ; 13,6; 2,2)	11, 5, 3, 2, 6
4ax		1,76 ( <i>d</i> ; 4,1)	11; 5, 6
5	88,9	-	-
6	185,7	-	
7	113,3	5,76 <i>s</i>	1, 5, 8, 6
8	174,4	-	
9	27,0	1,48 (3H; <i>s</i> )	10, 1, 2, 6
10	31,0	1,29 (3H; <i>s</i> )	9, 7, 6, 5, 3, 2, 1
11	27,4	1,77 (3H; <i>s</i> )	4, 5, 6

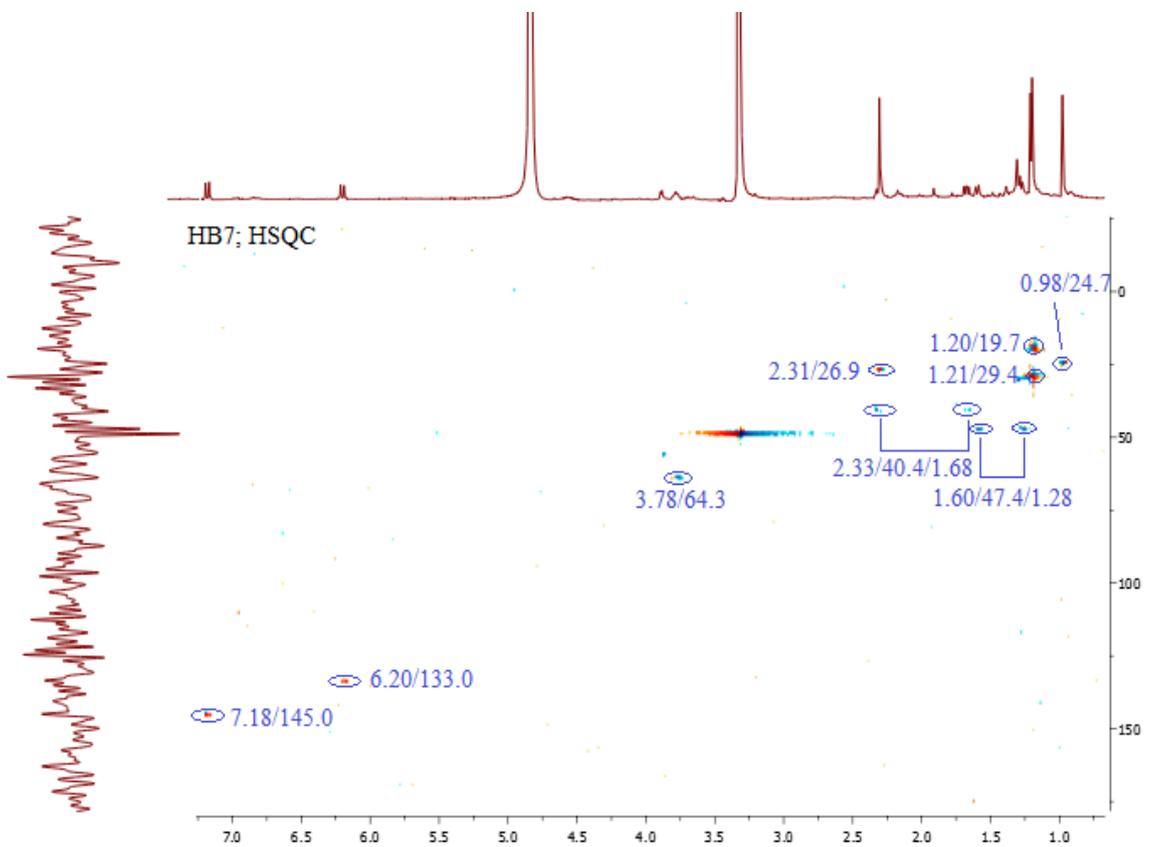
III.1.2.6. Elucidation structurale du composé **HB7**

L'examen simultané des spectres RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.1.30), HSQC (Spectre III.1.31) et le spectre COSY étalé (Spectre III.1.32) de ce composé permet de relever, dans cette molécule la présence de :

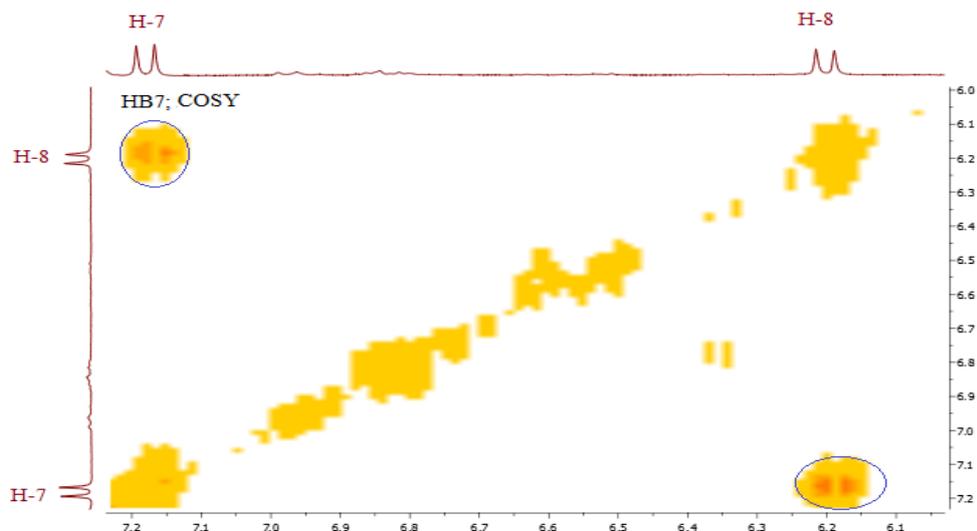
- Une double liaison éthylénique de configuration *trans* reconnaissable par les deux protons sous forme de doublet chacun ( $J = 15,6$  Hz) le premier à  $\delta_H$  7,18 ppm ( $\delta_C$  145,0 ppm) et le second à  $\delta_H$  6,20 ppm ( $\delta_C$  133,0 ppm). ceci est confirmé par le spectre COSY qui montre une corrélation entre ces deux protons.
- Un groupement CH dont le  $\delta_H$  à 3,78 ppm d'intégration 1H sous forme d'un multiplet corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  64,3 ppm. Vu les valeurs des déplacements du proton et du carbone, ce dernier ne peut être qu'oxygéné.
- Un groupement CH<sub>2</sub> dont les protons sont magnétiquement non équivalents (diastéréotopiques) et fortement couplés. Le premier résonnant sous forme d'un doublet ( $J = 5,4$  Hz partiellement recouvert par le signal du CH<sub>3</sub>) à  $\delta_H$  2,33 ppm et le second sous forme d'un doublet de doublet à  $\delta_H$  1,68 ( $J = 14,4 ; 9,0$  Hz) montrant une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  40,4 ppm.
- Un groupement CH<sub>2</sub> dont les protons sont magnétiquement non équivalents et fortement couplés résonnant sous forme d'un doublet large à  $\delta_H$  1,60 ppm ( $J = 13,2$  Hz) et  $\delta_H$  1,28 ( $J = 11,4$  Hz) montrant une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  47,4 ppm.
- Quatre CH<sub>3</sub> sous forme de singulet chacun, résonant à  $\delta_H$  2,31 ppm ( $\delta_C$  26,9 ppm),  $\delta_H$  1,21 ppm ( $\delta_C$  29,4 ppm),  $\delta_H$  1,20 ppm ( $\delta_C$  19,7 ppm) et  $\delta_H$  0,98 ppm ( $\delta_C$  24,7 ppm). Le fait que ces groupements apparaissent sous forme de singulet indique clairement qu'ils sont portés par des carbones quaternaires.



Spectre III.1.30 : Spectre RMN<sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> ; 600 MHz) du composé **HB7**



Spectre III.1.31 : Spectre HSQC du composé **HB7** dans le CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>

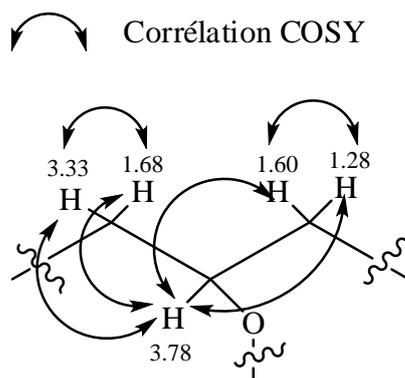


**Spectre III.1.32** : Spectre COSY du composé **HB7** dans le  $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$ , étalement

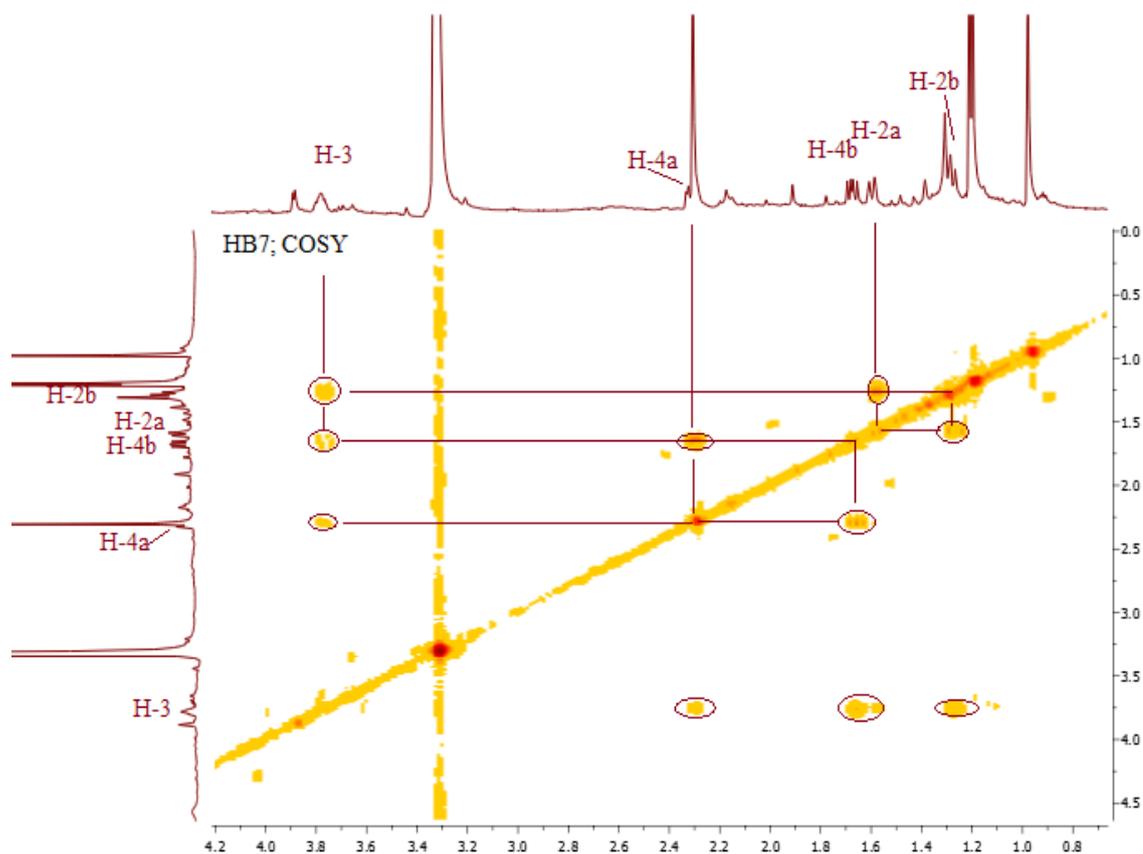
L'observation du spectre COSY (Spectre III.1.33) montre les corrélations entre :

- Les protons du groupement  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{C}}$  47,4 ppm) résonant à  $\delta_{\text{H}}$  1,60 ppm et  $\delta_{\text{H}}$  1,28 ppm et le proton du groupement CH oxygéné à  $\delta_{\text{H}}$  3,78 ppm.
- Ce dernier et les protons du groupement  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{C}}$  40,4 ppm) résonant à  $\delta_{\text{H}}$  2,33 ppm et  $\delta_{\text{H}}$  1,68 ppm.

D'après ces données, les deux groupements  $\text{CH}_2$  sont en position vicinale par rapport à ce CH comme le montre l'entité 1 reportée dans la figure III.1.25

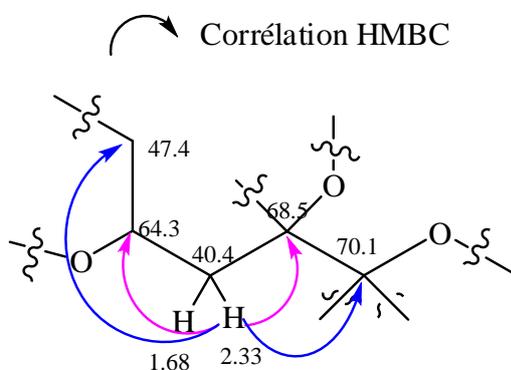


**Figure III.1.25** : Entité 1 présente dans le composé **HB7**



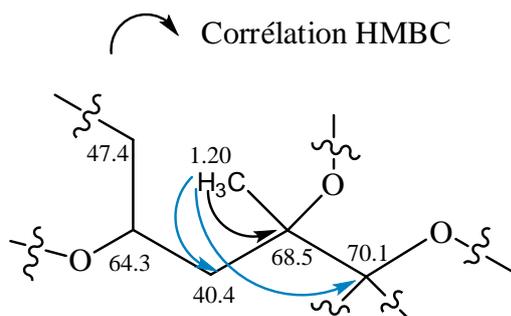
**Spectre III.1.33** : Spectre COSY du composé **HB7** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ , étalement

Sur le spectre HMBC (Spectre III.1.34), le proton du groupement  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{C}}$  40,4 ppm) résonnant à  $\delta_{\text{H}}$  2,33 ppm montre des corrélations avec le carbone du groupement  $\text{CH}$  oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  64,3 ppm et un carbone quaternaire oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  68,5 ppm et également des corrélations avec le carbone du groupement  $\text{CH}_2$  à  $\delta_{\text{C}}$  47,4 ppm et un carbone quaternaire oxygéné résonnant à  $\delta_{\text{C}}$  70,1 ppm. Ces corrélations permettent de déduire la présence de l'entité 2 dans la molécule. Cette dernière est représentée dans la figure III.1.26.



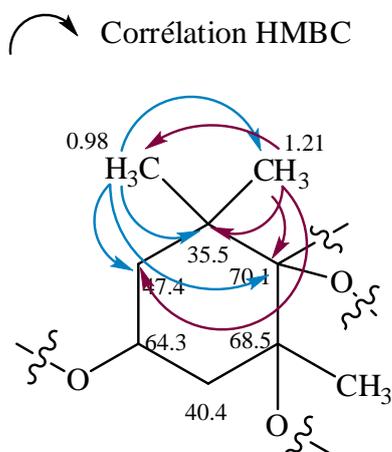
**Figure III.1.26** : Entité 2 présente dans le composé **HB7**

Par ailleurs, le spectre HMBC montre clairement des corrélations entre les protons du groupement  $\text{CH}_3$  ( $\delta_{\text{C}}$  19,7 ppm) résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_{\text{H}}$  1,20 ppm et le carbone quaternaire oxygéné résonant à  $\delta_{\text{C}}$  68,5 ppm et également des corrélations avec le carbone du groupement  $\text{CH}_2$  résonant à  $\delta_{\text{C}}$  40,4 ppm et le carbone quaternaire oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  70,1 ppm, suggérant ainsi que le groupement  $\text{CH}_3$  est porté par le carbone quaternaire oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  68,5 ppm comme le montre l'entité 3 reportée dans la figure III.1.27.

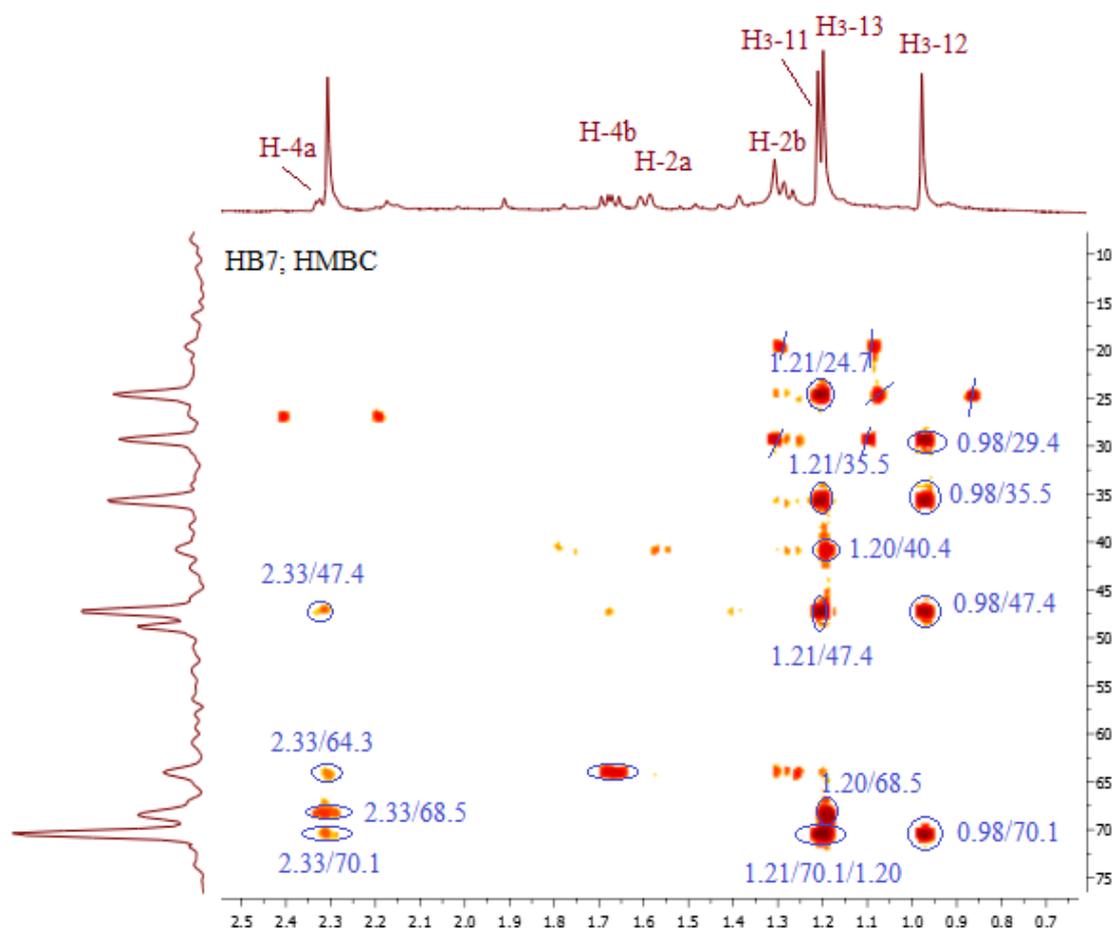


**Figure III.1.27** : Entité 3 présente dans le composé **HB7**

Toujours sur le spectre HMBC, les protons des deux méthyles à  $\delta_{\text{H}}$  1,21 ppm et  $\delta_{\text{H}}$  0,98 ppm montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire résonant à  $\delta_{\text{C}}$  35,5 ppm, cette situation suppose qu'ils sont tous les deux portés par ce carbone quaternaire vu leur multiplicité. Les protons de ces deux méthyles montrent des corrélations avec le carbone du  $\text{CH}_2$  à  $\delta_{\text{C}}$  47,4 ppm et également avec le carbone quaternaire oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  70,1 ppm. Ceci permet de placer ce carbone quaternaire ( $\delta_{\text{C}}$  35,5 ppm) entre le carbone  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{C}}$  47,4 ppm) et le carbone quaternaire oxygéné ( $\delta_{\text{C}}$  70,1 ppm). Ces observations permettent de proposer la présence dans cette molécule, de l'entité 4, reportée dans la figure III.1.28.



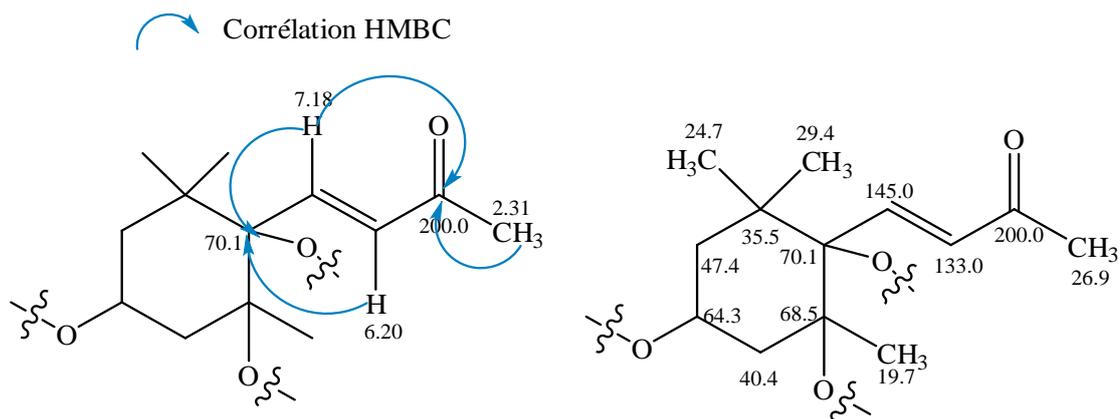
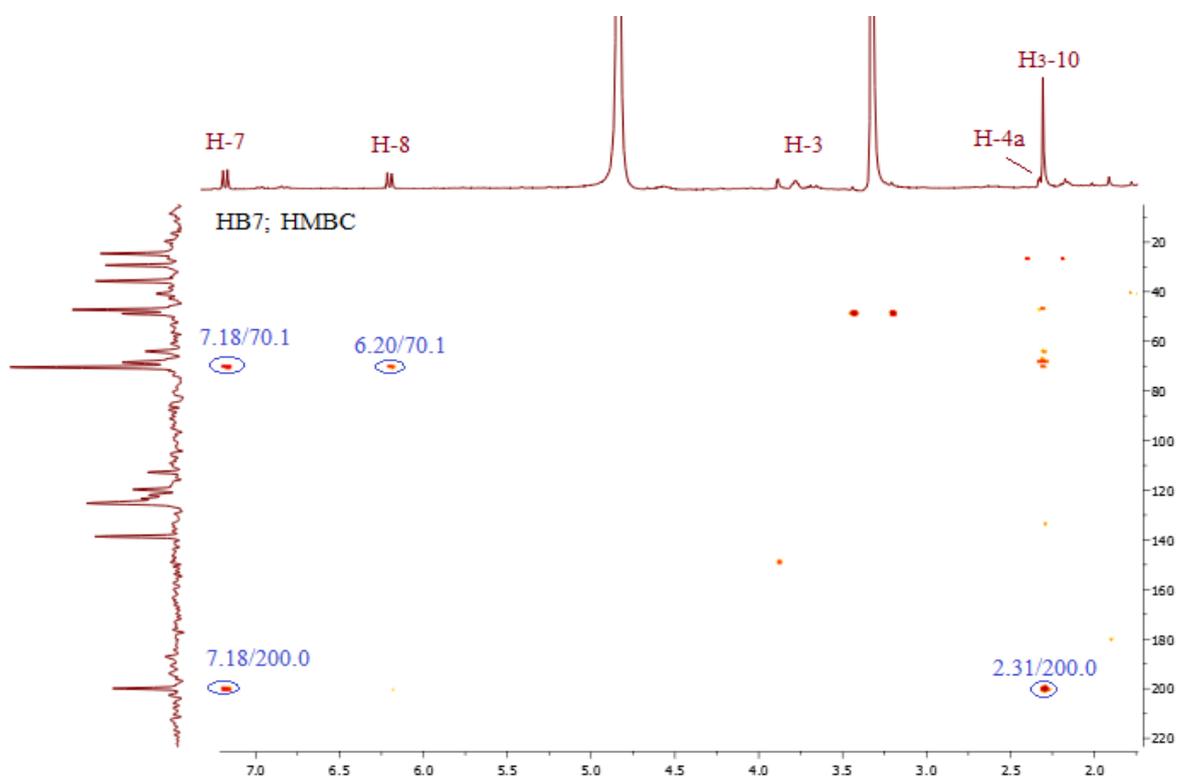
**Figure III.1.28** : Entité 4 présente dans le composé **HB7**



**Spectre III.1.34** : Spectre HMBC du composé **HB7** dans le  $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$ , étalement

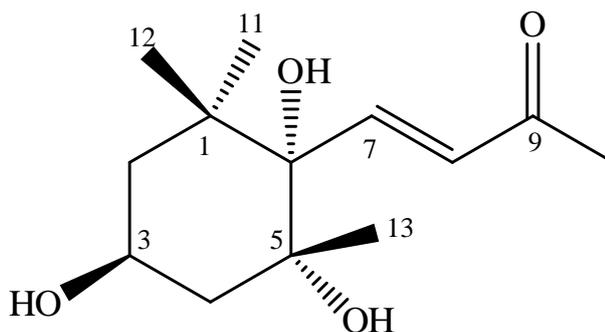
Par ailleurs, le proton éthylénique à  $\delta_{\text{H}}$  6,20 ppm montre une tache de corrélation sur le spectre HMBC (Spectre III.1.35) avec le carbone quaternaire oxygéné ( $\delta_{\text{C}}$  70,1 ppm), ceci permet de placer la chaîne portant la double liaison éthylénique sur ce dernier ( $\delta_{\text{C}}$  70,1 ppm).

Le même spectre révèle bien que le proton éthylénique à  $\delta_{\text{H}}$  7,18 ppm corrèle avec le carbone quaternaire oxygéné ( $\delta_{\text{C}}$  70,1 ppm) et avec un carbone quaternaire résonant à  $\delta_{\text{C}}$  200,0 ppm. La valeur du déplacement chimique de ce carbone caractérise un carbonyle d'une cétone conjuguée. Ce dernier corrèle également avec les protons du groupement  $\text{CH}_3$  résonant à  $\delta_{\text{H}}$  2,33 ppm. L'ensemble de ces constatations permet de proposer la structure partielle reportée dans la figure III.1.29.

Figure III.1.29 : Structure partielle du composé **HB7**Spectre III.1.35 : Spectre HMBC du composé **HB7** dans le  $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$ , étalement

L'ensemble de ces données spectrales conforté aux données de la littérature permet de d'identifier le composé **HB7** comme étant le **(3*S*, 5*R*, 6*S*, 7*E*)-3, 5, 6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one** [4], comme reporté dans la figure III.1.30.

Cette molécule est nouvelle pour le genre *Heliotropium*.

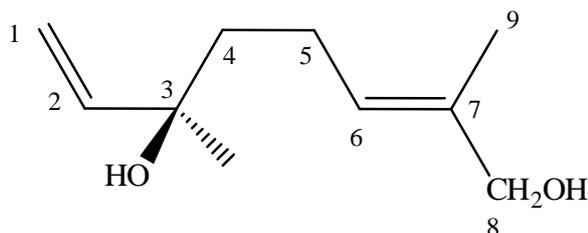


**Figure III.1.30** : Structure finale du le composé **HB7**, (*3S, 5R, 6S, 7E*)-3, 5, 6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one

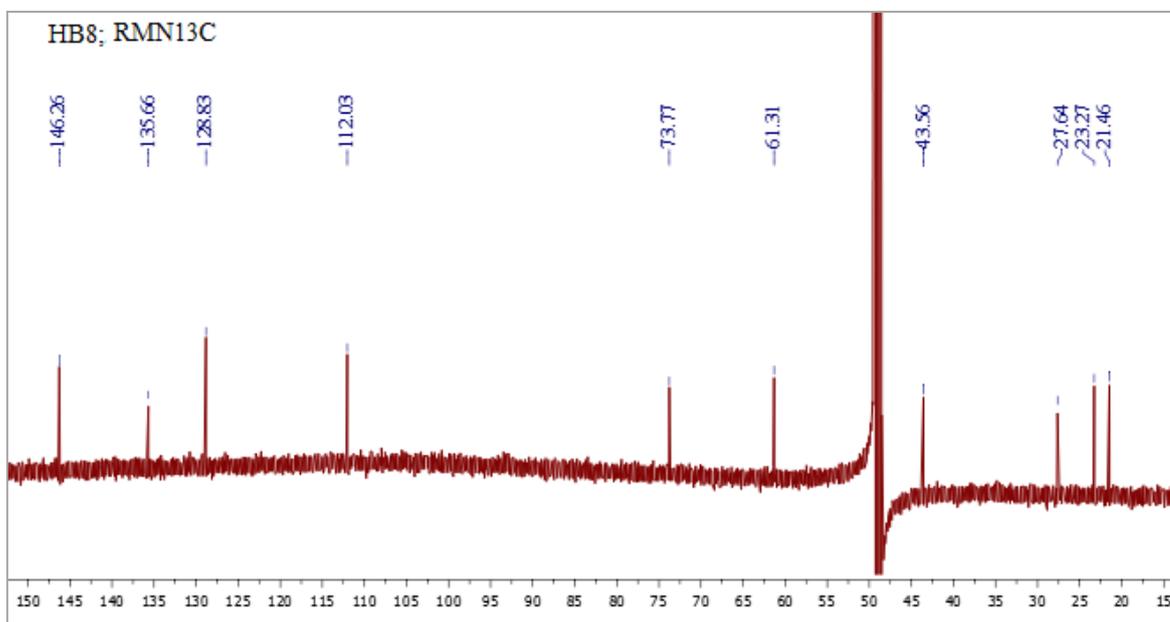
Toutes ces données sont reportées dans le tableau III.1.6

**Tableau III.1.6** : Données spectrales de RMN du composé **HB7**

Positions	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, <i>J</i> en Hz)	HMBC H-C
1	35,5	-	
2	47,4	1,60 ( <i>dl</i> ; 13,2)	1, 3, 6
		1,28 ( <i>d</i> ; 11,4)	12, 11, 4, 3, 1
3	64,3	3,78 <i>m</i>	
4a	40,4	2,33 ( <i>d</i> ; 5,4)	2, 3, 5, 6
4b		1,68 ( <i>dd</i> ; 14,4; 9,0)	13, 3
5	68,5	-	
6	70,1	-	
7	145,0	7,18 ( <i>d</i> ; 15,6)	6, 9
8	133,0	6,20 ( <i>d</i> ; 15,6)	6
9	200,0	-	
10	26,9	2,31 (3H; <i>s</i> )	8, 9
11	29,4	1,21 (3H; <i>s</i> )	12, 6, 5, 2, 1
12	24,7	0,98 (3H; <i>s</i> )	1, 2, 6, 11
13	19,7	1,20 (3H; <i>s</i> )	6, 5, 4

III.1.2.7. Elucidation structurale du composé **HB8**

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Spectre III.1.36) de ce composé indique la présence de dix atomes de carbone magnétiquement non équivalents dont quatre éthyléniques à  $\delta_{\text{C}}$  112,0,  $\delta_{\text{C}}$  128,8,  $\delta_{\text{C}}$  136,7 et 146,3 ppm. Cette information nous oriente vers un composé de type monoterpénique comportant 2 insaturations.



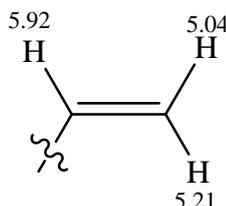
**Spectre III.1.36** : Spectre RMN $^{13}\text{C}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$  ; 150 MHz) du composé **HB8**

L'analyse simultanée des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Spectre III.1.37), HSQC (Spectre III.1.38), et COSY (Spectre III.1.39), permet de relever dans cette molécule la présence de :

- Un signal d'intégration  $1\text{H}$  résonne sous forme d'un doublet de doublet ( $J = 17,4$  ;  $10,8$  Hz) à  $\delta_{\text{H}}$  5,91 ppm et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  146,3 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques indiquent clairement qu'il s'agit d'un groupement CH éthylénique. Vu les valeurs des constantes de couplage, ce dernier présente deux types de couplage, l'un *trans* ( $J = 17,4$  Hz) et l'autre *cis* ( $J = 10,8$  Hz).

- Un autre signal d'intégration 1H résonne sous forme d'un doublet large ( $J = 17,4$  Hz) à  $\delta_H$  5,21 ppm et corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  112,3 ppm. Ce même carbone montre une tache de corrélation avec un signal à  $\delta_H$  5,04 ppm qui apparaît sur le spectre proton sous forme d'un doublet large ( $J = 10,8$ Hz) d'intégration 1H. les valeurs des deux constantes de couplage ( $J = 17,4 ; 10,8$ Hz) permettent de déduire que ces 2H sont magnétiquement non équivalent entre eux, dont celui qui se trouve à  $\delta_H$  5,21 ppm est en position *trans* par rapport au premier ( $\delta_H$  5,91 ppm), alors que celui qui se trouve à  $\delta_H$  5,04 ppm est en position *cis* par rapport au même proton.

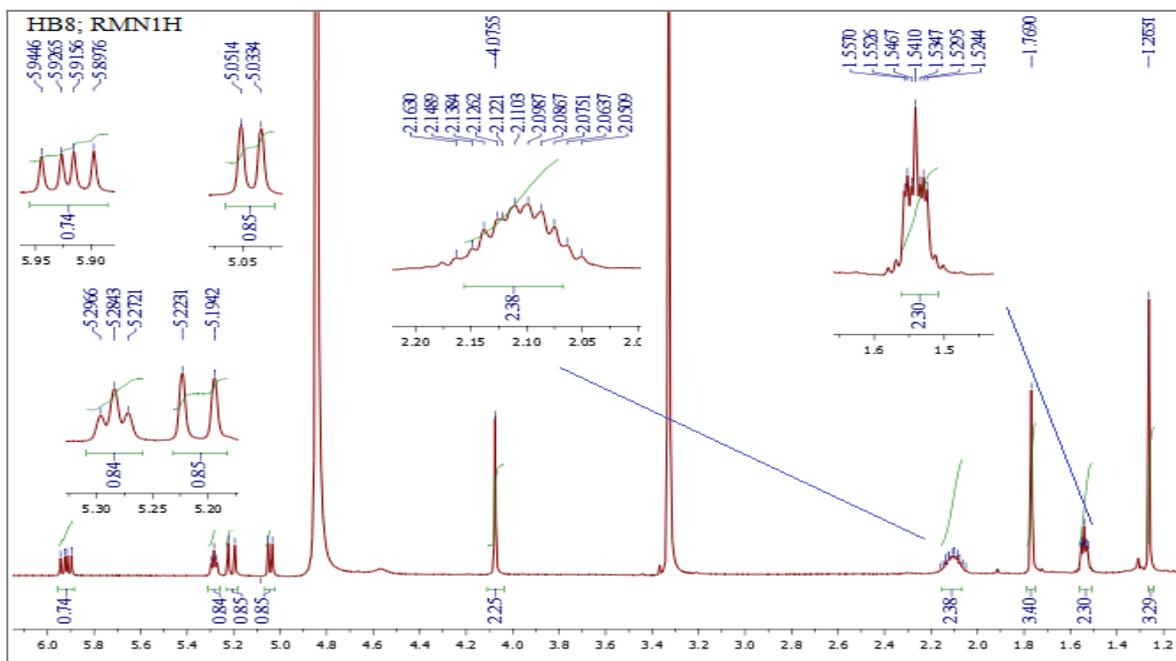
Sur le spectre COSY (Spectre III.1.39), le proton du CH éthylénique à  $\delta_H$  5,91 ( $J = 17,4 ; 10,8$  Hz) montre des taches de corrélation avec les protons du CH<sub>2</sub> éthylénique résonant sous forme d'un doublet chacun dont le premier relevé à  $\delta_H$  5,21 ppm ( $J = 17,4$  Hz), est en position *trans* par rapport au CH et le second en position *cis* par rapport au même CH, relevé à  $\delta_H$  5,04 ppm ( $J = 10,8$  Hz), indiquent la présence d'un groupement vinyle dans cette molécule comme reporté dans la figure III.1.31.



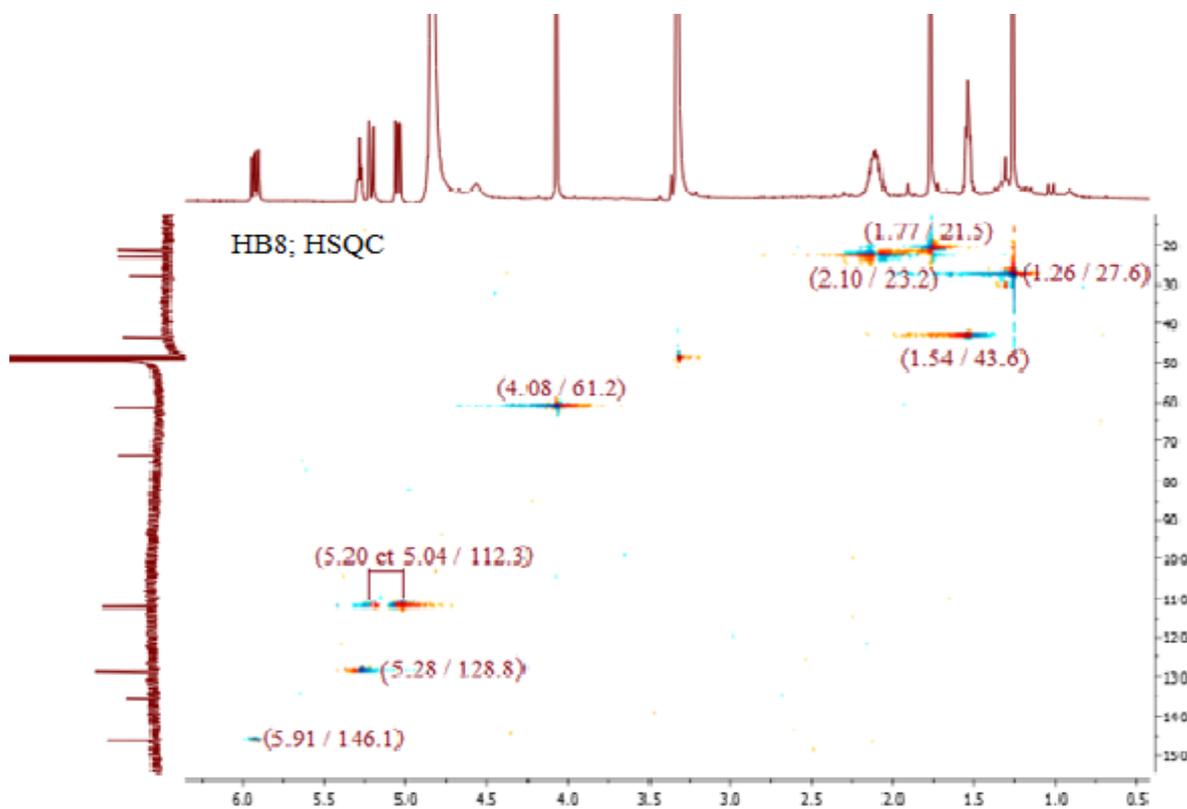
**Figure III.1.31** : Entité 1 présente dans le composé **HB8**

- Un signal intégrant pour 1H résonne sous forme d'un triplet ( $J = 7,4$  Hz) à  $\delta_H$  5,28 ppm et corrélant sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_C$  128,8 ppm. La valeur de son déplacement chimique ainsi que sa multiplicité indiquent clairement que d'une part, ce noyau est éthylénique et d'autre part il est voisin de 2H isochrones.
- Trois signaux intégrant pour 2H chacun, le premier sous forme d'un multiplet résonne à  $\delta_H$  2,11 ppm ( $\delta_C$  23,2 ppm), le deuxième sous forme, également d'un multiplet et résonne à  $\delta_H$  1,54 ppm ( $\delta_C$  43,6 ppm) et en dernier, le troisième sous forme d'un singulet large résonant à  $\delta_H$  4,08 ppm ( $\delta_C$  61,2 ppm). Les valeurs de déplacement chimique de ce dernier groupement CH indiquent clairement qu'il est oxygéné.

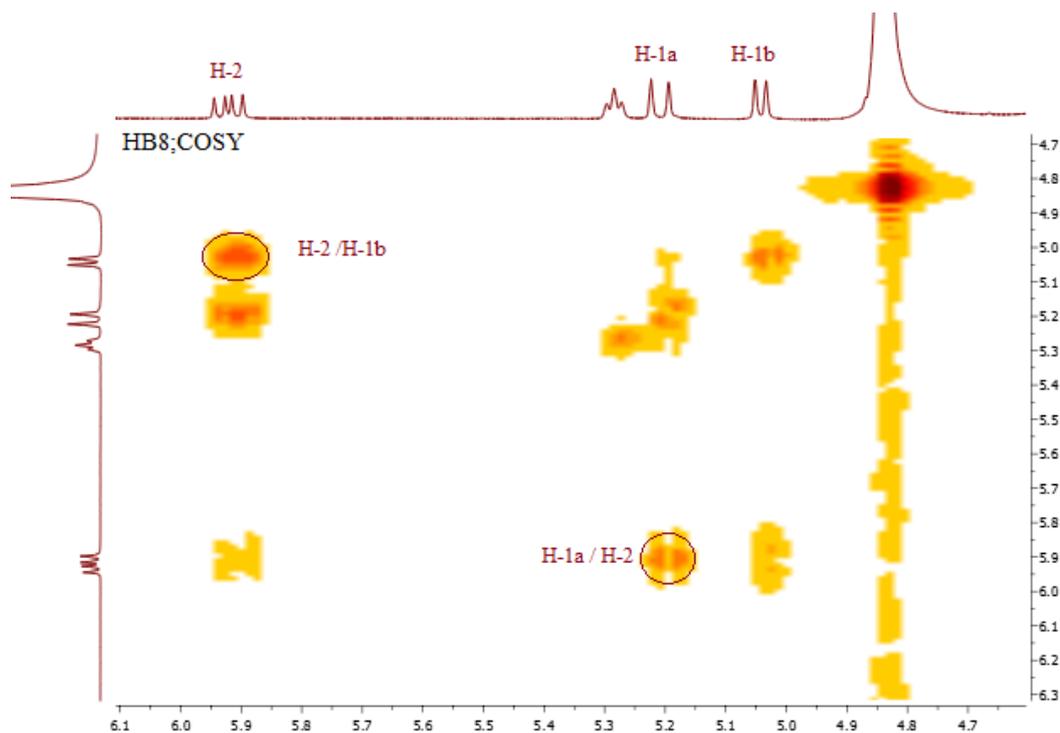
- Deux signaux d'intégration 3H chacun résonnant sous forme de deux singulets, le premier à  $\delta_H$  1,26 ppm ( $\delta_C$  27,6 ppm) et le second à  $\delta_H$  1,77 ppm ( $\delta_C$  21,5 ppm). Leurs multiplicités indiquent qu'ils sont portés par des carbones quaternaires.



**Spectre III.1.37** : Spectre RMN<sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>; 600 MHz) du composé **HB8**

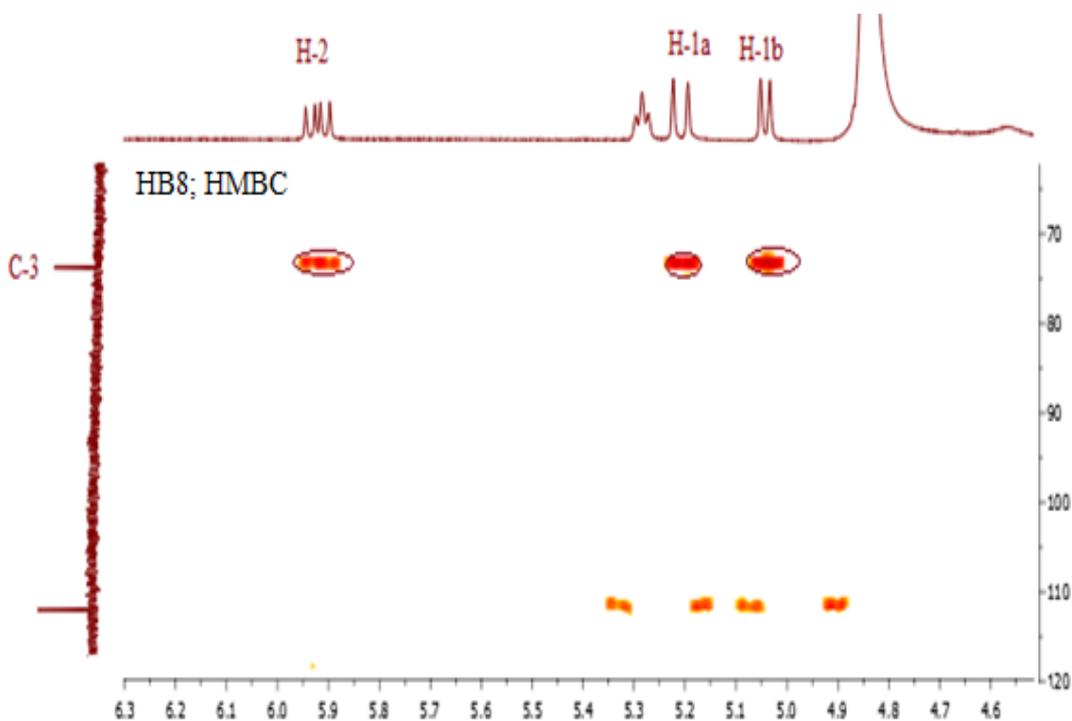


**Spectre III.1.38** : Spectre HSQC du composé **HB8** dans le CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>



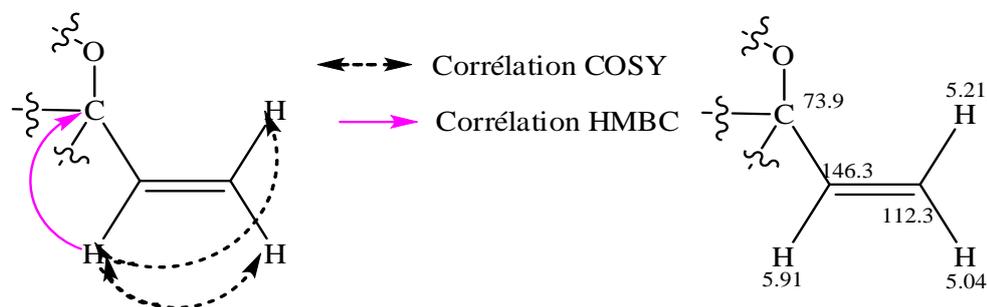
**Spectre III.1.39** : Spectre COSY du composé **HB8**  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ , étalement

L'analyse du spectre HMBC (Spectre III.1.40) montre une tache de corrélation entre le carbone quaternaire  $\text{sp}^3$  oxygéné résonnant à  $\delta_{\text{C}}$  73,9 ppm et les trois protons du groupement vinyle.



**Spectre III.1.40** : Spectre HMBC du composé **HB8** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ , étalement

Ces observations permettent de proposer à ce stade de notre analyse, la présence dans cette molécule de l'entité reportée dans la Figure III.1.32.



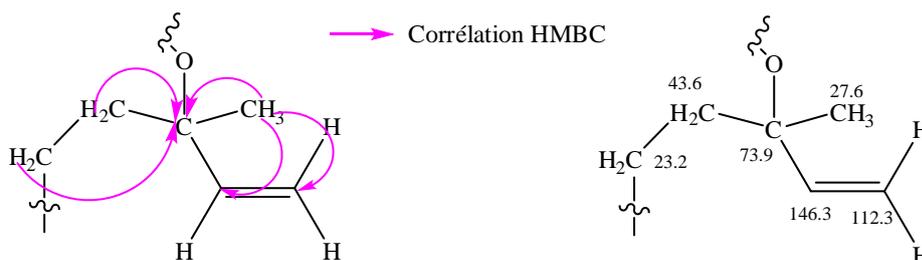
**Figure III.1.32** : Entité présente dans le composé **HB8**

Sur le spectre HMBC (Spectre III.1.41), ce même carbone quaternaire oxygéné ( $\delta_C$  73,9 ppm) donne des taches de corrélation avec les protons de deux groupements  $\text{CH}_2$  dont les quatre protons résonnent sous forme de multiplets à  $\delta_H$  1,54 ppm pour ceux du méthylène dont le carbone résonne à  $\delta_C$  43,6 ppm et à  $\delta_H$  2,11 ppm pour ceux du méthylène dont le carbone résonne à  $\delta_C$  23,2 ppm

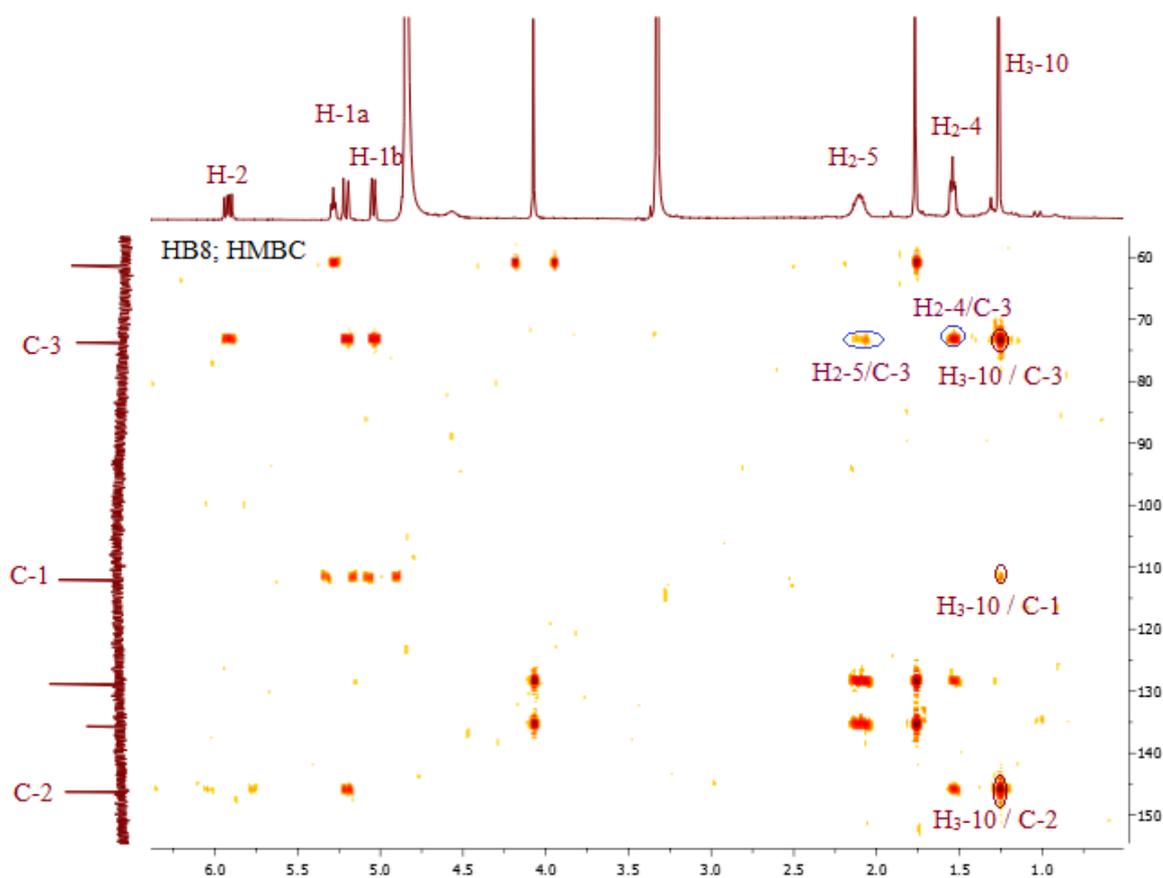
Un retour vers le spectre COSY (Spectre III.1.42), montre que les deux protons du  $\text{CH}_2$  résonant à  $\delta_H$  2,11 ppm corrélient avec les protons du  $\text{CH}_2$  résonant à  $\delta_H$  1,54 ppm. Cette observation suffit pour indiquer la présence de l'entité  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ .

Un deuxième examen du spectre HMBC (Spectre III.1.41), permet de relever des couplages nets entre les protons de ces deux méthylènes et le carbone quaternaire oxygéné à  $\delta_C$  73,9 ppm dans ce composé.

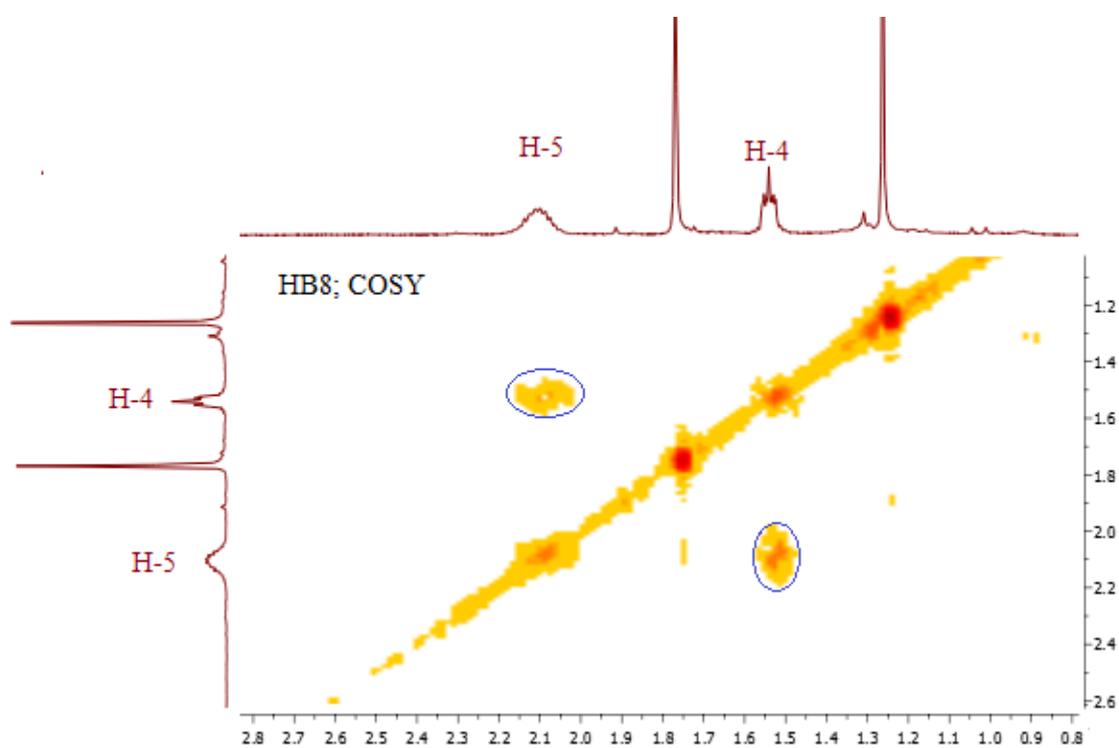
Par ailleurs et toujours sur le même spectre (Spectre III.1.41), le carbone quaternaire oxygéné ( $\delta_C$  73,9 ppm) montre une tache de corrélation avec les protons du méthyle résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_H$  1,26 ppm ( $\delta_C$  27,6 ppm), lesquels montre à leur tour, une tache de corrélation avec le carbone du méthylène à 43,6 ppm et avec les carbones éthyléniques  $\delta_C$  146,3 ppm et  $\delta_C$  112,3 ppm, comme le montre la figure III.1.33.



**Figure III.1.33** : Structure partielle 1 du composé **HB8**



Spectre III.1.41 : Spectre HMBC du composé **HB8** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ , étalement



Spectre III.1.42 : Spectre COSY du composé **HB8** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ , étalement

Un réexamen du spectre COSY (Spectre III.1.43) montre que les protons du CH<sub>2</sub> ( $\delta_C$  23,2 ppm) couplent avec le proton du CH éthylénique résonnant sous forme d'un triplet ( $J = 7,4$  Hz) à  $\delta_H$  5,28 ppm ( $\delta_C$  128,8 ppm) comme le montre la figure III.1.34.

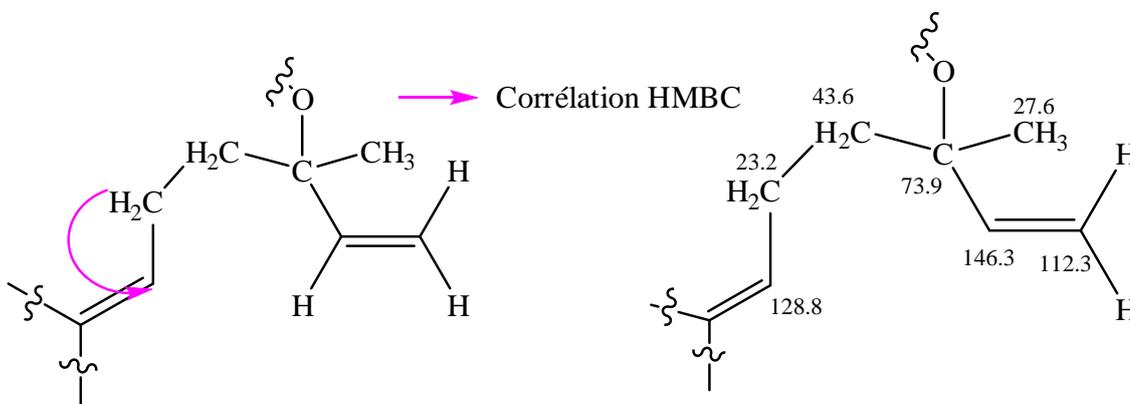
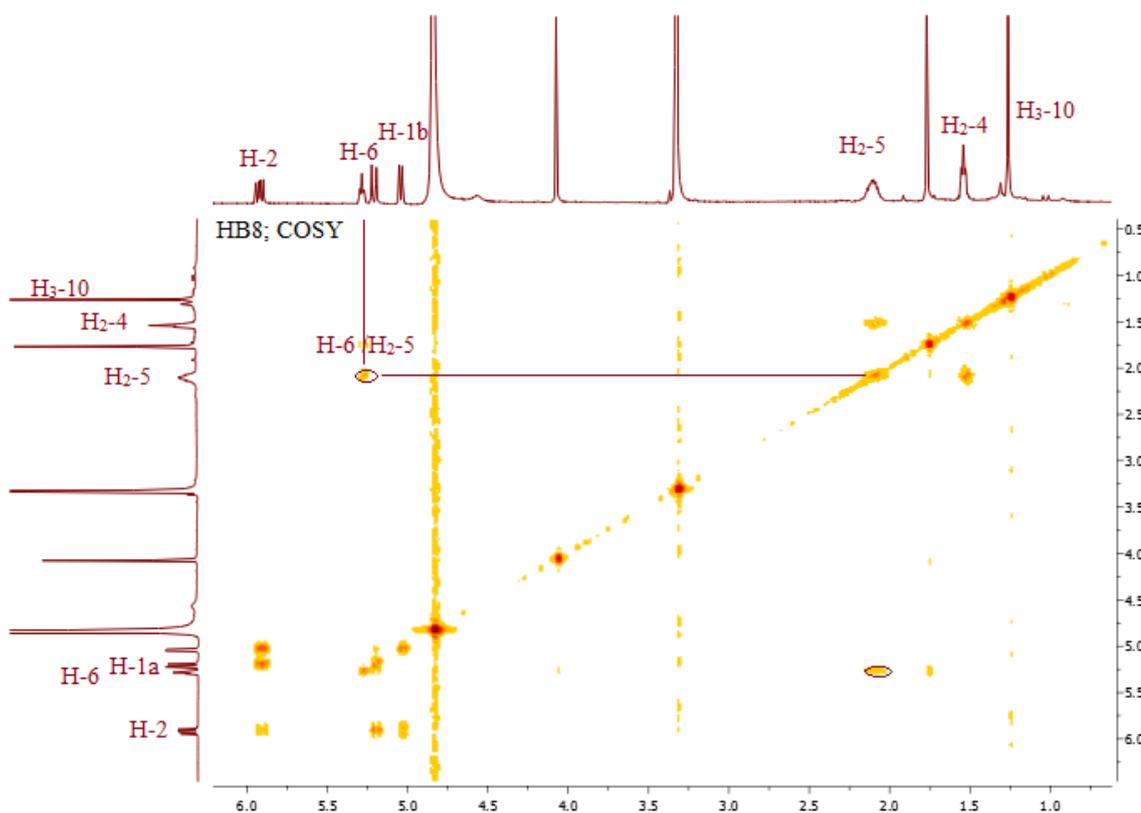


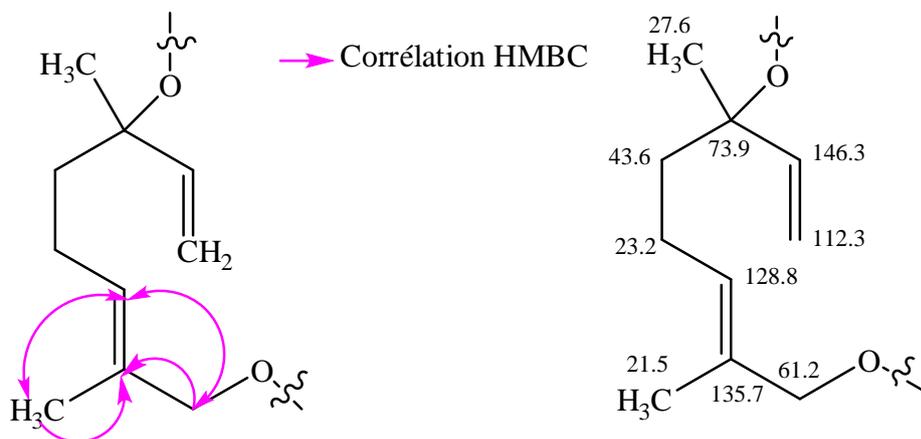
Figure III.1.34 : Structure partielle 2 du composé **HB8**



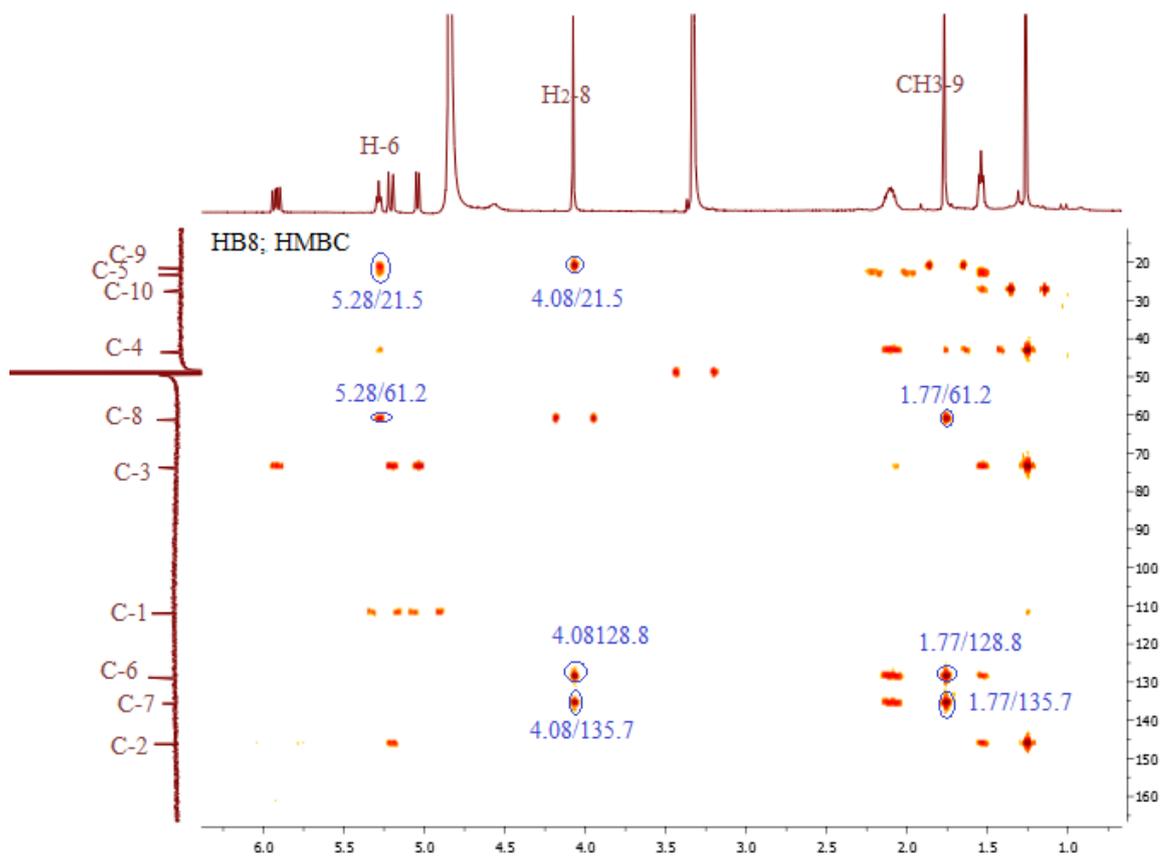
Spectre III.1.43 : Spectre COSY du composé **HB8** dans le CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>, étalement

Un retour vers le spectre HMBC (Spectre III.1.44) permet de relever la présence de trois taches de corrélation entre les protons du groupement méthyle résonant à  $\delta_H$  1,77 ppm ( $\delta_C$  21,5ppm) et le premier carbone CH éthylénique résonnant à  $\delta_C$  128,8 ppm, un deuxième carbone éthylénique quaternaire à  $\delta_C$  135,7 ppm et en dernier le carbone du groupement

CH<sub>2</sub> oxygéné résonant à  $\delta_C$  61,2 ppm. Ainsi les protons de ce groupement CH<sub>2</sub> oxygéné résonant à 4,08 ppm corrélerent avec le carbone du CH<sub>3</sub> à  $\delta_C$  21,5ppm et les deux carbones éthyléniques (CH à  $\delta_C$  128,8 ppm ; un carbone éthylénique quaternaire à  $\delta_C$  135,7 ppm). Ceci indique clairement que les deux groupements méthyle et méthylène oxygéné sont portés par le carbone quaternaire éthylénique comme le montre dans la figure III.1.35.

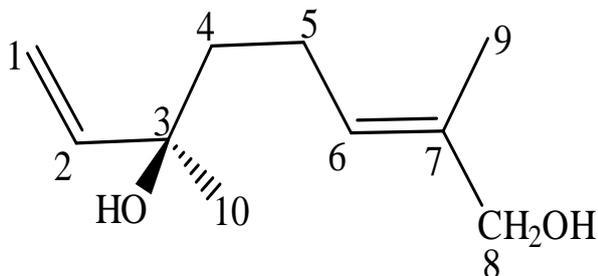


**Figure III.1.35** : Structure partielle 3 du composé **HB8**



**Spectre III.1.44** : Spectre HMBC du composé **HB8** dans le CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>, étalement

L'ensemble de cette analyse et par comparaison avec les données de la littérature mènent à un squelette monoterpénique de type linalol. Ce squelette étant oxygéné en C-8, il s'agit du 8-hydroxylinalol. Les déplacements chimiques des protons et des carbones de cette entité monoterpénique, sont en parfait accord avec ceux du **(3R)-8-hydroxylinalol** représenté dans la figure III.1.36 [6]. Cette molécule est nouvelle pour le genre *Heliotropium*.

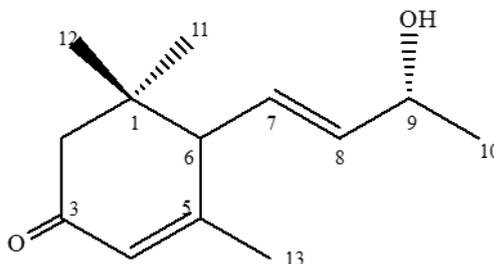


**Figure III.1.36** : Structure finale du composé **HB8**, **(3R)-8-hydroxylinalol**

Toutes ces données sont reportées dans le tableau III.1.7

**Tableau III.1.7** : Données spectrales de RMN du composé **HB8**.

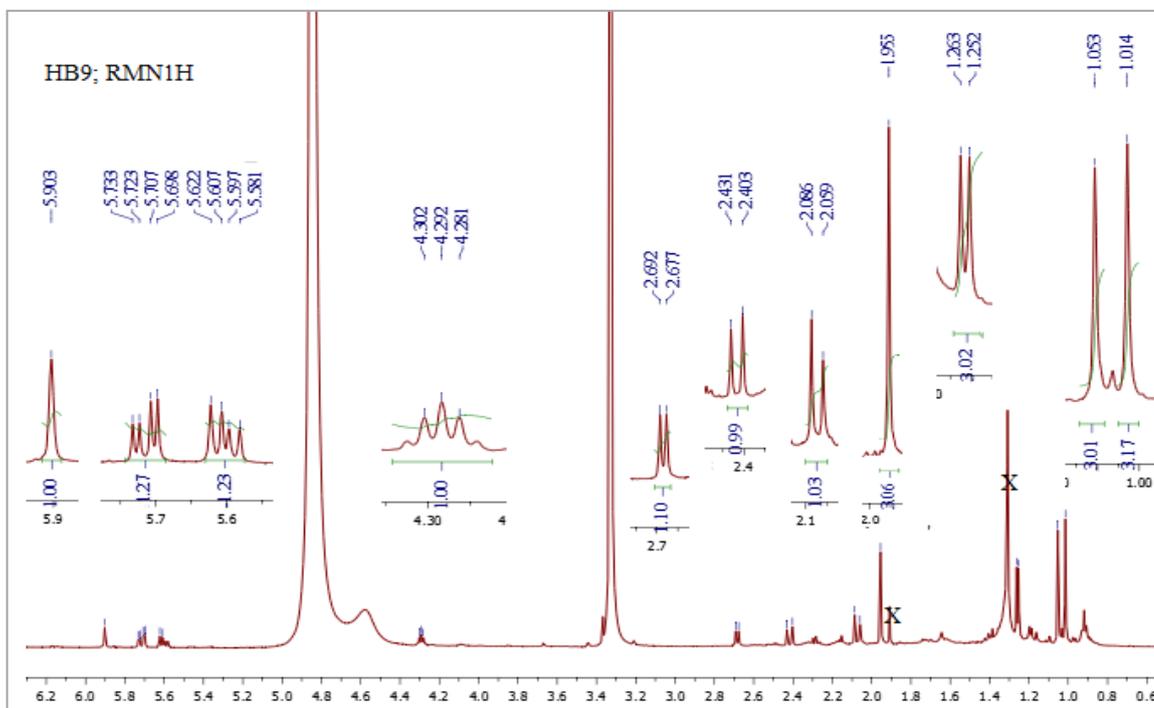
Positions	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm ; multiplicité ; $J$ en Hz)	HMBC H-C
1a	112,3	5,21 ( <i>d</i> ; 17,4)	3, 2
1b		5,04 ( <i>d</i> ; 10,8)	3
2	146,3	5,91 ( <i>dd</i> ; 17,4; 10,8)	10, 4, 3
3	73,9	-	
4	43,6	1,54 (2H; <i>m</i> )	5, 10, 3, 6, 2
5	23,2	2,11 (2H; <i>m</i> )	4, 3, 6, 7
6	128,8	5,28 ( <i>t</i> ; 7,4)	9, 4, 8, 1
7	135,7	-	
8	61,2	4,08 (2H; <i>s</i> )	9, 6, 7
7-Me (9)	21,5	1,77 (3H; <i>s</i> )	4, 8, 6, 7
3-Me (10)	27,6	1,26 (3H; <i>s</i> )	4, 3, 1, 2

III.1.2.8. Elucidation structurale du composé **HB9**

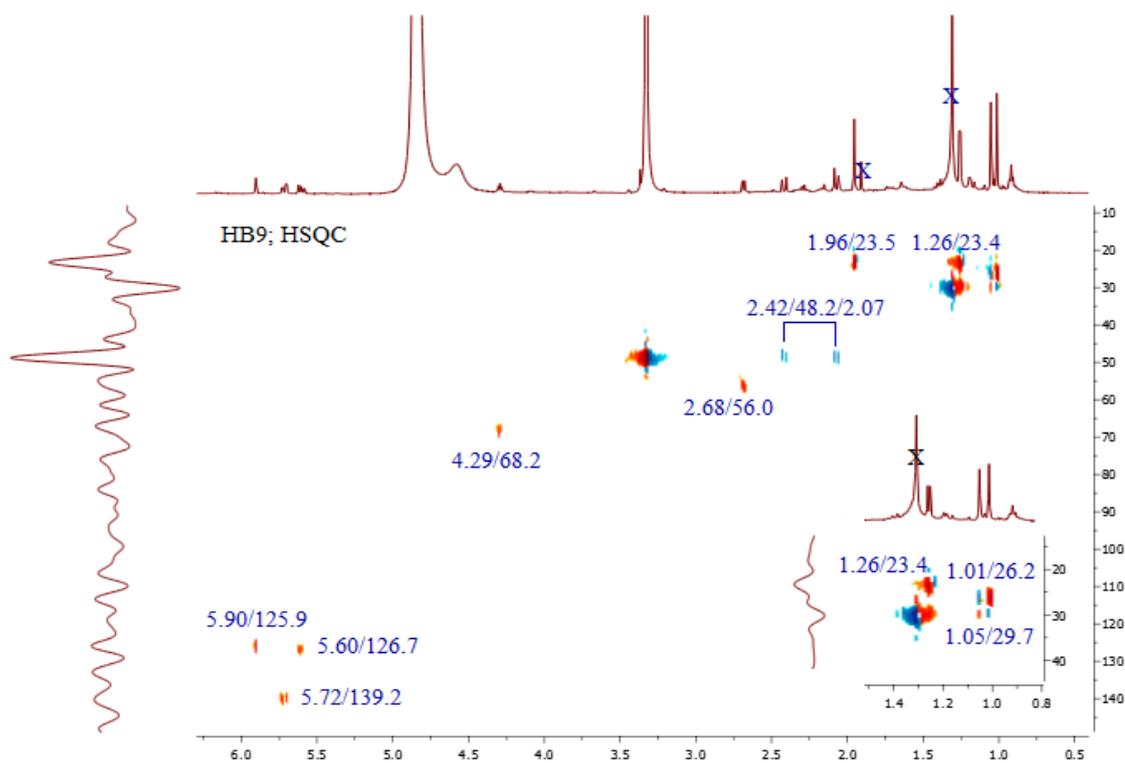
L'analyse simultanée des spectres RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.1.45), HSQC (spectre III.1.46) et COSY (Spectre III.1.47) de ce composé permet de relever, dans cette molécule la présence de :

- Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à  $\delta_H$  5,90 ppm corrélant sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_C$  125,9 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques indiquent qu'il est éthylénique.
- Un doublet de doublet ( $J = 15,3 ; 5,7$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  5,72 ppm corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  139,2 ppm.
- Un doublet de doublet ( $J = 15,3 ; 9,3$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  5,60 ppm corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  126,7 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques des 2H ainsi que la valeur de la constante de couplage ( $J = 15,3$  Hz) indiquent clairement la présence d'un groupement CH=CH de configuration *trans*. Ceci est d'ailleurs confirmé par les corrélations observées sur le spectre COSY entre ces deux noyaux.
- Un quintuplet ( $J = 6,2$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  4,29 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_C$  68,2 ppm. Vu les valeurs des déplacements du proton et du carbone, ce dernier ne peut être qu'oxygéné.
- Un doublet ( $J = 9,0$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  2,68 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_C$  56,0 ppm.
- Un doublet ( $J = 16,8$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  2,42 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_C$  48,2 ppm. Ce même carbone montre une autre tâche de corrélation avec un deuxième proton qui apparaît sur le spectre RMN<sup>1</sup>H sous forme d'un doublet ( $J = 16,2$  Hz) à  $\delta_H$  2,07 ppm permettant de déduire que ces 2H sont diastéréotopiques.
- Un doublet ( $J = 6,6$  Hz) d'intégration 3H à  $\delta_H$  1,26 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_C$  23,4 ppm.

- Trois signaux d'intégration 3H chacun sous forme d'un singulet indiquant la présence de trois groupements méthyles à  $\delta_H$  1,96 ppm ( $\delta_C$  23,5 ppm),  $\delta_H$  1,05 ppm ( $\delta_C$  29,7 ppm) et  $\delta_H$  1,01 ppm ( $\delta_C$  26,2 ppm).



**Spectre III.1.45** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ; 600 MHz) du composé **HB9**



**Spectre III.1.46** : Spectre HSQC du composé **HB9** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$

L'étude du spectre COSY (Spectre III.1.47) permet de relever la présence des taches de corrélation entre :

- Le proton du groupement CH oxygéné relevé à  $\delta_H$  4,29 ppm et les protons du groupement  $CH_3$  à  $\delta_H$  1,26 ppm et également avec le proton éthylénique relevé à  $\delta_H$  5,72 ppm.
- Ce dernier corrèle à son tour avec le proton éthylénique à  $\delta_H$  5,60 ppm.
- Ce proton éthylénique corrèle avec le proton du groupement CH résonant à  $\delta_H$  2,68 ppm.

Ces corrélations sont représentées dans la figure II.1.37.

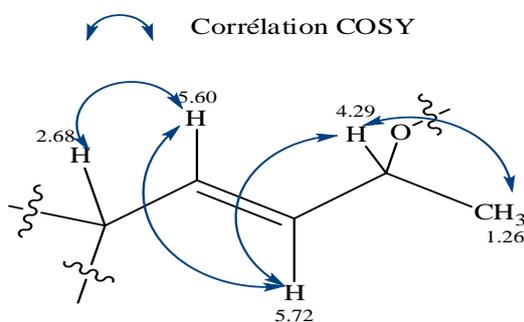
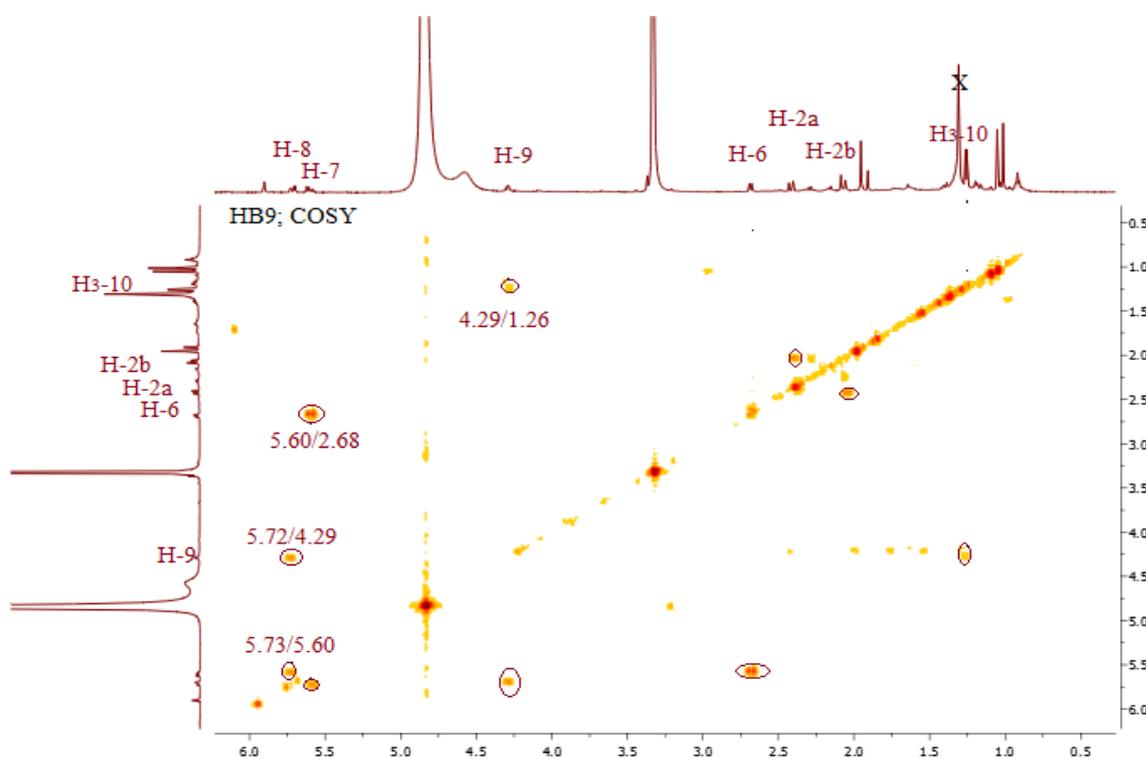


Figure III.1.37 : Entité 1 présente dans le composé **HB9**



Spectre III.1.47 : Spectre COSY du composé **HB9** dans le  $CH_3OH-d_4$

Sur le spectre étalé relatif à l'expérience HMBC (Spectre III.I.48), le proton du groupement CH ( $\delta_H$  2,68 ppm ;  $\delta_C$  56,0 ppm) montre des corrélations avec deux carbones quaternaires dont l'un est hybridé  $sp^3$  à  $\delta_H$  36,7 ppm et l'autre éthylénique à  $\delta_H$  166,1 ppm. Toujours sur le même spectre, ce carbone montre une corrélation avec les protons du méthyle résonant à  $\delta_H$  1,96 ppm ( $\delta_C$  23,5 ppm). Ceci suppose que le groupement  $CH_3$  est porté par le carbone à  $\delta_C$  166,1 ppm. Ainsi, cette attribution est confirmée par les corrélations des protons du groupement  $CH_3$  avec le carbone du groupement CH à  $\delta_C$  56,0 ppm et le carbone du groupement CH éthylénique à  $\delta_C$  125,9 ppm. A ce stade nous proposons pour le composé **HB9** la structure partielle représentée dans la figure III.1.38

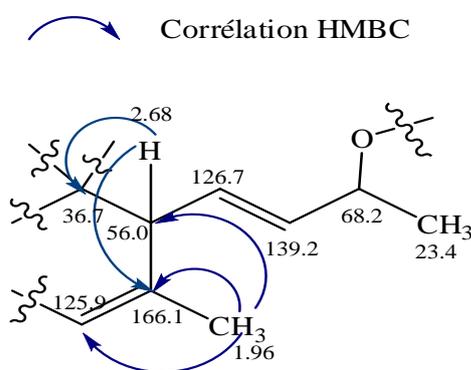
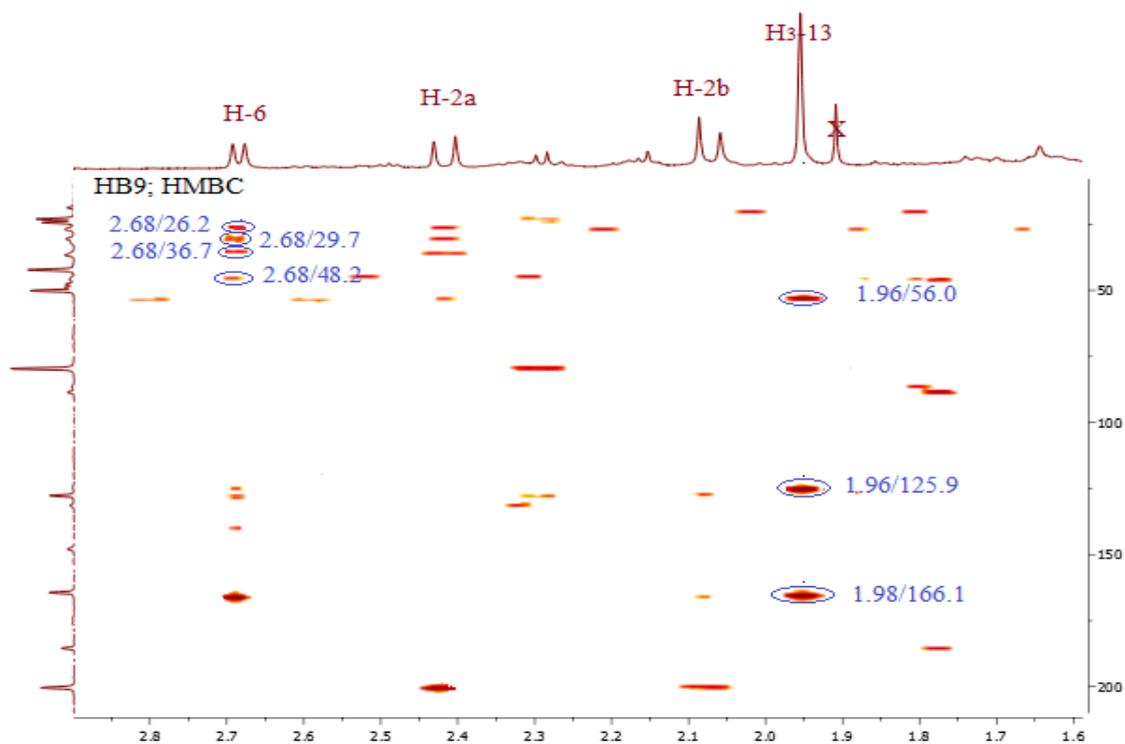
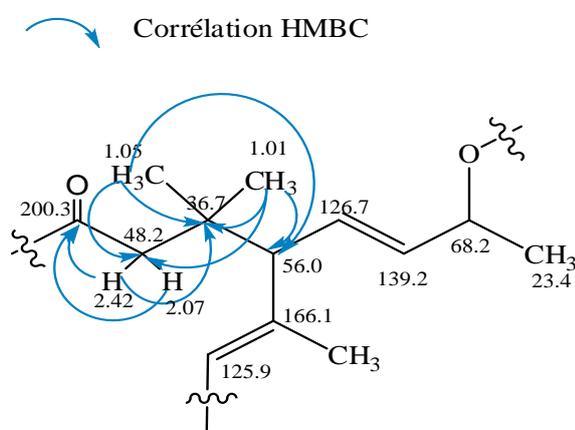


Figure III.1.38 : Structure partielle du composé **HB9**



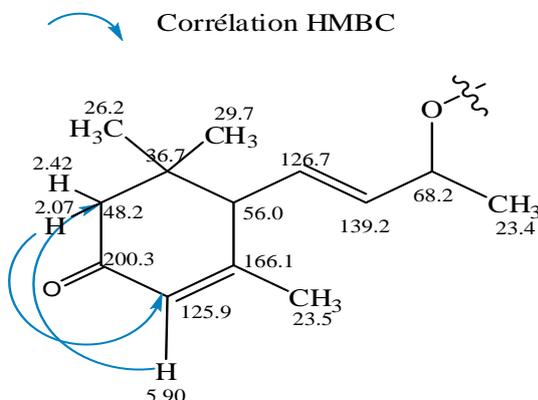
Spectre III.1.48 : Spectre HMBC du composé **HB9** dans le  $CH_3OH-d_4$ , étalement

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre III.1.49), les deux méthyles ( $\delta_{\text{H}}$  1,05 ppm et  $\delta_{\text{H}}$  1,01 ppm) montrent des taches de corrélation avec le carbone quaternaire résonant à  $\delta_{\text{C}}$  36,7 ppm ; cette situation suppose qu'ils sont tous les deux portés par ce carbone quaternaire vu leur multiplicité. Les protons de ces deux méthyles montrent également des corrélations avec le carbone du groupement CH résonant à  $\delta_{\text{C}}$  56,0 ppm et également avec le carbone du méthylène à  $\delta_{\text{C}}$  48,2 ppm. Les deux protons de ce dernier méthylène ( $\delta_{\text{H}}$  2,42 ; 2,07 ppm) montrent des taches de corrélation avec le carbone du carbonyle à  $\delta_{\text{C}}$  200,3 ppm. L'ensemble de ces observations permet de proposer la structure partielle reportée dans la figure III.1.39.

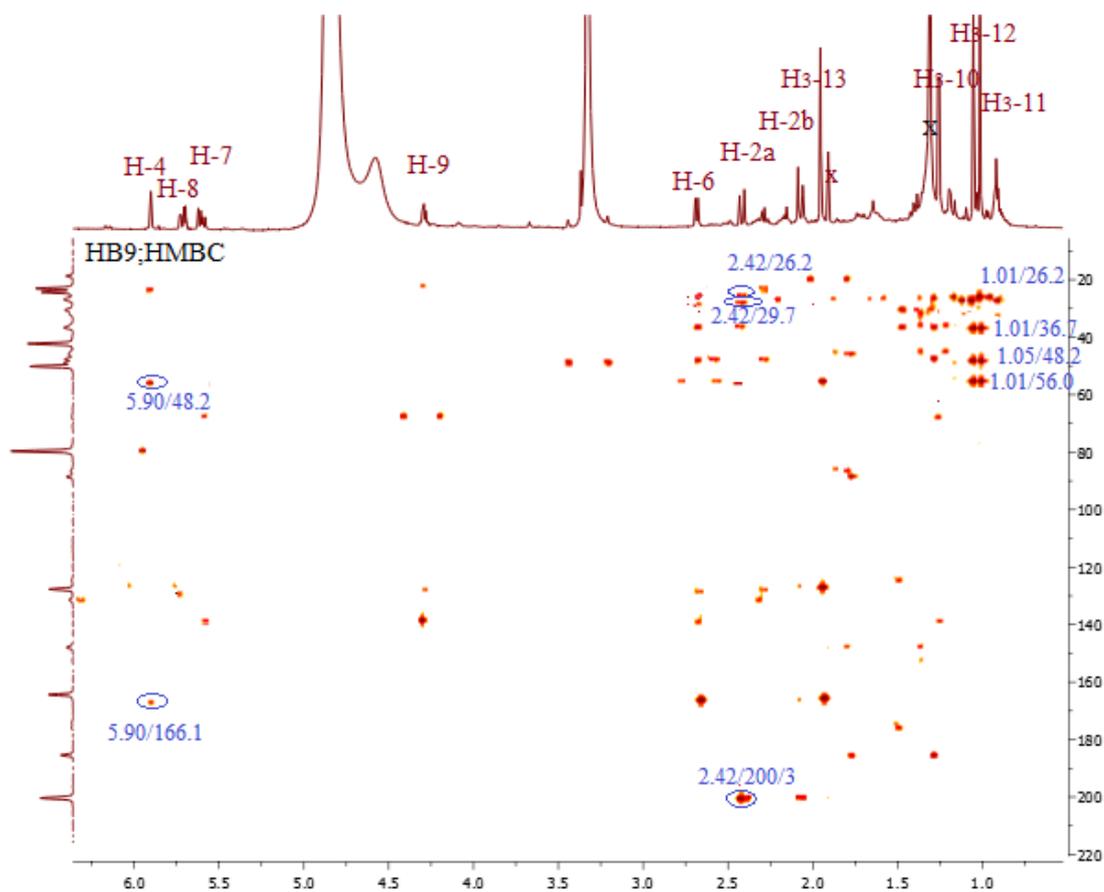


**Figure III.1.39** : Structure partielle du composé **HB9**

Par ailleurs, le spectre HMBC (Spectre III.1.49) montre clairement des corrélations entre un des protons ( $\delta_{\text{H}}$  2,07 ppm) du  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{C}}$  48,2 ppm) et le carbone du groupement CH éthylénique ( $\delta_{\text{C}}$  125,9 ppm), de même le proton du CH éthylénique avec le carbone du  $\text{CH}_2$  ( $\delta_{\text{C}}$  48,2 ppm). Ceci permet d'avoir la fermeture du cycle comme le montre la figure III.1.40

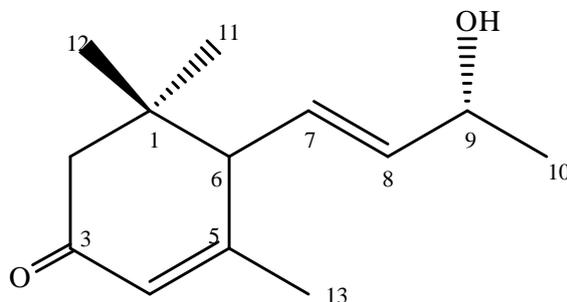


**Figure III.1.40** : Structure partielle du composé **HB9**



**Spectre III.1.49** : Spectre HMBC du composé **HB9** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$

L'ensemble de cette analyse et toujours en se reportant aux données de la littérature montre qu'il s'agit d'un squelette mégastigmane comportant 13 atomes de carbone de type nor-isoprenoïde. Les déplacements chimiques des protons et des carbones de cette entité sont en parfait accord avec ceux du **3-oxo- $\alpha$ -ionol** [4]. Cette molécule est nouvelle pour le genre *Heliotropium*.

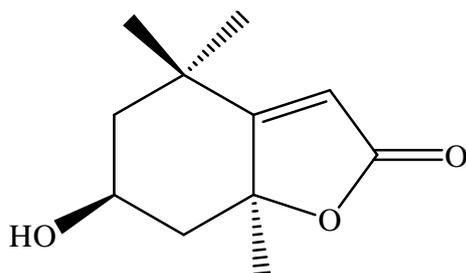


**Figure III.1.41** : Structure du composé **HB9**, **3-oxo- $\alpha$ -ionol**

Les données de  $\text{RMN}^1\text{H}$ ,  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  et corrélations HMBC sont reportées dans le tableau III.1.8.

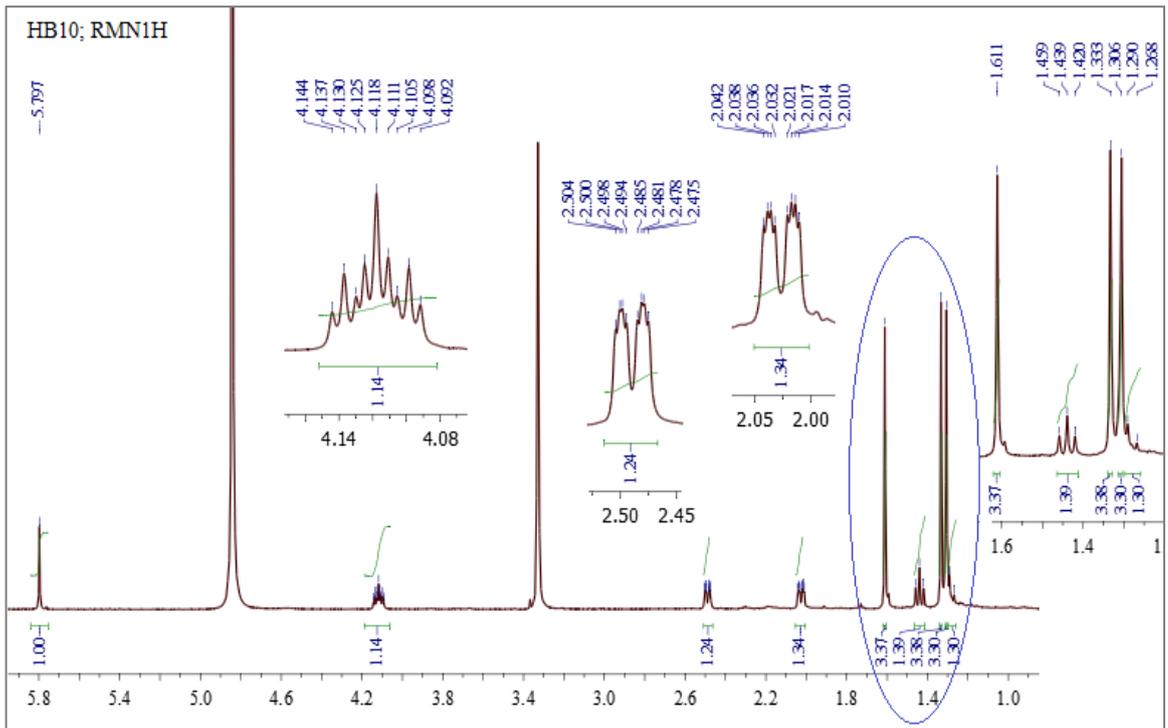
Tableau III.1.8 : Données spectrales de RMN du composé **HB9**

Positions	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, <i>J</i> en Hz)	HMBC H-C
1	36,7	-	
2a	48,2	2,42 ( <i>d</i> ; 16,8)	1, 3, 6, 11, 12
2b		2,07 ( <i>d</i> ; 16,2)	3, 4, 5
3	200,3	-	
4	125,9	5,90 <i>s</i>	2, 5, 13
5	166,1	-	
6	56,0	2,68 ( <i>d</i> ; 9,0)	1, 2, 4, 7, 8, 11,12
7	126,7	5,60 ( <i>dd</i> ; 15,3; 9,3)	8, 9
8	139,2	5,72 ( <i>dd</i> ; 15,3; 5,7)	7
9	68,2	4,29 (quint; 6,2)	7, 8, 10
10	23,4	1,26 ( <i>d</i> ; 6,6)	8, 9
11	26,2	1,01 (3H; <i>s</i> )	1, 2, 6, 12
12	29,7	1,05 (3H; <i>s</i> )	1, 2, 6, 11
13	23,5	1,96 (3H; <i>s</i> )	4, 5, 6

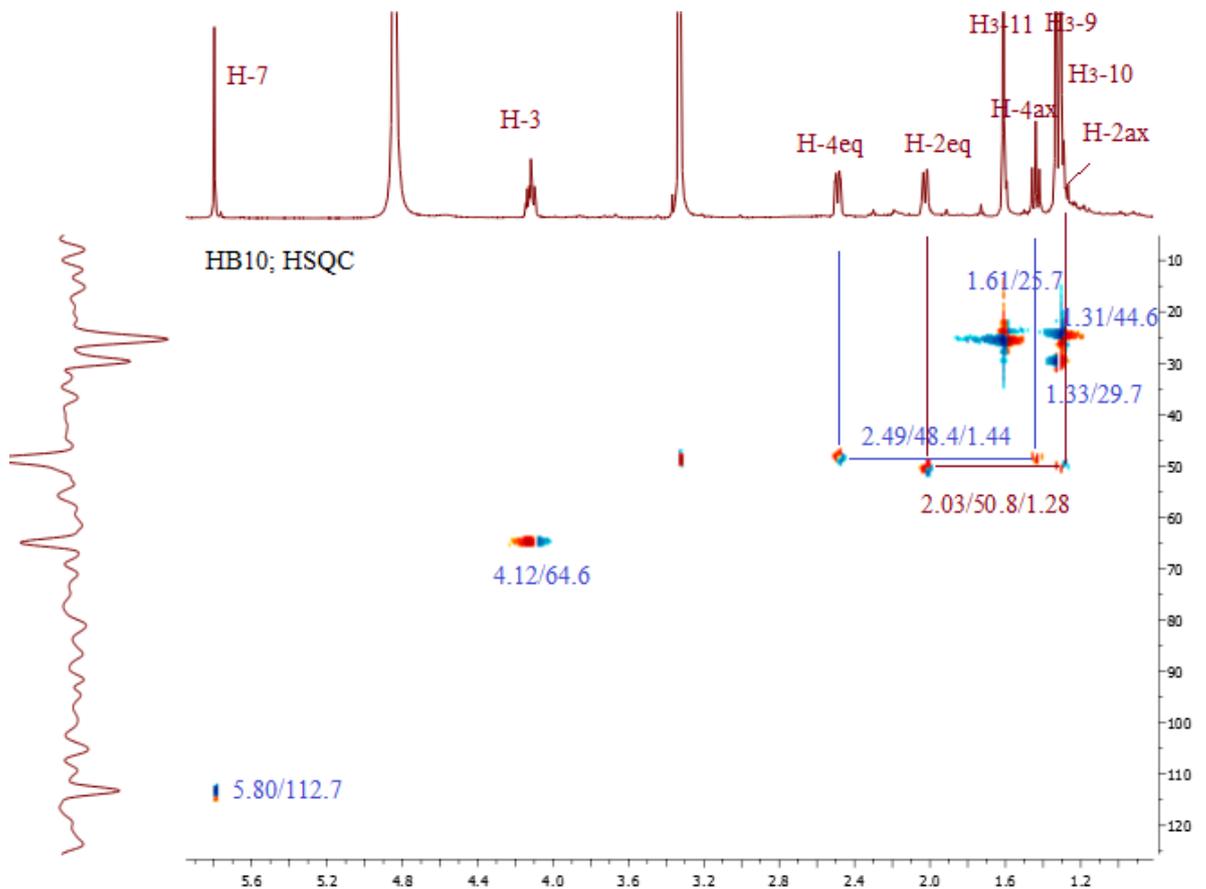
III.1.2.9. Elucidation structurale du composé **HB10**

L'analyse simultanée des spectres RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.1.50) et HSQC (Spectre III.1.51) permet de relever une grande similitude entre ce produit et le produit **HB6**. En effet cette analyse montre la présence de :

- Un groupement CH éthylénique résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_{\text{H}}$  5,80 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  112,7 ppm) attribuable à H-7 (C-7)
- Un groupement CH sp<sup>3</sup> résonant sous forme d'un triplet de triplet à  $\delta_{\text{H}}$  4,12 ppm ( $J = 11,4 ; 4,2$  Hz) montre une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  64,6 ppm attribuable à H-3ax et C-3 respectivement.
- Un groupement CH<sub>2</sub> hybridé sp<sup>3</sup> dont les deux protons sont magnétiquement non équivalents et résonnent sous forme d'un doublet de doublet dédoublé ( $J = 11,4 ; 3,8 ; 2,4$  Hz) à  $\delta_{\text{H}}$  2,03 ppm pour le premier, et sous forme d'un triplet ( $J = 11,4$  Hz) recouvert partiellement par le signal du méthyle à  $\delta_{\text{H}}$  1,28 ppm pour le second, attribuable à H-2eq et H-2ax respectivement. Ces deux derniers montrent deux taches de corrélation sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  50,8 ppm attribuable à C-2.
- Un groupement CH<sub>2</sub> hybridé sp<sup>3</sup> dont le premier proton résonne sous forme d'un doublet de doublet dédoublé à  $\delta_{\text{H}}$  2,49 ppm ( $J = 11,4 ; 3,8 ; 2,4$  Hz), et le second à  $\delta_{\text{H}}$  1,44 ppm sous forme d'un triplet ( $J = 11,4$  Hz) pour le second, attribuable à H-5eq et H-5ax respectivement. Ces deux derniers protons montrent des taches de corrélation sur le spectre HSQC avec un carbone résonant à  $\delta_{\text{C}}$  48,4 ppm attribuable à C-5.
- Trois groupements CH<sub>3</sub> sous forme d'un singulet chacun résonant à  $\delta_{\text{C}}$  29,7 ppm ( $\delta_{\text{H}}$  1,33 ppm) ;  $\delta_{\text{C}}$  24,6 ppm ( $\delta_{\text{H}}$  1,31 ppm) et  $\delta_{\text{C}}$  25,7 ppm ( $\delta_{\text{H}}$  1,61 ppm) attribuable à C-9, C-10 et C-11 respectivement.



Spectre III.1.50 : Spectre RMN<sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> ; 600 MHz) du composé **HB10**

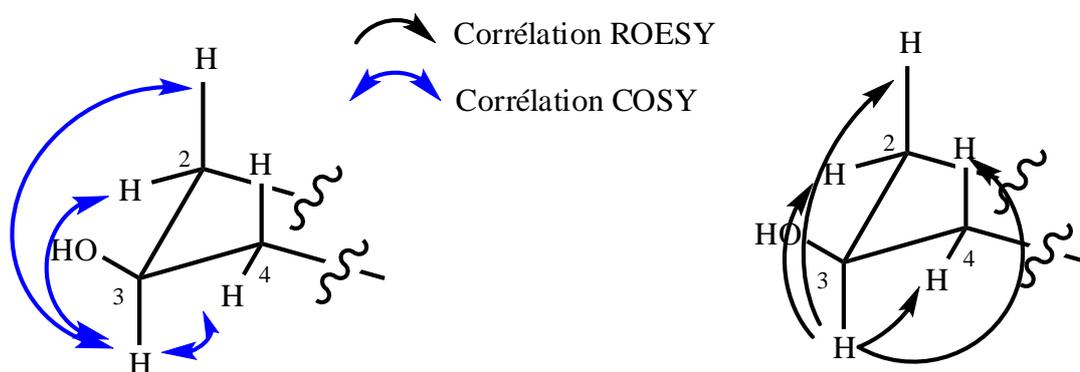


Spectre III.1.51 : Spectre HSQC du composé **HB10** dans le CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>

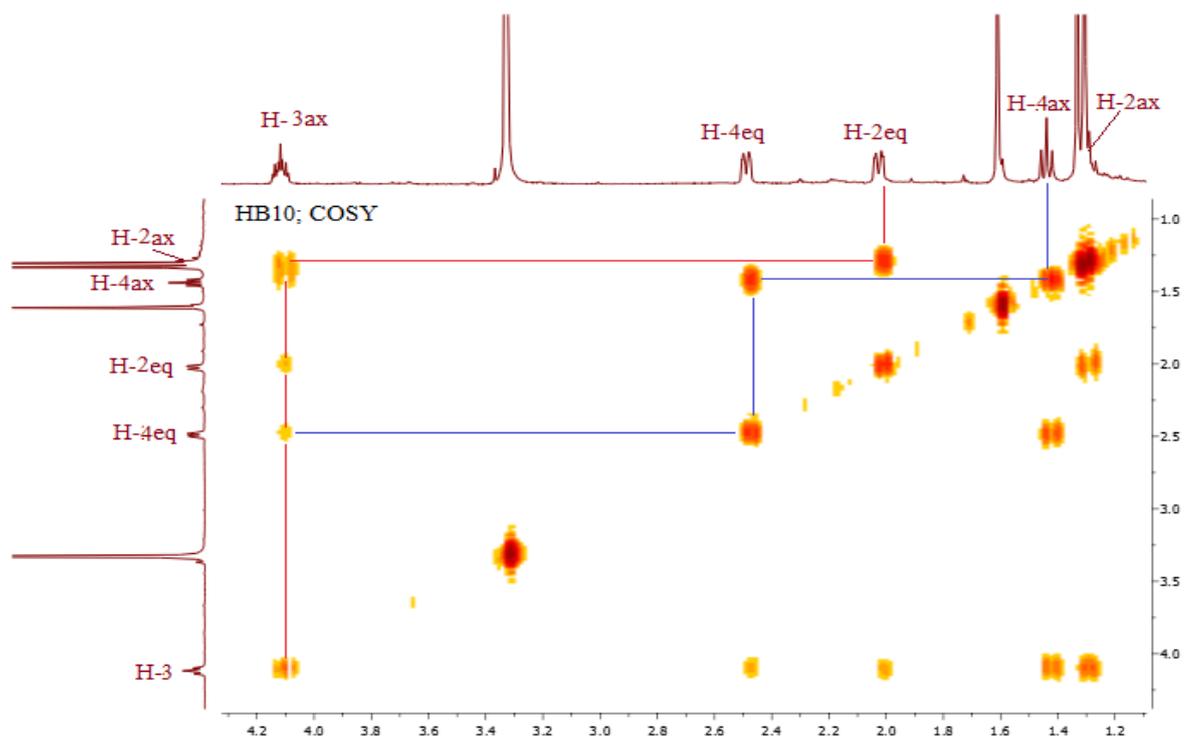
La différence entre les deux produits réside dans la configuration du proton H-3. En effet, dans le composé HB6, le proton H-3 est en configuration équatoriale avec une petite constante du couplage ( $J = 3,4$  Hz). Par contre, la configuration de ce même proton, dans le composé HB10, est axiale comme l'indique la valeur de la constante de couplage  $J = 11,4 ; 4,2$  Hz. Ceci est confirmé par les spectres COSY (Spectre III.1.52) et ROESY (Spectre III.1.53).

Sur le spectre COSY (Spectre III.1.52) le proton H-3 à  $\delta_H$  4,12 ppm montre des taches de corrélations avec les protons du CH<sub>2</sub>-2 résonant sous forme d'un doublet de doublet dédoublé à  $\delta_H$  2,03 ppm ( $J = 11,4 ; 3,8 ; 2,4$  Hz) pour le premier, et sous forme d'un triplet à  $\delta_H$  1,28 ppm ( $J = 13,2$  Hz) pour le second. Toujours sur le même spectre, le proton H-3 montre une tache de corrélation avec le proton H-4<sub>eq</sub> à  $\delta_H$  2,49 ppm résonant sous forme d'un doublet de doublet dédoublé ( $J = 11,4 ; 3,8 ; 2,4$  Hz).

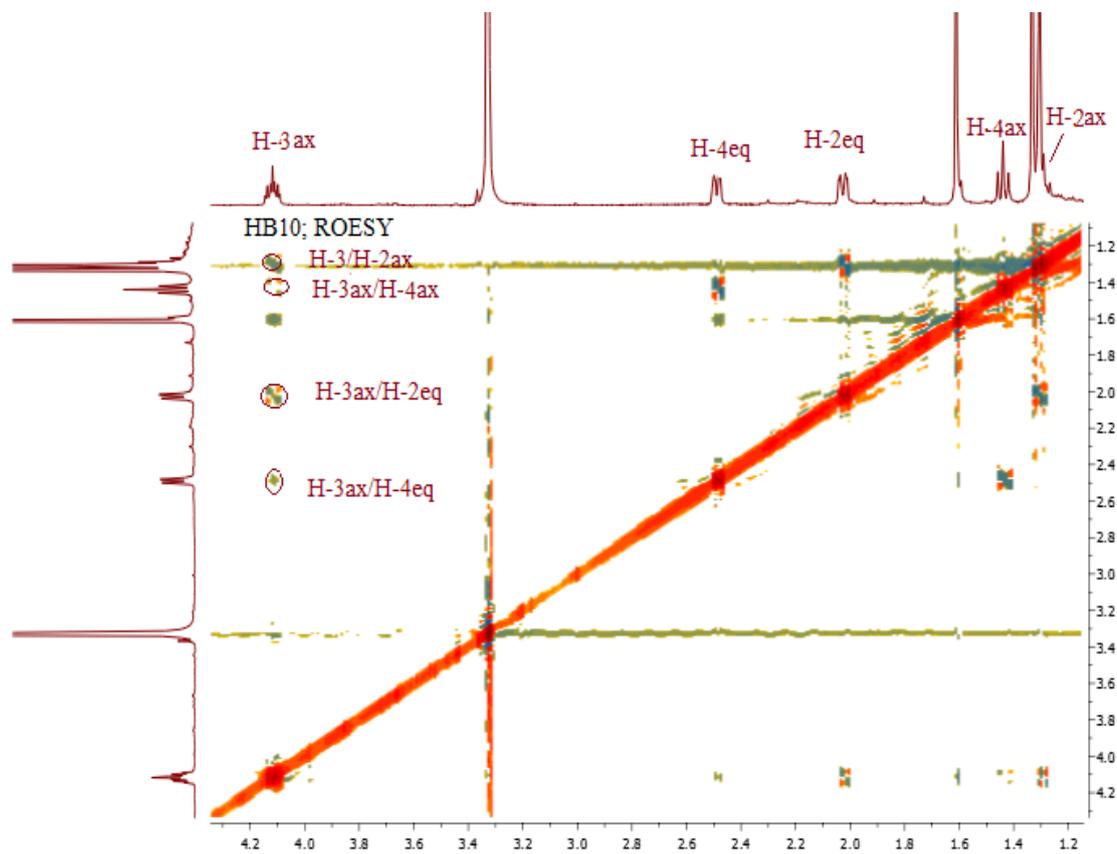
Par ailleurs, le spectre ROESY (Spectre III.1.53) montre une tache de corrélation entre H-3 et H-4<sub>ax</sub> ( $\delta_H$  1,44 ppm ;  $t$  ;  $J = 11,4$  Hz). Cette observation confirme bien l'orientation axiale de H-3 comme le montre la figure III.1.42.



**Figure III.1.42** : Les corrélations COSY et ROESY du proton H-3ax

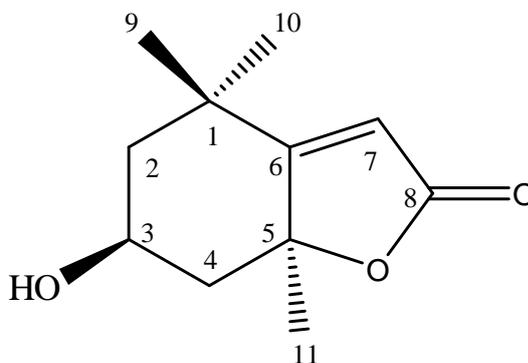


Spectre III.1.52 : Spectre COSY du composé **HB10** dans le  $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$ , étalement



Spectre III.1.53 : Spectre ROESY du composé **HB10** dans le  $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$  ; étalement

L'ensemble de cette analyse et toujours en se reportant aux données de la littérature montre qu'il s'agit d'un squelette monoterpénique comportant 11 atomes de carbone nommé C<sub>11</sub>-terpene lactone. Les valeurs de déplacement chimique des protons et des carbones de cette entité sont en parfait accord avec ceux de l'**isololiolide** [7]. Cette molécule est nouvelle pour le genre *Heliotropium*.

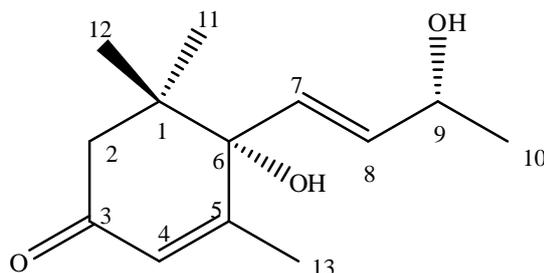


**Figure III.1.43** : Structure finale du composé **HB10**, isololiolide

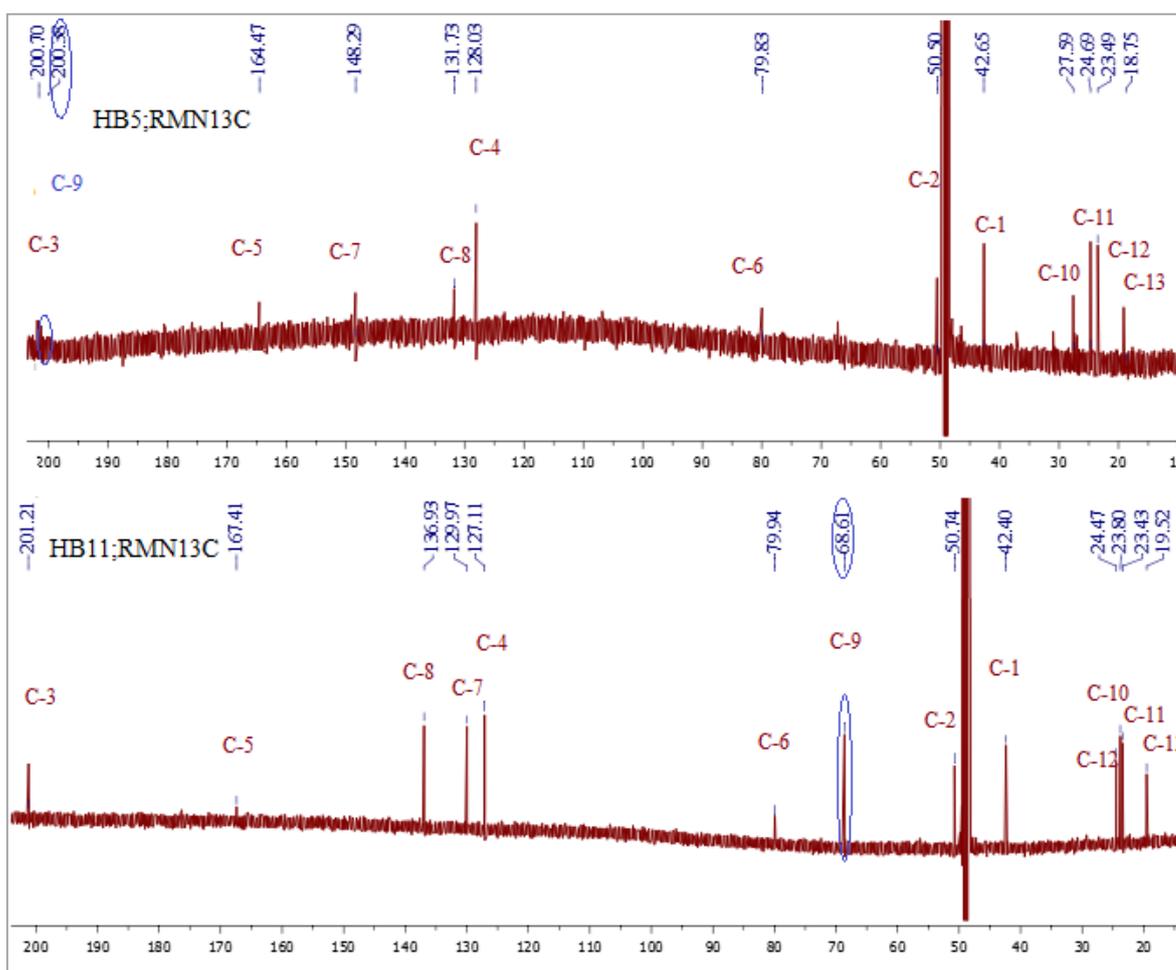
Toutes ces données sont reportées dans le tableau III.1.9.

**Tableau III.1.9** : Données spectrales de RMN du composé **HB10**.

Positions	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, $J$ en Hz)	HMBC H-C
1	35,7	-	
2eq	50,8	2,03 ( <i>ddd</i> ; 11,4 ; 3,8 ; 2,4)	
2ax		1,28 ( <i>t</i> ; 11,4)	10, 6, 4, 3, 1
3 ax	64,6	4,12 ( <i>tt</i> ; 11,4 ; 4,2)	11, 5, 3, 2
4eq	48,4	2,49 ( <i>ddd</i> ; 11,4 ; 3,8 ; 2,4)	-
4ax		1,44 ( <i>t</i> ; 11,4)	11, 5, 3, 2, 1
5	88,1	-	
6	183,3	-	
7	112,7	5,79 <i>s</i>	-
8	173,3	-	6, 5, 8, 1
9	29,7	1,33 (3H, <i>s</i> )	
10	24,6	1,31 (3H, <i>s</i> )	10, 6, 2, 3, 1
11	25,7	1,61(3H, <i>s</i> )	6, 2, 1, 3

III.1.2.10. Elucidation structurale du composé **HB11**

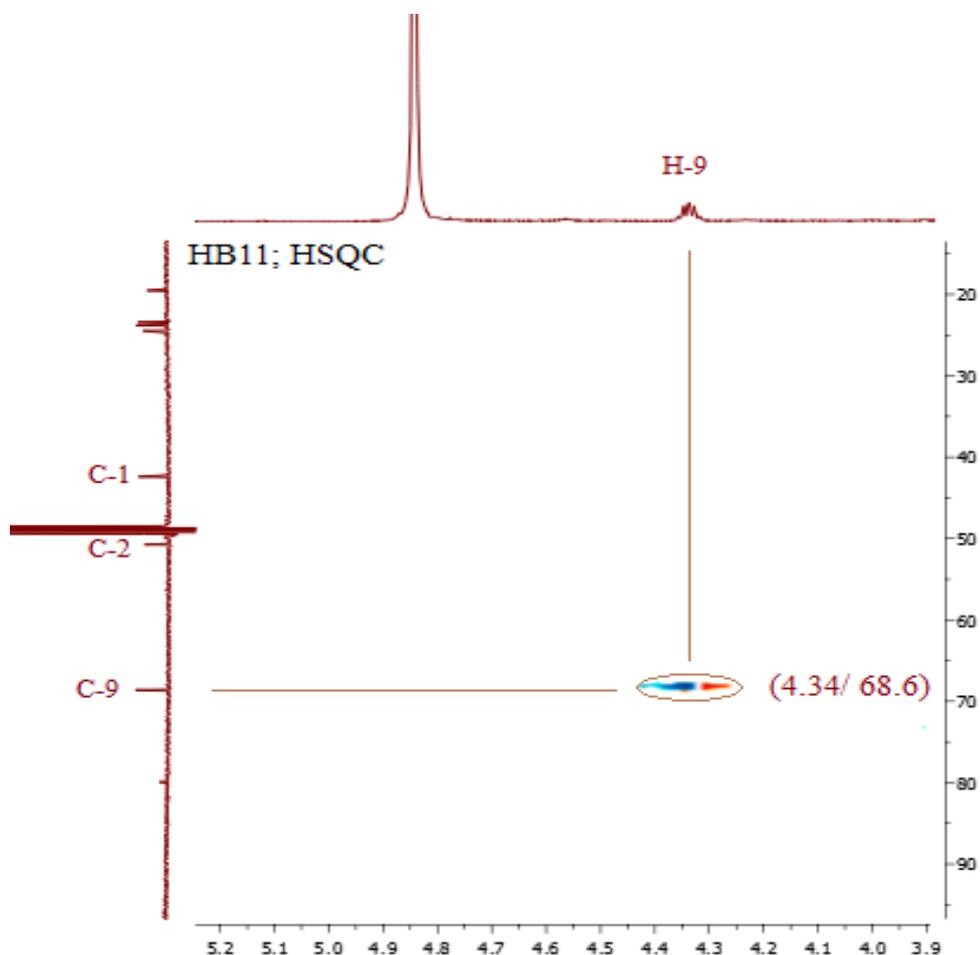
Le spectre RMN<sup>13</sup>C (Spectre III.1.54) de ce composé est très similaire à celui de composé précédent **HB5** (**Dehydrovomifoliol**).



**Spectre III.1.54** : Spectre RMN<sup>13</sup>C (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> ; 150 MHz) des composés **HB11** et **HB5**

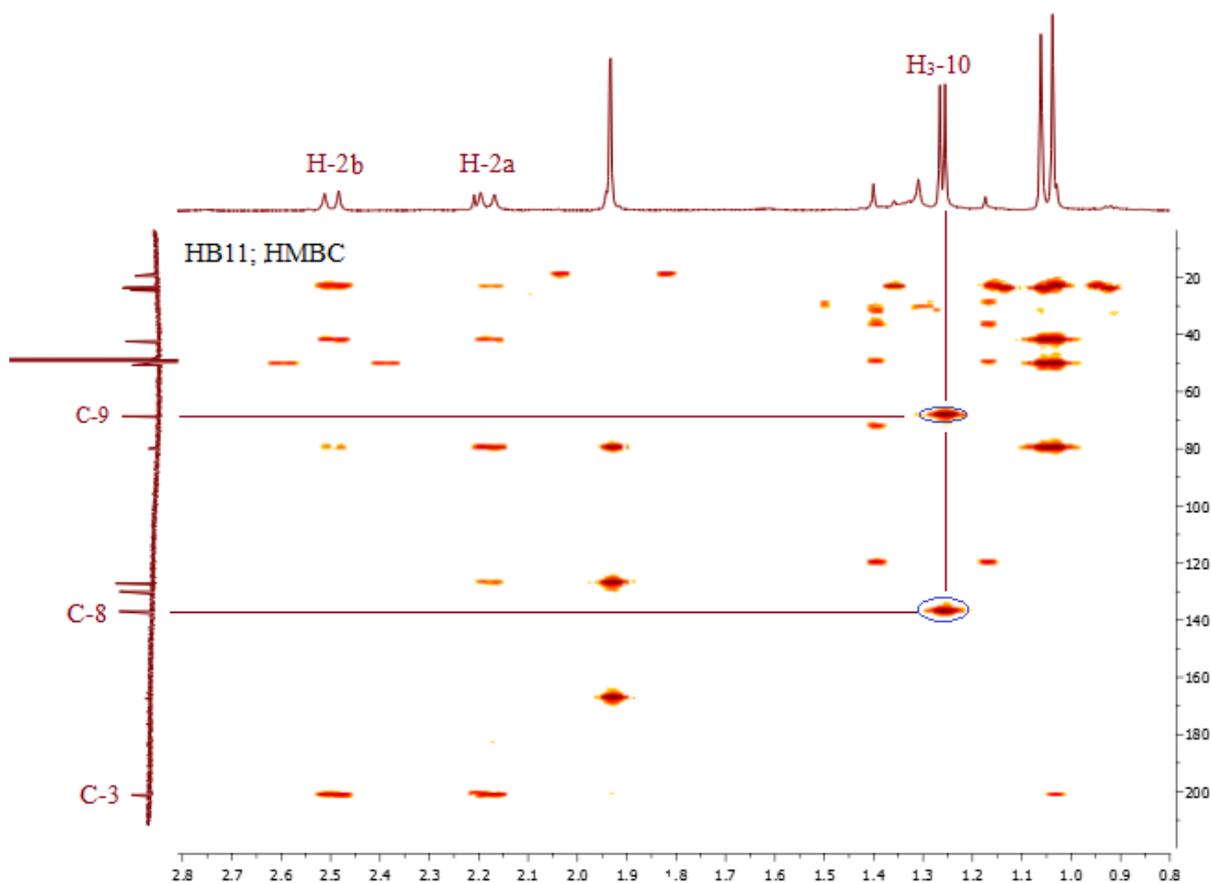
Un examen approfondi des deux spectres RMN<sup>13</sup>C indique que la différence entre les deux composés réside d'une part, dans la disparition du signal correspondant au carbone de la fonction cétone ( $\delta_C$  200,4 ppm) et d'autre part l'apparition d'un autre signal à  $\delta_C$  68,6 ppm correspondant à un CH oxygéné.

Le proton de ce groupement CH apparaît sous forme d'un quadruplet de doublet ( $J = 6,3 ; 5,4$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  4,34 ppm sur le spectre proton (spectre III.1.55), ce dernier corrèle sur le spectre HSQC (Spectre III.1.56) avec le carbone oxygéné précédent ( $\delta_C$  68,6 ppm).



**Spectre III.1.56** : Spectre HSQC du composé **HB11** dans le  $CH_3OH-d_4$ ; étalement

Ces observations indiquent une réduction de la position C-9 du **Dehydrovomifoliol** pour donner le (+)-Blumenol A. La position de l'hydroxyle en C-9 est bien confirmée par le spectre HMBC (Spectre III.1.57) qui montre une tache de corrélation nette entre les protons du  $CH_3-10$  à  $\delta_H$  1,26 ppm qui apparaissent sous forme d'un doublet ( $J = 6,3$  Hz) et le carbone de ce CH oxygéné.



Spectre III.1.57 : Spectre HMBC du composé **HB11** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ; étalement

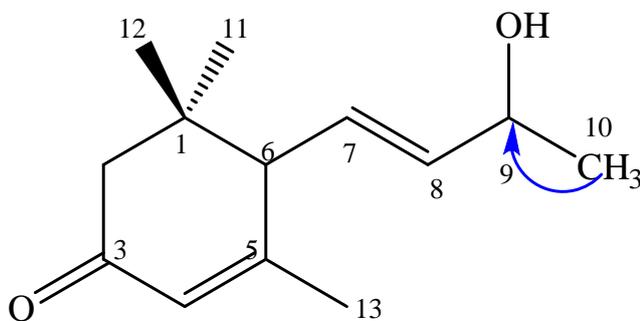


Figure III.1.44 : Corrélation HMBC

L'analyse des spectres HSQC, HMBC et COSY nous a permis d'élucider la structure de **HB11** comme étant le (+)-**Blumenol A**, cette molécule (figure III.1.45) a été déjà isolé de l'espèce *Heliotropium angiospermum* [5].

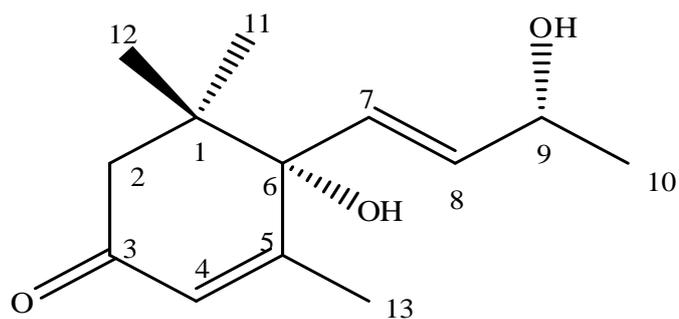
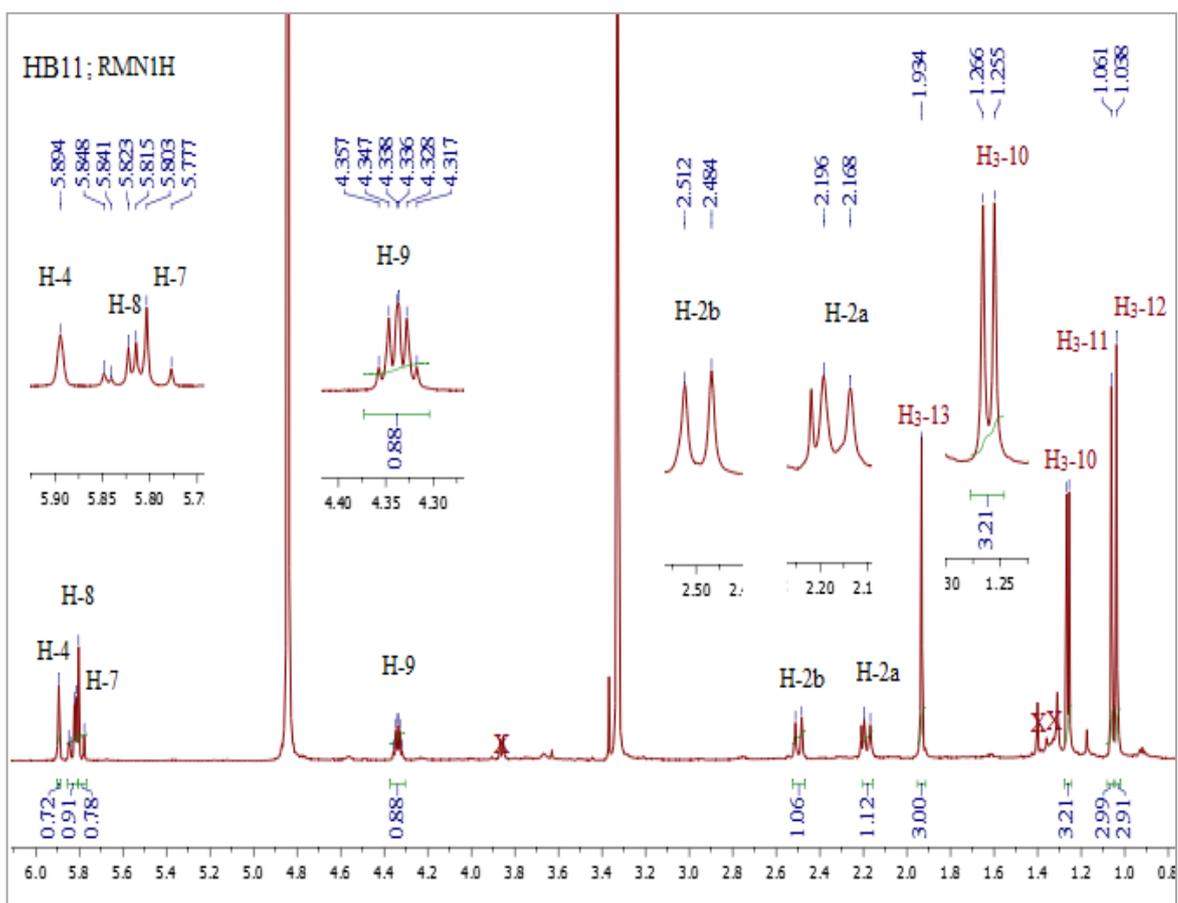
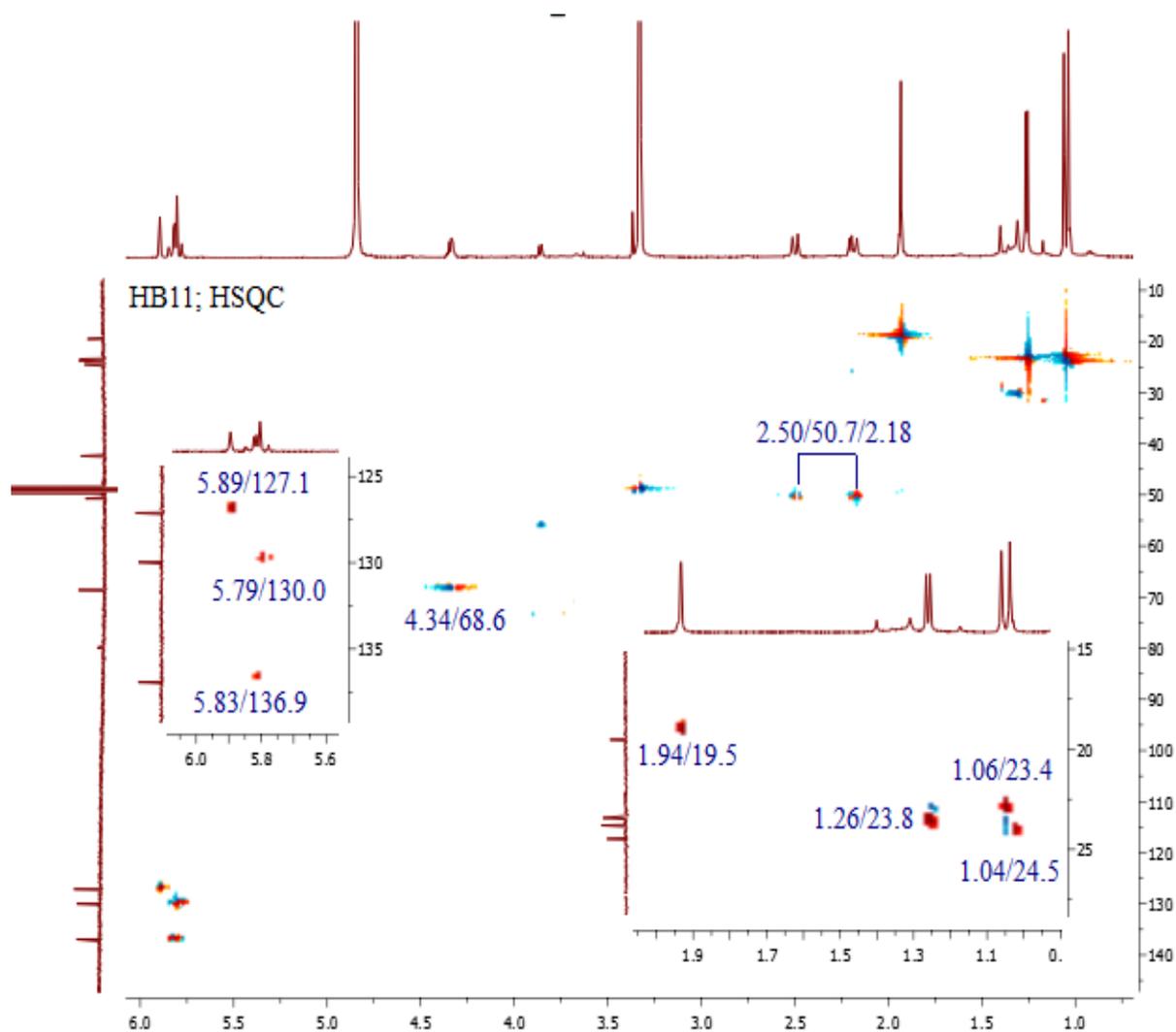


Figure III.1.45 : Structure du composé **HB11**, (+)-Blumenol A

Toutes ces données sont reportées sur les spectres du RMN<sup>13</sup>C, RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.1.55) et HSQC (Spectre III.1.58)



Spectre III.1.55 : Spectre RMN<sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>; 600 MHz) du composé **HB11**

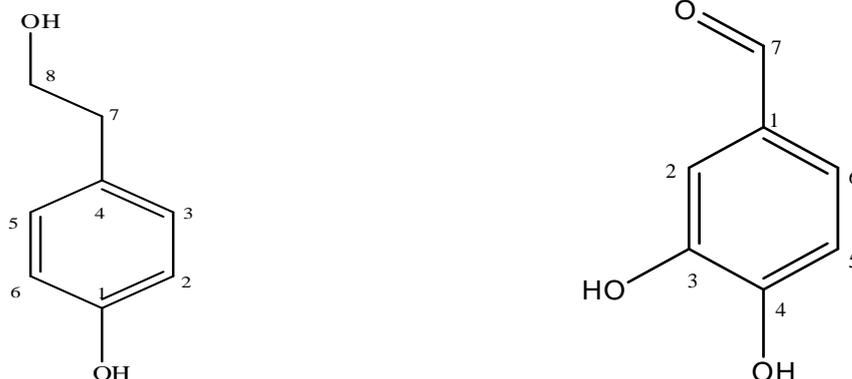


**Spectre III.1.58** : Spectre HSQC du composé **HB11** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$

Le tableau III.1.10 regroupe les attributions des différents signaux en RMN $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  et HMBC.

Tableau III.1.10 : Les données spectrales de RMN du composé HB11.

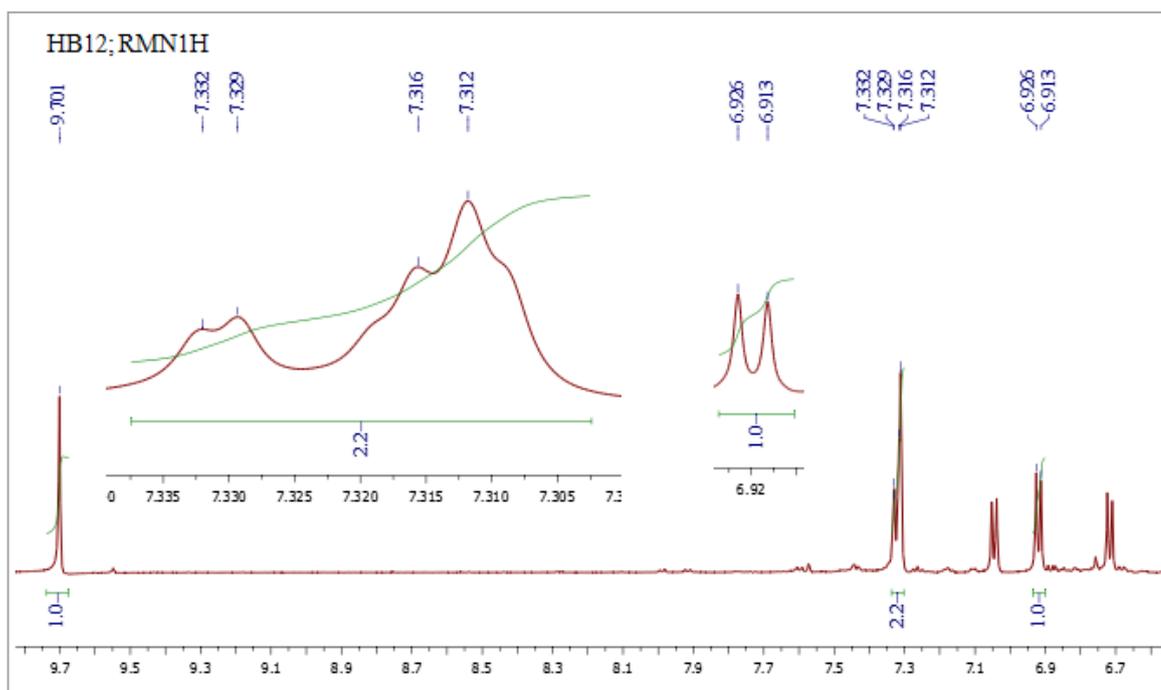
Positions°	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, <i>J</i> en Hz)	HMBC H-C
1	42,4	-	
2a	50,7	2,18 ( <i>d</i> ; 16,8)	1, 3, 11
2b		2,50 ( <i>d</i> ; 16,8)	3, 6
3	201,2	-	
4	127,1	5,89 <i>sl</i>	2, 6, 13
5	167,4	-	
6	79,9	-	
7	130,0	5,79 ( <i>d</i> ; 15,6)	
8	136,9	5,83 ( <i>dd</i> ; 15,3; 4,5)	6, 9
9	68,6	4,34 ( <i>qd</i> ; 6,3; 5,4)	7; 8; 10
10	23,8	1,26 (3H; <i>d</i> ; 6,6)	9, 8
11	23,4	1,06 (3H; <i>s</i> )	1, 2, 6, 12
12	24,5	1,04 (3H; <i>s</i> )	1, 2, 6, 11
13	19,5	1,94 (3H; <i>s</i> )	4, 5, 6

III.1.2.11. Elucidation structurale des composés **HB12** et **HB13**

L'examen du spectre RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.1.59) de ce composé, permet de relever :

- Un signal très déblindé sous forme d'un singulet à  $\delta_H$  9,70 ppm. La valeur de déplacement chimique de ce proton est caractéristique du proton faisant partie d'une fonction aldéhyde.
- Un doublet large ( $J = 7,8$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  7,33 ppm.
- Un singulet large d'intégration 1H à  $\delta_H$  7,31 ppm.
- Un doublet ( $J = 7,8$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  6,92 ppm.

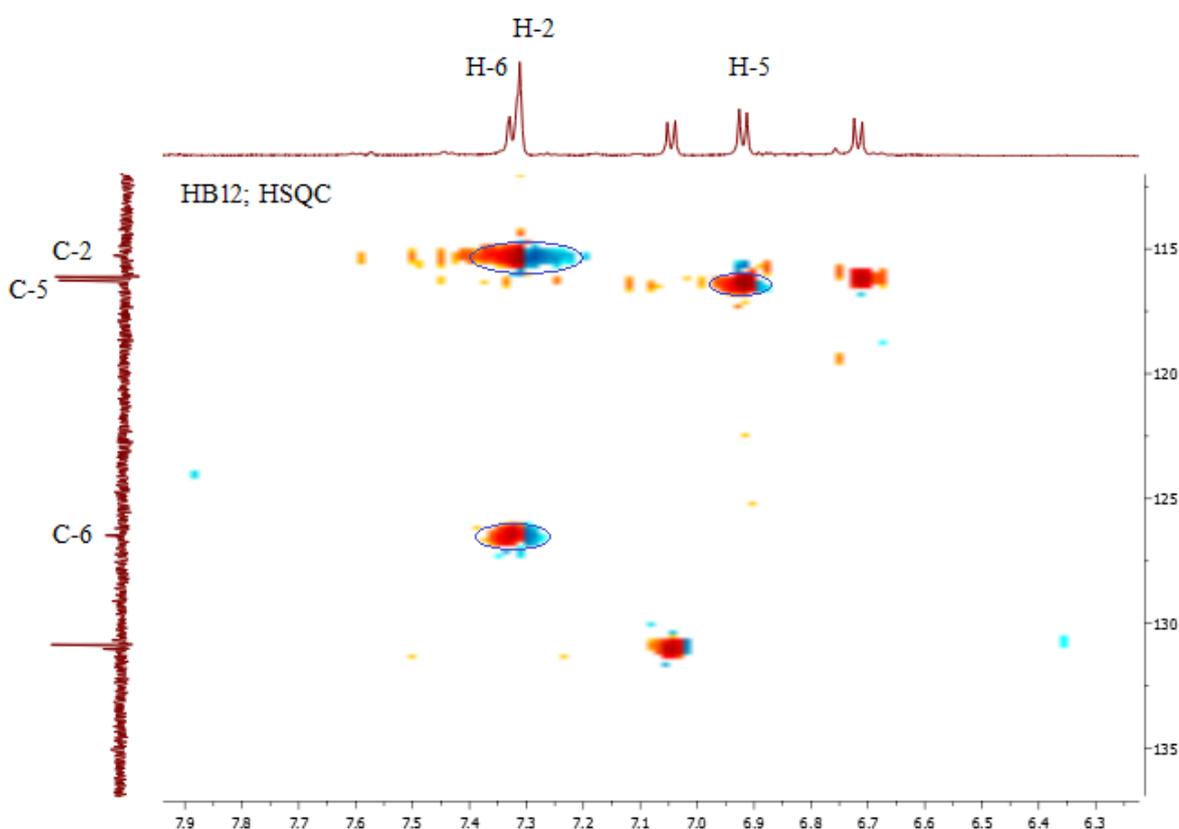
Les valeurs des déplacements chimiques ainsi que celles des constantes de couplage orientent vers la présence d'un noyau aromatique trisubstitué dans les positions 1, 3 et 4.



**Spectre III.1.59** : Spectre RMN <sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> ; 600 MHz) du composé **HB12**

L'étude du spectre relatif à l'expérience HSQC (Spectre III.1.60) montre que :

- Le proton résonnant à  $\delta_H$  9,70 ppm corrèle avec le carbone à  $\delta_C$  192,5 ppm. Ceci permet de confirmer la présence d'une fonction aldéhyde dans la molécule.
- Le proton H-6 résonnant à  $\delta_H$  7,33 ppm corrèle avec le carbone à  $\delta_C$  126,0 ppm attribuable à C-6
- Le proton H-2 résonnant à  $\delta_H$  7,31 ppm corrèle avec le carbone C-2 résonnant à  $\delta_C$  114,8 ppm.
- Le proton H-5 résonnant à  $\delta_H$  6,92 ppm corrèle avec le carbone C-5 résonnant à  $\delta_C$  115,8 ppm.



**Spectre III.1.60** : Spectre HSQC du composé **HB12** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$

Par ailleurs sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre III.1.61), la corrélation entre le proton de la fonction aldéhyde ( $\delta_H$  9,70 ppm) et le carbone quaternaire à  $\delta_C$  130,6 ppm permet son attribution au carbone à C-1. Les corrélations entre les protons H-2 et H-5 et le carbone quaternaire oxygéné à  $\delta_C$  146,5 ppm permettent l'attribution de ce carbone à C-3. Les corrélations entre les protons H-2, H-5 et H-6 et le carbone quaternaire oxygéné à  $\delta_C$  153,7 ppm permettent son attribution à C-4. L'ensemble de ces constatations indique

qu'il s'agit d'un aldéhyde phénolique substitué en C-3 et C-4 et permet de proposer la structure partielle reportée dans la figure III.1.46.

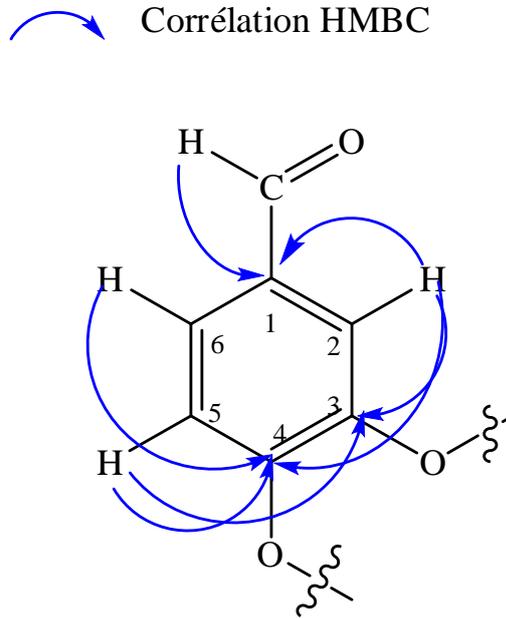
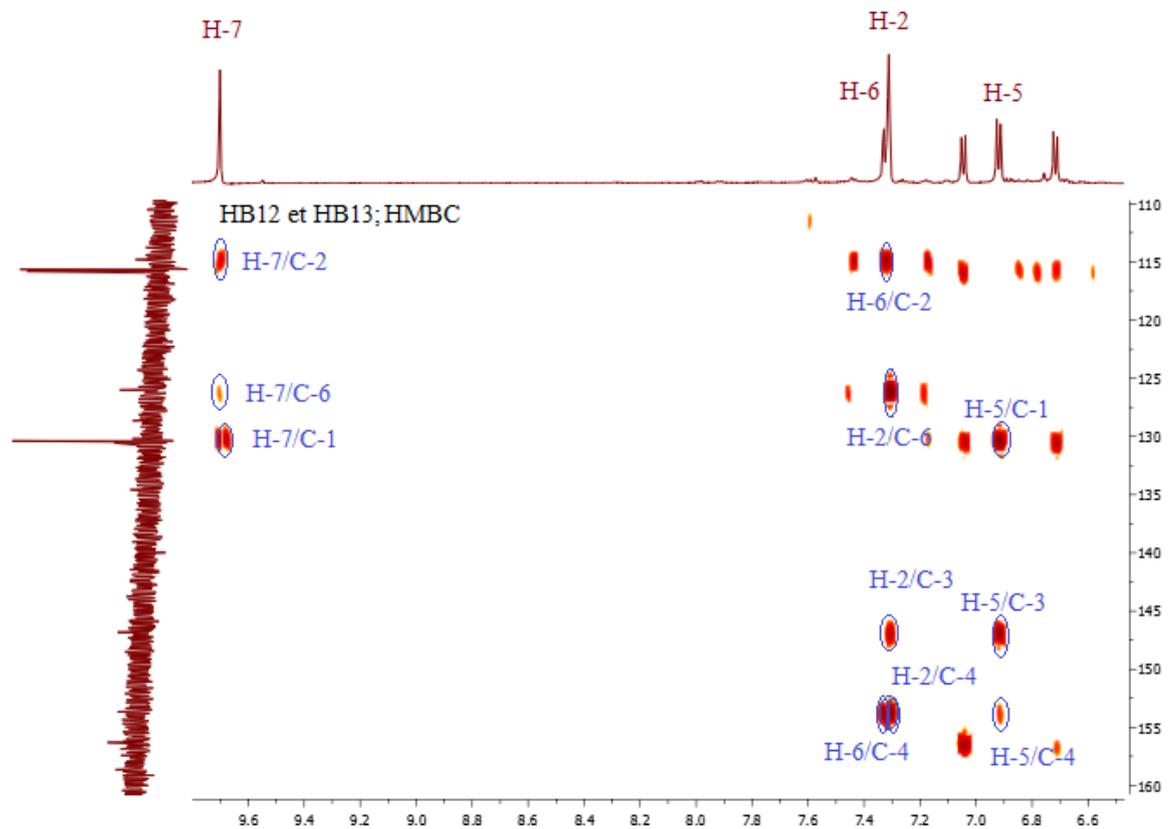
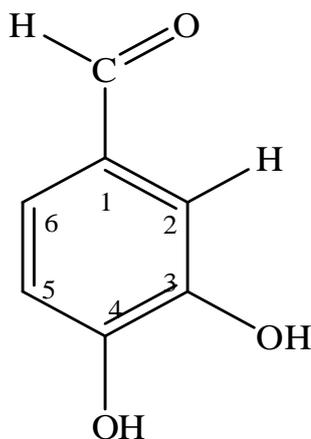


Figure III.1.46 : Structure partielle du composé **HB12**



Spectre III.1.61 : Spectre HMBC du composé **HB12** dans le  $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$

L'ensemble de cette analyse et par comparaison avec les données de la littérature montre qu'il s'agit d'un **protocatechualdéhyde** (PCA) [8], elle est nouvelle pour le genre *Heliotropium*. Le PCA est un aldéhyde phénolique naturel que l'on trouve dans l'orge [9], les bananes vertes de Cavendish [10], les feuilles de vigne [11] et les racines de l'herbe *S. miltiorrhiza* [12]. Le PCA possède des propriétés anti-athérosclérose [13], des effets antioxydants, des effets anti-inflammatoires [14], des propriétés antiprolifératives et pro-apoptotiques contre les cellules cancéreuses mammaires humaines [12] et les cellules cancéreuses colorectales en réduisant l'expression de la  $\beta$ -caténine prooncogène [15].



**Figure III.1.47** : Structure finale du composé **HB12**, Protocatechualdéhyde

Les données de RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C et corrélations HMBC sont reportées dans le Tableau III.1.11.

**Tableau III. 1.11** : Données spectrales RMN du composé **HB12**

Positions	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, $J$ en HZ)	HMBC H-C
1	130,6	-	
2	114,8	7,31 <i>sl</i>	3, 4, 6, 7
3	146,5	-	
4	153,7	-	
5	115,8	6,92 ( <i>d</i> ; 7,8)	1, 3, 4
6	126,0	7,33 ( <i>dl</i> ; 7,8)	2, 4, 7
7	192,5	9,70 (1H ; <i>s</i> )	1, 2, 6

L'abstraction des signaux relative au spectre proton du composé **HB12** (Spectre III.1.62), montre la présence d'autres signaux indiquant qu'il s'agit d'un mélange. Ce spectre montre la totalité des signaux des deux molécules avec des intensités différentes. Un dosage par RMN<sup>1</sup>H permet de déduire que cet échantillon renferme environ 73% du composé **HB12** et 27% du composé **HB13**.

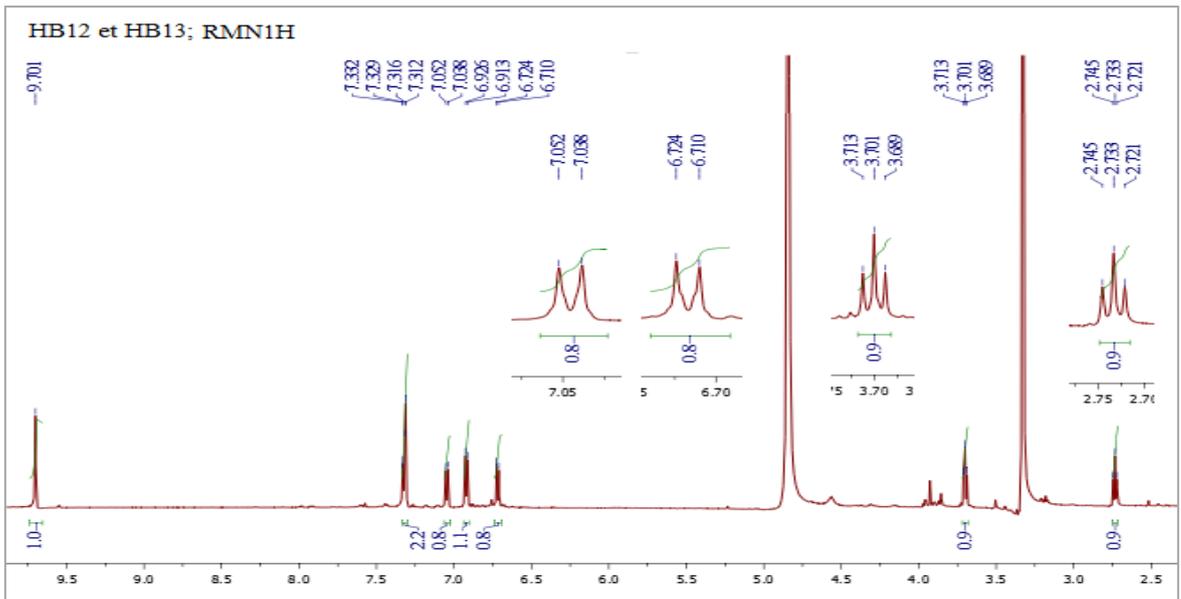
L'étude simultanée des spectres proton (Spectre III.1.62), HSQC (Spectre III.1.63) et COSY (Spectre III.1.64) permet de tirer les indications suivantes :

- Un doublet ( $J = 8,4$  Hz) d'intégration 2H à  $\delta_H$  7,04 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_C$  130,4 ppm attribuable à H-3 (C-3) et H-5 (C-5).
- Un doublet ( $J = 8,4$  Hz) d'intégration 2H à  $\delta_H$  6,72 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_C$  115,6 ppm attribuable à H-2 (C-2) et H-6 (C-6).

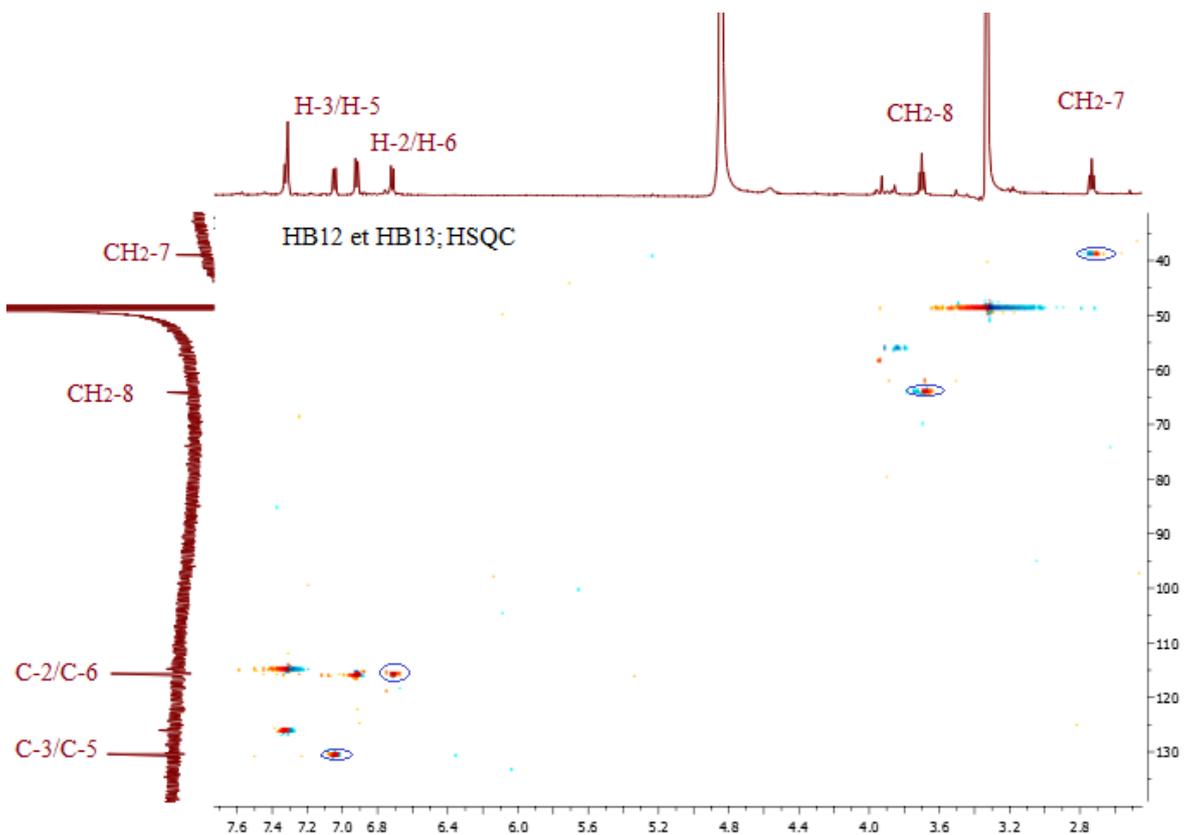
Les valeurs des déplacements chimiques ainsi que celles des constantes de couplage orientent vers la présence d'un noyau aromatique para-substitué. Ceci est d'ailleurs confirmé par la tache de corrélation sur le spectre COSY.

- Un triplet ( $J = 7,2$  Hz) d'intégration 2H à  $\delta_H$  3,70 ppm. Ce signal montre, sur le spectre HSQC, une tache de corrélation avec le signal à  $\delta_C$  63,8 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques des protons et de leur carbone indiquent clairement qu'il s'agit d'un CH<sub>2</sub> oxygéné.
- Un triplet ( $J = 7,2$  Hz) d'intégration 2H à  $\delta_H$  2,73 ppm montre une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  38,6 ppm. vu les valeurs de leurs déplacement chimique, ce proton ne peut être que benzylique et de ce fait ce CH<sub>2</sub> est porté par le cycle aromatique.

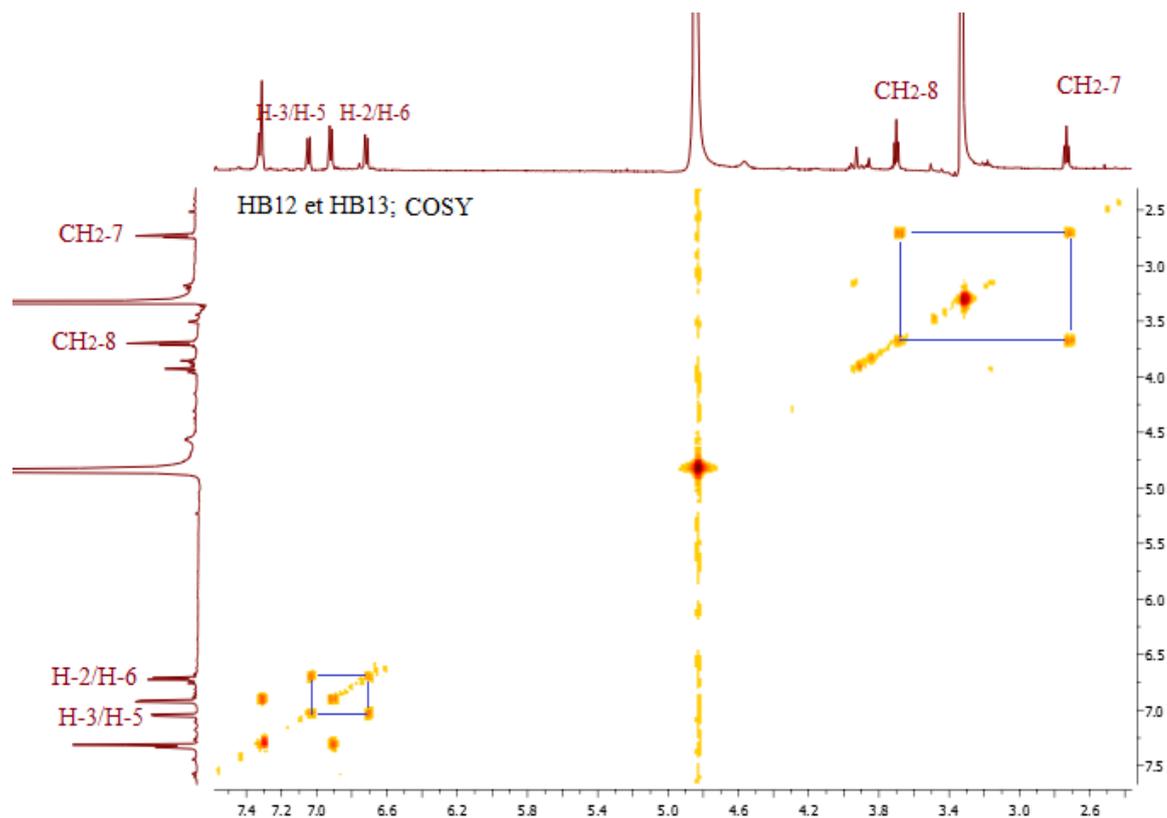
La multiplicité des deux derniers signaux (CH<sub>2</sub>-8 et CH<sub>2</sub>-7) indique que les deux groupements CH<sub>2</sub> sont reliés. Ceci est confirmé par les taches de corrélation se trouvant sur le spectre COSY (Spectre III.1.64).



Spectre III.1.62 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$  ; 600 MHz) du composé **HB13**



Spectre III.1.63 : Spectre HSQC du composé **HB13** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$



**Spectre III.1.64** : Spectre COSY du composé **HB13** dans le  $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre III.1.65), les deux protons H-3 et H-5 montrent des corrélations avec le carbone quaternaire aromatique résonant à  $\delta_{\text{C}}$  130,6 ppm attribuable à C-4.

Toujours sur le même spectre, les deux protons H-2 et H-6 montrent une tache de corrélation avec le carbone quaternaire aromatique oxygéné résonant à  $\delta_{\text{C}}$  156,2 ppm attribuable à C-1.

Par ailleurs, Les protons du groupement  $\text{CH}_2$  oxygéné résonant à  $\delta_{\text{H}}$  3,70 ppm montrent une tache de corrélation sur le spectre HMBC avec le carbone du deuxième groupement  $\text{CH}_2$  à  $\delta_{\text{C}}$  38,6 ppm. Ces deux méthylènes dont nous numérotions les carbones C-8 et C-7 respectivement, et d'autre part les protons des deux groupements  $\text{CH}_2$  montrent des taches de corrélation avec un carbone quaternaire aromatique résonant à  $\delta_{\text{C}}$  130,6 ppm attribuable à C-4, comme reporté dans la figure III.1.48.

Corrélation HMBC

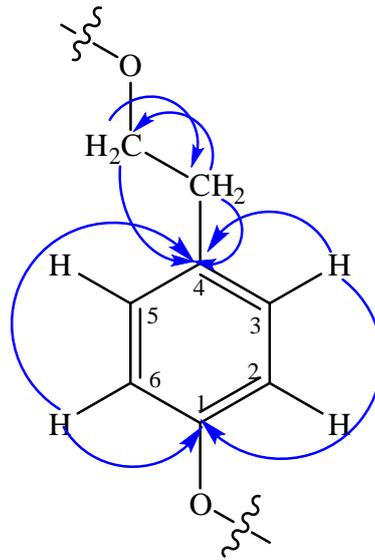
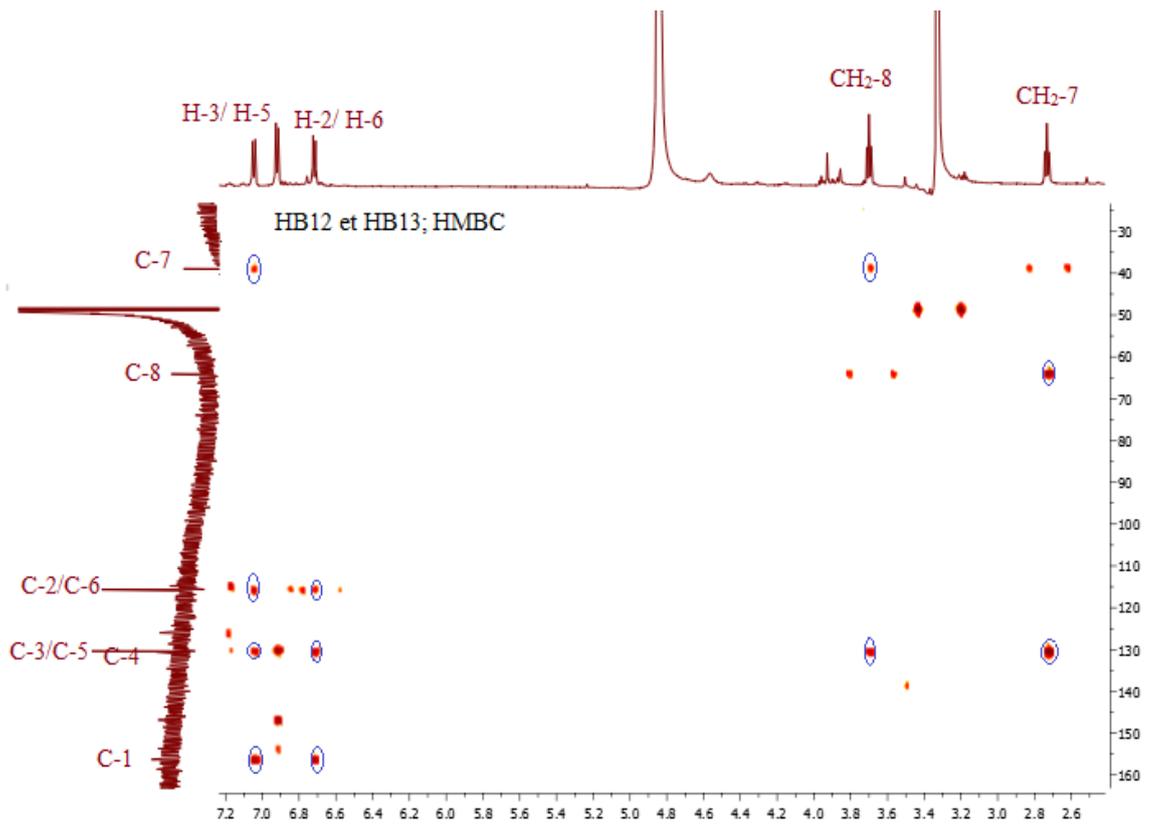
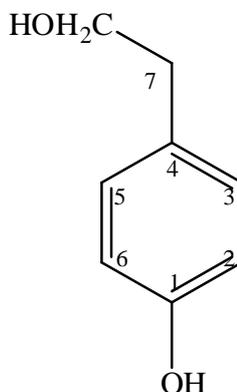


Figure III.1.48 : Structure partielle du composé **HB13**



Spectre III.1.65 : Spectre HMBC du composé **HB13** dans le  $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$

L'ensemble de cette analyse et par comparaison avec les données de la littérature montre qu'il s'agit d'un 4-hydroxyphényléthanol (**Tyrosol**) [16]. Cette molécule est nouvelle pour le genre *Heliotropium*.



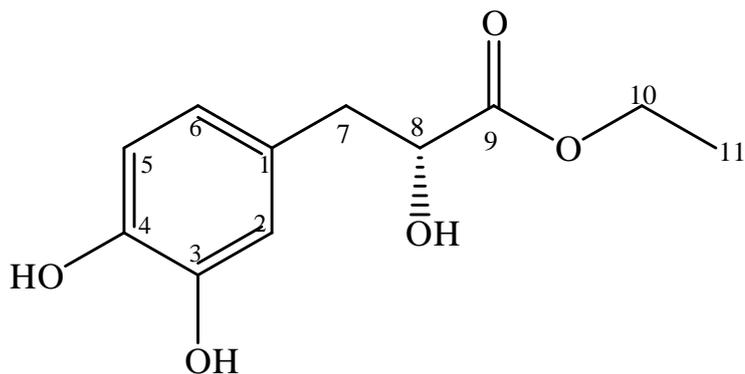
**Figure III.1.49** : Structure finale du composé **HB13**, **Tyrosol**

Le tyrosol est un composé d'intérêt pharmaceutique présentant une activité antioxydante, une propriété utilisée dans le traitement de l'athérosclérose [16].

Les données de RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C et corrélations HMBC sont reportées dans le Tableau III.1.12.

**Tableau III. 1.12** : Les données spectrales RMN du composé **HB13**

Positions	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, <i>J</i> en HZ)	HMBC H-C
1	156,2	-	
2/6	115,6	6,72 (2H; <i>d</i> ; 8,4)	2/6, 3/5, 1
3/5	130,4	7,04 (2H; <i>d</i> ; 8,4)	7, 2/6, 4, 1
4	130,6	-	
7	38,6	2,73 (2H; <i>t</i> ; 7,2)	4, 8
8	63,8	3,70 (2H; <i>t</i> ; 7,2)	4, 7

III.1.2.12. Elucidation structurale du composé **HB14**

L'examen simultané des spectres RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.1.66) et HSQC (spectre III.1.67) permettent de relever dans cette molécule la présence de :

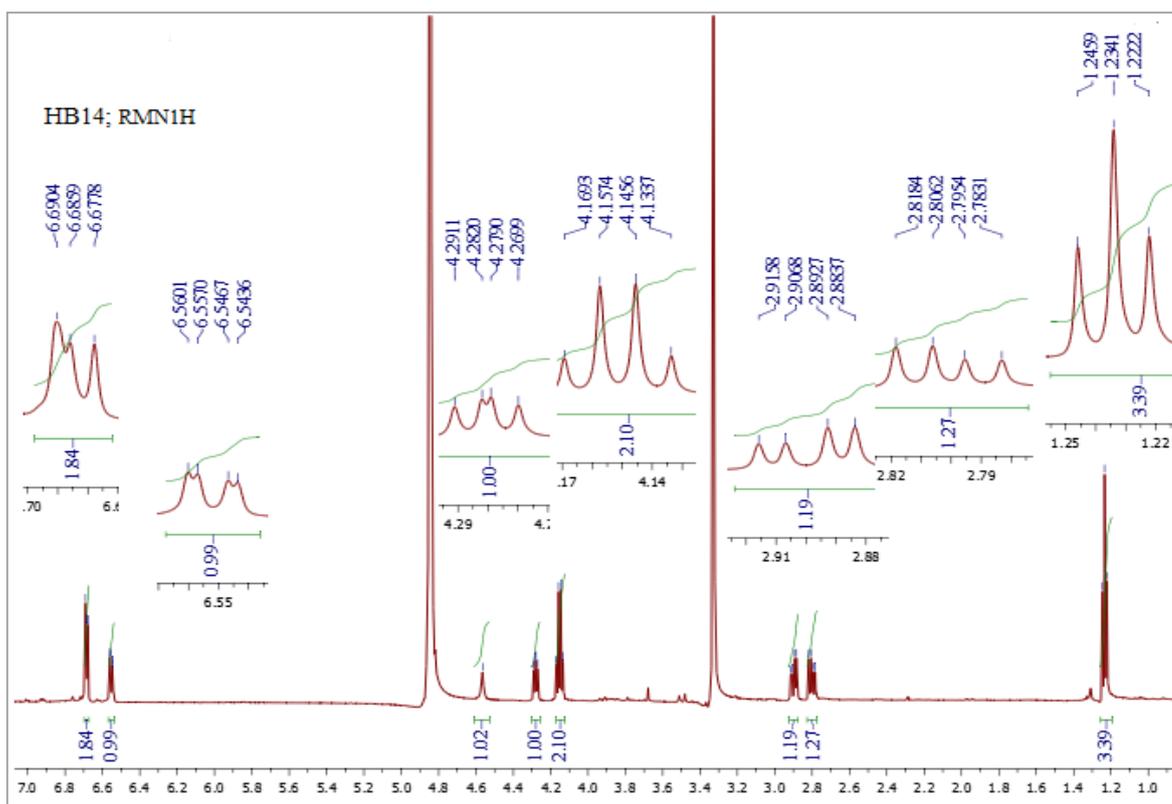
- Un signal à  $\delta_{\text{H}}$  6,69 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet ( $J = 2,7$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  115,9 ppm.
- Un signal à  $\delta_{\text{H}}$  6,68 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet ( $J = 7,6$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  117,6 ppm.
- Un signal à  $\delta_{\text{H}}$  6,55 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet de doublet ( $J = 8,0 ; 1,9$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  121,4 ppm.

Les valeurs des déplacements chimiques ainsi que celles des constantes de couplage orientent vers la présence d'un système ABX correspondant à un cycle aromatique 1, 3, 4-trisubstitué.

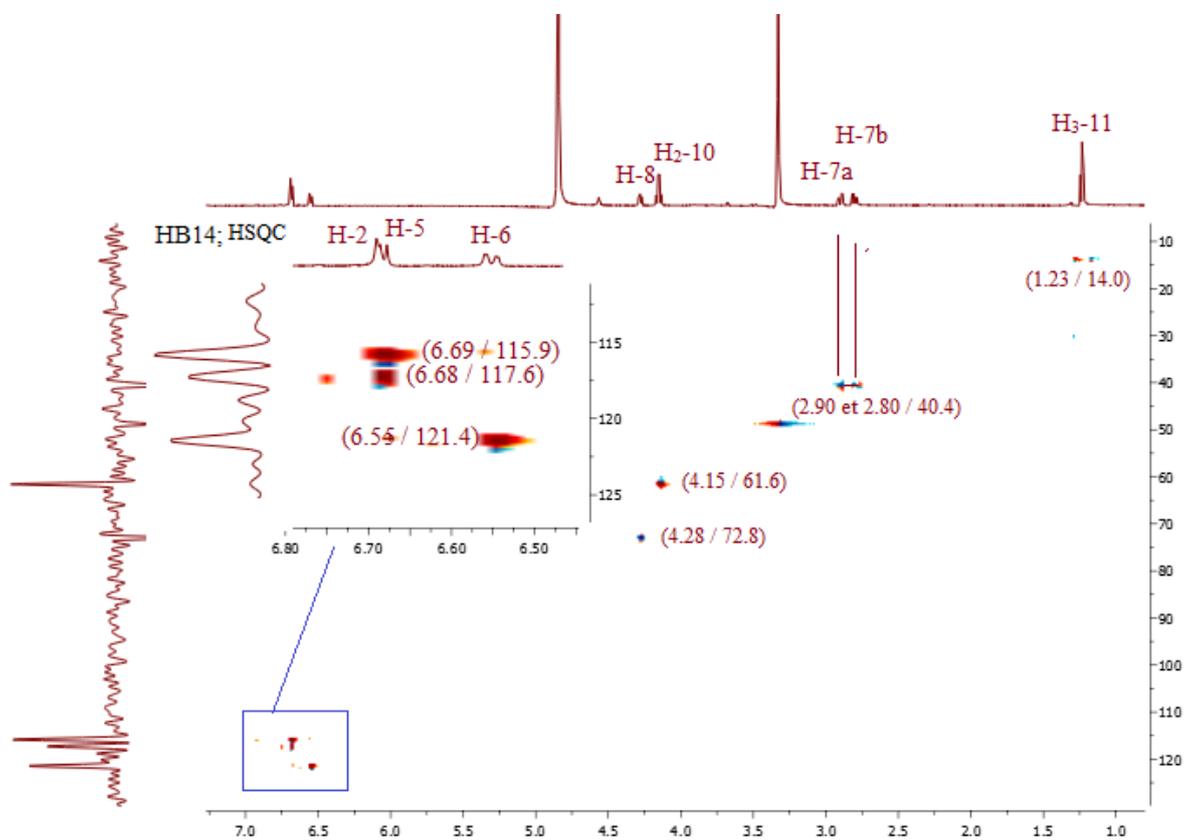
- Un signal à  $\delta_{\text{H}}$  4,28 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet de doublet ( $J = 7,3 ; 5,5$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  72,8 ppm.
- Un signal à  $\delta_{\text{H}}$  4,15 ppm d'intégration 2H sous forme d'un quadruplet ( $J = 7,1$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  61,6 ppm.

Les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones de ces deux signaux indiquent qu'ils sont oxygénés

- Deux signaux d'intégration 1H chacun sous forme d'un doublet de doublet ( $J = 13,9 ; 5,4$  Hz) à  $\delta_{\text{H}}$  2,90 ppm pour le premier et à  $\delta_{\text{H}}$  2,80 ppm ( $J = 13,8 ; 7,3$  Hz) pour le second, corrélerent sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  40,4 ppm.
- Un signal à  $\delta_{\text{H}}$  1,23 ppm d'intégration 3H sous forme d'un triplet ( $J = 7,1$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  14,0 ppm.



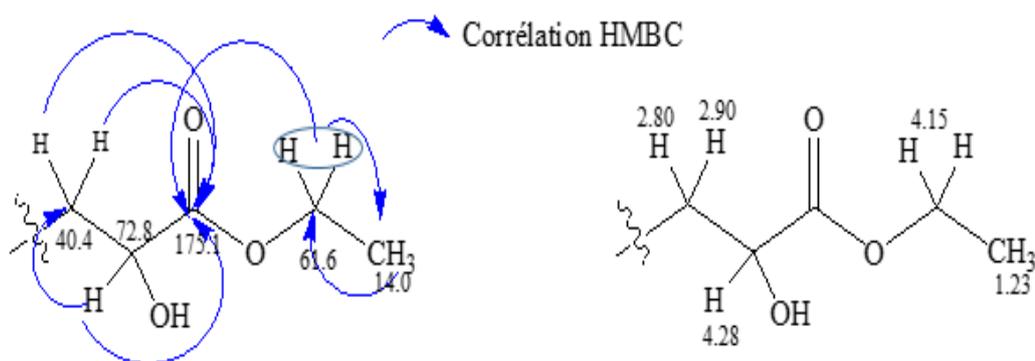
Spectre III.1.66 : Spectre RMN<sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub> ; 600 MHz) du composé **HB14**



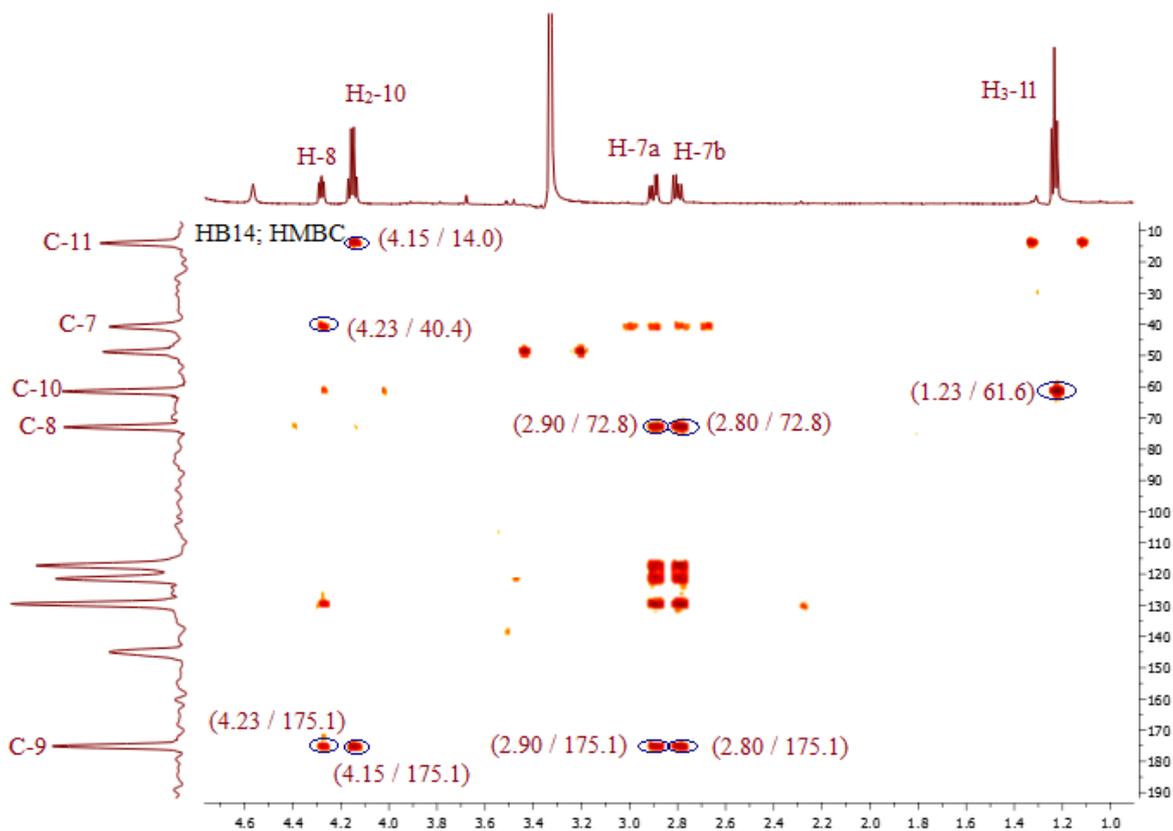
Spectre III.1.67 : Spectre HSQC du composé **HB14** dans le CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>

L'étude du spectre HMBC (Spectre III.1.68) montre des taches de corrélation entre les protons du groupement  $\text{CH}_2$  résonant sous forme d'un quadruplet à  $\delta_{\text{H}}$  4,15 ppm ( $J = 7,1$  Hz) et le carbone du groupement  $\text{CH}_3$  relevé à  $\delta_{\text{C}}$  14,0 ppm d'une part et le carbone du carbonyle relevé à  $\delta_{\text{C}}$  175,1 ppm d'autre part. Ce dernier donne des taches de corrélation avec le proton du groupement  $\text{CH}$  résonant sous forme d'un doublet de doublet à  $\delta_{\text{H}}$  4,28 ppm ( $J = 7,3 ; 5,5$  Hz ;  $\delta_{\text{C}}$  61,6 ppm) et les protons du groupement  $\text{CH}_2$  dont chaque proton résonne sous forme d'un doublet de doublet à  $\delta_{\text{H}}$  2,90 ppm ( $J = 13,9 ; 5,4$  Hz) pour le premier et 2,80 ppm ( $J = 13,8 ; 7,3$  Hz) ( $\delta_{\text{C}}$  40,4 ppm) pour le second.

Ces observations permettent de proposer la présence dans cette molécule, de l'entité 1, reportée dans la figure III.1.50.

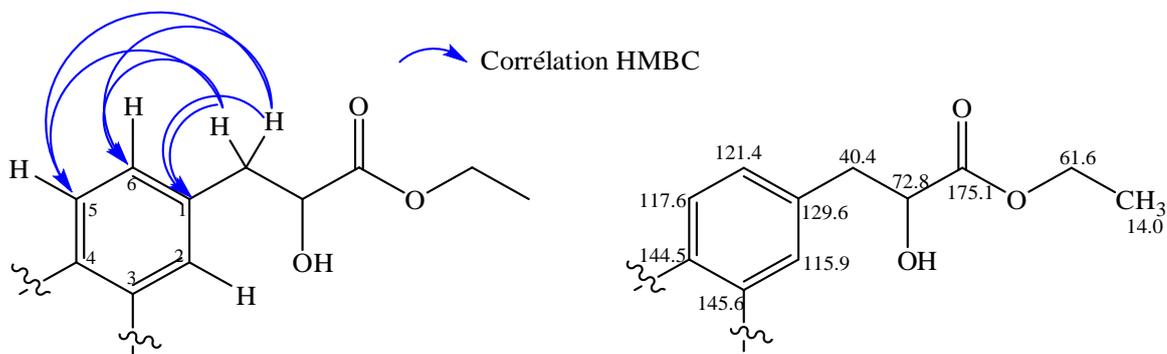


**Figure III.1.50** : Entité 1 présente dans le composé **HB14**

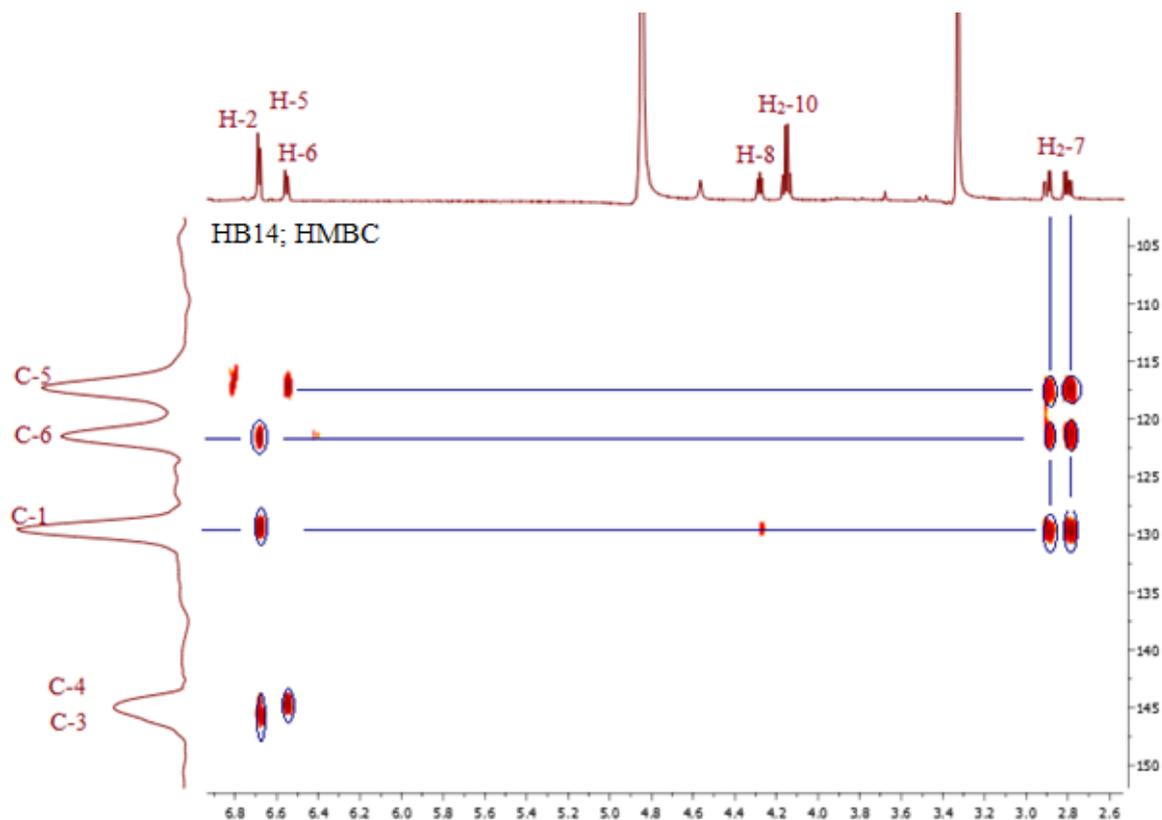


**Spectre III.1.68** : Spectre HMBC du composé **HB14** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$  ; étalement

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre III.1.69), les protons du groupement  $\text{CH}_2$  à  $\delta_{\text{H}}$  2,90 ppm et  $\delta_{\text{H}}$  2,80 ppm corrént avec les carbones aromatiques porteurs des H à  $\delta_{\text{H}}$  6,68 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  117,6 ppm), à  $\delta_{\text{H}}$  6,69 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  115,9 ppm) et  $\delta_{\text{H}}$  6,55 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  121,4 ppm) et également avec le carbone quaternaire aromatique à  $\delta_{\text{C}}$  129,6 ppm. Ces observations indiquent que l'entité 1 (Figure III.1.50) est reliée au noyau aromatique. On peut également en déduire, si l'on affecte la numérotation 1 au carbone de noyau aromatique lié à l'entité 1 que les carbones porteurs des protons précédents seront numérotés 2 et 6, comme le montre dans la figure III.1.51



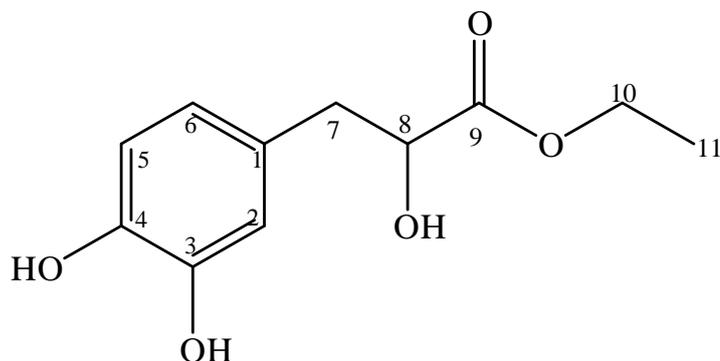
**Figure III.1.51** : Corrélation HMBC du composé **HB14**



**Spectre III.1.69** : Spectre HMBC du composé **HB14** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$  ; étalement

Selon les valeurs de déplacement des carbones C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  144,6 ppm) et C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  145,7 ppm) on peut déduire que ces positions ne peuvent être qu'oxygénées.

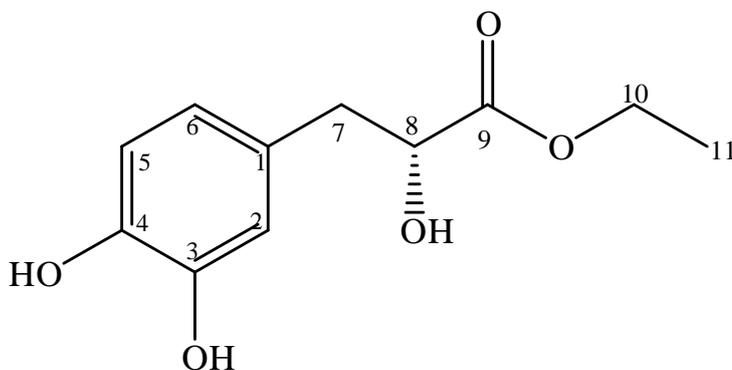
Vu l'absence d'autres substituants sur le spectre proton, les carbones aromatiques C-3 et C-4 ainsi que C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  72,8 ppm) ne peuvent être que porteurs des groupements hydroxyles comme reporté dans la figure III.1.52.



**Figure III.1.52** : Structure finale plane du composé **HB14**

Les analyses des spectres proton, HSQC et HMBC nous a permis d'identifier le composé **HB14**, comme étant une molécule déjà isolée et décrite sous le nom **Ethyl-3-(3,4-**

**dihydroxyphenyl) lactate.** Elle est nouvelle pour le genre *Heliotropium* et pour la famille Borraginaceae. Elle a été isolée de l'espèce *Nepeta prattii* (Lamiaceae) [17]. Les données spectrales que nous avons obtenues sont en accord avec les données publiées pour cette molécule.

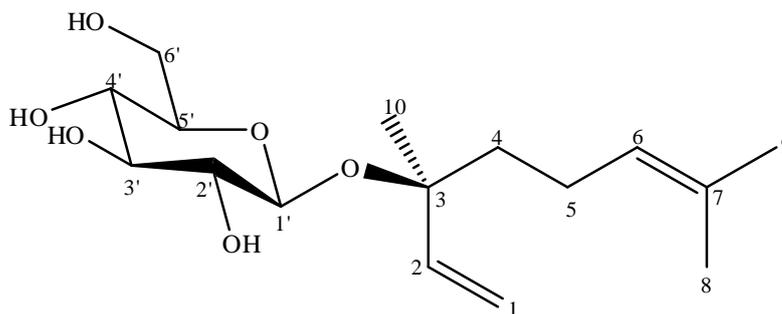


**Figure III.1.53 :** Structure finale du composé **HB14 ; Ethyl- 3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactate**

Le tableau III.1.13 résume les données spectroscopiques obtenues à partir des spectres proton, HSQC et HMBC.

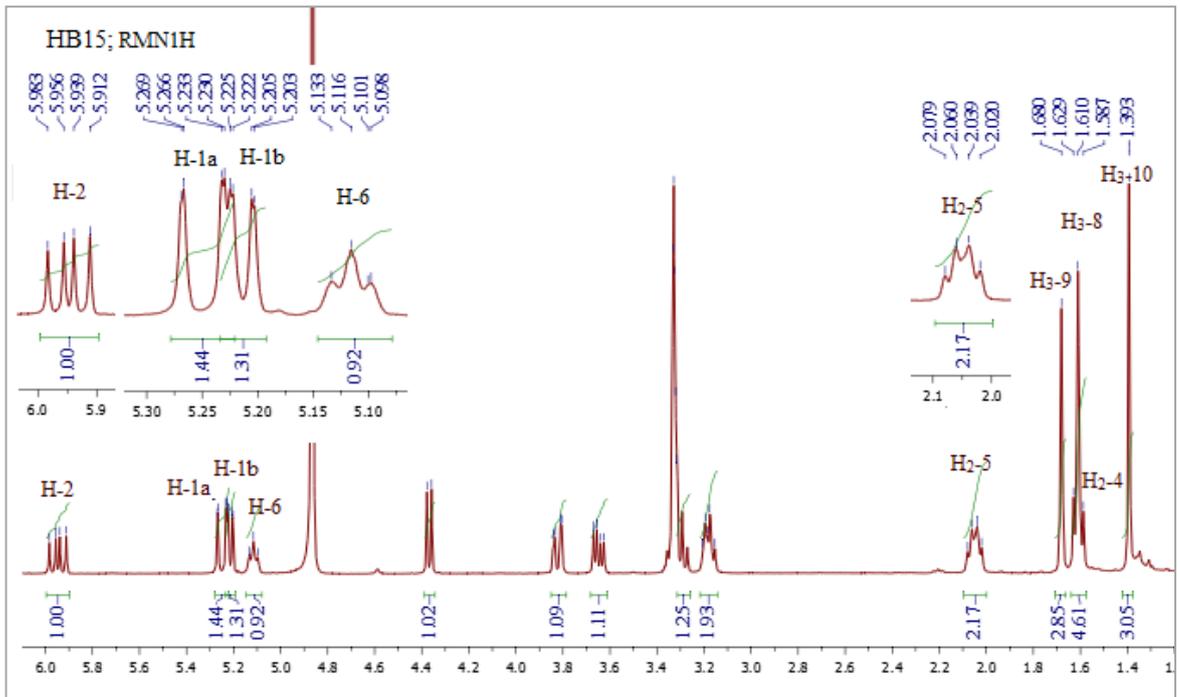
**Tableau III.1.13** : Les données spectrales RMN du composé **HB14**

Positions	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, $J$ en Hz)	HMBC H-C
1	129,6	-	
2	115,9	6,69 ( <i>d</i> ; 2,7)	3, 1, 6, 7
3	145,6	-	
4	144,5	-	
5	117,6	6,68 ( <i>d</i> ; 7,6)	3, 1, 6, 7
6	121,4	6,55 ( <i>dd</i> ; 8,0; 1,9)	7, 4
7	40,4	2,90 ( <i>dd</i> ; 13,9; 5,4)	8, 5, 6, 1, 9
		2,80 ( <i>dd</i> ; 13,8; 7,3)	8, 5, 6, 1, 9
8	72,8	4,28 ( <i>dd</i> ; 7,3; 5,5)	1, 7, 9, 10
9	175,1	-	
10	61,6	4,15 (2H; <i>q</i> ; 7,1)	9, 11
11	14,0	1,23 (3H; <i>t</i> ; 7,1)	10

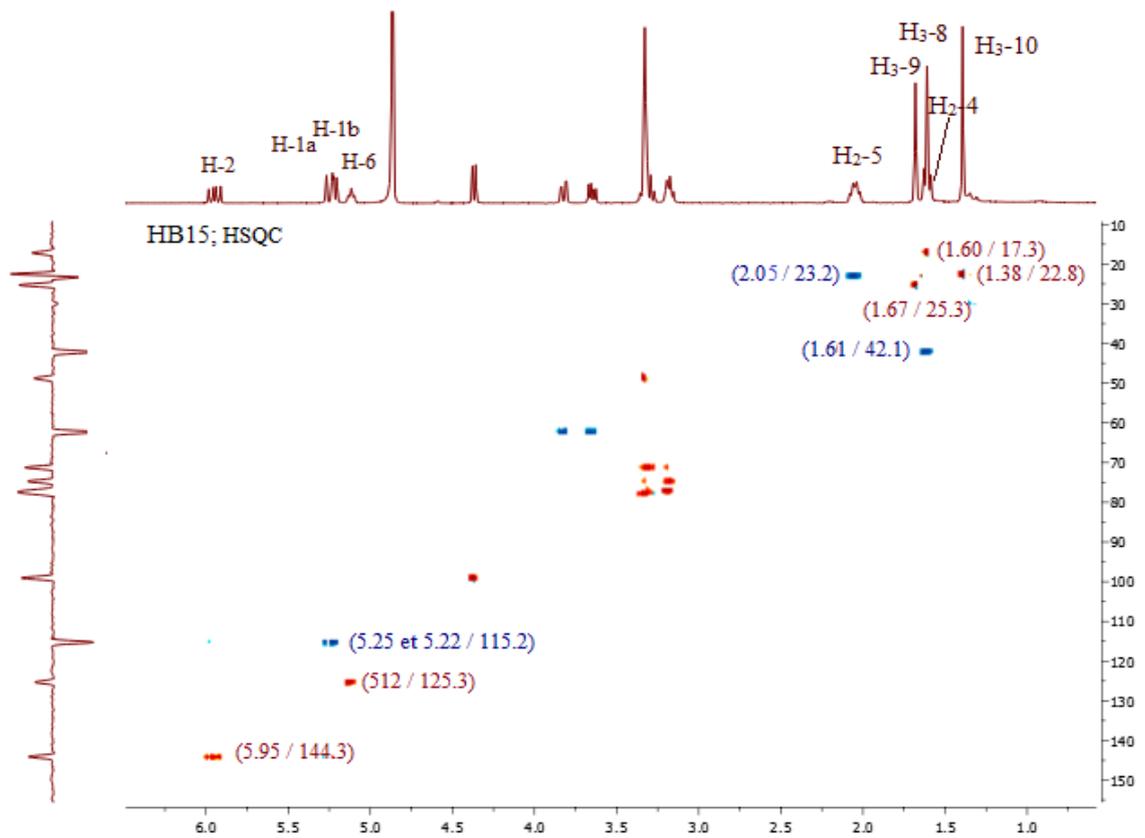
III.1.2.13. Elucidation structurale du composé **HB15**

L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre III.1.70) du composé **HB15** montre une forte similitude avec les signaux du spectre de la molécule **HB8** ((*3R*)-8-hydroxylinalol) et nous a permis de relever un ensemble de signaux qu'on peut répartir comme suit :

- Un groupement CH éthylénique résonant sous forme d'un doublet de doublet à  $\delta_{\text{H}}$  5,95 ppm ( $J = 17,6 ; 10,8$  Hz) montrant une tache de corrélation sur le spectre HSQC (Spectre III.1.73) avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  144,3 ppm, attribuable à H-2
- Un groupement  $\text{CH}_2$  éthylénique dont les 2H sont magnétiquement non équivalents et résonnant sous forme d'un doublet de doublet à  $\delta_{\text{H}}$  5,25 ppm ( $J = 17,6 ; 1,2$  Hz) et  $\delta_{\text{H}}$  5,22 ppm ( $J = 10,8 ; 1,2$  Hz) montrant une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  115,2 ppm, attribuable à  $\text{H}_2$ -1.
- Un groupement CH éthylénique résonant sous forme d'un triplet large à  $\delta_{\text{H}}$  5,12 ppm ( $J = 7,2$  Hz) montrant une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  125,3 ppm, attribuable à H-6
- Deux groupements  $\text{CH}_2$   $\text{sp}^3$  résonant à  $\delta_{\text{C}}$  42,1 ppm ( $\delta_{\text{H}}$  1,61 ppm ; recouvert par d'autres signaux) et  $\delta_{\text{C}}$  23,2 ppm ( $\delta_{\text{H}}$  2,05 ppm ;  $m$ ), attribuable respectivement à  $\text{H}_2$ -4 et  $\text{H}_2$ -5
- Deux groupements  $\text{CH}_3$  résonant sous forme de singulet chacun à  $\delta_{\text{C}}$  25,3 ppm ( $\delta_{\text{H}}$  1,67 ppm),  $\delta_{\text{C}}$  22,8 ppm ( $\delta_{\text{H}}$  1,38 ppm) attribuable respectivement à H-9 et H-10.

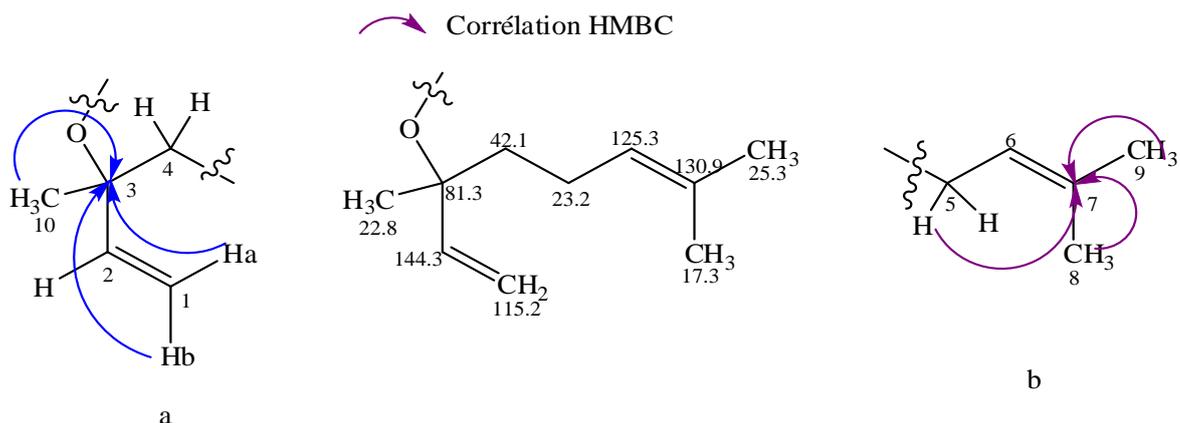


Spectre III.1.70 : Spectre RMN<sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>, 400 MHz) du composé **HB15**

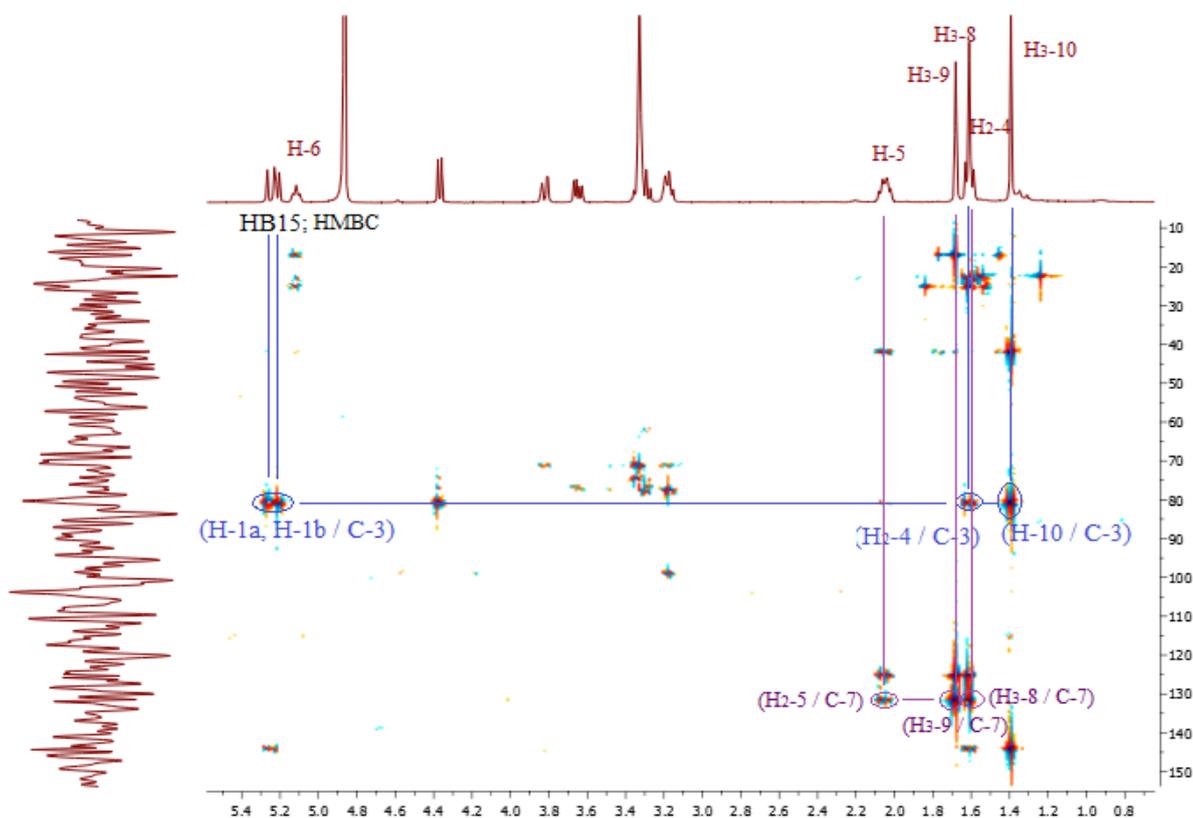


Spectre III.1.71 : Spectre HSQC du composé **HB15** dans le CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>

La différence réside d'une part, dans la disparition du signal sous forme de singulet correspondant au groupement CH<sub>2</sub> oxygéné ( $\delta_H$  4,08 ppm) et l'apparition d'un signal d'intégration 3H à  $\delta_H$  1,61 ppm résonnant sous forme de singulet et corrélant sur le spectre HSQC (Spectre III.1.71) avec un carbone à  $\delta_C$  17,3 ppm d'autre part. Les protons de ce CH<sub>3</sub> montrent sur le spectre HMBC (Spectre III.1.72) des taches de corrélation avec les carbones C-6 ( $\delta_C$  125,3 ppm) et C-7 ( $\delta_C$  130,9 ppm). Ces observations nous permettent de localiser ce CH<sub>3</sub> sur le carbone C-7 et sera numéroté C-8 comme le montre la figure III.1.54.



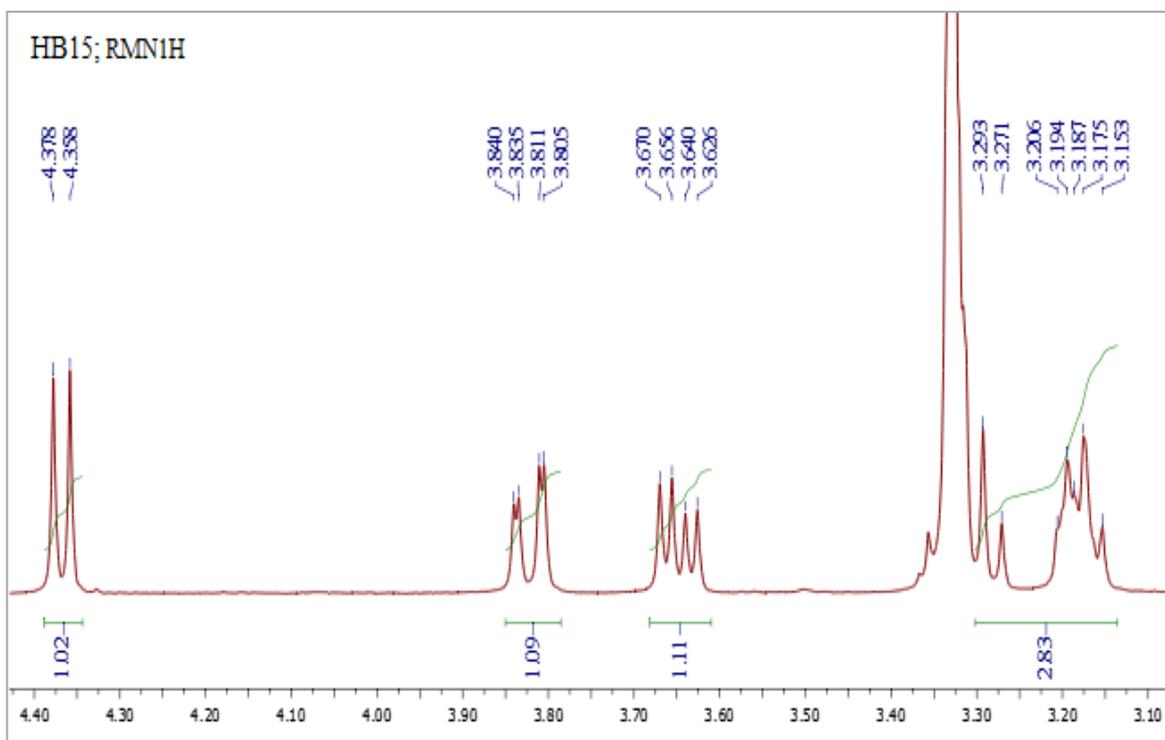
**Figure III.1.54** : Structure partielle du composé **HB15**



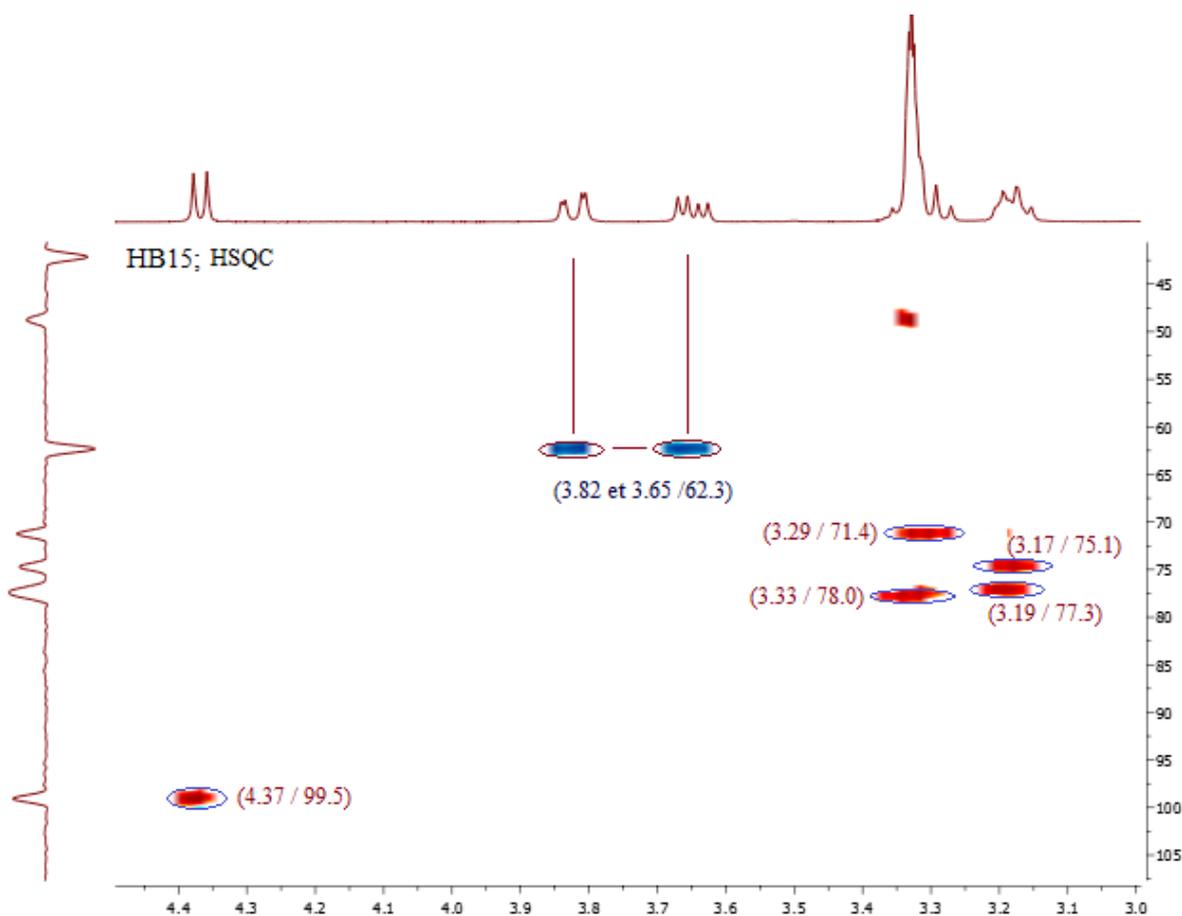
**Spectre III.1.72** : Spectre HMBC du composé **HB15** dans le CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>, étalement

D'autre part, l'analyse du spectre RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.1.73) montre la présence des signaux caractéristiques d'un hexose :

- Un signal à  $\delta_H$  4,37 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet ( $J = 8,0$  Hz) corrèle sur le spectre HSQC (Spectre III.1.74) avec le carbone à  $\delta_C$  99,5 ppm caractéristique du proton anomérique d'un hexose. Les valeurs des déplacements chimiques du proton et du carbone indiquent une jonction *O*-hexose, quant à la valeur de la constante de couplage (8,0 Hz), elle est en faveur d'un hexose avec une configuration  $\beta$ .
- Deux signaux sous forme de doublets de doublet d'intégration 1H chacun à  $\delta_H$  3,82 ppm ( $J = 12,0 ; 2.4$  Hz) et à  $\delta_H$  3,67 ppm ( $J = 12,0 ; 5.6$  Hz), corrélient sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  62,3 ppm, caractéristique du groupement CH<sub>2</sub>-6' de l'hexose.
- Trois signaux chacun d'intégration 1H sous forme de multiplet à  $\delta_H$  3,33 ppm ( $\delta_C$  78,0 ppm),  $\delta_H$  3,19 ppm ( $\delta_C$  77,3 ppm) et  $\delta_H$  3,17 ppm ( $\delta_C$  75,1 ppm)
- Un signal à  $\delta_H$  3,29 ppm d'intégration 1H sous forme d'un triplet ( $J = 8,8$  Hz) partiellement recouvert par le signal du solvant corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  71,4 ppm.



**Spectre III.1.73** : Spectre RMN<sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>, 400 MHz) du composé **HB15**, étalement

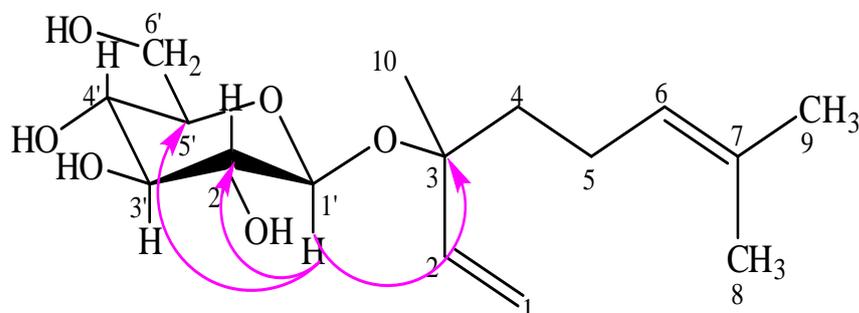


**Spectre III.1.74 :** Spectre HSQC du composé **HB15** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ , étalement

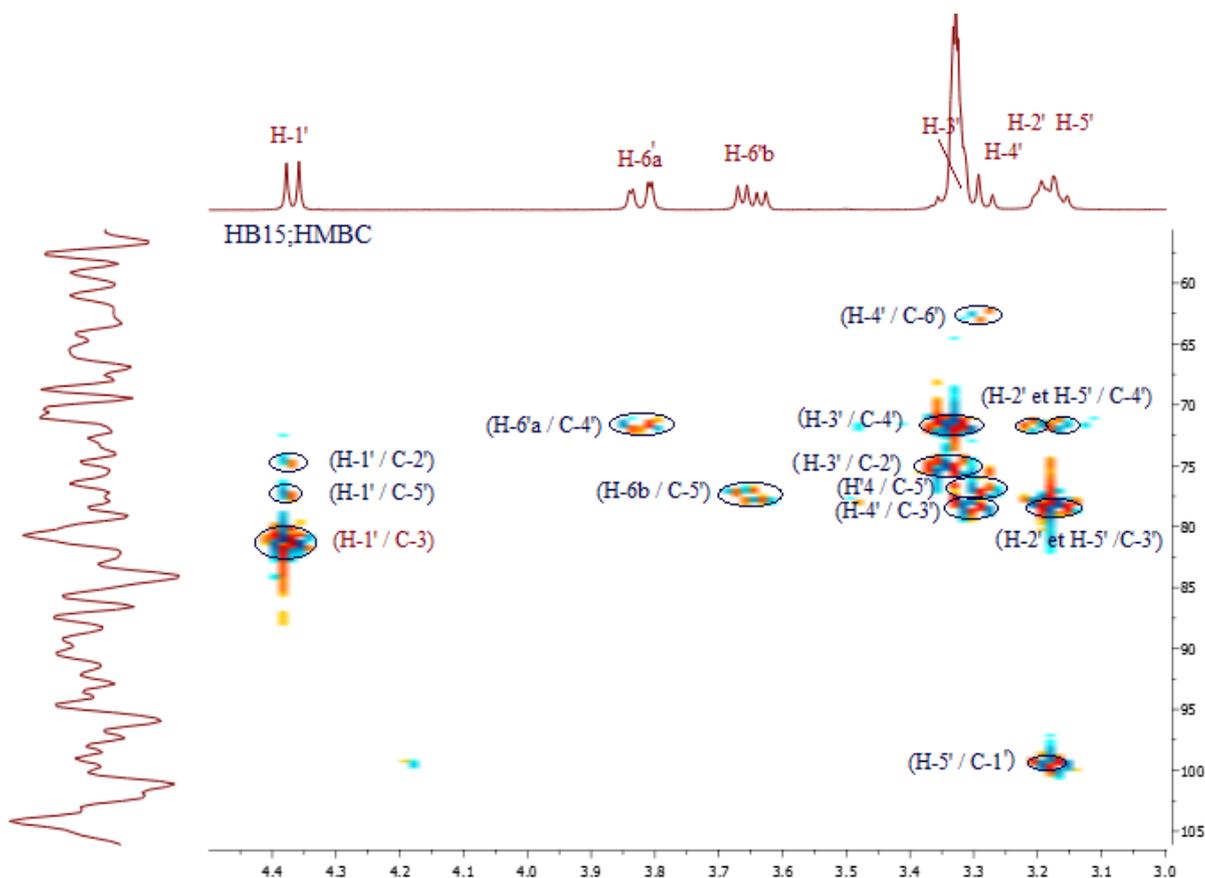
L'attribution des signaux osidique est réalisée à l'aide des données obtenues du spectre HMBC (Spectre III.1.75) et la comparaison avec les données de la littérature [18].

- Le proton anomérique H-1' ( $\delta_{\text{H}}$  4,37 ;  $\delta_{\text{C}}$  99,5) montre des taches de corrélation sur le spectre HMBC avec les carbones à  $\delta_{\text{C}}$  75,1 ppm et  $\delta_{\text{C}}$  77,3 ppm attribuable respectivement à C-2' et C-5'.
- Le proton H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  3,17 ppm), localisé par l'analyse du spectre HSQC à  $\delta_{\text{C}}$  75,1 ppm corréle sur le spectre HMBC avec deux carbones à  $\delta_{\text{C}}$  78,0 ppm et  $\delta_{\text{C}}$  71,4 ppm attribuable respectivement à C-3' et C-4'.
- Le proton H-3' ( $\delta_{\text{H}}$  3,33 ppm), localisé par l'analyse du spectre HSQC à  $\delta_{\text{C}}$  78,0 ppm corréle sur le spectre HMBC avec un carbone à  $\delta_{\text{C}}$  71,4 ppm attribuable à C-4'.
- Le proton H-4' ( $\delta_{\text{H}}$  3,29 ppm), localisé par l'analyse du spectre HSQC à  $\delta_{\text{C}}$  71,4 ppm corréle sur le spectre HMBC avec les carbones C-3' ( $\delta_{\text{C}}$  78,0 ppm), C-5' ( $\delta_{\text{C}}$  77,3 ppm) et C-6' ( $\delta_{\text{C}}$  762,3 ppm).
- Le proton H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  3,19 ;  $\delta_{\text{C}}$  77,3) ppm, localisé par l'analyse du spectre HSQC corréle sur le spectre HMBC avec les carbones C-1', C-3' et C-4'.

Nous avons une partie osidique qui est en fait un glucopyranosyle. Pour positionner cette entité, nous avons examiné le spectre HMBC où l'on relève une tache de corrélation entre le proton anomérique et le carbone C-3, ceci permet de placer ce groupement glucopyranosyle en cette position comme reporté dans la figure III.1.55.



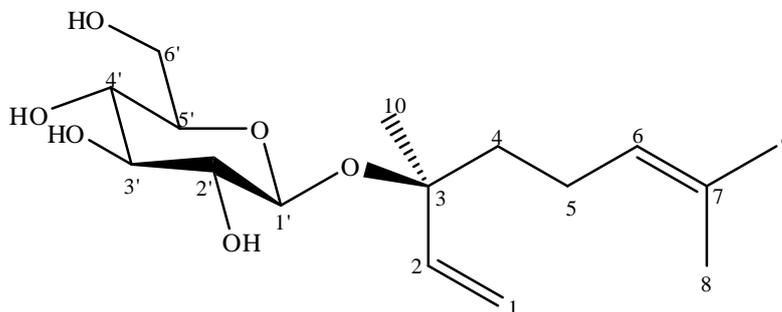
**Figure III.1.55** : Corrélation HMBC entre le proton anomérique et le carbone C-3



**Spectre III.1.75** : Spectre HMBC du composé **HB15** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ; étalement

L'ensemble des données précédentes et par comparaison avec les données de la littérature a permis d'établir la structure du composé **HB15**, il s'agit de (3S)-3-O-( $\beta$ -D-

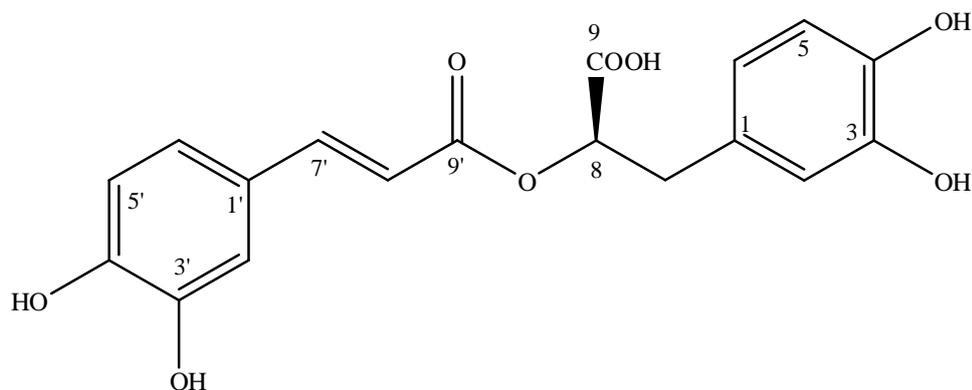
Glucopyranosyl)-3, 7-dimethylocta-1,6- dien-3-ol [18]. Cette molécule est nouvelle pour le genre *Heliotropium*.



**Figure III.1.56 :** Structure finale du composé **HB15** ; (3S)-3-O-(β-D-Glucopyranosyl)-3,7-dimethylocta-1,6- dien-3-ol

**Tableau III.1.14 :** Les données spectrales RMN du composé **HB15**

Positions	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, $J$ en Hz)	HMBC H-C
1	115,2	5,25 ( <i>dd</i> ; 17,6, 1,2)	3, 2
		5,22 ( <i>dd</i> ; 10,8, 1,2)	3, 2
2	144,3	5,95 ( <i>dd</i> ; 17,6, 10,8)	10
3	81,3	-	
4	42,1	1,61 signal de chevauchement	2, 3, 5, 7, 6, 10
5	23,2	2,05 ( <i>dt</i> ; 8,4; 7,6)	3, 4, 6, 7
6	125,3	5,12 ( <i>tt</i> ; 7,2)	5, 8, 9
7	130,9	-	
8	17,3	1,61 (3H; <i>s</i> )	6, 7
9	25,3	1,67 (3H; <i>s</i> )	6, 7, 8
10	22,8	1,38 (3H; <i>s</i> )	2, 3, 4
1'	99,5	4,37 ( <i>d</i> ; 8,0)	3, 2', 5'
2'	75,1	3,17 <i>m</i>	1', 3', 4'
3'	78,0	3,33 <i>m</i>	2', 4'
4'	71,4	3,29 ( <i>dl</i> ; 8,8)	3', 5', 6'
5'	77,3	3,19 <i>m</i>	1', 3', 4'
6'a	62,3	3,82 ( <i>dd</i> ; 12,0; 2,4)	4'
6'b		3,65 ( <i>dd</i> ; 12,0; 5,6)	5'

III.1.2.14. Elucidation structurale du composé **HB16**

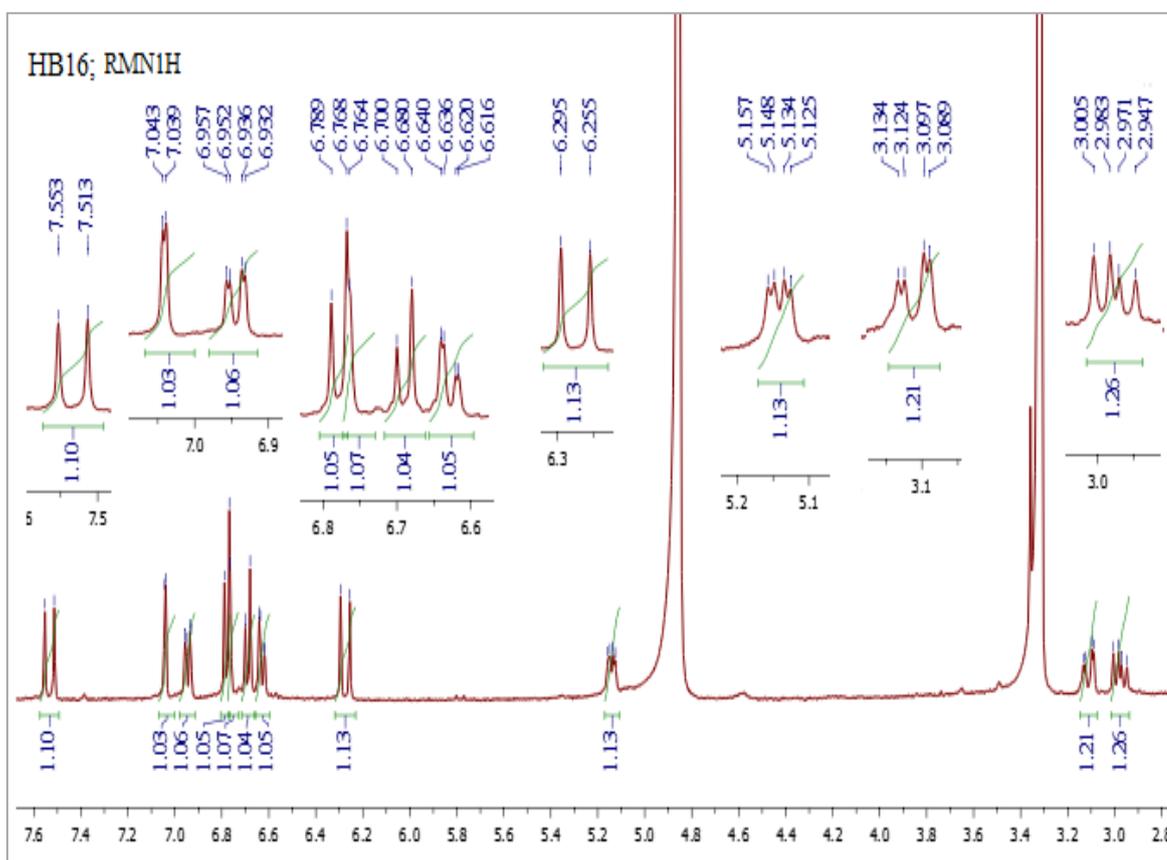
L'examen simultané des spectres RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.1.76) et HSQC (Spectre III.1.77) du composé **HB16** permet d'observer :

- Un signal à  $\delta_H$  7,03 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet ( $J = 1,7$  Hz) corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  114,5 ppm
- Un signal à  $\delta_H$  6,93 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet de doublet ( $J = 8,2 ; 1,7$  Hz) corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  122,4 ppm
- Un signal à  $\delta_H$  6,77 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet ( $J = 8,2$  Hz) corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  116,0 ppm.
- Un signal à  $\delta_H$  6,75 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet ( $J = 1,7$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  116,9 ppm
- Un signal à  $\delta_H$  6,68 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet ( $J = 8,2$  Hz) corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  115,5 ppm
- Un signal à  $\delta_H$  6,64 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet de doublet ( $J = 8,2 ; 1,7$  Hz) corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  121,2 ppm.

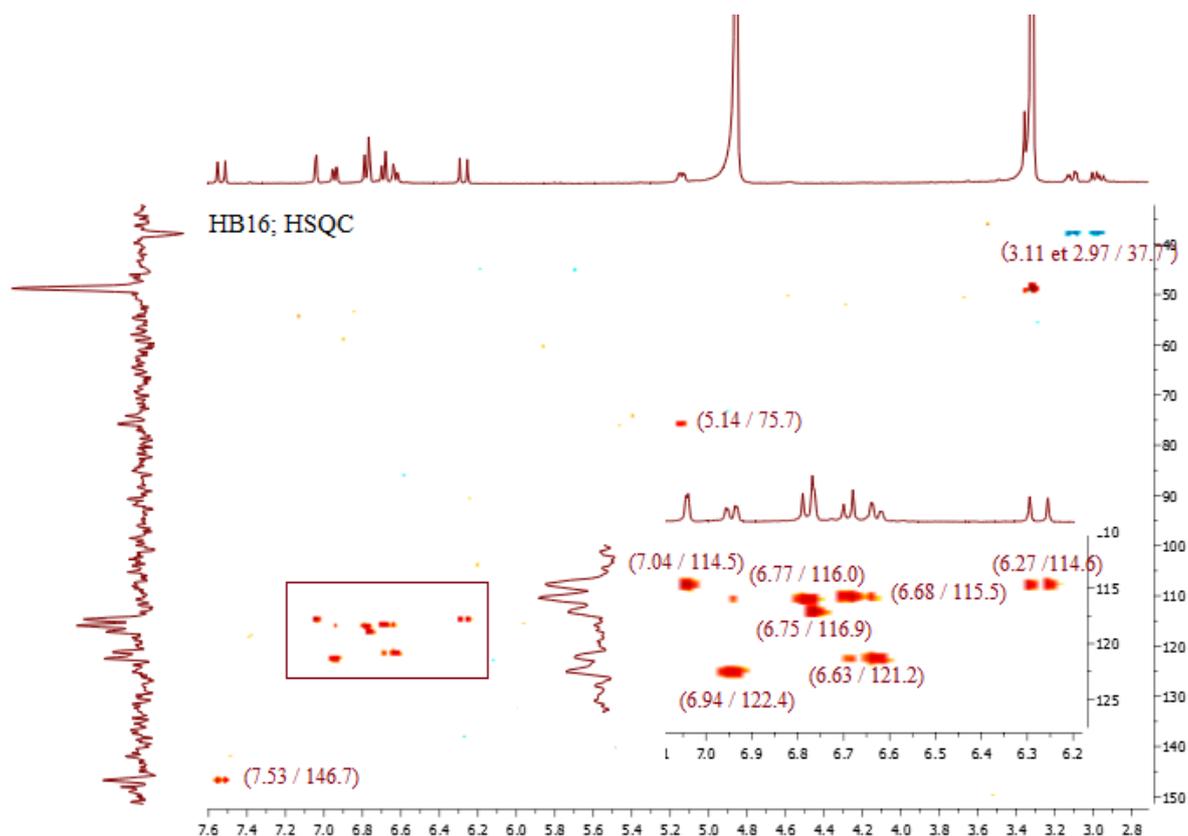
Les valeurs des déplacements chimiques ainsi que celles des constantes de couplage orientent vers la présence de deux systèmes ABX correspondants à deux cycles aromatiques 1, 3, 4-trisubstitués.

- Deux signaux de méthine oléfinique sous forme d'un doublet ( $J = 15,9$  Hz) à  $\delta_H$  7,53 ppm et  $\delta_H$  6,27 ppm, montrent des taches de corrélation sur le spectre HSQC avec les signaux à  $\delta_C$  146,7 ppm et  $\delta_C$  114,6 ppm respectivement. La multiplicité et la valeur de la constante de couplage ( $J = 15,9$  Hz) de ces deux signaux indiquent clairement la présence d'un groupement éthylénique de configuration *trans*.

- Un signal à  $\delta_H$  5,14 ppm d'intégration 1H sous forme d'un doublet de doublet ( $J = 9,1 ; 3,6$  Hz) corrélant sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  75,7 ppm. D'après les valeurs des déplacements du proton et du carbone, ce dernier ne peut être qu'oxygéné.
- Un signal d'intégration 1H résonnant sous forme d'un doublet de doublet ( $J = 14,3 ; 3,5$  Hz) à  $\delta_H$  3,11 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  37,7 ppm. Ce même carbone montre une tache de corrélation avec un signal à  $\delta_H$  2,97 ppm, apparaît sur le spectre proton sous forme d'un doublet de doublet ( $J = 14,1 ; 9,2$  Hz) d'intégration 1H. Cette constante permet de déduire que ces 2H sont magnétiquement non équivalents entre eux.



**Spectre III.1.76 :** Spectre RMN<sup>1</sup>H (CH<sub>3</sub>OH-*d*<sub>4</sub>; 400 MHz) du composé **HB16**



**Spectre III.1.77** : Spectre HSQC du composé **HB16** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$

Le proton à  $\delta_{\text{H}}$  6,68 ppm (*d* ;  $J = 8,2$  Hz) corrèle sur le spectre COSY (Spectre III.1.78) avec le proton à  $\delta_{\text{H}}$  6,64 ppm ( $J = 8,2$  ; 1,7 Hz), attribuable à H-5 et H-6 respectivement. Ce dernier H-6 montre deux taches de corrélation sur le spectre HMBC (Spectre III.1.79), la première avec le carbone aromatique porteur d'un H à  $\delta_{\text{H}}$  6,75 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  116,9 ppm) attribuable à H-2 et la deuxième avec carbone aromatique quaternaire oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  144,5 ppm.

Toujours sur le spectre HMBC, le proton H-5 montre deux taches de corrélation avec un carbone aromatique quaternaire à  $\delta_{\text{C}}$  129,7 ppm et un carbone aromatique quaternaire oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  145,4 ppm. Ceci permet de déduire les valeurs de déplacement chimique des carbones aromatiques quaternaires comme étant :  $\delta_{\text{C}}$  129,7 ppm (C-1),  $\delta_{\text{C}}$  144,5 ppm (C-3) et  $\delta_{\text{C}}$  145,4 ppm (C-4).

Toujours sur le même spectre, un des protons du groupement  $\text{CH}_2$  résonant à  $\delta_{\text{H}}$  2,97 ppm montre des taches de corrélation avec les carbones aromatiques C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  116,9 ppm), C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  121,2 ppm) et C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  129,7 ppm). Ces observations indiquent que le groupement  $\text{CH}_2$  est lié au noyau aromatique par le carbone C-1, Comme reporté dans la figure III.1.57.

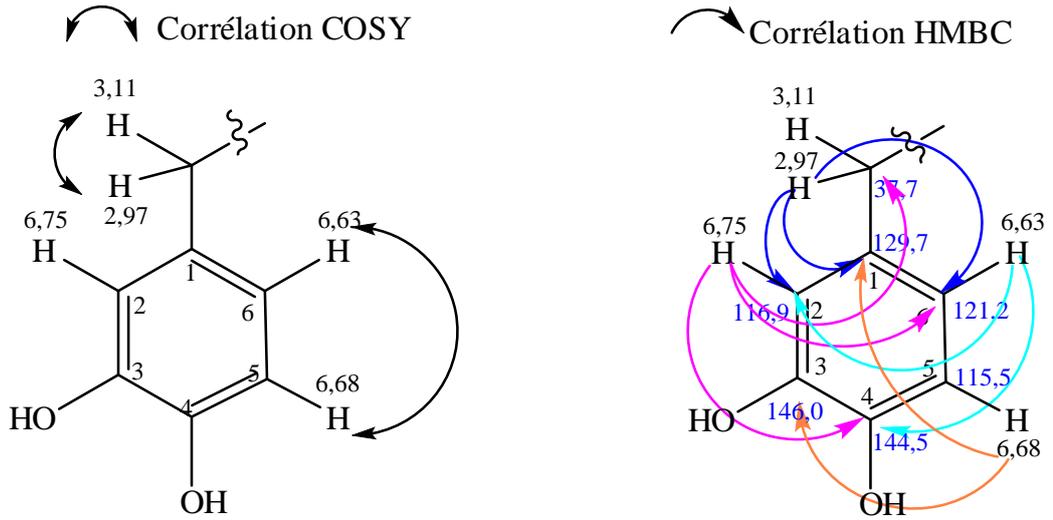
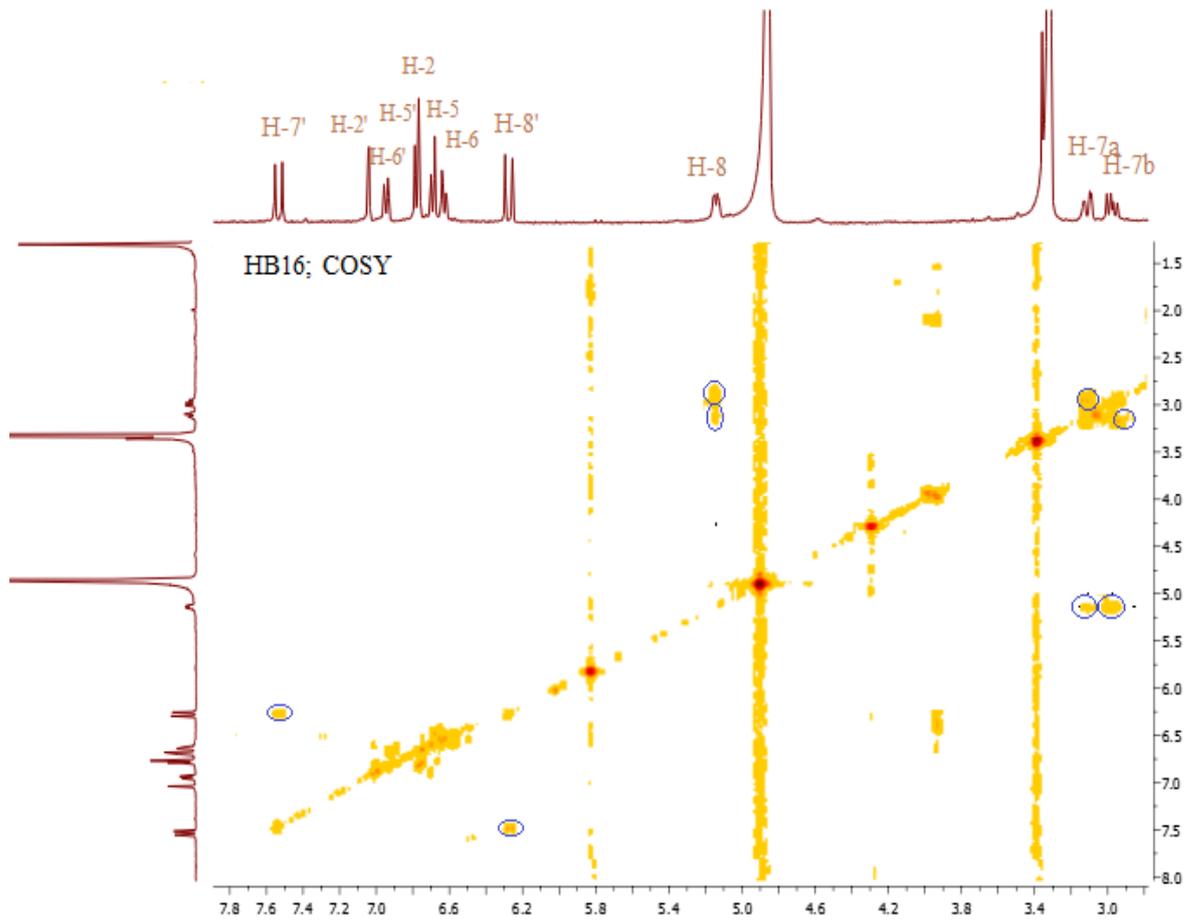
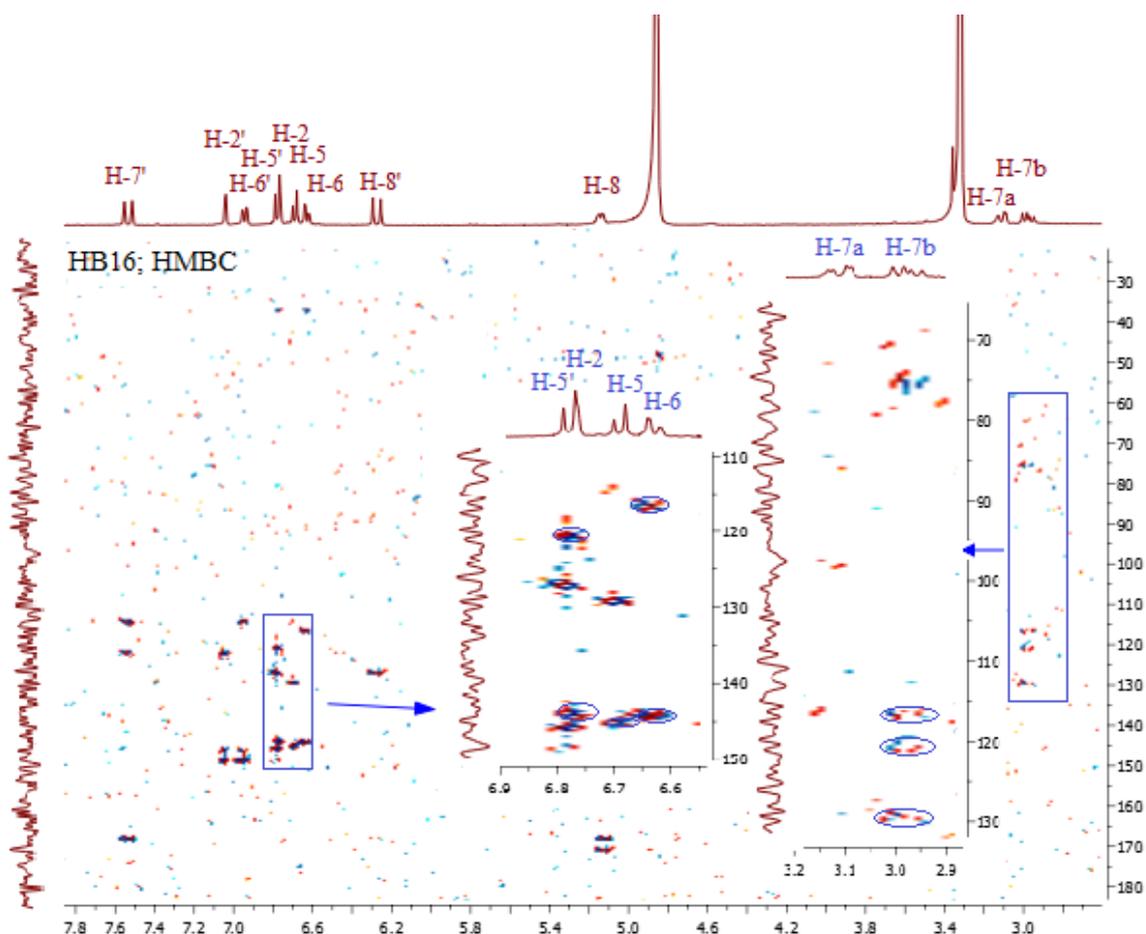


Figure III.1.57 : Structure partielle 1 du composé **HB16**



Spectre III.1.78 : Spectre COSY du composé **HB16** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$



**Spectre III.1.79** : Spectre HMBC du composé **HB16** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ , étalement

Par ailleurs, les protons du groupement  $\text{CH}_2$  à  $\delta_{\text{H}}$  3,11 ppm et  $\delta_{\text{H}}$  2,97 ppm corrélient sur le spectre COSY (Spectre III.1.78) avec le proton du groupement CH oxygéné à  $\delta_{\text{H}}$  5,14 ppm.

Ce dernier ( $\delta_{\text{H}}$  5,14 ppm) montre sur le spectre HMBC (Spectre III.1.80) des taches de corrélation avec deux carbones des groupements carbonyles à  $\delta_{\text{C}}$  171,7 ppm et  $\delta_{\text{C}}$  168,4 ppm.

Ces observations permettent de proposer la présence dans cette molécule, de l'entité 2, reportée dans la figure III.1.58.

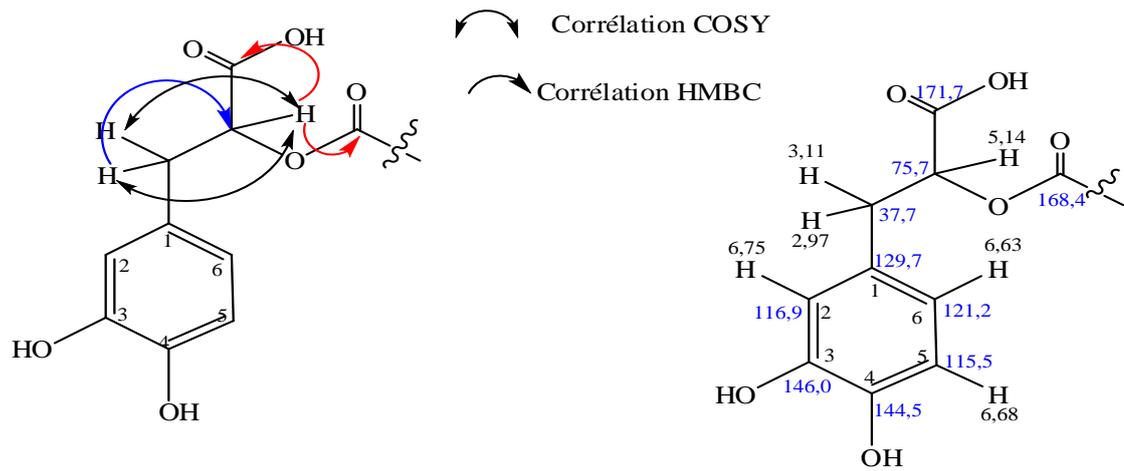
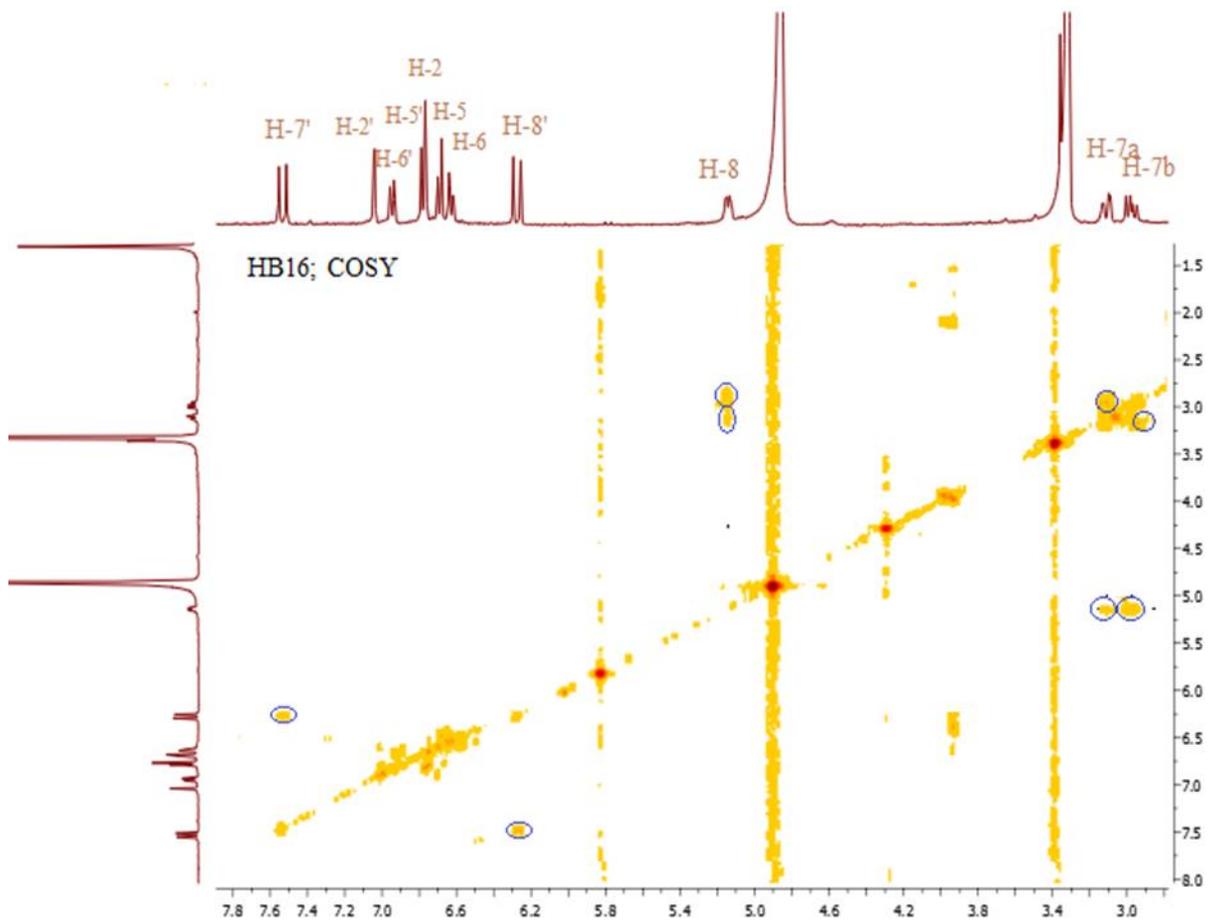
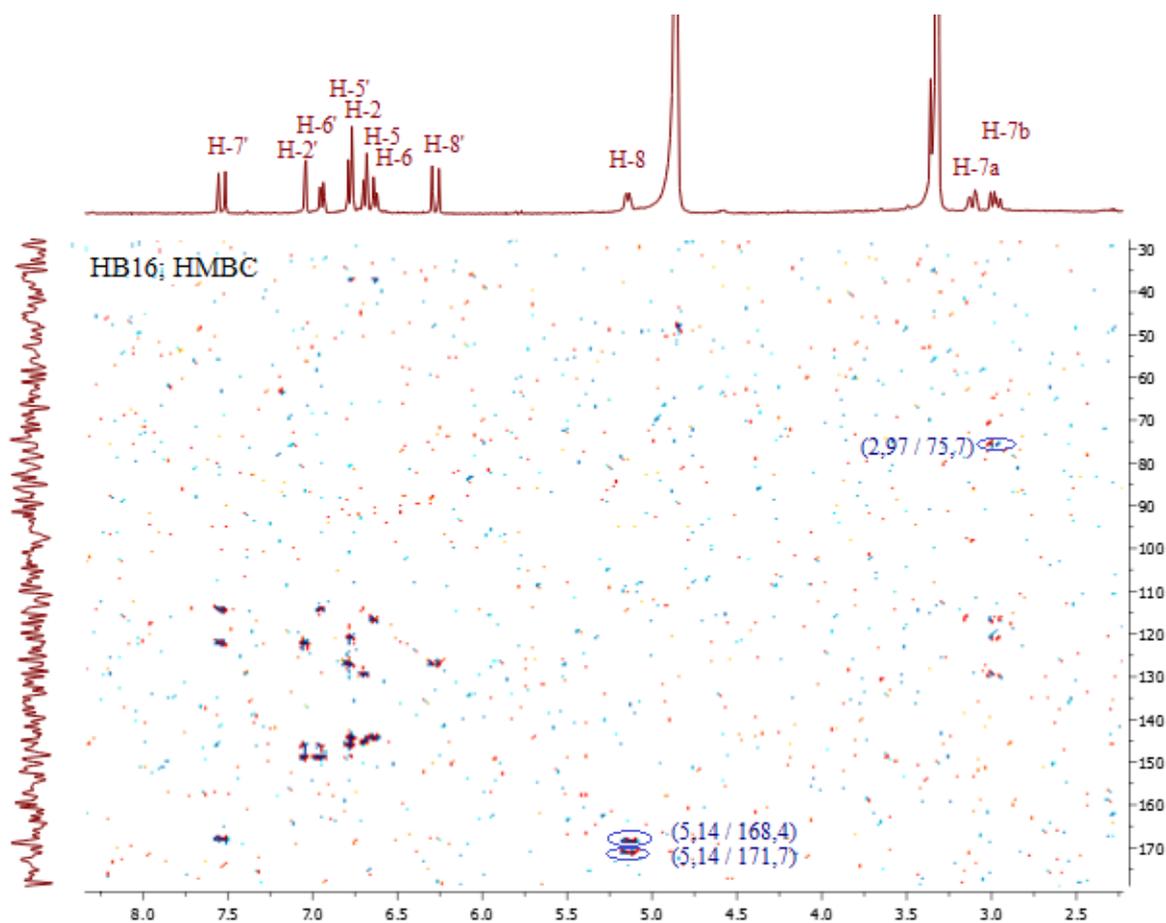


Figure III.1.58 : Structure partielle 2 du composé **HB16**



Spectre III.1.78 : Spectre COSY du composé **HB16** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$



**Spectre III.1.80** : Spectre HMBC du composé **HB16** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$

Le proton résonant à  $\delta_{\text{H}}$  6,93 ppm (*dd* ;  $J = 8,2$  ; 1,7 Hz) montre une tache de corrélation sur le spectre COSY (Spectre III.1.78) avec le proton résonant à  $\delta_{\text{H}}$  6,77 (*d* ;  $J = 8,2$  Hz) attribuable à H-6' et H-5' respectivement

Par ailleurs, sur le spectre HMBC (Spectre III.1.81), le proton H-6' montre une tache de corrélation avec le carbone aromatique porteur d'un H à  $\delta_{\text{H}}$  7,04 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  114,5 ppm), ce proton est attribuable à H-2'. Les protons à  $\delta_{\text{H}}$  7,04 ppm (H-2') et  $\delta_{\text{H}}$  6,93 ppm (H-6') montrent des taches de corrélations avec les deux carbones aromatiques quaternaires oxygénés à  $\delta_{\text{C}}$  146,5 ppm et  $\delta_{\text{C}}$  148,7 ppm qui ne peuvent être que C-3' et C-4'.

De plus sur le spectre HMBC, le proton éthylénique à  $\delta_{\text{H}}$  7,53 ppm montre des taches de corrélation avec les carbones aromatiques C-2' et C-6'. Le deuxième proton éthylénique résonant à  $\delta_{\text{H}}$  6,27 ppm corrèle avec un carbone aromatique quaternaire à  $\delta_{\text{C}}$  127,1 ppm. Ces observations permettent de placer ce groupement éthylénique sur le carbone C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  127,1 ppm) du noyau aromatique.

Toujours sur le spectre HMBC, le proton éthylénique à  $\delta_H$  7,53 ppm corrèle avec le carbone du carbonyle à  $\delta_C$  168,4 ppm, comme reporté dans la figure III.1.59.

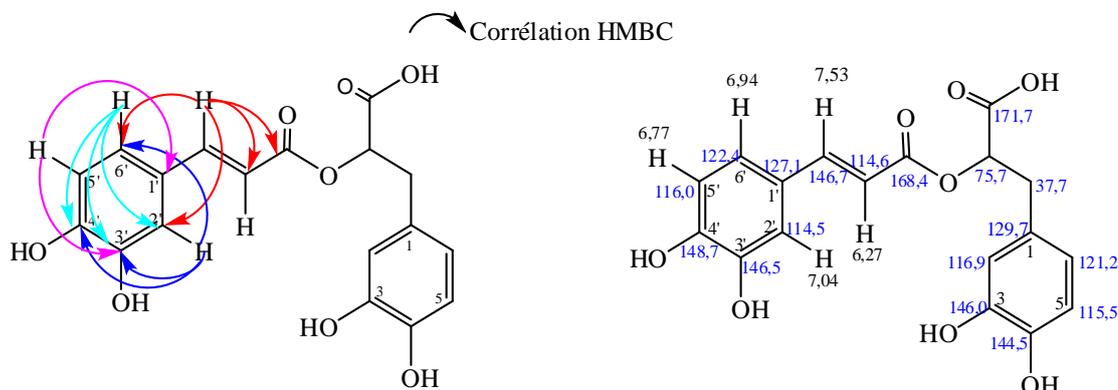
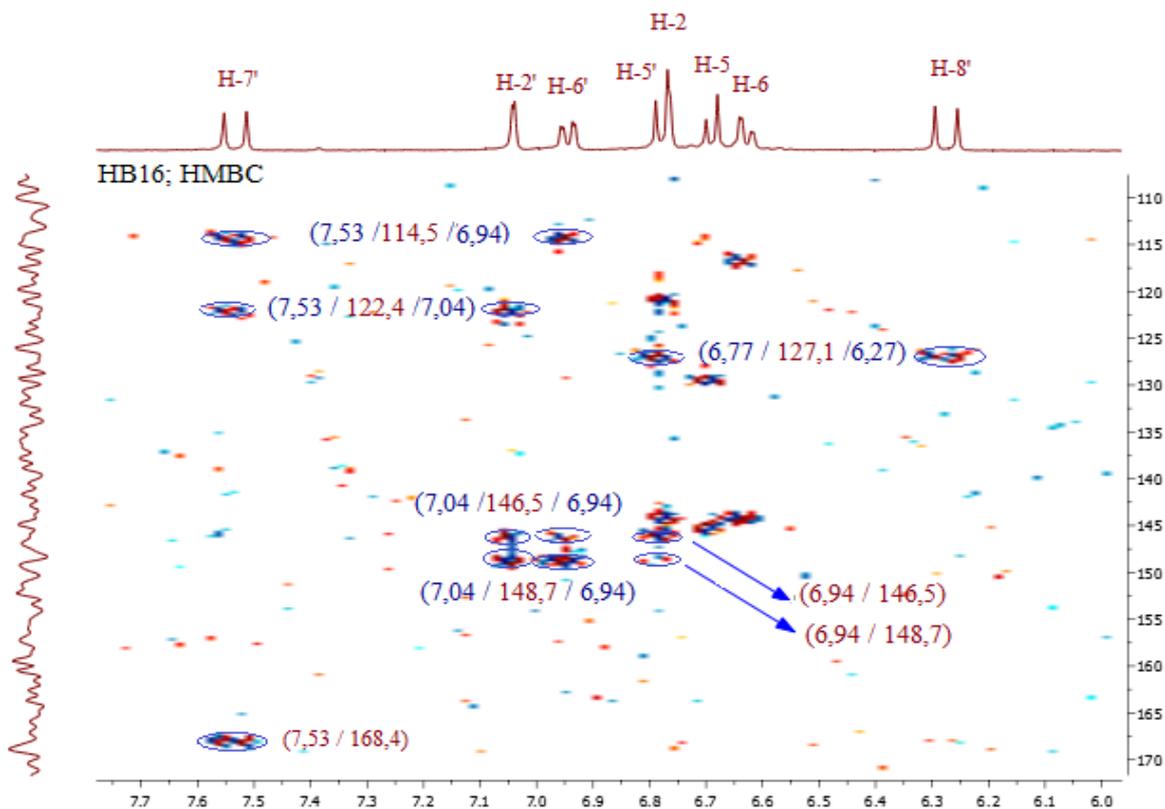


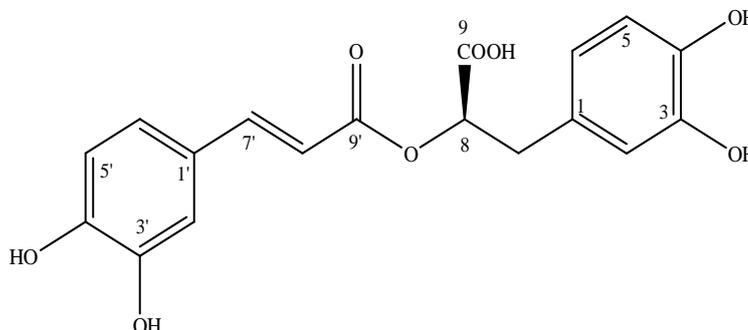
Figure III.1.59 : Corrélations HMBC du composé **HB16**



Spectre III.1.81 : Spectre HMBC du composé **HB16** dans le  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ ; étalement

L'analyse des spectres  $\text{RMN}^1\text{H}$ , HSQC et HMBC nous a permis d'identifier le composé **HB16** comme étant l'**acide rosmarinique**. Il a été isolé pour la première fois à l'état pur par deux chimistes italiens, Scarpati et Oriente en 1958 [19-20]. Son nom vient du nom de la plante à partir de laquelle il a été isolé, le romarin (*Rosmarinus officinalis*). Cette

molécule a été isolée de l'espèce *Heliotropium foertherianum* [21]. Les données spectrales que nous avons obtenues sont en parfait accord avec les données publiées pour cette molécule [22] comme reporté dans la figure III.1.60.

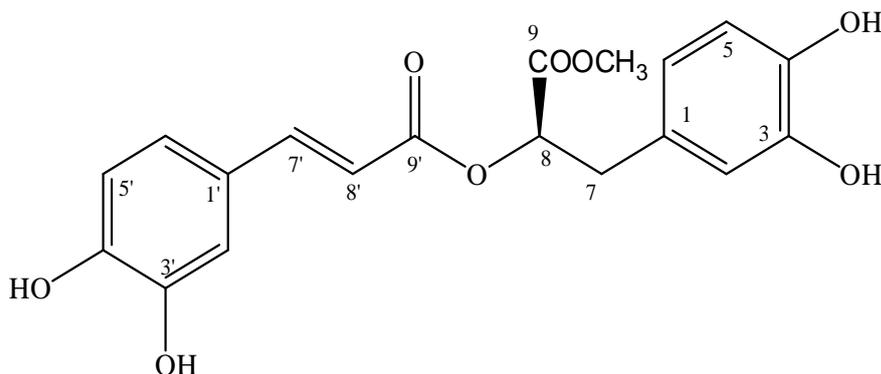


**Figure III.1.60** : Structure du composé **HB16**, acide rosmarinique

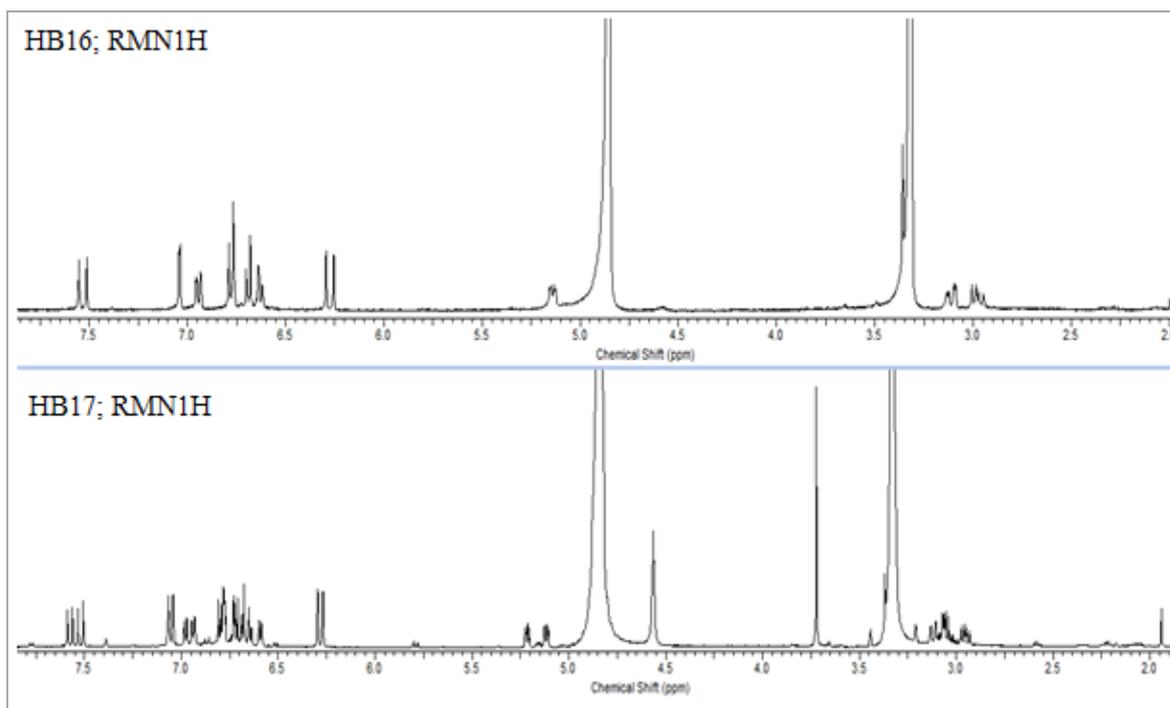
Le tableau III.1.15 regroupe les attributions des différents signaux en RMN<sup>1</sup>H, HSQC et HMBC.

**Tableau III.1.15** : Déplacement chimiques RMN du composé **HB16**.

Positions	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, <i>J</i> en HZ)	HMBC H-C
1	129,7	-	
2	116,9	6,75 ( <i>d</i> ; 1,7)	7, 6, 4
3	145,4	-	
4	144,5	-	
5	115,5	6,68 ( <i>d</i> ; 8,2)	1, 3
6	121,2	6,64 ( <i>dd</i> ; 8,2; 1,7)	2, 4
7	37,7	3,11 ( <i>dd</i> ; 14,3; 3,5)	8, 6, 2, 1
		2,97 ( <i>dd</i> ; 14,1; 9,2)	
8	75,7	5,14 ( <i>dd</i> ; 9,1; 3,6)	9, 9'
9	171,7	-	
1'	127,1	-	
2'	114,5	7,04 ( <i>d</i> ; 1,8)	6', 3', 4'
3'	146,5	-	
4'	148,7	-	
5'	116,0	6,77 ( <i>d</i> ; 8,2)	1', 3
6'	122,4	6,93 ( <i>dd</i> ; 8,2; 1,7)	2', 4', 3'
7'	146,7	7,53 ( <i>d</i> ; 15,9)	2', 6', 8', 9'
8'	114,6	6,27 ( <i>d</i> ; 15,9)	1'
9'	168,4	-	

III.1.2.15. Elucidation structurale du composé **HB17**

La comparaison des spectres proton du composé précédent **HB16** et ce composé **HB17** (Spectre III.1.82) montre que ce dernier (**HB17**) est en mélange avec le composé précédent l'acide rosmarinique. Un dosage par RMN<sup>1</sup>H permet de conclure que ce mélange renferme environ 52 % du **HB17** et 48 % de l'acide rosmarinique (**HB16**).



**Spectre III.1.82** : Spectre RMN<sup>1</sup>H (600MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) des composés **HB16** et **HB17**

Le spectre proton (Spectre III.1.83) du composé **HB17** est très similaire à celui du composé **HB16** et montre clairement la présence d'un groupement caféoyle, grâce à l'apparition des signaux du groupement CH=CH ( $J = 15,6$  Hz) à  $\delta_{\text{H}} 7,52$  ppm pour le proton voisin du cycle aromatique et  $\delta_{\text{H}} 6,28$  ppm pour le proton voisin du carbonyle.

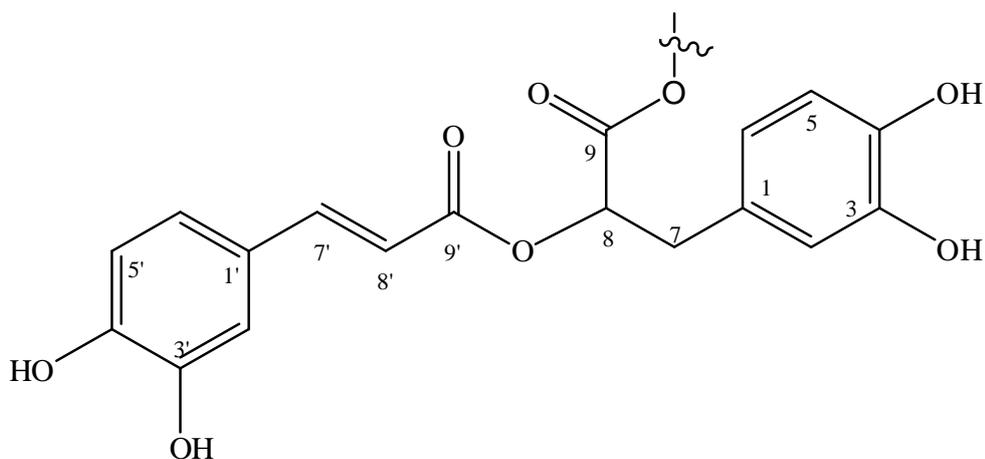
Les signaux du cycle aromatique du groupement caféoyle apparaissent sous forme :

- H-2' (*d*,  $J = 1,8$  Hz) à  $\delta_H$  7,04 ppm ; (C-2' à  $\delta_C$  114,6 ppm).
- H-5' (*d*,  $J = 8,4$  Hz) à  $\delta_H$  6,79 ppm ; (C-5' à  $\delta_C$  116,0 ppm).
- H-6' (*dd*,  $J = 8,4 ; 1,8$  Hz) à  $\delta_H$  6,94 ppm ; (C-6' à  $\delta_C$  122,3 ppm).
- H-7' (*d*,  $J = 15,6$  Hz) à  $\delta_H$  7,52 ppm ; (C-7' à  $\delta_C$  145,9 ppm).
- H-8' (*d*,  $J = 15,6$  Hz) à  $\delta_H$  6,28 ppm ; (C-8' à  $\delta_C$  114,4 ppm).

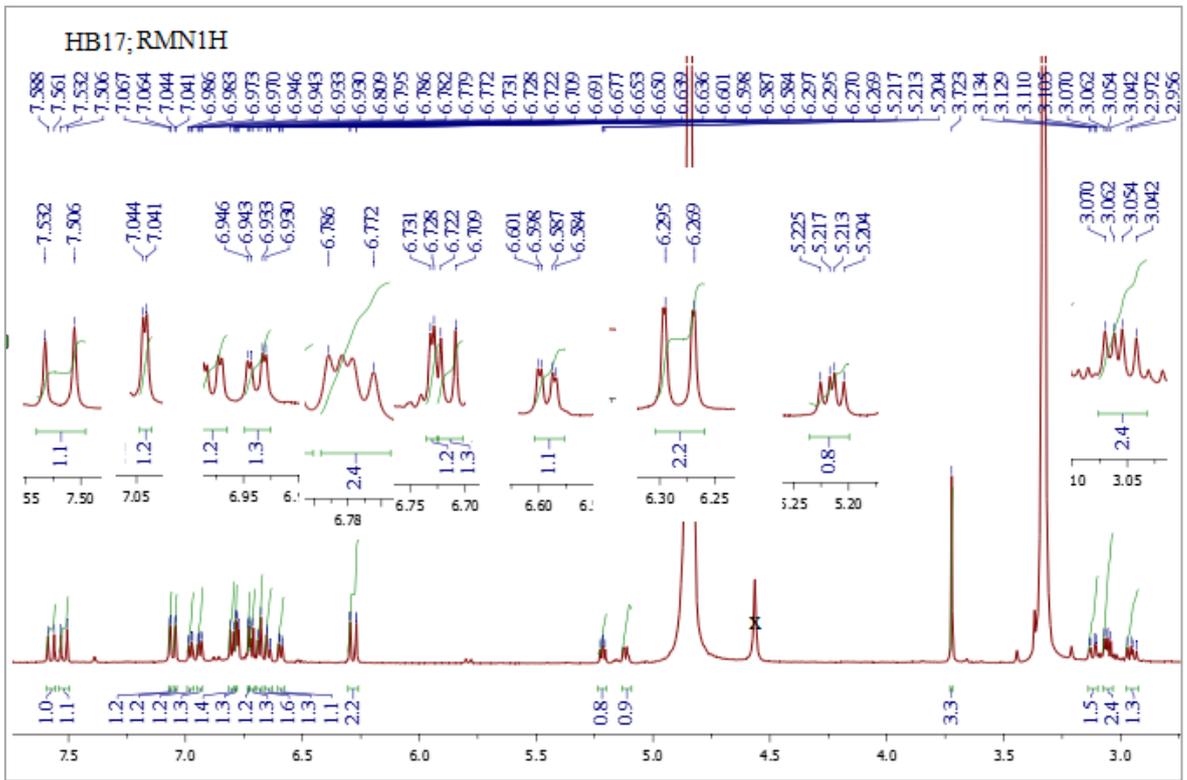
Les protons relatifs à la partie acide 3,4-dihydroxyphényllactique apparaissent sous forme :

- H-2 (*d*,  $J = 1,8$  Hz) à  $\delta_H$  6,73 ppm ; (C-2 à  $\delta_C$  116,9 ppm).
- H-5 (*d*,  $J = 7,8$  Hz) à  $\delta_H$  6,71 ppm ; (C-5 à  $\delta_C$  115,8 ppm).
- H-6 (*dd*,  $J = 8,4 ; 1,8$  Hz) à  $\delta_H$  6,59 ppm, (C-6 à  $\delta_C$  121,5 ppm).
- H-7 (2H ; *dd*,  $J = 12,0 ; 4,8$  Hz) à  $\delta_H$  3,06 ppm ; (C-2 à  $\delta_C$  37,3 ppm).
- H-8 (*dd*,  $J = 7,8 ; 5,4$  Hz) à  $\delta_H$  5,21 ppm ; (C-2 à  $\delta_C$  74,1 ppm).

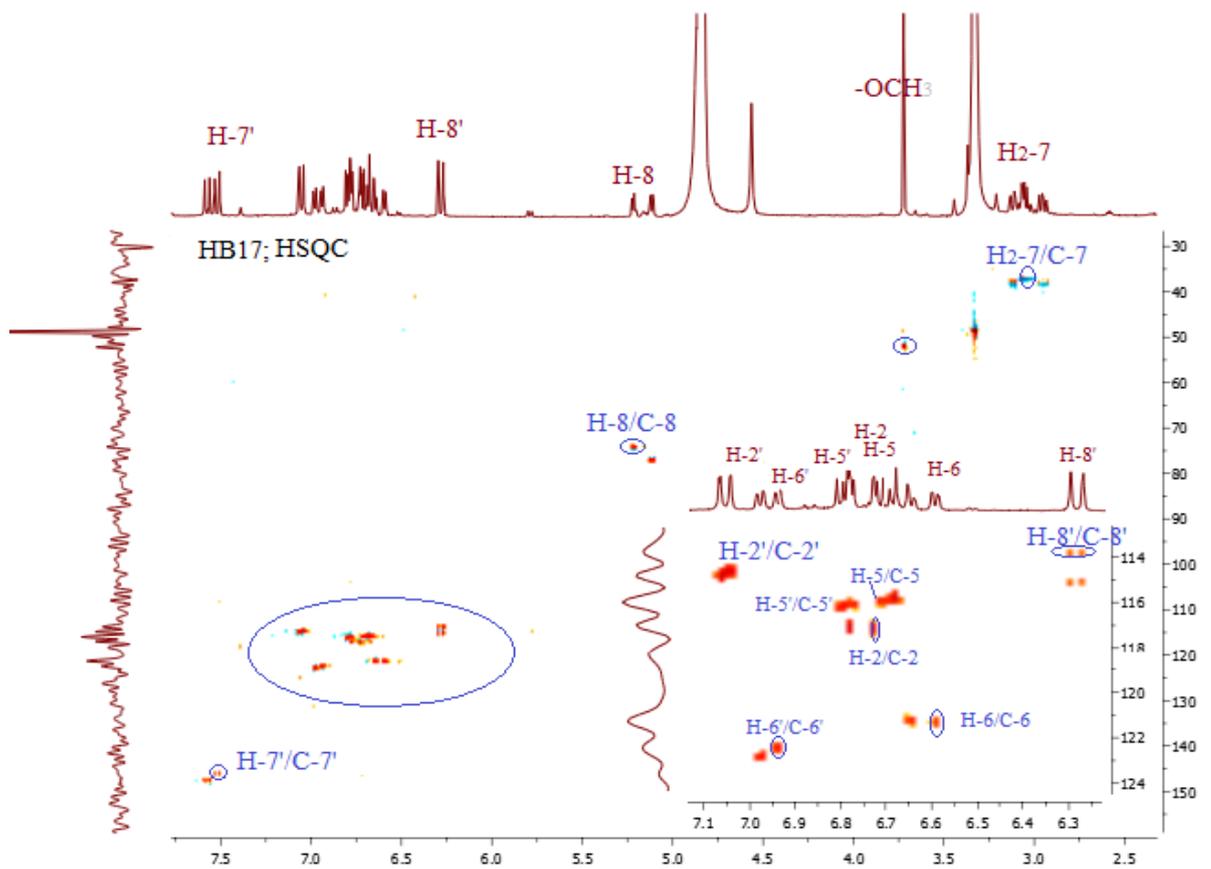
Cette analyse permet de proposer la structure partielle du produit **HB17**, reportée dans la figure III.1.61.



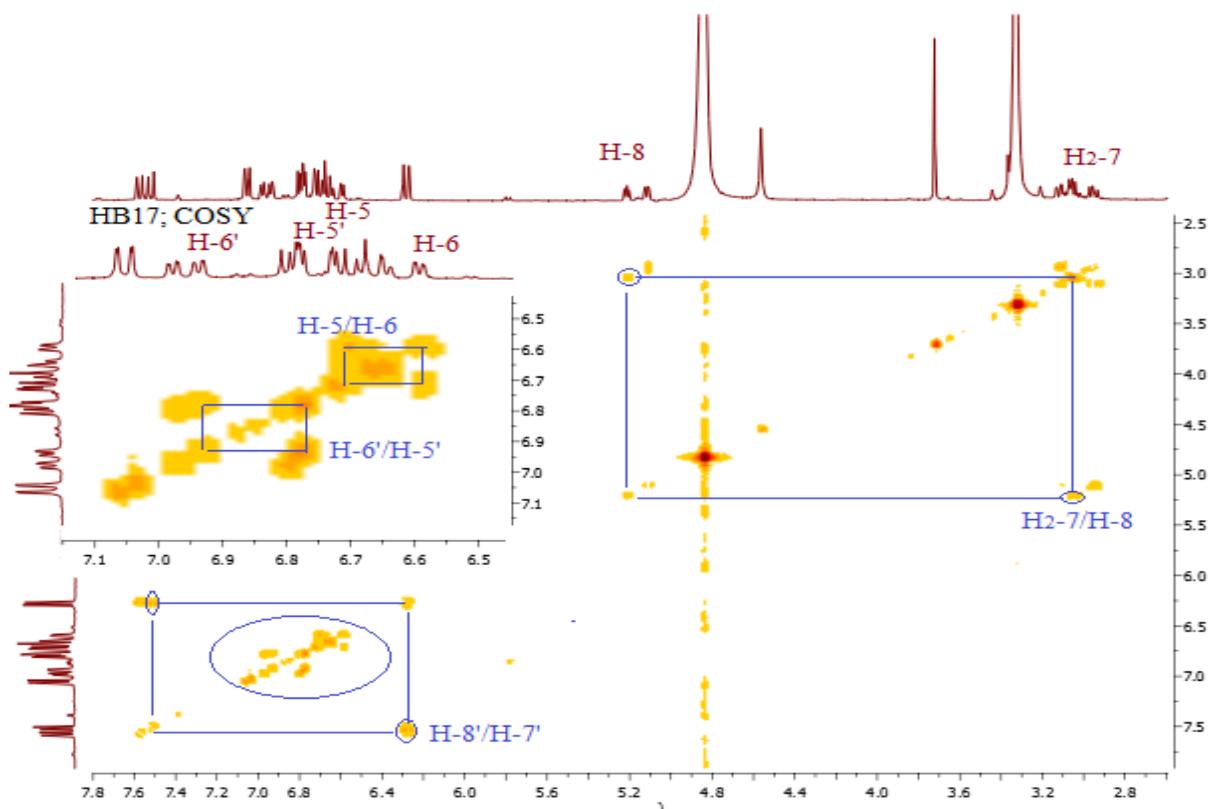
**Figure III.1.61** : structure partielle du composé **HB17**



Spectre III.1.83 : Spectre RMN<sup>1</sup>H (600MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>) du composé **HB17**

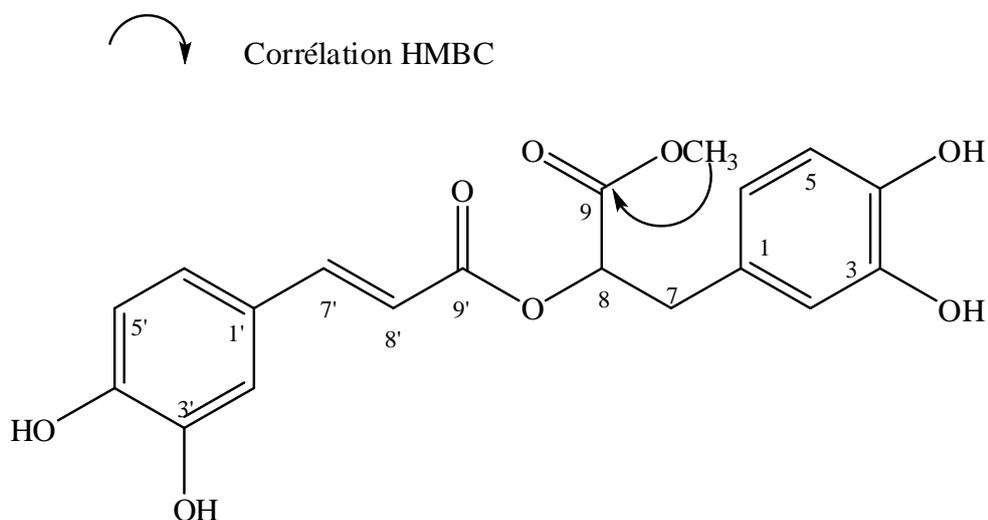


Spectre III.1.84 : Spectre HSQC du composé **HB17** dans MeOH-*d*<sub>4</sub>

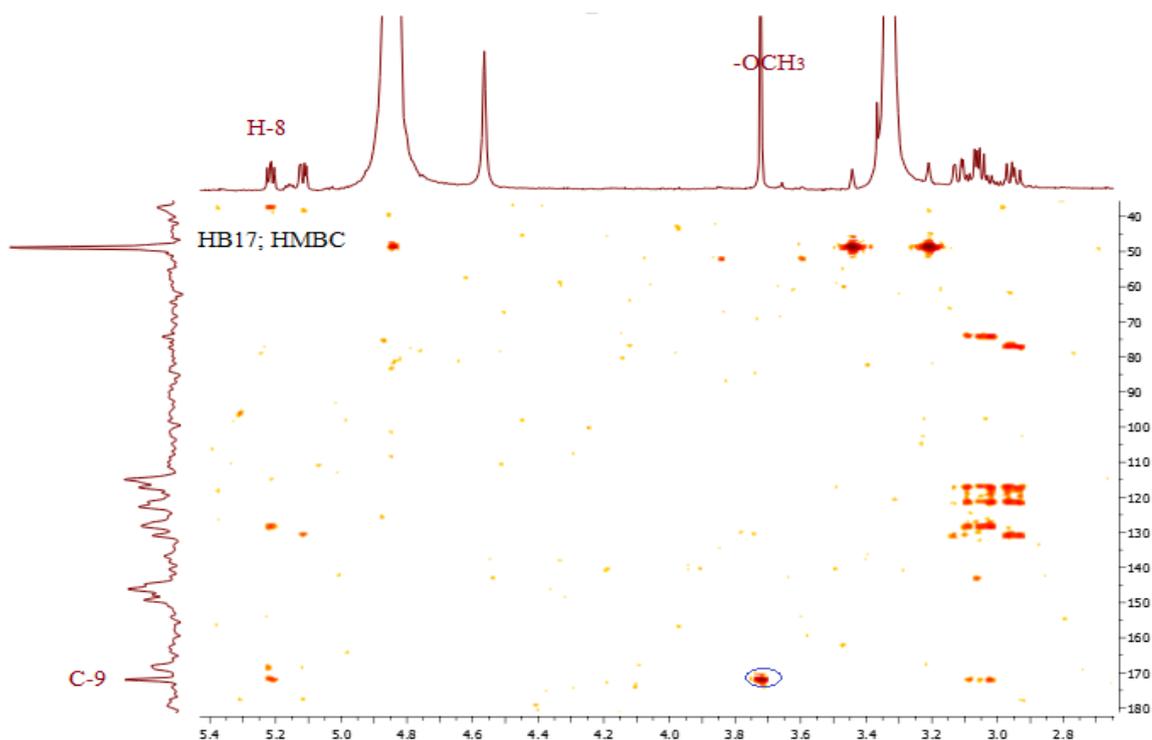


**Spectre III.1.85** : Spectre COSY du composé **HB17** dans MeOH- $d_4$

En plus de ces signaux, les spectres RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.1.86) et HSQC (Spectre III.1.87) révèlent la présence d'un groupement méthoxyle à  $\delta_H$  3,72 ppm ( $\delta_C$  52,2 ppm). Ce dernier montre une tache de corrélation avec le groupement carbonyle à  $\delta_C$  171,9 ppm comme le montre l'expérience HMBC (Spectre III.1.88). Cette observation permet de placer le méthoxyle sur le carbonyle en C-9 comme le montre dans la figure III.1.62

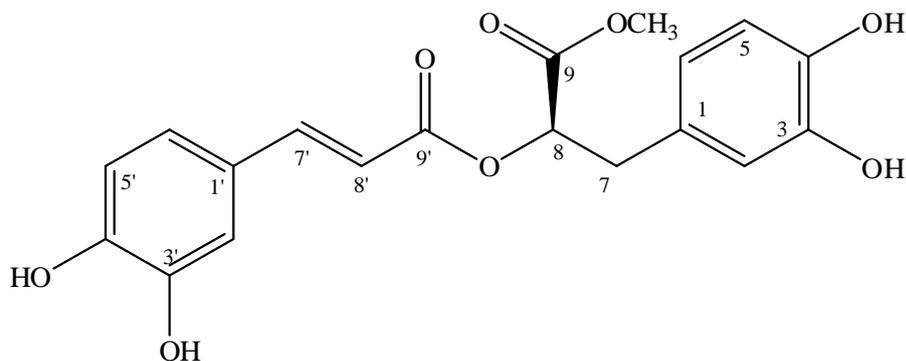


**Figure III.1.62** : Structure plane du composé **HB17**



**Spectre III.1.88** : Spectre HMBC du composé **HB17** dans  $\text{MeOH-}d_4$ , étalement

Tenant compte des résultats de la littérature et surtout de ceux de notre analyse, nous pouvons proposer l'entité présentée dans la figure III.1.63 comme structure finale de notre composé **HB17**. Il s'agit de **méthyl ester acide rosmarinique**.



**Figure III.1.63** : Structure finale du composé **HB17**, Méthyl ester acide rosmarinique

Les données de RMN de cette molécule reportées dans le tableau III.1.16 sont en parfait accord avec celles de la littérature [19].

Tableau III.1.16 : Données spectrales de RMN du composé **HB17**

Positions	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, $J$ en Hz)	HMBC (H-C)
1	128,5	-	
2	116,9	6,73 ( <i>d</i> ; 1,8)	7, 6, 1, 3, 4
3	145,3	-	
4	145,1	-	
5	115,8	6,71 ( <i>d</i> ; 7,8)	4, 1, 3
6	121,5	6,59 ( <i>dd</i> ; 8,4; 1,8)	2, 4
7	37,3	3,06 ( <i>dd</i> ; 12,0; 4,8)	8, 1
8	74,1	5,21 ( <i>dd</i> ; 7,8; 5,4)	
9	171,9	-	
1'	127,1	-	
2'	114,6	7,04 ( <i>d</i> , 1,8)	6', 3', 4'
3'	146,3	-	
4'	148,8	-	
5'	116,0	6,79 ( <i>d</i> ; 8,4)	1', 3', 4'
6'	122,3	6,94 ( <i>dd</i> ; 8,4; 1,8)	2', 4', 3'
7'	145,9	7,52 ( <i>d</i> ; 15,6)	8', 6', 9'
8'	114,4	6,28 ( <i>dd</i> ; 15,6)	
9'	168,5	-	
OCH <sub>3</sub>	52,2	3,72 <i>s</i>	9

### III.1.3. Discussion des résultats de l'activité antioxydante

L'extrait méthanol HBM montre un contenu en polyphénols de 68,0 mg EAG/g d'extrait. Cet extrait a été évalué pour son activité antioxydant *viv-à-vis* du radical libre DPPH et du radical ABTS. Les résultats montrent que cet extrait présente une activité significative *in vitro* et dépendante de la concentration vis-à-vis des radicaux DPPH (IC<sub>50</sub> 70,912 µg/ml), et ABTS (IC<sub>50</sub> 1,466 mg/ml), liés à la présence des dérivés du phénol.

Quelques produits isolés de l'extrait HBM : protocatéchualdéhyde (**HB12**), le tyrosol (**HB13**), le 3- (3,4-dihydroxyphényl) lactate d'éthyle (**HB14**), l'acide rosmarinique (**HB16**) et son ester méthylique (**HB17**) ont été également évalués pour leurs activités antioxydant vis-à-vis des deux radicaux précédents. Les résultats montrent que la valeur IC<sub>50</sub> est comprise dans l'intervalle de 2,376 ± 0,016 à 7,560 ± 0,029 µg/ml comparativement à l'IC<sub>50</sub> de l'acide ascorbique (3,282 ± 0,085 µg/ml) et le quercétine (2,433 ± 0,099 µg/ml) utilisés comme des standards pour le DPPH et de 0,374±0,013 à 1,526±0,010 mg/ml comparativement aux mêmes standards (0,834±0,015 et 3,461 ± 0,011 mg/ml) respectivement pour le TEAC.

Il est important de noter que les deux produits **HB12** (Protocatéchualdéhyde) et **HB16** (**acide rosmarinique**) présentent un effet de piégeage supérieur à celui des standards (acide ascorbique et quercétine) dans les deux tests. Il est connu que, d'une manière générale les polyphénols sont de bons antioxydants et que cette activité est directement liée à leur structure. En effet, l'activité anti-oxydante de l'acide rosmarinique, qui est un anti-oxydant puissant, est due à la présence de quatre groupements hydroxyles dans sa molécule. [23-24].

Comme attendu, l'extrait chloroforme HBC et le monoterpène glucosidique **HB15** ((3S)-3-O-(β-D-Glucopyranosyl)-3, 7-dimethylocta-1,6- dien-3-ol) n'ont présentés aucune activité comme piègeurs de radicaux libres (IC<sub>50</sub>> 600 µg/ml et valeur TEAC de 0,024 et 0,012 mg/ml, respectivement) et ceci est probablement due à leurs structures. En effet, L'absence de l'activité antioxydante observée pour l'extrait HBC riche en composés terpéniques dans la réduction du DPPH peut être expliquée par le fait que ces terpènes ne sont pas capables de donner l'atome d'hydrogène et également leur faible solubilité dans le milieu réactionnel, car ce test utilise le méthanol ou l'éthanol comme solvant [25]. Les

valeurs des  $CI_{50}$  pour les deux extraits et les produits isolés sont arborées sur le tableau III.1.17.

**Tableau III.1.17** : Acticité antioxydante et teneur totale en phénols des extraits et des composés de *H. bacciferum*

	Teneur en phénol (mg EAG <sup>a</sup> /g extrait)	Test DPPH EC50 ( $\mu$ g/ml)	Valeur TEAC <sup>b</sup>
<b>HBM</b>	68,0 $\pm$ 1,1 <sup>c</sup>	70,912 $\pm$ 1,413 <sup>c</sup>	1,466 $\pm$ 0,016 <sup>c</sup>
<b>HBC</b>	–	> 600	0,012 $\pm$ 0,014
<b>HB12</b>	–	2,376 $\pm$ 0,016	1,538 $\pm$ 0,005
<b>HB13</b>	–	7,560 $\pm$ 0,029	0,374 $\pm$ 0,013
<b>HB14</b>	–	7,062 $\pm$ 0,011	1,526 $\pm$ 0,010
<b>HB15</b>	–	>600	0,024 $\pm$ 0,003
<b>HB16</b>	–	3,162 $\pm$ 0,426	1,455 $\pm$ 0,013
<b>HB17</b>	–	6,713 $\pm$ 0,019	0,697 $\pm$ 0,011
Acide L- ascorbiqued	–	3,282 $\pm$ 0,085	0,834 $\pm$ 0,015
Quercetine	–	2,433 $\pm$ 0,099	3,461 $\pm$ 0,011

Note :

a- Equivalent d'acide gallique.

b- mg / ml pour les extraits et mM pour les composés.

c- écart-type (données de trois expériences en triple).

d- Contrôle positif du test.

### III.1.4. Discussion des résultats de l'activité cytotoxique

L'activité cytotoxique des extraits de *Heliotropium* et de quelques isolats nor-isoprenoids, comme le dihydrovomifoliol et le blumenol A, et des C<sub>11</sub> lactones terpene, sur des variétés de cellules cancéreuses a été rapportée [26-27].

L'activité antiproliférative des extraits HBC et HBM de *H.bacciferum* (de 1,000 à 0,025 mg/ml) et des composés purs (**HB6** et **HB10** de HBC, et **HB13** et **HB15** de HBM) de 1,0 à 0,1 mM, a été évaluée sur deux variétés de cellules tumorales humaines (carcinome HCT116 et adénocarcinome colorectal DLD1), et dans une variété de cellule normale

(fibroblaste cutané humain primaire, HDFa) en utilisant le test MTT (3 (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - bromure 2,5-diphenyltetrazolium).

Les résultats obtenus montrent que l'extrait HBM ne présente aucun effet cytotoxique sur les deux cellules testées. En revanche, à la plus basse concentration examinée (0,025 mg/ml) et après 24 h de traitement, cet extrait a stimulé la prolifération des cellules tumorales et des cellules normales. D'autre part, l'extrait HBC a montré un effet inhibiteur significatif et dépendant de la concentration sur la croissance des deux variétés de cellules cancéreuses traitées avec des  $CI_{50}$  de 0,095 mg/ml et de 0,062 mg/ml sur les cellules HCT116 et sur DLD1 respectivement (voir tableau III.18), mais pas dans les fibroblastes primaires jusqu'à la concentration de 0,100 mg/ml. Les deux composés, loliolide (HB6) et l'isololiolide (HB10), isolés tous deux de l'extrait HBC, ont été examinés dans les mêmes conditions que les extraits. Ils ont montré une  $CI_{50}$  s'étendant de 0,306 à 0,325 mM pour les cellules HCT116, et entre 0,276 et 0,395 mM pour les cellules DLD1.

Loliolide est rapporté à posséder des propriétés anti inflammatoire, antipyrétique, vasodilatatrice, anti tumorale, antifongique et antibactérienne. Il peut aussi être utilisé pour traiter la blessure, la dysenterie et la diarrhée [28].

Il a été rapporté que le loliolide, isolé des feuilles d'*Arctium lappa* présente une activité cytotoxique contre d'autres types de cellules cancéreuses du colon Caco-2, (carcinome du colon) [29].

D'autres travaux ont montré que le loliolide présente une activité cytotoxique contre différentes lignées cellulaires cancéreuses telles que les cellules HeLa (carcinome du col de l'utérus humain) et les MDA-MB231 (cancer mammaire) à une concentration maximale de 416 $\mu$ M, alors qu'il est inactif contre la lignée cellulaire MCF-7 [30]. De même, l'isololiolide s'est avéré être cytotoxique contre différentes lignées cellulaires tumorales et particulièrement les cellules HepG2 (hepatocellular carcinoma cells), tandis qu'aucun effet cytotoxique n'a été observé dans les fibroblastes humaines MRC-5 et HFF-1 [31].

L'effet cytotoxique de notre extrait pourrait être dû aux composés **HB6** et **HB10** et leurs interactions avec d'autres constituants. Il a été rapporté que l'activité observée pour un extrait semble être due à l'effet du synergisme entre les différents composés contenus dans cet extrait, et que ce synergisme ne dépend pas uniquement de la concentration des composés mais aussi de leurs structures chimiques et de leurs interactions [32-33].

**Tableau III.1.18 :** IC<sub>50</sub> d'extraits de *H. bacciferum* (mg/ml) et composés purs (mM) dans des variétés de cellules humaines de cancer.

	Lignes de cellules cancéreuses	DLD1 <sup>b</sup>
	HCT116 <sup>a</sup>	DLD1 <sup>b</sup>
<b>HBM</b>	Na <sup>c</sup>	Na
<b>HB12</b>	Na	Na
<b>HB14</b>	Na	Na
<b>HBC</b>	0,095 ± 0,002 <sup>d</sup>	0,062 ± 0,005
<b>HB6</b>	0,306 ± 0,027	0,395 ± 0,4
<b>HB10</b>	0,325 ± 0,015	0,276 ± 0,021

Note:

a- ligne cellulaire du cancer du côlon humain.

b- lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal humain.

c- Non actif jusqu'à 1 mg / ml pour les extraits, et 1 mM pour les composés.

d - ± écart-type (données de trois expériences en triple).

# Bibliographie

- [1] Chaturvedula. VSP., Prakash. I., (2012). Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavisissimus*. *Int Curr Pharm J.* 1:239–242.
- [2] Khatri. Y., Girhard. M., Romankiewicz. A., Ringle. M., Hannemann. F., Urlacher. VB., Hutter. MC., Bernhardt. R., (2010). Regioselective hydroxylation of norisoprenoids by CYP109D1 from *Sorangium cellulosum* So ce56. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88:485–495.
- [3] Fujimori. T., Kasuga. R., Noguchi. M., Kaneko. H., (1974). Isolation of R-(-)-3-hydroxy- $\beta$ -ionone from Burley tobacco. *Agric Biol Chem.* 38:891–892.
- [4] Park. JH., Lee. DG., Yeon. SW., Kwon. HS., Ko. JH., Shin. DJ., Park. HS., Kim. Yong-Soon., Bang. MH., Baek. NI., (2011). Isolation of megastigmane sesquiterpenes from the silkworm (*Bombyx mori* L.) droppings and their promotion activity on HO-1 and SIRT1. *Arch Pharm Res.* 34:533–542.
- [5] Erosa-Rejon. G., Pena-Rodriguez. LM., Sterner. O., (2009). Secondary metabolites from *Heliotropium angiospermum*. *J Mex Chem Soc.* 53:44–47.
- [6] Chen. H., Zhou. YZ., Qiao. L., Cao. JQ., Yao. Y., Hua. HM., Pei. YH., (2007). Androstane and monoterpene glucoside sinapoyl ester from *Cynanchum amplexicaule* SIEB. et ZUCC. *Chem Pharm Bull.* 55:1416–1418.
- [7] Vizetto-Duarte. C., Custodio. L., Gangadhar. KN., Lago. JHG., Dias. C., Matos. AM., Neng. N., Nogueira. JMF., Barreira. L., Albericio. F., et al., (2016). Isololiolide, a carotenoid metabolite isolated from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*, is cytotoxic and able to induce apoptosis in hepatocarcinoma cells through caspase-3 activation, decreased Bcl-2 levels, increased p53 expression and PARP cleava. *Phytomedicine.* 23:550–557.
- [8] Amen. YM., Marzouk. AM., Zaghoul. MG., Afifi. MS., (2013). Bioactive compounds from *Tipuana tipu* growing in Egypt. *J Am Sci.* 9:334–339.
- [9] Etoh. H., Murakami. K., Yogoh. T., Ishikawa. H., Fukuyama. Y., Tanaka. H., (2004). Antioxidative compounds in barley tea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 2616–2618.
- [10] Mulvena. D., Webb. E.C., Zerner. B., (1969). 3, 4-Dihydroxybenzaldehyde a fungistatic substance from green cavendish bananas. *Phytochemistry.* 8 393–395.

- [11] Weber. B., Hoesch. L., Rast. D.M., (1995). Protocatechualdehyde and other phenols as cell-wall components of grapevine leaves. *Phytochemistry*. 40 433–437.
- [12] Choi. J., Jiang. X., Jeong. JB., Lee. SH., (2014). Anticancer Activity of Protocatechualdehyde in Human Breast Cancer Cell. *J Med Food*. 17 (8), 842–848.
- [13] Zhou. Z., Liu. Y., Miao. A.D., Wang. S.Q., (2005). Protocatechuic aldehyde suppresses TNF $\alpha$ -induced ICAM-1 and VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol*. 513 1–8.
- [14] Chang. Z.Q., Gebru. E., Lee. S.P., Rhee. M.H., Kim. J.C., Cheng. H., Park S.C., (2011) *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of protocatechualdehyde isolated from *phellinus gilvus*, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* (Tokyo) 57 118–122.
- [15] Jeong. JB., Lee. SH., (2013). Protocatechualdehyde possesses anti-cancer activity through downregulating cyclin D1 and HDAC2 in human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 4 ; 430 (1):381-6.
- [16] Guzman-Lopez. O., Trigos .A., Fernandez. FJ., De Jesus Yanez-Morales. M., Saucedo-Castaneda. G., (2007). Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adiposa*. *World J Microbiol Biotechnol*. 23:1473–1477.
- [17] Hou. Z-F., Tu. Y-Q., Li. Y., (2002). Three New Phenolic compounds from *Nepeta prattii*. *J Chin Chem Soc*, 49:255–258.
- [18] Seo. Y., Shin. J., Cha. HJ., Kim. YA., Ahn. JW., Lee. BJ., Lee. DS., (2003). A new monoterpene glucoside from *Portulaca oleracea*. *Bull Korean Chem Soc*, 24:1475–1477.
- [19] Petersen M, Simmonds MSJ. (2003). Rosmarinic acid, *Phytochemistry* 62: 121-125.
- [20] Scarpati M, Oriente G. 1958. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *Rosmarinus off*), *Journal of Rice Science* 28: 2329-2333.
- [21] Rossi. F., Jullian. V., Pawlowicz. R., Kumar-Roiné. S., Haddad. M., Darius. H.T., *et al.*, (2012). Protective effect of *Heliotropium foertherianum* (Boraginaceae) folk remedy and its active compound, rosmarinic acid against a Pacific ciguatoxin. *J Ethnopharmacol*. 30, 33-40.
- [22] Abedini. A., Roumy. V., Mahieux. S., Biabiany. M., Standaert-Vitse. A., Riviere. C., Sahpaz. S., Bailleul. F., Neut. C., Hennebelle. T., (2013). Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evidence-based Complement Altern Med*, Article ID 604536:1–11.
- [23] Zheng. W., Wang. S.Y., (2001). Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem*. 49 (11):5165-70.

- [24] Adomako-Bonsu .A.G., Chan. S.L., Pratten. M., Fry. J.R.; (2017). Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicol In Vitro*. 40:248-255.
- [25] Mata. A.T., Proença. C., Ferreira. A.R., Serralheiro. M.L.M., Nogueira. J.M.F., Araújo. M.E.M., (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as portuguese food spices. *Food Chem*. 103, 778–786.
- [26] Moongkarndi. P., Kosem. N., Luanratana. O., Jongsomboonkusol. S., Pongpan. N., (2004). Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia*, 75:375–377.
- [27] Ren. Y., Shen. L., Zhang. DW., Dai. SJ., (2009). Two new sesquiterpenoids from *Solanum lyratum* with cytotoxic activities. *Chem Pharm Bull*, 57: 408–410.
- [28] Grabarczyk. M., Wińska. K., Mączka. W., *et al.*, (2015). Loliolide – the most ubiquitous lactone. *FoliaBiologica et Oecologica*. 11: 1–8.
- [29] Machado. F.B., Yamamoto. R.E., Zanolli. K., *et al.*, (2012). Evaluation of the antiproliferative activity of the leaves from *Arctiumlappaby* a bioassay-guided fractionation. *Molecules*. 17:1852–1859.
- [30] Pan. L., Sinden. M.R., Kennedy. A.H., Chai. H., Watson. L.E., Graham. T.L., Kinghorn. A.D., (2009). Bioactive constituents of *Helianthustuberosus* (Jerusalemartichoke). *Phytochem Lett*. 2:15–18.
- [31] Vizetto-Duarte. C., Custódio. L., Gangadhar. K.N., Lago. J.H.G., Dias. C., Matos. A.M., Neng. N.,Nogueira. J.M.F., Barreira. L., Albericio. F., Rauter. A.P., Varela.J., (2016). Isololiolide, a carotenoid metabolite isolated from the brown alga *Cystoseiratamariscifolia*, is cytotoxic and able to induce apoptosis in hepatocarcinoma cells through caspase-3 activation, decreased Bcl-2 levels, increased p53 expression and PARP cleavage. *Phytomedicine*. 23 550–557.
- [32] Houghton. P.J., Raman. A., (1998). *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*; Chapman & Hall: London, UK. pp. 1-13.
- [33] Sri Nurestri. A.B., Norhanom. A.W., Hashim. Y., Sim. K.S., Hong. S.L., Lee. G.S., Syarifah. N.S.A.R., (2008). Cytotoxicactivity of *Pereskiableo* (Cactaceae) against selected human cell lines. *Int. J.Cancer Res*. 4, 20-27.

## Chapitre III.2

### L'espèce *Lifago dielsii* Schweinj & Muschl

#### III.2.1. Discussion des résultats du screening chimique

Les résultats préliminaires du screening chimique effectué sur deux organes de l'espèce saharienne *L. dielsii* sont reportés dans le tableau III.2.1.

**Tableau III.2.1 :** résultats globaux de la recherche de groupe de substances dans deux organes de l'espèce *L. dielsii*

Groupe chimique	Fleurs	Tiges
Terpènes	-	-
Stérols	-	-
Triterpènes	+	++++
Saponines	+	+
Coumarines	+	+
Flavonoïdes	+	+
Leucoanthocyanes	-	+
Anthocyanes	-	-
Quinones	-	-
Tanins galliques	+	+
Tanins catéchiques	+	+
Alcaloïdes	+	++++

N.B. (++++): test fortement positif, (+): test positif, (-): test négatif

De ce tableau, nous remarquons que les organes étudiés contiennent aussi bien des alcaloïdes, des coumarines, des saponines, des tanins catéchiques, des triterpènes que des flavonoïdes en quantité variable. L'analyse de ces résultats permet de tirer les constatations suivantes :

- La majorité des groupes chimiques testés sont présent en quantité variable.
- L'absence des terpènes, stérols insaturés, quinones et anthocyanes.
- Une forte présence des alcaloïdes et des triterpènes dans les tiges.

L'étude du résultat du screening phytochimique de l'espèce étudiée met en évidence la présence des composés chimiques qui possèdent des activités biologiques intéressantes. Il s'agit des alcaloïdes qui sont connus par leur activité antiproliférative et antalgique, ainsi qu'une activité antidiabétique [1]. Cette dernière peut expliquer l'utilisation traditionnelle de la plante comme antidiabétique par les habitants de la région sud.

La présence des composés polyphénoliques tels que les tanins, considérés comme de bon remède dans le traitement des maladies respiratoires et la toux [2], les flavonoïdes possèdent des activités antioxydantes [3], antivirales [4], anti-inflammatoires [5, 3] et antitumorales [2].

### III.2.2. Rendement de l'extraction

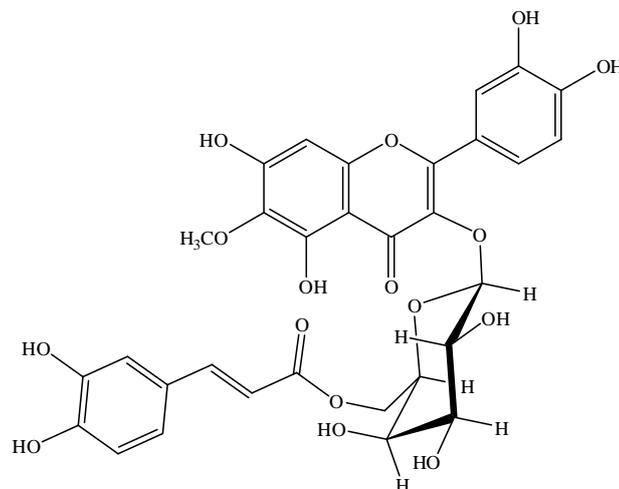
Le calcul du rendement de cette extraction par rapport à la matière sèche est reporté dans le tableau III.2.2

**Tableau III.2.2 :** Rendement de l'extraction de *Lifago dielsii*

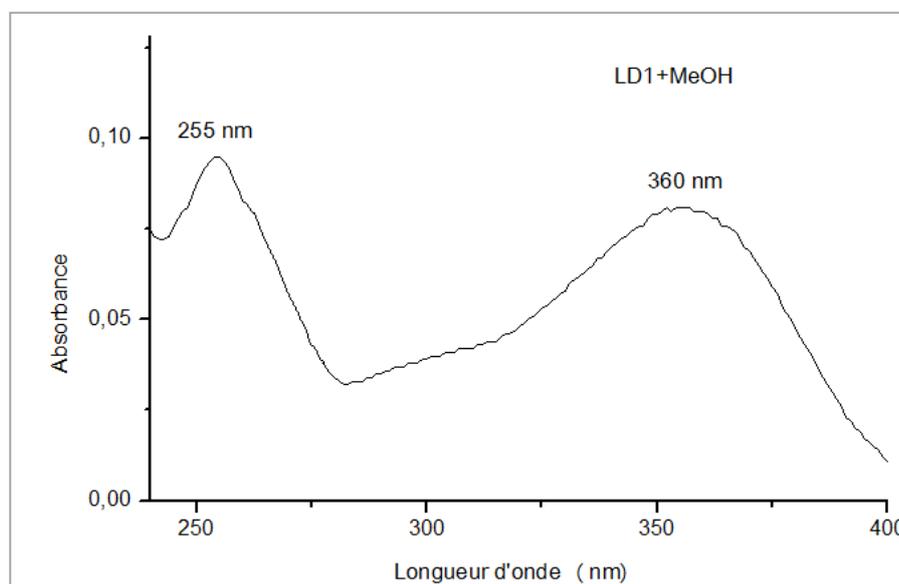
	Ext CHCl <sub>3</sub>	Ext AcOEt	Ext <i>n</i> -BuOH
Rend %	1,16	0,73	2,33

### III.2.3. Elucidation structurale des composés isolés

Les produits isolés ont été caractérisés par les méthodes d'analyse spectroscopiques RMN 1D du proton et du carbone 13, RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC), UV et par comparaison avec les données de la littérature.

III.2.3.1. Elucidation structurale du composé **LD1**

Le composé **LD1** se présente sous forme de cristaux jaunes soluble dans le méthanol. Ce composé de fluorescence noire violette sous la lumière du Wood (365nm) réagit avec le réactif de  $\text{NH}_3$  en affichant une coloration jaune terne laissant envisager une structure de type flavonoïde. Le spectre d'absorption UV montre deux maxima à 255 et 360 nm, caractéristiques des bandes II et I d'un flavonol substitué en 3 [6].



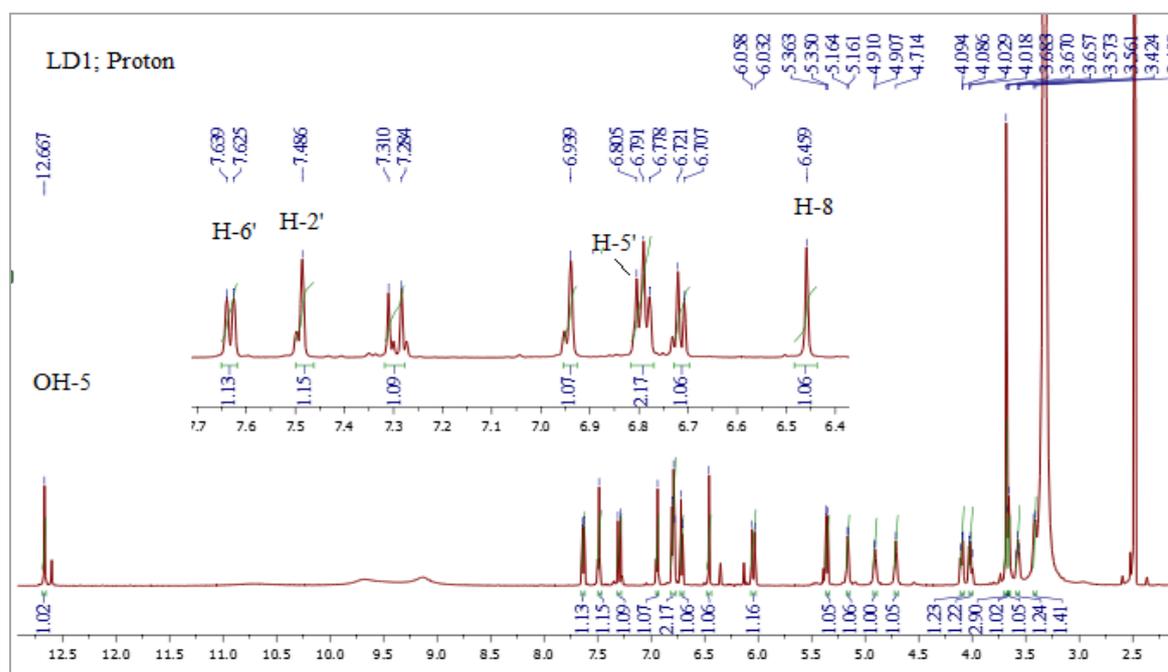
**Spectre III.2.1** : Spectre UV du composé **LD1** enregistré dans le MeOH

L'examen simultané des spectres  $\text{RMN}^1\text{H}$  (spectre III.2.2) et HSQC étalé (Spectre III.2.3) du composé **LD1** permet de tirer les indications suivantes :

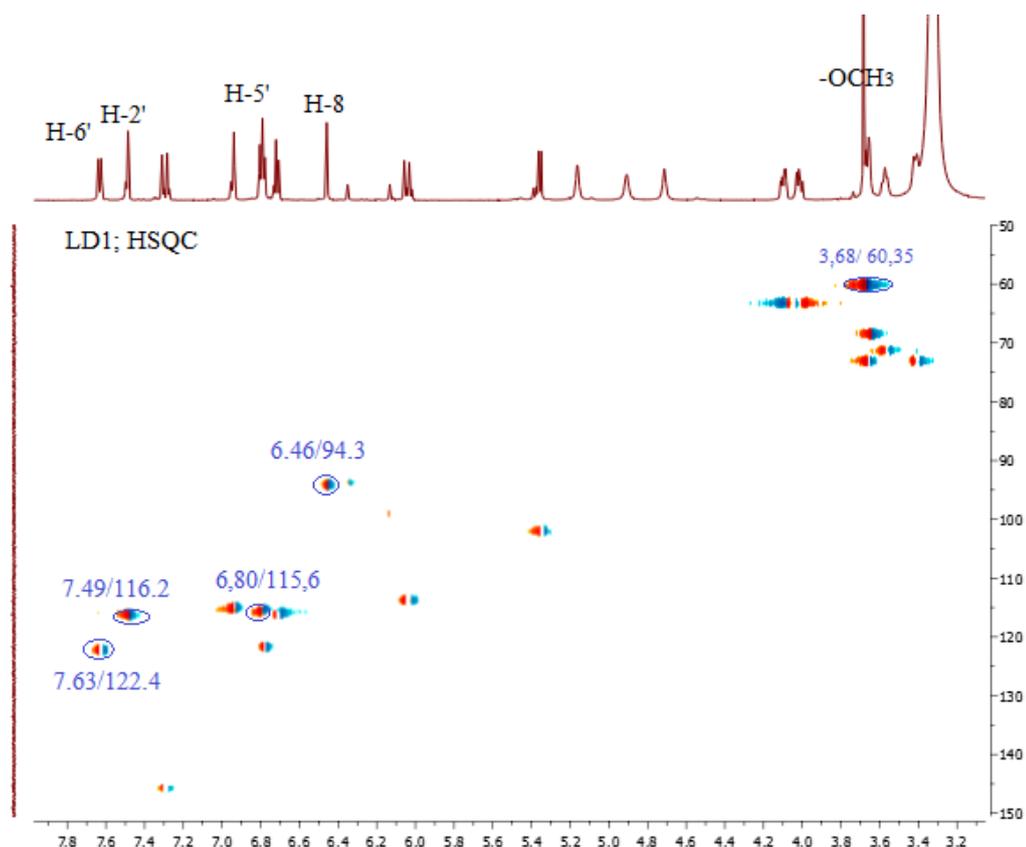
- Le signal d'intégration 1H à  $\delta_H$  12,67 ppm est caractéristique du groupement OH de la position 5 formant une chélation avec le carbonyle du squelette flavonique.
- Un singulet large d'intégration 1H à  $\delta_H$  7,49 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  116,2 ppm, attribuables à H-2' et C-2' respectivement.
- Un doublet large ( $J = 8,4$  Hz) d'intégration 1H, indicateur d'un couplage ortho à  $\delta_H$  7,63 ppm montre une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  122,4 ppm, attribuable à H-6' et C-6' respectivement.
- Un doublet ( $J = 8,4$  Hz) d'intégration 1H, indicateur également d'un couplage ortho à  $\delta_H$  6,80 ppm montre une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  115,6 ppm, attribuable à H-5' et C-5' respectivement.

La présence de ces trois derniers signaux est en faveur d'un cycle B substitué dans les positions 3' et 4'.

- Un singulet d'intégration 1H à  $\delta_H$  6,46 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_C$  94,3 ppm. La valeur du déplacement chimique de ce carbone est caractéristique du C-8, car ceux du C-3 et C-6 seraient plus élevés, indiquant ainsi une substitution des carbones 5, 6 et 7 du cycle A.
- Un signal d'intégration 3H à  $\delta_H$  3,68 ppm sous forme d'un singulet corrèle sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  60,4 ppm, indique la présence d'un groupement méthoxyle dans la molécule.



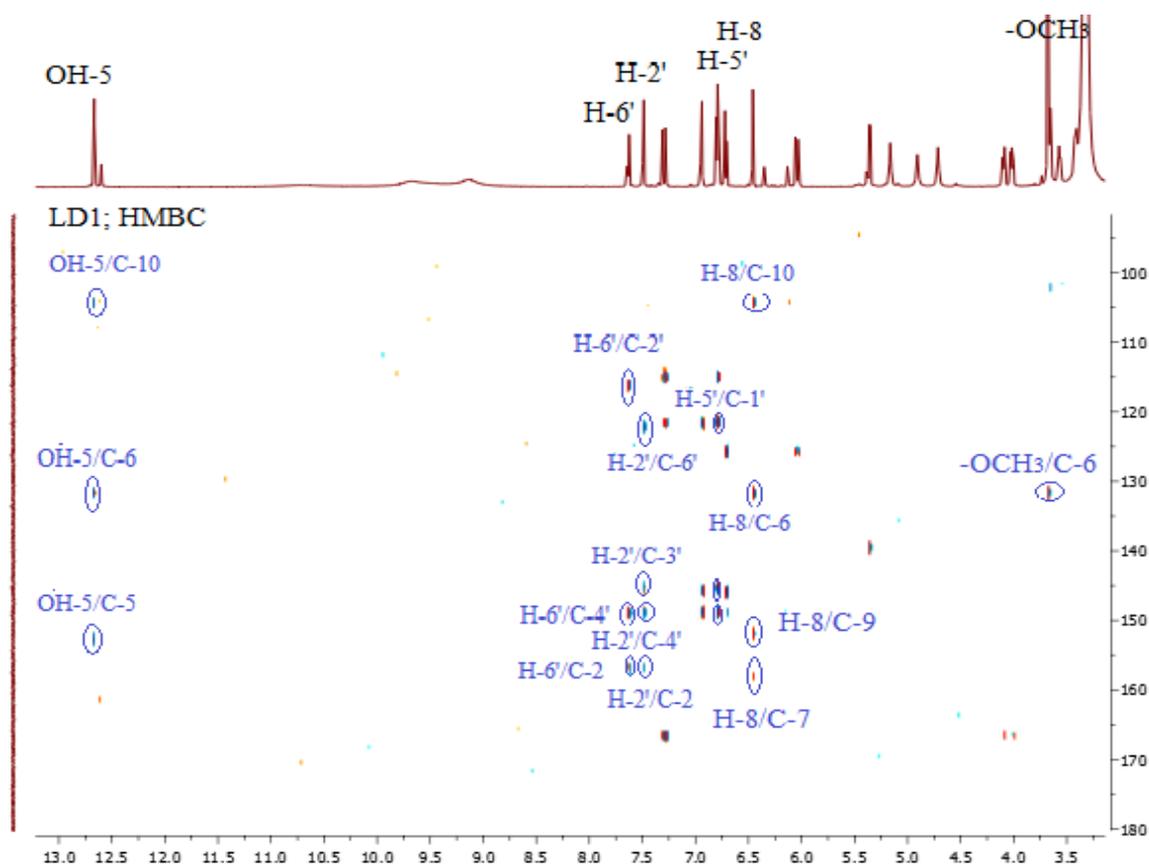
Spectre III.2.2 : Spectre de RMN<sup>1</sup>H (600 MHz) du composé LD1 dans DMSO-*d*<sub>6</sub>



**Spectre III.2.3 :** Spectre HSQC du composé **LD1** dans DMSO- $d_6$ , étalement

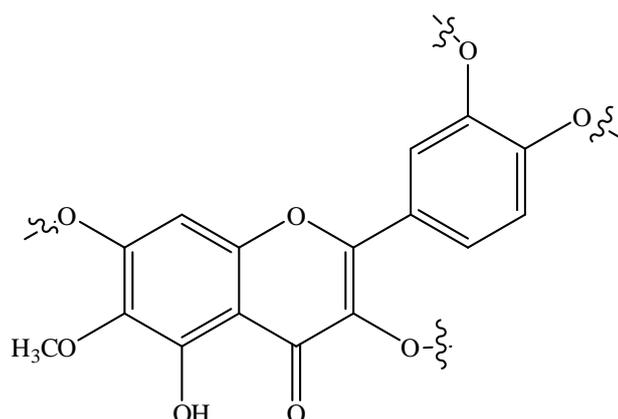
Le spectre HMBC (Spectre III.2.4) montre des couplages en  $^2J$  et  $^3J$  entre :

- Le proton du groupement OH et les carbones résonant à  $\delta_C$  104,3 (C-10), 131,4 (C-6), 152,7 (C-5).
- Le H-8 et les carbones à  $\delta_C$  104,3 (C-10), 131,4 (C-6), 151,8 (C-9), 158,1 (C-7).
- Le H-2' et les carbones à  $\delta_C$  122,4 (C-6'), 145,4 (C-3'), 148,9 (C-4'), 156,8 (C-2).
- Le H-6' et les carbones à  $\delta_C$  116,2 (C-2'), 148,9 (C-4'), 156,8 (C-2).
- Le H-5' et les carbones à  $\delta_C$  121,5 (C-1'), 145,4 (C-3'), 148,9 (C-4').
- Les protons du méthoxyle à  $\delta_H$  3,68 ppm et le carbone C-6 ( $\delta_C$  131,4 ppm). Cette corrélation explique le déblindage de ce carbone.



**Spectre III.2.4 :** Spectre HMBC du composé **LD1** dans DMSO- $d_6$ , étalement

Cette première analyse permet de proposer la structure partielle suivante (Figure III.2.1), il s'agit d'un squelette quercétine substitué en position C-6 par un méthoxyle.



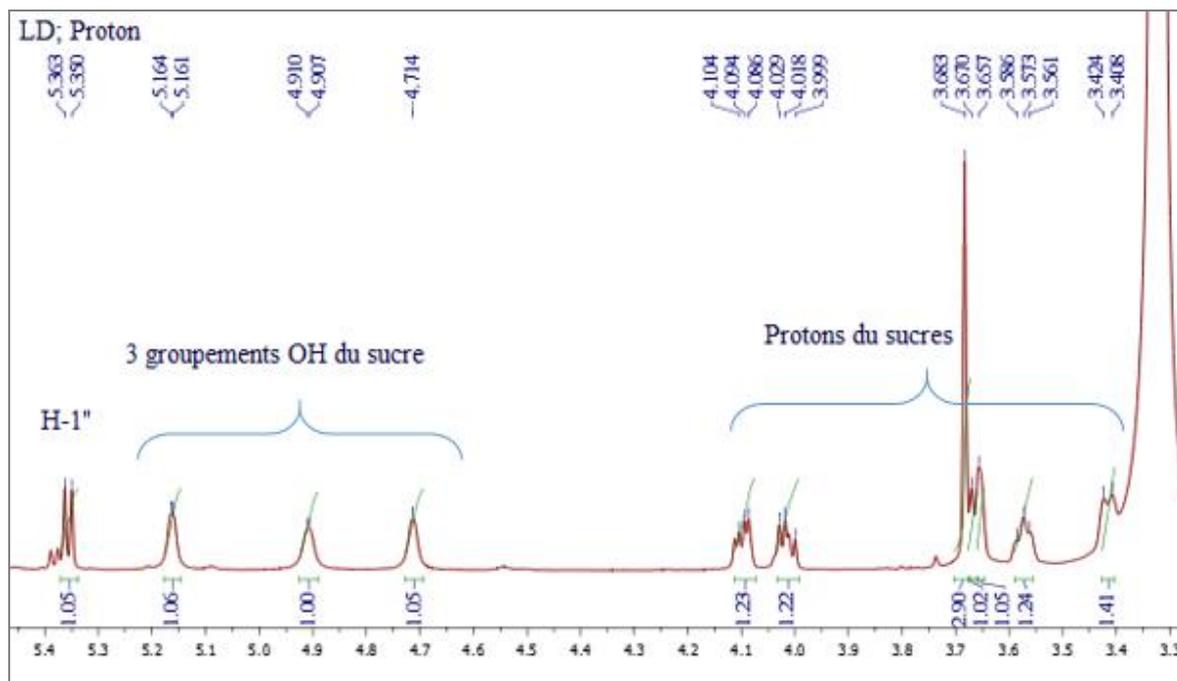
**Figure III.2.1 :** Structure partielle du composé **LD1**

Un retour au spectre RMN<sup>1</sup>H permet de repérer aisément d'autres signaux caractéristiques d'un hexose reconnaissable par :

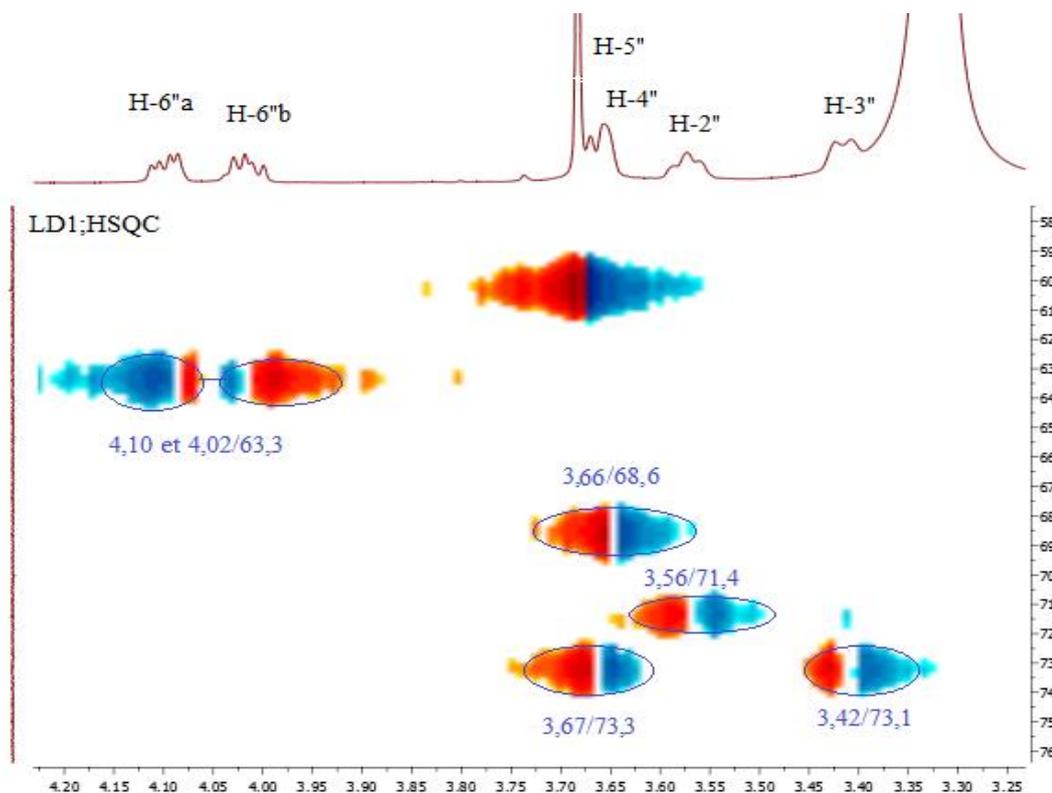
- Un signal sous forme d'un doublet ( $J = 7,8$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  5,36 ppm caractéristique du proton anomérique (H-1'') d'une entité glycosidique, ce proton corrèle sur le spectre HSQC (Spectre III.2.6) avec un carbone à  $\delta_C$  102,1 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques du proton ainsi que celle de son carbone indique que cette entité est relié à l'aglycone par un pont oxygène. D'après la valeur de la constante de couplage ( $J = 7,8$  Hz), cette entité pourrait dériver soit d'un groupement glucosyle soit d'un groupement galactosyle avec une configuration  $\beta$  de la liaison reliant le sucre à l'aglycone.
- Ce proton anomérique H-1'' corrèle sur le spectre COSY (Spectre III.2.7) avec le signal à  $\delta_H$  3,57 ppm ( $t$ ;  $J = 7,2$  Hz) attribuable à H-2'' ( $\delta_C$  71,4 ppm).
- Ce proton H-2'' permet la localisation de OH-2'' à  $\delta_H$  5,16 ppm ( $sl$ ) et de H-3'' à  $\delta_H$  3,42 ppm ( $dl$ ;  $J = 9,6$  Hz) ( $\delta_C$  73,1 ppm).
- Ce dernier montre une première tâche de corrélation avec le signal à  $\delta_H$  4,91 ppm ( $sl$ ) caractéristique du OH-3'' et une deuxième avec le signal à  $\delta_H$  3,66 ppm. attribuable H-4'' ( $sl$ ) ( $\delta_C$  68,6 ppm)
- Toujours sur le même spectre, H-4'' permet de localiser OH-4'' à  $\delta_H$  4,71 ppm ( $sl$ ) et montre une corrélation avec le noyau relatif au signal, qui apparait sur le spectre proton sous forme de singulet large à  $\delta_H$  3,67 ppm, ce noyau ne peut être que H-5'' ( $\delta_C$  73,3 ppm).

La multiplicité des trois derniers signaux (H-3'', H-4'', H-5'') indique une interaction de type équatoriale-axiale. Cette observation oriente vers une entité sucre dérivée du galactose.

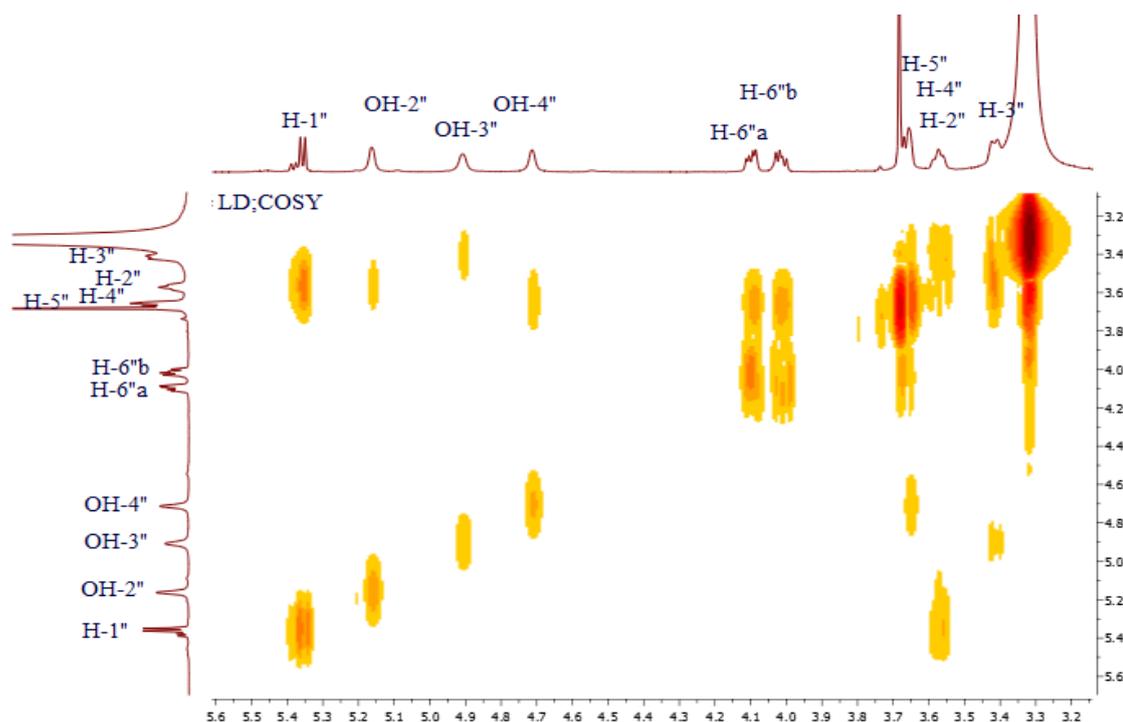
- Toujours sur le spectre COSY, le proton H-5'' mène à l'attribution de H-6''a à  $\delta_H$  4,10 ppm ( $\delta_C$  63,3 ppm) sous forme d'un doublet de doublet ( $J = 10,8$ ; 4,8 Hz) et H-6''b à  $\delta_H$  4,02 ppm ( $\delta_C$  63,3 ppm) sous forme d'un multiplet.



Spectre III.2.5 : Spectre de RMN<sup>1</sup>H (600 MHz) du composé **LD1** dans DMSO-*d*<sub>6</sub> ; étalement



Spectre III.2.6 : Spectre de HSQC du composé **LD1** dans DMSO-*d*<sub>6</sub>, étalement



**Spectre III.2.7** : Spectre de COSY du composé **LD1** dans DMSO- $d_6$ , étalement

Un réexamen des spectres RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.2.8), HSQC (Spectre III.2.9) et COSY (Spectre III.2.10) montre la présence d'autres signaux caractéristiques d'un cycle aromatique reconnaissable par :

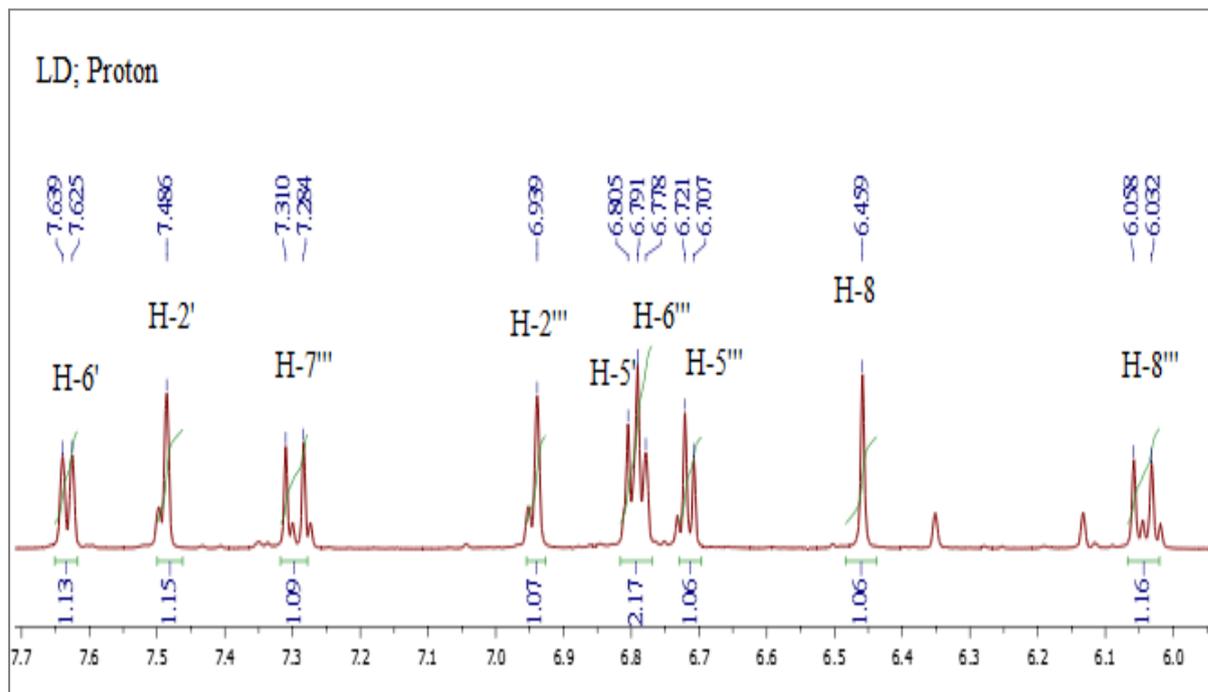
- Un singulet large d'intégration 1H à  $\delta_H$  6,94 ppm montre une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  115,3 ppm.
- Un doublet large ( $J = 8,4$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  6,78 ppm corrèle, sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  121,7 ppm.
- Un doublet ( $J = 8,4$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  6,71 ppm montrant une tache de corrélation sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  116,3 ppm.

Les valeurs des déplacements chimiques ainsi que celle des constantes de couplage de ces trois signaux orientent vers la présence d'un système ABX correspondant à un cycle aromatique trisubstitué.

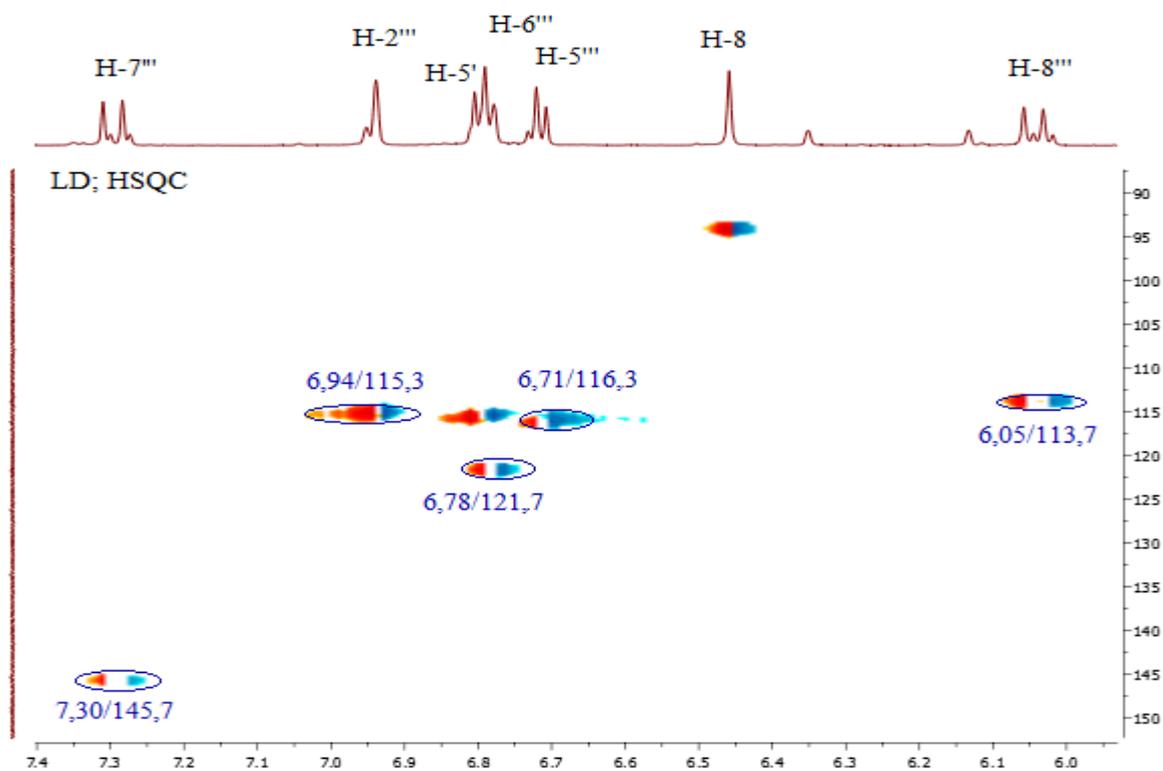
- deux doublets ( $J = 15,6$  Hz) d'intégration 1H chacun à  $\delta_H$  7,30 ppm et  $\delta_H$  6,05 ppm, montrent des taches de corrélation sur le spectre HSQC avec le carbone à  $\delta_C$  145,7 ppm et le carbone à  $\delta_C$  113,7 ppm respectivement.

La multiplicité et la valeur de la constante de couplage ( $J = 15,6$  Hz) de ces deux signaux indiquent clairement la présence d'un groupement éthylénique de configuration

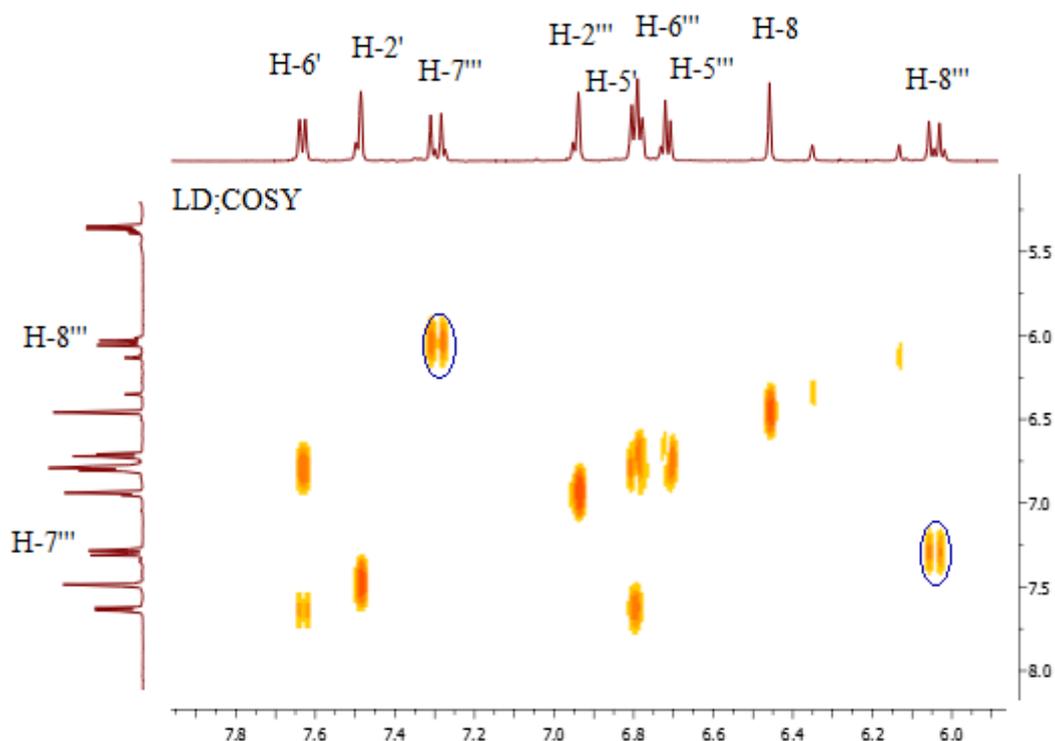
*trans*. Ceci est confirmé par les taches de corrélations se trouvant sur le spectre COSY (Spectre III.2.10).



**Spectre III.2.8** : Spectre de RMN<sup>1</sup>H (600 MHz) du composé **LD1** dans DMSO-*d*<sub>6</sub>, étalement



**Spectre III.2.9** : Spectre de HSQC du composé **LD1** dans DMSO-*d*<sub>6</sub>, étalement



**Spectre III.2.10** : Spectre de COSY du composé **LD1** dans DMSO- $d_6$ , étalement

A ce niveau, nous disposons d'un cycle aromatique trisubstitué et d'une double liaison éthylénique de configuration *trans*. L'analyse du spectre HMBC (Spectre III.2.11) permet de repérer les corrélations suivantes :

- Le proton aromatique à  $\delta_H$  6,94 ppm avec le carbone à  $\delta_C$  121,4 ppm et deux carbones oxygénés quaternaires à  $\delta_C$  145,8 ppm et  $\delta_C$  148,8 ppm.
- Le proton à  $\delta_H$  6,78 ppm avec ces deux derniers carbones.

Les valeurs du déplacement chimique des deux carbones ( $\delta_C$  145,8 et 148,8 ppm) indiquent clairement qu'ils sont aromatiques et oxygénés et ne peuvent être attribués qu'aux carbones C3''' et C4''' du cycle aromatique respectivement.

- Le proton éthylénique à  $\delta_H$  7,30 ppm et le carbone du carbonyle d'ester  $\delta_C$  166,6 ppm
- Ce même proton et les signaux des carbones à  $\delta_C$  121,7 et 113,7 ppm attribuables à C-6''' et C-8''' respectivement.
- Le proton éthylénique à  $\delta_H$  6,05 ppm et le signal à  $\delta_C$  125,7 ppm qui ne peut être que le carbone quaternaire aromatique (C-1''').

L'ensemble de cette analyse permet de proposer la structure partielle de l'entité 1 représentée dans la figure III.2.2, soit une entité cinnamoyle substituée dans les positions 3 et 4.

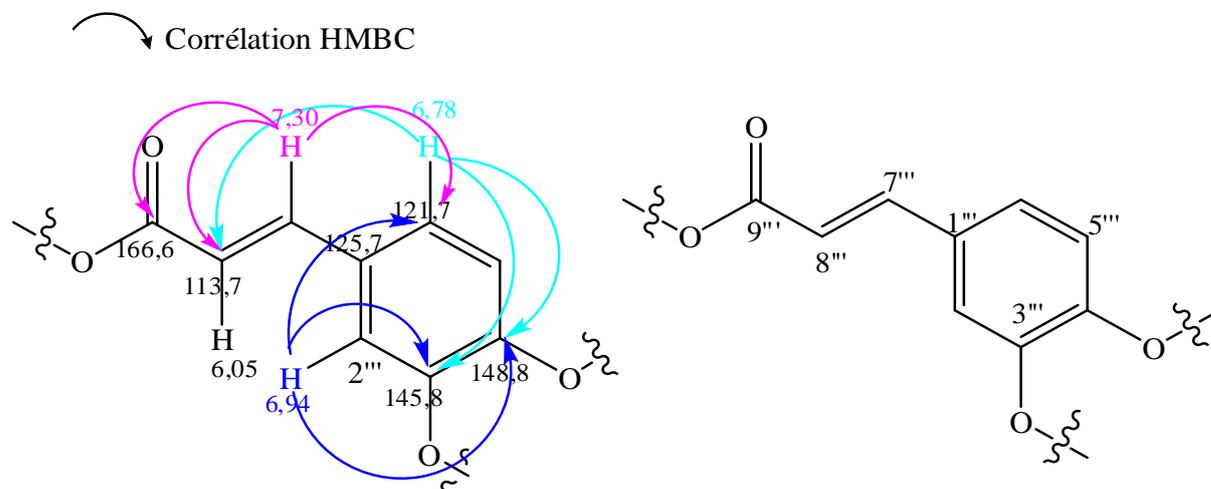
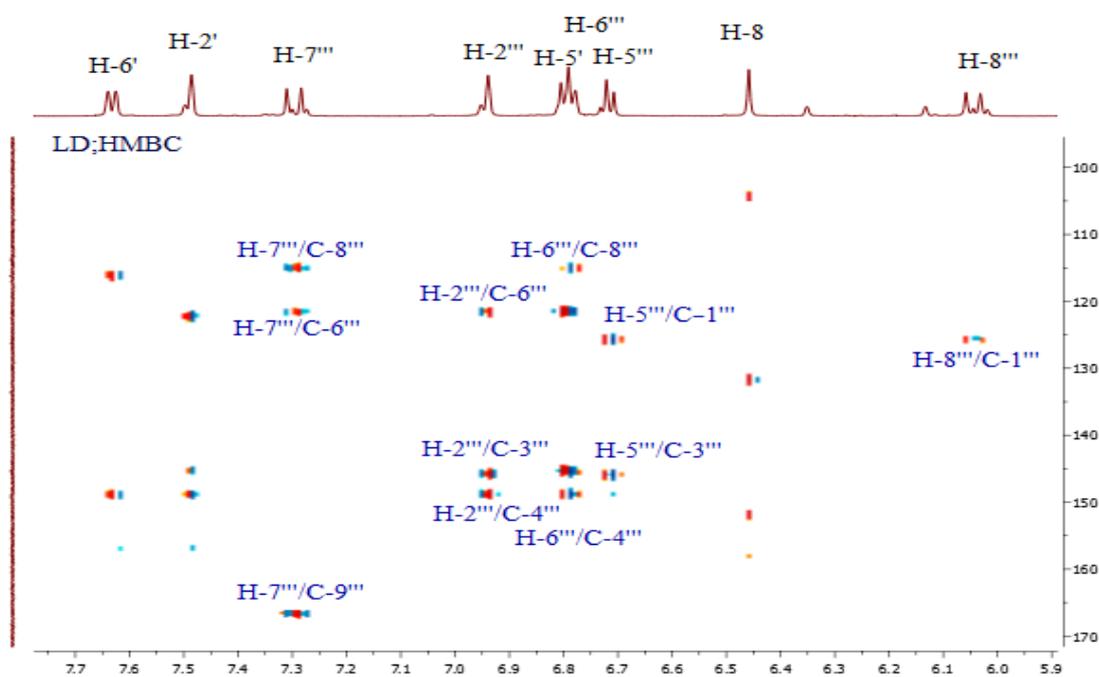
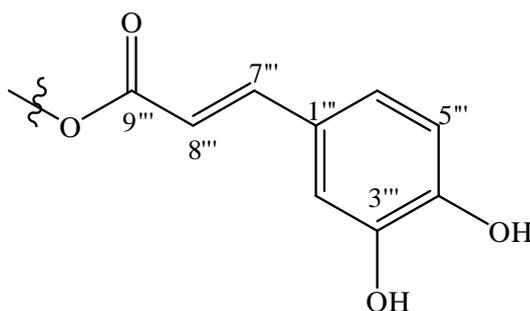


Figure III.2.2 : Entité 1 présente dans le composé LD1



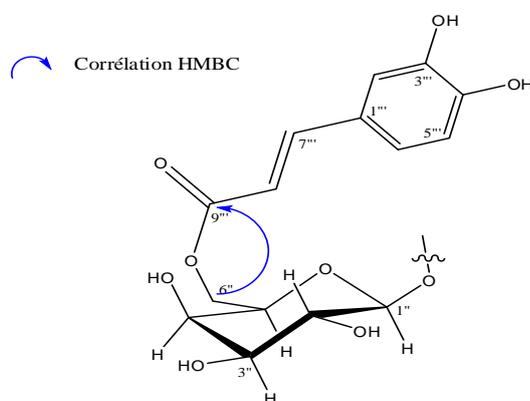
Spectre III.2.11 : Spectre de HMBC du composé LD1 dans DMSO- $d_6$ , étalement

L'ensemble de ces données et vu l'absence d'autres substituants sur le spectre RMN<sup>1</sup>H permet de déduire que les carbones quaternaire oxygénés sont substitués par des groupements hydroxyles et mène donc la présence dans cette molécule de l'entité reportée dans la figure III.2.3, soit un groupement caféoyle [8].



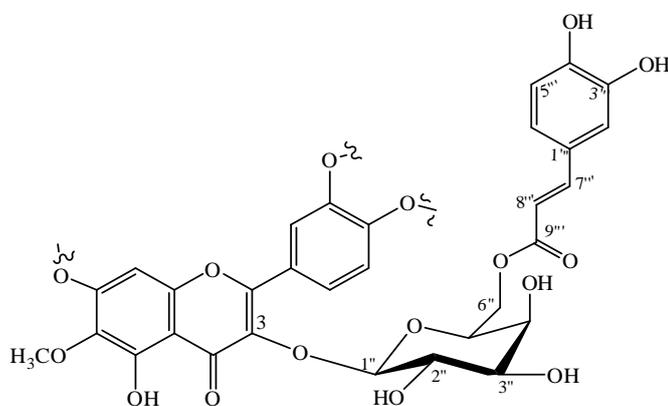
**Figure III.2.3 :** Groupement caféoyle

Par ailleurs sur le spectre HMBC (Spectre III.2.12), les deux protons du groupement CH<sub>2</sub> du galactose montrent une tache de corrélation nette avec le carbone du carbonyle C-9''' à  $\delta_C$  166,6 ppm. Cette observation permet de placer le groupement caféoyle en C-6''.

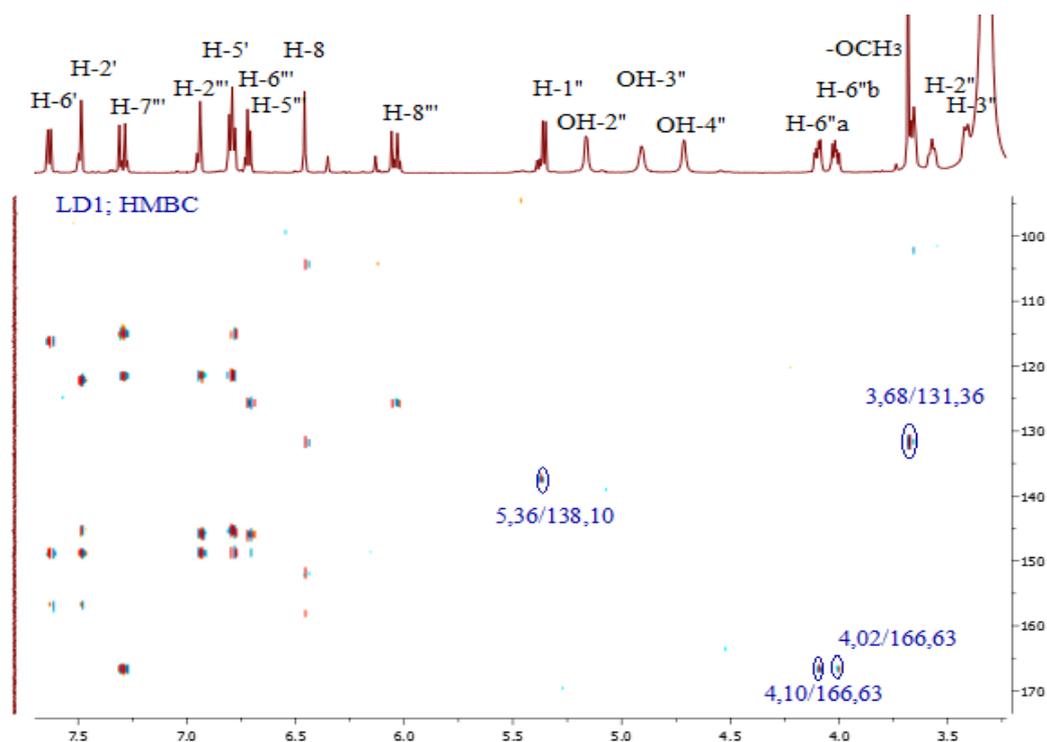


**Figure III.2.4 :** Entité 2 présente dans le composé LD1

Le même spectre montre une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1'' à  $\delta_H$  5,36 ppm et un carbone aromatique quaternaire à  $\delta_C$  138,1 ppm. Ce dernier est attribuable à C-3. Cette observation permet de placer l'entité 2 (Figure III.2.4) en position C-3



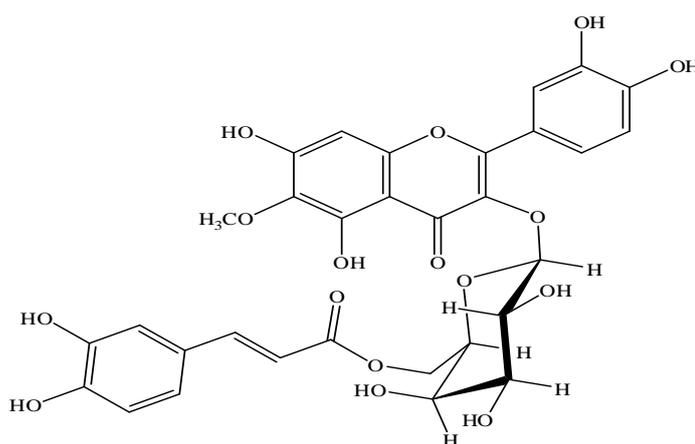
**Figure III.2.5 :** Structure partielle du composé LD1



**Spectre III.2.12** : Spectre de HMBC du composé **LD1** dans DMSO- $d_6$

Une étude complète des spectres étalés de l'expérience HMBC permet d'attribuer les carbones quaternaires restants comme reporter dans le tableau III.2.3

L'ensemble de ces données et vu l'absence d'autres substituants sur le spectre RMN<sup>1</sup>H permet de déduire que les carbones quaternaire oxygénés sont substitués par des groupements hydroxyles et mène donc à la structure reportée dans la figure III.2.6.



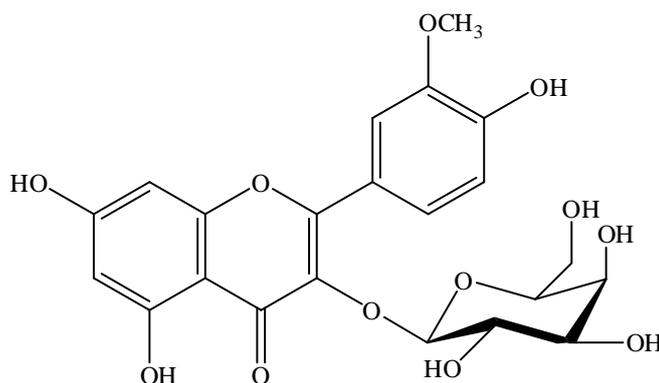
**Figure III.2.6** : Structure finale du composé **LD1**

L'analyse de l'ensemble de ces données spectrales nous a permis de déduire la structure du composé **LD1**, il s'agit de la Patulétine-3-O-β-[6''-O-(E)-cafféoyl]-galactopyranoside.

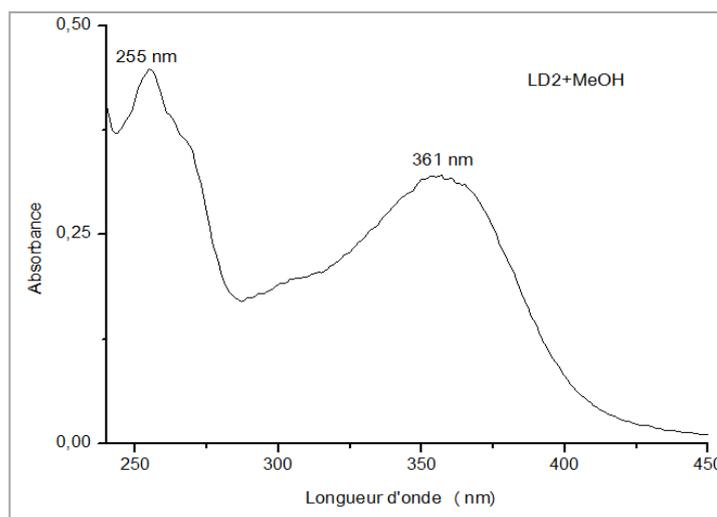
Le tableau III.2.3 rassemble les données spectroscopiques relatives à cette molécule

**Tableau III. 2.3 : Données spectrales RMN du composé LD1**

Position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, <i>J</i> en HZ)	Corrélations HMBC
2	156,8	-	
3	138,1	-	
4	178,0	-	
5	152,7	-	
6	131,4	-	-O-CH <sub>3</sub>
7	158,1	-	
8	94,3	6,46 ( <i>sl</i> )	C-6, C-7, C-9, C-10
9	151,8	-	
10	104,3	-	
1'	121,5	-	
2'	116,2	7,49 ( <i>sl</i> )	C-2, C-3', C-4', C-6'
3'	145,4	-	
4'	148,9	-	
5'	115,6	6,80 ( <i>d</i> ; 8,4)	C-6', C-3', C-4'
6'	122,4	7,63 ( <i>dl</i> ; 8,4)	C-2, C-2', C-4'
Galactose			
1''	102,1	5,36 ( <i>d</i> ; 7,8)	C-3
2''	71,4	3,56 ( <i>t</i> ; 7,2)	
3''	73,1	3,42 ( <i>d</i> ; 9,6)	
4''	68,6	3,66 ( <i>sl</i> )	
5''	73,3	3,67 ( <i>sl</i> )	C-6''
6''a	63,3	4,10 ( <i>dd</i> ; 10,8; 4,8)	C-9''
6''b		4,02 ( <i>m</i> )	C-5'', C-9''
Caféoyl			
1'''	125,7	-	
2'''	115,3	6,94 ( <i>sl</i> )	C-3''', C-4''', C-6'''
3'''	145,8	-	
4'''	148,8	-	
5'''	116,3	6,71 ( <i>d</i> ; 8,4)	C-1''', C-3''', C-4'''
6'''	121,7	6,78 ( <i>dl</i> ; 8,4)	C-2''', C-8''', C-4'''
7'''	145,7	7,30 ( <i>d</i> ; 15,6)	C-2''', C-8''', C-9'''
8'''	113,7	6,05 ( <i>d</i> ; 15,6)	C-1'''
9'''	166,6	-	
OH-5	-	12,67	C-6, C-9, C-10
OCH <sub>3</sub>	60,4	3,68 ( <i>s</i> )	C-6

III.2.3.2 Elucidation structurale du composé **LD2**

Le composé **LD2** se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Ce composé de fluorescence noire violette sous la lumière du Wood (365nm) réagit avec le réactif de  $\text{NH}_3$  en affichant une coloration jaune terne laissant envisager une structure de type flavonoïde. Le spectre d'absorption UV montre deux maxima à 255 et 361 nm, caractéristiques des bandes II et I d'un flavonol substitué en 3 [6].

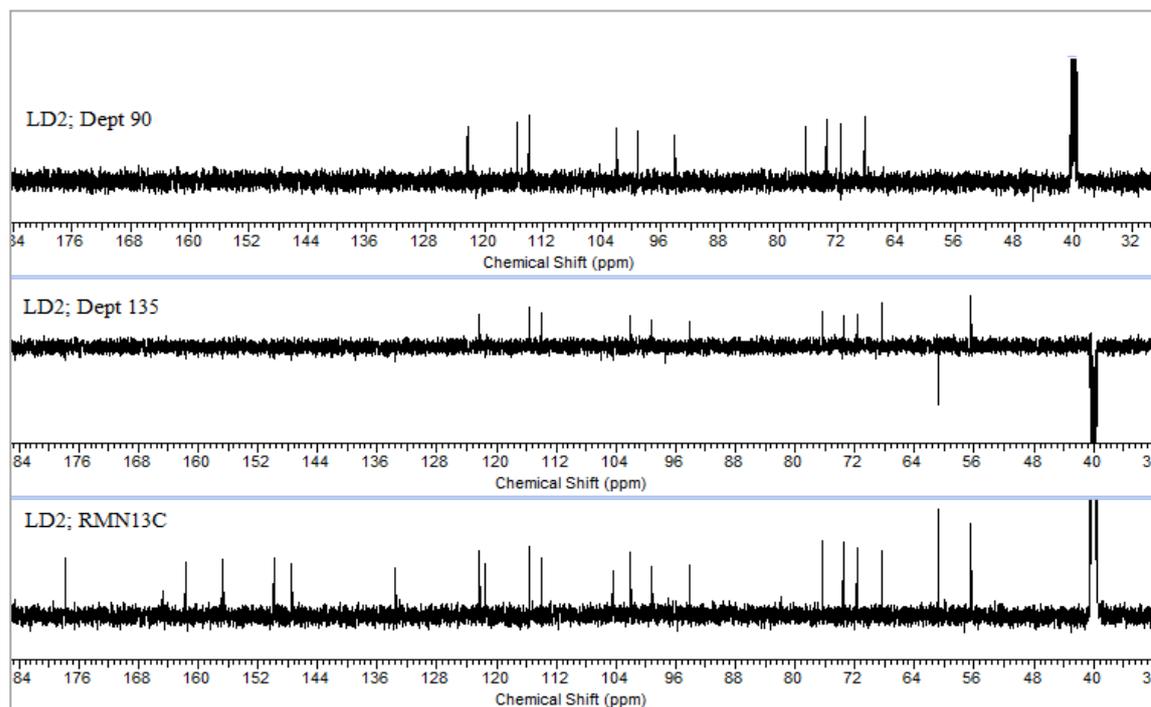


**Spectre III.2.13** : Spectre UV du composé **LD2** enregistré dans le MeOH

Le spectre de RMN<sup>13</sup>C (Spectre III.2.14) montre la présence de vingt-deux atomes de carbones dans cette molécule et les spectres des expériences DEPT 135 et DEPT 90 (Spectre III.2.14) permet de les répartir comme suit :

- un groupement méthoxyle à  $\delta_{\text{C}}$  56,4 ppm.
- Un groupement  $\text{CH}_2$  à  $\delta_{\text{C}}$  60,8 ppm.
- Cinq CH aromatiques :  $\delta_{\text{C}}$  122,3 ppm,  $\delta_{\text{C}}$  115,6 ppm,  $\delta_{\text{C}}$  114,0 ppm,  $\delta_{\text{C}}$  99,2 ppm et  $\delta_{\text{C}}$  94,1 ppm.

- Cinq CH oxygénés:  $\delta_C$  102,1 ppm,  $\delta_C$  76,4 ppm,  $\delta_C$  73,5 ppm,  $\delta_C$  71,7 ppm et  $\delta_C$  68,3 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques sont caractéristiques des CH oxygénés d'une entité osidique [7].
- En faisant abstraction de l'ensemble des signaux  $CH_3$ ,  $CH_2$  et CH, les dix signaux restant sont des carbones quaternaires dont un groupement carbonyle à  $\delta_C$  177,8 ppm et le signal à  $\delta_C$  133,6 ppm caractéristique du carbone 3 d'un flavonol substitué en cette position [9].



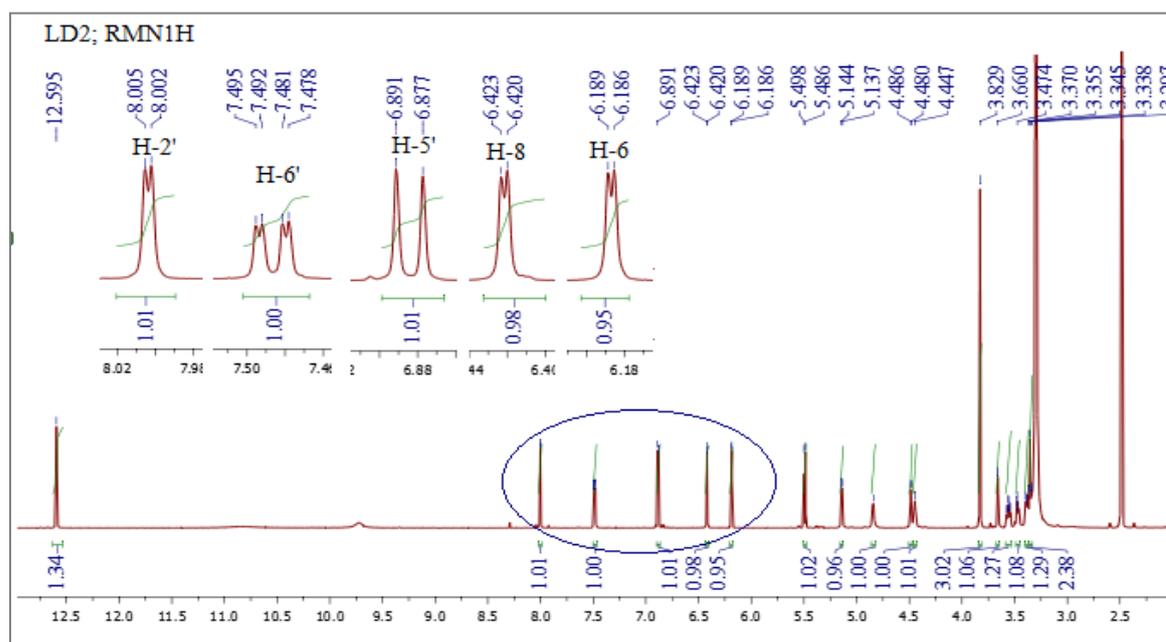
**Spectre III.2.14 :** Spectre RMN<sup>13</sup>C et DEPT (150 MHz) du composé **LD2** dans DMSO-*d*<sub>6</sub>

L'examen simultané des spectres RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.2.15) et HSQC (Spectre III.2.16) du composé **LD2** permet de tirer les indications suivantes :

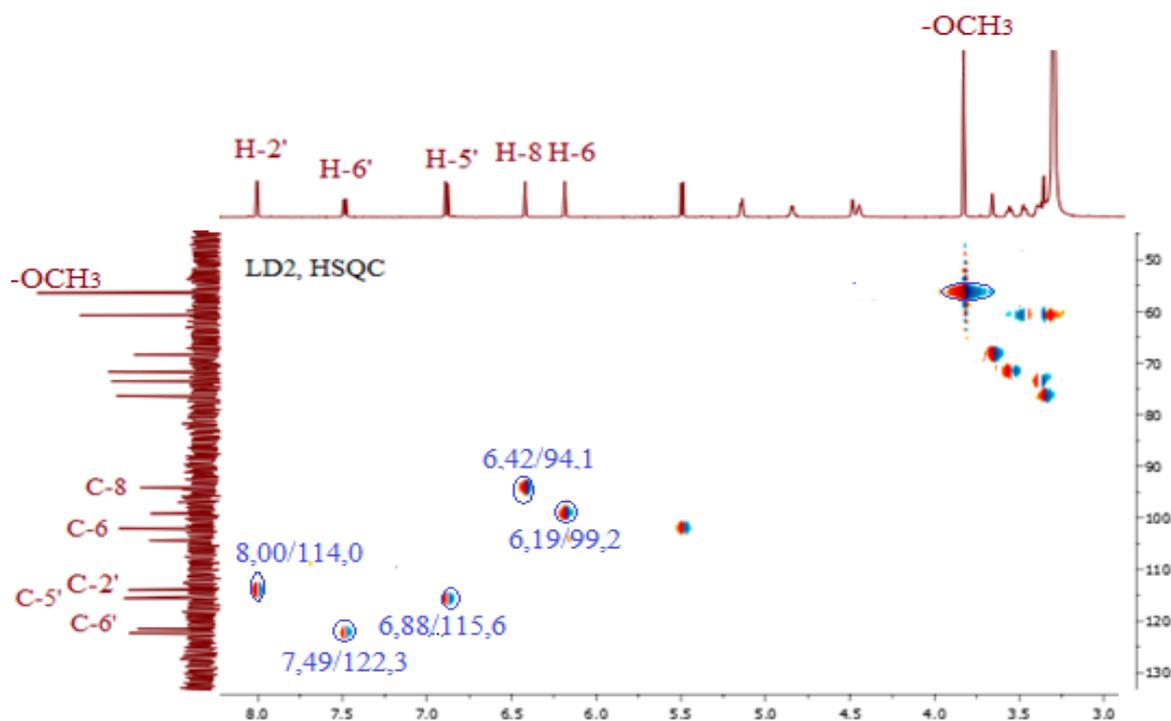
- Deux doublets ( $J = 1,8$  Hz) d'intégration 1H chacun, le premier résonant à  $\delta_H$  6,42 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_C$  94,1 ppm, le second à  $\delta_H$  6,19 ppm corrèle sur le spectre HSQC avec le signal à  $\delta_C$  99,2 ppm attribuable à H-8 (C-8) et H-6 (C-6) respectivement. La valeur de la constante de couplage ( $J = 1,8$  Hz) indique un couplage méta et du coup une substitution des carbones 5 et 7. Concernant la position 5, le signal d'intégration 1H à  $\delta_H$  12,59 ppm est caractéristique du proton du groupement OH.

- Un doublet ( $J = 1,8$  Hz) d'intégration 1H, indicateur d'un couplage méta à  $\delta_H$  8,00 ppm attribuable à H-2'. Ce proton montre, sur le spectre HSQC, une tache de corrélation avec son carbone à  $\delta_C$  114,0 ppm (C-2').
- Un doublet de doublet ( $J = 8,4 ; 1,8$  Hz) d'intégration 1H, indicateur d'un couplage ortho et un couplage méta à  $\delta_H$  7,49 ppm attribuable à H-6'. Ce dernier montre, sur le spectre HSQC, une tache de corrélation avec le carbone à  $\delta_C$  122,3 ppm attribuable à C-6'.
- Un doublet ( $J = 8,4$  Hz) d'intégration 1H, indicateur d'un couplage ortho à  $\delta_H$  6,88 ppm attribuable à H-5'. Celui-ci corrèle sur le spectre HSQC avec son carbone à  $\delta_C$  115,6 ppm (C-5').

La présence de ces trois derniers signaux est en faveur d'un cycle B substitué en positions 3' et 4'.



**Spectre III.2.15 :** Spectre de RMN<sup>1</sup>H (600 MHz) du composé **LD2** dans DMSO-*d*<sub>6</sub>

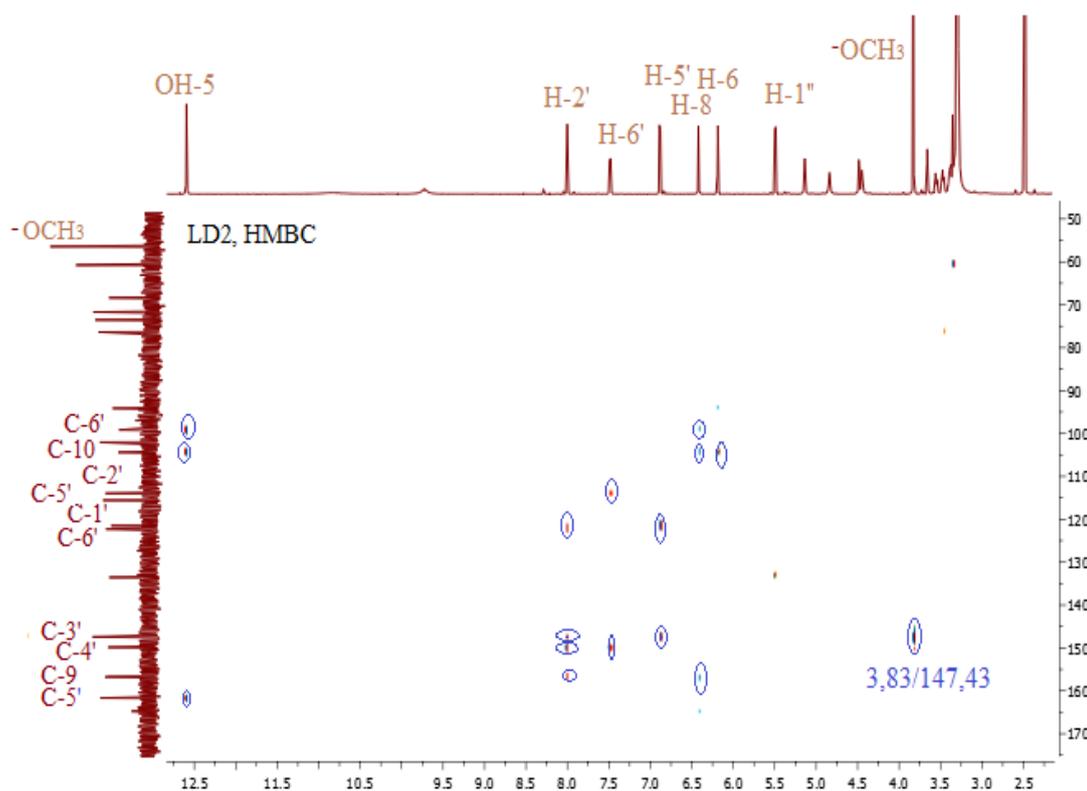


**Spectre III.2.16 :** Spectre HSQC du composé **LD2** dans DMSO-*d*<sub>6</sub>

En outre, l'observation d'un signal sur le spectre RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.2.15) d'intégration 3H à  $\delta_{\text{H}}$  3,83 ppm sous forme d'un singulet corrélant avec le signal à  $\delta_{\text{C}}$  56,4 ppm sur le spectre HSQC (Spectre III.2.16), indique la présence d'un groupement méthoxyle.

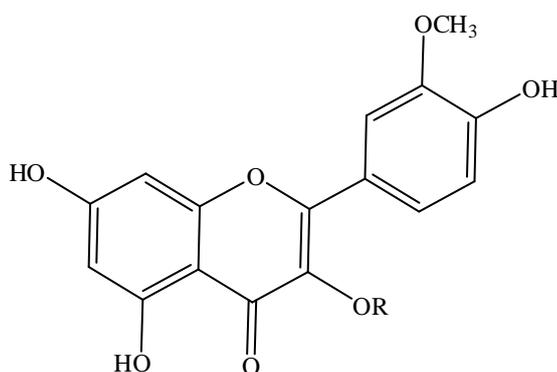
L'étude du spectre HMBC (Spectre III.2.17) montre des corrélations entre :

- Le proton H-6 et les carbones à  $\delta_{\text{C}}$  94,1 ppm (C-8), 104,4 ppm (C-10), 161,7 ppm (C-5) et 164,7 ppm (C-7).
- Le proton H-8 et les carbones résonant à  $\delta_{\text{C}}$  99,2 ppm (C-6), 104,4 ppm (C-10), 156,6 ppm (C-9) et 164,7 ppm (C-7).
- Le proton H-2' et les carbones à  $\delta_{\text{C}}$  122,3 ppm (C-6'), 147,4 ppm (C-3'), 149,9 ppm (C-4') et 156,8 ppm (C-2).
- Le proton H-5' et les carbones à  $\delta_{\text{C}}$  121,5 ppm (C-1'), 147,4 ppm (C-3') et 149,9 ppm (C-4').
- Le proton H-6' et les carbones à  $\delta_{\text{C}}$  114,0 ppm (C-2'), 149,9 ppm (C-4') et 156,8 ppm (C-2).
- Les protons du groupement méthoxyle et le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  147,4 ppm (C-3').



**Spectre III.2.17** : Spectre HMBC du composé **LD2** dans DMSO- $d_6$

A ce stade, nous pouvons formellement identifier cette génine de type flavonol comme étant l'isorhamnétine dont la structure partielle est reportée dans la figure III.2.7.



**Figure III.2.7** : Structure partielle du composé **LD2**

L'examen simultané du spectre RMN<sup>1</sup>H étalé (Spectre III.2.18), spectre HSQC (Spectre III.2.19) et spectre COSY (Spectre III.2.20) montre des signaux dans la zone 5,49-3,34 ppm qui peuvent être répartis comme suit :

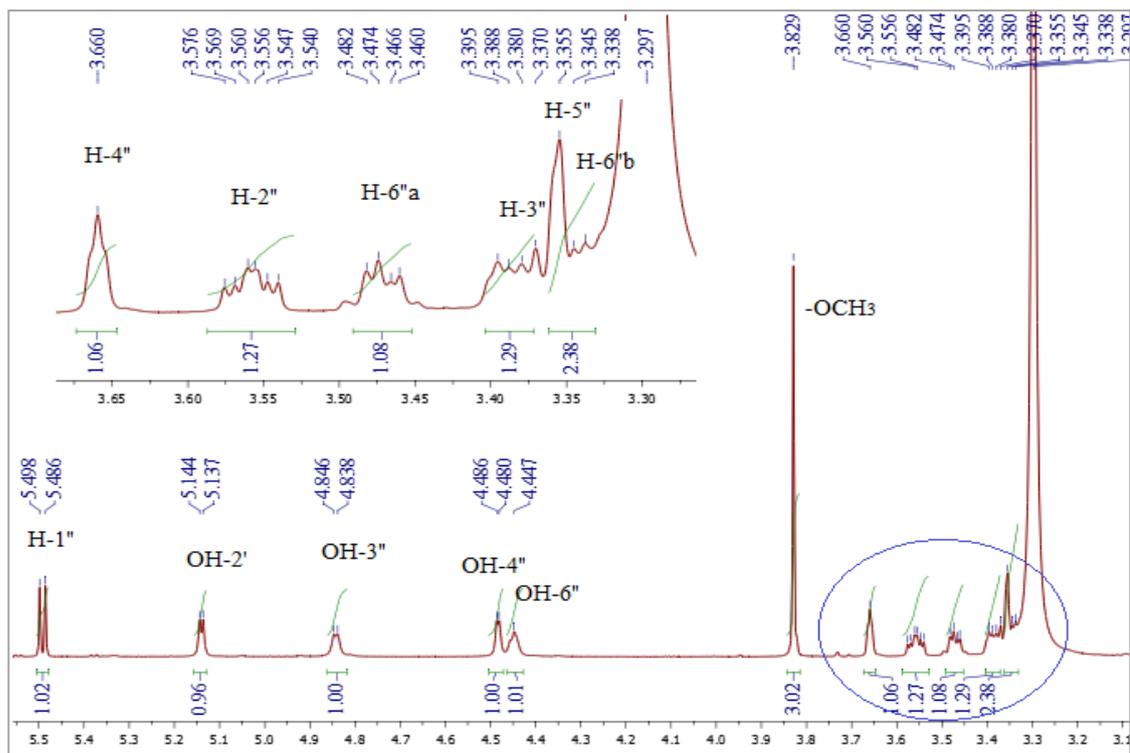
- Un doublet ( $J = 7,2$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  5,49 ppm caractéristique du proton anomérique (H-1'') d'une entité glycosidique, ce proton montre sur le spectre

HSQC, une tache de corrélation avec son carbone à  $\delta_C$  102,05 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques du proton ainsi que celle de son carbone indique que cette entité est relié à l'aglycone par un pont oxygène. Cette entité pourrait dériver soit d'un groupement glucosyle soit d'un groupement galactosyle avec une configuration  $\beta$  de la liaison reliant le sucre à l'aglycone vu la valeur de la constante de couplage ( $J = 7,2$  Hz).

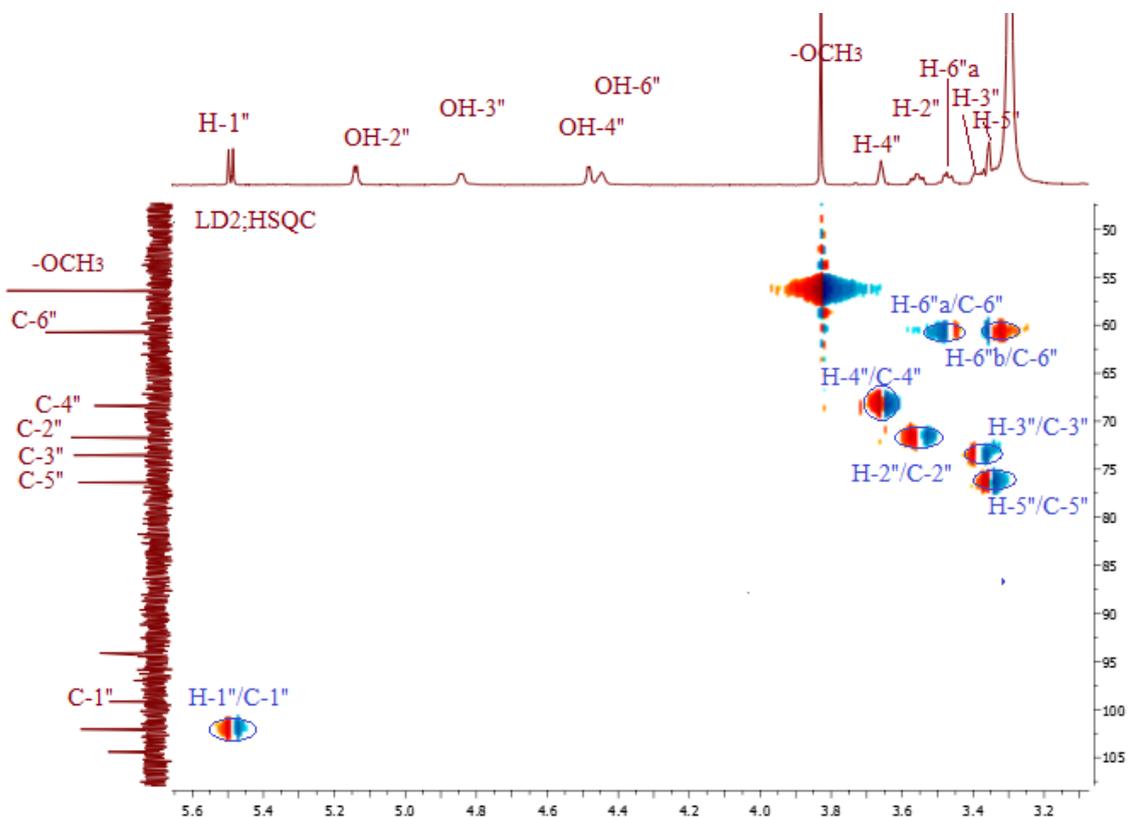
- Ce proton anomérique H-1'' corrèle avec le signal à  $\delta_H$  3,56 ppm ( $dt$  ;  $J = 9,6$  ; 4,2 Hz) attribuable à H-2'' ( $\delta_C$  71,69 ppm)
- Ce proton H-2'' permet la localisation de OH-2'' à  $\delta_H$  5,14 ppm ( $d$ ,  $J = 4,2$  Hz) et H-3'' à  $\delta_H$  3,37 ppm ( $dd$  ;  $J = 9,0$  ; 4,2 Hz) ( $\delta_C$  73,54 ppm)
- Ce dernier montre une première tâche de corrélation avec le signal à  $\delta_H$  4,84 ppm ( $d$  ;  $J = 4,8$  Hz) caractéristique du OH-3'' et une deuxième avec le signal à  $\delta_H$  3,66 ppm. attribuable à H-4'' ( $sl$ ) ( $\delta_C$  68,39 ppm)
- Toujours sur le même spectre, H-4'' permet de localiser OH-4'' à  $\delta_H$  4,48 ppm ( $d$  ;  $J = 3,6$  Hz) et montre une corrélation avec le noyau relatif au signal, qui apparait sur le spectre proton sous forme de singulet large à  $\delta_H$  3,35 ppm, ce noyau ne peut être que H-5'' ( $\delta_C$  76,37 ppm).

La valeur de la constante de couplage étant très petite indique une interaction de type équatoriale-axiale entre ce noyau et son voisin H-4''. Cette observation oriente vers une entité sucre dérivée du galactose.

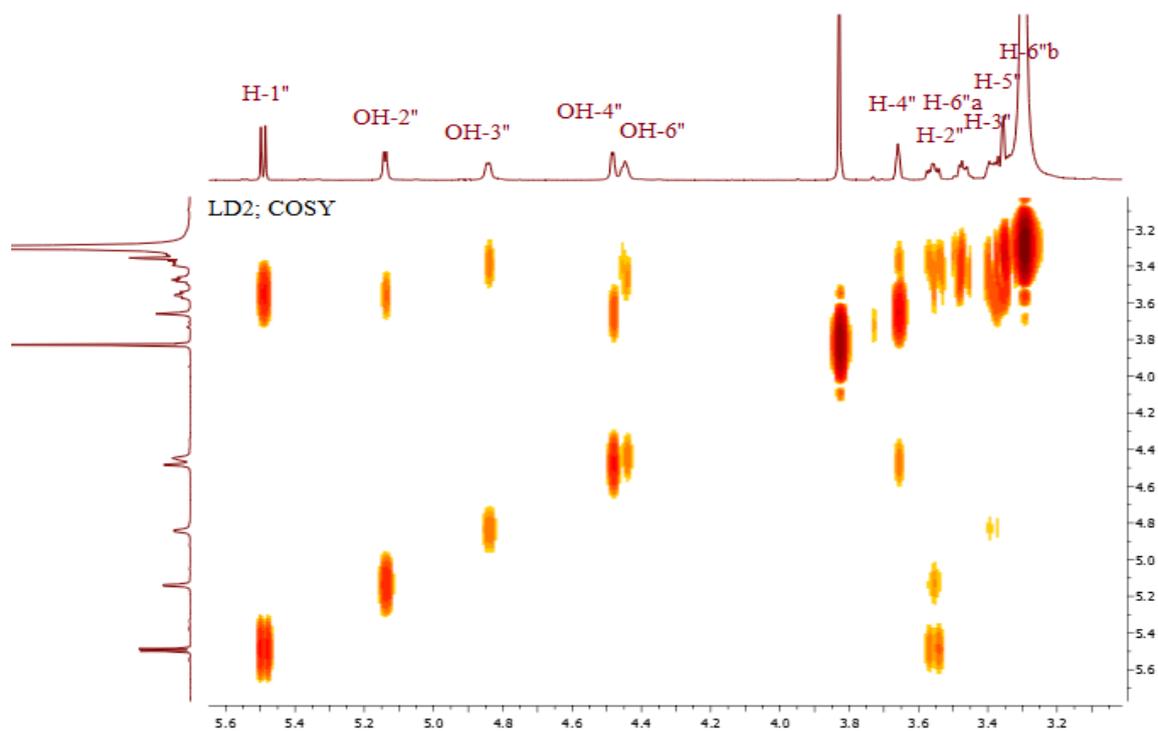
- Toujours sur le spectre COSY, le proton H-5'' mène à l'attribution de H-6''a à  $\delta_H$  3,47 ppm ( $\delta_C$  60,76 ppm) sous forme d'un doublet de doublet ( $J = 9,6$  ; 4,8 Hz) et H-6''b à  $\delta_H$  3,34 ppm ( $\delta_C$  60,76 ppm) recouvert partiellement par le signal de l'eau de contamination du DMSO deutéré.



Spectre III.2.18 : Spectre de RMN<sup>1</sup>H (600 MHz) du composé **LD2** dans DMSO-*d*<sub>6</sub>, étalement

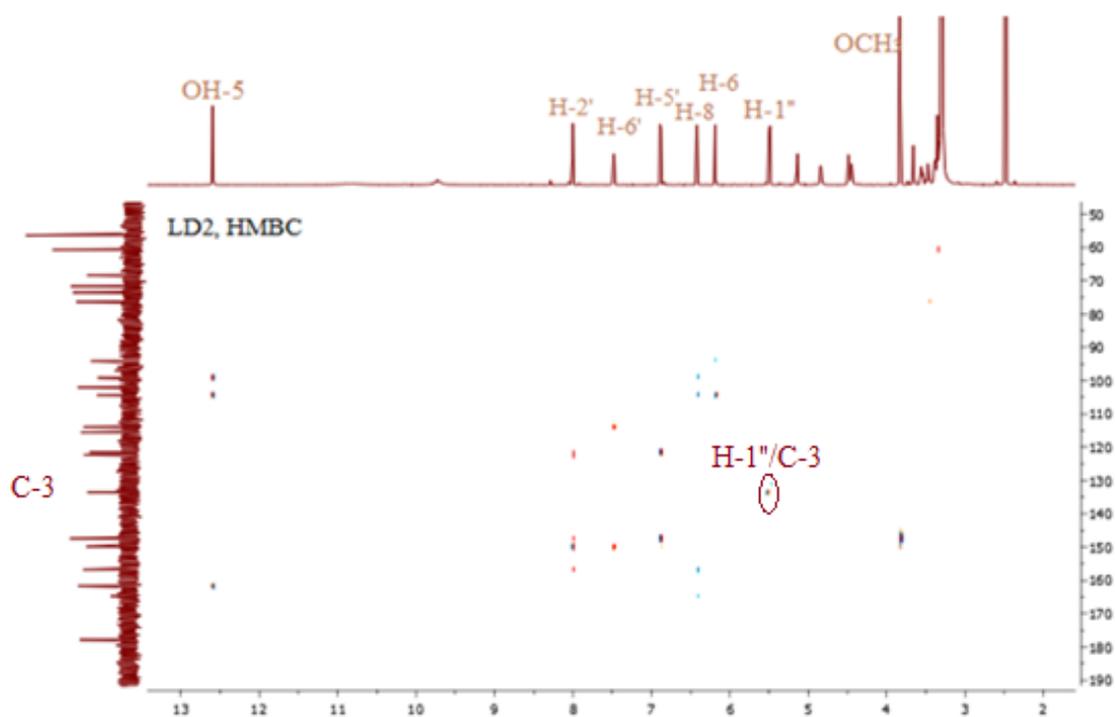


Spectre III.2.19 : Spectre HSQC du composé **LD2** dans DMSO-*d*<sub>6</sub>, étalement



**Spectre III.2.20** : Spectre COSY du composé **LD2** dans le DMSO- $d_6$ , étalement

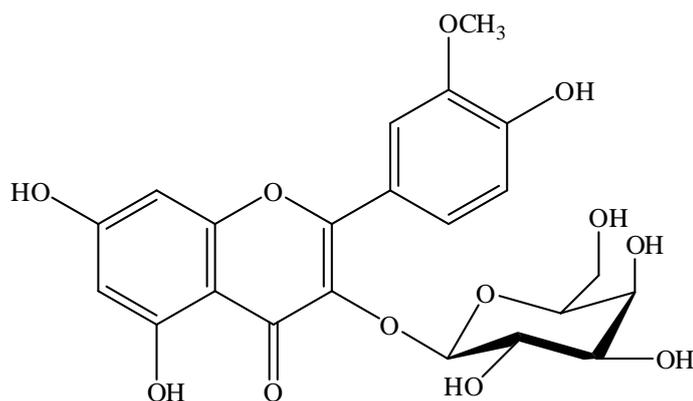
Par ailleurs, le spectre HMBC (Spectre III.2.17) montre une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1'' et le carbone quaternaire C-3 à  $\delta_C$  133,56 ppm, cette corrélation permet de placer le sucre en cette position.



**Spectre III.2.17** : Spectre HMBC du composé **LD2** dans le DMSO- $d_6$

Par ailleurs, l'analyse de l'ensemble des spectres (RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, HMBC) ainsi que la comparaison avec la littérature ont permis de faire toutes les attributions des signaux comme reporter dans le tableau III.2.3.

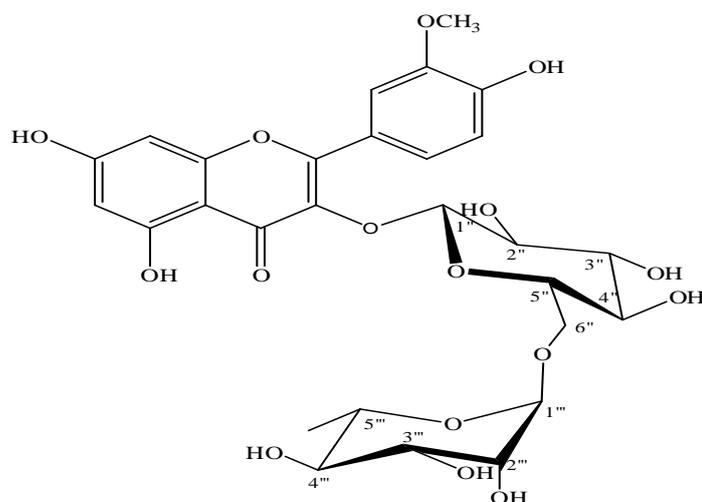
Sur la base de ces résultats, la structure du composé **LD2** a pu être établie comme étant l'**isorhamnétine 3-O- $\beta$ -galactopyranoside (Cacticine)** déjà isolée dans d'autres espèces *Glycyrrhiza glabra*, *Gl. uralensis* [10], *Caragana jubata* [11].



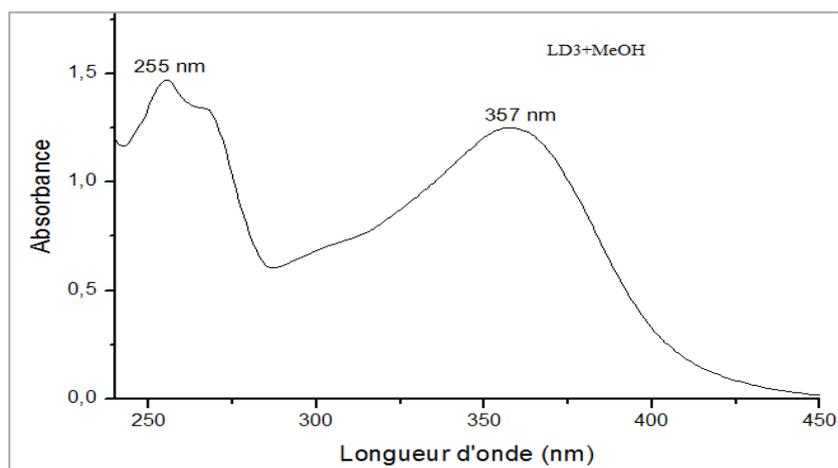
**Figure III.2.8** : Structure finale du composé **LD2**

Tableau III.2.4 : Données spectrales RMN du composé LD2.

Positions	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, $J$ en Hz)	Corrélations HMBC
2	156,8	-	
3	133,6	-	
4	177,8	-	
5	161,7	-	
6	99,2	6,19 ( <i>d</i> ; 1,8)	C-8, C-10, C-5, C-7
7	164,7	-	
8	94,1	6,42 ( <i>d</i> ; 1,8)	C-6, C-10, C-9, C-7
9	156,6	-	
10	104,4	-	
1'	121,5	-	
2'	114,0	8,00 ( <i>d</i> ; 1,8)	C-6', C-3', C-4', C-2
3'	147,4	-	
4'	149,9	-	
5'	115,6	6,88 ( <i>d</i> ; 8,4)	C-1', C-3', C-4'
6'	122,3	7,49 ( <i>dd</i> ; 8,4 ; 1,8 Hz)	C-2', C-4', C-2
Galactose			
1''	102,1	5,49 ( <i>d</i> ; 7,2)	C-3
2''	71,7	3,56 ( <i>dt</i> ; 9,6 ; 4,2)	C-1''
3''	73,5	3,37 ( <i>dd</i> ; 9,0 ; 4,2).	
4''	68,4	3,66 ( <i>sl</i> )	
5''	76,4	3,35 ( <i>sl</i> )	
6''a	60,8	3,47 ( <i>m</i> )	C-5''
6''b		3,34 ( <i>m</i> )	C-5''
OH-5	-	12,59 ( <i>s</i> )	
OCH <sub>3</sub>	56,4	3,83 (3H ; <i>sl</i> )	C-3'

III.2.3.3 Elucidation structurale du composé **LD3**

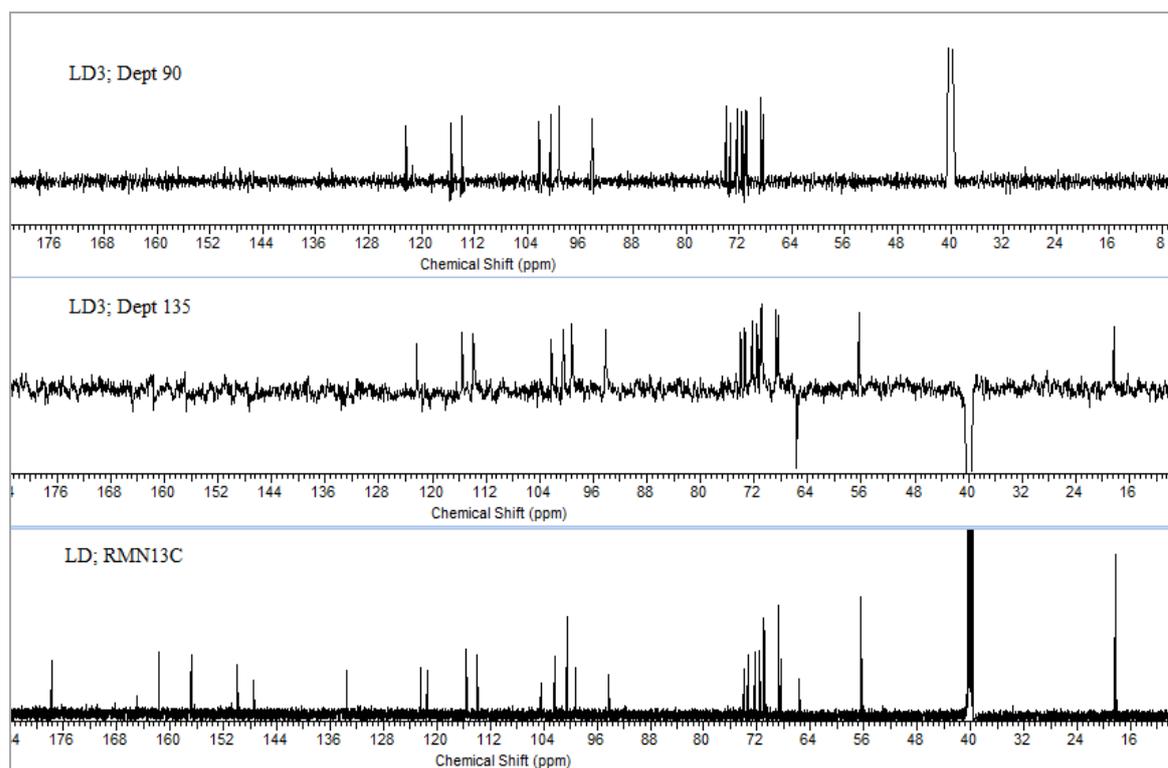
Ce produit se présente sous forme d'une fine poudre jaune intense soluble dans le méthanol. Ce composé de fluorescence noire violette sous la lumière du Wood (365nm) réagit avec le réactif de  $\text{NH}_3$  en affichant une coloration jaune laissant envisager une structure du type flavonoïde. Le spectre d'absorption UV montre deux maxima à 255 et 357 nm, caractéristiques des bandes II et I d'un flavonol substitué en 3 [6].



**Spectre III.2.21** : Spectre UV du composé LD3 enregistré dans le MeOH

Les spectres de RMN $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  (Spectres III.2.22 et III.2.23) de ce composé présentent de fortes similitudes avec ceux du composé **LD2**. La seule différence c'est l'apparition des signaux caractéristiques d'un rhamnose.

- Un groupement CH anomérique à  $\delta_{\text{C}}$  100,5 ppm
- Un groupement  $\text{CH}_3$  à  $\delta_{\text{C}}$  18,3 ppm, caractéristique du rhamnose [7].



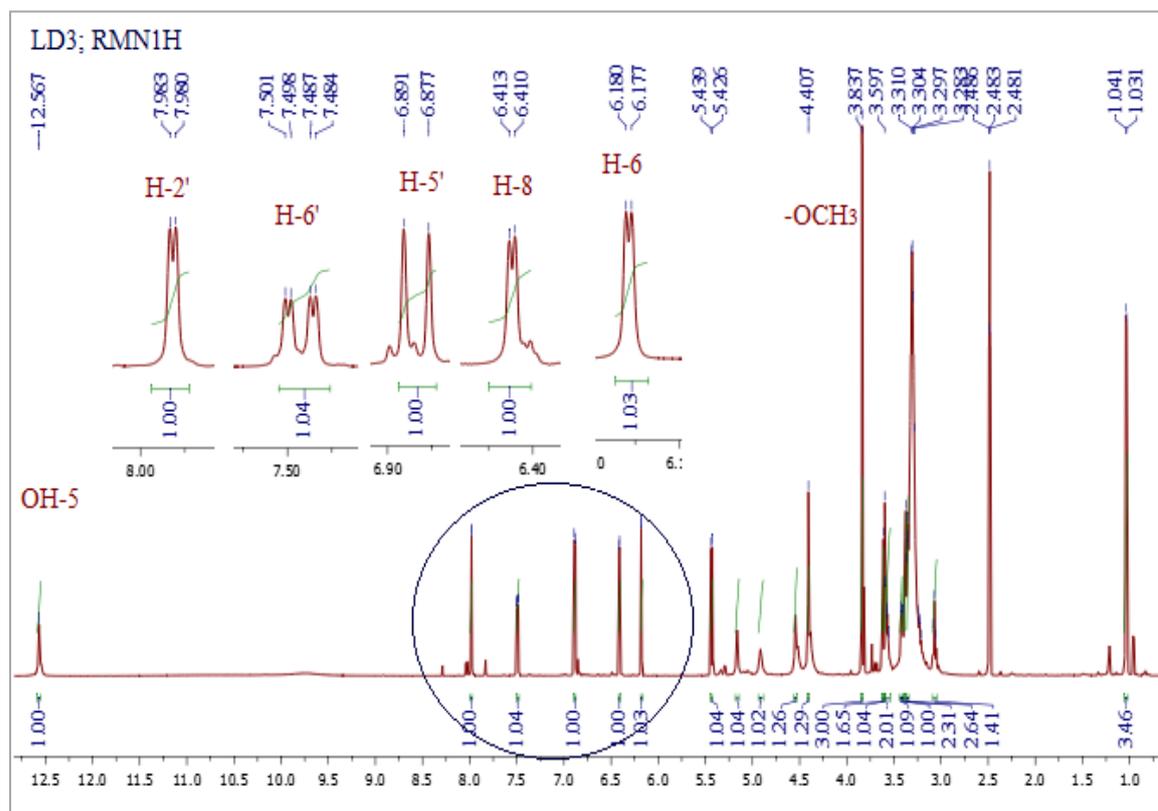
**Spectre II.2.22 :** Spectres RMN<sup>13</sup>C et DEPT (150 MHz) du composé **LD3** dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>

L'étude simultanée des spectres RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.2.23) et HSQC (Spectre III.2.24) de ce composé LD3 permet de tirer les indications suivantes :

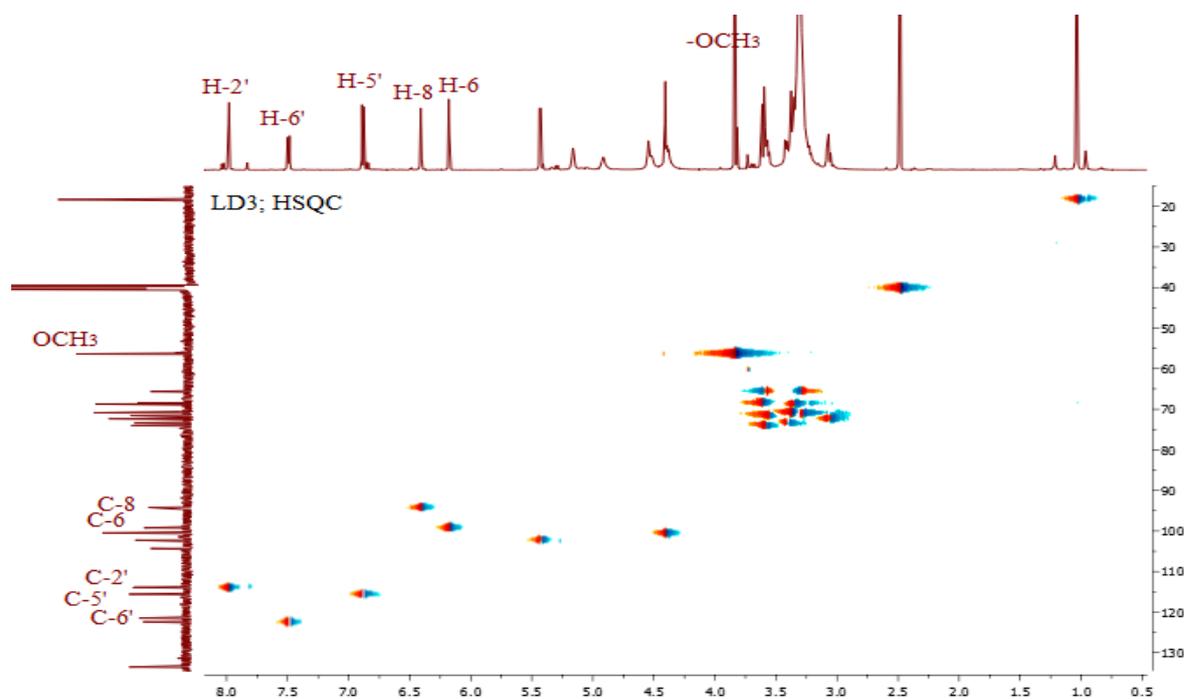
- Deux doublets  $J = 1,8$  Hz (couplage méta) d'intégration 1H chacun, le premier résonant à  $\delta_H$  6,41 ppm ( $\delta_C$  94,2 ppm) et le second à  $\delta_H$  6,18 ppm ( $\delta_C$  99,2 ppm) attribuable à H-8 (C-8) et H-6 (C-6) respectivement, indiquant ainsi une substitution des carbones 5 et 7. Concernant la position 5, cette dernière est hydroxylé déduite par la présence du signal d'intégration 1H à  $\delta_H$  12,57 ppm caractéristique du proton du groupement hydroxyle en cette position. Un doublet ( $J = 1,8$  Hz) d'intégration 1H, indicateur d'un couplage méta à  $\delta_H$  7,98 ppm (114,0 ppm) attribuable à H-2' (C-2').
- Un doublet de doublet ( $J = 8,4 ; 1,8$  Hz) d'intégration 1H, indicateur d'un couplage ortho et un couplage méta à  $\delta_H$  7,49 ppm ( $\delta_C$  122,4 ppm) attribuable à H-6' (C-6').
- Un doublet ( $J = 8,4$  Hz) d'intégration 1H, indicateur d'un couplage ortho à  $\delta_H$  6,88 ppm ( $\delta_C$  115,6 ppm) attribuable à H-5' (C-5').

La présence de ces trois derniers signaux est en faveur d'un cycle B substitué en positions 3' et 4'.

- Un singulet d'intégration 3H à  $\delta$ H 3,84 ppm ( $\delta$ C 56,37 ppm) indiquant la présence d'un groupement -OCH<sub>3</sub>.

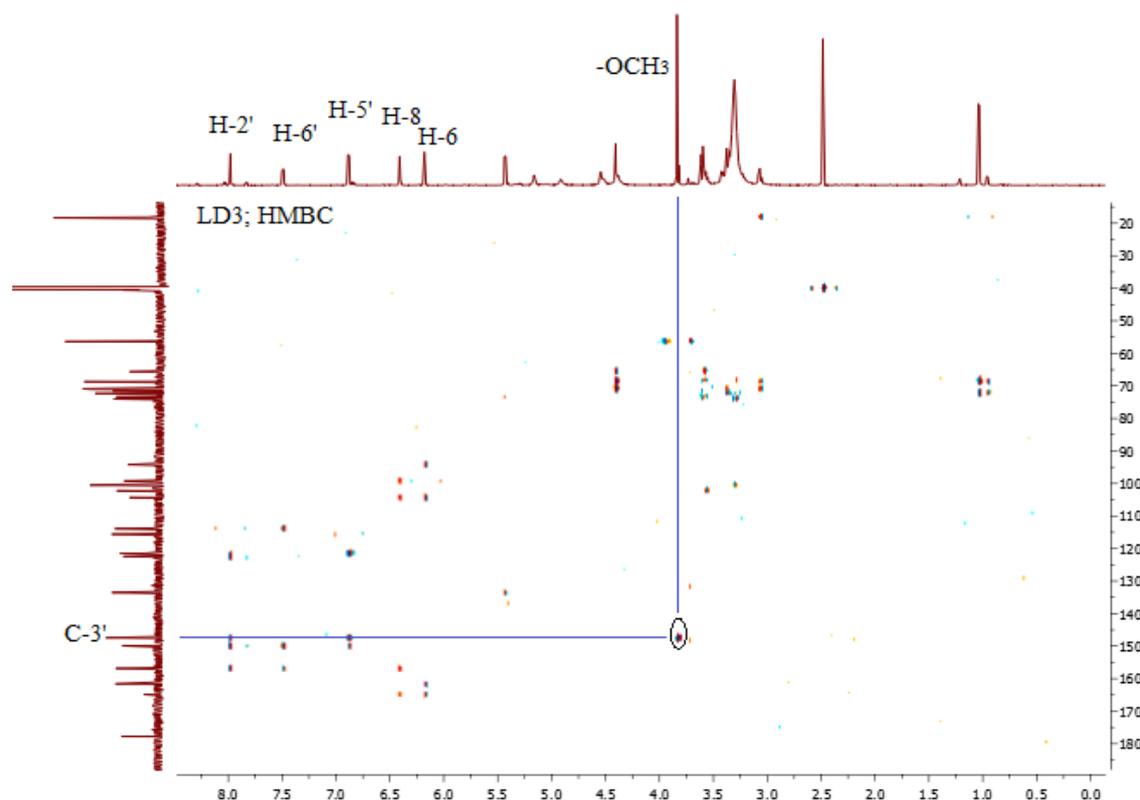


**Spectre II.2.23 :** Spectre de RMN<sup>1</sup>H (600 MHz) du composé **LD3** dans DMSO-*d*<sub>6</sub>



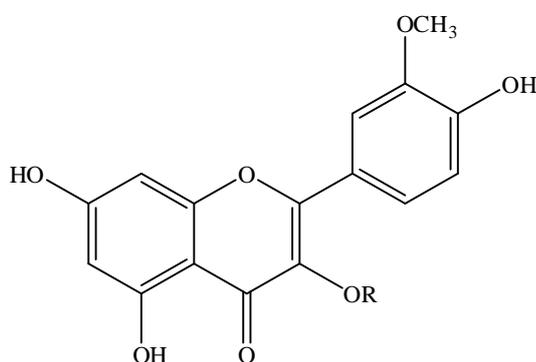
**Spectre II.2.24 :** Spectre HSQC du composé **LD3** dans DMSO-*d*<sub>6</sub>

Sur le spectre de HMBC (Spectre III.2.25), les protons du groupement méthoxyle à  $\delta_H$  3,84 ppm montrent une tache de corrélation avec le carbone quaternaire à  $\delta_C$  147,42 ppm. Ce carbone ne peut être, d'après la valeur de son déplacement chimique, que C-3'.



**Spectre II.2.25** : Spectre HMBC du composé **LD3** dans  $DMSO-d_6$

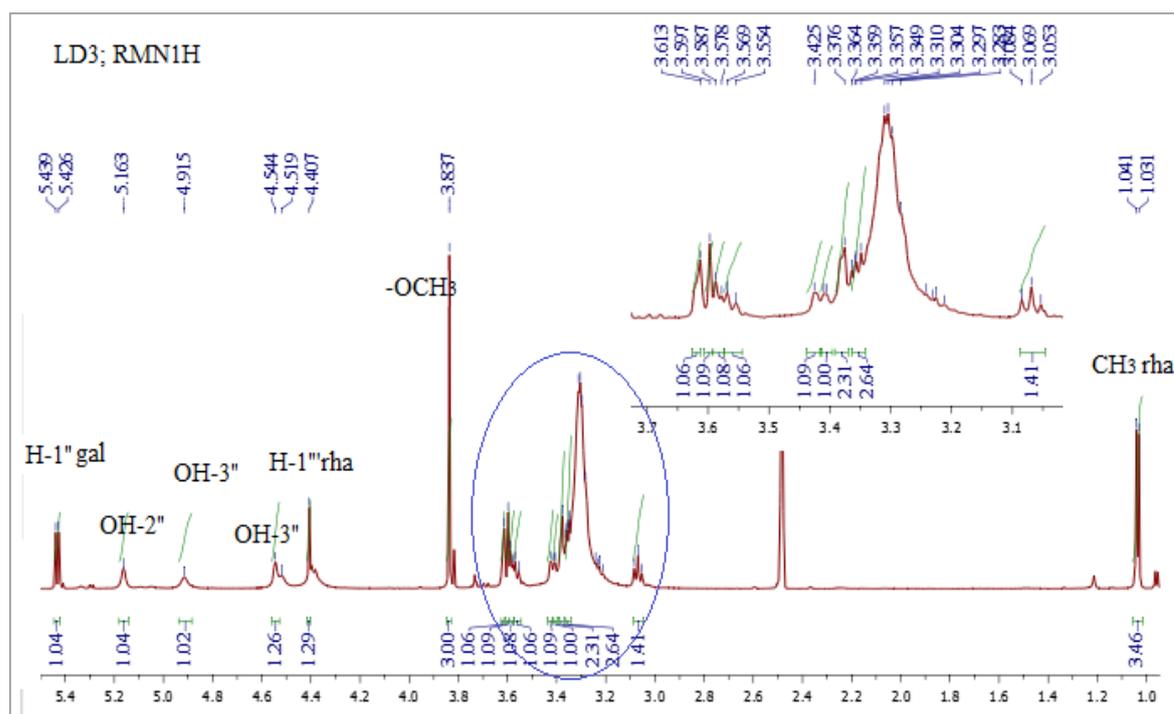
Les résultats de l'ensemble de cette analyse permettent à ce stade d'identifier cette génine de type flavonol comme étant l'isorhamnétine comme reportée dans la figure III.2.9



**Figure III.2.9** : Structure partielle du composé **LD3**

Un réexamen simultané des spectres  $RMN^1H$  étalé (Spectre III.2.26) et HSQC (Spectre III.2.27) montre :

- Un doublet ( $J = 7,8$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_H$  5,43 ppm caractéristique du proton anomérique (H-1'') d'une entité glycosidique, ce proton montre sur le spectre HSQC, une tache de corrélation avec son carbone à  $\delta_C$  102,3 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques du proton ainsi que celle de son carbone indique que cette entité est relié à l'aglycone par un pont oxygène. Cette entité pourrait dériver soit d'un groupement glucosyle soit d'un groupement galactosyle avec une configuration  $\beta$  de la liaison reliant le sucre à l'aglycone vu la valeur de la constante de couplage ( $J = 7,8$  Hz).
- Un singulet large d'intégration 1H à  $\delta_H$  4,41 ppm caractéristique du proton anomérique (H-1''') ( $\delta_C$  100,5 ppm) d'un deuxième sucre relié à l'aglycone ou bien le sucre par un pont oxygène. La multiplicité de ce signal indique la configuration  $\alpha$  du sucre.
- Un doublet ( $J = 6,0$  Hz) d'intégration 3H à  $\delta_H$  1,04 ppm, caractéristique du groupement  $CH_3-6'''$  ( $\delta_C$  18,31) du rhamnose [7].



**Spectre II.2.26 :** Spectre de RMN<sup>1</sup>H (600 MHz) du composé **LD3** dans DMSO-*d*<sub>6</sub>, étalé

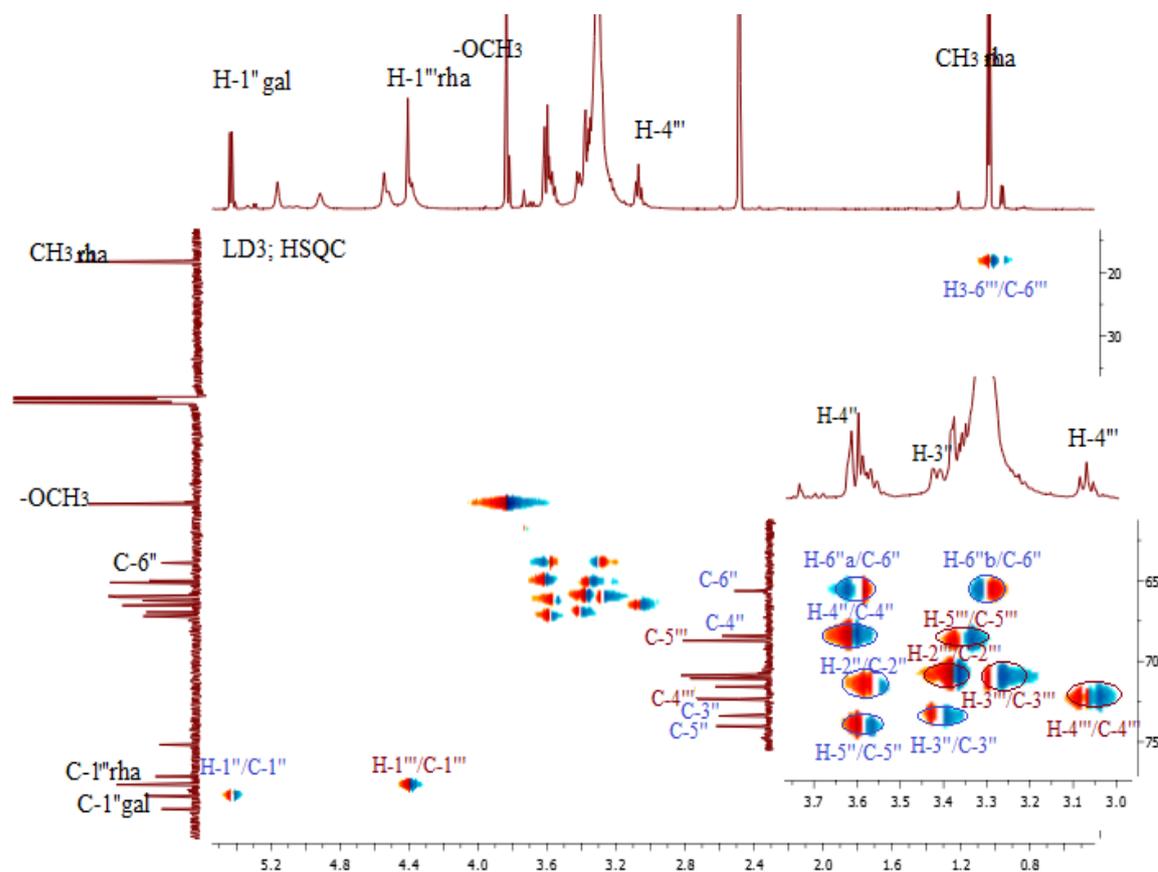
L'examen approfondi des spectres RMN<sup>1</sup>H (Spectre III.2.26), DEPT (Spectre III.2.22), HSQC (Spectre III.2.27), COSY (Spectre III.2.28) et HMBC (Spectre III.2.25) a permis de mettre en évidence la présence des groupements galactopyranosyle et

rhamnopyranosyle dans cette molécule en se référant aux valeurs des déplacements chimiques de leurs atomes de carbone. En effet, grâce à l'analyse des corrélations relevées sur ces spectres, les atomes de carbone de l'entité galactose résonnent à :

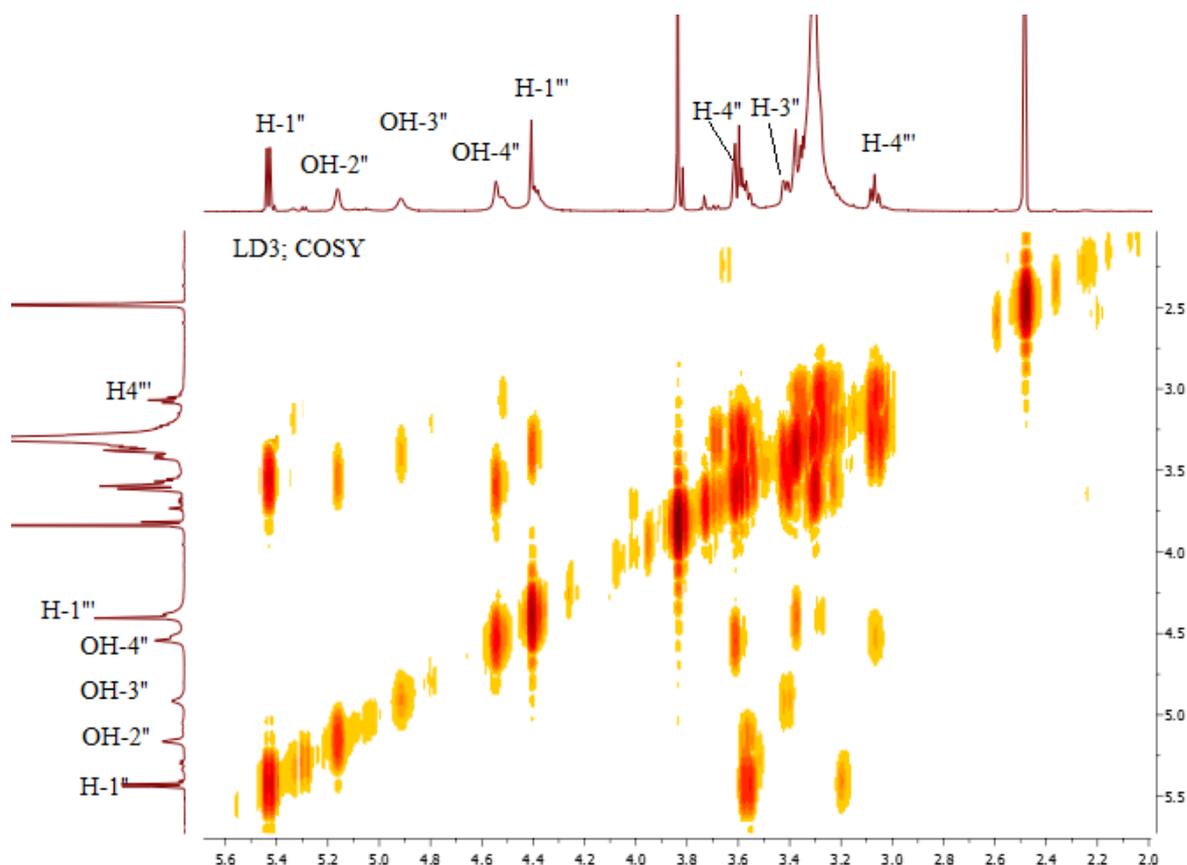
- C-2'' à  $\delta_C$  71,6 ppm (H-2'' à  $\delta_H$  3,56 ppm ; *d* ;  $J = 9,0$  Hz).
- C-3'' à  $\delta_C$  73,4 ppm (H-3'' à  $\delta_H$  3,42 ppm ; *dd* ;  $J = 9,0$  ; 1,8 Hz).
- C-4'' à  $\delta_C$  68,4 ppm (H-4'' à  $\delta_H$  3,61 ppm ; *sl*).
- C-5'' à  $\delta_C$  74,0 ppm (H-5'' à  $\delta_H$  3,59 ppm ; *m*).
- C-6'' à  $\delta_C$  65,6 ppm (H-6''a à  $\delta_H$  3,58 ppm et H-6''b à  $\delta_H$  3,28 ppm).

Les cinq carbones du rhamnose résonant à :

- C-2''' à  $\delta_C$  70,9 ppm (H-2''' à  $\delta_H$  3,37 ppm ; *m*).
- C-3''' à  $\delta_C$  71,0 ppm (H-3''' à  $\delta_H$  3,29 ppm H-3''').
- C-4''' à  $\delta_C$  72,3 ppm (H-4''' à  $\delta_H$  3,06 ppm ; *t* ;  $J = 9,0$  Hz).ppm)
- C-5''' à  $\delta_C$  68,7 ppm (H-5''' à  $\delta_H$  3,35 ppm ; *m*).
- C-6''' à  $\delta_C$  18,3 ppm (CH<sub>3</sub>-6''' à  $\delta_H$  1,04 ppm ; *d* ;  $J = 6,0$  Hz).



**Spectre II.2.27** : Spectre HSQC du composé **LD3** dans DMSO-*d*<sub>6</sub>, étalement

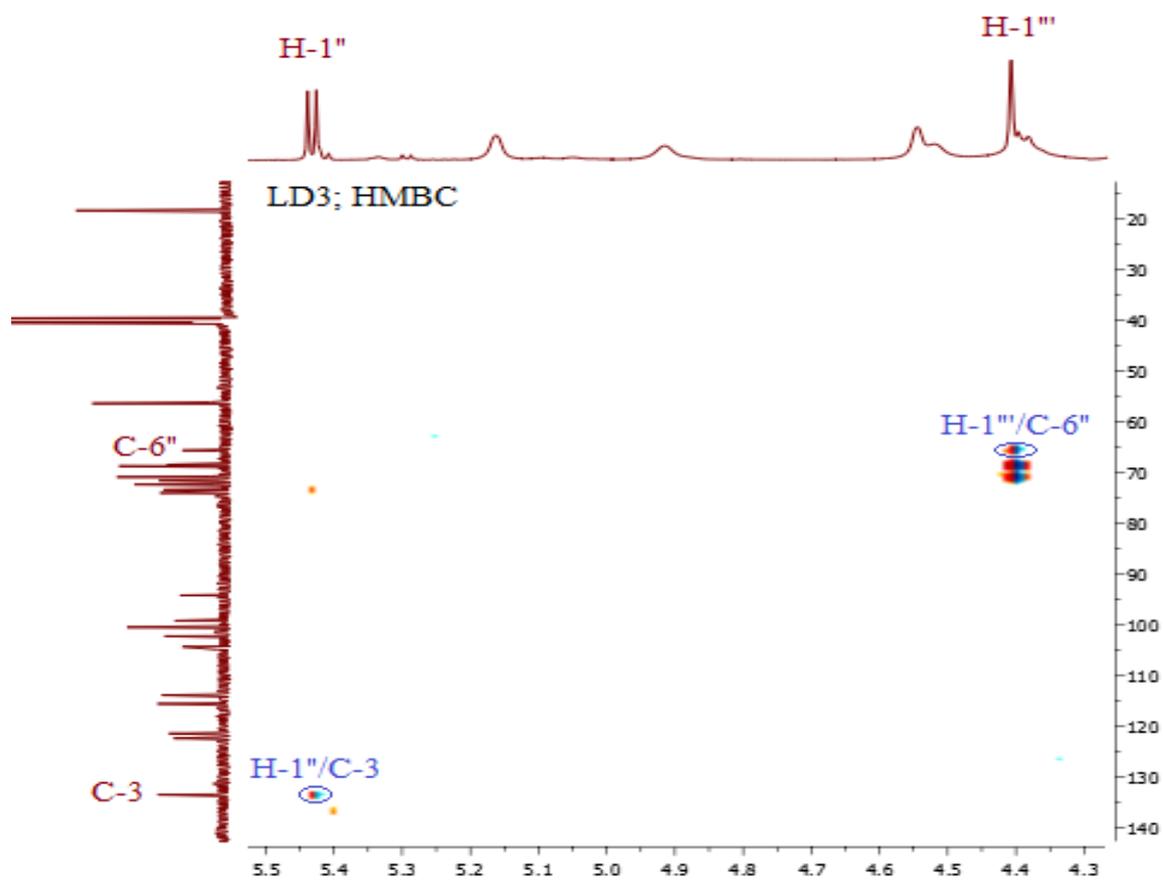


**Spectre II.2.28** : Spectre COSY du composé **LD3** dans DMSO- $d_6$ , étalement

Pour positionner les deux entités du sucre, nous avons examiné le spectre HMBC étalé (Spectre III.2.29) où l'on relève une tache de corrélation entre le proton anomérique du galactose H-1'' ( $\delta_H$  5,43 ppm) et le carbone C-3 à  $\delta_C$  133,53 ppm de l'aglycone.

Le déplacement chimique vers les champs faibles du carbone C-6'' du galactose à  $\delta_C$  65,63 ppm, montre que ce dernier est substitué [12].

Par ailleurs, sur le même spectre HMBC une corrélation observée entre le proton anomérique du rhamnose H-1''' ( $\delta_H$  4,41 ppm) et le carbone C-6'' situé à  $\delta_C$  65,63 ppm montre que la liaison galactose–rhamnose est 1→6, donc il s'agit du robinobioside [rhamnosyl- $\alpha$ -(1→6)- $\beta$ -galactose].



Spectre II.2.29 : Spectre HMBC du composé LD3 dans DMSO- $d_6$ , étalement

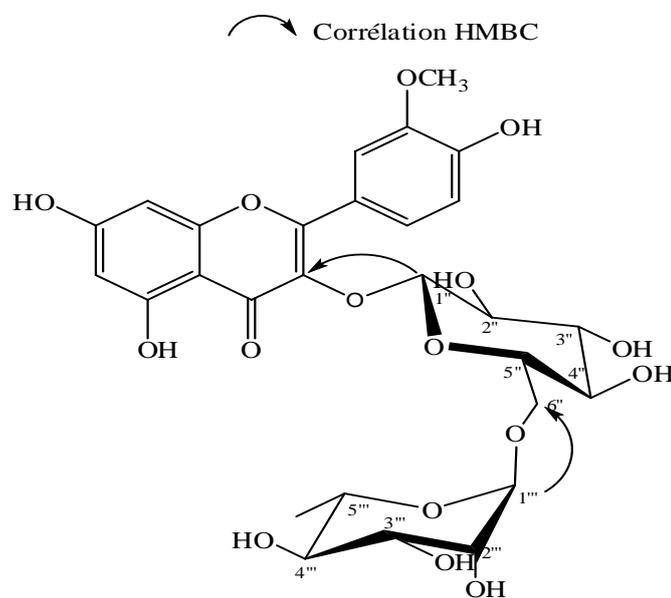
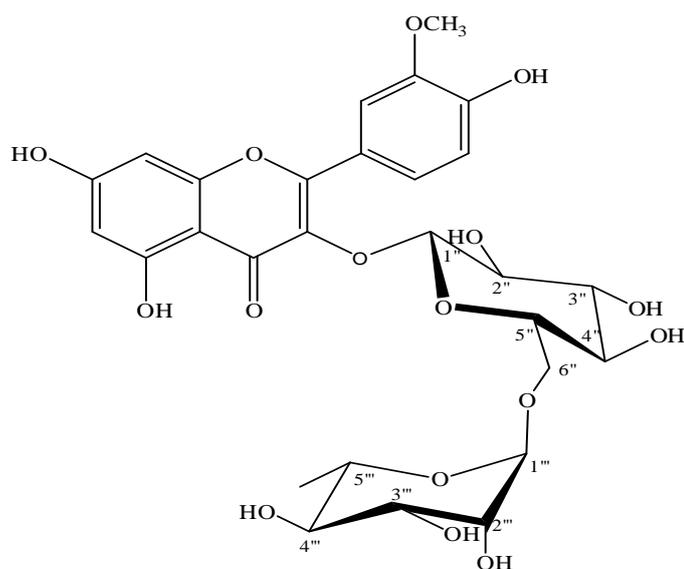


Figure III.2.10 : Structure partielle du composé LD3

L'analyse combinée des spectres RMN<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C *J*-modulé, COSY, HSQC et HMBC permet de déterminer les déplacements chimiques de tous les protons et carbones (tableau III.2.4).

Ces données correspondant avec celles de la littérature, permettent d'identifier le composé **LD3** comme étant l'isorhamnetine-3-*O*-β-galactopyranosyl-(1→6) Rhamnopyranoside (**Isorhamnetine-3-*O*-β –robinobioside**) déjà isolée dans l'espèce *Alhagi Kirghisorum* [13–15].



**Figure III.2.11** : Structure finale du composé **LD3**

Tableau III.2.5 : Données spectrales RMN du composé LD3.

Positions	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm, multiplicité, <i>J</i> en Hz)	Corrélations HMBC
2	156,9	-	
3	133,5	-	
4	177,8	-	
5	161,6	-	
6	99,2	6,18 ( <i>d</i> ; 1,8)	C-5, C-7, C-8, C-10
7	164,9	-	
8	94,2	6,41 ( <i>d</i> ; 1,8)	C-6, C-7, C-9, C-10
9	156,8	-	
10	104,3	-	
1'	121,5	-	
2'	114,0	7,98 ( <i>d</i> ; 1,8)	C-6', C-3', C-4', C-2
3'	147,4	-	
4'	149,9	-	
5'	115,6	6,88 ( <i>d</i> ; 8,4)	C-1', C-3', C-4'
6'	122,4	7,49 ( <i>dd</i> ; 8,4 ; 1,8 Hz)	C-2', C-4', C-2
Galactose			
1''	102,3	5,43 ( <i>d</i> ; 7,8)	C-3
2''	71,6	3,56 ( <i>d</i> ; 9,0)	C-1''
3''	73,4	3,42 ( <i>dd</i> ; 9,0 ; 1,8).	
4''	68,4	3,61 ( <i>sl</i> )	C-2'', C-3'', C-5''
5''	74,0	3,59 ( <i>sl</i> )	C-6''
6''a	65,6	3,58 ( <i>m</i> )	C-1'', C-3'', C-4''
6''b		3,28 ( <i>m</i> )	C-1'', C-3'', C-4''
Rhamnose			
1'''	100,5	4,41 <i>sl</i>	C-6'', C-2''', C-5'''
2'''	70,9	3,37 <i>m</i>	C-3'''
3'''	71,1	3,29 <i>m</i>	C-4'''
4'''	72,3	3,06 ( <i>t</i> ; 9,0)	C-3''', C-5''', C-6'''
5'''	68,7	3,35 <i>m</i>	C-4'''
6'''	18,3	1,04 (3H ; <i>d</i> ; 6,0)	C-4''', C-5'''
OH-5			
	-	12,59 <i>s</i>	
OCH <sub>3</sub>			
	56,37	3,83 (3H ; <i>sl</i> )	C-3'

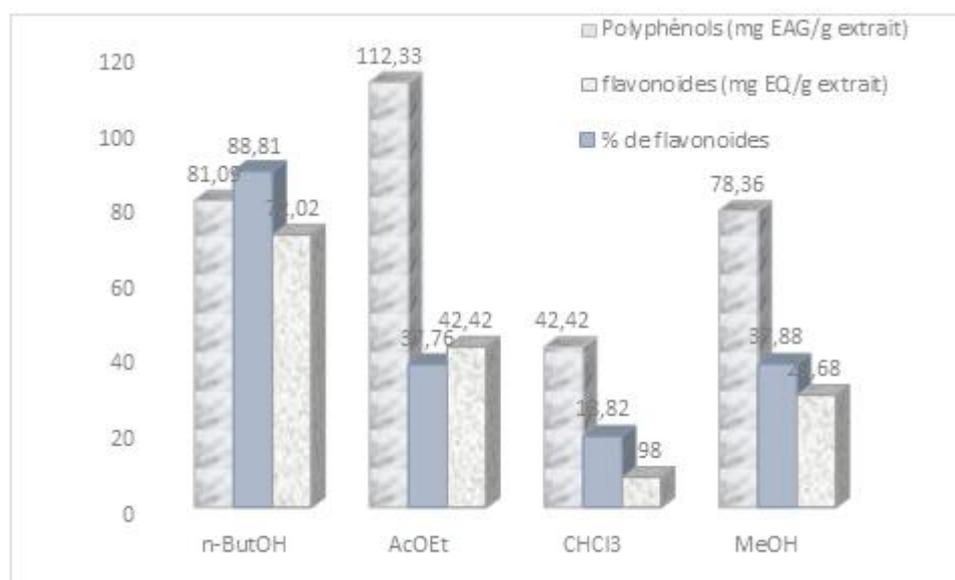
### III.2.4. Discussion des résultats de l'activité antioxydante

Dans le but d'évaluer l'activité antioxydante des différents extraits, ces derniers ont été soumis, en premier lieu à un dosage spectrophotométrique en vu de quantifier leur contenu en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux.

#### III.2.4.1. Dosage des polyphénols totaux (TPC) et des flavonoïdes totaux (TFC)

La figure III.2.12 présente le TPC et le TFC de tous les extraits de *L. dielsii*. Dans cette figure, l'extrait AcOEt ( $112,33 \pm 20,0$  mg EAG/g d'extrait) présente un TPC plus élevé que celui des extraits *n*-BuOH ( $81,09 \pm 19,6$  mg EAG/g d'extrait) et MeOH ( $78,36 \pm 9,74$  mg EAG/g d'extrait). L'extrait CHCl<sub>3</sub> semble être le moins riche en polyphénols.

De même et sur la même figure, l'extrait *n*-BuOH présente le taux le plus élevé en flavonoïdes avec une valeur de TFC de  $72,02 \pm 9,21$  mg EQ/g d'extrait comparé à l'extrait AcOEt avec un taux de  $42,42 \pm 2,17$  mg EQ/g d'extrait et l'extrait MeOH avec un taux de  $29,68 \pm 4,99$  mg EQ/g d'extrait. L'extrait CHCl<sub>3</sub> semble, également être le riche en TFC indiquant un contenu de  $7,98 \pm 2,24$  mg EQ/g d'extrait.



**Figure III.2.12 :** TPC (mg EAG/g d'extrait), TFC (mg EQ/g d'extrait) et pourcentage de flavonoïdes (%) d'extraits de *L. dielsii*.

(Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  écart-type, en triplicata).

Les résultats obtenus montrent que les polyphénols de l'extrait *n*-BuOH sont plus riches en flavonoïdes (88,81%) que les extraits AcOEt (37,76%) et MeOH (37,88%). Nos résultats sont en bon accord avec ceux obtenus par Elgabr *et al.*, (2010) et Öztürk *et al.*, (2009) [16-17].

Les polyphénols sont largement distribués dans le règne végétal et sont les métabolites secondaires les plus abondants dans les plantes. Nos résultats montrent que les composés phénoliques et flavonoïdiques sont en plus grande proportion dans les extraits polaires et semi-polaires. Cette différence du contenu phénolique et flavonique entre les différents extraits résulte de la variation du nombre et du type de substituant ainsi que de leur position sur le squelette. Il semble que la polarité des systèmes de solvants utilisés dans l'extraction peut affecter les teneurs en composants phénoliques et flavonoïdes [18]. La grande diversité structurelle des composés phénoliques et des flavonoïdes leur a permis de posséder de nombreuses activités biologiques telles que leur capacité à piéger les radicaux libres.

#### III.2.4.2. Effet de piégeage du radical DPPH

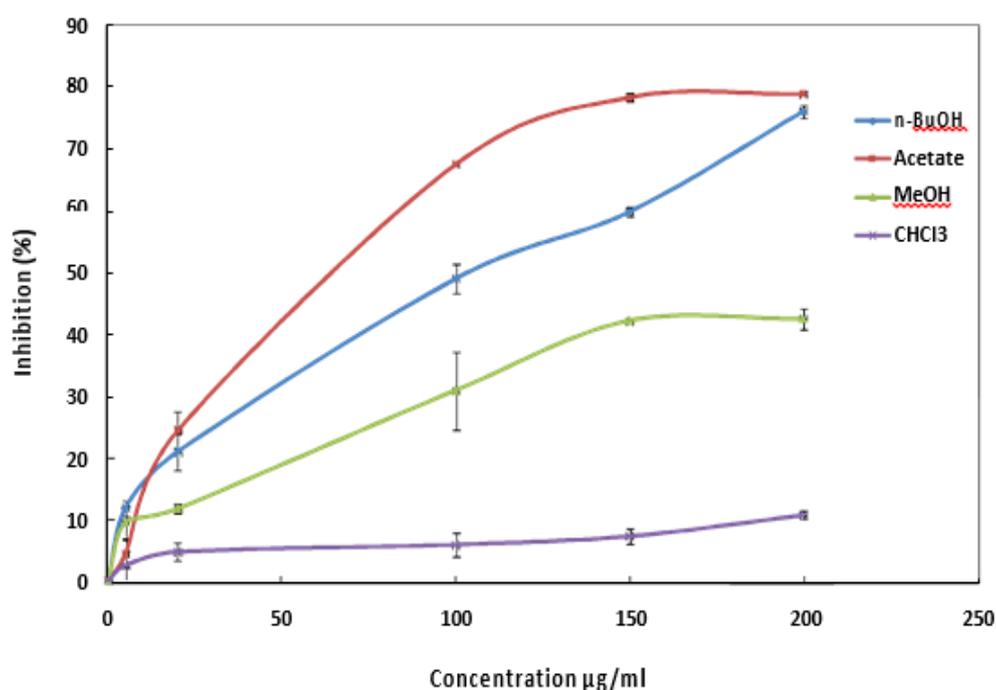
Afin d'évaluer l'activité antioxydante des quatre extraits de *L. dielsii*, nous avons adopté la méthode utilisant le transfert d'électrons, cette dernière est basée sur la capacité de piégeage du DPPH°. Ce test mesure la capacité d'un antioxydant à réduire un oxydant qui, une fois réduit, change de couleur de manière reproductible. Le degré de changement de couleur du violet au jaune a été corrélé avec le potentiel antioxydant dans les extraits.

La figure III.2.13 montre clairement que l'extrait AcOEt possède l'effet le plus important comparativement aux autres extraits et cet effet augmente jusqu'à atteindre un maximum de pourcentage d'inhibition de 78,53% à la concentration de 150 µg/ml. A la concentration de 200 µg/ml, il n'y a aucune différence significative entre les extraits AcOEt et *n*-BuOH. L'extrait CHCl<sub>3</sub> présente l'effet inhibiteur le plus faible (10,66%) à la même concentration.

Il est utile d'estimer la concentration inhibitrice médiane (CI<sub>50</sub>), paramètre largement utilisé pour mesurer le pouvoir antioxydant, et qui est défini comme étant la concentration antioxydante nécessaire pour réduire la concentration de DPPH par le facteur de deux. L'antioxydant le plus efficace se caractérise par une faible valeur de CI<sub>50</sub> et vice versa. Les valeurs de CI<sub>50</sub> pour les quatre extraits sont arborées sur la figure III.2.13. Il est à noter que l'acide ascorbique utilisé comme standard présente l'effet de piégeage le plus élevé avec

une valeur de  $CI_{50}$   $21,37 \pm 0,29 \mu\text{g/ml}$ . L'ordre d'augmentation des  $CI_{50}$  pour les extraits est  $\text{AcOEt}$  ( $47,80 \pm 2,20 \mu\text{g/ml}$ ) >  $n\text{-BuOH}$  ( $73,31 \pm 1,02 \mu\text{g/ml}$ ) >  $\text{MeOH}$  ( $512,11 \pm 109,56 \mu\text{g/ml}$ ) (Tableau III.2.5). L'extrait  $\text{CHCl}_3$  est doté d'un pouvoir antioxydant très faible que celui des autres extraits car, le chloroforme est le moins polaire des solvants utilisés et donc il est susceptible de contenir les composants les moins polaires.

De nombreux essais, pour expliquer la relation structure-activité de certains phénols ont été rapportés dans la littérature [19]. Halliwell et Guttridge (1999) ont rapporté que la puissance dans le processus anti-oxydation résulte d'abord de la capacité d'empêcher l'auto-oxydation des radicaux libres d'oxyder les substrats à faible concentration et ensuite que le radical résultant du piégeage doit être stable.

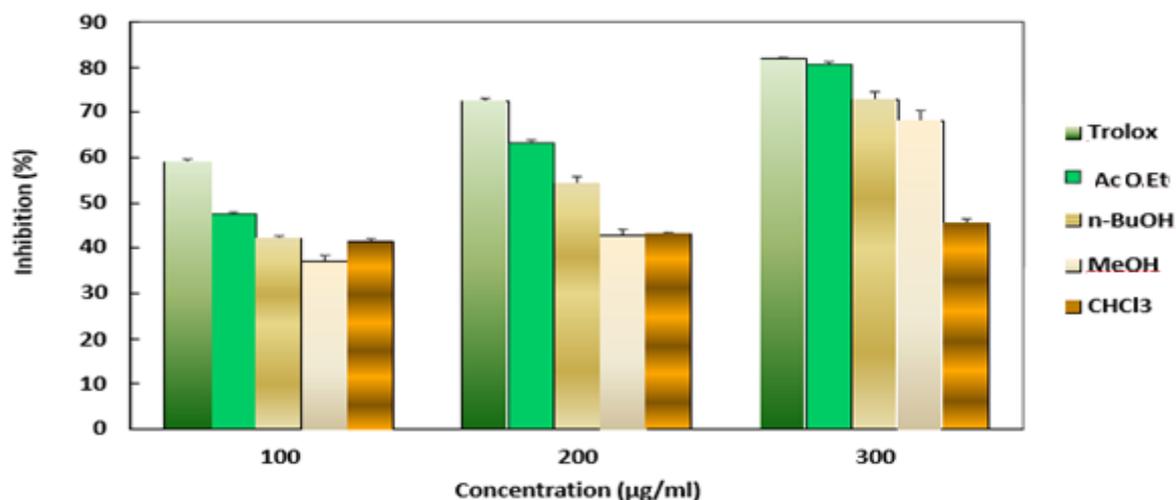


**Figure III.2.13 :** Activités de piégeage DPPH des extraits de *L. dielsii* et standard.

(Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  écart-type, en triplicata).

### III.2.4.3. Inhibition de la LPO induite par le système $\text{Fe}^{2+}$ /acide ascorbique

L'oxydation des lipides se produit lorsque l'oxygène réagit avec les lipides dans une série de réactions radicalaires en chaîne conduisant à des changements chimiques complexes. L'oxydation des lipides perturbe non seulement la qualité nutritionnelle des aliments, mais elle est également associée à de nombreuses maladies [20].



**Figure III.2.14 :** Inhibition de la LPO (%) *L. dielsii* et standard.

(Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  écart-type, en triplicata)

La figure III.2.14, montre qu'à la concentration de 200 µg/ml, l'extrait AcOEt ( $63,25 \pm 0,74\%$ ) possède une meilleure inhibition que les extraits *n*-BuOH ( $54,25 \pm 1,55\%$ ) et  $\text{CHCl}_3$  ( $43,11 \pm 0,29\%$ ). Alors qu'à la concentration de 300 µg/ml, l'extrait AcOEt ( $80,65 \pm 0,59\%$ ) qui est un bon inhibiteur de la LPO présente le même effet que le Trolox ( $81,82 \pm 0,29\%$ ) utilisé comme standard.

L'augmentation de la LPO est généralement considérée comme une cause sous-jacente importante de l'inhibition du stress antioxydant. La LPO est considérée comme l'un des mécanismes de base du tissu endommagé [21]. Nos résultats révèlent que les extraits AcOEt, *n*-BuOH et MeOH réduisent considérablement les taux de TBARS induits dans les homogénats hépatiques par le système  $\text{Fe}^{2+}$  / ascorbate avec des valeurs  $\text{IC}_{50}$  de  $113,24 \pm 0,65$ ,  $143,14 \pm 0,77$ ,  $184$  et  $79 \pm 6,74$  respectivement (Tableau III.2.6).

**Tableau III.2.6 :** Valeurs de DPPH et de LPO  $\text{IC}_{50}$  des activités antioxydantes de *L. dielsii* et des normes (Trolox et acide ascorbique). (Moyenne  $\pm$  écart-type, en triplicata).

Extraits et standards	$\text{IC}_{50}$ -(µg/ml)	
	LPO	DPPH
AcOEt	$113,24 \pm 0,65$	$47,80 \pm 2,20$
<i>n</i> -BuOH	$143,14 \pm 0,77$	$73,31 \pm 1,02$
MeOH	$184,79 \pm 6,74$	$512,11 \pm 109,56$
$\text{CHCl}_3$	$861,31 \pm 77,10$	-----
Acide ascorbique	-----	$21,37 \pm 0,29$
Trolox	$65,06 \pm 3,06$	-----

L'extrait AcOEt qui a le TPC le plus élevé mais le TFC le plus faible (37,76%) montre un bon effet d'inhibition de la LPO et également un bon effet de piégeage du DPPH. Cet effet peut être expliqué par la présence de type flavonoïde qui possède une structure idéale pour la décomposition des radicaux. L'extrait *n*-BuOH qui renferme le TFC le plus élevé (88,81%) présente plus d'inhibition de la LPO et un effet de piégeage du DPPH que le MeOH, bien qu'il n'y ait pas de différence entre leur TPC. Il est raisonnable de conclure que l'activité antioxydante n'est pas liée uniquement au niveau TPC / TFC mais à la nature des substituants et de leurs positions sur le squelette phénolique.

#### III.2.4.4. Conclusion

Le criblage phytochimique réalisé dans cette étude a confirmé la présence de plusieurs métabolites secondaires chez l'espèce *Lifago dielsii*. Le fractionnement de l'extrait MeOH en différentes phases (CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-BuOH) a conduit à une distribution intéressante des taux en polyphénols (TPC) et en flavonoïdes (TFC). L'extrait *n*-BuOH fournit plus d'antioxydant que l'extrait MeOH en dépit de leur contenu comparable de TPC. L'extrait CHCl<sub>3</sub> présente l'effet le plus faible. L'extrait AcOEt qui a le plus haut TPC est le plus puissant dans l'activité antioxydante. La synergie possible des flavonoïdes avec d'autres composés dans l'extrait peut être responsable de ces propriétés. Les résultats obtenus indiquent que *L. dielsii* serait une source alternative prometteuse des composés phénoliques antioxydants naturels. D'autres travaux de recherche doivent être réalisés afin d'isoler les molécules bioactives responsables de leur activité.

# Bibliographie

- [1] Pelltier. S.w., (1983), *The nature and definition of an alkaloid, in alkaloids chemical and biological perspectives*. 1, pp.26
- [2] Bouchet. N., Lévesque. J., Pousset. J.L., (2000). HPLC isolation, identification and quantification of tanins from *Guiera senegalensis*. *Phytochem.* 11, p.52-55.
- [3] Ghedira. K., (2005). Les flavonoids: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*. 3, 162-169.
- [4] Amlan. K., Patra. J.S., (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*. 71, 1198–1222
- [5] Bruneton. J., (1993). *Pharmacognosie, phytochimie et plantes médicinales*. 2<sup>ème</sup> Ed. Lavoisier. Londres. New-York. 625-642.
- [6] Markham. K.R., Chari. V.M., (1982). *Carbon-13 NMR spectroscopy of flavonoids*. In : Harborne, J.B., Mabry, T.J. Eds, *The Flavonoids : Advances in Research*. Chapman & Hall, London, pp. 19-134.
- [7] Agrawal. P.K., (1992). NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*. 31, 3307-3330.
- [8] Chen. P., Yang. J.S., (2007). Flavonol Galactoside Caffeiate Ester and Homoisoflavones from *Caesalpinia millettii* HOOK. et ARN. *Chem. Pharm. Bull.* 55(4) 655—657.
- [9] Harborne. J. B., (1988). *The Flavonoids, Advances in Research since 1986*. London, Chapman and Hall.
- [10] Shibano. M., Matsumoto. Y., Kusano. G., Shibata. T., (1996). Researches of *Glycyrrhiza* Species Grown at Medicinal Plant Gardens in Japan and Basic Studies for Selection of pharmaceutically Fine Races.1. Comparative Studies by HPLC Patterns and Constituents of Aerial parts. *Nat.Med. (Jpn.T.Pharmacognosy)*, 50, 273; *Chem.Abstr.* 125, 338818.
- [11] Umarova. A., Batyuk. V.S., Chaleskii. A.M., (1971). Flavonols of *Caragana jubata*. *Chem. Nat. Comp.* 7, 499
- [12] Markham. K.R., Ternay. B., Stanley. R., Geiger. H., Marbry. T.J., (1978). Carbon-13 NMR studies of flavonoids- III: Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. *Tetrahedron* 34, 1389-1397.

- [13] Burasheva. G.S., Mukhamed'yarova. M.M., Chumbalov. T.K., (1975). Flavonoids of *Alhagi kirgisotum*. *Chem. Nat. Comp.* 11, 261.
- [14] Burasheva. G.Sh., Mukhamed'yarova. M.M., Chumbalov. T.K., (1976). Polyphenols of *Alhagi kirghisorum*. III. *Chem. Nat. Comp.* 12, 596.
- [15] G.Sh. Burasheva, M.M. Mukhamed'yarova, T.K. Chumbalov., (1977). Polyphenols of *Alhagi kirghisorum*. IV. *Chem. Nat. Comp.* 13, 242.
- [16] Elgabr. M.N., Mekkiou. R., Ameddah. S., Menad. A., Boumaza. O., Seghiri. R., Benayache. S., Benayache. F., (2010). Antioxydant activities from the aerial parts of *Pulicaria jaubertii*. *Advances in Natural and Applied Sciences.* 4(1), 63-70.
- [17] Öztürk. N., Tunçel. M., Poto. I.E., (2009). Phenolic compounds and antioxidant activities of some *Hypericum* species: A comparative study with *H. Perforatum*. *Pharmaceutical Biology.* 47(2), 120-127.
- [18] Ghasemzadeh. A., Jaafar Hawa. Z.E., Rahmat. A., (2011). Effects of solvent type on phenolics, flavonoids content, and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. *Journal of Medicinal Plants Research.* 5(7), 1147-1154.
- [19] Halliwell. B., Gutteridge. J., (1999). *The Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press. Oxford.
- [20] Gago-Dominguez. M., Jiang. X., Esteban. C.J., (2007). Lipid peroxidation, oxidative stress genes and dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. *Breast Cancer Research.* 9, 201, 1-11.
- [21] Min. B., Ahn. DU., (2005). Mechanism of Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products -A Review. *Food Sci. Biotechnol;* 14(1), 152-163

# Conclusion générale

La flore Algérienne est l'une des plus riches au monde et possède de nombreuses plantes utilisées en médecine traditionnelle. Parmi lesquelles, deux espèces sahariennes ont fait l'objet de la présente étude phytochimique et biologique.

Les travaux d'extraction, des parties aériennes de l'espèce endémique du Sahara Algérien *Heliotropium bacciferum* Forssk. appartenant à la famille Boraginaceae, suivis de séparations chromatographiques successives (CC, CCM, HPLC semi-préparative), nous ont permis d'isoler et d'identifier, grâce aux techniques d'analyses spectroscopiques RMN 1D et 2D et par comparaison avec les données de la littérature, dix-sept produits naturels appartenant à différentes classes chimiques. Il s'agit de :

- Deux stérols.
- Six mégastigmane de type nor-isoprenoïdes.
- Deux C-11 terpènes lactones.
- Deux monoterpènes, l'un d'eux glucosylé.
- Cinq dérivés phénoliques.

Les deux stérols, loliolide, le blumenol, l'acide rosmarinique et son méthyle ester sont isolés pour la première fois de l'espèce *Heliotropium bacciferum*, alors que les autres sont rapportés pour la première fois dans le genre *Heliotropium* à travers cette étude.

L'extrait méthanolique HBM a montré une activité de piégeage des radicaux libres *in vitro* significative corrélant ainsi avec la teneur en dérivés polyphénoliques (trois dérivés phénoliques, l'acide rosmarinique et son méthyle ester). L'extrait chloroforme HBC était capable d'inhiber la croissance des lignées cellulaires du cancer du côlon, principalement pour la présence des C-11 terpène lactones (loliolide et l'isololiolide). En conclusion. Cette étude pourrait fournir un contexte scientifique à l'utilisation de dérivés de *H. bacciferum* en tant qu'ingrédients fonctionnels dans la médecine traditionnelle algérienne.

Le criblage phytochimique réalisé sur les parties aériennes de l'espèce *Lifago dielsii* Schwein. & Musch. (Asteraceae), espèce endémique au Sahara Algérien a mis en évidence la présence de plusieurs métabolites secondaires chez *L. dielsii*, ainsi l'étude phytochimique réalisée sur l'extrait AcOEt a mené à l'isolement de trois composés de type flavonoïdes glycosides dont l'un est nouveau. L'identification de ces composés a été réalisée grâce à l'analyse des spectres RMN 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT) et RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC) et par comparaison avec les données de la littérature.

Le fractionnement de l'extrait de MeOH en différentes phases (CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-BuOH) a conduit à une distribution intéressante de TPC et de TFC. L'extrait *n*-BuOH fournit plus d'antioxydants que l'extrait MeOH en dépit de leur contenu comparable de TPC. L'extrait CHCl<sub>3</sub> présente l'effet le plus faible. L'extrait AcOEt qui a le plus haut TPC présente l'effet le plus important dans l'activité antioxydante. La synergie possible des flavonoïdes avec d'autres composés dans l'extrait peut être responsable de ces propriétés. Les résultats obtenus indiquent que *L. dielsii* serait une source alternative prometteuse des composés phénoliques antioxydants naturels. D'autres travaux de recherche doivent être réalisés afin d'isoler les molécules bioactives responsables de cette activité.

## ملخص

انصب اهتمامنا في هذا العمل على الدراسة الفيتوكيميائية والبيولوجية لنبتتين صحراويتين مستديمتين، وتستهملان في الطب الشعبي من طرف سكان المناطق المتواجدة فيها ويتعلق الأمر ب

*Lifago dielsii* Schwein. & Musch (Asteraceae) و *Heliotropium bacciferum* Forssk (Boraginaceae)

سمحت هذه الدراسة بعزل وتحديد الصيغة الكيميائية لعشرين مركبا، منها سبعة عشر مركبا، من نوع تريينات أحادية megastine و بوليفينول من مستخلصي الكلوروفورم و الميثانول *H. bacciferum* Forssk وثلاثة فلافونيدات سكرية من مستخلص خلاص الايثيل للنوع *L. dielsii* Schwein. & Musch. تم التعرف على بنى المركبات المعزولة من خلال تقنيات D2 و D1 NMR (<sup>1</sup>H ، <sup>13</sup>C ، COSY ، HMBC و HSQC)، مطيافية الأشعة فوق البنفسجية UV وكذلك بمقارنة النتائج مع معطيات المراجع.

تم التحديد الكمي الكلي للبوليفينول في مستخلص الميثانول من *H. Bacciferum* بواسطة الطريقة اللونية-Folin, Ciocalteu هذه الخطوة أظهرت محتوى قدر ب 68.0 mgGAE/g extract. تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة لهذا المستخلص باستعمال جذري DPPH ° و ABTS. أظهر هذا الاختبار أن المستخلص يمتلك نشاطا ملحوظا ومتعلق بالتركيز حيث قدرت ال IC<sub>50</sub> ب 70.912 µg/ml لجذر DPPH و 1.466 µg/ml ل ABTS و يعود ذلك الى مشتقات الفينول.

تم اختبار المستخلصين وبعض المركبات المعزولة من *H. bacciferum* لتأثيرها على السمية بخلايا سرطانية ( مصدر بشري) (HCT-116 و 1DL و HDFa). أظهر مستخلص الكلوروفورم فقط تأثيرا مشبها كبيرا يعتمد على التركيز على نمو الخلايا السرطانية المعالجة ب IC<sub>50</sub> التي قدرت ب 0.0950 mg/ml على HCT116 و 0.062 mg/ml على DLD1

تم قياس كمية البوليفينول الكلي والفلافونويد الكلي لمستخلصات CHCl<sub>3</sub> ، EtOAc ، *n*-BuOH و الجزء غير القابل للذوبان في الميثانول (MeOH) للأجزاء الهوائية للنبتة *L. dielsii* بواسطة الطرق اللونية. أظهرت هذه الدراسة وجود أعلى نسبة من البوليفينول في مستخلص EtOAc بينما أعلى نسبة فلافونيدات (88.81%) كانت في مستخلص *n*-BuOH تم تقييم نشاط مضادات الأكسدة لمستخلصات *L. dielsii* باستعمال طريقة التقاط الجذور الحرة DPPH وطريقة الأكسدة الليبيدية (LPO). يمتلك مستخلص EtOAc التأثير الأقوى على DPPH الجذور الحرة بقم (IC<sub>50</sub> = 47.80 ± 2.20 µg/ml) والأكسدة الليبيدية (IC<sub>50</sub> = 113.24 ± 0.65 µg/ml).

**الكلمات المفتاحية:** *Lifago dielsii Heliotropium bacciferum*، تريينات أحادية، nor-isoprenoids، فلافونويد، بوليفينول، نشاط مضاد للأكسدة، التأثير السمي للخلايا.

# Abstract

This work is devoted to the phytochemical and biological study of two endemic Saharan medicinal plants, *Heliotropium bacciferum* Forssk. (Boraginaceae) and *Lifago dielsii* Schwein. & Musch. (Asteraceae).

This phytochemical study led the isolation and identification of twenty products, seventeen of which were monoterpenes megastigans and phenolic type, were obtained from the chloroform and methanol extracts of the aerial parts of *Heliotropium bacciferum* Forssk. While three glycosylated flavonoids were obtained from the ethyl acetate extract of the aerial parts of *Lifago dielsii* Schwein & Musch. The structures of the isolated products were elucidated mainly by the use of NMR techniques ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC and HMBC), UV spectrophotometry and by comparison with those reported in the literature.

The quantification of the total phenolic content of the MeOH extract of *H. bacciferum* was carried out using the Folin-Ciocalteu method. This step showed a polyphenolic content of 68.0 mgGAE/g extract. This extract was evaluated for its antioxidant activity towards the free radical DPPH and the radical ABTS. The results showed that this extract exhibited a significant activity and is dependent on the concentration *in vitro* with respect to the DPPH radicals ( $\text{IC}_{50}$  70.912  $\mu\text{g/ml}$ ), and ABTS ( $\text{IC}_{50}$  1.466  $\mu\text{g/ml}$ ), related to the presence of the phenolic derivatives.

Both extracts and some isolated products of *H. bacciferum* were tested for their cytotoxic effect in human cancer cell lines (HCT-116, DLD1 and HDFa). Only the chloroform extract showed a significant and concentration-dependent inhibitory effect on the growth of  $\text{IC}_{50}$  treated cancer cell lines of 0.095 mg/ml on HCT116 and 0.062 mg/ml on DLD1.

The quantification of total phenols and total flavonoids contents of the  $\text{CHCl}_3$ , EtOAc, *n*-BuOH extracts and of the methanol insoluble part (MeOH) of the aerial parts of *L. dielsii* was carried out using colometric methods. This study showed a phenolic content more important in the EtOAc extract. However, total flavonoids content was higher in *n*-BuOH extract (88.81%). The antioxidant activity of *L. dielsii* extracts was evaluated by the DPPH free radical scavenging and the lipid peroxidation inhibition (LPO) assays. The EtOAc extract has the strongest effect on DPPH with ( $\text{IC}_{50} = 47.80 \pm 2.20$   $\mu\text{g/ml}$ ) and the inhibition of lipid peroxidation ( $\text{IC}_{50} = 113.24 \pm 0.65$   $\mu\text{g/ml}$ ).

**Key words:** *Heliotropium bacciferum*, *Lifago dielsii*, terpenes, nor-isoprenoids, flavonoids, polyphenols, antioxidant activity, cytotoxic effect.

# Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique de deux plantes médicinales sahariennes endémiques, *Heliotropium bacciferum* Forssk. (Boraginaceae) et *Lifago dielsii* Schwein. & Musch. (Asteraceae).

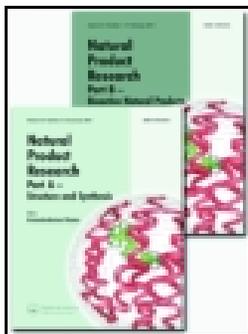
Cette étude a permis d'isoler et d'identifier vingt produits dont dix-sept, de type monoterpènes et mégastigmanes, des extraits chloroforme et méthanol de l'espèce *Heliotropium bacciferum* Forssk. et trois flavonoïdes glycosides de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Lifago dielsii* Schwein. & Musch. Les structures des produits isolés ont été élucidées principalement par l'utilisation des techniques de RMN 1D et 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC et HMBC), spectrophotométrie UV et par la comparaison avec les données de la littérature.

La quantification des polyphénols totaux de l'extrait MeOH de *H. bacciferum* a été réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu. Cette étape a montré un contenu en polyphénols de 68,0 mgEAG/g extrait. Cet extrait a été évalué pour son activité antioxydant *vis-à-vis* du radical libre DPPH et du radical ABTS. Les résultats montrent que cet extrait présente une activité significative et dépendante de la concentration *in vitro vis-à-vis* des radicaux DPPH (IC<sub>50</sub> 70,912 µg/ml), et ABTS (IC<sub>50</sub> 1,466 µg/ml), liés à la présence des dérivés du phénol.

Les deux extraits et quelques produits isolés de *H. bacciferum* ont été testés pour leur effet de cytotoxicité vis à vis des lignées cellulaires humaine (HCT-116, DLD1 et HDFa). Seul l'extrait chloroforme a montré un effet inhibiteur significatif et dépendant de la concentration sur la croissance des lignées de cellules cancéreuses traitées avec des CI<sub>50</sub> de 0,095 mg/ml sur HCT116 et 0,062 mg/ml sur DLD1.

La quantification des polyphénols totaux et des flavonoïdes totaux des extraits CHCl<sub>3</sub>, AcOEt, *n*-BuOH et de la partie insoluble dans le méthanol (MeOH) des parties aériennes de *L. dielsii* a été réalisée par les méthodes colorimétriques. Cette étude a montré un contenu en polyphénols plus important dans l'extrait AcOEt par rapport aux autres extraits. L'extrait *n*-BuOH est plus riche en flavonoïdes totaux (88,81%). L'activité antioxydant des extraits de *L. dielsii* a été évaluée par la méthode du piégeage du radical libre DPPH et celle de l'inhibition de la peroxydation lipidique (LPO). L'extrait AcOEt présente l'effet le plus puissant vis-à-vis du radical libre DPPH avec (CI<sub>50</sub> = 47,80 ± 2,20 µg / ml) et l'inhibition de la peroxydation lipidique (CI<sub>50</sub> = 113,24 ± 0,65 µg / ml).

**Mots clés :** *Heliotropium bacciferum*, *Lifago dielsii*, terpènes, nor-isoprenoïdes, flavonoïdes, polyphénols, activité antioxydante, effet cytotoxique.



# Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters

ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>

## Heliotropium bacciferum Forssk. (Boraginaceae) extracts: chemical constituents, antioxidant activity and cytotoxic effect in human cancer cell lines

Hanane Aïssaoui, Teresa Mencherini, Tiziana Esposito, Nunziatina De Tommasi, Patrizia Gazzero, Samir Benayache, Fadila Benayache & Ratiba Mekkiou

To cite this article: Hanane Aïssaoui, Teresa Mencherini, Tiziana Esposito, Nunziatina De Tommasi, Patrizia Gazzero, Samir Benayache, Fadila Benayache & Ratiba Mekkiou (2018): Heliotropium bacciferum Forssk. (Boraginaceae) extracts: chemical constituents, antioxidant activity and cytotoxic effect in human cancer cell lines, Natural Product Research, DOI: [10.1080/14786419.2018.1437433](https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1437433)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1437433>

 View supplementary material 

 Published online: 12 Feb 2018.

 Submit your article to this journal 

 Article views: 14

 View related articles 

 View Crossmark data 

SHORT COMMUNICATION



## *Heliotropium bacciferum* Forssk. (Boraginaceae) extracts: chemical constituents, antioxidant activity and cytotoxic effect in human cancer cell lines

Hanane Aïssaoui<sup>a</sup>, Teresa Mencherini<sup>b</sup>, Tiziana Esposito<sup>b,c</sup>, Nunziatina De Tommasi<sup>b</sup>, Patrizia Gazzero<sup>b</sup>, Samir Benayache<sup>a</sup>, Fadila Benayache<sup>a</sup> and Ratiba Mekkioua<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Unité de Recherche Valorisation des Ressources naturelles et Analyses physico-Chimiques et Biologiques, Université Frères Mentouri, Constantine, Algérie; <sup>b</sup>Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi di Salerno, Fisciano, Italy; <sup>c</sup>Program in Drug Discovery and Development, University of Salerno, Fisciano, Italy

### ABSTRACT

*Heliotropium bacciferum* (Boraginaceae) is a perennial herb, growing in the Bechar region of Algeria, where it is traditionally used for skin diseases and tonsillitis. Herein, we report the isolation and characterization of sixteen secondary metabolites from the aerial part extracts. They include a sterol (**1**), megastigman type nor-isoprenoids (**2**, **3**, **4**, **6**, **8**, **10**), C-11 terpene lactones (**5** and **9**), and a monoterpene (**7**) from the chloroform extract (HB-C); monoterpene glucoside (**14**), and phenolic compounds (**11–13**, **15**, **16**) from the methanol one (HB-M). Their structures were elucidated by spectroscopic methods including 1D and 2D NMR experiments, and ESIMS analysis. HB-M showed a significant and concentration dependent scavenging activity *in vitro* against the radicals DPPH and ABTS, related to the phenol derivatives (**11–13**, and **15–16**), and HB-C inhibited the growth of colon cancer cell lines, mainly for the presence of the antiproliferative C-11 terpene lactones (**5** and **9**).

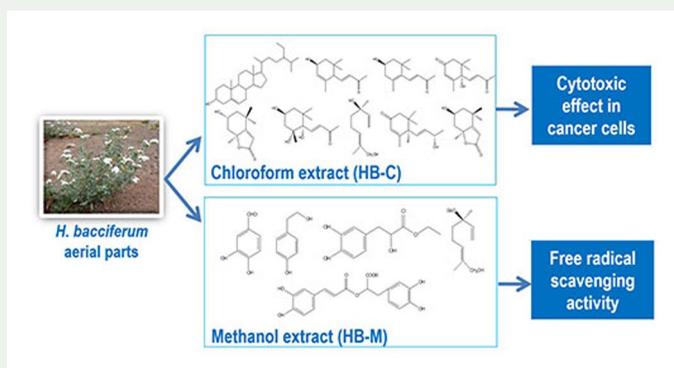
### ARTICLE HISTORY

Received 23 November 2017

Accepted 31 January 2018

### KEYWORDS

*Heliotropium bacciferum*; Boraginaceae; terpenoids; polyphenols; antioxidant activity; cytotoxic effect



**CONTACT** Teresa Mencherini ✉ tmencherini@unisa.it

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1437433>.

## 1. Introduction

*Heliotropium* is a large genus of the Boraginaceae family, including approximately 250 species distributed in tropical and temperate zones worldwide (Ghori et al. 2016), among them *Heliotropium bacciferum* (Forssk.) is a perennial herb growing in the Bechar region of Algeria. Many biological activities, including the antimicrobial and antioxidant effects (Ahmad et al. 2014, 2016) are attributed to the occurrence of bioactive substances, mainly identified as pyrrolizidine alkaloids (Farrag et al. 1996; Sarg et al. 1997; Rizk et al. 1998). The powdered leaves of *H. bacciferum* are locally used for skin diseases such as abscesses, boils and tinea, while the decoction of the aerial parts is used for tonsillitis (gargle), and the juice is employed on the skin burns (Hammiche and Maiza 2006). In this paper, we described the isolation and the structural identification, by spectroscopic and spectrometric techniques, of several compounds, as well as the free radical scavenging activity and cytotoxic effects in cancer cell lines of extracts and pure compounds from *H. bacciferum*.

## 2. Results and discussion

The phytochemical investigation of *H. bacciferum* chloroform and methanol extracts (HB-C and HB-M, respectively) led to isolation of a sterol (**1**), six megastigman type nor-isoprenoids (**2**, **3**, **4**, **6**, **8**, **10**), two C11-terpene lactones (**5** and **9**), and one monoterpene (**7**) from HB-C; monoterpene glucoside (**14**), and phenolic compounds (**11–13**, **15**, **16**) from HB-M. The compounds (Figure 1) were identified as  $\beta$ -sitosterol (**1**) (Chaturvedula and Prakash 2012), 3-hydroxy- $\alpha$ -ionone (**2**) (Khatri et al. 2010), (–)-3-hydroxy- $\beta$ -ionone (**3**) (Fujimori et al. 1974), (+)-dehydrovomifoliol (**4**) (Park et al. 2011), loliolide (**5**) (Erosa-Rejón et al. 2009), (3*S*, 5*R*, 6*S*, 7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one (**6**) (Park et al. 2011), (3*R*)-8-hydroxylinalool (**7**) (Chen et al. 2007), 3-oxo- $\alpha$ -ionol (**8**) (Park et al. 2011), isololiolide (**9**) (Vizetto-Duarte et al. 2016), blumenol A (**10**) (Erosa-Rejón et al. 2009), protocatechualdehyde (**11**) (Amen et al. 2013), tyrosol (**12**) (Guzmán-López et al. 2007), ethyl 3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactate (**13**) (Hou et al. 2002), linaloyl  $\beta$ -*O*-glucopyranoside (**14**) (Seo et al. 2003), rosmarinic acid (**15**) (Abedini et al. 2013), and rosmarinic acid methyl ester (**16**)

**Table 1.** Free radical-scavenging activity and total phenolic content of *H. bacciferum* extracts and compounds.

	Phenol content (GAE <sup>a</sup> mg/g extract)	DPPH test EC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)	TEAC value <sup>b</sup>
HB-M	68.0 $\pm$ 1.1 <sup>c</sup>	70.912 $\pm$ 1.413 <sup>c</sup>	1.466 $\pm$ 0.016 <sup>c</sup>
HB-C	–	>600	0.012 $\pm$ 0.014
<b>11</b>	–	2.376 $\pm$ 0.016	1.538 $\pm$ 0.005
<b>12</b>	–	7.560 $\pm$ 0.029	0.374 $\pm$ 0.013
<b>13</b>	–	7.062 $\pm$ 0.011	1.526 $\pm$ 0.010
<b>14</b>	–	>600	0.024 $\pm$ 0.003
<b>15</b>	–	3.162 $\pm$ 0.426	1.455 $\pm$ 0.013
<b>16</b>	–	6.713 $\pm$ 0.019	0.697 $\pm$ 0.011
L-ascorbic acid <sup>d</sup>	–	3.282 $\pm$ 0.085	0.834 $\pm$ 0.015
Quercetin	–	2.433 $\pm$ 0.099	3.461 $\pm$ 0.011

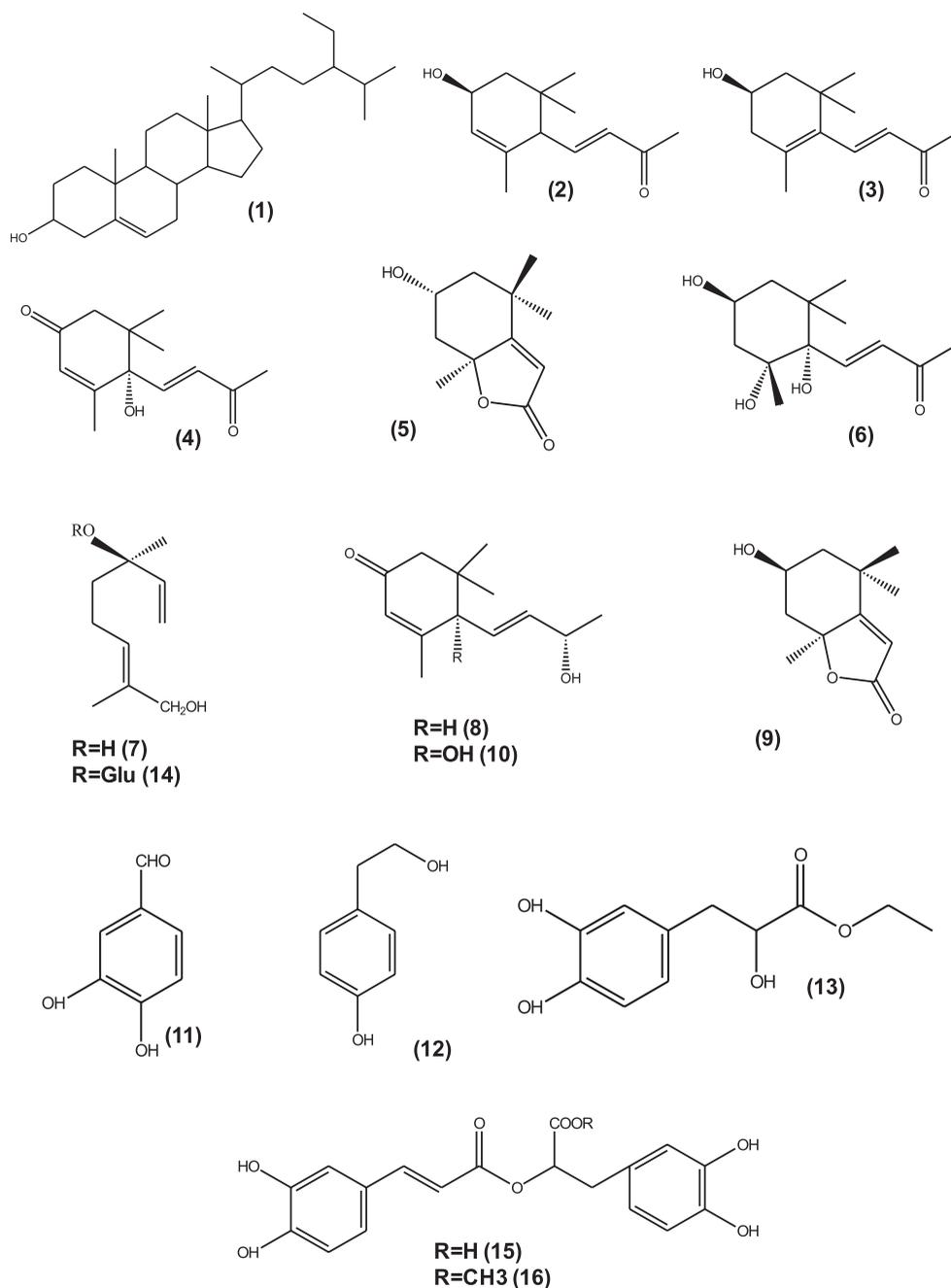
Notes: HB-M = *H. bacciferum* methanol extract; HB-C = *H. bacciferum* chloroform extract.

<sup>a</sup>Gallic acid equivalent.

<sup>b</sup>mg/mL for extracts and mM for compounds.

<sup>c</sup>Standard deviation (data from three experiments in triplicate).

<sup>d</sup>Positive control of the test.



**Figure 1.** Structures of compounds 1–16 isolated from *H. undulatum*.

(Abedini et al. 2013) by their NMR and MS data in comparison with those reported in literature. The isolated compounds, (1), (5), (10), and (15) were previously identified in *Heliotropium* species (Erosa-Rejón et al. 2009), rosmarinic acid methyl ester (16) could be an artifact of the extraction procedure, and the others are begin reported in the genus

for the first time in our research. Moreover, the (3*S*, 5*R*, 6*S*, 7*E*)-3,5,6-trihydroxy-7-megastigmen-9-one (**6**) and ethyl 3-(3,4-dihydroxyphenyl) lactate (**13**) are not very common natural compounds, they were isolated from few botanical species, mainly of Euphorbiaceae (**6**) and Lamiaceae (**13**) families (Bu et al. 2012; Huang et al. 2015). Based on the classes of isolated secondary metabolites, HB-M and HB-C were tested *in vitro* for their free scavenging activity, against the radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), and for the cytotoxic effect in human cancer and primary cell lines (HCT-116, DLD1, and HDFa). The polyphenol-rich HB-M (68.0 GAE mg/g extract) showed a significant and concentration dependent free radical scavenging activity both against DPPH (IC<sub>50</sub> 70.912 µg/mL) and ABTS [TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) value of 1.466 mg/mL] for the occurrence of protocatechualdehyde (**11**), rosmarinic acid (**15**) and its methyl ester (**16**), tyrosol (**12**) and the phenylpropanoid (**13**), showing an IC<sub>50</sub> range from 2.376 to 7.560 µg/mL, and TEAC values from 0.374 to 1.526 mg/mL. The IC<sub>50</sub> value of compounds **11** and **15** result higher or comparable to the used positive controls (α-ascorbic acid and quercetin) in both tests. As expected, the monoterpene glucoside (**14**) and the apolar HB-C were not active as free radical scavengers (IC<sub>50</sub> > 600 µg/mL and TEAC value of 0.024 and 0.012 mg/mL, respectively) (Table 1). The cytotoxic activity of both *Heliotropium* extracts and some isolates nor-isoprenoids, such as dihydrovomifoliol and blumenol A, and C11-terpene lactones, in cancer cell lines was reported (Moongkarndi et al. 2004; Ren et al. 2009). The antiproliferative activity of *H. bacciferum* extracts (from 1.000 to 0.025 mg/mL) and pure compounds (**5** and **9** from HB-C, and **12** and **14** from HB-M) from 1.0 to 0.1 mM, was evaluated in two human tumoral cell lines (colon carcinoma HCT116, and colorectal adenocarcinoma DLD1), and in a normal cell line (Primary Human Dermal Fibroblast, HDFa) using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. HB-M did not show any cytotoxic effect, in contrast, at the lowest tested concentration (0.025 mg/mL), after 24 h of treatment, it stimulated the proliferation of both tumor and normal cell lines. HB-C, on the other hand, showed a significant and concentration-dependent inhibitory effect on the growth of the treated cancer cell lines with IC<sub>50</sub> of 0.095 mg/mL on HCT116 and 0.062 mg/mL on DLD1 (Table 2), but not in primary fibroblasts up to 0.100 mg/mL. Lololide (**5**) and isolololide (**9**), isolated from HB-C, and tested under the same conditions as the extracts, showed IC<sub>50</sub> ranging from 0.306 to 0.351 mM in HCT116 cells, and between 0.236 and 0.395 mM in DLD1.

**Table 2.** IC<sub>50</sub> of *H. bacciferum* extracts (mg/mL) and pure compounds (mM) in human cancer cell lines.

	Cancer cell lines	
	HCT116 <sup>a</sup>	DLD1 <sup>b</sup>
HB-M	NA <sup>c</sup>	NA
<b>11</b>	NA	NA
<b>13</b>	NA	NA
HB-C	0.095 ± 0.002 <sup>d</sup>	0.062 ± 0.005
<b>5</b>	0.306 ± 0.027	0.395 ± 0.4
<b>9</b>	0.325 ± 0.015	0.276 ± 0.021

Notes: HB-M = *H. bacciferum* methanol extract; HB-C = *H. bacciferum* chloroform extract.

<sup>a</sup>Human colon cancer cell line.

<sup>b</sup>Human colorectal adenocarcinoma cell line.

<sup>c</sup>Not active up to 1 mg/mL for the extracts, and 1 mM for compounds.

<sup>d</sup>IC<sub>50</sub> ± standard deviation (data from three experiments in triplicate).

### 3. Conclusions

Secondary metabolites from different chemical classes (sterols, nor-isoprenoids, monoterpenes, and phenolic derivatives) were isolated from the aerial parts of *H. bacciferum*. The polar extract showed an *in vitro* free radical-scavenging activity correlated to the content of polyphenol derivatives (**11–13**, and **15–16**); the chloroform extract was able to inhibit the growth of colon cancer cell lines, mainly for the presence of the antiproliferative C-11 terpene lactones (**5** and **9**). In conclusion, this study could provide a scientific background to the use of *H. bacciferum* derivatives as functional ingredients in Algerian traditional medicine.

### Supplementary material

Experimental details relating to this paper are available online (S1–S5).

### Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

### References

- Abedini A, Roumy V, Mahieux S, Biabiany M, Standaert-Vitse A, Rivière C, Sahpaz S, Bailleul F, Neut C, Hennebelle T. 2013. Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). Evidence-based Complement Altern Med. Article ID 604536:1–11.
- Ahmad S, Ahmad S, Bibi A, Ishaq MS, Afridi MS, Kanwal F, Zakir M, Fatima F. 2014. Phytochemical analysis, antioxidant activity, fatty acids composition, and functional group analysis of *Heliotropium bacciferum*. Sci World J. 2014:1–8.
- Ahmad S, Abdel-Salam NM, Ullah R. 2016. *In vitro* antimicrobial bioassays, DPPH radical scavenging activity, and FTIR spectroscopy analysis of *Heliotropium bacciferum*. Article ID: Biomed Res Int; p. 3818945.
- Amen YM, Marzouk AM, Zaghoul MG, Afifi MS. 2013. Bioactive compounds from *Tipuana tipu* growing in Egypt. J Am Sci. 9:334–339.
- Bu W, Shi Y-N, Yan Y-M, Lu Q, Liu G-M, Li Y, Cheng Y-X. 2012. Norsesquiterpenoids from the leaves of *Croton tiglium*. Nat Products Bioprospect. 1:134–137.
- Chaturvedula VSP, Prakash I. 2012. Isolation of stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. Int Curr Pharm J. 1:239–242.
- Chen H, Zhou YZ, Qiao L, Cao JQ, Yao Y, Hua HM, Pei YH. 2007. Androstane and monoterpene glucoside sinapoyl ester from *Cynanchum amplexicaule* SIEB. et ZUCC. Chem Pharm Bull. 55:1416–1418.
- Erosa-Rejón G, Peña-Rodríguez LM, Sterner O. 2009. Secondary metabolites from *Heliotropium angiospermum*. J Mex Chem Soc. 53:44–47.
- Farrag NM, Abdel-Aziz EM, El-Shafae AM, Ateya AM, El Domiaty MM. 1996. Pyrrolizidine alkaloids of *Heliotropium bacciferum* Forssk from Egypt. Int J Pharmacogn. 34:374–377.
- Fujimori T, Kasuga R, Noguchi M, Kaneko H. 1974. Isolation of R(-)-3-hydroxy- $\beta$ -ionone from Burley tobacco. Agric Biol Chem. 38:891–892.
- Ghori MK, Ghaffari MA, Hussain SN, Aziz M, Sarwer W. 2016. Ethnopharmacological, phytochemical and pharmacognostic potential of genus *Heliotropium* L. Turk J Pharm Sci. 13:259–280.
- Guzmán-López O, Angel Trigos, Fernández FJ, De Jesus Yanez-Morales M, Saucedo-Castaneda G. 2007. Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adiposa*. World J Microbiol Biotechnol. 23:1473–1477.
- Hammiche V, Maiza K. 2006. Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. J Ethnopharmacol. 105:358–367.

- Hou Z-F, Tu Y-Q, Li Y. 2002. Three New Phe no lic com pounds from *Nepeta prattii*. *J Chin Chem Soc.* 49:255–258.
- Huang ZY, Huang B, Xiao CJ, Dong X, Jiang B. 2015. Two new labdane diterpenoids from the rhizomes of *Isodon yuennanensis*. *Nat Prod Res.* 29:628–632.
- Khatri Y, Girhard M, Romankiewicz A, Ringle M, Hannemann F, Urlacher VB, Hutter MC, Bernhardt R. 2010. Regioselective hydroxylation of norisoprenoids by CYP109D1 from *Sorangium cellulosum* So ce56. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88:485–495.
- Moongkarndi P, Kosem N, Luanratana O, Jongsomboonkusol S, Pongpan N. 2004. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. *Fitoterapia.* 75:375–377.
- Park JH, Lee DG, Yeon SW, Kwon HS, Ko JH, Shin DJ, Park HS, Kim Yong-Soon, Bang MH, Baek NI. 2011. Isolation of megastigmane sesquiterpenes from the silkworm (*Bombyx mori* L.) droppings and their promotion activity on HO-1 and SIRT1. *Arch Pharm Res.* 34:533–542.
- Ren Y, Shen L, Zhang DW, Dai SJ. 2009. Two new sesquiterpenoids from *Solanum lyratum* with cytotoxic activities. *Chem Pharm Bull.* 57:408–410.
- Rizk AM, Hammouda FM, Roder E, Wiedenfeld H, Ismail SI, Hassan NM, Hosseiny HA. 1998. Constituents of plants growing in Qatar. XIII. Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in *Heliotropium bacciferum* Forssk. *Sci Pharm.* 56:105–110.
- Sarg, TM, Ateya AM, Farrag, NM, El-Aziz, EM, ElShafae, AMZ. 1997. Phytochemical study and bioassay of some constituents from *Heliotropium bacciferum* forssk. *J Pharm Sci.* 6:74–80.
- Seo Y, Shin J, Cha HJ, Kim YA, Ahn JW, Lee BJ, Lee DS. 2003. A new monoterpene glucoside from *Portulaca oleracea*. *Bull Korean Chem Soc.* 24:1475–1477.
- Vizetto-Duarte C, Custódio L, Gangadhar KN, Lago JHG, Dias C, Matos AM, Neng N, Nogueira JMF, Barreira L, Albericio F, et al. 2016. Isolololide, a carotenoid metabolite isolated from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*, is cytotoxic and able to induce apoptosis in hepatocarcinoma cells through caspase-3 activation, decreased Bcl-2 levels, increased p53 expression and PARP cleava. *Phytomedicine.* 23:550–557.

## Phytochemical screening, quantitative analysis and antioxidant activity of *Lifago dielsii* Schweinj. & Muschl. (Asteraceae)

Aïssaoui Hanane<sup>1</sup>, Menad Ahmed<sup>2</sup>, Mezhoud Samia<sup>1</sup>, Ameddah Souad<sup>2</sup>, Mekkiou Ratiba<sup>1\*</sup>, Benayache Samir<sup>1</sup> and Benayache Fadila<sup>1</sup>

\*Corresponding author:

Mekkiou Ratiba

<sup>1</sup>Unité de recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Département de Chimie, Faculté des Sciences Exactes, Université Constantine 1, Route de Aïn El Bey, 25 000 Constantine, Algeria.

<sup>2</sup>Laboratoire de Biologie et Environnement, Faculté de Sciences de la Nature et de la vie, Université Constantine 1, Route de Aïn El Bey, 25 000 Constantine, Algeria.

### Abstract

This study is designed to assess the phytochemical screening of *Lifago dielsii* Schweinj. & Muschl., endemic species localized in the South of Algeria, and to evaluate their potential antioxidant properties using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and lipid peroxidation inhibition (LPO; Fe<sup>2+</sup>/ascorbic acid system) assays. The phytochemical screening of the aerial parts of *L. dielsii* revealed the presence of triterpenoids, saponins, alkaloids, coumarins, flavonoids and tannins. Three fractions [chloroform (CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (EtOAc), *n*-butanol (*n*-BuOH)] obtained from aqueous-MeOH extraction and the insoluble methanol (MeOH) part in water, were subjected to a quantitative determination of polyphenols and flavonoids. The antioxidant properties of all extracts were evaluated. The EtOAc fraction had the highest amount of total phenolic contents (TPC) compared to MeOH and *n*-BuOH) fractions whereas CHCl<sub>3</sub> fraction showed the lowest level. The *n*-BuOH fraction was richer in total flavonoids content (TFC) (88.81%) compared to EtOAc (37.76%) and MeOH extract (37.88%). The CHCl<sub>3</sub> fraction exhibited the weakest content of TFC (18.82%). The antioxidant activity revealed that the EtOAc extract seems to have the most powerful effect on the DPPH scavenging effect (IC<sub>50</sub>=47.80 ± 2.20 µg/ml) and on LPO inhibition (IC<sub>50</sub>=113.24±0.65µg/ml). These results showed that *L. dielsii* would be suggested as a promising alternative source of the natural anti-oxidative phenolic compounds.

**Keywords:** Phytochemical screening, phenolic content, flavonoid content, antioxidant activity, *Lifago dielsii*, Asteraceae.

### Introduction

The request for new natural antioxidants has greatly increased, due to the undesirable side effects of synthetic antioxidants and the potential health advantages of natural ones. Many studies have established an inverse relationship between intakes of popular medicinal plants and mortality, from many diseases, which may be attributed to their antioxidant properties [1]. As one of the most important plant antioxidant components, phenolic compounds are widely investigated in many medicinal plants and vegetable. The beneficial effects of phenolic compounds in human life is attributed to their antioxidant activity that mainly due to their redox properties which allow them to act as reducing agents, hydrogen donors [2]. The genus *Lifago* is, a monotypic genus, belonging to the Asteraceae family and representing by only one species: *L. dielsii* Schweinj. & Muschl. This species is an endemic shrub to Western Sahara [3]. In South Algeria, the aerial parts of *L. dielsii* are used in folk medicine as antidiabetic. To the best of our knowledge no scientific work on this plant has been performed yet. As a part of our continuing investigation of medicinal plants of Algeria [4-8], we report here in our preliminary research concerning

the phytochemical screening of the aerial parts of this species. Different extracts, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and *n*-BuOH, as well as insoluble MeOH part in water of the aerial parts of *L. dielsii* were subjected to quantitative determination of polyphenols and flavonoids as well as an evaluation of the antioxidant properties.

### Materials and Methods

#### Plant material

*L. dielsii* was collected at the flowering stage in April 2011 in Southern Algeria and authenticated by Mr. Abdelhakem (Director of forest, Bechar, Algeria) on the basis of Ozenda [3]. A voucher specimen has been deposited, under N LDC /2011, in the Herbarium of the VARENBIOMOL unit research, University of Constantine 1.

#### Phytochemical screening

Flowers and stems were separated, air-dried and subjected to qualitative tests in order to characterize several chemical groups using standard procedures [9-10].



## Preparation of plant extracts

The aerial parts of *L. dielsii* (2000 g) were macerated with MeOH/H<sub>2</sub>O (80:20 v/v) for 48 h three times. The crude extract was concentrated at room temp. and diluted with 900 ml H<sub>2</sub>O. The remaining aqueous solution was successively extracted with CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and *n*-BuOH.

## Determination of total phenolic content (TPC)

The amount of total phenolic in all extracts, (CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and *n*-BuOH) in addition to the insoluble MeOH part in water, was determined with Folin-Ciocalteu's reagent [11]. 5 mg of samples or a standard solution of gallic acid were weighed and dissolved in 5 ml of ethanol. A volume of 0.5 ml of Folin-Ciocalteu's reagent (previously diluted 2 fold with distilled water) was added into test tube containing samples and standard at room temperature for 5 min. 2.5 ml of sodium carbonate (20%) were added and left at room temperature around 90 minutes. The absorbance of mixture was evaluated at 765 nm using a UV-Vis spectrophotometer. The TPC was expressed as gallic acid equivalent (GAE) in mg/g of extract based on the calibration curve.

## Determination of total flavonoid content (TFC)

Total flavonoid content was estimated by the aluminum chloride (AlCl<sub>3</sub>) method [12]. 5 mg of samples or a standard solution of quercetin were weighed and dissolved in 5 ml of methanol. To 2 ml of sample, 2 ml of 2% AlCl<sub>3</sub> ethanol solution was added. After one hour, at room temperature, the absorbance was measured at 430 nm. TFC was calculated as quercetin equivalent in mg/g of extract (mgQE/g extract) based on the calibration curve.

## Antioxidant activity

### DPPH scavenging activity

The free radical scavenging activity of the extracts and ascorbic acid as positive control was determined using the stable radical DPPH [13] with minor modifications. Briefly, 1 ml of various concentrations of the extracts was added to 1 ml of freshly prepared DPPH solution (0.2 mM) in methanol. 60 minutes later, the absorbance was measured at 517 nm. Results were expressed as percentage of inhibition of the DPPH radical according to the following equation:

$$\% \text{ of inhibition} = \frac{(Abs_{CN} - Abs_{ext})}{(Abs_{CN})} \times 100.$$

Where  $Abs_{CN}$  is the absorbance of the control reaction and  $Abs_{ext}$  is the absorbance in presence of the extracts.

### Inhibition of LPO induced by Fe<sup>2+</sup>/ascorbic acid system

The reaction mixture containing rat liver homogenate (0.1 ml, 25% w/v) in Tris-HCl (30 mM), ferrous ammonium sulfate (0.16 mM), ascorbic acid (0.06 mM) and different concentrations of the extract in a final volume of 0.5 ml was incubated for 1h at 37 °C and the

resulting thiobarbituric reacting substance (TBARS) was measured at 532 nm [14]. Trolox was used as reference. Results were calculated, as percentage of inhibition, according to the following equation:

$$\% \text{ of inhibition} = \frac{(Abs_{CN} - Abs_{ext})}{(Abs_{CN})} \times 100.$$

Where  $Abs_{CN}$  is the absorbance of the control reaction and  $Abs_{ext}$  is the absorbance in presence of the extracts.

## Statistical analysis

All assays were estimated in triplicates and results were presented as means ± standard deviation (SD). IC<sub>50</sub> value which means the effective concentration that proved 50% of activity was calculated for each assay. Statistical comparisons were done with Student's test. Differences were considered to be significant at  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

### Phytochemical screening

Table1: Phytochemical screening from *L. dielsii* (Asteraceae)

Chemical groups	Sample	
	Flowers	Stems
Terpenes	-	-
Sterols	-	-
Triterpenes	+	+
Saponins	+	+
Coumarins	+	+
Flavonoids	+	+
Leucoanthocyan	-	+
Anthocyan	-	-
Quinones	-	-
Tannins	+	+
Alkaloids	+	+

Qualitative phytochemical investigation revealed that flowers and stems contained several phytoconstituents such as triterpenes, saponins, coumarins, tannins, alkaloids and flavonoids. (Table1). These bioactive components are naturally occurring in most plant materials and known to possess interesting biological activity such as antioxidant, anticarcinogenic, antiviral, antibacterial, antidiabetic, anti-inflammatory [15-18].

### TPC and TFC

TPC and TFC of all *L. dielsii* extracts are shown in figure 1 The EtOAc extract (112.33 ± 20.01 mgGAE/g extract) was found to have the highest TPC compared to *n*-BuOH (81.09 ± 19.67 mgGAE/g extract) and MeOH extracts (78.36 ± 9.74 mgGAE/g extract), whereas CHCl<sub>3</sub> had showed the lowest level. While the *n*-BuOH extract (72.02 ± 9.21 mgQE/g extract) was found to have



the highest TFC, compared to EtOAc ( $42.42 \pm 2.17$  mgQE/g extract) and MeOH extracts ( $29.68 \pm 4.99$  mgQE/g extract).  $\text{CHCl}_3$  extract had also the lowest TFC ( $7.98 \pm 2.24$  mgQE/g extract).

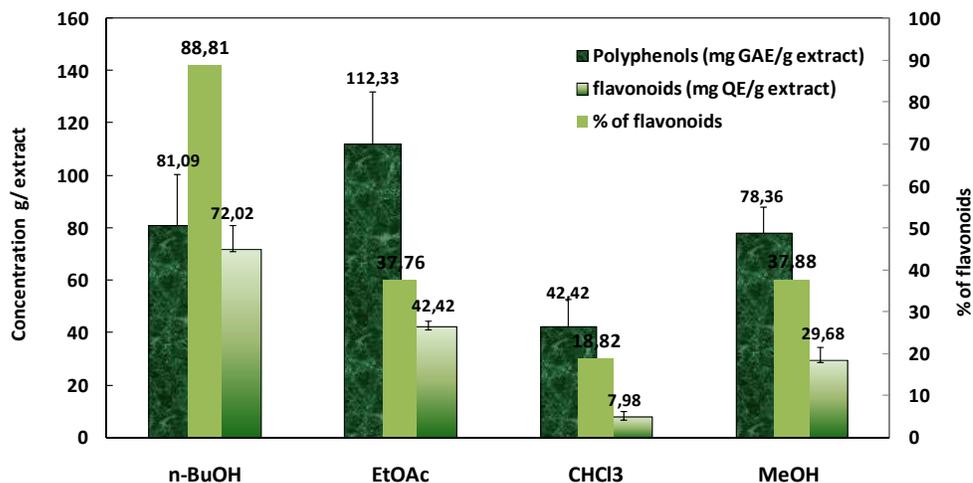


Figure 1: TPC (mgGAE/g extract), TFC (mgQE/g extract), and flavonoids percentage (%) of *L. dielsii* extracts.

Each value represents a mean $\pm$ SD (n=3),  $p < 0.05$ .

The obtained results showed that polyphenols of n-BuOH fraction were richer in flavonoids (88.81 %) than EtOAc (37.76 %) and MeOH (37.88%) fractions. Our results are in good agreement with those obtained by Elgabr & al. (2010) and Öztürk & al. (2009) [19-20]. Polyphenols are broadly distributed in the plant kingdom and are the most abundant secondary metabolites found in plants. The difference in each flavonoid fraction results from the variation in the number and substitution patterns of the hydroxyl groups of these groups. This structural diversity allows them to exhibit many biological activities. The potent antioxidant activity of polyphenols and flavonoids is their ability to scavenge hydroxyl and lipid peroxy radicals. The polarity of the solvent systems used in the extraction could affect the contents of phenolic and flavonoid components [21]. Consequently, the levels of these components that existed in the various solvent extract varied significantly. Our results showed that phenolic and flavonoid compounds are in greater proportion in polar and semi-polar fractions.

## Antioxidant activity

### DPPH scavenging activity

In order to evaluate the antioxidant activities of the four extracts of *L. dielsii*, we have used electron transfer based on DPPH scavenging capacity. This assay measures the capacity of an antioxidant to reduce an oxidant that, when reduced, changed color

reproducibly. The degree of color change from purple to yellow was correlated with antioxidant potential in extracts.

Figure 2 showed clearly that EtOAc extract was more effective than all the other extracts, and this effect increased until reaching the maximum (78.53 %) at 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . At 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  there was no significant difference between EtOAc and n-BuOH. The  $\text{CHCl}_3$  extract (10.66 %) exhibited the weakest effect.

It is also useful to estimate the median inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ), parameter widely used to measure the antioxidant power, and which is defined as the amount of antioxidant concentration needed to reduce the DPPH concentration by the factor of two. Highly effective antioxidant is characterized by low  $\text{IC}_{50}$  value and vice versa. The  $\text{IC}_{50}$  values for the four extracts are shown in the figure 4. It can be observed that the ascorbic acid utilized as standard exhibited the highest scavenging effect with  $21.37 \pm 0.29 \mu\text{g}/\text{ml}$   $\text{IC}_{50}$  value. The order of increasing  $\text{IC}_{50}$  for the extracts was EtOAc ( $47.80 \pm 2.20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) > n-BuOH ( $73.31 \pm 1.02 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) > MeOH ( $512.11 \pm 109.56 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) (Table 2). Since the polarity of  $\text{CHCl}_3$  is much weaker than the other solvents, it may contain much non polar components. Many attempts to explain the structure activity relationship of some phenols have been reported in the literature [22]. Halliwell and Guttridge (1999) reported that the power in the anti-oxidation process results first from the ability to prevent the autoxidation of free radical mediates oxidation of the substrates in low concentration and second that the resulting radical after scavenging must be stable.

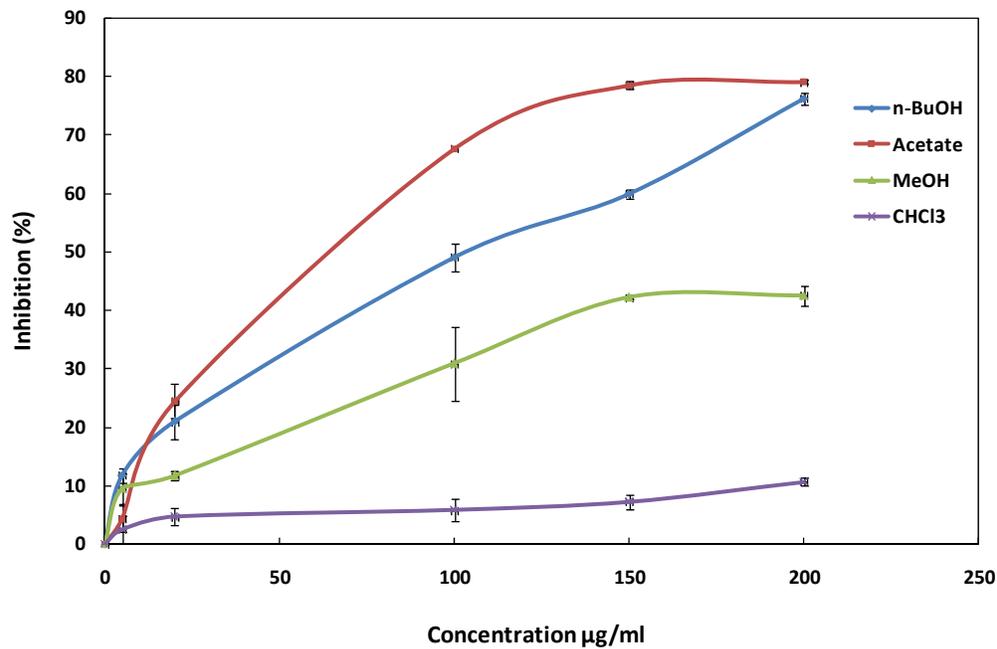


Figure 2: DPPH scavenging activities of *L. dielsii* extracts and standard. Each value represents a mean  $\pm$  SD (n=3),  $p < 0.05$

### Inhibition of LPO induced by Fe<sup>2+</sup>/ascorbic acid system

Lipid oxidation occurs when oxygen reacts with lipid in a series of free radical chain reactions that lead to complex chemical changes. Oxidation of lipids not only disturbs the nutritional quality of food, but it is also associated with many diseases [23]. Figure 3 showed

that at 200 µg/ml, EtOAc (63.25  $\pm$  0.74 %) possess better inhibition than n-BuOH (54.25  $\pm$  1.55%) and CHCl<sub>3</sub> (43.11  $\pm$  0.29%). At 300 µg/ml, EtOAc (80.65  $\pm$  0.59 %) which was better inhibitor of LPO exhibited the same effect as Trolox (81.82  $\pm$  0.29 %).

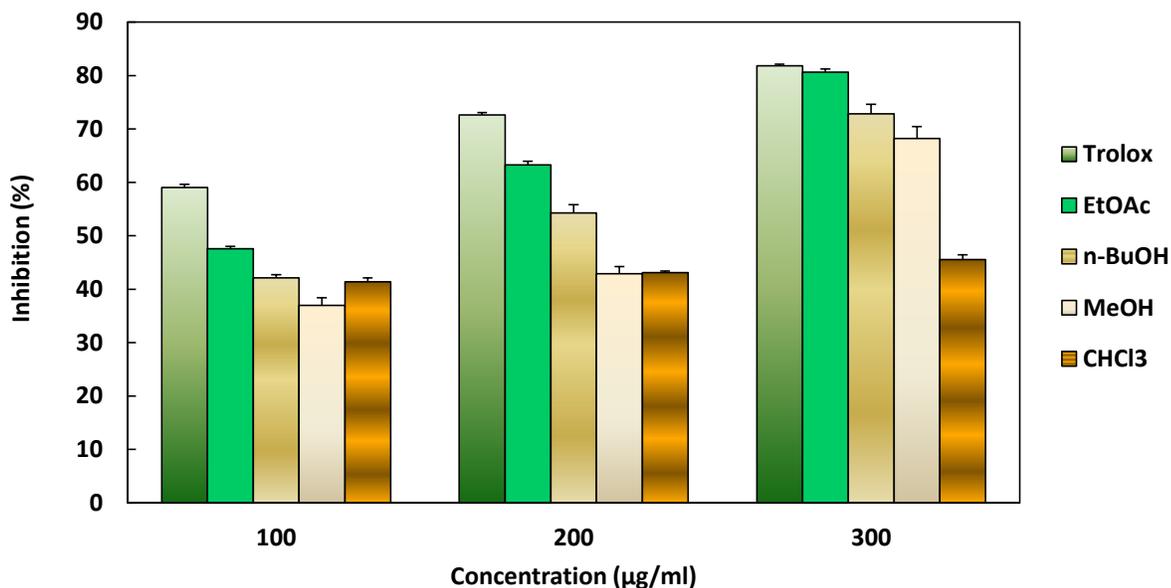


Figure 3: LPO inhibition (%) *L. dielsii* and standard. Each value represents a mean  $\pm$  SD (n=3),  $p < 0.05$ .

Increased LPO is generally believed to be an important underlying cause of inhibition of antioxidant stress. LPO is regarded as one of the basic mechanism of damage tissue [24]. Our results revealed that EtOAc, *n*-BuOH, and MeOH extracts notably reduced TBARS

levels induced in liver homogenates by Fe<sup>2+</sup>/ascorbate system) with IC<sub>50</sub> values 113.24 ± 0.65, 143.14 ± 0.77, 184 and 79 ± 6.74 respectively (Table 2).

**Table 2: DPPH and LPO IC<sub>50</sub> values of antioxidant activities of *L. dielsii* and standards (Trolox and Ascorbic Acid). Each value represents a mean ± SD (n=3), p<0.05.**

Extracts and standards	IC <sub>50</sub>	
	LPO	DPPH
EtOAc	113.24±0.65	47.80±2.20
<i>n</i> -BuOH	143.14±0.77	73.31±1.02
MeOH	184.79±6.74	512.11±109.56
CHCl <sub>3</sub>	861.31±77.10	-----
Ascorbic acid	-----	21.37±0.29
Trolox	65.06±3.06	-----

The EtOAc extract which had the highest TPC but lower TFC (37.76 %) exhibited a good LPO inhibition and DPPH scavenging effect. This effect may be explained by the presence of flavonoid type which possesses an ideal structure for decomposing radicals. *n*-BuOH extract which involves the highest TFC (88.81 %) exhibited more LPO inhibition and DPPH scavenging effect than MeOH although the no difference between their TPC. It is reasonable to conclude that the antioxidant activity is not related only with TPC/TFC level.

## Conclusion

The phytochemical screening of this investigation attested the presence of several secondary metabolites in *L. dielsii*. The fractionation of MeOH extract into different phases (CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and *n*-BuOH) solvents resulted into an interesting distribution of TPC and TFC. Some differences in the response of both antioxidant assays to each are noticed. The *n*-BuOH extract provide more antioxidant than MeOH in spite of their comparable content of TPC. The CHCl<sub>3</sub> extract exhibited the weakest effect. The EtOAc extract which had the highest TPC was the most powerful in antioxidant activity. The possible synergism of flavonoids with other compounds in the extract may be responsible for these properties. The obtained results indicated that *L. dielsii* would be a promising alternative source of the natural anti-

oxidative phenolic compounds. Further research work must be carried out in order to isolate bioactive molecules responsible for their activity.

## Author's contribution

MR is supervisor of this study participated in the design conception of this study and involved in drafting the manuscript. MZ collected the plant and preparing the plant extracts. AH prepared the plant extracts and phytochemical studies. AS and MA, have an equal contribution in carried antioxidant activity and statistical analysis, and helping in the drafting the manuscript. BF and BS have general supervision of the research group.

## Acknowledgements

The authors wish to express thanks to the Algerian minister of higher education and scientific research (MESRS) for financial support and to Mr Abdelhakem (Director of forest, Béchar, Algeria) for the identification of the plant material.

## References

- [1]. Shams Ardekani MR, Hajimahmoodi M, Oveisi MR, Sadeghi N, Jannat B, Ranjbar AM, Gholam N, Moridi T. Comparative antioxidant activity and total flavonoid content of Persian pomegranate (*Punicagranatum* L.) cultivars. Iranian J. Pharm. Res.2011; 10(3): 519-24.
- [2]. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine. 1996 ; 20 : 933–956.
- [3]. Ozenda P. Flore du Sahara Septentrional et Central, Centre National de la Recherche Scientifique, Imprimerie Louis-Jean. H.A. 1958 ; pp432.
- [4]. Seghiri R, Boumaza O, Mekkiou R, Benayache S, Mosset P, Quintana J, Estévez F, León F, Bermejo J, Benayache F. A flavonoid with cytotoxic activity and other constituents from *Centaurea africana*. Phytochem. Lett. 2009 ; 2 : 114-118.



- [5]. Mezache N, Bendjedou D, Sata D, Mekkiou R, Benayache S, Benayache F. Secondary metabolites from *Centaurea lippii* (Asteraceae). Chem. Nat. Comp. 2010; 46: 801-802.
- [6]. Hammoud L, Seghiri R, Benayache S, Mosset P, Lobstein A, Chaabi M, León F, Brouard I, Bermejo J, Benayache F. A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. walliana M. Nat. Prod. Res. 2012; 26: 203-208.
- [7]. Mezhoud S, Derbré S, Ameddah S, Mekkiou R, Boumaza O, Seghiri R, Benayache S, Richomme P, Benayache F. Antioxidant activity and chemical constituents of *Warionia saharæ* Benth. & Coss. (Compositae) from Algeria. Int. J. Med. Arom. Plants. 2012 ; 2(3) : 509-513.
- [8]. Bicha S, Chalard P, Hammoud L, León F, Brouard I, Garcia VP, Lobstein A, Bentamene A, Benayache S, Bermejo J, Benayache F. Rec. Nat. Prod. 2013; 7(2) : 114-118
- [9]. Harborne JB. Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis, 3rd Edn. Chapman and Hall, London, 1998; 235.
- [10]. Khandelwal KR. Preliminary phytochemical screening, in Practical Pharmacognosy Techniques and Experiments. 8th edn. Nirali Publication, Pune, 2001; 149-156.
- [11]. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymol. 1999; 299:152-178.
- [12]. Ordon Ez AAL, Gomez JD, Vattuone MA, Isla MI. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swart extracts. Food Chem. 2006; 97: 452-458.
- [13]. Magalhães LM, Santos M, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Automatic method for determination of total antioxidant capacity using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. Anal. Chim. Acta. 2006; 558:310-318
- [14]. Aiyegoro OA, Okoh AI. Preliminary phytochemical screening and *In vitro* antioxidant activities of the aqueous extract of *Helichrysum longifolium* DC. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2010; 10(21): 1-8.
- [15]. Adebayo AH, Tan NH, Akindahunsi AA, Zeng GZ, Zhang YM. Anticancer and antiradical scavenging activity of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). Pharmacognosy Magazine, 2010; 6(21): 62-66.
- [16]. Visintini Jaime MF, Redko F, Muschietti LV, Campos RH, Martino VS, Cavallaro LV. In vitro antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. Virology Journal, 2013; 10: 245
- [17]. Mofor Teugwa1 C, Chouadeu Mejiato1 P, Zofou D, Tugnoua Tchinda B, Fekam Boyom F. Antioxidant and antidiabetic profiles of two African medicinal plants: *Picralima nitida* (Apocynaceae) and *Sonchus oleraceus* (Asteraceae). BMC Complementary and Alternative Medicine. 2013; 13: 175.
- [18]. Gupta A, Naraniwal M, Kothari V. Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. International Journal of Applied and Natural Sciences (IJANS). 2012; 1(1): 8-26.
- [19]. Elgabr MN, Mekkiou R, Ameddah S, Menad A, Boumaza O, Seghiri R, Benayache S, Benayache F. Antioxydant activities from the aerial parts of *Pulicaria jaubertii*. Advances in Natural and Applied Sciences. 2010; 4(1): 63-70.
- [20]. Öztürk N, Tunçel M, Poto lu-Erkara . Phenolic compounds and antioxidant activities of
- [21]. some *Hypericum* species: A comparative study with *H. Perforatum*. Pharmaceutical Biology. 2009; 47(2): 120-127.
- [22]. Ghasemzadeh A, Jaafar Hawa ZE, Rahmat A. Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale Roscoe*) extracts. Journal of Medicinal Plants Research. 2011; 5(7): 1147-1154.
- [23]. Halliwell B, Gutteridge J. The Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, Oxford. 1999.
- [24]. Gago-Dominguez M, Jiang X, Esteban CJ. Lipid peroxidation, oxidative stress genes and dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. Breast Cancer Research 2007; 9(201): 1-11.
- [25]. Min B, Ahn DU. Mechanism of Lipid Peroxidation in Meat and Meat Products -A Review Food Sci. Biotechnol. 2005; 14(1): 152-163

