

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université El-Hadj Lakhdar - BATNA 1

Faculté des Sciences de la Matière

Département de Chimie



# THÈSE

En vue de l'obtention du  
Diplôme de Doctorat

Présentée par :

M<sup>elle</sup> MOUFFOUK SOUMIA

Thème :

---

**Etude chimique de deux plantes :**  
***Euphorbia atlantica* (Euphorbiaceae)**  
**et *Erinacea anthyllis* (Fabaceae)**

---

*Spécialité : Chimie organique*

Soutenue le : 29/06/2017

**Devant le jury :**

Président :	<b>BENKHALED Mohammed</b>	Professeur	Université Batna-1
Rapporteur :	<b>HABA Hamada</b>	Professeur	Université Batna-1
Examineurs :	<b>ATMANI Djebbar</b>	Professeur	Université Bejaia
	<b>AKKAL Salah</b>	Professeur	Université Constantine-1
	<b>ABERKANE Mohamed Cherif</b>	Maître de conférences A	Université Batna-1
	<b>BITAM Fatma</b>	Maître de conférences A	Université Batna-2

# Remerciements

Avant tout, je remercie Dieu, le tout puissant, pour m'avoir donné la force, le courage et la patience. Sans lui, cette thèse et ce jour n'auraient pu exister.

Ce travail de recherche en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences, spécialité chimie organique, a été réalisé au sein du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) de la faculté des sciences de la matière université de Batna-1, sous la direction du Professeur **HABA Hamada**.

J'exprime tout d'abord mes profonds remerciements à mon directeur de thèse, Monsieur **HABA Hamada** Professeur au département de chimie à l'université de Batna-1 pour m'avoir accueilli au sein de son groupe de recherche et m'avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique. Je le remercie pour sa disponibilité et ses précieux conseils. Merci de m'avoir consacré du temps pour corriger ma thèse, vous m'avez guidé pendant ces années et éclairé sur les voies les plus intéressantes à prendre. Ce travail n'aurait pas été le même sans votre encadrement.

Mes vifs remerciements vont également à Monsieur le Professeur **BENKHALED Mohammed** de l'université de Batna-1 pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance.

J'aimerais également remercier vivement Monsieur le Professeur **ATMANI Djebbar** de l'université de Bejaia, Monsieur le Professeur **AKKAL Salah** de l'université de Constantine-1 et Monsieur le Docteur **ABERKANE Mohamed Cherif**, Maître de conférences A de l'université de de Batna-1 et mademoiselle le Docteur **BITAM Fatma**, Maître de conférences A de l'université de Batna-2 pour avoir accepté de faire partie du Jury de ma thèse de Doctorat.

J'exprime mes sincères remerciements au Docteur **MARCOURT Laurence** et Professeur **WOLFENDER Jean-Luc** de l'université de Lausanne, Genève, Suisse, et Professeur **GOMEZ-RUIZ Santiago** de l'université Rey Juan Carlos, Madrid, Espagne, pour leur disponibilité et aide en me permettant la réalisation des spectres RMN 1D et 2D et Masse.

J'exprime ma profonde gratitude au professeur **OUJJEH H Bachir** du département d'agronomie de l'institut des sciences vétérinaires et agronomiques de l'Université de Batna-1, pour l'identification des deux espèces étudiées dans le cadre de cette thèse de Doctorat, *Erinacea anthyllis* Link et *Euphorbia atlantica* Coss.

J'adresse mes sincères remerciements au Docteur **BOUDIAF Kaouthar** du département de biologie de l'université de Batna-2, pour m'avoir aidé dans la réalisation de l'activité anti-oxydante, au sein du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE). J'aimerais aussi la remercier pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa grande générosité.

Grand et respectueux remerciements vont à Madame **MOUFFOUK Sara** enseignante au département de biologie à l'université de Batna-2, pour son aide constante, sa marque de sympathie et ses précieux conseils pour la réalisation de l'activité antibactérienne.

A ma très chère Sœur **MOUFFOUK Chaima** doctorante en biochimie moléculaire à l'université de Batna-2, je dis merci pour ton aide et tes précieux conseils dans la rédaction de la partie biologique. Ta disponibilité et ta serviabilité resteront à jamais dans ma mémoire.

A Messieurs **KORRA Nacer** et **SOLTANE Abdeslam** responsables des laboratoires pédagogiques au département de chimie à l'université de Batna-1, je voulais vous exprimer toute ma reconnaissance pour votre contribution à la réalisation de l'activité anti-oxydante et soyez assurés de mon profond respect et de ma vive reconnaissance pour m'avoir fait bénéficier de votre expérience et de votre rigueur scientifique et professionnelle.

Je remercie également tous mes collègues du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement LCCE de la faculté des sciences de la matière université de Batna-1 particulièrement **Badra, Sawsen, Sonia, Afaf, Chahra, Sabrina, Hasna, Mouna, Amira, Abla, Saliha** et **Ibrahim** pour les bons moments passés ensemble et pour leur disponibilité et gentillesse.

# Dédicaces

*A Dieu (ALLAH)*

*l'Unique, le Tout-Puissant, le Clément et le Miséricordieux,  
« Qu'il nous couvre de sa bénédiction ». AMEN !*

*Au Prophète Mouhamed*

*« Que la paix et la bénédiction de dieu soit sur lui »  
Notre guide et notre exemple bien-aimé.  
Qu'il nous oriente dans le droit chemin.*

*A Ma Très Chère Mère*

*Qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien,  
tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute  
son assistance et sa présence dans ma vie, qu'elle reçoit à  
travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes  
sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorde santé,  
longue vie et bonheur.*



*A Mon Cher Père*

*Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.*

*Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.*

*A la mémoire de Mon Grand Père*

*ABDELKADER MOUFFOUK*

*Qui a été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je vous dédie aujourd'hui ma réussite.*

*Que Dieu, le miséricordieux, vous accueille dans son éternel paradis.*

*A Ma très chère Sœur Asma*

*Je dis merci pour ta disponibilité, ta serviabilité et ta marque de sympathie qui resteront à jamais dans ma mémoire.*

*A mes chères sœurs*

*Samia, Sara, Asma, Chaima et Nada pour leurs encouragements*

*À mon cher frère Badraddinne*

*A mes chers petits*

*Nadine, Salsabile, Achraf, takwa hibat el rahman et Omar*

# Abréviations

<b>AcOEt :</b>	Acétate d'éthyle
<b>EP :</b>	Ether de pétrole
<b>MeOH :</b>	Méthanol
<b>CHCl<sub>3</sub> :</b>	Chloroforme
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Dichlorométhane
<b>EtOH :</b>	Ethanol
<b><i>n</i>-BuOH</b>	<i>n</i> -Butanol
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> :</b>	Sulfate de sodium
<b>DMSO :</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>CDCl<sub>3</sub> :</b>	Chloroforme deutéré
<b>CD<sub>3</sub>OD :</b>	Méthanol deutéré
<b>(CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO</b>	Acétone deuturée
<b>CCM :</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>CC :</b>	Chromatographie sur colonne ouverte
<b>CCE :</b>	Chromatographie sur couche épaisse
<b>VLC :</b>	Chromatographie liquide sous vide
<b>SiO<sub>2</sub> :</b>	Gel de silice normale
<b>RP-18 :</b>	Silice greffée en C-18
<b><i>s</i> :</b>	Singulet
<b><i>sl</i> :</b>	Singulet large
<b><i>d</i> :</b>	Doublet
<b><i>dd</i> :</b>	Doublet de doublets
<b><i>td</i> :</b>	Triplet de doublets
<b><i>m</i> :</b>	Multiplet
<b><i>dq</i> :</b>	Doublet de quadruplets
<b><i>ax</i> :</b>	Axial
<b><i>éq</i></b>	Equatorial
<b>RMN <sup>1</sup>H :</b>	Résonance magnétique nucléaire du proton
<b>RMN <sup>13</sup>C :</b>	Résonance magnétique nucléaire du carbone 13
<b>HMBC :</b>	Heteronuclear multiple bond correlation

<b>HSQC :</b>	Heteronuclear single quantum correlation
<b>COSY H-H :</b>	Correlation spectroscopy H-H
<b>HR-ESI-MS :</b>	Spectrométrie de masse à haute résolution
<b><math>\delta</math> :</b>	Déplacement chimique en ppm
<b><i>J</i> :</b>	Constante de couplage en <i>Hz</i>
<b>uma :</b>	Unité de masse atomique
<b><i>m/z</i> :</b>	Masse/charge d'un ion
<b>R :</b>	Radical
<b>Glc :</b>	Glucose
<b>Gal :</b>	Galactose
<b>Rha</b>	Rhamnose
<b>CoA :</b>	Coenzyme-A
<b>°C :</b>	Degré celsius
<b>F :</b>	Fraction
<b>ppm :</b>	Partie par million
<b>Hz :</b>	Hertz
<b>Ac :</b>	Acétyl
<b>OMe :</b>	Méthoxyl
<b>ATCC :</b>	American type culture collection
<b>DPPH :</b>	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
<b>nm :</b>	Nanomètre
<b>ERO :</b>	espèces oxygénées réactives
<b>NADPH oxydase :</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase
<b>SOD :</b>	Superoxyde dismutase
<b>CAT :</b>	Catalase
<b>GPX :</b>	Glutathion peroxydase
<b>GSH :</b>	Glutathion
<b>GSSG :</b>	Disulfure de glutathion
<b>EGA :</b>	Equivalent gramme d'acide galique
<b>EQ :</b>	Equivalent de la quercétine
<b>EC<sub>50</sub> :</b>	Concentration effective à 50 %
<b>IC<sub>50</sub> :</b>	Concentration efficace à 50 %
<b>APR :</b>	Pouvoir anti-radicalaire relatif

<b>BHT</b>	Hydroxytoluène butylé
<b>FRAP</b>	Pouvoir réducteur du fer
<b>PPM</b>	Phosphomolybdate
<b>PR</b>	Pouvoir réducteur
<b>PA</b>	Pouvoir anti-oxydant
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. albus</i>	<i>Staphylococcus albus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ATB :</b>	Antibiotique

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I- Rappel bibliographique</b>	
I-1- Position systématique de la famille Fabaceae .....	5
I-1-1- Etymologie.....	5
I-1-2- Distribution de la famille Fabaceae .....	5
I-1-3- Caractères botaniques de la famille Fabaceae.....	6
I-1-4- Intérêts économique et thérapeutique des Fabaceae.....	7
I-1-5- Présentation du genre <i>Erinacea</i> .....	8
I-1-6- Espèce <i>Erinacea anthyllis</i> Link.....	8
I-1-6-1- Etymologie .....	8
I-1-6-2- Classification systématique .....	8
I-1-6-3- Distribution de l'espèce <i>Erinacea anthyllis</i> .....	8
I-1-6-4- Noms communs .....	8
I-1-6-5- Description botanique .....	9
I-1-6-6- Usage traditionnel de l'espèce <i>Erinacea anthyllis</i> Link.....	10
I-1-7- Etudes chimiques antérieures sur la tribu Genisteae .....	11
I-1-7-1- Alcaloïdes .....	11
I-1-7-2- Flavonoïdes .....	15
I-2- Position systématique de la famille Euphorbiaceae .....	19
I-2-1- Etymologie .....	20
I-2-2- Caractères botaniques de la famille Euphorbiaceae .....	20
I-2-3- Ethnomédecine des Euphorbiaceae .....	21
I-2-3-1- Effets toxiques des Euphorbiaceae .....	21
I-2-3-2- Effets thérapeutiques des Euphorbiaceae .....	21
I-2-4- Intérêt économique de la famille Euphorbiaceae .....	22
I-2-5- Présentation du genre <i>Euphorbia</i> .....	23
I-2-6- Espèce <i>Euphorbia atlantica</i> Coss. ....	23
I-2-6-1- Classification systématique .....	23
I-2-6-2- Noms communs .....	24

I-2-6-3- Description botanique .....	24
I-2-6-4- Utilisation en médecine traditionnelle .....	25
I-2-6-5- Toxicité .....	25
I-2-7- Etudes phytochimiques antérieures sur le genre <i>Euphorbia</i> .....	25

## Chapitre II- Généralités sur les isoflavonoïdes

II-1- Isoflavonoïdes .....	42
II-2- Biosynthèse des isoflavonoïdes .....	42
II-3- Classification des isoflavonoïdes .....	44
II-4- Distribution des isoflavonoïdes .....	45
II-5- Activités biologiques des isoflavonoïdes .....	45

## Chapitre III- Etudes phytochimiques

III-1- Etude phytochimique de l'espèce <i>Erinacea anthyllis</i> Link.....	46
III-1-1- Extraction .....	46
III-1-2- Fractionnement et purification des extraits AcOEt et <i>n</i> -BuOH.....	47
III-1-3- Identification structurale des composés isolés .....	48
III-1-3-1- Identification structurale du composé <b>Ea1</b> .....	49
III-1-3-2- Identification structurale du composé <b>Ea2</b> .....	60
III-1-3-3- Identification structurale du composé <b>Ea3</b> .....	70
III-1-3-4- Identification structurale du composé <b>Ea4</b> .....	76
III-1-3-5- Identification structurale du composé <b>Ea5</b> .....	81
III-1-3-6- Identification structurale du composé <b>Ea6</b> .....	88
III-1-3-7- Identification structurale du composé <b>Ea7</b> .....	94
III-1-3-8- Identification structurale du composé <b>Ea8</b> .....	102
III-1-3-9- Identification structurale du composé <b>Ea9</b> .....	107
III-1-3-10- Identification structurale du composé <b>Ea10</b> .....	113
III-1-3-11- Identification structurale du composé <b>Ea11</b> .....	119
III-1-3-12- Identification structurale du composé <b>Ea12</b> .....	128
III-1-3-13- Identification structurale du composé <b>Ea13</b> .....	135
III-1-3-14- Identification structurale du composé <b>Ea14</b> .....	142
III-1-3-15- Identification structurale du composé <b>Ea15</b> .....	149

III-1-3-16- Identification structurale du composé <b>Ea16</b> .....	153
III-1-3-17- Identification structurale du composé <b>Ea17</b> .....	160
III-1-3-18- Identification structurale du composé <b>Ea18</b> .....	168
III-1-3-19- Identification structurale du composé <b>Ea19</b> .....	176
III-1-3-20- Identification structurale du composé <b>Ea20</b> .....	177
III-1-3-21- Identification structurale du composé <b>Ea21</b> .....	179
III-1-4- Conclusion .....	185
III-2- Etude phytochimique de l'espèce <i>Euphorbia atlantica</i> Coss.....	189
III-2-1- Extraction .....	189
III-2-2-Fractionnement et purification des extraits EP et AcOEt .....	190
III-2-3- Identification structurale des composés isolés .....	191
III-3-3-1- Identification structurale du composé <b>MS1</b> .....	191
III-3-3-2- Identification structurale du composé <b>MS2</b> .....	205
III-3-3-3- Identification structurale des composés <b>MS3</b> et <b>MS4</b> .....	210
III-3-3-4- Identification structurale du composé <b>MS5</b> .....	214
III-3-3-5- Identification structurale du composé <b>MS6</b> .....	218
III-3-3-6- Identification structurale du composé <b>MS7</b> .....	224
III-3-3-7- Identification structurale du composé <b>MS8</b> .....	225
III-2-4- Conclusion .....	225

## Chapitre IV- Activités biologiques

### Rappel bibliographique

IV-1- Stress oxydatif et anti-oxydants .....	228
IV-1-1-Radicaux libres.....	228
IV-1-2-Stress oxydant et ses conséquences biologiques .....	229
IV-1-3-Maladies liées au stress oxydatif.....	229
IV-1-4-Anti-oxydants.....	229
IV-1-4-1-Systèmes enzymatiques .....	230
IV-1-4-2-Systèmes non enzymatiques.....	230

IV-2- Activité antibactérienne .....	230
IV-2-1- Généralités sur la thérapeutique des infections bactériennes.....	230
IV-2-2- Types de bactéries infectives .....	231
IV-2-3- Micro-organismes utilisés dans les tests antimicrobiens.....	232
IV-2-4- Principales substances antimicrobiennes.....	234

### **Résultats et discussion**

IV-3-Résultats et discussion.....	236
IV-3-1- Dosage des polyphénols totaux .....	236
IV-3-2- Dosage des flavonoïdes .....	236
IV-3-3- Evaluation de l'activité anti-oxydante .....	238
IV-3-3-1- Test de piégeage du radical libre DPPH .....	238
IV-3-3-1-a-Résultats de l'activité anti-oxydante .....	239
IV-3-3-1-b- Discussion de l'activité anti-oxydante par DPPH .....	243
IV-3-3-2- Test de pouvoir réducteur du fer (FRAP) .....	244
IV-3-3-2-a- Résultats du test FRAP .....	244
IV-3-3-2-b- Discussion du test FRAP .....	245
IV-3-3-3- Test de phosphomolybdate (PPM) .....	246
IV-3-4- Résultats de l'activité antibactérienne.....	247
IV-3-4-a- Activité antibactérienne de la plante <i>Erinacea anthyllis</i> .....	247
IV-3-4-b-Activité antibactérienne de la plante <i>Euphorbia atlantica</i> .....	249
IV-3-5-Discussion de l'activité antibactérienne .....	251
IV-4- Conclusion .....	255
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>257</b>

## **Chapitre V- Partie expérimentale**

### **Partie phytochimique : Extraction-purification et données spectrales**

V-1- Matériels et appareillage .....	261
V-1-1- Récolte des plantes étudiées .....	261
V-1-2- Chimie extractive.....	261



V-1-2-1- Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	261
V -1-2-2- Chromatographie liquide sous vide (VLC) .....	261
V -1-2-3- Chromatographie sur colonne ouverte (CC) .....	261
V-1-3- Chimie structurale .....	262
V-1-3-1- Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) .....	262
V-1-3-2- Spectrométrie de masse à haute résolution (HR-ESI-MS).....	262
V-1-3-3- Spectrométrie UV-Visible .....	262
V-1-3-4- Pouvoir rotatoire .....	262
V-1-4- Etude de l'espèce <i>Erinacea anthyllis</i> Link. ....	263
V-1-4-1- Extraction de l'espèce <i>E. anthyllis</i> Link. ....	263
V-1-4-2- Etude de l'extrait AcOEt de l'espèce <i>Erinacea anthyllis</i> Link. ....	263
V-1-4-2-1- Purification .....	264
V-1-4-3-Etude de l'extrait <i>n</i> -butanolique de la plante <i>E. anthyllis</i> Link. ....	270
V-1-4-3-1- Purification .....	271
V-1-5- Composés isolés de l'espèce <i>Erinacea anthyllis</i> .....	273
V-1-6- Etude de l'espèce <i>Euphorbia atlantica</i> Coss. ....	280
V -1-6-1- Extraction de l'espèce <i>E. atlantica</i> Coss. ....	280
V-1-6-2- Etude de l'extrait EP de l'espèce <i>Euphorbia atlantica</i> Coss. ....	281
V-1-6-2-1- Purification .....	282
V-1-6-3- Etude de l'extrait AcOEt de l'espèce <i>Euphorbia atlantica</i> Coss. ....	284
V-1-6-2-2- Purification .....	285
V -1-7- Composés isolés de l'espèce <i>Euphorbia atlantica</i> .....	288

## **Partie biologique : Activités biologiques**

V-2- Matériel et méthodes .....	291
V-2-1-Matériel végétal.....	291
V-2-1-2- Préparation des extraits végétaux .....	291
V-2-2- Dosage des polyphénols totaux .....	291
V-2-3- Dosage des flavonoïdes .....	292
V-2-4- Evaluation de l'activité anti-oxydante .....	292
V-2-4-1- Test de piégeage du radical libre DPPH .....	292
V-2-4-2- Teste de phosphomolybdate (PPM) .....	293
V-2-4-3- Pouvoir réducteur du fer (FRAP) .....	294

V-2-5- Analyse statistique .....	294
V-2-6- Mise en évidence de l'activité antibactérienne .....	295
V-2-6-1- Principe .....	295
V-2-6-2- Technique utilisée .....	295
V-2-6-3- Matériel microbien utilisé .....	295
V-2-6-4- Vérification de la pureté des bactéries .....	295
V-2-6-5- Préparation de l'inoculum .....	296
V-2-6-6- Réalisation des tests antibactériens .....	296
V-2-6-7- Estimation de l'activité antibactérienne des extraits .....	297
V-2-6-8- Détermination des CMI .....	297
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	298

**RESUME**

**ABSTRACT**

**ملخص**

# ***INTRODUCTION GENERALE***

## INTRODUCTION GENERALE

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a estimé que 80 % de la population en Afrique et Asie emploient principalement les médicaments traditionnels (drogues végétales) obtenus à partir de plantes aromatiques et médicinales (PAM), pour leurs soins de santé primaire <sup>[1]</sup>. Par ailleurs, seulement 17 % d'espèces de plantes supérieures dans le monde, ont été étudiées pour leur potentiel médical <sup>[2]</sup>. La diversité chimique et biologique de ces plantes représente une source renouvelable et potentiellement illimitée pour leur utilisation dans le développement de nouveaux produits cosmétiques et pharmaceutiques.

Les plantes aromatiques et médicinales pourraient être définies comme des espèces qui fournissent des médicaments pour la prévention et la lutte contre plusieurs maladies. Ces plantes jouent un rôle précieux et important dans les secteurs économiques, socio-culturels et écologiques des communautés locales dans le monde entier <sup>[3]</sup>. L'activité pharmacologique de ces plantes est principalement due à leur composition chimique diversifiée, qui peut être classée en plusieurs groupes de métabolites secondaires: alcaloïdes, glycosides, huiles essentielles, polyphénols, terpènes et d'autres diverses substances actives <sup>[4]</sup>.

Dans cet ordre d'idées, les produits naturels issus de plantes aromatiques et médicinales pourraient être une alternative efficace afin de résoudre les problèmes de santé relatifs à la résistance microbienne. A cet effet, un grand intérêt a été particulièrement réservé à l'étude des microbes, tant du point de vue biologique, nosologique et thérapeutique durant la dernière décennie. Les maladies infectieuses causées par les bactéries et les champignons affectent des millions de personnes dans le monde. A ce sujet, des traitements à base d'antibiotiques ont été prescrits pour combattre ce fléau. Cependant, l'utilisation abusive et inadéquate des antibiotiques a régulièrement mené à l'apparition de la résistance des souches aux médicaments les plus communément utilisés <sup>[5, 6]</sup>.

Il est important de signaler que les espèces réactives oxygénées (ERO) sont impliquées dans des processus physiologiques à des faibles quantités <sup>[7]</sup>. Cependant, l'excès de la production des ERO dans le corps humain peut devenir toxique pour les composants majeurs de la cellule, les lipides, les protéines et les acides nucléiques et donne lieu au stress oxydatif qui sera impliqué dans diverses pathologies <sup>[8]</sup> à savoir : les maladies neurodégénératives

(Alzheimer et Parkinson), le diabète, les cancers, les maladies inflammatoires, le vieillissement, ...etc <sup>[9]</sup>.

En conséquence, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques, également la toxicité des anti-oxydants synthétiques utilisés notamment comme additifs dans l'industrie agroalimentaire, ont conduit à la recherche de nouvelles biomolécules à partir de plantes aromatiques et médicinales ayant des activités antimicrobiennes et anti-oxydantes prometteuses.

L'Algérie, en raison de son climat diversifié (méditerranéen, semi-aride et saharien) et la nature de ses sols, possède une flore particulièrement riche et variée en plantes aromatiques, médicinales, toxiques et condimentaires, dont la plupart existe à l'état spontané. Cette flore compte environ 3000 espèces réparties dans 150 familles botaniques parmi lesquelles 15 % sont endémiques <sup>[10]</sup>. L'exploitation de nouvelles molécules bioactives à partir de ces bioressources et leur utilisation comme une alternative thérapeutique aux molécules synthétiques ayant des effets secondaires souvent néfastes, sont devenues parmi les objectifs prioritaires pour plusieurs laboratoires de recherche et les industries cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques.

Dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules biologiquement actives d'origine végétale qui peuvent intervenir dans des applications thérapeutique, cosmétique et agroalimentaire, notre laboratoire a entamé depuis plus d'une dizaine d'année un programme de recherche destiné à l'exploitation des ressources naturelles d'origine végétale poussant dans les régions des Aurès et du Nord de Sahara. Les critères de sélection des plantes objets d'études sont basés principalement sur l'endémisme et/ou l'utilisation en médecine traditionnelle ainsi que pour leurs activités biologiques. Dans cet ordre d'idées, nous nous sommes intéressés à l'étude chimique et biologique de deux plantes médicinales nommées *Erinacea anthyllis* Link et *Euphorbia atlantica* Coss. qui appartiennent aux familles Fabaceae et Euphorbiaceae respectivement. Ces deux plantes n'ont pas fait antérieurement l'objet d'investigations chimique et biologique.

La famille Fabaceae est l'une des plus importantes familles de plantes supérieures <sup>[11]</sup>. Les plantes de cette famille sont riches en métabolites secondaires comme les alcaloïdes <sup>[12-14]</sup>, saponosides <sup>[15,16]</sup> et flavonoïdes particulièrement les isoflavonoïdes qui sont une branche très limitée dans le règne végétal, caractérisant seulement la sous-famille Papilionoideae

appartenant à la famille Fabaceae [17, 18]. De plus, les plantes de cette famille possèdent des activités biologiques intéressantes telles que: antidiarrhéique, estrogénique et/ou anti-estrogénique, anti-oxydante et antimicrobienne, un effet préventif dans le cas des cancers du sein et de la prostate, ainsi que dans celui du colorectal et aussi elles ont des propriétés insecticides [19-22].

La famille Euphorbiaceae est l'une des plus grandes familles de plantes à fleurs [23]. L'ethnomédecine des Euphorbiaceae est très diversifiée, cette diversité est due à la présence d'une large gamme de métabolites secondaires incluant les triterpènes, diterpènes et polyphénols [24-26], qui rend la plupart de ses espèces toxiques ou thérapeutiques. D'ailleurs, quatre espèces du genre *Euphorbia* à savoir : *E. guyoniana* Boiss. et Reut., *E. retusa* Forsk., *E. bupleuroides* Desf. et *E. pterococca* Brot. ont été déjà étudiées au niveau de notre laboratoire. Ces investigations ont conduit à l'isolement et l'identification de plus de 90 composés dont 24 structures sont nouvelles [26-31]. La recherche bibliographique démontre la richesse des plantes du genre *Euphorbia* en métabolites secondaires et met en évidence leurs activités biologiques importantes: analgésique, anti-inflammatoire, cytotoxique, antibactérienne et anti-oxydante [32-34].

Cette thèse de doctorat sera divisée en cinq grands chapitres:

Le premier chapitre de cette thèse concerne tout d'abord l'étude bibliographique des plantes objet de notre recherche. Cette étude commence par une description botanique de la famille Fabaceae, le genre *Erinacea* et l'espèce *Erinacea anthyllis* Link, description qui permet de positionner cette espèce dans la systématique des plantes Fabaceae. Elle se poursuit également par les travaux de chimie antérieurs relatifs à plusieurs espèces de la tribu Genisteae de la famille Fabaceae. La deuxième plante *Euphorbia atlantica* Coss. suit le même enchaînement d'idées incluant une description botanique (famille: Euphorbiaceae, genre: *Euphorbia* et espèce *E. atlantica*) et les études chimiques antérieures sur les espèces du genre *Euphorbia*.

Le deuxième chapitre a trait à l'étude des isoflavonoïdes en présentant leur définition, biosynthèse, classification, distribution et propriétés biologiques.

Le troisième chapitre est consacré aux résultats phytochimiques des espèces *Erinacea anthyllis* Link et *Euphorbia atlantica* Coss. Ce chapitre, présente les procédures relatives à

l'extraction, la séparation, la purification et la caractérisation structurale des composés obtenus à l'état pur.

Le quatrième chapitre présente un rappel bibliographique sur les activités anti-oxydantes et antibactériennes, l'analyse quantitative du contenu en polyphénols et flavonoïdes des différents extraits des plantes *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica*. L'évaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro* des extraits et fractions ainsi que des produits purs obtenus a été réalisée par trois différentes méthodes à savoir: le piégeage du radical libre DPPH, le test de phosphomolybdate PPM et le test du pouvoir réducteur du fer FRAP. L'activité antibactérienne des extraits des deux plantes *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica* a été évaluée par la technique de diffusion en milieu solide (méthode des disques), vis-à-vis de quatre souches bactériennes *Sataphylococcus aureus*, *Sataphylococcus albus*, *Enterobacter* sp et *Escherichia coli*. A la fin de ce chapitre, les résultats obtenus sont résumés dans une conclusion.

Le cinquième chapitre résume les travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de l'investigation phytochimique et l'évaluation des activités biologiques (anti-oxydante et antibactérienne) des extraits, des fractions et des biomolécules isolées à partir des deux plantes *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica*. Les différentes méthodes chromatographiques et spectroscopiques utilisées pour réaliser ce travail sont présentées.

# *Chapitre I*

## *Rappel bibliographique*



## I-1- Position systématique de la famille Fabaceae

La famille Fabaceae également connue sous le nom Leguminosae est l'une des plus importantes familles de plantes supérieures. Elle compte 19400 espèces classées en 730 genres regroupés dans trois sous-familles (Caesalpinioideae, Papilionoideae et Mimosoideae). Elles poussent aussi bien en milieu tempéré que tropical <sup>[11]</sup>.

Les plantes Fabaceae sont principalement des arbres, arbustes, lianes ou herbacées, parfois épineuses, à racines souvent munies de nodosités fixatrices d'azote atmosphérique grâce à une symbiose avec la bactérie *Rhizobium* <sup>[35]</sup>.

La classification botanique de cette famille se présente comme suit :

<b>Règne :</b>	Plantae
<b>Embranchement :</b>	Spermatophyta
<b>Sous embranchement :</b>	Angiospermae
<b>Classe :</b>	Eudicotyledonae
<b>Sous-classe :</b>	Rosidae
<b>Ordre :</b>	Fabidées
<b>Sous-ordre :</b>	Fabales
<b>Famille :</b>	Fabaceae
<b>Sous-famille:</b>	Papilionoideae

### I-1-1- Etymologie

Le nom **Fabaceae** vient du nom de genre *Faba* en latin, qui signifie fève. Ce nom de genre n'est plus utilisé actuellement et a été remplacé par le nom *Vicia*.

### I-1-2- Distribution de la famille Fabaceae

Les plantes de la famille Fabaceae sont distribuées dans tous les biomes terrestres. Leur répartition est cependant variable selon la sous-famille :

- ✓ Les Papilionoideae sont cosmopolites et se retrouvent presque dans tous les milieux du globe terrestre.
- ✓ Les Caesalpinioideae occupent surtout les régions tropicales et subtropicales de l'Amérique, Afrique et Asie.

- ✓ Les Mimosoideae dominent les régions tropicales et subtropicales et colonisent aussi les zones arides et semi-arides de l'Afrique, Amérique et Australie <sup>[36]</sup>.

### I-1-3- Caractères botaniques de la famille Fabaceae

La famille Fabaceae est divisée en trois sous-familles pouvant être identifiées facilement par leurs fleurs. Elles ont en commun le fruit communément appelé gousse <sup>[36]</sup>.

Les plantes Caesalpinioideae sont constituées pour la plupart d'arbres et arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leurs fleurs sont irrégulières (zygomorphe) avec cinq pétales et des étamines visibles extérieurement.

Les plantes Mimosoideae sont des arbres et arbustes tropicaux ou subtropicaux. Elles sont caractérisées par leurs fleurs petites et régulières (actinomorphes) serrées ensemble. L'inflorescence est en pompon et les étamines sont la partie la plus visible de la fleur. Les cinq pétales sont invisibles à l'œil nu et les feuilles sont composées bipennées.

Les Papilionoideae sont facilement reconnaissables par leurs fleurs papilionacées. La fleur est irrégulière (zygomorphe) et se compose de cinq pétales: l'étendard, la carène formée par deux pétales soudés et les deux ailes. L'étendard correspond au pétale supérieur, les pétales latéraux correspondent aux ailes et la carène est formée par deux pétales inférieurs. Les principaux caractères de ces trois sous familles sont cités dans le tableau I-1 ci-dessous:

**Tableau I-1:** Principaux caractères des trois sous familles (Caesalpinioideae, Mimosoideae et Papilionoideae).

	Caesalpinioideae	Mimosoideae	Papilionoideae
Forme biologique	arbre, arbuste, liane	arbre, arbuste, liane, rarement aquatique	herbe, arbuste, arbre, liane
Fleurs	zygomorphes, de grandes tailles	actinomorphes, de petites tailles groupées	zygomorphes, corolle papilionacée, fleurs groupées en grappes, en épis ou en panicules
Fruit	sec déhiscent (gousse)	sec déhiscent (gousse)	sec déhiscent (gousse)
Pétales	imbriqués	valvaires	imbriqués

<b>Sépales</b>	libres	soudés avec les pétales	soudés à la base formant le calice
<b>Feuilles</b>	composées bipennées, ou pennées, rarement simples ou unifoliées	composées bipennées	alternes, simples ou composées pennées
<b>Étamines</b>	varient de 1 à 10 rarement plus	10 n étamines, le plus souvent plus de 100	10 étamines soudées par leurs filets, ou 9 soudées par leurs filets et 1 libre

#### I-1-4- Intérêts économique et thérapeutique des Fabaceae

Les intérêts des Fabaceae ont été démontrés dans plusieurs études et nombreuses espèces de cette famille sont utilisées comme plantes alimentaires, fourragères ou comme fertilisants verts [37, 38]. En outre, les plantes de cette famille sont utilisées en médecine traditionnelle pour traiter diverses maladies. On citera [39] :

- ✓ Les graines de la plante *Retama raetam* Forsk sont fraîchement broyées et appliquées en cataplasme contre les étourdissements.
- ✓ Les plantes *Astragalus armatus* Willd., *Astragalus gombiformis* Pomel et *Crotalaria saharae* Coss. sont utilisées contre les morsures de serpents et de scorpions.
- ✓ Les feuilles de *Genista saharae* Coss. & Dur. sont utilisées comme tisane pour traiter les troubles digestifs
- ✓ Les parties aériennes de la plante *Genista microcephala* Coss. & Dur. sont utilisées par voie orale pour le traitement des vers intestinaux, des intoxications alimentaires et des infections microbiennes. Les feuilles de cette plante sont réduites en poudre et appliquées localement pour soigner les cicatrifications des blessures.
- ✓ La décoction des racines de l'espèce *Ononis natrix* L. est employée pour traiter l'arthrite rhumatoïde, les problèmes de prostate, les coliques néphrétiques et les troubles digestifs ainsi que la constipation.

### I-1-5- Présentation du genre *Erinacea*

Le genre *Erinacea* se présente sous forme d'arbrisseau formant des buissons arrondis avec de longues épines, les feuilles entières sont opposées sauf les supérieures, le calice poilu et les fruits mûrs sont d'environ 15-20 mm de longueur. Ce genre ne contient qu'une seule espèce nommée *Erinacea anthyllis* Link ou *Erinacea pungens* Boiss <sup>[40]</sup>.

### I-1-6- Espèce *Erinacea anthyllis* Link

#### I-1-6-1- Etymologie

Le nom *Erinacea* vient du mot latin Erineus (rameaux piquants), qui prend la forme d'un hérisson.

#### I-1-6-2- Classification systématique

L'espèce *Erinacea anthyllis* Link est classée comme suit <sup>[41]</sup>:

<b>Famille:</b>	Fabaceae
<b>Sous-famille:</b>	Papilionoideae
<b>Tribu:</b>	Genisteae
<b>Genre:</b>	<i>Erinacea</i>
<b>Espèce</b>	<i>Erinacea anthyllis</i> Link

#### I-1-6-3- Distribution de l'espèce *Erinacea anthyllis*

L'espèce *Erinacea anthyllis* Link pousse dans les lieux arides des hautes montagnes. Elle se rencontre dans les Pyrénées Orientales en France, Espagne, en Afrique du Nord-Ouest (Maroc, Algérie et Tunisie) <sup>[42]</sup>, l'Est de la Péninsule ibérique <sup>[43]</sup> et en Corse <sup>[40]</sup>. En Algérie, on trouve cette espèce dans les Aurès, les hautes montagnes de Bellezma et les montagnes du Hodna, de Djelfa, Babors et Djurdjura <sup>[10]</sup>.

#### I-1-6-4- Noms communs

L'espèce *Erinacea anthyllis* est désignée sous plusieurs noms vernaculaires et avec différentes langues <sup>[10, 44]</sup> :

<b>En Français :</b>	Genêt bleu, Genêt hérissou, Cytise hérissou
<b>En anglais :</b>	Hedgehogbroom
<b>En Espagnol :</b>	Piornoazul ou Cojín de monja
<b>En Arabe :</b>	Kedad, Chedida, Zaaket el maïz, Azamrouy et Awajdam
<b>En Berbère :</b>	Azzou, Azezzou

### I-1-6-5- Description botanique

*Erinacea anthyllis* Link (Figure I-1) est un sous-arbrisseau de 10 à 25 cm formant des coussinets hémisphériques rendus épineux par les rameaux stériles <sup>[10]</sup>.

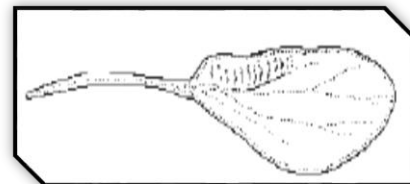


**Figure I-1 :** *Erinacea anthyllis* Link

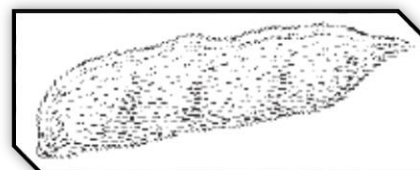
Les fleurs papilionacées, disposées en petites grappes axillaires d'une à trois fleurs grandes et bleu violacées ont un pédoncule court, portant des bractées et des bractéoles petites et foliacées.



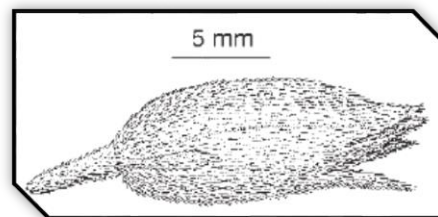
Les feuilles peu nombreuses ont quelque fois trois folioles petites pubescentes, soyeuses et vite détachées de la tige.



Le légume, oblong, linéaire, sessile, velu et argenté contient quatre à six graines sans strophioles.



Le calice est tubuleux à cinq dents subégales.



Le stigmate est capité.



- ✓ Les pétales sont étroits et longuement onguiculés.
- ✓ Les étamines sont monadelphes.

#### **I-1-6-6- Usage traditionnel de l'espèce *Erinacea anthyllis* Link**

*Erinacea anthyllis* Link est connue en milieu rural notamment par son utilisation médicinale pour le traitement des douleurs rhumatismales. Elle est collectée par les femmes âgées et guérisseuses.

Selon CAUVET (1925), l'espèce *Erinacea anthyllis* Link ou «chedida» est susceptible de provoquer des entérites chez le chameau <sup>[45]</sup>. Par ailleurs, d'autres études ont signalé la toxicité de cette espèce <sup>[46]</sup>.

Nous citons aussi d'autres utilisations locales dans des habitations rurales berbères, après séchage à l'air libre des parties aériennes de cette plante, comme éléments de préchauffage ou de préparation du feu, à cause de leur caractère combustible, ainsi que son

utilisation très fréquente comme outil de balayage des maisons traditionnelles berbères et aussi comme plante fourragère pour les animaux domestiques <sup>[47]</sup>. En outre, dans la région du Siroua au Maroc, cette espèce est utilisée comme source de mellifère <sup>[48]</sup>.

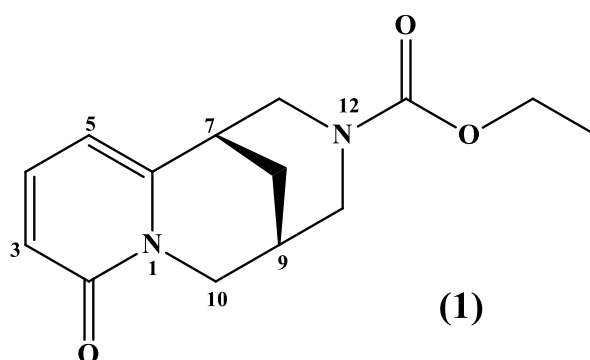
### I-1-7- Etudes chimiques antérieures sur la tribu Genisteae

Plusieurs plantes de la tribu Genisteae ayant fait l'objet de nombreuses investigations phytochimiques et pharmacologiques, ont montré la richesse de cette tribu en alcaloïdes spécifiquement les alcaloïdes à noyau quinolizidine qui sont parmi les métabolites secondaires abondants dans cette tribu <sup>[49]</sup>. En outre, la tribu Genisteae est remarquablement riche en flavonoïdes et isoflavones, particulièrement la daidzéine et la génistéine qui sont des marqueurs chimiotaxonomiques de cette tribu, connus pour leurs activités antioxydantes et oestrogéniques remarquables <sup>[50, 51]</sup>.

#### I-1-7-1- Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques d'origine naturelle (végétale ou animale) contenant un ou plusieurs atomes d'azote avec un caractère basique de degré plus ou moins fort <sup>[52]</sup>. La diversité structurale de ces composés a conduit à plusieurs intérêts thérapeutiques et activités pharmacologiques.

L'investigation phytochimique de l'espèce *Laburnum watereri* a conduit à l'isolement d'un seul alcaloïde quinolizidine nommé cytisine-12-carboxy-éthyl ester (**1**) <sup>[53]</sup>. Ce composé est trouvé dans plusieurs espèces de la tribu Genisteae telles que: *Genista lydia*, *Lahurnum anagyroides*, *Laburnocytisus adamii*, *Petteria ramentacea*, *Retama sphaerocarpa*, *Spartium junceum*, *Teline canariensis*, *Teline gomerae*, *Argyrocytisus battandieri* et *Echinospartum horridum* <sup>[53]</sup>.



L'étude de la plante *Petteria ramentacea* (Sieber) C. Presl a abouti à l'identification de 20 alcaloïdes de type quinolizidine et un alcaloïde dipipéridyle: ammodendrine (**2**), *N*-

méthylcytisine (3), déhydrocytisine (4), cytisine (5), hydroxycytisine (6),  $\alpha$ -isolupanine (7), 5,6-déhydrolypanine (8), rhombifoline (9), lupanine (10), hydroxy-*N*-méthylcytisine (11), *N*-*O*-acétylcytisine (12), cytisine-12-carboxy-méthyl ester (13), cytisine-12-carboxy-éthyl ester (1), thérmapsine (14), *N*-formylcytisine (15), *N*-acétylcytisine (16), anagryne (17), 13 $\alpha$ -hydroxylupanine (18), épibaptifoline (19) et baptifoline (20) (Figure I-2). Leurs structures ont été identifiées par la chromatographie en phase gazeuse GC et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la masse GC/MS [54].

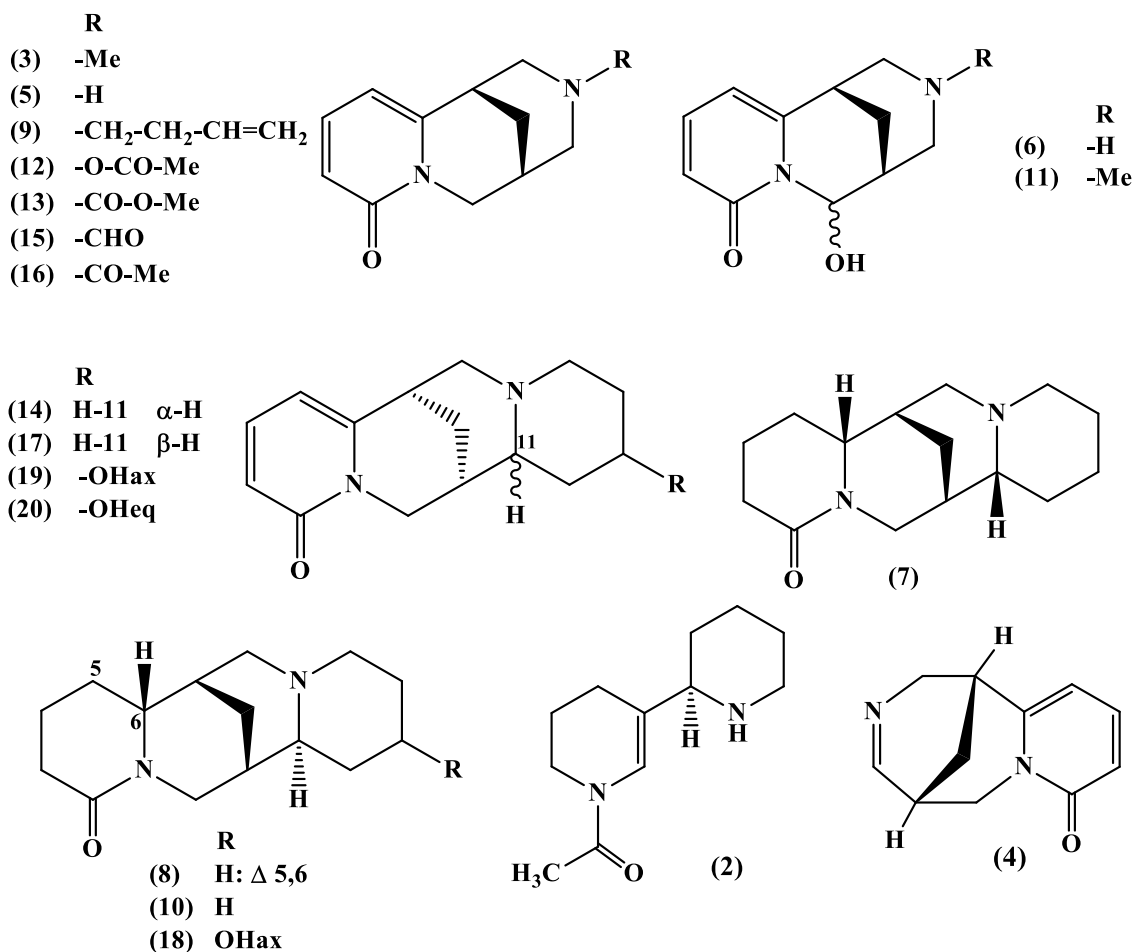
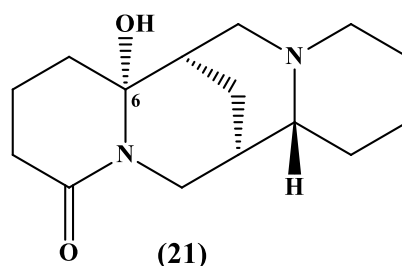


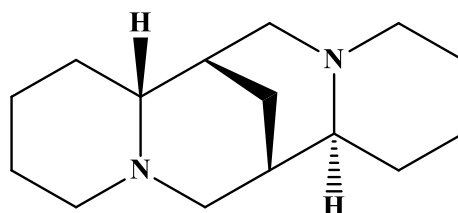
Figure I-2: Composés isolés de l'espèce *Petteria ramentacea*

Un alcaloïde nommé (-)-6 $\alpha$ -hydroxylupanine (21) a été isolé des parties aériennes de la plante *Lygos raetam* Var. *sarcocarpa* [55].



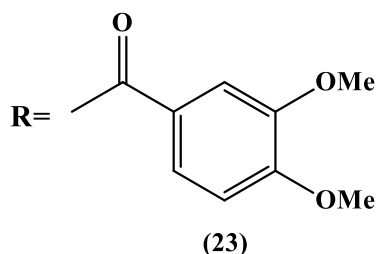


L'étude des tiges et des feuilles des deux espèces *Genista lobelii* DC. et *G. salzmannii* DC. par chromatographie capillaire en phase gazeuse a abouti à l'identification de sept alcaloïdes de type quinolizidines nommés spartéine (**22**), lupanine (**10**), 5,6-déhydrolupanine (**8**), anagrine (**17**), cytisine (**5**), N-méthylcytisine (**3**) et ammodéndrine (**2**) [56].

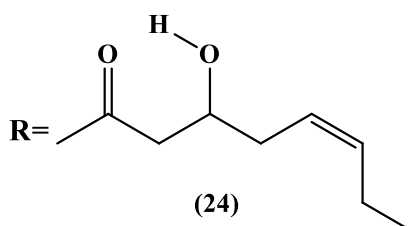


(22)

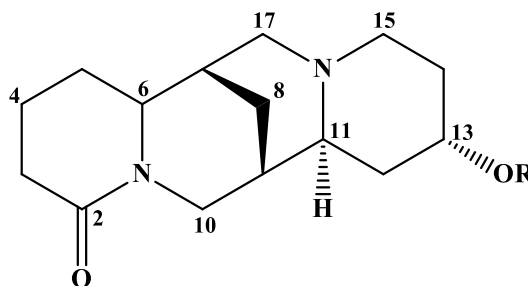
Deux esters alcaloïdiques et un alcaloïde quinolizidine ont été trouvés dans l'espèce *Genista cinerea* (Vill.) DC.: 13 $\alpha$ -(3',4'-diméthoxybenzoyl)oxylupanine (cineverine) (**23**), 13 $\alpha$ -(3-hydroxy-*cis*-oct-5-énoyl)oxylupanine (cineroctine) (**24**) et 13 $\alpha$ -hydroxylupanine (**18**). Il est à noter que les esters alcaloïdiques se rencontrent principalement dans la section Spartioides du genre *Genista* [57].



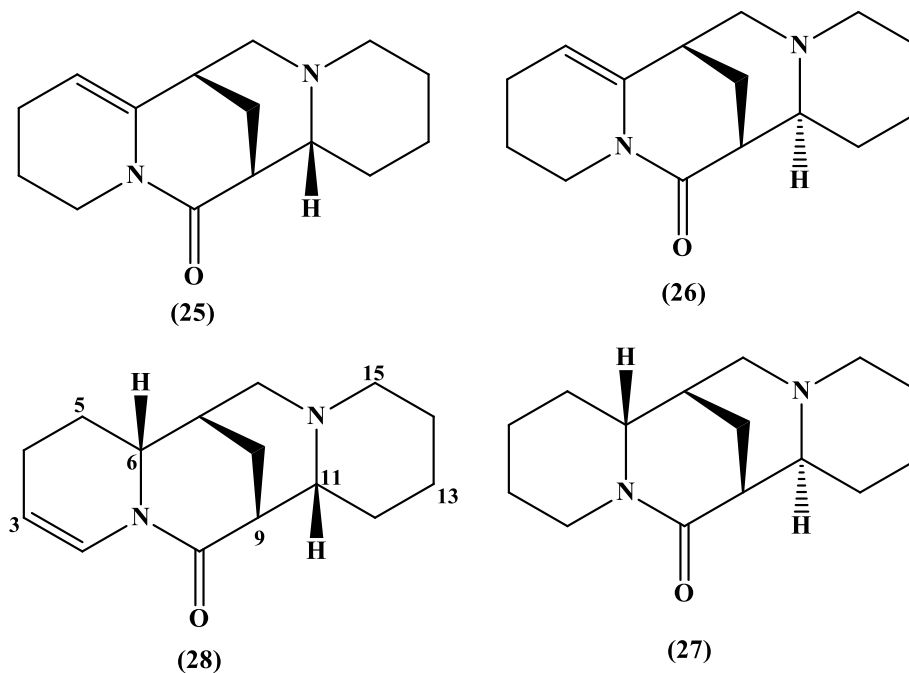
(23)



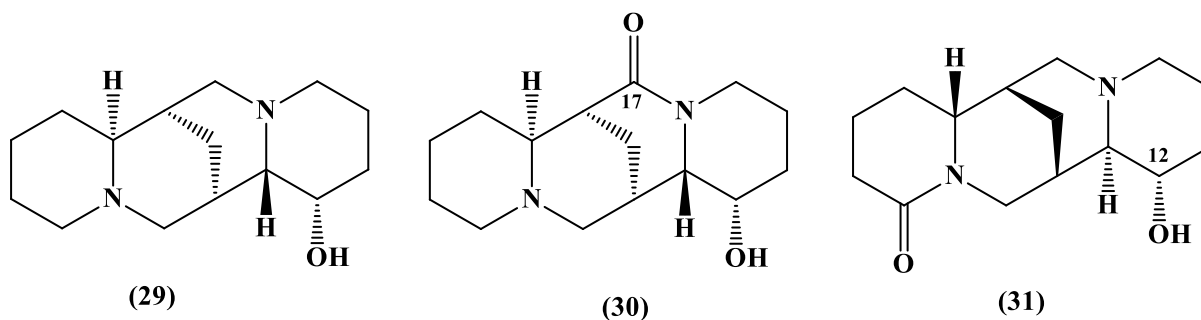
(24)



La purification de l'extrait méthanolique des feuilles de *Cytisus monspessulanus* L. par GC/MS a mené à l'isolement et l'identification de sept alcaloïdes dont deux sont des stéréoisomères aphyllidines (**25** et **26**), N-méthylcytisine (**3**), cytisine (**5**), aphylline (**27**), anagrine (**17**), (+)-2,3-déhydro-10-oxo- $\alpha$ -isopartéine (**28**) [58].

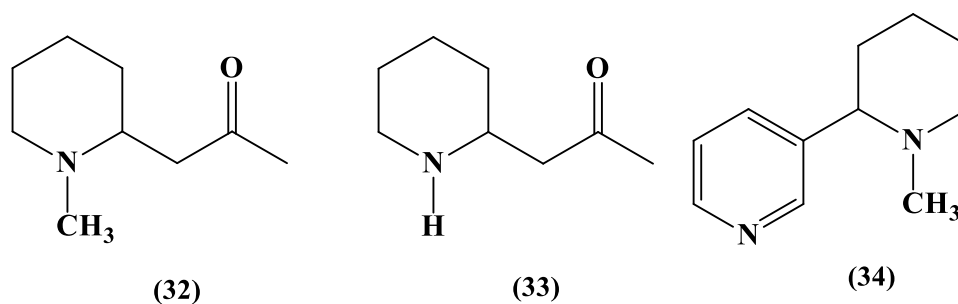


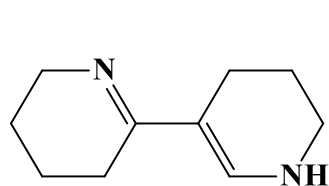
L'investigation phytochimique des parties aériennes de *Genista ephedroides* DC. a abouti à l'isolement de cinq alcaloïdes quinolizidines: retamine (29), anagyridine (17), lupanine (10), 17-oxoretamine (30) et 12- $\alpha$ -hydroxylupanine (31) [59].



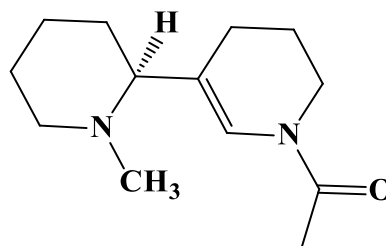
L'étude réalisée sur l'espèce *Genista quadriflora* Munby, a mis en évidence la présence de 18 alcaloïdes, dont cinq sont des alcaloïdes pipéridines dérivés de l'acide aminé lysine et 13 alcaloïdes quinolizidines [60].

**Alcaloïdes pipéridines:** N-méthylpelletièreine (32), pelletièreine (33), N-méthylanabasine (34), hystrine (35) et N-méthylammodendrine (36).



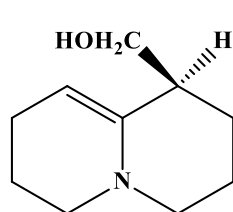


(35)

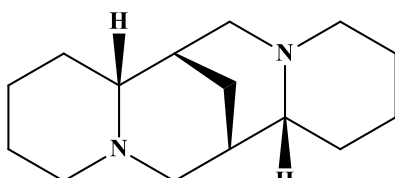


(36)

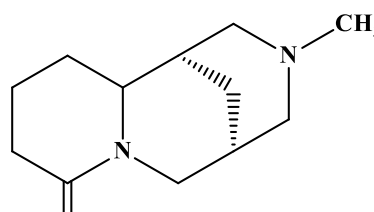
**Alcaloïdes quinolizidines:** déhydroepilupinine (37),  $\alpha$ -isospartéine (38), spartéine (22), N-méthyltétrahydrocystisine (39),  $\beta$ -isospartéine (40), tétrahydrocystisine (41), lusitanine (42), 10 $\alpha$ -hydroxyméthylspartéine (43), aphyllidine (25), rhombifoline (9), anagryne (17), pohakuline (44) et baptifoline (20).



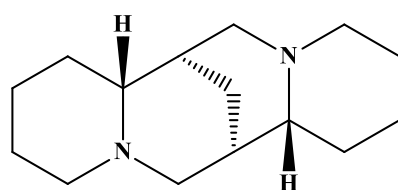
(37)



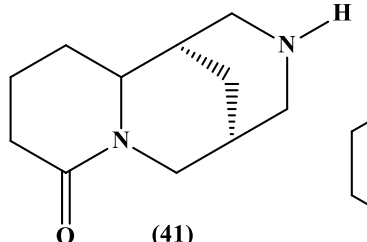
(38)



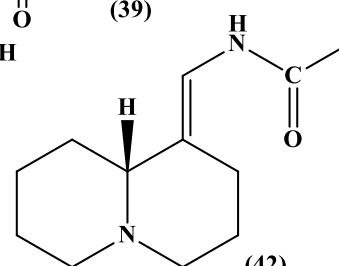
(39)



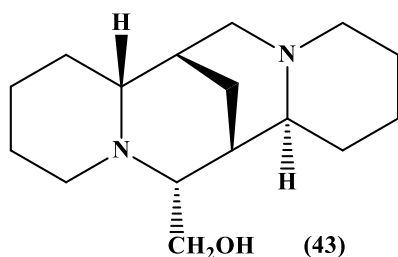
(40)



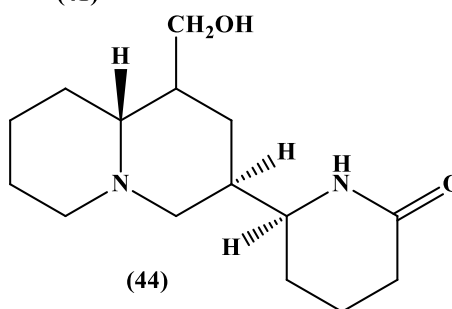
(41)



(42)



(43)



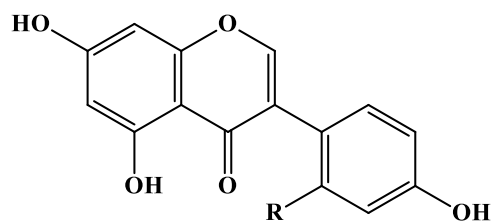
(44)

### I-1-7-2- Flavonoïdes

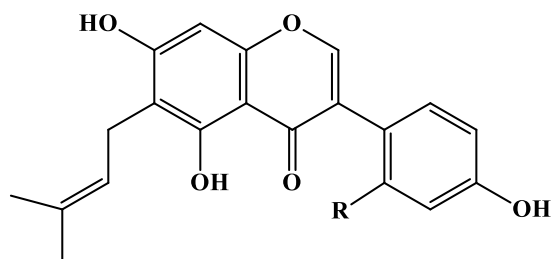
Les flavonoïdes constituent une très large classe de produits naturels isolés des plantes terrestres et marines. Ces molécules aromatiques appartenant à la famille des polyphénols possèdent un rôle fondamental au niveau des interactions plante/environnement [61]. La diversité des fonctions chimiques de ces composés induit à de nombreuses propriétés thérapeutiques reconnues dans le domaine de la phytothérapie [62].

De nombreuses études phytochimiques menées sur les espèces de la tribu Genisteae, ont montré la richesse de cette dernière en flavonoïdes particulièrement les isoflavonoïdes. Ci-dessous, nous allons citer quelques exemples de flavonoïdes et isoflavonoïdes isolés de la tribu Genisteae.

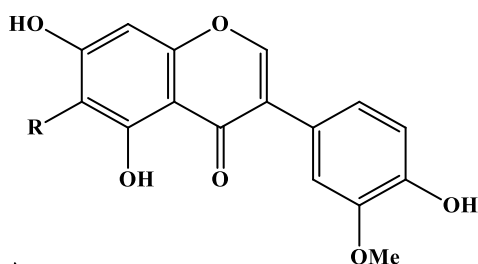
➤ *Lupinus albus* L. <sup>[63]</sup>



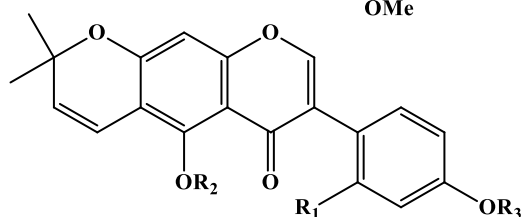
(45) R=H Génistéine  
(46) R=OH 2'-hydroxygénistéine



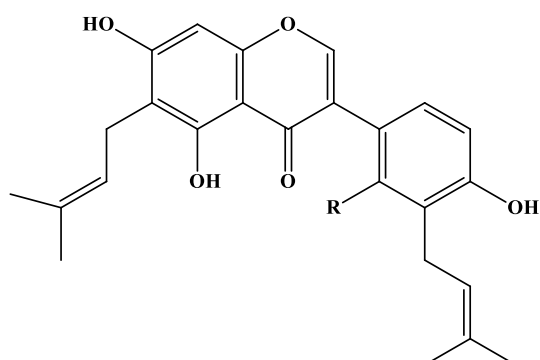
(47) R=H Wightéone  
(48) R=OH Lutéone



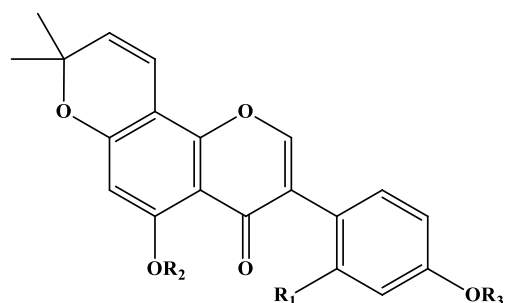
(49) R= CH<sub>2</sub>-CH=CMe<sub>2</sub> Lupisoflavone (5,7,4'-trihydroxy-3'-méthoxy-6-(3,3-diméthylallyl)isoflavone)  
(50) R= H 5,7,4'-trihydroxy-3'-méthoxyisoflavone



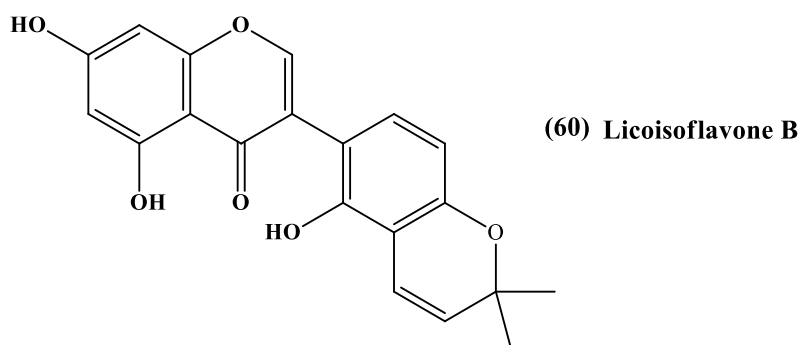
(51) R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H Alpinumisoflavone  
(52) R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=Ac Acétylalpinumisoflavone  
(53) R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H Parvisoflavone B  
(54) R<sub>1</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=Me Parvisoflavone B triméthyléthér



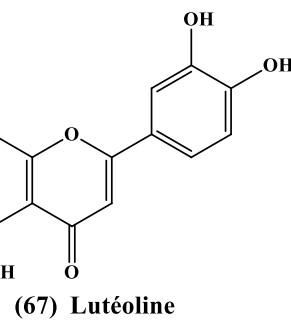
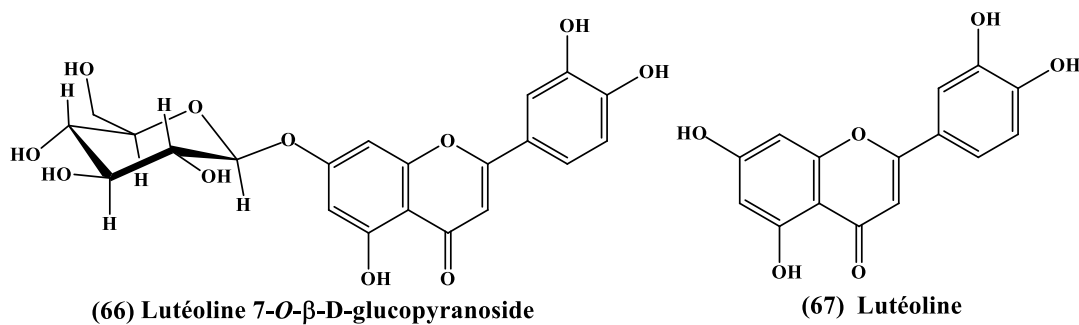
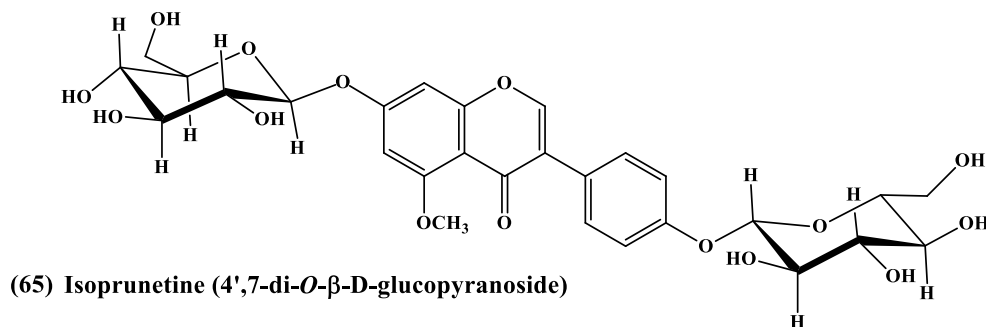
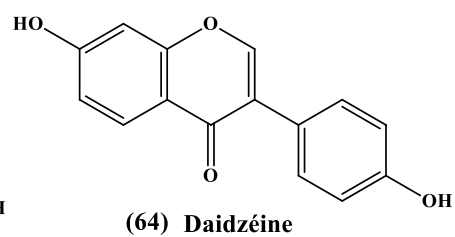
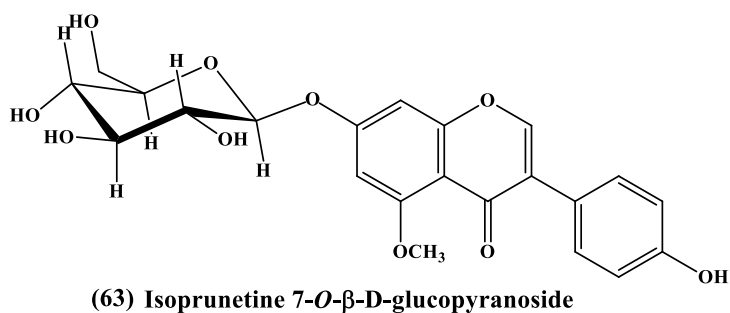
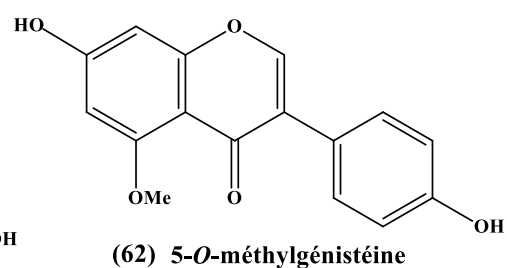
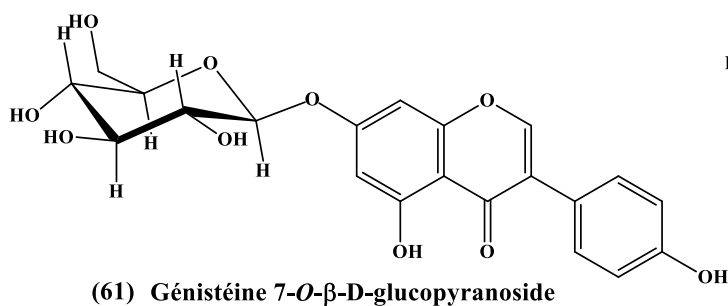
(55) R=H Lupalbigénine  
(56) R=OH 2'-hydroxylupalbigénine

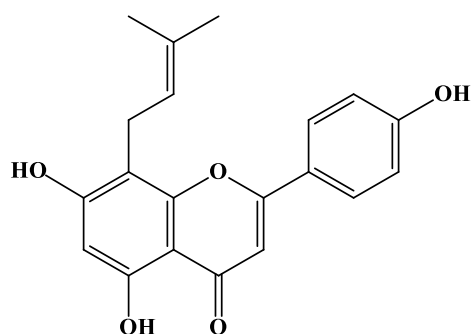


(57) R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H Derrone  
(58) R<sub>1</sub>=OH, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=H Parvisoflavone A  
(59) R<sub>1</sub>=OMe, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=Me parvisoflavone A triméthyléthér

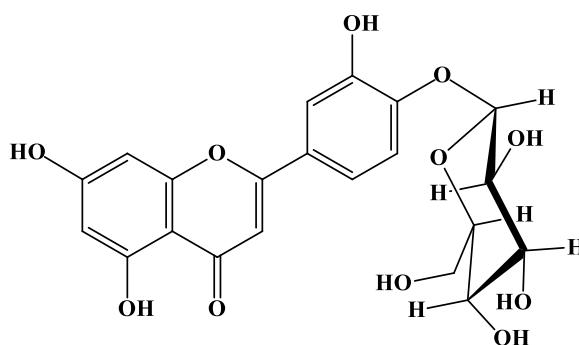


➤ *Genista morisii* Colla [50].





(68) Licoflavone C



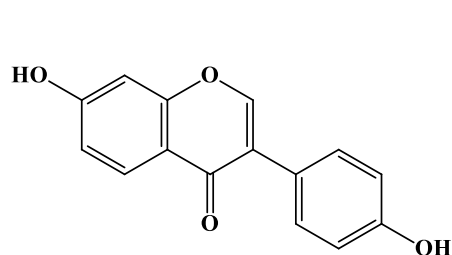
(69) Lutéoline 4'-O-β-D-glucopyranoside

La présence des flavones, flavonols et isoflavones est observée dans plusieurs espèces de la tribu Genisteae (Tableau I-2) [64]:

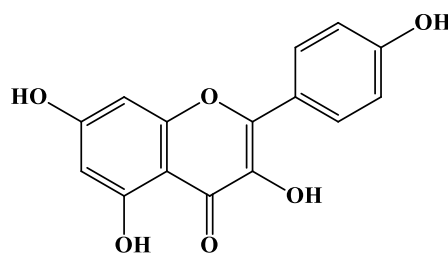
**Tableau I-2 :** Composés isolés de la tribu Genisteae

Espèce	Isoflavone	Flavone	Flavonol
<i>Adenocarpus foliolosus</i> (Aiton)	Da, Gn, 5MGn	-	-
<i>Chronanthus biflvrus</i> (Desf.)	Gn, 5MGn	-	Km
<i>Cytisus scoparius</i> L. (Link.)	Gn	-	-
<i>C. battundieri</i> Maire	Da, Gn	-	Km
<i>C. sessilifolius</i> L.	-	Lu, Ap	-
<i>C. patens</i> L.	-	Lu, Ap	Fs
<i>C. cantabricus</i> (Wink.)	-	-	-
<i>C. grandiflorus</i> DC	-	-	Fs
<i>C. eriocarpus</i> R. Br.	Gn	Lu	Fs
<i>C. welwitschii</i> (Boiss. & Reut.)	Da, Gn	Lu, Ap	Km
<i>C. purgans</i> (L.) Boiss.	Da, Gn	-	Fs
<i>C. commutatus</i> (Willk.) Briq.	Da, Gn	-	Fs
<i>C. plutycurpos</i> Maire	-	Lu, Ap	Fs
<i>C. proliferus</i> L.	Da, Gn, Fm	Lu	Qu, Km, Fs
<i>Chumaecytisus smyrnueus</i> Boiss.	Da, Gn	-	Qu
<i>C. heuffelii</i> Nierzb.	-	-	Fs
<i>C. hirsutus</i> L.	-	Lu	-
<i>C. albus</i> (Hacq.) Rothm.	Gn	-	Fs

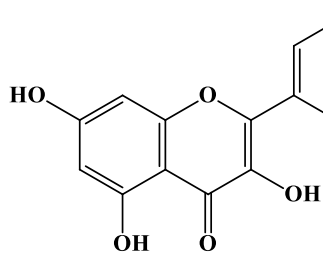
Fm, formononétine (70); Km, kaempférol (71); Qu, quercétine (72); Ap, apigénine (73); Fs, fisétine (74); Da, daidzéine (64); Gn, génistéine (45); 5MGn, 5-O-méthylgénistéine (62); Lu, lutéoline (67).



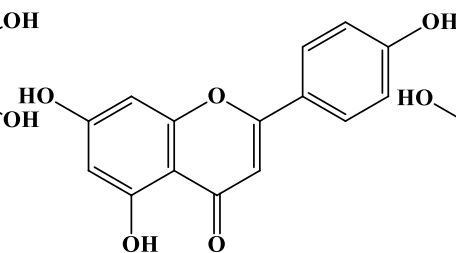
(70) Formononétine



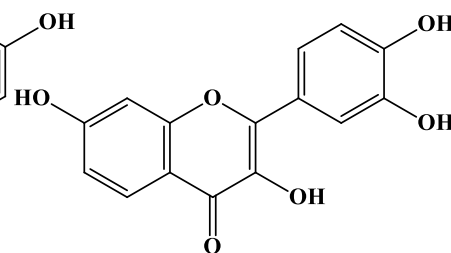
(71) Kaempférol



(72) Quercétine

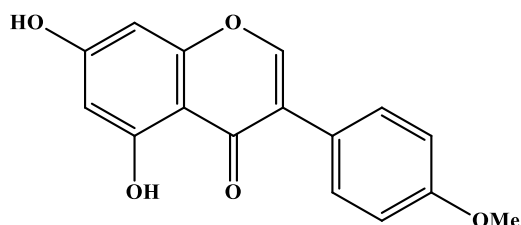


(73) Apigénine

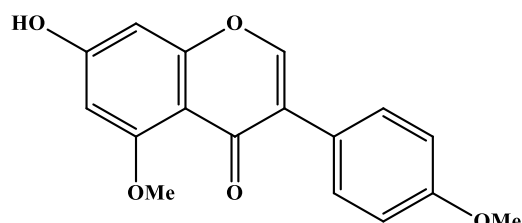


(74) Fisétine

L'étude phytochimique réalisée sur la plante *Echinoparum horridum* (M.Vahl) Rothm. a conduit à l'isolement de six métabolites secondaires nommés formononétine (70), daidzéine (64), génistéine (45), biochanine A (75), 5-*O*-méthylgénistéine (62) et 5-*O*-méthylbiochanine A (76) [65].



(75) Biochanine A

(76) 5-*O*-méthylbiochanine A

## I-2- Position systématique de la famille Euphorbiaceae

La famille Euphorbiaceae est l'une des plus grandes familles de plantes à fleurs, elle comprend environ 300 genres, 49 tribus et 10 000 espèces [23, 66] regroupées dans cinq sous-familles (Phyllanthoideae, Oldfieldioideae, Acalyphoideae, Crotonoideae et Euphorbioideae) [67]. Cette famille est classée la sixième famille la plus diversifiée parmi les angiospermes, après les Orchidaceae, Asteraceae, Fabaceae, Poaceae et les Rubiaceae [68].

Elle présente la classification suivante <sup>[69]</sup>:

<b>Règne :</b>	Plantae
<b>Embranchement :</b>	Spermatophyta
<b>Sous embranchement :</b>	Angiospermae
<b>Classe :</b>	Dicotyledonae
<b>Sous-classe :</b>	Dialypétales
<b>Ordre :</b>	Euphorbiales
<b>Famille :</b>	Euphorbiaceae
<b>Sous-famille:</b>	Euphorbioideae

### I-2-1- Etymologie

Le mot *Euphorbia* proviendrait d'*euphorbium*, le nom donné par le roi et érudit Berbère Juba II à la drogue médicinale préparée à partir du latex de la plante *Euphorbia resinifera* O.Berg, en l'honneur de son médecin grec Euphorbus au 1<sup>er</sup> siècle <sup>[70]</sup>.

### I-2-2- Caractères botaniques de la famille Euphorbiaceae

Les Euphorbiaceae sont distribuées principalement dans les régions tropicales et subtropicales du monde <sup>[71]</sup>. Les espèces de cette famille sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces, lianes, arbustes ou des arbres, dont certaines sont succulentes <sup>[72]</sup>.

- ✓ Les feuilles sont généralement alternes ou simples, souvent très réduites dans les espèces succulentes. Certains genres et espèces ont des feuilles opposées et palmées.
- ✓ Les inflorescences sont très variées: des grappes, des épis, des panicules et des cymeuses mais le genre *Euphorbia*, forme un type très particulier d'inflorescence.
- ✓ Les fleurs sont unisexuées avec ou sans périanthe. Les fleurs mâles à étamines soudées ou ramifiées et les fleurs femelles sont à trois carpelles uniovulés ou à deux carpelles biovulés.
- ✓ Le fruit est une capsule tricoque à déhiscence loculicide, septicide ou encore un schizocarpe à déhiscence explosive.
- ✓ Les graines sont pourvues d'une caroncule et les styles sont bifides ou plumeux <sup>[10, 73]</sup>.



### I-2-3- Ethnomédecine des Euphorbiaceae

Selon Seigler (1994) <sup>[74]</sup>, l'ethnomédecine des Euphorbiaceae est très diversifiée. Cette diversité est due à la présence d'une large gamme de métabolites secondaires inhabituels.

#### I-2-3-1- Effets toxiques des Euphorbiaceae

La toxicité des Euphorbiaceae a été démontrée dans plusieurs travaux par exemple, la plante *Ricinus communis* L. contenant la ricine, cette dernière est une protéine considérée comme l'une des substances les plus toxiques d'origine végétale <sup>[75]</sup>, tandis que la plante *Jatropha curcas* L. est signalée à être relativement toxique <sup>[76]</sup>. D'autres espèces de la famille Euphorbiaceae comme *Euphorbia tirucalli* L., *Euphorbia leuconeura* Boiss. et *Jatropha curcas* L. sont connues pour leurs effets co-cancérogènes en favorisant la division cellulaire excessive de la tumeur <sup>[77-79]</sup>.

En 1987, Rizk <sup>[80]</sup> a répertorié quelques espèces appartenant à la famille Euphorbiaceae ayant des caractéristiques d'empoisonnement: poison pour les poissons (*Euphorbia tirucalli* L. et *Euphorbia inaequilatera* Sond), poison pour les êtres humains (*Euphorbia ledienii* A. Berger, *Euphorbia heterophylla* L., *Euphorbia cooperi* NEBr., *Euphorbia candelabrum* Kotschy, *Euphorbia virosa* Willd., *Euphorbia poissonii* Pax, *Euphorbia unispina* NEBr et *Euphorbia venenifica* Tremaux) et poison pour les animaux domestiques (*Euphorbia caputmedusae* L., *Euphorbia silenifolia* (Haw.) Sweet et *Euphorbia ingens* Boiss.).

#### I-2-3-2- Effets thérapeutiques des Euphorbiaceae

De nombreuses espèces de la famille Euphorbiaceae sont connues pour leur utilisation en médecine traditionnelle pour guérir diverses maladies telles que: le cancer, le diabète, la diarrhée, les maladies cardiaques, les hémorragies, l'hépatite, le paludisme, les maladies ophtalmiques, les rhumatismes et la gale. Ci-dessous, nous allons citer les propriétés thérapeutiques de quelques plantes de la famille Euphorbiaceae :

*Acalypha indica* Linn : Le jus frais des feuilles mélangé avec du sel est appliqué sur l'eczéma des mains et des pieds. Le mélange des feuilles de cette plante et le jus de citron vert est employé comme remède contre les brûlures <sup>[81]</sup>.

*Croton banplandianum* Baill: Son latex est appliqué pour traiter de la gale et les plaies mais la pâte des feuilles de cette plante est utilisée pour arrêter le saignement des blessures [81].

*Euphorbia neriifolia* Linn : Le latex des feuilles fraîches de cette plante est frotté sur la peau pour guérir les blessures et les boutons [81].

*Euphorbia dracunculoides* Lamk : Le jus des feuilles de cette espèce est utilisé par certaines tribus en Asie pour tuer les poux chez l'homme ainsi que chez l'animal [81].

*Chrozophora rotleri* (Geis.) : Les graines de cette plante sont utilisées pour leurs propriétés émétiques et corrosives [82].

*Euphorbia macroclada* Boiss.: Le latex de cette espèce est utilisé comme antipyrétique contre le paludisme, les verrues et les morsures de serpents et scorpions et analgésique pour soulager les maux de dents et traiter la cicatrisation des plaies, l'eczéma et les infections fongiques [83].

*Bridelia airyshawii* P.T.Li: Les fruits mûrs sont comestibles, la poudre d'écorce est utilisée comme remède contre le diabète et pour réduire le poids corporel [84].

*Euphorbia bupleuroides* Desf. : La décoction des racines de cette plante est employée par les populations locales comme anti-inflammatoire.

*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. : Le latex de cette plante est utilisé pour attaquer les verrues et extirper les épines. On l'applique également sur les morsures et piqûres venimeuses [85].

*Euphorbia retusa* Forsk : Le latex de cette espèce est préconisé comme remède contre les verrues et pour extirper les épines. Il est aussi employé, en application sur les cils, contre le trichiasis. Au Maroc, on l'applique également sur les morsures et piqûres venimeuses [85].

#### I-2-4- Intérêt économique de la famille Euphorbiaceae

La famille Euphorbiaceae comprend plusieurs espèces qui ont un grand intérêt économique, comme la plante *Ricinus communis* L. qui est utilisée comme une source d'huile de ricin, *Manihot esculenta* Crantz, qui fournit un tubercule et une farine pour la nourriture dans les pays tropicaux. *Hevea brasiliensis* Willd. est un arbre à caoutchouc [84, 86]. Toutefois, nombreuses espèces de cette famille sont cultivées comme plantes ornementales : *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch, *Euphorbia milii* Des Moul., *Codiaeum variegatum* (L.) Rumph. Ex A. Juss. et *Dalechampia scandens* L. [87].

### I-2-5- Présentation du genre *Euphorbia*

Le genre *Euphorbia* est l'un des plus grands genres de la famille Euphorbiaceae. Il est classé le troisième parmi les genres de plantes à fleurs après les astragales (Fabaceae) et le genre *Psychotria* (Rubiaceae), avec environ 2000 espèces réparties à travers le monde et principalement dans les régions tropicales, subtropicales et les régions tempérées chaudes [88]. Le genre *Euphorbia* est caractérisé par un latex blanc. Il est distribué dans toute la plante dans une série de tubes à partir de cellules simples ou de cellules groupées par la fusion de plusieurs cellules. Le caractère laticifère des euphorbes est considéré comme un marqueur taxonomique dans les comparaisons systématiques entre et au sein des familles [89].

Les plantes du genre *Euphorbia* sont des herbes, arbustes ou des arbres vivaces ou annuels. Ces espèces peuvent être succulentes ou non succulentes et la plupart d'espèces succulentes sont endémiques à l'Afrique [90].

- ✓ Les feuilles sont simples rarement stipulées
- ✓ Les fleurs unisexuées et groupées en inflorescence complexe (cyathes) sont disposées en ombelles feuillées.
- ✓ La capsule tricoque est très généralement déhiscente.
- ✓ Les tiges des euphorbes sont très courtes, couchées, très ramifiées, étalées en cercle sur le sol.
- ✓ Le cyathe très petite (moins de 2 mm) est constitué par une fleur femelle centrale et cinq cymes exigües de fleurs males, réduites en général à une étamine, le tout est enveloppé dans un involucre cupuliforme à 4-5 lobes présentant une glande charnue de forme variable.
- ✓ Les carpelles sont soudés en ovaire à 3 loges uniovulées.
- ✓ Le fruit (schizocarpe) est une capsule tricoque explosif.
- ✓ Les graines sont quadrangulaires portant de petits tubercules et dépourvues de caroncules [10, 91].

### I-2-6- Espèce *Euphorbia atlantica* Coss.

#### I-2-6-1- Classification systématique

Les botanistes ont classé l'espèce *Euphorbia atlantica* Coss. comme suit [10, 73] :

<b>Famille :</b>	Euphorbiaceae
<b>Sous famille :</b>	Euphorbioideae
<b>Tribu :</b>	Euphorbieae
<b>Sous tribu :</b>	Euphorbiinae
<b>Genre :</b>	<i>Euphorbia</i>
<b>Espèce :</b>	<i>Euphorbia atlantica</i> Coss.

### I-2-6-2- Noms communs

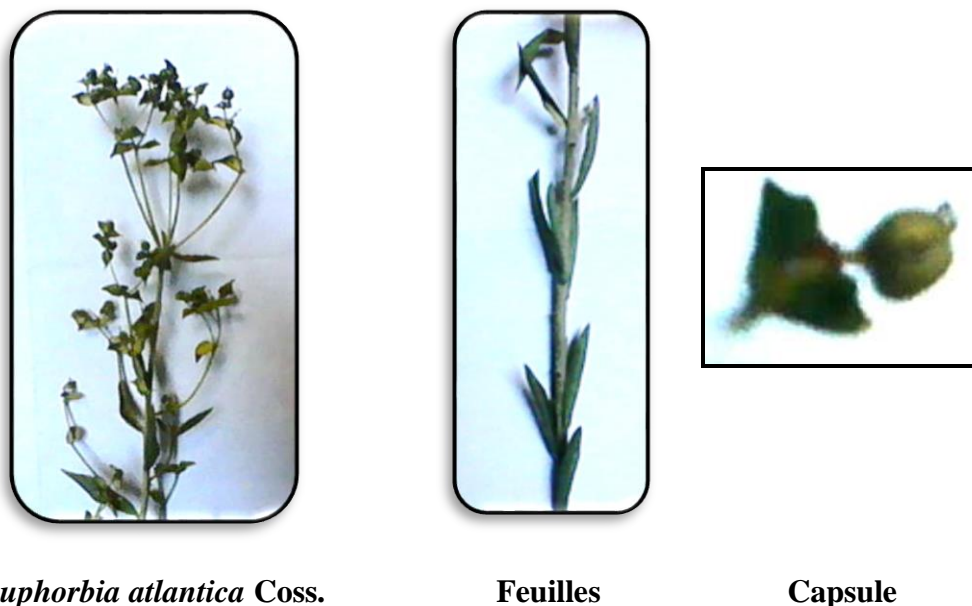
Selon Frank Bisby (2013) <sup>[92]</sup>, l'espèce *Euphorbia atlantica* Coss. possède 13 synonymes : *Euphorbia clementei* subsp. *clementei*, *Tithymalus atlantis* (Maire) Soják, *Euphorbia tetuanensis* Pau, *Euphorbia clementei* f. *hoz mariensis*, *Euphorbia clementei* var. *angustifolia*, *Euphorbia atlantica* var. *major*, *Euphorbia atlantis* f. *major*, *Euphorbia atlantis* var. *major*, *Euphorbia atlantis* var. *leiocarpa*, *Euphorbia atlantis* Maire, *Euphorbia clementei* var. *maroccana*, *Euphorbia clementei* f. *maroccana* et *Euphorbia atlantica* var. *leiocarpa*.

Cette espèce est connue aussi dans les régions versant-nord du Djurdjura occidental parmi les éboulis calcaires sous le nom vernaculaire **Er'radin** et elle a un autre nom ancien *Euphorbia verrucosa* Desf <sup>[93]</sup>. Dans la région des Aurès, elle est connue sous le nom **Hanghouthe**.

### I-2-6-3- Description botanique

*Euphorbia atlantica* Coss. (Figure I-3) est une plante vivace, multicaule. Les tiges sont décombantes puis redressées et simples de 20 à 30 cm <sup>[10, 93]</sup>.

- ✓ Les feuilles oblongues sont obtuses ou un peu aigués, atténués vers la base, sessiles, ciliolées et légèrement dentées aux bords.
- ✓ Les ombellaires et les florales sont arrondies.
- ✓ Les lobes de l'involucre sont ovales-oblongs et ciliés.
- ✓ Les capsules sans ailes sont lisses ou non.
- ✓ Les styles sont soudés au moins sur la moitié de leur longueur.



**Figure I-3:** *Euphorbia atlantica* Coss.

*Euphorbia atlantica* Coss. pousse dans les rocailles des montagnes des Aurès, du Djurdjura et des Babors <sup>[10]</sup>.

#### **I-2-6-4- Utilisation en médecine traditionnelle**

*Euphorbia atlantica* Coss. est une plante médicinale utilisée par la population locale des Aurès pour extirper les épines et les verrues. La décoction des racines de cette plante est employée comme anti-inflammatoire.

#### **I-2-6-5- Toxicité**

L'espèce *Euphorbia atlantica* Coss. est utilisée en Espagne, France, Angleterre et en Irlande comme un piscicide (poison pour les poissons). Cette utilisation est due à la présence de composés comme l'euphorbone, l'esculétine, et des acides organiques (tannoïde) dans le latex des euphorbes en général, qui affectent le système nerveux central du poisson induisant l'élargissement de sa vessie natatoire et par conséquent sa mort <sup>[94]</sup>.

#### **I-2-7- Etudes phytochimiques antérieures sur le genre *Euphorbia***

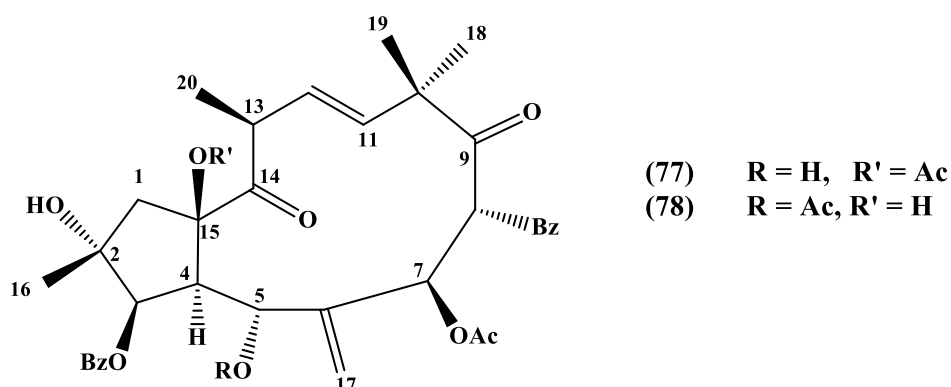
De nombreuses études phytochimiques réalisées sur les espèces du genre *Euphorbia* ont montré la présence d'une haute teneur en composés diterpéniques et triterpéniques (tétracycliques ou pentacycliques), stéroïdes, glycérols et en composés phénoliques

notamment les flavonoïdes et les esters aromatiques. Les huiles essentielles ont été aussi mises en évidence.

Etant donné la richesse du genre *Euphorbia* en métabolites secondaires, ainsi que l'utilisation de ses espèces en médecine traditionnelle, notre laboratoire a étudié quatre plantes de ce genre (*E. guyoniana*, *E. retusa*, *E. bupleuroides* et *E. pterococca*). Ces investigations ont permis l'identification de plus de 90 métabolites secondaires se répartissant en diterpènes, triterpènes et composés phénoliques [26-31]. Pour cela, nous nous sommes limités aux travaux qui concernent les études réalisées depuis 2014.

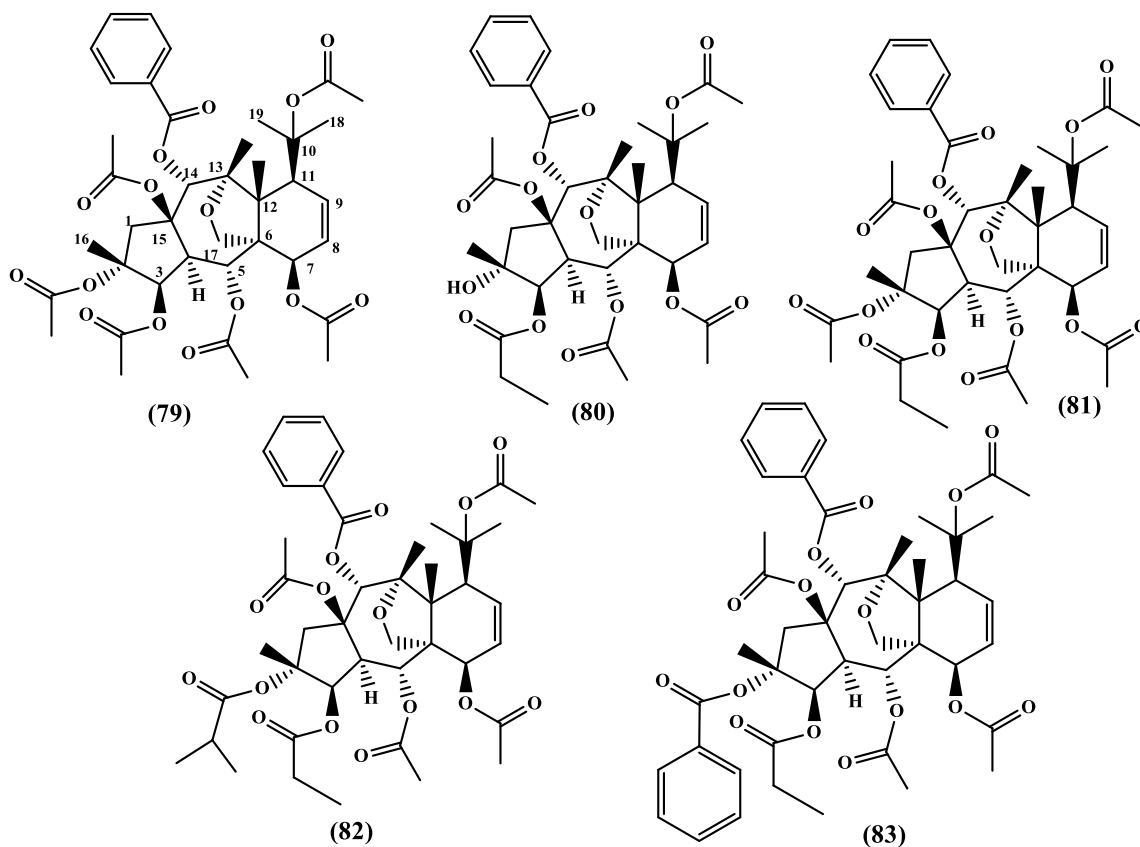
➤ *Euphorbia cyparissias* L.

L'étude phytochimique effectuée sur la plante entière *Euphorbia cyparissias* L. a conduit à l'isolement et l'identification de deux nouveaux diterpènes à squelette jatrophone, nommés cyparissins A (**77**) et cyparissins B (**78**). Leurs structures ont été établies par RMN 1D et 2D et la spectrométrie de masse [95].

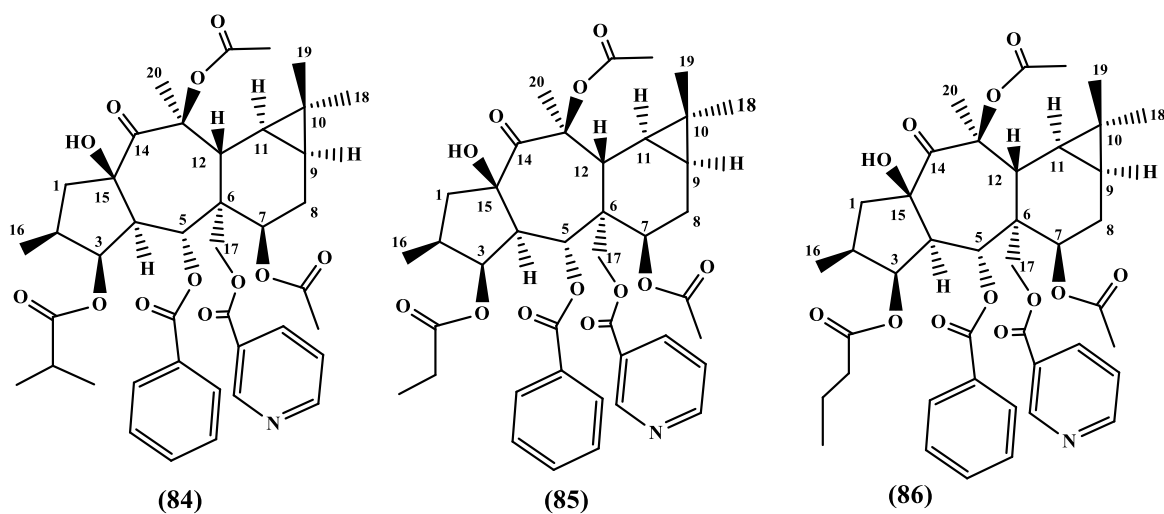


➤ *Euphorbia dracunculoides* Lam.

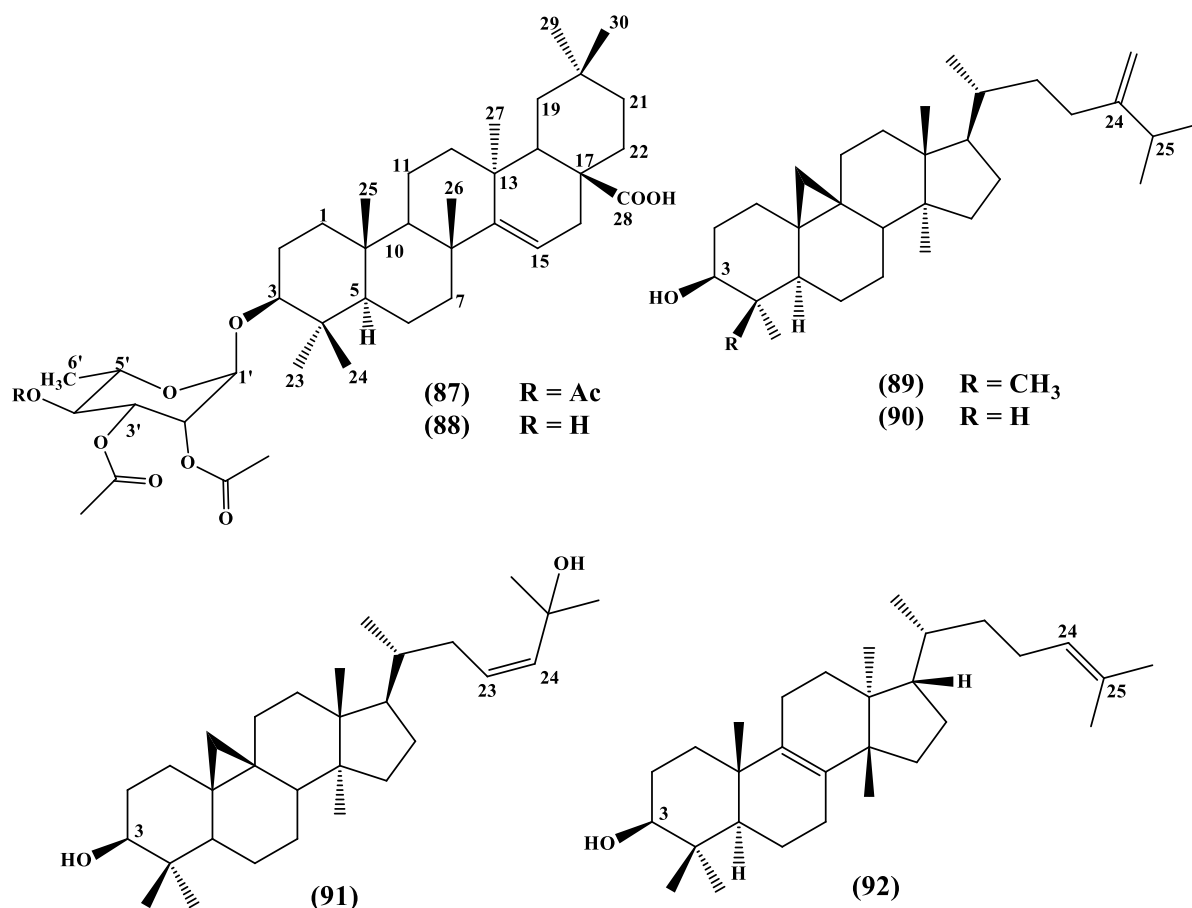
A partir de l'extrait éther de pétrole des parties aériennes de l'espèce *Euphorbia dracunculoides* Lam., deux nouveaux diterpénoïdes de type myrinsol, euphordracunculins A (**79**) et euphordracunculins B (**80**), ainsi que trois dérivés connus euphorprolithérine B (**81**), proliférins A (**82**) et B (**83**) ont été isolés et caractérisés par les différentes méthodes spectroscopiques [96].



L'investigation phytochimique de l'extrait acétone aqueux de la même espèce a donné un nouveau diterpénoïde polyester de type premyrsinane, 3 $\beta$ -*O*-isobutyryl-5 $\alpha$ -*O*-benzoyl-7 $\beta$ ,13 $\beta$ -di-*O*-acétyl-17-*O*-nicotinoylpremyrsinol (**84**) et deux analogues connus, euphorbioloids C (**85**) et D (**86**). Les structures moléculaires de ces composés ont été identifiées par spectroscopie de masse ESI-MS, RMN 1D et 2D et par comparaison avec les données rapportées dans la littérature [97].



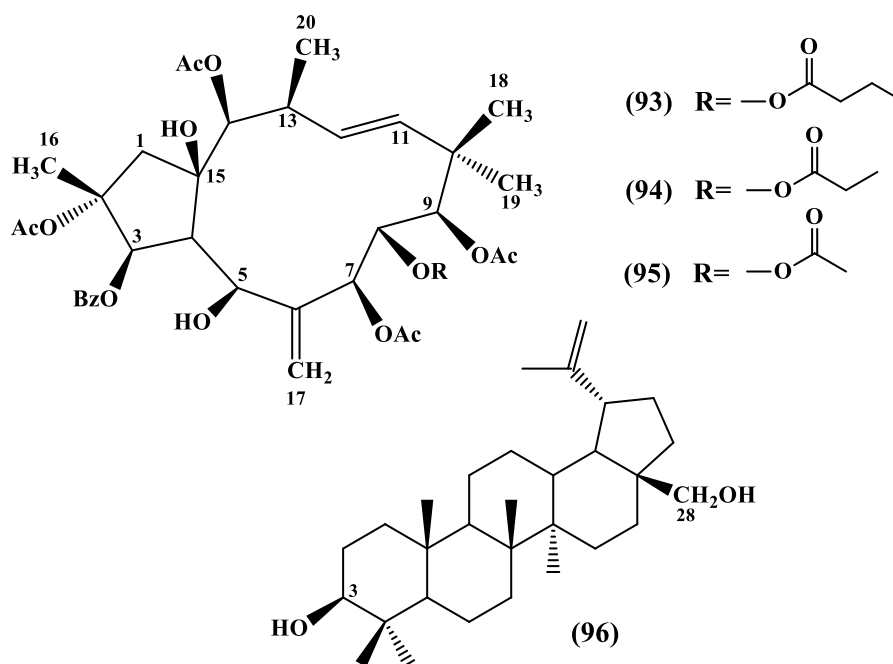
Une autre étude effectuée sur les parties aériennes de la plante *E. dracunculoides* Lam. a fourni six triterpènes dont deux sont nouveaux : acide 3 $\beta$ -O-[ $\alpha$ -L-(2',3',4'-O-triacétyl)-rhamnopyranosyl]-aleuritolique (**87**), acide 3 $\beta$ -O-[ $\alpha$ -L-(2',3'-O-diacétyl)-rhamnopyranosyl]-aleuritolique (**88**), 24-méthylèncycloart-3 $\beta$ -ol (**89**), cycloeucaoléol (**90**), cycloart-23Z-ène-3 $\beta$ ,25-diol (**91**) et euphol (**92**) [98].



➤ *Euphorbia osyridea* Bioss.

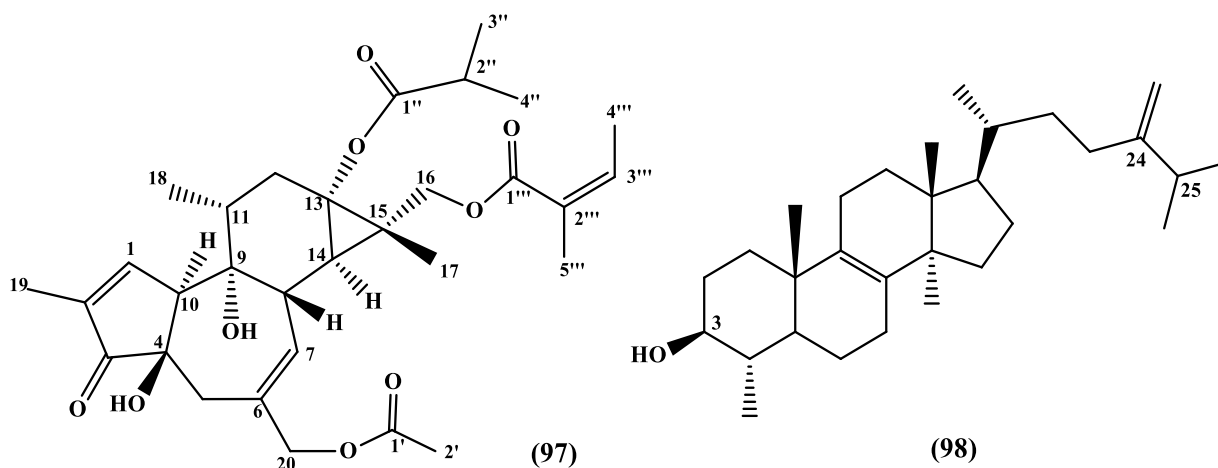
L'investigation chimique réalisée sur l'espèce *Euphorbia osyridea* Bioss. aussi appelée *Euphorbia lateriflora* Schumach. & Thonn a mené à l'isolement de trois nouveaux diterpènes à squelette jatropane: 2,7,9,14-tétra-acétyl-3-benzoyl-8-butanoyl-5,15-dihydroxy-6(17),11 (*E*)-jatrophadiène (**93**), 2,7,9,14-tétra-acétyl-3-benzoyl-8-propanoyl-5,15-dihydroxy-6(17),11 (*E*)-jatrophadiène (**94**) et 2,7,9,14-tétra-acétyl-3-benzoyl-8-acétyl-5,15-dihydroxy-6(17),11 (*E*)-jatrophadiène (**95**), ainsi que trois triterpènes connus betuline (**96**), 24-méthylèncycloart-3 $\beta$ -ol (**89**) et cycloart-23Z-ène-3( $\beta$ ),25-diol (**91**) [99].





➤ *Euphorbia cooperi* N.E.Br.

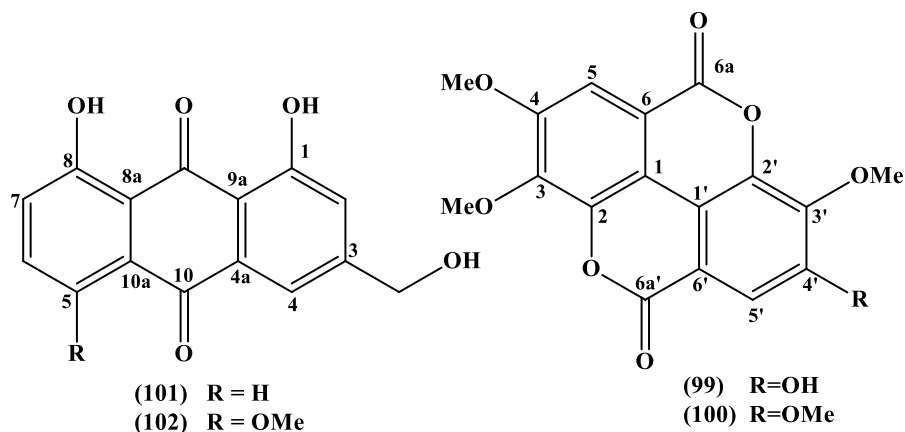
Un diterpène de type phorbol à squelette tigiane: 12-déoxyphorbol-13-isobutyrate-16-angelate-20-acétate (97) et deux triterpènes : euphol (92) et obtusifoliol (98) ont été isolés pour la première fois à partir de la fraction chloroformique du latex de la plante *Euphorbia cooperi* N.E.Br [100].



➤ *Euphorbia polyacantha* Boiss.

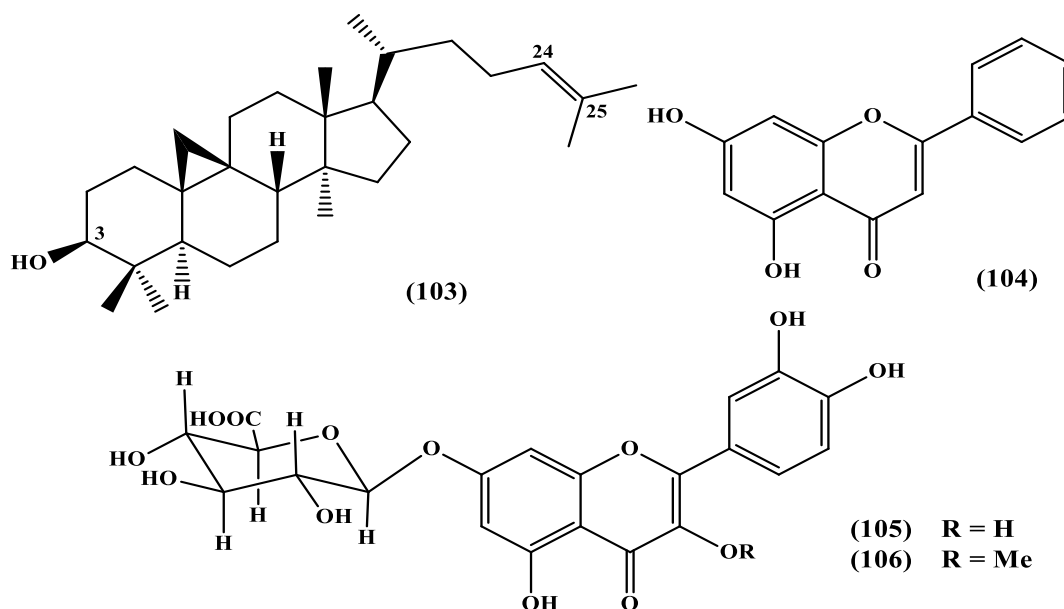
A partir de l'extrait acétate d'éthyle des tiges de l'espèce *Euphorbia polyacantha* Boiss., en plus de trois polyphénols connus: acide 3,4,3'-tri-*O*-méthylellagique (99) et acide 3,3',4,4'-tétra-*O*-méthylellagique (100) et aloé emodin (101), une nouvelle anthraquinone

nommée 1,8-dihydroxy-3-(hydroxyméthyl)-5-méthoxyanthracène-9,10-dione (**102**) a été isolée et élucidée par RMN multi-impulsionnelle et spectrométrie de masse <sup>[101]</sup>.



### ➤ *Euphorbia schimperianus* Scheele

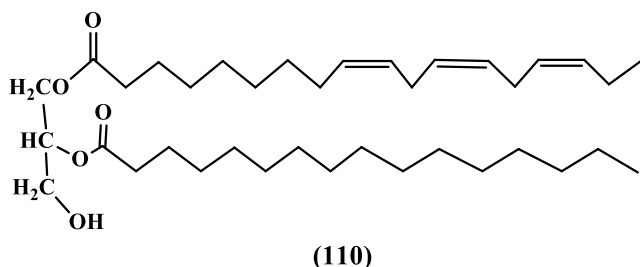
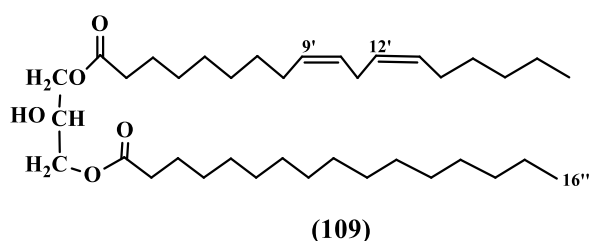
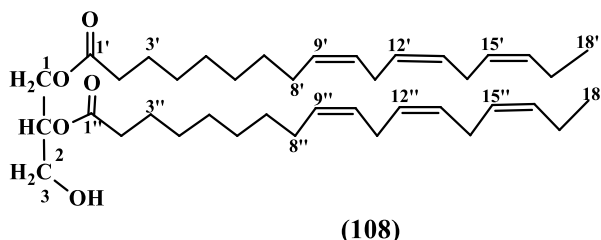
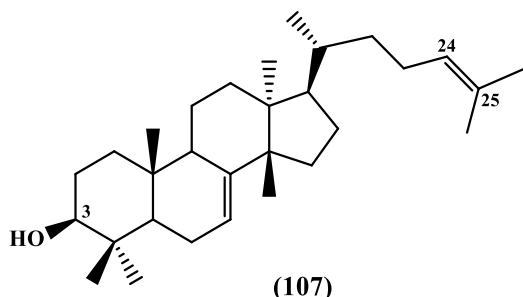
Quatre composés ont été isolés à partir de la plante *Euphorbia schimperiana* Scheele : 3 $\beta$ -cycloarténol (**103**), chryisine (**104**), quercétine-7-*O*- $\beta$ -D-glucoronside (**105**) et 3-méthylquercétine-7-*O*- $\beta$ -D-glucoronside (**106**). Leurs structures ont été élucidées par diverses méthodes spectroscopiques (la spectrométrie de masse et la résonance magnétique nucléaire) et aussi par la comparaison avec les données de la littérature <sup>[102]</sup>.



### ➤ *Euphorbia macrostegia* Boiss.

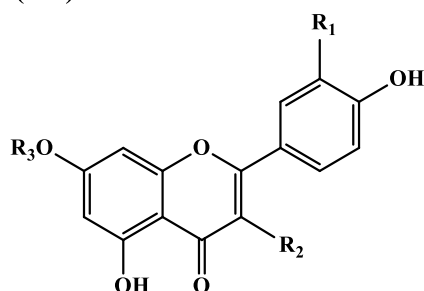
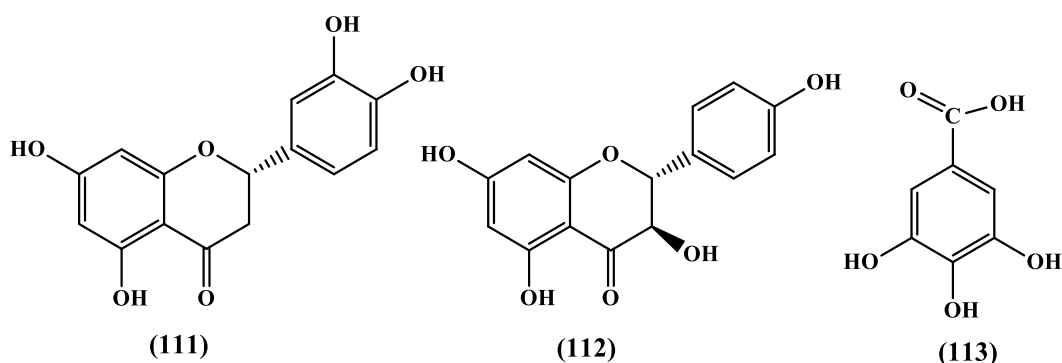
La purification de l'extrait éther de pétrole obtenu à partir de l'espèce *Euphorbia macrostegia* Boiss. a conduit à l'isolement et l'identification de six métabolites secondaires

incluant trois triterpènes: 24-méthylèncycloartan-3 $\beta$ -ol (**89**), butyrospermol (**107**) et 3 $\beta$ -cycloarténol (**103**) et trois diglycérides : 1,2-di-*O*- $\alpha$ -linolénoyl-*sn*-glycerol (**108**), 1-*O*-linoléoyl-3-*O*-palmitoyl-*sn*-glycérol (**109**) et 1-*O*- $\alpha$ -linolénoyl-2-*O*-palmitoyl-*sn*-glycérol (**110**) [103].



### *Euphorbia cuneata* VHL

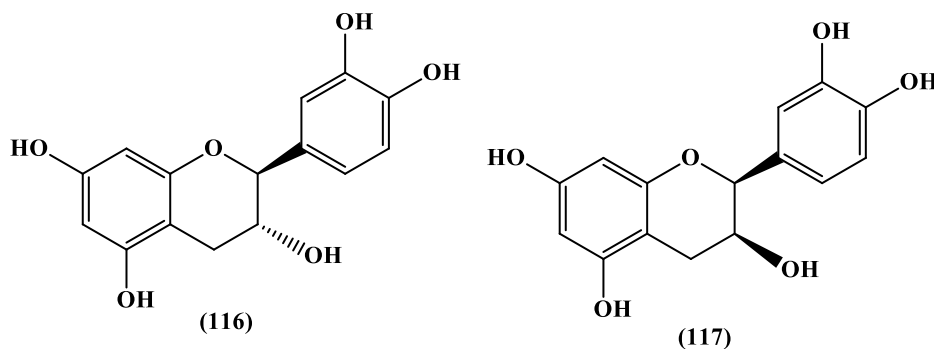
Les travaux réalisés sur les parties aériennes de l'espèce *E. cuneata* VHL ont permis d'isoler huit composés nommés naringénine (**111**), aromadendrine (**112**), apigénine (**73**), acide gallique (**113**), 3'-*O*-méthoxylutéoline-7-*O*-rhamnoglucoside (**114**), apigénine-7-*O*-galactoside (**115**), kaempférol (**71**) et quercétine (**72**) [25].



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
(114)	OCH <sub>3</sub>	H	Rha-Glu
(115)	H	H	Gal

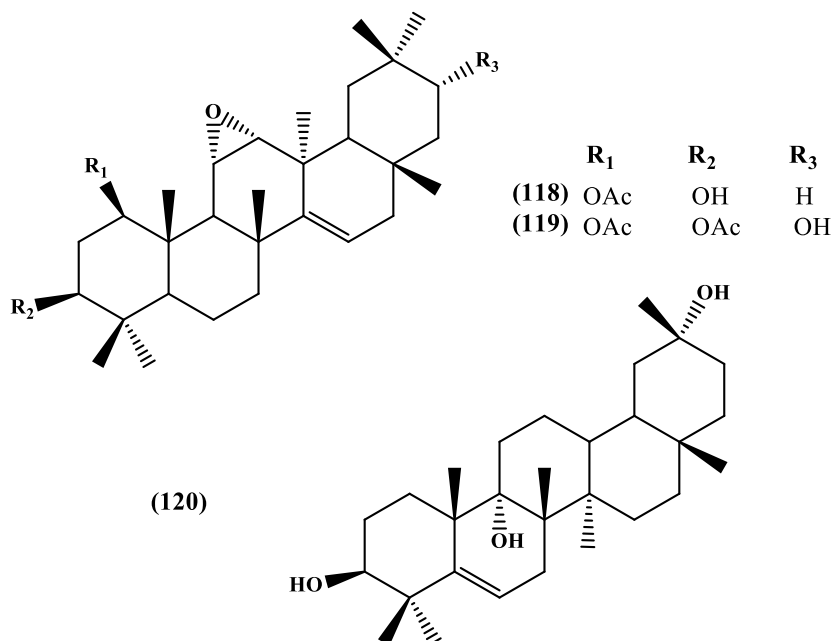
➤ *Euphorbia thymifolia* Linn

L'investigation phytochimique de l'extrait méthanolique de l'espèce *E. thymifolia* a abouti à l'isolement de deux flavanols isomères : catéchine (**116**) et épicatechine (**117**) [104].



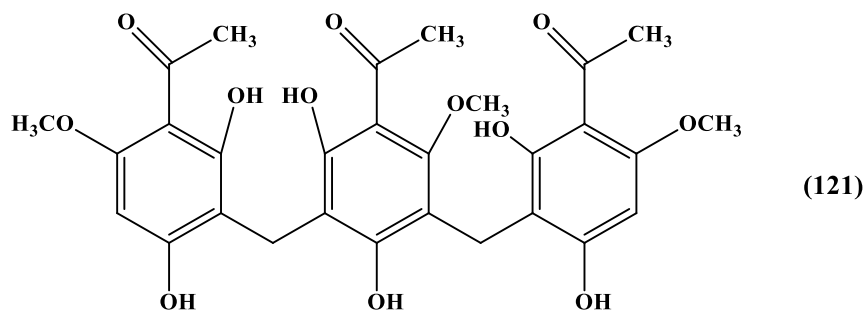
➤ *Euphorbia geniculata* Ortega

L'étude chimique de cette plante a conduit à la purification de trois triterpènes nouveaux appelés geniculolide A (**118**), geniculolide B (**119**) et geniculolide C (**120**) [105].



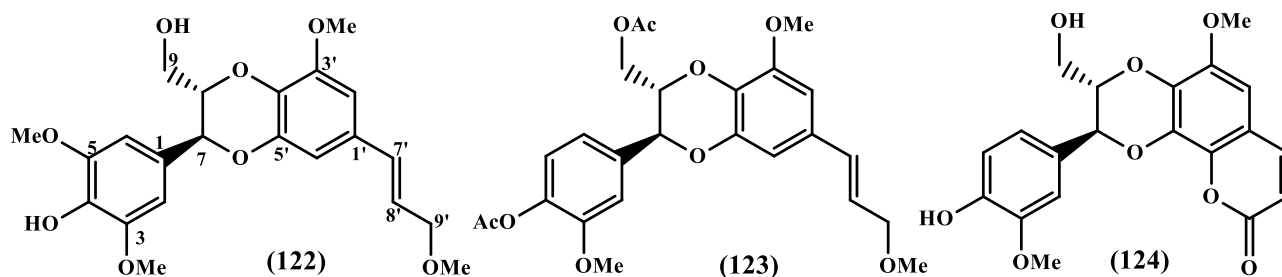
➤ *Euphorbia ebracteolata* Hayata

L'étude réalisée sur les racines de l'espèce *Euphorbia ebracteolata* a mis en évidence la présence d'un nouveau acétophénone nommé ebractéolatine C (**121**) [106].



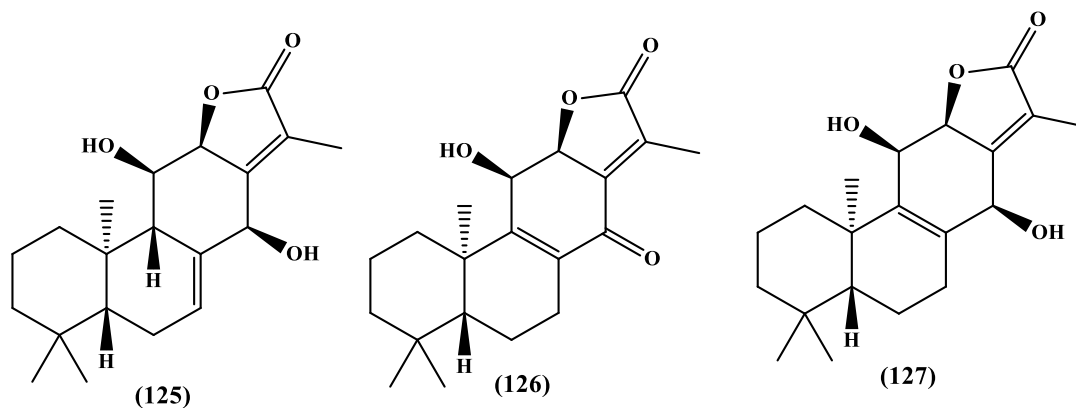
➤ *Euphorbia antiquorum* L.

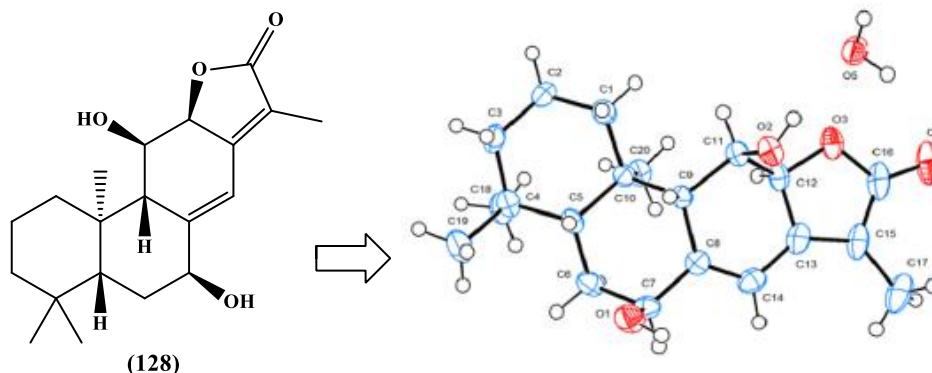
A partir des parties aériennes de la plante *E. antiquorum* trois nouveaux néolignanes ont été isolés: 7*S*,8*S*-4,9-dihydroxy-3,5,3',9'-tétraméthoxy-7-*O*-5',8-*O*-4'-néolignane (122), 7*S*,8*S*-4,9-diacétyl-3,3',9'-triméthoxy-7-*O*-5',8-*O*-4'-néolignane (123) et 3'-hydroxycléomiscosine B (124). Leurs structures ont été déterminées par analyse spectroscopique, y compris RMN 1D, RMN 2D et HR-ESI-MS [107].



➤ *Euphorbia fischeriana* Steud.

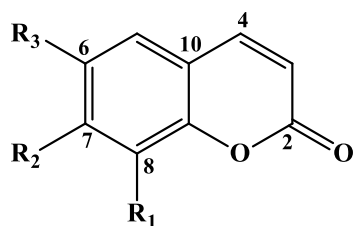
L'étude phytochimique réalisée sur l'espèce *E. fischeriana* a conduit à l'isolement et l'identification de quatre diterpènes nommés fischeriolide A (125), fischeriolide B (126), fischeriolide C (127) et fischeriolide D (128). La structure du composé fischeriolide D (128) a été déterminée par analyse des rayons X [108].





➤ *Euphorbia hirta* L.

L'investigation chimique réalisée sur l'espèce *Euphorbia hirta* a abouti à l'isolement et l'identification de sept coumarines à savoir umbelliférone (**129**), 6,7,8-triméthoxyl-coumarine (**130**), scoparone (**131**), scopolétine (**132**), isoscopolétine (**133**), esculétine (**134**) et daphnoretine (**135**) et quatre lignanes incluant (-)-pinorésinol (**136**), (+)-syringarésinol (**137**), (-)-pinorésinol glucoside (**138**) et (+)-syringarésinol glucoside (**139**) [109].



(129)  $R_1 = R_3 = H, R_2 = OH$

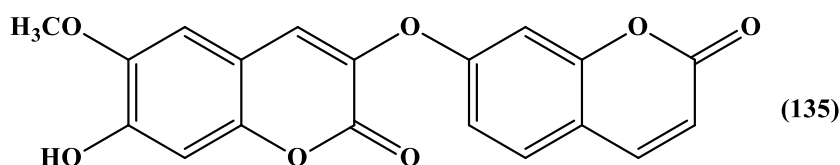
(130)  $R_1 = R_2 = R_3 = OCH_3$

(131)  $R_1 = H, R_2 = R_3 = OCH_3$

(132)  $R_1 = H, R_2 = OCH_3, R_3 = OH$

(133)  $R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = OCH_3$

(134)  $R_1 = H, R_2 = R_3 = OH$

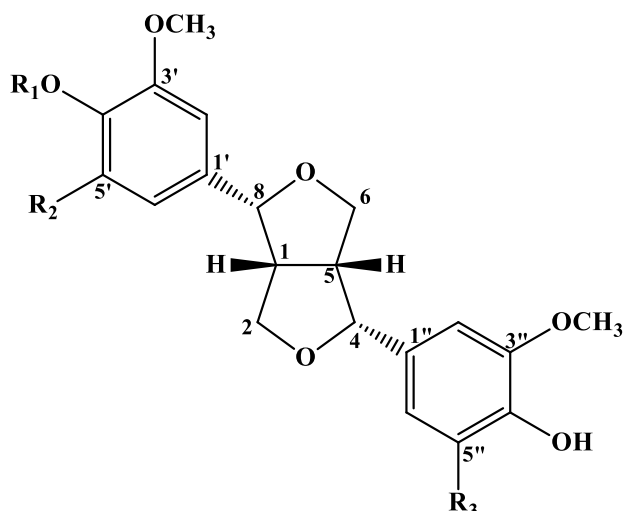


(136)  $R_1 = R_2 = R_3 = H$

(137)  $R_1 = H, R_2 = R_3 = OCH_3$

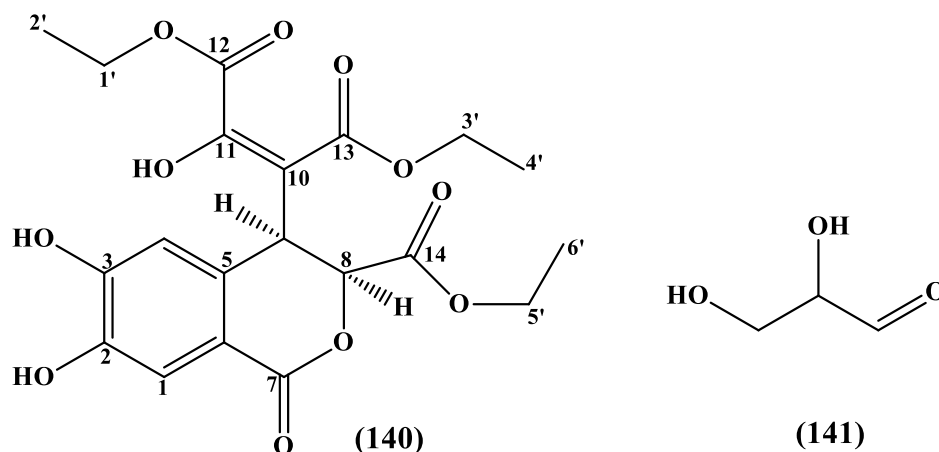
(138)  $R_1 = Glc, R_2 = R_3 = H$

(139)  $R_1 = Glc, R_2 = R_3 = OCH_3$



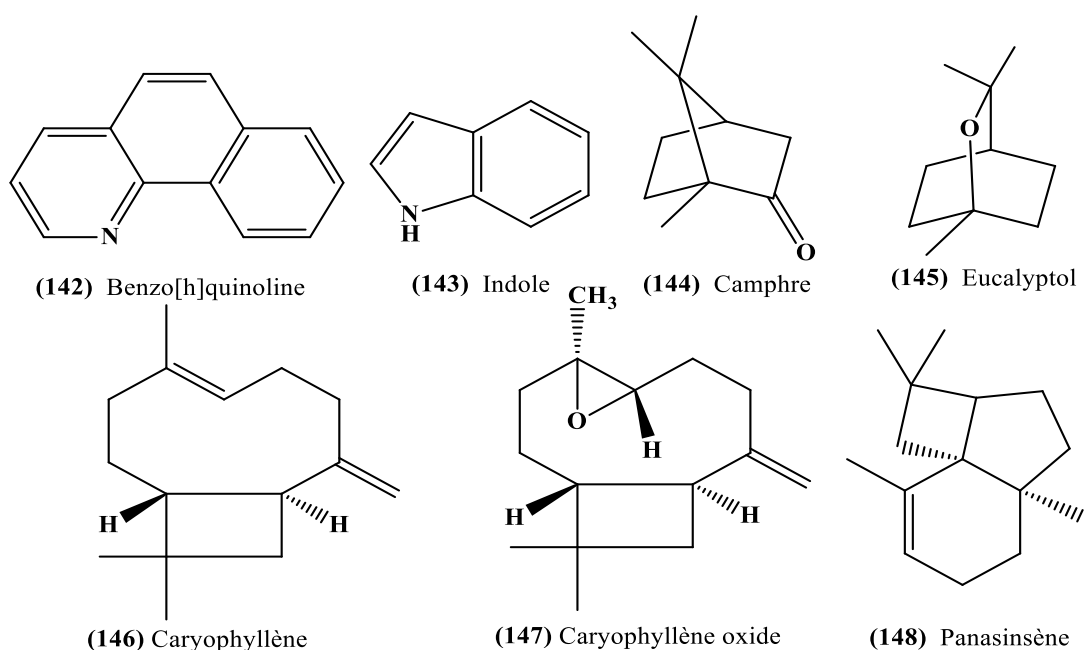
➤ *Euphorbia wallichii* Hook. f.

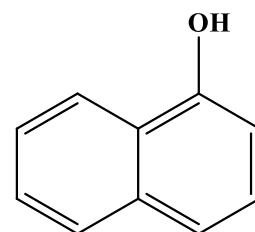
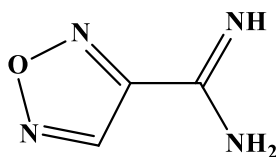
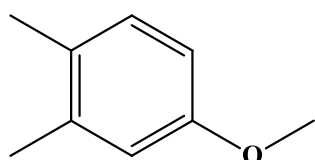
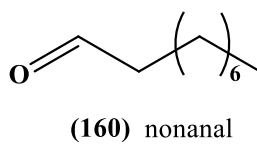
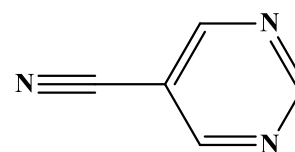
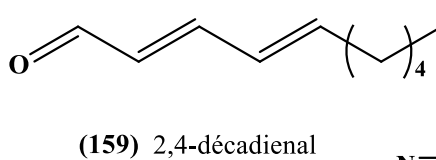
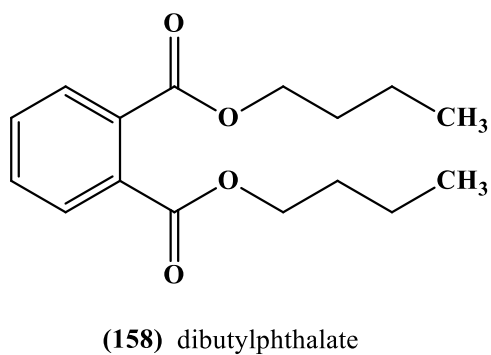
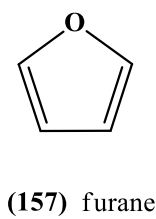
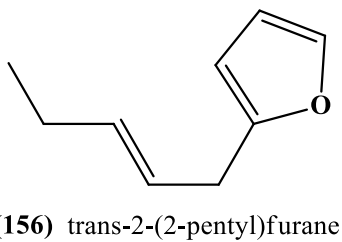
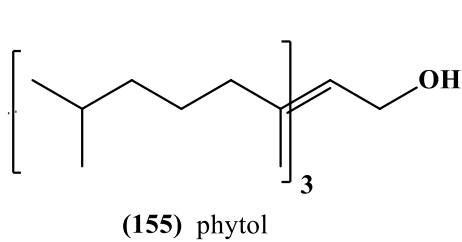
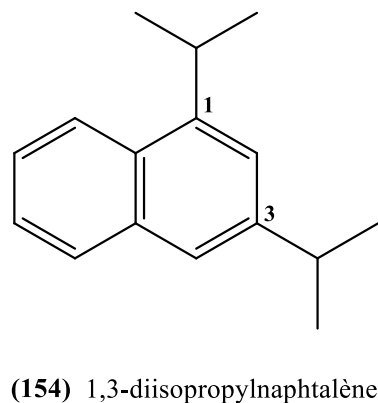
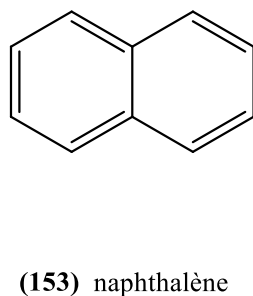
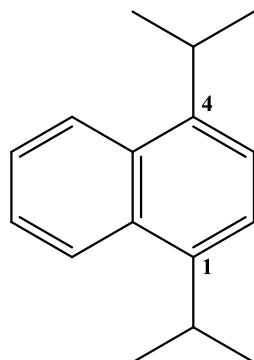
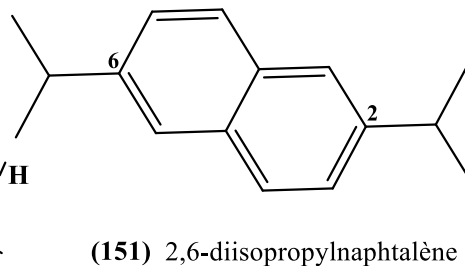
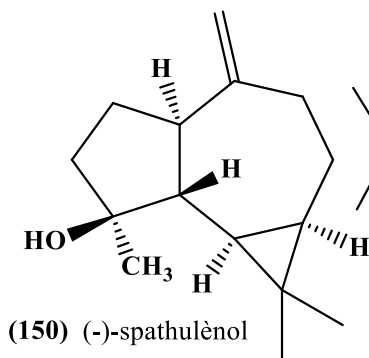
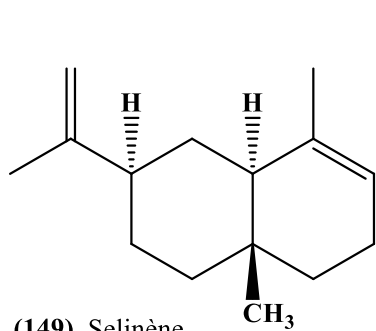
Un dérivé coumarine nommé 8-éthylcarboxylate-9-diéthylcarboxylate-11-ol-10,11-Z-2,3-dihydroxy dihydrocoumarine (140) et deux composés connus quercétine (72) et glycéraldéhyde (142) ont été isolés à partir de la plante entière *Euphorbia wallichii*. Leurs structures ont été déterminées par analyse spectroscopique (RMN et ESI-MS) et par comparaison avec les données rapportées dans la littérature [110].



➤ *Euphorbia golondrina* L.C. Wheeler

L'étude des huiles essentielles contenues dans la plante *Euphorbia golondrina* a conduit à l'identification de 23 composés, en utilisant la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) [111].

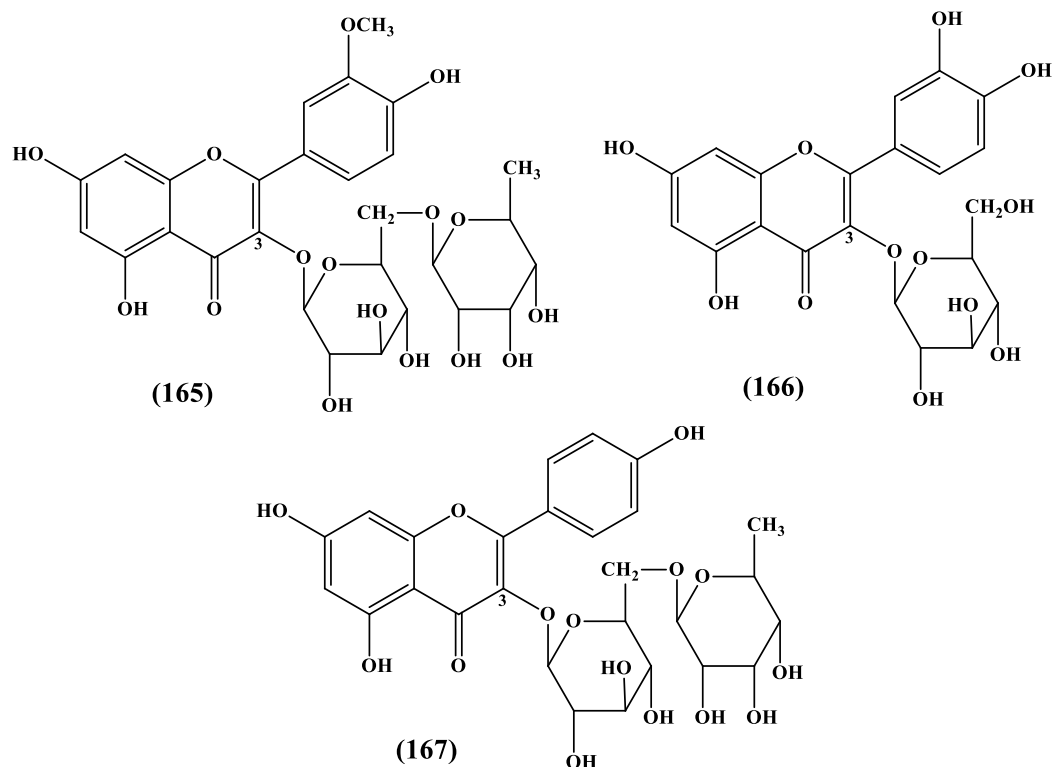






➤ *Euphorbia condylocarpa* M. Bieb.

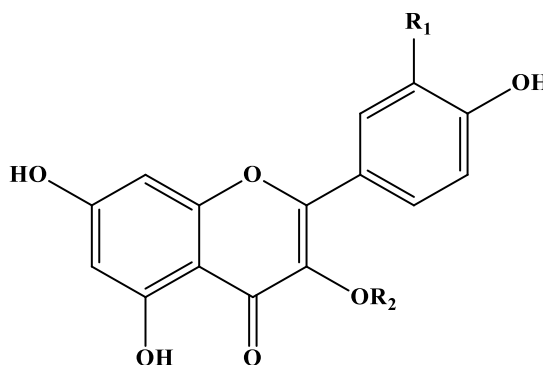
Quatre flavonoïdes ont été isolés à partir des parties racinaires de la plante *Euphorbia condylocarpa* incluant apigénine (73), isorhamnétine-3-*O*-rutinoside (165), quercétine-3-*O*-glucoside (166) et kaempférol-3-*O*-rutinoside (167) [112].

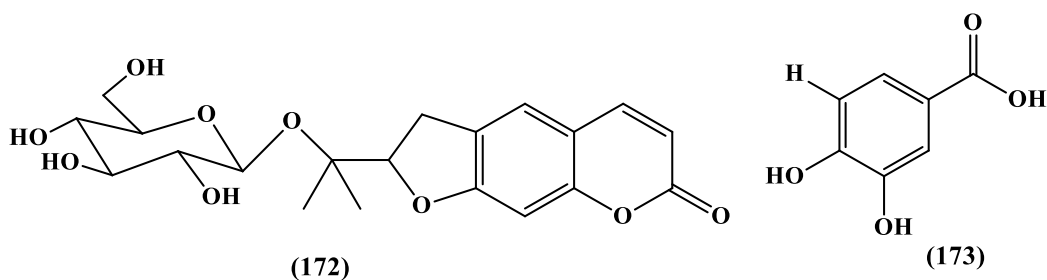


➤ *Euphorbia supina* Raf.

L'étude phytochimique effectuée sur la plante *Euphorbia supina* a mené à l'identification de neuf composés à savoir : acide gallique (113), quercétine (72), kaempférol (71), quercétine-3-*O*-hexoside (168), quercétine-3-*O*-pentoside (169), kaempférol-3-*O*-hexoside (170), kaempférol-3-*O*-pentoside (171), nodakenine (172) et acide protocatechique (173) [113].

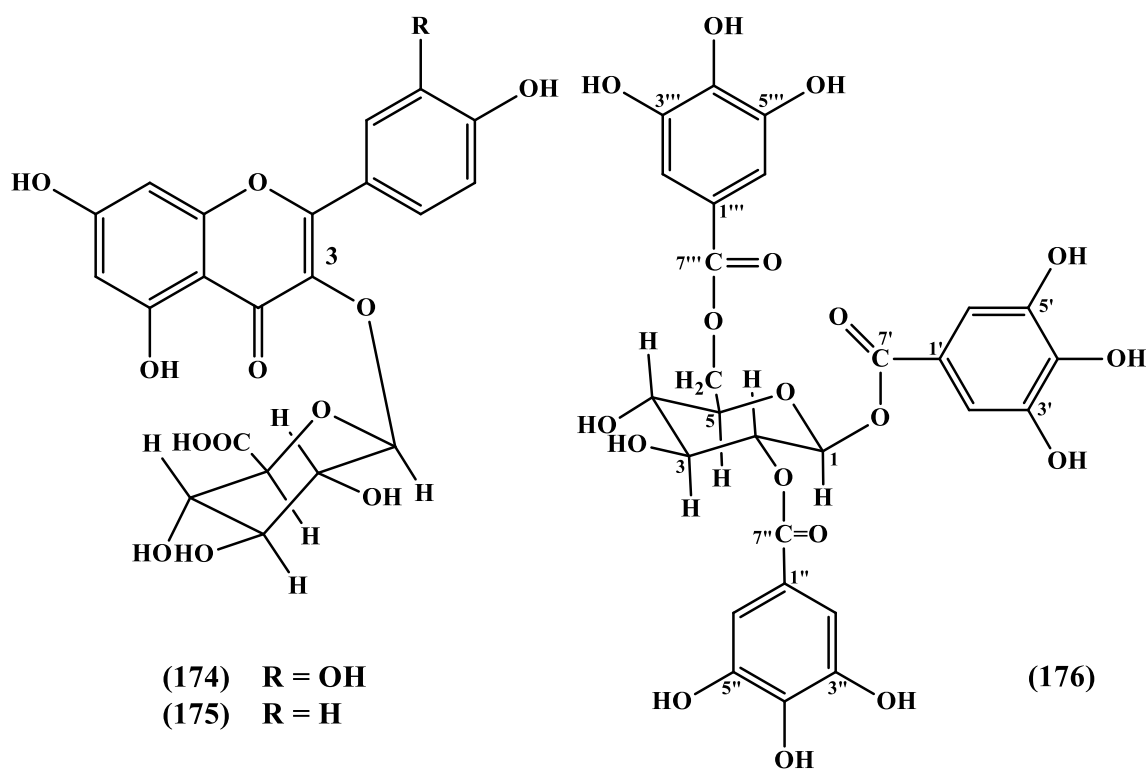
- (168) R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = hexosyl  
 (169) R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = pentosyl  
 (170) R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = hexosyl  
 (171) R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = pentosyl





➤ *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.

L'utilisation de la chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP) a permis l'isolement de deux flavonoïdes et un tanin gallique: Quercétine-3-*O*-β-D-glucuronide (**174**), kaempférol-3-*O*-β-D-glucuronide (**175**) et 1,2,6-tri-*O*-galloyl-β-D-glucose (**176**). Ceci à partir des parties aériennes de l'espèce *Euphorbia guyoniana* [114].

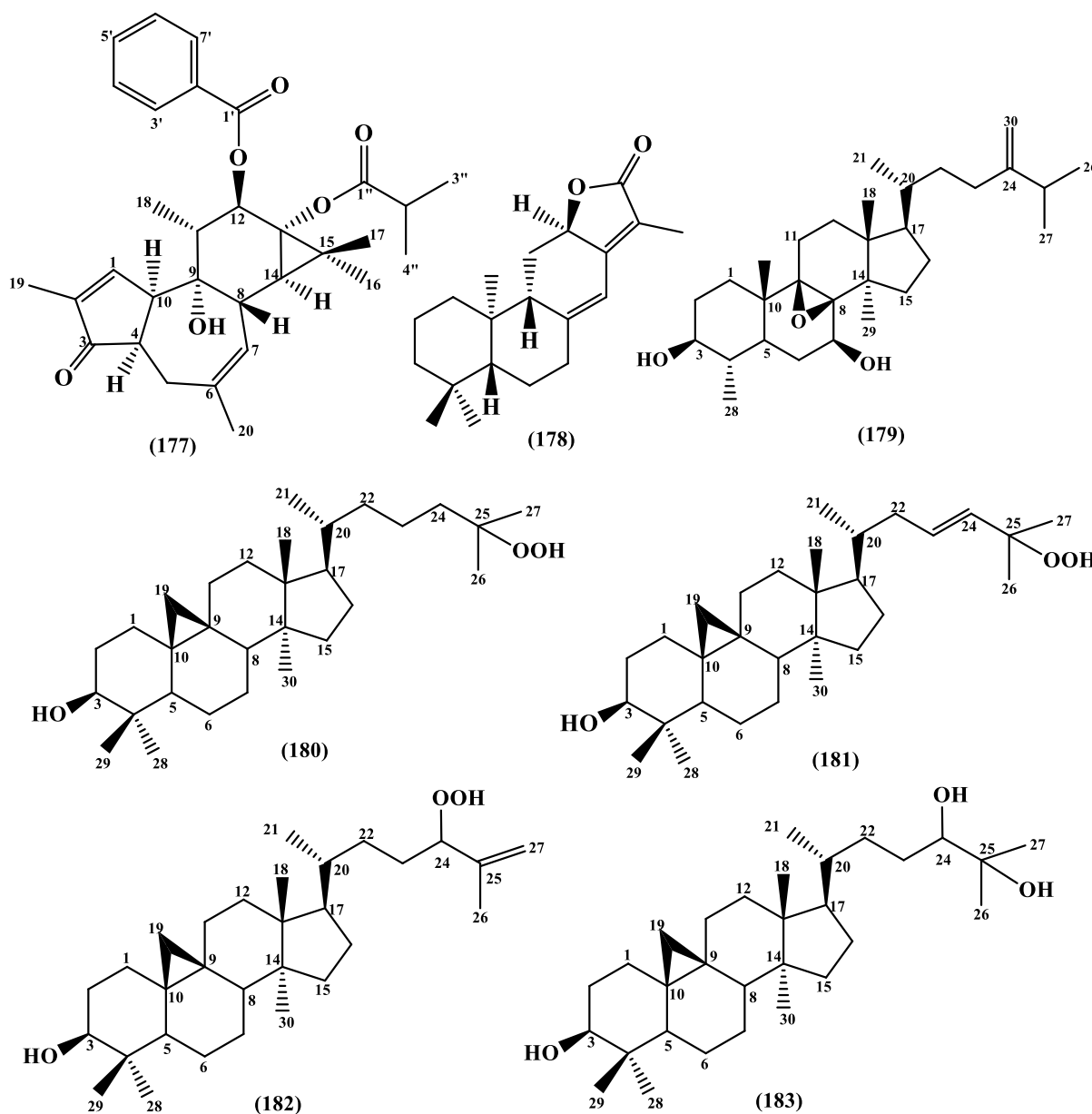


➤ *Euphorbia bupleuroides* Desf.

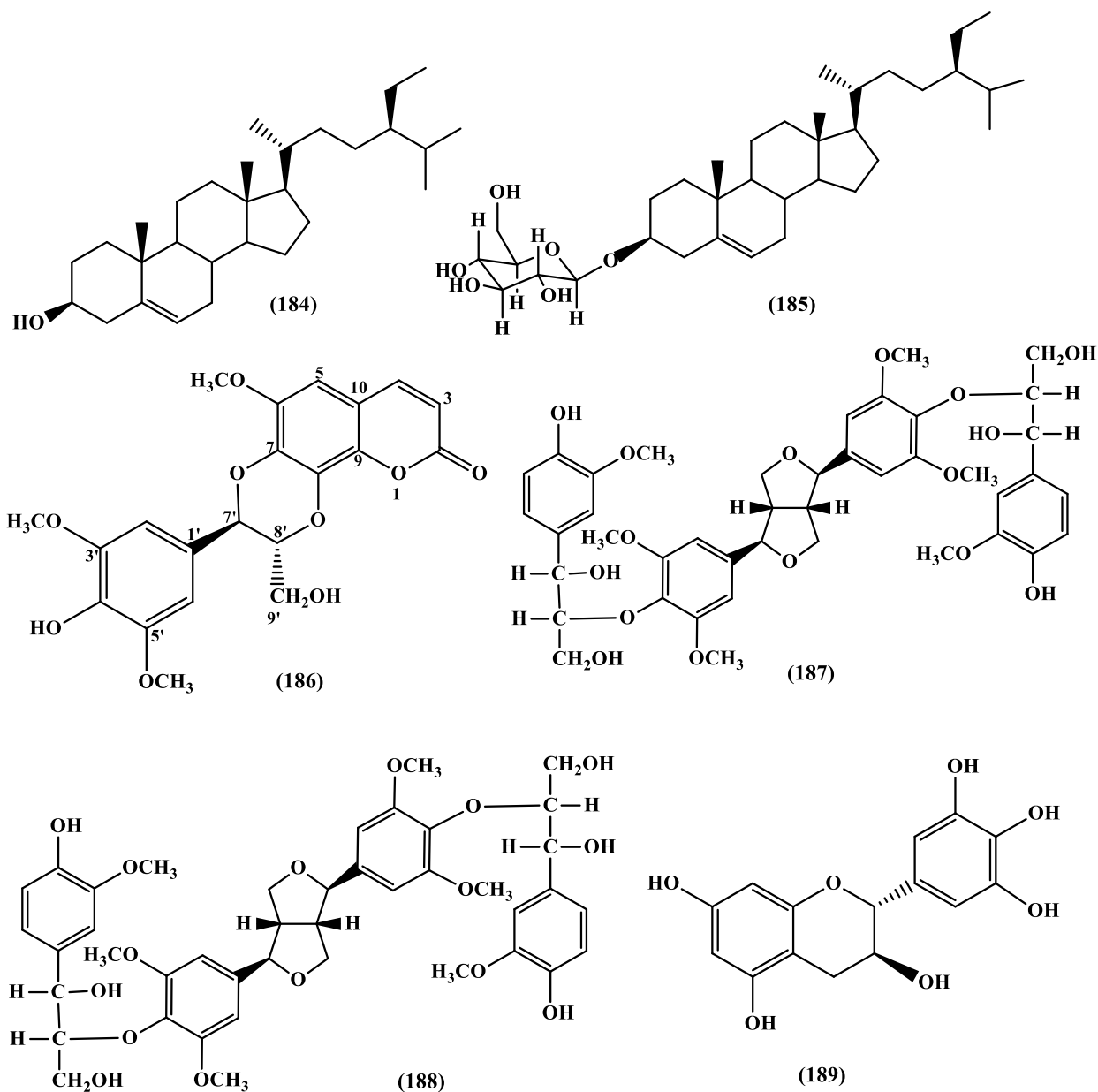
L'étude chimique réalisée sur l'espèce *Euphorbia bupleuroides* a permis l'isolement et l'identification de 20 métabolites secondaires dont trois sont nouveaux (**177**, **179** et **180**). Ces composés se répartissent en [30]:

- Deux diterpènes de types phorbol et *ent*-abiétane 4,20-didéoxy(4α)phorbol-12-benzoate-13-isobutyrate (**177**) et jolkinolide E (**178**), respectivement.

- Deux triterpènes à squelette ergostane : 3 $\beta$ ,7 $\beta$ -dihydroxy-4 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -diméthyl-8 $\beta$ ,9 $\beta$ -époxy-5 $\alpha$ -ergosta-24(28)-ène (**179**) et obtusifoliol (**98**)
- Huit triterpènes cycloartaniques : 25-hydroperoxycycloartan-3 $\beta$ -ol (**180**), 25-hydroperoxycycloart-23*E*-èn-3 $\beta$ -ol (**181**), 3 $\beta$ -hydroxycycloart-25-èn-24-hydroperoxyde (**182**), cycloart-23*Z*-ène-3 $\beta$ ,25-diol (**91**), cycloart-3 $\beta$ ,24,25-triol (**183**), 3 $\beta$ -cycloarténol (**103**), 24-méthyl-ènecycloartan-3 $\beta$ -ol (**89**) et cycloeucalénol (**90**).



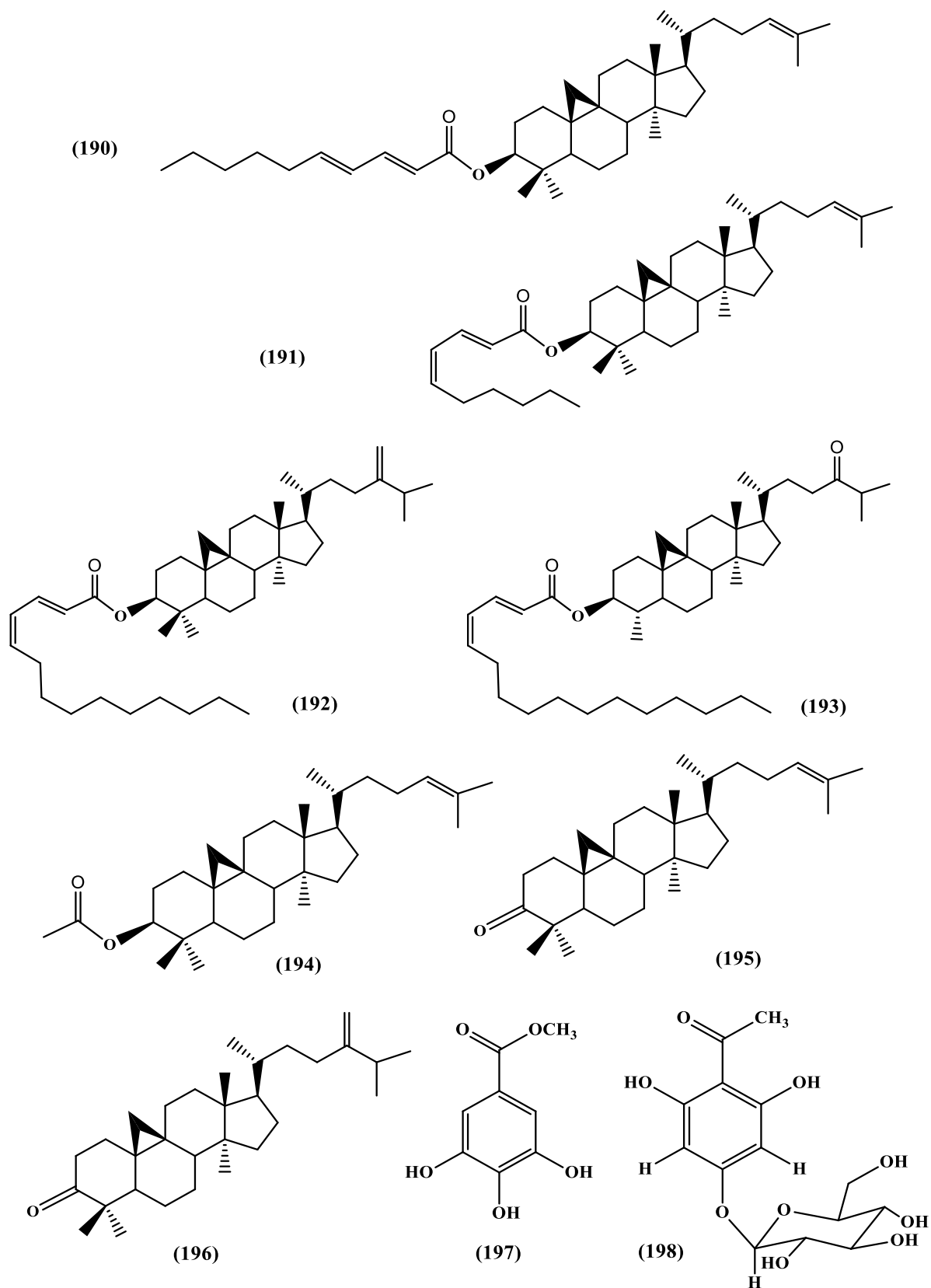
- Deux phytostérols :  $\beta$ -sitostérol (**184**) et daucostérol (**185**)
- Deux coumarines : scopolétine (**132**) et cléomiscosine C (**186**)
- Deux lignanes : hedyotisol A (**187**) et hedyotisol B (**188**)
- Deux flavanes : (-)-catéchine (**116**) et (-)-gallocatéchine (**189**)



➤ *Euphorbia pterococca* Brot.

L'étude de l'extrait acétonique de la plante *Euphorbia pterococca* a permis la détermination structurale de 15 composés. 4 triterpènes à squelette cycloartane nouveaux : cycloartényl-2'*E*,4'*E*-decadiénoate (190), cycloartényl-2'*E*,4'*Z*-decadiénoate (191), 24-méthylèneglycylcycloartanyl-2'*E*,4'*Z*-tétradecadiénoate (192), 24-oxo-29-norcycloartanyl-2'*E*,4'*Z*-hexadecadiénoate (193), 9 triterpènes tetracycliques connus cycloartényl acétate (194), 3 $\beta$ -cycloarténol (103), cycloarténone (195), 24-méthylèneglycylcycloartan-3 $\beta$ -ol (89), 24-méthylèneglycylcycloartanone (196), cycloeucaéolol (90), obtusifoliol (98),  $\beta$ -sitostérol (184), daucostérol

(185), et deux composés phénoliques méthyl gallate (197) et phloroacétophénone 4-*O*-β-D-glucopyranoside (198) [31].



# *Chapitre II*

## *Généralités sur les isoflavonoïdes*

## II-1- Isoflavonoïdes

Les isoflavonoïdes sont des composés phénoliques d'origine naturelle. Structuellement et biogénétiquement, ils sont étroitement liés aux composés flavonoidiques qui sont des dérivés de 1,3-diphénylpropane. Ils sont caractérisés par la migration du noyau B en position 2 vers la position 3. Par ailleurs, les isoflavonoïdes ont une distribution très limitée dans le règne végétal et sont presque entièrement limités à la sous-famille Papilionoideae de la famille Fabaceae. Cette spécificité est probablement due à la présence dans cette famille de l'enzyme responsable du réarrangement du 2-phénylchromone (flavanone) au 3-phényl-chromone (isoflavone) [17].

## II-2- Biosynthèse des isoflavonoïdes

Les isoflavonoïdes sont synthétisés par la voie des phénylpropanoïdes, une branche trouvée dans tout le règne végétal et aboutissant à une grande variété de métabolites secondaires, y compris des flavonoïdes, des tanins condensés, des monolignols et des stilbénoides [115].

La première étape de la voie des phénylpropanoïdes est la phénylalanine ammoniac lyase (PAL), qui catalyse l'élimination de l'ammoniac à partir de la phénylalanine pour produire la phénylalanine cinnamate. Cette dernière est convertie en *p*-coumarate en présence de l'enzyme cinnamate 4-hydroxylase (C4H). La dernière étape de cette voie (Figure II-1) est la conversion du *p*-coumarate en *p*-coumaroyl-CoA par la 4-coumarate-CoA ligase (4CL) [116, 117].

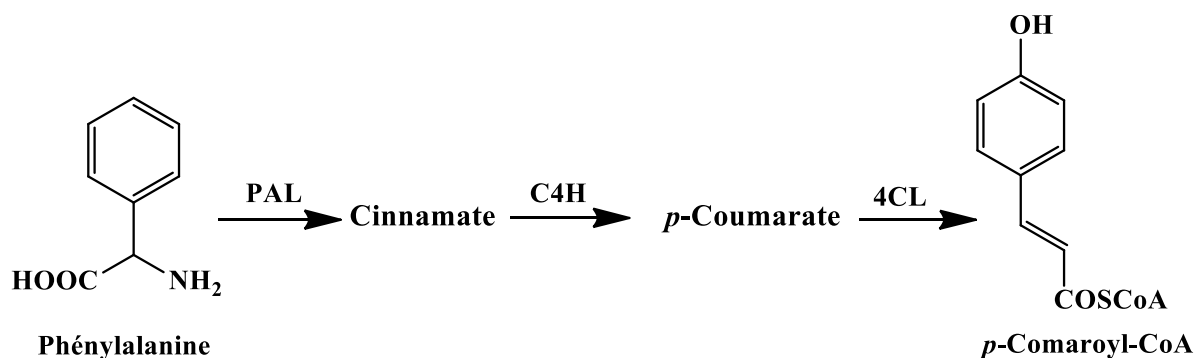
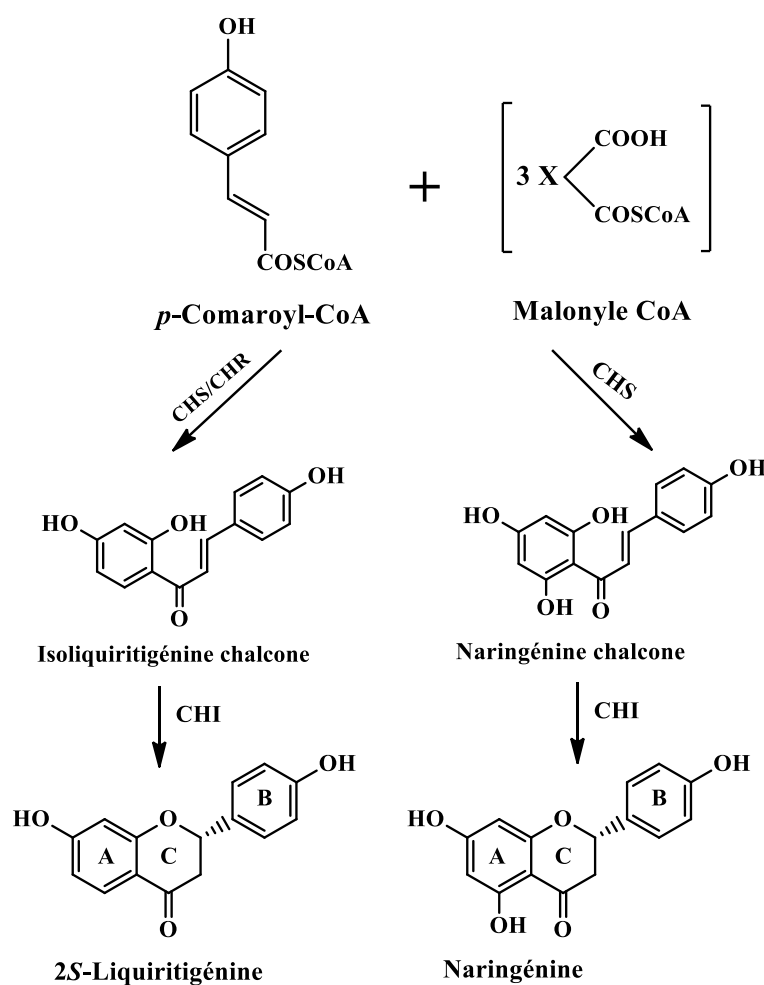


Figure II-1 : Formation de *p*-Coumaroyl-CoA

Tous les flavonoïdes et isoflavonoïdes sont construits à partir d'un squelette de la chalcone, qui est synthétisé en présence de la chalcone synthase CHS. Cette enzyme intervient dans la cyclisation intramoléculaire d'une molécule de *p*-coumaroyl-CoA et 3 malonyl-CoA

pour former une chalcone tétrahydroxybicyclique (naringénine chalcone), mais les plantes de la famille Fabaceae produisent en plus un trihydroxychalcone (chalcone isoliquiritigénine) grâce à l'activité couplée de CHS et la chalcone réductase (CHR) [118]. La cyclisation des deux chalcones (naringénine et isoliquiritigénine) se fait par l'enzyme chalcone isomérase (CHI) responsable de la cyclisation spontanée des chalcones intermédiaires pour former le noyau flavone [119] (Figure II-2).



**Figure II-2** : Formation du noyau flavone

La première étape impliquée dans la voie de biosynthèse des isoflavonoïdes est la migration du noyau B en position 2 à la position 3. Cette réaction est catalysée par l'enzyme isoflavone synthase (IFS), qui mène immédiatement au produit 2-hydroxyisoflavanone [120, 121]. Ce dernier est déshydraté en présence de l'enzyme hydroxyisoflavanone 2-déshydratase (HID) pour donner les isoflavones correspondantes génistéine et daidzéine (Figure II-3) qui sont métabolisées en différentes sous-classes d'isoflavonoïdes [122].



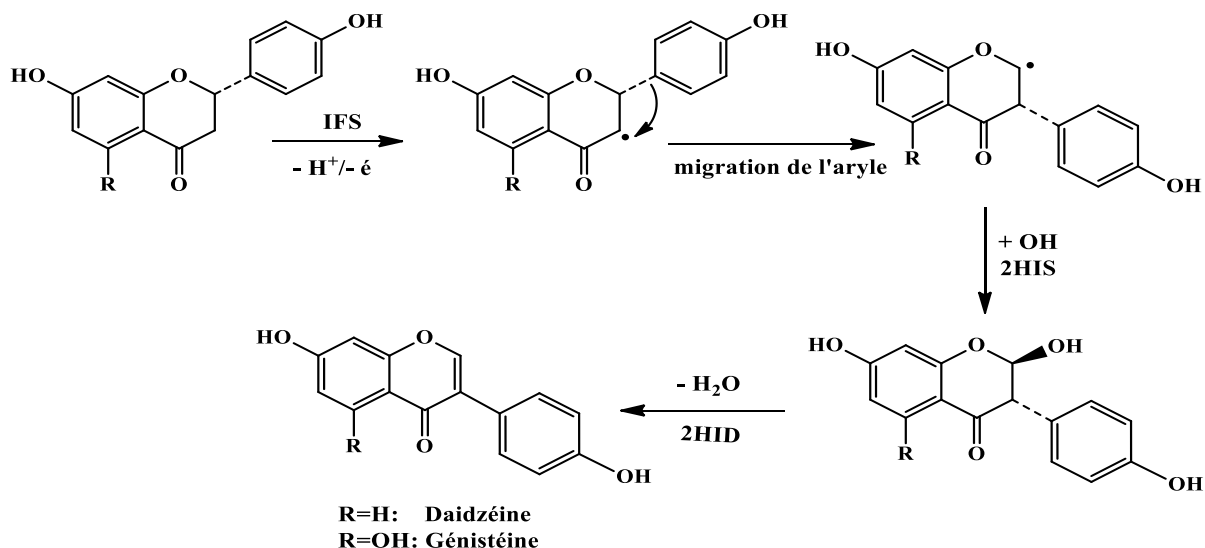


Figure II-3 : Formation des isoflavonoïdes (génistéine et daidzéine)

### II-3- Classification des isoflavonoïdes

Il existe plusieurs sous-classes d'isoflavonoïdes, divisées selon le degré d'oxydation et la présence ou l'absence d'hétérocycles supplémentaires. On indiquera les isoflavones, isoflavanols, isoflavanones, isoflavanes, roténoïdes, ptérocarpanes, coumaranochromones et les 3-arylcoumarines (Figure II-4) :

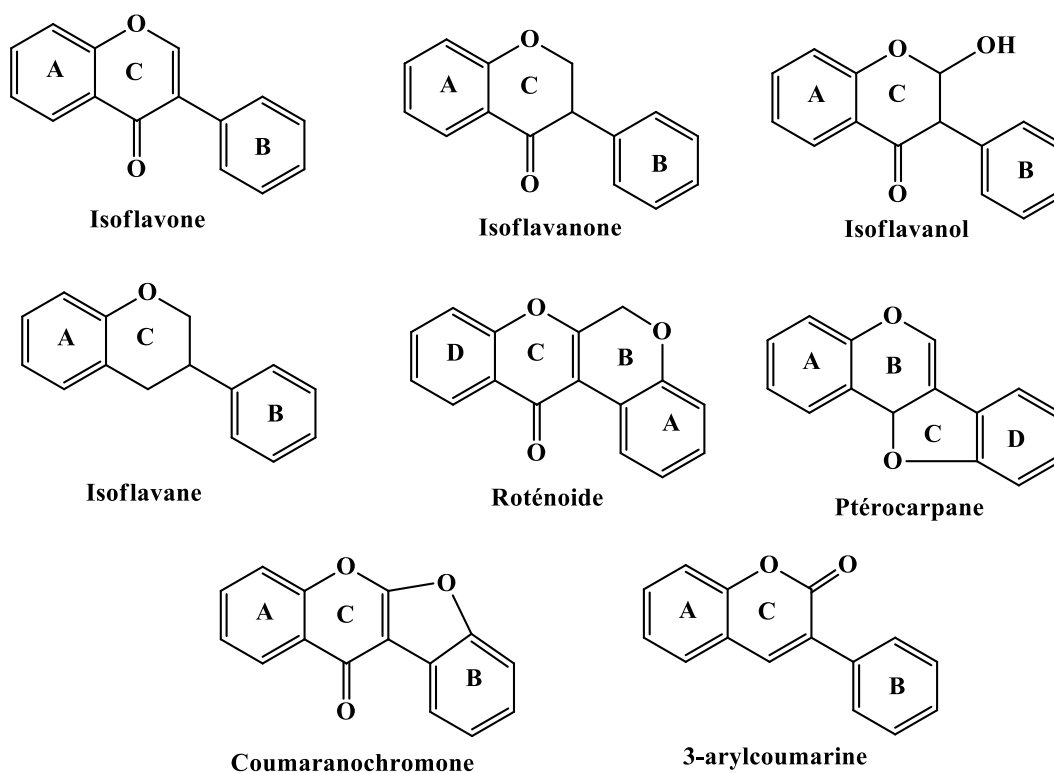


Figure II-4 : Différentes sous classes d'isoflavonoïdes

## II-4- Distribution des isoflavonoïdes

Les isoflavonoïdes constituent une branche distinctive de flavonoïdes. Ils sont présents dans la plupart des parties de plantes (racines, rhizomes, bois, écorce, graines et parfois dans les feuilles et les fleurs) [123].

La distribution des isoflavonoïdes est très limitée dans le règne végétal. Plus de 90% des isoflavones se retrouvent dans la famille Fabaceae et particulièrement dans la sous famille Papilionoideae [124, 125], mais elles sont également présentes dans un large éventail d'espèces végétales phylogénétiquement éloignées, à savoir: 18 familles d'angiospermes (13 familles de dicotylédones et 5 familles de monocotylédones), 2 familles de gymnospermes et une famille de bryophytes [124].

## II-5- Activités biologiques des isoflavonoïdes

De nombreuses études ont mis en évidence les activités biologiques des isoflavonoïdes. La plupart de ces composés pourrait être bénéfique ou préjudiciable, en fonction des circonstances spécifiques. Les isoflavonoïdes sont des produits naturels qui jouent un rôle important dans la nutrition humaine comme agents protecteurs de la santé, ils sont impliqués dans diverses fonctions biologiques par différentes voies. Structuellement ou fonctionnellement, ils sont similaires à l'oestrogène, exerçant les deux propriétés oestrogéniques et anti-oestrogéniques dans divers tissus cellulaires [126, 127].

Différentes études épidémiologiques dont le but est l'exploitation des rôles des isoflavones dans la santé humaine ont montré des effets de régulation immunologique et ont permis la réduction du risque de certains cancers, maladies cardiovasculaires et maladies épidermiques. Les isoflavonoïdes semblent aussi être actifs dans la prévention de l'ostéoporose et l'obésité, ainsi que le soulagement des symptômes de la ménopause. Cependant, d'autres études ont échoué à démontrer ces effets [128].

Les isoflavonoïdes ont un grand impact dans la résistance aux maladies de plantes en raison de leur activité antimicrobienne [129-131].

D'autres tests sur le soja utilisant l'homme comme modèle biologique (test clinique) ont montré que les flavonoïdes, et notamment les isoflavones, permettent de réduire le taux de cholestérol (LDL) [132]. Aussi, elles ont d'autres activités biologiques que nous citons ci-après : activité antiproliférative [133], activité anti-inflammatoire [134], activité anti-oxydante, une cytotoxicité contre des cellules cancéreuses [135] et activités neuroprotectrices [136].

## *Chapitre III*

### *Etudes phytochimiques*

### III-1- Etude phytochimique de l'espèce *Erinacea anthyllis* Link

#### III-1-1- Extraction

Les parties aériennes et racinaires de la plante *Erinacea anthyllis* Link (1500 g) sont séchées et broyées finement puis mises à macérer dans le mélange (EtOH/H<sub>2</sub>O:70/30). Cette macération est répétée 2 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas 48 heures. Après filtration et concentration non à sec à 40 °C, la phase aqueuse obtenue (500 ml) est extraite par l'éther de pétrole (5 x 150 ml), l'acétate d'éthyle (5 x 150 ml) et enfin par le *n*-butanol (5 x 150 ml). Les trois phases organiques ainsi obtenues (EP, AcOEt et *n*-BuOH) sont séchées sur sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) anhydre puis filtrées et concentrées à sec sous pression réduite, ce qui a donné 1 g de l'extrait éther de pétrole, 10,7 g de l'extrait acétate d'éthyle et 50 g de l'extrait *n*-butanolique. Les différentes étapes d'extraction sont présentées dans la figure III-1.

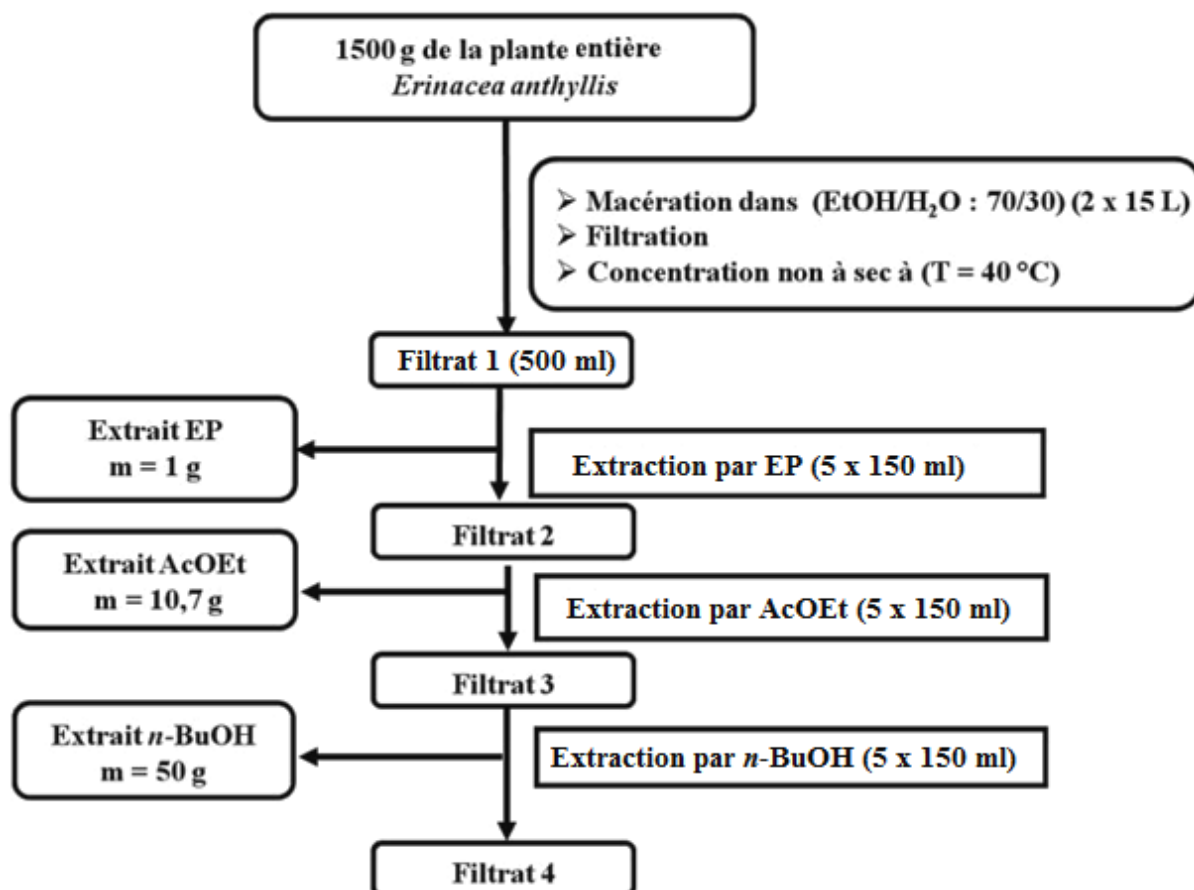


Figure III-1: Schéma d'extraction de la plante entière *Erinacea anthyllis* Link

### III-1-2- Fractionnement et purification des extraits AcOEt et *n*-BuOH

Les CCM réalisées sur les trois extraits obtenus (EP, AcOEt et *n*-BuOH) en utilisant plusieurs systèmes d'éluion révèlent la richesse des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique en produits comparativement à l'extrait éther de pétrole. Ce qui nous a conduit à choisir les deux extraits AcOEt et *n*-BuOH pour notre investigation phytochimique.

#### ➤ Extrait AcOEt

7,0 g de l'extrait AcOEt sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice en phase normale comme phase stationnaire. L'éluion est effectuée par le mélange de solvants EP/AcOEt (100-0 à 0-100), puis par un gradient de méthanol dans l'acétate d'éthyle (0-100 à 100-0). Les CCM obtenues sont visualisées sous la lumière UV à 254 nm puis révélées à l'acide sulfurique et chauffage. Les fractions présentant le même profil CCM sont réunies pour donner 8 fractions majoritaires.

L'utilisation en alternance des différentes techniques chromatographiques employées dans notre laboratoire a mené à l'isolement de 17 composés (Figure III-2).

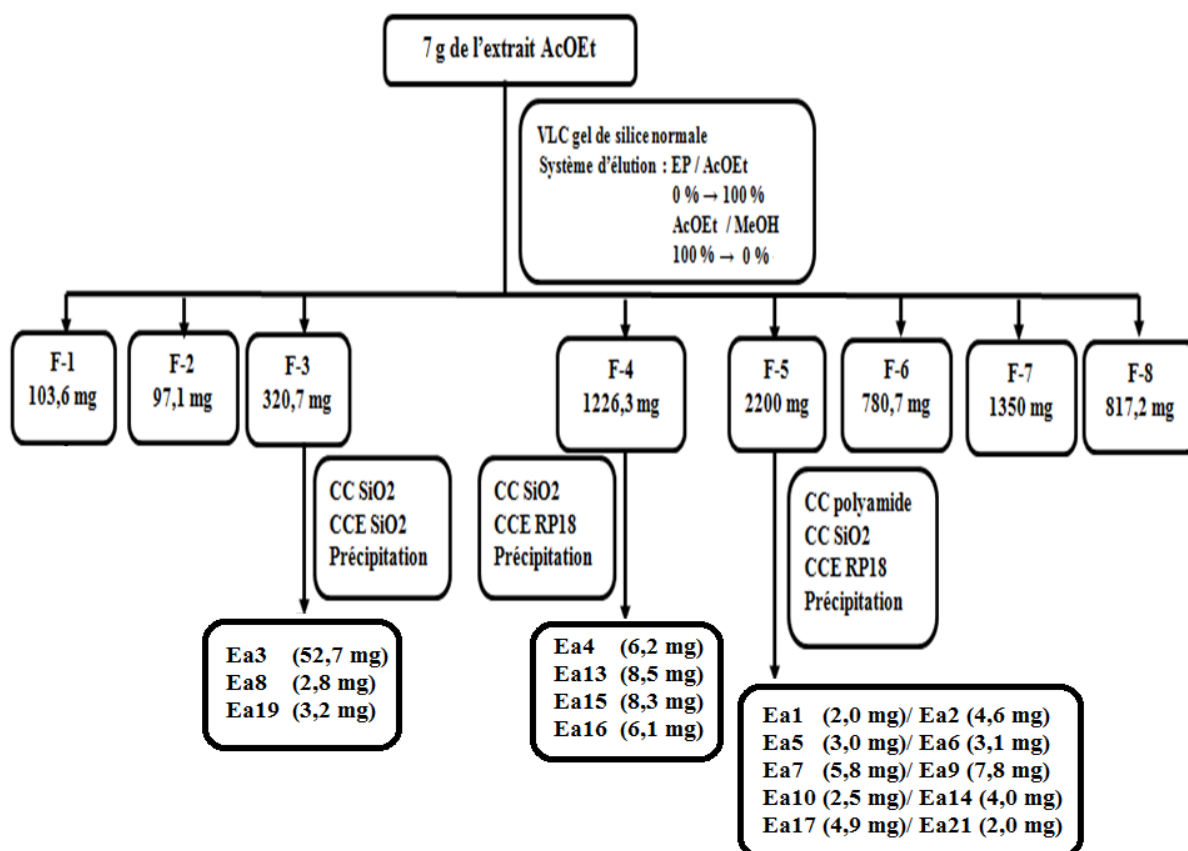
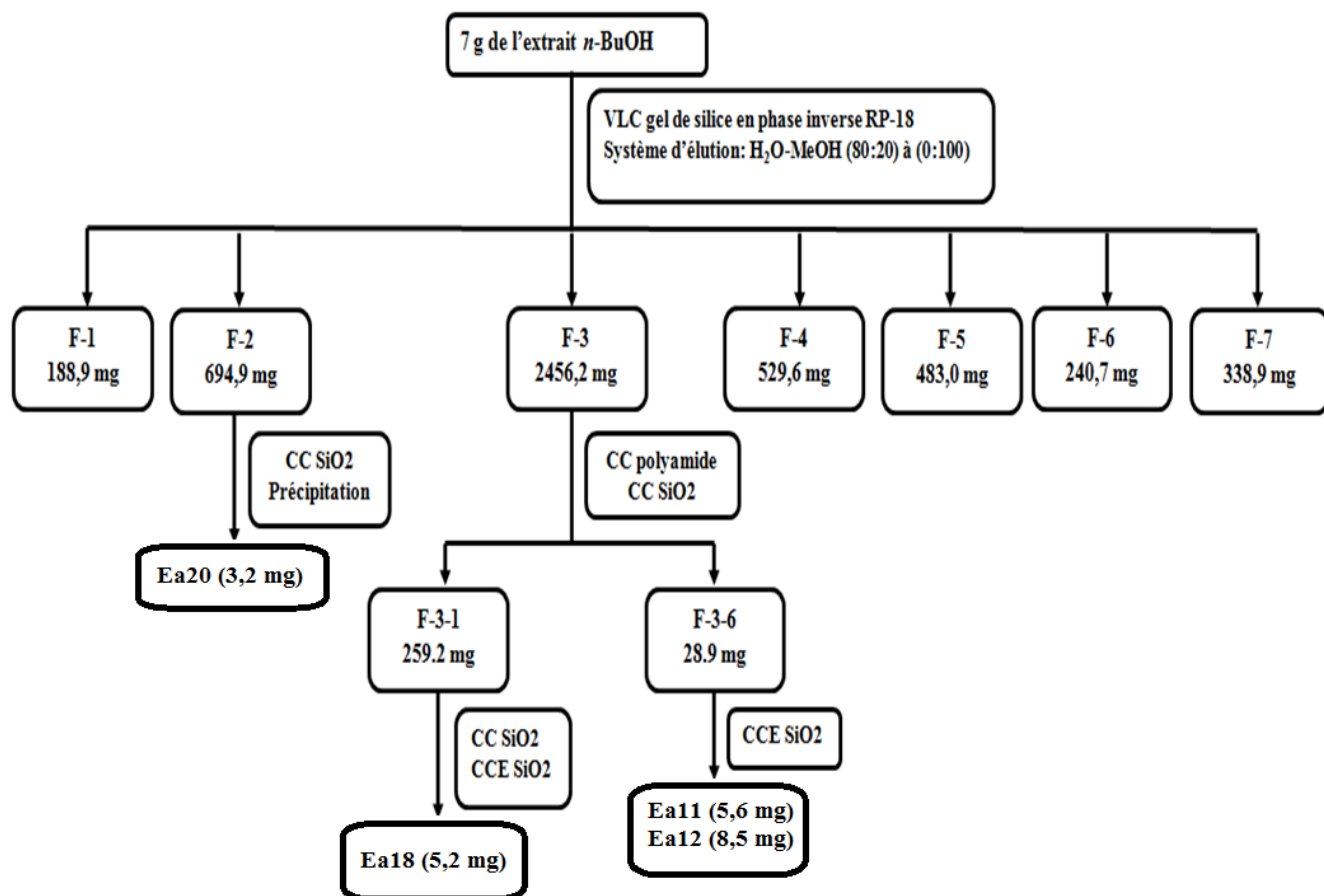


Figure III-2 : Schéma de purification de l'extrait AcOEt de l'espèce *Erinacea anthyllis*

➤ **Extrait *n*-BuOH**

7 g de l'extrait *n*-BuOH sont fractionnés sur gel de silice en phase inverse RP-18 par chromatographie liquide sous vide (VLC). L'élution est réalisée par le mélange de solvants (H<sub>2</sub>O/MeOH : 80-20 % à 0-100 %). A l'issue de ce fractionnement primaire, 7 fractions sont recueillies. Plusieurs techniques de purification ont été appliquées pour isoler quatre composés purs (Figure III-3).

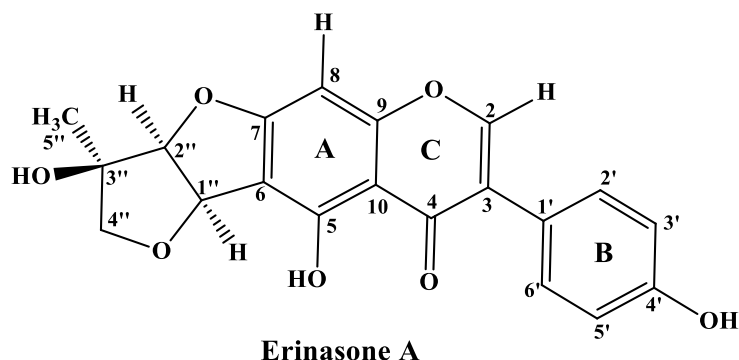


**Figure III-3** : Schéma de purification de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *Erinacea anthyllis*

### III-1-3- Identification structurale des composés isolés

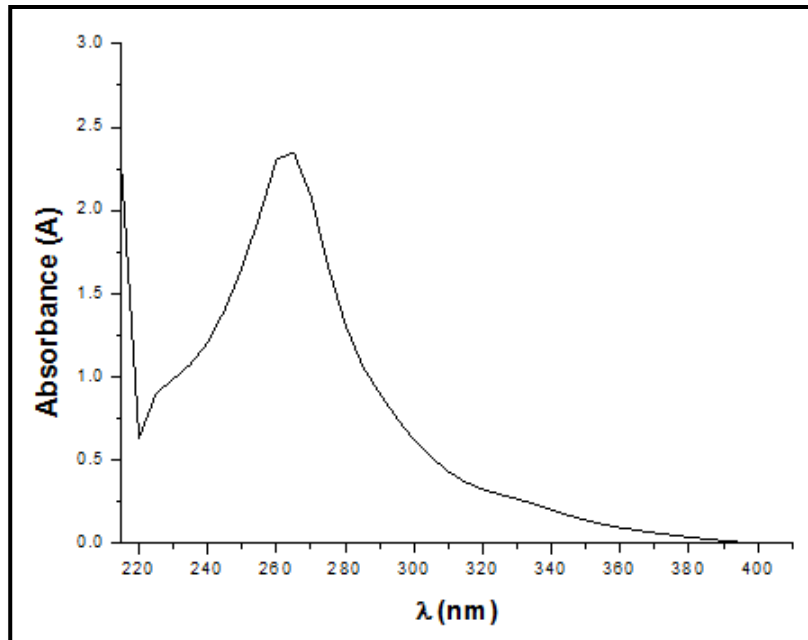
Les produits isolés de **1** à **21** ont été caractérisés par différentes méthodes spectroscopiques RMN 1D du proton et du carbone-13, RMN 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC et NOESY) et spectrométrie de masse à haute résolution HR-ESI-MS et ESI-MS, UV, la mesure du pouvoir rotatoire, ainsi que par comparaison avec les données de la littérature.

## III-1-3-1- Identification structurale du composé Ea1



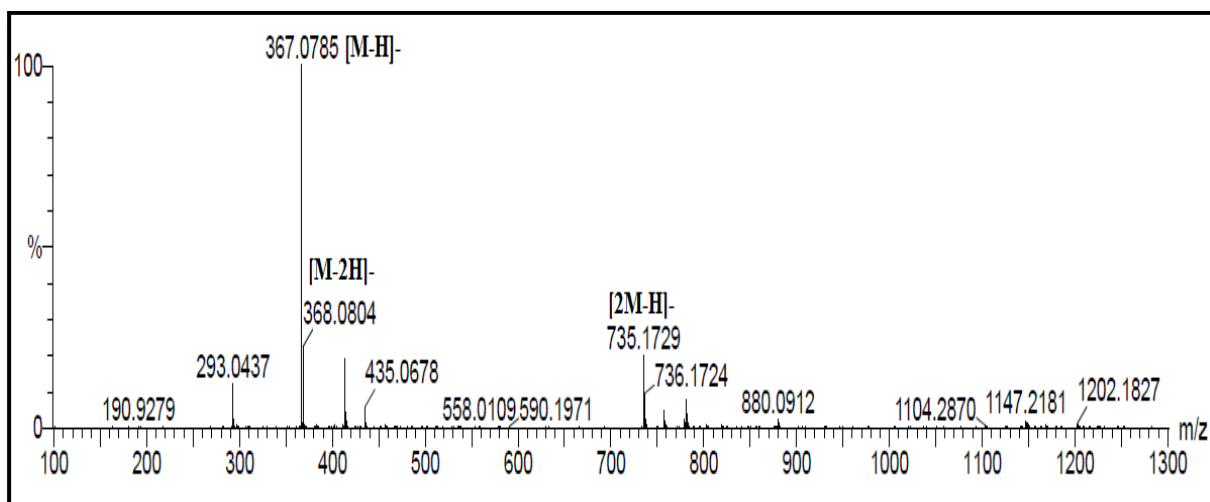
Ce composé est isolé sous forme d'une poudre blanche amorphe soluble dans l'acétone. Il présente une tache visible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en marron après révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. Il s'agit d'un nouvel isoflavonoïde appelé **Erinason A**.

Le spectre UV de ce composé enregistré dans le méthanol (Figure III-4) indique deux bandes d'absorption à 262 nm (Bande II) et 332 nm (Bande I) caractérisant la présence d'un composé phénolique de type isoflavonoïde [137].



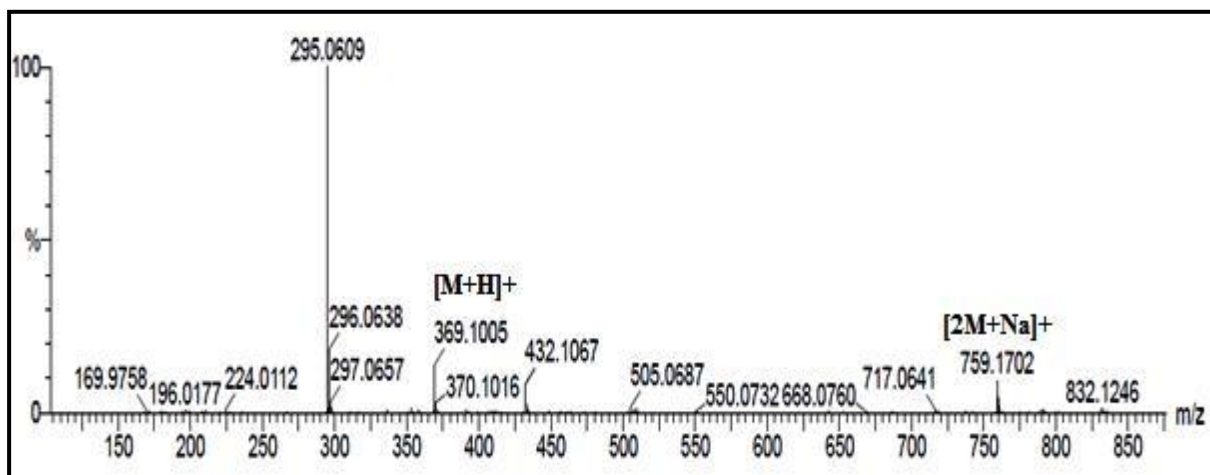
**Figure III-4:** Spectre UV du composé **Ea1**

Le spectre de masse à haute résolution HR-ESI-MS du composé **Ea1** enregistré en mode négatif (Figure III-5) montre la présence des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 367,0785$   $[M-H]^-$  (calc.  $C_{20}H_{15}O_7$ , 367,0818) et  $735,1729$   $[2M-H]^-$ .



**Figure III-5:** Spectre de masse HR-ESI-MS (mode négatif) du composé **Ea1**

Son spectre de masse à haute résolution HR-ESI-MS obtenu en mode positif présente des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 369,1005 [M+H]^+$  (calc.  $C_{20}H_{17}O_7$ , 369,0974) et  $759,1702 [2M+Na]^+$  (Figure III-6), indiquant une masse moléculaire égale à 368 uma correspondant à une formule brute en  $C_{20}H_{16}O_7$ .



**Figure III-6:** Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea1**

L'analyse combinée des spectres RMN  $^1H$  (Figure III-7), COSY H-H (Figure III-8) et HSQC  $J$ -modulé (Figure III-9) du composé **Ea1** montre la présence de :

- Un signal sous forme de singulet d'intégration 1H à  $\delta_H$  8,22 caractéristique du proton H-2 d'une isoflavone. Son carbone résonne à  $\delta_C$  154,2 selon l'expérience HSQC  $J$ -modulé [138].



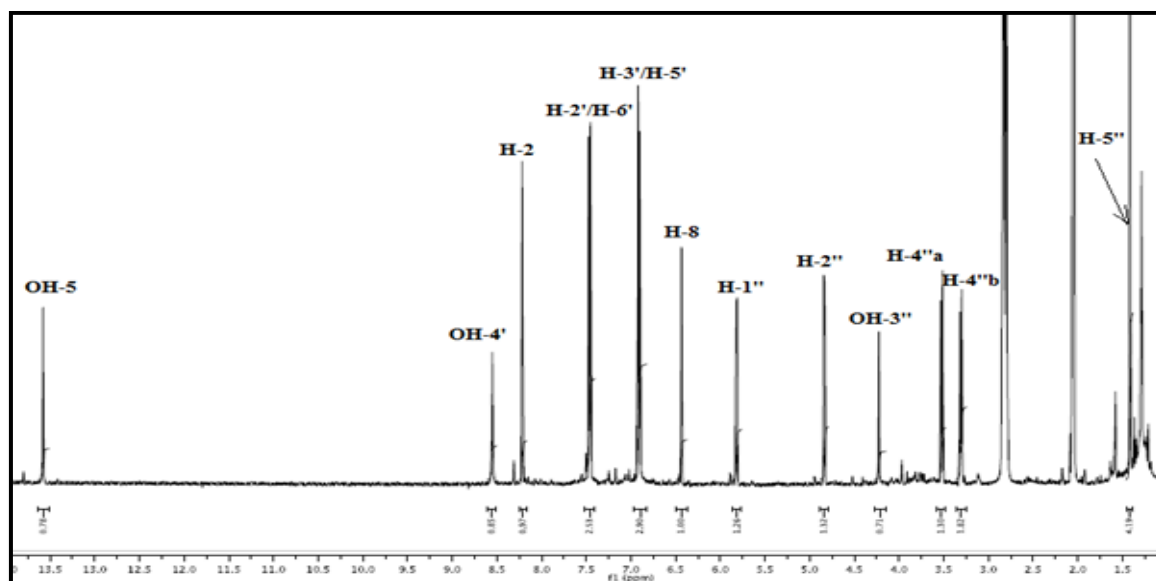


Figure III-7 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea1** (Acétone- $d_6$ )

- Deux signaux sous forme de doublet chacun correspondant à quatre protons aromatiques d'un système  $A_2X_2$  à  $\delta_{\text{H}}$  6,91 (2H) et 7,46 (2H) avec une constante de couplage  $J = 8,3$  Hz traduisant un couplage de type *ortho*. Selon le spectre COSY (Figure III-8), ces protons appartiennent à un même système de spins, attribuables aux protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6' respectivement du cycle B d'une isoflavone [137]. Leurs carbones sont détectés par l'analyse du spectre HSQC à  $\delta_{\text{C}}$  115,7 (C-3' et C-5') et 130,9 (C-2'/C-6').

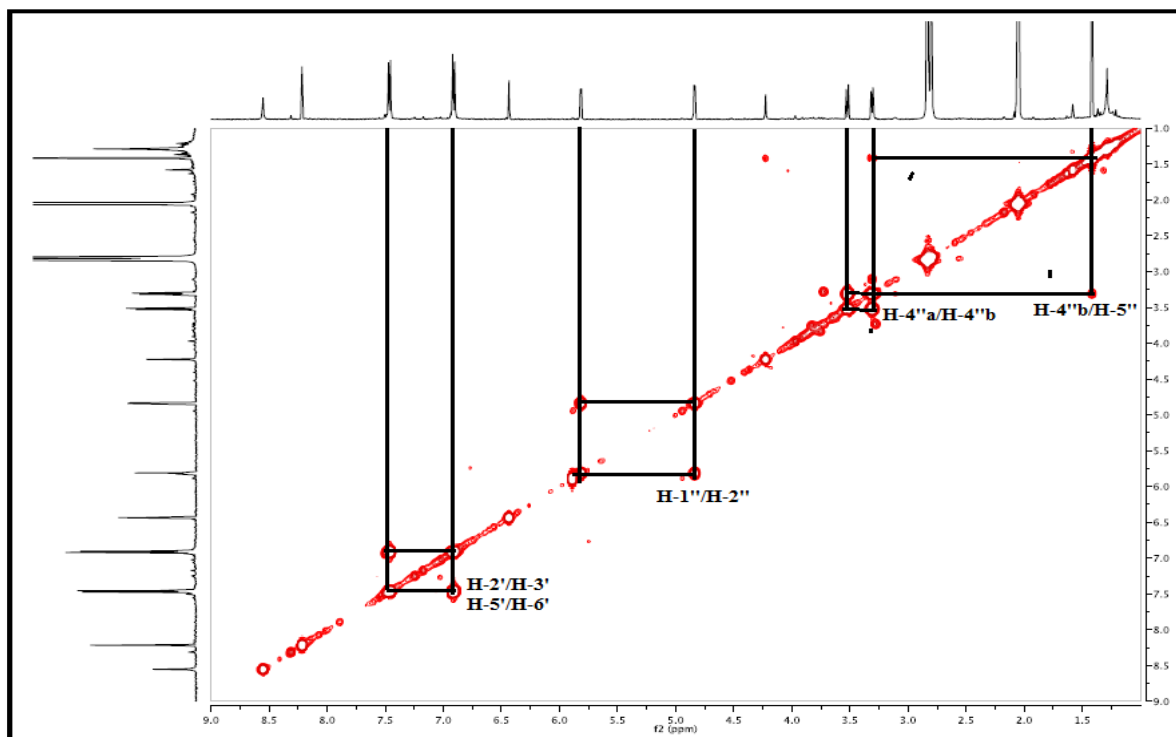


Figure III-8 : Spectre COSY H-H du composé **Ea1**

- Un proton aromatique sous forme de singulet à  $\delta_H$  6,44 corrélant avec son carbone à  $\delta_C$  89,3 sur le spectre HSQC *J*-modulé.
- Trois signaux sous forme de singulet d'intégration 1H chacun à  $\delta_H$  13,58, 8,55 et 4,23, ne montrant aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC *J*-modulé correspondent à trois groupements hydroxyles (3 x -OH).
- Un groupement méthylène à  $\delta_H$  3,52 (*d*,  $J = 8,6$  Hz) et  $\delta_H$  3,31 (*d*,  $J = 8,6$  Hz). Son carbone est assigné par l'analyse du spectre HSQC à  $\delta_C$  73,3.
- Deux protons oxyméthines à  $\delta_H$  5,82 (*d*,  $J = 5,7$  Hz/ $\delta_C$  79,3) et  $\delta_H$  4,84 (*d*,  $J = 5,7$  Hz/ $\delta_C$  92,2).
- Un groupement méthyle à  $\delta_H$  1,42, son carbone est détecté par l'expérience HSQC *J*-modulé à  $\delta_C$  24,4.

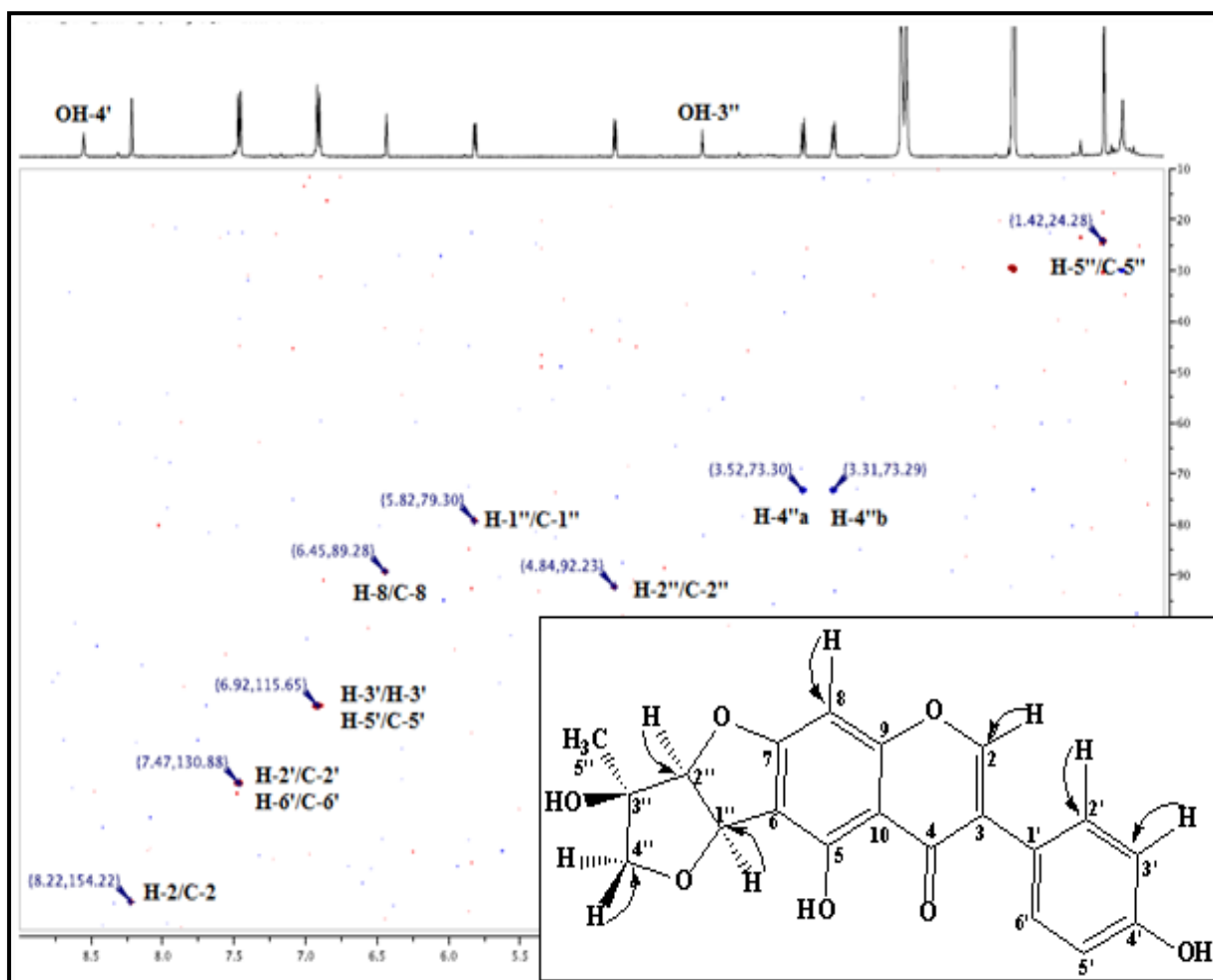


Figure III-9: Spectre HSQC du composé **Ea1**

L'identification structurale du composé **Ea1** est débutée par la localisation du proton H-2 (8,22 ppm, *s*) caractéristique des isoflavonoides, qui montre des corrélations HMBC avec quatre carbones quaternaires résonant à 181,8 (C-4), 159,9, 123,7 et 122,3 ppm. Le

déplacement chimique à 159,9 ppm est attribué aisément au carbone aromatique oxygéné C-9. Les deux carbones à 123,7 et 122,3 ppm correspondent aux carbones aromatiques quaternaires C-1' et C-3. La distinction entre ces deux carbones est facile du fait que les protons H-3' et H-5' du cycle B à  $\delta_H$  6,91 (*d*,  $J = 8,3$  Hz) couplent en  $^3J$  sur le spectre HMBC avec un carbone à  $\delta_C$  122,3, ne pouvant être que le carbone C-1' de l'isoflavonoïde, donc le carbone à  $\delta_C$  123,7 est attribué au carbone C-3 (Figure III-10).

Le spectre HMBC de ce composé permet aussi d'observer des taches de corrélation entre le proton H-2' et les carbones C-3 et C-6' déjà assignés et un carbone quaternaire oxygéné à  $\delta_C$  158,1. Ce dernier montre des corrélations HMBC en  $^2J$  avec les deux protons H-3' et H-5', ce qui nous permet de placer ce carbone en C-4' (158,1 ppm). D'autres couplages sont visualisés entre les protons H-3' et H-5' et les carbones C-1', C-5' et C-3' (Figure III-10). En outre, les carbones C-3' et C-5' à  $\delta_C$  115,7 présentent une tache de corrélation HMBC en  $^3J$  avec le proton hydroxyle à  $\delta_H$  8,55 (OH-4').

A ce niveau d'analyse tous les protons et carbones des cycles B et C ont été déterminés.

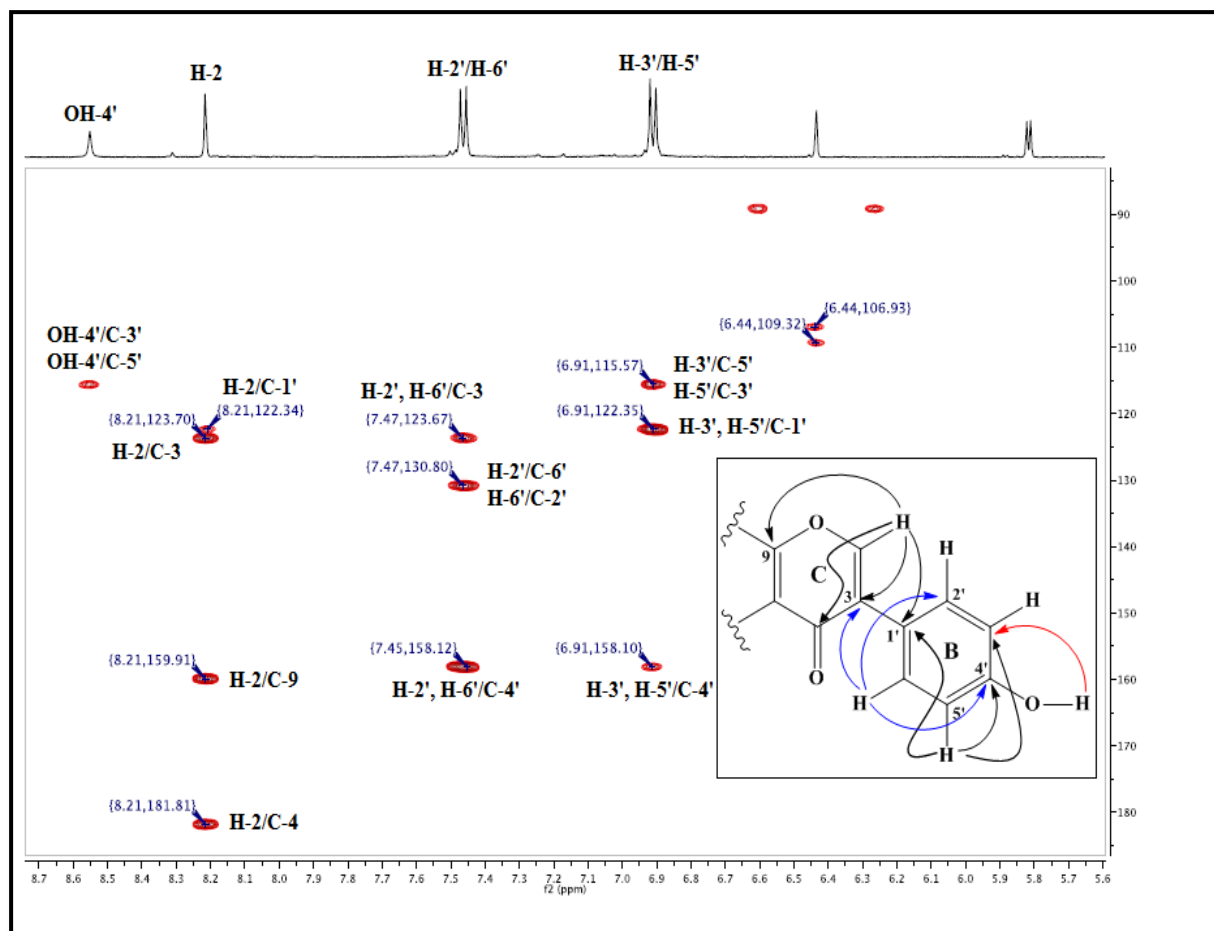


Figure III-10 : Partie du spectre HMBC des cycles C et B

L'analyse du spectre HMBC (Figure III-11) du composé **Ea1** montre des couplages entre le proton à  $\delta_H$  13,58 caractéristique du groupement hydroxyle en position C-5 chélaté avec la fonction cétonique en C-4 et trois carbones quaternaires à  $\delta_C$  160,0, 106,9 et 109,3. Le déplacement chimique à  $\delta_C$  160,0 est facilement attribué au carbone oxygéné C-5 et les deux autres carbones resonant à  $\delta_C$  106,9 et 109,3 correspondent aux carbones C-6 et C-10 respectivement [139]. D'autre part, les corrélations observées sur le spectre HMBC entre le proton aromatique singulet à  $\delta_H$  6,44 et les carbones quaternaires C-6, C-10, C-9 et C-7 ( $\delta_C$  167,6) nous conduisent à assigner la position de ce proton sur le carbone C-8.

A ce stade d'interprétation tous les protons et carbones du cycle A ont été attribués.

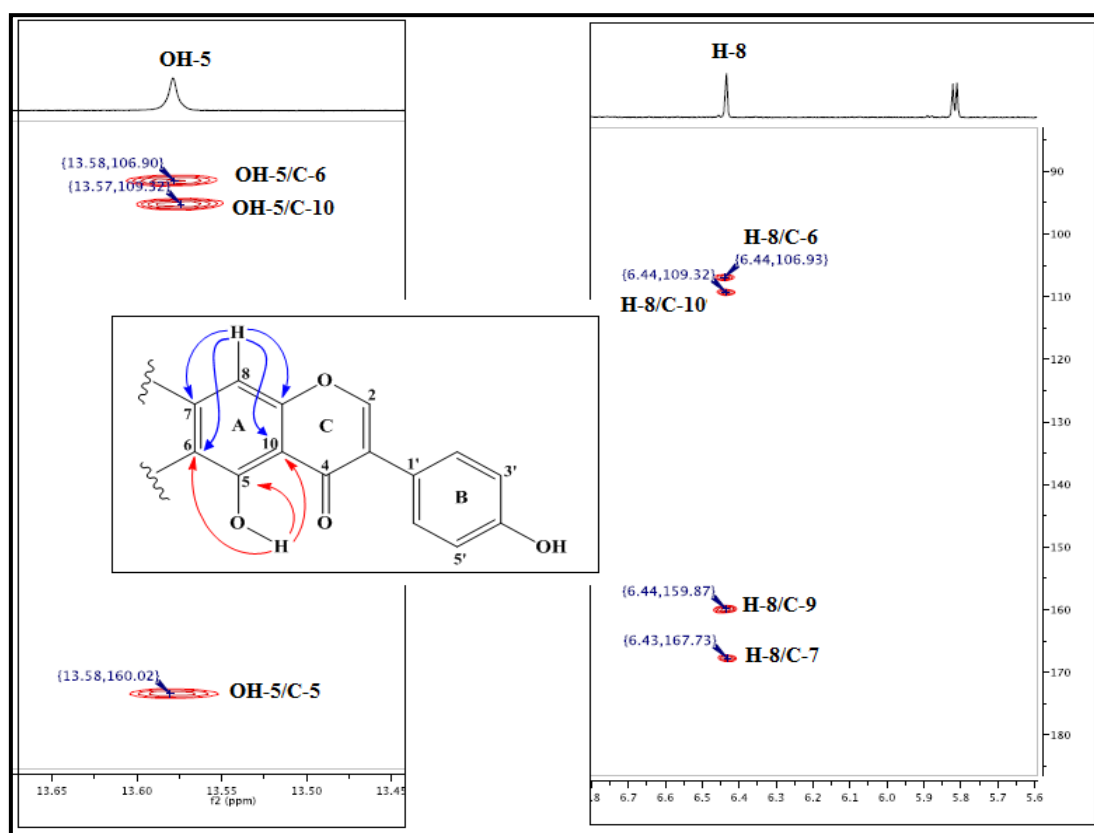


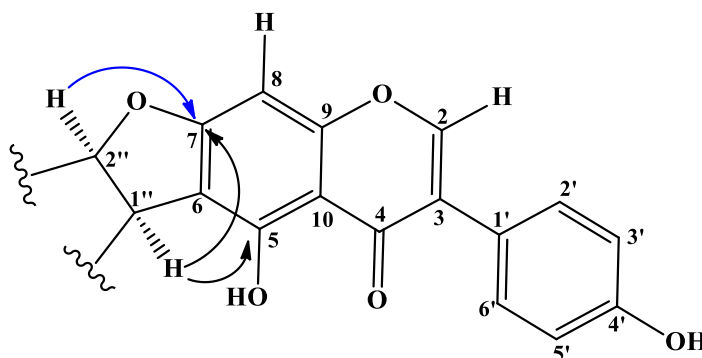
Figure III-11 : Partie du spectre HMBC du composé **Ea1**

La présence de 11 degrés d'insaturation selon le spectre de masse ESI-MS ( $C_{20}H_{16}O_7$ ) dans le squelette isoflavonique et l'absence de signaux caractéristiques de doubles liaisons supplémentaires sur les spectres RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  du composé **Ea1**, suggèrent qu'il reste deux degrés d'insaturation correspondant à deux cycles supplémentaires qu'il faut déterminer.

L'analyse des spectres RMN  $^1H$  (Figure III-7) et COSY H-H (Figure III-8) du composé **Ea1** indique également la présence de deux protons oxyméthines à  $\delta_H$  5,82 (*d*,  $J=5,7$

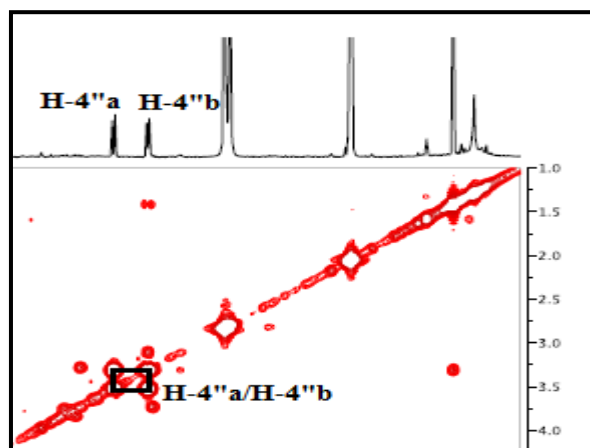
Hz) et 4,84 (*d*,  $J = 5,7$  Hz). Ces deux protons appartiennent à un même système de spins selon le spectre COSY H-H, leurs carbones sont assignés par l'expérience HSQC à  $\delta_C$  79,3 et 92,2 respectivement. Il s'agit de deux groupements oxyméthines (2 x CHO).

Les corrélations observées sur le spectre HMBC (Figure III-12) entre le proton H-1'' à  $\delta_H$  5,82 et les carbones quaternaires oxygénés à  $\delta_C$  160,0 (C-5) et 167,7 (C-7) du cycle A, nous conduisent à lier le carbone oxyméthine C-1'' avec le carbone C-6. En outre, le carbone C-7 montre également des corrélations en HMBC avec le deuxième proton oxyméthine H-2'' à  $\delta_H$  4,84 permettant la formation d'un cycle furanique entre le carbone trisubstitué C-2'' et le carbone C-7 du cycle A par l'intermédiaire de l'atome d'oxygène. La valeur de la constante de couplage  $J = 5,6$  Hz entre les deux protons oxyméthines H-1'' et H-2'' indique qu'ils sont en position *Cis* orientés [140, 141].



**Figure III-12:** Corrélations HMBC au niveau du premier cycle furanique

Le spectre COSY H-H (Figure III-13) du composé **Ea1** montre en plus des systèmes de spins cités précédemment, un autre système de spins à deux protons, qui visualise les couplages entre les deux protons géminés H-4''a ( $\delta_H$  3,52, *d*,  $J = 8,6$  Hz) et H-4''b ( $\delta_H$  3,31, *d*,  $J = 8,6$  Hz), leur carbone est déterminé par l'analyse du spectre HSQC à  $\delta_C$  73,1.



**Figure III-13 :** Partie du spectre COSY H-H du composé **Ea1**

Le spectre HMBC (Figure III-14) de ce composé présente une tache de corrélation en  $^3J$  entre le proton du troisième groupement hydroxyle à  $\delta_H$  4,23 et le carbone du groupement méthyle Me-5" à  $\delta_C$  24,2 indiquant, que ces deux groupements sont portés par un même carbone. Ceci est confirmé par les couplages observés en HMBC (Figure III-15) entre les protons du groupement méthyle Me-5" et les carbones C-2", C-4" et un carbone quaternaire oxygéné à  $\delta_C$  77,8 ne pouvant être que le carbone C-3" porteur des deux groupements hydroxyle et méthyle. Cette analyse nous conduit à proposer le fragment structural suivant (Figure III-14).

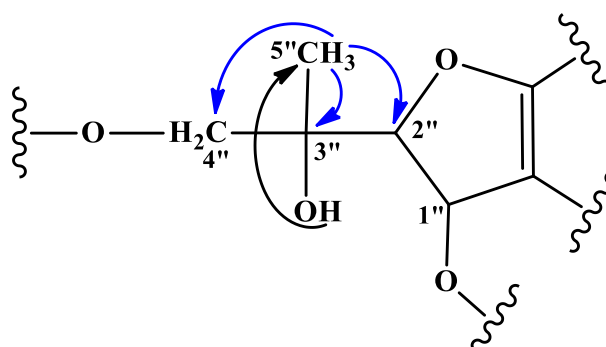


Figure III-14: Corrélations HMBC du composé Ea1

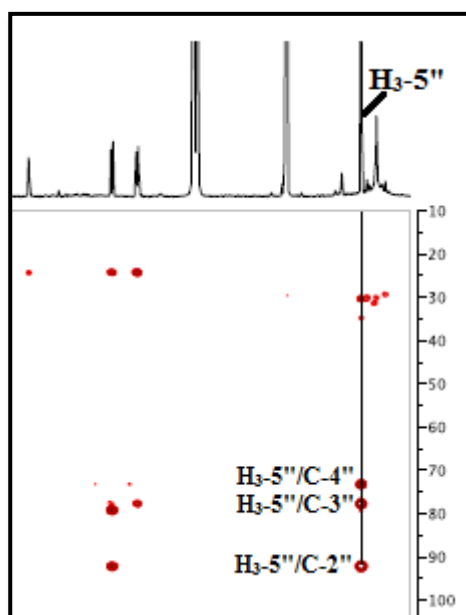


Figure III-15: Partie du spectre HMBC montrant les corrélations du groupement méthyle en C-5"

Les deux protons géminés H-4" a et H-4" b couplent sur le spectre HMBC avec les carbones C-2", C-5" et C-3". D'autres corrélations sont visualisées sur le spectre HMBC entre le proton oxyméthine H-1" et le carbone C-3" et entre le proton H-2" et les carbones C-1",

C-4'' et C-5''. Les corrélations HMBC en  $^3J$  observées entre les protons H<sub>2</sub>-4'' et C-1'' et le proton H-1'' et le carbone C-4'' permettent de relier les carbones C-1'' et C-4'' par l'intermédiaire de l'oxygène et former le 2<sup>ème</sup> cycle furanique de ce composé (Figure III-16).

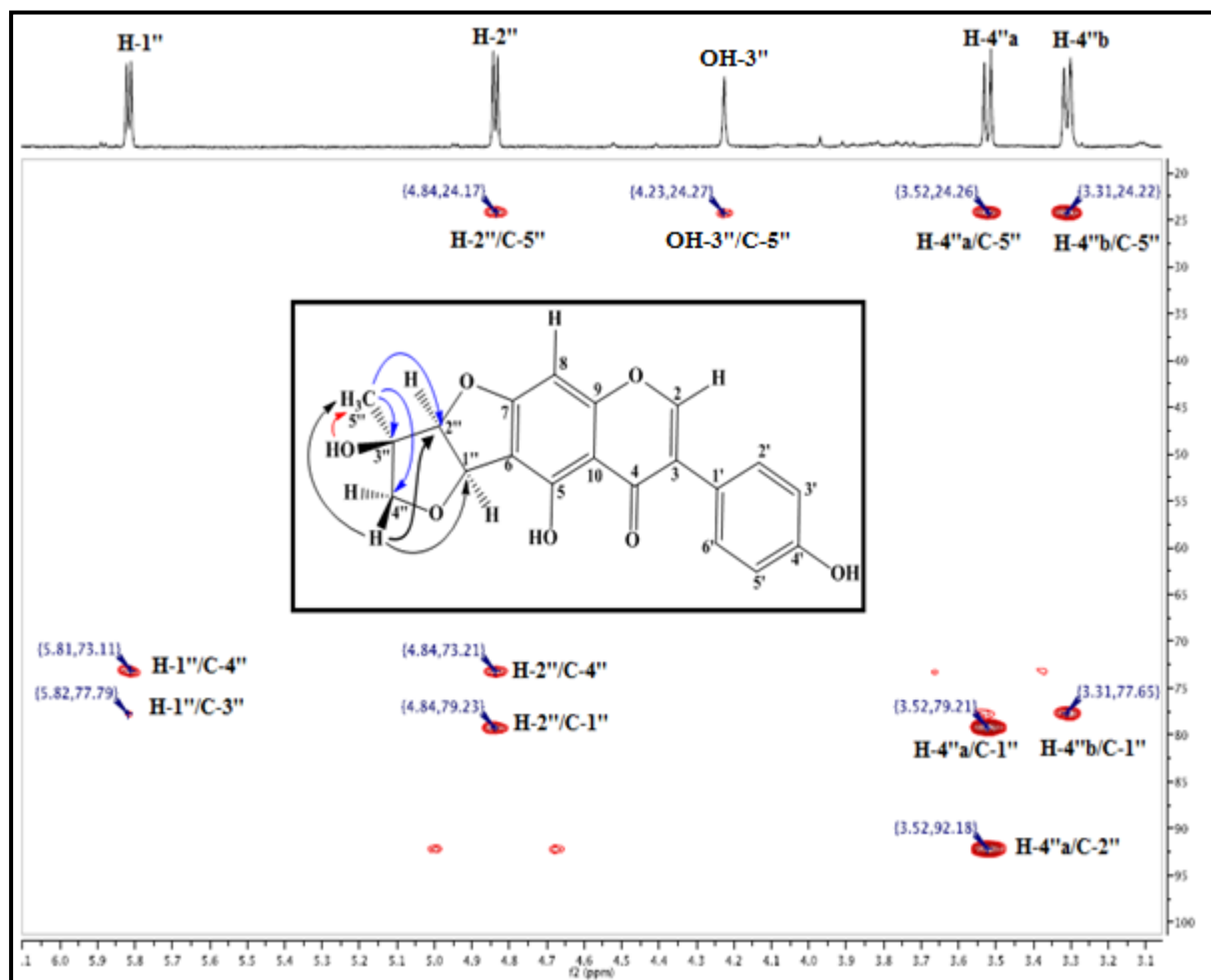
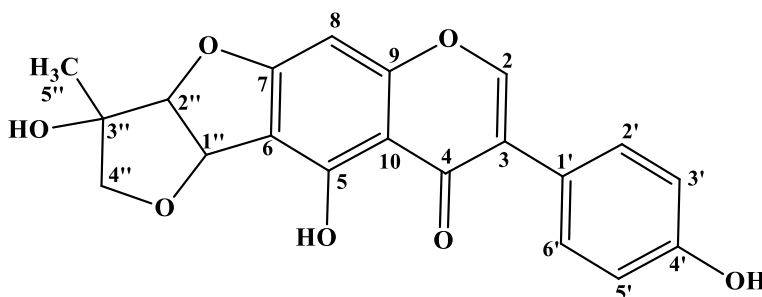
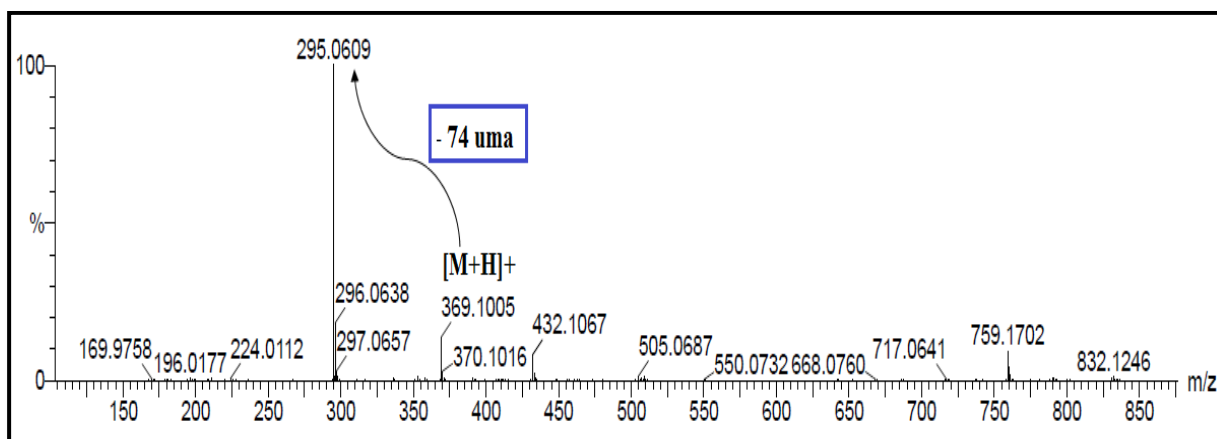


Figure III-16 : Partie du spectre HMBC du composé Ea1

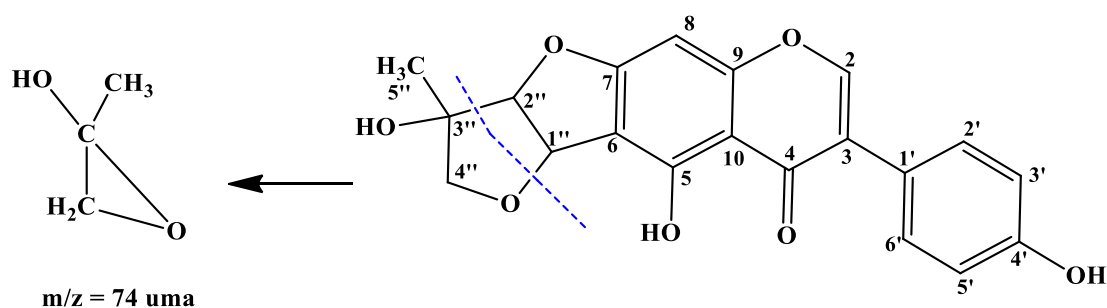
Il en résulte que la structure plane du composé Ea1 est :



La structure de ce composé est confirmée par le spectre de masse qui montre un pic de fragmentation à  $m/z = 295,0609$  traduisant une différence de 74 uma et indiquant ainsi le départ de la molécule C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (Figure III-17 et III-18).

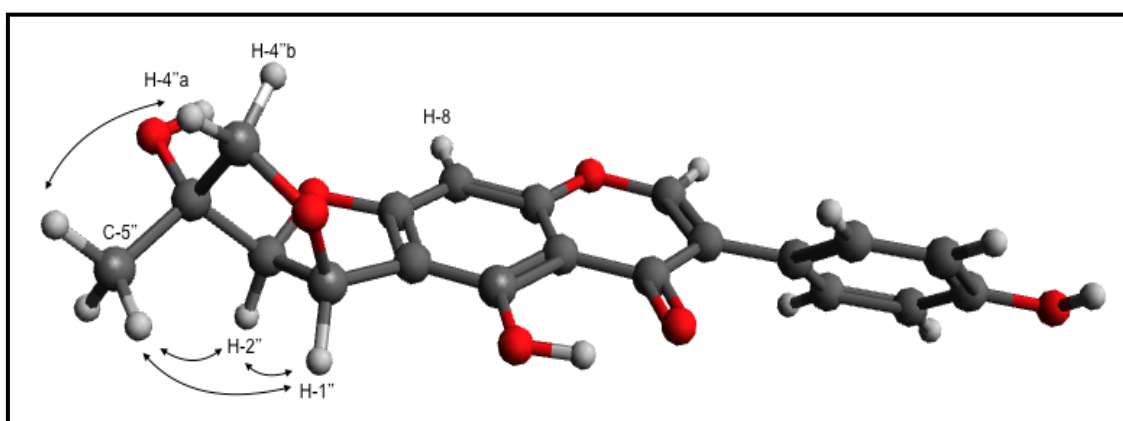


**Figure III-17:** Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea1**



**Figure III-18:** Fragmentation du composé **Ea1**

La stéréochimie relative entre les deux cycles furaniques de ce composé est confirmée *Cis* par l'analyse du spectre NOESY (Figures III-19 et III-20) qui montre des effets NOEs entre les protons H-1'' et H-2'' ayant une orientation  $\alpha$ . De plus, les corrélations observées entre les protons du groupement méthyle H<sub>3</sub>-5'' et les protons H-1'', H-2'' et H-4''a nous permettent d'orienter les protons H<sub>3</sub>-5'' et H-4''a en position  $\alpha$ . Les couplages visualisés entre les protons H-4''b et OH-3'' suggèrent que leur orientation est  $\beta$ .



**Figure III-19 :** Structure 3D avec des corrélations NOESY du composé **Ea1**



Par ailleurs, les corrélations observées sur le spectre NOESY (Figure III-20) entre les protons H-2/H-2'/H-3'/OH-4' indiquent que ces protons sont positionnés sur le même côté.

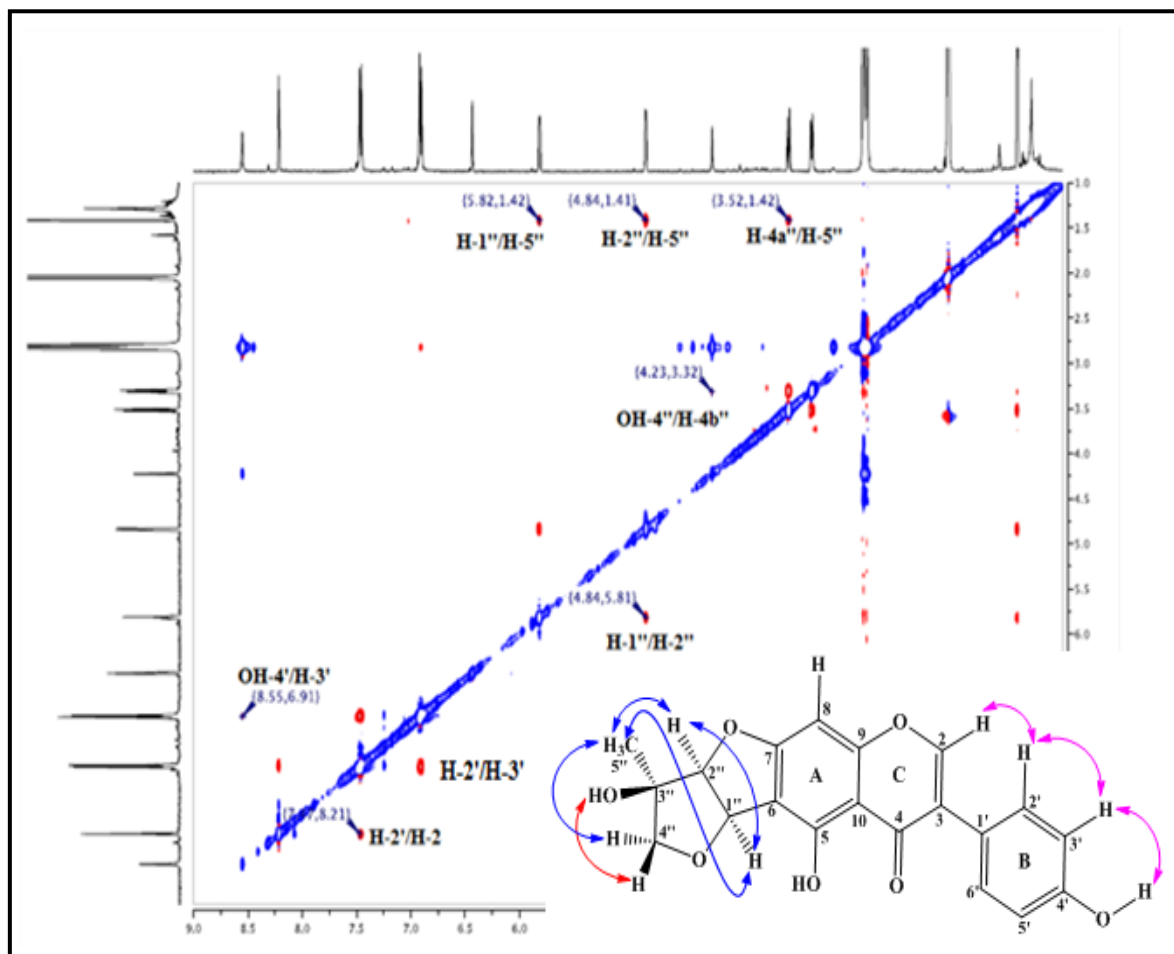


Figure III-20: Spectre NOESY du composé Ea1

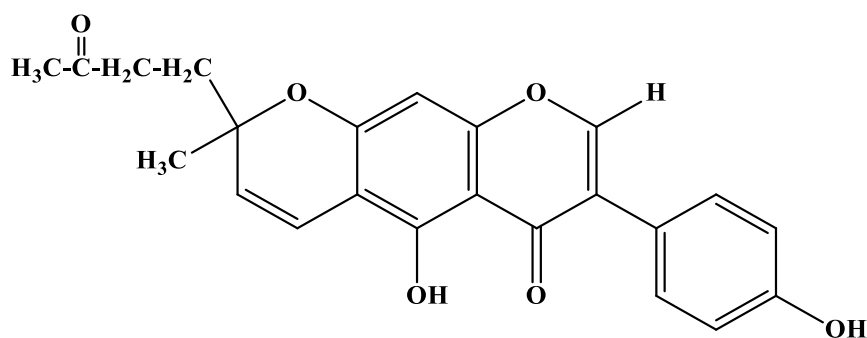
L'ensemble de ces données spectroscopiques et la mesure de la valeur du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20} - 24,6$  ( $C = 0,015$ , MeOH), nous permettent d'identifier la structure du composé Ea1 comme étant un nouvel isoflavonoïde prénylé nommé **Erinasone A**. Les valeurs de déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont représentées dans le tableau III-1.

**Tableau III-1:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé Ea1 dans l'acétone deutérée.

Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
2	8,22	-	<i>s</i>	154,2
3	-	-	-	123,7
4	-	-	-	181,8
5	-	-	-	160,0

6	-	-	-	106,9
7	-	-	-	167,7
8	6,44	-	<i>s</i>	89,3
9	-	-	-	159,9
10	-	-	-	109,3
1'	-	-	-	122,3
2'	7,47	8,3	<i>d</i>	130,9
3'	6,91	8,3	<i>d</i>	115,6
4'	-	-	-	158,1
5'	6,91	8,3	<i>d</i>	115,6
6'	7,47	8,3	<i>d</i>	130,9
1''	5,82	5,7	<i>d</i>	79,3
2''	4,84	5,7	<i>d</i>	92,2
3''	-	-	-	77,7
4''a	3,52	8,6	<i>d</i>	73,3
4''b	3,31	8,6	<i>d</i>	
5''	1,42	-	<i>s</i>	24,3
OH-5	13,58	-	<i>s</i>	-
OH-4'	8,55	-	<i>s</i>	-
OH-3''	4,23	-	<i>s</i>	-

### III-1-3-2- Identification structurale du composé Ea2



**Erinason B**

Le composé **Ea2** est obtenu sous forme d'une huile marron visible sous la lumière UV à 254 nm. Il se colore en orange après révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100°C. Il s'agit d'un nouvel isoflavonoïde prénylé nommé **Erinason B**.

Le spectre UV de ce composé enregistré dans le méthanol (Figure III-21) présente une allure semblable à celle du composé précédent **Ea1**. En effet, il montre l'existence de deux bandes d'absorption à 285 nm (Bande II) et 340 nm (Bande I) indiquant la présence d'un composé flavonoïdique de type isoflavonoïde <sup>[137]</sup>.

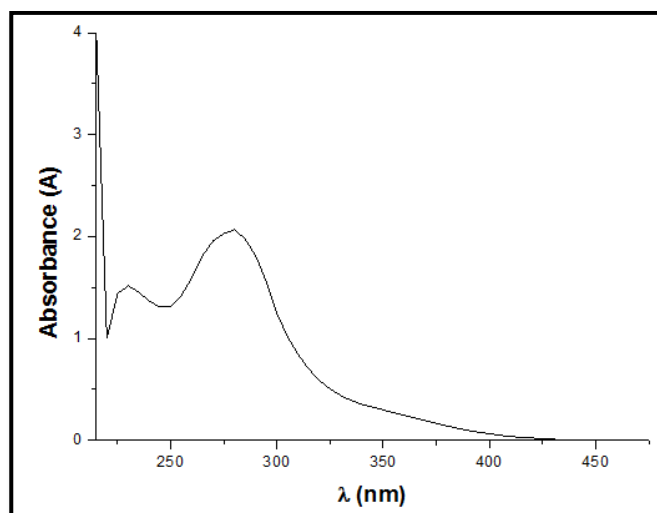


Figure III-21: Spectre UV du composé Ea2

Le spectre de masse à haute résolution HR-ESIMS de ce composé enregistré en modes négatif (Figure III-22) et positif (Figure III-23), présentent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  391,1208  $[M-H]^-$  (calc.  $C_{23}H_{19}O_6$ , 391,1182) et 393,1343  $[M+H]^+$  (calc.  $C_{23}H_{21}O_6$ , 393,1338) respectivement, soit une masse moléculaire de 392 uma correspondant à une formule brute en  $C_{23}H_{20}O_6$ , suggérant ainsi 14 degrés d'insaturation.

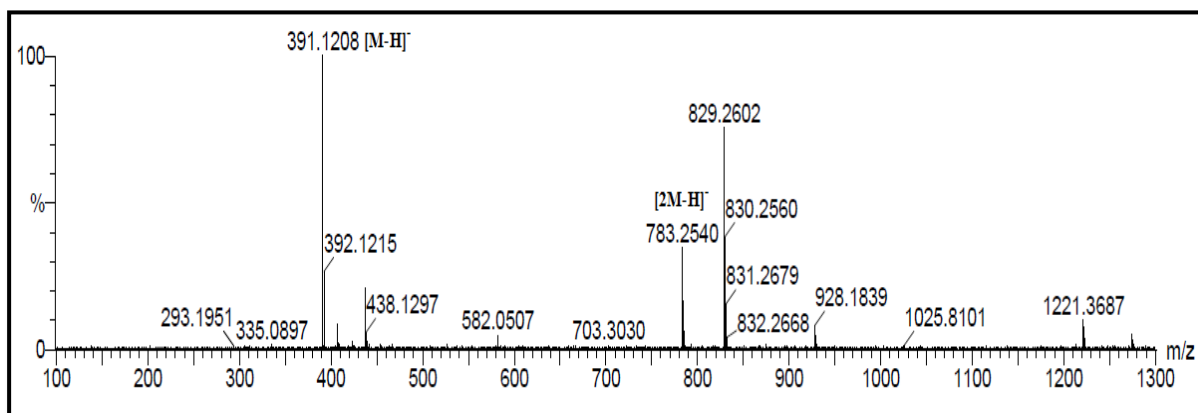


Figure III-22 : Spectre de masse HR-ESIMS (mode négatif) du composé Ea2

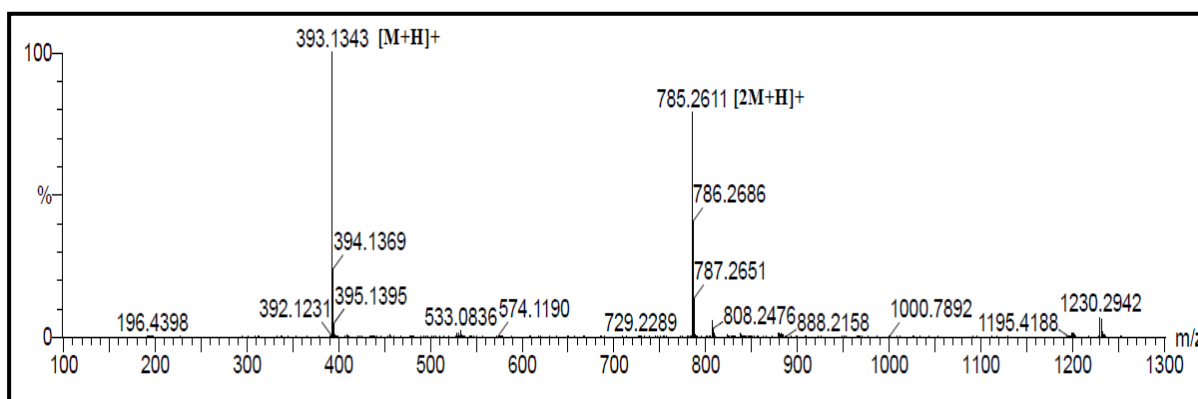


Figure III-23 : Spectre de masse HR-ESIMS (mode positif) du composé Ea2

Le Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea2** est presque similaire à celui du composé précédent **Ea1** au niveau des cycles A, B et C du squelette isoflavonique (Figure III-24).

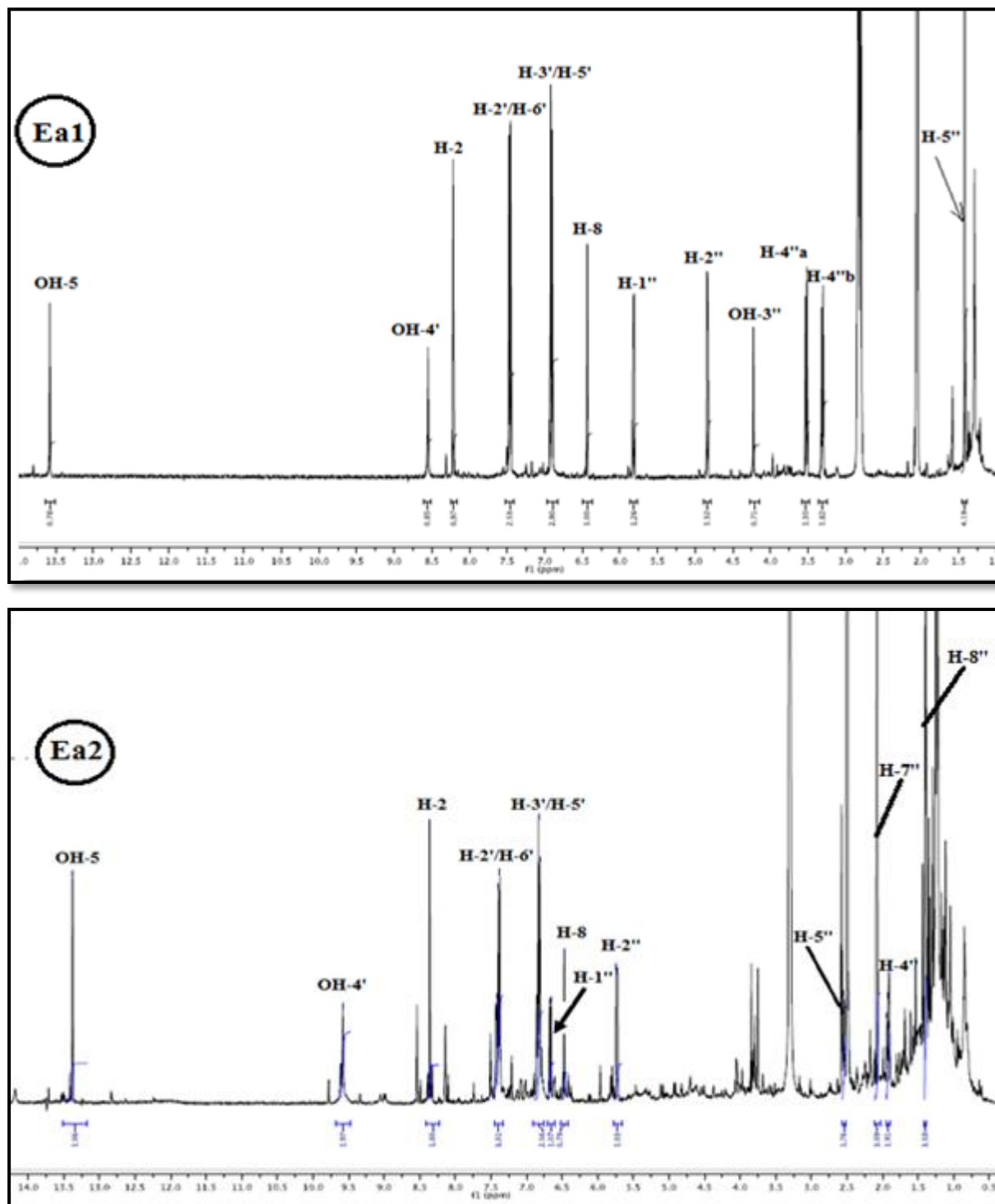


Figure III-24 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  des composés **Ea1** ( $\text{Acetone-}d_6$ ) et **Ea2** ( $\text{DMSO-}d_6$ )

La différence entre les deux composés **Ea2** et **Ea1** réside principalement dans l'apparition des signaux caractéristiques des protons aliphatiques et éthyléniques dans le cas



partir des corrélations en  $^3J$  et  $^2J$  du proton H-2 à  $\delta_H$  8,36, caractéristique des isoflavonoïdes. Son carbone est repéré à  $\delta_C$  153,9 par l'expérience HSQC  $J$ -modulé. En plus, les corrélations HMBC (Figure III-26) observées entre le proton aromatique résonnant à 6,47 ppm et les carbones quaternaires C-9 et C-10 déjà attribués et un carbone résonnant à 157,7 ppm attribuable au C-7, nous conduisent à placer ce proton en position CH-8, son carbone est repéré par l'expérience HSQC à  $\delta_C$  94,1.

En outre, le proton de l'hydroxyle en position C-5 corrèle aussi en HMBC avec trois carbones quaternaires résonnant à  $\delta_C$  104,0, 105,1 et 155,6. Le déplacement chimique à 155,6 ppm est facilement attribué au carbone aromatique oxygéné C-5. Les deux autres déplacements chimiques correspondent aux carbones C-6 et C-10. La distinction entre ces deux carbones quaternaires se fait par l'analyse du spectre HMBC qui montre une corrélation entre le carbone à  $\delta_C$  104,0 et un proton éthylénique résonnant à 5,73 ppm indiquant que ce carbone est positionné en C-6, donc le carbone C-10 est assigné à 105,1 ppm (Figure III-26).

A ce niveau d'analyse tous les protons et carbones des cycles A, B et C ont été attribués.

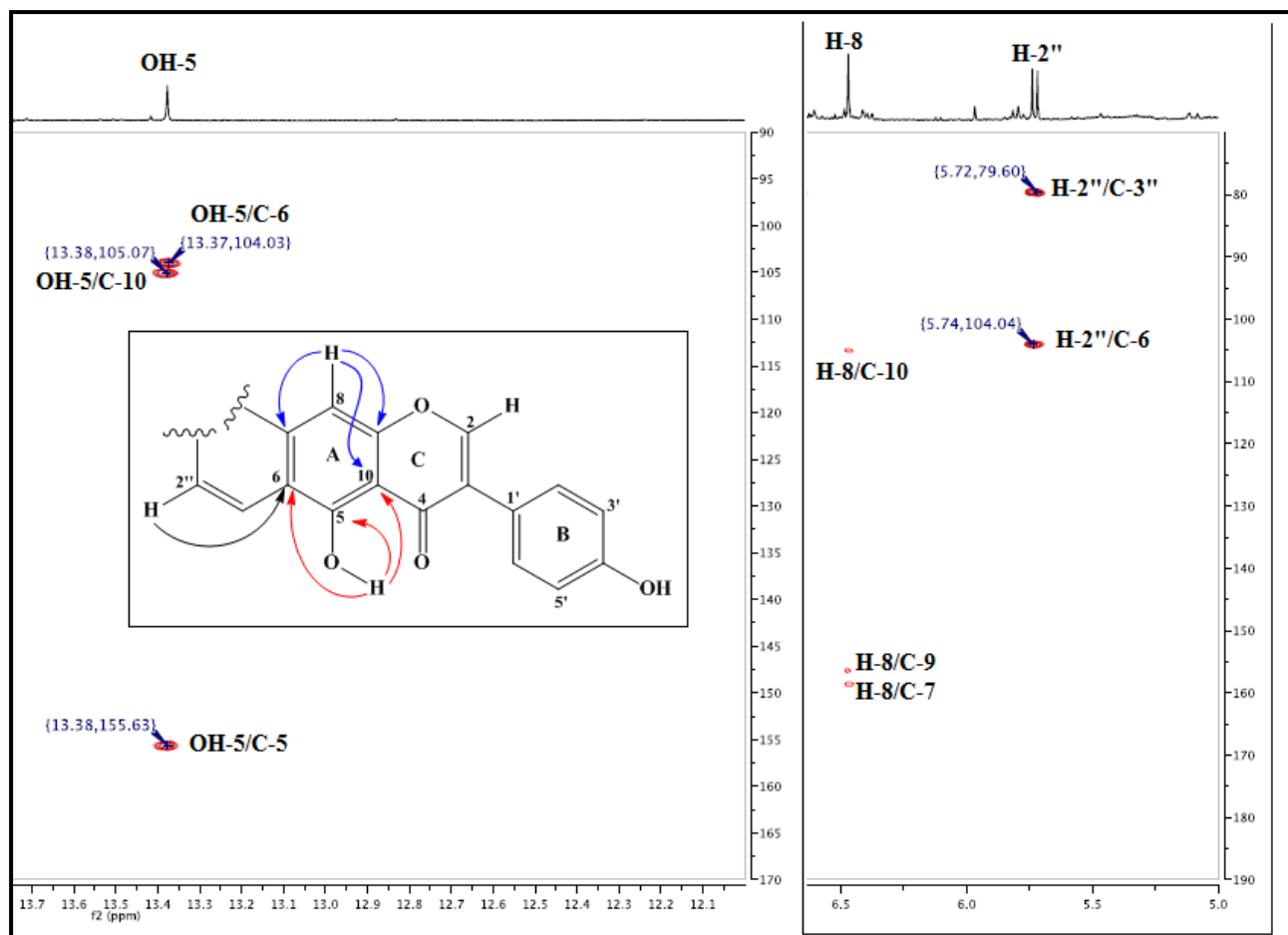


Figure III-26 : Partie du spectre HMBC du composé Ea2

L'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  et HSQC du composé **Ea2** indique la présence de :

- Deux protons aliphatiques sous forme de multiplet et d'intégration 2H chacun à  $\delta_{\text{H}}$  1,92 et 2,54, appartenant à un même système de spins selon l'expérience COSY H-H (Figure III-27), suggérant ainsi la présence d'une chaîne latérale. Leurs carbones sont assignés par l'analyse du spectre HSQC à  $\delta_{\text{C}}$  34,2 et 37,15 respectivement.
- Deux groupements méthyles sous formes de singulet chacun à ( $\delta_{\text{H}}$  1,40 ;  $\delta_{\text{C}}$  26,2) et ( $\delta_{\text{H}}$  2,08 ;  $\delta_{\text{C}}$  29,4). Le déblindage des protons méthyliques résonant à 2,08 ppm indique que ce méthyle est lié à un groupement attracteur.

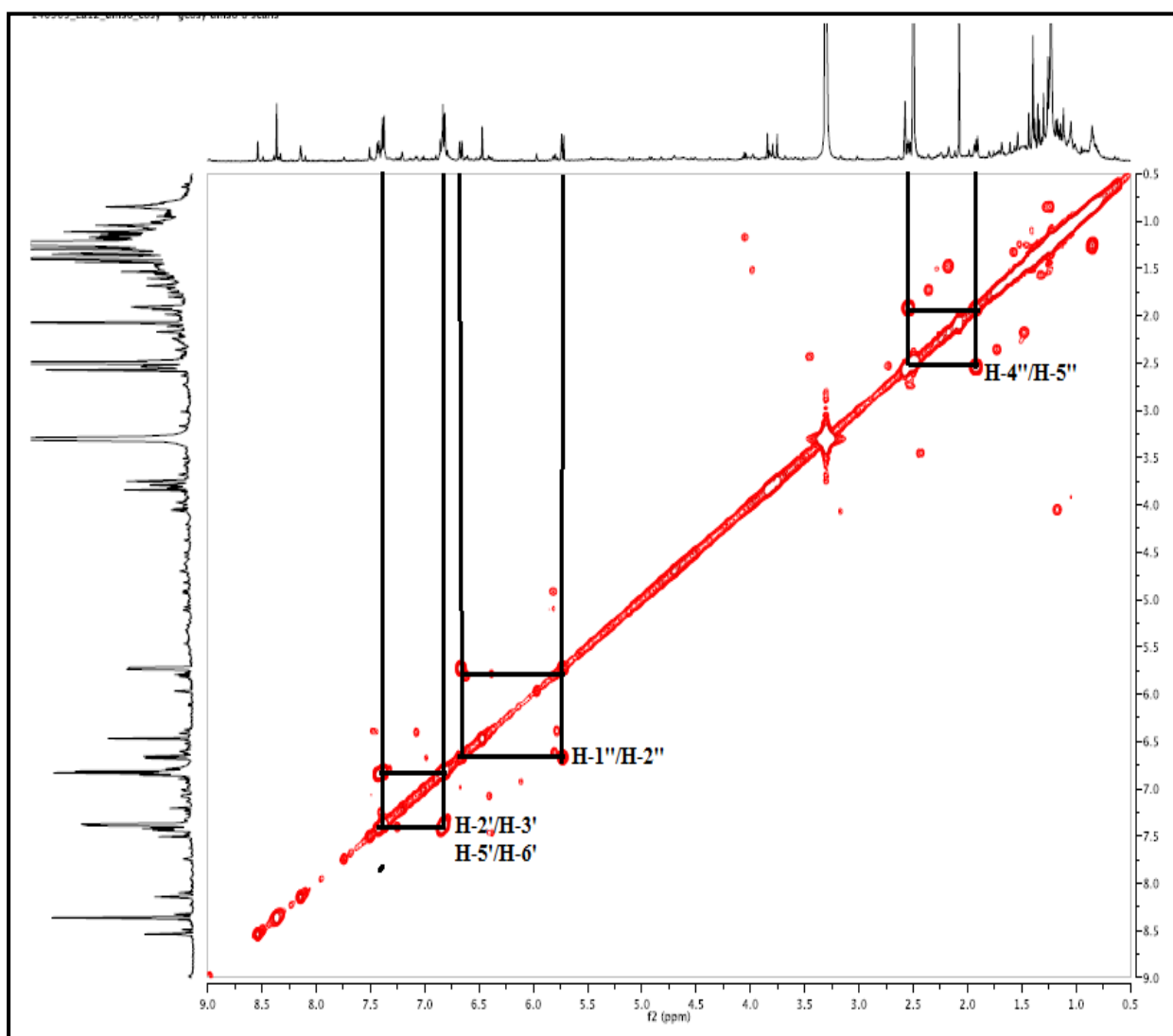


Figure III-27 : Spectre COSY H-H du composé **Ea2**

L'analyse du spectre COSY H-H (Figure III-27) de ce composé montre également la présence d'un système de spins à deux protons oléfiniques à  $\delta_{\text{H}}$  5,73 et 6,67, avec une constante de couplage  $J = 10$  Hz indiquant qu'ils sont en position *Cis*.

Le déplacement chimique le plus blindé à  $\delta_H$  5,73 est attribué au proton oléfinique H-2'', son carbone est déterminé par le spectre HSQC à  $\delta_C$  127,2 (Figure III-28). Ce proton présente des corrélations en HMBC avec deux carbones quaternaires C-6 déjà attribué et un carbone à  $\delta_C$  79,6 caractéristique du carbone C-3'' du cycle pyranique des isoflavonoïdes prénylés [142].

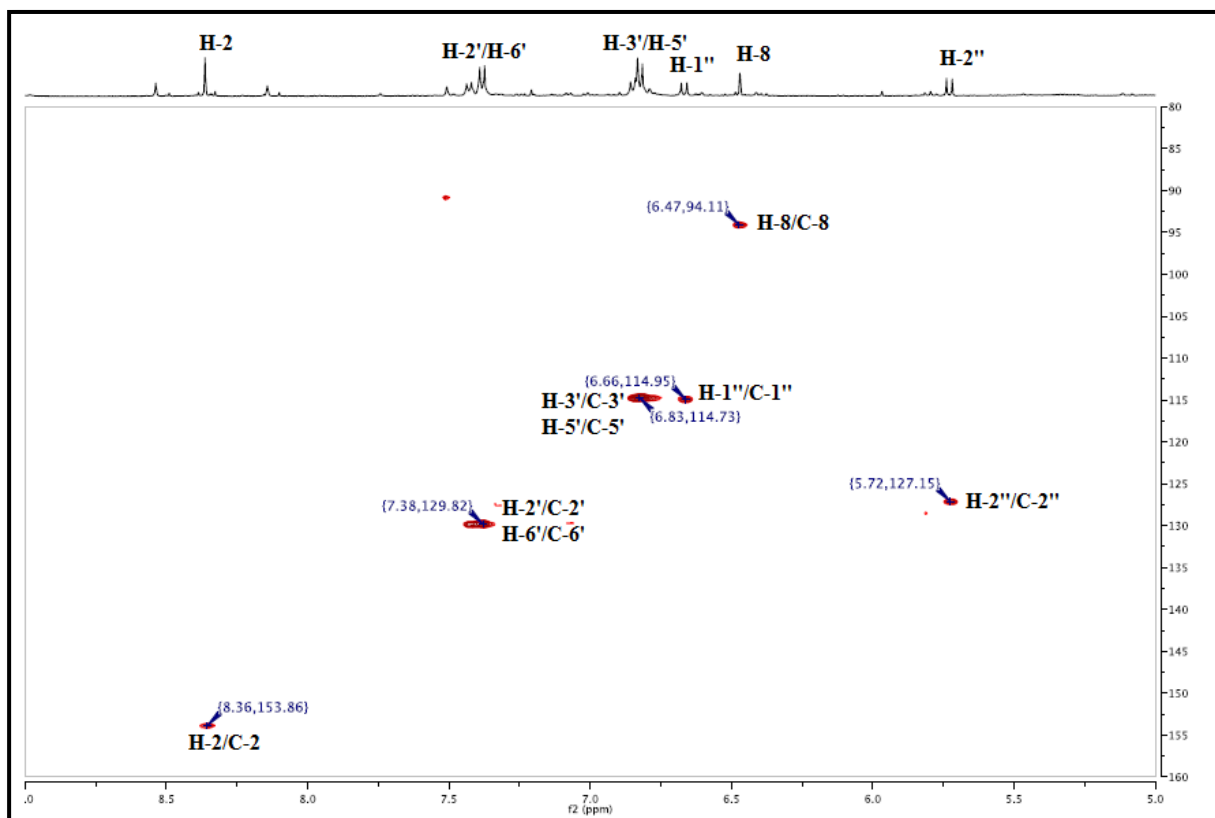


Figure III-28 : Partie du spectre HSQC du composé **Ea2**

Sur le spectre HMBC de ce composé plusieurs taches de corrélation sont observées entre le carbone C-3'' à  $\delta_C$  79,6 et les protons résonant à  $\delta_H$  1,40, 1,92, 2,55 et 6,67. Le déplacement chimique à 6,67 ppm correspond au proton oléfinique H-1'' du cycle pyranique et le déplacement à 1,40 ppm est attribuable à un groupement méthyle attaché au carbone C-3'' (Figure III-29).

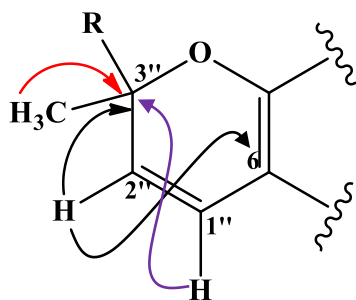
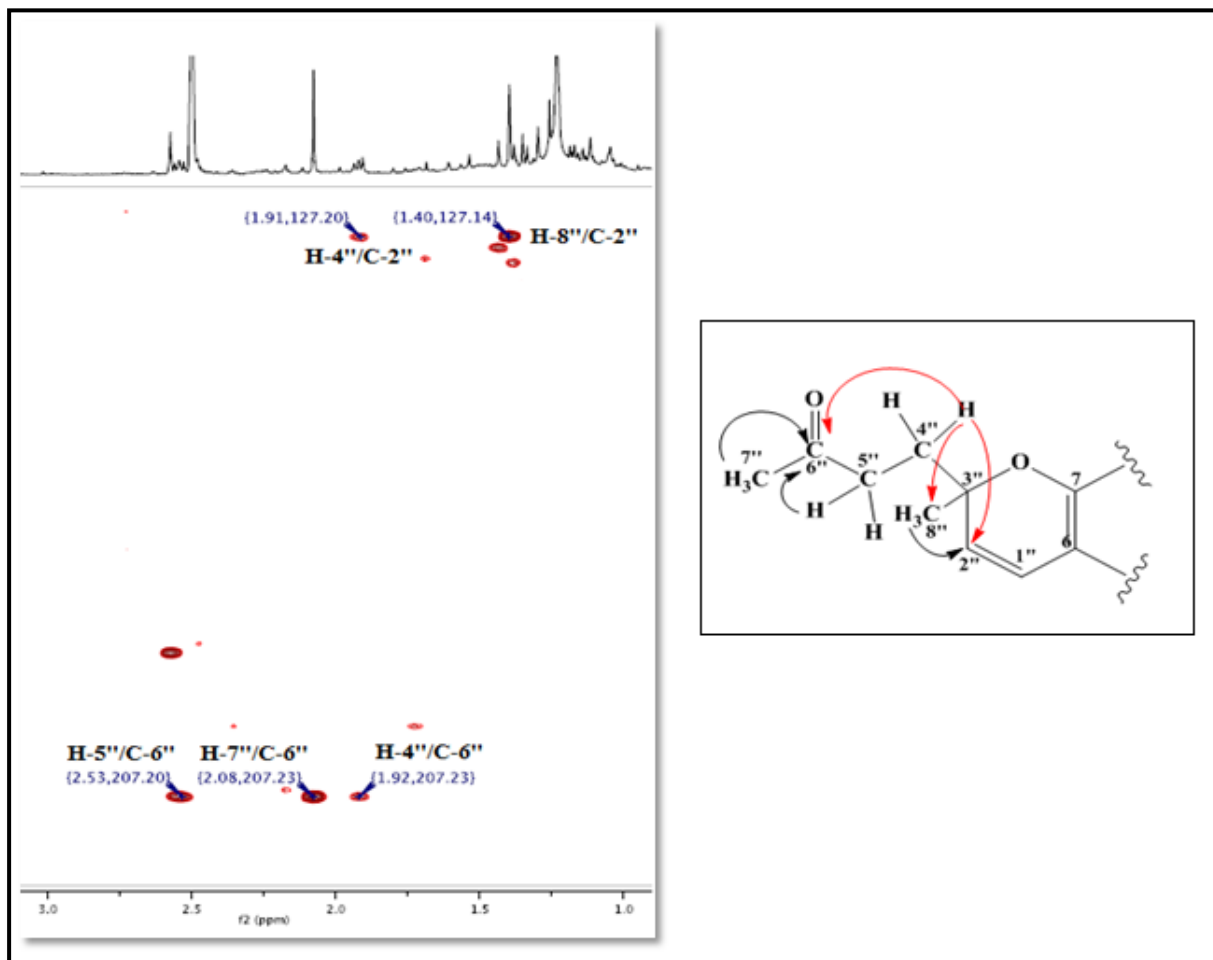


Figure III-29: Corrélations HMBC au niveau du cycle pyranique



Les deux autres signaux restant à  $\delta_H$  1,92 et 2,55 correspondent aux protons aliphatiques H<sub>2</sub>-4'' et H<sub>2</sub>-5'' d'une chaîne latérale liée au carbone C-3''. Ces protons couplent sur le spectre HMBC (Figure III-30) avec un carbone résonnant à 207,2 ppm attribué à un groupement carbonyle (C-6'') porteur d'un groupement méthyle terminal à  $\delta_H$  2,08 (H<sub>3</sub>-7''), son carbone est assigné par l'expérience HSQC à  $\delta_C$  29,4 (C-7''). Les protons de ce groupement (CH<sub>3</sub>-7'') corrélient en HMBC avec le carbonyle cétonique C-6''. Ce qui nous a permis l'élaboration de la chaîne latérale.



**Figure III-30** : Corrélations HMBC de la chaîne latérale

D'autres corrélations sont visualisées sur le spectre HMBC entre (Figure III-31):

- Les protons méthyléniques à  $\delta_H$  1,92 (H<sub>2</sub>-4'') et méthyliques à 1,40 (H<sub>3</sub>-8'') et le carbone C-2'' du cycle pyranique.
- Les protons H<sub>2</sub>-4'' et les carbones C-5'' à  $\delta_C$  37,2 et C-8'' à  $\delta_C$  26,2.
- Les protons H<sub>2</sub>-5'' à 2,55 ppm et H<sub>3</sub>-8'' et le carbone C-4'' à  $\delta_C$  34,2.

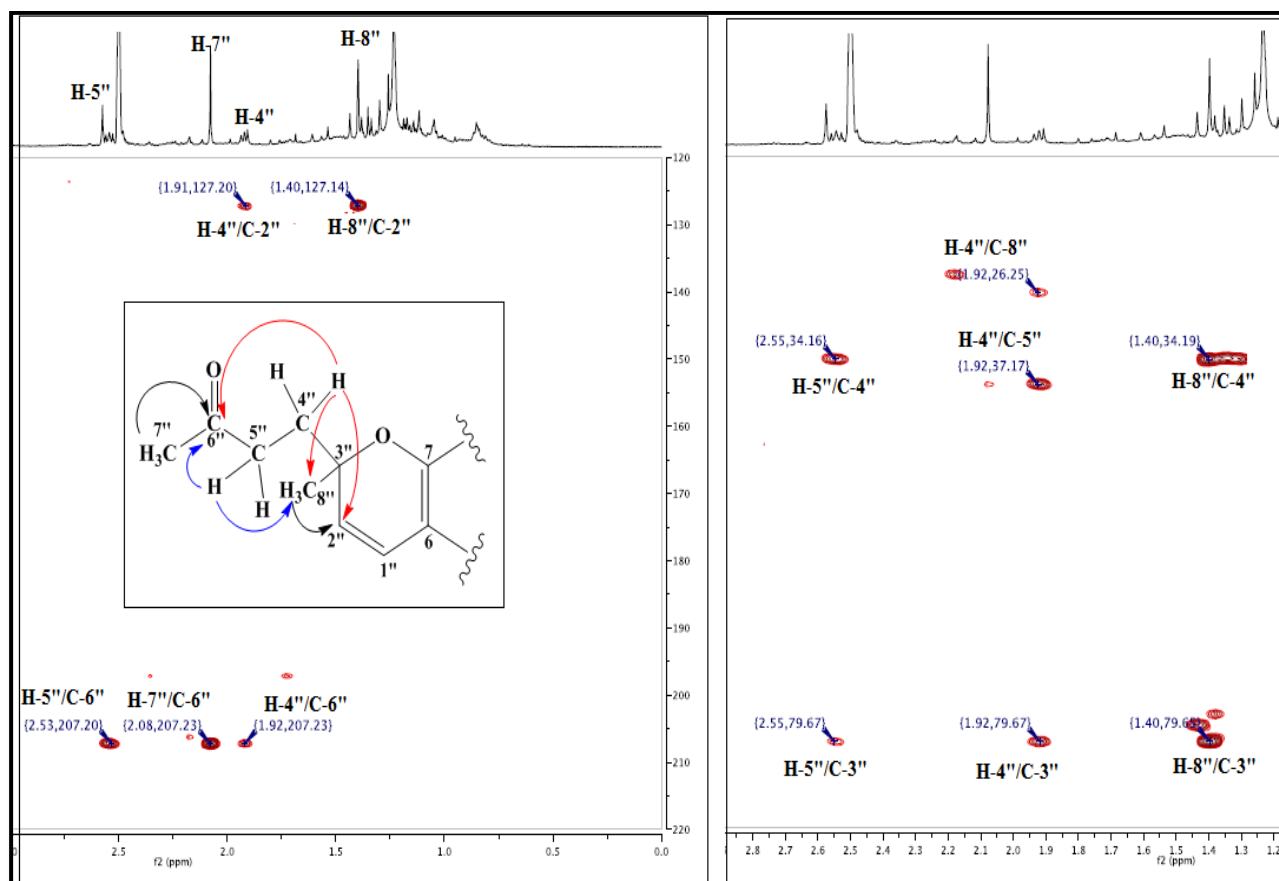
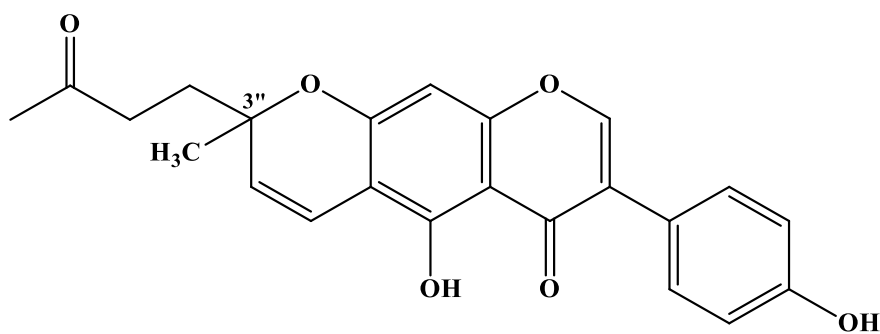


Figure III-31 : Partie du spectre HMBC de la chaîne latérale du composé **Ea2**

A l'issue de cette analyse la structure plane du composé **Ea2** est établie comme suit :



Erinasone B

Il est à noter que la stéréochimie au niveau du carbone chiral C-3'' demeure indéterminée.

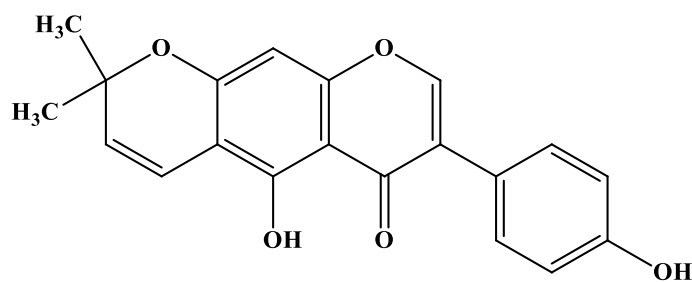
L'ensemble de ces données spectroscopiques et la mesure du pouvoir rotatoire dans le méthanol  $[\alpha]_D^{20} +30,5$  (C= 0,292, MeOH), nous permettent d'assigner pour le nouveau

composé **Ea2** la structure suivante: 3''-[butan-3-on]-alpinumisoflavone, appelé aussi **Erinasone B**.

**Tableau III-2:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **Ea2** dans le DMSO- $d_6$ .

Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
2	8,36	-	<i>s</i>	153,8
3	-	-	-	120,6
4	-	-	-	180,1
5	-	-	-	155,6
6	-	-	-	104,0
7	-	-	-	157,7
8	6,47	-	<i>s</i>	94,1
9	-	-	-	156,4
10	-	-	-	105,1
1'	-	-	-	122,1
2'	7,38	8,6	<i>d</i>	129,8
3'	6,82	8,6	<i>d</i>	114,7
4'	-	-	-	157,1
5'	6,82	8,6	<i>d</i>	114,7
6'	7,38	8,6	<i>d</i>	129,8
1''	6,67	10,2	<i>d</i>	114,9
2''	5,73	10,2	<i>d</i>	127,2
3''	-	-	-	79,7
4''	1,92	-	<i>m</i>	34,2
5''	2,54	-	<i>m</i>	37,2
6''	-	-	-	207,2
7''	2,08	-	<i>s</i>	29,4
8''	1,40	-	<i>s</i>	26,2
OH-5	13,38	-	<i>s</i>	-
OH-4'	9,58	-	<i>s</i>	-

## III-1-3-3-Identification structurale du composé Ea3



Alpinumisoflavone

Ce composé de type isoflavonoïde également, est nommé Alpinumisoflavone. Il est obtenu sous forme d'une poudre jaune visible en UV à 254 nm, se colorant en jaune après pulvérisation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse HR-ESI-MS du composé **Ea3** enregistré en modes négatif (Figure III-32) et positif (Figure III-33) révèlent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  335,0889  $[M-H]^-$  (calc.  $C_{20}H_{15}O_5$ , 335,0919) et 337,1098  $[M+H]^+$  (calc.  $C_{20}H_{17}O_5$ , 337,1076). Ceci correspond à une masse moléculaire de 336 uma et une formule brute en  $C_{20}H_{16}O_5$ , soit une différence de masse de - 56 uma par rapport au composé **Ea2** déjà identifié.

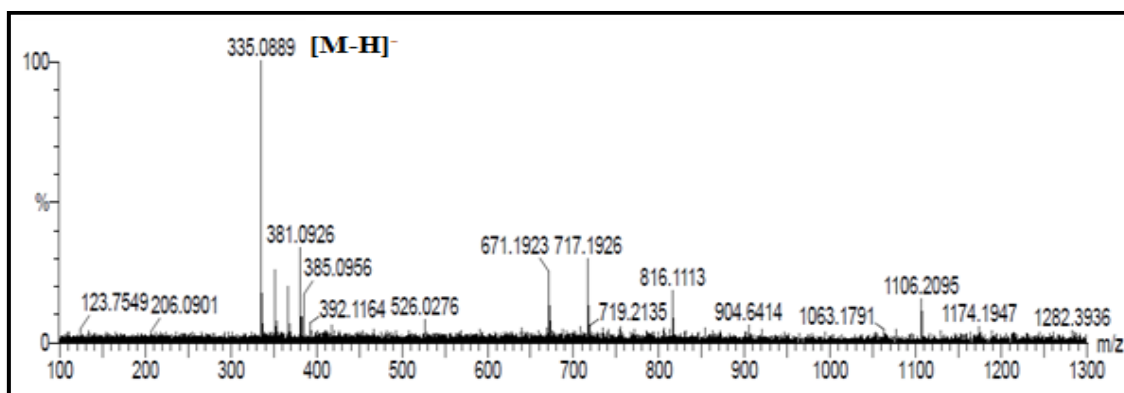


Figure III-32 : Spectre de masse HR-ESIMS (mode négatif) du composé Ea3

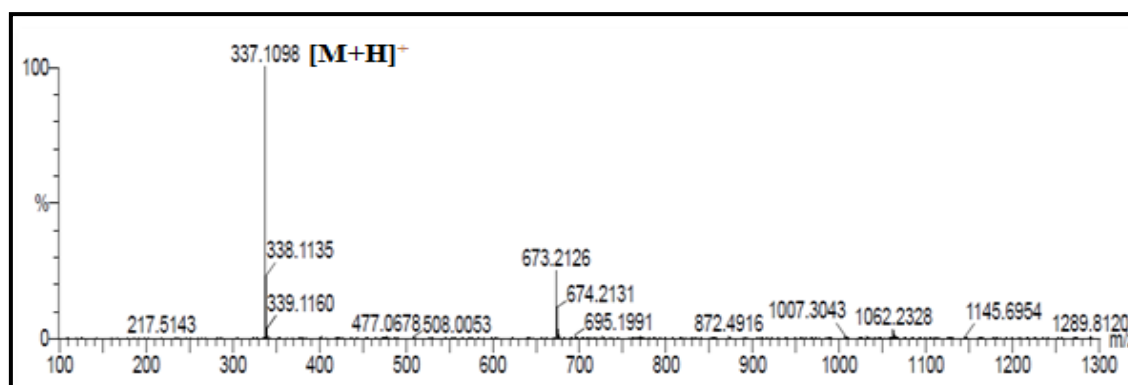


Figure III-33 : Spectre de masse HR-ESIMS (mode positif) du composé Ea3

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea3** est presque identique à celui du composé **Ea2** (Figure III-34) au niveau des cycles A, B et C de la partie aglycone et du cycle pyranique. La différence entre **Ea2** et **Ea3** consiste en la disparition des signaux de la chaîne latérale entre 1,92 et 2,54 ppm, et l'apparition d'un signal d'intégration 6H de deux groupements méthyles géminés et équivalents à  $\delta_{\text{H}}$  1,43 dans le cas du composé **Ea3**.

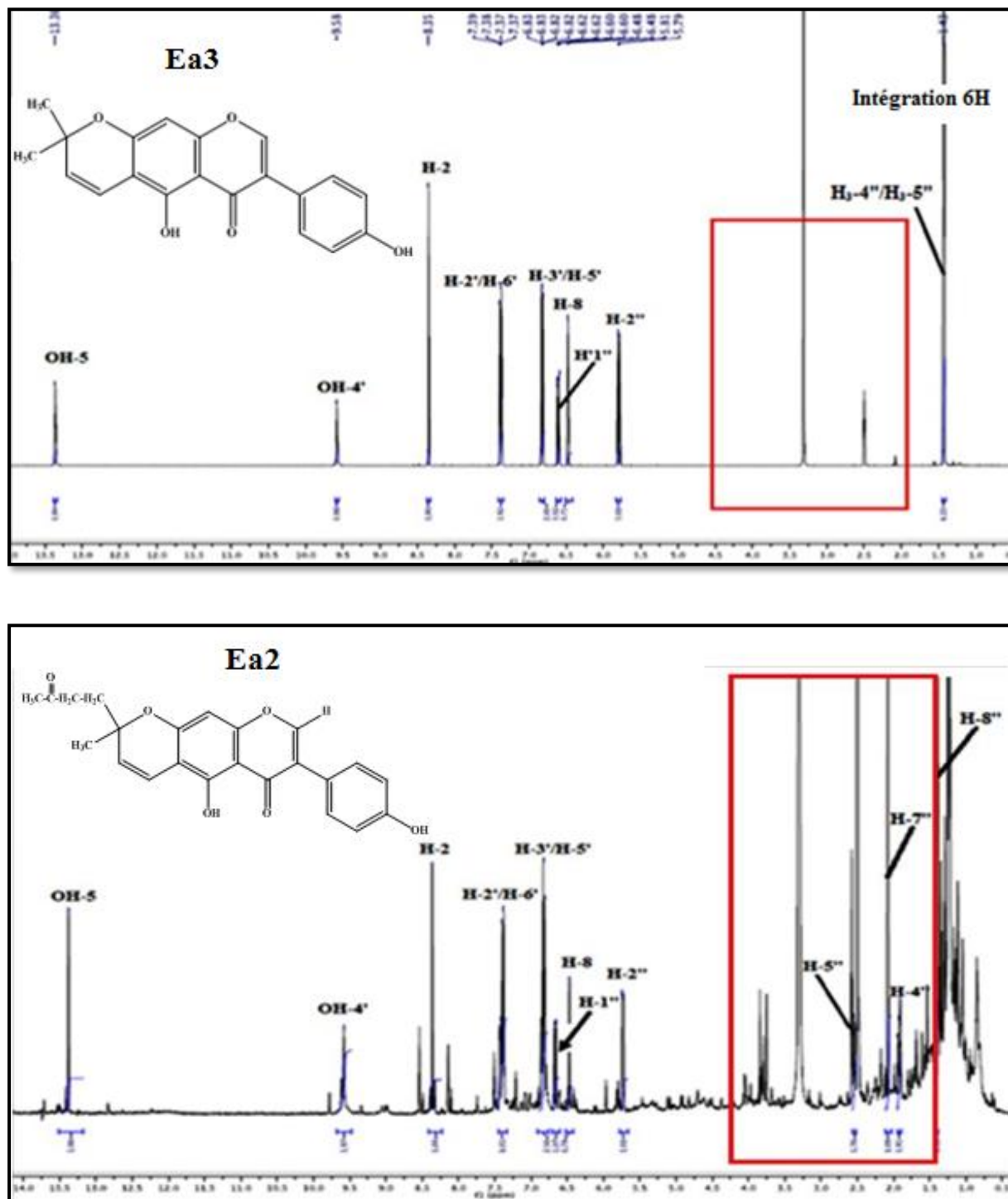
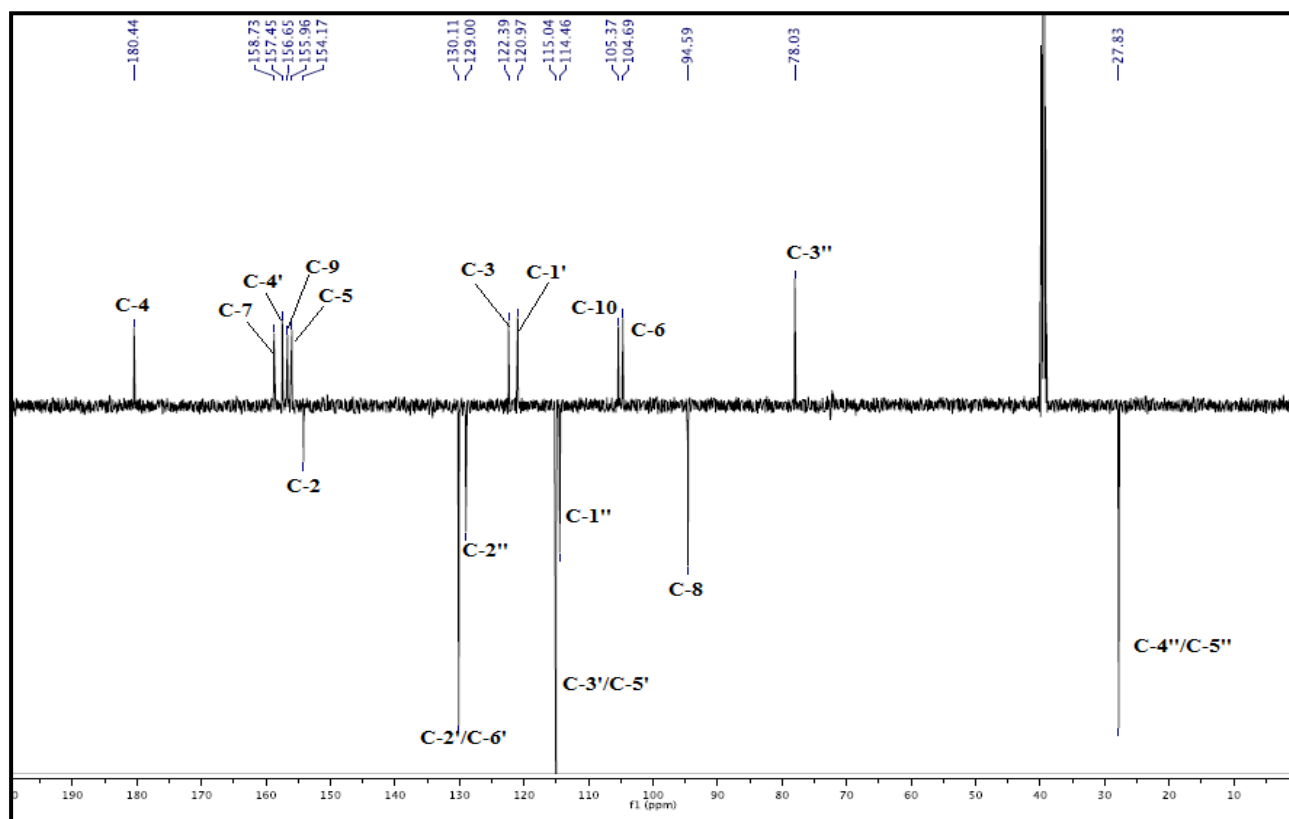


Figure III-34 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  des composés **Ea3** et **Ea2** ( $\text{DMSO-}d_6$ )

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé **Ea3** (Figure III-35) présente les signaux de 20 atomes de carbone, avec en particulier le signal du groupement carbonyle à  $\delta_{\text{C}}$  180,4.



**Figure III-35:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé **Ea3**

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé ont été caractérisés en analysant les spectres RMN  $^1\text{H}$ , HSQC  $J$ -modulé (Figure III-36) et HMBC (Figure III-37). En effet, la détermination du proton H-2 à ( $\delta_{\text{H}}$  8,35 ;  $\delta_{\text{C}}$  154,2) caractéristique des isoflavonoïdes nous permet de localiser les déplacements chimiques des carbones C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  122,4), C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  121,0), C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  155,9) et C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  180,4). En outre, le proton H-8 à 6,48 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  94,6, C-8), corrèle sur le spectre HMBC avec les carbones résonant à  $\delta_{\text{C}}$  105,0 (C-10), 104,7 (C-6), 158,7 (C-7), C-4 et C-9.

Les protons H-2'/H-6' à  $\delta_{\text{H}}$  7,38 et H-3'/H-5' à  $\delta_{\text{H}}$  6,83 typiques du cycle B para disubstitué ont présenté des corrélations avec un carbone oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  157,5 ne pouvant être que le carbone C-4' du cycle B. Leurs carbones sont assignés par l'expérience HSQC  $J$ -modulé à  $\delta_{\text{C}}$  130,1 et 115,0 respectivement. Le proton de l'hydroxyle en C-4' montre des corrélations HMBC avec les carbones C-4', C-3' et C-5' (Figure III-37). D'autres corrélations sont observées entre le proton de l'hydroxyle en position C-5 à  $\delta_{\text{H}}$  13,36 et le carbone à  $\delta_{\text{C}}$  155,9 (C-5) ainsi qu'avec le carbone C-10.

A ce niveau d'analyse tous les protons et carbones des cycles A, B et C ont été assignés.

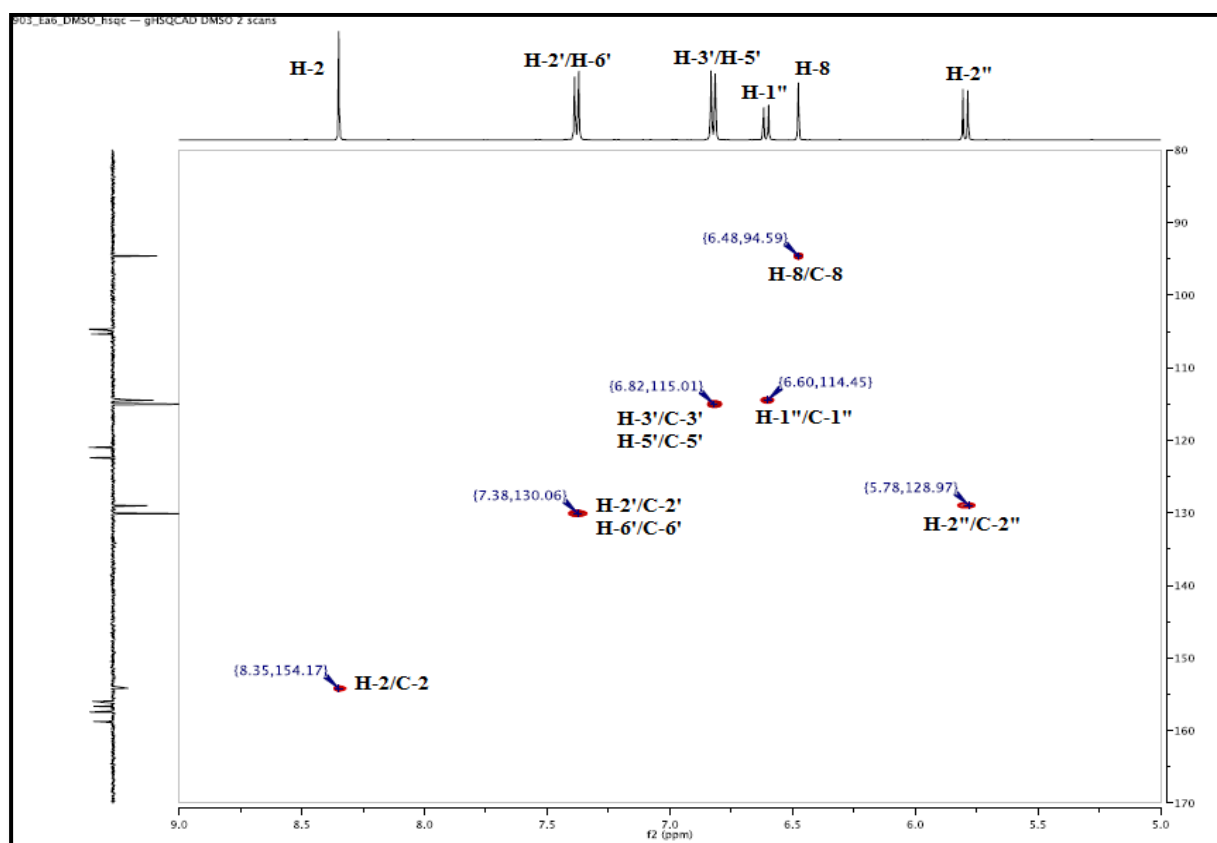


Figure III-36 : Spectre HSQC *J*-modulé du composé Ea3

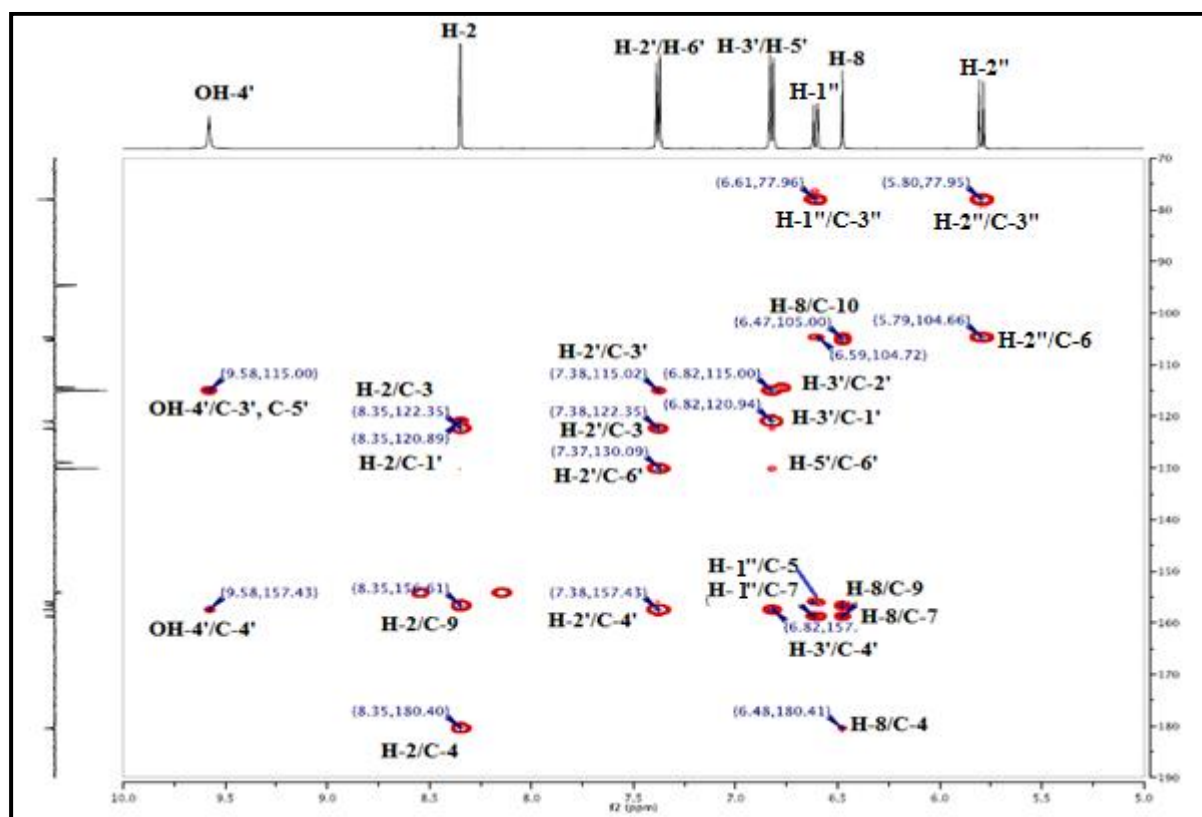


Figure III-37 : Spectre HMBC du composé Ea3

Les deux protons non attribués résonant à 6,61 et 5,80 ppm correspondent aux protons éthyléniques du cycle pyrane. Leur identification est réalisée aisément par l'expérience HMBC qui montre des corrélations entre le proton à  $\delta_H$  6,61 et les carbones du cycle A C-5, C-6 et C-7 déjà assignés, ne pouvant être que le proton H-1'' (Figure III-37). Ce proton couple sur le spectre COSY H-H avec le proton H-2'' résonant à 5,80 ppm ( $J = 10$  Hz, *Cis*). Les carbones C-1'' et C-2'' sont déterminés par analyse du spectre HSQC à  $\delta_C$  114,5 et 129,0 respectivement.

Les deux protons éthyléniques H-1'' et H-2'' corrélient sur le spectre HMBC (Figure III-37) avec un carbone quaternaire oxygéné repéré à 78,0 ppm (C-3''). Ce dernier présente également une tache de corrélation avec les protons méthyliques résonant à  $\delta_H$  1,43 attribués aux méthyles H<sub>3</sub>-4'' et H<sub>3</sub>-5'' (Figure III-38). Leur carbone est détecté par l'analyse du spectre HSQC à  $\delta_C$  27,8. En plus, les protons des deux groupements méthyles présentent des corrélations avec les carbones du cycle pyrane C-3'' et C-2'' (Figure III-38).

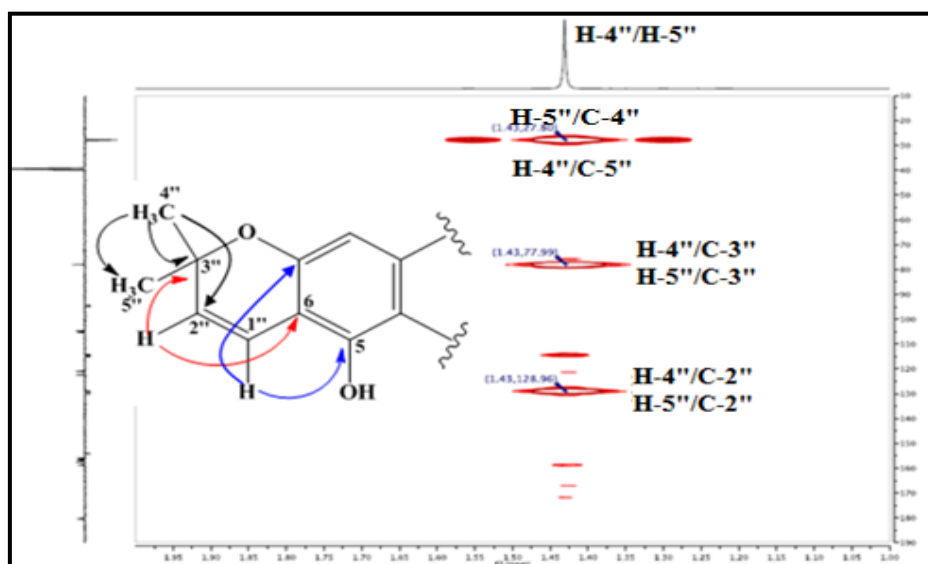
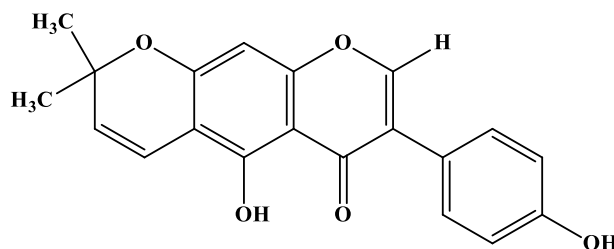


Figure III-38 : Corrélations HMBC du cycle pyranique

A l'issue de cette analyse et en tenant compte de la formule brute de ce composé  $C_{20}H_{16}O_5$ , la structure de **Ea3** correspond à l'alpinumisoflavone.



Structure du composé Ea3



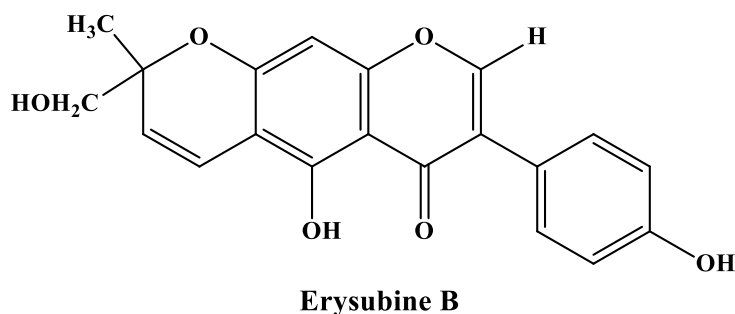
Les données spectrales établies et la comparaison avec les données de la littérature permettent d'identifier le composé **Ea3** à l'alpinumisoflavone <sup>[143]</sup>, antérieurement isolé des espèces: *Lupinus albus* <sup>[18]</sup>, *Erythrina arborescens* <sup>[144]</sup>, *Erythrina lysistemon* <sup>[145]</sup> et *Erythrina indica* <sup>[146]</sup> de la famille Fabaceae. Il est important de signaler que ce composé a été isolé pour la première fois dans le genre *Erinacea*.

Le composé alpinumisoflavone est connu par ses activités biologiques intéressantes à savoir : oestrogénique et anti-oestrogénique <sup>[145]</sup>, cytotoxique <sup>[146]</sup>, antiproliférative <sup>[147]</sup>, anti-oxydante <sup>[148]</sup>, antitumorale et anti-inflammatoire <sup>[149]</sup>.

**Tableau III-3** : Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) du composé **Ea3** dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>.

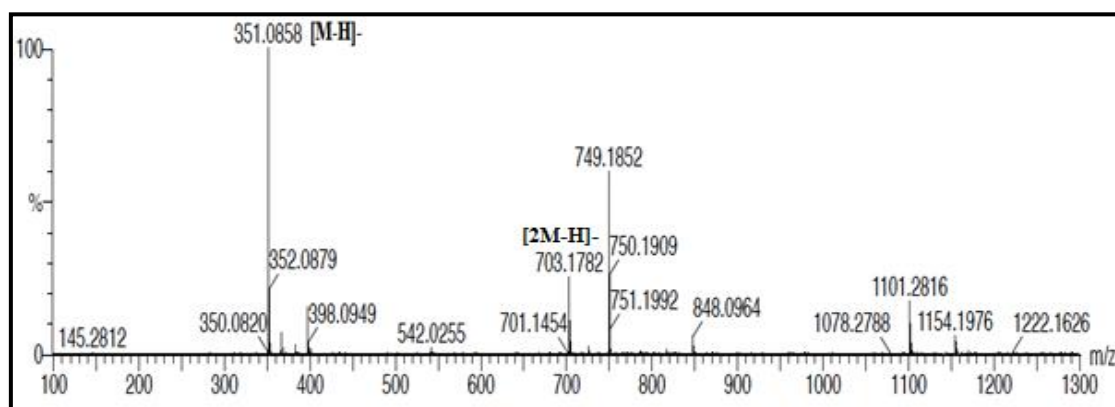
Position	$\delta_H$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_C$
2	8,35	-	<i>s</i>	154,2
3	-	-	-	122,4
4	-	-	-	180,4
5	-	-	-	155,9
6	-	-	-	104,7
7	-	-	-	158,7
8	6,48	-	<i>s</i>	94,6
9	-	-	-	156,7
10	-	-	-	105,4
1'	-	-	-	121,0
2'	7,38	8,6	<i>d</i>	130,1
3'	6,82	8,6	<i>d</i>	115,0
4'	-	-	-	157,5
5'	6,82	8,6	<i>d</i>	115,0
6'	7,38	8,6	<i>d</i>	130,1
1''	6,61	10,1	<i>d</i>	114,5
2''	5,80	10,1	<i>d</i>	129,0
3''	-	-	-	78,0
4''	1,43	-	<i>s</i>	27,8
5''	1,43	-	<i>s</i>	27,8
OH-5	13,36	-	<i>s</i>	-
OH-4'	9,58	-	<i>s</i>	-

## III-1-3-4-Identification structurale du composé Ea4

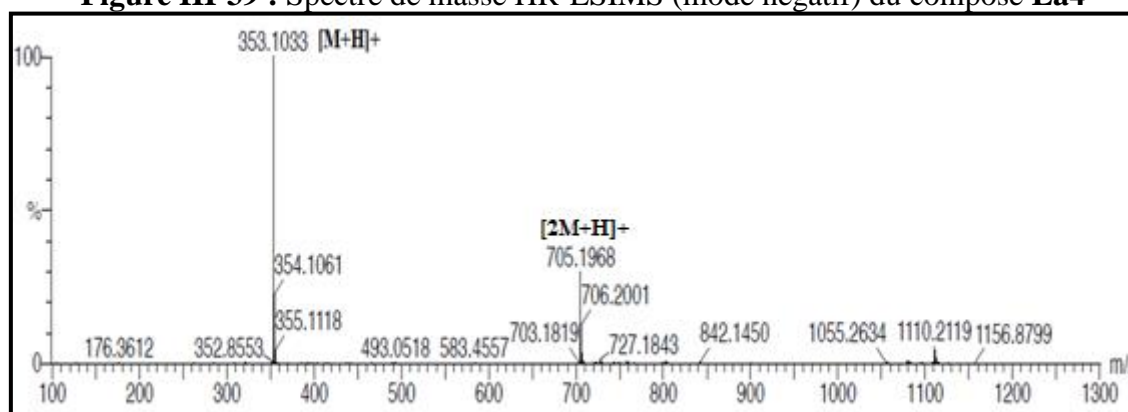


Le composé **Ea4** nommé Erysubine B se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans l'acétone. Ce composé est visible sous la lumière UV à 254 nm et se révèle en orange après pulvérisation à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

L'analyse des spectres de masse HR-ESI-MS enregistrés en modes négatif (Figure III-39) et positif (Figure III-40) met en évidence des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  351,0858  $[M-H]^-$  (calc.  $C_{20}H_{15}O_6$ , 351,0869) et 353,1033  $[M+H]^+$  (calc.  $C_{20}H_{17}O_6$ , 353,1025). Ceci correspond à une masse moléculaire de 352 uma et une formule brute en  $C_{20}H_{16}O_6$ , soit une différence de + 16 uma par rapport au composé **Ea3** déjà caractérisé.



**Figure III-39** : Spectre de masse HR-ESIMS (mode négatif) du composé **Ea4**



**Figure III-40** : Spectre de masse HR-ESIMS (mode positif) du composé **Ea4**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea4** enregistré dans le DMSO deutéré (Figure III-41) est presque similaire à celui du composé précédent **Ea3**. La seule différence entre **Ea4** et **Ea3** réside dans la disparition du signal d'un groupement méthyle à 1,43 ppm et l'apparition de deux signaux résonant à  $\delta_{\text{H}}$  3,49 (2H, *m*) et 5,08 (1H, *t*,  $J = 5,9$  Hz) dans le cas du composé **Ea4**. Ce dernier signal (5,08 ppm) ne présentant aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC *J*-modulé correspond à un groupement hydroxyle. Les protons à  $\delta_{\text{H}}$  3,49 couplent avec leur carbone oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  67,03 selon l'expérience HSQC.

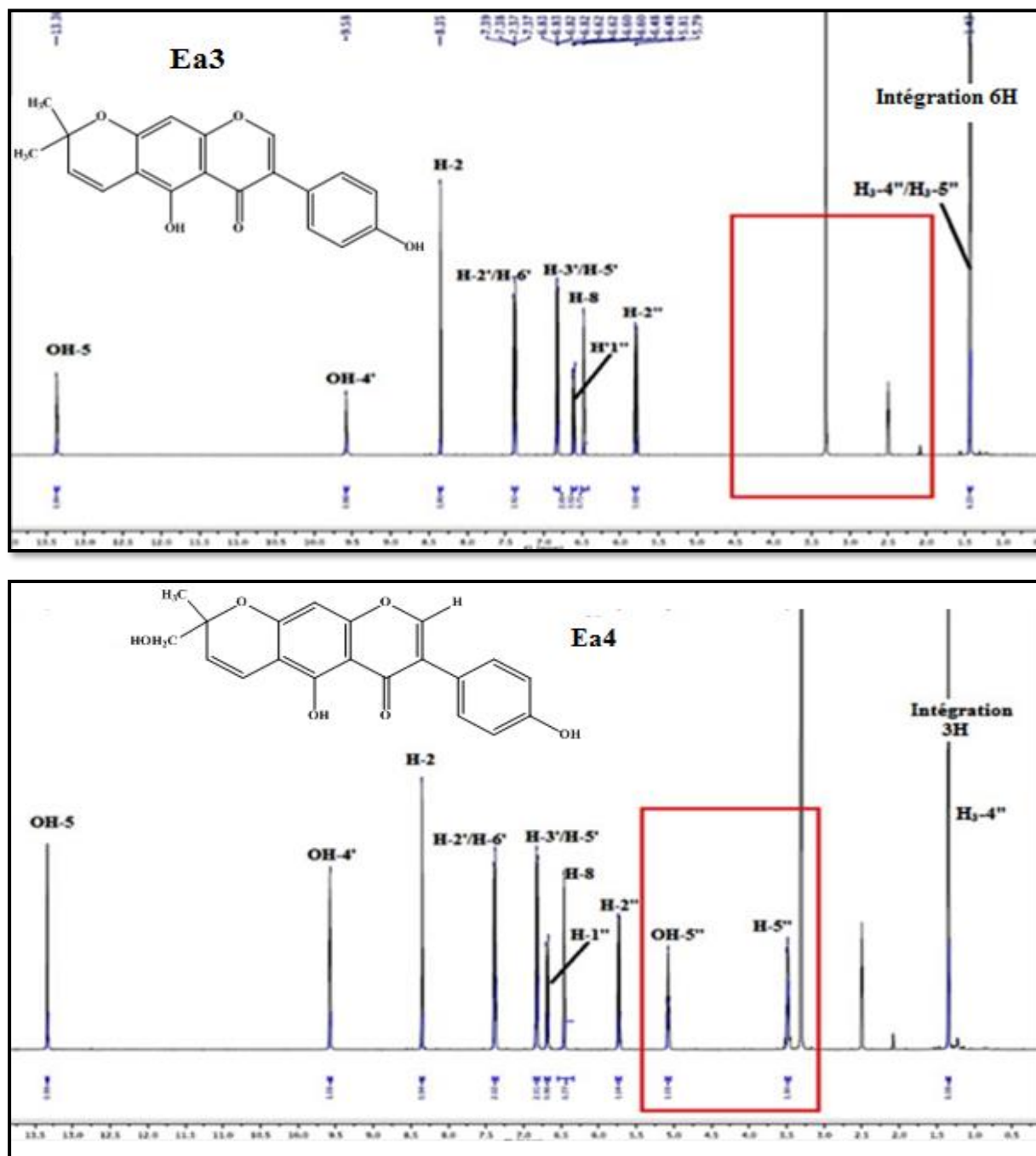


Figure III-41 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  des composés **Ea3** et **Ea4** (DMSO- $d_6$ )

Le spectre COSY H-H (Figure III-42) du composé **Ea4** montre en plus des systèmes de spins observés entre les protons H-2'/H-3' et H-5'/H-6' du cycle B et les protons H-1''/H-2'' du cycle pyranique, un autre système de spins à deux types de protons qui visualise le couplage entre le proton hydroxylique à  $\delta_H$  5,08 et les protons du groupement méthylène à  $\delta_H$  3,49 indiquant ainsi que l'hydroxyle est lié au carbone résonant à  $\delta_C$  67,03.

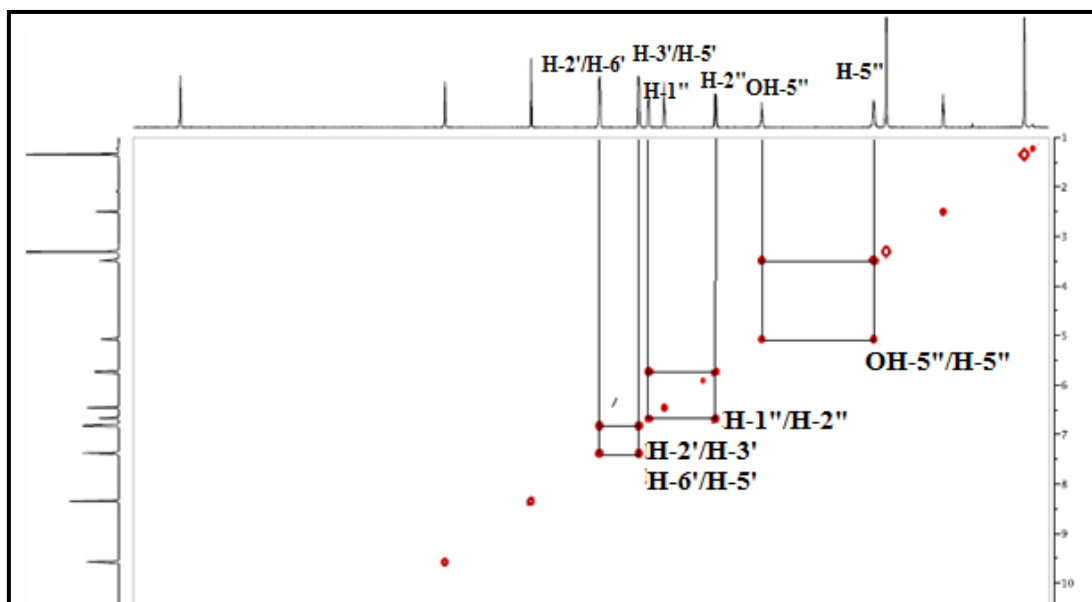


Figure III-42: Spectre COSY H-H du composé **Ea4**

L'attachement du groupement (CH<sub>2</sub>-OH) au squelette isoflavonique est établi par l'analyse du spectre HMBC (Figure III-43) qui montre des corrélations entre le proton de l'hydroxyle à 5,08 ppm et un carbone quaternaire repéré à  $\delta_C$  81,2. Ce dernier couple avec le proton d'un groupement méthyle à 1,35 ppm (CH<sub>3</sub>-4''), suggérant aussi que le carbone à  $\delta_C$  81,2 est attribué au carbone C-3'' du cycle pyranique. Ceci a été confirmé par les corrélations HMBC (Figure III-42) observées entre le carbone quaternaire oxygéné C-3'' et les protons H-1'' ( $\delta_H$  6,68, *d*,  $J = 10,2$  Hz), H-2'' ( $\delta_H$  5,73, *d*,  $J = 10,2$  Hz) et H-2-5'' ( $\delta_H$  3,49, *m*). Les carbones éthyléniques sont assignés par l'expérience HSQC à  $\delta_C$  115,9 (C-1'') et 126,2 (C-2'').

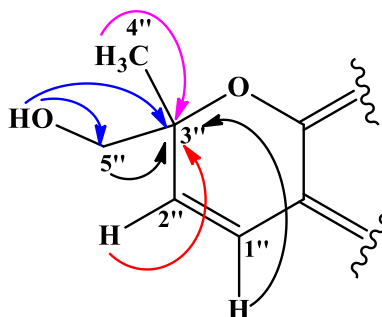
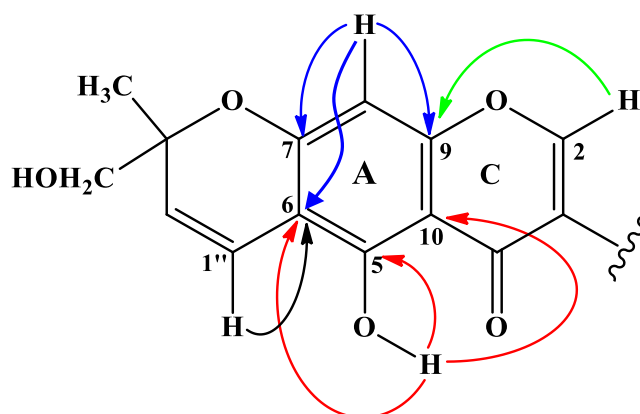


Figure III-43: Corrélations HMBC du cycle pyranique

Les déplacements chimiques des protons et carbones des cycles A, B et C sont déterminés par l'expérience HMBC (Figure III-44). En effet, le proton de l'hydroxyle en position C-5, connu par son déblindage à  $\delta_H$  13,34, présente des corrélations avec un carbone quaternaire oxygéné à 155,8 ppm attribuable au carbone C-5 et deux carbones quaternaires à  $\delta_C$  104,8 et 105,3 correspondant aux carbones C-6 et C-10. La différenciation entre ces deux carbones est facile du fait que le carbone à  $\delta_C$  104,8 montre sur le spectre HMBC une tache de corrélation avec le proton éthylénique H-1'' du cycle pyranique ne pouvant être que le carbone C-6 du cycle A, donc le deuxième carbone à  $\delta_C$  105,3 est attribuable au carbone C-10.



**Figure III-44:** Corrélations HMBC des cycles A et C

Le proton H-8 à  $\delta_H$  6,46 du cycle A présente des corrélations HMBC avec le carbone C-6 déjà attribué et deux carbones oxygénés à  $\delta_C$  156,7 et 159,2 correspondant aux carbones C-9 et C-7. La distinction entre ces deux derniers se fait par la corrélation en  $^3J$  observée sur le spectre HMBC (Figure III-45) entre le proton H-2 à  $\delta_H$  8,35 caractéristique des isoflavonoïdes et le carbone à  $\delta_C$  156,7 ne pouvant être que le carbone C-9. Il en résulte que le déplacement chimique à  $\delta_C$  159,2 est attribué au carbone C-7.

D'autres corrélations sont visualisées entre :

- Le proton H-2 et les carbones C-4 ( $\delta_C$  180,4), C-3 ( $\delta_C$  122,4) et C-1' ( $\delta_C$  121,0).
- Les deux protons H-2' et H-6' à  $\delta_H$  7,38 du cycle B para disubstitué et les carbones C-3'/C-5' à  $\delta_C$  115,0 et C-4' à  $\delta_C$  157,4.
- Les deux protons H-3' et H-5' à  $\delta_H$  6,82 et les carbones C-1' et C-4'.
- Le proton de l'hydroxyle en C-4' et les carbones C-4', C-3' et C-5'.

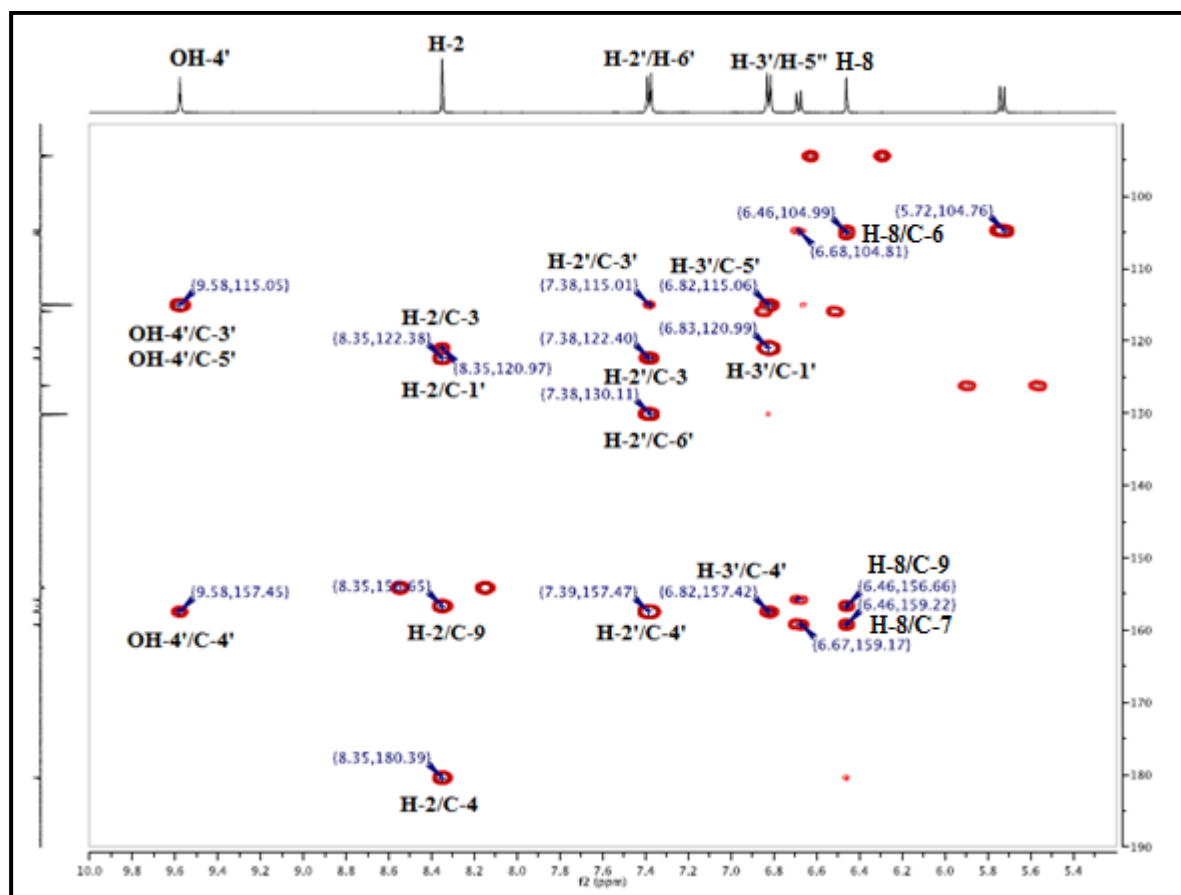
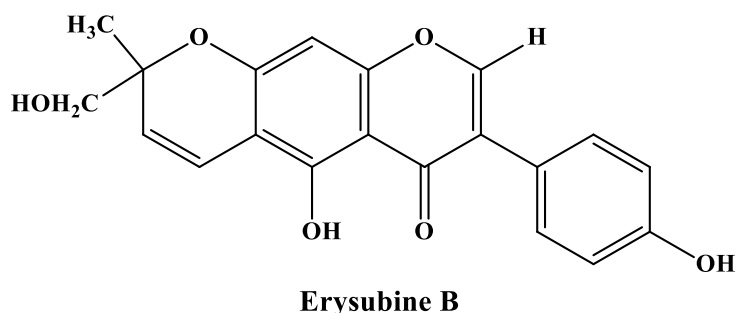


Figure III-45 : Spectre HMBC du composé Ea4

Toutes les données spectroscopiques représentées dans le tableau III-4, permettent d'identifier ce composé à l'Erysubine B ou hydroxyalpinumisoflavone (**Ea4**), isolé antérieurement des espèces : *Erythrina poeppigiana* <sup>[150]</sup> et *Erythrina caffra* <sup>[151]</sup> de la famille Fabaceae.

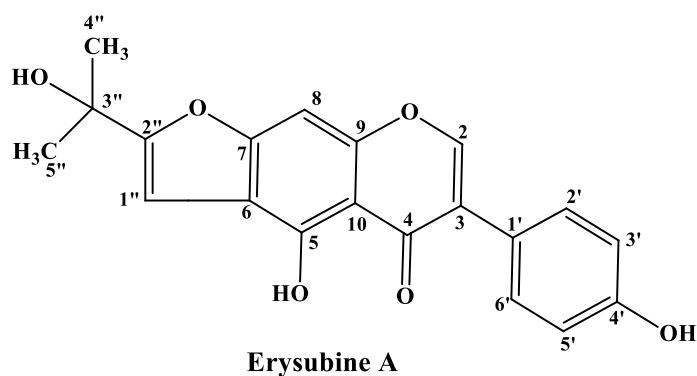


Ce composé a été isolé pour la première fois dans le genre *Erinacea*. Ces données sont conformes à celles de la littérature <sup>[152]</sup>. Il montre une activité contre le BACE1, qui est l'une des enzymes de protéase responsable de la maladie d'Alzheimer <sup>[153]</sup>. En outre, il n'a pas présenté une activité antibactérienne contre la souche bactérienne *Staphylococcus aureus* MRSA <sup>[150]</sup>.

**Tableau III-4:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **Ea4** dans le DMSO- $d_6$ .

Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
2	8,35	-	<i>s</i>	154,1
3	-	-	-	122,4
4	-	-	-	180,4
5	-	-	-	155,8
6	-	-	-	104,8
7	-	-	-	159,2
8	6,46	-	<i>s</i>	94,4
9	-	-	-	156,7
10	-	-	-	105,3
1'	-	-	-	121,0
2'	7,38	8,6	<i>d</i>	130,1
3'	6,82	8,6	<i>d</i>	115,0
4'	-	-	-	157,4
5'	6,82	8,6	<i>d</i>	115,0
6'	7,38	8,6	<i>d</i>	130,1
1''	6,68	10,2	<i>d</i>	115,9
2''	5,73	10,2	<i>d</i>	126,0
3''	-	-	-	81,1
4''	1,35	-	<i>s</i>	23,2
5''	3,49	-	<i>m</i>	67,0
OH-5	13,34	-	<i>s</i>	-
OH-4'	9,58	-	<i>s</i>	-
OH-5''	5,08	5,9	<i>t</i>	-

### III-1-3-5-Identification structurale du composé Ea5



Le composé **Ea5** nommé Erysubine A est isolé sous forme d'une poudre amorphe jaune soluble dans l'acétone. Ce composé est visible sous la lampe UV à 254 nm et il se colore en gris après pulvérisation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Les spectres de masse réalisés en haute résolution HR-ESI-MS enregistrés en modes négatif (Figure III-46) et positif (Figure III-47) montrent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  351,0866  $[M-H]^-$  (calc.  $C_{20}H_{15}O_6$ , 351,0869) et 353,1031  $[M+H]^+$  (calc.  $C_{20}H_{17}O_6$ , 353,1025), ceci correspond à une masse moléculaire de 352 uma et une formule brute en  $C_{20}H_{16}O_6$  suggérant 13 degrés d'insaturation.

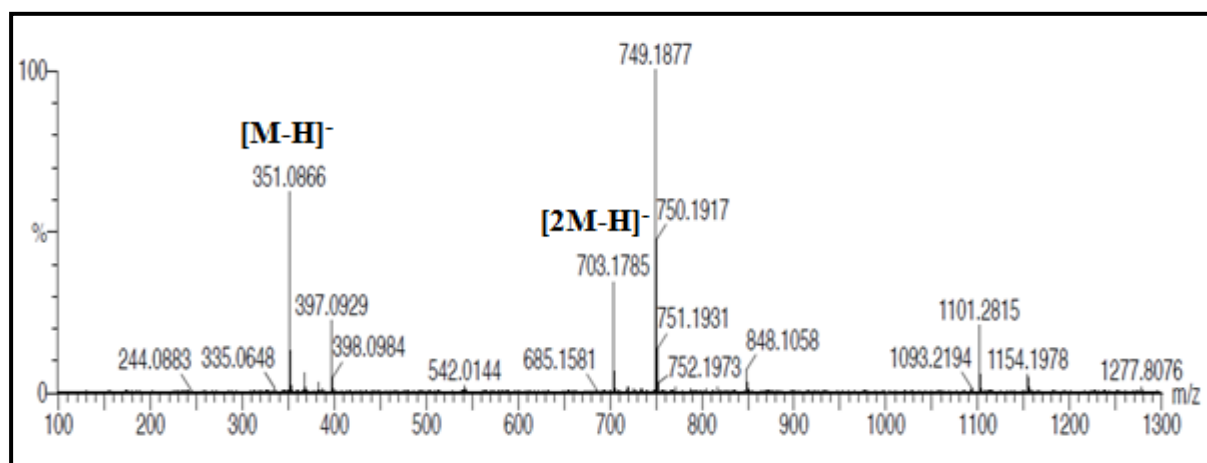


Figure III-46 : Spectre de masse HR-ESI-MS (mode négatif) du composé **Ea5**

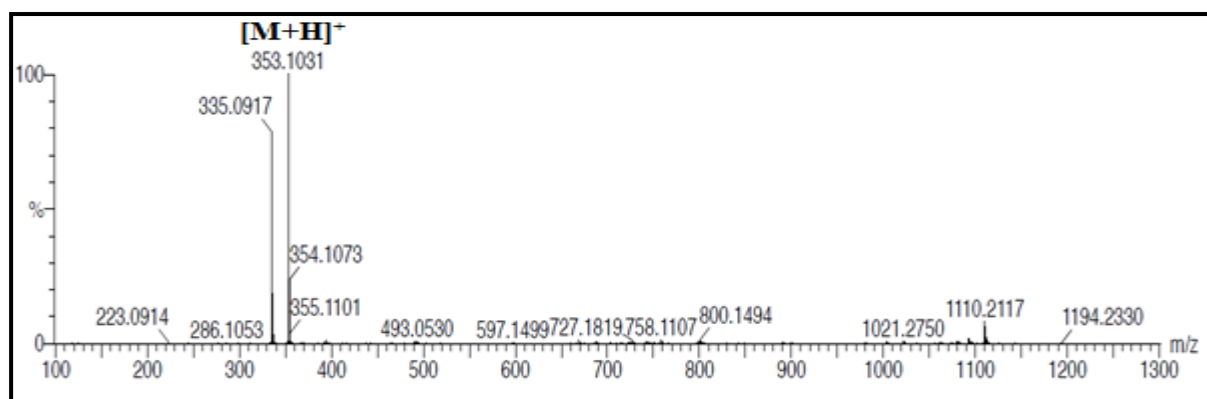


Figure III-47 : Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea5**

Les spectres RMN  $^1H$  (Figure III-48) des composés **Ea5** et **Ea3** sont presque semblables. La différence entre ces deux composés consiste en la disparition du proton oléfinique H-2" du cycle pyrane du composé **Ea3** et l'apparition d'un nouveau signal à  $\delta_H$  5,47 (1 H, s) ne montrant aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC  $J$ -modulé attribué à un groupement hydroxyle.



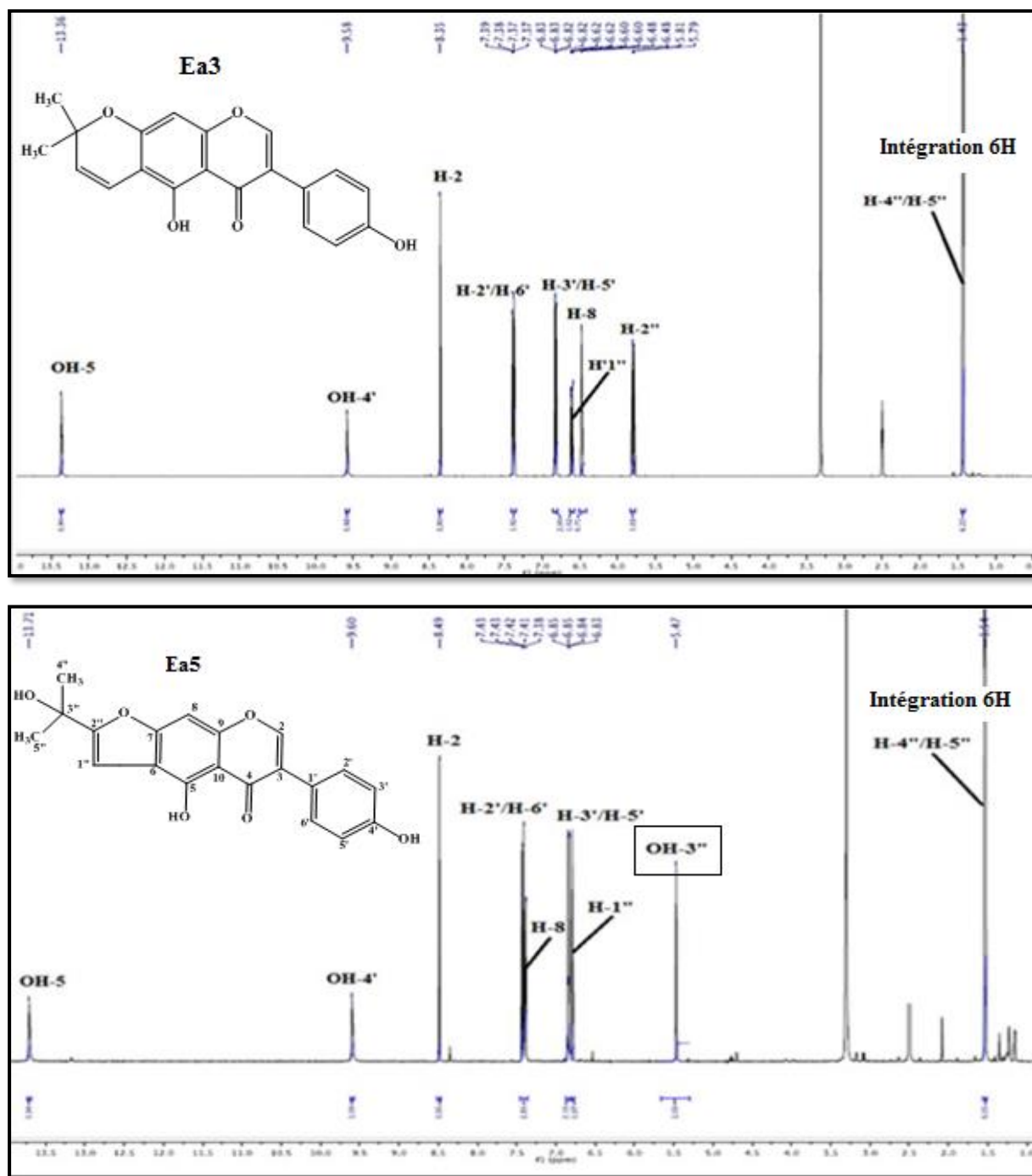


Figure III-48 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  des composés **Ea3** et **Ea5** ( $\text{DMSO}-d_6$ ).

Les valeurs de déplacement chimique des protons et carbones des cycles A, B et C sont déterminées par l'analyse conjointe des spectres RMN  $^1\text{H}$ , HSQC (Figure III-49) et HMBC (Figure III-50). A partir du proton H-2 caractéristique des isoflavonoïdes résonant à  $\delta_{\text{H}}$  8,49, on peut caractériser les carbones à  $\delta_{\text{C}}$  121,2 (C-3), 153,0 (C-9) et 181,7 (C-4) suite à leurs corrélations HMBC. Le carbone C-2 est repéré à 154,8 ppm selon l'expérience HSQC (Figure III-49).

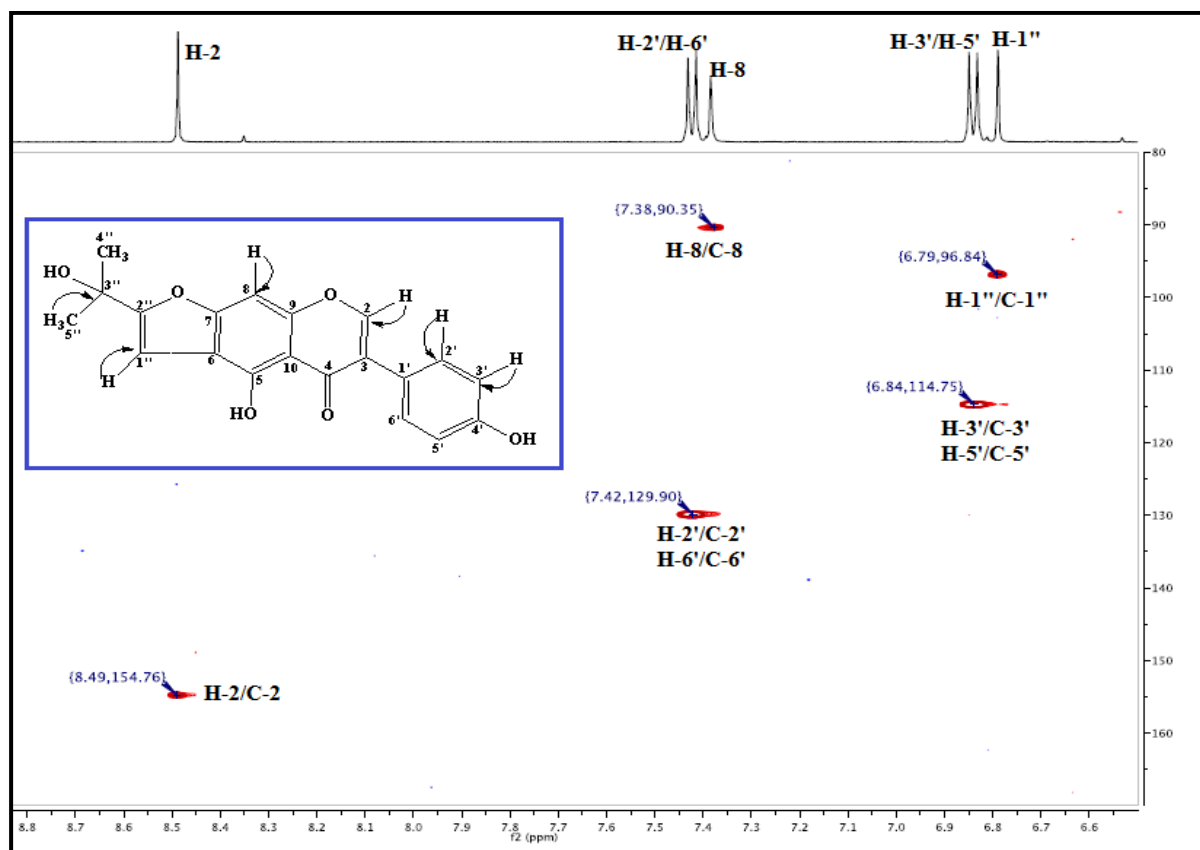


Figure III-49 : Spectre HSQC du composé Ea5

De plus, la localisation du groupement méthine  $Sp^2$  CH-8 à ( $\delta_H$  7,38, *s*,  $\delta_C$  90,4) nous permet d'assigner les valeurs de déplacement chimique des carbones résonant à  $\delta_C$  112,8 (C-6), 157,6 (C-7) et 105,6 (C-10). Cependant, les corrélations visualisées sur le spectre HMBC des protons H-2'/H-6' ( $\delta_H$  7,42/  $\delta_C$  129,9) et H-3'/H-5' ( $\delta_H$  6,84/  $\delta_C$  114,8) du cycle B paradisubstitué conduisent à l'identification des carbones résonant à  $\delta_C$  157,1 (C-4') et 120,7 (C-1') (Figure III-50).

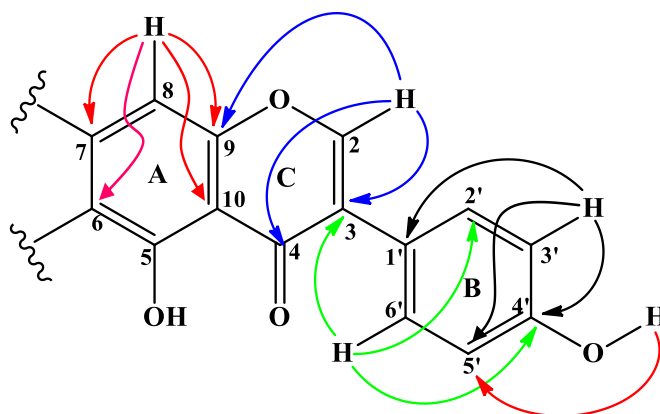


Figure III-50 : Corrélations HMBC du composé Ea5

En outre, le spectre HMBC (Figure III-51) de ce composé montre une tache de corrélation entre le carbone C-6 (112,8 ppm) du cycle A et un proton éthylénique à  $\delta_H$  6,79 correspondant au proton H-1'' faisant partie d'une chaîne prénylée, son carbone est détecté par l'expérience HSQC à  $\delta_C$  96,8. Ce proton couple en HMBC avec trois carbones quaternaires oxygénés résonant à  $\delta_C$  157,6 (C-7) déjà identifié, 157,7 et 164,7. La distinction entre les deux carbones à  $\delta_C$  157,7 et 164,7 est faite par l'analyse du spectre HMBC qui indique des corrélations entre les protons de deux groupements méthyles ( $\delta_H$  1,53, *s*) et le carbone à  $\delta_C$  164,7 ne pouvant être que le carbone C-2'' oxygéné de la chaîne prénylée (Figure III-52). Par conséquent, le déplacement chimique à 157,7 ppm est attribué au carbone C-5.

D'autres corrélations HMBC sont visualisées entre le proton du groupement hydroxyle résonant à  $\delta_H$  5,47 et les carbones C-2'', C-3'' ( $\delta_C$  65,5), C-4'' et C-5'' ( $\delta_C$  28,4) (Figure III-51). Ceci indique que ce groupement est lié au carbone quaternaire C-3'' de la chaîne prénylée.

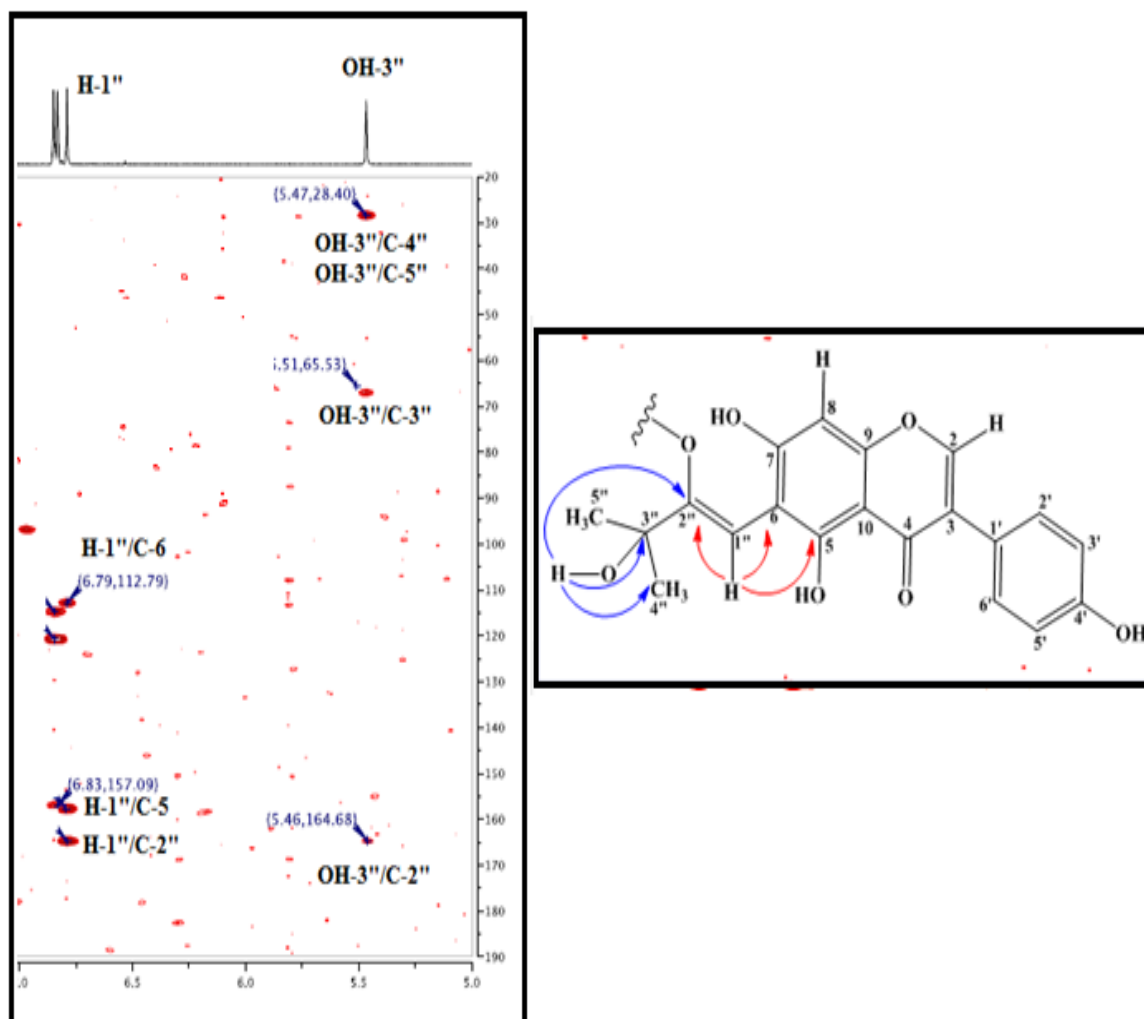


Figure III-51 : Partie du spectre HMBC du composé Ea5

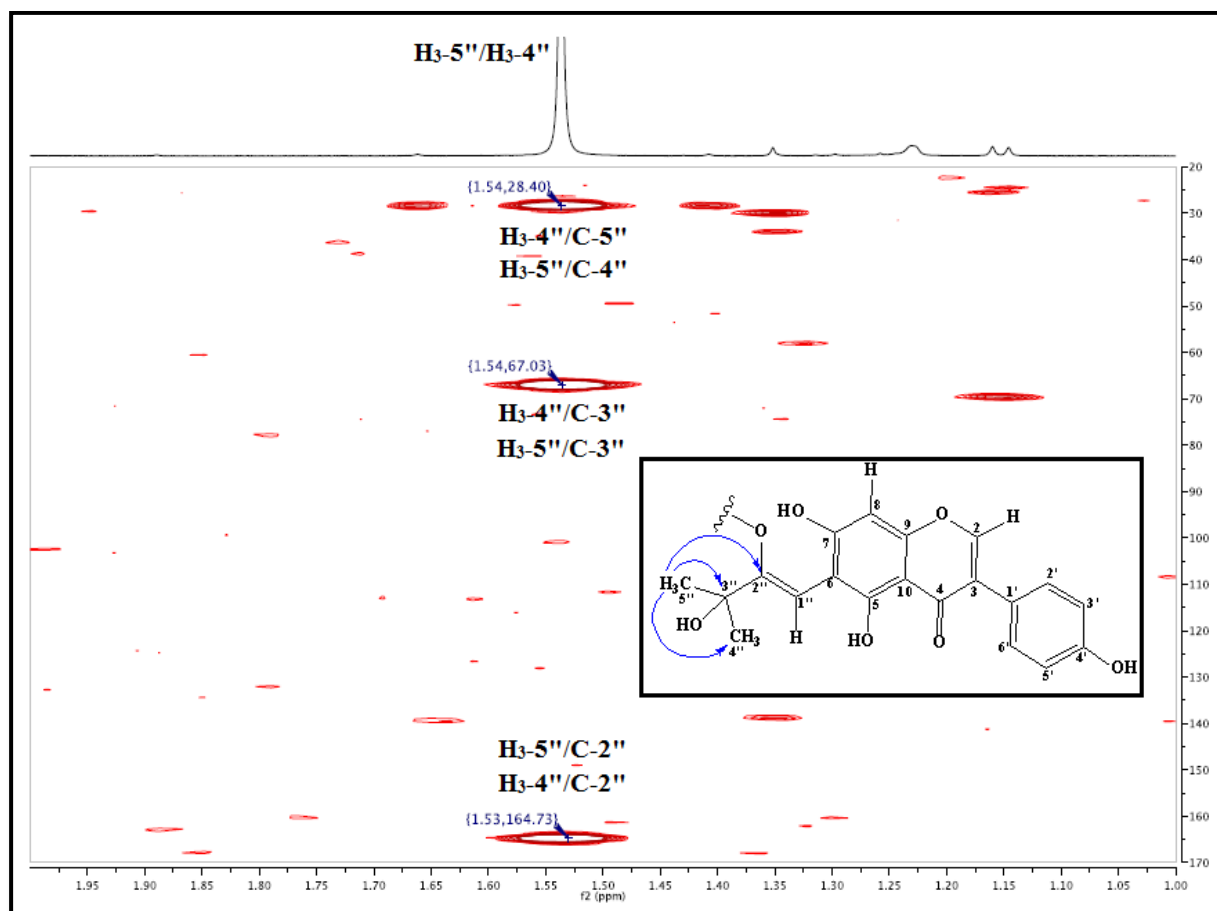
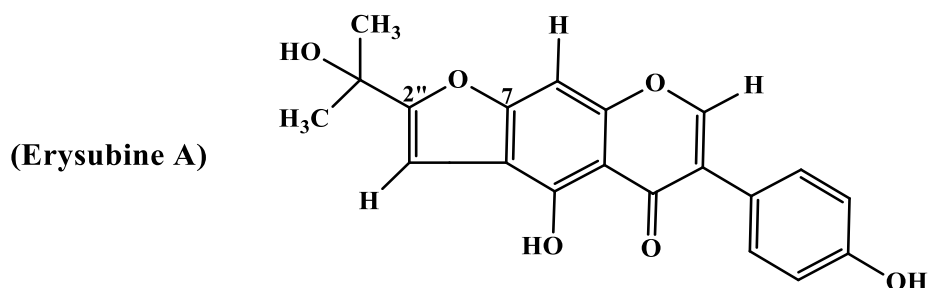


Figure III-52 : Correlations HMBC des protons H<sub>3</sub>-4'' et H<sub>3</sub>-5''

En tenant compte de la masse moléculaire de ce composé  $M = 352$  uma correspondant à la formule brute en  $C_{20}H_{16}O_6$ , le nombre d'insaturations déjà démontré par l'analyse du spectre de masse égale à 12, il reste donc à attribuer une seule insaturation correspondant à un cycle supplémentaire furanique résultant d'une cyclisation entre les carbones C-2'' de la chaîne prényle et C-7 du cycle A par l'intermédiaire d'un atome d'oxygène. Ce qui conduit à proposer la structure suivante :



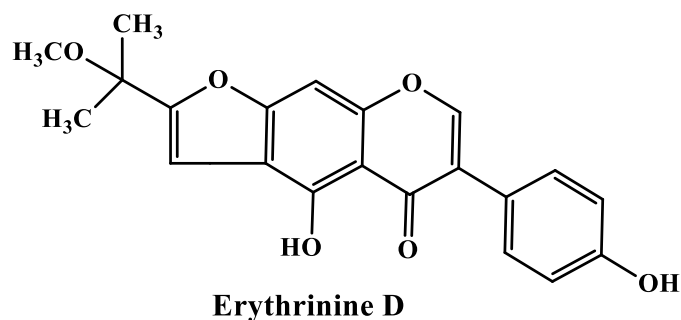
L'ensemble de ces données spectroscopiques illustrées dans le tableau III-5 et la comparaison avec celles de la littérature <sup>[152]</sup> permettent d'élucider le composé **Ea5** comme étant Erysubine A. Ce composé a été antérieurement isolé de l'espèce *Erythrina*

*suberosa* var. *glabrescences* [152], mais il a été identifié pour la première fois dans le genre *Erinacea*.

**Tableau III-5** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **Ea5** dans le DMSO- $d_6$ .

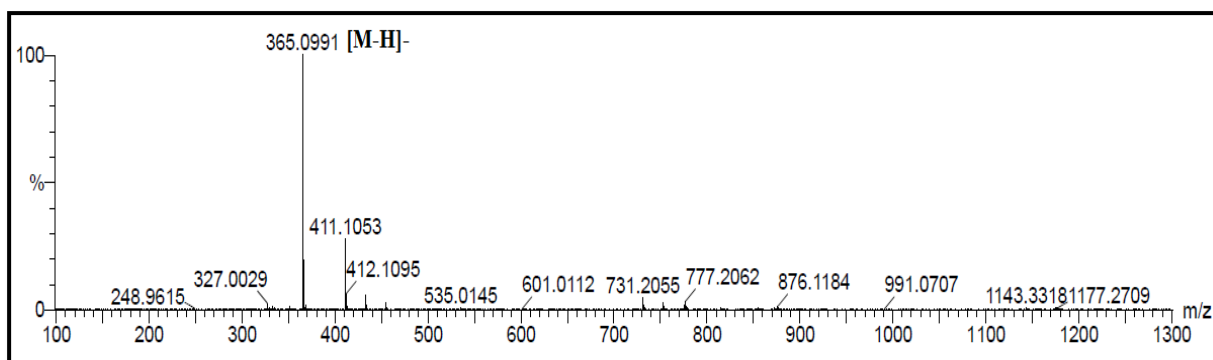
Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
2	8,49	-	<i>s</i>	154,8
3	-	-	-	121,2
4	-	-	-	181,7
5	-	-	-	157,7
6	-	-	-	112,8
7	-	-	-	157,6
8	7,38	-	<i>s</i>	90,4
9	-	-	-	153,0
10	-	-	-	105,6
1'	-	-	-	120,7
2'	7,42	8,6	<i>d</i>	129,9
3'	6,84	8,6	<i>d</i>	114,8
4'	-	-	-	157,1
5'	6,84	8,6	<i>d</i>	114,8
6'	7,42	8,6	<i>d</i>	129,9
1''	6,79	-	<i>s</i>	96,8
2''	-	-	-	164,8
3''	-	-	-	65,5
4''	1,54	-	<i>s</i>	28,4
5''	1,54	-	<i>s</i>	28,4
OH-5	13,71	-	<i>s</i>	-
OH-4'	9,60	-	<i>s</i>	-
OH-3''	5,47	-	<i>s</i>	-

## III-1-3-6-Identification structurale du composé Ea6

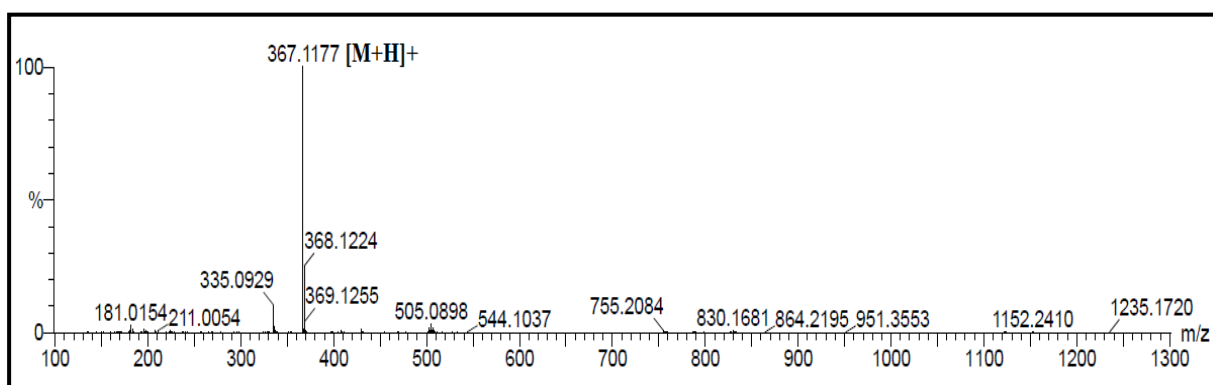


Ce composé est obtenu à l'état pur sous forme d'une poudre jaune, visible sous la lumière UV à 254 nm. Il se colore en marron après révélation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Les spectres de masse en HR-ESI-MS du composé **Ea6** enregistrés en modes négatif (Figure III-53) et positif (Figure III-54) montrent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z$  365,0991  $[M-H]^-$  (calc.  $C_{21}H_{17}O_6$ , 365,1025) et 367,1177  $[M+H]^+$  (calc.  $C_{21}H_{19}O_6$ , 367,1182), correspondant à une masse moléculaire de 366 uma et une formule brute en  $C_{21}H_{18}O_6$ , soit une différence de + 14 uma par rapport au composé précédent **Ea5** déjà identifié.



**Figure III-53** : Spectre de masse HR-ESI-MS (mode négatif) du composé **Ea6**



**Figure III-54** : Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea6**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-55) du composé **Ea6** enregistré aussi dans le DMSO- $d_6$  est presque identique à celui du composé **Ea5** déjà déterminé. La différence entre ces deux composés concerne la disparition du signal du groupement hydroxyle OH-3'' et l'apparition d'un signal supplémentaire d'intégration 3H attribuable à un groupement méthylique à  $\delta_{\text{H}}$  3,02 dans le cas du composé **Ea6**, dont le déblindage de leur protons suggère qu'il est lié à un groupement attracteur.

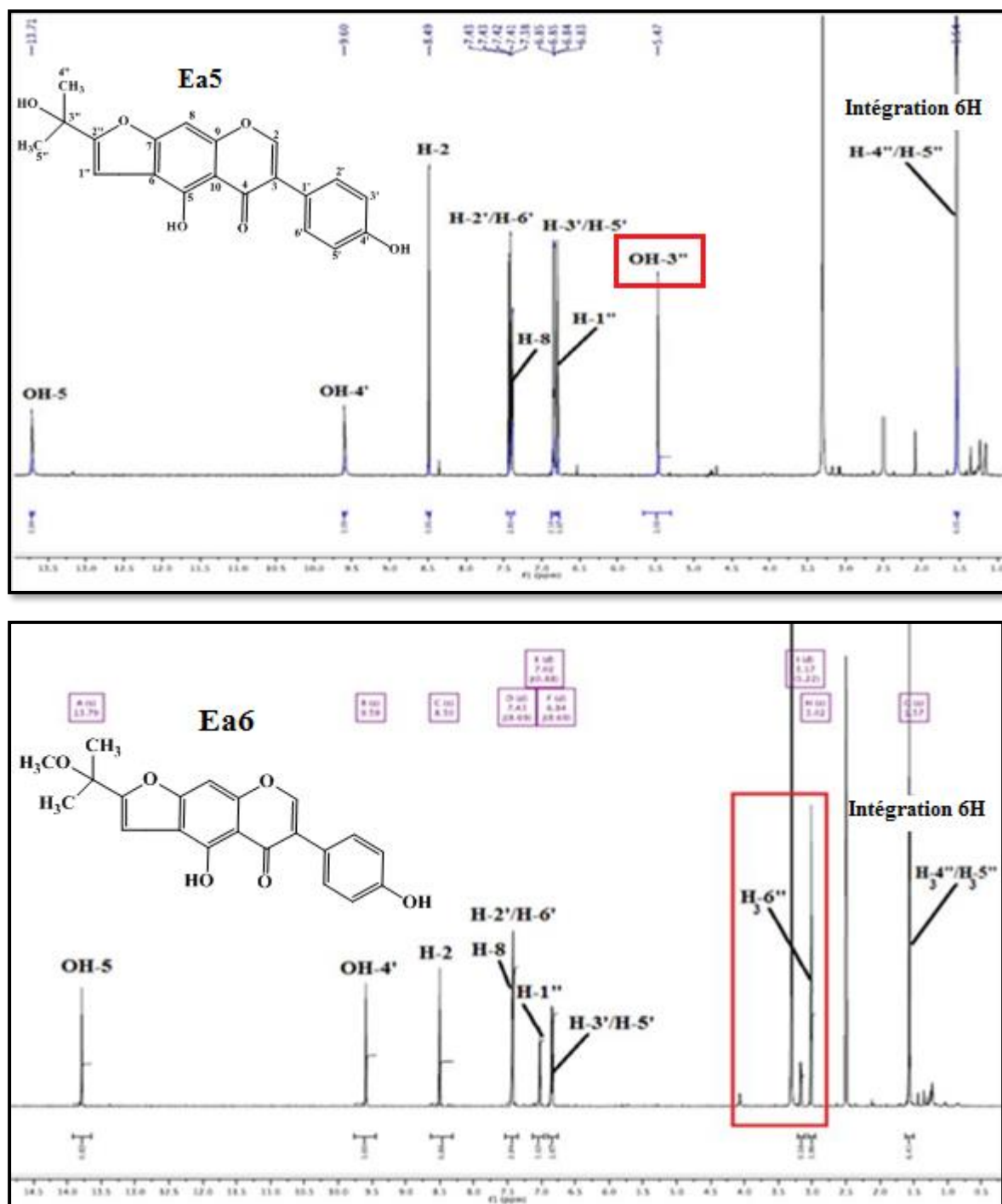


Figure III-55 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  des composés **Ea5** et **Ea6** (DMSO- $d_6$ )

Les déplacements chimiques des protons et carbones des cycles A, B et C ainsi que du cycle furanique de ce composé sont déterminés par l'analyse combinée des spectres RMN<sup>1</sup>H (Figure III-55), HSQC (Figure III-56) et HMBC (Figure III-57) et ils sont représentés dans le tableau III-6.

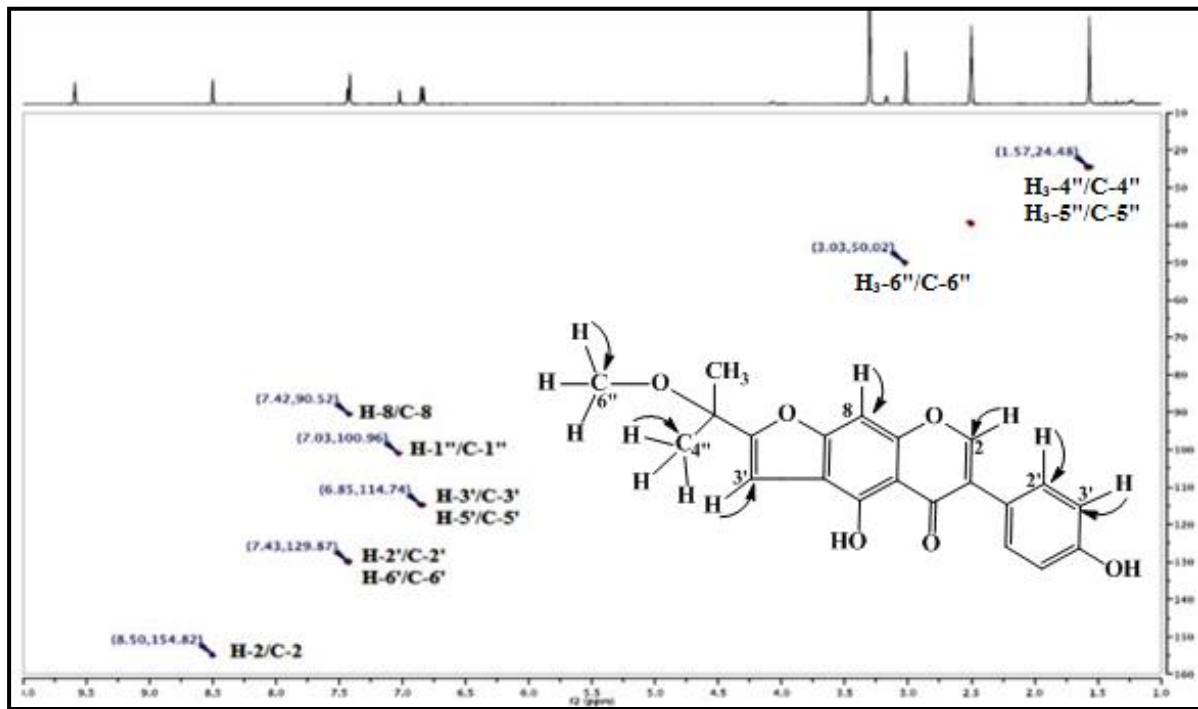


Figure III-56 : Spectre HSQC du composé Ea6

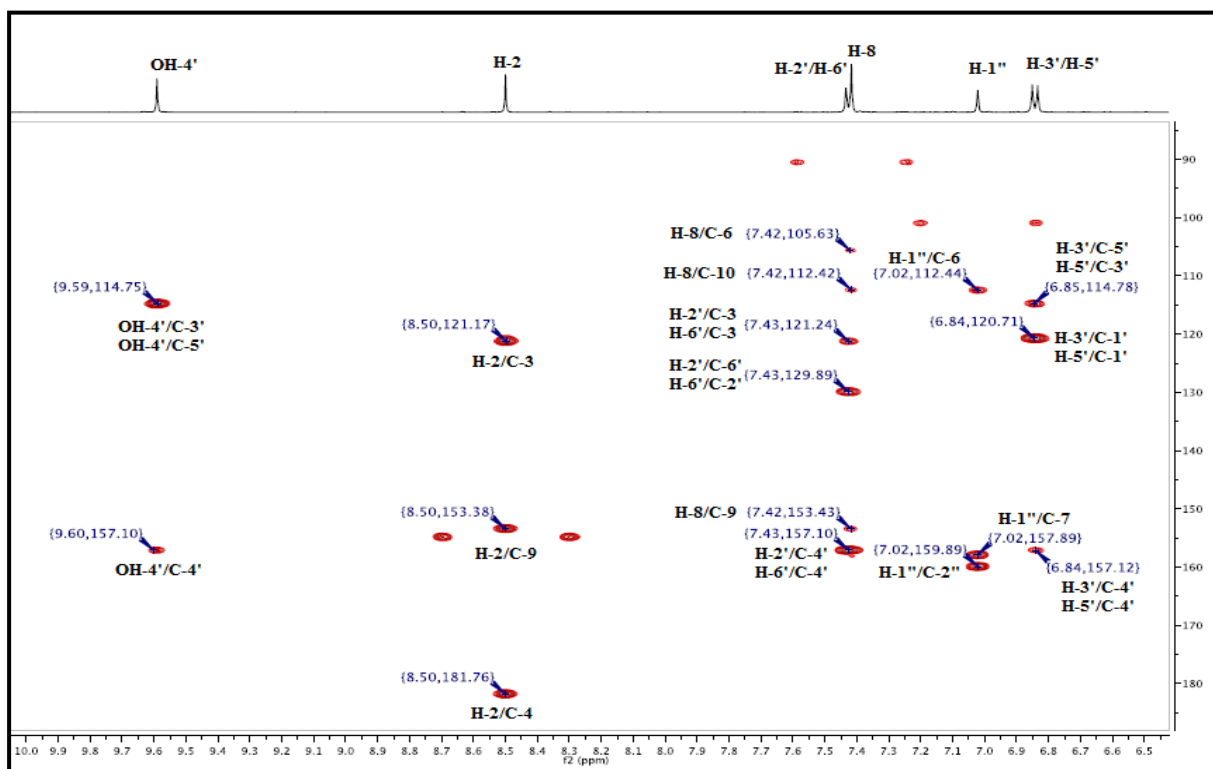


Figure III-57 : Spectre HMBC du composé Ea6



En tenant compte de la différence de la masse moléculaire de 14 uma entre les deux composés **Ea5** et **Ea6**, et qui se manifeste par l'apparition d'un nouveau groupement méthyle pour le composé **Ea6** ainsi que l'absence du proton du groupement hydroxyle lié au carbone C-3'' dans le cas du composé **Ea5**, suggérant ainsi la présence d'un groupement méthoxyle attaché au carbone C-3''.

La position du groupement méthoxyle en C-3'' est confirmée par l'analyse du spectre HMBC qui montre des corrélations entre les protons du groupement méthoxyle à  $\delta_H$  3,02 et le carbone quaternaire à  $\delta_C$  72,4 attribuable au carbone C-3''. Ce dernier présente des couplages en HMBC avec les protons des deux groupements méthyles géminés H<sub>3</sub>-4'' et H<sub>3</sub>-5'' à ( $\delta_H$  1,57, s;  $\delta_C$  24,5). D'autres corrélations HMBC sont observées entre les protons du groupement méthyle H<sub>3</sub>-4'' et les carbones C-5'' ( $\delta_C$  24,5) et C-2'' ( $\delta_C$  159,9) (Figure III-58).

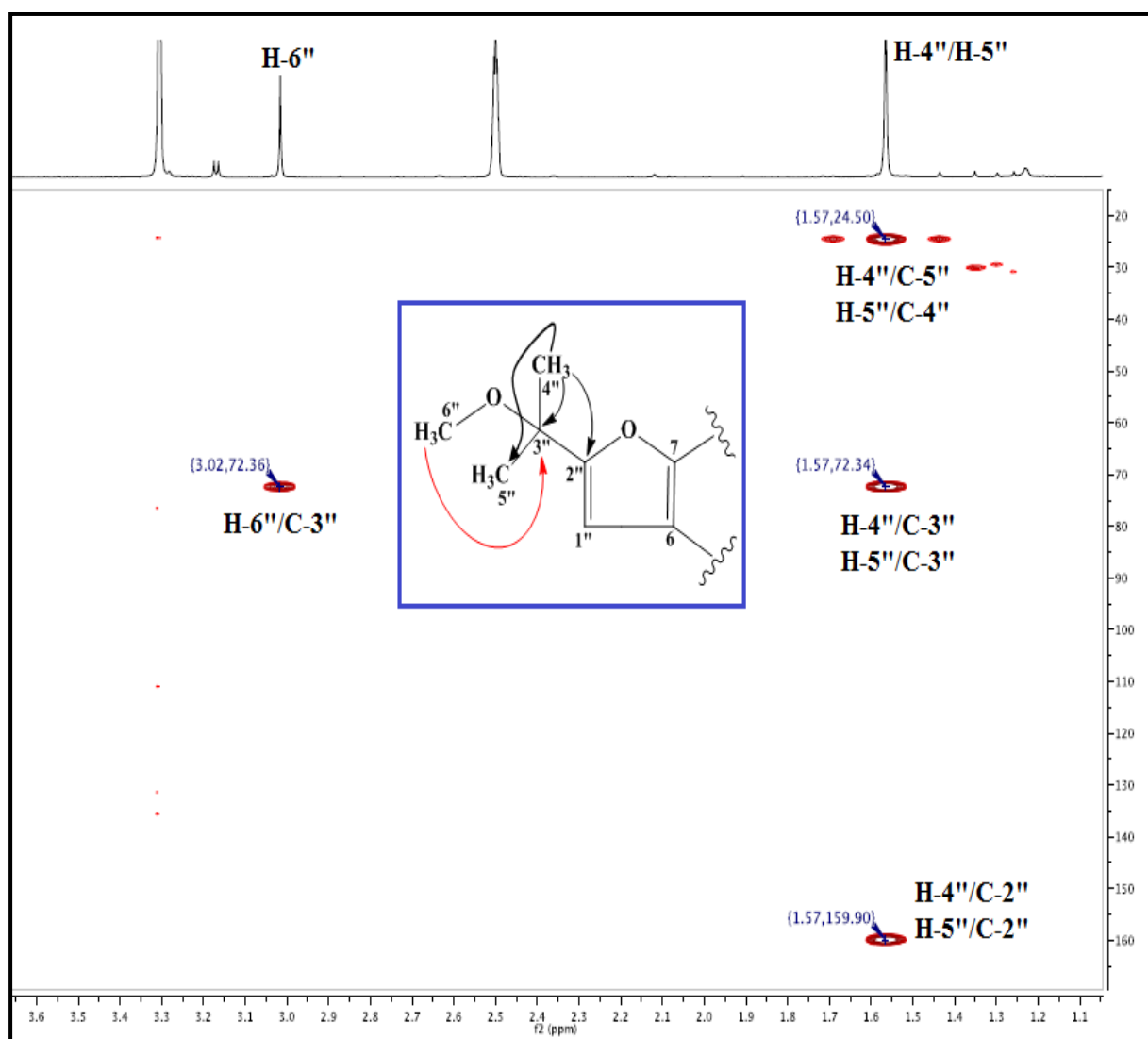


Figure III-58: Partie du spectre HMBC du composé **Ea6**

Le spectre NOESY (Figure III-59) apporte une preuve supplémentaire quant à la localisation du groupement méthoxyle en position C-3'' par les effets NOESY observés entre H<sub>3</sub>-6''/ H<sub>3</sub>-4'' et H<sub>3</sub>-5'' et H<sub>3</sub>-6''/ H-1''.

D'autres corrélations sont visualisées entre :

- H-1''/H<sub>3</sub>-4'', H<sub>3</sub>-5''.
- H-2'/H-2, H-2'/H-3' et H-3'/OH-4'.

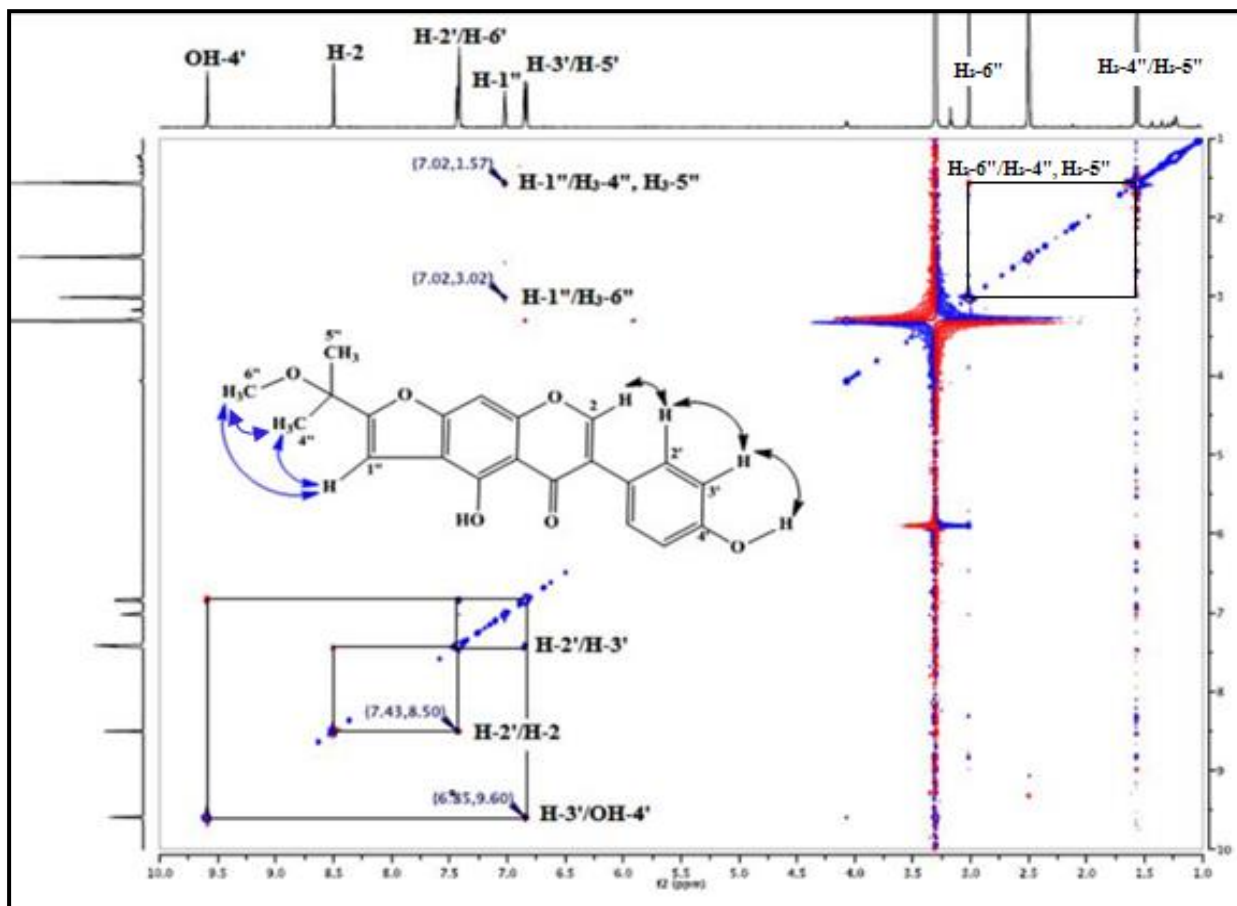
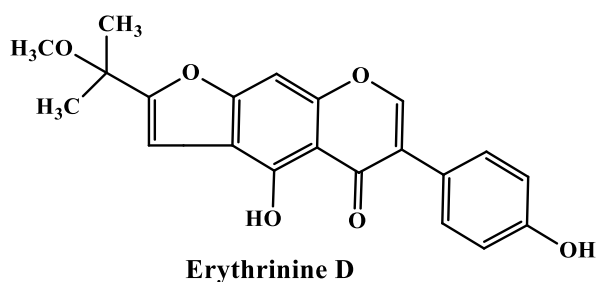


Figure III-59 : Spectre NOESY du composé Ea6

L'ensemble de ces données spectroscopiques (Tableau III-6) nous conduit à proposer sans ambiguïté pour ce composé la structure moléculaire suivante: 3''-O-méthylerysubine A ou Erythrinine D (**Ea6**).

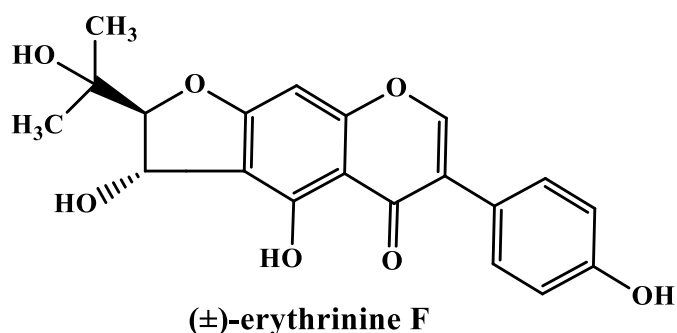


Ce composé a été isolé précédemment de l'espèce *Erythrina arborescens* [154], mais il a été identifié pour la première fois dans le genre *Erinacea*.

**Tableau III-6** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **Ea6** dans le DMSO- $d_6$ .

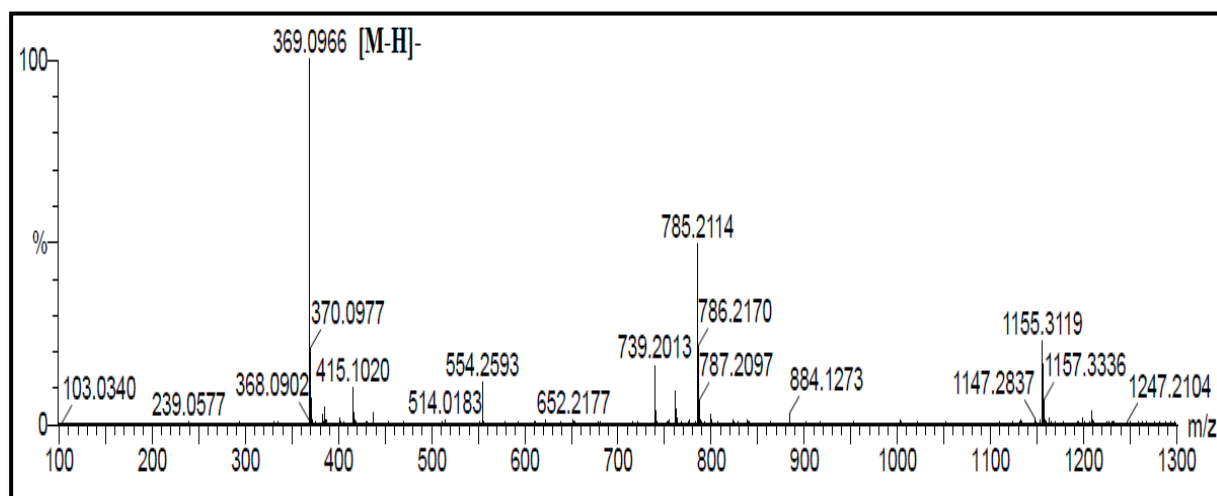
Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
2	8,50	-	<i>s</i>	154,8
3	-	-	-	121,2
4	-	-	-	181,8
5	-	-	-	154,1
6	-	-	-	105,6
7	-	-	-	157,9
8	7,42	-	<i>s</i>	90,5
9	-	-	-	153,4
10	-	-	-	112,5
1'	-	-	-	120,7
2'	7,43	8,7	<i>d</i>	129,9
3'	6,85	8,7	<i>d</i>	114,7
4'	-	-	-	157,1
5'	6,85	8,7	<i>d</i>	114,7
6'	7,43	8,7	<i>d</i>	129,9
1''	6,79	-	<i>s</i>	100,9
2''	-	-	-	159,9
3''	-	-	-	72,4
4''	1,54	-	<i>s</i>	24,5
5''	1,54	-	<i>s</i>	24,5
6''	3,02	-	<i>s</i>	50,0
OH-5	13,71	-	<i>s</i>	-
OH-4'	9,60	-	<i>s</i>	-

## III-1-3-7-Identification structurale du composé Ea7



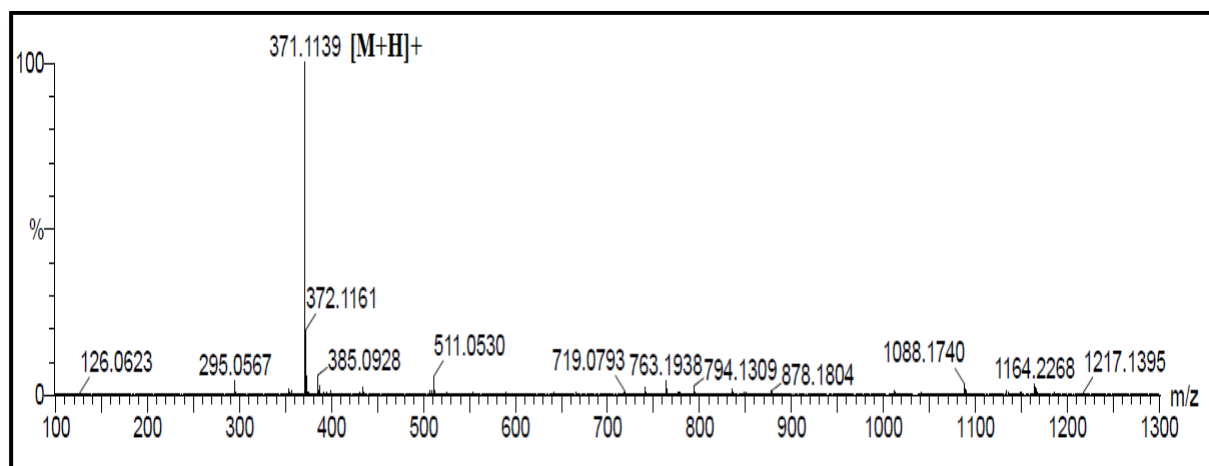
Le composé **Ea7** est obtenu sous forme d'une poudre jaune, visible sous la lumière UV à 254 nm. Il se colore en gris après révélation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. La pulvérisation de sa CCM par les vapeurs d'ammoniac NH<sub>3</sub> donne une tache jaune ce qui nous oriente vers une structure flavonoïdique pour ce composé.

Le spectre de masse à haute résolution (HR-ESI-MS) du composé **Ea7** enregistré en mode négatif révèle un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  369,0966 [M-H]<sup>-</sup> (calc. C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>O<sub>7</sub>, 369,0974) (Figure III-60).



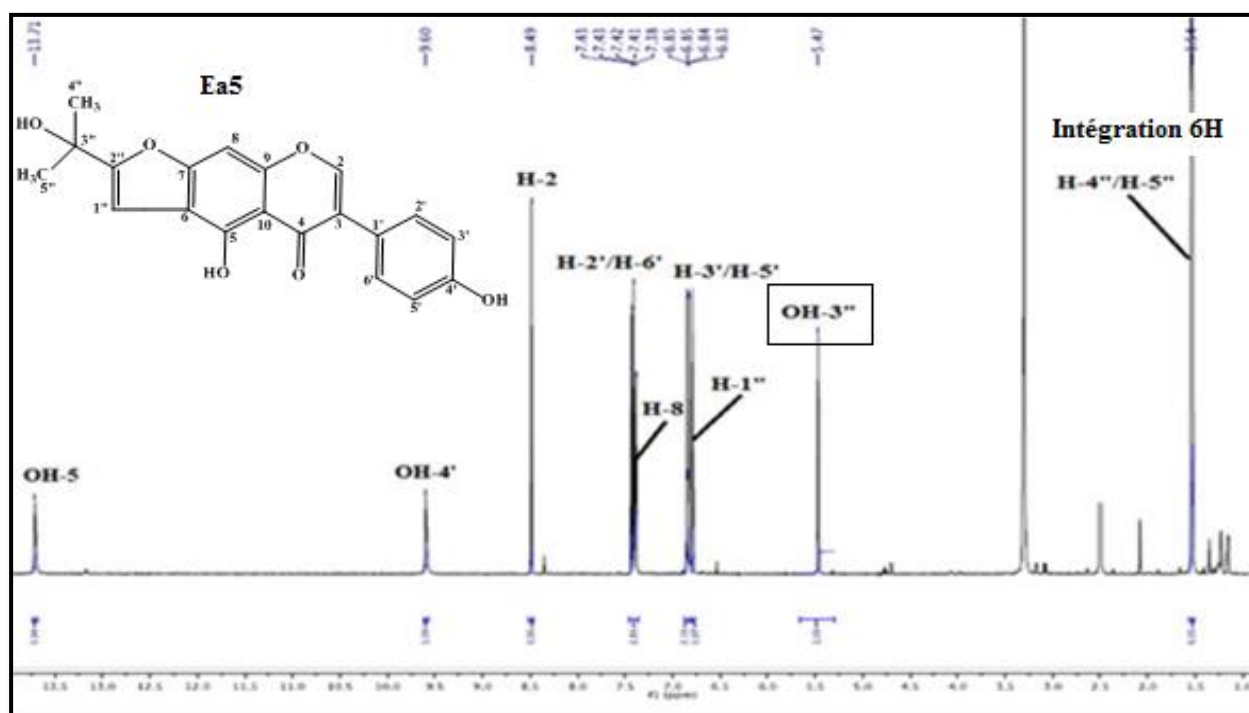
**Figure III-60** : Spectre de masse HR-ESI-MS (mode négatif) du composé **Ea7**

Son spectre de masse à haute résolution (HR-ESI-MS) enregistré en mode positif présente un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  371,1139 [M+H]<sup>+</sup> (calc. C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>O<sub>7</sub>, 371,1131) (Figure III-61). Ceci correspond à masse moléculaire de 370 uma et une formule brute en C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub> montrant ainsi 12 degrés d'insaturation, soit une différence de + 18 uma par rapport au composé déjà identifié **Ea5**.



**Figure III-61 :** Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea7**

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **Ea7** montrent une similitude structurale avec le composé **Ea5** déjà démontré au niveau des cycles A, B et C (Figure III-62 et Figure III-63). La différence entre ces deux composés est notablement remarquée dans l'apparition sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea7** de trois signaux à  $\delta_{\text{H}}$  4,29, 5,31 et 5,68 dont le signal sortant à 5,68 ppm et ne présentant aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC *J*-modulé correspond à un groupement hydroxyle. Les résonances observées à 4,29 et 5,31 ppm sont attribuées à deux protons oxyméthines selon l'expérience HSQC (Figure III-64).



**Figure III-62:** Spectres RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea5** ( $\text{DMSO-}d_6$ )

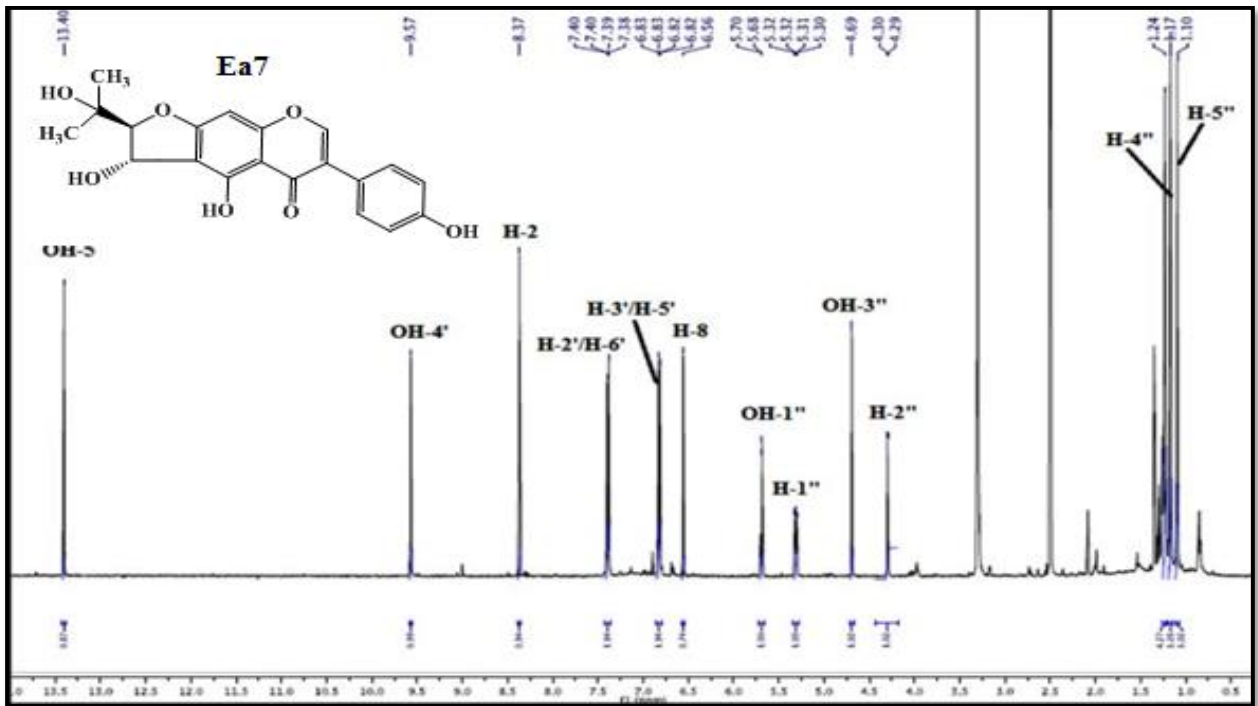


Figure III-63: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé Ea7 (DMSO- $d_6$ )

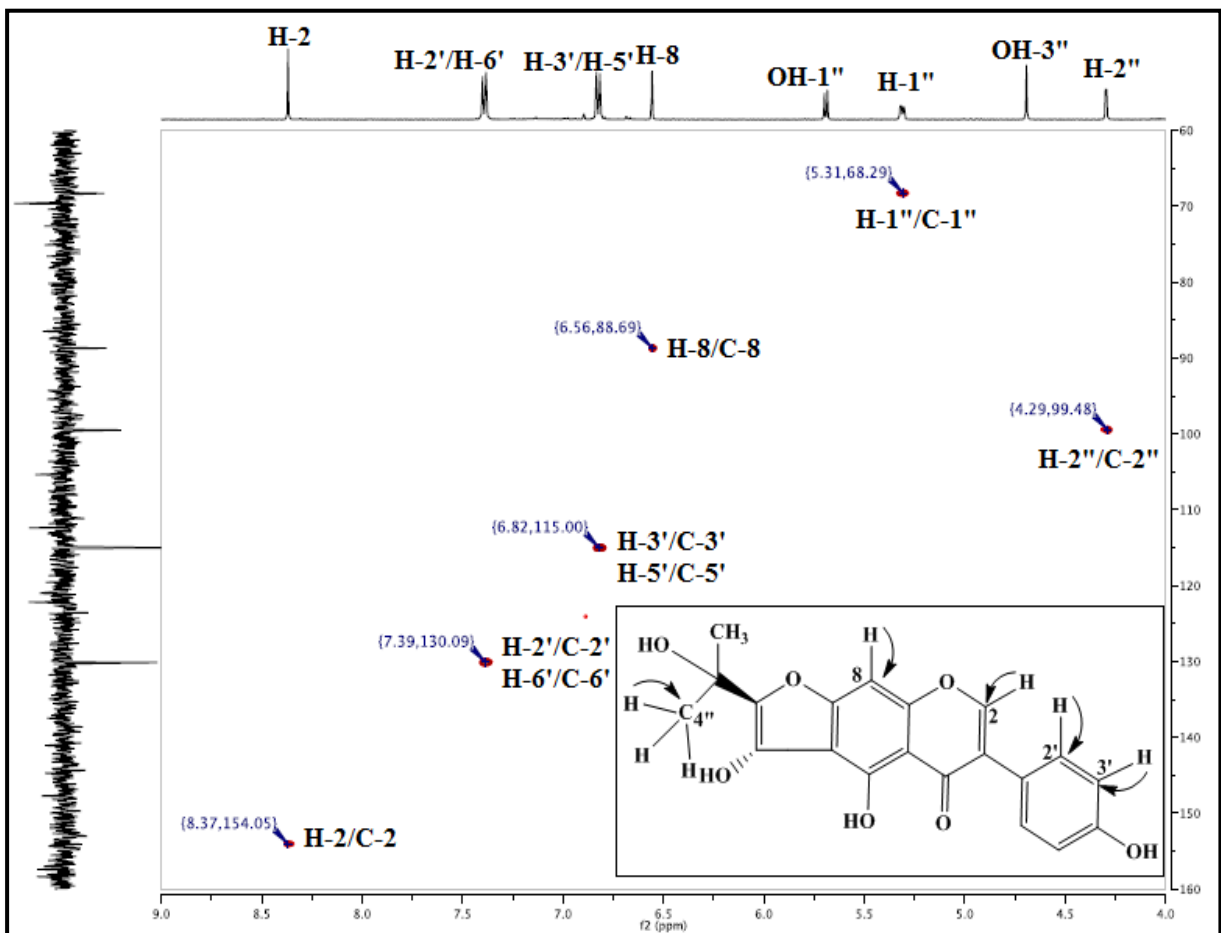


Figure III-64: Spectre HSQC  $J$ -modulé du composé Ea7

Sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé (Figure III-65) du composé **Ea7** sont visualisés 18 signaux correspondant à 20 atomes de carbone :

- Un carbonyle à 180,7 ppm (C-4).
- Six carbones aromatiques oxygénés.
- Quatre carbones aromatiques quaternaires non oxygénés résonant à 105,4, 112,4, 121,0 et 122,2 ppm.
- Cinq CH aromatiques entre 88,0 et 131,0 ppm.
- Deux groupements oxyméthines détectés à 68,3 et 99,5 ppm.
- Deux groupements méthyles à 24,9 et 25,7 ppm.

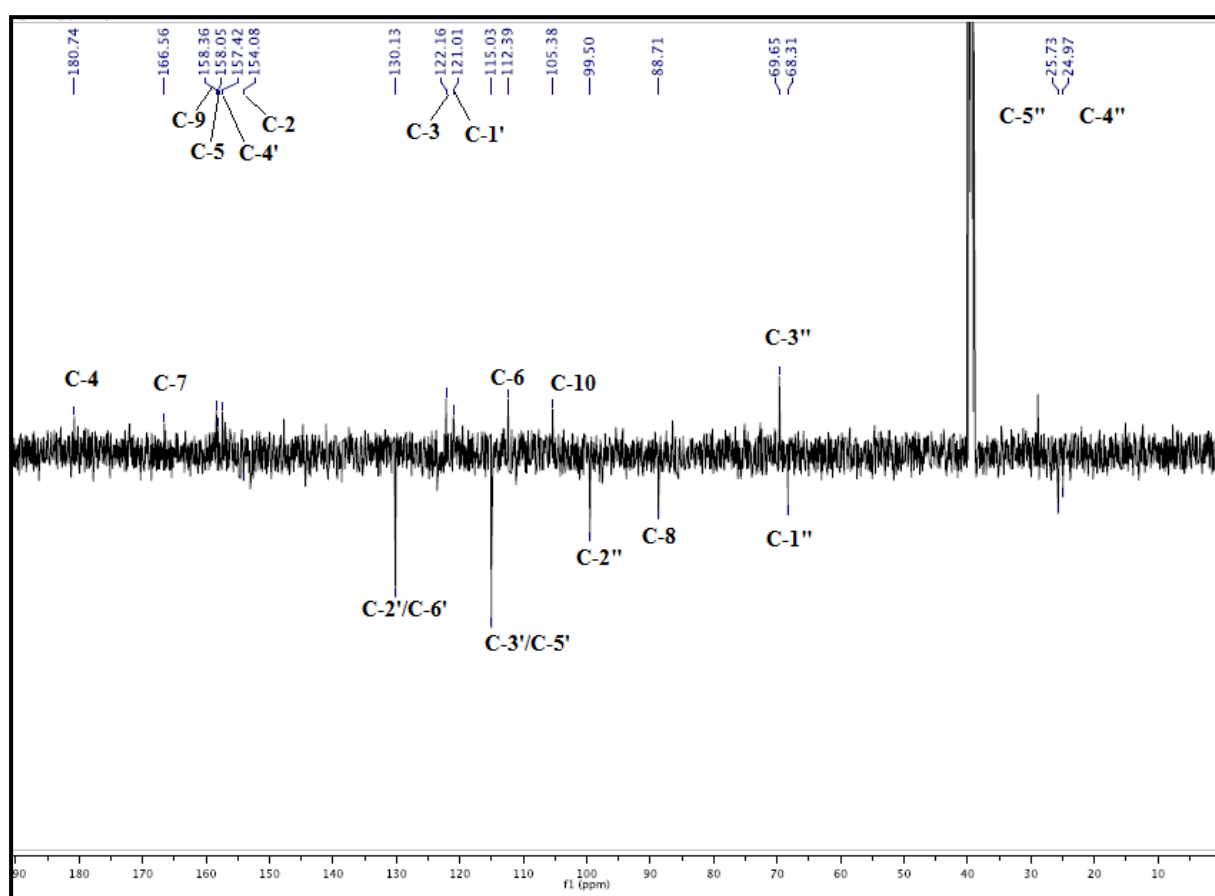


Figure III-65 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé du composé **Ea7**

Les déplacements chimiques des protons et carbones des cycles A, B et C sont déterminés suite à l'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , COSY H-H, HSQC et HMBC. En effet, le proton H-2 du groupement méthine  $\text{Sp}^2\text{CH}$  à ( $\delta_{\text{H}}$  8,37, s ;  $\delta_{\text{C}}$  154,1) caractéristique des isoflavonoïdes couple en HMBC avec les carbones C-1' ( $\delta_{\text{C}}$  121,0), C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  122,2), C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  158,4) et C-4. La présence d'un système  $\text{A}_2\text{X}_2$  au niveau du cycle B para-disubstitué est suggérée suite aux couplages observés sur le spectre COSY (Figure III-66) entre les protons

H-2'/H-6' et H-3'/H-5' à ( $\delta_H$  7,39, *d*,  $J = 8,6$  Hz) et ( $\delta_H$  6,82, *d*,  $J = 8,6$  Hz) respectivement. Leurs carbones sont assignés à  $\delta_C$  130,1 et 115,0 respectivement selon l'expérience HSQC.

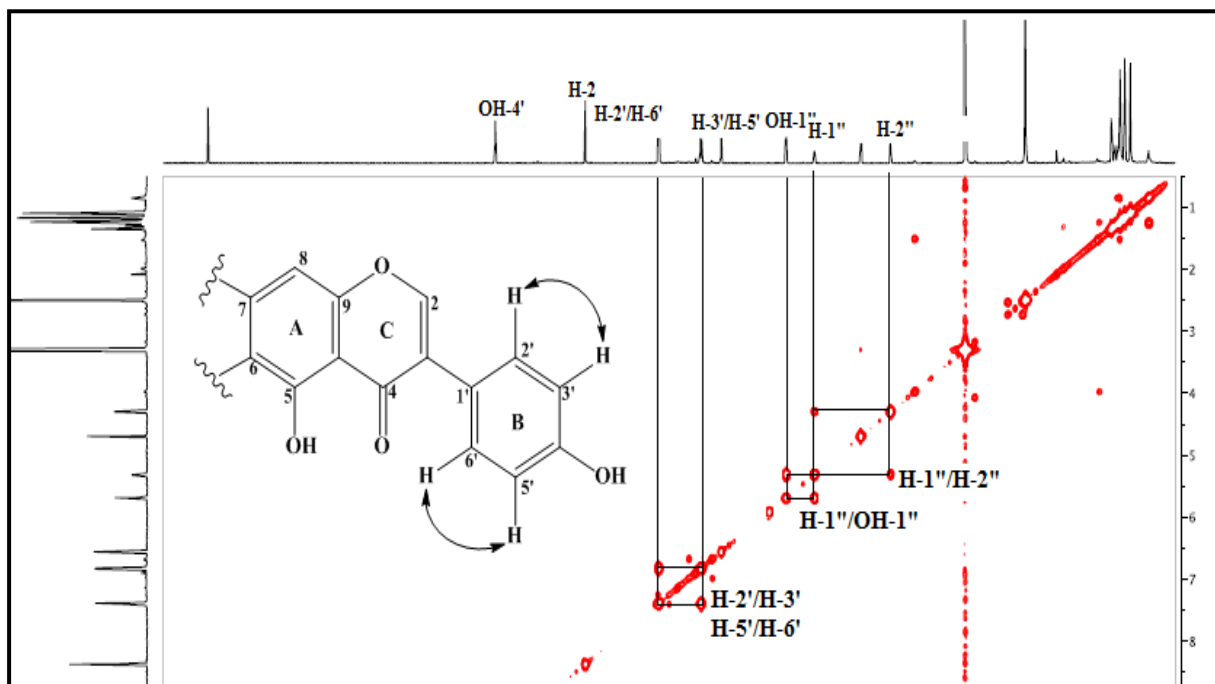


Figure III-66 : Spectre COSY H-H du composé Ea7

L'identification des protons et carbones du cycle A est basée principalement sur le proton de l'hydroxyle en position C-5 à  $\delta_H$  13,4 qui montre des couplages sur le spectre HMBC avec les carbones quaternaires C-5 ( $\delta_C$  158,0), C-6 ( $\delta_C$  112,5) et C-10 ( $\delta_C$  105,4). Le signal détecté à  $\delta_H$  6,56 sous forme de singulet corrélant en HMBC avec les carbones C-9 déjà identifié et un carbone quaternaire oxygéné résonant à 166,6 (C-7), est attribué au proton aromatique H-8. Son carbone C-8 est repéré à 88,7 ppm selon l'expérience HSQC, indiquant une position *ortho*-dioxgénée (Figure III-67).

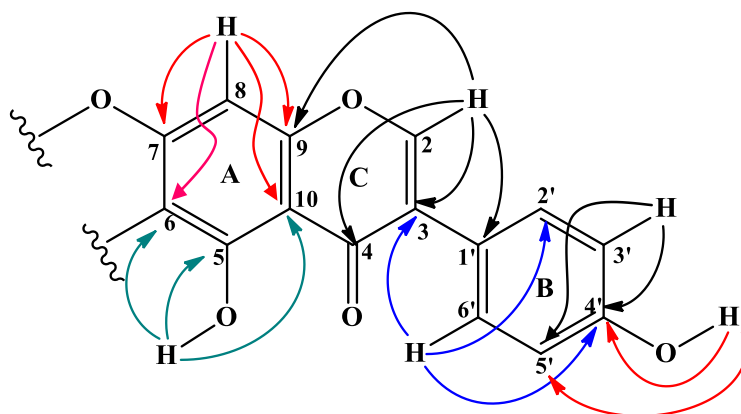
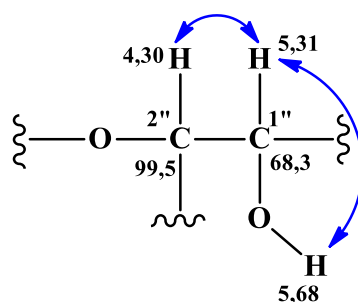


Figure III-67 : Corrélations HMBC des cycles A, B et C



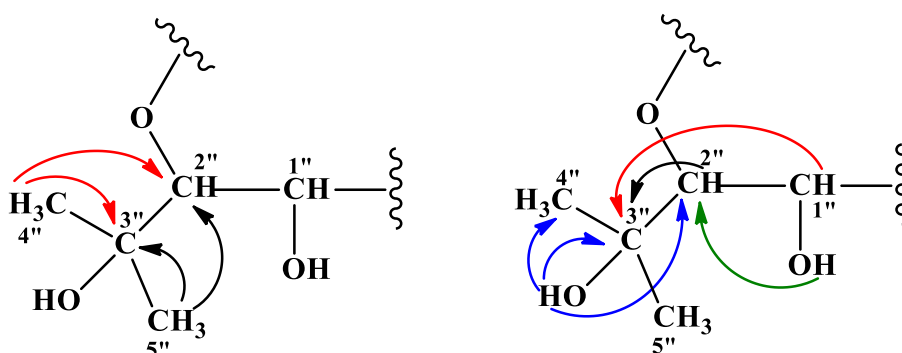
Le spectre COSY H-H (Figures III-66 et III-68) du composé **Ea7** présente un système de spins à trois protons relatif à une chaîne prénylée qui visualise les couplages entre le proton hydroxyle à  $\delta_H$  5,68 (OH-1'') et un proton oxyméthine H-1'' à  $\delta_H$  5,31 (*dd*,  $J = 7,2 ; 3,2$  Hz), ce dernier couple avec un autre proton oxyméthine H-2'' à  $\delta_H$  4,30 (*d*,  $J = 3,2$  Hz). Leurs carbones sont assignés par l'expérience HSQC à  $\delta_C$  68,3 (C-1'') et 99,5 (C-2''). Cette analyse nous permet de proposer l'enchaînement suivant :



**Figure III-68** : Corrélations COSY H-H de la chaîne prénylée

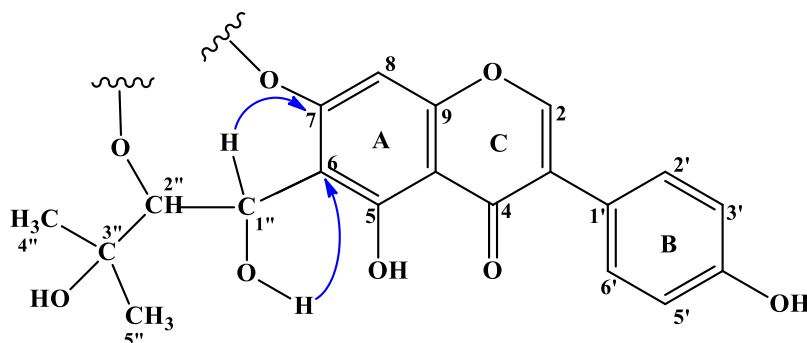
Le carbone oxyméthine C-2'' (99,5 ppm) présente des corrélations HMBC en  $^3J$  avec le proton du groupement hydroxyle (OH-1'') déjà identifié, le proton hydroxyle (OH-3'') résonant à 4,69 ppm et des protons de deux groupements méthyliques repérés à  $\delta_H$  1,09 et 1,17 ppm. L'analyse HSQC permet de caractériser leurs carbones à  $\delta_C$  24,9 et 25,7 respectivement. Les protons méthyliques ainsi que le proton du groupement hydroxylique OH-3'' corrélerent également sur le spectre HMBC avec un carbone quaternaire résonant à  $\delta_C$  69,6 correspondant au carbone C-3''. Ce dernier couple en HMBC avec les protons H-1'' et H-2'' déjà attribués.

Toute cette analyse conduit à proposer l'enchaînement prényle suivant (Figure III-69):

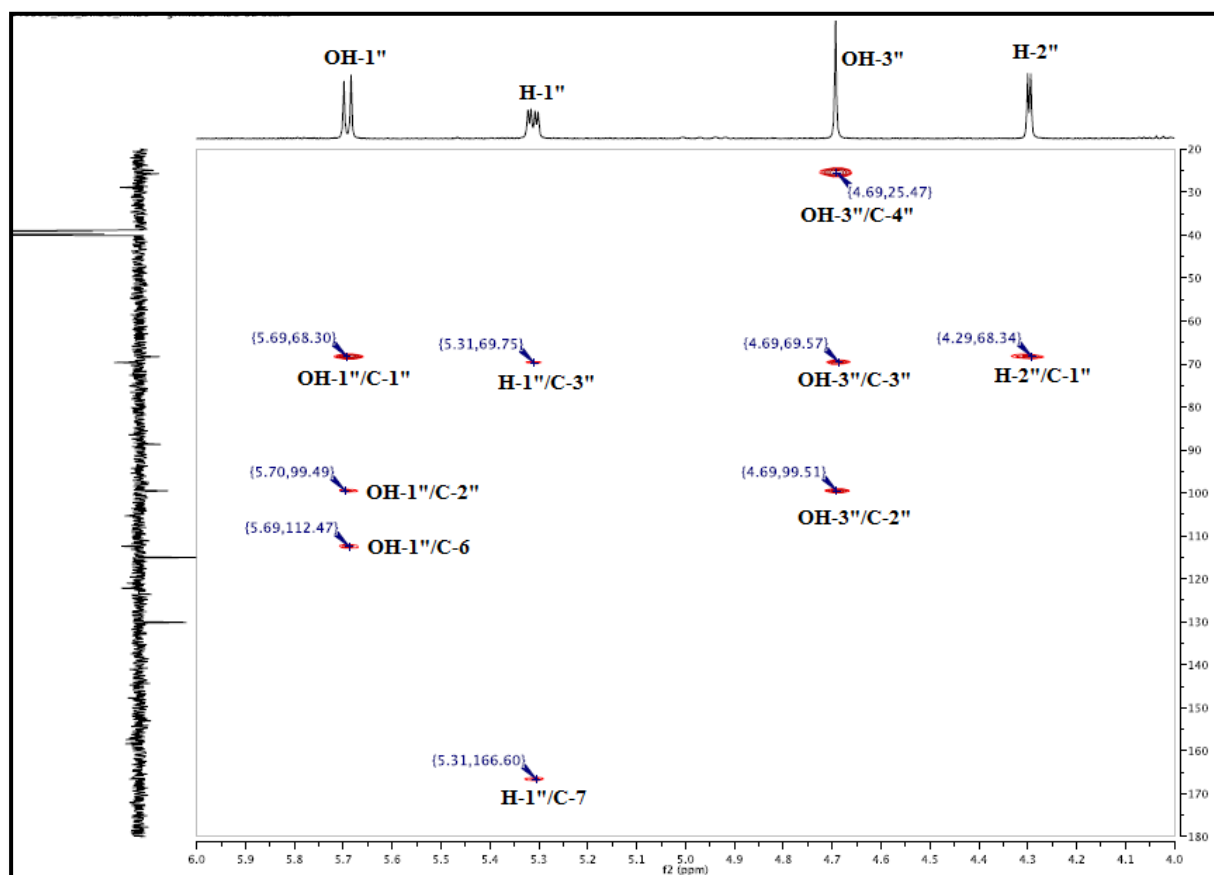


**Figure III-69** : Corrélations HMBC au niveau du groupement prényle

Le spectre HMBC (Figures III-70 et III-71) montrant une corrélation en  $^3J$  entre le proton hydroxyle (OH-1'') du groupement prényle et le carbone C-6 du cycle A de l'isoflavonoïde, permet de lier ce groupement au carbone C-6. En plus, le proton H-1'' corrèle en  $^3J$  sur le spectre HMBC avec le carbone C-7.



**Figure III-70:** Corrélations HMBC mettant en évidence l'attachement du groupement prényle à l'aglycone en C-6



**Figure III-71:** Partie du spectre HMBC du composé Ea7

En tenant compte de la masse moléculaire de ce composé ( $M = 370$  uma), le déplacement chimique déblindé du carbone C-2'' (99,5 ppm) et de la multiplicité du proton

H-2'' (*d*,  $J = 3,2$  Hz), le cycle supplémentaire se forme entre les carbones C-2'' et C-7 par l'intermédiaire d'un atome d'oxygène conduisant ainsi à la formation d'un hétérocycle à cinq chaînons (Figure III-72).

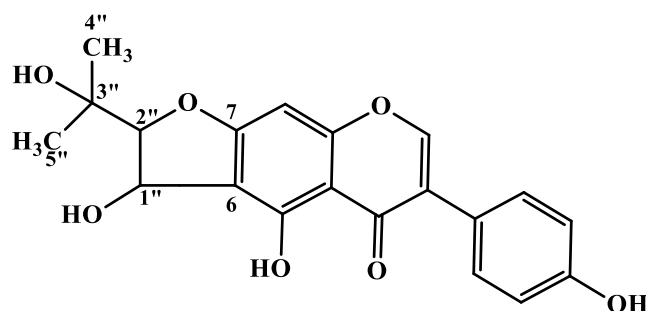


Figure III-72 : Structure plane du composé Ea7

La valeur de la constante de couplage entre les protons H-1'' et H-2'' ( $J = 3,2$  Hz) indique qu'ils sont en position *trans* [154], ce qui permet de proposer les deux structures énantiomériques suivantes (Figure III-73).

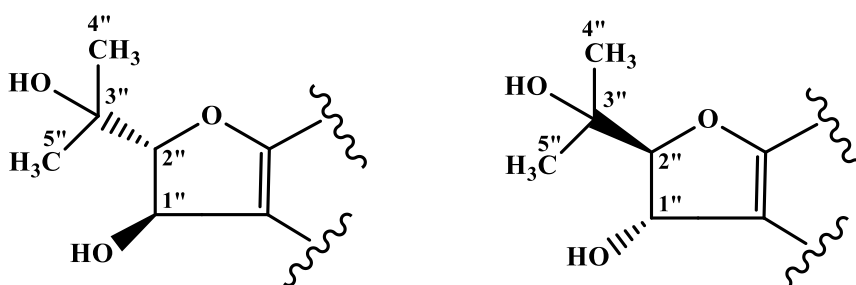


Figure III-73 : Structures énantiomériques

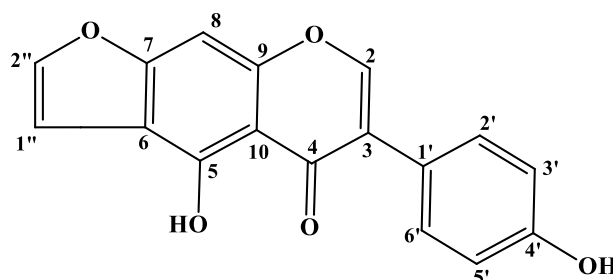
Toutes ces données spectrales (Tableau III-7) ainsi que la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20} = 0$  indiquent qu'il s'agit d'un isoflavonoïde prénylé connu sous le nom ( $\pm$ )-Erythrine F, isolé antérieurement de l'espèce *Erythrina arborescens* [154]. Il est rencontré pour la première fois dans le genre *Erinacea*.

**Tableau III-7** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé Ea7 dans le DMSO- $d_6$ .

Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
2	8,37	-	<i>s</i>	154,1
3	-	-	-	122,2
4	-	-	-	180,7

5	-	-	-	158,1
6	-	-	-	112,4
7	-	-	-	166,5
8	6,56	-	<i>s</i>	88,7
9	-	-	-	158,4
10	-	-	-	105,4
1'	-	8,6	-	121,0
2'	7,39	8,6	<i>d</i>	130,1
3'	6,83	-	<i>d</i>	115,0
4'	-	8,6	-	157,4
5'	6,83	8,6	<i>d</i>	115,0
6'	7,39	8,6	<i>d</i>	130,1
1''	5,31	(7,2 ; 3,2)	<i>dd</i>	68,3
2''	4,29	3,2	<i>d</i>	99,5
3''	-	-	-	69,6
4''	1,09	-	-	24,9
5''	1,17	-	<i>s</i>	25,7
OH-5	13,40	-	<i>s</i>	-
OH-4'	9,57	-	<i>s</i>	-
OH-1''	5,68	7,3	<i>d</i>	-
OH-3''	4,69	-	<i>s</i>	-

### III-1-3-8-Identification structurale du composé Ea8



**Ammoptanine B**

Le composé **Ea8** est purifié sous forme d'une poudre jaune soluble dans l'acétone. Il est visible sous la lumière UV à 254 nm et se révèle en jaune après pulvérisation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. Il s'agit d'un isoflavonoïde connu sous le nom Ammoptanine B.

Le spectre de masse à haute résolution (HR-ESI-MS) du composé **Ea8** enregistré en mode positif indique la présence d'un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  295,0586  $[M+H]^+$  (calc.  $C_{17}H_{11}O_5$ , 295,0606) (Figure III-74), correspondant à une masse moléculaire égale à 294 uma et une formule brute en  $C_{17}H_{10}O_5$ , reflétant une différence de masse de - 58 uma par rapport au composé précédent **Ea5**.

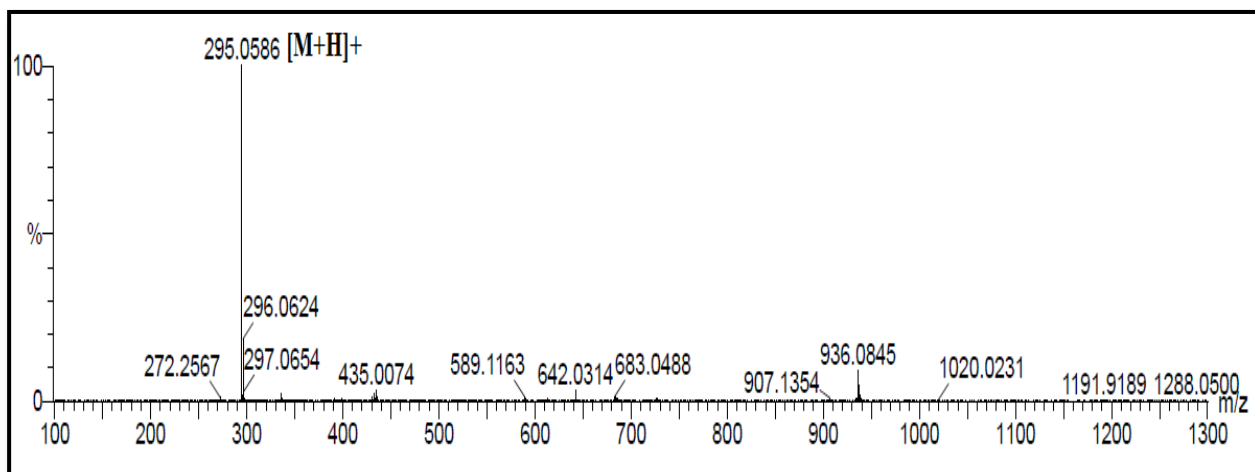


Figure III-74 : Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea8**

Le spectre RMN  $^1H$  du composé **Ea8** (Figure III-75) est presque identique à celui du composé **Ea5** déjà caractérisé (Figure III-76), au niveau des cycles A, B et C et même dans le cycle furanique.

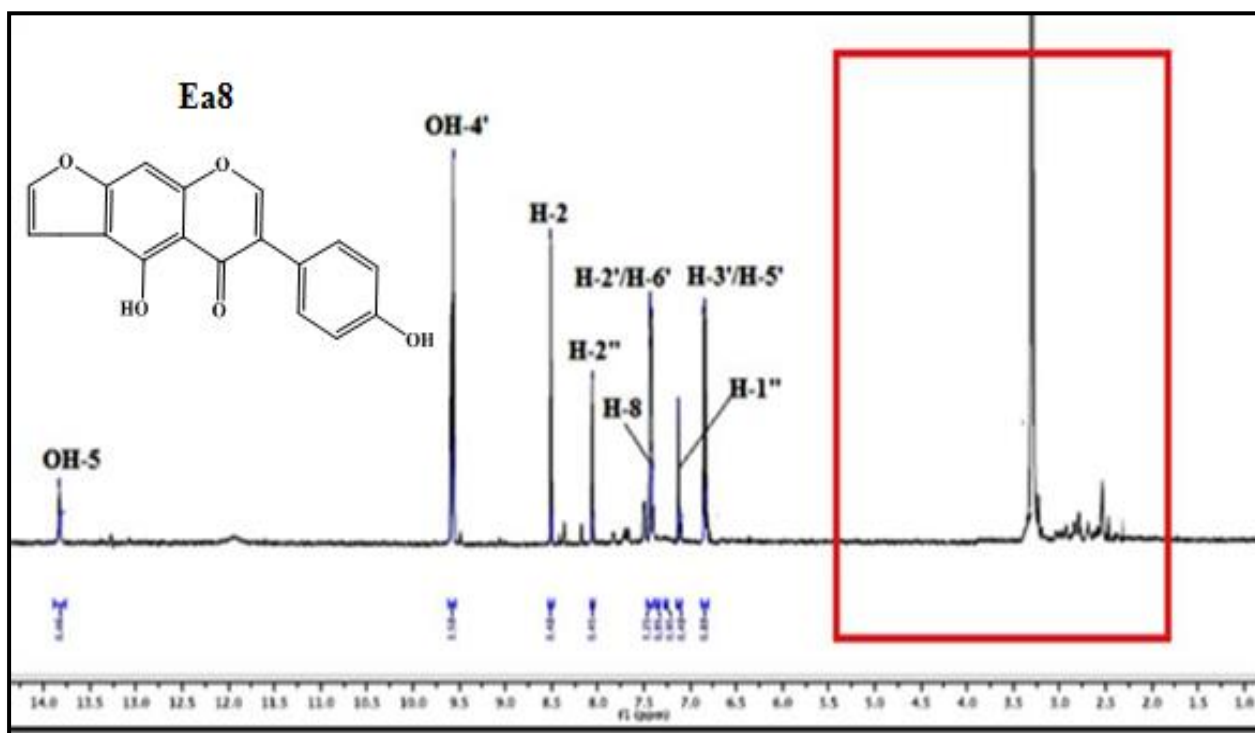


Figure III-75 : Spectre RMN  $^1H$  du composé **Ea8**

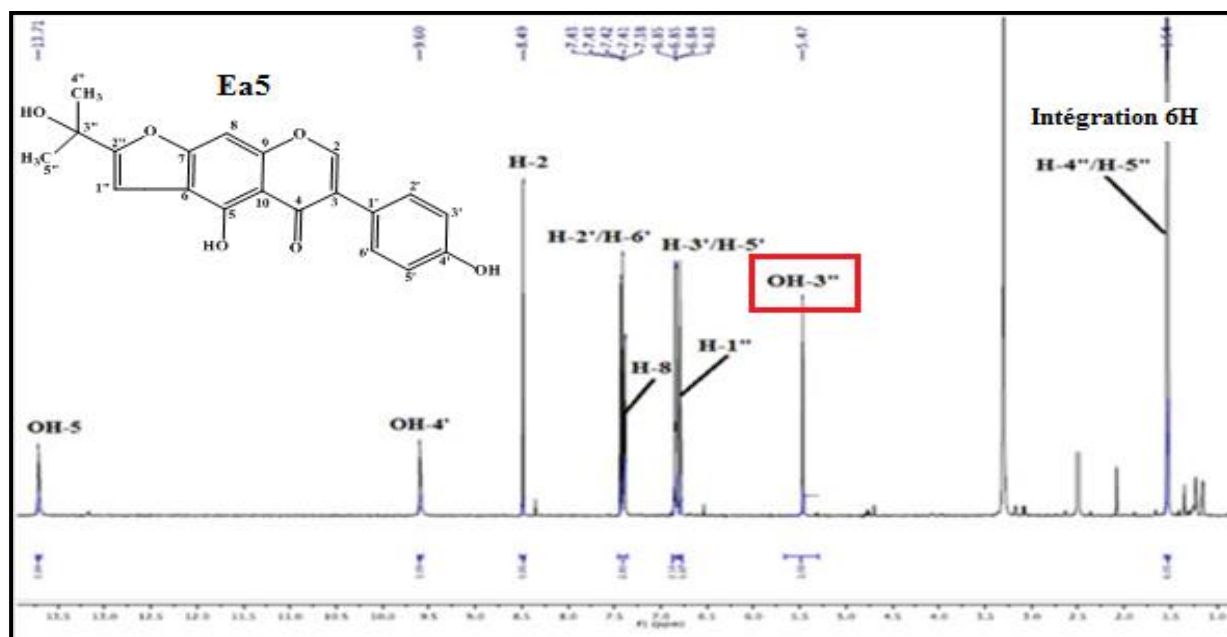


Figure III-76 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea5**

La différence entre ces deux composés réside dans la disparition des signaux des deux groupements méthyles géminés et le signal du proton du groupement hydroxyle OH-3'' observés pour le composé **Ea8**.

L'expérience homonucléaire COSY (Figures III-77) montre des taches de corrélation qui permettent d'assigner les déplacements chimiques des protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' caractéristiques du cycle B para-disubstitué à  $\delta_{\text{H}}$  7,43, ( $d$ ,  $J = 8,5$  Hz) et 6,84, ( $d$ ,  $J = 8,5$  Hz) respectivement. Leurs carbones sont détectés par l'analyse du spectre HSQC  $J$ -modulé à  $\delta_{\text{C}}$  129,9 (C-2', C-6'), 114,7 (C-3', C-5'),

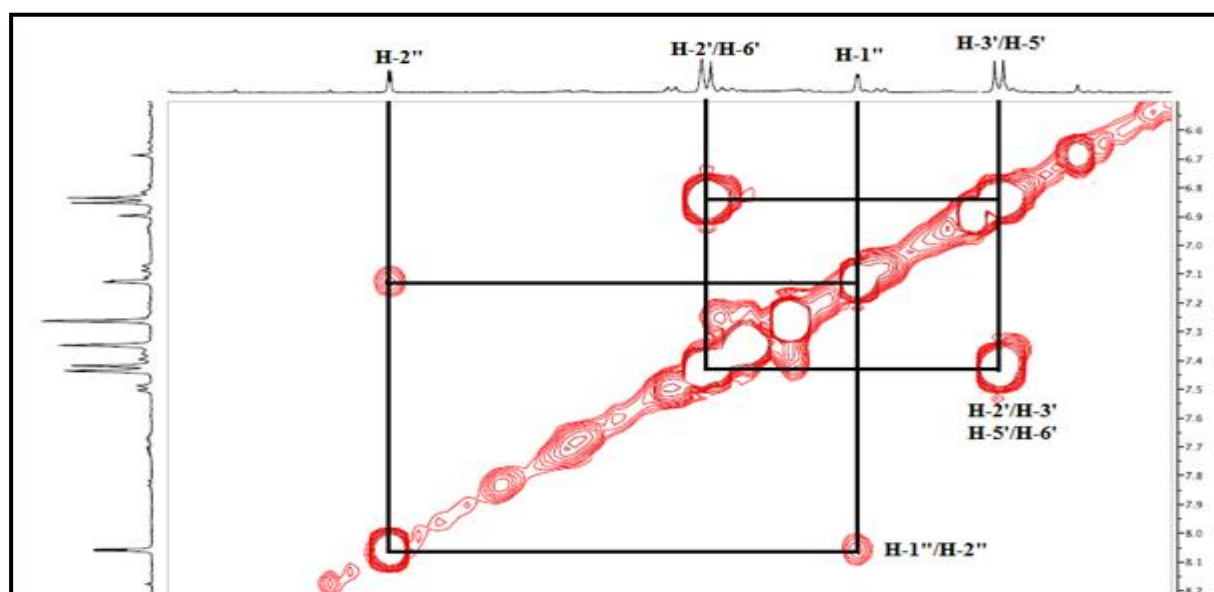
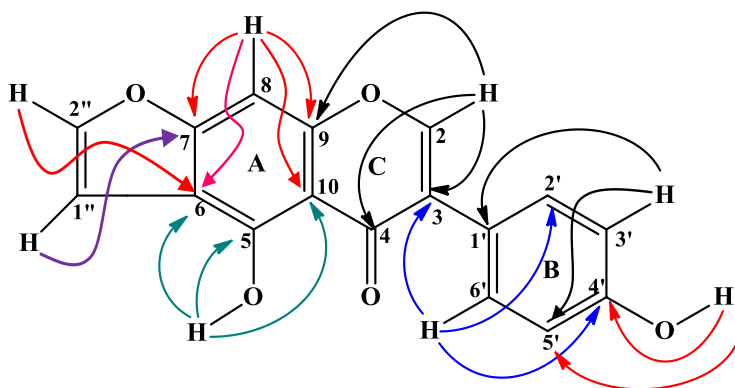


Figure III-77: Spectre COSY H-H du composé **Ea8**

Aussi, l'expérience COSY H-H montre des corrélations entre les deux protons éthyléniques H-1'' à  $\delta_H$  7,13, (*dd*,  $J = 2,2 ; 1,0$  Hz) et H-2'' à  $\delta_H$  8,06 (*d*,  $J = 2,2$  Hz). Leurs carbones sont assignés par l'expérience HSQC *J*-modulé à  $\delta_C$  103,7 (C-1'') et 146,1 (C-2'').

Le proton H-2 caractéristique des isoflavones à ( $\delta_H$  8,51/  $\delta_C$  155,0) montre des corrélations sur le spectre HMBC avec les carbones C-4 ( $\delta_C$  181,8), C-9 ( $\delta_C$  153,4) et C-3 ( $\delta_C$  121,2). En plus, la localisation du proton H-8 à ( $\delta_H$  7,45 /  $\delta_C$  90,54) permet d'assigner le carbone C-7 à  $\delta_C$  157,2 et les protons H-3'/H-5' à 6,84 ppm caractérisent le déplacement chimique du carbone C-1' à  $\delta_C$  120,6 selon l'expérience HMBC (Figure III-78).

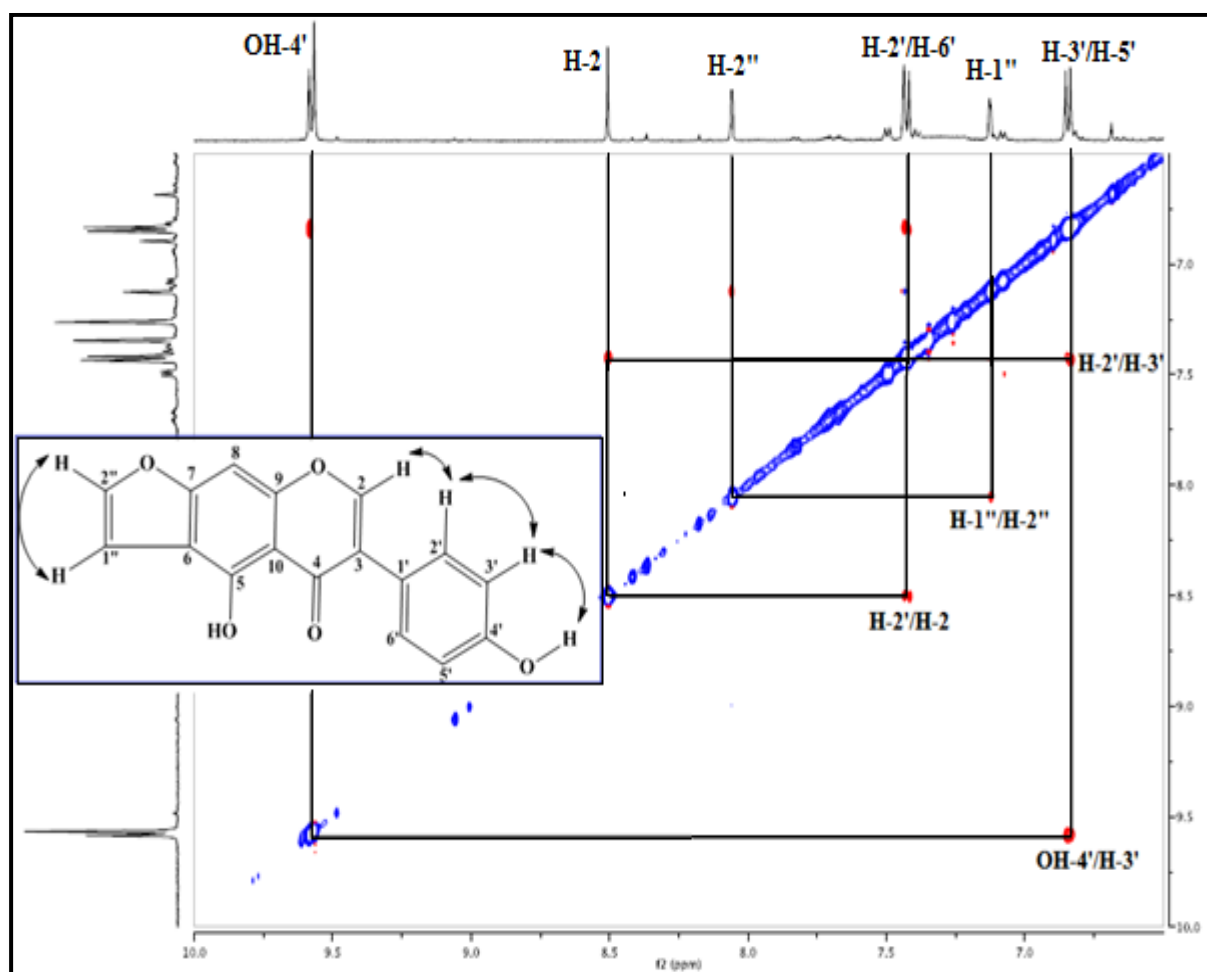
Par ailleurs, la détermination du proton du groupement hydroxyle en position C-5 à  $\delta_H$  13,83 permet d'identifier les carbones C-10 ( $\delta_C$  105,6), C-5 ( $\delta_C$  154,5) et C-6 ( $\delta_C$  112,1) par expérience HMBC. La corrélation observée en HMBC entre le proton de l'hydroxyle à 9,57 ppm et les carbones C-3' et C-5' conduit à situer le groupement hydroxyle en position C-4' ( $\delta_C$  140,7). D'autres couplages HMBC sont visualisés entre le proton éthylénique H-1'' et le carbone C-7 et entre le proton H-2'' et le carbone C-6 (Figure III-78).



**Figure III-78** : Corrélations HMBC du composé **Ea8**

Le spectre NOESY (Figure III-79) de ce composé montre des effets NOE entre les protons proches dans l'espace incluant:

- H-2', H-6' /H-3', H-5'.
- H-2/H-2', H-6'.
- H-3', H-5' /OH-4'.
- H-1''/H-2''.



**Figure III-79:** Spectre NOESY du composé **Ea8**

L'ensemble de ces données spectrales (Tableau III-8) nous permet d'identifier sans ambiguïté le composé **Ea8** comme étant Ammopiptanine B, isolé de l'espèce *Ammopiptanthus mongolicus* <sup>[155]</sup>. Il est à noter que ce composé est rencontré pour la première fois dans le genre *Erinacea*.

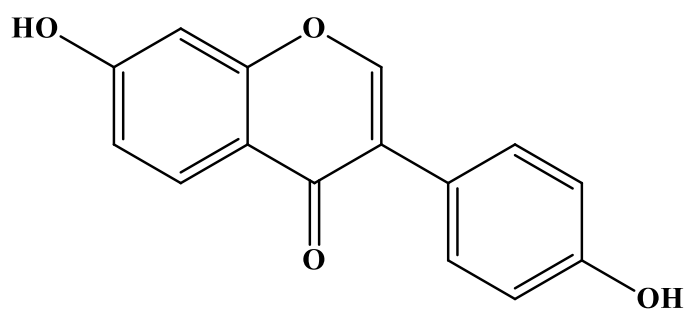
**Tableau III-8 :** Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) du composé **Ea8** dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Position	$\delta_H$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_C$
2	8,51	-	<i>s</i>	155,0
3	-	-	-	121,2
4	-	-	-	181,8
5	-	-	-	154,5
6	-	-	-	112,2
7	-	-	-	157,2



8	7,45	-	<i>s</i>	90,5
9	-	-	-	153,4
10	-	-	-	105,6
1'	-	-	-	120,6
2'	7,43	8,5	<i>d</i>	129,9
3'	6,84	8,5	<i>d</i>	114,7
4'	-	-	-	140,7
5'	6,84	8,5	<i>d</i>	114,7
6'	7,43	8,5	<i>d</i>	129,9
1''	7,13	2,2 ; 1,0	<i>dd</i>	103,7
2''	8,06	2,2	<i>d</i>	146,1
OH-5	13,83	-	<i>s</i>	-
OH-4'	9,57	-	<i>s</i>	-

### III-1-3-9-Identification structurale du composé Ea9



**Daidzeine**

Le composé **Ea9** connu sous le nom Daidzeine se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans l'acétone. Ce composé est visible sous la lumière UV (254 nm) et se révèle en jaune après pulvérisation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Les spectres de masse à haute résolution HR-ESI-MS de ce composé enregistrés en modes négatif (Figure III-80) et positif (Figure III-81), présentent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 253,0491$   $[M-H]^-$  (calc.  $C_{15}H_9O_4$ , 253,0501) et  $255,0636$   $[M+H]^+$  (calc.  $C_{15}H_{11}O_4$ , 255,0657) ; soit une masse moléculaire égale à 254 uma correspondant à une formule brute en  $C_{15}H_{10}O_4$  indiquant 11 degrés d'insaturation.

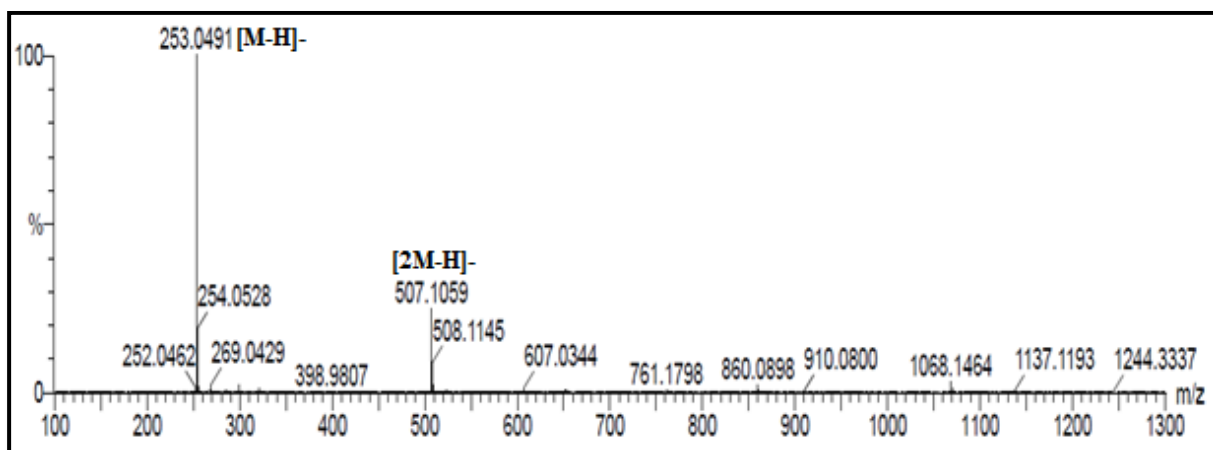


Figure III-80: Spectre de masse HR-ESI-MS (mode négatif) du composé **Ea9**

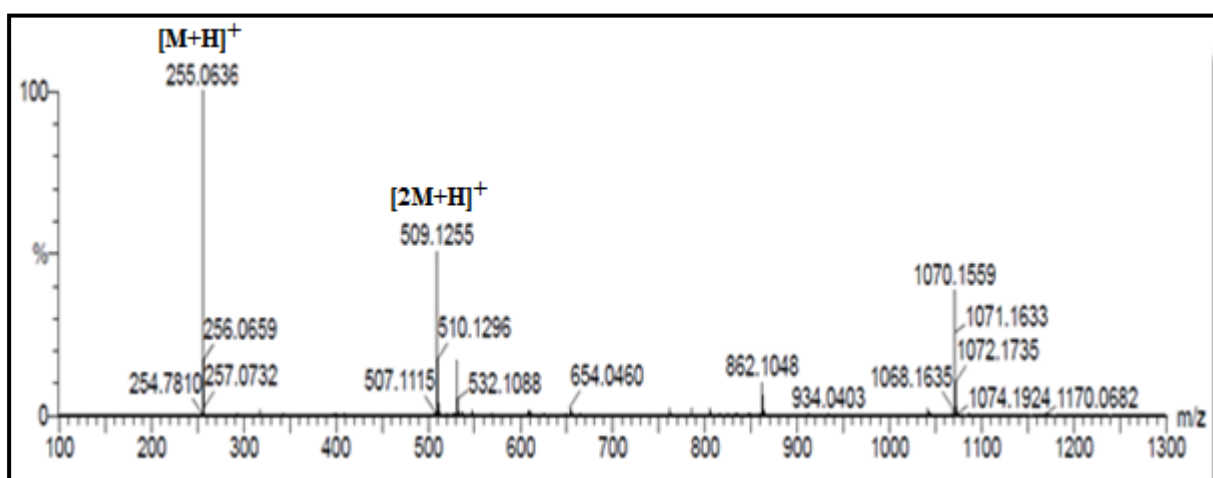


Figure III-81: Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea9**

L'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-82), HSQC  $J$ -modulé (Figure III-83) et COSY (Figure III-84) du composé **Ea9** indique la présence de:

Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}}$  8,26 caractéristique du proton H-2 d'une isoflavone. Son carbone résonne à  $\delta_{\text{C}}$  152,4 selon l'expérience HSQC [137].

Quatre protons aromatiques d'un système  $\text{A}_2\text{X}_2$  à  $\delta_{\text{H}}$  6,80 et 7,38 avec une constante de couplage  $J = 8,6$  Hz traduisant un couplage de type *ortho*, attribuables aux protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6' respectivement du cycle B para-disubstitué d'une isoflavone [138], leurs carbones sont assignés par l'expérience HSQC à  $\delta_{\text{C}}$  114,56 et 129,68 respectivement. La présence du système  $\text{A}_2\text{X}_2$  indiquant ainsi une substitution du cycle B en position C-4'. Ceci a été confirmé par le spectre HMBC qui montre des corrélations entre les protons H-3'/H-5' et H-2'/H-6' et un carbone oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  156,81 ne pouvant être que le carbone C-4'.

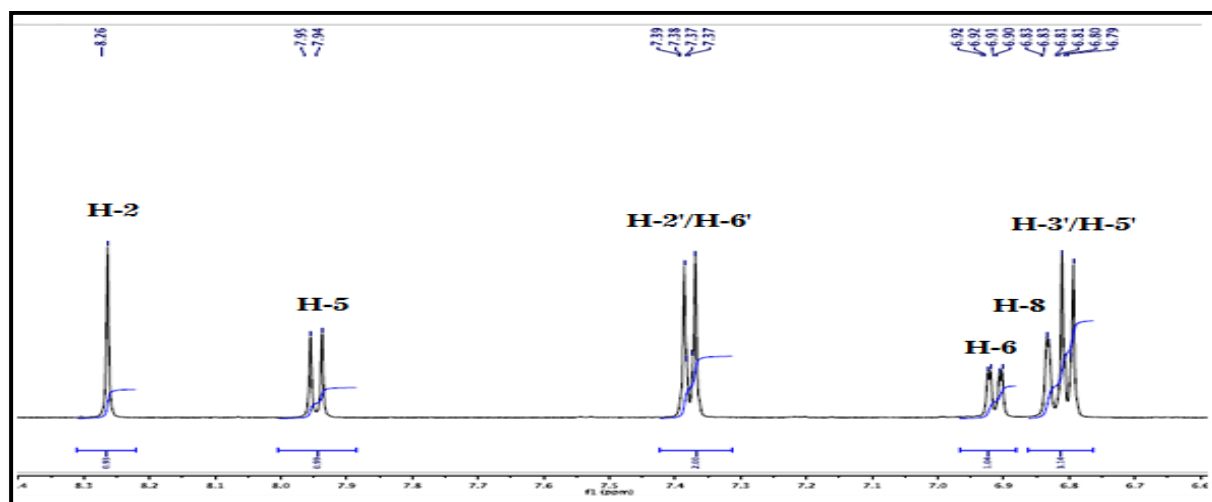


Figure III-82: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea9** ( $\text{DMSO-}d_6$ )

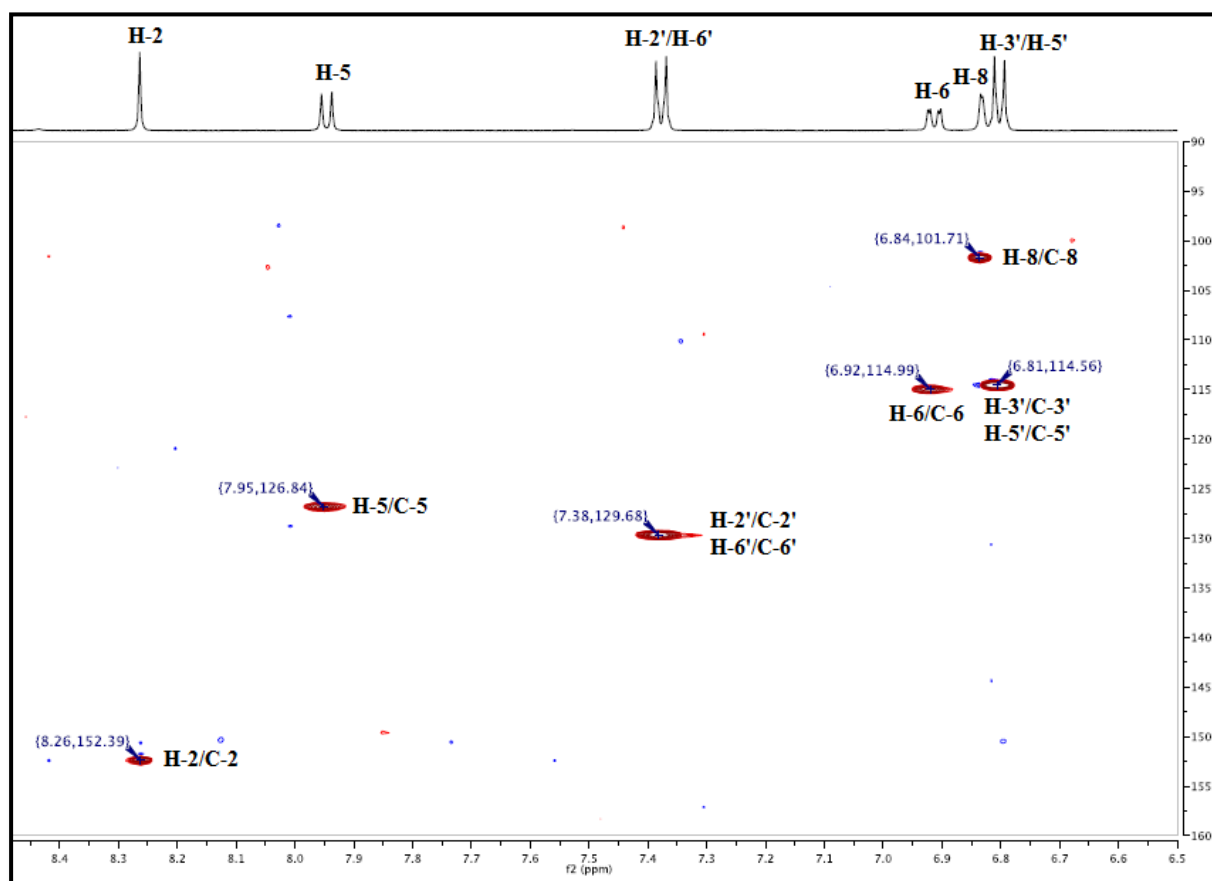
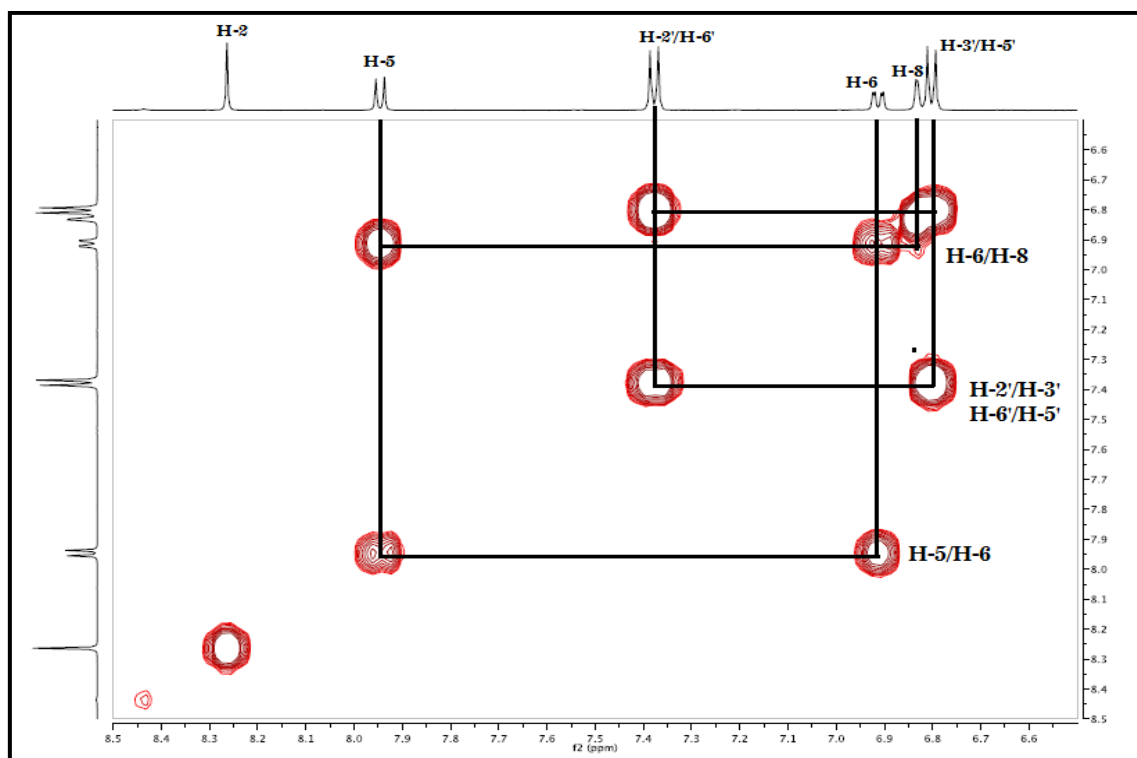


Figure III-83: Spectre HSQC du composé **Ea9**

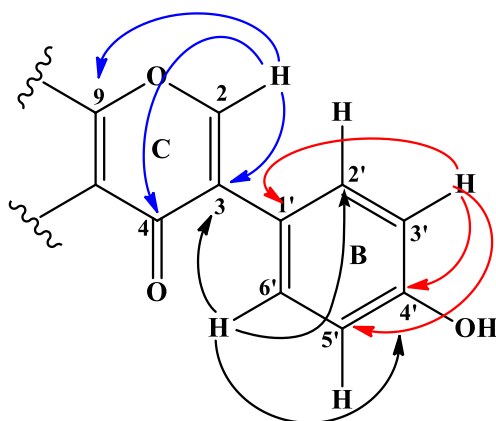
Trois protons aromatiques appartenant à un même système de spins de type ABX à  $\delta_{\text{H}}$  6,83 (*d*,  $J = 2,2$  Hz, H-8), 6,91 (*dd*,  $J = 8,7$  et  $2,2$  Hz, H-6) et 7,95 (*d*,  $J = 8,7$  Hz, H-5). Leurs carbones sont détectés sur le spectre HSQC *J*-modulé à  $\delta_{\text{C}}$  101,7, 115,0 et 126,8 respectivement.



**Figure III-84:** Spectre COSY du composé **Ea9**

L'élucidation structurale du composé **Ea9** repose principalement sur l'analyse de corrélations observées sur le spectre HMBC. En effet le proton H-2 (8,26 ppm, *s*) montre des corrélations avec trois carbones quaternaires résonant à  $\delta_C$  174,4 (C-4), 157,2 et 123,1. Le déplacement chimique à 157,2 ppm est attribué facilement au carbone aromatique oxygéné C-9, tandis que le deuxième correspond au carbone C-3. Ce dernier présente une tache de corrélation en HMBC (Figure III-85) avec les deux protons H-2' et H-6' du cycle B. D'autres couplages sont observés entre les protons H-3'/H-5' et un carbone quaternaire à  $\delta_C$  122,30 attribuable au carbone C-1'.

A ce niveau d'analyse tous les protons et carbones des cycles B et C sont assignés.



**Figure III-85:** Corrélations HMBC au niveau des cycles B et C

Sur le spectre HMBC (Figure III-86) de ce composé, il est observé des corrélations entre un proton aromatique résonnant à 7,95 ppm (*d*,  $J = 8,7$  Hz) et les carbones C-4, C-9 déjà attribués et un autre carbone quaternaire oxygéné à 162,8 ppm. Le déblindage de ce proton dû à l'effet d'anisotropie (Figure III-87) du groupement carbonyle, permet de placer ce proton en position C-5. Donc, le carbone à  $\delta_c$  162,8 correspond au C-7.

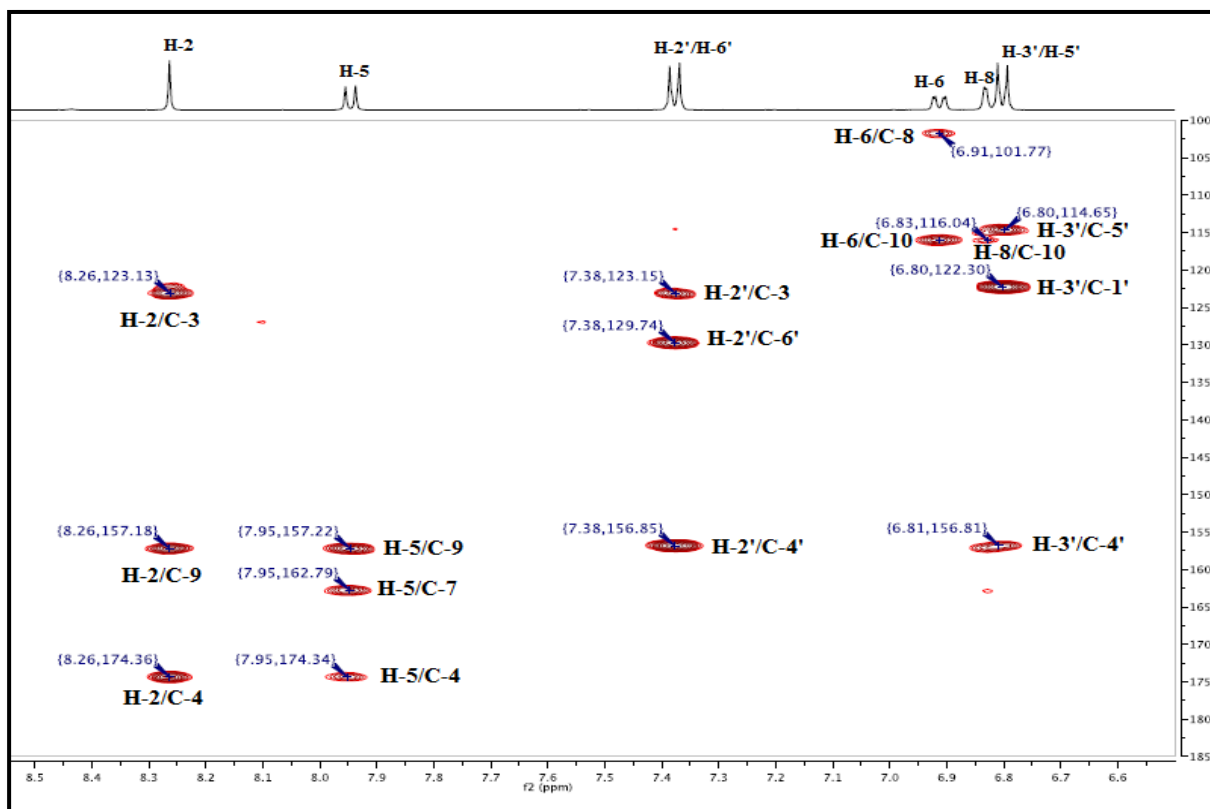


Figure III-86 : Spectre HMBC du composé Ea9

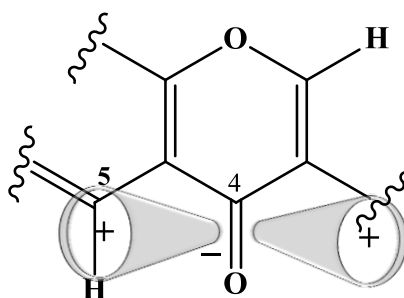
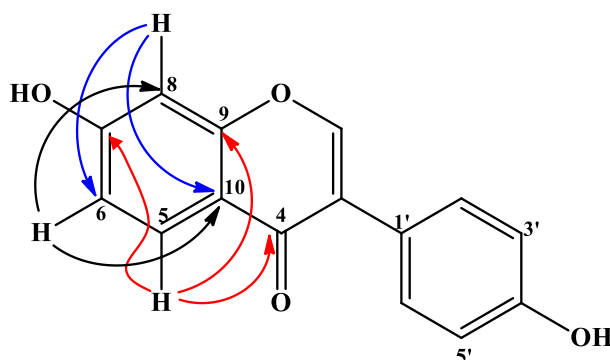


Figure III-87 : Effet d'anisotropie du carbonyle sur le proton H-5

Les deux protons restant sont positionnés en C-6 et C-8. La distinction entre ces deux protons est facile du fait que l'un de ces protons est sous forme de doublet de doublets à  $\delta_H$  6,91 (*dd*,  $J = 8,7$  et  $2,2$  Hz) indiquant des couplages *ortho* et *meta* avec deux protons différents est attribué au proton H-6, donc le proton à  $\delta_H$  6,83 (*d*,  $J = 2,2$  Hz) correspond au

proton H-8 (couplage *meta*). Ces deux protons H-8 et H-6 couplent sur le spectre HMBC en  $^3J$  avec les carbones C-6 et C-8 et avec le carbone quaternaire C-10 à  $\delta_C$  116,0 (Figure III-88).



**Figure III-88:** Corrélations HMBC du cycle A

Toutes ces données spectroscopiques (Tableau III-9) nous permettent de proposer pour le composé **Ea9** la structure suivante: 4',7-dihydroxyisoflavone nommé Daidzeine. Ce composé a été identifié antérieurement dans des espèces de la tribu Genisteae à savoir *Cytisus scoparius* L. (Link.), *Chamaecytisus smyrnaeus* Boiss <sup>[64]</sup>, *Genista sandrasica* et *G. vuralii* <sup>[51]</sup>, *G. acanthoclada* DC., *C. anatolica* Boiss., *G. sessilifolia* DC., *G. aucheri* Boiss., *G. carinalis* Gris., *G. involucrata* Spach., *G. albida* Willd., *G. tinctoria* L., *G. burdurensis* P. Gibbs, *G. lydia* Boiss. var. *lydia*, *G. lydia* var. *antiochia* (Boiss) P. Gibbs et *G. libanotica* Boiss. <sup>[156]</sup>. Il est connu par ses propriétés antioxydantes <sup>[51]</sup>, oestrogènes <sup>[50]</sup>, antiproliférative <sup>[157]</sup>, anticancéreuse <sup>[158]</sup>, antihémolytique <sup>[159]</sup> et antispasmodique <sup>[160]</sup>.

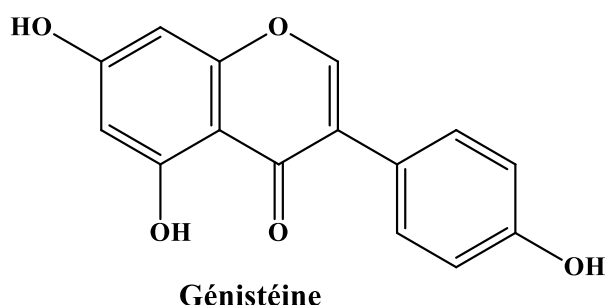
Il est important de signaler que le composé daidzeine est considéré comme un marqueur chimiotaxonomique pour la sous-famille papilionoideae de la famille Fabaceae <sup>[64, 161]</sup> et il a été isolé pour la première fois dans le genre *Erinacea*.

**Tableau III-9 :** Déplacements chimiques en RMN  $^1H$  (500 MHz) et RMN  $^{13}C$  (125 MHz) du composé **Ea9** dans le DMSO- $d_6$ .

Position	$\delta_H$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_C$
2	8,26	-	-	152,4
3	-	-	-	123,1
4	-	-	-	174,3
5	7,95	8,7	<i>d</i>	126,8
6	6,91	(8,7 ; 2,2)	<i>dd</i>	114,9
7	-	-	-	162,8
8	6,83	2,2	<i>d</i>	101,7

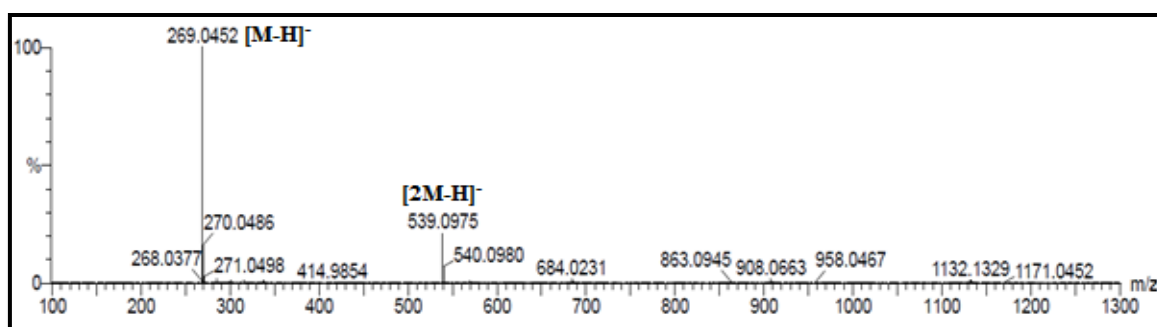
9	-	-	-	157,2
10	-	-	-	116,0
1'	-	-	-	122,3
2'	7,38	8,6	<i>d</i>	129,7
3'	6,80	8,6	<i>d</i>	114,6
4'	-	-	-	156,8
5'	6,80	8,6	<i>d</i>	114,6
6'	7,38	8,6	<i>d</i>	129,7

### III-1-3-10-Identification structurale du composé Ea10



Le composé **Ea10** est le 5,7,4'-trihydroxyisoflavone nommé Génistéine. Cette isoflavone se présente sous forme d'une poudre jaune, visible sous la lumière UV à 254 nm. Elle se colore en jaune après révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Les spectres de masse HR-ESI-MS du composé **Ea10** enregistrés en mode négatif (Figure III-89) et positif (Figure III-90) révèlent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 269,0452$   $[M-H]^-$  (calc.  $C_{15}H_9O_5$ , 269,0450) et  $271,0578$   $[M+H]^+$  (calc.  $C_{15}H_{11}O_5$ , 271,0606), ceci correspond à une masse moléculaire de 270 uma et une formule brute en  $C_{15}H_{10}O_5$ . Il est à signaler une différence de masse de + 16 uma par rapport au composé **Ea9** déjà identifié, suggérant aussi la présence d'un groupement hydroxyle supplémentaire attaché au squelette isoflavonique en comparaison avec le composé **Ea9**.



**Figure III-89:** Spectre de masse HR-ESI-MS (mode négatif) du composé **Ea10**

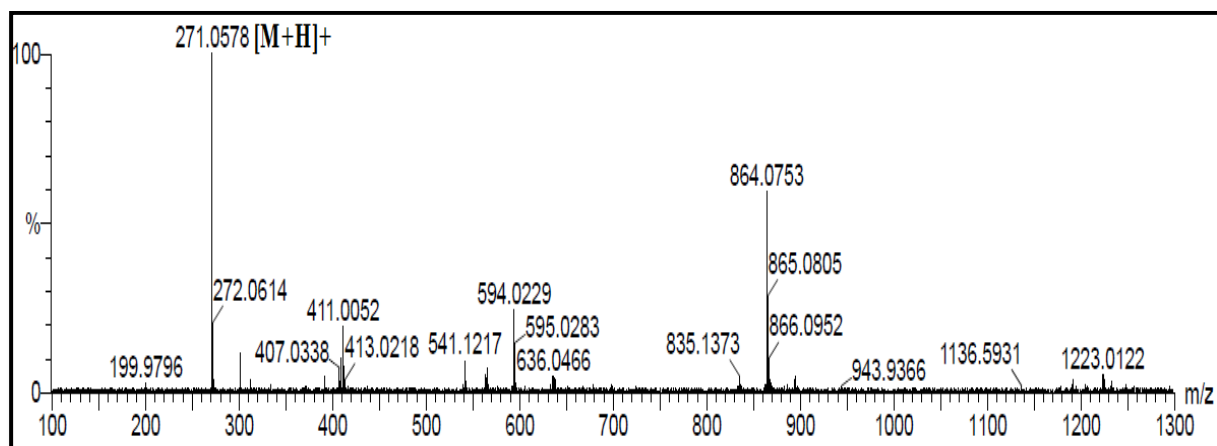


Figure III-90: Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea10**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea10** est presque similaire à celui du composé **Ea9** déjà élucidé particulièrement au niveau des cycles B et C (Figure III-91).

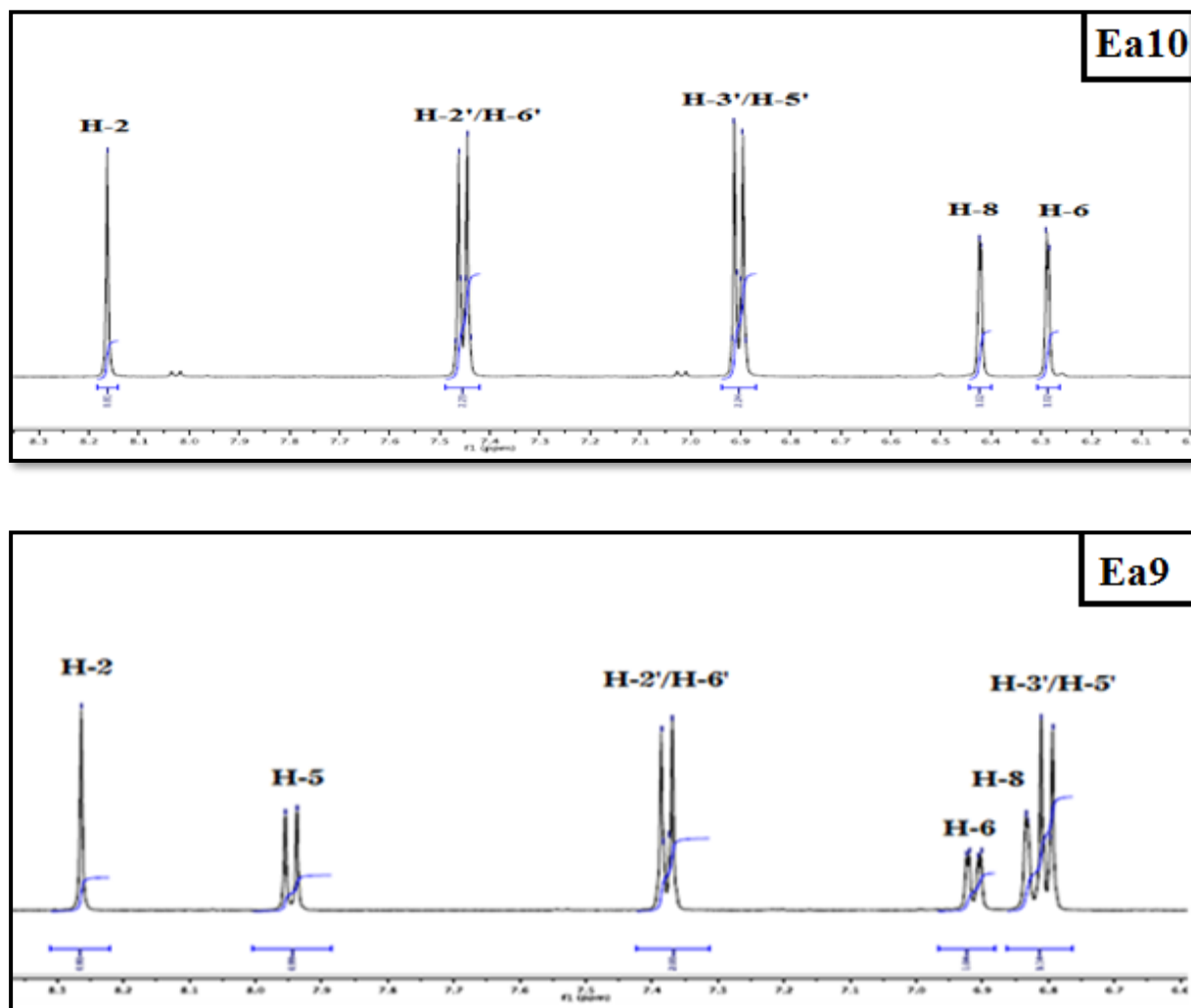
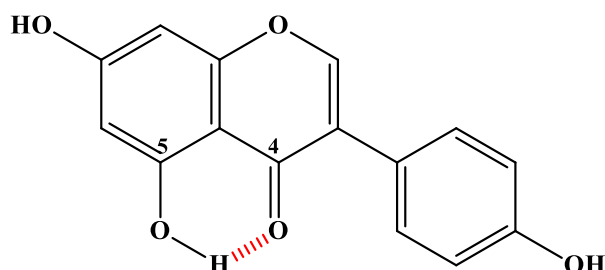


Figure III-91: Spectres RMN  $^1\text{H}$  des composés **Ea10** (Acétone- $d_6$ ) et **Ea9** (DMSO- $d_6$ )



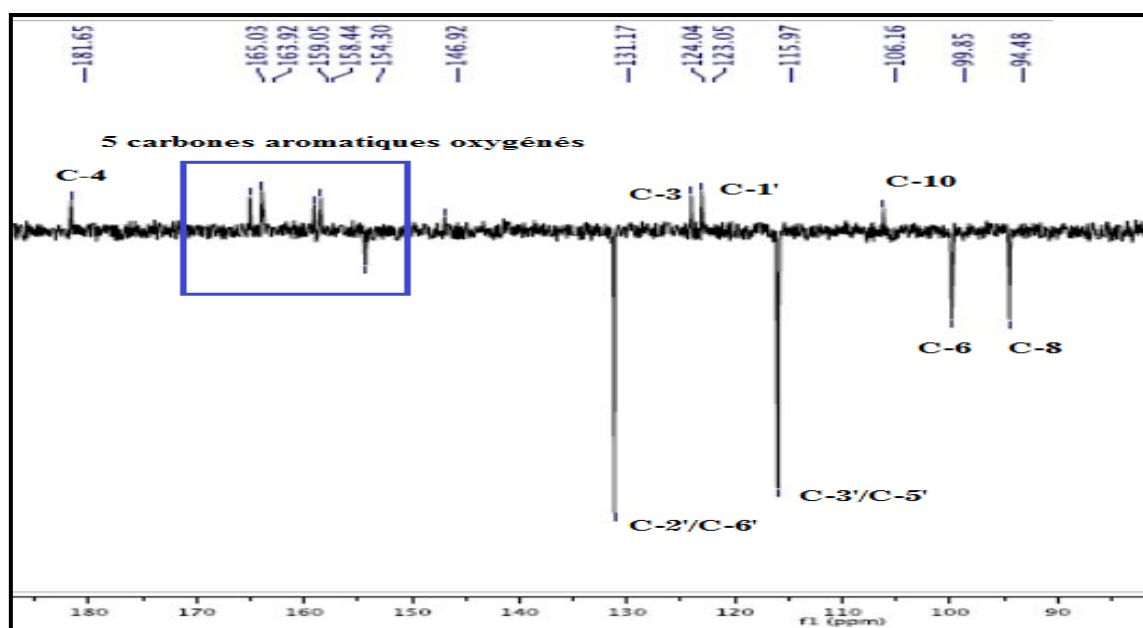
La différence principale entre **Ea10** et **Ea9** réside dans la disparition du signal du proton H-5 à  $\delta_H$  7,95 du composé **Ea10** et l'apparition de signaux de trois protons résonant à  $\delta_H$  8,53, 9,73 et 13,03 ppm sous forme de singulet chacun ne présentant aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC *J*-modulé correspondent à trois groupements hydroxyles. Le proton déblindé résonant à 13,03 ppm correspond au groupement OH en position C-5 chélaté avec la fonction cétonique en position C-4 (Figure III-92).



**Figure III-92:** Chélation entre OH-5 et C-4

Sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé (Figure III-93) du composé **Ea10**, sont visualisés 13 signaux correspondant à 15 atomes de carbone :

- 1 carbonyle à 181,65 ppm (C-4).
- 5 carbones aromatiques oxygénés entre 154,0 et 166,0 ppm
- 3 carbones aromatiques quaternaires non oxygénés résonant à 106,2, 123,1 et 124,0 ppm.
- 6 CH aromatiques résonant à 94,5, 99,8, 115,9 et 131,2 ppm dont deux sont équivalents à 115,9 ppm et deux autres sont équivalents à 131,2 ppm.



**Figure III-93 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé du composé **Ea10**

Le spectre COSY (Figure III-94) de ce composé montre la présence d'un système de spins à deux protons à  $\delta_H$  6,42 et 6,29 avec une constante de coupage  $J = 2,1$  Hz, indiquant qu'ils sont positionnés en *meta* l'un par rapport à l'autre sur le cycle A de l'isoflavone. La présence d'un OH libre en position C-5 permet de placer ces deux protons en positions C-6 et C-8 et suggérer ainsi la substitution du cycle A en position 7.

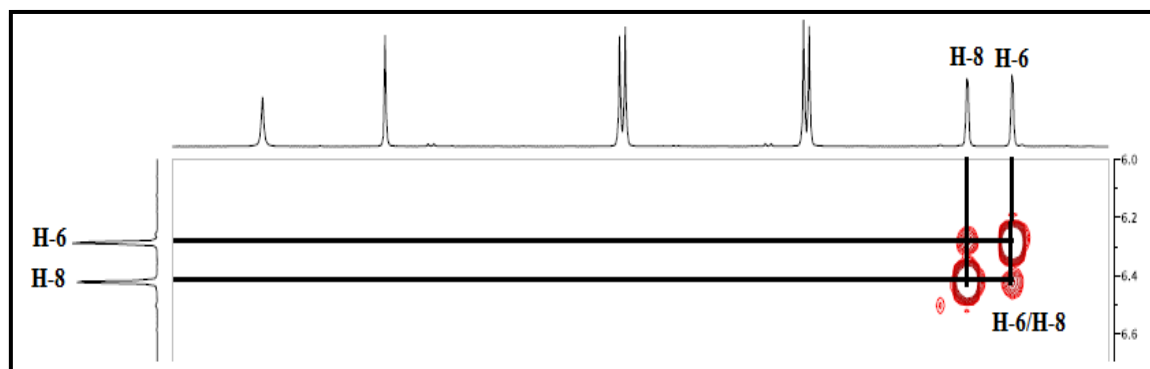


Figure III-94 : Partie du spectre COSY du composé Ea10

La différenciation entre les protons H-6 et H-8 se fait par l'analyse du spectre HMBC (Figure III-95), qui présente des couplages entre le proton du groupement hydroxyle en position C-5 et un CH à  $\delta_C$  99,85 attribuable au carbone C-6, son proton H-6 est repéré à 6,29 ppm selon l'expérience HSQC, donc le deuxième proton à 6,42 ppm correspond au proton H-8. Aussi, on observe des corrélations entre le groupement OH-5 et deux autres carbones quaternaires à  $\delta_C$  106,2 et 163,9 attribuables aux carbones C-10 et C-5 respectivement.

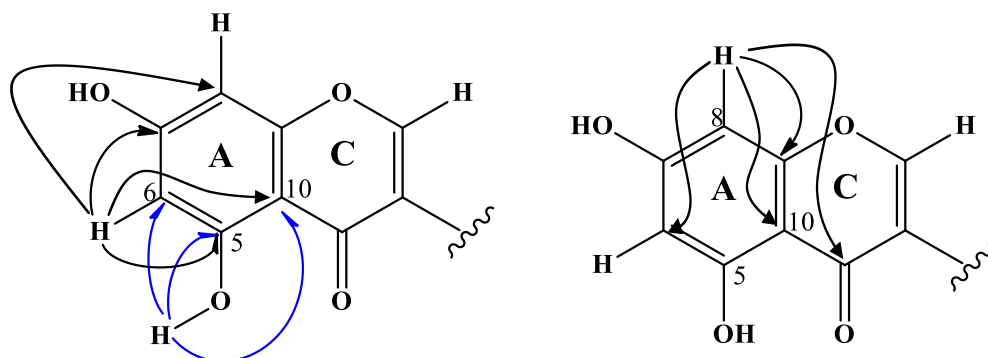


Figure III-95 : Corrélations HMBC du cycle A du composé Ea10

Le proton H-6 (6,29 ppm) corrèle sur le spectre HMBC avec les carbones C-10, C-5, C-8 ( $\delta_C$  94,5) et un carbone oxygéné à  $\delta_C$  165,0 attribuable au carbone C-7. Par ailleurs, le proton H-8 à  $\delta_H$  6,42 montre des corrélations avec les carbones C-10, C-4 et C-9 ( $\delta_C$  159,1).

D'autres corrélations sont observées sur le spectre HMBC (Figure III-96) entre :

- Le proton H-2 et les carbones repérés à  $\delta_C$  123,1 (C-1'), 124,0 (C-3), C-9 et C-4.

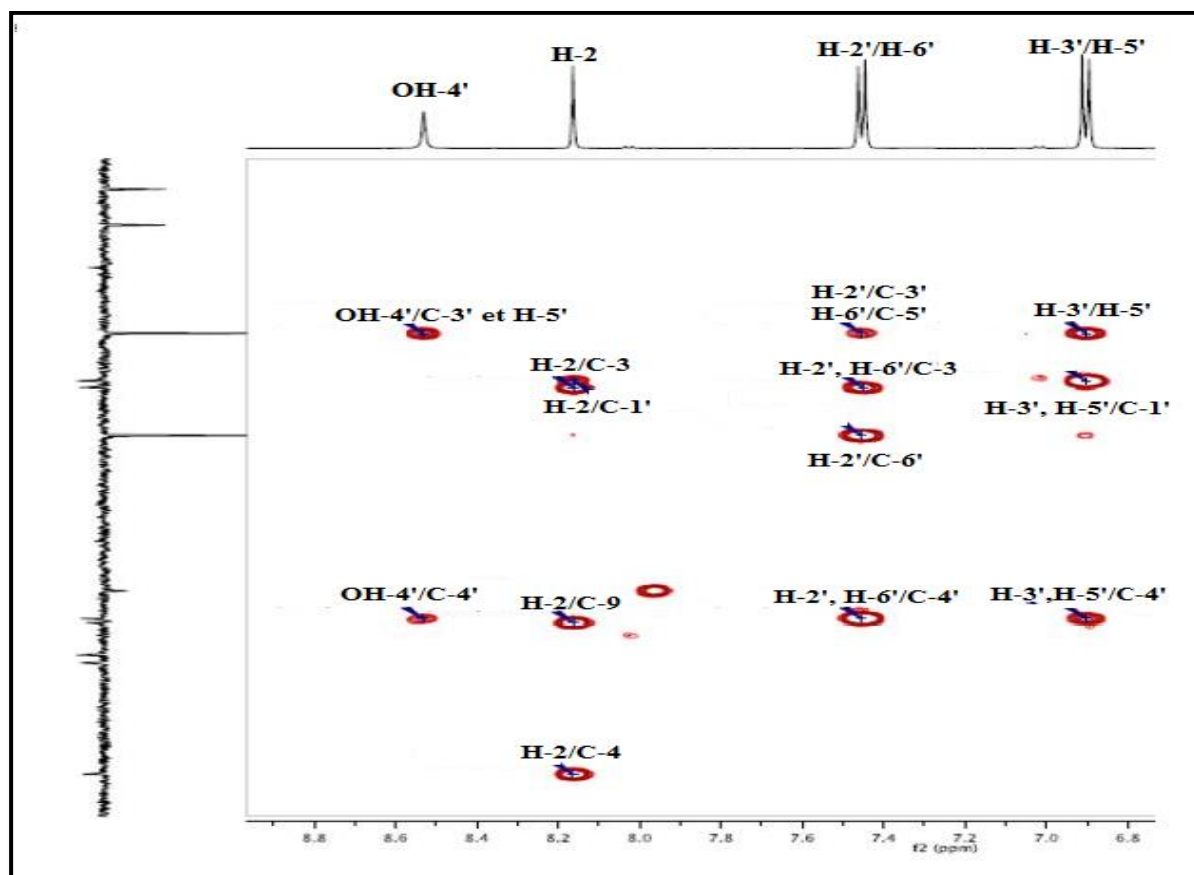
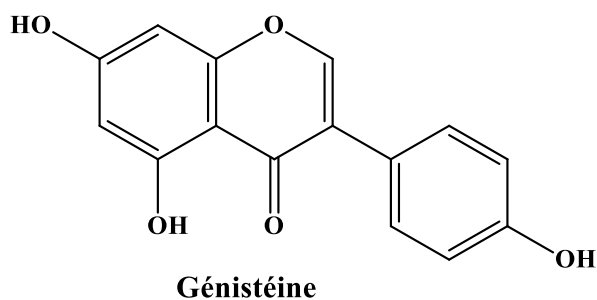


Figure III-96 : Partie du spectre HMBC du composé **Ea10**

- Le proton d'hydroxyle en position C-4' à  $\delta_H$  8,53 et les carbones C-3'/C-5' repérés à  $\delta_C$  115,9 et C-4' à  $\delta_C$  158,4.
- Les deux protons H-2'/H-6' du cycle B détectés à  $\delta_H$  7,45 (leurs carbones déterminés par expérience HSQC *J*-modulé à  $\delta_C$  131,2) et les carbones C-3'/C-5', C-4' et C-3.
- Les deux autres protons H-3'/H-5' des deux groupements méthines CH-3'/CH-5' repérés à  $\delta_H$  6,90/  $\delta_C$  115,9 et les carbones C-1', C-2'/ C-6' et C-4'.

A l'issu de cette analyse, la structure du composé **Ea10** est la suivante :



Ces données spectroscopiques nous conduisent à proposer sans ambiguïté pour le composé **Ea10**, la structure moléculaire suivante: 4',5,7-trihydroxyisoflavone (Génistéine),

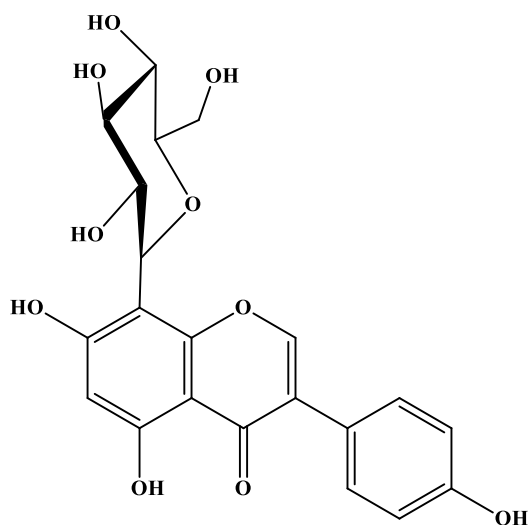
isolé antérieurement de quelques espèces de la tribu Genisteae : *Genista sandrasica* et *Genista vuralii* [51], *Genista tinctoria* et *Genista libanotica* [162]. Cette isoflavone possède plusieurs activités biologiques telles que: estrogénique [163], antioxydante [164] antiproliférative [157], antihémolytique [159] et elle est utilisée pour le traitement du cancer de la prostate [165].

La génistéine est l'une des composés les plus répandus dans la famille Fabaceae et pourrait être considérée comme un marqueur chimiotaxonomique de la sous-famille papilionoideae [64, 161]. Il est à signaler que ce composé a été identifié pour la première fois dans le genre *Erinacea*.

**Tableau III-10:** Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) du composé **Ea10** dans l'acétone deutérée.

Position	$\delta_H$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_C$
2	8,16	-	<i>s</i>	154,3
3	-	-	-	124,0
4	-	-	-	181,7
5	-	-	-	163,9
6	6,29	2,1	<i>d</i>	99,8
7	-	-	-	165,0
8	6,42	2,1	<i>d</i>	94,5
9	-	-	-	159,1
10	-	-	-	106,2
1'	-	-	-	123,1
2'	7,45	8,6	<i>d</i>	131,2
3'	6,90	8,6	<i>d</i>	115,9
4'	-	-	-	154,3
5'	6,90	8,6	<i>d</i>	115,9
6'	7,45	8,6	<i>d</i>	131,2
OH-5	13,03	-	<i>s</i>	-
OH-7	9,73	-	<i>s</i>	-
OH-4'	8,53	-	<i>s</i>	-

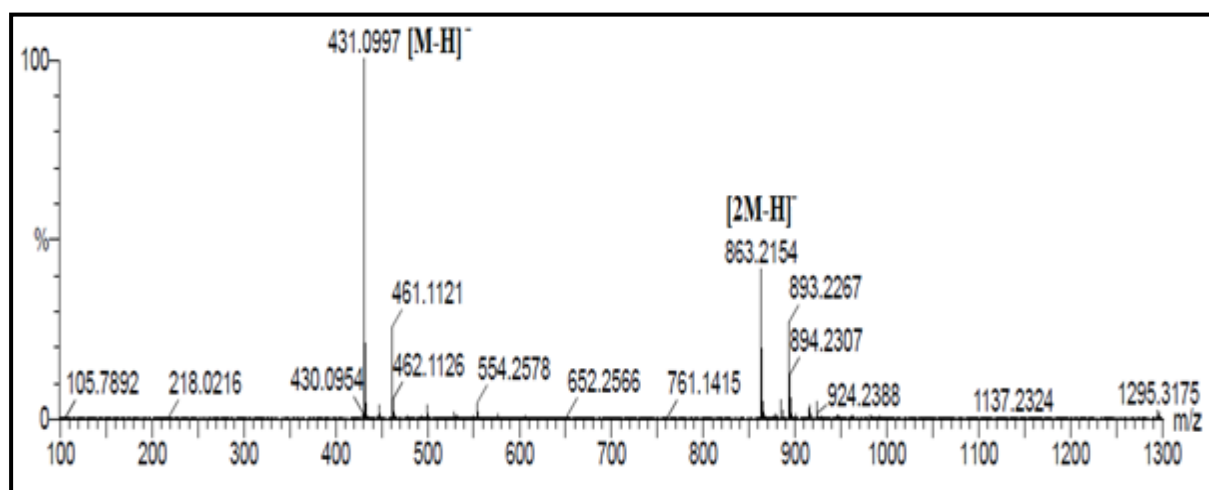
## III-1-3-11-Identification structurale du composé Ea11



Génisteine-8-C-glucoside

Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans l'acétone et visible sous la lampe UV à 254 nm. Il se colore en gris après révélation par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. La pulvérisation de sa CCM par les vapeurs d'ammoniac montre une tache jaune suggérant une nature flavonique pour ce composé.

Les spectres de masse à haute résolution (HR-ESI-MS) du composé **Ea11** enregistrés en modes négatif (Figure III-97) et positif (Figure III-98) indiquent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 431,0997 [M-H]^-$  (calc.  $C_{21}H_{19}O_{10}$ , 431,978) et  $433,1145 [M+H]^+$  (calc.  $C_{21}H_{21}O_{10}$ , 433,1135), ceci correspond à une masse moléculaire de 432 uma et une formule brute en  $C_{21}H_{20}O_{10}$  impliquant 12 degrés d'insaturation.

Figure III-97: Spectre de masse HR-ESI-MS (mode négatif) du composé **Ea11**

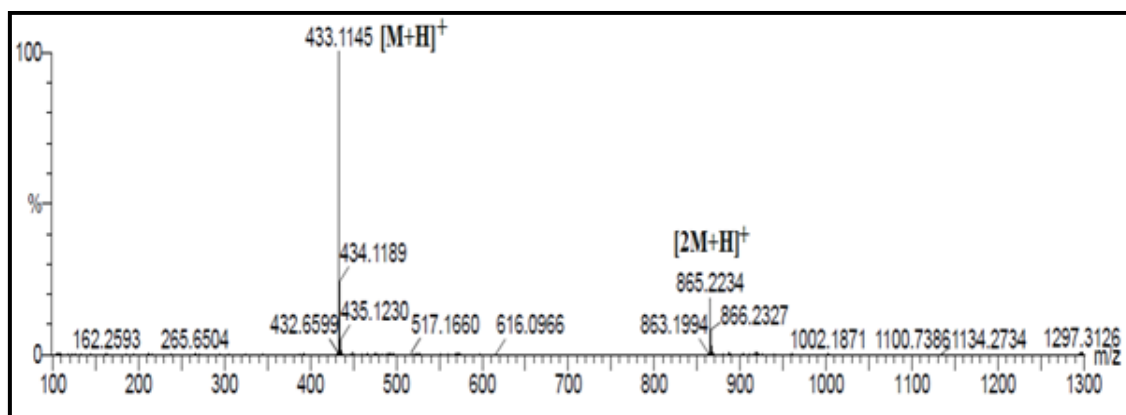


Figure III-98: Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea11**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea11** (Figure III-99) révèle une similitude structurale avec celui du composé précédent **Ea10** (Figure III-100) au niveau des cycles B et C. La différence réside dans l'apparition des signaux des protons osidiques entre 3 et 5 ppm et la disparition du signal de l'un des protons méthines CH, H-8 ou H-6 du cycle A pour le composé **Ea11**.

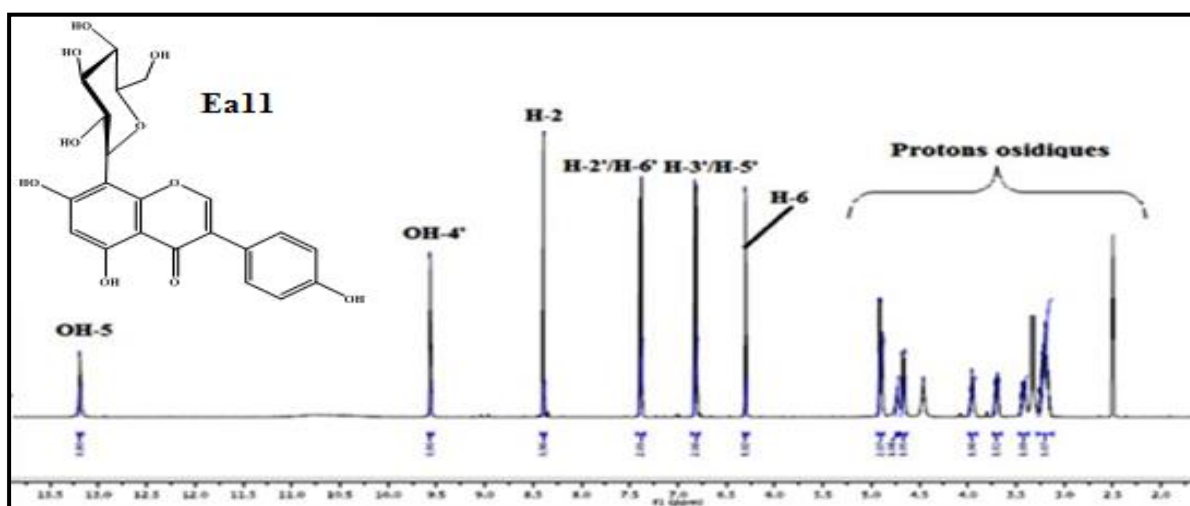


Figure III-99: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea11** ( $\text{DMSO-}d_6$ )

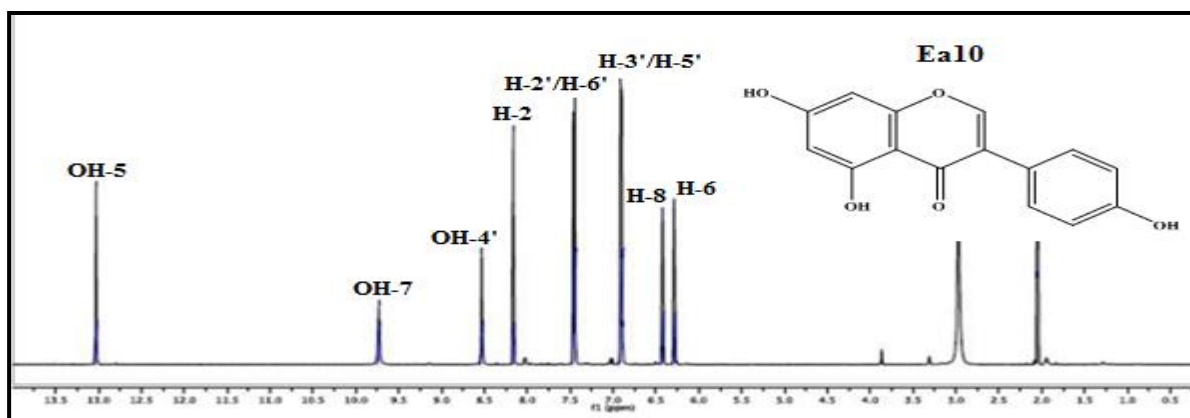


Figure III-100: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea10** ( $\text{Acétone-}d_6$ )

Comme il a été démontré précédemment dans le cas du composé **Ea10**, l'ensemble des informations recueillies à partir des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-99), COSY (Figure III-101) et HSQC (Figure III-102) suggère que ce composé fait également partie de la classe des flavonoïdes, surtout en raison de la présence des signaux du groupement méthine CH-2 caractéristiques des isoflavonoïdes à  $\delta_{\text{H}}$  8,39 et  $\delta_{\text{C}}$  153,8, ainsi que les signaux de protons aromatiques à  $\delta_{\text{H}}$  7,39 (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz) et 6,82 (2H, *d*,  $J = 8,5$  Hz). Ces derniers indiquent la présence d'un système  $\text{A}_2\text{X}_2$  au niveau du cycle B para-disubstitué, correspondant aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' respectivement. Leurs carbones sont assignés, en analysant les taches de corrélation observées sur le spectre HSQC à  $\delta_{\text{C}}$  130,1 (C-2'/C-6') et 115,0 (C-3'/C-5').

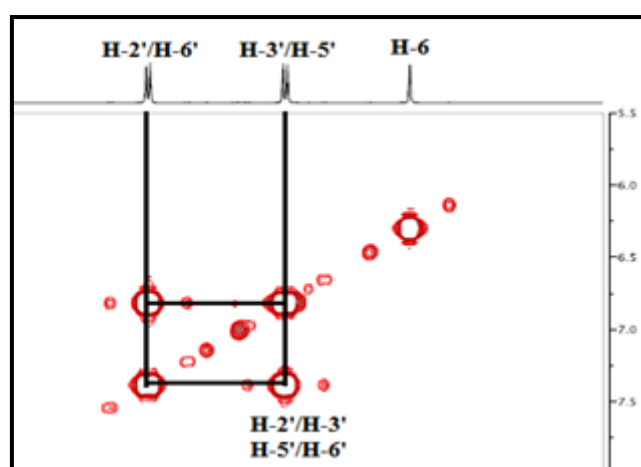


Figure III-101 : Partie du spectre COSY H-H du composé **Ea11**

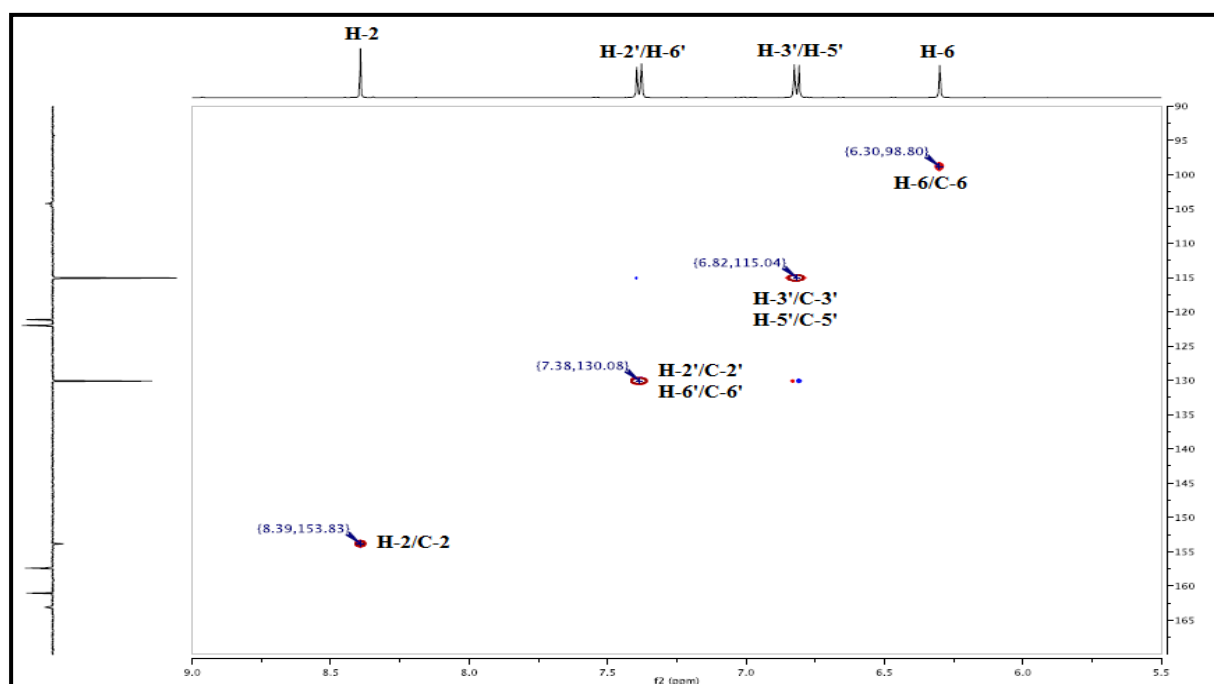
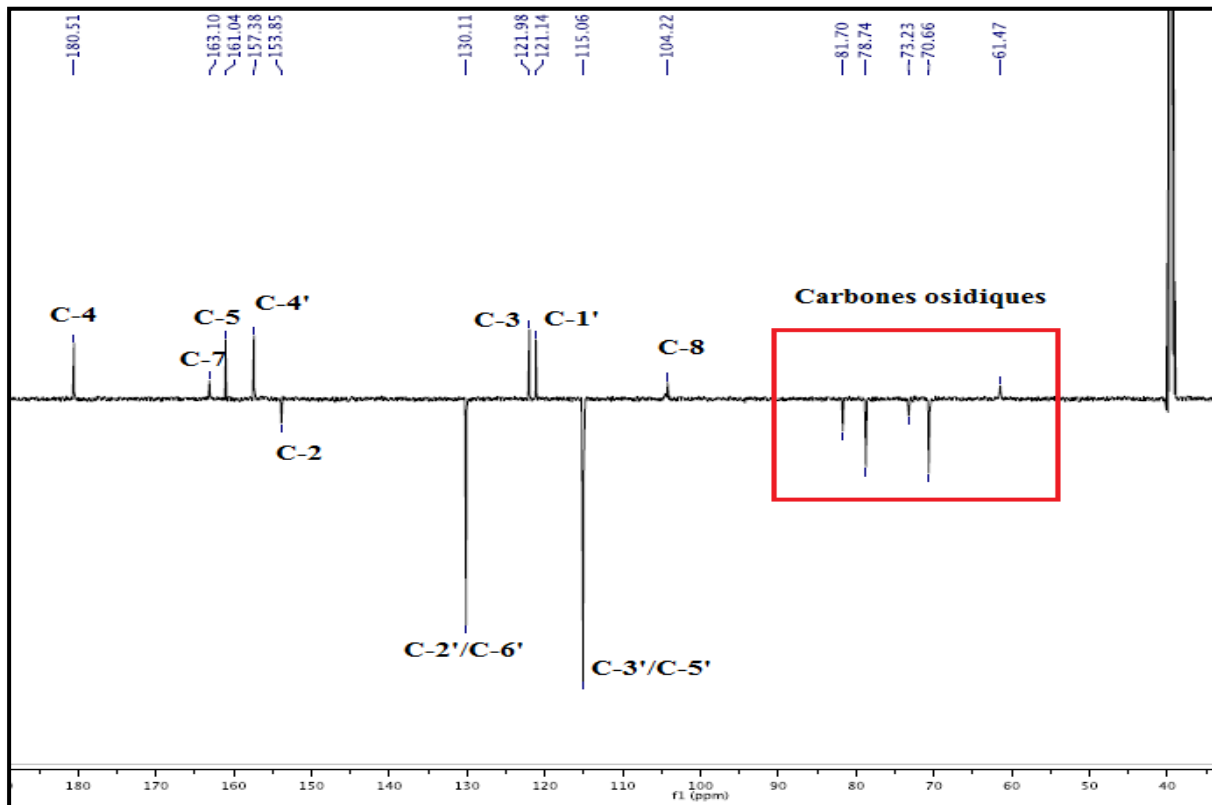


Figure III-102 : Partie du spectre HSQC du composé **Ea11**

Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure III-103) et HSQC du composé **Ea11** montrent la présence des signaux de carbones aromatiques résonant entre 104,2 et 181,0 ppm et de carbones osidiques sortant entre 61,0 et 82,0 ppm. Il est à signaler l'absence du signal de l'atome de carbone du groupement méthine observé pour le composé **Ea10** à  $\delta_{\text{C}}$  94,5 (C-8).



**Figure III-103:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé **Ea11**

L'absence d'un système de spins sur le spectre COSY H-H (Figure III-101) entre les deux protons H-6 et H-8 du cycle A en comparaison avec le produit **Ea10** identifié précédemment, indique que la position C-8 ou C-6 de ce composé est substituée.

L'analyse du spectre HMBC du composé **Ea11** montre des couplages hétéronucléaires H/C à longue distance entre (Figure III-104):

- Les protons équivalents H-2' et H-6' et les carbones C-3', C-5', C-6', C-2' et un carbone quaternaire oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  157,3 (C-4').
- Les protons H-3' et H-5' et les carbones C-2', C-6', C-5', C-3', C-4' et un carbone aromatique quaternaire détecté à  $\delta_{\text{C}}$  121,1 (C-1').
- Le proton oléfinique H-2 et les carbones quaternaires C-1', C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  182,8) et C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  156,2).
- Le proton de l'hydroxyle en position C-4' et les carbones C-4', C-3' et C-5'.



- Le proton de l'hydroxyle en C-5 à 13,16 ppm (OH-5) et les deux carbones à  $\delta_C$  104,5 (C-10) et 160,9 (C-5).

La substitution du cycle A en position C-8 a été confirmée par les corrélations observées dans l'expérience HMBC entre le proton résonant à  $\delta_H$  6,30 et le carbone C-5 déjà identifié, ce qui permet de placer ce proton en position 6. Ce dernier (H-6) couple également en HMBC avec les carbones C-10, C-8 ( $\delta_C$  104,2) et C-7 ( $\delta_C$  163,1). Le déplacement chimique du carbone quaternaire C-8 à 104,2 ppm plaide en faveur d'une liaison carbone  $SP^2$ -carbone  $SP^3$  (C8-C). Il s'agit donc d'une isoflavone : Genisteine 8-C-substituée.

A ce niveau d'analyse tous les protons et carbones des cycles A, B et C sont déterminés. Il reste alors à identifier le substituant osidique lié au carbone C-8.

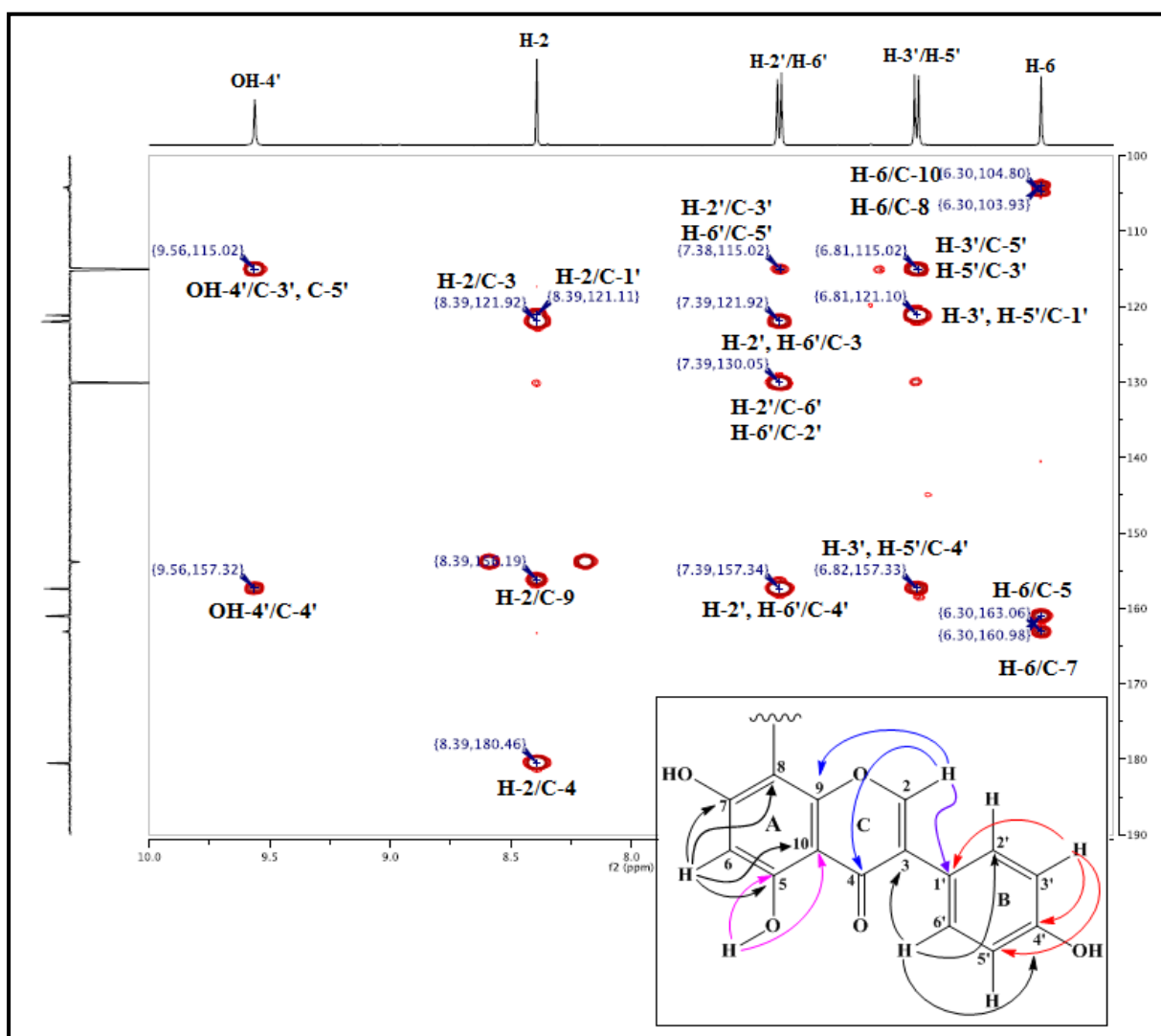


Figure III-104 : Partie du spectre HMBC du composé Ea11

L'expérience COSY H-H (Figure III-105) conduit à l'identification du groupement osidique par l'observation des corrélations entre ses différents protons.

Partant du proton anomérique H-1'' [ $\delta_{\text{H}}$  4,64 (*d*,  $J = 9,8$  Hz)], il est aisé d'identifier un système de spins à sept protons selon le spectre COSY incluant les protons H-1''/H-2''/H-3''/H-4''/H-5''/H-6''a/H-6''b, ce qui permet d'attribuer leurs déplacements chimiques : H-2'' [ $\delta_{\text{H}}$  3,96 (*t*,  $J = 9,3$  Hz)], H-3'' [ $\delta_{\text{H}}$  3,23 (*m*)], H-4'' [ $\delta_{\text{H}}$  3,19 (*m*)], H-5'' [ $\delta_{\text{H}}$  3,20 (*m*)], H-6a'' [ $\delta_{\text{H}}$  3,70 (*dd*,  $J = 11,7 ; 4,8$  Hz)] et H-6b'' [ $\delta_{\text{H}}$  3,42 (*m*)]. Les grandes valeurs des constantes de couplage entre les protons H-1''/H-2''/H-3'' indiquent la position *trans*-diaxiale de ces protons caractéristiques d'un hexose  $\beta$ -D-glucose ou  $\beta$ -D-galactose ( $J_{\text{H1''/H2''}} = 9,8$  Hz).

Leurs carbones sont assignés par l'expérience HSQC à  $\delta_{\text{C}}$  73,2 (C-1''), 70,6 (C-2''), 78,7 (C-3''), 70,5 (C-4''), 81,7 (C-5'') et 61,4 (C-6'').

D'autres couplages homonucléaires sont observés sur le spectre COSY entre le proton H-3'' et le proton de l'hydroxyle OH-3'' à  $\delta_{\text{H}}$  4,89 (*d*,  $J = 4,8$ ), H-4'' et OH-4'' à  $\delta_{\text{H}}$  4,91 (*d*,  $J = 4,2$ ) et entre H-6'' et OH-6'' à  $\delta_{\text{H}}$  4,46 (*s*).

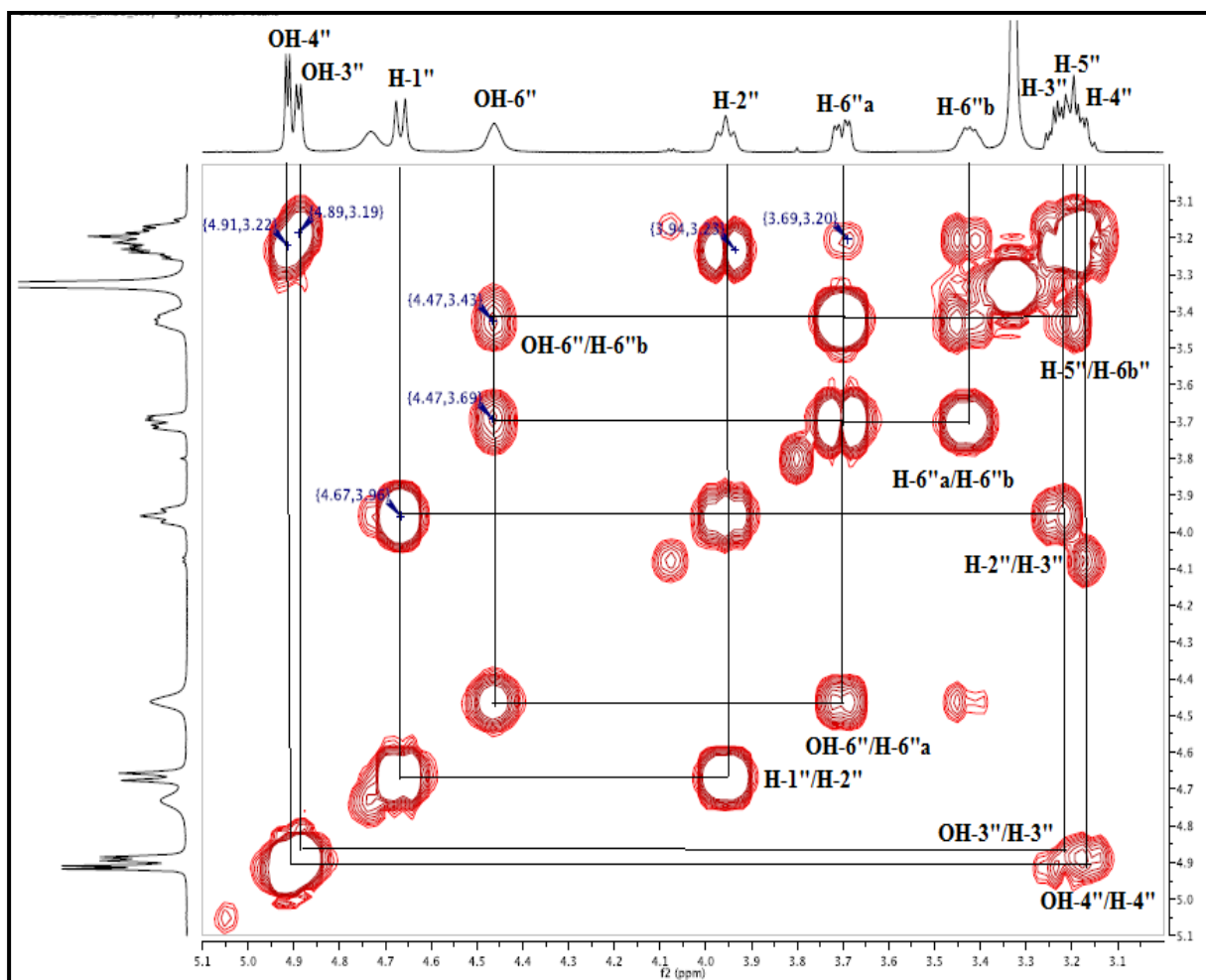


Figure III-105 : Spectre COSY H-H de la partie osidique du composé Ea11 (DMSO- $d_6$ )

La stéréochimie de la partie osidique de ce composé a été établie par analyse du spectre NOESY qui montre les effets NOE entre les protons: H-1"/H-5", H-2"/H-4" attestant que tous ces protons sont axiaux (Figure III-106). Ces constatations permettent d'identifier cet hexose au  $\beta$ -D-glucose.

D'autres effets NOE (Figure III-107) sont visualisés entre les protons : H-6"a/H-6"b, OH-3"/OH-6" et H-6"b/H-5".

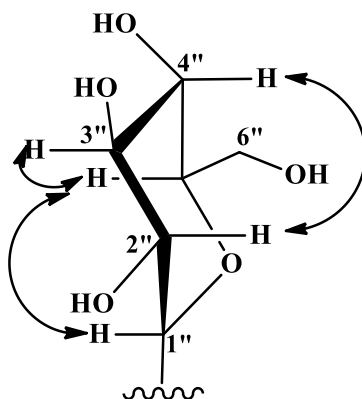


Figure III-106 : Corrélations NOESY du  $\beta$ -D-glucose

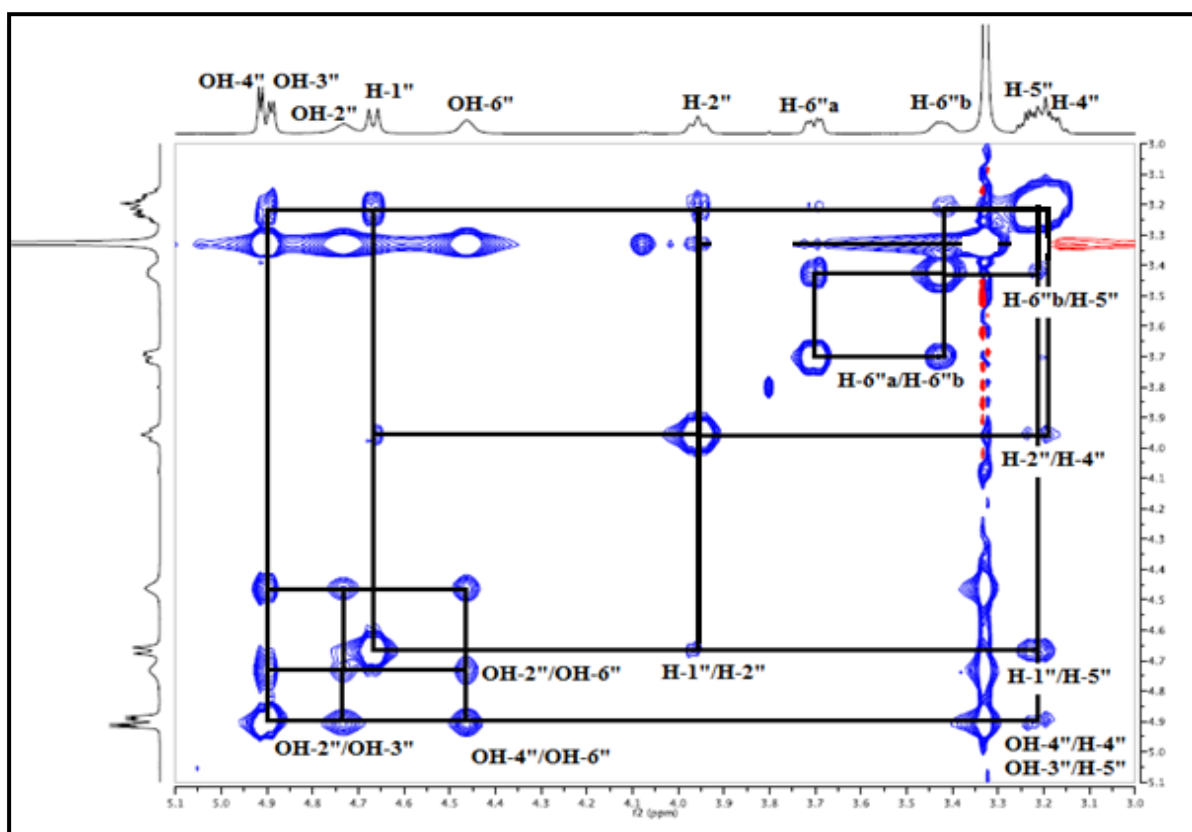


Figure III-107: Spectre NOESY du composé Ea11

L'emplacement du sucre en position C-8 (103,9 ppm) est confirmé par analyse des corrélations hétéronucléaires observées sur le spectre HMBC entre le proton anomérique H-1''

(4,64 ppm) du  $\beta$ -D-glucose et les carbones C-7, C-9 et C-8 du cycle A (Figures III-108 et III-109) indiquant que le carbone C-1'' (73,2 ppm) est attaché à la partie aglycone par une liaison C-C. Ceci est conforté par les valeurs blindées du déplacement chimique du proton H-1'' à  $\delta_H$  4,64 et C-1'' à  $\delta_C$  73,2 ; puisque dans le cas d'une liaison O-C le proton H-1'' et le carbone C-1'' résonneraient aux environ de 5,5 et 101 ppm [166].

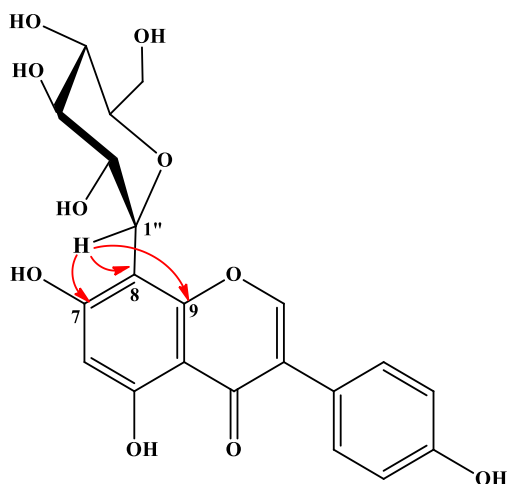


Figure III-108: Corrélations HMBC du proton anomère avec la partie aglycone

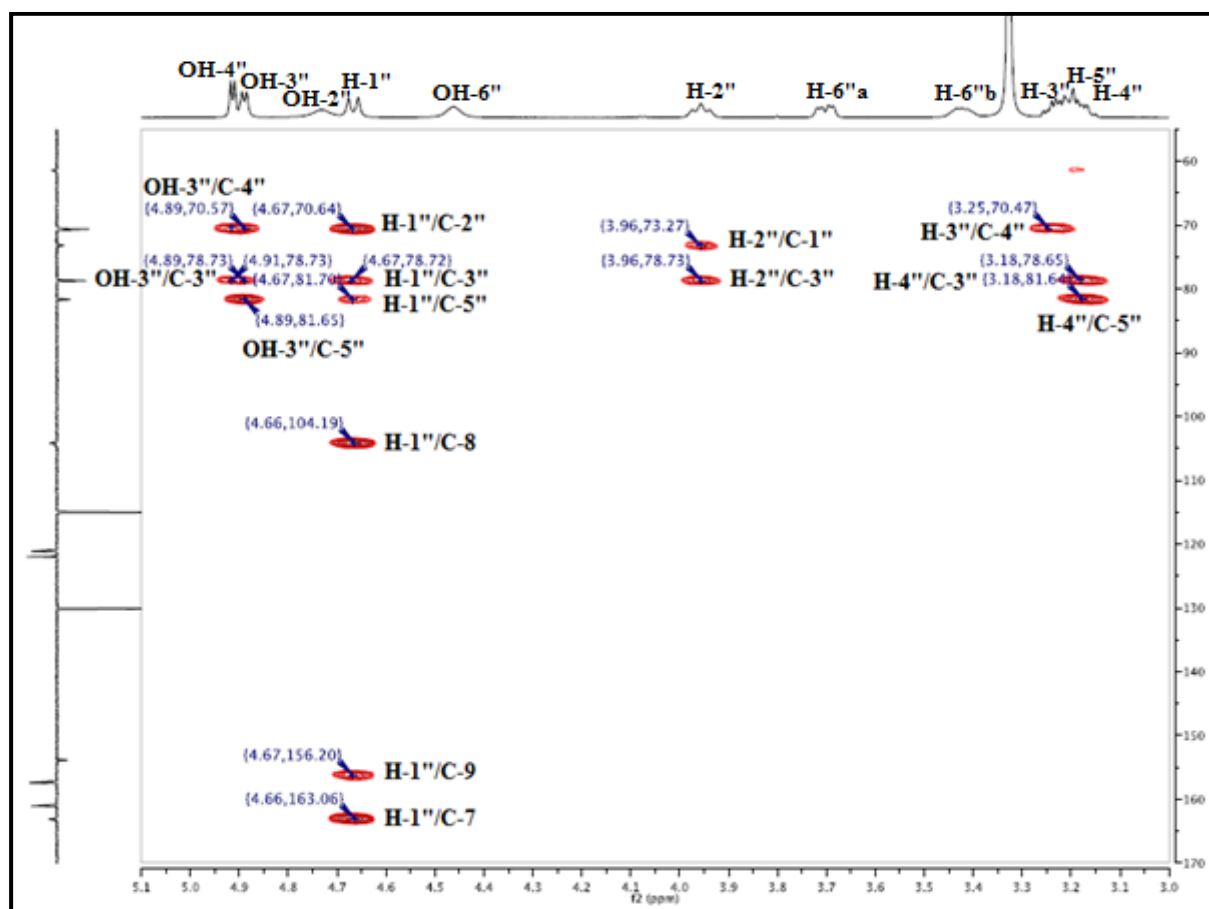


Figure III-109 : Corrélations HMBC de la partie osidique du composé Ea11

Tous les déplacements chimiques des protons et carbones (Tableau III-11) sont assignés conjointement par les expériences RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , COSY H-H, HSQC, HMBC et NOESY et par comparaison avec les données de la littérature [167], permettant ainsi d'identifier le composé **Ea11** à la Génisteine-8-*C*-glucoside isolée antérieurement de l'espèce *Genista ephedroides* [168] et *Genista cinerea* [169] de la tribu Genisteae. Elle a été trouvée pour la première fois dans le genre *Erinacea*.

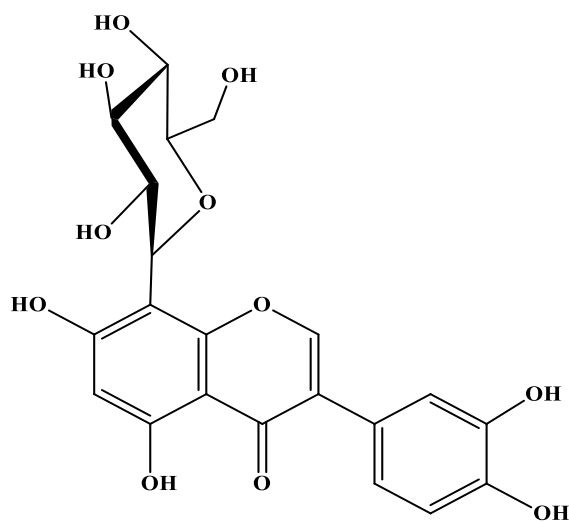
La génisteine-8-*C*-glucoside possède plusieurs activités biologiques intéressantes incluant l'inhibition de la prolifération, l'induction de l'apoptose, l'effondrement du potentiel de la membrane mitochondriale et la génération de ROS (espèces oxygénées réactives), aussi ce composé pourrait être utilisé pour le traitement et la prévention du cancer de l'ovaire [170]. En effet, ce composé présente des propriétés antioxydantes [171] et antidiabétique [172], mais il n'avait aucune activité cytotoxique ou génotoxique [173].

**Tableau III-11** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **Ea11** dans le DMSO- $d_6$ .

Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
2	8,39	-	<i>s</i>	153,8
3	-	-	-	121,9
4	-	-	-	180,5
5	-	-	-	160,9
6	6,30	-	<i>s</i>	98,8
7	-	-	-	163,1
8	-	-	-	104,2
9	-	-	-	156,2
10	-	-	-	104,5
1'	-	-	-	121,1
2'	7,38	8,5	<i>d</i>	130,1
3'	6,82	8,6	<i>d</i>	115,0
4'	-	-	-	157,3
5'	6,82	8,6	<i>d</i>	115,0
6'	7,38	8,5	<i>d</i>	130,1

1"	4,67	9,8	<i>d</i>	73,2
2"	3,96	9,3	<i>t</i>	70,6
3"	3,23	-	<i>m</i>	78,7
4"	3,19	-	<i>m</i>	70,5
5"	3,20	-	<i>m</i>	81,7
6a"	3,70	(11,7 ; 4,8)	<i>dd</i>	61,4
6b"	3,42	-	<i>m</i>	
OH-5	13,19	-	<i>s</i>	-
OH-4'	9,56	-	<i>s</i>	-
OH-3"	4,89	4,8	<i>d</i>	-
OH-4"	4,91	4,2	<i>d</i>	-
OH-6"	4,46	-	<i>sl</i>	-
OH-2"	4,73	-	<i>sl</i>	-

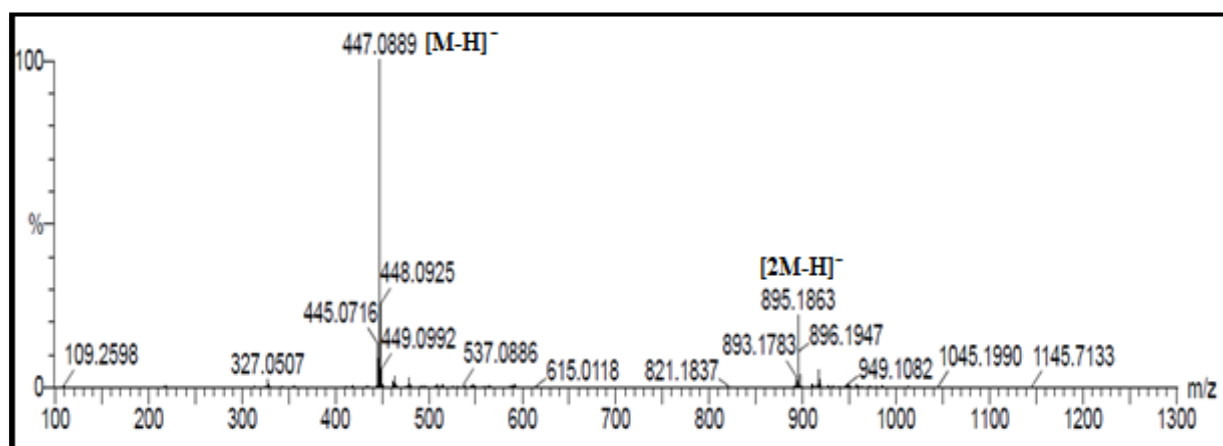
### III-1-3-12-Identification structurale du composé Ea12



**Orobol-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside**

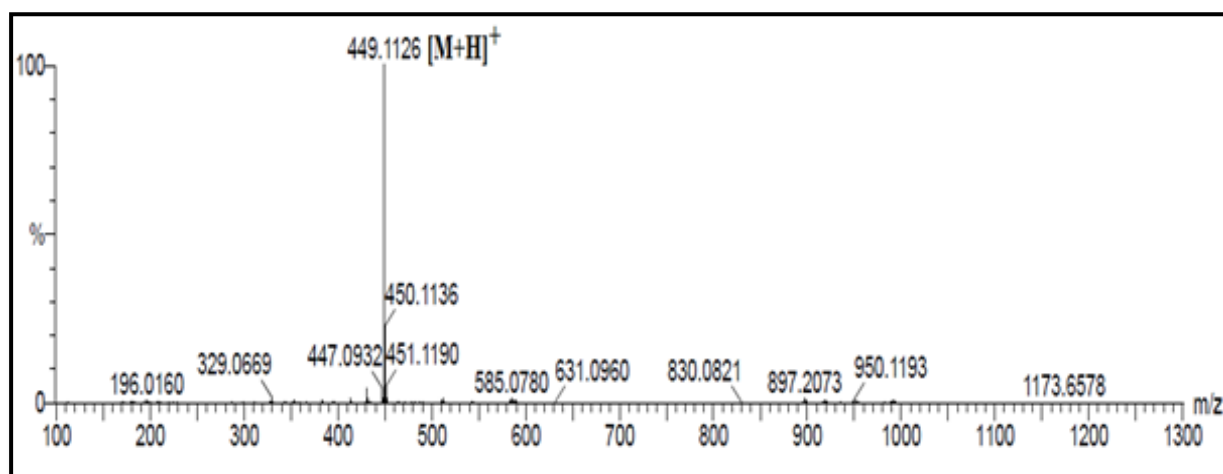
Le composé **Ea12** est purifié aussi sous forme d'une poudre blanche visible sous la lumière UV à 254 nm. Il donne une tache grise après révélation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse à haute résolution (HR-ESI-MS) du composé **Ea12** enregistré en mode négatif (Figure III-110) montre un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  447,0889  $[M-H]^-$  (calc.  $C_{21}H_{19}O_{11}$ , 447,0927).



**Figure III-110:** Spectre de masse HR-ESI-MS (mode négatif) du composé **Ea12**

Le spectre de masse à haute résolution (HR-ESI-MS) du composé **Ea12** en mode positif (Figure III-111) présente un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  449,1126  $[M+H]^+$  (calc.  $C_{21}H_{21}O_{11}$ , 449,1084). Ceci correspond à une masse moléculaire de 448 uma et une formule brute en  $C_{21}H_{20}O_{11}$  indiquant ainsi 12 degrés d'insaturation. Il est à noter une différence de +16 uma par rapport au composé **Ea11** déjà illustré.



**Figure III-111:** Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea12**

Sur les spectres RMN  $^1H$  (Figures III-112 et III-113) du composé **Ea12** enregistrés dans le  $CD_3OD$ , il est facile de visualiser le signal du proton H-2 à  $\delta_H$  8,08 caractéristique des isoflavonoïdes, les signaux des protons osidiques entre 3,0 et 5,0 ppm et le signal du proton H-6 à  $\delta_H$  6,25, comme il a été constaté précédemment lors de l'analyse structurale du composé **Ea11** (Génisteine-8-C-glucoside).

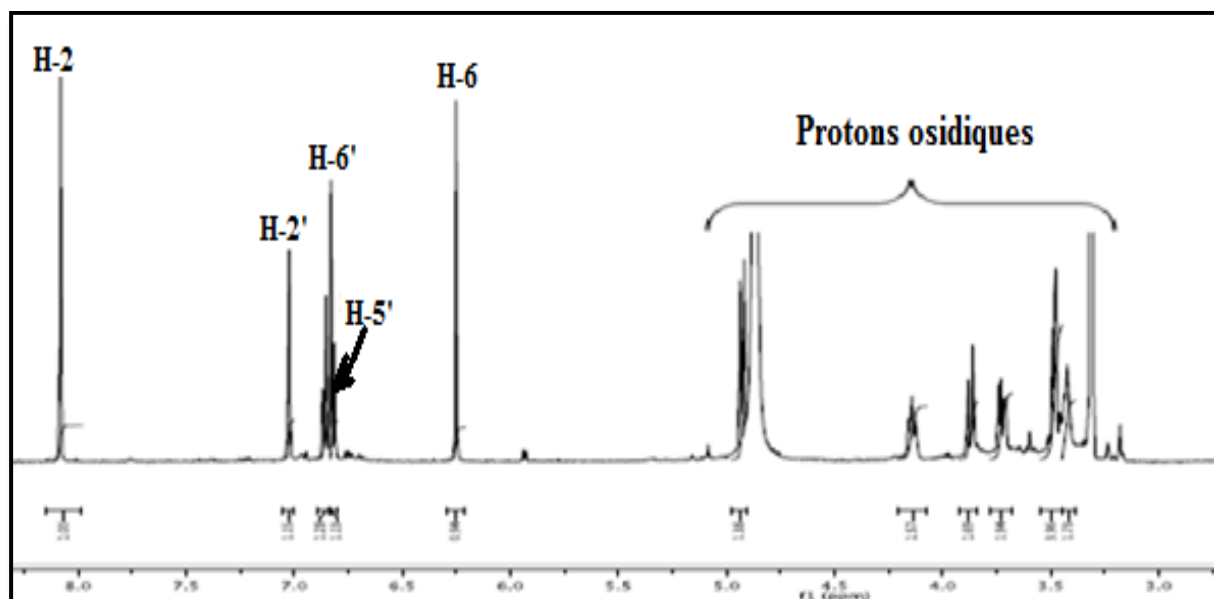


Figure III-112 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea12** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

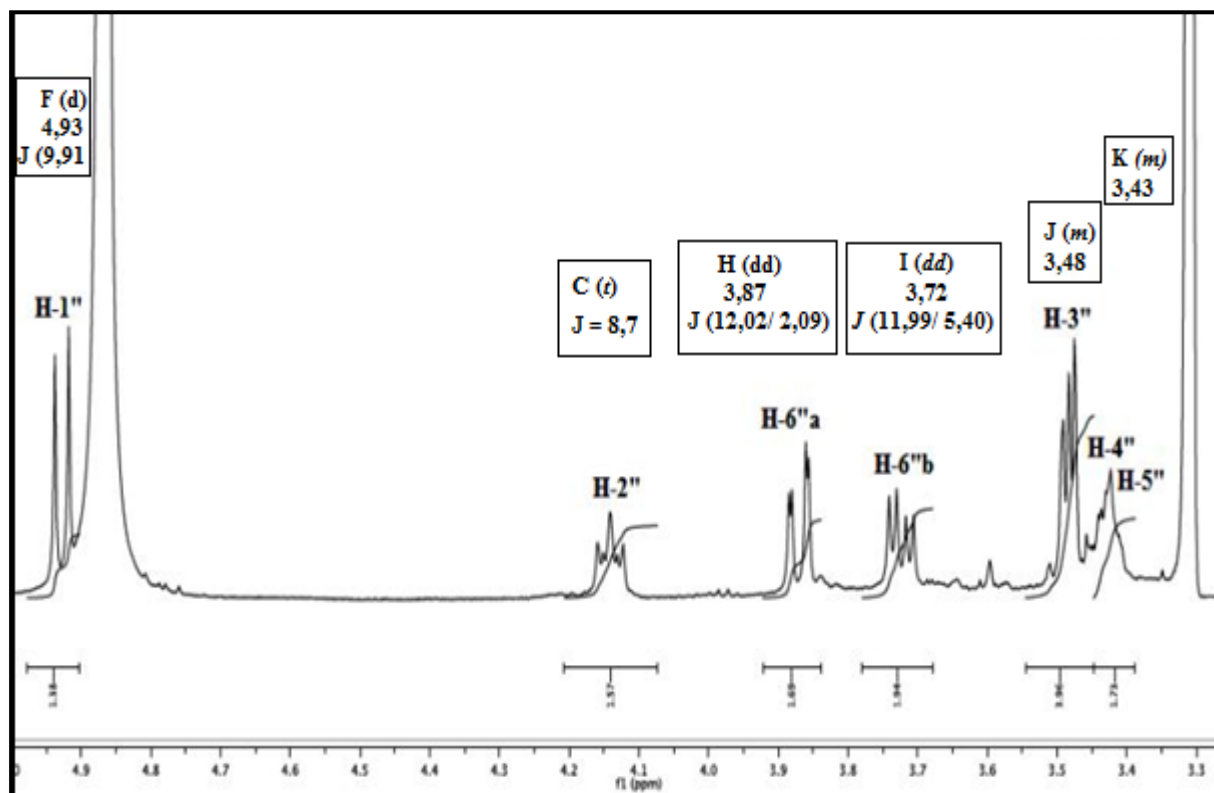
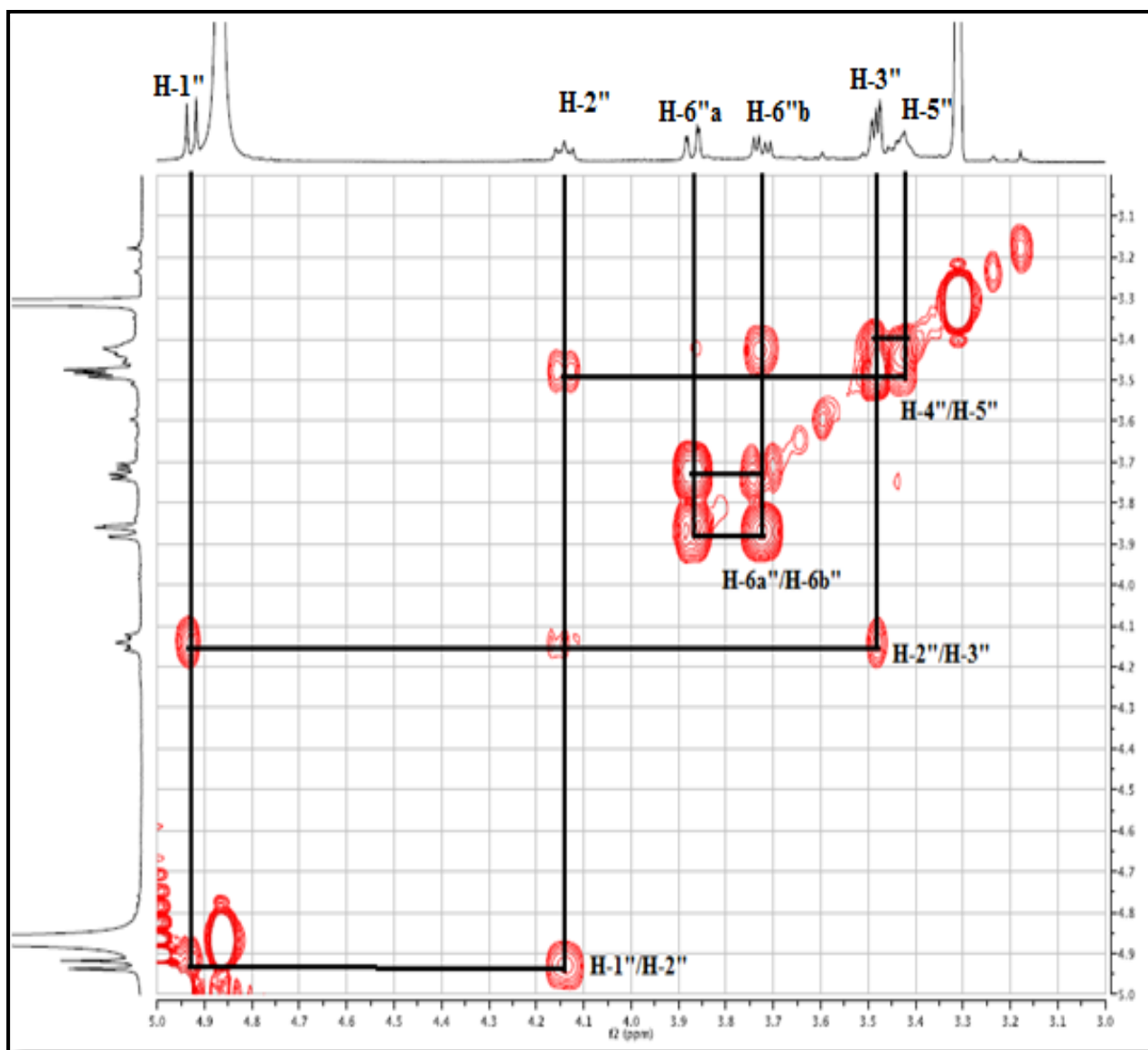


Figure III-113 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé de la partie osidique du composé **Ea12** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

Les déplacements chimiques des protons et carbones des cycles A et C et du sucre ( $\beta$ -D-glucose) sont aisément assignés par analyse des spectres COSY H-H (Figure III-114), HSQC (Figure III-115) et HMBC (Figure III-116) et par la comparaison avec les données spectrales du composé **Ea11** (Tableau III-11) et de la littérature [174].





**Figure III-114:** Spectre COSY H-H de la partie osidique du composé **Ea12**

En effet, l'analyse du spectre COSY H-H (Figure III-114) de ce composé entre 3 et 5 ppm montre un système de spins à sept protons d'un hexose. Commenant par le proton anomérique H-1'' à  $\delta_H$  4,93 (*d*,  $J = 9,9$  Hz) qui couple avec le proton H-2'' à  $\delta_H$  4,14 (*t*,  $J = 9,9$  Hz), ce dernier permet de localiser le proton H-3'' à  $\delta_H$  3,48 sous forme de multiplet qui corrèle à son tour avec le proton H-4'' résonant à  $\delta_H$  3,48 (*m*). La détermination des protons hydroxyméthylènes H-6''a à  $\delta_H$  3,87 (*dd*,  $J = 12,0 ; 2,1$  Hz) et H-6''b à  $\delta_H$  3,72 (*dd*,  $J = 12,0 ; 5,4$  Hz) conduit à la localisation du proton H-5'' à  $\delta_H$  3,43 (*m*). Les grandes taches de corrélation observées sur la carte COSY et les valeurs de constantes de couplage  $J > 7$  Hz indiquent que cet hexose est de type  $\beta$ -D-glucose ( $J_{H-1''/H-2''} = 9,9$  Hz).

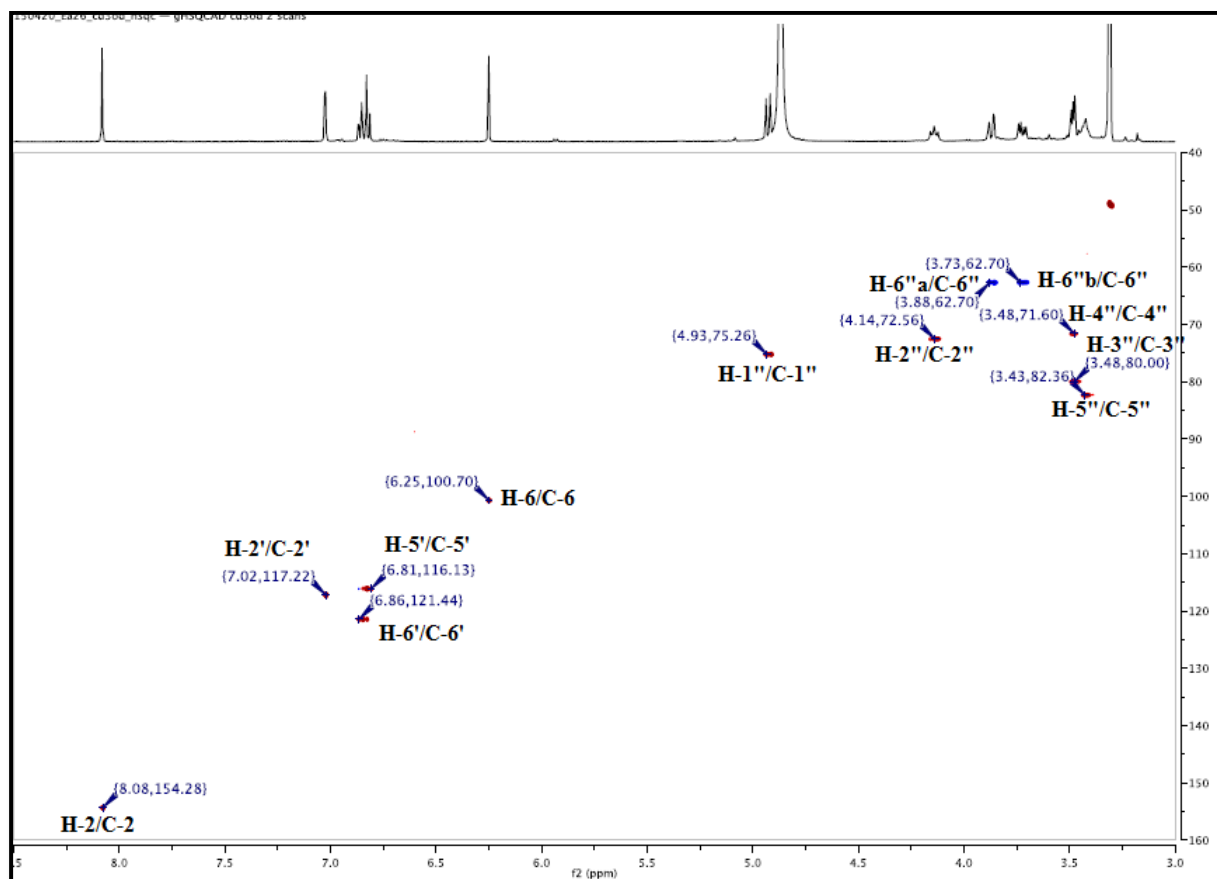


Figure III-115 : Spectre HSQC du composé Ea12

La distinction entre les deux composés **Ea12** et **Ea11** est constatée au niveau du cycle B de l'isoflavone. En effet, l'analyse du spectre COSY (Figure III-116) exhibe un système de spins à trois protons de type ABX à  $\delta_H$  7,02 (*d*,  $J = 2,0$  Hz, H-2'), 6,86 (*dd*,  $J = 8,2$  et  $2,0$  Hz, H-6') et 6,82 (*d*,  $J = 8,2$  Hz, H-5'). Leurs carbones sont déterminés par l'analyse du spectre HSQC (Figure III-115) à  $\delta_C$  117,2, 121,4 et 116,1 respectivement. La différence de la masse moléculaire égale à +16 uma atteste de la substitution du cycle B par deux groupements hydroxyles.

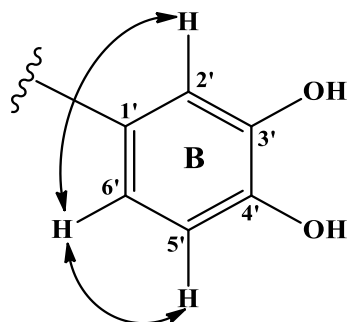


Figure III-116: Couplages COSY H-H au niveau du cycle B du composé Ea12

L'expérience HMBC (Figure III-117) met en évidence les couplages H/C à longue distance en  $^2J$  et  $^3J$  entre :

- Le proton H-6' et les carbones repérés à  $\delta_C$  117,1 (C-2') et 146,6 (C-4').
- Le proton H-5' et les carbones détectés à  $\delta_C$  123,6 (C-1') et 146,0 (C-3').
- Le proton H-2' et les carbones résonant à  $\delta_C$  124,2 (C-3), 121,4 (C-6') et C-4'.
- Le proton H-2 et les carbones C-4 ( $\delta_C$  182,1), C-9 ( $\delta_C$  158,0) et C-3.
- Le proton H-6 et les carbones C-7 ( $\delta_C$  166,4), C-5 ( $\delta_C$  163,1), C-8 ( $\delta_C$  104,4) et C-10 ( $\delta_C$  105,7).

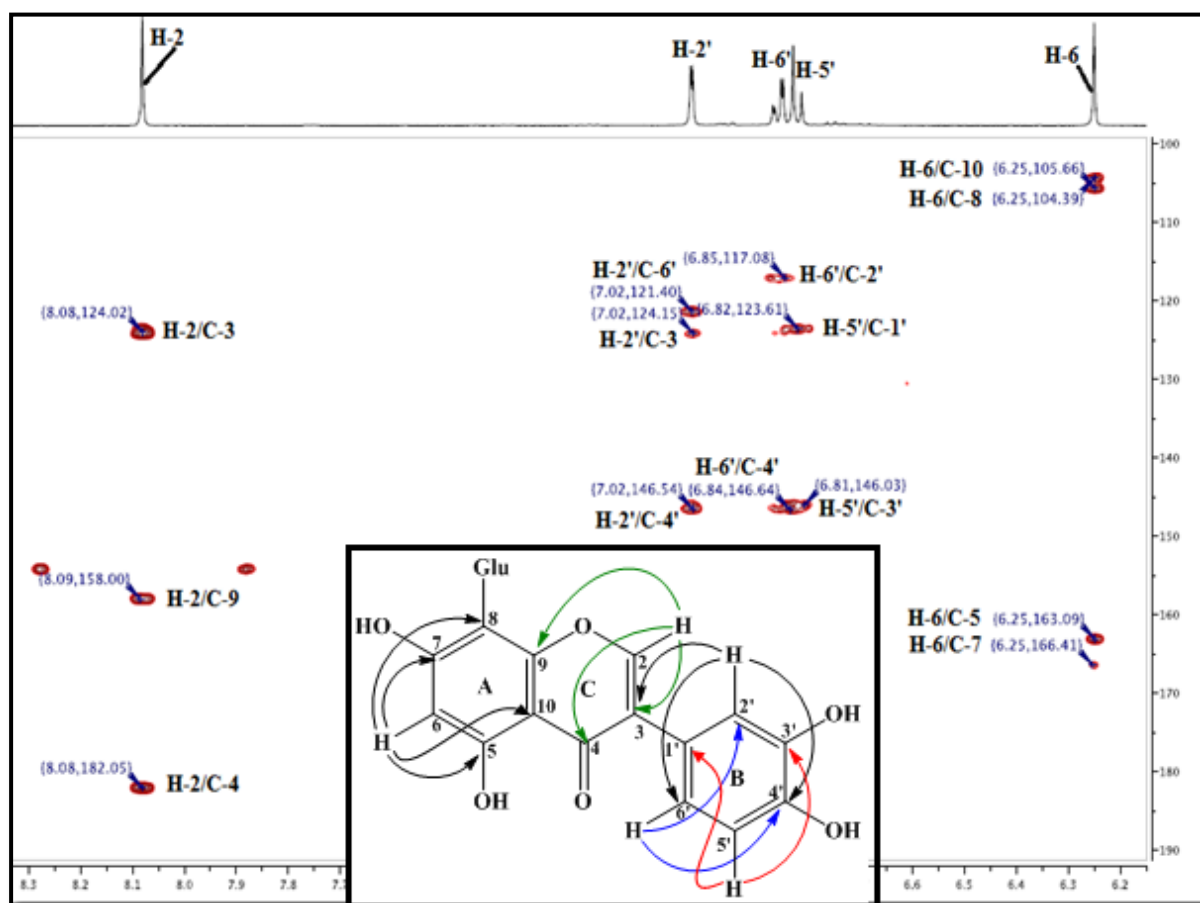


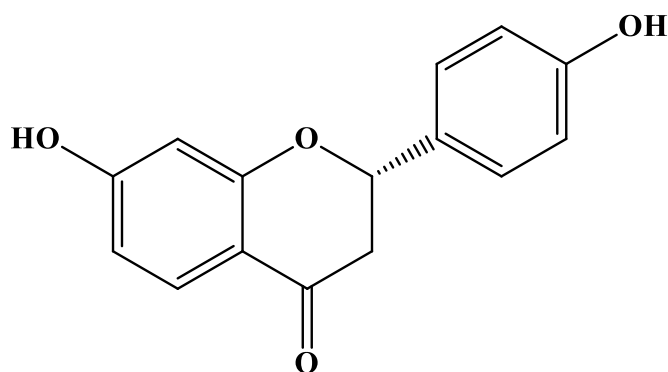
Figure III-117: Partie du spectre HMBC du composé **Ea12**

Toutes les données spectroscopiques représentées dans le tableau III-12 comparées à celles de la littérature [174], permettent de caractériser ce composé à l'orobol-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (**Ea12**), isolé antérieurement des espèces : *Genista aspalathoide* [175] et *Genista compacta* [176] de la tribu Genisteeae. Ce composé possède une activité immunomodulatrice [177]. Il est à noter que l'orobol-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside a été isolé pour la première fois dans le genre *Erinacea*.

**Tableau III-12:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **Ea12** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
2	8,08	-	<i>s</i>	154,3
3	-	-	-	124,2
4	-	-	-	182,1
5	-	-	-	163,1
6	6,25	-	<i>s</i>	100,7
7	-	-	-	166,4
8	-	-	-	104,4
9	-	-	-	158,0
10	-	-	-	105,7
1'	-	-	-	123,6
2'	7,02	2,0	<i>d</i>	117,1
3'	-	-	-	146,0
4'	-	-	-	146,6
5'	6,82	8,2	<i>d</i>	116,1
6'	6,86	8,2 ; 2,0	<i>dd</i>	121,4
1''	4,93	9,9	<i>d</i>	75,3
2''	4,14	8,7	<i>t</i>	72,6
3''	3,48	-	<i>m</i>	80,0
4''	3,48	-	<i>m</i>	71,6
5''	3,43	-	<i>m</i>	82,4
6''a	3,87	(12,0 ; 2,1)	<i>dd</i>	62,7
6''b	3,72	(12,0 ; 5,4)	<i>dd</i>	

## III-1-3-13-Identification structurale du composé Ea13



(2S)-Liquiritigenine

Le composé **Ea13** est obtenu sous forme d'une poudre jaune soluble dans l'acétone. Sa CCM révèle l'existence d'une tache visible à 254 nm se colorant en jaune à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. L'exposition de sa CCM aux vapeurs d'ammoniac laisse apparaître une tache jaune, ceci nous oriente vers un composé de nature flavonoïdique.

Les spectres de masse HR-ESI-MS du composé **Ea13** enregistrés en modes négatif (Figure III-118) et positif (Figure III-119) montrent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 255,0624$   $[M-H]^-$  (calc.  $C_{15}H_{11}O_4$ , 255,0657) et  $257,0779$   $[M+H]^+$  (calc.  $C_{15}H_{13}O_4$ , 257,0814), ceci correspond à une masse moléculaire de 256 uma et une formule brute en  $C_{15}H_{12}O_4$  impliquant 10 degrés d'insaturation.

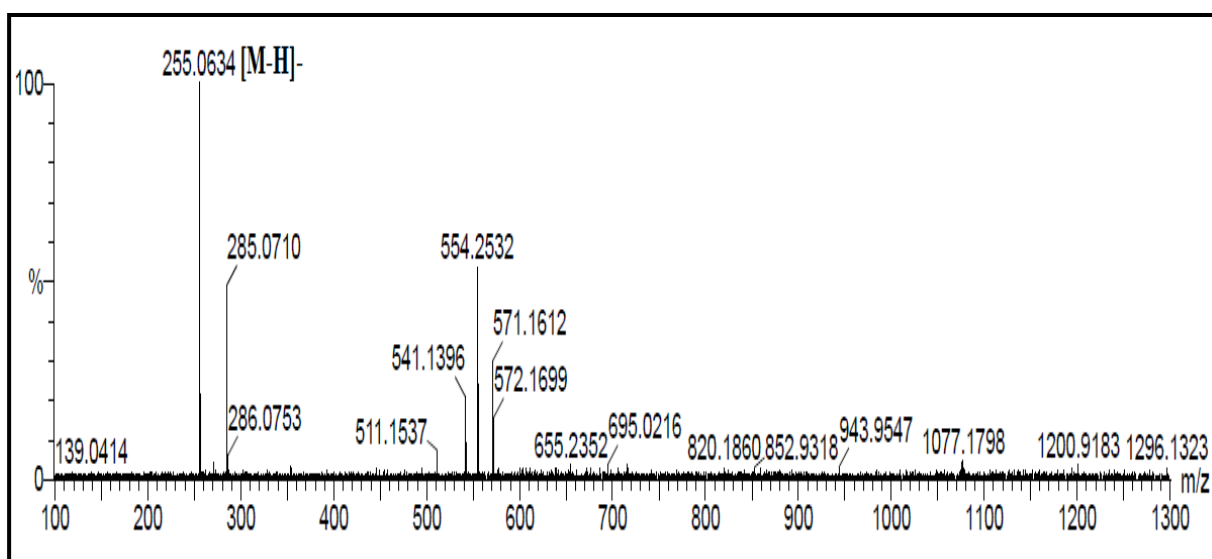


Figure III-118: Spectre de masse HR-ESI-MS (mode négatif) du composé Ea13

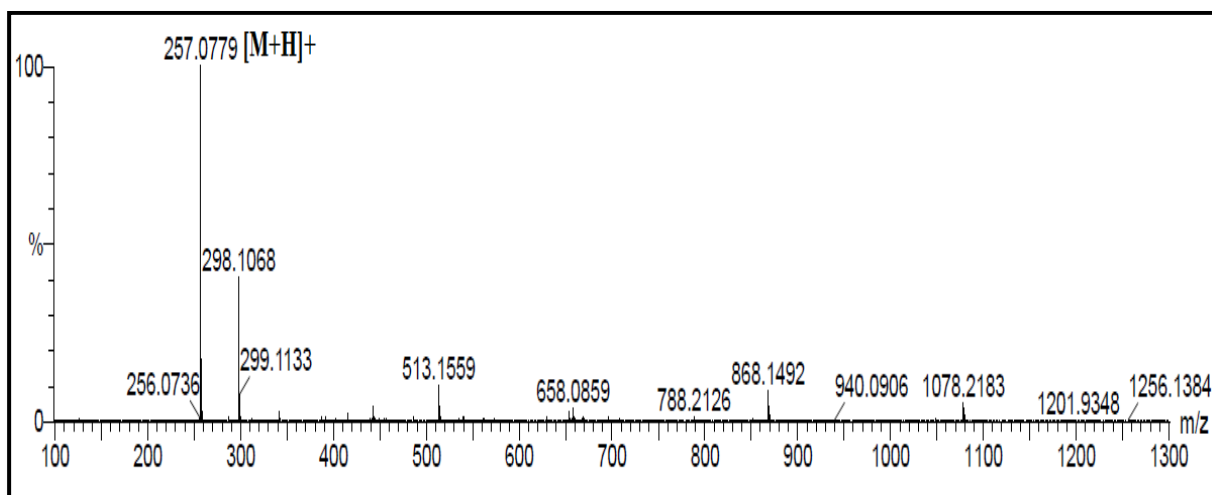


Figure III-119: Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea13**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-120) de ce composé exhibe, en plus des signaux de protons aromatiques, la présence de protons aliphatiques entre 2,50 et 5,50 ppm. Il est très important de signaler l'absence du signal de proton H-2 caractéristique des isoflavonoïdes en comparaison avec les spectres RMN  $^1\text{H}$  des composés **Ea1** à **Ea12** caractérisés précédemment, excluant par conséquent la nature isoflavonoïdique pour ce composé. L'allure des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-120) et RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure III-121) nous oriente, à priori, vers un squelette flavonoïdique.

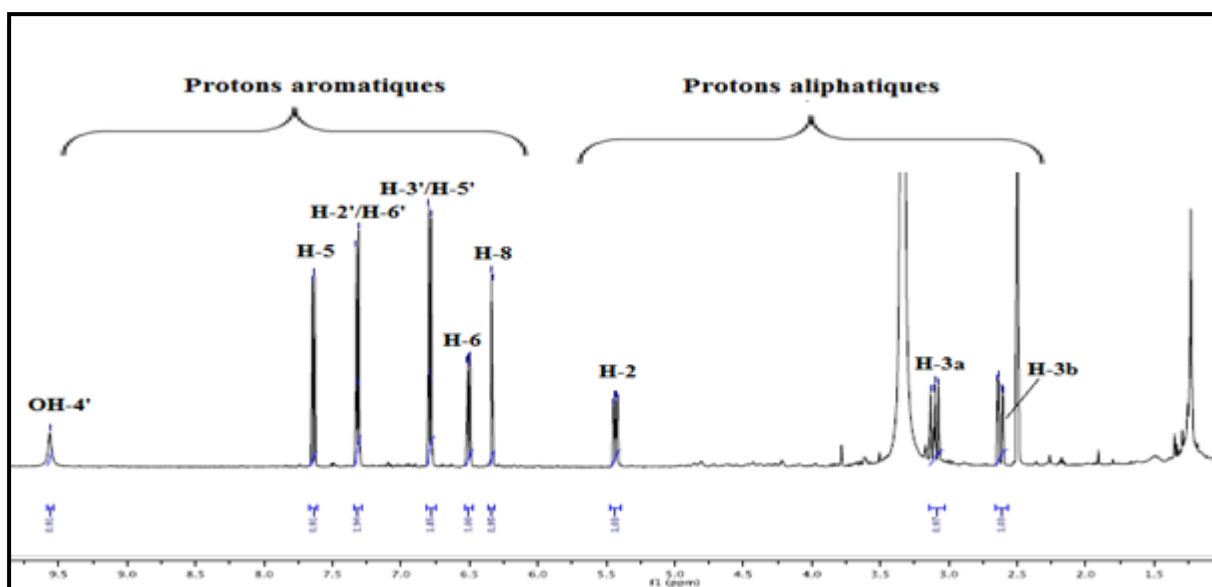


Figure III-120 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea13** ( $\text{DMSO}-d_6$ )

En effet, le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé (Figure III-121) indique l'existence de 15 atomes de carbone se répartissant en sept groupements CH, un groupement oxyméthine, trois carbones quaternaires, deux carbones quaternaires oxygénés, un groupement  $\text{CH}_2$  et un

carbone du carbonyle ( $\delta_c$  190,1) suggérant ainsi la présence d'un flavonoïde de type flavanone [178, 179].

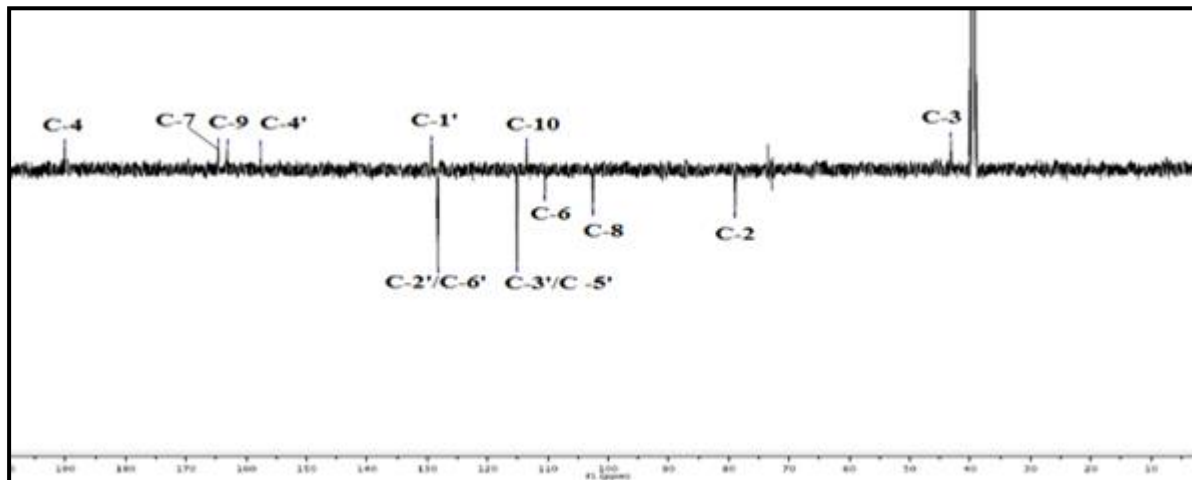


Figure III-121 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé **Ea13**

Le spectre COSY de ce composé montre la présence d'un système de spins à trois protons de type ABX à  $\delta_H$  7,64 ( $d$ ,  $J = 8,2$  Hz), 6,50 ( $dd$ ,  $J = 8,6$  et  $2,2$  Hz) et 6,34 ( $d$ ,  $J = 2,2$  Hz), attribuable aux protons H-5, H-6 et H-8 respectivement, comme il a été démontré précédemment lors de l'analyse structurale du composé **Ea9**. Un autre système de spins à quatre protons de type  $A_2X_2$  est observé entre les protons résonant à  $\delta_H$  7,32 (2H,  $d$ ,  $J = 8,6$  Hz) et 6,79 (2H,  $d$ ,  $J = 8,6$  Hz), correspondant aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' du cycle B para-disubstitué (Figure III-122).

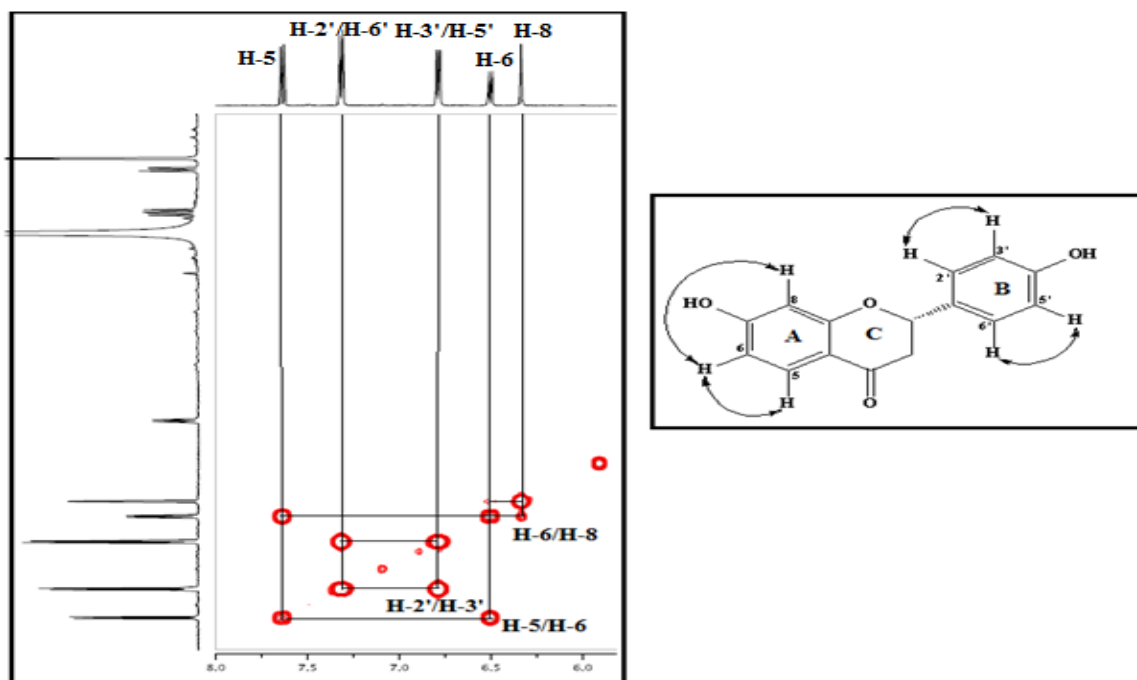


Figure III-122 : Partie du spectre COSY H-H du composé **Ea13**

L'analyse du spectre HSQC du composé **Ea13** permet de déterminer les déplacements chimiques des protons cités précédemment à  $\delta_C$  128,4 (C-5), 110,5 (C-6), 102,6 (C-8), 128,2 (C-2'/C-6') et 115,1 (C-3'/C-5'). Les valeurs de déplacement chimique des carbones restant des cycles A et B sont identifiés par analyse du spectre HMBC (Figure III-123), qui exhibe des corrélations entre:

- Le proton H-5 et les carbones C-4 ( $\delta_C$  190,1), C-7 ( $\delta_C$  164,6) et C-9 ( $\delta_C$  163,1).
- Le proton H-6 et les carbones C-8 et C-10 ( $\delta_C$  114,5).
- Le proton H-8 et les carbones C-10, C-6, C-9 et C-7
- Les protons équivalents H-2' et H-6' et les carbones C-2 ( $\delta_C$  78,9) et C-4' ( $\delta_C$  157,6).
- Les protons équivalents H-3' et H-5' et les carbones C-1' ( $\delta_C$  129,3) et C-4'.

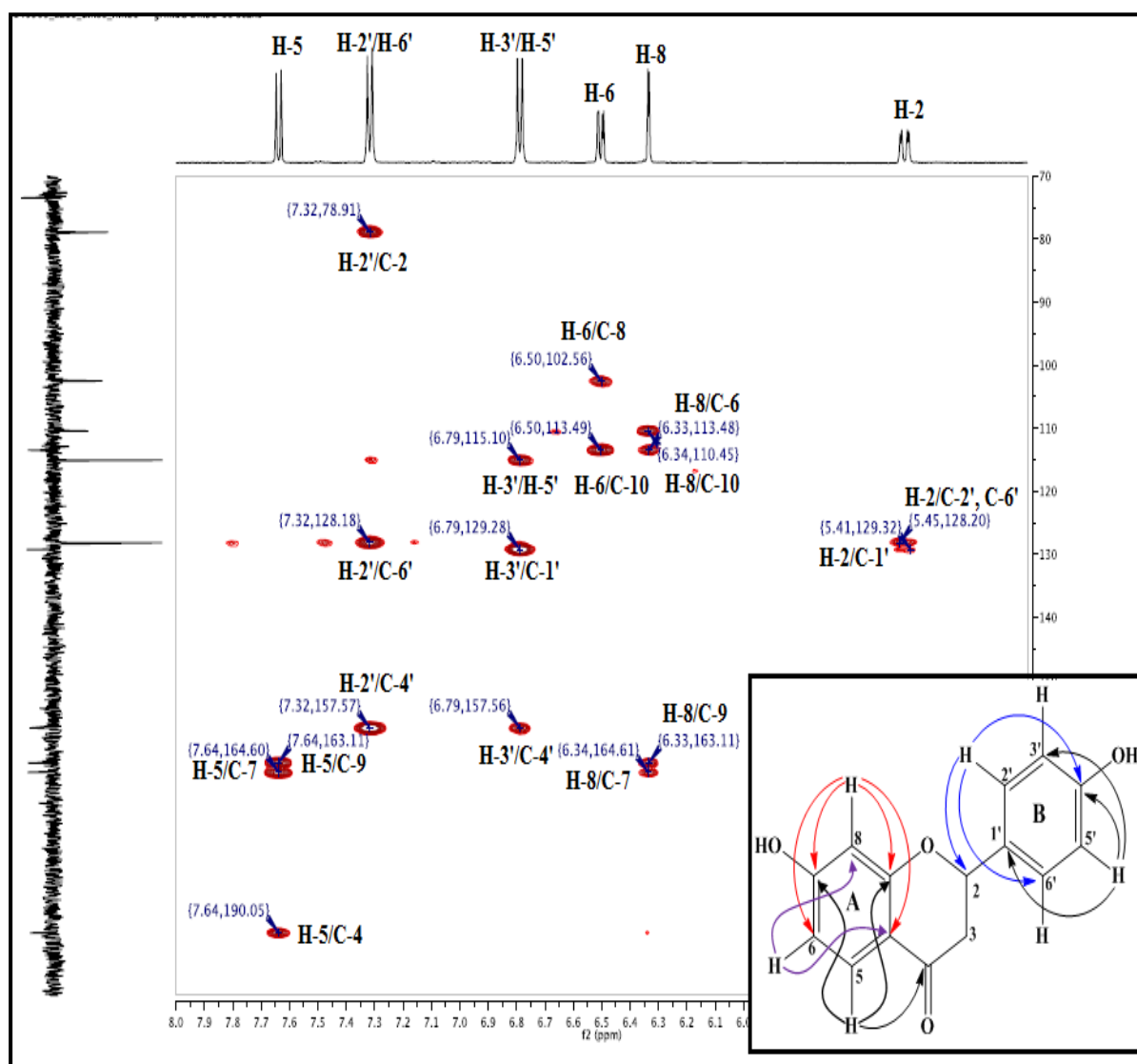
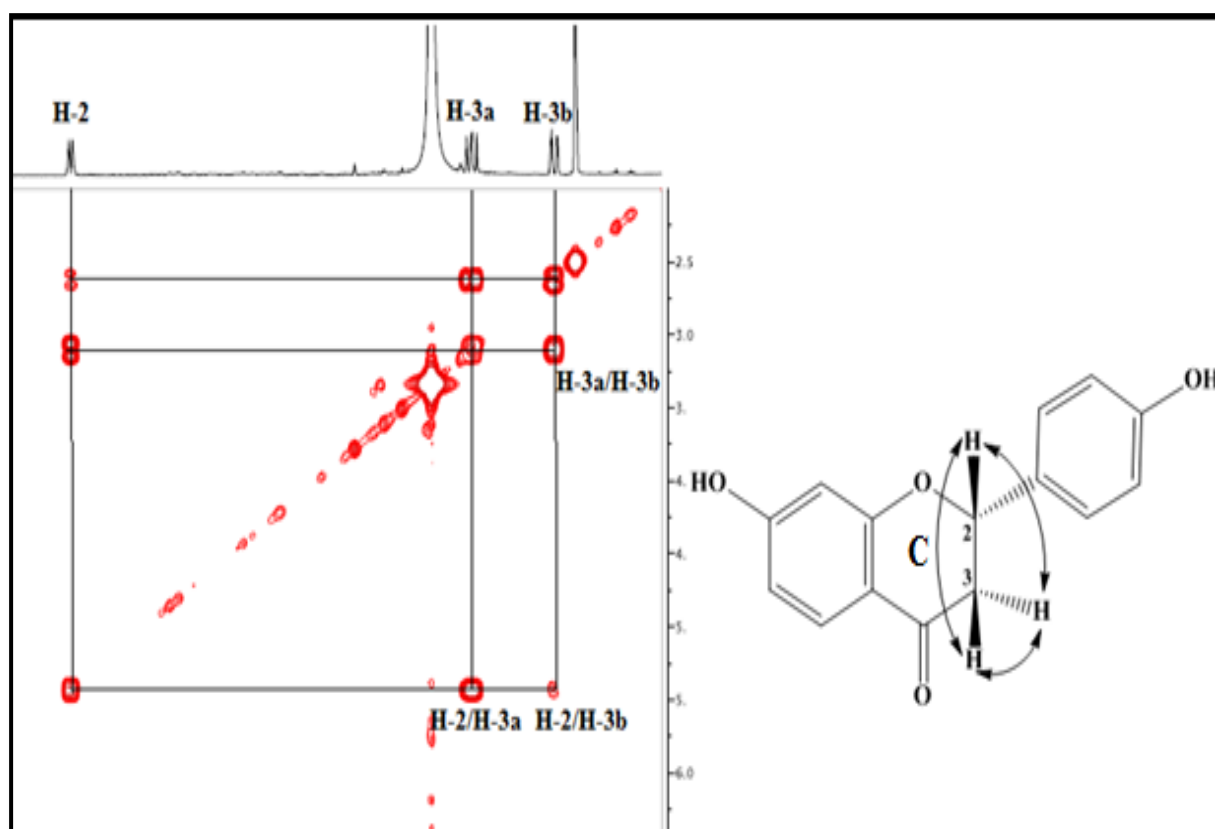


Figure III-123 : Spectre HMBC des cycles A et B du composé **Ea13**



A ce stade d'interprétation tous les protons et carbones des cycles A et B sont déterminés, il reste à trouver les déplacements chimiques des protons et carbones du cycle C.

Le spectre COSY H-H du composé **Ea13** montre, en plus des systèmes de spins observés entre les protons H-5/H-6/H-8 et H-2', H-6'/H-3', H-5', un autre système de spins à trois protons qui visualise les couplages entre un proton résonnant à  $\delta_H$  5,43 (*dd*,  $J = 12,8 ; 2,9$  Hz) caractéristique du proton H-2 d'une flavanone et deux autres protons géminés résonnant à  $\delta_H$  3,10 (*dd*,  $J = 16,8 ; 12,9$  Hz) et 2,62 (*dd*,  $J = 16,8 ; 12,9$  Hz) correspondant aux protons H-3a et H-3b respectivement (Figure III-24). Leurs carbones sont assignés par l'expérience HSQC à  $\delta_C$  78,9 (C-2) et 43,2 (C-3) [179-181].



**Figure III-124** : Partie du spectre COSY H-H des protons aliphatiques du cycle C

Le spectre HMBC de ce composé montre des corrélations entre le proton H-3a et les carbones C-2, C-1' et C-4. En plus, le proton oxyméthine H-2 présente des couplages avec les carbones C-1', C-2' et C-6' (Figure III-125).

A ce niveau d'analyse tous les protons et carbones du composé **Ea13** sont attribués.

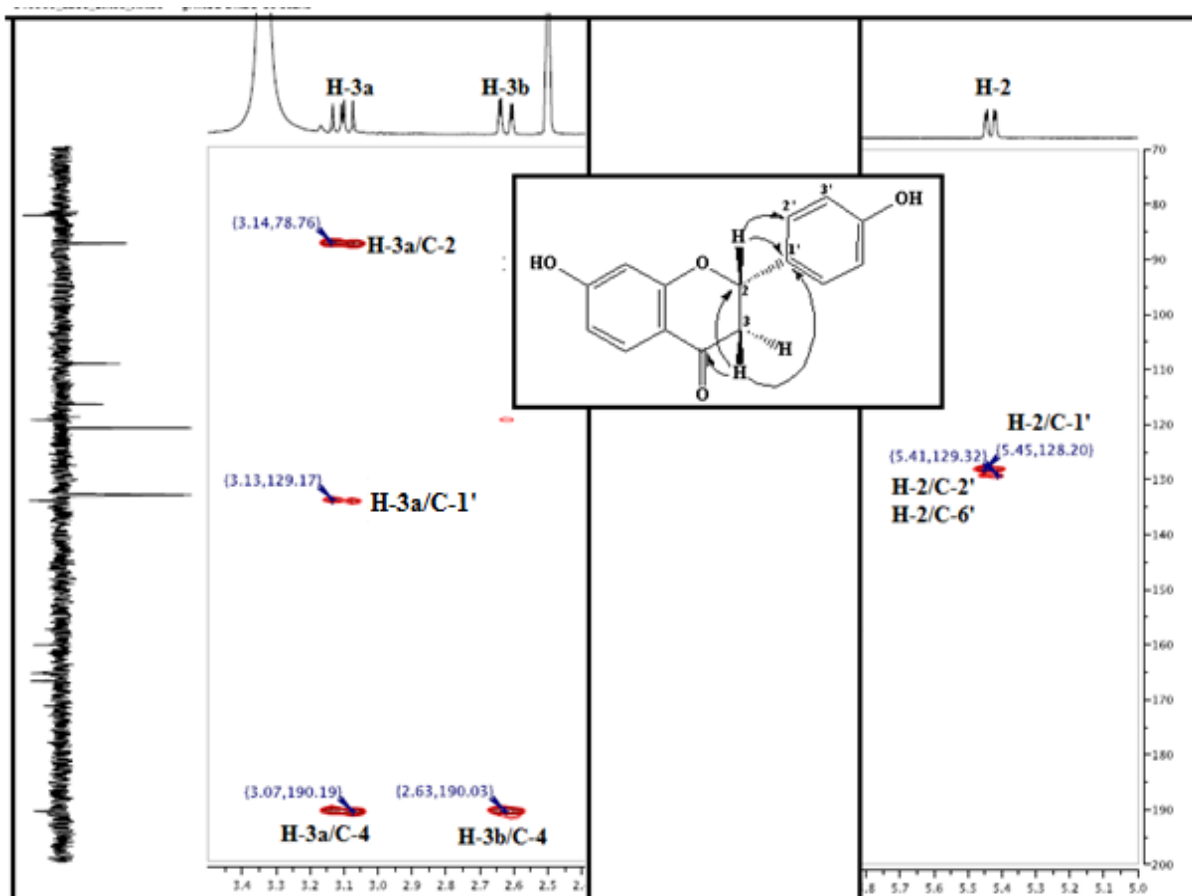


Figure III-125 : Corrélations HMBC des protons du cycle C

La détermination de la configuration absolue du carbone chiral C-2 de ce composé est basée sur des considérations de biogénèse [182] et les valeurs des constantes de couplage entre le proton H-2 et les protons méthyléniques H-3a, H-3b ( $J_{H-2ax-H-3a-ax} = 12,9$  et  $J_{H-2ax-H-3b-eq} = 2,9$  Hz) qui sont similaires à celles des composés analogues reportés dans la littérature [181, 183], confirmant ainsi la configuration *S* du carbone C-2 (Figure III-126).

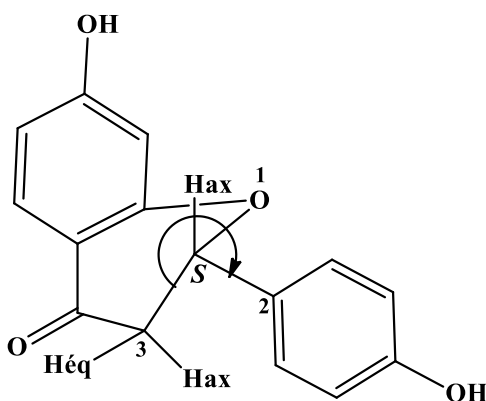


Figure III-126 : Configuration *S* du carbone chiral C-2

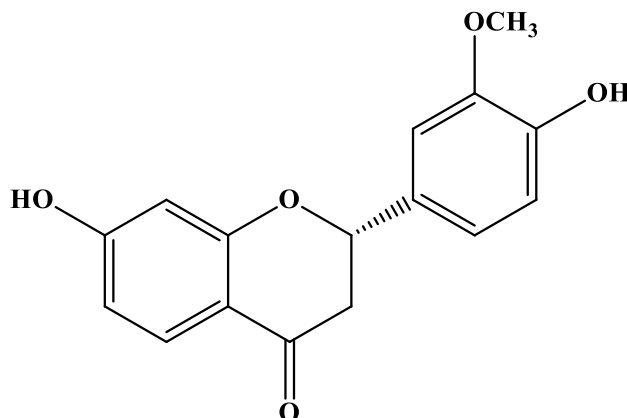
L'ensemble de ces données spectroscopiques et la comparaison avec celles de la littérature [181] permettent d'attribuer pour le composé **Ea13** la structure : (2*S*)-Liquiritigénine. Ce composé a été antérieurement isolé à partir des espèces *Puerariae lobata* et *Glycyrrhiza uralensis* [184] et *Vicia sativa* [185] de la famille Fabaceae. Par ailleurs, il est identifié pour la première fois dans le genre *Erinacea*.

La liquiritigénine est connue pour ses activités biologiques intéressantes telles que : estrogénique [186], hépatoprotectrice [187], antioxydante [188], anti-inflammatoire [189] et anti-diabétique [190]. Ce composé peut exercer des effets cytoprotecteurs contre la toxicité induite par les métaux lourds *in vitro* [191] et il peut être utilisé comme de nouveaux traitements contre la douleur neuropathique [192].

**Tableau III-13** : Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) du composé **Ea13** dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Position	δ <sub>H</sub>	<i>J</i> (Hz)	Multiplicité	δ <sub>C</sub>
2	5,43	(12,8 ; 2,9)	<i>dd</i>	78,9
3a	3,10	(16,8 ; 12,9)	<i>dd</i>	43,2
3b	2,62	(12,8 ; 2,9)	<i>dd</i>	
4	-	-	-	190,1
5	7,64	8,6	<i>d</i>	124,4
6	6,50	(8,6 ; 2,2)	<i>s</i>	110,5
7	-	-	-	164,6
8	6,34	2,2	<i>d</i>	102,6
9	-	-	-	163,1
10	-	-	-	113,5
1'	-	-	-	129,3
2'	7,32	8,6	<i>d</i>	128,2
3'	6,79	8,6	<i>d</i>	115,1
4'	-	-	-	157,7
5'	6,79	8,6	<i>d</i>	115,1
6'	7,32	8,6	<i>d</i>	128,2
OH-4'	9,56	-	<i>s</i>	-

## III-1-3-14-Identification structurale du composé Ea14



7,4'-dihydroxy-3'-méthoxyflavanone

Ce composé est purifié sous forme d'une poudre jaune amorphe, soluble dans l'acétone. Il est visible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en jaune après révélation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. L'exposition de sa CCM aux vapeurs d'ammoniac (NH<sub>3</sub>) donne une tache jaune en faveur d'une structure flavonique pour ce composé.

Les spectres de masse HR-ESI-MS du composé **Ea14** obtenus en modes négatif (Figure III-127) et positif (Figure III-128) présentent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 285,0739$  [M-H]<sup>-</sup> (calc. C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub>, 285,0763) et 287,0907 [M+H]<sup>+</sup> (calc. C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub>, 287,0893), ceci correspond à une masse moléculaire égale à 286 uma et une formule brute en C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>, soit une différence de + 30 uma par rapport au composé précédent **Ea13**.

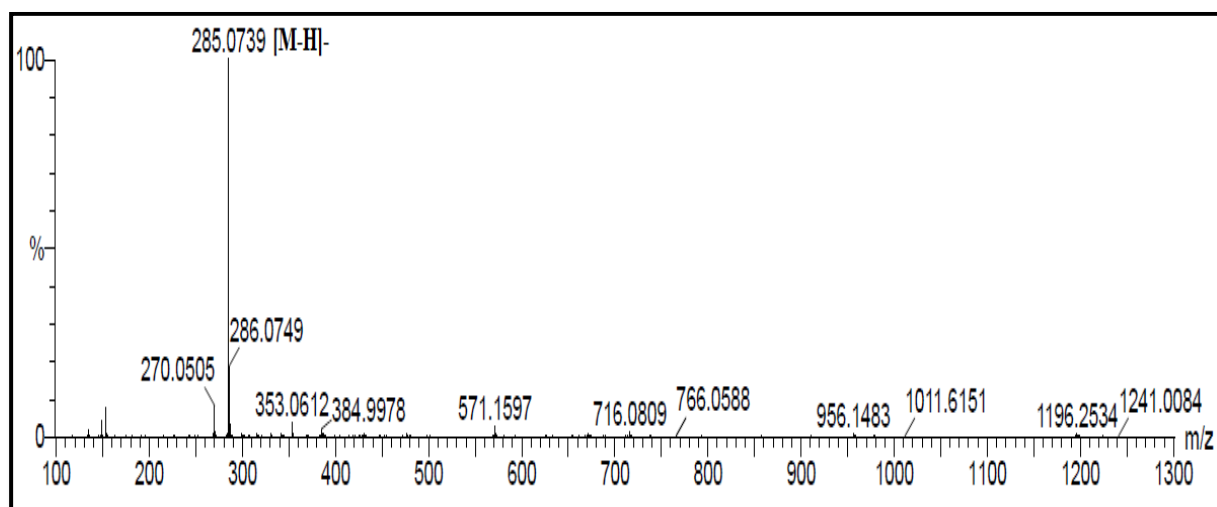


Figure III-127: Spectre de masse HR-ESI-MS (mode négatif) du composé Ea14

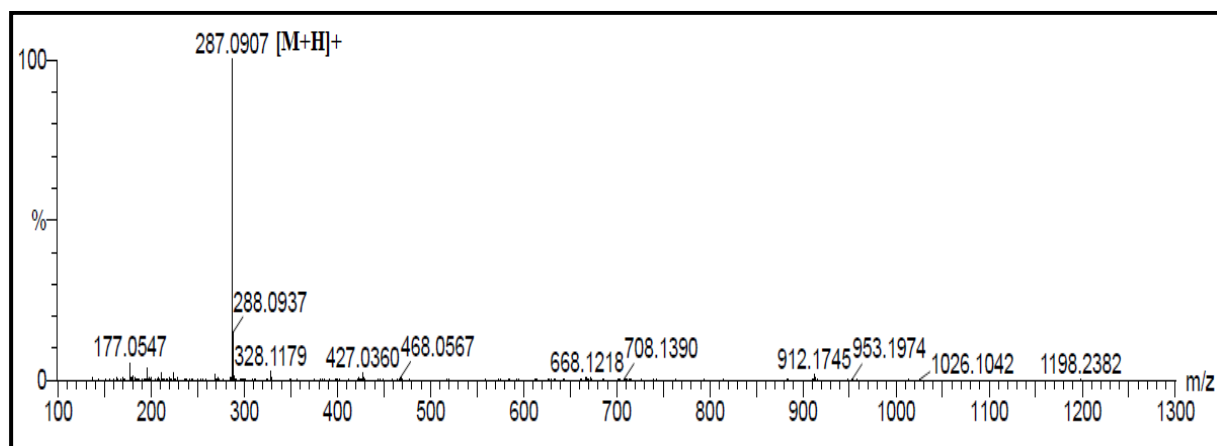


Figure III-128: Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea14**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea14** (Figure III-129) est presque identique à celui du composé précédent **Ea13** (Figure III-130) au niveau des cycles A et C.

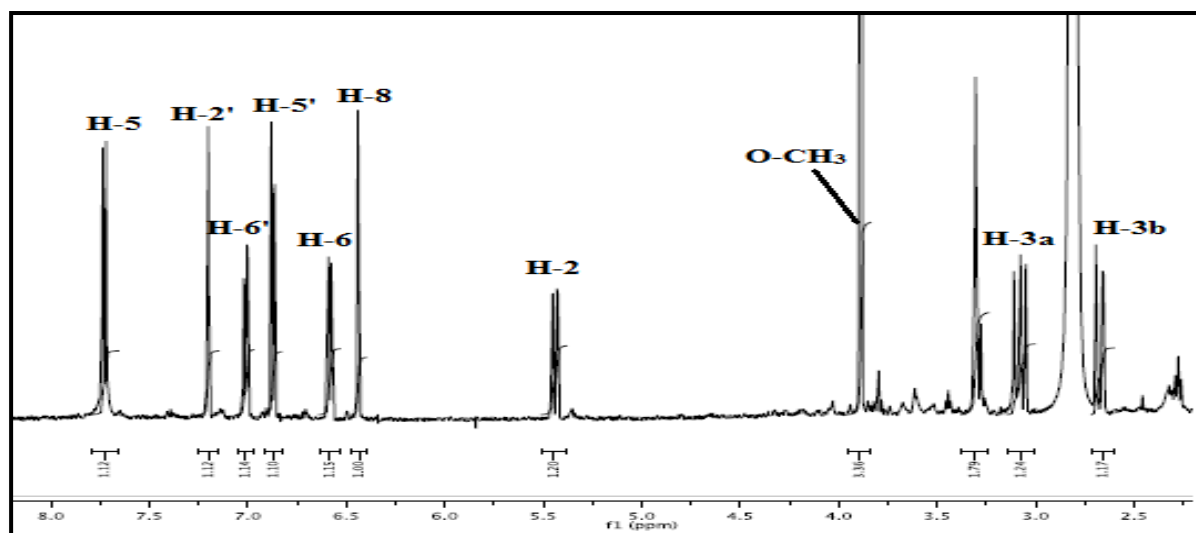


Figure III-129: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea14** (Acétone- $d_6$ )

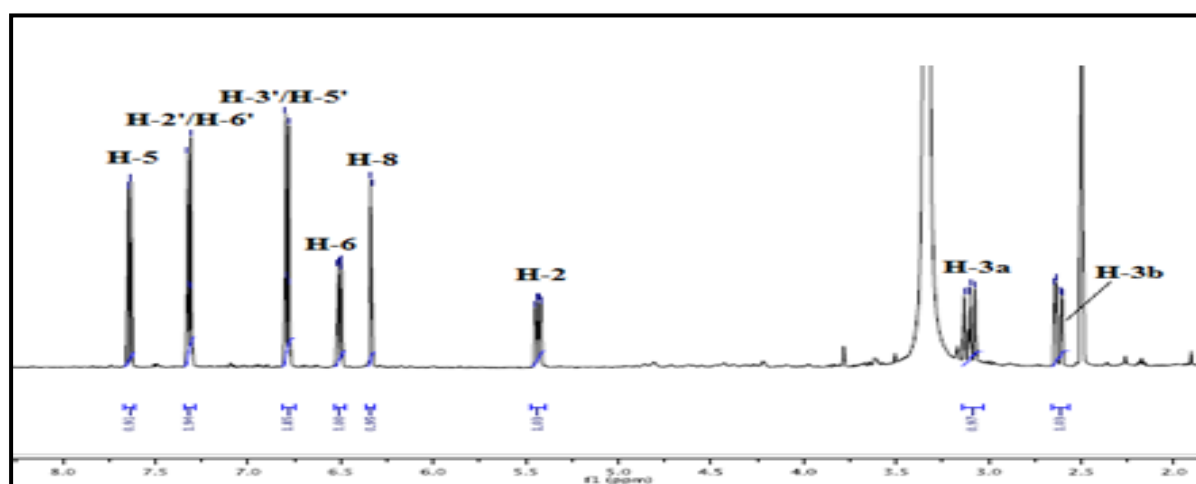


Figure III-130 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea13** (DMSO- $d_6$ )

La différence entre ces deux produits réside principalement dans l'apparition sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea14** d'un signal de groupement méthoxyle à 3,89 ppm et de signaux de trois protons aromatiques qui appartiennent à un même système de spins selon le spectre COSY H-H (Figure III-131), indiquant la présence d'un cycle B de type 1',3',4'-trissubstitué suite aux multiplicités des protons et valeurs des constantes de couplage. En effet, le signal sortant à  $\delta_{\text{H}}$  7,20 (*d*,  $J = 2,0$  Hz) est attribué au proton H-2'. Le signal résonant à  $\delta_{\text{H}}$  7,01 (*dd*,  $J = 8,1 ; 2,1$  Hz) correspond au proton H-6' et par conséquent le proton H-5' est apparu à  $\delta_{\text{H}}$  6,87 (*d*,  $J = 8,1$  Hz).

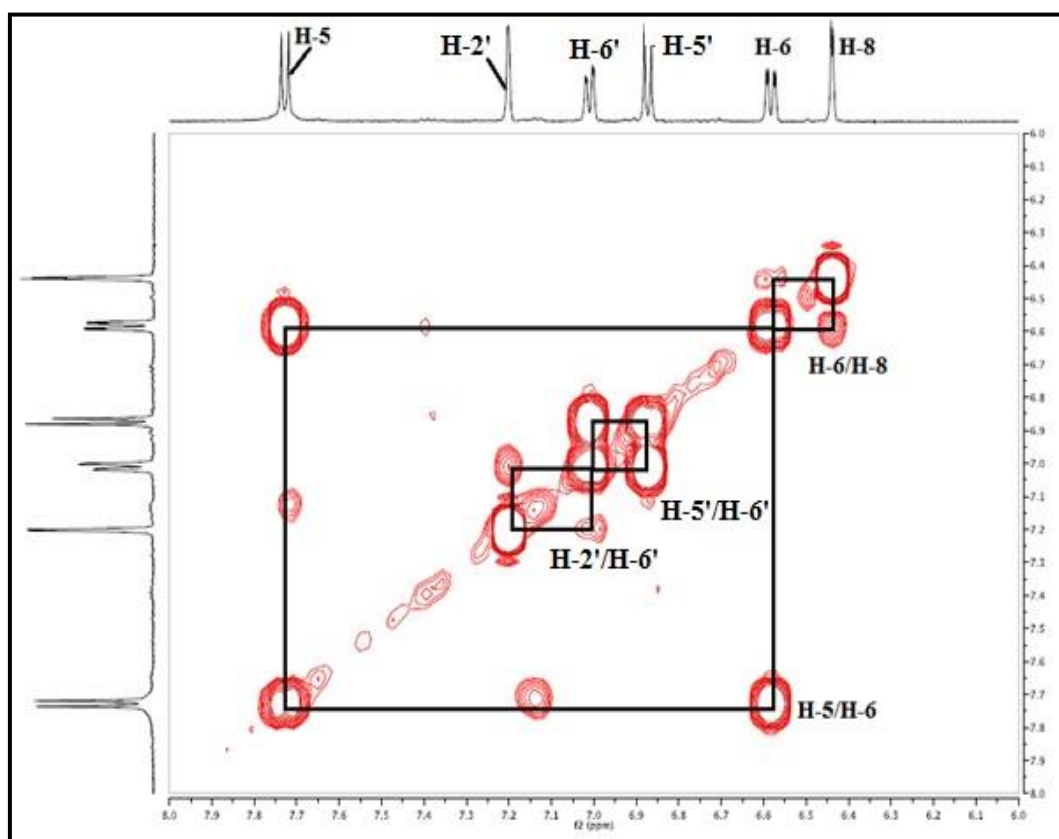


Figure III-131 : Partie du spectre COSY H-H du composé **Ea14**

Par ailleurs, le spectre RMN  $^1\text{H}$  de ce composé montre aussi la présence des protons H-5, H-6 et H-8 du cycle A à  $\delta_{\text{H}}$  7,73 (*d*,  $J = 8,6$  Hz), 6,58 (*dd*,  $J = 8,6 ; 2,3$  Hz) et 6,44 (*d*,  $J = 2,3$  Hz) respectivement et les protons H-2, H-3a et H-3b du cycle C d'une flavanone à  $\delta_{\text{H}}$  5,44 (*dd*,  $J = 13,1 ; 2,9$  Hz), 3,08 (*dd*,  $J = 16,8 ; 13,1$  Hz) et 2,68 (*dd*,  $J = 16,7 ; 2,8$  Hz) respectivement. En outre, l'expérience HSQC de ce composé conduit à la détermination de leurs carbones à  $\delta_{\text{C}}$  129,17 (C-5), 110,9 (C-6), 103,4 (C-8), 80,5 (C-2), 44,5 (C-3), 110,8 (C-2'), 115,3 (C-5'), 120,1 (C-6') et 56,0 (O-CH<sub>3</sub>) (Figure III-132).

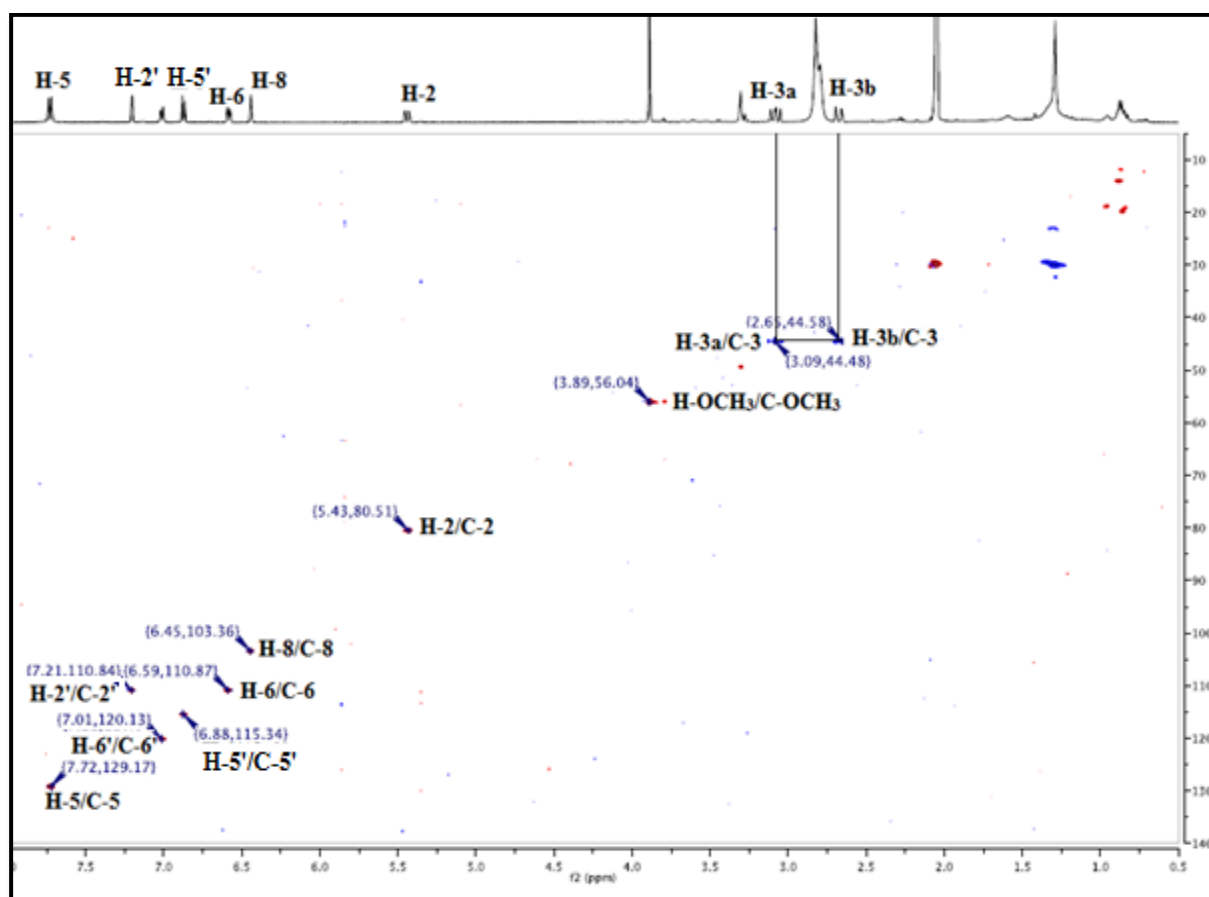


Figure III-132 : Spectre HSQC  $J$ -modulé du composé **Ea14**

Les autres carbones sont détectés par analyse du spectre HMBC qui exhibe les corrélations longue distance en  $^2J$  et  $^3J$  entre le proton H-5 du cycle A et les carbones à  $\delta_C$  190,1 (C-4) et 164,4 (C-7), et le proton H-6 et les carbones C-8 et C-10 à  $\delta_C$  114,9. En plus, le proton H-8 couple en HMBC avec les carbones C-9 à  $\delta_C$  164,3, C-6 et C-10. Toutefois, les protons du cycle C présentent des corrélations entre le proton H-3a et les carbones C-4 et C-2 et le proton H-3b et le carbone C-4 (Figure III-133).

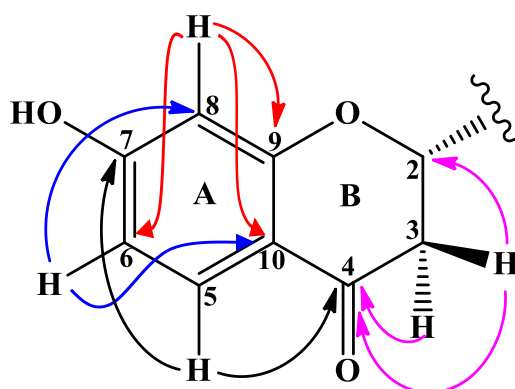


Figure III-133 : Corrélations HMBC au niveau des cycles A et B du composé **Ea14**

Les protons H-2' et H-6' du cycle B montrent des couplages HMBC en  $^3J$  avec les carbones C-6', C-2' déjà identifiés et C-2 à  $\delta_C$  80,5 et un carbone aromatique oxygéné C-4' à  $\delta_C$  147,5. Par contre, le proton H-5' présente des corrélations avec les carbones C-1' à  $\delta_C$  131,4 et C-3' à  $\delta_C$  148,0 (Figure III-134). La tache de corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton du groupement méthoxyle résonant à 3,89 ppm et le carbone à  $\delta_C$  148,0 permet de positionner ce groupement sur le carbone C-3' du cycle B (Figure III-135).

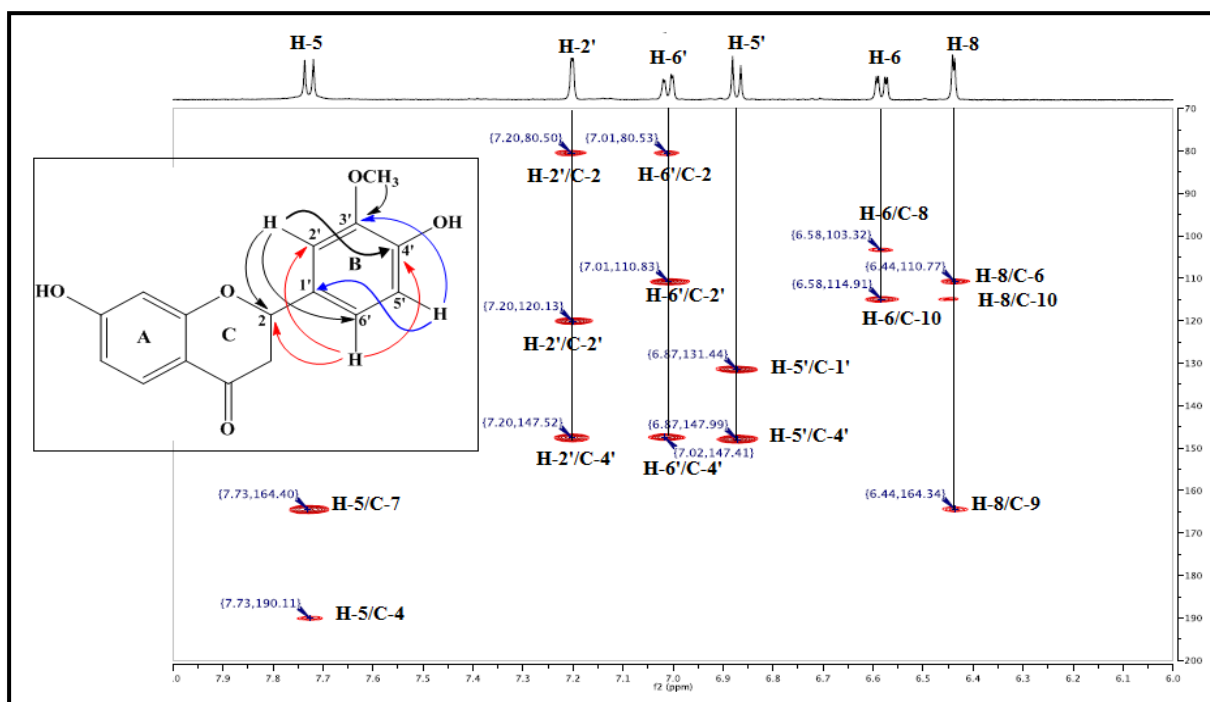


Figure III-134 : Spectre HMBC montrant des corrélations du cycle B du composé **Ea14**

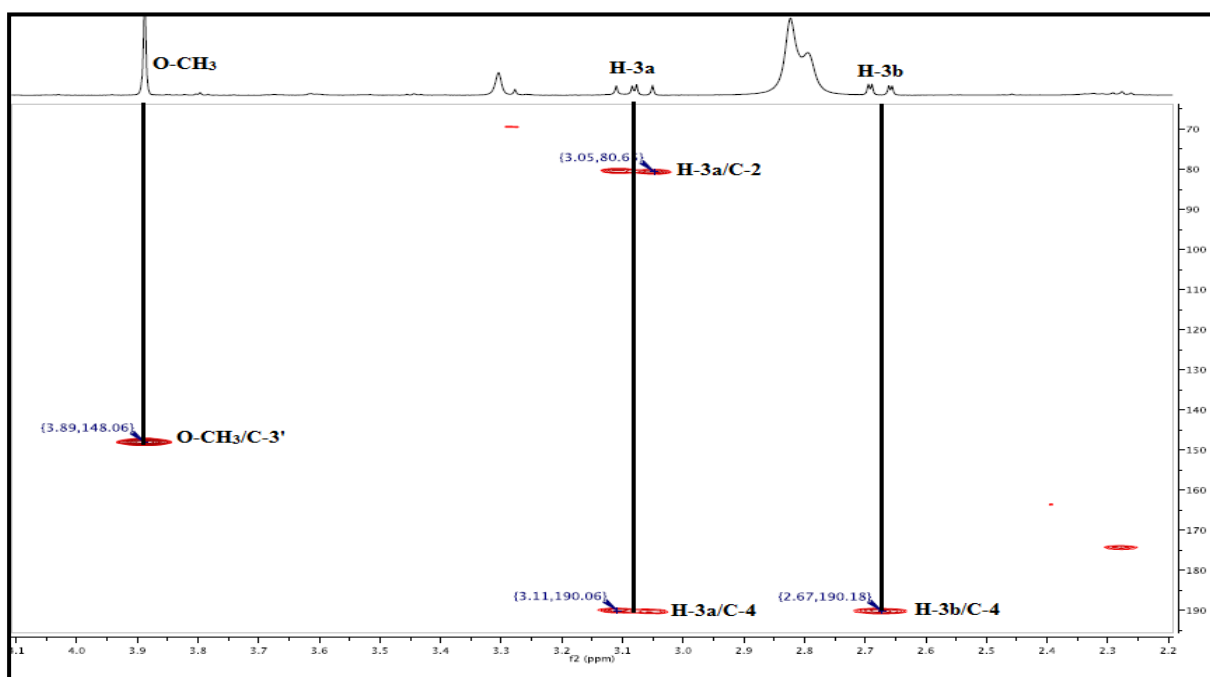


Figure III-135 : Partie du spectre HMBC du composé **Ea14**



A ce niveau d'analyse tous les protons et carbones des cycles A, B et C sont assignés, il est à noter que la stéréochimie du carbone asymétrique C-2 est *S* pour des considérations de biogénèses [182].

Le spectre NOESY de ce composé révèle des effets NOE entre les protons: H-2'/H-3a, H-2'/O-CH<sub>3</sub>, H-2'/H-2, H-6'/H-2, H-5'/H-6', H-2/H-3b et H-5/H-6 (Figure III-136).

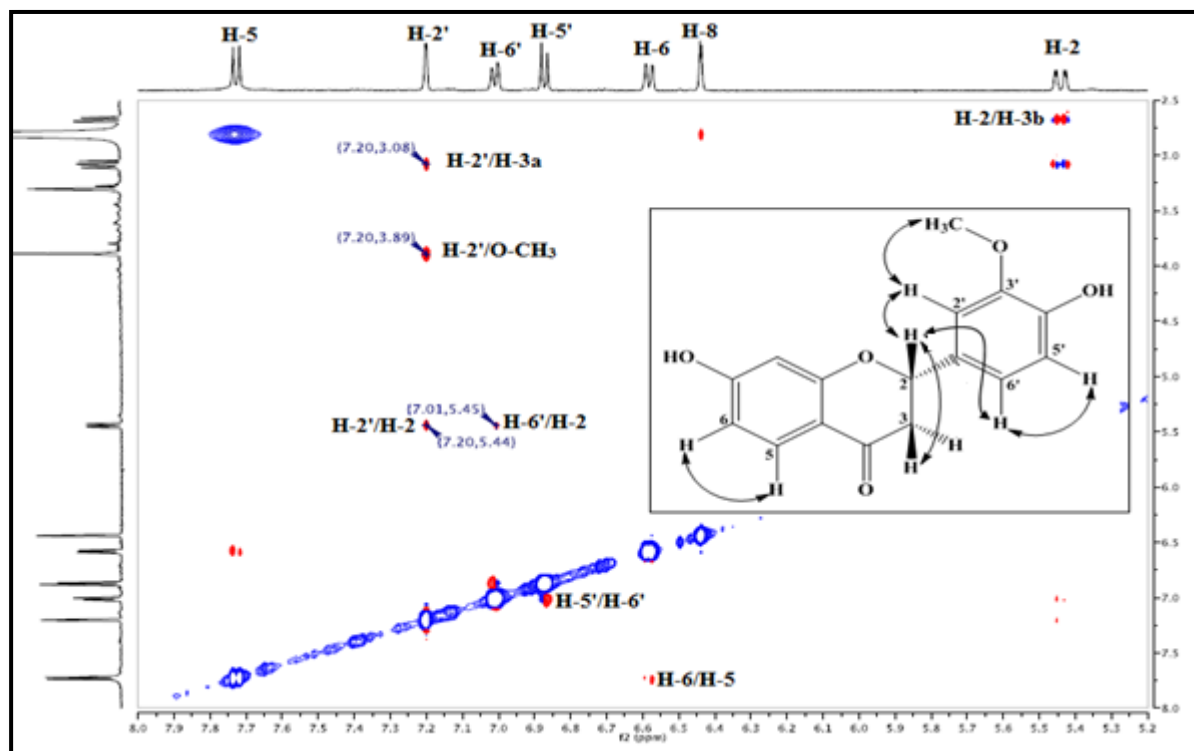


Figure III-136: Spectre NOESY du composé Ea14

La configuration absolue du carbone C-2 (*S*) de ce composé est confortée par les valeurs des constantes de couplage, comme il a été prouvé précédemment dans le cas du composé Ea13. En effet, le couplage entre le proton H-2 et les protons méthyléniques H-3a, H-3b indiquent des constantes de couplage à ( $J_{ax-ax} = 13,1$  et  $J_{ax-eq} = 2,9$  Hz) [181-183], en accord avec une configuration *S* du carbone asymétrique C-2 (Figure III-137).

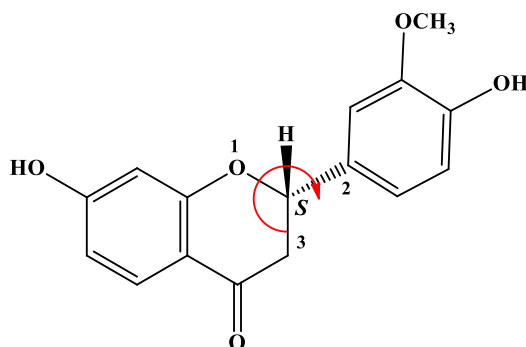


Figure III-137: Configuration *S* du carbone asymétrique C-2 du composé Ea14

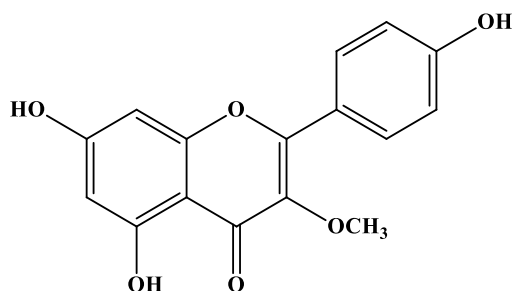
Toutes ces données spectrales (Tableau III-14) nous permettent de proposer pour le composé **Ea14**, la structure suivante: 7,4'-dihydroxy-3'-méthoxyflavanone. Ce composé a été isolé à partir des racines de la plante *Vicia sativa* de la famille Fabaceae [185]. Il a été détecté pour la première fois dans le genre *Erinacea*.

Ce composé n'a pas présenté une activité antibactérienne vis-à-vis des souches *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Proteus mirabilis*, mais il a montré une activité cytotoxique modérée [193].

**Tableau III-14** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **Ea14** dans l'acétone deutérée.

Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
2	5,44	(13,1 ; 2,9)	<i>dd</i>	80,5
3a	3,08	(16,8 ; 13,1)	<i>dd</i>	44,6
3b	2,68	(16,8 ; 2,8)	<i>dd</i>	-
4	-	-	-	190,1
5	7,73	8,7	<i>d</i>	129,2
6	6,58	(8,7 ; 2,3)	<i>dd</i>	110,9
7	-	-	-	164,4
8	6,44	2,3	<i>d</i>	103,4
9	-	-	-	164,3
10	-	-	-	114,9
1'	-	-	-	131,4
2'	7,20	2,0	<i>d</i>	128,2
3'	-	-	-	148,0
4'	-	-	-	147,4
5'	6,78	8,1	<i>d</i>	115,3
6'	7,01	(8,1 ; 2,1)	<i>dd</i>	120,1
O-CH <sub>3</sub>	3,89	-	<i>s</i>	56,0

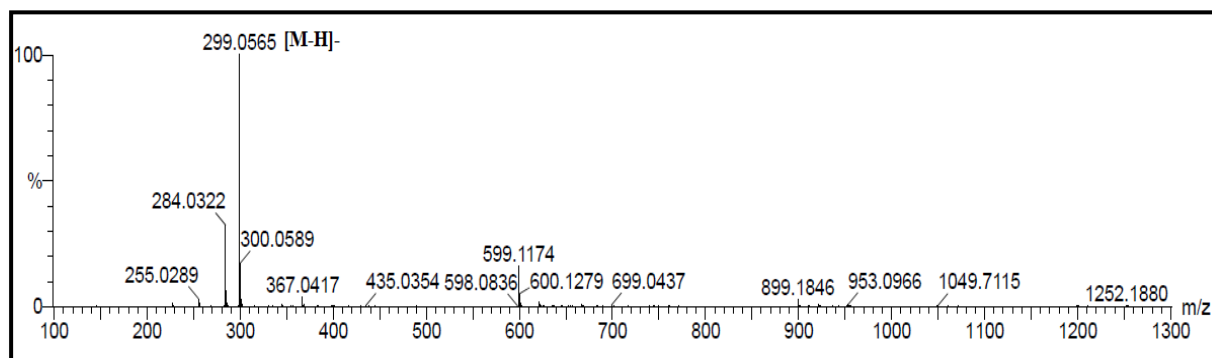
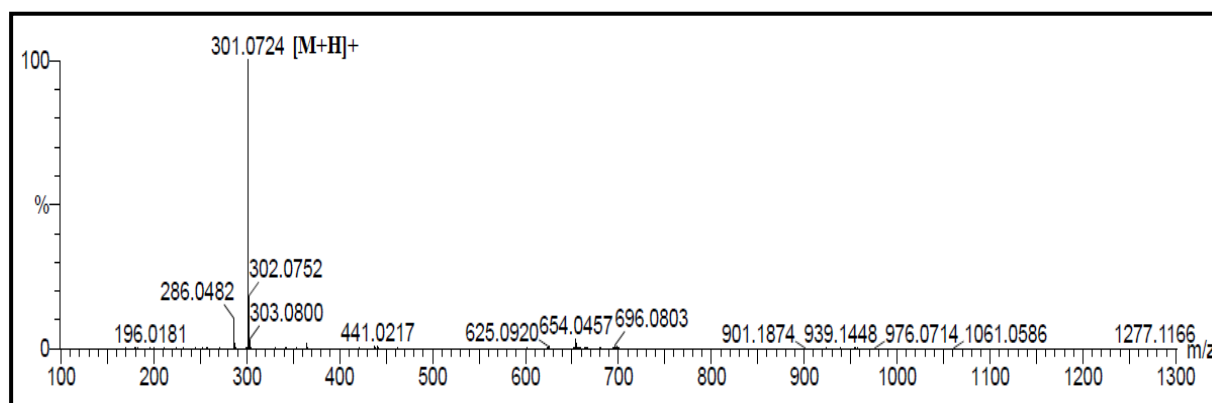
## III-1-3-15-Identification structurale du composé Ea15



Isokaempferide

Il s'agit d'un flavonol appelé 5,7,4'-trihydroxy-3-méthoxyflavanol ou Isokaempferide. Ce composé est isolé sous forme d'une poudre jaune, visible sous la lampe UV à 254 et 366 nm. Il se colore en jaune après pulvérisation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. Sa fluorescence jaune sous la lumière UV à 366 nm indique la présence d'un flavonoïde de type flavonol.

Les spectres de masse à haute résolution (HR-ESI-MS) du composé **Ea15** enregistrés en modes négatif (Figure III-138) et positif (Figure III-139) révèlent des pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 299,0565 [M-H]^-$  (calc.  $C_{16}H_{11}O_6$ , 299,0556) et  $301,0724 [M+H]^+$  (calc.  $C_{16}H_{13}O_6$ , 301,0712), soit une masse moléculaire de 300 uma et une formule brute en  $C_{16}H_{12}O_6$ , suggérant ainsi 11 degrés d'insaturation.

Figure III-138: Spectre de masse HR-ESI-MS (mode négatif) du composé **Ea15**Figure III-139: Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea15**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-140) de ce composé présente une allure différente par rapport aux composés précédents **Ea13** et **Ea14**. En effet, il montre la présence de sept protons incluant six C-H aromatiques entre 6,0 et 8,0 ppm et un groupement méthoxyle à 3,78 ppm.

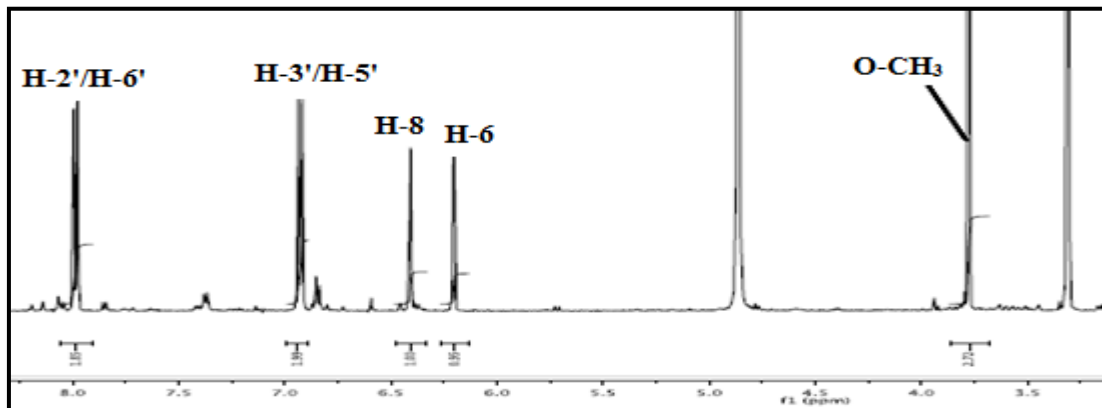


Figure III-140 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea15**

L'analyse du spectre COSY H-H de ce composé indique la présence de deux systèmes de spins, mettant en évidence les couplages entre les protons équivalents H-2'/H-6' à  $\delta_{\text{H}}$  7,99 (2H, *d*,  $J = 9,2$ ) et H-3'/H-5' à  $\delta_{\text{H}}$  6,93 (2H, *d*,  $J = 9,2$ ) caractéristiques du cycle B paradisubstitué et les protons H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  6,20, *d*,  $J = 2,1$ ) et H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  6,41, *d*,  $J = 2,1$ ) du cycle A <sup>[138]</sup> (Figure III-141).

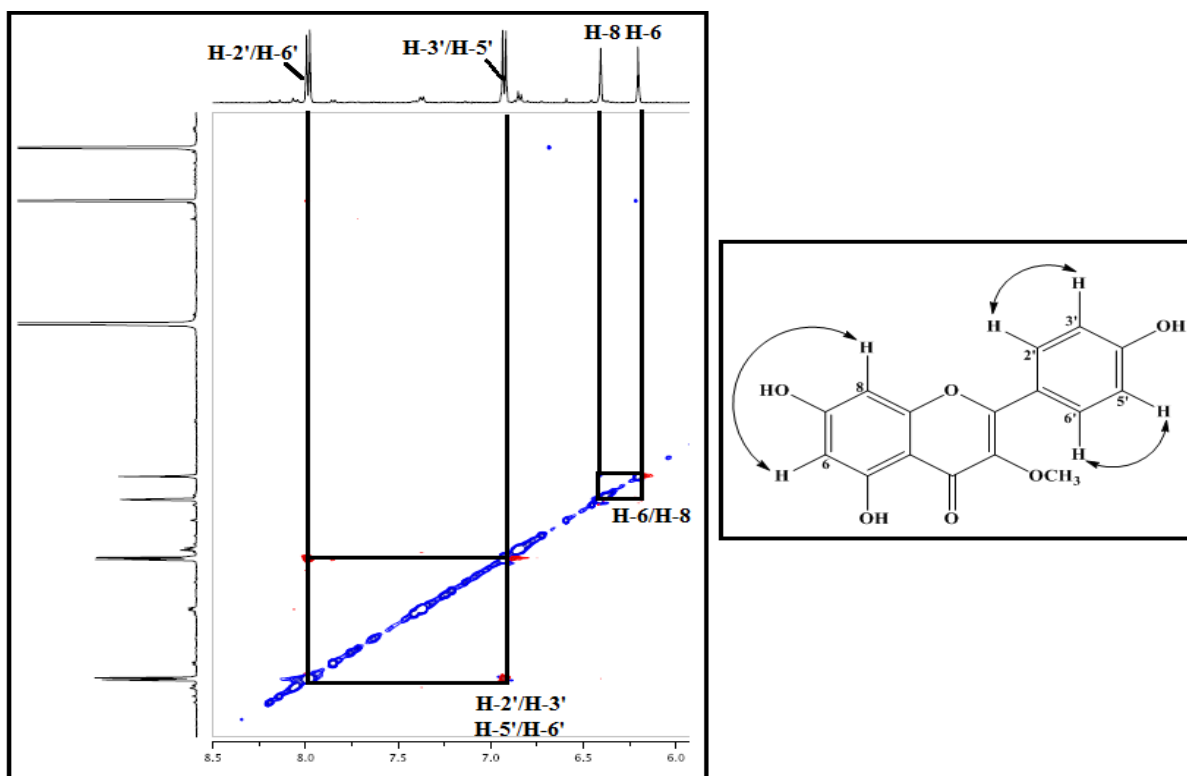
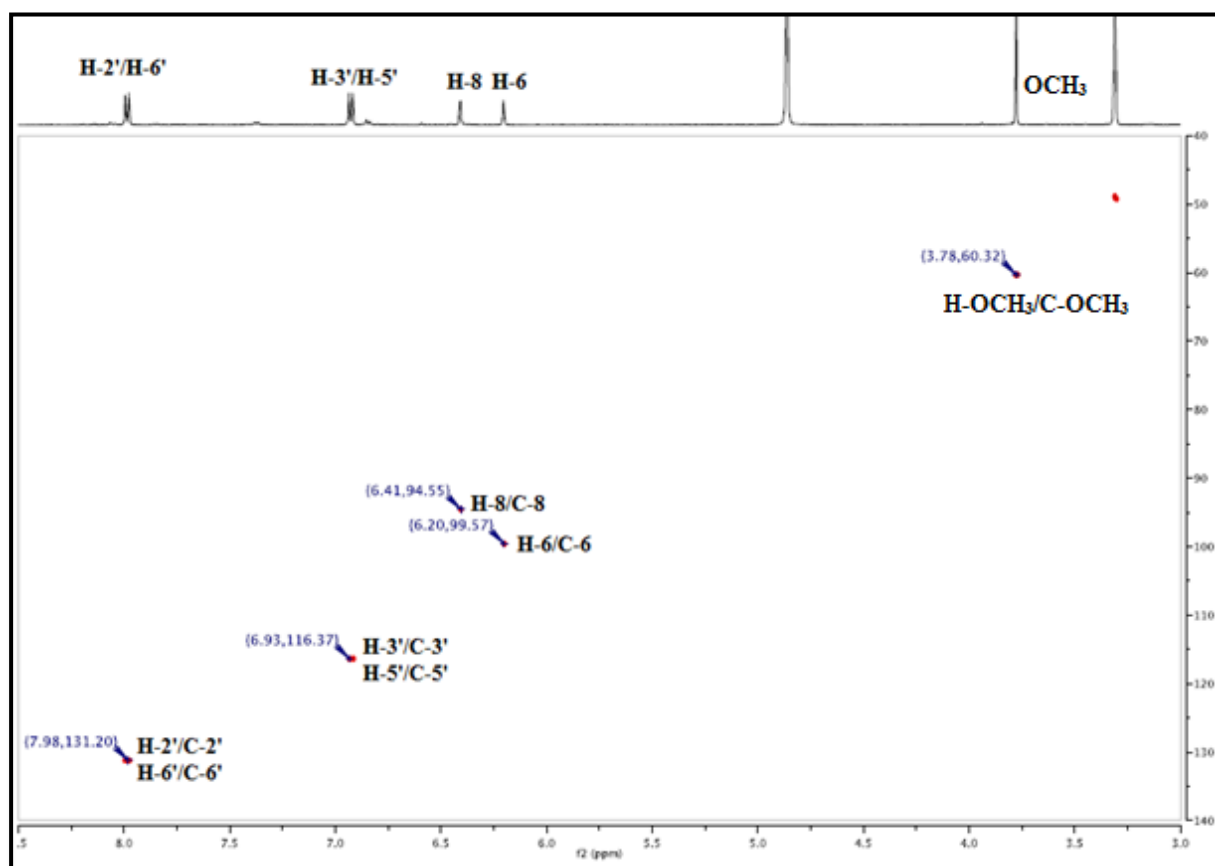


Figure III-141: Spectre COSY H-H du composé **Ea15**

Les déplacements chimiques des carbones porteurs des protons déjà cités sont assignés par analyse du spectre HSQC à  $\delta_C$  99,6 (C-6), 94,6 (C-8), 116,4 (C-2', C-6'), 131,2 (C-3', C-5') et -OCH<sub>3</sub> à  $\delta_C$  60,3 (Figure III-142).



**Figure III-142:** Spectre HSQC *J*-modulé du composé **Ea15**

Les déplacements chimiques des carbones restant sont déterminés par analyse du spectre HMBC qui montre des corrélations entre le proton H-6 et les carbones C-8, C-10 ( $\delta_C$  105,6), C-5 ( $\delta_C$  162,8) et C-7 ( $\delta_C$  165,7). Le proton H-8 présente des couplages en  $^2J$  et  $^3J$  avec les carbones C-6, C-9, C-10 et C-7. Les deux protons équivalents H-2' et H-6' révèlent des corrélations avec les carbones C-6', C-2', C-2 ( $\delta_C$  157,7) et C-4' ( $\delta_C$  161,4), tandis que les deux autres protons équivalents H-3' et H-5' couplent avec les carbones C-5', C-3', C-1' ( $\delta_C$  122,3) et C-4'. Les protons du groupement méthoxyle présentent une tache corrélation HMBC avec un carbone résonant à 139,2 ppm, et n'ayant révélé aucun couplage hétéronucléaire H/C avec les autres protons aromatiques, est attribué sans ambiguïté au carbone C-3 du flavonol (Figure III-143).

A ce stade d'analyse tous les déplacements chimiques des carbones et protons des cycles A, B et C sont détectés, à l'exception de celui du carbonyle C-4 qui ne montre aucune

corrélation sur le spectre HMBC. Son déplacement chimique est assigné à  $\delta_C$  179,5 selon le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé.

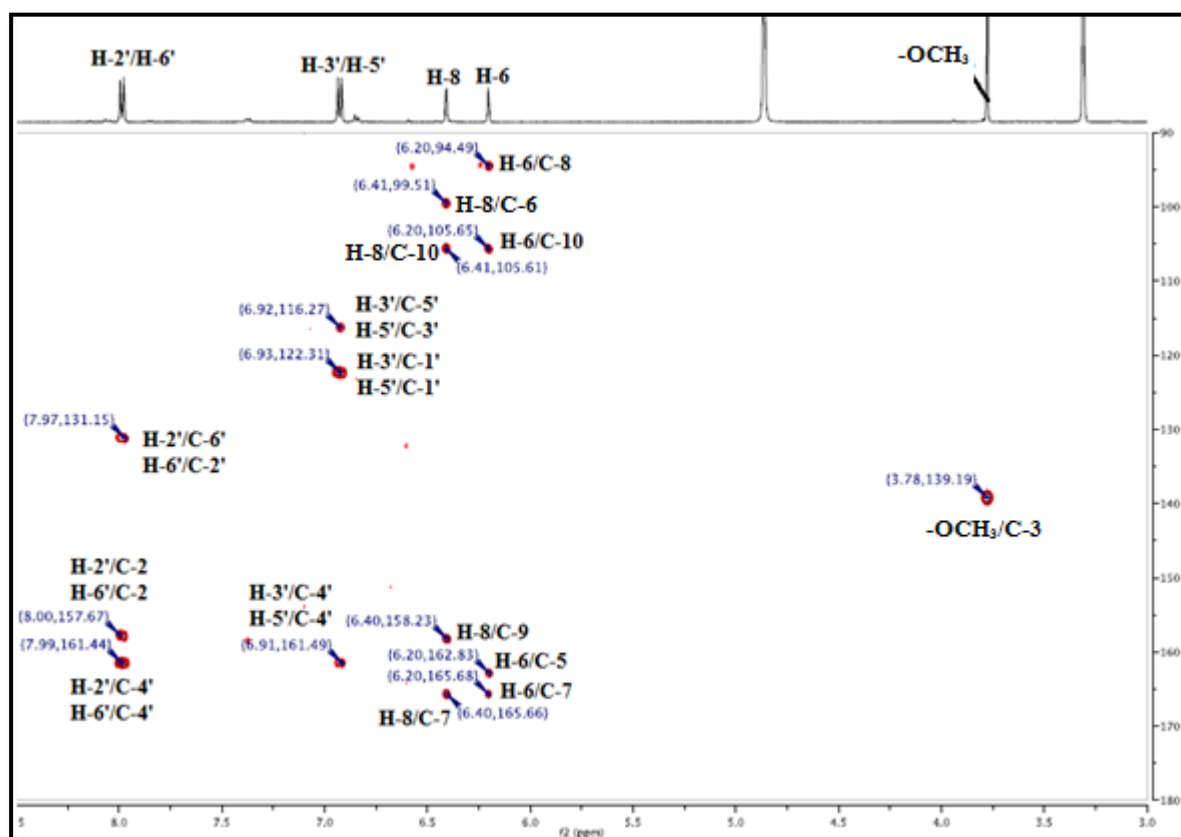


Figure III-143: Spectre HMBC du composé Ea15

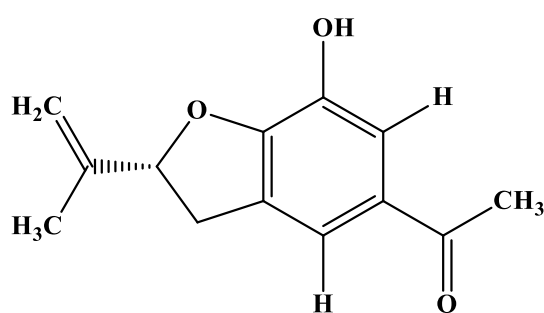
L'ensemble des données spectrales établies et la comparaison avec les données de la littérature permettent d'identifier le composé Ea15 à l'isokaempferide [194], antérieurement isolé de l'espèce *Amburana cearensis* de la famille Fabaceae [195]. Ce composé possède des activités biologiques intéressantes hépatoprotectrice [196], antimicrobienne [197] et anti-proliférative [198]. Il a été isolé pour la première fois dans le genre *Erinacea*.

**Tableau III-15** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé Ea15 dans le DMSO- $d_6$ .

Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
2	-	-	-	157,7
3	-	-	-	139,2
4	-	-	-	179,5

5	-	-	-	162,8
6	6,2	2,1	<i>d</i>	99,6
7	-	-	-	165,7
8	6,41	2,1	<i>d</i>	94,6
9	-	-	-	158,2
10	-	-	-	105,6
1'	-	-	-	122,3
2'	7,99	9,2	<i>d</i>	131,2
3'	6,93	9,2	<i>d</i>	116,4
4'	-	-	-	161,5
5'	6,93	9,2	<i>d</i>	131,2
6'	7,99	9,2	<i>d</i>	116,4
OCH <sub>3</sub>	3,78	-	<i>s</i>	60,3

### III-1-3-16-Identification structurale du composé Ea16

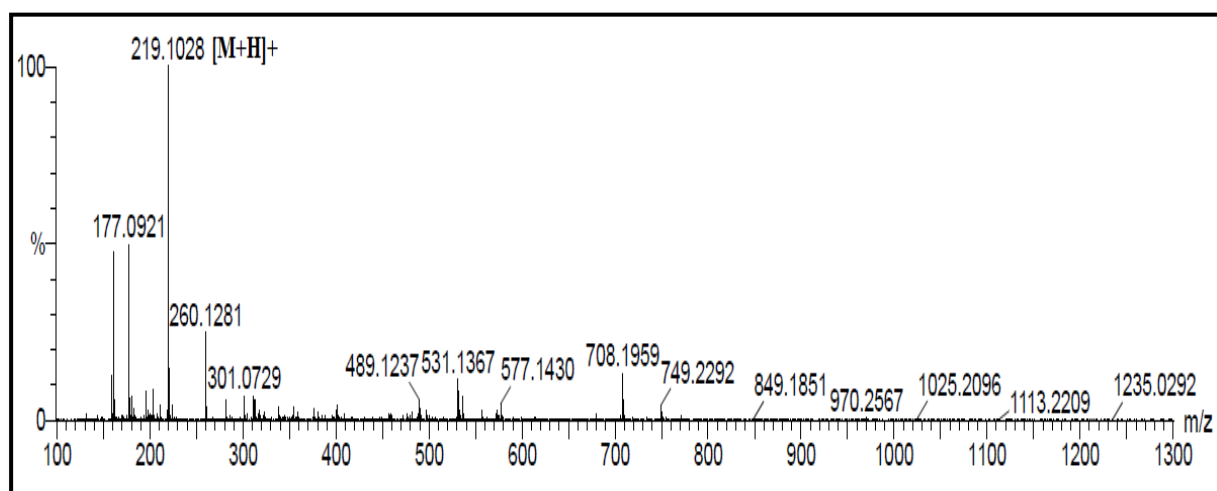


**7-hydroxytremetone**

Le composé **Ea16** est purifié sous forme d'une poudre blanche soluble dans l'acétone, il est visible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en marron après révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse à haute résolution HR-ESI-MS de ce composé obtenu en mode positif (Figure III-144) révèle un pic d'ion quasimoléculaire à  $m/z = 219,1028$   $[M+H]^+$  (calc.

C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>, 219,1021), correspondant à une masse moléculaire de 218 uma et une formule brute en C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>, indiquant la présence de 7 degrés d'insaturation.



**Figure III-144:** Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea16**

Le spectre RMN <sup>1</sup>H du composé **Ea16** montre l'existence de 10 signaux se répartissant en (Figure III-145):

- Un signal observé à  $\delta_H$  8,30 ne présentant aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC est attribué à un groupement hydroxyle.
- Deux signaux dans la zone aromatique d'intégration 1H chacun à  $\delta_H$  7,38 (*d*,  $J = 1,8$  Hz) et 7,40 (*d*,  $J = 1,8$  Hz) correspondant à deux protons aromatiques *meta*-couplés.
- Un signal détecté à  $\delta_H$  5,34 d'intégration 1H sous forme de triplet ( $J = 8,9$  Hz). Son carbone est assigné à  $\delta_C$  87,4 selon l'expérience HSQC. Ce signal est attribué à un groupement oxyméthine (CHO).
- Deux signaux d'intégration 1H chacun résonant à 5,11 ppm (*dt*,  $J = 2,0$  et 1,1 Hz) et 4,92 ppm (*t*,  $J = 1,7$  Hz) et corrélant sur le spectre HSQC avec un même carbone localisé à 112,4 ppm correspondent à deux protons éthyléniques géminés non équivalents (CH<sub>2</sub>=C).
- Deux signaux s'intégrant pour 1H chacun détectés à  $\delta_H$  3,46 (*dd*,  $J = 15,7$  et 9,7 Hz) et 3,10 (*dd*,  $J = 15,7$  et 8,0 Hz) et montrant sur le spectre HSQC deux taches de corrélation à  $\delta_C$  34,8 sont attribués à deux protons non équivalents d'un groupement méthylène (-CH<sub>2</sub>-).
- Deux signaux d'intégration 3H chacun observés à 2,46 ppm (*s*) et 1,77 ppm (*t*,  $J = 1,2$  Hz) correspondant à deux groupements méthyles (-CH<sub>3</sub>). Leurs carbones sont déterminés par l'expérience HSQC à  $\delta_C$  26,1 et 16,9 respectivement.



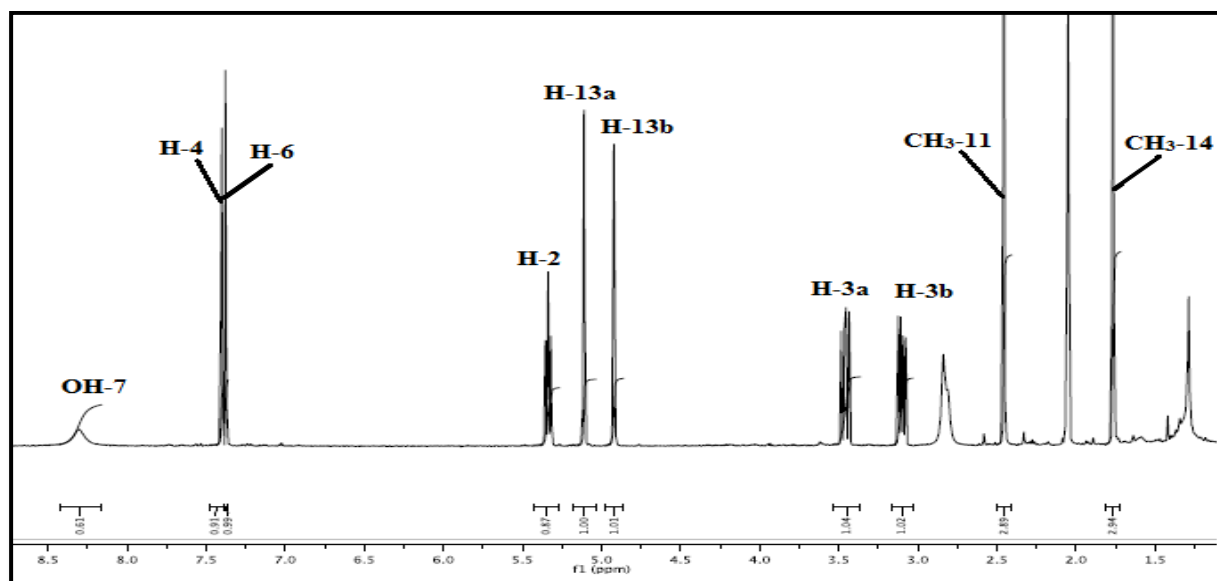


Figure III-145: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea16** (Acétone- $d_6$ )

Le spectre COSY H-H (Figure III-146) de ce composé révèle la présence de trois systèmes de spins.

- Le premier à trois protons montre des couplages entre les protons du groupement méthylène notés H-3a/H-3b et le proton oxyméthine H-2 à  $\delta_{\text{H}}$  5,34 formant le fragment ( $-\text{CH}_2-\text{CHO}$ ).

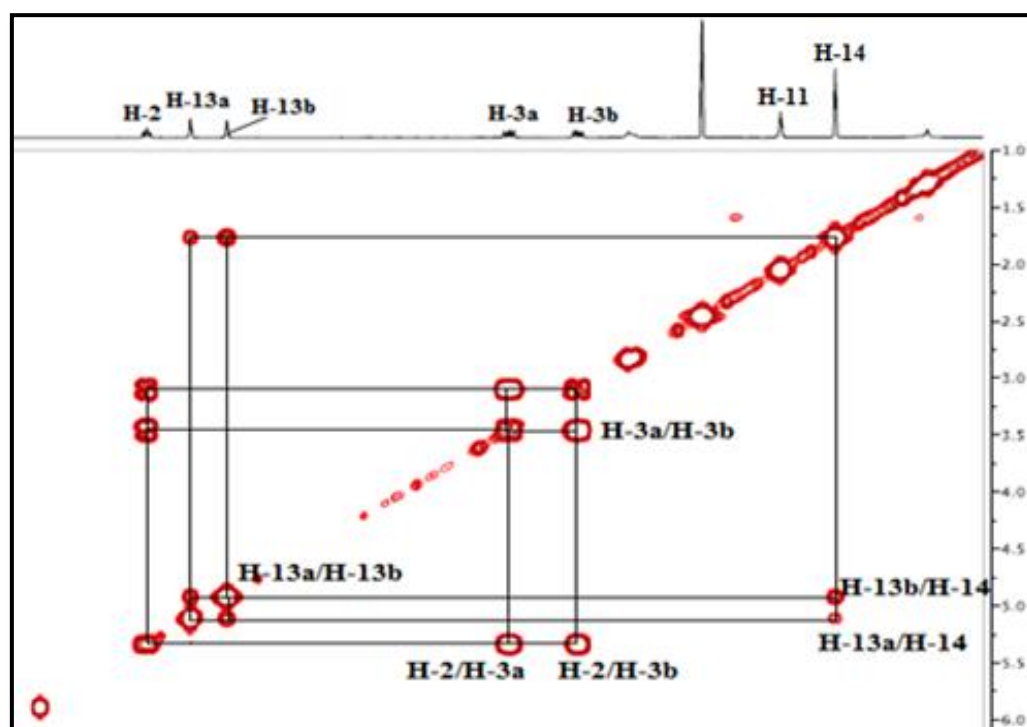


Figure III-146: Spectre COSY H-H du composé **Ea16**

- Le deuxième système de spins représente des couplages entre les deux protons éthyléniques nommés H-13a ( $\delta_H$  5,11) et H-13b ( $\delta_H$  4,92) et les protons du groupement méthyle H<sub>3</sub>-14 à  $\delta_H$  1,77 indiquant ainsi la présence d'un fragment de type isoprényle ( ${}_{13}\text{CH}_2={}_{12}\text{C}-{}_{14}\text{CH}_3$ ).
- Le troisième système à 2 protons indique un couplage *meta* entre les deux protons aromatiques H-4 et H-6.

Le branchement de ces deux fragments  ${}_{-3}\text{CH}_2\text{-}_2\text{CHO}$  et  ${}_{13}\text{CH}_2={}_{12}\text{C}-{}_{14}\text{CH}_3$  est fait suite à l'analyse du spectre HMBC (Figure III-147) qui montre des couplages entre les protons du groupement méthyle H<sub>3</sub>-14 et les carbones C-2 ( $\delta_C$  87,4), C-13 ( $\delta_C$  112,0) et le carbone quaternaire C-12 ( $\delta_C$  144,0). Les protons du groupement méthylène H-3a et H-3b sont couplés en  ${}^3J$  avec le carbone C-12 et en  ${}^2J$  avec le carbone C-2 et le proton du groupement oxyméthine H-2 corrèle en HMBC avec les deux carbones C-13 et C-14.

Toutes ces corrélations nous permettent de relier le carbone oxyméthine C-2 avec le carbone quaternaire C-12 du groupement isoprényle.

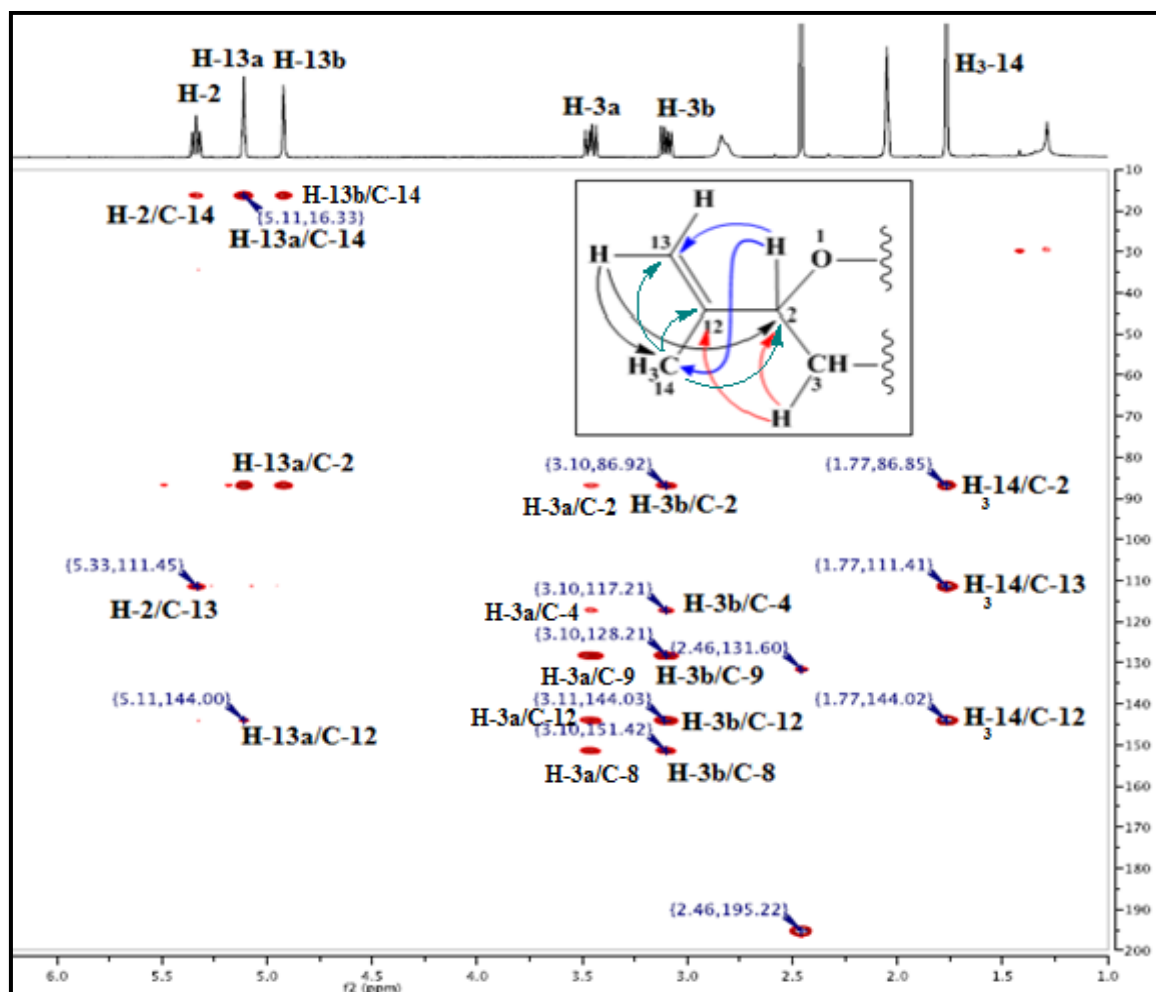


Figure III-147 : Partie du spectre HMBC du composé Ea16

Les deux protons aromatiques notés H-4 et H-6 corrélient sur le spectre HSQC (Figure III-148) avec leurs carbones respectifs à  $\delta_C$  117,8 et 116,5. L'absence d'autres signaux de protons aromatiques suggère la substitution des carbones restant du cycle aromatique.

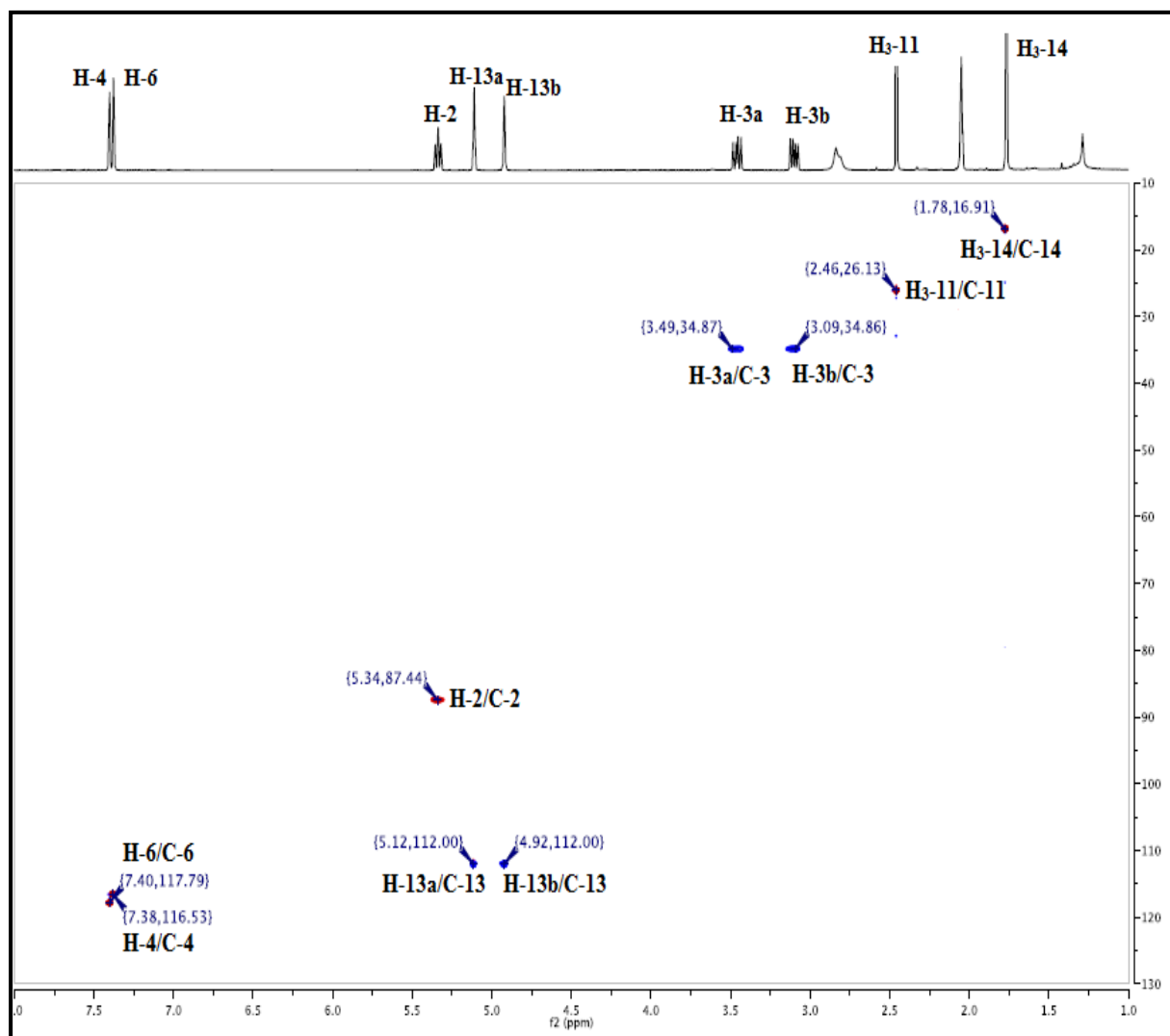


Figure III-148 : Spectre HSQC du composé **Ea16**

Le spectre HMBC du composé **Ea16** montre également des corrélations entre les deux protons aromatiques H-4 et H-6 et le carbone d'une fonction carbonyle à  $\delta_C$  194,9 (C-10), ce qui permet de lier le carbonyle en position C-5 du cycle aromatique. Par ailleurs, les protons du groupement méthyle (acétyle) H3-11 à  $\delta_H$  2,46 présentent des couplages avec le carbone C-10 et un carbone aromatique à  $\delta_C$  131,6 ne pouvant être que le carbone quaternaire aromatique C-5 porteur du groupement acétyle (Figure III-149).

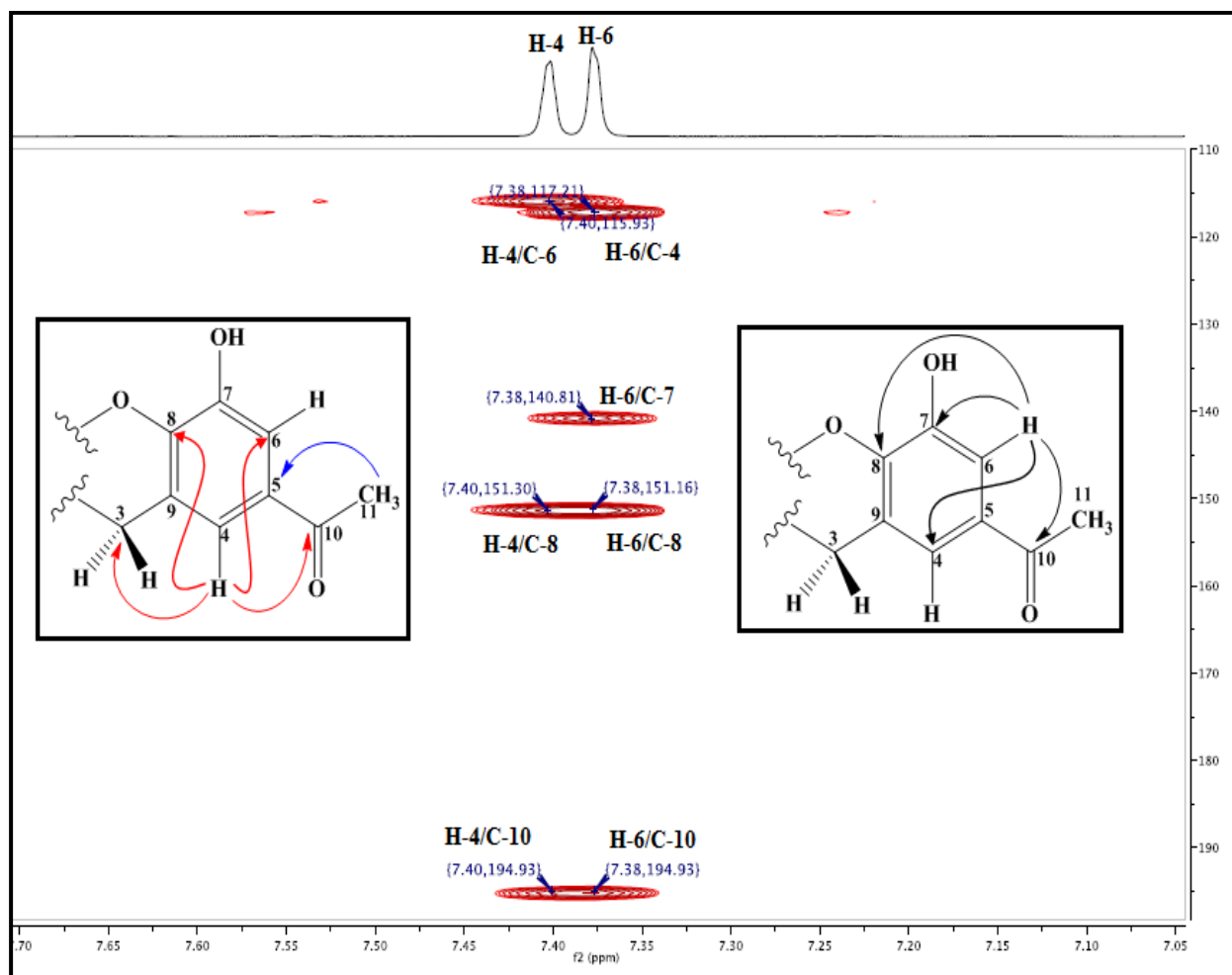


Figure III-149: Partie du spectre HMBC du composé Ea16

Aussi, les deux protons aromatiques H-4 et H-6 copulent ensemble en HMBC avec un carbone quaternaire oxygéné à  $\delta_C$  151,4 correspondant au carbone C-8. D'autres corrélations sont visualisées entre le proton H-6 et les carbones C-4 et un carbone oxygéné à  $\delta_C$  140,8 (C-7) et entre le proton H-4 et le carbone méthylénique C-3, ce qui permet de lier le carbone C-3 au carbone C-9 du cycle aromatique. Ceci est confirmé par les corrélations observées sur le spectre HMBC entre les protons du groupement méthylène CH<sub>2</sub>-3 et les carbones C-4, C-8 et un carbone quaternaire aromatique à 128,2 ne pouvant être que le carbone C-9 du cycle aromatique (Figure III-150). Il en résulte que tous les protons et carbones de ce composé ont été assignés. A ce stade d'analyse, le nombre d'insaturation établie correspond à 6, il reste donc une seule insaturation à attribuer en accord avec le spectre de masse suggérant 7 insaturations. Ceci implique exclusivement la formation d'un cycle furane entre les atomes de carbone C-2 et C-8.

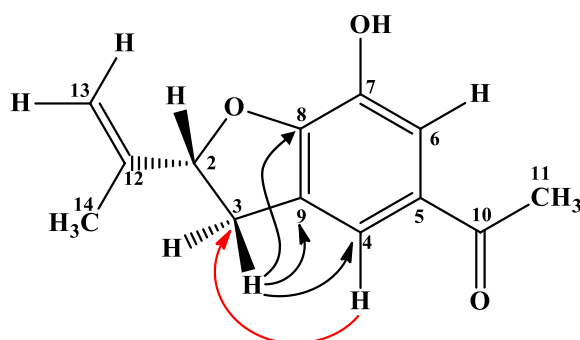
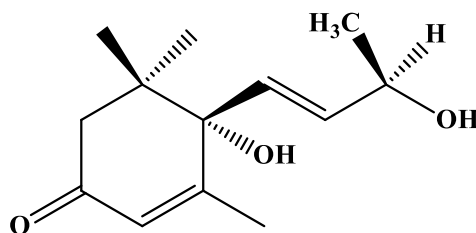


Figure III-150 : Corrélations HMBC du composé **Ea16**

L'ensemble de ces données spectroscopiques et la comparaison avec les données citées dans la littérature <sup>[199]</sup> permettent l'attribution à **Ea16** la structure: 2-propényl-5-acétyl-7-hydroxy-2,3-dihydrobenzofurane nommé aussi 7-hydroxytremetone. Ce composé a été isolé antérieurement des racines des espèces *Ligularia przewaukii* <sup>[199]</sup> et *Viguiera pazensis* <sup>[200]</sup> de la famille Asteraceae. Il est à signaler que ce composé a été isolé pour la première fois dans le genre *Erinacea* et même dans la famille Fabaceae.

Tableau III-16 : Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) du composé **Ea16** dans l'acétone deutérée.

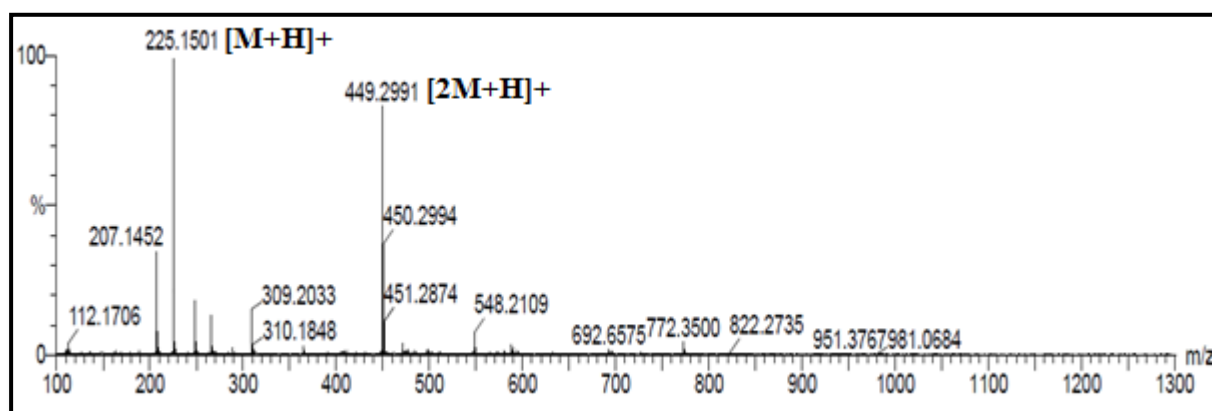
Position	$\delta_H$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_C$
2	5,34	8,9	<i>t</i>	87,4
3a	3,46	(15,7 ; 9,7)	<i>dd</i>	34,8
3b	3,10	15,7 ; 8,0	<i>dd</i>	
4	7,40	1,8	<i>d</i>	117,8
5	-	-	-	131,6
6	7,38	1,8	<i>d</i>	116,5
7	-	-	-	140,8
8	-	-	-	151,4
9	-	-	-	128,2
10	-	-	-	195,2
11	2,46	-	<i>s</i>	26,1
12	7,99	9,2	<i>d</i>	144,0
13a	5,11	(2,0 ; 1,1)	<i>dt</i>	112,0
13b	4,92	1,7	<i>t</i>	
14	1,77	1,2	<i>t</i>	16,3

III-1-3-17-Identification structurale du composé **Ea17**

Vomifoliol

Le composé **Ea17** est obtenu sous forme d'une poudre blanche amorphe soluble dans l'acétone. Il est visible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en jaune après pulvérisation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse à haute résolution (HR-ESI-MS) du composé **Ea17** enregistré en mode positif (Figure III-151) montre deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 225,1501$   $[M+H]^+$  (calc.  $C_{13}H_{21}O_3$ , 225,1491) et 449,2991  $[2M+H]^+$ , ceci correspond à une masse moléculaire de 224 uma et une formule brute en  $C_{13}H_{20}O_3$ , indiquant 4 degrés d'insaturation.

**Figure III-151:** Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea17**

L'analyse structurale des spectres RMN  $^1H$  (Figure III-152) et HSQC  $J$ -modulé (Figure III-153) du composé **Ea17** indique l'existence de:

- Deux protons à  $\delta_H$  4,97 (*s*) et 4,69 (*d*,  $J = 4,7$  Hz) ne présentant aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC  $J$ -modulé correspondent à deux groupements hydroxyles.
- Quatre groupements méthyles à  $\delta_H$  1,81 (*d*,  $J = 1,4$  Hz), 1,11 (*d*,  $J = 6,4$  Hz), 0,94 (*s*) et 0,91 (*s*), leurs carbones respectifs sont détectés par analyse du spectre HSQC à  $\delta_C$  18,9, 24,0, 23,0 et 23,9.

- Trois protons éthyléniques à  $\delta_H$  5,78 (*t*,  $J = 1,3$  Hz), 5,70 (*dd*,  $J = 15,6$  ;  $4,7$  Hz) et 5,65 (*d*,  $J = 15,7$  Hz). Ces protons couplent sur le spectre HSQC avec les carbones à  $\delta_C$  125,4, 135,8 et 127,8 respectivement.
- Un proton oxyméthine à  $\delta_H$  4,18 (*m*) corrélant sur le spectre HSQC *J*-modulé avec son carbone à  $\delta_C$  66,0
- Deux protons non équivalents d'un groupement méthylène à  $\delta_H$  2,35 (*d*,  $J = 16,7$  Hz) et 2,06 (*d*,  $J = 16,6$  Hz) couplant sur le spectre HSQC avec un carbone repéré à  $\delta_C$  49,4.

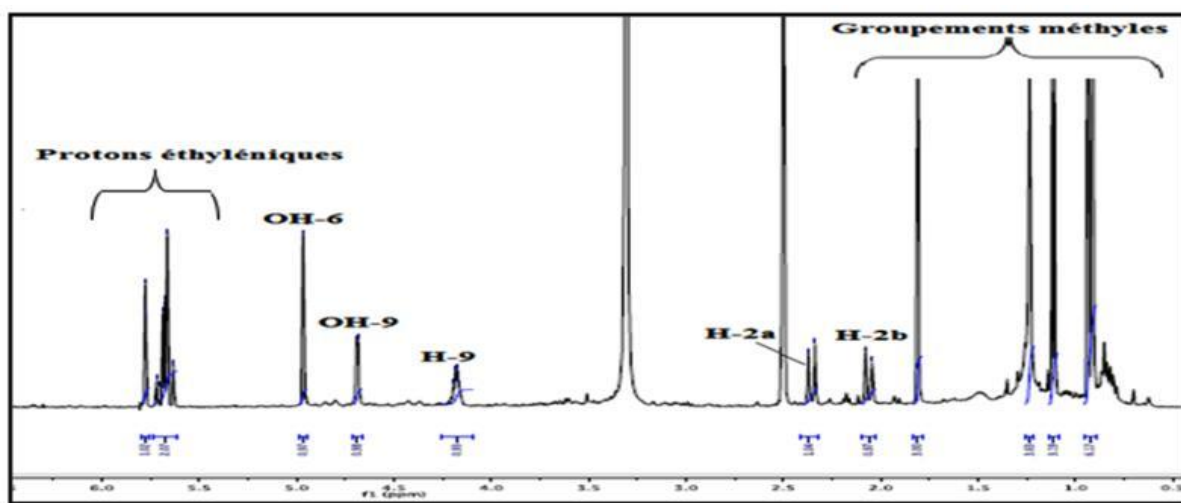


Figure III-152: Spectre RMN  $^1H$  du composé **Ea17** (DMSO- $d_6$ )

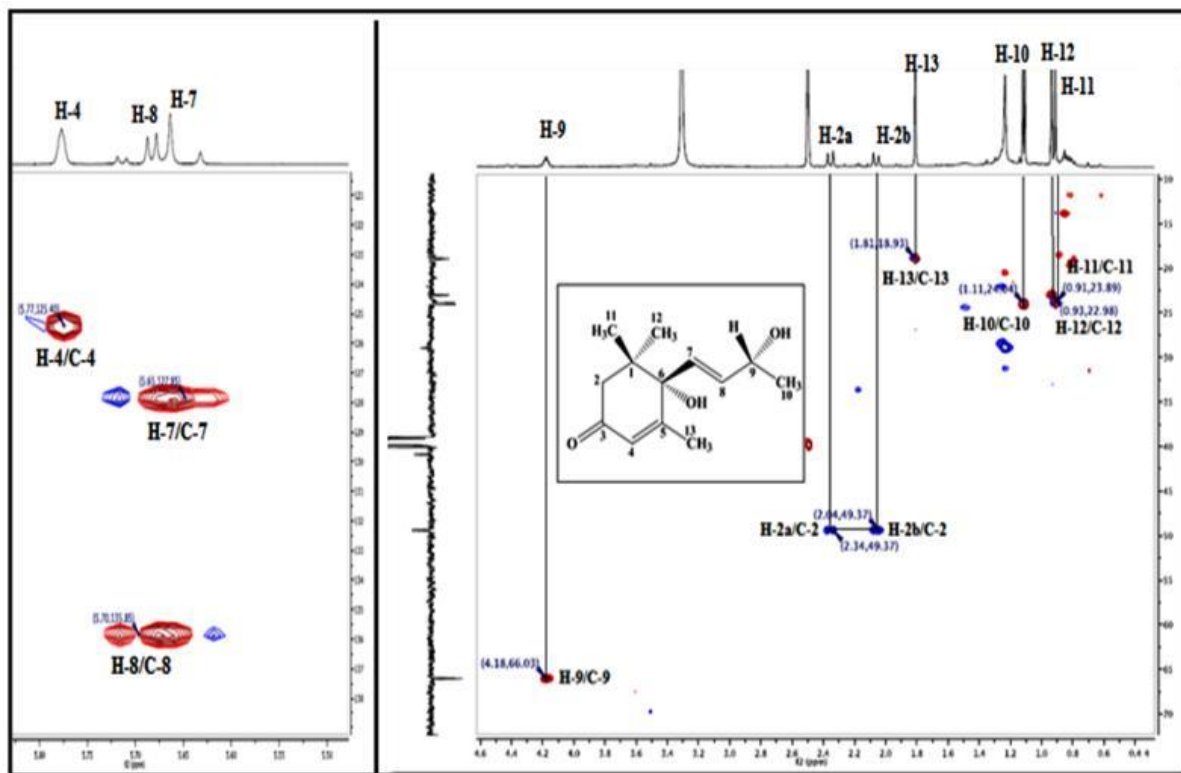


Figure III-153 : Spectre HSQC *J*-modulé du composé **Ea17**

Sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé **Ea17** sont visualisés 13 signaux correspondant à 13 atomes de carbone (Figure III-154):

- 1 carbonyle à 197,3 ppm.
- 4 carbones éthyléniques entre 125,4 et 164,3 ppm
- 1 carbone oxyméthine à 66,0 ppm.
- 3 carbones quaternaires entre 77,0 et 40,0 ppm.
- 4 groupements méthyles.

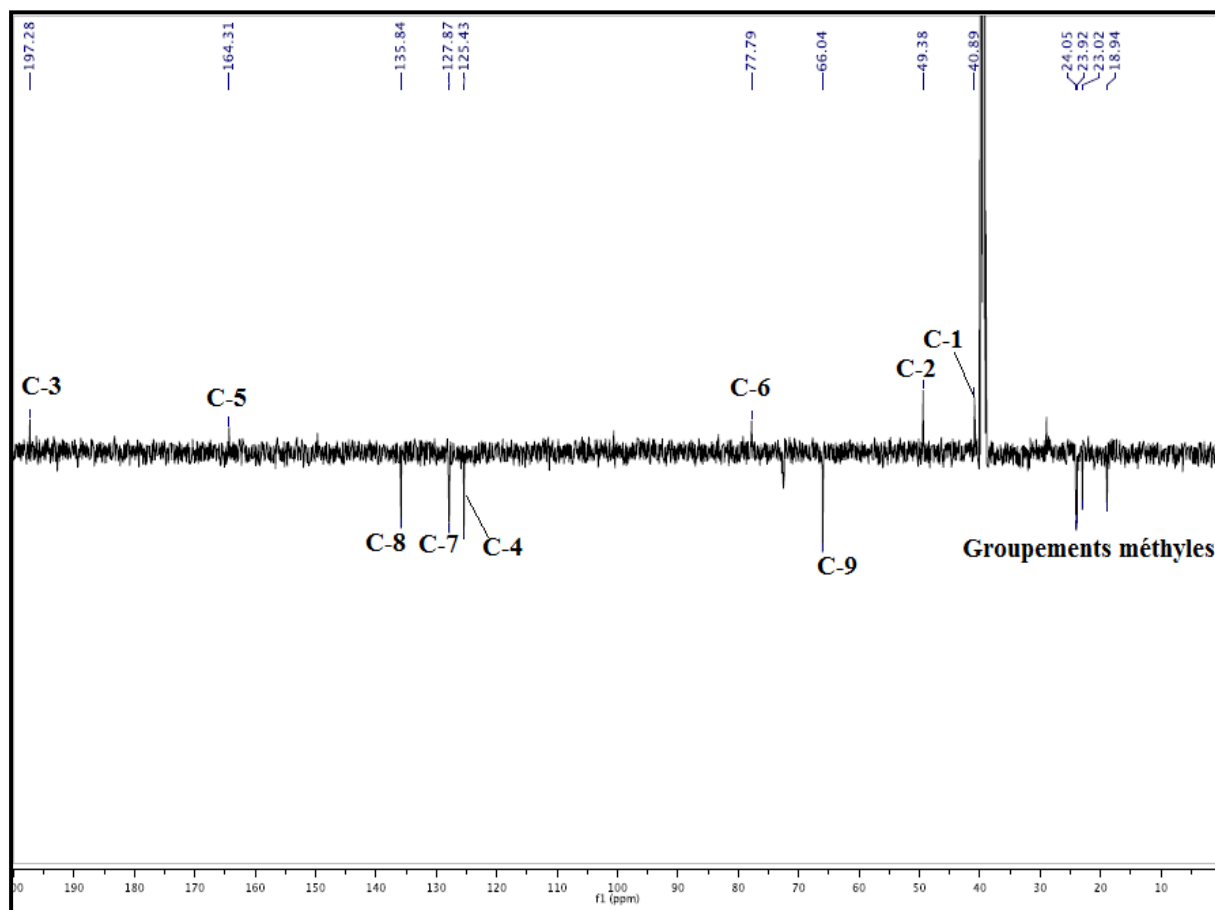


Figure III-154: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé du composé **Ea17**

L'élucidation structurale du composé **Ea17** est commencée par la localisation des protons non équivalents du groupement méthylène notés H-2a à  $\delta_{\text{H}}$  2,35 ( $d$ ,  $J = 16,7$  Hz) et H-2b à  $\delta_{\text{H}}$  2,06 ( $d$ ,  $J = 16,6$  Hz) qui couplent sur le spectre HMBC avec un groupement carbonyle à  $\delta_{\text{C}}$  197,3 (C-3), un carbone éthylénique (CH,  $\text{SP}^2$ ) à  $\delta_{\text{C}}$  125,3 (C-4), un carbone oxygéné à  $\delta_{\text{C}}$  77,7 (C-6), un carbone quaternaire à  $\delta_{\text{C}}$  40,9 (C-1) et un groupement méthyle à  $\delta_{\text{C}}$  23,0 (C-12). L'expérience HSQC permet d'identifier le proton éthylénique H-4 à  $\delta_{\text{H}}$  5,78 ( $d$ ,  $J = 1,3$  Hz, couplage allylique). En outre, les deux groupements méthyles à 0,91 ( $\text{CH}_3$ -11) et 0,94 ppm ( $\text{CH}_3$ -12) montrant des corrélations HMBC entre eux, sont portés par le même



carbone résonant à  $\delta_C$  40,9 (C-1). Aussi, ces deux méthyles couplent en  $^4J$  avec le groupement carbonyle et en  $^3J$  avec le carbone oxygéné à  $\delta_C$  77,7 (C-6) et le carbone méthylène à  $\delta_C$  49,4 (C-2), ce qui permet de former les enchainements suivants (Figure III-155).

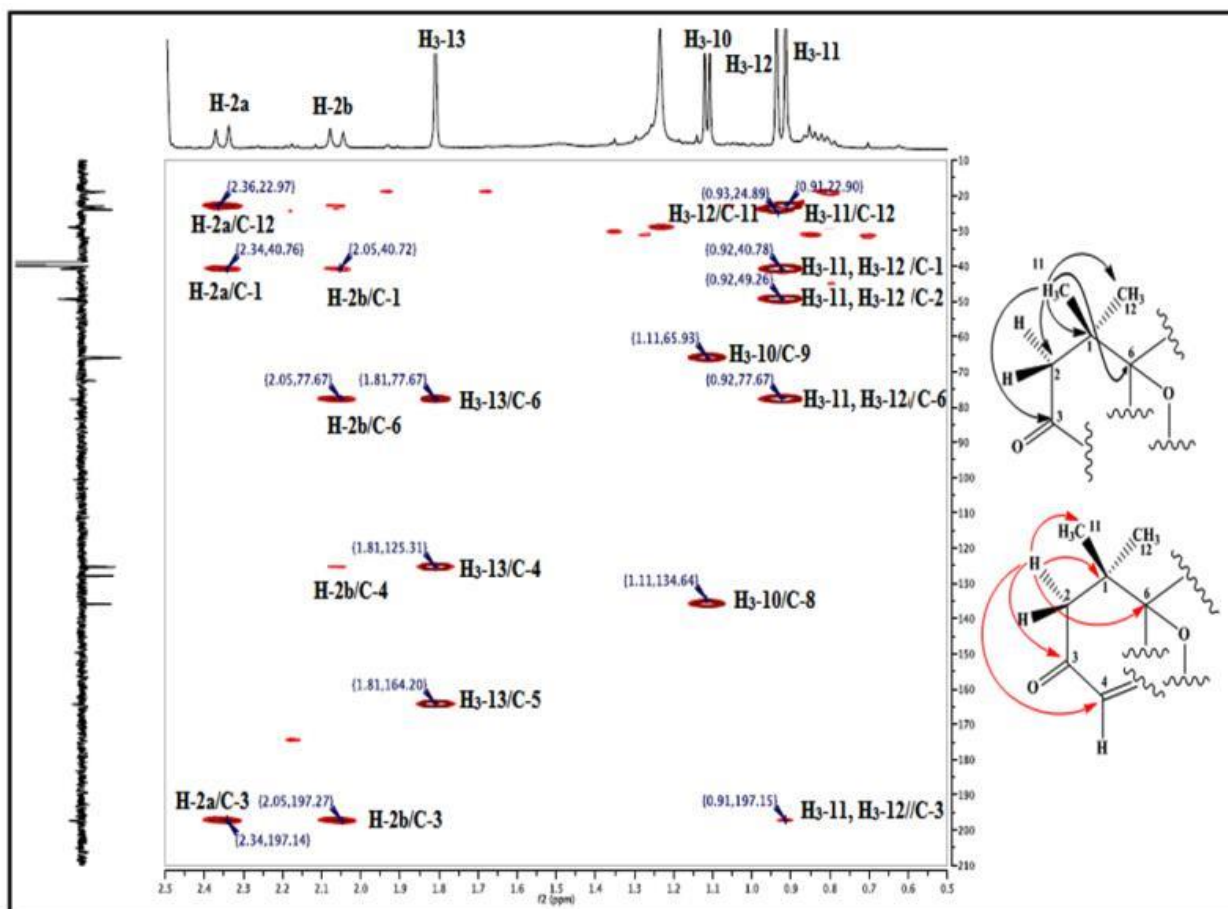


Figure III-155: Partie du spectre HMBC du composé Ea17

Des taches de corrélations en HMBC sont visualisées entre le proton éthylénique H-4 et les carbones C-6 et C-2 déjà identifiés et un groupement méthyle à  $\delta_C$  18,9 attribuable au carbone C-13, ses protons (H-13) sont assignés par HSQC à 1,81 ppm. Les protons méthyliques H-13 montrent des corrélations sur le spectre HMBC (Figures III-155 et III-156) avec les carbones C-6 et C-4 et un carbone éthylénique quaternaire à  $\delta_C$  164,3 ne pouvant être que le carbone C-5 (Figure III-156) permettant ainsi la fermeture du cycle à 6 chaînons pour ce composé. Ceci est confirmé également par les corrélations hétéronucléaires observées sur le spectre HMBC entre le proton de l'hydroxyle en C-6 détecté à  $\delta_H$  5,56 selon l'expérience HSQC *J*-modulé et les carbones C-1, C-5 et C-6. Ce proton corrèle aussi en HMBC avec un autre carbone éthylénique repéré à  $\delta_C$  127,9 (CH-7, SP<sup>2</sup>) (Figure III-156). Son proton H-7 est localisé à 5,65 ppm par analyse du spectre HSQC.

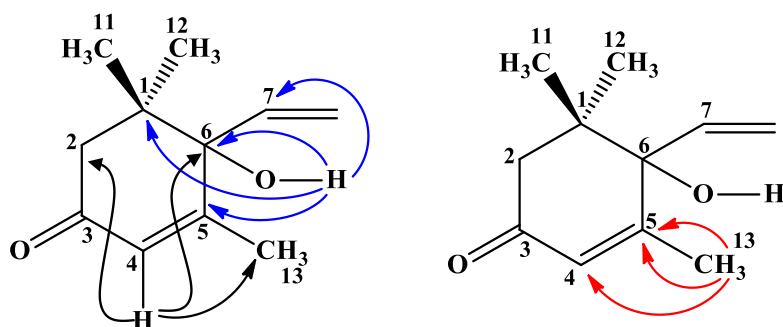


Figure III-156: Corrélations HMBC permettant la fermeture de cycle du composé **Ea17**

Le spectre COSY H-H du composé **Ea17** révèle la présence d'un système de spins à sept protons à partir du proton H-7 identifié précédemment comme suit: H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  5,65, *d*,  $J = 15,7$  Hz) /H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  5,70, *dd*,  $J = 15,6 ; 4,7$  Hz) / H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  4,18, *m*) /OH-9 ( $\delta_{\text{H}}$  4,69, *d*,  $J = 4,7$  Hz) /H<sub>3</sub>-10 (1,11, *d*,  $J = 6,4$  Hz) (Figure III-157). La grande valeur de la constante de couplage entre les protons H-7 et H-8 indique qu'ils sont en position *trans*, ceci conduit à élaborer la chaîne latérale  $-_7\text{CH}=\text{}_8\text{CH}-\text{}_9\text{CH}(\text{OH})_{10}\text{CH}_3$  liée au carbone C-6 (Figure III-157).

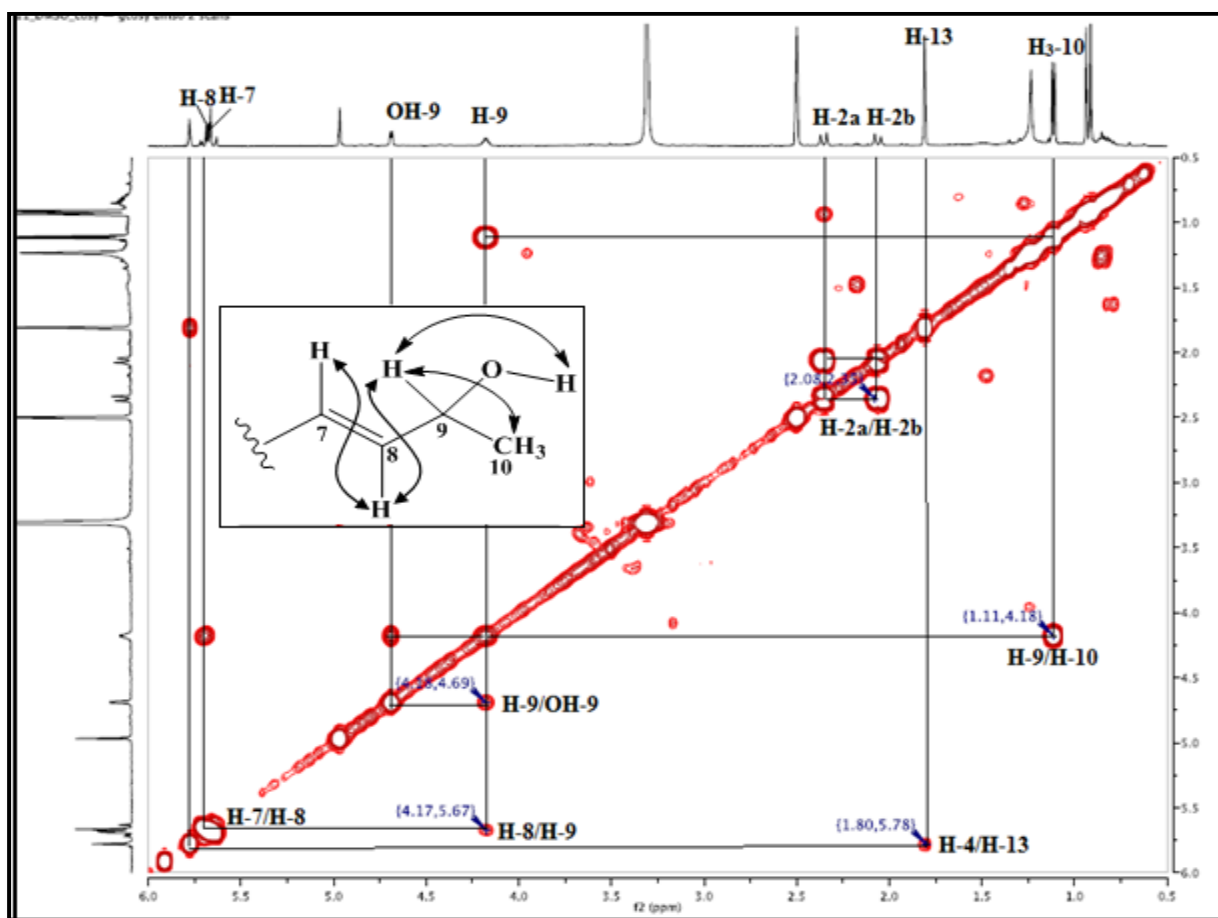


Figure III-157: Spectre COSY H-H du composé **Ea17**

La chaîne latérale du composé **Ea17** met en évidence les corrélations HMBC entre (Figure III-158):

- Le proton de l'hydroxyle en C-9 et le groupement méthyle à  $\delta_C$  24,1 (C-10), le carbone oxyméthine C-9 à  $\delta_C$  66,0 et le carbone éthylénique C-8 à  $\delta_C$  135,8.
- Le proton hydroxyméthine H-9 et le carbone C-7.
- Les deux protons éthyléniques H-7 et H-8 et les carbones C-9 et C-6, ce qui conduit à confirmer l'emplacement de la chaîne latérale sur le carbone C-6.
- Le proton H-7 et le carbone C-5.
- Les protons du groupement méthyle Me-10 et les carbones C-8 et C-9.

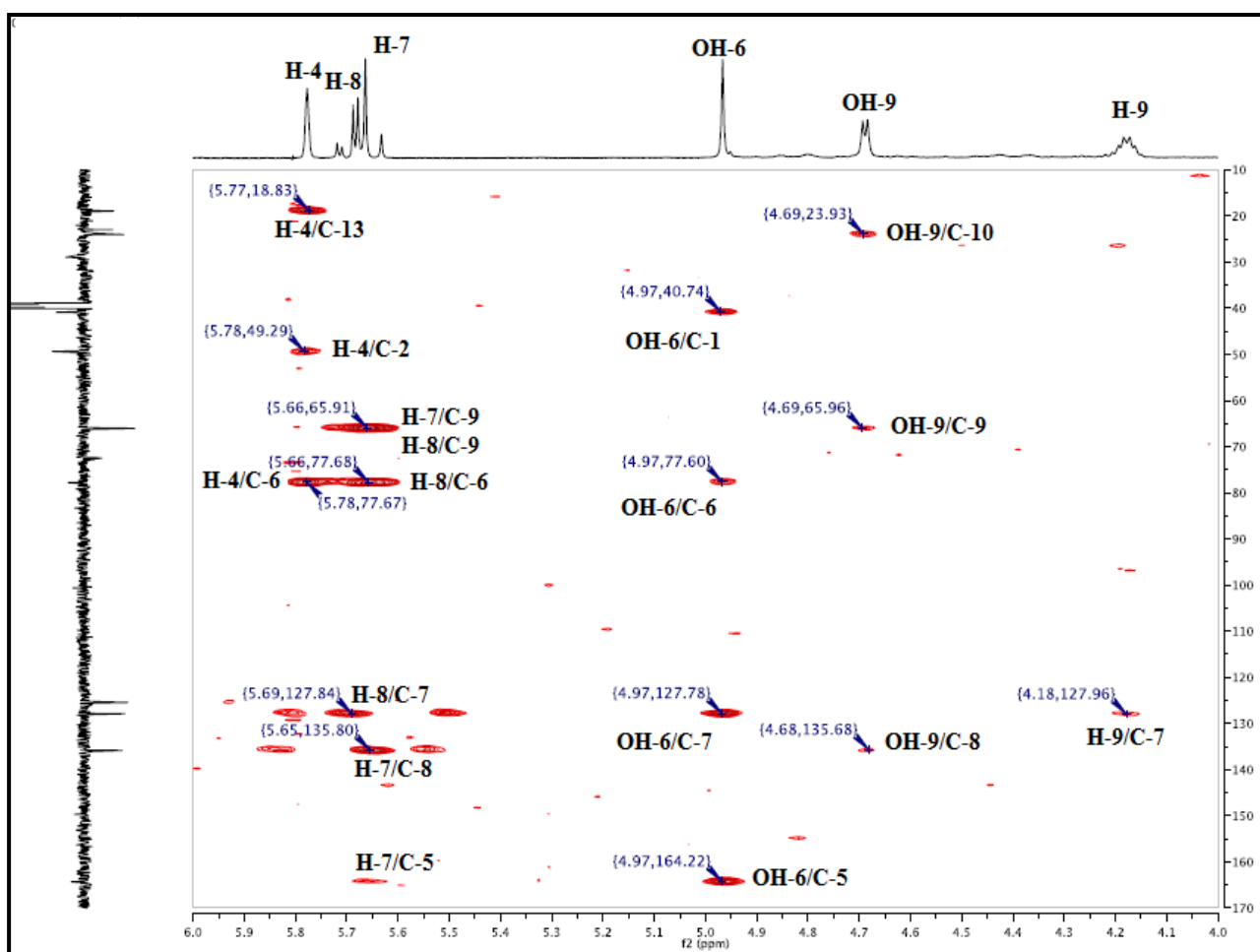


Figure III-158 : Partie du spectre HMBC du composé **Ea17**

A ce stade d'interprétation tous les carbones et protons du composé **Ea17** sont assignés, il reste à déterminer la stéréochimie relative des deux centres asymétriques C-9 et C-6 par analyse du spectre NOESY et comparaison avec les données de la littérature.

L'expérience NOESY (Figure III-159) montre clairement des effets NOE entre les protons des groupements hydroxyles 6-OH et 9-OH, ce qui traduit leur proximité spatiale. D'autres corrélations NOESY (Figure III-160) sont observées entre :

- Le proton H-9 et les protons H-7 et H<sub>3</sub>-10.
- Le proton H-8 et les protons H<sub>3</sub>-10 et OH-6.
- Le proton H-2a et les protons H-2b et H<sub>3</sub>-11.
- Le proton H-2b et les protons H-2a et H<sub>3</sub>-12.
- Le proton de l'hydroxyle OH-6 et les protons H<sub>3</sub>-12 et H<sub>3</sub>-13.
- Le proton H-7 et le proton H-2a.
- Le proton H-4 et les protons H<sub>3</sub>-13.

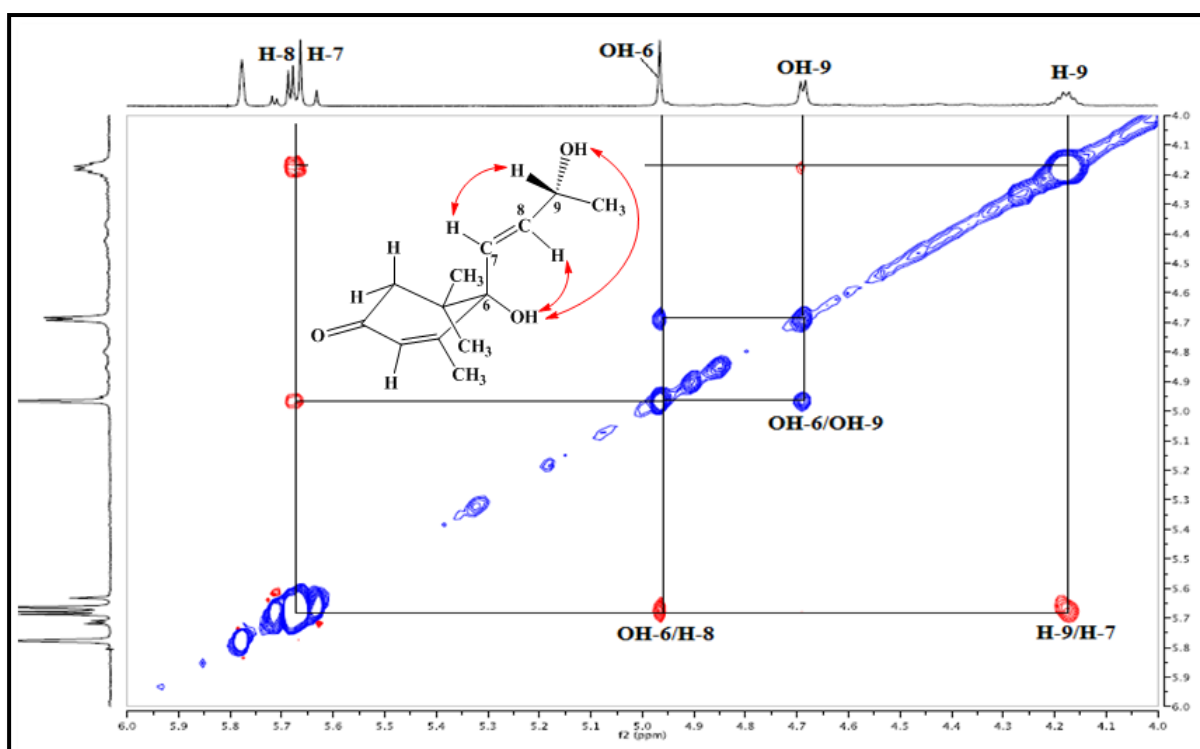


Figure III-159: Partie du spectre NOESY du composé Ea17

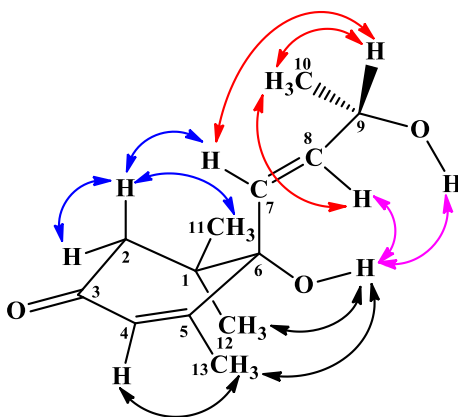


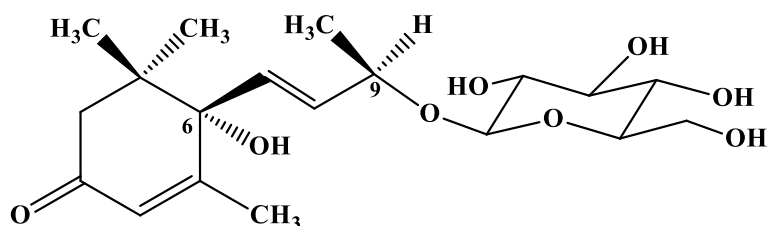
Figure III-160: Principaux effets NOE du composé Ea17

Toutes ces données spectroscopiques et la comparaison avec les données de la littérature [201] conduisent à identifier ce composé au (6*S*,7*E*,9*R*)-6,9-dihydroxy-4,7-megastigmadien-3-one nommé aussi vomifoliol ou blumenol A. Il a été isolé antérieurement des espèces *Heliotropium angiospermum* (Boraginaceae) [202], *Brassica fruticulosa* (Brassicaceae) [203] et *Teucrium heterophyllum* (Lamiaceae) [201].

Le vomifoliol est un composé à squelette ionone qui appartient à la classe de C<sub>13</sub>-norisoprénoïde, ce métabolite secondaire joue un rôle important en tant que régulateur endogène de l'ouverture stomatique [204] et il est considéré comme un élément important à la saveur de tabac, thé et de quelques fruits [203]. Ce composé a été isolé pour la première fois dans le genre *Erinacea*.

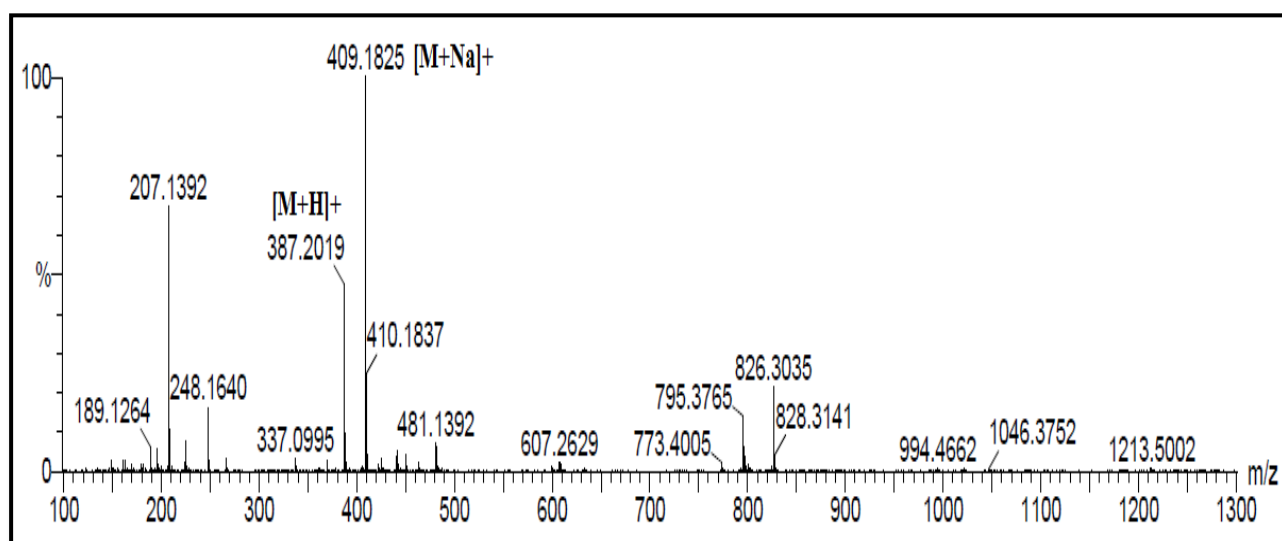
**Tableau III-17:** Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) du composé **Ea17** dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Position	δ <sub>H</sub>	<i>J</i> (Hz)	Multiplicité	δ <sub>C</sub>
1	-	-	-	40,9
2a	2,35	16,7	<i>d</i>	49,4
2b	2,06	16,7	<i>d</i>	-
3	-	-	-	197,3
4	5,78	1,28	<i>d</i>	125,4
5	-	-	-	164,3
6	-	-	-	77,8
7	5,65	15,7	<i>d</i>	127,9
8	5,70	(15,6 ; 4,7)	<i>dd</i>	135,8
9	4,18	-	<i>m</i>	66,0
10	1,11	6,4	<i>d</i>	24,0
11	0,91	-	<i>s</i>	23,9
12	0,94	-	<i>s</i>	23,0
13	1,81	1,4	<i>d</i>	18,9
OH-6	4,97	-	<i>s</i>	-
OH-9	4,69	4,7	<i>d</i>	-

III-1-3-18-Identification structurale du composé **Ea18**(6*S*, 9*R*)-roseoside

Le composé **Ea18** est purifié sous forme d'une poudre blanche soluble dans le MeOH. Il présente une tache visible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en marron après révélation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse à haute résolution HR-ESI-MS du composé **Ea18** enregistré en mode positif (Figure III-161) révèle deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 387,2019$   $[M+H]^+$  (calc.  $C_{19}H_{31}O_8$ , 387,2019) et 409,1825  $[M+Na]^+$ , soit une masse moléculaire de 386 uma et une formule brute en  $C_{19}H_{30}O$ , suggérant 5 degrés d'insaturation.

Figure III-161: Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé **Ea18**

Les spectres RMN  $^1H$  des composés **Ea18** (Figure III-162) et **Ea17** (Figure III-163) sont presque semblables au niveau du squelette ionone, la différence entre ces deux composés réside notamment dans l'apparition des signaux d'une unité osidique entre 3,0 et 4,5 ppm.

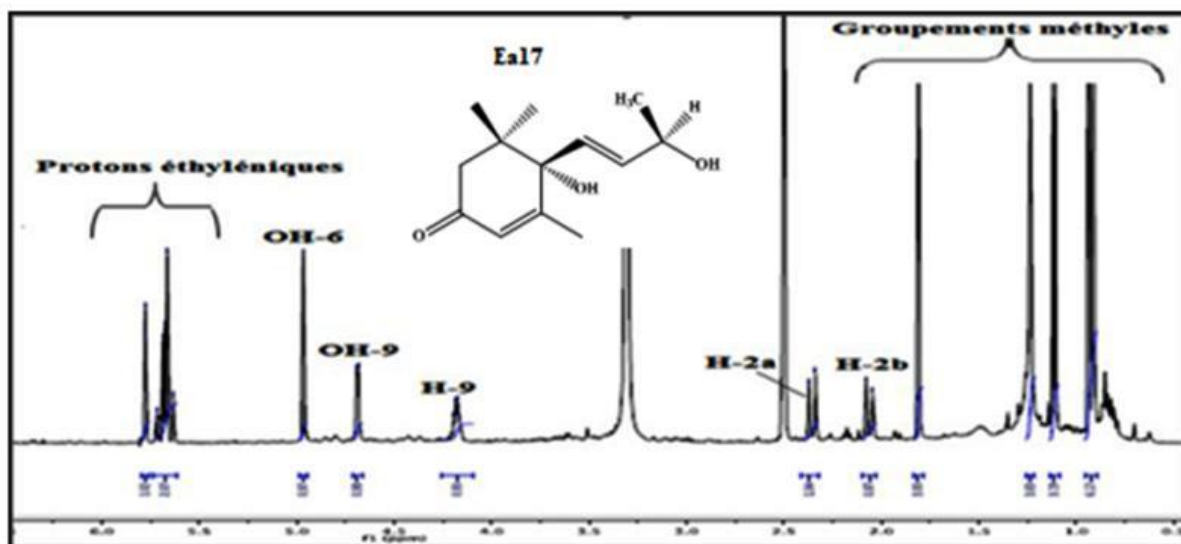


Figure III-162: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea17** ( $\text{DMSO-}d_6$ )

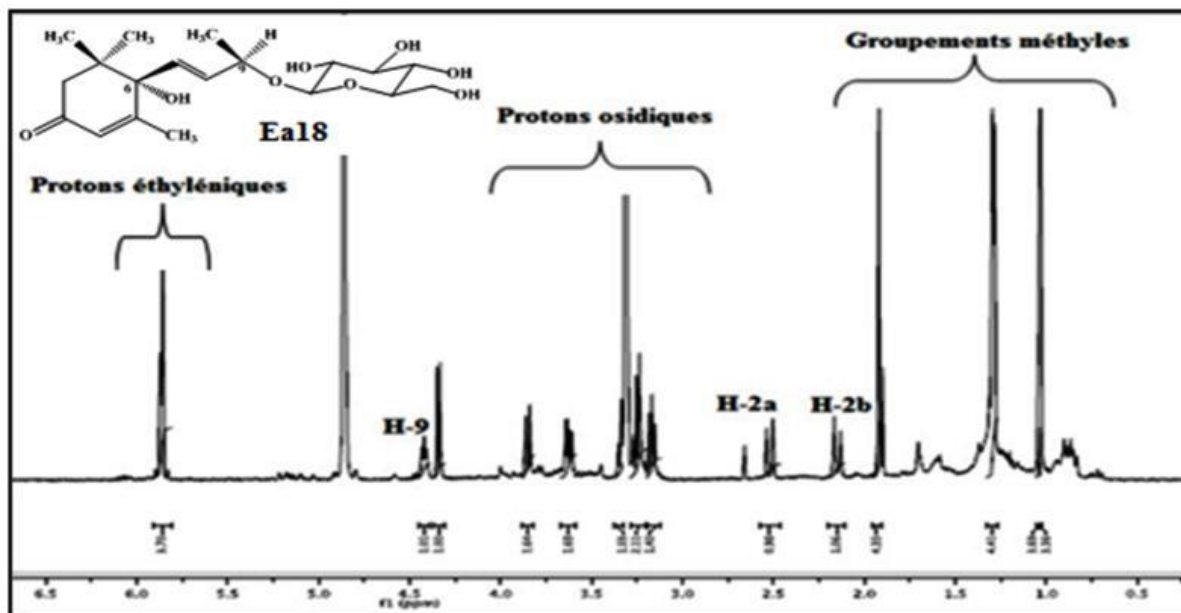


Figure III-163: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **Ea18** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

La détermination des déplacements chimiques des protons et carbones du squelette ionone repose principalement sur l'analyse conjointe des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-163), COSY H-H (Figure III-164), HSQC (Figure III-165) et HMBC (Figure III-166).

#### - Partie cycle

Les deux protons géminés H-2a à  $\delta_{\text{H}}$  2,52 ( $d$ ,  $J = 16,6$  Hz) et H-2b à 2,15 ( $d$ ,  $J = 16,6$  Hz) appartenant au même système de spins selon l'expérience COSY couplent sur le spectre HSQC avec leur carbone à  $\delta_{\text{C}}$  50,5. En plus, ces deux protons montrent sur le spectre HMBC

des corrélations avec les carbones à  $\delta_c$  23,2 (C-11), 24,4 (C-12), 42,3 (C-1), 126,8 (C-4) et 201,1 (C-3). Le proton éthylénique H-4 à  $\delta_H$  5,78 sous forme de multiplet présente des couplages en HMBC avec les carbones à  $\delta_c$  19,3 (C-13) et 50,5 (C-2) (Figure III-166).

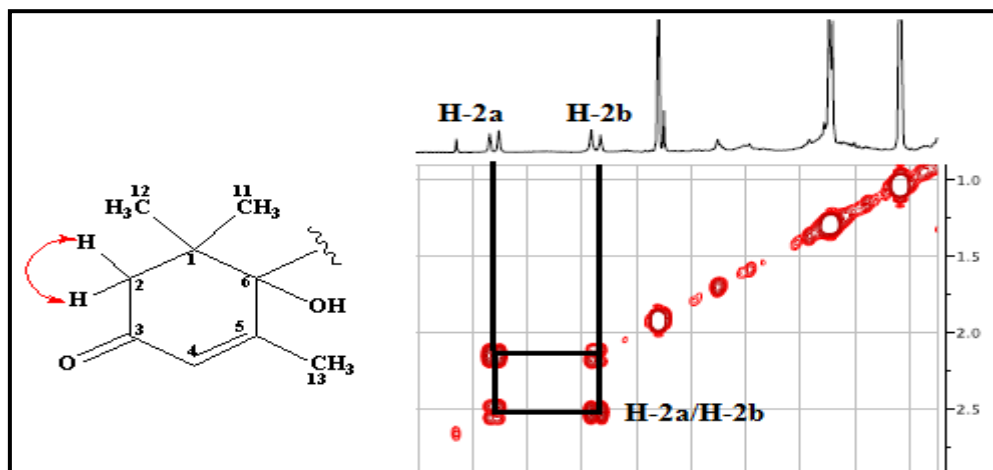


Figure III-164: Partie du spectre COSY H-H du composé Ea18

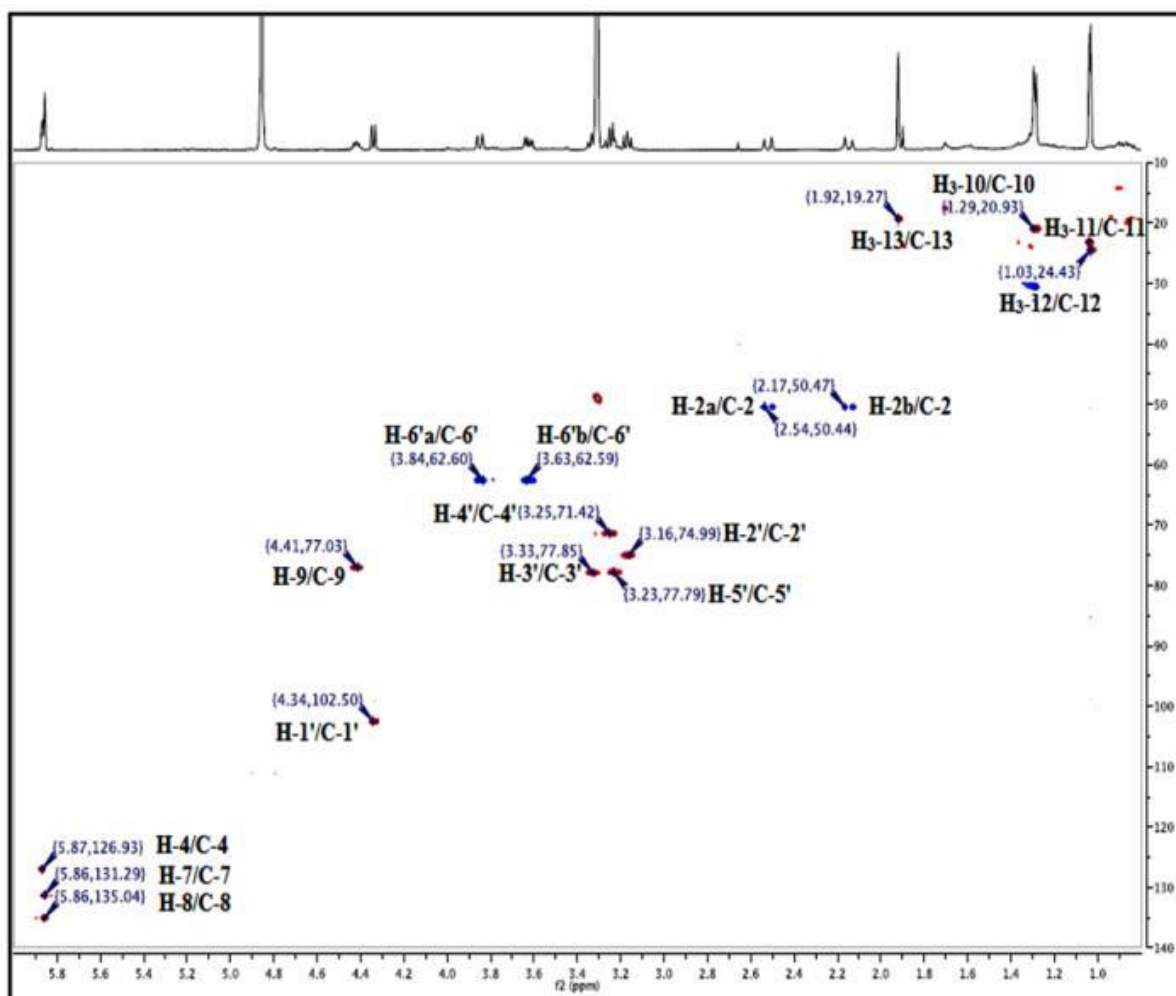


Figure III-165: Spectre HSQC du composé Ea18



Les deux groupements méthyles Me-11 à  $\delta_H$  1,04/  $\delta_C$  23,2 et Me-12 à  $\delta_H$  1,03/  $\delta_C$  24,4 montrent sur le spectre HMBC (Figure III-166) des corrélations entre eux et avec les carbones C-1, C-2 et le carbone quaternaire oxygéné C-6 à  $\delta_C$  79,8. Le proton éthylénique H-4 à  $\delta_H$  5,78 sous forme de multiplet couple en HMBC avec les carbones C-2, C-6 et C-13 (19,3 ppm). Par ailleurs, les protons du groupement Me-13 présentent des corrélations avec les carbones C-4, C-6 et C-5 à  $\delta_C$  167,0.

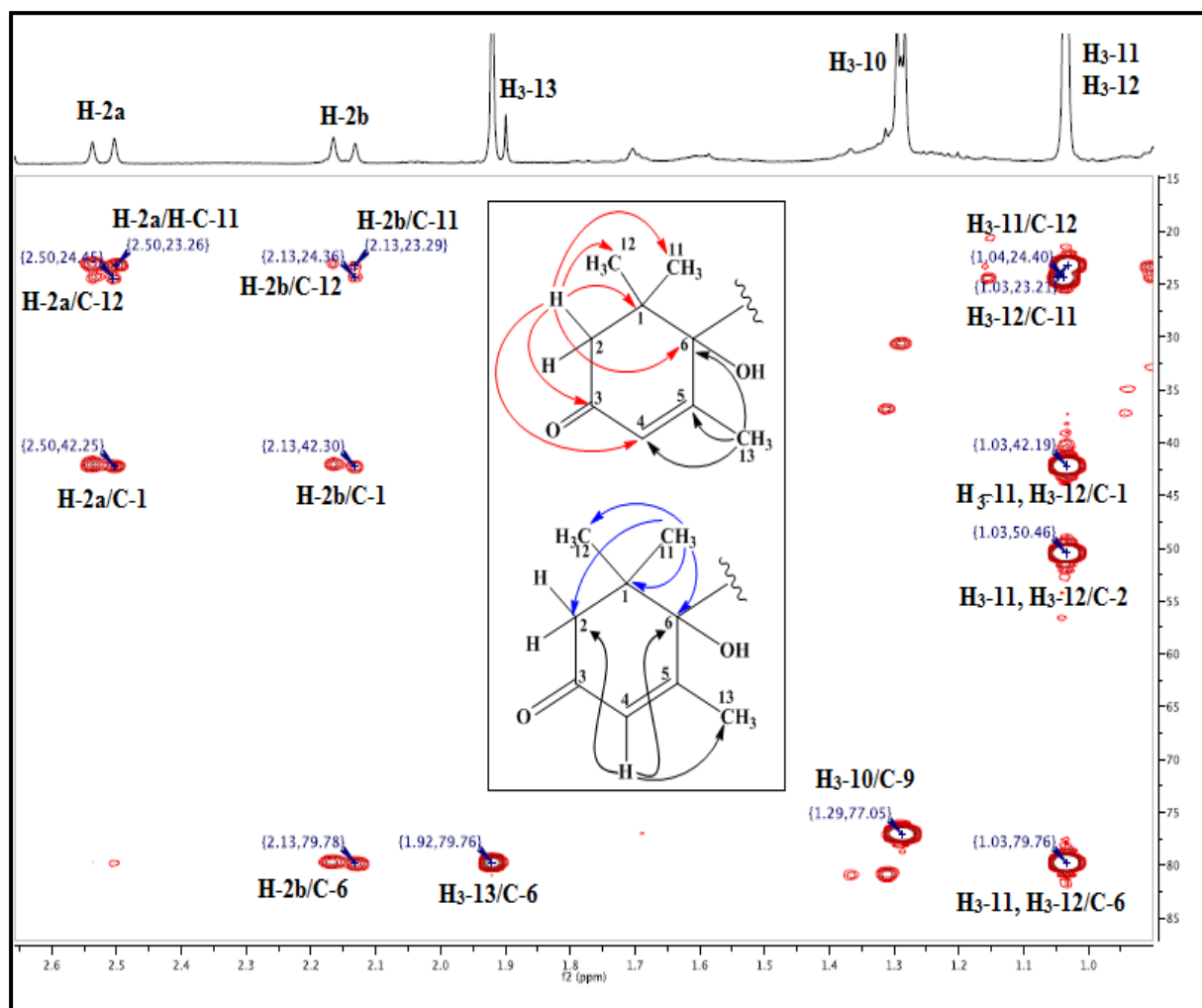


Figure III-166: Spectre HMBC de la partie cycle du composé Ea18

#### - Partie chaîne latérale

Le proton oxyméthine H-9 de la chaîne latérale résonant à 4,41 ppm révèle la présence de couplages en HMBC avec les deux carbones éthyléniques C-7 à  $\delta_C$  131,3 et C-8 à  $\delta_C$  135,0. Leurs protons sont localisés par l'expérience HSQC à  $\delta_H$  5,86 (H-7 et H-8, *m*). Ces protons couplent en HMBC avec les carbones C-6 et C-9. Aussi, les protons du groupement méthyle Me-10 présentent des corrélations HMBC avec les carbones C-9 et C-8 (Figure III-167).

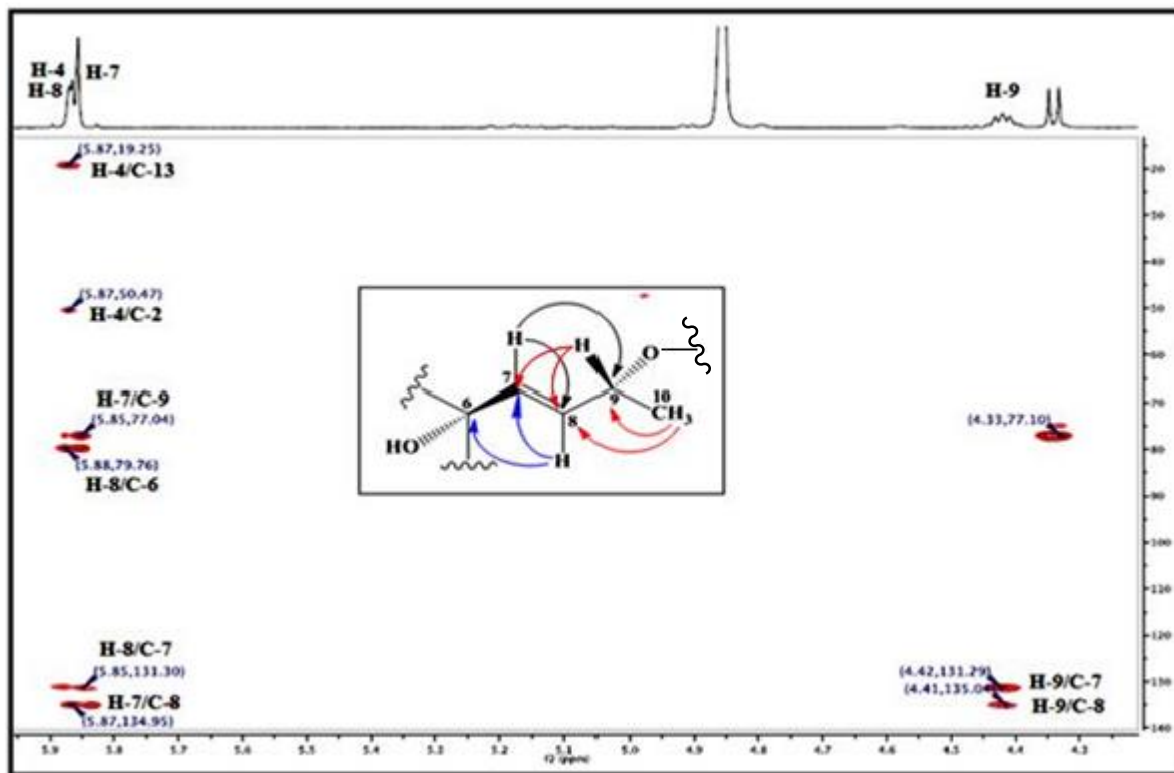


Figure III-167 : Partie du spectre HMBC du composé **Ea18**

A cette étape d'interprétation tous les protons et carbones du squelette ionone (Figure III-168) du composé **Ea18** sont déterminés, il reste à identifier la partie osidique.

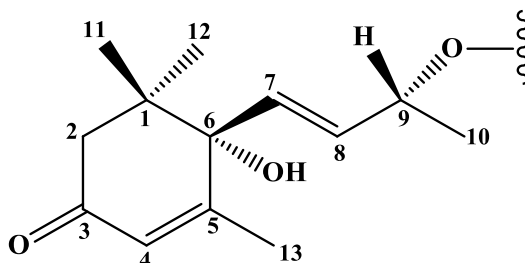
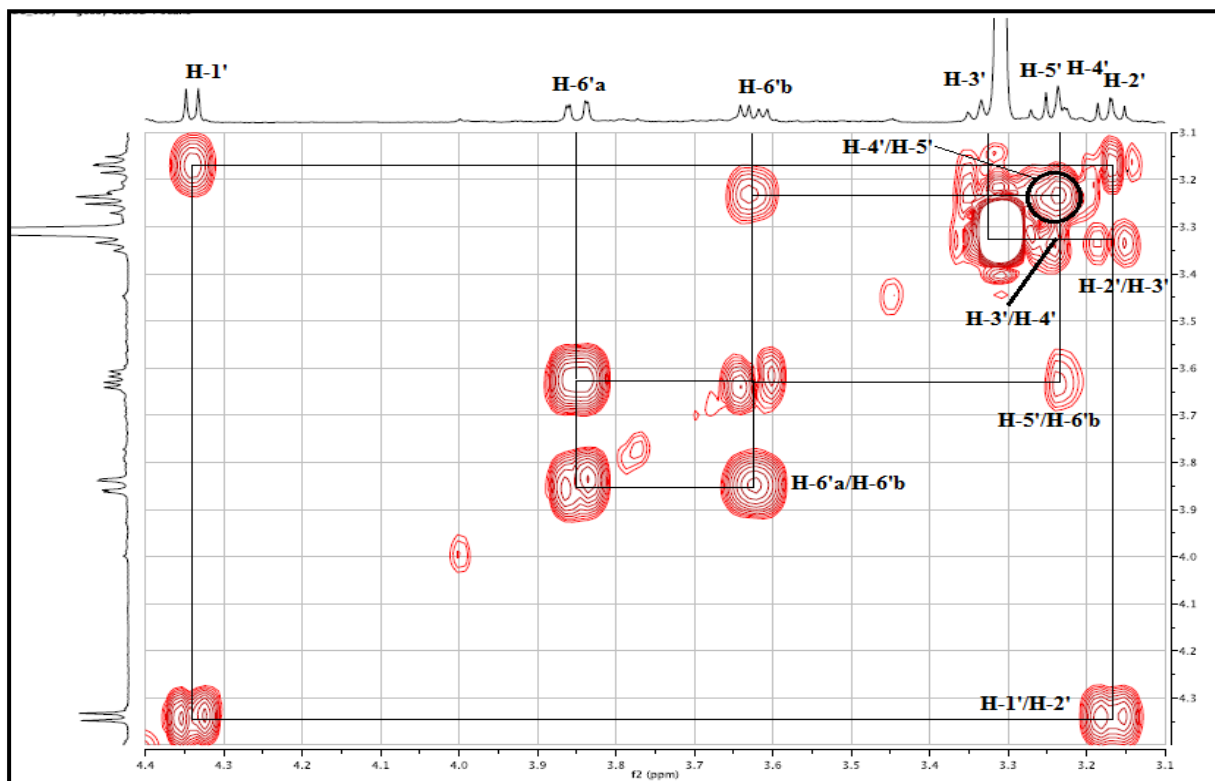


Figure III-168: Squelette ionone du composé **Ea18**

Le spectre COSY de ce composé exhibe également un système de spins à sept protons attestant ainsi de la présence d'un hexose, dont le proton anomérique H-1' résonne à  $\delta_H$  4,43 (*d*,  $J = 7,8$  Hz). Le proton H-2' est localisé à  $\delta_H$  3,16 (*dd*,  $J = 9,0 ; 7,9$  Hz) suite aux couplages observés sur le spectre COSY avec les deux protons H-1' et H-3' à  $\delta_H$  3,33 (*t*,  $J = 8,5$  Hz), ce dernier corrèle avec le proton H-4' à  $\delta_H$  3,25 (*m*) qui couple à son tour avec le proton H-5'  $\delta_H$  3,23 (*m*). Le proton H-5' montre un couplage avec le proton H-6'b à  $\delta_H$  3,62 (*dd*,  $J = 11,7 ; 5,6$  Hz). Le proton H-6'b corrèle aussi avec le proton H-6'a à  $\delta_H$  3,85 (*dd*,  $J = 11,8 ; 1,7$  Hz). En plus des grandes taches de corrélation observées sur le spectre COSY (Figure III-169), les

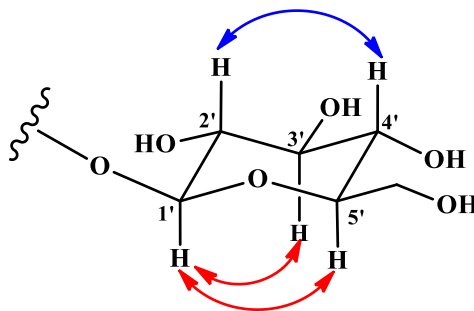
valeurs des constantes de couplage sont toutes supérieures à 7 Hz indiquant une position *trans*-diaxiale de ces protons, caractéristique d'un  $\beta$ -D-glucose.



**Figure III-169** : Spectre COSY H-H de la partie osidique du composé **Ea18**

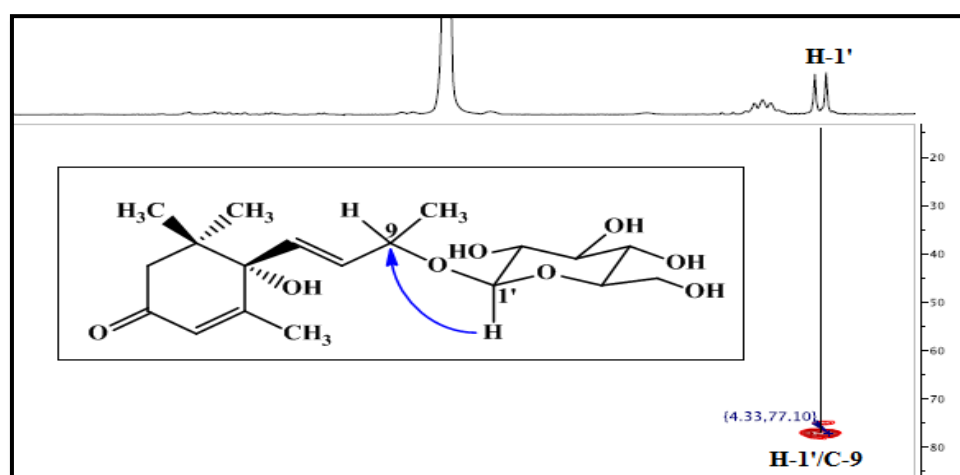
L'analyse du spectre HSQC *J*-modulé (Figure III-165) permet d'assigner les carbones du sucre ( $\beta$ -D-glucose) à  $\delta_c$  102,5 (C-1'), 74,9 (C-2'), 77,9 (C-3'), 71,4 (C-4'), 77,8 (C-5') et 62,6 (C-6').

La stéréochimie de la partie osidique ( $\beta$ -D-glucose) du composé **Ea18** est confirmée par analyse du spectre NOESY (Figure III-170) qui exhibe les effets NOE entre le proton anomérique H-1' et les protons H-3' et H-5' ce qui permet de mettre ces protons en position  $\alpha$ -axiale. Ce spectre révèle aussi un effet NOE entre les protons H-2' et H-4'  $\beta$ -orientés.



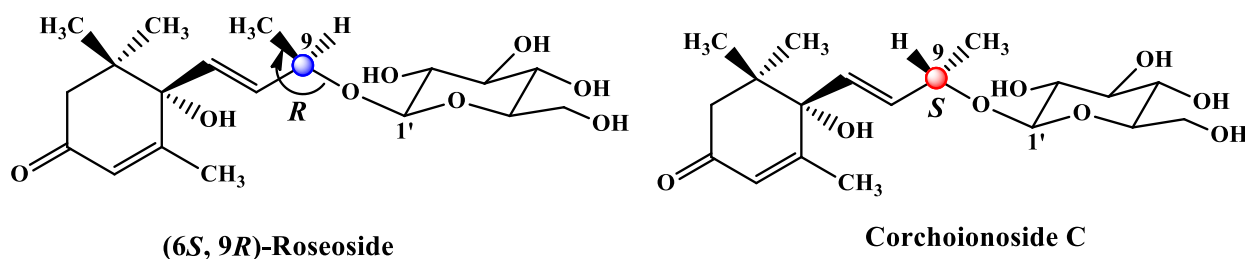
**Figure III-170** : Corrélations NOESY du glucose

Le branchement du squelette ionone au glucose est établi par analyse du spectre HMBC (Figure III-171) qui montre une tache de corrélation entre le proton anomérique H-1' et le carbone C-9 de la chaîne latérale. En plus, le déplacement chimique du carbone C-9 résonnant à  $\delta_C$  77,0 déblindé de + 10 ppm par rapport au même carbone dans le cas du composé **Ea17** porteur d'un OH libre en C-9 ( $\delta_C$  66,0) confirme l'attachement du groupement attracteur glucosyle en C-9.



**Figure III-171** : Corrélation HMBC entre le proton anomérique H-1' et le carbone C-9

Toutes ces données spectroscopiques permettent de proposer pour le composé **Ea18** les deux structures (6*S*, 9*R*)-roseoside ou (6*S*, 9*S*)-corchoionoside C (Figure III-172), dont la différence est affichée spécialement au niveau de la stéréochimie du carbone C-9.



**Figure III-172** : Structures proposées pour le composé **Ea18**

Une simple comparaison entre les déplacements chimiques des deux structures précédentes enregistrés dans le méthanol <sup>[205]</sup> avec les données spectrales du composé **Ea18** permet d'identifier sa structure finale. Les deux carbones C-1' et C-9 dans le cas du composé (6*S*, 9*R*)-roseoside sont détectés à  $\delta_C$  102,7 et 77,3 respectivement, mais dans le composé corchoionoside C, les carbones C-1' et C-9 sont assignés à  $\delta_C$  101,3 et 74,6 respectivement.

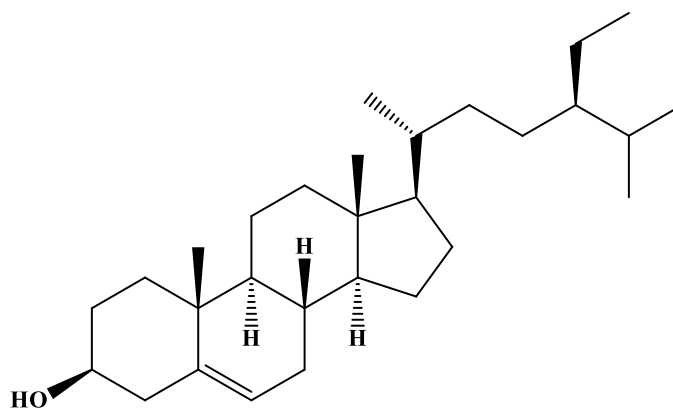
Pour le composé **Ea18**, le déplacement chimique des carbones C-1' et C-9 sont observés à  $\delta_c$  102,5 et 77,0 presque les mêmes valeurs de déplacements chimiques que dans le cas du composé (6*S*, 9*R*)-roseoside. En conséquence, le composé **Ea18** est un composé terpénique à squelette ionone glycoside nommé (6*S*, 9*R*)-roseoside.

Toutes ces données spectrales et la comparaison avec celles de la littérature [205] nous permettent de proposer pour le composé **Ea18** la structure vomifoliol-9-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, appelée également (6*S*, 9*R*)-roseoside. Ce composé est signalé pour la première fois dans le genre *Erinacea*. Il a été isolé antérieurement des espèces *Corchorus olicorius* (Tiliaceae) [205] et *Eriobotrya japonica* (Rosaceae) [206]. Ce composé est connu par ses activités biologiques intéressantes : antihistaminique [205] et antitumorale [206].

**Tableau III-18** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **Ea18** dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
1	-	-	-	42,3
2a	2,52	16,6	<i>d</i>	50,5
2b	2,15	16,6	<i>d</i>	
3	-	-	-	201,1
4	5,87	-	<i>m</i>	126,9
5	-	-	-	167,0
6	-	-	-	79,8
7	5,86	-	<i>m</i>	131,3
8	5,86	-	<i>m</i>	135,0
9	4,41	-	<i>m</i>	77,0
10	1,29	6,3	<i>d</i>	20,9
11	1,04	-	<i>s</i>	23,2
12	1,03	-	<i>s</i>	24,4
13	1,92	-	<i>s</i>	19,3
Glucose				
H-1'	4,34	7,8	<i>d</i>	102,5
H-2'	3,16	(9,0 ; 7,9)	<i>dd</i>	74,9
H-3'	3,33	8,5	<i>t</i>	77,9
H-4'	3,25	-	<i>m</i>	71,4
H-5'	3,23	-	<i>m</i>	77,8
H-6'a	3,85	(11,8 ; 1,7)	<i>dd</i>	62,6
H-6'b	3,62	(11,7 ; 5,6)	<i>dd</i>	

## III-1-3-19-Identification structurale du composé Ea19

 $\beta$ -sitostérol

Le composé **Ea19** est identifié au 24-éthylcholest-5-èn-3-ol ou  $\beta$ -sitostérol par comparaison de sa CCM avec un échantillon témoin. Les données RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé confirment ainsi sa structure. Ce composé se présente sous forme d'une poudre blanche, invisible sous la lumière UV à 254 nm. Il se colore en rose après révélation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100° C. Il a été isolé antérieurement de plusieurs espèces: *Erythrina velutina* [207], *Melipona subnitida* [208], *Deguelia duckeana* [209], *Cajanus cajan* [210] et *Caragana bungei* [211] de la famille Fabaceae.

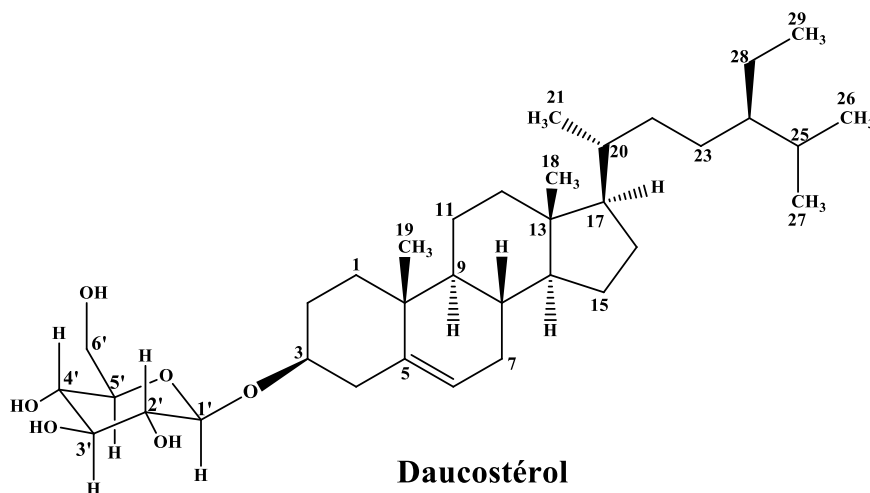
Le  $\beta$ -sitostérol est très connu pour ses activités biologiques intéressantes : anti-inflammatoire, antipyrétique, antinéoplasique, hypocholestérolémiant, effet angiogénique, antidiabétique, traitement du cancer de la prostate, effet neuroprotecteur, immunomodulatrice, antihelminthique, antimutagène et génotoxique [212].

**Tableau III-19:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **Ea19** dans le  $\text{CDCl}_3$ .

Position	$\delta\text{H } m J \text{ Hz}$	$\delta\text{C}$
1	1,90 H-1a <i>m</i> ; 1,13 H-1b <i>m</i>	37,2
2	1,88 H-2a <i>m</i> ; 1,56 H-2b <i>m</i>	31,6
3	3,58 <i>tt</i> 11,3 ; 5,3	71,8
4	2,34 H-4a <i>ddd</i> (13,0; 5,0; 2,0) , 2,30 H-4b <i>td</i> 11,0; 2,0	42,3
5	-	140,7
6	5,40 <i>dd</i> 5,2 ; 2,3	121,7
7	1,50 <i>m</i>	31,9

8	2,03 <i>td</i> 12,1; 2,4	31,8
9	0,98 <i>m</i>	50,1
10	-	36,5
11	1,55 H-11a <i>m</i> ; 1,50 H-11b <i>qd</i> 10,8; 4,6	21,1
12	2,06 H-12a <i>dt</i> 12,8; 3,6 ; 1,21 H-12b <i>m</i>	39,7
13	-	42,3
14	1,04 <i>m</i>	56,7
15	1,63 H-15a <i>m</i> ; 1,11 H-15b <i>tm</i> 11,2	24,3
16	1,89 H-16a <i>m</i> ; 1,30 H-16b <i>m</i>	28,2
17	1,16 <i>t</i> 10,0	56,0
18	0,74 <i>s</i>	11,8
19	1,06 <i>s</i>	19,4
20	1,4 <i>m</i>	36,1
21	0,93 <i>d</i> 6,5	18,8
22	1,36 H-22a <i>m</i> ; 1,07 H-22b <i>m</i>	33,9
23	1,21 <i>m</i>	26,0
24	0,97 <i>m</i>	45,8
25	1,71 <i>m</i>	29,1
26	0,88 <i>d</i> 6,9	19,8
27	0,87 <i>d</i> 6,9	19,0
28	1,31 <i>m</i>	23,0
29	0,89 <i>t</i> 7,4	12,0

## III-1-3-20-Identification structurale du composé Ea20



La comparaison des données spectroscopiques en RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé du composé **Ea20** avec celles de la littérature, indique qu'il s'agit du  $\beta$ -sitostéryl-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside connu sous le nom Daucostérol, isolé antérieurement des espèces suivantes: *Caragana bungei* [211], *Crotalaria saharae* [213], *Eriosema robustum* [214] de la famille Fabaceae.

Ce composé possède des activités biologiques à savoir: immunomodulatrice [215], anti-mutagénique [216] et cytotoxique [212].

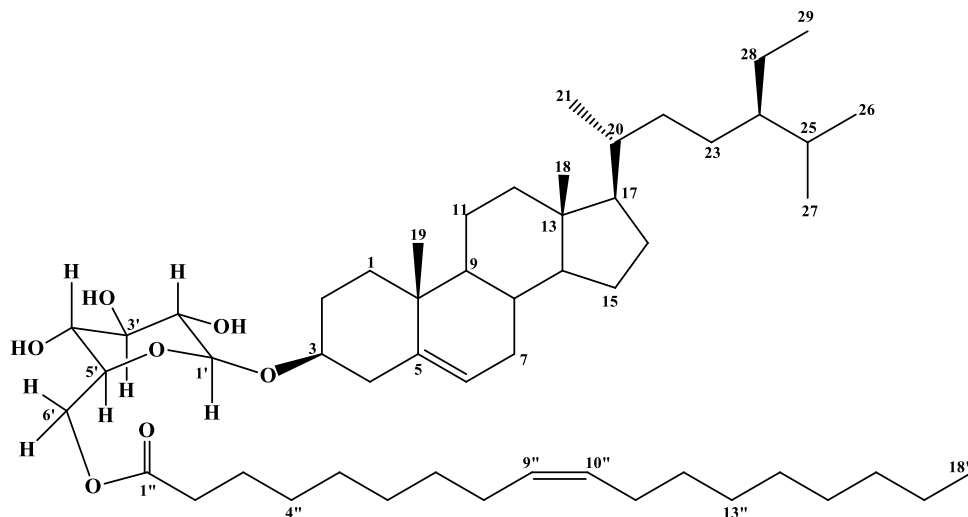
**Tableau III-20:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **Ea20** dans le mélange ( $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Position	$\delta_{\text{H}}$ <i>m J Hz</i>	$\delta_{\text{C}}$
1	1,88 (H-1a) <i>m</i> ; 1,08 (H-1b) <i>m</i>	37,6
2	1,91 (H-2a) <i>m</i> ; 1,62 (H-2b) <i>m</i>	29,9
3	3,59 <i>m</i>	79,5
4	2,42 (H-4a) <i>dm</i> 10 ; 2,28 (H-4b) <i>tl</i> 10	39,0
5	-	140,7
6	5,37 <i>d</i> 5,0	122,4
7	1,47 <i>m</i>	32,3
8	1,97 <i>m</i>	32,3
9	0,96 <i>m</i>	50,6
10	-	37,1
11	1,45 (H-11a) <i>m</i> ; 1,02 (H-11b) <i>m</i>	21,2
12	2,01 (H-12a) <i>m</i> ; 1,17 (H-11b) <i>m</i>	40,8
13	-	42,7
14	1,03 <i>m</i>	57,2
15	1,59 (H-15a) <i>m</i> ; 1,11 (H-15b) <i>m</i>	24,6
16	1,84 (H-16a) <i>m</i> ; 1,29 (H-16b) <i>m</i>	28,6
17	1,14 <i>m</i>	56,4
18	0,70 <i>s</i>	12,1
19	1,03 <i>s</i>	19,5
20	1,37 <i>m</i>	36,5
21	0,95 <i>d</i> 5,1	18,9
22	1,34 (H-22a) <i>m</i> ; 1,04 (H-22b) <i>m</i>	34,3



23	1,19 <i>m</i>	26,4
24	0,93 <i>m</i>	46,2
25	1,68 <i>m</i>	29,5
26	0,94 <i>d</i> 6,9	19,9
27	0,83 <i>d</i> 6,9	19,2
28	1,26 <i>m</i>	23,4
29	0,85 <i>t</i> 7,4	12,3
Glucose		
1'	4,41 <i>d</i> 7,9	101,5
2'	3,23 <i>t</i> 7,9	74,0
3'	3,42 <i>t</i> 7,9	76,9
4'	3,42 <i>m</i>	70,7
5'	3,29 <i>m</i>	76,3
6'a	3,84 H-6'a <i>dl</i> 10,0	62,2
6'b'	3,75 H-6'b' <i>dd</i> 10,0; 5,0	

### III-1-3-21-Identification structurale du composé Ea21



#### Sitoindoside II

Il s'agit d'un stéroïde acylé,  $\beta$ -sitostéryl-3-*O*-(6'-*O*-oléoyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside connu sous le nom sitoindoside II (**Ea21**) isolé antérieurement des espèces *Musa paradisiaca* (Musaceae) [217], *Musa sapientum* (Musaceae) [218] et *Moringa oleifera* (Moringaceae) [219].

Le spectre de masse ESI-MS du composé **Ea21** enregistré en mode positif montre un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z = 841$   $[M+H]^+$ , correspondant à une masse moléculaire de 840 uma et une formule brute en  $C_{53}H_{92}O_7$ .

Hormis les signaux de protons et carbones (Tableau III-21) de la génine stéroïdique (sitostérol) qui sont identifiés précédemment par comparaison avec le composé **Ea19** et les données de la littérature <sup>[220]</sup>, le spectre RMN  $^1H$  de ce composé révèle l'existence d'un proton anomérique déblindé résonant à 4,39 ppm sous forme d'un doublet ( $J_{H-1'/H-2'} = 7,8$  Hz) et trois protons éthyléniques à 5,37 ppm attribuables au proton H-6 du cycle A de la génine stéroïdique et à deux autres protons d'une double liaison disubstituée (Figures III-173 et III-174).

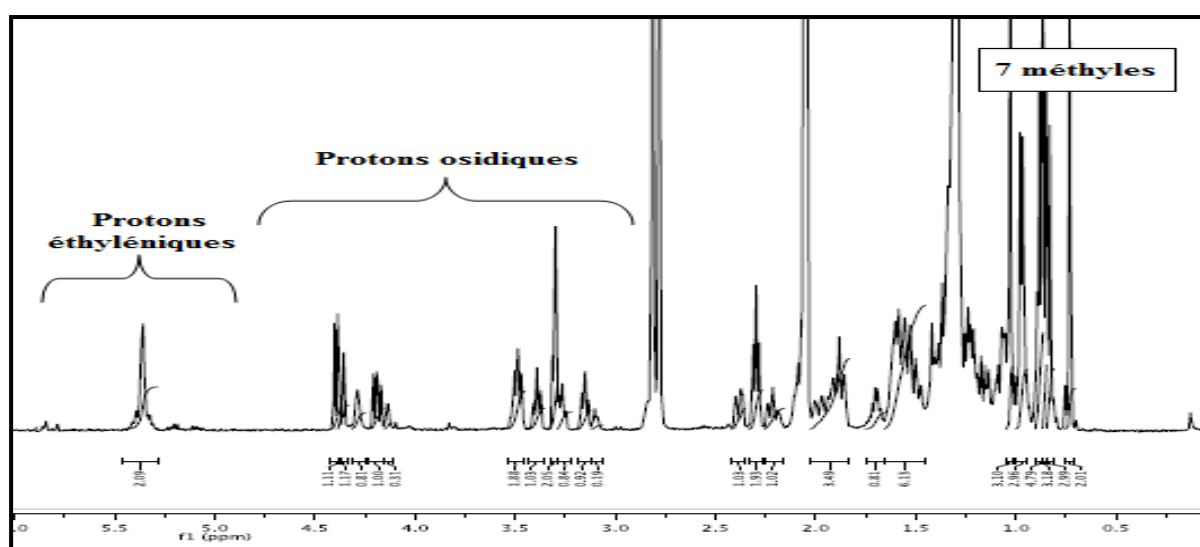


Figure III-173 : Spectre RMN  $^1H$  du composé **Ea21** (Acétone- $d_6$ )

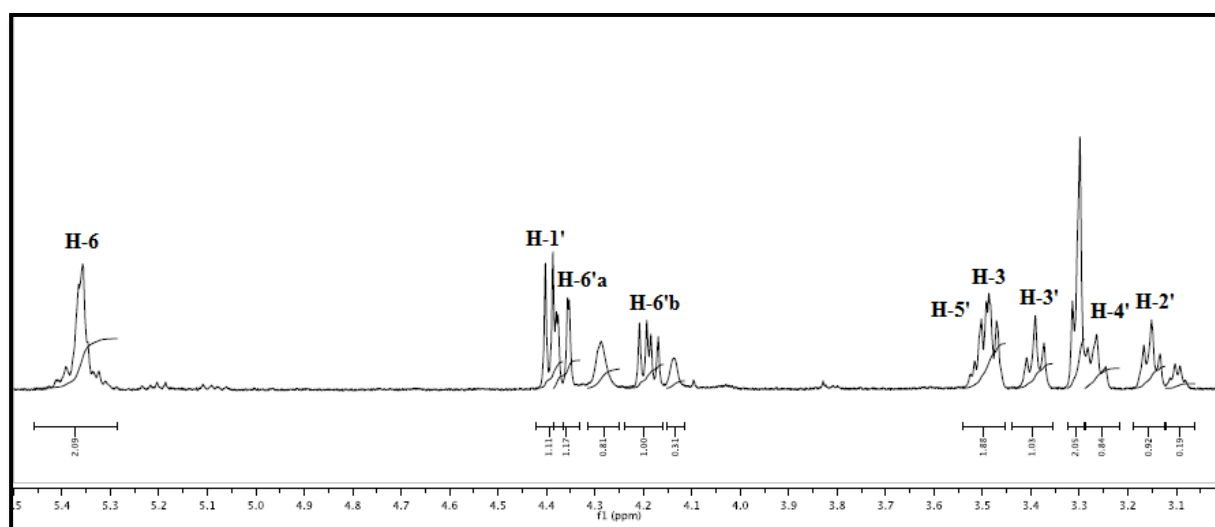
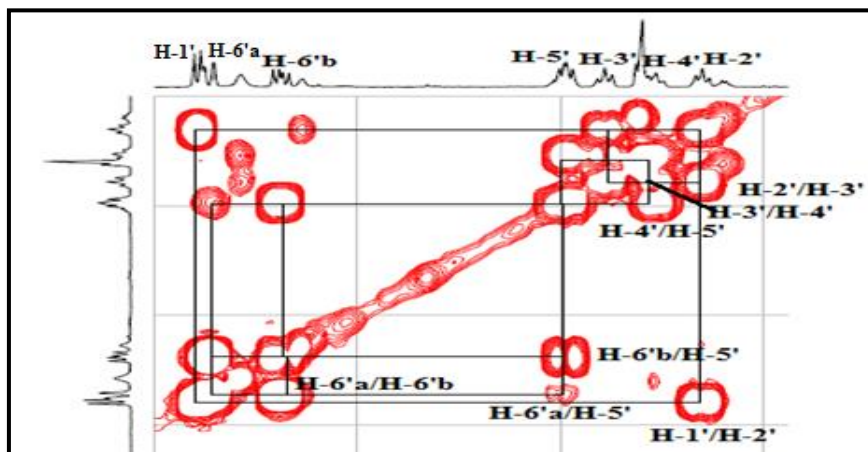


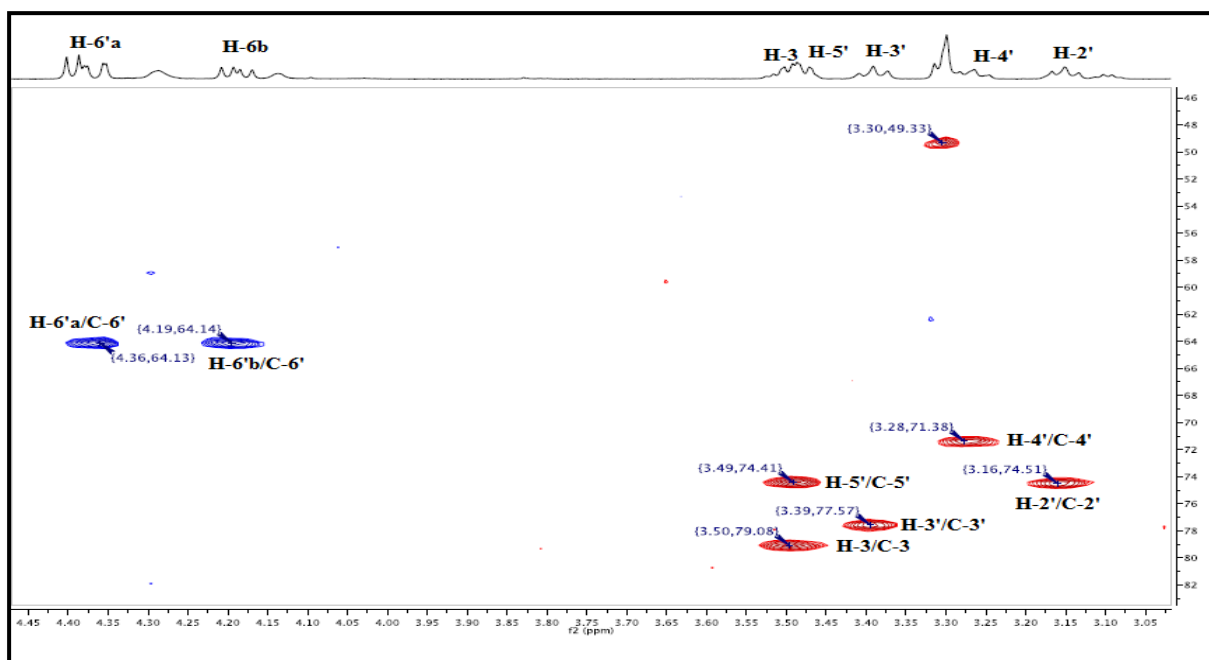
Figure III-174: Spectre RMN  $^1H$  (région déblindée) du composé **21** (Acétone- $d_6$ )

Le spectre COSY H-H (Figure III-175) du composé **Ea21** permet de déterminer sept protons d'un hexose. A partir du proton anomère H-1', on relie à travers leurs taches de corrélation les protons H-2' à  $\delta_H$  3,15 (*t*,  $J = 8,4$  Hz)/ H-3'  $\delta_H$  3,39 (*t*,  $J = 8,9$  Hz)/ H-4'  $\delta_H$  3,26 (*t*,  $J = 9,1$  Hz)/ H-5'  $\delta_H$  3,49 (*m*)/ H<sub>2</sub>-6' [H-6'a  $\delta_H$  4,37 (*dd*,  $J = 11,7 ; 2,3$  Hz)/ H-6'b  $\delta_H$  4,19 (*dd*,  $J = 11,6 ; 7,5$  Hz)]. Les grandes taches de corrélation ainsi que les valeurs des constantes de couplage de tous ces protons ( $J > 7$  Hz) impliquent qu'ils sont tous axiaux. Il s'agit donc d'un glucose de configuration  $\beta$ .



**Figure III-175:** Partie osidique du spectre COSY H-H du composé **Ea21**

L'expérience HSQC *J*-modulé permet d'attribuer tous les déplacements chimiques des carbones du glucose à  $\delta_C$  102,2 (C-1'), 74,5 (C-2'), 77,6 (C-3'), 71,4 (C-4'), 74,4 (C-5') et 64,1 (C-6') (Figure III-176).



**Figure III-176 :** Partie du spectre HSQC (Partie osidique) du composé **Ea21**

L'analyse du spectre HMBC (Figure III-177) de ce composé permet de visualiser des couplages en  $^3J$  et  $^2J$  de la partie osidique entre le proton H-2' et les carbones C-3' et C-1', H-4' et le carbone C-3', H-3' et les carbones C-4' et C-5' et H-5' et le carbone C-1'.

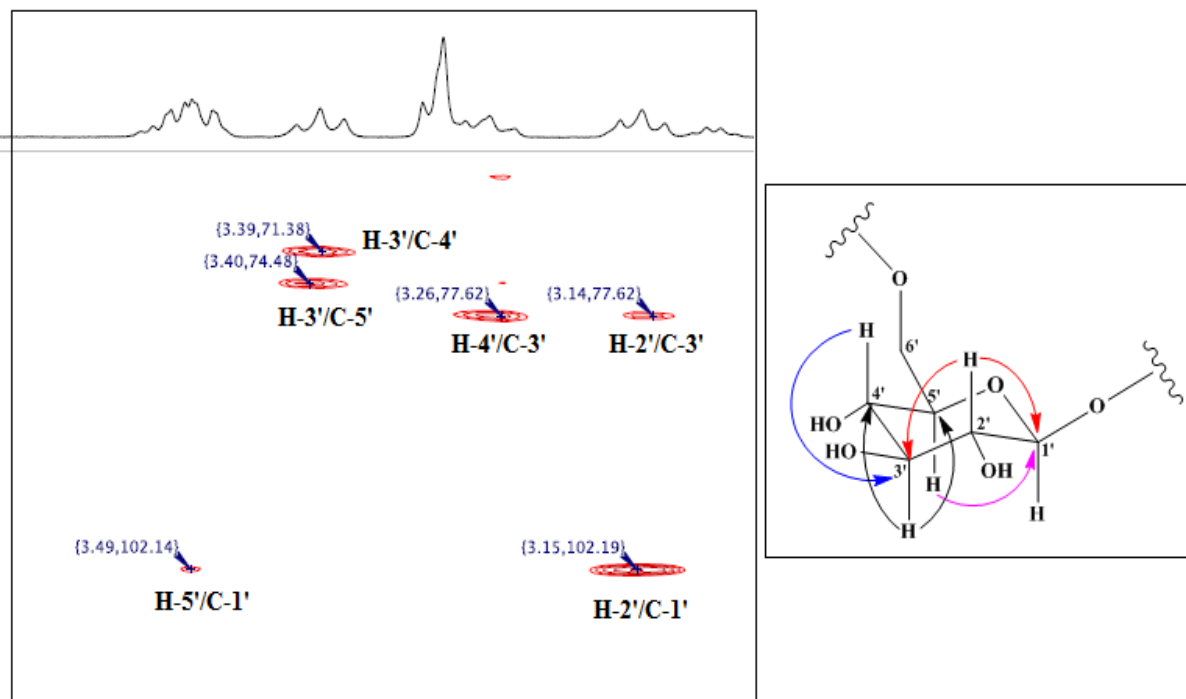


Figure III-177 : Correlations HMBC de la partie osidique

La corrélation visualisée sur le spectre HMBC entre le proton anomère H-1' du glucose et le carbone C-3 de la génine stéroïdique indique que le  $\beta$ -D-glucose est lié au carbone oxyméthine C-3. En outre, les déplacements chimiques déblindés des protons H-6'a  $\delta_H$  4,37 (*dd*,  $J = 11,7 ; 2,3$  Hz) et H-6'b  $\delta_H$  4,19 (*dd*,  $J = 11,6 ; 7,5$  Hz) ainsi que les corrélations observées sur le spectre HMBC entre ces deux protons et une fonction carbonyle à  $\delta_C$  173,3 (C-1'') révèle la présence d'une substitution à ce niveau par un groupement acyle insaturé (Figure III-178).

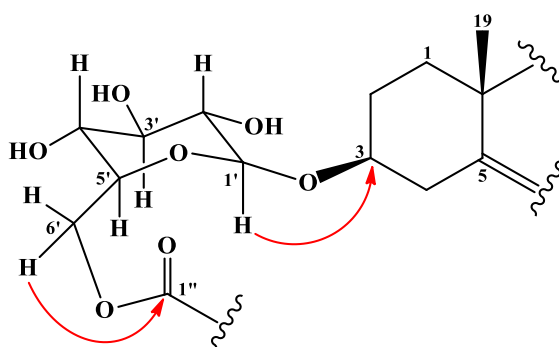


Figure III-178 : Correlations HMBC montrant l'attachement du glucose aux carbones C-3 et C-1''

L'analyse des spectres RMN  $^1\text{H}$ , COSY H-H et HSQC  $J$ -modulé (Tableau III-21) de ce composé et la comparaison avec les données de la littérature conduisent à identifier les signaux du groupement acyle insaturé à  $\delta_{\text{H}}$  2,30 ( $t$ ,  $J = 7,3$  Hz, H-2'')/  $\delta_{\text{C}}$  34,5 (C-2''),  $\delta_{\text{H}}$  1,60 ( $m$ , H-3'')/  $\delta_{\text{C}}$  24,6 (C-3''),  $\delta_{\text{H}}$  1,20-2,08 ( $m$ , H-4'' à H-7'')/  $\delta_{\text{C}}$  29,2-30,0 (C-4'' à C-7''),  $\delta_{\text{H}}$  2,10 ( $m$ , H-8'')/  $\delta_{\text{C}}$  27,6 (C-8''),  $\delta_{\text{H}}$  2,84 ( $m$ , H-11'')/  $\delta_{\text{C}}$  25,9 (C-11''),  $\delta_{\text{H}}$  1,20-2,08 ( $m$ , H-12'' à H-15'')/  $\delta_{\text{C}}$  29,2-30,0 (C-12'' à C-15''),  $\delta_{\text{H}}$  1,28 ( $m$ , H-16'')/  $\delta_{\text{C}}$  32,4 (C-16''),  $\delta_{\text{H}}$  1,31 ( $m$ , H-17'')/  $\delta_{\text{C}}$  22,8 (C-17'') et  $\delta_{\text{H}}$  0,89 ( $t$ ,  $J = 6,8$  Hz, H-18'') et  $\delta_{\text{C}}$  14,1 (C-18'').

Les signaux de la double liaison sont visualisés à  $\delta_{\text{H}}$  5,37 ( $m$ ) (H-9'') et  $\delta_{\text{C}}$  128,5 (C-9''),  $\delta_{\text{H}}$  5,37 ( $m$ ) (H-10'')/  $\delta_{\text{C}}$  130,4 (C-10''). Tous ces signaux sont caractéristiques d'un acide gras insaturé en C-9''-C-10'' [221]. La masse moléculaire de l'ordre de 840 uma, indique bien qu'il s'agit du groupement oléoyle.

La figure ci-dessous résume les principales corrélations observées sur le spectre HMBC du composé **Ea21**.

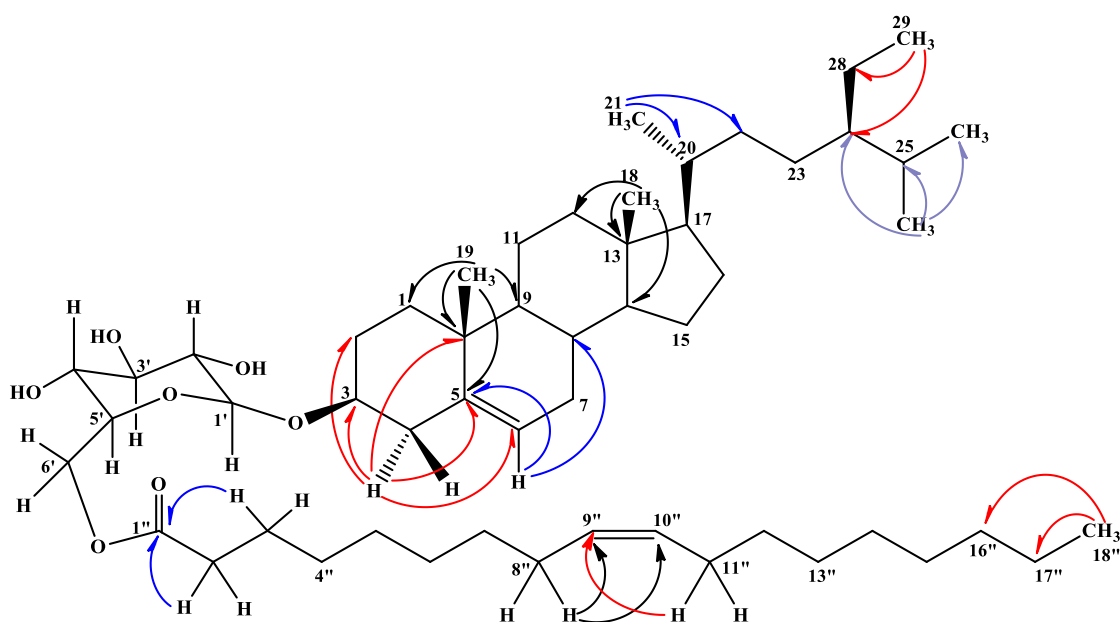


Figure III-179: Corrélations HMBC du composé **Ea21**

L'ensemble de ces données spectroscopiques et la valeur du pouvoir rotatoire de ce composé dans le chloroforme  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -9.3$  ( $C = 0,25$  g/100 ml), permettent d'attribuer sans ambiguïté pour ce composé la structure suivante:  $\beta$ -sitostéryl-3-*O*-(6'-*O*-oléoyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside appelée aussi sitoindoside II. Ce dernier possède une activité antitumorale [222].

Il est à noter que le sitoindoside II est isolé pour la première fois dans le genre *Erinacea*.

**Tableau III-21** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **Ea21** dans l'acétone deutérée.

Position	$\delta_{\text{H}}$ <i>m</i> / <i>J</i> / Hz	$\delta_{\text{C}}$
1	1,87 (H-1a) <i>m</i> ; 1,07 (H-1b) <i>m</i>	37,9
2	1,94 (H-2a) <i>m</i> ; 1,54 (H-2b) <i>m</i>	30,3
3	3,0 <i>m</i>	79,1
4	2,39 (H-4a) <i>ddd</i> (13,4; 4,8; 2,2); 2,21 (H-4b) <i>m</i>	39,3
5	-	141,4
6	5,37 <i>m</i>	121,9
7	1,99 (H-7a) <i>m</i> ; 1,56 (H-7b) <i>m</i>	32,4
8	1,49 <i>m</i>	32,4
9	0,97 <i>m</i>	50,9
10	-	37,2
11	1,56 (H-11a) <i>m</i> ; 1,52 (H-11b) <i>m</i>	21,5
12	2,05 (H-12a) <i>m</i> ; 1,21 (H-11b) <i>m</i>	40,4
13	-	40,8
14	1,06 <i>m</i>	57,4
15	1,89 (H-15a) <i>m</i> ; 1,32 (H-15b) <i>m</i>	28,6
16	1,62 (H-16a) <i>m</i> ; 1,12 (H-16b) <i>m</i>	24,6
17	1,17 <i>m</i>	56,6
18	0,74 <i>s</i>	11,9
19	1,03 <i>s</i>	19,4
20	1,42 <i>m</i>	36,6
21	0,98 <i>d</i> 6,4	18,9
22	2,3 <i>td</i> (7,6 ; 2,3)	34,5
23	1,61 <i>m</i>	25,5
24	0,98 <i>m</i>	46,4
25	1,7 <i>m</i>	29,6
26	0,84 <i>d</i> 6,9	19,0
27	0,86 <i>d</i> 6,8	19,2
28	1,31 <i>m</i>	23,2
29	0,87 <i>t</i> 6,8	12,0

Glucose		
1'	4,39 <i>d</i> 7,8	102,2
2'	3,15 <i>t</i> 8,4	74,5
3'	3,39 <i>t</i> 8,9	77,6
4'	3,26 <i>t</i> 9,1	71,4
5'	3,49 <i>m</i>	74,4
6'	4,37 (H-6'a) <i>dd</i> (11,7; 2,3) et 4,19 (H-6' b) <i>dd</i> , (11,6 ; 7,5)	64,1
Ester oléoylé		
1"	-	173,3
2"	2,30 <i>t</i> 7,3	34,5
3"	1,60 <i>m</i>	24,6
4"-7"	1,20-2,08 <i>m</i>	29,2-30,0
8"	2,10 <i>m</i>	27,6
9"	5,37 <i>m</i>	128,5
10"	5,37 <i>m</i>	130,4
11"	2,84 <i>m</i>	25,9
12"-15"	1,20-2,08 <i>m</i>	29,2-30,0
16"	1,28 <i>m</i>	32,4
17"	1,31 <i>m</i>	22,8
18"	0,89 <i>t</i> 6,8	14,1

### III-1-4- Conclusion

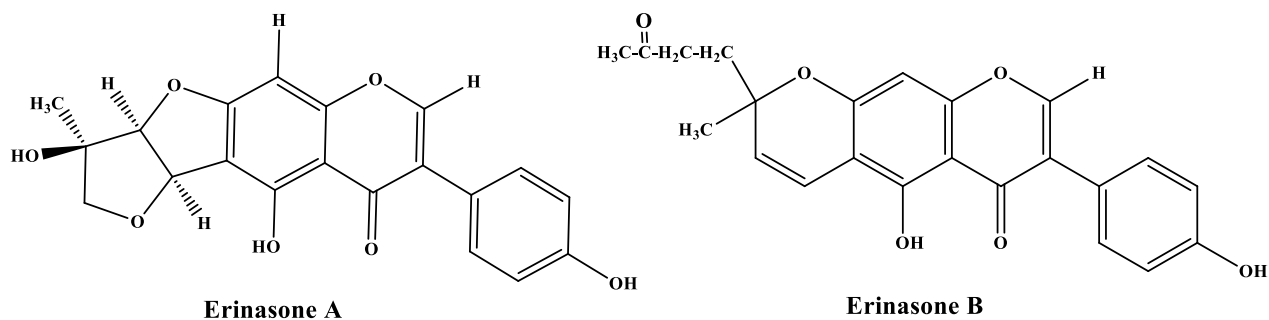
L'étude phytochimique réalisée sur l'espèce *Erinacea anthyllis* Link de la famille Fabaceae a conduit à l'isolement de 15 flavonoïdes répartis en 12 isoflavones, 2 flavanones et 1 flavanol, 1 polyphénol, 2 monoterpènes et 3 stéroïdes. Ces composés ont été obtenus à l'état pur à partir des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante entière *E. anthyllis* par l'utilisation souvent combinée des différentes méthodes chromatographiques à savoir la chromatographie sur colonne de gel de silice normale et sur polyamide SC6, sur plaques préparatives de silice normale et greffée en C<sub>18</sub> et la chromatographie d'exclusion stérique sur Sephadex.

L'élucidation structurale des composés isolés **1-21** a été réalisée par les méthodes d'analyse spectroscopiques modernes particulièrement la RMN 1D (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C *J*-modulé) et

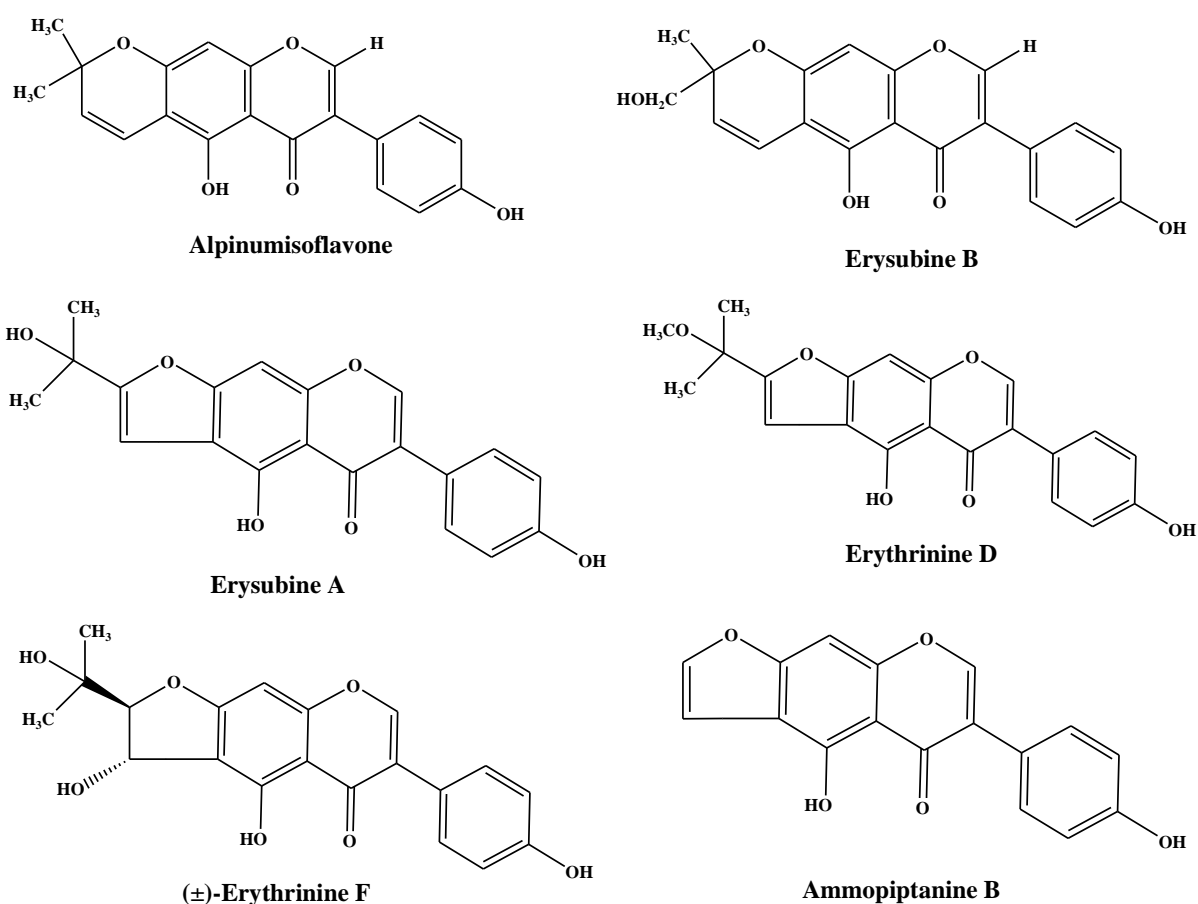
2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC et NOESY) et la spectrométrie de masse à haute résolution (HR-ESI-MS), l'UV, la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20}$  et par la comparaison avec les données de la littérature.

Les composés caractérisés se répartissent en quatre classes chimiques de métabolites secondaires incluant les flavonoïdes, les polyphénols, les terpènes et les stéroïdes. Ils se présentent comme suit :

- Deux isoflavonoïdes prénylés nouveaux : Erinasone A (**Ea1**) et Erinasone B (**Ea2**).

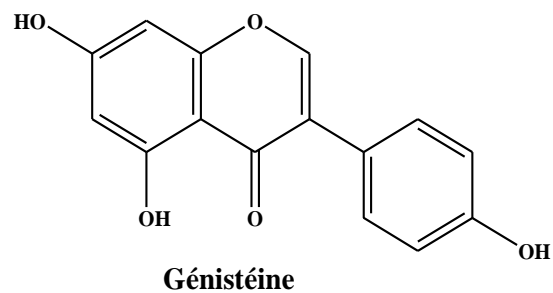
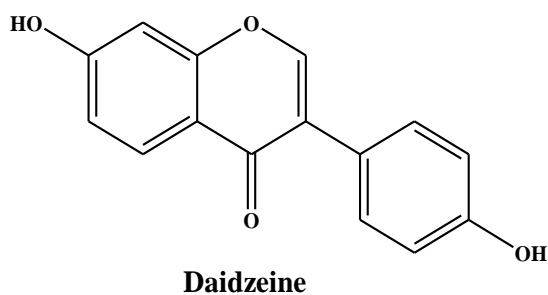


- Six isoflavonoïdes prénylés connus : Alpinumisoflavone (**Ea3**), Erysubine B (**Ea4**), Erysubine A (**Ea5**), Erythrinine D (**Ea6**), (±)-Erythrinine F (**Ea7**) et Ammopiptanine B (**Ea8**)

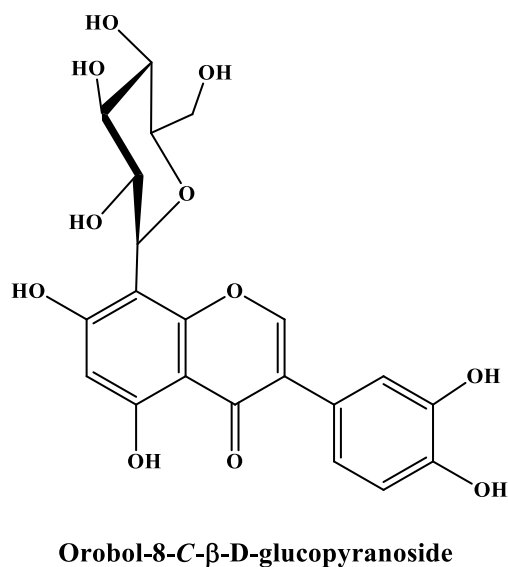
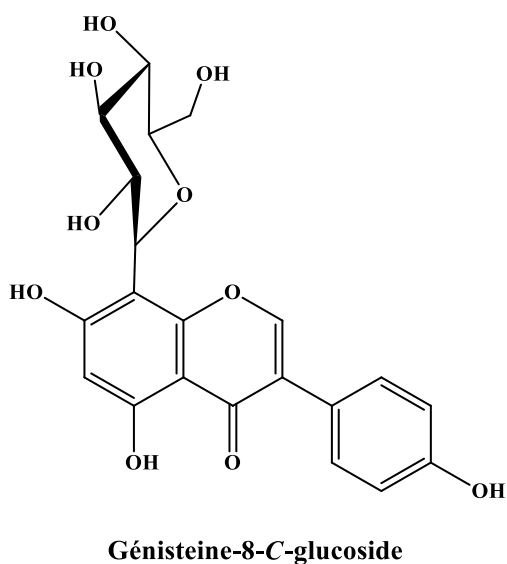




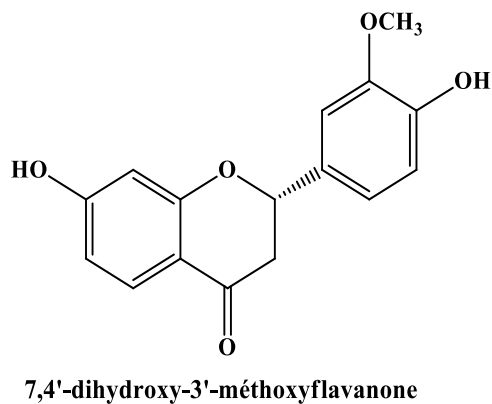
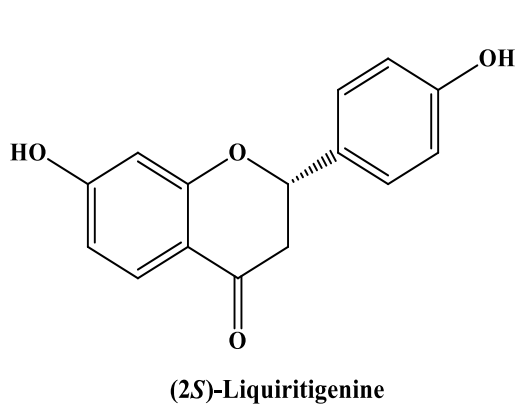
- Deux isoflavonoïdes aglycones connus : Daidzeine (**Ea9**) et Génistéine (**Ea10**)



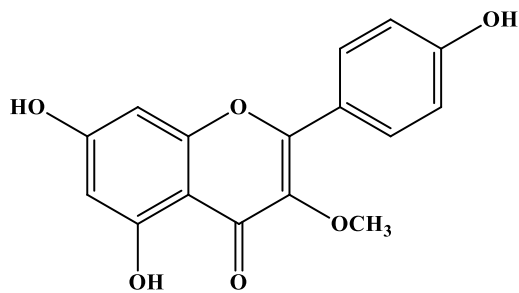
- Deux isoflavonoïdes C-glycosylés connus : Génistéine-8-C-glucoside (**Ea11**) et Orobol-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside (**Ea12**).



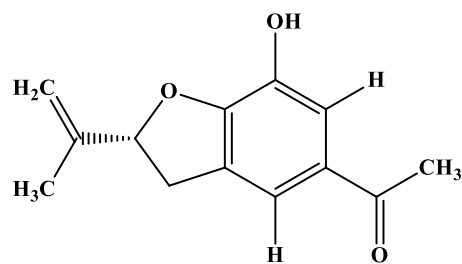
- Deux flavanones connues : (2*S*)-Liquiritigénine (**Ea13**) et 7,4'-dihydroxy-3'-méthoxyflavanone (**Ea14**).



- Un flavonol, Isokaempferide (**Ea15**) et un polyphénol, 7-hydroxytremetone (**Ea16**).

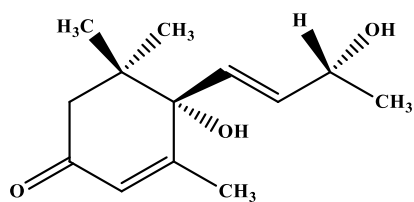


Isokaempferide

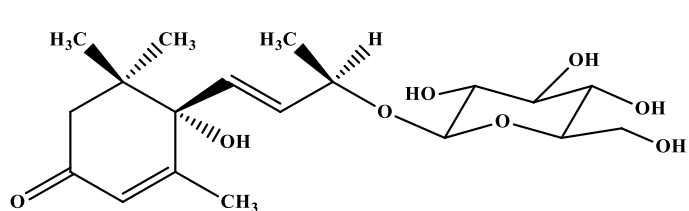


7-hydroxytremetone

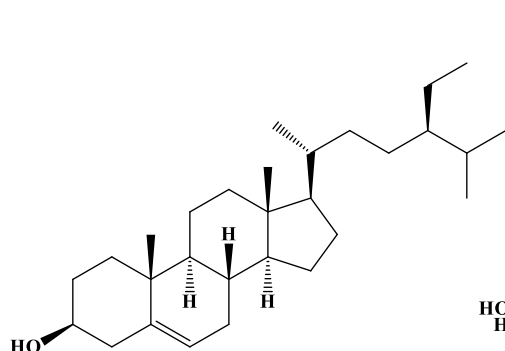
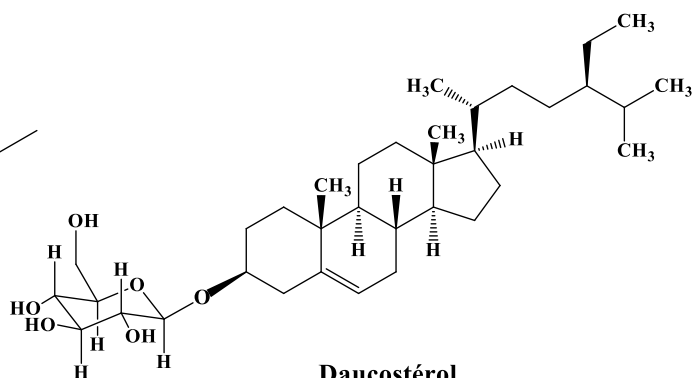
- Deux monoterpènes à squelette ionone connus: Vomifoliol (**Ea17**) et (6*S*, 9*R*)-Roseoside (**Ea18**).



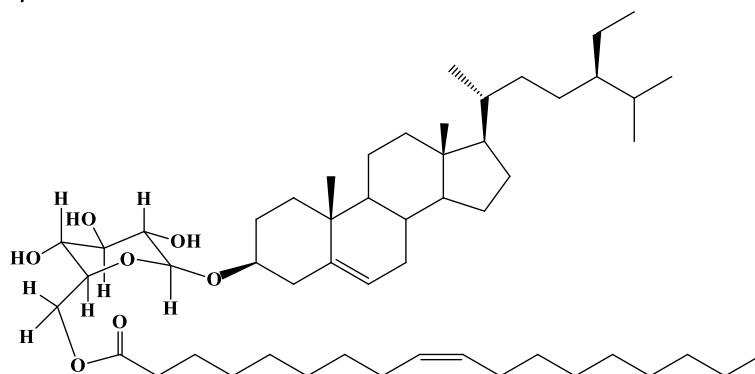
Vomifoliol

(6*S*, 9*R*)-Roseoside

- Trois stéroïdes :  $\beta$ -sitostérol (**Ea19**), Daucostérol (**Ea20**) et Sitoindoside II (**Ea21**).

 $\beta$ -sitostérol

Daucostérol



Sitoindoside II

### III-2- Etude phytochimique de l'espèce *Euphorbia atlantica* Coss.

#### III-2-1- Extraction

La plante entière *Euphorbia atlantica* Coss. séchée et broyée (1500 g) a subi une extraction hydro-alcoolique par le mélange de solvants EtOH-H<sub>2</sub>O (70 : 30) à température ambiante. Après filtration et évaporation non à sec à température 40 °C, l'extrait aqueux (800 ml) est soumis à une extraction liquide-liquide en utilisant successivement des solvants à polarité croissante: éther de pétrole (3 x 200 ml), dichlorométhane (3 x 200 ml), acétate d'éthyle (3 x 200 ml) et enfin *n*-butanol (3 x 200 ml). Les quatre phases organiques obtenues (EP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt et *n*-BuOH) sont traitées par sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), puis elles sont filtrées et évaporées à sec sous pression réduite, pour donner 13,96 g (EP), 15,17 g (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 7,4 g (AcOEt) et 29,95 g (*n*-BuOH). Les différentes étapes d'extraction sont rassemblées dans le schéma ci-dessous (Figure III-174).

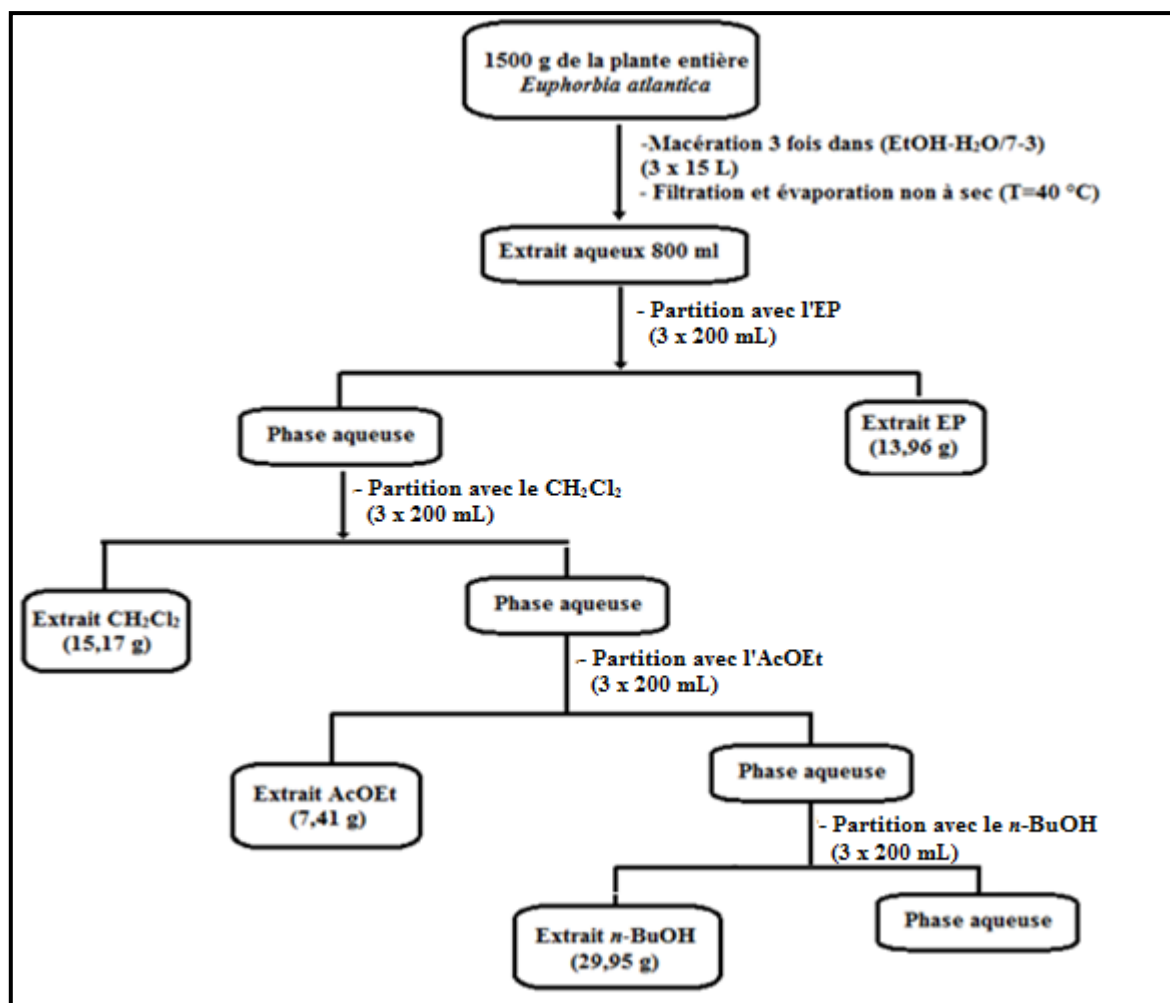


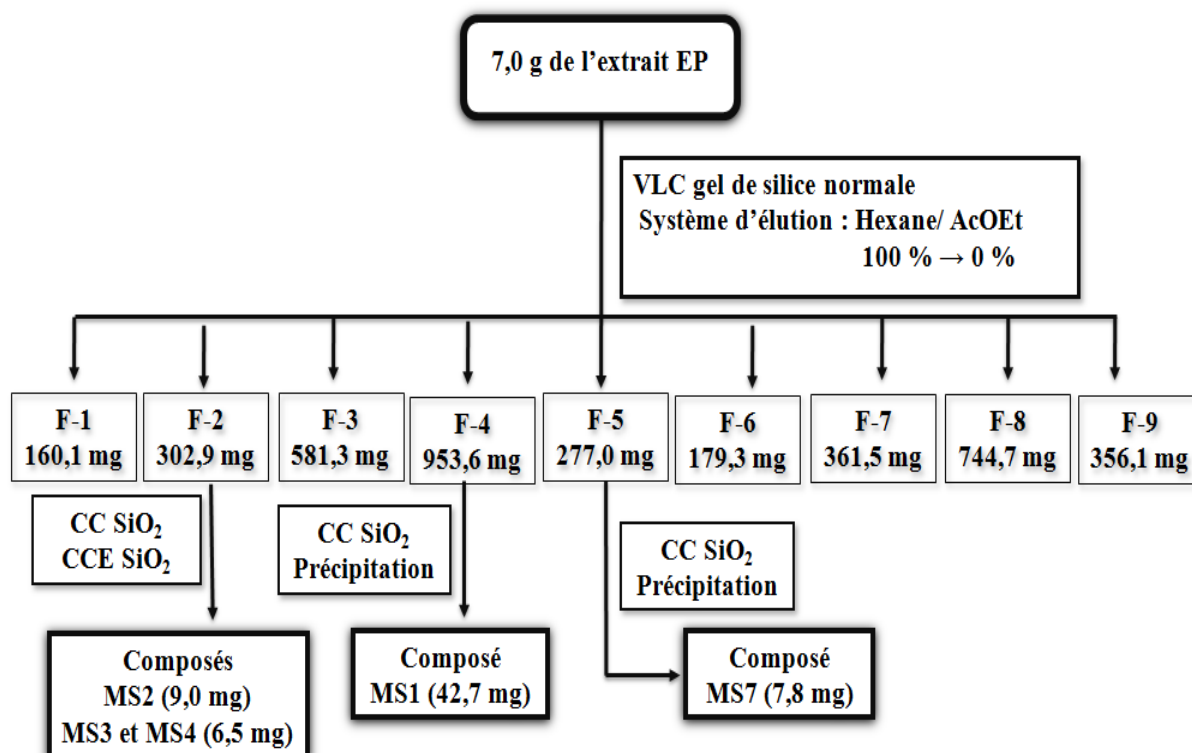
Figure III-180: Schéma général d'extraction de la plante *Euphorbia atlantica* Coss.

### III-2-2- Fractionnement et purification des extraits EP et AcOEt

La comparaison des CCM réalisées sur les quatre extraits (EP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOAt et *n*-BuOH) dans différents systèmes d'éluion met en évidence la richesse des deux extraits EP et AcOEt en métabolites secondaires, ce qui nous a orienté vers l'investigation phytochimique de ces deux extraits.

#### ➤ Extrait éther de pétrole

7 g de l'extrait éther de pétrole (EP) sont soumis à un fractionnement par chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice normale en utilisant un gradient d'éluion hexane/AcOEt (100 : 0 à 0 : 100). Les fractions révélant le même profil CCM sont regroupées pour donner 9 fractions majoritaires (Figure III-181).

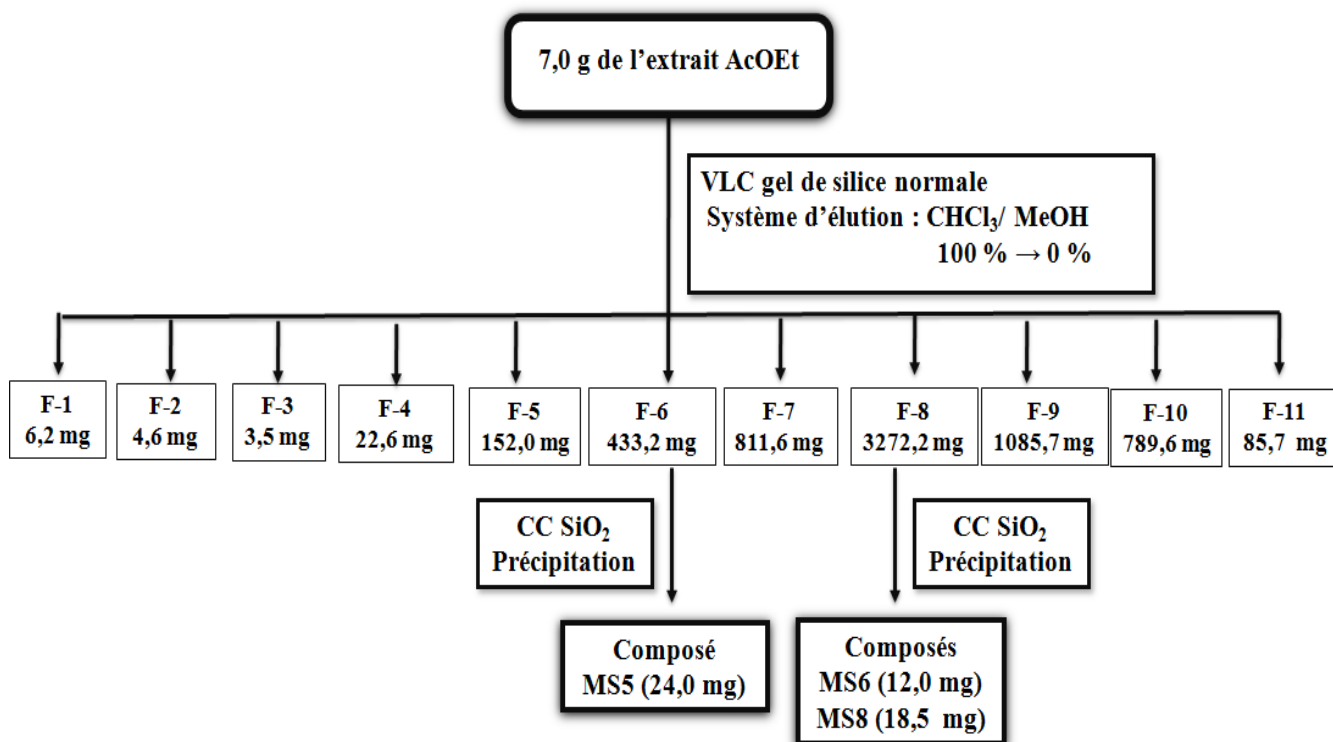


**Figure 181:** Schéma de purification de l'extrait EP de l'espèce *Euphorbia atlantica*

#### ➤ Extrait acétate d'éthyle

7,4 g de l'extrait AcOEt sont fractionnés sur gel de silice normale par chromatographie liquide sous vide (VLC), avec un gradient de solvants CHCl<sub>3</sub>/MeOH allant de 0 % à 100%. A l'issue de ce fractionnement, 11 fractions majoritaires ont été recueillies. Elles sont

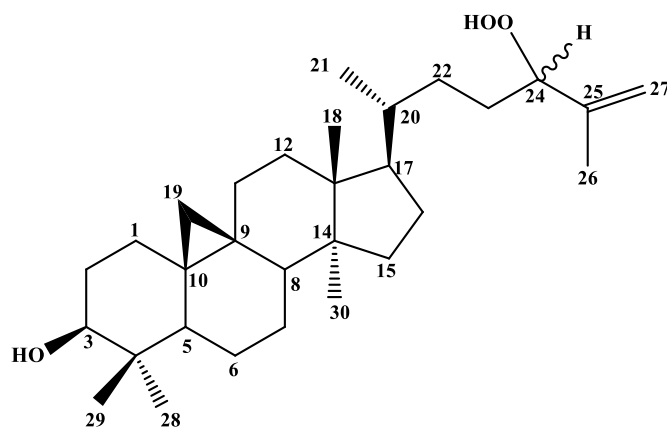
purifiées par l'utilisation de différentes méthodes chromatographiques pour fournir 3 produits (Figure III-182).



**Figure III-182:** Schéma de purification de l'extrait AcOEt de l'espèce *Euphorbia atlantica*

### III-2-3- Identification structurale des composés isolés

#### III-3-3-1- Identification structurale du composé MS1



**3β-hydroxycycloart-25-èn-24-hydroperoxyde**

Le composé **MS1** est obtenu sous forme d'une poudre blanche amorphe soluble dans le chloroforme. Il est invisible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en bleu après pulvérisation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse ESI-MS enregistré en mode positif du composé **MS1** (Figure III-183), révèle la présence d'un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  481,3  $[M+Na]^+$ , ceci correspond à une masse moléculaire de 458 uma et une formule brute en  $C_{30}H_{50}O_3$ , traduisant la présence de 6 insaturations.

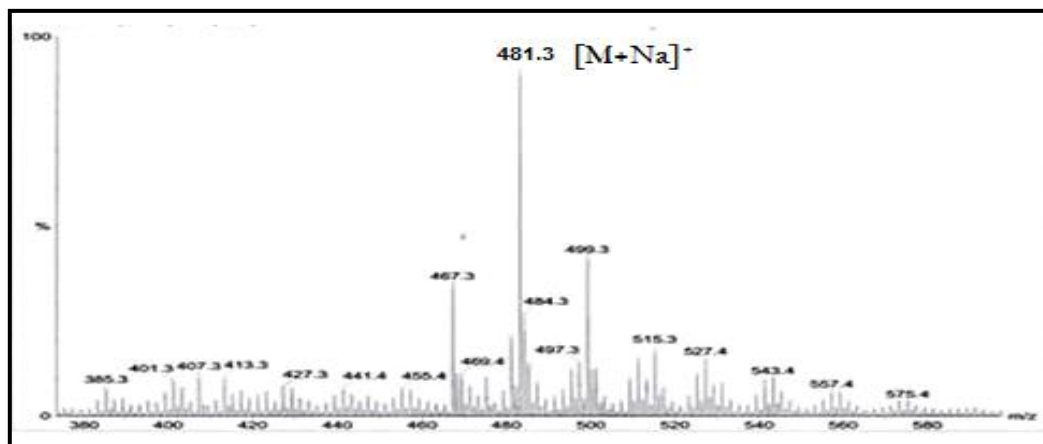


Figure III-183: Spectre de masse ESI-MS du composé **MS1**

Le spectre RMN  $^1H$  (Figure III-184 et III-185) de ce composé montre la présence d'un triterpène cycloartanique. Ce type de produits omniprésent dans les plantes du genre *Euphorbia* [223-225] est caractérisé par la présence des signaux à champ fort de deux protons non équivalents repérés à  $\delta_H$  0,36 (1H, *d*,  $J = 4,0$  Hz) et 0,58 (1H, *d*,  $J = 3,7$  Hz) qui sont attribués aux protons H-19 *exo* et H-19 *endo*, respectivement d'un noyau cyclopropane tétra-substitué. Aussi ce spectre exhibe l'existence de six groupements méthyles à  $\delta_H$  0,98 (3H, *s*, H<sub>3</sub>-18), 0,91 (3H, *s*, H<sub>3</sub>-30), 0,90 (3H, *d*,  $J = 6,1$  Hz, H<sub>3</sub>-21), 1,76 (3H, *s*, H<sub>3</sub>-26), 0,99 (3H, *s*, H<sub>3</sub>-28) et 0,83 (3H, *s*, H<sub>3</sub>-29) et deux groupements oxyméthines à  $\delta_H$  3,32 (1H, *dd*,  $J = 11,0$ , 4,1 Hz, H-3 $\alpha$ ) et 4,30 (1H, *t*,  $J = 6,8$  Hz).

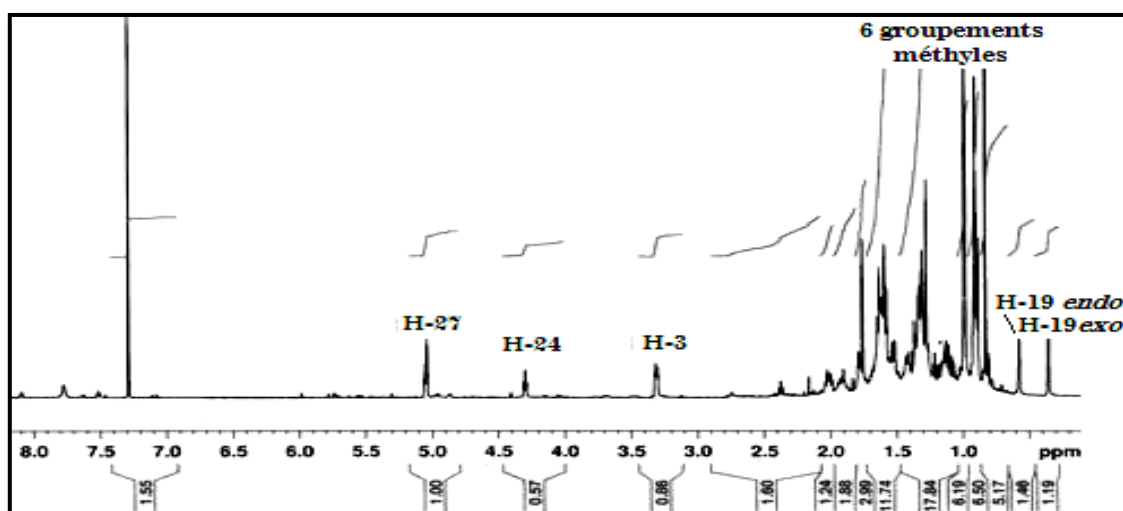
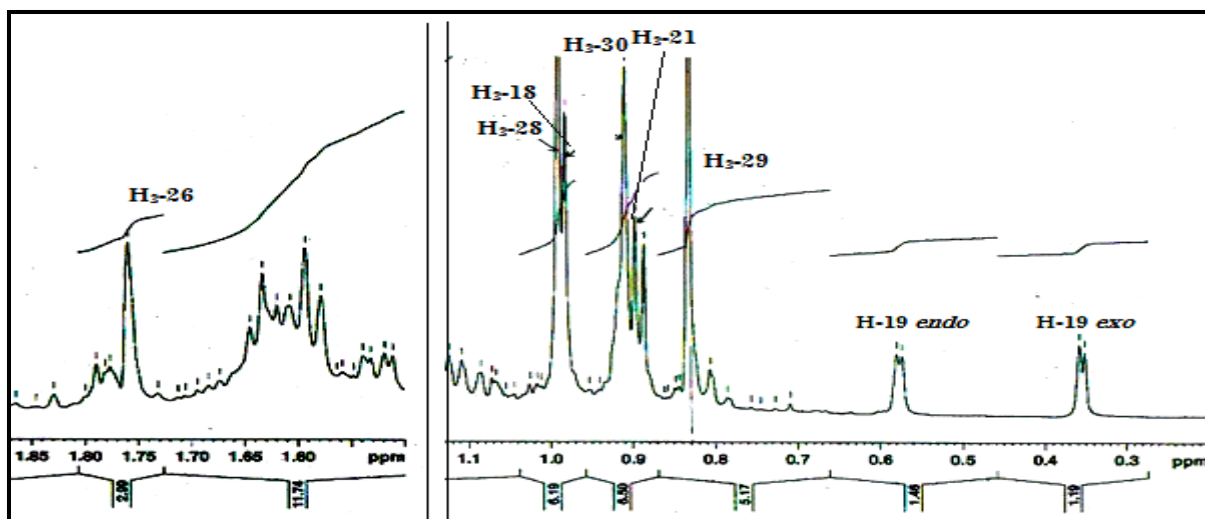
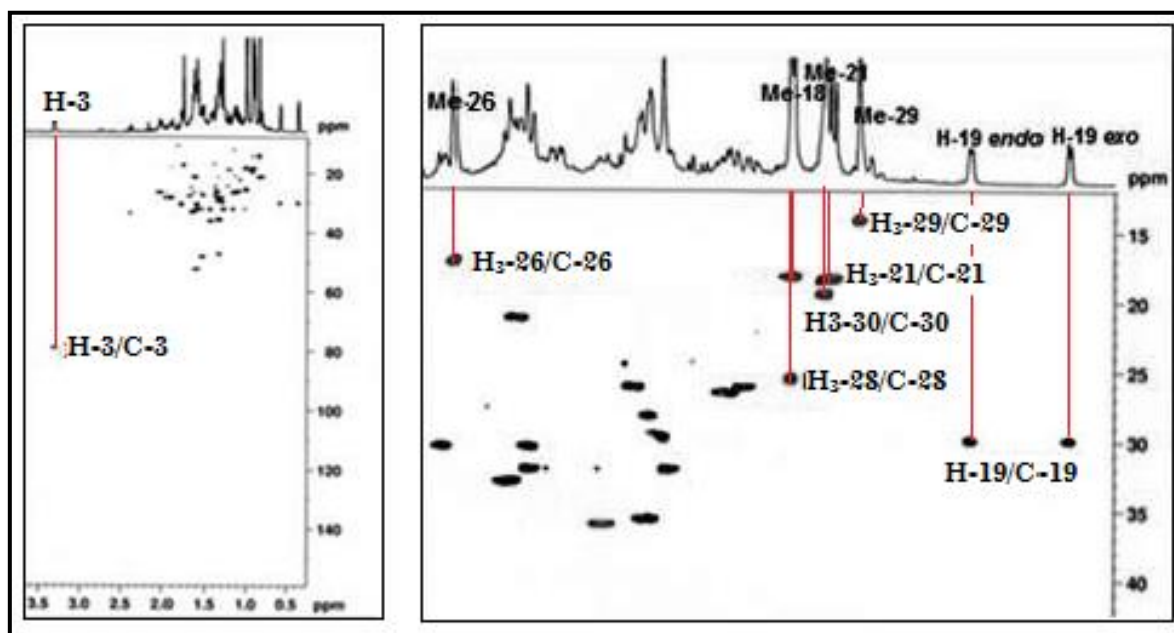


Figure III-184 : Spectre RMN  $^1H$  du composé **MS1** ( $CDCl_3$ )



**Figure III-185:** Partie étalée du spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **MS1** indiquant la présence de six groupements méthyles et les protons H-19 $_{endo}$  et H-19 $_{exo}$

L'expérience HSQC  $J$ -modulé (Figure III-186) du composé **MS1** permet la détermination de déplacements chimiques des carbones correspondant aux groupements cités précédemment à  $\delta_{\text{C}}$  29,9 (C-19), 78,8 (C-3), 29,9 (C-19), 18,0 (H<sub>3</sub>-18), 18,2 (H<sub>3</sub>-21), 17,1 (H<sub>3</sub>-26), 25,4 (H<sub>3</sub>-28), 14,0 (H<sub>3</sub>-29) et 19,3 (H<sub>3</sub>-30).



**Figure III-186:** Parties du spectre HSQC du composé **MS1**

L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$   $J$ -modulé (Figure III-187) confirme la nature triterpénique de ce composé par la présence de 30 signaux se répartissant en six groupements

méthyles, cinq carbones quaternaires, onze méthylènes, six groupements CH dont deux oxygénés, un carbone quaternaire éthylénique et un CH<sub>2</sub> oléfinique.

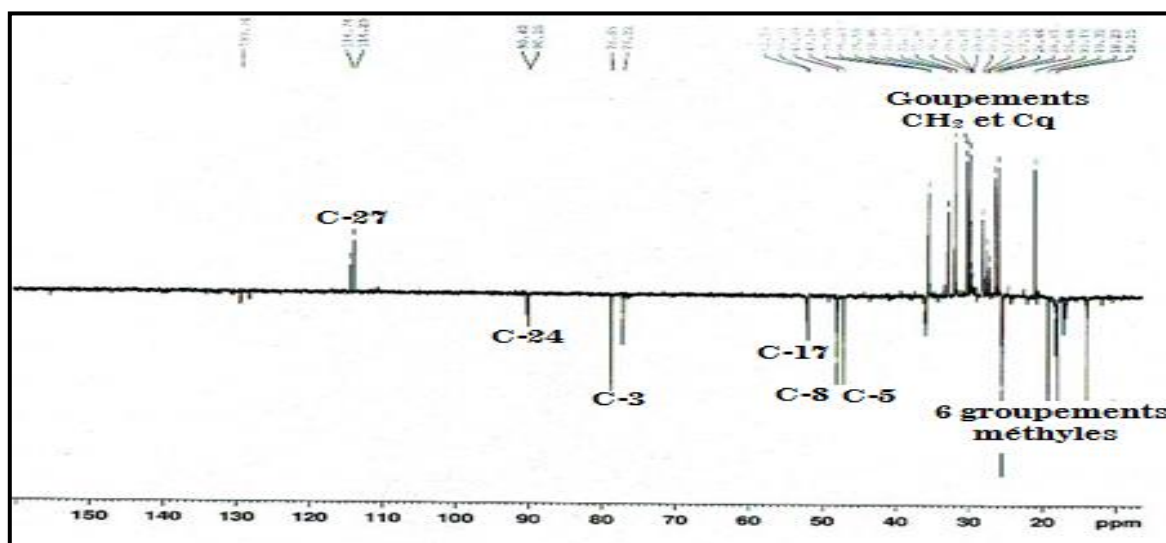


Figure III-187: Spectre RMN<sup>13</sup>C *J*-modulé du composé MS1

L'élucidation structurale du squelette triterpénique (cycloartane) de ce composé est débutée par la localisation du groupement oxyméthine CHO-3 à  $\delta_H$  3,32 (1H, *dd*,  $J = 11,0, 4,1$  Hz, H-3)/ $\delta_C$  78,8 (C-3) caractéristique des composés de cette catégorie de métabolites secondaires. Ce proton (H-3) couple sur le spectre COSY H-H (Figure III-188) avec les protons H<sub>2</sub>-2. Ces derniers corrélient avec les protons H<sub>2</sub>-1 pour former l'enchaînement H-3/H<sub>2</sub>-2 ( $\delta_H$  1,60 et 1,79, *m*)/H<sub>2</sub>-1 ( $\delta_H$  1,26 et 1,58, *m*). Les carbones de ces groupements sont repérés à  $\delta_C$  31,9 (C-1) et 30,3 (C-2) par l'expérience HSQC *J*-modulé.

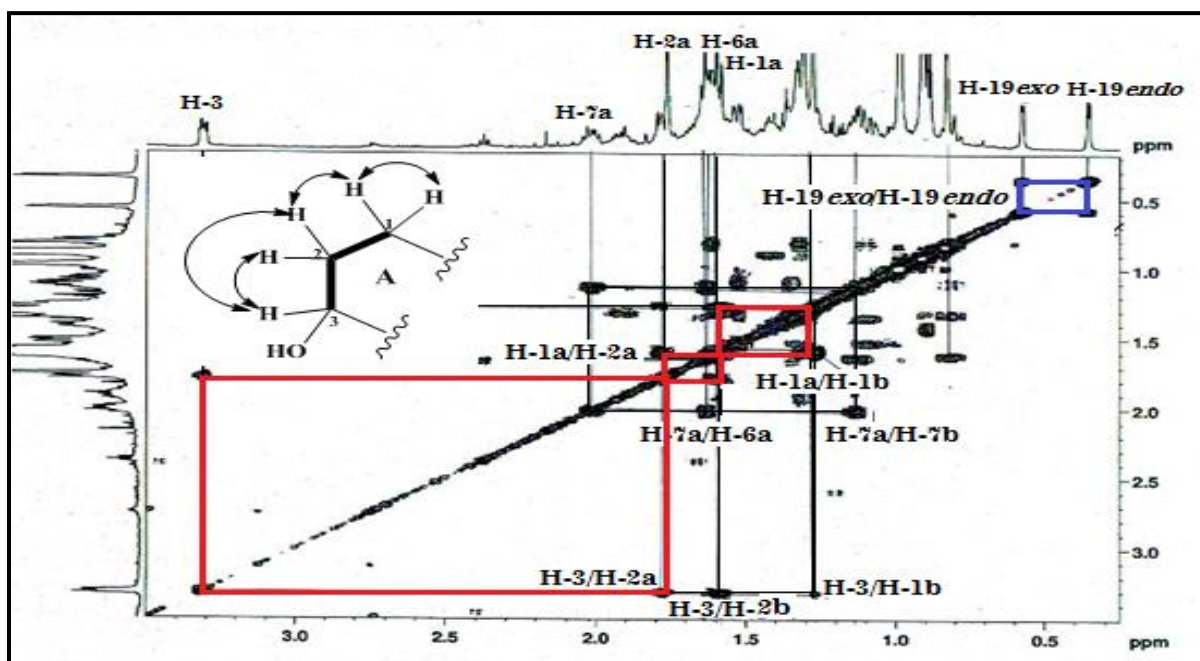


Figure III-188: Spectre COSY H-H du composé MS1



L'analyse du spectre HMBC (Figure III-189) de ce composé permet de visualiser des corrélations entre le proton oxyméthine H-3 et le carbone C-1, un carbone quaternaire à  $\delta_C$  40,4 et deux signaux de groupements méthyles à  $\delta_C$  25,4 et 14,0, correspondant aux méthyles angulaires CH<sub>3</sub>-28 et CH<sub>3</sub>-29 respectivement [226]. On en déduit que le signal à  $\delta_C$  40,4 est attribué au carbone quaternaire C-4 du cycle A, porteur des deux groupements méthyles. Les protons des groupements méthyles sont assignés par analyse du spectre HSQC à  $\delta_H$  0,99 (CH<sub>3</sub>-28, *s*) et 0,83 (CH<sub>3</sub>-29, *s*).

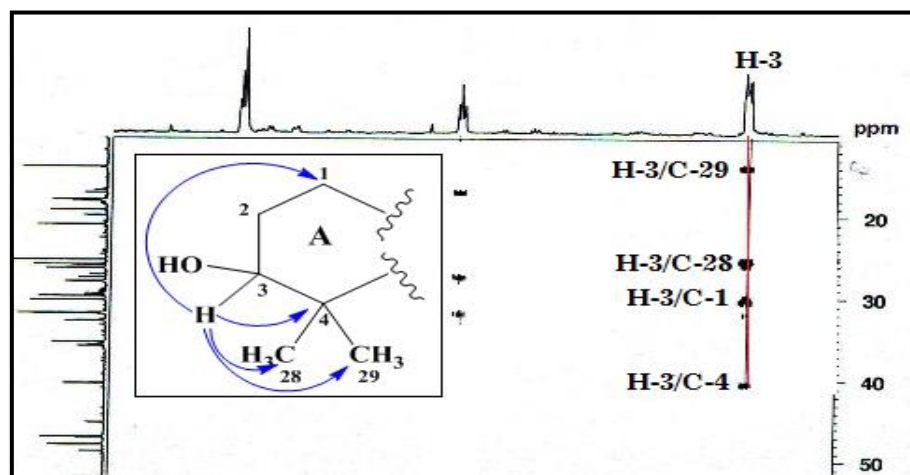


Figure III-189 : Partie du spectre HMBC du composé MS1

Les deux groupements méthyles (CH<sub>3</sub>-28 et CH<sub>3</sub>-29) montrent des corrélations en HMBC (Figure III-190) entre eux et avec les carbones C-4 et CH à  $\delta_C$  47,1, ne pouvant être que le carbone C-5 du cycle A, son proton est détecté par HSQC à 1,32 ppm (*m*).

Les deux protons non équivalents H-19 *exo* et H-19 *endo* caractéristiques du noyau cyclopropane tétrasubstitué, couplent sur le spectre HMBC (Figure III-190) avec les carbones C-1 et C-5 déjà caractérisés, un carbone quaternaire à  $\delta_C$  19,9 attribuable au carbone C-9 du noyau cyclopropane et un signal sortant à  $\delta_C$  26,1 correspondant au groupement CH<sub>2</sub>-11 ( $\delta_H$  1,08 et 1,35, *m*) du cycle C. Aussi, les deux protons H<sub>2</sub>-19 montrent des corrélations HMBC avec un groupement CH à 47,9 ppm correspondant au carbone C-8 du cycle B, son proton est déterminé par l'expérience HSQC à  $\delta_H$  1,53 (*dd*,  $J = 12,3$  et  $4,7$  Hz, H-8). La valeur de déplacement chimique du carbone C-10 est détectée par la corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton H-2a et le carbone résonant à  $\delta_C$  26,0 (C-10).

A ce stade d'interprétation tous les déplacements chimiques des carbones et protons du cycle A sont déterminés.

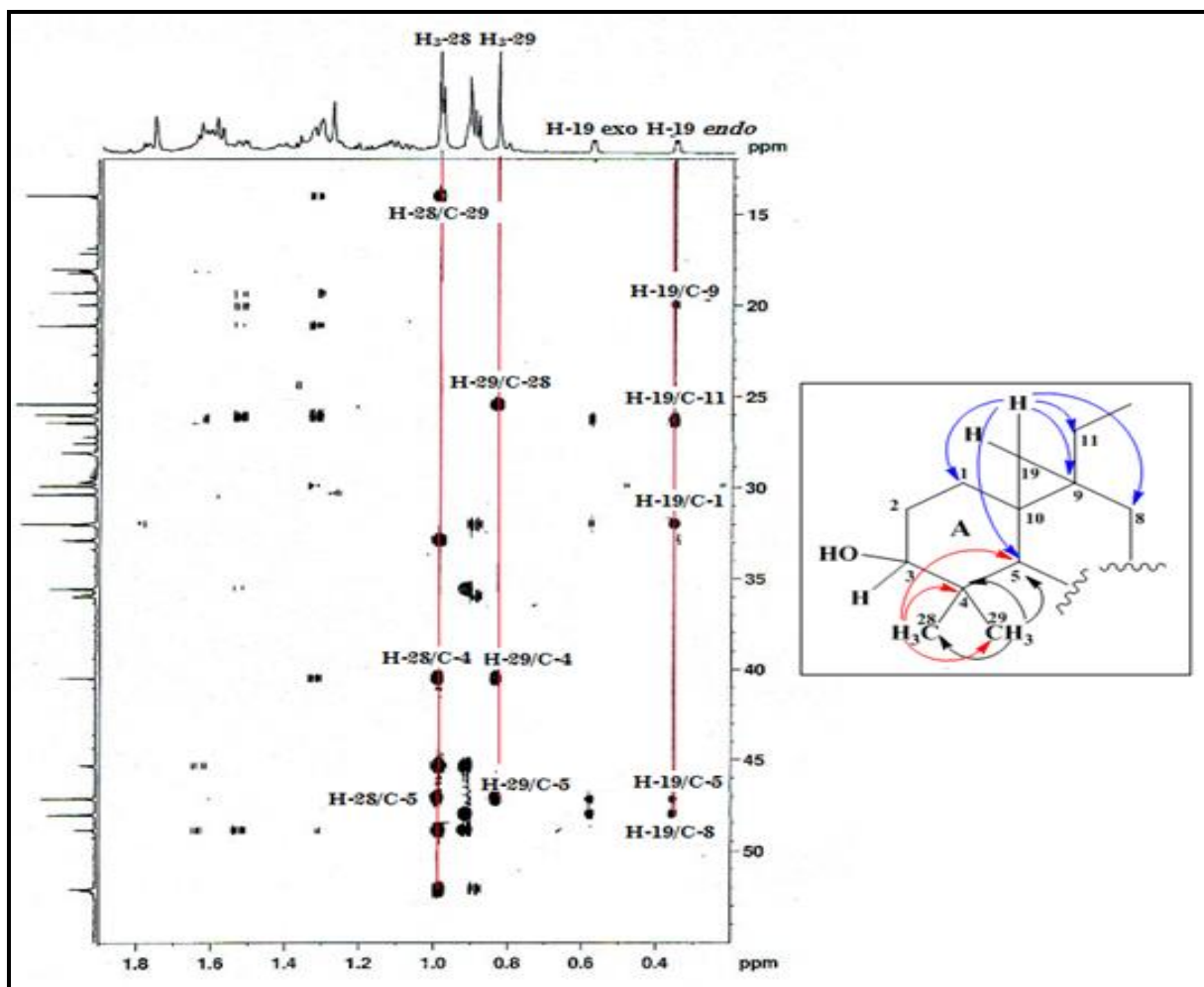


Figure III-190 : Corrélations HMBC du cycle A du composé MS3

L'analyse du spectre COSY H-H (Figure III-191) de ce composé conduit à la localisation d'un système de spins à six protons, qui visualise les couplages entre les protons H-5/H<sub>2</sub>-6 ( $\delta_{\text{H}}$  0,81 et 1,62, *m*)/H<sub>2</sub>-7 ( $\delta_{\text{H}}$  1,14 et 2,01, *m*)/H-8. Leurs carbones sont attribués à  $\delta_{\text{C}}$  21,1 (C-6), 26,4 (C-7) et 47,8 (C-8) par l'expérience HSQC *J*-modulé. Ceci permet de former le cycle B du triterpène.

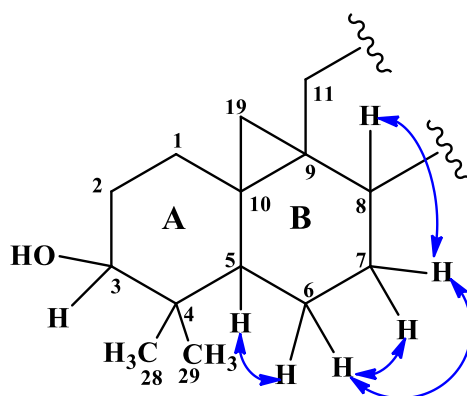


Figure III-191 : Corrélations COSY H-H du cycle B du composé MS1

A partir des protons H<sub>2</sub>-11 déjà assignés et selon le spectre COSY (Figure III-192), on peut déterminer la valeur de déplacement chimique des protons H<sub>2</sub>-12 à  $\delta_{\text{H}}$  1,64 (*m*), leur carbone est repéré par l'expérience HSQC *J*-modulé à  $\delta_{\text{C}}$  32,7.

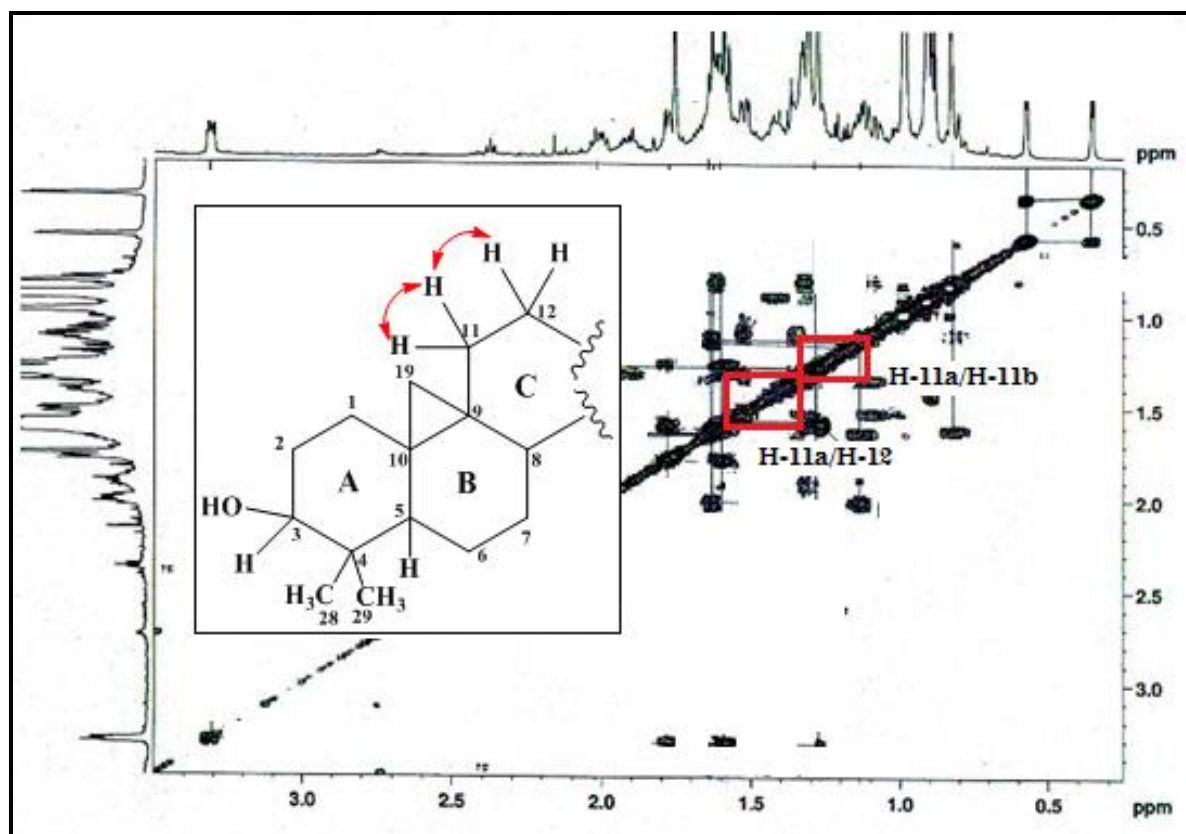


Figure III-192 : Corrélations COSY H-H du cycle C

Les corrélations des protons H<sub>2</sub>-12 et H-8 sur le spectre HMBC (Figure III-193) conduisent à finaliser la construction du cycle C du composé **MS1**. En effet, ces protons couplent avec deux carbones quaternaires localisés à  $\delta_{\text{C}}$  45,2 et 48,4 attribués respectivement aux carbones C-13 et C-14 du cycle C [227]. D'autres couplages sont visualisés entre le proton H<sub>2</sub>-12 et le carbone C-9, un carbone déblindé à  $\delta_{\text{C}}$  52,0 caractéristique d'un CH en position C-17 du cycle D et un groupement méthyle à  $\delta_{\text{C}}$  18,0 correspondant au carbone C-18 [227]. Le proton H-8 de ce composé révèle la présence des couplages avec les carbones C-19, C-6, C-10, un groupement méthyle à  $\delta_{\text{C}}$  19,3 ne pouvant être que le CH<sub>3</sub>-30 et un groupement méthylène à  $\delta_{\text{C}}$  35,5 attribuable au carbone C-15 du cycle D. Les protons portés par ces carbones sont détectés par analyse du spectre HSQC à  $\delta_{\text{H}}$  1,60 (H-17, *m*), 1,33 (H<sub>2</sub>-15, *m*) et 0,91 (H<sub>3</sub>-30, *s*).

Toutes ces attributions sont confirmées par les corrélations observées sur le spectre HMBC (Figure III-194) entre les protons du groupement méthyle CH<sub>3</sub>-18 et les carbones

C-12, C-13, C-14 et C-17 et entre les protons du groupement  $\text{CH}_3\text{-30}$  et les carbones C-15, C-13, C-8 et C-14. A ce niveau d'analyse tous les protons et carbones du cycle C sont assignés.

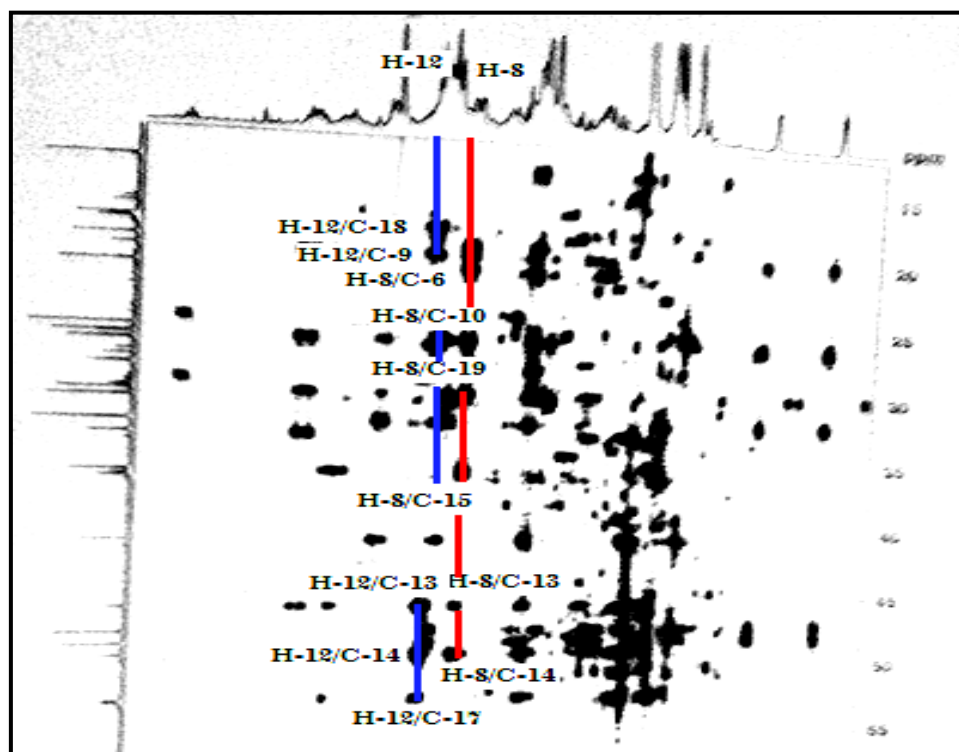


Figure III-193: Partie du spectre HMBC du composé MS1

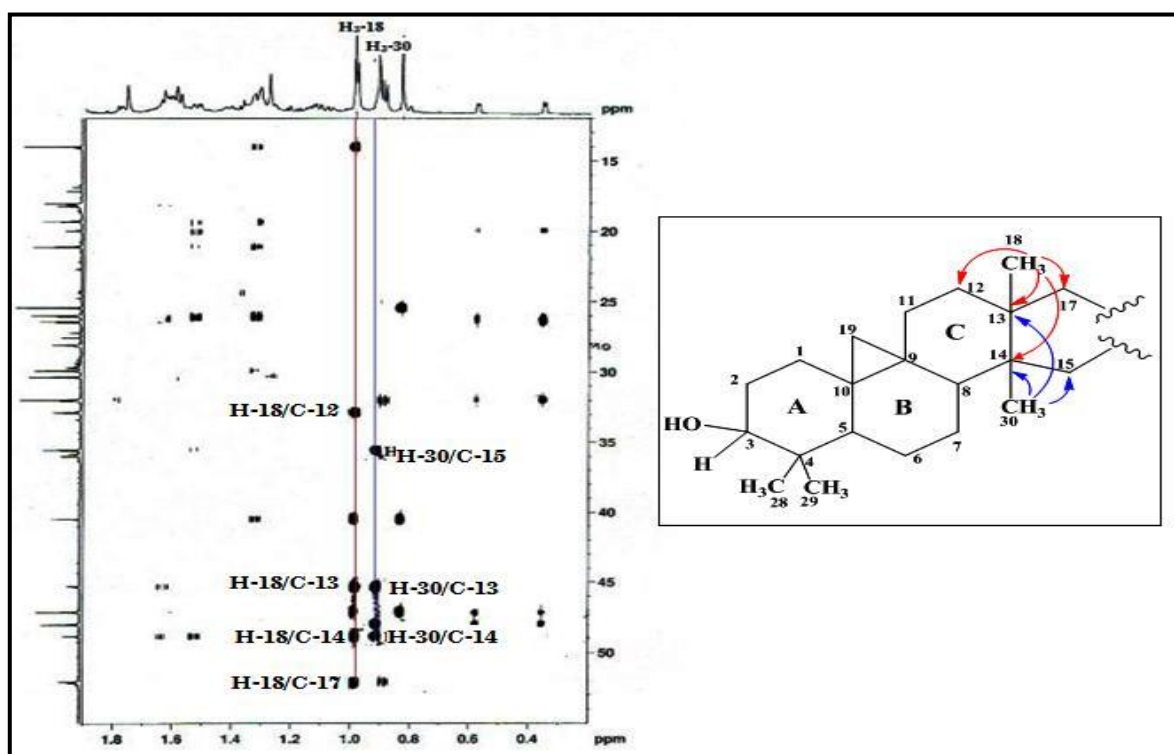
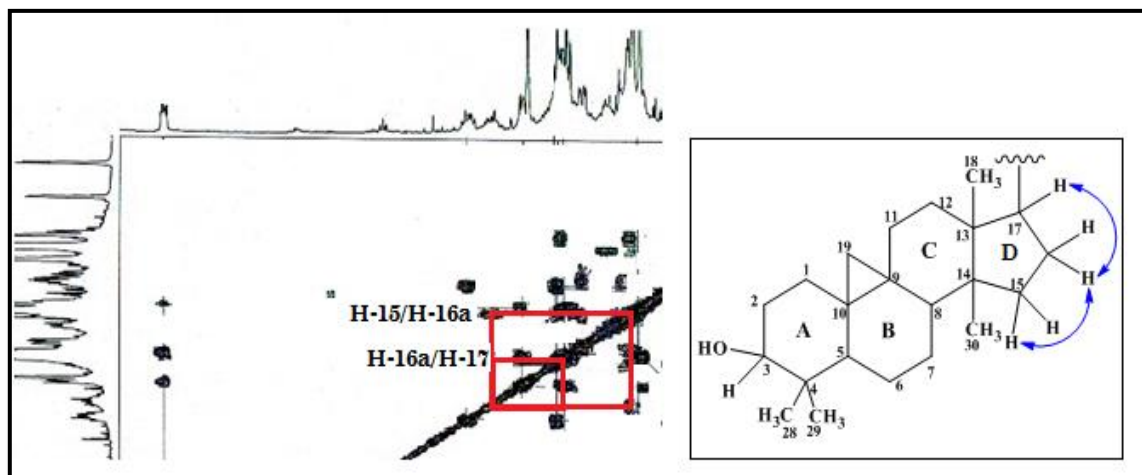


Figure III-194: Corrélations HMBC des groupements méthyles  $\text{CH}_3\text{-18}$  et  $\text{CH}_3\text{-30}$

La construction du cycle D de ce cycloartane est aisément achevée par les corrélations remarquées sur le spectre COSY H-H (Figure III-195) entre les protons H<sub>2</sub>-15/H<sub>2</sub>-16 ( $\delta_{\text{H}}$  1,33, *m*)/H-17. Ces protons couplent sur le spectre HSQC avec leurs carbones à  $\delta_{\text{C}}$  35,5 (C-15), 28,1 (C-16) et 52,0 (C-17).



**Figure III-195:** Corrélations COSY H-H du cycle D du composé **MS1**

Toutes ces données spectroscopiques indiquent la présence d'un squelette de type 9,19-cyclotriterpénoïde [228]. Donc, il reste à déterminer la chaîne latérale liée au squelette triterpénique en position C-17.

L'analyse du spectre COSY H-H (Figure III-196) de ce composé permet de visualiser les couplages entre les protons H-17 et H-20 ( $\delta_{\text{H}}$  1,41, *m*) et les protons CH<sub>3</sub>-21 ( $\delta_{\text{H}}$  0,90, *d*,  $J = 6,1$  Hz)/H-20/H<sub>2</sub>-22 ( $\delta_{\text{H}}$  1,50, *m*)/H<sub>2</sub>-23 ( $\delta_{\text{H}}$  1,28-1,58, *m*)/H-24 ( $\delta_{\text{H}}$  4,30, *t*,  $J = 6,8$ ) et entre les protons du groupement méthyle CH<sub>3</sub>-26 (1,76, *s*) et les protons éthyléniques H<sub>2</sub>-27 ( $\delta_{\text{H}}$  5,06, *s*, H-27a et 5,04, *s*, H-27b) (Figure III-205). L'analyse du spectre HSQC *J*-modulé conduit à attribuer leurs carbones à  $\delta_{\text{C}}$  35,8 (C-20), 18,2 (Me-21), 32,0 (C-22), 27,5 (C-23), 90,2 (C-24), 17,6 (C-26) et 114,7 (C-27).

Les résultats fournis par l'analyse des spectres COSY H-H et HSQC *J*-modulé sont confirmés par les corrélations observées sur le spectre HMBC (Figures III-197 et III-198) entre :

- Les protons du groupement méthyle (CH<sub>3</sub>-26) et les carbones C-24, C-27 et un carbone quaternaire éthylénique à  $\delta_{\text{C}}$  143,6 ne pouvant être que le carbone C-25 de la chaîne latérale.
- Le proton oxyméthine H-24 et les carbones C-26, C-23 et C-22.
- Les protons éthyléniques H<sub>2</sub>-27 et les carbones C-26 et C-24.



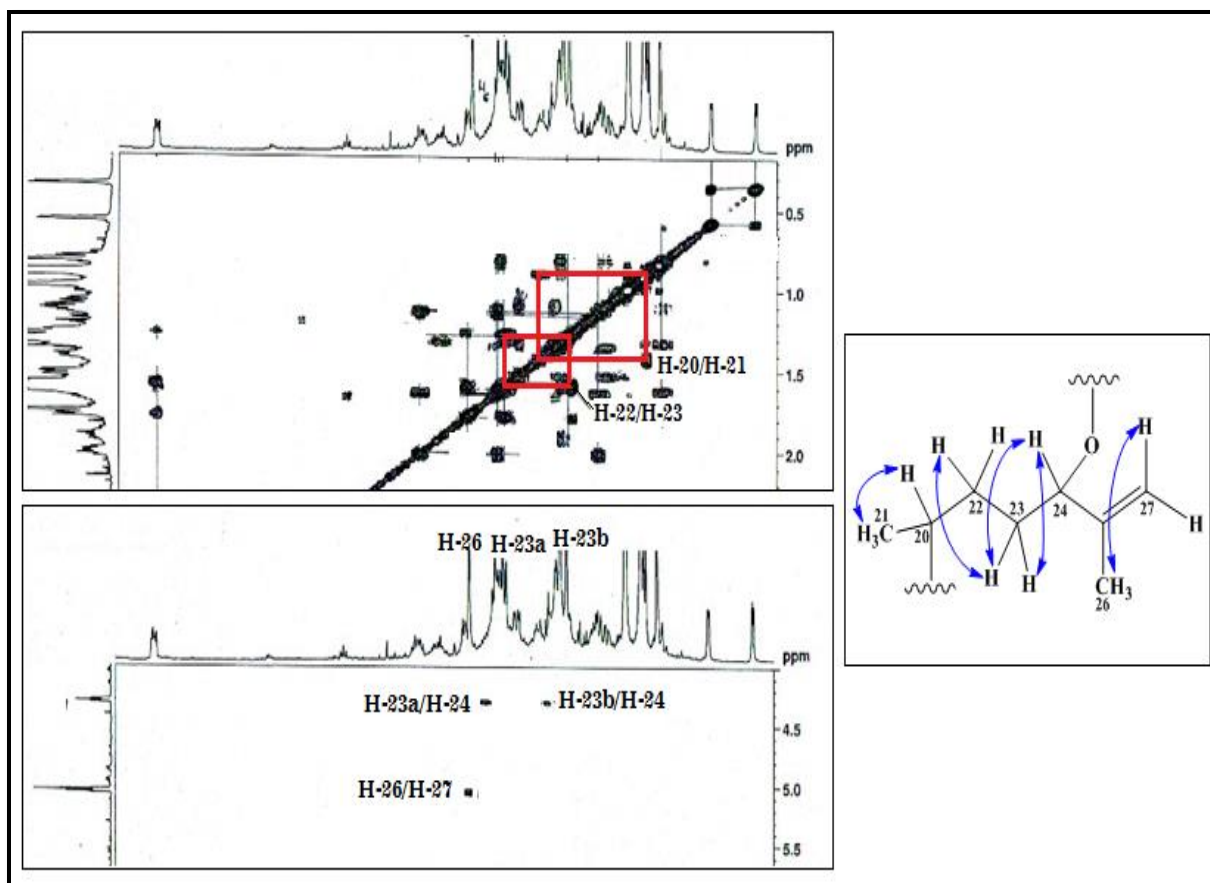


Figure III-196: Corrélations COSY H-H au niveau de la chaîne latérale du composé MS1

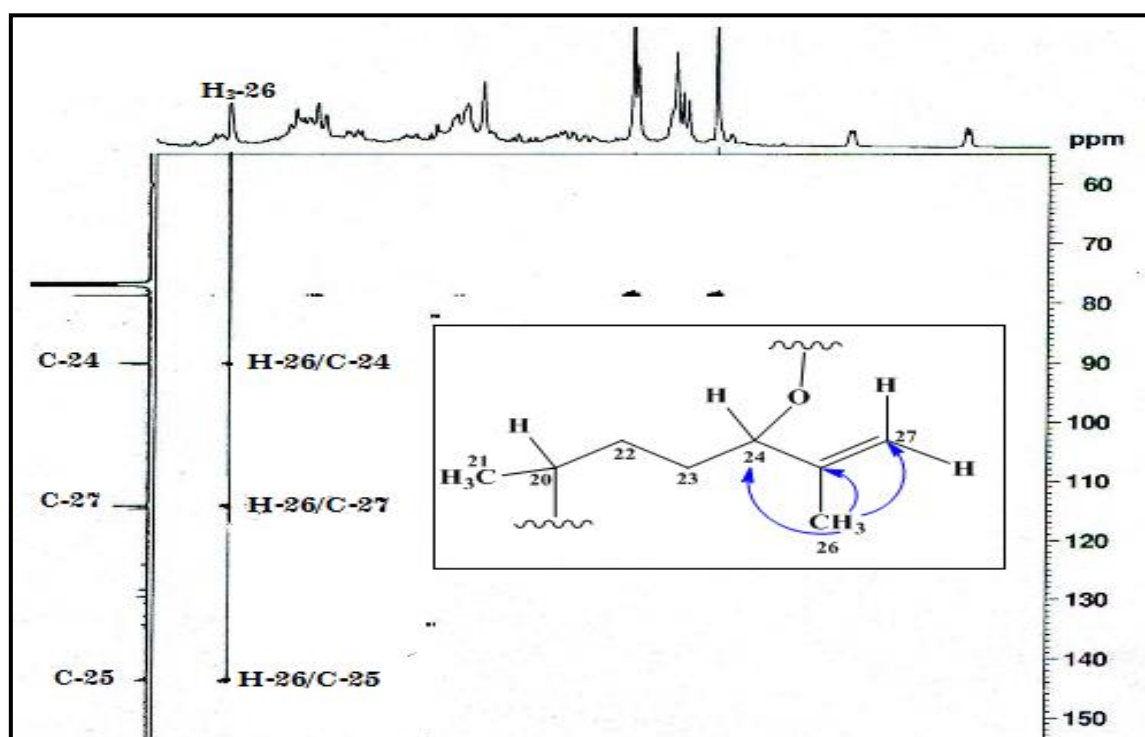


Figure III-197: Partie du spectre HMBC du composé MS1

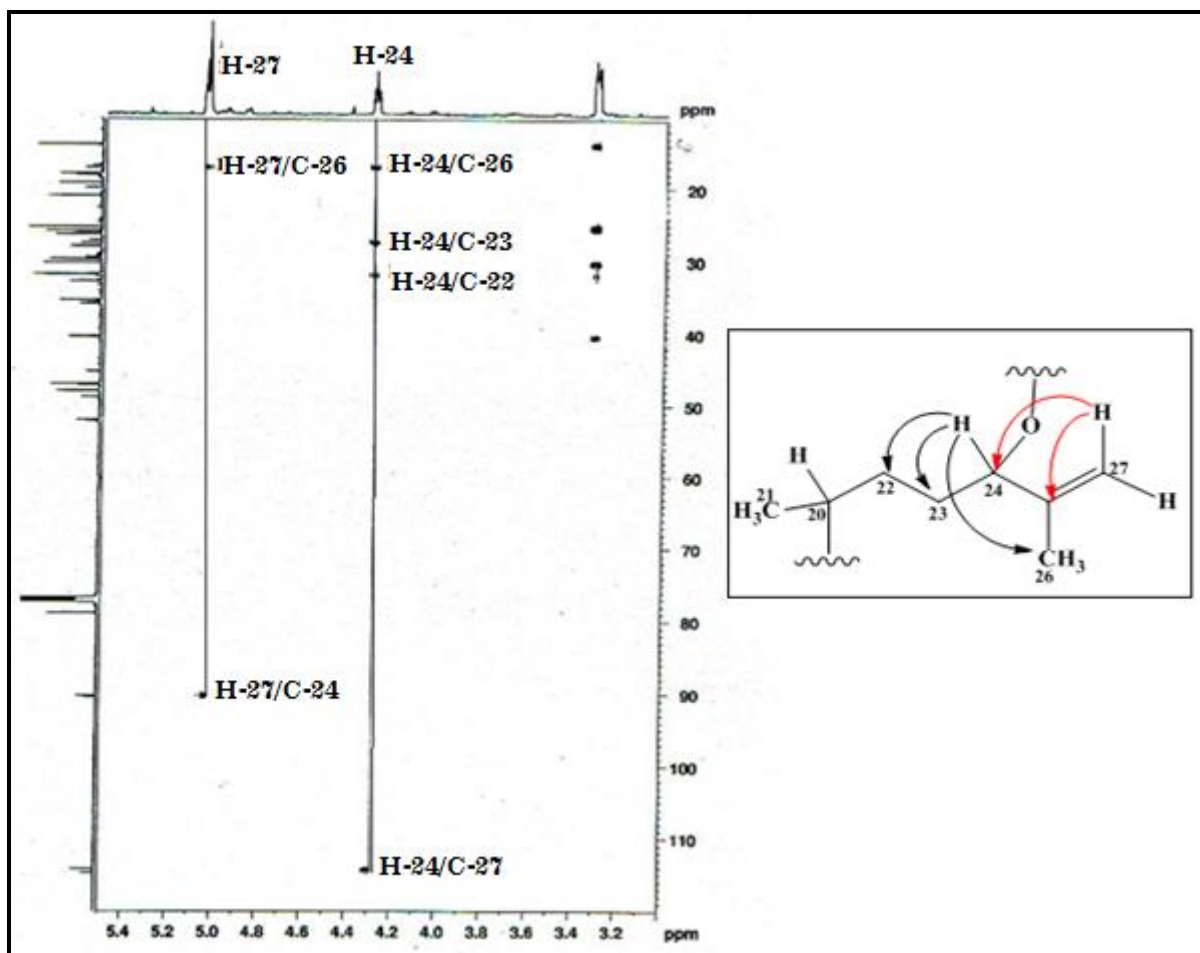


Figure III-198 : Couplages HMBC de la chaîne latérale

En se basant sur la formule brute de ce composé en  $C_{30}H_{50}O_3$ , qui a été déterminée par l'analyse du spectre de masse ESI-MS (Figure III-183) et la valeur du déplacement chimique déblindé du carbone oxyméthine en position C-24 à  $\delta_C$  90,2, il reste à attribuer un atome d'oxygène (O) et un groupement OH. La valeur déblindée du carbone C-24 ne peut être induite que par un groupement fortement attracteur hydroperoxyde (OOH) [229-231]. Ceci, nous permet de proposer la structure plane suivante (Figure III-199).

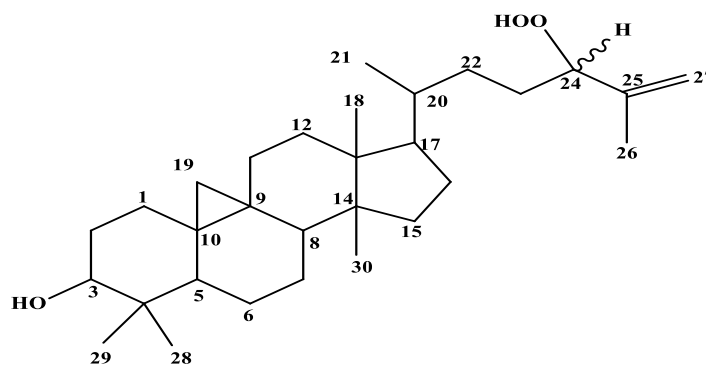


Figure III-199 : Structure du composé MS1

Le dédoublement des signaux avec une intensité inégale sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figures III-200 et III-201) des atomes de carbone de la chaîne latérale C-20 ( $\delta_{\text{C}}$  35,8 et 35,9), Me-21 ( $\delta_{\text{C}}$  18,2 et 18,5), C-22 ( $\delta_{\text{C}}$  32,0 et 32,7), C-23 ( $\delta_{\text{C}}$  27,5 et 27,9), C-24 ( $\delta_{\text{C}}$  90,2 et 90,4), C-25 ( $\delta_{\text{C}}$  143,5 et 143,8), Me-26 ( $\delta_{\text{C}}$  17,1 et 17,6) et C-27 ( $\delta_{\text{C}}$  114,2 et 114,7) indique qu'il s'agit d'un mélange de deux composés épimères en position C-24 (24*R* et 24*S*).

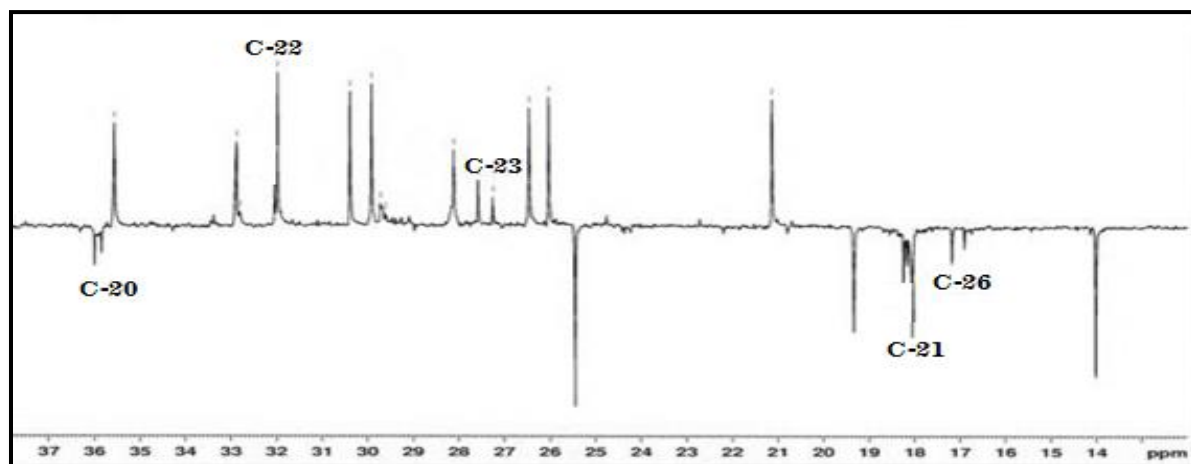


Figure III-200 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé du composé MS1

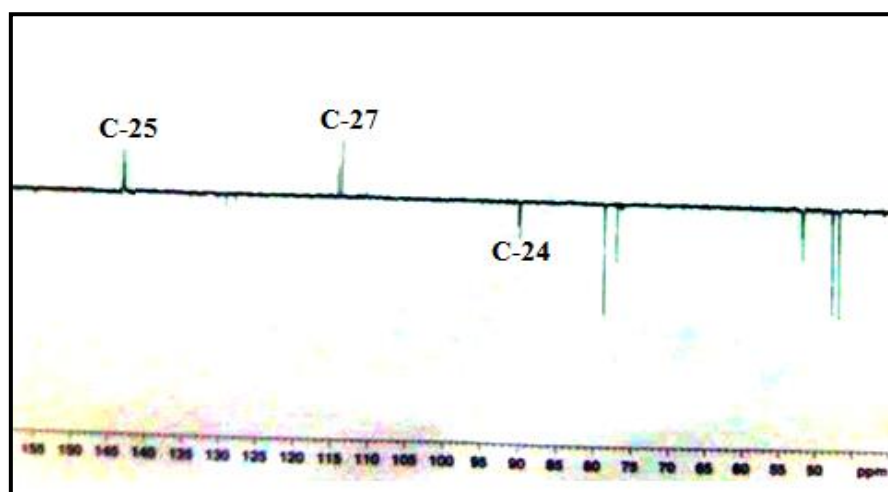


Figure III-201 : Partie du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé du composé MS1

La stéréochimie de ce composé est établie par analyse des constantes de couplage, les effets NOE et par des considérations de biogénèse [232]. Le groupement cyclopropane est  $\beta$ -orienté tandis que le proton H-3 (*dd*,  $J = 11,0$  et  $4,1$  Hz) à une orientation  $\alpha$ -axial. Sur le spectre NOESY (Figures III-202 et III-203) de ce composé, on observe des effets NOE sur la face  $\beta$  entre les protons H-19 *exo*/H<sub>3</sub>-29, H-19 *endo*/H-8, H-19 *endo*/H<sub>3</sub>-18 et H<sub>3</sub>-18/H-20. Sur la face  $\alpha$ , il est observé les effets NOE entre les protons suivants: H<sub>3</sub>-28/H-3/H-5/H-7/H<sub>3</sub>-



30/H-17/H<sub>3</sub>-21. D'autres corrélations sont visualisées entre le proton hydroperoxyméthine H-24 et les protons oléfiniques H<sub>2</sub>-27, les protons H<sub>2</sub>-27 et les protons du groupement Me-26. Ces effets prouvent que les protons H-24 et H<sub>2</sub>-27 sont du même côté de la chaîne (Figure III-203). La valeur du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20} = +23,9^\circ$ , (c 0,23 g/100 ml, MeOH), le déplacement chimique des protons H<sub>3</sub>-21 (0,90 ppm) ainsi que les effets NOE entre H-17 $\alpha$ /H<sub>3</sub>-21/H-12 $\beta$  indiquent une configuration 20*R* au niveau du carbone asymétrique C-20 [233]. La configuration absolue des autres carbones chiraux est déduite comme suit : 3*S*, 5*R*, 8*R*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*R* et 17*S*.

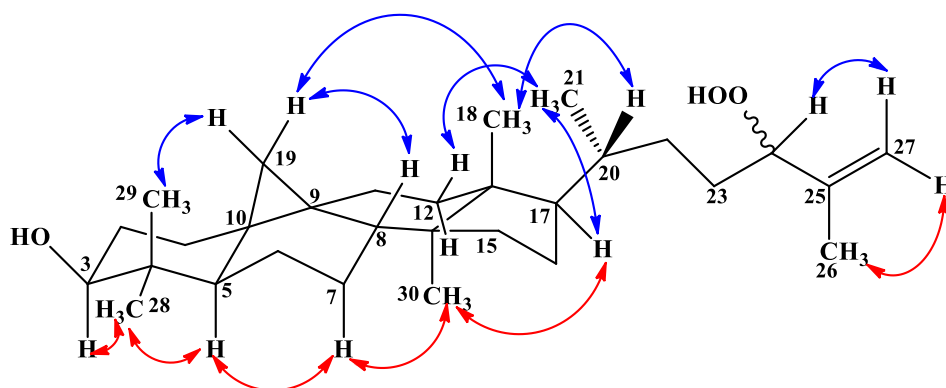


Figure III-202: Corrélations NOESY visualisées pour le composé MS1

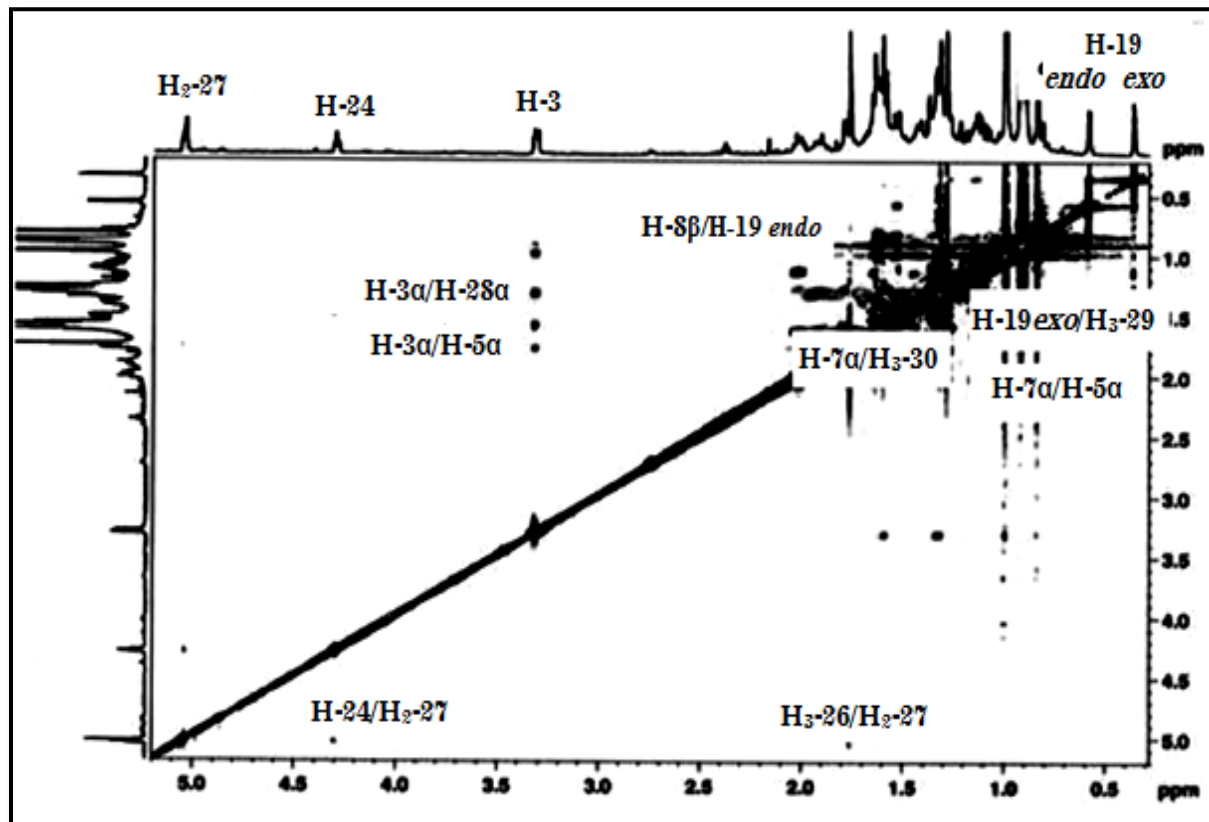


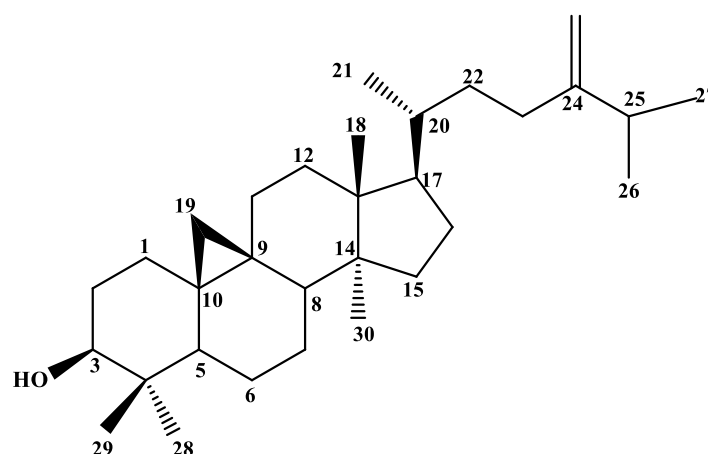
Figure III-203: Spectre NOESY du composé MS1

Toutes ces données spectroscopiques, permettent d'identifier la structure du composé **MS1** au 3 $\beta$ -hydroxycycloart-25- $\dot{e}$ n-24-hydroperoxyde. Il a été identifié antérieurement de quelques espèces du genre *Euphorbia* : *Euphorbia cyparissias* [234] et *Euphorbia bupleuroides* [30]. Ce composé possède une activité cytotoxique [234].

**Tableau III-22:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **MS1** dans  $\text{CDCl}_3$ .

Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
1	1,26-1,58	-	<i>m</i>	31,9
2	1,60-1,79	-	<i>m</i>	30,3
3	3,32 H-3 $\alpha$	11,0, 4,1	<i>dd</i>	78,8
4	-	-	-	40,4
5	1,32 H-5 $\beta$	-	<i>m</i>	47,1
6	0,81-1,62	-	<i>m</i>	21,1
7	1,14-2,01	-	<i>m</i>	26,4
8	1,53 H-8 $\beta$	12,3, 4,7	<i>dd</i>	47,9
9	-	-	-	19,9
10	-	-	-	26,0
11	1,08-1,35	-	<i>m</i>	26,1
12	1,64	-	<i>m</i>	32,7
13	-	-	-	45,2
14	-	-	-	48,4
15	1,33	-	<i>m</i>	35,5
16	1,34-1,91	-	<i>m</i>	28,1
17	1,60 H-17 $\alpha$	-	<i>m</i>	52,0
18	0,98	-	<i>s</i>	18,0
19	0,36 H-19 <i>exo</i>	4,0	<i>d</i>	29,9
	0,58 H-19 <i>endo</i>	3,7	<i>d</i>	
20	1,41	-	<i>m</i>	35,8 ; 35,9
21	0,90	6,1	<i>d</i>	18,2 ; 18,5
22	1,50	-	<i>m</i>	32,0 ; 32,7
23	1,28-1,58	-	<i>m</i>	27,5 ; 27,9
24	4,30	6,8	<i>t</i>	90,2 ; 90,4
25	-	-	-	143,5 ; 143,8
26	1,76	-	<i>s</i>	17,1 ; 17,6
27	5,06 H-27a	-	<i>s</i>	114,2 ; 114,7
	5,04 H-27b	-	<i>s</i>	
28	0,99	-	<i>s</i>	25,4
29	0,83	-	<i>s</i>	14,0
30	0,91	-	<i>s</i>	19,3

## III-3-3-2- Identification structurale du composé MS2



24-méthylèneglycoartanol

Le composé **MS2** est purifié sous forme d'une poudre blanche amorphe soluble dans le chloroforme. Il est invisible sous la lumière UV à 254 nm et se révèle en marron après pulvérisation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse EI-MS (Figure III-204) du composé **MS2** obtenu par impact électronique indique la présence d'un pic d'ion moléculaire à  $m/z = 440,4 [M]^+$  correspondant à une formule brute en  $C_{31}H_{52}O$  et une masse moléculaire de 440 uma. Par ailleurs, ce spectre présente des pics de fragmentation à  $m/z = 422 [M-18]^+$ , 407  $[M-15-18]^+$  et 297  $[M-125-18]^+$  caractéristiques des triterpènes tétracycliques. Le fragment à  $m/z = 297 [M-125-18]^+$  correspond à la perte d'un groupement alkyle ( $C_9H_{17}$ ) [235, 236].

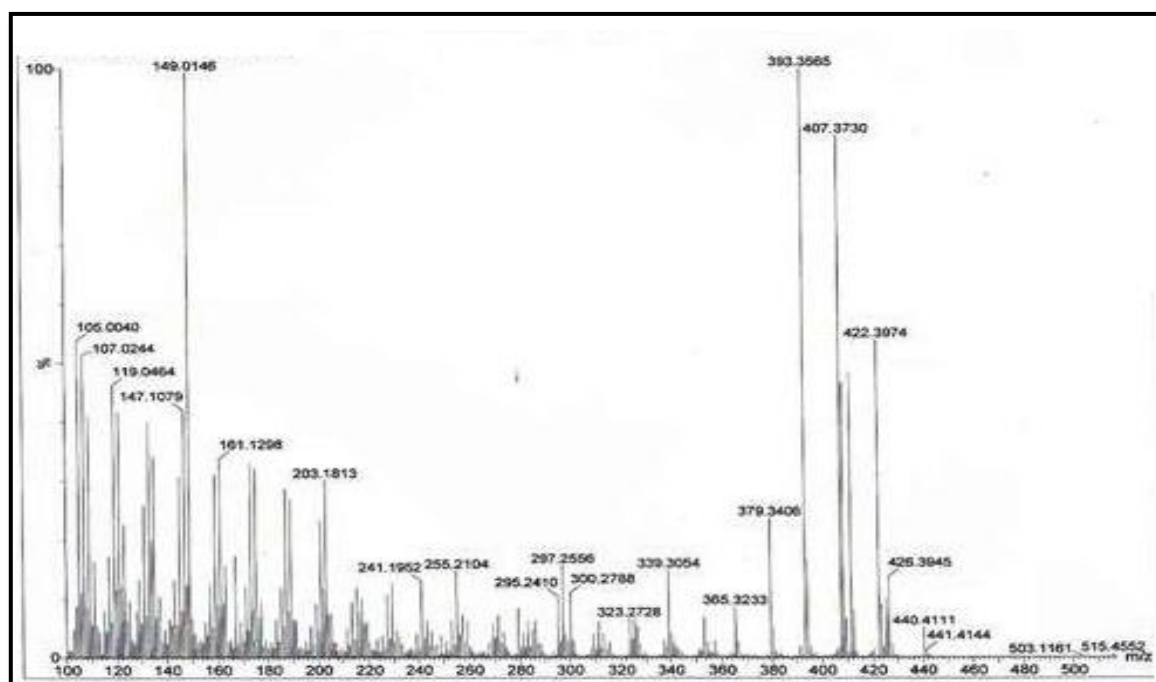


Figure III-204 : Spectre de masse EI-MS du composé MS2

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-205) du composé **MS2** montre la présence de signaux d'un squelette triterpénique cycloartanique incluant sept groupements méthyles à  $\delta_{\text{H}}$  1,01 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-18), 1,04 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-28), 0,85 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-29), 0,94 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>-30), 0,93 (3H, *d*,  $J = 6,2$  Hz, CH<sub>3</sub>-21), 1,08 (3H, *d*,  $J = 6,8$  Hz, CH<sub>3</sub>-26) et 1,07 (3H, *d*,  $J = 6,8$  Hz, CH<sub>3</sub>-27).

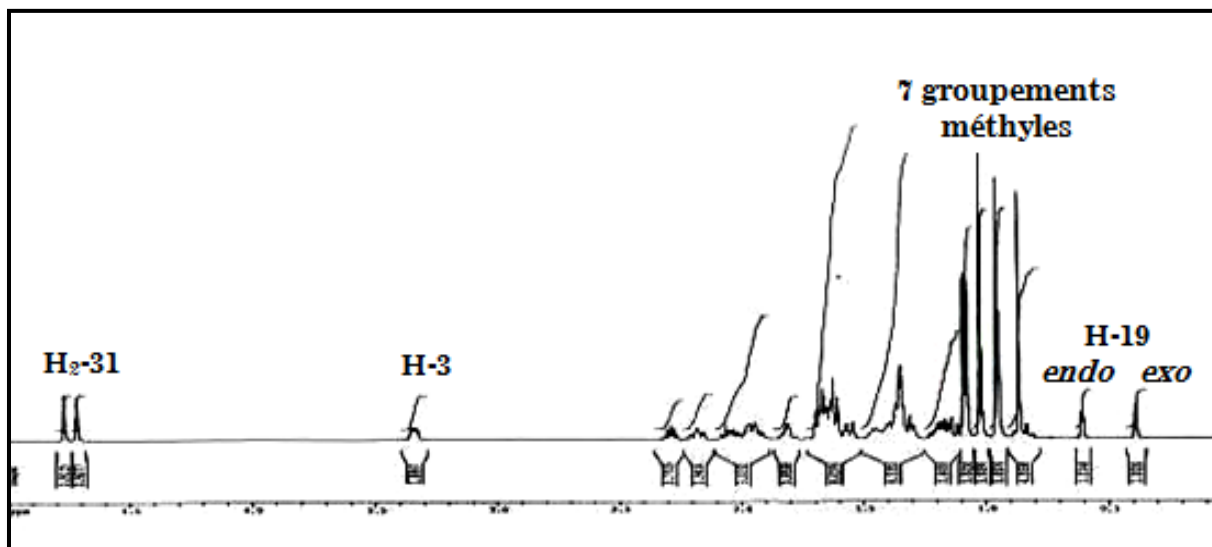


Figure III-205: Spectre RMN  $^1\text{H}$  du composé **MS2** ( $\text{CDCl}_3$ )

Un proton oxyméthine à  $\delta_{\text{H}}$  3,30 (*dd*,  $J = 11,6$  et  $4,3$  Hz) est attribué au proton H-3 $\alpha$ , deux protons non équivalents d'un noyau cyclopropane tétrasubstitué à  $\delta_{\text{H}}$  0,38 (1H, *d*,  $J = 4,1$  Hz, H-19 *exo*) et 0,60 (1H, *d*,  $J = 4,0$  Hz, H-19 *endo*) et deux signaux sous forme de singulet large chacun à  $\delta_{\text{H}}$  4,70 et 4,77, correspondant aux protons H-31a et H-31b respectivement, d'un groupement méthylène exocyclique [237].

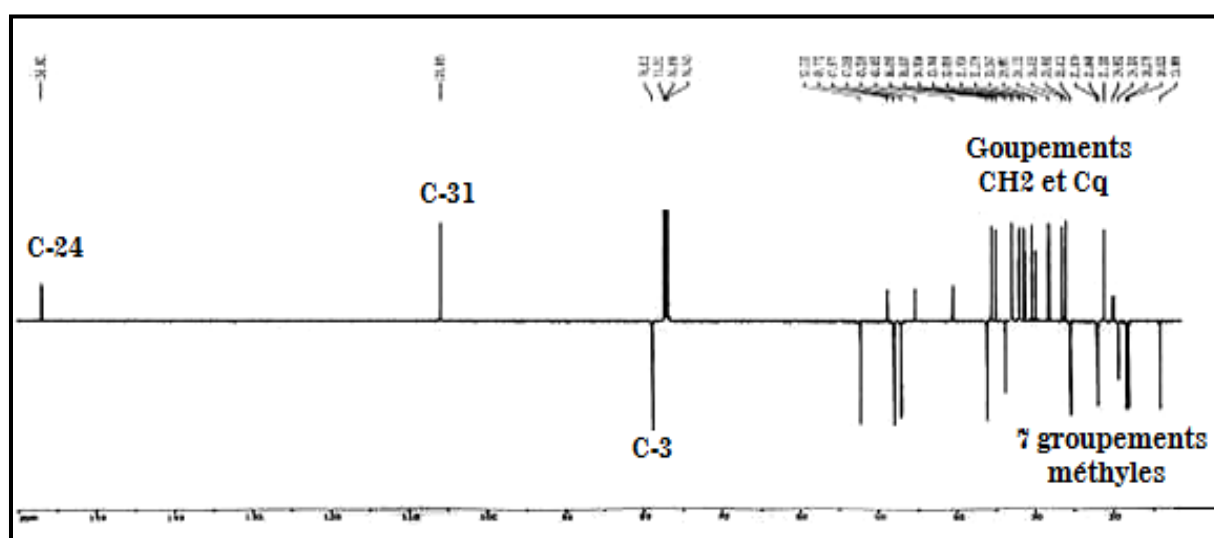


Figure III-206: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé du composé **MS2**

L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé (Figure III-206) du composé **MS2** confirme ainsi sa nature triterpénique par la présence de 31 signaux se répartissant en sept groupements méthyles ( $\text{CH}_3$ ), douze méthylènes ( $\text{CH}_2$ ), six méthines ( $\text{CH}$ ) et six atomes de carbone quaternaires, soit au total 31 atomes de carbone.

L'analyse conjointe des spectres COSY (H-H), HMBC (Figure III-207) et HSQC *J*-modulé (Figure III-208) permet l'identification de tous les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé.

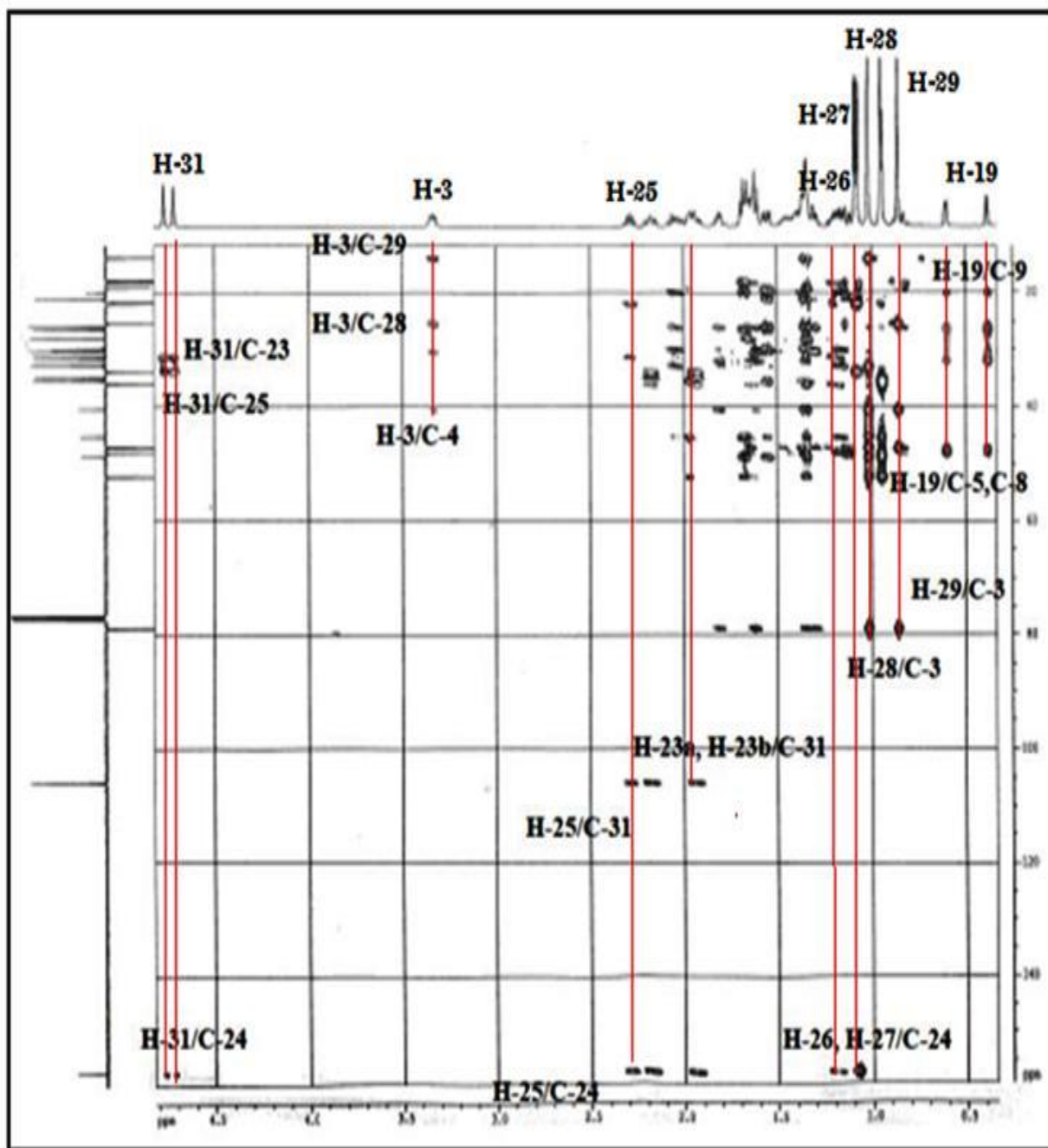


Figure III-207 : Correlations HMBC du composé MS2

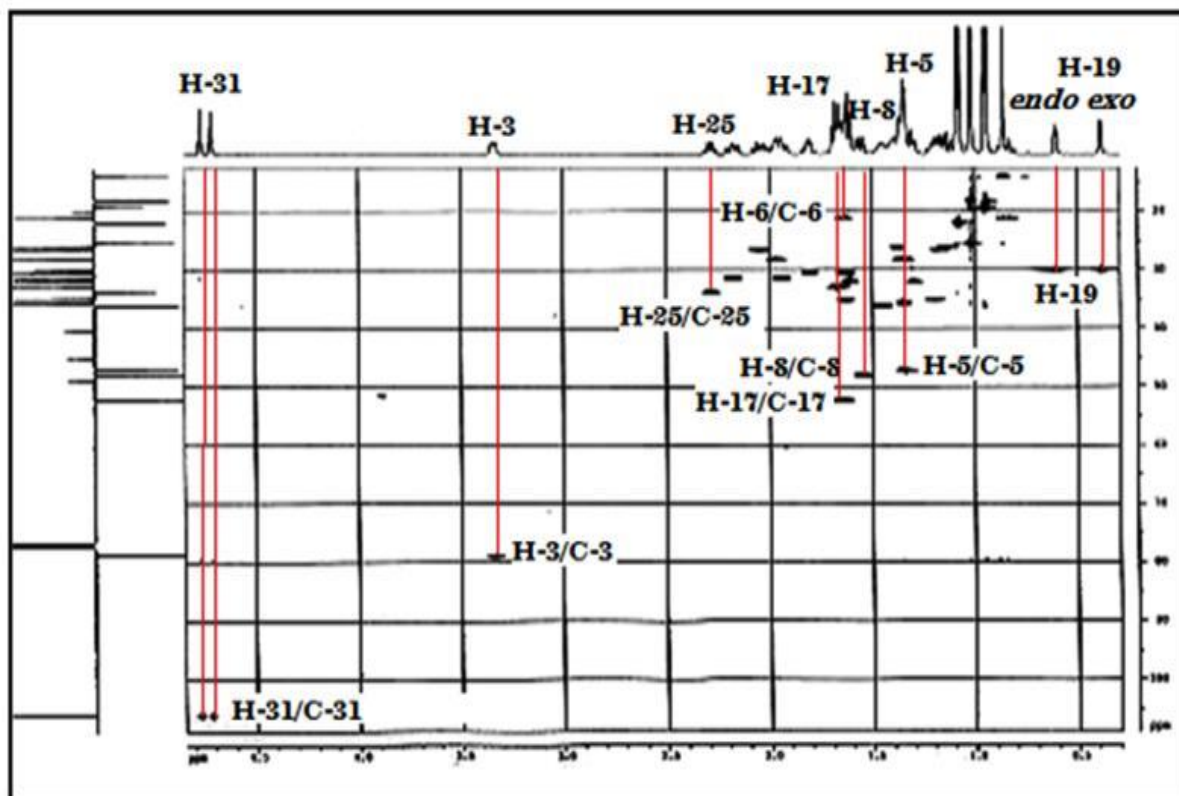


Figure III-208: Spectre HSQC du composé MS2

La stéréochimie du composé **MS2** a été établie principalement par analyse des valeurs de constantes de couplage et des corrélations observées sur le spectre NOESY (Figure III-209 et III-210). En effet, ce dernier présente des taches de corrélation entre le proton H-3  $\alpha$ -orienté et les protons H<sub>3</sub>-28, H-5, H-7, H<sub>3</sub>-30 et H-17, ce qui permet de positionner ces derniers sur la face  $\alpha$ . D'autres corrélations sont remarquées sur la face  $\beta$  entre les protons H<sub>3</sub>-29/H<sub>2</sub>-19 $\beta$  /H-8/H<sub>3</sub>-18/H-20.

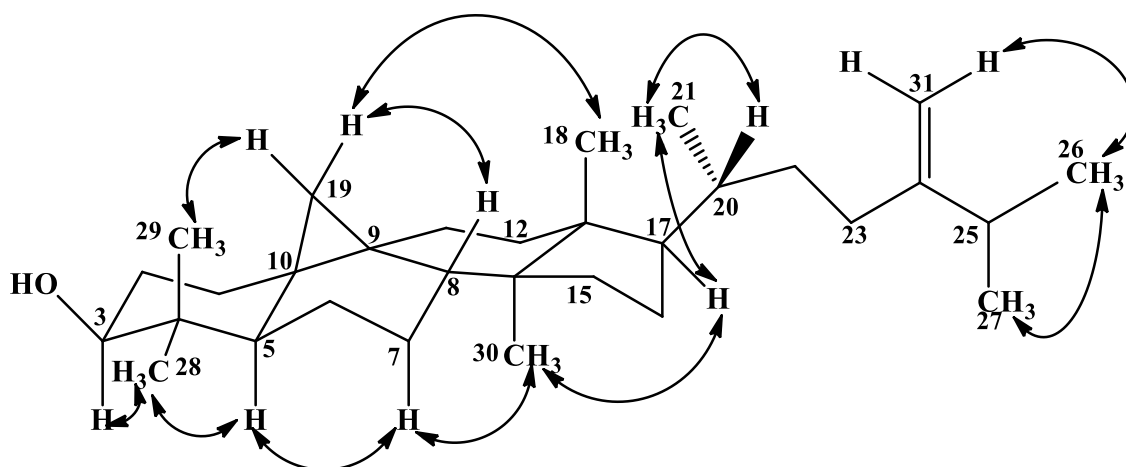


Figure III-209 : Principales corrélations NOESY du composé MS2

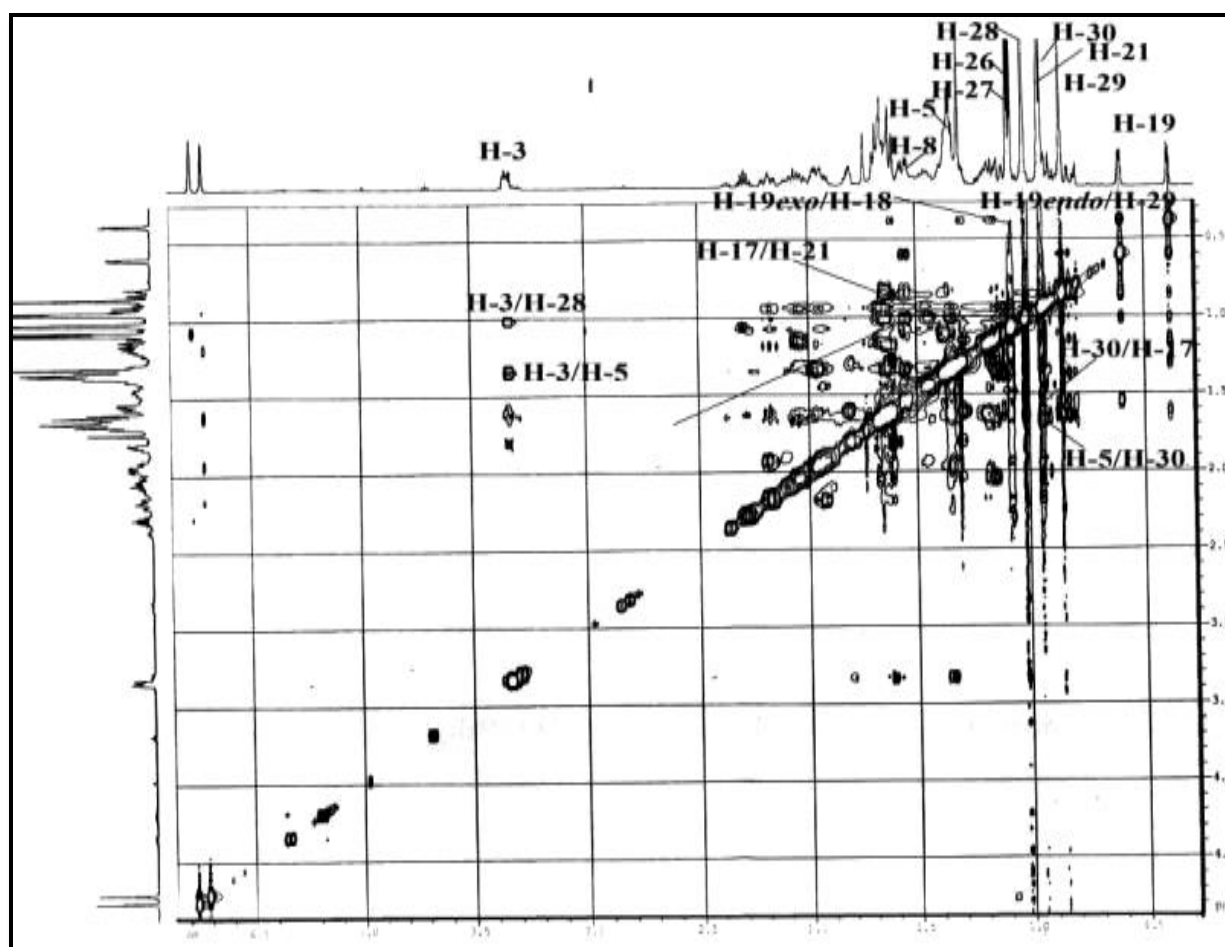


Figure III-210: Spectre NOESY du composé MS2

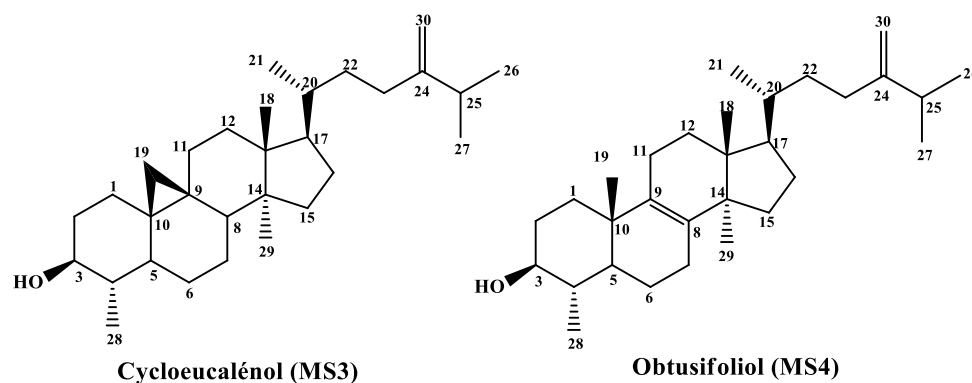
Toutes ces données spectrales, la valeur du pouvoir rotatoire mesurée dans le chloroforme ( $[\alpha]_D^{20} = +40,2$ ,  $C = 1,01$  g/100 ml), ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [238], permettent de proposer sans ambiguïté pour ce composé la structure 24-méthylèncycloartanol. Ce composé a été isolé antérieurement de plusieurs espèces du genre *Euphorbia* comme *E. guyoniana* [26], *E. retusa* [28], *E. bupleuroides* [30], *E. pterococca* [31] et *E. heteradena* [235]. Il est connu pour ses activités biologiques à savoir : anti-inflammatoire [239] et cytotoxique [240].

**Tableau III-23:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé MS2 dans  $\text{CDCl}_3$ .

Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
1	1,29-1,61	-	<i>m</i>	31,9
2	1,60-1,80	-	<i>m</i>	30,3
3	3,33 H-3 $\alpha$	11,2, 4,3	<i>dd</i>	78,8
4	-	-	-	40,4

5	1,35 H-5 $\alpha$	-	<i>m</i>	47,1
6	0,84-1,64	-	<i>m</i>	21,1
7	1,12 H-7 $\alpha$	12,5, 2,6	<i>dd</i>	26,0
	1,38 H-7 $\beta$	-	<i>m</i>	
8	1,55 H-8 $\beta$	12,3, 4,7	<i>dd</i>	47,9
9	-	-	-	19,9
10	-	-	-	26,0
11	1,16-2,05	-	<i>m</i>	26,4
12	1,67	6,3	<i>t</i>	32,8
13	-	-	-	45,2
14	-	-	-	48,7
15	1,35	-	<i>m</i>	35,5
16	1,36-1,96	-	<i>m</i>	28,1
17	1,66	-	<i>t</i>	52,2
18	1,01	-	<i>s</i>	18,0
19	0,38 H-19 <i>exo</i>	4,1	<i>d</i>	29,9
	0,60 H-19 <i>endo</i>	4,0	<i>d</i>	
20	1,45	-	<i>m</i>	36,1
21	0,93	6,2	<i>d</i>	18,3
22	1,19-1,63	-	<i>m</i>	34,9
23	1,94 H-23b	-	<i>m</i>	31,3
	2,17 H-23a	15,5, 12,0, 4,4	<i>ddd</i>	
24	-	-	-	156,8
25	2,28	6,8	<i>sept</i>	33,7
26	1,08	6,8	<i>d</i>	21,8
27	1,07	6,8	<i>d</i>	21,9
28	1,01	-	<i>s</i>	25,4
29	0,86	-	<i>s</i>	13,9
30	0,94	-	<i>s</i>	19,3
31	4,76 H-31a	-	<i>sl</i>	105,9
	4,71 H-31b	-	<i>sl</i>	

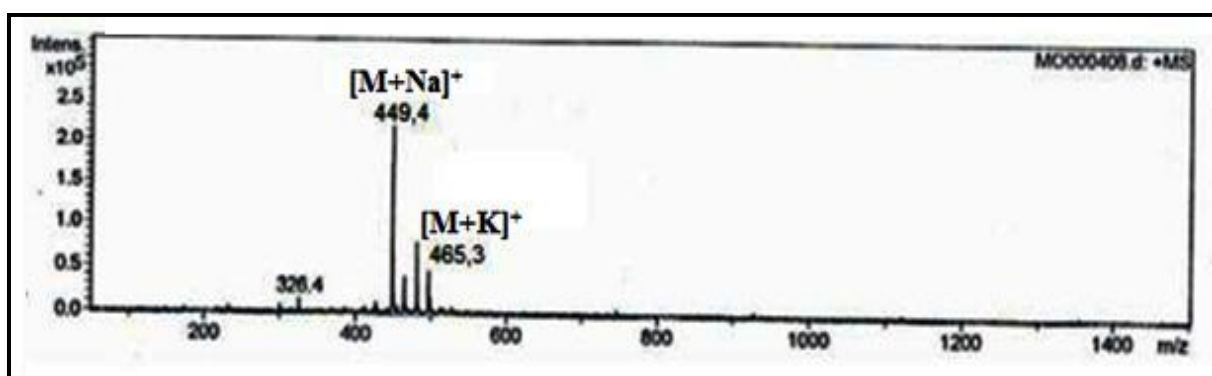
### III-3-3-3- Identification structurale des composés MS3 et MS4





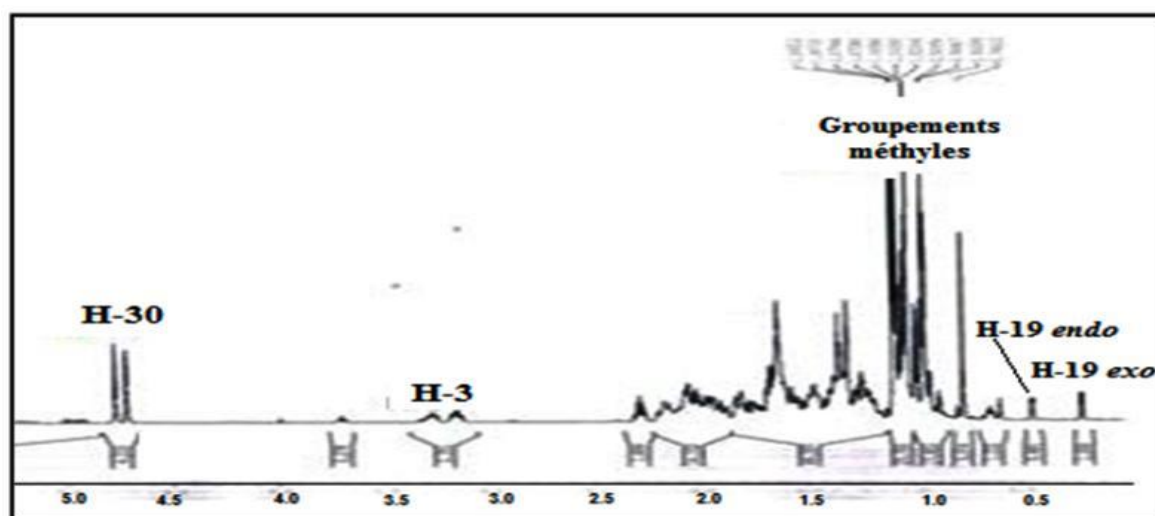
Le mélange des composés **MS3** et **MS4**, a été obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le chloroforme. Il représente une seule tache invisible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en bleu après révélation de sa CCM en phase normale et inverse RP-18, par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse ESI-MS de ce mélange enregistré en mode positif (Figure III-211) présente deux pics d'ions pseudomoléculaires à  $m/z = 449,4$   $[M+Na]^+$  et  $465,3$   $[M+K]^+$ . Ceci correspond à une masse moléculaire de 426 uma et une formule brute en  $C_{30}H_{50}O$ . Soit une différence de 14 uma par rapport au composé précédent **MS2** (440 uma), indiquant la perte d'un groupement méthyle.



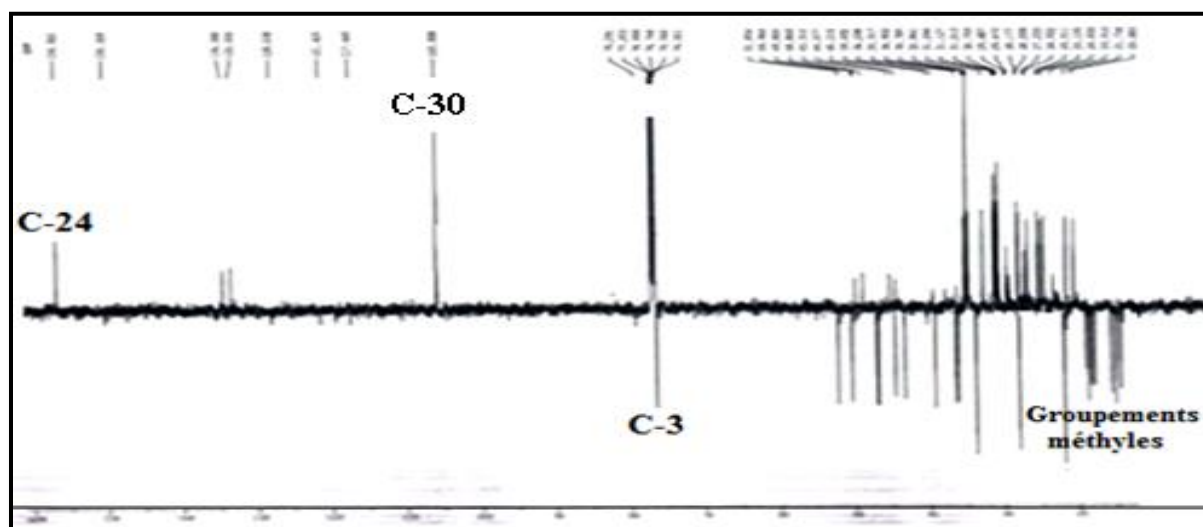
**Figure III-211:** Spectre de masse ESI-MS (mode positif) des composés **MS3** et **MS4**

La détermination structurale de ces composés (**MS3** et **MS4**) est basée principalement sur l'analyse des spectres RMN  $^1H$  et  $^{13}C$ , ainsi que la comparaison avec les données de la littérature. La différence d'intégration observée sur le spectre RMN  $^1H$  entre les protons caractéristiques des cycloarténols: H<sub>2</sub>-19 (2H), H-3 (2H) et H<sub>2</sub>-30 (4H) atteste bien qu'il s'agit d'un mélange de deux composés.



**Figure III-212:** Spectre RMN  $^1H$  des composés **MS3** et **MS4** ( $CDCl_3$ )

L'analyse du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure III-212) de ce mélange permet ainsi de visualiser les signaux de deux protons sous forme de doublets chacun à  $\delta_{\text{H}}$  0,01 (*d*,  $J = 4,1$  Hz, H-19 *exo*) et 0,23 (*d*,  $J = 4,0$  Hz, H-19 *endo*) caractéristiques de deux protons non équivalents d'un noyau cyclopropane du dérivé de cycloartanol, deux protons hydroxyméthines à  $\delta_{\text{H}}$  2,96 (*td*,  $J = 11,4, 5,3$  Hz, H-3 $\alpha$ ) et 3,05 (*td*,  $J = 11,7, 5,2$  Hz, H-3 $\alpha$ ) et deux protons éthyléniques résonant à 4,56 (*sl*, H-30a) et 4,51 ppm (*sl*, H-30b). Dans la région des champs forts de ce mélange, on observe une série de pics très dense entre 0,70 et 1,20 ppm. Ceci suggère la présence d'un nombre élevé de méthyles avec différentes multiplicités.



**Figure III-213:** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé des composés **MS3** et **MS4**

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé (Figure III-213) de ce mélange confirme la présence de deux molécules en tenant compte du nombre de signaux présents dans le spectre dépassant 40 atomes de carbone et donc l'existence de deux structures triterpéniques tétracycliques isomères.

L'analyse conjointe des spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [241], permettent l'attribution des déplacements chimiques des protons et carbones de ces deux triterpénoïdes, isolés en mélange constitué par le cycloeucalénol (**MS3**) et l'obtusifoliol (**MS4**). Ils ont été isolés précédemment des espèces : *E. guyoniana* [26], *E. bupleuroides* [30] et *E. pterococca* [31].

Le composé cycloeucalénol (**MS3**) a montré des activités biologiques intéressantes telles que : cardiotonique [242], anti-inflammatoire [239] et antimycobactérienne, mais il n'a pas révélé d'activités cytotoxique envers les cellules KB, BC et NCI-H187 et antiplasmodiale [243]. L'obtusifoliol (**MS4**) a présenté une activité antifongique contre *Candida albicans* [244].

**Tableau III-24:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **MS3** (Cycloeucalénol) dans  $\text{CDCl}_3$ .

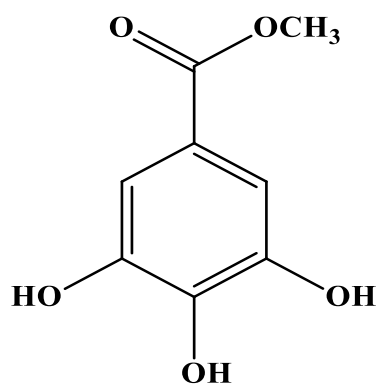
Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
1	1,11-1,40	-	<i>m</i>	30,9
2	1,29-1,84	-	<i>m</i>	34,8
3	3,05 H-3 $\alpha$	11,7, 5,2	<i>td</i>	76,5
4	1,03 H-4 $\beta$	-	<i>m</i>	44,4
5	1,05 H-5 $\alpha$	-	<i>m</i>	43,3
6	0,40-1,50	-	<i>m</i>	24,1
7	1,13-1,77	-	<i>m</i>	28,1
8	1,40 H-8 $\beta$	-	<i>m</i>	46,9
9	-	-	-	23,4
10	-	-	-	29,3
11	1,86	-	<i>m</i>	25,4
12	1,15	-	<i>m</i>	35,3
13	-	-	-	45,2
14	-	-	-	48,9
15	1,46	-	<i>m</i>	32,9
16	1,04-1,84	-	<i>m</i>	26,9
17	1,43 H-17 $\alpha$	-	<i>m</i>	52,2
18	0,82	-	<i>s</i>	18,0
19	0,01 H-19 <i>exo</i>	4,0	<i>d</i>	27,4
	0,23 H-19 <i>endo</i>	4,0	<i>d</i>	
20	1,26	-	<i>m</i>	36,1
21	0,74	-	<i>d</i>	18,6
22	1,01-1,41	-	<i>m</i>	35,0
23	1,70-1,98	-	<i>m</i>	31,3
24	-	-	-	156,9
25	2,08	6,8	<i>sept</i>	33,7
26	0,88	6,8	<i>d</i>	21,8
27	0,86	6,8	<i>d</i>	21,9
28	0,84	6,5	<i>d</i>	14,3
29	0,72	-	<i>s</i>	19,3
30	4,56 H-30a	-	<i>sl</i>	105,8
	4,51 H-30b	-	<i>sl</i>	

**Tableau III-25:** Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **MS4** (Obtusifoliol) dans  $\text{CDCl}_3$ .

Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
1	1,14	-	<i>m</i>	35,3
2	1,04-1,39	-	<i>m</i>	30,7

3	2,96 H-3 $\alpha$	11,4, 5,3	<i>td</i>	76,5
4	1,15 H-4 $\beta$	-	<i>m</i>	40,2
5	0,81 H-5 $\alpha$	-	<i>m</i>	48,8
6	1,08-1,60	-	<i>m</i>	20,6
7	1,11-1,78	-	<i>m</i>	26,9
8	-	-	-	133,5
9	-	-	-	134,5
10	-	-	-	36,5
11	1,84-1,91	-	<i>m</i>	21,7
12	1,50	-	<i>m</i>	24,6
13	-	-	-	44,4
14	-	-	-	48,8
15	1,56-1,68	-	<i>m</i>	30,7
16	1,40-1,98	-	<i>m</i>	31,1
17	1,35 H-17 $\alpha$	-	<i>m</i>	51,8
18	0,56	-	<i>s</i>	15,7
19	0,83	-	<i>s</i>	18,7
20	1,25	-	<i>m</i>	36,2
21	0,78	-	<i>d</i>	18,2
22	0,98-1,40	-	<i>m</i>	34,7
23	1,67-1,97	-	<i>m</i>	31,1
24	-	-	-	156,9
25	2,08	6,8	<i>sept</i>	32,8
26	0,88	6,8	<i>d</i>	21,9
27	0,86	6,8	<i>d</i>	22,0
28	0,84	6,5	<i>d</i>	14,3
29	0,72	-	<i>s</i>	19,3
30	4,56 H-30a	-	<i>sl</i>	105,8
	4,51 H-30b	-	<i>sl</i>	

#### III-3-3-4- Identification structurale du composé MS5



Méthyle gallate

Ce composé est isolé sous forme d'une poudre amorphe blanche soluble dans le méthanol, il présente une tache visible à lumière UV à 254 nm qui reste incolore après pulvérisation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse ESI-MS du composé **MS5** enregistré en mode positif (Figure III-214) révèle un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z = 207,1$   $[M+Na]^+$ , soit une masse moléculaire égale à 184 uma correspondant à une formule brute en  $C_8H_8O_5$ , suggérant 5 degrés d'insaturation.

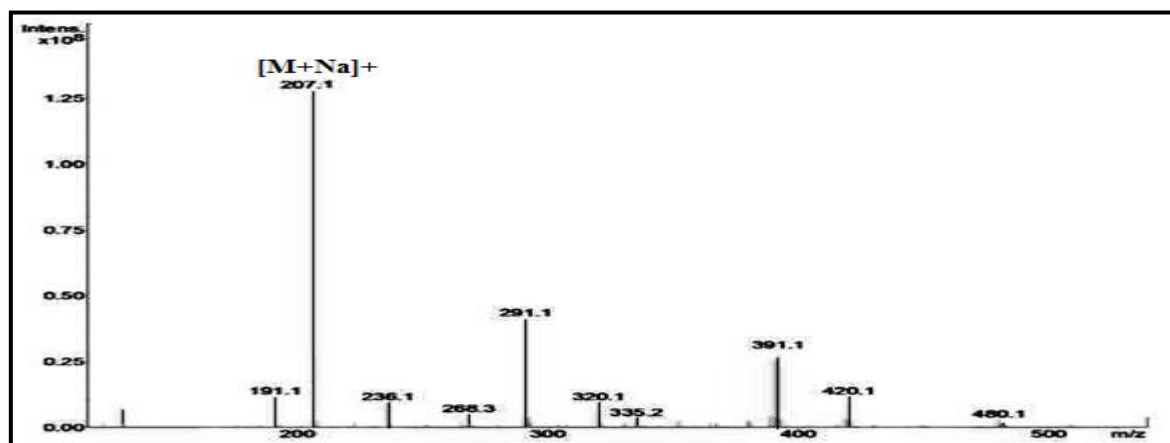


Figure III-214: Spectre de masse ESI-MS (Mode positif) du composé **MS5**

L'analyse conjointe des spectres RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  du composé **MS5** montre une allure très différente par rapport aux composés identifiés **MS1-MS4** et indique clairement sa nature phénolique. En effet, Le spectre RMN  $^1H$  (Figure III-215) du **MS5** met en évidence la présence de deux signaux sous forme de singulet chacun. Le premier est apparu à  $\delta_H$  3,83 d'intégration 3H correspondant à un groupement méthoxyle, son carbone est assigné par analyse du spectre HSQC à  $\delta_C$  50,9. Le deuxième signal est observé à  $\delta_H$  7,06 d'intégration 2H, attribuable à deux protons aromatiques équivalents. Leur carbone est détecté à  $\delta_C$  108,6 selon l'expérience HSQC  $J$ -modulé.

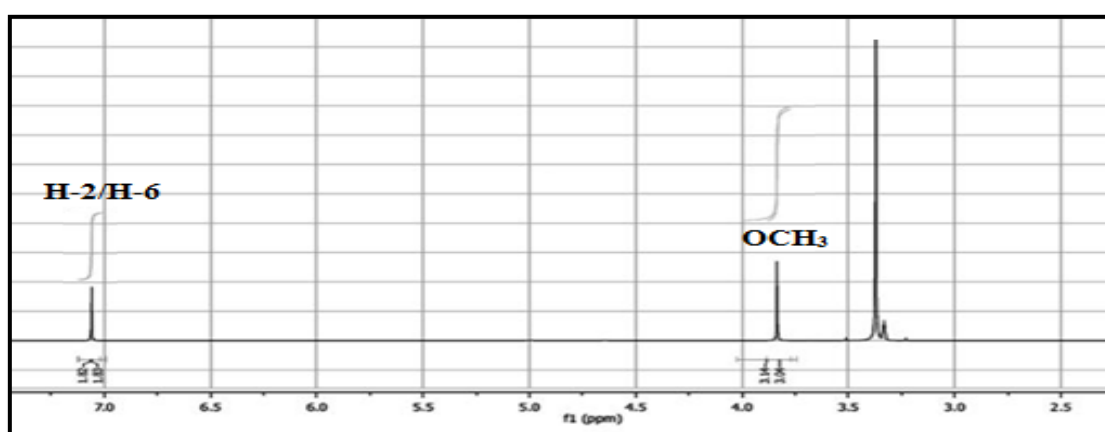


Figure III-215 : Spectre RMN  $^1H$  du composé **MS5** ( $CD_3OD$ )

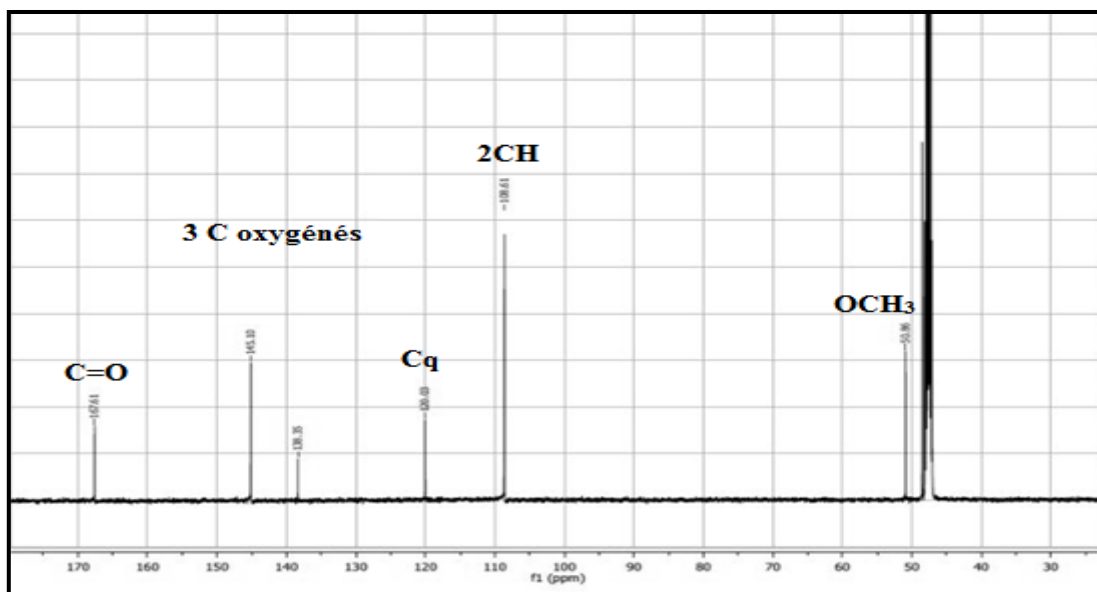


Figure III-216 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé MS5

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Figure III-216) du composé MS5 montre l'existence de six signaux correspondant à 8 atomes de carbone:

- Un méthoxy à  $\delta_{\text{C}}$  50,9
- Deux CH aromatiques à  $\delta_{\text{C}}$  108,6
- Un carbonyle à  $\delta_{\text{C}}$  167,6
- Un carbone aromatique quaternaire à  $\delta_{\text{C}}$  120,0
- Trois carbones aromatiques oxygénés dont deux sont équivalents à  $\delta_{\text{C}}$  145,1 et le troisième à  $\delta_{\text{C}}$  138,3

La présence de 5 degrés d'insaturation selon la formule brute  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$  et l'apparition des signaux dans la zones des carbones aromatiques entre 108 et 146 ppm laisse supposé qu'il s'agit d'un composé aromatique tétrasubstitué avec une symétrie de deux CH aromatiques soit en *ortho* ou en *méta* (Figure III-217).

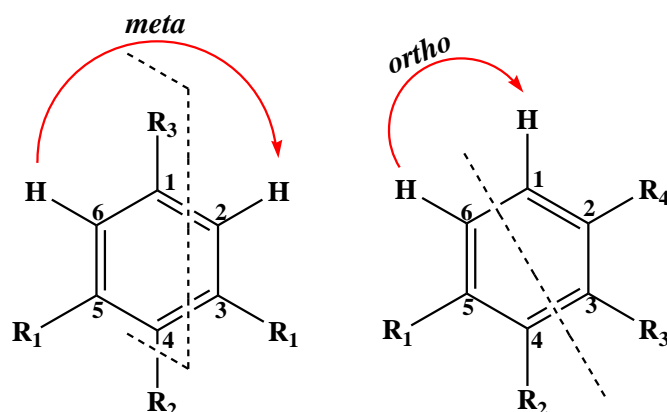


Figure III-217 : Substitution du cycle aromatique

Dans le cas des CH en position *ortho*, les quatre carbones substitués apparaissent sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  sous forme de quatre signaux de carbones non équivalents, alors que dans le cas d'une substitution de type *meta*, on observe trois signaux de carbones aromatiques, cette observation corrobore avec les données du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé **MS5**.

La substitution du cycle aromatique est basée principalement sur l'analyse du spectre HMBC (Figure III-218). A partir des protons aromatiques équivalents notés H-2 et H-6, il est repéré des taches de corrélation HMBC entre H-2 et H-6 et un carbone du carbonyle résonant à  $\delta_{\text{C}}$  167,6 (C-7) et un carbone aromatique quaternaire assigné à  $\delta_{\text{C}}$  120,0 (C-1), indiquant l'attachement de la fonction ester au carbone C-1. Le carbonyle ester C-7 présente aussi une corrélation en  $^3J_{\text{H/C}}$  avec les protons du groupement méthyle à  $\delta_{\text{H}}$  3,83. Les autres corrélations observées entre les protons H-2 et H-6 et les deux carbones équivalents C-3/C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  145,1) et le carbone oxygéné C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  138,3) suggèrent l'existence d'un dérivé méthylé de l'acide gallique. Il est à noter que l'absence d'autres corrélations HMBC avec les carbones C-3, C-4 et C-5 atteste que ces positions sont libres (porteurs de groupements hydroxyles).

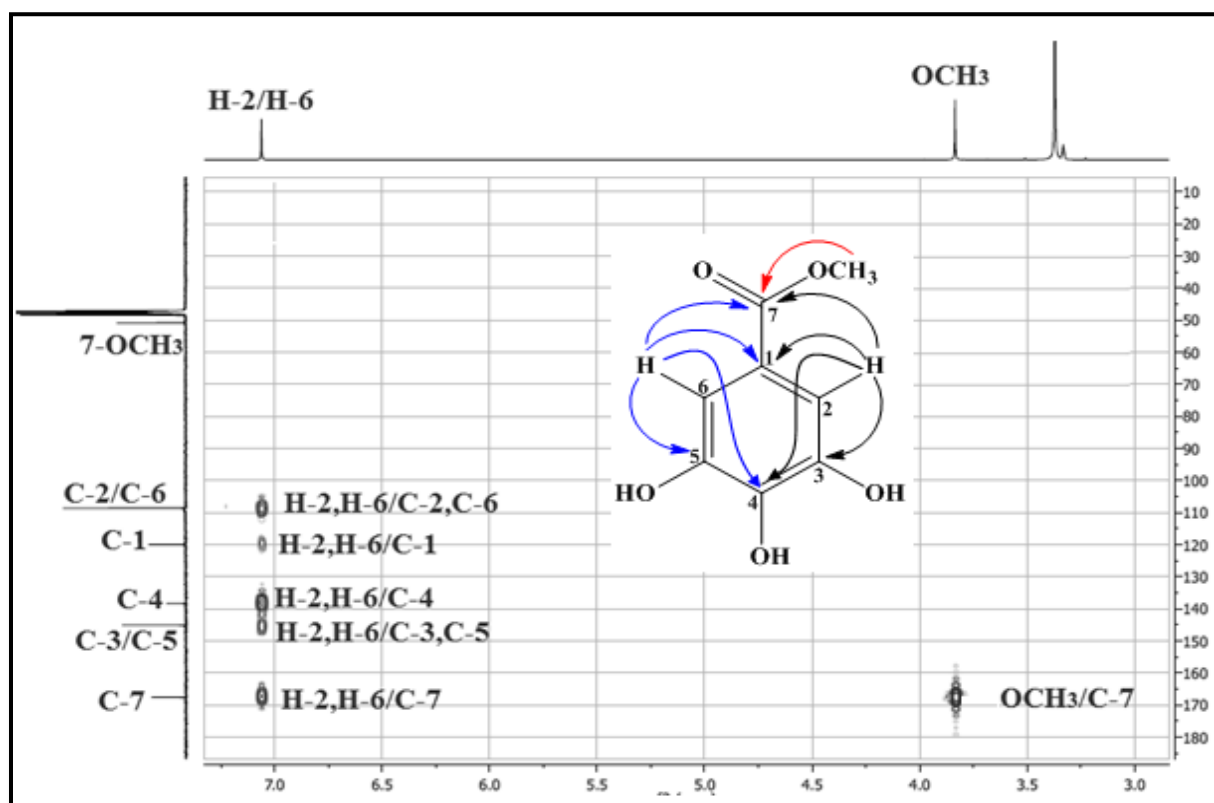


Figure III-218 : Corrélations HMBC du composé **MS5**

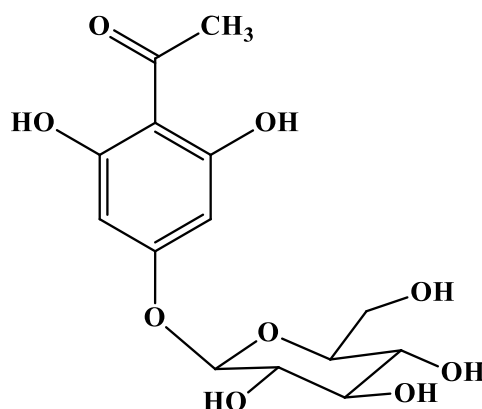
Toutes ces données spectrales et la comparaison avec celles de la littérature [245] permettent d'identifier le composé **MS5** à un dérivé méthylé de l'acide gallique connu sous le

nom Méthyl gallate. Ce composé a été isolé antérieurement de plusieurs espèces du genre *Euphorbia* telles que : *E. echinus* [246], *E. tibetica* [247], *E. teheranica* [248] et *E. supina* [249]. Le méthyl gallate est connu principalement pour ses propriétés biologiques à savoir antitumorale [250], anti-oxydante et cytotoxique [251] et antivirale [252].

**Tableau III-26** : Déplacements chimiques en RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) du composé **MS5** dans  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Position	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_{\text{C}}$
1	-	-	-	120,0
2	7,06	-	<i>s</i>	108,6
3	-	-	-	145,1
4	-	-	-	138,3
5	-	-	-	145,1
6	7,06	-	<i>s</i>	108,6
7	-	-	-	167,2
7-OCH <sub>3</sub>	3,83	-	<i>s</i>	50,8

### III-3-3-5- Identification structurale du composé MS6



**Phloroacétophénone 4-O-β-D-glucopyranoside**

Le composé **MS6** est obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Il montre une tache visible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en marron après révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse à haute résolution HR-ESI-MS de ce composé enregistré en mode positif (Figure III-219) révèle un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z$  353,2765  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calc.



$C_{14}H_{18}O_9Na$ , 353,2684). Ceci correspond à une masse moléculaire de 330 uma et une formule brute en  $C_{14}H_{18}O_9$ , indiquant 6 degrés d'insaturation.

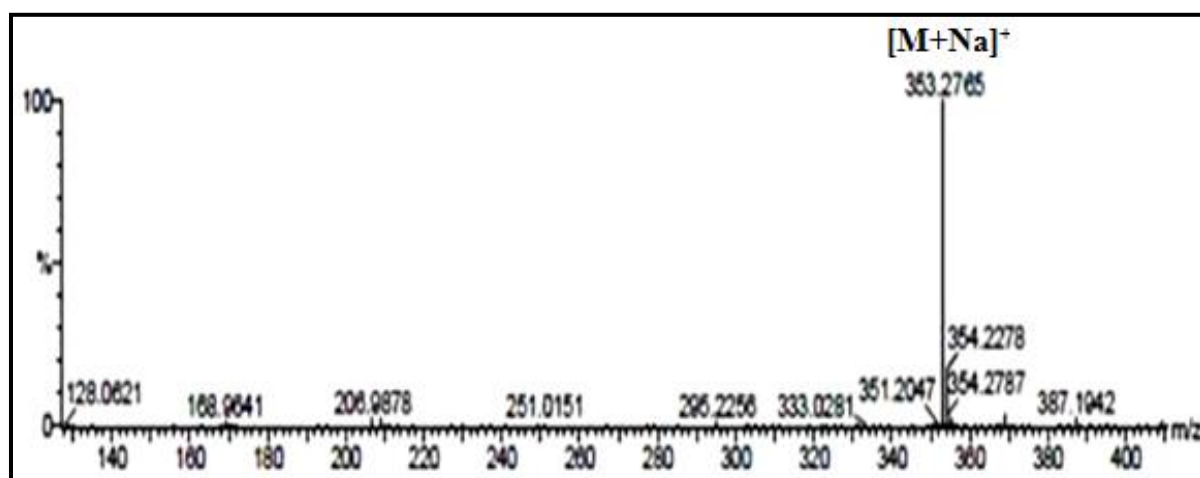


Figure III-219: Spectre de masse HR-ESI-MS (mode positif) du composé MS6

L'analyse combinée des spectres RMN  $^1H$  (Figure III-220) et HSQC  $J$ -modulé (Figure III-221) du composé MS6 montre l'existence de:

- Deux protons aromatiques équivalents à  $\delta_H$  6,10, (s) couplant sur le spectre HSQC avec un carbone à  $\delta_C$  94,8.
- Un groupement méthyle à  $\delta_H$  2,63 (s), sa valeur déblindée du déplacement chimique indique qu'il est lié à un groupement électro-attracteur. Son carbone correspondant est détecté par analyse du spectre HSQC à  $\delta_C$  31,6.
- Six protons osidiques résonnant entre 3,0 et 5,0 ppm.

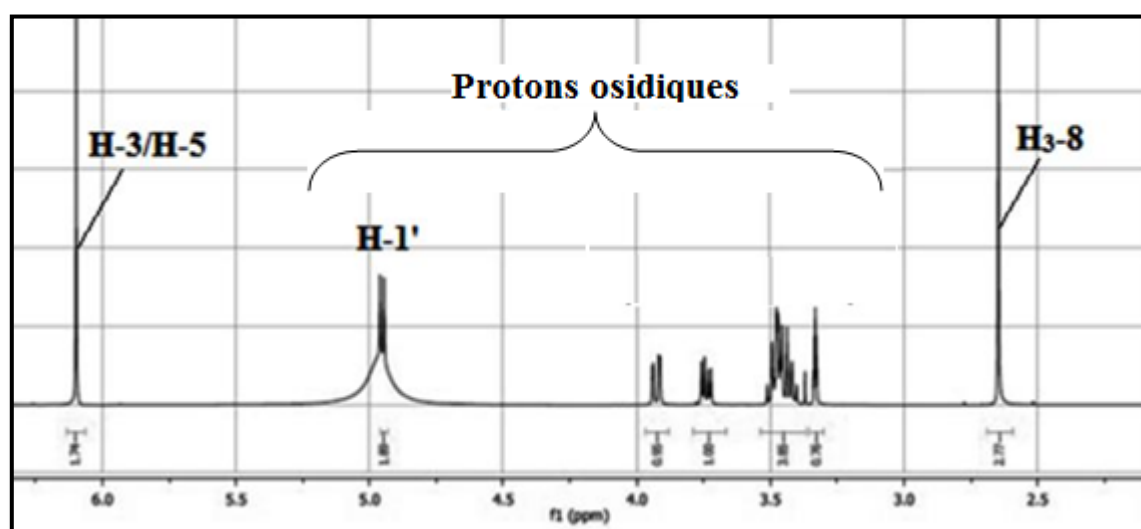


Figure III-220: Spectre RMN  $^1H$  du composé MS6 ( $CD_3OD$ )

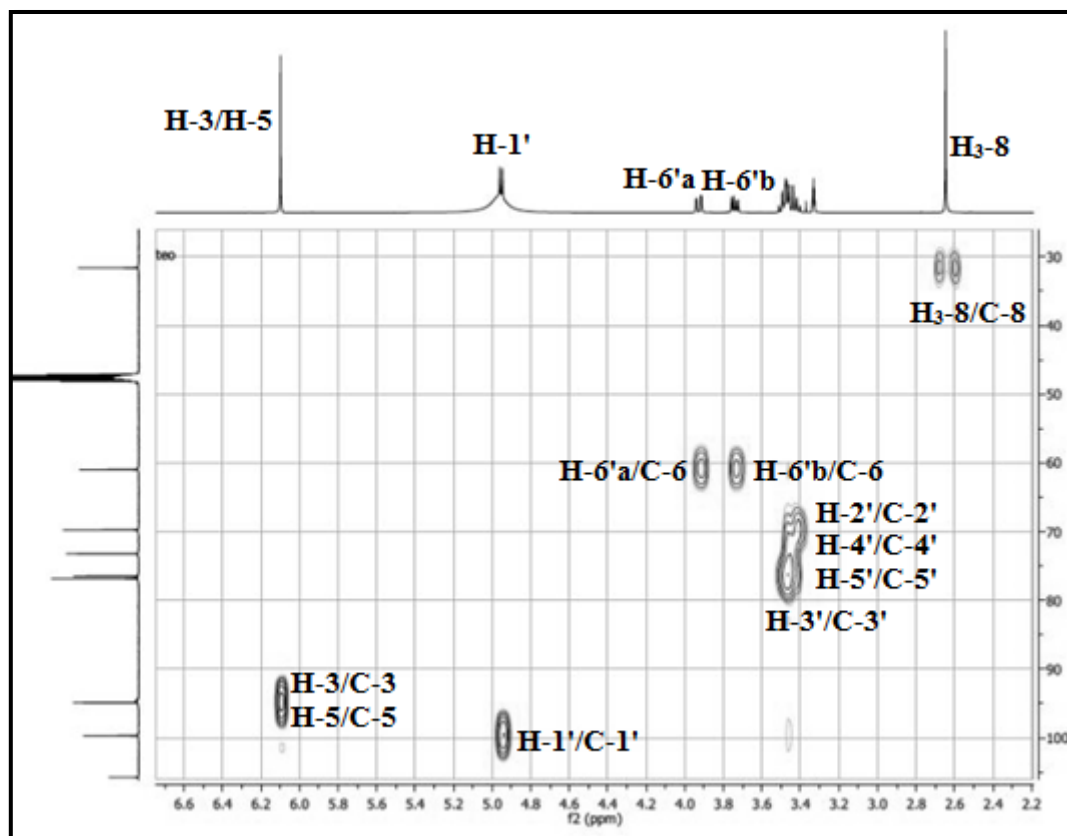


Figure III-221: Spectre HSQC *J*-modulé du composé MS6

Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé MS6 (Figure III-222) révèle la présence des signaux de carbones osidiques entre 60,0 et 100,0 ppm, deux CH aromatiques à  $\delta_{\text{C}}$  94,8, trois carbones aromatiques oxygénés à  $\delta_{\text{C}}$  163,7 et 164,1, un carbone quaternaire aromatique à  $\delta_{\text{C}}$  105,7, une fonction carbonyle cétonique à  $\delta_{\text{C}}$  203,9 et un groupement méthyle à 31,6 ppm.

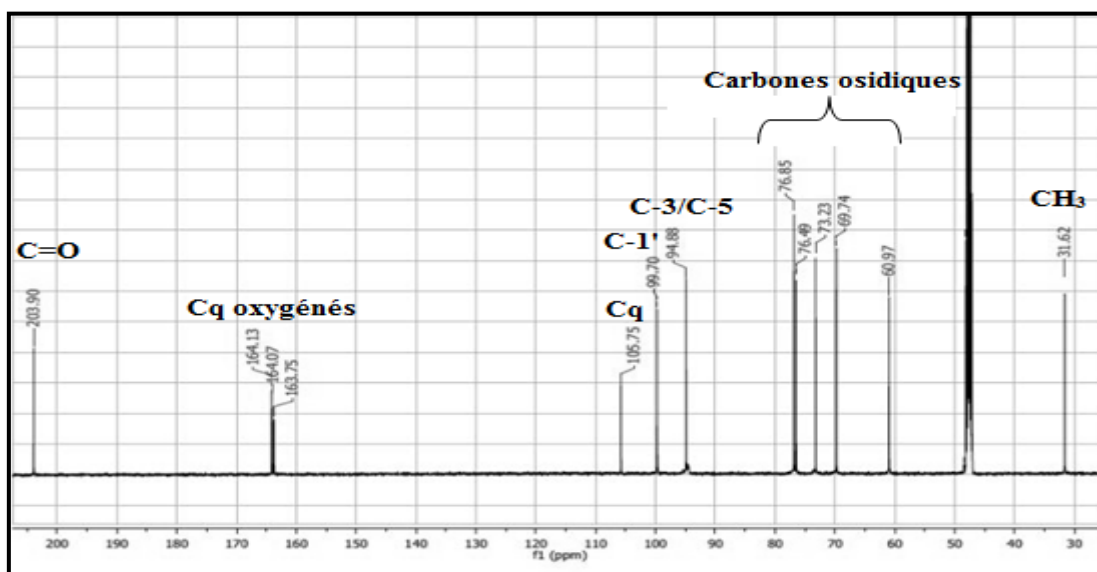
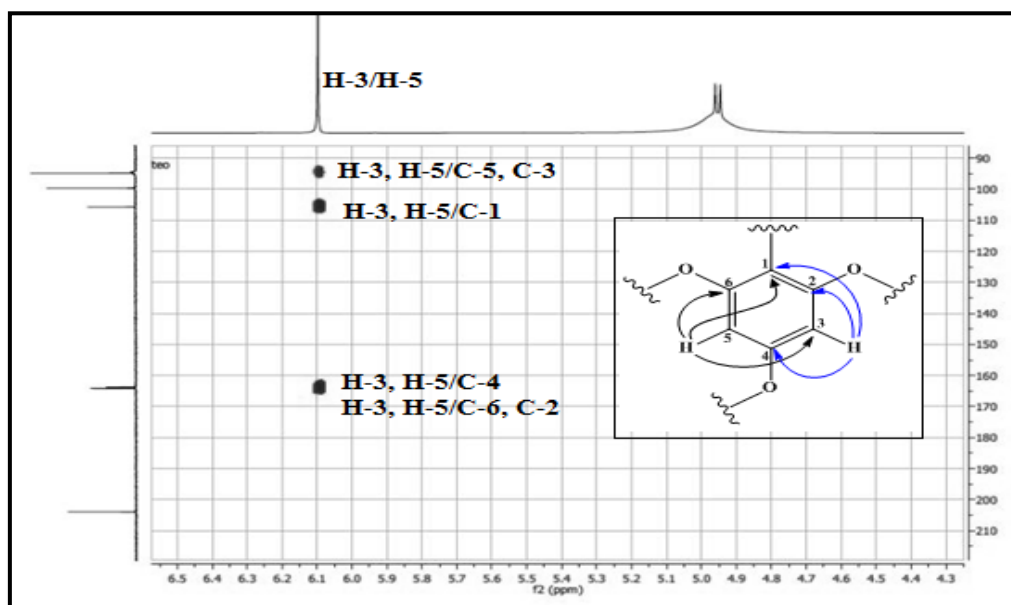


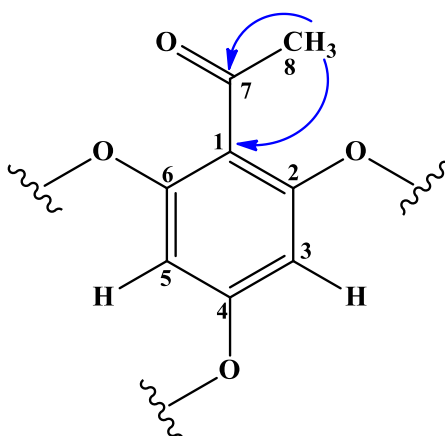
Figure III-222: Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  du composé MS6

Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de ce composé indiquent la présence d'un cycle aromatique tétrasubstitué, comme il a été démontré précédemment lors de l'analyse du composé **MS5**. Ceci est confirmé par les corrélations observées sur le spectre HMBC (Figure III-223) entre les protons aromatiques équivalents notés H-3 et H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  6,10) et trois carbones aromatiques oxygénés à  $\delta_{\text{C}}$  164,1 (C-2 et C-6) et 163,7 (C-4), ainsi qu'avec un carbone quaternaire à  $\delta_{\text{C}}$  105,7 (C-1).



**Figure III-223:** Partie du spectre HMBC du composé **MS6**

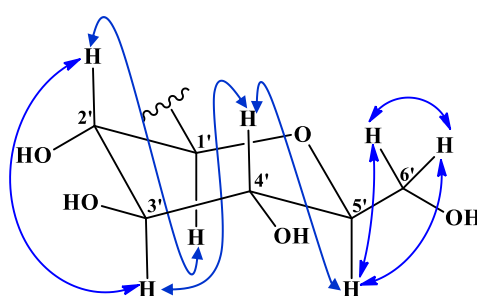
D'autres corrélations sont visualisées sur le spectre HMBC (Figure III-224) entre les protons du groupement méthyle à  $\delta_{\text{H}}$  2,63 et la fonction cétonique à  $\delta_{\text{C}}$  203,9 et le carbone C-1 du cycle aromatique. On en déduit que le la partie acétyle [ $\text{CH}_3\text{-C=O}$ ] est attachée au carbone C-1.



**Figure III-224:** Corrélations HMBC du groupement acétyle du composé **MS6**

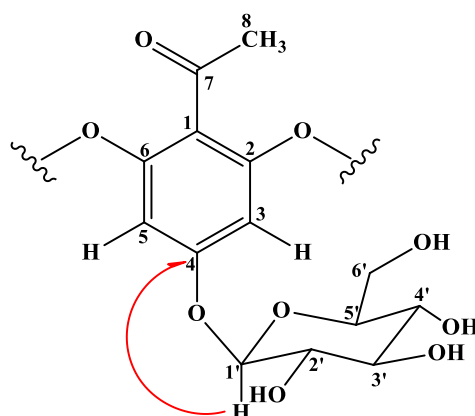
Les signaux non attribués sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  entre 3,0 et 5,0 ppm ainsi que sur le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  entre 60 et 100 ppm attestent de la présence d'un hexose dont le proton anomère est localisé à  $\delta_{\text{H}}$  4,95 (*d*,  $J = 7,4$  Hz, H-1'). Son carbone est assigné par analyse du spectre HSQC à  $\delta_{\text{C}}$  99,7 (C-1').

Comme pour tous les composés glycosylés élucidés précédemment, l'analyse du spectre COSY H-H de ce composé permet d'identifier les protons de cet hexose constituant l'enchaînement H-1'/H-2' ( $\delta_{\text{H}}$  3,45, *t*,  $J = 7,4$  Hz)/H-3' ( $\delta_{\text{H}}$  3,48, *m*)/H-4' ( $\delta_{\text{H}}$  3,42, *t*,  $J = 7,3$  Hz)/H-5' ( $\delta_{\text{H}}$  3,47, *m*)/H-6'a ( $\delta_{\text{H}}$  3,93, *dd*,  $J = 12,1-2,1$  Hz) et H-6'b ( $\delta_{\text{H}}$  3,74, *dd*,  $J = 12,1-5,3$  Hz). Les grandes valeurs de constantes de couplage entre ces protons indiquent que cet hexose est de type  $\beta$ -D-glucose (Figure III-225).



**Figure III-225:** Corrélations COSY H-H du  $\beta$ -D-glucose

Le branchement du cycle aromatique de ce composé au  $\beta$ -D-glucose est confirmé par la corrélation observée sur le spectre HMBC entre le proton anomérique H-1' et le carbone C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  163,7) du cycle aromatique (Figures III-226 et III-227).



**Figure III-226:** Corrélation HMBC entre le proton anomère H-1' et le carbone C-4

D'autres corrélations sont observées sur le spectre HMBC (Figure III-227) entre :

- Le proton anomérique H-1' et le carbone osidique C-3'
- Le proton H-6'a et le carbone C-4'

- Le proton H-6'b et le carbone C-5'
- Le proton H-5' et le carbone C-4'
- Le proton H-4' et le carbone C-6'
- Le proton H-2' et les carbones C-3' et C-1'

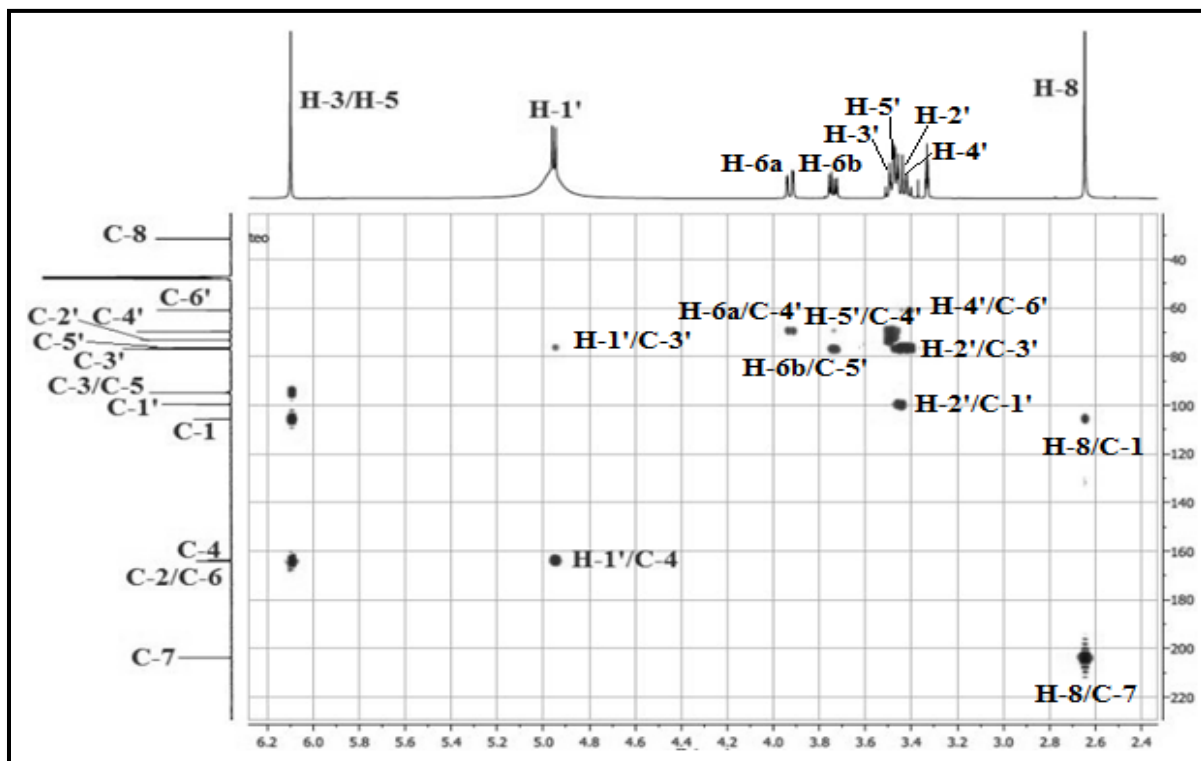


Figure III-227 : Spectre HMBC du composé MS6

En tenant compte de la masse moléculaire du composé **MS6** égale à 330 uma selon le spectre de masse ESI-MS et sa formule brute en  $C_{14}H_{18}O_9$ , la partie qui a été identifiée correspond à une formule brute en  $C_{14}H_{16}O_9$ , soit une différence de 2 uma, indiquant la présence de deux hydroxyles libres au niveau des carbones oxygénés C-2 et C-6 du cycle aromatique (Figure III-228).

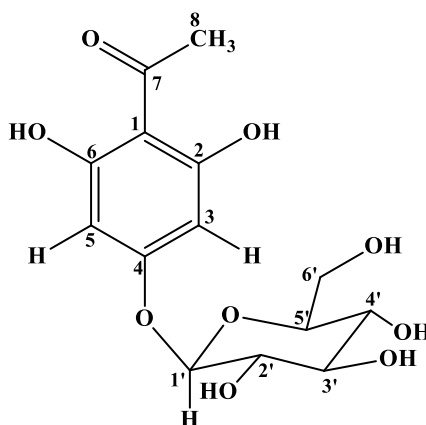


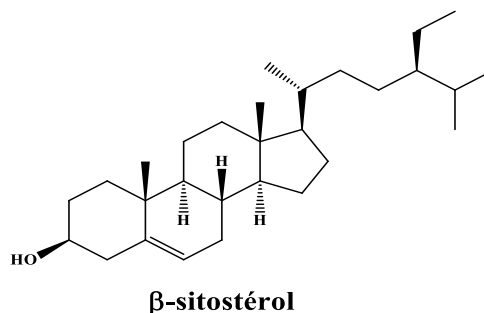
Figure III-228 : Structure du composé MS6

Tous les déplacements chimiques des protons et carbones (Tableau III-27) assignés conjointement par les expériences COSY H-H, HSQC et HMBC, ainsi que la valeur du pouvoir rotatoire ( $[\alpha]_D^{20} = + 23^\circ$ ,  $C = 1,2$  dans MeOH) et par la comparaison avec les données de la littérature <sup>[252]</sup> permettent d'identifier le composé **MS6** au Phloroacétophénone 4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside isolé antérieurement des espèces *E. aucherii* <sup>[253]</sup> et *E. pterococca* <sup>[31]</sup>. Ce composé montre une activité biologique antihépatotoxique <sup>[254]</sup>.

**Tableau III-27:** Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) et RMN <sup>13</sup>C (125 MHz) du composé **MS6** dans CD<sub>3</sub>OD.

Position	$\delta_H$	$J$ (Hz)	Multiplicité	$\delta_C$
1	-	-	-	105,7
2	-	-	-	164,1
3	6,10	-	<i>s</i>	94,8
4	-	-	-	163,7
5	6,10	-	<i>s</i>	94,8
6	-	-	-	164,1
7	-	-	-	203,9
8	2,63	-	<i>s</i>	31,6
1'	4,95	7,4	<i>d</i>	99,7
2'	3,45	7,4	<i>t</i>	73,2
3'	3,48	-	<i>m</i>	76,8
4'	3,42	7,3	<i>t</i>	69,7
5'	3,47	-	<i>m</i>	76,7
6'a	3,93	12,1 ; 2,1	<i>dd</i>	60,9
6'b	3,74	12,1 ; 5,3	<i>dd</i>	

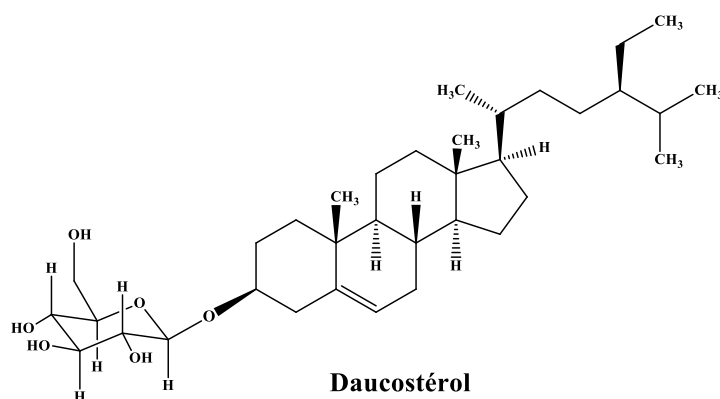
### III-3-3-6- Identification structurale du composé MS7



Le composé **MS7** est obtenu à l'état pur par précipitation dans le chloroforme, il indique une tache invisible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en rose après pulvérisation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. Il a été identifié au  $\beta$ -sitostérol par comparaison avec un échantillon témoin.

Les données des spectres RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé et ESI-MS de ce composé confirment ainsi sa structure. Il a été isolé antérieurement de plusieurs espèces du genre *Euphorbia* telles que : *E. guyoniana* [26], *E. bupleuroides* [30], *E. broterie* [255] et *E. pterococca* [31].

### III-3-3-7- Identification structurale du composé MS8



Ce composé est isolé sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Il est invisible sous UV à 254 nm et se colore en mauve après révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. La comparaison des données spectrales de ce composé avec celles de la littérature, indique qu'il s'agit de Daucostérol. Ce composé a été déjà isolé des espèces du genre *Euphorbia* : *E. retusa* [28], *E. guyoniana* [26], *E. altotibetic* [256] et *E. boetica* [257].

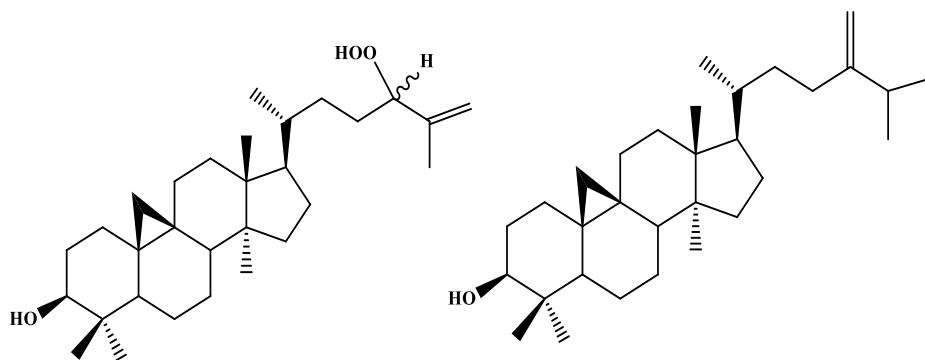
### III-2-4- Conclusion

Ce travail reporte l'investigation phytochimique de l'espèce *Euphorbia atlantica* Coss. appartenant à la famille Euphorbiaceae. Cette plante n'ayant pas fait l'objet d'étude phytochimique et d'évaluation biologique antérieures, est utilisée en médecine populaire locale pour extirper les épines et les verrues.

Cette étude est effectuée sur les deux extraits éther de pétrole et acétate d'éthyle de la plante entière *E. atlantica* aboutissant à l'isolement et l'identification de 8 métabolites

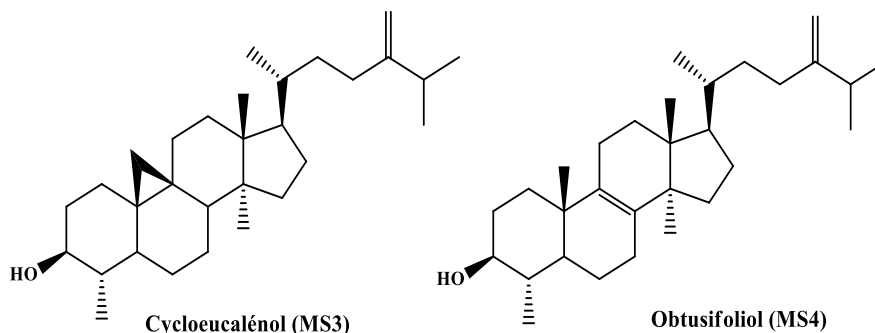
secondaires. Les composés caractérisés appartiennent à trois classes chimiques: les polyphénols, triterpènes et stéroïdes. Ils se présentent comme suit :

- Quatre triterpènes cycloartaniques : 3 $\beta$ -hydroxycycloart-25-èn-24-hydroperoxyde (MS1), 24-méthylèneglycylcycloartanol (MS2), Cycloeucaféol (MS3) et Obtusifoliol (MS4).



3 $\beta$ -hydroxycycloart-25-èn-24-hydroperoxyde (MS1)

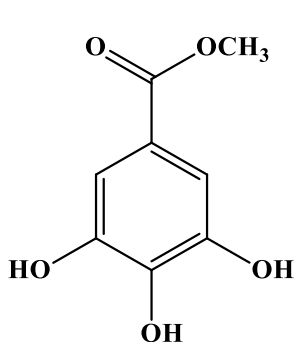
24-méthylèneglycylcycloartanol (MS2)



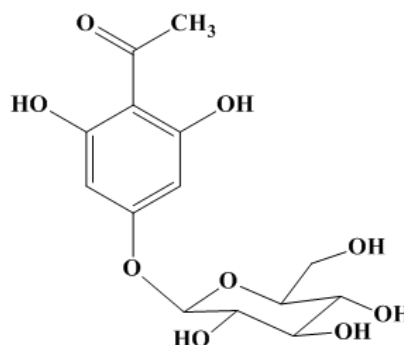
Cycloeucaféol (MS3)

Obtusifoliol (MS4)

- Deux polyphénols : Méthyl gallate (MS5) et Phloroacétophénone-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (MS6).



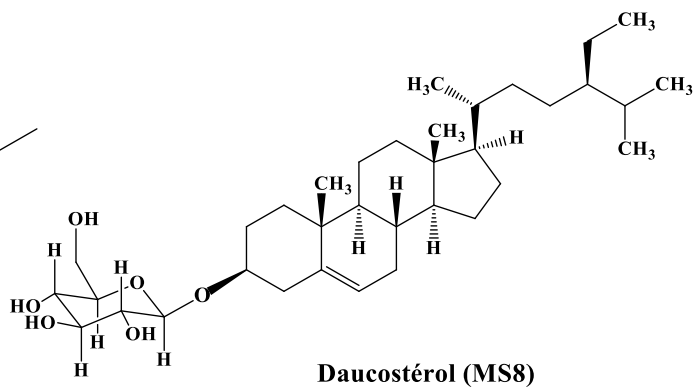
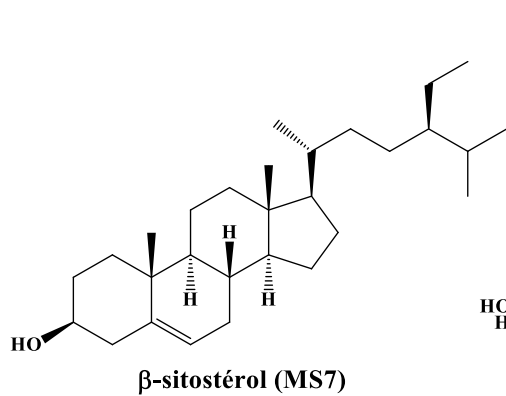
Méthyl gallate (MS5)



Phloroacétophénone 4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (MS6)

- Deux stéroïdes :  $\beta$ -sitostérol (MS7) et Daucostérol (MS8).





# *Chapitre IV*

## *Activités biologiques*

## **IV-1- Stress oxydatif et anti-oxydants**

Plusieurs réactions biologiques font impliquer l'oxygène moléculaire ( $O_2$ ) dans les réactions d'oxydation. Ces types de réactions sont catalysés par un groupe d'enzymes métalloprotéines appelé oxydase. Plus de 90% d'oxygène consommé par des cellules de mammifères est catalytiquement réduit par quatre électrons pour produire deux molécules d'eau, cependant l' $O_2$  peut être réduit par moins de quatre électrons. En effet, en présence de certaines oxydases, la réduction d' $O_2$  donne naissance à des espèces oxygénées partiellement réduites et hautement réactives appelées espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou espèces oxygénées réactives (EOR) [258].

### **IV-1-1-Radicaux libres**

Les radicaux libres sont des espèces chimiques atomiques ou moléculaires, contenant un ou plusieurs électrons célibataires non appariés sur leurs couches externes [259]. Cet état leur confère une instabilité énergétique et cinétique. Ils apparaissent soit au cours de la rupture symétrique d'une liaison covalente pendant laquelle chaque atome conserve son électron soit au cours d'une réaction redox qui permet la perte ou le gain d'un ou plusieurs électrons à partir d'un composé non radicalaire [260].

Les radicaux libres sont dotés d'une forte réactivité, qui peut mener à un désordre dans les structures moléculaires, en oxydant les lipides membranaires, les protéines cellulaires et les acides nucléiques, provoquant ainsi la mort cellulaire [261, 262]. Il existe deux sources différentes de ces radicaux libres.

#### **➤ Sources endogènes**

Parmi les réactions enzymatiques, plusieurs sont considérées comme source principale des ERO comme le NADPH oxydase, le lipoxygénase et la xanthine oxydase (enzyme dans le foie).

La mitochondrie est un élément fondamental pour le fonctionnement de la cellule, c'est au niveau de cet organite que s'effectue la respiration cellulaire. La consommation de l'oxygène et les différentes réactions du transfert des électrons produisent les espèces réactives d'oxygène. Les ions métalliques présents dans l'organisme (fer et cuivre) peuvent coopérer avec des espèces moins réactives pour produire des radicaux hydroxyles [262, 263].

➤ **Sources exogènes**

Les ERO sont également générées sous l'effet de stress environnementaux comme la pollution, la consommation d'alcool ou médicaments (dont leurs structures peuvent jouer le rôle d'accepteurs et donneurs d'électrons), l'exposition prolongée au soleil, l'effort intense et prolongé ainsi que le tabagisme (les facteurs interagissant lors des inflammations). Toutes ces situations provoquent une surproduction des ERO dans l'organisme [264].

### **IV-1-2-Stress oxydant**

Le stress oxydatif est le déséquilibre entre la génération des espèces oxygénées réactives (ERO) et la capacité du corps à les neutraliser et à réparer les dommages oxydatifs [265].

Le stress oxydatif correspond donc à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire [266]. Cette perturbation peut avoir diverses origines, citons la surproduction endogène d'agents pro-oxydants d'origine inflammatoire, un déficit nutritionnel en anti-oxydants ou même une exposition environnementale à des facteurs pro-oxydants (tabac, alcool, médicaments, rayons gamma, rayons ultraviolets, ozone, métaux toxiques) [260, 267, 268].

### **IV-1-3-Maladies liées au stress oxydatif**

Le stress oxydant est la principale cause initiale de plusieurs maladies: cancer, cataracte, sclérose latérale amyotrophique, syndrome de détresse respiratoire aigu, oedème pulmonaire, vieillissement accéléré, alzheimer, parkinson, infections intestinales, rhumatisme, athérosclérose et diabète [269, 270]

### **IV-1-4-Anti-oxydants**

Les anti-oxydants sont des substances capables de neutraliser ou de réduire les dommages causés par les radicaux libres dans l'organisme et permettent de maintenir au niveau de la cellule des concentrations non cytotoxiques de ERO [271].

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux en espèces réactives de l'oxygène. La nature des systèmes anti-oxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses anti-oxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques [272].

#### IV-1-4-1-Systèmes enzymatiques

Cette ligne de défense est constituée principalement de trois enzymes. Il s'agit de la superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPX). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau de l' $O_2^-$  et du  $H_2O_2$ , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire selon les réactions suivantes (Figure IV-1) [259].

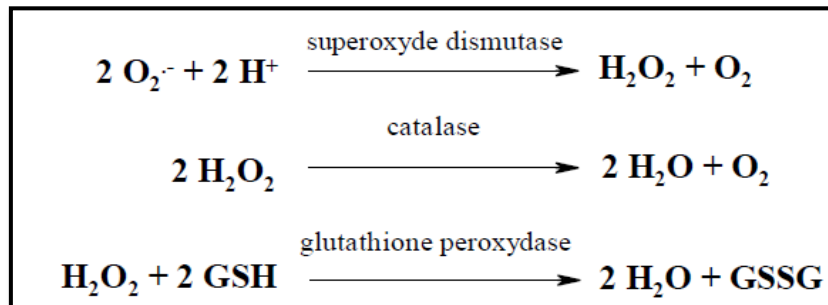


Figure IV-1 : Réactions des systèmes enzymatiques

#### IV-1-4-2-Systèmes non enzymatiques

Les anti-oxydants sont des agents redox qui réagissent avec les oxydants pour arrêter, ou ralentir les processus d'oxydation. Pendant ces réactions, les anti-oxydants s'oxydent en dérivés stables, ou persistent pendant un certain temps sous forme radicalaire. Ces formes radicalaires peuvent devenir des pro-oxydants [273].

Les principaux anti-oxydants non-enzymatiques sont le glutathion, la vitamine E, la vitamine C, les caroténoïdes et l'acide urique. Ces molécules stoppent la chaîne de réactions radicalaires [274].

### IV-2- Activité antibactérienne

#### IV-2-1- Généralités sur la thérapeutique des infections bactériennes

Dès la naissance, l'homme se trouve en contact avec des micro-organismes qui colonisent progressivement son revêtement cutanéomuqueux. Pour résister à ces micro-organismes de nombreux moyens sont mis en jeu, ces derniers peuvent être divisés en trois groupes : les barrières anatomiques, les mécanismes de résistance naturelle et l'immunité acquise [275].

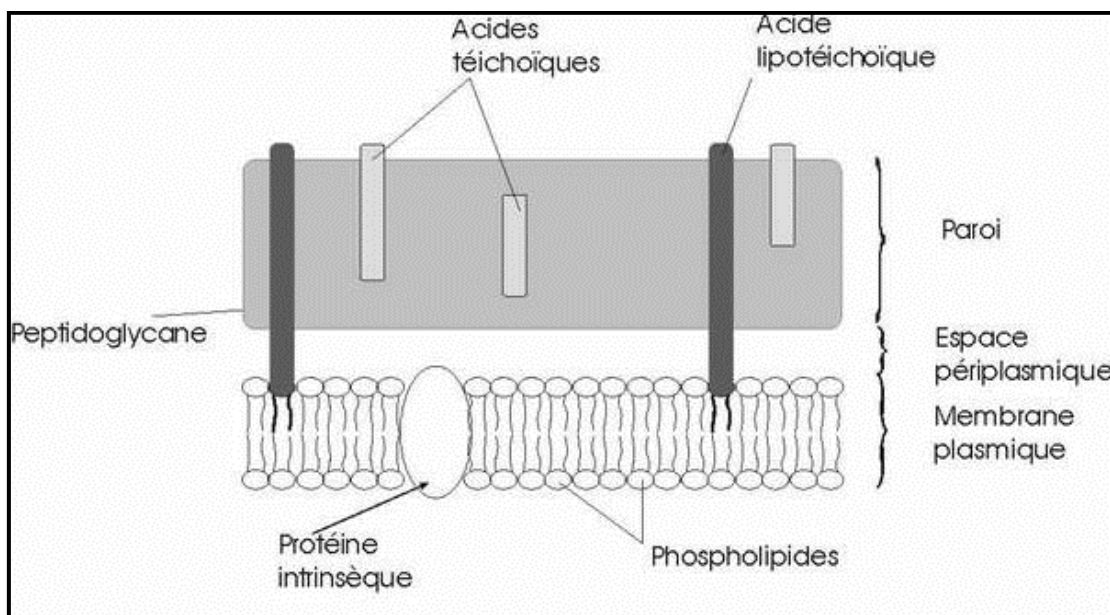
La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques. La prescription à grande échelle et parfois inappropriée de ces agents peut

engendrer des souches multi-résistantes d'où l'importance d'orienter les recherches vers la découverte de nouvelles voies qui constituent une source d'inspiration de nouveaux médicaments à base de plantes pouvant lutter efficacement contre le phénomène de la multi-résistance [276].

#### IV-2-2- Types de bactéries infectives

On peut identifier deux grands types de bactéries (Gram positif et Gram négatif) selon la coloration de Gram, d'où dérivent leurs noms. Les bactéries à Gram positif ont une paroi de peptidoglycane plus épaisse et prennent une coloration pourpre, alors que les bactéries à Gram négatif sont plus communes, contiennent moins de peptidoglycane colorées en rose foncé [277].

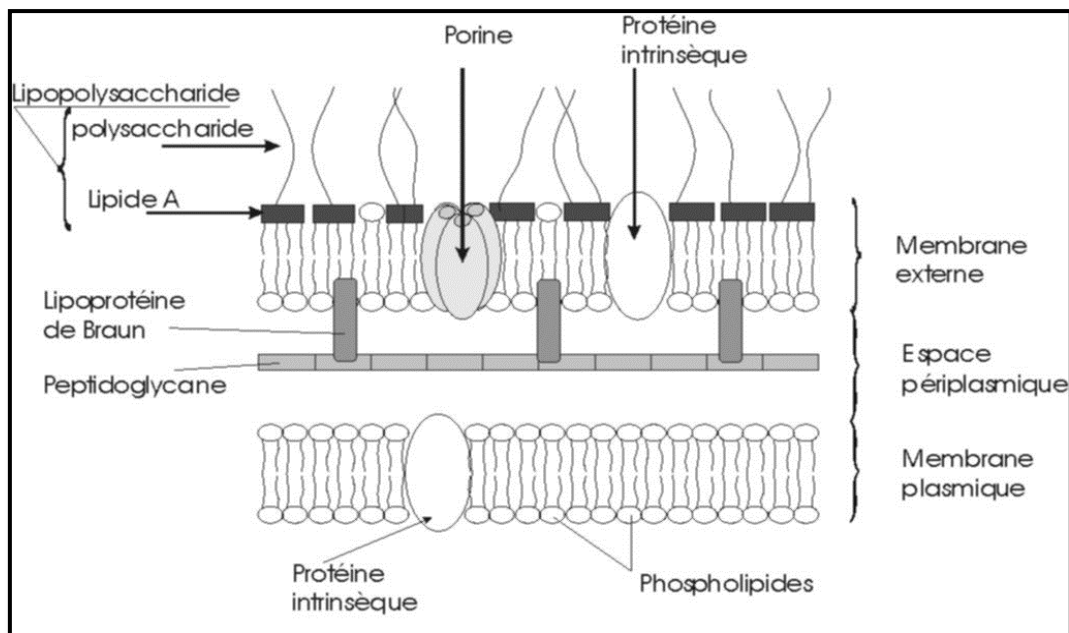
➤ **Bactéries à Gram positif** : le peptidoglycane forme un épais réseau complexe autour de la cellule. Ce réseau contient aussi de l'acide lipoteichoïque et teichoïque émergeant de la paroi cellulaire (Figure IV-2) [277, 278].



**Figure IV-2:** Structure de la paroi des bactéries à Gram<sup>+</sup>

➤ **Bactéries à Gram négatif** : une mince couche de peptidoglycane est prise en sandwich entre la membrane plasmique et une deuxième membrane externe. Cette membrane externe contient de grosses molécules de lipopolysaccharides, des lipides auxquels sont fixés des polysaccharides. Grâce à leur membrane externe, les bactéries à Gram<sup>-</sup> sont résistantes à beaucoup d'antibiotiques qui interfèrent avec la synthèse de la paroi cellulaire chez les bactéries à Gram<sup>+</sup>. Par exemple la pénicilline empêche les liaisons croisées des

peptidoglycane dans la paroi des cellules à Gram+ et tue les populations bactériennes en croissance <sup>[279]</sup> (Figure IV-3).

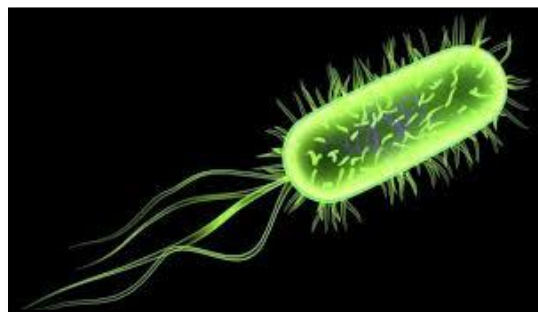


**Figure IV-3:** Structure de la paroi des bactéries à Gram<sup>-</sup>

#### IV-2-3- Micro-organismes utilisés dans les tests antibactériens

##### ➤ *Escherichia coli*

C'est une bactérie à Gram négatif, commensale du tube digestif de l'homme et de l'animal <sup>[280]</sup>, de forme non sporulée et de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles. Sa longueur varie entre 2 à 6  $\mu\text{m}$  alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5  $\mu\text{m}$ . L'espèce *E. coli* (Figure IV-4) représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, la diarrhée infantile et les intoxications alimentaires <sup>[281]</sup>.



**Figure IV-4 :** *Escherichia coli*

➤ *Staphylococcus aureus*

Ce sont des cocci à Gram positif avec un diamètre de 0,5 à 1,5 µm, de forme non sporulée qui tendent à se grouper en paires à petites chaînes. Elles sont habituellement non capsulée ou possédant des capsules limitées et sont anaérobies facultatives. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, d'endocardites aiguës et d'intoxications alimentaires [282] (Figure IV-5).

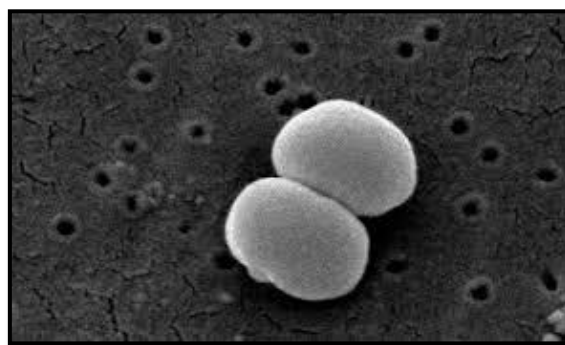


**Figure IV-5 :** *Staphylococcus aureus*

➤ *Staphylococcus albus*

A la différence de *Staphylococcus aureus*, les *Staphylocoques albus* (*Staphylococcus* blanc), font naturellement partie des flores cutané-muqueuses de l'homme. Ce type de bactérie est invisible à l'œil nu et se présente sous forme de grappe de raisin (Figure IV-6).

Ces *staphylocoques* sont potentiellement pathogènes dans certaines circonstances: implantation de corps étrangers (prothèses osseuses ou cardiaques, sondes, cathéters,...) et déficit immunitaire (SIDA, radiothérapie, chimiothérapie, prématurité). Le matériel implanté peut être contaminé par des souches de la flore cutané-muqueuse du patient ou du personnel soignant. De la même façon que les souches de *Staphylococcus aureus*, 50 à 70% des souches de *staphylocoques albus* isolées en milieu hospitalier sont fréquemment multi-résistantes aux antibiotiques [282-284].



**Figure IV-6 :** *Staphylococcus albus*



➤ ***Enterobacter* sp.**

*Enterobacter* sp. est un genre de bactéries appartenant à la classe des Gamma-proteobacteria et à la famille des Enterobacteriaceae. Il s'agit d'un bacille à Gram négatif de 2 à 3  $\mu\text{m}$  de longueur et 0,6  $\mu\text{m}$  de largeur (Figure IV-7). Ce genre comporte plusieurs espèces : *Enterobacter aerogene*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter agglomerans* et *Enterobacter sakazakii*. Les espèces de ce genre sont aérobies-anaérobies, mobiles ou immobiles, facilement cultivables, fermentant le glucose et réduisant les nitrates en nitrites [285].

Les espèces *Enterobacter* se trouvent dans l'environnement dans des habitats tels que l'eau, les eaux usées, les légumes et le sol. Ce sont des pathogènes opportunistes responsables en milieu hospitalier surtout d'infections urinaires, de bactériémies, de méningites ou de suppurations diverses [286].

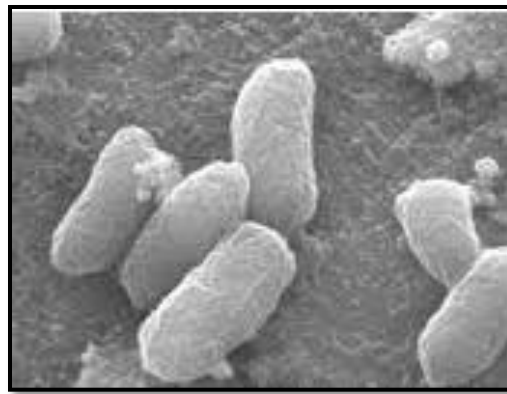


Figure IV-7 : *Enterobacter* sp.

#### IV-2-4- Principales substances antimicrobiennes

➤ **Antibiotiques**

Les antibiotiques, au sens strict du mot, sont des produits élaborés par des micro-organismes, mais on inclut généralement parmi eux les dérivés semi-synthétiques et les produits entièrement synthétiques. La thérapeutique des infections bactériennes se base principalement sur l'usage des antibiotiques qui inhibent sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer des effets toxiques pour les organismes supérieurs [287].

➤ **Composés phénoliques**

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* sont focalisées sur l'évaluation des propriétés antimicrobiennes des polyphénols et elles ont démontré que de nombreux composés

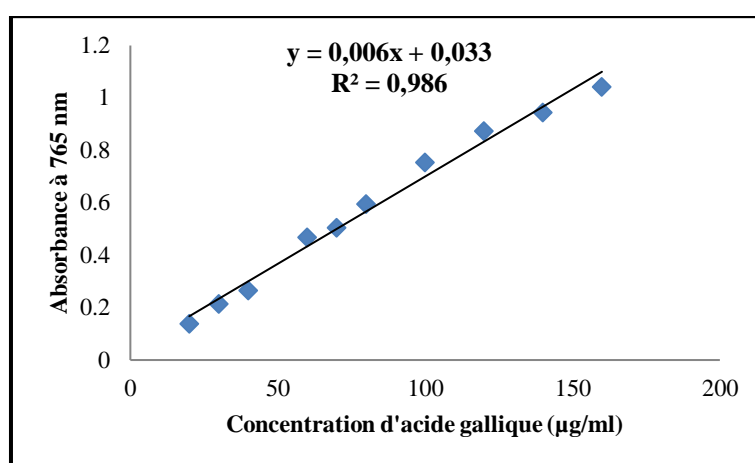
flavoniques tels que l'apigénine, le kaempférol et d'autres sont dotés d'effet sur différentes souches bactériennes à Gram négatif (*Escherichia coli*) et à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) [288]. D'autres études ont montré que les flavonoïdes ont un effet inhibiteur sur la croissance de la souche pathogène *Candida albicans*. Cette espèce est responsable de plus de 80% des infections connues sous le terme de candidose, comme les infections superficielles cutanées et infections superficielles muco-cutanées [289].

Les polyphénols (termilignane, thannilignane, 7-hydroxy-3',4'-méthylénedioxyflavane et anolignane B) isolés de la plante *Terminalia bellerica* ont présenté une activité antifongique contre les souches *Penicillium expansum* et *Candida albicans* [290].

### IV-3- RESULTATS ET DISCUSSION

#### IV-3-1- Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH obtenus à partir des plantes *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica* à été effectuée selon la courbe d'étalonnage établie avec l'acide gallique, ayant pour équation:  $Y = 0,006X + 0,033$  et un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,986$  (Figure IV-8). La quantité des polyphénols a été rapportée en microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g}$  EGA/mg d'extrait). Les résultats d'analyse sont présentés dans les tableaux ci-dessous (Tableaux IV-1 et IV-2) :



**Figure IV-8:** Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne  $\pm$  de trois essais SD)

**Tableau IV-1 :** Teneur en polyphénols totaux de la plante *Erinacea anthyllis*

Extrait de la plante <i>E. anthyllis</i>	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
Teneur ( $\mu\text{g}$ EGA/mg d'extrait)	26,133 $\pm$ 0,02	25,422 $\pm$ 0,004

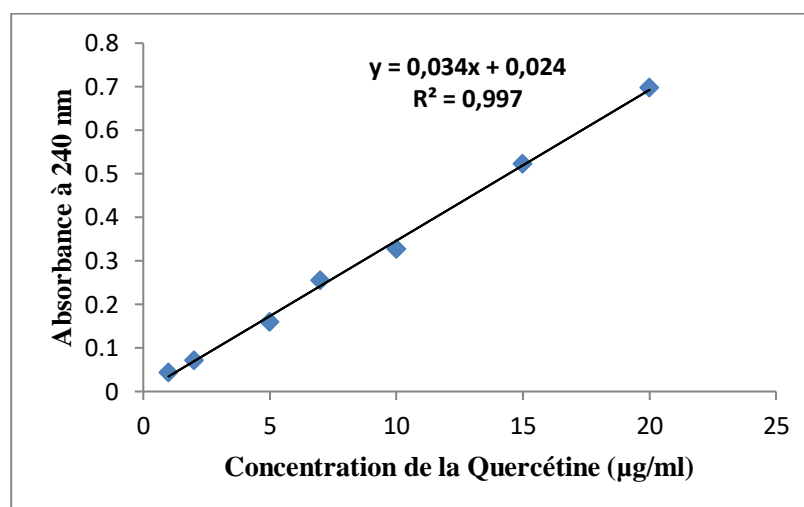
**Tableau IV-2 :** Teneur en polyphénols totaux de la plante *Euphorbia atlantica*

Extrait de la plante <i>E. atlantica</i>	EP	AcOEt
Teneur ( $\mu\text{g}$ EGA/mg d'extrait)	16,8 $\pm$ 0,007	12,53 $\pm$ 0,01

#### IV-3-2- Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Erinacea anthyllis* et EP et AcOEt de l'espèce *Euphorbia atlantica* a été déduite à partir de la droite

d'étalonnage établie par la quercétine (Figure IV-9). Les résultats du dosage sont représentés dans les tableaux IV-3 et IV-4.



**Figure IV-9:** Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne  $\pm$  de trois essais SD)

**Tableau IV-3 :** Teneur en flavonoïdes de la plante *Erinacea anthyllis*

Extrait de la plante <i>E. anthyllis</i>	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
Teneur (µg EQ/mg d'extrait)	6,635 $\pm$ 0,073	0,292 $\pm$ 0,006

**Tableau IV-4 :** Teneur en flavonoïdes de la plante *Euphorbia atlantica*

Extrait de la plante <i>E. atlantica</i>	AcOEt	EP
Teneur (µg EQ/mg d'extrait)	0,002 $\pm$ 0,023	0,0006 $\pm$ 0,054

L'étude quantitative des extraits bruts obtenus à partir des deux plantes *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica* a été faite au moyen des dosages spectrophotométriques et a pour objectif la détermination de la teneur totale en polyphénols et flavonoïdes.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes révèlent que l'extrait acétate d'éthyle de la plante *Erinacea anthyllis* est le plus riche en polyphénols totaux (26,133  $\pm$  0,025 µg EGA/mg d'Ex) et en flavonoïdes (6,635  $\pm$  0,073 µg EQ/mg d'Ex), suivi par l'extrait *n*-BuOH de la même plante qui présente des teneurs en polyphénols (25,422  $\pm$  0,004 µg EGA/mg d'Ex) et en flavonoïdes (0,292  $\pm$  0,006 EQ/mg d'Ex), ensuite l'extrait AcOEt de la plante *Euphorbia atlantica* qui montre des teneurs en polyphénols et flavonoïdes (17,867  $\pm$  0,009 µg EGA/mg d'Ex) et (0,002  $\pm$  0,023 EQ/mg d'Ex) respectivement, et enfin l'extrait EP avec des teneurs respectifs en polyphénols et flavonoïdes (12,233  $\pm$  0,042 µg

EGA/mg d'Ex) et  $(0,0006 \pm 0,054 \text{ EQ/mg d'Ex})$  pour *E. atlantica*. Ce dernier (extrait EP) a montré la plus faible teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes. Cette analyse fait ressortir que les teneurs en polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits obtenus à partir de la plante *Erinacea anthyllis* sont plus élevées que celles d'*Euphorbia atlantica*. Ces résultats confirment bien la partie analyse phytochimique qui a montré la richesse de l'extrait acétate d'éthyle de la plante *E. anthyllis* en polyphénols et flavonoïdes en conduisant particulièrement à l'isolement 14 métabolites secondaires (10 isoflavonoïdes, 2 flavanones, 1 flavanol et 1 polyphénol).

Plusieurs facteurs peuvent affecter la teneur en composés phénoliques. De nombreuses études ont montré que les facteurs géographiques, climatiques, génétiques, niveau de maturité à la récolte, la période de stockage et la technique d'extraction employée ont une forte influence sur le contenu en polyphénols [291, 292].

Les polyphénols sont des composés fortement hydroxylés que l'on retrouve dans diverses fractions d'extraits végétaux. Leurs principales caractéristiques sont la précipitation des protéines et des polyamides [293], ainsi que l'absorption des radicaux libres dans les systèmes biologiques. Ce qui fait de ces composés de puissants agents antioxydants [294].

### IV-3-3- Evaluation de l'activité anti-oxydante

#### IV-3-3-1- Test de piégeage du radical libre DPPH

L'activité anti-oxydante des extraits, fractions, composés isolés à partir des plantes *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica* et antioxydants standards (Acide ascorbique et BHT) contre le radical libre DPPH a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical, qui s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune à 517 nm.

Les résultats sont exprimés en  $IC_{50}$ , ce dernier est défini comme étant la concentration efficace de l'extrait capable de piéger 50 % des radicaux DPPH dans le mélange réactionnel dont l'activité la plus forte correspond à l' $IC_{50}$  la plus faible [295].

Pour mieux caractériser le pouvoir anti-radicalaire, deux autres paramètres ont été introduits l' $EC_{50}$  et le APR [296] :

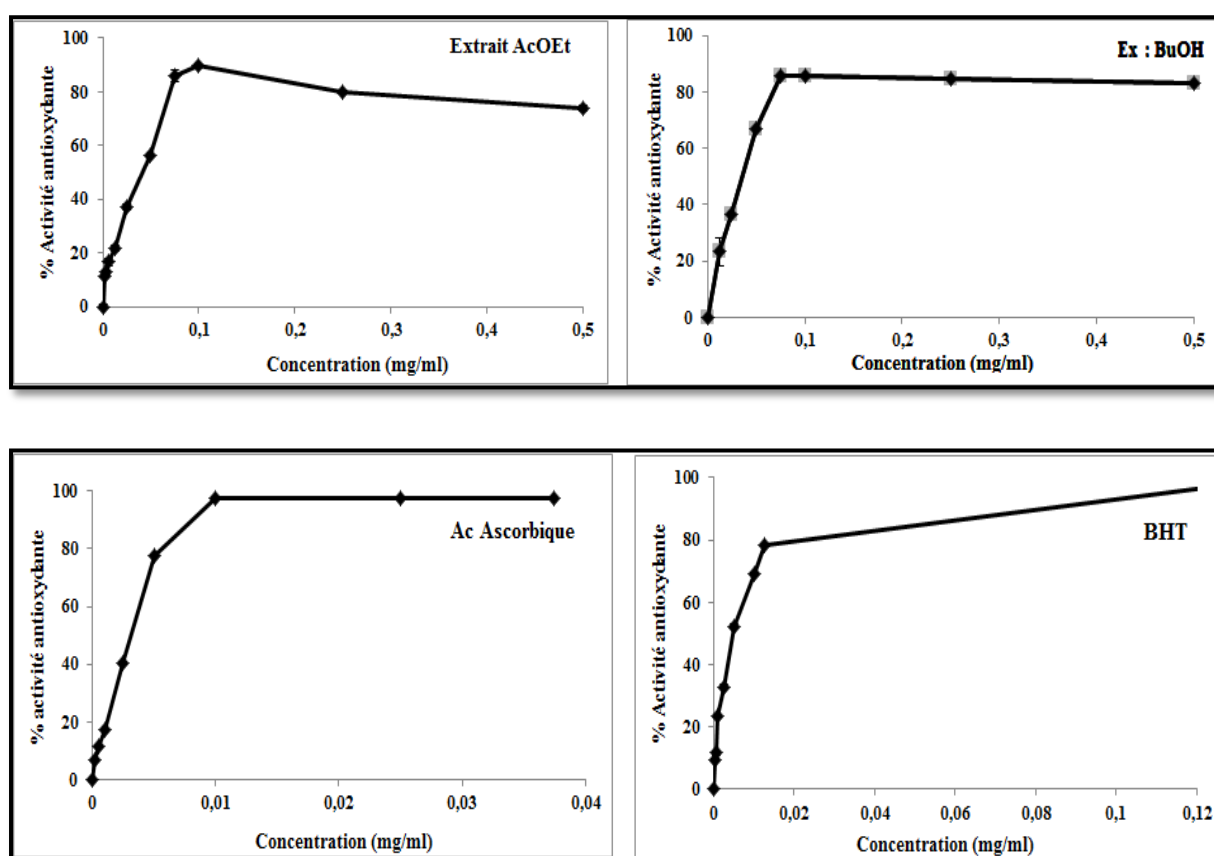
- Concentration effective à 50 % ( $EC_{50}$ ) qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel.

$$EC_{50} = (IC_{50}/\text{mg de DPPH/ml})$$

- Le pouvoir anti-radicalaire relatif (APR) qui est inversement proportionnel à l'EC<sub>50</sub>  
(APR = 1/EC<sub>50</sub>)

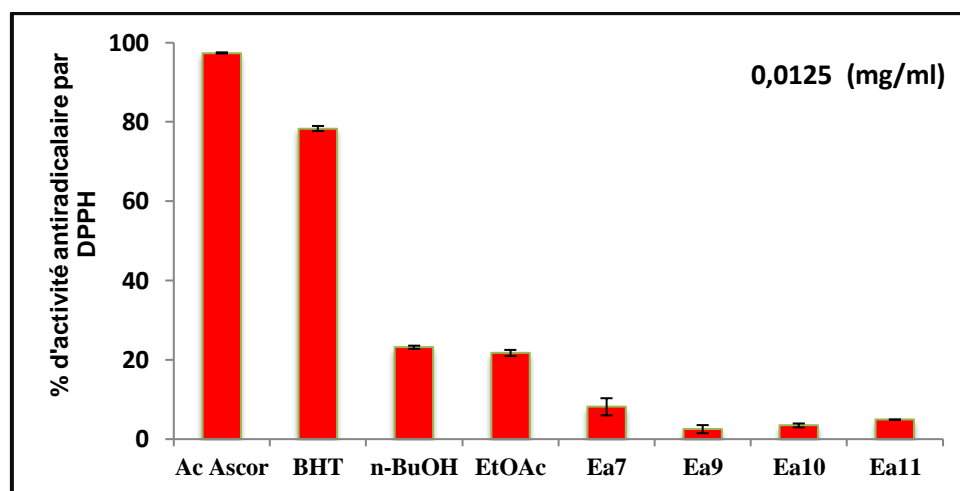
#### IV-3-3-1-a-Résultats de l'activité anti-oxydante

Les résultats obtenus montrent que les deux extraits (AcOEt et *n*-BuOH) de la plante *Erinacea anthyllis* et les isoflavonoïdes (±)-Erythrine F (**Ea7**), Daidzeine (**Ea9**) et Génistéine (**Ea10**) (Figure IV-11) isolés à partir de l'extrait AcOEt et Génistéine-8-*C*-glucoside (**Ea11**) purifié de l'extrait *n*-BuOH, ainsi que les antioxydants standards, agissent tous sur le radical DPPH d'une manière dépendante de la concentration (Figure IV-10).



**Figure IV-10:** Activité anti-oxydante des extraits (AcOEt, *n*-BuOH) de la plante *E. anthyllis* et des antioxydants standards vis-à-vis du radical DPPH en fonction de la concentration.

La comparaison de l'activité anti-oxydante entre les extraits et les composés isolés a montré que les extraits AcOEt et *n*-BuOH ont présenté une activité de piégeage du radical DPPH plus élevée que celle des isoflavonoïdes **Ea7**, **Ea9** et **Ea10** isolés de l'extrait AcOEt et **Ea11** obtenu de l'extrait *n*-BuOH pour une concentration de 0,0125 mg/ml (Figure IV-11).



**Figure IV-11 :** Comparaison de l'activité anti-oxydante des extraits, isoflavonoïdes isolés et antioxydants standards vis-à-vis du radical DPPH

Les valeurs d'IC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> et APR calculées pour chaque extrait et standard sont représentées dans le tableau suivant :

**Tableau IV-5:** Activité antiradicalaire des extraits et antioxydants standards

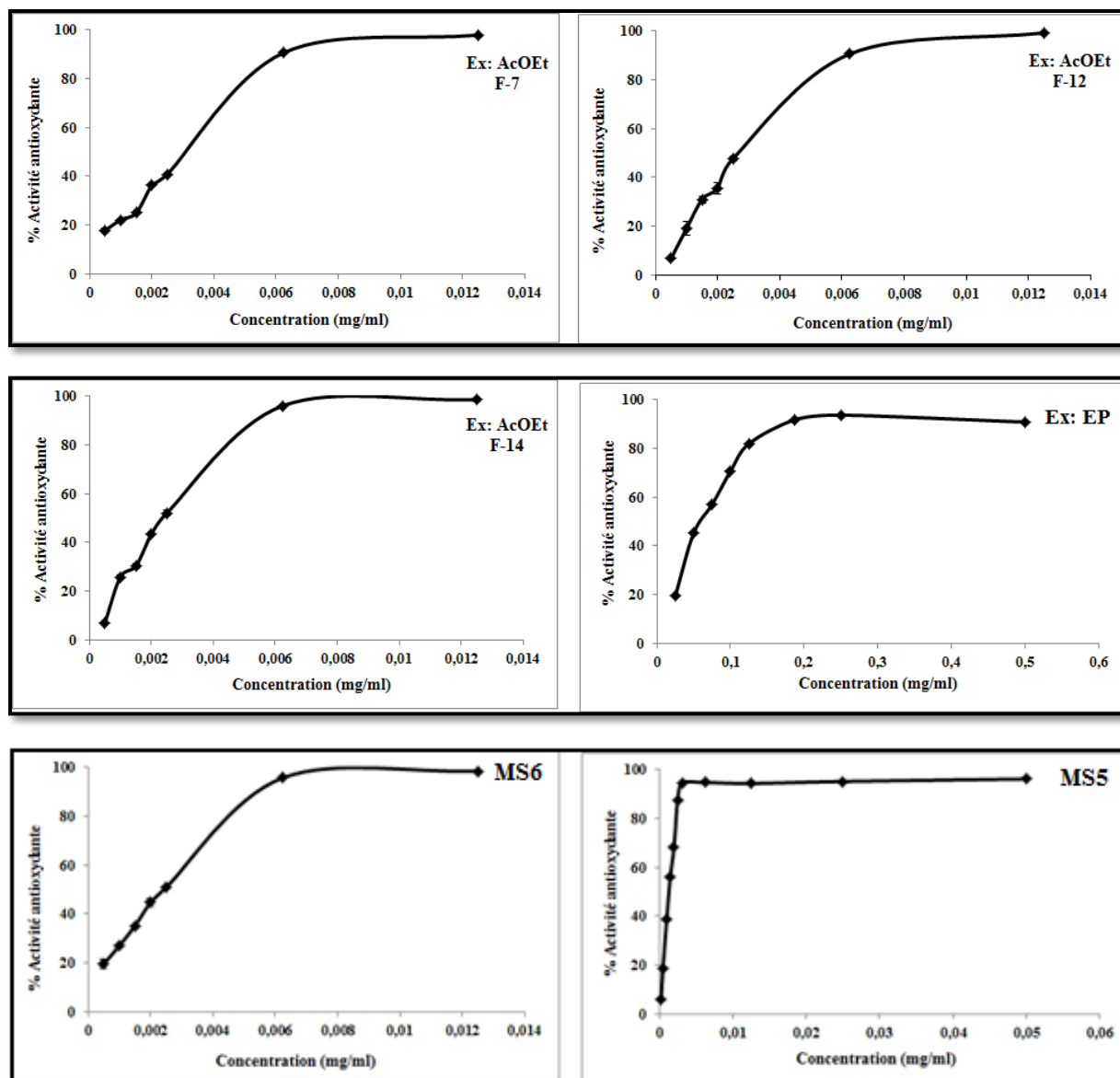
Extrait/Standard	IC <sub>50</sub> (mg/ml)	EC <sub>50</sub> (mg/ml)	APR
AcOEt	0,04 ± 0,003	1,684 ± 0,01	0,59 ± 0,005
<i>n</i> -BuOH	0,037 ± 0,001	1,50 ± 0,047	0,66 ± 0,02
BHT	0,005 ± 0,67	0,24 ± 0,001	4,20 ± 0,025
Acide ascorbique	0,003 ± 0,002	0,13 ± 0,001	7,95 ± 0,05

Les profils d'activité anti-oxydante révèlent que les extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *E. anthyllis* ont manifesté un pouvoir anti-oxydant modéré, leurs IC<sub>50</sub> sont 0,04 et 0,037 µg/ml respectivement (Tableau IV-5), mais relativement plus faible par rapport à l'acide ascorbique et le BHT dont les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont de l'ordre de 0,003 et 0,005 mg/ml respectivement (Figure IV-11 et Tableau IV-5). En général, les résultats obtenus ont permis de classer les extraits et les standards en fonction de leur IC<sub>50</sub> comme suit: Acide ascorbique > BHT > Ext: *n*-BuOH > Ext: AcOEt.

Les résultats de l'activité antiradicalaire de l'espèce *Euphorbia atlantica* (Figure IV-12) ont révélé que l'extrait éther de pétrole (EP), les fractions F-7, F-12 et F-14 obtenues à

partir de l'extrait AcOEt et les deux polyphénols Méthyl gallate (**MS5**) et Phloroacétophénone-4-*O*- $\beta$ -D-gluco-pyranoside (**MS6**) isolés de l'extrait AcOEt agissent positivement au DPPH. Il est à noter que l'extrait AcOEt et le triterpène cycloartanique : 3 $\beta$ -hydroxycycloart-25- $\text{\`e}$ n-24-hydroperoxyde (**MS1**) purifié de l'extrait éther de pétrole n'ont présenté aucun effet sur le radical DPPH.

Les valeurs d'IC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub> et APR calculées pour chaque extrait, produits et fractions sont représentées dans le tableau IV-6.



**Figure IV-12:** Activités anti-oxydantes des extraits (AcOEt et EP) et des polyphénols isolés (**MS5** et **MS6**) de l'espèce *E. atlantica* vis-à-vis du radical DPPH en fonction de la concentration.



Tableau IV-6 : Activité anti-radicalaire des extraits, fractions et polyphénols isolés

Extrait/Produit/Fraction	IC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>	APR
Ext : EP	0,066 ± 0,004	2,66 ± 0,160	0,37 ± 0,021
MS5	0,0019 ± 0,0004	0,075 ± 1,66	13,28 ± 0,003
MS6	0,0026 ± 0,001	0,105 ± 0,0002	9,487 ± 0,019
Ext : AcOEt (F-7)	0,0032 ± 0,0001	0,126 ± 0,0004	7,931 ± 0,025
Ext : AcOEt (F-12)	0,003 ± 0,001	0,125 ± 0,0017	8,0289 ± 0,107
Ext : AcOEt (F-14)	0,0028 ± 0,0003	0,112 ± 0,0005	8,899 ± 0,041

Les résultats obtenus ont montré que toutes les fractions (F-7, F-12 et F-14) et les deux polyphénols Méthyl gallate (MS5) et Phloroacétophénone-4-*O*-β-D-gluco-pyranoside (MS6) ont une activité anti-oxydante supérieure à celle du BHT et de l'acide ascorbique comme standards. L'extrait éther de pétrole a révélé un pouvoir anti-oxydant inférieur que les contrôles positifs.

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> nous permettent de classer le pouvoir anti-oxydant des fractions, polyphénols et extraits par rapport aux standards comme suit: MS5 > MS6 > F-14 > F-12 > F-7 = Acide ascorbique > BHT > Ext: EP.

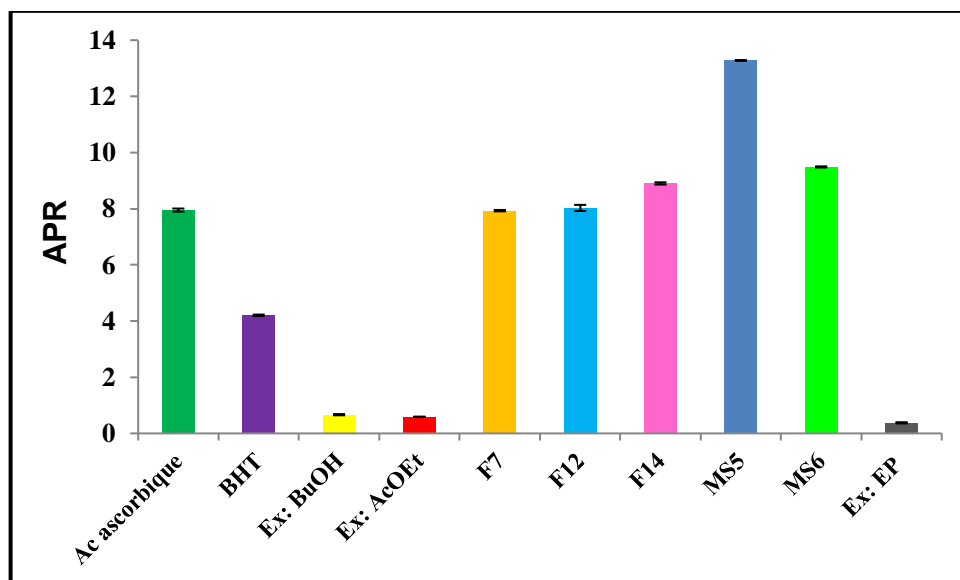


Figure IV-13 : Comparaison des pouvoirs anti-radicalaires relatifs aux extraits, fractions, polyphénols et antioxydants standards vis-à-vis du radical DPPH

La comparaison des valeurs d'APR (Figure IV-13 et Tableau IV-5) de tous les extraits, fractions et produits obtenus à partir des plantes *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica* et

aussi des standards (Acide ascorbique et BHT) a permis de conclure que les fractions de l'extrait AcOEt de la plante *E. atlantica* (**F-7**, **F-12**, **F-14**) et les polyphénols **MS5** et **MS6** ont un pouvoir antiradicalaire plus élevé que celui des standards (Acide ascorbique et BHT). En outre, les deux extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *E. anthyllis* ainsi que l'extrait EP d'*Euphorbia atlantica* ont présenté un pouvoir antiradicalaire moins efficace que les standards.

#### IV-3-3-1-b-Discussion de l'activité anti-oxydante par DPPH

L'activité anti-oxydante des plantes est notamment due à leur richesse en composés phénoliques, qui sont capables de donner des atomes d'hydrogènes pour inhiber la peroxydation lipidique. La présence et le nombre de groupements hydroxyles sont des facteurs déterminants de l'activité anti-oxydante des polyphénols [297].

Plusieurs études ont montré que les molécules anti-oxydantes telles que l'acide ascorbique, le tocophérol, les flavonoïdes et les tanins réduisent le radical DPPH pour donner une molécule diamagnétique stable, en raison de leur capacité à transférer un atome d'hydrogène [298, 299].

En plus, des travaux réalisés sur la relation structure-activité des flavonoïdes en général ont montré que les isoflavonoïdes les plus actifs contre le radical DPPH portent deux groupements hydroxyles en positions C-5 du cycle A et C-2' du cycle B et que la présence d'un OH en position C-4' n'a aucune influence sur le pouvoir anti-oxydant [300]. Il en résulte que la faible activité anti-oxydante des isoflavonoïdes testés ( $\pm$ )-Erythrine F (**Ea7**), Daidzeine (**Ea9**) et Génistéine (**Ea10**) et Génistéine-8-C-glucoside (**Ea11**) isolés de la plante *Erinacea anthyllis* est probablement due à l'absence de groupements OH en position C-2'.

L'absence de l'activité anti-oxydante dans l'extrait AcOEt de l'espèce *Euphorbia atlantica* peut être expliquée par l'effet antagoniste des composés présents dans cet extrait. Ceci a été confirmé par l'activité remarquable des fractions **F-7**, **F-12** et **F-14** obtenues à partir du même extrait (AcOEt), qui ont manifesté un pouvoir anti-oxydant supérieur à celui des anti-oxydants standards (BHT et Acide ascorbique)

Les extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *E. anthyllis*, ainsi que l'extrait EP de la plante *E. atlantica* possèdent une activité anti-oxydante modérée, et elle est moins efficace que les standards utilisés (Acide ascorbique et BHT). Ce résultat peut être expliqué par l'effet de synergie de métabolites secondaires présents dans les extraits en question [301] comme les

polyphénols en particulier les flavonoïdes, les isoflavonoïdes et même les stéroïdes et les triterpènes.

Il est important de signaler que les deux polyphénols Méthyl gallate (MS5) et Phloro-acétophénone-4-*O*- $\beta$ -D-gluco-pyranoside (MS6) isolés à partir de l'extrait AcOEt de la plante *Euphorbia atlantica* ont montré un pouvoir anti-oxydant plus élevé que les anti-oxydants standards (Acide ascorbique et BHT). A notre avis ce résultat est très significatif du fait que les anti-oxydants ont une importance croissante notamment grâce à leurs effets bénéfiques sur la santé à savoir leur intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, les maladies inflammatoires et cardiovasculaires et le diabète [302-304].

On constate également que la plante *Euphorbia atlantica* a montrée une activité anti-oxydante plus élevée que l'espèce *Erinacea anthyllis*.

### IV-3-3-2- Test de pouvoir réducteur du fer (FRAP)

#### IV-3-3-2-a- Résultats du test FRAP

Le pouvoir réducteur des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Erinacea anthyllis* a été évalué en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et peu coûteuse [305]. Elle est basée sur la capacité des extraits à réduire le fer ferrique Fe<sup>3+</sup> en fer ferreux Fe<sup>2+</sup>. Ce test est universel et peut être appliqué dans le cas de plantes et plasmas ainsi que pour les extraits organiques et aqueux [306]. Le pouvoir réducteur des extraits AcOEt et *n*-BuOH comparé à celui de l'acide ascorbique comme standard est dose-dépendante (Figure IV-14).

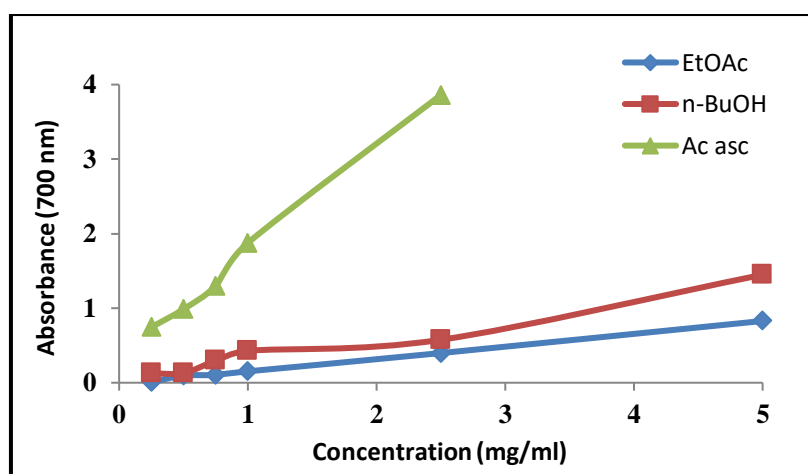


Figure IV-14: Activité anti-oxydante des extraits AcOEt et *n*-BuOH et l'acide ascorbique comme standard

Le pouvoir réducteur (PR) est calculé à partir de l'équation de régression de la droite établie par l'acide ascorbique (Figure IV-15). Les valeurs obtenues sont exprimées en microgrammes d'équivalents d'acide ascorbique par milligramme d'extrait et elles sont données dans le tableau IV-7.

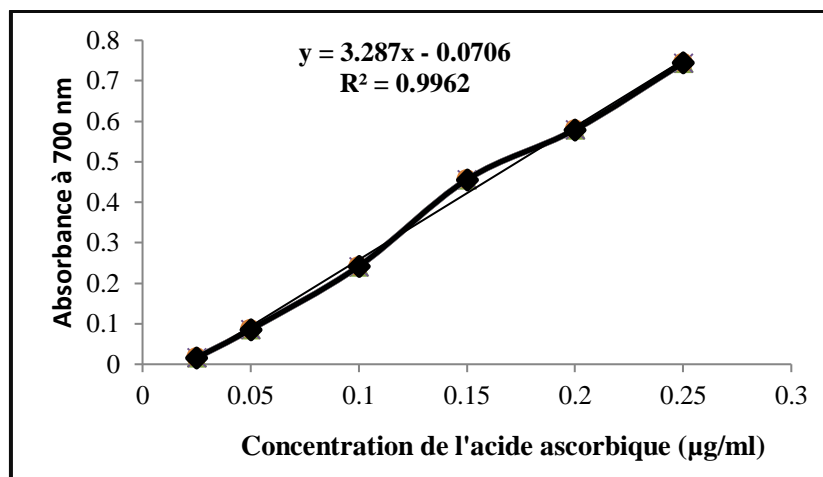


Figure IV-15 : Droite d'étalonnages de l'acide ascorbique (moyenne  $\pm$  SD de trois essais).

Tableau IV-7 : Pouvoir réducteur des extraits AcOEt et *n*-BuOH d'*E. anthyllis*

Extrait	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
Pouvoir réducteur (PR) <sup>(a)</sup>	59,56 $\pm$ 13,37	209,65 $\pm$ 25,09

(a) :  $\mu\text{g}$  d'équivalents d'acide ascorbique /mg d'extrait

Les valeurs sont représentés par la moyenne de 3 essais  $\pm$  SD

#### IV-3-3-2-b- Discussion du test FRAP

L'activité anti-oxydante des extraits de l'espèce *Erinacea anthyllis* a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Les résultats obtenus montrent que tous les extraits ont une activité dose dépendante et une capacité de réduire le fer, mais elle est inférieure à l'acide ascorbique comme standard (Figure IV-14).

Le pouvoir réducteur de l'extrait *n*-BuOH (209,65  $\pm$  25,09  $\mu\text{g}$  EAA/mg d'extrait) est plus important que celui de l'extrait AcOEt (59,56  $\pm$  13,37  $\mu\text{g}$  EAA/mg d'extrait). La forte activité de l'extrait *n*-BuOH serait due à sa forte teneur en composés polyphénoliques.

Le pouvoir réducteur des deux extraits est probablement expliqué par la présence de groupements hydroxyles dans les composés phénoliques contenus dans ces extraits qui peuvent servir comme donneur d'électrons. Par conséquent, les anti-oxydants peuvent être

considérés comme des réducteurs et inactivateurs des oxydants [307]. Quelques études antérieures ont également montré que le pouvoir réducteur d'un composé peut être utilisé comme indicateur significatif de son activité anti-oxydante potentielle [308].

### IV-3-3-3- Test de phosphomolybdate (PPM)

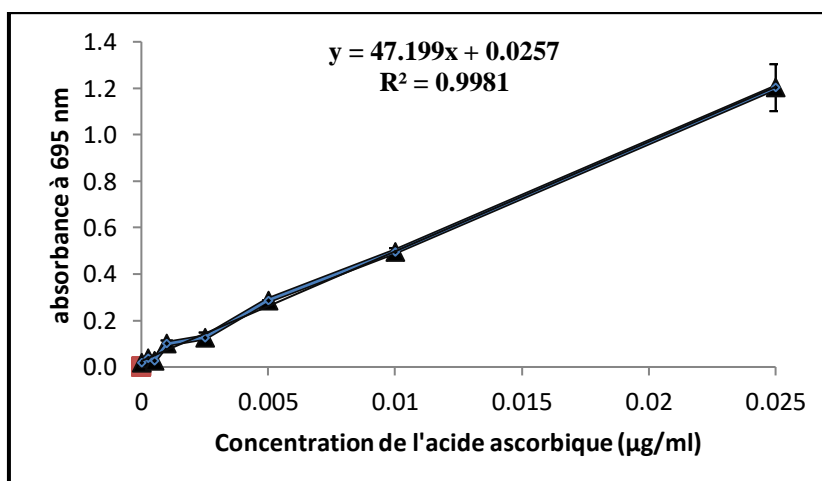
Le test de phosphomolybdate des extraits bruts a été évalué par la transformation de Mo (VI) en Mo (V) pour obtenir un complexe de phosphomolybdène, cette formation peut être suivie par spectrophotométrie à 695 nm. Dans notre étude, le pouvoir anti-oxydant des extraits AcOEt et *n*-BuOH obtenus à partir de l'espèce *Erinacea anthyllis* est calculé à partir de la droite d'étalonnage établie par l'acide ascorbique (Figure IV-16). Les valeurs obtenues sont exprimées en microgrammes d'équivalents d'acide ascorbique par milligramme d'extrait et sont représentées dans le tableau IV-8.

**Tableau IV-8** : Pouvoir anti-oxydant des extraits AcOEt et *n*-BuOH d'*E. anthyllis*

Extrait	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
Pouvoir anti-oxydant <sup>(a)</sup>	0,11 ± 0,006	0,089 ± 0,01

(a) : µg d'équivalents d'acide ascorbique /mg d'extrait

Les valeurs sont représentées par la moyenne de 3 essais ± SD



**Figure IV-16**: Droite d'étalonnages de l'acide ascorbique (moyenne ± SD de trois essais).

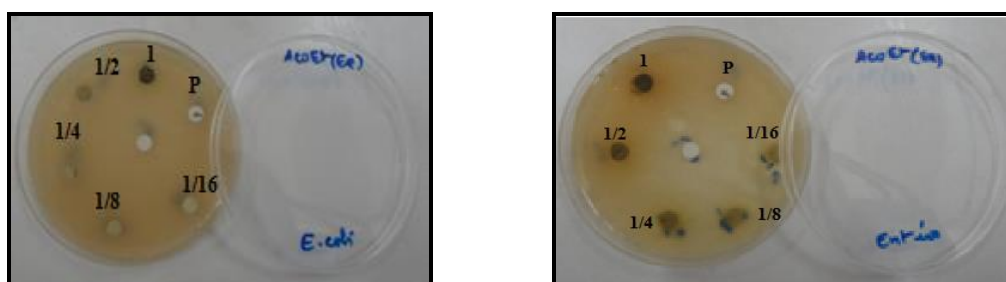
Les résultats obtenus montrent que l'extrait AcOEt possède le pouvoir antioxydant le plus important avec une valeur de  $0,11 \pm 0,006 \mu\text{g EAA/mg}$  d'extrait, suivi par l'extrait *n*-BuOH avec un pouvoir anti-oxydant de l'ordre de  $0,089 \pm 0,01 \mu\text{g EAA/mg}$  d'extrait.

L'activité anti-oxydante des extraits de la plante *Erinacea anthyllis* peut être attribuée à la présence des isoflavonoïdes et des composés polyphénoliques [309].

#### IV-3-4- Résultats de l'activité antibactérienne

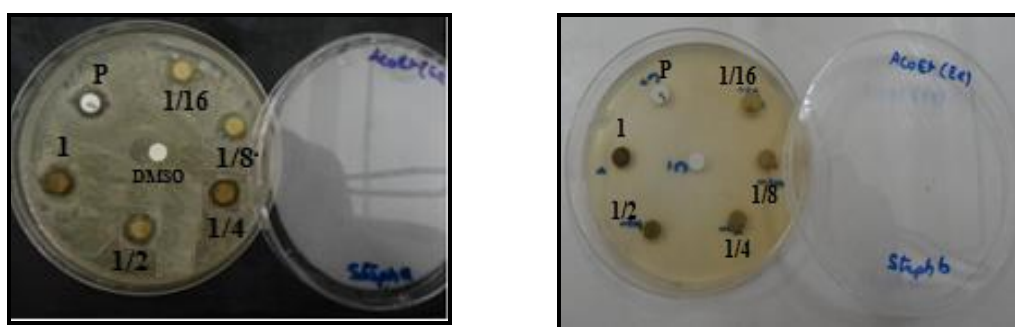
##### IV-3-4-a- Activité antibactérienne de la plante *Erinacea anthyllis*

Les résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait AcOEt de la plante *E. anthyllis* ont montré que les deux souches à Gram négatif *Enterobacter. Sp* et *Escherichia coli* ne présentent aucune zone d'inhibition de croissance. Ceci après les tests effectués sur des disques imprégnés par l'extrait à différentes concentrations. La pénicilline est utilisée comme contrôle positif (Figure IV-17).



**Figure IV-17:** Activité antibactérienne de l'extrait AcOEt contre les souches *Enterobacter sp* et *Escherichia coli*

La souche à Gram positif *Staphylococcus aureus* révèle des zones d'inhibition à différentes concentrations pour l'extrait AcOEt et la pénicilline. La souche à Gram positif *Staphylococcus albus* n'a pas montré de zones d'inhibition à l'égard de l'extrait AcOEt, mais elle est sensible à la pénicilline (Figure IV-18 et Tableau IV-9).



**Figure IV-18 :** Activité antibactérienne de l'extrait AcOEt contre les souches *Staphylococcus aureus* (Stapha) et *Staphylococcus albus* (Staph b = *Staphylococcus blanc*)

L'activité antibactérienne réalisée sur la plante *E. anthyllis* révèle que l'extrait *n*-BuOH ne montre aucun effet inhibiteur ni contre les deux souches à Gram négatif *E. coli* et *Enterobacter* sp, ni contre la bactérie à Gram positif *Staphylococcus albus*, mais cet extrait exerce un effet inhibiteur sur la croissance de la bactérie *Staphylococcus aureus* (Figure IV-19).

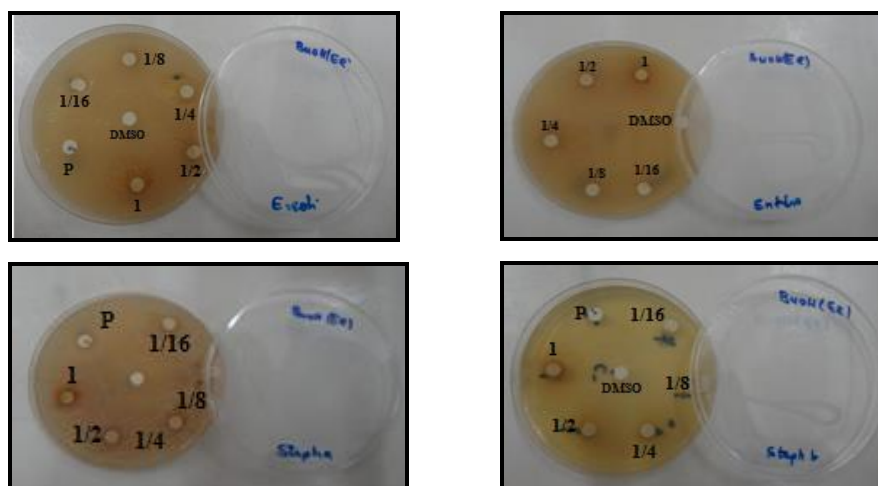


Figure IV-19: Activité antibactérienne de l'extrait *n*-BuOH de la plante *Erinacea anthyllis*

Les résultats de l'activité antibactérienne de la plante *Erinacea anthyllis* sont récapitulés dans le tableau IV-9 suivant :

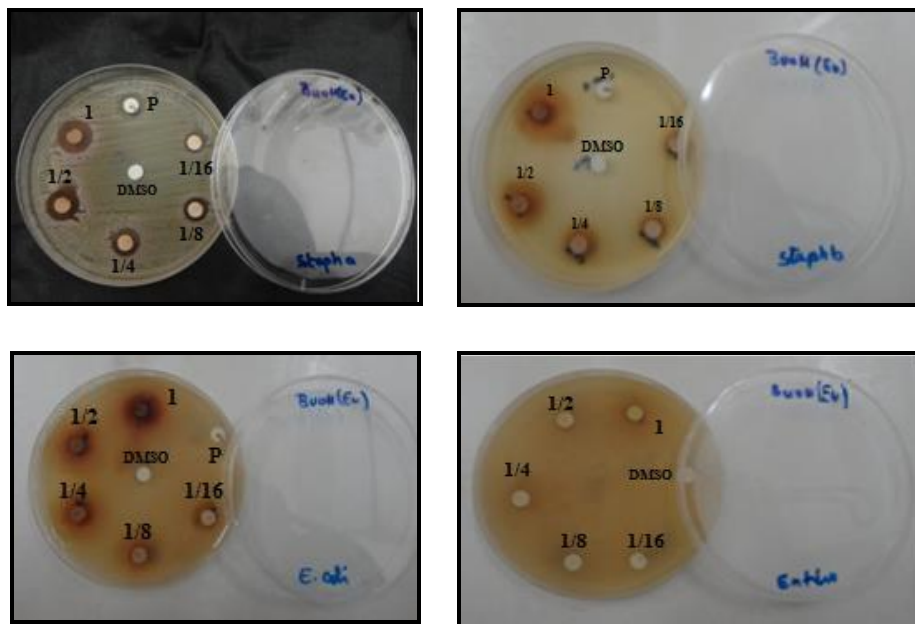
Tableau IV-9: Diamètre de la zone d'inhibition (mm) des extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Erinacea anthyllis*.

Extraits /ATB	Dilutions (g/ml)	Souches bactériennes			
		<i>S. blanc</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter</i> sp
AcOEt	1	-	12	-	-
	1/2	-	10	-	-
	1/4	-	8	-	-
	1/8	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-
<i>n</i> -BuOH	1	-	10	-	-
	1/2	-	-	-	-
	1/4	-	-	-	-
	1/8	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-
Pénicilline (Control positif)		15	12	-	-

ATB : antibiotique

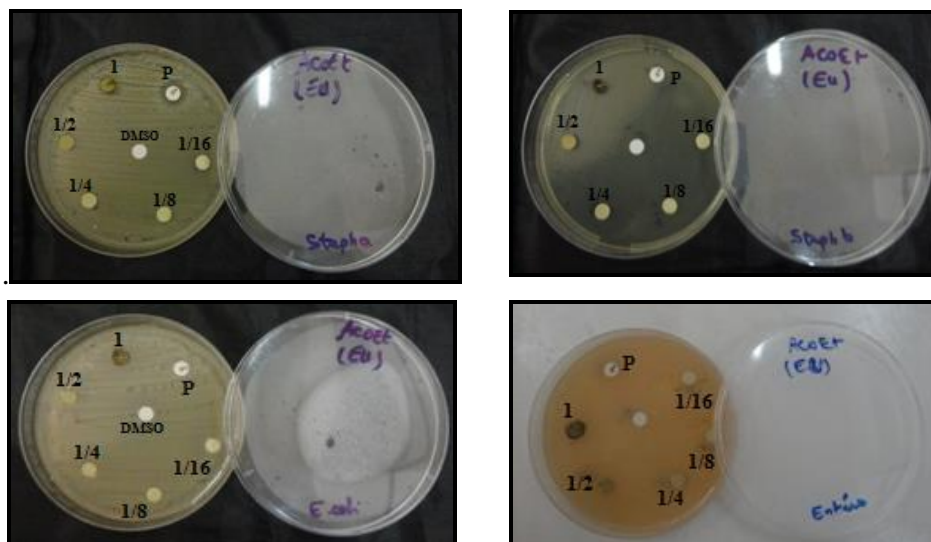
IV-3-4-b-Activité antibactérienne de la plante *Euphorbia atlantica*

Les trois souches *Staphylococcus aureus* (staph a), *Staphylococcus albus* (staph b) et *E. coli* sont sensibles vis-à-vis de l'extrait butanolique de la plante *Euphorbia atlantica* à différentes concentrations. Par contre, la bactérie à Gram négatif *Enterobacter* sp est résistante aux différentes concentrations de l'extrait *n*-BuOH (Figure IV-20).



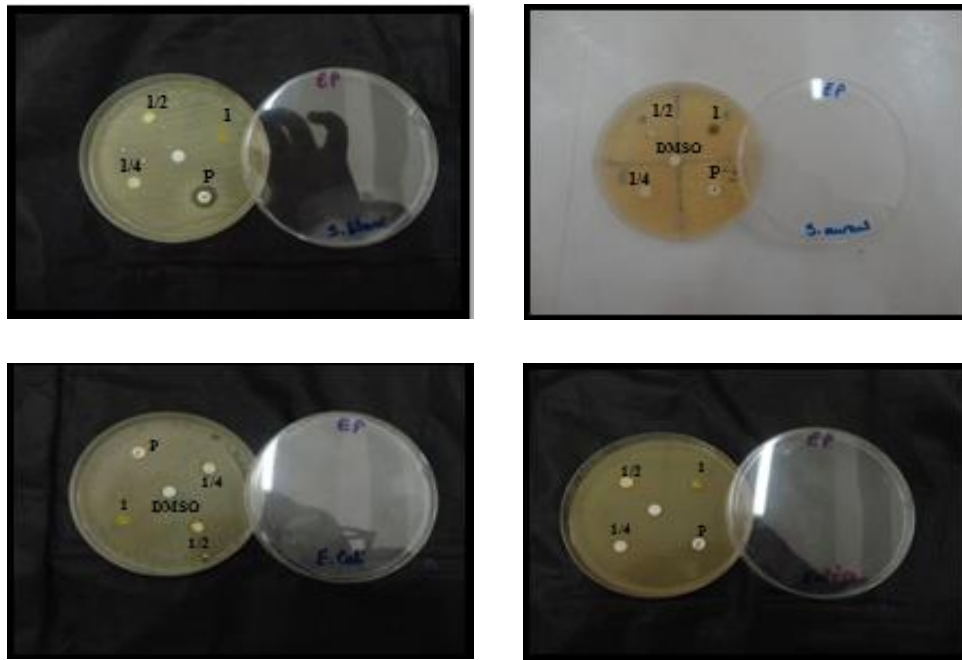
**Figure IV-20:** Activité antibactérienne de l'extrait *n*-BuOH de la plante *Euphorbia atlantica*

Le test de l'activité antibactérienne des extraits EP et AcOEt de la plante *Euphorbia atlantica* a montré que ces deux extraits n'ont aucun effet inhibiteur sur la croissance de toutes les souches bactériennes testées (Figures IV-21 et IV-22).



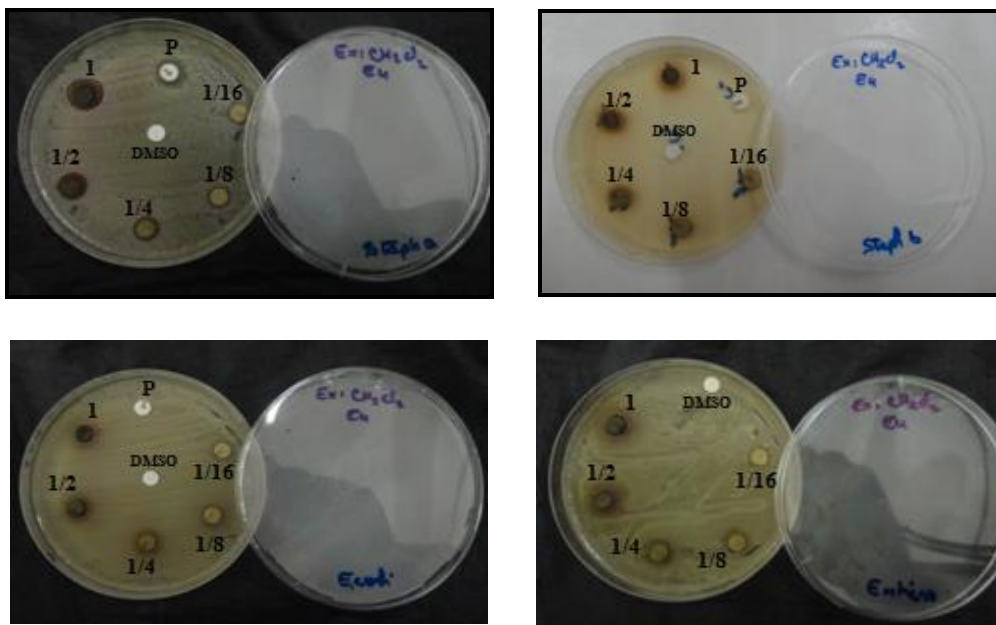
**Figure IV-21:** Activité antibactérienne de l'extrait AcOEt de la plante *Euphorbia atlantica*





**Figure IV-22:** Activité antibactérienne de l'extrait EP de la plante *Euphorbia atlantica*

Les tests réalisés sur l'extrait  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ont montré la sensibilité des deux souches à Gram positif *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus albus* à différentes concentrations et la résistance des souches à Gram négatif *Enterobacter* sp et *E. coli* (Figure IV-23).



**Figure IV-23 :** Activité antibactérienne de l'extrait  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de la plante *Euphorbia atlantica*

Les résultats de l'activité antibactérienne de la plante *Euphorbia atlantica* sont regroupés dans le tableau IV-10 ci-dessous :

**Tableau IV-10:** Diamètre de la zone d'inhibition (mm) des extraits EP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt et *n*-BuOH d'*Euphorbia atlantica*.

Extraits /ATB	Dilutions (g/ml)	Souches bactériennes			
		<i>S. blanc</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter sp</i>
EP	1	-	-	-	-
	1/2	-	-	-	-
	1/4	-	-	-	-
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1	12	13	-	-
	1/2	9,5	10	-	-
	1/4	-	8	-	-
	1/8	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-
AcOEt	1	-	-	-	-
	1/2	-	-	-	-
	1/4	-	-	-	-
	1/8	-	-	-	-
	1/16	-	-	-	-
<i>n</i> -BuOH	1	20	15	15	-
	1/2	16	13	12	-
	1/4	13	12	10	-
	1/8	11	10	8	-
	1/16	-	8	-	-
<b>Pénicilline (Control positif)</b>		15	12	-	-

ATB : Antibiotique

#### IV-3-5-Discussion de l'activité antibactérienne

L'effet des extraits des plantes *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica* vis-à-vis des bactéries testées est variable entre négligeable et important selon chaque type d'extrait et selon la bactérie utilisée.

##### ➤ Absence de l'activité antibactérienne

Les deux extraits éther de pétrole et acétate d'éthyle de la plante *Euphorbia atlantica* n'ont montré aucun effet inhibiteur envers la croissance de toutes les souches bactériennes testées. L'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de la même plante n'a pas exercé d'effet inhibiteur contre les souches à Gram négatif *Enterobacter sp* et *E. Coli*, aussi la bactérie *Enterobacter sp* a

présenté une résistance contre l'extrait *n*-BuOH de la même plante. Les trois souches bactériennes *Enterobacter* sp, *E. Coli* et *Staphylococcus albus* sont résistantes aux deux extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Erinacea anthyllis*.

L'absence de l'activité antibactérienne vis-à-vis des extraits obtenus des plantes étudiées *E. atlantica* et *E. anthyllis* pourrait être expliquée par beaucoup de facteurs qui sont liés soit à la nature de la plante, soit aux mauvaises choix des techniques, des conditions et des outils utilisés au cour des manipulations, soit à d'autres facteurs variés. En effet, l'absence de l'activité antibactérienne est interprétée comme suit :

L'absence de molécules possédant une activité antimicrobienne dans les extraits de plantes. Egalement leur présence en quantité très faible dans les extraits, ne favorise pas ainsi, la mise en évidence de l'activité antibactérienne.

La mauvaise méthode adoptée ou/et des solvants organiques utilisés dans l'extraction des molécules actives. En effet, l'étude de Hayouni et al (2007) <sup>[310]</sup> a montré que la méthode d'extraction et la nature des solvants utilisés peuvent influencer sur l'activité antibactérienne des composés phénoliques. Toutefois, il est toujours possible que l'ajout de DMSO à un extrait végétal diminue son activité antibactérienne <sup>[311]</sup>.

La méthode utilisée pour l'évaluation de l'activité antibactérienne serait un autre facteur qui influe aussi sur les résultats obtenus. Natarajan et al. (2005) <sup>[312]</sup> et Fazeli et al (2007) <sup>[313]</sup> ont constaté que la méthode de diffusion à partir des puits sur gélose est plus adaptée pour étudier l'activité des extraits aqueux et organiques des plantes que la méthode de diffusion en milieu gélosé. Dans notre cas, c'est la méthode de disque qui a été adoptée et il se pourrait qu'elle a influencé négativement sur les résultats notamment pour ceux correspondant aux extraits éther de pétrole et acétate d'éthyle de la plante *Euphorbia atlantica*.

L'absence de l'activité antibactérienne dans ces extraits pourrait être liée à la date de récolte de la plante. De nombreuses études ont montré que la composition chimique des plantes et donc leurs activités biologiques varient en fonction de la date de leur récolte. Par exemple le latex obtenu par incision du tronc d'*Alafia multiflora* et qui est utilisé pour le traitement des plaies en Afrique tropicale, contient des taux en acide vanillique qui varient entre 5 % à 16 % selon la période de récolte du latex <sup>[311]</sup>. Dans notre cas, la récolte est réalisée à la fin du mois de Mai pour la plante *Erinacea anthyllis* et au début du mois de

Juillet pour l'espèce *Euphorbia atlantica*, il se pourrait qu'en ces périodes, certains métabolites actifs seraient transformés, décomposés en d'autres molécules inactives ou bien totalement dégénérés. Ainsi, ces métabolites seraient soit absents dans les extraits correspondant soit, ils se retrouvent inactivés.

D'un autre côté, on peut envisager la probable existence d'une certaine activité antibactérienne des molécules présentes dans les extraits testés. Cependant, cette activité serait probablement visée contre d'autres types de bactéries que celles examinées dans ce présent travail, d'où l'impossibilité de détecter aucune activité dans nos tests à l'égard de ces extraits.

Finalement, la plante peut avoir une activité antibactérienne *in vivo* même si elle ne possède pas une activité *in vitro*. Certains métabolites de la plante peuvent être actifs sans être métabolisés et dans ce cas leur activité *in vitro* et *in vivo* sera détectable. Toutefois, plusieurs composés ne sont actifs qu'après leur métabolisation et dans ce cas ils seront inactifs *in vitro* alors qu'ils sont actifs *in vivo* [314-316].

#### ➤ Présence de l'activité antibactérienne dans la plante *Erinacea anthyllis*

Les extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Erinacea anthyllis* manifestent une activité antibactérienne à l'égard de la bactérie *Staphylococcus aureus* avec des valeurs de CMI de l'ordre de 0,25 g/ml et 1 g/ml respectivement. La souche *Staphylococcus aureus* s'est montrée la bactérie la plus sensible par rapport aux autres souches à Gram négatif (*E. Coli* et *Enterobacter* sp). Ceci pourrait être attribué à la différence de la structure entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif sachant que la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif est constituée par une seule couche alors que celle des Gram négatif a une structure multicouche liée par une membrane cellulaire externe [317].

En effet, les bactéries à Gram négatif, possèdent une membrane présentant une perméabilité sélective, la surface des lipopolysaccharides contient des charges négatives, qui empêchent la diffusion des molécules hydrophobes et des porines qui bloquent le passage des biomolécules à haut poids moléculaire [318]. Ces causes pourraient expliquer même partiellement la résistance des souches à Gram négatif aux extraits testés AcOEt et *n*-BuOH.

Les deux extraits AcOEt et *n*-BuOH ont inhibé la croissance de la souche *S. aureus* et non pas *S. albus*, appartenant au même Gram et au même genre. Ceci laisse supposé que la sensibilité de *S. aureus* pour les extraits en question est due plutôt à une cause génétique s'exprimant par un récepteur bactérien spécifique aux métabolites antibactériens présents dans cet extrait.

Par ailleurs, la présence de l'activité antibactérienne dans les extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Erinacea anthyllis* est due principalement à la présence de certains flavonoïdes qui sont connus par leurs activités antibactériennes comme les flavanones et les isoflavonoïdes [319, 130].

#### ➤ **Présence de l'activité antibactérienne dans la plante *Euphorbia atlantica***

L'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de l'espèce *Euphorbia atlantica* montre une activité antibactérienne envers les deux bactéries à Gram positif *S. aureus* et *S. albus* avec des CMI égale à 0,25 et 0,5 g/ml respectivement, tandis que l'extrait *n*-BuOH présente une activité vis-à-vis des trois souches *S. aureus*, *S. albus* et *E. Coli* avec des valeurs de CMI : 0,0625, 0,125 et 0,125 g/ml respectivement.

Ces résultats révèlent que l'activité antibactérienne de l'extrait butanolique est très intéressante que celle de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, indiquant la grande importance des solvants polaires dans l'extraction des biomolécules antibactériennes dans le cas de l'espèce *Euphorbia atlantica*.

Ces résultats sont en accord avec plusieurs travaux réalisés sur des espèces du même genre *Euphorbia*, dans lesquels ils ont montré que les solvants organiques polaires sont les meilleurs solvants pour l'extraction de molécules douées d'activité antibactérienne. A titre d'exemple, les deux extraits méthanolique et aqueux de la plante *Euphorbia hirta* ont révélé une activité antibactérienne vis-à-vis des souches *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi* et *Klebsiella pneumoniae* [320]. Cependant, les extraits méthanolique et acétonique des feuilles d'*Euphorbia fusiformis* ont montré une inhibition de la croissance des bactéries *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* [312]. Aussi, l'espèce *Euphorbia australis* a révélé une activité contre *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella*

*typhimurium* <sup>[321]</sup>. De même, les extraits d'*Euphorbia macroclada* <sup>[322]</sup> ont présenté des effets inhibiteurs contre *Staphylococcus aureus*.

Les résultats de notre travail de recherche peuvent soutenir l'utilisation populaire des deux plantes *Euphorbia atlantica* et *Erinacea anthyllis* dans la médecine traditionnelle pour le traitement des infections de plaies et les maladies rhumatismales et mettre en évidence l'importance de ces plantes comme sources pour la recherche de nouveaux antibiotiques pour le traitement de diverses maladies.

#### IV-4- Conclusion

De nombreuses plantes aromatiques et médicinales possèdent des propriétés biologiques très importantes, ces plantes sont utilisées dans divers domaines à savoir: la médecine, la pharmacie, la cosmétologie et l'agriculture. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substances bioactives et d'autre part, les effets secondaires induits par les médicaments de synthèse inquiètent les utilisateurs qui se retournent constamment vers des soins moins agressifs pour l'organisme. Pour cela, cette partie du travail est consacrée à l'estimation de la teneur en polyphénols totaux et flavonoïdes et l'évaluation des activités biologiques : anti-oxydante et antibactérienne des deux espèces *Erinacea anthyllis* Link et *Euphorbia atlantica* Coss.

Quantitativement, l'évaluation du contenu des polyphénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu indique la présence des quantités moyennement importantes en polyphénols dans les extraits des deux plantes *Erinacea anthyllis* (Fabaceae) et *Euphorbia atlantica* (Euphorbiaceae). L'estimation de la teneur en flavonoïdes est faite par la méthode du trichlorure d'aluminium, qui montre la présence des quantités très faibles en flavonoïdes dans les extraits éther de pétrole et acétate d'éthyle de la plante *E. atlantica* et l'extrait *n*-BuOH d'*Erinacea anthyllis*. L'extrait AcOEt de l'espèce *E. anthyllis* met en évidence l'existence d'une quantité moyennement importante en composés flavonoïdiques.

Le pouvoir anti-oxydant des extraits, fractions, standards ainsi que des produits isolés (isoflavonoïdes, polyphénols et triterpènes) à partir des espèces *E. anthyllis* et *E. atlantica* a été déterminé par trois méthodes différentes incluant: le piégeage du radical libre DPPH, le test de pouvoir réducteur du fer FRAP et le test de phosphomolybdate PPM. Les résultats montrent que ces espèces possèdent une bonne activité, indiquant que ces plantes contiennent

des molécules considérées comme des agents anti-oxydants susceptibles d'être utilisés à des fins thérapeutiques.

L'activité antibactérienne des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *E. anthyllis*, EP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *E. atlantica* et de la pénicilline comme control positif a été estimée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé contre quatre souches à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus albus*) et à Gram négatif (*Enterobacter* sp et *Escherichia coli*).

Les résultats de l'activité antibactérienne révèlent que les deux extraits EP et AcOEt de la plante *E. atlantica* n'ont aucun effet inhibiteur envers la croissance de toutes les souches bactériennes testées. Les extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *E. anthyllis* manifestent une activité antibactérienne seulement contre la souche *Staphylococcus aureus*. L'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> issu de l'espèce *E. atlantica* montre une activité antibactérienne contre les deux bactéries à Gram positif *S. aureus* et *S. albus*, tandis que l'extrait *n*-BuOH de la même plante présente une activité vis-à-vis des trois souches *S. aureus*, *S. albus* et *E. Coli*.

L'activité antibactérienne des extraits est difficile à mettre en corrélation à un composé spécifique, en raison de la complexité et la variabilité des quantités de métabolites secondaires dans les extraits végétaux.

# ***CONCLUSION GENERALE***



## CONCLUSION GENERALE

Ce travail est consacré à l'investigation phytochimique et l'évaluation des activités biologiques (anti-oxydante et antibactérienne) de deux plantes médicinales *Erinacea anthyllis* Link et *Euphorbia atlantica* Coss. appartenant aux familles Fabaceae et Euphorbiaceae respectivement. Ces deux familles sont connues par leur richesse en métabolites secondaires tels que : les triterpénoïdes, les ditepénoïdes, les flavonoïdes, les polyphénols, les alcaloïdes et les saponines, doués d'activités biologiques prometteuses. Ces deux espèces utilisées en médecine traditionnelle locale n'ont pas fait l'objet d'étude phytochimique et d'évaluation biologique antérieures.

Les investigations phytochimiques réalisées sur les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'espèce *Erinacea anthyllis* Link ainsi que sur les extraits éther de pétrole et AcOEt de la plante *Euphorbia atlantica* Coss. ont permis d'isoler **29** métabolites secondaires dont **2** structures moléculaires de type isoflavone sont nouvelles et **2** composés stéroïdiques communs aux deux plantes. Les composés isolés appartiennent à cinq classes de métabolites secondaires incluant les flavonoïdes, les polyphénols, les terpènes, les stéroïdes et les triterpènes. Ils se répartissent comme suit :

- Quinze flavonoïdes comportant huit isoflavonoïdes prénylés dont deux sont nouveaux, deux isoflavonoïdes aglycones, deux isoflavonoïdes glucosylés, deux flavonoïdes de type flavanone et un flavonol.
- Trois polyphénols.
- Deux monoterpènes à squelette ionone.
- Trois stéroïdes de type phytostérol.
- Quatre triterpènes cycloartaniques.

Le fractionnement, la séparation et la purification des métabolites secondaires obtenus de **1** à **29** est rendu possible grâce à l'utilisation conjointe des différentes techniques chromatographiques (VLC, CC, CCE, CCM) utilisant divers supports (Silice normale, Silice greffée RP-18, Polyamide et Sephadex LH-20).

La détermination structurale des composés isolés de **1** à **29** a été réalisée par les méthodes d'analyse spectroscopiques, RMN 1D ( $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  *J*-modulé) et RMN 2D (COSY H-H, HSQC *J*-modulé, TOCSY, HMBC et NOESY), la spectrométrie de masse à haute

résolution HR-ESI-MS, ESI-MS et EI-MS, l'UV, la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D$  et par la comparaison avec les données de la littérature.

Il est important de mentionner que les composés identifiés à partir de l'espèce *Erinacea anthyllis* sont entièrement isolés pour la première fois dans le genre *Erinacea*. La présence des isoflavonoïdes comme génistéine et daidzeine dans cette plante est confortée par les travaux de chimie antérieurs effectués sur la sous-famille Papilionoideae de la famille des Fabaceae, attestant que cette classe de métabolites secondaires est un marqueur chimiotaxonomique pour cette famille. En outre, l'identification de huit isoflavonoïdes prénylés dont deux sont nouveaux dans l'espèce *Erinacea anthyllis* a confirmé les résultats des études phytochimiques réalisées sur la sous-famille Papilionoideae, indiquant que ce type de composés est commun dans cette sous-famille.

L'étude chimique réalisée sur l'espèce *Euphorbia atlantica* met en évidence la présence des triterpènes tétracycliques à squelette cycloartanique comme composés majoritaires. Ils sont considérés comme des marqueurs chimiotaxonomiques du genre *Euphorbia*.

Il convient de noter que le composé cycloartanique possédant un groupement hydroperoxyde nommé 3 $\beta$ -hydroxycycloart-25-èn-24-hydroperoxyde (**MS1**) a été précédemment identifié dans deux espèces du genre *Euphorbia* : *E. cyparissias* <sup>[234]</sup> et *Euphorbia bupleuroides* <sup>[30]</sup>. Ce qui conforte la présence de ce type de composés dans ce genre et particulièrement dans les espèces poussant en Algérie. Cette constatation pourrait être utile pour des investigations de profils chimiotaxonomiques.

Dans la partie biologique de ce travail, nous avons déterminé la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH obtenus à partir des plantes *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica* par la méthode de Folin-Ciocalteu et trichlorure d'aluminium respectivement.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes révèlent que l'extrait AcOEt de l'espèce *E. anthyllis* est le plus riche en polyphénols totaux ( $26,133 \pm 0,025$   $\mu$ g EAG/mg d'Ex) et en flavonoïdes ( $6,635 \pm 0,073$   $\mu$ g EQ/mg d'Ex), suivi par l'extrait *n*-BuOH de la même plante ( $25,422 \pm 0,004$   $\mu$ g EAG/mg d'Ex) et ( $0,292 \pm 0,006$  EQ/mg d'Ex) respectivement, ensuite l'extrait AcOEt de la plante *E. atlantica* qui montre des teneurs en

polyphénols et flavonoïdes à  $17,867 \pm 0,009 \mu\text{g EAG/mg d'Ex}$  et  $0,002 \pm 0,023 \text{EQ/mg d'Ex}$  respectivement et enfin l'extrait EP avec des teneurs en polyphénols et flavonoïdes estimées à  $12,233 \pm 0,042 \mu\text{g EAG/mg d'Ex}$  et  $0,0006 \pm 0,054 \text{EQ/mg d'Ex}$  respectivement pour *E. atlantica*. Ceci témoigne de la richesse de la plante *E. anthyllis* en polyphénols et flavonoïdes par rapport à l'espèce *E. atlantica*.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro* des extraits, fractions, standards et quelques produits isolés à partir des deux plantes *E. anthyllis* et *E. atlantica* a été réalisée par trois méthodes à savoir: le piégeage du radical libre DPPH, le test du pouvoir réducteur du fer FRAP et le test du phosphomolybdate PPM.

Les résultats de l'activité anti-oxydante par piégeage du radical DPPH montrent que les fractions de l'extrait AcOEt (**F-7**, **F-12** et **F-14**) et les deux polyphénols Méthyl gallate (**MS5**) et Phloroacétophénone 4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**MS6**) isolés de la plante *Euphorbia atlantica* ont un pouvoir antiradicalaire plus élevé que celui des standards (Acide ascorbique et BHT). En outre, les deux extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Erinacea anthyllis* et les quatre isoflavonoïdes ( $\pm$ )-Erythrine F (**Ea7**), Daidzeine (**Ea9**), Génistéine (**Ea10**) et Génistéine-8-*C*-glucoside (**Ea11**), ainsi que l'extrait EP de l'espèce *Euphorbia atlantica* ont présenté un pouvoir antiradicalaire moins efficace que les standards. Il est à noter que malgré la richesse de l'espèce *Erinacea anthyllis* en composés phénoliques particulièrement les isoflavonoïdes, la plante *Euphorbia atlantica* a montré une activité anti-oxydante plus élevée que la plante *Erinacea anthyllis*.

L'activité réductrice du fer (FRAP) testée sur les extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Erinacea anthyllis* révèle que ces deux extraits ont montré un pouvoir réducteur estimé à  $59,56 \pm 13,37 \mu\text{g EAA/mg d'extrait}$  et  $209,65 \pm 25,09 \mu\text{g EAA/mg d'extrait}$  respectivement. Ces résultats sont dus à la richesse de la plante *E. anthyllis* en métabolites secondaires, particulièrement les flavonoïdes qui sont connus par leurs propriétés oxydo-réductrices.

Le test de phosphomolybdate des extraits bruts AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Erinacea anthyllis* montre que l'extrait AcOEt possède un pouvoir antioxydant légèrement plus fort ( $0,11 \pm 0,006 \mu\text{g EAA/mg d'extrait}$ ) que celui de l'extrait *n*-BuOH ( $0,089 \pm 0,01 \mu\text{g EAA/mg d'extrait}$ ). Ceci peut être expliqué par la teneur un peu élevée en polyphénols présents dans l'extrait AcOEt par rapport à l'extrait *n*-BuOH.

L'activité antibactérienne des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Erinacea anthyllis* et EP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Euphorbia atlantica*, ainsi que de la pénicilline comme control positif, a été estimée par la méthode de diffusion sur milieu gélosé contre quatre souches bactériennes, deux à Gram positif *Staphylococcus albus* et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et deux à Gram négatif *Escherichia coli* ATCC 35218 et *Enterobacter* sp.

Les résultats de l'activité antibactérienne révèlent que les deux extraits EP et AcOEt de la plante *Euphorbia atlantica* n'ont montré aucun effet inhibiteur envers la croissance de toutes les souches bactériennes testées. Les extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Erinacea anthyllis* manifestent une activité antibactérienne contre la souche *Staphylococcus aureus* avec des valeurs de CMI égale à 0,25 et 1 g/ml respectivement. L'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> issu de l'espèce *Euphorbia atlantica* exhibe une activité antibactérienne contre les deux bactéries à Gram positif *S. aureus* et *S. albus* avec des CMI de l'ordre de 0,25 et 0,5 g/ml respectivement, tandis que l'extrait *n*-BuOH présente une activité vis-à-vis des trois souches bactériennes *S. aureus*, *S. albus* et *E. Coli* avec des valeurs de CMI: 0,0625, 0,125 et 0,125 g/ml respectivement.

A l'issu de cette étude, il est important de signaler que les deux plantes médicinales *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica*, objet de ce travail de recherche, présentent des activités anti-oxydantes et antibactériennes modérées. La présence d'isoflavonoïdes dans *E. anthyllis* connus pour leur activité inflammatoire conforterait l'utilisation de cette plante contre les maladies de rhumatisme. Ceci justifierait dans une certaine mesure l'utilisation en médecine traditionnelle de ces deux espèces par les populations locales.

L'ensemble de ces résultats obtenus (phytochimique et biologique) *in vitro* ne constitue en réalité qu'une première étape dans la recherche de substances d'origine naturelle biologiquement actives. Au terme de cette investigation, il serait souhaitable d'une part de continuer les testes sur les autres composés isolés à l'état pur particulièrement les nouveaux isoflavonoïdes **Erinasone A (Ea1)** et **Erinasone B (Ea2)** et d'autre part, d'envisager d'autres activités biologiques à savoir : anti-inflammatoire, anti-cholinestérase, antifongique, antidiabétique, anti-pyrétique, anti-analgésique et anti-cancéreuse,...etc. Une étude biologique *in vivo* est également souhaitable, pour avoir une vue plus approfondie sur les activités anti-oxydante et antibactérienne des extraits et des produits purs de ces deux plantes.

*Chapitre V*  
*Partie expérimentale*

## V-1- Matériel et appareillage

### V-1-1- Récolte des plantes étudiées

La plante *Erinacea anthyllis* Link a été récoltée dans la région de Bellezma (hautes montagnes des Aurès) au mois de Mai 2013.

La récolte de l'espèce *Euphorbia atlantica* Coss. a été effectuée dans la région de Chélia au cours du mois de Juillet 2014.

Les deux plantes sont identifiées par le professeur Bachir Oudjehih du département d'Agronomie de l'institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques de l'Université de Batna-1.

### V-1-2- Chimie extractive

#### V-1-2-1- Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les CCM sont utilisées à chaque étape chromatographique pour le suivi et le contrôle des purifications. Les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis. Ces analyses sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Merck, 250 µm (20 x 20 cm) et en phase inverse sur des plaques d'aluminium RP-18 (20 x 20 cm). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. La phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée. Le révélateur utilisé est 10 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 % acide acétique et 80 % eau.

#### V -1-2-2- Chromatographie liquide sous vide (VLC)

Cette technique est utilisée pour obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut. Elle est rapide et a l'avantage de consommer moins de solvants que les méthodes de chromatographies classiques. La silice Kieselgel Merck (70-230 mesh, 63-200 µm) ou la silice greffée en C-18 Merck Lobar Lichroprep RP-18 (40-63 mm) sont mises dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n° 4.

#### V -1-2-3 Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée. La quantité de la silice utilisée est généralement 30 à 40 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée.

La chromatographie d'exclusion stérique est réalisée sur Sephadex<sup>®</sup> LH-20, en employant 30 fois le poids de l'échantillon à purifier. L'élution est effectuée à pression atmosphérique. Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

### **V -1-3- Chimie structurale**

#### **V -1-3-1- Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)**

Les spectres RMN sont enregistrés dans des solvants deutérés : acétone-*d*<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD et DMSO-*d*<sub>6</sub> sur un appareil Varian/Agilent Inova spectrometer à 500 MHz pour RMN <sup>1</sup>H et 125 MHz pour les spectres RMN <sup>13</sup>C. Les solvants de solubilisation des produits pour la réalisation des spectres sont précisés à chaque fois. Le TMS est utilisé comme substance de référence.

#### **V-1-3-2- Spectrométrie de masse en haute résolution (HR-ESI-MS)**

Les spectres de masse en haute résolution HR-ESI-MS des composés isolés ont été enregistrés sur un spectromètre de masse de type Micromass-LCT Premier Time of Flight mass spectrometer. Les spectres EI-MS et ESI-MS sont réalisés sur des appareils GCT Micromass et MSQ ThermoFinnigan respectivement.

#### **V-1-3-3- Spectrométrie UV-Visible**

Les techniques de spectroscopie UV-Visible sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique, les propriétés physico structurales et les caractéristiques optiques des composés. Les spectres UV-Visible des composés isolés sont enregistrés dans le MeOH sur un spectrophotomètre de type Beckman DU-600 spectrophotometer. Les mesures sont effectuées dans des cuves en quartz contenant 2 ml de solution.

#### **V-1-3-4- Pouvoir rotatoire**

Les pouvoirs rotatoires spécifiques sont mesurés sur un polarimètre électronique Perkin-Elmer 241 polarimeter à 20 °C. Le solvant de solubilisation et la concentration sont indiqués dans chaque cas.

## V -1-4- Etude de l'espèce *Erinacea anthyllis* Link

### V -1-4-1- Extraction de l'espèce *E. anthyllis* Link

Les parties aériennes et racines de la plante (1500 g) sont séchées et broyées finement puis mises à macérer dans un mélange (EtOH/H<sub>2</sub>O:70/30). Cette macération est répétée 2 fois avec renouvellement du solvant et dure dans chaque cas 48 heures. Après filtration et concentration non à sec à température 40 °C, la phase aqueuse obtenue (500 ml) est extraite par l'éther de pétrole (5 x 150 ml), acétate d'éthyle (5 x 150 ml) et en dernier par le *n*-butanol (5 x 150 ml).

Les trois phases organiques ainsi obtenues (EP, AcOEt et *n*-BuOH) sont séchées sur sulfate de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) anhydre puis filtrées et concentrées à sec sous pression réduite, ce qui a donné 1 g de l'extrait éther de pétrole, 10,7 g de l'extrait acétate d'éthyle et 50 g de l'extrait *n*-butanol.

### V-1-4-2-Etude de l'extrait AcOEt de l'espèce *Erinacea anthyllis* Link

10,7 g de l'extrait AcOEt sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice comme phase stationnaire. L'élution est effectuée par le mélange EP/AcOEt (100-0 à 0-100), puis par un gradient de méthanol dans l'acétate d'éthyle (0-100 à 100-0) pour donner plusieurs fractions. Ces fractions subissent une chromatographie sur couche mince (CCM) avec le système d'élution (EP/AcOEt : 1/1). Les CCM obtenues sont visualisées sous la lumière UV à 254 nm puis révélées à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. Les fractions présentant le même profil CCM sont réunies pour donner 8 fractions majoritaires (Tableau V-1 et Figure V-1).

**Tableau V-1** : Fractionnement de l'extrait AcOEt de l'espèce *E. anthyllis* Link

Eluant (EP/AcOEt)	Fractions collectées	Masse (mg)
100-0 à 80-20	F-1	103,6
70-30	F-2	97,1
60-40	F-3	735,2
50-50 à 40-60	F-4	1826,3
30-70 à 20-80	F-5	2260
10-90 à 0-100	F-6	1560,7



AcOEt/MeOH	Fractions collectées	Masse (mg)
99-1 à 80-20	F-7	1650
70-30 à 0-100	F-8	1752,2

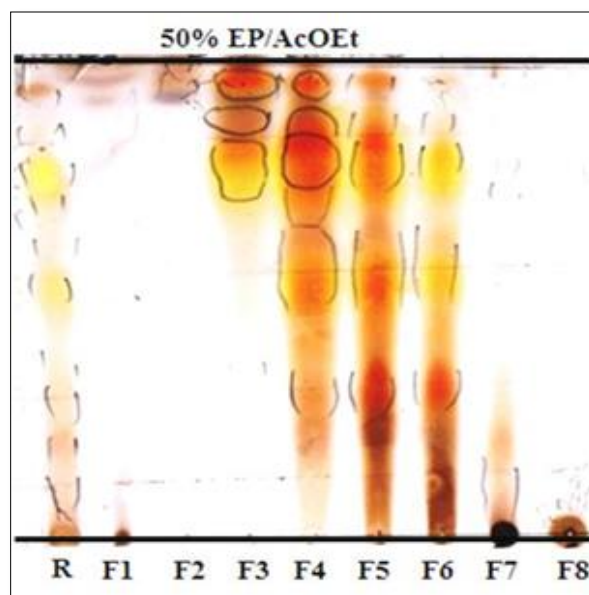


Figure V-1 : CCM récapitulative de l'extrait AcOEt

#### V-1-4-2-1- Purification

##### ➤ Etude de la fraction F-5

La fraction F-5 (2260 mg) est soumise à une chromatographie sur colonne de polyamide. L'élution est réalisée par un mélange de toluène-méthanol (100:0 à 0:100). Les fractions collectées sont réunies selon leur profil en CCM en phase normale effectuée dans le mélange (EP/AcOEt : 1/1) pour donner 13 sous-fractions (F-5-1 à F-5-13).

La sous-fraction F-5-10 (373 mg) a été purifiée par une chromatographie sur colonne de gel de silice normale en utilisant comme éluant EP/AcOEt pour fournir neuf sous-fractions (F-5-10-1 à F-5-10-9).

La précipitation des sous-fractions (F-5-10-2, F-5-10-4 et F-5-10-7) dans le mélange EP/AcOEt et les solvants purs AcOEt et MeOH respectivement a conduit à l'isolement des composés **Ea<sub>9</sub>** (7,8 mg), **Ea<sub>10</sub>** (2,5 mg) et **Ea<sub>7</sub>** (5,8 mg) (Figure V-2).

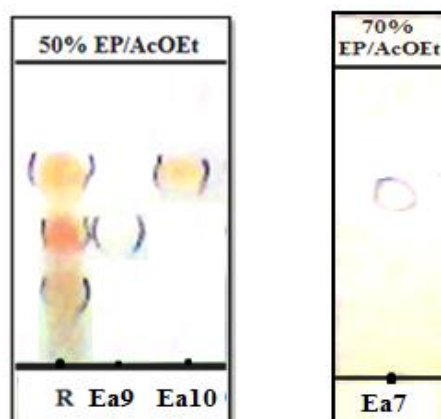


Figure V-2: CCM des composés **Ea7**, **Ea9** et **Ea10**

Les deux sous-fractions F-5-2 et F-5-3 (415,6 mg) rassemblées sont purifiées sur une colonne de gel de silice. L'éluion est effectuée par le mélange EP/AcOEt pour donner 12 sous-fractions (F-5-A à F-5-L). La sous fraction F-5-K (61,4 mg) a subi une purification par précipitation dans le méthanol pour isoler le composé **Ea21** (2 mg). Sa CCM révèle l'existence d'une tache invisible à 254 nm se colorant en rose à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. Après précipitation de la sous-fraction F-5-K, la phase liquide (filtrat) a été traitée sur une plaque préparative en phase inverse (RP-18) dans le mélange (MeOH/H<sub>2</sub>O : 7/3). Cette purification a donné le composé **Ea17** (4,9 mg) (Figure V-3).

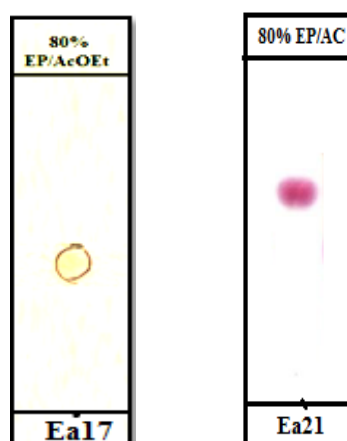


Figure V-3 : CCM des composés **Ea17** et **Ea21**

La purification de la sous-fraction F-5-F (69,1 mg) par précipitation dans le MeOH a abouti à l'isolement du produit **Ea6** (3,1 mg). La sous fraction F-5-J (16,9 mg) contient un produit majoritaire qui se précipite dans l'hexane pour donner le composé **Ea2** (4,6 mg). Leur CCM montre la présence de deux taches visibles à 254 nm se révélant en jaune à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Figure V-4).

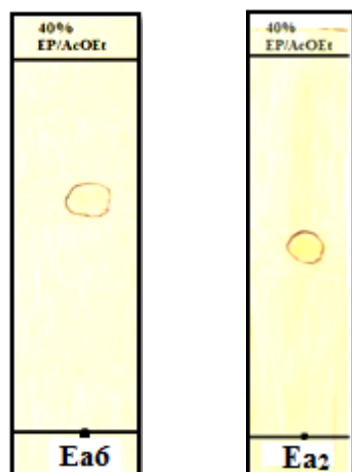


Figure V-4: CCM des composés  $Ea_2$  et  $Ea_6$

La fraction F-5-4 (250,8 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice normale avec l'éluant éther de pétrole-acétate d'éthyle : 100-0 à 50-50. Des fractions de 10 ml sont collectées et réunies selon leur profil en CCM en phase normale réalisée dans les solvants éther de pétrole-acétate d'éthyle : 1-1 pour donner 9 sous-fractions.

La sous fraction F-5-4-7 (35,9 mg) a subi une purification par précipitation dans le  $CHCl_3$  avec quelques gouttes de méthanol. Après lavage plusieurs fois par  $CHCl_3$ , le composé  $Ea_5$  (3 mg) a été isolé à l'état pur. Sa CCM permet de visualiser une tache visible à 254 nm qui se colore en jaune à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Figure V-5).



Figure V-5 : CCM du composé  $Ea_5$

Les trois sous-fractions F-5-5, F-5-6 et F-5-7 sont réunies en F-5' (301,7 mg) puis purifiées par chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale, avec un gradient d'éluant  $CHCl_3/AcOEt$ :100-0 à 40-60. Des fractions de 18 ml ont été récupérées et regroupées en fonction de leur profil en CCM réalisée dans le mélange de solvants EP/AcOEt : 1-1, pour donner 8 fractions (F-5'-1 à F-5'-8).

## (Partie phytochimique)

Les deux sous-fractions F-5'-1 et F-5'-2 rassemblées en F-5" (61,7 mg) sont séparées sur une colonne de gel de silice SiO<sub>2</sub> et éluée avec le mélange de solvants EP/CHCl<sub>3</sub> : 100-0 à 20-80 pour fournir 6 sous-fractions (F-5"-1 à F-5"-6). La sous-fraction F-5"-6 (25,6 mg) est purifiée sur plaque préparative en phase inverse (RP18) dans le mélange de solvants: MeOH-H<sub>2</sub>O (3/7) pour conduire au composé **Ea<sub>14</sub>** (4 mg) (Figure V-6).



Figure V-6: CCM du composé **Ea<sub>14</sub>**

Les deux sous-fractions F-5'-3 et F-5'-4 sont regroupées (182,4 mg) puis soumises à une purification par chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale. L'éluion est effectuée par un mélange de solvants EP-AcOEt (100:0 à 30:70) pour fournir 5 sous-fractions (F-5a-1 à F-5a-5). La sous-fraction F-5a-3 (27,8 mg) est purifiée par précipitation dans l'éther diéthylique pour donner le composé **Ea<sub>1</sub>** (2 mg). Sa CCM montre une tache visible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en marron après révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Figure V-7).



Figure V-7: CCM du composé **Ea<sub>1</sub>**

➤ **Etude de la fraction F-3**

La fraction F-3 (740,4 mg) est appliquée à une chromatographie sur colonne de gel de silice normale. L'éluion est réalisée au moyen d'un mélange EP/AcOEt (100:0, 99:1, 97:3, 95:5: 90:10, 85 :15, 80:20, 70:30 et 50:50) pour fournir 16 sous fractions (F-3-1 à F-3-16).

La sous fraction F-3-6 (57,40 mg) a subi une purification par précipitation dans l'éther de pétrole. Cette précipitation a permis d'obtenir le composé **Ea<sub>3</sub>** à l'état pur. Sa CCM révèle l'existence d'une tache visible à 254 nm se colorant en jaune à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

La sous-fraction F-3-8 (45,3 mg) est purifiée sur une plaque préparative en phase normale dans le mélange (EP/AcOEt : 7/3). Cette purification a conduit à l'isolement du composé **Ea<sub>8</sub>** (2,9 mg).

Le composé **Ea<sub>19</sub>** (3,2 mg) est obtenu à l'état pur à partir de la fraction F-3-9 par précipitation dans l'acétone. La CCM de ce composé présente une tache invisible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en violet après pulvérisation par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Figure V-8).

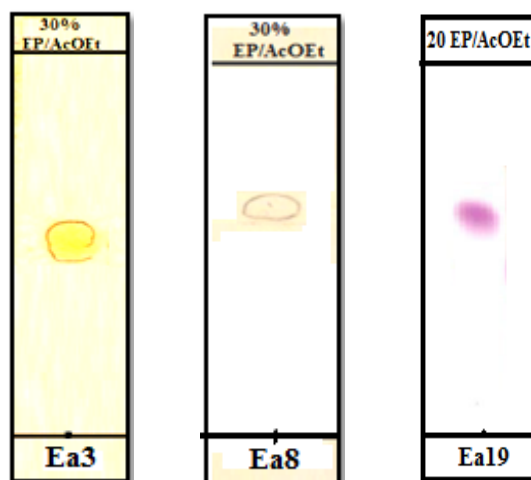


Figure V-8 : CCM des composés **Ea<sub>3</sub>**, **Ea<sub>8</sub>** et **Ea<sub>19</sub>**

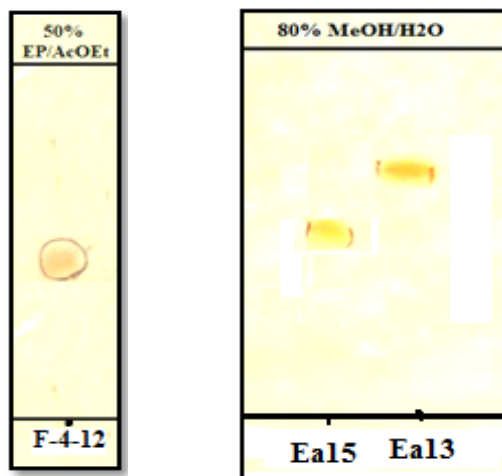
➤ **Etude de la fraction F-4**

La fraction F-4 (1826,3 mg) est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice. L'éluion est réalisée par un mélange EP/AcOEt (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 et 30:70) pour donner 15 sous-fractions (F-4-1 à F-4-15).

La sous-fraction F-4-12 (91,2 mg) contient un produit majoritaire qui se précipite dans le CHCl<sub>3</sub>. Après récupération du produit précipité, sa CCM RP18 montre la présence de

## (Partie phytochimique)

plusieurs taches. La séparation de 31,5 mg du précipité obtenu sur une plaque préparative RP18 éluée par un mélange de solvants MeOH/H<sub>2</sub>O (8/2) a conduit à l'isolement de deux produits **Ea<sub>15</sub>** (8,3 mg) et **Ea<sub>13</sub>** (8,5 mg) (Figure V-9).



**Figure V-9:** CCM du F-4-12 (phase normale) et des composés **Ea<sub>15</sub>** et **Ea<sub>13</sub>** (phase inverse)

La sous-fraction F-4-14 (182,3 mg) est fractionnée sur une colonne de gel de silice normale. L'élution est effectuée par un mélange de solvants CHCl<sub>3</sub>/MeOH : 100-0 à 95-5 pour conduire à 6 sous-fractions. La sous-fraction F-4-14-4 (35,7 mg) a subi une purification par précipitation dans le mélange Acétone/MeOH. Après lavage répété par l'acétone, le composé **Ea<sub>4</sub>** (6,2 mg) a été isolé à l'état pur (Figure V-10).



**Figure V-10:** CCM du composé **Ea<sub>4</sub>**

La sous-fraction F-4-6 (66,5 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice normale. L'élution est réalisée par un mélange de solvants éther de pétrole/AcOEt (100:0, 95:5, 93:7, 90:10 et 80 :20), pour fournir 7 sous-fractions (F-4-6-1 à F-4-6-7).

La sous-fraction F-4-6-3 est purifiée sur une plaque préparative en phase inverse (RP-18) dans le mélange (MeOH/H<sub>2</sub>O: 8/2). Cette purification a permis d'obtenir le composé **Ea<sub>16</sub>** (6,1 mg) (Figure V-11).



Figure V-11: CCM du composé **Ea<sub>16</sub>**

#### V-1-4-3-Etude de l'extrait *n*-butanolique de la plante *E. anthyllis* Link

7 g de l'extrait *n*-BuOH sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice en phase inverse (C-18) comme phase stationnaire. L'éluion est menée en premier lieu par le mélange de solvants (H<sub>2</sub>O/MeOH : 80/20) puis on ajoute du MeOH jusqu'à 100%. A l'issue de ce fractionnement primaire, 11 fractions sont recueillies (Figure V-12 et Tableau V-2).

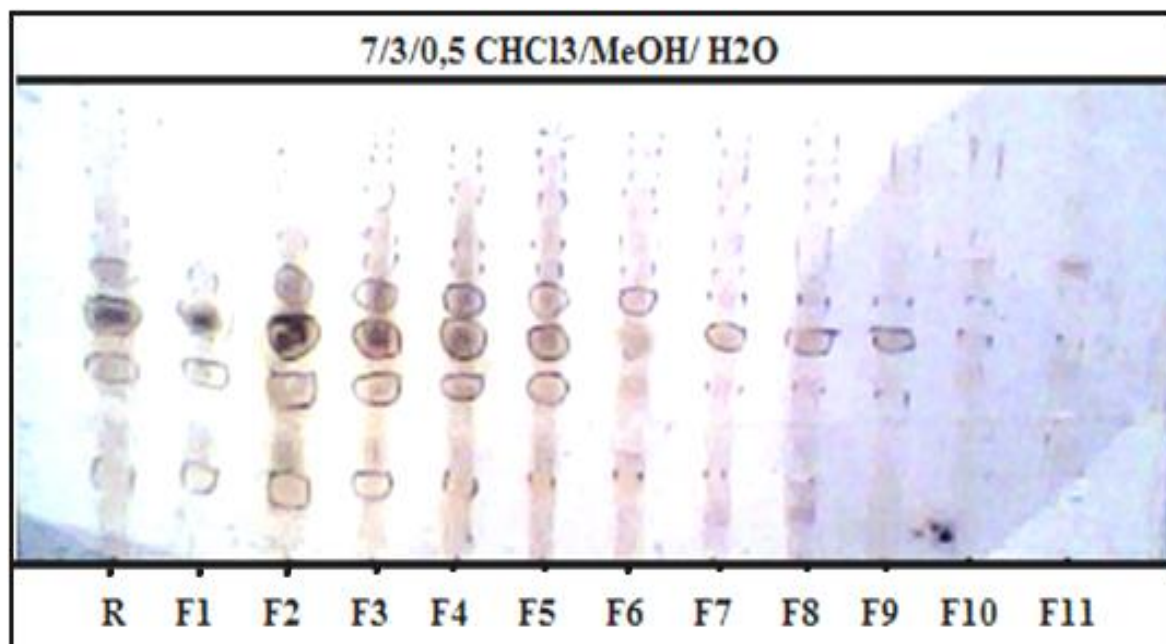


Figure V-12 : CCM récapitulative de l'extrait *n*-BuOH

**Tableau V-2** : Fractionnement de l'extrait *n*-BuOH de l'espèce *E. anthyllis* Link.

Eluant (H <sub>2</sub> O/MeOH)	Fractions collectées	Masse (mg)
80-20	F-1	188,9
80-20	F-2	694,9
60-40	F-3	1152,3
60-40	F-4	692,5
40-60	F-5	611,4
40-60	F-6	529,6
20-80	F-7	309,8
20-80	F-8	173,2
0-100	F-9	40,7
0-100	F-10	27,2
0-100	F-11	11,7

#### V-1-4-3-1- Purification

➤ **Etude de la fraction F-3' = (F-3+F-4+F-5)**

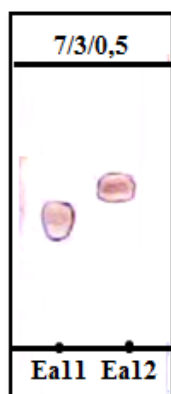
La fraction F-3' (2456,2 mg) est chromatographiée sur une colonne ouverte en utilisant le polyamide SC-6 comme phase stationnaire. L'élution est réalisée par le mélange H<sub>2</sub>O/MeOH allant de 100-0 à 0-100 pour fournir 11 sous-fractions (F-3'-1 à F-3'-11).

La sous-fraction F-3'-6 (1922,5 mg) est fractionnée sur une colonne de gel de silice normale avec un gradient de solvants (CHCl<sub>3</sub>/MeOH : 100:0 à 50:50) pour obtenir 8 sous-fractions (F-3'-6A à F-3'-6H).

La sous-fraction F-3'-6F (259,2 mg) est filtrée sur une colonne de Sephadex LH-20 en utilisant CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:1) comme éluant. A l'issue de cette filtration, 4 sous-fractions (F-3'-6F<sub>1</sub> à F-3'-6F<sub>4</sub>) ont été obtenues.

La dernière sous-fraction F-3'-6F<sub>4</sub> (30,7 mg) contenant seulement deux produits majoritaires est purifiée sur plaques préparatives de gel silice normale dans le mélange de solvants CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O : 7/3/0,5, donnant ainsi deux composés purs **Ea**<sub>11</sub> (5,6 mg) et **Ea**<sub>12</sub> (8,5 mg) (Figure V-13).





**Figure V-13:** CCM des composés **Ea<sub>11</sub>** et **Ea<sub>12</sub>**

La sous-fraction F-3'-1 (382,7 mg) est purifiée sur une colonne de gel de silice normale. L'éluion est effectuée par un mélange CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acétone (100-0 à 0-100), puis par un gradient de méthanol dans l'acétone (0-100 à 100-0). Des sous-fractions sont recueillies et rassemblées selon leur profil en CCM en phase normale pour donner 10 sous-fractions (F-3'-1-1 à F-3'-1-10).

La sous-fraction F-3'-1-5 (28,9 mg) a été filtrée sur une colonne de Sephadex LH-20 pour éliminer la trainée puis purifiée sur une plaque préparative de silice normale dans le mélange de solvants CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O : 8/2/0,2 pour conduire au composé **Ea<sub>18</sub>** (5,2 mg) (Figure V-14).



**Figure V-14:** CCM du composé **Ea<sub>18</sub>**

### ➤ Etude de la fraction F-2

La fraction F-2 (694,9 mg) est fractionnée sur une colonne de gel de silice en phase normale éluee par le mélange de solvants CHCl<sub>3</sub>/MeOH (100-0, 95-5, 90-10, 88-12, 85-15, 80-20, 70-30, 60-40, 50-50) pour obtenir 12 sous fractions (F-2-1 à F-2-12).

La première sous-fraction F-2-1 (22,3 mg) est soumise à une purification par précipitation dans le méthanol. Après lavage plusieurs fois par le même solvant, le composé

**Ea<sub>20</sub>** (3,2 mg) est obtenu à l'état pur. La CCM de ce composé indique une tache invisible à 254 nm se révélant en mauve à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Figure V-15).

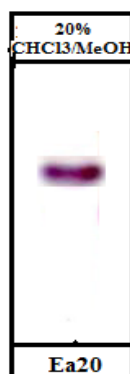


Figure V-15: CCM du composé Ea<sub>20</sub>

## V -1-5- Composés isolés de l'espèce *Erinacea anthyllis*

### V-1-5-1-Composé Ea1

- **Nom** : Erinasone A
- **Formule brute** : C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>
- **[α]<sub>D</sub>** : -24,6 (c 0,015, MeOH).
- **HR-ESI-MS**:

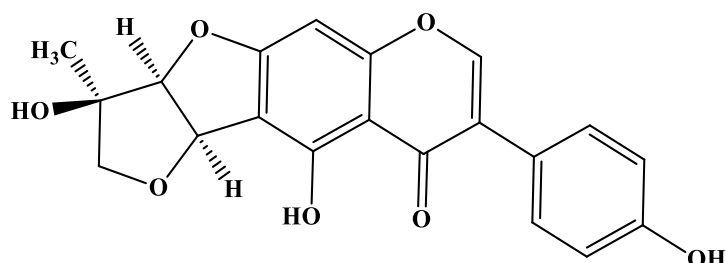
**Mode négatif :**

- $m/z = 367,0785$  [M-H]<sup>-</sup>
- $m/z = 368,0804$  [M-2H]<sup>-</sup>
- $m/z = 735,1729$  [2M-H]<sup>-</sup>.

**Mode positif :**

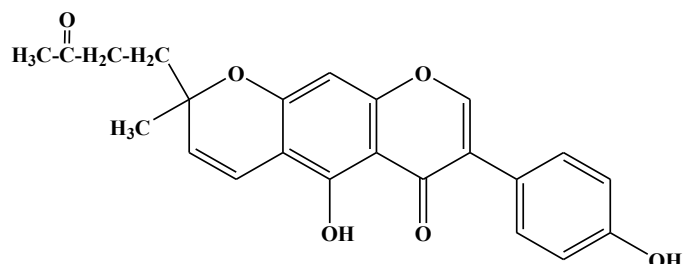
- $m/z = 369,1005$  [M+H]<sup>+</sup>

- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans l'acétone-*d*<sub>6</sub>
- **UV** : (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε): 214 (3,84), 262 (3,93), 332 (2,55) nm.
- **Données spectrales** :  
Tableau III-1, page 59.



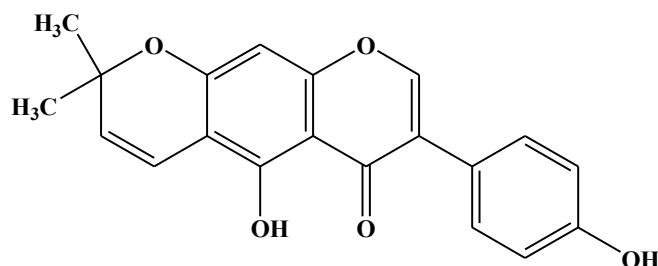
## V-1-5-2-Composé Ea2

- **Nom** : Erinasone B
- **Formule brute** :  $C_{23}H_{20}O_6$
- $[\alpha]_D$  : +30,5 (*c* 0,292, MeOH)
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode négatif :**  
 $m/z = 391,1208 [M-H]^-$   
**Mode positif :**  
 $m/z = 393,1343 [M+H]^+$
- **RMN  $^1H$**  (500 MHz) et **RMN  $^{13}C$**  (125 MHz) dans le DMSO- $d_6$
- **UV** : (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 226 (3,55), 285 (3,75) and 340 (2,64) nm.
- **Données spectrales** :  
Tableau III-2, page 69



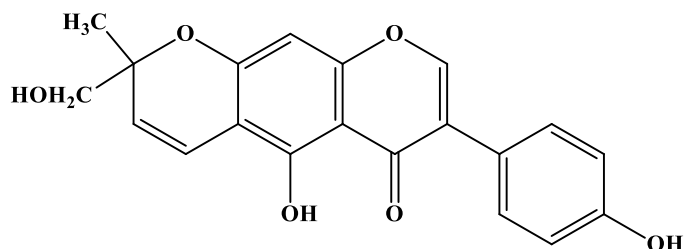
## V-1-5-3-Composé Ea3

- **Nom** : Alpinumisoflavone
- **Formule brute** :  $C_{20}H_{16}O_5$
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode négatif :**  
 $m/z = 335,0889 [M-H]^-$   
**Mode positif :**  
 $m/z = 337,1098 [M+H]^+$
- **RMN  $^1H$**  (500 MHz) et **RMN  $^{13}C$**  (125 MHz) dans le DMSO- $d_6$
- **Données spectrales** :  
Tableau III-3, page 75



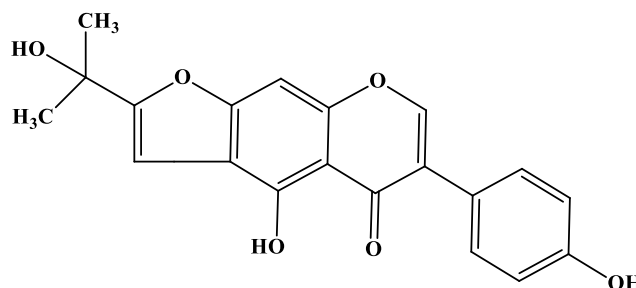
## V-1-5-4-Composé Ea4

- **Nom** : Erysubine B
- **Formule brute** :  $C_{20}H_{16}O_6$
- $[\alpha]_D$  : + 39,9 (*c* 0,158, DMSO)
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode négatif :**  
 $m/z = m/z 351,0858 [M-H]^-$   
**Mode positif :**  
 $m/z = 353,1033 [M+H]^+$
- **RMN  $^1H$**  (500 MHz) et **RMN  $^{13}C$**  (125 MHz) dans le DMSO- $d_6$
- **Données spectrales** :  
Tableau III-4, page 81



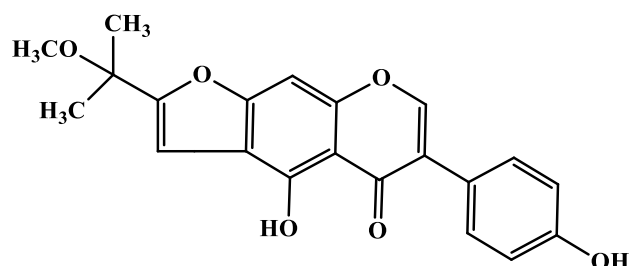
## V-1-5-5-Composé Ea5

- **Nom** : Erysubine A
- **Formule brute** : C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode négatif :**  
 $m/z = 351,0866 [M-H]^-$   
**Mode positif :**  
 $m/z = 353,1031 [M+H]^+$
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>
- **Données spectrales :**  
Tableau III-5, page 87



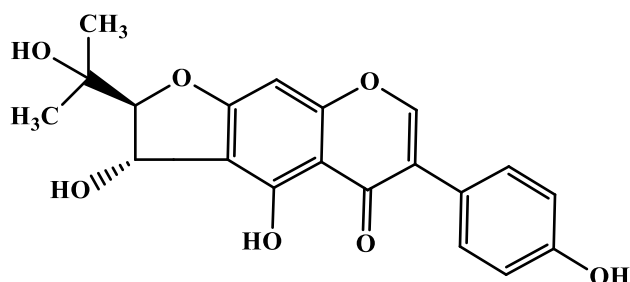
## V-1-5-6-Composé Ea6

- **Nom** : Erythrine D
- **Formule brute** : C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode négatif :**  
 $m/z = 365,0991 [M-H]^-$   
**Mode positif :**  
 $m/z = 367,1177 [M+H]^+$
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>
- **Données spectrales :**  
Tableau III-6, page 93



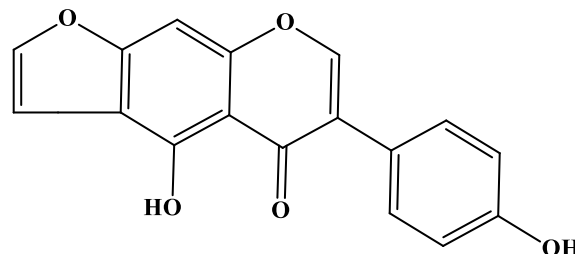
## V-1-5-7-Composé Ea7

- **Nom** : (±)-erythrine F
- **Formule brute** : C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>
- **[α]<sub>D</sub>** : 0 (c 0,05, MeOH)
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode négatif :**  
 $m/z = 369,0966 [M-H]^-$   
**Mode positif :**  
 $m/z = 371,1139 [M+H]^+$
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans le DMSO
- **Données spectrales :**  
Tableau III-7, page 101



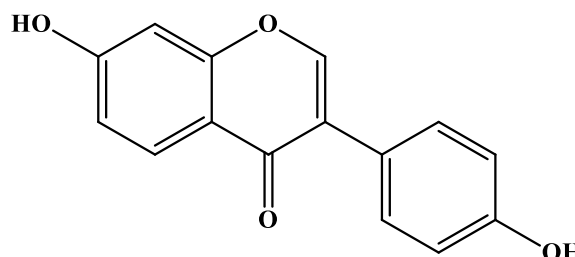
## V-1-5-8-Composé Ea8

- **Nom** : Ammopiptanine B
- **Formule brute** : C<sub>17</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode positif :**  
 $m/z = 295,0586 [M+H]^+$
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>
- **Données spectrales :**  
Tableau III-8, page 106



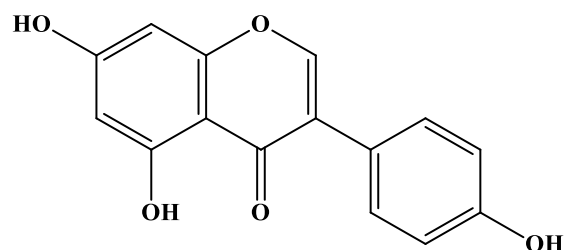
## V-1-5-9-Composé Ea9

- **Nom** : Daidzeine
- **Formule brute** : C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode négatif :**  
 $m/z = 253,0491 [M-H]^-$
- Mode positif :**  
 $m/z = 255,0636 [M+H]^+$
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>
- **Donnés spectrales :**  
Tableau III-9, page 112



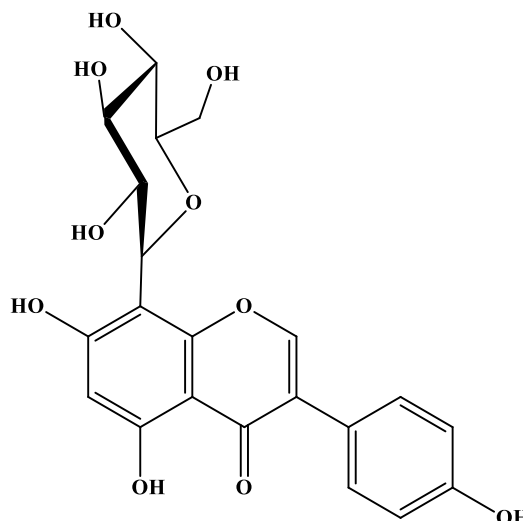
## V-1-5-10-Composé Ea10

- **Nom** : Génistéine.
- **Formule brute** : C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>.
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode négatif :**  
 $m/z = 269,0452 [M-H]^-$
- Mode positif :**  
 $m/z = 271,0578 [M+H]^+$
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans l'acétone
- **Données spectrales :**  
Tableau III-10, page 118



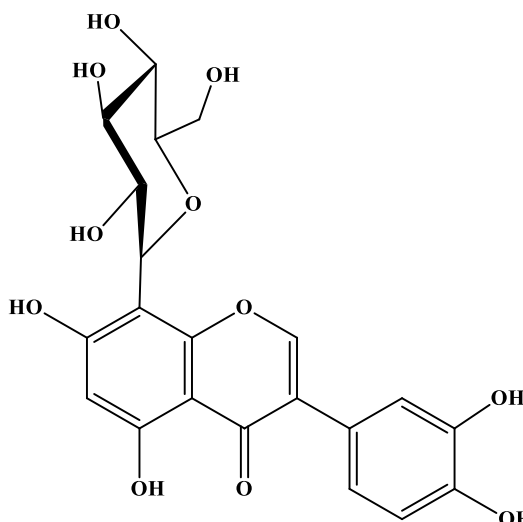
## V-1-5-11-Composé Ea11

- **Nom** : Génistéine-8-*C*-glucoside
- **Formule brute** : C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>10</sub>.
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode négatif :**  
 $m/z = 431,0997 [M-H]^-$   
**Mode positif :**  
 $m/z = 433,1145 [M+H]^+$
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans DMSO-*d*<sub>6</sub>
- **Données spectrales :**  
Tableau III-11, page 128.



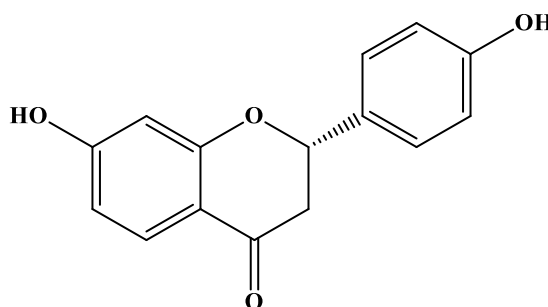
## V-1-5-12-Composé Ea12

- **Nom** : Orobol-8-*C*-β-*D*-glucopyranoside
- **Formule brute** : C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode négatif :**  
 $m/z = 447,0889 [M-H]^-$   
**Mode positif :**  
 $m/z = 449,1084 [M+H]^+$
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD
- **Données spectrales :**  
Tableau III-12 , page 134 .



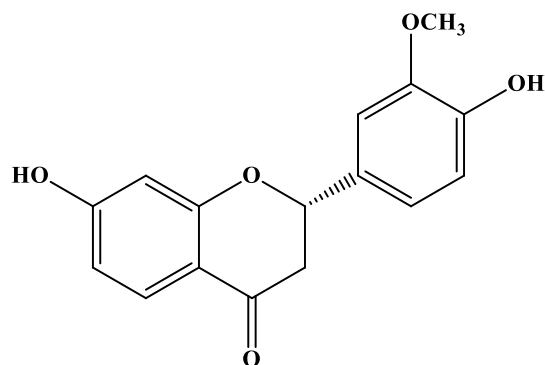
## V-1-5-13-Composé Ea13

- **Nom** : (2*S*)-Liquiritigénine
- **Formule brute** : C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>.
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode négatif :**  
 $m/z = 255,0624 [M-H]^-$   
**Mode positif :**  
 $m/z = 257,0779 [M+H]^+$
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans DMSO-*d*<sub>6</sub>
- **Données spectrales :**  
Tableau III-13, page 141.



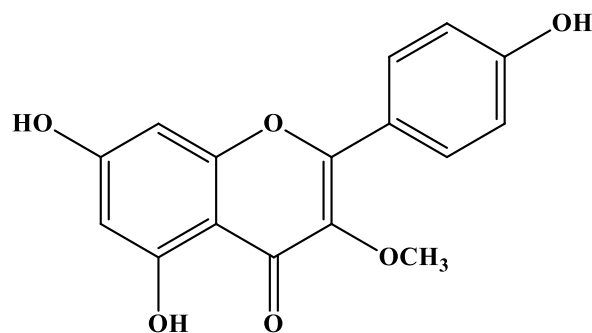
## V-1-5-14-Composé Ea14

- **Nom** : 7,4'-dihydroxy-3'-méthoxy-flavanone
- **Formule brute** : C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode négatif :**  
 $m/z = 285,0739$  [M-H]<sup>-</sup>  
**Mode positif :**  
 $m/z = 287,0907$  [M+H]<sup>+</sup>
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans l'acétone-*d*<sub>6</sub>
- **Données spectrales :**  
Tableau III-14, page 148



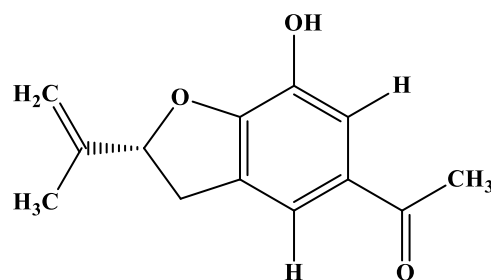
## V-1-5-15-Composé Ea15

- **Nom** : Isokaempferide
- **Formule brute** : C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode négatif :**  
 $m/z = 299,0565$  [M-H]<sup>-</sup>  
**Mode positif :**  
 $m/z = 301,0724$  [M+H]<sup>+</sup>
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans le DMSO-*d*<sub>6</sub>
- **Données spectrales :**  
Tableau III-15, page 152



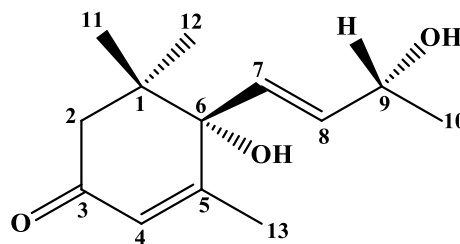
## V-1-5-16-Composé Ea16

- **Nom** : 7-hydroxytremetone
- **Formule brute** : C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode négatif :**  
 $m/z = 217,0842$  [M-H]<sup>-</sup>  
**Mode positif :**  
 $m/z = 219,1028$  [M+H]<sup>+</sup>
- **RMN <sup>1</sup>H** (600 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (150 MHz) dans l'acétone-*d*<sub>6</sub>
- **Données spectrales :**  
Tableau III-16, page 159



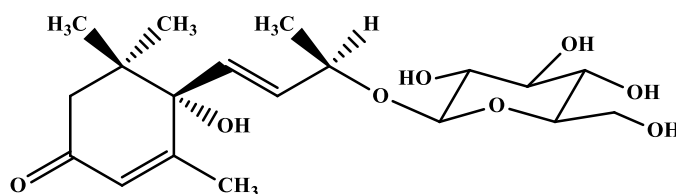
## V-1-5-17-Composé Ea17

- **Nom** : Vomifoliol
- **Formule brute** :  $C_{13}H_{20}O_3$
- **$[\alpha]_D$**  : +231 (*c* 0,97,  $CHCl_3$ )
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode positif :**  
 $m/z = 225,1501 [M+H]^+$
- **RMN  $^1H$**  (500 MHz) et **RMN  $^{13}C$**  (125 MHz) dans  $DMSO-d_6$
- **Données spectrales :**  
Tableau III-17, page 167



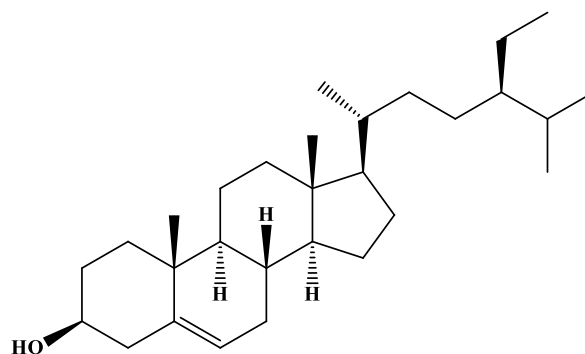
## V-1-5-18-Composé Ea18

- **Nom** : (6S, 9R)-roseoside
- **Formule brute** :  $C_{19}H_{30}O_8$
- **$[\alpha]_D$**  : + 109,4 (*c* 0,96, MeOH)
- **HR-ESI-MS:**  
**Mode positif :**  
 $m/z = 387,2019 [M+H]^+$   
 $m/z = 409,2019 [M+Na]^+$
- **RMN  $^1H$**  (500 MHz) et **RMN  $^{13}C$**  (125 MHz) dans  $CD_3OD$
- **Données spectrales :**  
Tableau III-18, page 175



## V-1-5-19-Composé Ea19

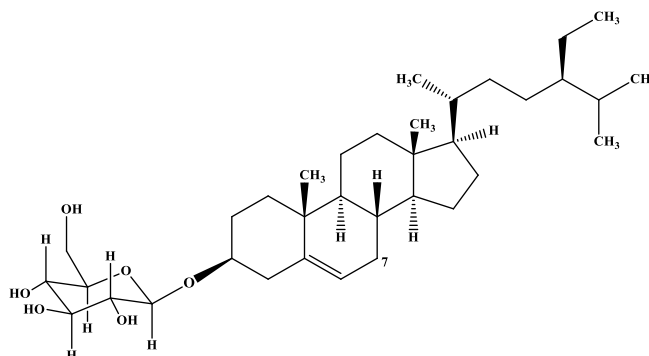
- **Nom** :  $\beta$ -sitostérol
- **Formule brute** :  $C_{29}H_{50}O$
- **$[\alpha]_D$**  = -30 (*C* = 0,8,  $CHCl_3$ )
- **ESI-MS :**  
**Mode négatif**  
 $m/z = 413 [M-H]^-$
- **RMN $^1H$**  (600 MHz) et **RMN  $^{13}C$**  (150 MHz) dans  $CDCl_3$
- **Données spectrales :**  
Tableau III-19, page 176





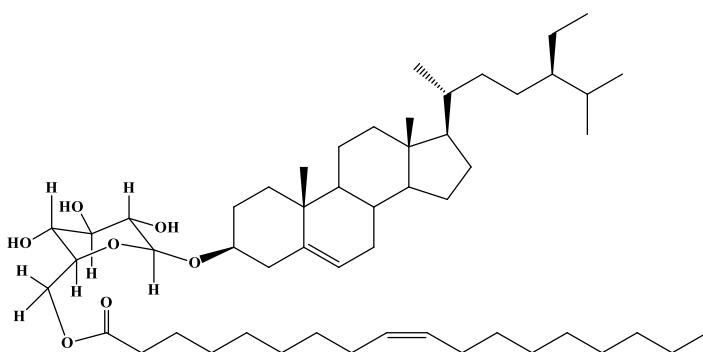
## V-1-5-20-Composé Ea20

- **Nom** : Daucostérol
- **Formule brute** : C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>
- **[α]<sub>D</sub>** = -41,5 (C= 0,4, MeOH)
- **ESI-MS** :  
**Mode négatif**  
 $m/z = 575$  [M-H]<sup>-</sup>  
 $m/z = 1151$  [2M-H]<sup>-</sup>
- **RMN<sup>1</sup>H** (600 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (150 MHz) dans CDCl<sub>3</sub>
- **Données spectrales** :  
 Tableau III-20, page 178



## V-1-5-21-Composé Ea21

- **Nom** : Sitoindoside II
- **Formule brute** : C<sub>53</sub>H<sub>92</sub>O<sub>7</sub>
- **[α]<sub>D</sub>** = -9.3 (C = 0,25 g/100 ml)
- **HR-ESI-MS**:  
**Mode positif**  
 $m/z = 841$  [M+H]<sup>+</sup>
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD
- **Données spectrales** :  
 Tableau III-21, page 184

V -1-6- Etude de l'espèce *Euphorbia atlantica* Coss.V -1-6-1- Extraction de l'espèce *E. atlantica* Coss.

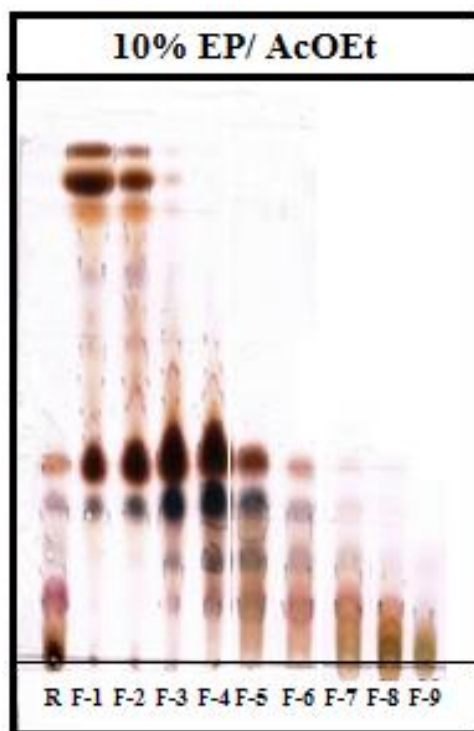
1500 g de la plante entière *Euphorbia atlantica* Coss. séchés et broyés, ont été soumis à une extraction hydro-alcoolique par le mélange de solvants EtOH-H<sub>2</sub>O (70:30) à température ambiante. Après filtration et évaporation non à sec à température 40 °C, l'extrait aqueux (800 ml) a subi une extraction liquide-liquide en utilisant des solvants à polarité croissante: EP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt et *n*-BuOH. Les quatre phases organiques obtenues sont traitées par sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), puis elles sont filtrées et concentrées à sec sous pression réduite, pour donner les extraits suivants : 13,96 g (EP), 15,17 g (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 7,4 g (AcOEt) et 29,95 g (*n*-BuOH).

**V-1-6-2- Etude de l'extrait EP de l'espèce *Euphorbia atlantica* Coss.**

7 g de l'extrait éther de pétrole sont soumis à une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice en phase normale. L'élution se fait par le mélange hexane/AcOEt allant de 100 : 0 à 0 : 100 (Tableau V-3). Les fractions révélant le même profil en CCM sont regroupées pour donner 8 fractions majoritaires (Figure V-16).

**Tableau V-3 :** Fractionnement de l'extrait EP de l'espèce *Euphorbia atlantica* Coss.

Eluant (Hexane/AcOEt)	Fractions collectées	Masse (mg)
100-0 à 90-10	F-1	160,1
90-10	F-2	302,9
80-20	F-3	581,3
80-20	F-4	953,6
80-20	F-5	277,0
80-20	F-6	179,3
20-80	F-7	361,52
30-70 à 50-50	F-8	744,7
50-50 à 0-100	F-9	356,1

**Figure V-16:** CCM récapitulatives de l'extrait éther pétrole

### V-1-6-2-1- Purification

#### ➤ Etude de la fraction F-2

La fraction F-2 (302,9 mg) est chromatographiée sur une colonne ouverte en utilisant le gel de silice SiO<sub>2</sub> comme phase stationnaire (Figure V-17). L'éluion est réalisée par un mélange de solvants hexane/AcOEt (100-0, 99,5-0,5, 99-1, 98,5-1,5, 98-2, 97-3, 96-4, 95-5, 94-6, 93-7, 90-10, 80-20) pour fournir 9 sous-fractions (F-2-1 à F-2-9).

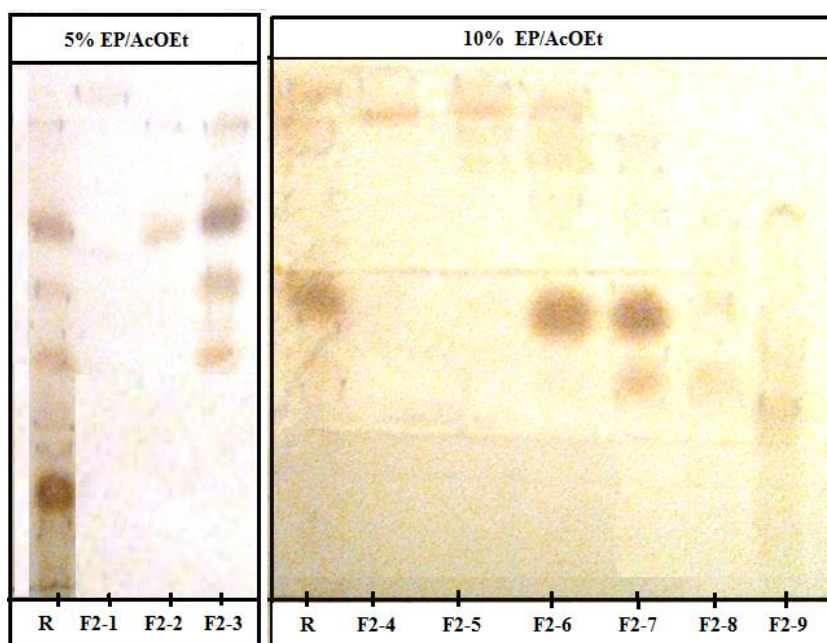


Figure V-17 : CCM récapitulative de la fraction F-2

La sous fraction F-2-7 (30 mg) a subi une purification sur plaque préparative en phase normale en utilisant le système d'éluion (EP-AcOEt : 97-3). Cette purification a conduit à l'isolement des composés MS<sub>2</sub> (9 mg) et le mélange de MS<sub>3</sub> et MS<sub>4</sub> (6,5 mg) (Figure V-18).

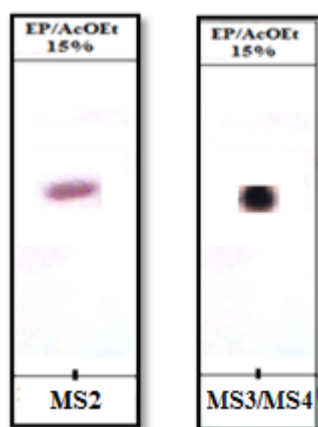


Figure V-18: CCM des composés MS<sub>2</sub>, MS<sub>3</sub> et MS<sub>4</sub>

## (Partie phytochimique)

La fraction F-4 (953,6 mg) est soumise à un fractionnement sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution a été effectuée par le système EP/acétone à divers gradients (100-0)/(90-10), pour fournir 13 sous fractions (F-4-1 à F-4-13) (Figure V-19).

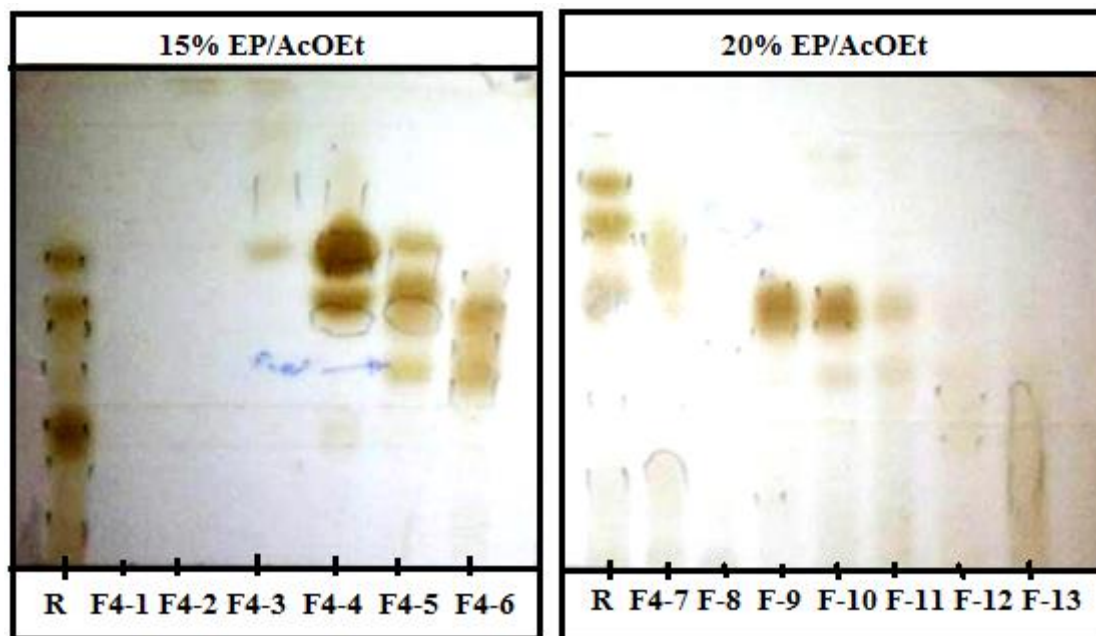


Figure V-19 : CCM récapitulative de la fraction F-4

La sous-fraction F-4-9 (64,8 mg) est purifiée par précipitation dans l'acétone pour donner le composé **MS<sub>1</sub>** (42,7 mg). Ce dernier est invisible sous UV à 254 nm et se révèle en bleu après pulvérisation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Figure V-20).

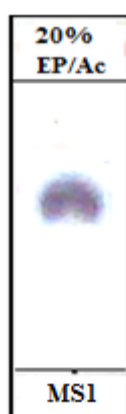


Figure V-18: CCM du composé **MS<sub>1</sub>**

La fraction F-5 (277,0 mg) contient un composé majoritaire qui se précipite dans l'acétone. Cette précipitation conduit à l'isolement du composé **MS<sub>7</sub>** (7,8 mg) qui présente

une tache invisible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en rose après révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Figure V-21).



Figure V-21: CCM du composé MS7

### V-1-6-3- Etude de l'extrait AcOEt de l'espèce *Euphorbia atlantica* Coss.

7,4 g de l'extrait AcOEt sont séparés par une chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice normale comme phase stationnaire. L'élution est effectuée par le mélange chloroforme/méthanol (100% CHCl<sub>3</sub>, 1%, 3%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% et 100% MeOH). A l'issue de ce fractionnement primaire, 11 fractions sont recueillies (Tableau V-4 et Figure V-22).

Tableau V-4: Fractionnement de l'extrait AcOEt de l'espèce *Euphorbia atlantica* Coss.

Eluant (CHCl <sub>3</sub> /MeOH)	Fractions collectées	Masse (mg)
100-0	F-1	6,2
99-1	F-2	4,6
97-3	F-3	3,5
95-5	F-4	22,6
90-10	F-5	152,0
80-20	F-6	433,2
80-20	F-7	811,6
80-20 à 70-30	F-8	3272,2
70-30 à 60-40	F-9	1085,7
60-40 à 20-80	F-10	789,6
20-80 à 0-100	F-11	85,7

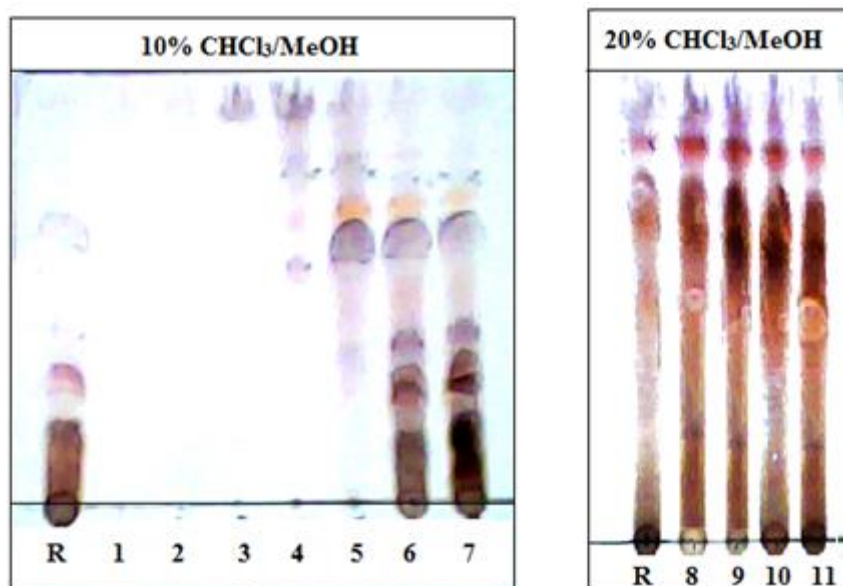


Figure V-22 : CCM récapitulatives des différentes fractions de l'extrait AcOEt

#### V-1-6-2-2- Purification

##### ➤ Etude de la fraction F-5

La fraction F-5 (152,0 mg) est séparée sur une colonne de gel de silice  $\text{SiO}_2$  éluée avec le mélange de solvants (EP/AcOEt). Des fractions de 20 ml ont été collectées et réunies selon leur profil en CCM en phase normale (Figure V-23) effectuée dans le mélange ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  : 9/1) pour donner 10 sous-fractions (F-5-1 à F-5-10).

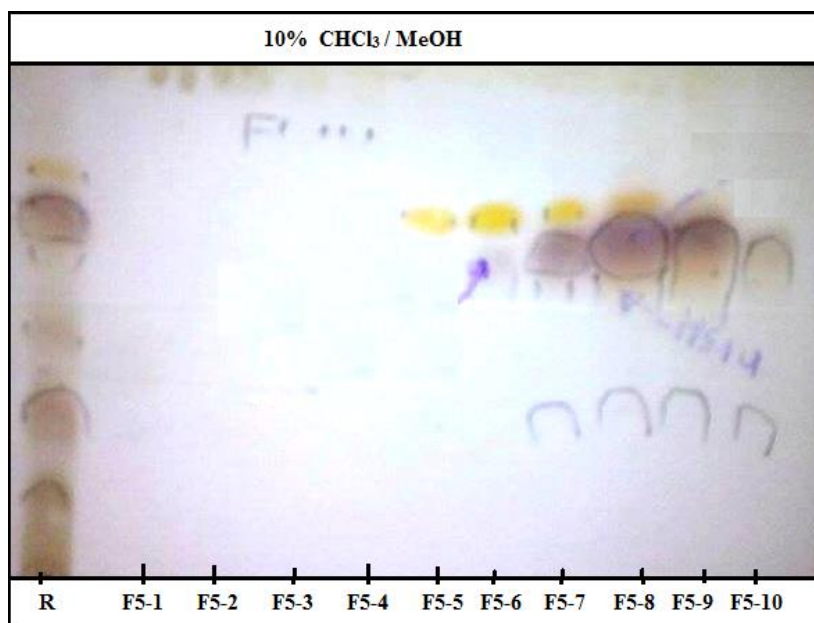


Figure V-23 : CCM récapitulative de la fraction F-5

## (Partie phytochimique)

La sous-fraction F-5-8 (39,8 mg) a subi une purification par précipitation dans le  $\text{CHCl}_3$  avec quelques gouttes d'acétone. Après lavage plusieurs fois par  $\text{CHCl}_3$ , le composé  $\text{MS}_5$  (24 mg) a été isolé à l'état pur. Sa CCM montre une tache visible à 254 nm se colorant en bleu après pulvérisation par une solution d'acide sulfurique et chauffage à  $100\text{ }^\circ\text{C}$  (Figure V-24).



Figure V-24: CCM du composé  $\text{MS}_5$

➤ Etude de la fraction F-8

La fraction F-8 (3727,2 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution est réalisée par le mélange de solvants (dichlorométhane/méthanol) (100%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1%, 3%, 5%, 7%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% et 100% MeOH) pour donner 18 sous-fractions (F-8-1 à F-8-18) (Figure V-25).

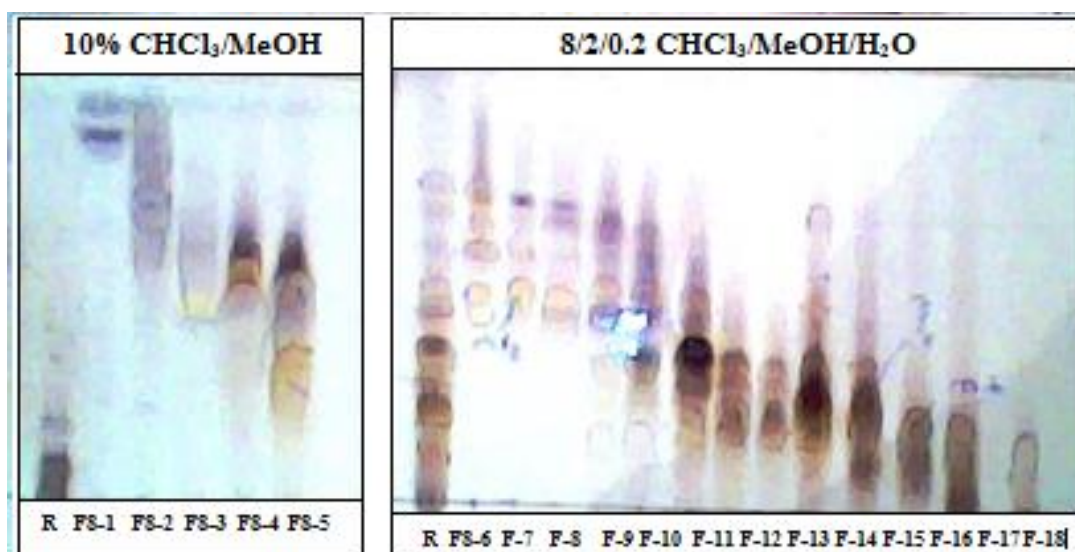


Figure V-25 : CCM récapitulatives de la fraction F-5



## (Partie phytochimique)

La sous-fraction F-8-9 (91,5) est purifiée par précipitation dans l'acétone pour donner le composé **MS<sub>8</sub>** (18,5 mg). La CCM de ce dernier révèle la présence d'une tache invisible à 254 nm se colorant en rose à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Figure V-26).

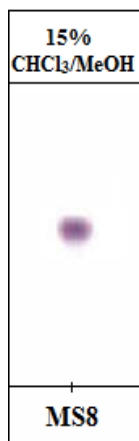


Figure V-26: CCM du composé **MS<sub>8</sub>**

La sous fraction F-8-14 (419,4 mg), a fait l'objet d'une chromatographie sur une colonne de SiO<sub>2</sub> par le mélange de solvants CHCl<sub>3</sub>/MeOH (100-0, 99-1, 97-3, 95-5, 93-7, 90-10, 85-15, 80-20, 70-30 et 50-50) pour récupérer 9 sous-fractions (Figure V-27).

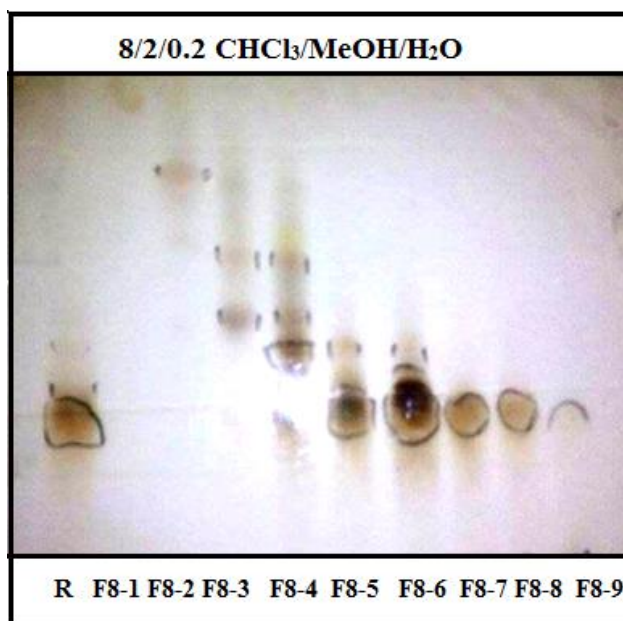


Figure V-27 : CCM récapitulative de la fraction F-8-14

Les deux sous-fractions F-8-14-8 et F-8-14-9 contiennent le composé **MS<sub>6</sub>** (12 mg) à l'état pur. Ce composé (Figure V-28) est obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol, il montre une tache visible sous la lumière UV à 254 nm et se colore en marron après révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

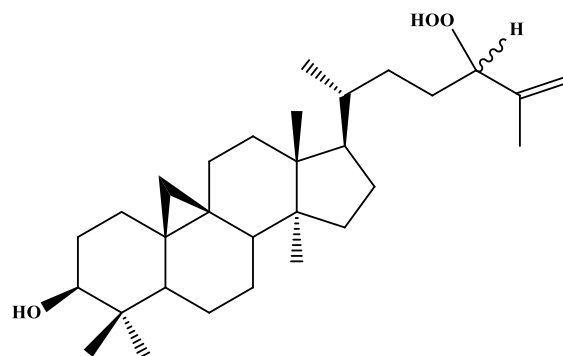


Figure V-28: CCM du composé MS<sub>6</sub>

## V -1-7- Composés isolés de l'espèce *Euphorbia atlantica*

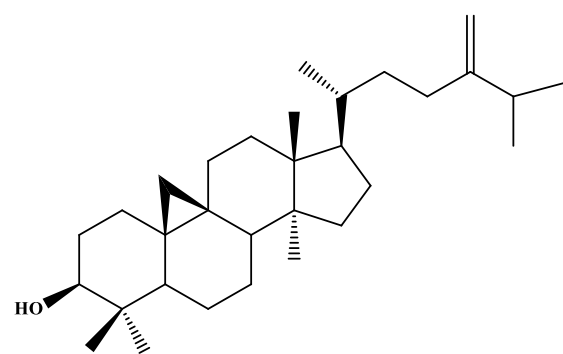
### V-1-7-1-Composé MS1

- **Nom** : 3β-hydroxycycloart-25-èn-24-hydroperoxyde
- **Formule brute** : C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O<sub>3</sub>
- **[α]<sub>D</sub>** = +23,9, (c 0,23, MeOH)
- **ESI-MS** (Mode positif)  
*m/z* = 481,3 [M+Na]<sup>+</sup>
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans CDCl<sub>3</sub>
- **Données spectrales** :  
Tableau III-22, page 204



### V-1-7-2-Composé MS2

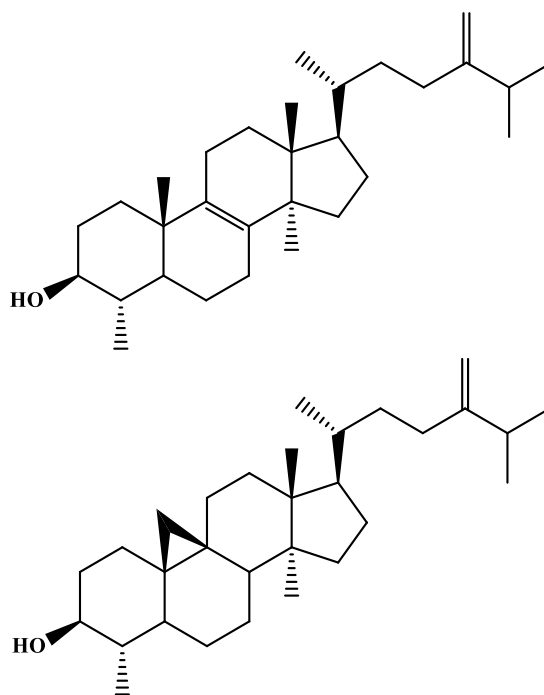
- **Nom** : 24-méthylèncycloartanol
- **Formule brute** : C<sub>31</sub>H<sub>52</sub>O
- **[α]<sub>D</sub>** = +40,2 (c 1,01, CHCl<sub>3</sub>).
- **EI-MS** :  
*m/z* = 440 [M]<sup>+</sup>
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans CDCl<sub>3</sub>
- **Données spectrales** :  
Tableau III-23, page 209



## (Partie phytochimique)

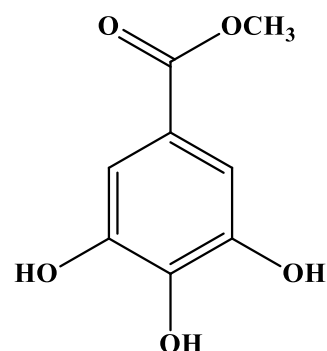
## V-1-7-3-Composés MS3 et MS4

- **Nom** : Obtusifoliol  
Cycloeucalénol
- **Formule brute** : C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O
- **ESI-MS** : (mode positif)  
 $m/z = 449$  [M+Na]<sup>+</sup>  
 $m/z = 465,3$  [M+K]<sup>+</sup>
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans CDCl<sub>3</sub>
- **Données spectrales** :  
Tableau III-24, page 213  
Tableau III-25, page 214



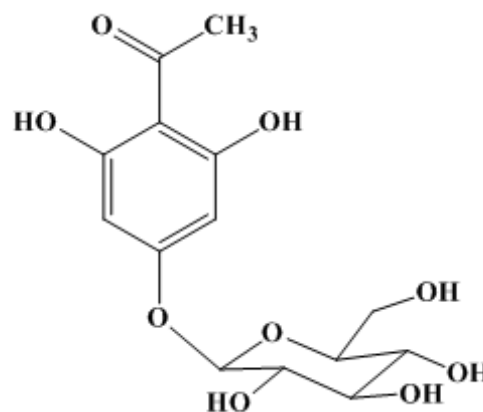
## V-1-7-4-Composé MS5

- **Nom** : Méthyl gallate
- **Formule brute** : C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>5</sub>
- **ESI-MS**:  
**Mode positif** :  
 $m/z = 207,5$  [M+Na]<sup>+</sup>
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD
- **Données spectrales** :  
Tableau III-26, page 218



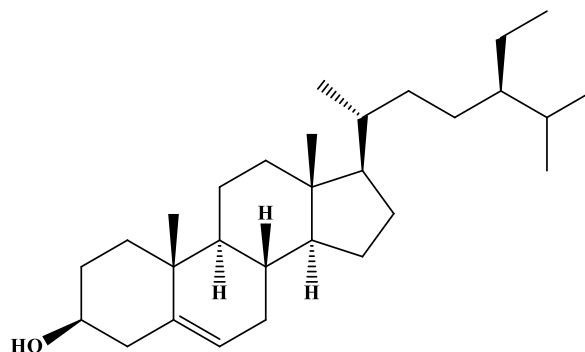
## V-1-7-5-Composé MS6

- **Nom** : Phloroacétophénone 4-O-β-D-glucopyranoside
- **Formule brute** : C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>
- **[α]<sub>D</sub>** = + 23, (c 1,2, MeOH)
- **ESI-MS**:  
**Mode positif** :  
 $m/z = 353,2$  [M+Na]<sup>+</sup>
- **RMN <sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN <sup>13</sup>C** (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD
- **Données spectrales** :  
Tableau III-27, page 224



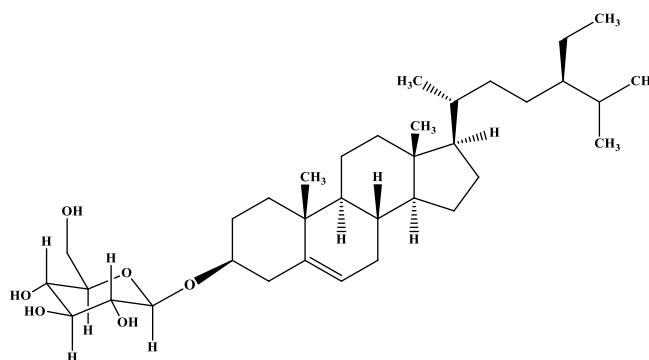
## V-1-7-6-Composé MS7

- **Nom** :  $\beta$ -sitostérol
- **Formule brute** :  $C_{29}H_{50}O$
- $[\alpha]_D = -30$  (C 0,8,  $CHCl_3$ )
- **ESI-MS** :  
**Mode positif** :  
 $m/z = 437$   $[M+Na]^+$
- **RMN<sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN<sup>13</sup>C** (125 MHz) dans  $CDCl_3$
- **Données spectrales** :  
 Tableau III-19, page 163



## V-1-7-7-Composé MS8

- **Nom** : Daucostérol
- **Formule brute** :  $C_{35}H_{60}O_6$
- $[\alpha]_D = -41,5$  (C 0,4, MeOH)
- **ESI-MS** :  
**Mode positif** :  
 $m/z = 599$   $[M+Na]^+$   
 $m/z = 1175$   $[2M+Na]^+$
- **RMN<sup>1</sup>H** (500 MHz) et **RMN<sup>13</sup>C** (125 MHz) dans  $CD_3OD + CDCl_3$
- **Données spectrales** :  
 Tableau III-20, page 165



## V-2- MATERIEL ET METHODES

### V-2-1- Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué de deux plantes entières *Erinacea anthyllis* Link et *Euphorbia atlantica* Coss.

#### V-2-1-2- Préparation des extraits végétaux

##### ➤ Pulvérisation

Les deux plantes *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica* sont récoltées et séchées à l'ombre dans un endroit bien aérée, ensuite découpées en petits morceaux et broyées à l'aide d'un broyeur pour obtenir de poudres fines.

##### ➤ Préparation des extraits organiques

La méthode d'extraction de ces plantes a été évoquée dans le troisième chapitre (Figures III-1 et III-174). Les extraits obtenus sont solubilisés dans différents solvants pour la réalisation des tests biologiques.

### V-2-2- Dosage des polyphénols totaux

##### ➤ Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. Lors de l'oxydation, il est réduit en un mélange d'oxyde bleu. La coloration produite est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait analysé [323].

##### ➤ Protocol

La teneur en polyphénols totaux des extraits obtenus à partir des deux plantes *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica* a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu décrite par Li et ses collaborateurs (2007) [324]. Un volume de 200 µl de solutions des extraits à différentes concentrations est ajouté à 1 ml de réactif de Folin-Ciocalteu dilué (1/10). Après 4 min, 800 µl de carbonate de sodium saturée (75 g/l) ont été ajoutés. Après 2 h d'incubation à température ambiante, l'absorbance à 765 nm a été mesurée par un spectrophotomètre (vis-7220G) UV-Vis. L'acide gallique (0 à 175 µg/ml) a été utilisé pour la courbe d'étalonnage

comme standard. Les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait ( $\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$ ) et calculés comme valeur moyenne  $\pm$  écart-type ( $n = 3$ ).

### V-2-3- Dosage des flavonoïdes

Le taux des flavonoïdes dans les extraits (EP, AcOEt et *n*-BuOH) des plantes *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica*, a été quantifié par la méthode de trichlorure d'aluminium décrite par Bahorun et ses collaborateurs (1996) [325]. 1 ml de la solution d' $\text{AlCl}_3$  (2%) est ajouté à 1 ml de la solution de l'échantillon (extraits ou quercétine) à différentes concentrations. Le mélange est laissé réagir pendant 10 min à température ambiante puis la lecture spectrophotométrique est faite à 430 nm. La concentration des flavonoïdes dans les extraits est calculée à partir de la gamme d'étalonnage établie par la quercétine (1-25  $\mu\text{g/ml}$ ), et exprimée en microgrammes d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$ ).

### V-2-4- Evaluation de l'activité anti-oxydante

La mise en évidence de l'activité anti-oxydante *in vitro* des extraits et fractions ainsi que des produits purs obtenus à partir des deux plantes *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica* a été réalisée par trois différentes méthodes à savoir: le piégeage du radical libre DPPH, le test de phosphomolybdate PPM et le test de pouvoir réducteur du fer FRAP.

#### V-2-4-1- Test de piégeage du radical libre DPPH

##### ➤ Principe

Dans ce test, les anti-oxydants présents dans les extraits et fractions et les métabolites isolés réduisent le 1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune (1,1-diphényl-2-picrylhydrazine), dont l'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des anti-oxydants présents dans le milieu à donner des protons [326].

##### ➤ Protocol

Pour réaliser l'activité anti-oxydante par piégeage du radical libre DPPH, nous avons suivi le protocole décrit par Menaceur et al. (2014) [327]. La solution de DPPH est préparée par

## (Partie biologique)

solubilisation de 2,5 mg de DPPH dans 100 ml de méthanol. 25 µl de différentes dilutions des extraits, fractions et composés isolés ainsi que les standards (Acide ascorbique et BHT) sont ajoutés à 975 µl de DPPH. Le mélange est laissé à l'obscurité pendant 30 min et la décoloration par rapport au contrôle négatif contenant uniquement la solution de DPPH est mesurée à 517 nm.

L'activité anti-oxydante est estimée selon l'équation ci-dessous :

$$I\% = [(A_{\text{contrôle}} - A_{\text{échantillon}})/A_{\text{contrôle}}] \times 100$$

$A_{\text{contrôle}}$  : l'absorbance du contrôle (contenant tous les réactifs à l'exception de l'échantillon de test).

$A_{\text{échantillon}}$  : l'absorbance d'extraits, fractions et composés isolés ou des références.

Les expériences ont été réalisées en triple et les résultats ont été exprimés comme valeurs moyennes avec SD (standard déviation).

Les concentrations des extraits dans le milieu réactionnel sont comprises entre 0 et 0,5 mg/ml pour les extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Erinacea anthyllis*, et entre 0 et 10 mg/ml pour l'extrait EP et les fractions F-7, F-12 et F-14 de l'extrait AcOEt de la plante *Euphorbia atlantica*, alors que celles de l'acide ascorbique et BHT sont comprises entre 0 et 0,0375 et 0 et 0,125 mg/ml respectivement. Les concentrations des produits isolés à partir des plantes *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica* varient de 0 à 0,06 mg/ml.

#### V-2-4-2- Teste de phosphomolybdate (PPM)

##### ➤ Principe

Cette méthode est basée sur la réduction du molybdate Mo VI en molybdate Mo V par les composés anti-oxydants, avec la formation d'un complexe vert de phosphomolybdate Mo V qui présente un maximum d'absorption à 695 nm. Cette méthode s'est avérée très efficace dans la quantification de l'activité anti-oxydante de la vitamine E [328], mais elle a été appliquée plus tard pour les polyphénols [329].

##### ➤ Protocol

Ce teste est réalisé selon la méthode décrite par Prieto et al. (1999) [328] qui consiste à introduire dans un tube Epindorff 100 µl de solution d'extraits et 900 µl d'un réactif composé de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,6 M), de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (28 mM) et du molybdate d'ammonium (4 mM). Le tube bien fermé, est ensuite incubé à 95°C pendant 90 minutes. Après refroidissement, l'absorbance est

mesurée à 695 nm. Un contrôle négatif est préparé en parallèle dans les mêmes conditions en remplaçant l'échantillon par 100 µl de méthanol. La vitamine C est utilisée comme témoin pour calculer la capacité anti-oxydante des extraits et elle est exprimée en mg d'équivalents de vitamine C par milligramme d'extrait (mg EVC/mg d'extrait).

### V-2-4-3- Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

#### ➤ Principe

L'activité réductrice du fer des extraits est déterminée selon la méthode décrite par Oyaizu en 1986 <sup>[330]</sup>, basée sur la réduction du  $Fe^{3+}$  présent dans le complexe  $K_3Fe(CN)_6$  en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ). Par conséquent,  $Fe^{2+}$  peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu dans le milieu réactionnel à 700 nm <sup>[331]</sup>.

#### ➤ Protocol

Un millilitre de l'extrait à différentes concentrations est mélangé avec 2,5 ml d'une solution tampon phosphate 0,2 M (pH 6,6) et 2,5 ml d'une solution de ferricyanure de potassium  $K_3Fe(CN)_6$  à 1%. L'ensemble est incubé au bain à 50 °C pendant 20 minutes. 2,5 ml d'acide trichloroacétique à 10% sont ensuite ajoutés pour arrêter la réaction et le tout est centrifugé à 3000 rpm pendant 10 minutes. A l'issue de cette centrifugation, 2,5 ml du surnageant sont mélangés à 2,5 ml d'eau distillée et 0,5 ml d'une solution aqueuse de chlorure ferrique ( $FeCl_3$ ) fraîchement préparé à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel est faite à 700 nm contre un blanc préparé dans les mêmes conditions, où l'extrait est remplacé par l'eau distillée. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés <sup>[332]</sup>.

L'activité anti-oxydante estimée par rapport à la vitamine C (dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons). Elle est exprimée en mg d'équivalents de vitamine C par milligramme d'extrait (mg EVC/mg d'extrait).

### V-2-5- Analyse statistique

Les données expérimentales du dosage et de l'évaluation des activités anti-oxydantes ont été exprimées par la moyenne  $\pm$  l'écart type. Le coefficient de corrélation des propriétés anti-oxydantes a été déterminé en utilisant les programmes: Origine 6 et Excel 2010.

## V-2-6- Mise en évidence de l'activité antibactérienne

### V-2-6-1- Principe

Le principe repose sur une confrontation entre un microorganisme et les extraits d'une plante. L'inhibition de la croissance microbienne permet de conclure sur l'activité antibactérienne des extraits testés.

### V-2-6-2- Technique utilisée

Dans cette partie, nous avons opté pour la méthode de diffusion en milieu gélosé (aromatogramme). Cette dernière consiste à utiliser des disques de papier imprégnés par des différents échantillons à tester, puis les déposer à la surface d'un milieu nutritif uniformément ensemencé avec une suspension du microorganisme à étudier. La lecture des antibiogrammes est faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibition autour des disques.

### V-2-6-3- Matériel microbien utilisé

L'activité antibactérienne des deux plantes *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica* a été évaluée par la technique de diffusion en milieu solide (méthode des disques), décrite par Falleh et ses collaborateurs (2008) <sup>[333]</sup> vis-à-vis de quatre souches bactériennes appartenant à différents genres et à différents Gram. Deux bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus albus*) et deux bactéries à Gram négatif (*Enterobacter* sp et *Escherichia coli*). Parmi ces bactéries, deux sont des souches référentielles de l'American Type Culture Collection (ATCC), il s'agit de: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922. Toutes ces souches sont aimablement fournies par le Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Batna (CHU), conservées sur une gélose nutritive.

### V-2-6-4- Vérification de la pureté des bactéries

Les bactéries utilisées sont purifiées sur le milieu nutritif Mueller, par striation des quatre quadrants dans des conditions stériles et à des températures optimales selon la souche, considérée pendant 24 h de temps.



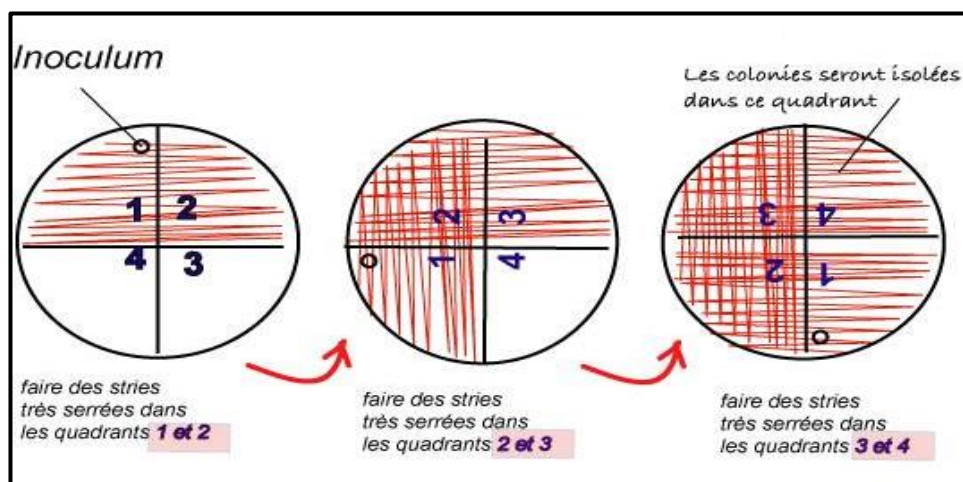


Figure V-24 : Isolement des bactéries par striation des quatre quadrants

### V-2-6-5- Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sont ensemencées sur la gélose Mueller et incubées à 37 °C pendant 24 h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester puis on décharge l'anse dans 5 ml de bouillon nutritif, ensuite on homogénéise la suspension bactérienne. Cette dernière est mise à incuber pendant 10-24 h à 37 °C.

Une lecture de la densité optique (DO) de 1 ml d'inoculum est faite par un spectrophotomètre à 625 nm. Son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland ou à une DO de (0,08-0,10) à 625 nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture cellulaire s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort <sup>[334]</sup>.

### V-2-6-6- Réalisation des tests antibactériens

#### Protocol

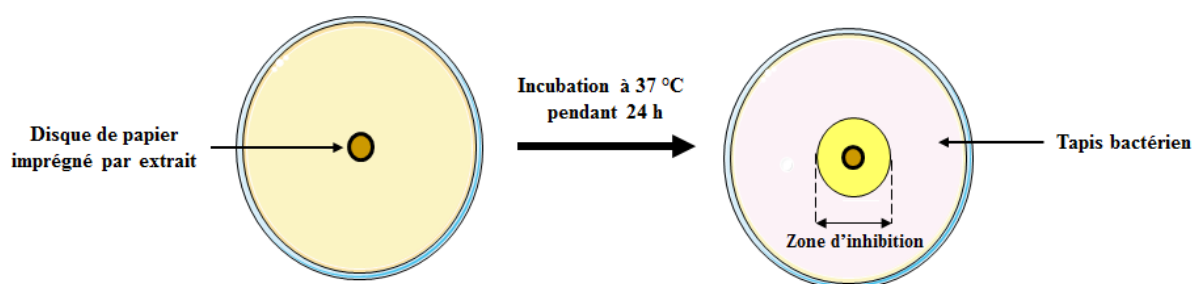
Selon la méthode de diffusion en milieu solide <sup>[332]</sup>, le contact entre une bactérie et la solution à tester doit être sur un milieu gélosé. Dans notre cas le milieu solide est représenté par le milieu de Muller-Hinton stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min.

L'ensemencement de chaque bactérie utilisée dans ce test est réalisé par écouvillonnage sur boîtes de Pétri. Un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube. L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées. Cette opération est répétée deux fois en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant

## (Partie biologique)

l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. L'écouvillon est rechargé à chaque fois qu'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri avec la même souche.

Les disques imprégnés de 10  $\mu\text{l}$  de la solution à tester sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile. De même les antibiogrammes réalisés avec des disques contenant des antibiotiques appropriés prêts à l'emploi (témoin positif) et des disques de DMSO (témoin négatif) sont utilisés pour la comparaison avec les résultats des extraits testés. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37 °C. Les tests sont effectués en triple (trois boîtes pour chaque concentration d'extrait et pour chaque souche).



**Figure V-25:** Principe de la méthode de diffusion en milieu solide

#### V-2-6-7- Estimation de l'activité antibactérienne des extraits

Les différents extraits organiques des plantes étudiées sont solubilisés dans le DMSO à raison de 1 g/ml. Ces solutions nous ont permis la préparation de différentes concentrations avec des dilutions successives au demi, afin d'en déduire les paramètres d'activités antibactériennes pour chaque extrait.

#### V-2-6-8- Détermination des CMI

Pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI), il suffit de déterminer les plus petites concentrations auxquelles les extraits présentent encore une activité antibactérienne visible à l'œil nu. Des dilutions successives au demi des extraits obtenus ont permis de préparer une gamme de dilution allant de 1 à 0,032 g/ml. Pour chaque concentration et pour chaque extrait, 10  $\mu\text{l}$  de solutions ont servi pour imbiber les disques.

# ***BIBLIOGRAPHIE***

---

# BIBLIOGRAPHIE

- [1] Marshall, E. F., 2011. Health and wealth from medicinale aromatic plants (FAO Diversification booklet 17), Rural Infrastructure and Agro-Industries Division, Rome.
- [2] Gupta, M. P., 2011. Perspectives of medicinal and aromatic plants and their products in emerging globalization era. Congresso brasileiro de olericultura, 51. Horticultura brasileira 29. Viçosa.
- [3] Fransworth, N. R., 1992. Preclinical assessment of medicinal plants. Natural Resources and Human Health. Elsevier Science Publishers BV, 87-91.
- [4] Mathe, A., 2010. Medicinal and aromatic plants. Soils, plant growth and crop production Vol. 2, encyclopedia of life support systems.
- [5] Rodero, L., Cuenca-Estrella, M., Córdoba, S., Cahn, P., Davel, G., Kaufman, S., Guelfand, L., Rodríguez-Tudela, J. L., 2002. Transient fungemia caused by an amphotericin B resistant isolate of *Candida haemulonii*. J Clin Microbiol. 40(6), 2266-2269.
- [6] Ramage, G., Bachmann, S., Patterson, T. F., Wickes, R. L., Lopez- Ribot, J. L., 2002. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. J Antimicrob Chemother. 49(6), 973-80.
- [7] Favier, A., 2003. Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. L'actualité chimique. 108-115.
- [8] Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact. 160, 1-40.
- [9] Aruoma, O. I., 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. Mutat Res. 523-524.
- [10] Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. In : CNRS (Ed.), Vol. 1-2. Paris.
- [11] Wojciechowski, M. F., Lavin, M., Sanderson, M. J., 2004. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *MATK* gene resolves many well-supported subclades within the family. Am J Bot. 11, 1846-2004.

- [12] Fdil, R., El Hamdani, N., El Kihel, A., Sraidi, K., 2012. Distribution of alkaloids in the aerial parts of *Retama monosperma* (L.) Boiss. in Morocco. *Ann Toxicol Anal.* 24(3), 139-143
- [13] Wink, M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry.* 64, 3-19.
- [14] Greinwald, R., Bachmann, P., Witte, L., Czygan, F. C., 1992. The alkaloids of *Hesperolaburnum platycarpum* (Fabaceae: Genisteae): Chemotaxonomic implications. *Biochem Syst Ecol.* 20(6), 583-588.
- [15] Negri, G., Tabach, R., 2013. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. *Rev Bras Farmacogn.* 23, 851-860.
- [16] Anam, E. M., 2003. Triterpenoid saponins from *Abrus precatorius* (Fabaceae). *Ind J Chem.* 42, 386-389.
- [17] Bruneton, J., 1999. *Pharmacognosie, Phytochimie des plantes médicinales.* Ed° TEC & DOC, 3<sup>ème</sup> édition, Paris, 347-351.
- [18] Botta, B., Menendez, P., Zappia, G., Lima, R. A., Torge, R., Monachea, G. D., 2009. Prenylated isoflavonoids: Botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006). *Curr Med Chem.* 16(26), 3414-3468.
- [19] Harbone, J. B., 1994. *The flavonoids : Advances in research since 1986.* Ed° Chapman & Hall, London.
- [20] Ahmadu, A. A., Zezi, A. U., Yaro, A. H., 2007. Anti-diarrheal activity of the leaf extracts of *Daniellia oliveri* hutch and dalz [Fabaceae] and *Ficus sycomorus* miq [Moraceae]. *Afr J Tradit Compliment Altern Med.* 4, 524-528.
- [21] Wang, Y., Gho, W. M., Chan, F. L., Chen, S., Leung, L. K., 2008. The red clover (*Trifolium pratense*) isoflavone biochanin A inhibits aromatase activity and expression. *Brit J Nutr.* 99, 303-310.
- [22] Redko, F., Clavin, M. L., Weber, D., Ranea, F., Anke, T., Martino, V., 2007. Antimicrobial isoflavonoids from *Erythrina crista galli* infected with *Phomopsis* sp. *Z Naturforsch C.* 62,164-168.
- [23] Spichiger, R. E., Savolainen, V. V., Figeat, M., 2000. *Botanique systématique des plantes à fleurs.* Ed. Presse polytechniques et universitaires Romandes, Lausanne.
- [24] Gherraf, N., Zellagui, A., Mohamed, N. S., Hussien, T. A, Mohamed, T. A., Hegazy, M. E., Rhouati, S., Moustafa, M. F, El-Sayed, M. A, Abou El-Hamd, M. H., 2010.

- Triterpenes from *Euphorbia rigida*. Pharmacogn Res. 2(3), 159-162.
- [25] Awaad, A. S., Abdalqawi, M. S., Kenawi, A., Monerah, R. A., Rehab, S., Zain M. E., 2016. Pharmacological activities for the extract and isolated compounds of *Euphorbia cuneata* VHL. Int J Pharm Biol Sci. 5(1), 319-331.
- [26] Haba, H., Lavaud, C., Harkat, H., Magid, A. A., Marcourt, L., Benkhaled, M., 2007. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. Phytochemistry 68, 1255-1260.
- [27] Haba, H., Lavaud, C., Marcourt, L., Long, C., Harkat, H., Benkhaled, M., 2009. *Ent*-abietane diterpenoids from *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. Biochem Syst Ecol. 37, 504-508.
- [28] Haba, H., Lavaud, C., Magid, A. A., Marcourt, L., Benkhaled, M., 2009. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia retusa*. J Nat Prod. 72, 1258-1264.
- [29] Haba, H., Marcourt, L., Benkhaled, M., Long, C., 2013. Minor *Ent*-abietane diterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. Nat prod commun. 8, 1519-1522.
- [30] Aichour, S., Haba, H., Benkhaled, M., Harakat, D., Lavaud, C., 2014. Terpenoids and other constituents from *Euphorbia bupleuroides*. Phytochem Lett. 10, 198-203.
- [31] Benabdelaziz, I., 2015. Etude chimique des espèces *Helianthemum sessiliflorum* et *Euphorbia pterococca*. Thèse de doctorat en sciences, Université Hadj Lakhdar-Batna-1, Algérie.
- [32] Aslanturk, O. S., Celik, T. A., 2013. Antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of extracts from medicinal plant *Euphorbia platyphyllos* L. J Med Plants Res. 7, 1293-1304.
- [33] Prabha, M. N., Ramesh, C. K., Kuppasta, I. J., Mankania, K. L., 2008. Studies on anti-inflammatory and analgesic activities of *Euphorbia tirucalli* L. Latex. Int J Chem Sci. 6(4), 1781-1787
- [34] Abdallah, E. M., 2014. Antimicrobial properties and phytochemical constituents of the methanol extracts of *Euphorbia retusa* Forssk. and *Euphorbia terracina* L. from Saudi Arabia. South Asian J Exp Biol. 4(2), 48-53.
- [35] Polhill, R. M., Raven, P. H., 1981. Advances in Legume Systematics. Part 1, Royal Botanic Gardens. Kew. 425 p.
- [36] Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., Lock, M., 2005. Legumes of the World, Royal Botanic Gardens, Kew. 577 p.

- [37] Skerman, P. J., 1982. Les légumineuses fourragères tropicales. *Collections de la FAO*, n°2, Italie. Rome.
- [38] Bado, B. V., 2002. Rôle des légumineuses sur la fertilité des sols ferrugineux tropicaux des zones guinéenne et soudanienne du Burkina Faso. Thèse de doctorat, Faculté des Sciences de l'Agriculture et de l'Alimentation. Université Laval, Québec. 197 p.
- [39] El rhaffari, L., Zaid, A., 2002. Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Actes du 4ème congrès Européen d'Ethnopharmacologie : origine des pharmacopées traditionnelles et élaboration des pharmacopées savantes. 295-304.
- [40] Adanson, M., 1763. Famille de plante (erinaceus, hérisson). Académie des Sciences, de la Société Royale de Londres, Censeur Royal. II Partie. Paris.
- [41] Angiosperm phylogeny group. 2003. An update of the AngiospermPhylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot J Linn Soc.* 141, 399-436
- [42] Maire, R., 1987. Flore de l'Afrique du Nord. 16. Paris.
- [43] Talavera, S., Aedo, C., Castroviejo, S., Romero Zarco, C., Saez, L., Salgueiro, F. J., Velayos, M., 1999. *Erinacea* Adans. Eds. *Flora Iberica-Madrid*. 7(1), 209-211.
- [44] Rafael, D. A., Vicent, G. M., Dra., 2010. Penélope MacDonald Lightbound. *Vocabulari [Forestal] català castellà anglès francès*. Université Vives. 157 p
- [45] Cauvet, C., 1925. Le chameau Tome 1 : anatomie, physiologie, race, vie et moeurs, élevage, alimentation, maladies, rôle économique. Ed. Baillière et fils, Paris, 784 p.
- [46] Floc'h, E. L., 1983. Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne Légumineuses. 308 p.
- [47] Biodiversité et diversité associée : 1.b les systèmes de gestion ancestraux des parcours: LES AGDALS. 2011, Promotion des systèmes de savoir et de culture, conservation dynamique des Systèmes Ingénieux du Patrimoine Mondial (SIPAM) Maroc. 16 p.
- [48] Birouk, A., 2009. Consultant national en en biodiversité et ressources phytogénétiques, Projet FAO/TCP/MOR/3201. 34 p.
- [49] Kinghorn, A. D., Balandrin, M. F., 1984. In: Pelletier, S.W. (Ed.), *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, vol. 2. Wiley-Inter science, New York, 105 p.

- [50] Garritano, S., Pinto, B., Giachi, I., Pistelli, L., Reali, D., 2005. Assessment of estrogenic activity of flavonoids from Mediterranean plants using an *in vitro* short-term test. *Phytomedicine*. 12, 143-147.
- [51] Orhan, I. E., Tosun, F., Tamer, U., Duran, A., Alan, B., Kök, F. A., 2011. Quantification of genistein and daidzein in two endemic *Genista* species and their antioxidant activity. *J Serb Chem Soc*. 1, 35-42.
- [52] Hesse, M., 2002. Alkaloids. Nature's Curse or Blessing. Wiley-VHC, Zürich, 413 p.
- [53] Greinwald, R., Bachmann, P., Witte, L., Czygan, F. C., 1990. Cytisine-12-carboxy-ethylester, a quinolizidine alkaloid From *laburnum watereri* and its occurrence in the Leguminosae. *Phytochemistry* 29 (11), 3553-3554.
- [54] Veen, G., Gunther, S., Greinwald, R., Bachmann, P., Witte, L., Kustrak, D., Czygan, F. C., 1992. Quinolizidine alkaloids in *Petteria ramentacea*. *Phytochemistry* 31(10), 3487-3490.
- [55] Abdel-Halim, O. B., 1995. (-)-6 $\alpha$ -hydroxylupanine, a lupin alkaloid from *Lygos raetam* Var. *Sarcocarpa*. *Phytochemistry* 40 (4), 1323-1325.
- [56] Kirch, J., Viet, M., Wätzig, H., Greinwald, P., Czygan, F., 1995. Alkaloidal variation in *Genista lobelia* s.l. (Fabaceae). *Biochem Syst Ecol*. 23 (6), 635-643.
- [57] Rensen, I. V., Wray, V., Witte, L., Canto, P., Greinwald, R., Veen, G., Veit, M., Czygan, F. C., 1994. Ester alkaloids of *Genista cinerea* sub-species *cinerea*. *Phytochemistry* 35(2), 421-424.
- [58] Nihei, K. I., Shibata, K., Kubo, I., 2002. (+)-2,3-Dehydro-10-oxo- $\alpha$ -isosparteine in *Uresiphitareversalis* larvae fed on *Cytisus monspessulanus* leaves. *Phytochemistry* 61, 987-990.
- [59] Pistelli, L., Bertoli, A., Giachi, I. I., Morelli, I. I., Rubiolo, P., Bicchi, C., 2001. Quinolizidine alkaloids from *Genista ephedroides*. *Biochem Syst Ecol*. 29 (2), 137-141
- [60] Kacem, N., Goossens, J. F., Duhal, N., Roumy, V., Hennebelle, T., Christen, P., Hostettmann, K., Rhouati, S., 2014. Determination of alkaloids in endemic *Genista quadriflora* Munby (Fabaceae). *Biochem Syst Ecol*. 56, 83-87.
- [61] Harborne, J. B., Williams, C. A. 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- [62] Forkmann, G., Heller, W., 1999. Biosynthesis of flavonoids. *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Pergamon: Oxford. 713-746.



- [63] Tahara, S., Ingham, J. L., Nakahara, S., Mizutani, J., Harborne, J. B., 1984. Fungitoxic dihydrofuranoisoflavones and related compounds in white *Lupin*, *Lupinus albus*. *Phytochemistry* 23 (9), 1889-1900.
- [64] Harborne, J. B., 1969. Chemosystematics of the leguminosae. Flavonoid and isoflavonoid patterns in the tribe *Genisteae*. *Phytochemistry* 8, 1449-1456.
- [65] Grayer-Barkmeijer, R. J., Ingham, J. L., Dewick, P. M., 1978. 5-O-Methylbiochanin A, a new isoflavone from *Echinopartum horridum*. *Phytochemistry* 17, 829-830.
- [66] Webster, G. L., 1994. Classification of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 81, 3-32.
- [67] Radcliffe-Smith, A., 2001. *Genera Euphorbiacearum*. Royal Botanic Gardens, kew.
- [68] Radcliffe-Smith, A., 1987. *Flora of tropical Africa*. Royal Botanic Gardens, kew.
- [69] Webster, G. L., 1987. The saga of the spurges: a review of classification and relationships in the Euphorbiales. *Bot J Linn Soc*. 94, 3-44.
- [70] Michaud, L. G., 1815. *Biographie universelle, ancienne et moderne, ou Histoire, par ordre alphabétique, de la vie publique et privée de tous les hommes qui se sont distingués par leurs écrits, leurs actions, leurs talents, leurs vertus ou leurs crimes*. Nouv. Ed, 513 p. Paris
- [71] Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J., 2009. *Sistemática vegetal: um enfoque filogenético*. 3ª Ed. Artmed, 612 p. Porto Alegre.
- [72] Defelice, R. P., 1967. *Guide pour l'étude de quelques plantes tropicales*. Gauthier-Villars. Paris.
- [73] Ozenda, P., 1991. *Flore et végétation du Sahara*. In : CNRS (Ed.), Paris.
- [74] Seigler, D. S., 1994. *Phytochemistry and systematics of the Euphorbiaceae*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. Vol 81(2). 380-401.
- [75] Palatnick, W., Tenenbein, M., 2000. Hepatotoxicity from castor bean ingestion in a child. *J Toxicol Clin Toxicol*. 38, 67-69.
- [76] Mampane, K. J., Joubert, P. H., Hay, I. T., 1987. *Jatropha curcas*: Use as a traditional Tswana medicine and its role as a cause of acute poisoning. *Phytother Res*. 1 (1) 50-51.
- [77] Van Damme, P. L. J., 2001. *Euphorbia tirucalli* for high biomass production, in: A. Schlissel and D. Pasternak (Eds.), *Combating desertification with plants*, Kluwer Academic Pub. 169-187 p.

- [78] Hirota, M., Suttajit, M., Suguri, H., Endo, Y., Shudo, K., Wongchai, V., Hecker, E., Fujiki, H., 1988. A new tumorpromoter from the seed oil of *Jatropha curcas* L., an intramolecular diester of 12-deoxy-16- hydroxyphorbol. *Cancer Res.* 48, 5800-5804.
- [79] Vogg, G., Mattes, E., Rothenburger, J., Hertkorn, N., Achatz, S., Sandermann, H. J., 1999. Tumor promoting diterpenes from *Euphorbia leuconeura* L. *Phytochemistry* 51 (2), 289-295.
- [80] Rizk, A. F. M., 1987. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. *Bot J Linn Soc.* 94, 293-326.
- [81] Tripathi, S. C., Srivastava, M., 2010. Ethnomedicinal flora of Euphorbiaceae used in dermatological problems. *Ind J Tradit Know.* 9 (2), 318-320.
- [82] Kirtikar, K. R., Bbasu, B. D., 1975. Indian medicinal plants Vol. I-IV, 2nd Edition. Bishan Singh Mahendrapal, Pal Singh, New Delhi.
- [83] Altundag, E., Ozturk, M., 2011. Ethnomedicinal studies on the plant resources of East anatolia, Turkey. *Procedia Soc Behav Sci.* 19, 756-777.
- [84] Mwine. J. T., Van Damme, P., 2011. Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *Review J Med Plants Res.* 5, 652-662.
- [85] Bellakhdar, J., 1997. La pharmacopée Marocaine traditionnelle, Ibis Press, France.
- [86] Davis, C. C., Latvis, M., Nickrent, D. L., Wurdack, K. J., Baum, D. A., 2007. Floral gigantism in *Rafflesiaceae*. *Science.* 315(5820), 1812.
- [87] Michel, H., Georges, C., 2005. Le jardin guyanais inventaire des plantes cultivées et des adventices des jardins de guyane française. *J Bot Soc.* 29, 3-40. France.
- [88] Govaerts, R., Fordin., D. G., Radcliffe-Smith, A., 2000. World checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae). Vol 4, The Royal Botanic Gardens, Kew.
- [89] Carlquist, S. J., 1961. Comparative plant anatomy: A guide to taxonomic and evolutionary application of anatomical data in angiosperms. Holt, Rinehart & Winston, New York.
- [90] Aldhebiani, A. 1., Jury, S., 2013. Anatomical studies on the genus *Euphorbia* L. Saudi Arabia (Subgenera: *Triucalli*, *Ermophyton*, *Esula* and *Chamaesyce*). *Int Res J Plant Sci.* 4(6), 168-191.
- [91] Jacques, F., 1997. Flore de la Polynésie française : Cannabaceae, Cecropiaceae, Euphorbiaceae, Moraceae, Piperaceae, Ulmaceae, Urticaceae. Paris: ORSTOM,

- (34), 393 p.
- [92] Bisby, F., 2013. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life.
- [93] Debeaux, J. O., 1984. Flore de la Kabylie du Djurdjura, ou, Catalogue méthodique et raisonné de toutes les plantes vasculaires et spontanées observées jusqu'à ce jour dans cette contrée. Ed. P. Klincksieck. 325 p. Paris.
- [94] Gunda, B., 1966. Fish poisoning in the carpathian area and in the balkan peninsula. Ethnological Institute of the University, Debrecen, Hungary and University of California. Special Publications. 1-33.
- [95] Lanzotti, V., Barile, E., Scambia, G., Ferlini, C., 2015. Cyparissins A and B, jatrophone diterpenes from *Euphorbia cyparissias* as Pgp. inhibitors and cytotoxic agents against ovarian cancer cell lines. *Fitoterapia*, 104, 75-79.
- [96] Wang, L., Zang, Z., Wang, Y. F., Huang, S. X., Cao, P., Zhao, Y., 2015. Two new myrinsol diterpenoids from *Euphorbia dracunculoides* Lam. *Chin Chem Lett.* 26, 121-123.
- [97] Wang, L., Zang, Z., Zhang, J., Wu, X., Huang, S., Cao, P., Zhao Y., 2015. A new premyrsinane-type diterpenoid polyester from *Euphorbia dracunculoides* Lam. *Rec Nat Prod.* 9(3), 374-378.
- [98] Wang, L., Cao, P., Zang, Z., Ma, Y. T., Liu, F. Y., Li, F., Wu, X., Huang, S. X., Zhao, Y., 2015. Two new triterpene rhamnosides from *Euphorbia dracunculoides* Lam. *Phytochem Lett.* 12, 168-172.
- [99] Ghanadian, M., Saeidi, H., Aghaei, M., Rahiminejad, M. R., Ahmadi, E., Ayatollahi, S. M., Choudhary, M. I., Bahmani, B., 2015. New jatrophone diterpenes from *Euphorbia osyridea* with proapoptotic effects on ovarian cancer cells. *Phytochem Lett.* 12, 302-307.
- [100] El-sherei, M. M., Islam, W. T., El-Dine, R. S., El-Toumy, S. A., Ahmed, S. R., 2015. Phytochemical investigation of the cytotoxic latex of *Euphorbia cooperi* N.E.Br. *Aust J Basic and Appl Sci.* 9(11), 488-493.
- [101] ELhassan, G. O. M., Adhikari, A., Abdalla, O. M., Shukrulla, A., Khalid, A., Choudhary, M. I., Mesaik, M. A., Yagi, S., 2015. Chemical constituents of *Euphorbia polyacantha* Boiss. and their immunomodulatory properties. *Rec Nat Prod.* 9(1), 146-152.
- [102] Shakera, K. H., Al shehria, B. M., Oteefa, M. D. Y., Mahmoud, M. F., 2015. Antioxidant compounds from *Euphorbia schimperianas* Scheele in Aseer region,

- Saudi Arabia. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 32(1), 117-122.
- [103] Zare, S., Ghaedi, M., Miri, R., Heiling, S., Asadollahi, M., Baldwin, T. I, Jassbi, A. R., 2015. Phytochemical Investigation on *Euphorbia macrostegia* (Persian woods purge). *Iran J Pharm Res.* 14 (1), 243-249.
- [104] Kainsa, S, Singh, R., 2016. Flavan-3-ol isomers isolated from *Euphorbia thymifolia* Linn. *Pharmacogn Commn.* 6(1), 28-33.
- [105] Farozi, A., Banday, J. A., Shah, A. S., 2015. Genicunolide A, B and C: three new triterpenoids from *Euphorbia geniculata*. *Beilstein J Org Chem.* 11, 2707-2712.
- [106] Geng, D., Ma, X., Weng, L., Yi, L., Han, Y., Yang, X., 2015. New acetophenone trimer from roots of *Euphorbia ebracteolata*. *Open Chem Eng J.* 9, 67-70.
- [107] Hu, J., Li, H., Mao, X., Shi, X., 2016. Neolignans from the ethanol extract of *Euphorbia antiquorum*. *Chem Nat Compd.* 52 (1), 47-49.
- [108] Lee, J. W., Lee, C., Jin, Q., Jang, H., Lee, D., Lee, H. J., Shin, J. W., Han, S. B., Hong, J. T., Kim, Y., Lee, M. K., Hwang, B. Y., 2016. Diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana* with inhibitory effects on nitric oxide production. *J Nat Prod.* 79(1), 126-131.
- [109] Li, E. T., Liu, K. H., Zang, M. H., Zhang, X. L., Jiang, H. Q., Zhou, H. L., Wang, D. Y., Liu, J. G., Hu, Y. L., Wu, Y., 2015. Chemical constituents from *Euphorbia hirta*. *Biochem Syst Ecol.* 62, 204-207.
- [110] Xu, W. H., Shen, Y. H., Liang, Q., Zhao, P., 2015. New coumarin derivative from *Euphorbia wallichii*. *Nat Prod Res.* 29(19), 1860-1864.
- [111] Ndam, L. M., Mih, A. M., Tening, A. S., Fongod, A. G. N., Temenu, N. A., Fujii, Y., 2016. Phytochemical analysis, antimicrobial and antioxidant activities of *Euphorbia golondrina* L.C. Wheeler (Euphorbiaceae Juss.): an unexplored medicinal herb reported from Cameroon. *Springer Plus.* 5(1), 264.
- [112] Hassana, G. F., Omera, M. A., Babadoust, S., Najata, D. D., 2014. Flavonoids from *Euphorbia condylocarpa* roots. *Int J Chem Biochem Sci.* 6, 56-60.
- [113] Song, Y., Jeong, S. W., Lee, W. S., Park, S. Kim, Y. H., Kim, G. S., Lee, S. J., Jin, J. S., Kim, C. Y., Lee, J. E., Ok, S. Y., Bark, K. M., Shin, S. C., 2014. Determination of polyphenol components of Korean prostrate spurge (*Euphorbia supina*) by using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: overall contribution to antioxidant activity. *J Anal Methods Chem.* 2014, 1-8.

- [114] Smara, O., Julia, A., Moral-Salmi, C., Vigor, C., Vercauteren, J., Legseir, B., 2014. Flavonoids from *Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter. *J Life Sci.* 8 (6), 544-551.
- [115] Yu, O., Jez, J. M., 2008. Nature's assembly line: biosynthesis of simple phenylpropanoids and polyketides. *Plant J.* 54, 750-762.
- [116] Yu, O., Shi, J., Hession, A. O., Maxwell, C. A., McGonigle, B., Odell, J. T., 2003. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed. *Phytochemistry* 63,753-763
- [117] Li, X., Gao, P., Cui, D., Wu, L., Parkin, I., Saberianfar, R., Menassa, R., Pan, H. Y., Westcott, N., Gruber, M. Y., 2011. The arabidopsis TT<sub>19-4</sub> mutant differentially accumulates proanthocyanidin and anthocyanin through A 3' amino acid substitution in glutathione S-transferase. *Plant Cell Environ.* 34, 374–388.
- [118] Austin, M. B., Noel, J. P., 2003. The chalcone synthase super family of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep.* 20(1),79-110.
- [119] Jez, J. M., Bowman, M. E., Noel, J. P., 2002. Role of hydrogen bonds in there action mechanism of chalcone isomerase. *Biochem.* 41, 5168-5176.
- [120] Steele, C. L., Gijzen, M., Qutob, D., Dixon, R. A., 1999. Molecular characterization of the enzyme catalyzing the aryl migration reaction of isoflavonoid biosynthesis in soybean. *Arch Biochem Biophys.* 367(1),146-150.
- [121] Jung, W., Yu, O., Lau, S. M., O'Keefe, D. P., Odell, J., Fader, G., McGonigle, B., 2000. Identification and expression of isoflavone synthase, the key enzyme for biosynthesis of isoflavones in legumes. *Nature Biotechnol.* 18, 208-212.
- [122] Akashi, T., Aoki, T., Ayabe, S., 2005. Molecular and biochemical characterization of 2-hydroxyisoflavanone dehydratase. In volvement of carboxyl esterase-like proteins in leguminous isoflavone biosynthesis. *Plant Physiol.* 137, 882-891.
- [123] Iwashina, T., 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J Plant Res.* 113, 287-299.
- [124] Dewick, P. M., 1993. Isoflavonoids. In: Harborne JB (Ed) *The Flavonoids. Advances in research since 1986.* Chapman and Hall, London. 117-238 pp.
- [125] Tahara, S., Ibrahim, R. K., 1995. Prenylated isoflavonoids-an update. *Phytochemistry* 38(5), 1073-1094.
- [126] Okamoto, Y., Suzuki, A., Ueda, K., Ito, C., Itoigawa, M., Furukawa, H., Nishihara, T., Kojima, N., 2006. Anti-Estrogenic Activity of prenylated isoflavones from *Millettia pachycarpa*: implications for pharmacophores and unique mechanisms. *J*

- Health Sci. 52(2), 186-191.
- [127] Vitale, D. C., Piazza, C., Melilli, B., Drago, F., Salomone, S., 2013. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 38(1), 15-25.
- [128] Miadokova, E., 2009. Isoflavonoids – an overview of their biological activities and potential health benefits. *Interdisc Toxicol.* 2(4), 211-218.
- [129] Wyman, J. G., Nan-Etten, H. D., 1978. Antibacterial activity of selected isoflavonoids. *Phthopathology.* 68, 583-589.
- [130] Dhayakaran, R. P. A., Neethirajan, S., Xue, J., Shi, J., 2015. Characterization of antimicrobial efficacy of soy isoflavones against pathogenic biofilms. *LWT Food Sci Technol.* 63, 859-865.
- [131] Tanaka, H., Sato, M., Fujiwara, S., Hirata, M., Etoh, H., Takeuchi, H., 2002. Antibacterial activity of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol.* 35(6), 494-498.
- [132] Anderson, J. W., Johnstone, B. M., Cook-Newell, M. E., 1995. Meta-Analysis of the Effects of soy protein in take on serum lipids. *N Engl J Med.* 333(5), 276-282.
- [133] Wang, W., He, Y., Xu, P., You, Q., Xiao, H., Xiang, H., 2015. Synthesis and biological evaluation of isoflavone amide derivatives with antihyperlipidemic and preadipocyte antiproliferative activities. *Bioorg Med Chem.* 23(15), 4428-4433.
- [134] Danciu, C. T., Soica, C., Csanyi, E., Ambrus, R., Feflea, S., Peev, C., Dehelean, C., 2012. Changes in the anti-inflammatory activity of soy isoflavonoid genistein versus genistein in incorporated in two types of cyclodextrin derivatives. *Chem Cent J.* 6, 58.
- [135] Feng, S., Hao, J., Xu, Z., Chen, T., Qiu, S. X., 2012. Polyprenylated isoflavanone and isoflavonoids from *Ormosia henryi* and their cytotoxicity and anti-oxidation activity. *Fitoterapia.* 83(3), 161-165.
- [136] Hiep, N. T., Kwon, J., Kim, D. W., Hwang, B. Y., Lee, H. J., Mar, W., Lee, D., 2015. Isoflavones with neuroprotective activities from fruits of *Cudrania tricuspidata*. *Phytochemistry* 111, 141-148.
- [137] Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B., 1970. The systematic identification of flavonoids springer, Berlin. 169 -261 p.
- [138] Markham, K. R., Mabry, T. J., 1975. Ultraviolet-Visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids. In: *The Flavonoids*. Harborne, J., Mabry, T. J., Mabry, H. (eds.). Chapman and Hall, London. 45-77 p.

- [139] Jha, H. C., Zilliken, F., Breitmaier, E., 1980. Carbon-13 chemical shift assignments of chromones and isoflavones. *Can J Chem.* 58, 1211.
- [140] Hassner, A., 2008. Synthesis of heterocycles via cycloadditions II., *Top Heterocycl Chem*, Vol. 12., p 159.
- [141] Chuang, N. C., Chuang, L. W. C., Yeh M. C. P., 1995. Transition metal cation salts in organic synthesis. *J Chin Chem Soc.* 42(4), 713-734.
- [142] Mahendra, A. A., Bandara, G. K., Rohinie, G. A., Disala, J. C., 2012. Studies on the composition and standardization of “Bakuchi Oil”, an ayurvedic medicinal oil prepared from *Psoralea corylifolia* L. used in the treatment of vitiligo. *Int J Res Ayurveda Pharm.* 3(3), 411-414.
- [143] Tjahjandarie, T. S., Tanjung, M., 2015. Antiplasmodial isoprenylated flavonoids from the stem bark of *Erythrina ovalifolia* Roxb. *Pharm Lett.* 7 (2), 35-39.
- [144] Huang, K. F., Hsu, C. J., 2001. Constituents of stem bark of *Erythrina arborescens*. *J Chin.* 12(1), 61-67.
- [145] Nde, C. B. M., Njamen, D., Fomum, S. T., Wandji, J., Simpson, E., Clyne, C., Vollmer, G., 2012. *In vitro* estrogenic activity of two major compounds from the stem bark of *Erythrina lysistemon* (Fabaceae). *Eur J Pharmacol.* 674, 87-94.
- [146] Nkengfack, A. E., Azebaze, A. G. B., Waffo, A. K., Fomum, Z. T., Meyer, M., Heerden, R. F., 2001. Cytotoxic isoflavones from *Erythrina indica*. *Phytochemistry* 58, 1113-1120.
- [147] Matsuda, H., Yoshida, K., Miyagawa, K., Asao, Y., Takayama, S., Nakashima, S., Xu, F., Yoshikawa, M., 2007. Retonoids and flavonoids with anti-invasion of HT1080, anti-proliferation of U937, and differentiation-inducing activity in HL-60 from *Erycibe expansa*. *Bioor Med Chem.* 15 (3), 1539-1546.
- [148] Rahman, M. Z., Rahman, M. S., Kaiser, A., Housain, A., Rashid, M. A., 2010. Bioactive isoflavones from *Erythrina variegata* L. *Turk J Pharm Sci.* 7 (1), 21-28.
- [149] Amen, Y. M., Marzouk, A. M., Zaghoul, M. G., Afifi, M. S., 2013. Bioactive compounds from *Tipuana tipu* growing in Egypt. *J Am Sci.* 9(10), 334-339.
- [150] Sato, M., Tanaka, H., Tani, N., Nagayama, M., Yamaguchi, R., 2006. Different antibacterial actions of isoflavones isolated from *Erythrina poeppigiana* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol.* 43, 243-248.
- [151] Desta, Z. Y., Sewald, N., Majinda, R. R. T., 2014. New flavonoids from the stem bark of *Erythrina caffra* Thunb. *Nat Prod Res.* 28(9), 667-673.

- [152] Tanaka, H., Tanaka, T., Etoh, H., Watanabe, N., Ahmad, M., Qurashi, I., Khan, M. R., 1998. Two New Isoflavones from *Erythrina suberosa* var. *glabrescences*. *Heterocycles*. 48, 2661-2667.
- [153] Dai, J., Shen, D., Yoshida, W. Y., Parrish, S. M., Williams, P. G., 2012. Isoflavonoids from *Ficus benjamina* and their inhibitory activity on BACE1. *Planta Med*. 78(12), 1357-1362.
- [154] Wang, F., Li, X. L., Wei, G. Z., Ren, F. C., Liu, J. K., 2013. New isoflavonoids from *Erythrina arborescens* and structure revision of anagyroidisoflavone A. *Nat Prod Bioprospect*. 3(5), 238-242.
- [155] Tiana, X. M., Chena, S. Z., Tang, L., Tu, P. F., 2008. Three new isoflavonoids from the aerial parts of *Ammopiptanthus mongolicus*. *Helv chim Acta*. 91, 1015-1022.
- [156] Erdemoglu, N., Tosun, F., Eroglu, Y., 2006. LC-MS analysis of daidzein in the Turkish *Genista* species. *Chem Nat Compd*. 42, 517.
- [157] Choi, E. J., Kim, G. K., 2013. Antiproliferative activity of daidzein and genistein may be related to ER $\alpha$ /c-erbB-2 expression in human breast cancer cells. *Mol Med Reports*. 7, 781-784.
- [158] Boik, J., 1996. Dietary non-nutrient factors and their effects on cancer. In *Cancer and Natural Medicine: A Textbook of Basic Science and Clinical Research*; Oregon Medical Press, Princeton, MN. 315 p.
- [159] Naim, M., Gestetner, B., Bondi, A., Birk, Y., 1976. Antioxidative and antihemolytic activities of soybeans isoflavones. *J Agric Fd Chem*. 24, 1174.
- [160] Shibata, S., Murakami, T., Nishikawa, Y., Harada, M., 1959. The constituents of *Pueraria* root. *Chem Pharm Bull*. 7, 134.
- [161] Hegnauer, R., Grayer-Barkmeijer, R. J., 1993. Relevance of seed polysaccharides and flavonoids for the classification of the Leguminosae: a chemotaxonomic approach. *Phytochemistry* 34(1), 3-16.
- [162] Tosun, F., Erdem, C. K., Eroglu, Y., 2003. Determination of genistein in the Turkish *Genista* L. species by LC-MS. *Pharmazie*. 58 (8), 549-550.
- [163] Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J. A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 138 (3), 863-870.



- [164] Sarkar, F. H, Li, Y., 2002. Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev.* 21, 265-280.
- [165] Perabo, F. G., Von-Löw, E. C., Ellinger, J., Von-Rücker, A., Müller, S. C, Bastian, P. J., 2008. Soy isoflavone genistein in prevention and treatment of prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 11(1), 6-12.
- [166] Lazaro, M. L., Cordero, C. M., C., Guerra, F. I., Gonzalez, M. J. A., 1998. Isoflavone glucoside from *Retama sphaerocarpa* boissier. *Phytochemistry* 48 (2), 401-402.
- [167] Heerden, F. R. V., Brandt, E. V., Roux, D. G. 1980. Synthesis of the pyrano-isoflavonoid, heminitidulan; isoflavanoid and rotenoid glycosides from the bark of *Dalbergia nitidula* Welw. ex Bak. *J Chem Soc Perkin Trans 1.* 11, 2463-2469.
- [168] Pistelli, L., Bertoli, A., Giachi, I., Manunta, A., 1998. Flavonoids from *Genista ephedroides*. *J Nat Prod.* 61(11), 1404-1406.
- [169] Rensen, I. V., Veit, M., Wray, V., Czygan, F. C., 1995. Genistein-C-Glucosides from *Genista cinerea*. *Nat Prod Letts.* 6(3), 203-207
- [170] Antosiak, A., Milowska, K., Maczynska, K., Rozalska, S., Gabryelak, T., 2017. Cytotoxic activity of genistein-8-C-glucoside form *Lupinus luteus* L. and genistein against human SK-OV-3 ovarian carcinoma cell line. *Med Chem Res.* 26(1), 64-73.
- [171] Zavodnik, L. B., Shkodich, A. P., Wielanek, M., Egorov, A. I., Zavodnik, I. B., Popov, I. U.V., Ovchinnikov, V. A., Laman, N. A., Buko, V. U., 2006. Antioxidative effects of isoflavon genisteine-8-C-glycoside *in vitro* and *in vivo*. *Eksp Klin Farmakol.* 69(1), 48-52.
- [172] Jesus, A. R., Dias, C., Matos, A. M., de-Almeida, R. F., Viana, A. S., Marcelo, F., Ribeiro, R. T., Macedo, M. P., Airoldi, C., Nicotra, F., Martins, A., Cabrita, E. J., Jiménez-Barbero, J., Rauter, A. P., 2014. Exploiting the therapeutic potential of 8- $\beta$ -D-Glucopyranosylgenistein: synthesis, antidiabetic activity, and molecular interaction with islet amyloid polypeptide and amyloid  $\beta$  -Peptide (1-42). *J Med Chem.* 57 (22), 9463-9472.
- [173] Rucinska, A., Kirko, S., Gabryelak, T., 2007. Effect of the phytoestrogen, genistein-8-C-glucoside, on Chinese hamster ovary cells *in vitro*. *Cell Biol Int.* 31, 1371-1378.
- [174] Sato, S., Hiroe, K., Kumazawa, T., Jun-ichi, O., 2006. Total synthesis of two isoflavone C-glycosides: genistein and orobol 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosides. *Carbohydr Res.* 341(9), 1091-1095.

- [175] Kerkatou, M., Menad, A., Sarri, D., León, F., Brouard, I., Bouldjedj, R., Chalard, P., Ameddah, S., Benayache, S., Benayache, F., 2013. Secondary metabolites from *Genista aspalathoides* Lamk ssp. *aspalathoides* M. Pharm Lett. 5 (5), 285-289.
- [176] Ozimina, I. I., Bandyukova, V. A., 1985. Compactin-a novel glycoside of orobol from *Genista compacta*. Khim Prir Soedin. 507-510.
- [177] Kawaguchi, K., Alves, S. D. M., Watanabe, T., Kikuchi, S., Satake, M., Kumazawa, Y., 1998. Colony stimulating factor-inducing activity of isoflavone C-glucosides from the bark of *Dalbergia monetaria*. Planta Med. 64, 653-655.
- [178] Hyun-Jung, L., Oh-Kyu, L., Yeong-Han, K., Don-Ha, C., Ha-Young, K., Hyeon-Yong, L., Ki-Hyon, P., Hak-Ju, L., 2006. A new flavanone from the wood of *Amorpha fruticosa* L. Bull Korean Chem Soc. 27(3), 426-428.
- [179] Sheela, Q. R. X., Arockiasamy, P., Kanmani, R., Charles, A., Ramani, A. V., 2011. Isolation and characterization of flavanone compounds from the leaf extract of *Polygonum barbatum*. J Chem Pharm Res. 3(2), 762-764.
- [180] Singh, V. P., Yadav, Y., Pandey, V. B., 1999. Flavanone glycosides from *Alhagi pseudalhagi*. Phytochemistry 51(4), 587-590.
- [181] Hammami, S., Ben Jannet, H., Bergaoui, A., Ciavatta, L., Cimino, G., Mighri, Z., 2004. Isolation and structure elucidation of a flavanone, a flavanone glycoside and vomifoliol from *Echiochilon fruticosum* growing in Tunisia. Molecules 9, 602-608
- [182] Grisebach, V. H., Patschke, L., 1961. Zur Biogenese der Flavonoide IV. Mitt. : 2'.4.4'.6'-Tetrahydroxy-chalkon-2'-glucosid- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$  als vorstufe für quercetin und cyanidin. Z. Naturforschg. 645-647.
- [183] Kang, T. H., Jeong, S. J., Ko, W. G., Kim, N. Y., Lee, B. H. Inagaki, M., Miyamoto, T., Higuchi, R., Chul-Kim, Y., 2000. Cytotoxic lavandulyl flavanones from *Sophora flavescens*. J Nat Prod. 63(5), 680-681.
- [184] Liu, L., Shi, S., Zhao, H., Yu, J., Jiang, X., Chen, X., 2014. Selective fishing and analysis of xanthine oxidase binders from two Fabaceae species by coupling enzyme functionalized core-shellmagnetic nanoparticles with HPLC–MS. J Chromatography B. 15, 945- 946.
- [185] Recourt, K., Schripsema, J., Kijne, J. W., van-Brussel, A. A., Lugtenberg, B. J. 1991. Inoculation of *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* results in release of *nod* gene activating flavanones and chalcones. Plant Mol Biol. 16 (5), 841-852.

- [186] Mersereau, J. E., Levy, N., Staub, R. E., Baggett, S., Zogric, T., Chow, S., Ricke, W. A., Tagliaferri, M., 2008. Liquiritigenin is a plant-derived highly selective estrogen receptor  $\beta$ -agonist. *Mol Cell Endocrinol.* 283,49-57.
- [187] Gaur, R., Kumar, S., Trivedi, P., Bhakuni, R. S., Bawankule, D. U., Pal, A., Shanker, K., 2010. Liquiritigenin derivatives and their hepatoprotective activity. *Nat Prod Commun.* 5, 1243-1246.
- [188] Alrushaid, S., Davies, N. D., Martinez, S. E., Sayre, C. L., 2016. Pharmacological characterization of liquiritigenin, a chiral flavonoid in licorice. *Res Pharm Sci.* 11(5), 355-365.
- [189] Kim, Y. W., Zhao, R. J., Park, S. J., Lee, J. R., Cho, I. J., Yang, C. H., Kim, S. G., Kim, S. C., 2008. Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *Br J Pharmacol.* 154(1), 165-173.
- [190] Gaura, R., Yadav, K. S., Verma, R. K., Yadav, N. P., Bhakunia, R. S., 2014. *In vivo* anti-diabetic activity of derivatives of isoliquiritigenin and liquiritigenin. *Phytomedicine.* 21, 415-422.
- [191] Kim, Y. W., Ki, S. H., Lee, J. R., Lee, S. J., Kim, C. W., Kim, S. C., Kim, S. G., 2006. Liquiritigenin, an aglycone of liquiritin in *Glycyrrhizae radix*, prevents acute liver injuries in rats induced by acetaminophen with or without buthionine sulfoximine. *Chem-Bio Interac.* 161 (2), 125-138.
- [192] Liu, R. T., Zou, L. B., Lü, Q. J., 2009. Liquiritigenin inhibits Abeta(25-35)-induced neurotoxicity and secretion of Abeta(1-40) in rat hippocampal neurons. *Acta Pharmacol Sin.* 30(7), 899-906.
- [193] Joray, M. B., Trucco, L. D., González, M. L., Napal, G. N. D., Palacios, S. M., Bocco, J. L., Carpinella, M. C., 2015. Antibacterial and cytotoxic activity of compounds isolated from *Flourensia oolepis*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015, 912484.
- [194] Dreyer, D. L., 1978. Kaempferol methyl ethers from flowers of *Dodonaea viscosa*. *Rev Latinoam Quim.* 9, 97-98.
- [195] Canuto, K. M., Lima, M. A. S., Silveira, E. R., 2010. Amburosides C-H and 6-*O*-protocatechuoyl coumarin from *Amburana cearensis*. *J Braz Chem Soc.* 21 (9), 1746-1753.

- [196] Banskota, A. H, Tezuka, Y., Adnyana, I. K., Xiong, Q., Hase, K., Tran. K. Q., Tanaka, K., Saiki, I., Kadota, S., 2000. Hepatoprotective effect of *Combretum quadrangulare* and its constituents. Biol Pharm Bull. 23(4), 456-460.
- [197] De-Meyer, N., Haemers, A., Mishra, L., Pandey, H.K., Pieters, L.A., Vandenberghe, D. A., Vlietinck, A. J., 1991. 4'-Hydroxy-3-methoxyflavones with potent antipicornavirus activity. J Med Chem. 34(2),736-746.
- [198] Costa-Lotufo, L. V., Jimenez, P. C., Wilke, D. V., Leal, L. K. A. M., Cunha, G. M., Viana, G. S. B., 2003. Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* A. C. Smith. Z Naturforsch C. 58, 675-680.
- [199] Jia, Z., Zhao, Y., 1994. Four new furans from the roots of *Ligularia przewalskii*. J Nat Prod. 57(1), 146-150.
- [200] Bohlmann, F., Jakupovic, J., Ahmed, M., Grenz, M., Suding, H., Robinson, H., King, R., 1981. Germacranolides and diterpenes from *Viguiera* species. Phytochemistry 20, 113-116
- [201] Fraga, B. M., Hernandez, M. G., Mestres, T., Terrero, D., Arteaga, J. M., 1995. Nor-sesquiterpenes from *Teucrium heterophyllum*. Phytochemistry 39 (3), 617-619.
- [202] Erosa-Rejón, G., Peña-Rodríguez, L. M., Sterner, O., 2009. Secondary Metabolites from *Heliotropium angiospermum*. J Mex Chem Soc. 53(2), 44-47.
- [203] Cutillo, F., Dellagrecia, M., Previtera, L., Zarrelli, A., 2005. C13 Norisoprenoids from *Brassica fruticulosa*. Nat Prod Res. 19(2), 99-103.
- [204] Stuart, K. L., Coke, L. B., 1975. The effect of vomifoliol on stomatal aperture. Planta. 122(3), 307-310.
- [205] Yoshikawa, M., Shimada, H., Saka, M., Yoshizumi, S., Yamahara, J., Matsuda, H., 1997. Medicinal foodstuffs. V. Moroheiya. (1): Absolute stereostructures of corchoionosides A, B, and C, histamine release inhibitors from the leaves of Vietnamese *Corchorus olitorius* L. (Tiliaceae). Chem Pharm Bull. 45(3), 464-469
- [206] Ito, H., Kobayashi, E., Li, S. H., Hatano, T., Sugita, D., Kubo, N., Shimura, S., Itoh, Y., Tokuda, H., Nishino, H., Yoshida, T., 2002 . Antitumor activity of compounds isolated from leaves of *Eriobotrya japonica*. J Agric Food Chem. 50(8), 2400-2403.
- [207] Virtuoso, S., Davet, A., Dias, J. F. G., Cunico, M. M., Miguel, M. D., Oliveira, A. B., Miguel, O. G., 2005. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). Rev Braz Pharmacogn. 15(2), 137-142.

- [208] Silva, T. M. S., Camara, C. A., Lins, A. C. S., Agra, M. F., Silva, E. M. S., Reis, I. T., Freitas, B. M., 2006. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *J Food Comp Anal.* 19(6), 507-511
- [209] Lima, N. M., Andrade, J. I., Lima, K. C, Dos Santos F. N., Barison, A., Salomé, K. S., Matsuura, T., Nunez, C. V., 2013. Chemical profile and biological activities of *Deguelia duckeana* A.M.G. Azevedo (Fabaceae). *Nat Prod Res.* 27(4-5), 425-32.
- [210] Rodrigues, V. F., Oliveira, R. R., Vega, M. R., 2014. A new isocoumarin from *Cajanus cajan* (Fabaceae). *Nat Prod Commun.* 9(4), 493-494.
- [211] Olennikov, D. N, Tankhaeva, L. M., Partilkhaev, V. V., Rokhin, A. V., 2012. Chemical constituents of *Caragana bungei* shoots. *Rev Braz Pharmacogn.* 22(3), 490-496.
- [212] Saeidnia, S., Manayi, A., Gohari, A. R. Abdollahi, M., 2014. The Story of Beta-sitosterol- A Review. *European J Med Plants.* 4(5), 590-609.
- [213] Aissaoui, M., León, F., Brouard, I., Benayache, F., Benayache, S., 2014. Secondary metabolites from *Crotalaria saharae* (Fabaceae). *Pharm Lett,* 6 (1), 186-189.
- [214] Awouafack, M. D., McGaw, L. J., Gottfried, S., Mbouangouere, R., Tane, P., Spitteller, M., Eloff, J. N., 2013. Antimicrobial activity and cytotoxicity of the ethanol extract, fractions and eight compounds isolated from *Eriosema robustum* (Fabaceae). *Complement Altern Med.* 13 (1), 289.
- [215] Lee, J. H., Lee, J. Y., Park, J. H., Jung, H. S., Kim, J. S., Kang, S. S., 2007. Immunoregulatory activity by daucosterol, a beta-sitosterol glycoside, induces protective Th1 immune response against disseminated Candidiasis in mice. *Vaccine.* 25, 3834-3840.
- [216] Kun-Young, P., Jung, K. O., Rhee, S. H., Yung, H. C., 2003. Antimutagenic effects of *Doenjang* (Korean fermented soypaste) and its active compounds. *Mutat res.* 523-524.
- [217] Ghosal, S., 1985. Steryl glycosides and acyl steryl glycosides from *Musa paradisiaca*. *Phytochemistry* 24(8), 1807-1810.
- [218] Imam, M. Z., Akter, S., 2011. *Musa paradisiaca* L. and *Musa sapientum* L.: A Phytochemical and Pharmacological Review. *J Appl Pharm Sci.* 1(5), 14-20.
- [219] Hussain, S., Malik, F., Mahmood, S., 2014. An exposition of medicinal preponderance of *Moringa oleifera* (Lank.). *Pak J Pharm Sci.* 27(2), 397-403.

- [220] Nes, W. D., Norton, R. A., Benson, M., 1992. Carbon-13 NMR studies on sitosterol biosynthesized from [<sup>13</sup>C] Mevalonates. *Phytochemistry* 31(3), 805-811.
- [221] Ghosal, S., Saini, K. S., 1984. Sitoindosides I and II. Two new anti-ulcerogenic steryl acyl-glycosides from *Musa paradisiaca*. *J Chem Res.* 23, 965-975.
- [222] Guevara, A. P., Vargas, C., Sakurai, H., Fujiwara, Y., Hashimoto, K., Maoka, T., Kozuka, M., Ito, Y., Tokuda, H., Nishino, H. 1999. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. *Mutat Res.* 440(2),181-188.
- [223] Ferreira, M. J., Pinto, F. C., Ascenso, J. R., 2001. Cycloartane triterpenes from *Euphorbia tuckeyana*. *Nat Prod Lett.* 15(5), 363-369.
- [224] Ayatollahi, A. M, Ghanadian, M., Afsharypuor, S., Mesaik, M. A., Abdalla, O. M., Shahlaei, M., Farzandi, G., Mostafavi, H., 2011. Cycloartanes from *Euphorbia aellenii* Rech. f. and their Antiproliferative Activity. *Iran J Pharm Res.* 10(1), 105-112.
- [225] Kuang, X., Li, W., Kanno, Y., Mochizuki, M., Inouye, Y., Koike, K., 2014. Cycloartane-type triterpenes from *Euphorbia fischeriana* stimulate human CYP3A4 promoter activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 24(23), 5423-5427.
- [226] Mahato, S. B., Kundu, A. P., 1994. <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37(6), 1517-1575.
- [227] Yoshida, K., Hirose, Y., Imai, Y., Kondo, T., 1989. Conformational analysis of Cycloartenol, 24-Methylenecycloartanol and their derivatives. *Agric Biol Chem* 53 (7), 1901-1912.
- [228] Anjaneyulu, V., Prasad, K. H., Ravi, H., Connolly, J. D., 1985. Triterpenoids from *Mangifera indica*. *Phytochemistry* 24(10), 2359-2367.
- [229] Morgenstern, T., Bittner, M., Silva, M., Aqueveque, P., Jakupovic, J., 1996. Diterpenes and phloracetophenones from *Euphorbia portulacoides*. *Phytochemistry* 41(4), 1149-1153.
- [230] Inada, A., Murata, H., Inatomi, Y., Nakanishi, T., Darnaedi, D., 1997. Pregnanes and triterpenoid hydroperoxides from the leaves of *Aglaia grandis*. *Phytochemistry* 45(6), 1225-1228.
- [231] Xinping, H., Xiaobin, Z., Liping, D., Zhiwei, D., Wenhan, L., 2006. Cycloartane triterpenes from marine green alga *Cladophora fascicularis*. *Chin J Oceanol Limnol* 24(4), 443-448.

- [232] Nes, D. W., Koike, K., Jia, Z., Sakamoto, Y., Satou, T., Nikaido, T., Griffin, J. F., 1998. 9, 19-Cyclosterol analysis by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, crystallographic observations, and molecular mechanics calculations. *J Am Chem Soc* 120, 5970-5980.
- [233] Azimova, S. S., 2013. Natural Compounds (Cycloartane triterpenoids and glycosides) : Plant Sources, Structure and Properties. Springer New York Heidelberg Dordrecht London. P 547.
- [234] Öksüz, S., Gil, R. R., Chai, H., Pezzuto, J. M., Cordell, G. A., Ulubelen, A., 1994. A biologically active compounds from the Euphorbiaceae; 2. Two triterpenoids of *Euphorbia cyparissias*. *Planta Med.* 60(6), 594-596.
- [235] Öksüz, S., Ulubelen, A., Barla, A., Voelter, W., 2002. Terpenoids and aromatic compounds from *Euphorbia heteradena*. *Turk J Chem.* 26, 457-463.
- [236] Barla, A., Birman, H., Kultur, S., Öksüz, S., 2006. Secondary métabolites from *Euphorbia helioscopia* and their vasodepressor activity. *Turk J Chem.* 30(3), 325-332.
- [237] Lago, J. H. G., Roque, N. F., 2002. Cycloartane triterpenoids from *Guarea macrophylla*. *Phytochemistry* 60(4), 329-332.
- [238] Seo, S., Uomori, A., Yoshimura, Y., Takeda, K., Seto, H., Ebizuka, Y., Noguchi, H., Sankawa, U., 1988. Biosynthesis of sitosterol, cycloartenol and 24-methylene-cycloartanol in tissue cultures of higher plants and of ergosterol in yeast from  $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ - and  $[2-^{13}\text{C}^2\text{H}_3]$ -acetate and  $[5-^{13}\text{C}^2\text{H}_2]$ MVA. *J Chem Soc Perkin Trans* 8, 2407-2414.
- [239] Akihisa, T., Yasukawa, K., Yamaura, M., Ukiya, M., Kimura, Y., Shimizu, N., Arai, K., 2000. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. *J Agric Food Chem* 48,2313-2319.
- [240] Kpoviessi D. S. S., Accrombessi, G. C., Gbenou, J. D., Gbaguidi, F. A., Kossou, D. K., Moudachirou, M., Quetin-Leclercq, J. 2008. Cytotoxic activities of sterols and triterpenes identified by GC-MS in *Justicia anselliana* (NEES) T. anders active fractions and allelopathic effects on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) plant. *J Soc Ouest-Afr Chim* 13:59-67.
- [241] Rahier, A., Taton, M., Benveniste, P., 1989. Cycloeucalenol-obtusifoliol isomerase Structural requirements for transformation or binding of substrates and inhibitors. *Eur J Biochem.* 181(3), 615-626.

- [242] Kongkathip, N., Dhumma-upakorn, P., Kongkathip, B., Chawanoraset, K., Sangchomkaeo, P., Hatthakitpanichakul, S. 2002. Study on cardiac contractility of cycloeucalenol and cycloeucalenone isolated from *Tinospora crispa*. J Ethnopharm. 83, 95-99.
- [243] Rukachaisirikul, T., Saekee, A., Tharibun, C., Watkuolham, S., Suksamrarn, A., 2007. Biological activities of the chemical constituents of *Erythrina stricta* and *Erythrina subumbrans*. Arch Pharm Res. 30(11), 1398-1403.
- [244] Subden, R. E., Safe, L., Morris, D. C., Brown, G. R., Safe, S., 1977. Eburicol, lichesterol, ergosterol, and obtusifoliol from polyene antibiotic-resistant mutants of *Candida albicans*. Can J Microbiol. 23(6), 751-754.
- [245] Ekaprasada, M. T., Nurdin, H., Ibrahim, S., Dachriyanus, D., 2009. Antioxidant activity of methyl gallate isolated from the leaves of *Toona sureni*. Indo J Chem. 9(3), 457-460.
- [246] Lahlou, F. A., Hmimid, F., Loutfi, M., Bourhim, N., 2014. Antioxidant activity and quantification of phenolic compounds of *Euphorbia echinus*. Int J Pharm Pharm Sci, 6 (2), 357-360.
- [247] Da-Song, Y., Qiu-Xia, H., Yong-Ping, Y., Ke-Chun, L., Xiao-Li, L., 2014. Chemical constituents of *Euphorbia tibetica* and their biological activities. Chin J Nat Med. 12(1), 38-42.
- [248] Ahmed, U. V., Jassbi, A. R., 1999. New diterpenoids from *Euphorbia teheranica*. J Nat Prod, 62(7), 1016-1018.
- [249] An, R. B., Kwon, J. W., Kwon, T. O., Chung, W. T., Lee, H. S., Kim, Y. C., 2007. Chemical constituents from the whole plants of *Euphorbia supina* Rafin. Korean J Pharm, 38(3), 291-295.
- [250] Lee, S. H., Kim, J. K., Kim, D. W., Hwang, H. S., Eum, W. S., Park, J., Han, K. H., Oh, J. S., Choi, S. Y., 2013. Antitumor activity of methyl gallate by inhibition of focal adhesion formation and Akt phosphorylation in glioma cells. Biochim Biophys Acta. 1830(8), 4017-4029.
- [250] Choi, Y. H., Han, S. S., Lee, H. O., Baek, S. H., 2005. Biological activity of bioactive components from *Acer ginnala* Max. Bull Korean Chem Soc. 26(5), 1450-1452.
- [251] Kane, C. J. M., Menna, J. H., Sung, C. C., Yeh, Y. C., 1988. Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxy-benzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex



- virus *in vitro*, antiviral activity of methyl gallate and its derivatives. *Bio sci Rep*, 8: 1-8.
- [252] Chosson, E., Chaboud, A., Chulia, A. J., Raynaud, J., 1998. A phloracetophenone glucoside from *Rhododendron ferrugineum*. *Phytochemistry* 47, 87-88.
- [253] Murillo, R., Jakupovic, J., 1998. Glycosides from *Euphorbia aucherii*. *Ing Cienc Quim.* 18, 57-60.
- [254] Khan, S. A., Ahmed, B., Alam, T., 2006. Antihepatotoxic activity of some new chalcones containing 1,4-dioxane ring system. *Pak J Pharm Sci*, 19, 290-294.
- [255] De, P. T., Urones, J. G., Marcos, I. S., Basabe, P., Cuadrado., M. J. S., Moro, F. R., 1987. Triterpenes from *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry* 26(6), 1767-1776.
- [256] Zhang, B. B., Han, X. L., Joang, Q., Liao, Z. X., Wang, H. S., 2103. Cytotoxic cholestane-type and ergostane-type steroids from the aerial parts of *Euphorbia altotibetic*. *Steroids*, 78 (1), 38-43.
- [257] Ferreira, M. J. U., Ascenso, J. R., 1999. Steroids and a tetracyclic diterpene from *Euphorbia boetica*. *Phytochemistry* 51(3), 439-444.
- [258] Grisham, M. B., McCord, J. M., 1986. *Physiology of oxygen radicals*. Eds. Taylor, A. E., Matalon, S., Ward, P. A (Waverly Press, Baltimore). p 1-18.
- [259] Lehucher-Michel, M. P., Lesgards, J. F., Delubac, O., Stocker, P., Durand, P., Prost, M., 2001. Stress oxydant et pathologies humaines. Bilan et perspectives préventives. *Presse médicale*. Paris, France. 30(21), 1076-1081.
- [260] Ramonatxo, C. K., 2006. Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutr Clin Metabol.* 20, 165-177.
- [261] Marfak, A., 2003. Radiolyse gamma des flavonoïdes. Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de dépsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges. 220 p.
- [262] Boutabet, K., 2007. Etude pharmacochimique de l'extrait de propolis au cours d'un stress oxydatif rénal induit par la doxorubicine. Thèse de magistère de l'université de Jijel. 175 p.
- [263] Servais, S., 2002. Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'ozone: effets de l'âge et d'une supplémentation en Oméga-3. Thèse de doctorat de l'université de Claude Bernard. 163 p.

- [264] Fuorocci, S., 2006. Activités biologiques de composés de la famille des flavonoïdes: Approches par des méthodes de chimie quantique et de dynamique moléculaire. Thèse de doctorat de l'université de Nice sophia antipolis. 212 p.
- [265] Boyd, B., Ford, C., Koepke, M.C., Gary, K., Horn, E., Mcanalley, S., Mcanalley, B., 2003. Etude pilote ouverte de l'effet antioxydant d'ambrotose AOTM sur des personnes en bonne santé. *Glycoscience and Nutrition*. 4(6), 7.
- [266] Morel, Y., Barouki, R., 1999. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*. 342(3), 481-496.
- [267] Pincemail, J., Bonjean, K., Cayeux, K., Defraigne, J. O., 2002. Mécanismes physiologiques de la défense antioxydante. *Nutr Clin Metabol*. 16(4), 233-239.
- [268] Sorg, O., 2004. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality?. *Comptes Rendus Biologies*. 327(7), 649-662.
- [269] Atawodi, S. E., 2005. Antioxidant potential of African plants. *Afr J Biotechnol*. 4(2), 128-133.
- [270] Georgetti, S. R., Casagrande, R., Di-Mambro, V. M., Azzolini, A. E., Fonseca, M. J. V., 2003. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemilu-minescence method. *AAPS Pharm Sci*. 5 (2), 20.
- [271] Vansant, D. I. G., 2004. Radicaux libres et antioxydants: principes de base. Symposium «Antioxydants et alimentation». Institut Danone.
- [272] Goudable, J., Favier, A., 1997. Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nut Clin Metabol*. 11(2), 115-120.
- [273] Leopoldini, M., Russo, N., Toscano, M., 2011. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem*. 125(2), 288-306.
- [274] Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*. 58, 79-110.
- [275] Kaufmann, S. H. E., 1997. Host response to intracellular pathogens. Ed. Springer; R.G. Landes, New York. 345 p.
- [276] Billing, J., Sherman, P. W., 1998. Antimicrobial functions of spices: Why some like it hot. *Q Rev Biol*. 73(1), 3-49.
- [277] Raven, P. H., Georges, B. J., Kenneth, A. M. Jonathan B. L., 2011. Biologie. Ed De Boeck Supérieur. 1406 p.
- [278] Shockman, G. D., Barrett, J. F. 1983. Structure, function and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Ann Rev Microbiol*. 37, 501-527.

- [279] Graham, L. L., Beveridge, T. J., Nanninga, N., 1991. Periplasmic space and the concept of the periplasm. *Trends Biochem Sci.* 16(9), 328-329
- [280] Kaper, J. B., Nataro, J. P., Mobley, H. L., 2004. Pathogenic *Escherichia Coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2(2), 123-140.
- [281] Percival, S. L., 2004. *Microbiology of waterborne diseases*. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam. Boston, 480 p.
- [282] Bankier, R. G., 1965. *Staphylococcus albus*-a potential pathogen. *Can Med Assoc J.* 93(1), 38-39.
- [283] Mitchell, R. G., 1968. Classification of *Staphylococcus albus* strains isolated from the urinary tract. *J Clin Pathol.* 21(1), 93-96.
- [284] Namvar, A. E., Bastarahang, S., Abbasi, N., Ghehi, G. S., Farhadbakhtiarian, S., Arezi, P., Hosseini, M., Baravati, S. Z., Jokar, Z., Chermahin, S. G., 2014. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS Hyg Infect Control.* 9(3): Doc23.
- [285] Grimont, F., Grimont, P. A. D., 2006. The genus *Enterobacter*. *Prokaryotes.* 6:197-214.
- [286] Le-Minor, L., Veron, M., 1989. *Bactériologie Médicale*. Flam Med. Science, Paris, 333-318 ; 773-823.
- [287] Bergogne-Berezin, E., Dellamonica, P., 1995. *Antibiothérapie en pratique clinique*. Ed. Masson, Paris, 486 p.
- [288] Ulanowska, K., Majchrzyk, A., Moskot, M., Jakobkiewicz-Banecka, J., Wegrzyn, G., 2007. Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia.* 62(2), 132-135.
- [289] Wächter, G. A., Hoffmann, J. J., Furbacher, T., Blake, M. E., Timmermann, B. N., 1999. Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. *Phytochemistry* 52(8), 1469-1471.
- [290] Valsaraj, R., Pushpangadan, P., Smitt, U. W., Adsersen, A., Christensen, S. R. B., Sittie, A., Nyman, U., Nielsen, C., Olsen, C. E., 1997. New anti-HIV-1, antimalarial, and antifungal compounds from *Terminalia bellerica*. *J Nat Prod.* 60(7), 739-742.
- [291] Aganga, A. A., Mosase, K. W., 2001. Tannins content, nutritive value and dry matter digestibility of *Lonchocarpus cappassa*, *Ziziphus mucropata*, *Sclerocarya birrea*, *Kirkia acuminata* and *Rhus lancea* seeds. *Anim Feed Sci Technol.* 9, 107-113.

- [292] Pedneault, K., Leonhart, S., Angers, P., Gosselin, A., Ramputh, A., Arnason, J. T., Dorais, M., 2001. Influence de la culture hydroponique de quelques plantes médicinales sur la croissance et la concentration en composés secondaires des organes végétaux. Texte de conférence, 5ème colloque sur les produits naturels d'origine végétale, Université Laval Qc Canada. 1-5.
- [293] Haslam, E., 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible mode of action. *J Nat Prod.* 59(2), 205-215.
- [294] Hagerman, A. E., Riedl, K. M., Jones, G. A., Sovik, K. N., Ritchard, N. T., Hartzfeld, P. W., Riechel, T. L., 1998. High molecular weight plant polyphenolic (tannins) as biological antioxidant. *J Agric Food Chem.* 46(5), 1887-1892.
- [295] Bastos, D. H., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A., Cunha, I. B., Carvalho, P. O., Eberlin, M. N., 2007. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from Yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. *Molecules* 12(3), 423-432.
- [296] Prakash, D., Upadhyay, G., Singh, B. N., Singh, H. B., 2007. Antioxidant and free radical-scavenging activities of seeds and agri-wastes of some varieties of soybean (*Glycine max*). *Food Chem.* 104(2), 783-790.
- [297] Amič, D., Davidovič-Amič, D., Beslo, D., Trinajstić, N., 2003. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croat Chem Acta.* 76(1), 55-61.
- [298] De Pooter, H. L., Schamp, N., 1986. Comparaison of the volatils composition of some *Calamintha satureja* species. In: Progress in essential oil research. Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin. 139-150 p.
- [299] Soares, J. R., Dins, T. C. P., Cunha, A. P., Almeida, L. M., 1997. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. *Free Radic Res.* 26(5), 469-478.
- [300] Promden, W., Monthakantirat, O., Umehara, K., Noguchi, H., De-Eknamkul, W., 2014. Structure and antioxidant activity relationships of isoflavonoids from *Dalbergia parviflora*. *Molecules* 19(2), 2226-2237.
- [301] Ngakegni-Limbili, A. C., 2012. Etude de synergie des effets chimiques et biologiques des lipides de réserves et des huiles essentielles des fruits et graines saisonniers de la sous-région Afrique Centrale. Thèse de doctorat en Sciences des agroressources. Université de Toulouse.
- [302] Nishino, H., Tokuda, H., Satomi, Y., Masuda, M., Osaka, Y., Yogosawa, S., Wada, S., Mou, X. Y., Takayasu, J., Murakoshi, M., Jinnno, K., Yano, M., 2004. Cancer

- prevention by antioxidants. *Biofactors*. 22(1-4), 57-61.
- [303] Ceriello, A. M. D., Testa, R. M. D., 2009. Antioxidant anti-inflammatory treatment in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 32(2), 232–236.
- [304] Manson, J. E., Gaziano, J. M., Jonas, M. A., Hennekens, C. H., 1993. Antioxidants and cardiovascular disease: a review. *J Am Coll Nutr*. 12(4), 426-432.
- [305] Benzie, I. F. F., Strain, J. J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem*. 239, 70-76.
- [306] Li, H. B., Wong, C. C., Cheng, K. W., Chen, F., 2008. Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Sci Technol*. 385-390.
- [307] Siddhuraju, P., Becker, K., 2007. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chem*. 101(1), 10-19.
- [308] Jeong, S. M., Kim, S. Y., Kim, D. R., Jo, S. C., Nam, K. C., Ahn, D. U., Lee, S.C., 2004. Effects of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from *Citrus peels*. *J Agric Food Chem*. 52, 3389-3393.
- [309] Joseph, B., Raj, S. J., 2010. Phytopharmacological properties of *Ficus racemosa* Linn an overview. *Int J Pharm Sci Rev Res* 3(2), 134-138.
- [310] Hayouni, E. A., Abedrabba, M., Bouix, M., Hamdi, M., 2007, The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities *in vitro* of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food Chem*. 105(3), 1126-1134.
- [311] Balansard, G., 2007. Analyse critique des protocoles pharmacologiques utilisés pour la recherche d'extraits et de substances pures d'origine végétale à propriétés antibactérienne ou antiparasitaire. *Revue ethnopharmacologie*. 42 p.
- [312] Natarajan, D., Britto, S. J., Srinivasan, K., Nagamurugan, N., Mohanasundari, C., Perumal, G., 2005. Antibacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol*. 102 (1), 123-126.
- [313] Fazeli, M. R., Gholamreza, A., Attari, A. M. M., Ashtiani, H., Jamalifar, H., Samadi, N., 2007. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food-borne bacteria. *Food Control*. 18, 646-649.
- [314] Choi, J. G., Kang, O. H., Lee, Y. S., Chae, H. S., Oh, Y. C., Brice, O. O., Kim, M. S., Sohn, D. H., Kim, H. S., Park, H., Shin, D. W., Rho, J. R., Kwon, D. Y., 2011. *In*

- vitro* and *in vivo* antibacterial activity of *Punica granatum* Peel ethanol extract against *Salmonella*. Evid Based Complement Alternat Med. 2011, 690518.
- [315] Peng, F., Wan, F., Xiong, L., Peng, C., Dai, M., Chen, J., 2014. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity of Pogostone. Chin Med J (Engl). 127(23), 4001-4005.
- [316] Taha, S. O., 2013. *In vivo* antimicrobial activity of ethanol extract of Sumac (*Rhus coriaria*) on *Klebsiella pneumoniae*. Brit J Pharmacol Toxicol. 4(1), 1-4.
- [317] Ali-Shtayeh, M. S., Yaghmour, R. M., Faidi, Y. R., Salem, K., Al-Nuri, M. A, 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the palestinian area. J Ethnopharmacol. 60(3), 265- 271.
- [318] Garrett, R. H., Grisham, C. M., 2000. Les transports membranaires. In *Biochimie*. Ed DeBoeck. 314 p. France.
- [319] Wächter, G. A., Hoffmann, J. J., Furbacher, T., Blake, M. E., Timmermann, B. N., 1999. Antibacterial and antifungal flavanones from *Eysenhardtia texana*. Phytochemistry 52, 1469-1471.
- [320] Abubakar, E. M., 2009. Antibacterial activity of crude extracts of *Euphorbia hirta* against some bacteria associated with enteric infections. J Med Plants Res. 3(7), 498-505,
- [321] Palambo, E. A., Semple, S. J., 2001. Antibacterial activity of traditional medicinal plants. J Ethnopharmacol. 77, 151-157
- [322] Darwish, R. M., Aburjai, T., Al-Khalil, S., Mahafzah, A.. 2002. Screening of antibiotic resistant inhibitors form local plant material against two strains of *Staphylococcus aureus*. J Ethnopharmacol. 79, 359-364.
- [323] Arab, K., Bouchenak, O., Yahiaoui, K., 2014. Phytochemical study and evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of essential oils and phenolic compounds of *Pistacia lentiscus* L. J Fundam Appl Sci. 6(1), 77-91.
- [324] Li, H. B., Cheng, K. W., Wong, C. C., Fan, K. W., Chen, F., Tian, Y. 2007. Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fraction of selected microalgae. Food Chem. 102, 771-776.
- [325] Bajorun, T., Grinier, B., Troitin, F., Brunet, G., Pin, T., Luncky, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, C., Pinkas, M., 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. Arzneimittelforschung. 46,1086-1089.

- [326] Sanchez-Moreno, C., 2002. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int.* 8, 121-137.
- [327] Menaceur, F., Hazzit, M., 2014. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of ethanolic extracts from Algerian *Lavandula stoechas* L. and *Rosmarinus tournefortii* de Noé. *IJASR.* 4, 139-146.
- [328] Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application of vitamin E analytical. *Biochem.* 269, 337-341.
- [329] Lu, Y., Foo, L.Y., 2001. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem.* 75, 197-202.
- [330] Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nut.* 44, 307-315,
- [331] Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F., Chou, S. T., 2002. Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *J Agr Food Chem.* 50, 2454-2458.
- [332] Singleton, V. L., Rossi, J. A. 1965. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Technol Viticult.* 16, 144-153.
- [333] Falleh, H., Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Abdelly, C., 2008. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies* 331, 372-379.
- [334] Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle national, 2005. Selon les recommandations de l'OMS. 4<sup>ème</sup> Ed. 64 p.

## RESUME

Ce travail de recherche a porté sur l'investigation phytochimique de deux plantes médicinales *Erinacea anthyllis* Link et *Euphorbia atlantica* Coss. appartenant aux familles Fabaceae et Euphorbiaceae respectivement, ainsi que l'évaluation des activités biologiques : antibactérienne et anti-oxydante des extraits végétaux, fractions et biomolécules isolées. Ces deux espèces n'ont pas fait l'objet d'étude phytochimique et d'évaluation biologique antérieures.

L'étude chimique réalisée sur les deux plantes entières *Erinacea anthyllis* et *Euphorbia atlantica* a abouti à l'isolement de **29** métabolites secondaires. Ces composés ont été obtenus à l'état pur par l'utilisation en alternance des différentes méthodes chromatographiques à savoir : la chromatographie sur colonne de gel de silice normale et sur plaques préparatives de silice normale et greffée en C18 et la chromatographie d'exclusion stérique sur Sephadex.

L'élucidation structurale des composés isolés est rendue possible grâce à l'utilisation combinée des différentes méthodes d'analyse spectroscopiques modernes particulièrement la RMN 1D et 2D, la spectrométrie de masse à haute résolution HR-ESI-MS, UV-Vis, la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20}$  et par la comparaison avec les données de la littérature.

**21** composés ont été isolés à partir des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Erinacea anthyllis* dont **2** isoflavonoïdes prénylés ont de nouvelles structures Erinasone A (**Ea1**) et Erinasone B (**Ea2**). Les autres composés connus se répartissent en **10** isoflavonoïdes, **3** flavonoïdes, **1** polyphénol, **2** monoterpènes à squelette ionone et **3** stéroïdes.

A partir des extraits éther de pétrole et AcOEt de la plante *Euphorbia atlantica* **8** métabolites secondaires ont été identifiés. Il s'agit de **4** triterpènes cycloartaniques, **2** polyphénols et **2** stéroïdes de type phytostérol.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH des plantes *E. anthyllis* et *E. atlantica*, obtenus par les méthodes de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) respectivement, révèlent que les extraits AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *E. anthyllis* sont les plus riches en polyphénols totaux et flavonoïdes par rapport aux extraits EP et AcOEt issus de l'espèce *Euphorbia atlantica*.

L'évaluation de l'activité anti-oxydante *in vitro* des extraits, et de certains fractions et composés isolés à partir des deux plantes est réalisée par trois méthodes incluant: le piégeage du radical libre DPPH, le test de pouvoir réducteur du fer FRAP et le test de phosphomolybdate PPM. Les résultats des différents tests de l'activité anti-oxydante montrent que tous les extraits issus des deux espèces, les fractions (**F-7**, **F-12** et **F-14**) ainsi que les produits isolés méthyl gallate (**MS1**), phloroacétophénone 4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**MS2**), ( $\pm$ )-erythrine F (**Ea7**), Daidzeine (**Ea9**), Génistéine (**Ea10**) et Génistéine-8-*C*-glucoside (**Ea11**) ont réagi comme des anti-oxydants.

L'activité antibactérienne des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Erinacea anthyllis* et les extraits EP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Euphorbia atlantica* a été évaluée contre quatre souches bactériennes à savoir *Staphylococcus albus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *enterobacter* sp par la méthode de diffusion en milieu gélosé. La pénicilline est utilisée comme control positif. Les résultats révèlent que les extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Erinacea anthyllis* et les l'extraits CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et *n*-BuOH de l'espèce *Euphorbia atlantica* manifestent une activité antibactérienne modérée contre la plupart des souches testées.

**Mots clés :** *Erinacea anthyllis*, *Euphorbia atlantica*, Isoflavonoïdes, Triterpènes, Polyphénols, RMN 1D et 2D, Spectrométrie de masse HR-ESI-MS, Activité anti-oxydante et Activité antibactérienne.



## ABSTRACT

This research is focused on the phytochemical investigation of two medicinal plants *Erinacea anthyllis* Link and *Euphorbia atlantica* Coss. belonging to the families Fabaceae and Euphorbiaceae respectively, and the evaluation of the antibacterial and anti-oxidant activities of crude extracts, fractions and isolated compounds. These two species have not been the subject of any previous phytochemical and biological investigations.

The chemical study of the whole plants *Erinacea anthyllis* and *Euphorbia atlantica* led to the isolation of **29** secondary metabolites. These compounds were obtained in the pure state by the alternating use of different chromatographic methods such as VLC, CC and TLC.

Structural elucidation of the isolated compounds was done on the basis of the combined use of different spectroscopic methods particularly 1D and 2D NMR, high resolution mass spectrometry HR-ESI MS, UV-Vis, measurement of the optical rotation  $[\alpha]_D^{20}$  and by comparison with the literature data.

**21** compounds have been isolated from the EtOAc and *n*-BuOH extracts of the plant *Erinacea anthyllis* including **2** new prenylated isoflavonoids Erinasone A (**Ea1**) and Erinasone B (**Ea2**), the other known compounds are divided into **10** isoflavonoids, **3** flavonoids, **1** polyphenol, **2** monoterpenes with ionone skeleton and **3** steroids.

**8** secondary metabolites have been identified from the petroleum ether and EtOAc extracts of the species *Euphorbia atlantica*. These compounds consisted of four cycloartane triterpenes, two polyphenols and two steroids.

The results of total phenolic and flavonoid contents of the EtOAc and *n*-BuOH extracts from *Erinacea anthyllis* and PE and EtOAc extracts from the species *Euphorbia atlantica* obtained by the Folin-Ciocalteu and  $\text{AlCl}_3$  methods revealed that EtOAc and *n*-BuOH extracts of *E. anthyllis* contain a great amount of polyphenols and flavonoids compared to the PE and EtOAc extracts of *Euphorbia atlantica*.

The evaluation of anti-oxidant activity of the extracts, fractions as well as isolated compounds from both plants was carried out by three methods including DPPH free radical-scavenging assay, ferric reducing anti-oxidant power (FRAP) and total anti-oxidant capacity by phosphomolybdate assay (PPM). The results of the anti-oxidant activity show that all extracts of both species, fractions (**F-7**, **F-12** and **F-14**) and isolated products methyl gallate (**MS1**), phloroacetophenone 4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (**MS2**), ( $\pm$ )-erythrinin F (**Ea7**), Daidzein (**Ea9**), Genistein (**Ea10**) et Genistein-8-*C*-glucoside (**Ea11**), act as anti-oxidants.

The antibacterial activity of the EtOAc and *n*-BuOH extracts of the plant *Erinacea anthyllis* and PE,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , EtOAc and *n*-BuOH extracts of *Euphorbia atlantica* was estimated by the agar disk diffusion assay against four bacterial strains, including two Gram-positive (*Staphylococcus albus* and *Staphylococcus aureus*) and two Gram-negative (*Escherichia coli* and *Enterobacter* sp). Penicillin was used as a positive control. The results indicate that EtOAc and *n*-BuOH extracts of *E. anthyllis* and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  and *n*-BuOH extracts of *E. atlantica* exhibit a moderate antibacterial activity against the most tested strains.

**Keywords:** *Erinacea anthyllis*, *Euphorbia atlantica*, Isoflavonoids, Triterpenes, Polyphenols, 1D and 2D NMR, mass spectrometry HR-ESI-MS, Anti-oxidant activity and Antibacterial activity.

## ملخص

هذا العمل يعتمد على الدراسة الفيتو كيميائية للنبتين الطبيتين *Euphorbia atlantica* و *Erinacea anthyllis* اللتان تنتميان إلى عائلي البقوليات والفربيونات على التوالي، وكذلك تقييم النشاط المضاد للبكتيريا ومضادات الأكسدة في المستخلصات، الكسور والمركبات المعزولة من خلال هذين النوعين. من المهم الذكر أن هذين النوعين لم يخضعا لأي دراسة فيتوكيميائية أو بيولوجية سابقة.

أدت الدراسة الكيميائية لهاتين النبتتين إلى عزل وتحديد بنية 29 مركب طبيعي و التي تم الحصول عليها من خلال استعمال مختلف الطرق الكروماتوغرافية (VLC, TLC, LH-20 و CC) وكذلك بواسطة استخدام طرق التحليل الطيفي كمتيافية الرنين النووي المغناطيسي بجميع أنواعها، متيافية الكتلة، متيافية الأشعة فوق البنفسجية UV-Vis حساب زاوية التدوير النوعي  $[\alpha]_D^{20}$  و المقارنة مع الدراسات السابقة.

انطلاقا من مستخلصي الاستات الايثيلي و البوتانول لنبات *Erinacea anthyllis* تم عزل 21 مركب و التي تشمل اثنان من الايزوفلافونويدات البرينيلية التي لديها هيكل جديدة (Ea1) و Erinasone B (Ea2)، و تنقسم المركبات الأخرى المعروفة إلى 10 ايزوفلافونويد، 3 فلافونويدات، 1 متعددات الفينول، 2 من مركبات أحادية التربينات و 3 ستيرويدات. بالنسبة لمستخلصي الأثير البترولي و الاستات الايثيلي لنبات *Euphorbia atlantica* فقد تم فصل 8 مركبات ثنوية منها اربعة ثلاثية التربينات، اثنان من متعددات الفينول و اثنان من الستيرويدات من نوع فيتوستيرولات.

تكشف نتائج المحتوى الإجمالي لمتعددات الفينول و الفلافونويدات لمستخلصي الاستات الايثيلي و البوتانول لنبات *Erinacea anthyllis* و مستخلصات الأثير البترولي و الاستات الايثيلي لنبات *Euphorbia atlantica* بواسطة طريقتي Ciocalteu-Folin و ثلاثي كلور الألمنيوم ( $AlCl_3$ ) على التوالي أن مستخلصات نبات *E. anthyllis* هي أغنى بالمواد البوليفينولية و الفلافونويدية مقارنة مع نبات *E. atlantica*

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصات، الكسور وكذلك المركبات المعزولة لكائنا النبتتين باستعمال ثلاث طرق مختلفة: النشاط الازاحي للجذر الحر DPPH، القوة المضادة للأكسدة الحديد (FRAP) وإجمالي القدرة المضادة للأكسدة عن طريق الفوسفوموليبيدات (PPM). تظهر نتائج النشاط المضاد للأكسدة أن جميع المستخلصات لكلا النوعين، الكسور (F-7، F-12، F-14) و المركبات (MS1، MS2، Ea7، Ea9، Ea10 و Ea11) قد تفاعلت كلها كمضادات للأكسدة.

لقد تم تقدير النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات الاستات الايثيلي، اثير البترولي، ثنائي كلور الميثان و البوتانول لنباتي *Erinacea anthyllis* و *Euphorbia atlantica* ضد أربعة أنواع من البكتيريا، من بينهم اثنان من الجرام الإيجابية (العنقودية البيضاء و المكورات العنقودية الذهبية) و اثنان سالبة الجرام (الاشريكية القولونية و البكتيريا المعوية). و أظهرت النتائج أن مستخلصات الاستات الايثيلي و البوتانول لنبات *Erinacea anthyllis* و كذا مستخلصات ثنائي كلور الميثان و البوتانول لنبات *Euphorbia atlantica* لها فعالية ضد معظم السلالات التي تم اختبارها.

**الكلمات المفتاحية:** *Euphorbia atlantica*، *Erinacea anthyllis*، الايزوفلافونويدات، ثلاثية التربينات، متعددات الفينول، الرنين المغناطيسي، متيافية الكتلة، النشاط المضاد للأكسدة ونشاط مضاد للبكتيريا.

## Two New Prenylated Isoflavonoids from *Erinacea anthyllis* with Antioxidant and Antibacterial Activities

Soumia Mouffouk<sup>a</sup>, Laurence Marcourt<sup>b</sup>, Mohammed Benkhaled<sup>a</sup>, Kaouthar Boudiaf<sup>c</sup>, Jean-Luc Wolfender<sup>b</sup> and Hamada Haba<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (L.C.C.E), Département de Chimie, Faculté des Sciences de la Matière, Université de Batna-1, Algérie

<sup>b</sup>School of Pharmaceutical Sciences, University of Geneva, University of Lausanne, Rue Michel-Servet, CH-1211 Geneva 4, Switzerland

<sup>c</sup>Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Batna-2, Algérie

haba.hamada@yahoo.fr

Received: February 20<sup>th</sup>, 2017; Accepted: April 12<sup>th</sup>, 2017

Two new prenylated isoflavonoids, namely Erinasonone A and Erinasonone B along with 19 known secondary metabolites, including twelve isoflavonoids, three polyphenols, one flavonol, two flavanones and three steroids, were isolated from the whole plant (roots and aerial parts) of *Erinacea anthyllis*. Structures of all isolated compounds were elucidated by spectroscopic analysis, including 1D and 2D NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC, TOCSY, HMBC and NOESY), mass spectrometry (ESI-MS), UV-Vis, measurement of optical rotation [ $\alpha$ ]<sub>D</sub> and by comparison with the literature data. The total phenolic and flavonoid contents were determined in this study. Furthermore, the antioxidant and antibacterial activities of the EtOAc and *n*-BuOH extracts of *E. anthyllis* were evaluated. These extracts exhibited moderate antibacterial and antioxidant activities. Their IC<sub>50</sub> values were approximately 0.04 mg/mL (*n*-BuOH) and 0.037 mg/mL (EtOAc). Consequently, *Erinacea anthyllis* is a rich source of polyphenolic compounds particularly isoflavonoids used as chemotaxonomic markers for the subfamily Papilionoideae of the family Fabaceae.

**Keywords:** *Erinacea anthyllis*, Fabaceae, Prenylated isoflavonoids, Antioxidant activity, Antimicrobial activity, NMR.

The genus *Erinacea* belonging to the subfamily Papilionoideae of the family Fabaceae and the tribe Genisteae, is represented by a single species named *Erinacea anthyllis* Link or *Erinacea pungen* [1]. *E. anthyllis* is a shrub with purplish blue flowers that is found mainly in the Pyrenees Orientales in France, Spain, Algeria, Tunisia and Corsica [2]. In Algeria, this species is used in traditional medicine to treat rheumatic diseases [3] while in the Siroua region of Morocco it is utilized as honey source [4]. The present work describes the isolation and structural determination of two new prenylated isoflavonoids **1** and **2** (Figure 1), together with 19 known compounds from the EtOAc and *n*-BuOH extracts of *E. anthyllis*. Structures of all the isolated metabolites **1-21** were established mainly by 1D and 2D NMR and mass spectrometry ESI-MS experiments, and by comparison with the literature data. Moreover, the total phenolic and flavonoid contents were established. In addition, the antioxidant and the antimicrobial activities of the crude extracts (EtOAc and *n*-BuOH) were determined.

All the isolated compounds **1-21** (Figure S1) were obtained from the EtOAc and *n*-BuOH extracts of *E. anthyllis* by the use of different chromatographic methods including vacuum liquid chromatography (VLC), column chromatography (CC) and TLC. The known compounds were identified as  $\beta$ -sitosterol (**3**) [5], erythrinin D (**4**) and ( $\pm$ )-erythrinin F (**9**) [6], sitoindoside II (**5**) [7], vomifoliol (**6**) [8], diadzein (**7**) [9], genistein (**8**) [10], alpinumisoflavone (**10**) [11], ammopiptanine B (**11**) [12], liquiritigenin (**12**) [13], erysubin-A (**13**) and erysubin-B (**14**) [14], 7-hydroxytremetone (**15**) [15], 7,4'-dihydroxy-3'-methoxyflavanone (**16**) [16], genistein-8-*C*-glucoside (**17**) [17], daucosterol (**18**) [18], orobol-8-*C*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside (**19**) [19], (6*S*, 9*R*)-roseoside (**20**) [20] and isokaempferide (**21**) [21].

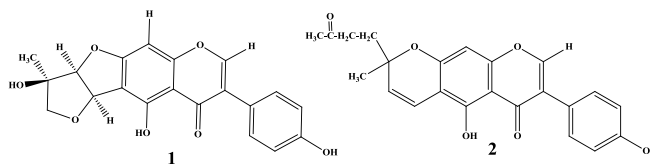


Figure 1: Structures of new compounds **1** and **2**.

Compound **1** was obtained as an amorphous white powder soluble in acetone. The molecular formula was determined as C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub> by HRESIMS (*m/z* 367.0785 [M-H]<sup>-</sup>; calcd for C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>O<sub>7</sub>, 367.0818), which indicated 13 degrees of unsaturation.

The UV spectrum of **1** displayed the characteristic absorption maxima of an isoflavone chromophore at 262 and 332 nm [6,14]. The analysis of <sup>1</sup>H NMR, HSQC and COSY spectra (Table 1) of compound **1** indicated the presence of one proton singlet at  $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  8.22/154.2 assignable to the proton H-2 of an isoflavone skeleton [22], four aromatic protons (A<sub>2</sub>X<sub>2</sub>-System) at  $\delta_{\text{H}}$  6.91 (2H, d, *J* = 8.4 Hz) and 7.47 (2H, d, *J* = 8.4 Hz) which were attributed to the protons H-3'/H-5' and H-2'/H-6' of a *p*-disubstituted ring B [23], a singlet aromatic proton at  $\delta_{\text{H}}$  6.44 potentially positioned on ring A, two doublets of oxymethine protons ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  5.82/79.3 and 4.84/92.2 for H-1"/C-1" and H-2"/C-2", respectively), two non-equivalent protons of an oxymethylene ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  3.31, 3.52/73.3, CH<sub>2</sub>-4"), a methyl singlet ( $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$  1.42/24.3, CH<sub>3</sub>-5") and three hydroxyl protons ( $\delta_{\text{H}}$  4.23, 8.55 and 13.58 for OH-3", -4' and -5, respectively). The singlet aromatic proton was located at C-8 position of ring A based on HMBC correlations from H-8 to carbons C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  106.9), C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  109.3), C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  167.7) and C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  159.9), from H-2 to C-9 and from the characteristic chelated phenolic hydroxyl group at the C-5 position ( $\delta_{\text{H}}$  13.58) to C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  160.0), C-6 and C-10. The chemical

shift at  $\delta_H$  8.55 was assigned to the hydroxyl proton OH-4' as this proton correlated with the carbons C-3'/5' in its HMBC spectrum. The presence of 13 degrees of unsaturation according to molecular formula, the fact that an isoflavone skeleton account for 11 degrees of unsaturation and the lack of additional NMR signals characteristic of double bonds in **1** suggested that it remained two degrees of unsaturation corresponding to two supplementary cycles. Based on the HMBC correlations (Figure 2) from H-1'' to C-5 and C-7, from H-2'' to C-7, from the methyl H-5'' to C-2'', C-3'' ( $\delta_C$  77.7) and C-4'' and from H-4'' to C-1'' and C-2'', the presence of two furan rings for **1** was suggested.

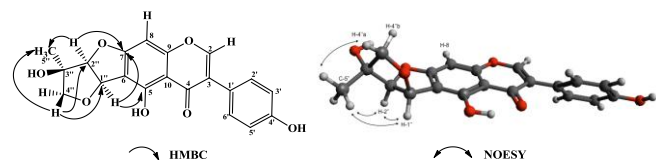


Figure 2: Pertinent HMBC and NOESY correlations for **1**.

Table 1:  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR data of compounds **1** (in Acetone- $d_6$ ) and **2** (in DMSO- $d_6$ ).

1			2		
Atom	$\delta_C$	$\delta_H$ (m, J in Hz)	Atom	$\delta_C$	$\delta_H$ (m, J in Hz)
2	154.2	8.22 (s)	2	153.9	8.36 (s)
3	123.7	-	3	120.6	-
4	181.8	-	4	180.1	-
5-OH	160.0	13.58 (s)	5-OH	155.6	13.38 (s)
6	106.9	-	6	104.0	-
7	167.7	-	7	157.7	-
8	89.3	6.44	8	94.1	6.47 (s)
9	159.9	-	9	156.4	-
10	109.3	-	10	105.1	-
1'	122.3	-	1'	122.1	-
2'	130.9	7.47 (d, 8.4)	2'	129.8	7.38 (d, 8.6)
3'	115.6	6.91 (d, 8.4)	3'	114.7	6.82 (d, 8.6)
4'-OH	158.1	8.55 (s)	4'-OH	157.1	9.58 (s)
5'	115.6	6.91 (d, 8.4)	5'	114.8	6.82 (d, 8.6)
6'	130.9	7.47 (d, 8.4)	6'	129.8	7.38 (d, 8.6)
1''	79.3	5.82 (d, 5.7)	1''	114.9	6.67 (d, 10.1)
2''	92.2	4.84 (d, 5.7)	2''	127.2	5.73 (d, 10.1)
3''-OH	77.7	4.23 (s)	3''	79.7	-
4''a	73.3	3.52 (d, 8.5)	1'''	34.2	1.92 (t, 8.0)
4''b	3.31 (d, 8.5)		2'''	37.2	2.54 (t, 8.0)
5''	24.3	1.42 (s)	3'''	207.2	-
			4'''	29.4	2.08 (s)
			5'''	26.2	1.40 (s)

The first one being fused to C-6 and C-7 of ring A and the second one fused to C-1'' and C-2'' of the first furan moiety (Figure 2). Complete assignment of protons and carbons of **1** (Table 1) was achieved with COSY, HSQC, HMBC and NOESY experiments. The NOESY correlations (Figure 2) from methyl H-5'' to both H-1'' and H-2'' indicated the relative configuration of **1** (all these protons were in the same side of the molecule whereas the hydroxyl was in the opposite side). Thus, compound **1** was elucidated to be Erinasonone A.

Compound **2** was obtained as a brown oil. The ESI<sup>+</sup> mass spectrum of **2** gave pseudomolecular ion peaks at  $m/z$  393 [M + H]<sup>+</sup> and 785 [2M + H]<sup>+</sup>, indicating a molecular mass M = 392. The molecular formula was confirmed as C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub> by HRESIMS ( $m/z$  393.1343; calcd for C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>O<sub>6</sub>, 393.1338). **2** also displayed typical UV absorption bands of an isoflavone at 226, 285 and 340 nm [6,14]. The  $^1\text{H}$  NMR of **2** (Table 1) was similar to that of **1** for the aglycone moiety with signals of aromatic protons at  $\delta_H$  8.36 (s, H-2) for the ring C, 6.82 (2H, d,  $J$  = 8.6 Hz, H-3'/H-5') and 7.38 (2H, d,  $J$  = 8.6 Hz, H-2'/H-6') for the ring B and 6.47 (s, H-8) for the ring A, and two downfield protons at  $\delta_H$  9.58 and 13.71 attributed to the protons of hydroxyl groups OH-4' and OH-5', respectively. The main differences between **1** and **2** were the lack of oxymethine and oxymethylene signals and the appearance of two coupled olefinic protons signals at  $\delta_H/\delta_C$  5.73/127.2 and 6.67/114.9 (H-1'' and H-2'',

respectively), two coupled methylene signals at  $\delta_H/\delta_C$  1.92/34.2 and 2.54/37.2 (H-1''' and H-2''', respectively), a methyl signal at  $\delta_H/\delta_C$  1.40/26.2 (H-5''') and an acetyl signal at  $\delta_H/\delta_C$  2.08/29.4 (H-4'''). The double bond was located at C-6 based on the HMBC correlations between H-1'' and carbons at  $\delta_C$  104.0 (C-6), 155.6 (C-5) and 157.7 (C-7).

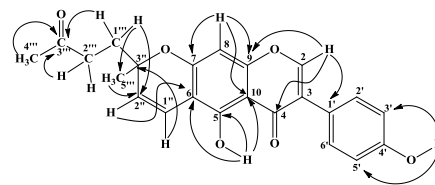


Figure 3: Key HMBC correlations for **2**.

Furthermore, the HMBC spectrum revealed correlations (Figure 3) from H-1'' and H-2'' to methylene C-1''', the methyl C-5''' and a quaternary carbon at  $\delta_C$  79.7 (C-3'''). The acetyl was linked to the methylene H-2''' as it correlated with the carbonyl ketone at  $\delta_C$  207.2. Analyses of COSY, HSQC, and HMBC experiments allowed assignments of all protons and carbons of compound **2** (Table 1). These structural features confirmed that **2** was a derivative of alpinumisoflavone [11]. Moreover, the configuration at chiral carbon C-3''' remained unclarified. Based on the above data, the structure of **2** was characterized as Erinasonone B.

The total phenolic and flavonoid contents of the EtOAc and *n*-BuOH extracts were carried out according to the calibration curve established with gallic acid and quercetin, respectively. The total phenolic and flavonoid contents of the ethyl acetate extract (26.13 ± 0.02 µg GAE/mg extract and 16.80 ± 0.007 µg QE/mg extract, respectively), were higher than the *n*-butanol extract (25.42 ± 0.004 µg GAE/mg extract and 12.53 ± 0.01 µg QE/mg extract, respectively).

The antioxidant activity of the EtOAc and *n*-BuOH extracts as well as the standard antioxidants (ascorbic acid and BHT) against the free radical DPPH indicated that EtOAc and *n*-BuOH extracts reacted positively with the DPPH radical as antioxidant. Both extracts possessed a moderate antioxidant activity. Their inhibitory concentrations at 50% (IC<sub>50</sub>) were approximately 0.04 mg/mL (*n*-BuOH) and 0.037 mg/mL (EtOAc), but relatively low compared to ascorbic acid and BHT which exhibiting values of 0.0031 and 0.0059 mg/mL, respectively (Figure S2 and Table S1).

The FRAP assay was used to evaluate the reduction of iron in the presence of an antioxidant. The power reducing ability was calculated from the curve of the regression equation determined by the ascorbic acid. The obtained values were expressed in microgram of ascorbic acid equivalents per mg of extract (Table S1). The data indicated that the *n*-BuOH extract was more active than the EtOAc extract. The phosphomolybdate assay of the crude extracts was evaluated by the transformation of Mo(VI) to Mo(V) to obtain a phosphomolybdenum complex, which can be followed spectrophotometrically. In this study, the antioxidant power of EtOAc and *n*-BuOH extracts was expressed as µg of ascorbic acid equivalents per mg of the dried extract (µg AAE/mg extract). The results displayed that the antioxidant power of the EtOAc extract was higher than the *n*-BuOH extract (Table S1). The antioxidant activity of this plant evaluated by different methods can be attributed to the presence of flavonoids and polyphenolic compounds, which explain their ability to capture free radicals and metal complex [24].

The antibacterial activity of EtOAc and *n*-BuOH extracts was determined against four strains of microorganisms. The mean of the

zones of inhibition were calculated and the results were presented in (Table S2). The results of the antibacterial activity revealed a sensibility only against Gram positive strain *Staphylococcus aureus* and penicillin as a positive control with MIC values at 0.25 and 1 g/mL, respectively. The antibacterial activity of the EtOAc was higher than *n*-BuOH extracts. These findings can be explained by the presence of isoflavonoids which are known for their antibacterial activity [25].

Phytochemical investigation of *Erinacea anthyllis* allowed the isolation and characterization of two new prenylated isoflavonoids **1** and **2** and nineteen known compounds **3-21**, including twelve isoflavonoids, three polyphenols, one flavanol, two flavanones and three steroids. It is very important to indicate that all these compounds were isolated for the first time from the *Erinacea* genus. In this study, the total phenolic and flavonoid contents of EtOAc and *n*-BuOH extracts were determined. Furthermore, the antioxidant activity was evaluated by three different methods: DPPH radical scavenging, ferric reducing power and phosphomolybdate assay, and the antibacterial activity was also carried out against four strains. The obtained results indicated that both extracts (EtOAc and *n*-BuOH) showed moderate antibacterial and antioxidant activities. Moreover, this investigation revealed that isoflavonoids are major constituents of *E. anthyllis* which could be used as specific chemotaxonomic markers for the subfamily Papilionoideae. In addition, the occurrence of isoflavonoids in *E. anthyllis* known for their anti-inflammatory activity could explain the traditional use of this plant against the rheumatism disease [26,27].

## Experimental

**General:** UV-Vis measurements were obtained on Beckman DU-600 spectrophotometer (Beckman, California, USA). IR spectra were recorded using a Shimadzu model IR-470 spectrometer (Shimadzu, Ontario, Canada) and FT-IR Bruker Tensor 27 spectrophotometer (Bruker, Wissembourg, France). The HR-ESI-MS analyses were performed on a Micromass-LCT Premier Time of Flight mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA).  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra were measured in acetone- $d_6$ ,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$  or  $\text{DMSO}-d_6$  using a Varian/Agilent Inova spectrometer at 500 MHz for  $^1\text{H}$  and 125 MHz for  $^{13}\text{C}$  (Varian, Palo Alto, CA, USA). Optical rotations were measured in methanol solution on a Perkin-Elmer 241 polarimeter (Perkin-Elmer, California, USA). Column chromatographies were carried out using Merck Kieselgel 60 (320–400 mesh), Merck Lobar Lichroprep RP-18 ( $40 \times 63 \mu\text{m}$ ), Polyamide SC6, and Sephadex LH-20. Analytical and preparative (1 mm thickness) TLCs were carried on Silica gel (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, Merck), RP-18 (Kieselgel 60 F<sub>254s</sub>) plates (Merck, Darmstadt, Germany), and developed by spraying with 50 % sulfuric acid reagent followed by heating.

**Plant material:** The plant material of *E. anthyllis* was collected in May 2013 in the Aures region (high mountains of Bellezma, Algeria) and was identified by Prof. Bachir Oudjehih, Agronomic Institute of the University of Batna-1. A voucher specimen is kept under the number 690/LCCE.

**Extraction and isolation:** The powder of the whole plant *Erinacea anthyllis* (1500 g) was macerated twice (15 L  $\times$  2, each 48 h) with EtOH/H<sub>2</sub>O (70:30) at room temperature. After filtration, the filtrate was concentrated and submitted to liquid-liquid fractioning using solvents successively petroleum ether, EtOAc and *n*-BuOH (each solvent, 125 mL  $\times$  5) to give 1 g of petroleum ether, 10.7 g of EtOAc and 50 g of *n*-BuOH extracts.

The EtOAc extract (10.7 g) was separated over a VLC carried on silica gel eluting with PE/EtOAc (100:0 to 0:100) and EtOAc/MeOH (100:0 to 0:100) to give nine fractions (F1–F9).

Fraction F5 (2260 mg) was subjected to polyamide column chromatography with the solvent system toluene/MeOH (100:0 to 0:100) to yield 13 sub-fractions (F5-1 to F5-13). The grouped three sub-fractions F5-5,6,7 (301.7 mg) were applied to purification on a silica gel CC using  $\text{CHCl}_3$ /EtOAc (100:0 to 30:70) to give **1** (2 mg). Sub-fractions F5-2,3 (415.6 mg) were combined and purified on a silica gel CC eluting with PE/EtOAc to afford 12 sub-fractions (F5-A to F5-L). Sub-fractions F5-J (16.9 mg), F5-D (21.9 mg) and F5-F (69.1 mg) were purified by precipitation using hexane, acetone and MeOH respectively, to provide **2** (4.6 mg), **3** (6 mg) and **4** (3.1 mg). Sub-fraction F5-K (61.4 mg) was precipitated in MeOH to isolate **5** (2 mg) and the filtrate was submitted on a preparative TLC RP-18 in MeOH/H<sub>2</sub>O (7:3) to afford **6** (4.9 mg). Sub-fraction F5-4 (250.8 mg) was separated over silica gel CC eluting with PE/EtOAc to yield **7** (3.0 mg). Sub-fraction F5-10 (373 mg) was applied to silica gel CC using PE/EtOAc to allow the isolation of **8** (7.8 mg), **9** (2.5 mg) and **10** (5.8 mg).

Fraction F3 (740.4 mg) of the VLC was applied to silica gel CC using PE/EtOAc (100:0 to 50:50) to obtain 16 sub-fractions (F3-1 to F3-16). Sub-fraction F3-6 (57.4 mg) was precipitated in petroleum ether to give **11** (52.7 mg). Preparative TLC of sub-fraction F3-8 (45.3 mg), developed with PE/EtOAc (7:3), afforded **12** (2.9 mg).

Fraction F4 (1826.3 mg) of the VLC was submitted to CC over silica gel, eluted with a gradient of solvents PE/EtOAc (100:0 to 30:70) to provide 15 sub-fractions (F4-1 to F4-15). Sub-fraction F4-12 (31.5 mg) was separated on TLC RP-18, to allow the isolation of **13** (8.3 mg) and **14** (8.5 mg). Sub-fraction F4-14 (182.3 mg) was purified on silica gel CC using  $\text{CHCl}_3$ /MeOH to give **15** (6.2 mg). Sub-fraction F4-6 (66.5 mg) was chromatographed on silica gel CC eluting with PE/EtOAc, and followed by TLC RP-18 in MeOH/H<sub>2</sub>O (8:2) to yield **16** (6.1 mg) and **17** (4 mg).

The *n*-BuOH extract (14 g) was separated over a VLC (RP-18). Elution was performed with H<sub>2</sub>O/MeOH (100:0 to 0:100) to give eleven fractions (F1–F11).

Fraction F2 (694.9 mg) of the VLC was fractionated on silica gel CC eluting with  $\text{CHCl}_3$ /MeOH to obtain 7 sub-fractions (F2-1 to F2-7). Sub-fraction F2-1 (22.3 mg) was precipitated in MeOH to provide **18** (7.2 mg).

Fraction F3 (2456.2 mg) was separated on CC of polyamide using H<sub>2</sub>O/MeOH (100:0 to 0:100) to provide 11 sub-fractions (F3-1 to F3-11). Sub-fraction F3-5 (214.7 mg) was separated on silica gel CC with  $\text{CHCl}_3$ /MeOH (100:0 to 50:50) to give **19** (7.5 mg) and **20** (5.3 mg). Sub-fraction F3-1 (382.7 mg) was purified on silica gel CC using  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /acetone (100:0 to 0:100) and MeOH/acetone (0-100 to 100-0) to afford **21** (3.4 mg).

## Erinasone A (1)

Amorphous white powder.

$[\alpha]_D^{20}$  –24.6 (*c* 0.142, MeOH).

UV-Vis (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  nm (log  $\epsilon$ ): 214 (3.84), 262 (3.93), 332 (2.55).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Acetone- $d_6$ ): (Table 1).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, Acetone- $d_6$ ): (Table 1).

(–) HR-ESI-MS *m/z*: 367.0785  $[\text{M} - \text{H}]^-$  (calcd  $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{O}_7$ , 367.0818), and 735.1729  $[2\text{M} - \text{H}]^-$ ; (+) HR-ESI-MS *m/z*: 369.1005  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd  $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{O}_7$ , 369.0974).

**Erinasone B (2)**

Brown oil.

 $[\alpha]_D^{20} +30.5$  (c 0.292, MeOH).UV-Vis (MeOH)  $\lambda_{\max}$  nm (log  $\epsilon$ ): 226 (3.55), 285 (3.75), 340 (2.64). $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ ): (Table 1). $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ ): (Table 1).(-) HR-ESI-MS  $m/z$ : 391.1208  $[\text{M} - \text{H}]^-$  (calcd  $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{O}_6$ , 391.1182); (+) HR-ESI-MS  $m/z$ : 393.1343  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{O}_6$ , 393.1338).

**Determination of the total phenolic content** (more details in the supplementary data): The total phenolic content of the extracts obtained from *E. anthyllis* was estimated by the Folin-Ciocalteu method.

**Determination of the total flavonoid content** (more details in the supplementary data): The total flavonoid content of the extracts (*n*-BuOH and EtOAc) was evaluated by the method of the aluminum trichloride.

**Antioxidant activity** (more details in the supplementary data): The evaluation of the antioxidant activity of the crude extracts (EtOAc and *n*-BuOH) was carried out by three different methods including DPPH radical scavenging, iron reduction power test (FRAP) and phosphomolybdate assay (PPM).

**Antibacterial activity** (more details in the supplementary data): The antibacterial activity of the EtOAc and *n*-BuOH extracts was estimated by the agar disk diffusion assay against four bacterial strains.

**Supplementary data:** Details on determination of the total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antibacterial assays,  $^1\text{H}$  NMR, HSQC, HMBC, NOESY and ESI-MS spectra for compounds **1** and **2**, and structures of isolated compounds (**1-21**) are available online.

**Acknowledgments** - The authors thank the DGRSDT-Algeria for providing a research grant (PNR Project 8/u05/853) and School of Pharmaceutical Sciences, EPGL, University of Geneva, Geneva, Switzerland.

**References**

- Adanson M. (1763) Familles des Plantes. II partie. (Ed). Vincent, Paris, France, 1-640.
- Maire R. (1952-1987) Flore de l'Afrique du Nord. Vol. 16, (Ed). Le chevalier, Paris.
- M'hirit O, Blerot P. (1999) Plantes aromatiques et médicinales dans les hauts atlas-Le grand livre de la forêt marocaine. (Ed). Mardaga, France, 1-280.
- Birouk A. (2009) Consultant national en biodiversité et ressources phylogénétiques, Projet FAO/TCP/MOR/3201, Maroc, 1-34.
- Nes WD, Norton RA, Benson M. (1992) Carbon-13 NMR studies on sitosterol biosynthesized from [ $^{13}\text{C}$ ]mevalonates. *Phytochemistry*, **31**, 805-811.
- Wang F, Li X-L, Wei G-Z, Ren F-C, Liu J-K. (2013) New isoflavonoids from *Erythrina arborescens* and structure revision of anagyroid isoflavone A. *Natural Products and Bioprospecting*, **3**, 238-242.
- Luo X-D, Wu S-H, Ma Y-B, Wu D-G. (2001) Chemical constituents from *Walsura yunnanensis*. *Acta Botanica Yunnanica*, **23**, 515-520.
- Hammami S, Ben Jannet H, Bergaoui A, Ciavatta L, Cimino G, Mighri Z. (2004) Isolation and structure elucidation of a flavanone, a flavanone glycoside and vomifoliol from *Echiochilon fruticosum* growing in Tunisia. *Molecules*, **9**, 602-608.
- Kaufman PB, Duke LA, Briemann H, Boik J, Hoyt JE. (1997) A comparative survey of leguminous plants as sources of the isoflavones, genistein and daidzein: Implications for human nutrition and health. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **3**, 7-12.
- Almahy HA, Alhassan NI. (2011) Studies on the chemical constituents of the leaves of *Ficus bengalensis* and their antimicrobial activity. *Journal of Science and Technology*, **12**, 118-124.
- Huang K-F, Hsu C-J. (2001) Constituents of stem bark of *Erythrina arborescens*. *Journal of Chinese Medical*, **12**, 61-67.
- Tiana XM, Chena SZ, Tang L, Tu PF. (2008) Three new isoflavonoids from the aerial parts of *Ammopiptanthus mongolicus*. *Helvetica chimica Acta*, **91**, 1015-1022.
- Yahara S, Ogata T, Saijo R, Konishi R, Yamahara J, Miyahara K, Nohara T. (1989) Isoflavan and related compounds from *Dalbergia odorifera*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **37**, 979-987.
- Tanaka H, Tanaka T, Etoh H, Watanabe N, Ahmad M, Qurashi I, Khan MR. (1998) Two new isoflavones from *Erythrina suberosa* var. *glabrescences*. *Heterocycles*, **48**, 2661-2667.
- Bohlmann F, Grenz M. (1970) Neue isopentenyl-acetophenon-derivate aus *Helianthella uniflora*. *Chemische Berichte*, **103**, 90-96.
- Recourt K, Schripsema J, Kijne JW, Van Brussel AAN, Lugtenberg BJJ. (1991) Inoculation of *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots with *rhizobium* leguminosarum biovar *viciae* results in release of *nod* gene activating flavanones and chalcones. *Journal of Plant Molecular Biology*, **16**, 841-852.
- Van Rensen, I, Veit M, Wray V, Czygan F-C. (1995) Genistein-C-Glucosides from *Genista cinerea*. *Natural Product Letters*, **6**, 203-207.
- Yoo JS, Ahn EM, Bang MH, Song MC, Yang HJ, Kim DH, Lee DY, Chung HG, Jeong TS, Lee KT. (2006) Steroids from the aerial parts of *Artemisia princeps* Pampanini. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, **14**, 273-277.
- Sato S, Hiroe K, Kumazawa T, Jun-Ichi, O. (2006) Total synthesis of two isoflavone C-glycosides: genistein and orobol 8-C- $\beta$ -D-glucopyranosides. *Carbohydrate Research*, **341**, 1091-1095.
- Yoshikawa M, Shimada H, Saka M, Yoshizumi S, Yamahara J, Matsuda H. (1997) Medicinal foodstuffs. V.<sup>1)</sup> Moroheiya. (1): Absolute stereostructures of corchoionosides A, B, and C, histamin release inhibitors from the leaves of Vietnamese *Corchorus olitorius* L. (Tiliaceae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **45**, 46-69.
- Dreyer DL. (1978) Kaempferol methyl ethers from flowers of *Dodonaea viscosa*. *Revista Latinoamericana Quimica*, **9**, 97-98.
- Markham KR, Mabry TJ. (1975) Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids. In: the flavonoids. Harborne J, Mabry TJ, Mabry H (Ed). Chapman and Hall, London, 45-77.
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. (1970) The systematic identification of flavonoids. (Ed). Springer, Berlin, Germany.
- Joseph B, Raj SJ. (2010) Phytopharmacological properties of *Ficus racemosa* Linn an overview. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, **3**, 134-138.
- Dhayakaran RPA, Neethirajana S, Xue J, Shi J. (2015) Characterization of antimicrobial efficacy of soy isoflavones against pathogenic biofilms. *LWT-Food Science and Technology*, **63**, 59-865.
- Sudhadevi PK. (1999) Folkloric plant remedies for rheumatism. *Ancient Science of Life*, **18**, 264-265.
- Yankep E, Njamen D, Fotsing MT, Fomum ZT, Mbanya JC, Giner RM, Recio MC, Máñez S, Ríos JL. (2003) Griffonianone D, an isoflavone with anti-inflammatory activity from the root bark of *Milletia griffoniana*. *Journal of Natural Product*, **66**, 1288-1290.