### **REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Hadj Lakhdar - BATNA 1 Faculté des Sciences de la Matière Département de Chimie



## THESE

## Présentée en vue de l'obtention du

## Diplôme de Doctorat troisième cycle

## Par :

## **Mohamed Ibrahim BADAOUI**

## Thème :

## Métabolites secondaires de Atractylis cancellata (Asteraceae) et

### Euphorbia gaditana (Euphorbiaceae) et évaluation biologique

Domaine: Science de la MatièreFilière: ChimieSpécialité: Chimie OrganiqueSoutenue le : 06/ 07/ 2020

### **Devant le jury :**

Président :	Mohammed BENKHALED	Professeur	Université de Batna-1
Rapporteur :	Hamada HABA	Professeur	Université de Batna-1
Co-encadreur	Abdulmagid ALABDUL MAGID	Maitre de conférences A	Université de Reims Champagne- Ardenne-France
Examinateurs :	Ammar DIBI	Professeur	Université de Batna-1
	Djebbar ATMANI	Professeur	Université de Bejaia
	Noura BENBELLAT	Maitre de conférences A	Université de Batna-1

## DEDICACE

À mes parents bien aimés : Mohamed Nacereddine et Farida

qui ont su me donner les ailes nécessaires

pour réussir mon envol dans la vie.

À mes sœurs : Fatima zohra et Kaouther pour leur soutien

et leur générosité.

À mon frère Mohamed Youcef pour sa présence

et sa disponibilité.

À mes deux adorables nièces.

À tous mes amis et collègues.

## REMERCIEMENTS

Ce travail de recherche en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en troisième cycle LMD, spécialité chimie organique, a été réalisé sous la direction du Professeur *Hamada HABA* au sein du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) de la faculté des sciences de la matière, université de Batna-1, Algérie, en collaboration avec les deux co-encadreurs *Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO* et *Abdulmagid ALABDUL MAGID* du laboratoire de l'institut de chimie moléculaire, université de Reims Champagne-Ardenne, France.

Avant tout, je dois remercier Dieu le tout puissant qui m'a donné l'envie et la force pour mener à terme ce travail de recherche « Dieu merci ».

En premier lieu, je tiens à remercier vivement mon directeur de thèse Monsieur *Pr. Hamada HABA*, Professeur à l'Université de Batna 1 pour son encadrement, sa disponibilité, ses conseils avisés et pour la confiance qu'il m'a accordé tout au long de ma formation, et surtout pour l'aide qu'il m'a apporté pour la rédaction de mes publications ainsi pour ce manuscrit de these.

Je tiens particulièrement à remercier le Docteur *Abdulmagid ALABDUL MAGID*, Maitre de conférences A de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, France, pour son encadrement, son soutien, ses conseils, son aide apportée au cours de la rédaction des articles. Un grand merci pour lui de m'avoir formé en phytochimie et chimie structurale. Quels que soient les remerciements, ce ne serait jamais assez.

J'exprime mes sincères remerciements à Madame la Professeure *Laurence VOUTQUENNE-NAZABADIOKO* de m'avoir accueilli au sein de son équipe de recherche, pour son aide, ses conseils et sa gentillesse, ma profonde reconnaissance.

Je voudrais remercier le *Pr. Mohammed BENKHALED*, professeur à l'université de Batna 1, d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de doctorat.

J'aimerais également remercier Monsieur le Professeur Ammar DIBI de l'université de Batna-1, Monsieur le Professeur Djebbar ATMANI de l'université de Bejaia et Docteur Noura BENBELLAT Maitre de conférences A de l'université de Batna-1 pour avoir acceptés de faire partie du Jury de ma thèse de Doctorat.

Je remercie évidemment tous mes collègues du laboratoire LCCE de l'université de Batna-1, pour l'échange des conseils et suggestions, en particulier : *Sihem SIFOUANE, Wassila BENCHADI, Meriem BESBES* et *Dr. Sonia CHAABANI*.

Je souhaite exprimer ici, le plaisir d'avoir travaillé avec l'ensemble des membres de l'équipe « Chimie des Substances Naturelles » de l'université de Reims : *Dr. Jean-Marc NUZILLARD, Charlotte SAYAGH, Benjamin BERTAUX, Agathe MARTINEZ* et *Nicolas BORIE*.

Pour la réalisation des analyses RMN et Masse je remercie Anthony ROBERT et Dr. Dominique HARAKAT. Je tiens à remercier en particulier mes collègues Evariste AKISSI, Sara BECHKRI, Samia BENDAMEN et Jean-Michel KOFFI. Je vous remercie tous pour votre accueil chaleureux, vous êtes une superbe équipe.

Enfin, n'oubliant pas à remercier tous mes amis avec qui j'ai passé de bons moments et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail par un soutien moral ou matériel, je cite en particulier : *Khalil HAMOUCHE, Mourad NOUIOUA, Abdenour Mohamed REDOUAN, Ryma LAROUM et Imen BOUALIA.* 

Abréviation	i
Introduction	1
Partie I. Etude bibliographique	6
Chapitre 1.Présentation du genre Atractylis	7
I.1.1. Famille Asteraceae	6
I.1.1.1 Distribution géographique	6
I.1.1.2. Caractères botaniques de la famille Asteraceae	6
I.1.2. Genre Atractylis	
I.1.2.1. Métabolites secondaires du genre Atractylis	9
I.1.2.1.1. Flavonoïdes	9
I.1.2.1.2. Diterpènes	
I.1.2.1.3. Triterpènes	
I.1.2.1.4. Saponines	
I.1.2.1.5. Acétylènes	
I.1.2.2. Usage en médicine traditionnelle	
I.1.2.3. Activités biologiques	
I.1.3. Atractylis cancellata L.	
I.1.3.1. Description	
I.1.3.2. Classification botanique	
I.1.3.3. Usage traditionnel	
Chapitre 2. Présentation du genre Euphorbia	19
I.2.1. Famille Euphorbiaceae	
I.2.1.1. Distribution géographique	19
I.2.1.2. Caractères botaniques de la famille Euphorbiaceae	19
I.2.2. Genre Euphorbia	21
I.2.2.1. Métabolites secondaires du genre Euphorbia	23
I.2.2.1.1. Sesquiterpènes	23
I.2.2.1.2. Diterpènes	24
I.2.2.1.3. Triterpènes	

I.2.2.1.4. Flavonoïdes	29
I.2.2.1.5. Phénols	32
I.2.2.2. Usage en médecine traditionnelle	34
I.2.2.3. Activités biologiques	35
I.2.3. Euphorbia gaditana Coss.	36
I.2.3.1. Description	36
I.2.3.2. Classification botanique	38
I.2.3.3. Usage traditionnel	38
I.2.3.4. Travaux antérieurs sur la plante	38
Références	40
Partie II. Matériel et méthodes	46
Chapitre 1. Extraction et purification d'Atractylis cancellata L. (Asteraceae)	47
II.1.1. Matière végétale	46
II.1.2. Extraction	46
II.1.3. Fractionnement et purification	46
II.1.3.1. Extrait EP	48
II.1.3.2. Extrait AcOEt	48
II.1.3.2.1. Fractionnement et purification de la fraction Acc5	49
II.1.3.2.2. Fractionnement et purification de la fraction Acc6	51
II.1.3.2.3. Fractionnement et purification de la fraction Acc9	52
II.1.3.2.4. Fractionnement et purification de la fraction Acc10	53
II.1.3.3. Extrait <i>n</i> -BuOH	55
II.1.3.3.1. Fractionnement et purification de la fraction Buc2	56
II.1.3.3.2. Fractionnement et purification de la Fraction Buc3	57
Chapitre 2. Extraction et purification d' <i>Euphorbia gaditana</i> Coss. (Euphorbiaceae)	59
II.2.1.Matière végétale	59
II.2.2. Extraction	59
II.2.3. Fractionnement et purification	60
II.2.3.1. Extrait AcOEt	61

II.2.3.1.1. Fractionnement et purification de la Fraction Acg1	
II.2.3.1.2. Fractionnement et purification de la Fraction Acg2	
II.2.3.1.3. Fractionnement et purification de la Fraction Acg3	
II.2.3.2. Extrait <i>n</i> -BuOH	
II.2.3.2.1. Fractionnement et purification de la Fraction Bug1	
II.2.3.2.2. Fractionnement et purification de la Fraction Bug2	64
II.2.3.2.3. Fractionnement et purification de la Fraction Bug3	64
Chapitre 3. Méthodes expérimentales et appareillages	
II.3.1. Chromatographie et séparation	
II.3.1.1. Extraction	
II.3.1.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)	
II.3.1.3. Chromatographie sur colonne (CC)	67
II.3.1.4. Chromatographie liquide sous vide (VLC)	67
II.3.1.5. Flash Chromatographie (FC)	
II.3.1.6. Chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC)	
II.3.1.6.1. HPLC analytique	
II.3.1.6.2. HPLC préparative	
II.3.1.6.3. HPLC semi-préparative	
II.3.1.6.4. HPLC (Gilson PLC 2050)	
II.3.2. Chimie structurale	71
II.3.2.1. Pouvoir rotatoire	71
II.3.2.2. Spectrométrie UV-Vis	
II.3.2.3. Spectrométrie Infrarouge (IR)	
II.3.2.4. Spectroscopie RMN	
II.3.2.5. Spectrométrie de Masse	
II.3.2.6. Hydrolyse acide	
II.3.3. Dosages et tests biologiques	
II.3.3.1. Dosages	
II.3.3.1.1. Dosage des phénols	

II.3.3.1.2. Dosage des flavonoïdes	73
II.3.3.2. Tests antioxydants	73
II.3.3.2.1. Test de piégeage du radical DPPH	74
II.3.3.2.2. Test de piégeage du radical ABTS	74
II.3.3.2.3. Test de réduction du fer (FRAP)	74
II.3.3.2.4. Test de réduction du cuivre (CUPRAC)	75
II.3.3.3. Activité anticholinesterase	75
II.3.3.4. Activité anti-tyrosinase	76
References	77
Partie III. Résultats et discussion	78
Chapitre 1. Etude spectrale des composés isolés d'Atractylis cancellata L	79
III.1.1. Elucidation structurale du composé <b>Ac1</b>	78
III.1.2. Elucidation structurale du composé Ac2	84
III.1.3. Elucidation structurale du composé Ac3	90
III.1.4. Elucidation structurale du composé Ac4	93
III.1.5. Elucidation structurale du composé Ac5	95
III.1.6. Elucidation structurale du composé Ac6	97
III.1.7. Elucidation structurale du composé <b>Ac7</b>	100
III.1.8. Elucidation structurale du composé Ac8	105
III.1.9. Elucidation structurale du composé <b>Ac9</b>	112
III.1.10. Elucidation structurale du composé Ac10	118
III.1.11. Elucidation structurale du composé Ac11	123
III.1.12. Elucidation structurale du composé Ac12	129
III.1.13. Elucidation structurale du composé Ac13	135
III.1.14 Elucidation structurale du composé Ac14, Ac15, Ac16 et Ac17	137
Chapitre 2. Etude spectrale des composés isolés d'Euphorbia gaditana Coss.	138
III.2.1. Elucidation structurale du composé <b>Eg1</b>	138
III.2.1.1. Détermination de la configuration absolue du sucre	145
III.2.2. Elucidation structurale du composé <b>Eg2</b>	147

III.2.3. Elucidation structurale du composé <b>Eg3</b>	154
III.2.4. Elucidation structurale du composé <b>Eg4</b>	159
III.2.5. Elucidation structurale du composé <b>Eg5</b>	160
III.2.6. Elucidation structurale du composé <b>Eg6</b>	163
III.2.7. Elucidation structurale du composé <b>Eg7</b>	164
III.2.8. Elucidation structurale du composé <b>Eg8</b>	169
III.2.9. Elucidation structurale du composé <b>Eg9</b>	171
III.2.10. Elucidation structurale du composé <b>Eg10</b>	174
III.2.11. Elucidation structurale du composé <b>Eg11</b>	179
III.2.12. Elucidation structurale du composé <b>Eg12</b>	183
III.2.13. Elucidation structurale du composé <b>Eg13</b>	187
III.2.14. Elucidation structurale du composé <b>Eg14</b>	189
III.2.15. Elucidation structurale du composé <b>Eg15</b>	192
III.2.16. Elucidation structurale du composé <b>Eg16</b>	195
III.2.17. Elucidation structurale du composé <b>Eg17</b>	198
III.2.18. Elucidation structurale du composé <b>Eg18</b>	203
III.2.19. Elucidation structurale du composé <b>Eg19</b>	206
III.2.20. Elucidation structurale du composé <b>Eg20</b>	210
III.2.21. Elucidation structurale du composé <b>Eg21</b>	213
III.2.22. Elucidation structurale du composé <b>Eg22</b>	219
III.2.23. Elucidation structurale du composé <b>Eg23</b>	224
III.2.24. Elucidation structurale du composé <b>Eg24</b>	227
III.2.25. Elucidation structurale du composé <b>Eg25</b>	230
III.2.26. Elucidation structurale du composé <b>Eg26</b>	234
III.2.27. Elucidation structurale du composé <b>Eg27</b>	237
III.2.28. Elucidation structurale du composé <b>Eg28</b>	240
III.2.29. Elucidation structurale du composé <b>Eg29</b>	242
III.2.30. Elucidation structurale du composé <b>Eg30</b>	244
III.2.31. Elucidation structurale du composé <b>Eg31</b>	246

III.2.32. Elucidation structurale du composé <b>Eg32</b>	
Chapitre 3. Etude biologique	
III.3.1. Dosage des polyphénols totaux	
III.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux	
III.3.3. Activités biologiques	
III.3.3.1. Etude biologique de la plante A. cancellata	
III.3.3.1.1. Activité antioxydante	
III.3.3.1.1.a. Test DPPH	
III.3.3.1.1.b. Test ABTS	
III.3.3.1.1.c. Test FRAP	
III.3.3.1.1.d. Test CUPRAC	
III.3.3.1.2. Activité anticholinesterase	
III.3.3.2. Etude biologique de la plante <i>E. gaditana</i>	
III.3.3.2.1. Activité antioxydante	
III.3.3.2.1.a. Activité antioxydante des extraits et des fractio	ons259
III.3.3.2.1.b. Activité antioxydante des composés isolés	
III.3.3.2.2. Activité anti-tyrosinase	
References	
Conclusion générale	
Annexes	
ملخص	Erreur ! Signet non défini.
Résumé	Erreur ! Signet non défini.
Abstract	Erreur ! Signet non défini.

### Abréviations

## Abréviation

Extraits et produits isolés

Ac	Produits isolés d'Atractylis cancellata
Acc	Fractions de l'extrait acétate d'éthyl d'Atractylis cancellata
Buc	Fractions de l'extrait n-butanol d'Atractylis cancellata
Eg	Produits isolés d'Euphorbia gaditana
Acg	Fractions de l'extrait acétate d'éthyl d'Euphorbia gaditana
Bug	Fractions de l'extrait n-butanol d'Euphorbia gaditana

Solvants et réactifs

MeCN	Acétonitrile
AcOEt	Acétate d'éthyle
Acétone-d <sub>6</sub>	Acétone deutéré
CHCl <sub>3</sub>	Chloroforme
$CH_2Cl_2$	Dichlorométhane
CD <sub>3</sub> OD	Méthanol deutéré
DMSO- $d_6$	Diméthylsulfoxyde deutéré
EP	Ether de pétrole
EtOH	Ethanol
MeOH	Méthanol
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Nitrate d'aluminium
AChE	Acétylcholinestérase
BChE	Butyrylcholinestérase
BHA	Hydroxyanisole butylé
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> K	Acétate de potassium
CuCl <sub>2</sub>	Chlorure de cuivre II
CUPRAC	Pouvoir réducteur du cuivre
C-18, ou RP-18	Silice greffée
DPPH	1,1-diphényl-2-picryl-hydrazyl
DTNB	5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoique)
FeCl <sub>3</sub>	Chlorure ferrique
FRAP	Pouvoir réducteur de fer
HCl	Acide hydrochlorique
$H_2SO_4$	Acide sulfurique
KBr	Bromure de potassium
КОН	Hydroxyde de potassium
$K_3Fe(CN_6)$	Ferricyanure de potassium
L-DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine

### Abréviations

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonate de sodium
SiO <sub>2</sub>	Gel de silice normale
TCA	Acide trichloroacétique
TFA	Acide trifluoroacétique

Technique chromatographique

CCM	Chromatographie sur couches minces
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
VLC	Chromatographie liquide sous vide

### Détermination structurale

Ultra-Violet
Infrarouge
Spectroscopie de masse
ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry
Hieght Resolution ElectroSpray Ionization Mass Spectrometry
Résonance Magnétique Nucléaire
Résonance Magnétique Nucléaire du proton
Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
COrrelated SpectroscopY
Heteronuclear Single Quantum Connectivity
Heteronuclear Multiple Bonding Connectivity
Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
Singulet
Singulet large
Doublet
Doublet large
Doublet de doublets
Doublet de doublets de doublets
Triplet
Triplet large
Septuplet
Multiplet
Déplacement chimique du proton en ppm
Déplacement chimique du carbone en ppm
Constante de couplage
masse/charge d'un ion
Pouvoir rotatoire

### Abréviations

°C	Degré Celsius
Da	Dalton
EAG	Equivalent de l'acide gallique
EQ	Equivalent de la quercétine
$J(\mathrm{Hz})$	Constante de couplage exprimée en Hertz
min	Minute
nm	Nanomètre
ppm	Partie par million

Unité des grandeurs physiques et chimiques

### Introduction

Depuis l'apparition de la vie sur la terre, l'être humain a développé une relation intelligente avec son environnement et particulièrement les différentes plantes qui l'entourent, soit pour se nourrir, se protéger ou se soigner. Il a même parvenu au cours de sa longue histoire à faire la distinction entre les espèces végétales toxiques, alimentaires, ornementales, ou médicinales. Aujourd'hui, une grande partie de la population mondiale et surtout dans les pays d'Afrique, d'Amérique latine et d'Asie se soigne avec des traitements à base de plantes médicinales préconisées et transmis par la tradition.

La flore végétale n'a pas été vraiment explorée, parmi environ 250 000 à 500 000 espèces, un pourcentage minime de plantes a été étudié sur le plan phytochimique et biologique, et dans la majorité des cas seulement un screening ou une étude préliminaire ont été effectués (Rates 2001).

L'Algérie, par la diversité de son climat et de ses sols, offre une flore particulièrement riche en plantes. Ces ressources végétales constituent incontestablement un réservoir riche en substances biologiquement actives, susceptibles d'être utilisées à des fins pharmaceutiques, diététiques, agroalimentaires et cosmétiques.

A cet effet, et vu que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de métabolites secondaires biologiquement actifs avec une grande diversité structurale, et dans le cadre de développer des médicaments à base de plantes qui pourraient maintenir et sauvegarder la santé humaine, la recherche de principes actifs extraits des plantes aromatiques et médicinales (PAM) revêt une importance capitale. Cela inspire l'industrie pharmaceutique à mener minutieusement des investigations chimiques et biologiques dans le but d'avoir de nouvelles molécules plus puissantes qui peuvent être utilisées contre les maladies récentes lesquelles ont développé une résistance médicamenteuse. C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés à ce type d'investigation phytochimique et biologique.

Pour cela, et afin de valoriser la flore locale de la région de Batna, deux plantes ont été choisies pour une étude chimique et biologique en raison de leur utilisation en médecine traditionnelle. La première plante *Atractylis cancellata* L. appartient à la famille des Asteraceae, c'est une des plus grandes familles de plantes à fleurs dans le monde. Les espèces Asteraceae sont riches en métabolites secondaires bioactifs (Dupont et al., 2012). En plus, notre laboratoire a tracé un programme pour une étude chimique et systématique des plantes du genre *Atractylis* qui comporte environ 30 espèces.

Les plantes déjà étudiées sont *A. flava* (Chabani et al., 2013 et 2016a), *A. serratuloides* (Chabani et al., 2016b) et *A. humilis* (Sifouan et al., 2020). Ces études ont conduit à la caractérisation de nombreux métabolites secondaires appartenant à diverses classes chimiques à savoir les flavonoïdes, triterpènes et saponines.

La deuxième plante étudiée dans le cadre de ce travail est *Euphorbia gaditana* Coss. Elle appartient à une des plus grandes familles des angiospermes (famille Euphorbiaceae). Cette dernière est répartie entre les deux hémisphères nord et sud du globe à part l'antarctique (Botineau 2010 ; Evans et Taylor 1983). Le genre *Euphorbia* constitué d'environ 2 000 espèces, compte une grande diversité de plantes et différentes classes de métabolites secondaires (diterpènes, triterpènes, flavonoïdes...etc.), ainsi une large gamme d'activités biologiques intéressantes comme l'activité antitumorale, antioxydante, antibactérienne, antivirale, anti-inflammatoire, cytotoxicité, activité trypanocidale ...etc. (Shi et al., 2008 ; Singla et Pathak 1990 ; Jassbi 2006 ; Benabdelaziz et al., 2018 ; Mouffouk et al., 2019).

Il est à rappeler que notre laboratoire est distingué en Algérie par l'investigation phytochimique et biologique des plantes du genre *Euphorbia* poussant dans la région des Aurès et du nord de Sahara, telles que *E. retusa* (Haba et al., 2009a), *E. guyoniana* (Haba et al., 2007, 2009b et 2013), *E. bupleuroides* (Aichour et al., 2014), *E. pterococca* (Benabdelaziz et al., 2018) et *E. atlantica* (Mouffouk et al., 2019). Ces études ont abouti à l'identification d'un nombre important de métabolites secondaires dont 15 nouvelles molécules avec différents squelettes diterpéniques et triterpéniques. En plus, des bioactivités prometteuses sur des extraits et produits purs ont été établies (Benabdelaziz et al., 2019).

L'étude phytochimique a été faite sur la plante entière *A. cancellata* et les parties aériennes de l'espèce *E. gaditana*, en utilisant les différentes méthodes chromatographiques de séparation et de purification et les méthodes d'analyse spectroscopiques. Cela a permis d'isoler et d'identifier un nombre considérable de métabolites secondaires des deux espèces en question de types alcaloïde, tannin,  $\alpha$ -pyrone, flavonoïde, acide phénolique et triterpène. Par ailleurs, les extraits organiques et quelques composés isolés à l'état pur de la plante *A. cancellata* ont été examinés pour leur pouvoir antioxydant et anticholinesterase. D'autre part, les extraits organiques, les fractions ainsi que les produits purifiés de la deuxième plante *E. gaditana* ont été évalués pour leurs capacités antioxydantes et anti-tyrosinase.

### Introduction

Notre travail décrit dans ce manuscrit sera divisé en trois grandes parties :

- La première partie est présentée comme un rappel bibliographique sur les plantes étudiées *Atractylis cancellata* et *Euphorbia gaditana*, leurs genres *Atractylis* et *Euphorbia* et familles Asteraceae et Euphorbiaceae, les métabolites secondaires isolés, l'utilisation en médecine traditionnelle et les activités biologiques y afférentes.

- La deuxième partie est consacrée à l'étude chromatographique et l'évaluation biologique des deux plantes *A. cancellata* et *E. gaditana*; ensuite, il est décrit les appareils et les méthodes utilisés, ainsi que les protocoles expérimentaux suivis lors de la réalisation des activités biologiques antioxydante, anticholinesterase et anti-tyrosinase.

- La troisième partie présente l'élucidation structurale des produits isolés (**1-49**) à partir des deux espèces étudiées, à l'aide des différentes méthodes spectroscopiques la RMN 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>13</sup>C *J*-modulé et DEPT) et 2D (COSY, HSQC, HMBC et NOESY), la spectrométrie de masse (HR-ESI-MS et ESI-MS), l'IR, l'UV-Vis, la mesure du pouvoir rotatoire [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>, l'hydrolyse acide et la comparaison avec les données de la littérature. Ainsi, les résultats obtenus des activités biologiques réalisées sur les extraits, fractions et produits purs isolés ont été discutés.

Le manuscrit se termine par une conclusion générale.

- Aichour S, Haba H, Benkhaled M, Harakat D, Lavaud C. 2014. Terpenoids and other constituents from *Euphorbia bupleuroides*. Phytochemistry Letters. 10: 198-203.
- Benabdelaziz I, Gomez-Ruiz S, Benkhaled M, Carralero S, Schenker P, Salm A, Gertsch J, Haba H. 2018. New cycloartane-type ester triterpenes from *Euphorbia pterococca* and biological evaluation. Fitoterapia. 127: 271-278.
- Botineau M. 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Editions TEC and DOC. Paris.
- Chabani S, Haba H, Lavaud C, Benkhaled M, Harakat D. 2013. Flavonoid glycosides and triterpenoids from *Atractylis flava*. Phytochemistry Letters. 6: 9-13.
- Chabani S, Lavaud C, Benkhaled M, Harakat D, Long C, Haba H. 2016a. Three new oleanane-type triterpene saponins from *Atractylis flava*. Phytochemistry Letters. 15: 88-93.
- Chabani S, Haba H, Long C, Benkhaled M. 2016b. Chemical composition of medicinal plant *Atractylis serratuloides*. Industrial Crops and Products. 88: 91-95.
- Dupont F, Guignard JL, Pelt JM. 2012. Botanique: les familles des plantes, Elsevier Masson 15<sup>émé</sup> Ed.
- Evans FJ, Taylor SE. 1983. Pro-inflammatory, tumor promoting and antitumor diterpene of the plant families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. 44: 1-99.
- Haba H, Lavaud C, Alabdul Magid A, Benkhaled M. 2009a. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia retusa*. Journal of Natural Products. 72: 1258-1264.
- Haba H, Marcourt L, Benkhaled M, Long C. 2013. Minor *ent*-abietane diterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. Natural Product Communications. 8(11): 1519-1522.
- Haba H, Lavaud C, Harkat H, Alabdul Magid A, Marcourt L, Benkhaled M. 2007. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. Phytochemistry. 68: 1255-1260.
- Haba H, Lavaud V, Marcourt L, Long C, Harkat H, Benkhaled M. 2009. *Ent*-abietane diterpenoids from *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. Biochemical Systematics and Ecology. 37: 504-508.

- Jassbi AR. 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. Phytochemistry. 67: 1997-1984.
- Mouffouk S, Gomez-Ruiz S, Benkhaled M, Carralero S, Haba H. 2019. Phytochemical composition, antioxidant and antibacterial activities of crude extracts from the species *Euphorbia atlantica* Coss. Pharmaceutical Chemistry Journal. 53(9): 831-837.

Rate SMK. 2001. Plants as source of drugs. Toxicon. 39: 603-613.

- Shi QW, Su XH, Kiyota H. 2008. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. Chemical Review. 108: 4295-4327.
- Sifouane S, Benabdelaziz I, Benkhaled M, Gomez-Ruiz S, Carralero S, Haba H. 2020. Biochemical Systematics and Ecology. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bse.2020.104018.

Singla AK, Pathak K. 1990. Phytoconstituents of *Euphorbia* species. Fitoterapia. 41(6): 483-516.

## Partie I Etude bibliographique

# Chapitre 1. Présentation du genre *Atractylis*

### I.1.1. Famille Asteraceae

La famille Asteraceae, dénommée aussi Compositae, représente environ 10% des plantes à fleurs. Elle comporte entre 24 000 et 30 000 espèces regroupées en 1600 - 1700 genres, et se définit comme la plus importante famille des Angiospermes (Dupont et al., 2012; Funk et al., 2005; Heywood et al., 2007).

### I.1.1.1. Distribution géographique

La famille Asteraceae est répandue dans le monde entier sauf les régions de l'Antarctique. Elle se concentre particulièrement dans les zones tempérées. C'est la plus grande famille de plantes à fleurs dans le monde (Kadereit et Jeffrey 2007).

### I.1.1.2. Caractères botaniques de la famille Asteraceae

Les Asteraceae sont des plantes herbacées, annuelles, bisannuelles ou vivaces, rarement arbustives à arborescentes. Cette famille se distingue essentiellement par sa structure florale uniforme, sa grande variété écologique, son caractère cosmopolite, et son inflorescence en capitule (Figure 1). Le capitule est formé de fleurs sessiles, serrées en tête sur un réceptacle commun, entourées d'un involucre de bractées. Cette inflorescence contractée simule une fleur. Le capitule présente un réceptacle entouré par un involucre de bractées stériles. Les fleurs sessiles s'insèrent sur le réceptacle qui peut être bombé, plan ou concave, et dépourvu ou non de paillettes (correspondant aux bractées des fleurs), caractère de détermination. Le calice a perdu son rôle de protection, joué par l'involucre et est réduit. Il peut aussi constituer l'organe de dissémination sous forme d'une aigrette, c'est-à-dire une couronne de soies simples ou plumeuses ou d'écailles, appelée chez les Asteraceae pappus. La corolle est constituée de généralement 5 pétales. Elle peut être régulière et on a affaire à des fleurons ou fleurs tubuleuses. Elle peut être irrégulière. Le limbe terminant le tube de la corolle peut être déjeté sur le côté en lame aplatie à 3 ou 5 dents. On parle de demi-fleurons ou fleurs ligulées. Les étamines, au nombre de 5, sont soudées à la corolle. Elles sont généralement liées par leurs anthères et sont dites synanthérées. Leurs anthères liées forment un tube à l'intérieur duquel passe le style. L'ovaire est infère et constitué de 2 carpelles. Le fruit sera 1 akène, surmonté ou non du pappus (Dupont et al., 2012; Kadereit et Jeffrey 2007).

Vu la complexité et la diversité de la famille Asteraceae (Figure I.1), plusieurs classifications ont été effectuées. Une classification plus précise de cette grande famille a été élaborée après de nombreux travaux de recherches (Bremer et Anderberg 1994).



Figure I.1. Plantes à fleurs de la famille Asteraceae

### I.1.2. Genre Atractylis

Le genre *Atractylis* de la famille Asteraceae comprend environ 30 espèces dont 16 poussent en Afrique du nord (Quezel et Santa 1963). Ces espèces sont des plantes très épineuses, présentant un aspect de petits chardons, à capitules entourés par des feuilles supérieures (dites feuilles involucrales) et dont les bractées externes sont elles-mêmes épineuses (souvent bordées d'un rang régulier d'épines bifurquées) ; à chaines velues, surmontées d'une aigrette blanche très fournie (Figure I.2). Ce sont des plantes annuelles, bisannuelles ou vivaces, à racine grêle, tige ramifiée dès la base et rameaux très étalés et feuillés avec une petite base, molles, peu épineuses. Les feuilles involucrales, à divisions étroites forment un peigne régulier à dents fines, des bractées portant une longue pointe ; et des fleurs qui sont purpurines (Ozenda 2004).

Les fleurs du rayon sont stériles et se trouvent sur un rang, parfois transformées en ligules radiantes ; celles du disque sont hermaphrodites. Le réceptacle est plan, à longues paillettes étroites, multifides, et concrescentes à la base en un tube très court. Les akènes sont cylindriques oblongs, à aigrette de poils 1-2 sériés, libres ou soudés en anneau à la base et plumeux supérieurement (Quezel et Santa 1963). Localement, les plantes *Atractylis* sont appelées «Assennane = dents» à cause de leurs épines.



Figure I.2. Plantes du genre Atractylis

### I.1.2.1. Métabolites secondaires du genre Atractylis

Il y a lieu de signaler que peu de travaux phytochimiques se sont intéressés à l'identification des métabolites secondaires des espèces du genre *Atractylis*. Ces études ont mené particulièrement à l'isolement et la caractérisation de flavonoïdes, diterpènes, triterpènes, saponines et acétylènes.

### I.1.2.1.1. Flavonoïdes

Les études des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *A. flava* (*A. carduus*), ainsi que les feuilles d'A. *gummifera* ont permis l'isolement et l'identification de dix-huit flavonoïdes (**1-18**) avec différentes squelettes et différentes parties osidiques (Figure I.3 et Tableau I.1).

On note l'identification de cinq flavonoïdes non glycosylés (**1-5**) (chrysine, apigénine, quercétine, ladanéine et isorhamnetine), cinq autres flavonoïdes mono-glycosilés (**6-10**) (isorhamnetine-3-*O*-glucuronide, atraflavoside A, orientine, isoorientine et isorhamnétine-3-*O*-robinobioside) et huit flavonoïdes di-glycosilés (**11-18**) (tiliroside, narcissine, vicenine 3, schaftoside, isoschaftoside, neocorymboside, vicenine 2 et atraflavoside B). Tous les sucres sont liés à la génine flavonoïdique en positions C-3, C-6, C-7 et/ou C-8, en particulier le glucose, galactose, rhamnose, xylose et arabinose (Chabani et al., 2013 ; Chabani et al., 2016a ; Chaboud et al., 1988 ; Melek et al., 1992).



9



Figure I.3. Structures des flavonoïdes isolés du genre Atractylis

Tableau I.1	. Flavonoïdes	isolés du	genre Atractylis
-------------	---------------	-----------	------------------

N°	Composés	Source biologique	Références
1	Chrysine		Chabani et al., 2013
2	Apigénine		
3	Quercétine		Chabani et al., 2013
		A. flava	Melek et al., 1992
4	Ladanéine		Chabani et al., 2016a
5	Isorhamnétine		Melek et al., 1992
6	Isorhamnétine-3-O-glucuronide		
7	Atraflavoside A		Chabani et al., 2013
8	Orientine	A. gummifera	Chaboud et al., 1988
9	Isoorientine		
10	Isorhamnétine-3-O-robinobioside		Chabani et al., 2016a
11	Tiliroside		Chabani et al., 2013
12	Narcissine	A. flava	Chabani et al., 2013
			Melek et al., 1992
13	Schaftoside		Chabani et al., 2013
			Melek et al., 1992
14	Isoschaftoside	A. gummifera	Chaboud et al., 1988

15	Neocorymboside		
16	Vicenine 3		Chabani et al., 2013
17	Vicenine 2	A. flava	Melek et al., 1992
18	Atraflavoside B		Chabani et al., 2013

### I.1.2.1.2. Diterpènes

Deux diterpènes osidiques nommés atractyloside (**19**) et 4-carboxyatractyloside (**20**) (Figure I.4 et Tableau I.2) ont été isolés des racines de la plante toxique *A. gummifera*. Il est à noter que plusieurs études biologiques ont été réalisées sur ces composés en mentionnant leur forte toxicité (Riccio et al., 1973 ; Danieli et al., 1972 ; Chen et al., 2013).



Figure I.4. Structures des diterpènes isolés du genre Atractylis

Une étude a été faite sur la dégradation de ces toxines (**19** et **20**) par un traitement hydrothermique (décoction), où l'effet de la chaleur en milieu acide engendre la séparation de la génine de la partie osidique. Cette génine est 150 fois moins toxique que les diterpènes (**19** et **20**) (Riccio et al., 1973 ; Danieli et al., 1972 ; Chen et al., 2013).

Tableau I.2. Diterpènes isolés du genre Atractylis

N°	Composés	Source biologique	Références
19	Atractyloside	A. gummifera	Riccio et al., 1973
20	4-CarboxyAtractyloside		Danieli et al., 1972

### I.1.2.1.3. Triterpènes

Treize composés (**21-33**) de types triterpènes tétracycliques et pentacycliques ont été isolés des espèces *A. flava* et *A. serratuloides* (Figure I.5).



Figure I.5. Structures des triterpènes isolés du genre Atractylis

La moitié des triterpènes isolés sont des dérivés de l'acide oléanolique, et l'autre moitié se compose des dérivés de stérol, lupéol et betuline (Tableau I.3) (Chabani et al., 2016b et 2013 ; Melek et al., 1989).

	Composés	Source	Références
		biologique	
21	Acide 3-acétoxyoléanolique	A. serratuloides	Chabani et al., 2016b
22	Acide oléanolique	A. serratuloides	Chabani et al., 2016b
		A. flava	Chabani et al., 2013
23	Caulophyllogénine	A. serratuloides	Chabani et al., 2016b
24	Hederagénine	A. flava	
25	Acide $22\beta$ -hydroxy oléanolique	-	Chabani et al., 2013
26	Lupénone		
27	Lupéol acétate	A. serratuloides	Chabani et al., 2016b
28	Lupéol		

Tableau I.3.	Triterpènes	isolés du	genre Atractylis
I ubicuu Iici	1 morpones	100100 44	Someration

29	Bétuline	A. flava	Melek et al., 1989
30	$\beta$ -sitostérol	A. serratuloides	Chabani et al., 2016b
31	Daucostérol	A. serratuloides	Chabani et al., 2016b
		A. flava	Chabani et al., 2013
32	Stigmastérol	A. flava	Melek et al., 1989
33	Stigmastérol-3-O-glucoside		Chabani et al., 2013

### I.1.2.1.4. Saponines

L'étude réalisée par Chabani et al. (2016a) sur la plante *A. flava* a permis l'isolement et l'identification de plusieurs métabolites secondaires de type flavonoïdes et triterpènes, ainsi que trois saponines nouvelles (**34-36**) dérivées d'acide gypsogenique et l'acide quillaique à partir de l'extrait *n*-BuOH (Figure I.6 et Tableau I.4).



Figure I.6. Structures des triterpènes isolés du genre Atractylis

La partie osidique est représentée par les sucres de type glucose, rhamnose, xylose, arabinose et acide glucuronique. Ces sucres sont liés à la génine en positions C-3 et C-28 (à l'acide) (Chabani et al., 2016a).

Tableau I.4. Sap	onines isolées	du genre A	tractylis
------------------	----------------	------------	-----------

N°	Composés	Source	Référence
		biologique	
34	Acide 3- $O$ -[ $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-28- $O$ -[ $\beta$ -D-		Chabani et al.,
	xylopyranosyl-(1-4)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- $\beta$ -D-	A. flava	

	xylopyranosyl]-16a-hydroxygypsogénique		2016a
35	Acide 3- $O$ -[ $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-28- $O$ -[ $\beta$ -D-	A. flava	
	xylopyranosyl-(1-4)-a-L-rhamnopyranosyl-(1-2)-a-L-		
	arabinopyranosyl]-16-α-hydroxygypsogénique		
36	acide 3- <i>O</i> -[β-D-galactopyranosyl-(1-2)-β-D-		Chabani et al.,
	glucuronopyranosyl]-28- $O$ -[{ (3- $O$ -acetyl)- $\beta$ -D-		2016a
	xylopyranosyl}-(1-4)- { (2- $O$ -acetyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl}-		
	$(1-2)$ - $\beta$ -D-xylopyranosyl]-quillaique		

### I.1.2.1.5. Acétylènes

En 1990, une étude phytochimique a été réalisée sur l'extrait éther de pétrole des racines de la plante *A. koreana* conduisant à l'isolement et la caractérisation de six acétylènes (**37-42**) à chaines contenant onze et douze carbones hydroxylés ou acétylés (Figure I.7 et Tableau I.5) (Pachaly et al., 1990).



Figure I.7. Structures des acétylènes isolés du genre Atractylis

	Tableau	I.5.	Acétylènes	isolés d	lu genre A	tractylis
--	---------	------	------------	----------	------------	-----------

N°	Composés	Source	Références
		biologique	
37	(6E,12E)-tétradéca-6,12-diène-8,10-diyne-1,3-diyl		
	diacétate	A. koreana	Pachaly et al., 1990
38	(6E, 12E)-3-hydroxytétradéca-6,12-diéne-8,10-diyn-1-		
	yl acétate		

39	(6E, 12E)-1-hydroxytétradéca-6,12-dién-8,10-diyn-3-		
	yl acétate		
40	(3E,5E,11E)-tridéca-3,5,11-trién-7,9-diyn-1-ol		
41	(3E,5Z,11E)-tridéca-3,5,11-trién-7,9-diyn-1-ol	A. koreana	Pachaly et al., 1990
42	(4E, 6E, 12E)-tétradéca-4,6,12-trién-8,10-diyne-1,3-		
	diyl diacétate		

### I.1.2.2. Usage en médicine traditionnelle

Les espèces du genre *Atractylis* sont utilisées en médecine traditionnelle pour leurs diverses propriétés thérapeutiques. L'Afrique du nord présente une diversité florale à plusieurs espèces appartenant à ce genre. Parmi ces espèces on trouve :

L'espèce *Atractylis gummifera* L. ou « chardon à glu » en France et « el-heddah » dans les pays arabes, est très connue pour sa toxicité, à cause de ces composés atractylosides type diterpène-osidique renfermés dans ses racines. Plusieurs cas d'intoxication ont été reportés chez les animaux et les êtres humains particulièrement les enfants qui mâchent les racines de cette espèce, à cause de son jus sucré à forte odeur. En médecine traditionnelle, elle est employée contre les parasites intestinaux, les ulcères et les morsures de serpents. En plus, elle est préconisée sous forme de décoction ou cataplasme pour à ses effets diurétique, dermatologique, antipyrétique et purgatif, ainsi que pour le traitement de la syphilis. En médecine vétérinaire, elle est recommandée contre les parasites (Daniele et al., 2005 ; Larrey 1995 ; Najem et al., 2018 ; Toilabiya et al., 2013 ; Botineau 2010).

*Atractylis lancea* (*Atractylodes lancea* (Thunb.) DC.) est utilisée pour traiter les problèmes gastriques et intestinaux, elle est aussi employée en Chine depuis plusieurs années pour l'amélioration de la vue et les troubles gastro-intestinaux (Chen et al., 2013 ; Guo et al., 2013).

Les deux plantes *Atractylis flava* et *Atractylis babeli* sont préconisées sous forme de décoction pour leur effet diurétique (El Rhaffari et Zaid 2002).

Les espèces Atractylis serratuloides et Atractylis delicatula sont recommandées pour traiter le désordre circulatoire ainsi que l'hépatite (El Rhaffari et Zaid 2002).

### I.1.2.3. Activités biologiques

Peu d'investigations biologiques se sont focalisées sur le genre *Atractylis*. Toutefois, une étude menée par Guo et al. (2013) sur la plante *A. lancea* a montré le pouvoir de l'extrait EtOH de provoquer la mort des cellules et d'inhiber leur prolifération, ce qui pourrait être bénéfique en cas de cancer. Les composants majeurs de *A. lancea* induisent l'apoptose et réduisent la prolifération des cellules cancéreuses du poumon (Guo et al., 2013).

Les deux extraits AcOEt et MeOH de l'espèce *A. serratuloides* ont été évalués pour leur pouvoir antioxydant en utilisant les méthodes de piégeage du radical ABTS et DPPH. Ces deux extraits ont montré une forte inhibition de ces radicaux libres par rapport au standard BHT (Bouaziz et al., 2009).

Les travaux *in-vivo* des deux équipes Melakhessou et al. (2018) et Melek et al. (1992) sur l'espèce *A. flava*, ont montré que son extrait MeOH présente un pouvoir anti-inflammatoire et antipyrétique important.

Une étude pharmacologique effectuée sur les extraits hexanique et méthanolique des parties aériennes de la plante *A. carduus (A. flava)* poussant en Egypte a révélé une activité antibactérienne remarquable. En effet, cette investigation a montré que ces extraits possèdent un effet sur les bactéries Gram positif (*staphylococcus aureus* et *bacillus cereus*) et Gram négatif (*klepsiella pneumonia*) (Abdel Rahman et al., 2011).

Les extraits de la plante *A. babelii* obtenus par deux méthodes d'extraction ont montré une bonne activité antioxydante (Boudebaz et al., 2015).

Les extraits hexanique, AcOEt, MeOH et H<sub>2</sub>O des partie aériennes de la plante *A. serratuloides* poussant en Tunisie ont fait l'objet d'une étude antibactérienne indiquant que l'extrait AcOEt est le plus actif vis-à-vis des bactéries *pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *salmonella enterica* (Bouaziz et al., 2009).

### I.1.3. Atractylis cancellata L.

#### I.1.3.1. Description

L'espèce *Atractylis cancellata* L. est rencontrée dans la région méditerranéenne et ne dépasse pas au sud et la zone pré-désertique (Figure I.9). C'est une petite plante annuelle herbacée de 3-25 cm à racine grêle. Les bractées de l'involucre supplémentaire sont égales ou dépassent le capitule, écartées et très lâches. L'involucre proprement dit à bractées ovales-lancéolées, apiculées mais inermes et fleurs purpurines, est uni ou multicaule (Figure I.8).



Figure I.8. Atractylis cancellata L.

Les fleurs intérieures sont courtes, toutes tubuleuses et hermaphrodites. Les graines sont couvertes d'une laine rousse. Les feuilles sont lancéolées ou linéaires, incisées-dentées, ciliées-spinuleuses et à dents se terminant en épine faible. Les capitules solitaires sont ovoïdes ou subglobuleux. Les akènes périphériques sont avortés. En Algérie, on la retrouve dans les forêts, les pâturages, et les champs. La population rurale l'appelle « Nedjemma = étoile ». La floraison de l'espèce *A. cancellata* commence le mois de mai jusqu'à juillet (Ozenda 2004, Quezel et Santa 1963).



Figure I.9. Distribution de l'espèce Atractylis cancellata L. [1]

### I.1.3.2. Classification botanique

L'espèce Atractylis cancellata L. est classée comme suit (Tableau I.6) (Quezel et Santa 1963):

Règne	Plantae
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Asteridae
Famille	Asteraceae
Tribu	Cardueae
Sous-tribu	Carlininea
Genre	Atractylis L.
Espèce	Atractylis cancellata L.

### I.1.3.3. Usage traditionnel

La plante *Atractylis cancellata* L. occupant une importante place en médecine traditionnelle, elle est utilisée dans les pays d'Afrique du nord sous forme de friction ou cataplasme pour traiter les affections dermatologiques. En usage interne, la décoction des racines est recommandée comme purgatif (Bammou et al., 2015 ; Najem et al., 2018).

## Chapitre 2. Présentation du genre *Euphorbia*

### I.2.1. Famille Euphorbiaceae

La famille Euphorbiaceae, famille de plantes à fleurs de type euphorbe d'où vient la dénomination famille d'Euphorbe, est l'une des plus grandes familles des angiospermes contenant environ 8 000 espèces réparties en 310 genres. Les genres les plus larges de cette famille sont le genre *Euphorbia* avec environ 2000 espèces, *Croton* avec environ 750 espèces, *Phyllanthus* avec 600 espèces, *Acalypha* de 400 espèces, *Glochidon* de 300 espèces, *Macaranga* avec 280 espèces, *Jatropha* de 175 espèces, *Antidesma* qui comporte 170 espèces, *Tragia* et *Manihot* avec 100 espèces chacun (Botineau 2010). Beaucoup d'espèces de cette famille produisent des diterpènes toxiques (Evans et Taylor 1983).

### I.2.1.1. Distribution géographique

La famille Euphorbiaceae est présente dans les deux hémisphères du globe sauf l'Antarctique. De nombreuses espèces sont de mauvaises herbes, elles envahissent les terres cultivées en tant que croissance secondaire et se considèrent comme nocifs pour la santé des humains et du bétail en pâturage (Evans et Taylor 1983).

### I.2.1.2. Caractères botaniques de la famille Euphorbiaceae

La famille Euphorbiaceae est très hétérogène et comporte une grande diversité au niveau de l'appareil végétal. On rencontre des arbres comme le genre *Hevea*, des arbustes, des lianes, des plantes succulentes et des cactiformes qui s'adaptent à la sécheresse au niveau des régions tropicales, des herbes vivaces (comme la Mercuriale des bois) ou des herbes annuelles (comme la Mercuriale des jardins) voire même des herbes flottantes (Figure I.10) (Botineau 2010 ; Dupont et al., 2012).

Le feuillage est également plus varié, le plus souvent simple, entier et alterne. Les feuilles peuvent être aussi composées, palmées comme chez le Manioc ; entières mais plus ou moins découpées, souvent palmées (Ricin) et parfois opposées comme chez les Mercuriales (Dupont et al., 2012). Pour la majorité des genres, la famille peut être reconnue par les fleurs unisexuées sous forme de disque. Les inflorescences sont très variées : grappes, épis, panicules cymeuses, qu'on le retrouve surtout dans le genre *Euphorbia*. Ce dernier est constitué d'un type d'inflorescence très spéciale, le *cyathium*. Les fleurs sont unisexuées à périanthe présent ou nul, monoïques ou dioïques. Les fleurs mâles à plusieurs étamines sont libres, soudées ou ramifiées, tandis que les fleurs femelles à 3 carpelles uniovulés sont de style bifide ou plumeux. Les fruits secs comportent 3 coques et les graines sont

pourvues d'une caroncule. Il est à signaler que le latex est présent dans de nombreux genres (Quezel et Santa 1963, Webster 1967).

La famille Euphorbiaceae est vaste et variée et comporte plusieurs espèces très connues et employée dans plusieurs domaines économiques, ornementales, alimentaires .... A titre d'exemples, les hévéa originaires du Brésil, cultivés dans plusieurs régions tropicales d'Afrique, sont considérés comme la source la plus importante de caoutchouc naturel.

La plupart des populations africaines des régions forestières se nourrissent du tapioca qui vient des tubercules de manioc. Les graines du ricin (*Ricinus communis* L.) renferment une grande quantité de lipides à base de l'acide ricinoléique (un acide gras saturé), l'huile obtenue par la pression à froid de ces graines est préconisée pour l'éclairage dans les civilisations antiques, aussi employée comme laxatif et purgatif. Les poinsettia sont utilisées comme Euphorbes décoratives (Dupont et al., 2012 ; Botineau 2010).

De nombreuses tentatives ont été faites pour classer cette famille, on prend par exemple la classification qui divise la famille en quatre sous-familles en fonction de paramètres morphologiques : Phyllanthoideae, Crotonoideae, Poranteroideae et Ricinocarpoideae.

Les diterpènes favorisant les tumeurs et pro-inflammatoires ont été obtenus à partir de la sous-famille Crotonoideae. Cette sous-famille a été divisée en deux tribus connues sous le nom de Crotoneae et d'Euphorbieae. La tribu Euphorbieae se caractérise par une inflorescence sous forme de cyathium et a récemment été subdivisée en trois sous-tribus, Pimelodendrinae, Hippomanae et Euphorbiinae. La sous-tribu Euphorbiinae contient les genres produisant du diterpène comme *Euphorbia* et *Elaeophorbia*, avec *Pedilanthus* et *Synadenium* (Evans et Taylor 1983).


Figure I.10. Quelques plantes de la famille Euphorbiaceae

# I.2.2. Genre Euphorbia

Le genre *Euphorbia* est le plus grand genre de la famille Euphorbiaceae, comprenant environ 2000 espèces (Shi et al., 2008), dont au minimum 40 espèces en Algérie (Quezel et Santa 1963). Il comprend une vaste et diverse gamme de plantes (Figure I.11), caractérisées par la présence d'un latex irritant riche en composés bioactifs constitués des unités isoprénoïdes. Les diterpénoïdes constituant la majorité des composants chimiques du genre *Euphorbia* avec de nombreux squelettes de base tels que jatrophane, lathyrane, tigliane, ingénane, myrsinol ..... sont connus par leur irritation en contact avec la peau, ainsi par leur promotion des tumeurs. Les alcools triterpéniques tétracycliques de types

cycloartane, euphane, lanostane..., trouvés dans le latex ont été utilisés comme marqueurs chimiotaxonomiques du genre (tels que  $\alpha$ -euphol et  $\alpha$ -euphorbol). De plus, des sesquiterpénoïdes, des phloracétophénones, des cérébrosides, des glycérols, des flavonoïdes et des stéroïdes ont également été obtenus à partir des plantes du genre *Euphorbia* (Shi et al., 2008 ; Singla et Pathak 1990 ; Jassbi 2006 ).



Figure I.11. Quelques plantes du genre Euphorbia

Les espèces du genre *Euphorbia* sont des herbacées (vivaces ou annuelles) ou arbustes, qui contiennent un latex sous forme d'un lait blanc qui leur a valu cet ancien surnom de « tithymale » (ce qui signifie « tendre mamelle »), ce latex peut être un purgatif violent et irritant pour la peau (Botineau 2010).

Les feuilles sont simples et rarement stipulées. Les fleurs sont unisexuées, groupées en inflorescence complexe (cyathes) et disposées en ombelles feuillées. Le cyathe est constitué par une fleur femelle centrale et 5 cymes exiguës de fleurs mâles, réduites en général à une étamine, le tout enveloppé dans un involucre cupuliforme à 4-5 lobes présentant dans les sinus une glande charnue de

forme variable. Les inflorescences mâles et femelles sont portées sur le même pied. Les carpelles sont soudés en ovaire supère à 3 loges uniovulées. Le style est bifide, capsule tricoque, très généralement déhiscente.

La détermination de certaines espèces algériennes d'Euphorbes est très délicate et nécessite l'examen de la capsule et des graines à un assez fort grossissement (Quezel et Santa 1963 ; Botineau 2010 ; Shu et al., 2008).

La plante *Euphorbia myrsinites* L. connue de l'Italie jusqu'à la Turquie, est citée comme une plante dangereuse. Le contact de cette plante avec la peau induit des cloques et œdèmes. Des troubles oculaires peuvent être engendrés par le contact du latex de quelques *Euphorbes* cactiformes avec la muqueuse ophtalmique comme *Euphorbia lactea* Haw., *Euphorbia royleana* Boiss. ou *Euphorbia tirucalli* L. (Botineau 2010).

#### I.2.2.1. Métabolites secondaires du genre Euphorbia

Les parties recherchées des espèces *Euphorbia* comprennent les racines, les graines, le latex, les tubes lactifères, les feuilles et les plantes entières (Shi et al., 2008). Par ailleurs, il est déjà mentionné que les espèces du genre *Euphorbia* sont particulièrement riches en diterpènes, triterpènes et flavonoides. On cite ci-dessous quelques exemples de métabolites secondaires isolés à partir des plantes *Euphorbia*.

#### I.2.2.1.1. Sesquiterpènes

En 1997, l'extrait acétone de la plante entière *Euphorbia wangii* a fait l'objet d'une étude phytochimique par l'équipe de Shi et al. (1997). Cette étude a abouti à l'isolement et l'identification de sept sesquiterpènes (**43-49**), dont six sont des dérivés du *trans*-caryophyllene, et un clovandiol (Figure I.12 et Tableau I.7).



Figure I.12. Structures des sesquiterpènes isolés du genre Euphorbia

N°	Composés	Source biologique	Référence
43	Cyclocaryophyll-4-èn-8-ol		
44	Euphanginol		
45	Euphanginol acétate		
46	14-hydroxy-4β,5α,-époxy-4,5-		
	dihydrocaryophyllène	E. Wangii	Shi et al., 1997
47	14-acétoxy-4β,5α,-époxy-4,5-		
	dihydrocaryophyllène		
48	$\beta$ -Caryophyllène		
49	Clovandiol		

# Tableau I.7. Sesquiterpènes isolés du genre Euphorbia

#### I.2.2.1.2. Diterpènes

Nombreux diterpènes (**50-77**) ont été isolés durant ces dernières décennies, à partir des espèces *Euphorbia* soit à partir d'une partie de la plante, de la plante entière ou surtout du latex. On remarque la présence de plusieurs squelettes diterpéniques à savoir abiétane, tigliane, kaurène, atisane, pepluane, lathyrane, myrsinane, premyrsinane, ingenanse, et surtout le squelette jatrophane qui caractérise la famille Euphorbiaceae. La recherche documentaire montre que plusieurs molécules diterpèniques à squelette jatrophane sont substituées par des groupements acétyle, benzoyle, isobutyryle, butanoyl, tigloyl, nicotinoyl et angeloyl (Figure I.13 et Tableau I.8).





Figure I.13. Structures des diterpènes isolés du genre Euphorbia

Tableau I.8	. Diterpènes	isolés du	genre	Euphorbia
-------------	--------------	-----------	-------	-----------

N°	Composés	Source	Références
		biologique	
50	Retusolide A	E. retusa	Haba et al.,
51	Retusolide E	-	2009a
52	11,16-epoxy-ent-abieta-8,11,15-triéne-13,14-dione		Haba et al.,
53	11-hydroxy-ent-abieta-8,11,13-trién-15-one	Е.	2009b
54	Ent-abieta-8,11,13-trién-16-ol	guyoniana	Haba et al.,
55	Ent-abieta-8,11,13-trién-11,16-diol	-	2013
56	Ebractéolata A	Е.	Yuan et al.,
57	Ebractéolata B	ebracteolata	2016
58	Ent-16-a,17-dihydroxyatisan-3-one	E. stracheyi	Liu et al.,

59	Ent-(16R)-16,17-dihydroxykauran-3-one		2019
60	(2S,3S,4R,5R,6R,8R,11R,13S,14S,15R, 16R)-5,8,15-		
	triacétoxy-3-benzoyloxy-11,16-dihydroxy-9-oxopepluane	F nenlus	Hua et al
61	(2S,3S,4R,5R,6R,8R,9R,11R,13S,14S,15R,16R)-5,8,9,15-	L. pepius	2017
	tétra-acétoxy-3-benzoyloxy-11,16-dihydroxypepluane		2017
62	4,12-dideoxy(4a)phorbol-13-hexadecanoate	Е.	Haba et al.,
		guyoniana	2007
63	5- <i>O</i> -benzoyl-3- $\beta$ -hydroxy-20-déoxyingénol		D ( 1
64	$3-O$ -benzoyl- $3-\beta$ -hydroxy- $20$ -déoxyingénol	E. kansui	Peng et al.,
65	4-acétoxy-5-O-benzoyl-3-β-hydroxy-20-déoxyingénol		2012
66	Jolkinol A	E. stracheyi	Liu et al.,
67	Jolkinol A'		2019
68	3,5,13,17-tétra-acétoxy-7-O-benzoyl-15-hydroxymyrsinol	E. decipiens	Ahmad et
69	3,5,13,17-tetra-acétoxy-7-O-butanoyl-13-hydroxymyrsinol		al., 2005
70	Ebracteolata C	Е.	Yuan et al.,
		ebracteolata	2016
71	(2S,3S,4S,5R,7R,9R,13R,15R)-3,5,7,15- tetra-acétoxy-9-		
	nicotinoyloxy-14-oxojatropha-6(17),11-diéne		
72	(2R,3R,4S,5R,7S,8S,9S,13S,15R)-2,5,8-tri-acétoxy-3-		
	benzoyloxy-15-hydroxy-7-isobutanoyloxy-9-nicotinoyloxy-		
	14-oxojatropha-6(17),11E-diéne		
73	(2R,3R,4S,5R,7S,8S,9S,13S,14S,15R)-2,5,7,8,9, 14-hexa-		
	acétoxy-3-benzoyloxy-15-hydroxyjatropha-6(17),11E-diéne	E peplus	Hua et al.
74	Pepluanin A		2017
75	(2R,3R,4S,5R,7S,8S,9S,13S,14S,15R)-2,5,9,14-tétra-acétoxy-		2017
	3-benzoyloxy-8,15-dihydroxy-7-isobutyroyloxyjatropha-		
	6(17),11 <i>E</i> -diéne		
76	(2R,3R,4S,5R,7S,8S,9S,13S,14S,15R)- 2,5,14-		
	tri-acétoxy-3-benzoyloxy-8,15-dihydroxy-7-isobutyroyloxy-9-		
	nicotinoyloxyjatropha-6(17),11E-diéne		

77	(2R,3R,4S,5R,7S,8S,9S,13S,14S,15R)-2,5,8,9,14- penta-	
	acétoxy-3-benzoyloxy-15-hydroxy-7-isobutyroyloxyjatropha-	
	6(17),11 <i>E</i> -diène	

# I.2.2.1.3. Triterpènes

Les triterpènes représentent la deuxième classe de métabolites secondaires produite par les plantes Euphorbia sous forme de plusieurs squelettes (78-104) : cycloartane, euphane, lanostane, tirucallane kansenane, lupane, taraxerane, friedelane, taraxastane, oleanane, ursane...etc (Figure I.14 et Tableau I.9).



 $R_1$ =β-ОН R<sub>2</sub> =CH



Figure I.14. Structures des triterpènes isolés du genre Euphorbia

N°	Composés	Source	Références
		biologique	
78	Formate de 24-méthylènecycloartanyl	E. retusa	Haba et al., 2009a
79	24-Méthylènecycloartanyl 2'E,4'E-decadienoate	•	
80	24-méthylènecycloartane-3,28-diol	E. guyoniana	Haba et al., 2007
81	3-benzoyloxy-5,15-diacétoxy-		
	9,14-dioxojatropha-6(17),11-diéne		
82	cycloartenyl-2'E,4'E-décadienoate	E. pterococca	Benabdelaziz et
83	cycloartenyl-2'E,4'Z-decadienoate	•	al., 2018
84	25-hydro-peroxycycloart-3b-ol	Е.	Aichour et al.,
85	$3\beta,7\beta$ -dihydroxy- $4\alpha,14\alpha$ -diméthyl- $8\beta,9\beta$ -epoxy- $5\alpha$ -	bupleuroides	2014
	ergosta-24(28)-éne		
86	3 -hydroxycycloart-25-en-24-hydroperoxyde	E. atlantica	Mouffouk et al.,
			2019
87	Taraxérol		
88	Taraxérol acétate	•	
89	Taraxérone	-	
90	φ-taraxastane-3,20-diol	E. hirta	Li et al., 2015
91	Friedéline		

92	Friedélan-3-β-ol		
93	28-hydroxyfriedéline		
94	Friedélane-3-β-29-diol	•	
95	α-amyrine		
96	Acide oléanolique		
97	β-amyrine	E. kansui	Peng et al., 2012
98	Acide ursolique		
99	Euphol		
100	Kansenone		
101	Epi-kansenone	E. kansui	Wang et al., 2003
102	Kansenonol		
103	11-oxo-kansenonol		
104	Kansenol		

#### I.2.2.1.4. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont présents dans les plantes du genre *Euphorbia*, la plupart d'eux sont des flavonoïdes dérivés de kaempférol et quercétine avec des substituants mono ou di-osidiques en général en position C-3 (Figure I.15 et Tableau I.10). Les sucres sont représentés par le glucose, le rhamnose, l'acide glucuronique et rarement le galactose. En plus, des substituants phénoliques sont présents comme l'acide gallique et l'acide *para*-coumarique.

On remarque l'omniprésence de quelques flavonoïdes dans plusieurs plantes du genre *Euphorbia* comme le kaempférol-3-*O*-glucuronide, quercétine-3-*O*-glucuronide, quercétine-3-*O*-glucuronide, quercétine-3-*O*-glucuronide... (**105-126**).



Figure I.15. Structures des flavonoïdes isolés du genre Euphorbia

# Tableau I.10. Flavonoïdes isolés du genre Euphorbia

N°	Composés	Source	Références
		biologique	
105	Naringénine	Е.	Zhang et Guo
		helioscopia	2006
106	(2S)-7-hydroxy-5-méthoxy-6,8-diméthylflavanone	E. kansui	Peng et al.,
			2012
107	Glabrone	Е.	Zhang et Guo
		helioscopia	2006
108	(-)-gallocatéchine	Е.	Aichour et al.,
		bupleuroides	2014
109	Kaempférol	Е.	Boudiar et al.,
		guyoniana	2010
110	Quercétine	Е.	Boudiar et al.,
		guyoniana,	2010,
		E. lunulata	Nishimura
			et al., 2005
111	2-(3,4-dihydroxy-5-méthoxyphényl)-3,5-dihydroxy-6,7-	E. neriifolia	Sharma et
	diméthoxychromèn-4-one		Janmeda 2017
112	Kaempférol-3-O-glucoside	Е.	Boudiar et al.,
		guyoniana	2010
113	Kaempférol-3-O-glucuronide	E. retusa,	Nabiel et al.,
		E. sanctae-	1985
		catharinae	
114	Hypérine	E. lunulata	Nishimura et
			al., 2005
115	Quercétine-3-O-rhamnoside	E. retusa, E.	Nabiel et al.,
		hirta	1985. Manjur
		E. atlantica	et al., 2015.
			Mouffouk et
			al., 2019

116	Quercétine-3-O-glucoside	Е.	Boudiar et al.,
		guyoniana,	2010. Nabiel
		E. retusa	et al., 1985
117	Quercétine-3-O-glucuronide	E. retusa, E.	Nabiel et al.,
		sanctae-	1985
		catharinae	
118	5,7-dimethoxyquercétine-3-O-rhamnoside	E. hirta	Manjur et al.,
119	Hirtaflavonoside B		2015
120	Quercétine 3- <i>O</i> -(2"-galloyl)-β-D-galactopyranoside	E. lunulata	Nishimura et
			al., 2005
121	Kaempférol-3-O-rutinoside	Е.	Boudiar et al.,
		guyoniana	2010
122	Quercétine-3-O-rutinoside	Е.	Boudiar et al.,
		guyoniana,	2010. Nabiel
		E. retusa	et al., 1985
123	Kaempférol-3-O-glucuronide-7-O-glucoside	E. sanctae-	
		catharinae	Nabiel et al.,
124	Quercétine-3-O-glucuronide-7-O-glucoside	E. retusa, E.	1985
		sanctae-	
		catharinae	
125	Quercetine $3-O-(2'',3''-digalloyl)-\beta-D-galactopyranoside$	E. lunulata	Nishimura et
			al., 2005
126	Hirtacoumaroflavonoside	E. hirta	Manjur et al.,
			2015

#### I.2.2.1.5. Phénols

La littérature n'a pas trop rapporté de composés appartenant à cette classe de métabolites secondaires (**127-145**). En effet, les phénols isolés de plantes *Euphorbia* sont en général soit des acides phénoliques simples comme l'acide gallique et ses dérivés, soit des chalcones, ou des coumarines qui représentent la majorité des constituants isolés de cette classe chimique. Cependant, les lignanes ne sont pas vraiment répandus dans les espèces du genre *Euphorbia* (Figure I.16 et Tableau I.11).



Figure I.16. Structures des phénols isolés du genre Euphorbia

Tableau I.1	1. Phénols	isolés du	genre Eu	phorbia
-------------	------------	-----------	----------	---------

N°	Composés	Source	Références
		biologique	
127	Acide gallique	E. lunulata	Nishimura et al.,
			2005
128	Méthyle gallate	E. stracheyi	Liu et al., 2019
129	Ethyle gallate		
130	phloroacetophenone-	E. atlantica	Mouffouk et al.,
	4- $O$ - $\beta$ -D-glucopyranoside		2019
131	2',4,4'-hydroxychalcone		7hans at Care
132	Licochalcone A	E. helioscopia	
133	Licochalcone B		2000
134	Umbelliférone	E. hirta	Li et al., 2015
135	Esculétine	E. stracheyi, E.	Liu et al., 2019.
136	Isoscopolétine	hirta	Li et al., 2015
137	Scopolétine	E. hirta	Li et al., 2015
138	Scoparone	E. stracheyi, E.	Liu et al., 2019.

		hirta	Li et al., 2015
139	6,7,8-triméthoxy-coumarine	E. hirta	Li et al., 2015
140	Daphnorétine		
141	Cleomiscosine C	E. bupleuroides	Aichour et al.,
			2014
142	(-)-Pinorésinol		
143	(+)-Syringarésinol	E. hirta	Li et al., 2015
144	(-)-Pinorésinol glucoside		
145	(+)-Syringarésinol glucoside		

#### I.2.2.2. Usage en médecine traditionnelle

Certaines espèces du genre *Euphorbia* sont considérées comme de plantes médicinales préconisées en ophtalmologie et pour le traitement des morsures venimeuses (El Rhaffari et Zaid 2002). D'autres sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour soigner les maladies de la peau, la gonorrhée, la migraine, les parasites intestinaux et les verrues (Singla et Pathak, 1990).

Dans le Nord-Est de l'Ecosse, l'espèce *Euphorbia helioscopia* est employée contre la teigne. Ainsi à Northumberland sa perfusion est bue deux fois par jour pour soulager la douleur rhumatisme (David et Gabrielle 2004).

La plante *Euphorbia hyberna* a la réputation d'être un remède infaillible contre la diarrhée en Irlande (David et Gabrielle 2004).

La dilution du latex de la plante *Euphorbia cornuta* (Pers.) qui est connue sous le nom populaire « Moulbina », est préconisée en médecine traditionnelle soit pour soigner les morsures de serpents et de scorpions par une application locale, soit pour le désordre digestif, l'avortement et les coliques néphrétiques par admission orale (El Rhaffari et Zaid 2002).

Les résines d'*Euphorbia calyptrata* (Coss. et Dur.) ou « Remmada » (nom populaire) sont utilisées par application locale sur la tête pour soigner la migraine et les maux de tête. Son latex est employé après dilution pour les désordres digestifs (El Rhaffari et Zaid 2002).

Le latex d'*Euphorbia granulata* (Forsk) est employé sous forme de bandage pour soigner les morsures de serpents et de scorpions ; il est aussi utile pour diminuer les douleurs rénales, la fatigue nerveuse et pour provoquer l'avortement (El Rhaffari et Zaid 2002). La décoction des parties aériennes

d'*Euphorbia guyoniana* (Boiss. et Reut.) est préconisée par la population rurale pour l'élimination des vers intestinaux, son jus est appliqué localement pour soigner les verrues et diminuer les douleurs névralgiques (El Rhaffari et Zaid 2002).

Le latex d'*Euphorbia ingens* E. Meyer ex Boiss. est omployé comme caustique dans les maladies de la peau, il est recommandé aussi comme un remède contre le cancer. Le latex contient de la résine et de l'euphorbone, qui est utilisé dans le traitement des tumeurs oculaires dans l'Afrique de l'Est (Hargreaves 1991).

Les racines et les tiges d'*Euphorbia cooperi* N.E.Br trempées dans l'eau, tamisées et administrées comme lavement liquide semblent être efficaces contre les maux d'estomac (Hargreaves 1991).

La plante *Euphorbia hirta* L. ou « *Euphorbia* rouge » est conseillée pour ses effets diurétiques et légèrement purgatifs ; au Mozambique elle est recommandée pour les maux d'estomac ; les racines sont un remède contre les morsures de serpents en Inde et son latex est un remède ophtalmique, il est aussi recommandé pour la toux en Afrique orientale et tropicale (Hargreaves 1991).

Dans les Moluques, le latex d'*Euphorbia tirucalli* L. est un émétique et antisyphilitique. Au Malawi, il est conseillé d'utiliser une goutte de latex dans un bol de porridge pour le blocage intestinal, mais seulement après des traitements moins drastiques par *E. ingens* (Hargreaves 1991).

#### I.2.2.3. Activités biologiques

Les extraits et les composés isolés du genre *Euphorbia*, spécialement la classe des diterpénoides exhibent de nombreuses activités biologiques à savoir antiproliférative, antifeedante, anti-VIH, cytotoxique, antimicrobienne, anti-inflammatoire, analgésique, et anticancéreuse ... etc. (Jassbi 2006).

Treize diterpénoides ont été isolés des racines de la plante *Euphorbia ebracteolata*, ceux-ci ont montré une bonne activité anti-inflammatoire, mieux même que les standards utilisés, l'indométacine et l'hydrocortisone (Lui et al., 2014).

La plante *Euphorbia helioscopia* a été étudiée par plusieurs équipes sur les plans chimique et pharmacologique. L'équipe de Mohamed et al. (2012) a résumé les activités biologiques de cette espèce telles que : antibactérienne, antifongique, antivirale, anti-tumorale et antioxydante.

La plante *Euphorbia hirta* L. a fait l'objet de beaucoup d'études sur le plan pharmacologique. En effet, les extraits de cette plante ont présenté une grande activité antibactérienne vis-à-vis de 11 souches pathogènes testés. L'extrait des feuilles a montré une grande activité antioxydante par rapport aux extraits des fleurs, racines et tiges. Un test antidiabétique sur les rats a révélé que l'extrait des feuilles présente un effet antidiabétique. L'activité antifongique a été examinée pour les extraits méthanoliques des différentes parties de la plante par la méthode de diffusion des disques. L'extrait des feuilles a donné la plus large zone d'inhibition par rapport aux autres parties de cette plante. En plus, d'autres activités biologiques ont été examinées comme l'activité antivirale, anti-inflammatoire, antidiarrhéique, antitumorale, diurétique, et antimalaria, ...etc. (Ansari et al., 2016).

Les extraits des deux parties (racines et feuilles) de l'espèce *Euphorbia fusiformis* ont été évalués pour leur pouvoir antibactérien avec deux méthodes différentes. Les résultats ont révélé que les extraits méthanoliques sont plus actifs que les autres extraits acétonique et chloroformique. Toutefois, les racines ont un plus grand potentiel d'inhibition que celui des feuilles (Natarajan et al., 2005).

La fraction hydrosoluble du latex d'*Euphorbia royleana*, a montré des effets antiinflammatoires et antiarthritiques dose-dépendante chez les rats et les souris et par rapport aux différents modèles de tests aigus et chroniques. L'extrait AcOEt du latex d'*Euphorbia royleana* a exhibé une inhibition significative des œdèmes sur les rats à 35,9% et sur les souris à 33,3% (Özbilgin et Saltan Citoglu, 2012).

L'extrait alcoolique d'*Euphorbia heyneana* a montré une grande inhibition des œdèmes avec un pourcentage de 35,3%, 45,6% et 47,1% pour les doses 200, 400 et 800 mg/kg, respectivement. Le diterpénoide myrsinane isolé de l'extrait chloroformique d'*Euphorbia decipens* a révélé une activité analgésique comparable à celle de l'aspirine et l'ibuprofène, tandis que le composé prostratine, identifié dans *Euphorbia fischeriana* a montré des activités analgésiques et sédatives intéressantes. Les extraits d'*Euphorbia helioscopia* ont présenté une activité anticancéreuse, avec des doses testées entre 50-200 µg/mL (Özbilgin et Saltan Citoglu 2012).

# I.2.3. Euphorbia gaditana Coss.

#### I.2.3.1. Description

*Euphorbia gaditana* Coss., connue aussi sous le nom *Euphorbia reboudiana* Coss., est une plante annuelle distribuée en Algérie, Tunisie et Espagne. C'est une plante à tiges et feuilles inférieures

densément hérissées de longs poils étalés. Les capsules de 2-3 mm sont globuleuses et recouvertes de forts tubercules épars. Les graines sont lisses (Figure I.17) (Quezel et Santa 1963).



Figure I.17. Euphorbia gaditana Coss.



Figure I.18. Distribution de l'espèce Euphorbia gaditana Coss. [1]

#### I.2.3.2. Classification botanique

L'espèce Euphorbia gaditana Coss. est classée comme suit (Tableau I.12) (Quezel et Santa 1963):

Tableau I.1	2. Classification	de l'espèce	Euphorbia	gaditana Coss.
-------------	-------------------	-------------	-----------	----------------

Règne	Plantae
Classe	Dicotylédones
Sous-classe	Dialypetales
Ordre	Tricoques
Famille	Euphorbiaceae
Sous-famille	Crotonoideae
Tribu	Euphorbieae
Sous-tribu	Euphorbiinae
Genre	Euphorbia
Espèce	Euphorbia gaditana Coss.

#### I.2.3.3. Usage traditionnel

La plante *Euphorbia gaditana* est préconisée en médecine traditionnelle en Algérie afin d'enlever les épines et éliminer les verrues. Elle est aussi utilisée sous forme de décoction comme un calmant des douleurs rhumatismales.

#### I.2.3.4. Travaux antérieurs sur la plante

L'espèce *Euphorbia gaditana* Coss. a déjà fait l'objet d'une seule étude phytochimique en 2017. Cette étude a particulièrement porté sur l'extrait éther de pétrole des parties aériennes de la plante, conduisant à l'isolement par HPLC et la caractérisation par RMN multi-impulsionnelle et la spectrométrie de masse de deux nouveaux composés diterpéniques macrocycliques (**146**) et polycyclique (**147**) : un dérivé de jatrophane et son analogue tétracyclique nommé gaditanone (Figure I.19) (Flores-Giubi et al., 2017).



Figure I.19. Structures des diterpènes isolés d'Euphorbia gaditana Coss.

#### Références

- Abdel Rahman SM, Abd-Ellatif SA, Deraz SF, Khalil AA. 2011. Antibacterial activity of some wild medicinal plants collected from western Mediterranean coast, Egypt: Natural alternatives for infectious disease treatment. African Journal of Biotechnology. 10(52): 10733-10743.
- Ahid S, Ait El Cadi M, Meddah B, Cherrah Y. 2012. *Atractylis gummifera* : de l'intoxication aux méthodes analytiques. Analyse de Biochimie Clinique. 70(3): 263-268.
- Ahmad WJ, Hussain J, Hussain H, Farooq U, Rmanullah, Lodhi MA, Choudhary MA. 2005. Two new diterpene polyesters from *Euphorbia decipiens*. Natural Product Research. 19(3): 267-274.
- Aichour S, Haba H, Benkhaled M, Harakat D, Lavaud C. 2014. Terpenoids and other constituents from *Euphorbia bupleuroides*. Phytochemistry Letters. 10: 198-203.
- Ansari AA, Khatun T, Ahmed MP, Gupta RS, Madhikarmi NL. 2016. A review on pharmacological and chemical documentation of *Euphorbia hirta* Linn (Asthama Herb). Med Phoenix. 1(1): 31-38.
- Bammou M, Daoudi A, Sellam K, El-Rhaffari E, Ibijbijen J, Nassiri L. 2015. Ethnobotanical survey of Asteraceae family used in Meknes-Tafilalet Region (Morocco). International Journal of Innovation and Applied Studies 13, 789-815.
- Bellakhdar J. 1997. Médecine Arabe ancienne et savoir populaire. La pharmacopée marocaine tradionnelle. Ibis Presse.
- Benabdelaziz I, Gomez-Ruiz S, Benkhaled M, Carralero S, Schenker P, Salm A, Gertsch J, Haba H. 2018. New cycloartane-type ester triterpenes from *Euphorbia pterococca* and biological evaluation. Fitoterapia. 127: 271-278.
- Boudebaz K, Nia S, Trabelsi Ayadi M, Cherif JK. 2015. The effect of extraction method on antioxidant activity of *atractylis babelii* Hochr. Leaves and flowers extracts. Algerian Journal of Natural Products. 3(2): 146-152.
- Botineau M. 2010. Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs. Editions TEC and DOC. Paris.

- Bouaziz M, Dhouib A, Loukil S, Boukhris M, Sayadi S. 2009. Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. African Journal of Biotechnology. 8(24): 7017-7027.
- Boudiar T, Hichem L, Khalfallah A, Kabouche A, Kabouche Z, Brouard I, Bermejo J, Bruneau C.
  2010. A new alkaloid and flavonoids from the aerial parts of *Euphorbia guyoniana*.
  Natural Product Communications. 5(1): 35-37.
- Bremer K, Anderberg AA. 1994. Asteraceae: Cladistics and Classification, Timber Press.
- Chabani S, Haba H, Lavaud C, Benkhaled M, Harakat D. 2013. Flavonoid glycosides and triterpenoids from *Atractylis flava*. Phytochemistry Letters. 6: 9-13.
- Chabani S, Lavaud C, Benkhaled M, Harakat D, Long C, Haba H. 2016a. Tree new oleanane-type triterpène saponins from *Atractylis flava*. Phytochemistry Letters. 15: 88-93.
- Chabani S, Haba H, Long C, Benkhaled M. 2016b. Chemical composition of medicinal plant *Atractylis serratuloides*. Industrial Crops and Products. 88: 91-95.
- Chaboud A, Dellamonica G, Raynaud J. 1988. Neocorymboside, a di-*c*-glycosylflavone from *Atractylis gummifera*. Phytochemistry. 27(7): 2360-2361.
- Chen LY, Hu A, Chang CJ. 2013. The degradation mechanism of toxic Atractyloside in herbal medicines by decoction. Molecules. 18: 2018-2028.
- Danieli B, Boumbardelli E, Bonati A, Gabetta B. 1972. Structure of the diterpenoid carboxyatractyloside. Phytochemistry. 11: 3501-3504.
- Daniele C, Dahamna S, Firuzi O, Sekfali N, Saso L, Mazzanti G. 2005. *Atractylis gummifera* L. poisoning: an ethnopharmacological review. Journal of Ethnopharmacology. 97: 175-181.

David EA, Gabrielle H. 2004. Medicinal Plants in Folk Tradition. Timber Press-Portland.

Dupont F, Guignard JL, Pelt JM. 2012. Botanique: les familles des plantes, Elsevier Masson 15<sup>émé</sup> Ed.

El Rhaffari L, Zaid A. 2002. Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet). Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Fleurentin J (éd.). Des sources du savoir aux médicaments du futur. IRD Editions. Paris. 293-318.

- Evans FJ, Taylor SE. 1983. Pro-inflammatory, tumor promoting and antitumor diterpene of the plant families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. 44: 1-99.
- Flores-Giubi ME, Duran-Pena MJ, Botubol-Ares JM, Escobar-Montaño F, Zorrilla D, Macías-Sanchez AJ, Hernandez-Galań R. 2017. Gaditanone, a diterpenoid based on an unprecedented carbon skeleton isolated from *Euphorbia gaditana*. Journal of Natural Product. 80: 2161-2165.
- Funk VA, Bayer RJ, Keeley S, Chan R, Watson L, Gemeinholzer B, Schilling E, Panero JL, Baldwin BG, Garcia-Jacas N, Susanna A, Jansen RK. 2005. Everywhere but antartica: using a superthree to understand the diversity and distribution of the Compositae. Biologiske Skriffer. 55: 343-374.
- Guo WQ, Li LZ, He ZY, Zhang Q, Liu J, Hu CY, Qin FJ, Wang TY. 2013. Anti-proliferative Effects of *Atractylis lancea* (Thunb.) DC. Via Down-regulation of the c-myc/hTERT/ Telomerase pathway in Hep-G2 Cells. Asian Pacifc Journal of Cancer Prevention. 14: 6363-6367.
- Haba H, Lavaud C, Alabdul Magid A, Benkhaled M. 2009. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia retusa*. Journal of Natural Products. 72: 1258-1264.
- Haba H, Lavaud V, Marcourt L, Long C, Harkat H, Benkhaled M. 2009. *Ent*-abietane diterpenoids from *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. Biochemical Systematics and Ecology. 37: 504-508.
- Haba H, Marcourt L, Benkhaled M, Long C. 2013. Minor *Ent*-abietane diterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. Natural Product Communications. 8(11): 1519-1522.
- Haba H, Lavaud C, Harkat H, Alabdul Magid A, Marcourt L, Benkhaled M. 2007. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. Phytochemistry. 68: 1255-1260.
- Hargreaves BJ. 1991. The Spurges of Botswana. Botswana Notes and Records. 23: 115-158.
- Heywood VH, Brummit RK, Culham A, Seberg O. 2007. Flowring plant families of the world. Royal Botanic Gardens.
- Hua J, Liu Y, Xiao CJ, Jing SX, Luo SH, Li SH. 2017. Chemical profile and defensive function. of the latex of *Euphorbia peplus*. Phytochemistry. 136: 56-64.

- Jassbi AR. 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. Phytochemistry. 67: 1997-1984.
- Jeong SI, Kim SY, Kim SJ, Hwang BS, Kwon TH, Yu KY, Hang SH, Suzuki K, Kim KJ. 2010. Antibacterial activity of phytochemicals isolated from *Atractylodes japonica* against methicillin-resistant staphylococcus aureus. Molecules. 15: 7395-7402.

Kadereit JW, Jeffrey C. 2007. The Families and Genera of Vascular Plants. Vol VIII.

Li ET, Liu KH, Zang MH, Zhang XL, Jiang HQ, Zhou HL, Wang DY, Liu JG, Hu YL, Wu Y. 2015.

- Chemical constituents from *Euphorbia hirta*. Biochemical Systematics and Ecology. 62: 204 207.
- Liu T, Liang Q, Zhang XM, Su XM, Qin JC, Li GQ, Xu WH. 2019. Chemical constituents from. *Euphorbia stracheyi* Boiss. Biochemical Systematics and Ecology. 84: 52-54.
- Manjur AS, Begum R, Abuzer A, Krishna KP, Vidhu A, Manju S, Showkat RM. 2015. Inhibition of αglucosidase by new prenylated flavonoids from *Euphorbia hirta* L. herb. Journal of Ethnopharmacology. 176: 1-8.
- Melakhessou MA, Benkiki N, Marref S, Bouzidi S. 2018. Anti-inflammatory, anti-pyretic and acute toxicity effects of n-butanol extract of *Atractylis flava* Desf. in rats. Pharmacognosy Journal. 10: 763-767.
- Melek FR, Aboutabl EA, El-Shabrawy O, Radwan AS, Hilal SH, Hammam A. 1992. Atractylis carduus var. angustifolia flavonoids and antiinflammatoire activite. Egypcian journal of Pharmaceutical Sciences. 33(1-2): 11-19.
- Melek FR, Radwan AS, Ahmed AA, Hammam A, Aboutabl EA. 1989. Triterpenes from *Atractylis carduus* L. Pharmazie. 44(10): 735.
- Mohamed HAE, Hegazy FME, Moustafa MFM, El-Sayed AM, Abdel-Farid BI, Esmail MA, Abdelrazik HM, Mohamed SN, Nenaah G, Mohamed AT, Shahat AA, Karchesy J, Matsuda H, Pare WP. 2012. *Euphorbia helioscopia*: chemical constituents and biological activities. International Journal of Phytopharmacology. 3(1): 78-90.

- Mouffouk S, Gomez-Ruiz S, Benkhaled M, Carralero S, Haba H. 2019. Phytochemical composition, antioxidant and antibacterial activities of crude extracts from the species *Euphorbia atlantica* Coss. Pharmaceutical Chemistry Journal. 53(9): 831-837.
- Nabiel A, Saleh M. 1985. Flavonol Glycosides of *Euphorbia retusa* and *E. sanctae-catharinae*. Phytochemistry. 24(2): 371-372.
- Najem M, Belaidi R, Harouak H, Bouiamrine EH, Ibijbijen J, Nassiri L. 2018. Occurrence de plantes toxiques en phytothérapie traditionnelle dans la région du Moyen Atlas central Maroc. Journal of Animal and Plant Sciences. 35(2): 5651-5673.
- Natarajan D, Jolin Britto S, Srinivassan K, Nagamurugan N, Mohanasundari C, Perumal G. 2005. Antibacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-A rare medicinal herb. Journal of Ethnopharmacology. 102: 123-126.
- Nishimura T, Wang LY, Kusano K, Kitanaka S. 2005. Flavonoids that mimic human ligands from the whole plants of *Euphorbia lunulata*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 53(3): 305-308.
- Özbilgin S, Saltan Citoglu GS. 2012. Uses of some *Euphorbia* species in traditional medicine in turkey and their biological activities. Turkian Journal of Pharmaceutical Sciences. 9(2): 241-256.
- Ozenda P. 2004. Flore et Végétation du Sahara. CNRS 3<sup>éme</sup> Ed. Paris.
- Pachalya P, Lansing A, Neugebauer M, Seog Sin K. 1990. Acetylenes from Atractylis koreana. Planta Medica. 56: 469-471.
- Peng Q, Li G, Ma Y, Huang J, Wei X, Wang J. 2012. Chemical constituents of *Euphorbia kansui*. Biochemical Systematics and Ecology. 43: 64-66.
- Quezel P, Santa S. 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie. CNRS. Tome II. Paris.
- Riccio P, Scherer B, Klingenberg M. 1973. Isolation of a new Atractyloside type compound. FEBS Letters. 31(1): 11-14.
- Salim AA, Chin YW, Kinghorn AD. 2008. Bioactive molecules and medicinal plants. Springer. Ramawat KG, Merillon JM Ed.
- Shi JC, Shi YP, Jia ZJ. 1997. Sesquiterpenoids from *Euphorbia wangii*. Phytochemistry. 45(2): 343-347.

- Sharma V, Janmeda P. 2017. Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Euphorbia neriifolia* leaves. Arabian Journal of Chemistry. 10: 509-514.
- Shi QW, Su XH, Kiyota H. 2008. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. Chemical Review. 108: 4295-4327.
- Shu DJ, Jinshuang M, Micheal GG. 2008. Euphorbia Linnaeus. Fl. China. 11: 288-313.
- Singla AK, Pathak K. 1990. Phytoconstituents of Euphorbia species. Fitoterapia. 41(6): 483-516.
- Toilbabiya L, Hami H, Soulaymani A, Rhalem N, Ouammi L, Benali D, Mokhtari A, Soulaymani RB.
  2013. Poisoning by plants in the Taza-Al Hoceima-Taounate region in Marocco. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research Series B: Biological Sciences. 56(1): 23-28.
- Wang LY, Wang NL, Yao XS, Miyata S, Kitanaka S. 2003. Euphane and tirucallane triterpènes from the roots of *Euphorbia kansui* and their in vitro effects on the cell division of xenopus. Journal of Natural products. 66: 630-633.
- Webster GL. 1967. The genera of the Euphorbiaceae in the South-Estern United States. Journal of Arnold Arboretum. 48: 303.
- Yuan WJ, Yang GP, Zhang JH, Zhang Y, Chen DZ, Li SL, Di YT, Hao XJ. 2016. Three new diterpenes with cytotoxic activity from the roots of *Euphorbia ebracteolata* Hayata. Phytochemistry Letters. 18: 176-178.
- Zhang W, Guo YW. 2006. Chemical Studies on the Constituents of the Chinese Medicinal Herb *Euphorbia helioscopia* L. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 54(7): 1037-1039.

### **Références web**

[1] <u>http://www.emplantbase.org/home.html</u>

# Partie II Matériel et méthodes

# Chapitre 1. Extraction et purification de l'espèce *Atractylis cancellata* L. (Asteraceae)

# II.1.1. Matière végétale

La plante *Atractylis cancellata* L. a été authentifiée par le Pr. Bachir Oudjehih Département d'agronomie de l'institut des sciences vétérinaires et agronomiques, université de Batna-1, Algérie). La récolte a été faite par Pr. Hamada Haba et Pr. Mohammed Benkhaled (Faculté des Sciences de la Matière, Université de Batna 1, Algérie) en Mai 2015 dans la localité de Djerma (région semi-aride de Batna, Algérie) (35°38'55.1"N 6°17'33.7"E). Une référence de l'espèce (846/LCCE) a été déposée à la Faculté des Sciences de la Matière, Université de Batna-1, Algérie.

# **II.1.2.** Extraction

Après la récolte, la plante entière *Atractylis cancellata* L. a été mise à l'air libre et à l'abri de la lumière pour éviter toutes les dégradations photochimiques possibles. La plante entière totalement sèche est ensuite broyée pour donner une poudre fine d'une masse de 1,2 kg de matière végétale.

Ensuite, cette poudre (1,2 Kg) est soumise à une macération dans le mélange éthanol-eau à 70% (2 x 12 L, 48h) à la température ambiante. L'extrait hydro-alcoolique obtenu est filtré puis concentré sous basse pression pour donner un résidu aqueux de 500 mL. Ce dernier a subi des extractions successives avec des solvants à polarité croissante, en commençant par l'éther de pétrole (3 x 300 mL EP) puis l'acétate d'éthyle (3 x 300 mL AcOEt), et enfin le *n*-butanol (3 x 300 mL *n*-BuOH).

Les extraits organiques obtenus sont évaporés à sec pour fournir 13,4 g de l'extrait EP, 10 g de l'extrait AcOEt et 16,8 g de l'extrait *n*-BuOH (Figure II.1 et Tableau II.1). Tous les extraits ont été évaporés à moins de 40 °C, sous une basse pression en utilisant l'évaporateur rotatif.

Extrait	Quantité (g)	Rendement d'extraction (%)
EP	13,4	1,12%
AcOEt	10	0,83%
<i>n</i> -BuOH	16,8	1,4%

Tableau II.1. Extraits obtenus de l'espèce Atractylis cancellata L.

# **II.1.3.** Fractionnement et purification

Les extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH ont fait l'objet d'un fractionnement suivie par une purification. La sélection des extraits a été faite en se basant sur leur profil CCM (chromatographie sur

couche mince), ceci va nous renseigner en premier lieu sur la richesse de l'extrait en métabolites secondaires, la séparation des produits (valeurs de R<sub>f</sub>), le type de produits existant...etc.



Figure II.1. Schéma d'extraction de l'espèce Atractylis cancellata L.

Des CCM en phase normale SiO2 sont utilisées et éluées avec des systèmes suivants :

CHCl<sub>3</sub>: MeOH

9 : 1 et 8 : 2

 $CHCl_3: MeOH: H_2O$ 

8:2:0,2;7:3:0,2 et 7:3:0,5



Figure II.2. Profil CCM sur gel de silice normale des extraits obtenus d'A. cancellata

#### II.1.3.1. Extrait EP

Une quantité de 5 g de l'extrait EP a été soumise à une chromatographie liquide sous vide (VLC) sur silice en phase normale éluée avec un système de solvants EP : AcOEt (100 : 0 à 0 : 100). Après le regroupement des tubes suite à l'examen CCM sous la lampe UV (254 et 366 nm) et révélation par une solution d'acide sulfurique et chauffage, 9 fractions majoritaires ont été obtenues (Epc1 à Epc9) (Figure II.2).

La fraction Epc3 d'une masse de 725 mg a fait l'objet de purification en utilisant une colonne chromatographique de gel de silice en phase normale (système d'élution EP : AcOEt), ce qui a permis l'isolement de 3 composés : Ac14 (13 mg), Ac15 (7 mg) et Ac16 (172 mg).

#### II.1.3.2. Extrait AcOEt

Une quantité de 8 g de l'extrait AcOEt a été solubilisée dans le méthanol afin de préparer un dépôt solide pour réaliser un fractionnement majeur par VLC, pour cela, le gel de silice phase normale a été élué avec un mélange de solvants EP : AcOEt : MeOH, commençant par l'éther de pétrole pur, ensuite la polarité a été augmentée en ajoutant l'acétate d'éthyle, puis le méthanol (100 : 0 : 0 à 0 : 100 : 0 à 0 : 0 : 100). A l'issue de ce fractionnement primaire, treize fractions ont été obtenues Acc1 à Acc13 (Figure II.3). Il est à signaler que quelques fractions ont révélé des profils CCM presque similaires, ce qui a conduit à les regrouper ensemble. Les fractions Acc6, Acc7 et Acc8 ont été rassemblées, ainsi que les fractions Acc10 et Acc11. Les fractions Acc5, Acc6, Acc9 et Acc10 ont été sélectionnées pour des purifications ultérieures sur colonnes chromatographiques sur silice normal.



Figure II.3. Fractions issues de la VLC (extrait AcOEt)

#### II.1.3.2.1. Fractionnement et purification de la fraction Acc5

Une colonne ouverte de diamètre 2,2 cm remplie avec une quantité de 18 g de gel de silice en phase normale a été utilisée pour le fractionnement de 550 mg de la fraction Acc5. L'élution a été faite par le système de solvants EP : AcOEt (100 : 0 à 0 : 100). La collection des sous fractions a été réalisée dans des tubes de 25 mL, le regroupement des tubes selon leur profil CCM a fourni 11 sous fractions (Acc5-A à Acc5-K) (Figure II.4 et Tableau II.2).

Tubes	Sous fraction	Masse (mg)	Tubes	Sous fraction	Masse (mg)
1-6	Acc5-A	7,8	40-53	Acc5-G	16
7-11	Acc5-B	1,3	54-61	Acc5-H	19,2
12-14	Acc5-C	1,8	62-69	Acc5-I	22,4
15-22	Acc5-D	3	70-73	Acc5-J	320
23-29	Acc5-E	5	74-79	Acc5-K	2,4
30-39	Acc5-F	5,5			

Tableau II.2. Sous fractions obtenues du fractionnement d'Acc5

Vu les profils CCM et les quantités des sous fractions obtenues (tableau II.2), la sous fraction Acc5-J a été choisie pour une deuxième séparation et purification chromatographiques.



Figure II.4. Profil CCM en phase normale du fractionnement d'Acc5

La sous fraction sélectionnée Acc5-J (320 mg) a fait l'objet d'une séparation sur colonne chromatographique de gel de silice en phase normale éluée avec EP : AcOEt. Les tubes récupérés ont été regroupés pour donner 7 sous fractions (Acc5-J-a à Acc5-J-g) (Figure II.5 et Tableau II.3).



Figure II.5. Profil CCM en phase normale du fractionnement d'Acc5-J

Tableau II.3. Sous fractions obtenues du fractionnement d'Acc5-J

Tubes	Sous fraction	Masse (mg)
1-13	Acc5-J-a	6,9
14-34	Acc5-J-b	13
35-45	Acc5-J-c	52,2
46-57	Acc5-J-d	18,3
58-73	Acc5-J-e	79,5
74-116	Acc5-J-f	111
117-121	Acc5-J-g	8,8

La sous fraction Acc5-J-f (111 mg) a été choisie afin de purifier les 3 taches apparues sur son profil CCM en phase normale. La couleur des taches nous suggère que ces composés pourraient être des flavonoïdes.

La sous fraction Acc5-J-f (111 mg) a fait l'objet d'une ultime purification sur colonne chromatographique de polyamide SC-6 avec un système d'élution toluène : MeOH (100 : 0 à 0 : 100). Deux produits à l'état pur ont été obtenus **Ac6** (3 mg) et **Ac4** (1,3 mg) (Figure II.6).



Figure II.6. Profil CCM en phase normale du fractionnement d'Acc5-J-f

#### **II.1.3.2.2.** Fractionnement et purification de la fraction Acc6

La fraction Acc6 (2,4 g) a été fractionnée sur une colonne chromatographique de gel de silice  $SiO_2$  éluée par un mélange de solvants  $CH_2Cl_2$ : Acétone : MeOH (100 : 0 : 0 à 0 : 100 : 0 puis 0 : 100 : 0 à 0 : 0 : 100). Des tubes de 25 mL ont été utilisés pour collecter les fractions. Après le regroupement, 08 sous fractions (Acc6-A à Acc6-H) ont été récupérées et analysées par CCM de gel de silice  $SiO_2$  (Figure II.7 et Tableau II.4).



Figure II.7. Profil CCM en phase normale du fractionnement d'Acc6

La sous fraction Acc6-C (6 mg) a été identifiée comme un mélange de trois produits relativement séparables dont un est majoritaire. Ce dernier est isolé et nommé Ac3.

Tableau II.4. Sous fractions obtenues du fractionnement d'Acc6

Tubes	Sous fraction	Masse (mg)
1-9	Acc6-A	1,5
10-13	Acc6-B	46
14-26	Acc6-C	36
27-41	Acc6-D	472
42-52	Acc6-E	53
53-64	Acc6-F	49
65-72	Acc6-G	8,6
73-74	Acc6-H	1584

#### II.1.3.2.3. Fractionnement et purification de la fraction Acc9

La fraction Acc9 (1,15 g) a subi un fractionnement sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution est assurée par un mélange de solvants EP : AcOEt ( $100 : 0 \ge 0 : 100$ ) pour fournir

plusieurs sous fractions (Acc9-A à Acc9-O). Ensuite, la sous fraction Acc9-G (85 mg) a fait l'objet d'une purification chromatographique sur gel de silice SiO<sub>2</sub> en utilisant une colonne de 1 cm de diamètre, élué avec le système de solvants CHCl<sub>3</sub> : MeOH (100 : 0 à 0 : 100), ceci nous a permis de récupérer un précipité blanc à partir de la sous fraction Acc9-G-f traitée par le méthanol. Il s'agit du produit **Ac17** (5 mg) (Figure II.8).



Figure I.8. Profil CCM en phase normale du fractionnement d'Acc9-G

#### II.1.3.2.4. Fractionnement et purification de la fraction Acc10

La fraction Acc10 (2,86 g) issue de la VLC, est soumise à un fractionnement en utilisant une colonne chromatographique de diamètre 2,8 cm, sur gel de silice en phase normale éluée avec un mélange de solvants  $CHCl_3$ : MeOH (100 : 0 à 0 : 100). Le regroupement des tubes de 25 mL a permis d'avoir 15 sous fractions (Acc10-A à Acc10-O) (Figure II.9 et Tableau II.5).



Figure II.9. Profil CCM en phase normale du fractionnement d'Acc10

Parmi les sous fractions obtenues, nous nous sommes intéressés à la sous fraction Acc10-H (285,8 mg) vu sa masse et sa richesse sur CCM en métabolites secondaires.

Tubes	Sous-fraction	Masse (mg)	Tubes	Sous-fraction	Masse (mg)
1-17	Acc10-A	7	69-72	Acc10-I	95
18-21	Acc10-B	16	73-86	Acc10-J	469
22-24	Acc10-C	3	87-106	Acc10-K	462
25-36	Acc10-D	20,4	107-113	Acc10-L	157
37-48	Acc10-E	18	114-132	Acc10-M	224,2
49-52	Acc10-F	70	133-146	Acc10-N	30,8
53-59	Acc10-G	109,4	147-154	Acc10-O	15,7
60-68	Acc10-H	285,8			

Tableau II.5. Sous fractions obtenues du fractionnement d'Acc10

La sous fraction Acc10-H a été purifiée par colonne chromatographique de polyamide. L'élution est réalisée au moyen d'un mélange de toluène : MeOH (100 : 0 à 0 : 100). Cette opération a conduit à l'obtention de 8 sous fractions (Acc10-H-a à Acc10-H-h), dont une contenant un produit pur **Ac5** (7 mg).
#### II.1.3.3. Extrait *n*-BuOH

L'extrait *n*-BuOH (13,4 g) a été fractionnée par VLC sur silice en phase inverse (RP-18) élué avec un mélange MeOH : H<sub>2</sub>O (25 : 75 à 100 : 0) avec 500 mL de chaque proportion, pour donner 4 fractions majoritaires (Figure II.10, II.11 et Tableau II.6) : Buc1 (25% MeOH, 5 g), Buc2 (50% MeOH, 2,7 g), Buc3 (75% MeOH, 1,65 g) et Buc4 (100% MeOH, 0,58 g).



Figure II.10. Fractions issues de la VLC de l'extrait n-BuOH

Avant d'entamer la séparation chromatographique des fractions issues de cette VLC, nous avons procédé à des tests CCM, en parallèle avec des analyses sur HPLC analytique, afin de déterminer les conditions optimum de séparation et choisir la technique convenable pour une meilleure séparation.

Tableau II.6. Fractions issues de la VLC de l'extrait n-BuOH

Pourcentage	Fraction	Masse (mg)
25%	Buc1	5
50%	Buc2	2,7
75%	Buc3	1,65
100%	Buc4	0,58

Les deux fractions Buc3 et Buc4 sont regroupées (fraction Buc3), la nouvelle fraction obtenue ainsi que la fraction Buc2 ont été sélectionnées pour la purification sur HPLC.



Figure II.11. Profil CCM sur gel de silice normale de fractions obtenues de l'extrait n-BuOH

#### II.1.3.3.1. Fractionnement et purification de la fraction Buc2

Une masse de 2,7 g de la fraction Buc2 a été éluée par un mélange isocratique constitué de 10% de MeCN et de 90% de H<sub>2</sub>O sur HPLC préparative pendant 30 min. Des tubes de 40 mL sont utilisés pour la collecte des sous fractions. Le regroupement de ces tubes en tenant compte de leur profil CCM ainsi que leur profil HPLC a donné 21 sous fractions (Buc2-A à Buc2-U) (Figure II.12).



Figure II.12. Profil CCM en phase normale du fractionnement de Buc2

Un précipité est apparu au niveau du tube de la sous fraction Buc2-Q et a été identifié comme le produit **Ac8** (42 mg).

La sous fraction Buc2-H (80 mg) a été purifiée par HPLC semi- préparative avec un système d'élution isocratique 10% de MeCN pour mener au produit pur **Ac11** (Rt 15,2 min, 24 mg).

La sous fraction Buc2-K (60 mg) a été purifiée par HPLC semi-préparative, éluée avec un mélange MeCN : H<sub>2</sub>O (isocratique 10% de MeCN) pour conduire aux composés Ac13 (Rt 11,4 min, 1,8 mg) et Ac10 (Rt 25,5 min, 25 mg).

La dernière sous fraction Buc2-P (160 mg) est purifiée à l'aide de la Chromatographie Flash sur gel de silice en phase normale. L'élution est effectuée au moyen d'un mélange de solvants CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O, pour conduire à plusieurs sous fractions. La sous fraction Buc2-P-d (14 mg) a été ensuite purifiée par HPLC semi-préparative, éluée avec le mélange de solvants MeCN : H<sub>2</sub>O (gradient 14-20% de MeCN, 20 min) pour donner le produit **Ac12** (Rt 11 min, 2,7 mg).

#### II.1.3.3.2. Fractionnement et purification de la Fraction Buc3

Une Chromatographie Flash a été utilisée pour le fractionnement de Buc3 (2,2 g) (Buc3+Buc4), en employant une cartouche de silice en phase normale, et un système d'élution  $CH_2Cl_2$  : MeOH :  $H_2O$  avec un gradient (90 : 10 : 0 à 70 : 30 : 5).

Parmi les sous fractions obtenues (Buc3-A à Buc3-V), un précipité dans le méthanol est visualisé dans la sous fraction Buc2-G sous forme d'une poudre jaune **Ac9** (3 mg). La seule sous fraction jugée purifiable vu les quantités et les compositions des sous fractions, est Buc3-I (300 mg) (combinaison des sous fractions Buc3-I à Buc3-M) (Figure II.13).



Figure II.13. Profil CCM en phase normale du fractionnement de Buc3

La sous fraction Buc3-I (300 mg) a été soumise à une purification par HPLC préparative en RP-18, en utilisant un système isocratique de 15% de MeCN pendant 30 min pour donner plusieurs sous fractions Buc3-I-1 à Buc3-I-22. Les sous fractions Buc3-I-2 (9 mg), Buc3-I-10 (14 mg) et Buc3-I-15 (33 mg) issues de ce dernier fractionnement sont purifiées séparément par HPLC semi-préparative (gradient 10-20% de MeCN, 20 min) pour obtenir les composés Ac2 (Rt 12,5, 2 mg), Ac7 (Rt 10 min, 3 mg) et Ac1 (Rt 7,7 min, 2 mg) respectivement.



Figure II.14. Chromatogramme HPLC analytique des deux fractions Buc2 et Buc3

Chapitre 2. Extraction et purification de l'espèce *Euphorbia gaditana* Coss. (Euphorbiaceae)

# II.2.1.Matière végétale

La plante *Euphorbia gaditana* Coss. a été récoltée par Pr. Hamada Haba (Faculté des Sciences de la Matière, Université de Batna 1, Algérie) en Mai 2015 de Seriana (région semi-aride de Batna, Algérie) (35°41'20.3"N 6°11'48.4"E). Après son identification par Pr. Bachir Oudjehih (département d'Agronomie de l'Institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques, Université de Batna 1, Algérie), une référence de l'espèce (908/ LCCE) a été déposée à la Faculté des Sciences de la Matière, Université de Batna 1, Algérie.

# **II.2.2.** Extraction

Une macération a été réalisée sur 1 kg de poudre des parties aériennes de la plante *Euphorbia gaditana* Coss. (à l'état sec) dans une solution d'éthanol/eau à 70% pendant 48h. Cette opération est répétée deux fois avec renouvellement du solvant.

En réduisant le volume totale du macérât à 500 ml sous basse pression, le résidu aqueux est ensuite soumis à des extractions successives avec des solvants à polarité croissante, EP ( $3 \times 300 \text{ mL}$ ), CHCl<sub>3</sub> ( $3 \times 300 \text{ mL}$ ), AcOEt ( $3 \times 300 \text{ mL}$ ) et *n*-BuOH ( $3 \times 300 \text{ mL}$ ). Tous les extraits obtenus sont évaporés à sec à pression réduite en utilisant un évaporateur rotatif à 40 °C (Figure II.15 et Tableau II.7) pour donner les masses suivantes : EP (1,3 g), CHCl<sub>3</sub> (30 g), AcOEt (7,1 g) et *n*-BuOH (23,1 g).



Figure II.15. Schéma d'extraction de l'espèce Euphorbia gaditana Coss.

Extrait	Quantité (g)	Rendement d'extraction (%)
EP	1,3	0,13%
CHCl <sub>3</sub>	30	3%
AcOEt	7,1	0,71
<i>n</i> -BuOH	23,1	2,31%

Tableau II.7. Extraits obtenus de l'espèce Euphorbia gaditana Coss.

Tous les extraits ont été stockés dans l'obscurité à température ambiante avant de procéder aux opérations de fractionnement et purification.

# **II.2.3.** Fractionnement et purification

Les extraits AcOEt et *n*-BuOH ont été choisis pour la purification et l'isolement des métabolites secondaires suite à leur profil CCM (gel de silice en phase normale et phase inverse) (Figure II.16 et II.17), profil HPLC et leurs activités biologiques.

Des CCM en phase normale SiO<sub>2</sub> ainsi que sur silice greffée (RP-18) sont utilisées et éluées avec divers systèmes :

EP : AcOEt	80 : 20 et 20 : 80		
CHCl <sub>3</sub> : MeOH : H <sub>2</sub> O	70 : 30 : 5 et 60 : 40 : 7		
MeOH : H <sub>2</sub> O	20 : 80, 60 : 40 et 100 : 00		

Le fractionnement et la purification des extraits et des fractions ont été réalisés à l'aide de la chromatographie Flash, HPLC préparative, HPLC semi-préparative et une autre HPLC (PLC Gilson 2050) que l'on utilise pour le fractionnement et même la purification des petites fractions.

On note ici que certains composés ont été isolés plusieurs fois (isolés même 5 fois dans certains cas) à partir de différentes fractions soit dans le même extrait ou dans deux extraits.



Figure II.16. Profil CCM sur gel de silice normale des extraits obtenus de l'espèce *Euphorbia* gaditana Coss.



**Figure II.17.** Profil CCM sur gel de silice en phase inverse (C-18) des extraits obtenus de l'espèce *Euphorbia gaditana* Coss.

# II.2.3.1. Extrait AcOEt

L'extrait AcOEt (7,1 g) a été soumis à une VLC sur RP-C-18 élué avec le mélange de solvants MeOH : H<sub>2</sub>O (20: 80 à 100: 0) pour donner 5 fractions majeures (Acg1-Acg5). Les deux fractions Acg4 et Acg5 ont été par la suite combinées.

#### II.2.3.1.1. Fractionnement et purification de la Fraction Acg1

La fraction Acg1 (2,2 g) a été soumise à une Chromatographie Flash (CF) sur gel de silice (phase normale) éluée avec  $CH_2Cl_2$ : MeOH :  $H_2O$  (100 : 0: 0 à 70: 30 : 0 puis 70: 30 : 0 à 70 : 30 : 5) pour obtenir plusieurs sous fractions (Acg1-A à Acg1-M). La plus importante sous fraction obtenue au vu de sa masse est la sous fraction Acg1-E (195 mg). Cette dernière a été purifiée par CF sur RP-C18 avec un mélange MeOH :  $H_2O$  (gradient ; 5-20% de MeOH) pour donner la sous fraction Acg1-E-f sous forme d'un produit pur **Eg3** (19,4 mg), et la sous fraction Acg1-E-b se présentant comme un mélange des deux composés **Eg3** et **Eg32** (43,5 mg). Le composé **Eg32** (11,5) a été obtenu par la suite à partir de la sous fraction Acg1-E-c.

#### II.2.3.1.2. Fractionnement et purification de la Fraction Acg2

La fraction majeure Acg2 (2 g) a été fractionnée par HPLC préparative sur RP-C18 en utilisant MeCN : H<sub>2</sub>O comme éluant avec un gradient (20-30% de MeCN, pendant 1 h), pour conduire à douze sous fractions (Acg2-A à Acg2-L). Les sous fractions Acg2-C (144 mg), Acg2-D (192), Acg2-E (356 mg), Acg2-F (268 mg), Acg2-G (157 mg) et Acg2-H (100 mg) ont été purifiées par CF sur gel de silice SiO<sub>2</sub> éluée avec un système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH : H<sub>2</sub>O (100 : 0 : 0 à 70 : 30 : 0 puis 70 : 30 : 0 à 70 : 30 : 5).

La sous fraction Acg2-C a donné les composés **Eg9** (10 mg) et **Eg24** (7 mg), la sous fraction Acg2-D a fourni le produit **Eg5** (5,8 mg), ensuite la sous fraction Ac2-E a permis l'isolement du composé **Eg30** (43,5 mg), par contre la sous fraction Acg2-E-g (34 mg) a subi une deuxième purification par HPLC préparative (PLC 2050 Gilson) pour obtenir le produit **Eg6** (2,5 mg). La sous fraction Acg2-F a été fractionnée par CF sur gel de silice SiO<sub>2</sub> éluée avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH (100 : 0 à 65 : 35) pour donner la sous fraction Acg2-F-k (141 mg), qui a été purifiée à son tour par HPLC préparative (PLC 2050 Gilson) éluée avec MeCN : H<sub>2</sub>O (20-35% de MeCN) pour mener au produit pur **Eg1** (15,8 mg). Enfin, la sous fraction Acg2-G a fourni les composés **Eg2** (5,8 mg) et **Eg31** (7 mg) à l'état pur et la sous fraction Acg2-H a conduit au composé **Eg29** (2,5 mg).

#### II.2.3.1.3. Fractionnement et purification de la Fraction Acg3

Une purification avec HPLC préparative sur RP-C-18 a été réalisée sur une quantité de 1,2 g de la fraction Acg3. L'élution est réalisée au moyen des solvants MeCN :  $H_2O$  (gradient, 20-35% de MeCN, pendant 45 min) pour donner plusieurs sous fractions. Après analyse avec HPLC analytique des sous fractions récupérées par le système de solvants MeCN :  $H_2O$  (20-35% de MeCN, 20 min) les

composés suivants sont obtenus à l'état pur : **Eg4** (Rt 20,5 min, 7 mg), **Eg7** (Rt 9 min, 19,6 mg), **Eg10** (Rt 9,8 min, 24 mg), **Eg11** (Rt 7,2 min, 6,7 mg) et **E17** (Rt 15,0 min, 17,5 mg). Cependant, les sous fractions Acg3-24 (27 mg), Acg3-26 (18,3 mg) et Acg3-31 (18 mg) ont été ultérieurement purifiées par HPLC semi-préparative avec MeCN : H<sub>2</sub>O (20-35% de MeCN, 20 min) pour conduire aux produits **Eg19** (Rt 11,6 min, 3,8 mg) et **Eg20** (Rt 12,2 min, 2,6 mg) à partir de la sous fraction Acg3-24, le composé **Eg21** (Rt 14,6 min, 3 mg) de la sous fraction Acg3-26 et finalement le composé **Eg18** (Rt 15,6 min, 2,5 mg) de la sous fraction Acg3-31.



Figure II.18. Chromatogramme HPLC analytique de l'extrait AcOEt

# II.2.3.2. Extrait *n*-BuOH

L'extrait *n*-BuOH (22 g) a été fractionné par VLC sur RP-C18 et élué avec un mélange de solvants MeOH :  $H_2O$  (0 : 100 à 100: 0) pour fournir six fractions majoritaires (Bug0 à Bug5). Les deux fractions Bug4 et Bug5 ont été combinées pour donner une seule fraction.

#### II.2.3.2.1. Fractionnement et purification de la Fraction Bug1

La fraction Bug1 (3,4 g) a été fractionnée par CF sur RP-C-18 en utilisant comme éluant le mélange MeOH : H<sub>2</sub>O (5-40% de MeOH) pour conduire au composé **Eg27** (17 mg), les sous fractions Bug1-C et Bug1-D ont été combinées (64 mg) pour être purifiées par HPLC semi préparative en utilisant MeCN : H<sub>2</sub>O (5-25% de MeCN, 20 min). Ceci a mené à l'isolement du produit **Eg23** (Rt 12,3

min, 1,5 mg). La sous fraction Bug1-Q (316 mg) a fait l'objet d'une séparation sur une CF sur gel de silice SiO<sub>2</sub> éluée avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH : H<sub>2</sub>O (100 : 0 : 0 à 70 : 30 : 0 à 70 : 30 : 5) pour obtenir plusieurs sous fractions. La sous fraction Bug1-Q-c (27 mg) est purifié par HPLC semi préparative. L'élution est faite avec MeCN : H<sub>2</sub>O (gradient, 17-21% de MeCN, 20 min) pour aboutir aux composés **Eg25** (Rt 8,3 min, 5,5 mg) et **Eg22** (Rt 11,6 min, 3 mg), tandis que la sous fraction Bug1-Q-d a donné le produit **Eg28** (7,7 mg) sous forme d'un précipité dans le méthanol.

#### II.2.3.2.2. Fractionnement et purification de la Fraction Bug2

La fraction Bug2 (5,3 g) a été fractionnée par CF sur gel de silice SiO<sub>2</sub> élué avec CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O (100 : 0 : 0 à 70 : 30 : 0 puis 70 : 30 : 0 à 70 : 30 : 5) pour donner plusieurs sous fractions. La sous fraction Bug2-C (11,3 mg) a été purifiée par HPLC préparative (PLC 2050 Gilson) (15-35% de MeCN) pour aboutir au composé **Eg26** (2,6 mg).

La sous fraction Bug2-E (600 mg) est soumise à une purification par une CF sur RP-C18 éluée avec MeOH : H<sub>2</sub>O (15-25% de MeOH) pour conduire à la sous fraction Bug2-E-h (68 mg) qui à son tour a été purifiée par HPLC semi préparative sur RP-C-18 en utilisant un mélange de MeCN : H<sub>2</sub>O (15-25% de MeCN, 20 min) pour fournir le produit **Eg15** (Rt 12,6 min, 4,4 mg). La sous fraction Bug2-J (80 mg) a fait l'objet d'une purification sur HPLC préparative (PLC 2050 Gilson) éluée avec MeCN : H<sub>2</sub>O (15-35% de MeCN) pour donner le composé **Eg16** (6 mg).

#### II.2.3.2.3. Fractionnement et purification de la Fraction Bug3

Une quantité de (2,6 g) de la fraction Bug3 a été fractionnée par CF sur gel de silice SiO<sub>2</sub> en utilisant comme éluant le système de solvants CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH : H<sub>2</sub>O (100 : 0 : 0 à 70 : 30 : 0 puis 70 : 30 : 0 à 70 : 30 : 5) pour conduire à plusieurs sous fractions. Les sous fractions Bug3-I (20 mg) et Bug3-R (84 mg) ont été soumises à une séparation sur HPLC préparative (PLC 2050 Gilson) (MeCN : H<sub>2</sub>O) (25-45% de MeCN) et (15-25% de MeCN) respectivement, pour aboutir aux composés **Eg8** (1,3 mg) et **Eg12** (1 mg) à partir de la sous fraction Bug3-I, et les produits **Eg13** (5,4 mg) et **Eg14** (7,3 mg) de la sous fraction Bug3-R.



Figure II.19. Chromatogramme HPLC analytique de l'extrait n-BuOH

# Chapitre 3. Méthodes expérimentales et appareillages

# II.3.1. Chromatographie et séparation

Au cours des opérations de séparations et purifications, de nombreuses méthodes et divers appareils ont été utilisés :

# **II.3.1.1.** Extraction

Des extractions liquide-liquide ont été réalisées afin de partager le contenu de l'extrait brut (hydro-alcoolique) sur plusieurs extraits organiques à différentes polarités, ce qui simplifie leur étude phytochimique ultérieure. Pour cela, une ampoule à décanter de 1 L a été utilisée, en introduisant l'extrait brut solubilisé dans l'eau, suivi par les solvants EP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt et ensuite *n*-BuOH. Chaque extraction a été répétée 3 fois (3 x 300 mL de chaque solvant), les extraits organiques obtenus sont concentrés à sec à l'aide d'un évaporateur-rotatif sous pression réduite et à 40 °C pour donner des extraits organiques correspondant à l'état sec.

# **II.3.1.2.** Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM), est une méthode d'analyse qui permet d'avoir des informations sur la composition chimique et la pureté des fractions analysées.

Des plaques de silice prêtes à l'emploi ont été employées :

-Plaque de silice en phase normale (SiO<sub>2</sub>) sur support aluminium (Silice 60 F254, Merck).

-Plaque de silice en phase inverse (greffée C18) sur support aluminium (silice 60 RP-18 F254S, Merck).

Des systèmes de solvants ont été utilisés pour faire éluer les extraits, fractions et composés sur les plaques CCM, soit des systèmes de un, deux ou trois solvants selon le type des produits et leurs polarités.

Les systèmes utilisés sont :

-EP : AcOEt	80 : 20 et 20 : 80
-CHCl <sub>3</sub> : MeOH	99 : 1 ; 97 : 3 ; 95 : 5 ; 93 : 7 ; 90 : 10 et 80 : 20
-CHCl <sub>3</sub> : MeOH : H <sub>2</sub> O	80 : 20 : 2 ; 70 : 30 : 2 ; 70 : 30 : 5 et 60 : 40 : 7
-MeOH : H <sub>2</sub> O	20 : 80 et 60 : 40
-MeOH	100%

Après l'élution des CCM, ces dernières ont été révélées sous lampe UV (mpevilber Lourmat VL-6.MC) à 254 et 366 nm avant la deuxième révélation qui consiste en la pulvérisation de la solution de l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50%), cela est suivi d'un chauffage des CCM au décapeur thermique.

## II.3.1.3. Chromatographie sur colonne (CC)

Des colonnes ont été employées avec différents taille et diamètre, soit des colonnes ouvertes en verre de gel de silice (phase normale) ou de polyamide, soit des colonnes spécifiques pour la Chromatographie Flash sous forme de cartouches fermées déjà préparées avec du gel de silice (phase normale ou inverse).

#### II.3.1.4. Chromatographie liquide sous vide (VLC)

La chromatographie liquide sous vide (VLC : Vacuum Liquid Chromatography) est une technique de fractionnement majeure et rapide. D'habitude elle est préconisée pour fractionner grossièrement les extraits. On utilise dans cette technique un entonnoir en verre contenant un disque fritté (porosité N°4), une fiole à vide afin de récupérer les fractions et une pompe ou une trompe à eau pour créer le vide (Figure II.20).

L'entonnoir est rempli avec le gel de silice soit en phase normale (40-43  $\mu$ m, Merk) ou en phase inverse (RP-18 43-60  $\mu$ m, Merck). La silice en phase normale est éluée avec un système de solvants EP : AcOEt : MeOH (100 : 0 : 0 à 0 : 100 : 0 à 0 : 0 : 100) ; par contre la silice en phase inverse est parcourue par un système polaire H<sub>2</sub>O : MeOH (80 : 20 à 0 : 100).



Figure II.20. Montage de la VLC

# **II.3.1.5.** Flash Chromatographie (FC)

La Chromatographie Flash est une technique de séparation rapide à moyenne pression sur des colonnes traversées par un mélange de solvants avec un débit élevé accélérant la séparation. L'appareil utilisé est de marque Grace® Reveleris®, muni d'un détecteur UV-Vis, un détecteur DEDL (Détecteur évaporatif à diffusion de lumière) qui utilise l'isopropanol, des vannes de purge pour les 4 voies de solvants disponibles, ainsi une vanne pour le DEDL et un pilote (logiciel Reveleris® Flash Système) qui contrôle le débit, le gradient, les solvants, les détecteurs et les longueurs d'ondes, la collection automatique...etc (Figure II.21).

Des cartouches en plastique de gel de silice préemballées (phases normale ou inverse) avec différents volumes et diamètres qui supportent jusqu'aux 17 bars ont été utilisées.



Figure II.21. Appareil de Chromatographie Flash

# **II.3.1.6.** Chromatographie liquide haute performance (CLHP ou HPLC)

# II.3.1.6.1. HPLC analytique

Une chaine HPLC analytique a été utilisée pour les analyses des extraits et des fractions. Cette chaine Dionex U3000 (Thermo Fisher Scientific, France) est dotée d'un injecteur WPS 3000 SL, une pompe LPG 3400 SD, un double détecteur UV-DAD-3000 et un four TTC-3000 ; la chaine est pilotée avec le logiciel Chromeleon<sup>®</sup> (Figure II.22).

Les conditions suivantes ont été utilisées :

- Une colonne Interchim de stratégie C-18-HQ Uptisphere 250 x 4,6 mm
- Température 30 °C
- Débit 1 mL/min.

- Volume d'injection entre 10-25 μL (selon la concentration des échantillons)
- Un système d'élution MeCN : H<sub>2</sub>O (MeCN qualité HPLC, H<sub>2</sub>O filtrée à 0,22 μm et 0,025% acidifiée avec le TFA)



Figure II.22. HPLC Analytique Ultimate 3000

# II.3.1.6.2. HPLC préparative

Une chaine HPLC préparative (Armen Instrument) a été utilisée pour le fractionnement sur silice RP-18. La chaine est constituée d'une pompe AP 250/500, un injecteur manuel ACC 250/500, un détecteur UV Knauer K-2501 relié avec un enregistreur papier Kipp & Zonen BP111, une colonne Merck Lichrospher RP-18 (12 µm) et un collecteur automatique Buchi C-660 (Figure II.23).

Un système de solvants MeCN :  $H_2O$  (MeCN qualité HPLC et  $H_2O$  filtrée à 0,45 µm et 0,025% acidifiée avec le TFA) élué avec un débit entre 75 et 100 mL/min (changement selon la quantité et la simplicité des fractions).



Figure II.23. HPLC Préparative

## II.3.1.6.3. HPLC semi-préparative

La chaine HPLC (Dionex) semi-préparative employée pour la purification des produits est constituée d'une pompe U3000 LPG 3400 AB, un injecteur ASI 100 Dionex, un four Jasco CO-965, un détecteur Diode array UV 340 S et un collecteur de fractions Thermo Fisher FC-3000 (Figure II.24). Les conditions utilisées pour la purification sur HPLC semi-préparative sont :

- Une colonne Interchim Uptisphere stratégie RP-18-HQ (250 x 10 mm)
- Température 30 °C
- Débit 5 mL/min.
- Volume d'injection entre 50 et 150 μm (changement selon la simplicité des fractions et l'absorbance des composés à purifier)
- Un système d'élution MeCN : H<sub>2</sub>O (MeCN qualité HPLC, H<sub>2</sub>O filtrée à 0,22 μm et 0,025% acidifiée avec le TFA)



Figure II.24. HPLC Préparative

# II.3.1.6.4. HPLC (Gilson PLC 2050)

La chaine HPLC (Gilson PLC 2050) est utilisée pour le fractionnement des mélanges pas très complexes de produits, ou pour la purification des fractions à 2 ou 3 composés relativement séparables. Cette chaine est dotée d'un injecteur manuel de 1 ml de volume, une pompe qui peut atteindre les 50 mL/min, une colonne Interchim Uptispherstratégy C-18-HQ SUM (250 x 21,2 mm), un détecteur UV avec 4 longueurs d'onde possible et un collecteur automatique avec 3 raques de tubes. Un système d'élution MeCN : H<sub>2</sub>O (MeCN qualité HPLC, H<sub>2</sub>O filtrée à 0,45  $\mu$ m et 0,025% acidifiée avec le TFA) est employé. Le pilote utilisé est un pilote Prep (version V5.1e.02), qui contrôle les paramètres de

débit, de la pression, des voies de solvants et leurs proportions, des longueurs d'ondes UV choisies et du collecteur (Figure II.25).



Figure II.25. HPLC (PLC Gilson 2050)

# **II.3.2.** Chimie structurale

Plusieurs méthodes et appareils ont été utilisés au cours de l'élucidation structurale des composés isolés à l'état pur.

# II.3.2.1. Pouvoir rotatoire

Un polarimètre électronique Perkin-Elmer, model 341, a été utilisé pour la mesure des pouvoirs rotatoires spécifiques des nouveaux composés chiraux. Il est équipé d'une lampe à sodium ( $\lambda$ =589 nm), une cuve de 10 cm de longueur et 1 mL de volume. A la température 20 °C, on procède au calibrage à zéro avec le solvant de solubilisation, après le pouvoir rotatoire est mesuré et exprimé en degré.

A l'aide de la formule ci-dessous on peut calculer le pouvoir rotatoire des produits étudiés :

$$[\alpha]_{\rm D} = \alpha/(l \ge c)$$

Où  $\alpha$  : angle de rotation en degré lu sur le polarimètre

l: longueur en dm de la cuve de mesure (1 dm)

c: concentration du composé mesurée en g/100 mL

#### II.3.2.2. Spectrométrie UV-Vis

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

#### II.3.2.3. Spectrométrie Infrarouge (IR)

Un appareil Nicolet Impact 410 FTIR a été utilisée afin d'enregistrer des spectres IR des produits. L'échantillon est mélangé avec une poudre du KBr anhydre pour but de former des pastilles. Le pilote Ommic ESP 5.2a est servi pour l'enregistrement des spectres.

#### II.3.2.4. Spectroscopie RMN

Deux spectromètres de résonance magnétique nucléaire (RMN) à 500 MHz (Brüker Avance DRX-500) et 600 MHz (Brüker Avance DRX-600) ont été utilisés pour enregistrer des spectres d'expériences monodimensionnelles (RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) ou bidimensionnelles (COSY, HSQC, HMBC, NOESY). Deux versions du logiciel TopSpin 3.2 et 4.0 (fournis par Brüuker) ont été utilisées pour le traitement des spectres enregistrés, des informations structurales ont été fournies à partir de chaque spectre enregistré. Les échantillons analysés ont été solubilisés dans des solvants deutérés : CD<sub>3</sub>OD, acétone- $d_6$  et DMSO- $d_6$  dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre.

#### II.3.2.5. Spectrométrie de Masse

Des spectres de masse ESI-MS (Electro-Spray Ionisation) ont été enregistrés en basse et haute résolutions avec l'appareil micromasse ESI-Q-TOF® (Manchester, UK).

#### II.3.2.6. Hydrolyse acide

Afin d'obtenir la configuration du résidu monosaccharide du composé **Eg1** de la plante *Euphorbia gaditana*, une hydrolyse acide a été effectuée. Pour cela, 10 mg du produit **Eg1** ont été chauffés à reflux avec 5 mL de HCl 2 N à 90 °C pendant 4 h, puis neutralisés avec du KOH 0,5 M. Après extraction avec du  $CH_2Cl_2$  (3 x 5 mL), la solution aqueuse a été évaporée pour obtenir le sucre libre correspondant. Le sucre obtenu est comparé avec des sucres de référence sur plaque CCM afin de confirmer le type de sucre. Ce qui a conduit à l'identification du sucre comme le D-glucose dans notre cas.

#### **II.3.3.** Dosages et tests biologiques

Les différents dosages ainsi que les activités biologiques effectués au cours de ce travail ont été effectuées au Centre National de Recherche en Biotechnologie (CRBt, Constantine, Algérie), les dosages et les activités ont été réalisés en microplaques à 96 puits, et la mesure d'absorbance a été faite par un lecteur microplaques multimode EnSpire de Perkin Elmer. Les échantillons ont été préparés dans le méthanol à différentes concentrations, commençant par 1 mg/mL et préparant 6 autres dilutions. Toutes les expériences ont été faites en triple.

#### II.3.3.1. Dosages

#### II.3.3.1.1. Dosage des phénols

La teneur en composés phénoliques totaux a été mesurée pour les extraits obtenus des deux plantes en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu (Müller et al., 2010). Une solution d'acide gallique à différentes concentrations a été utilisée afin d'établir une courbe d'étalonnage et les résultats ont été exprimés en équivalent d'acide gallique ( $\mu$ g EAG/mg d'extrait). La méthode consiste à mettre 20  $\mu$ L d'échantillon à différentes concentrations dans des puits de microplaque (96 puits), suivie par l'addition de 100  $\mu$ L du folène à 10%, ensuite on additionne un volume de 80  $\mu$ L d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 7,5%. Après 2 heures en obscurité, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 765 nm.

#### II.3.3.1.2. Dosage des flavonoïdes

La mesure de la teneur en flavonoïdes a été réalisée selon la méthode de Topçu et al. (2007), les résultats sont exprimés en équivalent de quercétine ( $\mu$ g EQ/mg extrait), en utilisant la quercétine comme standard d'étalonnage. 50  $\mu$ L de l'échantillon de chaque concentration ont été mis dans des puits d'une microplaque (96 puits), suivie de 130  $\mu$ L de méthanol et 10  $\mu$ L d'une solution de CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>K, et à la fin on ajoute un volume de 10  $\mu$ L d'une solution d'Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>. Après 40 min, l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde de 415 nm.

#### II.3.3.2. Tests antioxydants

Afin d'évaluer l'activité antioxydante des extraits et des produits isolés des deux plantes *Atractylis cancellata* et *Euphorbia gaditana*, plusieurs méthodes ont été appliquées (DPPH, ABTS, CUPRAC et FRAP). L'acide ascorbique et BHA sont utilisés comme standards. La concentration inhibitrice à 50% (IC<sub>50</sub>) des radicaux DPPH et ABTS est calculée par la formule suivante :

$$IC_{50} = 100 \times [(A_0 - A)/A_0]$$

Où :  $A_0$  et A sont les absorbances du système en absence et présence d'échantillon, respectivement. La concentration à l'absorbance A = 0,5 (A<sub>0,5</sub>) pour les activités CUPRAC et FRAP est calculée par la formule suivante :

#### $A = 100 - (A/A_0 \times 100)$

Les résultats sont exprimés en IC<sub>50</sub>, qui est défini comme étant la concentration efficace de l'extrait capable de piéger 50 % des radicaux (DPPH ou ABTS) dans le mélange réactionnel, dont l'activité la plus forte correspond à l'IC<sub>50</sub> la plus faible. On peut dire la même chose pour les A<sub>0,5</sub>, qui définit l'absorbance à A = 0,5, ce qui est relié au changement de la couleur lors de la réduction du fer ou du cuivre (activité CUPRAC ou FRAP).

Les valeurs de l' $IC_{50}$  et l' $A_{0,5}$  ont été interpolées à partir d'un graphique de régression linéaire de l'échantillon.

#### II.3.3.2.1. Test de piégeage du radical DPPH

Le test de piégeage des radicaux libres DPPH a été évalué par la méthode décrite par Blois (1958), la réduction de ce radical s'accompagne par son passage de la couleur violette à la couleur jaune à 517 nm. En bref, 160  $\mu$ L de solution de DPPH en EtOH (0,4 mM) ont été ajoutés à 40  $\mu$ L d'échantillon dissous dans le méthanol à différentes concentrations ; un contrôle contenant 40  $\mu$ L de méthanol avec 160  $\mu$ L de solution de DPPH a été employé. Après 30 min dans l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 517 nm.

#### II.3.3.2.2. Test de piégeage du radical ABTS

La méthode de Re et al. (1999) a été utilisée pour évaluer la capacité des extraits et des composés isolés à piéger le radical ABTS. Le cation radicalaire ABTS<sup>.+</sup> est régénéré en ajoutant 2,45 mM de persulfate de potassium à une solution aqueuse à 7 mM ABTS qui est stocké dans le noir à température ambiante pendant 12 heures avant emploi. A chaque puits de la microplaque, 160  $\mu$ L de solution ABTS<sup>.+</sup> ont été ajoutés à 40  $\mu$ L de solution échantillon à différentes concentrations. Après 10 minutes, l'absorbance a été mesurée à 734 nm.

#### II.3.3.2.3. Test du pouvoir réducteur de fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur du fer (FRAP) des extraits et des composés testés a été déterminé selon la méthode de Bouratoua et al. (2017). Afin d'évaluer cette activité, 10  $\mu$ L d'échantillon à plusieurs concentrations ont été ajoutés dans une plaque à fond rond de 96 puits. Après cela, 40  $\mu$ L de 0,2 M du tampon phosphate (pH= 6,6) et 50  $\mu$ L de ferricyanure de potassium K<sub>3</sub>Fe(CN<sub>6</sub>) (1%) ont été ajoutés à

chaque puits, la plaque a été incubée à 50 °C pendant 20 min, ensuite, 50  $\mu$ L de l'acide trichloroacétique TCA (10%), 40  $\mu$ L d'eau distillée et 10  $\mu$ L de chlorure ferrique FeCl<sub>3</sub> (0,1%) ont été ajoutés dans chaque puits. L'absorbance a été mesurée à 700 nm. Une absorbance plus élevée du mélange réactionnel indique un pouvoir réducteur plus important.

#### II.3.3.2.4. Test de réduction du cuivre (CUPRAC)

La capacité antioxydante réductrice cuivrique (CUPRAC) a été évaluée selon la méthode d'Apak et al. (2004). Dans chaque puits d'une plaque à 96 puits, 60  $\mu$ L d'une solution d'acétate d'ammonium (1 M, pH 7,0) est ajoutée sur 40  $\mu$ L d'échantillon à différentes concentrations, ensuite 50  $\mu$ L d'une solution de néocuproine à 7,5 mM et 50  $\mu$ L d'une solution de chlorure de cuivre II (CuCl<sub>2</sub>) ont été additionnées sur les solutions initiales. La plaque est laissée pendant 1 h puis l'absorbance est mesurée à 450 nm.

#### II.3.3.3. Activité anticholinesterase

L'activité inhibitrice des enzymes acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) a été mesurée à l'aide de la méthode spectrophotométrique développée par Ellman et al. (1961). Brièvement, 150  $\mu$ L de tampon phosphate de sodium (pH = 8,0), 10  $\mu$ L de solution d'échantillon dissous dans le méthanol à différentes concentrations et 20  $\mu$ L d'enzyme acétylcholinestérase (AChE) (ou d'enzyme butyrylcholinesterase BChE), ont été mélangés et incubés pendant 15 min à 25 °C ; puis, 10  $\mu$ L de DTNB 0,5 mM (5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoique)) ont été ajoutés. La réaction a ensuite été initiée par l'addition de 10  $\mu$ L d'iodure d'acétyl thiocholine (0,71 mM) (ou d'iodure de butyryl thiocholine (0,2 mM)). L'hydrolyse de ces substrats a été contrôlée par la spectrophotométrie (à une longueur d'onde de 412 nm) par la formation d'un anion jaune du 5-thio-2-nitrobenzoate résultant de la réaction du DTNB avec la thiocholine, libérée par l'hydrolyse enzymatique d'iodure d'acétylthiocholine (ou d'iodure de butyrylthiocholine). La galantamine a été utilisée comme composé de référence. L'inhibition de l'AChE ou BChE (%) est calculée à l'aide de la formule suivante :

#### $IC_{50} = [(E-S)/E] \times 100$

Où E est l'activité de l'enzyme sans échantillon, et S est l'activité de l'enzyme avec l'échantillon. Les valeurs  $IC_{50}$  ont été interpolées à partir d'une courbe de régression linéaire des extraits et des composés en fonction de l'effet inhibiteur en pourcentage.

## II.3.3.4. Activité anti-tyrosinase

L'activité inhibitrice de l'enzyme tyrosinase a été mesurée à l'aide de la méthode de Deveci et al. (2018). La méthode consiste à ajouter 150  $\mu$ L de tampon phosphate de sodium (pH= 6,8), 10  $\mu$ L d'échantillon à différentes concentrations et 20  $\mu$ L de solution d'enzyme tyrosinase dans le même puits, ensuite la microplaque est incubée pendant 10 min à 37 °C. Après cela, 20  $\mu$ L de L-DOPA ont été ajoutés et incubés à nouveau pendant 10 minutes à 37 °C. Les absorbances ont été lues à 475 nm.

#### References

- Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. Journal of Agricultal and Food Chemistry. 52: 7970-7981.
- Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature. 181: 1119-1200.
- Bouratoua A, Khalfallah A, Bensouici B, Kabouche Z, AlabdulMagid A, Harakat D, Voutquenne-Nazabadioko L, Kabouche A. 2018. Chemical composition and antioxidant activity of aerial parts of *Ferula longipes Coss.* ex Bonnier and Maury. Natural Product Research. 32: 1873-1880.
- Deveci E, Tel-Çayan G, Duru ME. 2018. Phenolic profile, antioxidant, anticholinesterase, and antityrosinase activities of the various extracts of *Ferula elaeochytris* and *Sideritisstricta*. International Journal of Food Properties. 21(1): 771-783.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Featherston RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology. 7(2): 88-95.
- Müller L, Gnoyke S, Popken AM, Böhm V. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. LWT Food Science and Technology. 43: 992-999.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology Medicine. 26: 1231-1237.
- Topçu G, Ay A, Bilici A, Sarıkürkcü C, Öztürk M, Ulubelen A. 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. Food Chemistry. 103: 816–822.

# Partie III. Résultats et discussion

# Chapitre 1. Etude spectrale des composés isolés de *Atractylis cancellata* L.

L'étude chimique des extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH issus de l'extrait brut de la plante entière *A. cancellata* a été achevée par l'isolement et l'identification de **17** métabolites secondaires. Afin de caractériser ces produits, plusieurs méthodes spectroscopiques sont utilisées : la spectroscopie RMN monodimensionnelle (RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) et bidimensionnelle (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), la spectrométrie de masse à basse et à haute résolution (ESI-MS et HR-ESI-MS), ainsi que par comparaison avec les données de la littérature.

Les tableaux des déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C des composés isolés sont insérés à la fin de chaque interprétation.

# III.1.1. Elucidation structurale du composé Ac1

Le nouveau composé **Ac1** (Figure III.1) a été isolé sous forme d'une poudre amorphe blanche soluble dans le méthanol. La CCM de ce produit montre une tache visible sous lumière UV à 254 et 366 nm, se révèlant en marron foncé par l'acide sulfurique et chauffage.



**Pyrroloquinolone** A

Figure III.1. Structure du composé Ac1

Le spectre UV de ce composé enregistré dans le méthanol (Figure III.2) indique deux bandes d'absorption maximales à 220 et 278 nm caractérisant la présence d'un système aromatique étendu.



Figure III.2. Spectre UV du composé Ac1

Le spectre de masse haute résolution en mode positif HR-ESI-MS (Figure III.3) montre un pic d'ion moléculaire à m/z = 198,0791 [M]<sup>+</sup> (calculé pour C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O, 198,0793), soit une masse moléculaire M = 198 Da, ceci correspond à une formule brute en C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O avec un nombre d'insaturation égale à 9.



Figure III.3. Spectre de masse HR-ESI-MS (en mode positif) du composé Ac1

Le spectre RMN <sup>1</sup>H enregistré dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.4) montre quatre protons aromatiques à  $\delta_{\rm H}$  8,24 (1H, *dl*, 8,0 Hz), 8,01 (1H, *d*, 8,7 Hz), 7,75 (1H, *tl*, 8,1 Hz), 7,61 (1H, *t*, 7,6 Hz) qui appartiennent au même système de spins selon le spectre COSY (Figure III.5). Ces signaux indiquent la présence d'un noyau aromatique di-substitué en *ortho*, et ils sont attribués aux protons nommés H-9, H-6, H-7 et H-8 respectivement.

Deux doublets (J = 3,1 Hz) d'intégration 1H chacun à  $\delta_H$  7,46 et 7,12 assignés respectivement aux protons appelés H-2 et H-3 d'une double liaison. Un dernier signal relativement déblindé à  $\delta_H$  4,02 (3H, *s*) correspond à des protons H<sub>3</sub>-5a d'un méthyle lié à un hétéroatome.



Figure III.4. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Ac1 (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)



Figure III.5. Spectre COSY du composé Ac1

Le spectre HSQC (Figure III.6) permet d'assigner chaque proton à son carbone comme suit : les protons H-9, H-6, H-7, H-8, H-2, H-3 et H<sub>3</sub>-5a sont portés par les carbones qui résonnent à  $\delta_{C}$  121,5 (C-9), 116,9 (C-6), 129,0 (C-7), 124,9 (C-8), 125,1 (C-2), 103,9 (C-3) et 33,1 (C-5a) respectivement. Le déplacement chimique du carbone C-5a suggère qu'il est lié à un atome d'azote (Zhang et al., 2014).



Figure III.6. Spectre HSQC du composé Ac1

Le spectre RMN <sup>13</sup>C réalisé dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.7) montre un signal à  $\delta_C$  152,4 correspondant à un carbone quaternaire d'un amide (Hao et al., 2017). D'autres signaux apparaissent sur ce spectre à  $\delta_C$  108,6, 115,1, 134,8 et 135,1 assignés aux carbones sp<sup>2</sup>.



Figure III.7. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Ac1 (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz)

Toutes ces caractéristiques spectrales nous orientent vers une structure de type quinolone (Hao et al., 2017).

Le spectre HMBC (Figure III.8) présente des taches de corrélation entre les protons H-7 et H-9 et le carbone résonant à  $\delta_{\rm C}$  135,1 correspondant au carbone aromatique C-6a. Ainsi, les protons H-8 et H-6 indiquent des corrélations avec le carbone à  $\delta_{\rm C}$  115,1 assigné au C-9a. A ce niveau, tous les protons et carbones du cycle aromatique ont été attribués (Figure III.9).



Figure III.8. Spectre HMBC du composé Ac1



Figure III.9. Correlation HMBC au niveau du cycle benzène

Les protons H<sub>3</sub>-5a du méthyle montrent un couplage en  ${}^{3}J$  avec le carbone C-4 de la fonction amide (-CON-) à 152,4 ppm, ce qui confirme que l'hétéroatome lié au méthyle est l'azote. Les mêmes protons corrèlent avec le carbone C-6a indiquant que la fonction amide est portée par le carbone C-6a du cycle aromatique. Le proton H-9 couple en  ${}^{3}J$  avec un carbone à  $\delta_{C}$  134,8 correspondant au carbone quaternaire C-9b lié directement au carbone C-9a. De plus, son déplacement chimique suggére qu'il est lié à un atome éléctro-attracteur (Figure III.10).



Figure III.10. Correlation HMBC de H-9 et H<sub>3</sub>-5a

Les deux protons H-2 et H-3 montrent des corrélations en <sup>3</sup>*J* avec le carbone C-9b d'un côté, et un carbone à 108,6 ppm attribué au carbone C-3a d'un autre côté. Cependant, le proton H-2 montre un couplage lointain en <sup>4</sup>*J* avec le carbone de la fonction amide C-4 à  $\delta_{\rm C}$  152,4 (Figure III.11), ce qui nous conduit à conclure :

-le carbone C-2 est relié au carbone C-9b par l'intermédiaire d'un hétéroatome qui est forcément un azote vu la masse paire de l'ion moléculaire observé sur le spectre de masse (Figure III.3), formant ainsi un cycle pyrrole.

-le carbone C-3a relie les deux carbones C-3 et C-4 et forme un autre cycle de type pyridine incluant le groupement amide.



Figure III.11. Correlation HMBC des protons H-2 et H-3

Il en résulte que ce composé contient deux cycles : benzène et pyrrole reliés au noyau pyridine central. Ceci conduit à une structure de type pyrroloquinolone.

A l'issue de cette analyse, le nouveau composé **Ac1** (Figure III.1) est identifié comme 5méthyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrrolo [3,2-c] quinolin-4-one, précédemment synthétisée par Tim et Keith (1997), et que nous avons nommé pyrroloquinolone A. Ce métabolite secondaire a été isolé pour la première fois du règne végétale, fait partie de la classe des quinolones qui sont connues pour leurs activités biologiques intérésentes comme anticholinesterase (Mermer et al., 2018), antimicrobienne (Chen et al., 2016), antiproliferative (Zhou et al., 2017) ....

Tableau III.1. Dé	placements chimic	ues en RMN <sup>1</sup> H e	t <sup>13</sup> C du composé A	<b>c1</b> dans CD <sub>3</sub> OD

Ac1			
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	
2	7,46, 1H, <i>d</i> , 3,1 Hz	125,1	
3	7,12, 1H, <i>d</i> , 3,1 Hz	103,9	
3a	-	108,6	
4	-	152,4	
5a	4,02, 3H, <i>s</i>	33,1	
6a	-	135,1	
6	8,01, 1H, <i>d</i> , 8,7 Hz	116,9	
7	7,75, 1H, <i>tl</i> , 8,1 Hz	129,0	
8	7,61, 1H, <i>t</i> , 7,6 Hz	124,9	
9	8,24, 1H, <i>dl</i> , 8,0 Hz	121,5	
9a	-	115,1	
9b	-	134,8	

# III.1.2. Elucidation structurale du composé Ac2

Le produit **Ac2** (Figure III.12) est obtenu sous forme d'une poudre amorphe blanche soluble dans le méthanol. Il donne une tache visible sous UV à 254 et 366 nm sur sa CCM, qui se révèle avec une couleur marron très claire lors de la révélation avec l'acide sulfurique et le chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS en mode positif (Figure III.13) du composé Ac2 indique un pic d'ion moléculaire à  $m/z = 189 \text{ [M]}^+$ , soit une masse moléculaire de 189 Da correspond à une formule brute de C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub> et un nombre d'insaturation égale à 7.



4-méthoxy-1-méthyl-2-quinolone





Figure III.13. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Ac2

Les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Ac2 effectués dans CD<sub>3</sub>OD (Figures III.14 et III.15) montrent une similitude structurale avec ceux du produit Ac1 (Figures III.4 et III.7).



Figure III.14. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Ac2 (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)



Figure III.15. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Ac2 (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz)

En effet, le noyau aromatique di-substitué en *ortho* est représenté par les quatres signaux à  $\delta_{\rm H}$  8,11 (1H, *d*, 8,1 Hz), 7,83 (1H, *d*, 8,6 Hz), 7,78 (1H, *td*, 8,6, 1,3 Hz), 7,46 (1H, *t*, 7,8 Hz) correspondant aux protons H-5, H-8, H-7 et H-6 respectivement. Ces attributions ont été confirmées par le spectre COSY (Figure III.16).



Figure III.16. Spectre COSY du composé Ac2

Un signal sous forme d'un singulet sur le spectre RMN <sup>1</sup>H repéré à 6,40 ppm (1H, *s*) est assigné à un proton d'une double liaison nommé H-3. Son carbone résonne à  $\delta_{\rm C}$  90,0 selon les l'éxperience HSQC.
Deux signaux détectés d'intégration 3H à  $\delta_{\rm H}$  4,05 et 3,78 chacun correspondent à deux méthyles liés à des atomes éléctro-attracteurs. L'analyse du spectre HSQC (Figure III.17) permet d'attribuer les carbones de ces deux méthyles à  $\delta_{\rm C}$  56,3 et 32,8 respectivement. Il s'agit donc d'un méthoxyle (CH<sub>3</sub>-O-) ( $\delta_{\rm H}$  4,05/ $\delta_{\rm C}$  56,3) et d'un méthyle lié à l'azote (CH<sub>3</sub>-N-) ( $\delta_{\rm H}$  3,78/ $\delta_{\rm C}$  32,8).



Figure III.17. Spectre HSQC du composé Ac2

Le spectre HMBC (Figure III.19) présente des corrélations en  ${}^{3}J$  entre les protons H-6 et H-8 avec un carbone à  $\delta_{\rm C}$  117,5 qui correspondent au carbone C-4a, les deux autres protons du noyau aromatique H-5 et H-7 couplent en  ${}^{3}J$  avec un carbone à 138,6 ppm assigné au carbone C-8a. Ces deux carbones C-4a et C-8a représentent les deux carbones substitués du cycle aromatique (Figure III.18).



Figure III.18. Correlations HMBC au niveau du cycle aromatique



Figure III.19. Spectre HMBC du composé Ac2

Le proton aromatique H-5, le proton éthylénique H-3 et les protons du groupement méthoxyle H<sub>3</sub>-4' corrèlent en HMBC avec un carbone résonant à  $\delta_C$  164,6 attribuable au carbone C-4 (Figure III.20).



Figure III.20 Corrélations HMBC avec le carbone C-4

En plus, le proton H-3 présente des couplages HMBC avec le carbone quaternaire aromatique C-4a déjà identifié. Par ailleurs, le carbone aromatique quaternaire C-8a corrèle en HMBC avec les protons H<sub>3</sub>-1' du groupement méthyle amine (CH<sub>3</sub>-N-) attestant que ce substituant est lié au noyau

aromatique en position C-8a. Ces trois protons présentent également sur le spectre HMBC une corrélation en  ${}^{3}J$  avec un carbone à  $\delta_{C}$  157,2 qui ne pourait être que le carbonyle d'un amide (Figure III.21) (Hao et al., 2017).



Figure III.21. Corrélations HMBC des protons H<sub>3</sub>-1' et H-3

A ce stade d'analyse, tous les protons et carbones de ce composé sont assignés. Aussi cette élucidation nous a permis de déterminer le nombre d'atomes de carbone, hydrogène, oxygène et azote comme suit : 11C, 11H, 2O et 1N. En tenant compte de la formule brute en  $C_{11}H_{11}NO_2$  et le nombre d'insaturations déjà trouvé (I = 6), il reste une seule insaturation correspondant à la formation d'un cycle à six chainons entre les carbones C-2 et C-3 correspondant au noyau pyridine comportant le groupement amide (Figure III.22).



Figure III.22. Structure finale du composé Ac2

D'aprés ces données et la comparaison avec celles de la littérature (Coppola et al., 1981), le produit **Ac2** est élucidé comme 4-méthoxy-1-méthyl-2-quinolone, isolé pour la premier fois de la famille Asteraceae. Ce composé a été isolé et évalué pour son activité antimicrobienne à partir de deux plantes *Helietta apiculata* (Fernandes et al., 2017) et *Hortia superba* (Severino et al., 2015) de la famille Rutaceae.

Ac2						
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\rm C}$				
1′	3,78, 3H, <i>s</i>	32,8				
2	-	157,2				
3	6,40, 1H, <i>s</i>	90,0				
4	-	164,6				
4′	4,05, 3H, <i>s</i>	56,3				
4a	-	117,5				
5	8,11, 1H, <i>d</i> , 8,1 Hz	123,4				
6	7,46, 1H, <i>t</i> , 7,8 Hz	124,8				
7	7,78, 1H, td, 8,6, 1,3 Hz	133,1				
8	7,83, 1H, <i>d</i> , 8,6 Hz	115,9				
8a	-	138,6				

Tableau III.2. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Ac2 dans CD<sub>3</sub>OD

## III.1.3. Elucidation structurale du composé Ac3

Le métabolite secondaire **Ac3** (Figure III.23) est purifié sous forme d'une poudre jaune soluble dans l'acétone. Il est visible sous la lumière UV à 254 et 366 nm, et se colore en jaune après la révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Deux pics d'ions pseudo-moléculaires du composé **Ac3** sont observés sur le spectre de masse ESI-MS en mode négatif (Figure III.24) à  $m/z = 253 \text{ [M-H]}^-$  et 507 [2M-H]<sup>-</sup>, correspondant à une masse moléculaire de 254 Da et une formule brute en C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>.



Chrysine

Figure III.23. Structure du composé Ac3



Figure III.24. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Ac3

Le composé **Ac3** présente sur son spectre RMN <sup>1</sup>H enregistré dans l'acétone- $d_6$  (Figure III.25) des signaux caractéristiques du squelette flavone. En effet, il montre des résonances à  $\delta_{\rm H}$  6,77 (1H, *s*), 6,58 (1H, *d*, 2,1 Hz) et 6,29 (1H, *d*, 2,1 Hz) qui correspondent aux protons H-3, H-8 et H-6 respectivement des cycles A et C des flavonoides.

Un autre signal sous forme d'un multiplet d'intégration 3H repéré à 7,60 ppm (3H, *m*) est attribué aux protons aromatiques H-3', H-4' et H-5', en plus d'un doublet de doublets qui résonne à  $\delta_{\rm H}$  8,05 (2H, *dd*, 8,1, 1,8 Hz) correspond aux protons H-2' et H-6'. Cela montre que le cycle B du squelette flavone est mono-substitué.



Figure III.25. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Ac3 (Acétone-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)

L'analyse du spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé réalisé dans l'acétone- $d_6$  (Figure III.26), ainsi que la comparaison avec les données de la littérature (Liu et al., 2010), permettent l'attribution des carbones de ce composé comme suit : les carbones qui résonnent à  $\delta_C$  95,1, 99,8, 105,7 et 106,3 correspondent aux carbones C-8, C-6, C-10 et C-3 respectivement. Tandis que, les carbones du cycle B sortent dans la

zone entre 125-135 ppm. Les carbones oxygénés C-9, C-5, C-2 et C-7 sont indiqués par les pics à 159,1, 163,4, 164,7 et 165,9 ppm. Le dernier carbone à attribuer est le carbone C-4 qui résonne à  $\delta_{C}$  182,4.



Figure III.26. Spectre RMN <sup>13</sup>C J-modulé du composé Ac3 (Acétone-d<sub>6</sub>, 125 MHz)

Donc, le composé **Ac3** est identifié comme la chrysine, qui a été déjà isolée de la plante *A. flava* (Chabani et al., 2013) du même genre, ainsi de l'espèce *Ziziphora clinopodioides* (Lamiaceae) (Zhang et al., 2018) et autres plantes.

Fableau III.3. Déplacements chimiqu	ues en RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du com	posé Ac3 dans l'Acétone-d <sub>6</sub>
-------------------------------------	---	--

Ac3						
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\mathrm{C}}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	
2	-	164,7	1'	-	132,5	
3	6,77, 1H, <i>s</i>	106,3	2'	8,05, 1H, <i>dd</i> , 8,1, 1,8 Hz	127,4	
4	-	182,4	3'	7,60, 1H, <i>m</i>	130,1	
5	-	163,4	4'	7,60, 1H, <i>m</i>	132,8	
6	6,29, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	99,8	5'	7,60, 1H, <i>m</i>	130,1	
7	-	165,9	6'	8,05, 1H, <i>dd</i> , 8,1, 1,8 Hz	127,4	
8	6,58, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	95,1				
9	-	159,1				
10	-	105,7				

### III.1.4. Elucidation structurale du composé Ac4

Le composé **Ac4** (Figure III.27) est isolé sous forme d'une poudre jaune amorphe soluble dans le méthanol. Il est visible sous lumière UV à 254 et 366 nm et il apparait sous forme d'une tache jaune sur la CCM lors de la révélation avec l'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III.28) en mode positif du produit Ac4 montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 309 [M+K]^+$  et correspond à une masse moléculaire de 270 Da et une formule brute en C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>.



Apigénine





Figure III.28. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Ac4

Des signaux caractéristiques des flavonoïdes de type flavone visualisés sur les deux spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C enregistrés dans CD<sub>3</sub>OD (Figures III.29 et III.30) du produit isolé **Ac4**, nous amènent à identifier les protons H-3, H-8 et H-6 des cycles A et C du flavone à  $\delta_{\rm H}$  6,63 (1H, *s*), 6,49 (1H, *sl*) et 6,24 (1H, *sl*) respectivement. Le noyau aromatique B est représenté par deux doublets d'intégration 2H

chacun à  $\delta_{\rm H}$  7,88 (2H, *d*, 8,1 Hz, H-2', H-6') et 6,95 (2H, *d*, 8,1 Hz, H-3', H-5') indiquant que le cycle B est di-substitué en *para*.



Figure III.29. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Ac4 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

Le spectre RMN <sup>13</sup>C confirme la symétrie du cycle B représentée par les deux signaux intenses à  $\delta_C$  128,4 (C-2', C-6') et 116,0 (C-3', C-5'). Le carbone C-4 du carbonyle est repéré à  $\delta_C$  181,7.



Figure III.30. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Ac4 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

A cet effet, et vu les données collectées des spectres RMN et la comparaison avec celles de la littérature (Liu et al., 2010), le composé Ac4 (Figure III.27) est identifié comme l'apigénine. Ce composé possédant une activité antioxydante modérée, a été isolé entérieurement de plusieurs espèces

comme *Atractylis flava* (Chabani et al., 2013), *Euterpe oleracea* (Arecaceae) (Brunschwig et al., 2017) et *Ziziphora clinopodioides* (Lamiaceae) (Zhang et al., 2018).

Ac4						
Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{\rm C}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	
2	-	161,2	1'	-	121,1	
3	6,63, 1H, <i>s</i>	102,8	2'	7,88, 1H, <i>d</i> , 8,1 Hz	128,4	
4	-	181,7	3'	6,95, 1H, <i>d</i> , 8,1 Hz	116,0	
5	-	163,7	4'	-	161,4	
6	6,24, 1H, <i>sl</i>	98,6	5'	6,95, 1H, <i>d</i> , 8,1 Hz	116,0	
7	-	164,5	6'	7,88, 1H, <i>d</i> , 8,1 Hz	128,4	
8	6,49, 1H, <i>sl</i>	94,0				
9	-	157,3				
10	-	103,5				

Tableau III.4. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Ac4 dans CD<sub>3</sub>OD

## III.1.5. Elucidation structurale du composé Ac5

Le produit **Ac5** (Figure III.31) est purifié sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il est visible sous UV à 254 et 366 nm, et donne une tache jaune foncé sur sa CCM après une révélation avec une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS en mode positif (Figure III.32) du métabolite secondaire Ac5 indique un pic d'ion moléculaire à  $m/z = 330 \text{ [M]}^+$ , donnant une masse moléculaire de 330 Da et une formule brute de C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>.



Tricine

Figure III.31. Structure du composé Ac5



Figure III.32. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Ac5

Vu la tache jaune sur la CCM et les trois signaux observés sur le spectre RMN <sup>1</sup>H effectué dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.33) à  $\delta_{\rm H}$  6,70 (1H, *s*, H-3), 6,51 (1H, *sl*, H-8) et 6,24 (1H, *sl*, H-6) et qui sont caractéristiques des flavones comme il est déjà mentionné lors de l'interprétation des composé **Ac3** et **Ac4**, on conclut que le composé **Ac5** est une flavone.

Le spectre RMN <sup>1</sup>H montre aussi la presence d'un singulet d'intégration 6H à  $\delta_H$  3,98 attribuable à deux groupements méthoxyles, ainsi qu'un signal déblindé s'intégrant pour 2H à  $\delta_H$  7,28 correspondant aux protons H-2' et H-6' du cycle B. Ceci suggére une symétrie au niveau du noyau aromatique B. En conséquence, les deux méthoxyles sont placés sur les carbones aromatiques C-3" et C-5".



**Figure III.33.** Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé **Ac5** (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

D'après l'analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H et masse, et la comparaison avec un échantillon témoin et les données de la littérature (Ghasemi et al., 2018), le composé **Ac5** est identifé comme la tricine, isolée pour la première fois du genre *Atractyis*.

Elle présente une bonne activité antioxydante et antiproliférative d'après les tests faits sur ce composé isolé des espèces *Arenaria kansuensis* (Caryophyllaceae) (Cui et al., 2018) et *Myoporum bontioides* (Scrophulariaceae) (Weng et al., 2017).

$\delta_{\rm H}, m, J$
-
28, 1H, <i>s</i>
-
-
-
28, 1H, <i>s</i>
98, 3H, <i>s</i>
98, 3H, <i>s</i>

Tableau III.5. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H du composé Ac5 dans CD<sub>3</sub>OD

## III.1.6. Elucidation structurale du composé Ac6

Le produit **Ac6** (Figure III.34) est obtenu sous forme d'une poudre jaune visible sous UV à 254 et 366 nm et soluble dans le méthanol. Il donne une tache jaune sur la CCM après la révélation avec l'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse en mode positif ESI-MS du composé Ac6 dévoile un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z = 325 \text{ [M+Na]}^+$ , ce qui indique une masse moléculaire de 302 Da et une formule brute de C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>.



Quercétine

Figure III.34. Structure du composé Ac6

Les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C enregistrés dans CD<sub>3</sub>OD (Figures III.35 et III.36) du produit **Ac6** suggerent que la nature de ce flavonoide est de type flavonol, du fait de l'absence du signal du proton H-3 et l'apparition sur le spectre RMN <sup>13</sup>C d'un signal à  $\delta_C$  137,3 attribué au carbone C-3 porteur d'un groupement hydroxyle. Ceci est confirmé par le déplacement chimique du carbone C-4 à  $\delta_C$  177,3, car dans le cas de la présence du proton H-3, le carbone C-4 du carbonyle résonnerait vers  $\delta_C$  182.

L'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H permet d'assigner les déplacements chimiques des protons du cycle A méta-couplés H-6 et H-8 à  $\delta_{\rm H}$  6,18 (*d*, 1,8 Hz) et 6,39 (*d*, 1,8 Hz) respectivement. Le cycle B du flavonol est représenté par trois signaux qui résonnent sous forme d'un singulet large, un doublet large et un doublet à  $\delta_{\rm H}$  7,74 (1H, *sl*, H-2'), 7,63 (1H, *dl*, 7,8 Hz, H-6') et 6,88 (1H, *d*, 7,8 Hz, H-5'), cela montre que le cycle B est *ortho*-disubstitué.



Figure III.35. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Ac6 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

L'absence d'autres signaux sur le spectre RMN <sup>1</sup>H indique que les positions C-3, C-5, C-7, C-3' et C-4' sont porteuses des groupements hydroxyles libres.

Le spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé (Figure III.36) révèle les déplacements chimiques de tous les carbones de ce composé (Tableau III.6).



Figure III.36. Spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé du composé Ac6 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

A l'issue de cette analyse spectroscopique et la comparaison avec les données de la littérature (Liu et al., 2010), on identifie le métabolite secondaire isolé **Ac6** comme la quercétine.

Elle est connue pour son activité antioxydante et est utilisée étant même comme un standard de comparaison pour cette activité, vu son pouvoir à piéger les radicaux libres. Elle est aussi utilisée comme additif alimantaire antioxydant dans les jus. Cette molécule présente aussi une bonne activité antifongique (Lu et al., 2002). Plusieurs études signalent la présence de la quercétine dans une variété de plantes médicinales. On cite quelques plantes comme *Atractylis flava* (Chabani et al., 2013, Melek et al., 1992), les Euphorbiaceae *Euphorbia guyoniana* (Boudiar et al., 2010), *E. lunulata* (Nishimura et al., 2005), *E. wallichii* (Taskeen et al., 2009) et *Ziziphora clinopodioides* (Lamiaceae) (Zhang et al., 2018).

Ac6						
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	
2	-	148,0	1'	-	124,1	
3	-	137,3	2'	7,74, 1H, <i>sl</i>	116,0	
4	-	177,3	3'	-	146,2	
5	-	162,5	4′	-	148,8	
6	6,18, 1H, <i>d</i> , 1,8 Hz	99,2	5'	6,88, 1H, <i>d</i> , 7,8 Hz	116,2	
7	-	165,6	6′	7,63, 1H, <i>dl</i> , 7,8 Hz	121,6	
8	6,39, 1H, <i>d</i> , 1,8 Hz	94,4				
9	-	158,2				
10	-	104,5				

Tableau III.6. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Ac6 dans CD<sub>3</sub>OD

# III.1.7. Elucidation structurale du composé Ac7

Le métabolite secondaire **Ac7** (Figure III.37) est purifié sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il est visible sous la lumière UV à 254 et 366 nm, sa tache apparait sur CCM sous forme d'une tache jaune lors de la révélation avec l'acide sulfurique et le chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III.38) en mode positif du produit Ac7 montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 487 \text{ [M+Na]}^+$ , soit une masse moléculaire de 464 Da et une formule brute de C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>.



Figure III.37. Structure du composé Ac7



Figure III.38. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Ac7

L'analyse du spectre RMN <sup>1</sup>H permet de localiser les signaux de la partie aglycone du flavonoide entre 6 et 8 ppm, ainsi que les résonances des protons de la partie osidique allant de 3 à 5,5 ppm. Ceci suggère que ce composé est un flavonoide glycosylé.

Les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C *J*-modulé réalisés dans CD<sub>3</sub>OD (Figures III.39 et III.40) montrent une grande similarité au niveau de la partie génine avec ceux du composé **Ac6** (Figures III.35 et III.36) déjà identifié, permettant ainsi de caractériser la génine à la quércétine.

En outre, le spectre RMN <sup>1</sup>H révèle un signal d'un proton anomérique sous forme de doublet à  $\delta_{\rm H}$  5,37 (1H, *d*, 7,6 Hz, H-1"). D'autres signaux détéctés dans la zone entre  $\delta_{\rm H}$  3,20 à 3,80 des protons osidique seront attribués à l'aide de l'expérience COSY.



Figure III.39. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Ac7 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Figure III.40. Spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé du composé Ac7 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

Le spectre COSY (Figure III.41) montre la corrélation entre le proton anomérique H-1" et le proton à  $\delta_{\rm H}$  3,50 (1H, *dd*, 9,0, 7,8 Hz) qui correspond au proton H-2". Ce dernier couple avec un proton à  $\delta_{\rm H}$  3,44 (1H, *t*, 9,0 Hz) assigné au proton H-3". Le triplet à  $\delta_{\rm H}$  3,37 (1H, *t*, 9,8 Hz) du proton H-4" montre des taches de corrélations avec le proton H-3" et le proton H-5" résonant à  $\delta_{\rm H}$  3,19 (1H, *ddd*, 9,4, 5,4, 2,1 Hz). Ce dernier couple avec les deux protons geminés H-6"a et H-6"b à  $\delta_{\rm H}$  3,73 (1H, *dd*, 11,9, 2,2 Hz) et 3,60 (1H, *dd*, 11,7, 5,5 Hz) respectivement.



Figure III.41. Spectre COSY (étalement de la partie osidique) du composé Ac7

La présence de six protons osidiques avec les grandes constantes de couplages fournis entre les protons (H-1"/H-2", H-2"/H-3", H-3"/H-4" et H-4"/H-5") nous conduit à identifier un glucose de configuration  $\beta$  (Figure III.42).



Figure III.42. Couplage COSY du sucre

Les déplacements chimiques des carbones de ce sucre sont déterminés à  $\delta_C$  102,9 (C-1"), 74,3 (C-2"), 76,7 (C-3"), 69,8 (C-4"), 77,0 (C-5") et 61,1 (C-6") par analyse du spectre HSQC (Figure III.43).



Figure III.43. Spectre HSQC du composé Ac7

Le spectre HMBC (Figure III.44) révèle un couplage en  ${}^{3}J$  entre le proton anomère H-1" et le carbone C-3 de l'aglycone, cela indique que le glucose est attaché au carbone C-3 par une liaison oxygénée (Figure III.45), vu le déplacement chimique du carbone C-1" à 102,9 ppm.



Figure III.44. Spectre HMBC du composé Ac7



Figure III.45. Corrélation HMBC entre H-1"et C-3

A l'issue de cette analyse et étant la comparaison avec les données de la littérature, le composé **Ac7** (Figure III.37) est élucidé comme quercétine-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (Chang et al., 2009).

Ce composé a une bonne activité antioxydante et il a été isolé antérieurement des espèces *Euphorbia guyoniana* (Boudiar et al., 2010) et *Ziziphora clinopodioides* (Lamiaceae) (Zhang et al., 2018). Par contre notre étude signale pour la première fois l'existence de ce composé dans le genre *Atractylis*.

Ac7							
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\rm C}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\mathrm{C}}$		
2	-	158,0	1″	5,37, 1H, <i>d</i> , 7,6 Hz	102,9		
3	-	134,8	2″	3,50, 1H, <i>dd</i> , 9,0, 7,8 Hz	74,3		
4	-	178,1	3″	3,44, 1H, <i>t</i> , 9,0 Hz	76,7		
5	-	161,7	4″	3,37, 1H, <i>t</i> , 9,8 Hz	69,8		
6	6,23, 1H, <i>d</i> , 1,9 Hz	98,5	5″	3,19, 1H, <i>ddd</i> , 9,4, 5,4, 2,1 Hz	77,0		
7	-	164,6	6″а	3,73, 1H, <i>dd</i> , 11,9, 2,2 Hz	61,1		
8	6,43, 1H, <i>d</i> , 1,9 Hz	93,3	6″b	3,60, 1H, <i>dd</i> , 11,7, 5,5 Hz			
9	-	157,1					
10	-	102,9					
1'	-	121,7					
2'	7,73, 1H, <i>d</i> , 2,0 Hz	116,1					
3'	-	140,1					
4′	-	144,6					
5'	6,89, 1H, <i>d</i> , 8,5 Hz	114,6					
6'	7,61, 1H, <i>dd</i> , 8,5, 2,0 Hz	121,8					

Tableau III.7. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Ac7 dans CD<sub>3</sub>OD

## III.1.8. Elucidation structurale du composé Ac8

Le produit **Ac8** (Figure III.46) est isolé sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il montre une tache visible sous UV à 254 366 nm, qui se colore en jaune après la révélation avec une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Ce composé indique sur son spectre de masse ESI-MS (Figure III.47) un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z = 471 \text{ [M+Na]}^+$ , soit une masse moléculaire de 448 Da et une formule brute de  $C_{21}H_{20}O_{11}$ . Présumant que le produit **Ac8** est du même type que **Ac7** (basant sur leurs polarités et la couleur des taches sur CCM), on remarque une différence de -16 Da sur la masse du produit **Ac8** par rapport au composé précédent **Ac7** correspondant à la perte d'un atome d'oxygène.









En comparant les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C *J*-modulé effectués dans CD<sub>3</sub>OD (Figures III.48 et III.49) avec ceux du produit précédent **Ac7** (Figures III.39 et III.40), et en suivant la même méthode d'interprétation, on remarque que les deux structures sont proches (partie aglycone et sucre), avec une légère différence représentée particuliérement sur le spectre RMN <sup>1</sup>H par l'absence du signal de proton résonant à 6,23 ppm (H-6). En plus de l'apparition d'un autre signal plus déblindé que le H-8 ( $\delta_{\rm H}$  6,47, *s*), repéré à  $\delta_{\rm H}$  6,53 sous forme d'un singulet attribuable au proton H-3.



Figure III.49. Spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé du composé Ac8 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

Ceci est confirmé par le spectre HSQC qui montre les corrélations H-8/C-8 ( $\delta_C$  93,8) et H-3/C-3 ( $\delta_C$  102,5) (Figure III.50).

L'analyse des spectres HSQC et COSY (Figures III.50 et III.51) conduit à l'identification des protons du cycle B, ainsi que leurs carbones comme suit : les protons H-2' (7,3, *d*, 2,2 Hz), H-5' (6,9, *d*, 8,9 Hz) et H-6' (7,36, *dd*, 8,9, 2,2 Hz) sont portés par les carbones à  $\delta_{\rm C}$  112,7 (C-2'), 115,4 (C-5') et 118,9 (C-6').



Figure III.50. Spectre HSQC du composé Ac8





La determination des déplacements chimiques des carbones quaternaires de la génine repose sur l'examen du spectre HMBC (Figure III.52). En effet, il montre les couplages à longue distance entre :

-Le proton H-5' et les carbones C-4' (149,6), C-3' (145,6) et C-1' (122,1).

-Le proton H-6' avec le carbone C-2 (164,8).

-Le proton H-3 et les carbones C-4 (182,7), C-2 (164,8), C-5 (160,6) et C-10 (102,5).

-Le proton H-8 avec le carbone C-7 (163,4), C-9 (157,3) et C-10 (102,5).

En plus le proton H-8 présente une tache de corrélation HMBC avec un carbone quaternaire résonant à 107,7 ppm ne pouvant être que le carbone C-6 (Figure III.53).



Figure III.52. Spectre HMBC du composé Ac8



Figure III.53. Corrélations HMBC au niveau de la génine

La partie osidique est élaborée en analysant le spectre COSY qui révèle les corrélations n système de spins entre :

-H-1" (4,92, *d*, 9,9 Hz)/H-2" (4,19, *t*, 9,4 Hz)

-H-2"/H-3" (3,49, *t*, 8,6 Hz)

-H-3"/H-4" (3,50, *t*, 8,6 Hz)

-H-4"/H-5" (3,43, m)

-H-5"/H-6"b (3,77, *dd*, 12,1, 5,4 Hz)

-H-6"b/H-6"a (3,91, *dd*, 12,1, 2,2 Hz)

A l'aide de l'expèrience HSQC, les déplacements chimiques des carbones de cet hexose sont déterminés à  $\delta_C$  73,9 (C-1"), 71,2 (C-2"), 78,7 (C-3"), 70,4 (C-4"), 81,2 (C-5") et 61,5 (C-6"). A l'issue de cette analyse et par comparaison avec les données de la littérature (Chang et al., 2009), l'unité osidique (hexose) a été identifiée à  $\beta$ -D-glucopyranose.

Le spectre HMBC (Figure III.52) montre des taches de corrélation entre le proton anomérique H-1" et les carbones à  $\delta_C$  107,7, 160,6 et 163,4 correspondant aux carbones C-6, C-5 et C-7 respectivement.

D'aprés les données colléctées de l'analyse des différents spectres RMN on déduit que le  $\beta$ -Dglucose est attaché sur le carbone C-6 de la génine par une liaison carbone-carbone (Figure III.54) vu le déplacement chimique relativement blindé des carbones C-6 et C-1" par rapport aux flavonoides *O*glycosylés.



Figure III.54. Corrélations HMBC montrant le point de branchement du sucre à la génine

Il s'agit donc d'un flavonoide *C*-glucosylé nommé isoorientine (Chang et al., 2009). Ce composé est connu comme un bon antioxydant et est présent dans plusieurs espèce comme *Atractylis gumifera* (Chaboud et al., 1988), *Oenocarpus bacaba* et *Oenocarpus bataua* (Arecaceae) (Leba et al., 2016).

Ac8						
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\mathrm{C}}$	
2	-	164.8	1″	4,92, 1H, <i>d</i> , 9,9 Hz	73,9	
3	6,53, 1H, <i>s</i>	102,5	2″	4,19, 1H, <i>t</i> , 9,4 Hz	71,2	
4	-	182,7	3″	3,49, 1H, <i>t</i> , 8,6 Hz	78,7	
5	-	160,6	4″	3,50, 1H, <i>t</i> , 8,6 Hz	70,4	
6	-	107,7	5″	3,43, 1H, <i>m</i>	81,2	
7	-	163,4	6″a	3,91, 1H, <i>dd</i> , 12,1, 2,2 Hz	61,5	
8	6,47, 1H, <i>s</i>	93,8	6″b	3,77, 1H, <i>dd</i> , 12,1, 5,4 Hz		
9	-	157,3				
10	-	102,5				
1′	-	122,1				
2'	7,30, 1H, <i>d</i> , 2,2 Hz	112,7				
3'	-	145,6				
4′	-	149,6				
5'	6,90, 1H, <i>d</i> , 8,9 Hz	115,4				
6′	7,36, 1H, <i>dd</i> , 8,9, 2,2 Hz	118,9				

Tableau III.8. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Ac8 dans CD<sub>3</sub>OD

### III.1.9. Elucidation structurale du composé Ac9

Le métabolite secondaire **Ac9** (Figure III.55) est obtenu sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il présente une fluorecence sous la lumière UV à 254 et 366 nm. La révélation de sa CCM avec l'acide sulfurique et le chauffage montre une tache jaune foncé.

Le spectre de masse ESI-MS en mode positif (Figure III.56) du produit **Ac9** montre la présence d'un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 631 [M+Na]^+$ , qui correspond à une masse moléculaire de 608 Da et une formule brute en C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub>, soit 13 insaturations.









Figure III.56. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Ac9

Le spectre RMN <sup>1</sup>H enregistré dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.57) dévoile la présence d'un squelette flavone indiqué par les trois signaux résonant à  $\delta_{\rm H}$  6,83 (1H, *s*, H-3), 6,77 (1H, *d*, 1,9 Hz, H-8) et 6,47 (1H, *d*, 1,9 Hz, H-6), un cycle aromatique (cycle B) tri-substitué en position *ortho* et *para* indiqué par

les signaux à  $\delta_H$  7,45 (1H, *d*, 2,2 Hz, H-2'), 7,14 (1H, *d*, 8,7 Hz, H-5') et 7,58 (1H, *dd*, 8,6, 2,2 Hz, H-6'). Le spectre montre aussi, un groupement méthoxyle à  $\delta_H$  3,88 (3H, *s*, H-7'), et deux sucres d'une nature différente caractérisés par les deux protons anomériques à  $\delta_H$  5,08 (1H, *d*, 7,3 Hz, H-1') et 4,55 (1H, *sl*, H-1'').



Figure III.57. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Ac9 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

L'analyse des spectres RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé (Figure III.58), COSY (Figure III.59), HSQC (Figure III.60) et HMBC (Figure III.61) nous permet d'identifier la partie aglycone de ce composé comme un dérivé de la luteoline (Benayache et al., 2014), nommé 4'-méthoxy luteoline (Figure III.62).



Figure III.58. Spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé du composé Ac9 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)



Figure III.59. Spectre COSY du composé Ac9



Figure III.60. Spectre HSQC du composé Ac9



Figure III.61. Spectre HMBC du composé Ac9



Figure III.62. Structure de la partie génine du composé Ac9

Le spectre COSY (Figures III.59 et III.63) permet l'identification de la partie osidique. Le proton H-1" couple avec un proton à  $\delta_{\rm H}$  3,28 (1H, *m*) qui correspond au proton H-2", lequel corrèle à son tour avec le proton H-3" à  $\delta_{\rm H}$  3,34 (1H, *m*). Ce dernier montre une tache de corrélation avec le signal à  $\delta_{\rm H}$  3,17 (1H, *m*) assigné au proton H-4". Tandis que le proton H-5" qui résonne à  $\delta_{\rm H}$  3,61 (1H, *m*) couple avec H-4", H-6"a et H-6"b, distingués par les deux signaux à  $\delta_{\rm H}$  3,88 (1H, *dl*, 11,6 Hz) et 3,47 (1H, *m*) respectivement.

Cela nous conduit à déterminer la nature du premier sucre qui se présente comme un hexose (glucose ou galactose) de configuration  $\beta$  vu la grande constante de couplage entre les prontons H-1"/H-2" ( $J_{\text{H-1"/H-2"}} = 7,3$  Hz). Le déplacement chimique du proton H-4" à  $\delta_{\text{H}}$  3,61 suggère un glucose parce que dans le cas d'un galactose ce proton sera relativement déblindé vers  $\delta_{\text{H}} \approx 4$  ppm.

Les déplacements chimiques des carbones correspondant sont déterminés par l'examen du spectre HSQC (Figures III.60 et III.64) à  $\delta_{C}$  100,4 (C-1"), 73,6 (C-2"), 76,7 (C-3"), 70,0 (C-4"), 76,1 (C-5") et 66,5 (C-6"). Ces valeurs suggèrent que cet hexose est un glucopyranoside (Bokesch et al., 2008).

Le deuxième proton anomérique H-1"' corrèle sur le spectre COSY avec le proton H-2"' à  $\delta_{\rm H}$  3,67 (1H, *sl*), en suivant la chaine des corrélations on trouve que ce dernier proton couple avec H-3"' à  $\delta_{\rm H}$  3,47 (1H, *m*), qui montre à son tour une tache de corrélation avec H-4"' à  $\delta_{\rm H}$  3,15 (1H, *m*). Le proton à  $\delta_{\rm H}$  3,41 (1H, *m*) correspondant au proton H-5"' indique des taches de corrélations entre le proton H-4"' ainsi qu'avec le doublet du méthyle à  $\delta_{\rm H}$  1,08 (3H, *d*, 6,2 Hz) assigné aux protons H<sub>3</sub>-6"'. Ceci conduit à identifier un déoxyhexose dont les atomes de carbones sont assignés à  $\delta_{\rm C}$  101,1 (C-1"'), 70,8 (C-2"'), 71,2 (C-3"'), 72,5 (C-4"'), 68,8 (C-5"') et 18,3 (C-6"') selon le spectre HSQC. Ces attributions correspondant à un rhamnopyranoside (Szeleszczuk et al., 2017).



Figure III.63. Spectre COSY (étalement) du composé Ac9



Figure III.64. Spectre HSQC (étalement) du composé Ac9

Le déblindage du C-6" du glucose à 68,8 ppm ainsi que sa corrélation observé sur le spectre HMBC (Figure III.61) avec le proton anomère H-1" du rhamnose permet d'élaborer la liaison interosidique (C-1"'-O-C-6") et identifier la séquence suivante (Figure III.65) :



Figure III.65. Corrélation HMBC indiquant la liaison interglycosidique (rutinose)

Le point d'encrage de l'unité osidique à l'aglycone est établi en analysant le spectre HMBC qui montre un couplage en  ${}^{3}J$  entre le proton anomère H-1" du glucose avec le carbone C-7 du cycle A de la génine (Figure III.66).



Figure III.66. Corrélation HMBC montrant le point de branchement de l'unité osidique à la génine

Les données spectroscopiques et la comparaison avec la littérature (Szeleszczuk et al., 2017) nous conduisent à assigner pour ce composé **Ac9** la structure 3',5,7-trihydroxy-4'-méthoxyflavone-7-rutinoside nommée diosmine. Ce produit est isolé pour la première fois genre *Atractylis*. Il a été purifié aussi des espèces *Ziziphora clinopodioides* (Zhang et al., 2018) et *Hyssopus officinalis* (Ivashev et al., 1995) de la famille Lamiaceae. Le diosmine présente plusieurs activités biologiques comme anti-inflammatoire, anticoagulant, antioxydante et anti-apoptotique (Shalkami et al., 2018).

Ac9							
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$		
2	-	164,7	1″	5,08, 1H, <i>d</i> , 7,3 Hz	100,4		
3	6,83, 1H, <i>s</i>	104,3	2″	3,28, 1H, <i>m</i>	73,6		
4	-	182,4	3″	3,34, 1H, <i>m</i>	76,7		
5	-	161,7	4″	3,17, 1H, <i>m</i>	70,0		
6	6,47, 1H, <i>d</i> , 1,9 Hz	100,1	5″	3,61, 1H, <i>m</i>	76,1		
7	-	163,4	6″a	3,88, 1H, <i>dl</i> , 11,6 Hz	66,5		
8	6,77, 1H, <i>d</i> , 1,9 Hz	95,3	6″b	3,47, 1H, <i>m</i>			
9	-	157,4	1‴	4,55, 1H, <i>sl</i>	101,1		
10	-	105,9	2‴′	3,67, 1H, <i>sl</i>	70,8		
1′	-	123,4	3‴	3,47, 1H, <i>m</i>	71,2		
2'	7,45, 1H, <i>d</i> , 2,2 Hz	113,6	4‴′	3,15, 1H, <i>m</i>	72,5		
3'	-	151,8	5‴′	3,41, 1H, <i>m</i>	68,8		
4′	-	148,2	6‴′	1,08, 3H, <i>d</i> , 6,2 Hz	18,3		
5'	7,14, 1H, <i>d</i> , 8,7 Hz	112,7					
6′	7,58, 1H, <i>dd</i> , 8,6, 2,2 Hz	119,4					
7′	3,88, 3H, <i>s</i>	56,3					

Tableau III.9. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Ac9 dans CD<sub>3</sub>OD

#### III.1.10. Elucidation structurale du composé Ac10

Le composé **Ac10** (Figure III.67) a été isolé sous forme d'une poudre amorphe jaune soluble dams le méthanol. Sa CCM montre une tache visible sous lumière UV à 254 et 366 nm, se révélant en coloration jaune par l'acide sulfurique et chauffage.

Un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 335 \text{ [M+Na]}^+$  est visualisé sur le spectre de masse ESI-MS en mode positif (Figure III.68) du métabolite secondaire isolé **Ac10**, soit une masse moléculaire de 312 Da et une formule brute en C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>, correspont à 7 insaturations.



Acide 4-O-cafféoyl-2-methyl-threonique





Figure III.68. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Ac10

Le spectre RMN <sup>1</sup>H effectué dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.69) révèle la présence de trois signaux dans la zone des aromatiques caractéristiques d'un noyau aromatique tri-substitué en *ortho* et *para*, à  $\delta_{\rm H}$  7,07 (1H, *d*, 1,9 Hz), 6,97 (1H, *dd*, 8,2, 1,9 Hz), 6,80 (1H, *d*, 8,2 Hz) attribuables aux protons désignés (H-10, H-14 et H-13) respectivement. Ce spectre montre aussi deux doublets avec une constante de couplage de 15,9 Hz caractéristique d'une *trans* double liaison à  $\delta_{\rm H}$  7,58 (1H, *d*, 15,9 Hz, H-8) et 6,28 (1H, *d*, 15,9 Hz, H-7). Ces deux protons corrèlent en expérience HMBC (Figure III.70) avec un carbone d'une fonction ester nommé C-6 à  $\delta_{\rm C}$  167,7. Il est à noter l'absence des signaux de groupements méthoxyles. A ce stade, les données analysées sont caractéristiques du fragment caffèate (Figure III.71).



Figure III.69. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Ac10 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)







Figure.III.71. Corrélation HMBC des protons H-7 et H-8 du groupement caffèate

Le spectre RMN <sup>1</sup>H indique la présence de deux signaux de protons liés à des carbones oxygénés qui forment un seul système de spins d'après le spectre COSY (Figure III.72), un doublet d'intégration 2H à 4,27 ppm (2H, d, 5,8 Hz) correspond aux protons H<sub>2</sub>-4, et un triplet d'intégration 1H résonant à 4,06 ppm (1H, t, 5,8 Hz) accordé au proton H-3. Le dernier signal apparait à 1,48 ppm (3 H, s) assigné aux protons méthyliques H<sub>3</sub>- 2'.



Figure III.72. Spectre COSY du composé Ac10

Les spectres RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé et HSQC (Figures III.73 et III.74) permettent d'assigner les protons analysés à leurs carbones. En plus, on remarque la présence d'un deuxième carbonyle représenté par le carbone à  $\delta_{\rm C}$  176,7 attribué au carbone nommé C-1.



Figure III.73. Spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé du composé Ac10 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)



Figure III.74. Spectre HSQC du composé Ac10

En outre, le spectre HMBC (Figures III.70 et III.75) montre un couplage en  ${}^{3}J$  entre les protons H<sub>2</sub>-4 et le carbone de la fonction ester C-6, cela indique que le carbone oxyméthylène C-4 est lié directement à la fonction ester. Les même protons H<sub>2</sub>-4 ainsi que les protons H-3 et H<sub>3</sub>-2' corrèlent avec un carbone quaternaire à  $\delta_{\rm C}$  75,4 attribué au carbone C-2. D'autres couplages en  ${}^{3}J$  entre les protons H-3 et H<sub>3</sub>-2' et le carbone à  $\delta_{\rm C}$  176,7 (C-1).



Figure III.75. Corrélations HMBC de la partie aliphatique du composé Ac10

A l'issue de cette analyse, tous les protons et carbones de ce composé ont été attribués et correspondent au  $C_{14}H_{15}O_8$ , soit une masse de 311 Da, moins d'une unité par rapport à la masse moléculaire (M = 312 Da) établie par le spectre de masse (Figure III.68). Il en résute que le carbone C-1 fait partie de la fonction acide (Figure III.76).


Figure III.76. Structure final établie du composé Ac10

Les données spectrales obtenues et la mésure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20} = +14,9^\circ$  (*c* 0,15, MeOH) permettent d'attribuer au composé **Ac10** la structure suivante acide 4-*O*-cafféoyl-2-methyl-threonique (Uriburua et al., 2008). Ce composé a été isolé pour la premère fois du genre *Atractylis* et trouvé seulement dans quatre espèces du règne végétale *Viguiera pazensis* (Uriburua et al., 2008), *Pericarpium zanthoxyli* (Hong et al., 2018), *Bidens parviflora* (Jue et al., 2006) et *Tithonia diversifolia* (Cana-Capatinta et al., 2017) de la famille Asteraceae.

Tableau III.10. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Ac10 dans CD<sub>3</sub>OD

Ac10								
δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\rm C}$	Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{C}$				
-	176,7	9	-	126,4				
-	75,4	10	7,07, 1H, <i>d</i> , 1,9 Hz	113,8				
1,48, 3H, s	21,7	11	-	145,4				
1,06, 1H, <i>m</i>	73,0	12	-	148,2				
4,27, 2H, <i>m</i>	64,5	13	6,80, 1H, <i>d</i> , 8,2 Hz	115,1				
-	-	14	6,97, 1H, <i>dd</i> , 8,2, 1,9 Hz	121,6				
-	167,7							
6,28, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	145,8							
7,58, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	126,6							
	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i> - - 1,48, 3H, <i>s</i> 1,06, 1H, <i>m</i> 4,27, 2H, <i>m</i> - - 6,28, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz 7,58, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	$\delta_{\rm H}, m, J$ $\delta_{\rm C}$ -176,7-75,41,48, 3H, s21,71,06, 1H, m73,04,27, 2H, m64,5167,76,28, 1H, d, 15,9 Hz145,87,58, 1H, d, 15,9 Hz126,6	Ac10 $\delta_{\rm H}, m, J$ $\delta_{\rm C}$ Position-176,79-75,4101,48, 3H, s21,7111,06, 1H, m73,0124,27, 2H, m64,51314-167,76,28, 1H, d, 15,9 Hz145,87,58, 1H, d, 15,9 Hz126,6	Ac10 $\delta_{\rm H}, m, J$ $\delta_{\rm C}$ Position $\delta_{\rm H}, m, J$ -176,7975,4107,07, 1H, d, 1,9 Hz1,48, 3H, s21,711-1,06, 1H, m73,012-4,27, 2H, m64,5136,80, 1H, d, 8,2 Hz146,97, 1H, dd, 8,2, 1,9 Hz-167,7145,8145,87,58, 1H, d, 15,9 Hz126,6II				

# III.1.11. Elucidation structurale du composé Ac11

Le produit **Ac11** (Figure III.77) est obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Il donne une tache visible sous UV à 254 et 366 nm sur sa CCM. Cette tache se révèle avec une couleur violée lors de la révélation avec l'acide sulfurique et le chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III.78) en mode positif du produit **Ac11** indique des pics d'ions pseudo-moléculaires à  $m/z = 391 \text{ [M+Na]}^+$  et 759  $[2\text{M+Na}]^+$ , soit une masse moléculaire de 368 Da et une formule brute en C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub> correspondant à 8 insaturations.



Chlorogénate de méthyle





Figure III.78. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Ac11

L'analyse combinée des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C *J*-modulé réalisés dans CD<sub>3</sub>OD (Figures III.79 et III.80) permet d'identifier le premier fragment de la molécule recherchée, ce fragment est assigné au groupement caffèate. En effet, le spectre RMN <sup>13</sup>C montre un carbone d'ester à  $\delta_C$  167,4 assigné au carbone C-9' du même fragment, comme dans le cas du composé **Ac10**. En plus, d'un carbone à  $\delta_C$  174,1 correspondant à un carbone d'un deuxième carbonyle.





Figure III.80. Spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé du composé Ac11 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

Un signal résonne à  $\delta_H$  5,36 (1H, *td*, 9,0, 4,3 Hz) assigné au proton nommé H-5, ce proton montre des taches de corrélation sur le spectre COSY (Figure III.82) avec deux protons à  $\delta_H$  2,26

(1H, *dd*, 13,6, 3,7 Hz) et 2,10 (1H, *m*) correspondant aux deux protons geminés H-6a et H-6b respectivement, ainsi qu'avec le proton à  $\delta_{\rm H}$  3,76 (1H, *dd*, 8,8, 2,7 Hz) attribué au proton H-4. Ce dernier (H-4) couple avec le proton H-3 qui résonne à  $\delta_{\rm H}$  4,20 (1H, *m*), tandis que le proton H-3 corrèle avec les deux protons geminés H-2a et H-2b repérés à  $\delta_{\rm H}$  2,20 (1H, *dd*, 13,4, 2,3 Hz) et 2,08 (1H, *dd*, 13,2, 5,8 Hz) respectivement. Ceci conduit à constituer l'enchainement suivant :



Figure III.81. Couplages COSY des protons aliphatiques

Un dernier signal d'un méthoxyle (–O-CH<sub>3</sub>-8) résonne à  $\delta_{\rm H}$  3,72 (3H, s).



Figure III.82. Spectre COSY du composé Ac11

Les carbones des protons déja assignés sont attribués à l'aide du spectre HSQC (Figure III.83).



Figure III.83. Spectre HSQC du composé Ac11

Le spectre HMBC (Figure III.84) révèle les corrélations en  ${}^{2}J$  et  ${}^{3}J$  entres les protons H-2a et H-6a avec les carbones résonant à  $\delta_{\rm C}$  74,8 et 174,1 correspondant aux carbones C-1 et C-7. Ce dernier couple également en HMBC avec les protons méthoxyle CH<sub>3</sub>-8. Ceci nous permet de fermer l'enchaînement obtenu suite à l'analyse COSY et former un cycle à six chaînons (Figure III.85).



Figure III.84. Spectre HMBC du composé Ac11

L'analyse HSQC (Figure III.83) permet de déterminer les déplacements chimiques des carbones C-2 ( $\delta_C$  36,8), C-3 ( $\delta_C$  70,0), C-4 ( $\delta_C$  72,2), C-5 ( $\delta_C$  70,5), C-6 ( $\delta_C$  37,5) et C-8 ( $\delta_C$  51,7). Ces constatations conduisent à identifier un dérivé d'ester méthylique de l'acide quinique (Figure III.85).



Figure III.85. Couplages HMBC permettant la formation du cycle à six chaînons

La tache de corrélation visualisée sur le spectre HMBC entre le proton H-5 du dérivé de l'acide quinique et le carbonyle C-9' du groupement caffèate établit la connection entre ces deux fragments (Figure III.86).



Figure III.86. Couplage HMBC permettant la connection entre les fragments identifiés

A l'issue de cette analyse et la mésure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20} = -40,7^\circ$  (*c* 0,12, MeOH), ainsi que la comparaison avec les données de la littérature (Chang et al., 2009), le composé **Ac11** est identifié au chlorogénate de méthyle. Ce produit est isolé pour la première fois du genre *Atractylis*. Le chlorogénate de méthyl est un composé antioxydant puissant rencontré de plusieurs plantes telles que *Prunus cerasus* (Rosaceae) (Wang et al., 1999) et *Wolf berry* (Solanaceae) (Zhou et al., 2017).

Ac11									
Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{\mathrm{C}}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\rm C}$				
1	-	74,8	1'	-	126,4				
2a	2,20, 1H, <i>dd</i> , 13,4, 2,3 Hz	36,8	2'	7,17, 1H, <i>d</i> , 1,7 Hz	113,8				
2b	2,08, 1H, <i>dd</i> , 13,2, 5,8 Hz		3'	-	145,4				
3	4,20, 1H, <i>m</i>	70,0	4'	-	148,2				
4	3,76, 1H, <i>dd</i> , 8,8, 2,7 Hz	72,2	5'	6,81, 1H, <i>d</i> , 8,2 Hz	115,1				
5	5,36, 1H, <i>td</i> , 9,0, 4,3 Hz	70,5	6′	6,97, 1H, <i>dd</i> , 8,2, 1,7 Hz	121,6				
ба	2,26, 1H, <i>dd</i> , 13,6, 3,7 Hz	37,5	7'	7,58, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	145,7				
6b	2,10, 1H, <i>m</i>		8′	6,29, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	113,8				
7	-	174,1	9'	-	167,0				
8	3,72, 3H, <i>s</i>	51,7							

Tableau III.11. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Ac11 dans CD<sub>3</sub>OD

## III.1.12. Elucidation structurale du composé Ac12

Le métabolite secondaire **Ac12** (Figure III.87) est purifié sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il est visible sous la lumière UV à 254 et 366 nm, et se colore en violet après révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 335 \text{ [M-H]}^-$  est indiqué sur le spectre de masse ESI-MS en mode négatif (Figure III.88) du produit **Ac12**. Il correspond à une masse moléculaire de 336 Da et une formule brute en C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>, suggèrant 9 insaturations.



Acide 5-O-cafféoylshikimique

Figure III.87. Structure du composé Ac12



Figure III.88. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Ac12

Les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C *J*-modulé effectués dans DMSO-*d*<sub>6</sub> (Figures III.89 et III.90) présentent présque les mêmes signaux que le produit précédent **Ac11**. La différence remarquée est l'absence des protons des groupements méthoxyle (CH<sub>3</sub>-8) et méthylène (CH<sub>2</sub>-2) observés dans le cas du composé **Ac11**. Il est à noter l'apparition sur le spectre RMN <sup>1</sup>H d'un signal déblindé d'intégration 1H résonant à 6,67 ppm sous forme de singulet large. Son carbone est repéré à  $\delta_{\rm C}$  138,7 selon l'expèrience HSQC (Figure III.). Il s'agit d'un CH éthylinique.



Figure III.89. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Ac12 (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz)



Figure III.90. Spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé du composé Ac12 (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 125 MHz)

L'analyse des spectres COSY et HSQC (Figures III.91 et III.92) permet tout d'abort de caractériser un goupement cafféate à travers les couplages proton-proton : H-7'/H-8' (J = 15,9 Hz) indiquant la présence d'une *trans* double liaison, H-2'/H-6'/H-5' (J = 8,1 et 1,6 Hz) traduisant des couplages *ortho* et *meta* d'un noyau aromatique tri-substitué.



Figure III.91. Spectre COSY du composé Ac12

Les déplacements chimiques des carbones correspondant sont assignés à  $\delta_C$  114,5 (C-8'), 145,8 (C-7'), 121,8 (C-6'), 116,2 (C-5') et 115,4 (C-2') par l'expèrience HSQC. Les autres carbones quaternaires de ce groupement sont déterminés par HMBC.

Le spectre COSY montre aussi un autre système de spins entre les protons désignés :

-Le proton H-5 ( $\delta_{\rm H}$  5,09, 1H, *m*) corrèle avec les protons H-4 ( $\delta_{\rm H}$  3,75, 1H, *dd*, 6,3, 3,5 Hz), H-6a ( $\delta_{\rm H}$  2,65, 1H, *dd*, 18,1, 3,5 Hz) et H-6b ( $\delta_{\rm H}$  2,18, 1H, *dd*, 18,3, 4,7 Hz).

-Le proton H-4/H-3 (δ<sub>H</sub> 4,26, 1H, *m*).

## -Le proton H-3/H-2 (δ<sub>H</sub> 6,67, 1H, *sl*).



Figure III.92. Spectre HSQC du composé Ac12



Figure III.93. Corrélations COSY du 2<sup>éme</sup> système de spins

Les protons déjà attribués corrèlent sur le spectre HSQC (Figure III.92) avec leurs carbones à  $\delta_C$  138,7 (C-2), 65,9 (C-3), 68,2 (C-4), 70,3 (C-5) et 28,2 (C-6).

Le spectre HMBC (Figure III.94) présente une tache de corrélation en  ${}^{3}J$  entre le proton oxyméthine H-5 et un carbone éthylénique quaternaire résonant à  $\delta_{\rm C}$  128,7 assigné au carbone C-1. Ceci conduit à formé un cycle insaturé à six chaînons. Ce même proton (H-5) couple en HMBC en  ${}^{3}J$  avec le carbonyle ester (C-9') du groupement caffèate.



Figure III.94. Spectre HMBC du composé Ac12



Figure III.95. Couplages HMBC permettant la formation du cycle insaturé à 6 chaînons et la connection entre les deux fragments

Les données de la spectrométrie de masse (M = 336 Da) et le déplacement chimique du proton H-2 (6,67 ppm) et les carbones de la double liaison éthylénique C-1 (128,7 ppm) et C-2 (138,9 ppm)

impliquent que la double liaison fait partie d'un système énone (carbonyle  $\alpha,\beta$ -insaturé). Ceci conduit à proposer la structure suivante constituée de deux groupements caffèate et acide shiquimique.



Figure III.96. Acide 5-O-cafféoylshiquimique

Les données spectroscopiques obtenues, la mésure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20} = -31,2^\circ$ (*c* 0,09, MeOH) et la comparaison avec la littérature permettent de déterminer la structure de ce composé à l'acide 5-*O*-cafféoylshiquimique (Khaligh et al., 2016). On mentionne l'isolement de ce composé pour la premier fois du genre *Atractylis*, il a été trouvé entérieurement de quieques espèces à savoir *Euterpe oleracea* (Brunschwig et al., 2017), *Oenocarpus bacaba* et *Oenocarpus bataua* (Leba et al., 2016) de la famille Arecaceae.

	Ac12									
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\mathrm{C}}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$					
1	-	128,7	1'	-	125,9					
2	6,67, 1H, <i>sl</i>	138,9	2'	7,04, 1H, <i>d</i> , 1,6 Hz	115,4					
3	4,26, 1H, <i>m</i>	65,9	3'	-	146,0					
4	3,75, 1H, <i>dd</i> , 6,3, 3,5 Hz	68,2	4'	-	148,9					
5	5,09, 1H, <i>m</i>	70,3	5'	6,76, 1H, <i>d</i> , 8,1 Hz	116,2					
6a	2,65, 1H, <i>dd</i> , 18,1, 3,5 Hz	28,2	6′	6,67, 1H, <i>dd</i> , 8,1, 1,6 Hz	121,8					
6b	2,18, 1H, <i>dd</i> , 18,3, 4,7 Hz		7′	7,47, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	145,8					
7	-	168,3	8′	6,25, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	114,5					
			9′	-	166,5					

<b>Tableau III.12.</b> Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du composé Ac12 dans DMSC	$)-d_6$
--	---------

# III.1.13. Elucidation structurale du composé Ac13

Le produit **Ac13** (Figure III.97) est purifié sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Ce composé montre une tache visible sur CCM visualisée sous la lampe UV à 254 nm se colorant en rose lors de la révélation avec l'acide sulfurique et chauffage.



Acide salicylique

Figure III.97. Structure du composé Ac13

Le spectre RMN <sup>1</sup>H enregistré dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.98) montre quatre signaux caractéristiques d'un noyau aromatique di-substitué en position *ortho* à  $\delta_{\rm H}$  8,04 (1H, *dl*, 7,7 Hz), 7,58 (1H, *td*, 8,2, 1,0 Hz), 7,27 (1H, *dl*, 8,2 Hz), 7,23 (1H, *tl*, 7,6 Hz) correspondant aux protons nommés H-6, H-4, H-3 et H-5 respectivement.



Figure III.98. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Ac13 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

En outre, le spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé (Figure III.99) révèle quatre signaux aromatiques (CH) attribuables aux carbones C-3, C-4, C-5 et C-6. Un carbone aromatique quaternaire 139,4 ppm attribué au carbone C-1, un signal d'un carbone aromatique oxygéné à  $\delta_{\rm C}$  164,3 assigné au carbone C-2 et un

dernier carbone dans la zone des acides attribuable au carbone C-7 d'un acide lié directement au carbone C-1.



Figure III.99. Spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé du composé Ac13 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

D'après cette analyse le composé **Ac13** a une structure d'acide salicylique (Choi et al., 2012). Ce composé est isolé pour la première fois du genre *Actractylis*. Il est purifié pour la première fois de l'espèce *Salix pentandra* (Salicaceseae) d'où il tien son nom. L'acide salicylique joue un rôle de précurseur de synthèse de l'aspirine qui possède une excellente activité antipyrétique et analgésique, ainsi que d'autres dérivés biologiquement actifs.

	Ac13	
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\rm C}$

Tableau III.13. Déplacements	chimiques en RMN	<sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du composé <b>Ac13</b>	dans CD <sub>3</sub> OD
------------------------------	------------------	--	-------------------------

Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{C}$
1	-	139,4
2	-	164,3
3	7,27, 1H, <i>dl</i> , 8,2 Hz	115,6
4	7,58, 1H, <i>td</i> , 8,2, 1,0 Hz	132,7
5	7,23, 1H, <i>tl</i> , 7,6 Hz	121,9
6	8,04, 1H, <i>dl</i> , 7,7 Hz	124,2
7	-	175,1

## III.1.14 Elucidation structurale du composé Ac14, Ac15, Ac16 et Ac17

Les trois produits Ac14, Ac15 et Ac16 sont obtenus de l'extrait ether de pétrole, par contre le composé Ac17 est isolé de l'extrait acétate d'éthyle. Ces quatre métabolites secondaires solubles dans le chloroforme sont invisibles sous la lumière UV à 254 nm. Les composés lupéol (Ac14) et  $\beta$ -sitostérol-3-*O*- $\beta$ -D-glucose (Ac17) donnent des taches violées sur la CCM après la révélation avec l'acide sulfurique et chauffage, tandis que les deux métabolites secondaires l'acide oléanolique (Ac15) et le  $\beta$ -sitostérol (Ac16) montrent des taches marron. Ces produits ont été comparés avec des échantillons témoins au laboratoire en utilisant la chromatographie sur couche mince. Les témoins utilisés sont en général des produits isolés à partir des espèces du même genre que le genre étudié, comme *Atractylis serratuloides* et *Atractylis flava* (Chabani et al., 2016b ; chabani et al., 2013).



β-sitostérol (Ac16)

β-sitosterol-3-*O*-β-D-glucopyranoside (Ac17)

Figure III.100. Structure des composés Ac14, Ac15, Ac16 et Ac17

`он′

нс

но

# Chapitre 2. Etude spectrale des composés isolés de *Euphorbia* gaditana Coss.

L'étude chimique des extraits AcOEt et *n*-BuOH issus de l'extrait brut des parties aériennes de l'espèce *E. gaditana* a permis d'isoler et d'identifier 32 métabolites secondaires. Les produits isolés ont été caractérisés par les différentes méthodes spectroscopiques RMN monodimensionnelle (RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C) et bidimensionnelle (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) ; la spectrométrie de masse à basse et haute résolutions (ESI-MS et HR-ESI-MS), la mesure du pouvoir rotatoire, l'hydrolyse acide ainsi que la comparaison avec les données de la littérature.

Les produits isolés se répartissent en 1 nouveau tannin hydrolysable, 1 nouveau  $\alpha$ -pyrone, 18 flavonoïdes et 12 phénols. Comme la majorité des composés isolés sont des flavonoïdes de structures proches ou des phénols qui ont presque le même noyau de base, des interprétations détaillées des spectres vont se faire sur quelques composés, ensuite, l'analyse des autres produits sera basée sur les composés déjà interprétés.

Les tableaux des déplacements chimiques <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C des produits isolés (les parties génines et les parties osidiques) sont insérés à la fin de chaque analyse.

## III.2.1. Elucidation structurale du composé Eg1

Le nouveau composé **Eg1** (Figure III.101) a été isolé sous forme d'une poudre amorphe marron soluble dans le méthanol, et est visible sous UV à 254 nm. Sa tache sur la plaque CCM apparait marron après révélation avec l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$  à 50%) et chauffage.



3,5-dihydroxyacétophénone-4-O-(2'-galloyl)-β-D-glucopyranoside

#### Figure III.101. Structure du composé Eg1

Le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS en mode positif (Figure III.102) montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z = 505,0953 [M+Na]<sup>+</sup> (Calculé pour C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>13</sub>Na, 505,0958), indiquant une masse moléculaire égale à 482 Da correspondant à une formule brute en C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>13</sub> et 11 insaturations.

#### Partie III. Résultats et discussion



Figure III.102. Spectre de masse HR-ESI-MS (en mode positif) du composé Eg1

Le spectre RMN <sup>1</sup>H réalisé dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.103) montre un signal à  $\delta_{\rm H}$  2,60 (3H, s) indiquant la présence d'un groupement méthyle nommé CH<sub>3</sub>-8 lié à un. Un autre signal sous forme de singulet à 7,07 ppm (2H, s) correspond à 2 protons aromatiques équivalents H-2" et H-6", un pic d'intégration 2H à 5,98 ppm (2H, s) est attribué aux deux autres protons aromatiques équivalents H-2 et H-6. Ce qui nous amène à conclure qu'il existe deux noyaux aromatiques différents (Figure III.104).



Figure III.103. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg1 (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)



Figure III.104. Fragments proposés

En outre, un signal d'un proton anomérique apparu à 5,21 ppm sous forme de doublet (1H, *d*, 8,1 Hz, H-1'), au voisinage d'un doublet de doublets et qui résonne à 5,12 ppm (1H, *dd*, 9,5, 8,1 Hz). D'autres signaux résonnant dans la région  $\delta_{\rm H}$  3,5-4,0 indiquent la présence d'un hexose ou pentose.

Le spectre COSY (Figure III.105), révèle les corrélations entre les protons de l'unité osidique, où on remarque que le proton anomérique H-1' couple avec le proton à 5,12 ppm qui donne une multiplicité d'un doublet de doublets, ce signal est attribué au proton H-2'. Le déplacement chimique déblindé du proton H-2' indique que le carbone C-2' est lié à un groupement acétyle. Ce proton (H-2') montre aussi une tache de corrélation avec un proton sous forme de triplet à 3,74 ppm correspondant au proton H-3', qui corrèle avec le signal à  $\delta_{\rm H}$  3,53 sous forme d'un triplet avec une grande constante de couplage (J = 9,0 Hz) attribuable au proton H-4'. Ce dernier couple avec le proton H-5' résonnant à 3,57 ppm, et qui corrèle à son tour avec les protons H-6'a et H-6'b qui sont assignés aux deux doublets de doublets à 3,96 et 3,77 ppm respectivement. Les grandes constantes de couplage du proton anomérique H-1' ainsi, les deux protons H-3' et H-4' nous orientent vers un sucre de type  $\beta$ glucopyranoside (Figure III.106).



Figure III.105. Spectre COSY du composé Eg1



Figure III.106. Couplage COSY de l'unité osidique

D'autre part, on distingue sur le spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé effectué dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.107) 17 pics, dont certains correspondant à plusieurs carbones équivalents. Ceci suggère des symétries dans cette molécule.



Figure III.107. Spectre RMN <sup>13</sup>C J-modulé du composé Eg1 (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz)

Le spectre HSQC (Figures III.108 et III.109) montre un signal à  $\delta_C$  33,0 représentant le carbone du groupement méthyle C-8, un signal CH<sub>2</sub> à  $\delta_C$  62,3 assigné au carbone hydroxyméthyle C-6' du glucose, quatre signaux entre ( $\delta_C$  70,0-80,0) correspondant aux carbones du glucose C-4', C-2', C-3' et C-5'. Le carbone anomèrique C-1' est représenté par un signal à  $\delta_C$  99,7 qui exhibe que le glucose est engagé dans une liaison C-O. Les carbones équivalents C-2 et C-6 figurent à  $\delta_C$  96,3, la même chose pour les carbones similaires C-2" et C-6" qui sont indiquées par un signal à  $\delta_C$  110,3.

A ce stade d'analyse, on a réussi à accorder les carbones du glucose ainsi que ceux des protons aromatiques, il nous reste donc 08 carbones quaternaires à identifier.



Figure III.108. Spectre HSQC du composé Eg1



Figure III.109. Couplages directs protons-carbones

On remarque sur le spectre HMBC (Figure III.110) que les protons aromatiques H-2 et H-6 présentent des taches de corrélation avec cinq carbones différents. Commençant par la corrélation entre ces deux protons et leurs carbones à  $\delta_C$  96,3 (H-2/C-6 et H-6/C-2), en passant à la deuxième tache avec un signal relativement intense à  $\delta_C$  165,5 attribué aux deux carbones équivalents oxygénés C-3 et C-5 du même noyau aromatique. Un autre couplage en <sup>2</sup>J avec le carbone aromatique quaternaire non oxygéné à  $\delta_C$  107,3 attribuable au carbone C-1, et la quatrième tache de corrélation révèle le couplage avec le carbone oxygéné qui résonne à  $\delta_C$  164,9 désigné au carbone C-4.



Figure III.110. Spectre HMBC du composé Eg1

Concernant la dernière tache de corrélation des protons H-2 et H-6, elle indique la présence d'un carbone d'une fonction cétone C-7 qui resonne à  $\delta_C$  205,3. Ce dernier carbone ainsi que le carbone C-1 montre des taches de corrélation avec les protons du méthyle H<sub>3</sub>-8, ce qui nous permet de dire que le fragment méthyle-cétone est porté par le carbone C-1. Toutes ces données indiquent que cette partie représente un dérivé acétophénone (Figure III.111).



Figure III.111. Fragment acétophénone du composé Eg1

Les protons H-2" et H-6" montrent cinq taches de corrélation avec différents carbones, la premiere tache à 110,3 ppm indique les corrélations H-2"/C-6" et H-6"/C-2", une autre corrélation avec le carbone résonnat à 121,3 ppm correspond à un carbone aromatique non oxygéné C-1", la troisième tache à  $\delta_{\rm C}$  140,0 assigné au carbone oxygéné C-4". Deux carbones aromatiques oxygénés C-3" et C-5" à  $\delta_{\rm C}$  146,5 montrent un couplage en <sup>2</sup>*J* avec les protons H-2" et H-6". Ces derniers protons présentent une tache avec le carbone qui résonne à  $\delta_{\rm C}$  167,6 attribué au carbone C-7" d'une fonction ester. Donc, on peut déterminer le deuxième fragment comme étant le fragment gallate (Figure III.112).



Figure III.112. Fragment gallate du composé Eg1

Le spectre HMBC montre la corrélation entre le proton anomèrique H-1' et le carbone C-4 (164,9 ppm) du cycle aromatique A (premier fragment), ce qui signifie que le glucose est lié au cycle aromatique A en position C-4. Le proton H-2' du glucose présente une tache de corrélation avec le carbonyl C-7" (167,6 ppm) attestant l'acylation du glucose par le groupement gallate en position C-2'.

Ceci prouve que le glucose relie les deux fragments (le fragment acétophénone et le fragment gallate) en positions 1' et 2' respectivement (Figure III.113).



Figure III.113. Corrélations HMBC du composé Eg1

Le spectre NOESY (Figure III.114) confirme la position des protons H-2 et H-6 par la corrélation entre ces deux protons et les protons du méthyle H<sub>3</sub>-8 (Figure III.115). Il montre également les intéractions entre H-1'/H-2", H-6" confirmant le positionnement des protons aromatiques H-2" et

H-6". D'autres effets NOESY sont observés pour les protons du  $\beta$ -glucose entre : H-1'/H-3', H-1'/H-5' et H-2'/H-4'.





Figure III.115. Corrélation NOESY du composé Eg1

# III.2.1.1. Détermination de la configuration absolue du sucre

Afin de confirmer le type et la configuration absolue du résidu monosaccharide du composé **Eg1**, une hydrolyse acide a été effectuée sur une quantité de 10 mg du composé. En suivant les étapes de l'hydrolyse acide (protocole décrit en partie II), une masse de 1,6 mg du sucre libre a été obtenu.

Le sucre obtenu est comparé avec des sucres de référence sur plaque CCM ce qui nous confirme la nature du sucre (glucose). Ensuite, la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20} = +25,8^\circ$  (*c* 0,11, H<sub>2</sub>O) a permis d'avoir la configuration du sucre comme D-glucopyranoside.

Selon ces données RMN, la masse moléculaire donnée par HR-ESI-MS et la comparaison avec son analogue isolé à partir des racines d'*Euphorbia fischeriana* par Huang et al. (2017), le composé **Eg1** (Figure III.101) a été élucidé comme 3,5-dihydroxyacétophénone-4-O-(2'-galloyl)- $\beta$ -Dglucopyranoside. Ce métabolite secondaire est isolé pour la première fois du règne végétal.

Eg1									
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\mathrm{C}}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\rm C}$				
1	-	107,3	1″	-	121,3				
2	5,98, 1H, <i>s</i>	96,3	2″	7,07, 1H, s	110,3				
3	-	165,5	3″	-	146,5				
4	-	164,9	4″	-	140,0				
5	-	165,5	5″	-	146,5				
6	5,98, 1H, <i>s</i>	96,3	6″	7,07, 1H, s	110,3				
7	-	205,3	7″	-	167,6				
8	2,60, 3H, s	33,0							
1′	5,21, 1H, <i>d</i> , 8,1 Hz	99,7							
2'	5,12, 1H, <i>dd</i> , 9,5, 8,1 Hz	74,9							
3'	3,74, 1H, <i>t</i> , 9,1 Hz	76,1							
4′	3,53, 1H, <i>t</i> , 9,0 Hz	71,6							
5'	3,57, 1H, <i>m</i>	78,5							
6′a	3,96, 1H, <i>dd</i> , 12,1, 1,9 Hz	62,3							
6′b	3,77, 1H, <i>dd</i> , 12,1, 5,1 Hz								

Tableau III.14. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg1 dans CD<sub>3</sub>OD

# III.2.2. Elucidation structurale du composé Eg2

Le nouveau produit **Eg2** (Figure III.116) a été isolé sous forme de cristaux blancs soluble dans le méthanol. Il est visible sous la lampe UV à 254 nm, se révélant en couleur rose claire sur la CCM après sa pulvérisation avec l'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre IR de ce composé (Figure III.117) montre des bandes d'absorption maximales à 2500-3600 cm<sup>-1</sup> (O-H d'un acide), 1752 cm<sup>-1</sup> (C=O lactone), 1690 cm<sup>-1</sup> (C=O acide), 1645 cm<sup>-1</sup> (C=C non aromatique) et 1277 cm<sup>-1</sup> (C-O ester).



5-isopropyl-2-oxo-3,6-dihydropyrane-4-carboxylique



### Figure III.116. Structure du composé Eg2

Figure III.117. Spectre IR du composé Eg2

Le spectre de masse à haute résolution HR-ESI-MS en mode positif (Figure III.117a) révèle un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 207,0628 [M+Na]^+$  (calculé pour C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>Na, 207,0633), soit une masse moléculaire de 184 Da correspondant à la formule brute C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub> et un nombre d'instauration I = 4.

Elementa	Composition	Report										Page 1
Single Ma Tolerance - Element pro Number of	e 20.0 PPM / Di ediction: Off isotope peaks use	BE: min = - id for i-FIT (	.5, max = 3	50.0				4				
Monoisotopii 23 formula(e Elements Us C 9-9 H 0	c Mass, Even Electr ) evaluated with 1 m ed -100 O: 0-6 Na	on lons esuits within 0-1 L 0-1	limits (up to	50 closest	results for	each masa)						
IB-EQ-46-F2 ( 19HR68 141 (	G-a-1 (4 569) AM (Can.4, 60	00, Ar.5000.0	622 57,0 70	LS 20): Sm (	SG, 1#1-00	); Bb (5,40.00 ),	Cm (135.141)				10	TOP MS ES+
100				[M+N	a]+	20	7.0628					
*	6.9618 139.061	5 158.0715	179 0206	185.0811	25	229.04	245.0251 2	53.1020	7 1083 291 1207	310.0918	337.1299	347.1758
110	120 130 140	150 100	170 1	80 160	200 210	0 220 250	240 250	260 270	280 290 300	310 320	330 340	350
Maximum:		5.0	20.0	-1,5 50,0								
MARS	Calc. Nava	=04	17976	\$184E	1-711	Futu	ala		CoH12O4N	a		
207,042#	207,0623	-0.5	-2.4	3.5	127.4	( D)	12 04 Hz	>				

Figure III.117a. Spectre de masse HR-ESI-MS (en mode positif) du composé Eg2

Le spectre RMN <sup>1</sup>H enregistré dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.118) montre un signal d'intégration 6H à  $\delta_{\rm H}$  1,09 sous forme d'un doublet correspondant à deux méthyles équivalents (6H, *d*, 7,0 Hz), deux signaux triplets à  $\delta_{\rm H}$  3,33 (2H, *t*, 1,8 Hz) et 4,95 (2H, *t*, 1,8 Hz) et un septuplet à  $\delta_{\rm H}$  3,87 (1H, *sept*, 7,0 Hz).



Figure III.118. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg2 (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz)

Le spectre RMN <sup>13</sup>C enregistré dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.119) de ce composé indique la présence de 8 signaux correspondant à 9 atomes de carbones, se repartissant en quatre carbones aliphatiques localisés entre 20-40 ppm, un carbone oxyméthylène à  $\delta_C$  68,2, deux carbones ethyléniques quaternaires résonant à  $\delta_C$  121,0 et 152,8 et deux carbonyles à  $\delta_C$  168,1 et 173,3 (fonctions acide et lactone).



Figure III.119. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Eg2 (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz)

Toutes ces caractéristiques spectrales suggèrent que le composé **Eg2** est un pyrone insaturé comportant deux carbonyles.

Le spectre COSY (Figure III.120) montre que les protons des deux méthyles couplent avec le proton résonant à  $\delta_{\rm H}$  3,87 sous forme de septuplet. Ceci est caractéristique d'un groupement isopropyle. Un autre couplage est remarqué entre les protons des groupements méthylènes à  $\delta_{\rm H}$  3,33 et 4,95 avec une très petite constante de couplage J = 1,8 Hz due à un couplage scalaire en <sup>5</sup> $J_{\rm H-H}$  de type homo-allylique.



Figure III.120. Spectre COSY du composé Eg2

Ceci conduit à proposer les enchainements suivants :



Figure III.121. Fragments proposés du composé Eg2

La combinaison des spectres RMN <sup>13</sup>C et HSQC réalisés dans CD<sub>3</sub>OD (Figures III.119 et III.122) supporte la présence de 9 atomes de carbones, et permet l'attribution des signaux suivants : le pic qui résonne à  $\delta_{\rm C}$  20,1 correspond aux carbones nommés C-8 et C-9, les deux signaux à  $\delta_{\rm C}$  29,8 et 32,8 sont accordés aux carbones désignés C-7 et C-3 respectivement. Tandis que les protons du groupement méthylène H<sub>2</sub>-6 corrèlent avec leur carbone C-6 à  $\delta_{\rm C}$  68,2.



Figure III.122. Spectre HSQC du composé Eg2

On remarque sur le spectre HMBC (Figure III.124) que les protons  $H_2$ -3 et  $H_2$ -6 corrèlent avec les carbones éthyléniques à 121,0 et 152,8 ppm d'une part, ce qui confirme le couplage homo-allylique

observé sur le spectre COSY (Figure III.120), et avec un carbone résonant à 173,3 ppm attribué au carbone C-2 de la fonction ester d'autre part. Eu egard aux déplacements chimiques des carbones C-2, C-3 et C-6, la bande d'absorption visualisée sur le spectre IR à 1752 cm<sup>-1</sup>, et l'instauration qui reste à déterminer, on déduit que l'ester détecté représente une fonction lactone permettant ainsi la fermeture du cycle à six chaînons (Onocha et al., 1995). Ceci conduit à proposer le fragment suivant (Figure III.123):



Figure III.123. Formation de cycle à six chaînons



Figure III.124. Spectre HMBC du composé Eg2

Les protons H-7, H<sub>3</sub>-8 et H<sub>3</sub>-9 montrent des corrélations HMBC avec le carbone quaternaire de la double liaison à  $\delta_{\rm C}$  152,8 attribuable au carbone C-4 ou C-5. Ceci conduit à statuer que le groupement isopropyle est enchainé avec la double liaison C-4=C-5 (Figure III.125).



Figure III.125. Enchainement proposé du groupement isopropyle avec la double liaison

En tenant compte des données de la spectromètrie de masse (M = 184 Da), il reste à attacher la fonction acide représenté par le carbone à 168,1 ppm, laquelle va forcément être liée aux carbones C-4 ou C-5 en proposant deux structures A et B (Figure III.126).



Figure III.126. Structures proposées pour le composé Eg2

Pour déterminer la structure exacte, on fait recours aux expèriences HMBC et NOESY (Figures III.124 et III.127). En effet, la corrélation des protons méthylénes H<sub>2</sub>-3 avec le carbonyle C-10 de la fonction acide sur le spectre HMBC d'une part, et le couplage spatial des protons méthyliques H<sub>3</sub>-9 et H<sub>3</sub>-8 du groupement isopropyle avec les protons oxyméthylénes H<sub>2</sub>-6 sur le spectre NOESY d'autre part, permettent de fixer le groupement isopropyle en position C-5 et la fonction acide carboxylique en C-4 (Figure III.128).



Figure III.127. Spectre NOESY du composé Eg2



Figure III.128. Corrélations HMBC et NOESY permettant le positionnement des substituants

A l'issue de cette analyse spectroscopique le produit **Eg2** (Figure III.116) possède une structure moléculaire appartenant à la classe des  $\alpha$ -pyrone, élucidée en acide 5-isopropyl-2-oxo-3,6-dihydropyrane-4-carboxylique. Ce composé est isolé pour la première fois du règne végétal. Un analogue structural à ce composé nommé djalonenol a été trouvé antérieurement dans l'espèce *Anthocleista djalonensis* (Onocha et al., 1995).

	Eg2	
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$
2	-	173,3
3	3,33, 2H, <i>t</i> , 1,8 Hz	32,2
4	-	152,8
5	-	121,0
6	4,95, 2H, <i>t</i> , 1,8 Hz	68,2
7	3,87, 1H, sept, 7,0 Hz	29,9
8	1,09, 3H, <i>d</i> , 7,0 Hz	20,1
9	1,09, 3H, <i>d</i> , 7,0 Hz	20,1
10	-	168,1

Tableau III.15. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg2 dans CD<sub>3</sub>OD

## III.2.3. Elucidation structurale du composé Eg3

Le produit **Eg3** (Figure III.129) est obtenu sous forme d'une poudre jaune visible sous UV à 254 nm et soluble dans le méthanol. Il donne une tache jaune sur la CCM après la révélation avec l'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS en mode positif (Figure III.130) du composé **Eg3** montre deux pics d'ions pseudo-moléculaires à m/z = 313 [M+Na]<sup>+</sup> et 603 [2M+Na]<sup>+</sup>, indiquant une masse moléculaire de 290 Da et C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> comme formule brute, soit 9 degrés d'insaturation.



(-) Catéchine

Figure III.129. Structure du composé Eg3



Figure III.130. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Eg3

Le spectre RMN <sup>1</sup>H effectué dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.131) montre deux signaux sous forme de doublet chacun (J = 2, 2 Hz) à  $\delta_{\rm H}$  5,93 (1H, d, H-6) et 5,86 (1H, d, H-8). Ces deux doublets avec cette constante de couplage dans la zone (entre  $\delta_{\rm H}$  5,70 - 6,50) sont caractéristique du noyau A d'un flavonoïde. Cette hypothèse est confirmée par la présence de quinze signaux sur le spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé (Figure III.132) équivalents aux carbones des flavonoïdes simples. L'existence de deux signaux seulement dans la zone entre 5 et 6 ppm sur le spectre RMN <sup>1</sup>H, ainsi l'absence des signaux dans la zone des carbonyles sur le spectre RMN <sup>13</sup>C, nous renvoie au squelette flavanol. Trois autres signaux dans la zone des aromatiques qui sortent sous forme d'un doublet de doublets, un grand doublet et un petit doublet, révèlent que le noyau B du flavonoïde est tri-substitué en position *ortho* et *para*. Ces signaux résonnent à  $\delta_{\rm H}$  6,72 (1H, *dd*, 8,1, 1,7 Hz, H-6'), 6,77 (1H, *d*, 8,1 Hz, H-5') et 6,84 (1H, *d*, 1,7 Hz, H-2').



Figure III.131. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg3 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

Un signal qui résonne sous forme d'un doublet à  $\delta_{\rm H}$  4,58 (1H, *d*, 7,4 Hz) correspond à un (CH) lié à un oxygène d'un côté et au groupe attracteur d'un autre côté vu son déplacement chimique, donc, celui-ci correspond au proton en position 2 (H-2). Un autre signal sous forme d'un doublet de doublets de doublets détecté à  $\delta_{\rm H}$  3,98 (1H, *ddd*, 13,2, 7,9, 5,5 Hz) attribué au proton H-3, et deux autres signaux sous forme de doublet de doublets chacun à  $\delta_{\rm H}$  2,85 (1H, *dd*, 16,1, 5,4 Hz, H-4a) et  $\delta_{\rm H}$  2,52 (1H, *dd*, 16,1, 8,1 Hz, H-4b). Puisqu'il n'y a que quinze carbones sur le spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé, donc il n'y a aucune chaine qui substitue le squelette du flavonoïde, et les données précédentes requiert la saturation des positions 2, 3 et 4.



Figure III.132. Spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé du composé Eg3 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

Le spectre COSY (Figure III.133) indique le couplage en *méta* entre les protons H-6/H-8 du cycle A, ainsi qu'entre les protons H-2'/H-6' (*méta*) et H-5'/H-6' (*ortho*) ce qui confirme que ces trois protons sont portés sur le même noyau aromatique B. Des corrélations aussi, entre les protons H-2/H-3, H-3/H-4a/H-4b et H-4a/H-4b sont observés. Etant donné le déplacement chimique déblindé du proton H-3 et le fait qu'il corrèle avec les deux protons H-4a et H-4b geminés on déduit que son carbone est un carbone asymétrique et il est liée à un groupement hydroxyle libre, ce qui confirme la présence du squelette flavanol.



Figure III.133. Spectre COSY du composé Eg3

Le spectre HSQC (Figure III.134) permet d'identifier les carbones de chaque proton. Il montre les corrélations des protons H-2', H-5', H-6', H-6, H-8, H-2, H-3, H<sub>2</sub>-4 avec leurs carbones à  $\delta_{C}$  115,2 (C-2'), 116,1 (C-5'), 120,0 (C-6'), 96,3 (C-6), 95,5 (C-8), 82,8 (C-2), 68,6 (C-3), 28,5 (C-4).



Figure III.134. Spectre HSQC du composé Eg3
Tandis que, le spectre HMBC (Figure III.135) indique des taches de corrélation entre le proton H-2 et les carbones C-2' et C-1' qui résonne à  $\delta_C$  132,2, ce qui signifie que le noyau B est bien lié au carbone C-2. La corrèlation entre H-4/C-5 qui sort vers  $\delta_C$  157,6 et H-4/C-9 qui est indiqué par le pic à  $\delta_C$  156,9, atteste de la présence d'une structure de type catéchine.



Figure III.135. Spectre HMBC du composé Eg3

D'après les données issues des expériences RMN, masse, mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D{}^{20} = -1,77^\circ$  (*c* 0,04, MeOH) et la comparaison avec les données de la littérature (Jung et al., 2008), la structure du métabolite secondaire isolé **Eg3** (Figure III.129) est élucidée comme (-) catéchine. Ce composé est connu comme un antioxydant fort, on le retrouve dans plusieurs espèces telle que *Euphorbia thymifolia* (Kainsa et al., 2016), *E. dracunculoides* (Majid et al., 2015), *Ulmus davidiana* (Ulmaceae) (Jung et al., 2008), *Acacia saligna* (Fabaceae) (El-toumy et al., 2010) et *Calligonum comosum* (Polygonaceae) (Badria et al., 2007), tandis que c'est la première purifiction de la catéchine à partir des espèces du genre *Atractylis*.

	Eg3									
Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{\mathrm{C}}$	Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{C}$					
2	4,58, 1H, <i>d</i> , 7,4 Hz	82,8	1'	/	132,2					
3	3,98, 1H, <i>ddd</i> , 13,2, 7,9, 5,5 Hz	68,8	2'	6,84, 1H, <i>d</i> , 1,7 Hz	115,2					
4a	2,85, 1H, <i>dd</i> , 16,1, 5,4 Hz	28,4	3'	/	146,2					
4b	2,52, 1H, <i>dd</i> , 16,1, 8,1 Hz		4'	/	146,3					
5	/	157,5	5'	6,77, 1H, <i>d</i> , 8,1Hz	116,1					
6	5,94, 1H, <i>d</i> , 2,2 Hz	96,3	6'	6,72, 1H, <i>dd</i> , 8,1, 1,7 Hz	120,0					
7	/	157,8								
8	5,86, 1H, <i>d</i> , 2,2 Hz	95,5								
9	/	156,8								
10	/	100,8								

Tableau III.16. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg3 dans CD<sub>3</sub>OD

### III.2.4. Elucidation structurale du composé Eg4

Le métabolite secondaire **Eg4** (Figure III.136) est purifié sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol, visible sous la lumière UV à 254 et 366 nm. Sa tache apparait sur CCM sous forme d'une tache jaune lors de la révélation avec l'acide sulfurique et le chauffage.

L'analyse de masse ESI-MS en mode positif (Figure III.137) du composé **Eg4** indique deux pics d'ions pseudo-moléculaires à m/z = 325 [M+Na]<sup>+</sup> et à m/z = 627 [2M+Na]<sup>+</sup>. Soit une masse moléculaire de 302 Da et une formule de C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>.



Figure III.136. Structure du composé Eg4



Figure III.137. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Eg4

L'analyse des differents spectres RMN 1D et 2D de ce composé et la comparaison avec les données de la littérature et un échantillion témoin (**Ac6**) conduisent à identifier ce produit comme la quercétine (**Eg4** = **Ac6**). On la retrouve dans plusieurs plantes du genre *Euphorbia* telles que *E. hirta* (Mekam et al., 2019), *E. gaillardotii, E. macroclada* (Ertas et al., 2015), *E. helioscopia* (Saleem et al., 2014) ....

#### III.2.5. Elucidation structurale du composé Eg5

Le produit **Eg5** (Figure III.138) est isolé sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il montre une tache visible sous UV à 254 et 366 nm, se colorant en jaune après la révélation avec une solution d'acide sulfurique et chauffage.



Myricétine

Figure III.138. Structure du composé Eg5

Le spectre de masse ESI-MS en mode positif montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 341 \text{ [M+Na]}^+$ , indiquant une masse moléculaire égale à 318 Da correspondant à une formule brute de C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>8</sub>.

En suivant la même méthode d'interprétation, le spectre RMN <sup>1</sup>H effectué dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.139) du composé **Eg5** montre deux signaux un à  $\delta_{\rm H}$  6,18 (1H, *d*, 1,7 Hz) correspond au proton H-6 et l'autre à  $\delta_{\rm H}$  6,38 (1H, *d*, 1,7 Hz) attribuable au proton H-8. L'absence d'un troisième signal dans cette zone (6 à 7 ppm) suggère une structure flavonoidique de type flavonol.

Donc le pic a  $\delta_H$  7,35 qui résonne sous forme d'un singulet d'intégration 2H représente deux protons équivalants du noyau B (H-2' et H-6'), suggèrant que le noyau B est symétriquement tetra-substitué par des groupes hydroxyles.



Figure III.139. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg5 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

Les signaux visualisés sur le spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé enregistré dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.140) sont presque identiques à ceux du composé **Ac6** (**Eg4**) (Figure III.36), sauf que les déplacements chimiques des carbones du noyau B changent, vu que ce composé a un subtitutant de plus que le composé **Eg4**. La symétrie au niveau du cycle aromatique terta-substitué B permet d'avoir deux pics qui représentent deux carbones identiques chacun à  $\delta_C$  108,5 (C-2' et C-6') et à  $\delta_C$  146,7 (C-3' et C-5'). Le carbone oxygéné C-4' résonne à 136,9 ppm, tandis que le carbone C-1' est repéré à  $\delta_C$  123,1.



Figure III.140. Spectre RMN <sup>13</sup>C J-modulé du composé Eg5 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

Les données spectroscopiques obtenus comparées à celles présentées dans la littérature (Sakushima et al., 1983) permettant de caractériser le produit **Eg5** à la myricétine. Ce composé a été isolé entérieurement des plantes *Euphorbia helioscopia* (Saleem et al., 2014), *E. wallichii* (Taskeen et al., 2009), *E. gaillardotii, E. macroclada* (Ertas et al., 2015) et *E. dracunculoides* (Majid et al., 2015).

Tableau III.17. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg5 dans CD<sub>3</sub>OD

	Eg5									
Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{C}$	Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{\mathrm{C}}$					
2	/	148,0	1'	/	123,1					
3	/	137,4	2'	7,35, 1H, <i>s</i>	108,5					
4	/	177,3	3'	/	146,7					
5	/	162,5	4′	/	136,9					
6	6,18, 1H, <i>d</i> , 1,7 Hz	99,2	5'	/	146,7					
7	/	165,6	6′	7,35, 1H, <i>s</i>	108,5					
8	6,38, 1H, <i>d</i> , 1,7 Hz	94,3								
9	/	158,2								
10	/	104,5								

### III.2.6. Elucidation structurale du composé Eg6

Le métabolite secondaire **Eg6** (Figure III.141) est obtenu sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il présente une fluorescence sous la lumière UV à 254 et 366 nm, ainsi, la révélation de sa CCM avec l'acide sulfurique et le chauffage montre une tache jaune.

Une masse moléculaire du produit **Eg6** de 464 Da correspondant à une formule brute en  $C_{21}H_{20}O_{12}$  est indiquée par un pic d'ion peudo-moléculaire à  $m/z = 463 \text{ [M-H]}^{-}$  sur le spectre de masse ESI-MS en mode négatif (Figure III.142).



Quercétine-3-*O*-*β*-D-glucopyranoside



Figure III.141. Structure du composé Eg6

Figure III.142. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé EG6

Après l'examen des differents spectres RMN 1D et 2D et la comparaison avec ceux du composé **Ac7**, il en résulte que ce produit est la quercétine-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (**Eg6** = **Ac7**). Ce composé

est trouvé antérieurement des espèces du même genre telle que *E. retusa* (Nabiel et al., 1985) et *E. hirta* (Mekam et al., 2019).

### III.2.7. Elucidation structurale du composé Eg7

Le métabolite secondaire **Eg7** (Figure III.143) est purifié sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il est visible sous la lumière UV à 254 et 366 nm, se colorant en jaune après la révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Le composé **Eg7** montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 457 \text{ [M+Na]}^+$  sur le spectre de masse ESI-MS en mode positif (Figure III.144). Soit une masse moléculaire de 434 et une formule de C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>.



Quercétine-3-*O*-α-L-arabinopyranoside

Figure III.143. Structure du composé Eg7



Figure III.144. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Eg7

On remarque une grande similarité dans la partie génine entre les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C *J*-modulé du composé **Eg7** (Figures III.145 et III.146) et les spectres du produit **Ac7** (**Eg6**) (Figures III.39 et III.40). Donc, le composé **Eg7** contient la même génine (quercétine) que le produit **Eg6**. La différence est notée dans les signaux de la partie osidique entre 3 à 5,5 ppm.

En effet, le signal à  $\delta_{\rm H}$  5,15 (1H, *d*, 6,6 Hz) représente le proton anomérique du sucre recherché, tandis que, le reste des protons résonnent dans la zone entre  $\delta_{\rm H}$  3,40 à 4,00.



Figure III.145. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg7 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)





Le spectre COSY (Figure III.147) nous permet d'identifier les protons osidiques qui font partie d'un seul système de spins à six protons correspondant à un pentose. Le proton anomérique corrèle avec le proton à  $\delta_H$  3,90 (1H, *dd*, 8,4, 6,6 Hz) assigné au proton H-2". Ce dernier montre une tache de corrélation avec le signal à  $\delta_H$  3,65 (1H, *dd*, 8,4, 3,5 Hz) qui correspond au proton H-3" corrèlant à son tour avec le proton à  $\delta_H$  3,83 (1H, *m*, H-4"), qui couple avec deux protons à la fois à  $\delta_H$  3,83 (1H, *m*) et 3,45 (1H, *dd*, 13,3, 3,0 Hz) attribués aux protons H-5"a et H-5"b respectivement (Figure III.148).



Figure III.147. Spectre COSY (étalement) du composé Eg7



Figure III.148. Couplages COSY au niveau des protons du sucre

La petite valeur de la constante de couplage entre H-3"/H-4" (J = 3,5 Hz) suggère un couplage axial/équatorial entre les protons H-3" et H-4", indique que le sucre est un arabinose.

Les déplacements chimiques des carbones de l'arbinose ont été détectés par analyse du spectre HSQC (Figure III.149) à  $\delta_{C}$  104,7 (C-1"), 72,9 (C-2"), 74,1 (C-3"), 69,1 (C-4") et 67,0 (C-5").



Figure III.149. Spectre HSQC du composé Eg7

L'analyse du spectre HMBC (Figure III.150) permet à assigner les déplacements chimiques de tous les carbones de l'aglycone (quercétine). Le déplacement chimique du carbone C-2 (158,7 ppm) et la tache de corrélation que présente le carbone C-3 (135,6 ppm) avec le proton anomère de l'arabinose conduisent à accrocher l'unité osidique en position 3 de la génine (Figure III.151).



Figure III.150. Spectre HMBC du composé Eg7



Figure III.151. Corrélations HMBC montrant l'attachement de l'arabinoside à l'aglycone

Vu les données collectées des expériences RMN, masse ESI-MS et la comparaison avec les données de la littérature (El-toumy et al., 2010), nous concluons que la structure du produit **Eg7** (Figure III.143) est la quercétine-3-O- $\alpha$ -L-arabinopyranoside. Ce produit a été trouvé entérieurement dans de nombreuse espèces telle que *Euphorbia characias* (Pisano et al., 2016), *E. supina* (Ryu et al., 2016), *E. sikkimensis* (Yang et al., 2013), *Homonoia riparia* (Euphorbiaceae) (Park et al., 2014) et *Acacia saligna* (Fabaceae) (El-toumy et al., 2010).

Eg7									
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$				
2	/	158,7	1″	5,15, 1H, <i>d</i> , 6,6 Hz	104,7				
3	/	135,6	2″	3,90, 1H, <i>dd</i> , 8,4, 6,6 Hz	72,9				
4	/	179,4	3″	3,65, 1H, <i>dd</i> , 8,4, 3,5 Hz	74,1				
5	/	163,0	4″	3,83, 1H, <i>m</i>	69,1				
6	6,19, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	99,9	5″a	3,83, 1H, <i>m</i>	67,0				
			5″b	3,45, 1H, <i>dd</i> , 13,3, 3,0 Hz					
7	/	166,0							
8	6,38, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	94,7							
9	/	158,4							
10	/	105,6							
1'	/	122,8							
2'	7,75, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	123,0							
3'	/	145,9							
4′	/	149,9							
5'	6,87, 1H, <i>d</i> , 8,5 Hz	116,2							
6′	7,57, 1H, <i>dd</i> , 8,5, 2,2 Hz	117,5							

**Tableau III.18.** Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé **Eg7** dans CD<sub>3</sub>OD

#### III.2.8. Elucidation structurale du composé Eg8

Le composé **Eg8** (Figure III.152) est isolé sous forme d'une poudre jaune amorphe soluble dans le méthanol. Il est visible sous lumière UV à 254 et 366 nm et il apparait sous forme d'une tache jaune sur la CCM lors de la révélation avec l'acide sulfurique et chauffage.

Ce composé montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 417 \text{ [M-H]}^{-}$  sur le spectre de masse ESI-MS en mode négatif (Figure III.153), correspondant à une masse moléculaire de 418 Da et une formule en C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>, soit une différence de -16 par rapport au composé précédent **Eg7** (C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>).



Kaempférol-3-*O*-α-L-arabinopyranoside





Figure III.153. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg8

Sur le spectre RMN <sup>1</sup>H effectué dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.154) on distingue les deux doublets à  $\delta_{\rm H}$  6,21 (1H, d, 2,1 Hz) et 6,41 (1H, d, 2,0 Hz) des protons H-6 et H-8 du cycle A d'un flavonoïde. Aussi dans la zone des protons aromatiques on remarque deux signaux d'intégration 2H sous forme de doublet chacun à  $\delta_{\rm H}$  6,90 (1H, d, 8,9 Hz) et 8,07 (1H, d, 8,9 Hz) correspondant aux protons (H-3', H-5') et (H-2', H-6') respectivement. Ceci suggère une symétrie au niveau du cycle aromatique B signifiant que ce cycle et di-substitué en position para. En concéquence, la génine de ce composé est identifié au kaempférol.

On remarque une similarité entre le proton anomérique qui sort à  $\delta_{\rm H}$  5,15 sous forme d'un doublet avec une constante de couplage de 6,4 Hz, ainsi que le reste des protons du sucre résonant dans la zone entre 3,30 à 4,00 ppm, et ceux du composé **Eg7** (Figure III.145), donc le sucre arabinose représente la partie osidique de ce composé.



Figure III.154. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg8 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

Le spectre RMN <sup>13</sup>C enregistré dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.155) confime la symétrie du cycle B et permet d'identifier les carbone de la molécule. On constate que les cabones C-2 et C-3 ont des déplacements chimiques de 158,8 et 135,5 ppm attestant que l'arabinose est attaché au carbone C-3 par une liaison (C-O-C).



Figure III.155. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Eg8 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

L'interprétation des spectres RMN 2D (COSY, HSQC et HMBC) et masse ESI-MS, et la comparaison avec les déplacements chimiques rapportés dans la littérature (Cui et al., 2018), permettent d'identifier le produit **Eg8** (Figure III.152) comme kaempférol-3-O- $\alpha$ -L-arabinopyranoside.

Ce métabolite secondaire présente une bonne activité antioxydante et il a été isolé antérieurement des espèces *Euphorbia supina* (Ryu et al., 2016), *E. sikkimensis* (Yang et al., 2013), *Miconia albicans* (Melastomataceae) (Lima et al., 2018) et autres.

Eg8									
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\rm C}$				
2	/	158,8	1″	5,15, 1H, <i>d</i> , 6,4 Hz	104,3				
3	/	135,5	2″	3,89, 1H, <i>dd</i> , 8,2, 6,4 Hz	72,7				
4	/	179,6	3″	3,63, 1H, <i>dd</i> , 8,3, 3,1 Hz	74,0				
5	/	163,1	4″	3,79, 1H, <i>m</i>	69,0				
6	6,21, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	99,9	5″a	3,79, 1H, <i>m</i>	66,8				
7	/	166,1	5″b	3,41, 1H, <i>dl</i> , 10,3 Hz					
8	6,41, 1H, <i>d</i> , 2,0 Hz	94,7							
9	/	158,5							
10	/	105,6							
1'	/	122,6							
2'	8,07, 1H, <i>d</i> , 8,9 Hz	132,3							
3'	6,90, 1H, <i>d</i> , 8,9 Hz	116,2							
4'	/	161,7							
5'	6,90, 1H, <i>d</i> , 8,9 Hz	116,2							
6′	8,07, 1H, <i>d</i> , 8,9 Hz	132,3							

Tableau III.19. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg8 dans CD<sub>3</sub>OD

#### III.2.9. Elucidation structurale du composé Eg9

Le produit **Eg9** (Figure III.156) est purifié sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Ce composé est visible sous UV à 254 et 366 nm, et donne une tache jaune sur sa CCM après la révélation avec une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS en mode positif (Figure III.157) de ce composé montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 473 \text{ [M+Na]}^+$ , donc une masse moléculaire de 450 et une formule brute en C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>12</sub>, soit une différence de +16 par rapport au produit **Eg7** (C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>).



Myricétine-3-O-a-L-arabinopyranoside



Figure III.156. Structure du composé Eg9

Figure III.157. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Eg9

Les deux spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C réalisés dans CD<sub>3</sub>OD (Figures III.158 et III.159) montrent une similarité dans la partie génine avce les spectres du composé **Eg5** (la myricetine) (Figures III.139 et III.140). En effet, on remarque la présence des signaux des protons H-6 et H-8 sous forme de doublet chacun à  $\delta_{\rm H}$  6,21 et 6,40 sur le spectre RMN <sup>1</sup>H, ainsi que leurs carbones sur le spectre <sup>13</sup>C à  $\delta_{\rm C}$  99,4 et 94,6 respectivement. Un singulet d'intégration 2H résonne à  $\delta_{\rm H}$  7,32 correspondant aux deux protons équivalents H-2' et H-6'. Les carbones C-2' et C-6' sont représentés par le pic qui sort à  $\delta_C$  109,8 (Chung et al., 2004).

En plus, la comparaison de la partie osidique du produit **Eg9** avec celle du composé **Eg7** (arabinose) (Figure III.145 et III.146) laisse suggérer une rassemblance au niveau des signaux des spectres RMN (<sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C), notamment, avec les constantes de couplage et les déplacements chimiques.



Figure III.158. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg9 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Figure III.159. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Eg9 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

Ces constatations et les données de la littérature nous conduisent à caractériser la structure du composé **Eg9** (Figure III.156) comme myricétine-3-*O*-α-L-arabinopyranoside (El-toumy et al., 2010). Ce métabolite secondaire est isolé pour la première fois du genre *Euphorbia*, il a été aussi purifiée des plantes *Homonoia riparia* (Euphorbiaceae) (Park et al., 2014), *Acacia saligna* (Fabaceae) (El-toumy et al., 2010).

Eg9									
Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{\mathrm{C}}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\mathrm{C}}$				
2	/	158,7	1″	5,18, 1H, <i>d</i> , 6,7 Hz	104,8				
3	/	135,8	2″	3,89, 1H, <i>m</i>	73,0				
4	/	179,4	3″	3,65, 1H, <i>dd</i> , 8,4, 3,3 Hz	74,2				
5	/	163,1	4″	3,83, 1H, <i>m</i>	69,2				
6	6,21, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	99,4	5″a	3,87, 1H, <i>m</i>	67,1				
			5″b	3,47, 1H, <i>dd</i> , 11,8, 1,0 Hz					
7	/	166,0							
8	6,40, 1H, <i>d</i> , 2,1Hz	94,6							
9	/	158,4							
10	/	105,6							
1′	/	127,7							
2'	7,32, 1H, <i>s</i>	109,8							
3'	/	146,5							
4′	/	138,1							
5'	/	146,5							
6'	7,32, 1H, <i>s</i>	109,8							

Tableau III.20. Déplace	ements chimiques e	en RMN <sup>1</sup> H et <sup>1</sup>	<sup>13</sup> C du composé <b>Eg</b>	9 dans CD3OD
-------------------------	--------------------	---------------------------------------	--------------------------------------	--------------

## III.2.10. Elucidation structurale du composé Eg10

Le produit **Eg10** (Figure III.160) est obtenu sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol et visible sous UV à 254 et 366 nm. Il donne une tache jaune sur la CCM après la révélation avec l'acide sulfurique et chauffage.

Le produit **Eg10** indique un pic d'ion pseudo-moléculaire sur son spectre de masse ESI-MS en mode positif (Figure III.161) à m/z = 471 [M+Na]<sup>+</sup>, pour une masse moléculaire de 448 Da correspondant à une formule brute en C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>.



Quercétine-3-O-a-L-rhamnopyranoside





Figure III.161. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Eg10

Le spectre RMN <sup>1</sup>H effectué dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.162) révèle la présence des deux protons H-6 et H-8 repérés à  $\delta_{\rm H}$  6,20 (1H, *d*, 2,1 Hz) et 6,37 (1H, *d*, 2,1 Hz) respectivement, ainsi que les trois protons aromatiques H-5', H-6' et H-2' du cycle B à  $\delta_{\rm H}$  6,91 (1H, *d*, 8,3 Hz), 7,31 (1H, *dd*, 8,3, 2,1 Hz) et 7,33 (1H, *d*, 2,1 Hz) respectivement. Donc d'après ces données ainsi que celles issues des spectres RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé, HSQC et HMBC (Figures III.163, III.165 et III.166) on conclut que la génine est la quercetine.

Il reste donc à élucider la partie osidique de ce composé. Dans la zone des protons anomériques on distingue un signal sous forme d'un doublet très serré à  $\delta_H$  5,35 (1H, *d*, 1,5 Hz) attribué au proton H-1", un autre signal à 4,22 ppm (1H, *dd*, 3,3, 1,7), ensuite, trois signaux à 3,75 ppm (1H, *dd*, 9,3, 3,4 Hz), 3,42 ppm (1H, *m*) et 3,35 ppm (1H, *t*, 3,5 Hz). Dans la zone des protons blindés, on observe un grand signal sous forme d'un doublet d'intégration 3H qui résonne à 0,94 ppm (1H, *d*, 6,1 Hz) correspondant à un méthyle. Les constantes de couplage du proton anomérique H-1" et des protons du méthyle attestent que ce sucre est un deoxyhexose.



Figure III.162. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg10 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Figure III.163. Spectre RMN <sup>13</sup>C J-modulé du composé Eg10 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

L'analyse du spectre COSY (Figure III.164) permet d'identifier les protons de ce sucre. Commençant par le proton anomérique qui montre une tache de corrélation avec le proton à  $\delta_H$  4,22 (H-2"), ce dernier corrèle à son tour avec le proton H-3" résonant à 3,75 ppm. Le proton H-3" montre une tache de corrélation avec le proton à  $\delta_H$  3,35 assigné au proton H-4", tandis que le proton H-5" qui résonne à  $\delta_H$  3,42 couple avec le proton H-4" d'une part et les protons méthyliques H<sub>3</sub>-6" à 0,94 ppm d'autre part. Ces attributions conduisent à identifier ce sucre à un rhamnose.



Figure III.164. Spectre COSY du composé Eg10

En outre, les spectres RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé, HSQC et HMBC (Figures III.163, III.165 et III.166) permettent d'identifier les carbones de chaque proton ainsi que les carbones quaternaires. Sur le spectre HMBC, le proton anomérique indique une tache de correlation avec le carbone C-3, ce qui nous ammene à conclure que le rhamnose est porté sur le carbone C-3 de la quercetine.



Figure III.165. Spectre HSQC du composé Eg10



Figure III.166. Spectre HMBC du composé Eg10

A l'issue de cette analyse et la comparaison avec les données de la littérature (Kong et al., 2014), le composé **Eg10** (Figure III.160) est élucidé comme quercétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside. Ce produit présente des activités antioxydante, Antimalaria et antifongique (Babujanarthanam et al., 2011 ; Liu et al., 2007 ; Lu et al., 2002), et il a été purifié de plusieurs plantes telle que *Euphorbia petiolata* (Nazemiyeh et al., 2010 ; Liu et al., 2007), *Euphorbia characias* (Pisano et al., 2016), *Acacia saligna* (Fabacées) (El-toumy et al., 2010) et *Calligonum comosum* (Polygonacées) (Badria et al., 2007).

Eg10									
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	δ <sub>C</sub>				
2	/	159,2	1″	5,35, 1H, <i>d</i> , 1,5 Hz	103,5				
3	/	136,2	2″	4,22, 1H, <i>dd</i> , 3,3, 1,7 Hz	71,9				
4	/	179,6	3″	3,75, 1H, <i>dd</i> , 9,3, 3,4 Hz	72,1				
5	/	163,2	4″	3,35, 1H, <i>t</i> , 9,5 Hz	73,2				
6	6,20, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	99,8	5″	3,42, 1H, <i>m</i>	72,0				
7	/	165,8	6″	0,94, 1H, <i>d</i> , 6,1 Hz	17,9				
8	6,37, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	94,7							
9	/	158,4							
10	/	105,9							
1′	/	123,0							
2'	7,33, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	116,9							
3'	/	146,4							
4′	/	149,8							
5'	6,91, 1H, <i>d</i> , 8,3 Hz	116,4							
6'	7,31, 1H, <i>dd</i> , 8,3, 2,1 Hz	122,9							

Tableau III.21. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg10 dans CD<sub>3</sub>OD

# III.2.11. Elucidation structurale du composé Eg11

Le métabolite secondaire **Eg11** (Figure III.167) est purifié sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol, visible sous la lumière UV à 254 et 366 nm. Sa tache apparait sur CCM sous forme d'une tache jaune lors de la révélation avec l'acide sulfurique et le chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III.168) en mode positif du composé **Eg11** montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 487 \text{ [M+Na]}^+$ , soit une masse moléculaire de 464 Da correspond à une formule brute de C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>.



Myricétine-3-*O*-α-L-rhamnopyranoside

Figure III.167. Structure du composé Eg11



Figure III.168. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Eg11

Le spectre RMN <sup>1</sup>H (Figure III.169) montre des signaux dans trois parties distinctes :

-Partie aromatique  $6 < \delta_H > 7$ 

- -Partie osidique  $3 < \delta_H > 5,5$
- -Partie aliphatique  $\delta_{\rm H} = 0.96$

Ce spectre indique la présence de trois signaux dans la zone des aromatique, commençant par le doublet repéré à  $\delta_{\rm H}$  6,20 (1H, *d*, 2,1 Hz, H-6), ensuite l'autre doublet à  $\delta_{\rm H}$  6,37 (1H, *d*, 2,1 Hz, H-8), et le singulet d'intégration 2H qui résonne à  $\delta_{\rm H}$  6,95 (2H, *s*, H-2', H-6').



Figure III.169. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg11 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

Sur le spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé réalisé dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.170), on peut facilement identifier les carbones de cette partie qui est identique à celle du composé **Eg5**, donc la partie génine représente le squelette de la myricétine.

Passant à la partie osidique, on remarque que le proton anomérique H-1" résonne à  $\delta_{\rm H}$  5,32 avec une petite constante de couplage (J = 1,4 Hz). En plus, on observe un doublet à  $\delta_{\rm H}$  0,97 avec une constante de couplage de J = 6,2 Hz, ce qui nous oriente vers un sucre de type deoxyhexose.



Figure III.170. Spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé du composé Eg11 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

L'analyse des spectres COSY et HSQC et la mésure des valeurs des constantes de couplages atteste que cette partie est identique à celle du composé **Eg10** déterminée comme un rhamnose. Le point de branchement du rhamnose à l'aglycone (myricétine) en carbone C-3 a été établie selon l'analyse HMBC montrant une tache de corrélation entre le proton anomère H-1" et le carbone C-3. Le déplacement chimique du carbone C-2 (159,4 ppm) en apporte la confirmation.

Donc, la structure du produit **Eg11** (Figure III.167) a été identifiée à la myricétine-3-O- $\alpha$ -Lrhamnopyranoside (El-toumy et al., 2010). La littérature cite ce composé pour ces pouvoirs antioxydant et antimalaria, et dans plusieurs travaux phytochimiques sur des espèces telle que *Euphorbia hirta* (Liu et al., 2007), *Euphorbia aucherii* (Jassbi 2006), *Euphorbia petiolata* (Nazemiyeh et al., 2010), *Miconia albicans* (Melastomataceae) (Lima et al., 2018), *Homonoia riparia* (Euphorbiaceae) (Park et al., 2014) et *Acacia saligna* (Fabacées) (El-toumy et al., 2010).

Eg11									
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\rm C}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	δ <sub>C</sub>				
2	/	159,4	1″	5,32, 1H, <i>d</i> , 1,4	103,6				
3	/	136,3	2″	4,22, 1H, <i>dd</i> , 3,3, 1,7 Hz	71,8				
4	/	179,7	3″	3,79, 1H, <i>dd</i> , 9,6, 3,3 Hz	72,1				
5	/	163,2	4″	3,35, 1H, <i>t</i> , 5,0 Hz	73,3				
6	6,20, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	99,8	5″	3,52, 1H, <i>m</i>	72,0				
7	/	165,8	6″	0,97, 1H, <i>d</i> , 6,2 Hz	17,6				
8	6,37, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	94,6							
9	/	158,5							
10	/	105,9							
1′	/	121,9							
2'	6,95, 1H, <i>s</i>	109,5							
3'	/	146,8							
4′	/	137,9							
5'	/	146,8							
6'	6,95, 1H, <i>s</i>	109,5							
			1						

Tableau III.22. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg11 dans CD<sub>3</sub>OD

### III.2.12. Elucidation structurale du composé Eg12

Le produit **Eg12** (Figure III.171) est isolé sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il montre une tache visible sous UV à 254 et 366 nm, qui se colore en jaune après la révélation avec une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 499 [M+Na]^+$  est observé sur le spectre de masse ESI-MS (Figure III.172) de ce composé attestent de la présence d'une masse moléculaire de 476 Da avec une formule brute de C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>.



6"-méthyl kaempférol-3-*O*-β-D-glucuronide

Figure II1.171. Structure du composé Eg12



Figure III.172. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Eg12

Selon le spectre RMN <sup>1</sup>H effectué dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.173), les deux signaux à 6,23 et 6,42 ppm sous forme d'un doublet chacun avec J = 2,0 Hz sont assignés aux protons H-6 et H-8 respectivement des flavonoïdes. Les deux autres doublets d'intégration 2H chacun résonant à 6,87 et 8,03 ppm sont attribuables aux protons aromatiques (H-3', H-5') et (H-2', H-6') respectivement, la

constante de couplage (J = 8,9 Hz) et l'intégration des signaux indiquent que le noyau aromatique du cycle B est di-substitué en *para*, et présente une symétrie. Donc, on suggère la structure du kaempférol pour la partie génine.

Un proton anomérique avec une grande constante de couplage a été détecté à 5,26 ppm (1H, d, 7,5 Hz, H-1"), un autre signal apparu sous forme de singulet d'intégration 3H à 3,65 ppm correspond à un groupement méthoxyle.



Figure III.173. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg12 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

Les carbones des protons analysés sont détectés sur le spectre HSQC (Figure III.174) à  $\delta_{C}$  100,8 (C-6), 94,8 (C-8), 116,0 (C-3' et C-5'), 132,3 (C-2' et C-6'), 104,6 (C-1") et 52,8 (O-CH<sub>3</sub>).



Figure III.174. Spectre HSQC du composé Eg12

Le spectre COSY (Figure III.175) révèle un couplage entre le proton anomérique H-1" et le proton à  $\delta_{\rm H}$  3,45 (1H, *t*, 8,9 Hz) correspondant au proton H-2". Celui-ci corrèle avec le proton H-3" à  $\delta_{\rm H}$  3,48 (1H, *t*, 8,7 Hz), ce dernier présente une autre tâche de corrélation avec le proton H-4" qui résonne à  $\delta_{\rm H}$  3,55 (1H, *t*, 9,0 Hz). Le dernier couplage indiqué par le spectre COSY est assigné à la corrélation entre les deux protons H-4"/H-5" ( $\delta_{\rm H}$  3,75, 1H, *d*, 9,8 Hz).

On peut assigner facilement les carbones de ces protons du sucre à  $\delta_C$  75,4 (C-2"), 77,3 (C-3"), 72,8 (C-4"), 77,1 (C-5") par l'analyse de l'expèrience HSQC (Figure III.174).



Figure III.175. Spectre COSY du composé Eg12

Sur le spectre HMBC (Figure III.176), on remarque des taches de corrélation entre le proton H- 5" et les protons du méthoxyle H<sub>3</sub>-7" avec un carbone localisé dans la région des acides à  $\delta_{\rm C}$  170,5 attribuable au carbone C- 6". Donc, d'après les grandes constantes de couplage des protons du sucre, la multiplicité du proton H-5" et les corrélations détectées sur le spectre HMBC des protons H-5" et H<sub>3</sub>-7" avec le carbone de l'acide, tout cela implique la présence d'un acide glucuronique (ou glucuronide).



Figure III.176. Spectre HMBC du composé Eg12



Figure III.177. Corrélations HMBC au niveau de l'acide glucuronique

En se basant sur les données de la spectrométrie de masse, les analyses RMN 1D et 2D et la comparaison avec les données de la litérature (Zaghloul 1993), on identifie le composé **Eg12** (Figure III.171) comme 6"-méthyl kaempférol-3-O- $\beta$ -D-glucuronide, qui a été déjà isolé des espèces *Euphorbia wallichii* (Yang et al., 2015) et *Euphorbia dracunculoides* (Zaghloul 1993).

Tableau III.23. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg12 dans CD<sub>3</sub>OD

Eg12										
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\mathrm{C}}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$					
2	/	159,4	1″	5,26, 1H, <i>d</i> , 7,5 Hz	104,6					
3	/	135,3	2″	3,45, 1H, <i>t</i> , 8,9 Hz	75,4					
4	/	179,3	3″	3,48, 1H, <i>t</i> , 8,7 Hz	77,3					
5	/	163,1	4″	3,55, 1H, <i>t</i> , 9,0 Hz	72,8					
6	6,23, 1H, <i>d</i> , 2,0 Hz	100,0	5″	3,75, 1H, <i>d</i> , 9,8 Hz	77,1					
7	/	166,1	6″	/	170,5					
8	6,42, 1H, <i>d</i> , 2,0 Hz	94,8	7″	3,65, 3H, <i>s</i>	52,8					
9	/	158,5								
10	/	105,6								
1'	/	122,5								
2'	8,03, 1H, <i>d</i> , 8,9 Hz	132,3								
3'	6,87, 1H, <i>d</i> , 8,9 Hz	116,0								
4'	/	161,7								
5'	6,87, 1H, <i>d</i> , 8,9 Hz	116,0								
6′	8,03, 1H, <i>d</i> , 8,9 Hz	132,3								

#### III.2.13. Elucidation structurale du composé Eg13

Le métabolite secondaire **Eg13** (Figure III.178) est obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Il présente une fluorescence sous la lumière UV à 254 et 366 nm. Ainsi, la révélation de sa CCM avec l'acide sulfurique et le chauffage montre une tache jaune.

Le spectre de masse ESI-MS en mode négatif (Figure III.179) du composé **Eg13** montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 461 \text{ [M-H]}^{-}$ , correspondant à une masse moléculaire de 462 Da avec une formule brute de C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>12</sub>, soit une différence de -14 unités par rapport au produit **Eg12** (M = 476 Da).



Kaempférol-3-*Ο-β*-D-glucuronide



Figure III.178. Structure du composé Eg13

Figure III.179. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg13

La comparaison des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C enregistrés dans CD<sub>3</sub>OD (Figures III.180 et III.181) du composé **Eg13** avec ceux du composé **Eg12** précédemment identifié suggère une similitude structurale en ces deux produits. La différence réside dans la disparition des signaux du groupement méthoxyle observé dans le cas du composé **Eg12**. La diminition de la masse moléculaire de 14 unités confirme l'absence du groupement méthylique lié à l'acide glucuronique.



**Figure III.181.** Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé **Eg13** (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

Ceci nous conduit à proposer pour le métabolite secondaire **Eg13** la structure kaempférol-3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside (Satake et al., 2007). Ce composé antioxydant a été signalé dans de nombreuses investigations phytochimiques sur *Euphorbia hirta* (Mekam et al., 2019), *E. schimperi* (Ahmed et al., 2017), *Centella asiatica* (Apiaceae) (Satake et al., 2007) et *Calligonum comosum* (Polygonaceae) (Badria et al., 2007).

Eg13									
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$				
2	/	159,3	1″	5,27, 1H, <i>d</i> , 7,5 Hz	104,5				
3	/	135,5	2″	3,49, 1H, <i>t</i> , 8,8 Hz	75,3				
4	/	179,3	3″	3,45, 1H, <i>t</i> , 8,9 Hz	72,9				
5	/	163,0	4″	3,57, 1H, <i>t</i> , 9,4 Hz	77,6				
6	6,21, 1H, <i>sl</i>	100,0	5″	3,71, 1H, <i>d</i> , 9,7 Hz	77,0				
7	/	166,1	6″	/	173,2				
8	6,40, 1H, <i>sl</i>	94,8							
9	/	158,5							
10	/	105,6							
1′	/	122,4							
2'	8,04, 1H, <i>d</i> , 8,6 Hz	132,4							
3'	6,86, 1H, <i>d</i> , 8,6 Hz	116,1							
4′	/	161,7							
5'	6,86, 1H, <i>d</i> , 8,6 Hz	116,1							
6'	8,04, 1H, <i>d</i> , 8,6 Hz	132,4							

Tableau III.24.	Déplacements	chimiques en	RMN <sup>1</sup> H	et <sup>13</sup> C du o	composé <b>E</b>	E <b>g13</b> dar	ns CD3OD
-----------------	--------------	--------------	--------------------	-------------------------	------------------	------------------	----------

### III.2.14. Elucidation structurale du composé Eg14

Le composé **Eg14** (Figure III.182) a été isolé sous forme d'une poudre amorphe blanche soluble dans le méthanol. La CCM de ce produit montre une tache visible sous lumière UV à 254 et 366 nm, se révèlant en coloration jaune par l'acide sulfurique et chauffage.

Le produit **Eg14** révèle un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 477 \text{ [M-H]}^{-}$  sur son spectre de masse ESI-MS en mode négatif (Figure III.183), il correspond à une masse moléculaire de 478 Da et

une formule brute de  $C_{21}H_{18}O_{13}$ , soit une différence de +16 par rapport au composé **Eg13** (M = 462 Da).



Quercétine-3-*O*-β-D-glucuronopyranoside





Figure III.183. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg14

Les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C réalisés dans CD<sub>3</sub>OD (Figures III.184 et III.185) attestent qu'il y a une similarité entre les deux composés **Eg14** et **Eg10** (Figures III.162 et III.163) dans la partie génine (quercétine), et que la partie osidique et identique à celle du produit **Eg13** (Figures III.180 et III.181) (acide glucuronique).

En effet, le spectre RMN <sup>1</sup>H indique clairement les trois fragments, premièrement, les trois protons H-2', H-6' et H-5' du cycle B, ensuite, les deux doublets à  $\delta_{\rm H}$  6,40 et 6,20 attribuables aux

protons H-8 et H-6 du cycle A. La partie osidique est aussi très claire avec de grandes constantes de couplages, un doublet du proton anomérique à  $\delta_{\rm H}$  5,31 (J = 7,6 Hz), les trois triplets à  $\delta_{\rm H}$  3,59 (1H, 9,1 Hz, H-4"), 3,47 (1H, 9,0 Hz, H-3") et 3,53 (1H, 9,0 Hz, H-2"), le dernier signal à attribuer est celui du proton H-5" à  $\delta_{\rm H}$  3,78 (d, 9,2 Hz).



Figure III.184. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg14 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Figure III.185. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Eg14 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

L'analyse des spectre RMN et masse, et la comparaison avec la littérature (Satake et al., 2007), permettent d'attribuer la structure quercétine-3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside au produit **Eg14** (Figure III.182). La littérature indique que ce composé révèle une bonne activité antioxydante et il est obtenus à partir des mêmes plantes que le produit **Eg13**.

	Eg14									
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	δ <sub>C</sub>	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	δ <sub>C</sub>					
2	/	159,1	1″	5,31, 1H, <i>d</i> , 7,6 Hz	104,4					
3	/	135,6	2″	3,53, 1H, <i>t</i> , 9,0 Hz	75,4					
4	/	179,3	3″	3,47, 1H, <i>t</i> , 9,0 Hz	73,0					
5	/	163,0	4″	3,59, 1H, <i>t</i> , 9,1 Hz	77,7					
6	6,20, 1H, <i>d</i> , 1,4 Hz	100,0	5″	3,78, 1H, <i>d</i> , 9,2 Hz	77,2					
7	/	166,1	6″	/	173,6					
8	6,40, 1H, <i>d</i> , 1,4 Hz	94,8								
9	/	158,5								
10	/	105,7								
1′	/	122,8								
2′	7,71, 1H, <i>d</i> , 1,5 Hz	117,4								
3'	/	146,0								
4′	/	149,9								
5'	6,85, 1H, <i>d</i> , 8,5 Hz	116,1								
6′	7,58, 1H, <i>dd</i> , 8,4, 1,5 Hz	123,3								

Tableau III.25. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg14 dans CD<sub>3</sub>OD

## III.2.15. Elucidation structurale du composé Eg15

Le produit **Eg15** (Figure III.186) est obtenu sous forme d'une poudre amorphe blanche soluble dans le méthanol. Il montre une tache visible sous UV à 254 et 366 nm sur sa CCM, qui se révèle avec une couleur jaune très claire lors de la révélation avec l'acide sulfurique et le chauffage.

Un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 507 \text{ [M-H]}^-$  visualisé sur le spectre de masse ESI-MS en mode négatif (Figure III.187) du composé **Eg15**, implique une masse moléculaire de 508 Da et une formule brute de C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>O<sub>14</sub>.



6"-méthyl myricétine-3-O-β-D-glucuronopyranoside

Figure III.186. Structure du composé Eg15



Figure III.187. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg15

Les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C (Figures III.188 et III.189) du composé **Eg15** exhibitent une similitude structurale avec ceux des composés **Eg11** (Figures III.169 et III.170) (partie aglycone) et **Eg12** (Figure III.173) (partie osidique). En effet, le singulet d'intégration 2H à  $\delta_H$  7,22 (H-2' et H-6') sur le spectre RMN <sup>1</sup>H, ainsi que les deux doublets à  $\delta_H$  6,40 (H-8) et 6,21 (H-6), requièrent la présence de la myricétine comme partie génine.
L'anomére qui résonne à  $\delta_{\rm H}$  5,23 (1H, *d*, 7,8 Hz, H-1"), en plus du doublet du proton H-5" avec les trois triplets localisés entre 3,40 et 3,60 ppm (H-4", H-2" et H-3") suggèrent la présence de l'acide glucuronique.

Un méthoxyle à  $\delta_{\rm H}$  3,67 est forcément lié au carbone C-6" (équivalent au méthoxyle du produit **Eg12**).



Figure III.188. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg15 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

Les carbones du composé **Eg15** sont facilement attribuables sur le spectre RMN <sup>13</sup>C (Figure III.189).



Figure III.189. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Eg15 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

A l'issue de cette analyse et la comparaison avec la littérature le métabolite secondaire **Eg15** (Figure III.186) est élucidé comme 6"-méthyl myricétine-3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside. On note que ce produit est isolé pour la première fois du genre *Euphorbia* et pour la deuxième fois de la règne végétale après sa purification de l'espèce *Lumnitzera racemosa* (Combretaceae) (Gomaa Darwish et al., 2016). Ainsi, il présente une bonne activité antioxydante et antiinflammatoire (Hiermann et al., 1998).

Eg15								
Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{C}$	Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{C}$			
2	/	159,4	1″	5,23, 1H, <i>d</i> , 7,8 Hz	104,7			
3	/	135,5	2″	3,55, 1H, <i>t</i> , 9,1 Hz	75,2			
4	/	179,2	3″	3,45, 1H, <i>t</i> , 9,1 Hz	78,4			
5	/	163,0	4″	3,58, 1H, <i>t</i> , 9,1 Hz	72,7			
6	6,21, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	99,9	5″	3,76, 1H, <i>d</i> , 9,8 Hz	78,1			
7	/	166,1	6″	/	170,9			
8	6,40, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	94,7	7″	3,67, 3H, <i>s</i>	53,0			
9	/	158,4						
10	/	105,6						
1′	/	121,8						
2'	7,22, 1H, <i>s</i>	109,9						
3'	/	146,4						
4′	/	138,1						
5'	/	146,4						
6′	7,22, 1H, <i>s</i>	109,9						

Tableau III.26. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg15 dans CD<sub>3</sub>OD

# III.2.16. Elucidation structurale du composé Eg16

Le métabolite secondaire **Eg16** (Figure III.190) est purifié sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il est visible sous la lumière UV à 254 et 366 nm, se colorant en jaune après la révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS en mode négatif du produit **Eg16** (Figure III.191) permet de visualiser un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z = 493 [M-H]<sup>-</sup>, indiquant une masse moléculaire de 494 Da qui correspond à une formule brute en C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>14</sub>.



Myricétine-3-*O*-β-D-glucuroonopyranoside



Figure III.190. Structure du composé Eg16

Figure III.191. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg16

Vu la similarité entre les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C des composés **Eg16** (Figures III.192 et III.193) et **Eg15** (Figures III.188 et III.189), la différence de masse moléculaire de -14 Da entre les deux composés (Figures III.191 et III.187), l'absence du pic du groupement méthoxyle sur le spectre

RMN <sup>1</sup>H et son carbone sur le spectre RMN <sup>13</sup>C, on déduit que le produit **Eg16** (Figure III.190) est la myricétine-3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside (Hilbert et al., 2014).



Figure III.192. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg16 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Figure III.193. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Eg16 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

On tient à signaler l'isolement de ce composé pour la première fois du genre *Euphorbia*. Il présente une activité antiinflammatoire (Hiermann et al., 1998), et il est obtenu antérieurement à partir de *Schinus terebinthifolia* (Anacardiaceae) (Iwanaga et al., 2018) er *Malva verticillata* (Malvaceae) (Bao et al., 2017).

Eg16								
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\mathrm{C}}$			
2	/	159,2	1″	5,37, 1H, <i>d</i> , 7,7 Hz	104,4			
3	/	135,8	2″	3,56, 1H, <i>t</i> , 9,0 Hz	75,5			
4	/	179,3	3″	3,50, 1H, <i>t</i> , 9,0 Hz	73,3			
5	/	163,0	4″	3,60, 1H, <i>t</i> , 9,0 Hz	78,0			
6	6,20, 1H, <i>d</i> , 2,0 Hz	99,9	5″	3,68, 1H, <i>d</i> , 9,7 Hz	77,8			
7	/	166,1	6″	/	175,6			
8	6,39, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	94,6						
9	/	158,4						
10	/	105,6						
1′	/	121,6						
2'	7,36, 1H, <i>s</i>	109,9						
3'	/	146,5						
4′	/	138,0						
5'	/	146,5						
6'	7,36, 1H, <i>s</i>	109,9						

Tableau III.27. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg16 dans CD<sub>3</sub>OD

### III.2.17. Elucidation structurale du composé Eg17

Le composé **Eg17** (Figure III.194) est isolé sous forme d'une poudre jaune amorphe soluble dans le méthanol. Il est visible sous lumière UV à 254 et 366 nm et il apparait sous forme d'une tache jaune foncé sur la CCM lors de la révélation avec l'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS de ce produit (Figure III.195) enregistré en mode positif montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à m/z = 623 [M+Na]<sup>+</sup>, soit une masse moléculaire de 600 Da pour une formule brute de C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>O<sub>15</sub>.



Quercétine-3-0-(2"-0-galloyl)-a-L-rhamnopyranoside

Figure III.194. Structure du composé Eg17



Figure III.195. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Eg17

L'analyse combinée des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C *J*-modulé effectués dans CD<sub>3</sub>OD des composés **Eg17** (Figures III.196 et III.197) et **Eg10** (Figure III.162 et III.163) permet d'identifier le fragment quercétine-3-*O*-rhamnopyranose où le proton H-2″ du rhamnose est déplacé vers les champs faibles. Sur le spectre RMN <sup>1</sup>H de **Eg17** on observe en plus, un signal sous forme d'un singulet d'intégration 2H à  $\delta_{\rm H}$  7,08 correspondant à deux protons aromatiques équivalents. En outre, on remarque la présence de sept carbones de plus sur le spectre RMN <sup>13</sup>C dont un résonne dans la zone des esters à  $\delta_{\rm C}$  167,4, ce qui implique l'existence d'un autre noyau aromatique symétrique tetra-substitué, dont un des substituants est une fonction ester.



Figure III.196. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg17 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Figure III.197. Spectre RMN <sup>13</sup>C J-modulé du composé Eg17 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

Avec le spectre COSY (Figure III.198), on peut attribuer facilement les protons du rhamnose, et confirmer la position du proton H-2" à  $\delta_{\rm H}$  5,63 sous forme d'un doublet de doublets très serré, avec J = 3,3 et 1,8 Hz suite à son couplage avec le proton anomère H-1" repèré à 5,50 ppm (d, 1,6 Hz) et le proton H-3" qui résonne à 4,05 ppm (dd, 9,2, 3,4 Hz). Les deux protons H-4" et H-5" donnent deux signaux superposés sous forme d'un multiplet à 3,45 ppm. Le dernier doublet détecté est attribué au méthyle H<sub>3</sub>-6" (J = 5,7 Hz) du rhamnose.



Figure III.198. Spectre COSY du composé Eg17

Les carbones de la partie quercétine-3-*O*-rhamnose sont attribuables à l'aide des expériences HSQC et HMBC (Figures III.199 et III.200). Les carbones correspondant aux protons singulets H-2" et H-6" sont détectés à  $\delta_C$  110,4 (C-2" et C-6") selon l'HSQC.



Figure III.199. Spectre HSQC du composé Eg17

Le spectre HMBC (Figures III.200 et II.201) montre des taches de corrélations des protons H-2"' et H-6"' avec quatre carbones différents à  $\delta_C$  121,2 (C-1"'), 140,0 (C-4"') et 146,5 correspondant aux deux carbones aromatiques oxygénés équivalent C-3"' et C-5"'. La dernière tache de corrélation implique les protons H-2"', H-6"' et H-2" avec le carbone de l'ester à  $\delta_C$  167,4 (C-7"'). Cela atteste que le deuxième groupement est le gallate, et qu'il est accroché au carbone C-2" du rhamnosyle.



Figure III.200. Spectre HMBC du composé Eg17



Figure III.201. Corrélations HMBC montrant l'attachement du gallate au rhamnose

Toutes ces analyses spectroscopiques et la comparaison avec les données de la littérature (Isobe et al., 1981) conduisent à élucider la structure du composé **Eg17** (Figure III.194) comme quercétine-3-O-(2"-O-galloyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside. Ce produit antioxydant est trouvé pour la première fois dans le genre *Euphorbia*, il est sité dans de nombreuse travaux entérieurs sur les espèces telles que *polygonum filiforme* (Polygonacéeae) (Isobe et al., 1981), *Miconia albicans* (Melastomataceae) (Lima et al., 2018), *Acer ginnala* (Sapindaceae) (Li et al., 2013) et *Limonium sinense* (Plumbaginaceae) (Lin et al., 2000).

Eg17								
Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{\mathrm{C}}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$			
2	/	159,3	1″	5,50, 1H, <i>d</i> , 1,6 Hz	100,5			
3	/	135,6	2″	5,63, 1H, <i>dd</i> , 3,3, 1,8 Hz	73,5			
4	/	179,4	3″	4,05, 1H, <i>dd</i> , 9,2, 3,4 Hz	70,7			
5	/	163,2	4″	3,45, 1H, <i>m</i>	73,8			
6	6,20, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	99,9	5″	3,45, 1H, <i>m</i>	72,2			
7	/	165,9	6″	1,03, 3H, <i>d</i> , 5,7 Hz	17,8			
8	6,38, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	94,7	1‴′	/	121,2			
9	/	158,5	2‴′	7,08, 1H, <i>s</i>	110,4			
10	/	105,9	3‴′	/	146,5			
1'	/	122,8	4‴′	/	140,0			
2'	7,37, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	116,9	5"'	/	146,5			
3'	/	146,4	6‴′	7,08, 1H, <i>s</i>	110,4			
4′	/	149,9	7″′	/	167,4			
5'	6,95, 1H, <i>d</i> , 8,3 Hz	116,5						
6′	7,35, 1H, <i>dd</i> , 8,2, 2,1 Hz	122,9						

Tableau III.28. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg17 dans CD<sub>3</sub>OD

### III.2.18. Elucidation structurale du composé Eg18

Le produit **Eg18** (Figure III.202) est purifié sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Ce composé est visible sous UV à 254 et 366 nm, et donne une tache jaune foncé sur sa CCM après une révélation avec une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS en mode négatif (Figure III.203) montre un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z = 599 \text{ [M-H]}^-$ , indiquant une masse moléculaire de 600 Da et C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>O<sub>15</sub> comme formule brute. Il est à noté que les composés **Eg18** et **Eg17** possèdent la même masse moléculaire.



Quercétine-3-O-(3"-O-galloyl)-α-L-rhamnopyranoside





Figure III.203. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg18

La comparaison des spectres RMN <sup>1</sup>H et COSY du composé **Eg18** (Figures III.204 et III.205) avec ceux du produit **Eg17** (Figures III.196 et III.198) révèle que dans **Eg18**, le signal du proton H-2" ( $\delta_{\rm H}$  4,48, *dd*, 3,1, 1,5 Hz) est blindé alors que le signal du proton H-3" est déblindé ( $\delta_{\rm H}$  5,23, *dd*, 10,0,

3,0 Hz). Avec ces données, et la comparaison avec celles obtenues de la littérature (Lin et al., 2002), on assigne la structure quercétine-3-O-(3"-O-galloyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside au produit **Eg18**.



Figure III.204. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg18 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Notre travail décrie cette molécule antioxydante pour la première fois dans le genre *Euphorbia*. Par ailleur, elle est isolé antérieurement à partir de quelques plantes des autres genres comme *Pyrus*  ussuriensis (Rosaceae) (Qiu et al., 2018), Rhus typhina (Anacardiaceae) (Qiu et al., 2016) et Acer ginnala (Sapindaceae) (Li et al., 2013).

Eg18								
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\mathrm{C}}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$			
2	/	159,3	1″	5,39, 1H, <i>d</i> , 1,1 Hz	103,5			
3	/	136,2	2″	4,48, 1H, <i>dd</i> , 3,1, 1,5 Hz	70,8			
4	/	179,5	3″	5,23, 1H, <i>dd</i> , 10,0, 3,0 Hz	75,3			
5	/	163,3	4″	3,67, 1H, <i>t</i> , 10,0 Hz	72,3			
6	6,21, 1H, <i>d</i> , 2,0 Hz	99,8	5″	3,59, 1H, <i>m</i>	70,0			
7	/	165,9	6″	1,00, 3H, <i>d</i> , 6,1 Hz	17,7			
8	6,39, 1H, <i>d</i> , 2,0 Hz	94,7	1‴′	/	121,7			
9	/	158,6	2‴′	7,17, 1H, <i>s</i>	110,5			
10	/	105,9	3‴′	/	146,5			
1′	/	122,9	4‴′	/	140,0			
2'	7,40, 1H, <i>d</i> , 2,1 Hz	116,8	5‴′	/	146,5			
3'	/	146,4	6‴′	7,17, 1H, <i>s</i>	110,5			
4′	/	149,9	7‴′	/	167,2			
5'	6,95, 1H, <i>d</i> , 8,2 Hz	116,5						
6′	7,40, 1H, <i>dd</i> , 8,2, 2,1 Hz	123,1						

Tableau III.29. Déplacements chimiques en	n RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du composé	Eg18 dans CD3OD
---	--	-----------------

# III.2.19. Elucidation structurale du composé Eg19

Ce produit **Eg19** (Figure III.206) est obtenu sous forme d'une poudre jaune visible sous UV à 254 et 366 nm et soluble dans le méthanol. Il montre une tache jaune foncé sur la CCM après la révélation avec l'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS en mode négatif (Figure III.207) de ce composé présente un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 615 \text{ [M-H]}^{-}$ , soit une masse moléculaire de 616 Da correspondant à une formule brute en C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>O<sub>16</sub>.



Myricétine-3-O-(2"-O-galloyl)-α-L-rhamnopyranoside





Figure III.207. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg19

L'analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et COSY enregistrés dans CD<sub>3</sub>OD (Figures III.208, III.209 et III.210) du produit **Eg19** et la comparaison avec les spectres déjà caractérisés du produit **Eg11** (Figure III.169 et III.170) et **Eg17** (Figure III.196, III.197 et III.198) montrent une grande similarité structurale.



Figure III.208. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg19 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Figure III.209. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Eg19 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)



Figure III.210. Spectre COSY du composé Eg19

A cet effet, cette comparaison est refaite une deuxième fois avec les données de la littérature (Lee et al., 2017), le composé **Eg19** (Figure III.206) est élucidé comme myricétine-3-O-(2"-O-galloyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside. Ce produit est considéré comme une molécule isolée du genre *Euphorbia* pour la première fois. La littérature a mentionné la présence de cet flavonoide dans des espèces comme *Myrica rubra* (Myricaceae) (Kim et al., 2013) et *Limonium sinense* (Plumbaginaceae) (Lin et al., 2000), ainsi, la molécule trouvé a révélé des bonnes activités antioxydante et antiinflammatoire (Kim et al., 2013).

Eg19							
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\mathrm{C}}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$		
2	/	159,4	1″	5,51, 1H, <i>d</i> , 1,1 Hz	100,5		
3	/	165,6	2″	5,63, 1H, <i>dd</i> , 3,1, 1,5 Hz	73,5		
4	/	179,4	3″	4,04, 1H, <i>dd</i> , 8,9, 3,2 Hz	70,7		
5	/	163,2	4″	3,49, 1H, <i>m</i>	73,9		
6	6,20, 1H, <i>d</i> , 2,0 Hz	99,8	5″	3,49, 1H, <i>m</i>	72,2		
7	/	165,9	6″	1,04, 3H, <i>d</i> , 5,78 Hz	17,2		
8	6,36, 1H, <i>d</i> , 2,0 Hz	94,7	1‴	/	121,3		

Tableau III.30. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg19 dans CD<sub>3</sub>OD

9	/	158,5	2"'	7,08, 1H, <i>s</i>	110,4
10	/	105,9	3‴′	/	146,5
1'	/	121,8	4‴′	/	140,0
2'	6,98, 1H, s	109,6	5"'	/	146,5
3'	/	146,9	6"'	7,08, 1H, <i>s</i>	110,4
4'	/	138,0	7"′	/	167,5
5'	/	146,9			
6′	6,98, 1H, <i>s</i>	109,6			

# III.2.20. Elucidation structurale du composé Eg20

Le composé **Eg20** (Figure III.211) est purifié sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol, visible sous la lumière UV à 254 et 366 nm. Sa tache apparait sur CCM sous forme d'une tache jaune foncé lors de la révélation avec l'acide sulfurique et le chauffage.

Ce composé montre un pic d'ion pseudo-moléculaire sur son spectre de masse ESI-MS en mode négatif (Figure III.212) identique à celui du produit **Eg19** (Figure III.207), à  $m/z = 615 \text{ [M-H]}^-$ , avec une masse moléculaire de 616 Da et une formule brute en C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>O<sub>16</sub>.



Myricétine-3-O-(3"-O-galloyl)-α-L-rhamnopyranoside

Figure III.211. Structure du composé Eg20



Figure III.212. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg20

Les spectres RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et COSY des composés **Eg20** (Figures III.213, III.214 et III.215) et **Eg19** (Figures III.208, III.209 et III.210) sont presque identiques, il n'y a que le changement des déplacements chimiques des protons H-2" et H-3" du rhamnose, et vu qu'ils ont la même masse moléculaire, on déduit que le produit **Eg20** (Figure III.211) a la structure suivante : myricétine-3-O-(3"-O-galloyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (Sun et al., 1991).



Figure III.213. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg20 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Figure III.214. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Eg20 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)



Figure III.215. Spectre COSY du composé Eg20

Ce composé (**Eg20**) est isolé pour la premièr fois du genre *Euphorbia*, il possède une activité cytotoxique moyenne, et il est purifié antérieurement à partir des plantes suivante *Ardisia insularis* (Primulaceae) (Van et al., 2015), *Memecylon polyanthum* (Polyanthumin) (Chen et al., 2014) et *Limonium sinense* (Plumbaginaceae) (Lin et al., 2000).

	Tableau III.31. De	éplacements chimic	ues en RMN <sup>1</sup>	H et <sup>13</sup> C du com	posé Eg20 dans CD3OD
--	--------------------	--------------------	-------------------------	-----------------------------	----------------------

Eg20								
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{C}$			
2	/	159,5	1″	5,29, 1H, <i>d</i> , 1,3 Hz	103,8			
3	/	136,5	2″	4,29, 1H, <i>dd</i> , 3,3, 1,3 Hz	70,9			
4	/	179,6	3″	5,26, 1H, <i>dd</i> , 9,5, 3,3 Hz	75,4			
5	/	163,3	4″	3,71, 1H, <i>m</i>	72,3			
6	6,21, 1H, <i>d</i> , 1,9 Hz	99,8	5″	3,71, 1H, <i>m</i>	70,0			
7	/	165,9	6″	1,02, 1H, <i>d</i> , 5,8 Hz	17,7			
8	6,38, 1H, <i>d</i> , 1,9 Hz	94,7	1‴	/	121,7			
9	/	158,6	2‴′	7,18, 1H, <i>s</i>	110,5			
10	/	105,9	3‴′	/	146,4			
1'	/	121,9	4‴′	/	139,9			
2'	7,00, 1H, <i>s</i>	109,6	5‴′	/	146,4			
3'	/	146,9	6‴′	7,18, 1H, <i>s</i>	110,5			
4'	/	138,9	7″′	/	168,4			
5'	/	146,9						
6′	7,00, 1H, <i>s</i>	109,6						

# III.2.21. Elucidation structurale du composé Eg21

Le produit **Eg21** (Figure III.216) est isolé sous forme d'une poudre marron soluble dans le méthanol. Il montre une tache visible sous UV à 254 nm, se colorant en rose après la révélation avec une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Son spectre de masse ESI-MS en mode positif (Figure III.217) révèle un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z = 459 [M+Na]^+$ , correspondant à une masse moléculaire de 436 Da et une formule brute de C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub>.



Figure III.216. Structure du composé Eg21



Figure III.217. Spectre de masse ESI-MS (en mode positif) du composé Eg21

Le spectre RMN <sup>1</sup>H réalisé dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.218) montre la présence d'un cycle aromatique di-substitué en *para* représenté par deux signaux sous forme de doublet d'intégration 2H chacun à 7,06 ppm (2H, *d*, 8,5 Hz, H-2 et H-6) et 6,51 ppm (2H, *d*, 8,5 Hz, H-3 et H-5). Le spectre <sup>1</sup>H révèle aussi un singulet d'intégration 2H qui résonne à 6,11 ppm (H-3' et H-5') caractéristique d'un noyau aromatique symétrique tétra-substitué. Les carbones de ces protons sont identifiés à l'aide de l'expérience HSQC (Figure III.219) à  $\delta_{\rm C}$  130,3 (C-2 et C-6), 116,1 (C-3 et C-5) et 96,4 (C-3' et C-5').



Figure III.218. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg21 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Figure III.219. Spectre HSQC du composé Eg21

Un signal d'un proton anomérique est observé sur le spectre <sup>1</sup>H à 4,95 ppm (1H, *d*, 7,3 Hz, H-1"), les autres protons du sucre sont facilement attribuables avec le spectre COSY (Figure III.220) à  $\delta_{\rm H}$  3,43 (1H, *t*, 9,0 Hz, H-2"), 3,48 (1H, *t*, 8,4 Hz, H-3"), 3,41 (1H, *t*, 9,1 Hz, H-4"), 3,46 (1H, *m*, H-5"), 3,93 (1H, *dd*, 12,1, 2,1 Hz, H-6"a) et 3,74 (1H, *dd*, 12,1, 5,4 Hz, H-6"b). L'hexose présent dans la

molécule est identifié comme  $\beta$ -D-glucose, vu les grandes constantes de couplage entre les protons H-1"/H-2" et H-3"/H-4".

Deux signaux de groupement méthylène résonnent à  $\delta_H$  3,33 (2H, *m*, H-8) et 2,88 (2H, *t*, 8,1 Hz, H-7) corrèlant ensemble sur le spectre COSY. Leurs carbones C-8 et C-7 sont identifiés sur le spectre HSQC à  $\delta_C$  31,2 et 14,6 respectivement.



Figure III.220. Spectre COSY du composé Eg21

A ce niveau, tout les signaux ont été attribués permettant de former quatre fragments représentés par un cycle aromatique symétrique tetra-substitué (cycle B), un autre noyau aromatique symétrique di-substitué en *para* (cycle A), un glucose et une chaine contenant deux CH<sub>2</sub>.

L'analyse combinée des spectres RMN <sup>13</sup>C et HMBC effectué dans CD<sub>3</sub>OD (Figures III.221 et III.222) permet d'identifier le reste des carbones des deux cycles A et B. Les protons H-3 et H-5 du cycle A corrèlent avec un carbone aromatique non oxygéné à  $\delta_C$  133,8 correspondant au carbone C-1, ces protons ainsi que les protons H-2 et H-6 montrent une tache de corrélation avec un carbone oxygéné à  $\delta_C$  156,5 attribuable au carbone C-4.



Figure III.221. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Eg21 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)



Figure III.222. Spectre HMBC du composé Eg21

Les protons H<sub>2</sub>-7 et H<sub>2</sub>-8 couplent avec le carbone C-1 du cycle A, tandis que, les protons H<sub>2</sub>-7 corrèle avec les carbones C-2 et C-6 ce qui signifie que, le carbone C-1 est substitué par le groupement méthylène CH<sub>2</sub>-7, et l'autre méthylène CH<sub>2</sub>-8 est attaché au premier afin d'avoir le fragment *para*-éthylphénol (Figure III.223).



Figure III.223. Fragment para-ethylphénol du composé Eg21

Les deux protons H-3' et H-5' du cycle B révélent des taches de corrélation avec un carbone non oxygéné à 106,8 ppm correspondant au carbone C-1', ainsi, une autre tache avec un carbone oxygéné à 165,0 ppm définie le carbone C-4'.

Ces deux protons (H-3' et H-5'), en plus des protons H-7 et H-8 montrent un couplage avec un carbone dans la zone des cétones à 207,0 ppm indiquent la présence d'une cétone (C-9), et que cette fonction relie le cycle B et le *para*-éthylphénol (Figure III.224).



Figure III.224. Fragment 1-(9-oxo-(2',4',6'-trihydroxyphenyl) propyl) 4-hydroxyphenyl du composé Eg21

En arrivant à ce stade, il nous reste qu'à attacher le dernier fragment qui est le glucose. Pour cela, on analyse les corrélations du proton anomérique afin de déterminer le carbone qui porte le sucre, on remarque qu'il existe un couplage en  ${}^{3}J$  entre le proton anomérique et le carbone C-4' du cycle B.

Donc la structure finale du composé **Eg21** sera élucidée comme le trilobatine. Notre travail décrie la première purification de cette molécule à partir des espèces du genre *Euphorbia*. Il détient des capacités antioxydante et antiviral (Yin et al., 2018). Ainsi, il est obtenu à partir des espèces *Malus* 

*domestica* (Rosaceae) (Dugé de Bernonville et al., 2009), *Lithocarpus polystachyus* (Fagaceae) (Yang et al., 2018) et *Homalium stenophyllum* (Salicaceae) (Wu et al., 2018).

Eg21									
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$				
1	/	133,8	1″	4,95, 1H, <i>d</i> , 7,3 Hz	101,1				
2	7,06, 1H, <i>d</i> , 8,5 Hz	130,3	2″	3,43, 1H, <i>t</i> , 9,0 Hz	74,6				
3	6,51, 1H, <i>d</i> , 8,5 Hz	116,1	3″	3,48, 1H, <i>t</i> , 8,4 Hz	77,9				
4	/	156,5	4″	3,41, 1H, <i>t</i> , 9,1 Hz	71,1				
5	6,51, 1H, <i>d</i> , 8,5 Hz	116,1	5″	3,46, 1H, <i>m</i>	78,3				
6	7,06, 1H, <i>d</i> , 8,5 Hz	130,3	6″a	3,93, 1H, <i>dd</i> , 12,1, 2,1 Hz	62,3				
7	2,88, 2H, t, 8,1 Hz	31,2	6″b	3,74, 1H, <i>dd</i> , 12,1, 5,4 Hz					
8	3,33, 2H, <i>m</i>	14,6							
9	/	207,0							
1'	/	106,8							
2'	/	165,4							
3'	6,11, 1H, <i>s</i>	96,4							
4'	/	165,0							
5'	6,11, 1H, s	96,4							
6′	/	165,4							

Tableau III.32. Déplacements ch	nimiques en RMN <sup>1</sup> H et	<sup>13</sup> C du composé <b>Eg21</b> dans CD <sub>3</sub> OD
---------------------------------	-----------------------------------	--

# III.2.22. Elucidation structurale du composé Eg22

Le composé **Eg22** (Figure III.225) est obtenu sous forme d'une poudre marron soluble dans le méthanol. Il présente une fluorescence sous la lumière UV à 254 nm, ainsi, la révélation de sa CCM avec l'acide sulfurique et le chauffage montre une tache violée.

Deux pics d'ions pseudo-moléculaires sont observés sur le spectre de masse ESI-MS en mode négatif (Figure III.226) du composé **Eg22** à m/z = 371 [M-H]<sup>-</sup> et 417 [M+HCOO]<sup>-</sup>, indiquant une masse moléculaire de 372 Da et une formule brute de C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>.



Figure III.225. Structure du composé Eg22



Figure III.226. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg22

Le spectre RMN <sup>1</sup>H enregistré dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.227) indique trois signaux de protons aromatiques d'intégration 1H chacun, sous forme d'un grand doublet, un petit doublet et un doublet de doublets correspodant aux protons localisés à  $\delta_{\rm H}$  7,07 (1H, *d*, 8,2 Hz, H-6), 6,87 (1H, *d*, 1,8 Hz, H-3) et 6,75 (1H, *dd*, 8,2, 1,8 Hz, H-5) respectivement. Un doublet d'un proton anomérique à  $\delta_{\rm H}$  4,85, en plus de cinq signaux d'un sucre. Ces protons sont facilement attribuables sur le spectre COSY (Figure III.228). La mésure des constantes de couplages de ce sucre atteste qu'il s'agit bien d'un glucose de configuration  $\beta$ .

Deux signaux sous forme de singulet et d'intégration 3H chacun, résonant à  $\delta_H$  3,85 et 3,64 indiquent la présence de deux groupements méthoxyles. Les derniers signaux du spectre <sup>1</sup>H révèlent la présence de deux méthylènes à  $\delta_H$  2,87 et 2,62 nommés H-1' et H-2', ces protons couples sur le spectre COSY.



Figure III.227. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg22 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Figure III.228. Spectre COSY du composé Eg22

Le spectre HSQC (Figure III.229) permet la coordination entre les protons déjà identifiés et leurs carbones.



Figure III.229. Spectre HSQC du composé Eg22

L'analyse des spectres RMN <sup>13</sup>C et HMBC (Figures III.230 et III.231) conduit à l'identification du reste des carbones de la molécule. Commençant par les corrélations entre les protons H-3, H-5 et H-6 du cycle aromatique et les carbones qui résonnent à  $\delta_C$  146,4, 150,7 et 137,0 assignés aux carbones C-1, C-2 et C-4 respectivement. Les protons du groupement méthoxyle H-5' corrèle avec le carbone C-2, ce qui permet de positionner ce méthoxyle en C-2.

Le couplage en <sup>3</sup>*J* entre le proton anomérique H-1" et le carbone C-1 indique que le glucose est porté sur le carbone C-1 du cycle aromatique. Les deux groupements méthylènes H<sub>2</sub>-1' et H<sub>2</sub>-2' montrent des taches de corrélation avec le carbone C-4, suggérant que la chaine latérale est attachée au noyau aromatique en position 4 du côté du méthylène CH<sub>2</sub>-1' vu que ses protons indiquent des couplages en <sup>4</sup>*J*<sub>H-H</sub> (allylique) avec les protons H-3 et H-5 sur le spectre COSY (Figure III.228).

Sur le spectre RMN <sup>13</sup>C (Figure III.230), on remarque la présence d'un signal dans la zone des esters à  $\delta_{\rm C}$  175,1 d'une fonction ester. Ce carbone C-3' montre trois taches de corrélation sur le spectre HMBC avec les protons H<sub>2</sub>-1' et H<sub>2</sub>-2'. Le carbonyle C-3' présente également une tache de corrélation avec les protons du groupement méthoxyle (3,64 ppm) attribué au méthoxyle CH<sub>3</sub>-4'. Ceci permet d'accrocher la fonction d'ester méthylique au carbone C-2' de la chaîne linéaire.



Figure III.230. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Eg22 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)



Figure III.231. Spectre HMBC du composé Eg22

Suite à cette analyse spectroscopique et la comparaison avec les données de la littérature (Matsubara et al., 1991), le composé **Eg22** est identifié comme la citrusine E (Figure III.197). On note ici que la citrusin E est trouvée pour la premièr fois dans le genre *Euphorbia*, elle possède une bonne activité antiinflammatoire, et elle est isolé antérieurement à partir des deux plantes *Nicandra physaloides* (Solanaceae) (Yang et al., 2017) et *Citrus limon* (Rutaceae) (Matsubara et al., 1991).

Tableau II	[ <b>I.33.</b> Déplac	ements chimiques	en RMN <sup>1</sup> H e	t <sup>13</sup> C du co	mposé <b>Eg22</b> dans	CD <sub>3</sub> OD
	1	1			1 8	

Eg22								
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\mathrm{C}}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\mathrm{C}}$			
1	/	146,4	1″	4,85, 1H, <i>d</i> , 7,3 Hz	102,9			
2	/	150,7	2″	3,48, 1H, <i>t</i> , 9,1 Hz	74,9			
3	6,87, 1H, <i>d</i> , 1,8 Hz	113,9	3″	3,45, 1H, <i>t</i> , 9,2 Hz	77,8			
4	/	137,0	4″	3,39, 1H, <i>m</i>	71,3			
5	6,75, 1H, <i>dd</i> , 8,2, 1,8 Hz	121,8	5″	3,39, 1H, <i>m</i>	78,2			
6	7,07, 1H, <i>d</i> , 8,2 Hz	118,1	6″a	3,87, 1H, <i>dl</i> , 12,1 Hz	62,5			
1′	2,87, 2H, <i>t</i> , 7,5 Hz	31,6	6″b	3,68, 1H, <i>dd</i> , 12,0, 4,7 Hz				
2'	2,62, 2H, <i>t</i> , 7,5 Hz	36,6						
3'	/	175,1						
4′	3,64, 3H, <i>s</i>	52,1						
5'	3,85, 3H, <i>s</i>	56,6						

# III.2.23. Elucidation structurale du composé Eg23

Le composé **Eg23** (Figure III.232) a été isolé sous forme d'une poudre amorphe marron soluble dans le méthanol. La CCM de ce produit montre une tache visible sous lumière UV à 254 et 366 nm, se révèlant en coloration marron foncé par l'acide sulfurique et chauffage.

Trois pics d'ions pseudo-moléculaires à  $m/z = 325 \text{ [M-H]}^-$ , 651 [2M-H] $^-$  et 673 [2M-2H+Na] $^-$  sont indiqués sur le spectre de masse ESI-MS (Figure III.233) du produit **Eg23**, correspondant à une masse moléculaire de 326 Da et une formule brute de C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>.



Cis-p-coumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranoside ester



Figure III.232. Structure du composé Eg23

Figure III.233. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg23

Le spectre RMN <sup>1</sup>H réalisé dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.234) montre la présence d'un noyau aromatique symétrique di-substitué en *para* représenté par les deux doublets d'intégration 2H chacun à  $\delta_{\rm H}$  7,65 (2H, *d*, 8,7 Hz, H-2 et H-6) et 7,06 (2H, *d*, 8,7 Hz, H-3 et H-5). Il révèle aussi deux autres doublets d'intégration 1H chacun à  $\delta_{\rm H}$  6,87 (1H, *d*, 12,8 Hz, H-7) et 5,86 (1H, *d*, 12,8 Hz, H-8). Ces deux protons sont assignés à une double liaison, la valeur de la constante de couplage atteste une configuration *cis* de la double liaison.

En outre, les signaux du sucre sont caractéristiques d'un  $\beta$ -D-glucose déjà identifiés plusieurs fois dans les composés précédents.



Figure III.234. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg23 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

L'analyse du spectre RMN <sup>13</sup>C effectué dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.235) permet d'assigner facilement les carbones des protons identifiés. En plus, on remaque la présence d'un carbone dans la zone des esters à  $\delta_{\rm C}$  170,0 assigner au carbone C-9.



Figure III.235. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Eg23 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

A l'issue de cette analyse spectroscopique et la comparaison avec les données de la littérature (Fons et al., 1998), la structure du composé **Eg23** (Figure III.232.) est élucidée comme *cis-p*-

coumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranoside ester. Ce composé issue de *Jerusalem artichoke* (Asteraceae) (Wang et al., 2017) et de Black currant (Mäkilä et al., 2016) présente une activité  $\alpha$ -glucosidase modéré.

Eg23								
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{\mathrm{C}}$			
1	/	130,5	1'	4,95, 1H, <i>d</i> , 7,5 Hz	101,9			
2	7,65, 1H, <i>d</i> , 8,7 Hz	132,9	2'	3,47, 1H, <i>m</i>	74,9			
3	7,06, 1H, <i>d</i> , 8,7 Hz	117,0	3′	3,47, 1H, <i>m</i>	78,0			
4	/	159,7	4′	3,40, 1H, <i>t</i> , 9,3 Hz	71,3			
5	7,06, 1H, <i>d</i> , 8,7 Hz	117,0	5'	3,47, 1H, <i>m</i>	78,2			
6	7,65, 1H, <i>d</i> , 8,7 Hz	132,9	6′a	3,90, 1H, <i>dd</i> , 11,9, 2,2 Hz	62,5			
7	6,87, 1H, <i>d</i> , 12,8 Hz	143,2	6′b	3,70, 1H, <i>dd</i> , 12,0, 5,6 Hz				
8	5,86, 1H, <i>d</i> , 12,8 Hz	119,2						
9	/	170,0						

<b>Tableau III.34.</b> Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du comp	posé Eg23	dans CD <sub>3</sub> OD
--	-----------	-------------------------

# III.2.24. Elucidation structurale du composé Eg24

Le produit **Eg24** (Figure III.236) est obtenu sous forme d'une poudre amorphe marron soluble dans le méthanol. Ce produit montre une tache visible sous la lumière UV à 254 nm sur sa CCM, qui se révèle avec une couleur marron foncée lors de la révélation avec l'acide sulfurique et le chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS en mode négatif (Figure III.237) du métabolite secondaire **Eg24** montre deux pics d'ions pseudo-moléculaires à  $m/z = 329 \text{ [M-H]}^-$  et 659 [2M-H]<sup>-</sup>, soit une masse moléculaire de 330 Da correspondant à une formule brute en C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>.



3,5-dihydroxyacétophénone-4-*O*-β-D-glucopyranoside

Figure III.236. Structure du composé Eg24



Figure III.237. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg24

On retrouve sur le spectre <sup>1</sup>H enregistré dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.238) un seul signal sous forme de singulet d'intégration 2H dans la zone des aromatiques à 6,09 ppm attribué aux protons H-2 et H-6, et qui révèle la présence d'un noyau aromatique symétrique tétra-substitué. Un singulet d'intégration 3H est visualisé à 2,63 ppm attribuable à un méthyle lié à un carbonyle vu son déplacement chimique déblindé.

En plus de ces signaux, le spectre <sup>1</sup>H exhibite des signaux caractéristiques du  $\beta$ -D-glucopyranoside.



Figure III.238. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg24 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

En outre, le spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé réalisé dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.239) indique les carbone du cycle aromatique et du glucose, en plus, d'un carbone à  $\delta_C$  205,3 correspondant au

carbonyle d'une fonction cétone. Ceci permet de lier le méthyle identifié précédemment à la cétone afin d'élucider la structure du produit **Eg24** (Figure III.236) comme 3,5-dihydroxyacétophénone-4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, isolé pour la première fois du genre *Euphorbia*, et trouvé entérieurement dans la plante *Rhus javanica* (Anacardiaceae) (Cho et al., 2013).



Figure III.239. Spectre RMN <sup>13</sup>C J-modulé du composé Eg24 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

Tableau III.35. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg24 dans CD<sub>3</sub>OD

διι μ Ι	
01, 11, 5	$\delta_{\rm C}$
4,93, 1H, <i>d</i> , 7,3 Hz	101,1
3,43, 1H, <i>t</i> , 8,7 Hz	74,6
3,43, 1H, <i>t</i> , 8,6 Hz	77,9
3,39, 1H, <i>t</i> , 9,1 Hz	71,2
3,43, 1H, <i>m</i>	78,3
3,92, 1H, <i>dd</i> , 12,1, 2,1 Hz	62,4
3,72, 1H, <i>dd</i> , 12,1, 5,3 Hz	
	4,93, 1H, d, 7,3 Hz   3,43, 1H, t, 8,7 Hz   3,43, 1H, t, 8,7 Hz   3,43, 1H, t, 8,6 Hz   3,39, 1H, t, 9,1 Hz   3,43, 1H, m   3,92, 1H, dd, 12,1, 2,1 Hz   3,72, 1H, dd, 12,1, 5,3 Hz
# III.2.25. Elucidation structurale du composé Eg25

Le produit **Eg25** (Figure III.240) est purifié sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Il est visible sous la lumière UV à 254 et 366 nm, et se colore en jaune foncé après la révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage.

L'expérience de masse ESI-MS en mode négatif permet l'enregistrement du spectre (Figure III.241) du produit **Eg26** qui montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 367 \text{ [M-H]}^{-}$ , correspondant à une masse moléculaire de 368 Da et une formule brute de C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>.



4-O-cafféoylquinate de méthyl



Figure III.240. Structure du composé Eg25

Figure III.241. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg25

L'analyse combinée des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C effectués dans CD<sub>3</sub>OD (Figures III.242 et III.244) conduit à identifier le premier fragment de la molécule recherchée. Ce fragment est assigné au groupement caffèate, représenté par trois signaux des protons H-2' ( $\delta_{\rm H}$  7,07, 1H, *d*, 2,0 Hz), H-5' ( $\delta_{\rm H}$  6,78, 1H, *d*, 8,2 Hz) et H-6' ( $\delta_{\rm H}$  6,97, 1H, *dd*, 8,2, 2,0 Hz) dans la zone des aromatiques sur le spectre RMN <sup>1</sup>H caractéristiques d'un noyau aromatique tri-substitué en *ortho* et *para*. Ainsi des deux

signaux résonant à  $\delta_H$  7,64 (H-7') et 6,37 (H-8') sous forme de doublet chacun avec une constante de couplage J = 15,9 Hz indiquant la présence d'un double liaison d'une géométrie *trans*.



Figure III.242. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg25 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

Le spectre RMN <sup>13</sup>C montre un carbone d'ester à  $\delta_C$  169,0 assigné au carbone C-9', du groupement caffèate (Figure III.243).



Figure III.243. Fragment caffèate du composé Eg25



Figure III.244. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Eg25 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

Un signal sous forme de doublet de doublets est repéré à  $\delta_{\rm H}$  4,82 (1H, *dd*, 8,6, 3,0 Hz) assigné au proton nommé H-4. Ce dernier montre des taches de corrélation sur le spectre COSY (Figures III.245 et III.246) avec deux protons à 4,29 (1H, *m*) et 4,25 ppm (1H, *td*, 9,2, 4,4 Hz) correspondant aux deux protons H-3 et H-5 respectivement. Le proton H-3 couple sur COSY avec les deux protons geminé H-2a et H-2b qui résonnent à 2,21 (1H, *dd*, 14,2, 3,3 Hz, H-2a) et 2,06 (1H, *dd*, 14,2, 2,3 Hz, H-2b), tandis que le proton H-5 corrèle avec les deux protons H-6a et H-6b localisés à  $\delta_{\rm H}$  2,16 (1H, *dl*, 13,5 Hz) et 2,02 (1H, *m*) respectivement. Un dernier signal d'un méthoxyle résonne à 3,75 ppm.



Figure III.245. Spectre COSY du composé Eg25



Figure III.246. Spectre COSY (étalement) du composé Eg25



Les carbones des protons assignés sont attribuables à l'aide du spectre HSQC (Figure III.247).

Figure III.247. Spectre HSQC du composé Eg25

Le spectre HMBC (Figures III.248 et III.249) révèle les corrélations entre les protons H-3 et H-5 avec un carbone quaternaire déblindé à  $\delta_C$  76,4 correspondant au carbone C-1, ainsi, les protons H<sub>2</sub>-2 et H<sub>2</sub>-6 couplent en <sup>3</sup>*J* avec un carbone d'ester à 175,7 ppm attribuable au C-7. Les protons du groupement méthoxyle observés à  $\delta_H$  3,75 (3H, *s*) corrèlent avec le même carbone C-7, ce qui signifie la présence d'ester méthylique de l'acide quinique.



Figure III.248. Spectre HMBC du composé Eg25

La tache de corrélation en HMBC entre le proton H-4 et le carbonyle C-9' permet de relier les deux fragments identifiés.



Figure III.249. Corrélations HMBC du composé Eg25

A l'issue de cette analyse, la mésure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20} = -32,7^\circ$  (*c* 0,02, MeOH) et la comparaison avec la littérature, le produit **Eg25** (Figure III.240) a été identifié au 4-*O*-cafféoylquinate de méthyl, isolé pour la première fois du genre *Euphorbia*. Il a été trouvé antérieurement dans l'espèce *Viburnum cylindricum* (Adoxaceae) (Zhu et al., 2005).

Eg25					
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\rm C}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\mathrm{C}}$
1	/	76,4	1'	/	127,8
2a	2,21, 1H, <i>dd</i> , 14,2, 3,3 Hz	38,4	2'	7,07, 1H, <i>d</i> , 2,0 Hz	115,1
2b	2,06, 1H, <i>dd</i> , 14,2, 2,3 Hz	38,4	3'	/	146,8
3	4,29, 1H, <i>m</i>	69,0	4'	/	149,0
4	4,82, 1H, <i>dd</i> , 8,6, 3,0 Hz	78,5	5'	6,78, 1H, <i>d</i> , 8,2 Hz	116,5
5	4,25, 1H, td, 9,2, 4,4 Hz	65,7	6′	6,97, 1H, <i>dd</i> , 8,2, 2,0 Hz	123,0
ба	2,16, 1H, <i>dl</i> , 13,5 Hz	42,1	7'	7,64, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	147,2
6b	2,02, 1H, <i>m</i>	42,1	8′	6,37, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	115,3
7	/	175,7	9′	/	169,0
8	3,75, 3H, <i>s</i>	53,0			

Tableau III.36. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg25 dans CD<sub>3</sub>OD

# III.2.26. Elucidation structurale du composé Eg26

Ce composé **Eg26** (Figure III.250) est isolé sous forme d'une poudre blanche amorphe soluble dans le méthanol. Il est visible sous lumière UV à 254 et 366 nm et il apparait sous forme d'une tache jaune foncé sur la CCM lors de la révélation avec l'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III.251) de ce composé indique un pic d'ion pseudomoléculaire à  $m/z = 381 \text{ [M-H]}^{-}$ , soit une masse moléculaire de 382 Da et une formule brute de C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>, suggèrant une différence de +14 unités de masse par rapport au produit **Eg25** (M = 368 Da)



4-O-feruloylquinate de méthyl





Figure III.251. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg26

Il est à noter que les spectres RMN <sup>1</sup>H et HMBC enregistré dans CD<sub>3</sub>OD (Figures III.252 et III.253) du produit **Eg26** sont symilaires à ceux du composé **Eg25** déjà identifiés (Figures III.242 et III.248), avec l'apparition d'un signal du groupement méthoxyle à  $\delta_{\rm H}$  3,90 attaché au carbone C-3' ( $\delta_{\rm C}$  149,4) comme montre le spectre HMBC.



Figure III.252. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg26 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Figure III.253. Spectre HMBC du composé Eg26

L'analyse des spectres RMN <sup>13</sup>C, COSY, HSQC et HMBC conduit à déterminer les déplacement chimiques de tous les protons et carbones de ce composé. Ainsi la mésure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20} = -29,1^\circ$  (*c* 0,11, MeOH) et la comparaison des données RMN obtenus avec ceux de la littérature (Li et al., 1998) permettent d'assigner au produit **Eg26** la structure suivante 4-*O*-feruloylquinate de méthyl. On mentionne l'isolement de ce composé pour la première fois du genre *Euphorbia*. La littérature indique sa présence dans plusieurs espèces telles que *Coptis japonica* (Ranunculaceae) (Kazuko et al., 1997), *Stemona japonica* (Stemonaceae) (Ge et al., 2007) et *Toddalia asiatica* (Rutaceae) (Li et al., 2017).

Eg26						
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{\rm C}$	
1	/	76,3	1'	/	127,8	
2a	2,21, 1H, <i>dd</i> , 14,1, 3,2 Hz	38,4	2'	7,22, 1H, <i>d</i> , 1,8 Hz	111,7	
2b	2,06, 1H, <i>dd</i> , 14,2, 2,2 Hz		3'	/	149,4	
3	4,25, 1H, <i>m</i>	65,7	4'	/	150,6	
4	4,83, 1H, <i>dd</i> , 8,7, 3,0 Hz	78,5	5'	6,82, 1H, <i>d</i> , 8,2 Hz	116,5	
5	4,30, 1H, <i>td</i> , 9,1, 4,3 Hz	68,9	6′	7,09, 1H, <i>dd</i> , 8,2, 1,8 Hz	124,1	
ба	2,16, 1H, <i>dl</i> , 13,5 Hz	42,1	7'	7,70, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	147,0	
6b	2,05, 1H, <i>m</i>		8′	6,47, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	115,7	
7	/	175,7	9'	/	168,9	
8	3,75, 3H, <i>s</i>	52,9	3″	3,90, 3H, <i>s</i>	56,4	

Tableau III.37. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg26 dans CD<sub>3</sub>OD

## III.2.27. Elucidation structurale du composé Eg27

Le produit **Eg27** (Figure III.254) est purifié sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Ce composé est visible sous UV à 254 nm, et donne une tache jaune foncé sur sa CCM après une révélation avec une solution d'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III.255) en mode négatif du composé **Eg27** montre un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 353 \text{ [M-H]}^{-}$ , avec une masse moléculaire de 354 Da et une formule brute de C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>9</sub>.



Acide chlorogénique

Figure III.254. Structure du composé Eg27



Figure III.255. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg27

On remarque sur le spectre RMN <sup>1</sup>H réalisé dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.256) que la partie de l'acide quinique et un peu différente de celle du produit précédent **Eg26**. Le proton H-5 change son déplacement chimique à 5,41 ppm. Tandis que le proton H-4 recule vers les champs forts à 3,81 ppm, cela signifie que le fragment caffèate est accroché au carbone C-5 de l'acide quinique (Li et al., 1998 et Forino et al., 2015).



Figure III.256. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg27 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Figure III.257. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Eg27 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

L'examen des spectres RMN 1D et 2D de ce composé, la mésure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20} = -38,9^\circ$  (*c* 0,12, MeOH) et la comparaison avec les données de la littérature (Forino et al., 2015) permettent d'établir la structure du métabolite secondaire **Eg27** (Figure III.254) à l'acide chlorogénique. Ce produit antioxydant est très répandu dans la règne végétal, on site quelques espèces qui contiennent cette molécule comme *Euphorbia tirucalli* (Jahan et al., 2013), *E. lathyris* (Zhang et al., 2017), *E. gaillardotii* et *E. macroclada* (Ertas et al., 2015) et *Centella asiatica* (Apiaceae) (Satake et al., 2007).

Eg27						
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{\rm C}$	Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	δc	
1	/	75,9	1'	/	127,9	
2a	2,06, 1H, <i>m</i>	37,4	2'	7,05, 1H, <i>d</i> , 1,9 Hz	115,1	
2b	2,06, 1H, <i>m</i>	37,4	3'	/	146,8	
3	3,99, 1H, <i>dd</i> , 10,6, 5,6 Hz	70,1	4'	/	149,4	
4	3,81, 1H, <i>dd</i> , 5,5, 2,8 Hz	73,3	5'	6,77, 1H, <i>d</i> , 8,2 Hz	116,4	
5	5,41, 1H, <i>m</i>	72,4	6'	6,95, 1H, <i>dd</i> , 8,2, 1,9 Hz	122,9	
6a	2,06, 1H, <i>m</i>	37,4	7'	7,58, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	146,8	
6b	1,91, 1H, <i>dd</i> , 14,0, 5,7 Hz	37,4	8'	6,31, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	115,7	
7	/	182,2	9′	/	168,8	

Tableau III.38. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg27 dans CD<sub>3</sub>OD

# III.2.28. Elucidation structurale du composé Eg28

Ce produit **Eg28** (Figure III.258) est obtenu sous forme d'une poudre blanche visible sous UV à 254 et 366 nm et soluble dans le méthanol. Il donne une tache jaune foncé sur la CCM après la révélation avec l'acide sulfurique et chauffage.

Le composé **Eg28** montre sur son spectre de masse ESI-MS (Figure III.259) un pic d'ion pseudo-moléculaire à  $m/z = 381 \text{ [M-H]}^-$ , avec une masse moléculaire de 382 Da et une formule brute de C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>.



5-O-feruloylquinate de méthyl

Figure III.258. Structure du composé Eg28



Figure III.259. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg28

La comparaison des spectres RMN <sup>1</sup>H des composés **Eg28** (Figure III.260) et **Eg27** (Figure III.256) indique une similarité entre les résonances observés sur les deux spectres. Toutfois, deux signaux supplémentaires d'intégration 3H chacun, sous forme de singulet chacun sont visualisés à  $\delta_{\rm H}$  3,37 et 3,90 (Figure III.260) attribués à deux groupements méthoxyles O-CH<sub>3</sub>-8 et O-CH<sub>3</sub>-3". A l'aide du spectre HMBC (Figure III.261), on peut accrocher ces deux méthoxyles aux carbone C-7 et C-3' respectivement.



Figure III.260. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg28 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Figure III.261. Spectre HMBC du composé Eg28

Les données spectrales de ce composé obtenues suite à l'analyse des spectres RMN 1D et 2D et masse, la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{20} = -30,7^\circ$  (*c* 0,12, MeOH) et la comparaison avec la littérature (Menozzi Smarrito et al., 2008) conduisent à caractériser ce produit au 5-*O*-feruloylquinate de méthyl, isolé pour la première fois du genre *Euphorbia*.

La littérature signale la présence de cette molécule dans les plantes *Coptis japonica* (Ranunculaceae) (Kazuko et al., 1997) et *Toddalia asiatica* (Rutaceae) (Li et al., 2017).

Eg28						
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$	Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{\mathrm{C}}$	
1	/	75,3	1'	/	127,9	
2a	2,10, 1H, <i>m</i>	40,8	2'	7,20, 1H, <i>d</i> , 1,9 Hz	111,6	
2b	2,01, 1H, <i>dd</i> , 13,5, 8,8 Hz		3'	/	149,4	
3	4,12, 1H, td, 8,3, 3,8 Hz	68,6	4'	/	150,5	
4	3,69, 1H, <i>dd</i> , 7,8, 3,3 Hz	73,8	5'	6,81, 1H, <i>d</i> , 8,2 Hz	116,4	
5	5,37, 1H, <i>m</i>	72,6	6′	7,08, 1H, <i>dd</i> , 8,2, 1,9 Hz	124,0	
ба	2,22, 1H, <i>dd</i> , 14,3, 3,9 Hz	36,4	7'	7,65, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	146,7	
6b	2,14, 1H, <i>m</i>	36,4	8′	6,40, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	116,1	
7	/	176,4	9'	/	168,8	
8	3,73, 3H, <i>s</i>	52,8	3″	3,90, 3H, <i>s</i>	56,4	

Tableau III.39. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg28 dans CD<sub>3</sub>OD

## III.2.29. Elucidation structurale du composé Eg29

Le produit **Eg29** (Figure III.262) est purifié sous forme d'une poudre blanche soluble dans le méthanol. Ce composé est visible sous la lumière UV à 254 nm, sa tache apparait sur CCM d'une couleur marron lors de la révélation avec l'acide sulfurique et le chauffage.



3,4,5-trihydroxyacétophénone

Figure III.262. Structure du composé Eg29

Le produit **Eg29** montre un singulet sur son spectre RMN <sup>1</sup>H enregistré dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.263) à  $\delta_{\rm H}$  5,82 d'intégration 2H indiquant la présence d'un noyau aromatique symétrique tétra-

substitué, un autre singulet à  $\delta_{\rm H}$  2,51 d'intégration 3H correspondant aux protons d'un méthyle lié à un carbonyle. Ce carbonyle résonne sur le spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé (Figure III.264) à  $\delta_{\rm C}$  204,6 attribuable à une fonction cétone.



Figure III.263. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg29 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Figure III.264. Spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé du composé Eg29 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

Donc, la structure du produit **Eg29** (Figure III.262) est élucidée comme 3,4,5-trihydroxyacétophénone (Li et al., 2011).

Eg29				
Position	$\delta_{ m H}, m, J$	$\delta_{\rm C}$		
1	/	130,1		
2	5,82, 1H, <i>s</i>	95,6		
3	/	166,4		
4	/	165,9		
5	/	166,4		
6	5,82, 1H, <i>s</i>	95,6		
7	/	204,6		
8	2,51, 3H, <i>s</i>	32,8		

# III.2.30. Elucidation structurale du composé Eg30

Le produit **Eg30** (Figure III.265) est isolé sous forme d'une poudre marron soluble dans le méthanol. Il montre une tache visible sous UV à 254 nm, qui se colore en marron foncé après la révélation avec une solution d'acide sulfurique et chauffage.



Figure III.265. Structure du composé Eg30

Les spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C réalisés dans CD<sub>3</sub>OD (Figures III.266 et III.267) exhibitent les mêmes signaux du noyau aromatique que ceux du composé **Eg29** (Figures III.263 et III.264). En plus deux signaux sont observés à 4,27 ppm (2H, q, 7,1 Hz, H<sub>2</sub>-1') et 1,34 ppm (3H, t, 7,1 Hz, H<sub>3</sub>-2') correspondant à un groupement éthyle. Le carbone du méthylène C-1' résonne à  $\delta_{\rm C}$  61,7 ce qui signifie qu'il est oxygéné, tandis que le carbone du méthyle C-2' est détecté à 14,6 ppm.

Le signal à  $\delta_C$  168,5 visualisé sur le spectre RMN <sup>13</sup>C atteste de la présence d'un carbone d'une fonction ester.



Figure III.266. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg30 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



Figure III.267. Spectre RMN <sup>13</sup>C du composé Eg30 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

Avec ces données RMN et la comparaison avec les données de la littérature (Chen et al., 2018), le composé **Eg30** (Figure III.265) est identifié comme éthyl gallate. Ce produit est trouvé antérieurement dans l'espèce *Euphorbia hirta* (Mekam et al., 2019).

Eg30				
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	δ <sub>C</sub>		
1	/	121,8		
2	7,05, 1H, s	110,0		
3	/	146,4		
4	/	139,7		
5	/	146,4		
6	7,05, 1H, s	110,0		
7	/	168,5		
1′	4,27, 2H, q, 7,1 Hz	61,7		
2'	1,34, 3H, <i>t</i> , 7,1 Hz	14,6		

Tableau III.41.	Déplacements	chimiques e	n RMN	$^{1}\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ d	lu composé	Eg30 dans	CD <sub>3</sub> OD
-----------------	--------------	-------------	-------	-------------------------------------	------------	-----------	--------------------

# III.2.31. Elucidation structurale du composé Eg31

Le composé **Eg31** (Figure III.268) est obtenu sous forme d'une poudre marron claire soluble dans le méthanol. Il présente une fluorescence sous la lumière UV à 254 et 366 nm, ainsi, la révélation de sa CCM avec l'acide sulfurique et le chauffage montre une tache marron foncé.



Acide *E*-p-coumarique



Le speetre RMN <sup>1</sup>H effectué dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.269) montre la présence de deux doublets d'intégration 2H chacun à  $\delta_{\rm H}$  7,45 (2H, *d*, 8,6 Hz, H-2 et H-6) et 6,81 (2H, *d*, 8,6 Hz, H-3 et H-5) attestant de la présence d'un cycle aromatique symétrique di-substitué en *para*. Ainsi que deux autres doublets d'intégration 1H à  $\delta_{\rm H}$  7,60 (1H, *d*, 15,9 Hz, H-7) et 6,28 (1H, *d*, 15,9 Hz, H-8). La grande constante de couplage est caractéristique d'une double liaison en forme *trans*.

On peut attribuer facilement les carbones de ces protons sur le spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé (Figure III.270), le carbone qui résonne à 171,2 ppm est assigné à un carbone d'acide.



Figure III.270. Spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé du composé Eg31 (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)

Après l'analyse des spectres RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C et la comparaison des données obtenues avec celles de la littérature (Szeleszczuk et al., 2016), on déduit que le produit **Eg31** est l'acide *E-p*-coumarique. Ce composé a été trouvé antérieurement dans les espèces *Euphorbia hirta* (Mekam et al., 2019), *E. gaillardotii* et *E. macroclada* (Ertas et al., 2015).

Eg31				
Position	$\delta_{\mathrm{H}}, m, J$	$\delta_{C}$		
1	/	127,3		
2	7,45, 1H, <i>d</i> , 8,6 Hz	131,0		
3	6,81, 1H, <i>d</i> , 8,6 Hz	116,8		
4	/	161,1		
5	6,81, 1H, <i>d</i> , 8,6 Hz	116,8		
6	7,45, 1H, <i>d</i> , 8,6 Hz	131,0		
7	7,60, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	146,2		
8	6,28, 1H, <i>d</i> , 15,9 Hz	115,6		
9	/	171,2		

Tableau III.42. Déplacements chimiques en RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé Eg31 dans CD<sub>3</sub>OD

# III.2.32. Elucidation structurale du composé Eg32

Le composé **Eg32** (Figure III.271) a été isolé sous forme d'une poudre amorphe marron soluble dans le méthanol. La CCM de ce produit indique une tache visible sous lumière UV à 254 nm, se révèlant en marron foncé par l'acide sulfurique et chauffage.

Le produit **Eg32** montre un pic d'ion pseudo-moléculaire sur le spectre de masse ESI-MS en mode négatif (FigurIII.272) à  $m/z = 169 \text{ [M-H]}^-$ , soit une masse moléculaire de 170 Da (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>).



Figure III.271. Structure du composé Eg32



Figure III.272. Spectre de masse ESI-MS (en mode négatif) du composé Eg32

Le spectre RMN <sup>1</sup>H enregistré dans CD<sub>3</sub>OD (Figure III.273) indique un seul signal d'intégration 2H dans la zone des protons aromatiques à  $\delta_H$  7,03 correspondant aux deux protons aromatiques équivalents H-2 et H-6, ce qui nous indique que le noyau aromatique symétrique est tetra-substitué.



Figure III.273. Spectre RMN <sup>1</sup>H du composé Eg32 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

On remarque cinq signaux sur le spectre RMN <sup>13</sup>C *J*-modulé (Figure III.274), se répartissant en un pic à  $\delta_{\rm C}$  110,2 correspondant aux carbones C-2 et C-6, un petit signal à  $\delta_{\rm C}$  121,6 assigné au carbone C-1, deux carbones oxygénés C-3 et C-5 à 146,7 ppm, un autre pic d'un carbone oxygéné C-4 à

132,8 ppm, le dernier pic sort dans la zone des acides à 169,2 ppm montrant que le quatrième substituant est un acide C-7.



A cet effet, et avec la comparaison de ces données RMN avec celles de la littérature (Cho et al., 2013), le produit **Eg32** est identifié comme acide gallique. La littérature signale la présence de ce métabolite dans plusieurs *Euphorbia* telles que *E. tirucalli* (Jahan et al., 2013), *E. lathyris* (Zhang et al., 2017), *E. gaillardotii* et *E. macroclada* (Ertas et al., 2015).

Tableau III.43.	Déplacements	chimiques en RM	N <sup>1</sup> H et <sup>13</sup> C du	1 composé <b>Eg32</b>	dans CD <sub>3</sub> OD
-----------------	--------------	-----------------	--	-----------------------	-------------------------

Eg32				
Position	δ <sub>H</sub> , <i>m</i> , <i>J</i>	$\delta_{C}$		
1	/	121,6		
2	7,03, 1H, <i>s</i>	110,2		
3	/	146,7		
4	/	132,8		
5	/	146,7		
6	7,03, 1H, <i>s</i>	110,2		
7	/	169,2		

# **Chapitre 3. Etude biologique**

## III.3.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux (TPT) des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *Atractyllis cancellata* et des extraits EP, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Euphorbia gaditana* a été déterminée suivant la méthode décrite par Folin-Ciocalteu (Müller et al., 2010). Les valeurs ont été calculées à partir de la droite d'étalonnage établie par l'acide gallique et les résultats sont exprimés en milligramme equivalents d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait) (Tableau III.44).

Extraits	TPT (mg EAG <sup>x</sup> /g)			
A. can	cellata			
AcOEt	4,55 ± 0,13			
n-BuOH	53,20 ± 1,21			
E. gaditana				
EP	$6,32 \pm 1,43$			
CHCl3	$29,39 \pm 1,98$			
AcOEt	189,87 ± 1,32			
<i>n</i> -BuOH	$109,26 \pm 1,43$			

Tableau III.44. Teneur en polyphénols totaux des plantes A. cancellata et E. gaditana

<sup>x</sup> Equivalent d'acide gallique

Les extraits obtenus à partir de deux espèces ont montré des différences dans leurs teneurs totales en fonction de la polarité des solvants utilisés dans d'extraction. L'extrait *n*-BuOH (53,20  $\pm$  1,21 mg EAG/g) de la plante *A. cancellata* possède une teneur en polyphénols plus élevée que l'extrait AcOEt (4,55  $\pm$  0,13 mg EAG/g). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus dans l'étude phytochimique. En effet, sept composés phénoliques ont été purifiés à partir de l'extrait de *n*-BuOH, mais seulement quatre de l'extarit AcOEt.

Les résultats de la teneur en polyphénols totaux de la plante *E. gaditana* ont révélé que l'extrait AcOEt a la plus grande teneur en polyphénols (189,87  $\pm$  1,32 mg EAG/g) suivi par l'extrait *n*-BuOH (109,26  $\pm$  1,43 mg EAG/g). Les deux autres extraits (CHCl<sub>3</sub> et EP) ont exhibé une faible teneur en polyphénols (29,39  $\pm$  1,98 et 6,32  $\pm$  1,43 mg EAG/g) respectivement. En outre, la nature et le nombre des produits isolés des extraits de l'espèce *E. gaditana* confirment ces résultats, où dix-neuf polyphénols ont été purifiés de l'extrait AcOEt, et douze autres de l'extrait *n*-BuOH.

De nombreuses études réalisées antérieurement sur des espèces du genre *Euphorbia* telles que celles faites sur les espèces *E. dracunculoides* (Majid et al., 2015) et *E. heterophylla* (Abbasi et al.,

2013) supportent les résultats obtenus dans la présente étude, où l'extraits acétate d'éthyle et l'extrait alcoolique sont riches en phytoconstituents de type polyphénols, et la teneur est plus élevée dans l'extrait acétate d'éthyle par rapport à l'extrait alcoolique.

## III.3.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux (TFT) des extraits obtenus à partir des espèces *A. cancellata* et *E. gaditana* a été déterminée suivant la méthode de trinitroaluminum (Topçu et al., 2007). Les résultats du dosage sont exprimés en milligramme équivalents de la quercétine par gramme d'extrait (mg EQ/g d'extrait) en utilisant la gamme d'étalonnage établie par la quercétine et les valeurs sont présentées dans le tableau III.45.

Extraits	TTF (mg EQ <sup>y</sup> /g)
А. са	uncellata
AcOEt	$8,72 \pm 1,08$
<i>n</i> -BuOH	$49,39 \pm 0,98$
E. g	aditana
EP	1,17 ± 0,25
CHCl <sub>3</sub>	11,70 ± 1,51
AcOEt	91,31 ± 1,35
<i>n</i> -BuOH	37,16 ± 2,40

Tableau III.45. Teneur en flavonoïdes des plantes A. cancellata et E. gaditana

<sup>y</sup> Equivalent de quercetine

Les résultats de la teneur totale en flavonoïdes des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *A*. *cancellata* ont révélé que l'extrait AcOEt possède une faible teneur en flavonoïdes ( $8,72 \pm 1,08$  mg EQ/g) par rapport à celle de l'extrait *n*-BuOH (49,39 ± 0,98 mg EQ/g). En effet, plusieurs flavonoïdes ont été détectés dans les deux extraits.

Concernant la teneur en flavonoïdes totaux des extraits de l'espèce *E. gaditana*, on note que l'extrait AcOEt a la plus grande teneur en flavonoïdes (91,31  $\pm$  1,35 mg EQ/g) suivi par les extraits *n*-BuOH (37,16  $\pm$  2,40 mg EQ/g), CHCl<sub>3</sub> (11,70  $\pm$  1,51 mg EQ/g) et EP (1,17  $\pm$  0,25 mg EQ/g) respectivement. Cela certifie l'étude phytochimique réalisée sur les extraits AcOEt et *n*-BuOH, étant donné que douze flavonoïdes ont été trouvés dans l'extrait AcOEt, par contre uniquement six flavonoïdes ont été isolés à partir de l'extrait *n*-BuOH. Ainsi, l'ordre de la teneur en flavonoïdes obtenus de ces deux extraits est comparable à celui reporté dans les études sur les espèces *Euphorbia dracunculoides* (Majid et al., 2015) et *E. heterophylla* (Abbasi et al., 2013).

## III.3.3. Activités biologiques

Pour un but de valorisation des résultats chimiques des deux plantes étudiées, nous nous sommes intéressés à une étude biologique des extraits organiques et des produits purifiés susceptibles d'avoir un potentiel biologique, et qui sont obtenus en quantités suffisantes.

En se basant sur le fait que les polyphénols possèdent une très bonne activité antioxydante (Rice-Evans et al., 1996 ; Apak et al., 2004 ; Al-qudah et al., 2014 ; Shalkami et al., 2018 ; Dong et al., 2019), et en tenant compte que la majorité des métabolites secondaires isolés sont des composés phénoliques, une étude de l'activité antioxydante a été réalisée sur les extraits organiques EP, AcOEt et *n*-BuOH et quelques composés isolés de la plante *A. cancellata* en utilisant quatre méthodes différentes à savoir l'activité antioxydante par le piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS, le pouvoir réducteur du fer (FRAP) et la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC). En outre, ces extraits en plus des deux alcaloïdes **Ac1** (pyrroloquinolone A) et **Ac2** (4-methoxy-1-methyl-2-quinolone) trouvés ont été testés pour leur capacité anticholinesterase, vu que les alcaloïdes de type quinoléines présentent des effets inhibiteurs prometteurs de l'AChE et de la BChE de l'activité anticholinesterase (Cabral et al., 2012 ; Konrath et al., 2013 ; Mermer et al., 2018 ; Mishra et al., 2019).

En seconde temps, les extraits AcOEt et *n*-BuOH de la plante *E. gaditana* ainsi que leurs fractions ont subi une étude antioxydante bio-guidée par deux différentes méthodes DPPH et CUPRAC ; ensuite, les composés obtenus de la purification de ces extraits ont été aussi évalués pour leur pouvoir antioxydant par les deux méthodes DPPH et CUPRAC. Par ailleurs, l'activité anti-tyrosinase a été testée sur les mêmes extraits organiques en plus des deux nouveaux composés isolés **Eg1** (3,5-dihydroxyacétophénone-4-O-(2'-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside) et **Eg2** (5-isopropyl-2-oxo-3,6-dihydropyrane-4-carboxylique).

## III.3.3.1. Etude biologique de la plante A. cancellata

#### III.3.3.1.1. Activité antioxydante

#### III.3.3.1.1.a. Test DPPH

Le test DPPH<sup>·</sup> permet d'évaluer le pouvoir antioxydant de molécules pures ou d'extraits de plantes dans un système modèle. Il mesure la capacité d'un antioxydant à réduire le radical stable DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) ayant une couleur violette en DPPH-H de couleur jaune pâle,

par le transfert d'un hydrogène. La réduction du DPPH est facilement mesurable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm. La réaction sera plus ou moins rapide selon la nature et la quantité de l'antioxydant dans le milieu réactionnel.

Les résultats obtenus ont montré que l'extrait *n*-BuOH (IC<sub>50</sub> 60,55  $\pm$  2,18 µg/mL) présente une activité antioxydante moyenne par rapport à celle des antioxydants standards l'acide ascorbique et le BHA (IC<sub>50</sub> 13,94  $\pm$  2,81 et 5,73  $\pm$  0,41 µg/mL) respectivement. Les deux extraits EP et AcOEt révèlent une faible activité antioxydante dont les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont supérieures à la concentration 100 µg/mL (Tableau III.46).

Les cinq composés testés **Ac7** (quercétine-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside), **Ac8** (isoorientine), **Ac10** (acide 4-*O*-cafféoyl-2-methyl-threonique), **Ac11** (chlorogénate de méthyle) et **Ac12** (acide 5-*O*-cafféoylshikimique) ont indiqué une bonne activité vis-à-vis le radical DPPH, en particulier les deux produits **Ac8** et **Ac11** qui ont révélé une activité puissante (IC<sub>50</sub> 8,16 ± 0,27 et 18,81 ± 0,17 l µg/mL) respectivement, par rapport à l'acide ascorbique (IC<sub>50</sub> 13,94 ± 2,81 µg/mL) et le BHA (IC<sub>50</sub> 5,73 ± 0,41 µg/mL) comme standards. Tandis que, les deux métabolites secondaire **Ac5** (tricine) et **Ac9** (diosmine) n'ont pas absorbé aux concentrations testées (Tableau III.46).

Il est à noter que les produits testés obtenus à partir de l'extrait de *n*-BuOH avaient de bonnes activités antioxydantes par rapport aux composés isolés de l'extrait AcOEt. Cela pourrait expliquer la puissante activité antioxydante de l'extrait *n*-BuOH par rapport à celles des extraits AcOEt et EP.

Extraits / Produits	Test DPPH IC50	Extraits / Produits	Test DPPH IC50
	(µg/mL)		(µg/mL)
EP	>100	Ac9	>100
AcOEt	>100	Ac10	$25,80 \pm 0,39$
n-BuOH	$60,55 \pm 2,18$	Ac11	$18,81 \pm 0,17$
Ac5	>100	Ac12	$25,01 \pm 0,55$
Ac7	57,91 ± 1,83	ВНА	5,73 ± 0,41
Ac8	8,16 ± 0,27	Acide ascorbique	13,94 ± 2,81

Tableau III.46. Test DPPH des extraits et produits isolés de la plante A. cancellata

Les valeurs IC<sub>50</sub> sont définies comme la concentration de 50% d'inhibition, calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

#### III.3.3.1.1.b. Test ABTS

La méthode de piégeage du radical ABTS est basée sur la neutralisation d'un radical-cation (ABTS<sup>++</sup>) resultant de l'oxydation du chromophore synthétique l'acide 2,2'-azino-bis-(3- éthylbenzo-thiazoline-6-sulfonique). Cette réaction est suivie par spectrophotométrie à 734 nm.

Les résultats de l'activité antioxydant des extraits obtenus de l'espèce *A. cancellata* ont dévoilé des résultats similaires à ceux du test DPPH, où on trouve que l'extrait *n*-BuOH présente une forte activité antioxydante (IC<sub>50</sub> 36,58  $\pm$  2,41 µg/mL), tandis que les extraits EP et AcOEt n'ont pas absorbé aux concentrations inferieurs à 100 µg/mL.

Les composés **Ac8** (isoorientine) et **Ac11** (chlorogénate de méthyle) issus de l'extrait *n*-BuOH ont également montré une très bonne activité contre le radical ABTS<sup>+</sup> (IC<sub>50</sub> 7,14 ± 0,13 et 5,98 ± 0,30 µg/mL) respectivement, par rapport à l'acide ascorbique (IC<sub>50</sub> 1,74 ± 0,10 µg/mL) et le BHA (IC<sub>50</sub> 1,81 ± 0,10 µg/mL). Alors que les produits **Ac5** (tricine) et **Ac7** (quercétine-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside) isolés de l'extrait AcOEt et les composés **Ac10** (acide 4-*O*-cafféoyl-2-methyl-threonique) et **Ac12** (acide 5-*O*-cafféoylshikimique) issus de l'extrait *n*-BuOH ont montré une bonne activité antioxydante (IC<sub>50</sub> 47,23 ± 2,44 ; 30,79 ± 1,42 ; 14,81 ± 0,47 et 17,09 ± 0,64 µg/mL) respectivement (Tableau III.47).

Extraits / Produits	Test ABTS IC50 (µg/mL)	Extraits / Produits	Test ABTS IC50
			(µg/mL)
EP	>100	Ac10	14,81 ± 0,47
AcOEt	>100	Ac11	$5,98 \pm 0,30$
n-BuOH	$36,58 \pm 2,41$	Ac12	17,09 ± 0,64
Ac5	$47,23 \pm 2,44$	ВНА	$1,81 \pm 0,10$
Ac7	$30,79 \pm 1,42$	Acide ascorbique	$1,74 \pm 0,10$
Ac8	7,14 ± 0,13		

Tableau III.47. Test ABTS des extraits et produits isolés de la plante A. cancellata

Les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont définies comme la concentration de 50 % d'inhibition, calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

#### III.3.3.1.1.c. Test du pouvoir réducteur de fer (PR)

L'activité antioxydante par réduction de fer permet d'évaluer le pouvoir antioxydant des composés, en déterminant leurs capacités à réduire le fer ferrique ( $Fe^{+3}$ ) en fer ferreux ( $Fe^{+2}$ ). La réaction est suivie spectrophotométriquement à 700 nm, dont le pouvoir antioxydant est proportionnelle à la concentration des antioxydants dans l'échantillon testé.

Les résultats obtenus montrent que tous les extraits et les produits testés possèdent une activité antioxydante qui varie d'une manière que la dose est dépendante à la concentration, et qui ont la capacité de réduire le fer III en fer II. Mais, cette activité est inférieure à l'acide ascorbique et le BHA comme molécules de référence.

L'extrait *n*-BuOH (A<sub>0,5</sub> 49,25 ± 0,08 µg/mL) révèle une forte activité par rapport aux autres extraits (EP et AcOEt). Les composés **Ac8** (isoorientine), **Ac10** (acide 4-*O*-cafféoyl-2-methyl-threonique), **Ac11** (chlorogénate de méthyle) et **Ac12** (acide 5-*O*-cafféoylshikimique) ont montré une bonne capacité à réduire l'ion ferrique (A<sub>0,5</sub> 10,76 ± 0,80 ; 27,45 ± 1,16 ; 14,18 ± 0,25 et 19,83 ± 0,60 µg/mL) respectivement, par rapport à l'acide ascorbique (A<sub>0,5</sub> 6,37 ± 0,42 µg/mL) et le BHA (A<sub>0,5</sub> 8,41 ± 0,67 µg/mL) (Tableau III.48). Tandis que, les produits **Ac5** (tricine), **Ac7** (quercétine-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside) et **Ac9** (diosmine) n'ont donné aucune valeur d'absorbance à une concentration inférieure à 50 µg/mL.

Extraits /	Test du pouvir réducteur de fer	Extraits /	Test du pouvir réducteur de fer
Produits	A0,5 (μg/mL)	Produits	A0,5 (µg/mL)
EP	>100	Ac9	>50
AcOEt	>100	Ac10	$27,45 \pm 1,16$
n-BuOH	$49,25 \pm 0,08$	Ac11	$14,18 \pm 0,25$
Ac5	>50	Ac12	$19,83 \pm 0,60$
Ac7	>50	BHA	8,41 ± 0,67
Ac8	$10,76 \pm 0,80$	Acide ascorbique	6,37 ± 0,42

Tableau III.48	. Pouvoir r	éducteur des	s extraits et	produits isolé	s de la	plante A.	cancellata
----------------	-------------	--------------	---------------	----------------	---------	-----------	------------

Les valeurs  $A_{0,5}$  sont définies comme la concentration à l'absorbance A = 0.5, calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

#### III.3.3.1.1.d. Test CUPRAC

La capacité antioxydante réductrice du cuivre est basée sur la réduction du Cu (II) en Cu (I) en présence d'un antioxydant, où l'absorbance est enregistrée à la longueur d'onde maximale de 450 nm.

Les résultats de l'activité antioxydante par CUPRAC montrent que l'extrait *n*-BuOH (A<sub>0,5</sub> 36,59  $\pm$  0,76 µg/mL) issu de la plante *A. cancellata* présente une forte activité par rapport aux extraits AcOEt (A<sub>0,5</sub> 148,56  $\pm$  0,28 µg/mL) et EP (A<sub>0,5</sub> 194,17  $\pm$  2,36 µg/mL). En revanche, tous les produits purs testés Ac5 (tricine), Ac7 (quercétine-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside), Ac8 (isoorientine), Ac9 (diosmine), Ac10 (acide 4-*O*-cafféoyl-2-methyl-threonique), Ac11 (chlorogénate de méthyle) et Ac12 (acide 5-*O*-cafféoylshikimique) ont montré une excellente activité par rapport aux antioxydants standards l'acide ascorbique (A<sub>0,5</sub> 12,43  $\pm$  0,09 µg/mL) et le BHA (A<sub>0,5</sub> 3,64  $\pm$  0,19 µg/mL) (Tableau III.49).

Extraits /	Test CUPRAC A0,5 (µg/mL)	Extraits /	Test CUPRAC A0,5
Produits		Produits	(µg/mL)
EP	194,17 ± 2,36	Ac9	$0,60 \pm 0,39$
AcOEt	$148,56 \pm 0,28$	Ac10	$0,71 \pm 0,60$
n-BuOH	$36,59 \pm 0,76$	Ac11	$0,70 \pm 0,20$
Ac5	$0,58 \pm 0,23$	Ac12	$0,71 \pm 0,57$
Ac7	$0,73 \pm 0,48$	ВНА	$3,64 \pm 0,19$
Ac8	$0,73 \pm 0,35$	Acide ascorbique	12,43 ± 0,09

Tableau III.49. Test CUPRAC des extraits et produits isolés de la plante A. cancellata

Les valeurs  $A_{0,5}$  sont définies comme la concentration à l'absorbance A = 0.5, calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

#### III.3.3.1.2. Activité anticholinesterase

Les cholinestérases (ChE) jouent un rôle essentiel dans la régulation de la transmission cholinergique. L'inhibition des ChE est considérée comme une cible thérapeutique émergente et utile pour les troubles neurodégénératifs par la restauration des niveaux d'acétylcholine dans le cerveau (par exemple la maladie d'Alzheimer) (Bensouici et al., 2016).

Etant donné que les dérivés d'alcaloïdes de type quinoléine (comme la tacrine par exemple) ont des effets inhibiteurs prometteurs de l'AChE et de la BChE (Cabral et al., 2012 ; Konrath et al., 2013 ; Mermer et al., 2018 ; Mishra et al., 2019), le nouveau métabolite secondaire **Ac1** (pyrroloquinolone A), le produit **Ac2** (4-méthoxy-1-methyl-2-quinolone) et les extraits organiques EP, AcOEt et *n*-BuOH obtenus de la plante *A. cancellata* ont été évalués pour leur capacité inhibitrice de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la butyrylcholinesterase (BChE). La galantamine a été utilisée comme contrôle positif (Tableau III.50).

L'extrait *n*-BuOH présente une activité modérée contre l'AChE (IC<sub>50</sub> 48,58  $\pm$  0,26 µg/mL) et une bonne activité inhibitrice de la BChE (IC<sub>50</sub> 22,85  $\pm$  2,15 µg/mL), par contre les deux extraits EP et AcOEt n'ont pas absorbé à une concentration infèrieur à 200 µg/mL. La variation dans les résultats des activités AChE et BChE entre les extraits de la même espèce pourrait s'expliquer par la différence de la composition chimique notamment dans les polyphénols et les flavonoïdes connus pour leurs activités anticholinestérasiques (Jabir et al., 2018). En effet, l'extrait *n*-BuOH montre une teneur élevée en polyphénols et flavonoides comparativement aux extraits AcOEt et EP.

Le nouveau composé **Ac1** nommé pyrroloquinolone A révèle une activité inhibitrice de l'AChE (IC<sub>50</sub> 18,48 ± 0,33 µg/mL) et de la BChE (9,66 ± 0,16 µg/mL), plus élevée que celle du médicament standard la galantamine (AChE IC<sub>50</sub> 6,27 ± 1,15 et BChE 34,75 ± 1,99 µg/mL). Tandis que, le produit **Ac2** (4-méthoxy-1-methyl-2-quinolone) présente une activité inhibitrice modérée de la BChE (IC<sub>50</sub> 37,49 ± 1,61 µg/mL). En comparant les structures des deux composés **Ac1** et **Ac2** partageant le même noyau quinoliène, le produit **Ac1** se distingue par un cycle pyrrole de plus que le composé **Ac2**. Le cycle pyrrole ajouté au noyau de base quinoléine pourrait être le motif responsable de l'évolution de l'activité anticholinesterase du produit **Ac1** par rapport à son analogue **Ac2**.

Extraits / Produits	AChE IC50 (µg/mL)	BChE IC <sub>50</sub> (µg/mL)
EP	>200	>200
AcOEt	>200	>200
<i>n</i> -BuOH	$48,58 \pm 0,26$	22,85 ± 2,15
Ac1	18,48 ± 0,33	$9,66 \pm 0,16$

Tableau III.50. Activité anticholinesterase des extraits et produits isolés de la plante A. cancellata

Ac2	>50	37,49 ± 1,61
Galantamine	$6,27 \pm 1,15$	$34,75 \pm 1,99$

Les valeurs IC<sub>50</sub> sont définies comme la concentration de 50% d'inhibition, calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

## III.3.3.2. Etude biologique de la plante E. gaditana

Les extraits et les fractions obtenus de la plante *E. gaditana* ont fait l'objet d'un fractionnement bio-guidé en testant l'activité antioxydante par deux méthodes DPPH et CUPRAC.

## III.3.3.2.1. Activité antioxydante

## III.3.3.2.1.a. Activité antioxydante des extraits et des fractions

La capacité antioxydante des extraits et des fractions récupérées a été évaluée à l'aide des méthodes DPPH et CUPRAC (comme c'est une étude bio-guidée, les résultats des deux activités seront discutées au même temps) (Tableau III.51).

Extraits /	Test DPPH	Test	Extraits /	Test DPPH	Test CUPRAC
Fractions	IC50 (µg/mL)	CUPRAC	Fractions	IC50	A <sub>0,5</sub> (µg/mL)
		A <sub>0,5</sub> (µg/mL)		(µg/mL)	
EP	>200	>200	Fraction <b>Bug0</b>	56,27 ± 1,13	107,89 ± 1,45
CHCl <sub>3</sub>	>200	$61,2 \pm 0,35$	Fraction <b>Bug1</b>	$5,27 \pm 0,73$	12,68 ± 0,44
AcOEt	$8,28 \pm 0,88$	6,44 ± 1,09	Fraction <b>Bug2</b>	$3,59 \pm 0,13$	$10,85 \pm 0,29$
n-BuOH	$11,23 \pm 0,66$	15,94 ± 1,07	Fraction <b>Bug3</b>	$6,15 \pm 0,1$	22,11 ± 0,24
Fraction Acg1	$3,\!98 \pm 0,\!43$	$13,\!38 \pm 0,\!78$	Fraction <b>Bug4</b>	$4,09 \pm 0,2$	$21,\!40 \pm 0,\!12$
Fraction Acg2	$2,86 \pm 0,29$	$8,72 \pm 0,26$	BHA	5,73 ± 0,41	$3,64 \pm 0,19$
Fraction Acg3	4,78 ± 0,44	11,68 ± 0,09	Acide ascorbique	13,94 ± 2,81	$1\overline{2,43\pm0,09}$
Fraction Acg4	30,82 ± 2,57	59,41 ± 1,37			

Tableau III.51. Tests DPPH et CUPRAC des extraits et fractions de la plante E. gaditana

Les valeurs IC<sub>50</sub> sont définies comme la concentration de 50% d'inhibition, les valeurs A<sub>0,5</sub> sont définies comme la concentration à l'absorbance A = 0.5, calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n = 3), Acg : fraction de l'extrait AcOEt de la plante *E. gaditana*, Bug : fraction de l'extrait *n*-BuOH de la plante *E. gaditana*.

Les extraits AcOEt et *n*-BuOH ont été sélectionnés pour une étude chimique et biologique bioguidée, en raison de leur richesse en composés phénoliques et de leur capacité antioxydante remarquables dans les tests DPPH (AcOEt IC<sub>50</sub> 8,28 ± 0,88 et *n*-BuOH 11,23 ± 0,66) et CUPRAC (AcOEt A<sub>0,5</sub> 6,44 ± 1,09 et *n*-BuOH 15,94 ± 1,07), en comparaison avec les antioxydants standards l'acide ascorbique (DPPH IC<sub>50</sub> 13,94 ± 2,81, CUPRAC A<sub>0,5</sub> 12,43 ± 0,09 µg/mL) et le BHA (DPPH 5,73 ± 0,41, CUPRAC 3,64 ± 0,19 µg/mL). Le fractionnement de ces extraits et l'évaluation de l'activité antioxydante des fractions chromatographiques nous ont conduit à sélectionner les fractions les plus intéressantes Acg1, Acg2, Acg3, Bug1, Bug2 et Bug3 selon leurs valeurs d'IC<sub>50</sub> et A<sub>0,5</sub> (Tableau III.51).

#### III.3.3.2.1.b. Activité antioxydante des composés isolés

Les fractions sélectionnées du fractionnement bio-guidé ont été soumises à une étude phytochimique. A l'issue des différentes opérations chromatographiques de séparation et de purification 32 produits ont été isolés ; 31 parmi eux ont été testés pour leur capacité antioxydante par les méthodes DPPH et CUPRAC.

Le nouveau composé **Eg1** (3,5-dihydroxyacétophénone-4-*O*-(2'-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside) donne une excellente activité antioxydante dans les deux tests DPPH (IC<sub>50</sub> 3,25 ± 0,09) et CUPRAC (A<sub>0,5</sub> 7,09 ± 0,1 µg/mL) par rapport aux standards l'acide ascorbique et le BHA (DPPH IC<sub>50</sub>13,94 ± 2,81 et 5,73 ± 0,41 ; CUPRAC A<sub>0,5</sub>12,43 ± 0,09 et 3,64 ± 0,19 µg/mL) respectivement. Par contre le nouveau produit **Eg2** (5-isopropyl-2-oxo-3,6-dihydropyrane-4-carboxylique) n'a monté aucune activité antioxydante vis-à-vis des deux tests. Bien que la majorité des composés isolés (**Eg3-Eg31**) aient fourni une bonne à excellente activité antioxydante.

Le nombre et la variété de structure des flavonoïdes isolés nous amènent à étudier la relation structure-activité. Le composé **Eg3** qui représente une structure de la catéchine montre une excellente activité antioxydante (DPPH IC<sub>50</sub> 3,40 ± 0,06 ; CUPRAC A<sub>0,5</sub> 4,20 ± 0,42 µg/mL) mieux que celles des molécules de références l'acide ascorbique et le BHA (DPPH IC<sub>50</sub>13,94 ± 2,81 et 5,73 ± 0,41 ; CUPRAC A<sub>0,5</sub>12,43 ± 0,09 et 3,64 ± 0,19 µg/mL) respectivement. Tandis que la quercetine (**Eg4**) indique une valeur d'IC<sub>50</sub> inférieure à celle de la catéchine (**Eg3**), par conséquence une activité antioxydante plus élevée (DPPH IC<sub>50</sub> 0,89 ± 0,13 ; CUPRAC A<sub>0,5</sub> 2,20 ± 0,26 µg/mL). A cet effet, on remarque la similarité structurale au niveau des cycles A et B entre la catéchine (**Eg3**) et la quercétine (**Eg4**), la différence se situe au niveau du cycle C de la catéchine, où l'absence de système carbonyle  $\alpha,\beta$  insaturé, conjugué au cycle B diminue le pouvoir antioxydant, vu que ce système stabilise le radical formé à partir des groupements hydroxyles du cycle B lors du piégeage des radicaux libres. En outre, l'ajout d'un troisième groupement hydroxyle sur le cycle B réduit la capacité antioxydante des composés, cela a été observé pour la quercétine (**Eg4**) et la myricetine (**Eg5**) (DPPH IC<sub>50</sub> 3,0 ± 0,14 ; CUPRAC A<sub>0,5</sub> 6,32 ± 0,07  $\mu$ g/mL) (Silva et al., 2002 ; Wolfe et al., 2008).

D'autre part, le type de sucre lié au flavonoïde en position C-3 affecte l'activité antioxydante. En effet, la comparaison des résultats obtenus pour les flavonoides glycosylés **Eg6** (quercétine-3-O- $\beta$ -D-glucoside), **Eg7** (quercétine-3-O- $\alpha$ -L-arabinoside), **Eg10** (quercétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside) et **Eg14** (quercétine-3-O- $\beta$ -D-glucuronide) (Tableau III.52) nous a permis d'établir cet ordre d'efficacité des substituants glycosylés : l'arabinose> glucose> rhamnose> acide glucuronique. Ceci est confirmé par la comparaison des métabolites secondaires **Eg9** (myricétine-3-O- $\alpha$ -L-arabinoside), **Eg11** (myricétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside) et **Eg16** (myricétine-3-O- $\beta$ -D-glucuronide). Ainsi, la comparaison des composés **Eg12** (6"-méthyl kaempférol-3-O- $\beta$ -D-glucuronide) et **Eg16** (myricétine-3-O- $\beta$ -D-glucuronide) atteste que l'estérification de la fonction acide du sucre glucuronide réduit notablement le pouvoir antioxydant du produit.

Par ailleurs, lors de la comparaison des composés **Eg17** (quercétine-3-O-(2"-O-galloyl)- $\alpha$ -L-rhamnoside) et **Eg18** (quercétine-3-O-(3"-O-galloyl)- $\alpha$ -L-rhamnoside) avec le produit **Eg10** (quercétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside); et les composés **Eg19** (myricétine-3-O-(2"-O-galloyl)- $\alpha$ -L-rhamnoside) et **Eg20** (myricétine-3-O-(3"-O-galloyl)- $\alpha$ -L-rhamnoside) avec le produit **Eg11** (myricétine-3-O- $\alpha$ -L-rhamnoside), on remarque que l'acylation des fonctions hydroxyles du rhamnose par le groupement galloyl augmente l'activité antioxydante, et elle sera encore plus forte lorsque le groupement galloyl est accroché au carbone C-3" du rhamnose que lorsqu'il est lié au carbone C-2" (Tableau III.52).

	Test DPPH	Test		Test DPPH	Test
Produits	IC50 (µg/mL)	CUPRAC	Produits	IC50	CUPRAC
Trouits		A0,5 (µg/mL)	Froduits	(µg/mL)	A0,5 (µg/mL)
Eg1	$3,25 \pm 0,09$	$7,09 \pm 0,1$	Eg18	$3,18 \pm 0,33$	$10,13 \pm 0,89$
Eg2	NA	NA	Eg19	$2,8 \pm 0,58$	$10,64 \pm 0,36$
Eg3	3,40 ± 0,06	$4,20 \pm 0,42$	Eg20	$2,51 \pm 0,23$	$10,30 \pm 0,78$
Eg4	$0,89 \pm 0,13$	$2,20 \pm 0,26$	Eg21	$19,\!49 \pm 0,\!77$	$19,44 \pm 1,19$

Tableau III.52. Tests DPPH et CUPRAC des produits isolés de la plante E. gaditana

Eg5	$3,0 \pm 0,14$	$6,32 \pm 0,07$	Eg22	>200	83,84 ± 1,54
Eg6	$3,32 \pm 0,34$	9,79 ± 1,15	Eg23	$153,7\pm0,8$	$75,\!43 \pm 0,\!38$
Eg7	$1,12 \pm 0,19$	8,13 ± 0,34	Eg24	$98,7 \pm 2,6$	$11,\!64 \pm 0,\!55$
Eg8	$31,34 \pm 1,11$	$72,98 \pm 1,29$	Eg25	$5,78 \pm 0,09$	$8,\!10\pm0,\!67$
Eg9	2,61 ± 0,11	$10,37 \pm 0,09$	Eg26	30,84 ± 1,23	$40,32 \pm 1,33$
Eg10	$3,52 \pm 1,20$	$11,59 \pm 0,45$	Eg27	8,23 ± 0,2	$10,\!43 \pm 0,\!68$
Eg11	$2,87 \pm 0,21$	$11,01 \pm 0,11$	Eg28	$17,99 \pm 1,11$	13,04 ± 0,28
Eg12	$18,36 \pm 0,76$	$21,\!38\pm0,\!72$	Eg29	39,3 ± 1,94	$5,83 \pm 0,5$
Eg13	$9,94 \pm 0,86$	$18,02 \pm 0,71$	Eg30	$1,01 \pm 0,07$	$2,25 \pm 0,15$
Eg14	$5,59 \pm 0,39$	$11,19 \pm 0,24$	Eg31	>200	$16,0 \pm 0,84$
Eg15	8,6 ± 0,38	12,77 ± 0,35	ВНА	5,73 ± 0,41	3,64 ± 0,19
E-16	<u>9 12 ± 0 12</u>	11.00 + 0.20	Acide	$13,94 \pm 2,81$	12,43 ± 0,09
Egio	$0,12 \pm 0,12$	$11,88 \pm 0,39$	ascorbique		
Eg17	$3,34 \pm 0,27$	$10,52 \pm 0,75$			

Les valeurs IC<sub>50</sub> sont définies comme la concentration de 50% d'inhibition, les valeurs  $A_{0,5}$  sont définies comme la concentration à l'absorbance A = 0,5, calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n = 3). NA: non absorbé.

#### III.3.3.2.2. Activité anti-tyrosinase

L'enzyme tyrosinase est principalement impliquée dans deux réactions distinctes de la synthèse de la mélanine ; d'une part, l'hydroxylation de l'acide aminé tyrosine (TYR) pour avoir le L-DOPA, et d'autre part, l'oxydation du L-DOPA en dopaquinone. Cette dopaquinone subit plusieurs réactions pour éventuellement former la mélanine. La mélanine est un pigment présent chez les animaux, les plantes et chez l'être humain, soit au niveau de la peau ou les cheveux. Les pigments mélaniques constituent pour la peau une protection naturelle contre les effets nocifs des rayons UV. Divers dysfonctionnements de la mélanogenèse dus aux agressions extérieures (UV), aux perturbations hormonales ou au vieillissement entraînent l'apparition de taches d'hyperpigmentation particulièrement inesthétiques. Dans ces cas, l'utilisation d'agents de blanchiment chimique ou cosmétique peut être utile pour guérir ces troubles (Chang 2009 ; Seo et al., 2003).

Les produits qui possèdent une activité anti-tyrosinase sont particulièrement visés par l'industrie pharmaceutique afin d'élaborer des crèmes qui contrastent et préviennent les taches cutanées et le teint non homogène, en d'autres terme, le produit actif agit sur la tyrosinase en inhibant la synthèse de la mélanine.

L'activité anti-tyrosinase a également été évaluée pour les extraits, les fractions majeures et les deux nouveaux composés **Eg1** (3,5-dihydroxyacétophénone-4-O-(2'-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside) et **Eg2** (5-isopropyl-2-oxo-3,6-dihydropyrane-4-carboxylique). Les extraits organiques EP, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-BuOH ne montrent aucune activité à une concentration de 200 µg/mL. Tandis que, la fraction mère (**Acg2**) des nouveaux produits **Eg1** et **Eg2** révèle une très bonne activité anti-tyrosinase (IC<sub>50</sub> 35,39 ± 2,92 µg/mL) comparant aux autres fractions de l'extrait AcOEt. Les fractions **Bug2** et **Bug3** issues de l'extrait *n*-BuOH ont aussi donné une très bonne activité (IC<sub>50</sub> 32,16 ± 2,18 et 15,23 ± 0,87 µg/mL) respectivement (Tableau III.53).

Par ailleurs, les deux nouveaux métabolites secondaires **Eg1** et **Eg2** révèlent une bonne activité, en particulier le composé **Eg2** (IC<sub>50</sub> 52,39 ± 0,69 µg/mL) par rapport au produit **Eg1** (IC<sub>50</sub> 89,78 ± 0,93 µg/mL) et l'acide kojique (standard) (IC<sub>50</sub> 25,23 ± 0,78 µg/mL) (Tableau III.53).

Extraits / Fractions / Produits	Activité anti-tyrosinase IC50 (μg/mL)	Extraits / Fractions / Produits	Activité anti-tyrosinase IC50 (μg/mL)
EP	>200	Fraction <b>Bug0</b>	>200
CHCl <sub>3</sub>	>200	Fraction <b>Bug1</b>	>200
AcOEt	>200	Fraction <b>Bug2</b>	32,16 ± 2,18
<i>n</i> -BuOH	>200	Fraction <b>Bug3</b>	$15,23 \pm 0,87$
Fraction Acg1	>200	Fraction <b>Bug4</b>	88,25 ± 1,16
Fraction Acg2	$35,39 \pm 2,92$	Eg1	$89,78\pm0,93$
Fraction Acg3	>200	Eg2	$52,39 \pm 0,69$
Fraction Acg4	>200	Acide kojique	$25,23 \pm 0,78$

Tableau III.53. Activité anti-tyrosinase des extraits, fractions et produits isolés de la plante E. gaditana

Les valeurs IC<sub>50</sub> sont définies comme la concentration de 50% d'inhibition, calculées par analyse de régression linéaire et exprimées en moyenne  $\pm$  SD (n = 3).

- Abbasi MA, Saleem H, Aziz-ur-rehman, Riaz T, Ajaib M. 2013. Determination of antioxidant activity and phytoconstituent screening of *Euphorbia heterophylla* Linn. British Journal of Pharmaceutical Research. 3(2): 202-216.
- Ahmed S, Nur-e-Alam M, Mothana RA, Yousaf M, Al-Rehaily AJ. 2017. Activity guided isolation of chemical constituents from the biologically active methanol extract of *Euphorbia schimperi* C. Presl. Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia. 31(3): 471-479.
- Al-Qudah MA, Al-Jaber HI, Abu Zarga MH, Abu Orabi ST. 2014. Flavonoid and phenolic compounds from *Salvia palaestina* L. growing wild in Jordan and their antioxidant activities. Phytochemistry. 99: 115-120.
- Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of Neocuproine: CUPRAC Method. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52: 7970-7981.
- Babujanarthanam R, Kavitha P, Mahadeva Rao US, Pandian MR. 2011. Quercitrin a bioflavonoid improves the antioxidant status in streptozotocin: Induced diabetic rat tissues. Molecular and Cellular Biochemistry. 358: 121-129.
- Badria FA, Ameen M, Akl MR. 2007. Evaluation of cytotoxic compounds from *Calligonum comosum* L. growing in Egypt. Zeitschrift fur Naturforschung. 62c: 656-660.
- Bao L, Bao X, Li P, Wang X, Ao W. 2017. Chemical profiling of *Malva verticillata* L. by UPLC-Q-TOF-MS<sup>E</sup> and their antioxidant activity in vitro. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 150: 420-426.
- Benayache F, Boureghda A, Ameddah S, Marchioni E, Benayache F, Benayache S. 2014. Flavonoids from *Thymus numidicus* Poiret. Der Pharmacia Lettre. 6(2): 50-54.
- Bensouici C, Kabouche A, Karioti A, Ozturk M, Duru ME, Bilia AR, Kabouche Z. 2016. Compounds from *Sedum caeruleum* with antioxidant, anticholinesterase, and antibacterial activities. Pharmaceutical Biology. 54: 174-179.
- Bokesch HR, Wamiru A, Le Grice SFJ, Beutler JA, McKee TC, McMahon JB. 2008. HIV-1 ribonuclease H inhibitory phenolic glycosides from *Eugenia hyemalis*. Journal of Natural Products. 71: 1634-1636.
- Brunschwig C, Leba LJ, Saout M, Martial K, Bereau D, Robinson JC. 2017. Chemical composition and antioxidant activity of *Euterpe oleracea* roots and leaflets. International Journal of Molecular Sciences. 18(1): 61.
- Cabral RS, Sartori MC, Cordeiro I, Queiroga CL, Eberlin MN, Lago JHG, Moreno PRH, Young MCM. 2012. Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus*. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 22(2): 374-380.
- Ccana-Ccapatinta GV, Sampaio BL, Dos Santos Jr FM, Batista Jr JM, Da Costa FB. 2017.
  Absolute configuration assignement of caffeic acid ester derivatives from *Tithonia diversifolia* by vibrational circular dichroism: the pitfalls of deuteration. Tetrahedron: *Asymmetry*. 28: 1823-1828.
- Chang SW, Kim KH, Lee LK, Choi SU, Ryu SY, Lee KR. 2009. Phytochemical constituents of *Bistorta manshuriensis*. Natural Product Sciences. 15(4): 234-240.
- Chang TS. 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors. International Journal of Molecular Sciences. 10: 2440-2475.
- Chen G, Cui CB, Qi AD, Li CW, Tao ZW, Ren R. 2014. Polyanthumin, a novel cyclobutane chalcone trimmer from *Memecylon polyanthum*. Journal of Asian Natural Products Research. 17(2): 170-177.
- Chen H, Li M, Zhang C, Du W, Shao H, Feng Y, Zhang W, Yang S. 2018. Isolation and identification of the anti-oxidant constituents from *Loropetalum chinense* (R. Brown) oliv. Based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS. Molecules. 23: 1720.
- Chen Y, Avula SR, Gao WW, Addla D, Tangadanchu VKR, Zhang L, Lin JM, Zhou CH. 2016. Multi-targeting exploration of new 2-aminothiazolyl quinolones : synthesis, antimicrobial evaluation, interaction with DNA, combination with topoisomerase IV and penetrability into cells. European Journal of Medicinal Chemistry. 124: 935-945.
- Cho JY, Lee KD, Park SY, Jeong WC, Moon JH, Ham KS. 2013. Isolation and identification of αglucosidase inhibitors from the stem bark of the Nutgall Tree (*Rhus javanica* Linné). The Korean Society for Applied Biological Chemistry and Springe. 56: 547-552.

- Choi JM, Kim K, Cho E, Jung S. 2012. Solubility enhancement of salicylic acid by complexation with succunglycan monomers isolated from *Sinorhizobium meliloti*. Bulletin Korean Chemical Society. 33(6): 2091-2094.
- Chung SK, Kim YC, Takaya Y, Terashima K, Niwa M. 2004. Novel flavonol glycoside, 7-*O*-methyl mearnsitrin, from sageretia theezans and its antioxidant effet. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52: 4664-4668.
- Coppola GM, Kahle AD, Shapiro MJ. 1981. 13C NMR investigation of some hetero-ring substituted 2and 4-Quinolone systems. Organic Magnetic Resonance. 17(4): 242-245.
- Csuk R, Woeste B. 2008. A chemoenzymatic approach to (+)-pilocarpine. Tetrahedron. 64: 9384-9387.
- Cui L, Xing M, Xu L, Wang J, Zhang X, Ma C, Kang W. 2018. Antithrombotic components of *Malus halliana* Koehne flowers. Food and Chemical Toxicology. 119: 326-333.
- Cui Y, Tao Y, Jiang L, Shen N, Wang S, Wen H, Liu Z. 2018. Antihypoxic activities of constituents from Arenaria kansuensis. Phytomedicine. 38: 175-182.
- Dong X, Huang Y, Wang Y, He X. 2019. Anti-inflammatory and antioxidant jasmonates and flavonoids from *lychee seeds*. Journal of Functional Foods. 54: 74–80.
- Dugé de Bernonville T, Guyot S, Paulin JP, Gaucher M , Loufrani L, Henrion D, Derbré S, Guilet D, Richomme P, Dat JF, Brisset MN. 2009. Dihydrochalcones: in resistance to oxidative stress and bioactivities against advanced glycation end-products and vasoconstriction. Phytochemistry. 71: 443-452.
- El-Toumy SA, Salib JY, Mohamed WM, Morsy FA. 2010. Phytochemical and antimicrobial studies on *Acacia saligna* leaves. Egyptian Journal of Chemistry. 53(5): 705-717.
- Ertas A, Yilmaz MA, Firat M. 2015. Chemical profile by LC-MS/MS, GC/MS and antioxidant activities of the essential oils and crude extracts of two *Euphorbia* species. Natural Product Research. 29(6): 529-534.
- Fernandes FT, Copetti D, Carmo GD, Neto AT, Pedroso M, Silva UF, Mostardeiro MA, Burrow RE, Dalcol II, Morel AF. 2017. Phytochemical analysis of bark from *Heleitta apiculata* Benth and antimictobial activities. Phytochemistry. 141: 131-139.

- Fons F, Rapior S, Gueiffier A, Roussel JL, Gargadennec A, Andary A. 1998. (E) -p-coumaroyl-1-O-β-D-glucopyranoside accumulation in roots of *Plantago lanceolata* cultures. Acta Botanica Gallica. 145(3): 249-255.
- Forino M, Tenore GC, Tartaglione L, Carmela DA, Novellino E, Ciminiello P . 2015. (1S, 3R, 4S, 5R)5-O-Caffeoylquinic acid: isolation, stereo-structure characterization and biological activity. Food Chemistry. 178: 306-310.
- Ge F, Ke C, Tang W, Yang X, Tang C, Qin G, Xu R Li T, Chen X, Zuo J, Ye Y. 2007. Isolation of chlorogenic acids and their derivatives from *Stemona japonica* by preparative HPLC and evaluation of their anti-AIV (H5N1) activity *in vitro*. Phytochemical Analysis. 18(3): 213-218.
- Ghasemi S, Lorigooini Z, Wibowo J, Amini-khoei H. 2018. Tricin isolated from *Allium atroviolaceum* potentiated the effect of docetaxel on PC3 cell proliferation: role of miR-21. Natural Product Research. 15: 1-4.
- Gomaa Darwish AG, Samy MN, Sugimoto S, Otsuka H, Abdel-Salam H, Matsunami K. 2016. Effects of hepatoprotective compounds from the leaves of *Lumnitzera racemosa* on acetaminophen-Induced liver damage in Vitro. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 64: 360-365.
- Hao F, Asahara H, Nishiwaki N. 2017. Direct amino-halogenation and aziridination of the 2quinolone framework by sequential treatment of 3-nitro-2-quinolone with amine and Nhalosuccinimide. Tetrahedron. 73: 1255-1264.
- Hilbert G, Temsamani H, Bordenave L, Pedrot E, Chaher N, Cluzet S, Delaunay JC Ollat N, Delrot S, Mérillon JM, Gomès E, Richard T. 2014. Flavonol profiles in berries of wild *Vitis* accessions using liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry. Food Chemistry. 169: 49-58.
- Hiermann A, Schramm HW, Laufer S. 1998. Anti-inflammatory activity of myricetin-3-O- $\beta$ -D-glucuronide and related compounds. Inflammation Research. 47: 421-427.
- Hong G, Shiyuag C, Yina H, Kai Z, Yanping W. 2018. Method for preparing bacteriostatic agent from *Pericarpium Zanthoxyli* leaf.

- Huang SS, Li P, Zhang BJ, Deng S, Zhang HL, Sun CP, Huo XK, Tian XG, Ma XC, Wang C. 2017. Acetophenone glycosides from the roots of *Euphorbia fischeriana* and their inhibitory effects against Mycobacterium smegmatis. Phytochemistry Letters. 19: 151-155.
- Isobe T, Kanazawa K, Fujimura M, Noda Y. 1981. Flavonoides of *Polygonum seiboldi* and *P. filiforme*. The Chemical Society of Japan. 54: 3239.
- Iwanaga CC, Ferreira LDAO, Bernuci KZ, Fernandez KMM, Lorenzetti FB, Sehaber CC, Frez FCV, Bernardes SS, Panizzon GP, Linde GA, Vieira MC, Zanoni JN, Cortez DAG. 2018. *In vitro* antioxidant potential and *in vivo* effects of *Schinus terebinthifolia* Raddi leaf extract in diabetic rats and determination of chemical composition by HPLC-ESI-MS/MS. Natural Product Research.
- Ivashev MN, Andreeva OA, Bandyukova VA, Dragaleva TD. 1995. Isolation of diosmin from plants of the genus *Vicia* and *Hyssopus officinalis* and its influence on blood coagulation. Pharmaceutical Chemistry Journal. 29(10): 707-709.
- Jabir NR, Khan FR, Tabrez S. 2018. Cholinesterase targeting by polyphenols: A therapeutic approach for the treatment of Alzheimer's disease. CNS Neuroscience & Therapeutics. 24(9): 753-762.
- Jahan N, Khalil-ur-rahman AS, Shoukat A, Asi MR. 2013. Phenolic acid and flavonol contents of gemmo-modified and native extracts of some indigenous medicinal plants. Pakistan Journal of Botany. 45(5): 1515-1519.
- Jassbi AR. 2006. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. Phytochemistry. 67: 1997-1984.
- Jue W, Naili W, Xinsheng Y, Susumu K. 2006. Caffeoyl quinic acid derivatives from *Bidens* parviflora and their antihistamine release activities. Chinese Traditional and Herbal Drugs. 37(7): 966-970.
- Jung MJ, Heo SI, Wang MH. 2008. Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. Food Chemistry. 108: 482-487.
- Kainsa S, Singh R. 2016. Flavan-3-ol isomers isolated from *Euphorbia thymifolia* Linn. Pharmacognosy Communications. 6(1): 28-33.

- Kazuko Y, Hiroshi K, Shigenobu A. 1997. Non-basic components of *Coptis Rhizoma*. II: four new hemiterpenoid glucosides, two new phenylpropanoid glucosides and a new flavonoid glycoside from *Coptis japonica* var. dissecta. Natural Medicines. 51(3): 244-248.
- Khaligh P, Salehi P, Farimani MM, Ali-Asgari S, Esmaeili MA, Ebrahimi SN. 2016. Bioactive compounds from *Smilax excelsa* L. Journal of Iranian Chemical Society. 13: 1055-1059.
- Kim HH, Kim HD, Kim MH, Oh MH, Kim SR, Park KJ, Lee, MW. 2013. Flavonoid constituents in the leaves of *Myrica rubra* sieb. et zucc. with anti-inflammatory activity. Archives of Pharmacal Research. 36: 1533-1540.
- Kong NN, Fang ST, Wang JH, Wang ZH, Xia CH. 2014. Two new flavonoid glycosides from the halophyte *Limonium franchetii*. Journal of Asian Natural Products Research. 16(4): 370-375.
- Konrath EL, Ortega MG, De Loreto Bordignon S, Apel MA, Henriques AT, Cabrera JL. 2013. Alkaloid profiling and anticholinesterase activity of South American *Lycopodiaceae* species. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 28: 218-222.
- Leba LJ, Brunschwig C, Martial K, Bereau D, Robinson JC. 2016. *Oenocarpus bacaba* and *Oenocarpus bataua* leaflets and roots: a new source of antioxidant compounds. International Journal of Molecular Sciences. 17(7): 1014.
- Lee IS, Jung SH, Kim CS, Kim JS. 2017. Phenolic compounds from the leaves of *Homonoia ripariaand* their inhibitory effects on advanced glycation and product formation. Natural Product Sciences. 23(4): 274-280.
- Lima RCL, Kongstad KT, Kato I, Silva MJD, Franzyk H, Staerk D. 2018. High-resolution PTP1B inhibition profiling combined with HPLC-HRMS-SPE-NMR for identification of PTP1B inhibitors from *Miconia albicans*. Molecules. 23: 1755.
- Lin LC, Chou CJ. 2000. Flavonoids and phenolics from *Limonium sinense*. Planta Medica. 66: 382-383.
- Lin WH, Deng ZW, Lei HM, Fu HZ, Li J. 2002. Polyphenolic compounds from the leaves of *Koelreuteria paniculata* Laxm. Journal of Asian Natural Products Research. 4(4): 287-295.
- Liu H, Mou Y, Zhao J, Wang J, Zhou L, Wang M, Wang D, Han J, Yu Z, Yang F. 2010. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. Molecules. 15: 7933-7945.

- Liu Y, Murakami N, Ji1 H, Abreu P, Zhang S. 2007. Antimalarial flavonol glycosides from *Euphorbia hirta*. Pharmaceutical Biology. 45(4): 278-281.
- Li H, Miyahara T, Tezuka Y, Namba T, Nemoto N, Tonami S, Seto H, Tada T, Kadota S. 1998. The effect of kampo formulae on bone resorption in vitro and *in vivo*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 21(12): 1322-1326.
- Li L, Seeram NP. 2011. Further investigation into Maple Syrup yields three new lignans, a new phenylpropanoid, and twenty-six other phytochemicals. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59(14): 7708-7716.
- Li RL, Zhang J, Chen XT, Jia J, Zhang H, Sun JM. 2013. Studies on chemical constituents from ethyl acetate extracts of *Acer ginnala* Maxim. leaves. Journal of Jilin Agricultural University.
- Li W, Zhang JS, Huang JL, Jiang MH, Xu YK, Ahmed A, Yin S, Tang GH. 2017. New prenylated coumarins from the stems of *Toddalia asiatica*. Royal Scociety of Chemistry Advances. 7: 31061-31068.
- Lu YH, Zhang Z, Shi GX, Meng JC, Tan RX. 2002. A new antifungal flavonol glycoside from *Hypericum perforatum*. Acta Botanica Sinica. 44(6): 743-745.
- Majid M, Khan MR, Shah NA, Haq IU, Farooq MA, Shafi U, Sharif A, Zahra Z, Younis T, Sajid M.
  2015. Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic activities of *Euphorbia dracunculoides*. Complementary and Alternative Medicine. 15: 349.
- Mäkilä L, Laaksonen O, Alanne AL, Kortesniemi M, Kallio H, Yang B. 2016. Stability of hydroxycinnamic acid derivatives, flavonol glycosides, and anthocyanins in Black Currantjuice. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 64(22): 4584-4598.
- Matsubara Y, Yusa T, Sawabe A, Iizuka Y, Okamoto K. 1991. Structure and physiological activity of phenyl propanoid glycosides in Lemon (*Citrus limon* Burm. f.) Peel. Agricultural and Biological Chemistry. 55(3): 647-650.
- Mekam PN, Martini S, Nguefack J, Tagliazucchi D. 2019. Phenolic compounds profile of water and ethanol extracts of *Euphorbia hirta* L. leaves showing antioxidant and antifungal properties. South African Journal of Botany. 127: 319-332.
- Melek FR, Aboutabl EA, El-Shabrawy O, Radwan AS, Hilal SH, Hammam A. 1992. Atractylis carduus var. angustifolia flavonoids and antiinflammatoire activite. Egypcian journal of Pharmaceutical Sciences. 33(1-2): 11-19.

- Menozzi Smarrito C, Munari C, Robert F, Barron D. 2008. A novel efficient and versatile route to the synthesis of 5-*O*-feruloylquinic acids. Organic & Biomolecular Chemistry. 6: 986-987.
- Mermer A, Demirbas N, Sirin Y, Uslu H, Ozdemir Z, Demirbas A. 2018. Conventional and microwave prompted synthesis, antioxidant, anticholinesterase activity screening and molecular docking studies of new quinolone-triazole hybrids. Bioorganic Chemistry. 78: 236-248.
- Mishra P, Kumar A, Panda G. 2019. Anti-cholinesterase hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease (1998-2018). Bioorganic and Medicinal Chemistry. 27:895-930.
- Müller L, Gnoyke S, Popken AM, Böhm V. 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. LWT Food Science and Technology. 43: 992-999.
- Nazemiyeh H, Kazemi EM, Zare K, Jodari M, Nahar L, Sarker SD. 2010. Free radical scavengers from the aerial parts of *Euphorbia petiolata*. Journal of Natural Medicines. 64: 187-190.
- Nguyen Thi Hong Van NTH, Vien TA, Kiem PV, Minh CV, Nhiem NX, Long PQ, Anh LT, Kim N, Park SJ, Kim SH. 2015. Chemical components from the leaves of *Ardisia insularis* and their cytotoxic activity. Archives of Pharmacal Research. 38(11):1926-1931.
- Onocha PA, Okorie DA, Connolly JD, Roycroft DS. 1995. Monotérpene diol, iridoid glucoside and dibenzo-α-pyrane from *Anthocleista djalonensis*. Phytochemistry. 40(4): 1183-1189.
- Park SJ, Nhiem NX, Kiem PV, Ban NK, Kim N, Kim SH. 2014. A new flavonoid glycoside from the leaves of *Homonoia riparia*. Biochemical Systematics and Ecology. 57: 155-158.
- Pisano MB, Cosentino S, Viale S, Spanò D, Corona A, Esposito F, Tramontano E, Montoro P, Tuberoso CIG, Medda R, Pintus F. 2016. Biological activities of aerial parts extracts of *Euphorbia characias*. BioMed Research International.
- Qiu D, Guo J, Yu H, Yan J, Yang S, Li X, Zhang Y, Sun J, Cong J, He S, Wei D, Qin JC. 2018. Antioxidant phenolic compounds isolated from wild *Pyrus ussuriensis* Maxim. fruit peels and leaves. Food Chemistry. 241:182-187.
- Qiu DR, Wang DC, Yang SX, Zhang YM, Wei DS, Zhang MZ, Sun JZ, Cong J, Guo J, He SL, Qin JC. 2016. Chemical constituents from the fruits of *Rhus typhina* L. and their chemotaxonomic significance. Biochemical Systematics and Ecology. 69: 261-265.

- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine. 20(7): 933-956.
- Ryu HW, Song HH, Kim KO, Park YJ, Kim DY, Kim JH, Oh SR. 2016. Secondary metabolite profiling and modulation of antioxidants in wild and cultivated *Euphorbia supina*. Industrial Corps and Products. 89: 215-224.
- Sakushima A, Coskun M, Hisada S, Nishibe S. 1983. Flavonoids from *Rhamnus pallash*. Phytochemistry. 22: 1677-167.
- Saleem U, Ahmad B, Hussain K, Ahmad M, Bukhari NI. 2014. Simultaneous quantification of quercetin, myricetin and kaempferol in extracts and latex of *Euphorbia helioscopia* using RP-HPLC. Asian Journal of Chemistry. 26(22): 7673-7676.
- Satake T, Kamiya K, An Y, Oishi T (Taka N), Yamamoto J. 2007. The anti-thrombotic active constituents from *Centella asiatica*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 30(5): 935-940.
- Severino VGP, Monteiro AF, Fernandes Silva MFG, Lucarini R, Martins CHG. 2015. Chemical study of *Hortia superba* (Rutaceae) and investigation of the antimycrobial activity of crude extracts and constituents isolated from *Hortia* species. Quimica Nova. 38(1): 42-45.
- Seo SY, Sharma VK, Sharma N. 2003. Mushroom Tyrosinase: recent prospects. Journal of Agricultural Food chemistry. 51: 2837-2853.
- Shalkami AS, Hassan MIA, Bakr AG. 2018. Anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic activity of diosmin in acetic acid-induced ulcerative colitis. Human and Experimental Toxicology. 37(1): 78-86.
- Silva MM, Santos MR, Caroco G, Rocha R, Justino G, Mira L. 2002. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids : a re-examination. Free Radical Research. 36(11): 1219-1227.
- Sun D, Zhao Z, Lai YF, Herbert W. 1991. Flavonoids from *Myrica esculenta* bark. Chemistry and Industry of Forest Products 11: 251-255.
- Szeleszczuk L, Pisklak DM, Zielinska-Pisklak M, Wawer I. 2016. Effects of structural differences on the NMR chemical shifts in cinnamic acid derivatives: Comparison of GIAO and GIPAW calculations. Chemical Physics Letters. 653: 35-41.
- Szeleszczuk L, Pisklak DM, Zielińska-Pisklak M, Wawer I. 2017. Spectroscopic and structural studies of the diosmin monohydrate and anhydrous diosmin. International Journal of Pharmaceutics. 529: 193-199.

- Taskeen A, Naeem I, Mubeen H. 2009. Isolation of flavonols from *Euphorbia wallichii* by preparative High Performance Liquid Chromatography. Nature and Science. 7(8): 86-88.
- Tim CTH, Keith J. 1997. A synthesis of the tricyclic pyrroloquinoline core of martinelline. Tetrahedron. 53: 8287-8297.
- Topçu G, Ay A, Bilici A, Sarıkürkcü C, Öztürk M, Ulubelen A. 2007. A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. Food Chemistry. 103: 816-822.
- Uriburua ML, Gilb RR, Sosac VE, Fuente JR. 2008. Caffeoyl esters of threonic acid and its lactone from *Viguiera pazensis*. Journal of the Argentine Chemistry Society. 96(1-2): 55-61.
- Wang H, Nair MG, Strasburg GM, Booren AM, Gray JL. 1999. Novel antioxidant compounds from Tart Cherries (*Prunus cerasus*). Journal of Natural Products. 62: 86-88.
- Wang YM, Zhao JQ, Yang JL, Idong PT, Mei LJ, Tao YD, Shi YP. 2017. Antioxidant and αglucosidase inhibitory ingredients identified from *Jerusalem artichoke* flowers. Natural Product Research. 33(4):584-588.
- Weng JR, Bai LY, Lin WY, Chiu CF, Chen YC, Chao SW, Feng CH. 2017. A flavone constituent from *Myoporum bontioides* induces M-phase cell cycle arrest of MCF-7 breast cancer cells. Molecules. 22: 472.
- Wolfe KL, Liu RH. 2008. Structure-activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 8404-8411.
- Wu SY, Fu YH, Zhou Q, Bai M, Chen GY, Han CR, Song XP. 2018. A new dihydrochalcone glycoside from the stems of *Homalium stenophyllum*. Natural Product Research. 38(8): 953-958.
- Yang BY, Liu Y, Jiang HB, Xu ZP, Guo R, Wang R, Li XM, Kuang HX. 2017. Phenylpropanoids from the fruits of *Nicandra physaloides* and their anti-inflammatory activities. Natural Product Research. 31(22): 2634-2640.
- Yang DS, Peng WB, Yang YP, Liu KC, Li XL, Xiao WL. 2015. Chemical constituents from *Euphorbia wallichii* and their biological activities. Journal of Asian Natural Products Research. 17(9): 946-951.
- Yang DS, Wei JG, Yang YP, Yang YH, Li XL. 2013. Chemical constituents of *Euphorbia sikkimensis*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 38(23): 4094-8.

- Yang J, Huang Y, Yang Z, Zhou C, Hu X. 2018. Identification and quantitative evaluation of major sweet ingredients in Sweet Tea (*Lithocarpus polystachyus* Rehd.) based upon location, harvesting time, Leaf Age. Journal of the Chemical Society of Pakistan. 40(1): 158-164.
- Yin S, Zhang X, Lai F, Liang T, Wen J, Lin W, Qiu J, Liu S, Li L. 2018. Trilobatin as an HIV-1 entry inhibitor targeting the HIV-1 Gp41 envelope. FEBS Letters. 592: 2361-2377.
- Zaghloul AM. 1993. New flavonoid glycosides from *Euphorbia dracunculoides*. Mansoura Journal of Pharmaceutical Sciences. 9(2): 204-212.
- Zhang L, Wang C, Meng Q, Tian Q, Niu Y, Niu W. 2017. Phytochemicals of *Euphorbia lathyris* L. and their antioxidant activities. Molecules. 22: 1335-1347.
- Zhang PT, Pan BY, Liao QF, Yao MC, Xu XJ, Wan JZ, Liu D, Xie ZY. 2014. Separation of five quinolone alcaloids from fruits od *Evodia rutaecarpa* by high-speed counter-current chromatography. Chinese Herbal Medicines. 6(1): 47-52.
- Zhang XM, An DQ, Guo LL, Yang NH, Zhang H. 2018. Identification and screening of sctive compounds from *Ziziphora clinopodioides* Lam. In regulating autophagy. Natural Product Research. 33(17): 2549-2553.
- Zhou ZQ, Xiao J, Fan HX, Yu Y, He RR, Feng XL, Kurihara H, So KF, Yao XS, Gao H. 2017. Polyphenols from wolfberry and their bioactivities. Food Chemistry. 214: 644-654.
- Zhou P, Huang L, Zhou J, Jiang B, Zhao Y, Deng X, Zhao Q, Li F. 2017. Discovery of novel 4(1*H*)-quinolone derivatives as potential antiprooliferative and apoptosis inducting agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 27: 4185-4189.
- Zhu X, Dong X, Wang Y, Ju P, Luo S. 2005. Phenolic compounds from *Viburnum cylindricum*. Helvetica Chimica Acta. 88: 339-342.

# **Conclusion générale**

#### **Conclusion générale**

Ce manuscrit représente une étude phytochimique et biologique de deux plantes médicinales Algériennes *Atractylis cancellata* L. de la famille Asteraceae, et *Euphorbia gaditana* Coss. de la famille Euphorbiaceae utilisées en médecine traditionnelle locale. Cette investigation a permis d'une part, d'isoler et d'identifier **49** métabolites secondaires à l'état pur dont **3** présentent de nouvelles structures, et d'autre part, les extraits, les fractions et la majorité des produits isolés ont été examinés pour leur activité antioxydante. En plus, l'évaluation biologique de quelques molécules sélectionnées pour leur pouvoir anticholinesterase et anti-tyrosinase a été réalisée.

La séparation et la purification de ces molécules est réalisée à l'aide de différentes méthodes chromatographiques CCM, CC, CF, HPLC analytique, préparative et semi-préparative. Tandis que leur identification structurale est effectuée par les analyses combinées des données spectrales obtenues des expériences spectroscopiques RMN 1D et 2D, la spectrométrie de masse HR-ESI-MS et ESI-MS, UV, IR, la mesure du pouvoir rotatoire, l'hydrolyse acide et par la comparaison avec les données issues de la littérature.

L'étude phytochimique faite sur les extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH obtenus de la plante entière *Atractylis cancellata* L. a révélé la diversité structurale des métabolites secondaires constituant cette plante. Cette étude a conduit à l'isolement et l'identification de **17** composés naturels dont un présente une nouvelle structure. Ces produits varient entre alcaloïdes, flavonoïdes, acides phénoliques et triterpènes. On mentionne dans cette étude que les composés appartenant à la classe des alcaloïdes sont isolés pour la première fois à partir du genre *Atractylis*. Par ailleurs, les acides phénoliques, les flavonoïdes et les triterpènes ont été déjà trouvés dans plusieurs espèces de ce genre telles que *A. flava, A. serratuloides, A. humilis* et *A. gummifera*. En effet, les produits isolés sont présentés comme suit :

- 2 alcaloïdes avec une structure de base de quinolone, nommé pyrroloquinolone A (Ac1) et
  4-méthoxy-1-méthyl-2-quinolone (Ac2), dont le premier est un composé nouveau dans le règne végétal.
- 7 flavonoïdes Ac3-Ac9 entre flavonoïdes simples ou glycosylés (mono ou di-saccharide).
- 4 acides phénoliques Ac10-Ac13, en général sont des dérivés de l'acide cafféique.
- 4 triterpènes pentacyclique Ac14-Ac17.

Cette étude chimique a été suivie par une étude biologique. En effet, les extraits organiques EP, AcOEt et *n*-BuOH, ainsi que les produits **Ac5** (tricine), **Ac7** (quercétine-3-*O*- $\beta$ -D-glucoside), **Ac8** (isoorientine), **Ac9** (diosmine), **Ac10** (acide 4-*O*-cafféoyl-2-methyl-threonique), **Ac11** (chlorogénate de méthyle) et **Ac12** (acide 5-*O*-cafféoylshikimique) ont fait l'objet d'une étude de leurs capacités antioxydantes avec quatre méthodes DPPH, ABTS, FRAP et CUPRAC. En plus, les extraits et les deux alcaloïdes ont été examinés pour leur pouvoir anticholinesterase. Cela a révélé une bonne activité antioxydante des produits **Ac8**, **Ac10-Ac12** pour les quatre méthodes testées en général, ainsi un excellent pouvoir anticholinesterase du nouvel alcaloïde **Ac1** (pyrroloquinolone A) (AChE IC<sub>50</sub> 18,48 ± 0,33 et BChE 9,66 ± 0,16 µg/mL) par rapport au standard utilisé la galantamine (AChE IC<sub>50</sub> 6,27 ± 1,15 et BChE 34,75 ± 1,99 µg/mL).

Dans un seconde temps, une investigation phytochimique bio-guidée a été réalisée sur les extraits AcOEt et *n*-BuOH de la deuxième plante *Euphorbia gaditana* Coss. Elle a montré la richesse de cette plante en métabolites secondaires bioactifs de type polyphenol, ceci a été parachevé par l'isolement et la caractérisation de **32** composés à l'état pur dont **2** sont nouveaux (flavonoïdes et phénols en général). De nombreux produits appartenant à ces classes chimiques ont été antérieurement rencontrés dans plusieurs espèces étudiées du genre *Euphorbia* par exemple *E. bupleuroides, E. helioscopia, E. atlantica, E. stracheyi, E. guyoniana, E. retusa, E. hirta* ...etc. On mentionne aussi qu'il existe 13 composés parmi ceux qui sont isolés d'*E. gaditana* sont trouvés pour la première fois dans le genre *Euphorbia*.

Les composés isolés et identifiés de l'espèce E. gaditana sont classés comme suit :

- 1 nouveau tannin de type hydrolysable Eg1 (3,5-dihydroxyacétophénone-4-*O*-(2'-galloyl)-β-D-glucopyranoside).
- **1** nouveau α-pyrone **Eg2** (5-isopropyl-2-oxo-3,6-dihydropyrane-4-carboxylique).
- **18** flavonoïdes de type flavonol **Eg3-Eg20**.
- 12 phénols Eg21-Eg32.

Une étude bio-guidée de l'activité antioxydante a été menée sur les extraits organiques EP, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-BuOH de la plante *E. gaditana*, ensuite sur les fractions **Acg1-Acg4** (issues de l'extrait AcOEt), ainsi que les fractions **Bug0-Bug4** (issues de l'extrait *n*-BuOH), et enfin sur les produits isolés **Eg1-Eg31**. Cela a démontré une bonne activité antioxydante de ces produits en général, et surtout les composés **Eg4** (quercétine), **Eg7** (quercétine-3-O- $\alpha$ -L-arabinoside), **Eg9** (myricétine-3-O- $\alpha$ -

α-L-arabinoside), **Eg11** (myricétine-3-*O*-α-L-rhamnoside), **Eg14** (quercétine-3-*O*-β-D-glucuronide), **Eg20** (myricétine-3-*O*-(3"-*O*-galloyl)-α-L-rhamnoside), **Eg25** (4-*O*-cafféoylquinate de méthyl) et **Eg30** (éthyl gallate). Toutefois, les mêmes fractions en plus des deux nouveaux produits **Eg1** (3,5-dihydroxyacétophénone-4-*O*-(2'-galloyl)-β-D-glucopyranoside) et **Eg2** (5-isopropyl-2-oxo-3,6dihydropyrane-4-carboxylique) ont été examinés pour leurs pouvoir anti-tyrosinase, ce qui a révélé une bonne activité du composé **Eg2** (IC<sub>50</sub> 52,39 ± 0,69 µg/mL) par rapport à l'acide kojique utilisé comme un standard de comparaison (IC<sub>50</sub> 25,23 ± 0,78 µg/mL).

Ensuite, en se basant sur les résultats obtenus de l'évaluation de l'activité antioxydante des composés flavonoïdiques obtenus (**Eg3-Eg20**), une étude de la relation structure-activité a été établie. Ceci a permet de distinguer les positions ainsi la nature des substituants qui pourraient influencer le pouvoir antioxydant des flavonoïdes de type flavonol. En effet, la comparaison a été portée sur les substituants hydroxyles du noyau B (nombre et position), le type du sucre accroché en position C-3 (glucoside, arabinoside, rhamnoside, glucuronide et glucuronide-6-*O*-méthyl) et même sur le groupement galloyl attaché au rhamnoside (présence et position).

L'étude bibliographique exhaustive faite sur les plantes appartenant aux genres *Atractylis* et *Euphorbia* ainsi que l'ensemble des résultats obtenus à l'issue de l'investigation phytochimique et biologique des espèces *A. cancellata* et *E. gaditana* dévoilant clairement l'intérêt de cette étude, suggèrent la formulation de quelques voies et perspectives de recherche à savoir :

- il serait souhaitable de réaliser d'autres tests biologiques sur les extraits et les composés isolés de la plante *A. cancellata* telles que l'activité antibactérienne et antifongique en se basant particulièrement sur son utilisation en médecine traditionnelle locale pour traiter les affections dermatologiques.

- Dans le but d'achever les travaux phytochimique et biologique sur l'espèce *E. gaditana*, il serait intéressant d'investiguer l'extrait éther de pétrole tout en cherchant notamment les composés diterpéniques de type abiétane, jatrophane et tigliane doués d'activités biologiques prometteuses et triterpéniques à squelette cycloartane, lanostane, euphane et tirucallane, vu que le genre *Euphorbia* est caractérisé par ce type de métabolites secondaires considérés comme marqueurs chimiotaxonomiques.

- Une étude biologique sur les extraits et les produits isolés de l'espèce *E. gaditana* comme les tests des activités anti-inflammatoire et antibactérienne vont certainement enrichir plus ce travail en matière de valorisation, étant donné que cette plante est utilisée en médecine traditionnelle pour diminuer les douleurs rhumatismales et éliminer les verrues.

- Une investigation phytochimique et biologique des racines de l'espèce *E. gaditana* serait envisageable afin de valoriser toutes les parties de cette plante médicinale.

- Il serait également préférable de continuer des travaux de recherche chimique et biologique sur d'autres espèces appartenant aux genres *Atractylis* et *Euphorbia* utilisées en médecine traditionnelles afin de valoriser le savoir ancestral de nos guérisseurs en particulier, et la flore algérienne en général.



#### Annexes

III.4. Composés isolé d'*A. cancellata* III.4.1. Composé Ac1

Pyrroloquinolone A

(5-méthyl-4, 5-dihydro-1*H*-pyrrolo [3,2-c] quinolin-4-one)

Formule brute : C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O

**SM :** HR-ESI (mode positif)  $m/z = 198,0791 \text{ [M]}^+$ 

<sup>1</sup>H (600 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.1, page 84).

## III.4.2. Composé Ac2

4-methoxy-1-methyl-2-quinolone

Formule brute : C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O

**SM** : ESI (mode positif)  $m/z = 189 [M]^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.2, page 90).

#### III.4.3. Composé Ac3

Chrysine

Formule brute : C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>

**SM :** ESI (mode négatif)  $m/z = 253 \text{ [M-H]}^{-}$ , 507 [2M-H]<sup>-</sup>

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans Acétone- $d_6$  (Tableau III.3, page 92).

#### III.4.4. Composé Ac4

Apigénine Formule brute :  $C_{15}H_{10}O_5$ SM : ESI (mode positif)  $m/z = 309 [M+K]^+$ 

 $^1\mathrm{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\mathrm{C}$  (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.4, page 95).









#### III.4.5. Composé Ac5

Tricine

Formule brute : C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>

**SM** : ESI (mode positif)  $m/z = 331 [M+H]^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.5, page 97).

#### III.4.6. Composé Ac6

Quercétine

Formule brute : C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>

**SM :** ESI (mode positif)  $m/z = 325 [M+Na]^+, 627 [2M+Na]^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.6, page 100).

#### III.4.7. Composé Ac7

Quercétine-3-*O*-β-D-glucopyranoside

Formule brute : C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>

**SM** : ESI (mode positif)  $m/z = 487 [M+Na]^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.7, page 105).

#### III.4.8. Composé Ac8

Isoorientine

Formule brute : C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>

**SM :** ESI (mode positif)  $m/z = 471 [M+Na]^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.8, page 111).







,OH

OMe

#### III.4.9. Composé Ac9

Diosmine

Formule brute : C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>15</sub>

**SM** : ESI (mode positif)  $m/z = 631 [M+Na]^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.9, page 118).

#### III.4.10. Composé Ac10

Acide 4-O-cafféoyl-2-methyl-threonique

**Formule brute :** C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>

**SM** : ESI (mode positif)  $m/z = 335 [M+Na]^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.10, page 123).

#### III.4.11. Composé Ac11

Chlorogénate de méthyle

Formule brute : C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>

**SM :** ESI (mode positif)  $m/z = 391 [M+Na]^+$ , 759  $[2M+Na]^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.11, page 129).

#### III.4.12. Composé Ac12

Acide 5-O-cafféoylshikimique

**Formule brute :** C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>

**SM** : ESI (mode négatif)  $m/z = 335 [M-H]^{-1}$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.12, page 134).







#### III.4.17. Composé Ac13

Acide salicylique

#### Formule brute : C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>

 $^{1}$ H (500 MHz) et  $^{13}$ C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.13, page 136).

# III.4.13. Composé Ac14

Lupéol

Formule brute : C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O

# III.4.14. Composé Ac15

Acide oléanolique

Formule brute : C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>

# III.4.15. Composé Ac16

 $\beta$ -sitostérol

Formule brute : C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O

# III.4.16. Composé Ac17

 $\beta$ -sitostérol-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside

**Formule brute :** C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>











III.5. Composés isolé d'E. gaditana

# III.5.1. Composé Eg1

3,5-dihydroxyacétophénone-4-O-(2'-galloyl)- $\beta$ -D-glucopyranoside

Formule brute : C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>13</sub>

**SM :** HR-ESI (mode positif)  $m/z = 505,0953 [M+Na]^+$ 

<sup>1</sup>H (600 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.14, page 146).

# III.5.2. Composé Eg2

5-isopropyl-2-oxo-3,6-dihydropyrane-4-carboxylique **Formule brute :** C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>

**SM :** HR-ESI (mode positif)  $m/z = 207,0628 [M+Na]^+$ 

<sup>1</sup>H (600 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.15, page 154).

# III.5.3. Composé Eg3

(-) Catéchine

Formule brute :  $C_{15}H_{14}O_6$ 

**SM :** ESI (mode positif)  $m/z = 313 [M+Na]^+$ , 603  $[2M+Na]^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.16, page 159).

# III.5.4. Composé Eg4

Quercétine

Formule brute : C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>

**SM :** ESI (mode positif)  $m/z = 325 [M+Na]^+$ , 627  $[2M+Na]^+$ 

 $^{1}$ H (500 MHz) et  $^{13}$ C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.6, page 100).









#### III.5.5. Composé Eg5

Myricétine

**Formule brute :** C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>8</sub>

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.17, page 162).

#### III.5.6. Composé Eg6

Quercétine-3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside

Formule brute :  $C_{21}H_{19}O_{12}$ 

**SM :** ESI (mode négatif)  $m/z = 463 \text{ [M-H]}^{-1}$ 

 $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.7, page 105).

# 

#### III.5.7. Composé Eg7

Quercétine-3-*O*-*α*-L-arabinopyranoside

Formule brute : C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>11</sub>

**SM :** ESI (mode positif)  $m/z = 457 [M+Na]^+$ 

 $^{1}$ H (500 MHz) et  $^{13}$ C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.18, page 168).

## III.5.8. Composé Eg8

Kaempférol-3-*O*-α-L-arabinopyranoside

Formule brute : C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>10</sub>

**SM** : ESI (mode négatif)  $m/z = 417 \text{ [M-H]}^{-1}$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.19, page 171).

# 





#### III.5.9. Composé Eg9

Myricétine-3-O-α-L-arabinopyranoside

**Formule brute :** C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>12</sub>

**SM :** ESI (mode positif)  $m/z = 473 [M+Na]^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.20, page 174).

#### III.5.10. Composé Eg10

Quercétine-3-*O*-*α*-L-rhamnopyranoside

**Formule brute :** C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>

**SM :** ESI (mode positif)  $m/z = 471 [M+Na]^+$ 

 $^{1}$ H (500 MHz) et  $^{13}$ C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.21, page 179).

# III.5.11. Composé Eg11

Myricétine-3-*O*-α-L-rhamnopyranoside

Formule brute : C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>11</sub>

**SM :** ESI (mode positif)  $m/z = 487 [M+Na]^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.22, page 182).

#### III.5.12. Composé Eg12

6"-méthyl kaempférol-3-*O*-β-D-glucuronide

Formule brute : C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>

**SM :** ESI (mode positif)  $m/z = 499 [M+Na]^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.23, page 186).









#### III.5.13. Composé Eg13

Kaempférol-3-*O*-β-D-glucuronide

Formule brute : C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>12</sub>

**SM** : ESI (mode négatif)  $m/z = 461 \text{ [M-H]}^{-1}$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.24, page 189).

#### III.5.14. Composé Eg14

Quercétine-3-*O*-β-D-glucuronide

Formule brute : C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>13</sub>

**SM** : ESI (mode négatif)  $m/z = 477 [M-H]^{-1}$ 

 $^{1}$ H (500 MHz) et  $^{13}$ C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.25, page 192).

#### III.5.15. Composé Eg15

6"-méthyl myricétine-3-O- $\beta$ -D-glucuronide

Formule brute : C<sub>22</sub>H<sub>20</sub>O<sub>14</sub>

**SM**: ESI (mode négatif)  $m/z = 507 [M-H]^{-1}$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.26, page 195).

#### III.5.16. Composé Eg16

Myricétine-3-O- $\beta$ -D-glucuronide

**Formule brute :** C<sub>21</sub>H<sub>18</sub>O<sub>14</sub>

**SM :** ESI (mode négatif)  $m/z = 493 \text{ [M-H]}^{-1}$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.27, page 198).









#### III.5.17. Composé Eg17

Quercétine-3-O-(2"-O-galloyl)-a-L-rhamnopyranoside

**Formule brute :** C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>O<sub>15</sub>

**SM :** ESI (mode positif)  $m/z = 623 [M+Na]^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.28, page 203).

#### III.5.18. Composé Eg18

Quercétine-3-O-(3"-O-galloyl)-α-L-rhamnopyranoside

**Formule brute :** C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>O<sub>15</sub>

**SM** : ESI (mode négatif)  $m/z = 599 [M-H]^{-1}$ 

 $^{1}$ H (500 MHz) et  $^{13}$ C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.29, page 206).

### III.5.19. Composé Eg19

Myricétine-3-O-(2"-O-galloyl)-α-L-rhamnopyranoside

Formule brute : C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>O<sub>16</sub>

**SM**: ESI (mode négatif)  $m/z = 615 [M-H]^{-1}$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.30, page 209).

#### III.5.20. Composé Eg20

Myricétine-3-O-(3"-O-galloyl)-α-L-rhamnopyranoside

Formule brute : C<sub>28</sub>H<sub>24</sub>O<sub>16</sub>

**SM :** ESI (mode négatif)  $m/z = 615 \text{ [M-H]}^{-1}$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.31, page 213).









#### III.5.21. Composé Eg21

Trilobatine

Formule brute : C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub>

**SM** : ESI (mode positif)  $m/z = 459 [M+Na]^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.32, page 219).

#### III.5.22. Composé Eg22

Citrusine E

Formule brute : C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>9</sub>

**SM :** ESI (mode négatif)  $m/z = 371 [M-H]^{-}, 417 [M+HCOO]^{-}$ 

 $^{1}$ H (500 MHz) et  $^{13}$ C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.33, page 224).

#### III.5.23. Composé Eg23

*Cis*-p-coumaroyl- $\beta$ -D-glucopyranoside ester

Formule brute : C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>

**SM :** ESI (mode négatif)  $m/z = 325 \text{ [M-H]}^{-}$ , 651 [2M-H]<sup>-</sup>, 673 [2M-2H+Na]<sup>-</sup>

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.34, page 227).

#### III.5.24. Composé Eg24

3,5-dihydroxyacétophénone-4-O- $\beta$ -D-glucopyranoside

**Formule brute :** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>

**SM :** ESI (mode négatif)  $m/z = 329 \text{ [M-H]}^{-}$ , 659 [2M-H]<sup>-</sup>

 $^{1}$ H (500 MHz) et  $^{13}$ C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.35, page 229).









#### III.5.25. Composé Eg25

4-O-cafféoylquinate de méthyl

**Formule brute :** C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>

**SM :** ESI (mode négatif)  $m/z = 367 [M-H]^{-1}$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.36, page 234).

#### III.5.26. Composé Eg26

4-*O*-feruloylquinate de méthyl

**Formule brute :** C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>

**SM** : ESI (mode négatif)  $m/z = 381 \text{ [M-H]}^{-1}$ 

 $^{1}$ H (500 MHz) et  $^{13}$ C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.37, page 237).

#### III.5.27. Composé Eg27

Acide chlorogénique

**Formule brute :** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>9</sub>

**SM**: ESI (mode négatif)  $m/z = 353 [M-H]^{-1}$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.38, page 239).

#### III.5.28. Composé Eg28

5-*O*-feruloylquinate de méthyl

**Formule brute :** C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>9</sub>

**SM :** ESI (mode négatif)  $m/z = 381 \text{ [M-H]}^{-1}$ 

 $^{1}$ H (500 MHz) et  $^{13}$ C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.39, page 242).





юн



#### III.5.29. Composé Eg29

3,4,5-trihydroxyacétophénone

**Formule brute :** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.40, page 244).

# III.5.30. Composé Eg30

Ethyl gallate

**Formule brute :** C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>

**SM :** ESI (mode positif)  $m/z = 198,0791 \text{ [M]}^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.41, page 246).

# III.5.31. Composé Eg31

Acide *E*-p-coumarique

**Formule brute :** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>

**SM :** ESI (mode positif)  $m/z = 198,0791 \text{ [M]}^+$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.42, page 248).

# III.5.32. Composé Eg32

Acide gallique

**Formule brute :** C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>

**SM**: ESI (mode négatif)  $m/z = 169 [M-H]^{-1}$ 

<sup>1</sup>H (500 MHz) et <sup>13</sup>C (125 MHz) dans CD<sub>3</sub>OD (Tableau III.43, page 250).











#### Check for updates

# Pyrroloquinolone A, a new alkaloid and other phytochemicals from *Atractylis cancellata* L. with antioxidant and anticholinesterase activities

Mohamed Ibrahim Badaoui<sup>a</sup>, Abdulmagid Alabdul Magid<sup>b</sup>, Mohammed Benkhaled<sup>a</sup>, Chawki Bensouici<sup>c</sup>, Dominique Harakat<sup>d</sup>, Laurence Voutquenne-Nazabadioko<sup>b</sup> and Hamada Haba<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (LCCE), Département de Chimie, Faculté des Sciences de la Matière, Université de Batna-1, Batna, Algeria; <sup>b</sup>Equipe Chimie des Substances Naturelles, Institut de Chimie Moléculaire de Reims (ICMR-UMR CNRS 7312), Reims, France; <sup>c</sup>Centre de Recherche en Biotechnologie, Laboratoire de Biochimie, Division Biotechnologie et Santé, Constantine, Algérie; <sup>d</sup>Service Commun d'Analyses, ICMR-UMR CNRS 7312, Reims, France

#### ABSTRACT

A new alkaloid pyrroloquinolone A (1), along with fifteen known compounds **2–16** were isolated from the petroleum ether, EtOAc and *n*-BuOH extracts of the whole plant *Atractylis cancellata* L. Their structures were elucidated on the basis of extensive spectroscopic analysis including 1D- and 2D-NMR and HR-ESI-MS techniques. This is the first report of alkaloids in the genus *Atractylis*. Some of the isolated compounds and extracts were evaluated for their antioxidant potential (scavenging activity of DPPH and ABTS radicals, and reducing Fe<sup>+3</sup> and Cu<sup>+2</sup> power assays) and acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities. Compounds **8** and **11** showed good antioxidant capacity compared to ascorbic acid, BHA, and BHT used as standards, whereas compounds **1** and **2** exhibited good anticholinesterase activities compared to galantamine used as standard.



#### **ARTICLE HISTORY**

Received 4 May 2019 Accepted 10 October 2019

#### **KEYWORDS**

Asteraceae; Atractylis cancellata L; pyrroloquinolone A; NMR; antioxidant activity; anticholinesterase activity

CONTACT Hamada Haba a haba.hamada@yahoo.fr; hamada.haba@univ-batna.dz Supplemental data for this article can be accessed at https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1682575. © 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

#### 1. Introduction

The Asteraceae family also called Compositae is the most diverse of all plant families, and it is growing in the entire globe except for Antarctica, with 24,000–30,000 species and 1600–1700 genera (Funk et al. 2005). The *Atractylis* genus belonging to this family is widespread in the Mediterranean area, including 16 species in North Africa due to its variable climate (arid, semi-arid, tropical and desert) (Chabani et al. 2013).

The *Atractylis* species are used in folk medicine against urinary retention, intestinal parasites and snakebite poisoning, and for their anti-inflammatory and antipyretic activities (Larrey and Pageaux 1995; El Rhaffari and Zaid 2002; Daniele et al. 2005; Melakhessou et al. 2018). In addition, many studies have been reported for *Atractylis* plants, which allowed the identification of diterpenes, triterpenes, saponins and flavo-noids (Sadek et al. 1998; Chabani et al. 2013, 2016a, 2016b). *Atractylis cancellata* L., used in folk medicine for the treatment of skin disorders (Bammou et al. 2015), is an herbaceous endemic plant; it grows in semi-arid zone of Mediterranean area (Quezel and Santa 1963).

In this paper, we report the isolation and structural elucidation of one new alkaloid type pyrroloquinolone A (1), together with fifteen known secondary compounds including one alkaloid **2**, seven flavonoids **3–9**, three phenolic acids **10–12**, and four triterpenes **13–16**. In addition, the antioxidant capacities of extracts (PE, EtOAc and *n*-BuOH) and some phenolic compounds were measured using DPPH, ABTS, CUPRAC and reducing power methods. Furthermore, the acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activities of extracts and the alkaloids **1** and **2** were tested.

It is worth to note that this work represents the first phytochemical and biological investigations of *A. cancellata* and the first report of alkaloids in the genus *Atractylis*.

#### 2. Results and discussion

#### 2.1. Chemical constituents

The 70% ethanol extract of dried whole plant A. cancellata was partitioned by liquid/ liquid chromatography into three extracts PE, EtOAc and n-BuOH. Purification of the PE, and EtOAc soluble parts gave the known compounds 13-15, and 3-6 and 16, respectively. While, one new alkaloid 1, in addition of seven known compounds 2 and 7-12 were isolated from the n-BuOH soluble part (Figure 1). Their structures were elucidated on the basis of 1D- and 2D-NMR and HR-ESI-MS techniques, and comparison with data reported in the literature. The known compounds were elucidated as the alkaloid 4-methoxy-1-methyl-2-quinolone (2) (Nayar et al. 1971), the flavonoids chrysin (3) (Liu et al. 2010), apigenin (4) (Liu et al. 2010), tricine (5) (Ghasemi et al. 2018), quercetin (6) (Liu et al. 2010), quercetin 3-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (7) (Chang et al. 2009), isoorientin (8) (Chang et al. 2009), and diosmin (9) (Szeleszczuk et al. 2017), the phenolic acids 4-O-caffeoyl-2-C-methyl-D-threonic acid (10) (Chang et al. 2009), chlorogenic acid methyl ester (11) (Chang et al. 2009), and 5-O-caffeoylshikimic acid (12) (Khaligh et al. 2016). Finally, the triterpenes lupeol (13) (Silva et al. 2017), and oleanolic acid (14) (Seebacher et al. 2003), were identified with  $\beta$ -sitosterol (15) (Chaturvedula and Prakash 2012), and  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucoside (**16**) (Peshin and Kar 2017).



Figure 1. Chemical structures of compounds 1–16 isolated from A. cancellata L.

#### 2.2. Structural elucidation of the new compound

Compound 1 was isolated as a white amorphous powder. The positive HR-ESI-MS showed a molecular ion peak at m/z 198.0791 [M]<sup>+</sup> (calcd. C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O, 198.0793). The <sup>1</sup>H-NMR spectrum of **1** showed a methyl group signal at  $\delta_{\rm H}$  4.02 (3H, s) and six aromatic proton signals at  $\delta_{H}$  7.12 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-3), 7.46 (1H, d, J = 3.1 Hz, H-2), 7.61 (1H, t, J=7.6 Hz, H-8), 7.75 (1H, ddd, J=8.7, 7.6, 1.3 Hz, H-7), 8.01 (1H, d, J=8.7 Hz, H-6) and 8.24 (1H, brd, J = 8.0 Hz, H-9). According to the correlation observed in the <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY spectrum between protons H-3/H-2, H-8/H-7, H-8/H-9, and H-7/H-6, and their coupling constants, we assumed that the protons H-6, H-7, H-8 and H-9 belong to the same aromatic ring which is di-substituted in ortho position; and the two protons H-2 and H-3 belong to an another aromatic ring. The <sup>13</sup>C-NMR spectrum showed signal at  $\delta_{C}$  152.4 corresponding to a quaternary carbon of an ester or an amide group. The other signals are in the aromatic area shifts ( $\delta_{C}$  103.9, 108.6, 115.1, 116.9, 121.5, 124.9, 125.1, 129.0, 134.8 and 135.1), in addition to a signal at  $\delta_{C}$  33.1 attributed to a methyl group. The chemical shifts of the carbon and the protons signals ( $\delta_H$  4.02/  $\delta_{\rm C}$  33.1) of this methyl group suggested it to be linked to a nitrogen atom. The HSQC spectrum allowed the assignment of the protons at  $\delta_{H}$  7.12, 7.46, 7.61, 7.75, 8.01 and 8.24 to their carbons at  $\delta_{C}$  103.9 (C-3), 125.1 (C-2), 124.9 (C-8), 129.0 (C-7), 116.9 (C-6) and 121.5 (C-9), respectively. The HMBC spectrum exhibited  ${}^{3}J_{H/C}$  correlation between the protons of the N-methyl group ( $\delta_H$  4.02) and carbons C-6, C-6a (135.1 ppm) and C-4 (152.4 ppm) (Figure S8) indicating that the nitrogen is related to the aromatic ring by the bond N-(C-6a), and the function will be an amide. The two protons of the aromatic ring H-6 and H-8 showed  ${}^{3}J_{H/C}$  correlations with the quaternary carbon at  $\delta_{C}$ 115.1, ascribable to C-9a. The HMBC spectrum exhibited also the correlations H-6/C-8, H-7/C-6a, H-7/C-9 and H-9/C-6a, H-6/C-9b (134.8 ppm), and H-9/C-9b (Figure S8).

According to the HMBC correlations H-2/C-9b and H-3/C-9b, the carbon chemical shifts of C-2 (125.1 ppm) and C-9b (134.8 ppm), and the molecular formula obtained by HR-ESI-MS spectrum ( $C_{12}H_{10}N_2O$ ), the carbons C-2 and C-9b were proposed to be connected by a second nitrogen atom (C-9b-NH-C-2). The HMBC correlations H-3/C-3a (108.6 ppm), H-2/C-3a and H-2/C-4 confirmed that C-3 is connected to C-3a (Figure S8), and were included in a pyrrole ring.

According to these data, this compound is composed of benzene and pyrrole rings linked to a pyridine ring including the amide group, which lead us to the structure of pyrroloquinolone. Thus, compound **1** was elucidated as 5-methyl-4, 5-dihydro-1*H*-pyrrolo[3,2-c]quinolin-4-one, previously synthetized by Tim and Keith (1997), and named pyrroloquinolone A.

#### 2.3. Spectral data

Pyrroloquinolone A (1): White amorphous powder; UV  $\lambda_{max}$  (MeOH): 249, 316, 328 nm; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_{H}$  4.02 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>), 7.12 (1H, d, J = 3.1, H-3), 7.46 (1H, d, J = 3.1, H-2), 7.61 (1H, t, J = 7.6 Hz, H-8), 7.75 (1H, ddd, J = 8.7, 7.6, 1.3 Hz, H-7), 8.01 (1H, d, J = 8.7 Hz, H-6), 8.24 (1H, brd, J = 8.0 Hz, H-9); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta_{C}$ 33.1 (*N*-CH<sub>3</sub>), 103.9 (C-3), 108.6 (C-3a), 115.1 (C-9a), 116.9 (C-6), 121.5 (C-9), 124.9 (C-8), 125.1 (C-2), 129.0 (C-7), 134.8 (C-9b), 135.1 (C-6a), 152.4 (C-4); HR-ESI-MS *m/z* 198.0791 [M]<sup>+</sup> (calcd. C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O, 198.0793).

#### 2.4. Phenolic and flavonoid contents

The total phenolic and flavonoid contents (TPC, TFC) were determined in the PE, EtOAc and *n*-BuOH extracts. The results were expressed by gallic acid equivalent as (mg GAE/g Extract) for TPC, and by quercetin equivalent as (mg QE/g Extract) for TFC. The *n*-BuOH extract showed the higher content of phenols ( $53.20 \pm 1.21$  mg GAE/g) comparing to the EtOAc ( $4.55 \pm 0.13$  mg GAE/g) and the PE ( $28.44 \pm 2.85$  mg GAE/g). The same result was obtained for content of flavonoids (*n*-BuOH 49.39 ± 0.98 mg QE/g EtOAc  $8.72 \pm 1.08$ , and PE  $6.38 \pm 1.01$  mg QE/g) (Table S1).

#### 2.5. Biological activity

The results of phenolic and flavonoid contents were confirmed by the phytochemical investigation. Indeed, many phenolic and flavonoid compounds were isolated from the EtOAc and *n*-BuOH extracts. According to the literature, the polyphenol compounds show a good antioxidant activity (Rice-Evans et al. 1996; Apak et al. 2004; Al-Qudah et al. 2014; Shalkami et al. 2018; Dong et al. 2019). So, the PE, EtOAc and *n*-BuOH extracts and some isolated compounds **5**, **7–9** and **10–12** were evaluated for their antioxidant activity by four methods DPPH, ABTS, CUPRAC, and reducing power assay; using ascorbic acid, BHA and BHT as positive control (Table S2).

The DPPH assay indicated a good activity for five tested compounds, in particular compounds **8** and **11** which afforded a potent activity ( $IC_{50}$  8.16±0.27 and 18.81±0.17 µg/mL, respectively) compared to ascorbic acid ( $IC_{50}$  13.94±2.81 µg/mL),

BHA (IC<sub>50</sub> 5.73±0.41 µg/mL) and BHT (IC<sub>50</sub> 22.32±1.19 µg/mL) as standards, while the IC<sub>50</sub> for compounds **5** and **9** were not achieved at 100 µg/mL (Table S2). Compounds **8** and **11** showed also the highest activity in ABTS<sup>+.</sup> radical scavenging assay (IC<sub>50</sub> 7.14±0.13 and 5.98±0.00 µg/mL, respectively) compared to ascorbic acid (IC<sub>50</sub> 1.74±0.10 µg/mL), BHA (IC<sub>50</sub> 1.81±0.10 µg/mL) and BHT (IC<sub>50</sub> 1.29±0.30 µg/mL), whereas good scavenging activity was observed for compounds **5**, **7**, **10** and **12** (IC<sub>50</sub> 47.23±2.44,  $30.79\pm1.42$ ,  $14.81\pm0.47$  and  $17.09\pm0.64$ µg/mL, respectively). The CUPRAC assay was applied and all compounds revealing an excellent ability to reduce Cu<sup>+2</sup> (IC<sub>50</sub> < 0.78µg/mL). In the reducing power assay, compounds **8** and **10–12** showed a good ability to reduce Fe<sup>+3</sup> (IC<sub>50</sub> 10.76±0.80, 27.45±1.16, 14.18±0.25 and 19.83±0.60µg/mL, respectively), compared to ascorbic acid (IC<sub>50</sub> 6.37±0.42 µg/mL), BHA (IC<sub>50</sub> 8.41±0.67µg/mL) and BHT (IC<sub>50</sub> > 100µg/mL) (Table S2).

Cholinesterases (ChEs) play a vital role in regulating cholinergic transmission. Inhibition of ChEs is thought to be an emerging and useful therapeutic target for neurodegenerative disorders through restoration of acetylcholine levels in the brain (e.g. Alzheimer's disease) (Bensouici et al. 2016). Since derivatives of quinoline alkaloids such as tacrine have promising AChE and BChE inhibitory effects (Cabral et al. 2012; Konrath et al. 2013; Mermer et al. 2018; Mishra et al. 2019), the unexplored quinoline alkaloid derivatives **1** and **2** and extracts in which they were detected, were evaluated for their acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) inhibitory activity (Table S3). Galantamine was used as positive control (Mishra et al. 2019), (Table S3). The *n*-BuOH extract exhibited moderate AChE (IC<sub>50</sub> 48.58 ± 0.26 µg/mL) and good BChE (IC<sub>50</sub> =  $6.27 \pm 1.15$ , AChE and  $34.75 \pm 1.99 \mu g/mL$ , BChE). Compound **1** exhibited a significant AChE inhibitory activity (IC<sub>50</sub> =  $18.48 \pm 0.33 \mu g/mL$ ) and a potent BChE inhibitory activity (9.66 ± 0.16 µg/mL), whereas compound **2** exhibited a moderate BChE inhibitory activity (IC<sub>50</sub>  $37.49 \pm 1.61 \mu g/mL$ ).

#### 3. Conclusion

In summary, one new alkaloid, pyrroloquinolone A (1), along with fifteen known compounds **2–16** were isolated and identified from the whole plant *Atractylis cancellata* L. The antioxidant activity, evaluated by DPPH, ABTS, CUPRAC and reducing power methods, showed that compounds **8** and **11** possess good antioxidant activity. Furthermore, the *n*-BuOH extract, pyrroloquinolone A, and compound **2** showed good AChE and BChE inhibitory activities. This study reports for the first time the occurrence of alkaloids in the *Atractylis* genus.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria for PRFU Project (B00L01UN050120180001), CRBt (Constantine-Algeria), Conseil Regional Champagne Ardenne, Conseil General de la Marne, Ministry of Higher Education and Research (MESR) France and EU-program FEDER to the PIAneT CPER project.

#### **Disclosure statement**

No potential conflict of interest was reported by the authors.

#### **Statistical analysis**

All data on both chemical analysis and bioassays activity tests were the average of triplicate analyses. The data were recorded as mean values  $\pm$  standard deviation. The IC<sub>50</sub> values were calculated by linear regression analysis, and one-way analysis of variance ANOVA to detect significant differences (p < 0.05), using XLSTAT Tukey test.

#### References

- Al-Qudah MA, Al-Jaber HI, Abu Zarga MH, Abu Orabi ST. 2014. Flavonoid and phenolic compounds from *Salvia palaestina* L. growing wild in Jordan and their antioxidant activities. Phytochem. 99:115–120.
- Apak R, Guclu K, Ozyurek M, Karademir SE. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of Neocuproine: CUPRAC method. J Agric Food Chem. 52(26):7970–7981.
- Bammou M, Daoudi A, Sellam K, El-Rhaffari E, Ibijbijen J, Nassiri L. 2015. Ethnobotanical survey of Asteraceae family used in Meknes-Tafilalet region (Morocco). Int J Innov Appl Stud. 13: 789–815.
- Bensouici C, Kabouche A, Karioti A, Ozturk M, Duru ME, Bilia AR, Kabouche Z. 2016. Compounds from Sedum caeruleum with antioxidant, anticholinesterase, and antibacterial activities. Pharm Biol. 54(1):174–179.
- Cabral RS, Sartori MC, Cordeiro I, Queiroga CL, Eberlin MN, Lago JHG, Moreno PRH, Young M. 2012. Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus*. Rev Bras Farmacogn. 22(2):374–380.
- Chabani S, Haba H, Lavaud C, Benkhaled M, Harakat D. 2013. Flavonoid glycosides and triterpenoids from *Atractylis flava*. Phytochem Lett. 6(1):9–13.
- Chabani S, Lavaud C, Benkhaled M, Harakat D, Long C, Haba H. 2016a. Three new oleanane-type triterpene saponins from *Atractylis flava*. Phytochem Lett. 15:88–93.
- Chabani S, Haba H, Long C, Benkhaled M. 2016b. Chemical composition of medicinal plant *Atractylis serratuloides*. Ind Crops Prod. 88:91–95.
- Chang SW, Kim KH, Lee IK, Choi SU, Ryu SY, Lee KR. 2009. Phytochemical constituents of *Bistorta* manshuriensis. Nat Prod Sci. 15:234–240.
- Chaturvedula VSP, Prakash I. 2012. Isolation of stigmasterol and β-sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. Int Curr Pharm J. 1(9):239–242.
- Daniele C, Dahamna S, Firuzi O, Sekfali N, Saso L, Mazzanti G. 2005. Atractylis gummifera L. poisoning: an ethnopharmacological review. J Ethnopharmacol. 97(2):175–181.
- Dong X, Huang Y, Wang Y, He X. 2019. Anti-inflammatory and antioxidant jasmonates and flavonoids from lychee seeds. J Funct Foods. 54:74–80.
- El Rhaffari L, Zaid A. 2002. Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet) In: Des sources du savoir aux médicaments du futur. Ed: Marseille, France: IRD; p. 293–318.
- Funk VA, Bayer RJ, Keeley S, Chan R, Watson L, Gemeinholzer B, Schilling E, Panero JL, Baldwin BG, Garcia-Jacas N, et al. 2005. Everywhere but Antarctica: using a superthree to understand the diversity and distribution of the Compositae. Biol Skr. 55:343–374.
- Ghasemi S, Lorigooini Z, Wibowo J, Amini-Khoei H. 2018. Tricin isolated from *Allium atroviola-ceum* potentiated the effect of docetaxel on PC3 cell proliferation: role of miR-21. Nat Prod Res. 15:1–4.
- Konrath EL, Ortega MG, De Loreto Bordignon S, Apel MA, Henriques AT, Cabrera JL. 2013. Alkaloid profiling and anticholinesterase activity of South American Lycopodiaceae species. J Enzyme Inhib Med Chem. 28(1):218–222.

- Khaligh P, Salehi P, Farimani MM, Ali-Asgari S, Esmaeili MA, Ebrahimi SN. 2016. Bioactive compounds from *Smilax excelsa* L. J Iran Chem Soc. 13(6):1055–1059.
- Larrey D, Pageaux GP. 1995. Hepatotoxicity of herbal remedies and mushrooms. Semin Liver Dis. 15(3):183–188.
- Liu H, Mou Y, Zhao J, Wang J, Zhou L, Wang M, Wang D, Han J, Yu Z, Yang F. 2010. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. Molecules. 15(11): 7933–7945.
- Melakhessou MA, Benkiki N, Marref S, Bouzidi S. 2018. Anti-inflammatory, anti-pyretic and acute toxicity effects of n-butanol extract of *Atractylis flava* Desf. in rats. Pharmacogn J. 10:763–767.
- Mermer A, Demirbaş N, Şirin Y, Uslu H, Özdemir Z, Demirbaş A. 2018. Conventional and microwave prompted synthesis, antioxidant, anticholinesterase activity screening and molecular docking studies of new quinolone-triazole hybrids. Bioorg Chem. 78:236–248.
- Mishra P, Kumar A, Panda G. 2019. Anti-cholinesterase hybrids as multi-target-directed ligands against Alzheimer's disease (1998–2018). Bioorg Med Chem. 27(6):895–930.
- Nayar MNS, Sutar CV, Bhan MK. 1971. Alkaloids of the bark of *Hesperethusa crenulatta*. Phytochem. 10(11):2843–2844.
- Peshin T, Kar HK. 2017. Isolation and characterization of  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glucoside from the extract of the flowers of *Viola odorata*. BJPR. 16(4):1–8.
- Quezel P, Santa S. 1963. New flora of Algeria and the southern desert regions, Tome 2. Paris: C.N.R.S.; p. 998–1002.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med. 20(7):933–956.
- Sadek EG, Metwally MA, Mpango GB. 1998. Triterpenes from *Atractylis carduus* L. Boll Chim Farm. 137:249–250.
- Seebacher W, Simic N, Weis R, Saf R, Kunert O. 2003. Complete assignments of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR resonances of oleanolic acid, 18α-oleanolic acid, ursolic acid and their 11-oxo derivatives. Magn Reson Chem. 41(8):636–638.
- Shalkami AS, Hassan MIA, Bakr AG. 2018. Anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic activity of diosmin in acetic acid-induced ulcerative colitis. Hum Exp Toxicol. 37(1):78–86.
- Silva ATM, Magalhães CG, Duarte LP, Mussel WN, Ruiz A, Shiozawa L, Carvalho JE, Trindade IC, Vieira Filho SA. 2017. Lupeol and its esters: NMR, powder XRD data and in vitro evaluation of cancer cell growth. Braz J Pharm Sci. 53:1–10.
- Szeleszczuk L, Pisklak DM, Zielińska-Pisklak M, Wawer I. 2017. Spectroscopic and structural studies of the diosmin monohydrate and anhydrous diosmin. Int J Pharm. 529(1–2):193–199.
- Tim CTH, Keith J. 1997. A synthesis of the tricyclic pyrroloquinoline core of martinelline. Tetrahedron. 53:8287–8297.

Contents lists available at ScienceDirect



## Phytochemistry Letters



journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytol

# Antioxidant activity-guided isolation of constituents from *Euphorbia gaditana* Coss. and their antioxidant and tyrosinase inhibitory activities



Mohamed Ibrahim Badaoui<sup>a</sup>, Abdulmagid Alabdul Magid<sup>b</sup>, Laurence Voutquenne-Nazabadioko<sup>b</sup>, Mohammed Benkhaled<sup>a</sup>, Dominique Harakat<sup>b</sup>, Anthony Robert<sup>b</sup>, Hamada Haba<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (LCCE), Département de Chimie, Faculté des Sciences de la Matière, Université de Batna-1, 05000, Algeria <sup>b</sup> Université de Reims Champagne Ardenne, CNRS, ICMR UMR 7312, 51097 Reims, France

#### ARTICLE INFO

Keywords: Euphorbia gaditana Coss. Euphorbia gaditana Coss. 4-O-(2"-O-galloy1-β-D-glucopyranosyl)-3,5dihydroxyacetophenone 5-Isopropyl-2-oxo-3,6-dihydropyran-4carboxylic acid Antioxidant activity Tyrosinase inhibitory activity

#### ABSTRACT

Two previously unreported compounds, 4-*O*-(2"-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-3,5-dihydroxyacetophenone (1) and 5-isopropyl-2-oxo-3,6-dihydropyran-4-carboxylic acid (2), along with twenty-nine known compounds (**3** – **31**) were isolated from the aerial parts of *Euphorbia gaditana* Coss. Their structures were elucidated based on extensive spectroscopic analysis 1D and 2D-NMR, mass spectrometry HR-ESI-MS, optical rotation [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>, acid hydrolysis and the comparison of NMR data with those described in literature. The antioxidant activity-guided study was conducted using DPPH and CUPRAC methods started from the extracts to bioactive isolated molecules. Most of the isolates (**1-31**) showed a good to excellent antioxidant activity compared to the standards BHT and ascorbic acid. Furthermore, **1** and **2** exhibited a moderate tyrosinase inhibitory activity (IC<sub>50</sub> 89.78 ± 0.93 and 52.39 ± 0.69 µg/mL, respectively) compared to the standard kojic acid (IC<sub>50</sub> 25.23 ± 0.78 µg/mL).

#### 1. Introduction

The largest *Euphorbia* genus of the Euphorbiaceae family comprises about 2000 plants distributed worldwide. The species of this genus, from annuals to trees, are characterized by their latex (Shi et al., 2008). In the past years, a considerable attention has been paid to *Euphorbia* species due to their use in folk medicines to cure skin diseases, gonorrhea, migraines, intestinal parasites and as wart cures, and for their diverse pharmacological effects of their secondary metabolites, including antiproliferative, antimicrobial, antioxidant, antiviral and antiinflammatory activities (Benabdelaziz et al., 2018; Mouffouk et al., 2019; Özbilgin and Citoğlu, 2012; Shi et al., 2008; Singla and Pathak, 1990). This large range of pharmacological properties is due to a huge diversity of their chemical constituents such as diterpenes, triterpenes, sesquiterpenes, coumarins, phenols and flavonoids (Aichour et al., 2014; Benmerache et al., 2017; Haba et al., 2009, 2013; Özbilgin and Citoğlu, 2012; Liu et al., 2019).

*Euphorbia gaditana* Coss. is an annual plant grown in northern Algeria, Tunisia and southern Spain. Previously, the petroleum ether extract of *E. gaditana* has been studied and allowed the identification of two new diterpenes (Flores-Giubi et al., 2017). However, the present investigation is mainly focused on the EtOAc and *n*-BuOH extracts of this plant to discover other secondary metabolites particularly flavonoids and polyphenolic compounds following antioxidant activityguided isolation.

We report in this paper chemical constitution of EtOAc and *n*-BuOH extracts, obtained from the 70 % aqueous-ethanol extract of *E. gaditana* aerial parts, consisting of two previously unreported compounds, an acetophenone glycoside (1) and an  $\alpha$ -pyrone derivative (2), along with the previously described eighteen flavonoids (3-20) and eleven phenolic compounds (21-31). In addition, the antioxidant capacity of the extracts of different solvents (PE, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and *n*-BuOH), fractions and isolated compounds was evaluated using DPPH and CUPRAC methods. Furthermore, the tyrosinase inhibitory activity of all the extracts and 1 and 2 was investigated.

#### 2. Results and discussion

#### 2.1. Phenolic and flavonoid contents

The aerial parts of *E. gaditana* were macerated in 70 % aqueousethanol and the obtained extract was fractionated by liquid-liquid partition, with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate, and *n*-butanol. The obtained extracts i.e. PE, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and *n*-BuOH were investigated for their total phenolic and flavonoid contents (TPC, TFC). The results of TPC are expressed by gallic acid equivalent (GAE) as (mg

\* Corresponding author.

E-mail addresses: haba.hamada@yahoo.fr, hamada.haba@univ-batna.dz (H. Haba).

https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.07.012

Received 2 June 2020; Received in revised form 18 July 2020; Accepted 27 July 2020

1874-3900/ © 2020 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.
#### Table 1

Phenolic and flavonoid contents in E. gaditana extracts.

Extracts	TPC (mg GAE <sup>x</sup> /g)	TFC (mg QE <sup>y</sup> /g)
PE CHCl <sub>3</sub> EtOAc n-BuOH	$6.32 \pm 1.43$ 29.39 $\pm 1.98$ 189.87 $\pm 1.32$ 109.26 $\pm 1.43$	$\begin{array}{c} 1.17 \pm 0.25 \\ 11.70 \pm 1.51 \\ 91.31 \pm 1.35 \\ 37.16 \pm 2.40 \end{array}$
CHCI <sub>3</sub> EtOAc n-BuOH	$29.39 \pm 1.98$ 189.87 ± 1.32 109.26 ± 1.43	$11.70 \pm 1.51$ $91.31 \pm 1.35$ $37.16 \pm 2.40$

<sup>x</sup>Gallic acid equivalent, <sup>y</sup>quercetin equivalent.

GAE/g Extract), and those of TFC are given by quercetin equivalent (QE) as (mg QE/g Extract) (Table 1). Indeed, the most rich extract in flavonoids was the EtOAc extract (91.31  $\pm$  1.35 mg QE/g), followed by the *n*-BuOH extract (37.16  $\pm$  2.40 mg QE/g), and then CHCl<sub>3</sub> and PE extracts (11.70  $\pm$  1.51 and 1.17  $\pm$  0.25 mg QE/g, respectively). In addition, the determination of total phenolic contents indicated that the EtOAc extract has the highest content of phenolic compounds (189.87  $\pm$  1.32 mg GAE/g) even more than the *n*-BuOH extract (109.26  $\pm$  1.43 mg GAE/g). However, the CHCl<sub>3</sub> and PE extracts yielded low phenolic contents (29.39  $\pm$  1.98 and 6.32  $\pm$  1.43 mg GAE/g, respectively) (Table 1).

# 2.2. Chemical constituents

The EtOAc and *n*-BuOH extracts were chosen for further purification based on their total phenolic contents, antioxidant activity, TLC and HPLC profiles. The purification of EtOAc and *n*-BuOH extracts using different chromatographic methods (VLC, CC, TLC, MPLC, and HPLC) afforded thirty-one compounds. All the structures were elucidated based on 1D, 2D-NMR, (–) and (+)-HR-ESI-MS techniques and the measurement of optical rotation. Besides, the NMR data of previously described compounds (**3-29**) were compared with those reported in the literature.

The previously unreported compounds were elucidated as 4-*O*-(2"-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-3,5-dihydroxyacetophenone (1) and 5isopropyl-2-oxo-3,6-dihydropyran-4-carboxylic acid (2) (Fig. 1), whereas the known compounds have been identified as (–)-catechin (3) (Son et al., 1989), quercetin (4) (Chang et al., 2009), myricetin (5) (Sakushima et al., 1983), 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl quercetin (6) (Chang et al., 2009), 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl kaempferol (7) (Cui et al., 2018), 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl quercetin (8), 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl myricetin (9) (El-Toumy et al., 2010), 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl quercetin (10) (Chang et al., 2009), 3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl myricetin (11) (El-Toumy et al., 2010), 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl kaempferol (12) (Satake et al., 2007), 3-*O*-(6"-*O*-methyl- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl kaempferol (13) (Zaghloul, 1993), 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl

quercetin (14) (Satake et al., 2007), 3-O-β-D-glucuronopyranosyl myricetin (15) (Hilbert et al., 2014), 3-O-(6"-O-methyl-β-D-glucuronopyranosyl) myricetin (16) (Gomaa-Darwish et al., 2016), 3-O-(2"-O-galloyl-α-L-rhamnopyranosyl) quercetin (17) (Isobe et al., 1981), 3-O-(3"-O-galloyl-a-L-rhamnopyranosyl) quercetin (18) (Lin et al., 2002), 3-O- $(2''-O-galloyl-\alpha-L-rhamnopyranosyl)$  myricetin (19) (Lee et al., 2017), 3-O-(3"-O-galloyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl) myricetin (20) (sun et al., 1991), trilobatin (21) (Dugé de Bernonville et al., 2009), citrusin E (22) (Matsubara et al., 1991), (Z)-p-coumaroyl-1-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (23) (Fons et al., 1998), 3,5-dihydroxyacetophenone-4-O-β-D-glucopyranoside (24) (Cho et al., 2013), 4-O-caffeoylquinic acid methyl ester (25) (Zhu et al., 2005), 4-O-ferulovlquinic acid methyl ester (26) (Li et al., 1998), chlorogenic acid (27) (Satake et al., 2007), 5-O-feruloylquinic acid methyl ester (28) (Menozzi Smarrito et al., 2008), 3,4,5-trihydroxyacetophenone (29) (Li and Seeram, 2011), ethyl gallate (30) (Chen et al., 2018), and (Z)-p-coumaric acid (31) (Swisłocka et al., 2012) (Fig. S1).

#### 2.3. Structure elucidation of 1 and 2

Compound 1 was isolated as a brown amorphous powder. The (+)-HR-ESI-MS showed a pseudomolecular ion peak at m/z 505.0953  $[M + Na]^+$  (calcd C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>13</sub>Na, 505.0958), which corresponded to the molecular formula C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>13</sub> requiring 11 degrees of unsaturation. The UV spectrum of 1 exhibited maxima absorption bands at 220 and 278 nm revealing the presence of a phenolic derivative (Jancovicova et al., 2007). The <sup>1</sup>H-NMR spectrum (Table 2) displayed signals for a methyl group at  $\delta_{\rm H}$  2.60 (3H, s), and four aromatic protons belonging to two symmetrical 1,3,4,5-tetrasubstituted benzene rings at  $\delta_{\rm H}$  5.98 (2H, s, H-2/H-6) and 7.07 (2H, s, H-2"/H-6"), respectively. A signal of an anomeric proton at  $\delta_{\rm H}$  5.21 (1H, d, J = 8.1 Hz), with a signal at  $\delta_{\rm H}$  5.12 (1H, dd, J = 9.5, 8.1 Hz) and other protons in the range (3.5–4.0 ppm) coupled with the correlations observed in the <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY spectrum (Figs. S6 and S7) and the large coupling constants between H-1'/H-2', H-2'/H-3', H-3'/H-4' and H-4'/H-5' indicated the presence of  $\beta$ -glucopyranosyl moiety. These structural features suggested 1 to be an acetophenone glucoside (Cho et al., 2013; Huang et al., 2017). The HSQC correlations allowed evidently the assignment of the protons at  $\delta_{\rm H}$  2.60, 3.53, 3.74, 3.77, 3.96, 5.12, 5.98 and 7.07 attached to the carbons at  $\delta_{\rm C}$ 33.0 (C-8), 71.6 (C-4'), 78.5 (C-5'), 76.1 (C-3'), 62.3 (C-6'), 74.9 (C-2'), 99.7 (C-1'), 96.3 (C-2 and C-6) and 110.3 (C-2" and C-6"), respectively. In addition to these carbons, the <sup>13</sup>C-NMR spectrum (Table 2) exhibited two signals at  $\delta_{\rm C}$  107.3 (C-1) and 121.3 (C-1") ascribable to non-protonated aromatic carbons, and four signals of oxygenated aromatic carbons at  $\delta_{\rm C}$  140.0 (C-4"), 146.5 (C-3", C-5"), 164.9 (C-4), and 165.5 (C-3, C-5). The non-protonated sp<sup>2</sup> carbon signal resonating at 167.6



Fig. 1. Chemical structures of the two previously unreported compounds 1 and 2 isolated from E. gaditana.

#### Table 2

 $^{1}$ H and  $^{13}$ C NMR data of compounds 1 and 2 (500 and 125 MHz, CH<sub>3</sub>OH-d<sub>4</sub>).

Position	1		Position	2	
	$\delta_{\rm H}$ , m (J in Hz)	$\delta_{C}$ , type		δ <sub>H</sub> , m (J in Hz)	$\delta_{C}$ , type
1	-	107.3 (C)	2	-	173.3 (CO)
2	5.98, s	96.3 (CH)	3	3.33, t (1.8)	32.8 (CH <sub>2</sub> )
3	-	165.5 (C)	4	-	121.0 (C)
4	-	164.9 (C)	5	-	152.8 (C)
5	-	165.5 (C)	6	4.95, t (1.8)	68.2 (CH <sub>2</sub> )
6	5.98, s	96.3 (CH)	7	3.87, m	29.8 (CH)
7	-	205.3 (CO)	8	1.09, d (7.0)	20.1 (CH <sub>3</sub> )
8	2.60, s	33.0 (CH <sub>3</sub> )	9	1.09, d (7.0)	20.1 (CH <sub>3</sub> )
1'	5.21, d (8.1)	99.7 (CH)	10	-	168.1 (CO)
2'	5.12, dd (9.5,	74.9 (CH)			
	8.1)				
3′	3.74, t (9.1)	76.1 (CH)			
4′	3.53, t (9.0)	71.6 (CH)			
5′	3.57, m	78.5 (CH)			
6Ъ	3.77, dd (12.1,	62.3 (CH <sub>2</sub> )			
	5.1)				
6′a	3.96, dd (12.1,				
	1.9)				
1″	-	121.3 (C)			
2"	7.07, s	110.3 (CH)			
3″	-	146.5 (C)			
4″	-	140.0 (C)			
5″	-	146.5 (C)			
6″	7.07, s	110.3 (CH)			
7″	-	167.6 (CO)			

ppm was attributed to a conjugated carbonyl group (C-7"), whereas another carbonyl signal at  $\delta_{\rm C}$  205.3 (C-7) suggested the presence of a ketone functionality. The HMBC spectrum showed a correlation from H-1' to C-4 suggesting that the  $\beta$ -glucopyranosyl moiety is linked to C-4 via an oxygen bridge. Moreover, H-2' and H-2"/H-6" also displayed HMBC correlations to C-7", indicating that C-2' of the  $\beta$ -glucopyranosyl moiety is linked to C-7" of the galloyl moiety through an ester linkage. Furthermore, the HMBC spectrum presented cross-peaks from H-2/H-6 and H<sub>3</sub>-8 to C-7 supporting the presence of a function ketone on C-7 (Fig. S12). The NOESY spectrum displayed correlation from H-2/H-6 to H<sub>3</sub>-8, thus confirming the structure of 1. Based on the above evidence and comparison of the NMR data of 1 with those of the previously isolated analogue (Huang et al., 2017), 1 was elucidated as 4-O-(2"-Ogalloyl-β-D-glucopyranosyl)-3,5-dihydroxyacetophenone, and was named gadiacetophenone.

Compound 2 was isolated as a white crystal. The (+)-HR-ESI-MS spectrum displayed a pseudomolecular ion peak at m/z 207.0628 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>Na, 207.0633) corresponding to the molecular formula  $C_9H_{12}O_4$ , indicating that the molecule possessed four degrees of unsaturation. The IR spectrum indicated absorption bands at 3451  $cm^{-1}$  (OH), 1752  $cm^{-1}$  (pyrone carbonyl), 1690  $cm^{-1}$  (carbonyl acid), and 1645 cm<sup>-1</sup> (double bond). The <sup>1</sup>H-NMR spectrum (Table 2) showed signals at  $\delta_{\rm H}$  1.09 (6H, d, J = 7.0 Hz, CH<sub>3</sub>-8, CH<sub>3</sub>-9), 3.33 (2H, t, J = 1.8 Hz, H<sub>2</sub>-3), 4.95 (2H, t, J = 1.8 Hz, H<sub>2</sub>-6) and 3.87 (1H, m, H-7). The  ${}^{1}H{}^{-}H{}^{-}COSY$  spectrum revealed correlations from the doublet at  $\delta_{\rm H}$  1.09 to H-7 suggesting the presence of an isopropyl group. The <sup>13</sup>C-NMR spectrum (Table 2) exhibited signals corresponding to nine carbon atoms including five sp<sup>3</sup> at  $\delta_{\rm C}$  20.1 (C-8, C-9), 29.8 (C-7), 32.8 (C-3) and 68.2 (C-6), two non-protonated sp<sup>2</sup> at  $\delta_{\rm C}$  121.0 (C-4) and 152.8 (C-5) and two carbonyls at  $\delta_{\rm C}$  168.1 (C-10) and 173.3 (C-2). In addition, the HSQC spectrum allowed the assignment of the methyl protons at  $\delta_{\rm H}$  1.09 to C-8 and C-9, the methylene protons at  $\delta_{\rm H}$  3.33 to the carbon at  $\delta_{\rm C}$  32.8 (C-3), the methine proton at  $\delta_{\rm H}$  3.87 to the carbon at  $\delta_{\rm C}$  29.8 (C-7) and the oxymethylene protons at  $\delta_{\rm H}$  4.95 to the carbon at  $\delta_{\rm C}$  68.2 (C-6). The HMBC spectrum also showed correlations from H<sub>3</sub>-8 and H<sub>3</sub>-9 to C-7 and C-5, H-7 to C-8, C-9, C-6, C-4 and C-5, H<sub>2</sub>-3 to C-4, C-5, C-10 and C-2, and H<sub>2</sub>-6 to C-4, C-5 and C-2 (Figs. S22 and S23).

These spectroscopic features suggested that **2** is a derivative of  $\alpha$ -pyrone (Onocha et al., 1995) with a carboxylic acid functionality. Due to the previous HMBC correlations from H<sub>2</sub>-3 to C-10, H<sub>3</sub>-8 and H<sub>3</sub>-9 to C-5 and H-7 to C-4, and NOESY effects observed between H<sub>3</sub>-8/H<sub>3</sub>-9 and H<sub>2</sub>-6, the isopropyl group and the carboxylic acid functionality are linked to ethylenic carbons C-5 and C-4, respectively (Figs. S20 and S23). All the above data were consistent with the structure of **2** which was characterized as 5-isopropyl-2-oxo-3,6-dihydropyran-4-carboxylic acid and named gadipyrone.

Several plants revealed the presence of  $\alpha$ -pyrone derivatives with different skeletons such as monocyclic  $\alpha$ -pyrone (e.g., djalonenol, boronolide, deacetylboronolide) (Davies-Coleman and Rivett, 1989; Onocha et al., 1995), monobenzo- $\alpha$ -pyrone (e.g., aesculetin, fraxin) (Liu et al., 2005), dibenzo- $\alpha$ -pyrone (e.g., autumnariol, sarolactone, 3-epialtenuene) (Mao et al., 2014) or a moiety of a complex structure (e.g., cryptorigidifoliol F, cryptorigidifoliol I) (Liu et al., 2015). Compound **2** is the first example of  $\alpha$ -pyrone possessing a double bond between C-4 and C-5, which might be biosynthesized via the pathways involved in the biosynthesis of  $\alpha$ -pyrone such as the  $\beta$ -oxidation of linoleic acid and the condensation of malonyl-CoA derivatives in polyketide synthase (Schäberle, 2016). Hence, gadipyrone (**2**) could be of importance for the elucidation of biogenesis of  $\alpha$ -pyrone.

## 2.3.1. Identification of *D*-glucose

The acid hydrolysis of 1 was carried to establish the configuration of the monosaccharide residue. 10 mg of 1 was refluxed with 5 mL of 2 N HCl for 4 h, and then neutralized with 0.5 M KOH. After extraction with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL), the aqueous solution was evaporated to obtain p-glucose (1.6 mg,  $[\alpha]_D^{20} + 25.8^\circ$  (c 0.11, H<sub>2</sub>O) (Budavari et al., 1989), which was confirmed by TLC comparison with an authentic sample.

# 2.4. Biological studies

The phytochemical investigation of E. gaditana afforded numerous secondary metabolites especially flavonoids and phenolics from the EtOAc and *n*-BuOH extracts, which is compatible with the TFC and TPC measurements. It's well known that natural polyphenol compounds furnished a good antioxidant activity (Badaoui et al., 2019; Mouffouk et al., 2019; Rice-Evans et al., 1996). For this reason, and in order to isolate bioactive compounds, an antioxidant activity-guided isolation has been conducted. The antioxidant capacity of all the extracts has been evaluated using DPPH and CUPRAC methods. The EtOAc and n-BuOH extracts have been selected for a phytochemical and biological study, due to their richness in polyphenolic compounds and according to their antioxidant capacity (DPPH IC\_{50} 8.28  $\pm$  0.88 and 11.23  $\pm$  0.66  $\mu$ g/mL; CUPRAC A<sub>0.5</sub> 6.44 ± 1.09 and 15.94 ± 1.07  $\mu$ g/mL, respectively). Furthermore, each extract was fractionated, and the major fractions obtained were tested using DPPH and CUPRAC assays. Fractions Ac1, Ac2, Ac3, Bu1, Bu2 and Bu3 have been chosen for chromatographic purifications based on their  $IC_{50}$  and  $A_{0.5}$  values (Table 3).

The selected fractions were subjected to a phytochemical investigation and 31 compounds were isolated and tested for their antioxidant capacity by DPPH and CUPRAC methods. Compound **1** exhibited an excellent antioxidant activity (DPPH IC<sub>50</sub> 3.25  $\pm$  0.09 µg/mL, CUPRAC A<sub>0.5</sub> 7.09  $\pm$  0.1 µg/mL) compared to the standards BHT and ascorbic acid (DPPH IC<sub>50</sub> 12.99  $\pm$  0.41 and 13.94  $\pm$  2.81 µg/mL; CUPRAC A<sub>0.5</sub> 8.97  $\pm$  3.94 and 52.59  $\pm$  1.98 µg/mL, respectively). Compound **2** was not active at the tested concentration (200 µg/mL). In addition, the majority of the known compounds (**3**–**31**) indicated a good to excellent antioxidant activity (Table 3).

The number and a structural variation of the isolated flavonoids lead us to study the relationship structure-activity. Quercetin (4) gave a higher antioxidant activity than myricetin (5); so, we conclude that the third hydroxyl group in B ring of the flavonol decreases the antioxidant capacity (Fig. S1). Moreover, the type of sugar on C-3 of flavonols also affects the antioxidant activity. Comparing the effect of sugars on C-3

#### Table 3

Antioxidant (DPPH and CUPRAC assays) and tyrosinase inhibitory activity of *E. gaditana* extracts, fractions, and compounds (1-31).

	Antioxidant activities		Tyrosinase activity	
Extracts/ Fractions/ Compounds	DPPH assay IC <sub>50</sub> (µg/ mL)	CUPRAC assay A <sub>0.5</sub> (µg/mL)	IC <sub>50</sub> (μg/mL)	
PE extract	> 200	> 200	> 200	
CHCl <sub>3</sub> extract	> 200	$61.2\pm0.35$	> 200	
EtOAc extract	$8.28\pm0.88$	$6.44 \pm 1.09$	> 200	
n-BuOH extract	$11.23 \pm$	$15.94 \pm 1.07$	> 200	
	0.66	10.00 . 0.70		
Acl	$3.98 \pm 0.43$	$13.38 \pm 0.78$	> 200	
AC2	$2.86 \pm 0.29$	$8./2 \pm 0.26$	35.39 ± 2.92	
Ac3	$4.78 \pm 0.44$	$11.08 \pm 0.09$ 59.41 + 1.37	> 200	
AC4	2.57	59.41 ± 1.57	> 200	
Bu0	56.27 +	$107.89 \pm 1.45$	> 200	
	1.13			
Bu1	$5.27 \pm 0.73$	$12.68 \pm 0.44$	> 200	
Bu2	$3.59 \pm 0.13$	$10.85 \pm 0.29$	$32.16 \pm 2.18$	
Bu3	$6.15 \pm 0.1$	$22.11 \pm 0.24$	$15.23 \pm 0.87$	
Bu4	$4.09 \pm 0.2$	$21.40\pm0.12$	$88.25 \pm 1.16$	
1	$3.25\pm0.09$	$7.09 \pm 0.1$	$89.78 \pm 0.93$	
2	NA	NA	$52.39 \pm 0.69$	
3	$3.40\pm0.06$	$4.20\pm0.42$	-	
4	$0.89\pm0.13$	$2.20\pm0.26$	-	
5	$3.0 \pm 0.14$	$6.32\pm0.07$	-	
6	$3.32 \pm 0.34$	$9.79 \pm 1.15$	-	
7	31.34 ±	$72.98 \pm 1.29$	-	
	1.11			
8	$1.12 \pm 0.19$	$8.13 \pm 0.34$	-	
9	$2.61 \pm 0.11$	$10.37 \pm 0.09$	-	
10	$3.52 \pm 1.20$	$11.59 \pm 0.45$	-	
11	$2.87 \pm 0.21$	$11.01 \pm 0.11$	-	
12	$9.94 \pm 0.86$	$18.02 \pm 0.71$	-	
15	0.76	$21.30 \pm 0.72$	-	
14	$5.59 \pm 0.39$	$11.19 \pm 0.24$	-	
15	$8.12 \pm 0.12$	$11.88 \pm 0.39$	-	
16	$8.6 \pm 0.38$	$12.77 \pm 0.35$	-	
17	$3.34\pm0.27$	$10.52 \pm 0.75$	-	
18	$3.18\pm0.33$	$10.13 \pm 0.89$	-	
19	$2.8\pm0.58$	$10.64 \pm 0.36$	-	
20	$2.51\pm0.23$	$10.30\pm0.78$	-	
21	19.49 ±	$19.44 \pm 1.19$	-	
22	0.77	00.04 + 1.54		
22	2200	$33.84 \pm 1.54$	-	
23	$133.7 \pm 0.6$	$73.43 \pm 0.36$ 11.64 ± 0.55	-	
24	$578 \pm 0.09$	$11.04 \pm 0.00$ 8 10 + 0.67	_	
26	30.84 +	$40.32 \pm 1.33$	_	
	1.23	10102 - 1100		
27	$8.23 \pm 0.2$	$10.43 \pm 0.68$	-	
28	17.99 ±	$13.04 \pm 0.28$	-	
	1.11			
29	$39.3 \pm 1.94$	$5.83\pm0.5$	-	
30	$1.01\pm0.07$	$2.25\pm0.15$	-	
31	> 200	$16.0\pm0.84$	-	
BHT	$12.99 \pm$	$8.97 \pm 3.94$	-	
	0.41			
Ascorbic acid	13.94 ±	$52.59 \pm 1.98$	-	
W-1114	2.81		05 00 + 0 50	
Kojic acid	-	-	$25.23 \pm 0.78$	

 $IC_{50}$  values are defined as the concentration of 50 % inhibition percentages,  $A_{0.5}$  values are defined as the concentration at absorbance A=0.5 and calculated by linear regression analysis and expressed as Mean  $\pm$  SD (n = 3). NA: not absorbed.

on the antioxidant activity of **6**, **8**, **10** and **14**, it was found that the antioxidant activity decreases from arabinose to glucose, from glucose to rhamnose and from rhamnose to glucuronic acid. This effect is corroborated by the antioxidant capacity observed for **9**, **11** and **15**. Comparison of **12** with **13**, and **15** with **16** revealed that glucuronic

acid displays a higher activity than its methyl ester. Furthermore, the comparison of **17** and **18** with **10**, and of **19** and **20** with **11**, indicated that the addition of the galloyl group to rhamnose of the 3-O-rhamnosyl flavonoids increases their antioxidant activity, especially when the galloyl group is linked to C-3 instead of C-2 of rhamnose (Table 3).

The tyrosinase activity (Table 3) was also evaluated for the extracts, major fractions as well as for 1 and 2. Indeed, 1 and 2 displayed a moderate tyrosinase inhibitory activity with IC<sub>50</sub> values of 89.78  $\pm$  0.93 and 52.39  $\pm$  0.69 µg/mL, respectively, when compared to kojic acid (IC<sub>50</sub> = 25.23  $\pm$  0.78 µg/mL).

#### 3. Conclusion

In summary, two previously undescribed compounds named gadiacetophenone (1) and gadipyrone (2), along with twenty-nine previously reported compounds (3-31), comprising seventeen flavonoids and eleven phenolic compounds, were isolated and identified from the aerial parts of *Euphorbia gaditana* Coss. Among the known constituents, thirteen compounds (9, 15-22, 24–26 and 28) possessing several skeletons like flavonol, acetophenone glycoside, hydroxycinnamic acid glycoside and chlorogenic acid, are found for the first time in *Euphorbia* species. The antioxidant activity, evaluated by DPPH and CUPRAC methods for extracts, fractions and all the isolated compounds, showed in general good to excellent antioxidant activity. Furthermore, the two undescribed compounds 1 and 2 showed a moderate inhibition of the tyrosinase enzyme comparing to the standard kojic acid.

## 4. Experimental

# 4.1. General experimental procedures

UV spectra were measured on a Shimadzu UV/Vis U-2450 spectrophotometer. IR spectra were obtained using a Nicolet Impact 410 FTIR spectrometer. Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 341 polarimeter. 1D and 2D-NMR spectra were recorded in CH<sub>3</sub>OH-d<sub>4</sub> on Bruker Avance DRX III 500 instrument using standard Bruker microprograms (Karlsruhe, Germany). (-) and (+)-HR-ESI-MS were obtained from Micromass Q-TOF micro-instrument (Manchester, UK). Flash chromatography was performed on a Grace Reveleris system equipped with dual UV and ELSD detection using Grace cartridges (Silica gel or RP-C<sub>18</sub>), and the monitored wavelengths were at 205 and 254 nm. The medium-pressure liquid chromatography (MPLC) was employed using a Buchi pump system AP250/500 (Bushi, France), with a RP-C\_{18} silica gel MERCK column (15  $\times$  230 and 26  $\times$  460 mm). Preparative HPLC (PLC 2050 Gilson) was equipped with a RP-C<sub>18</sub> column (Phenomenex 250-15 mm, Luna 5 m, Interchim, France), it was used as a semi-preparative HPLC with a binary gradient eluent (H<sub>2</sub>O pH 2.4 with TFA; CH<sub>3</sub>CN) and a flow rate of 5 mL/min; the chromatogram was monitored at 205, 254, 300, and 360 nm. Semipreparative HPLC was performed on an apparatus equipped with an ASI-100 Dionex autosampler, an Ultimate 3000 pump ThermoFisher Scientific, a diode array detector UVD 340S and a Chromeleon software (Dionex, ThermoFisher Scientific, France). RP-C<sub>18</sub> column (Phenomenex 250-15 mm, Luna 5 m, Interchim, France) was used for a semi-preparative HPLC with a binary gradient eluent (H<sub>2</sub>O pH 2.4 with TFA; CH<sub>3</sub>CN) and a flow rate of 5 mL/min; the chromatogram was monitored at 205, 254, 300, and 360 nm. An HPLC analytic Ultimate 3000 ThermoFisher Scientific equipped with LPG 3400SD pump, WPS3000SL injector, UV-DAD-3000 detector (ThermoFisher Scientific, France); and an Interchim uptisphere strategy column C-18-HQ 250  $\times$ 4.6 mm (Interchim, France) was used. Analytical TLC was performed using silica gel plates (Merck Kieselgel 60 F254) and RP-C<sub>18</sub> (Kieselgel 60 F254S) plates and visualized at 254 and 366 nm and by spraying the dried plates with 50 % of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, followed by heating.

The bioactivity assays were carried out at the Center of biotechnology Research (Algeria) on a 96-well microplate reader, Perkin Elmer Multimode Plate Reader EnSpire (Perkin Elmer, France). Folin-Ciocalteu reagent (FCR), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), butylated hydroxytoluene (BHT), ascorbic acid, ammonium acetate were obtained from Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany). Copper (II) chloride, neocuproine, L-DOPA and tyrosinase enzyme were purchased from Biochem Chemopharma (Biochem Chemopharma, France). All other chemicals and solvents were of analytical grade.

# 4.2. Plant material

The plant Euphorbia gaditana Coss. was collected in May 2015 in Seriana from semi-arid region of Batna (North eastern of Algeria). It was identified by Prof. Bachir Oudjehih from the Agronomic Institute of the University of Batna-1 (Algeria). A voucher specimen number (908/ LCCE) was deposited at the Faculty of Sciences of Matter, University of Batna-1, Algeria.

#### 4.3. Extraction and isolation

The aerial parts of E. gaditana (1 kg of dried powder) were macerated in 70 % aqueous-ethanol (2  $\times$  12 L, 48 h) at room temperature, and then filtered by filter paper and the aqueous-ethanol solution was concentrated under reduced pressure to remove EtOH. The aqueous solution was successively extracted with PE (3  $\times$  300 mL), CHCl<sub>3</sub> (3  $\times$ 300 mL), EtOAc (3  $\times$  300 mL) and *n*-BuOH (3  $\times$  300 mL). The obtained organic phases were evaporated to dryness under reduced pressure at 45 °C to provide 1.3 g of PE, 30 g of CHCl<sub>3</sub>, 7.1 g of EtOAc and 23.1 g of n-BuOH extracts. All the extracts and fractions were stored in darkness at room temperature before fractionation and purification. The EtOAc and n-BuOH extracts were chosen for further purification based on their antioxidant activity, TLC and HPLC profiles.

The EtOAc extract (7.1 g) was subjected to vacuum liquid chromatography (VLC) over RP-C<sub>18</sub> and eluted successively with (20, 40, 60, 80, and 100 % MeOH in H<sub>2</sub>O, 1 L each) to provide five major fractions (Ac1-Ac5). Ac1 (2.2 g) was applied to a flash chromatography of silica gel and eluted with mixtures of CH2Cl2-MeOH-H2O (100:0:0-70:30:0-70:30:5) to obtain fraction Ac1-E (195 mg) which was further purified by flash chromatography over RP-C18 and eluted with MeOH-H<sub>2</sub>O (5-20 % MeOH) to yield 3 (19.4 mg). Fraction Ac2 (2 g) was fractionated by preparative HPLC over RP-C<sub>18</sub>. The elution was carried out by CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (20-30 % CH<sub>3</sub>CN, in 45 min) to obtain fractions Ac2-C (144 mg), Ac2-D (192), Ac2-E (356 mg), Ac2-F (268 mg), Ac2-G (157 mg) and Ac2-H (100 mg); then, fractions (Ac2-C, Ac2-D, Ac2-E, Ac2-G and Ac2-H) were purified by flash chromatography of a gel silica eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O and (100:0:0-70:30:0-70:30:5). Indeed, fraction Ac2-C provided compounds 9 (10 mg) and 24 (7 mg), fraction Ac2-D gave compound 5 (5.8 mg), fraction Ac2-E afforded compound 30 (43.5 mg) and sub-fraction Ac2-E-g (34 mg) which was further purified using preparative HPLC to yield 6 (2.5 mg), and fraction Ac2-G provided compounds 2 (5.8 mg) and **31** (7 mg), whereas, the last fraction Ac2-H furnished **29** (2.5 mg). Fraction Ac2-F was purified by flash chromatography of silica gel and eluted with CH2Cl2-MeOH (0-35 % MeOH, 30 min) to afford subfraction Ac2-F-k (141 mg), which was purified by preparative HPLC using CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O as eluent (20-35 % CH<sub>3</sub>CN, 30 min) to furnish 1 (15.8 mg). Fraction Ac3 was subjected to preparative HPLC over RP-C18 and eluted with CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (20-35 % CH<sub>3</sub>CN, 30 min) to obtain 4 (7 mg), 8 (19.6 mg), 10 (24 mg), 11 (6.7 mg), 17 (17.5 mg), in addition to sub-fractions Ac3 - 24 (27 mg), Ac3 - 26 (18 mg) and Ac3 - 31 (18 mg). These sub-fractions were further purified with semi-preparative HPLC using CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O as eluent (20–35 % CH<sub>3</sub>CN) to yield **19** (3.8 mg,  $t_{\rm R}$ 3.05 min) and 20 (2.6 mg, t<sub>R</sub> 11.52 min) from sub-fraction Ac3 – 24; 21 (3 mg,  $t_{\rm R}$  26.55 min) from sub-fraction Ac3-26 and 18 (2.5 mg,  $t_{\rm R}$ 22.10 min) from sub-fraction Ac3-31.

elution was performed with MeOH-H<sub>2</sub>O (0:100-100:0) to afford six fractions (Bu0-Bu5). Fraction Bu1 (3.4 g) was fractionated by flash chromatography over RP-C<sub>18</sub> and eluted with MeOH-H<sub>2</sub>O (5-40 % MeOH, 30 min) to obtain 27 (17 mg) and several sub-fractions. Subfractions Bu1-C and Bu1-D were combined (64 mg) and purified by semi-preparative HPLC using CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O as eluent (5-25 % MeCN, 30 min) to yield **23** (1.5 mg,  $t_{\rm R}$  25.03 min). Sub-fraction Bu1-Q (316 mg) was purified by flash chromatography over silica gel and eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:0:0-70:30:0-70:30:5) to give two sub-fractions Bu1-Q-c and Bu1-Q-d. Bu1-Q-c (27 mg) was further purified by semi-preparative HPLC eluting with MeCN-H<sub>2</sub>O (17-21 % CH<sub>3</sub>CN, 25 min) to afford 25 (5.5 mg, t<sub>R</sub> 8.25 min) and 22 (3 mg, t<sub>R</sub> 11.54 min). Sub-fraction Bu1-O-d (10.5 mg) gave, after precipitation in MeOH. 28 (7.7 mg). Fraction Bu2 (5.3 g) was purified by flash chromatography of а silica gel and eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:0:0-70:30:0-70:30:5) to provide several sub-fractions. Subfraction Bu2-C (11.3 mg) was purified by preparative HPLC (15-35 % CH<sub>3</sub>CN, 30 min) to give 26 (2.6 mg). Sub-fraction Bu2-E (600 mg) was applied to flash chromatography of RP-C<sub>18</sub> and eluted with MeOH-H<sub>2</sub>O (15-25 % MeOH, 30 min) to afford sub-fraction Bu2-E-h (68 mg) which was purified by semi-preparative HPLC over RP-C<sub>18</sub> using CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O as eluent (15–25 %) to furnish 16 (44 mg,  $t_{\rm R}$  12.13 min). Sub-fraction Bu2-J (80 mg) was purified by preparative HPLC and eluted with CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (15-35 CH<sub>3</sub>CN, 30 min) to give 15 (6 mg). Fraction Bu3 (2.6 g) was chromatographed over flash chromatography of silica gel. The elution was carried out with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (100:0:0-70:30:0-70:30:5) to provide two sub-fractions Bu3-I (20 mg) and Bu3-R (84 mg) which were purified by preparative HPLC using CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O as eluent (25-45 % CH<sub>3</sub>CN) and (15-25 % CH<sub>3</sub>CN), respectively, to yield 7 (1.3 mg) and 13 (1 mg) from sub fraction Bu3-I, and 12 (5.4 mg) and 14 (7.3 mg) from sub-fraction Bu3-R.

## 4.3.1. Spectral data

Gadiacetophenone (4-O-(2"-O-galloyl-β-D-glucopyranosyl)-3,5-dihy*droxyacetophenone*) (1): Brown amorphous powder;  $[\alpha]_D^{20}$  –13.1° (c 0.25, MeOH); UV  $\lambda_{max}$  (MeOH): 220, 278 nm; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz,  $CH_3OH-d_4$ ) and <sup>13</sup>C NMR (125 MHz,  $CH_3OH-d_4$ ), see Table 2; (+)-HR-ESI-MS m/z 505.0953 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>13</sub>Na, 505.0958).

Gadipyrone (5-isopropyl-2-oxo-3,6-dihydropyran-4-carboxylic acid) (2): White crystal; UV  $\lambda_{max}$  (MeOH): 220 nm; IR  $\nu$ : 3451, 1752, 1690 and 1645 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CH<sub>3</sub>OH-d<sub>4</sub>) and <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CH<sub>3</sub>OH-d<sub>4</sub>), see Table 2; (+)-HR-ESI-MS m/z 207.0628 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>Na, 207.0633).

## 4.4. Chemical screening of plant extracts

The total phenolic and flavonoid contents of PE, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc and n-BuOH extracts were established using Folin-Ciocalteu and trinitroaluminum methods (See supplementary material).

### 4.5. Antioxidant activity

The antioxidant activity of the extracts, fractions and isolated compounds was evaluated by DPPH free radical scavenging and Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assays (See supplementary material).

# 4.6. Tyrosinase inhibitory activity

The extracts, fractions and 1 and 2 were tested for their tyrosinase inhibitory activity (See supplementary material).

### Statistical analysis

All data on bioassays were the average of triplicate analyses. The data were recorded as mean values  $\pm$  standard deviation. The IC<sub>50</sub> and A<sub>0.5</sub> values were calculated by linear regression analysis.

### **Declaration of Competing Interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

# Acknowledgements

The authors are grateful to the DGRSDT of the Ministry of Higher Education and Scientific Research of Algeria for PRFU Project (B00L01UN050120180001), Biotechnology Research Center (CRBt) (Constantine-Algeria), Conseil Regional Champagne-Ardenne, Conseil General de la Marne, Ministry of Higher Education and Research (MESR) France and EU-program FEDER to the PlAneT CPER project.

# Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.phytol.2020.07.012.

#### References

- Aichour, S., Haba, H., Benkhaled, M., Harakat, D., Lavaud, C., 2014. Terpenoids and other constituents from *Euphorbia bupleuroides*. Phytochem. Lett. 10, 198–203.
- Badaoui, M.I., Alabdul Magid, A., Benkhaled, M., Bensouici, C., Harakat, D., Voutquenne-Nazabadioko, L., Haba, H., 2019. Phytochemical study, antioxidant and anticholinesterase activities of *Atractylis cancellata* L. Nat. Prod. Res. 7, 1–7. https://doi. org/10.1080/14786419.2019.1682575.
- Benabdelaziz, I., Gomez-Ruiz, S., Benkhaled, M., Carralero, S., Schenker, P., Salm, A., Gertsch, J., Haba, H., 2018. New cycloartane-type ester triterpenes from *Euphorbia pterococca* and biological evaluation. Fitoterapia 127, 271–278.
- Benmerache, A., Alabdul Magid, A., Labed, A., Kabouche, A., Voutquenne-Nazabadioko, L., Hubert, J., Morjani, H., Kabouche, Z., 2017. Isolation and characterization of cytotoxic compounds from *Euphorbia clementei* Boiss. Nat. Prod. Res. 31, 2091–2098.
- Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P.E., 1989. The Merck Index, 11th edition. Merck & CO., INC., pp. 699–700.
- Chang, S.W., Kim, K.H., Lee, L.K., Choi, S.U., Ryu, S.Y., Lee, K.R., 2009. Phytochemical constituents of Bistorta manshuriensis. News Physiol. Sci. 15, 234–240.
- Chen, H., Li, M., Zhang, C., Du, W., Shao, H., Feng, Y., Zhang, W., Yang, S., 2018. Isolation and identification of the anti-oxidant constituents from *Loropetalum chinense* (R. Brown) oliv. Based on UHPLC-Q-TOF-MS/MS. Molecules 23, 1720.
- Cho, J.Y., Lee, K.D., Park, S.Y., Jeong, W.C., Moon, J.H., Ham, K.S., 2013. Isolation and identification of α-glucosidase inhibitors from the stem bark of the nutgall tree (*Rhus javanica* L.). J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 56, 547–552.
- Cui, L., Xing, M., Xu, L., Wang, J., Zhang, X., Ma, C., Kang, W., 2018. Antithrombotic components of *Malus halliana* Koehne flowers. Food Chem. Toxicol. 119, 326–333.
- Davies-Coleman, M.T., Rivett, D.E.A., 1989. Stereochemical studies on boronolide, an α-pyrone from *Tetradenia barberae*. Phytochemistry 26 (11), 3047–3050.
   Dugé de Bernonville, T., Guyot, S., Paulin, J.P., Gaucher, M., Loufrani, L., Henrion, D.,
- Dege de berlohme, L., ouyor, S., Padmi, J.F., Bradelle, M., Bohrah, D., Dihydrochalcones: implication in resistance to oxidative stress and bioactivities against advanced glycation end-products and vasoconstriction. Phytochemistry 71, 443–452.
- El-Toumy, S.A., Salib, J.Y., Mohamed, W.M., Morsy, F.A., 2010. Phytochemical and antimicrobial studies on Acacia saligna leaves. Egypt. J. Chem. 53, 705–717.
- Flores-Giubi, M.E., Duran-Pena, M.J., Botubol-Ares, J.M., Escobar-Montaño, F., Zorrilla, D., Macías-Sanchez, A.J., Hernandez-Galań, R., 2017. Gaditanone, a diterpenoid based on an unprecedented carbon skeleton isolated from *Euphorbia gaditana*. J. Nat. Prod. 80, 2161–2165.
- Fons, F., Rapior, S., Gueiffier, A., Roussel, J.L., Gargadennec, A., Andary, A., 1998. (E)-pcoumaroyl-1-O-β-D-glucopyranoside accumulation in roots of *Plantago lanceolata* cultures. Acta Bot. Gall. 14, 249–255.
- Gomaa-Darwish, A.G., Samy, M.N., Sugimoto, S., Otsuka, H., Abdel-Salam, H., Matsunami, K., 2016. Effects of hepatoprotective compounds from the leaves of *Lumnitzera racemosa* on acetaminophen-induced liver damage *in vitro*. Chem. Pharm. Bull. 64, 360–365.
- Haba, H., Lavaud, C., Alabdul Magid, A., Benkhaled, M., 2009. Diterpenoids and

triterpenoids from Euphorbia retusa. J. Nat. Prod. 72 (7), 1258-1264.

- Haba, H., Marcourt, L., Benkhaled, M., Long, C., 2013. Minor *ent*-abietane diterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. Nat. Prod. Commun. 8 (11), 1519–1522.
- Hilbert, G., Temsamani, H., Bordenave, L., Pedrot, E., Chaher, N., Cluzet, S., Delaunay, J.C., Ollat, N., Delrot, S., Mérillon, J.M., Gomès, E., Richard, T., 2014. Flavonol profiles in berries of wild Vitis accessions using liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectrometry. Food Chem. 169, 49–58.
- Huang, S.S., Li, P., Zhang, B.J., Deng, S., Zhang, H.L., Sun, C.P., Huo, X.K., Tian, X.G., Ma, X.C., Wang, C., 2017. Acetophenone glycosides from the roots of *Euphorbia fischeriana* and their inhibitory effects against *Mycobacterium smegmatis*. Phytochem. Lett. 19, 151–155.
- Isobe, T., Kanazawa, K., Fujimura, M., Noda, Y., 1981. Flavonoides of Polygonum seiboldi and P. filiforme. B. Chem. Soc. Jpn. 54, 3239.
- Jancovicova, V., Ceppan, M., Havlinova, B., Rehacova, M., Jakubikova, Z., 2007. Interaction in iron gall inks. Chem. Pap. 61 (5), 391–397.
- Lee, I.S., Jung, S.H., Kim, C.S., Kim, J.S., 2017. Phenolic compounds from the leaves of *Homonoia riparia* and their inhibitory effects on advanced glycation end product formation. News Physiol. Sci. 23, 274–280.
- Li, L., Seeram, N.P., 2011. Further investigation into maple syrup yields three new lignans, a new phenylpropanoid, and twenty-six other phytochemicals. J. Agric. Food Chem. 59, 7708–7716.
- Li, H., Miyahara, T., Tezuka, Y., Namba, T., Nemoto, N., Tonami, S., Seto, H., Tada, T., Kadota, S., 1998. The effect of kampo formulae on bone resorption *in vitro* and *in vivo*. Biol. Pharm. Bull. 21, 1322–1326.
- Lin, W.H., Deng, Z.W., Lei, H.M., Fu, H.Z., Li, J., 2002. Polyphenolic compounds from the leaves of *Koelreuteria paniculata* Laxm. J. Asian Nat. Prod. Res. 4, 287–295.
- Liu, R., Quighua, S., Ailing, S., Jichun, C., 2005. Isolation and purification of coumarin compounds from *Cortex fraxinus* by high-speed counter-current chromatography. J. Chromatogr. A 1072, 195–199.
- Liu, Y., Rakotondraibe, L.H., Brodie, J.P., Wiley, D.J., Cassera, B.M., Miller, S.J., Ratovoson, F., Rakotobe, E., Rasamison, E.V., Kingston, G.I.D., 2015. Antimalarial 5,6-dihydro-α-pyrones from *Cryptocarya rigidifolia*: related bicyclic tetrahydro-αpyrones are artifacts. J. Nat. Prod. 78, 1330–1338.
- Liu, T., Liang, Q., Zhang, X.M., Su, X.M., Qin, J.C., Li, G.Q., Xu, W.H., 2019. Chemical constituents from *Euphorbia stracheyi* Boiss. Biochem. Syst. Ecol. 84, 52–54.
- Mao, Z., Sun, W., Fu, L., Luo, H., Lai, D., Zhou, L., 2014. Natural dibenzo-α-pyrones and their bioactives. Molecules 19, 5088–5108.
- Matsubara, Y., Yusa, T., Sawabe, A., Iizuka, Y., Okamoto, K., 1991. Structure and physiological activity of phenyl propanoid glycosides in lemon (*Citrus limon* Burm. f.) peel. Agric. Biol. Chem. 55, 647–650.
- Menozzi Smarrito, C., Munari, C., Robert, F., Barron, D., 2008. A novel efficient and versatile route to the synthesis of 5-O-feruloylquinic acids. Org. Biomol. Chem. 6, 986–987.
- Mouffouk, S., Gomez-Ruiz, S., Benkhaled, M., Carralero, S., Haba, H., 2019. Phytochemical composition, antioxidant and antibacterial activities of crude extracts from the species *Euphorbia atlantica* Coss. Pharm. Chem. J. 53 (9), 831–837.
- Onocha, P.A., Okorie, D.A., Connolly, J.D., Roycroft, D.S., 1995. Monoterpene diol, iridoid glucoside and dibenzo-α-pyrane from *Anthocleista djalonensis*. Phytochemistry 40, 1183–1189.
- Özbilgin, S., Citoğlu, G.S., 2012. Uses of some *Euphorbia* species in traditional medicine in turkey and their biological activities. Turk. J. Pharma. Sci. 9, 241–256.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic. Biol. Med. 20, 933–956.
- Sakushima, A., Coskun, M., Hisada, S., Nishibe, S., 1983. Flavonoids from *Rhamnus pallash*. Phytochemistry 22 1677-167.
- Satake, T., Kamiya, K., An, Y., Oishi, T., Taka, N., Yamamoto, J., 2007. The anti-thrombotic active constituents from *Centella asiatica*. Biol. Pharm. Bull. 30, 935–940.
- Schäberle, T.F., 2016. Biosynthesis of α-pyrone. Beilstein J. Org. Chem. 12, 571–588.
  Shi, Q.W., Su, X.H., Kiyota, H., 2008. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. Chem. Rev. 108, 4295–4327.
- Singla, A.K., Pathak, K., 1990. Phytoconstituents of *Euphorbia* species. Fitoterapia 41, 483–516.
- Son, B.W., Park, J.H., Zee, O.P., 1989. Catechin glycoside from Ulmus davidiana. Arch. Pharm. 12, 219–222.
- Sun, D., Zhao, Z., Lai, Y.F., Herbert, W., 1991. Flavonoids from Myrica esculenta bark. Chem. Ind. For. Prod. 11, 251–255.
- Swisłocka, R., Kowczyk-Sadowy, M., Kalinowska, M., Lewandowski, W., 2012. Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR) and theoretical studies of pcoumaric acid and alkali metal p-coumarates. Spectroscopy 27, 35–48.
- Zaghloul, A.M., 1993. New flavonoid glycosides from Euphorbia dracunculoides. Man. J. Pharm. Sci. 9, 204–212.
- Zhu, X., Dong, X., Wang, Y., Ju, P., Luo, S., 2005. Phenolic compounds from Viburnum cylindricum. Helv. Chim. Acta 88, 339–342.

ملخص

تهدف هذه الدراسة الكيميائية والبيولوجية الى تسليط الضوء على النباتات المحلية لمنطقة الأوراس، وذلك من خلال البحث عن مستقبلات ثانوية جديدة و فعالة بيولوجيا من النباتات الطبية الجزائرية .Atractylis cancellata L و Euphorbia gaditana روالتي تنتمي على التوالي إلى عائلتي Asteraceae وEuphorbiaceae . هتين النبتتين معروفتين لدى السكان المحليين كنبتتين مستخدمتين في الطب التقليدي لعلاج العديد من الأمراض.

تم عزل الجزيئات النباتية 1-49 من مستخلصات AcOEt ,EP و AcOEt من كامل النبتة AcOEt و AcOEt من كامل النبتة AcOEt و AcoEt و AcoEt و AcoEt و AcoEt مت الأجزاء الهوائية للنبتة *AcOEt و gaditana و AcOEt و AcoEt و BuOH من الأجزاء الهوائية للنبتة E. gaditana من خلال الجمع بين تقنيات الكروماتو غرافيا المختلفة مثل الكروماتو غرافيا المحتلفة مثل الكروماتو غرافيا المائلة تحت الضغط، كروماتو غرافيا العمود، كروماتو غرافيا الطبقة السميكة، كروماتو غرافيا الوميض PLC، شبه HPLC، الكروماتو غرافيا المحتلو العادي SiO<sub>2</sub> و SiO<sub>2</sub> و HPLC التحضيرية ياستخدام مسحوق السيليكا في الطور العادي SiO<sub>2</sub> و العكسي HPLC، نشير الى أنه تم اتباع فصل التحضيرية و موجه لدراسة النبتة Acoecellata مسحوق السيليكا في الطور العادي SiO<sub>2</sub> و SiO<sub>2</sub> و Accellata من الكروماتو غرافية المور العادي Accellata و العكسي Accellata من و النوي و محمل و التنقية الكروماتو غرافية إلى عزل 17 مركبا من نبتة Accellata و C. و مركبًا من نبتة Accellata مركبًا من نبتة Accellata مركبًا من نبتة Accellata من و التنقية الكروماتو غرافية إلى عزل 17 مركبا من نبتة Accellata مركبًا من نبتة Accellata* 

تم التعرف على المركبات الأيضية الثانوية التي تم الحصول عليها في الحالة النقية 1-49 بفضل التحليل المشترك لأطياف الرنين النووي المعناطيسي أحادي وثنائي البعد (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) و NMR 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>13</sup>C J-mod) 20، الأشعة فوق البنفسجية لال الأشعة تحت الحمراء IR، مطيافية الكتلة HR-ESI-MS و ESI-MS، قياس إنحراف الضوء [α]، التحولات الكيميائية والمقارنة مع بيانات المراجع. هذه الدراسة أدت الى فصل وتحديد البنية الكيميائية لثلاث نواتج أيض طبيعية جديدة، وهي ألكالي و المقارنة مع بيانات المراجع. هذه الدراسة أدت الى فصل وتحديد البنية الكيميائية لثلاث نواتج أيض طبيعية جديدة، وهي ألكلميائية والمقارنة مع بيانات المراجع. هذه الدراسة أدت الى فصل وتحديد البنية الكيميائية لثلاث نواتج أيض طبيعية جديدة، وهي ألكالويد ذو بنية كينولين (Ac1) من نبتة *E. concellata الحراحية والبية التحلل المائي (Eg1) و ألفا بيرون (Eg2) من النبتة . وهما وتحديد البنية الكيميائية لثلاث نواتج أيض طبيعية جديدة، وهي ألكالويد ذو بنية كينولين (Ac1) من نبتة Mac الدراسة أدت الى فصل وتحديد البنية الليميائية لثلاث نواتج أيض طبيعية جديدة، وهي ألكالويد ذو بنية كينولين (Ac1) من نبتة <i>E. concellata بينية والمائي (Eg1) و ألفا بيرون (Eg2) من النبتة . ولمائلويد ذو بنية قابلة للتحلل المائي (Eg1) و ألفا بيرون (Ac1) من النبتة . <i>Baditana بالإ*ضافة الى 40 من المركبات المعروفة مقسمة إلى 1 ألكالويد, و25 فلافونويد, 16 فينول و 4 تربينات. علاوة على ذلك، أظهرت هذه الدراسة ثراء هتين النبتتين بالمركبات من نوع البوليفينول ذات الفعالية البيولوجية المثيرة للاهتمام.

أعطت غالبية مركبات الفلافونويد والفينول التي تم اختبار ها لمعرفة نشاطها المضاد للأكسدة نتائج ممتازة. تم أيضا تقييم الألكالودين المعزولين من النبتة A. cancellata من أجل تأثير هما المضادة لإنزيم الكولينستريز، حيث تم التوصل الى نتائج جيدة جدا خاصة بالنسبة للألكالودين المعزولين من النبتة A. cancellata من أجل تأثير هما المضادة لإنزيم الكولينستريز، حيث تم التوصل الى نتائج جيدة جدا خاصة بالنسبة للألكالودين المعزولين من النبتة (Ac1). آخر نشاط تم فحصه هو قدرة تثبيط إنزيم الكولينستريز، حيث تم التوصل الى نتائج جيدة جدا خاصة بالنسبة للألكالويد الجديد (Ac1). آخر نشاط تم فحصه هو قدرة تثبيط إنزيم التيروزيناز للمركبين الجديدين اللذين تم الحصول عليهما من نبتة معام ويناز للمركبين الجديدين اللذين تم الحصول عليهما من نبتة معرفة ويناز للمركبين القابل للتحلل المائي (Eg1) و ألفا بيرون (Eg2) , حيث أظهر هذا الأخير نشاطًا عاليا جدًا كمضاد لإنزيم التيروزينيز قريبا من نشاط المركب المرجعي (حمض الكوجيك).

الكلمات المفتاحية: نباتات طبية، Euphorbia gaditana، Atractylis cancellata، الكالويد، تانين، ألفا بيرون ، فلافونويد، فينول، ESI-MS ،NMR 1D 2D، الكروماتو غرافيا، الفصل الحيوي الموجه، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد لإنزيم الكولينستر از ، نشاط مضاد لإنزيم التيروزيناز.

# Résumé

Cette étude chimique et biologique vise la valorisation des espèces de la flore locale poussant dans la région des Aurès, par la recherche de nouveaux principes actifs et de bioactivités prometteuses, à partir de deux plantes médicinales Algériennes *Atractylis cancellata* L. et *Euphorbia gaditana* Coss. appartenant aux familles Asteraceae et Euphorbiaceae respectivement. Ces plantes sont connues au niveau de la population locale pour leur utilisation en médecine traditionnelle afin de traiter plusieurs maladies.

L'isolement des phytoconstituants **1-49** à partir des extraits éther de pétrole, acétate d'éthyle et *n*-butanol de la plante entière *A. cancellata* et des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol des parties aériennes de l'espèce *E. gaditana* a été réalisé en combinant alternativement diverses techniques chromatographiques telles que la chromatographie liquide sous vide, la chromatographie sur colonne, la chromatographie sur couche épaisse, la chromatographie flash, l'HPLC semi-preparative et l'HPLC préparative en phases normales SiO<sub>2</sub> et inverse C-18. Il est à noter que l'espèce *E. gaditana* a fait l'objet d'un fractionnement bio-guidé. La séparation et la purification chromatographiques ont conduit à isoler **17** produits de la plante *A. cancellata* et **32** composés de l'espèce *E. gaditana*.

L'élucidation structurale des métabolites secondaires obtenus à l'état pur **1-49** s'est faite grâce à l'analyse conjointe des spectres RMN 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>13</sup>C *J*-modulé) et 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), UV et IR, la spectrométrie de masse HR-ESI-MS et ESI-MS, la mesure du pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D$ , l'hydrolyse acide et la comparaison avec les données de la littérature. En effet, cette investigation a permis particulièrement d'identifier en plus de **3** nouveaux produits naturels à savoir un alcaloide de type quinoléine (Ac1) à partir de la plante *A. cancellata*, un tanin hydrolysable (Eg1) et un  $\alpha$ -pyrone (Eg2) de l'espèce *E. gaditana*, **46** composés connus se répartissant en **1** alcaloïde, **25** flavonoïdes, **16** phénols et **4** triterpènoides. Par ailleurs, cette étude a montré la richesse de ces plantes en composés de type polyphénol ayant en général des activités biologiques intéressantes.

La majorité des flavonoïdes et phénols testés pour leur activité antioxydante ont donné des résultats intéressants. Les deux alcaloïdes isolés de l'espèce *A. cancellata* ont été evalués pour leur pouvoir anticholinesterase révélant une excellente activité notamment pour le nouvel alcaloïde (**Ac1**). La dernière activité examinée est le pouvoir d'inhibition de la tyrosinase des deux nouveaux composés obtenus de la plante *E. gaditana* le tannin hydrolysable (**Eg1**) et l' $\alpha$ -pyrone (**Eg2**). Ce dernier a exhibé une très bonne activité antityrosinase proche de celle du standard (acide kojique).

**Mots clés :** Plantes médecinales, *Atractylis cancellata, Euphorbia gaditana*, alcaloïde, tannin,  $\alpha$ -pyrone, flavonoïde, phénol, chromatographie, fractionnement bio-guidé, RMN 1D et 2D, ESI-MS, activité antioxidante, activité anticholinesterase, activité antityrosinase.

# Abstract

The aim of this chemical and biological study is the valorization of the local flora species growing in the Aures region, through the search for new active secondary metabolites and promising bioactivities, from two Algerian medicinal plants *Atractylis cancellata* L. and *Euphorbia gaditana* Coss. belonging to the Asteraceae and Euphorbiaceae families, respectively. These plants are known among the local population for their usage in traditional medicine for treatment of several diseases.

The isolation of phytoconstituents **1-49** from petroleum ether, ethyl acetate and *n*-butanol extracts of the whole plant *A. cancellata* and from ethyl acetate and *n*-butanol of the aerial parts of *E. gaditana* species was performed by alternately combining various chromatographic techniques such as liquid vacuum chromatography, column chromatography, thick layer chromatography, flash chromatography, semi-preparative HPLC and preparative HPLC in normal SiO<sub>2</sub> and reverse phases C-18. It is noteworthy to indicate that bio-guided fractionation was conducted on *E. gaditana*. Chromatographic separation and purification resulted in the isolation of **17** products from the plant *A. cancellata* and **32** compounds from the species *E. gaditana*.

The structural elucidation of obtained secondary metabolites **1-49** was carried out using combined analysis of 1D-NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>13</sup>C *J*-modulated) and 2D-NMR (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), UV, IR, HR-ESI-MS and ESI-MS mass spectrometry, measurement of optical rotation [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>, acid hydrolysis and the comparison with literature data. Indeed, this investigation has particularly allowed the identification of **3** new natural products, an alcaloid of quinoline-type (**Ac1**) from the plant *A. cancellata*, a hydrolysable tannin (**Eg1**) and an  $\alpha$ -pyron (**Eg2**) from the species *E. gaditana*, in addition of **46** known compounds divided into **1** alkaloid, **25** flavonoids, **16** phenols and **4** triterpenoids. Moreover, this study showed the richness of these plants in polyphenol-type compounds that generally presented interesting biological activities.

The majority of the flavonoids and phenols tested for their antioxidant activity gave interesting results. The two alkaloids isolated from the *A. cancellata* species have been evaluated for their anticholinesterase power showing particularly an excellent activity for the new alkaloid (**Ac1**). The last activity assessed was the ability to inhibit tyrosinase enzyme for the two new compounds obtained from the plant *E. gaditana*, hydrolysable tannin (**Eg1**) and  $\alpha$ -pyron (**Eg2**). The latter compound exhibited a very good antityrosinase activity close to that of the standard (kojic acid).

**Keywords:** Medicinal plants, *Atractylis cancellata*, *Euphorbia gaditana*, alkaloid, tannin,  $\alpha$ -pyron, flavonoid, phenol, chromatography, bio-guided fractionation, 1D-, 2D-NMR, ESI-MS, antioxidant activity, anticholinesterase activity, antityrosinase activity.