

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

UNIVERSITE EL HADJ LAKHDAR-BATNA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE
Filière Chimie

THESE DE DOCTORAT 3^{ème} CYCLE

Spécialité

Chimie Organique

Option

Chimie des Substances Naturelles d'Intérêt Biologique

Présentée par

M^{elle} AICHOUR SAMIRA

Thème

Etude chimique d'une Euphorbiaceae : *Euphorbia
bupleuroides*

Soutenue le 14/05/2015

JURY

Mohamed BENKHALED	Professeur Université de Batna	Président
Hamada HABA	Professeur Université de Batna	Rapporteur
Ammar DIBI	Professeur Université de Batna	Examineur
Salah RHOUATI	Professeur Université de Constantine-1	Examineur
Tahar BENDAIKHA	Professeur Université de Batna	Examineur
Samah DJEDDI	Maître de conférences Université de Annaba	Examinatrice

2014-2015

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

UNIVERSITE EL HADJ LAKHDAR-BATNA
FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MATIERE
Filière Chimie

THESE DE DOCTORAT 3^{ème} CYCLE

Spécialité

Chimie Organique

Option

Chimie des Substances Naturelles d'Intérêt Biologique

Présentée par

M^{elle} AICHOUR SAMIRA

Thème

Etude chimique d'une Euphorbiaceae : *Euphorbia
bupleuroides*

Soutenue le 14/05/2015

JURY

Mohamed BENKHALED	Professeur Université de Batna	Président
Hamada HABA	Professeur Université de Batna	Rapporteur
Ammar DIBI	Professeur Université de Batna	Examineur
Salah RHOUATI	Professeur Université de Constantine-1	Examineur
Tahar BENDAIKHA	Professeur Université de Batna	Examineur
Samah DJEDDI	Maître de conférences Université de Annaba	Examinatrice

2014-2015

Remerciements

Ce travail de recherche en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat 3^{ème} cycle, Spécialité chimie organique, Option Chimie des Substances Naturelles d'Intérêt Biologique, a été réalisé au laboratoire de chimie et chimie de l'environnement LCCE de la faculté des Sciences université de Batna, sous la direction du Docteur Haba Hamada, Professeur au département des sciences de la matière filière chimie.

Tous d'abord, j'adresse mes plus vifs remerciements à mon encadreur le Professeur ***Haba Hamada***, de m'avoir accueilli au sein du groupe de phytochimie, guidé, encouragé et conseillé tout au long de la réalisation de ma thèse de Doctorat. J'aimerais aussi le remercier pour sa gentillesse et sa disponibilité durant la période de la rédaction du manuscrit. Je tiens aussi à lui exprimer ma vive reconnaissance pour son enthousiasme et ses précieux conseils qui ont fait progresser ce travail de recherche dans de bonnes conditions.

J'offre un grand merci à Monsieur ***Mohamed Benkhaled*** Professeur à l'université de Batna et directeur du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) pour l'honneur qu'il nous a fait en acceptant de présider le jury de ma thèse de Doctorat.

J'aimerais également remercier vivement les Professeurs ***Ammar Dibi*** et ***Tahar Bendaikha*** de l'université de Batna, le Professeur ***Salah Rhouati*** de l'université de Constantine-1 et le docteur ***Samah Djeddi*** Maître de Conférences à l'université de Annaba pour avoir accepté de faire partie du Jury de ma thèse de Doctorat.

Je souhaite particulièrement remercier le Professeur ***Catherine Lavaud*** de l'UFR de Pharmacie-Institut de chimie moléculaire ICMR de l'université de Reims Champagne-Aderne France, et le Docteur ***Dominique Harakat*** du service commun d'analyse spectrométrique de l'institut de chimie moléculaire ICMR de l'université de Reims Champagne-Ardenne France, pour la réalisation des spectres de RMN et masse.

Je tiens également à exprimer mes remerciements les plus sincères au Professeur ***Bachir Oudjehih*** du département d'agronomie de l'institut des sciences vétérinaires et agronomiques pour l'identification botanique de l'espèce étudiée dans le cadre de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le Professeur *Ahmed Kasseh-Laouar* de m'avoir accueilli dans son laboratoire de microbiologie au CHU de Batna pour la réalisation des tests biologiques antibactériens.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes vifs remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ma formation universitaire Licence, Master et Doctorat LMD.

J'exprime également mes remerciements à tous mes amies et collègues du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement LCCE pour les bons moments qu'on a passés ensemble Leila, Hasna, Zina, Imane, Wassila, Habiba et Sonia.

A mes amies et collègues Ferdousse, Malika, Karima, Souhila et Amel pour leur gentillesse.

Dédicaces

Tout d'abord, je remercie mon «*Dieu*» tout puissant qui m'a donné, la volonté, le courage, la patience et l'endurance et qui a guidé mes pas vers le droit chemin pour réaliser ce travail de
Doctorat.

A mes parents si chers et précieux, qui ont toujours été là pour moi, et
qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance et un grand merci de m'avoir
toujours encouragé.

A mon cher frère Abd el rahmane

A mes chères sœurs : Assia, Hanane, Kahina et Foulla.

A mes nièces : Aridj et Khadidja

A mes neveux : Moncif et Yasser

A ma chère famille oncle Abess, Tata Fatiha, Imene, Ikram et Yacine

Abréviations

AcOEt	: acétate d'éthyle
<i>n</i> -BuOH	: <i>n</i> -butanol
CHCl ₃	: chloroforme
DCM	: dichlorométhane
CDCl ₃	: chloroforme deutéré
CD ₃ OD	: méthanol deutéré
CH ₂ Cl ₂	: dichlorométhane
MeOD	: méthanol deutéré
DMSO	: diméthylsulfoxyde
EtOH	: éthanol
EP	: éther de pétrole
MeOH	: méthanol
Na ₂ SO ₄	: sulfate de sodium
CCM	: chromatographie sur couche mince
CCE	: chromatographie sur couche épaisse
VLC	: chromatographie liquide sous vide
SiO ₂	: gel de silice normale
RP-18	: silice greffée en C-18
ax	: axial
éq	: équatorial
sept	: septuplet
q	: quadruplet
qd	: quadruplet de doublets
d	: doublet
dd	: doublet de doublets
ddd	: doublet de doublets de doublets
dt	: doublet de triplets
dtl	: doublet de triplets larges
t	: triplet
td	: triplet de doublets

dl	: doublet large
s	: singulet
sl	: singulet large
m	: multiplet
dm	: doublet de multiplets
Cq	: carbone quaternaire
RMN ¹ H	: résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ¹³ C	: résonance magnétique nucléaire du carbone 13
COSY H-H	: correlated spectroscopy
HSQC	: heteronuclear single quantum connectivity
HMBC	: heteronuclear multiple bonding connectivity
NOESY	: nuclear overhauser effect spectroscopy
δ	: déplacement chimique exprimé en ppm
<i>J</i>	: constante de couplage exprimée en Hz
SM	: spectrométrie de masse
ESI	: spectrométrie de masse par electrospray
<i>m/z</i>	: masse/charge d'un ion
UMA	: unité de masse atomique
IR	: infrarouge
UV	: ultra-violet
λ	: longueur d'onde exprimée en nm
OBz	: benzoate
i-pr	: isobutyrate
ATCC	: American Type Culture Collection

Sommaire

Introduction	1
---------------------------	---

Chapitre I : Rappel Bibliographique

I.1. Famille Euphorbiaceae.....	4
I.1.1. Généralités	4
I.1.2. Distribution	4
I.1.3. Caractéristiques botaniques des Euphorbiaceae	5
I.2. Utilisation des Euphorbiaceae.....	5
I. 2.1. Utilisation en médecine traditionnelle	5
I. 2.2. Utilisation industrielle.....	6
I. 2.3. Utilisation alimentaire.....	6
I.2.4. Autres utilisations	6
I.3. Genre <i>Euphorbia</i>	7
I.3.1. Description botanique	7
I.3.2. Utilisation en médecine traditionnelle	8
I.4. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre <i>Euphorbia</i> ..	9
I.4.1. Diterpénoïdes	9
I-4.2. Triterpénoïdes	21
I.4.3. Flavonoïdes	28
I.4.4. Coumarines	30
I.4.5. Lignanes	31

Chapitre II : Etude des composés terpénoïdiques et phénoliques

II.1. Généralités	34
II.2. Classification et biogénèse des terpènes.....	34
II.3. Diterpénoïdes.....	36
II.3.1. Biosynthèse des diterpénoïdes.....	36
II.3.2. Rôles et activités biologiques des diterpénoïdes	38
II.4. Triterpénoïdes.....	38
II.4.1. Rôles et activités biologiques des triterpénoïdes	39
II.4.2. Biosynthèse des triterpènes	40

II.5. Composés phénoliques	41
II.5.1. Coumarines	41
II.5.1.1. Classification	41
II.5.1.2. Biosynthèse.....	43
II.5.1.3. Propriétés physico-chimiques.....	43
II.5.1.4. Intérêt pharmacologique des coumarines	44
II.5.2. Lignanes.....	44
II.5.2.1. Classification	44
II.5.2.2. Biosynthèse des lignanes	46
II.5.2.3. Intérêt pharmacologique des lignanes	47
II.5.3. Flavonoïdes.....	47
II.5.3.1. Biosynthèse des flavonoïdes.....	48
II.5.3.2. Rôle des flavonoïdes.....	49

Chapitre III : Etude phytochimique de l'espèce *Euphorbia bupleuroides*

III.1. Description botanique	50
III.2. Utilisation en médecine traditionnelle.....	50
III.3. Classification botanique	50
III.4. Extraction et fractionnement	51
III.5. Séparation et purification	52
III.5.1 Extrait dichlorométhane	52
III.5.2 Extrait acétate d'éthyle.....	52
III.6. Caractérisation des produits obtenus.....	54
III.6.1. Produits nouveaux	54
III.6.2. Produits connus	55
III.7. Détermination structurale des composés isolés 1-20	57
III.7.1. Détermination structurale du composé 1	57
III.7.2. Détermination structurale du composé 2	76
III.7.3. Détermination structurale du composé 3	87
III.7.4. Détermination structurale du composé 4	107
III.7.5. Détermination structurale du composé 5	124
III.7.6. Détermination structurale du composé 6	133
III.7.7. Détermination structurale du composé 7	140
III.7.8. Détermination structurale du composé 8	148

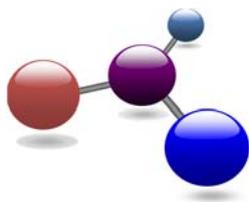
III.7.9. Détermination structurale du composé 9	155
III.7.10. Détermination structurale du composé 10	161
III.7.11. Détermination structurale des composés 11 et 12	169
III.7.12. Détermination structurale du composé 13	176
III.7.13. Détermination structurale du composé 14	180
III.7.14. Détermination structurale du composé 15	185
III.7.15. Détermination structurale du composé 16	193
III.7.16. Détermination structurale du composé 17	204
III.7.17. Détermination structurale du composé 18	217
III.7.18. Détermination structurale du composé 19	226
III.7.19. Détermination structurale du composé 20	235

Chapitre IV : Activité antibactérienne

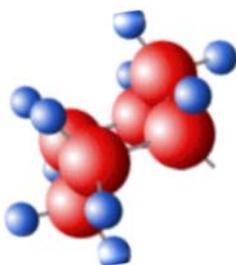
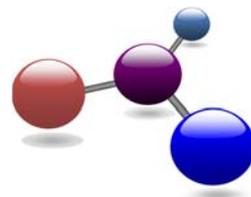
IV.1. Rappel	241
IV.2. Caractères généraux sur les souches étudiées	241
IV.2.1. <i>Esherichia coli</i>	241
IV.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	241
IV.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	241
IV.3. Détermination de l'activité antibactérienne	242
IV.3.1. Méthodes d'analyse.....	242
IV.3.1.1. Préparation des disques	242
IV.3.1.2. Préparation des solutions	242
IV.3.1.3. Préparation de l'inoculum bactérien	242
IV.3.1.4. Ensemencement	243
IV.3.1.5. Incubation.....	243
IV.3.1.6. Lecture	243
IV.4. Test de l'activité antibactérienne	243
IV.4.1. Microorganismes.....	243
IV.5. Expression des résultats	243
IV.6. Conclusion	246
Conclusion	247

Chapitre V: Partie expérimentale

V.1. Matériels et appareillage	252
V.1.1. Récolte de la plante <i>Euphorbia bupleuroides</i>	252
V.2. Techniques préparatives de séparation.....	252
V.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	252
V.2.2. Chromatographie liquide sous vide (VLC)	252
V.2.3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)	252
V.3. Chimie structurale	253
V.3.1. Spectroscopie de RMN.....	253
V.3.2. Spectrométrie de masse	253
V.3.3. Spectrométrie UV-visible.....	253
V.3.4. Spectrométrie Infra-rouge (IR).....	253
V.3.5. Pouvoir rotatoire.....	253
V.4. Etude de l'espèce <i>Euphorbia bupleuroides</i> Desf	254
V.4.1. Extraction	254
V.4.2. Etude de l'extrait CH ₂ Cl ₂ de <i>E. bupleuroides</i>	254
V.4.2.1. Purification des produits de l'extrait CH ₂ Cl ₂	256
V.4.3. Etude de l'extrait AcOEt d' <i>E. bupleuroides</i>	265
V.4.3.1. Purifications des produits	267
V.4.4. Composés isolés de l'espèce <i>Euphorbia bupleuroides</i>	268
Références bibliographiques	275
Résumé	286
Abstract	287
ملخص	288



INTRODUCTION



Introduction

Les plantes occupent une position très importante dans la vie quotidienne des hommes, puisque, elles sont utilisées comme bois de chauffage, matières premières dans l'immobilier, la décoration et dans les soins de maladies. Aujourd'hui, celles-ci sont une véritable ruche à médicaments car, elles sont totalement intégrées dans les mœurs de plusieurs franges de populations et particulièrement africaines et interviennent en pharmacopée traditionnelle dans la lutte contre de nombreuses maladies telles que le paludisme, la dysenterie, la fièvre jaune, le cancer et la stérilité,...etc.

A coté de ces usages ethnopharmacologiques ancrés dans plusieurs sociétés, il est impossible de nier que la nature offre une pharmacopée qui ne cesse de se développer à travers le monde. C'est ainsi que plusieurs plantes ont servi de médicaments en médecine traditionnelle et sont aujourd'hui introduites en médecine moderne; par exemple, l'artémisinine (*Artemisia annua*) utilisé comme composé antipaludique efficace contre toutes les souches résistantes de *plasmodium* [1], le maprouneacine (*Maprounea africana*) utilisé comme agent antidiabétique [2] et le taxol (*Breviflora taxus*) employé comme drogue antitumorale [3].

Dans le cadre de la valorisation de la médecine traditionnelle, il y a eu d'une part un intérêt croissant ces dernières décennies dans l'utilisation des plantes médicinales dans différentes régions de la planète, et d'autre part ces plantes constituent une source pour la recherche scientifique en matière de molécules bioactives. Aujourd'hui, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 80% des populations dépendent de la médecine traditionnelle pour des soins de santé primaire.

Les travaux de recherches scientifiques dans le domaine de la phytochimie ont conduit à l'isolement de nouveaux produits du métabolisme secondaire des plantes. Ces composés sont en très grand nombre et d'une variété structurale extraordinaire. Ces molécules marquent de manière originale, une espèce, une famille botanique ou un genre de plantes et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique. Ces composés se répartissant en : phénoliques, terpénoïdes, stéroïdes et alcaloïdes, sont des exemples de métabolites secondaires du règne végétal. Ils ont de nombreuses applications pharmaceutiques, cosmétiques et agro-alimentaires.

En Algérie, pays avec plus de 3000 espèces regroupées dans plusieurs familles botaniques dont 15% sont endémiques [4], auxquelles la population a recours en médecine traditionnelle, pour traiter plusieurs maladies. Toutefois, des études systématiques portant sur des

plantes médicinales issues de sa flore ont été entreprises récemment en vue d'une classification chimiotaxonomique.

Dans ce contexte, notre laboratoire a entamé depuis un bon moment un programme de recherche destiné à valoriser certaines plantes médicinales poussant dans les régions des Aurès et du Nord de Sahara par la recherche de nouvelles biomolécules à intérêt thérapeutique.

Notre objectif est axé principalement sur l'isolement et la caractérisation de substances naturelles issues de plantes médicinales du genre *Euphorbia* de la famille Euphorbiaceae. Cette famille est la plus vaste du règne végétal et comprend environ 10000 espèces réparties en 300 genres dont 1600 pour le seul genre *Euphorbia* [5]. Les plantes du genre *Euphorbia* sont largement utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde pour guérir un bon nombre de maladies [6]. Les études chimiques antérieures sur ce genre ont mis en évidence la présence d'un nombre important de biomolécules à intérêt thérapeutique, se répartissant principalement en : diterpénoïdes [7,8] et triterpénoïdes [9,10]. D'ailleurs, deux espèces du genre *Euphorbia* à savoir : *E. guyoniana* Boiss. et Reut. et *E. retusa* Forsk. ont été déjà étudiées au niveau de notre laboratoire. Ces investigations ont conduit à l'identification d'une cinquantaine de métabolites secondaires dont 17 de structures nouvelles [8,9,11,12]. Toutes ces études témoignent de la richesse des plantes *Euphorbia* en isoprénoïdes et particulièrement les diterpènes et triterpènes. Ces composés possèdent diverses activités biologiques intéressantes à savoir : antitumorale [13] antibactérienne [14], anti-inflammatoire [14] et anti-oxydante [15]...etc.

Dans cet ordre d'idées, nous nous sommes intéressés à l'investigation chimique de l'espèce endémique à l'Algérie *Euphorbia bupleuroides* Desf. [4,5], plante n'ayant pas fait l'objet d'études phytochimique et biologique antérieures. C'est une plante médicinale connue localement en Tamazight sous l'appellation « hanghouthe ». Elle est largement utilisée en médecine traditionnelle locale contre les verrues et pour extirper les épines [6].

Cette thèse est organisée comme suit :

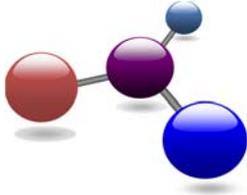
Dans le premier chapitre de cette thèse, il est présenté une description botanique du genre *Euphorbia* et de la famille Euphorbiaceae ainsi que l'utilisation traditionnelle des plantes de cette famille. Cette partie est suivie d'une synthèse bibliographique résumant les différentes investigations phytochimiques réalisées sur des espèces de la famille Euphorbiaceae conduisant à l'identification de diterpènes, triterpènes, flavonoïdes, coumarines et lignanes.

Le second chapitre rapporte l'étude théorique des composés diterpéniques, triterpéniques et phénoliques. Cette partie englobe leur classification chimique, biosynthèse et intérêt thérapeutique.

La troisième partie est consacrée à l'investigation phytochimique de l'espèce *E. bupleuroides*. Dans cette partie, il est décrit les différentes étapes d'extraction, de fractionnement, d'isolement et d'élucidation structurale de 20 métabolites secondaires isolés des extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle des racines de cette plante.

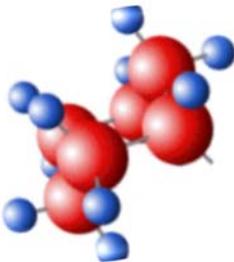
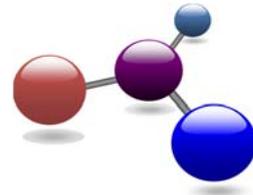
Dans le quatrième chapitre, il est présenté le test de l'activité biologique ayant trait à l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits végétaux (dichlorométhane et acétate d'éthyle).

Le cinquième chapitre est consacré aux travaux expérimentaux effectués sur les extraits CH₂Cl₂ et AcOEt des racines de l'espèce *E. bupleuroides*. Les différentes méthodes chromatographiques et spectroscopiques utilisées pour réaliser ce travail seront présentées.



Chapitre I

Rappel bibliographique



I.1. Famille Euphorbiaceae

I.1.1. Généralités

La famille Euphorbiaceae est une famille de plantes dicotylédones comprenant près de 10000 espèces réparties en près de 300 genres [5], c'est la plus grande des familles de phanérogames, venant après les Asteraceae, Fabaceae et Orchidaceae [16]. Les espèces Euphorbiaceae sont présentes partout dans le monde, sauf dans les régions antarctiques et les sommets des hautes montagnes [17]. Ce sont des plantes herbacées annuelles ou vivaces, lianes, arbustes ou arbres dont certaines espèces sont succulentes ou en forme de cactus [5,17].

I.1.2. Distribution

La famille Euphorbiaceae est presque cosmopolite, bien que principalement tropicale [5]. Il existe cependant des concentrations locales, notamment le genre *Euphorbia* dans le sud de l'Amérique du nord, le Moyen Orient et le sud de l'Afrique (Figure I.1). Les plantes de cette famille se rencontrent dans les régions tropicales indo-malaise, Amérique et Afrique [16]. Elle est moins représentée dans les régions tempérées, où des espèces du genre *Euphorbia* sont les seuls représentants dans la famille.



Figure I.1: Répartition géographique mondiale des Euphorbiaceae.

I.1.3. Caractéristiques botaniques des Euphorbiaceae

D'aspect très variable, les plantes de cette famille se caractérisent par leur latex, liquide blanc et qui est très toxique. La toxicité existe également dans les graines, utilisées autrefois comme purgatif [5,17]. Cette famille est très hétérogène [5,17] et les plantes qui la constituent varient à la fois par leur appareil végétatif ainsi que par la structure de leurs fleurs [5]. Une évolution de la morphologie florale est rencontrée dans les espèces de cette famille allant de fleurs classiques, avec un vrai périanthe (sous-famille des *Crotonoideae*) à des fleurs simplifiées et réduites (sous-famille des *Euphorbiodeae*). Chez la grande majorité des espèces, un fruit à trois loges est remarqué [17].

Les plantes de la famille Euphorbiaceae présentent les caractéristiques morphologiques suivantes:

- ❖ Les feuilles sont généralement alternes et simples, souvent très réduites dans le cas des espèces succulentes. Certains genres et espèces possèdent cependant des feuilles opposées ou palmées (*Hevea, Ricin*) [17].
- ❖ Les fruits se présentent généralement sous forme d'une capsule à 3 parfois 2 loges contenant chacune une seule graine [16].
- ❖ Les graines albuminées (souvent huileuses) sont pourvues d'une caroncule, petite expansion charnue appréciée par des insectes et autres animaux et favorisant la dissémination des graines [5].

I.2. Utilisation des Euphorbiaceae

I.2.1. Utilisation en médecine traditionnelle

Beaucoup d'espèces de cette famille ont des propriétés thérapeutiques remarquables, et sont utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde. Dans ce qui suit, nous allons citer quelques espèces de très importante application thérapeutique.

Phyllanthus myrtifolius (Moon) : c'est une plante réputée en médecine populaire Indienne. Elle est utilisée dans le traitement des maladies des reins, du diabète, de l'hépatite et de la dysenterie. Elle est aussi employée contre les infections intestinales [19].

Bridelia retusa (L.): les racines de cette plante sont utilisées dans le traitement du rhumatisme. Les extraits (AcOEt et MeOH) de cette espèce ont des activités antifongiques [20].

Croton kongensis (Gagnep.) : cette espèce a été utilisée dans la médecine populaire chinoise pour soulager la dysenterie (les fruits), comme un purgatif (les graines) et contre la malaria (les feuilles) [21].

Euphorbia balsamifera (Aiton): c'est une espèce tropicale qui remonte jusqu'au Sud marocain. L'extrait aqueux des racines de cette plante est utilisé comme purgatif et le latex est appliqué localement sur les morsures de serpents et sur les plaies comme anti-venin et cicatrisant [6].

Euphorbia helioscopia (L.): cette espèce est cosmopolite. Dans la région de Rabat, la plante entière est utilisée, par voie interne, à faibles doses, comme laxatif et émétique. Le latex est employé pour attaquer les verrues [6]. Cette espèce est connue dans la région des Aurès pour ses propriétés anti-inflammatoires.

Euphorbia lathyris (L.): cette espèce est cosmopolite. Ses graines sont parfois utilisées dans les campagnes comme purgatif, et le latex comme rubéfiant externe [6].

I.2.2. Utilisation industrielle

- ❖ Le ricin ou *Ricinus communis* (L.) est exploité pour son huile qui entoure sa graine et à partir duquel est produite la fameuse et purgative huile de ricin. Il est utilisé principalement dans le milieu industriel, par exemple dans la fabrication de savons, peintures et vernis [22].
- ❖ L'hévéa (*Hevea brasiliensis* Willd.ex A.Juss), est cultivé pour la production de caoutchouc à partir de son latex. Le développement de l'automobile a favorisé l'introduction de cette culture dans tous les pays tropicaux mais l'apparition de caoutchouc synthétique a réduit son intérêt économique [23].

I.2.3. Utilisation alimentaire

Le manioc ou *Manihot esculenta* (Crantz) est une plante alimentaire possédant des racines charnues d'où est tiré le tapioca. Ses racines riches en amidon sont la base alimentaire de nombreuses populations, notamment africaines. On trouve aussi des plantes fournissant des fruits comestibles (*Phyllanthus emblica* L.), des teintures (*Sapium sebiferum* Lour., *Chozophora tinctoria* L., *Mallotus philippinensis* Lam....etc) [17].

I.2.4. Autres utilisations

Certaines espèces du genre *Croton* aux feuilles panachées ainsi que la plante *Euphorbia pulcherrina* (Willd.) appelée Poinsettia ou Etoile de Noël sont utilisées comme plantes ornementales [16].

Plusieurs espèces européennes, issues des genres *Croton* et *Euphorbia* sont cultivées pour être utilisées également à des fins d'ornementation. Parmi ces espèces, on peut citer *Euphorbia lathyris* L. communément appelée herbe taupe, qui a la réputation d'éloigner les insectivores [16].

I.3. Genre *Euphorbia*

Les Euphorbiaceae sont une famille de plantes à fleurs qui contient plus de 300 genres, dont trois genres (*Euphorbia*, *Croton* et *Phyllanthus*) sont considérés les plus représentatifs de cette famille. La famille doit son nom au plus vaste de ses genres à savoir *Euphorbia* (1600 espèces). La simplicité et l'extrême réduction des fleurs des plantes Euphorbiaceae ne sont pas représentatives de l'ensemble de la famille [5].

Sur le plan systématique le genre *Euphorbia* est classé comme suit :

Embranchement	Spermaphytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous-Classe	Dialypétales
Famille	Euphorbiaceae
Sous-famille	Euphorbioideae
Tribu	Euphorbieae
Sous-tribu	Euphorbiinae
Genre	<i>Euphorbia</i> L.

I.3.1. Description botanique

Il existe environ 1600 espèces d'euphorbes [5], certaines tropicales sont très différentes des euphorbes méditerranéennes et européennes par leur aspect général ; quelques-unes ont même la forme de cactus. Leur principal point commun est la production de latex, liquide visqueux blanc qui apparaît à la cassure du matériel végétal et qui est très toxique en raison principalement de l'euphorbone qu'il contient. Il provoque des irritations de la peau et est dangereux en cas de contact avec les yeux [5,17]. On reconnaît en général les euphorbes par leurs inflorescences rouge jaunâtres, ou cyathes, disposées en ombelles, ne possédant ni sépales ni pétales. La cyathe constituée par une cupule et les pièces sous forme de croissant

représenteraient l'involucre. Chaque inflorescence contient une fleur femelle entourée de fleurs mâles [4,5].

I.3.2. Utilisation en médecine traditionnelle

Les plantes du genre *Euphorbia* sont largement utilisées en médecine traditionnelle à travers le monde. Le tableau I.1 ci-dessous montre quelques propriétés thérapeutiques et activités biologiques attribuées aux plantes du genre *Euphorbia*.

Tableau I.1 : Utilisation en médecine traditionnelle et activités biologiques de quelques espèces du genre *Euphorbia*

Espèce	Propriétés thérapeutiques et biologiques
<i>Euphorbia peplus</i>	Antiasthmatique, anticatarrhe et traitement du cancer [24].
<i>Euphorbia fischeriana</i>	Grand soin pour traitement d'œdème, indigestion, toux, asthme et bronchite chronique [25].
<i>Euphorbia decipiens</i>	Antitumorale, cytotoxique [26].
<i>Euphorbia salicifolia</i>	Antivirale, antitumorale, cytotoxique, activité protéine kinase C [27].
<i>Euphorbia lunulata</i>	Traitement de l'asthme et bronchite chronique [28].
<i>Euphorbia sapinii</i>	Irritant de peau, anti-inflammatoire, antitumorale [13].
<i>Euphorbia aellenii</i>	Traitement de mal de dos et soin de plaies [29].
<i>Euphorbia sororia</i>	Traitement de douleurs abdominales, maladie de peau et paralysie [30].
<i>Euphorbia milii</i>	Antibactérienne, parasites intestinaux, rhumatisme, morsures de serpents [31].
<i>Euphorbia guyoniana</i>	Anti verrues et extirper les épines, traitement des morsures et piqûres venimeuses [6].
<i>Euphorbia retusa</i>	Névrалgie, toux, asthme et tricchisis [6].
<i>Euphorbia falcata</i>	Irritant de peau, antitumorale, anti-allergique, antivirale, anticancéreuse [32].
<i>Euphorbia amygdaloides</i> et <i>esula</i>	Anticancéreuse [33], [34].
<i>Euphorbia peplis</i>	Prophylaxie de cancer de la prostate, anti-inflammatoire et activité protéine kinase C (PKC) [35].
<i>Euphorbia humifusa</i>	Traitement de l'hépatite causée par le virus HBV [36].
<i>Euphorbia tangutica</i>	Cytotoxique [37].

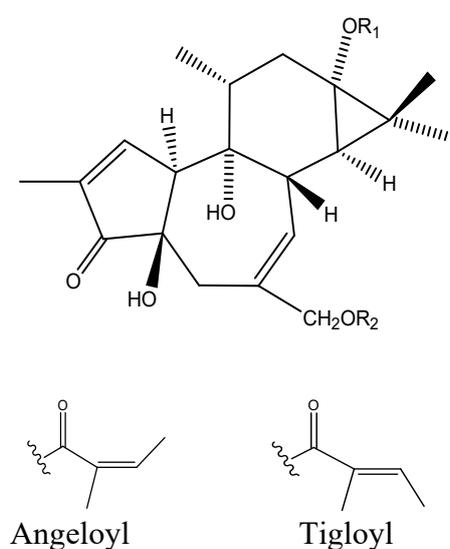
I.4. Travaux antérieurs et principaux métabolites secondaires isolés du genre *Euphorbia*

La majorité des travaux effectués sur le genre *Euphorbia* a relevé la présence des terpénoïdes (diterpénoïdes et triterpénoïdes). Certaines investigations phytochimiques ont souligné la présence d'acides gras, de coumarines, flavonoïdes et lignanes.

I.4.1. Diterpénoïdes

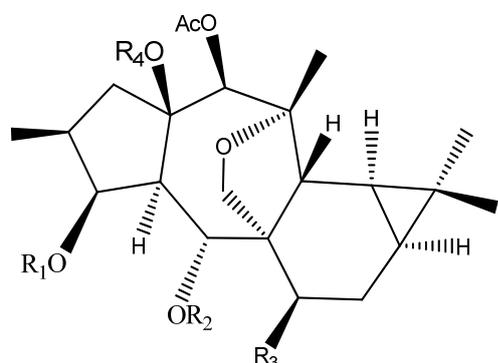
Les diterpènes constituent le plus vaste ensemble connu de métabolites secondaires des végétaux. Ce sont des molécules en C-20 qui sont bien représentées dans le genre *Euphorbia* et comptent un bon nombre de squelettes carbonés (pimarane, abiétane, atisane, tiglane, jatrophone et ingenane).

Les travaux réalisés sur les racines de l'espèce *Euphorbia cornigera* ont permis d'isoler et d'identifier neuf diterpénoïdes à squelette tiglane nouveaux (**1-9**) et un autre connu (**10**) [38]. Ces composés ont été identifiés comme : 13-*O*-acétyl-20-*O*-benzoyl-12-deoxyphorbol (**1**), 13-*O*-acétyl-20-*O*-benzoyl-*p*-méthoxybenzoyl-12-deoxyphorbol (**2**), 13-*O*-décanoyl-20-*O*-angéyl-12-deoxyphorbol (**3**), 13-*O*-décanoyl-20-*O*-tigéyl-12-deoxyphorbol (**4**), 13-*O*-acétyl-20-*O*-décanoyl-12-deoxyphorbol (**5**), 13-*O*-butanoyl-20-*O*-décanoyl-12-deoxyphorbol (**6**), 13-*O*-hexanoyl-20-*O*-décanoyl-12-deoxyphorbol (**7**), 13-*O*-octanoyl-20-*O*-décanoyl-12-deoxyphorbol (**8**), 13-*O*-dodécanoyl-20-*O*-décanoyl-12-deoxyphorbol (**9**) et 13-*O*-acétyl-12-deoxyphorbol (**10**). Les structures moléculaires de ces composés ont été élucidées par les différentes méthodes spectroscopiques telles que la RMN 1D, 2D et la spectrométrie de masse.

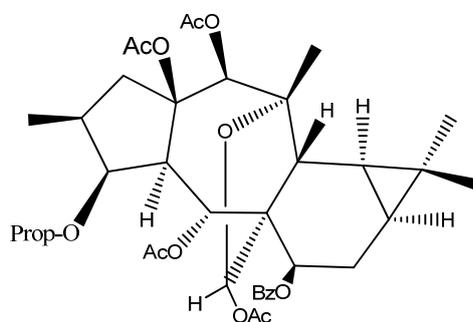


	R ₁	R ₂
1	Acétyl	Benzoyl
2	Acétyl	<i>p</i> -méthoxybenzoyl
3	Décanoyl	Angéoyl
4	Décanoyl	Tigéoyl
5	Acétyl	Décanoyl
6	Butanoyl	Décanoyl
7	Hexanoyl	Décanoyl
8	Octanoyl	Décanoyl
9	Dodécanoyl	Décanoyl
10	Acétyl	H

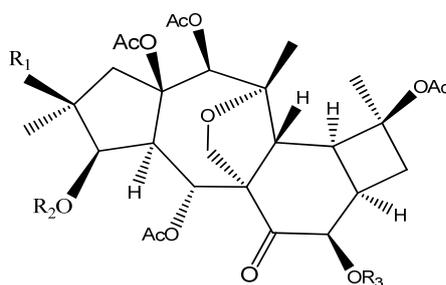
Une étude chimique réalisée sur l'extrait méthanolique de la plante entière *E. falcata* [39] a révélé la présence de quatre nouveaux diterpènes de type premyrsinane **11-14**.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
11	Hex	H	H	H
12	Prop	Ac	OBz	Ac
13	IBu	H	OBz	Ac

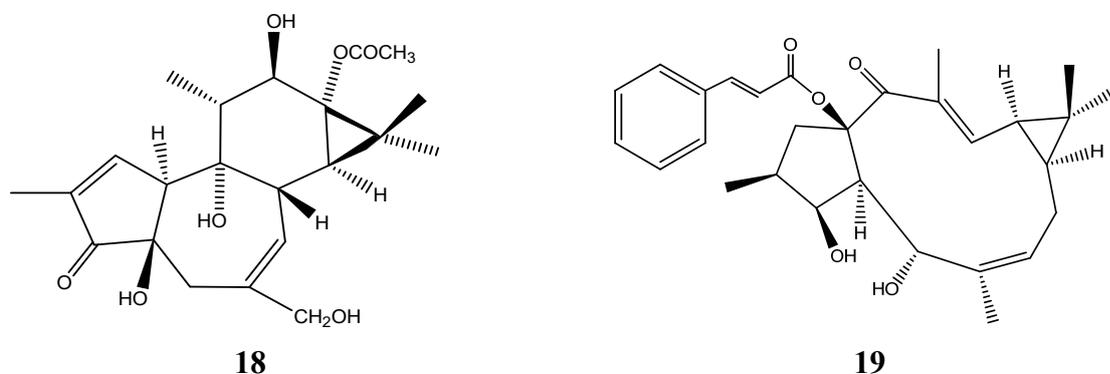
**14**

Une autre étude phytochimique effectuée sur la même espèce, a permis d'identifier trois diterpènes de type premyrsinane (**15-17**) dont deux nouveaux (**15** et **16**) [32]. L'extrait méthanolique de cette plante a été évalué pour son activité antitumorale.

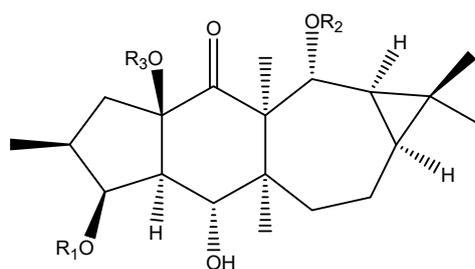
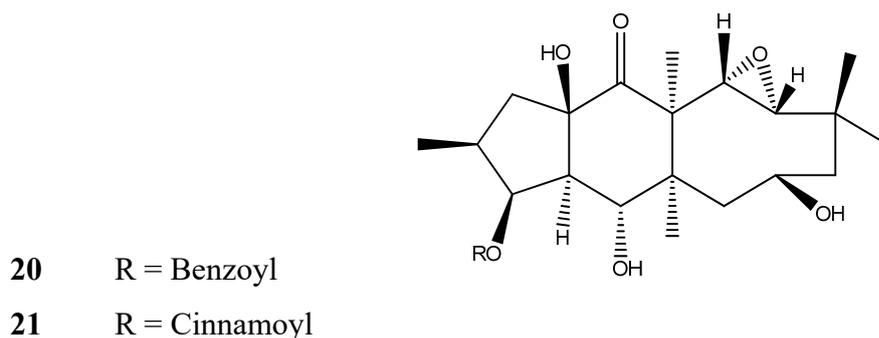


	R ₁	R ₂	R ₃
15	OBz	IBu	MeBu
16	OBz	IBu	IBu
17	H	Prop	Bu

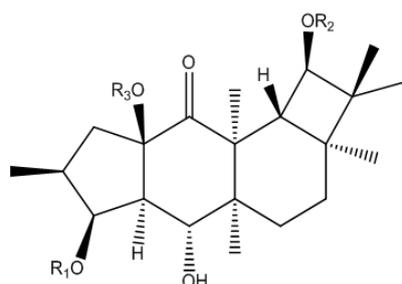
Deux diterpènes nouveaux nommés phorbol-13-acétate (**18**) et 3 β ,5 α -dihydroxy-15 β -cinnamoyloxy-14-oxolathyr-6Z,12E-diène (**19**), ont été isolés de l'extrait acétate d'éthyle de l'espèce *Euphorbia tangutica* [37].



Les racines de l'espèce *E. micractina* ont fait l'objet d'une investigation phytochimique [14] qui a abouti à l'isolement de douze diterpènes nouveaux **20-28** et **30-32** ainsi que trois connus **29**, **33** et **34**.

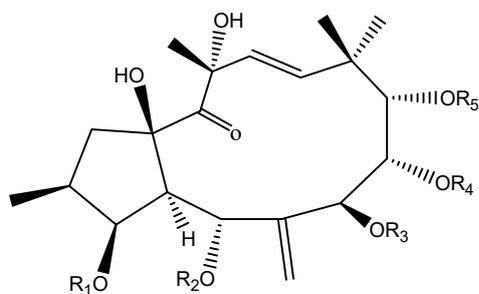


	R ₁	R ₂	R ₃
22	Benzoyl	H	H
23	Cinnamoyl	H	H
24	H	Me	Benzoyl
25	Benzoyl	Et	H
26	Cinnamoyl	Me	H
27	Cinnamoyl	Et	H
28	Cinnamoyl	Isopropylidène	Isopropylidène
29	H	H	Cinnamoyl

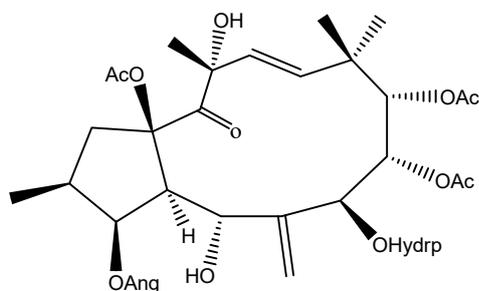


	R ₁	R ₂	R ₃
30	Benzoyl	H	H
31	Cinnamoyl	H	H
32	H	Me	Cinnamoyl
33	H	H	Cinnamoyl
34	H	H	Benzoyl

A partir de l'extrait acétate d'éthyle de la plante entière *Euphorbia amygdaloides*, douze nouveaux diterpènes [33] nommés amygdaloidines A-L (35-46) ont été caractérisés par les différentes méthodes spectroscopiques notamment la RMN 1D et 2D. Certains composés présentent un modèle de substitution unique sur leur squelette jatropane.



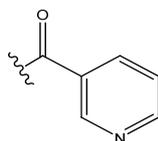
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
35	Ac	Ac	Ang	Ang	Nic
36	Ang	H	Ang	Ac	Nic
37	Hydrp	H	Ang	Ac	Ac
38	Ang	H	Ang	Ac	Ac
39	Ang	H	Hydrp	Ac	Ac
41	Ang	Ac	H	Hydrp	Ac
42	Hydrp	Ac	H	Ang	Ac
43	Ac	Hydrp	H	Ang	Ac
44	Hydrp	Ac	H	Ang	Ac
45	Ac	Hydrp	Ang	H	Ac
46	Ang	Ac	Hydrp	H	Ac



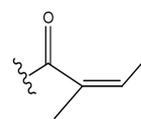
40

Nic : Nicotinyll

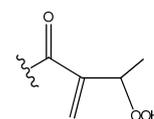
Hydrp : 3-hydroperoxy-2-méthylène-butyryl



Nic



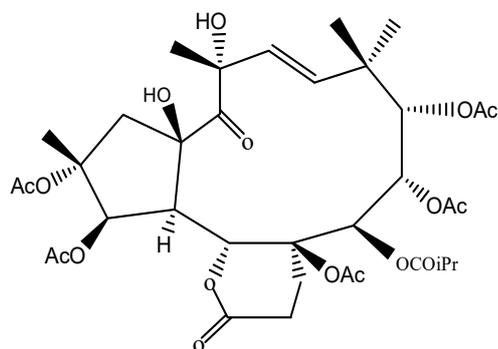
Ang



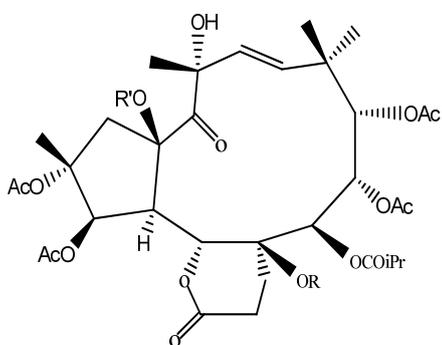
Hydrp

Une étude effectuée sur les parties aériennes de l'espèce *E. terracina* [40] a permis d'isoler et de caractériser six diterpènes lactones : 13 α -hydroxyterracinolide I (47), 13 α -hydroxy-terracinolide G (48), 15-*O*-deacétyl-13 α -hydroxyterracinolide A (49), 13 α -hydroxy-

terracinolide B (**50**), isoterracinolide A (**51**), isoterracinolide B (**52**), et un *ent*-abiétane de type jolkinolide : 7 β -hydroxy-8 α ,14-dihydrojolkinolide *E* (**53**).



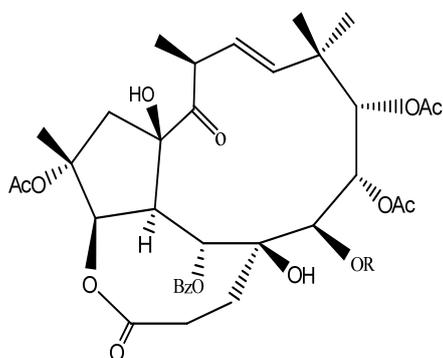
47



48 R=R'= Ac

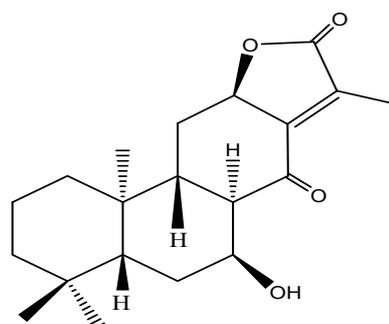
49 R = Ac R' = H

50 R = Bz R' = H



51 R= COiPr

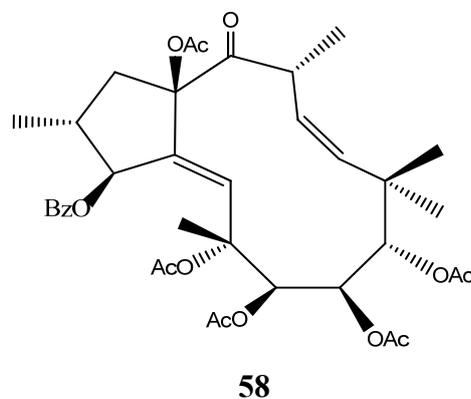
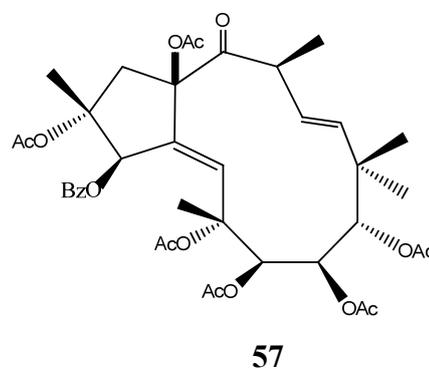
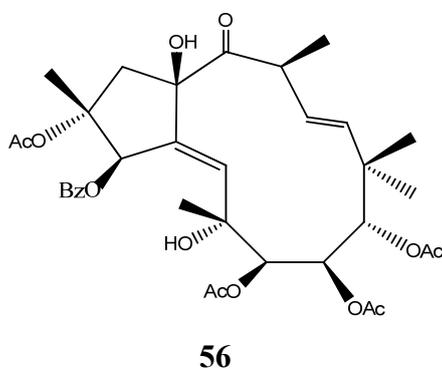
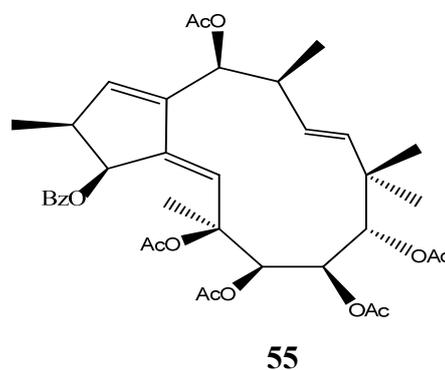
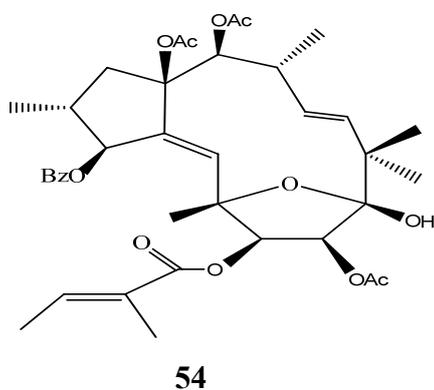
52 R= COEt



53

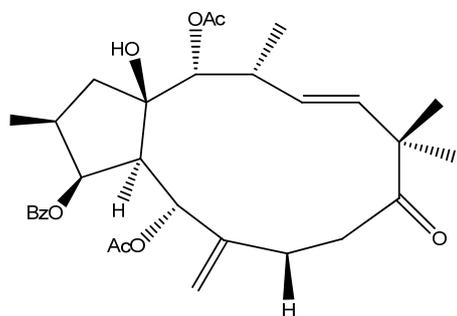
De l'espèce *Euphorbia serrulata* [41], ont été isolés et identifiés cinq nouveaux diétrpènes polyesters de type jatrophane 8,14,15-triacétoxy-3-(benzoyloxy)-6,9-époxy-9-hydroxy-7-tigloyloxyjatropha-4,11-diène (**54**), 6,7,8,9,14-penta-acétoxy-3-benzoyloxyjatropha-1(15),4,11-triène (**55**), 2,7,8,9-tétra-acétoxy-3-benzoyloxy-6,15-dihydroxy-14-oxojatropha-4,11-

diène (**56**), 2,6,7,8,9,15-hexa-acétoxy-3-benzoyloxy-14-oxojatropha-4,11-diène (**57**), 6,7,8,9,15-penta-acétoxy-3-benzoyloxy-14-oxo-jatropha-4,11-diène (**58**).

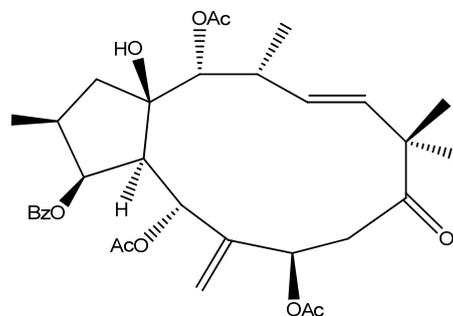


Plusieurs études phytochimiques ont été réalisées sur la plante médicinale *E. guyoniana* [8,9,11,12,42]. Celles-ci ont conduit à l'isolement de neuf nouveaux diterpènes (**59-67**) à squelette jatropane, tiglane et *ent*-abiétane : 5,14-diacétoxy-3-benzoyloxy-15-hydroxy-9-oxojatropha-6(17),11*E*-diène (**59**), 5,7,14-triacétoxy-3-benzoyloxy-15-hydroxy-9-oxojatropha-6(17),11*E*-diène (**60**), 2,7,8,9,14-penta-acétoxy-5-benzoyloxy-6,15-dihydroxy-11,12-époxy-17-éthyl-22-oxojatropane (**61**), 4,12-dideoxy(4 α)phorbol-13-hexadecanoate (**62**), 11,16-époxy-*ent*-abiéta-8,11,15-triène-13,14-dione (**63**), 11-hydroxy-*ent*-abiéta-8,11,13-triène-15-one (**64**), *ent*-abiéta-8,11,13-triène-16-ol (**65**), *ent*-abiéta-8,11,13-triène-11,16-diol (**66**), acide 11,12-dihy-

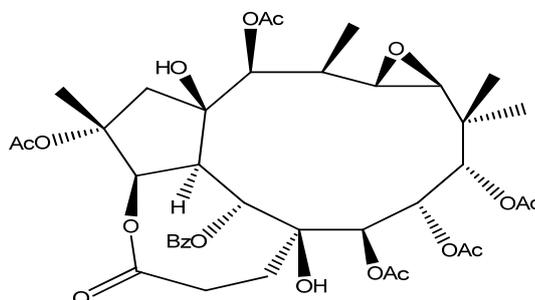
droxy-7-oxo-*ent*-abiéta-8,11,13-trièn-16-oïque-méthylate (67). Leurs structures moléculaires ont été établies grâce aux méthodes d'analyse spectroscopiques (RMN 1D et 2D, ESI-MS, EI-MS et IR).



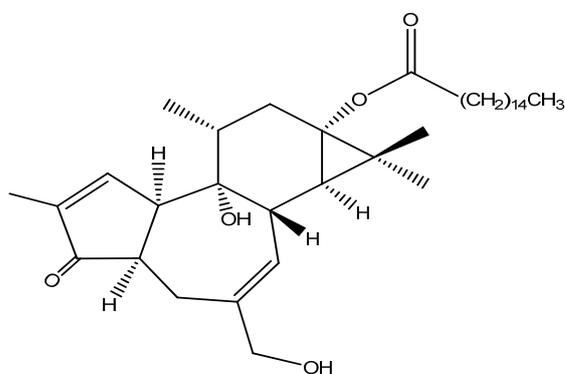
59



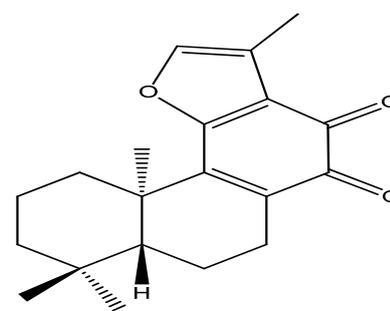
60



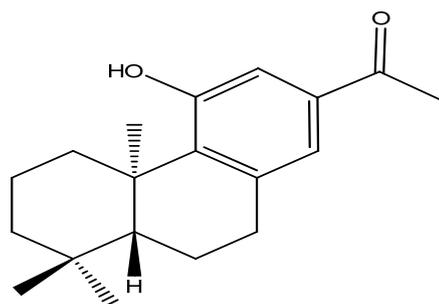
61



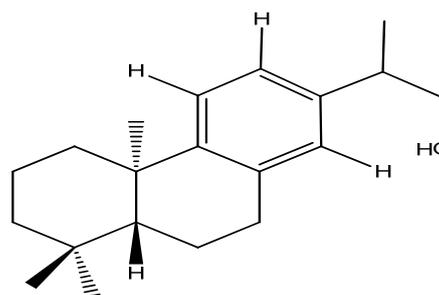
62



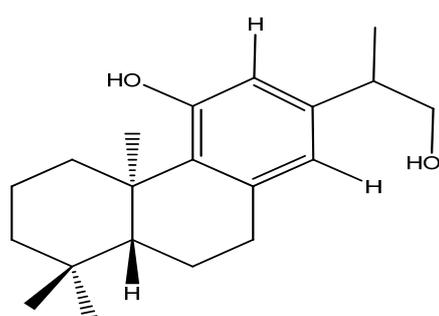
63



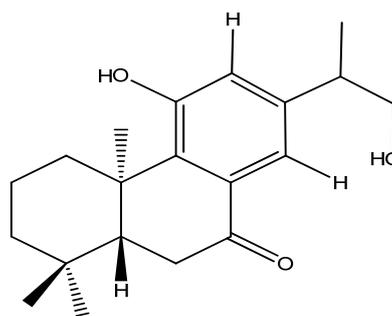
64



65

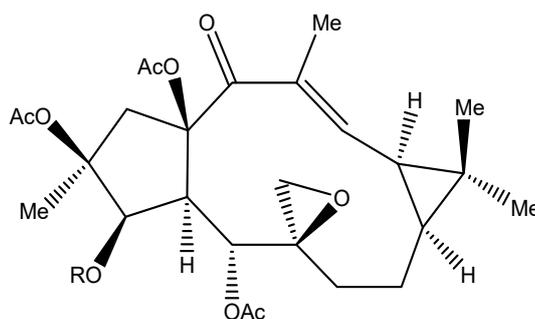


66



67

Deux diterpénoïdes esters 6(17)-époxyathyrol appelés 2 β ,5 α ,15 β -*O*-triacétoxy-3 β -*O*-nicotinyloxy-14-oxo-lathyra-12(13*E*)-èn-6(17)-époxyde (**68**), 2 β ,3 β ,5 α ,15 β -*O*-tétra-acétoxy-14-oxolathyra-12(13*E*)-èn-6(17)-époxyde (**69**), ont été isolés de l'extrait éthanolique des racines de l'espèce *Euphorbia aellenii* [29].

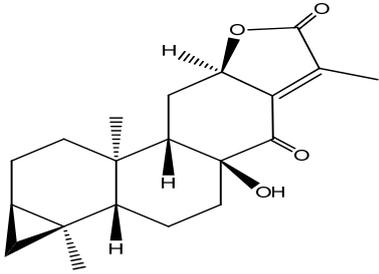
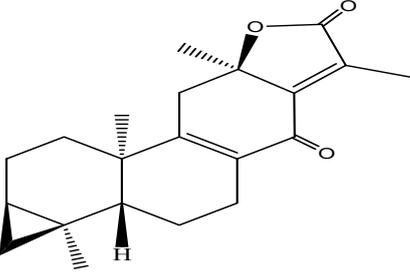
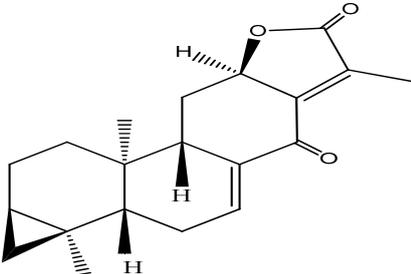
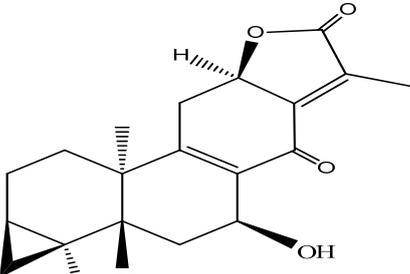
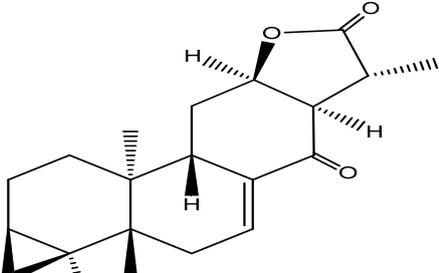
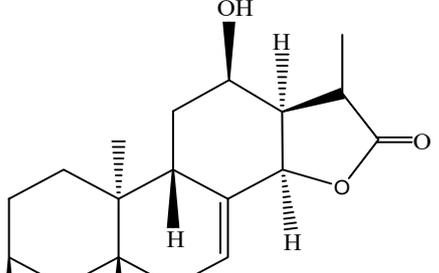
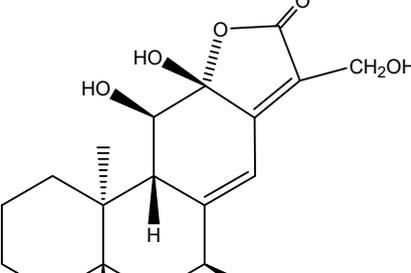
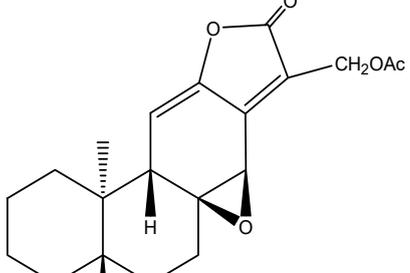


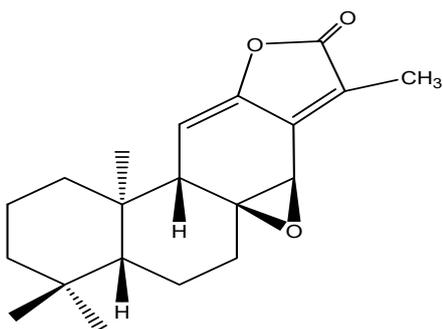
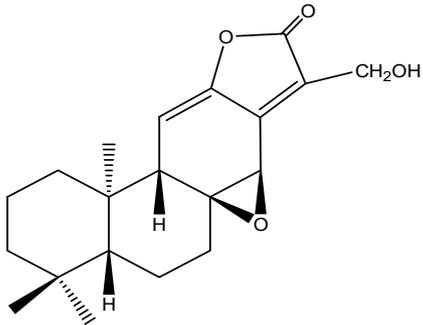
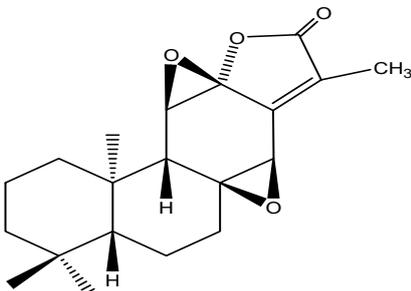
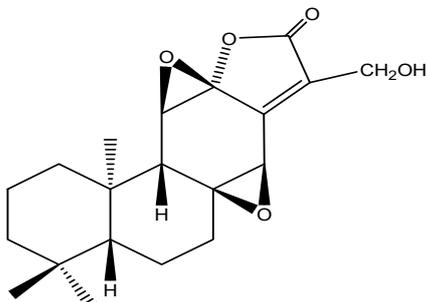
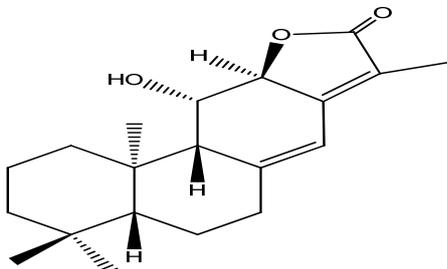
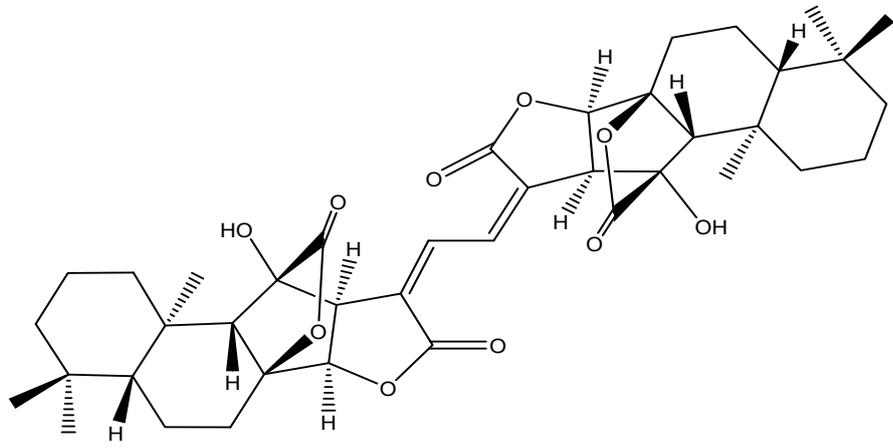
68 R = Nicotinyll

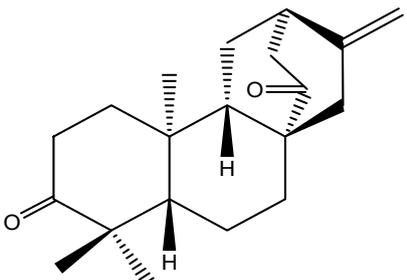
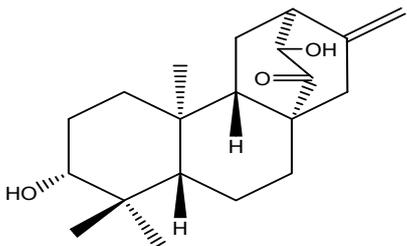
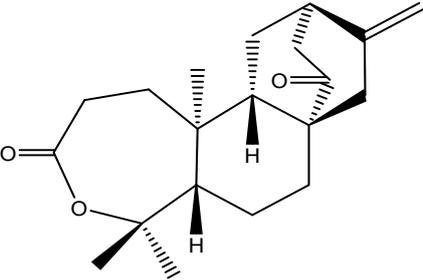
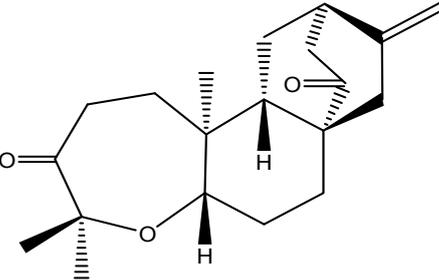
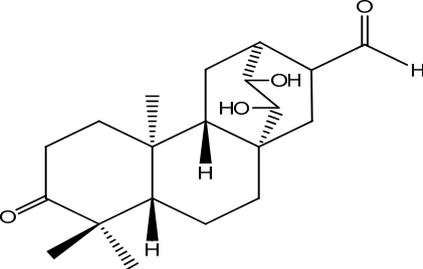
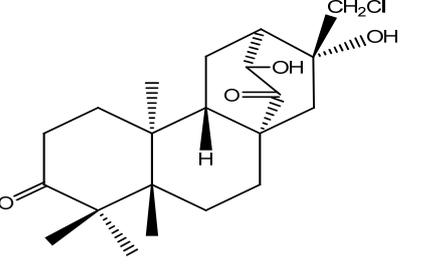
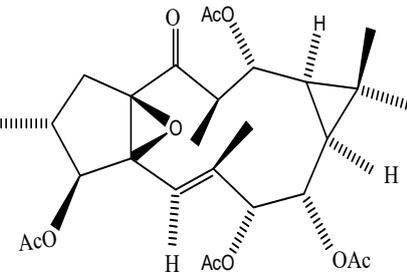
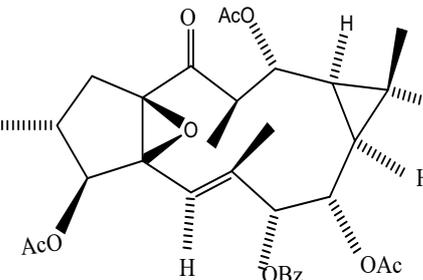
69 R = Acétyl

Plusieurs investigations chimiques menées sur d'autres espèces du genre *Euphorbia*, ont permis d'identifier de nombreux dérivés diterpéniques qui sont indiqués dans le tableau suivant (Tableau I.2).

Tableau I.2: Diterpènes isolés de quelques plantes *Euphorbia*

Espèces	Diterpénoïdes		Réf	
<i>E. retusa</i>	 <p data-bbox="451 633 686 672">Retusolide A (70)</p>	 <p data-bbox="957 633 1192 672">Retusolide B (71)</p>	[11]	
	 <p data-bbox="451 1041 686 1079">Retusolide C (72)</p>	 <p data-bbox="957 1059 1192 1097">Retusolide D (73)</p>		
	 <p data-bbox="451 1489 686 1527">Retusolide E (74)</p>	 <p data-bbox="957 1518 1192 1556">Retusolide F (75)</p>		
	 <p data-bbox="451 1982 686 2020">Langduine B (76)</p>	 <p data-bbox="885 1971 1264 2009">17-acétoxyjolkinalide A (77)</p>		

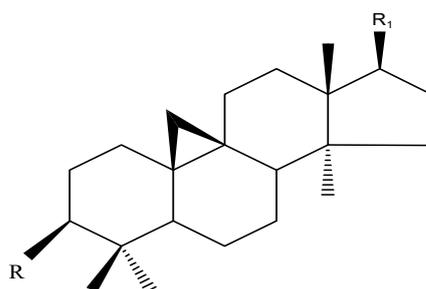
<i>E. fischeriana</i>	 <p>Jolkinolide A (78)</p>	 <p>17-hydroxyjolkinolide A (79)</p>	[25]
	 <p>Jolkinolide B (80)</p>	 <p>17-hydroxyjolkinolide B (81)</p>	
	 <p><i>Ent</i>-11β-hydroxyabiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12β-olide (82)</p>		
	<i>E. fischeriana</i>	 <p>Langduine C (83)</p>	

	 <p><i>Ent-atis-16-ène-3,14-dione (84)</i></p>	 <p><i>Ent-3β,(13S)-dihydroxyatis-16-èn-14-one (85)</i></p>	
<i>E. fidjiana</i>	 <p><i>Ent-(13S)-hydroxy-14-oxo-3,4-seco-atis-16-èn-3,4-olide (86)</i></p>	 <p><i>Ent-(13S)-hydroxy-4,5-oxy-4,5-seco-atis-16-ène-3,14-dione (87)</i></p>	
	 <p><i>Ent-(13S,14S)-dihydroxy-3,14-dioxo-atis-15-èn-17-al (88)</i></p>	 <p><i>Ent-17-chloro-(13S),16β-dihydroxyatisane-3,14-dione (89)</i></p>	[44]
<i>E. portu-lacoides</i>	 <p><i>2-epi-ingol-3,7,8,12-tétra-acétate (90)</i></p>	 <p><i>2-epi-ingol-3,8,12-tétra-acétate-7-benzoate (91)</i></p>	[45]

I.4.2. Triterpénoïdes

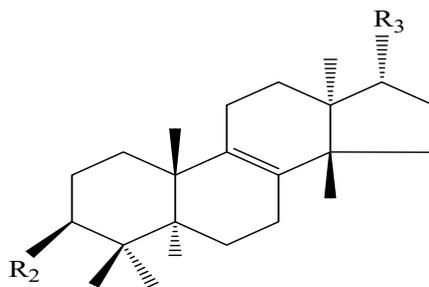
C'est une classe de métabolites secondaires dont la structure de base est en C₃₀. Elle est très répandue dans les espèces du genre *Euphorbia*. C'est ainsi qu'il existe des triterpènes tétracycliques et pentacycliques.

L'investigation chimique réalisée sur les parties aériennes ainsi que sur le latex de l'espèce *E. broteri* a conduit à l'identification de triterpénoïdes tétracycliques à squelettes cycloartane, lanostane et euphane et triterpénoïdes pentacycliques, lupane, secolupane et oléanane [10].



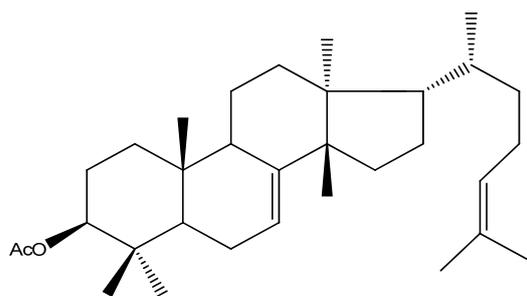
Squelette cycloartane

R	R ₁	R	R ₁
99 OAc (acétate cycloartényl) 100 OH (cycloarténol)		107 OAc (cycloart-25-ol-3β,24-diacétate)	
101 OAc (acétate 24-méthylèncycloartanyl) 102 OH (24-méthylèncycloartanol)		108 OAc (cycloart-25-ène-3β,24-diacétate)	
103 OAc (3β-acétoxy-cycloart-25-èn-24-one)		109 OAc (3β-acétoxy-cycloart-24,25-diol) 110 OH (cycloart-3β,24,25-triol)	
104 OAc (3β-acétoxy-24,25-epoxycycloartane) 105 OH (24,25-epoxycycloartane)		111 OAc (25,26,27-trisnor-3β-acétoxy-24 diméthoxycycloartane)	
106 OAc (cycloart-23-ène-3β,25-diol monoacétate)		112 OAc (3β-acétoxy-cycloart-23-aldehyde)	

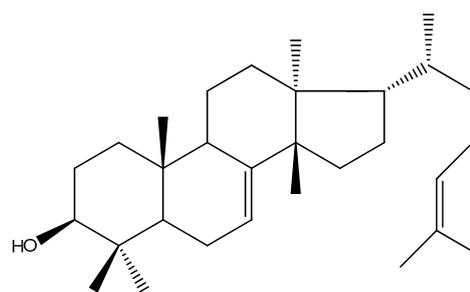


Squelette euphane

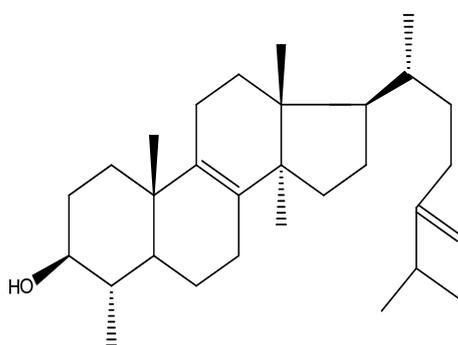
R ₂	R ₃	R ₂	R ₃
113 OAc (acétate euphol) 114 OH (euphol)		115 OAc (euphan-8,25-diène-3β,24-diacétate)	



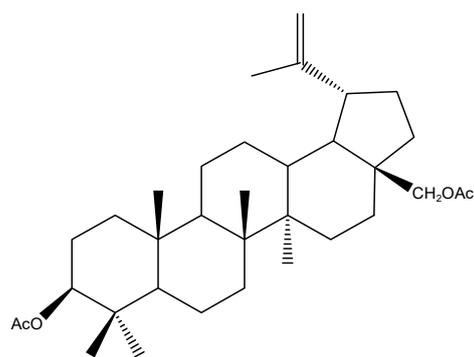
116 (3β-acétate butyrospermyl)



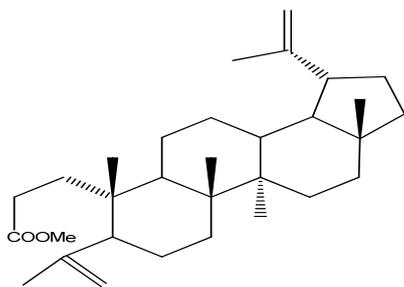
117 (butyrospermol)



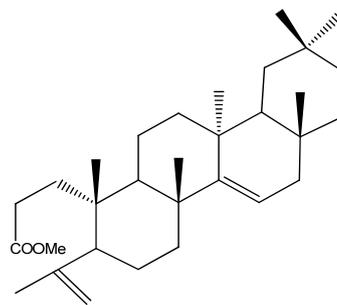
118 (obtusifoliol)



119 (diacétate betuline)



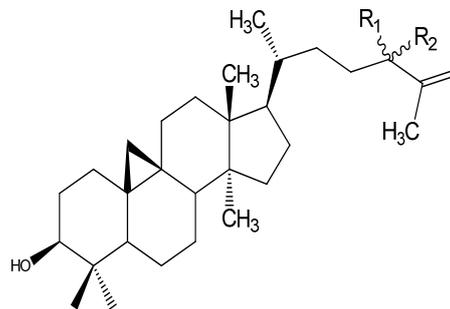
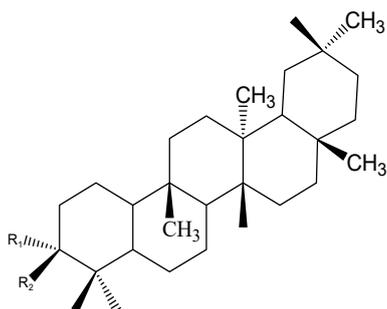
120



121

(3,4-*seco*-4(23),20(30)-lupadiène-3-méthyl ester) (3,4-*seco*-4(23),12-oléadiène-3-méthyl ester)

L'étude chimique réalisée sur l'espèce *E. cyparissias* [47] a conduit à l'isolement de deux nouveaux triterpènes pentacycliques à squelette glutéran (122 et 124) et d'autres triterpénoïdes connus. Ces composés sont identifiés aux glut-5-ène-3 α -méthylbutyrate (122), glut-5-èn-3 α -ol (123), glut-5-èn-3-one (124), 3 β -hydroxycycloart-25-èn-24-hydroperoxyde (125) et 3 β -hydroxycycloart-25-èn-24-one (126).

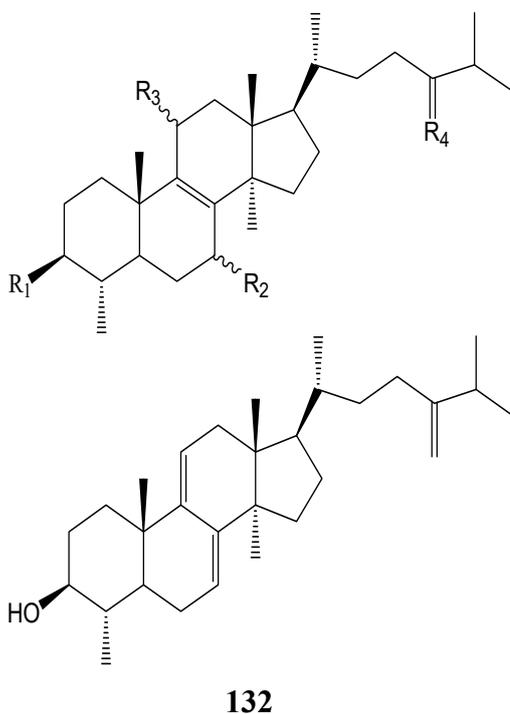


	R ₁	R ₂
122	O-méthylbutyl	H
123	α -OH	H
124	O	O

	R ₁	R ₂
125	OOH	H
126	O	O

Une étude phytochimique réalisée sur l'extrait éthanolique de la plante *E. chamaesyce* [48], a permis de séparer par HPLC et identifier par les méthodes spectroscopiques deux nouveaux stéroïdes de type ergostane 3 β -hydroxy-4 α ,14 α -diméthyl-5 α -ergosta-8,24(28)-dièn-7-one (127) et 3 β -hydroxy-4 α ,14 α -diméthyl-5 α -ergosta-8,24(28)-diène-7,11-dione (138) et quatre triterpènes tétracycliques connus, obtusifoliol (129), 3 β ,7,11-dioxo-obtusifoliol (130), 3 β -

acétoxy-4 α ,14 α -diméthyl-5 α -cholest-8-ène-7,11,24-trione (**131**), et 4 α ,14 α -diméthyl-5 α -ergosta-7,9(11),24(28)-trièn-3 β -ol (**132**).

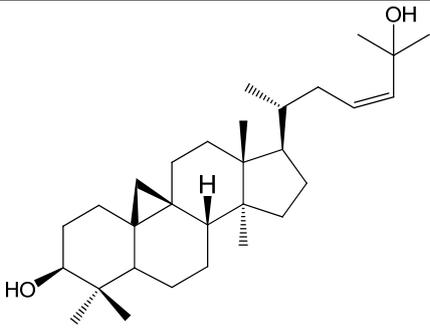
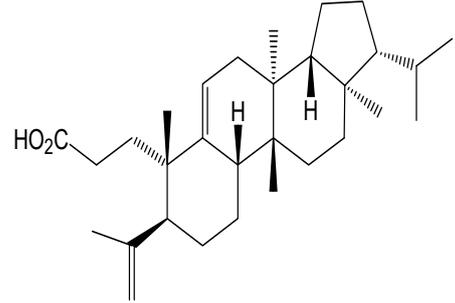
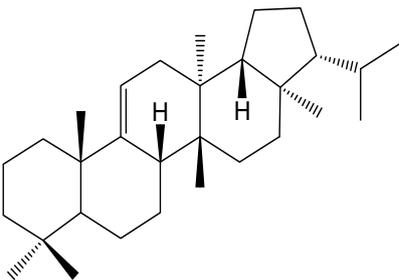
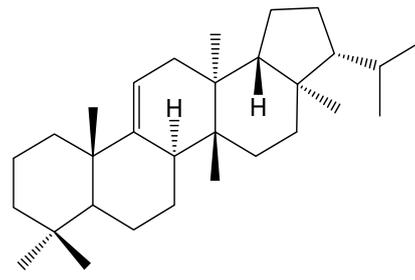
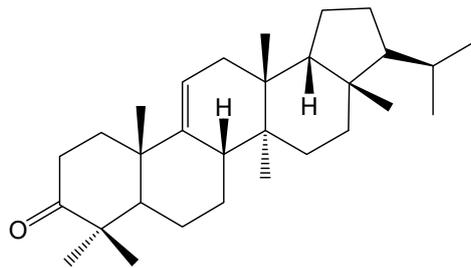
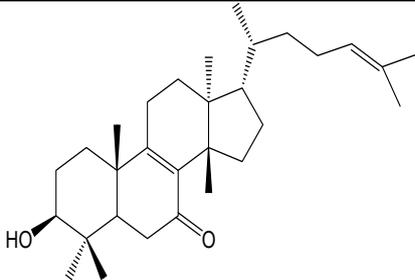
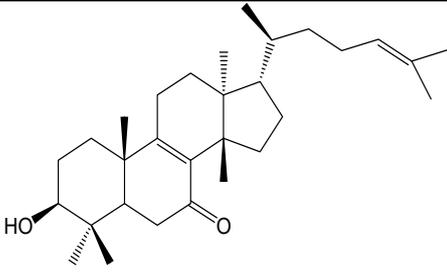
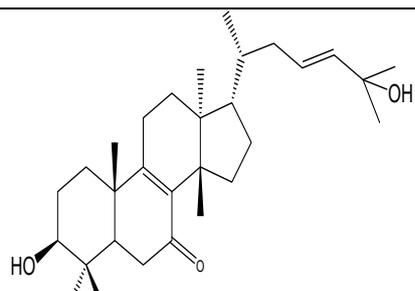
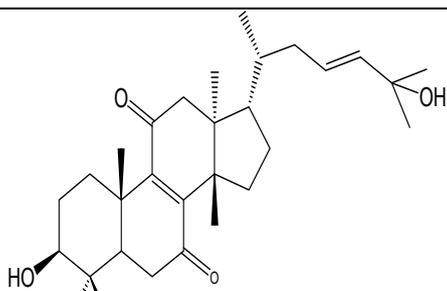


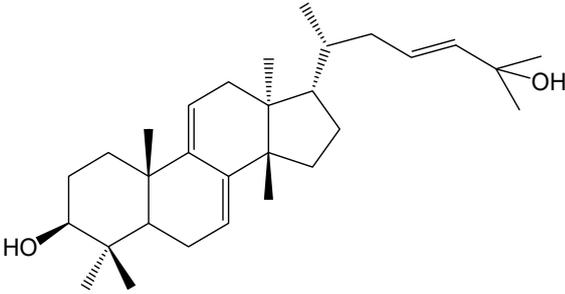
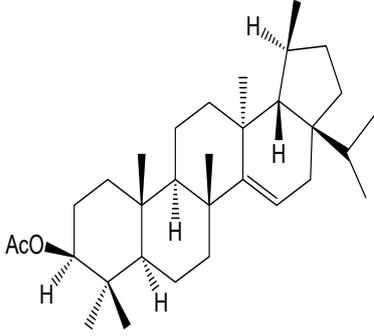
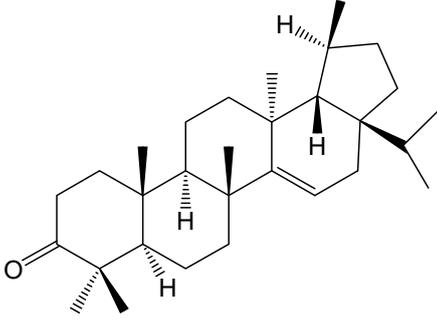
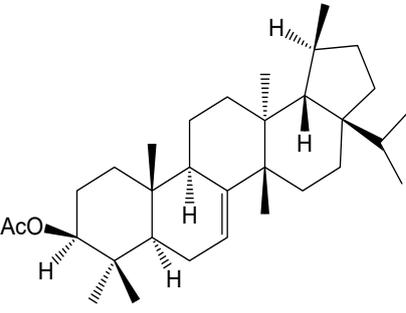
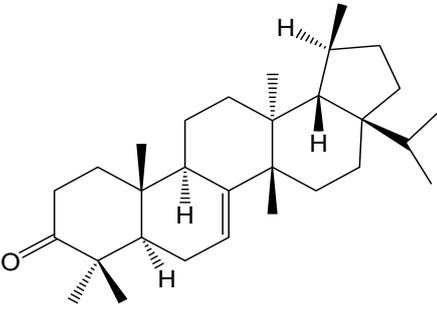
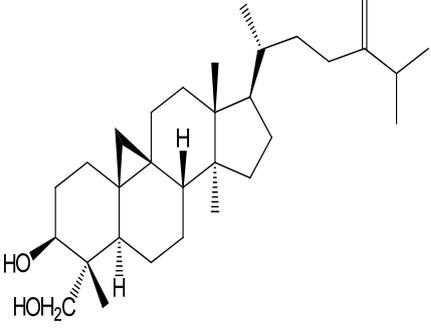
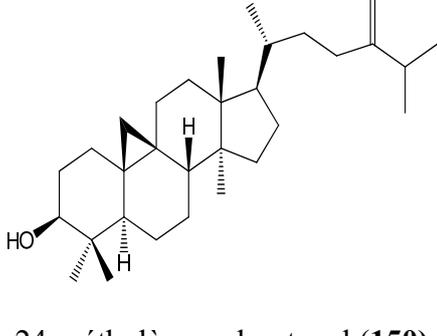
	R1	R2	R3	R4
127	OH	O	H ₂	CH ₂
128	OH	O	O	CH ₂
129	OH	H ₂	H ₂	CH ₂
130	OAc	O	O	CH ₂
131	OAc	O	O	O

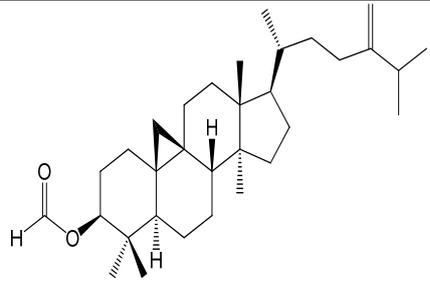
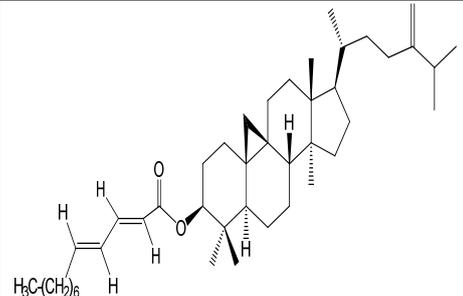
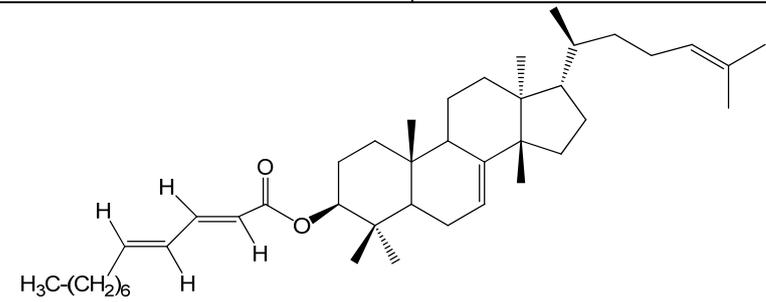
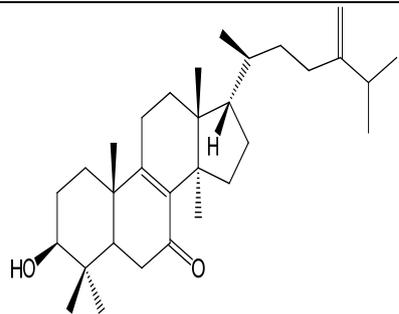
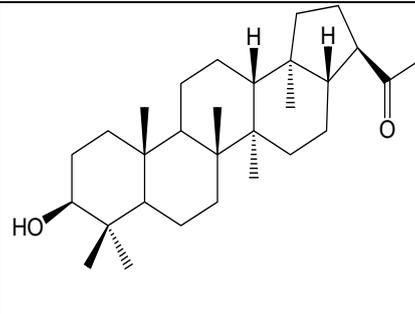
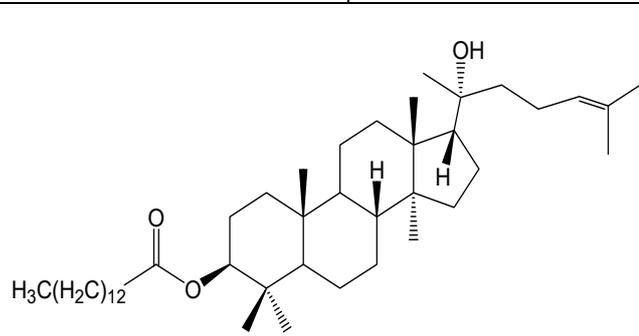
Le Tableau I.3 ci-dessous présente quelques triterpènes isolés des plantes *E. chamaesyce*, *E. kansui*, *E. stygiana*, *E. guyoniana*, *E. retusa* et *E. sapinii*.

Tableau I.3: Triterpènes isolés de quelques espèces du genre *Euphorbia*

Espèces	Triterpénoïdes	Réf
<i>E. chamaesyce</i>	<p style="text-align: center;">Glutinol (133)</p> <p style="text-align: center;">3β-hydroxymultiflor-8-èn-7-one (134)</p>	[49]

	 <p>Cycloart-23Z-ène-3β,25-diol (135)</p>	 <p>Acide 3,4-seco-8βH-ferna-4(23),-9(11)-dièn-3-oïque (136)</p>	
	 <p>8αH-fern-9(11)-ène (137)</p>	 <p>8βH-fern-9(11)-ène (138)</p>	
	 <p>Arborinone (139)</p>		
<i>E. kansui</i>	 <p>Kansenone (140)</p>	 <p>Epi-kansenone (141)</p>	[50]
	 <p>Kansenonol (142)</p>	 <p>11-oxo-kansenonol (143)</p>	

	 <p style="text-align: center;">Kansanol (144)</p>	
<i>E. sty-giana</i>	 <p style="text-align: center;">Madeiranyl acétate (145)</p>	[51]
	 <p style="text-align: center;">Madeiranone (146)</p>	
	 <p style="text-align: center;">Isomadeiranyl acétate (147)</p>	
	 <p style="text-align: center;">Isomadeiranone (148)</p>	
<i>E. guyo-niana</i>	 <p style="text-align: center;">24-méthylèncycloartane-3,28-diol (149)</p>	[9]
	 <p style="text-align: center;">24-méthylèncycloartanol (150)</p>	

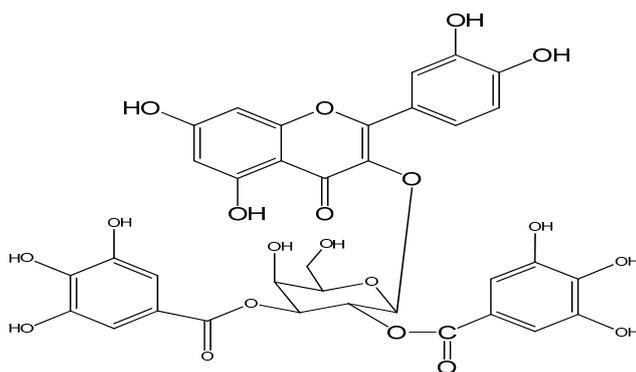
	 <p>24-méthylèncycloartanyl formiate (151)</p>	 <p>24-méthylèncycloartanyl 2'E,4'E-décadiénoate (152)</p>	
<p><i>E. retusa</i></p>	 <p>Tirucalla-7,24-dièn-3β-yl 2'E,4'E-décadiénoate (153)</p>		<p>[11]</p>
<p><i>E. sapinii</i></p>	 <p>Euphorbol-7-one (154)</p>	 <p>30-nor-hopan-3β-ol-22-one (155)</p>	<p>[13]</p>
	 <p>Lanost-24-èn-20-ol-3-tétradécanoate (156)</p>		

I.4.3. Flavonoïdes

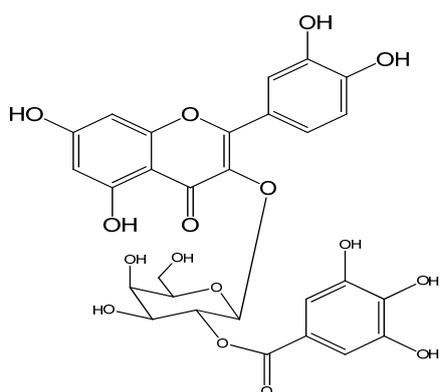
Les flavonoïdes sont des pigments quasiment universels des végétaux. Structuralement les flavonoïdes se répartissent en plusieurs groupes : flavones, flavonols, flavanones, flavanols...etc. Dans le genre *Euphorbia*, les flavonoïdes sont particulièrement représentés par les flavonols (Tableau I.4).

Tableau I.4: Flavonoïdes isolés de quelques espèces du genre *Euphorbia*

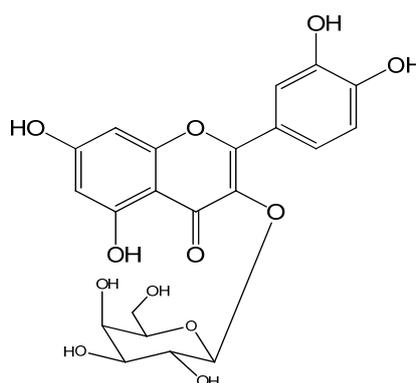
Espèces	Flavonoïdes	Réf
<i>Euphorbia lunulata</i>	Quercétine 3- <i>O</i> -(2'',3''-digalloyl)- β -D-galactopyranoside (157)	[28]
	Quercétine 3- <i>O</i> -(2''-galloyl)- β -D-galactopyranoside (158)	
	Hyperine (159)	
	Quercétine (160)	
	Kaempférol (161)	
<i>Euphorbia retusa</i>	Kaempférol-3-glucoside (162)	[52]
	Quercétine-3-glucoside (163)	
	Myricétine (164)	
	Apigénine (165)	
	Genesteine (166)	
<i>Euphorbia altotibetic</i>	Kaempférol (161)	[46]
	Astragaline (167)	
<i>Euphorbia ebracteolata</i>	Quercétine 3- <i>O</i> -6''-(3-hydroxyl-3-méthylglutaryl)- β -D-glucopyranoside (168)	[53]
	Kaempférol 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 4)- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-galactopyranoside (169)	
<i>Euphorbia guyoniana</i>	Quercétine (160)	[54]
	Kaempférol (161)	
	Kaempférol-3-glucoside (162)	
	Quercétine-3-glucoside (163)	
	Kaempférol-3- <i>O</i> -rutinoside (170)	
	Rutine (171)	



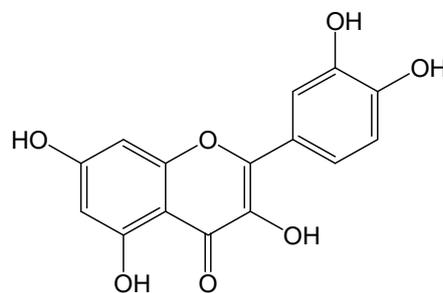
157



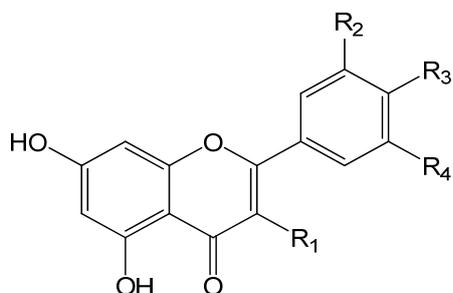
158



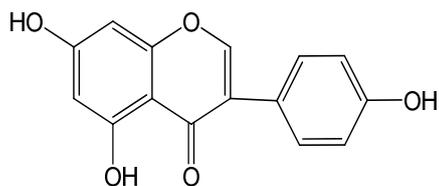
159



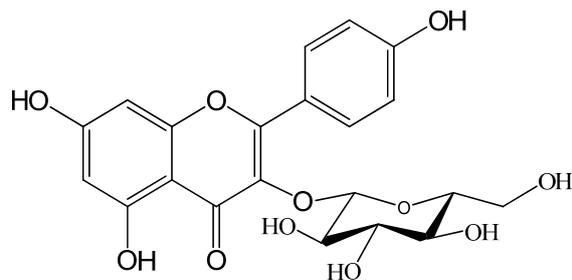
160



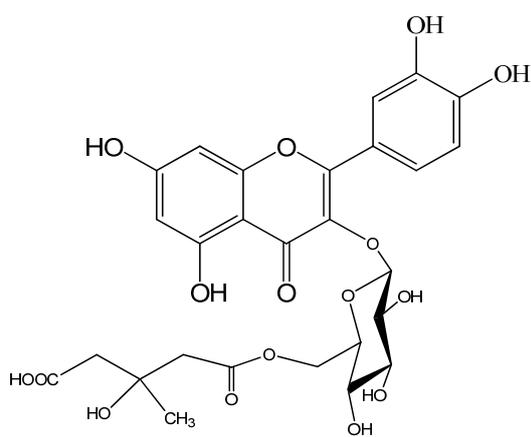
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
161	H	H	OH	H
162	3-O-Glu	H	OH	H
163	3-O-Glu	OH	OH	H
164	OH	OH	OH	OH
165	H	H	OH	H



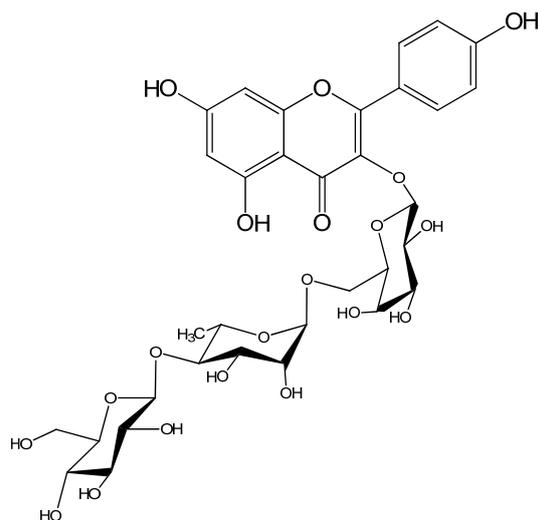
166



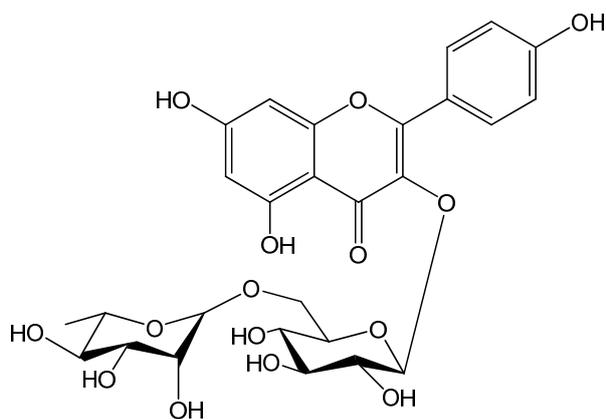
167



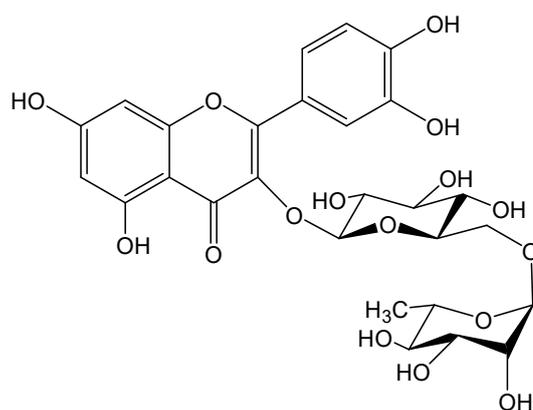
168



169



170



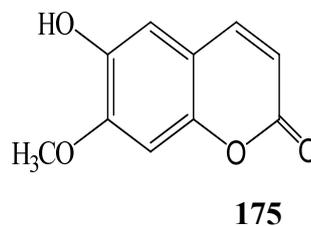
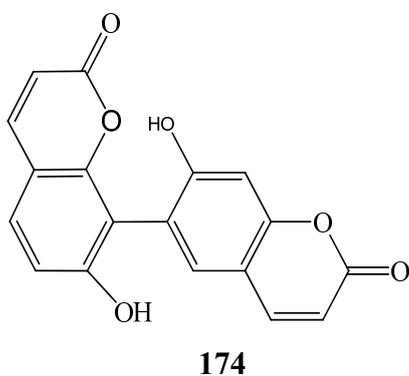
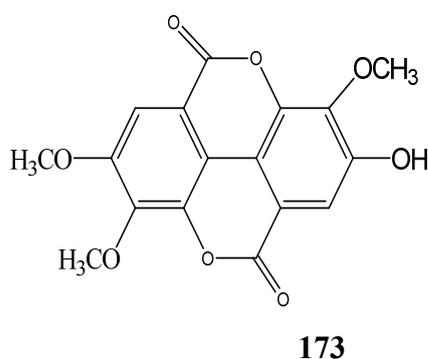
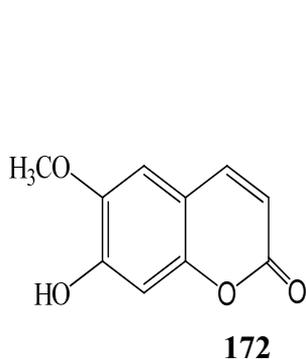
171

I.4.4. Coumarines

Les coumarines sont des composés phénoliques, dérivées de la coumarine ou 1,2-benzopyrone. Elles sont moins répandues dans le genre *Euphorbia* (Tableau I.5).

Tableau I.5: Quelques composés coumariniques isolés et identifiés dans les plantes du genre *Euphorbia*

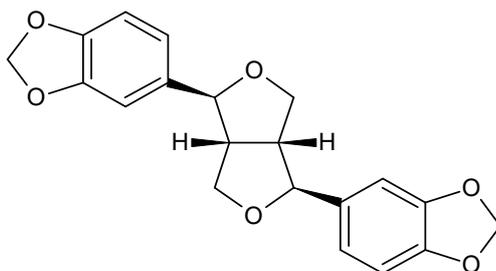
Espèces	Coumarines	Réf
<i>E. heteradena</i>	Scopolétine (172)	[55]
	Acide 3,4,3'-triméthoxy-ellagique (173)	
<i>E. altotibetic</i>	Scopolétine (172)	[46]
<i>E. quinquecostata</i>	7,7'-dihydroxy-6,8'-bicomarine (174)	[56]
	6-hydroxy-7-méthoxycoumarine (isoscopolétine) (175)	



I.4.5. Lignane

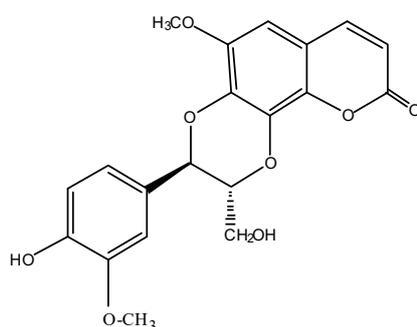
Les lignanes sont des composés phénoliques formés de deux unités dérivées du 1-phenyl propane. Il est à noter que ces composés se trouvent rarement dans le genre *Euphorbia*.

La sésamine (176) a été isolée de l'extrait acétone des fruits de la plante *Euphorbia sororia* [57].



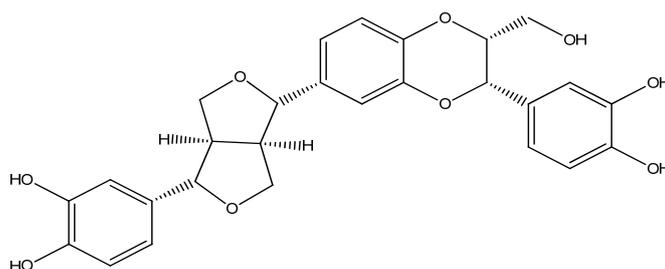
176

L'étude réalisée sur l'extrait méthanolique de l'espèce *Jatropha gossypifolia* (Euphorbiaceae) [58] a permis d'isoler la substance suivante : Cléomiscosine A (177).

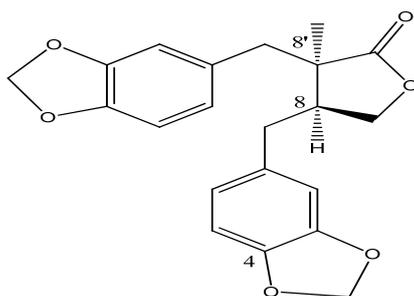


177

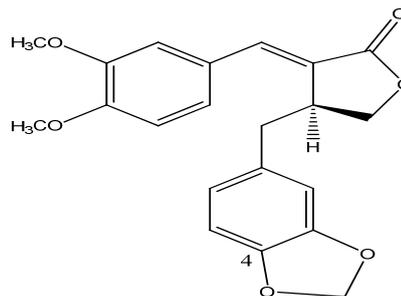
A partir de l'extrait acétate d'éthyle de la plante entière *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae), cinq lignanes (178-182) [59] ont été isolées et caractérisées par les différentes méthodes spectroscopiques.



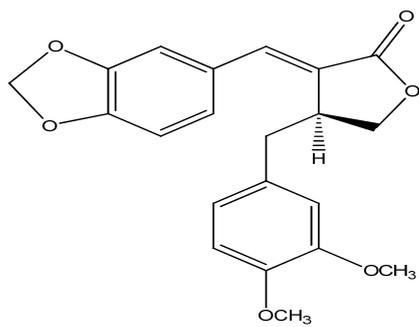
178



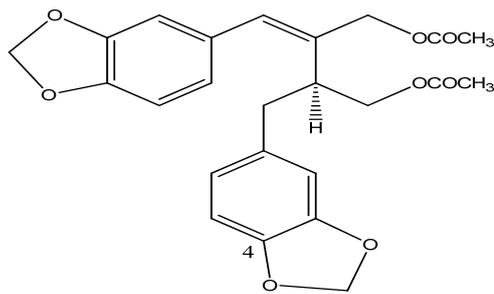
179



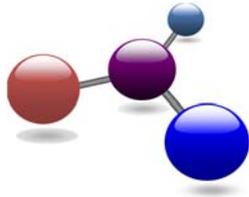
180



181

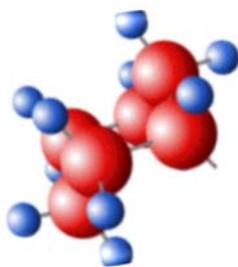
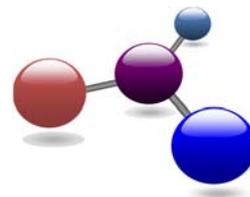


182



Chapitre II

Etude des composés terpénoïdiques et phénoliques



II.1. Généralités

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte. La molécule de base est l'isoprène de formule C_5H_8 [60] (Figure II.1).

Le terme terpénoïde désigne un ensemble de substances présentant le squelette des terpènes avec une ou plusieurs fonctions chimiques (alcool, aldéhyde, cétone, acide, lactone, etc.). Ils ont généralement des propriétés fongicides, insecticides et ils attirent les pollinisateurs [61].

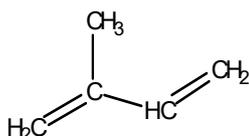


Figure II.1: Structure de l'unité isoprène

II.2. Classification et biosynthèse des terpénoïdes

Dans le règne végétal, les terpénoïdes sont classés dans la catégorie des métabolites secondaires. Leur classification est basée sur le nombre de répétitions de l'unité de base isoprène : hémiterpène (C5), monoterpènes (C10), sesquiterpènes (C15), diterpènes (C20), sesterpènes (C25), triterpènes (C30), tétraterpènes (C40) et polyterpènes (Figures II.2 et II.3).

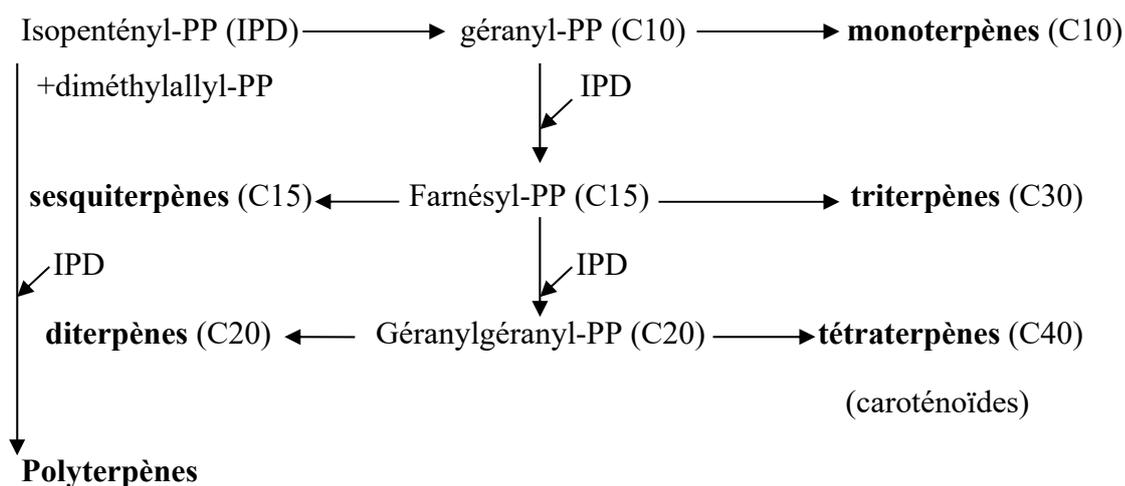


Figure II.2: Formation des terpénoïdes.

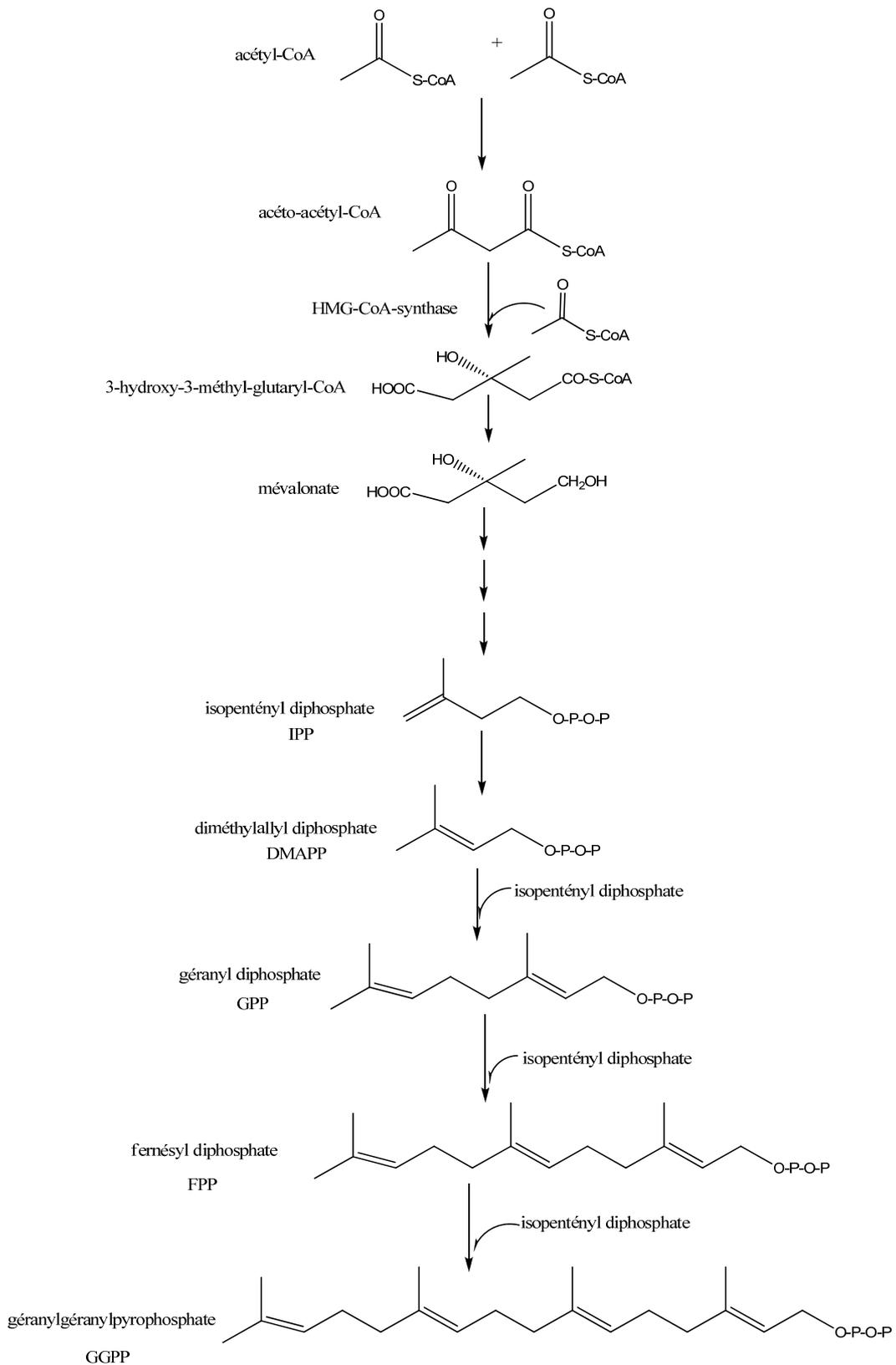


Figure II.3: Biosynthèse des différents précurseurs des terpénoïdes.

Nous nous sommes intéressés dans ce qui suit à la biosynthèse des diterpènes et triterpènes.

II.3. Diterpénoïdes

Les diterpènes sont des substances naturelles avec 20 atomes de carbone (C₂₀) élaborés à partir de 4 unités d'isoprène [62]; ils se forment à partir de leur précurseur, géranylgeranylpyrophosphate (GGPP). Il existe environ 2700 diterpénoïdes dans la nature dont la majorité est sous forme cyclique [63]. Ils sont très répandus dans certaines familles de végétaux.

II.3.1. Biosynthèse des diterpénoïdes

Il existe deux modes de cyclisation du GGPP précurseur des diterpénoïdes :

▪ Mode 1

Cyclisation induite par le départ du groupement diphosphate (Figure II.4) [61]. Ce type de cyclisation conduit à la formation de diterpènes polycycliques et macrocycliques.

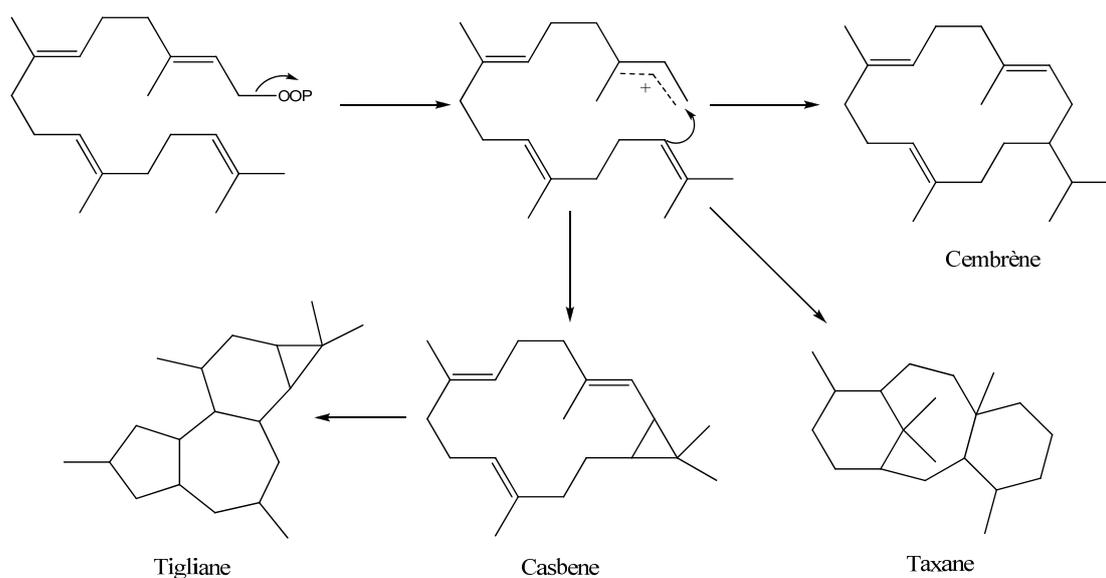


Figure II.4: Schéma de biogenèse des diterpènes polycycliques et macrocycliques.

▪ Mode 2

La cyclisation acido-catalysée du GGPP forme un décahydronaphtalène substitué. Ce type de cyclisation conduit à deux séries énantiomères, différant par les configurations opposées des carbones C₅, C₉ et C₁₀. La série est dite normale lorsque la fusion des deux cycles A et B est identique à celle des triterpènes et des stéroïdes et *Ent* (énantio) lorsque c'est l'antipode [61] (Figure II.5). L'orientation vers l'une ou l'autre série est déterminée par la conformation que

prend le précurseur linéaire (GGPP) sur la surface de l'enzyme catalysant la cyclisation. La séquence réactionnelle est la suivante : protonation de la double liaison C₁₄-C₁₅ du précurseur et addition 1,2-antiparallèle des liaisons C₆-C₇ et C₁₀-C₁₁ pour former, dans les deux cas, un composé intermédiaire appelé *trans* décaline (Figure II.5).

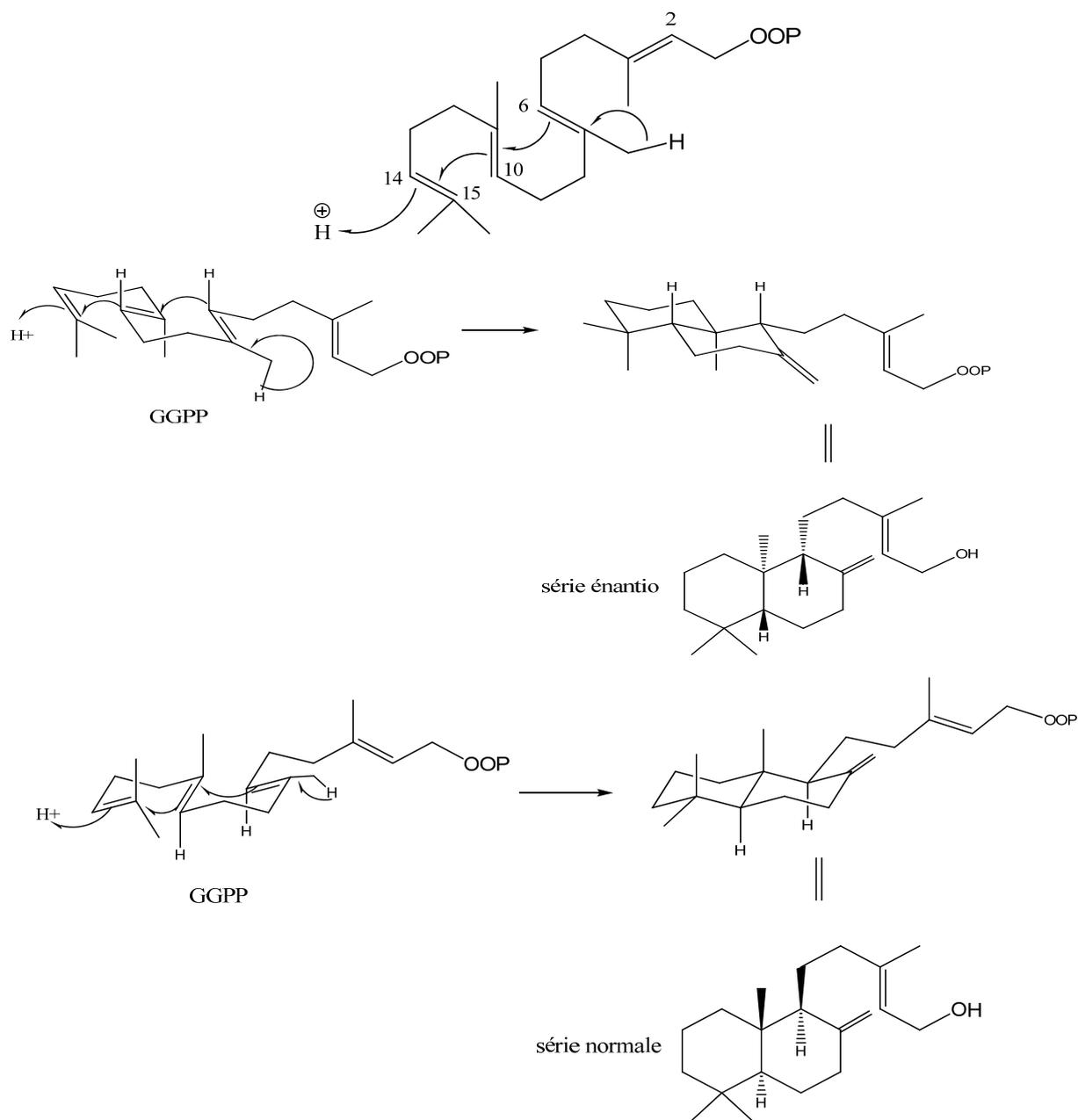


Figure II.5: Schéma de cyclisation du GPP conduisant à deux séries (*normale* et *ent*).

La chaîne de GGPP se cyclise partiellement en système décaline, et ensuite de nouveaux cycles peuvent se former avec souvent des modifications et réarrangements [60] des squelettes intermédiaires conduisant aux diterpènes tri- et tétracycliques (Figure II.6).

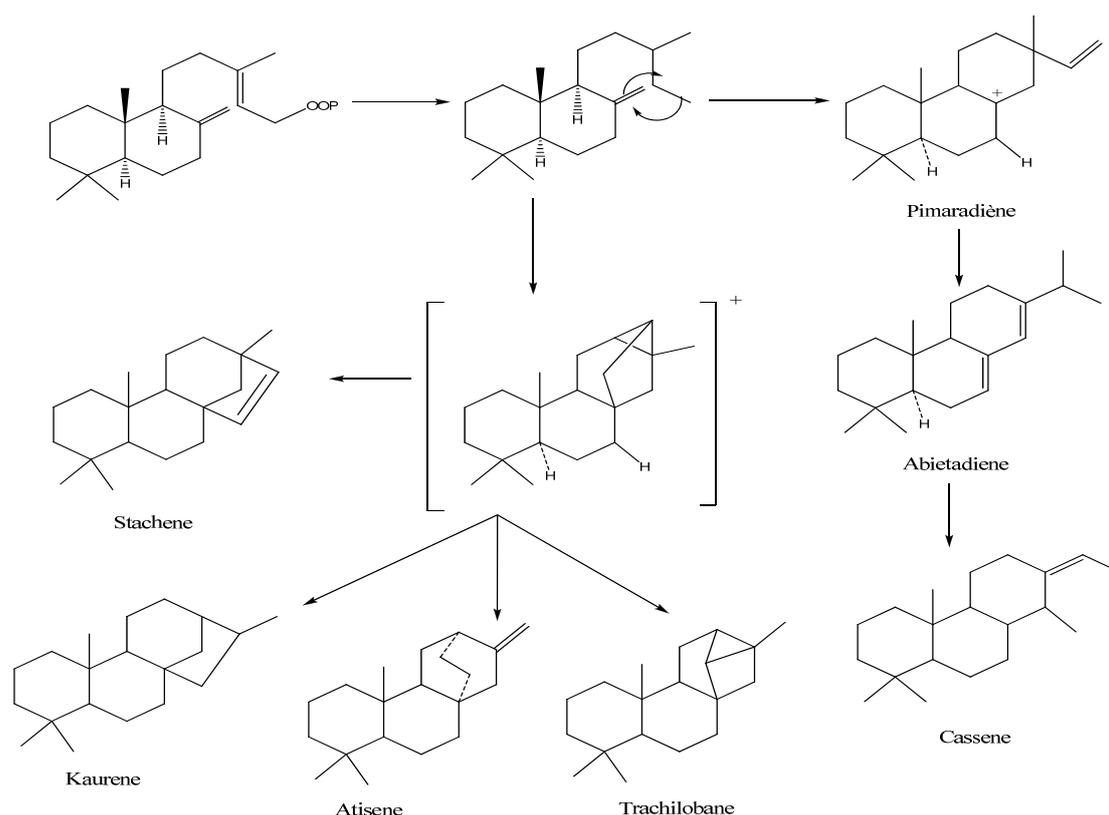


Figure II.6: Schéma de biogénèse des diterpènes tri-et tétracycliques.

II.3.2. Rôles et activités biologiques des diterpénoïdes

L'intérêt thérapeutique des diterpènes reste d'actualité surtout que ces composés sont pourvus de potentialités thérapeutiques intéressantes telles que les propriétés anti-inflammatoires [13], antivirales [32], anticancéreuses [33,34] et cytotoxiques [26,37]. Les composés les plus actifs sont les diterpènes esters dérivés du phorbol comme le TPA (12-*O*-tétradécanoylphorbol-13-acétate). Cette molécule se substitue au diacylglycérol endogène en activant la protéine kinase C, et aussi l'un des plus puissants inducteurs de tumeurs [61]. Les diterpènes jouent aussi un rôle dans la protection des constituants des revêtements foliaires contre les prédateurs ce qui limite ainsi la perte en eau.

II.4. Triterpénoïdes

Les triterpènes en C30 sont produits à partir de deux molécules de farnésylpyrophosphate (FPP) par une fusion de tête-à-tête. La majorité de triterpènes dans la nature est sous forme tétra ou pentacycliques, la forme acyclique est très rare. Parmi les triterpènes acycliques, on peut citer le squalène (Figure II.7). Ce dernier est le précurseur des autres triterpénoïdes [60-62], et aussi des stéroïdes végétaux. La plupart des triterpènes sont des alcools

sous forme libre ou glycoside (saponines) ou ester. Les triterpénoïdes libres sont des composants principaux des résines ou du latex des végétaux.

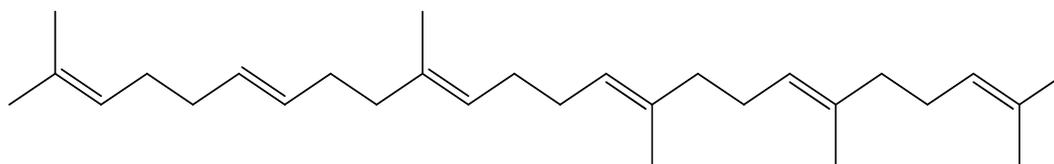
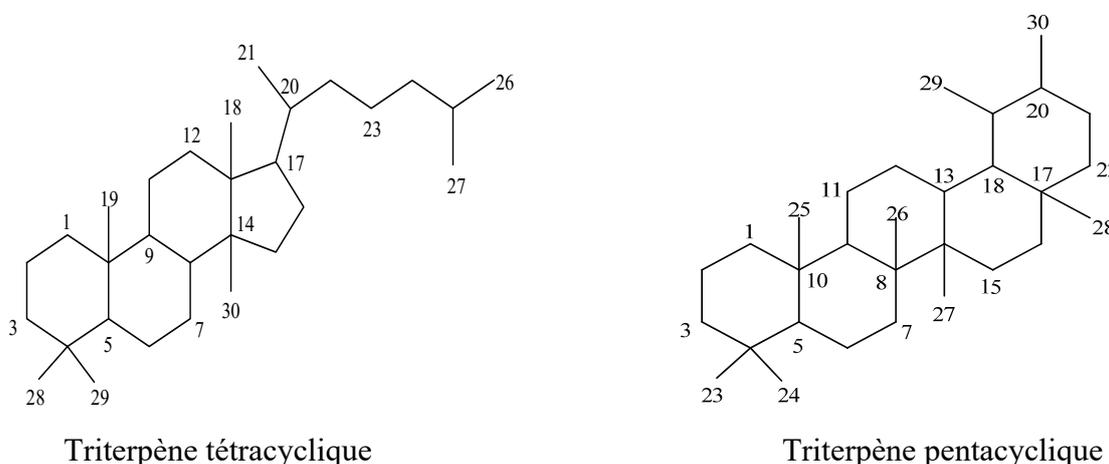


Figure II.7: Structure moléculaire de squalène

La numérotation des différents squelettes tétra-et pentacycliques qui caractérisent ce groupe de substances naturelles [60-62], est représentée ci-dessous :



Triterpène tétracyclique

Triterpène pentacyclique

II.4.1. Rôles et activités biologiques des triterpénoïdes

Les propriétés thérapeutiques de certains triterpènes découlent de la grande diversité structurale des métabolites secondaires triterpéniques conduisant à une grande diversité en termes d'activités biologiques [64] telles que: antitumorale (acide bétulinique), anti-inflammatoire (acide boswellique, bétuline, lupéol), cytotoxique (acide oléanolique), anticancéreuse (acide ursolique), antiallergique (α et β amyrynes). Les triterpénoïdes sont à la base de la synthèse de plusieurs contraceptifs et des médicaments anti-inflammatoires [61]. Ils sont également indispensables dans l'industrie pharmaceutique puisqu'ils sont utilisés comme matière première.

II.4.2. Biosynthèse des triterpènes

La biosynthèse des triterpènes est donnée dans la figure II.8 suivante :

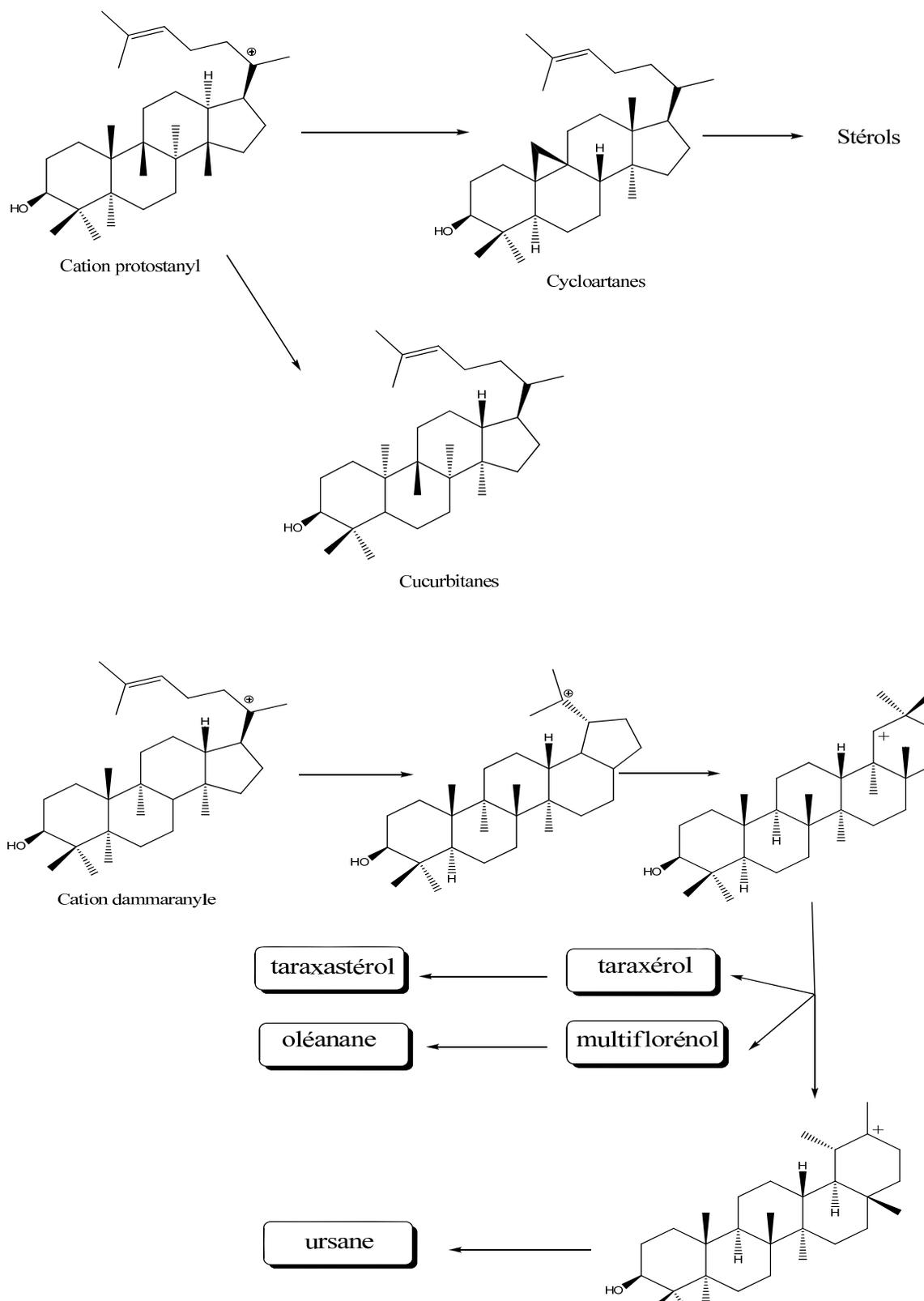


Figure II.8: Biosynthèse des triterpènes.

II.5. Composés phénoliques

Les composés phénoliques correspondent à une grande variété de substances naturelles possédant un cycle aromatique portant au moins un groupement hydroxyle. Ils englobent particulièrement les coumarines, lignanes, flavonoïdes,...etc. Parmi les milliers décrits dans la littérature, les plus nombreux sont les flavonoïdes. Leurs activités biologiques très diversifiées jouent un rôle très important dans les relations plantes-insectes, tantôt répulsifs voire toxiques pour ces animaux [65].

On peut distinguer différents type de composés phénoliques :

- ❖ La première est représentée par les acides phénoliques, qui comprennent les dérivés d'acides benzoïques (acide gallique).
- ❖ La seconde classe est constituée d'un noyau phénolique porteur d'une chaîne latérale insaturée en C3 (acide caféique).
- ❖ La dernière classe est basée sur un squelette en C6-C3-C6 (catéchine), elle comprend plusieurs groupes de composés qui se distinguent par le degré d'oxydation de l'hétérocycle central en C3.

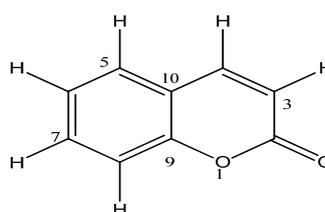
II.5.1. Coumarines

Ce sont des hétérocycles oxygénés ayant comme structure de base le benzo-2-pyrone. Ce composé dériverait de la cyclisation de l'acide *cis* cinnamique oxygéné en C-2 [66]. Isolées la première fois en 1820 [61], elles sont largement distribuées dans le règne végétal.

II.5.1.1. Classification

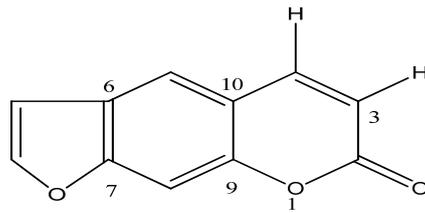
La coumarine est le point de départ de nombreux composés qui se forment par des substitutions sur les cycles aromatiques. On peut classer les coumarines en cinq catégories [61]:

- Coumarines simples



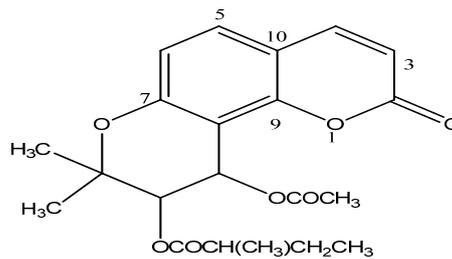
Coumarine

- Furanocoumarines



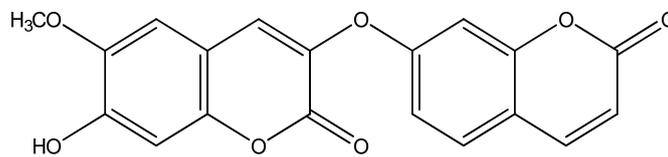
Psoralène

- Pyranocoumarines



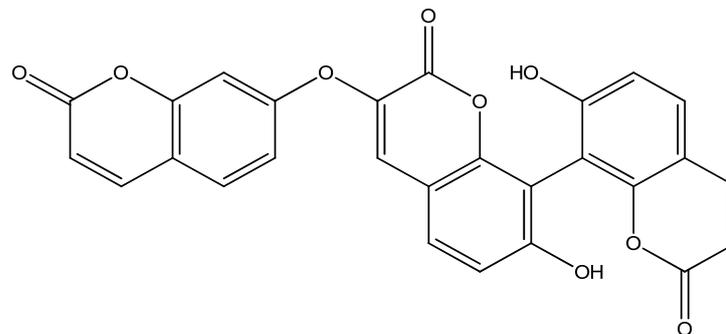
Visnadine

- Dicoumarines (coumarines dimériques)



Daphnorétine

- Tricoumarines (coumarines trimériques)



Triumbéllatine

II.5.1.2. Biosynthèse

La grande majorité des composés phénoliques dérivent de l'acide cinnamique formé par la voie shikimate de biosynthèse de composés aromatiques. Cet acide est produit à partir du phosphoenolpyruvate et l'érythrose 4-phosphate en passant par divers intermédiaires réactionnels comme shikimate, chorissmate et phénylalanine (Figure II.9) [67].

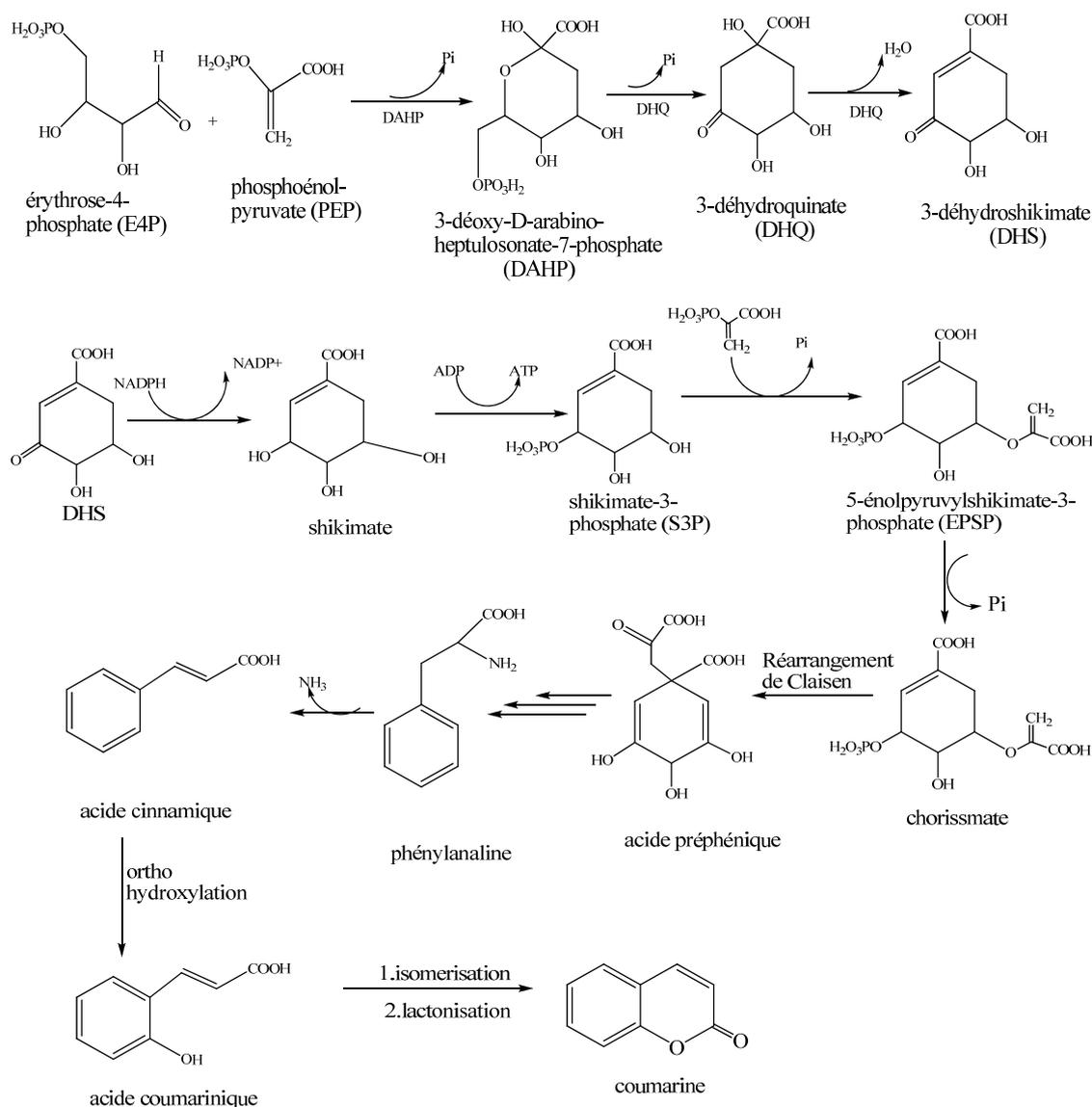


Figure II.9: Formation de la coumarine selon le chemin phénylalanine

II.5.1.3. Propriétés physico-chimiques

Les coumarines sont des solides cristallisés blancs ou jaunâtres de saveur généralement amère, certaines sont sublimes et entraînés à la vapeur d'eau. Les hétérosides et les génines

sont assez solubles dans l'eau et l'alcool méthylique. Les coumarines hydroxylées possèdent une intense fluorescence en lumière ultraviolette à $\lambda = 366 \text{ nm}$ [68].

Les propriétés chimiques sont principalement dues à la fonction lactones par son ouverture et sa solubilisation en milieu alcalin puis, par fermeture en milieu acide.

II.5.1.4. Intérêt pharmacologique des coumarines

La coumarine est connue pour ses propriétés anti-œdémateuse, antifongique, anti tumorale, antivirale, anti-inflammatoire, diurétique et analgésique [69]. Elle a fait l'objet de plusieurs études cliniques chez les patients atteints de cancers avancés, elle développerait une activité cytotoxique [61].

Les psoralènes; furanocoumarines typiques, ont été exploitées par les Egyptiens dans leur médecine traditionnelle pour le traitement de la dépigmentation de la peau [61].

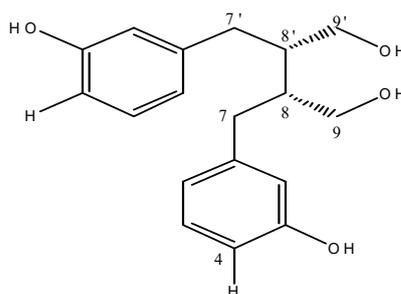
II.5.2. Lignanes

Elles sont considérées comme des composés naturels formées à partir des dérivés de l'acide cinnamique. Ces dérivés servent de précurseurs pour les composés de type phénylpropanoïdes [70] tels que lignanes ou les lignines. Les lignanes répondent à une représentation structurale de type $(C_6-C_3)_2$; l'unité (C_6-C_3) est considérée comme un propylbenzène.

II.5.2.1. Classification

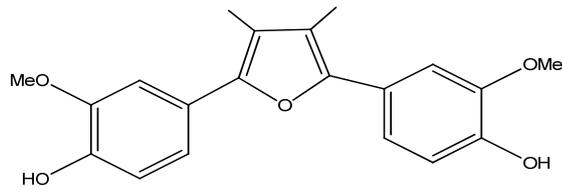
Six groupes structuraux fondamentaux de lignanes ont été caractérisés chez différentes familles du règne végétal [61].

- Lignanes dibenzylbutanes

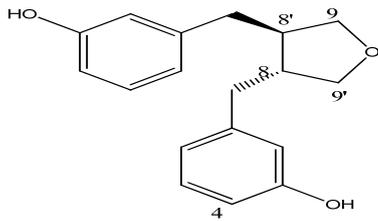


Entérodiol

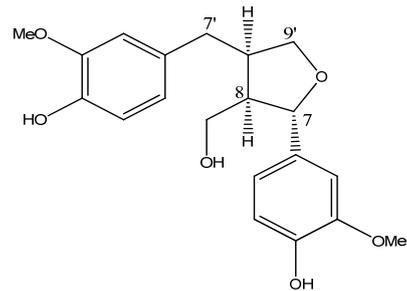
- Lignanes monofuraniques



Acide guaiaconique

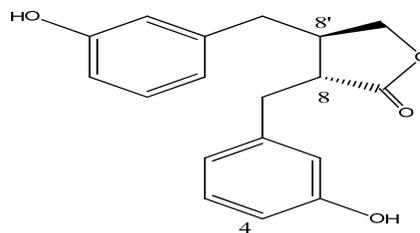


Entérofurane



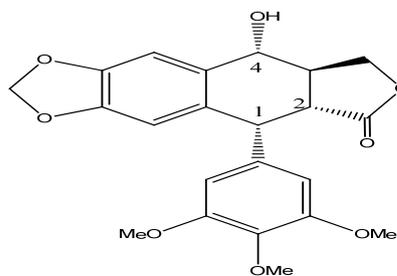
Laricirésinol

- Lignanes butyrolactones



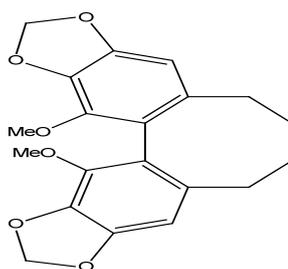
Entérolactone

- Lignanes aryltétralines



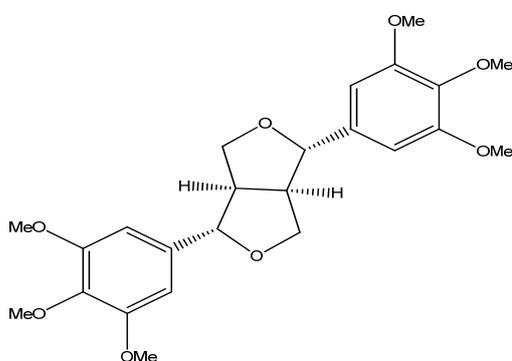
Podophyllotoxine

- Lignanes dibenzocycloctanes

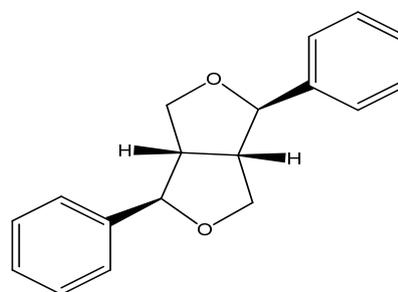


Wuweizicu C

- Lignanes furanofuraniques



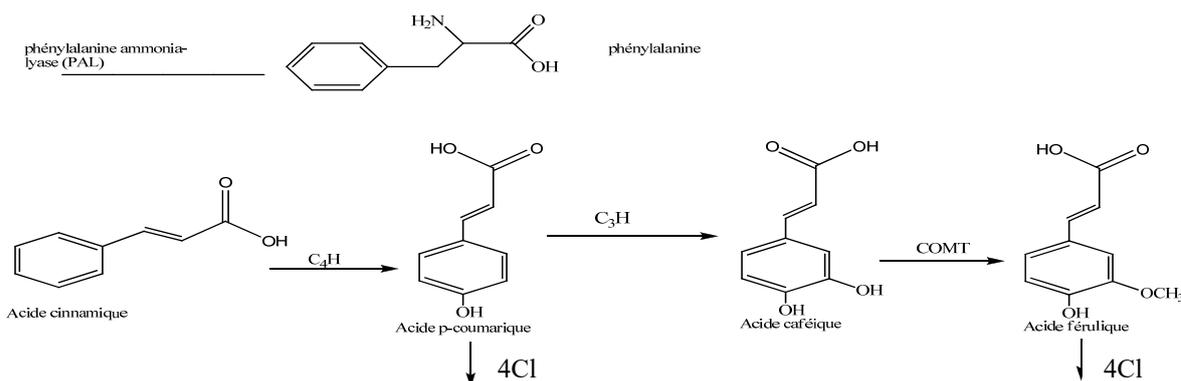
Diméthyle éther liriorsinol B



Antipode

II.5.2.2. Biosynthèse des lignanes

Les lignanes constituent une classe importante de produits naturels dans le règne végétal. Elles se trouvent dans les différentes parties des plantes: les racines, les fleurs et les graines. Biosynthétiquement, elles sont élaborées comme tous les dérivées des phénylpropanoïdes par la voie du schikimate (voir la biosynthèse des coumarines) via l'alcool coniférylique [70] représenté ci-dessous (Figure II.10).



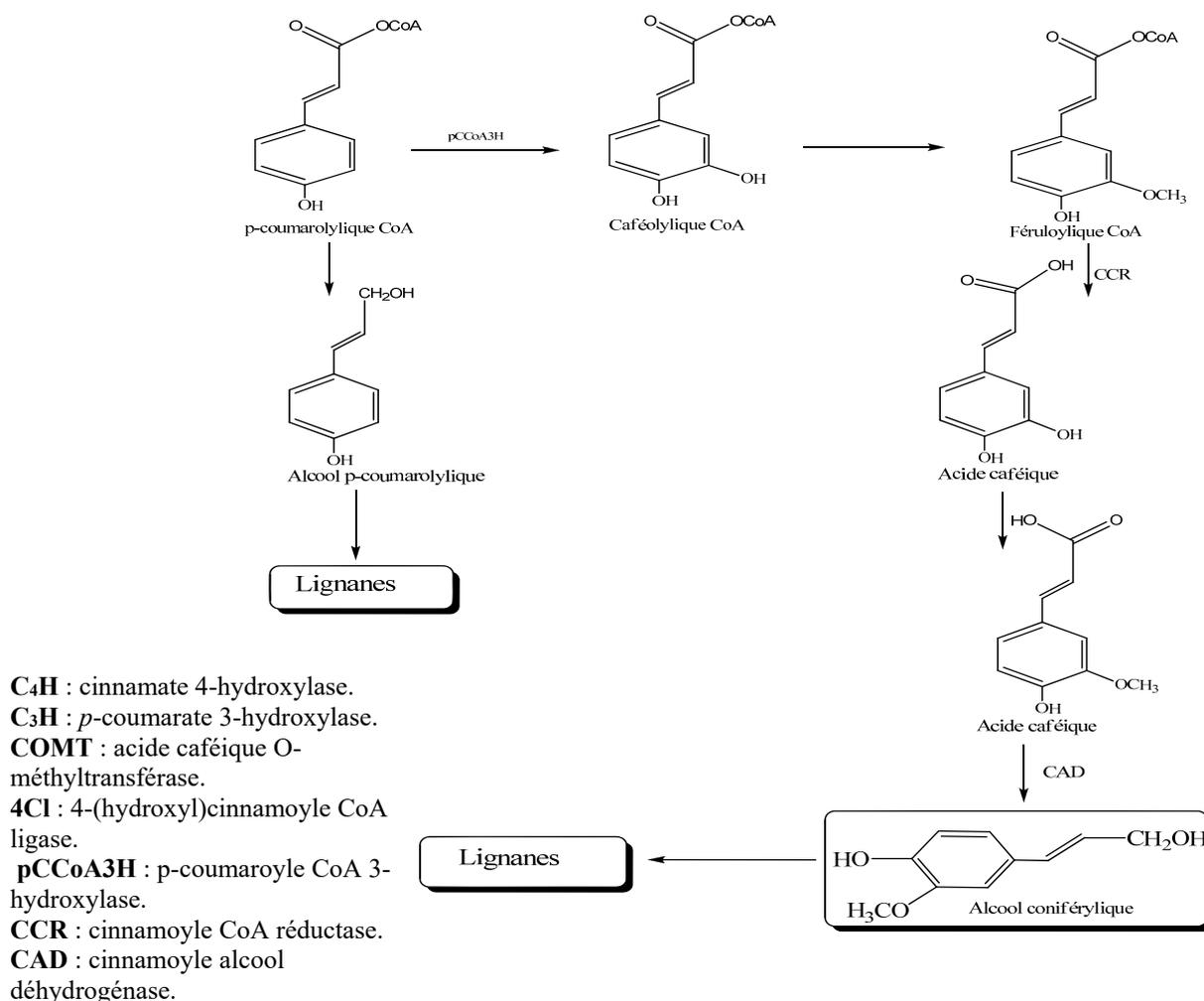


Figure II.10: Biosynthèse des lignanes

II.5.2.3. Intérêt pharmacologique des lignanes

Les lignanes possèdent une large gamme d'activités biologiques incluant les propriétés, anti-cancéreuse, antitumorale et anti-oestrogénique. Ce sont également des inhibiteurs des enzymes impliquées dans le métabolisme des hormones sexuelles. La recherche scientifique indique que les lignanes sont transformées par les bactéries intestinales en composés qui protègent l'homme des maladies hormonales [70].

II.5.3. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires issus de plusieurs familles de plantes et représentent un des plus grands groupes de produits naturels phénoliques. Les flavonoïdes sont des pigments jaunes, ils sont présents dans tous les organes de plantes [71]: feuilles, fleurs, graines, racines,.....etc.

Flavonoïde étant le terme générique pour des composés basés sur un squelette à 15 atomes de carbone (Figure II.11), consiste en deux cycles phényles, les cycles A et B, connectés par un pont à trois carbones (structure en C6-C3-C6).

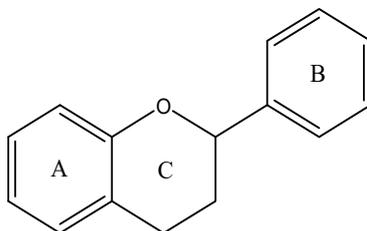
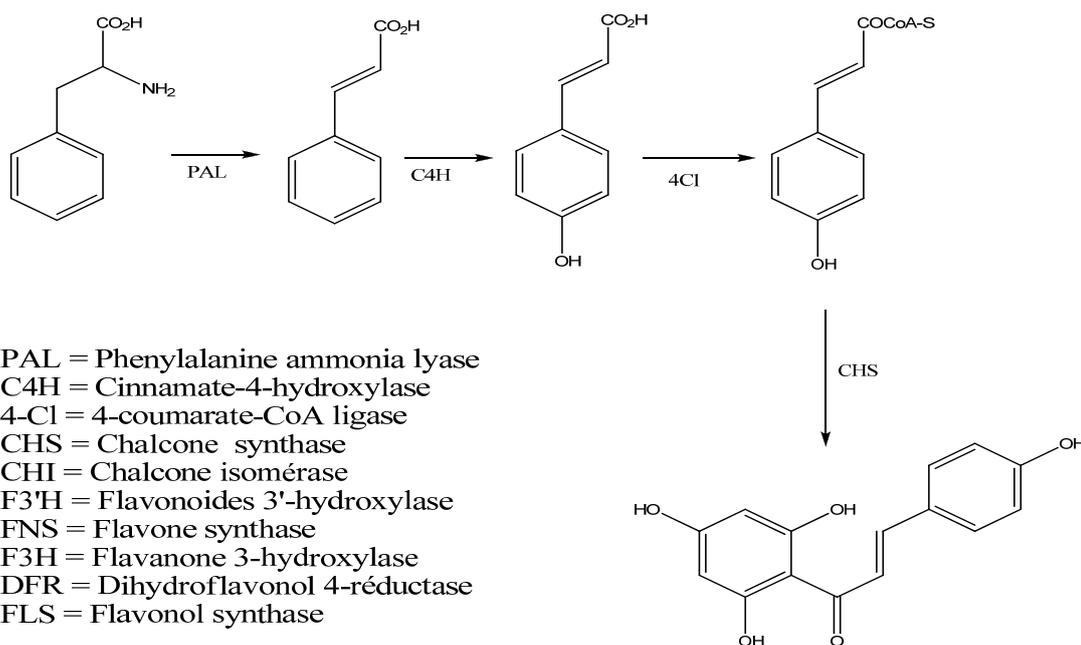


Figure II.11: Squelette de base des flavonoïdes.

Ces composés se divisent en différents types : flavones, flavonols, flavonones, flavanes, aurones et chalcones [70]. Ils se présentent souvent sous forme d'hétérosides, solubles dans la vacuole cellulaire ou solubles dans les solvants polaires [72].

II.5.3.1. Biosynthèse des flavonoïdes

Robinson [73] remarqua que les différents systèmes d'hydroxylation des deux cycles aromatiques des flavonoïdes témoignent de leurs origines biogénétiques divergentes. Cependant, la principale voie de biosynthèse de cette classe de composés a été correctement identifiée par Birch (Figure II.12) [74].



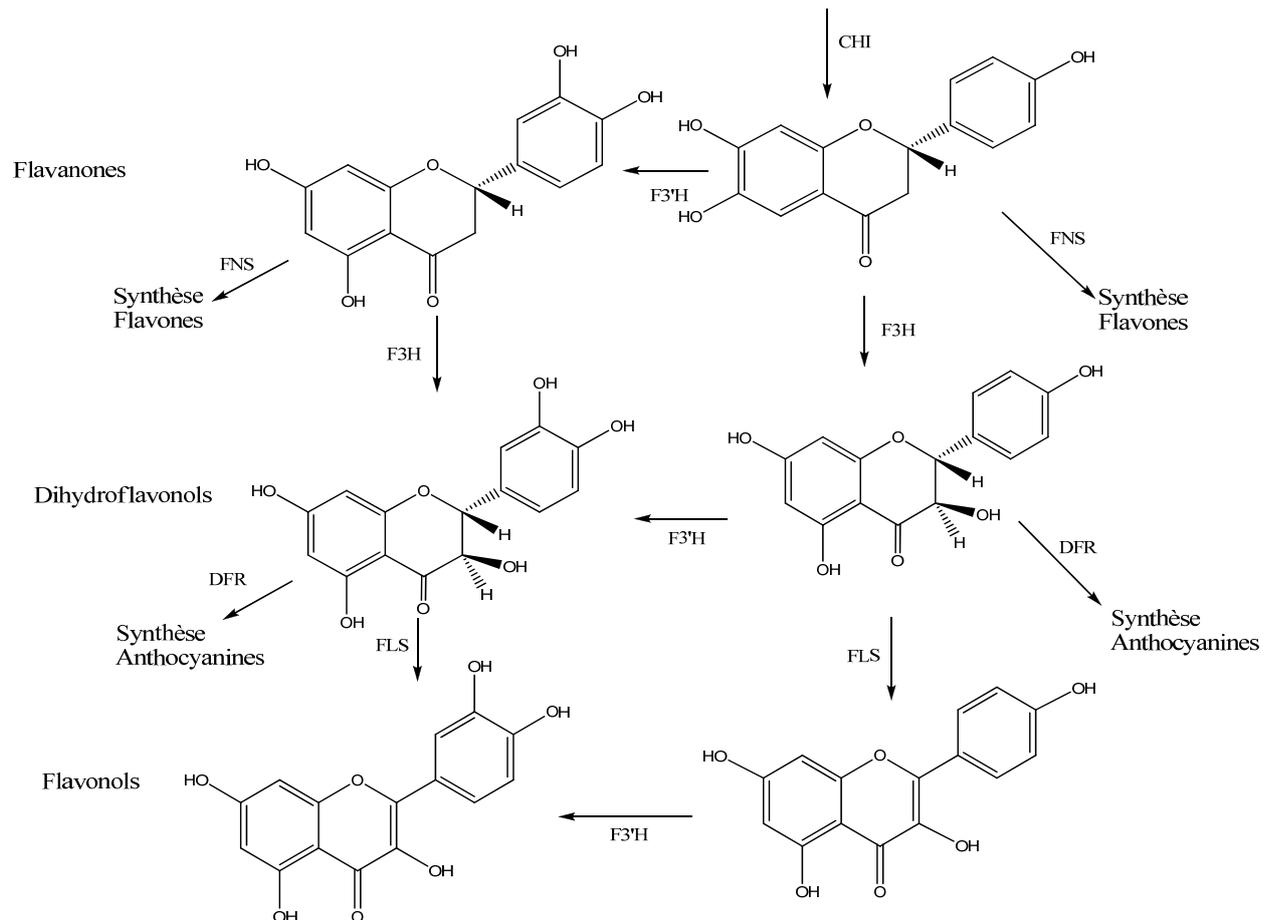


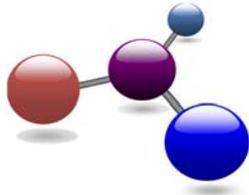
Figure II.12: Biosynthèse des flavonoïdes [75,76]

II.5.3.2. Rôle des flavonoïdes

Les travaux de la littérature indiquent que les flavonoïdes seraient impliqués dans un certain nombre de fonctions à savoir :

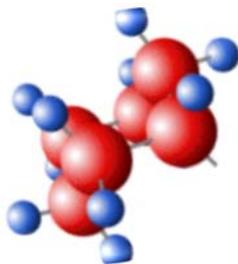
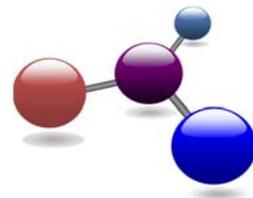
- Ils assurent la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines pour attirer les pollinisateurs et disperser les graines [70].
- Ils représentent un système de défense contre les organismes micro pathogènes [72].
- Ils agissent dans les systèmes de défense des cellules végétales en réponse à certains stress tels que les radiations ultraviolettes [77].

Les flavonoïdes ont également des propriétés biologiques fongicides, anticancérigènes, insecticides et protègent les plantes contre les champignons et les insectes [78]. Ils possèdent plusieurs activités biologiques à savoir : anti-oxydante [79], antibactérienne, anti-inflammatoire, antitumorale, antivirale, anti-allergique et anticancéreuse [80].



Chapitre III

Etude phytochimique de l'espèce *Euphorbia bupleuroides*



III.1. Description botanique

Euphorbia bupleuroides Desf. est une espèce endémique à l'Algérie [5]. C'est une plante puissante des rocailles des montagnes de la région des Aurès (Figure III.1).

Cette espèce présente les caractéristiques botaniques suivantes:

- ❖ Les feuilles sont lancéolées ou lancéolées-linéaires.
- ❖ Les bractées sont 2 à 3 fois plus longues que larges, ovales ou triangulaires.
- ❖ Les graines sont ornées de bandelettes longitudinales peu saillantes.

Cette espèce est désignée sous le nom vernaculaire Hanghouth (Tamazight).



Figure III.1: Espèce *Euphorbia bupleuroides* Desf.

III.2. Utilisation en médecine traditionnelle

Euphorbia bupleuroides est une plante médicinale, elle est utilisée par la population locale pour extirper les épines et les verrues. La décoction des racines de cette plante est employée comme anti-inflammatoire [6].

III.3. Classification botanique

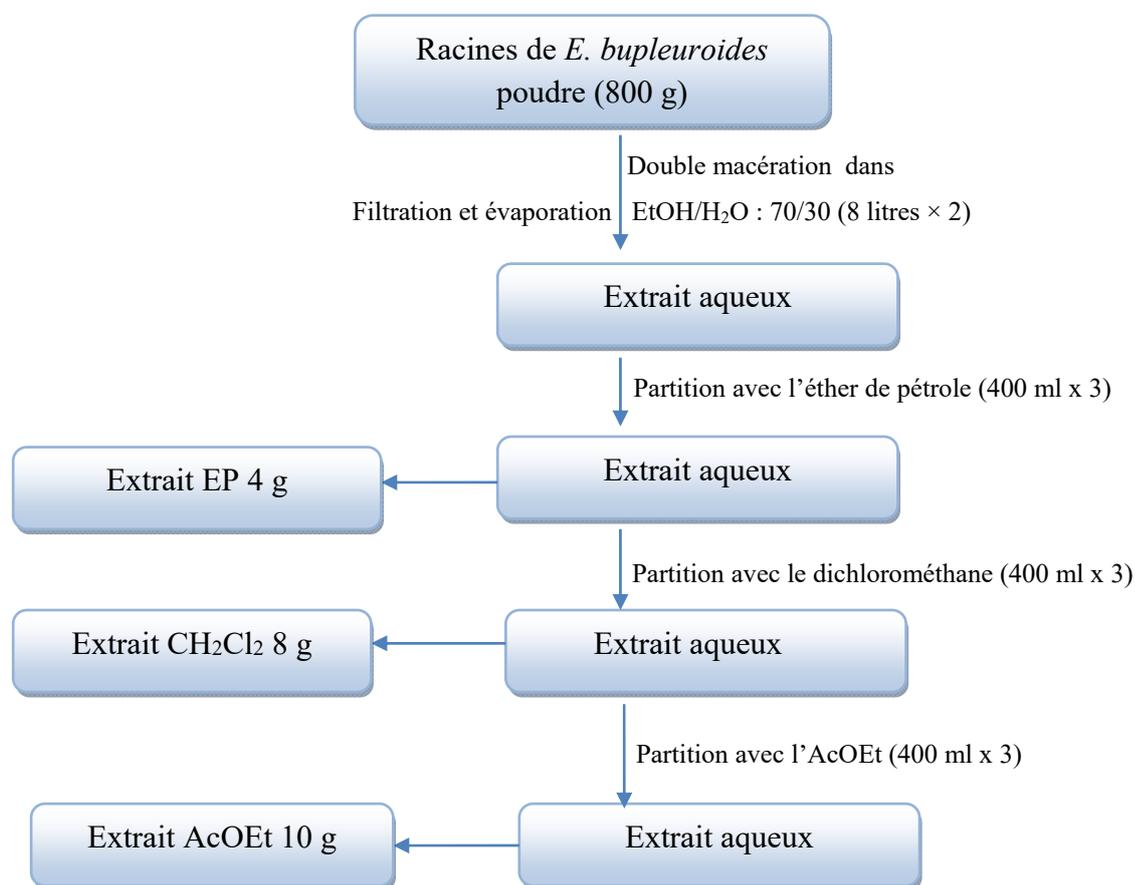
L'espèce *Euphorbia bupleuroides* Desf. est classée comme suit:

Famille :	Euphorbiaceae
Sous famille :	Euphorbiodeae
Tribu :	Euphorbieae
Sous tribu :	Euphorbiinae
Genre :	<i>Euphorbia</i> L.
Espèce :	<i>Euphorbia bupleuroides</i> Desf.

III.4. Extraction et fractionnement

Les racines de l'espèce *Euphorbia bupleuroides* ont été récoltées en Mai 2009 dans la localité de Chenaoura, Wilaya de Batna.

Les racines découpées, séchées et broyées, ont donné 800 g de poudre fine. Cette dernière a été macérée dans un mélange éthanol-eau (70%-30%) pendant trois jours (72 h). Après filtration et concentration de l'extrait, une solution aqueuse-alcoolique a été obtenue. Cette solution est soumise à une extraction liquide-liquide par les solvants suivants : éther de pétrole, dichlorométhane, acétate d'éthyle et enfin par *n*-butanol. Les quatre phases organiques récupérées sont évaporées et concentrées à sec pour conduire aux extraits suivants: éther de pétrole (4 g), dichlorométhane (8 g), acétate d'éthyle (10 g) et *n*-butanol (28 g). Le protocole d'extraction des racines de l'espèce *E. bupleuroides* est présenté dans la figure III.2 suivante:



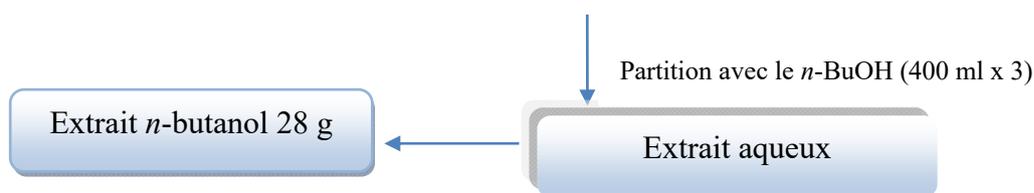


Figure III.2: Schéma général d'extraction des racines de l'espèce *Euphorbia bupleuroides*

III.5. Séparation et purification

Notre travail phytochimique a porté sur l'investigation de deux extraits préparés précédemment: dichlorométhane et AcOEt en raison de leur profil CCM révélant un nombre important de taches sur CCM visibles et invisibles à la lumière UV (254 et 366 nm). Ces taches se colorent en marron, mauve, rose, bleu et jaune,...etc après pulvérisation de l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

III.5.1. Extrait dichlorométhane

7 g de l'extrait CH_2Cl_2 ont subi une VLC (chromatographie liquide sous vide) sur gel de silice en phase normale. L'élution a été réalisée par le mélange de solvants suivants : hexane/AcOEt puis AcOEt/MeOH. Les fractions collectées de 100 ml ont été examinées par CCM, éluées au moyen d'un mélange (EP/AcOEt : 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50). La révélation des CCM obtenues a été faite par un mélange acide-sulfurique-acide acétique-eau : 25/25/50 (v/v/v) et chauffage à 100 °C, permettant de constituer 17 fractions majoritaires. La purification de ce nombre important de fractions a été réalisée grâce à l'utilisation des différentes méthodes chromatographiques sur colonne de gel de silice normale (CC), sur plaque préparative (CEE), sur couche mince en phase inverse (RP-18) et sur Sephadex LH-20. Ce qui a permis d'obtenir 17 composés à l'état pur (2 diterpénoïdes, 11 triterpénoïdes, 2 coumarines et 2 lignanes) (Figure III.3).

III.5.2. Extrait acétate d'éthyle

L'extrait AcOEt (8 g) est soumis aussi à une chromatographie liquide sous vide en phase normale (VLC) avec les gradients d'élution hexane/AcOEt puis AcOEt/MeOH. Cette étape s'est soldée principalement par l'obtention de 12 fractions. Trois composés naturels dont un stéroïde glycosylé et deux de type flavane ont été purifiés par les différentes méthodes chromatographiques sur colonne de gel de silice normale (CC), sur plaque préparative (CEE), et sur Sephadex LH-20 (Figure III.3).

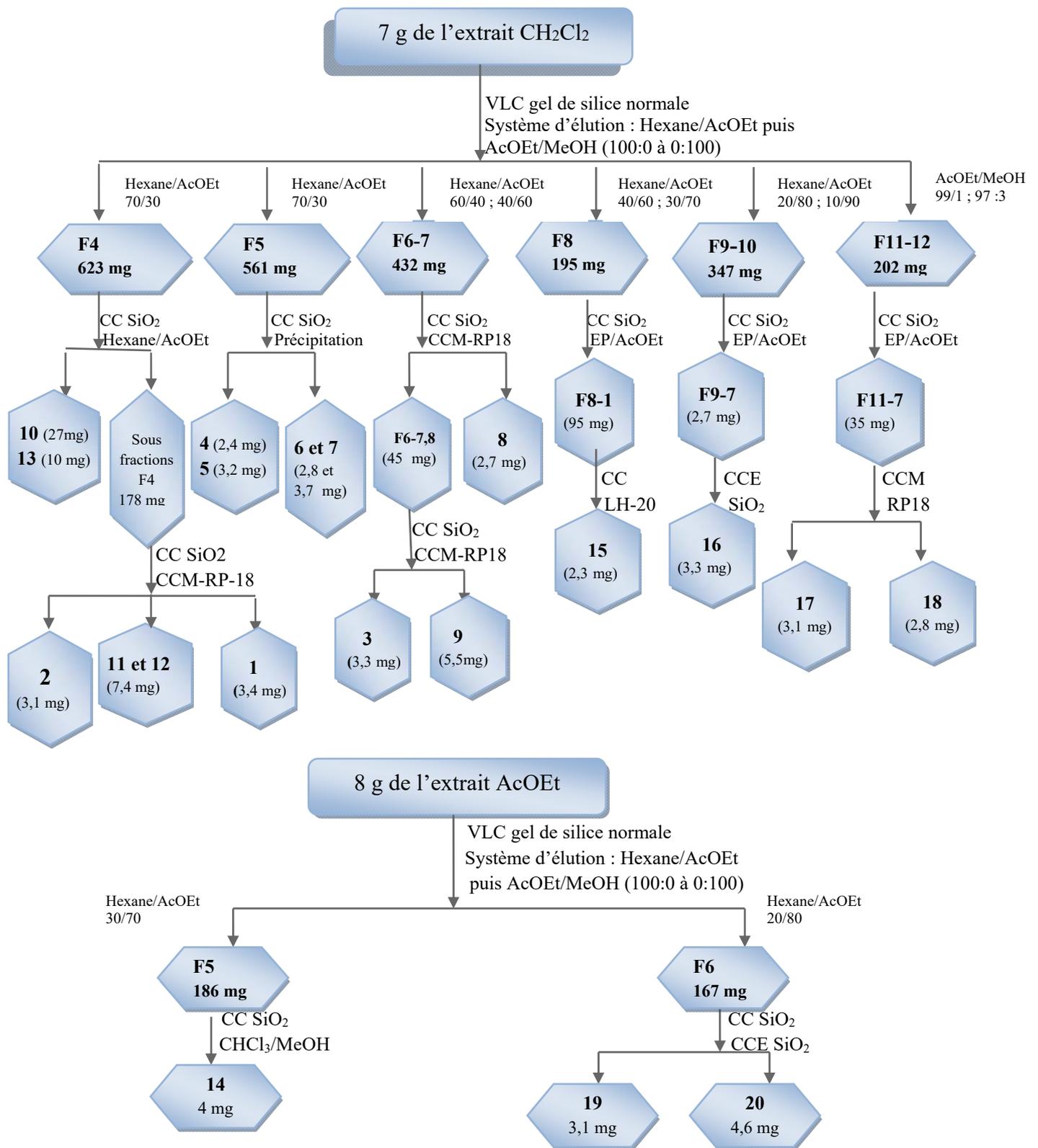
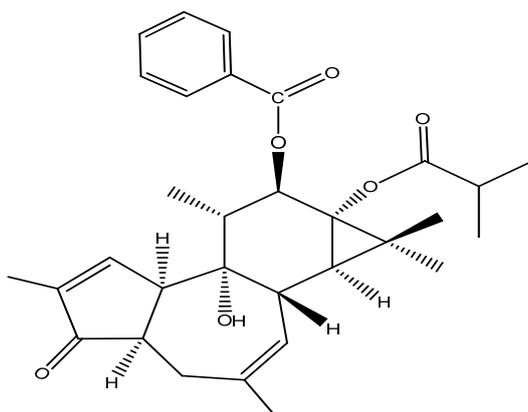


Figure III.3: Schéma de purification des extraits CH₂Cl₂ et AcOEt des racines de l'espèce *E. bupleuroides*

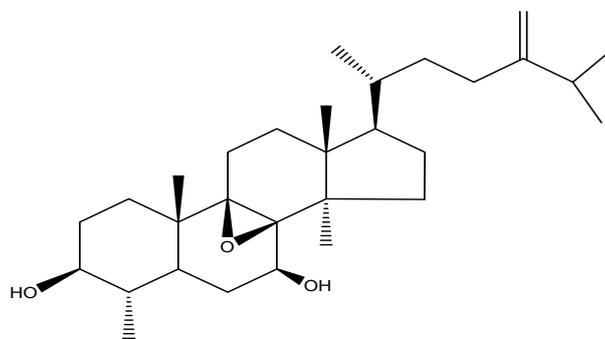
III.6. Caractérisation des produits obtenus

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés 1-20 a été réalisée grâce à la combinaison des différentes méthodes spectroscopiques RMN 1D (^1H , ^{13}C DEPT et ^{13}C *J*-modulé) et 2D (COSY, HSQC, HMBC et NOESY), la spectrométrie de masse ESI-MS et EI-MS, la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$ et la comparaison avec les données de la littérature.

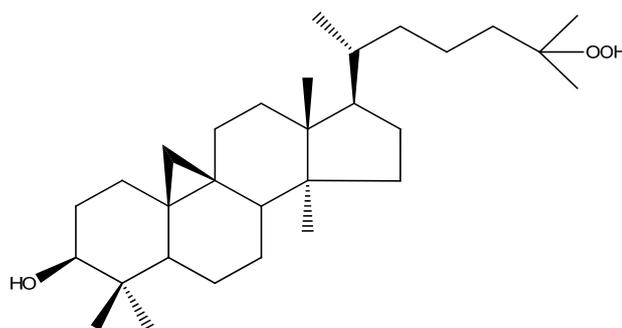
III.6.1. Produits nouveaux



4,20-dideoxy(4 α)phorbol-12-benzoate-13-isobutyrate (**1**)

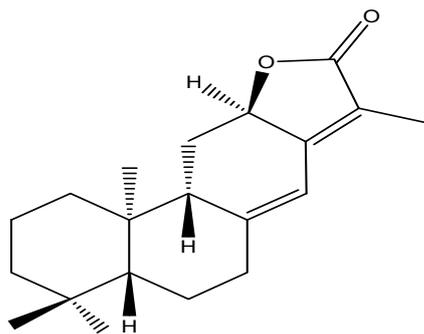


3 β ,7 β -dihydroxy-4 α ,14 α -diméthyl-8 β ,9 β -époxy-5 α -ergosta-24(28)-ène (**3**)

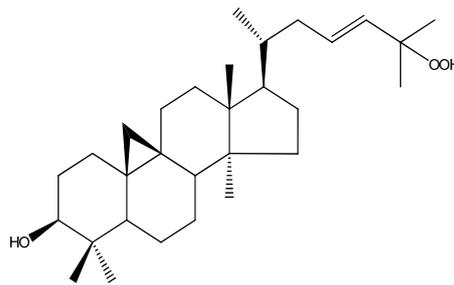


25-hydroperoxycycloart-3 β -ol (**4**)

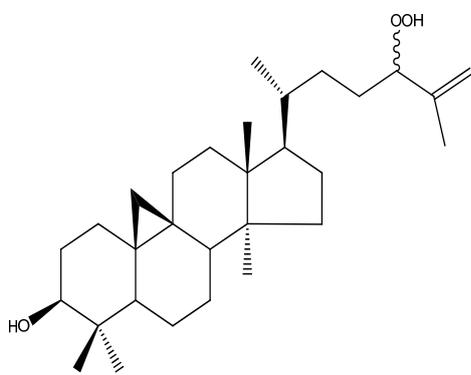
III.6.2. Produits connus



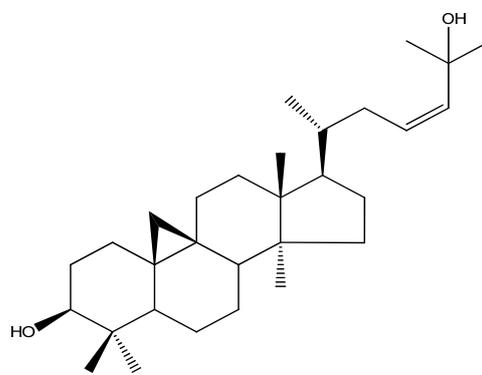
jolkinolide E (2)



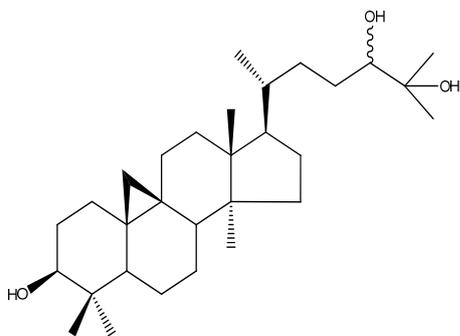
25-hydroperoxycycloart-23E-en-3β-ol (5)



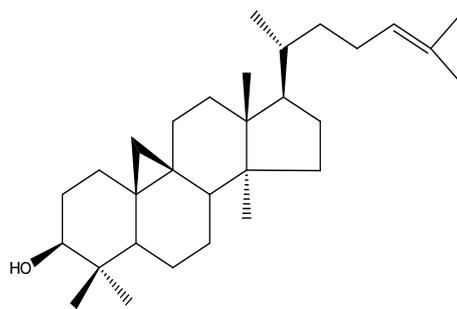
3β-hydroxycycloart-25-en-24-hydroperoxyde (6)



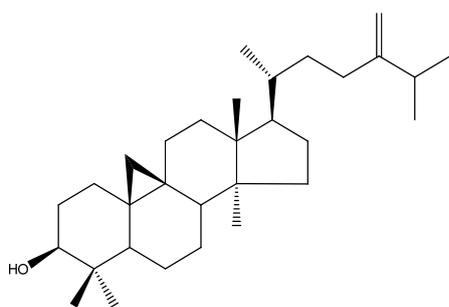
cycloart-23Z-ène-3β,25-diol (7)



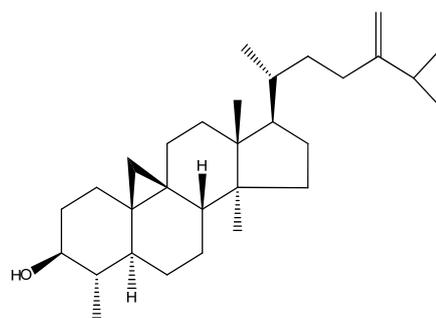
cycloart-3β,24,25-triol (8)



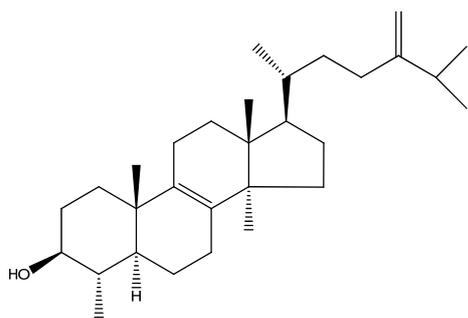
cycloarténol (9)



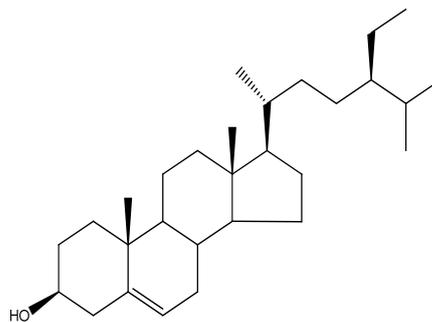
24-méthylèncycloartanol (10)



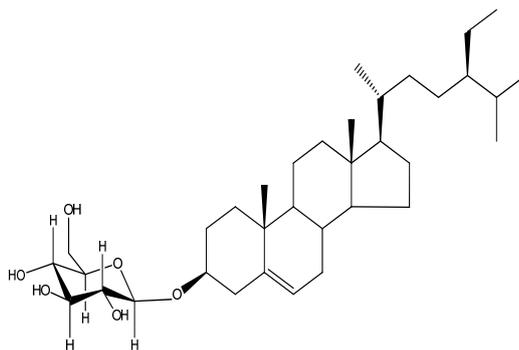
cycloeucalénol (11)



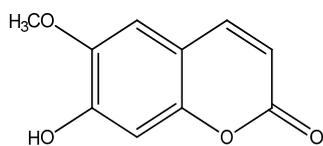
obtusifoliol (12)



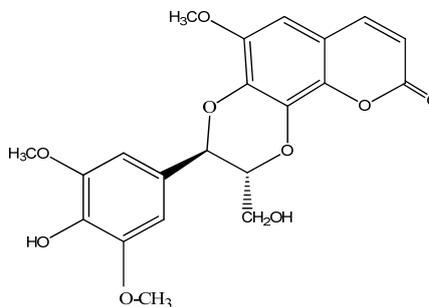
β -sitostérol (13)



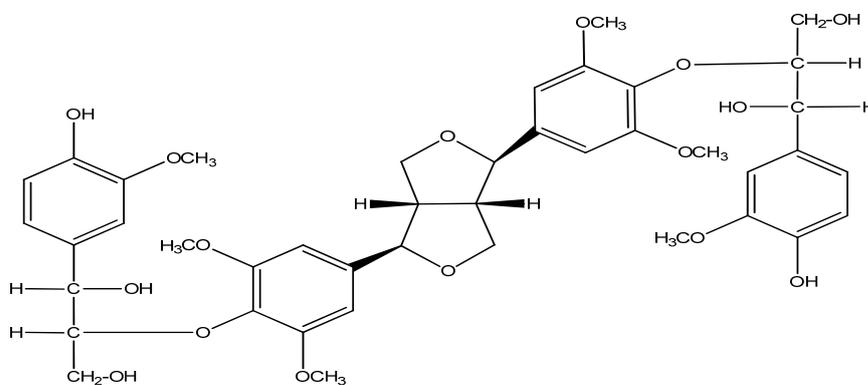
3 β -D-glucopyranosyl β -sitostérol (14)



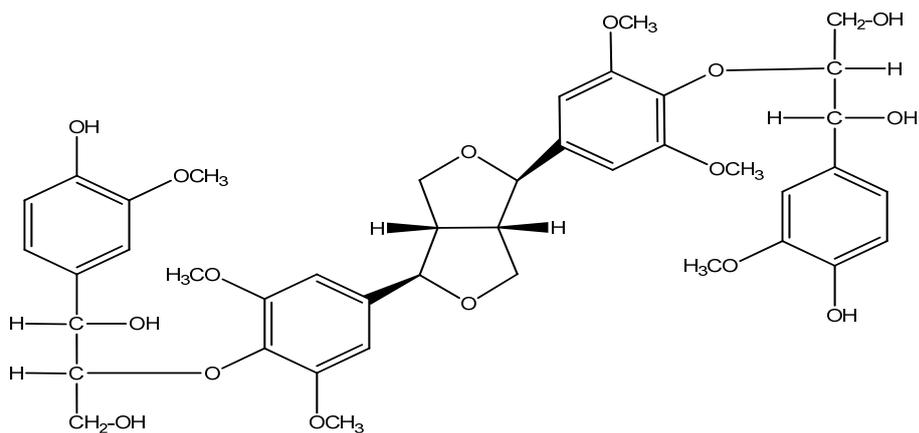
scopoléline (15)



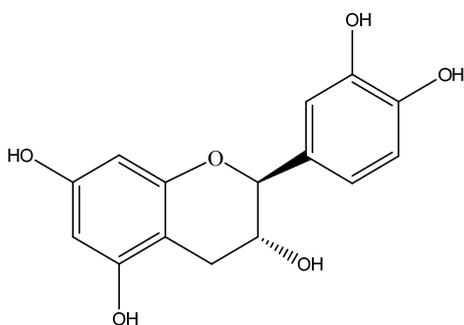
cleomiscosine C (16)



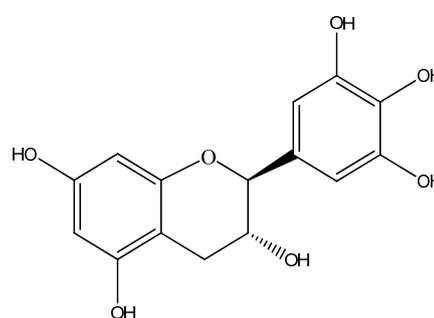
hedyotisol A (17)



hedyotisol B (18)



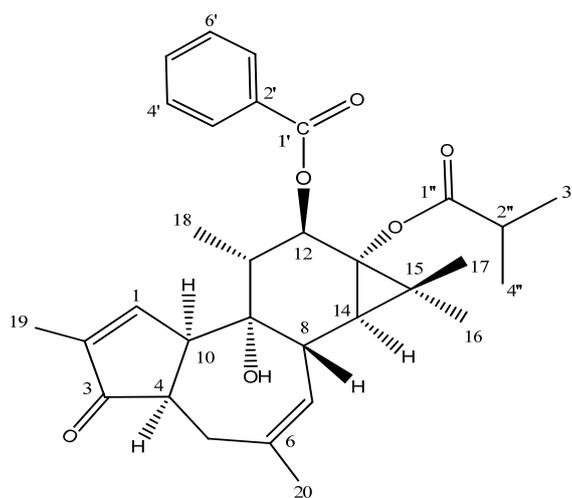
(-)-catéchine (19)



(-)-gallocatechine (20)

III.7. Détermination structurale des composés 1-20

III.7.1. Détermination structurale du composé 1

4,20-dideoxy(4 α)phorbol-12-benzoate-13-isobutyrate (1)

Ce composé a été obtenu sous forme d'huile incolore visible à 254 et 366 nm et se colore en marron après révélation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS enregistré en mode positif (Figure III.1.1) montre deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 529,3$ $[M+Na]^+$ et $545,3$ $[M+K]^+$, soit une masse moléculaire $M = 506$ correspondant à une formule brute $C_{31}H_{38}O_6$. Ceci est confirmé par le spectre de masse haute résolution HR-ESI-MS (m/z 529,2565, calc. $C_{31}H_{38}O_6Na$, 529,2566) (Figure III.1.2).

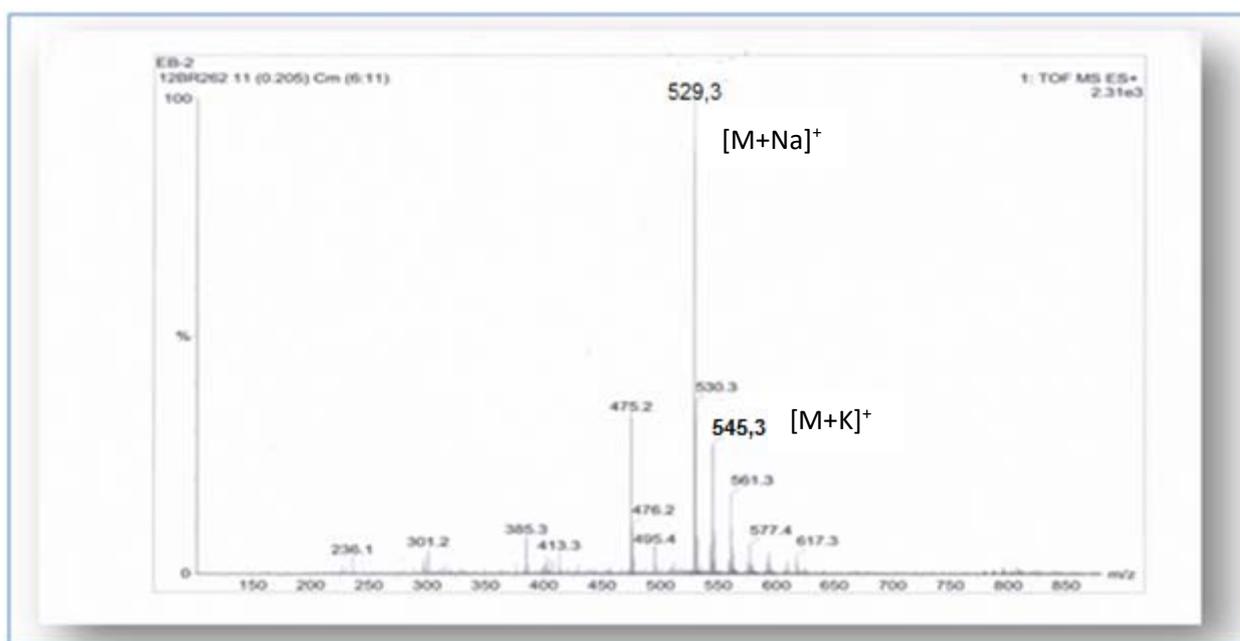


Figure III.1.1: Spectre de masse ESI-MS du composé 1

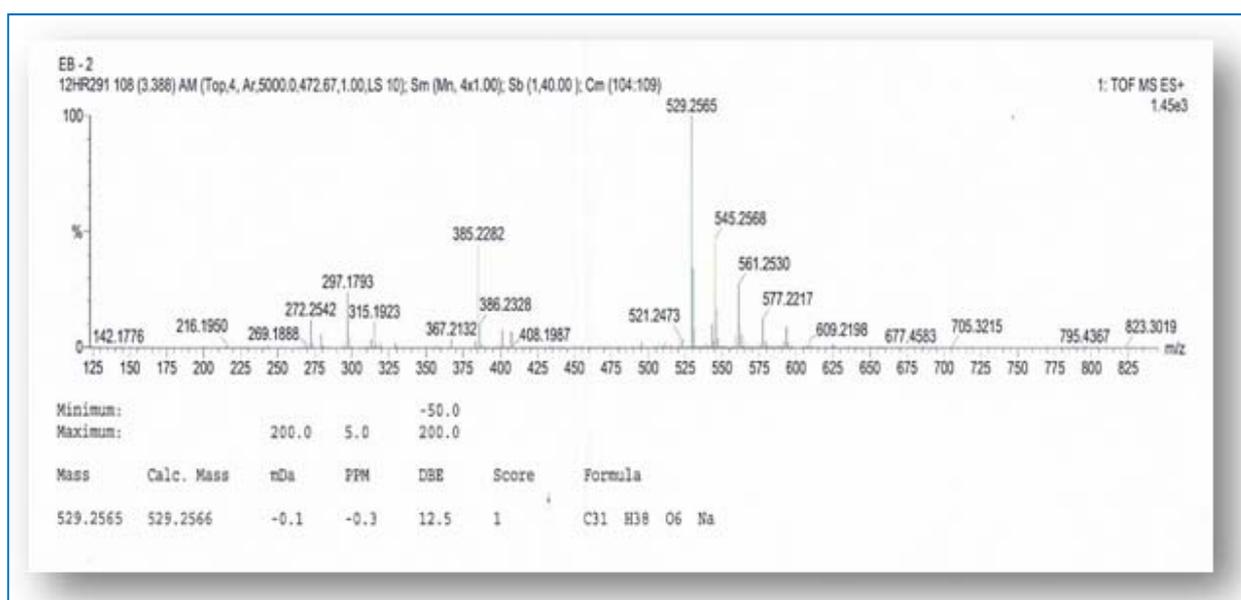


Figure III.1.2: Spectre de masse HR-ESI-MS du composé 1

Le spectre UV (Figure III.1.3) du composé **1** enregistré dans le méthanol, révèle un maximum d'absorption à λ_{\max} 240 nm suggérant la présence d'un système insaturé conjugué.

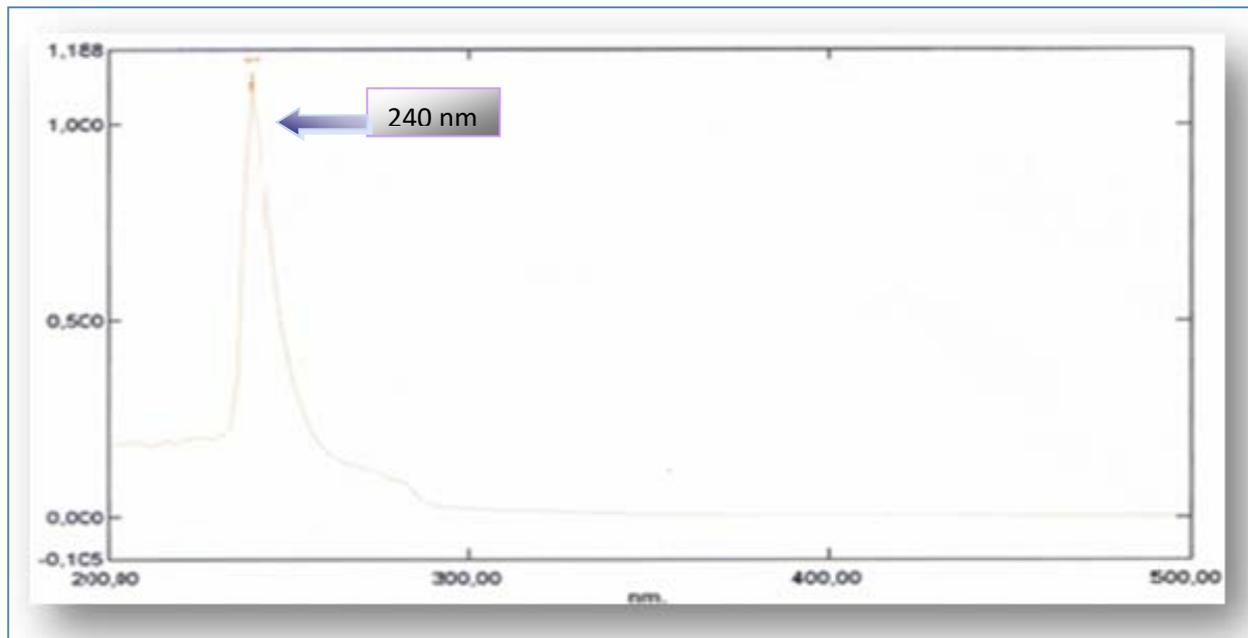


Figure III.1.3: Spectre UV du composé **1**

Le spectre IR (Figure III.1.4) présente des bandes d'absorption à 3407, 1720 et 1633 cm^{-1} indiquant la présence d'un groupement hydroxyle, carbonyle et doubles liaisons respectivement.

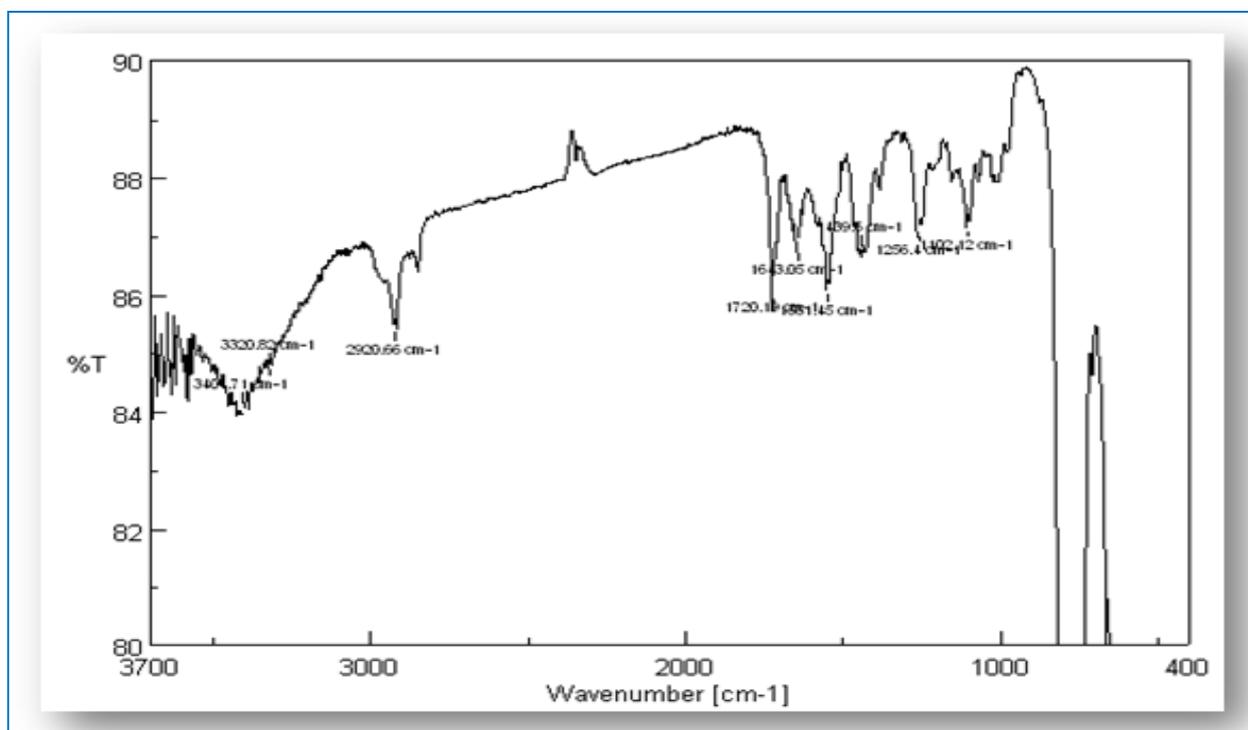


Figure III.1.4: Spectre IR du composé **1**

L'analyse du spectre RMN ^1H (Figure III.1.5) enregistré dans le chloroforme, permet de visualiser cinq signaux à δ_{H} 1,38 (3H, s, Me-16), 1,21 (3H, s, Me-17), 1,83 (3H, s, Me-19), 1,79 (3H, m, Me-20) et 1,14 (3H, d, $J = 6,3$ Hz, Me-18) correspondant à 5 groupements méthyles caractéristiques des diterpènes de type phorbol à squelette tigliane très présents au sein des Euphorbes [9,81-83]. Dans la zone de résonance déblindée, il est repéré deux signaux de protons oléfiniques à δ_{H} 7,08 (sl, H-1) et 4,88 (s, H-7).

D'autres résonances typiques des dérivés des esters de phorbols se résument en :

- Un signal à champ fort sous forme de doublet à δ_{H} 0,85 ($J = 5$ Hz) attribuable au proton H-14 des phorbols [84-87].
- Un signal singulet à 5,30 ppm ne présentant aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC J -modulé correspond à un groupement hydroxyle (9-OH).
- Un signal détecté à δ_{H} 5,58 d'intégration 1H sous forme de doublet ($J = 11,5$ Hz) est attribué au proton H-12.

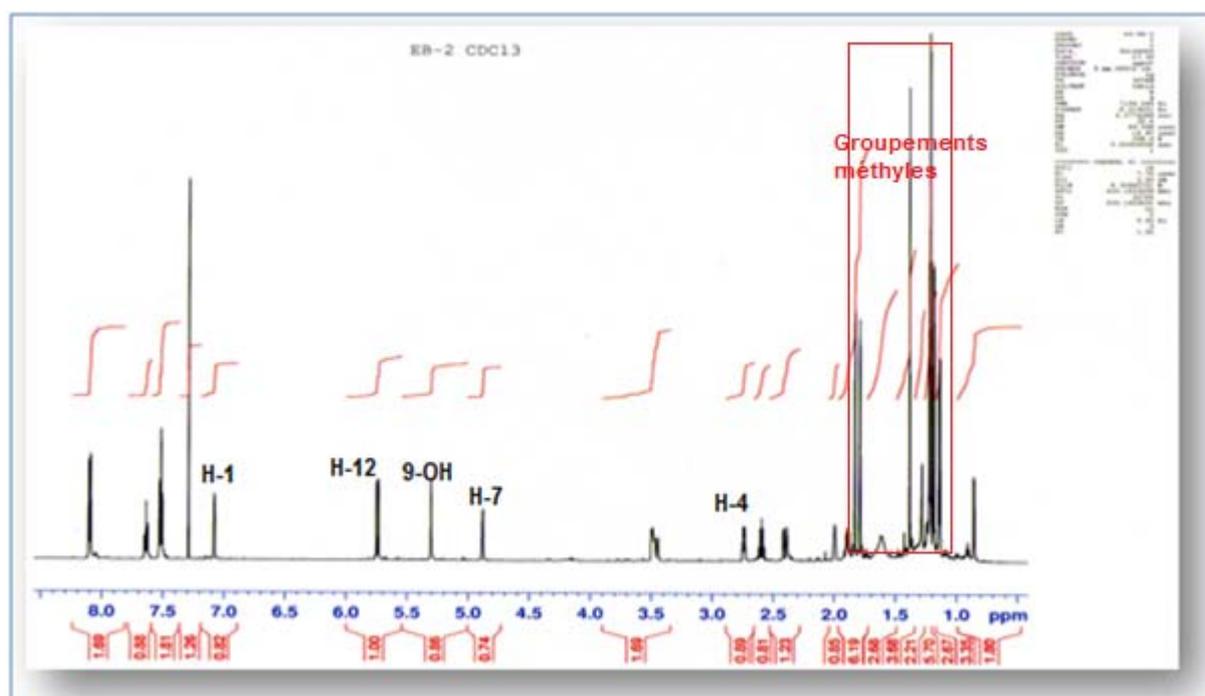
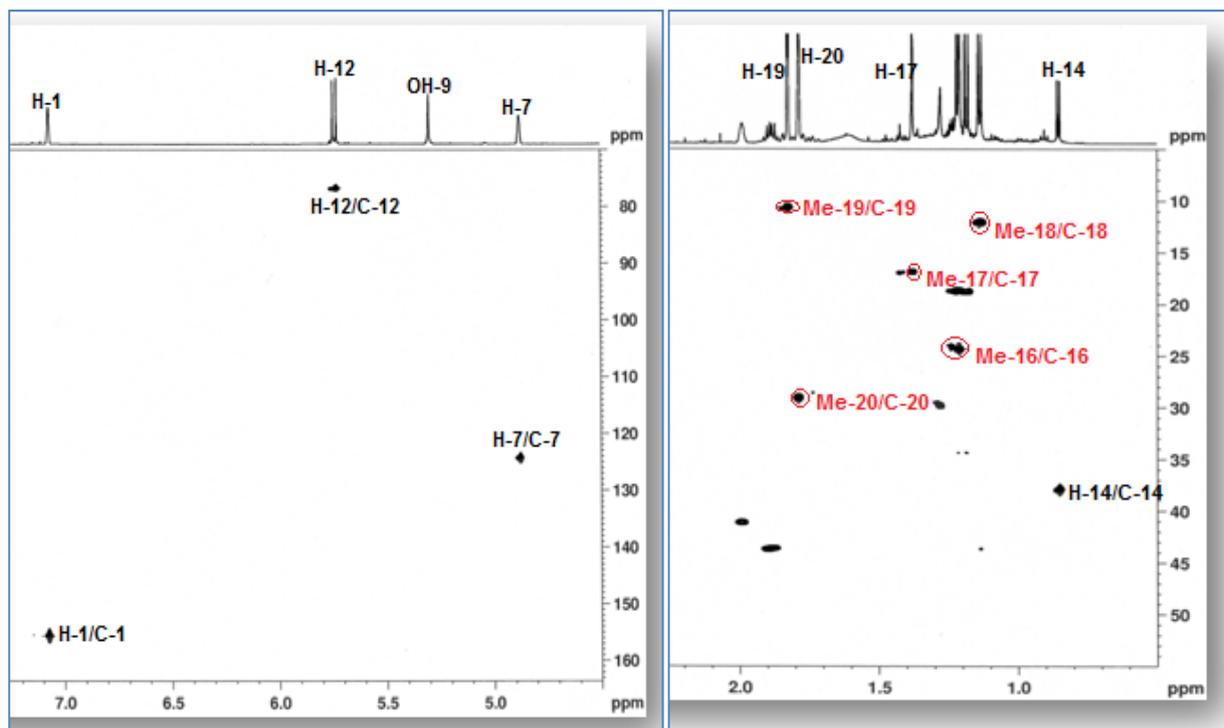


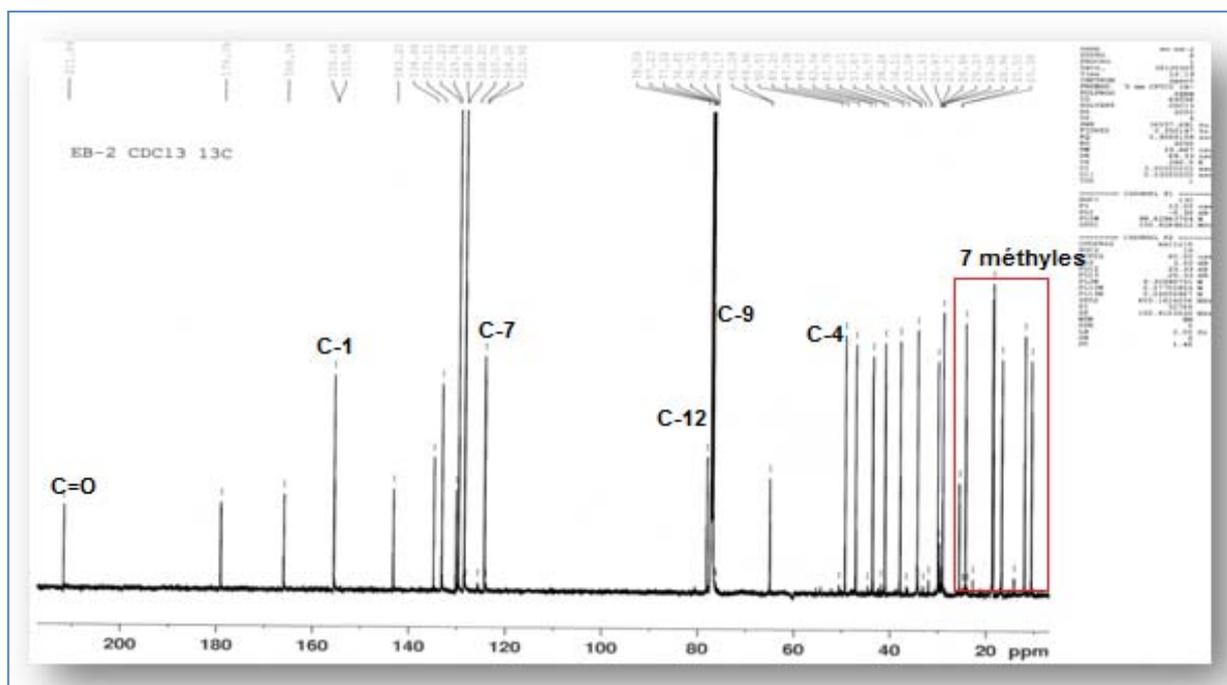
Figure III.1.5: Spectre RMN ^1H du composé 1

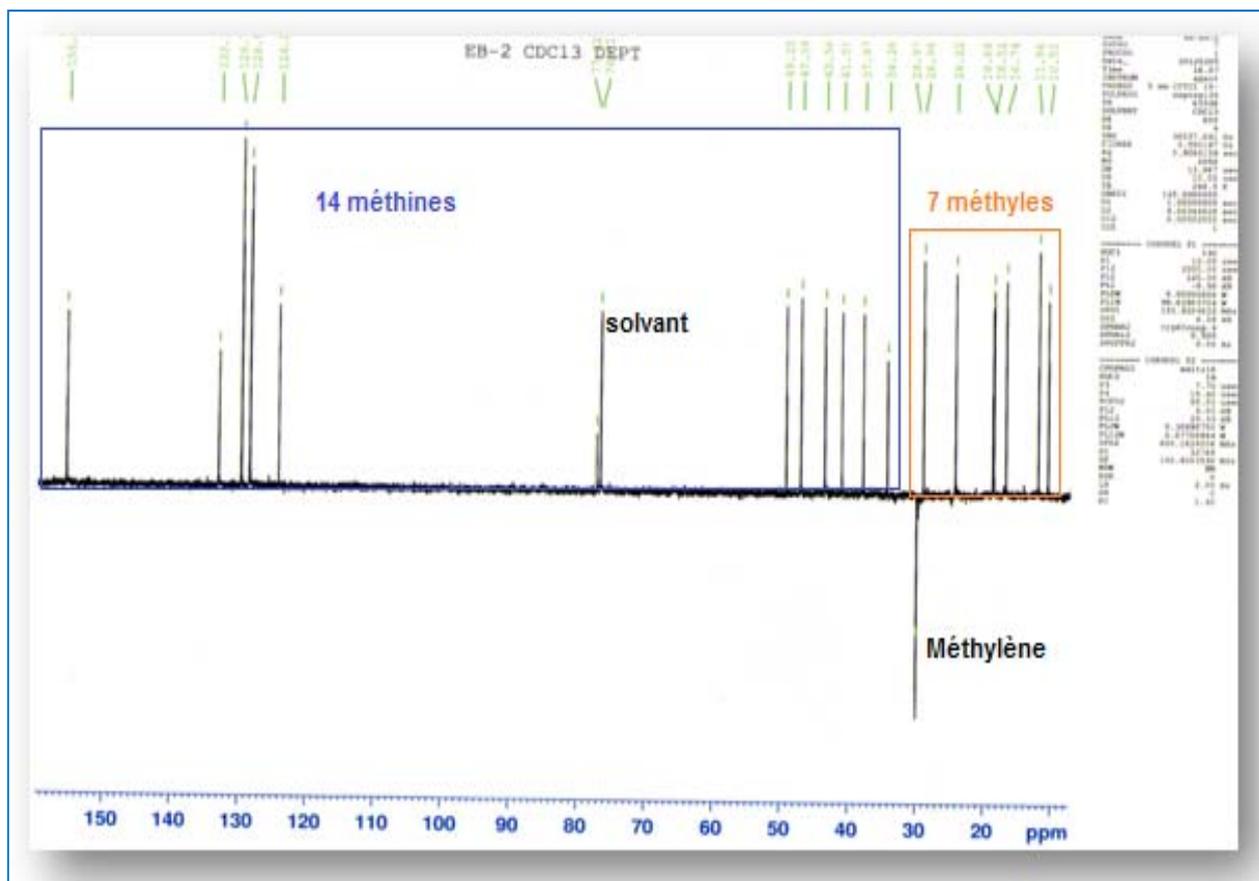
L'expérience HSQC J -modulé (Figure III.1.6) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones qui les portent C-1 (δ_{C} 155,6), C-7 (δ_{C} 128,5), C-12 (δ_{C} 78,0), C-14 (δ_{C} 37,8), Me-16 (δ_{C} 16,7), Me-17 (δ_{C} 24,3), Me-18 (δ_{C} 11,9), Me-19 (δ_{C} 10,6) et Me-20 (δ_{C} 28,9).

L'ensemble de ces données spectrales atteste bien que ce composé est un dérivé du phorbol.

Figure III.1.6: Spectres HSQC *J*-modulé du composé 1

De plus, les spectres RMN ^{13}C (Figure III.1.7) et DEPT (Figure III.1.8) montrent 28 signaux correspondant à 31 carbones se répartissant en 7 méthyles, 1 méthylène, 14 méthines, 9 carbones quaternaires incluant 3 carbones de carbonyle et 2 carbones oxygénés sp^3 .

Figure III.1.7: Spectre RMN ^{13}C du composé 1

Figure III.1.8: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **1**

A partir des protons caractéristiques et identifiés précédemment, l'expérience COSY H-H (Figures III.1.9 et III.1.10) permet de localiser les déplacements chimiques des protons suivants:

- Le proton H-10 résonant à 3,49 ppm sous forme de multiplet suite au couplage qu'il présente avec le proton H-1.
- Les protons Me-19 à δ_{H} 1,83 sous forme de singulet couplant avec le proton éthylénique H-1 (couplage allylique).

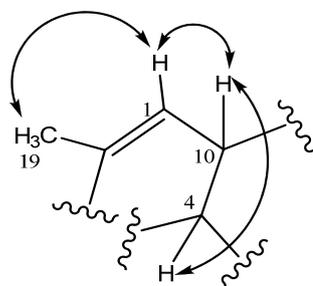


Figure III.1.9: Couplages COSY des protons H-1, H-4, H-10 et Me-19

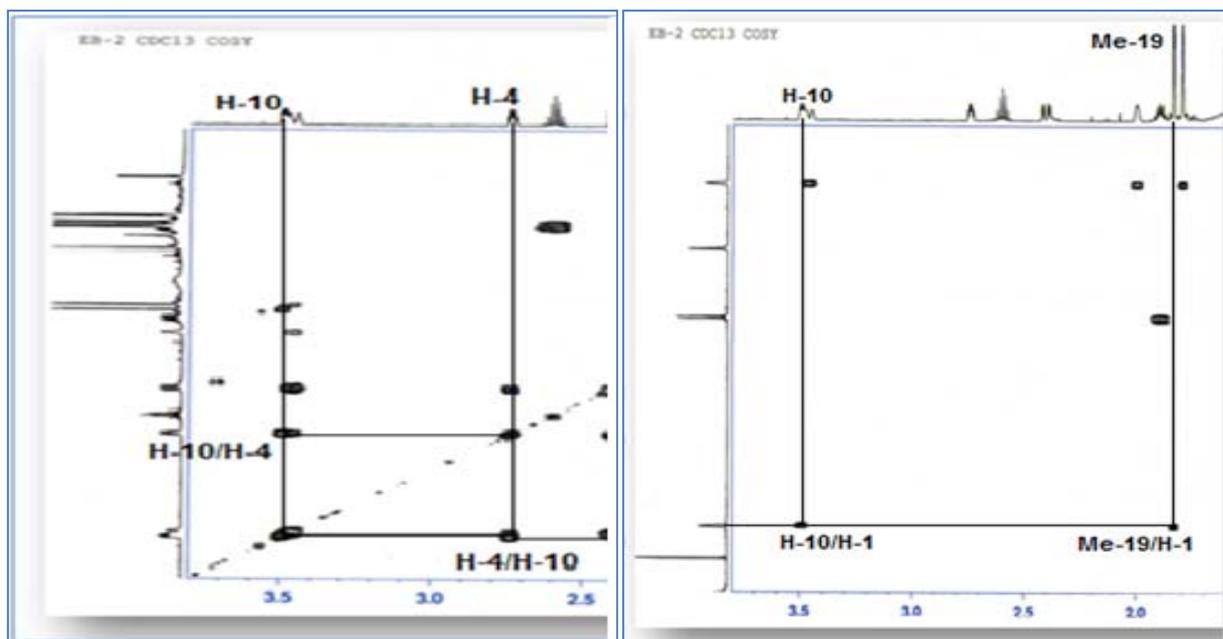
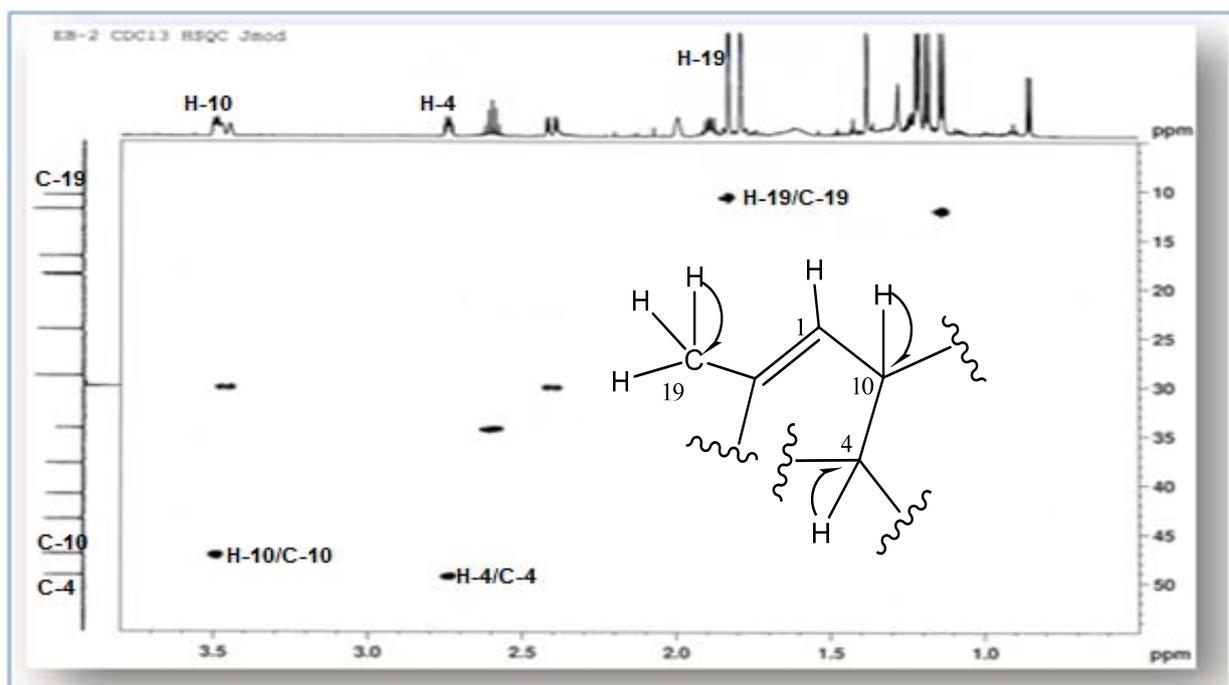


Figure III.1.10: Spectres COSY H-H du composé 1

Le spectre HSQC *J*-modulé permet de localiser les déplacements chimiques des carbones C-1, C-10 et C-19 (Figure III.1.11) à 155,6, 47,0 et 10,6 ppm respectivement.

Figure III.1.11: Spectre HSQC *J*-modulé du composé 1

Le proton H-10 couple aussi sur le spectre COSY (Figures III.1.9 et III.1.10) avec un autre proton résonant à 2,74 ppm sous forme d'un doublet de triplets ($J = 7,1$ et $4,4$ Hz) correspondant au proton H-4. Son carbone est repéré à 49,2 ppm selon l'expérience HSQC *J*-modulé (Figure III.1.11).

Sur le spectre HMBC (Figures III.1.12 et III.1.13), il est détecté des corrélations entre le proton éthylénique H-1 et les carbones méthines C-4 et C-10, assignés précédemment et le carbone éthylénique quaternaire à δ_c 143,2 (C-2). Aussi, les protons méthyliques Me-19 corrélient en HMBC avec les carbones C-1 et C-2 déjà identifiés et le carbone du carbonyle C-3 résonnant à 211,8 ppm. Ce dernier couple aussi en HMBC avec le proton H-4. A l'issue de cette analyse, le cycle A de ce diterpène est formé (Figure III.1.12).

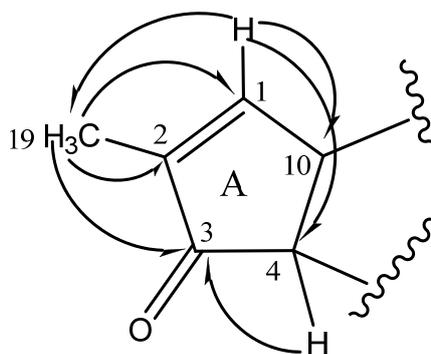


Figure III.1.12: Corrélations HMBC du cycle A

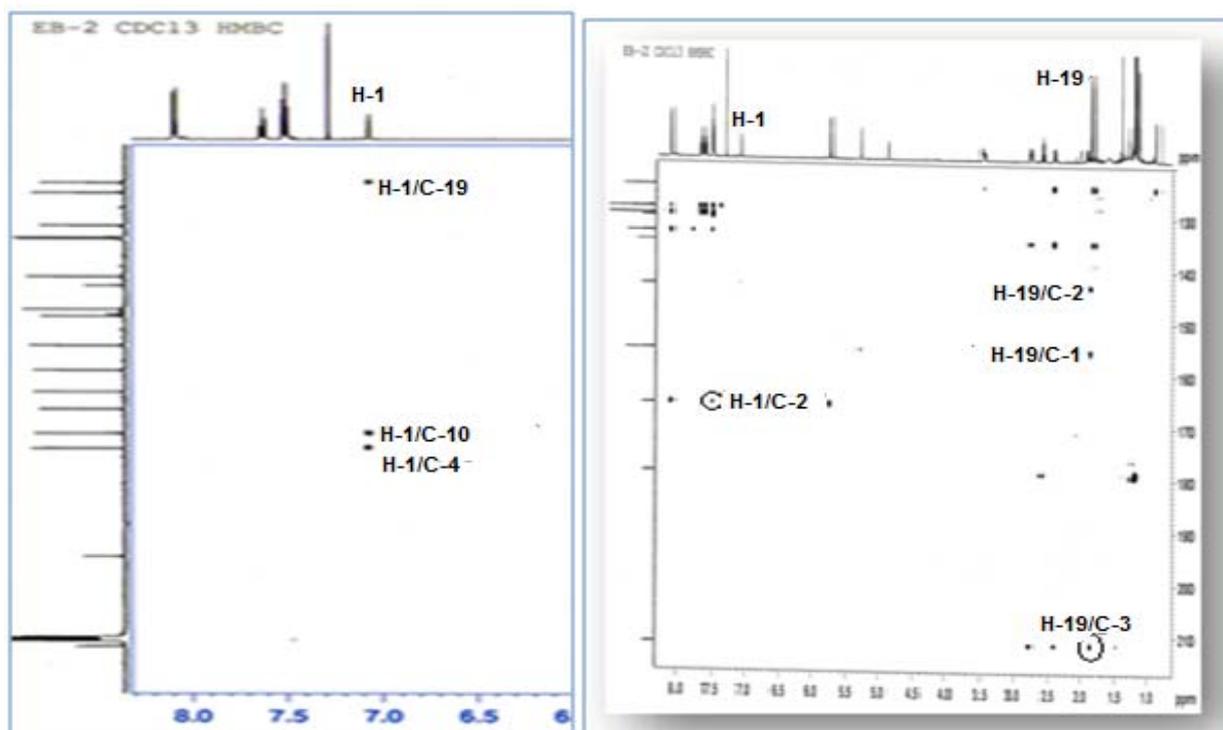


Figure III.1.13: Spectres HMBC du composé 1

Le proton H-4 corrèle également sur le spectre COSY H-H (Figure III.1.14) avec deux protons géminés H-5a (δ_H 3,45, dm, $J = 15,5$ Hz) et H-5b (δ_H 2,40, dd, $J = 15,5$ et 4,5 Hz).

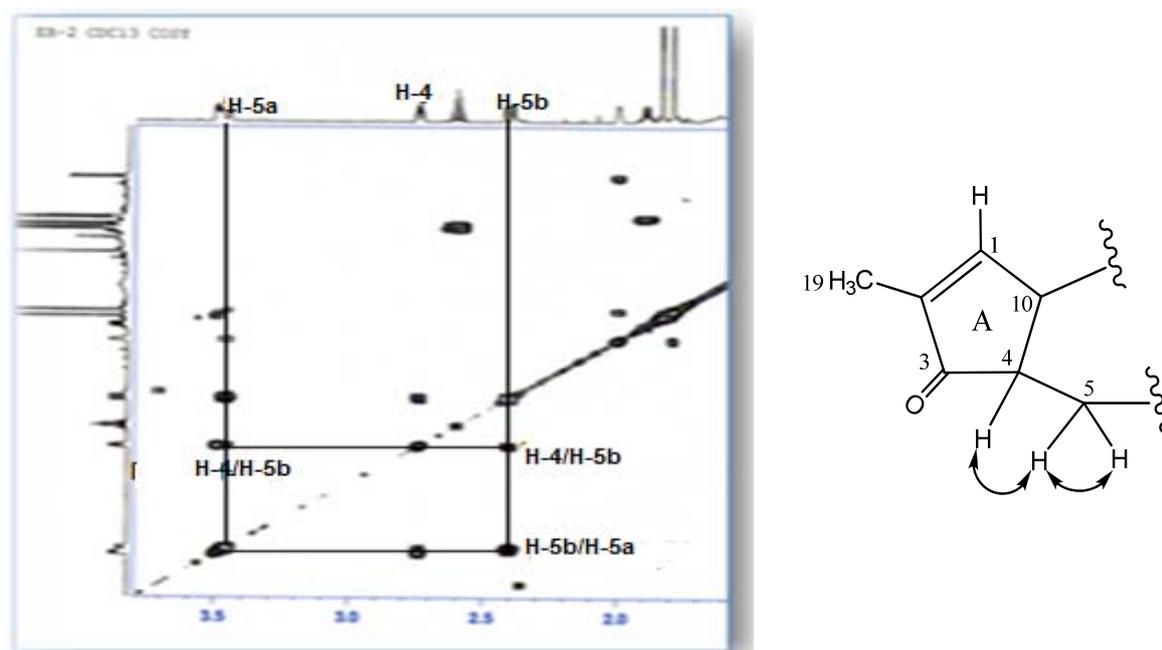
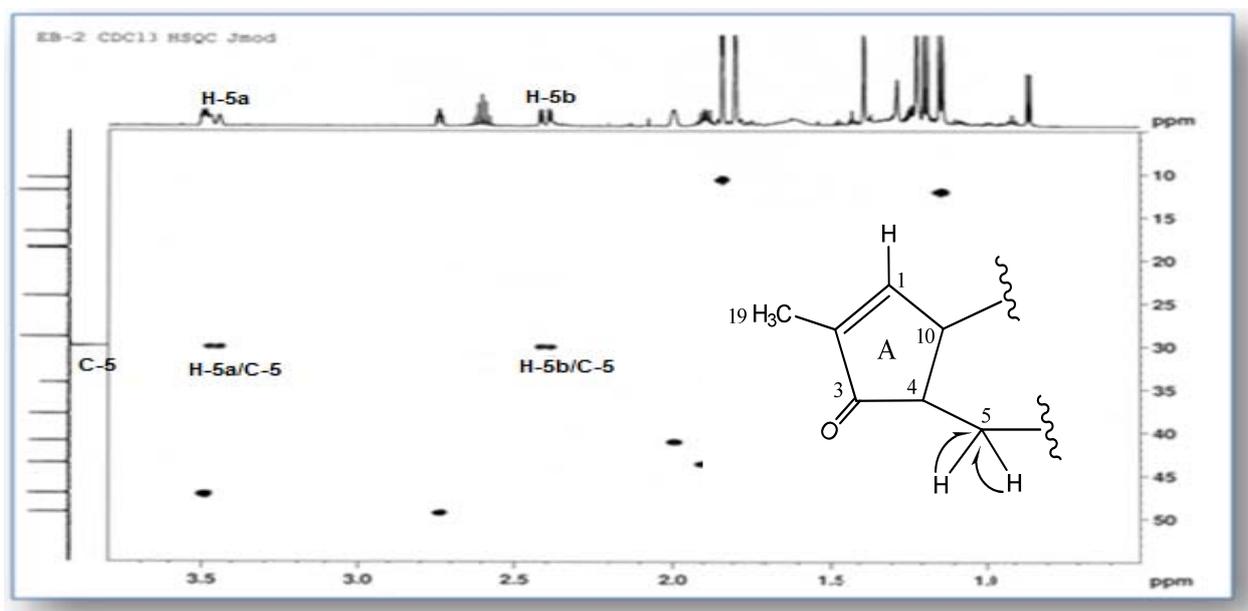


Figure III.1.14: Spectre et couplage COSY H-H

Leur carbone C-5 est repéré à 29,9 ppm selon l'expérience HSQC J -modulé (Figure III.1.15).

Figure III.1.15: Spectre HSQC J -modulé du composé 1

Le spectre HMBC (Figures III.1.16 et III.1.17) permet de visualiser les corrélations en 3J entre le proton H-4 et le carbone quaternaire oxygéné C-9 (δ_c 76,4 ppm), un carbone éthylénique quaternaire résonant à 134,8 ppm qui ne peut être que le carbone C-6 et en 2J avec les carbones C-5 et C-10 déjà connus, ce qui conduit à l'élaboration de l'enchaînement suivant (Figure III.1.16).

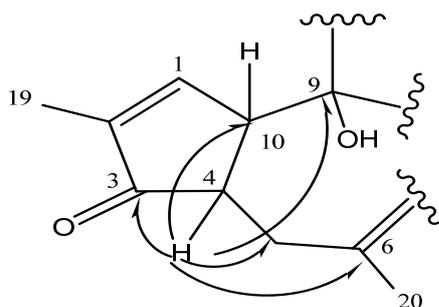


Figure III.1.16: Corrélations HMBC du composé 1

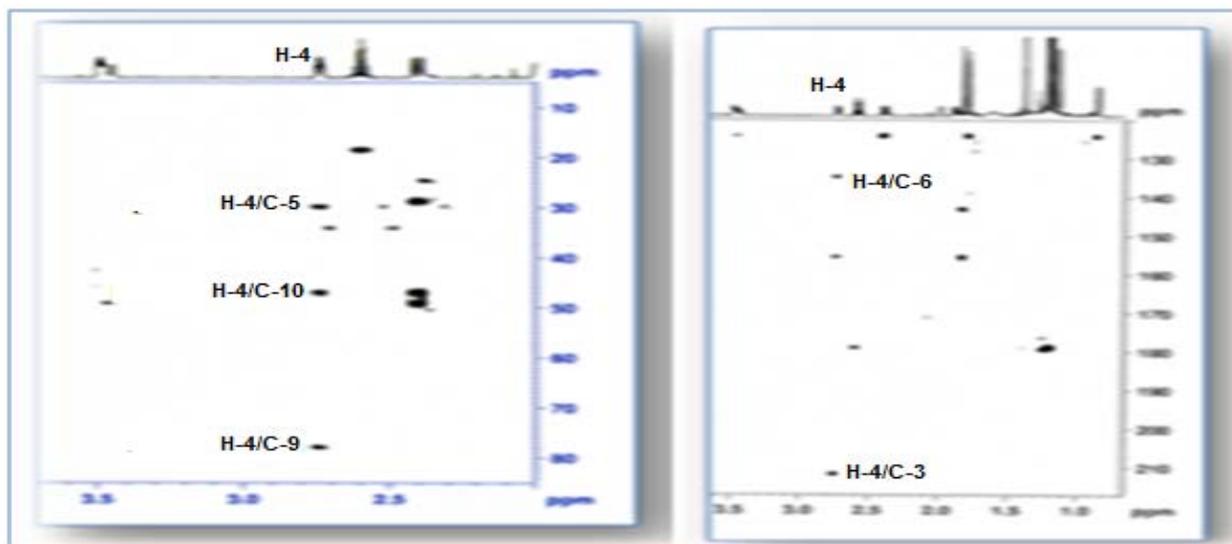


Figure III.1.17: Spectres HMBC du composé 1

Sur le spectre COSY (Figure III.1.18), il est visualisé un système de spins à sept protons indiquant les corrélations $H_2-5/H-7$ (4,88 ppm) et $H-7/H_3-20$ (1,79 ppm) traduisant des couplages allyliques, et un couplage vicinal entre $H-7/H-8$. Ce dernier résonne à δ_H 2,0 sous forme de singulet large.

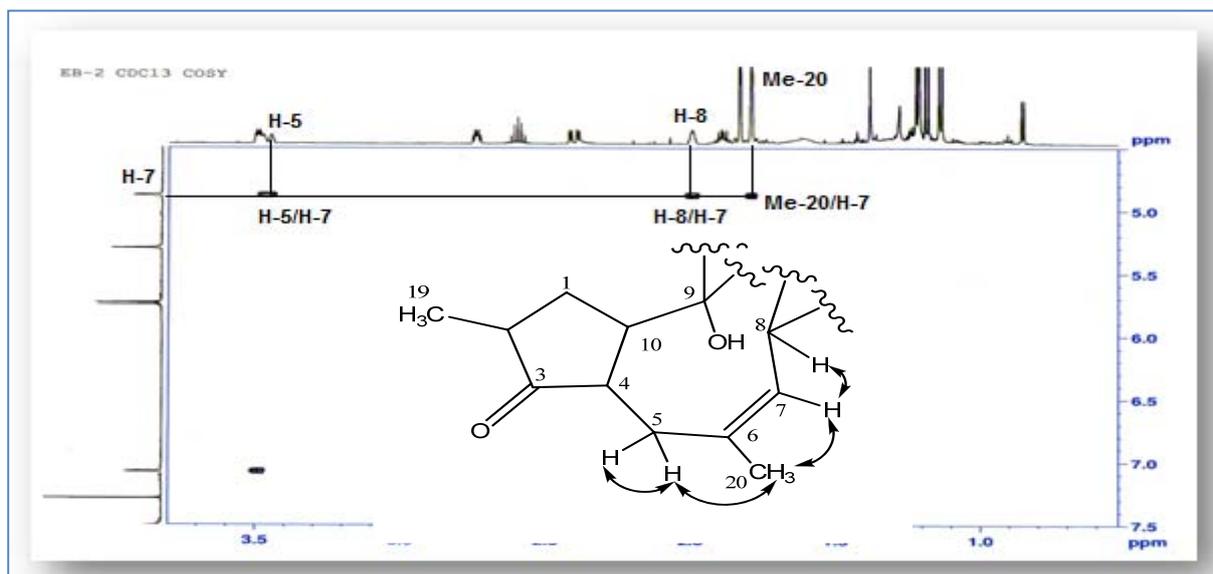


Figure III.1.18: Spectre COSY H-H du composé 1

Ces protons corrélient en HSQC J -modulé (Figure III.1.19) avec les carbones résonant à δ_c 28,9 (Me-20), 128,5 ppm (C-7) et 41,0 (C-8).

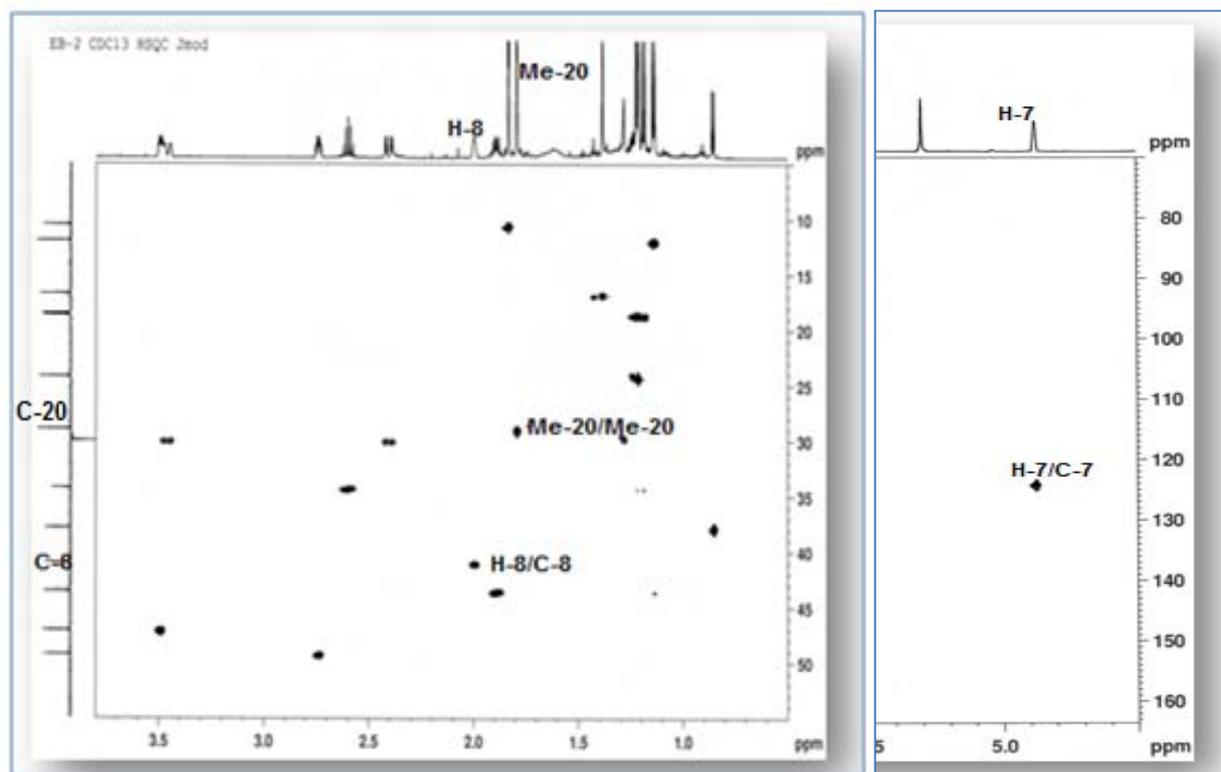


Figure III.1.19: Spectres HSQC J -modulé du composé 1

La multiplicité du proton H-7 sous forme de singulet indique un couplage nul avec le proton voisin H-8 du fait que l'angle dièdre (Figure III.1.20) entre les plans H-7 et H-8 est voisin de 90° ($J = 0$ Hz). Comme il a été observé dans tous les dérivés du phorbol [83,84].

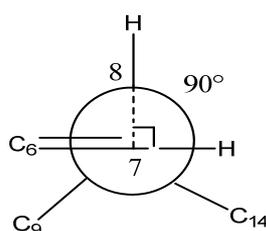


Figure III.1.20: Projection de Newman montrant un angle dièdre 90° entre les protons H-7 et H-8

A partir du proton H-8 attribué précédemment, l'expérience COSY H-H (Figures III.1.21 et III.1.22) permet de localiser le proton H-14 à 0,85 ppm sous forme de doublet ($J = 5$ Hz) couplant sur le spectre HSQC avec son carbone C-14 résonant à δ_c 37,8. Les protons H-8 et H-14 présentant deux taches de corrélation en 2J et 3J respectivement sur le spectre HMBC avec le

carbone C-9 déjà identifié, conduisant à la fermeture du cycle B à 7 chaînons (Figures III.1.21 et III.1.23).

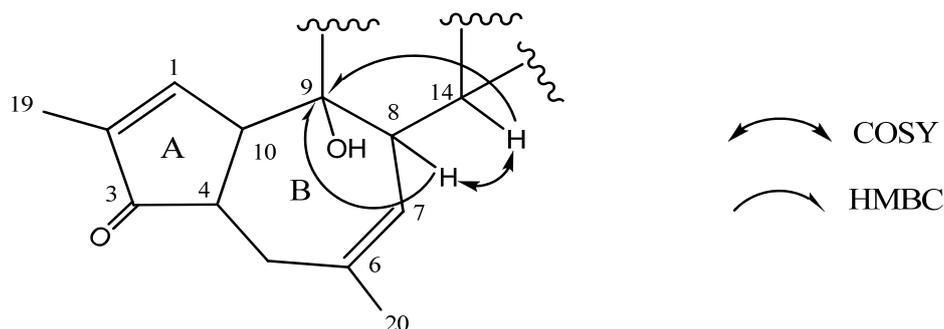


Figure III.1.21: Formation du cycle B

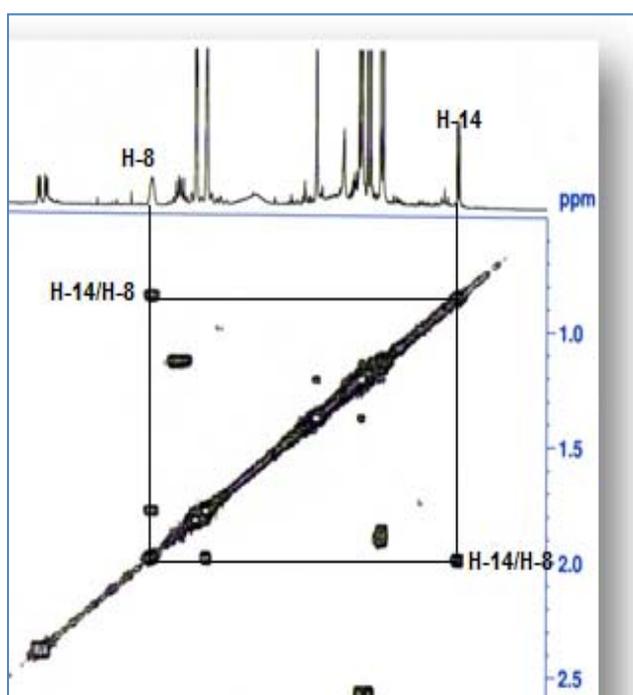


Figure III.1.22: Spectre COSY H-H

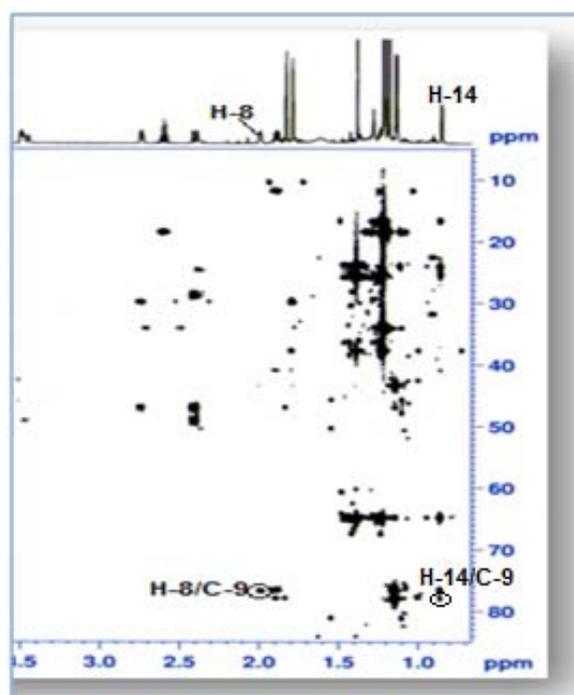


Figure III.1.23: Spectre HMBC

Le proton H-14 corrèle également sur le spectre HMBC (Figures III.1.24 et III.1.25) avec plusieurs carbones : un carbone quaternaire oxygéné à δ_c 65,0 (C-13), un autre carbone quaternaire résonant à 25,5 ppm (C-15), deux carbones méthyliques repérés à δ_c 24,3 et 16,7 correspondant aux Me-16 et Me-17 respectivement et un carbone oxyméthine C-12 résonant à 78,0 ppm dont le proton H-12 est déjà repéré à 5,58 ppm (d, $J = 11,5$ Hz) par expérience HSQC. Les protons méthyliques Me-16 et Me-17 présentent des corrélations HMBC avec les carbones C-15, C-13 et C-14 permettant ainsi la formation du cyclopropane (cycle C) (Figure III.1.24).

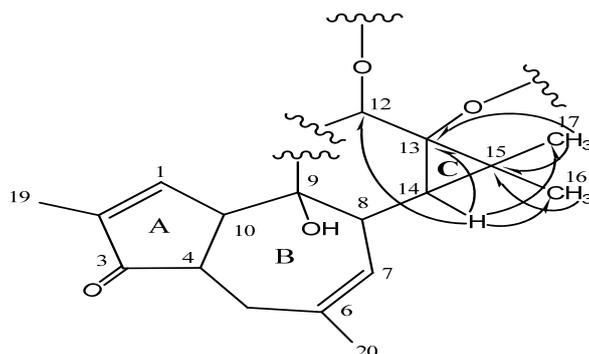


Figure III.1.24: Formation du cycle C (3 chaînons)

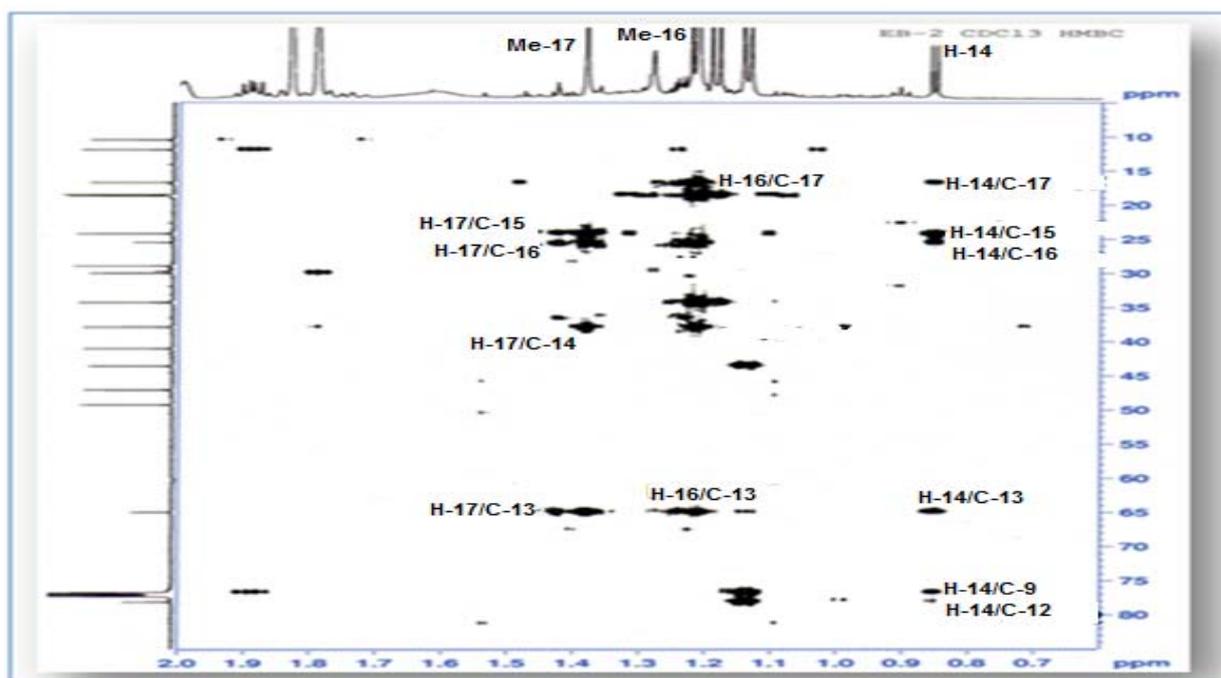


Figure III.1.25: Spectre HMBC du composé 1

A partir du proton H-12, l'expérience COSY (Figures III.1.26 et III.1.27) permet de visualiser un système de spins à 5 protons à travers les couplages H-12/H-11 (1,89 ppm, dq, $J = 11,5$ et $6,3$ Hz) et H-11/H₃-18 (1,14 ppm, d, $J = 6,3$ Hz). Leurs carbones sont assignés par expérience HSQC (Figure III.1.28) à δ_c 43,5 (C-11), 78,0 (C-12) et 11,9 (Me-18).

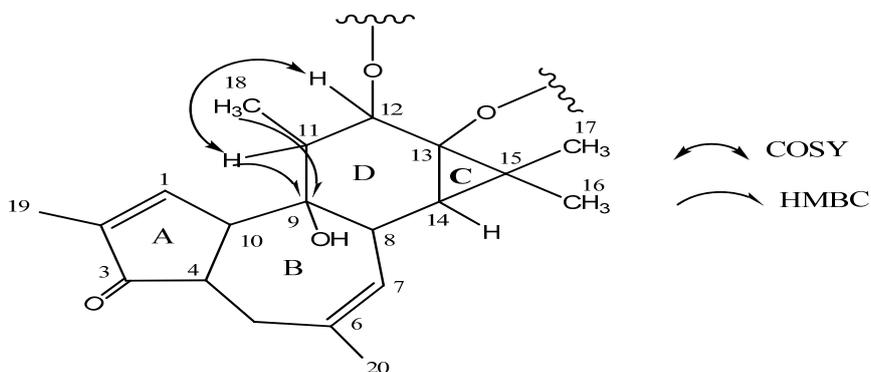


Figure III.1.26: Formation du cycle D à 6 chaînons

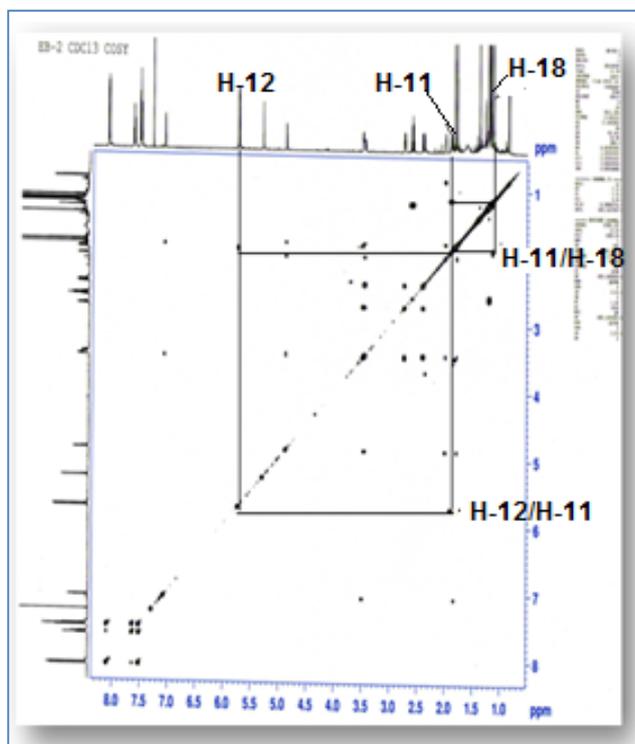


Figure III.1.27: Spectre COSY

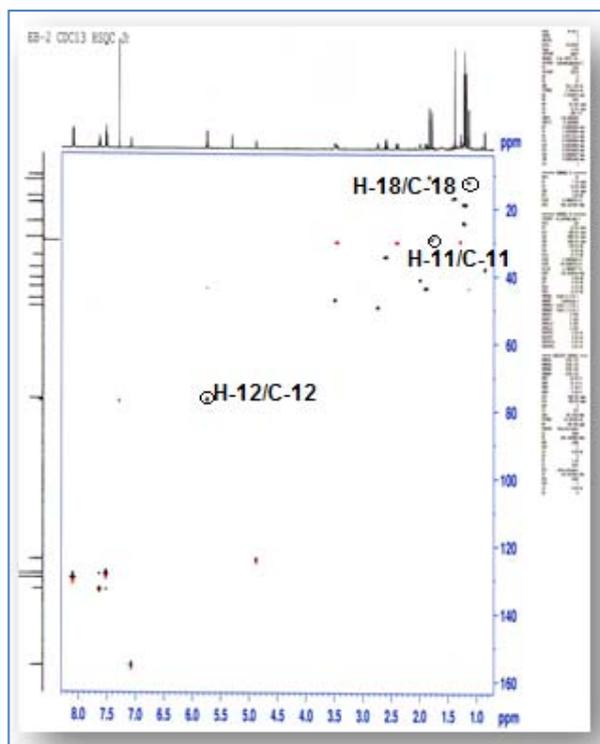


Figure III.1.28: Spectre HSQC

Les protons H-11 et Me-18 couplent sur le spectre HMBC en 2J et 3J (Figures III.1.26 et III.1.29) respectivement avec le carbone C-9 permettant ainsi la formation du cycle D à 6 chaînons. A l'issue de cette analyse, le squelette tigliane de ce composé a été élaboré (Figure III.1.30).

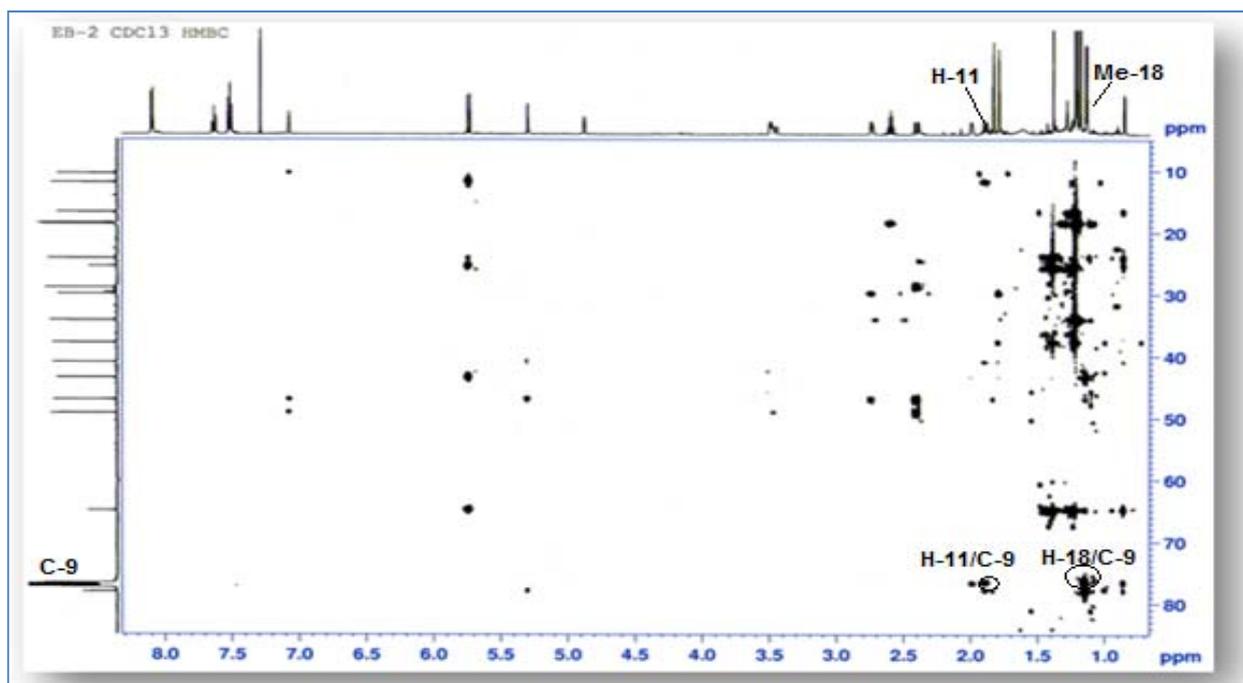


Figure III.1.29: Spectre HMBC du composé 1

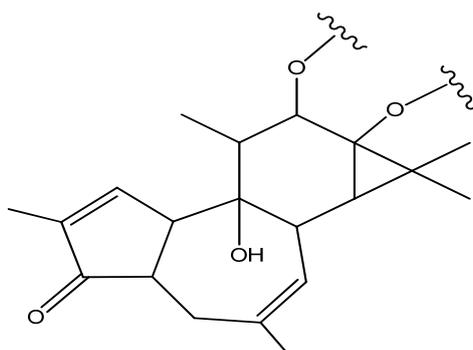


Figure III.1.30: Squelette tigliane

En plus, l'analyse des spectres RMN ^1H , COSY, HSQC et HMBC permet d'identifier les signaux de protons de deux groupements acyles à savoir :

- Le groupement benzoyle : H-3'/H-7' (8,1 ppm, d, $J = 7,5$ Hz), H-4'/H-6' (7,5 ppm, d, $J = 7,5$ Hz) et H-5' (7,61 ppm, t, $J = 7,5$ Hz). Leurs carbones résonnent à δ_{C} 128,2, 129,7 et 133,1.
- Le groupement isobutanoyle à δ_{H} 1,19 (d, $J = 7$ Hz, Me-3'' et Me-4'') et 2,6 (sept, $J = 7$ Hz, H-2''). Leurs carbones sont détectés à δ_{C} 18,5 (Me-3''), 18,6 (Me-4'') et 34,2 (C-2'').

Le déblindage du proton H-12 (5,58 ppm) indique une acylation au niveau du carbone C-12. Ceci est confirmé par l'expérience HMBC (Figures III.1.31 et III.1.32) qui montre une tache de corrélation entre le proton H-12 et un carbonyle résonnant à δ_{C} 166,0 correspondant au carbone C-1', indiquant l'attachement du groupement benzoyle au carbone C-12 du squelette polycyclique (Figure III.1.32). Ce carbonyle corrèle en HMBC (Figures III.1.31 et III.1.32) avec les protons H-3'/H-7' et H-4'/H-6' du noyau aromatique.

Le déplacement chimique du carbone C-13 à δ_{C} 65,0 ppm indique que le carbone C-13 est porteur du 2^{ème} groupement acyle qui est l'isobutanoyle (Figure III.1.31) [86,88].

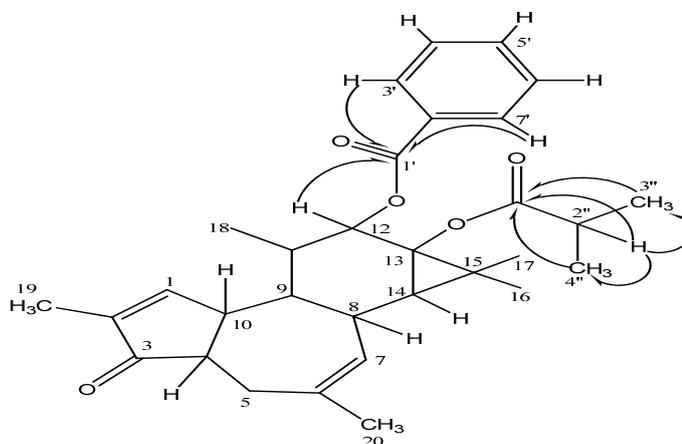


Figure III.1.31: Corrélations HMBC des groupements acyles du composé 1

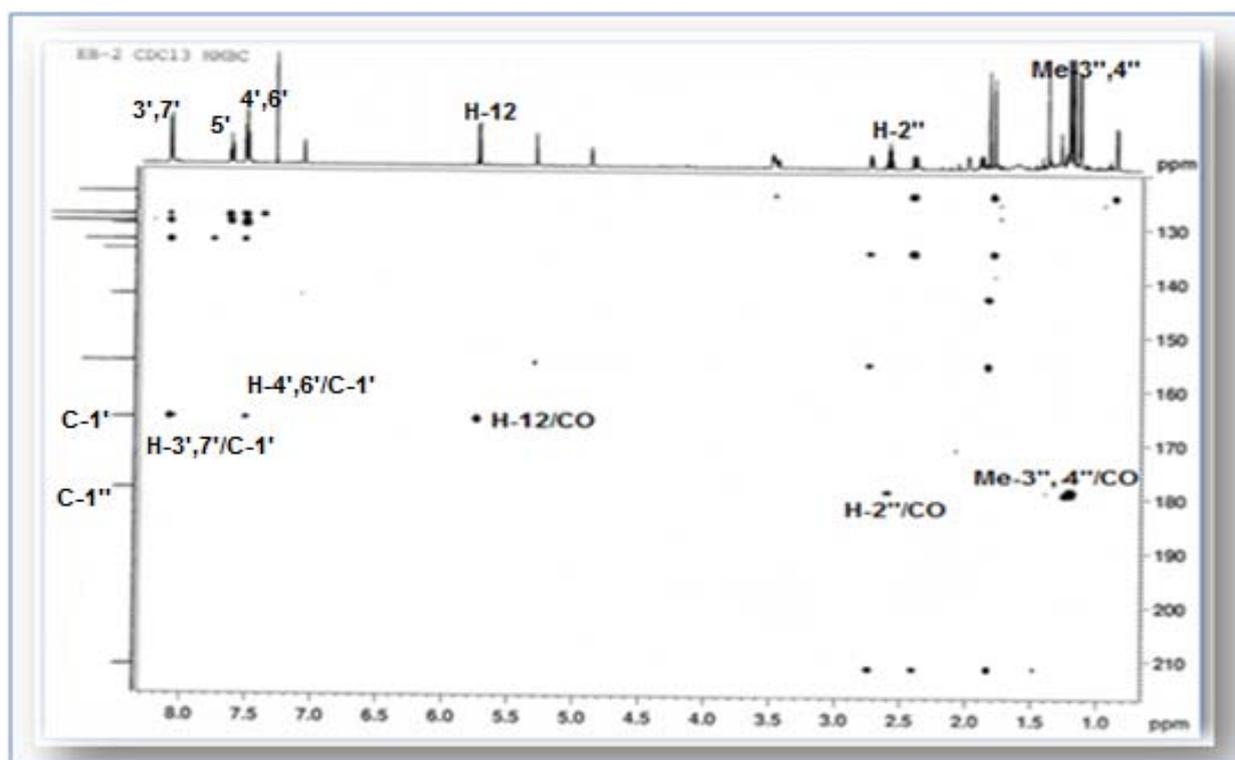


Figure III.1.32: Spectre HMBC du composé 1

Les données spectrales RMN ^1H et ^{13}C (Tableau III.1) indiquent que la structure plane du composé **1** est similaire à celle du 4,20-dideoxyphorbol-12-benzoate-13-isobutyrate appelé *Euphorbia* factor Pr₁ isolé précédemment de l'espèce *Euphorbia prolifera* [88].

Par ailleurs, les différences entre le composé **1** et *Euphorbia* factor Pr₁ se situent au niveau du :

- Le proton H-1 (composé **1**) résonne à 7,08 ppm (1H, sl) au lieu de 7,58 ppm (1H, m) pour *Euphorbia* factor Pr₁.
- La multiplicité du proton H-4 à δ_{H} 2,74 sous forme de doublet de triplets ($J = 7,1$ et $4,4$ Hz) pour le composé **1** est différente de celle du même proton à δ_{H} 2,48 (ddd, $J = 10, 9$ et $4,5$ Hz) dans le cas du composé *Euphorbia* factor Pr₁.

Il a été établi que les dérivés du phorbol isolés des plantes de la famille Euphorbiaceae possèdent la configuration H-8 β , 9 α -OH, H-10 α et 13 α -OR. Le déplacement chimique du proton H-1, la multiplicité et les valeurs des constantes de couplage du proton H-4 indiquent que le proton H-4 du composé **1** est α -orienté, contrairement au même proton du composé *Euphorbia* factor Pr₁ possédant une orientation β [9,84-87]. Cette orientation (α) a été confirmée par l'effet NOESY observé (Figures III.1.33 et III.1.34) entre les protons H-4 et H-10 α et l'absence d'effet NOE entre les protons H-4 et H-8 β . L'absence de corrélation entre les protons H-8 β et H-14,

indique que ce dernier est en position α . Les corrélations observées sur le spectre NOESY entre H-8 β et les protons H-11 et Me-17 impliquent que ces protons sont β -orientés. Il en résulte que le noyau cyclopropane est β -orienté. D'autres effets NOE sont visualisés également entre H-10 α /Me-18, Me-18/H-12 et H-14/Me-16 conduisant à une orientation α de tous ces protons. La grande valeur de la constante de couplage entre H-12 et H-11 β -axial ($J_{11,12} = 11,5$ Hz) conforte bien la position α -axiale du proton H-12. En conséquence, le groupement benzoyle lié au carbone C-12 est β -orienté (équatoriale).

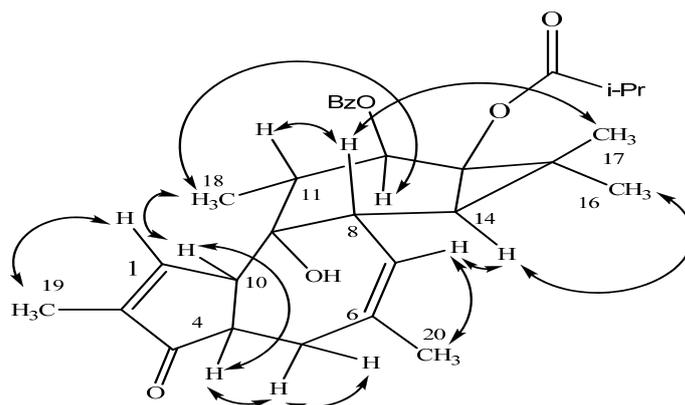


Figure III.1.33: Corrélations NOESY du composé 1

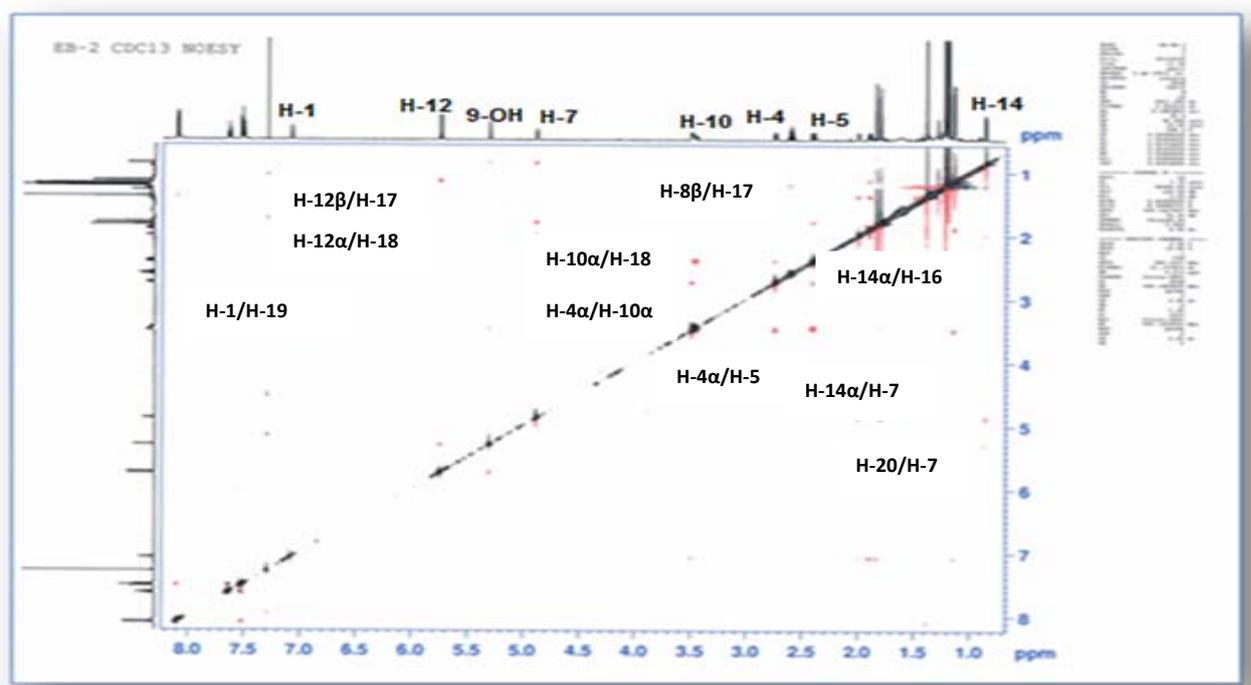
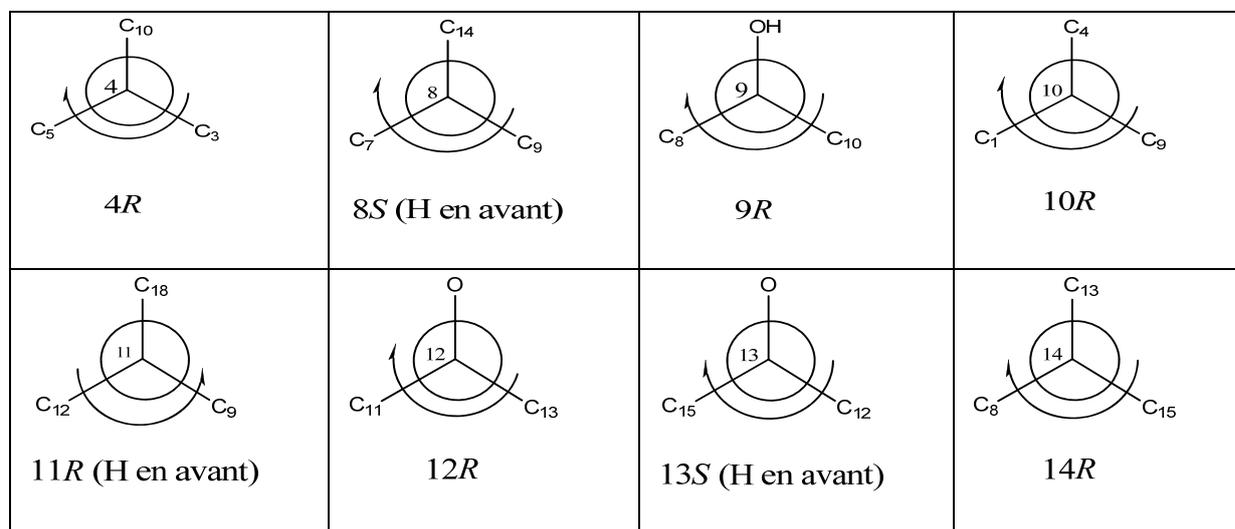


Figure III.1.34: Spectre NOESY du composé 1

Il est reconnu que le chemin biogénétique proposé pour les diterpénoïdes de type tigliane admet comme précurseur le casbène [89]. Les configurations relative et absolue des dérivés du phorbol ont été assignées par analyse de la diffraction des rayons X et des données de

transformations chimiques. Cette stéréochimie a été trouvée identique pour tous les diterpénoïdes de type phorbol découverts dans la nature à ce jour [90-93]. Par conséquent et pour des considérations de biogenèse, la même stéréochimie est attribuée pour ces composés constituant un groupe stéréochimique commun. Il en résulte que la configuration absolue des carbones chiraux est établie comme suit : 4*R*, 8*S*, 9*R*, 10*R*, 11*R*, 12*R*, 13*S* et 14*R*.



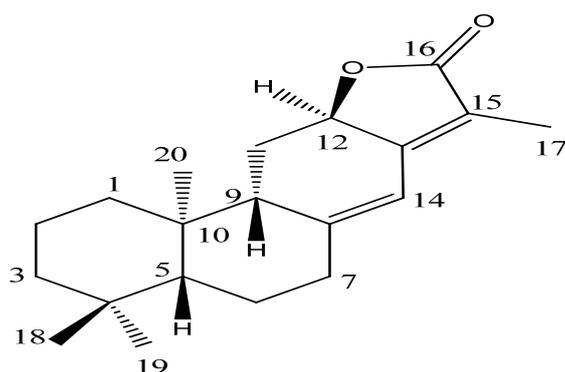
L'ensemble de ces données spectrales, la valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = -49^\circ$ (c 0,2, MeOH) ainsi que la comparaison avec les données de la littérature, nous permettent de proposer pour le composé **1** la structure nouvelle suivante 4,20-dideoxy(4 α)phorbol-12-benzoate-13-isobutyrate. Ce composé est un épimère du composé *Euphorbia factor* Pr₁ (épi-4). Bien que des dérivés du 4-deoxyphorbol sont sujetes à des réactions d'épimérisation en C-4 [94], le composé **1** est détecté dans l'extrait brut dichlorométhane et ne peut pas être un artefact formé durant les procédures de séparation et de purification.

Tableau III.1: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **1** dans CDCl₃

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	7,08 sl	155,6
2	-	143,2
3	-	211,8
4	2,74 dt 7,1, 4,4	49,2
5	2,40 dd 15,5, 4,4 3,45 dm 15,5	29,9

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
6	-	134,8
7	4,88 s	128,5
8	2 sl	41,0
9	5,30 sl OH-9	76,4
10	3,49 m	47,0
11	1,89 dq 11,5, 6,3	43,5
12	5,58 d 11,5	78,0
13	-	65,0
14	0,85 d 5	37,8
15	-	25,5
16	1,38 s	16,7
17	1,21 s	24,3
18	1,14 d 6,3	11,9
19	1,83 s	10,6
20	1,79 m	28,9
1'	-	166,0
2'	-	130,2
3',7'	8,1 d 7,5	128,2
4',6'	7,5 t 7,5	129,7
5'	7,61 t 7,5	133,1
1''	-	179,0
2''	2,60 sept	34,2
3''	1,19 d 7	18,5
4''	1,19 d 7	18,6

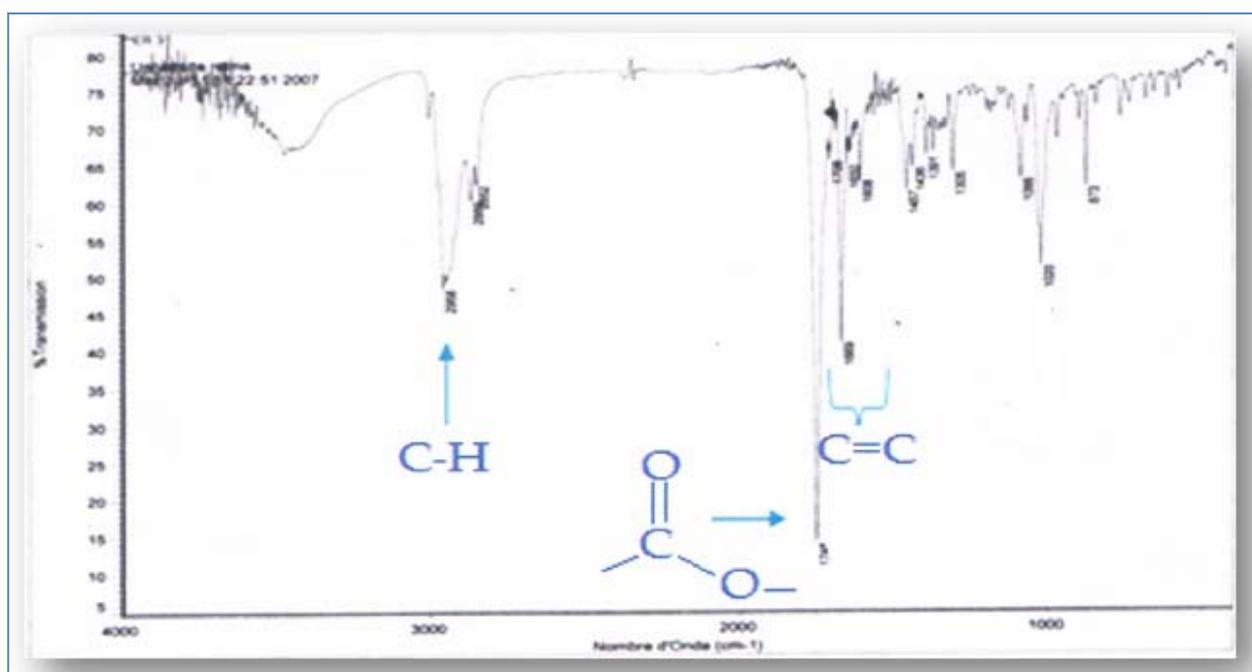
III.7.2. Détermination structurale du composé 2

*ent*-abiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12-olide (**2**)

Le composé **2** est isolé sous forme de cristaux blancs solubles dans le chloroforme. Il est visible à 254 nm et se colore en rose claire après révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre UV présente deux maxima d'absorption à 204 et 277 nm suggérant la présence d'un système insaturé conjugué.

Le spectre IR (Figure III.2.1) montre des bandes d'absorption à 1750, 2958 et 1608 cm^{-1} , indiquant la présence d'une fonction γ -lactone α,β -insaturée, de groupes alkyles (CH, CH_2 et CH_3) et de doubles liaisons conjuguées respectivement.

Figure IV.2.1: Spectre IR du composé **2**

Sur le spectre de masse réalisé en ESI-MS (Figure III.2.2), il est observé des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 323,2$ $[M+Na]^+$ et $339,2$ $[M+K]^+$, suggérant une masse moléculaire de 300 uma et une formule brute $C_{20}H_{28}O_2$.

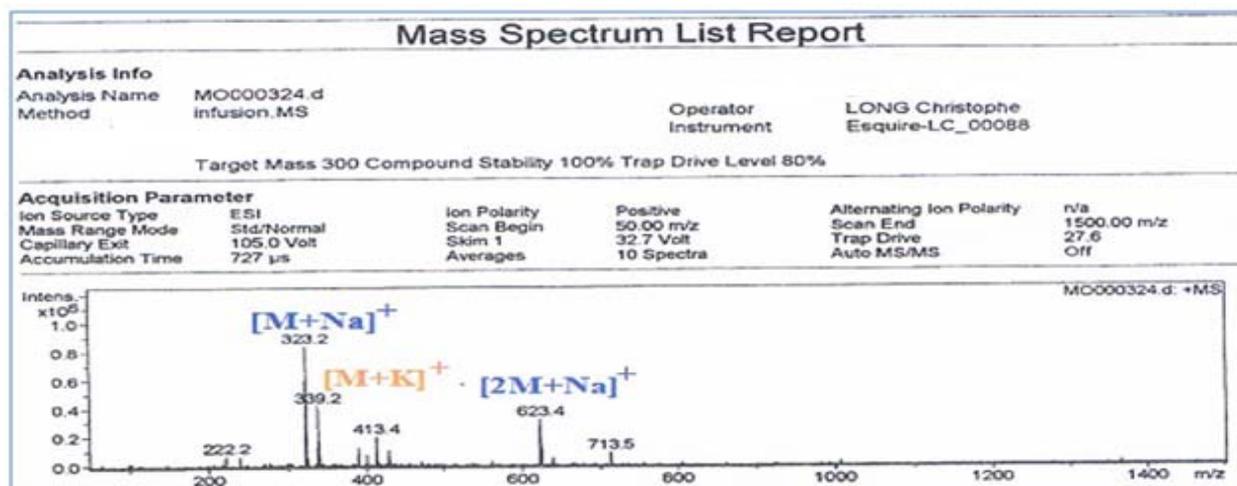


Figure III.2.2: Spectre de masse ESI-MS du composé 2

Le spectre RMN 1H (Figure III.2.3) révèle 4 signaux de groupements méthyles à δ_H 0,86 (3H, s, Me-19), 0,92 (3H, s, Me-18), 0,94 (3H, s, Me-20) et 1,87 (3H, d, $J = 1,2$ Hz, Me-17). Ces signaux sont communs pour les groupements méthyles des composés à squelette diterpénique de type abiétane [8,12,95,96] (Tableau III.2). Ce spectre montre également des signaux dans la zone déblindée à 6,30 ppm sous forme d'un singulet large et à 4,91 ppm sous forme d'un doublet de doublets de quadruplets ($J = 13,5, 6,1$ et $1,1$ Hz), attribuables aux protons H-14 et H-12 respectivement. Leurs carbones sont assignés par l'expérience HSQC J -modulé (Figure III.2.4) à δ_C 8,2 (Me-17), 16,8 (Me-20), 21,8 (Me-19), 33,9 (Me-18), 76,0 (Me-12) et 113,9 (Me-14).

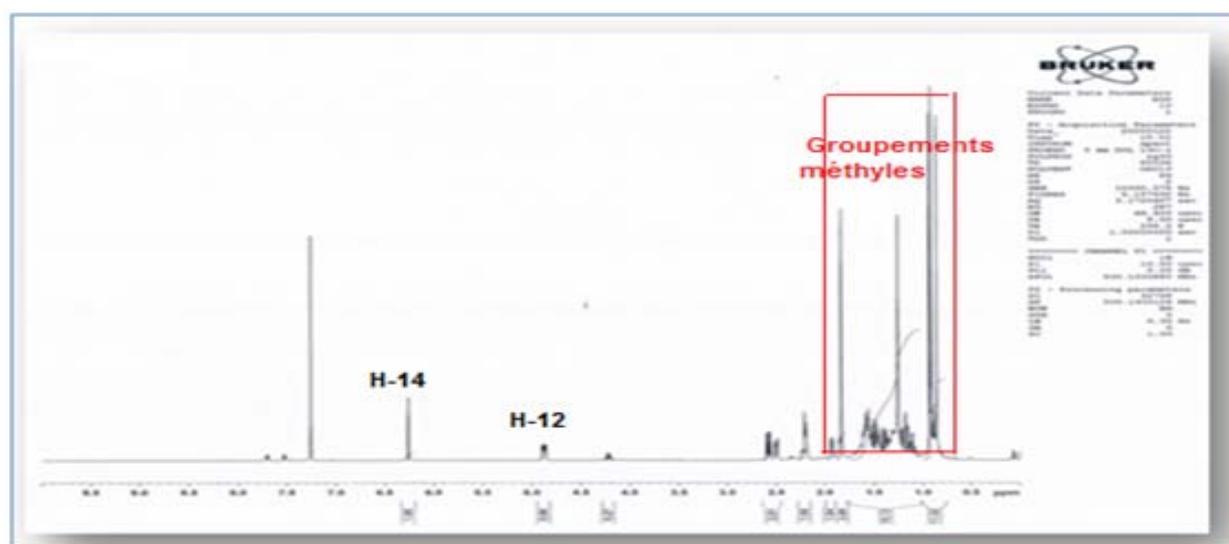
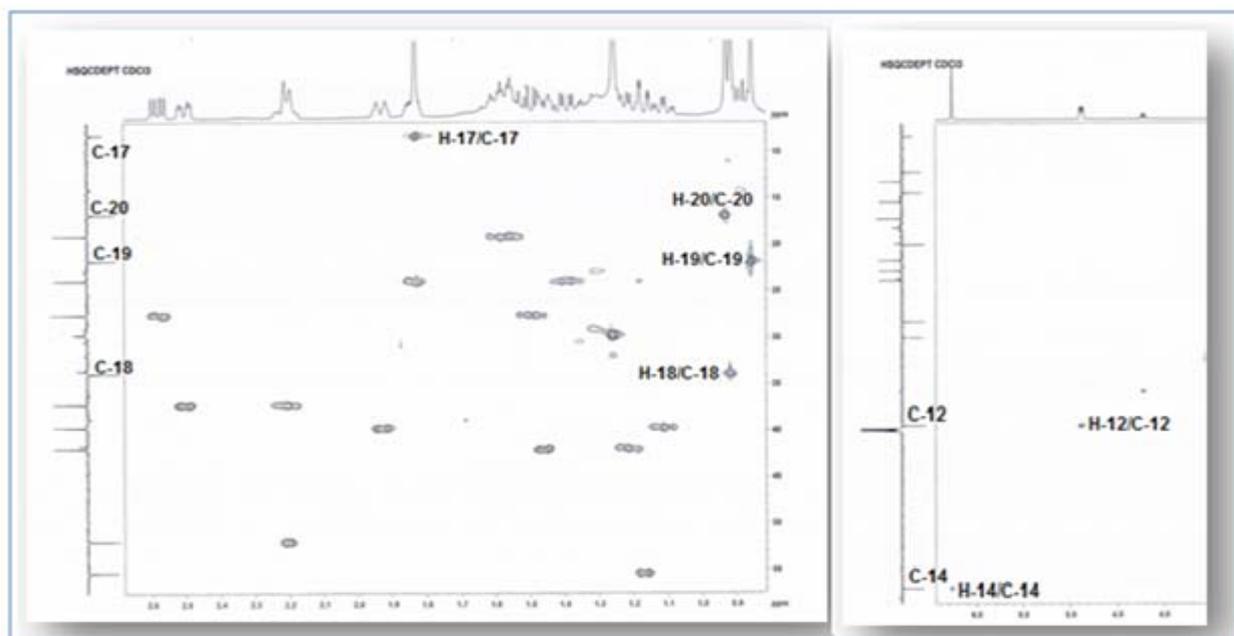
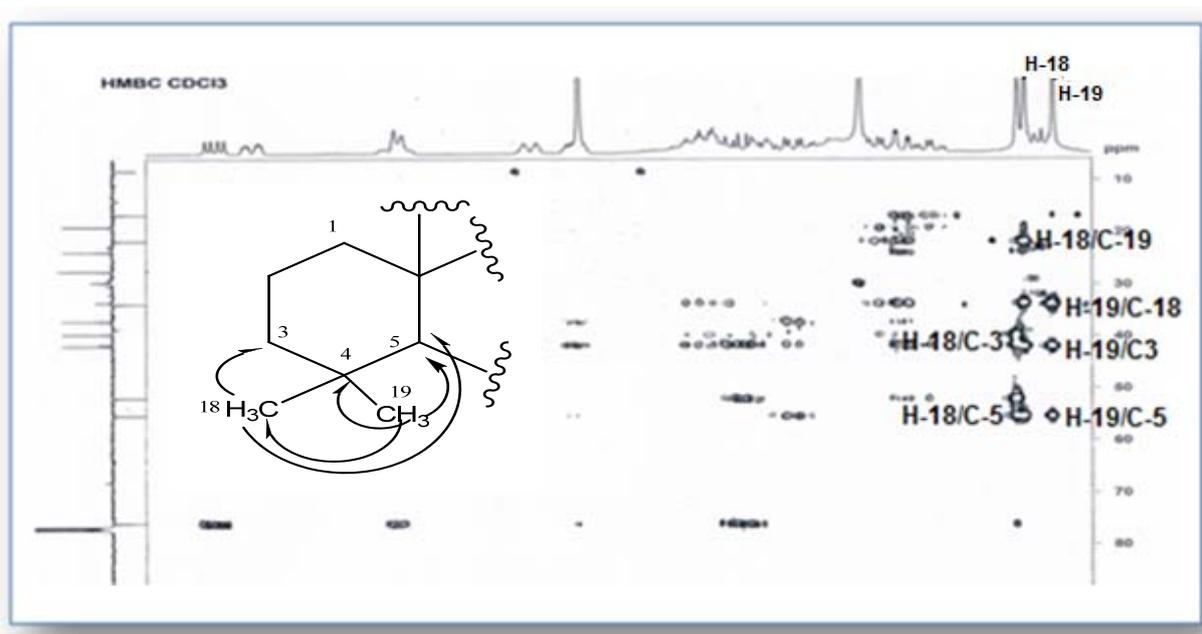


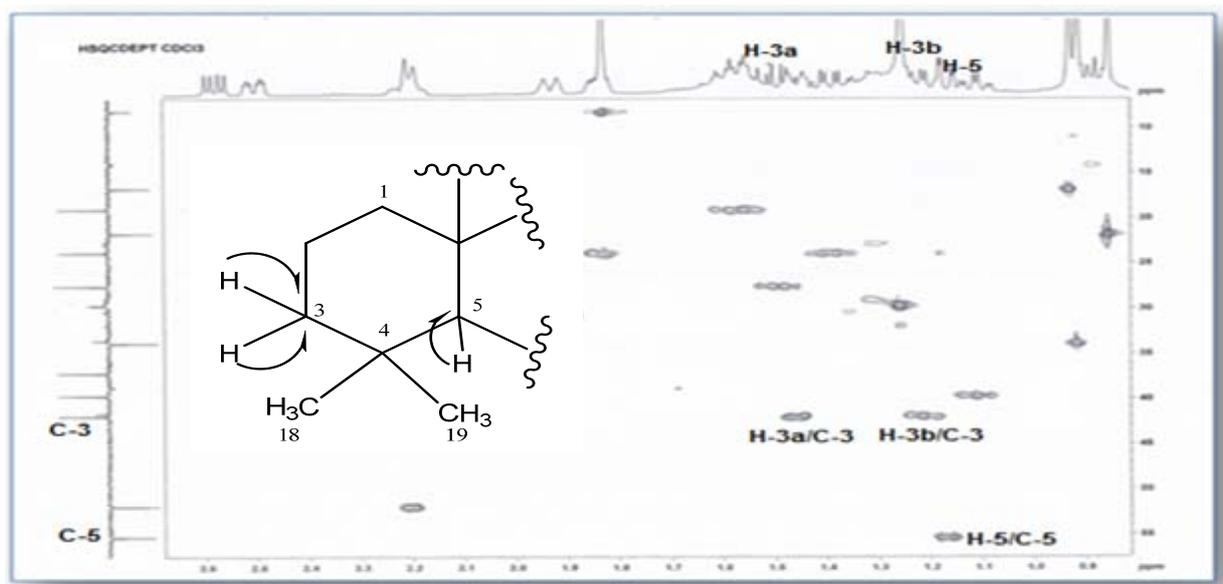
Figure III.2.3: Spectre RMN 1H du composé 2

Figure III.2.4: Spectres HSQC J -modulé du composé **2**

L'analyse structurale du composé **2** peut débuter à partir des signaux de carbones méthyliques Me-18 et Me-19 identifiés précédemment qui corrént en 2J et 3J sur le spectre HMBC (Figure III.2.5) avec les carbones résonant à 42, 33,6 et 55,3 ppm, attribuables respectivement aux carbones C-3, C-4 et C-5.

Figure III.2.5: Spectre HMBC du composé **2**

Ces carbones corrént sur le spectre HSQC J -modulé (Figure III.2.6) avec leurs protons à δ_H 1,24 (td, $J = 13,1$ et $4,5$ Hz, H-3b), 1,49 (dm, $J = 13,1$ Hz, H-3a) et 1,20 (dd, $J = 13$ et $2,4$ Hz, H-5).

Figure III.2.6: Spectre HSQC *J*-modulé du composé 2

Les protons H₂-3 font partie d'un système de spins à 6 protons selon le spectre COSY H-H (Figure III.2.7). En effet il y est observé les couplages H₂-3/H₂-2 et H₂-2/H₂-1 qui résonnent à 1,56 (m, H-2b), 1,62 (m, H-2a), 1,16 (td, $J = 12,7$ et 4,2 Hz, H-1b) et 1,96 (dm, $J = 12,7$ Hz, H-1a).

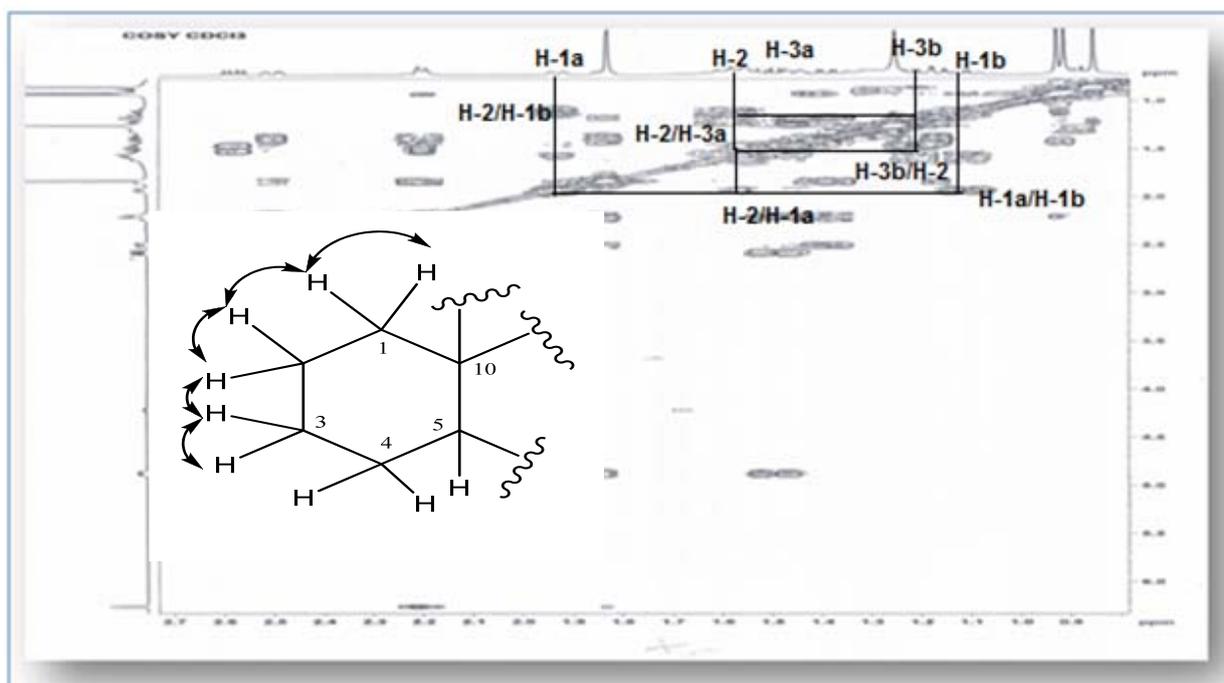
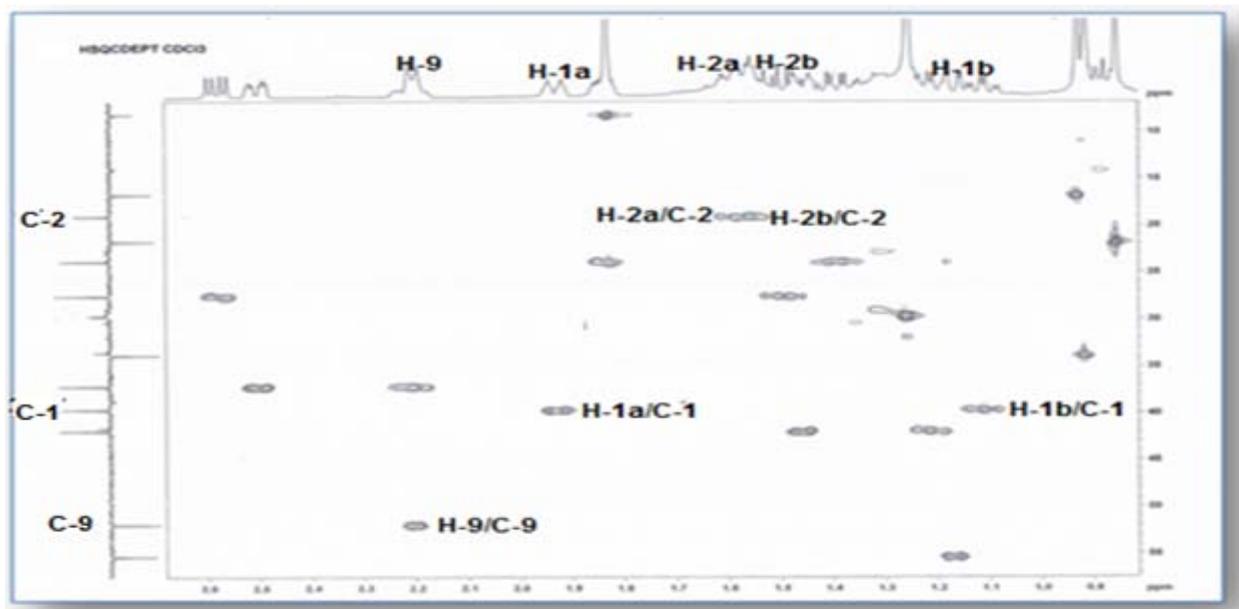
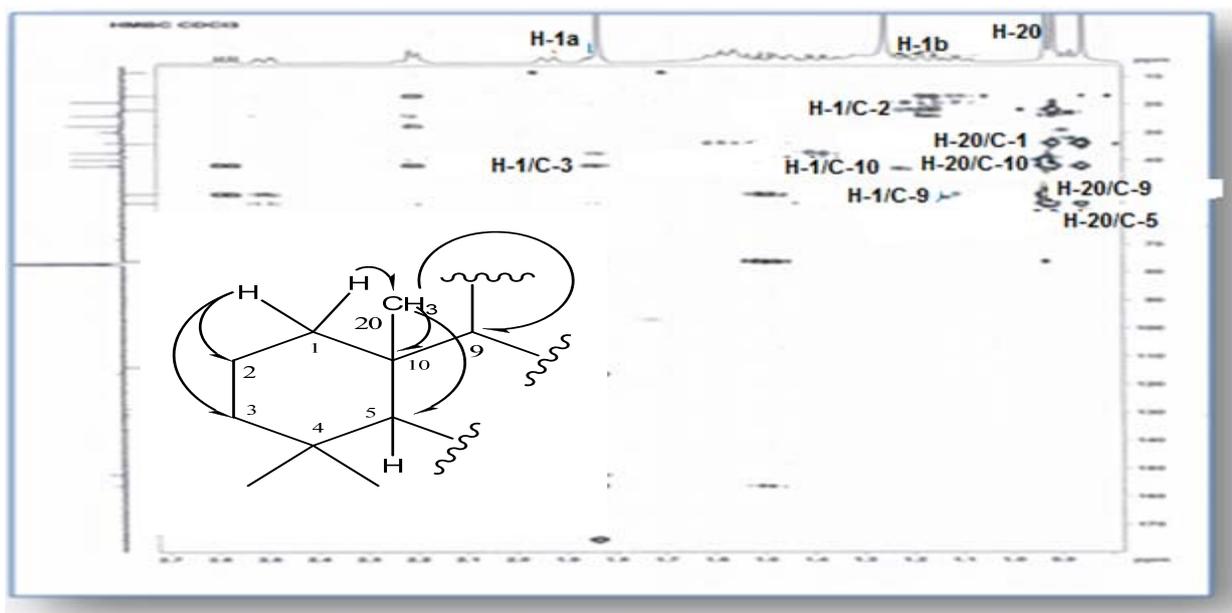


Figure III.2.7: Spectre COSY H-H du composé 2

Leurs carbones sont déterminés à δ_c 39,7 (C-1) et 19,1 (C-2) par HSQC *J*-modulé (Figure III.2.8).

Figure III.2.8: Spectre HSQC *J*-modulé du composé **2**

De plus, les protons H₂-1 couplent en HMBC (Figure III.2.9) avec trois carbones C-2, C-3 et C-20 déjà identifiés, un carbone quaternaire C-10 (41,6 ppm) et un carbone méthine C-9 (51,9 ppm). Aussi, les protons méthyliques Me-20 corrélient en HMBC avec les carbones C-1, C-9, C-10 et C-5.

Figure III.2.9: Spectre HMBC du composé **2**

L'analyse du spectre COSY (Figures III.2.10 et III.2.11) permet de visualiser un autre système de spins à cinq protons. En effet, le proton H-5 couple avec deux protons H₂-6 résonant à 1,86 ppm (H-6a, m) et 1,44 ppm (qd, $J = 13,0$ et $4,1$ Hz, H-6b), qui à leur tour corrélient avec

les protons vicinaux H₂-7 détectés à δ_H 2,53 (ddd, $J = 13,0, 4,1$ et $1,6$ Hz, H-7a) et 2,25 (m, H-7b).

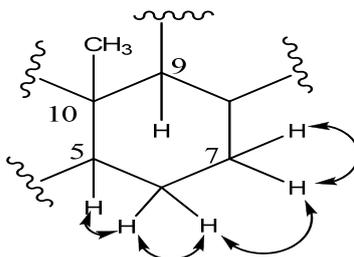


Figure III.2.10: Corrélations COSY H-H

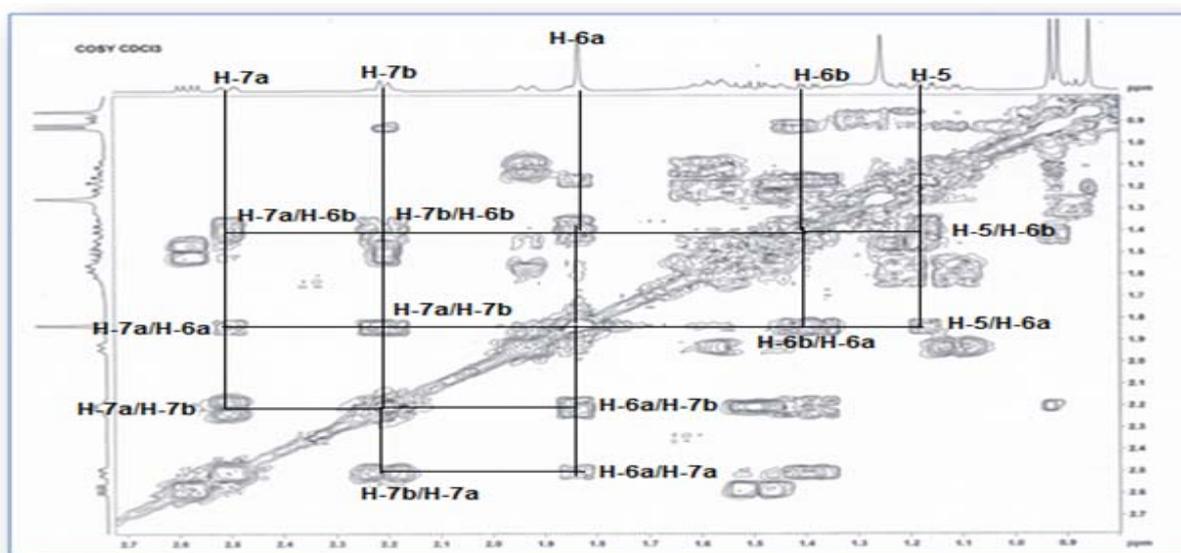


Figure III.2.11: Spectre COSY H-H du composé 2

Leurs carbones résonnent respectivement à 23,8 (C-6) et 37,2 ppm (C-7) selon l'expérience HSQC J -modulé (Figure III.2.12).

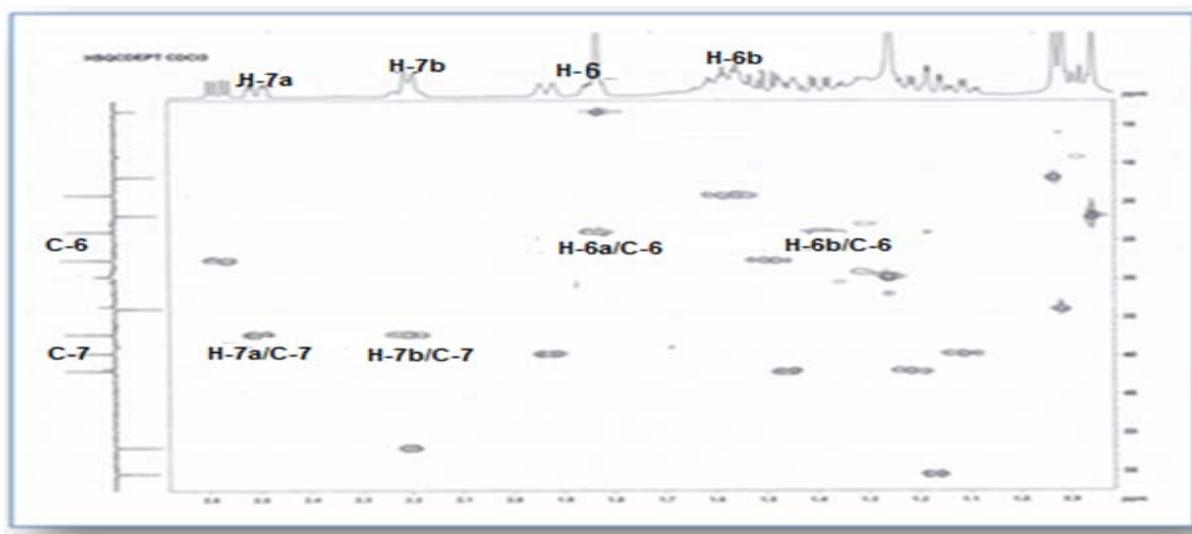
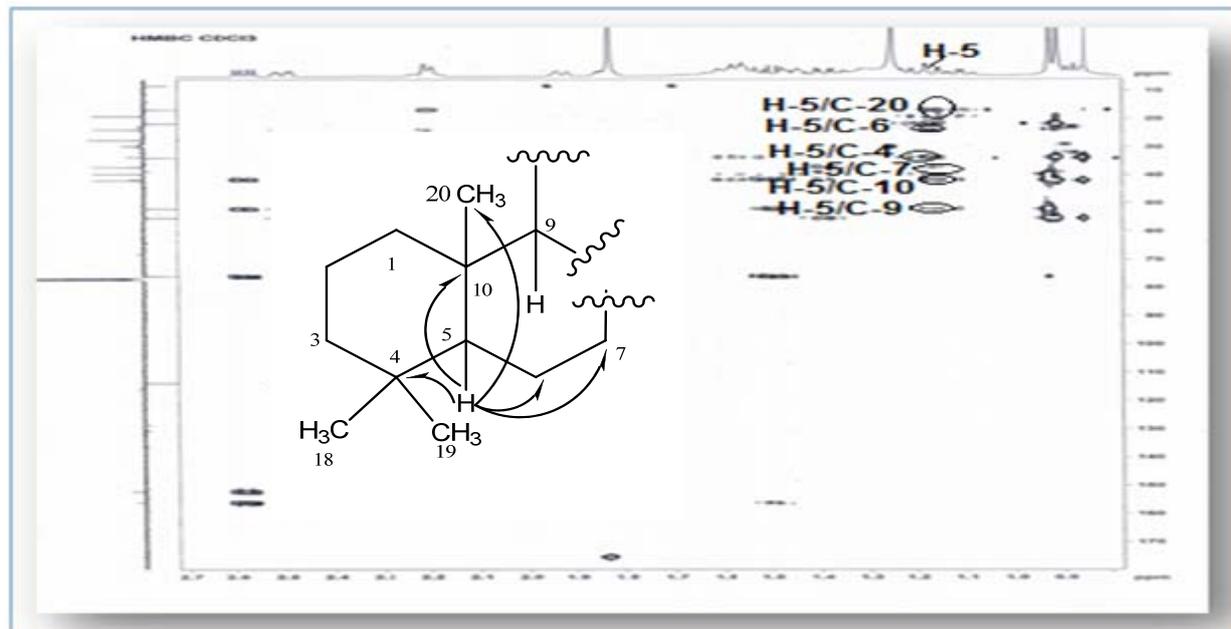
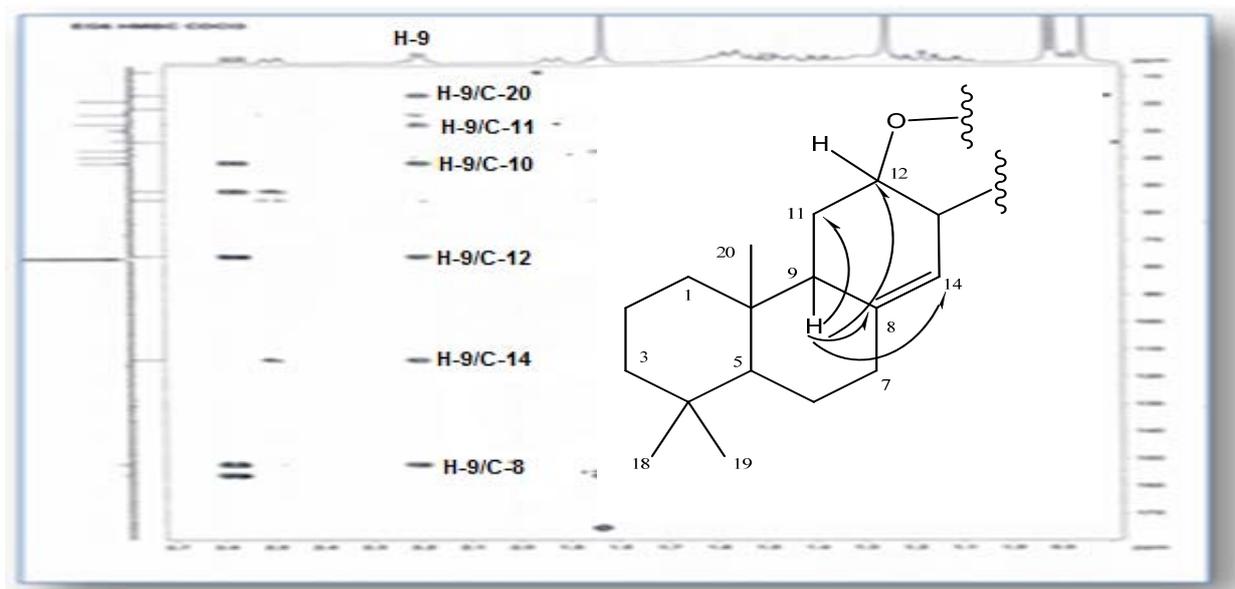


Figure III.2.12: Spectre HSQC J -modulé du composé 2

Sur le spectre HMBC, le proton H-5 couple avec les carbones C-6, C-7, C-9, C-10 et C-20 (Figure III.2.13).



En HMBC (Figure III.2.14), le proton H-9 repéré à δ_H 2,23 (dtl, $J = 8,0$ et $2,0$ Hz) par analyse HSQC corrèle en 2J et 3J avec les carbones C-10 et C-20 attribués précédemment et un carbone méthylène à δ_C 27,6 (C-11). Ce proton (H-9) couple également en HMBC avec un carbone méthine déblindé à 76,0 ppm (C-12) lié à un oxygène (C-12), et deux carbones éthyléniques à 152,2 ppm (Cq, C-8) et 113,9 ppm (CH, C-14).



L'analyse HSQC J -modulé (Figure III.2.15) permet d'identifier les protons H₂-11 à δ_{H} 2,60 (dd, $J = 13,5$ et $6,1$ Hz, H-11a) et 1,54 (td, $J = 13,5$ et $8,5$ Hz, H-11b). Le proton H-14 présente en HMBC (Figure III.2.16) des taches de corrélation en 2J et 3J avec C-7, C-9, C-12 et le carbone éthylénique C-13 (156,2 ppm). Ce dernier corrèle à son tour en HMBC avec les protons H₂-11.

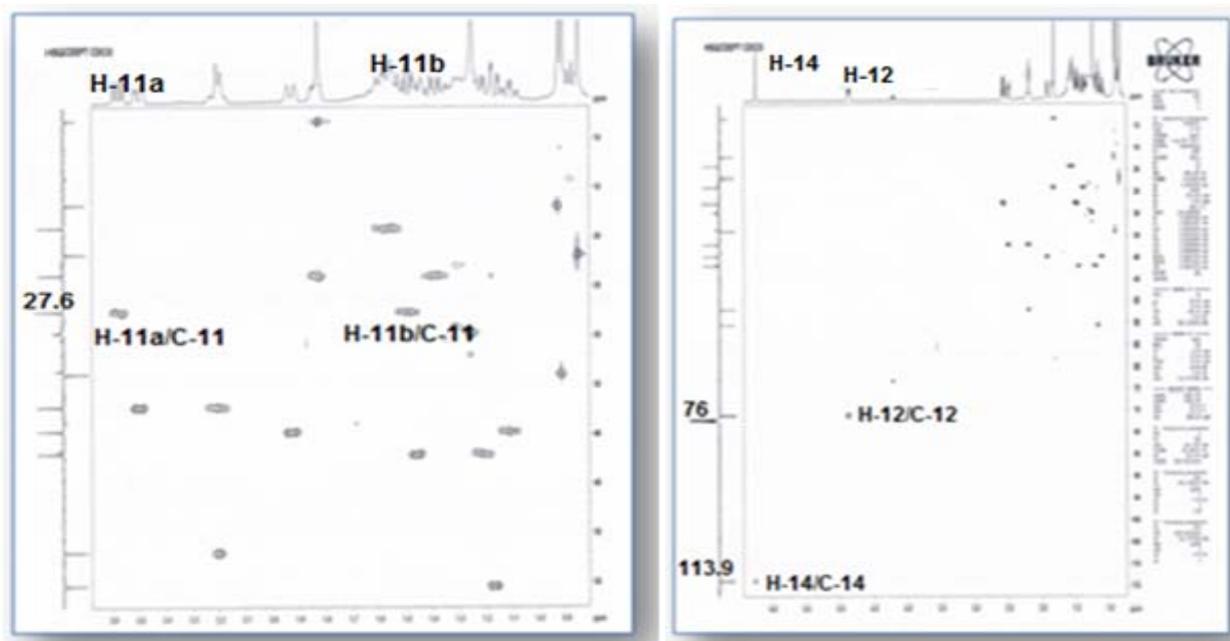


Figure III.2.15: Spectre HSQC J -modulé du composé 2

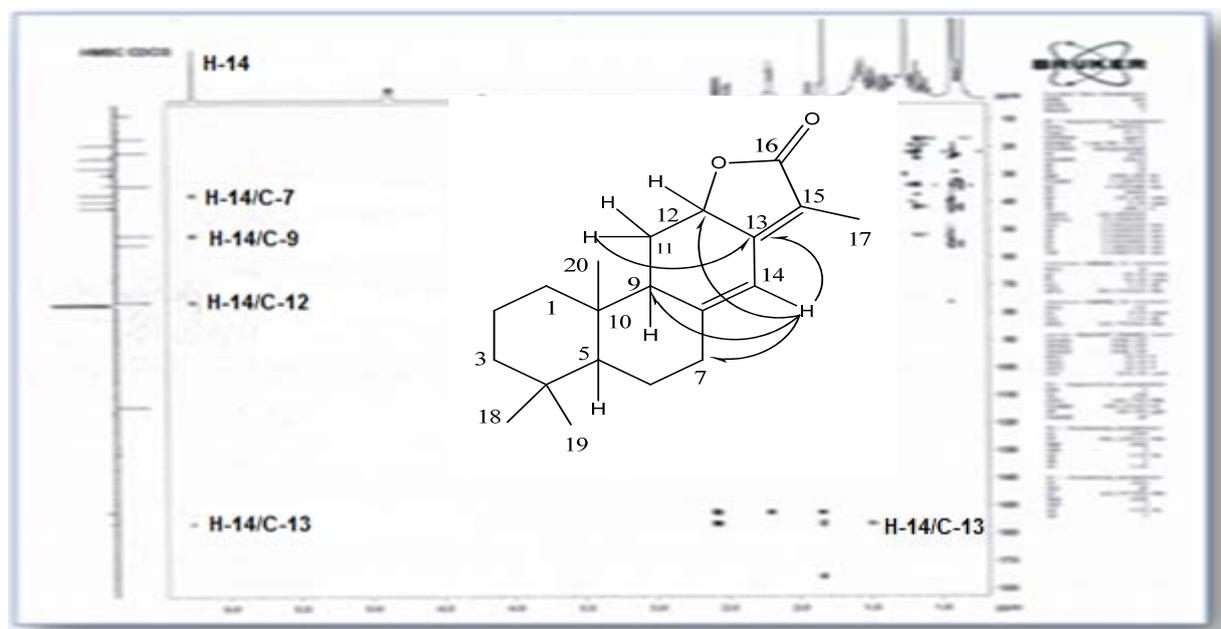


Figure III.2.16: Spectre HMBC du composé 2

Les protons méthyliques Me-17 déblindés à 1,87 ppm par rapport aux autres protons méthyliques (Me-18, Me-19 et Me-20) montrent en 2J et 3J en HMBC (Figure III.2.17) des

corrélations avec les carbones éthyléniques C-13 (156,2 ppm) et C-15 (116,2 ppm) et un carbone quaternaire à δ_c 176,0 (C-16) caractéristique de la fonction carbonyle lactone. Ces signaux indiquent la présence d'un noyau γ -lactone α,β insaturée en comparaison avec les données de la littérature [95,96].

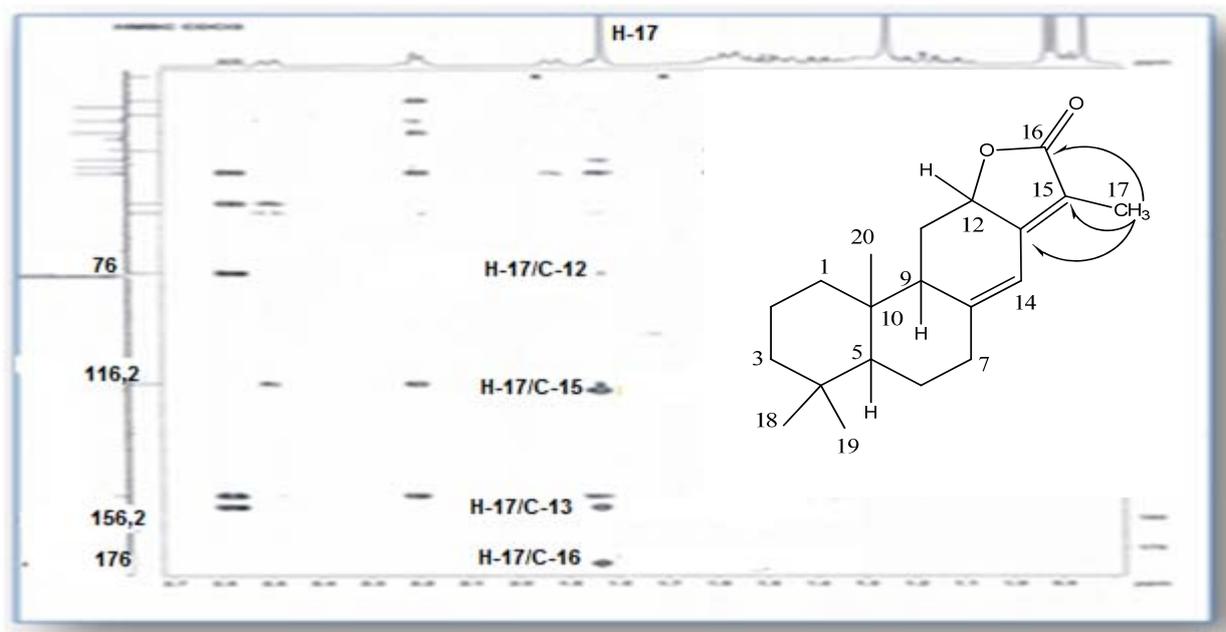


Figure III.2.17: Spectre HMBC composé **2**

A l'issue de cette analyse, tous les protons et carbones de ce composé **2** ont été identifiés (Tableau III.2).

La stéréochimie du composé **2** est assignée en analysant les taches de corrélation observées sur le spectre NOESY (Figures III.2.18 et III.2.19) entre le proton H-12 α orienté et les protons du méthyle Me-20. La grande constante de couplage ($J = 13$ Hz) entre le proton H-5 et l'un des protons H₂-6 indique que le proton H-5 est β -axial. La corrélation observée entre le proton H-5 β et les protons Me-18 et H-9, impliquent que tous ces protons sont β -orientés. L'absence d'une tache de corrélation entre le méthyle Me-20 α -axial et le proton H-5 qui est en position β montre bien que la jonction (C-5 et C-10) entre les deux cycles A et B est *trans*. Toutes ces corrélations indiquent que ce diterpène appartient à la série *ent* (Me-20 α , H-5 β et H-9 β). D'autres effets NOE sont visualisés entre les protons H-11a/H-12 α , H-11b/H-12 α , H-11a/H-1b, H-11a/H-9 β , H-9 β /H-11b, H-1a/H-2a, H-3a/Me-18 β , H-3a/Me-19 α , H-7b/H-5 β , H-6b/H-5 β , H-6b/Me-18 β , H-7a/H-14 et H-14/Me-17. La mesure du pouvoir rotatoire dans CHCl₃ [α]_D²⁰ = +328,4° (c 0,34 g/100 ml) indique que la configuration absolue des carbones asymétriques est comme suit : 5*S*, 9*S*, 10*R* et 12*R*.

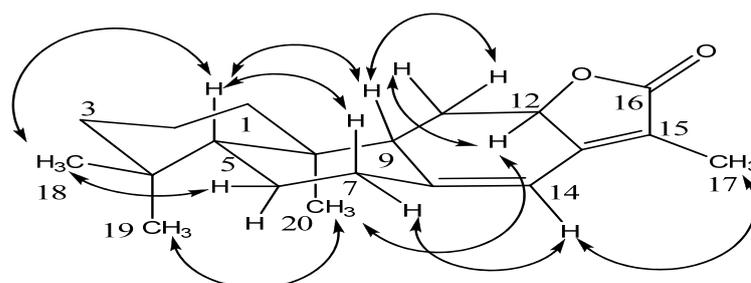


Figure III.2.18: Principales corrélations NOESY observées pour le composé 2

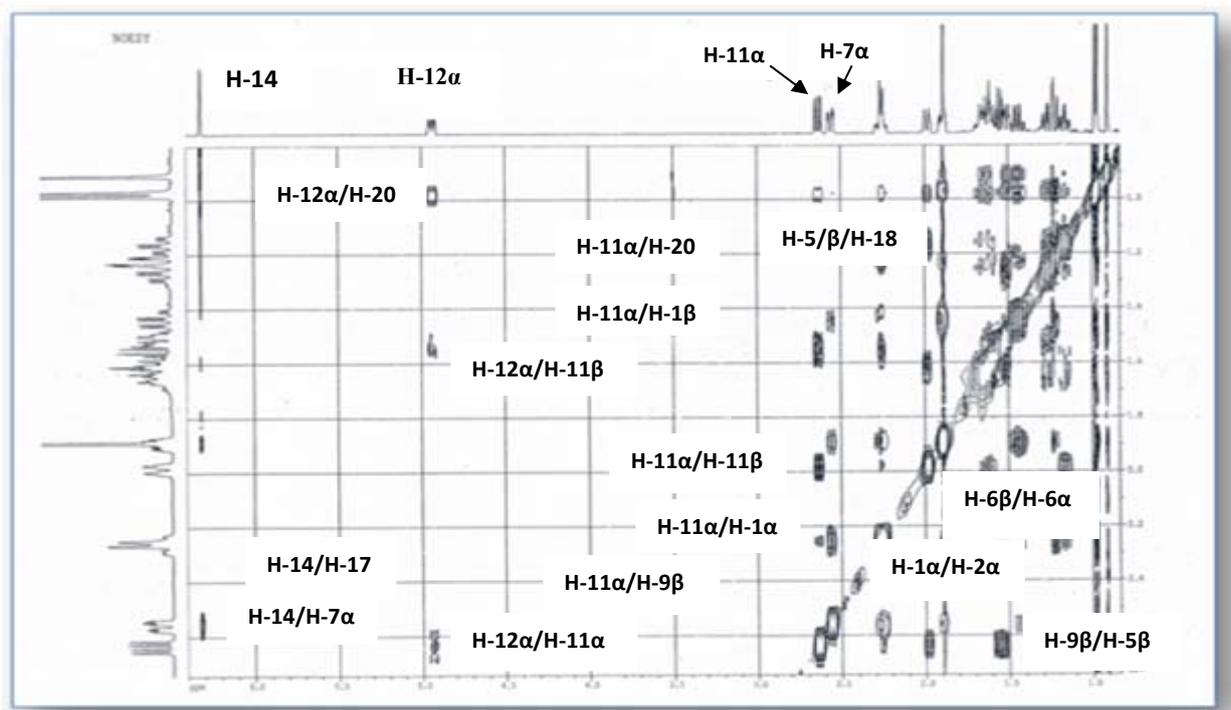


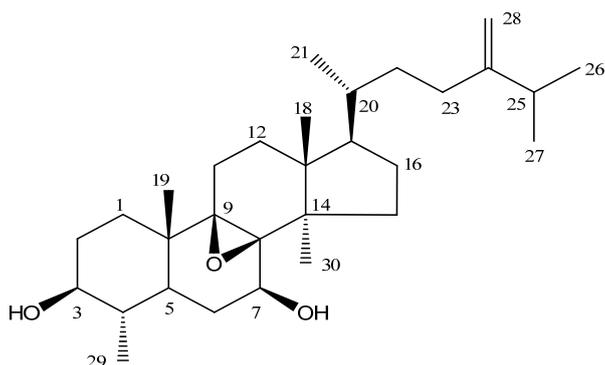
Figure III.2.19: Spectre NOESY du composé 2

A l'issue de cette analyse, la structure du composé 2 correspond à *ent*-abiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12-olide. Ce composé a été identifié antérieurement dans les espèces suivantes : *E. guyoniana* [9], *E. retusa* [8], *E. fidjiana* [95], *E. characias* [96], *E. calyptrata* [97] et *E. jolkinii* [98]. Les données spectroscopiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C sont résumées dans le tableau suivant (Tableau III.2).

Tableau III.2: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé 2 dans CDCl_3 .

Position	δ_{H} (m, J Hz)	Orientation	δ_{C}
1	1,16 td 12,7, 4,2 H-1b	β	39,7
	1,96 dm 12,7 H-1a	α	

Position	δ_H (m, J Hz)	Orientation	δ_C
2	1,56 m H-2b	β	19,1
	1,62 m H-2a	α	
3	1,24 td 13,1, 4,5 H-3b	β	42,0
	1,49 dm 13,1 H-3a	α	
4	-	-	33,6
5	1,20 dd 13,0, 2,4	β	55,3
6	1,44 qd 13,0, 4,1 H-6b	α	23,8
	1,86 m H-6 a	β	
7	2,25 m H-7b	β	37,2
	2,53 ddd 13,0, 4,1, 1,6 H-7a	α	
8	-	-	152,2
9	2,23 dtl 8,0, 2,0	β	51,9
10	-	-	41,6
11	1,54 td 13,5, 8,5 H-11b	β	27,6
	2,60 dd 13,5, 6,1 H-11a	α	
12	4,91 dq 13,5, 6,1, 1,1	α	76,0
13	-	-	156,2
14	6,30 sl	-	113,9
15	-	-	116,2
16	-	-	176,0
17	1,87 d 1,2	-	8,2
18	0,92 s	β	33,9
19	0,86 s	α	21,8
20	0,94 s	α	16,8

III.7.3. Détermination structurale du composé **3**

3 β ,7 β -dihydroxy-4 α ,14 α -diméthyl-8 β ,9 β -époxy-5 α -ergosta-24(28)-ène (**3**)

Le composé **3** a été obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le CHCl₃. Il est invisible à la lumière UV 254 nm et se révèle en mauve par l'acide sulfurique et chauffage. Ce composé nommé 3 β ,7 β -dihydroxy-4 α ,14 α -diméthyl-8 β ,9 β -époxy-5 α -ergosta-24(28)-ène a été isolé pour la première fois dans le règne végétal.

L'analyse en spectrométrie de masse ESI-MS (Figure III.3.1) du composé **3** montre un pic d'ion quasi-moléculaire à $m/z = 481$ [M+Na]⁺, correspondant à une masse moléculaire M = 458 uma et une formule brute en C₃₀H₅₀O₃ avec un nombre d'insaturation égal à 6 traduisant sa nature triterpénique.

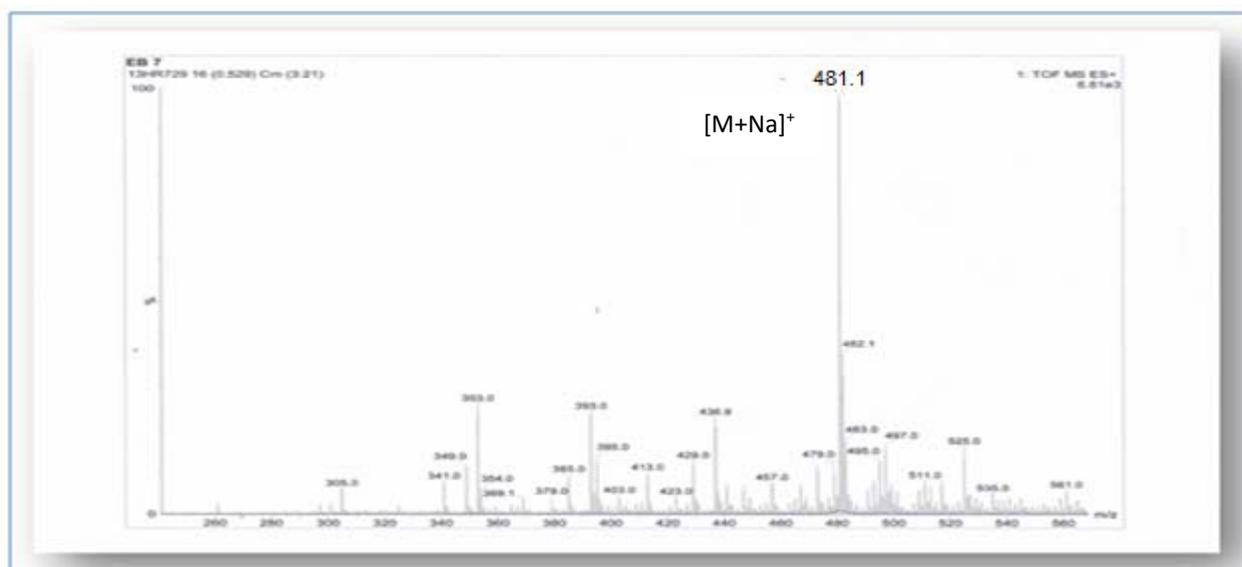


Figure III.3.1: Spectre de masse ESI-MS du composé **3**

Le spectre IR du produit **3** indique la présence des bandes d'absorption à 3468 cm⁻¹ (groupement hydroxyle) et 1630 cm⁻¹ (double liaison).

Le spectre RMN ^1H (Figure III.3.2) du composé **3**, enregistré dans le chloroforme deutéré, montre une allure différente par rapport aux composés **1** et **2** déjà identifiés. En effet, il révèle la présence de sept signaux de groupements méthyles des triterpènes résonant à δ_{H} 0,69 (3H, s, Me-18), 1,50 (3H, s, Me-19), 0,96 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, Me-21), 1,05 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, Me-26), 1,06 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, Me-27), 0,98 (3H, d, $J = 6,7$ Hz, Me-29) et 1,23 (3H, s, Me-30).

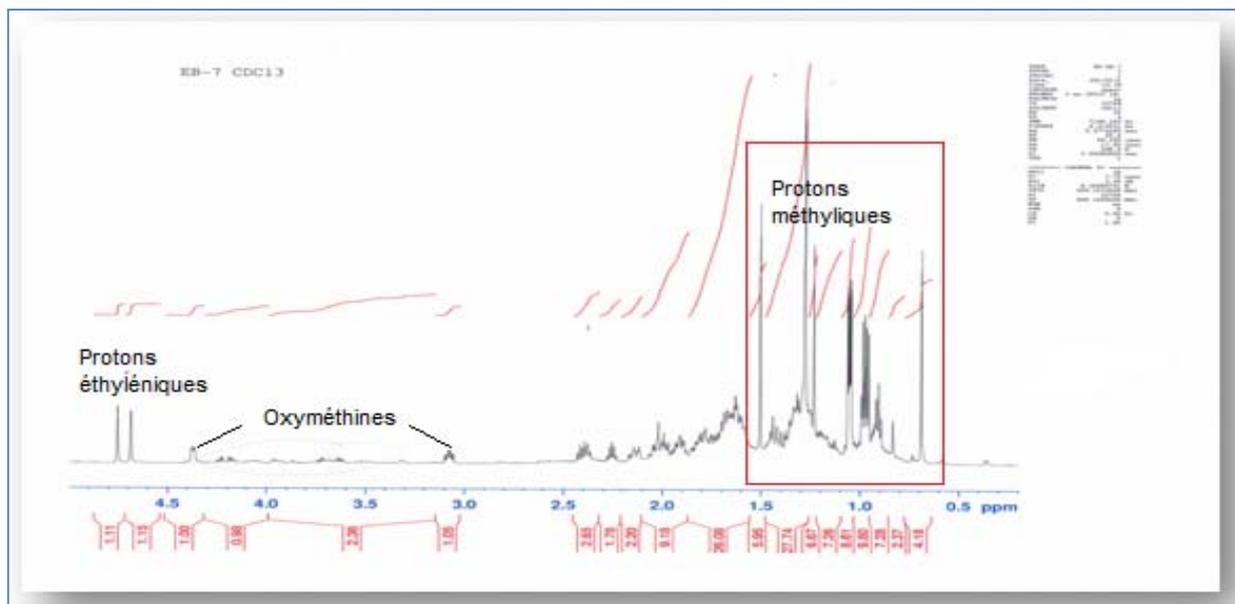


Figure III.3.2: Spectre RMN ^1H du composé **3**

Leurs carbones sont assignés à δ_{C} 16,4 (Me-18), 18,4 (Me-19), 18,7 (Me-21), 21,8 (Me-26), 21,9 (Me-27), 16,1 (Me-29) et 19,5 (Me-30) par analyse du spectre HSQC J -modulé (Figure III.3.3). Ces données spectrales sont caractéristiques de sa nature triterpénique tétracyclique.

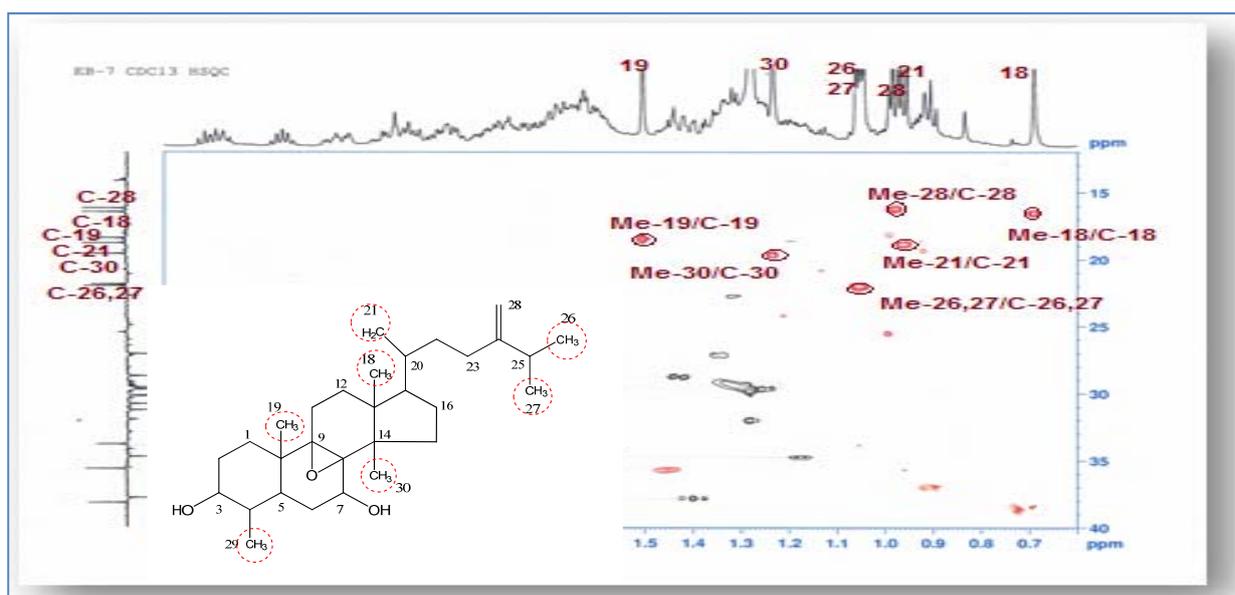


Figure III.3.3: Spectre HSQC J -modulé du composé **3**

Le spectre RMN ^1H montre aussi à champ faible (Figure III.3.2), deux signaux sous forme de triplet de doublets à 3,08 ppm ($J = 10,2, 5,2$ Hz) et de doublet de doublets à 4,37 ppm ($J = 7,5, 3,3$ Hz), correspondant à deux protons oxyméthines. Leurs carbones sont localisés par l'expérience HSQC J -modulé (Figure III.3.4) à 77,2 (C-3), 80,5 (carbone oxyméthine) ppm. Les déplacements chimiques à $\delta_{\text{H}} 3,08/\delta_{\text{C}} 77,2$ sont attribués au groupement hydroxyméthine CHO-3.

Dans la zone déblindée du spectre RMN ^1H (Figure III.3.2), il est repéré aussi deux signaux sous forme de deux doublets ($J = 0,9$ Hz) d'intégration 1H chacun à 4,76 et 4,69 ppm attribuables respectivement aux protons oléfiniques géminés H-28a et H-28b, qui couplent sur le spectre HSQC J -modulé (Figures III.3.4 et III. 3.5) avec le même carbone résonant à $\delta_{\text{C}} 106,1$ (C-28).

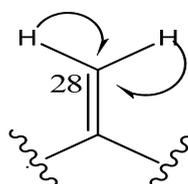


Figure III.3.4: Corrélations HSQC des protons H₂-28

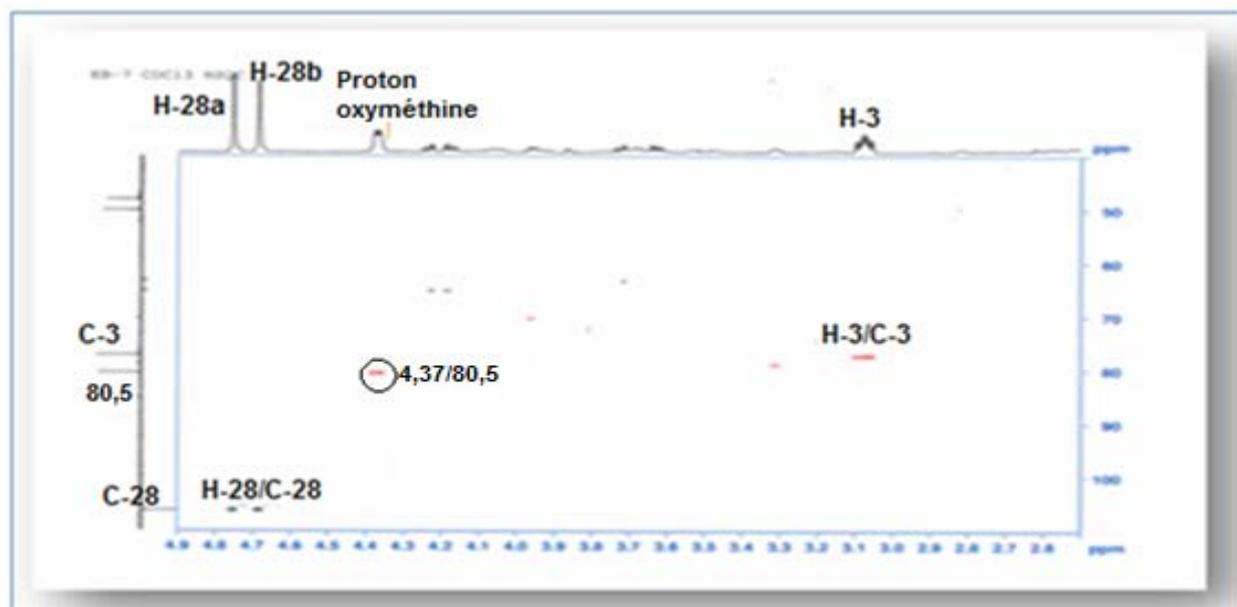


Figure III.3.5: Spectre HSQC J -modulé du composé **3** (partie déblindée)

A partir des protons caractéristiques et attribués précédemment, l'expérience COSY H-H (Figure III.3.6) montre les couplages des protons oléfiniques H-28a et H-28b avec le proton

résonant à 2,26 ppm H-25 (couplage allylique), son carbone est localisé par l'expérience HSQC *J*-modulé (Figure III.3.7) à δ_c 33,8 (C-25).

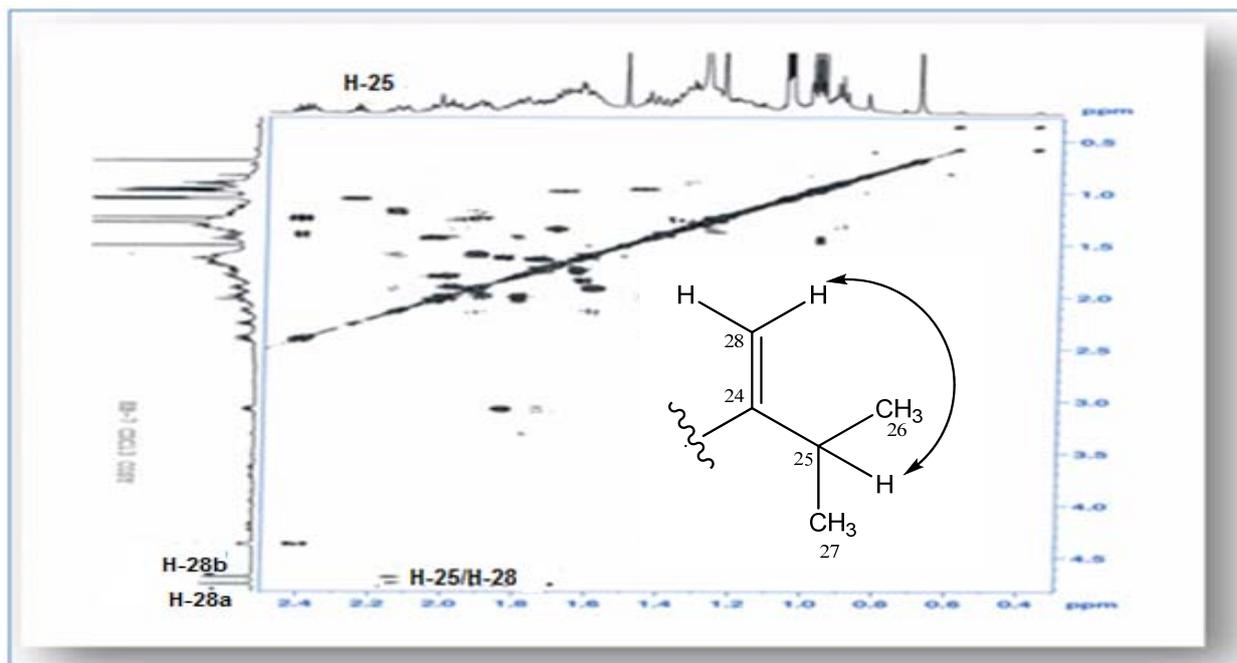


Figure III.3.6: Spectre COSY H-H du composé **3** montrant le couplage allylique (H₂-28/H-25)

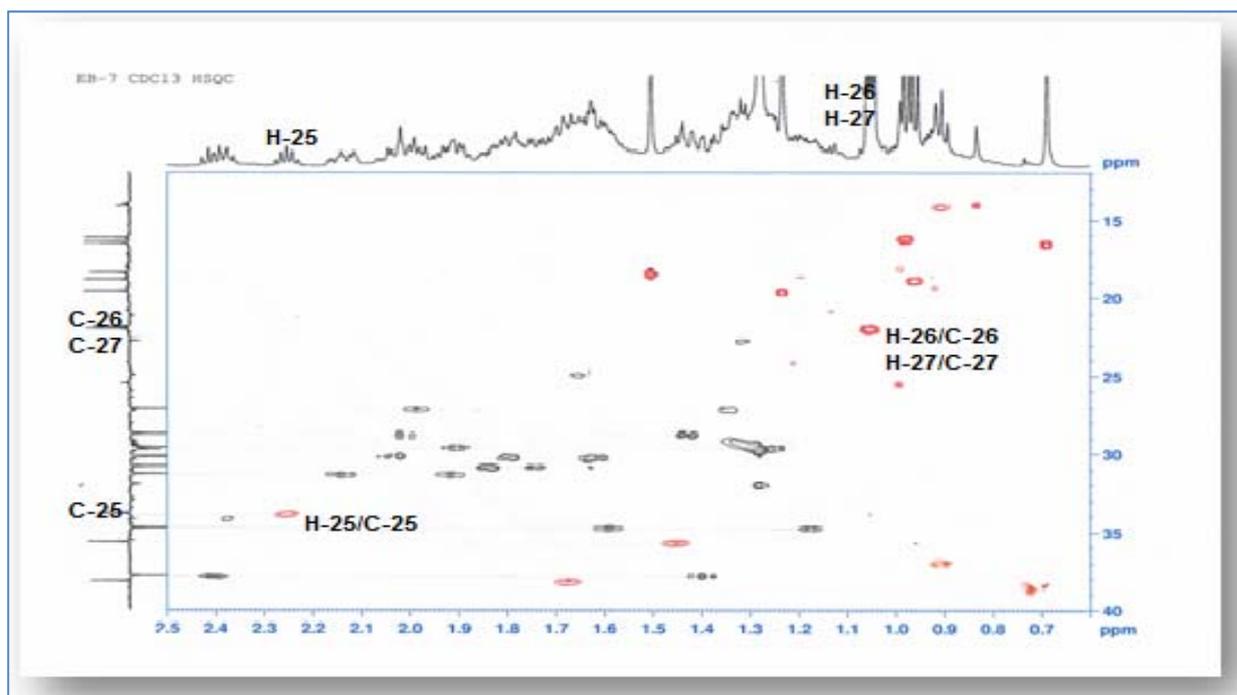


Figure III.3.7: Spectre HSQC *J*-modulé du composé **3**

Ce dernier corrèle (C-25) sur le spectre HMBC (Figures III.3.8 et III.3.9) avec des protons de deux groupements méthyles correspondant aux Me-26 (1,05 ppm) et Me-27 (1,06 ppm) ainsi qu'avec les protons H₂-28. Les carbones méthyliques Me-26 et Me-27 sont attribués par HSQC

J-modulé (Figure III.3.7) à δ_c 21,8 et 21,9 respectivement. Aussi, ces protons méthyliques (Me-26 et Me-27) corrélient en HMBC (Figure III.3.9) avec un carbone quaternaire à 156,5 ppm ne pouvant être que le carbone C-24.

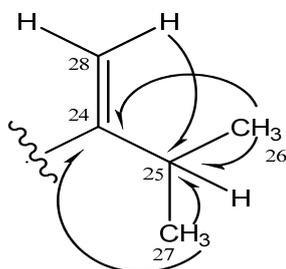
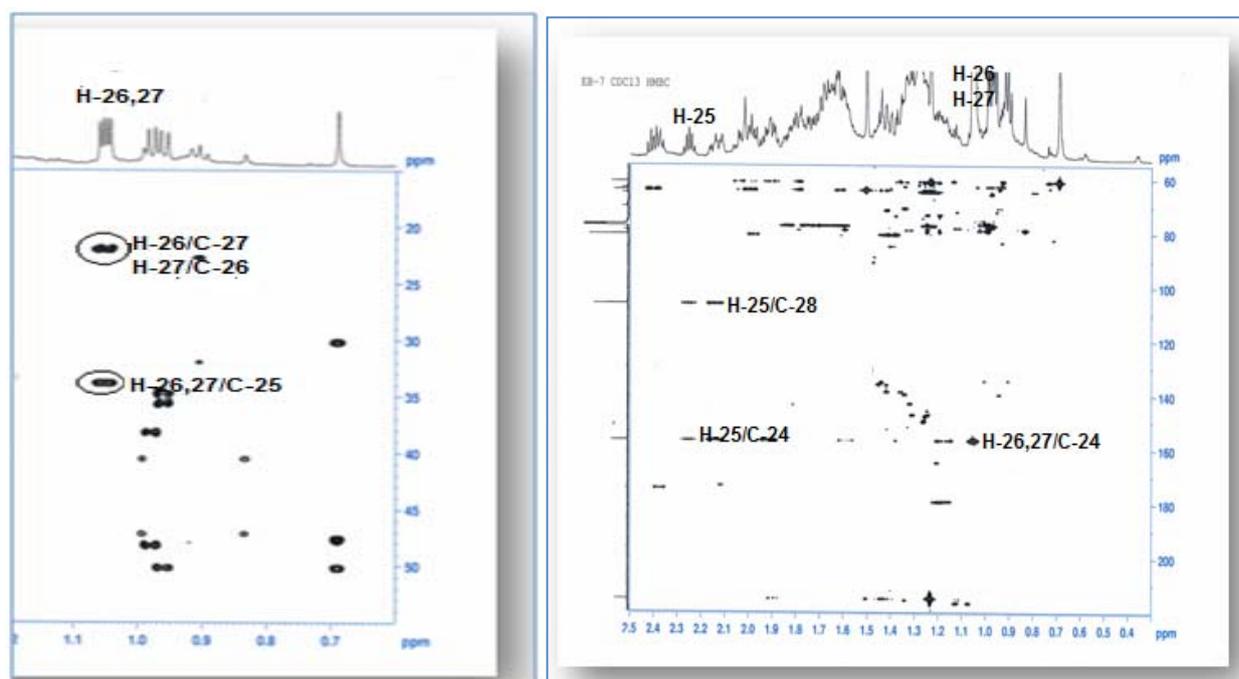


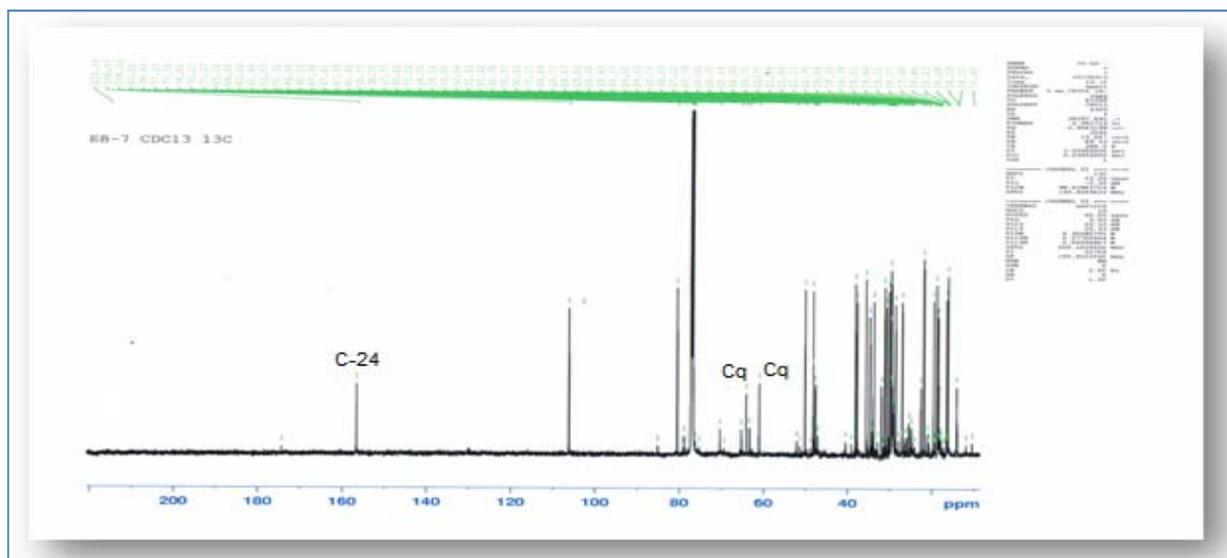
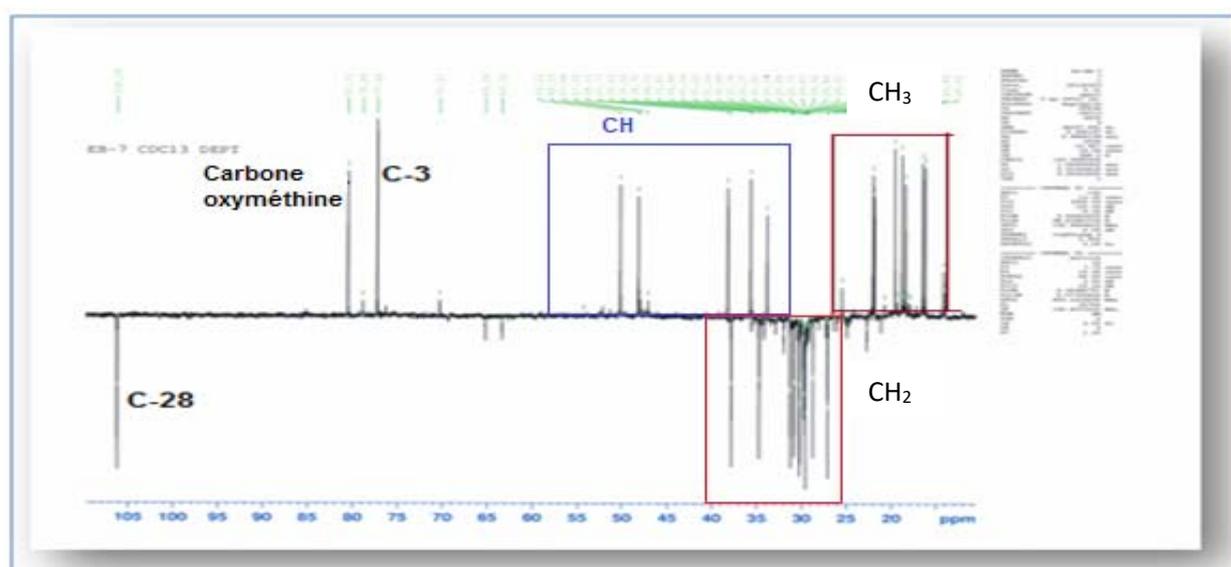
Figure III.3.8: Corrélations HMBC

Figure III.3.9: Spectres HMBC du composé **3**

Ce fragment structural est souvent rencontré dans les composés triterpéniques tétracycliques de type cycloartanol [10,99,100].

Il est à signaler l'absence des signaux des protons H₂-19 du noyau cyclopropane (C-9, C-19) des composés 9 β ,19-cyclostérol observé habituellement dans la zone fortement blindée de 0,20 à 0,70 ppm [101,102].

De plus, les spectres RMN ¹³C découplé et DEPT (Figures III.3.10 et III.3.11) indique la présence de 30 signaux se répartissant en 7 méthyles, 10 méthylènes, 7 méthines et 6 carbones quaternaires.

Figure III.3.10: RMN ^{13}C découplé du composé **3**Figure III.3.11: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **3**

Le nombre de méthyles égale à 7 visualisés sur le spectre RMN ^1H (Figure III.3.2) dont 4 méthyles présentant une multiplicité sous forme de doublet, suggère l'appartenance de ce composé aux triterpènes tétracycliques à squelette ergostane (Figure III.3.12) [48,103,104].

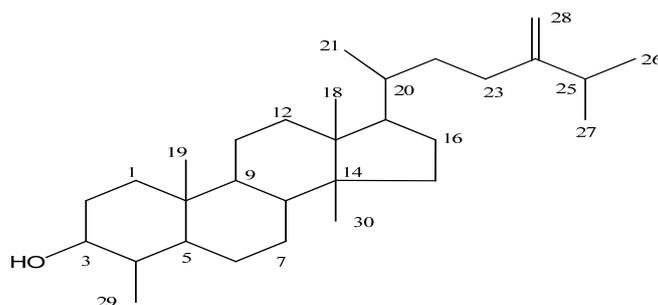


Figure III.3.12: Squelette ergostane

Partant du proton oxyméthine H-3 (3,08 ppm), le spectre COSY (Figure III.3.13) indique les couplages scalaires entre les protons : H-3/H₂-2 (δ_H 1,84 H-2a ; 1,74 H-2b)/H₂-1 (δ_H 1,63 H-1a ; 1,61 H-1b), H-3/H-4 (δ_H 1,67)/Me-29 (δ_H 0,98) et H-4/H-5 (δ_H 1,23).

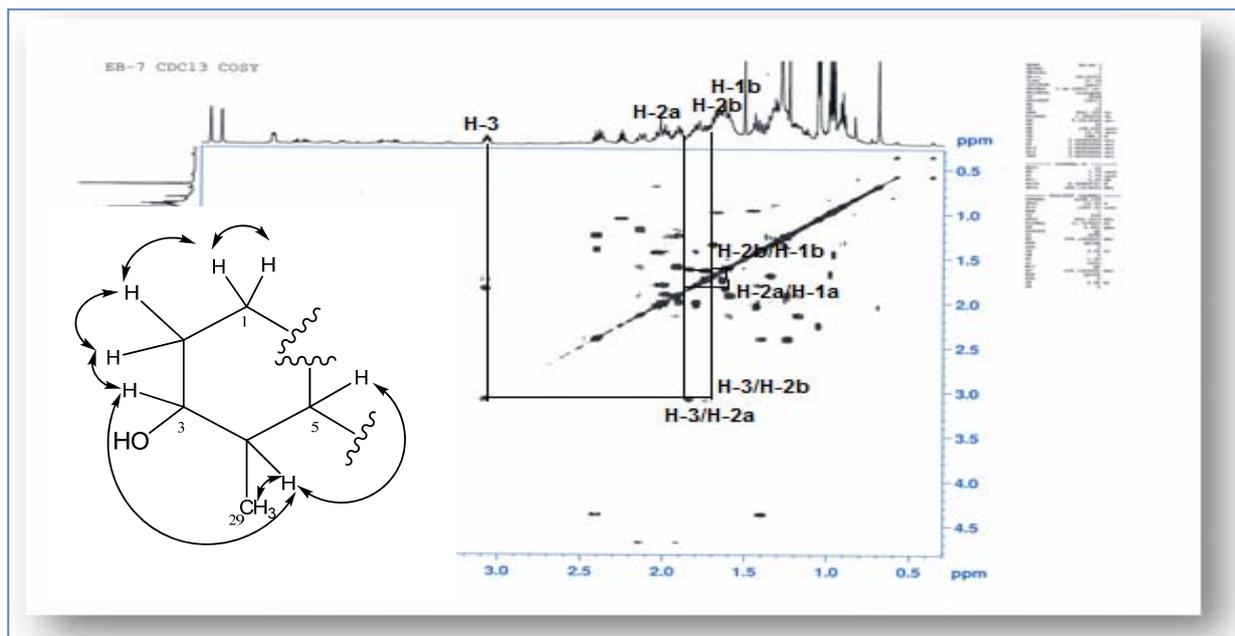


Figure III.3.13: Spectre COSY H-H du composé **3**

L'expérience HSQC *J*-modulé (Figure III.3.14) permet de détecter les carbones de cet enchaînement à δ_C 30,2 (C-1), 30,7 (C-2), 38,1 (C-4), 47,9 (C-5) et 16,1 (Me-29).

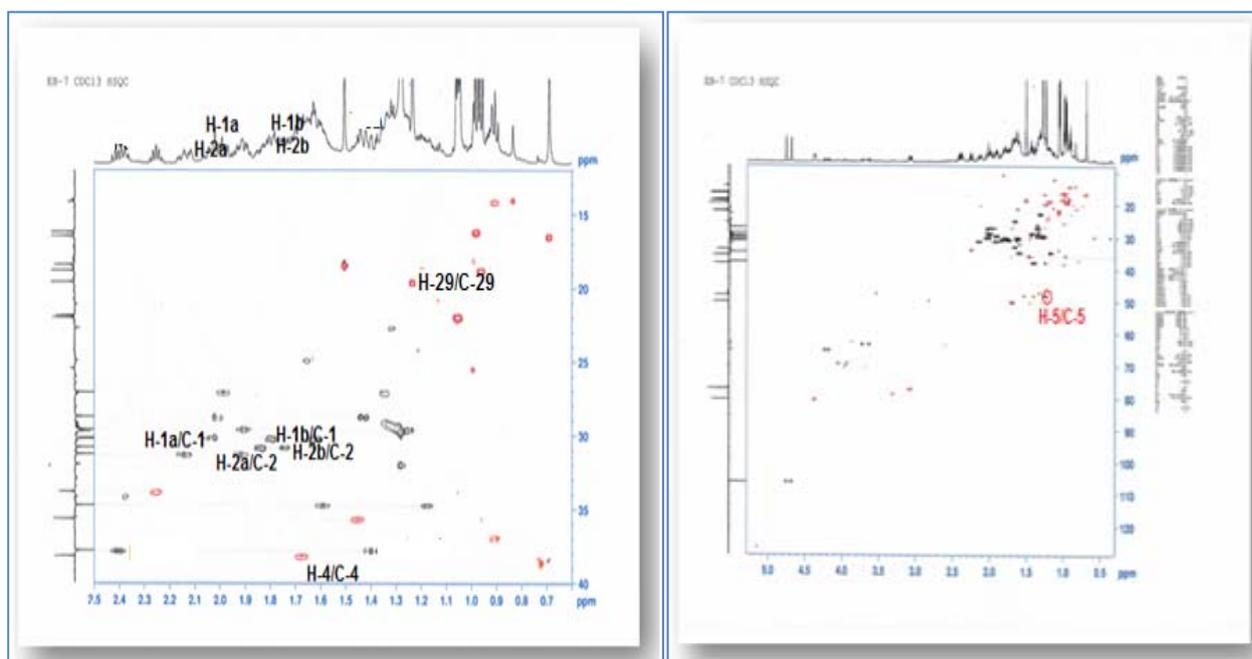


Figure III.3.14: Spectres HSQC *J*-modulé du composé **3**

Les grandes valeurs de constantes de couplage entre le proton H-3 (td, $J = 10,2, 5,2$ Hz) et les protons H₂-2 et H-4 impliquent une relation *trans*-diaxiale entre les protons H-3/H-2b et H-3/H-4 et une position *cis*-axiale-équatoriale entre les protons H-3/H-2a. Par conséquent, le groupement hydroxyle OH-3 est en position β-équatoriale (Figure III.3.15).

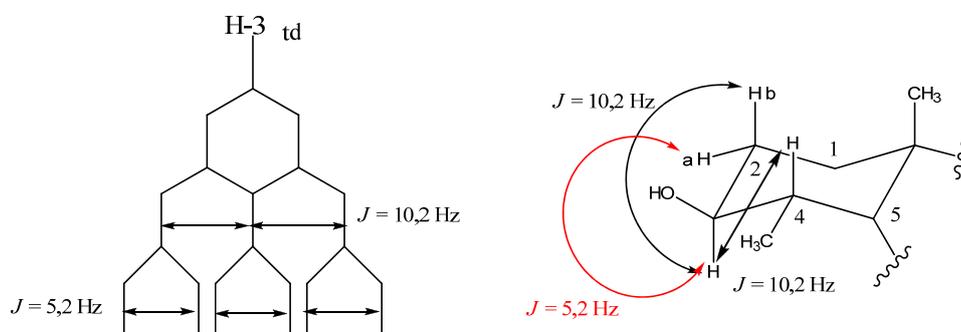


Figure III.3.15: Couplages COSY du proton hydroxyméthine H-3

L'expérience HMBC (Figures III.3.16 et III.3.17) conduit à l'établissement des couplages H/C longue distance en 2J et 3J , permettant l'identification d'un grand nombre de carbones. En effet, le spectre HMBC montre les corrélations entre le proton H-4 et les carbones C-2, C-3, C-5 et Me-29 déjà assignés et un carbone quaternaire résonant à δ_C 48,1 correspondant au carbone C-10. Ce spectre met aussi en évidence la corrélation des protons H₂-1 avec un méthyle à (δ_C 18,4/ δ_H 1,50) attribuable au Me-19 lié au carbone C-10 et avec un carbone quaternaire déblindé à 64,0 ppm qui ne peut être que le carbone C-9. Le déblindage de ce dernier indique que le carbone C-9 est oxygéné. Toutes ces corrélations conduisent à former le cycle A de ce composé (Figure III.3.16).

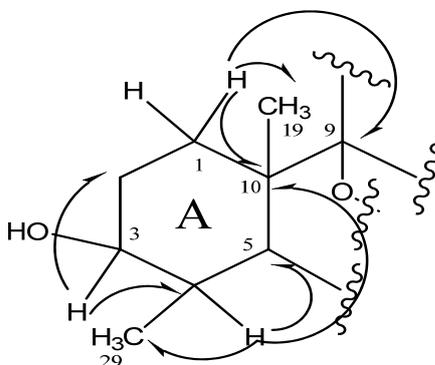
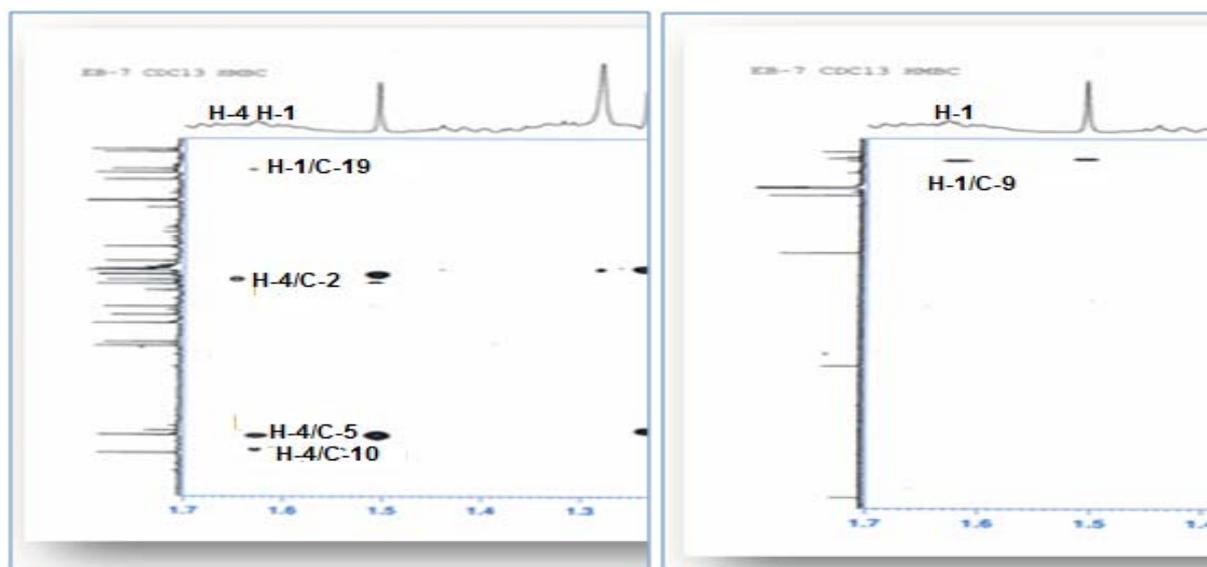
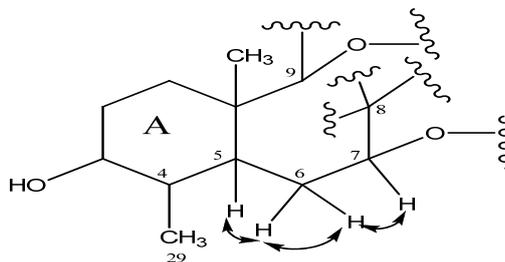
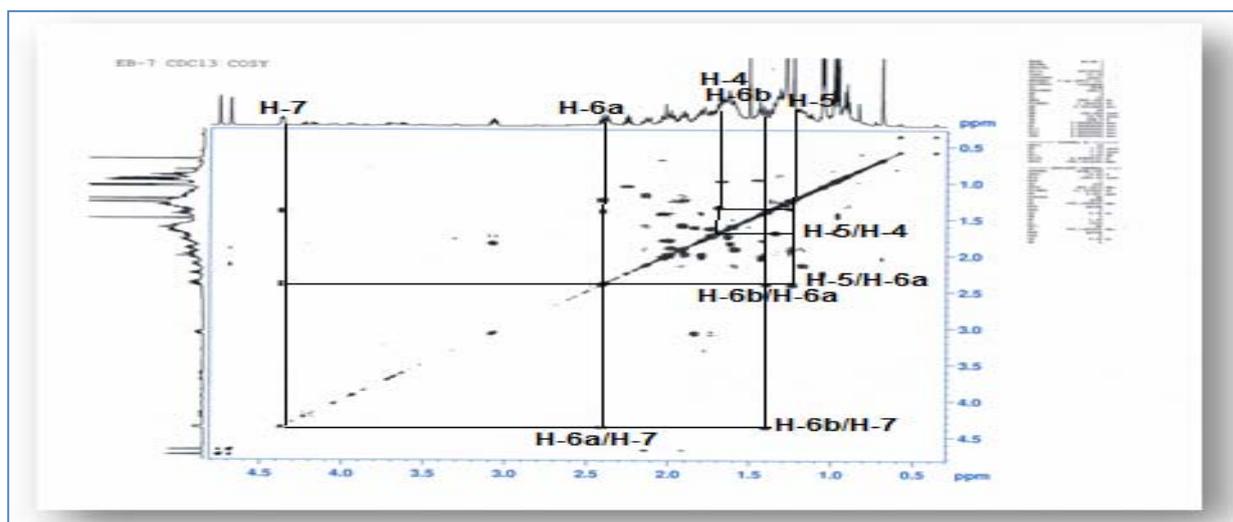


Figure III.3.16: Corrélations HMBC du composé **3** au niveau du cycle A

Figure III.3.17: Spectres HMBC du composé **3**

A partir du proton H-5 déjà assigné, le spectre COSY (Figures III.3.18 et III.3.19) montre un système de spins à 4 protons formant l'enchaînement $-^5\text{CH}-^6\text{CH}_2-^7\text{CHOH}-$ et permet d'attribuer les protons couplés à δ_{H} 1,40 (m, H-6b), 2,40 (dt, $J = 13,6; 7,5$ Hz, H-6a), et 4,37 (dd, $J = 7,5; 3,3$ Hz, H-7).

Figure III.3.18: Corrélations COSY H-H du composé **3** montrant les couplages au niveau du cycle BFigure III.3.19: Spectre COSY H-H du composé **3**

Ces protons présentent en HSQC J -modulé (Figure III.3.20) des corrélations directes $^1J_{H/C}$ avec les carbones résonant à 37,7 ppm (C-6) et 80,5 ppm (C-7). Le déplacement chimique du carbone C-7 indique qu'il est oxygéné. La multiplicité du proton H-7 sous forme de doublet de doublets ($J = 7,5$ et $3,3$ Hz) laisse supposer que le carbone adjacent C-8 est substitué (quaternaire).

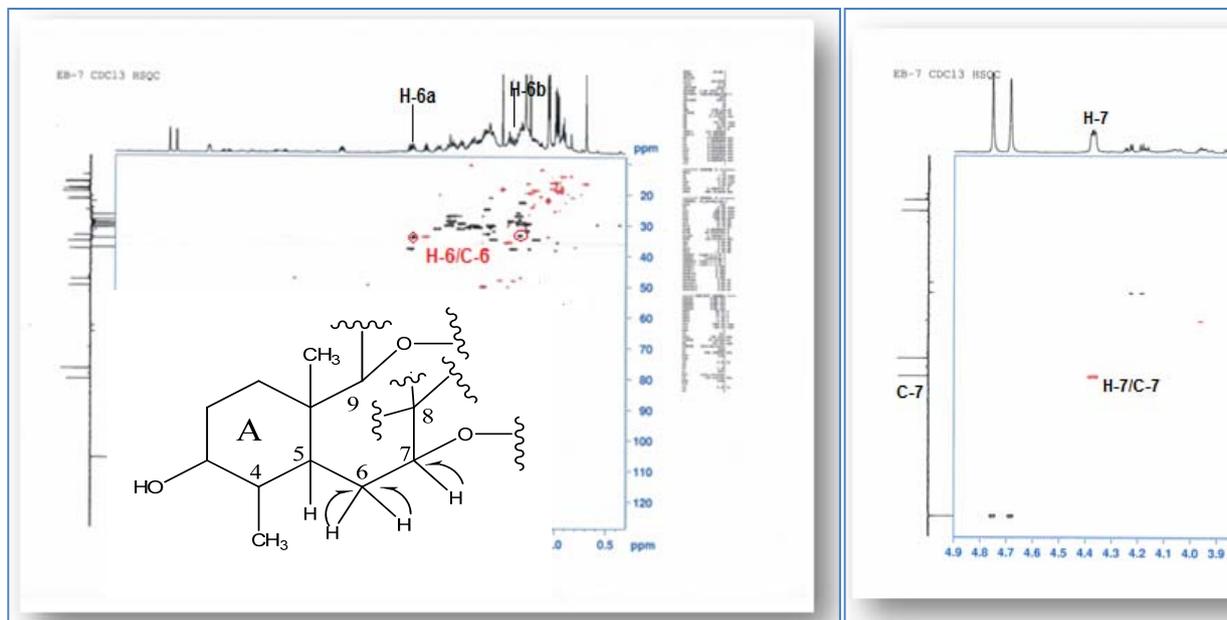


Figure III.3.20: Spectres HSQC J -modulé du composé **3**

Le proton H-7 corrèle en HMBC (Figure III.3.21) avec les carbones C-5 et C-6 déjà attribués et avec un carbone quaternaire déblindé résonant à 60,9 ppm, correspondant au carbone C-8 oxygéné. Cette analyse nous permet la formation du 2^{ème} cycle B de ce triterpène.

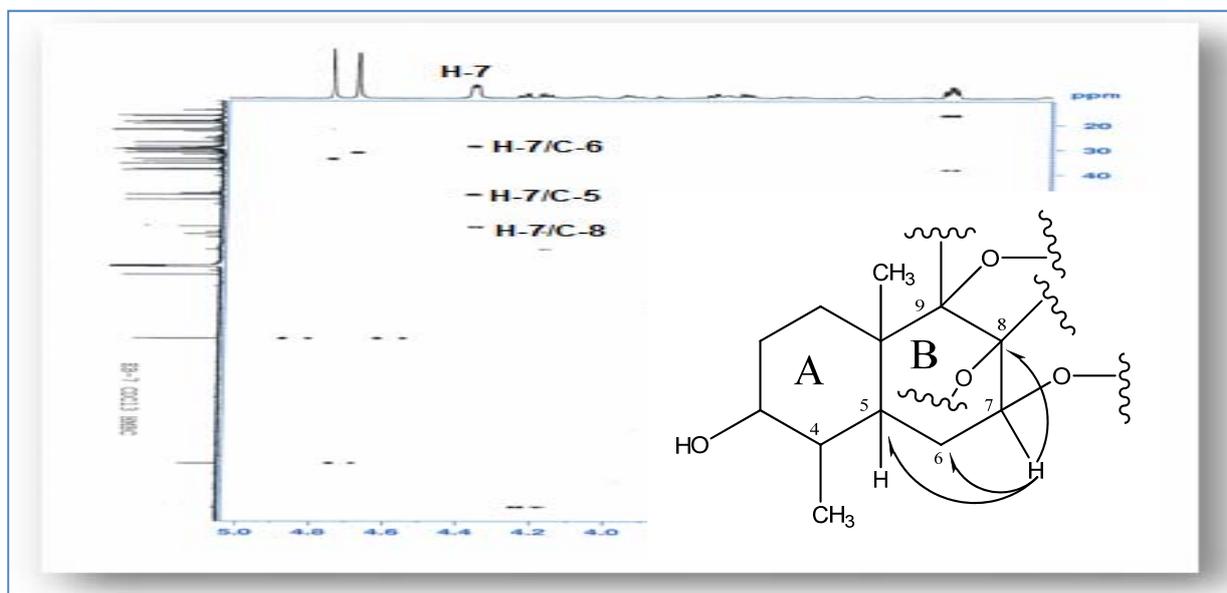


Figure III.3.21: Spectre HMBC du composé **3**

Il est observé également sur le spectre HMBC (Figure III.3.22) les corrélations du carbone quaternaire oxygéné C-9 avec les protons du groupement méthyle Me-19 et les protons résonnant à 1,43 et 2,10 ppm (H₂-11) et du carbone C-8 avec les protons méthyliques Me-30 et les protons situés à 1,26 et 1,91 ppm (H₂-15). Ceci permet de confirmer les déplacements chimiques des carbones C-8 à 60,9 et C-9 à 64,0 ppm caractéristiques d'une substitution par des atomes d'oxygène en positions C-8 et C-9 [104-106].

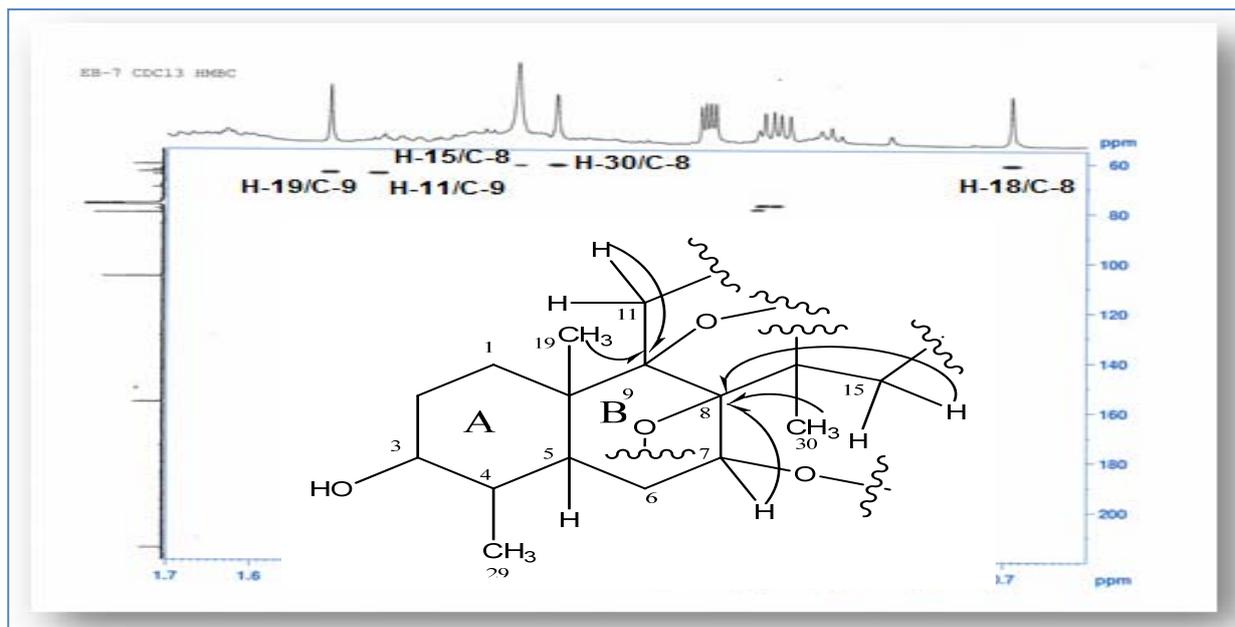


Figure III.3.22: Spectre HMBC du composé **3**

Les protons H₂-11 connus corrélient sur le spectre COSY (Figure III.3.23) avec deux protons résonnant à 1,79-2,04 ppm attribuables aux protons H₂-12.

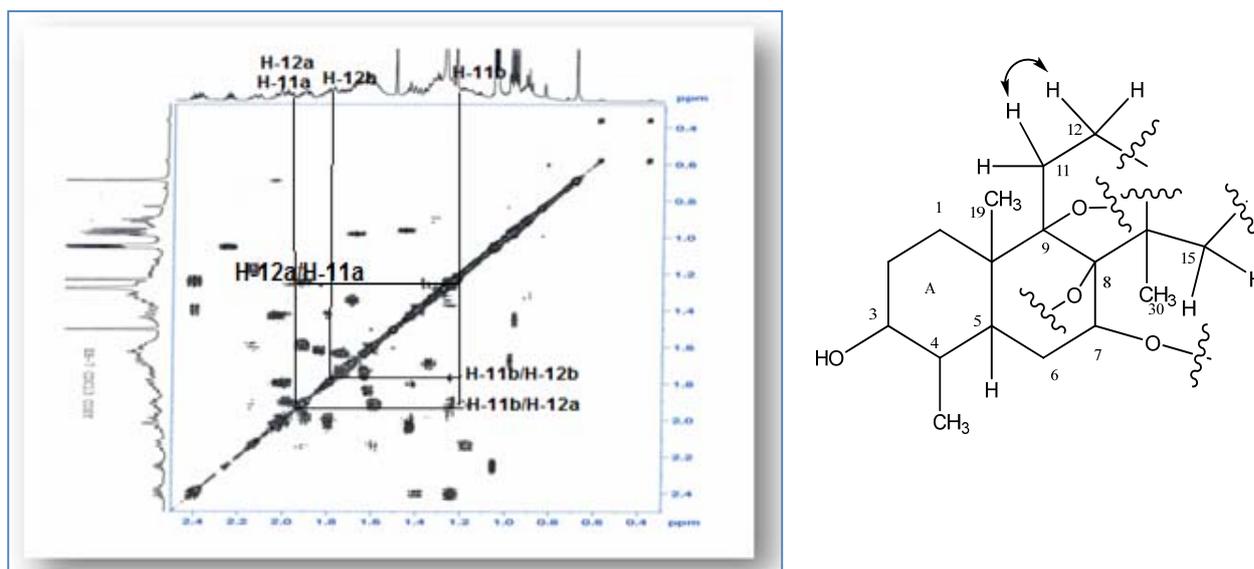


Figure III.3.23: Spectre et couplage COSY H-H du composé **3**

Les carbones de tous ces protons sont localisés par l'expérience HSQC J -modulé (Figure III.3.24) à δ_c 30,1 (C-12), 28,7 (C-11) et 29,7 (C-15).

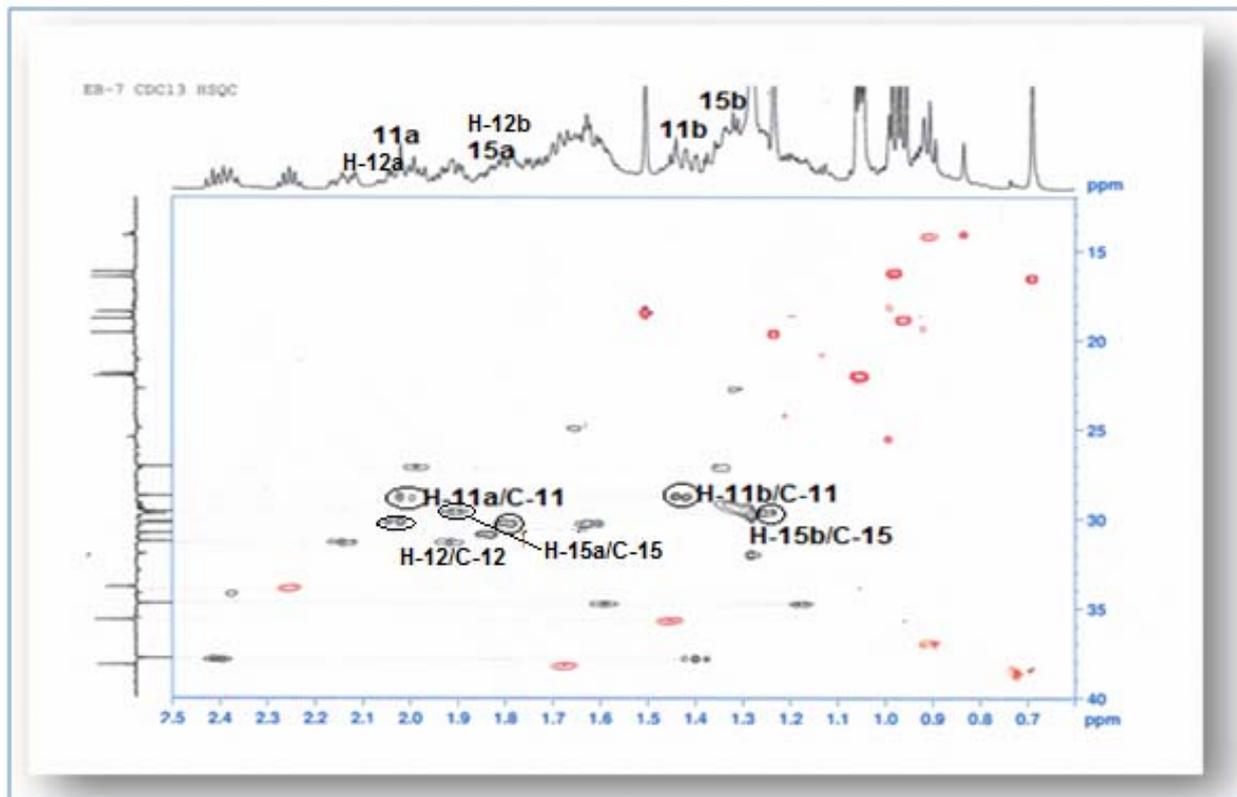


Figure III.3.24: Spectre HSQC J -modulé du composé **3**

A partir des protons méthyliques Me-30 déjà identifiés, le spectre HMBC (Figures III.3.25 et III.3.26) montre les corrélations en 2J et 3J avec le carbone oxygéné C-8 et C-15 attribués précédemment et deux carbones quaternaires résonnant à δ_H 47,6 et 48,1.

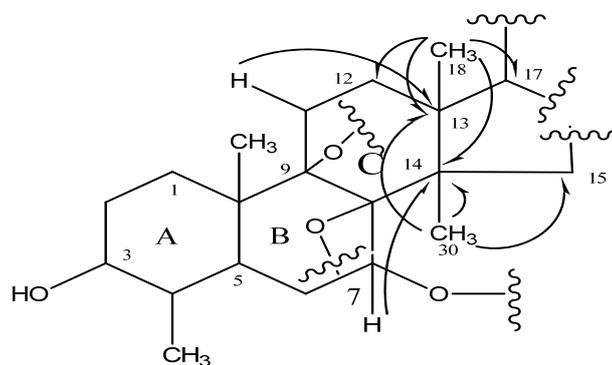


Figure III.3.25: Corrélations HMBC du composé **3** permettant la formation du cycle C

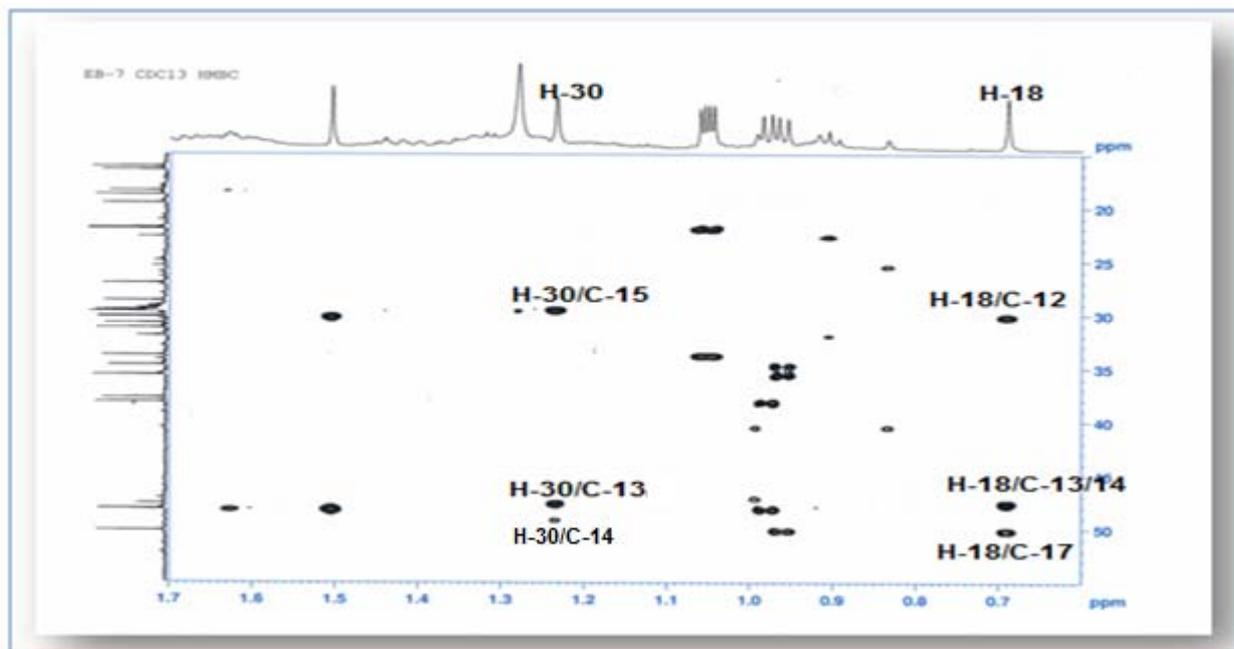


Figure III.3.26: Spectre HMBC du composé 3

La distinction entre ces carbones est facile du faite que le proton H-7 corrèle en HMBC avec C-14 (48,1 ppm) tandis que le carbone C-13 (47,6 ppm) présente une tache de corrélations avec le proton H-11a (Figures III.3.25 et III.3.27). Les protons méthyliques Me-18 sont détectés à δ_H 0,69 suite aux corrélations qu'ils présentent en HMBC (Figures III.3.25 et III.3.26) avec les carbones C-12, C-13 et C-14 identifiés précédemment, et un carbone méthine résonant à 50,1 ppm (C-17). Ce dernier corrèle en HSQC *J*-modulé avec son proton repéré à 1,70 (H-17). Ceci conduit à la fermeture du cycle C.

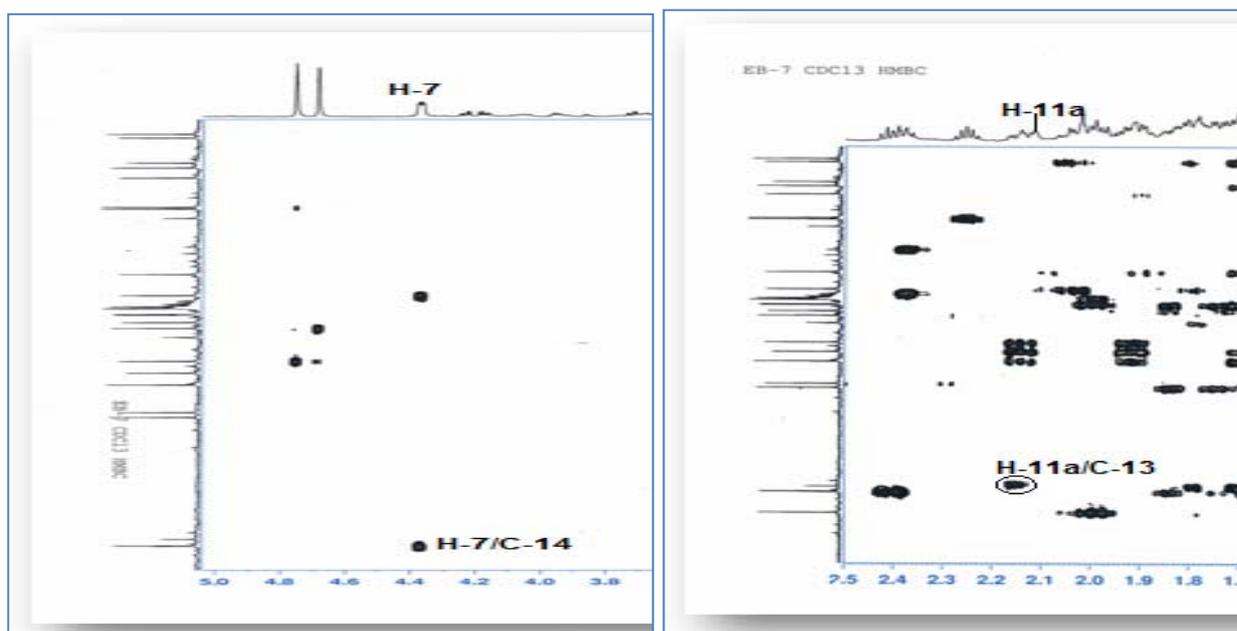


Figure III.3.27: Spectres HMBC du composé 3

Le spectre HMBC (Figures III.3.30 et III.3.31) montre les couplages entre le proton H-17 et les carbones C-13, C-14, C-15, C-16 et C-18 déjà attribués permettant de former le cycle D. Aussi, ce proton corrèle en HMBC (Figures IV.3.30 et IV.3.31) avec un carbone méthylique Me-21 (18,7 ppm), un carbone méthine CH-20 (35,6 ppm) et un carbone méthylénique CH₂-22 (34,7 ppm). Leurs protons sont assignés par expérience HSQC *J*-modulé (Figure III.3.29) à δ_H 0,96 (Me-21), 1,44 (H-20) et 1,18-1,59 (H₂-22).

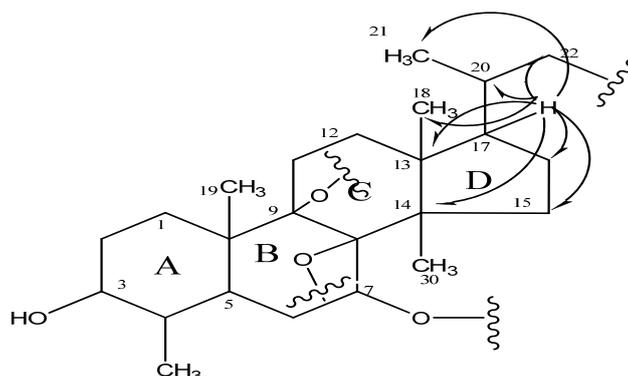


Figure III.3.30: Corrélations HMBC du composé **3** au niveau du cycle D et de la chaîne latérale

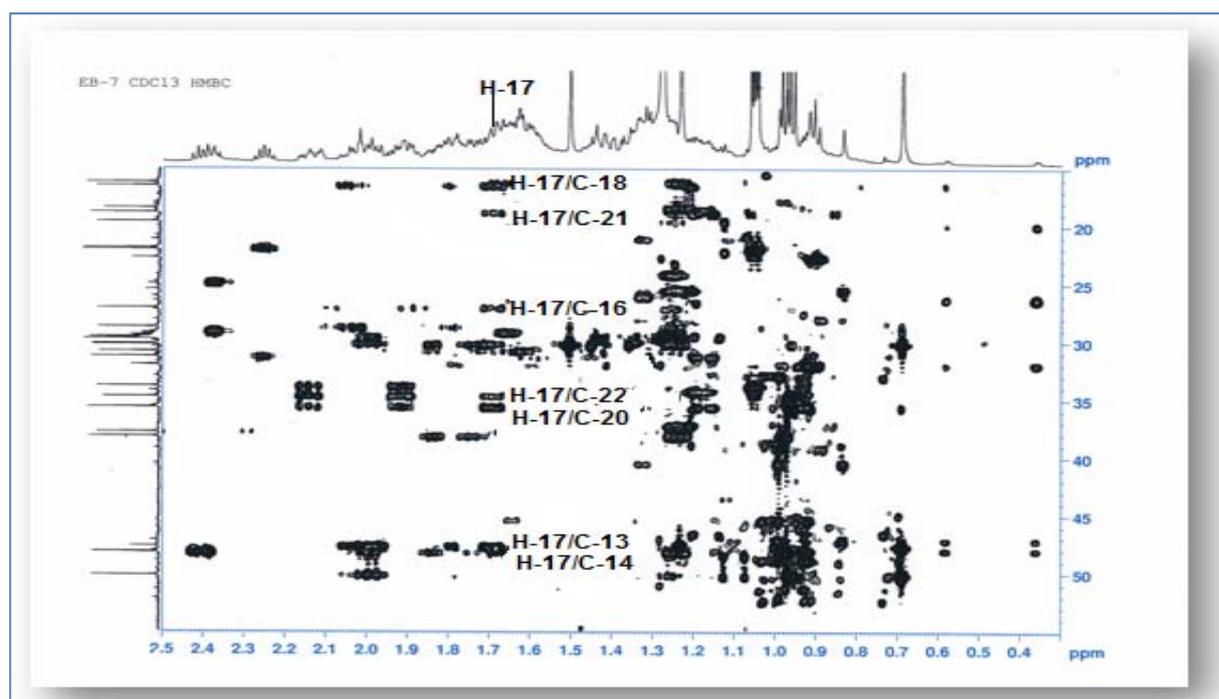


Figure III.3.31: Spectre HMBC du composé **3** (partie blindée)

L'analyse du spectre COSY H-H (Figure III.3.32) permet également de visualiser les couplages entre les protons du groupement méthyle Me-21 (0,96, d, $J = 6,5$ Hz) et le proton H-20 (1,44, m), ce dernier corrèle en HMBC (Figures III.3.32 et III.3.33) avec les carbones C-17, C-21 et C-22 attribués précédemment et un carbone méthine résonant δ_C 31,2 ne pouvant être que le

carbone C-23. Les protons H₂-23 sont détectés à δ_H 1,93 (m, H-23b) et 2,14 (m, H-23a) selon l'expérience HSQC.

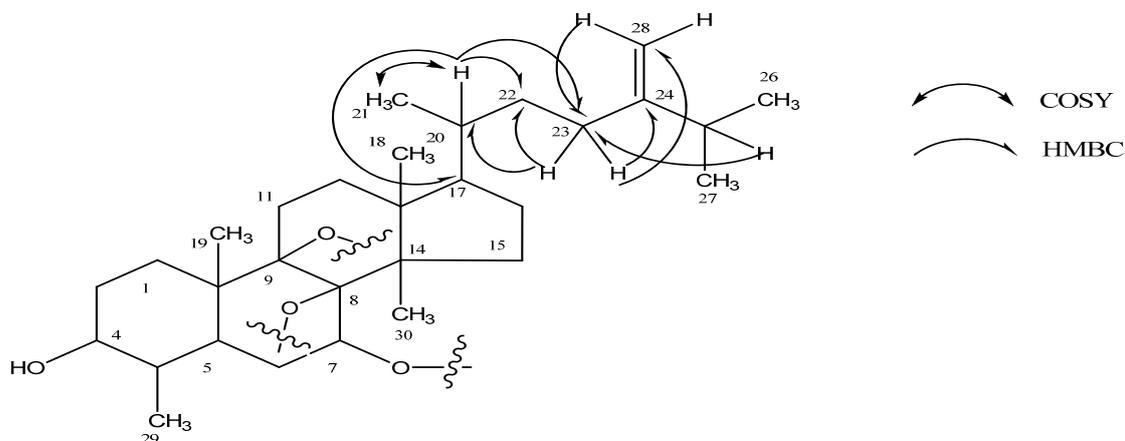


Figure III.3.32: Corrélations COSY H-H et HMBC du composé **3** au niveau de la chaîne latérale

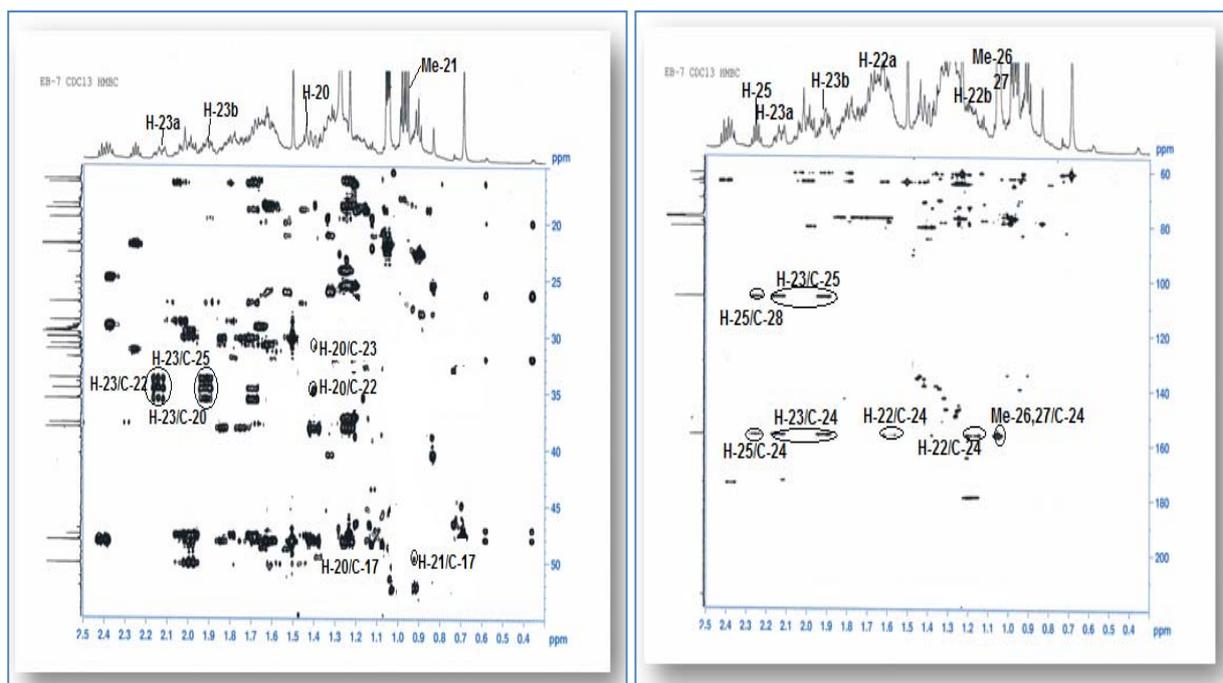


Figure III.3.33: Spectres HMBC du composé **3** mettant en évidence les corrélations au niveau de la chaîne latérale

Le carbone C-23 corrèle en HMBC (Figures III.3.32 et III.3.33) avec le proton éthylénique H-28b et le proton H-25. En plus les protons H₂-23 présentent en HMBC des corrélations avec les carbones C-20, C-22, C-24, C-25 et C-28. Ce qui permet l'élaboration de la chaîne latérale de ce triterpène (Figure III.3.32).

En tenant compte de la formule brute de ce composé $C_{30}H_{50}O_3$ correspondant à 6 insaturations et le nombre d'insaturations déjà identifié par analyse RMN égale à 5, il reste donc une seule insaturation à déterminer (Figure III.3.34).

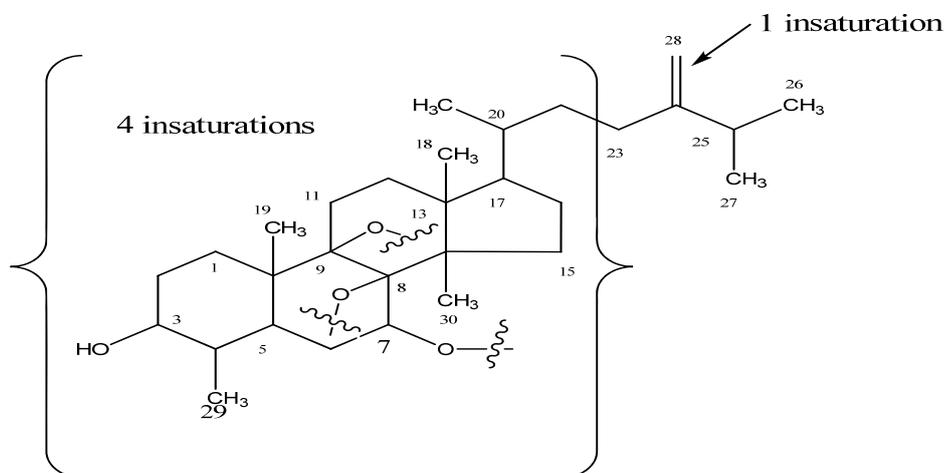


Figure III.3.34: Structure partielle du composé **3**

Cette insaturation ne peut être qu'un cycle supplémentaire correspondant à un époxyde en positions C-7-C-8, ou C-8-C-9 (Figure III.3.35) ou bien à un cycle oxirane en position C-7-C-9 (Figure III.3.36).

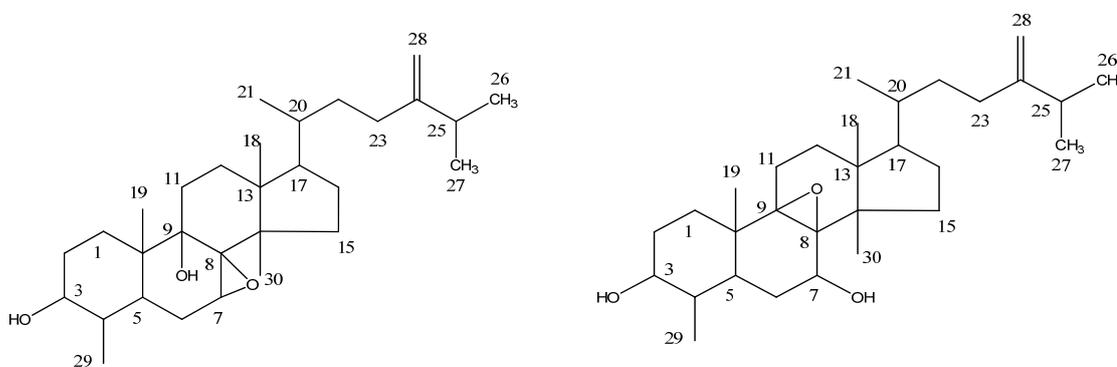


Figure III.3.35: Epoxyde en positions C-7-C-8 et C-8-C-9

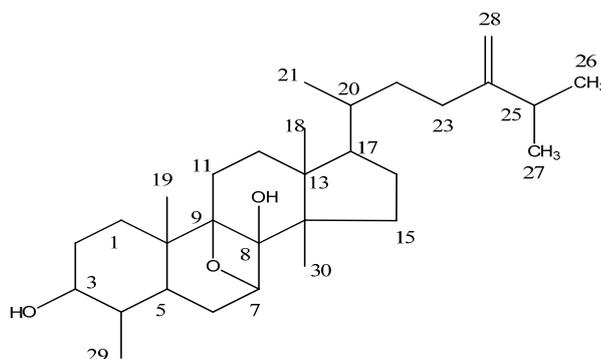


Figure III.3.36: Oxirane en positions C-7-C-9

Le déblindage du carbone C-7 (80,8 ppm) confirme l'hydroxylation de la position C-7 car dans le cas de 7,8-epoxy-lanostane triterpénoïdes, le carbone C-7 résonne à 55,8 ppm [104,105,108]. En conséquence, l'hydroxyle en position C-7 est libre (Figure III.3.37).

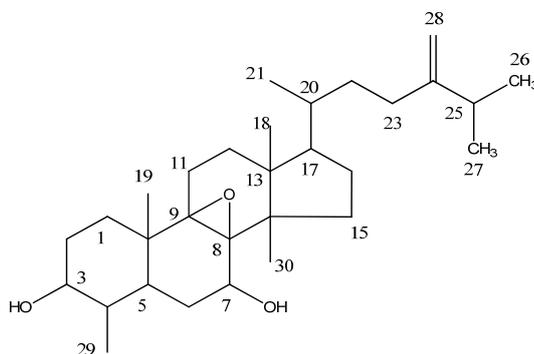


Figure III.3.37: Epoxyde en positions C-8–C-9

La détermination de la configuration relative du composé **3** peut être déduite des valeurs des constantes de couplage et de l'analyse du spectre NOESY (Figures III.3.38 et III.3.39). Les constantes de couplage du proton H-7 doublet de doublets avec le proton H-6a (2,40 ppm), $J_{ax-ax} = 7,5$ Hz et avec H-6b (1,40 ppm), $J_{ax-eq} = 3,3$ Hz indiquent que le groupement hydroxyle en C-7 est β -équatoriale. Les déplacements chimiques déblindés des protons H-6a à δ_H 2,40 et Me-19 à δ_H 1,50 β -orientés, comparés à ceux des même protons dans le cas de triterpènes tétracycliques [9,48,105], indiquent l'orientation β du groupement époxyde en C-8 et C-9. D'autres effets NOE sont visualisés entre les protons H-7 α /Me-30, Me-30/H-17, H-7/H-15b, H-7/H-5 et H-7/H-6b, suggérant que ces protons sont α -orientés. L'absence d'effet NOE entre les protons méthyliques Me-19 et Me-18, confirme que le groupement époxyde est en position β . Cette orientation implique l'éloignement spatial entre les protons des deux groupements méthyles selon le modèle moléculaire Dreiding. Les corrélations observées entre les protons Me-19/H-6a, Me-19/H-4 et Me-18/H-20 indiquent que tous ces protons sont β -orientés.

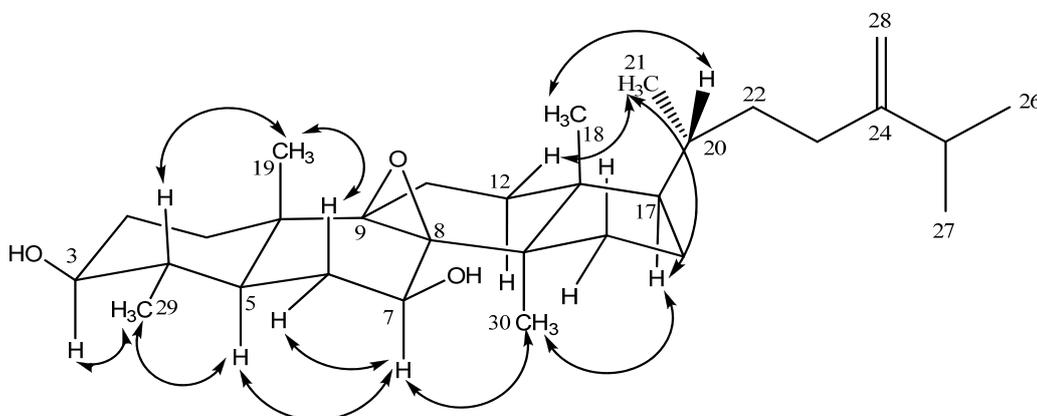
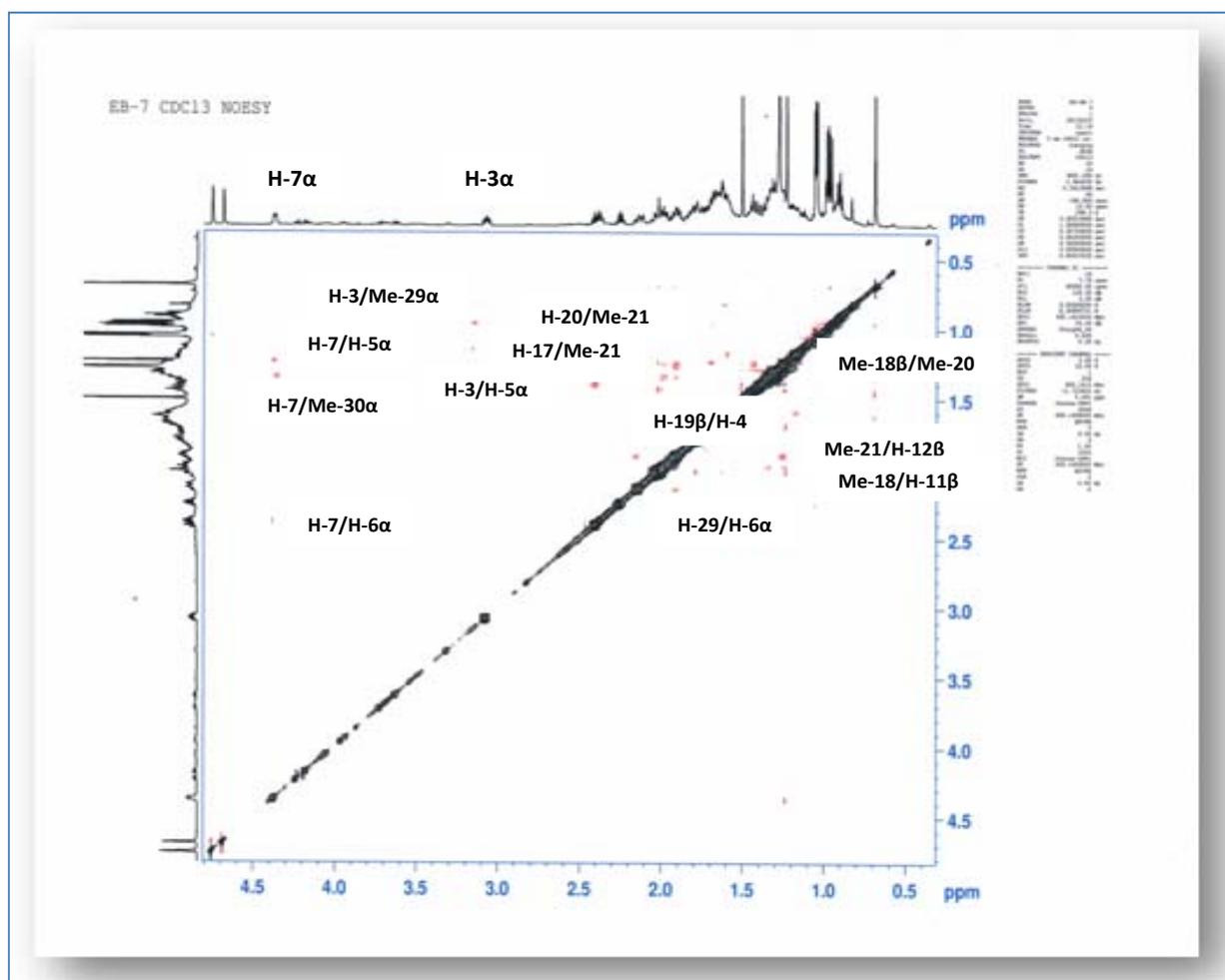
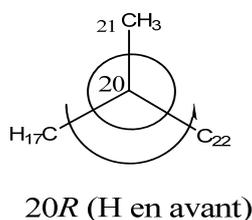


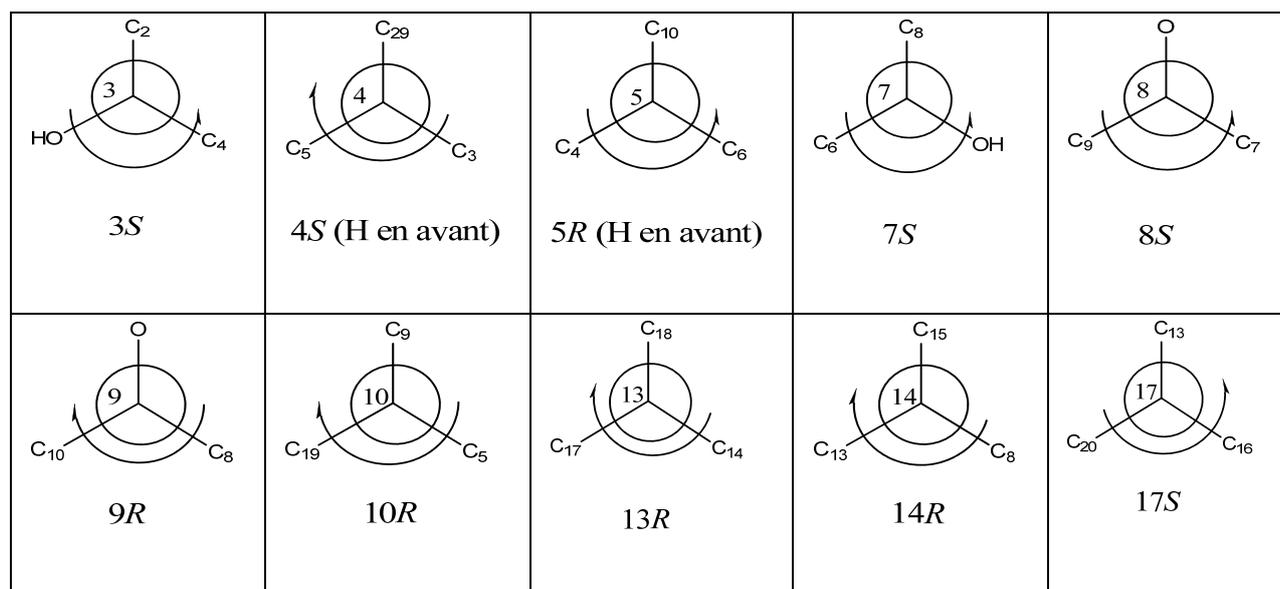
Figure III.3.38: Principales corrélations NOESY observées pour le composé **3**

Figure III.3.39: Spectre NOESY du composé **3**

La valeur du déplacement chimique des protons Me-21 à 0,96 ppm ($J = 6,5$ Hz) et les effets NOE entre H-17/Me-21 et Me-21/H-12 β sont significatifs d'une configuration absolue $20R$ au niveau du carbone chiral C-20 (Figures III.3.40) [101,109].

Figures III.3.40: Configuration $20R$

En tenant compte de ces constatations et des effets NOE signalés précédemment, les configurations absolues au niveau de tous les carbones asymétriques de ce composé sont établies comme suit : $3S$, $4S$, $5R$, $7S$, $8S$, $9R$, $10R$, $13R$, $14R$ et $17S$.



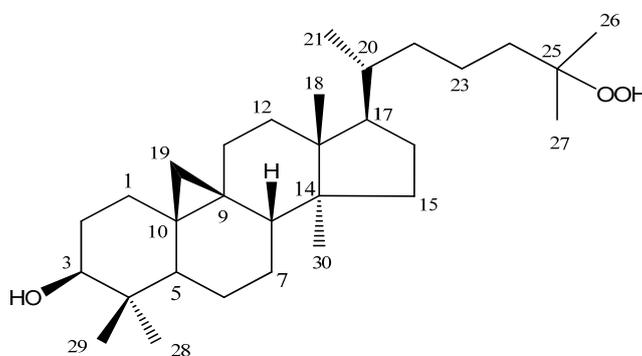
L'ensemble de ces données (Tableau III.3) et la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = +32,3$ (c 0,18, MeOH) permettent d'assigner pour le composé **3** la structure nouvelle suivante : 3 β ,7 β -dihydroxy-4 α ,14 α -diméthyl-8 β ,9 β -époxy-5 α -ergosta-24(28)-ène.

Tableau III.3: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **3** dans CDCl₃.

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	1,61-1,63 m	30,2
2	1,74-1,84 m	30,7
3	3,08 td 10,2, 5,2 H-3 α	77,2
4	1,67 m	38,1
5	1,23 sl	47,9
6	1,40 m H-6 β 2,40 dt 13,6, 7,5 H-6 α	37,7
7	4,37 dd 7,5, 3,3 H-7 α	80,5
8	-	60,9
9	-	64,0
10	-	48,1
11	1,43-2,10 m	28,7
12	1,79-2,04 m	30,1

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
13	-	47,6
14	-	48,1
15	1,26-1,91 m	29,7
16	1,35-1,99 m	27,0
17	1,70 m H-17 α	50,1
18	0,69 s	16,4
19	1,50 s	18,4
20	1,44 m	35,6
21	0,96 d 6,5	18,7
22	1,18-1,59 m	34,7
23	1,93-2,14 m	31,2
24	-	156,5
25	2,26 sept 6,7	33,8
26	1,05 d 6,7	21,8
27	1,06 d 6,7	21,9
28	4,69 d 0,9 H-28b 4,76 d 0,9 H-28a	106,1
29	0,98 d 6,7	16,1
30	1,23 s	19,5

III.7.4. Détermination structurale du composé 4



25-hydroperoxycycloart-3 β -ol (4)

Le composé **4** se présente à l'état de poudre blanche, soluble dans le chloroforme. Il est invisible aussi à la lumière UV et se colore en mauve après révélation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage.

Le spectre IR du composé **4** (Figure III.4.1) montre des bandes d'absorption à 3425 cm^{-1} (groupement hydroxyle), 2937 cm^{-1} et 2865 cm^{-1} (CH, CH_2 et CH_3 aliphatiques).

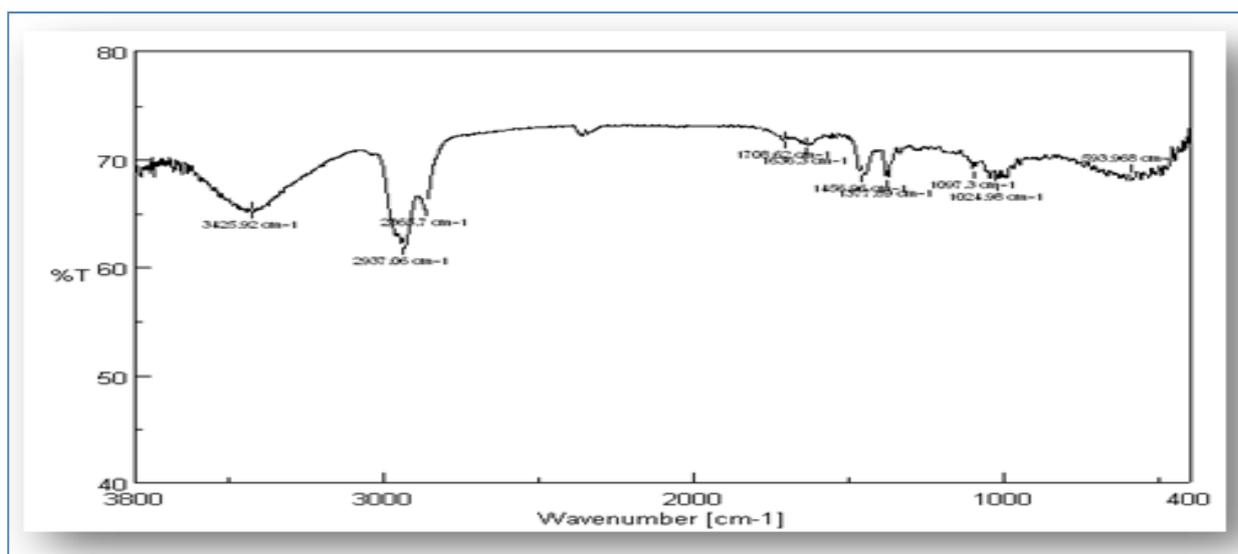


Figure III.4.1: Spectre IR du composé **4**

Le spectre de masse obtenu par ionisation douce (ESI) (Figure III.4.2) révèle un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 483,3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ correspondant à une masse moléculaire de 460 uma. L'ion de faible intensité observé à $m/z = 943,7$ $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ est attribué au dimère de ce composé. Ceci suggère une formule brute en $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_3$ renfermant 5 insaturations.

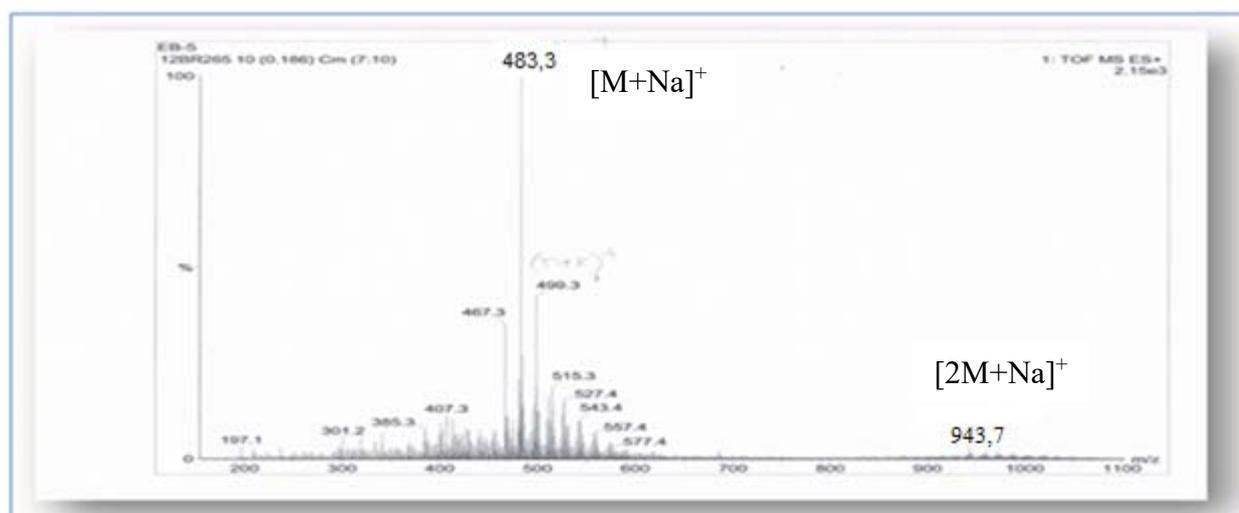


Figure III.4.2: Spectre de masse ESI-MS du composé **4**

Le nombre d'atomes de carbone est confirmé par la présence de 30 pics sur le spectre RMN ^{13}C découplé (Figure III.4.3), ce qui nous fait penser également à un composé de nature triterpénique. En effet, ce spectre montre les signaux correspondant à sept méthyles, douze méthylènes, cinq méthines, six atomes de carbone quaternaires sp^3 dont un atome de carbone quaternaire oxygéné, confirmant ainsi sa nature triterpénique.

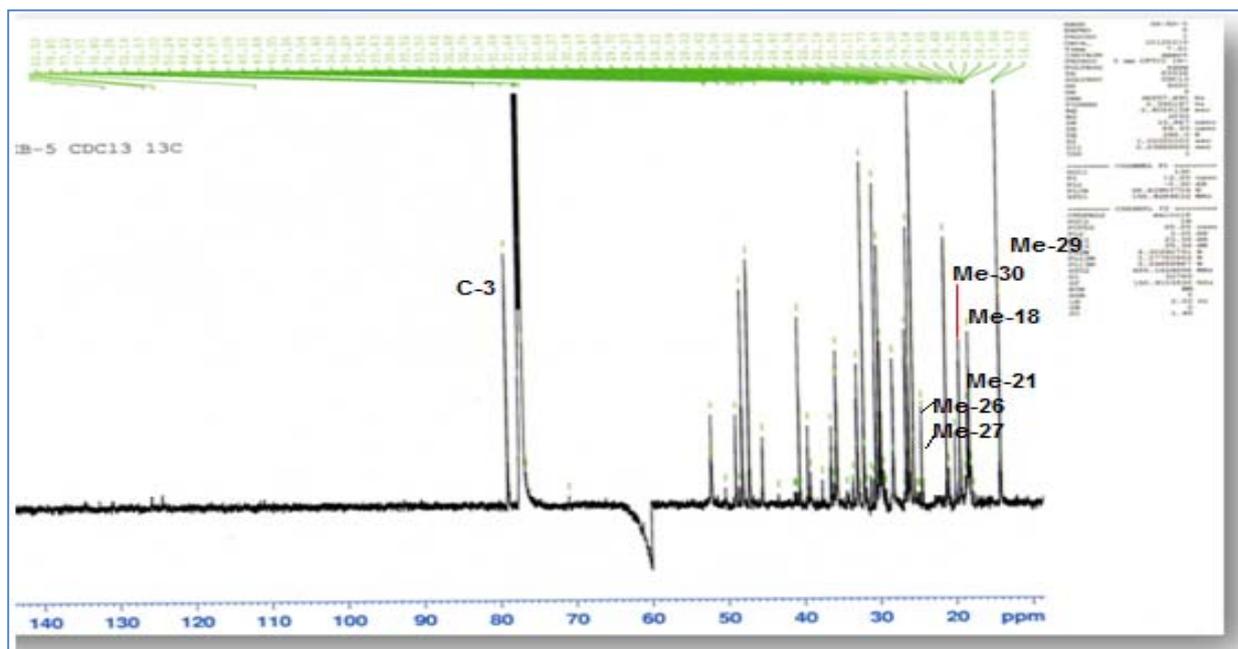
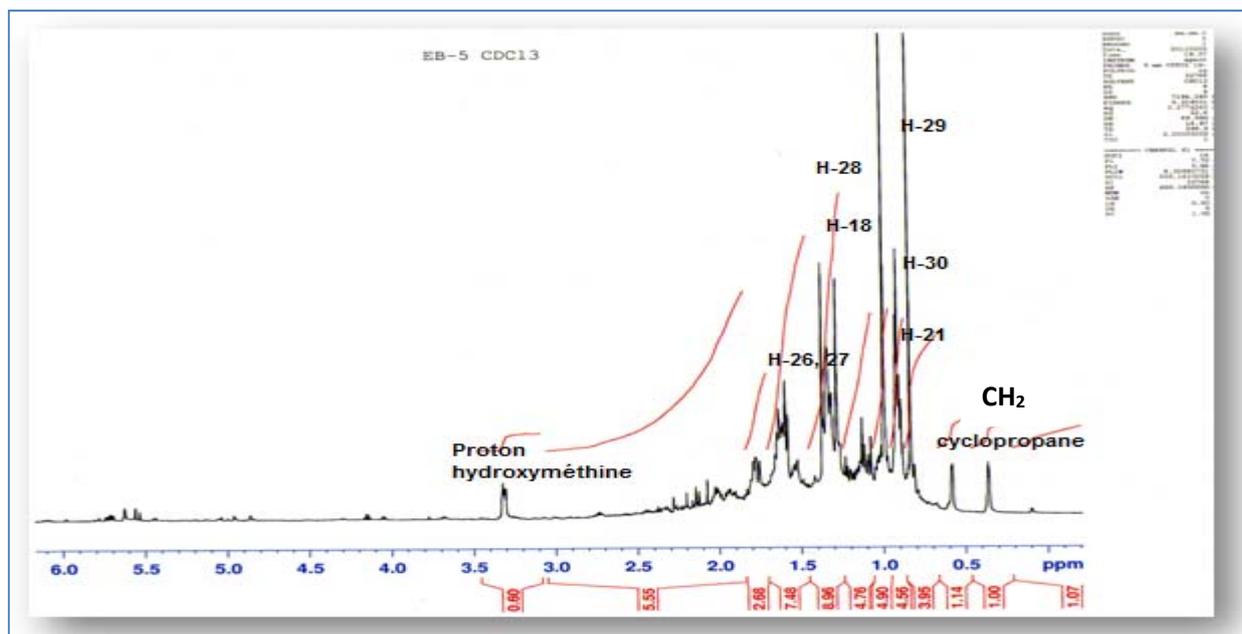
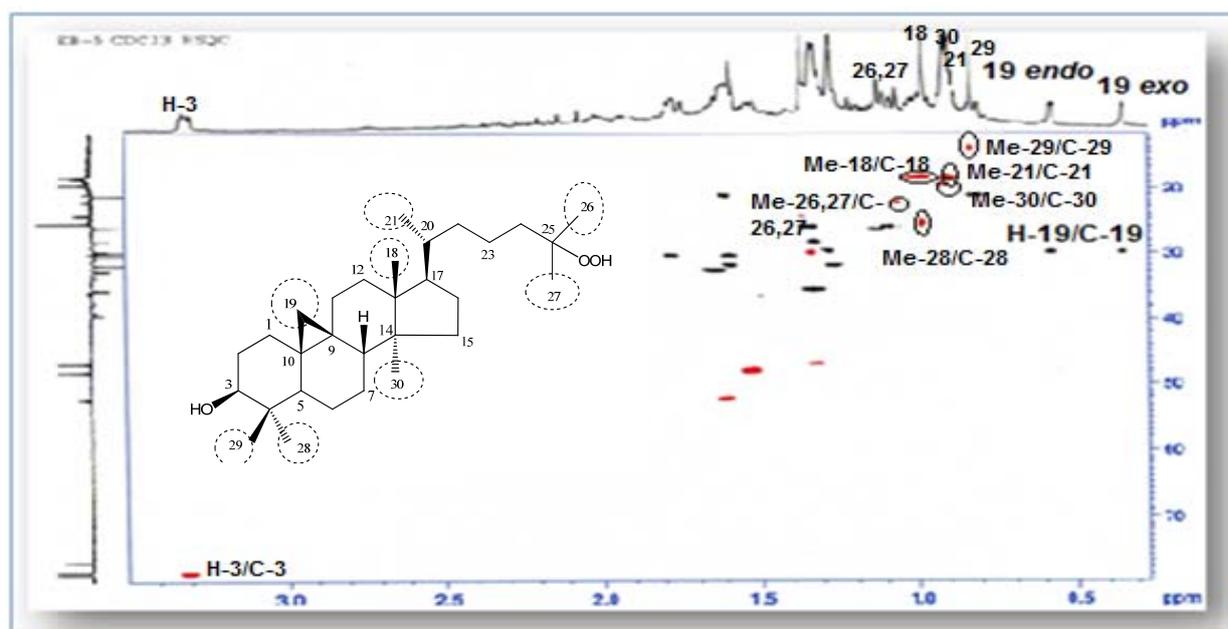


Figure III.4.3: Spectre RMN ^{13}C découplé du composé 4

Les spectres RMN ^1H (Figure III.4.4) et HSQC J -modulé (Figure III.4.5) enregistrés dans le chloroforme deutéré indiquent une structure triterpénique à partir des signaux suivants :

- six signaux à haut champ correspondent aux groupements méthyles résonant sous forme de singulet à δ_{H} 0,83, 0,99, 1,01, 0,92 et 1,09 ppm et de doublet à 0,90 ppm. Leurs carbones sont assignés à δ_{C} 18,0 (Me-18), 19,3 (Me-30), 25,4 (Me-28), 14,0 (Me-29), 18,3 (Me-21) et 22,2 (Me-26 et Me-27) par analyse du spectre HSQC J -modulé (Figure III.4.5).
- Deux signaux blindés à δ_{H} 0,36 (1H, d, $J = 3,7$ Hz, H-19 *exo*) et 0,58 (1H, d, $J = 3,7$ Hz, H-19 *endo*) caractéristiques de deux protons non équivalents d'un noyau cyclopropane tétrasubstitué. Leur carbone est repéré à 29,8 ppm par HSQC J -modulé (Figure III.4.5).
- Un signal à champ faible résonant à 3,31 ppm sous forme d'un doublet de doublets ($J = 11,0, 4,2$ Hz) s'intégrant pour un proton correspond au proton hydroxyméthine H-3. Son carbone est détecté par HSQC J -modulé à 78,8 ppm (Figure III.4.5).

Figure III.4.4: Spectre RMN ^1H du composé 4Figure III.4.5: Spectre HSQC J -modulé du composé 4

L'ensemble de ces caractéristiques spectrales nous oriente vers une structure triterpénique cycloartanique [9,10,110].

L'élaboration de la structure moléculaire du composé 4 peut débuter à partir du proton H-3 (3,31 ppm). Celui-ci corrèle sur le spectre COSY H-H (Figures III.4.6 et III.4.7) avec deux protons vicinaux résonant à δ_{H} 1,59 (H-2b) et 1,79 (H-2a), qui à leur tour couplent avec les protons détectés à δ_{H} 1,27 (H-1b) et 1,58 (H-1a). La grande valeur de la constante de couplage

du proton H-3 ($J = 11,0$ Hz) conforte bien les positions axial-axial entre les protons H-2b et H-3, confirmant ainsi la configuration 3β -OH.

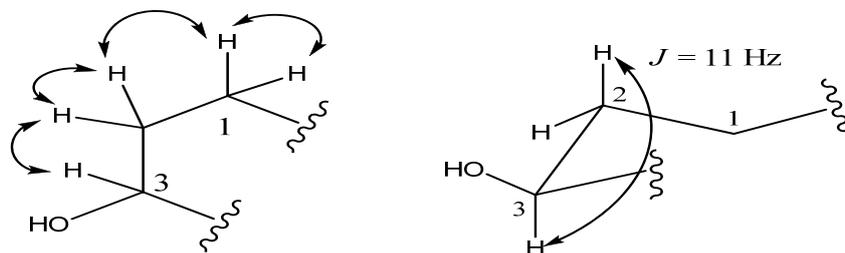


Figure III.4.6: Couplages COSY des protons H₂-1, H₂-2 et H-3 du composé 4

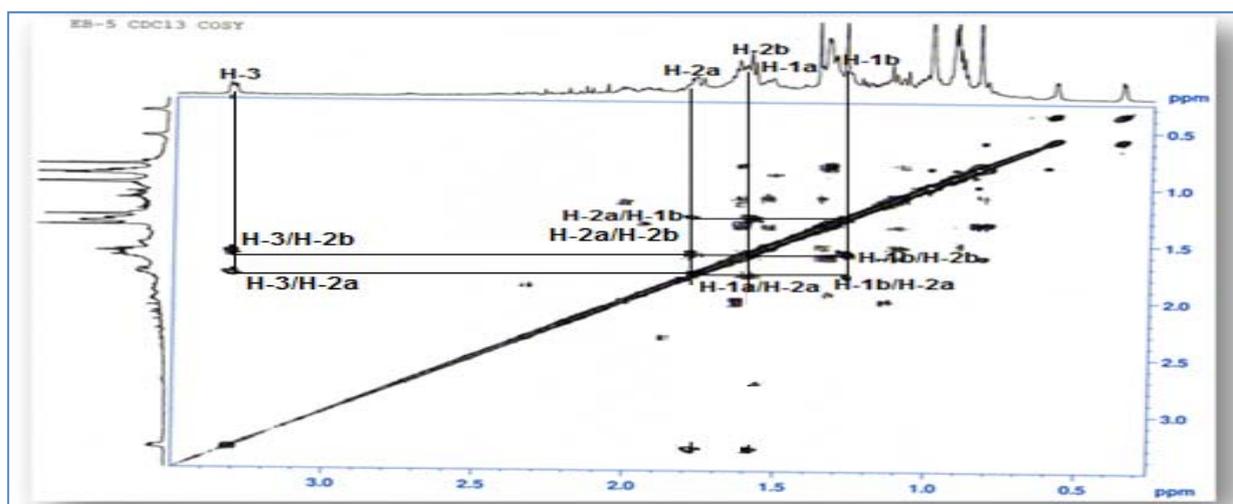


Figure III.4.7: Spectre COSY H-H du composé 4

Les protons H₂-1 et H₂-2 couplent en HSQC J -modulé (Figure III.4.8) avec leurs carbones résonant à 31,9 et 30,3 ppm respectivement.

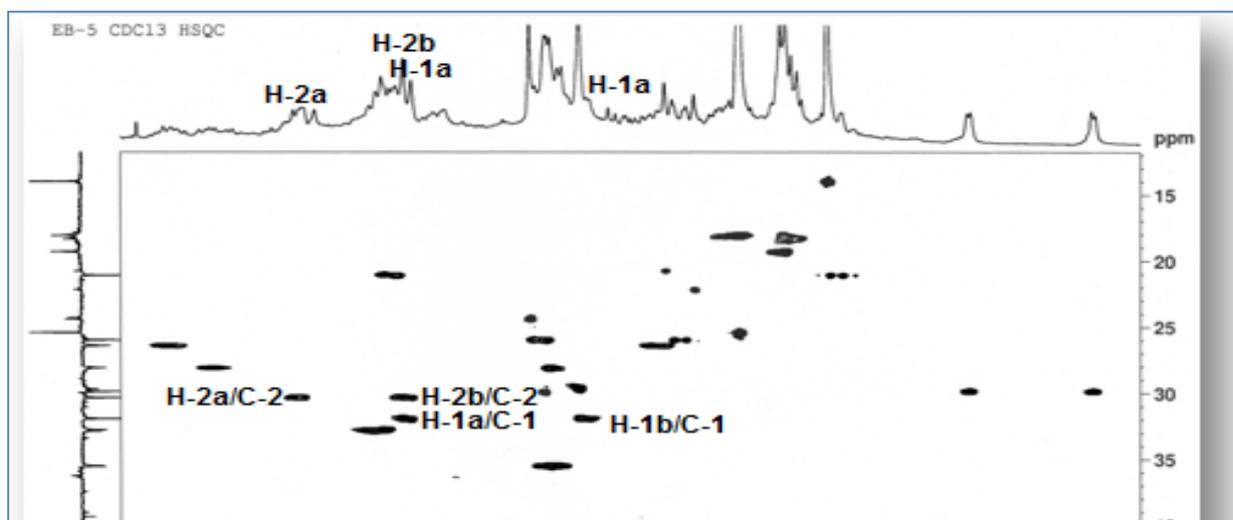


Figure III.4.8: Spectre HSQC J -modulé du composé 4

Grâce à l'analyse des corrélations hétéronucléaires en $^3J_{H/C}$ et $^2J_{H/C}$ (Figures III.4.9 et III.4.10), le proton H-3 conduit également à la reconnaissance des carbones suivants C-1 et C-2 déjà identifiés et les carbones résonant à δ_C 25,4, 14,0, 40,4 et 47,0 attribuables respectivement aux carbones méthyliques Me-28, Me-29, un carbone quaternaire ne pouvant être que le C-4 et un carbone méthine C-5. Les protons méthyliques Me-28, Me-29 et le proton H-5 sont localisés à δ_H 0,99, 0,83 et 1,32 suite aux corrélations qu'ils présentent en HSQC J -modulé (Figure III.4.11). Aussi, les protons H₂-1 corrélient en HMBC (Figures III.4.9 et III.4.10) avec les carbones C-2 et C-5 identifiés précédemment et un carbone méthylénique repéré à 29,8 ppm (C-19). En plus, les protons H₂-2 présentent des taches de corrélation en $^3J_{H/C}$ (Figure III.4.10) avec un carbone quaternaire résonant à 25,8 ppm attribuable au carbone C-10. A ce niveau d'analyse, les déplacements chimiques des protons et carbones du cycle A du composé **4** ont été déterminés (Figure III.4.9).

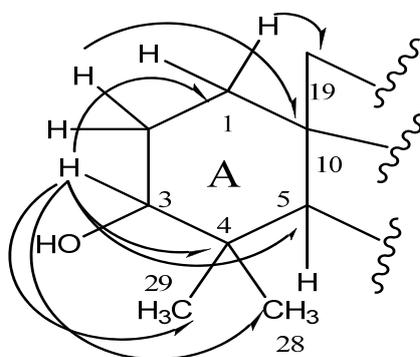


Figure III.4.9: Corrélations HMBC au niveau du cycle A du composé **4**

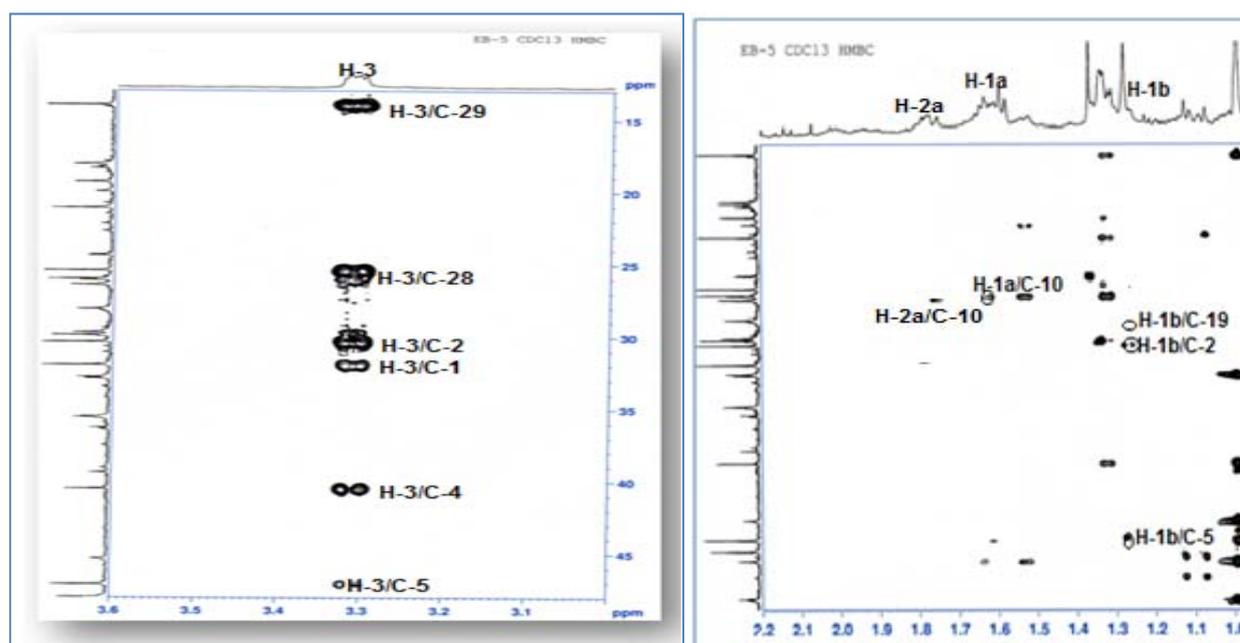
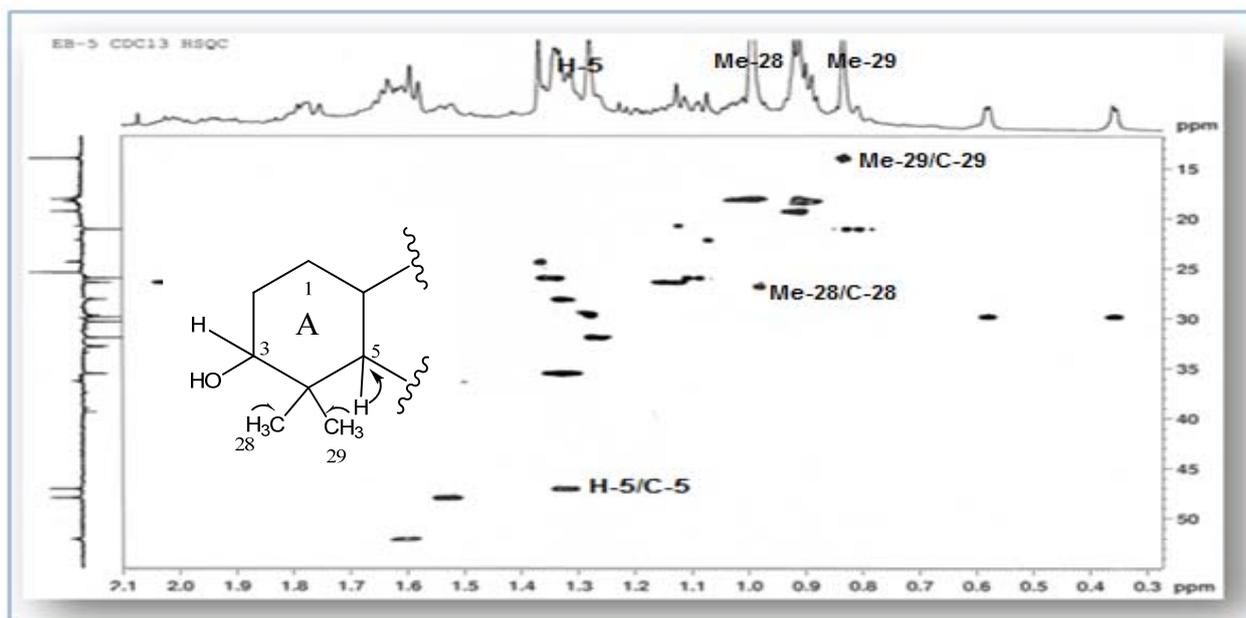


Figure III.4.10: Spectres HMBC du composé **4** (cycle A)

Figure III.4.11: Spectre HSQC *J*-modulé du composé 4

A partir des protons H₂-19 (δ_H 0,36-0,58) attribués précédemment, le spectre HMBC (Figure III.4.12) montre les couplages de ces protons, avec deux carbones quaternaires C-10 déjà identifié et C-9 résonant à 19,9 ppm, deux carbones méthines à 47,0 (C-5), 47,9 ppm (C-8) et un carbone méthylénique à 26,1 ppm (C-11), permettant ainsi la fermeture du cycle à 3 chaînons correspondant au noyau cyclopropane tétrasubstitué localisé en C-9 et C-10.

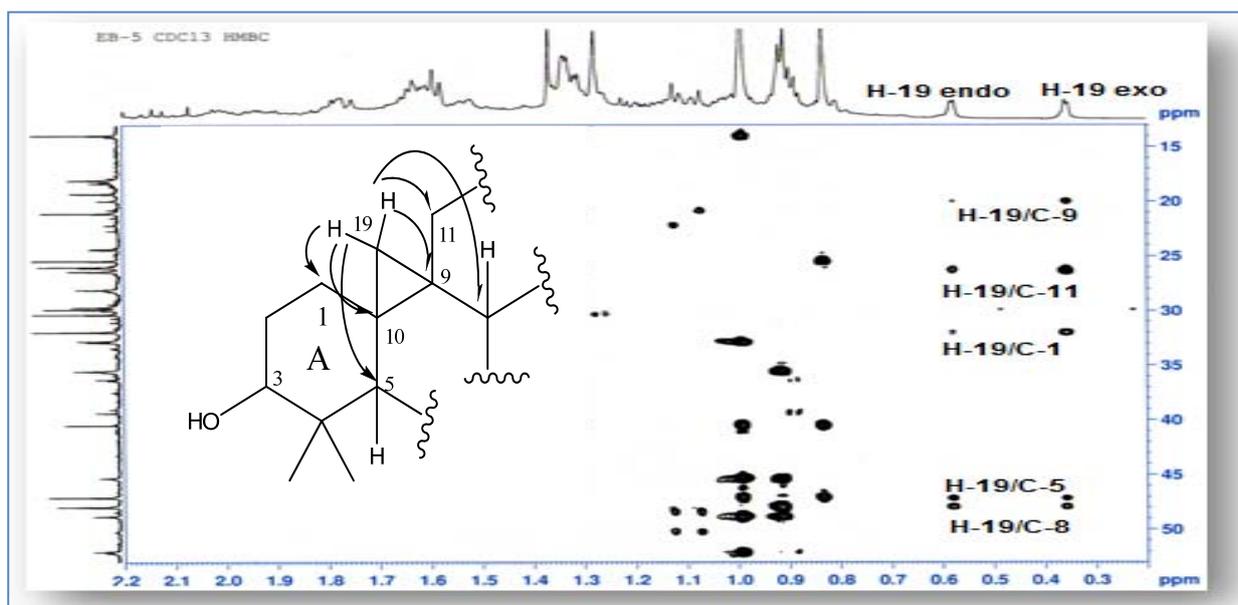
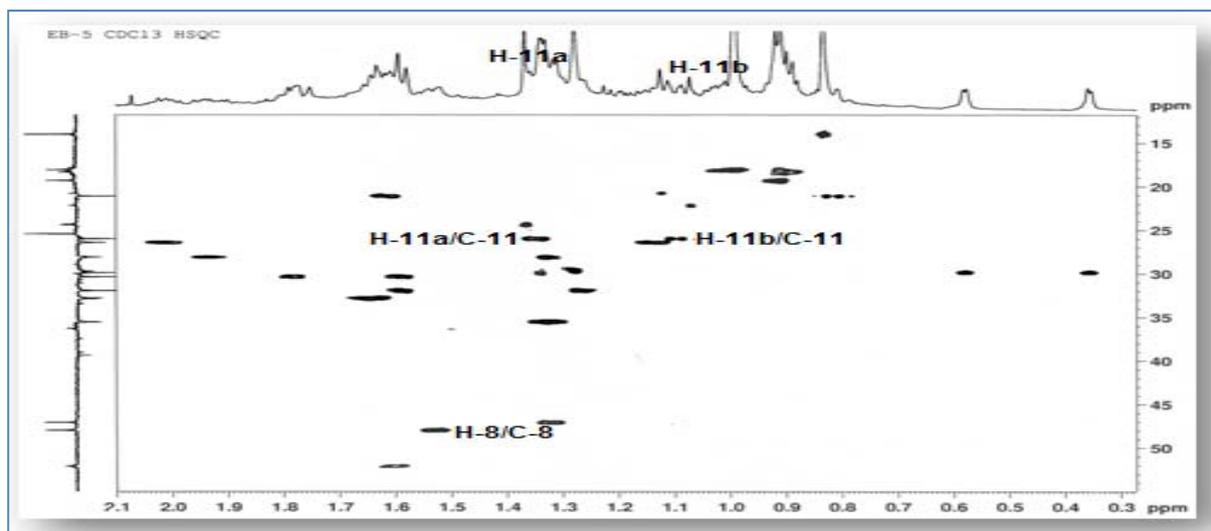


Figure III.4.12: Spectre HMBC du composé 4

Les protons résonant à 1,55 ppm (H-8), 1,09 ppm (H-11b) et 1,34 ppm (H-11a) ont été détectés à l'aide de l'expérience HSQC *J*-modulé (Figure III.4.13) par les corrélations hétéronucléaires en $^1J_{H/C}$ qu'ils présentent avec leurs carbones.

Figure III.4.13: Spectre HSQC *J*-modulé du composé 4

Les protons H₂-6 sont localisés à (δ_H 0,81, H-6b; 1,62 H-6a) par expérience COSY (Figures III.4.14 et III.4.15), du fait des corrélations qu'ils présentent avec le proton H-5 déjà connu. Cette expérience permet de voir également les couplages entre les protons H₂-6/H₂-7 (δ_H 1,13, H-7b; 2,02, H-7a) et H₂-7/H-8 (δ_H 1,55, H-8).

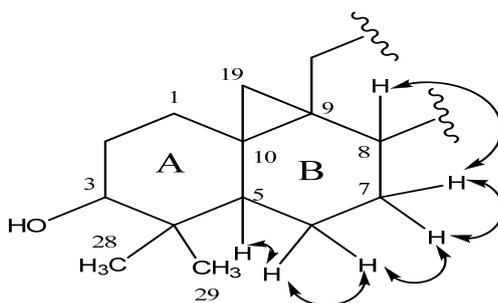


Figure III.4.14: Couplages COSY H-H au niveau du cycle B

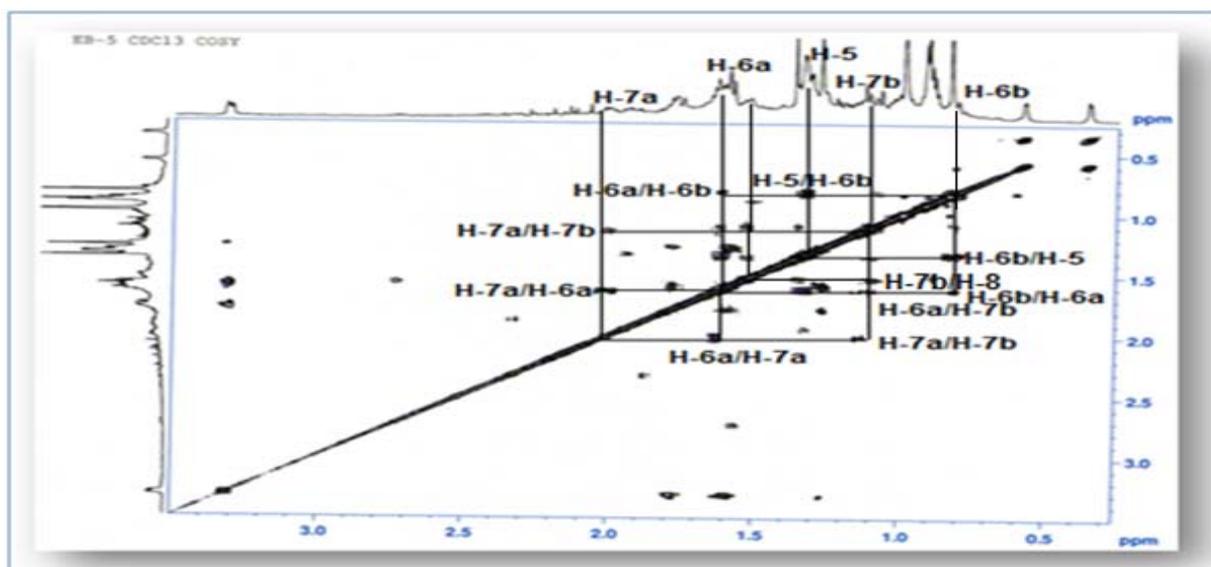


Figure III.4.15: Spectre COSY H-H du composé 4 (cycle B)

Ces protons couplent en HSQC *J*-modulé (Figure III.4.16) avec les carbones C-6 (21,1 ppm), C-7 (26,4 ppm) et C-8 (47,9 ppm).

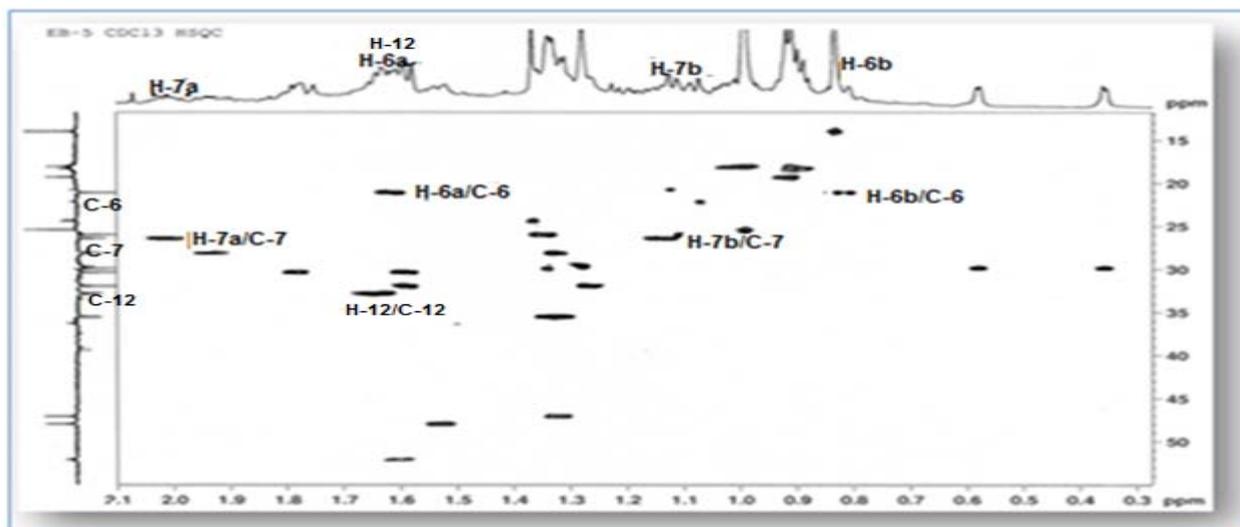


Figure III.4.16: Spectre HSQC *J*-modulé du composé 4 (cycle B)

Les protons H₂-7 corrélient en HMBC (Figure III.4.17) avec des carbones C-5, C-6 et C-8 identifiés précédemment et un carbone quaternaire résonnant à 48,3 ppm attribuable au carbone C-14. A ce stade d'analyse, l'attribution des déplacements chimiques des protons et carbones du cycle B du composé 4 a été faite sans ambiguïté.

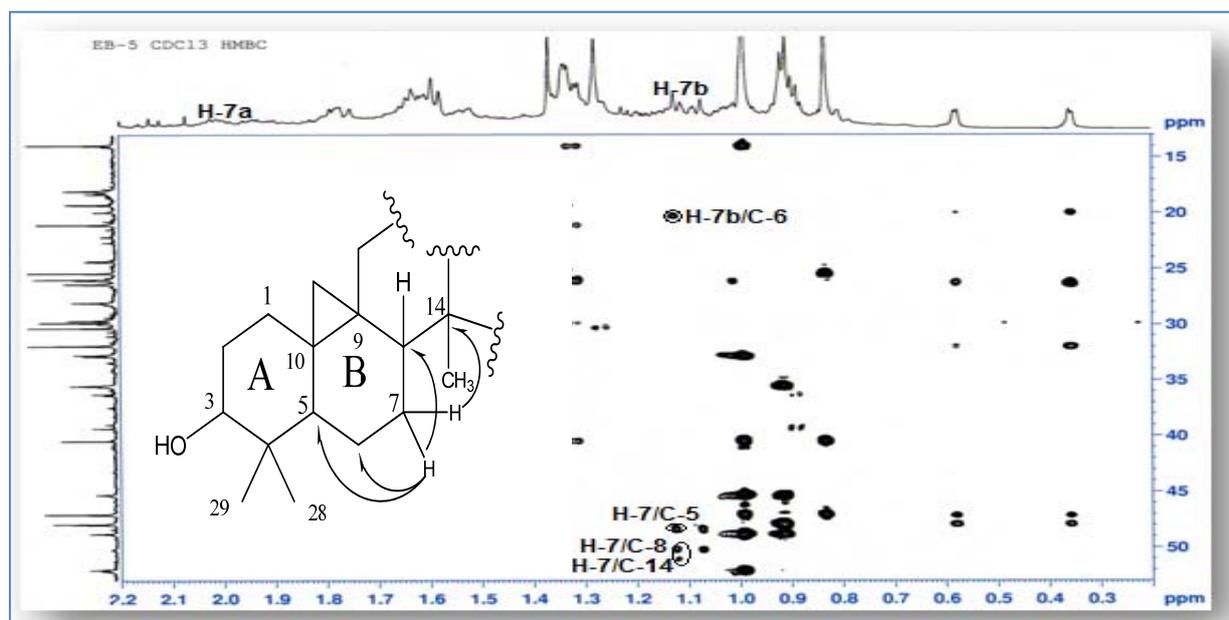


Figure III.4.17: Spectre HMBC du composé 4 (cycle B)

L'attribution des autres carbones et protons des cycles C et D se fait également de la même manière.

A partir des protons H₂-11 à δ_H 1,09-1,34 (2H, m) décrits précédemment, le spectre COSY (Figure III.4.18) montre un couplage H-11b/H₂-12; cette expérience permet de repérer les protons H₂-12 à δ_H 1,64 ppm (2H, m). Ces derniers couplent en HSQC *J*-modulé avec leur carbone résonant à 32,7 ppm (Figure III.4.16).

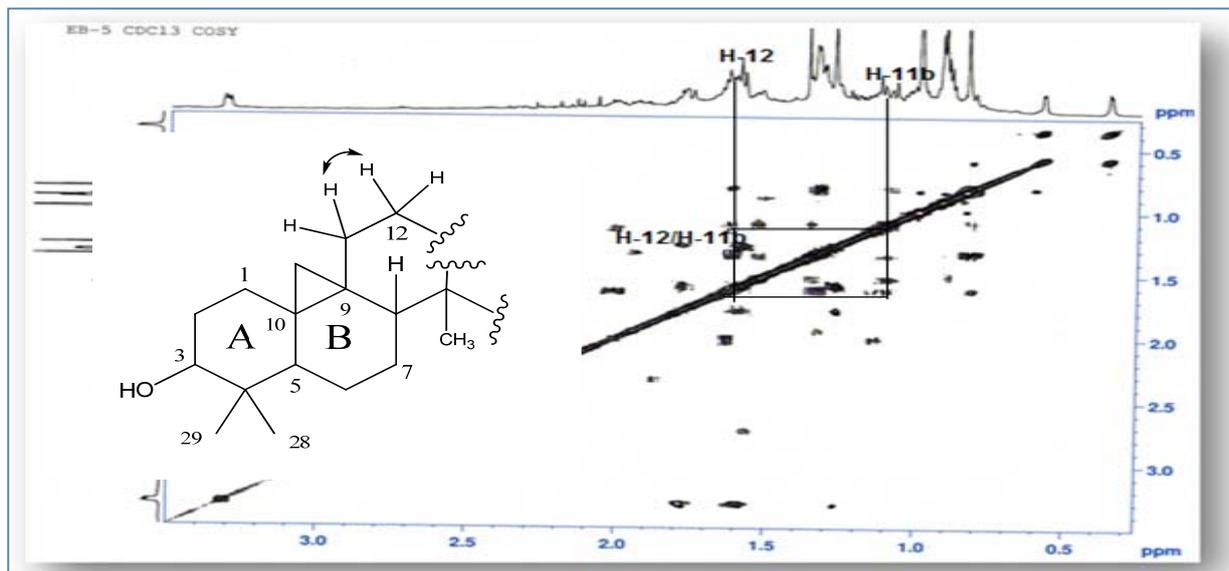


Figure III.4.18: Spectre COSY indiquant le couplage H-11b/H₂-12

L'expérience HMBC (Figures III.4.19 et III.4.20) permet également d'observer les corrélations à longue distance en ²*J* et ³*J* entre :

- Les protons du méthyle Me-30 et les carbonnes C-8 et C-14 déjà attribués, le carbone quaternaire à 45,3 ppm (C-13) et le carbone méthylénique à 35,5 ppm (C-15).
- Les protons du méthyle Me-18 et les carbonnes C-12, C-13 et C-14 connus et le carbone méthine à 52,0 ppm (C-17).

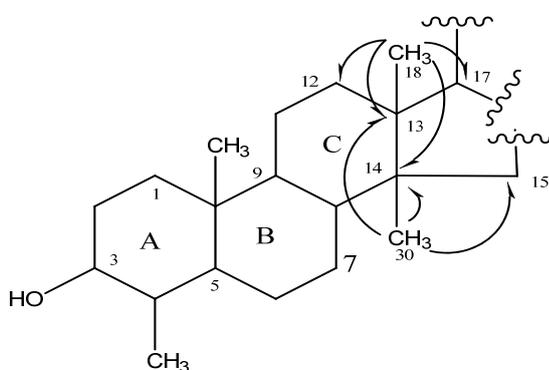


Figure III.4.19: Corrélations HMBC du composé **3** permettant la formation du cycle C

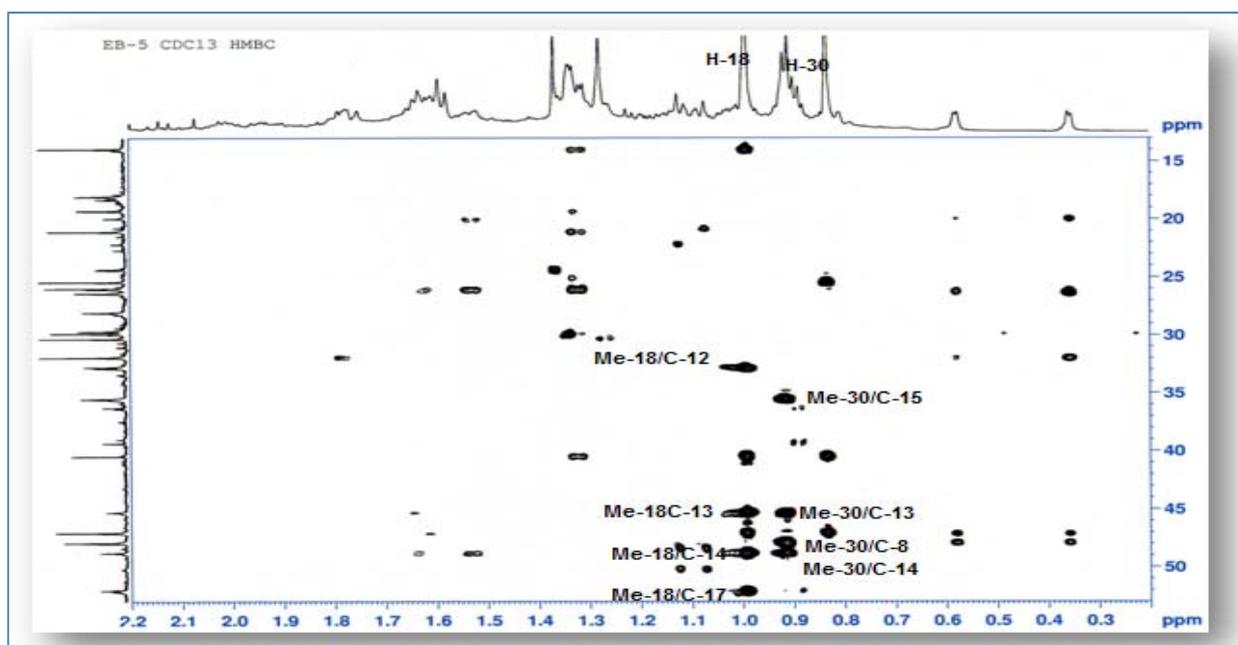
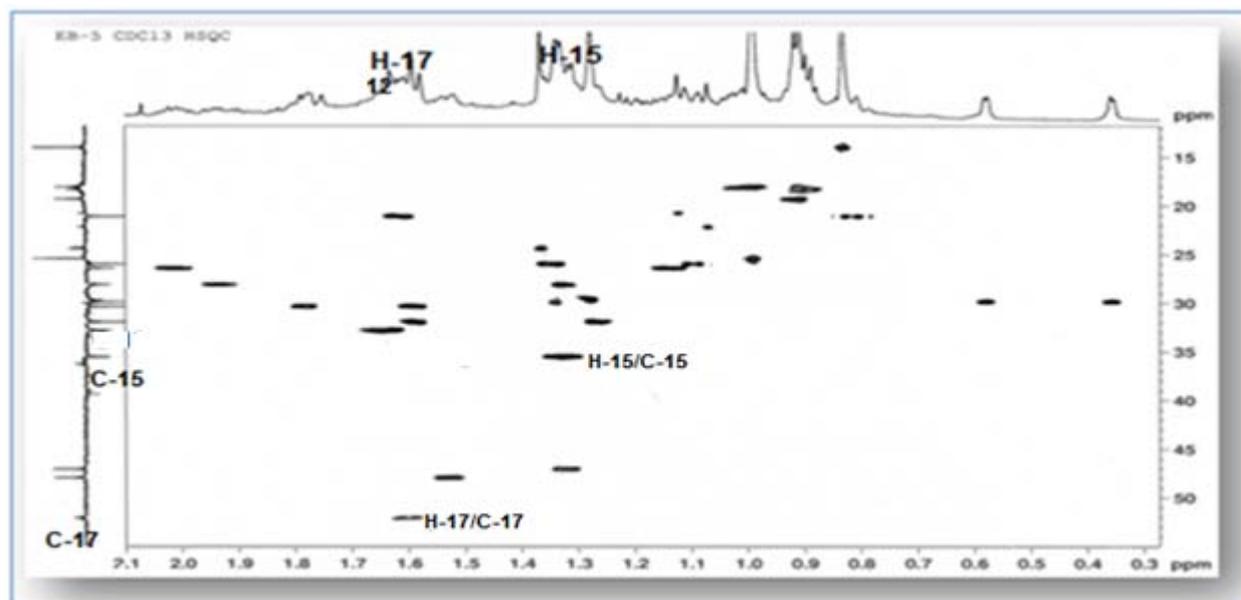


Figure III.4.20: Spectre HMBC du composé 4

Les protons portés par ces carbones sont assignés par analyse du spectre HSQC *J*-modulé (Figure III.4.21) à δ_H 1,33 (H₂-15) et 1,61 (H-17).

Figure III.4.21: Spectre HSQC *J*-modulé du composé 4

A partir des protons identifiés précédemment l'expérience COSY permet de repérer un système de spins constitué de 5 protons H₂-15/H₂-16 (δ_H 1,31, H-16b ; 1,94, H-16a)/H-17. Selon l'expérience HSQC *J*-modulé (Figure III.4.22), le carbone C-16 résonne à 28,0 ppm. Le proton H-16a montre des corrélations en HMBC (Figure III.4.23) avec les carbones C-13, C-14, C-15 et C-17 déjà identifiés et un carbone méthine résonant à 36,2 ppm dont le proton est repéré à 1,49

ppm (H-20) sur le spectre HSQC *J*-modulé (Figure III.4.22). Toute cette analyse nous permet de former les cycles C et D de ce triterpène tétracyclique.

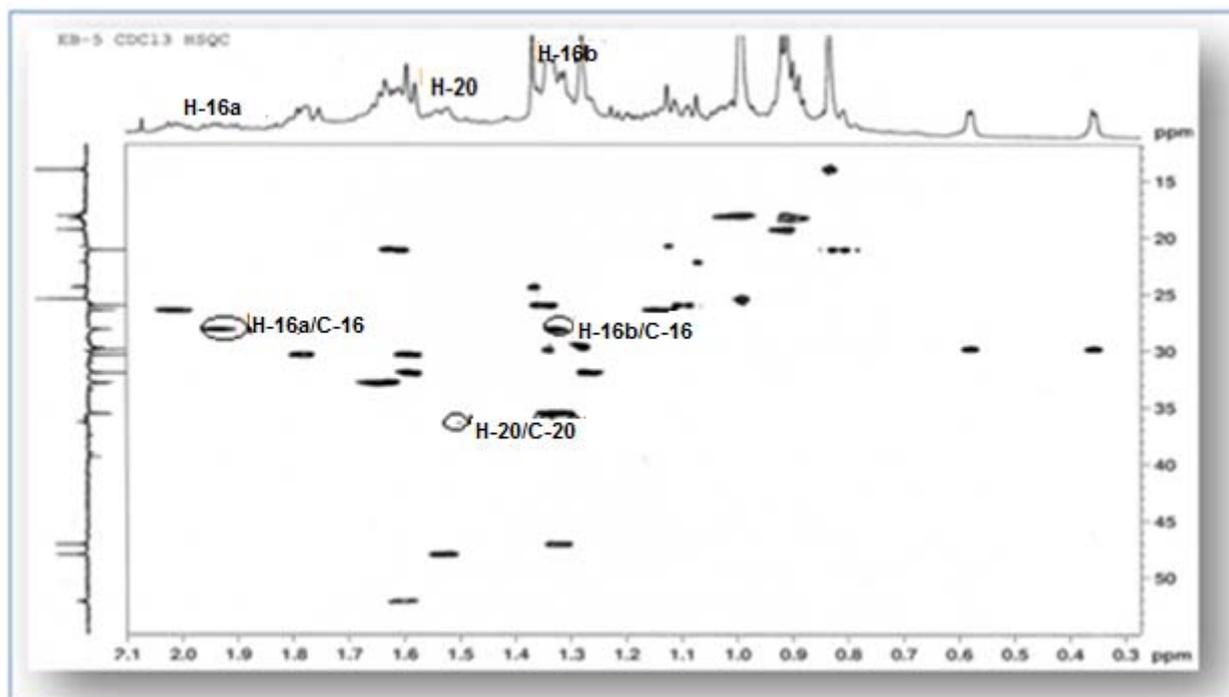


Figure III.4.22: Spectre HSQC *J*-modulé du composé 4

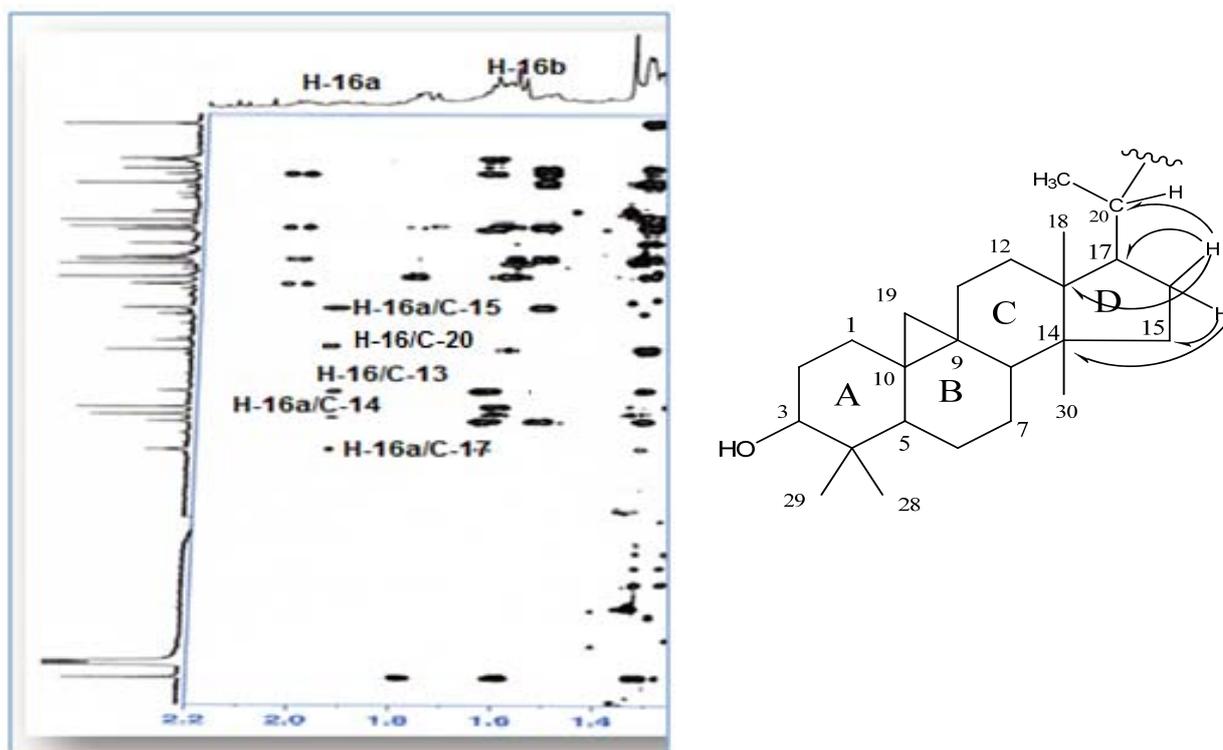


Figure. III. 4. 23: Spectre et corrélations HMBC du composé 4

A partir du proton H-20 assigné précédemment, l'expérience COSY (Figure III.4.24) permet de localiser les protons Me-21 résonant à 0,90 ppm (d, $J = 6,5$ Hz).

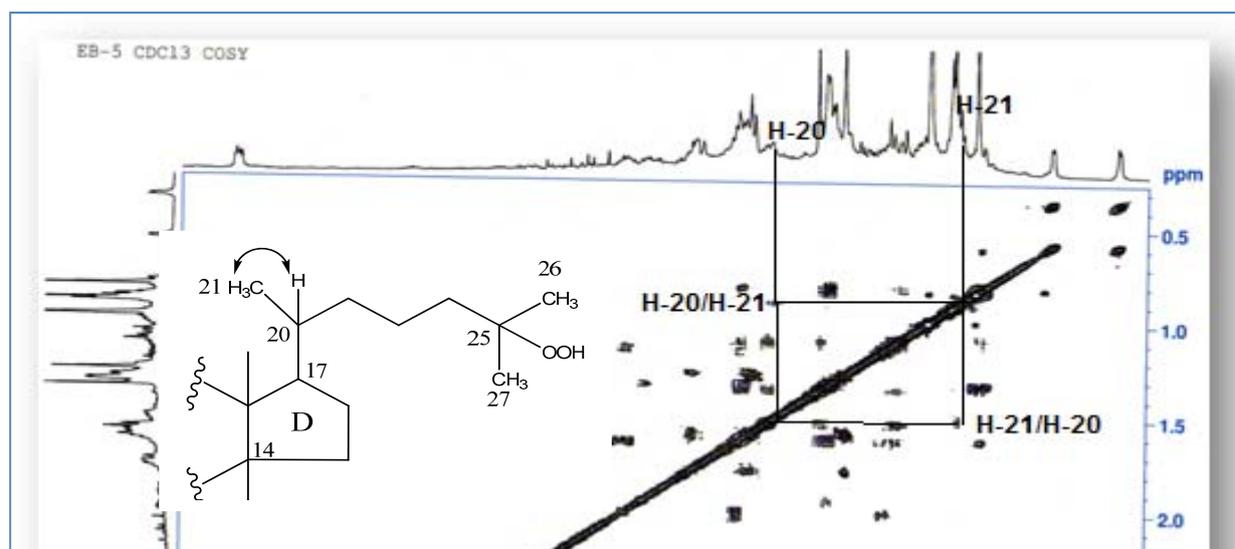


Figure III.4.24: Spectre COSY du composé 4

L'expérience HMBC (Figure III.4.25) met en évidence les corrélations entre les protons de ce groupement (Me-21) et les carbones C-17, C-20 déjà connus et un carbone repéré à 33,4 ppm correspondant au carbone C-22. Ses protons sont détectés à 1,14-1,55 ppm (H₂-22) par l'analyse du spectre HSQC *J*-modulé (Figure III.4.26).

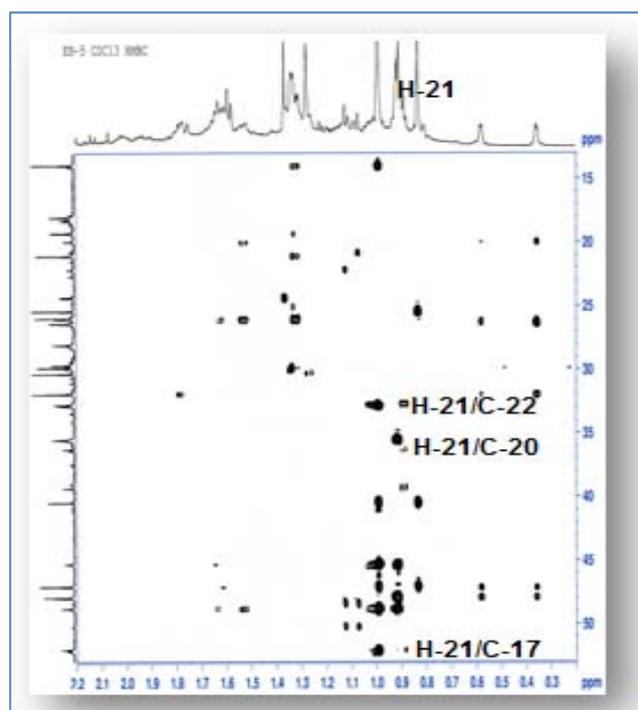
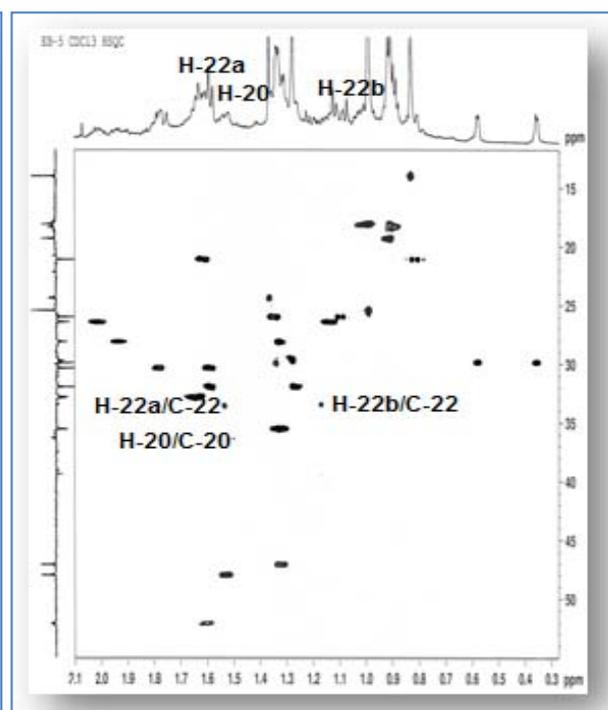


Figure III.4.25: Spectre HMBC

Figure III.4.26: Spectre HSQC *J*-modulé

Le spectre COSY (Figures III.4.27 et III.4.28) montre les couplages suivants H-22a (δ_H 1,55)/H-23a (δ_H 1,35)/H-23b (δ_H 1,10)/H-24a (δ_H 1,02)/H-24b (δ_H 0,80), correspondant à une

partie des protons de la chaîne latérale liée au carbone C-17 des composés triterpéniques tétracycliques. L'expérience hétéronucléaire directe HSQC J -modulé (Figure III.4.29) permet d'assigner leurs carbones résonant à 26,0 ppm (C-23) et 37,5 ppm (C-24).

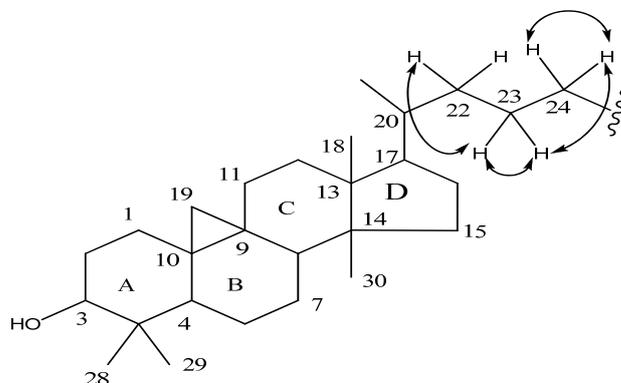


Figure III.4.27: Corrélations COSY au niveau de la chaîne latérale

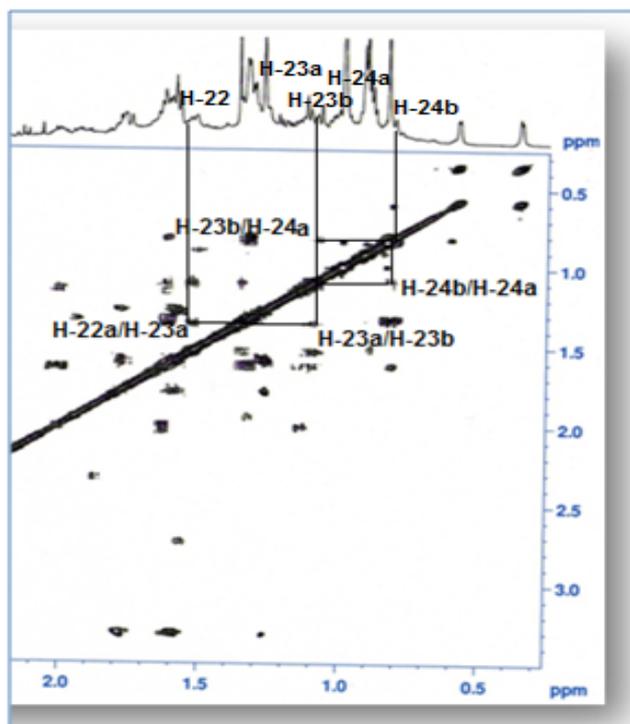


Figure III.4.28: Spectre COSY H-H

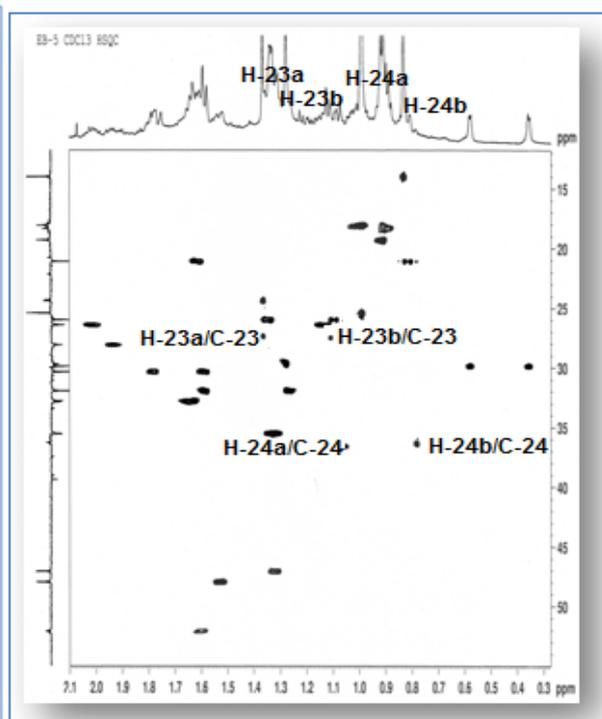


Figure III.4.29: Spectre HSQC J -modulé

Sur le spectre HMBC (Figure III.4.30), il est observé les corrélations H/C en 2J et 3J entre :

- Les protons H₂-23 et le carbone C-24 déjà attribué et un carbone quaternaire déblindé résonant à δ_c 78,9 correspondant au carbone C-25.
- Les protons H₂-24 et les carbones C-23 et C-25.
- Les protons méthyliques Me-26 et Me-27 et les carbones C-24 et C-25.

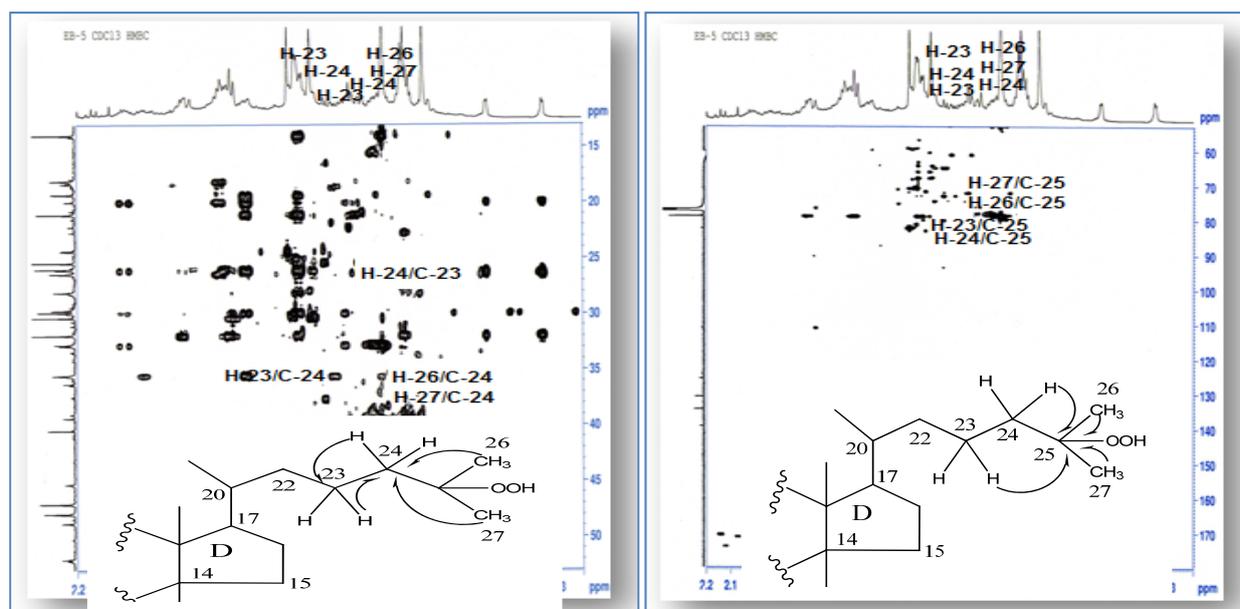


Figure III.4.30: Spectres HMBC du composé 4

Les données spectrales du composé 4 sont similaires à celles du composé 25-hydroperoxycycloart-23*E*-èn-3β-ol (5) isolé aussi dans le cadre de cette étude et identifié antérieurement dans les espèces *Aglaia grandis* [111], *Cladophora fascicularis* [112] et *Xanthosoma robustum* [113]. Le déplacement chimique déblindé du carbone quaternaire C-25 à δ_C 78,9 au lieu de 70 ppm dans le cas où ce carbone est porteur d'un groupement OH libre, indique que le carbone C-25 est lié à un groupement hydroperoxyde [111-114].

La différence principale entre les composés 4 et 5 réside dans l'absence des signaux δ_H 5,52/ δ_C 130,8 (CH-23) et δ_H 5,69/ δ_C 134,4 (CH-24) de la double liaison C-23=C-24 (5) et l'apparition des signaux de deux groupements méthylènes CH₂-23 (1,10–1,35/ δ_C 26,0) et CH₂-24 (0,80–1,02/ δ_C 37,5). L'hydrogénation de la double liaison $\Delta^{23,24}$ induit un blindage au niveau du carbone C-25 du composé 4 (78,9 ppm) en comparaison avec le même carbone du composé 5 (82,3 ppm) [111-114]. Ces résultats sont confirmés par l'observation sur le spectre de masse ESI d'un pic d'ion de fragmentation à $m/z = 337 [(M+Na)-146]^+$ correspondant à la perte de la chaîne latérale attachée au carbone C-17 : CH₃(CH₂)₄C(CH₃)₂OOH.

La stéréochimie de ce composé a été établie en analysant les corrélations observées sur le spectre NOESY (Figures III.4.31 et III.4.32) qui sont conformes aux effets reportés pour le composé 25-hydroperoxycycloart-23*E*-èn-3β-ol [111-113].

La multiplicité du signal du proton H-3 sous forme de doublet de doublets avec des constantes de couplage $J = 11,0$ et $4,2$ Hz permet d'assigner la stéréochimie α -axiale du proton

H-3. Celle-ci est confirmée par l'effet NOE observés sur le spectre NOESY entre les protons H-3 α /Me-28 et Me-28/H-5 α . Ce spectre montre des corrélations NOE entre les protons H-5/H-6 β , H-5/H-7 β , H-7 β /Me-30 et Me-30/H-17 indiquant que ces protons sont α -orientés. En conséquence la chaîne latérale liée au carbone C-17 a une orientation β . Alors que pour la face β , il est observé les effets NOE entre les deux protons du noyau cyclopropane (CH₂-19) et les protons du groupement méthyle Me-29 confirmant ainsi l'orientation β du noyau cyclopropane. D'autres effets NOE sont visualisés entre le proton H-19 *endo*/H-8 et H-8/Me-18, impliquant que tous ces protons sont β -orientés. Le déplacement chimique des protons Me-21 à 0,90 ppm et les corrélations NOE entre H-17 α /Me-21 et Me-21/H-12 β indiquent une configuration absolue 20*R* au niveau du carbone chiral C-20 comme il a été observé dans tous les cycloarténols isolés du règne végétal [101,109]. Les composés **4** et **5** exhibent un pouvoir rotatoire positif [+26,4 (**4**) et +46 (**5**)]. Il en résulte que la configuration absolue des carbones asymétriques du composé **4** est établie comme suit : 3*S*, 5*R*, 8*R*, 9*S*, 10*R*, 13*S*, 14*R* et 17*S*.

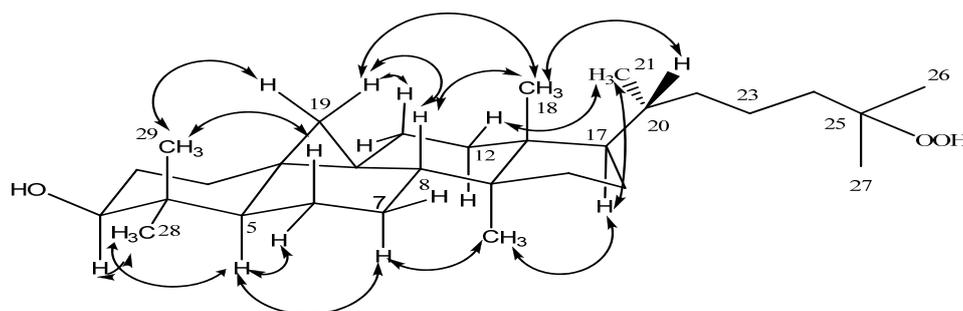


Figure III.4.31: Principales corrélations NOESY observées pour le composé **4**

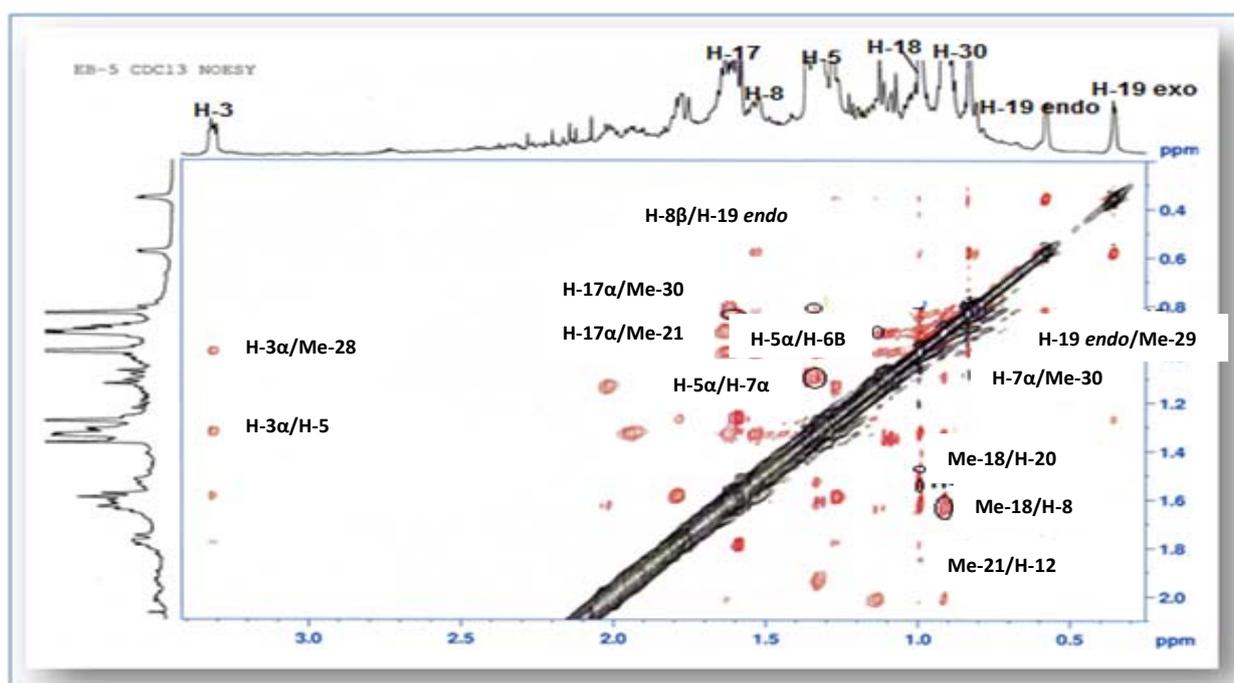


Figure III.4.32: Spectre NOESY du composé **4**

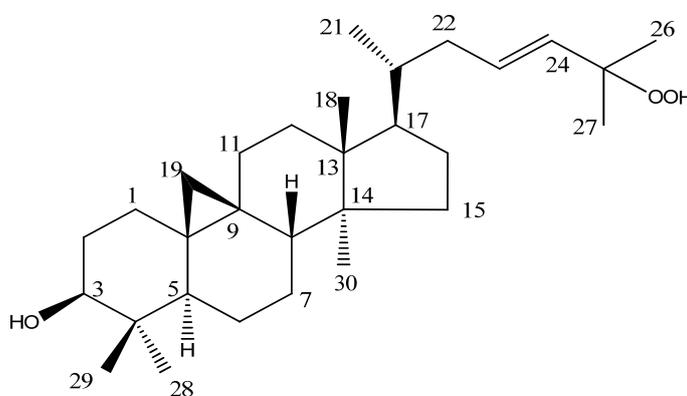
Les déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C du composé **4** sont présentés dans le tableau (4). Toutes ces données (Tableau III.4) nous permettent d'identifier sans ambiguïté, pour ce composé nouveau, la structure suivante : 25-hydroperoxycycloart-3 β -ol (**4**).

Tableau III.4: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **4** dans CDCl_3 .

Position	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1	1,27-1,58 m	31,9
2	1,59-1,79 m	30,3
3	3,31 dd 11,0, 4,2 H-3 α	78,8
4	-	40,4
5	1,32 m H-5 α	47,0
6	0,81-1,62 m	21,1
7	1,13-2,02 m	26,4
8	1,55 dd 10,5, 6,0 H-8 β	47,9
9	-	19,9
10	-	25,8
11	1,09-1,34 m	26,1
12	1,64 m	35,5
13	-	45,3
14	-	48,3
15	1,33 m	32,7
16	1,31-1,94 m	28,0
17	1,61 m H-17 α	52,0
18	1,01 m	18,0
19	0,36 d 3,7 H-19 <i>exo</i> 0,58 d 3,7 H-19 <i>endo</i>	29,8
20	1,49 m	36,2
21	0,90 d 6,5	18,3
22	1,14-1,55 m	33,4
23	1,10-1,35 m	26,0
24	0,80-1,02 m	37,5

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
25	-	78,9
26	1,09 s	22,2
27	1,09 s	22,2
28	0,99 s	25,4
29	0,83 s	14,0
30	0,92 s	19,3

III.7.5. Détermination structurale du composé 5

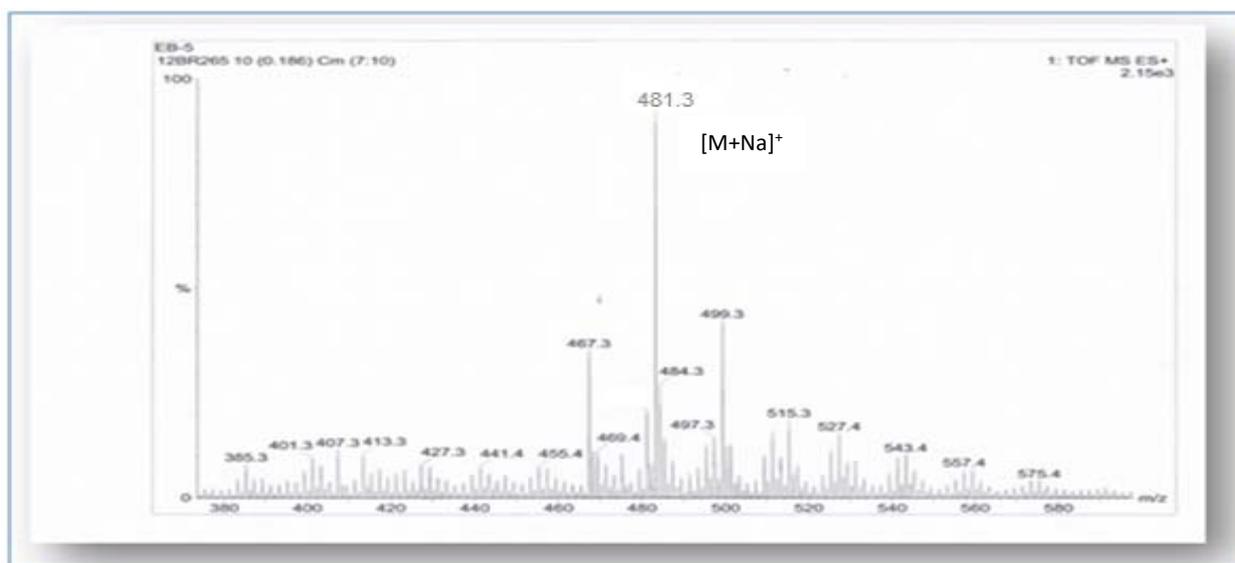


25-hydroperoxycycloart-23*E*-èn-3β-ol (**5**)

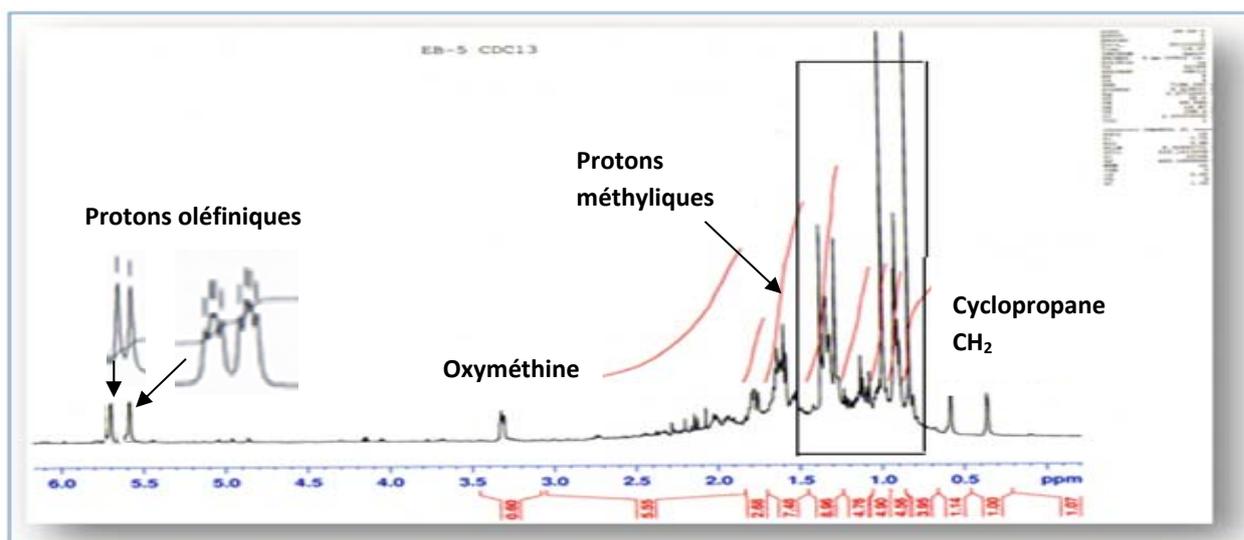
Ce triterpène tétracyclique est isolé sous forme d'une poudre amorphe blanche soluble dans le chloroforme. Il est invisible à la lumière UV à 254 et 366 nm et se colore en mauve après pulvérisation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

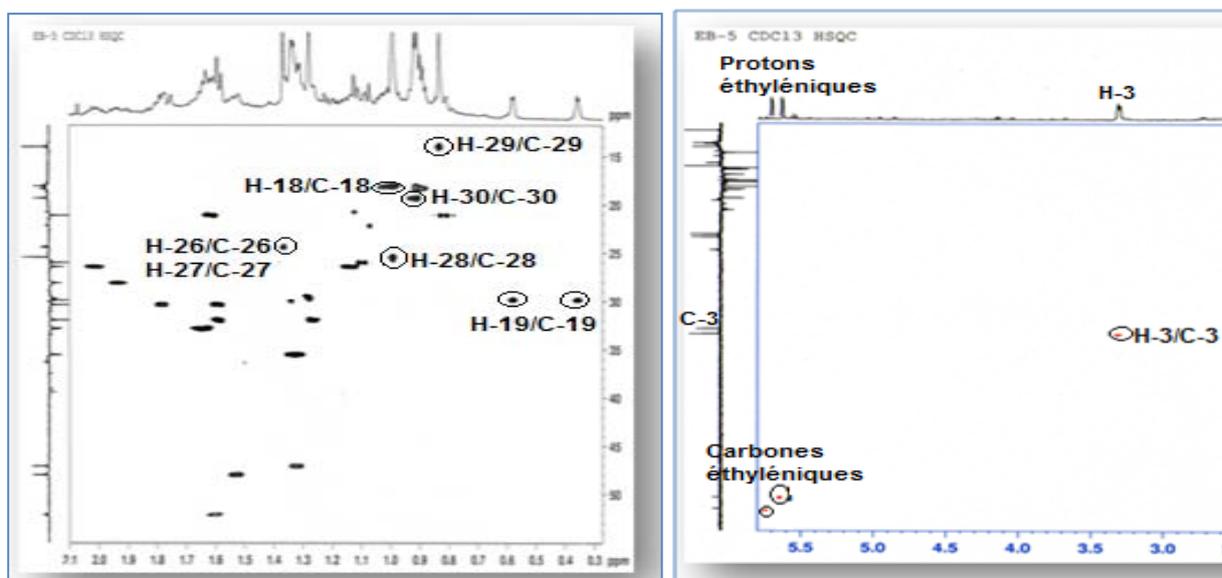
Le spectre IR de ce composé montre des bandes d'absorption à 3425 cm^{-1} attestant la présence de groupement hydroxyle et à 1635 cm^{-1} caractérisant une double liaison.

Le spectre de masse ESI-MS enregistré en mode positif du composé **5** (Figure III.5.1), présente un pic d'ion pseudomoléculaire à m/z 481,3 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, soit une masse moléculaire égale à 458 uma correspondant à une formule brute en $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3$. Le nombre d'insaturations égal à 6 et la différence de 2 uma par rapport au composé $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_3$ **4** ($M = 460$, nombre d'insaturation = 5) déjà identifié indique la présence dans la structure du composé **5** d'une double liaison ou un cycle supplémentaire.

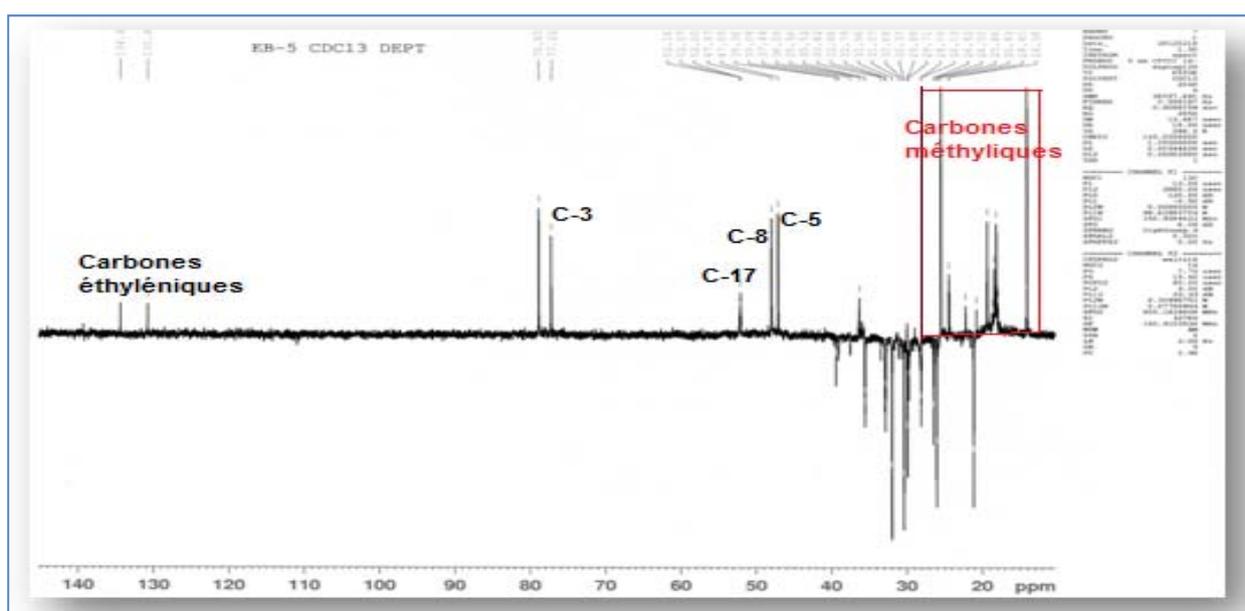
Figure III.5.1: Spectre de masse ESI-MS du composé **5**

Le spectre RMN ^1H (Figure III.5.2) du composé **5** est caractéristique d'un triterpène cycloartanique. Il indique la présence de sept méthyles résonant à δ_{H} 1,0 (3H, s, Me-28), 0,80 (3H, s, Me-29), 0,90 (3H, d, $J = 6,1$ Hz, Me-21), 0,93 (3H, s, Me-30), 0,98 (3H, s, Me-18) et 1,37 (6H, s, Me-26 et Me-27). Leurs carbones sont détectés à δ_{C} 25,3 (Me-28), 14,1 (Me-29), 18,2 (Me-21), 19,3 (Me-30), 18,0 (Me-18), 24,3 (Me-26) et 24,4 (Me-27) par analyse du spectre HSQC J -modulé (Figure IV.5.3). Deux pics de deux protons non équivalents repérés à δ_{H} 0,35 (1H, d, $J = 3,6$ Hz) et 0,58 (1H, d, $J = 3,6$ Hz) sont attribués aux protons H-19 *exo* et H-19 *endo* respectivement d'un noyau cyclopropane tétrasubstitué. Le spectre RMN ^1H révèle aussi la présence d'un signal à δ_{H} 3,30 (1H, dd, $J = 11,1, 4,1$ Hz) attribuable au proton H-3 α . Son carbone résonne à 78,5 ppm selon le spectre HSQC J -modulé (Figure III.5.3).

Figure III.5.2 : Spectre RMN ^1H du composé **5**

Figure III.5.3: Spectres HSQC *J*-modulé du composé **5**

Les signaux des spectres RMN ^1H (Figure III.5.2) et ^{13}C DEPT (Figure III.5.4) sont semblables à ceux du 25-hydroperoxycycloart-3 β -ol (**4**), avec cependant la seule différence majeure par rapport au composé **4** est l'apparition de deux signaux déblindés résonant à δ_{H} 5,56 (ddd, $J = 15,9, 7,0, 5,0$ Hz) et δ_{H} 5,58 (d, $J = 15,9$ Hz) attribuables à deux protons d'une double liaison endocyclique (CH=CH). La constante de couplage $J = 15,9$ Hz indique une géométrie *trans* au niveau de la double liaison. L'expérience HSQC *J*-modulé (Figure III.5.3) permet de repérer ses carbones à δ_{C} 130,8 et 136,4. Ceci exclut la présence d'un cycle supplémentaire dans le squelette du composé **5**.

Figure III.5.4: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **5**

A partir des protons déjà caractéristiques, l'analyse combinée des spectres COSY H-H et HSQC J -modulé (Figure III.5.5) conduit à attribuer les déplacements chimiques de la plupart des protons et carbones de ce composé.

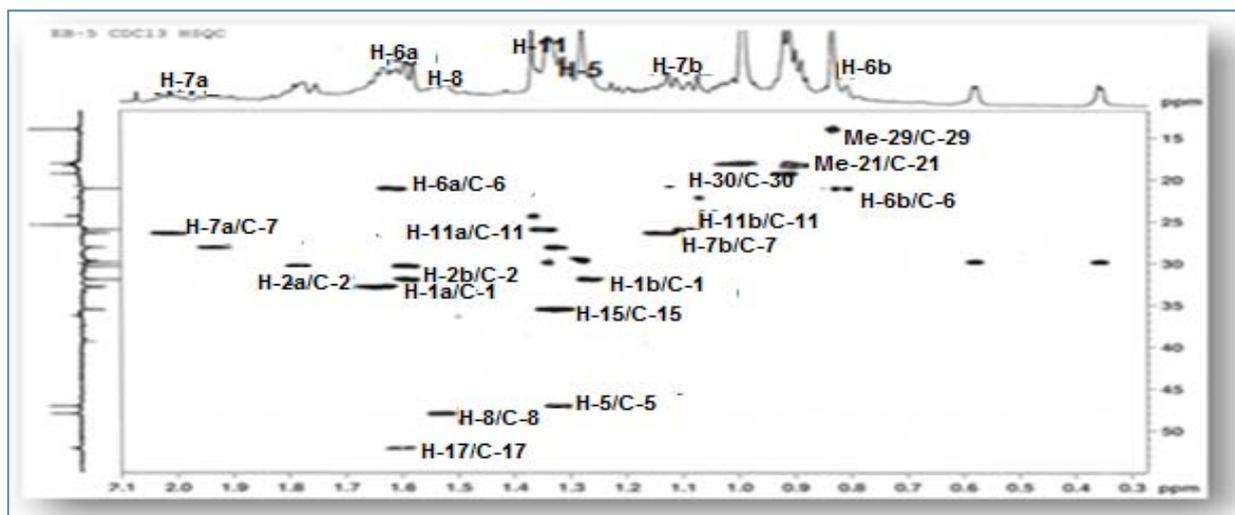


Figure III.5.5: Spectre HSQC J -modulé du composé **5**

L'expérience HMBC (Figures III.5.6 et III.5.7) permet d'observer les corrélations à longue distance en 2J et 3J entre:

- Le proton H-3 et les carbones résonant à δ_c 25,3 (Me-28), 14,1 (Me-29), 40,8 (C-4) et 47,1 (C-5).
- Les deux protons du groupement méthylène H₂-19 du noyau cyclopropane et les carbones reperés à δ_c 20,0 (C-9), 25,9 (C-10), 26,0 (C-11), 47,1 (C-5) et 47,6 (C-8).
- Les protons du groupement méthyle Me-18 et les carbones à δ_c 32,9 (C-12), 45,2 (C-13), 48,6 (C-14) et 52,2 (C-17).
- Les protons du groupement méthyle Me-30 et les carbones C-8, C-13 et C-14 déjà attribués et le carbone C-15 résonant à 35,5 ppm.

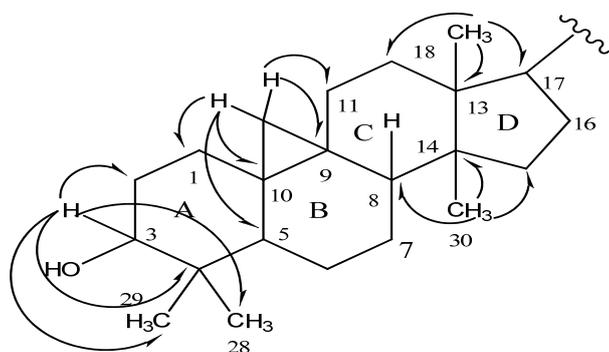


Figure III.5.6: Corrélations HMBC des cycles (A, B, C et D) du composé **5**

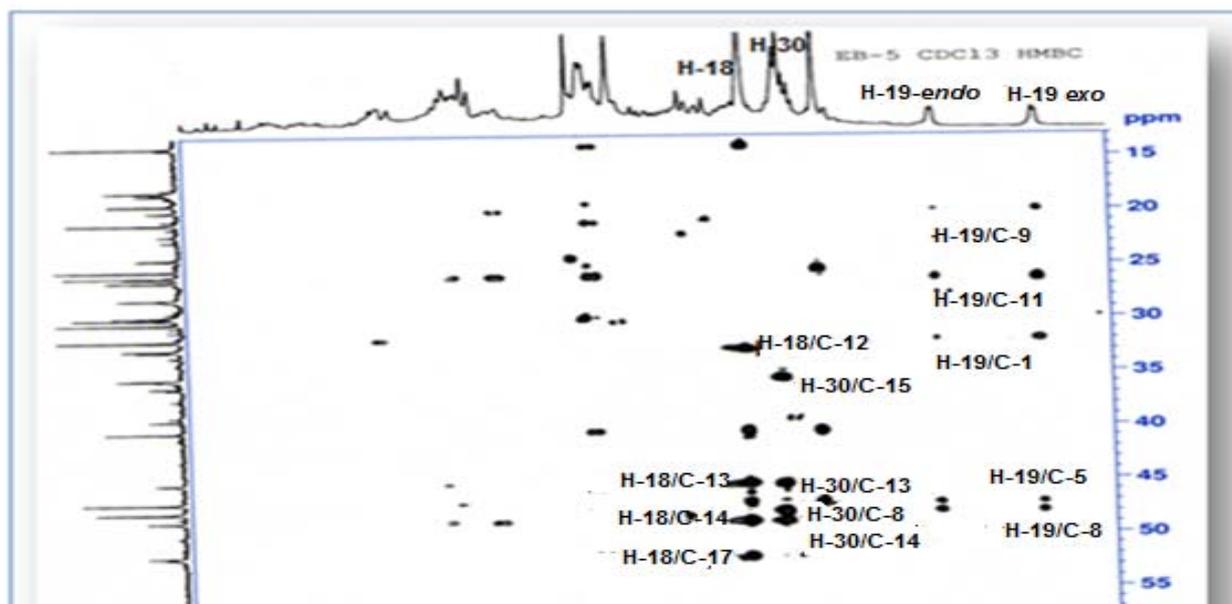


Figure III.5.7: Spectre HMBC du composé 5

Toute cette analyse nous permet d'assigner les déplacements chimiques des protons et carbones de tous les cycles de ce triterpène.

Comme il a été signalé précédemment, la différence entre les composés 4 et 5 réside dans l'apparition d'une double liaison endocyclique au niveau de la chaîne latérale liée au carbone C-17 et dont la position reste à déterminer. Pour cela, l'analyse HMBC s'avère à notre avis l'outil de choix pour localiser cette double liaison. En effet, le carbone C-17 (52,2 ppm) corrèle en HMBC (Figure III.5.8) avec les protons du groupement méthyle Me-21 (0,90 ppm), qui à leur tour couplent avec un carbone méthine CH-20 (36,5 ppm) et un carbone méthylène ne pouvant être que le CH₂-22 (40,7 ppm).

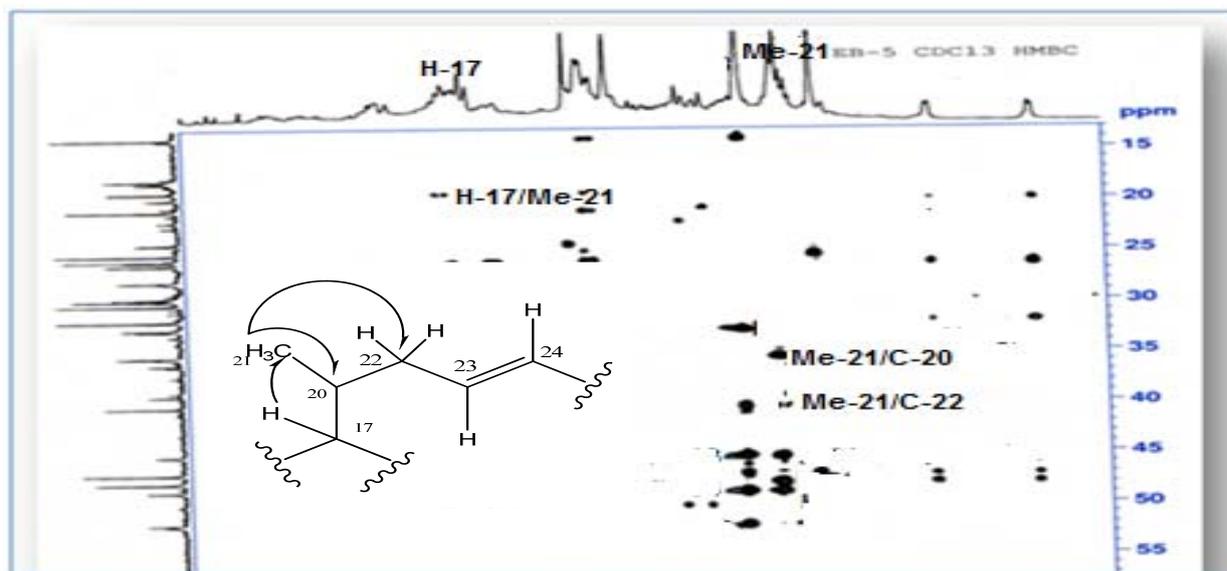


Figure III.5.8: Spectre HMBC du composé 5 (chaîne latérale)

Les protons de ces carbones sont localisés par analyse HSQC *J*-modulé (Figure III.5.9) à δ_H 1,50 (m, H-20), 1,80 (m, H-22b) et 2,20 (m, H-22a).

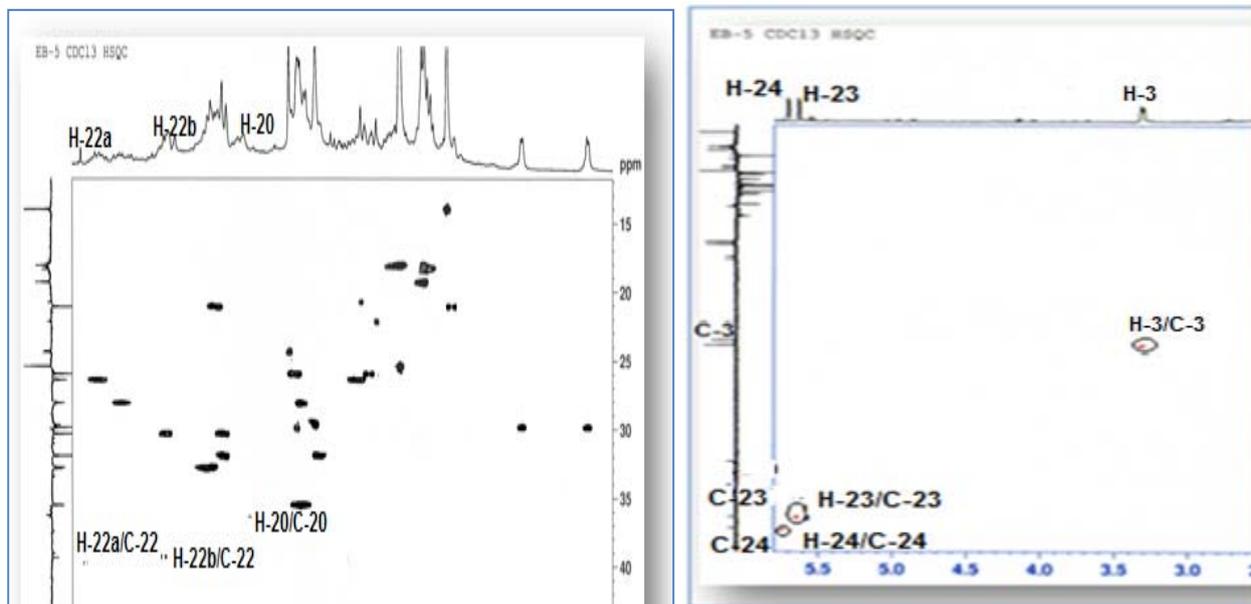


Figure III.5.9: Spectres HSQC *J*-modulé du composé **5**

Les protons H₂-22 couplent en COSY (Figure III.5.10) avec un proton déblindé résonnant à δ_H 5,56 (ddd, $J = 15,9, 7,0$ et $5,0$ Hz) correspondant au proton éthylénique H-23. Le deuxième proton éthylénique H-24 est assigné à δ_H 5,58 (d, $J = 15,9$ Hz) suite à son couplage avec le proton H-23 sur le spectre COSY (Figure III.5.10).

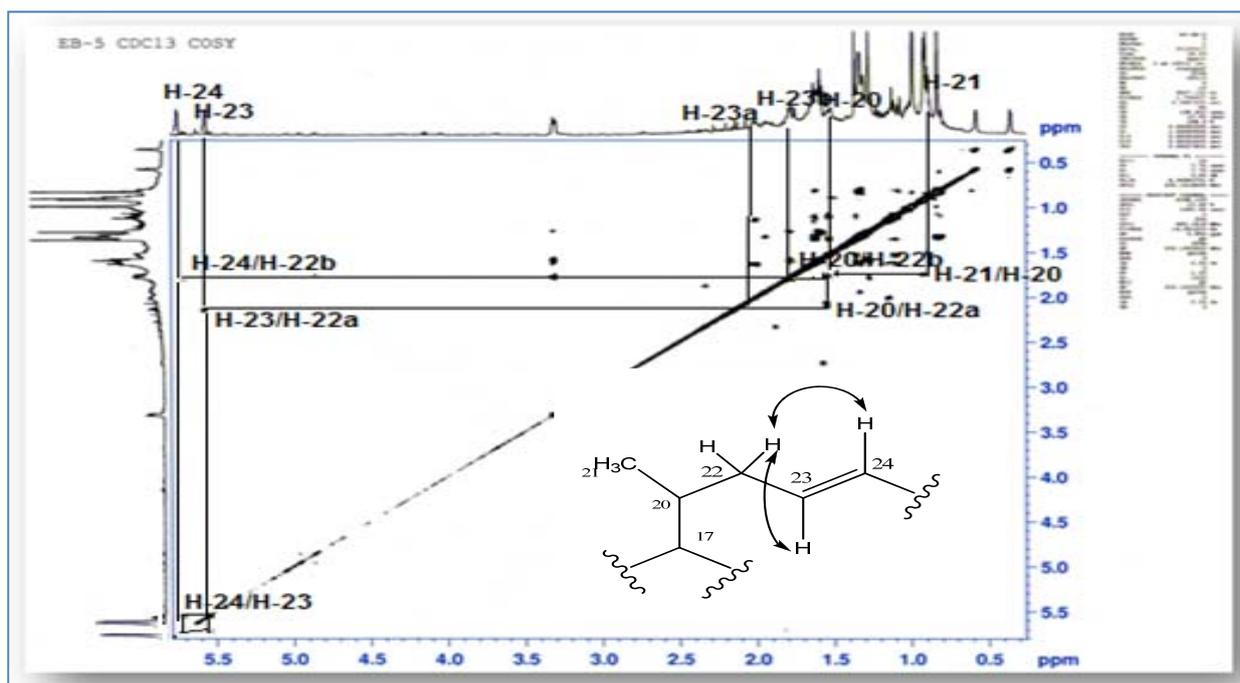


Figure III.5.10: Spectre COSY H-H du composé **5**

Le spectre HSQC J -modulé (Figure III.5.9) permet d'assigner les carbones C-23 à δ_c 130,8 et C-24 à δ_c 136,4.

L'expérience HMBC (Figures III.5.11 et III.5.12) permet de compléter l'identification de la chaîne latérale en montrant les corrélations en 2J et 3J entre les protons éthyléniques H-23/H-24 et les carbones des groupements méthyles Me-26 (δ_c 24,3), Me-27 (δ_c 24,4) et un carbone quaternaire déblindé résonnant à 82,3 ppm (C-25). Ce déblindage pourrait s'expliquer par la présence de groupement hydroperoxyde en position 25 [111-114]. Ceci est confirmé par le spectre de masse indiquant une formule brute en $C_{30}H_{50}O_3$ ($M = 458$).

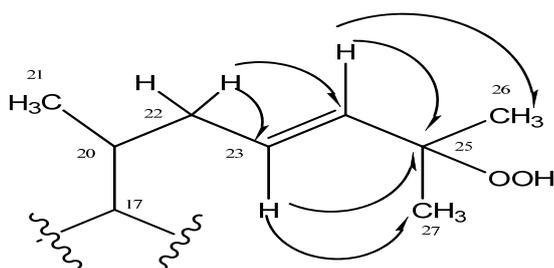


Figure III.5.11: Corrélations HMBC du composé **5** (chaîne latérale)

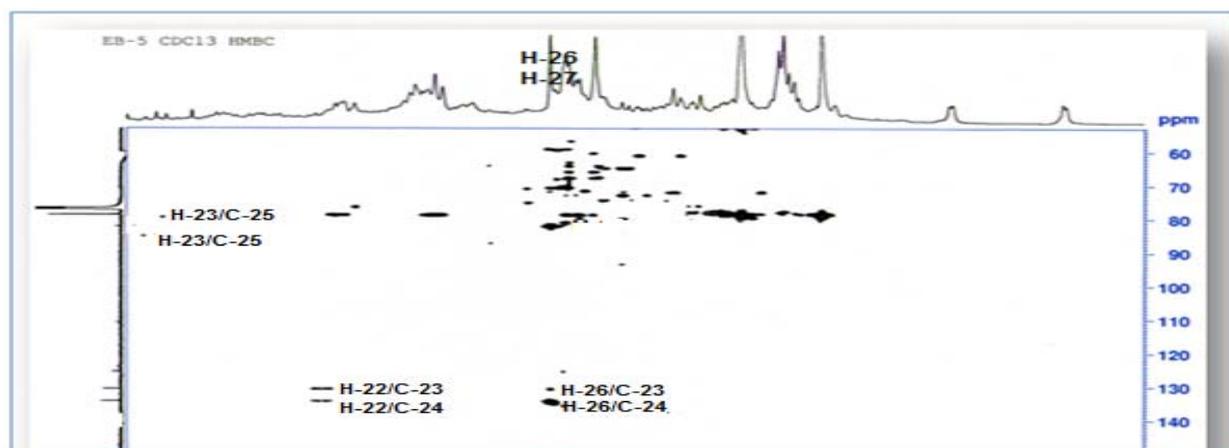
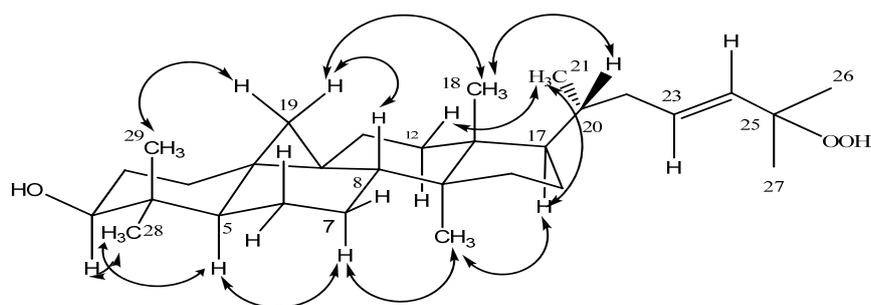
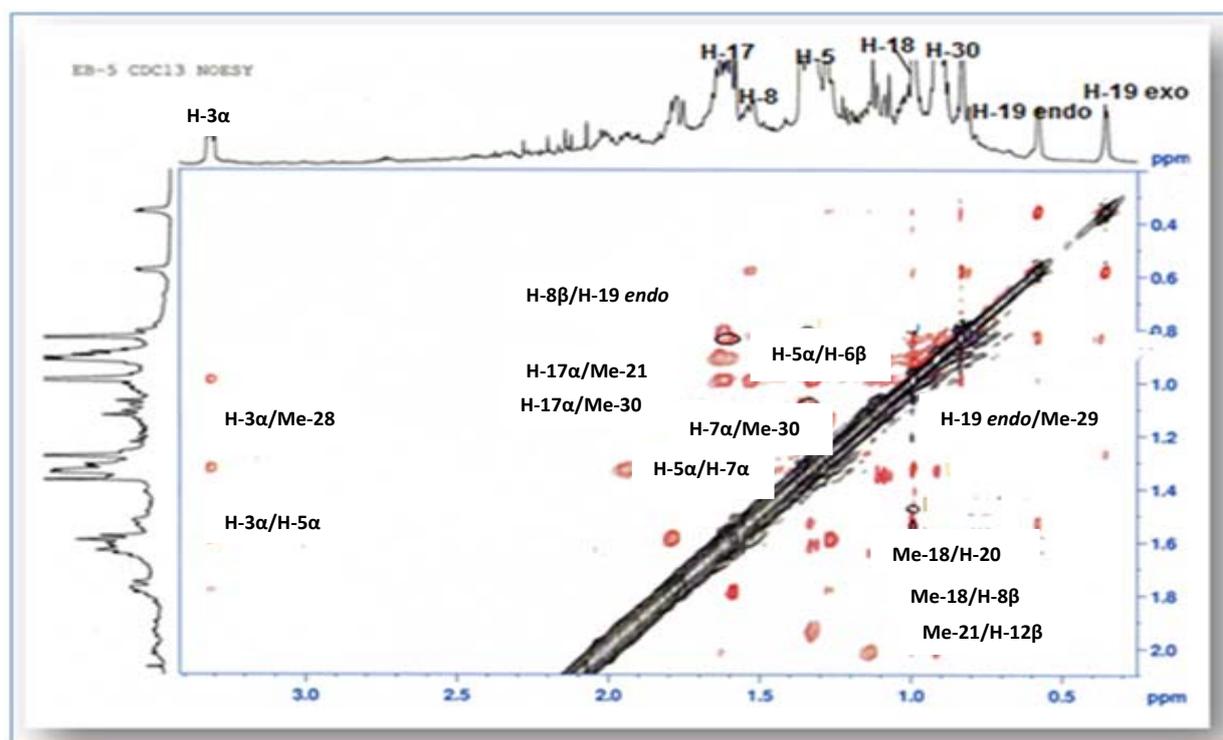


Figure III.5.12: Spectre HMBC du composé **5**

La stéréochimie du composé **5** est établie par analyse des valeurs de constantes de couplage et les effets NOE observés sur le spectre NOESY (Figures III.5.13 et III.5.14). Ce dernier indique des corrélations entre les protons du groupement méthylène CH_2 qui sont en position β (H-19 *exo*, H-19 *endo*) [101] et les protons méthyliques Me-29, impliquant que le méthyle Me-29 est β -axial. Le proton H-19 *endo* corrèle aussi avec les protons H-8 β et Me-18. La tache de corrélation entre le proton H-3 α et Me-28 permet de conclure l'orientation α des protons Me-28. D'autres effets NOE sont visualisés sur le spectre NOESY entre les protons H-3 α /H-5 α , H-5 α /H-7 α , H-7 α /Me-30, Me-30/H-17 α et H-17 α /Me-21 (Figure III.5.13).

Figure III.5.13: Corrélations NOESY observées pour le composé **5**Figure III.5.14: Spectre NOESY du composé **5**

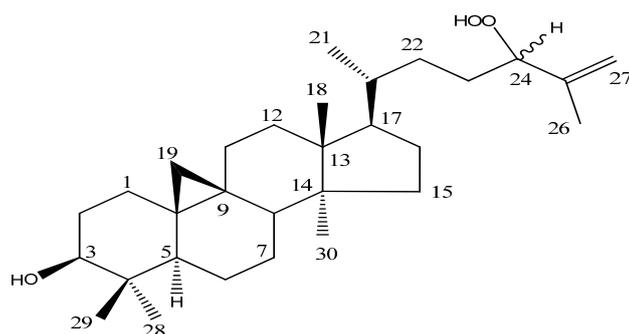
Toute cette analyse spectroscopique (Tableau III.5) et la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = +46^\circ$ (c 0,4, MeOH) permettent d'attribuer pour le composé **5** la structure suivante: 25-hydroperoxycycloart-23*E*-èn-3β-ol. Ce triterpène a été isolé pour la première fois du genre *Euphorbia*. Il a été isolé antérieurement des espèces *Aglaia grandis* [111], *Cladophora fascicularis* [112] et *Xanthosoma robustum* [113]. Il possède une activité antibactérienne contre les souches *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* et *Microcoques lutteuse* [113].

Tableau III.5: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **5** dans CDCl₃.

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	1,26-1,59 m	31,8

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
2	1,60-1,79 m	30,4
3	3,30 dd 11,1, 4,1 H-3 α	78,5
4	-	40,8
5	1,30 m H-5 α	47,1
6	0,83-1,60 m	21,2
7	1,10-2,04 m	26,8
8	1,56 dd 10,5, 6,0 H-8 β	47,6
9	-	20,0
10	-	25,9
11	1,10-1,32 m	26,0
12	1,64 m	32,9
13	-	45,2
14	-	48,6
15	1,32 m	35,5
16	1,31-1,93 m	28,1
17	1,60 m H-17 α	52,2
18	0,98 s	18,0
19	0,35 d 3,6 H-19 <i>exo</i> 0,58 d 3,6 H-19 <i>endo</i>	29,7
20	1,50 m	36,5
21	0,90 d 6,1	18,2
22	1,80-2,20 m	40,7
23	5,56 ddd 15,9, 7,0, 5,0	130,8
24	5,58 d 15,9	136,4
25	-	82,3
26	1,37 s	24,3
27	1,37 s	24,4
28	1,0 s	25,3
29	0,80 s	14,1
30	0,93 s	19,3

III.7.6. Détermination structurale du composé 6

3β-hydroxycycloart-25-en-24-hydroperoxyde (**6**)

Le composé **6** correspond au triterpène tétracyclique nommé 3β-hydroxycycloart-25-en-24-hydroperoxyde. Ce triterpène se présente sous forme de poudre blanche soluble dans le chloroforme. Il est invisible à la lumière UV à 254 et 366 nm et se colore en rose après pulvérisation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. Il a été identifié antérieurement des espèces suivantes : *Euphorbia cyparissias* [47], *Aglaia grandis* [111], *Cladophora fascicularis* [112] et *Xanthosoma robustum* [113].

Le spectre IR du composé **6** présente des bandes d'absorption de groupement hydroxyle (3393 cm^{-1}) et de double liaison (1640 cm^{-1}).

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III.6.1) réalisé en mode positif montre un pic de l'ion pseudomoléculaire à $m/z = 481,3$ $[M+Na]^+$, donnant une masse moléculaire de 458 uma et une formule brute en $C_{30}H_{50}O_3$ comme il a été observé pour le composé **5**. Ceci suggère que les composés **5** et **6** sont des isomères.

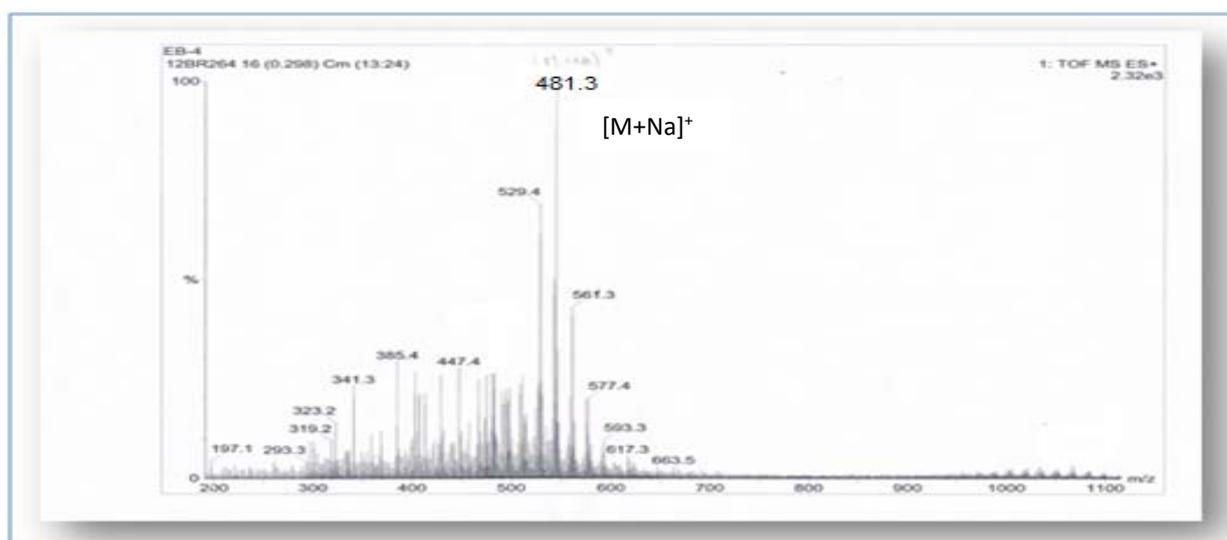


Figure III.6.1: Spectre de masse ESI-MS du composé 6]

L'analyse combinée des spectres RMN ^1H (Figure III.6.2), ^{13}C J -modulé et HSQC J -modulé montre la présence de signaux de deux protons fortement blindés résonant à δ_{H} 0,36 (1 H, d, $J = 4,0$ Hz, H-19 *exo*) et 0,58 (1H, d, $J = 3,7$ Hz, H-19 *endo*) du noyau cyclopropane tétrasubstitué, de six groupements méthyles à δ_{H} 0,98 (3H, s, Me-18), 0,91 (3H, s, Me-30), 0,90 (3H, d, $J = 6,1$ Hz, Me-21), 1,76 (3H, s, Me-26), 0,99 (3H, s, Me-28) et 0,83 (3H, s, Me-29) et d'un groupement hydroxyméthine à δ_{H} 3,32 (1H, dd, $J = 11,0, 4,1$ Hz, H-3 α).

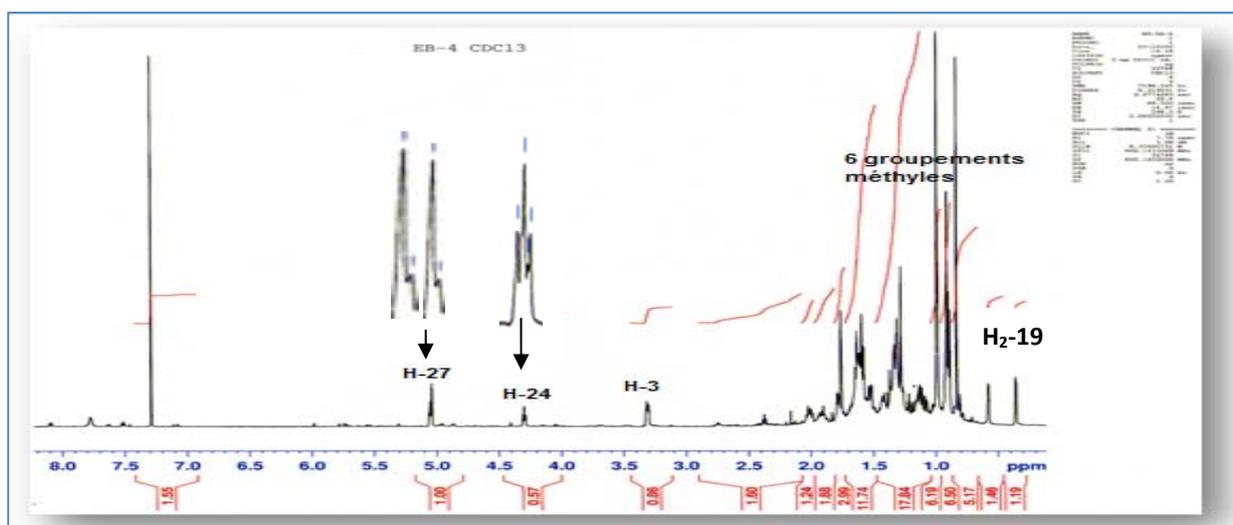


Figure III.6.2: Spectre RMN ^1H du composé 6

Leurs carbones sont déterminés à δ_{C} 78,8 (C-3), 29,9 (C-19), 18,0 (Me-18), 18,2 (Me-21), 17,1 (Me-26), 25,4 (Me-28), 14,0 (Me-29) et 19,3 (Me-30) par analyse du spectre HSQC J -modulé (Figure III.6.3). Ces valeurs de déplacements chimiques sont caractéristiques d'un triterpène tétracyclique à squelette cycloartane.

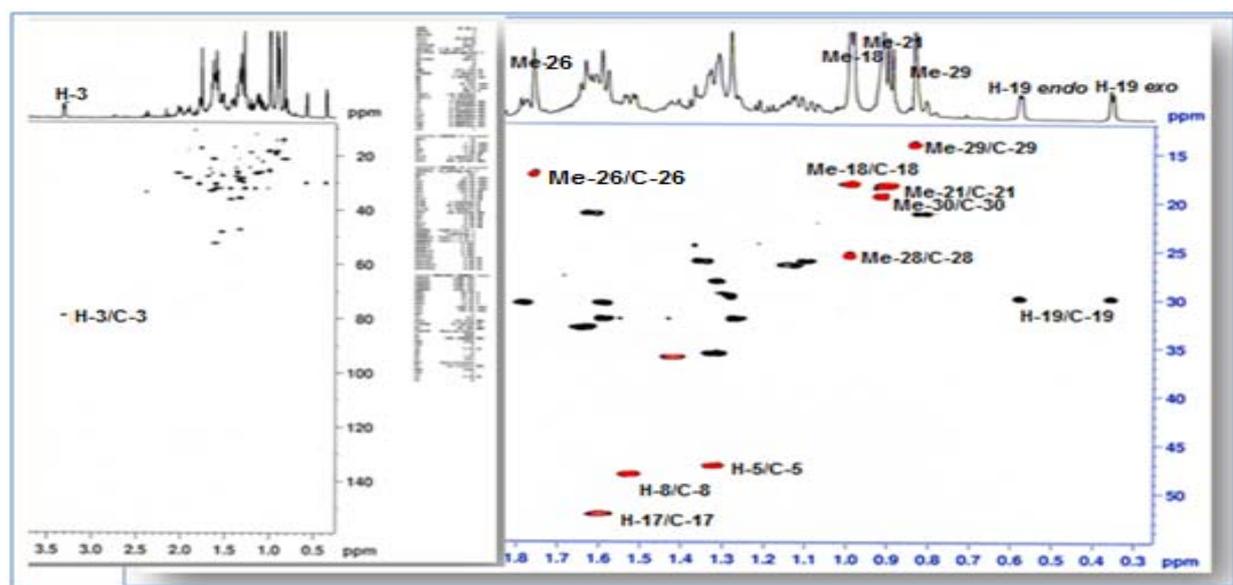


Figure III.6.3: Spectres HSQC J -modulé du composé 6

Les spectres RMN ^1H , ^{13}C et HSQC J -modulé du composé **6** révèlent une similitude structurale avec le composé **5** au niveau du squelette cyclique (A, B, C et D). La différence structurale entre les composés **5** et **6** (isomères) réside dans la disparition des signaux de protons et carbones de la double liaison $\Delta^{23,24}$ pour le composé **5** et l'apparition dans le cas du composé **6** sur le spectre RMN ^1H (Figure III.6.2) de trois signaux à δ_{H} 4,30 (1H, t, $J = 6,8$ Hz), 5,04 (1H, s) et 5,06 (1H, s) et sur le spectre RMN ^{13}C découplé (Figure III.6.4) de trois signaux localisés à δ_{C} 90,2, 114,2 et 143,5.

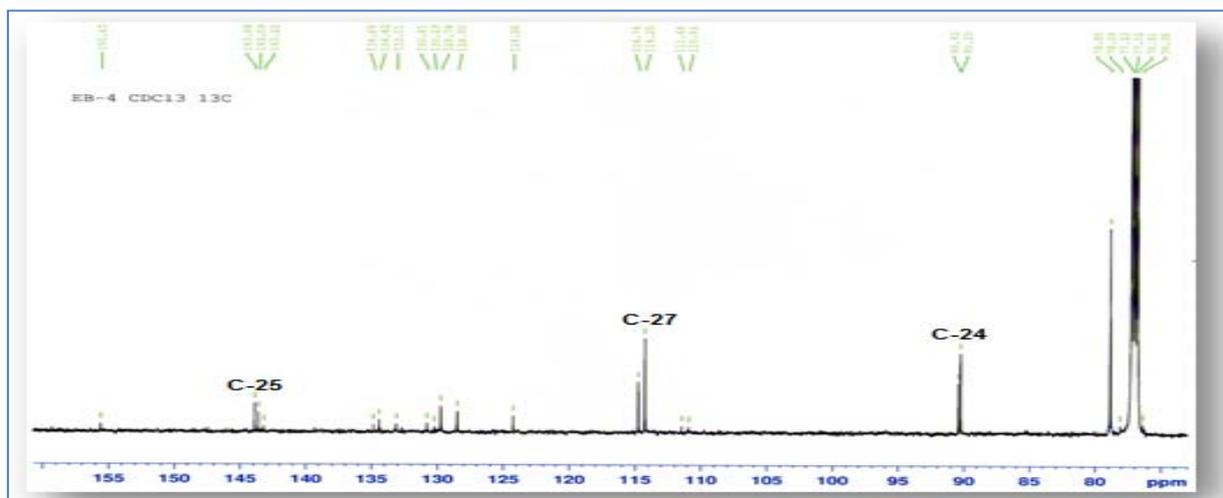


Figure III.6.4: Spectre RMN ^{13}C découplé du composé **6**

L'analyse HSQC J -modulé (Figure III.6.5) permet d'affecter ces protons à leurs carbones porteurs comme suit : δ_{H} 4,30/ δ_{C} 90,2 et δ_{H} 5,04 et 5,06/ δ_{C} 114,7. Il en résulte que la chaîne latérale comporte un groupement oxyméthine et une double liaison exocyclique portant deux protons géminés.

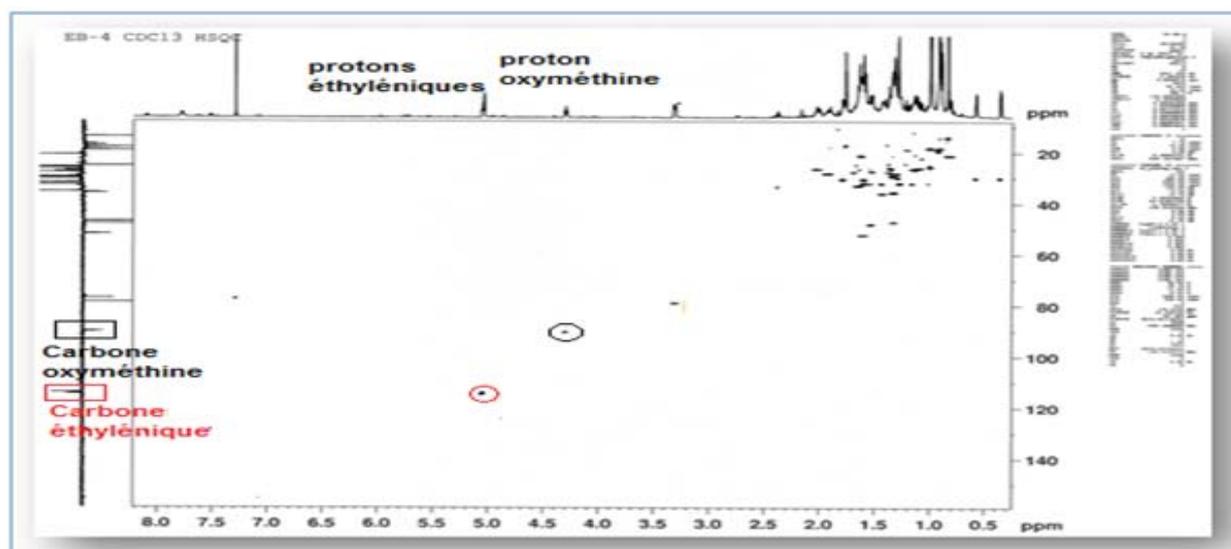


Figure III.6.5: Spectre HSQC J -modulé du composé **6**

A partir des protons Me-21 (δ_H 0,90, d, $J = 6,1$ Hz), l'expérience COSY H-H (Figures III.6.6 et III.6.7) permet de visualiser les couplages entre les protons Me-21/H-20 (δ_H 1,41)/H₂-22 (δ_H 1,50)/H₂-23 (δ_H 1,28-1,58)/CHO (δ_H 4,30, H-24) constituant un même système de spins.

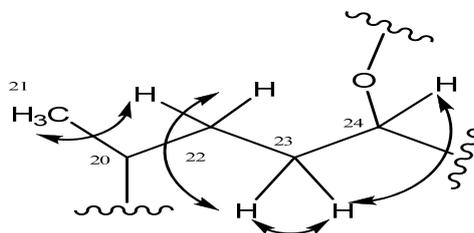


Figure III.6.6: Corrélations COSY H-H de la chaîne latérale du composé 6

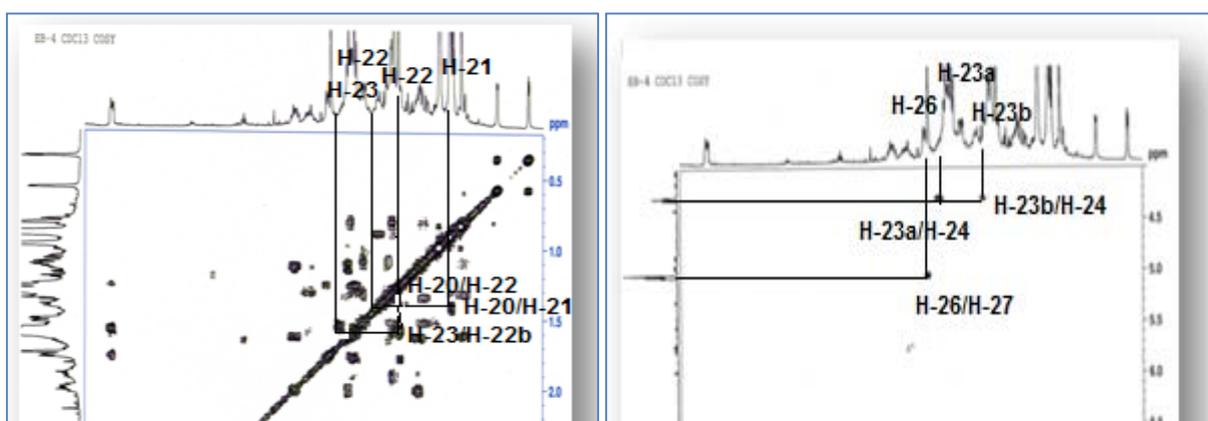


Figure III.6.7: Spectres COSY H-H du composé 6

L'analyse du spectre HSQC J -modulé (Figure III.6.8) conduit à attribuer leurs carbones à δ_C 35,8 (C-20), 18,2 (Me-21), 32,0 (C-22), 27,5 (C-23) et 90,2 (C-24).

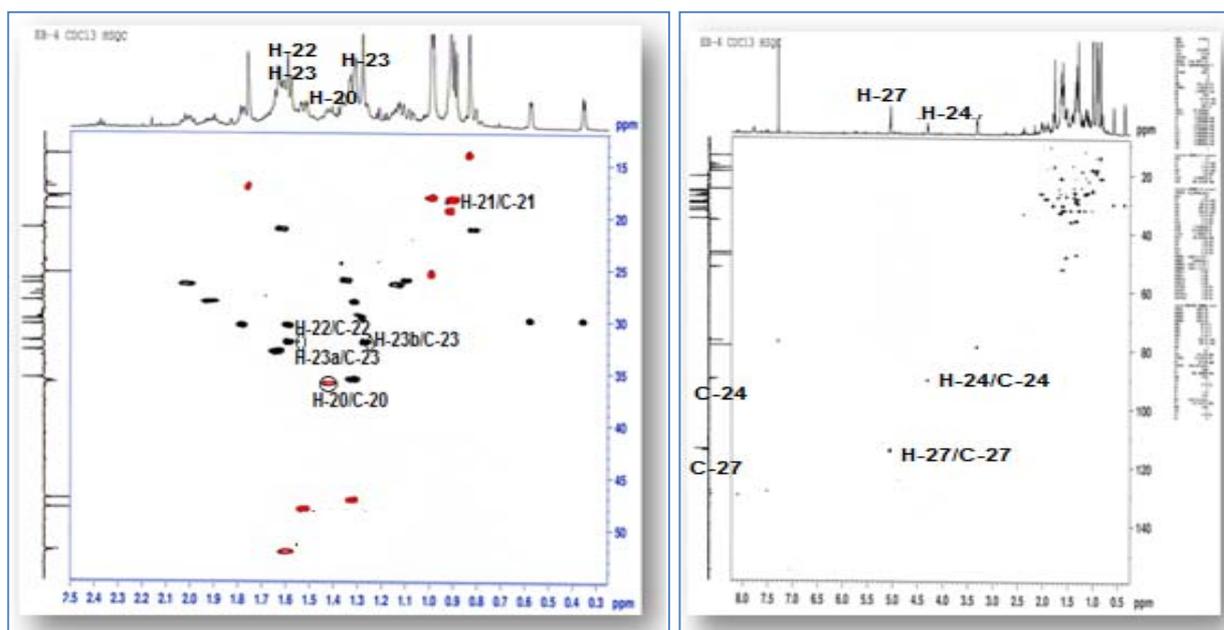


Figure III.6.8: Spectres HSQC J -modulé du composé 6

L'expérience HMBC (Figures III.6.9 et III.6.10) montre des corrélations en 2J et 3J entre le proton H-24 et les carbones C-22, C-23 déjà assignés, un groupement méthyle à 17,1 ppm (Me-26) et deux carbones éthyléniques résonant à 143,5 ppm (C-25) et 114,2 ppm (C-27) caractéristiques de la double liaison d'un groupement isoprényle. Aussi, ces deux protons oléfiniques H-27a et H-27b couplent en COSY H-H (Figures III.6.7 et III.6.9) avec les protons du groupement méthyle Me-26 (couplage allylique). Ces constatations suggèrent la présence d'un groupement isoprényle lié au carbone C-24.

En se basant sur la formule brute de ce composé ($C_{30}H_{50}O_3$) déduite à partir du spectre de masse (Figure III.6.2) et la valeur du déplacement chimique déblindé du carbone oxyméthine C-24 à δ_c 90,2, la substitution au niveau du carbone C-24 ne peut être faite que par un groupement fortement attracteur hydroperoxyde (OOH) [45,111-113].

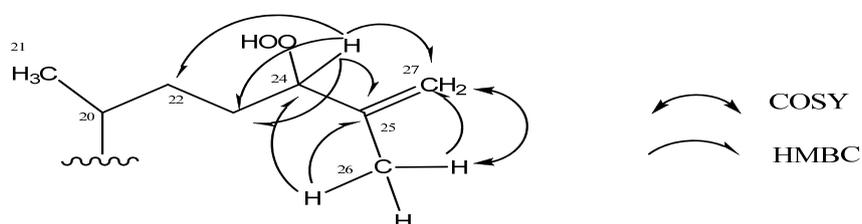


Figure III.6.9: Corrélations COSY et HMBC du composé 6

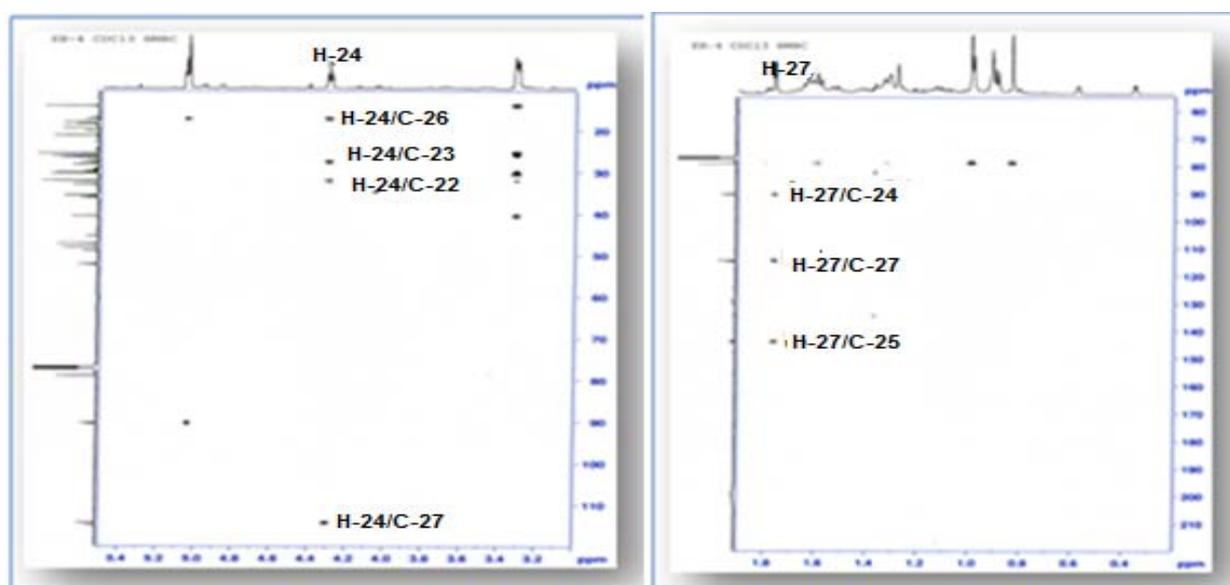
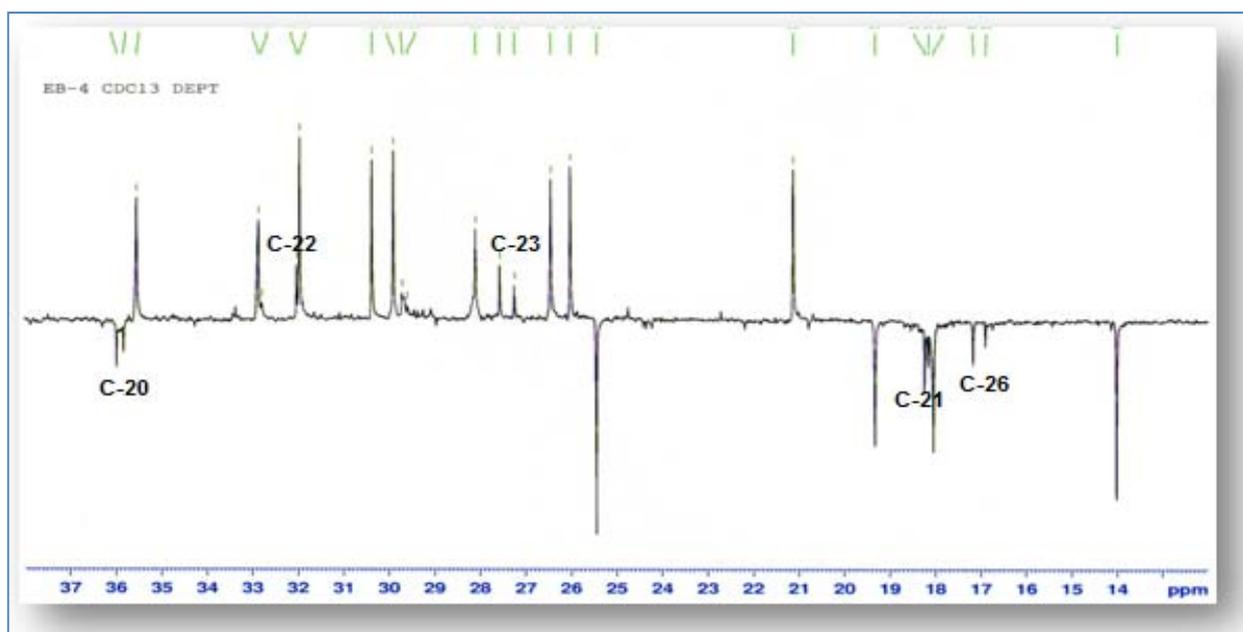
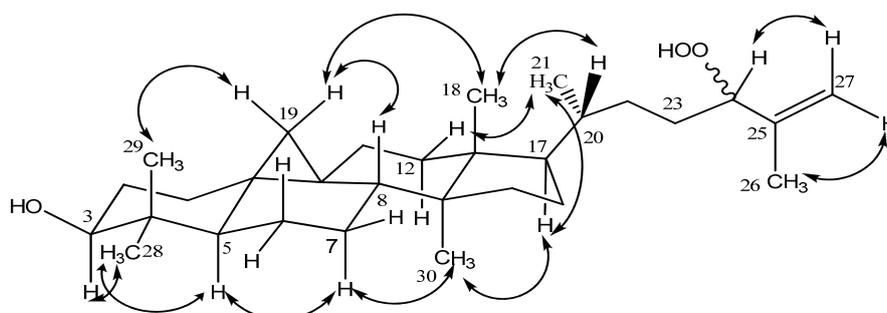


Figure III.6.10: Spectres HMBC du composé 6

Le dédoublement des signaux sur les spectres RMN ^{13}C (Figures III.6.4 et III.6.11) des carbones C-20 (δ_c 35,8 et 35,9), Me-21 (δ_c 18,2 et 18,5), C-22 (δ_c 32,0 et 32,7), C-23 (δ_c 27,5 et 27,9), C-24 (δ_c 90,2 et 90,4), C-25 (δ_c 143,5 et 143,8), Me-26 (δ_c 17,1 et 17,6) et C-27 (δ_c 114,2 et 114,7) indique qu'il s'agit d'un mélange de deux épimères en C-24 (24R et 24S).

Figure III.6.11: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **6**

L'analyse du spectre NOESY (Figures III.6.12 et III.6.13) et la mesure des valeurs des constantes de couplage suggèrent que le composé **6** possède la même stéréochimie que les composés **4** et **5** décrits précédemment. En effet, il est observé sur la face β les effets NOE entre H-19 *exo*/Me-29, H-19 *endo*/H-8, H-19 *endo*/Me-18 et Me-18/H-20. Les effets NOE sont visualisés également sur la face α entre les protons suivants: Me-28/H-3 α /H-5 α /H-7 α /Me-30/H-17 α /Me-21. D'autres corrélations sont observées entre H-24 et les protons oléfiniques H₂-27, les protons H₂-27 et les protons du groupement Me-26. Ces effets prouvent que les protons H-24 et H₂-27 sont du même côté (Figure III.6.12). La valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +23,9^\circ$, (c 0,23 g/100 ml, MeOH), le déplacement chimique des protons Me-21 (0,90 ppm) et les effets NOE entre H-17 α /Me-21/H-12 β indiquent une configuration *20R* au niveau du carbone chiral C-20. La configuration absolue des autres carbones asymétriques est déduite comme suit : *3S*, *5R*, *8R*, *9S*, *10R*, *13S*, *14R* et *17S*.

Figure III.6.12: Principales corrélations NOESY observées pour le composé **6**

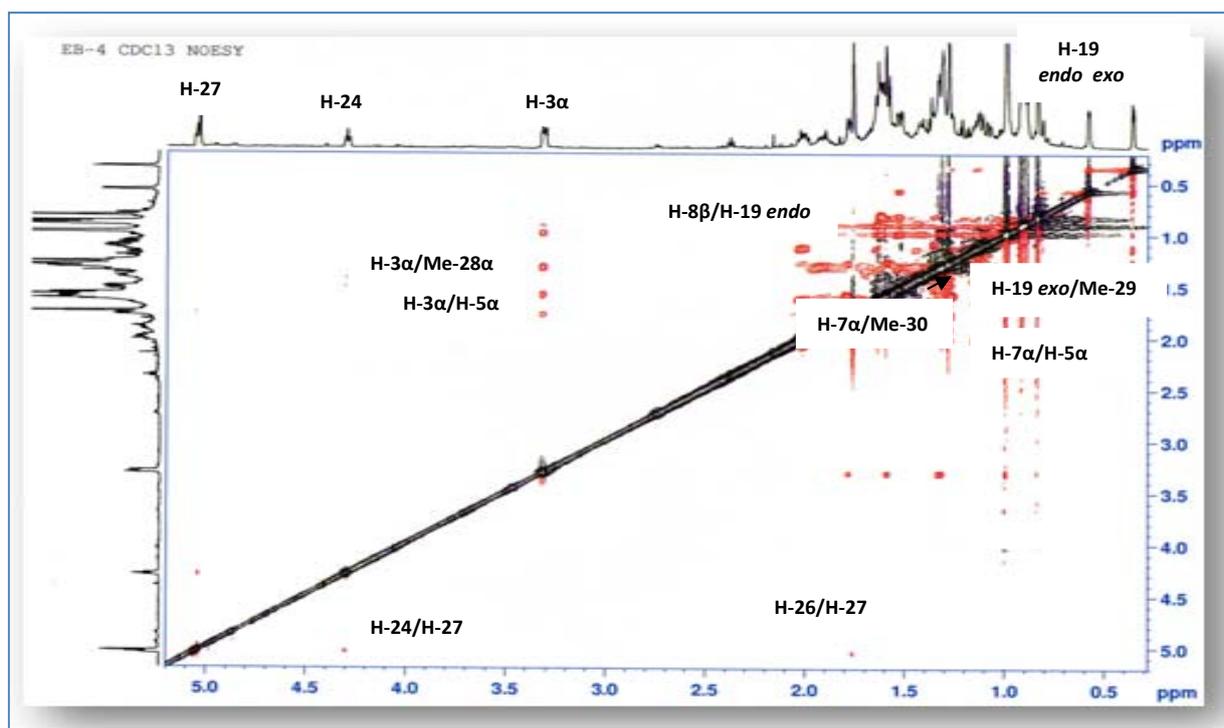


Figure III.6.13: Spectre NOESY du composé 6

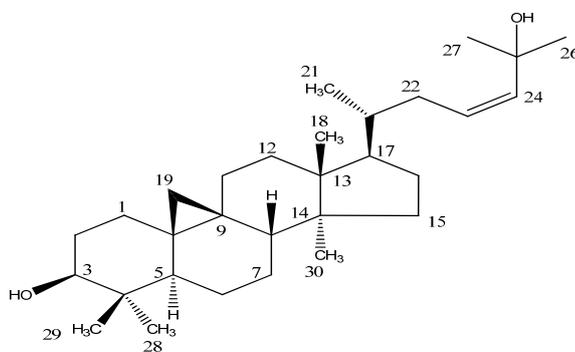
Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé 6 sont donnés dans le tableau III.6.

Tableau III.6: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé 6 dans CDCl_3 .

Position	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1	1,26-1,58 m	31,9
2	1,60-1,79 m	30,3
3	3,32 dd 11,0, 4,1 H-3 α	78,8
4	-	40,4
5	1,32 m H-5 α	47,1
6	0,81-1,62 m	21,1
7	1,14-2,01 m	26,4
8	1,53 dd 12,3, 4,7 H-8 β	47,9
9	-	19,9
10	-	26,0
11	1,08-1,35 m	26,1
12	1,64 m	32,7

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
13	-	45,2
14	-	48,4
15	1,33 m	35,5
16	1,34-1,91 m	28,1
17	1,60 m H-17 α	52,0
18	0,98 s	18,0
19	0,36 d 4,0 H-19 <i>exo</i> 0,58 d 3,7 H-19 <i>endo</i>	29,9
20	1,41 m	35,8; 35,9
21	0,90 d 6,1	18,2; 18,5
22	1,50 m	32,0; 32,7
23	1,28-1,58 m	27,5; 27,9
24	4,30 t 6,8	90,2; 90,4
25	-	143,5; 143,8
26	1,76 s	17,1 ; 17,6
27	5,06 s H-27a 5,04 s H-27b	114,2 ; 114,7
28	0,99 s	25,4
29	0,83 s	14,0
30	0,91 s	19,3

III.7.7. Détermination structurale du composé 7



cycloart-23Z-ène-3 β ,25-diol (7)

Il s'agit d'un triterpène tétracyclique appelé cycloart-23Z-ène-3 β ,25-diol isolé à l'état d'une poudre blanche. Il a été identifié précédemment dans les espèces suivantes : *Euphorbia altotibetic* [46], *Euphorbia broteri* [10], *Euphorbia chamaesyce* [49], *Juncus effusus* [102], *cladophora fascicularis* [112] et *Euphorbia schimperi* [115].

Sa formule brute C₃₀H₅₀O₂ a été déduite du spectre de masse ESI-MS (Figure III.7.1) enregistré en mode positif qui montre un pic d'ion quasimoléculaire à $m/z = 465$ [M+Na]⁺, correspondant à une masse moléculaire M = 442 uma.

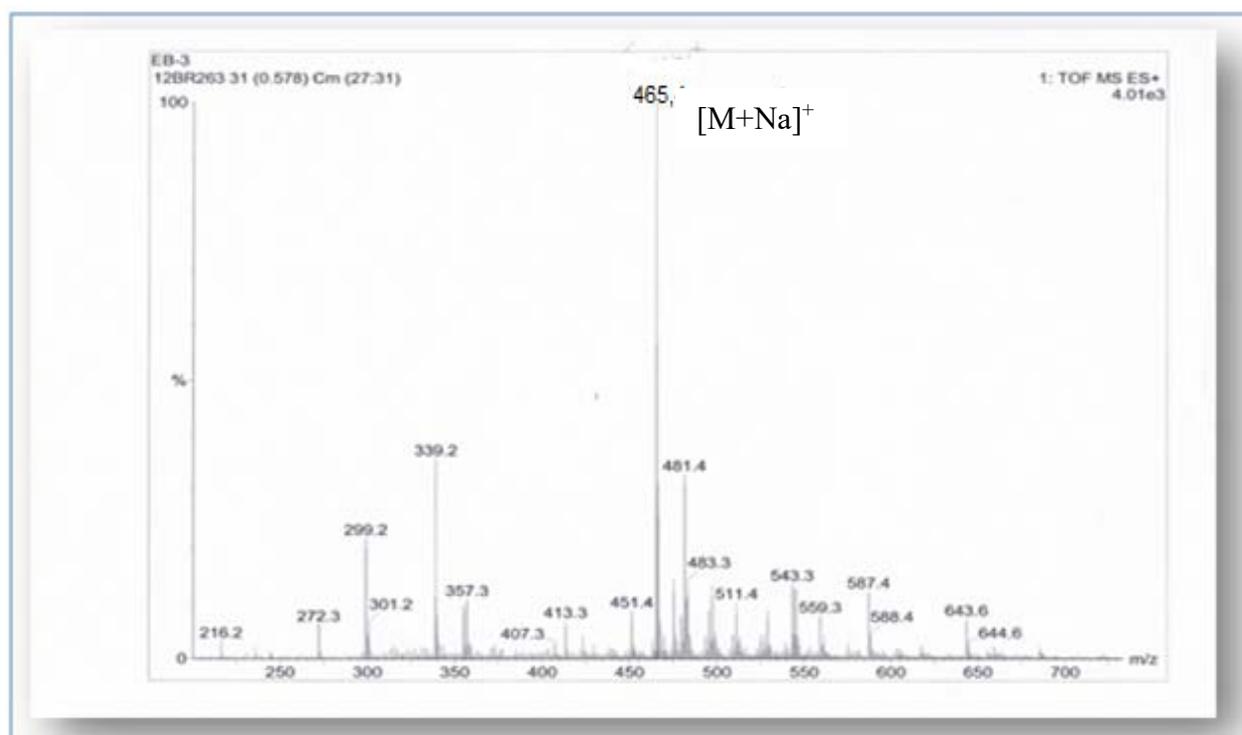
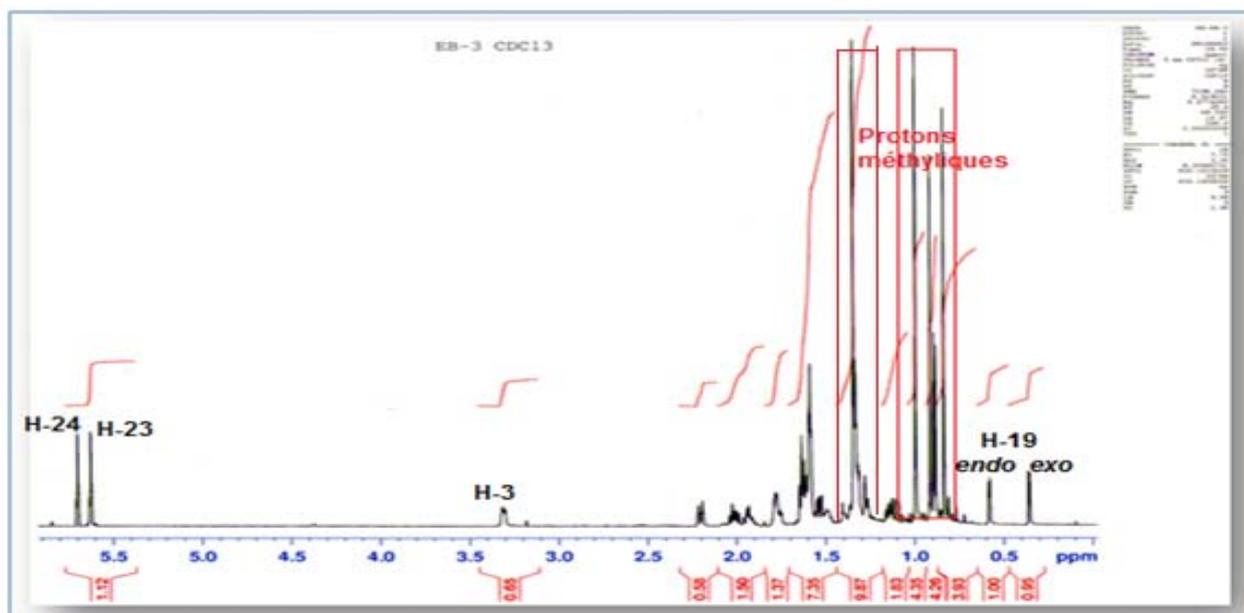
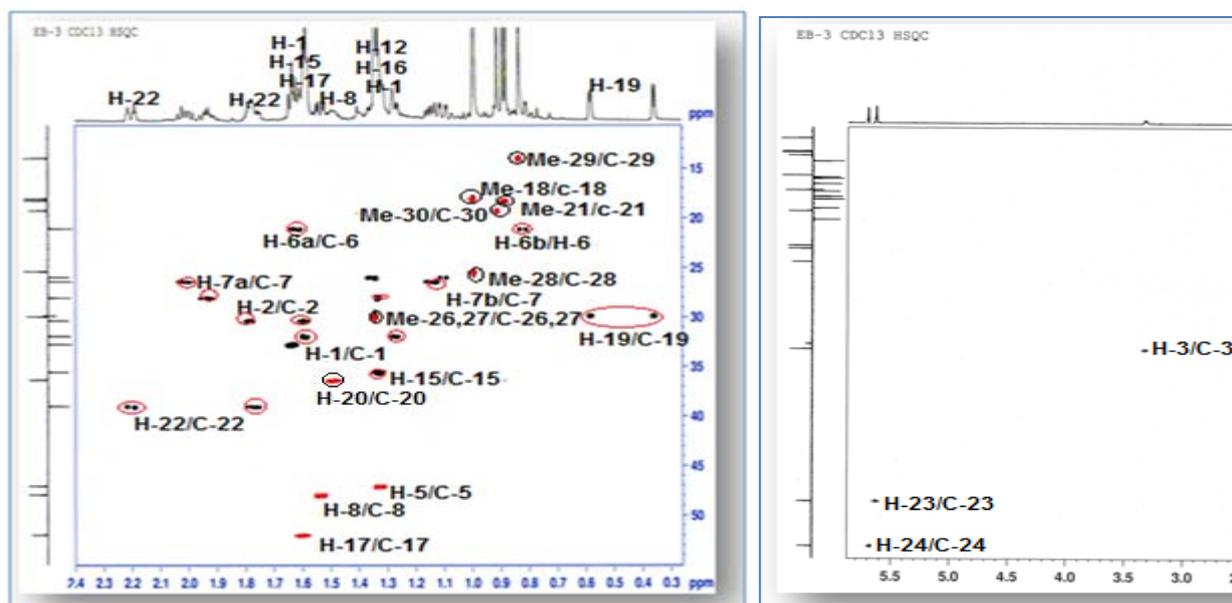


Figure III.7.1: Spectre de masse ESI-MS du composé 7

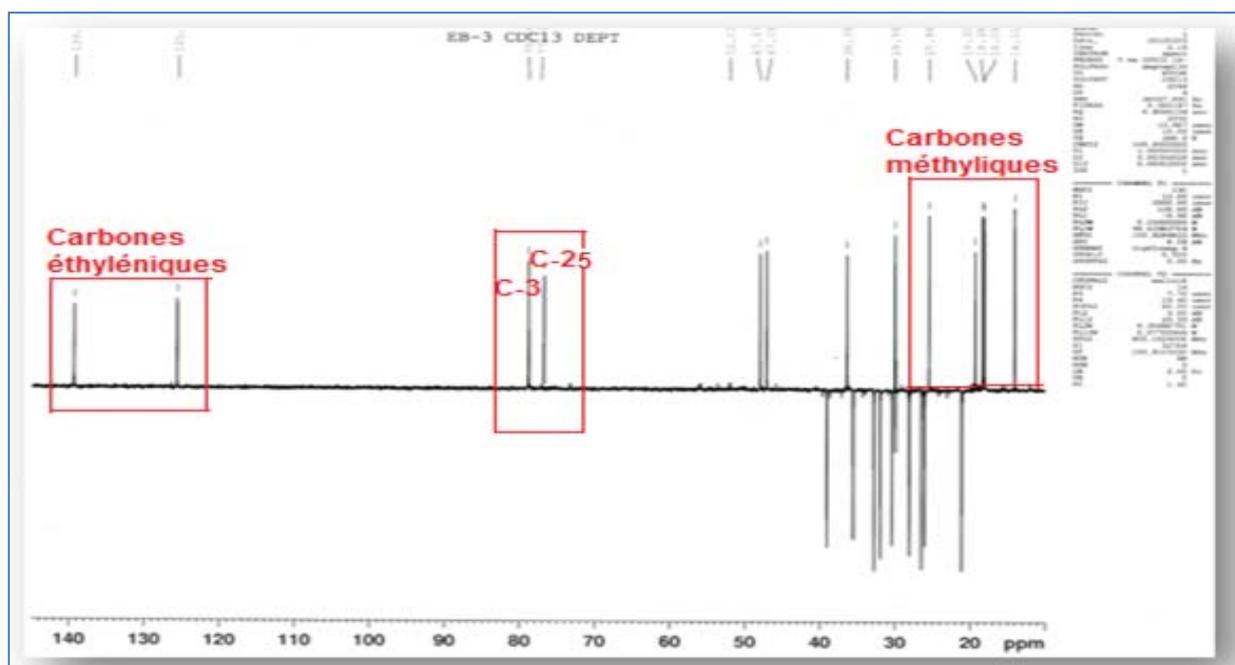
Le spectre RMN ¹H (Figure III.7.2) présente deux signaux blindés à δ_H 0,36 (1H, d, $J = 4,2$ Hz) et 0,58 (1H, d, $J = 4,0$ Hz) caractéristiques des deux protons H-19 *exo* et H-19 *endo* non équivalents d'un noyau cyclopropane. Un signal à 3,31 ppm est attribué au proton H-3 sous forme d'un doublet de doublets (dd, $J = 11,1, 4,2$ Hz). Il montre également 7 signaux caractéristiques de sept groupements méthyles résonant à δ_H 1,0 (3H, s, Me-18), 0,89 (3H, d, $J = 6,4$ Hz, Me-21), 1,01 (3H, s, Me-28), 0,84 (3H, s, Me-29), 0,91 (3H, s, Me-30) et 1,35 ppm (6H, s, Me-26 et Me-27). En plus, deux signaux déblindés à δ_H 5,63 et 5,65 sous forme de multiplets correspondent à deux protons éthyléniques.

Figure III.7.2: Spectre RMN ^1H du composé 7

L'expérience HSQC J -modulé (Figure III.7.3) permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones qui les portent δ_{C} 78,8 (C-3), 29,9 (C-19), 18,0 (Me-18), 18,2 (Me-21), 29,9 (Me-26 et Me-27), 25,4 (Me-28), 14,0 (Me-29), 19,3 (Me-30), 139,5 et 125,6 (CH=CH).

Figure III.7.3: Spectres HSQC J -modulé du composé 7

Le spectre RMN ^{13}C DEPT (Figure III.7.4) du composé 7 montre dans la région blindée, sept signaux entre 14 et 25 ppm correspondant aux sept méthyles d'un squelette triterpénique tétracyclique, et dans la région déblindée, quatre signaux résonant à 77,2, 78,8, 125,6 et 139,3 ppm attribuables respectivement à deux carbones oxygénés et deux carbones éthyléniques (CH).

Figure III.7.4: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé 7

L'analyse combinée des spectres COSY H-H, HSQC J -modulé (Figure III.7.3) et HMBC (Figure III.7.5) et comparaison avec les données de la littérature [11,12,105] permettent d'assigner facilement tous les protons et carbones pour les 4 cycles (A, B, C et D) de ce composé.

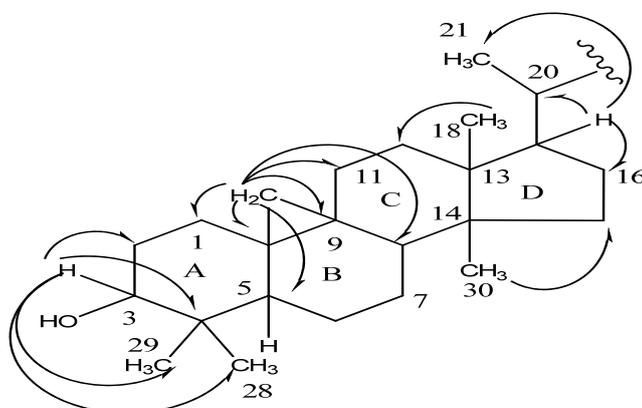


Figure III.7.5: Principales corrélations HMBC du composé 7

A partir des protons méthyliques Me-21 connus (δ_{H} 0,89, d, $J = 6,4$ Hz), il est observé sur le spectre COSY H-H (Figures III.7.6 et III.7.7) les couplages scalaires entre les protons de la chaîne latérale: Me-21/H-20 (1,50 ppm, m)/H-22 (δ_{H} 1,79, dt, $J = 6,4, 3,2$ Hz, H-22a et 1,63, m H-22b)/H-23 (δ_{H} 5,63, m)/H-24 (δ_{H} 5,65, m). Ces protons corrélient en HSQC J -modulé (Figure III.7.4) avec leurs carbones C-23 (125,6 ppm), C-24 (139,5 ppm), C-22 (39,0 ppm) et C-20 (36,3 ppm).

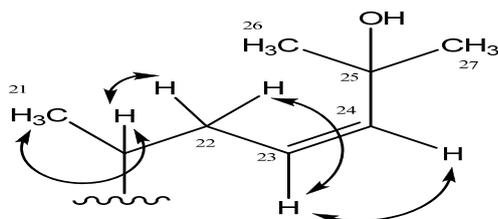
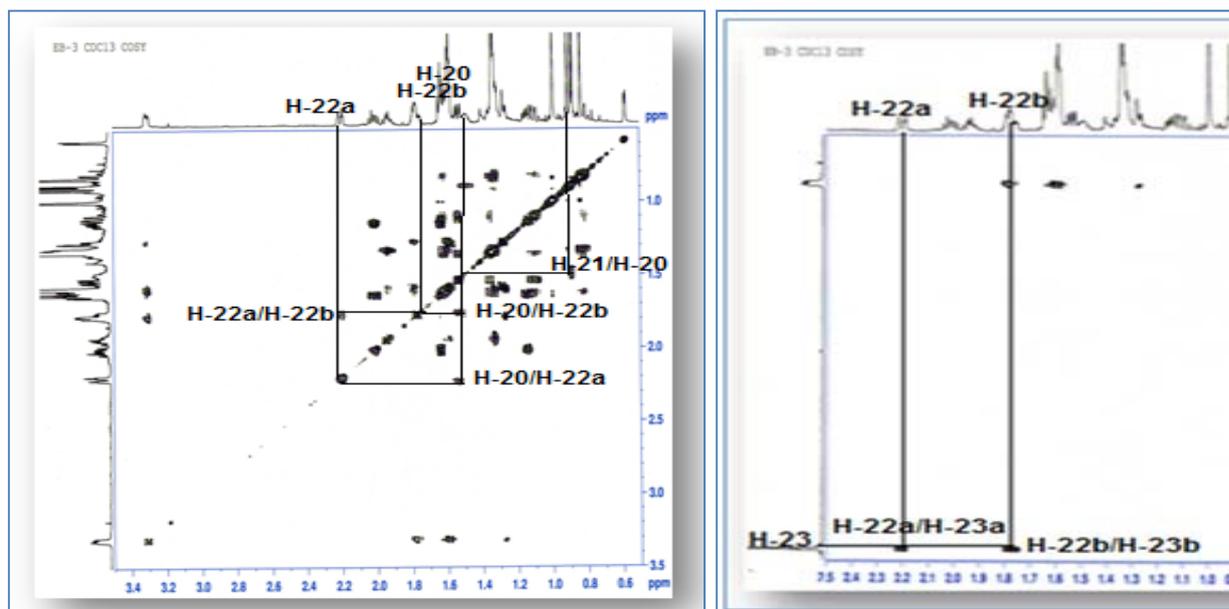


Figure III.7.6: Corrélations COSY de la chaîne latérale du composé 7



Figures III.7.7: Spectres COSY de la chaîne latérale du composé 7

Le carbone éthylénique C-24 corrèle en 3J sur le spectre HMBC (Figures III.7.8 et III.7.9) avec les protons méthyliques Me-26 et Me-27 (1,35 ppm). Les corrélations 2J observées sur le même spectre (Figure III.7.9) entre les protons des groupements méthyles Me-26 et Me-27 et le proton éthylénique H-24 avec un carbone quaternaire repéré à 77,2 ppm (C-25) indique que le carbone C-25 est porteur d'un groupement hydroxyle libre. L'effet NOE observée sur le spectre NOESY entre les protons Me-26/Me-27 et le proton éthylénique H-24 confirme l'attachement des deux méthyles Me-26 et Me-27 au carbone C-25 (Figure III.7.8).

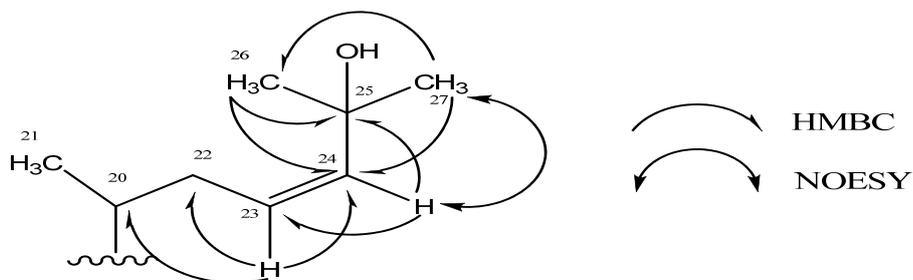
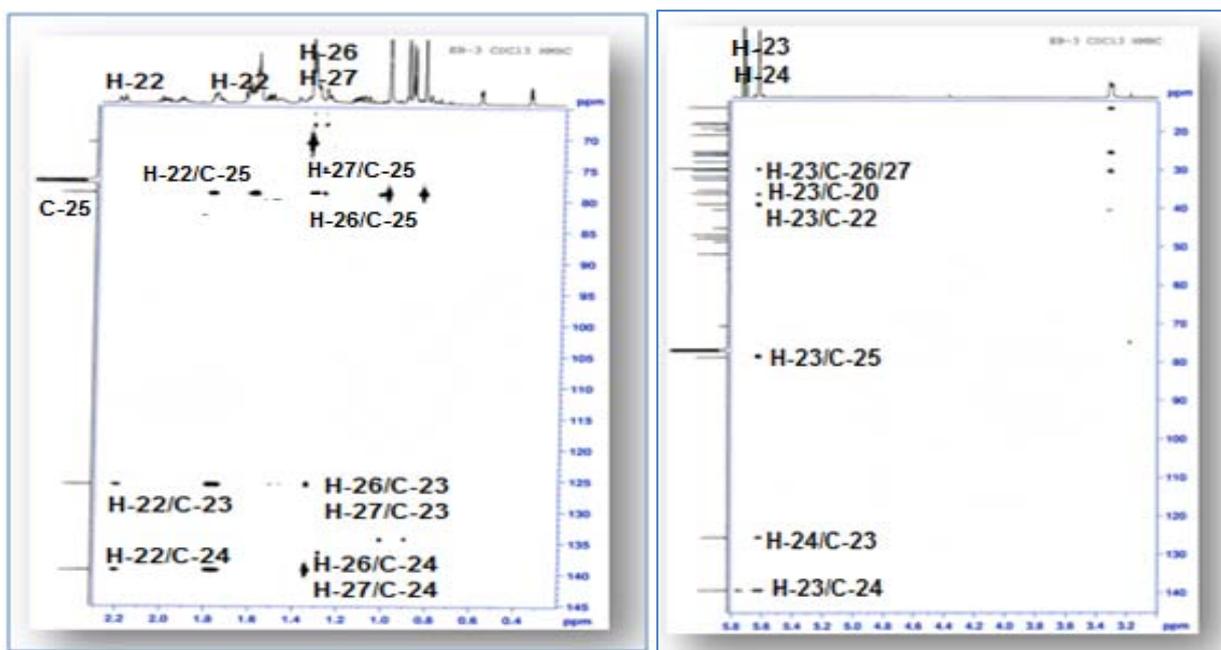


Figure III.7.8: Corrélations HMBC et NOESY de la chaîne latérale du composé 7



Figures III.7.9: Spectres HMBC du composé 7

A l'issue de cette analyse, les déplacements chimiques et les attributions des signaux RMN de protons et carbones sont présentés dans le tableau 7.

La stéréochimie de ce triterpène a été établie en analysant les valeurs de constantes de couplage, et les corrélations observées sur le spectre NOESY (Figures III.7.10 et III.7.11). Ce dernier montre sur la face β des taches de corrélation entre H₂-19/Me-29, H-19 *endo*/H-8 β et Me-18/H-20. Les effets NOE sont visualisés également entre Me-28/H-3 α /H-5 α /H-7 α /Me-30/H-17 α /Me-21/. La valeur du déplacement chimique des protons Me-21 (0,89 ppm) et l'interaction dipolaire Me-21/H-12 β impliquent une configuration absolue 20*R* au niveau du carbone chiral C-20. La configuration absolue au niveau de tous les carbones asymétriques de ce composé est déduite à partir de ces constatations et des effets NOE décrits précédemment à savoir : 3*S*, 5*R*, 10*R*, 9*S*, 8*R*, 13*S*, 14*R* et 17*S*.

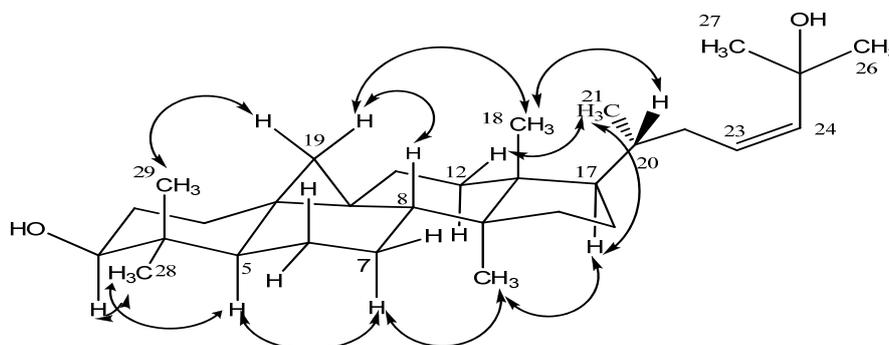


Figure III.7.10: Corrélations NOESY observées pour le composé 7

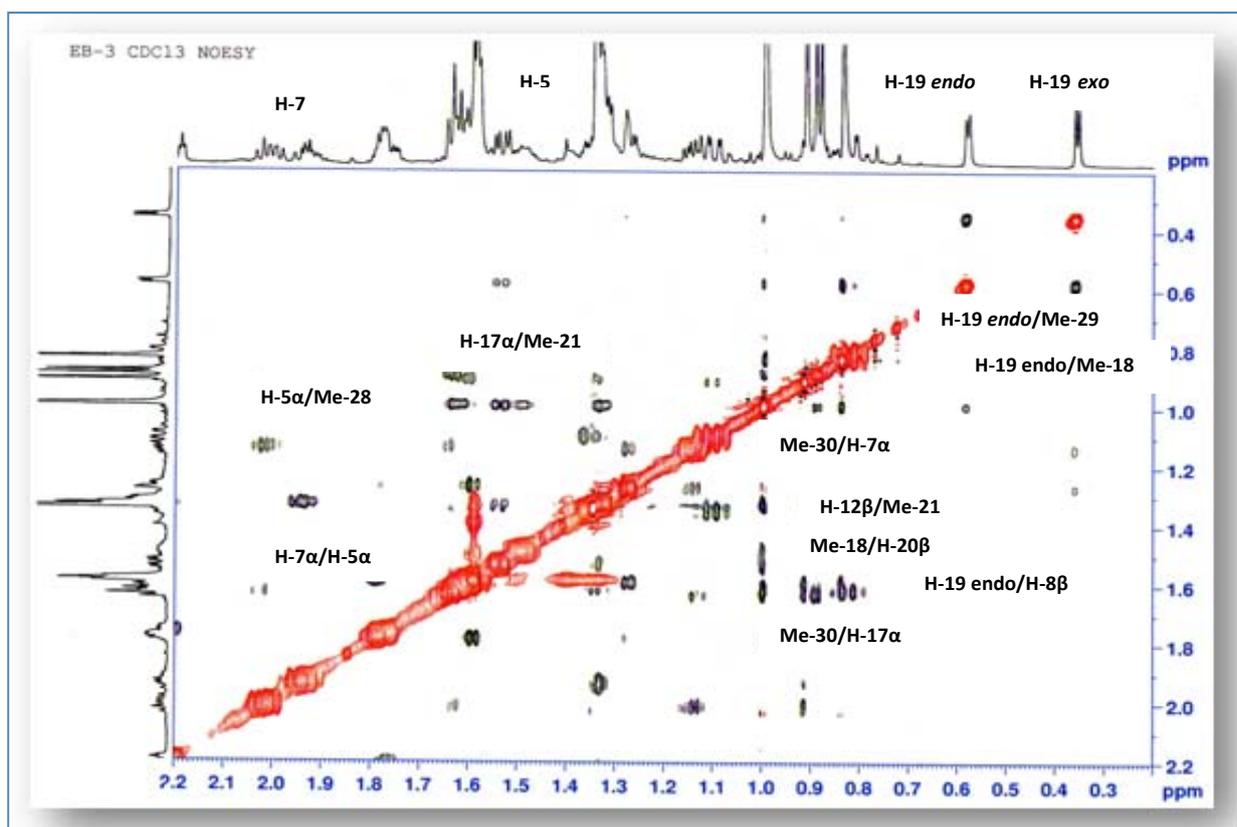


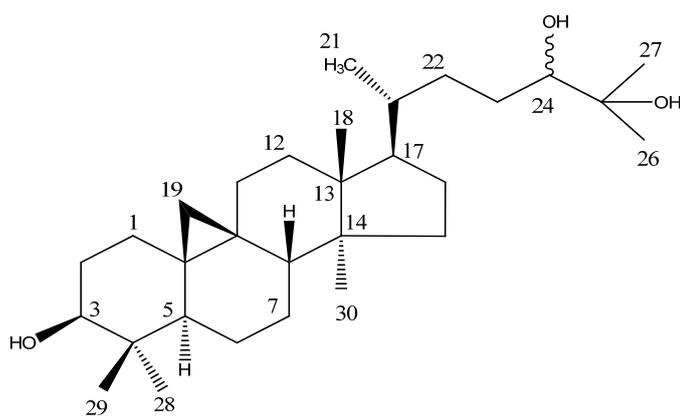
Figure III.7.11 : Spectre NOESY du composé 7

La comparaison des données spectrales du composé 7 avec celles de la littérature [10,46,49,102] et du pouvoir rotatoire dans le chloroforme $[\alpha]_D^{20} = +25,6^\circ$, (c 0,3 g/100 ml, MeOH) permettent d'assigner sans ambiguïté pour ce composé la structure suivante cycloart-23Z-ène-3 β ,25-diol.

Tableau III.7: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé 7 dans CDCl_3 .

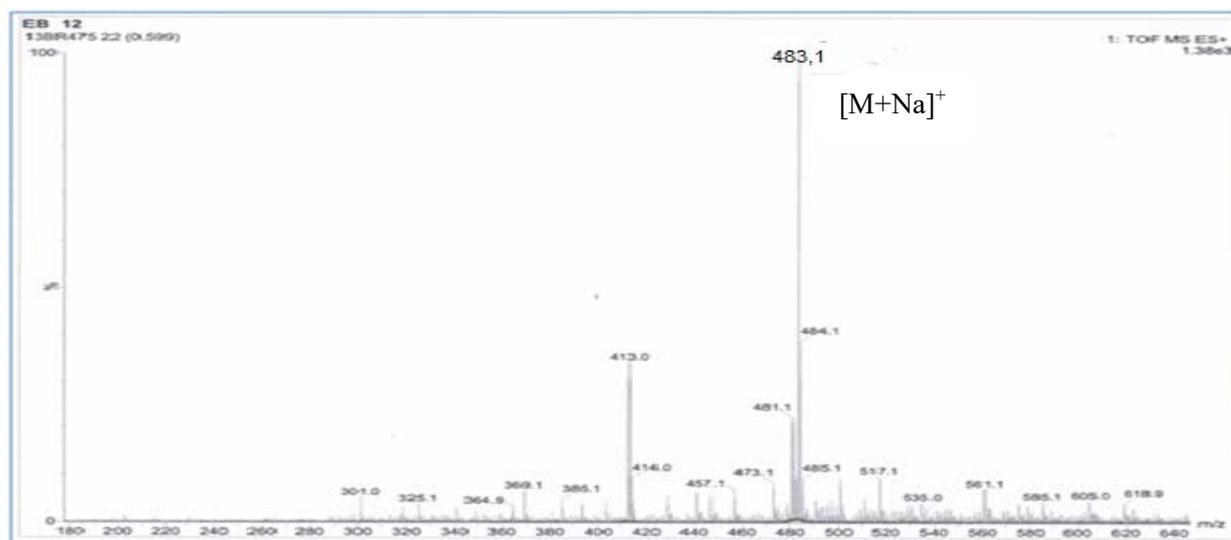
Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	1,27-1,58 m	31,9
2	1,59-1,79 m	30,3
3	3,31 dd 11,1, 4,2 H-3 α	78,8
4	-	40,4
5	1,33 m H-5 α	47,0
6	0,82-1,62 m	21,1
7	1,15-2,01 m	26,4
8	1,53 dd 12,3, 4,7 H-8 β	47,9

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
9	-	19,9
10	-	26,0
11	1,10 td 13,6, 3,7 H-11 β 1,34 m H-11 α	26,1
12	1,65 m	32,7
13	-	45,3
14	-	48,7
15	1,65 m	35,5
16	1,32-1,93 m	28,0
17	1,63 m H-17 α	52,0
18	1,0 s	18,0
19	0,36 d 4,2 H-19 <i>exo</i> 0,58 d 4,0 H-19 <i>endo</i>	29,9
20	1,50 m	36,3
21	0,89 d 6,4	18,2
22	1,79 dt 6,4, 3,2 1,63 m	39,0
23	5,63 m	125,6
24	5,65 m	139,5
25	-	77,2
26	1,35 s	29,9
27	1,35 s	29,9
28	1,01 s	25,4
29	0,84 s	14,0
30	0,91 s	19,3

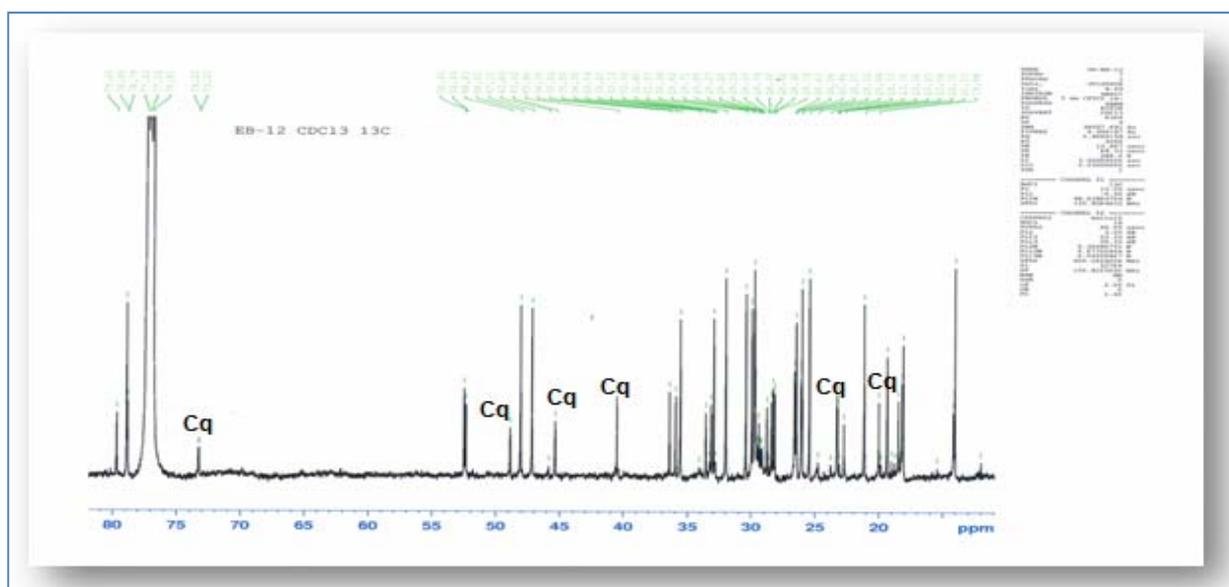
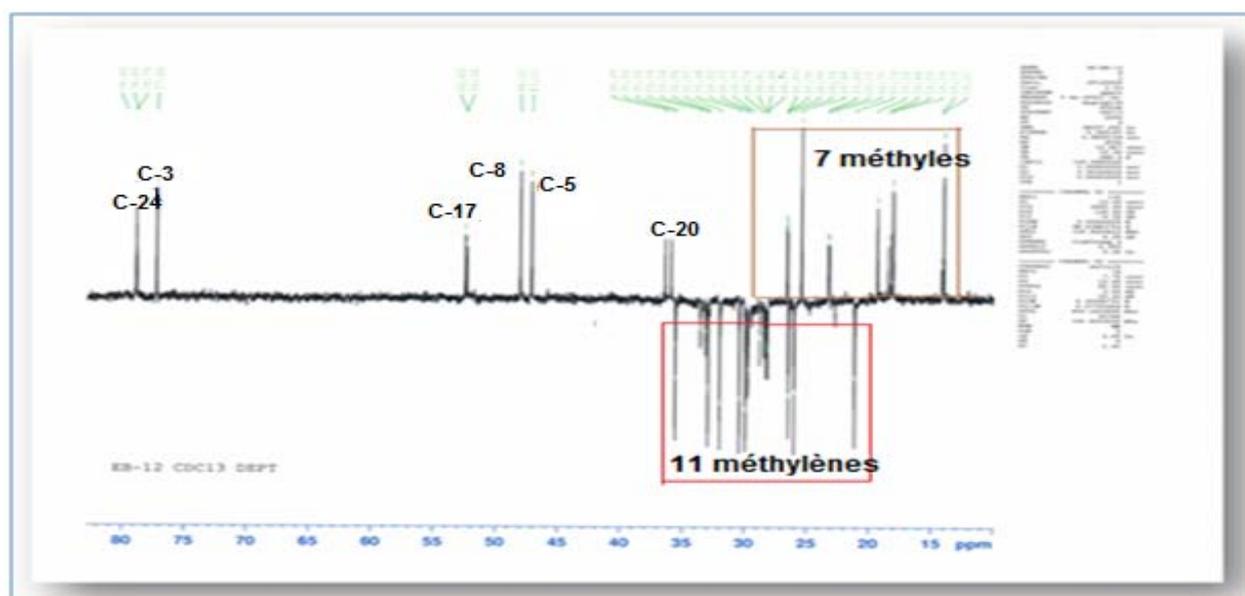
III.7.8. Détermination structurale du composé **8**cycloart-3 β ,24,25-triol (**8**)

Le composé **8** est isolé sous forme d'une poudre blanche. Il est invisible à la lumière UV (254 et 366 nm) et se colore en bleu après révélation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

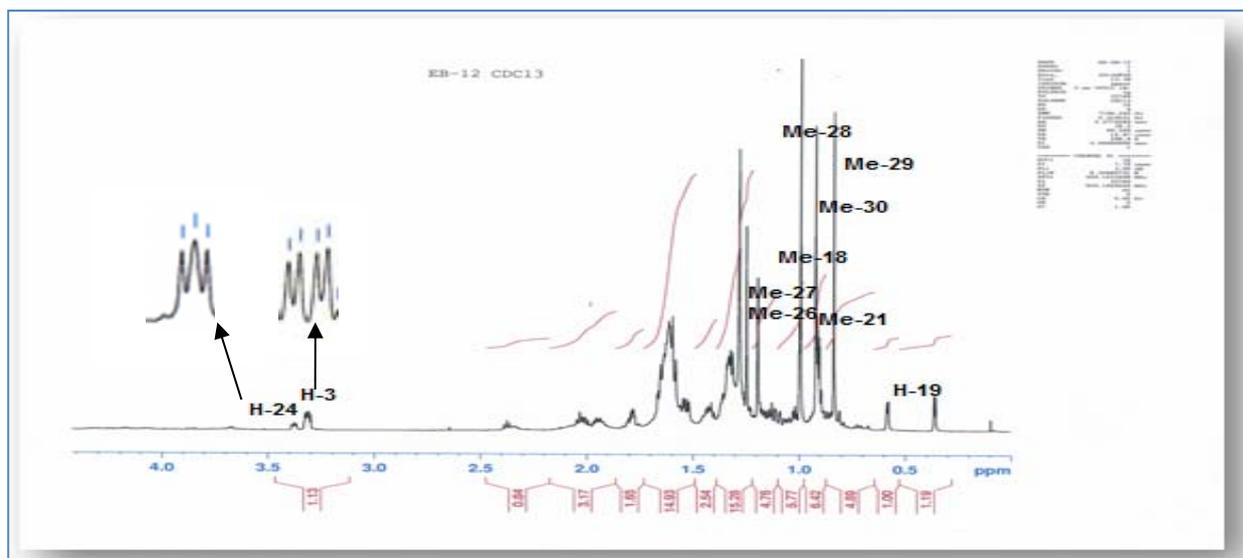
Le spectre de masse obtenu par ionisation douce ESI-MS du composé **8** (Figure III.8.1) permet d'observer en mode positif un pic d'ion pseudomoléculaire $[M+Na]^+$ à $m/z = 483,1$, ce qui donne une masse moléculaire $M = 460$ uma correspondant à une formule brute en $C_{30}H_{52}O_3$.

Figure III.8.1: Spectre de masse ESI-MS du composé **8**

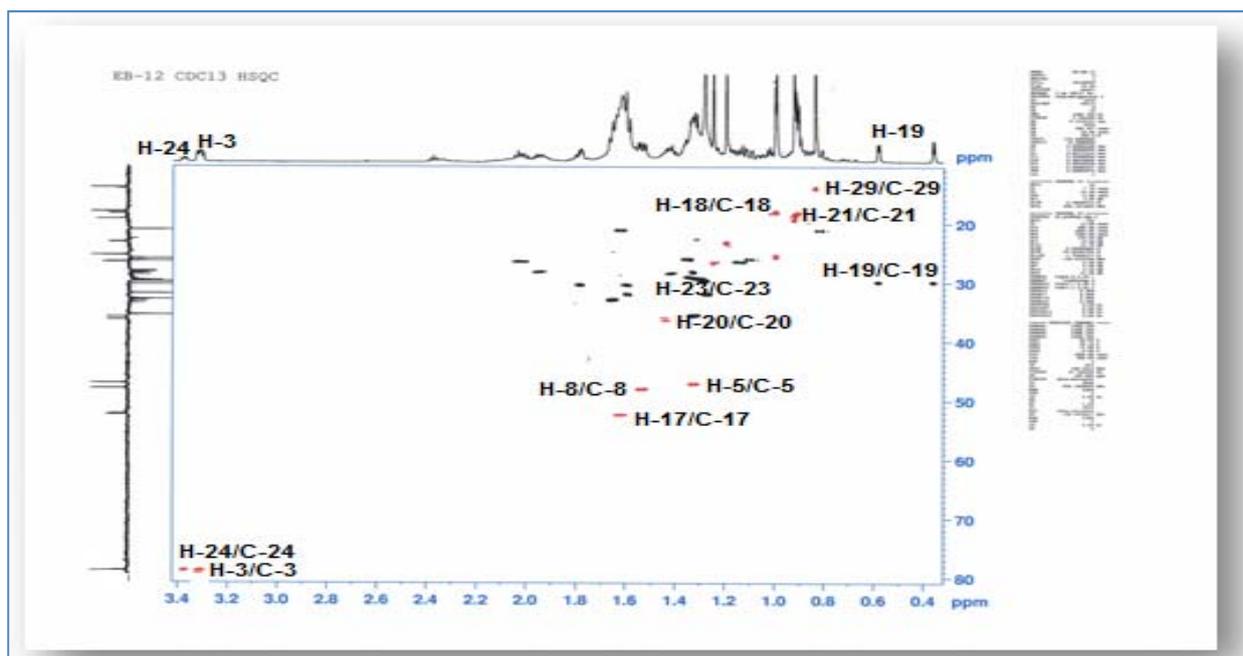
Les spectres RMN ^{13}C découplé et DEPT (Figures III.8.2 et III.8.3) révèlent la nature triterpénique de ce composé, en exhibant des signaux correspondant à sept méthyles, onze méthylènes, six méthines et six carbones quaternaires.

Figure III.8.2: Spectre RMN ^{13}C découplé du composé **8**Figure III.8.3: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **8**

Le spectre RMN ^1H (Figure III.8.4) du composé **8** indique une allure d'un triterpène de type cycloartane. En effet, il montre un signal à 3,31 ppm (dd, $J = 10,1, 4,5$ Hz, H-3 α) et deux signaux des protons cyclopropaniques à δ_{H} 0,36 (1H, d, $J = 4,1$ Hz, H-19 *exo*) et 0,58 (1H, d, $J = 4,1$ Hz, H-19 *endo*). Il révèle également 7 groupements méthyles dont 5 résonant à δ_{H} 0,99 (3H, s, Me-18), 0,90 (3H, d, $J = 6,1$ Hz, Me-21), 0,90 (3H, s, Me-28), 0,84 (3H, s, Me-29) et 0,92 (3H, s, Me-30) et deux méthyles relativement déblindés par rapport aux autres méthyles localisés à 1,19 ppm (3H, s, Me-26) et 1,25 ppm (3H, s, Me-27).

Figure III.8.4: Spectre RMN ^1H du composé **8**

Ces protons corrélient en HSQC J -modulé (Figure III.8.5) avec leurs carbones C-3 (78,8 ppm), C-19 (29,9 ppm), Me-18 (18,0 ppm), Me-21 (18,3 ppm) et Me-26 (23,2 ppm), Me-27 (26,6 ppm), Me-28 (25,4 ppm), Me-29 (14,0 ppm) et Me-30 (19,3 ppm).

Figure III.8.5: Spectre HSQC J -modulé du composé **8**

En plus, le spectre RMN ^1H (Figure III.8.4) du composé **8** est très voisin de celui du composé **7** déjà identifié, avec principalement comme différence la disparition des signaux des deux protons éthyléniques de la double liaison endocyclique $\Delta^{23,24}$ et l'apparition d'un signal

déblindé à δ_H 3,34 sous forme d'un triplet ($J = 4,0$ Hz) d'un autre proton oxyméthine. Ce dernier couple en HSQC J -modulé (Figure III.8.5) avec son carbone résonant à 79,6 ppm.

Les protons méthyliques Me-26 et Me-27 déjà identifiés présentent en HMBC (Figures III.8.6 et III.8.7) deux taches des corrélations avec le carbone oxyméthine à 79,6 ppm correspondant au carbone C-24, et un carbone quaternaire oxygéné résonant à δ_C 73,2 ne pouvant être que le carbone C-25 porteur d'un OH libre. Il en résulte que le signal observé à 3,34 ppm est attribué au proton H-24.

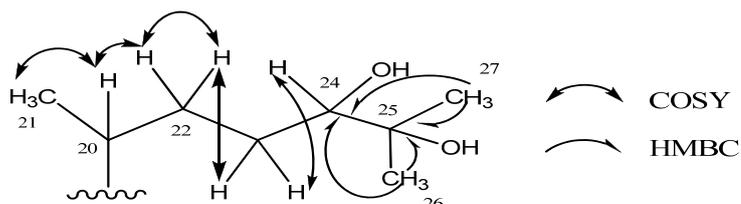


Figure III.8.6: Corrélations HMBC et COSY de la chaîne latérale

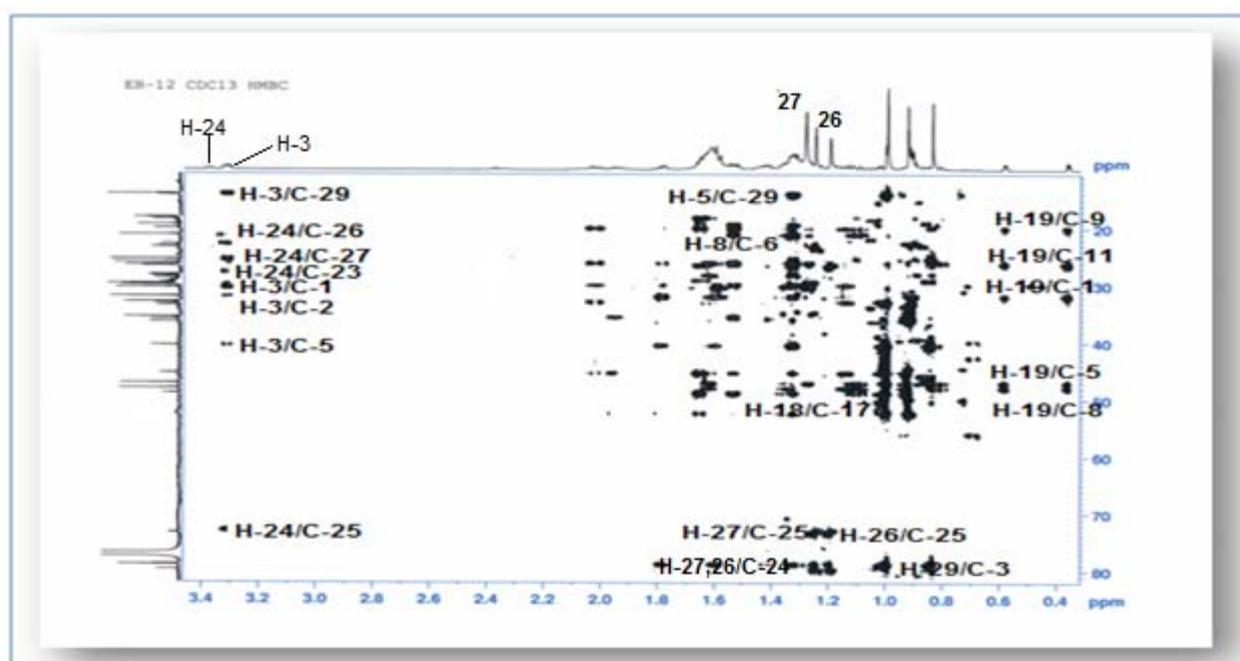


Figure III.8.7: Spectre HMBC du composé 8

Partant du proton oxyméthine H-24, l'expérience homonucléaire COSY (Figures III.8.6 et III.8.8) permet de relier 9 protons à travers leurs taches de corrélations comme suit :

- H-24/H₂-23 (δ_H 1,80 (m)) ;
- H₂-23/H₂-22 (δ_H 1,38 (m)) ;
- H₂-22/H-20 (δ_H 1,42 (m)) ;
- H-20/H₃-21 (δ_H 0,90 (d, $J = 6,1$ Hz)).

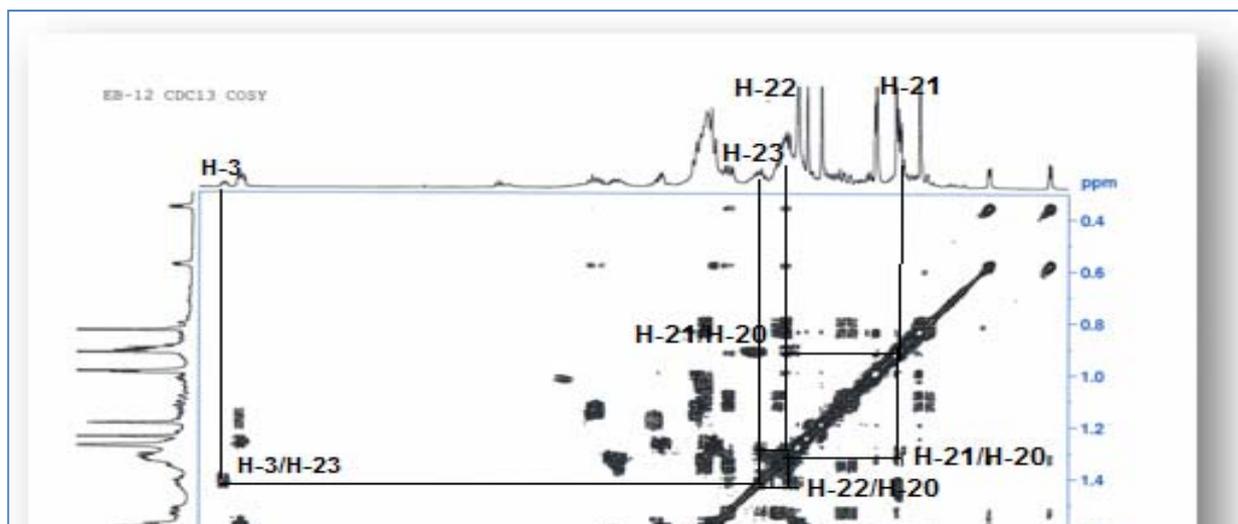


Figure III.8.8: Spectre COSY montrant les couplages H-H au niveau de la chaîne latérale

L'expérience HMBC (Figure III.8.7) confirme ces attributions par l'observation des corrélations longue distance en 2J et 3J entre le proton H-24 et les carbones C-23, C-25, C-26 et C-27 de la chaîne latérale.

Leurs carbones respectifs C-20 (δ_c 36,4, 36,6), Me-21 (δ_c 18,3, 18,4), C-22 (δ_c 28,4, 28,7), C-23 (δ_c 33,1, 33,5) et C-24 (δ_c 79,6, 79,8) sont localisés à partir de l'analyse du spectre HSQC J -modulé (Figure III.8.5). Le dédoublement des signaux de ces carbones indiquent qu'il s'agit d'un mélange d'épimères en C-24 de ce composé (24*R* et 24*S*) [10,99].

L'expérience NOESY (Figures III.8.9 et III.8.10) montre des taches de corrélation typiques des dérivés cycloartaniques pour ce composé entre Me-29/CH₂-19/H-8β/Me-18/H-20. D'autres effets NOE sont observés entre Me-28/H-3α/H-5α/H-7α/Me-30/H-17α/Me-21. Ce spectre révèle aussi des corrélations entre H-24/Me-26 et Me-27.

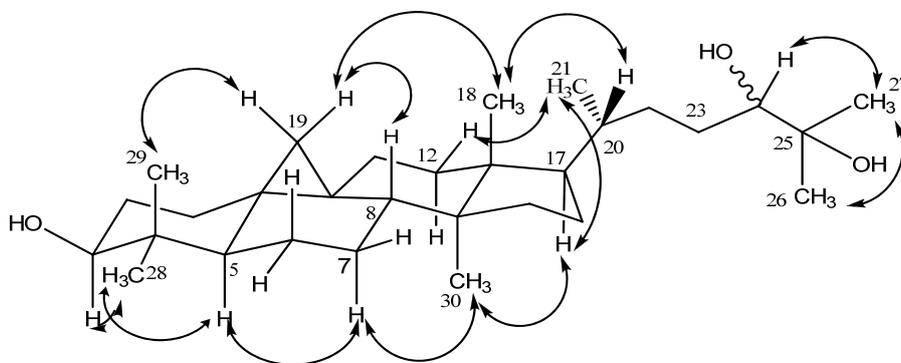
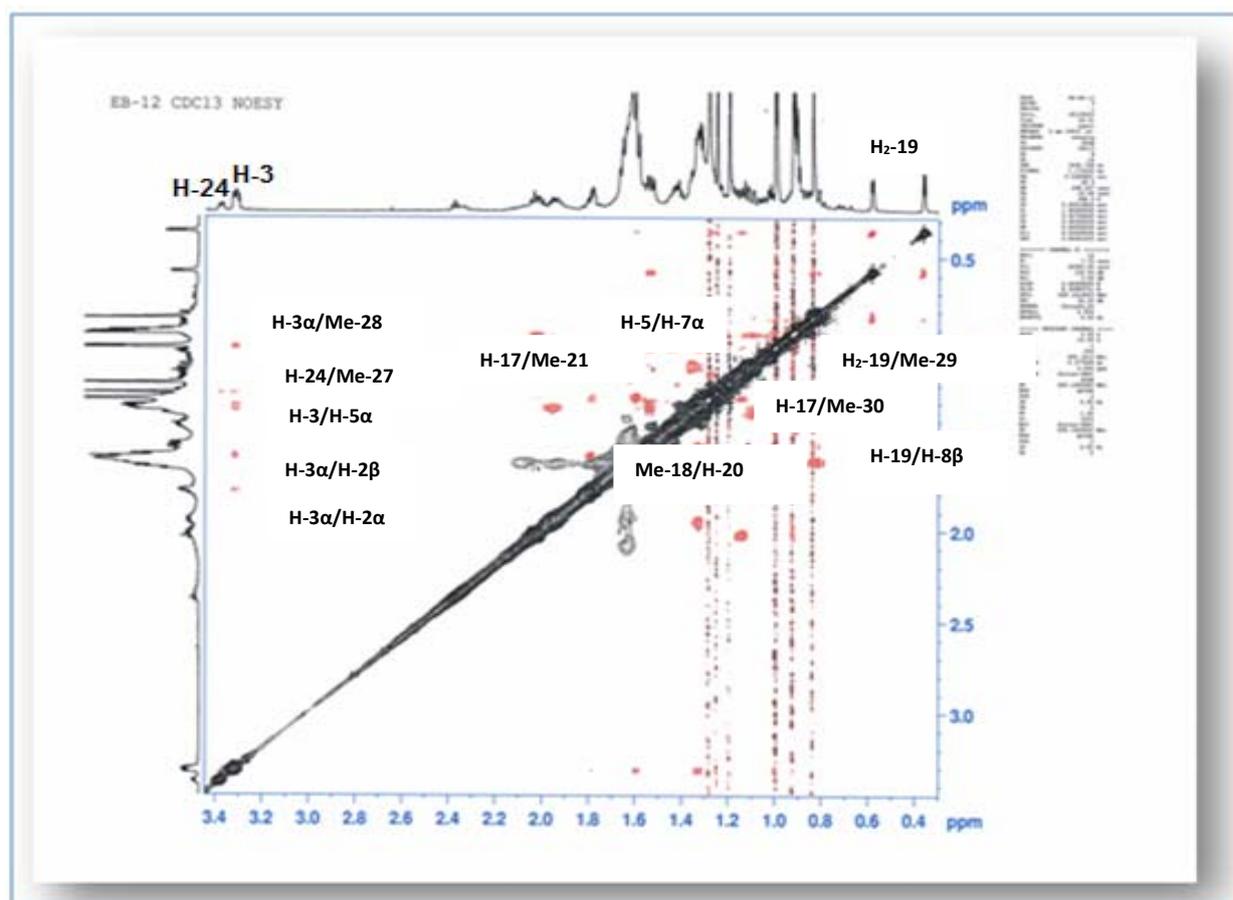


Figure III.8.9: Corrélations NOESY observées pour le composé **8**

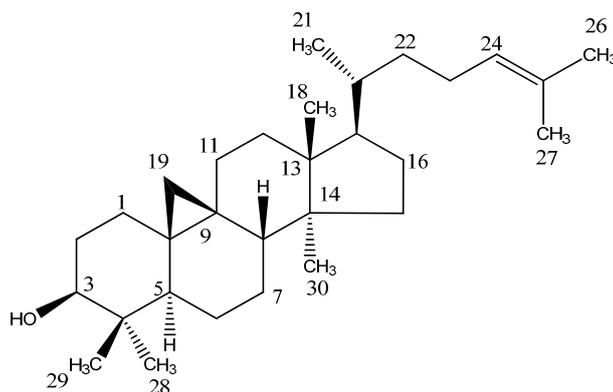
Figure III.8.10: Spectre NOESY du composé **8**

La valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = 38^\circ$ (c 0,11 g/100 ml, MeOH) et les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé (Tableau III.8), indiquent que la structure du composé **8** est cycloart-3 β ,24,25-triol (**8**). Ce composé a été déjà isolé des parties aériennes des espèces *Euphorbia broteri* [10], *Euphorbia sessiliflora* [116] et *Juncus effusus* [102].

Tableau III.8: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **8** dans CDCl_3 .

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	1,27–1,58 m	31,9
2	1,59-1,78 m	30,3
3	3,31 dd 10,1, 4,5 H-3 α	78,8
4	-	40,5
5	1,33 m H-5 α	47,1
6	0,81-1,64 m	21,1
7	1,15-2,03 m	26,5

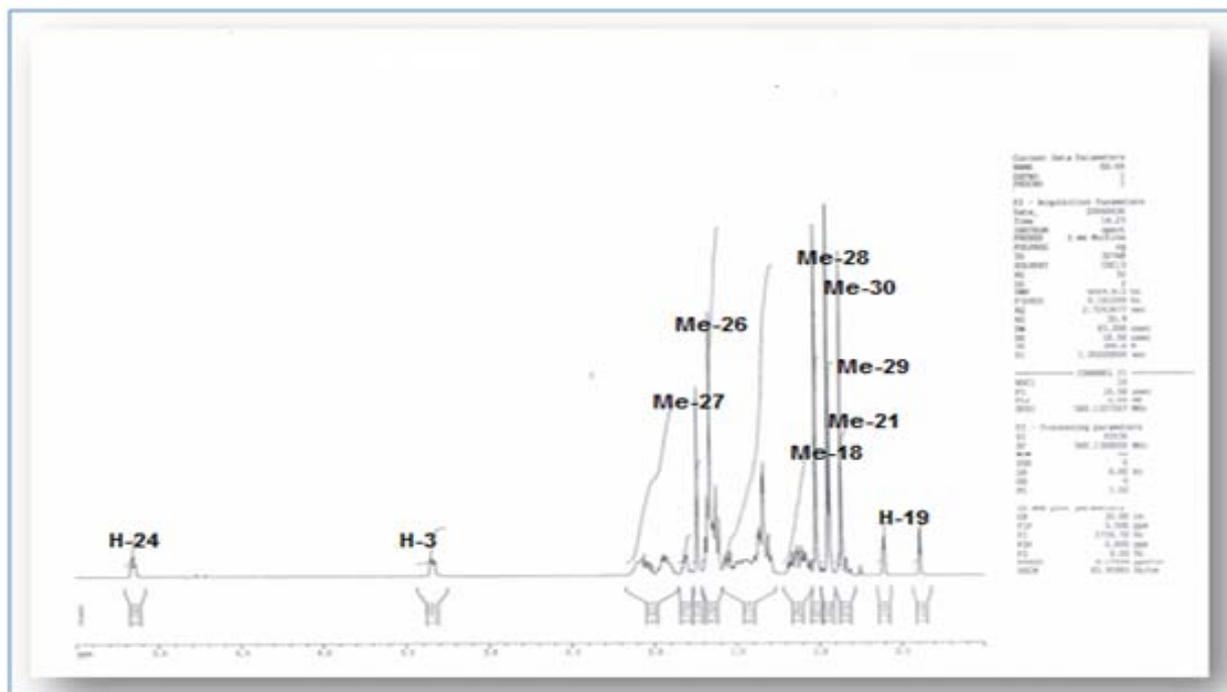
Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
8	1,53 dd 12,2, 4,8 H-8 β	48,0
9	-	19,9
10	-	26,0
11	1,09-1,34 m	26,1
12	1,65 m	32,8
13	-	45,3
14	-	48,8
15	1,32 m	35,5
16	1,32-1,94 m	28,1
17	1,61 m H-17 α	52,3
18	0,99 s	18,0
19	0,36 d 4,1 H-19 <i>exo</i> 0,58 d 4,1 H-19 <i>endo</i>	29,9
20	1,42 m	36,4 ; 36,6
21	0,90 d 6,1	18,3 ; 18,4
22	1,38 m	28,4 ; 28,7
23	1,80 m	33,1 ; 33,5
24	3,34 t 4,0	79,6 ; 79,8
25	-	73,2 ; 73,4
26	1,19 s	23,2
27	1,25 s	26,6
28	0,90 s	25,4
29	0,84 s	14,0
30	0,92 s	19,3

III.7.9. Détermination structurale du composé **9**Cycloarténol (**9**)

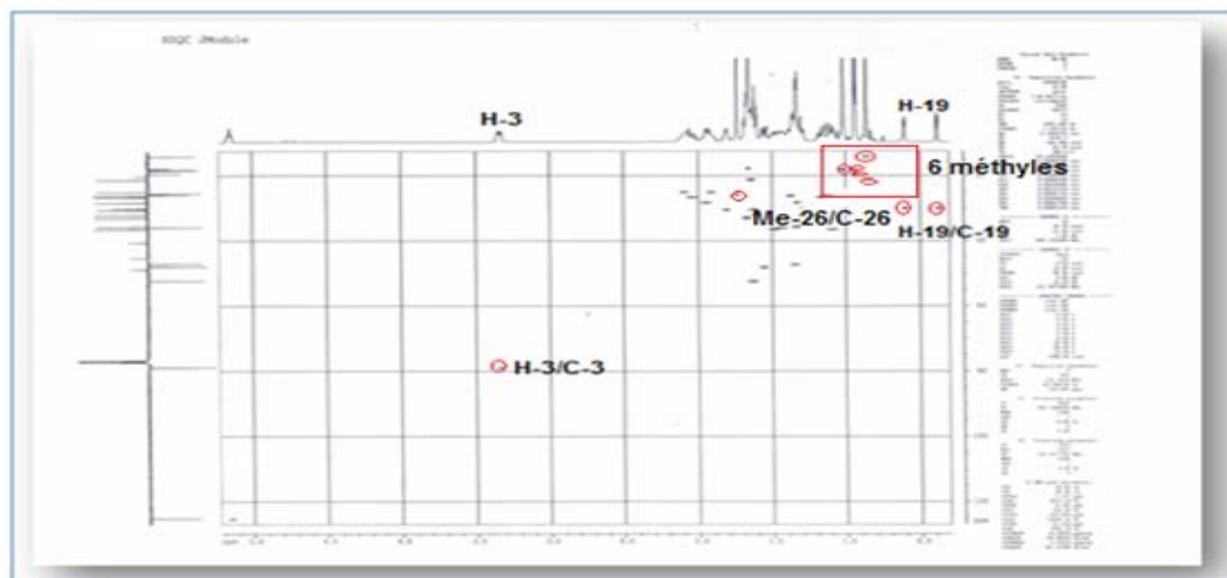
Le composé **9** obtenu à l'état de poudre blanche est soluble dans le chloroforme. Il est invisible à la lumière UV et se colore en mauve après révélation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C

Le spectre IR présente une bande d'absorption à 3426 cm^{-1} de groupement hydroxyle et une bande à 1640 cm^{-1} caractérisant l'existence d'une double liaison.

Le spectre RMN ^1H (Figure III.9.1) du composé **9** présente une similitude structurale avec les composés **4-8** déjà identifiés attestant de sa nature cycloartanique. En effet, il montre à champ fort six signaux singulets à δ_{H} 1,02 (3H, s, Me-18), 1,73 (3H, s, Me-26), 1,65 (3H, s, Me-27), 1,01 (3H, s, Me-28), 0,85 (3H, s, Me-29) et 0,94 (3H, s, Me-30) et un signal sous forme de doublet résonant à 0,92 ppm (3H, $J = 6,5$ Hz, Me-21) attribuables aux sept groupements méthyles des triterpènes tétracycliques de type cycloartane. Un doublet de doublets ($J = 11,1; 4,5$ Hz) observé à 3,34 ppm sur le spectre RMN ^1H correspond à un proton lié au carbone C-3 porteur d'un groupement hydroxyle. Il révèle également deux signaux sous forme de doublets chacun à δ_{H} 0,38 (1H, d, $J = 4,1$ Hz, H-19 *exo*) et 0,60 (1H, d, $J = 4,0$ Hz, H-19 *endo*) du noyau cyclopropane. Un signal sous forme de triplet à 5,15 ppm est attribué à un proton oléfinique.

Figure III.9.1: Spectre RMN ^1H du composé 9

Leurs carbones sont identifiés à δ_{C} 78,8 (C-3), 29,9 (C-19), 18,3 (Me-21), 25,7 (Me-26), 17,6 (Me-27), 25,4 (Me-28), 13,9 (Me-29), 19,2 (Me-30) et 125,2 (carbone éthylénique) par expérience HSQC J -modulé (Figure III.9.2).

Figure III.9.2: Spectre HSQC J -modulé du composé 9

L'analyse combinée des spectres RMN ^1H et ^{13}C , COSY, HSQC et HMBC permet d'attribuer les déplacements chimiques des protons et carbones des cycles A, B, C et D de ce triterpène.

Le spectre de masse obtenu par impact électronique EI-MS du composé **9** (Figure III.9.3) présente un pic d'ion moléculaire $[M]^+$ à $m/z = 426,4$, suggérant une formule brute en $C_{30}H_{50}O$. Il révèle des fragments à $m/z = 408 [M-H_2O]^+$, $393 [M-CH_3-H_2O]^+$ et $297 [M-111-H_2O]^+$. L'ion de fragmentation détecté à $m/z = 297$ indique le départ d'un groupement CH_3 , une molécule d'eau et une molécule C_8H_{14} correspondant à la chaîne latérale $(CH_2=CH-CH_2-CH_2-CH=C(CH_3)_2)$.

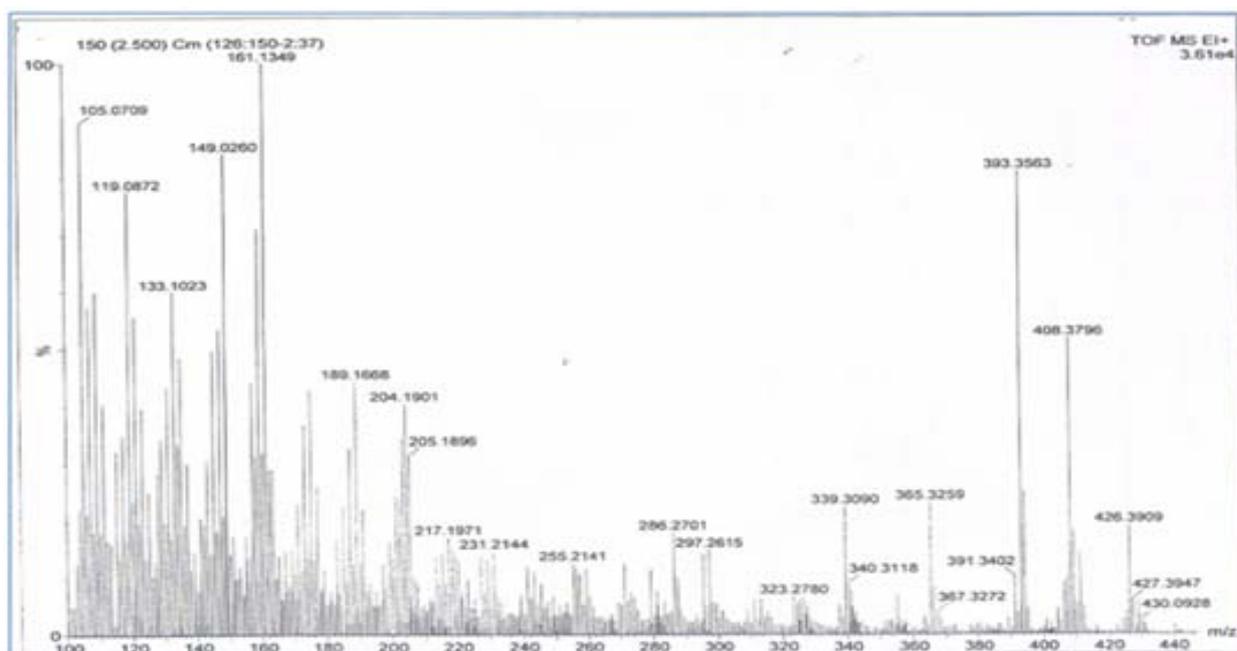


Figure III.9.3: Spectre de masse EI-MS du composé **9**

A partir des protons caractéristiques et identifiés précédemment l'expérience COSY H-H (Figures III.9.4 et III.9.5) permet de localiser les protons de la chaîne latérale à travers leur couplage scalaire entre : Me-21/H-20/H₂-22/H₂-23/H-24, ce qui permet d'assigner leurs déplacements chimiques à δ_H 1,42 (H-20), 1,09 (H-22b) et 1,49 (H-22a), 1,91 (H-23b), 2,08 (H-23a) et 5,15 (H-24).

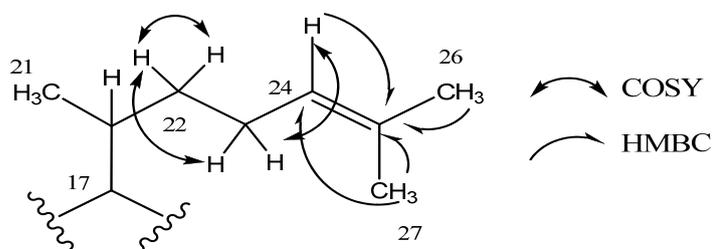


Figure III.9.4: Corrélations COSY H-H et HMBC de la chaîne latérale du composé **9**

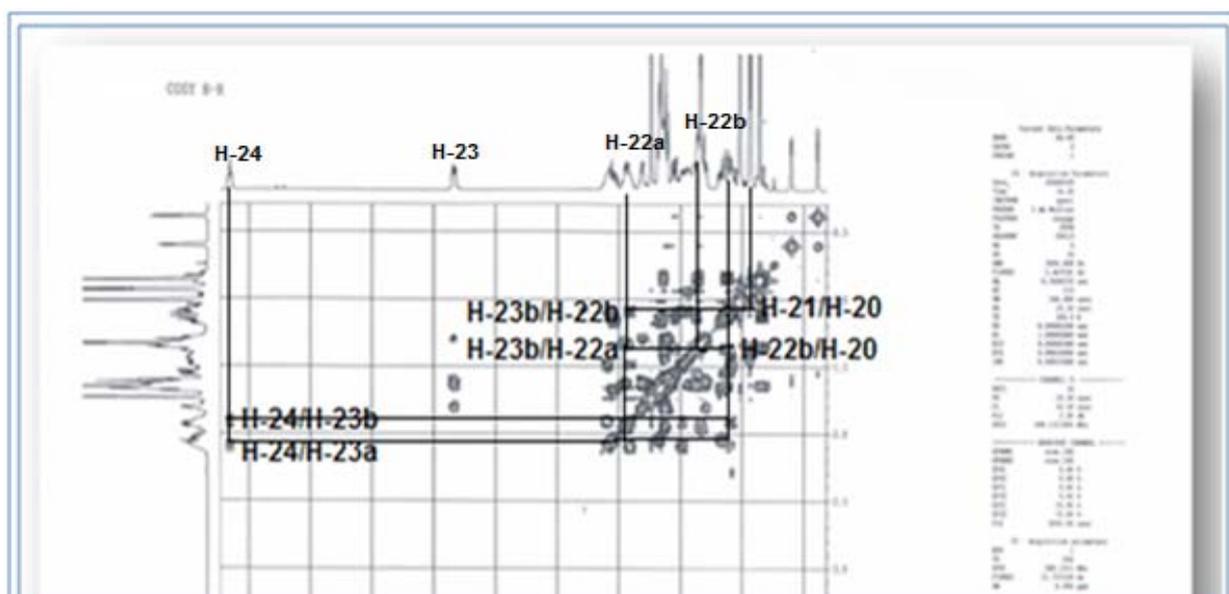


Figure III.9.5: Spectre COSY du composé **9** indiquant les couplages H-H au niveau de la chaîne latérale

L'expérience HSQC *J*-modulé (Figure IV.9.6) permet de détecter leurs carbones C-20 (δ_c 35,8), C-22 (δ_c 36,1), C-23 (δ_c 24,9) et C-24 (δ_c 125,2).

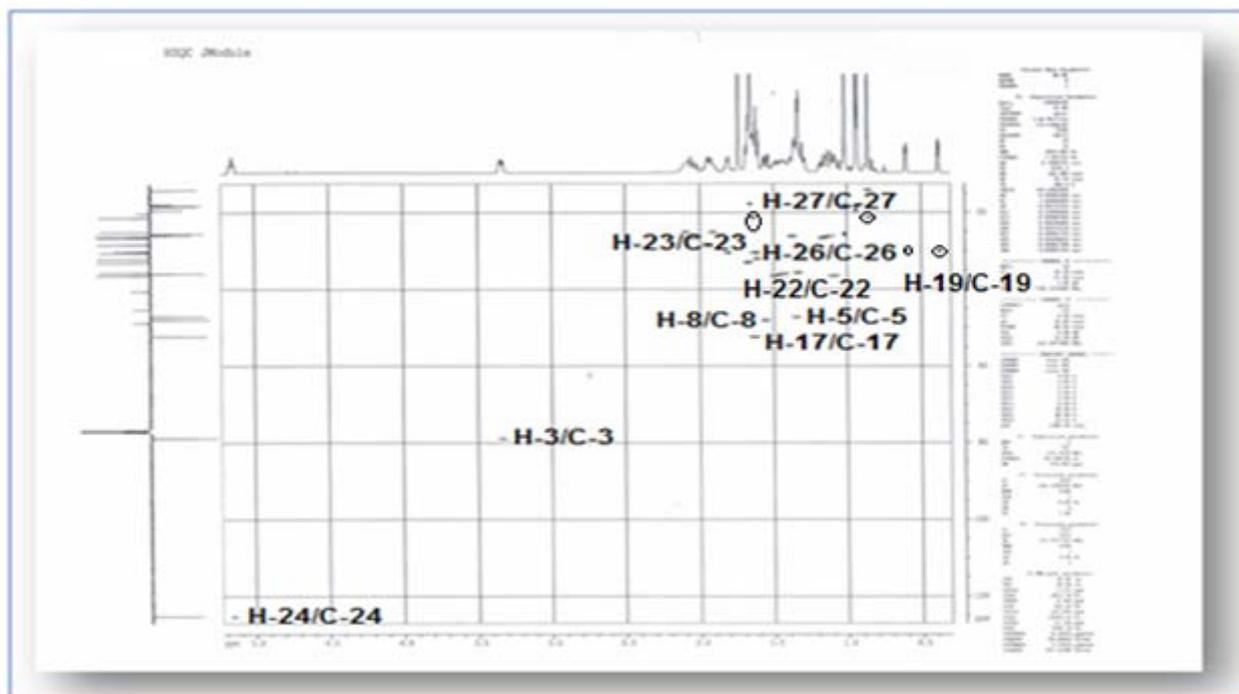


Figure III.9.6: Spectre HSQC *J*-modulé du composé **9**

Sur le spectre HMBC (Figures III.9.4 et III.9.7) les protons des groupements méthyles vinyliques Me-26 (δ_H 1,73) et Me-27 (δ_H 1,65) corrélient avec le carbone C-24 et un autre carbone résonant à 130,9 ppm correspondant au carbone éthylénique quaternaire C-25.

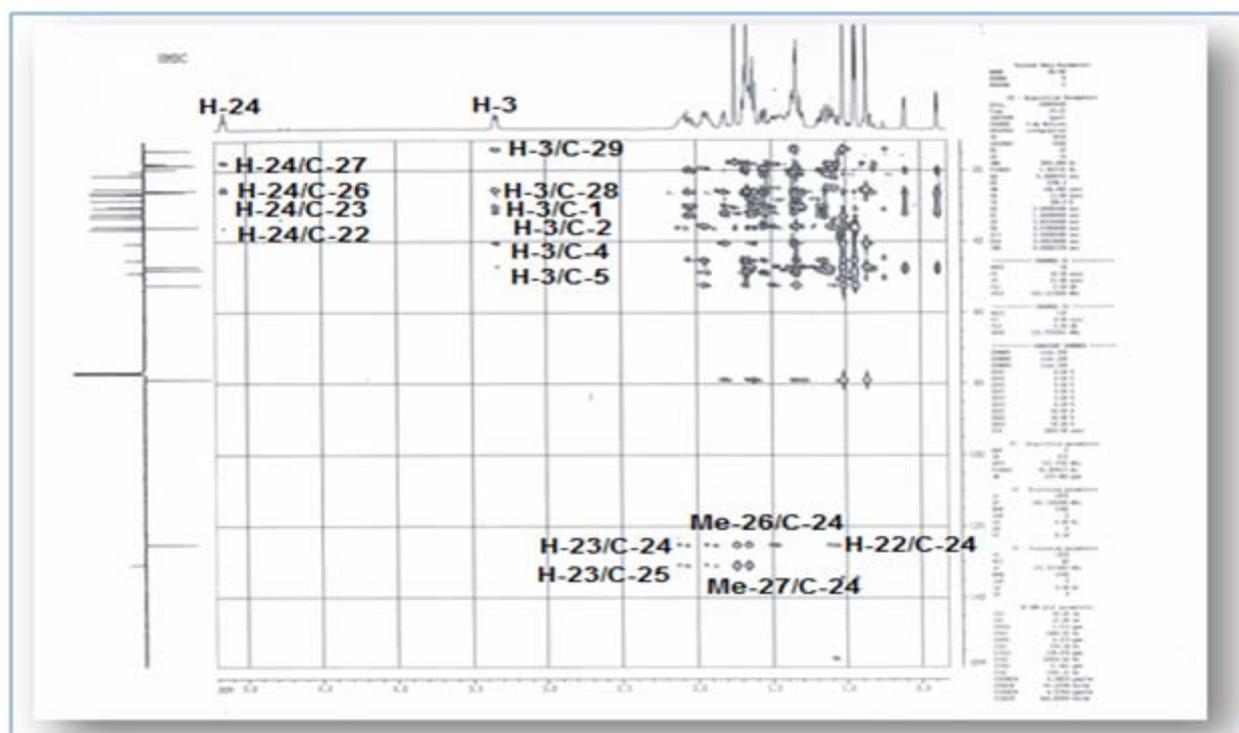


Figure III.9.7: Spectre HMBC du composé 9

La stéréochimie de ce composé est établie par analyse des valeurs des constantes de couplage et du spectre NOESY (Figures III.9.8 et III.9.9). Les effets NOE observés entre les protons H₂-19/Me-29, H-19 *endo*/H-8/Me-18/H-20 indiquent qu'ils sont de configuration β. D'autres effets NOE sont visualisés entre les protons : Me-28/H-3α/H-5α/H-7α/Me-30/H-17α/Me-21/H-12β. Les effets dipolaires cités précédemment et la valeur du déplacement chimique des protons Me-21 à 0,92 ppm ($J = 6,5$ Hz) [101] impliquent une configuration absolue 20*R* (C-20). Ces données conduisent à la détermination de la configuration absolue des autres carbones asymétriques comme suit : 3*S*, 5*R*, 10*R*, 9*S*, 8*R*, 13*S*, 14*R* et 17*S*.

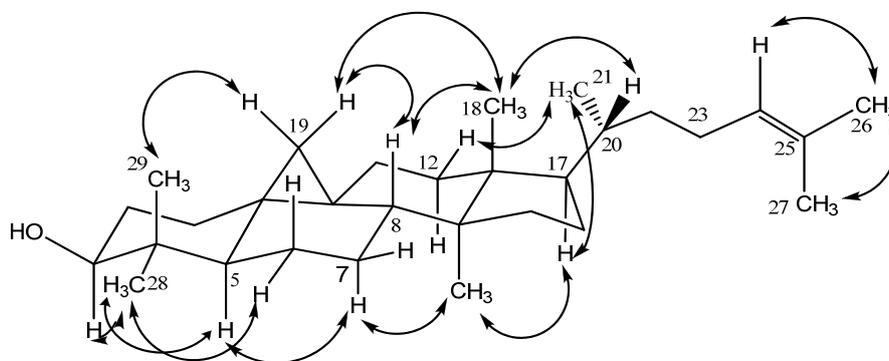


Figure III.9.8: Corrélations NOESY du composé 9

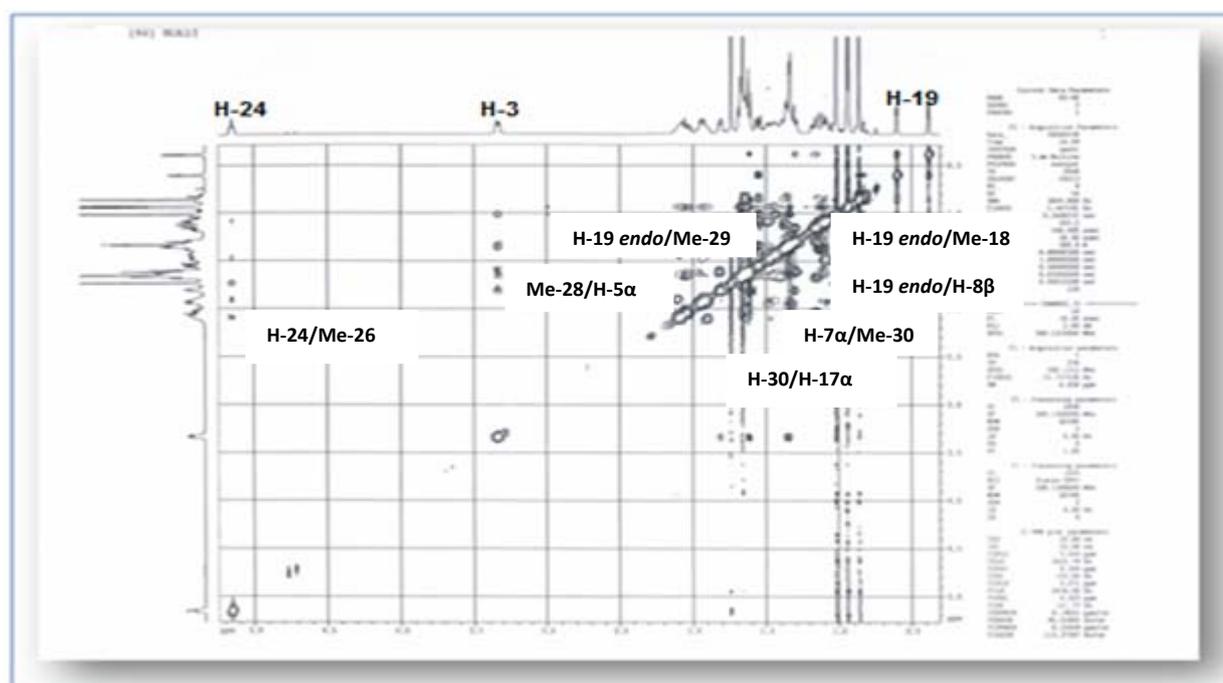


Figure III.9.9: Spectre NOESY du composé 9

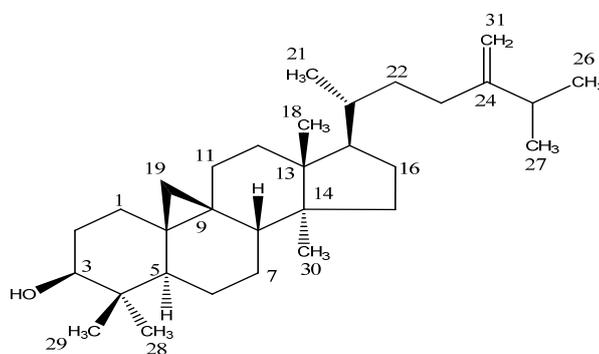
Cette analyse spectrale (Tableau III.9) et la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = +24^\circ$ (c 0,083 g/100 ml, CHCl_3) permettent d'attribuer la structure suivante au composé 9 : Cycloarténol. Ce composé a été identifié précédemment dans plusieurs espèces du genre *Euphorbia* : *E. guyoniana* [9], *E. broterie* [10], *E. cyparissias* [47], *E. heteradena* [55] et *E. peplus* [117], ainsi dans l'espèce *Xanthosoma robustum* [113].

Tableau III.9: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé 9 dans CDCl_3 .

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	1,31–1,61 m	31,9
2	1,60-1,81 m	30,3
3	3,34 dd 11,1, 4,5 H-3 α	78,8
4	-	40,5
5	1,35 m H-5 α	47,1
6	0,82 td 12,5, 2,4 H-6 β 1,64 m H-6 α	21,1
7	1,15-1,39 m	26,0
8	1,54 dd 12,2, 4,7 H-8 β	47,9
9	-	19,9
10	-	26,0

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
11	1,15-2,03 m	26,4
12	1,66 m	32,8
13	-	45,2
14	-	48,7
15	1,31 m	35,5
16	1,33-1,94 m	28,1
17	1,63 m H-17 α	52,1
18	1,02 s	18,0
19	0,38 d 4,1 H-19 <i>exo</i> 0,60 d 4,0 H-19 <i>endo</i>	29,9
20	1,42 m	35,8
21	0,92 d 6,5	18,3
22	1,09-1,49 m	36,1
23	1,91-2,08 m	24,9
24	5,15 t 7,1	125,2
25	-	130,9
26	1,73 s	25,7
27	1,65 s	17,6
28	1,01 s	25,4
29	0,85 s	13,9
30	0,94 s	19,2

III.7.10. Détermination structurale du composé 10



24-méthylèncycloartanol (10)

Le composé **10** est isolé sous forme d'une poudre blanche soluble dans le chloroforme. Il est invisible à 254 et 366 nm et se révèle en mauve après pulvérisation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C. Il s'agit d'un triterpène omniprésent dans les plantes du genre *Euphorbia* [9,55,118,119]. Il est nommé 24-méthylèneglycoartanol.

Le spectre de masse EI-MS du composé **10** (Figure III.10.1) donne un pic d'ion moléculaire à $m/z = 440,4$ $[M]^+$, ce qui correspond à la formule brute en $C_{31}H_{52}O$. Par ailleurs, on y retrouve les fragments caractéristiques des triterpènes tétracycliques à $m/z = 422$ $[M-18]^+$, 407 $[M-15-18]^+$ et 297 $[M-125-18]^+$. Ce dernier fragment correspond à la perte d'un groupement alkyle C_9H_{17} [55,117,118].

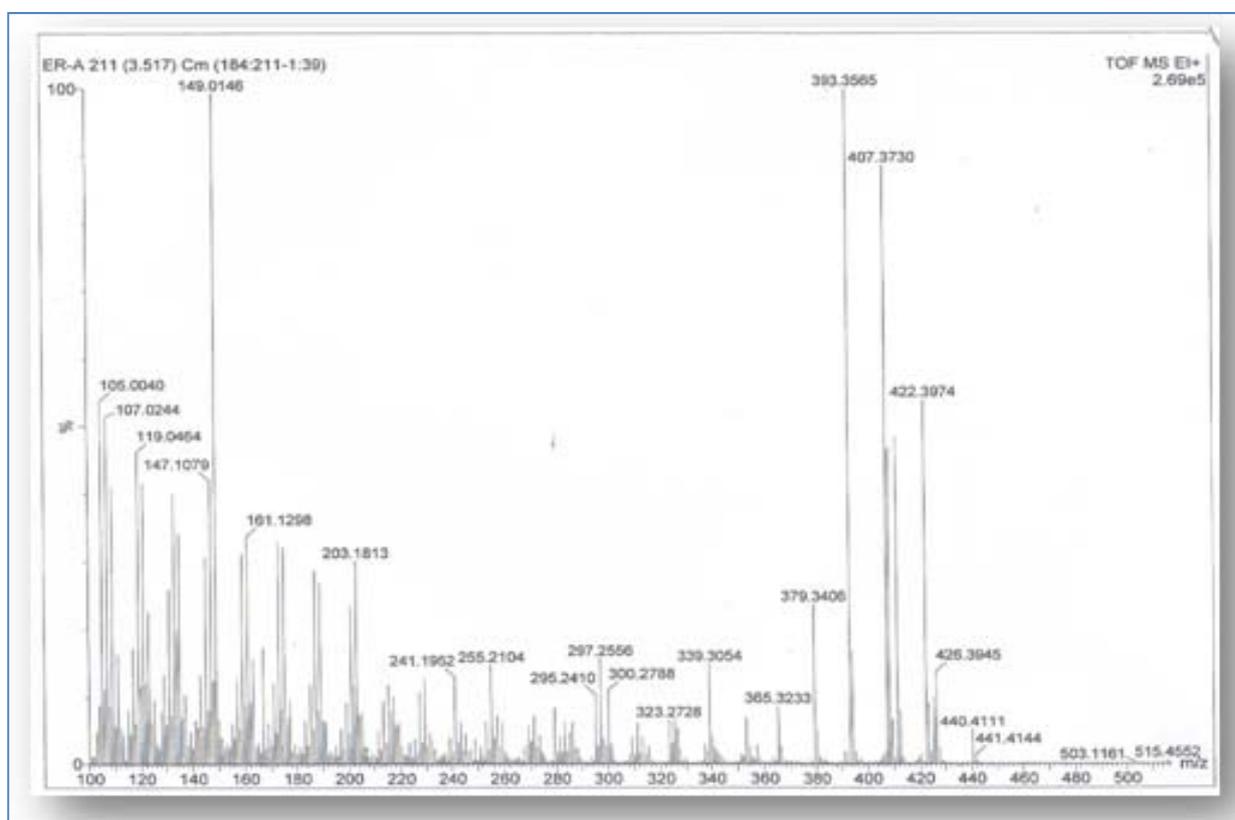
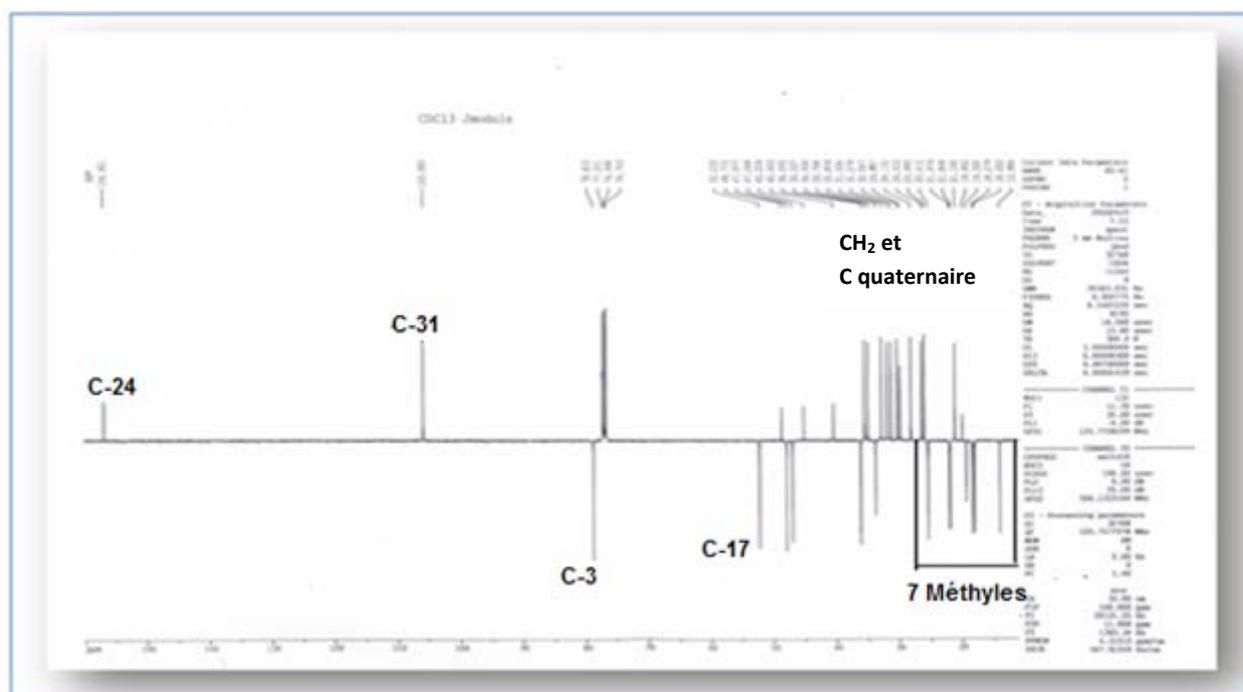


Figure III.10.1: Spectre de masse EI-MS du composé **10**

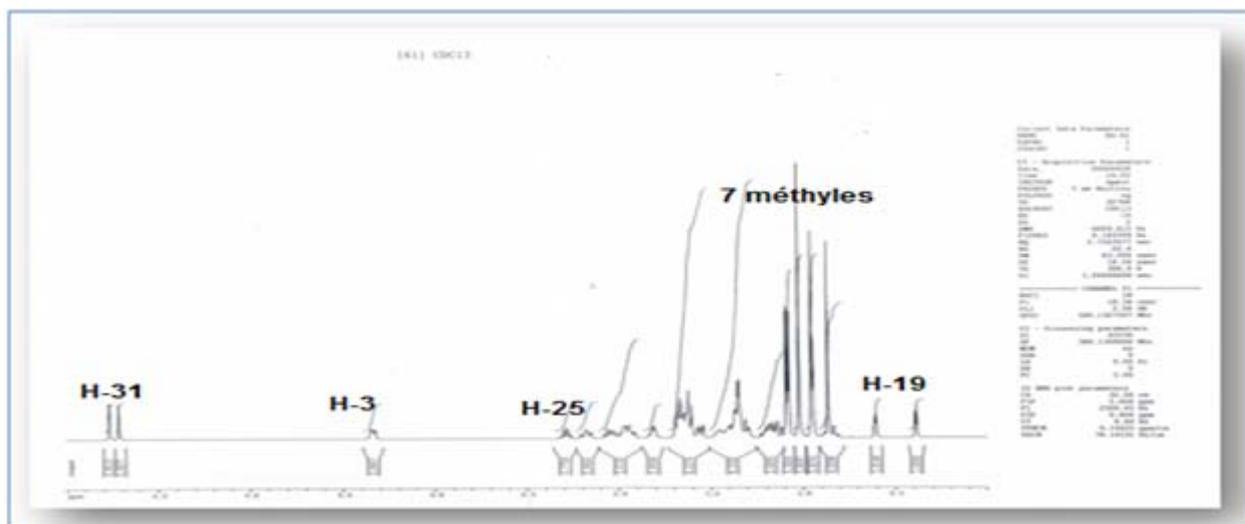
Le spectre RMN ^{13}C J -modulé (Figure III.10.2) de ce composé en apporte la confirmation de sa nature triterpénique tétracyclique. Il présente 31 signaux correspondant à 7 méthyles résonant entre 13,9 et 25,4, 12 méthylènes, 6 méthines dont un oxyméthine $CH-O$ (δ_c 78,8) et un groupement éthylénique $CH_2=$ (δ_c 105,9) ainsi que 6 atomes de carbone quaternaires dont un éthylénique (δ_c 156,8).

Figure III.10.2: Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé **10**

Le spectre RMN ^1H (Figure III.10.3) du composé **10** est presque identique à celui du composé **9**. En effet, il révèle la présence de :

- Sept signaux à haut champ correspondant à sept groupements méthyliques sous forme singulet et doublet repérés à δ_{H} 1,01 (3H, s, Me-18), 1,04 (3H, s, Me-28), 0,85 (3H, s, Me-29), 0,94 (3H, s, Me-30), 0,93 (3H, s, d, $J = 6,2$ Hz, Me-21), 1,08 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, Me-26) et 1,07 (3H, d, $J = 6,8$ Hz, Me-27).
- Un signal attribuable au proton H-3 α à 3,30 ppm sous forme d'un doublet de doublets (dd, $J = 11,6, 4,3$ Hz).
- Deux signaux doublets à δ_{H} 0,38 (1H, d, $J = 4,1$ Hz, H-19 *exo*) et 0,60 (1H, d, $J = 4,0$ Hz, H-19 *endo*).

La différence de ce composé par rapport au composé précédent **9** se situe au niveau de la chaîne latérale, où on dénote la disparition du signal de la double liaison endocyclique sous forme de triplet à 5,14 ppm et l'apparition de deux signaux sous forme de singulets larges à 4,70 et 4,77 ppm, correspondant aux déplacements chimiques des protons oléfiniques de la double liaison exocyclique (24)C=CH₂(31) rencontrée dans plusieurs composés cycloartaniques [9,10,102].

Figure III.10.3: Spectre RMN ^1H du composé **10**

L'analyse des spectres COSY (Figure III.10.4) et HSQC J -modulé (Figure III.10.5) permet d'assigner les déplacements chimiques de la majorité des protons et les carbones correspondant au composé **10**.

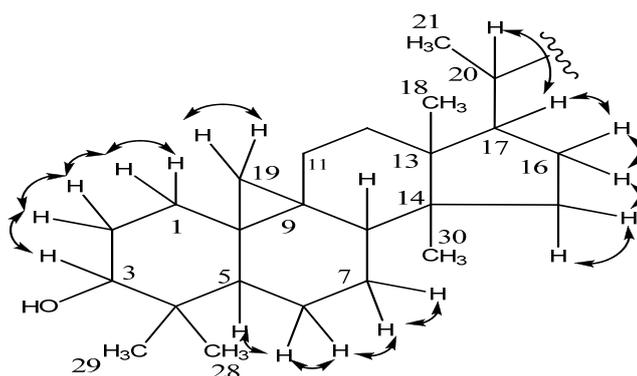
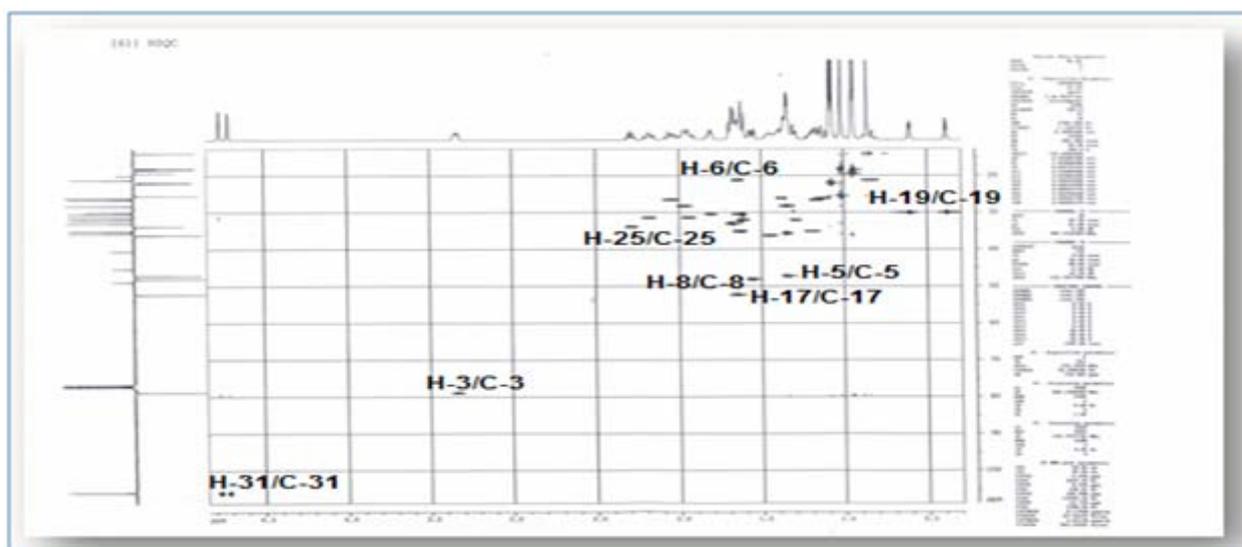


Figure III.10.4: Couplages COSY H-H

Figure III.10.5: Spectre HSQC J -modulé du composé **10**

Le spectre HMBC du composé **10** (Figures III.10.6 et III.10.7) permet de déterminer les déplacements chimiques d'un bon nombre de carbones à partir des groupements méthyles, méthylènes et méthines. En effet, il montre les couplages en 2J et 3J entre :

- Les deux protons du groupement méthylène CH₂-19 et les carbones résonant à δ_c 31,9 (C-1), 26,0 (C-10), 19,9 (C-9), 47,1 (C-5), 47,9 (C-8) et 26,4 (C-11).
- Le proton oxyméthine H-3 et les carbones repérés à δ_c 30,3 (C-2), 40,4 (C-4), 25,4 (Me-28), 13,9 (Me-29) et le carbone C-5 déjà identifié.
- Les protons du méthyle Me-18 et les carbones localisés à δ_c 32,8 (C-12), 45,2 (C-13) et 48,7 (C-14).
- Les protons du méthyle Me-30 et les carbones situés à δ_c 35,5 (C-15), C-13 et C-14 déjà attribués.
- Les protons du méthyle Me-21 et les carbones détectés à δ_c 52,2 (C-17), 36,1 (C-20) et 34,9 (C-22).

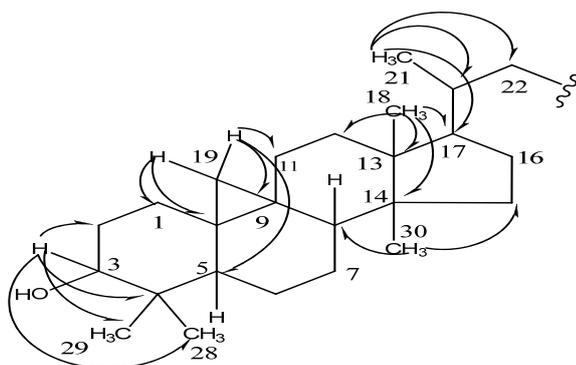


Figure III.10.6: Principales corrélations HMBC observées pour le composé **10**

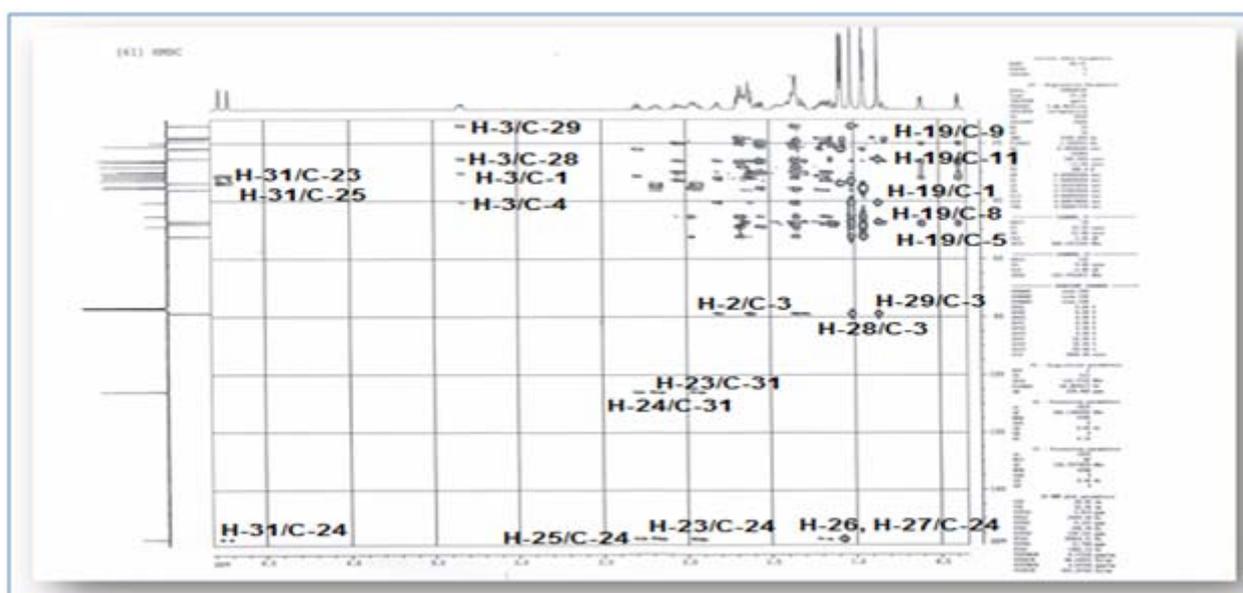


Figure III.10.7: Spectre HMBC du composé **10**

Le spectre COSY (Figures III.10.8 et III.10.9) permet aussi de visualiser les couplages de la chaîne latérale suivants: Me-21/H-20 (δ_H 1,44, m)/H₂-22 (δ_H 1,19-1,63, m)/H₂-23 (δ_H 1,94, m, H-23b ; 2,18, ddd, $J = 15,5, 12,0, 4,5$ Hz, H-23a)/H₂-31 (δ_H 4,77, sl, H-31a ; 4,70, sl, H-31b)/H-25 (δ_H 2,28, sept, $J = 6,8$ Hz)/Me-26 (δ_H 1,08, d, $J = 6,8$ Hz) et Me-27 (δ_H 1,07, d, $J = 6,8$ Hz). L'expérience hétéronucléaire directe HSQC permet d'assigner leurs carbones résonant à δ_C 36,1 (C-20), 34,9 (C-22), 31,3 (C-23), 105,9 (C-31), 33,7 (C-25), 21,8 (Me-26) et 21,9 (Me-27).

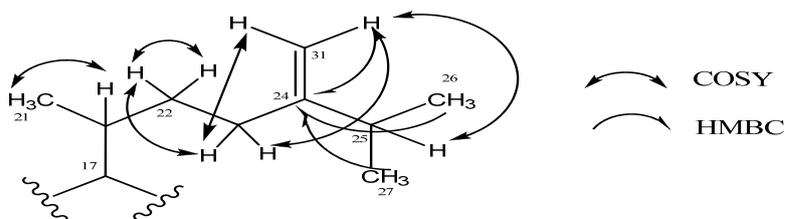


Figure III.10.8: Corrélations COSY et HMBC de la chaîne latérale

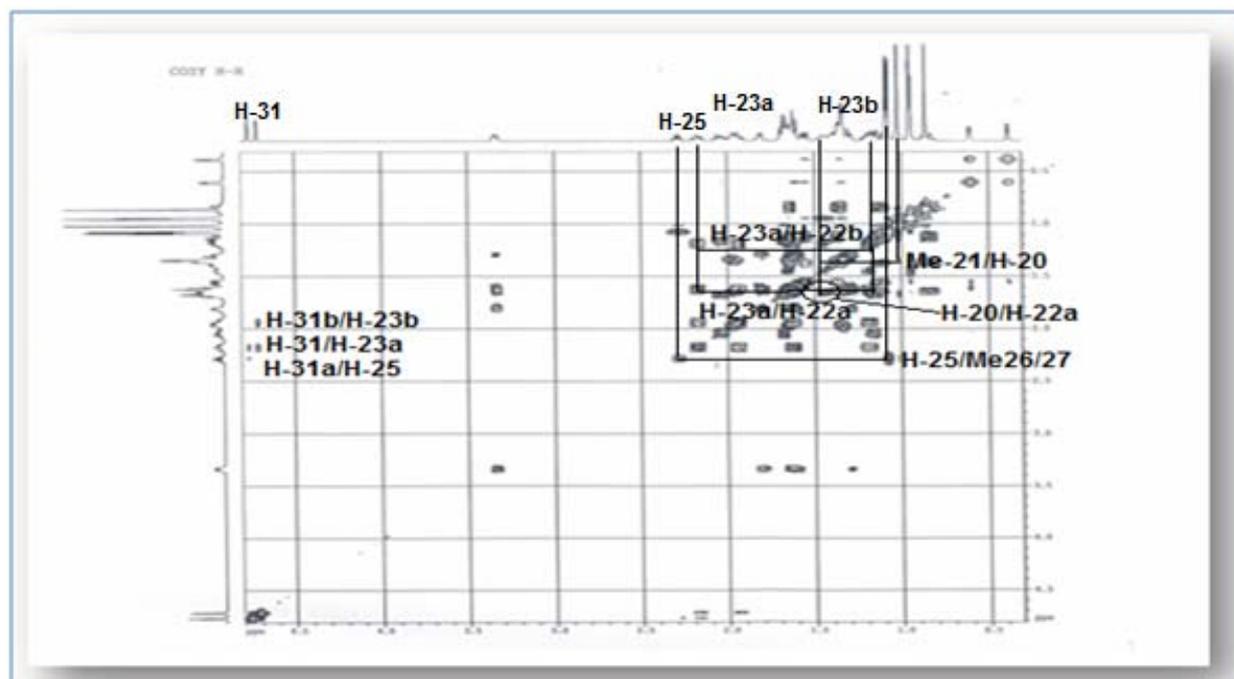


Figure III.10.9: Spectre COSY du composé **10** mettant en évidence les couplages H-H de la chaîne latérale

En plus, les deux protons oléfiniques CH₂-31 et les protons des méthyles Me-26 et Me-27 corrélient en HMBC (Figure III.10.7) avec un carbone éthylénique quaternaire résonant à δ_C 156,8 ne pouvant être que le carbone C-24.

La stéréochimie de ce triterpène est vérifiée par l'analyse des valeurs de constantes de couplage et les effets NOE observés sur le spectre NOESY (Figures III.10.10 et III.10.11). En

effet, l'expérience NOESY montre les taches de corrélation entre les protons Me-29/CH₂-19β/H-8β/Me-18/H-20. D'autres effets NOE sont détectés entre Me-28/H-3α/H-5α/H-30/H-17α/Me-21, ainsi qu'entre les groupements méthyles Me-26 et Me-27 et le proton oléfinique H-31a. Ces données spectrales (Tableau III.10) et la mesure du pouvoir rotatoire dans le chloroforme du composé **10** [α]_D²⁰ = +40,2° (c 1,01 g/100 ml, CHCl₃) permettent d'identifier pour ce composé la structure suivante : 24-méthylèncycloartanol. Ce composé a été isolé antérieurement des espèces du genre *Euphorbia* dont *E. retusa* [8], *E. guyoniana* [9], *E. broterie* [10], *E. cyparissias* [47], *E. heteradena* [55] et *E. peplus* [117].

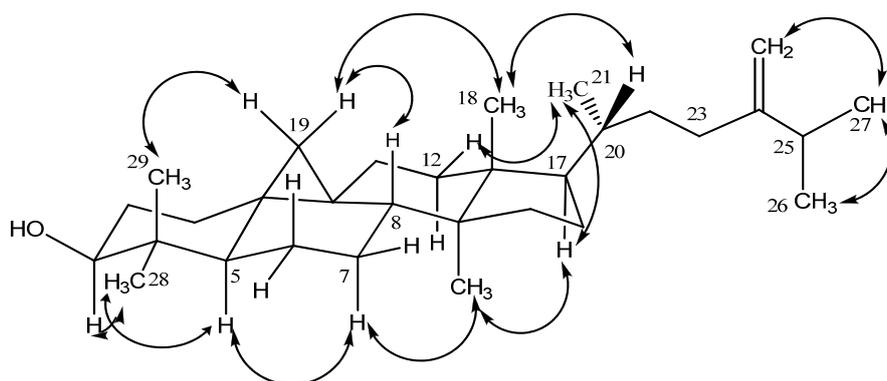


Figure III.10.10: Corrélations NOESY du composé **10**

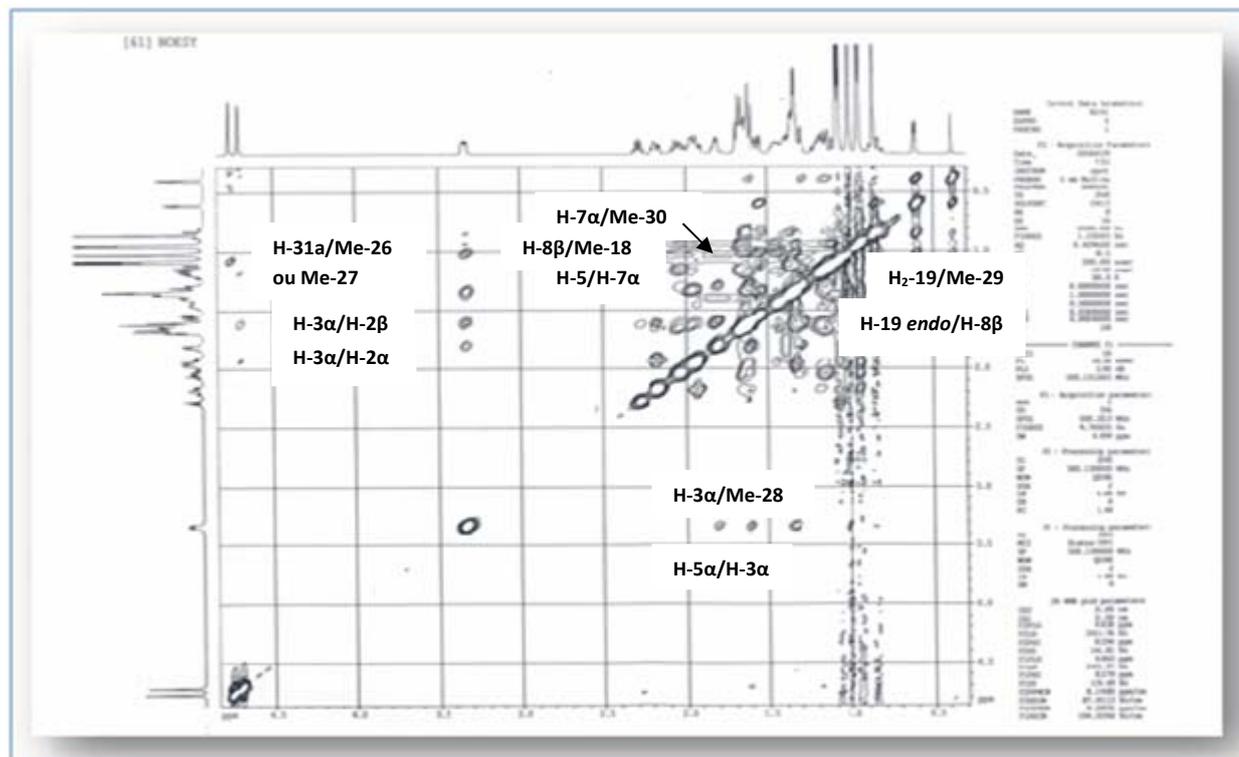


Figure III.10.11: Spectre NOESY du composé **10**

Tableau III.10: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **10** dans CDCl₃.

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	1,29-1,61 m	31,9
2	1,66-1,80 m	30,3
3	3,30 dd 11,6, 4,3 H-3 α	78,8
4	-	40,4
5	1,34 m H-5 α	47,1
6	0,85-1,64 m	21,1
7	1,12 dd 12,5, 2,5 H-7 α 1,38 m H-7 β	26,0
8	1,53 dd 12,2, 4,8 H-8 β	47,9
9	-	19,9
10	-	26,0
11	1,16-2,04 m	26,4
12	1,67 t 6,3	32,8
13	-	45,2
14	-	48,7
15	1,35 m	35,5
16	1,36-1,96 m	28,1
17	1,66 t 8,2 H-17 α	52,2
18	1,01 s	18,0
19	0,38 d 4,1 H-19 <i>exo</i> 0,60 d 4,0 H-19 <i>endo</i>	29,9
20	1,44 m	36,1
21	0,93 d 6,2	18,3
22	1,19-1,63 m	34,9
23	1,94 m H-23b 2,18 ddd 15,5, 12,0, 4,5 H-23a	31,3
24	-	156,8
25	2,28 sept 6,8	33,7
26	1,08 d 6,8	21,8
27	1,07 d 6,8	21,9
28	1,04 s	25,4
29	0,85 s	13,9

La détermination structurale de ces composés (**11** et **12**) est basée sur l'analyse des spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C et la comparaison avec les données de la littérature. La différence d'intégration entre les protons caractéristiques des cycloarténols : H₂-19 (2H), H-3 (2H) et H₂-28 (4H) atteste bien qu'il s'agit d'un mélange de deux composés.

L'interprétation du spectre RMN ^{13}C de ce mélange (Figure III.11.2) montre une grande similitude entre les composés **10** (24-méthylèncycloartanol) et **11**, on peut reconnaître facilement les 30 atomes de carbone du cycloeucalénol (**11**) dont un quaternaire déblindé à 156,9 ppm (C-24), un oxyméthine à 76,5 ppm (C-3), un CH₂ oléfinique à 105,8 ppm (C-28), onze CH₂ résonnant entre 24,1 et 35,0 ppm, six CH résonnant entre 33,7 et 52,2 ppm et les 6 méthyles à 18,0, 18,6, 21,8, 21,9, 19,3 et 14,3 ppm.

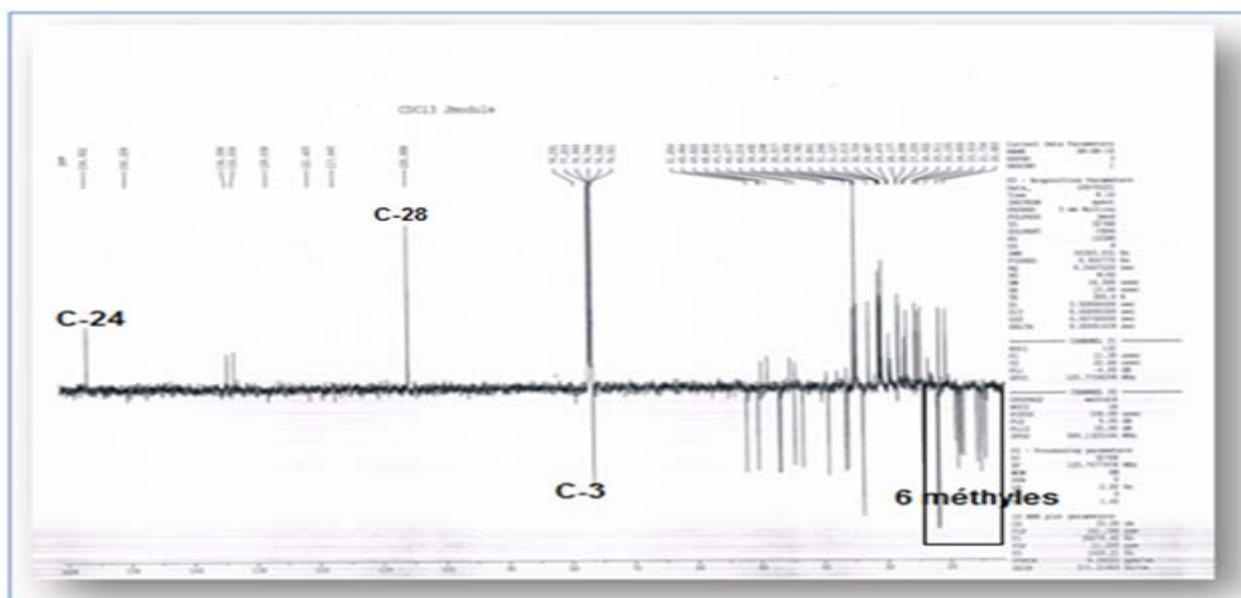


Figure III.11.2: Spectre RMN ^{13}C J-modulé du composé **11**

L'analyse du spectre RMN ^1H (Figure III.11.3) de ce mélange permet d'attribuer les signaux du cycloeucalénol (**11**) à savoir : six groupements méthyles à δ_{H} 0,72 (s, Me-30), 0,74 (d, $J = 6,5$ Hz, Me-21), 0,84 (d, $J = 6,5$ Hz, Me-29), 0,82 (s, Me-18), 0,88 (d, $J = 6,8$ Hz, Me-26) et 0,86 (d, $J = 6,8$ Hz, Me-27), deux protons sous forme de doublets à δ_{H} 0,01 (d, $J = 4,1$ Hz, H-19 *exo*), 0,23 (d, $J = 4,0$ Hz, H-19 *endo*) typiques de deux protons non équivalents d'un noyau cyclopropane tétrasubstitué du dérivé de cycloartanol, un proton hydroxyméthine à δ_{H} 3,05 (td, $J = 11,7, 5,2$ Hz, H-3 α) et deux protons éthyléniques résonnant à 4,56 ppm (sl, H-28a) et 4,51 ppm (sl, H-28b). Ces protons couplent en HSQC avec les carbones à δ_{C} 76,5 (C-3), 27,4 (C-19), 19,3 (Me-30), 18,6 (Me-21), 14,3 (Me-29), 18,0 (Me-18), 21,8 (Me-26), 21,9 (Me-27) et 105,8 (C-28).

En plus, les taches de corrélation visualisées en HMBC (Figure III.11.5) entre le proton H-4 et les carbones C-2, C-3, C-5 et Me-29 confirmant ces attributions.

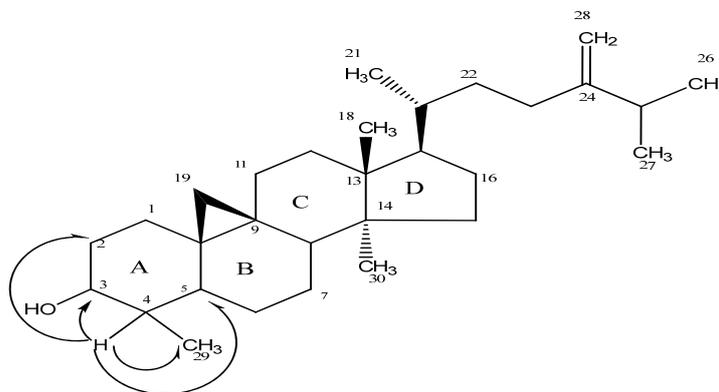


Figure III.11.5: Corrélations HMBC du composé **11** au niveau du cycle A

Ces données spectrales (Tableau III.11) et la comparaison avec celles trouvées dans la littérature [9,119-121] permettent d'identifier le composé **11** au cycloeucalénol.

Tableau III.11: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **11** dans CDCl_3 .

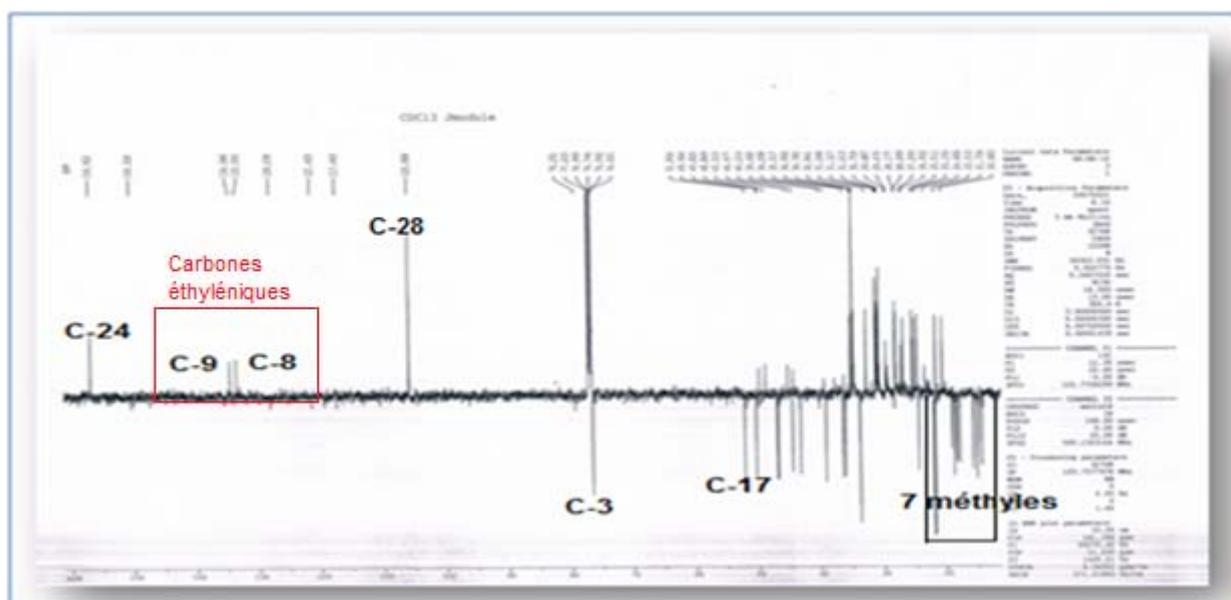
Position	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1	1,11-1,40 m	30,9
2	1,29-1,84 m	34,8
3	3,05 td 11,7, 5,2 H-3 α	76,5
4	1,03 m H-4 β	44,4
5	1,05 m H-5 α	43,3
6	0,40-1,50 m	24,1
7	1,13-1,77 m	28,1
8	1,40 m H-8 β	46,9
9	-	23,4
10	-	29,3
11	1,86 m	25,4
12	1,15 m	35,3
13	-	45,2
14	-	48,9
15	1,46 m	32,9

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
16	1,04-1,84 m	26,9
17	1,43 m H-17 α	52,2
18	0,82 s	18,0
19	0,01 d 4,1 H-19 <i>exo</i> 0,23 d 4,0 H-19 <i>endo</i>	27,4
20	1,26 m	36,1
21	0,74 d 6,5	18,6
22	1,01-1,41 m	35,0
23	1,70-1,98 m	31,3
24	-	156,9
25	2,08 sept 6,8	33,7
26	0,88 d 6,8	21,8
27	0,86 d 6,8	21,9
28	4,56 sl H-30a 4,51 sl H-30b	105,8
29	0,84 d 6,5	14,3
30	0,72 s	19,3

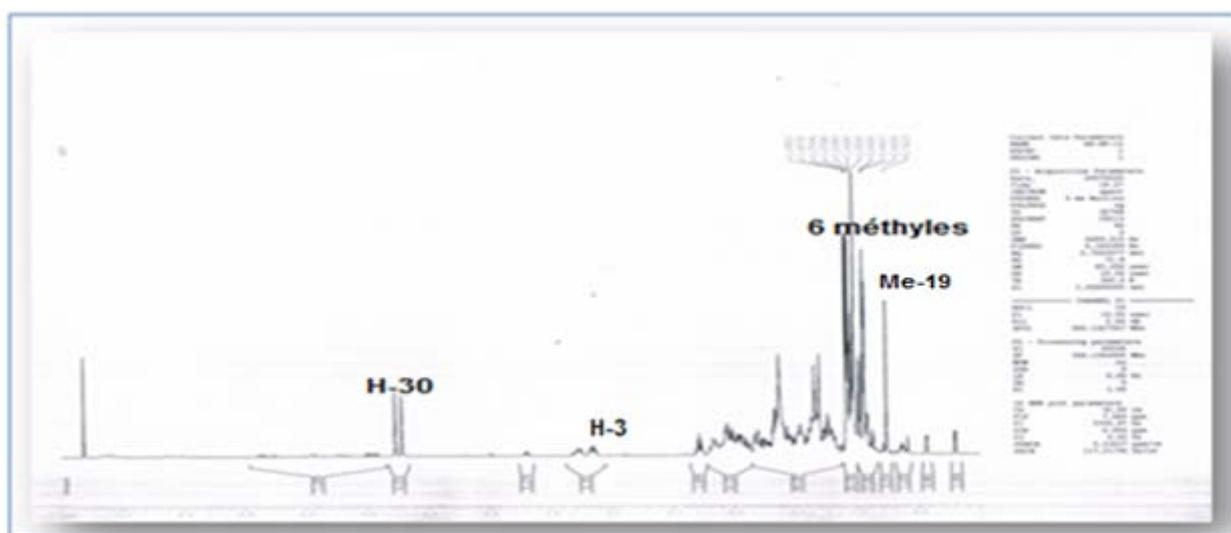
Le deuxième composé du mélange est identifié à l'obtusifoliol (**12**). Les composés **11** et **12** sont deux isomères et ne se différencient que par l'ouverture du cycle 9 β ,19-cyclopropane catalysé par une enzyme spécifique [103,104].

Sur le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (Figure III.12.1), il est visualisé les signaux correspondant à l'obtusifoliol (**12**):

- Sept groupements méthyles.
- Un signal à 76,5 ppm correspondant au carbone oxyméthine C-3.
- Quatre signaux correspondant à quatre carbones éthyléniques, l'un méthylène =CH₂ (105,8 ppm) et trois quaternaires (133,5, 134,5 et 156,9 ppm). L'observation sur le même spectre de deux signaux supplémentaires de carbones quaternaires éthyléniques indique la présence d'une double liaison tétrasubstituée.

Figure III.12.1 : Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé **12**

Le spectre RMN ^1H du composé **12** (Figure III.12.2) est presque identique à celui du composé **11** déjà identifié. En effet, l'apparition dans la région des champs forts d'un signal singulet résonnant à 0,83 ppm correspondant à un groupement méthyle explique bien l'ouverture du noyau $9\beta,19$ -cyclopropane et la formation d'un méthyle supplémentaire en comparaison avec le composé **11**.

Figure III.12.2 : Spectre RMN ^1H du composé **12**

Sur le spectre HMBC (Figure III.12.3), on observe les corrélations en 2J et 3J entre :

- Les protons du méthyle Me-19 et les carbones résonnant à δ_c 35,3 (C-1), 48,8 (C-5) et un carbone éthylénique à 134,5 ppm (C-9).

- Les protons du méthyle Me-30 et un carbone éthylénique résonant à 133,5 ppm ne pouvant être que le carbone C-8, deux carbones quaternaires à δ_C 44,4 (C-13) et 48,8 ppm (C-14) et un carbone méthylène à δ_C 30,7 (C-15).

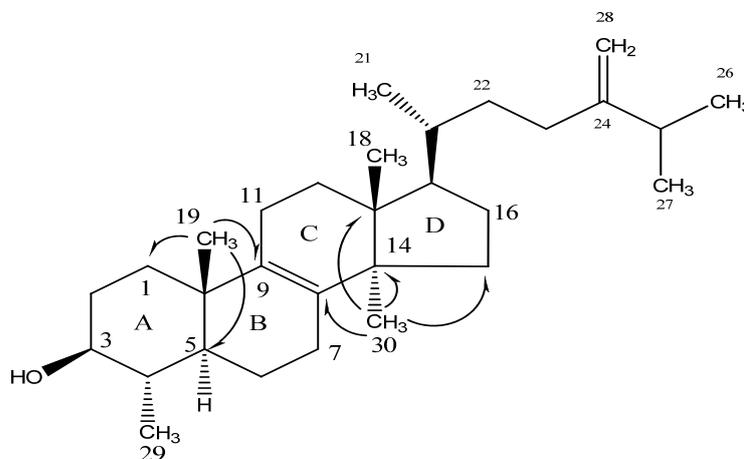


Figure III.12.3: Corrélations HMBC du composé **12**

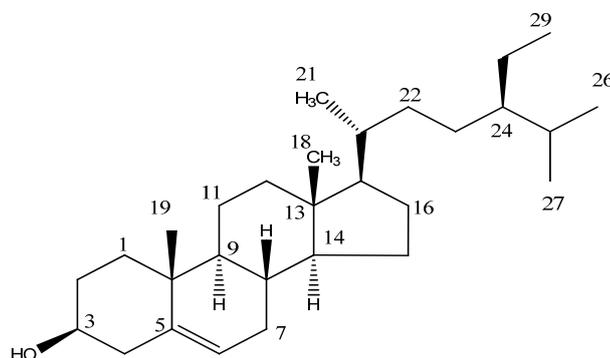
Toutes ces données spectroscopiques (Tableau III.12) et la comparaison avec celles trouvées dans la littérature [8,9,49,119,120] indiquent que le composé **12** est l'obtusifoliol.

Tableau III.12: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **12** dans $CDCl_3$.

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	1,14 m	35,3
2	1,04-1,39 m	30,7
3	2,96 td 11,4, 5,3 H-3 α	76,5
4	1,15 m H-4 β	40,2
5	0,81 m H-5 α	48,8
6	1,08-1,60 m	20,6
7	1,11-1,78 m	26,9
8	-	133,5
9	-	134,5
10	-	36,5
11	1,84-1,91 m	21,7
12	1,50 m	24,6
13	-	44,4

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
14	-	48,8
15	1,56-1,68 m	30,7
16	1,40-1,98 m	31,1
17	1,35 m H-17 α	51,8
18	0,56 s	15,7
19	0,83 s	18,7
20	1,25 m	36,2
21	0,78 d 6,5	18,2
22	0,98-1,40 m	34,7
23	1,67-1,97 m	31,1
24	-	156,9
25	2,08 sept 6,8	32,8
26	0,88 d 6,7	21,9
27	0,86 d 6,8	22,0
28	4,56 sl H-30a 4,50 dl 1,2 H-30b	105,8
29	0,84 d 6,2	15,1
30	0,73 s	24,6

III.7.12. Détermination structurale du composé 13



24-éthylcholest-5-èn-3-ol (13)

Le composé **13** est obtenu à l'état de poudre blanche soluble dans le CHCl_3 . Il est invisible à l'UV (254 et 366 nm) et se révèle en bleu après pulvérisation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le composé **13** a été identifié au 24-éthylcholest-5-èn-3-ol appelé également β -sitostérol. Ce composé est omniprésent dans le règne végétal. Les spectres de masse ESI-MS du composé **13** enregistrés en modes négatif (Figure III.13.1) et positif (Figure III.13.2), présentent deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 413$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ et 437,8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ respectivement, ceci correspond à une masse moléculaire de 414 uma et une formule brute en $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$.

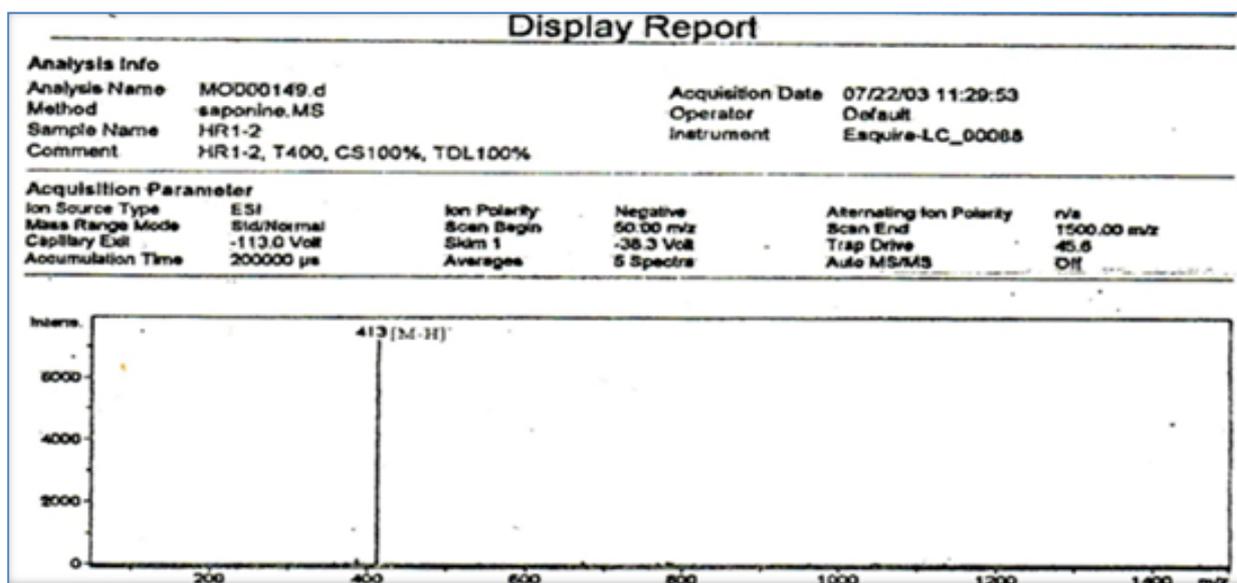


Figure III.13.1: Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé **13**

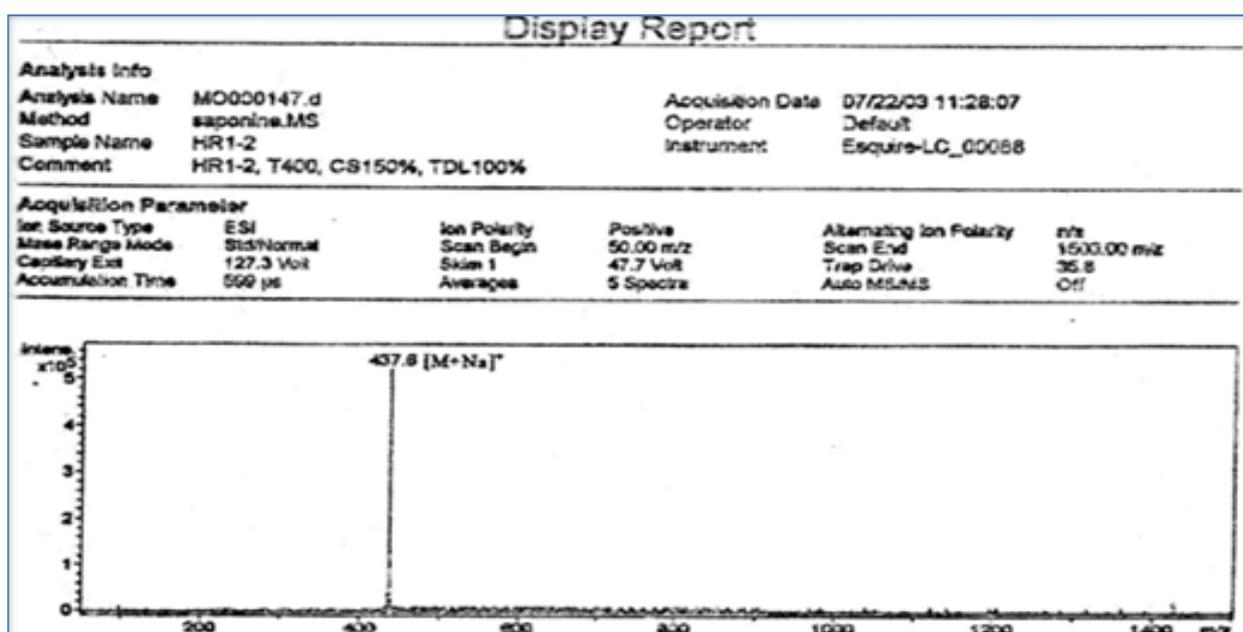


Figure III.13.2: Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé **13**

Dans le spectre RMN ^1H (Figure III.13.3) du composé **13**, il est visualisé:

- Six signaux à haut champ correspondant à six groupements méthyliques sous forme singulet, doublet et triplet repérés à : 0,74 (s, Me-18), 1,06 (s, Me-19), 0,93 (d, $J = 6,5$ Hz, Me-21), 0,88 (d, $J = 6,9$ Hz, Me-26), 0,86 (d, $J = 6,9$ Hz, Me-27) et 0,89 (t, $J = 7,4$ Hz, Me-29).
- Un signal attribuable au proton H-3 α à 3,6 ppm sous forme d'un triplet de triplets (tt, $J = 11,3 ; 5,3$ Hz).
- Un signal de proton oléfinique à 5,40 (1H, dd, $J = 5,2 ; 2,3$ Hz).

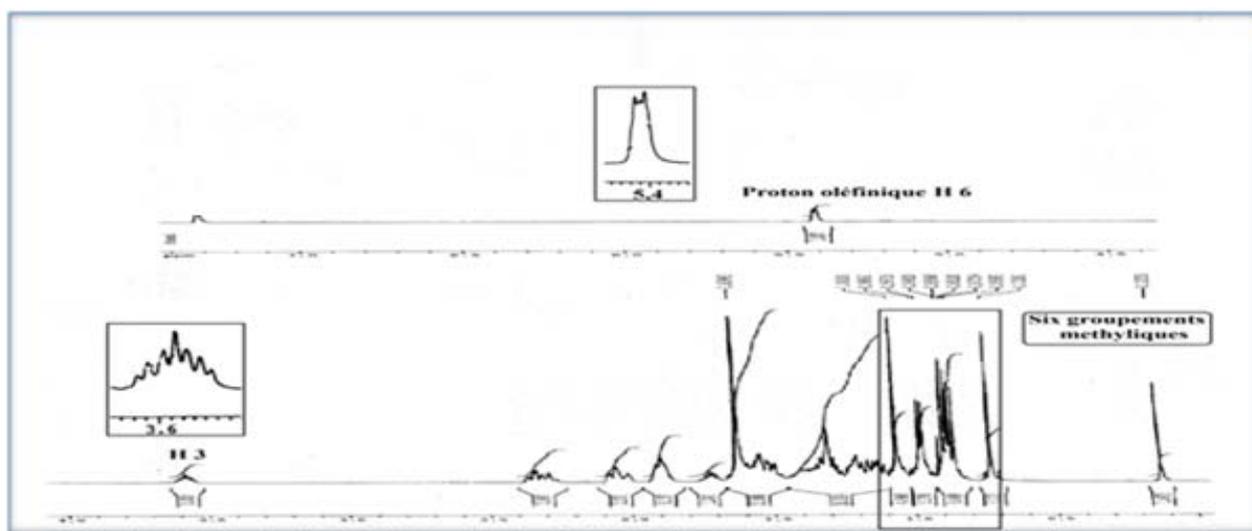


Figure III.13.3: Spectre RMN ^1H du composé **13**

Le spectre RMN ^{13}C J -modulé (Figure III.13.4) montre les signaux correspondant à six méthyles, onze méthylènes, sept méthines et cinq atomes de carbone quaternaires confirmant la nature stéroïdique de ce composé.

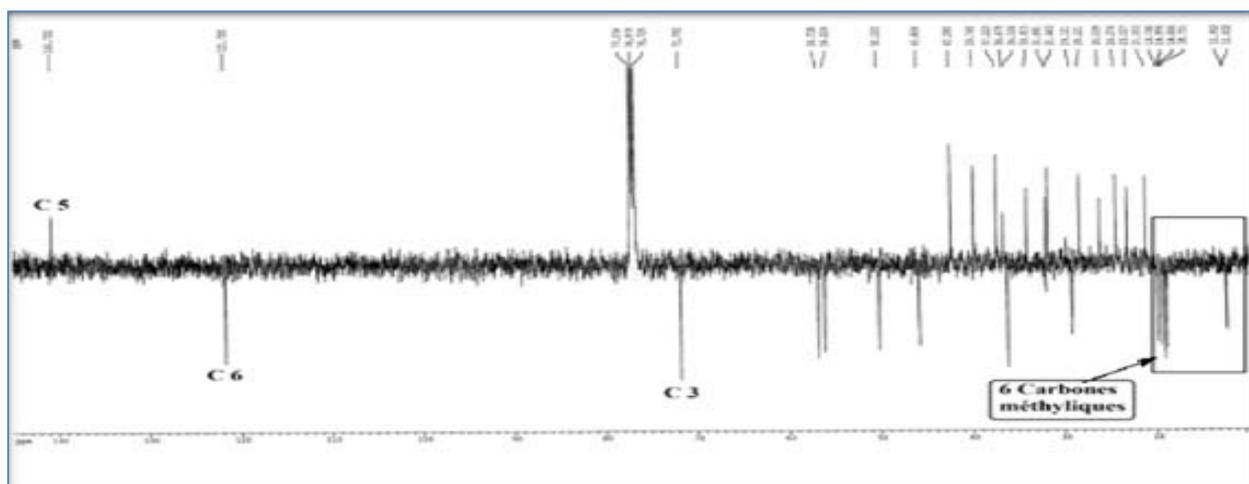


Figure III.13.4: Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé **13**

L'analyse conjointe des spectres RMN ^1H et RMN ^{13}C , COSY, HSQC et HMBC conduit à assigner les déplacements chimiques de tous les protons et carbones de ce composé.

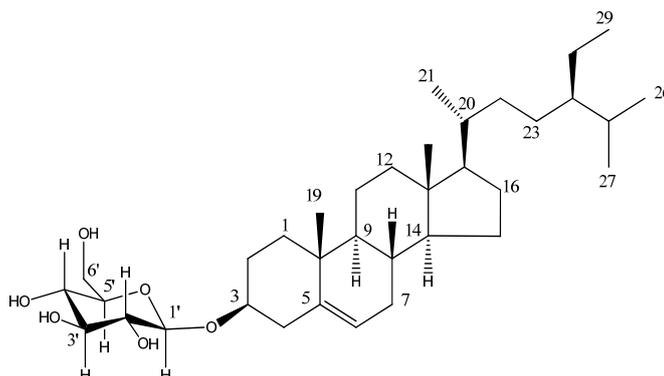
L'ensemble de ces données (Tableau III.13), la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -30^\circ$ (c 0,80 g/100 ml, CHCl_3), ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [36], mènent à l'identification du composé **13** comme étant 24-éthylcholest-5-èn-3-ol. Il a été isolé antérieurement des espèces : *Euphorbia retusa* [8], *Euphorbia guyoniana* [9], *Euphorbia antiquorum* [120], *Euphorbia nivulia* [121] et *Euphorbia segetalis* [122].

Tableau III.13: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **13** dans CDCl_3 .

Position	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}
1	1,90-1,13 m	37,2
2	1,88-1,56 m	31,6
3	3,60 tt 11,3, 5,3 H-3 α	71,8
4	2,34 ddd 13,0, 5,0, 2,0 H-4 α 2,30 td 11,0, 2,0 H-4 β	42,3
5	-	140,7
6	5,40 dd 5,2, 2,3	121,2
7	1,50 m	31,9
8	2,03 td 12,1, 2,4 H-8 β	31,8
9	0,98 m H-9 α	50,1
10	-	36,5
11	1,55 m H-11 α 1,50 qd 10,8, 4,6 H-11 β	21,1
12	2,06 td 12,8, 3,6 H-12 β 1,21 m H-12 α	39,7
13	-	42,3
14	1,04 m H-14 α	56,7
15	1,11-1,63 m	24,3
16	1,30-1,89 m	28,2
17	1,16 t 10,0 H-17 α	56,0
18	0,74 s	11,8
19	1,06 s	19,4

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
20	1,40 m	36,1
21	0,93 d 6,5	18,8
22	1,07-1,36 m	33,9
23	1,21 m	26,0
24	0,97 m	45,8
25	1,71	29,1
26	0,88 d 6,9	19,8
27	0,86 d 6,9	19,0
28	1,31 m	23,0
29	0,89 t 7,4	12,0

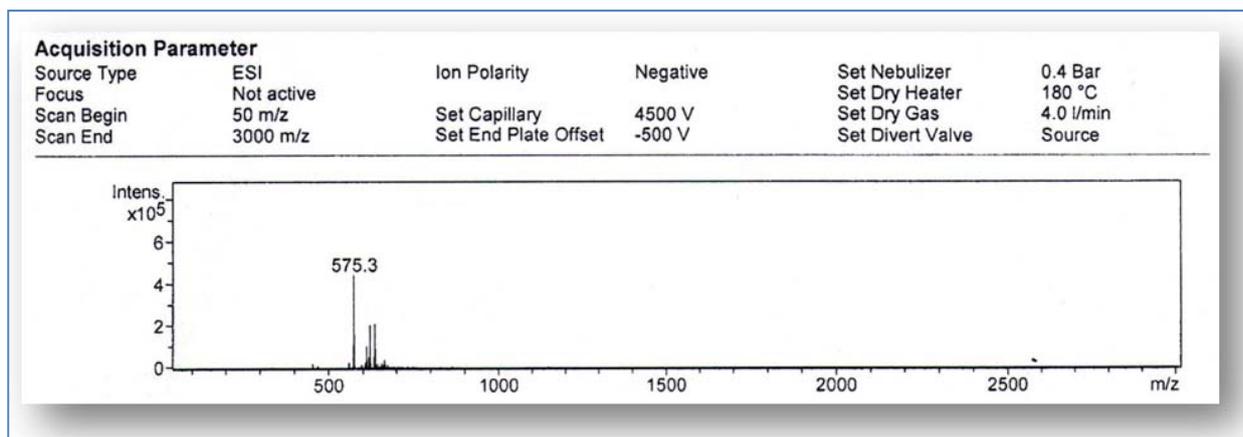
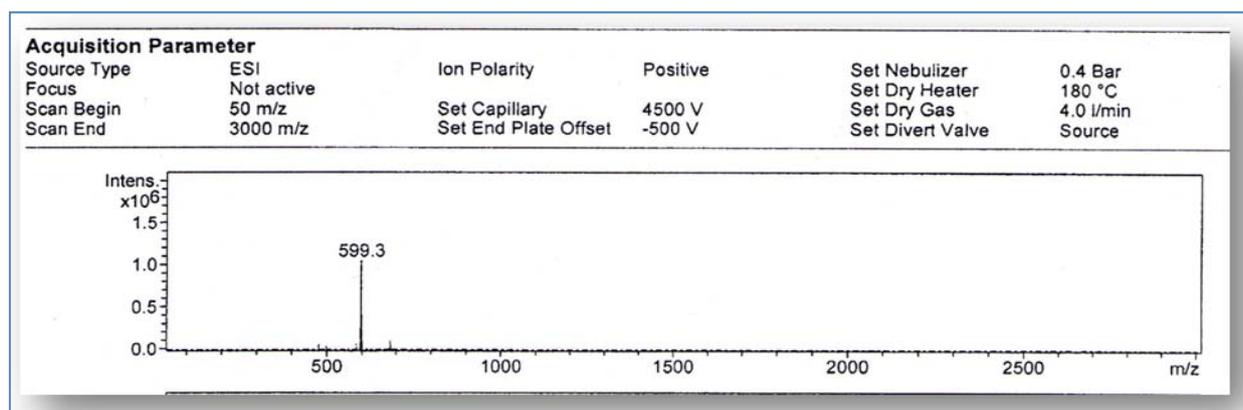
III.7.13. Détermination structurale du composé 14



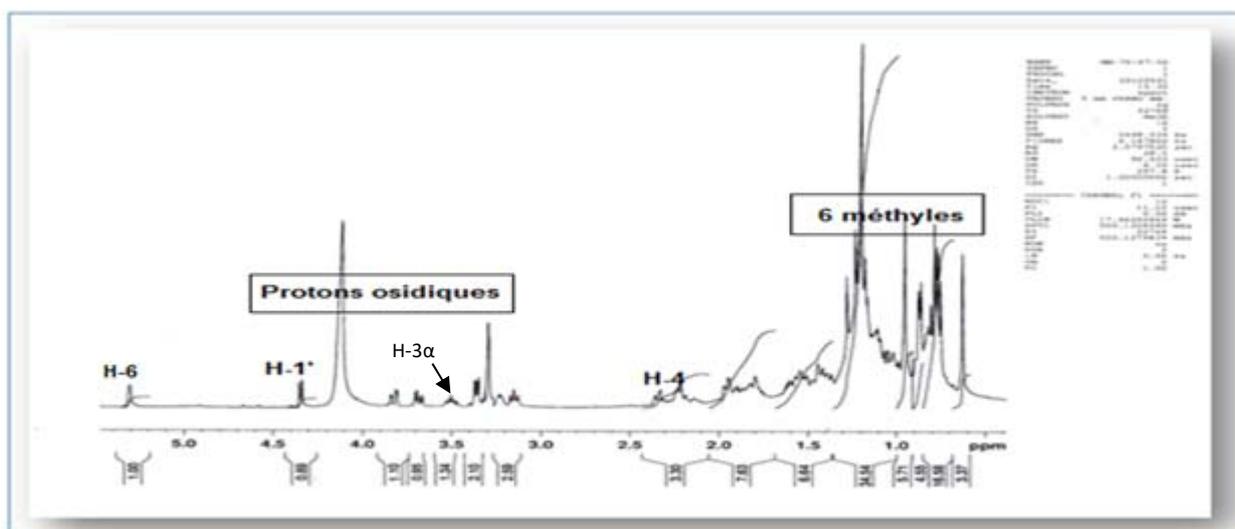
3β-D-glucopyranosyl β-sitostérol (**14**)

Le composé **14** est obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le mélange $\text{CHCl}_3 + \text{MeOH}$. Il est invisible à l'UV et se colore en rose foncé après révélation à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Les spectres de masse du composé **14** obtenus par ESI-MS en modes négatif (Figure III.14.1) et positif (Figure III.14.2), révèlent des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 575,3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ et $599,3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, correspondant à la formule brute en $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$ et une masse moléculaire $M = 576$ uma.

Figure III.14.1: Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé **14**Figure III.14.2: Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé **14**

Les spectres RMN ^1H (Figure III.14.3) des composés **13** et **14** présentent une grande similitude structurale. La différence réside dans la partie déblindée du spectre qui montre plusieurs signaux entre 3 et 4,5 ppm correspondant à une unité osidique en tenant compte des valeurs de leurs intégrations. Il s'agit donc d'un phytostérol glucosylé (β -sitostérol glucosylé).

Figure III.14.3: Spectre RMN ^1H du composé **14**

A partir du proton anomérique H-1' observé à δ_H 4,35 (d, $J = 7,8$ Hz), l'analyse du spectre COSY (Figures III.14.4 et III.14.5) permet de repérer les couplages entre les protons H-2' (3,19 ppm, d, $J = 7,8$ Hz)/H-3' (3,38 ppm, t, $J = 7,8$ Hz)/H-4' (3,35 ppm, t, $J = 7,8$ Hz)/H-5' (3,23 ppm, m) et H₂-6' (3,81 ppm, dd, $J = 11,9, 2,9$ Hz, H-6'a et 3,70 ppm, dd, $J = 11,9, 4,9$ Hz, H-6'b). Les grandes valeurs des constantes de couplage ($J_{H-1'-H-2'} = 7,8$ Hz, $J_{H-2'-H-3'} = 7,8$ Hz, $J_{H-3'-H-4'} = 7,8$ Hz) indiquent que tous les protons sont axiaux. Il s'agit donc d'un glucose de configuration β .

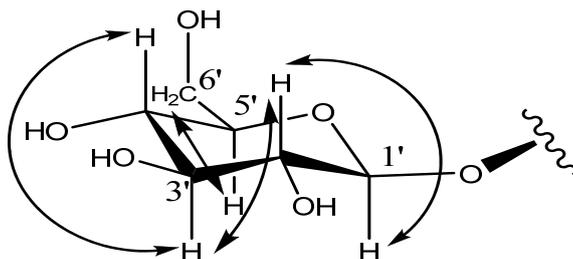


Figure III.14.4: Corrélations COSY de la partie osidique

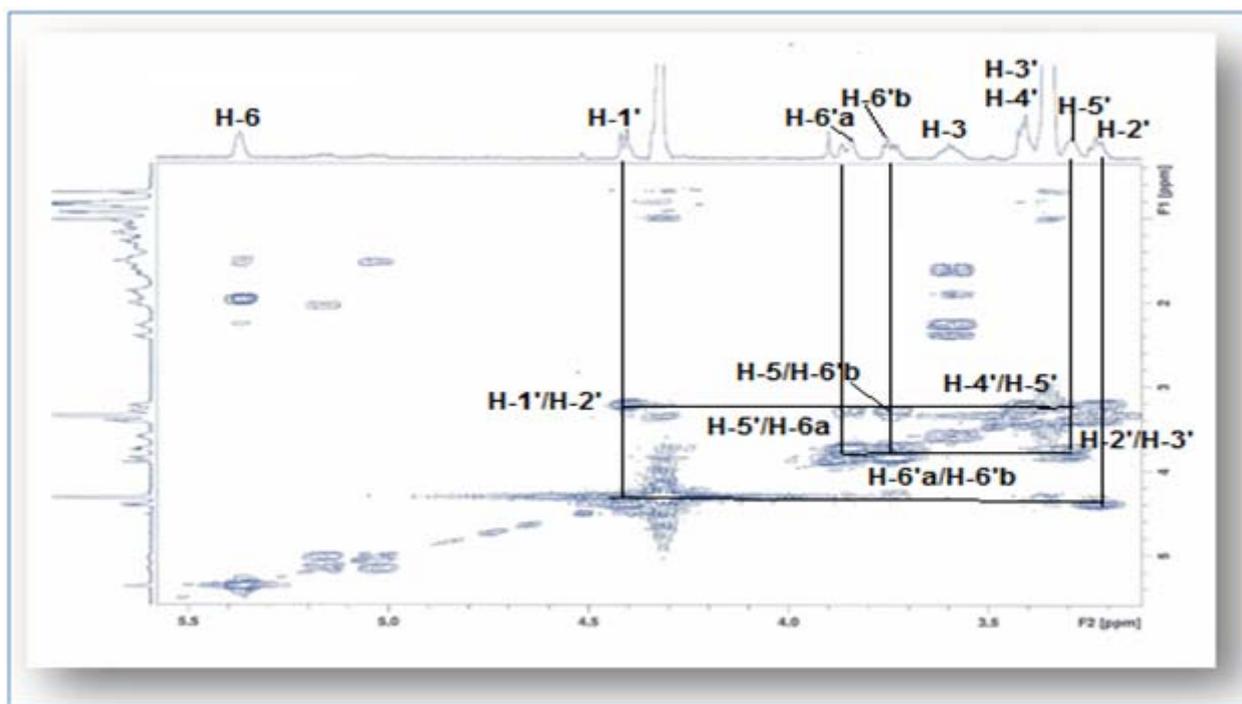


Figure III.14.5: Spectre COSY (partie glucose)

L'analyse du spectre HSQC J -modulé permet d'attribuer les déplacements chimiques des carbones du glucose à δ_C 101,3 (C-1'), 73,8 (C-2'), 76,7 (C-3'), 70,5 (C-4'), 76,1 (C-5') et 62,0 (C-6').

L'analyse HMBC (Figures III.14.6 et III.14.7) conduit à lier le glucose au carbone C-3 de la génine stéroïdique à travers la tache de corrélation H-1'/C-3.

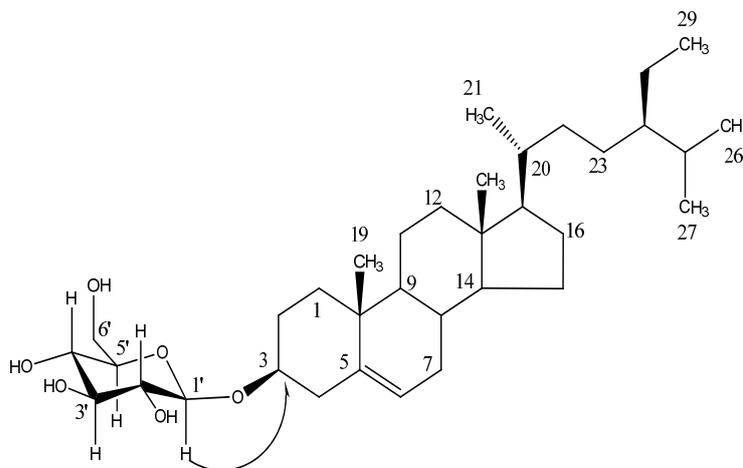


Figure III.14.6: Corrélation HMBC du composé **14** indiquant l'attachement du glucose à la génine.

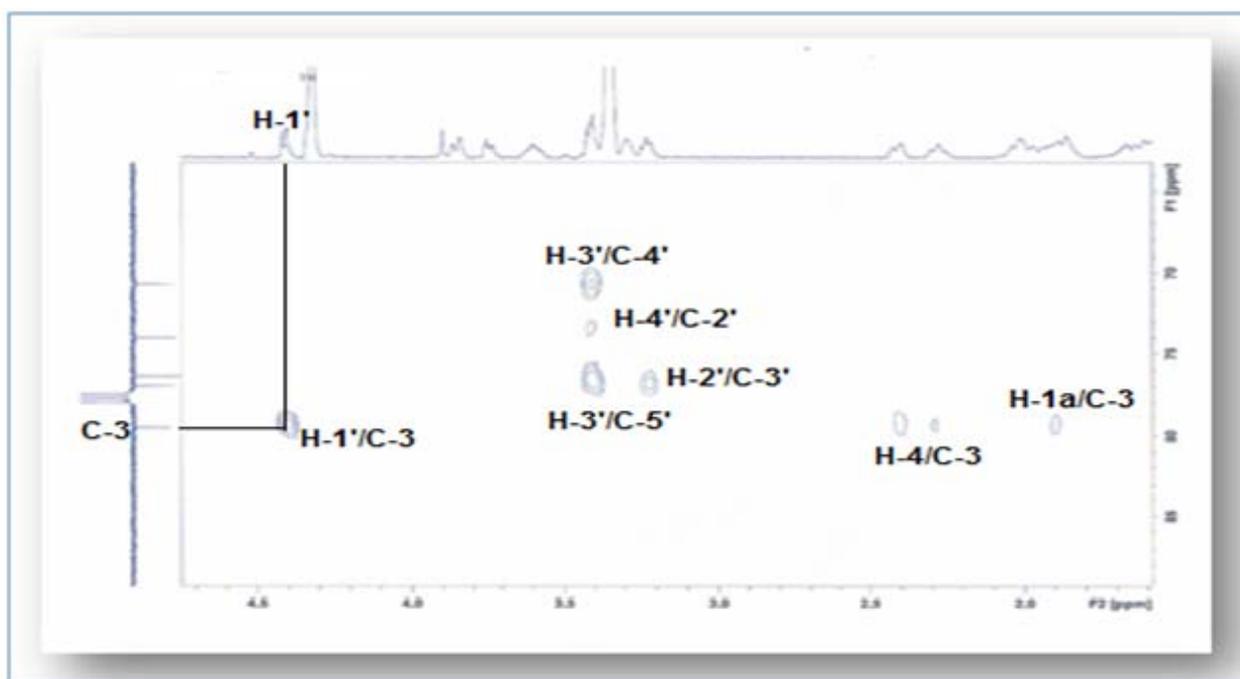


Figure III.14.7: Spectre HMBC du composé **14**

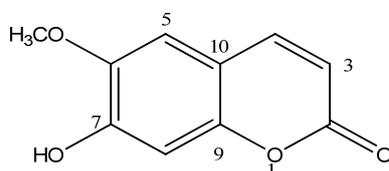
La comparaison des données spectrales du composé **14** (Tableau III.14) avec celles trouvées dans la littérature [122] et la mesure de son pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = -41,5^\circ$ (c 0,4 g/100 ml, MeOH) permettent d'identifier sans équivoque le composé **14** au 3 β -D-glucopyranosyl β -sitostérol. Ce composé a été déjà isolé des espèces *Euphorbia retusa* [8], *Euphorbia guyoniana* [9], *Euphorbia altotibetic* [46], *Euphorbia sessiliflora* [116], *Euphorbia boetica* [124] et *Euphorbia tirucalli* [125].

Tableau III.14: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **14** dans CD₃OD.

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1	1,86-1,09 m	37,5
2	1,91-1,36 m	29,8
3	3,53 m H-3 α	79,3
4	2,37 dd 15,0, 5,0 H-4 α 2,29 t 10,0 H-4 β	38,3
5	-	140,8
6	5,30 dl 5,0	122,3
7	1,96 m H-7 α 1,56 m H-7 β	32,1
8	1,45 m H-8 β	32,1
9	0,95 m H-9 α	50,4
10	-	36,9
11	1,48-1,53 m	21,2
12	1,17-2,10 m	40,0
13	-	42,5
14	1,01 m H-14 α	57,0
15	1,10-1,59 m	24,5
16	1,85 m	28,5
17	1,15 m H-17 α	56,3
18	1,61 s	12,0
19	0,95 s	19,4
20	1,36 m	36,3
21	0,85 d 6,0	18,9
22	1,04-1,35 m	34,1
23	1,12 m	26,3
24	0,98 m	46,1
25	1,67 m	29,3
26	0,75 d 6,8	19,1
27	0,76 d 6,8	19,9

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
28	1,28 m H-28a 1,23 m H-28b	23,2
29	0,80 t 7,5	12,1
Glucose		
1'	4,35 d 7,8	101,3
2'	3,19 t 7,8	73,8
3'	3,38 t 7,8	76,7
4'	3,35 t 7,8	70,5
5'	3,23 m	76,1
6'	3,81 dd 11,9, 2,9 H-6'a 3,70 dd 11,9, 4,9 H-6'b	62,0

III.7.14. Détermination structurale du composé 15



Scopolétine (**15**)

Le composé **15** est le 6-méthoxy-7-hydroxycoumarine nommé scopolétine, se présentant sous forme de cristaux blancs solubles dans CHCl_3 . Il montre une tache visible sous la lumière UV, donnant une fluorescence bleue brillante aux longueurs d'onde $\lambda = 254$ et 366 nm. La CCM ne se colore pas à l'acide sulfurique et chauffage mais se révèle en jaune aux vapeurs d'iode.

Sur le spectre UV du composé **15** (Figure III.15.1) réalisé dans le MeOH, des bandes d'absorption sont observées à $\lambda = 230, 255, 295$ et 350 nm.

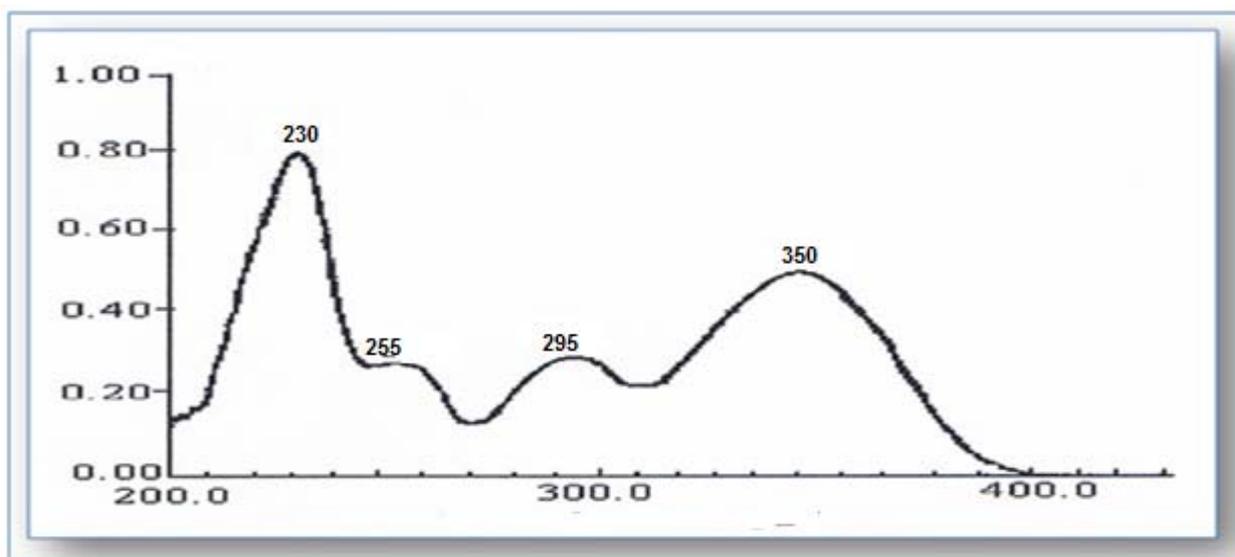


Figure III.15.1: Spectre UV du composé 15

Le spectre IR (Figure III.15.2) de ce composé montre les bandes d'absorption suivantes : 1712 (carbonyle d'une lactone), 3346 cm^{-1} (hydroxyle), 2978 et 2890 cm^{-1} (CH_3 , CH_2 , CH), 1617 cm^{-1} (double liaison), 1565 et 1514 cm^{-1} (noyau aromatique).

Toutes ces constatations nous orientent, à priori, vers une structure de type coumarinique.

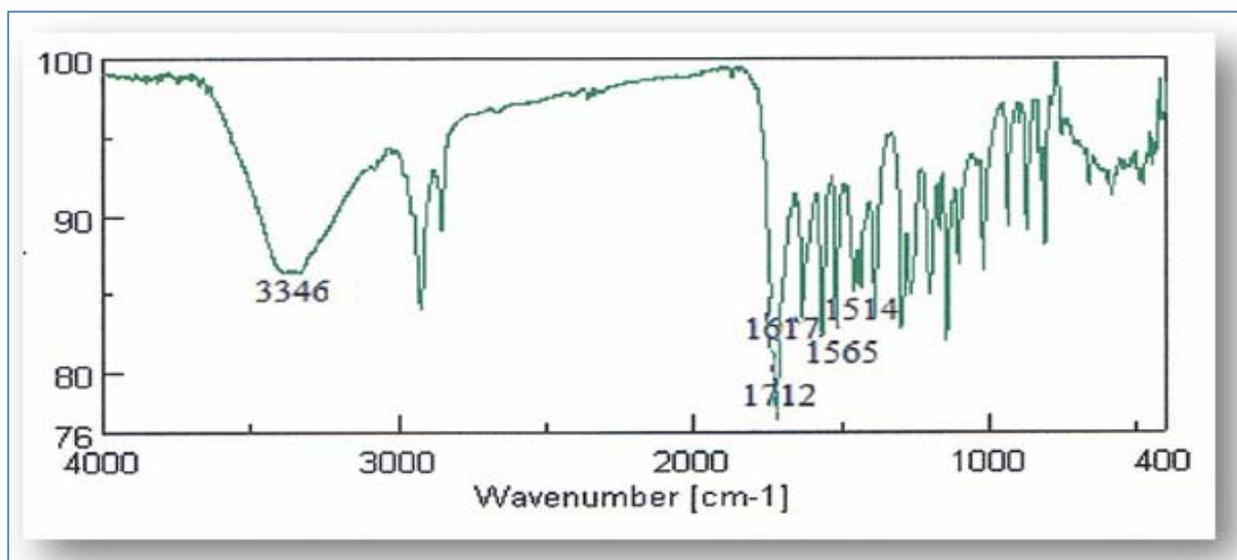


Figure III.15.2: Spectre IR du composé 15

Le spectre de masse du composé 15 obtenu par ESI-MS (Figure III.15.3) donne des pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 215$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 244 $[\text{M}+\text{K}]^+$ et 193 $[\text{M}+\text{H}]^+$, soit une masse moléculaire de 192 uma ($\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_4$) correspondant à 7 insaturations.

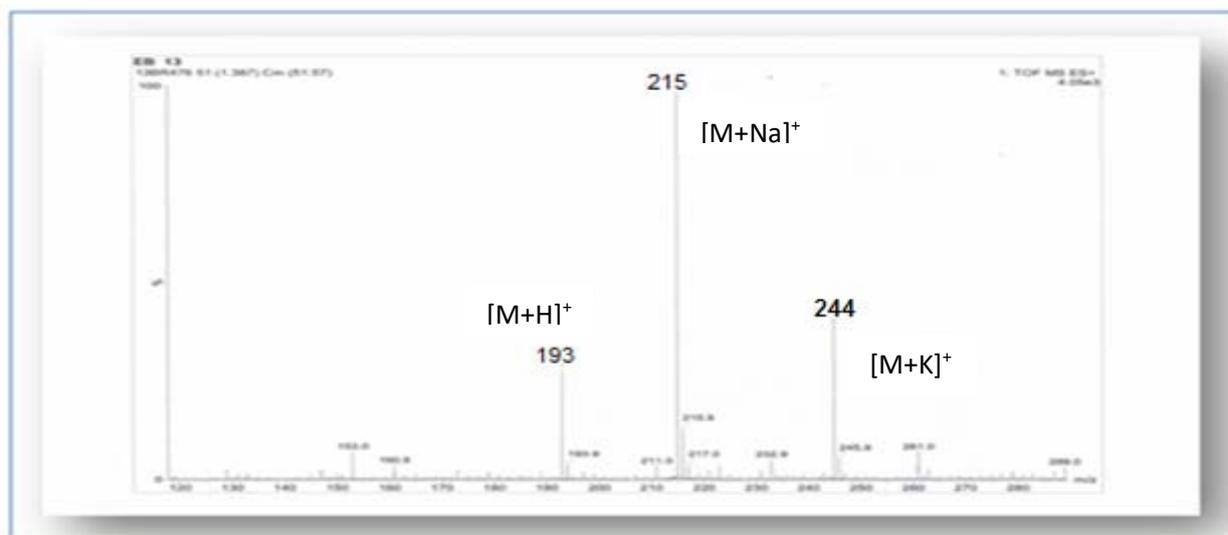


Figure III.15.3: Spectre de masse ESI-MS du composé **15** (mode positif)

Le spectre RMN ^{13}C découplé (Figure III.15.4) indique la présence de dix atomes de carbone, dont cinq carbones quaternaires incluant un carbonyle d'une lactone, quatre CH (sp^2) et un méthoxy.

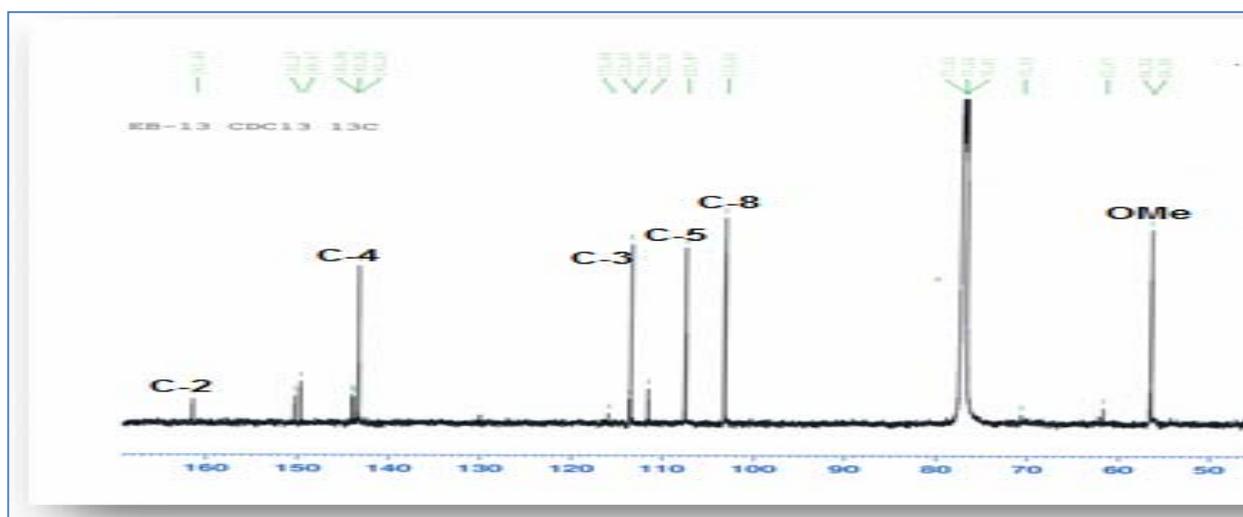


Figure III.15.4: Spectre RMN ^{13}C découplé du composé **15**

Le spectre RMN ^1H du composé **15** (Figure III.15.5) est simple par rapport aux composés déjà identifiés. Ses signaux RMN sont localisés tous dans la région des champs faibles (partie aromatique et partie aliphatique oxygéné). Il montre deux doublets à δ_{H} 6,30 et 7,62 avec une constante de couplage $J = 9,4$ Hz attribués aux protons oléfiniques H-3 et H-4 d'une double liaison de configuration *cis* et deux signaux singulets à δ_{H} 6,88 et 6,95 correspondant aux protons aromatiques H-5 et H-8 respectivement. Il en résulte que les autres positions des cycles

aromatiques sont occupées par des carbones quaternaires, avec un substituant méthoxyle résonnant à δ_H 4,0 et hydroxyle à 6,20.

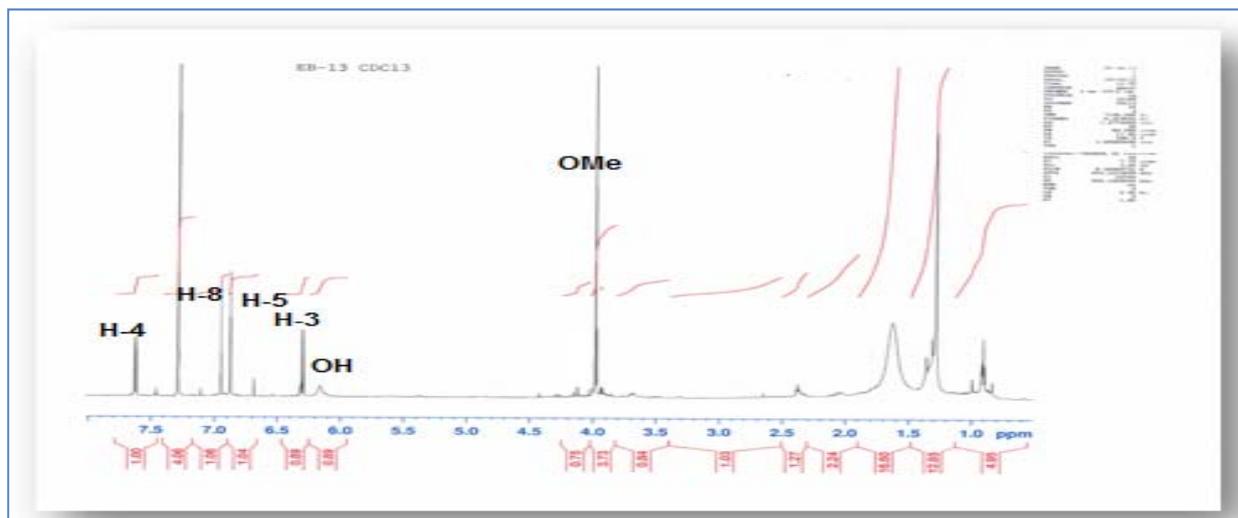


Figure III.15.5: Spectre RMN ^1H du composé **15**

Ces protons corrélient sur le spectre HSQC J -modulé (Figures III.15.6 et III.15.7) avec leurs carbones à δ_C 113,4 (C-3), 143,2 (C-4), 107,4 (C-5), 103,2 (C-8) et 56,4 (OCH₃).

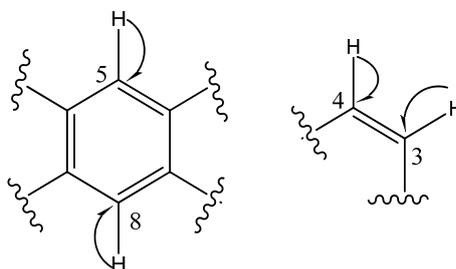


Figure III.15.6: Corrélations HSQC

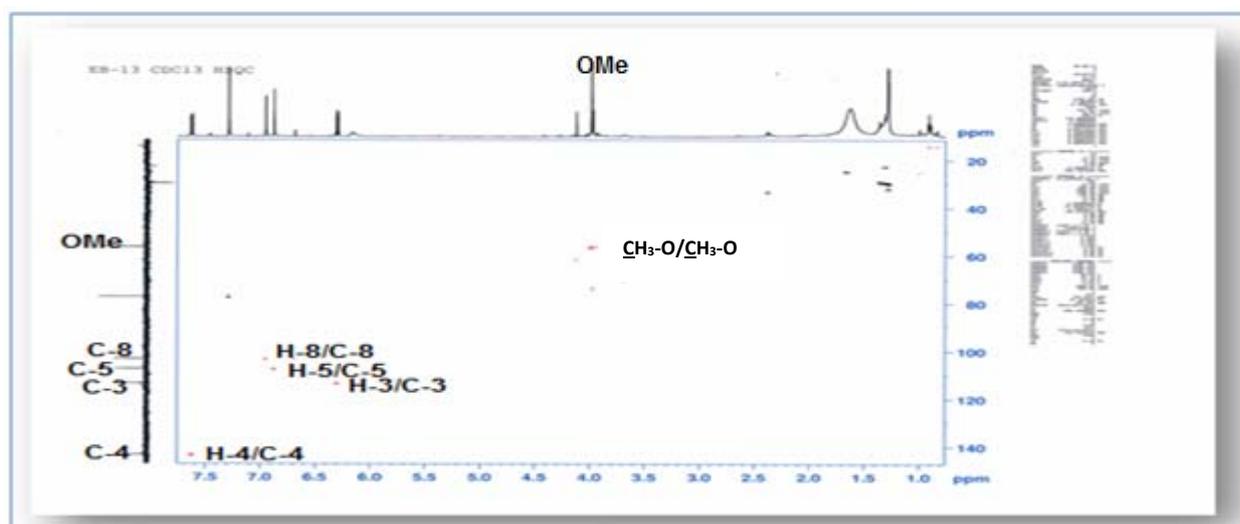


Figure III.15.7: Spectre HSQC J -modulé du composé **15**

L'expérience COSY (Figure III.15.8) révèle les couplages vicinaux entre les protons oléfiniques H-3 (6,30 ppm, d, $J = 9,4$ Hz) et H-4 (7,62 ppm, d, $J = 9,4$ Hz) et le couplage allylique entre le proton H-4 et un proton qui apparaît sous forme d'un singulet à δ_H 6,88 qui est le H-5. Le signal restant sous forme d'un autre singulet à 6,95 ppm ne présentant aucun couplage sur le spectre COSY est attribué au proton H-8.

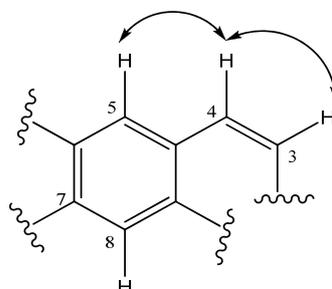


Figure III.15.8: Couplages COSY H-H

A partir des protons déjà caractérisés, on peut commencer l'élaboration structurale du composé **15** par le signal du proton oléfinique H-3 qui corrèle sur le spectre HMBC (Figures III.15.9 et III.15.10) en 2J avec un carbone résonnant à 161,4 ppm caractéristique d'un carbone du carbonyle d'une lactone (C-2) et en 3J avec un carbone quaternaire localisé à δ_C 111,5 attribuable au carbone C-10.

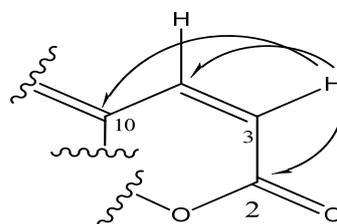
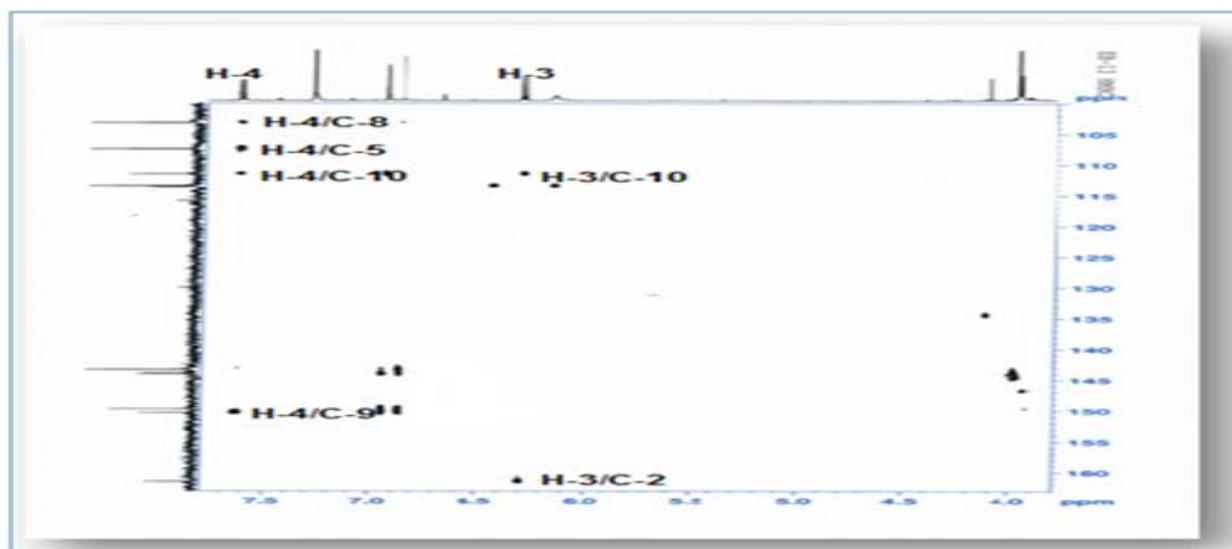


Figure III.15.9: Corrélations HMBC du proton H-3

Figure III.15.10: spectre HMBC du composé **15**

Le proton H-4 localisé à δ_H 7,62 présente en HMBC (Figures III.15.10 et III.15.11) des corrélations avec les deux carbones aromatiques à C-5 et C-8, un carbone aromatique quaternaire oxygéné à δ_C 150,2 (C-9) et les carbones C-2 et C-3 identifiés.

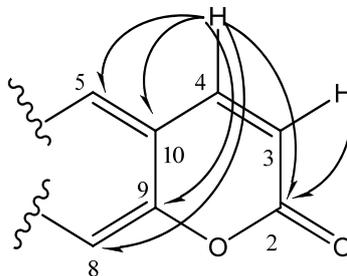


Figure III.15.11: Corrélations HMBC du proton H-4

Dans l'expérience HMBC (Figures III.15.12 et III.15.13), le proton H-5 corrèle avec les carbones C-4 et C-9 déjà assignés, et d'autres carbones résonant à 143,8 et 149,6 ppm correspondant aux carbones C-6 et C-7. Le proton H-8 montre également en HMBC (Figures III.15.12 et III.15.13) des taches de corrélation avec les carbones C-9 et C-10 déjà attribués et un carbone aromatique oxygéné résonant à 143,8 ppm correspondant au carbone C-6 ou C-7.

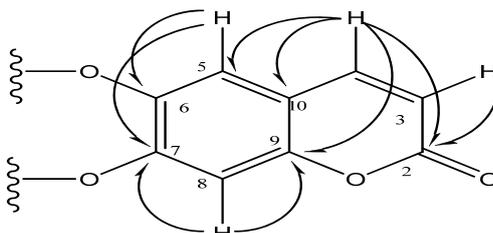


Figure III.15.12: Corrélations HMBC

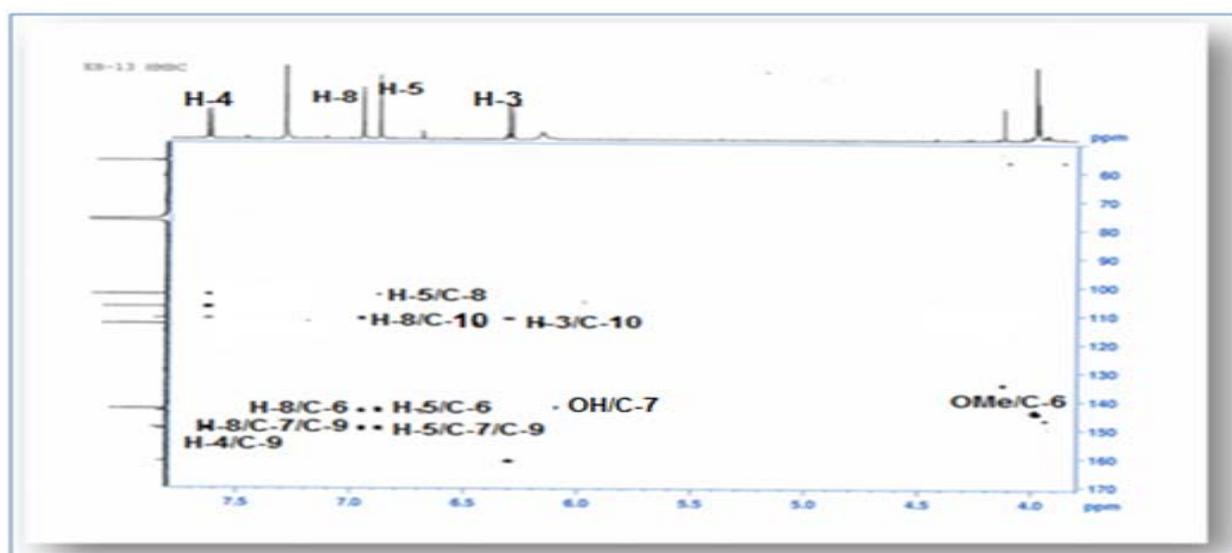
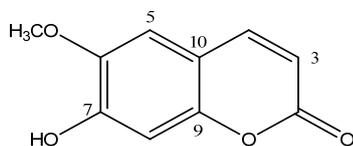
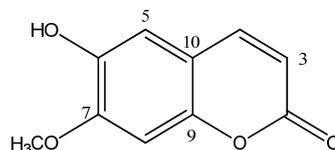


Figure III.15.13: Spectre HMBC du composé 15

Le problème qui reste à résoudre concerne le positionnement des deux substituants oxygénés (méthoxyle et hydroxyle) sur les carbones C-6 et C-7. Il faut donc choisir entre les deux structures possibles, celle de la scopolétine ou l'isoscopolétine.

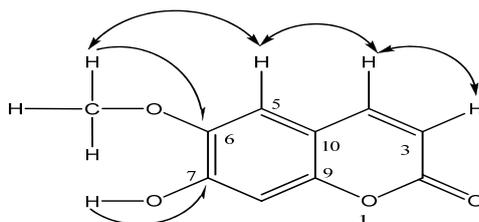
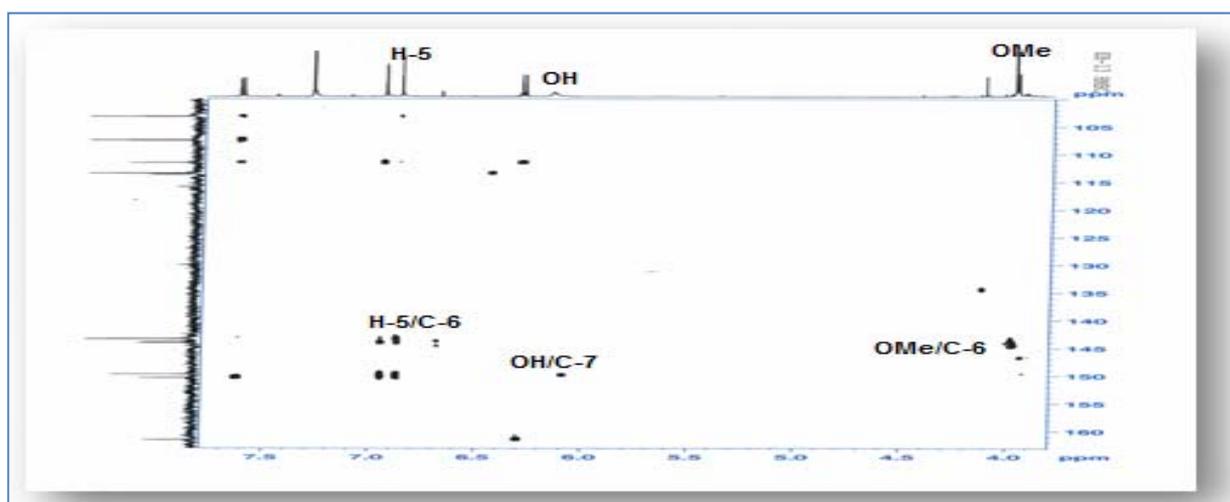


Scopolétine

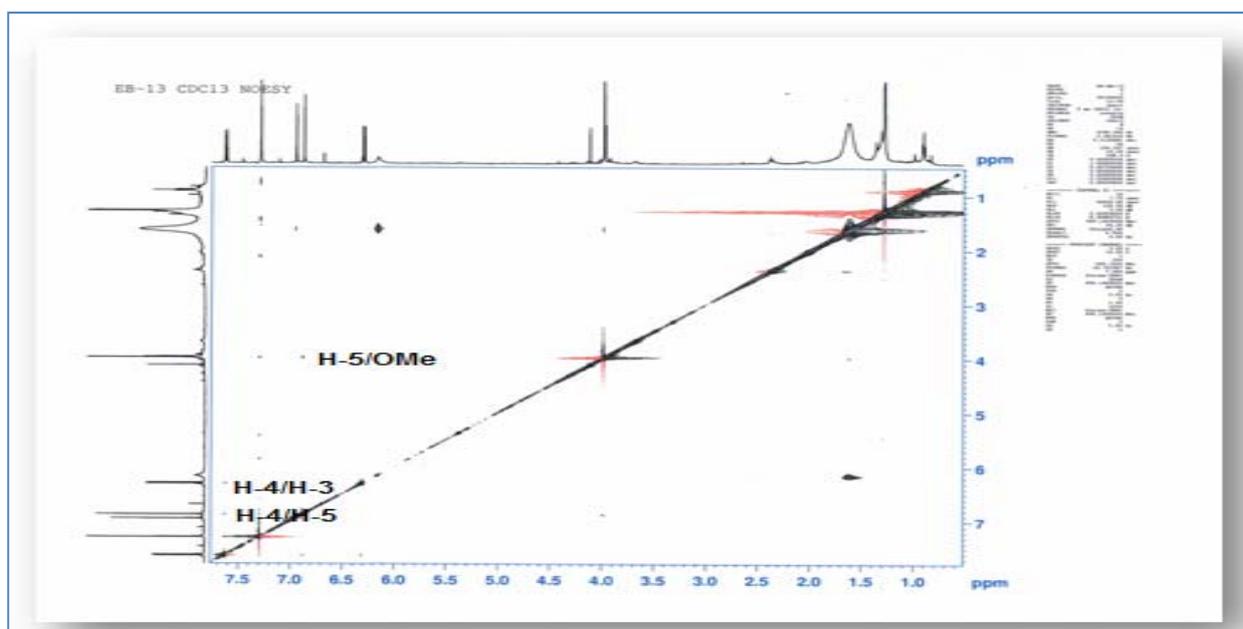


Isoscopolétine

Les protons du groupement méthoxyle couplent en HMBC (Figures III.15.14 et III.15.15) avec un carbone résonant à 143,6 ppm et corrélient sur le spectre NOESY (Figures III.15.14 et IV.15.16) avec le proton H-5. Ceci permet de localiser le groupement méthoxyle en position C-6 (143,6 ppm). Par conséquent, le carbone C-7 porteur du groupement hydroxyle est assigné à δ_c 149,6.

Figure III.15.14: Corrélations HMBC et NOESY du composé **15**Figure III.15.15: Corrélations HMBC du composé **15**

En plus des corrélations déjà mentionnées, le spectre NOESY (Figure III.15.16) montre également des effets NOE entre les protons H-3/H-4 et H-4/H-5. Il s'agit donc bien de la scopolétine.

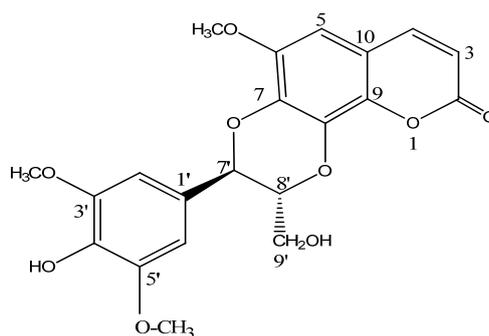
Figure III.15.16: Spectre NOESY du composé **15**

Toutes ces données spectroscopiques (Tableau III.15) comparées avec celles trouvées dans la littérature conduisent à établir la structure du composé **15** à 6-méthoxy-7-hydroxycoumarine appelé scopolétine. Il a été isolé antérieurement des espèces suivantes : *Euphorbia altotibetic* [46], *E. heteradena* [55], *E. schimperi* [115] et *Magnolia fargesii* [126].

Tableau III.15: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **15** dans CDCl₃.

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
2	-	161,4
3	6,30 d 9,4	113,4
4	7,62 d 9,4	143,2
5	6,88 s	107,4
6	-	143,8
7	-	149,6
8	6,95 s	103,2
9	-	150,2
10	-	111,5
6-OCH ₃	4,0 s	56,4
7-OH	6,20 s	-

IV.7.15. Détermination structurale du composé 16

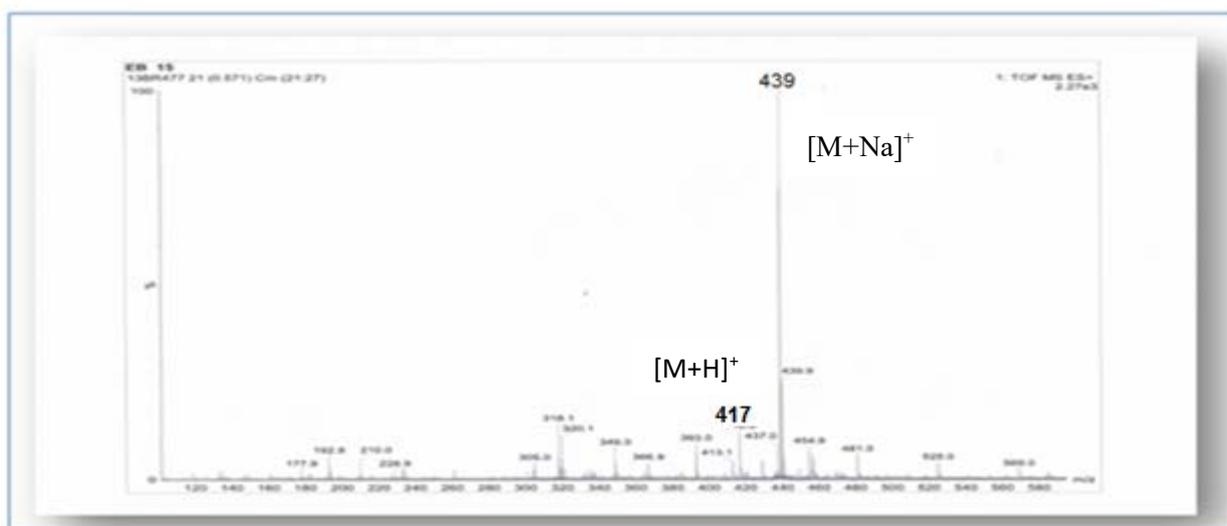
Cleomiscosine C (**16**)

Le composé **16** se présente sous forme de cristaux blancs soluble dans le chloroforme. Il montre une tache visible sous la lumière UV (254 nm) avec une coloration bleue après révélation par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre UV montre des bandes d'absorption à $\lambda = 231, 282$ et 327 nm.

Sur le spectre IR les bandes d'absorption suivantes ont été observées : 3420 (groupement hydroxyle), 1720 (carbonyle) et 1685 cm^{-1} (doubles liaisons).

Le spectre de masse du composé **16** obtenu par ESI-MS (Figure III.16.1) révèle deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 439$ $[M+Na]^+$ et 417 $[M+H]^+$, soit une masse moléculaire de 416 uma, correspondant à une formule brute en $C_{21}H_{20}O_9$ avec 12 insaturations.

Figure III.16.1: Spectre de masse ESI-MS du composé **16**

L'analyse des spectres RMN 1H (Figure III.16.2), COSY (Figure III.16.3) et HSQC J -modulé (Figure III.16.4) du composé **16** indique une similitude structurale avec le composé précédent **15**. En effet, ces spectres montrent :

- Un signal à δ_H 5,57 ne présentant aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC *J*-modulé suggérant la présence d'un groupement hydroxyle.
- Deux signaux oléfiniques résonant à 6,37 ppm (d, $J = 9,4$ Hz) et 7,66 ppm (d, $J = 9,4$ Hz) attribuables respectivement aux protons H-3 et H-4 typiques des coumarines
- Un singulet large à 6,58 ppm est attribué au proton aromatique H-5 couplant sur le spectre COSY avec le proton H-4.

Ces protons sont caractéristiques d'un squelette coumarinique.

Ces spectres exhibent également :

- Deux protons équivalents appartenant au second noyau aromatique de cette molécule résonant à 6,72 ppm sous forme de singulet.

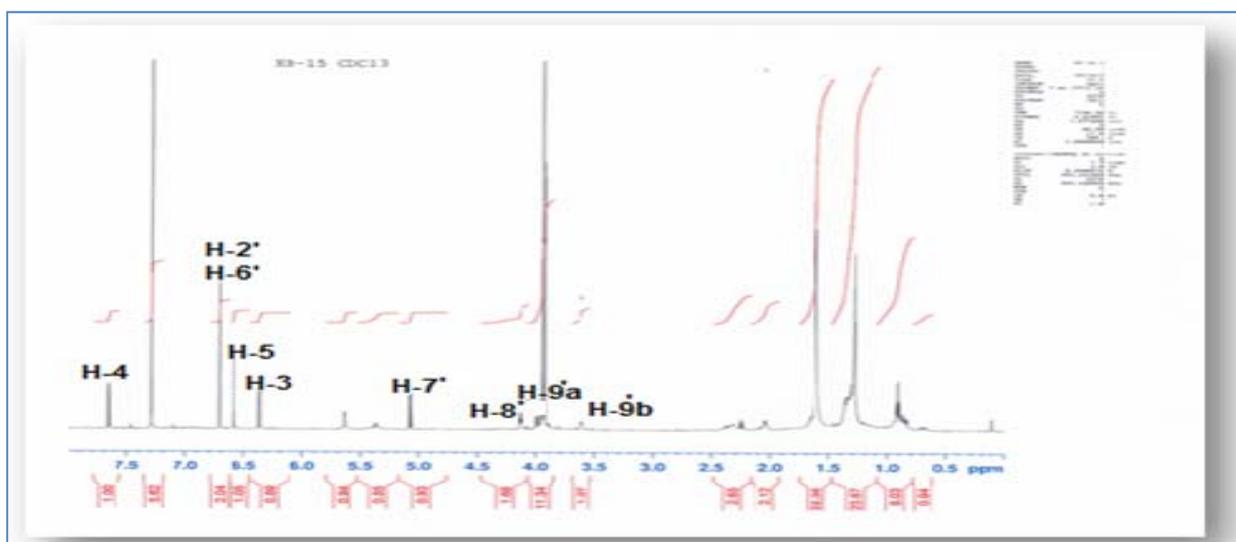


Figure III.16.2: Spectre RMN 1H du composé 16

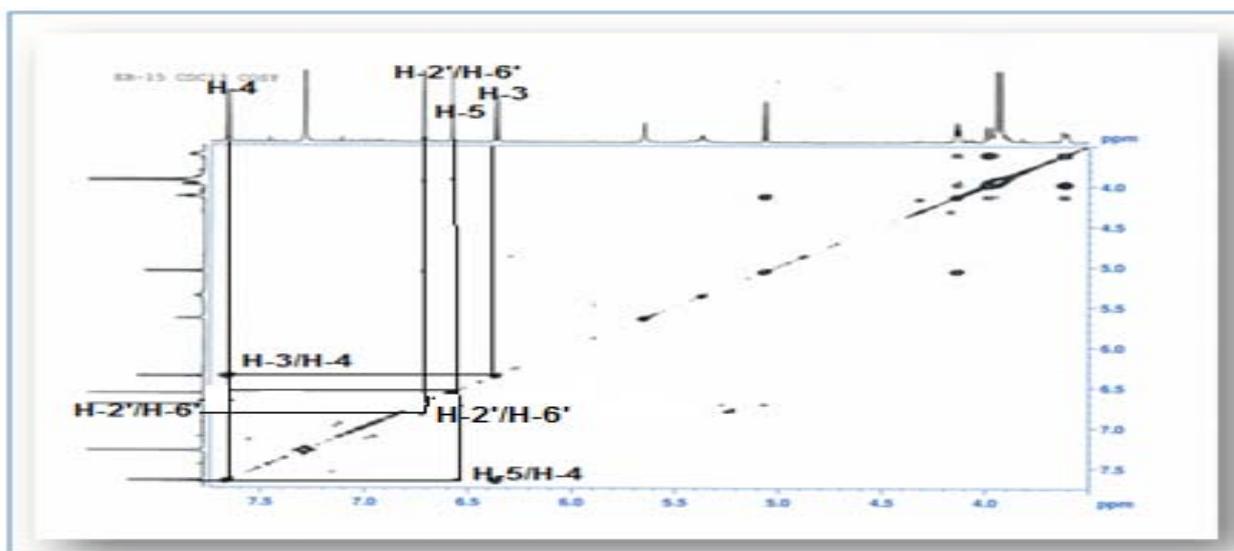


Figure III.16.3: Spectre COSY du composé 16

L'analyse des couplages hétéronucléaires $^1J_{H-C}$ visualisés sur le spectre HSQC J -modulé (Figure III.16.4) permet d'identifier les carbones C-3 (δ_c 114,2) et C-4 (δ_c 143,8), ainsi que d'autres carbones aromatiques résonant à δ_c 100,2 (C-5) et 104,4 (2 CH).

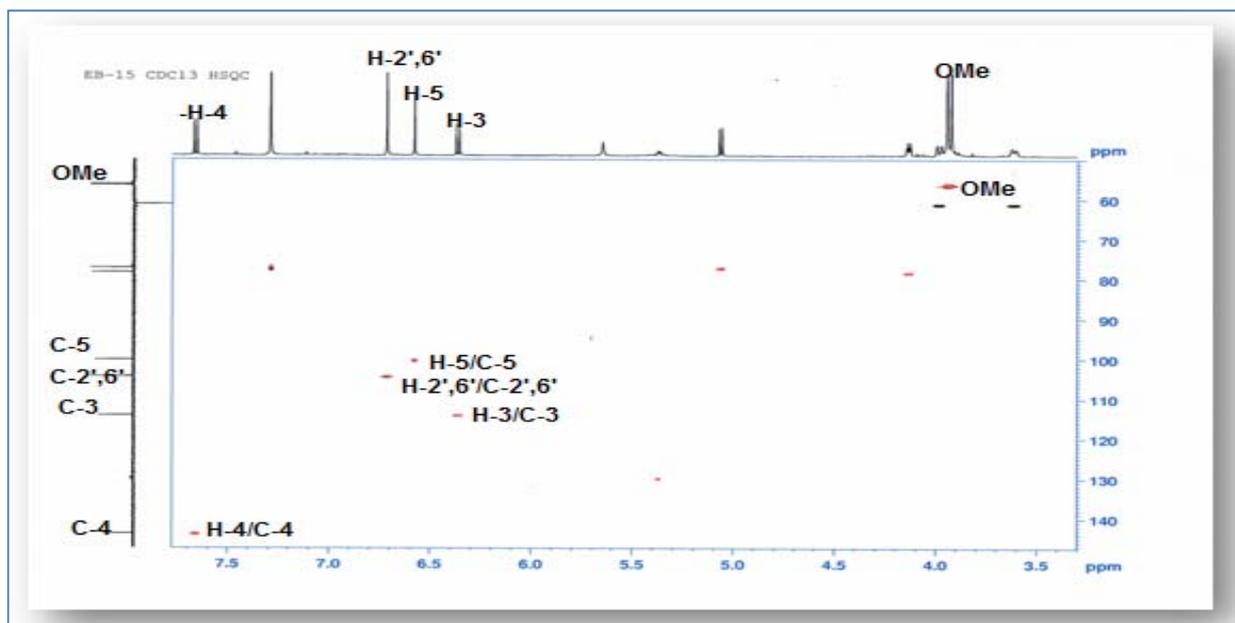


Figure III.16.4: Spectre HSQC J -modulé du composé **16**

Par ailleurs, le spectre RMN 1H montre dans la zone moyennement déblindée plusieurs signaux caractérisant la partie aliphatique oxygénée entre (3,50 et 5,10 ppm) (Figure III.16.5) de ce composé.

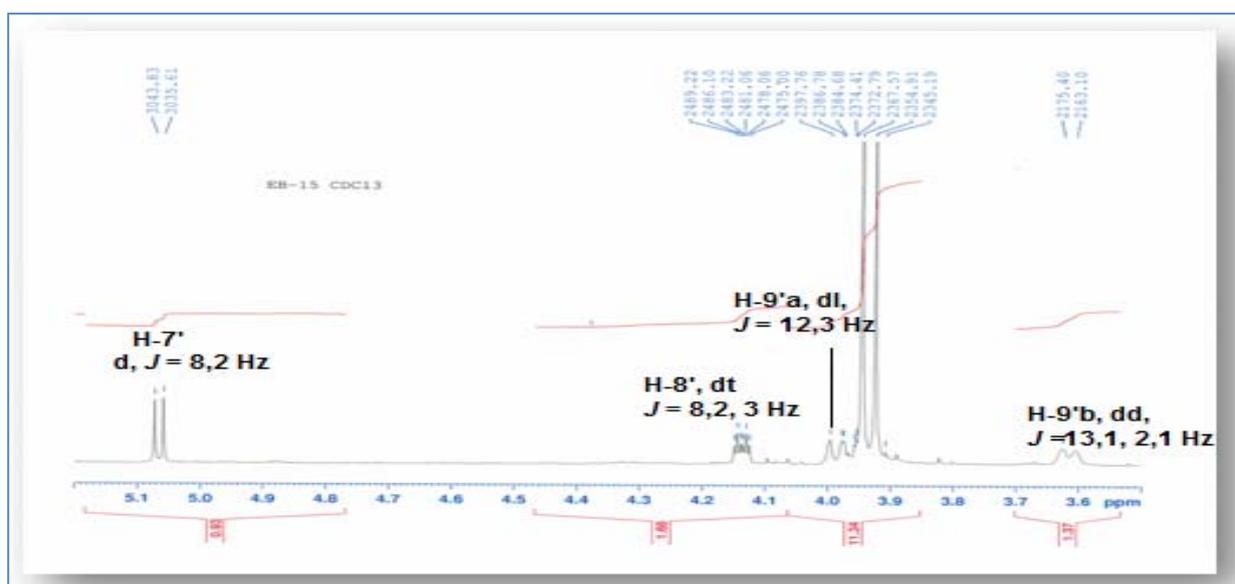


Figure III.16.5: Spectre RMN 1H de partie aliphatique oxygénée du composé **16**

En effet, le spectre COSY (Figure III.16.6) met en évidence la présence d'un système de spins à 4 protons constituant l'enchaînement carboné suivant (Figure III.16.6).

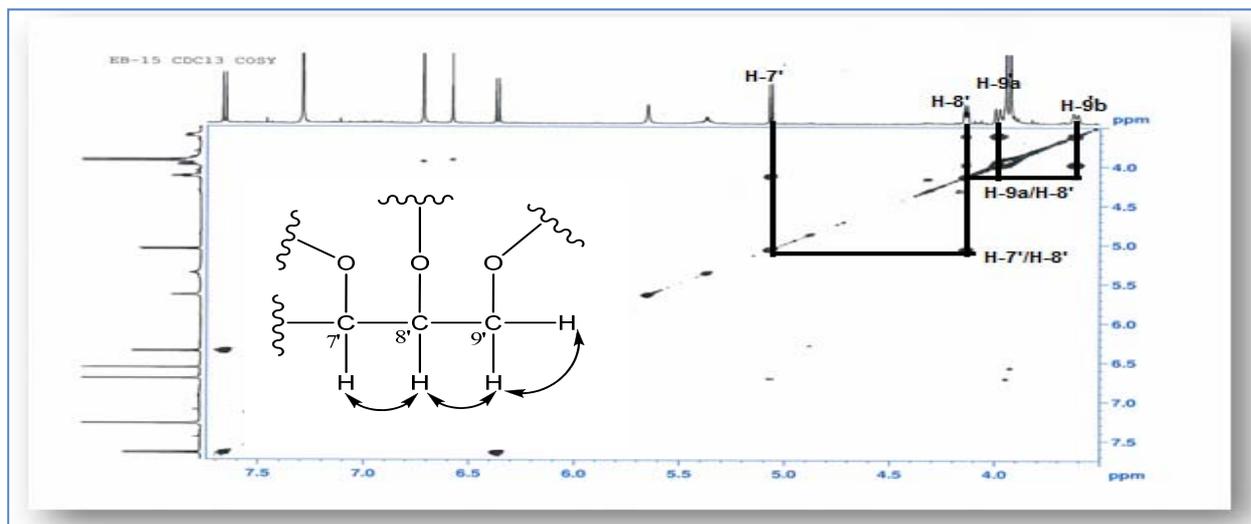


Figure III.16.6: Spectre COSY H-H

Le spectre HSQC *J*-modulé permet de détecter les carbones correspondants entre 60 et 80 ppm. Ces constatations plaident en faveur de la présence d'un dérivé du glycérol. Il en résulte que la 2^{ème} partie du composé **16** est de nature phenylpropanoïde.

Le spectre RMN ¹³C découplé (Figure III.16.7) permet de visualiser les signaux suivants :

- Un signal repéré à 160,8 ppm correspondant au carbonyle d'une lactone (C-2).
- Les carbones résonant à 114,2 et 143,8 ppm attribuables aux carbones de la double liaison oléfinique C-3 et C-4 respectivement.
- 3 CH aromatiques dont deux équivalents à 104,4 ppm et l'autre à 100,2 ppm (C-5).
- 7 carbones aromatiques oxygénés entre 132,1 et 147,4 ppm.
- 2 carbones aromatiques quaternaires non oxygénés résonant à 111,6 et 126,0 ppm.

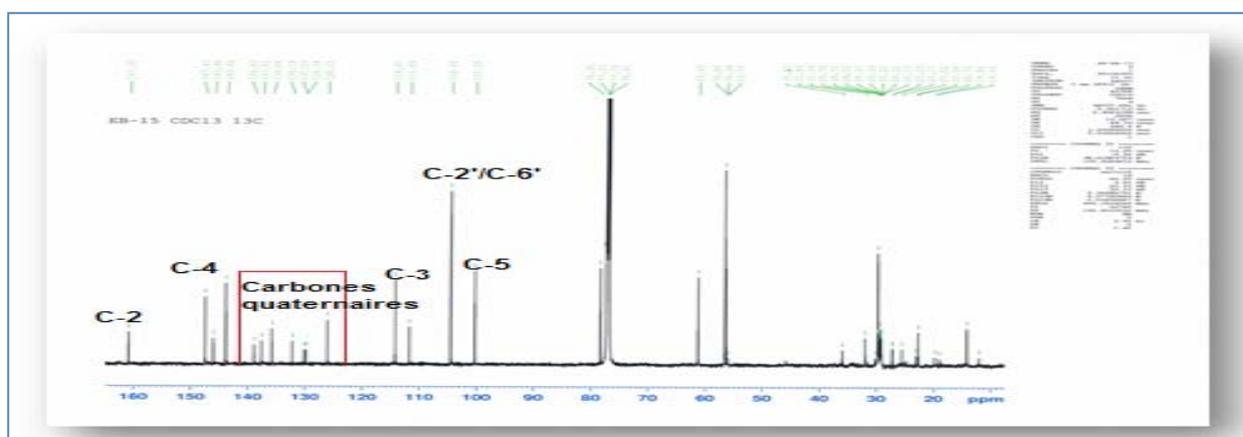


Figure III.16.7: Spectre RMN ¹³C du composé **16**

Toutes ces données spectroscopiques attestent de la présence de deux sous structures dans le composé **16**, l'une coumarine et l'autre lignane (phenylpropanoïde).

Partie coumarine

Cette hypothèse a pu être confirmée en 1^{er} lieu par l'expérience COSY H-H (Figure III.16.8) à travers les couplages entre les protons oléfiniques H-3 (δ_H 6,37, d, $J = 9,4$ Hz) et H-4 (δ_H 7,66, d, $J = 9,4$ Hz) et H-4/H-5 (δ_H 6,58, sl) de la partie coumarine.

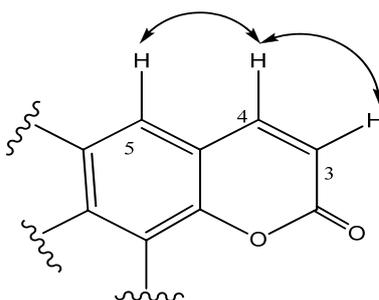


Figure III.16.8: Couplages COSY de la partie coumarine

A partir des protons déjà identifiés par RMN 1H et COSY. L'expérience HMBC (Figures III.16.9 et III.16.10) conduit à l'établissement des couplages hétéronucléaires longue distance en 2J et 3J de ce composé. En effet, le signal à δ_C 160,8 caractéristique du carbonyle d'une lactone (C-2) présente des taches de corrélation avec les deux protons H-3 et H-4. Ce dernier corrèle en HMBC (Figures III.16.9 et III.16.10) avec deux carbones quaternaires détectés à 138,8 et 111,6 ppm correspondant aux carbones C-9 et C-10, un carbone aromatique à 100,2 ppm (C-5) et un carbone quaternaire déblindé repéré à 132,1 ppm correspondant au carbone C-8 (couplage type W). Ceci indique que la position C-8 de la coumarine est substituée par un groupement attracteur en comparaison avec le composé précédent **15**.

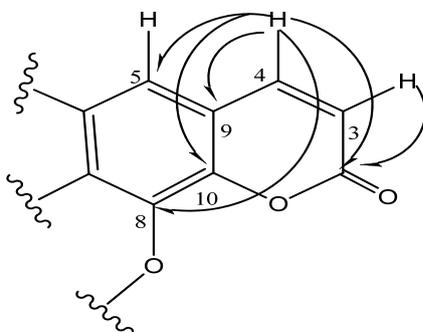


Figure III.16.9: Corrélations HMBC de la partie coumarine

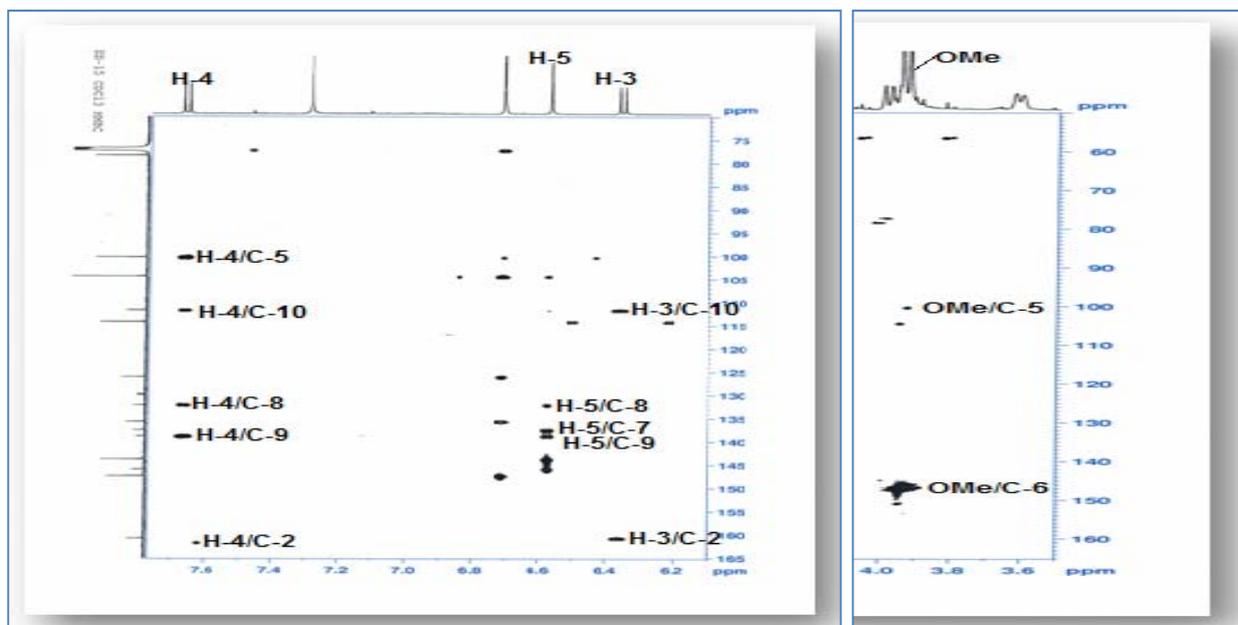


Figure III.16.10: Spectre HMBC du composé 16

De plus, le proton H-5 corrèle en HMBC (Figures III.16.10 et III.16.11) avec le carbone C-8 déjà attribué et ainsi avec deux carbones quaternaires oxygénés situés à δ_C 146,0 et 137,5 ppm correspondant aux carbones C-6 et C-7. La différenciation entre les carbones C-6 et C-7 est facile du faite des corrélations (4J) observées en HMBC entre les protons méthoxyles à δ_H 3,90 et le carbone C-5 déjà identifié, et un autre carbone situé à δ_C 146,0 attribuable au carbone C-6. Ceci permet de localiser le groupement méthoxyle en position C-6 et de déduire le déplacement chimique du carbone C-7 à δ_C 137,5. En conséquence, les déplacements chimiques des protons et carbones du noyau coumarine ont été tous déterminés.

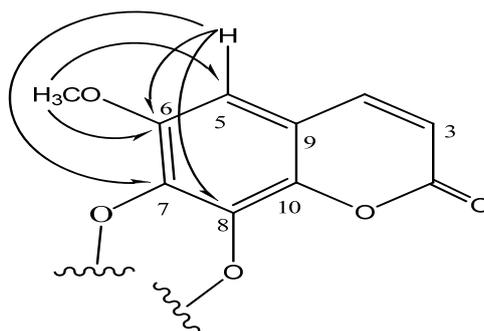


Figure IV.16.11: Corrélations HMBC de la partie coumarine

Partie lignane

Le second système aromatique est caractérisé par une symétrie des signaux de deux protons aromatiques équivalents résonant à 6,72 ppm attribuables aux protons H-2' et H-6' corrélant sur le spectre HMBC (Figure III.16.12) avec les carbones C-6' et C-2', les carbones

quaternaires oxygénés résonant à δ_C 147,4 (C-3'), 135,6 (C-4') et 147,4 (C-5'), un carbone aromatique quaternaire situé à 126,0 ppm correspondant au carbone C-1' et un carbone oxyméthine repéré à 77,2 ppm (C-7'). Le déplacement chimique de ce dernier confirme qu'il est porteur d'un oxygène.

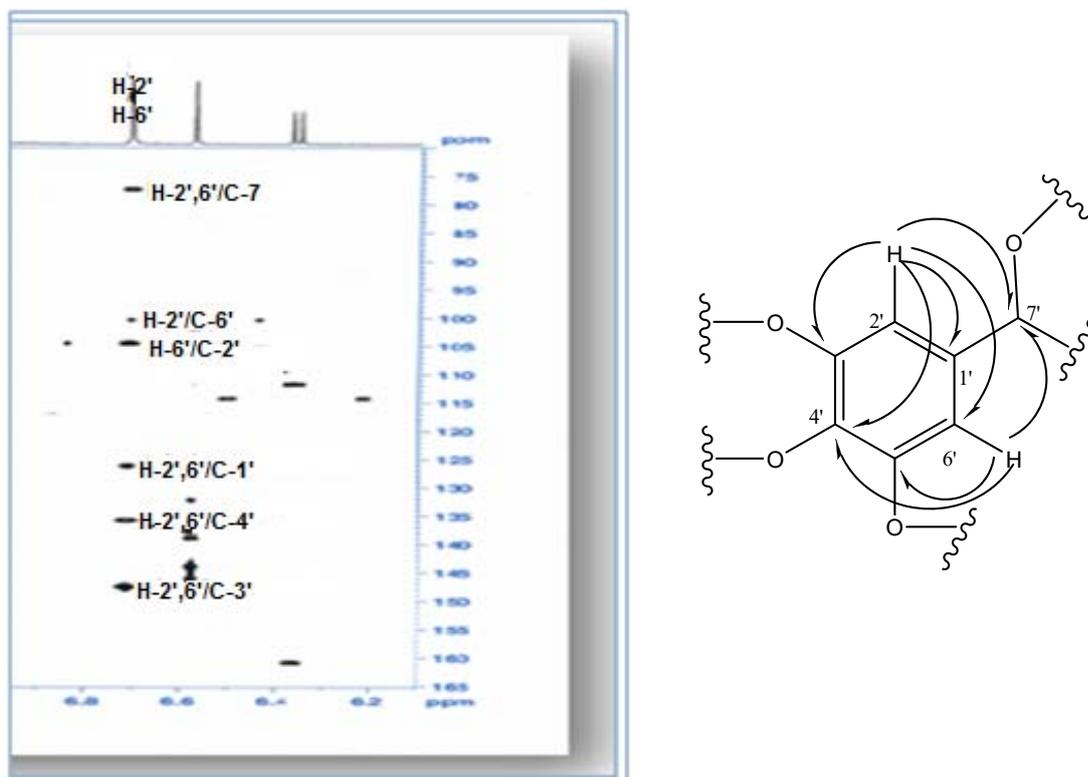


Figure III.16.12: Spectre et corrélations HMBC du composé **16**

Le spectre HMBC (Figures III.16.13 et III.16.14) permet d'observer aussi des taches de corrélation entre les protons des groupements méthoxyles résonant à δ_H 3,98 et les carbones C-3' et C-5', ce qui permet de les situer sur ces carbones (C-3' et C-5'). L'hydroxyle (δ_H 5,57) corrèle en HMBC avec les carbones C-3' et C-5' et un carbone résonant à 135,6 ppm ne pouvant être que le carbone C-4'.

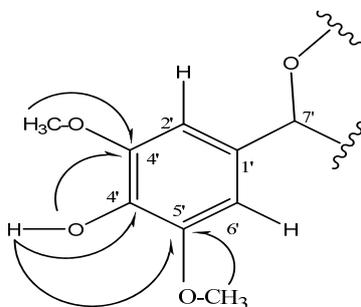


Figure III.16.13: Corrélations HMBC du composé **16**

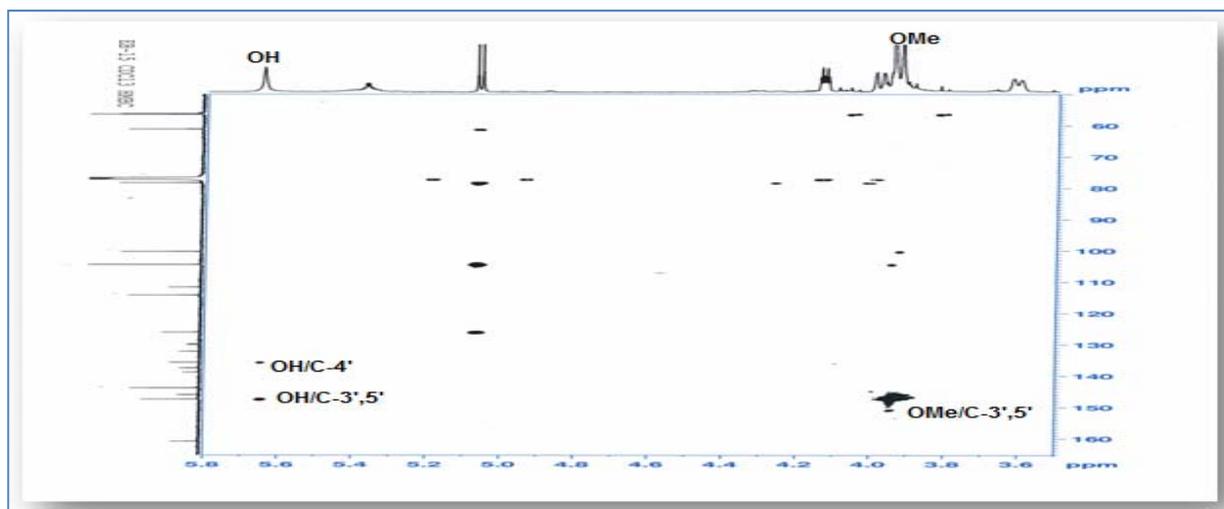


Figure III.16.14: Spectre et corrélations HMBC de la partie lignane

Le spectre COSY exhibe un couplage entre les deux protons aromatiques équivalents H-2'/H-6' et un signal à 5,07 ppm (couplage allylique) attribuable au proton H-7'. Ce dernier fait partie d'un système de spins à 4 protons selon le spectre COSY H-H (Figures III.16.15 et III.16.16) et résonant à δ_H 5,07 (d, $J = 8,2$ Hz, H-7')/4,14 (dt, $J = 8,2, 3,0$ Hz, H-8')/3,62 (dd, $J = 12,7, 2,1$ Hz, H-9'b) et 3,98 (dl, $J = 12,7$ Hz, H-9'a). Les protons H-7', H-8' et H-9' appartiennent à une chaîne propane trisubstituée en 7', 8' et 9' par des atomes d'oxygène.

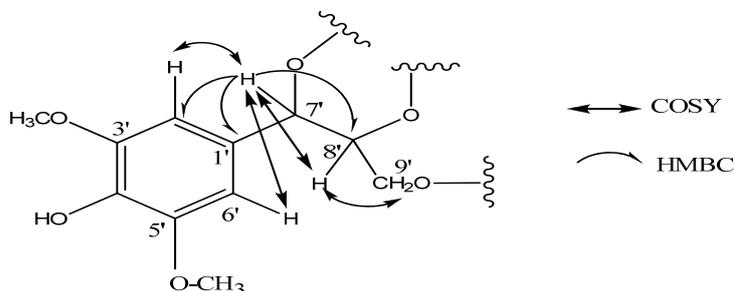


Figure III.16.15: Corrélations COSY et HMBC de la partie lignane

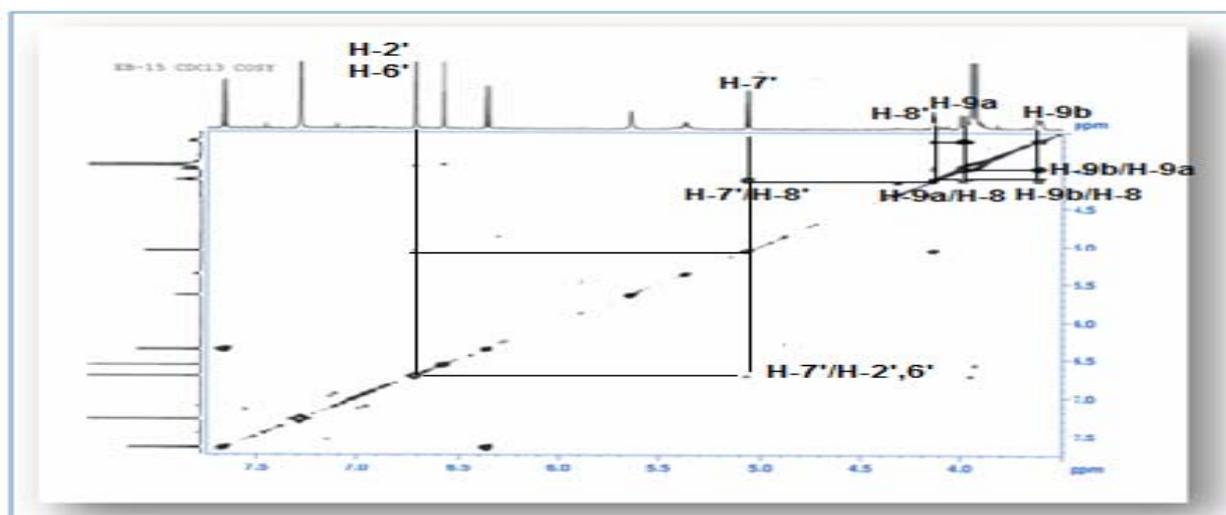


Figure III.16.16: Spectre COSY du composé 16

Ces protons corrént sur le spectre HSQC *J*-modulé (Figure III.16.17) avec les carbones à δ_c 77,2 (C-7'), 78,3 (C-8') et 61,2 (C-9'). Les déplacements chimiques de ces derniers confirment bien que les carbones de cette chaîne sont oxydés.

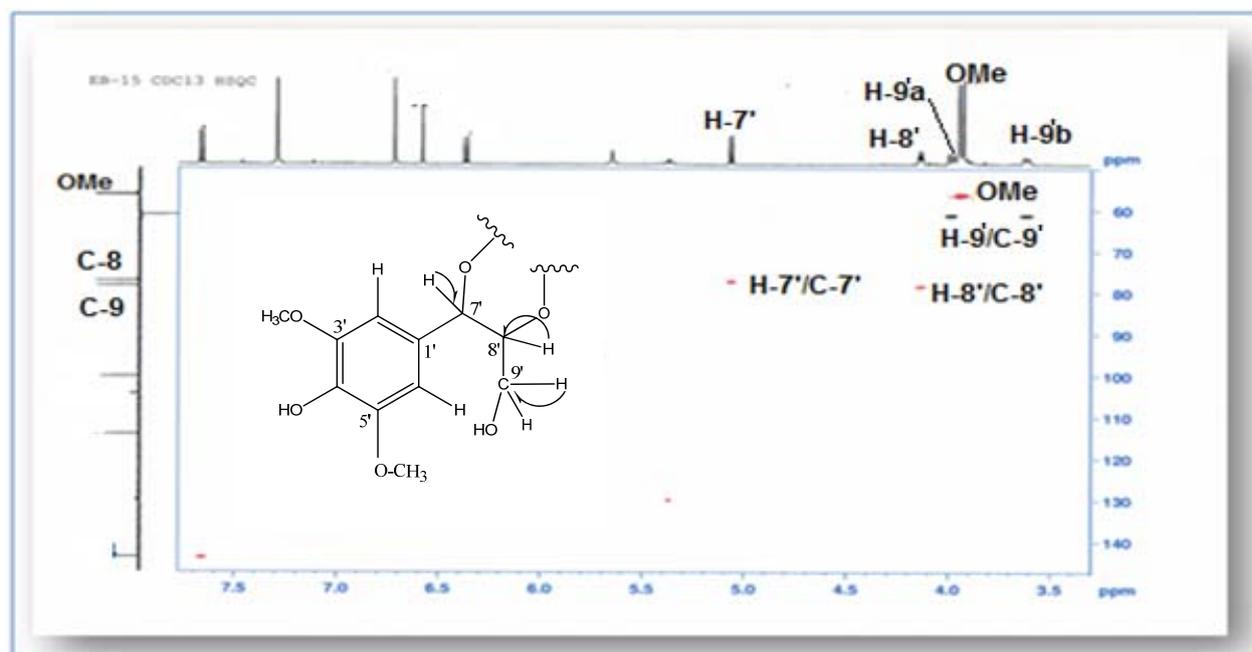


Figure III.16.17: Spectre HSQC *J*-modulé du composé **16**

En plus le proton H-7' corréle sur le spectre HMBC (Figure III.16.18) avec les carbones C-1', C-2', C-6', C-8' et C-9'. A l'issue de cette analyse, tous les protons et carbones de la partie lignane sont attribués.

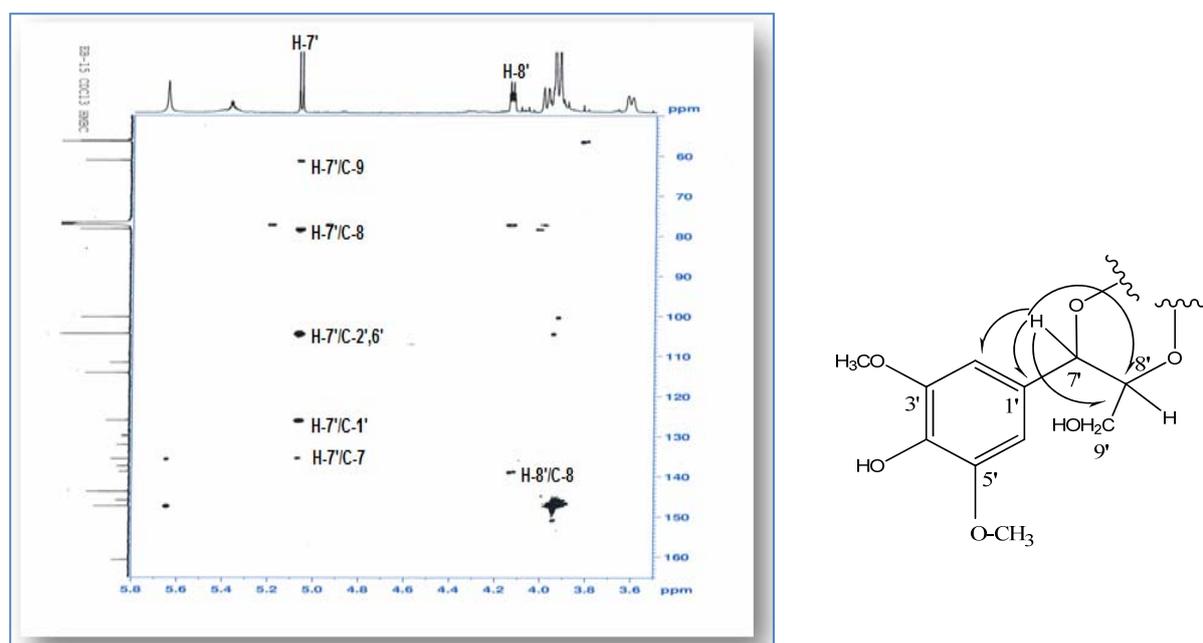


Figure III.16.18: Spectre et corrélations HMBC de la partie lignane

La connexion entre les deux sous unités structurales (coumarine et lignane) s'effectue par analyse du spectre HMBC (Figure III.16.18). En effet, le proton H-7' présente une tache de corrélation avec le carbone quaternaire oxygéné résonant à 137,5 ppm (C-7) tandis que le proton H-8' corrèle avec le carbone oxygéné repéré à 132,1 ppm (C-8) de la partie coumarine. Ce qui conduit à l'élaboration des jonctions entre les deux parties et la fermeture du cycle à 6 chaînons (Figure III.16.19).

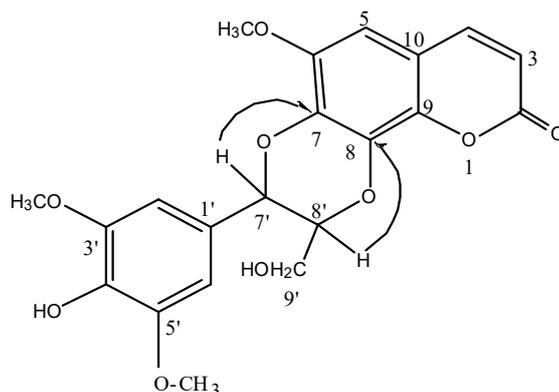


Figure III.16.19: Corrélations HMBC reliant les deux unités coumarine et lignane

La stéréochimie de ce composé a été établie par l'analyse des valeurs des constantes de couplage et du spectre NOESY (Figures III.16.20 et III.16.21). La grande constante de couplage entre les protons H-7'/H-8' $J = 8,2$ Hz suggère une configuration *thréo* [127-129]. Le spectre NOESY présente les corrélations entre : H-3/H-4, H-4/H-5, H-5/O-CH₃, H-2',6'/H-7', H-2',6'/H-8', H-8'/H-9'b, H-9'a/H-9'b et H-2',H-6'/3',5'-OCH₃ confirmant ainsi le positionnement des groupements méthoxyles. Ces données spectrales (Tableau III.16) permettent d'attribuer pour le composé **16** la structure coumarinolignane appelée cleomiscosine C. Ce composé a été isolé précédemment de l'espèce *Annona squamosa* Linn. [130], mais il a été identifié pour la première fois dans le genre *Euphorbia*.

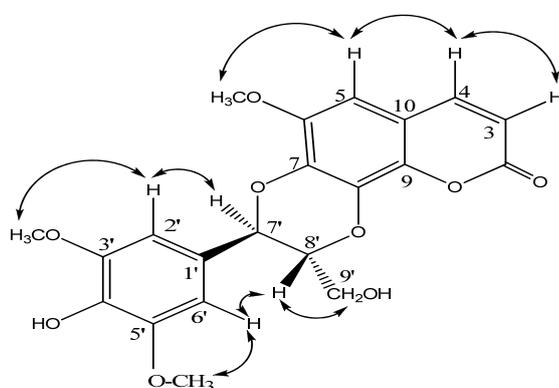


Figure III.16.20: Corrélations NOESY du composé **16**

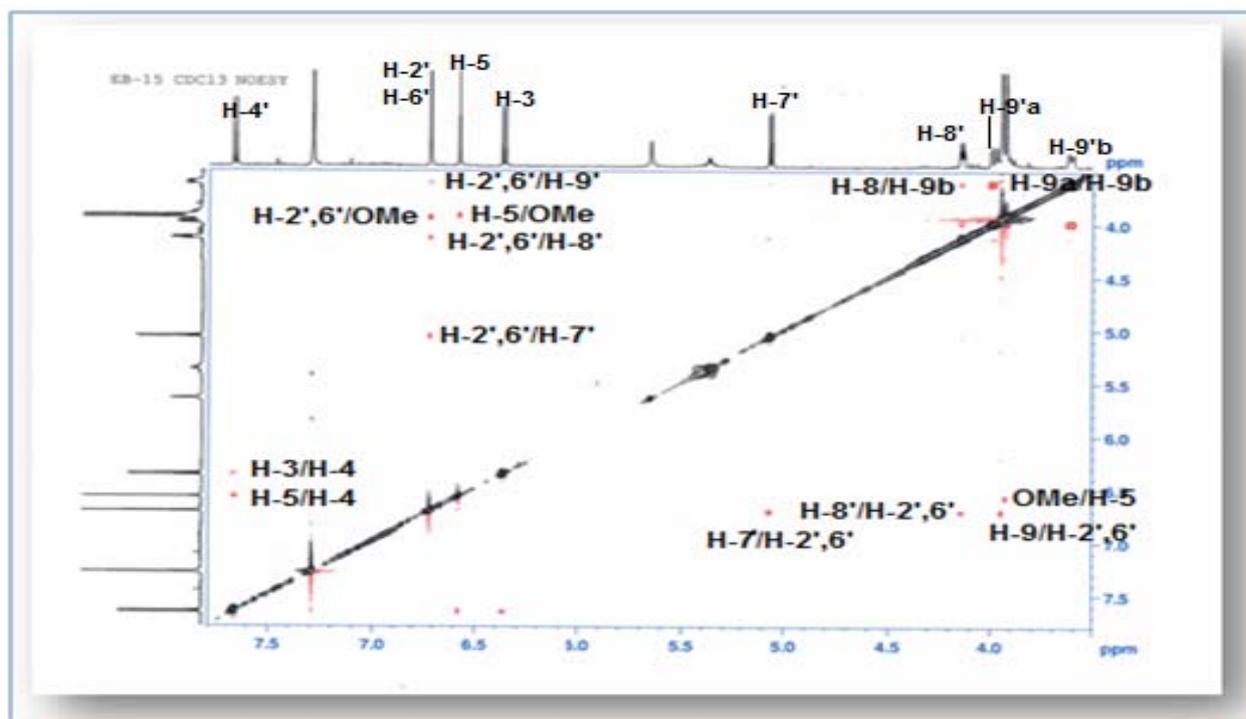


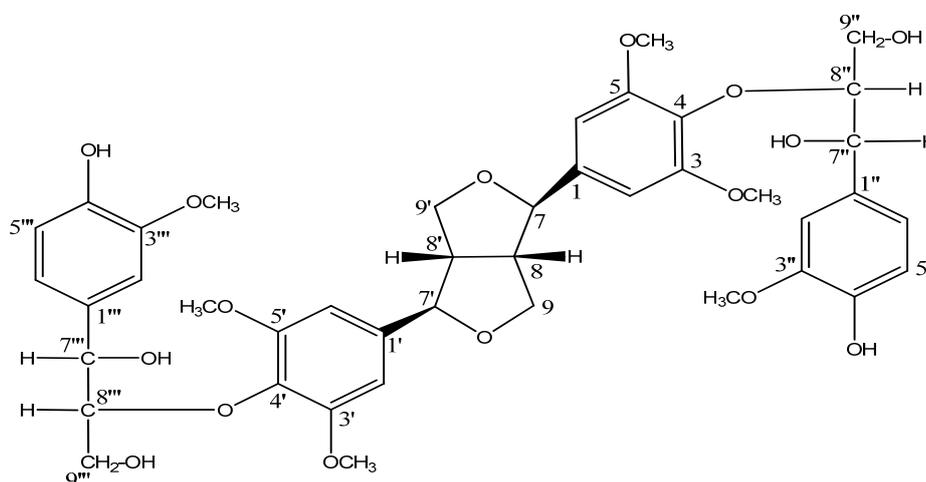
Figure III.16.21: Spectre NOESY du composé 16

Tableau III.16: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé 16 dans CDCl₃.

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
2	-	160,8
3	6,37 d 9,4	114,2
4	7,66 d 9,4	143,8
5	6,58 sl	100,2
6	-	146,0
7	-	137,5
8	-	132,1
9	-	138,8
10	-	111,6
1'	-	126,0
2'	6,72 sl	104,4
3'	-	147,4
4'-OH	5,57 s	135,6
5'	-	147,4

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
6'	6,72 sl	104,4
7'	5,07 d 8,2	77,2
8'	4,14 dt 8,2, 3,0	78,3
9'	3,62 dd 12,7, 2,1 H-9b 3,98 dl 12,7 H-9a	61,2
6-OCH ₃	3,96 s	56,3
3',5'-OCH ₃	3,98 s	56,4

III.7.16. Détermination structurale du composé 17



Hedyotisol A (17)

Le composé Hedyotisol A se présente sous forme d'une huile soluble dans le chloroforme. Il est visible à la lumière UV à 254 nm. Sa CCM se révèle en bleu par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Sur le spectre UV (MeOH) des maxima d'absorption ont été repérés aux longueurs d'ondes λ_{\max} 220, 255, 310 et 350 nm.

Le spectre IR (KBr) indique la présence d'une fonction hydroxyle à 3407 cm^{-1} et un système aromatique à 1620 et 1519 cm^{-1} .

L'analyse en spectrométrie de masse ESI-MS (Figure III.17.1) permet de détecter un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 833$ $[M+Na]^+$ correspondant à un poids moléculaire de 810 uma et une formule brute $C_{42}H_{50}O_{16}$. Cette dernière donne 18 insaturations.

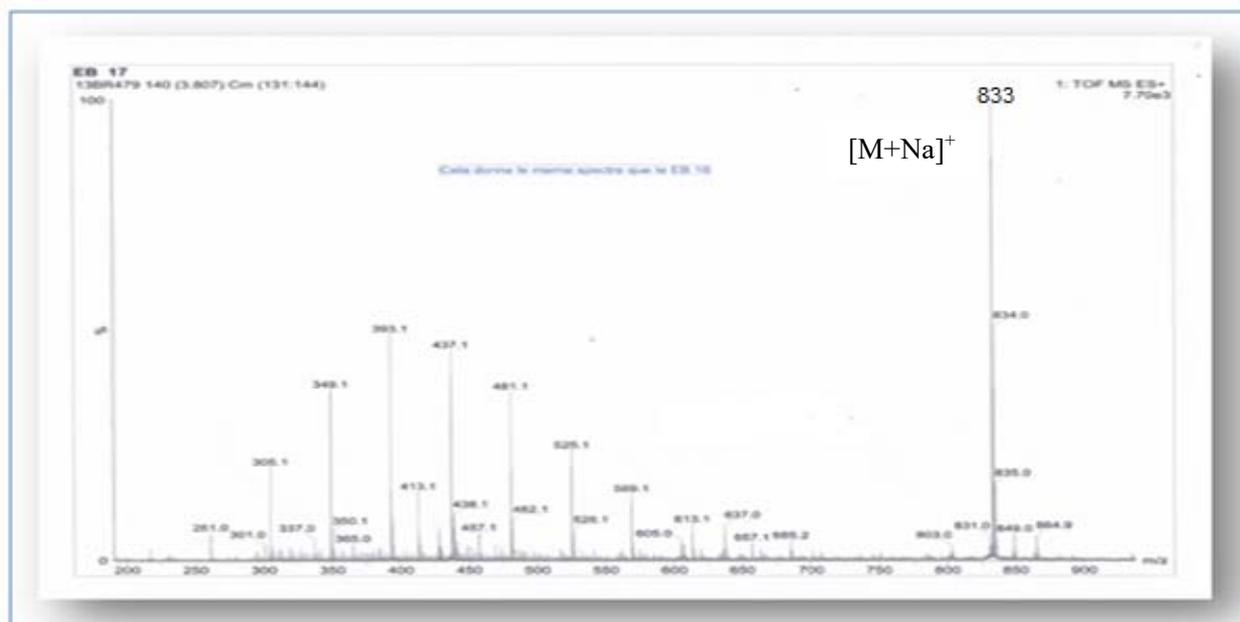


Figure III.17.1: Spectre de masse ESI-MS du composé 17

Les spectres RMN ^{13}C découplé (Figure III.17.2) et DEPT (Figure III.17.3) permettent de compter au moins 18 signaux d'atomes de carbone incluant des carbones aromatiques quaternaires (130-155 ppm), CH aromatiques (100-120 ppm), oxyméthines OCH (77,5-90 ppm), oxyméthylènes OCH_2 (60-72,1 ppm), méthines CH à 54,4 ppm et méthoxyles OCH_3 à 56 et 56,3 ppm indiquant une superposition de certains carbones et une symétrie au niveau de la molécule.

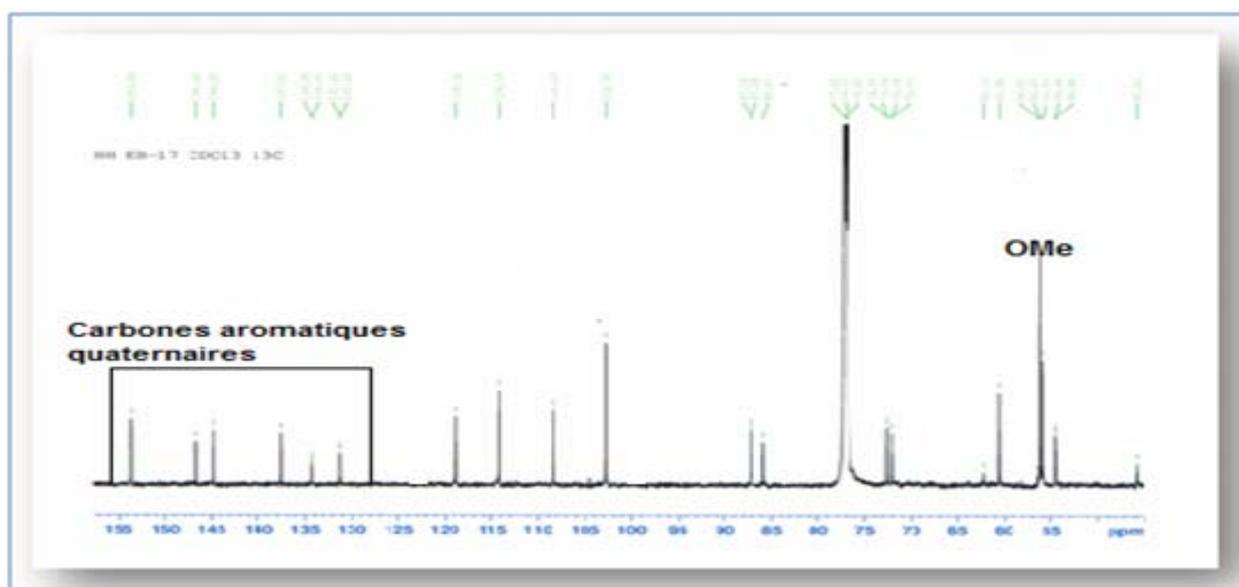


Figure III.17.2: Spectre RMN ^{13}C découplé du composé 17

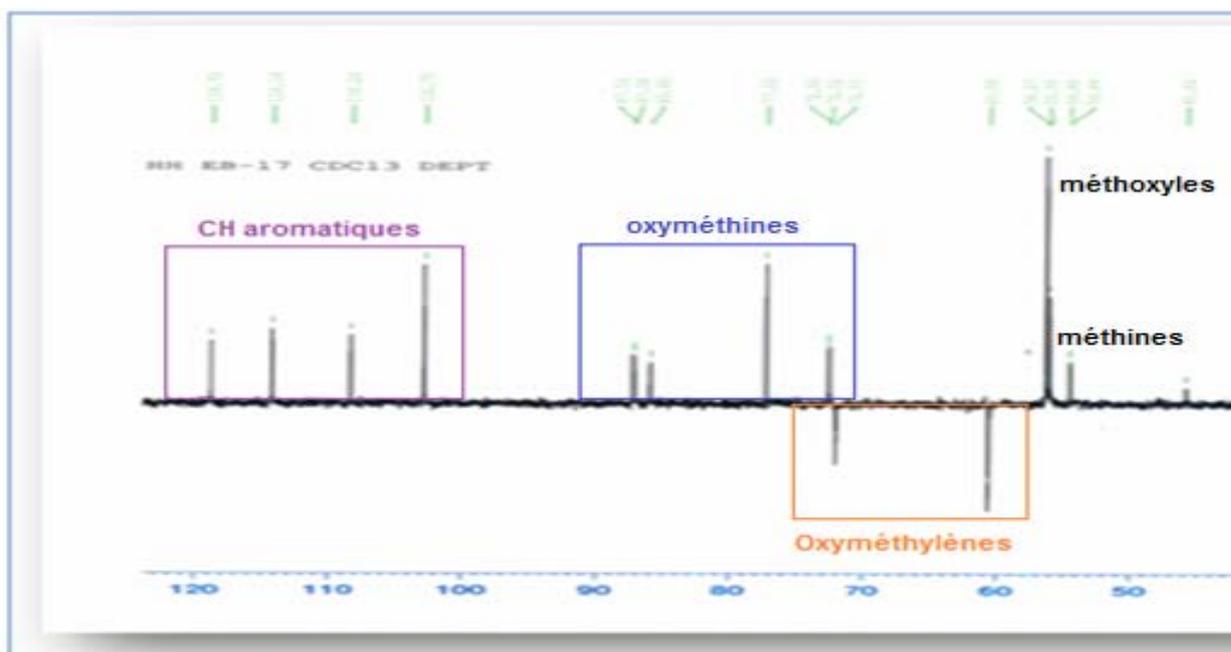
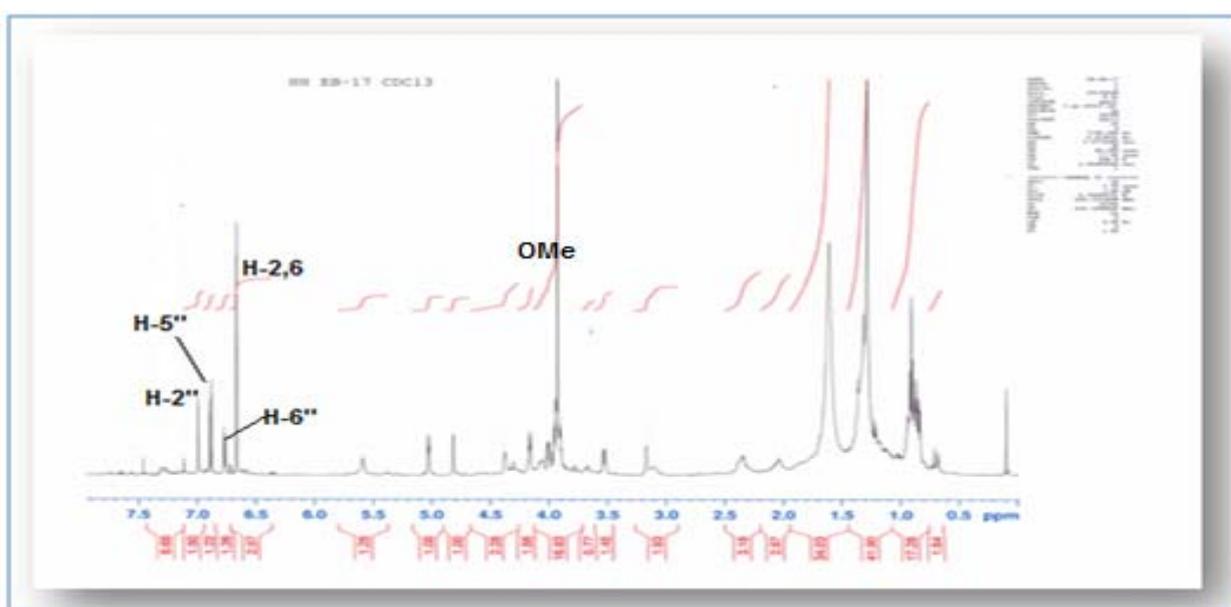
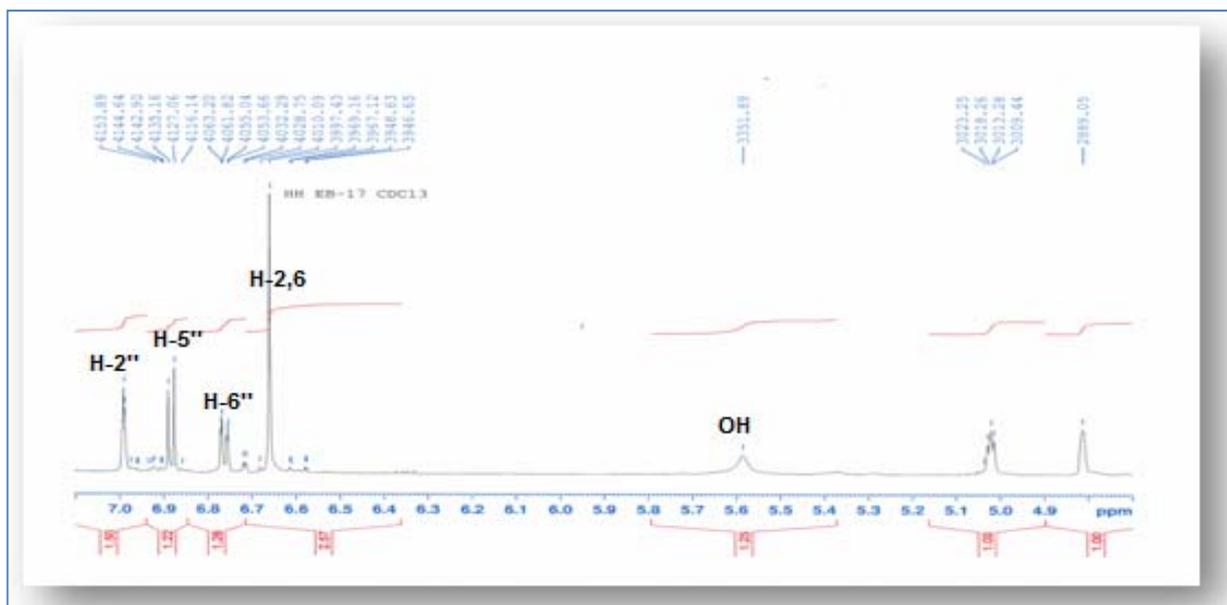


Figure III.17.3: Spectre RMN ^{13}C DEPT du composé **17**

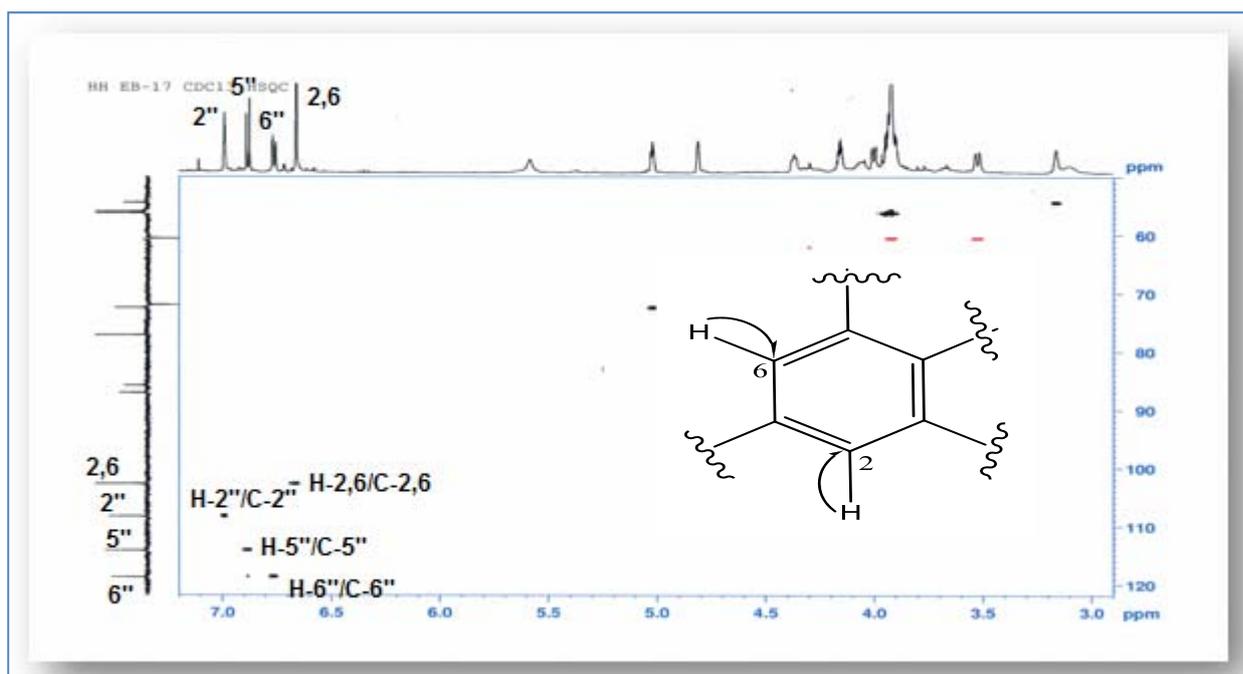
Les spectres RMN ^1H (Figure III.17.4), HSQC J -modulé (Figure III.17.5) et COSY H-H (Figure III.17.6) et, enregistrés dans le chloroforme deutéré, comportent deux parties.

La zone des signaux aromatiques comprenant un signal d'intégration 2H sous forme de singulet résonant à 6,66 ppm correspondant à deux protons équivalents d'un cycle aromatique tétrasubstitué attribuables aux protons (H-2 et H-6), ce qui permet de suggérer qu'ils sont entourés de carbones quaternaires et que ce noyau aromatique est symétrique.



Figure III.17.4: Spectres RMN ^1H des parties aromatiques du composé **17**

L'analyse du spectre HSQC J -modulé permet de détecter leurs carbones à δ_c 102,7 (C-2 et C-6) (Figure III.17.5).

Figure III.17.5: Spectre HSQC J -modulé

Trois autres protons aromatiques appartenant au second noyau aromatique sont observés à δ_H 6,99 (d, $J = 1,3$ Hz), 6,89 (d, $J = 8,1$ Hz) et 6,76 (dd, $J = 8,1, 1,3$ Hz) attribuables aux protons H-2'', H-5'' et H-6'' respectivement. Les constantes de couplage de ces derniers suggèrent que les deux protons (H-5'' et H-6'') sont en position ortho, tandis que le plus

déblindé (H-2'') est en position méta par rapport à H-6'', et para par rapport à H-5'' (Figure III.17.6). Les autres positions du cycle aromatique (1'', 3'' et 4'') sont occupées par des carbones quaternaires. Les carbones C-2'', C-5'' et C-6'' sont assignés à 108,2, 114,1 et 118,7 ppm selon l'expérience HSQC (Figure III.17.5).

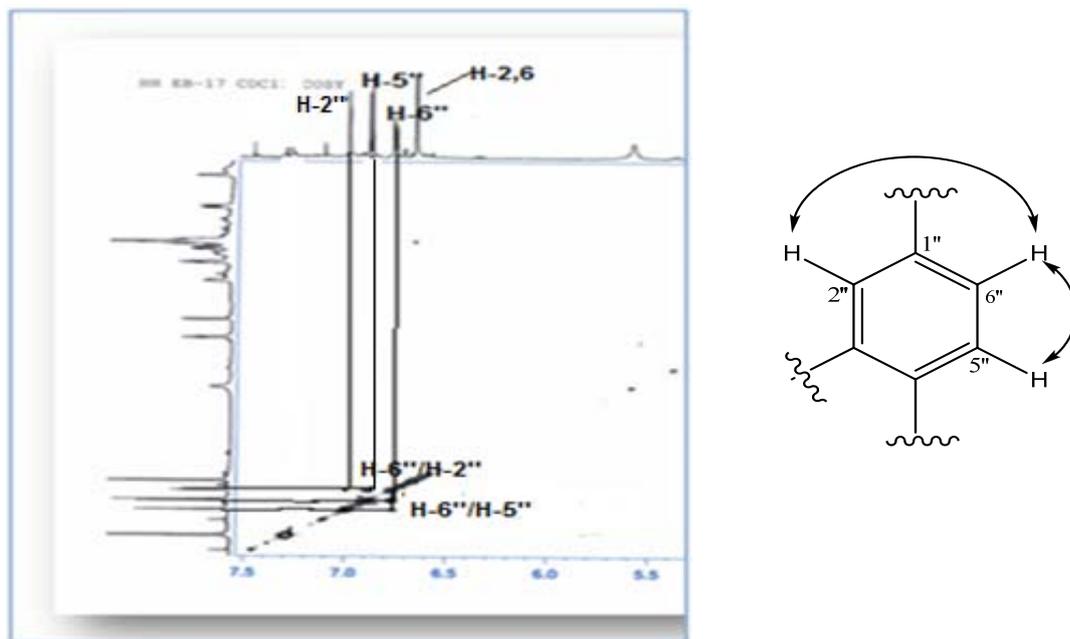


Figure III.17.6: Spectre et corrélations COSY du composé 17

La zone des signaux aliphatiques (Figure III.17.7) contient deux systèmes de spins selon le spectre COSY (Figure III.17.8). Ce dernier permet de déterminer les connectivités suivantes :

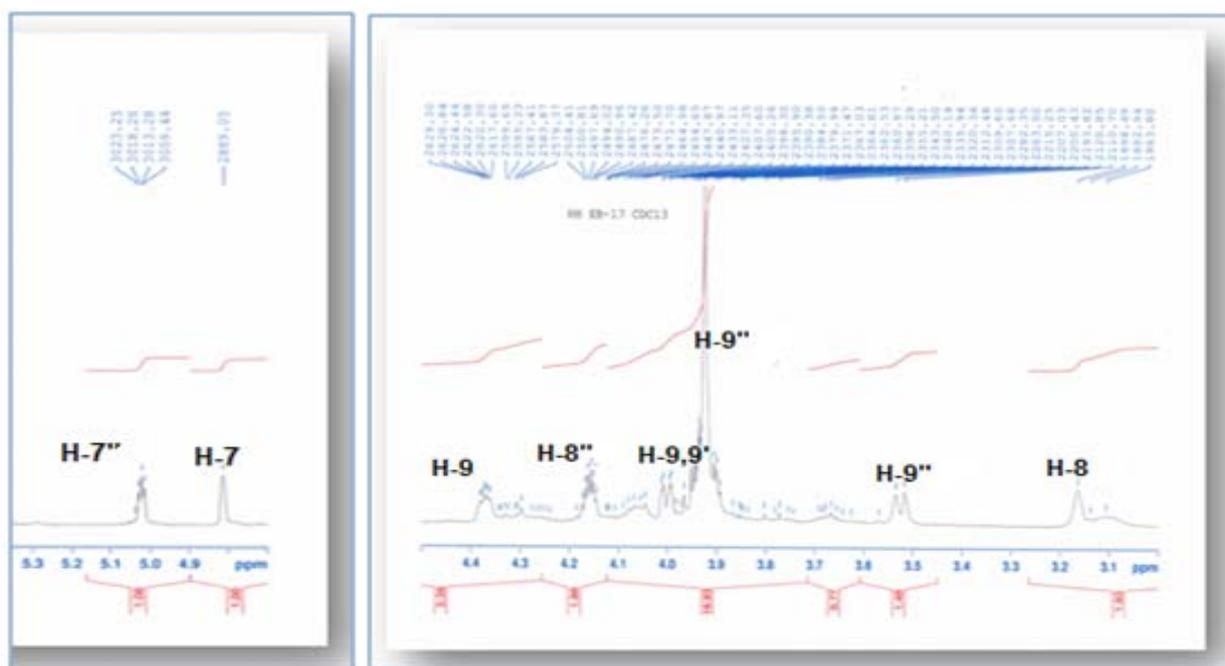


Figure III.17.7: Spectre RMN¹H des parties aliphatiques du composé 17

- Un système de spins à quatre protons se présentant comme suit :

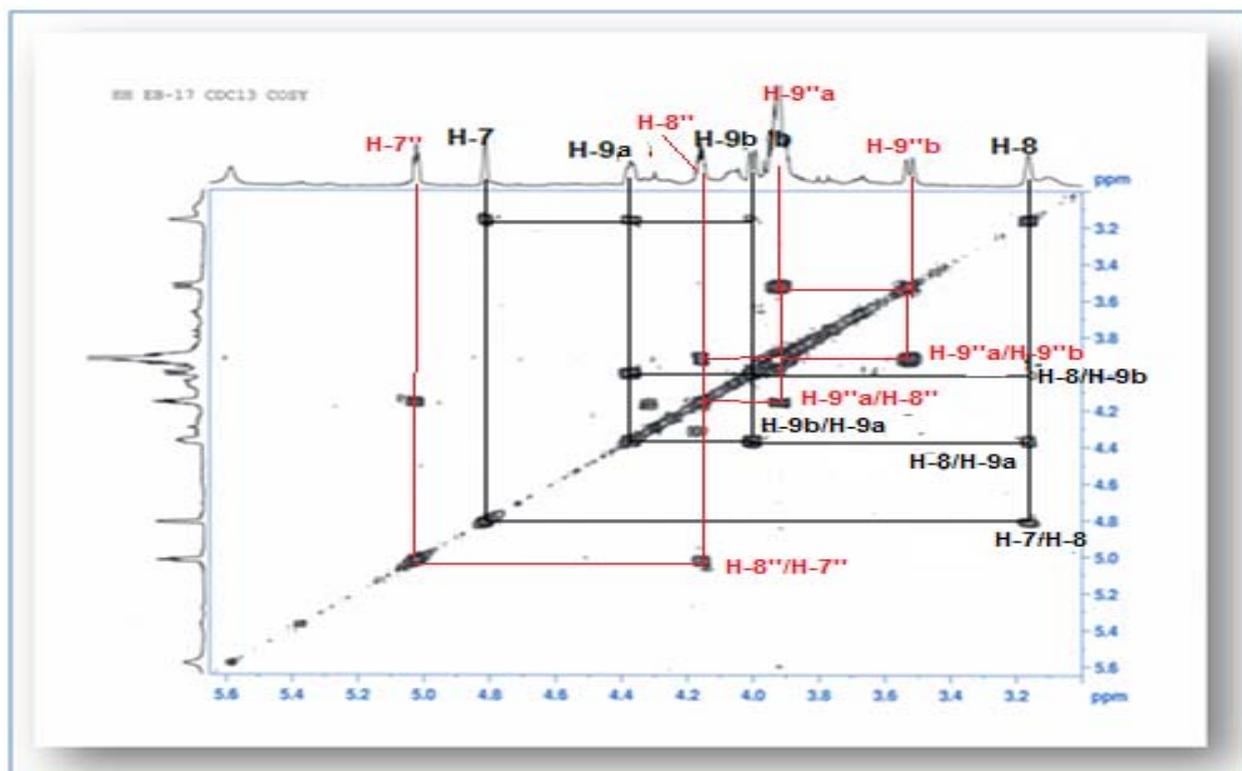
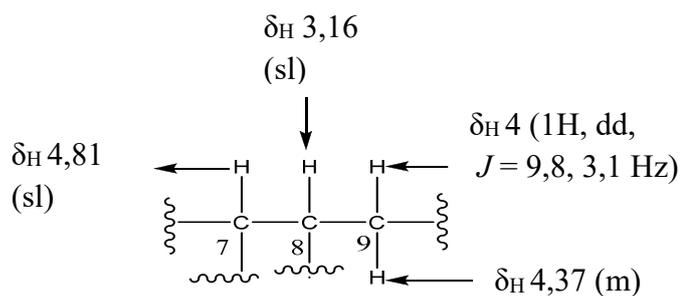
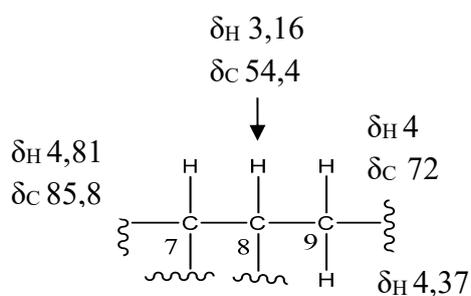


Figure III.17.8: Spectre COSY du composé 17

Le spectre HSQC J -modulé (Figure III.17.9) permet de déterminer les déplacements chimiques des carbones correspondants.



Les valeurs des déplacements chimiques des protons et carbones de ce fragment structural indiquent que les positions 7 et 9 sont oxygénées.

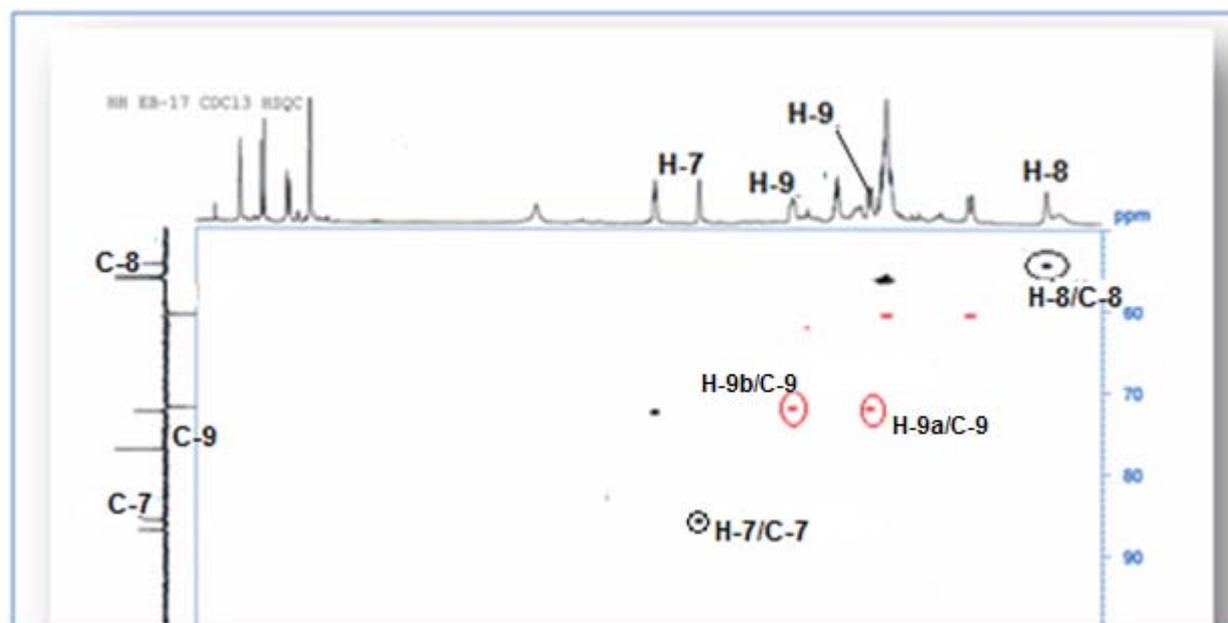
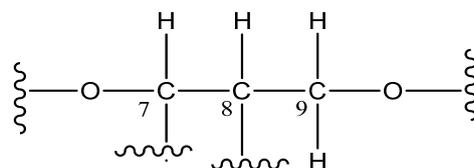
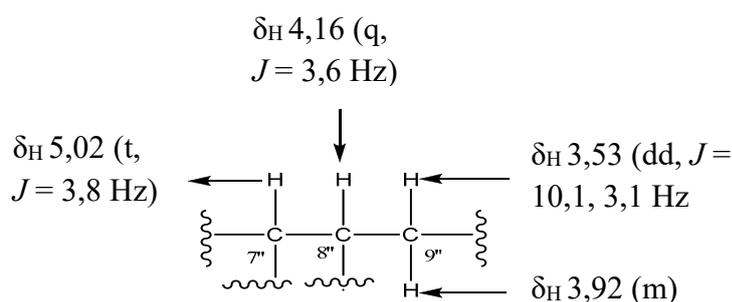
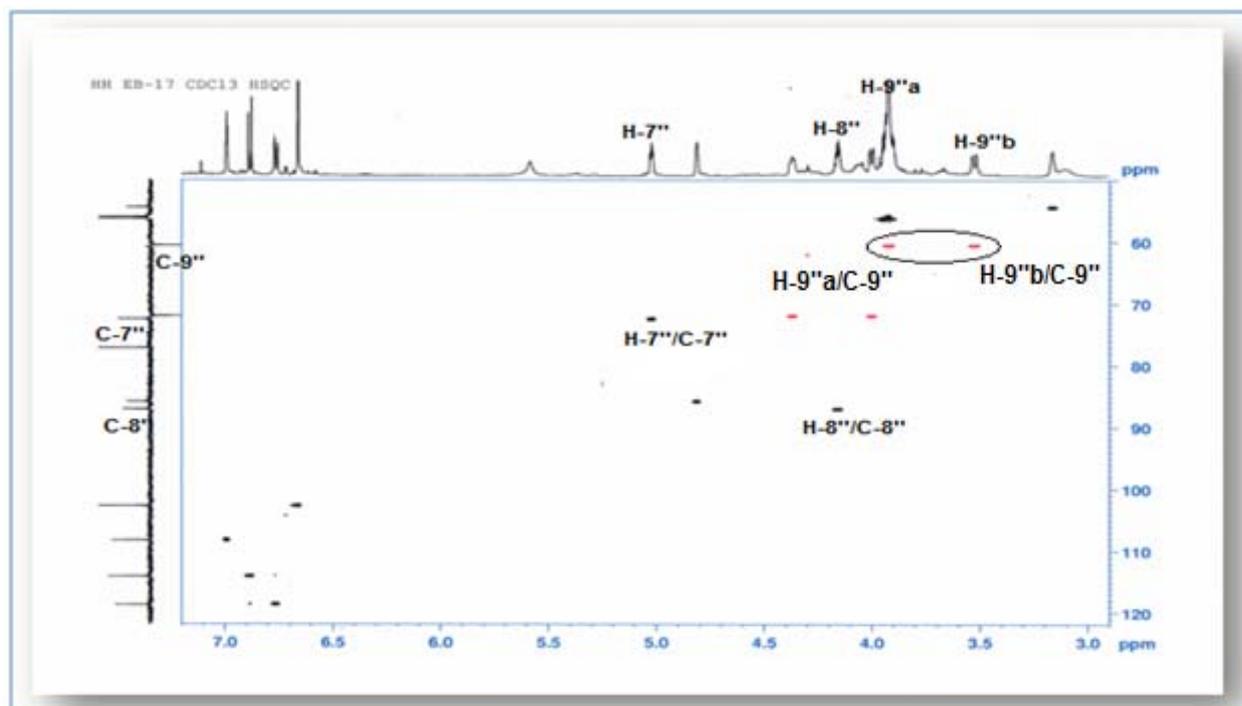
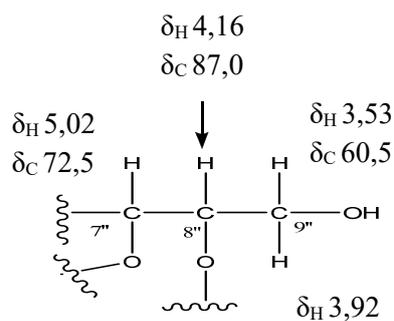


Figure III.17.9: Spectre HSQC J -modulé du composé 17

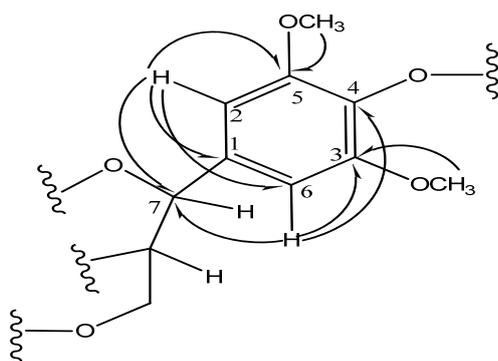
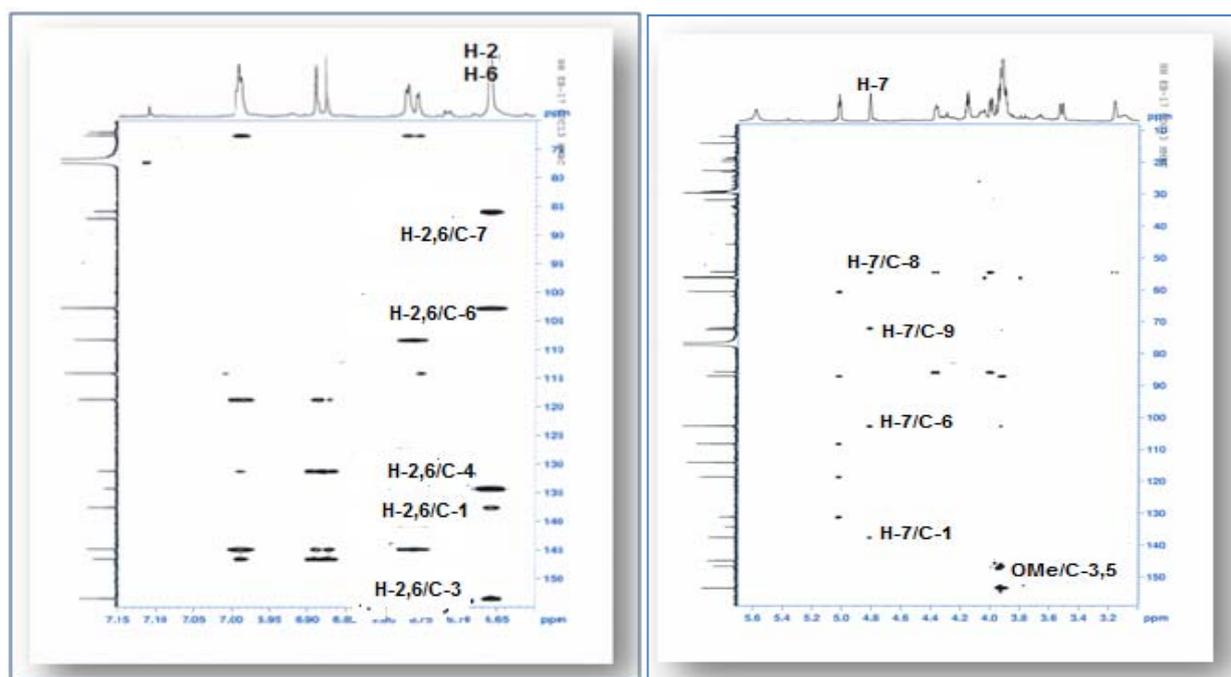
- Le deuxième système de spins est constitué de quatre protons (Figure III.17.8) résonant à :



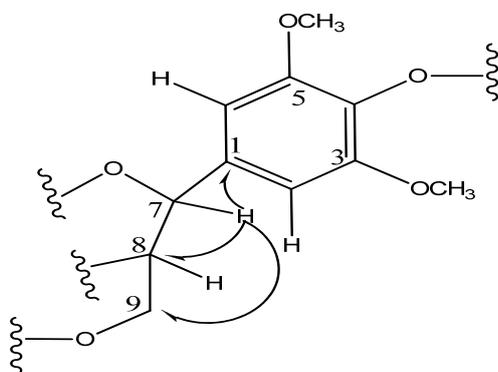
Le spectre HSQC J -modulé (Figure III.17.10) permet de localiser les déplacements chimiques des carbones de cette partie de la molécule qui est un dérivé du propane-7'',8'',9''-triol rencontré souvent dans le règne végétal [125,126].

Figure III.17.10: Spectre HSQC *J*-modulé du composé 17

La suite de l'analyse structurale est basée sur l'observation des corrélations présentes sur le spectre HMBC (Figures III.17.11 et III.17.12). En effet, les deux protons équivalents H-2 et H-6 corrélient avec les carbones résonant à 102,7 ppm (C-6 et C-2), un carbone aromatique quaternaire à $\delta_{\text{C}} 137,6$ (C-1), trois carbones aromatiques quaternaires oxygénés à $\delta_{\text{C}} 153,4$ (C-3 et C-5) et 134,3 (C-4), et un carbone situé à 85,8 ppm (C-7). La valeur très déblindée de son déplacement chimique confirme que le carbone C-7 lié directement au noyau aromatique est oxygéné (Figure III.17.11). Son proton (H-7) est localisé à $\delta_{\text{H}} 4,81$ grâce à l'analyse du spectre HSQC. Aussi, les protons des groupements méthoxyles repérés à 3,96 ppm corrélient avec les carbones résonant à 153,4 ppm permettant de localiser la substitution au niveau des positions C-3 et C-5 par les groupements méthoxyles.

Figure III.17.11: Corrélations HMBC du composé **17**Figure III.17.12: Spectre HMBC du composé **17**

L'analyse du spectre HMBC (Figure III.17.12) permet également de visualiser des taches de corrélation (Figure III.17.13) entre le proton H-7 et les carbones C-1 (δ_c 137,6), C-8 (δ_c 54,4) et C-9 (δ_c 72,0) déjà identifiés.

Figure III.17.13: Corrélations HMBC du composé **17**

En plus de ces corrélations, les deux protons aromatiques (H-2'' et H-6'') présentent des taches de corrélation en 2J et 3J dans le spectre HMBC (Figures III.17.14 et III.17.15) avec un carbone aromatique quaternaire à δ_c 131,2 (C-1''), un carbone aromatique oxygéné résonnant à 146,6 ppm correspondant au carbone C-4'' et un carbone aliphatique oxyméthine à δ_c 72,5 (C-7''). Ce dernier couple sur le spectre HSQC J -modulé avec son proton détecté à 5,02 ppm (H-7''). Le proton H-2'' et les protons du groupement méthoxye corrélient avec un carbone résonnant à 144,8 ppm ne pouvant être que le carbone C-3''. Par ailleurs, le carbone repéré à δ_c 146,6 (C-4'') couple avec le proton du groupement hydroxyle lié au carbone C-4''.

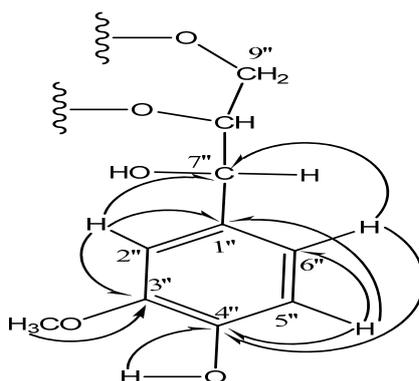


Figure III.17.14: Corrélations HMBC du composé **17**

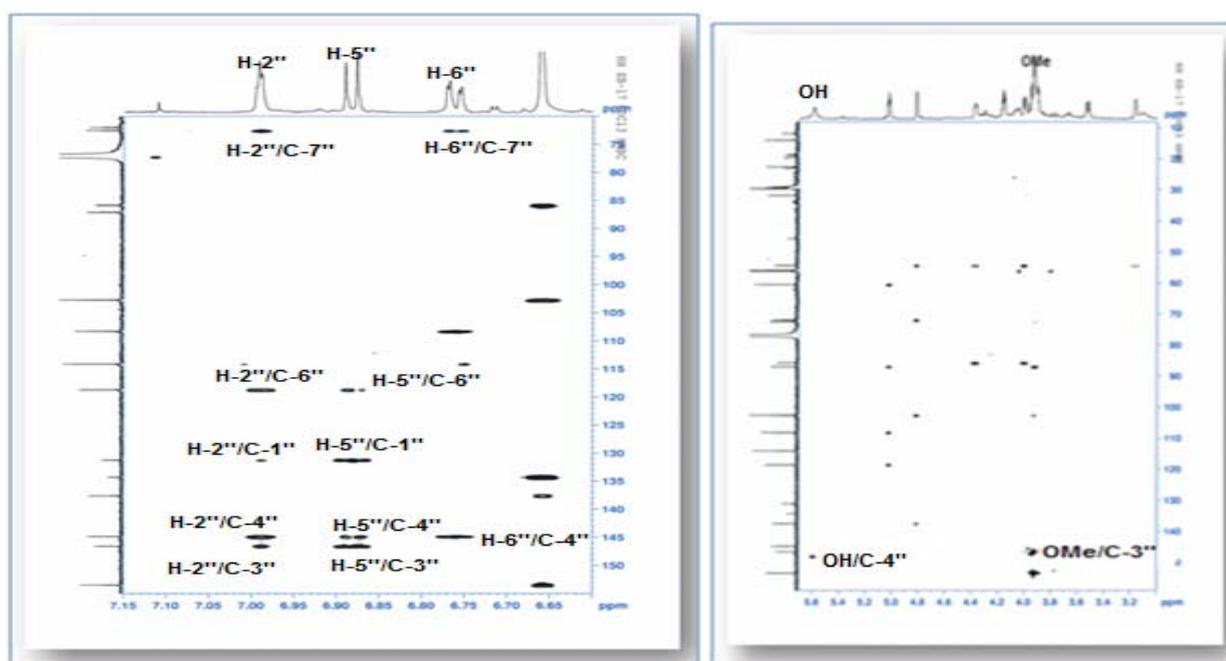


Figure III.17.15: Spectre HMBC du composé **17**

L'analyse du spectre HMBC (Figure III.17.16) du composé **17** montre également des taches de corrélation entre le proton H-7'' déjà identifié et les carbones aromatiques C-1'', C-2'' et C-6'' et les carbones aliphatiques C-8'' et C-9'' déjà assignés. Ces constatations indiquent que

le groupement propane-7'',8'',9''-triol est lié au carbone C-1'' du noyau aromatique, suggérant la présence d'un groupement guaiacyl glycérol [132]. Ce dernier est lié au carbone C-4 comme le montre le spectre HMBC (Figure III.17.16) à travers la corrélation entre le proton H-8'' et le carbone C-4 (Figure III.17.17).

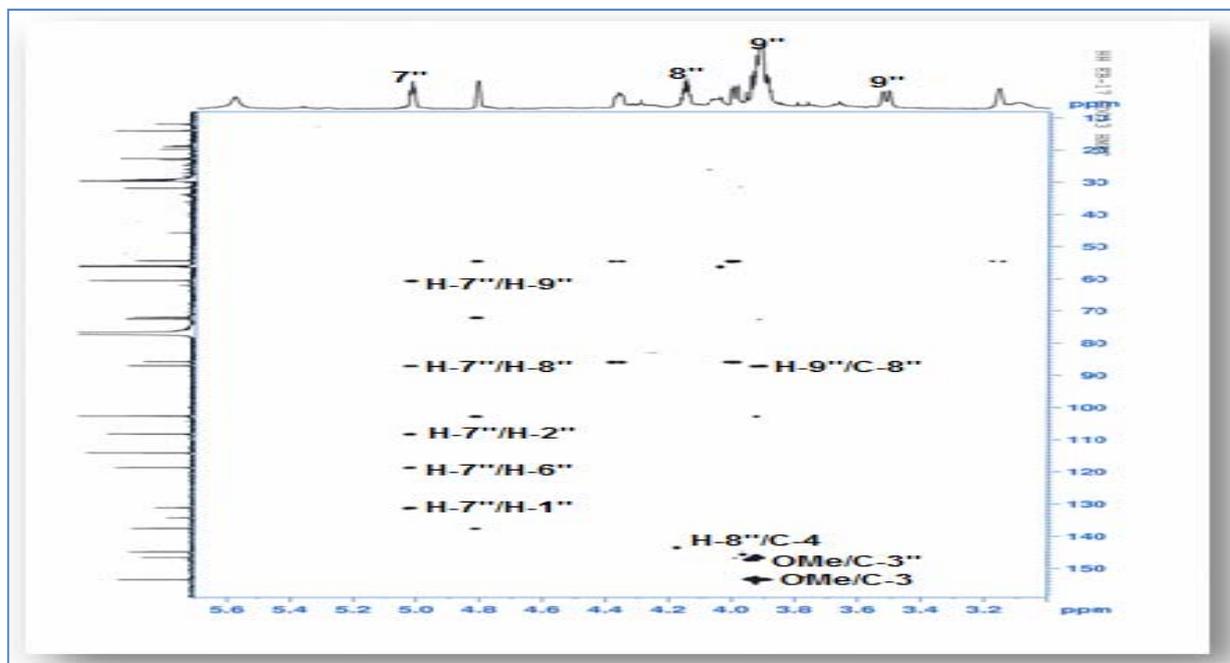


Figure III.17.16: Spectre HMBC du composé **17**

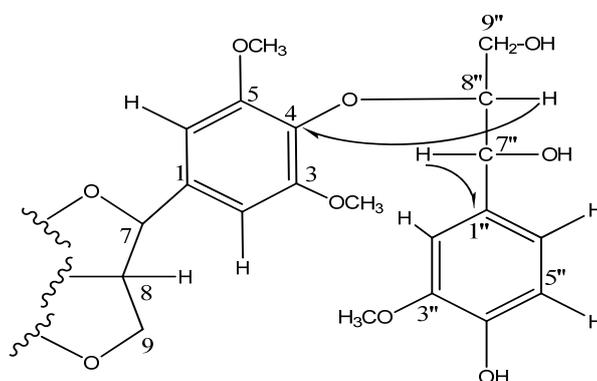


Figure III.17.17: Corrélations HMBC du composé **17**

A l'issue de cette analyse, tous les protons et carbones du composé **17** sont attribués permettant ainsi de compter 21 atomes de carbone, 25 hydrogènes et 9 oxygènes, soit une masse moléculaire 421 uma. Cette masse est très inférieure à la valeur déduite à partir du spectre de masse ESI (810 uma) (Figure III.17.1). En conséquence, le composé **17** résulte de l'assemblage de deux fragments d'une masse de 405 = 421-16 uma chacun (8 insaturations) par

l'intermédiaire d'un noyau furofurane (2 insaturations) (Figure III.17.18), ce qui donne une formule brute $C_{42}H_{50}O_{16}$ (18 insaturations).

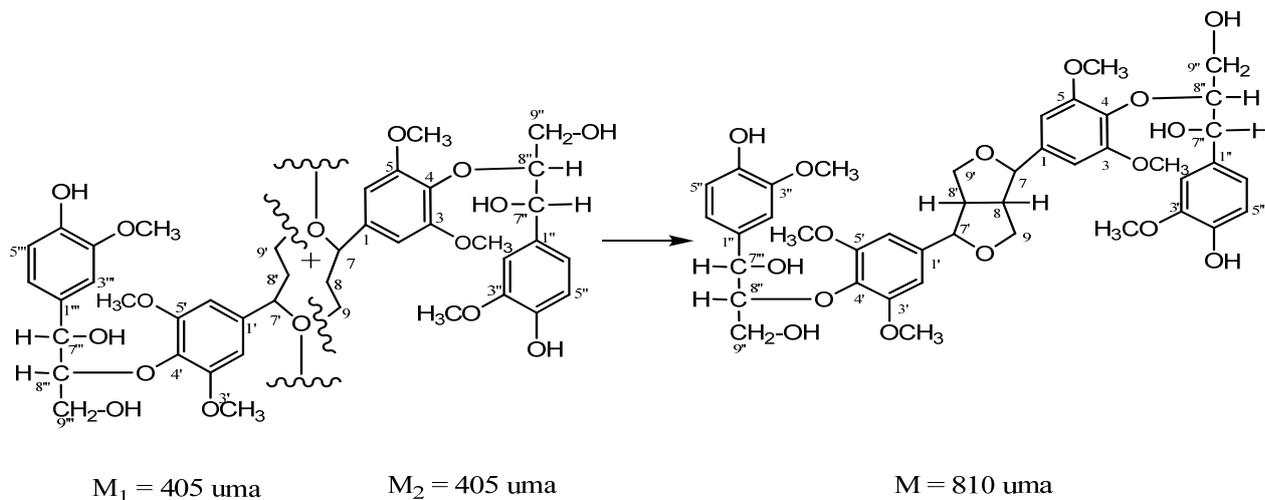


Figure III.17.18: Structure plane du composé **17**

La configuration relative du composé **17** est établie par analyse des valeurs de constantes de couplage entre les protons $H-7''/8''$ et $H-7'''/8'''$ ($J_{H-7''/8''} = J_{H-7'''/8'''} = 3,8 \text{ Hz}$) qui sont en accord avec une configuration *érythro* au niveau de l'unité guaiacyl glycérol (Figure III.17.19), car dans le cas d'une configuration *thréo* la valeur de la constante de couplage est grande ($J_{H-7''/8''} = 8 \text{ Hz}$) [131,132].

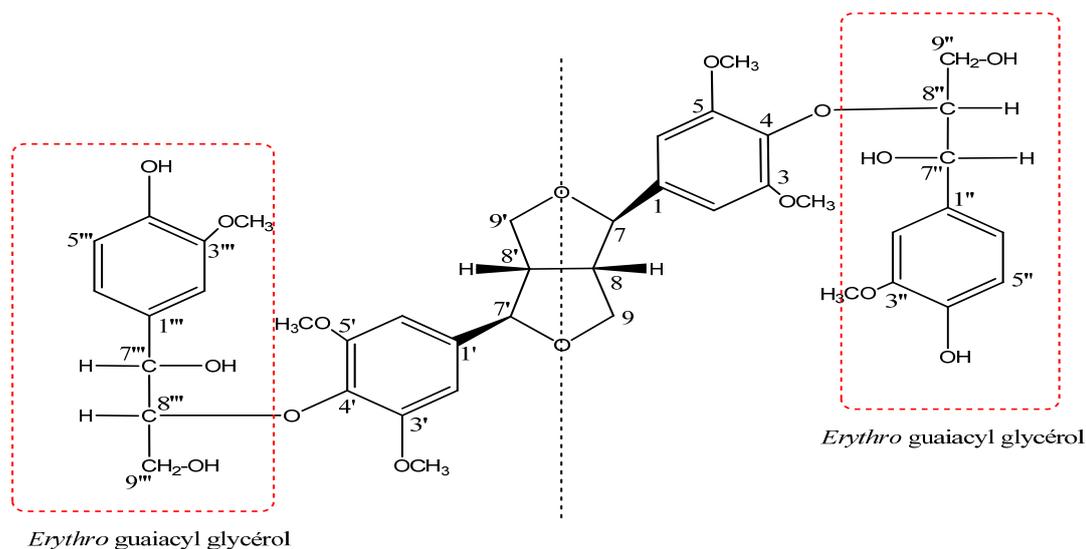


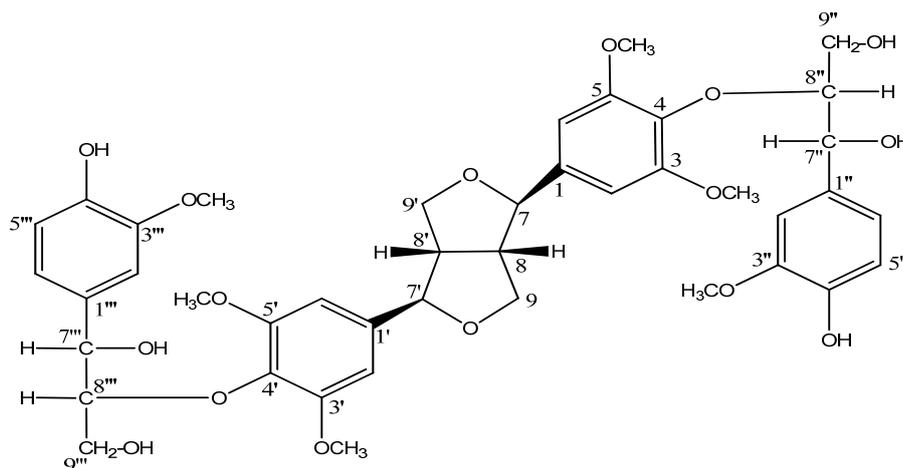
Figure III.17.19: Stéréochimie du composé **17**

La mesure du pouvoir rotatoire de ce composé donnant une valeur $[\alpha]_D^{20} = 0$ (c 0,25 g/100 ml, MeOH), comparée à celle donnée dans la littérature $[\alpha]_D^{20} = 0^\circ$ (c 0,2, MeOH) [133],

permet d'assigner la structure suivante hedyotisol A pour le composé **17**. Ce composé a été isolé antérieurement à partir des espèces suivantes : *Hedyotis lawsoniae* (Rubiaceae) [133], *Pluchea indica* (Pluchea) [134] et *Cassia occidentalis* (Leguminaceae) [135]. Ce lignane est identifié pour la première fois dans le genre *Euphorbia*. Toutes les données spectroscopiques de ce composé sont résumées dans le tableau III.17.

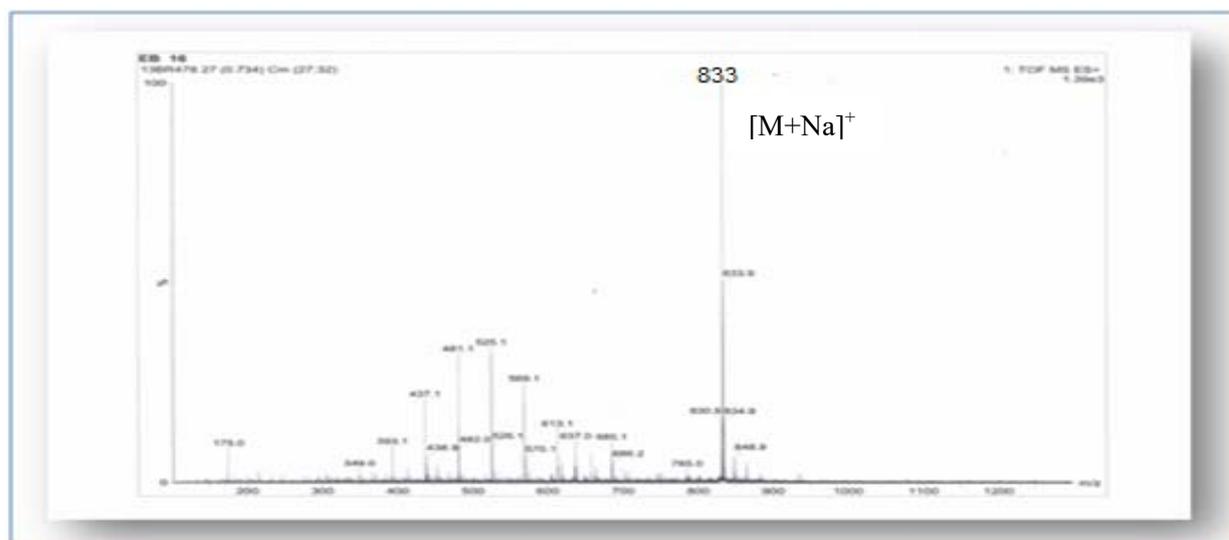
Tableau III.17: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **17** dans CDCl₃.

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1, 1'	-	137,6
2, 6	6,66 s	102,7
3, 5	-	153,4
4, 4'	-	134,3
3', 5'	-	153,4
2', 6'	6,66 s	102,7
7, 7'	4,81 sl	85,8
8, 8'	3,16 sl	54,4
9, 9'	4,37 m H-9, 9'a 4,0 dd 9,8, 3,1 H-9, 9'b	72,0
1'', 1'''	-	131,2
2'', 2'''	6,99 d 1,3	108,2
3'', 3'''	-	144,8
4'', 4'''	-	146,6
5'', 5'''	6,89 d 8,1	114,1
6'', 6'''	6,76 dd 8,1, 1,3	118,7
7'', 7'''	5,02 t 3,8	72,5
8'', 8'''	4,16 q 3,6	87,0
9'', 9'''	3,92 m H-9'', 9'''a 3,53 dd 10,1, 3,1 H-9'', 9'''b	60,5
3'', 3'''-OCH ₃	3,95 s	56,2
3, 5, 3', 5'-OCH ₃	3,96 s	56,5
4'', 4'''-OH	5,60 s	-

III.7.17. Détermination structurale du composé **18**Hedyotisol B (**18**)

Ce lignane a été isolé aussi à l'état huileux, il est visible à la lumière UV à 254 nm et se colore en bleu après révélation en CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse electrospray (ESI-MS) du composé **18**, donne en mode positif un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 833$ $[M+Na]^+$ (Figure III.18.1), qui correspond à une masse moléculaire de 810 uma et une formule brute en $C_{42}H_{50}O_{16}$. Ceci suggère que les composés **17** et **18** sont des isomères.

Figure III.18.1: Spectre de masse ESI-MS du composé **18**

Les spectres RMN 1H (Figure III.18.2), ^{13}C découplé (Figure III.18.3) et DEPT (Figure III.18.4) du composé **18** montrent en plus des signaux correspondant au composé précédent **17** déjà identifié, d'autres signaux allant de la zone aliphatique jusqu'à la partie aromatique.

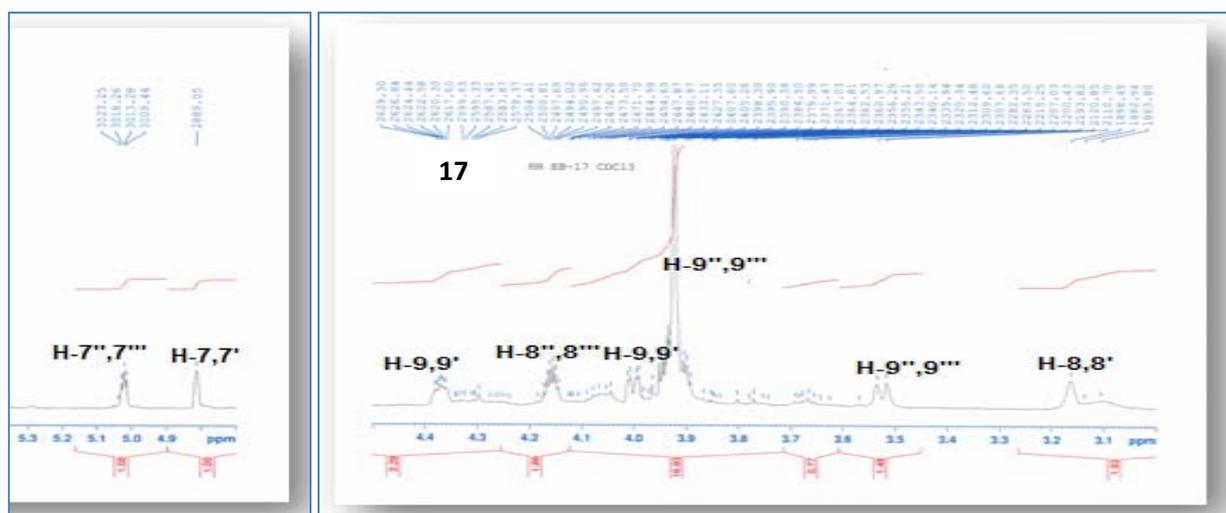


Figure III.18.2: Spectres RMN ^1H de la partie aliphatique des composés 17 et 18

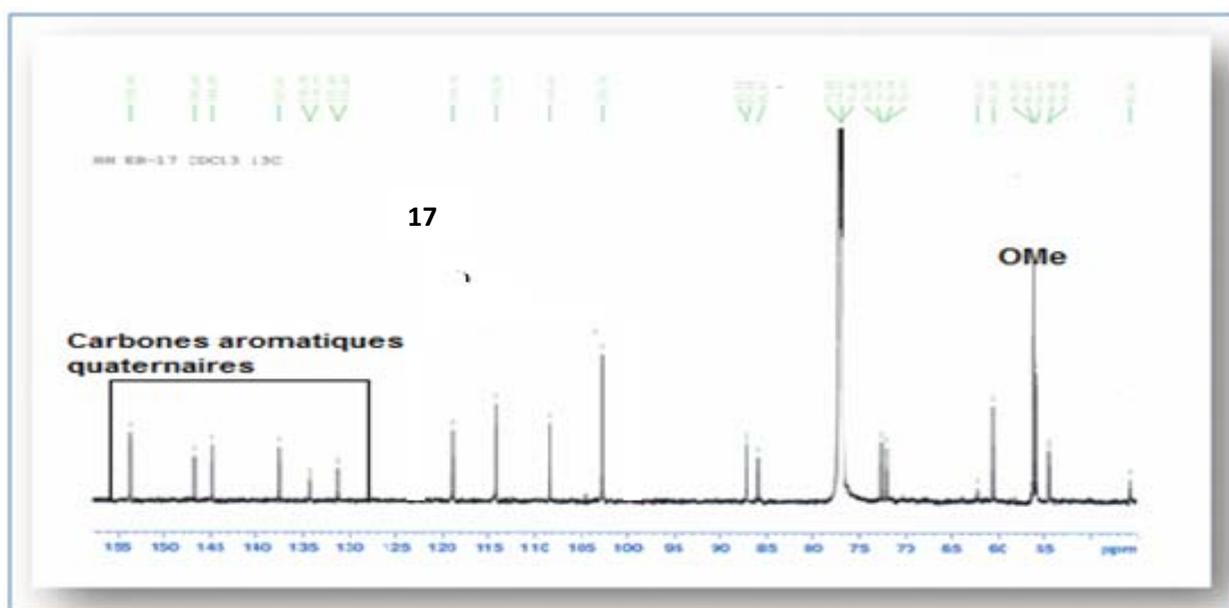
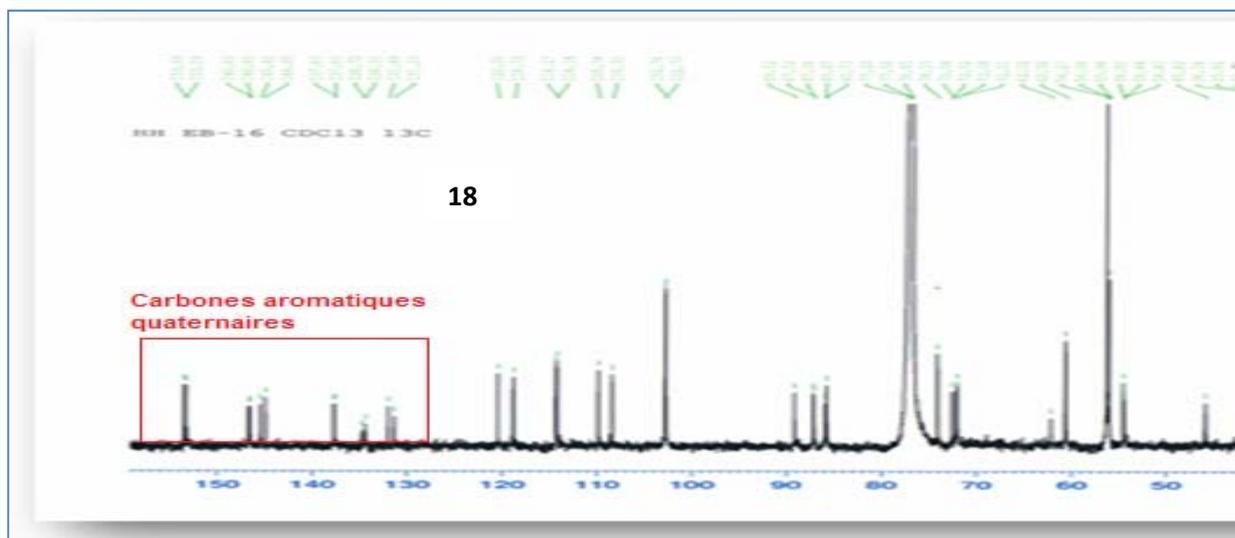


Figure III.18.3: Spectres RMN ^{13}C découplés des composés 17 et 18

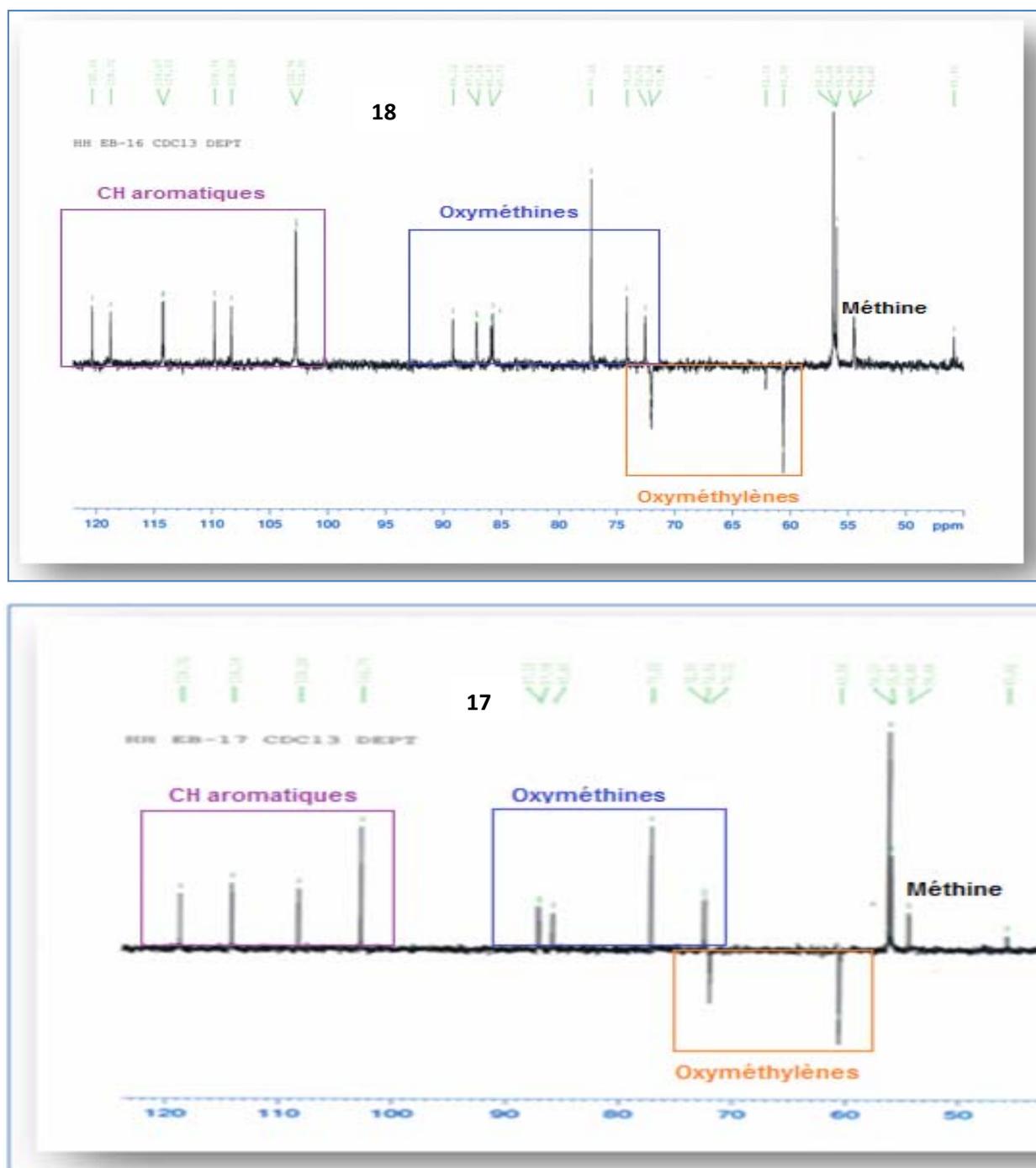


Figure III.18.4: Spectres RMN ^{13}C DEPT des composés **17** et **18**

Cette différence se manifeste particulièrement dans l'apparition sur le spectre RMN ^1H (Figure III.18.2) du composé **18** des signaux à champ faible à δ_{H} 6,97 (1H, dd, $J = 8,0, 1,3$ Hz), 6,92 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) et 6,99 (1H, d, $J = 1,3$ Hz). Ces signaux sont attribués aux protons H-6'', H-5'' et H-2'' respectivement d'un noyau aromatique 1,3,4-trisubstitué. Leurs carbones sont assignés par analyse HSQC (Figure III.18.5) à δ_{C} 109,7 (C-2''), 114,2 (C-5'') et 120,3 (C-6'').

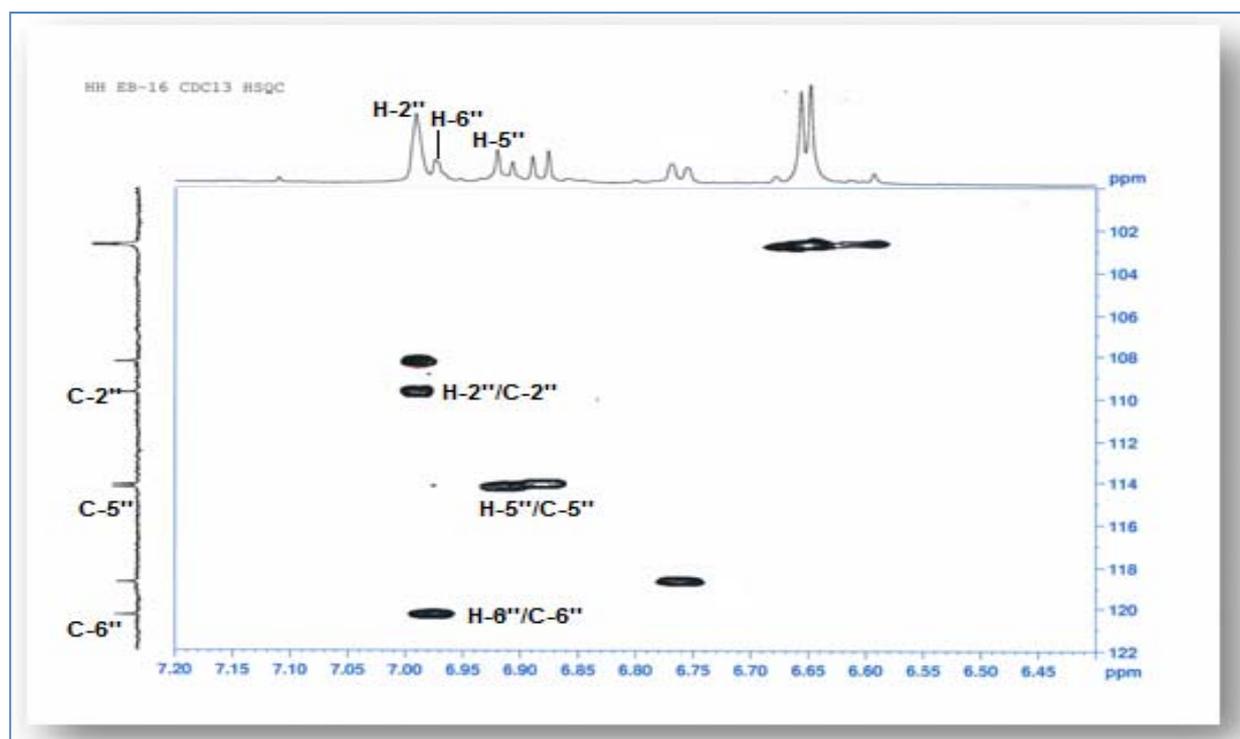


Figure III.18.5: Spectre HSQC J -modulé de la partie guaiacyl du composé **18**

Dans la partie aliphatique, l'analyse des spectres RMN ^1H (Figure III.18.2), COSY H-H (Figure III.18.6) et HSQC J -modulé (Figure III.18.7) permet d'observer un système de spins à 4 protons correspondant à une unité glycérol (Figure III.18.a):

- Un signal à δ_{H} 5,05 (d, $J = 8,7$ Hz, H-7'') correspondant à un groupement oxyméthine.
- Un signal à δ_{H} 3,92 (q, $J = 8,7$ Hz, H-8'') attribuable à un deuxième groupement oxyméthine.
- Deux signaux résonant à δ_{H} 3,60 (dm, $J = 11,8$ Hz, H-9''a) et 3,36 (m, H-9''b) correspondant au groupement hydroxyméthylène $\text{CH}_2\text{-OH-9''}$.

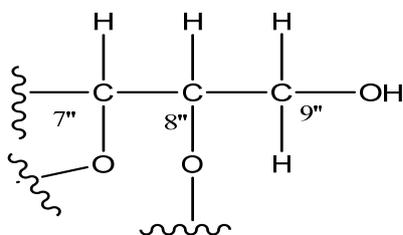
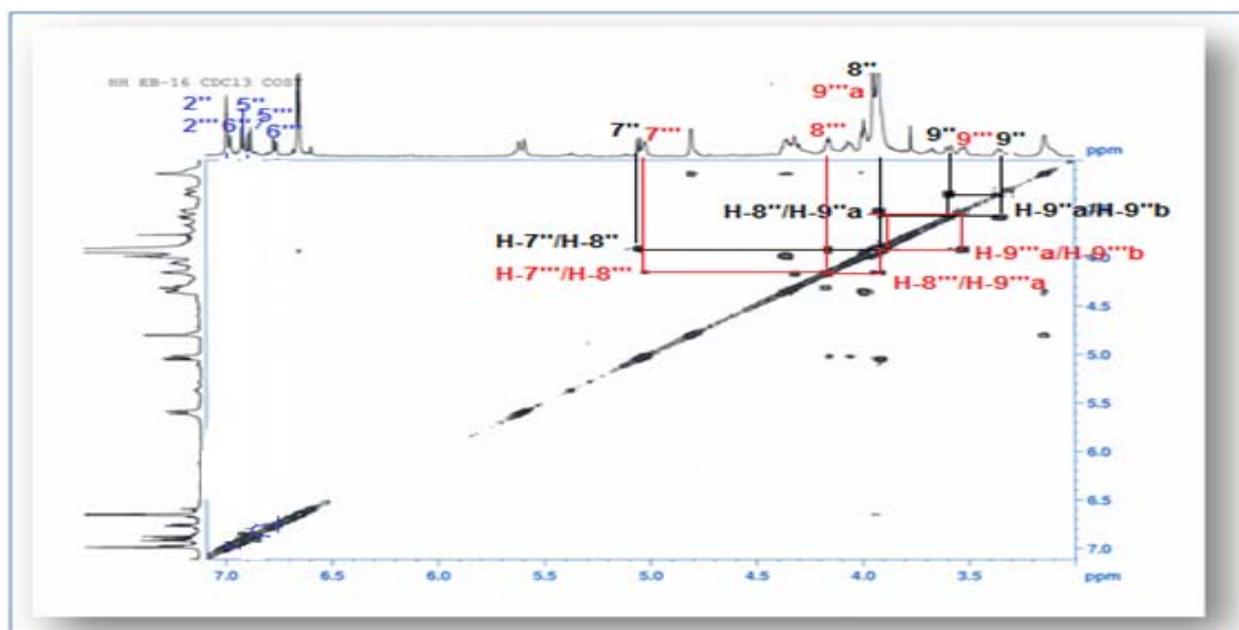
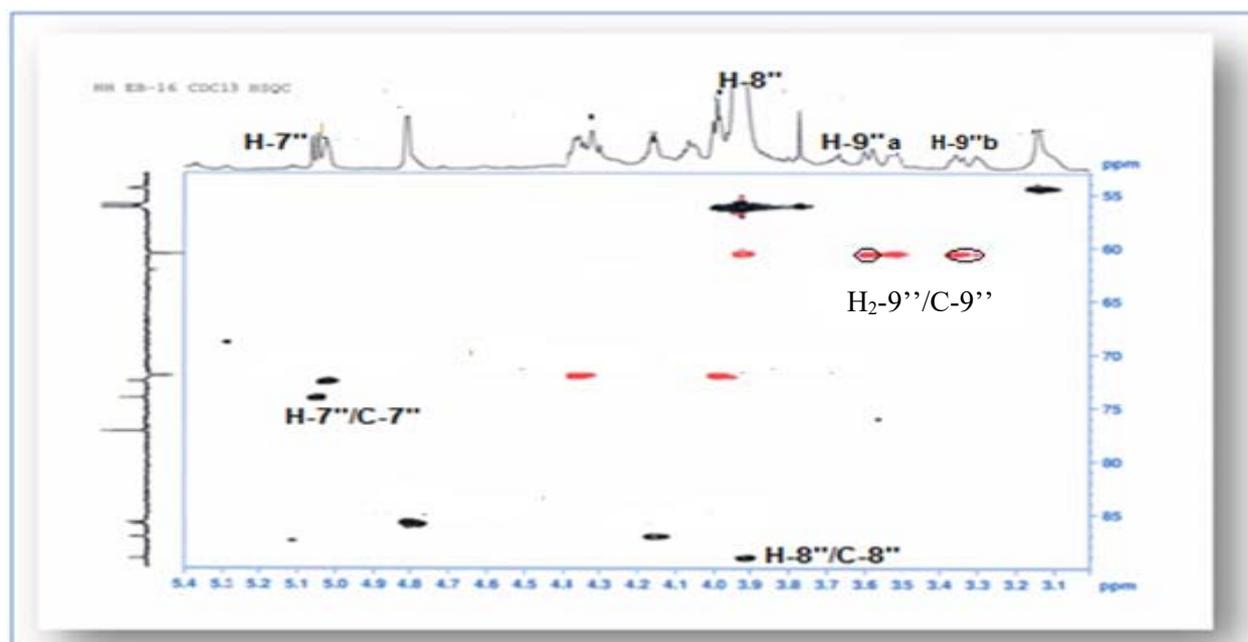


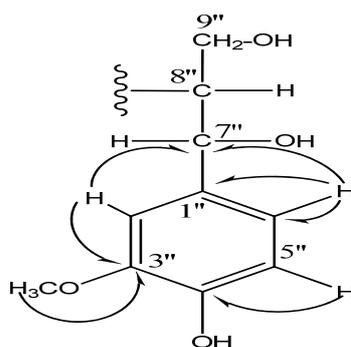
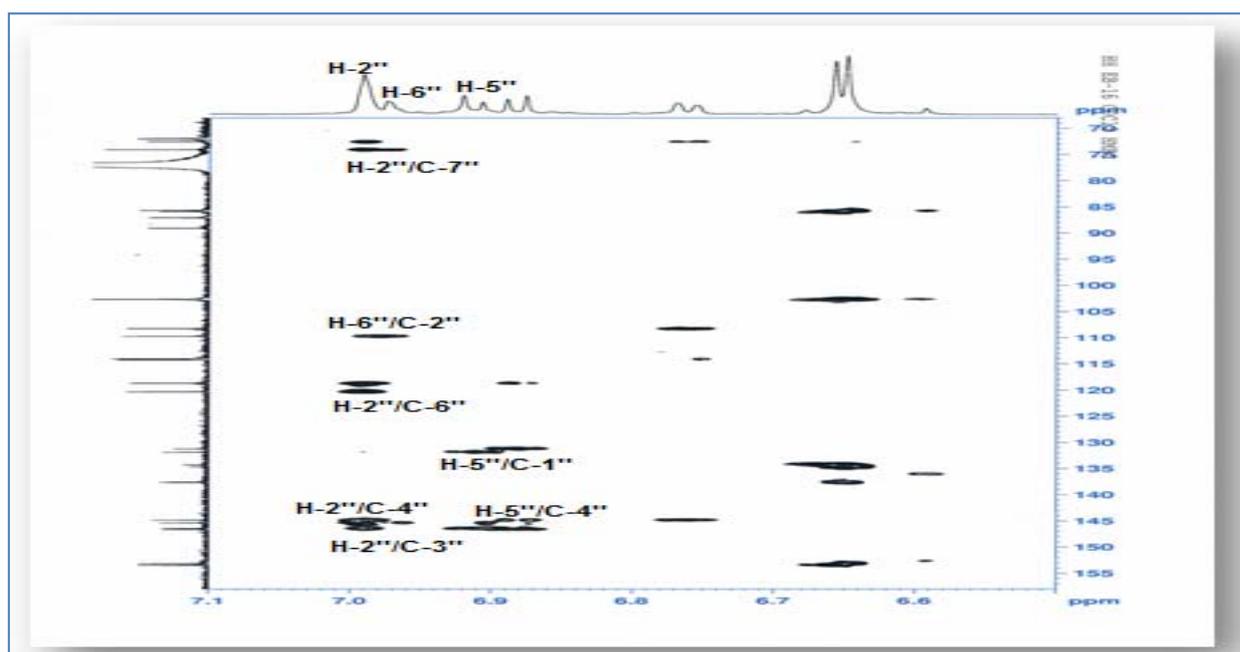
Figure III.18.a: Unité glycérol du composé **18**

Figure III.18.6: Couplages COSY du composé **18**

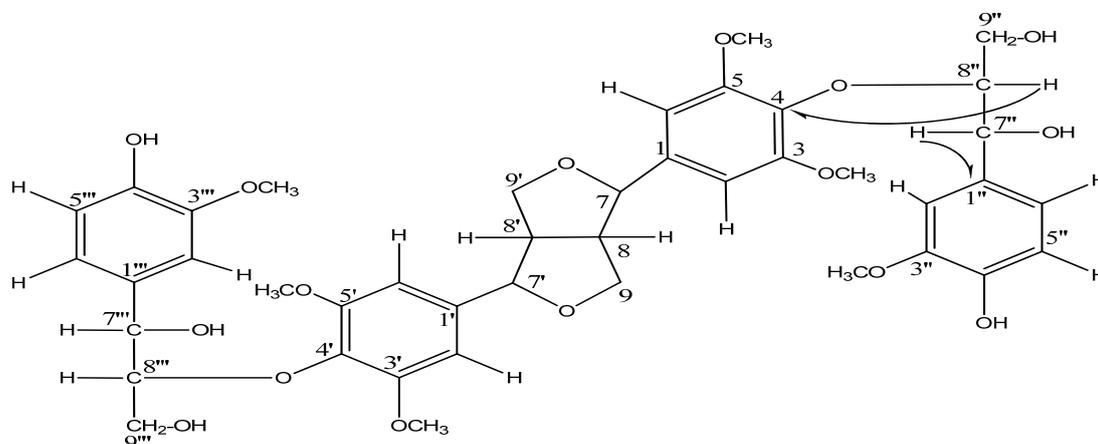
Les carbones de cette unité (Figure III.18.a) sont déterminés par analyse HSQC *J*-modulé (Figure III.18.7) à δ_c 74,1 (C-7''), 89,1 (C-8'') et 60,5 (C-9'').

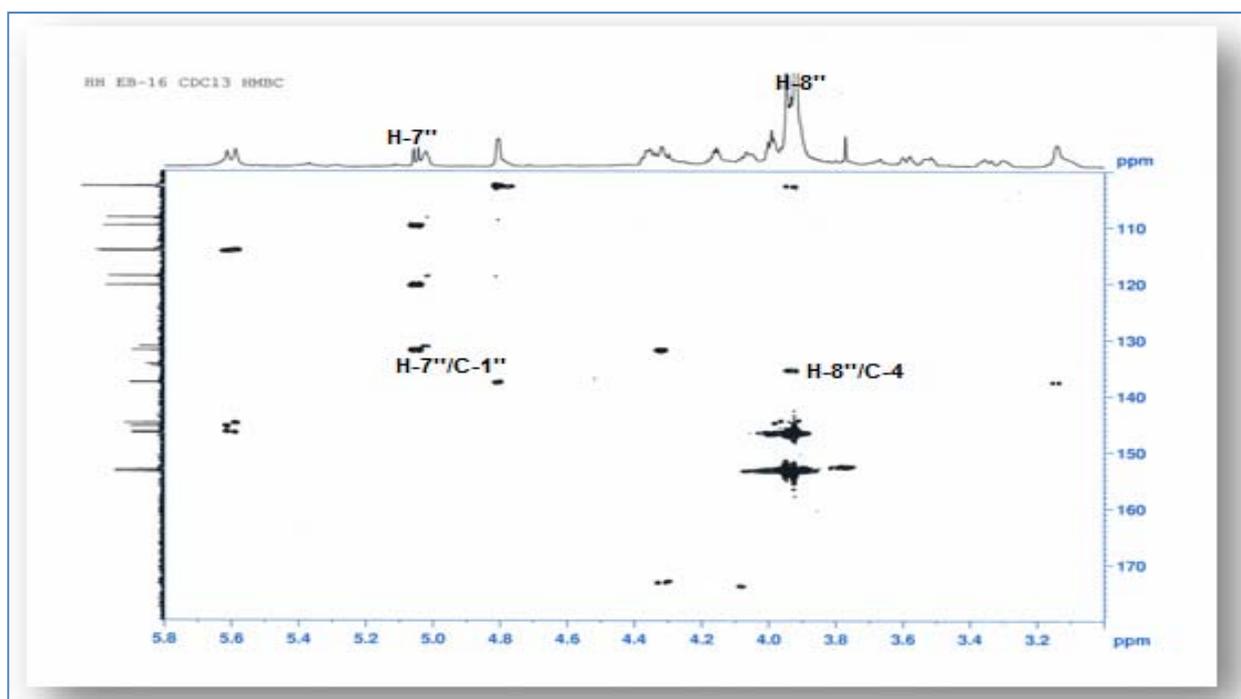
Figure III.18.7: Spectre HSQC *J*-modulé de la partie aliphatique du composé **18**

Les corrélations HMBC (Figures III.18.8 et III.18.9) des protons H-2'', H-5'', H-6'' et méthoxyles permettent d'identifier le noyau aromatique au guaiacyl lié à l'unité glycérol en C-7''.

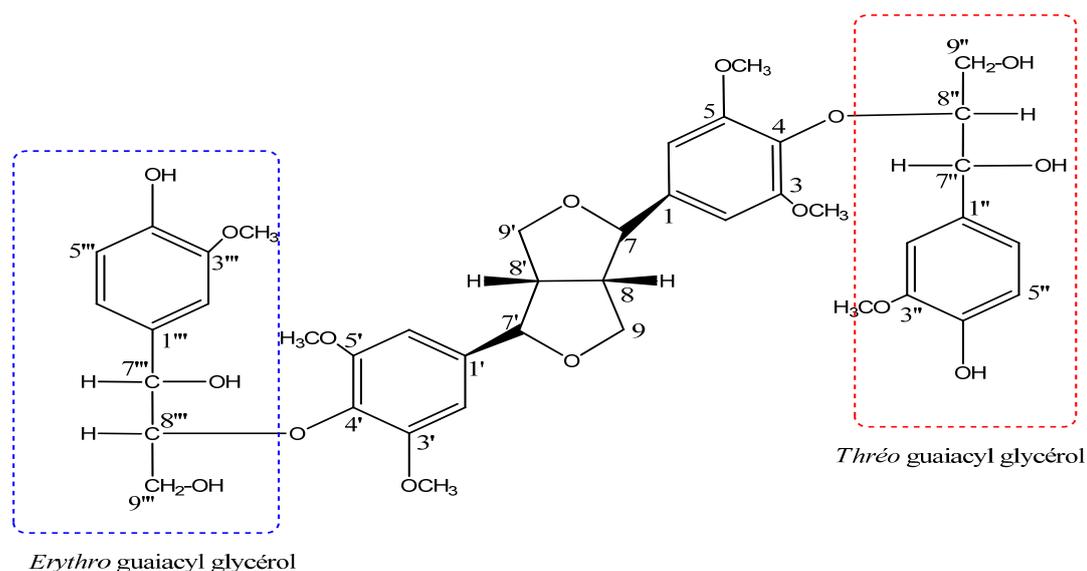
Figure III.18.8: Corrélations HMBC du composé **18**Figure III.18.9: Spectre HMBC du composé **18**

L'analyse du spectre HMBC (Figures III.18.10 et III.18.11) permet de visualiser les corrélations entre H-7''/C-1'' et H-8''/C-4, ce qui permet de relier l'unité guaiacyl glycérol au carbone C-4.

Figure III.18.10: Corrélations HMBC du composé **18**

Figure III.18.11: Spectre HMBC du composé **18**

La multiplicité du proton H-7''' couplant avec le proton H-8''' sous forme de doublet avec une constante de couplage $J = 8,7$ Hz traduit une configuration relative *thréo* du guaiacyl glycérol [127-129], alors que pour le proton H-7''', la constante de couplage $J = 3,6$ Hz avec le proton vicinal H-8''' indiquant une configuration *érythro* [131] comme il a été observé pour le composé **17**. Ce qui signifie que les composés **17** et **18** sont des stéréoisomères [133] (Figure III.18.12).

Figure III.18.12: Stéréochimie du composé **18**

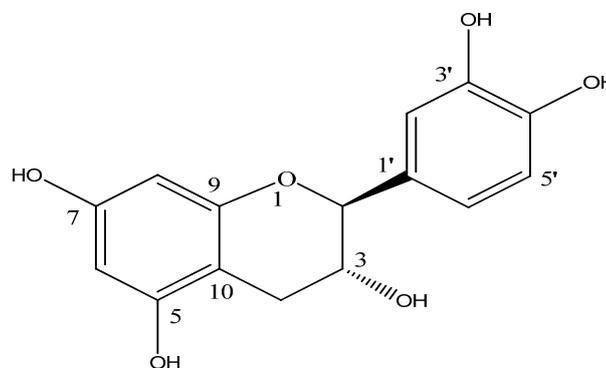
Le pouvoir rotatoire du composé **18** mesuré dans le méthanol est égale à 0 (c 0,23 g/100 ml). Ainsi, en comparaison des données spectroscopiques du composé **18** (Tableau III.18) avec les données de la littérature [131,133], le composé **18** est caractérisé comme étant le Hedyotisol B, isolé antérieurement des espèces *Hedyotis lawsoniae* (Rubiaceae) [133] et *Pluchea indica* (Pluchea) [134], mais il a été aussi identifié pour la première fois dans le genre *Euphorbia*.

Tableau III.18: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **18** dans CDCl₃

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
1, 1'	-	160,8
2, 6	6,65 s	102,7
3, 5	-	153,4
4, 4'	-	134,3
3', 5'	-	153,4
2', 6'	6,66 s	102,7
7, 7'	4,81 s	85,8
8, 8'	3,14 sl	54,4
9, 9'	4,37 m H-9, 9'a 4,0 dd 9,8, 3,1 H-9, 9'b	72,0
1''	-	131,8
2''	6,99 d 1,3	109,7
3''	-	145,4
4''	-	146,4
5''	6,92 d 8,0	114,2
6''	6,97 dd 8,0, 1,3	120,3
7''	5,05 d 8,7	74,1
8''	3,92 q 8,7	89,1
9''	3,36 m H-9''b 3,60 dm 11,8 H-9''a	60,5
1'''	-	131,2
2'''	6,99 d 1,3	108,3
3'''	-	144,8

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
4'''	-	146,6
5'''	6,89 d 8,1	114,1
6'''	6,76 dd 8,1, 1,3	118,7
7'''	5,02 d 3,6	72,5
8'''	4,16 q 3,6	87,0
9'''	3,53 dd 10,5, 3,1 H-9b 3,92 m H-9a	60,5
3, 5, 3', 5'-OCH ₃	3,95 s	56,2
3''-OCH ₃	3,96 s	56,5
3'''-OCH ₃	3,94 s	56,3
4''-OH	5,62 s	-
4'''-OH	5,60 s	

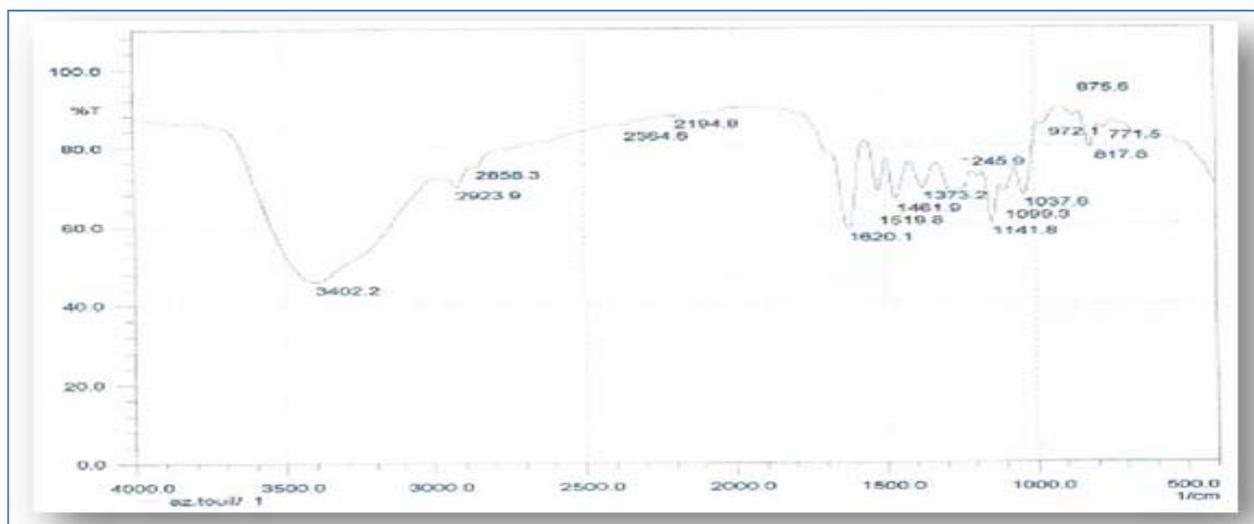
IV.7.18. Détermination structurale du composé 19



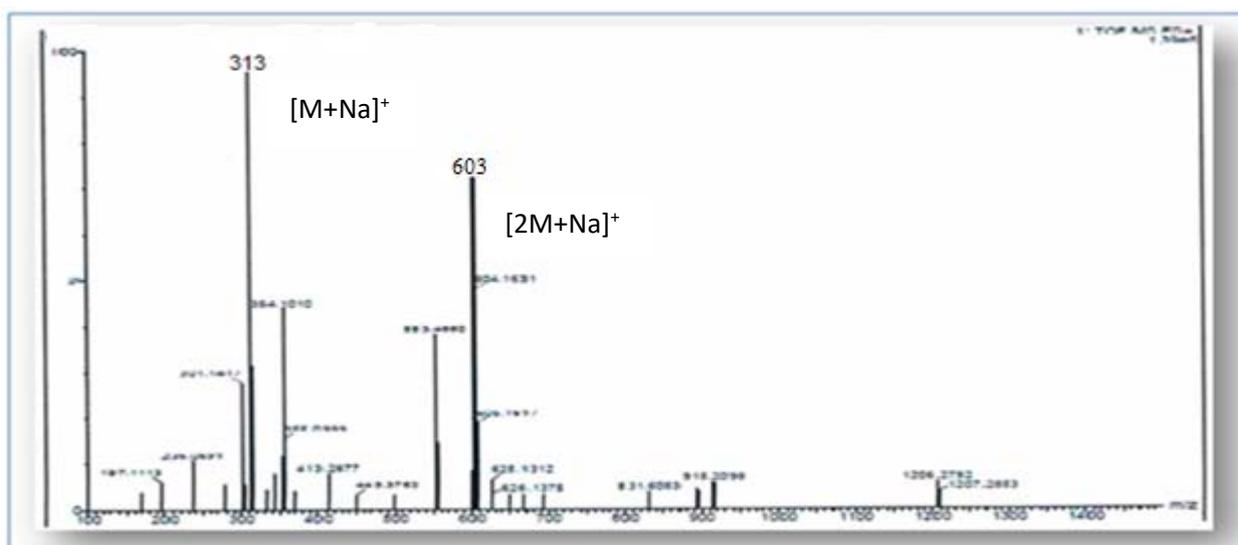
(-)-catéchine (**19**)

Le composé **19** se présente sous forme d'une poudre brune rougeâtre soluble dans le méthanol. Il est visible à la lumière UV à 254 et 366 nm se colorant en marron après pulvérisation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Son spectre IR (Figure III.19.1) indique des bandes d'absorption à 3402,2 cm⁻¹ correspondant au groupement hydroxyle. D'autres bandes d'absorption apparaissant à 1620 et 1519 cm⁻¹ suggérant l'existence d'un système aromatique.

Figure III.19.1: Spectre IR du composé **19**

Sur le spectre de masse en électrospray (ESI-MS) du composé **19** enregistré en mode positif, il est observé deux pics d'ions quasimoléculaires à $m/z = 313$ $[M+Na]^+$ et 626 $[2M+Na]^+$, indiquant une masse moléculaire de 290 uma et une formule brute en $C_{15}H_{14}O_6$ (Figure III.19.2).



doublets à δ_H 5,90 et 5,95 ($J = 2,1$ Hz), typiques d'un couplage en méta sur un cycle aromatique. Ces signaux sont caractéristiques du cycle A d'un flavonoïde substitué en C-5 et C-7 et peuvent être attribués aux protons H-8 et H-6 respectivement (Figure III.19.a). Ils corrélaient sur le spectre HSQC J -modulé (Figure III.19.5) avec les carbones résonant à 94,8 ppm (C-6) et 94,0 (C-8).

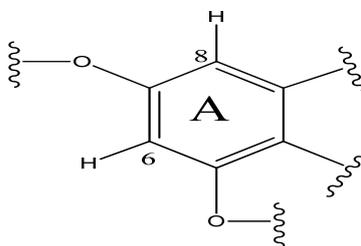


Figure III.19.a : Cycle A

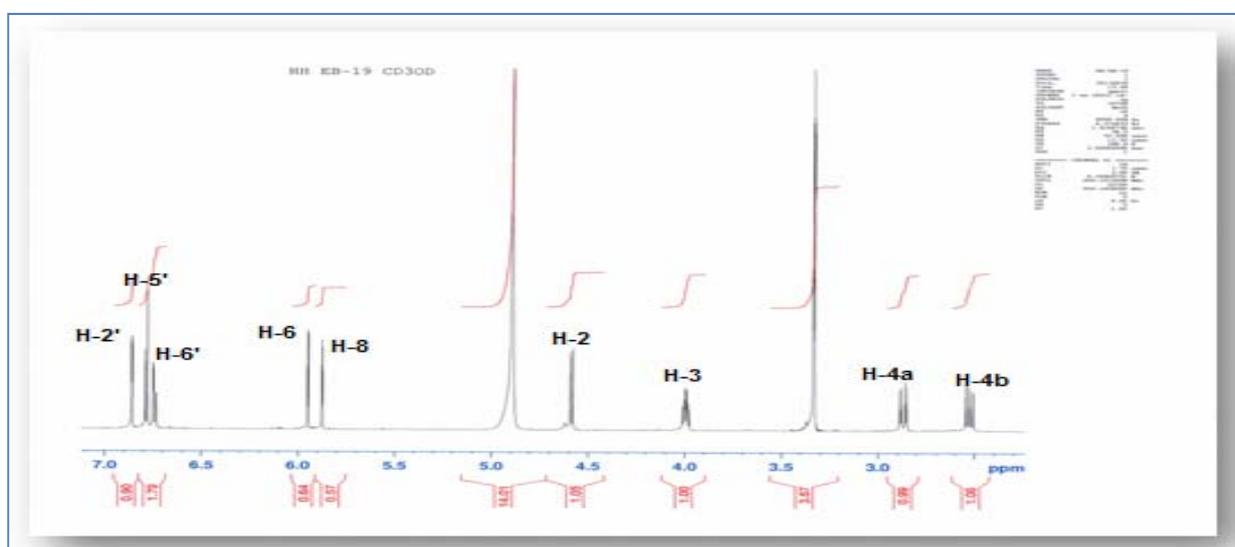
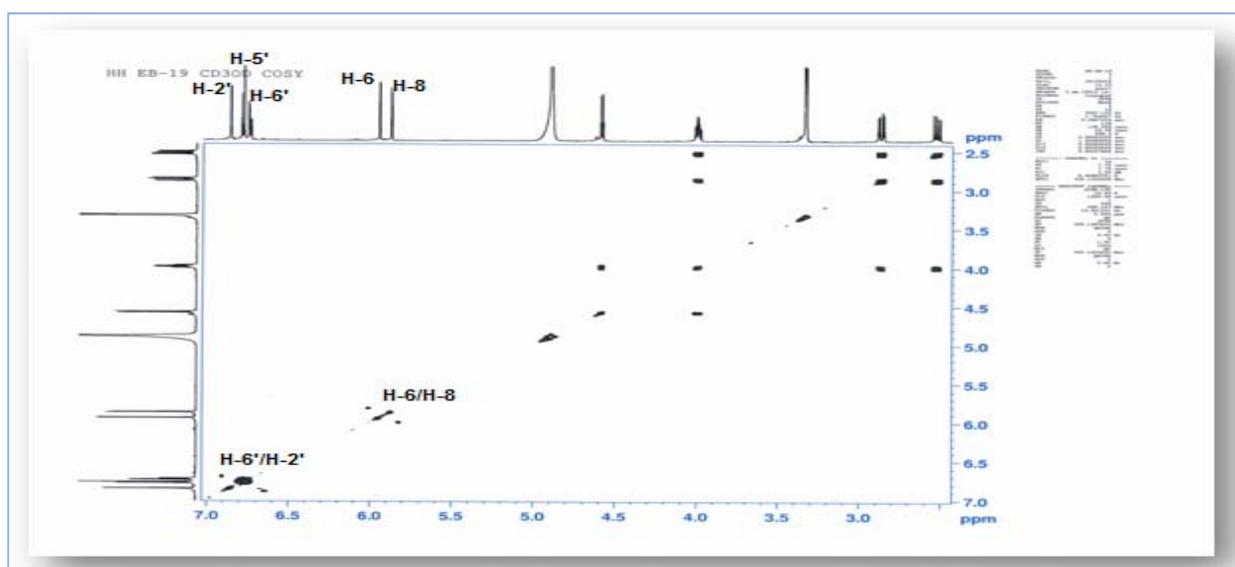
Figure III.19.3: Spectre RMN ^1H du composé **19**

Figure III.19.4: Partie du spectre COSY (cycle A et B)

Les signaux des protons du cycle B de ce flavonoïde sont visibles sur le spectre RMN ^1H (Figure III.19.3) entre 6,50 et 7,0 ppm. En effet, ce spectre révèle la présence de trois protons aromatiques à δ_{H} 6,89 (d, $J = 1,8$ Hz), 6,80 (d, $J = 8,1$ Hz) et 6,74 (dd, $J = 8,1, 1,8$ Hz) appartenant à un même système de spins selon le spectre COSY H-H (Figure III.19.4), dont les constantes de couplages indiquent qu'ils forment un système ABX sur le cycle B et que celui-ci est 1', 3', 4'-trisubstitué. Ces protons sont respectivement attribués à H-2', H-5' et H-6' (Figure III.19.b).

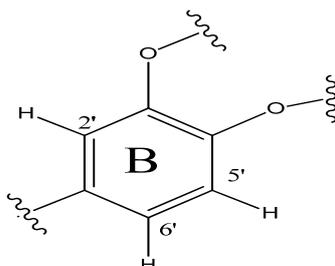
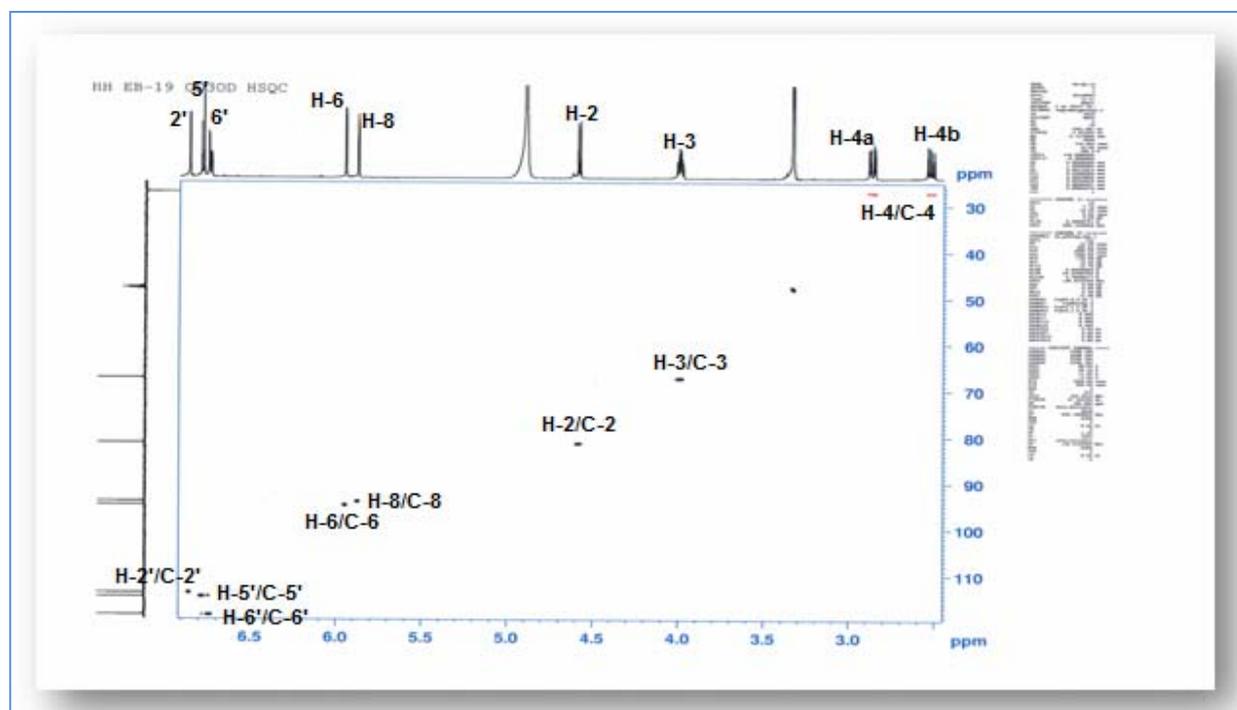


Figure III.19.b : Cycle B

L'expérience HSQC J -modulé (Figure III.19.5) permet de détecter les carbones C-2' (δ_{C} 114,8), C-5' (δ_{C} 114,6) et C-6' (δ_{C} 118,6).

Figure III.19.5: Spectre HSQC J -modulé du composé 19

En plus, le spectre de RMN ^1H (Figure III.19.6) révèle également les signaux suivants :

- Deux signaux à δ_{H} 2,54 et 2,85 sous forme de deux doublets dédoublés dont l'une des constantes de couplage $J = 16,0$ Hz est caractéristique d'un couplage géminel attestant de la présence de deux protons non équivalents d'un groupement méthylène.
- Un signal résonant δ_{H} 4,0 d'intégration 1H sous forme d'un doublet de doublets de doublets ($J = 8,2, 7,5, 5,4$ Hz).
- Un signal fortement déblindé à δ_{H} 4,60 sous la forme d'un doublet ($J = 7,5$ Hz).

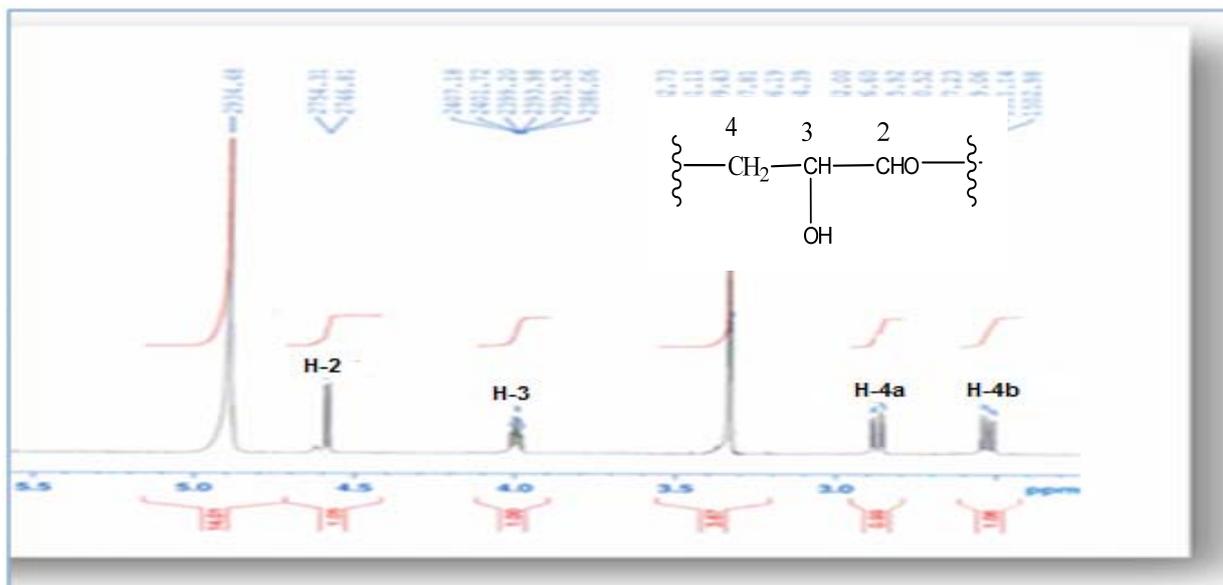


Figure III.19.6: Etallement du spectre RMN ^1H

L'analyse du spectre COSY (Figure III.19.7) permet d'attribuer ces protons à un même système de spins indiquant les couplages suivants : H-2 (4,60 ppm)/H-3 (4,0 ppm)/H-4a (2,85 ppm) et H-4-b (2,54 ppm)/H-4a.

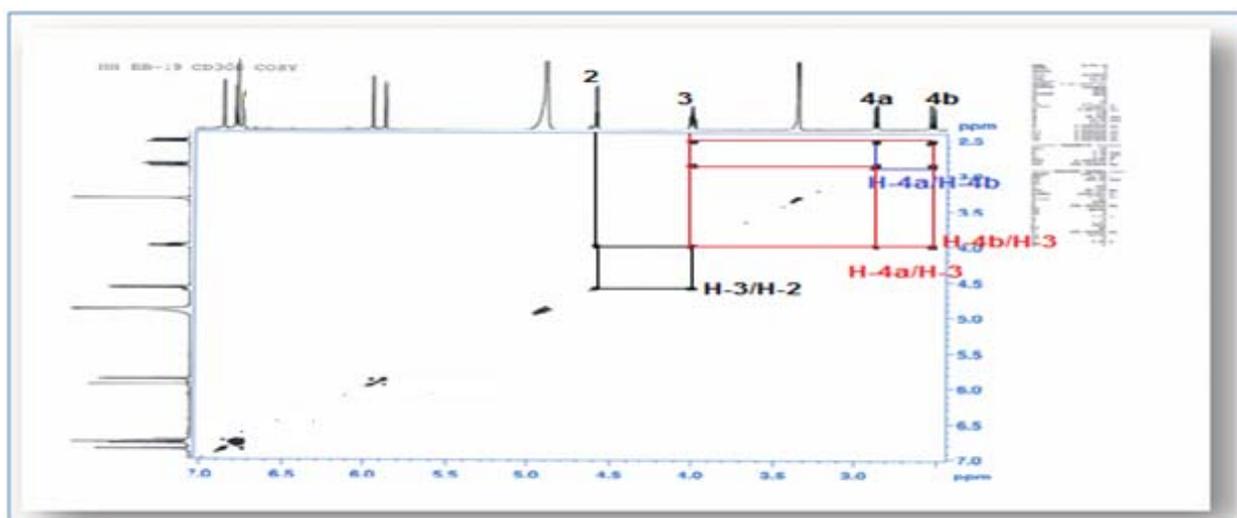


Figure III.19.7: Spectre COSY du composé 19

Le spectre HSQC *J*-modulé (Figure III.19.5) nous permet d'attribuer ces quatre signaux à un CH substitué par un hétéroatome (δ_c 81,4 C-2), un groupement hydroxyméthine CHOH (δ_c 67,4 C-3) et un groupement CH₂ (δ_c 27,1 C-4).

L'analyse du spectre RMN ¹³C découplé (Figure III.19.8) du composé **19** apporte des informations complémentaires en visualisant quinze signaux. Ces derniers se répartissant en sept carbones quaternaires aromatiques, cinq CH aromatiques que nous avons pu attribuer aux cycles A et B d'une flavane substituée en 5, 7, 3' et 4' et deux oxyméthines et un méthylène du cycle C.

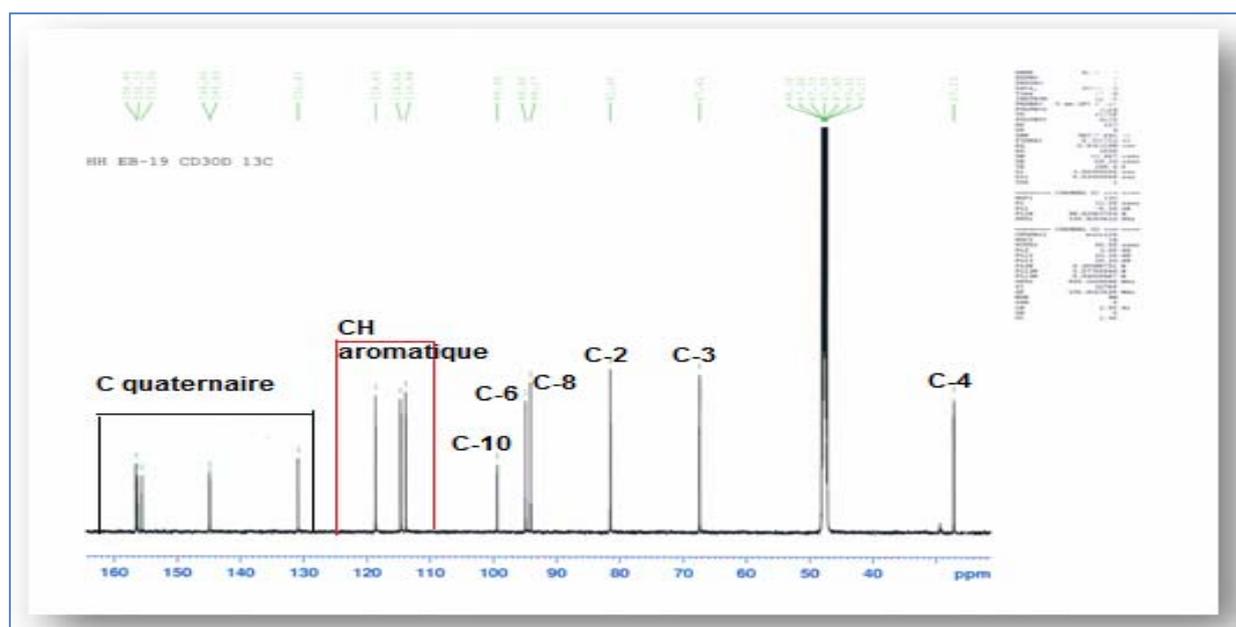


Figure III.19.8: Spectre RMN ¹³C du composé **19**

Les informations apportées par la spectrométrie IR et RMN du proton, permettent d'affirmer que le composé **19** présente les caractéristiques d'un flavonoïde sans groupement carbonyle, ce qui nous oriente vers une structure de type flavane (Figure III.19.9) substituée en position 3, c'est à dire une structure de type catéchine.

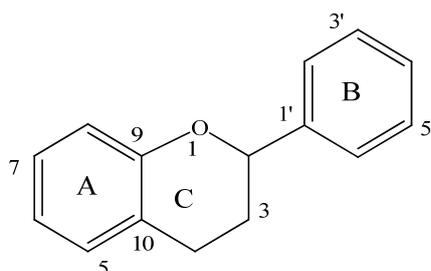


Figure III.19.9: Structure d'une flavane

L'analyse structurale du composé **19** peut débuter par les signaux des protons H-6 et H-8 déjà identifiés qui corrént dans l'expérience HMBC (Figures III.19.10 et III.19.11) en 3J avec un carbone aromatique quaternaire résonant à 99,3 ppm attribuable au carbone C-10 et en 2J avec un carbone quaternaire oxygéné repéré à 156,4 ppm qui ne peut être que le carbone C-7 (Figure III.19.10). Le déplacement chimique de ce dernier confirme qu'il est porteur d'un groupement OH.

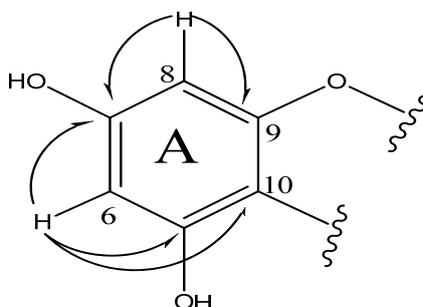


Figure III.19.10: Corrélations HMBC au niveau du cycle A

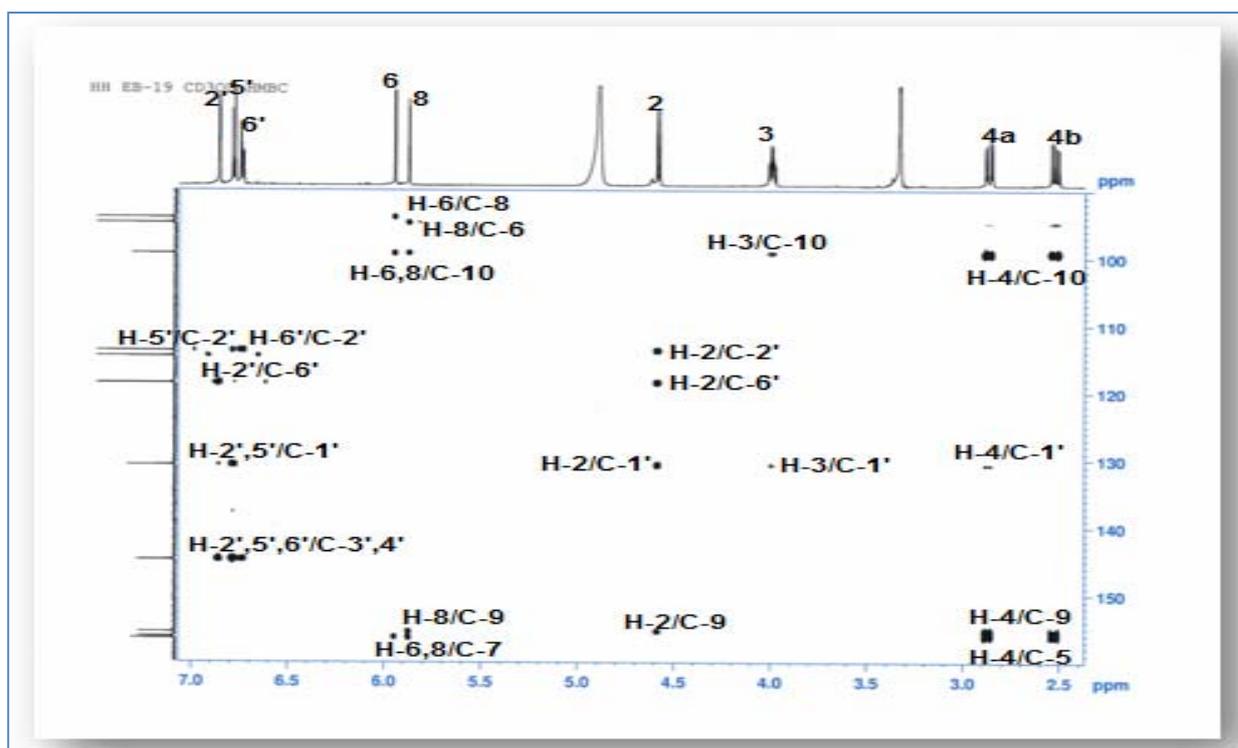


Figure III.19.11: Spectre HMBC du composé **19**

Les carbones oxygénés C-5 (δ_c 156,1) et C-9 (δ_c 155,5) présentent des corrélations en 2J (Figures III.19.11 et III.19.12) avec les protons H-6 et H-8 respectivement. Aussi, nous observons des corrélations entre les protons H₂-4 et le carbone quaternaire C-10 déjà identifié, ainsi qu'avec deux carbones oxygénés résonant à δ_c 81,4 (C-2) et 67,4 (C-3). Le déblindage du

carbone C-3 est expliqué par la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 [136-138]. Le proton hydroxyméthine H-3 corrèle en 3J avec un carbone aromatique quaternaire qui est le C-1' (130,8 ppm) du cycle B de la flavane.

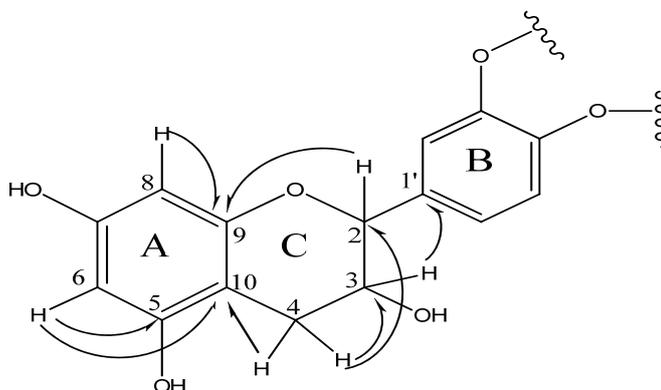


Figure III.19.12: Corrélations HMBC au niveau du composé **19**

Les protons H-2' et H-6' corrèlent en HMBC (Figures III.19.11 et III.19.13) avec quatre carbones dont trois appartenant au cycle B à 144,4 (C-3' et C-4'), 130,8 (C-1') et un carbone oxygéné correspondant au carbone C-2 déjà attribué.

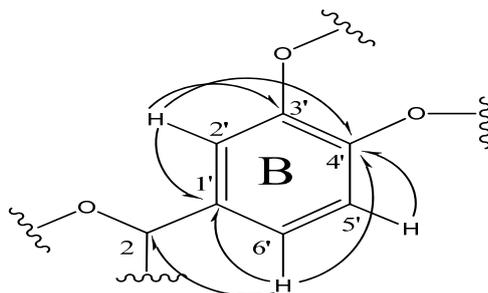


Figure III.19.13: Corrélations HMBC au niveau du cycle B

En l'absence des signaux de groupements méthoxyles, acyles et sucres et en tenant compte de la formule brute en $C_{15}H_{14}O_6$ déduite à partir du spectre de masse ESI-MS (Figure III.19.2) le composé **19** est donc de type catéchique substitué par des groupements hydroxyles en positions 5, 7, 3', 4' et 3 (Figure III.19.14).

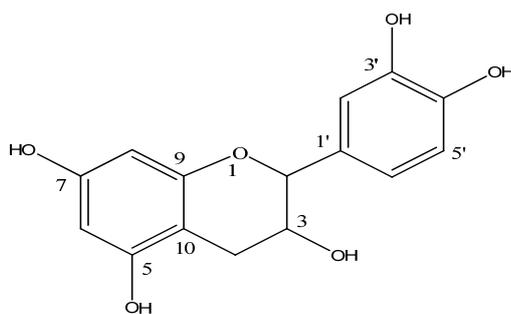
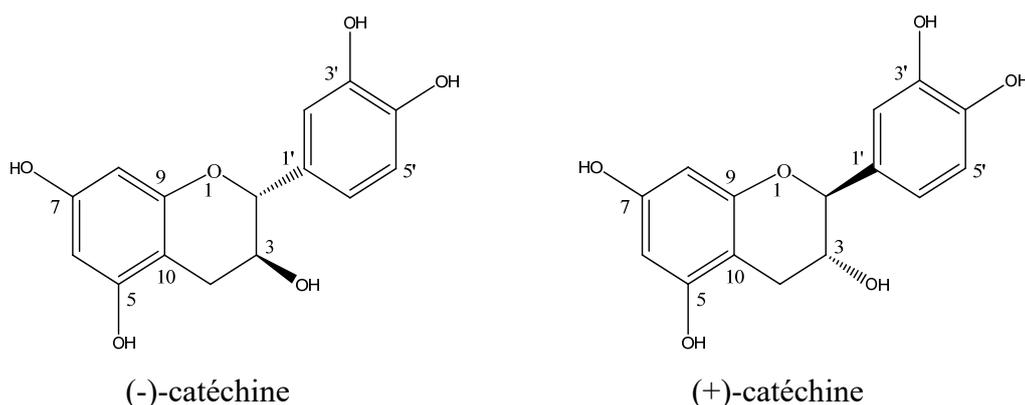


Figure III.19.14: Structure type catéchine

Il est à signaler que la catéchine se trouve dans la nature sous forme de deux énantiomères : (-)-catéchine et (+)-catéchine. La configuration relative au niveau des carbones asymétrique C-2 et C-3 est établie en analysant la valeur de la constante de couplage entre les protons H-2 et H-3 ($J_{H-2/H-3} = 7,5$ Hz). Cette valeur indique une position trans-diaxiale entre ces deux protons permettant ainsi d'identifier ce composé à la catéchine, ce qui nous permet de proposer les deux structures énantiomères suivantes :



La valeur négative du pouvoir rotatoire $-20,8^\circ$ (c 0,25 g/ml, MeOH) est également significative de la (-)-catéchine nommé également (2*R*,3*S*)-2-(3',4'-dihydroxyphenyl)chromane-3,5,7-triol. Ce composé a été déjà isolé dans l'espèce *Carapa guianensis* (Meliaceae) [139], *Jatropha macrantha* (Euphorbiaceae) [140] et *Centaurea stoebe* (Asteraceae) [141].

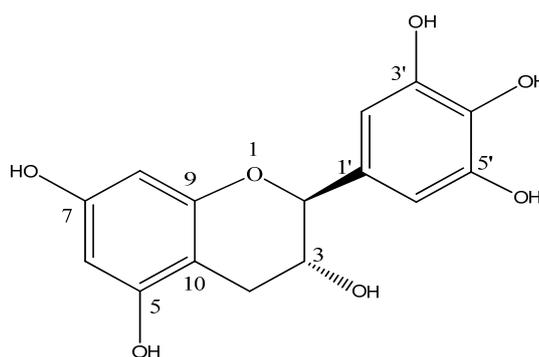
Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **19** sont donnés dans le tableau III.19.

Tableau III.19: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **19** dans CD₃OD.

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
2	4,6 d 7,5	81,4
3	4,0 ddd 8,2, 7,5, 5,4	67,4
4	2,54 dd 16,0, 8,2 H-4b 2,85 dd 16,0, 5,4 H-4a	27,1
5	-	156,1
6	5,95 d 2,1	94,8
7	-	156,4

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
8	5,90 d 2,1	94,0
9	-	155,5
10	-	99,3
1'	-	130,8
2'	6,89 d 1,8	114,8
3'	-	144,8
4'	-	144,8
5'	6,80 d 8,1	114,6
6'	6,74 dd 8,1, 1,8	118,6

IV.7.19. Détermination structurale du composé **20**



(-)-gallocatechine (**20**)

Le composé **20** est le (2*R*,3*S*)-2-(3',4',5'-trihydroxyphenyl) chromane-3,5,7-triol, une flavane nommée gallocatechine, obtenue sous forme d'une poudre brun rougeâtre soluble dans le méthanol. Il est visible à la lumière UV à 254 et 366 nm et se révèle en marron par pulvérisation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre IR du composé **20** montre des bandes d'absorption à 3500 cm⁻¹ (groupement hydroxyle), 1614 et 1530 cm⁻¹ (cycle aromatique).

Le spectre de masse ESI-MS du composé **20** obtenu en mode positif montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 329$ [M+Na]⁺, ce qui donne une masse moléculaire égale à 306 uma

correspondant à une formule brute en $C_{15}H_{14}O_7$, soit une différence de +16 uma par rapport au composé **19** déjà identifié.

Les spectres RMN 1H (Figure III.20.1), COSY (Figure III.20.2) et HSQC J -modulé (Figure III.20.3) du composé **20** présentent des similitudes avec ceux du composé **19** au niveau des cycles A et C. En effet, nous retrouvons facilement les signaux des protons à δ_H 5,92 (d, $J = 2,3$ Hz, H-6), 5,85 (d, $J = 2,3$ Hz, H-8) du cycle A et à δ_H 2,50 (dd, $J = 16,1, 7,5$ Hz, H-4b), 2,81 (dd, $J = 16,1, 5,5$ Hz, H-4a), 4,52 (d, $J = 7,3$ Hz, H-2) et 3,98 (ddd, $J = 7,5, 7,3, 5,5$ Hz, H-3) pour le cycle C.

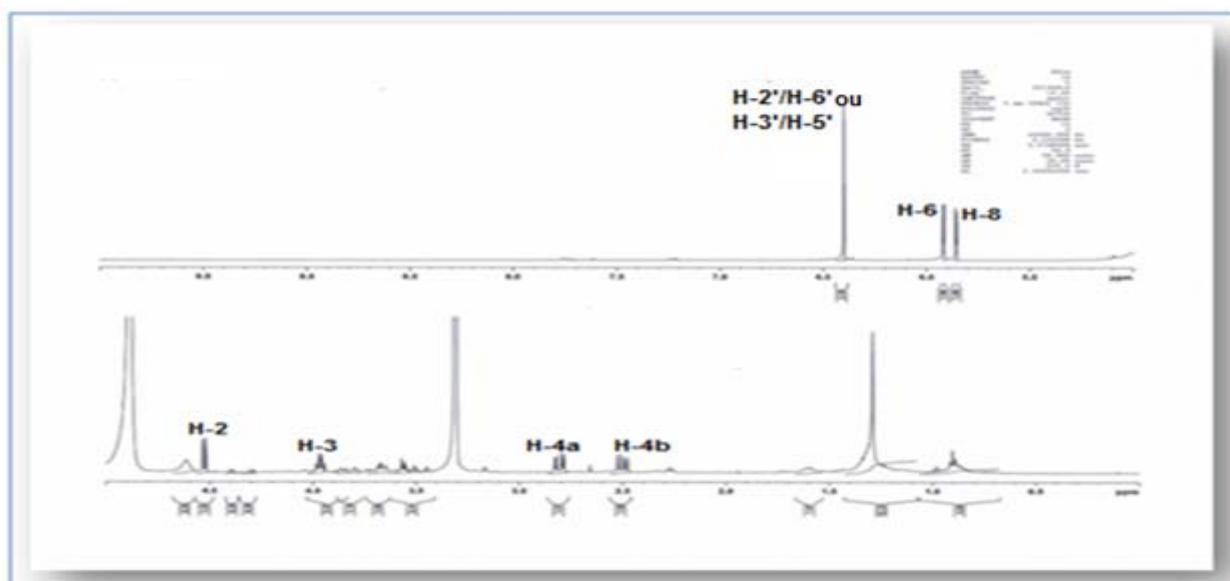


Figure III.20.1: Spectre RMN 1H du composé **20**

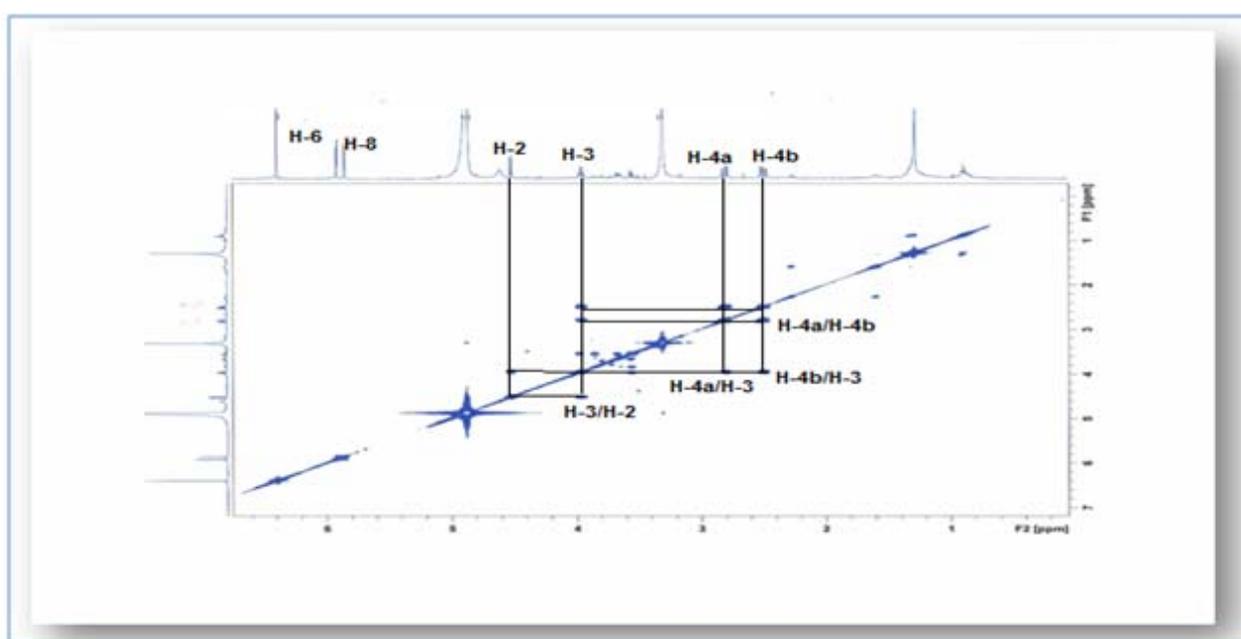


Figure III.20.2: Spectre COSY du composé **20**

L'analyse du spectre HSQC *J*-modulé (Figure III.20.3) permet de détecter leurs carbones à δ_c 83,0 (C-2), 68,9 (C-3), 28,2 (C-4), 96,3 (C-6) et 95,6 (C-8).

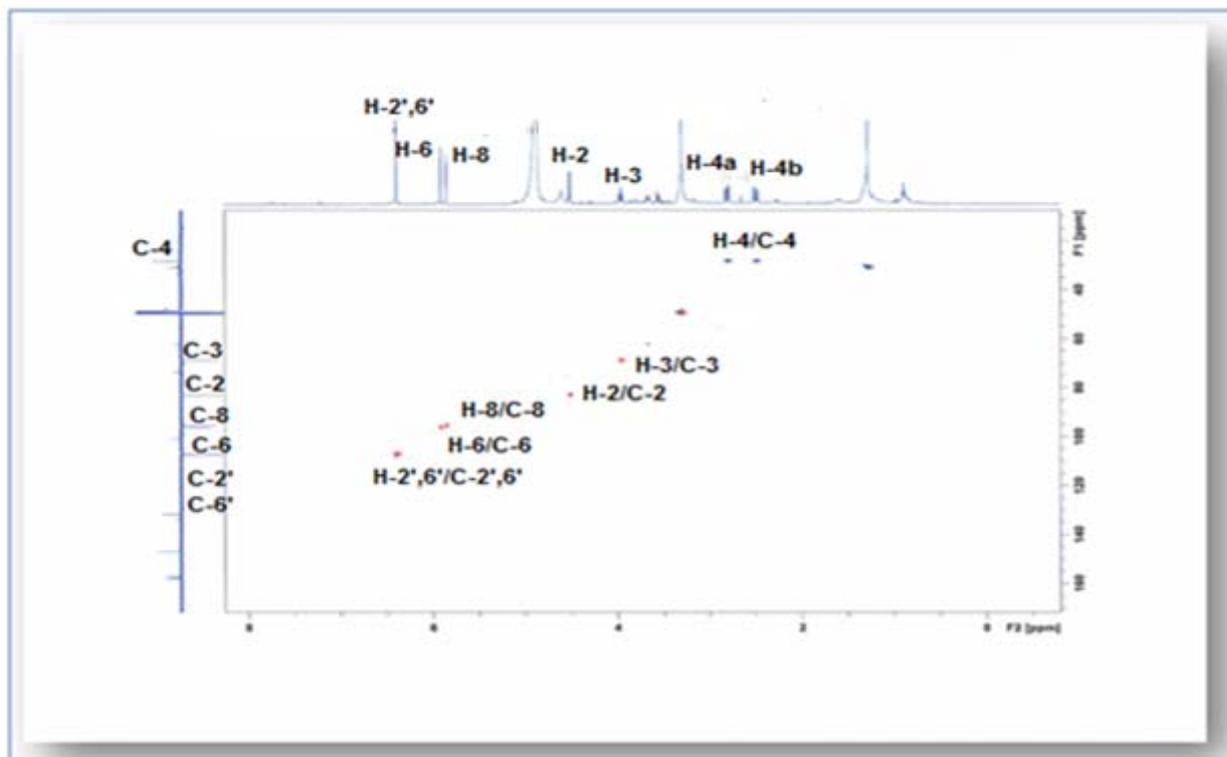


Figure IV.20.3: Spectre HSQC *J*-modulé du composé **20**

Les deux autres protons équivalents appartenant au second noyau aromatique (cycle B) résonnent à 6,40 ppm sous forme de singulet, ce qui permet de suggérer qu'ils sont entourés de carbones quaternaires et que le noyau B est symétrique (Figure III.20.4).

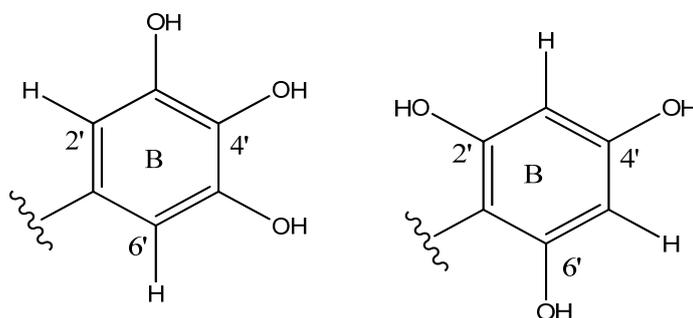


Figure III.20.4: Positions de substitution au niveau du cycle B

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (Figure III.20.5) révèle la présence de 13 signaux correspondant à 15 atomes de carbone se répartissant en C-2 (83,0 ppm), C-3 (68,9 ppm), C-4

(28,2 ppm), C-5 (157,7 ppm), C-6 (96,3 ppm), C-7 (157,9 ppm), C-8 (95,6 ppm), C-9 (156,9 ppm) et C-10 (100,8 ppm).

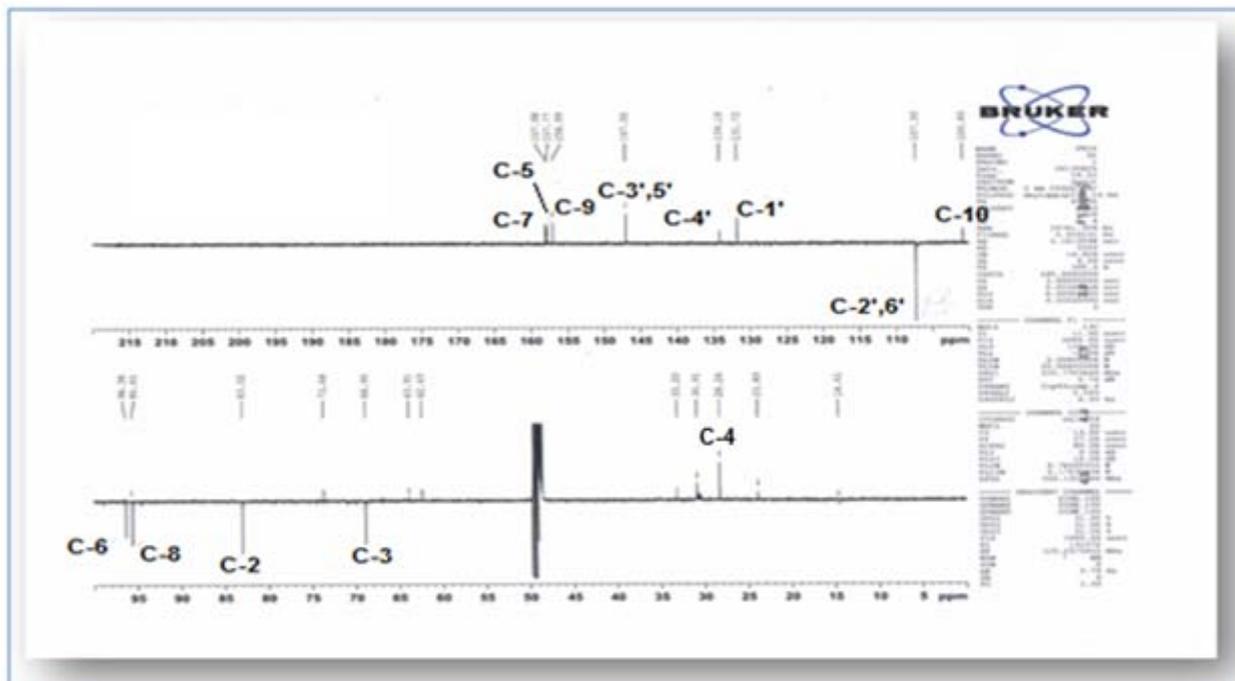


Figure III.20.5: Spectre RMN ^{13}C J -modulé du composé **20**

Le carbone oxygéné C-2 à 83,0 ppm présente sur le spectre HMBC (Figures III.20.6 et III.20.7) une tache de corrélation en 3J avec deux protons équivalents résonant à 6,40 ppm sous forme de singulet ne pouvant être que les protons H-2' et H-6' dont le carbone est repéré à 107,3 ppm selon le spectre HSQC J -modulé (Figure III.20.3). Ces deux protons montrent les corrélations en 2J et 3J avec les carbones résonant à δ_c 147,0 (C-3'), 134,1 (C-4'), 147,0 (C-5'), 131,7 (C-1') et 83,0 (C-2).

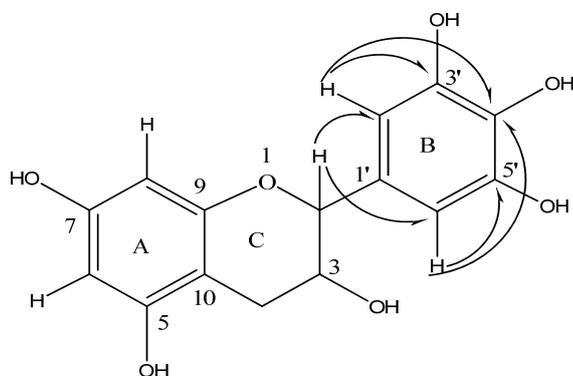
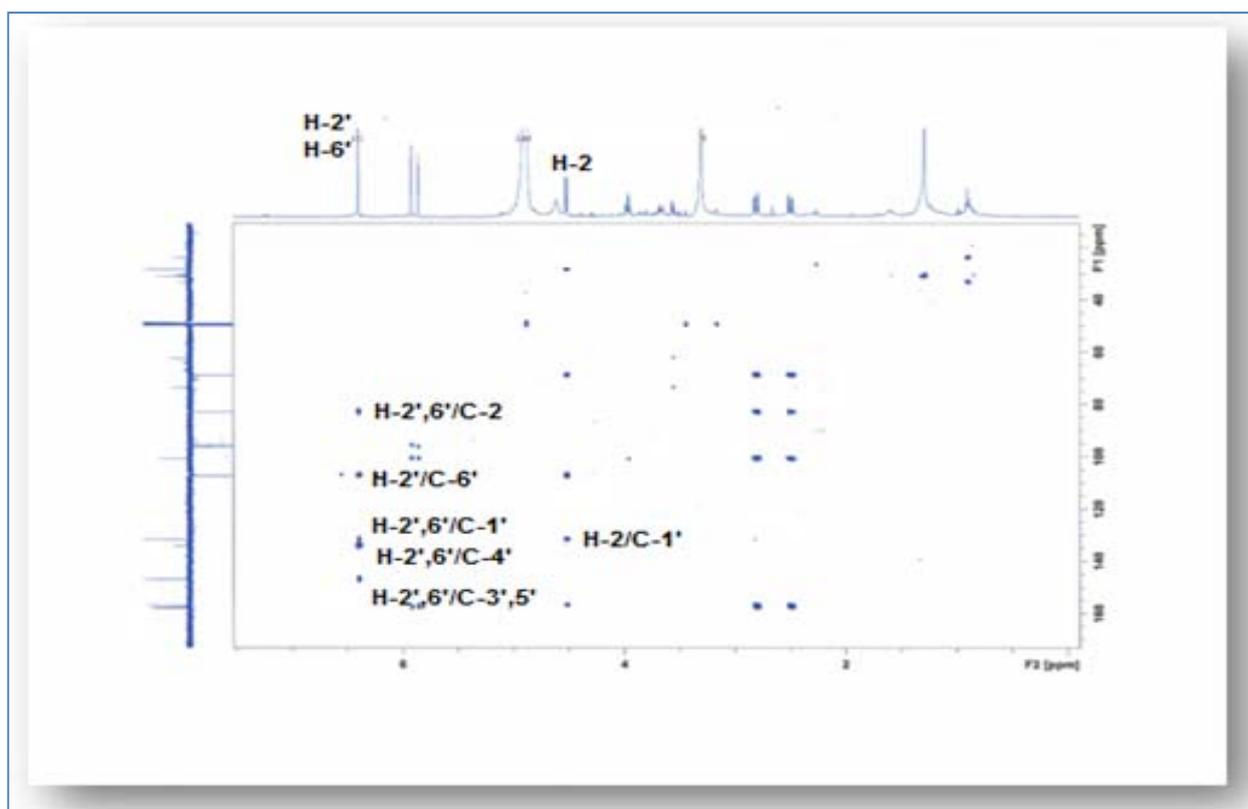


Figure III.20.6: Corrélations HMBC au niveau du cycle B

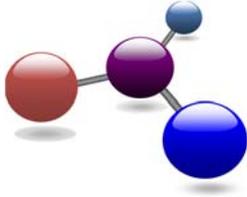
Figure III.20.7: Spectre HMBC du composé **20**

Toutes ces données spectroscopiques (Tableau III.20) et la valeur du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} = -22,5^\circ$ (c 0,42 mg/100 ml, MeOH) permettent d'attribuer pour le composé **20** la structure suivante: (2*R*,3*S*)-2-(3',4',5'-trihydroxyphenyl)chromane-3,5,7-triol appelé (-)-gallocatéchine. Ce composé a été identifié antérieurement dans l'espèce *Schisandra propinqua* var. *sinensis* [142] et *Camellia sinensis* [143].

Tableau III.20: Déplacements chimiques des protons et carbones du composé **20** dans MeOD.

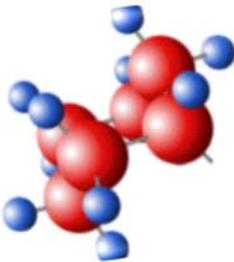
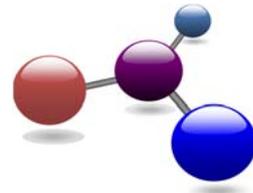
Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
2	4,52 d 7,3	83,0
3	3,98 dd 7,5, 7,3, 5,5	68,9
4	2,81 dd 16,1, 5,5 2,50 dd 16,1, 7,5	28,2
5	-	157,7
6	5,92 d 2,3	96,3
7	-	157,9

Position	δ_H (m, J Hz)	δ_C
8	5,85 d 2,3	95,6
9	-	156,9
10	-	100,8
1'	-	131,7
2'	6,40 s	107,3
3'	-	147,0
4'	-	134,1
5'	-	147,0
6'	6,40 s	107,3



Chapitre IV

Activité antibactérienne



IV. Activité antibactérienne

IV.1. Rappel

L'évaluation *in vitro* de l'activité antibactérienne a été réalisée par la technique de diffusion en milieu gélosé [144]. Les souches microbiennes utilisées sont trois espèces bactériennes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*). L'activité antimicrobienne est déterminée en terme de diamètre de la zone d'inhibition de croissance bactérienne produite autour des disques après incubation.

IV.2. Caractères généraux sur les souches étudiées

IV.2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie à Gram négatif (Figure IV.1). Elle a été découverte en 1885 par Theodor Escherich [145], dans des selles de chèvres, généralement commensal de tube digestif de l'homme et des animaux (dans l'intestin) [146]. Son enveloppe cellulaire est composée de deux membranes concentriques : les membranes internes et externes séparées par un gel aqueux le périplasme. Certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes, entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires et méningites [147].

IV.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa connu sous le nom de bacille pyocyanique ou bacille du pus bleu l'ancienne pourriture d'hôpital, isolé en 1882 par Gessar [145]. C'est une bactérie à Gram-négatif (Figure IV.1) du genre *Pseudomonas* [146], naturellement très résistante aux antibiotiques et s'adapte rapidement aux attaques médicamenteuses. Les formes de pathologie qu'elle engendre sont diverses : infection de l'œil, plaies (surtout brûlures et plaies opératoires), gastro-intestinales et des poumons (par exemple après bronchoscopie), méningites d'inoculation et septicémies...etc.

IV.2.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus découvert par pasteur en 1880 [145], est une bactérie à Gram positif (Figure IV.1) de forme sphérique (coque), de 0,8 à 1,0 µm de diamètre. C'est une bactérie non mobile [148]. Le *S. aureus* est très répandu dans la nature, il est commensal sur la peau et les muqueuses des organismes humains et animaux [146]. *S. aureus* possède des pouvoirs pathogènes à savoir infections cutanées-muqueuses, agents de septicémies et agents d'intoxication alimentaire.

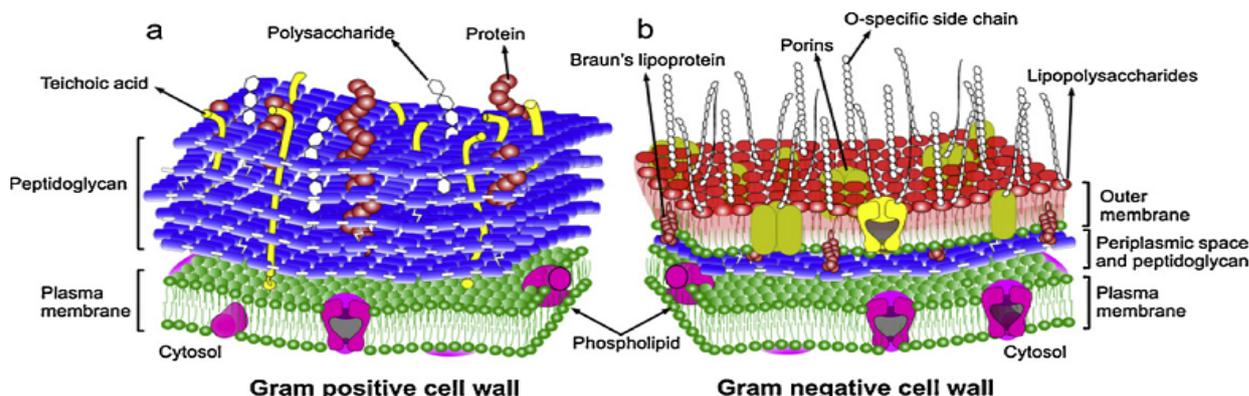


Figure IV.1: Aspect morphologique des bactéries (Gram positif et négatif) [149].

IV.3. Détermination de l'activité antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits (CH_2Cl_2 et AcOEt) de l'espèce *E. bupleuroides*, a été effectuée au Laboratoire central de microbiologie CHU de Batna, Faculté de médecine Université de Batna.

IV.3.1. Méthodes d'analyse

IV.3.1.1. Préparation des disques

Nous avons utilisé le papier Whatman N° 3 coupé en disque de 5 mm. Les disques, une fois préparés, sont placés dans un tube à essai.

IV.3.1.2. Préparation des solutions

1 g de chaque extrait (CH_2Cl_2 et AcOEt) de la plante est dissout dans une solution de 1 ml de DMSO, on appelle cette solution, la solution mère. A partir de la solution mère, on réalise une série de dilutions (Tableaux IV.1 et IV.2).

IV.3.1.3. Préparation de l'inoculum bactérien

Chaque souche a étéensemencée en stries sur une gélose non inhibitrice (gélose nutritive) pour obtenir des colonies isolées. Après incubation de 24 heures à 37 °C, 4 à 5 colonies ont été choisies avec une anse de platine puis transférées dans un tube de solution d'eau distillée stérile afin d'avoir une densité cellulaire initiale ou une turbidité voisine à celle de 0,5 McFarland. Cette comparaison est mesurée à l'aide d'un densitomètre.

IV.3.1.4. Ensemencement

L'écouvillon a été trempé pendant 15 minutes dans la suspension bactérienne et on a étalé la surface entière de la gélose contenue dans les boîtes de Pétri (Gélose Mueller Hinton) à trois reprises, en tournant la boîte à chaque application dont le but d'avoir une distribution égale et homogène de l'inoculum.

IV.3.1.5. Incubation

Les disques stériles imprégnés des concentrations croissantes d'extraits à raison de 10 µl par disque, ont été déposés stérilement à l'aide d'une pince sur la surface de la gélose. Des témoins imbibés seulement par le DMSO ont été réalisés. Les boîtes de Pétri ont été incubées durant 24 h à 37 °C.

IV.3.1.6. Lecture

- Pour chaque disque, on mesure le diamètre de la zone d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse ou d'une règle.

IV.4. Test de l'activité antibactérienne

Nous avons évalué l'activité antibactérienne des extraits par la méthode de diffusion en milieu gélosé, cette activité a été faite sur trois souches bactériennes de référence.

IV.4.1. Microorganismes

- **Souches bactériennes** : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- **Milieux de cultures** : Mueller-Hinton.
- **Matériels et solvants** : densitomètre, eau distillée, bouillons nutritif, disques stériles de 5 mm de diamètre.

IV.5. Expression des résultats

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits CH₂Cl₂ et AcOEt sont présentés dans les tableaux IV.1 et IV.2.

Tableau IV.1: Activité antibactérienne de l'extrait CH₂Cl₂

Extrait CH ₂ Cl ₂	Dilutions en g/ml							
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/132
<i>Esherichia coli</i> ATCC	12	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	6	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	19	10	7	-	-	-	-	-

(-) : pas d'inhibition



Inhibition de la croissance d'*Esherichia coli* par l'extrait CH₂Cl₂.



Inhibition de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* par l'extrait CH₂Cl₂.



Inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* par l'extrait CH₂Cl₂.

Tableau IV.2: Activité antibactérienne de l'extrait AcOEt

Extrait AcOEt	Dilutions en g/ml							
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/132
<i>Esherichia coli</i> ATCC	8	7	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonasaeruginosa</i> ATCC	12	10	8	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	28	24	18	16	14	13	9	6

(-) : pas d'inhibition



Inhibition de la croissance d'*Esherichia coli* par l'extrait AcOEt.



Inhibition de la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* par l'extrait AcOEt.

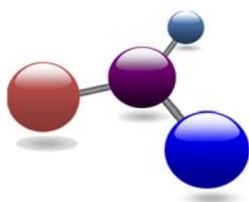


Inhibition de la croissance de *Staphylococcus aureus* par l'extrait AcOEt.

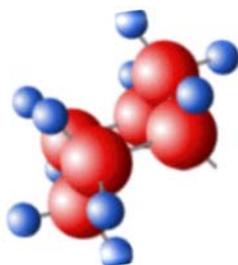
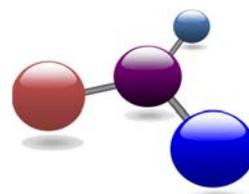
IV.6. Conclusion

D'après les résultats obtenus, on constate que l'extrait CH₂Cl₂ de la plante *Euphorbia bupleuroides* présente une faible activité antibactérienne contre les souches *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, tandis qu'il s'est révélé inactif contre *Pseudomonas aeruginosa* et ce quelque soit la dose utilisée.

On remarque que l'extrait AcOEt de cette plante présente une faible activité antibactérienne contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. Cet extrait révèle, d'importantes zones d'inhibition, quelque soit la concentration, sur la bactérie *Staphylococcus aureus*. Il en résulte que l'extrait AcOEt possède une forte activité antibactérienne vis-à-vis de la souche bactérienne *Staphylococcus aureus*.



CONCLUSION



Conclusion

L'objet de notre travail concerne l'investigation phytochimique de l'espèce *Euphorbia bupleuroides* Desf., espèce endémique à l'Algérie et appartenant à la grande famille Euphorbiaceae, ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits végétaux issus de cette plante. *Euphorbia bupleuroides* est utilisée dans la pharmacopée traditionnelle nord africaine pour extirper les épines et les verrues. La décoction des racines de cette plante est employée comme anti-inflammatoire. Cette investigation est considérée comme la première étude chimique entreprise sur cette plante.

L'étude phytochimique des racines de l'espèce *Euphorbia bupleuroides* a permis de mettre en évidence, par des techniques chromatographiques (VLC, CC et CPP) et spectroscopiques (UV, IR, RMN et ESI), 20 composés naturels appartenant à trois classes de métabolites secondaires que sont les diterpènes et triterpènes, très répandus dans le genre *Euphorbia* et les phénols. Ces composés se répartissent en :

- deux diterpènes de type phorbol dont un nouveau :
 - 4,20- dideoxy(4 α)phorbol-12-benzoate 13-isobutyrate (**1**) (nouveau);
 - Jolkinolide E (**2**);
- Deux triterpènes de type ergostane dont un nouveau:
 - 3 β ,7 β -dihydroxy-4 α ,14 α -diméthyl-8 β ,9 β -époxy-5 α -ergosta-24(28)-ène (**3**) (nouveau);
 - Obtusifoliol (**12**);
- Huit triterpènes cycloartane dont un nouveau:
 - 25-hydroperoxycycloart-3 β -ol (**4**) (nouveau);
 - 25-hydroperoxycycloart-23*E*-èn-3 β -ol (**5**);
 - 3 β -hydroxycycloart-25-èn-24-hydroperoxyde (**6**);
 - cycloart-23*Z*-ène-3 β ,25-diol (**7**) ;
 - cycloart-3 β ,24,25-triol (**8**);
 - cycloarténol (**9**);
 - 24-méthylènegycloartanol (**10**);
 - Cycloeucalénol (**11**);
- Deux phytostérols : β -sitostérol (**13**) et daucostérol (**14**);
- Deux coumarines
 - Scopolétine : 6-méthoxy-7-hydroxycoumarine (**15**);
 - Cleomiscosine C (**16**);
- Deux lignanes :

- Hedyotisol A (**17**);
- Hedyotisol B (**18**);
- Deux flavanes
 - (-)-Catéchine (**19**);
 - (-)-Gallocatéchine (**20**);

La séparation et purification des extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle des racines de *Euphorbia bupleuroides* ont été faites par l'utilisation des différentes méthodes chromatographiques: la chromatographie sur colonne de gel de silice normale, sur plaque préparative de silice normale et inverse et la chromatographie sur colonne de Séphadex LH-20.

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à la combinaison des différentes méthodes spectroscopiques RMN 1D (^1H , ^{13}C DEPT et ^{13}C *J*-modulé) et 2D (COSY, HSQC, HMBC, et NOESY), la spectrométrie de masse ESI-MS, l'UV, l'IR, la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$ et la comparaison avec les données de la littérature.

Il est important de signaler que le diterpène nouveau 4,20-dideoxy(4 α)phorbol-12-benzoate-13-isobutyrate (**1**) isolé dans le cadre de ce travail est un dérivé des esters de phorbol connus pour leur activité anti-tumorale [24,39,150]. Ce diterpène possède une stéréochimie H-4 α qui est rare pour ce genre de composé [9,84-87]. Ce composé constitue le 3^{ème} produit naturel avec cette configuration isolé du règne végétal.

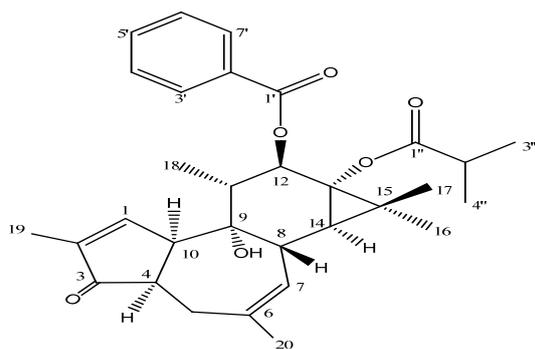
Il est intéressant de mentionner que les triterpènes cycloartane-hydroperoxydes 25-hydroperoxycycloart-23*E*-èn-3 β -ol (**5**) et 3 β -hydroxycycloart-25-èn-24-hydroperoxyde (**6**) ont été identifiés antérieurement des espèces *Aglaiia grandis* [111], *Cladophora fascicularis* [112] et *Xanthosoma robustum* [113]. Ils sont isolés pour la première fois dans genre *Euphorbia* à partir de l'espèce *Euphorbia cyparissias* [47]. Cette investigation constitue le deuxième rapport indiquant leur présence dans le genre *Euphorbia*.

Il est à noter que cette étude s'est soldée par l'identification de 14 triterpènes tétracycliques dont huit sont à squelette cycloartane considérés comme marqueurs chimiotaxonomiques du genre *Euphorbia*.

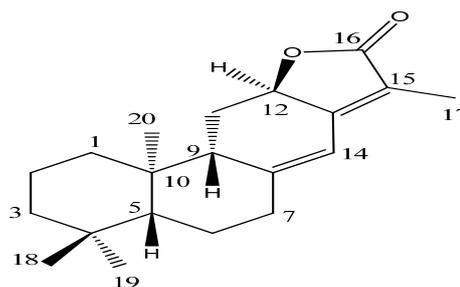
L'activité antibactérienne a été évaluée sur trois souches bactériennes de références par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats biologiques obtenus ont montré que l'extrait

CH₂Cl₂ de la plante *Euphorbia bupleuroides* révèle une faible activité antibactérienne contre les souches bactériennes testées, tandis que l'extrait AcOEt possède une forte activité sur la souche *Staphylococcus aureus*.

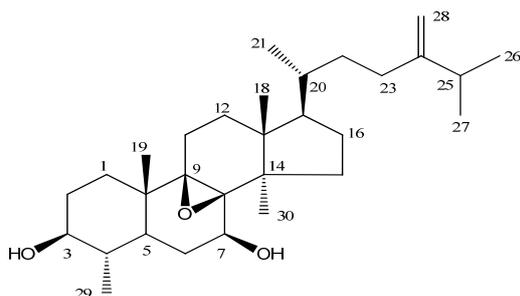
Les structures des composés isolés, à l'issue de cette investigation chimique, s'établissent comme suit :



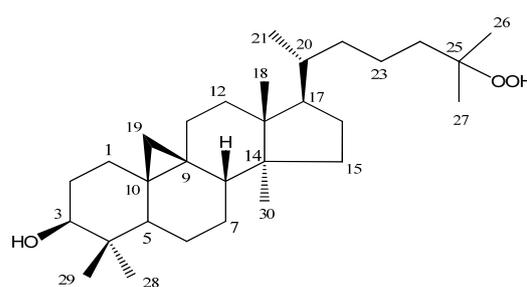
1



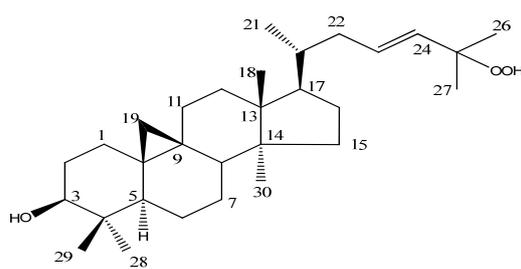
2



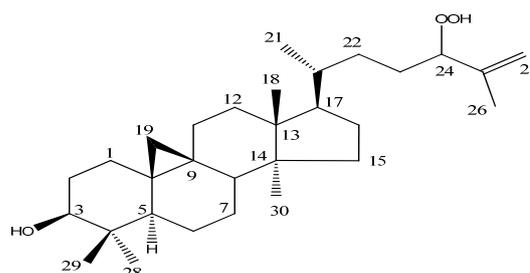
3



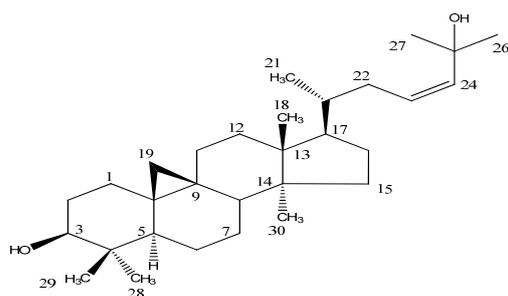
4



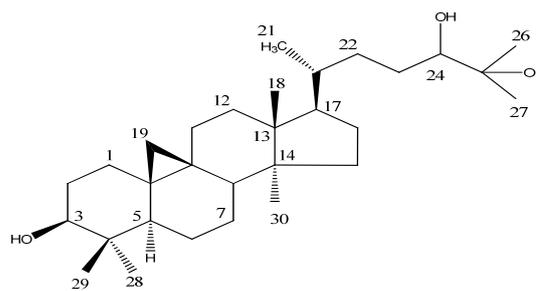
5



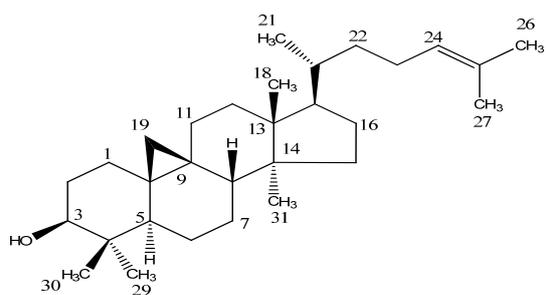
6



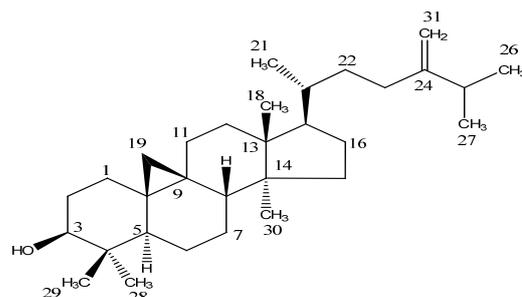
7



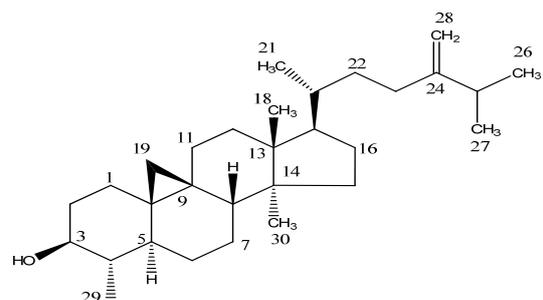
8



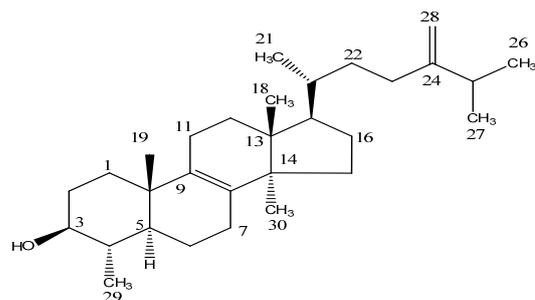
9



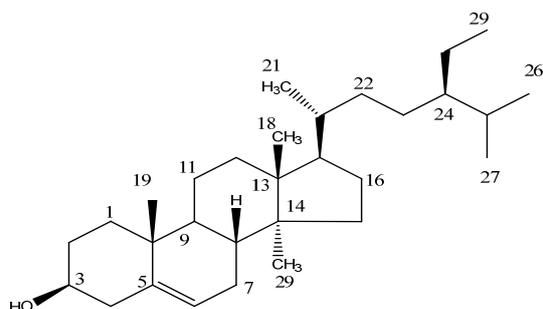
10



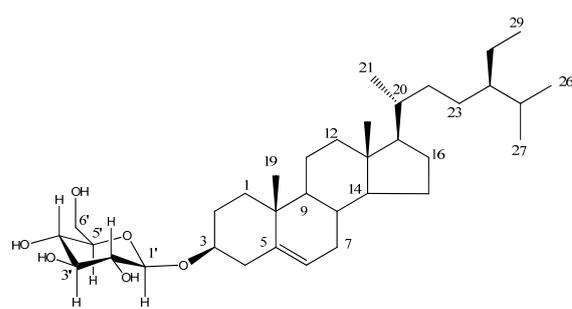
11



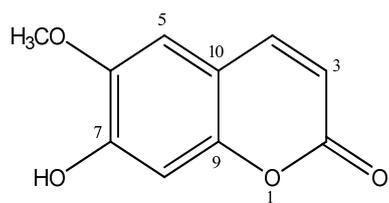
12



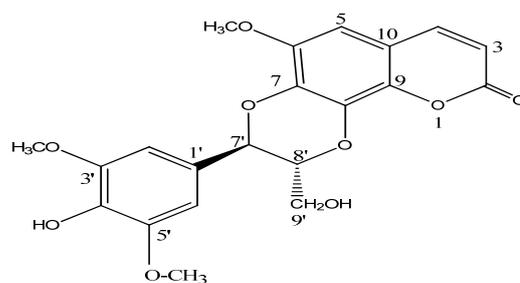
13



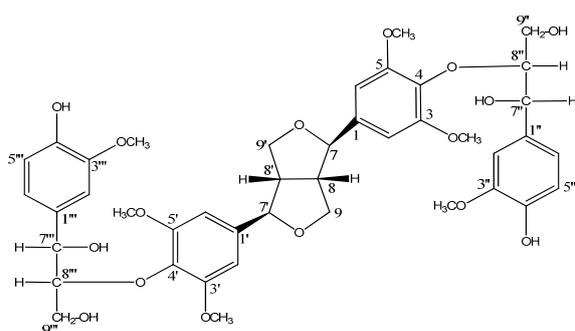
14



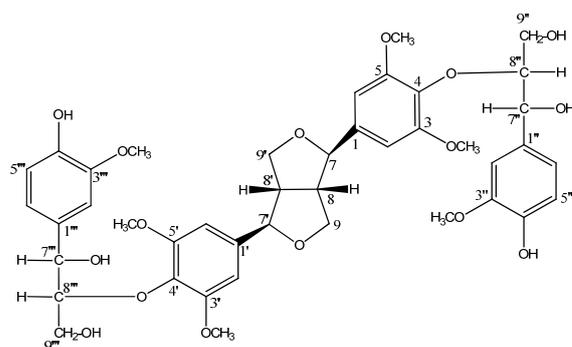
15



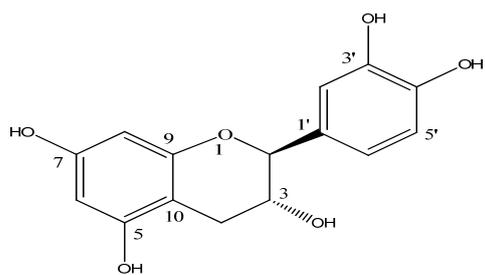
16



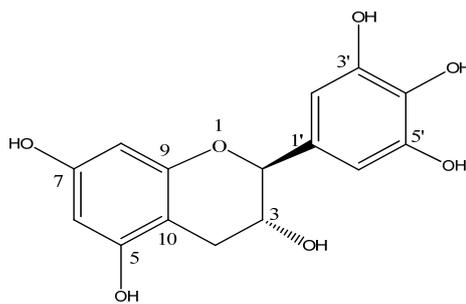
17



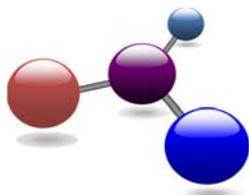
18



19

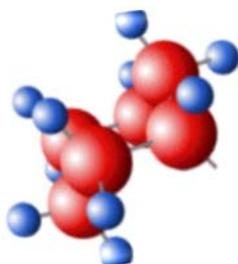
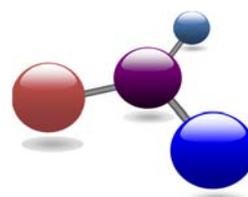


20



Chapitre V

Partie expérimentale



V.1. Matériels et appareillage

V.1.1. Récolte de la plante *Euphorbia bupleuroides*

La plante *Euphorbia bupleuroides* Desf. a été récoltée en Mai 2010 dans la localité de Chenaoura, wilaya de Batna. Elle a été identifiée par le professeur Bachir Oudjehih département d'agronomie de l'institut des sciences vétérinaires et agronomiques de l'université de Batna.

V.2. Techniques préparatives de séparation

V.2.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les CCM sont utilisées à chaque étape pour le suivi et le contrôle des purifications. Les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits suivis. Ces analyses sont réalisées en phase normale sur des plaques d'aluminium, Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck, 250 µm (10 ou 20 x 20 cm) et en phase inverse sur des plaques d'aluminium RP-18 (20 x 20 cm).

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. La phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type de séparation souhaitée. Le révélateur utilisé est 25 % H₂SO₄, 25 % acide acétique et 50 % eau.

V.2.2. Chromatographie liquide sous vide (VLC)

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

V.2.3. Chromatographie sur colonne ouverte (CC)

La taille et le diamètre de la colonne sont choisis en fonction de la quantité d'échantillon à purifier et de la résolution souhaitée. La quantité de la silice utilisée est généralement 30 à 40 fois supérieure à la quantité d'échantillon déposée.

La chromatographie d'exclusion stérique est réalisée sur Séphadex LH-20, en employant 30 fois le poids de l'échantillon à purifier. L'éluion est effectuée à pression atmosphérique. Les fractions recueillies sont regroupées selon les résultats de l'analyse par CCM.

V.3. Chimie structurale

V.3.1. Spectroscopie de RMN

Les spectres de RMN sont enregistrés sur un appareil BRUKER Avance DRX-600. Les microprogrammes BRUKER et le logiciel de traitement des données (XWIN-NMR 2.6) sont appliqués. Les solvants deutérés de solubilisation des produits pour la réalisation des spectres sont précisés à chaque fois. Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C sont enregistrés à 600 et 125 MHz respectivement.

V.3.2. Spectrométrie de masse

Deux méthodes d'ionisation sont utilisées pour réaliser l'analyse par spectroscopie de masse :

- Impact électronique (EI-MS) sur un appareil Maldimicro MX, micromasse walter.
- Electrospray (ESI-MS) sur un spectromètre Micromasse Q-TOF.

V.3.3. Spectrométrie UV-visible

Les techniques de spectroscopie UV-visible sont des méthodes simples et rapides qui fournissent des informations sur la nature chimique, les propriétés physico structurales, et les caractéristiques optiques des composés.

Les spectres UV-visible des composés isolés sont enregistrés dans le CHCl_3 et MeOH sur un spectrophotomètre UV KONTRON Logiciel UVS900Lite. Les mesures sont effectuées dans des cuves en quartz contenant 2 ml de solution.

V.3.4. Spectrométrie Infra-rouge (IR)

Les spectres IR ont été réalisés sur les produits préalablement mis sous forme de pastille de KBr ou de film de CCl_4 , sur un appareil à transformée de Fourier JASCO (FT/IR-4100), du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) de l'université de Batna.

V.3.5. Pouvoir rotatoire

Les pouvoirs rotatoires spécifiques sont mesurés sur un polarimètre électronique Perkin-Elmer 241 à 20 °C. La source de la lumière utilisée est la raie D du sodium (589 nm). La cuve employée est de 1 ml de volume et d'une longueur de 10 cm. Le solvant de solubilisation et la concentration sont indiqués dans chaque cas.

V.4. Etude de l'espèce *Euphorbia bupleuroides* Desf.

V.4.1. Extraction

Les racines de la plante *Euphorbia bupleuroides* préalablement séchées sont réduites en poudre. 800 g de cette dernière sont mis à macérer pendant trois jours (72 h) dans un mélange hydroalcolique éthanol-eau (70%- 30%). La filtration et l'évaporation à température ambiante donnent un extrait aqueux. La phase aqueuse obtenue (800 ml) est extraite 3 fois par l'éther de pétrole (3 x 400 ml), dichlorométhane (3 x 400 ml), acétate d'éthyle (3 x 400 ml) et *n*-butanol (3 x 400 ml). Les phases organiques récupérées sont séchées finalement sur sulfate de sodium Na_2SO_4 anhydre, suivies d'une filtration et évaporation à sec pour donner les extraits suivants : 4 g éther de pétrole, 8 g dichlorométhane, 10 g acétate d'éthyle et 28 g *n*-butanol.

L'investigation phytochimique a porté uniquement sur deux extraits préparés précédemment: dichlorométhane et AcOEt en raison de leur profil CCM révélant un nombre important de taches dans différents systèmes d'éluion chromatographiques (Figure V.1).

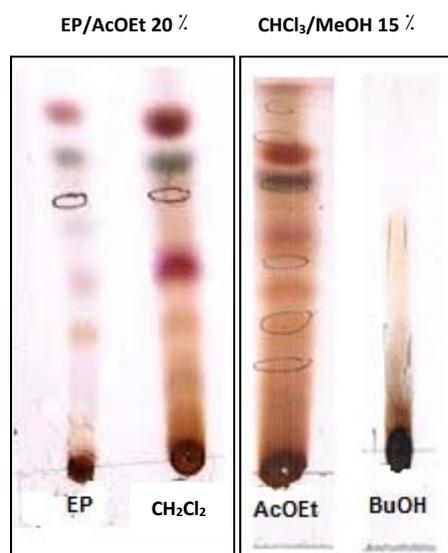


Figure V.1 : CCM des différents extraits des racines de la plante *E. bupleuroides*

V.4.2. Etude de l'extrait CH_2Cl_2 d'*E. bupleuroides*

La masse 7 g de l'extrait CH_2Cl_2 a été séparée par chromatographie liquide sous vide (VLC) sur gel de silice en phase normale. L'éluion a été réalisée par le mélange de solvants suivants : hexane/AcOEt puis AcOEt/MeOH. 30 fractions de 100 ml ont été collectées (Tableau V.1).

Tableau V.1: Fractionnement de l'extrait CH₂Cl₂

Fractions	Eluant de colonne	Observation sur CCM
1	Hexane (200 ml) Hexane-AcOEt	Néant
2	99-1 (100 ml)	"
3	97-3 (200 ml)	"
4	95-5 (200 ml)	"
5	90-10 (200 ml)	2 taches
6	80-20 (200 ml)	"
7	"	3 taches
8	70-30 (100 ml)	3 taches + traînée
9	"	2 taches + traînée
10	"	"
11	60-40 (100 ml)	plusieurs taches + traînée
12	"	"
13	50-50 (100 ml)	traînée
14	"	"
15	40-60 (200 ml)	"
16	30-70 (100 ml)	"
17	20-80 (100 ml)	tache + traînée
18	10-90 (200 ml)	"
19	AcOEt (100 ml)	traînée
20	AcOEt (100 ml)	"
21	AcOEt/MeOH	"
22	99-1 (200 ml)	"
23	97-3 (200 ml)	"
24	95-5 (200 ml)	"
25	90-10 (200 ml)	"
26	80-20 200 ml)	Tache + traînée
27	70-30 (100 ml)	"
28	60-40 (100 ml)	néant
29	50-50 (100 ml)	"
30	40-60 (100 ml)	"
31	MeOH (200 ml)	"

L'examen en chromatographie sur couche mince CCM des fractions récupérées puis révélation par l'acide sulfurique-acide acétique-eau : 25/25/50 (v/v/v) et chauffage à 100 °C, permettent de rassembler les fractions obtenues en 17 fractions majoritaires **F1** à **F17** (Tableau V.2).

Tableau V.2: Rassemblement des différentes fractions de la VLC de l'extrait CH₂Cl₂

Fractions	Fractions collectées	Masse en mg	Observation sur CCM
F1	1-4	3,7	Néant
F2	5-6	223	2 taches
F3	7	518,1	"
F4	8	623,1	4 taches
F5	9-10	561,7	4 taches+ traînée
F6	11-12	307,7	Plusieurs taches+ traînée
F7	13-14	124,0	"
F8	15-16	195,4	2 taches+ traînée
F9	17-18	249,2	4 taches+ traînée
F10	19-21	98,0	"
F11	22	79,5	Plusieurs taches+ traînée
F12	23	122,5	"
F13	24	269,5	"
F14	25	451,4	"
F15	26	131,2	traînée
F16	27	46,4	"
F17	28	52,9	"

V.4.2.1. Purification des produits de l'extrait CH₂Cl₂

❖ Etude de la fraction F4

La fraction **F4** (623,1 mg) a été chromatographiée sur une colonne de gel de silice normale SiO₂. L'élution a été réalisée par l'hexane puis un gradient hexane/AcOEt. Ce qui permet d'obtenir 17 sous fractions (Tableau V.3).

Tableau V.3: Rassemblement des sous fractions de la fraction F4

Sous fractions	Eluant de la colonne	Fractions collectées	Masse en mg
F4-1	Hexane-AcOEt 97-3	7-24	95
F4-2	95-5	25-48	202
F4-3	97-3	49-55	33
F4-4	"	56-60	6,1
F4-5	95-5	61-70	12,8
F4-6	"	71-96	50,5
F4-7	93-7	97-102	20,6
F4-8	"	103-110	19,3
F4-9	"	111-116	50
F4-10	90-10	117-130	24,1
F4-11	"	131-136	38,6
F4-12	"	137-143	12
F4-13	85-15	144-150	10,3
F4-14	"	151-160	6,6
F4-15	"	161-170	7,2
F4-16	70-30	171-180	3,9
F4-17	"	180-190	10

La sous fraction **F4-1** (95 g, éluée par un mélange hexane/AcOEt 97:3) a été purifiée sur une colonne de gel de silice en phase normale en utilisant comme éluant hexane/AcOEt (99:1; 97:3 et 95:5) pour donner deux produits : 27 g de 24-méthylèncycloartanol **10** (élution 97:3) (Figure V.2) et 10 g de β -sitostérol **13** (élution 95:5).

Hexane/AcOEt 15%

Figure V.2: CCM du composé **10**

La sous fraction **F4-3** (33 mg, éluée par hexane/AcOEt 97:3) soumise à une purification sur plaques préparatives de silice en phase inverse RP-18 dans le système d'éluion MeOH: H₂O (90:10), aboutit au composé **1** (3,4 mg) (Figure V.3).

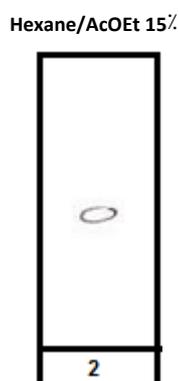


Figure V.3: CCM du composé **1**

La sous fraction **F4-9** (50 mg, éluée par hexane/AcOEt 93:7) est fractionnée sur une colonne de gel de silice normale avec le gradient d'éluion éther de pétrole/acétone (99:1 ; 97:3 et 95:5) pour donner 5 fractions (Tableau V.4).

Tableau V.4: Rassemblement des sous fractions de la fraction F4-9

Sous fractions	Eluant de la colonne	Fractions collectées	Masse en mg
F4,9-1	EP-Acétone 99-1	1-6	3
F4,9-2	"	13-24	2,3
F4,9-3	97-3	25-40	5,1
F4,9-4	"	41-46	20
F4,9-5	95-5	47-52	18

Une chromatographie préparative sur CCM de silice en phase inverse RP-18 est réalisée sur la fraction **F4,9-4** (20 mg, éluée par éther de pétrole/acétone 97:3) en utilisant comme éluant le méthanol. 3,1 mg à l'état pur du produit **2** ont été isolés (Figure V.4).

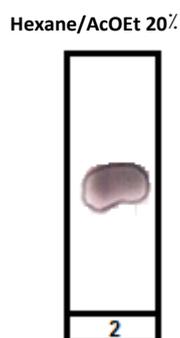


Figure V.4 : CCM du composé **2**

La sous fraction **F4,9-5** (18 mg, éluée par éther de pétrole/acétone 95:5) montrant après révélation de sa CCM une large tache verte a subi une chromatographie sur colonne de gel de silice avec le même système d'éluant, conduisant au mélange de deux produits cycloeucaléno **11** et obtusifoliol **12** (7,4 mg) (Figure V.5).

Hexane/AcOEt 20%



Figure V.5 : CCM du mélange des deux composés **11** et **12**

❖ Etude de la fraction **F5**

La fraction **F5** de la VLC (561,7 mg) est chromatographiée sur une colonne de gel de silice normale en utilisant comme éluant hexane/AcOEt (100:0 à 0:100). Après séparation et rassemblement des fractions à profils chromatographiques similaires, 16 sous fractions ont été obtenues (Tableau V.5).

Tableau V.5: Rassemblement des sous fractions de la fraction **F5**

Sous fractions	Eluant de la colonne	Fractions collectées	Masse en mg
F5-1	Hexane-AcOEt 99-1	11-17	4,3
F5-2	97-3	18-19	6
F5-3	"	20-26	13,1
F5-4	"	27-36	17,2
F5-5	"	37-40	21,4
F5-6	"	43-77	33,5
F5-7	95-5	78-96	24,3
F5-8	93-7	97-108	44,5
F5-9	"	109-119	148
F5-10	"	120-130	8,2

F5-11	"	131-137	11,3
F5-12	"	138-150	14,2
F5-13	90-10	151-181	23
F5-14	"	161-170	7,2
F5-15	85-15	171-180	64
F5-16	"	180-190	10

Une chromatographie sur colonne de gel de silice effectuée sur la fraction **F5-9** (148 mg, éluee par hexane/AcOEt 93:7) en utilisant comme éluant le même système de solvants a permis d'isoler deux composés **4** (2,4 mg) et **5** (3,2 mg) (Figure V.6).

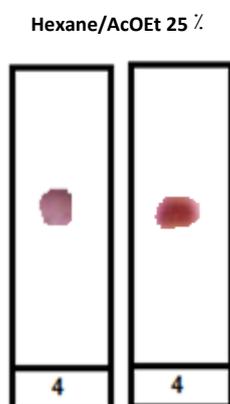


Figure V.6 : CCM des deux composés **4** et **5**

La sous fraction **F5-13** (23 mg) a subi une purification par précipitation dans le chloroforme en conduisant au produit **7** (3,7 mg) (Figure V.7).

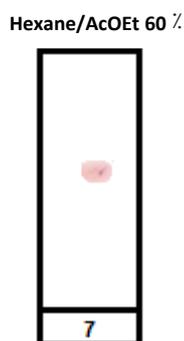


Figure V.7 : CCM du composé **7**

La sous fraction **F5-15** (64 mg, éluee par hexane/AcOEt 85:15), a été purifiée sur colonne de Séphadex LH-20. L'élution a été menée par le dichlorométhane pour donner le composé **6** (2,8 mg) (Figure V.8).

Hexane/AcOEt 60%



Figure V.8 : CCM du composé 6

❖ Etude des fractions F6 et F7

Les deux fractions **F6** et **F7** de la VLC combinées (432,7 mg) ont été fractionnées sur colonne de gel de silice avec l'éluant hexane/AcOEt (100:0 à 0:100) en conduisant à 17 sous fractions (Tableau V.6).

Tableau V.6: Rassemblement des sous fractions des fractions F6 et F7 réunies

Sous fractions	Eluant de la colonne	Fractions collectées	Masse en mg
F6,7-1	Hexane-AcOEt 99-1	15-19	3,1
F6,7-2	97-3	20-26	11,5
F6,7-3	"	27-66	12,1
F6,7-4	95-5	67-70	10,2
F6,7-5	"	71-80	12,7
F6,7-6	93-7	81-96	15,5
F6,7-7	90-10	96-106	14,3
F6,7-8	85-15	107-120	44,5
F6,7-9	"	121-130	26,1
F6,7-10	80-20	131-140	45
F6,7-11	"	141-152	13,3
F6,7-12	70-30	153-160	23
F6,7-13	"	161-180	20,3
F6,7-14	40-60	181-196	16,7
F6,7-15	50-50	197-200	8,6

F6,7-16	30-70	201-215	15,2
F6,7-17	10-90	216-222	12,3

Une chromatographie sur plaque préparative de silice en phase inverse RP-18 (éluant : MeOH/H₂O : 90 :10) effectuée sur la fraction **F6,7-10** (45 mg) a permis d'obtenir les deux composés **3** (3,3 mg) et **9** (5,5 mg) (Figure V.9).

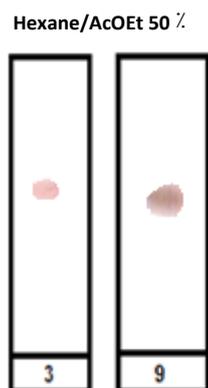


Figure V.9 : CCM des composés **3** et **9**

La sous fraction **F6,7-12** (23 mg, élue par hexane/AcOEt : 70:30) soumise à une purification sur plaque préparative de silice en phase inverse RP-18 dans le système d'élution MeOH, fournit le composé **8** (2,7 mg) (Figure V.10).

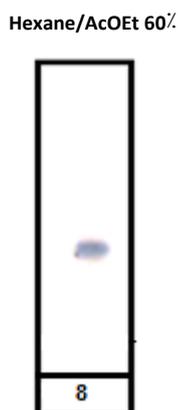


Figure V.10 : CCM du composé **8**

❖ Etude de la fraction **F8**

La fraction **F8** (195 mg) de la VLC contient un seul produit majoritaire donne, après purification sur une colonne de sephadex LH-20 élue par le dichlorométhane, le composé **15** (2,3 mg) (Figure V.11).

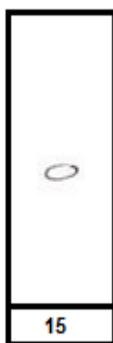
CHCl₃/MeOH 5 %

Figure V.11 : CCM du composé 15

❖ Étude des fractions F9 et F10

Les deux fractions **F9** et **F10** de la VLC regroupées (347 mg) sont soumises à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale éluee avec un gradient ether de pétrole/AcOEt : 100-0 à 0-100. Des fractions de 10 ml sont recueillies et regroupées pour donner 11 sous fractions (Tableau V.7).

Tableau V.7: Rassemblement des sous fractions des fractions F9 et F10

Sous fractions	Eluant de la colonne	Fractions collectées	Masse en mg
F9,10-1	EP-AcOEt 80-20	8-18	5,7
F9,10-2	70-30	19-32	27,7
F9,10-3	"	33-39	18,4
F9,10-4	40-60	40-49	10,2
F9,10-5	"	50-66	12,7
F9,10-6	"	67-70	5,5
F9,10-7	"	71-81	20
F9,10-8	50-50	82-100	65,5
F9,10-9	"	101-121	26,1
F9,10-10	20-80	122-130	45
F9,10-11	10-90	131-145	25,2

La sous fraction **F9,10-7** (20 mg, éluée par éther de pétrole/AcOEt 40:60) fait l'objet d'une purification sur plaques préparatives de gel de silice normale dans le système de solvants $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (90:10). Elle permet l'isolement du composé **16** (3,3 mg) (Figure V.12).

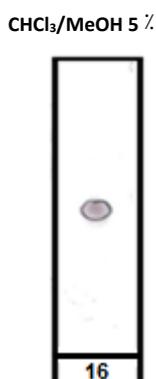


Figure V.12 : CCM du composé **16**

❖ Etude des fractions **F11** et **F12**

Les deux fractions **F11** et **F12** de la VLC sont réunies (202 mg) puis chromatographiées sur colonne de gel de silice normale. L'éluion a été effectuée par hexane/AcOEt (70:30 ; 50:50 ; 30:70 ; 10:90 et 0:100). Ce qui permet d'obtenir 8 sous fractions (Tableau V.8).

Tableau V.8: Rassemblement des sous fractions des fractions **F11** et **F12**

Sous fractions	Eluant de la colonne	Fractions collectées	Masse en mg
F11,12-1	Hexane-AcOEt 70-30	23-59	8,5
F11,12-2	"	60-68	4,6
F11,12-3	50-50	69-92	12,8
F11,12-4	"	93-110	5,4
F11,12-5	30-70	111-128	16,6
F11,12-6	"	129-164	22,2
F11,12-7	10-90	165-182	35
F11,12-8	"	183-201	34,8

Une chromatographie préparative sur CCM RP-18 réalisée sur la fraction **F11,12-7** (35 mg, éluée par hexane/AcOEt 10:90) en employant comme éluant $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (60:40), a permis d'isoler à l'état pur les produits **17** (3,1 mg) et **18** (2,8 mg) (Figure V.13).

CHCl₃/MeOH 10 %

Figure V.13 : CCM des composés 17 et 18

V.4.3. Etude de l'extrait AcOEt d'*E. bupleuroides*

L'extrait AcOEt (8 g) a subi une VLC (chromatographie liquide sous vide) sur gel de silice en phase normale. L'élution est menée par un gradient hexane/AcOEt puis AcOEt/MeOH, des fractions de 100 ml sont collectées à chaque fois. Les fractions recueillies sont soumises à une chromatographie sur couche mince CCM, et révélées à l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C (Tableau V.9).

Tableau V.9: Fractionnement de l'extrait AcOEt

Fractions	Eluant de colonne	Observation sur CCM
1	Hexane (200 ml) Hexane-AcOEt	Néant
2	99-1 (100 ml)	"
3	97-3 (200 ml)	"
4	95-5 (200 ml)	"
5	90-10 (200 ml)	2 taches
6	80-20 (200 ml)	"
7	70-30 (200 ml)	"
8	60-40 (100 ml)	"
9	"	3 taches+ traînée
10	50-50 (100 ml)	"
11	"	traînée
12	40-60 (100 ml)	2 taches+ traînée
13	"	"

14	30-70 (100 ml)	1 tache
15	"	"
16	20-80 (100 ml)	2 taches+ traînée
17	"	"
18	10-90 (100 ml)	traînée
19	AcOEt (100 ml)	"
20	AcOEt-MeOH	"
21	99-1 (200 ml)	"
22	97-3 (200 ml)	"
23	95-5 (200 ml)	"
24	90-10 (200 ml)	2 taches+ traînée
25	80-20 (200 ml)	"
26	70-30 (200 ml)	traînée
27	60-40 (200 ml)	"
28	50-50 (200 ml)	2 taches+ traînée
29	40-60 (200 ml)	traînée
30	MeOH (200 ml))	traînée

Les fractions présentant des similitudes sur CCM ont été rassemblées, permettant de constituer 12 fractions majoritaires (Tableau V.10).

Tableau V.10: Rassemblement des différentes fractions de la VLC de l'extrait AcOEt

Fractions	Fractions collectées	Masse en mg	Observation sur CCM
F1	5-8	194,1	2 taches+ traînée
F2	9-10	28,3	4 taches+ traînée
F3	11	26,4	traînée
F4	12-13	74,8	2 taches+ traînée
F5	14-15	186,0	1 tache
F6	16-17	167,1	2 taches+ traînée
F7	18-20	124,0	traînée
F8	21-23	395,4	"
F9	24-25	422,2	3 taches+ traînée
F10	26-27	600,0	traînée

F11	28-29	779,5	1 tache+ traînée
F12	30	132,8	traînée

V.4.3.1. Purifications des produits

❖ Etude de la fraction F5

La fraction **F5** (186 mg) a été purifiée sur une colonne de gel de silice. L'élution est effectuée avec le mélange de solvants chloroforme/Methanol (99 :1 ; 97 :3 ; 95 :5 ; 90 :10 et 80 :20). 4 mg du composé **14** (daucostérol) ont été isolés (élution CHCl₃/MeOH: 5%).

❖ Etude de la fraction F6

La fraction **F6** (167 mg) est fractionnée sur une colonne de silice en phase normale. L'élution a été faite par le système de solvants CHCl₃/MeOH (100 :0 ; 99,5 :0,5; 99 :1 ; 97 :3 et 95 :5) pour donner 11 sous fractions (Tableau V.11).

Tableau V.11: Rassemblement des sous fractions de la fraction F6

Sous fractions	Eluant de la colonne	Fractions collectées	Masse en mg
F6-1	CHCl ₃	1-12	6,5
F6-2	CHCl ₃ /MeOH 99,5-0,5	13-24	6,4
F6-3	99-1	25-36	10,8
F6-4	"	37-45	13,3
F6-5	"	46-55	16,6
F6-6	97-3	56-67	21,3
F6-7	"	68-80	16,4
F6-8	95-5	81-86	15,5
F6-9	"	87-100	25,1
F6-10	"	101-112	17,8
F6-11	"	113-120	11,9

La sous fraction **F6-8** éluee par le mélange CHCl₃/MeOH (95:5), a été purifiée dans les mêmes conditions pour donner le produit **19** (3,1 mg) (Figure V.14).

CHCl₃/MeOH 20%Figure V.14 : CCM du composé **19**

Le composé **20** (4,6 mg) est obtenu à partir de la sous fraction **F6-9** (25,1 mg), après purifications sur plaques préparatives de silice normale éluées par le mélange de solvants CHCl₃/MeOH (70:30) (Figure V.15).

CHCl₃/MeOH 20%Figure V.15 : CCM du composé **20**

V-4.4. Composés isolés de l'espèce *Euphorbia bupleuroides*

V.4.4.1. Composé 1

4,20- dideoxy(4 α)phorbol-12-benzoate-13-isobutyrate

Formule brute : C₃₁H₃₈O₆

Poids moléculaire : 506 g.mol⁻¹

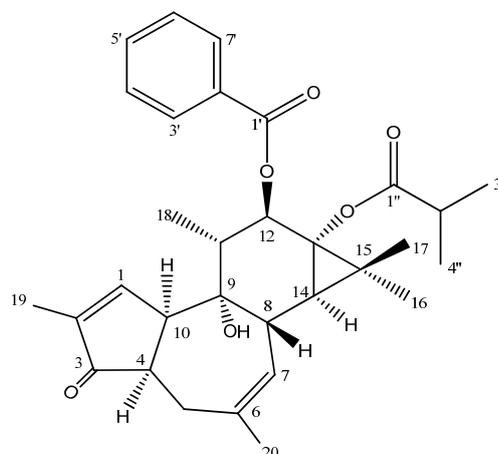
Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D = -49^\circ$ (c 0,2, MeOH)

Aspect : huile

MS : ESI (mode positif) $m/z = 529$ [M+Na]⁺

RMN : ¹H (600 MHz) et ¹³C (125 MHz)

dans CDCl₃ (Tableau III.1, pages 74-75).



V.4.4.2. Composé 2

ent-abiéta-8(14),13(15)-dièn-16,12-olide

Formule brute : C₂₀H₂₈O₂

Poids moléculaire : 300 g.mol⁻¹

Pouvoir rotatoire : [α]_D = +328,4° (c 0,34, MeOH)

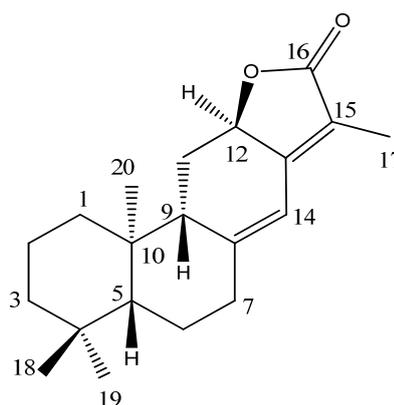
Aspect : cristaux incolores

MS : ESI (mode positif) *m/z* = 323 [M+Na]⁺

m/z = 339 [M+K]⁺

RMN : ¹H (600 MHz) et ¹³C (125 MHz)

dans CDCl₃ (Tableau III.2, pages 85-86).



V.4.4.3. Composé 3

3β,7β-dihydroxy-4α,14α-diméthyl-8β,9β-époxy-5α-ergosta-24(28)-ène

Formule brute : C₃₀H₅₀O₃

Poids moléculaire : 458 g.mol⁻¹

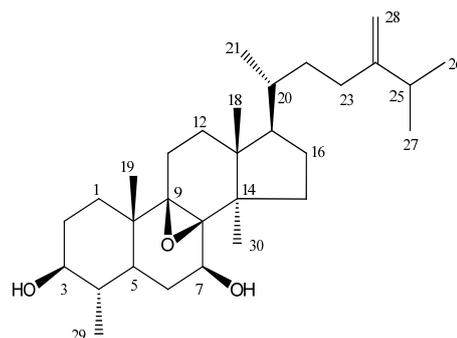
Pouvoir rotatoire : [α]_D = + 32,3 (c 0,18, MeOH)

Aspect : poudre blanche

MS : ESI (mode positif) *m/z* = 481 [M+Na]⁺

RMN : ¹H (600 MHz) et ¹³C (125 MHz)

dans CDCl₃ (Tableau III.3, pages 106-107).



V.4.4.4. Composé 4

25-hydroperoxycycloart-3β-ol

Formule brute : C₃₀H₅₂O₃

Poids moléculaire : 460 g.mol⁻¹

Pouvoir rotatoire : [α]_D = + 26,4° (c 0,15, MeOH).

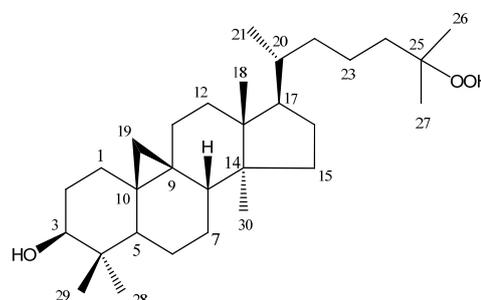
Aspect : poudre blanche

MS : ESI (mode positif) *m/z* = 483 [M+Na]⁺

m/z 943 [2M+Na]⁺

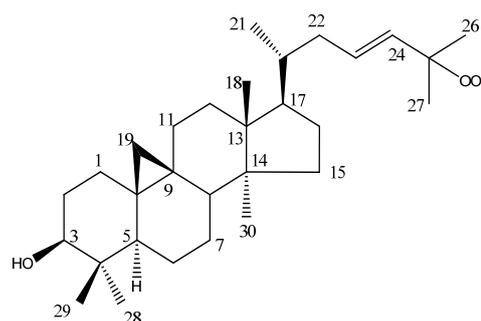
RMN : ¹H (600 MHz) et ¹³C (125 MHz)

dans CDCl₃ (Tableau III.4, pages 123-124).



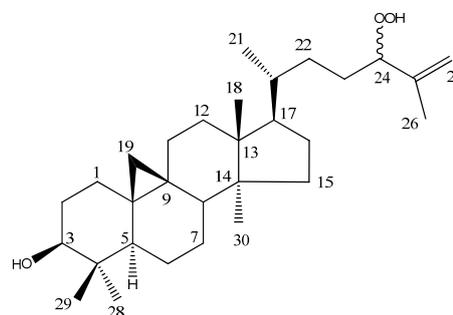
V.4.4.5. Composé 5

25-hydroperoxycycloart-23E-èn-3β-ol

Formule brute : C₃₀H₅₀O₃**Poids moléculaire :** 458 g.mol⁻¹**Pouvoir rotatoire :** [α]_D = + 46° (c 0,4, MeOH).**Aspect :** poudre amorphe blanche**MS :** ESI (mode positif) *m/z* = 481 [M+Na]⁺**RMN :** ¹H (600 MHz) et ¹³C (125 MHz)dans CDCl₃ (Tableau III.5, pages 131-132).

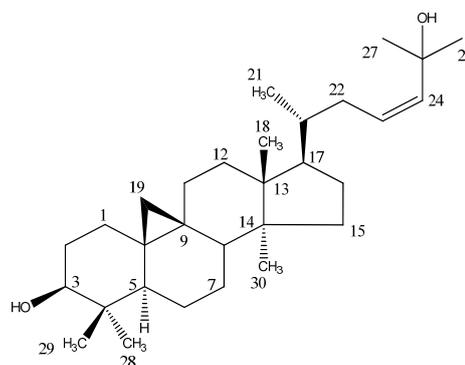
IV.4.4.6. Composé 6

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

Formule brute : C₃₀H₅₀O₃**Poids moléculaire :** 458 g.mol⁻¹**Pouvoir rotatoire :** [α]_D = +23,9°, (c 0,23, MeOH).**Aspect :** poudre blanche**MS :** ESI (mode positif) *m/z* = 481 [M+Na]⁺**RMN :** ¹H (600 MHz) et ¹³C (125 MHz)dans CDCl₃ (Tableau III.6, pages 139-140).

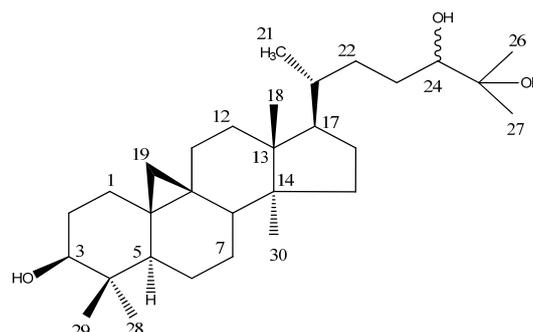
V.4.4.7. Composé 7

cycloart-23Z-ène-3β,25-diol

Formule brute : C₃₀H₅₀O₂**Poids moléculaire :** 442 g.mol⁻¹**Pouvoir rotatoire :** [α]_D = +25,6°, (c 0,3, MeOH).**Aspect :** poudre blanche**MS :** ESI (mode positif) *m/z* = 465 [M+Na]⁺**RMN :** ¹H (600 MHz) et ¹³C (125 MHz)dans CDCl₃ (Tableau III.7, pages 146-147).

V.4.4.8. Composé 8

cycloart-3β,24,25-triol

Formule brute : C₃₀H₅₂O₃**Poids moléculaire :** 460 g.mol⁻¹**Pouvoir rotatoire :** [α]_D = +38°, (c 0,11, MeOH)

Aspect : poudre blanche

MS : ESI (mode positif) $m/z = 483 [M+Na]^+$

RMN : 1H (600 MHz) et ^{13}C (125 MHz)

dans $CDCl_3$ (Tableau III.8, pages 153-154).

V.4.4.9. Composé 9

Cycloarténol

Formule brute : $C_{30}H_{50}O$

Poids moléculaire : 426 g.mol^{-1}

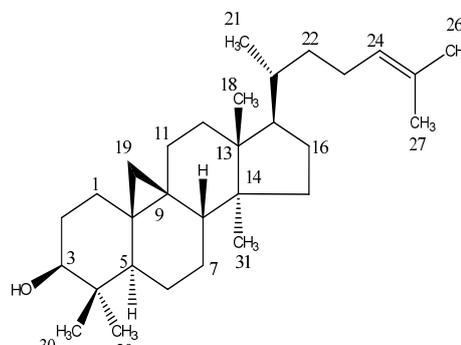
Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D = +24^\circ$ (c 0,083, MeOH).

Aspect : poudre blanche

MS : EI $m/z = 426 [M]^+$

RMN : 1H (600 MHz) et ^{13}C (125 MHz)

dans $CDCl_3$ (Tableau III.9, pages 160-161).



V.4.4.10. Composé 10

24-méthylèncycloartanol

Formule brute : $C_{31}H_{52}O$

Poids moléculaire : 440 g.mol^{-1}

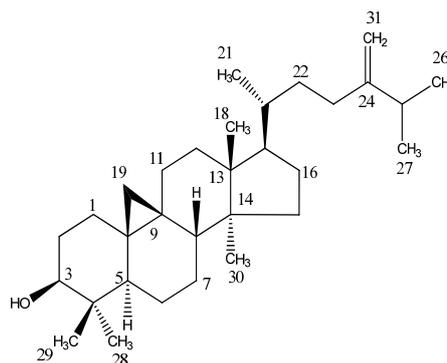
Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D = +40,2^\circ$ (c 1,01, $CHCl_3$).

Aspect : poudre blanche

MS : EI $m/z = 440 [M]^+$

RMN : 1H (600 MHz) et ^{13}C (125 MHz)

dans $CDCl_3$ (Tableau III.10, pages 168-169).



V.4.4.11. Composés 11 et 12

Cycloeucalénol et Obtusifoliol

Formule brute : $C_{30}H_{50}O$

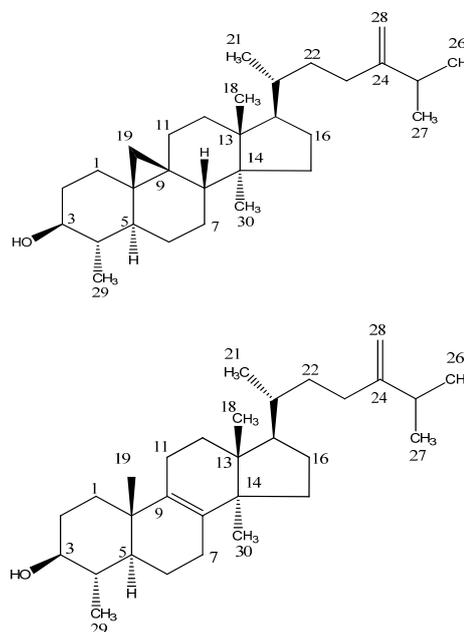
Poids moléculaire : 426 g.mol^{-1}

Aspect : poudre blanche

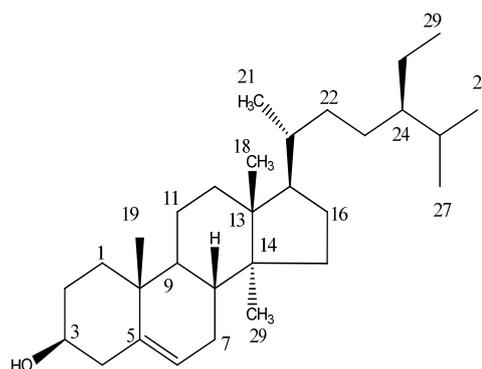
MS : ESI (mode positif) $m/z = 449 [M+Na]^+$

RMN : 1H (600 MHz) et ^{13}C (125 MHz)

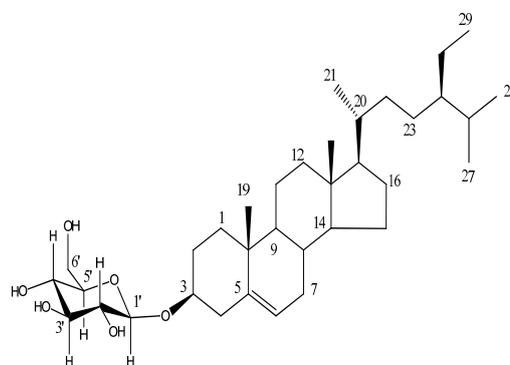
dans $CDCl_3$ (Tableaux III.11, pages 172-173 et III.12, pages 175-176).



V.4.4.12. Composé 13

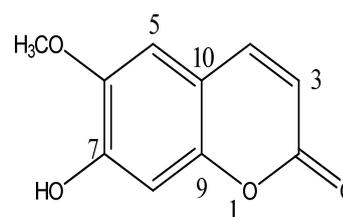
24-éthylcholest-5-èn-3-ol (β -sitostérol)**Formule brute :** $C_{29}H_{50}O$ **Poids moléculaire :** 414 g.mol^{-1} **Pouvoir rotatoire :** $[\alpha]_D = -30^\circ$ (c 0,80, $CHCl_3$).**Aspect :** poudre blanche**MS :** ESI (mode positif) $m/z = 437 [M+Na]^+$ **RMN :** 1H (600 MHz) et ^{13}C (125 MHz)dans $CDCl_3$ (Tableau III.13, pages 179-180).

V.4.4.13. Composé 14

3 β -D-glucopyranosyl β -sitostérol (Daucostérol)**Formule brute :** $C_{35}H_{60}O_6$ **Poids moléculaire :** 576 g.mol^{-1} **Pouvoir rotatoire :** $[\alpha]_D = -41,5^\circ$ (c 0,4, MeOH).**Aspect :** poudre blanche**MS :** ESI (mode positif) $m/z = 599 [M+Na]^+$ ESI (mode négatif) $m/z = 575[M-H]^-$ **RMN :** 1H (600 MHz) et ^{13}C (125 MHz)dans CD_3OD (Tableau III.14, pages 184-185).

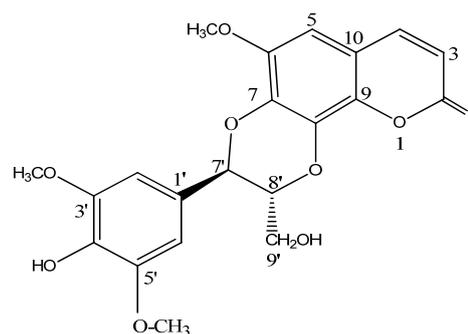
V.4.4.14. Composé 15

6-méthoxy-7-hydroxycoumarine (Scopolétine)

Formule brute : $C_{10}H_8O_4$ **Poids moléculaire :** 192 g.mol^{-1} **Aspect :** cristaux blancs**MS :** ESI (mode positif) $m/z = 215 [M+Na]^+$ **RMN :** 1H (600 MHz) et ^{13}C (125 MHz)dans $CDCl_3$ (Tableau III.15, page 192).

V.4.4.15. Composé 16

Cleomiscosine C

Formule brute : $C_{21}H_{20}O_9$ **Poids moléculaire :** 416 g.mol^{-1} 

Aspect : cristaux blancs

MS : ESI (mode positif) $m/z = 439 [M+Na]^+$

$m/z = 417 [M+H]^+$

RMN : 1H (600 MHz) et ^{13}C (125 MHz)

dans $CDCl_3$ (Tableau III.16, pages 203-204).

V.4.4.16. Composé 17

Hedyotisol A

Formule brute : $C_{42}H_{50}O_{16}$

Poids moléculaire : 810 g.mol^{-1}

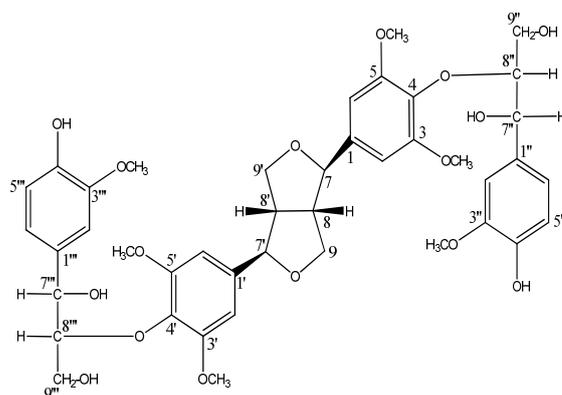
Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D = 0$ (c 0,25, MeOH).

Aspect : huile

MS : ESI (mode positif) $m/z = 833 [M+Na]^+$

RMN : 1H (600 MHz) et ^{13}C (125 MHz)

dans $CDCl_3$ (Tableau III.17, page 216).



V.4.4.17. Composé 18

Hedyotisol B

Formule brute : $C_{42}H_{50}O_{16}$

Poids moléculaire : 810 g.mol^{-1}

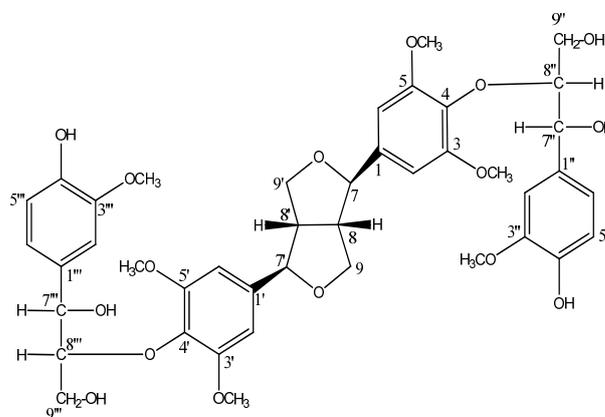
Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D = 0$ (c 0,23, MeOH).

Aspect : huile

MS : ESI (mode positif) $m/z = 833 [M+Na]^+$

RMN : 1H (600 MHz) et ^{13}C (125 MHz)

dans $CDCl_3$ (Tableau III.18, pages 225-226).



V.4.4.18. Composé 19

(2*R*, 3*S*)-2-(3',4'-dihydroxyphenyl)chromane-3,5,7-triol ; (-)catéchine.

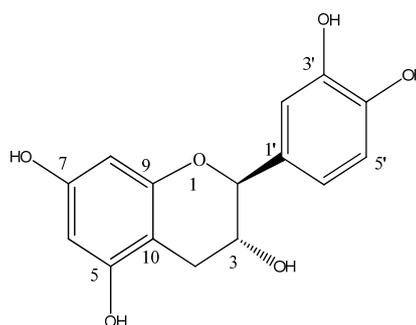
Formule brute : $C_{15}H_{14}O_6$

Poids moléculaire : 290 g.mol^{-1}

Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D = -20,8^\circ$ (c 0,25, MeOH).

Aspect : poudre brune

MS : ESI (mode positif) $m/z = 313 [M+Na]^+$



RMN : ^1H (600 MHz) et ^{13}C (125 MHz)
dans CD_3OD (Tableau III.19, pages 234-235).

V.4.4.19. Composé 20

(2*R*, 3*S*)-2-(3',4',5'-trihydroxyphenyl)chromane-3,5,7-triol ; (-)-gallocatéchine.

Formule brute : $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_7$

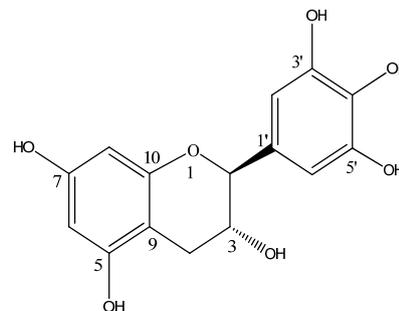
Poids moléculaire : $306 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

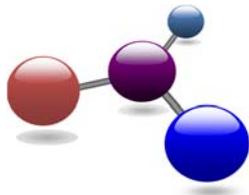
Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_{\text{D}} = -22,5^\circ$ (c 0,42, MeOH)

Aspect : poudre brune

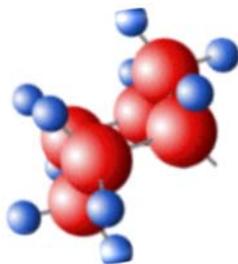
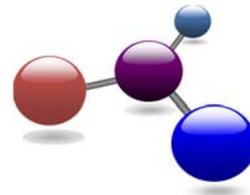
MS : ESI (mode positif) $m/z = 329$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$

RMN : ^1H (600 MHz) et ^{13}C (125 MHz)
dans MeOD (Tableau III.20, pages 239-240).





Références bibliographiques



Références bibliographiques

1. Ajibesin, K. K., Ekpo, B. A., Bala, D. N., Essien, E. E., Adesanya, S. A., 2008. Ethnobotanical survey of Akwa Ibom state of Nigeria. *J. Ethnopharmacol.* 115, 387-408.
2. Carney, J. R., Krenisky, J. M., Williamson, R. T., Luo, J., Carlson, T. J., Hsu, V. L., Moswa, J. L., 1999. Maprouneacin, a new daphnane diterpenoid with potent antihyperglycemic activity from *Maprounea africana*. *J. Nat. Prod.* 62, 345-347.
3. Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., Ignacimuthu, S., 2006. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 2, 1746-4269.
4. Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, V. 1-2. CNRS, Paris, France.
5. Ozenda, P., 1991. Flore et végétation du Sahara. In: CNRS (Ed), Paris, France.
6. Bellakhdar, J., 1997. La pharmacopée Marocaine traditionnelle, Ibis Press, France.
7. Marco, J. A., Sanz-Cerverca, J. F., Checa, J., Palomares, E., Fraga, B. M., 1999. Jatrophone and tiglane diterpenes from the latex of *Euphorbia obtusifolia*. *Phytochemistry* 52, 479-485.
8. Haba, H., Lavaud, C., Magid, A. A., Benkhaled, M., 2009. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia retusa*. *J. Nat. Prod.* 72, 1258-1264.
9. Haba, H., Lavaud, C., Harkat, H., Magid, A. A., Benkhaled, M., 2007. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. *Phytochemistry* 68, 1255-1260.
10. De Pascual Teresa, J., Urones, J. G., Marcos, I. S., Basabe, P., Sexmero Cuadrado, M.J.S., Fernandez Moro, R., 1987. Triterpenes from *Euphorbia Broteri*. *Phytochemistry* 26, 1767-1776.
11. Haba, H., Lavaud, C., Marcourt, L., Long, C., Harkat, H., Benkhaled, M., 2009. *Ent*-abietane diterpenoids from *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. *Biochem. Syst. Ecol.* 37, 504-508.
12. Haba, H., Marcourt, L., Benkhaled, M., Long, C., 2013. Minor *Ent*-abietane diterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. *Nat. Prod. Commun.* 8, 1519-1522.
13. Tsopmo, A., Kamning, P., 2011. Terpenoids constituents of *Euphorbia sapinii*. *Phytochem. Lett.* 4, 218-221.
14. Tian, Y., Xu, W., Zhu, C., Lin, S., Guo, Y., Shi, J., 2013. Diterpenoids with diverse skeletons from the roots of *Euphorbia micractina*. *J. Nat. Prod.* 76, 1036-1046.
15. Aslantürk, Ö. S., Celik, T. A., 2013. Antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of extracts from medicinal plant *Euphorbia platyphyllos* L. *J. Med. Plants Res.* 7, 1293-1304.
16. Daniel, M., 2006. Flore électronique de Tela botanica, l'Afrique du Nord.

17. Bruneton, J., 1996. Plantes toxiques : Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Technique et documentation, Paris, France.
18. Spichiger, R. E., Savolainen, V. V., Figeat, M., 2000. Botanique systématique des plantes à fleurs. Edition. Press polytechniques et universitaires Romandes, Lausanne, Suisse.
19. Lee, S. S., Kishore, P. H., Chen, C. H., 2002. Three novel triterpenoid dienolides from *Phyllanthus myrtifolius*. Helv. Chim. Acta. 85, 2403-2407.
20. Jayasinghe, L., Mallika Kumarihay, B. M., Nishantha Jayarathna, K. H. R., Gayathri Udishani, N. W. M., Ratnayake Bandara, B. M., Hara, N., Fujimoto, Y., 2003. Antifungal constituents of the stem bark of *Bridelia retusa*. Phytochemistry 62, 637-641.
21. Yang, X. D., Chen, W., Zhao, J. F., Yang, L. J., Zhang, H. B., Liang, L., 2009. *Ent*-kaurane diterpenes and phenolic compounds from *Croton kongensis* (Euphorbiaceae). Biochem. Syst. Ecol. 37, 237-240.
22. Reynaud, J., 2002. La flore du pharmacien. Technique et documentation, Paris. France.
23. Schulte, R. E., 1987. Members of Euphorbiaceae in primitive and advanced societies. Bot. J. Linn. Soc. 94, 77-96.
24. Hohmann, J., Gunther, G., Vasas, A., Kalman, A., Argay, G., 1999. Isolation and structure revision of pepluane diterpenoids from *Euphorbia peplus*. J. Nat. Prod. 62, 107-109.
25. Che, C. T., Zhou, T-X., Ma, Q. G., Qin, G. W., Williams, I. D., Wu, H. M., Shi, Z. S., 1999. Diterpenes and aromatic compounds from *Euphorbia fischeriana*. Phytochemistry 52, 117-121.
26. Jassbi, A. R., Fukushi, Y., Tahara, S., 2002. Determination of absolute configuration of decipinone, a diterpenoid ester with a myrsinane-type carbon skeleton, by NMR spectroscopy. Helv. Chim. Acta. 85, 1706-1713.
27. Hohmann, J., Evanics, F., Dombi, G., Szabo, P., 2001. Salicifoline and salicinolide, new diterpene polyesters from *Euphorbia salicifolia*. Tetrahedron Lett. 42, 6581-6584.
28. Nichimura, T., Wang, L. Y., Kusano, K., Kitanaka, S., 2005. Flavonoids that mimic human ligands from the whole plants of *Euphorbia lunulata*. Chem. Pharm. Bull. 53, 305-308.
29. Ayatollahi, A. M., Ghanadian, M., Afsharypuor, S., Choudhary, M. I., Kobarfard, F., Rahmati, M., 2010. Two new lathyrane type diterpenoids from *Euphorbia aellenii*. Fitoterapia 81, 891-893.
30. Huang, Y., Aisa, H. A., 2010. Jatrophone diterpenoids from Fructus *Euphorbia sororia*. Phytochem. Lett. 3, 176-180.
31. Liu, J. H., Latif, A., Ali, M., Zhang, G. P., Xiang, W. J., Ma, L., Arfan, M., Hu, L. H., 2012. Diterpenoids from *Euphorbia neriifolia*. Phytochemistry 75, 153-158.

32. Vasas, A., Sulyok, E., Martins, A., Rédei, D., Forgo, P., Kele, Z., Zupko, I., Molnar, J., Pinke J., Hohmann, J., 2012. Cyclomyrsinane and premyrsinane diterpenes from *Euphorbia falcata* modulate resistance of cancer cells to doxorubicin. *Tetrahedron* 68, 1280-1285.
33. Corea, G., Fattorusso, C., Fattorusso, E., Lanzotti, V., 2005. Amygdaloidins A-L, twelve new 13 α -OH jatrophane diterpenes from *Euphorbia amygdaloides* L. *Tetrahedron* 61, 4485-4494.
34. Wang, Y. B., Ji, P., Wang, H. B., Qin, G. W., 2010. Diterpenoids from *Euphorbia esula*. *Chin. J. Nat. Med.* 8, 0094-0096.
35. Cateni, F., Zilic, J., Zacchigna, M., Procida, G., 2010. Cerebrosides with antiproliferative activity from *Euphorbia peplis* L. *Fitoterapia* 81, 97-103.
36. Tian, Y., Sun, L. M., Li, B., Liu, X. Q., Dong, J. X., 2011. New anti-HBV caryphyllane-type sesquiterpenoids from *Euphorbia humifusa* Willd. *Fitoterapia* 82, 251-254.
37. Zhang, B. Y., Wang, H., Luo, X. D., Du, Z. Z., Wu, H. F., Shen, J. W., Zhang, X. F., 2012. Chemical constituents of *Euphorbia tangutica*. *Nat. Prod. Res.* 26, 2309-2315.
38. Baloch, I. B., Baloch, M. K., Najam us Saqib, Q., 2008. Anti-tumor 12-deoxyphorbol esters from *Euphorbia cornigera*. *Eur. J. Med. Chem.* 43, 274-281.
39. Sulyok, E., Vasas, A., Rédei, D., Fergo, P., Kele, Z., Pinke, G., Hohmann, J., 2011. New premyrsinane-type diterpene polyesters from *Euphorbia falcata*. *Tetrahedron* 67, 7289-7293.
40. Alberto Marco, J., Sanz-Cervera, G. F., Yuste, A., Jakupovic, J., 1999. Isoterracinolides A and B, novel bishomoditerpene lactones from *Euphorbia terracina*. *J. Nat. Prod.* 62, 110-113.
41. Rédei, D., Hohmann, J., Evanics, F., Forgo, P., Szabo, P., Mathé., 2003. Isolation and structural characterization of new, highly functionalized diterpenes from *Euphorbia serrulata*. *Helv. Chim. Acta.* 86, 280-289.
42. Hegazy, M-E. F., Mohamed, A. E-H. H., Aoki, N., Ikeuchi, T., Ohta, E., Ohta, S., 2010. Bioactive jatrophane diterpenes from *Euphorbia guyoniana*. *Phytochemistry* 71, 249-253
43. Zhou, T. X., Bao, G. H., Ma, Q. G., Q. G. W., Che, C. T., Lv, Y., Wang, C., Zheng, Q. T., 2003. Langduin C, a novel dimeric diterpenoids from the roots of *Euphorbia fischeriana*. *Tetrahedron Lett.* 44, 135-137.
44. Lal, A. R., Cambie, R. C., Rutledge, P. S., Woodgate, P. D., 1990. *Ent*-atisane diterpenes from *Euphorbia Fidjiana*. *Phytochemistry* 29, 1925-1935.
45. Morgenstern, T., Bittner, M., Silva, M., Aqueveque, P., Jakupovic, J., 1995. Diterpenes and phloracetophenones from *Euphorbia portulacoides*. *Phytochemistry* 41, 1149-1153.
46. Li, P., Feng, Z. X., Ye, D., Huan, W., Gang, W. D., Dong, L. X., 2003. Chemical constituents from the whole plant of *Euphorbia altotibetic*. *Helv. Chim. Acta.* 86, 2525-2532.

47. Öksüz, S., Roberto Gil, R., Chai, H., Pezzuto, J. M., Cordell, G. A., and Ulubelen, A., 1994. A Biologically Active Compounds from the Euphorbiaceae; 2. Two Triterpenoids of *Euphorbia cyparissias*. *Planta Med.* 60, 594-596.
48. Tanaka, R., Kasubuchi, K., Kita, S., Tokuda, H., Nishino, H., Matsunaga, S., 1999. Obtusifoliol and related steroids from the whole herb of *Euphorbia chamaesyce*, *Phytochemistry* 51, 457-463.
49. Tanaka, R., Ida, T, Kita, S., Kamisako, W., Matsunaga, S., 1996. A 3,4-*seco*-8 β H-fernadienoic acid and other constituents from *Euphorbia chamaesyce*. *Phytochemistry* 41, 1163-1168.
50. Wang, L. Y., Wang, N. L., Yao, X. S., Miyata, S., Kitanaka, S., 2003. Euphane and tirucallane triterpenes from the roots of *Euphorbia kansui* and their *in vitro* effects on the cell division of xenopus. *J. Nat. Prod.* 66, 630-633.
51. Lima, E. M. C., Medeiros, J. M. R., Davin, L. B., 2003. Pentacyclic triterpenes from *Euphorbia stygiana*. *Phytochemistry* 63, 421-425.
52. Fathalla M, H., Kin, A., 2009. Constituents of *Euphorbia retusa*. *EJEAFCh.* 8, 179-183.
53. Liu, X., Ye, W., Yu, B., Zhao, S., Wu, H., Che, C., 2004. Two new flavonol glycosides from *Gymnema sylvestre* and *Euphorbia ebracteolata*. *Carbohydr.Res.* 339, 891-895.
54. Boudiar, T., Hichem, L., Khalfallah, A., Kabouche, A., Kabouche, Z., Brouade, L., Bermejo, J., 2010. A new alkaloid and flavonoids from the aerial parts of *Euphorbia guyoniana*. *Nat. Prod. Commun.* 5, 35-37.
55. Öksüz, S., Ulubelen, A., Barla, A., 2002. Terpenoids and aromatic compounds from *Euphorbia heteradena*. *Turk. J. Chem.* 26, 457-463.
56. Su, B. N., Park, E. J., Mbwambo, Z. H., Santarsiero, B. D., Mesecar, A. D., Fong, H. H. S., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D., 2002. New chemical constituents of *Euphorbia quinquecostata* and absolute configuration assignment by a convenient Mosher ester procedure carried out in NMR tubes. *J. Nat. Prod.* 65, 1278-1282.
57. Lu, D., Liu, Y., Aisa, H. A., 2014. Jatrophone diterpenoid ester from *Euphorbia sororia* serving as multidrug resistance reversal agents. *Fitoterapia* 92, 244-251.
58. Das, B., Kashinatham, A., Venkataiah, B., Srinivas, K., Mahender, G., Ravinder, M, R., 2003. Cleomiscosin A, a coumarino-lignoid from *Jatropha gossypifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 1189-1191.
59. Sabandar, C. W., Ahmet, N., Jaafar, F. M., Sahidin, I., 2013. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* 85, 7-29.

60. Dey, P. M., Harbone, J. B., 1991. *Methods in plant biochemistry*. Volume 7, Terpenoids Academic press, France.
61. Bruneton, J., 1999. *Pharmacognosie phytochimie plantes médicinales*. 3^{ème} Edition. Techniques et documentations, Paris, France.
62. Manito, P., 1981. *Biosynthesis of naturel products*. John Willey et sons, New York, USA.
63. Claude, N. J., 2008. Thèse de doctorat; Contribution à l'étude phytochimique de deux plantes médicinales: *Crepis Cameroonica* et *Senecio burtonii* (Asteracées). Université de Yaounde 1, Cameroun.
64. Rhourri-Frih, B., 2009. Thèse de doctorat; Analyse, classification et caractérisation de résines d'origine végétale par chromatographie et spectrométrie de masse. Université d'Orléans, France.
65. Mann, J., Daridson, R. S., Hobbs, J. B., Banthorpe, D. V., Harborne, J. B., 1994. *Their chemistry and biological significance*, 1^{ère} Edition. Paris, France.
66. Gray A. I., Waterman P. G., 1978. Coumarins in the Rutaceae. *Phytochemistry* 17, 845-864.
67. Boudet, A.-M., 2007. Evolution and current status of reaserch in phenolic compounds. *Phytochemistry* 68, 2722-2735.
68. Reddy. N. S., Gumireddy, K., Mallireddigari, M. R., 2005. Synthesis and biological evaluation of coumarin-3-carboxamide derivatives via ring-opening reaction of coumarin-3-activated aziridines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 3141-3147.
69. Schoch, G., Goepfert, S., Morant, M., Hehn, A., Meyer, D., Ullmann, P., Werck-Reichhar, D., 2001. CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoids pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 26566-26574.
70. Kone, D., 2009. Thèse de doctorat; Enquête ethnobotanique de six plantes médicinales maliennes extraction, identification d'alcaloïdes caractérisation, quantification de polyphénols : étude de leur activité antioxydante. Université de Paul Verlaine de Metz-UPV-M, France.
71. Pietta, P., 2000. Flavonoids as antioxydants. *J. Nat. Prod.* 63, 1053-1042.
72. Pearce, F. L., Befus, A. D., Bienenstock, J., 1984. Mucosal mast cells III. Effect of quercetin and other flavonoids on antigen-induced histamine secretion from rat intestinal mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 73, 819-823.
73. Robinson, R., 1955. *Structural relations of Natural Product* Oxford: Clarendon Press, England.
74. Birch, A. J., 1962. *The chemistry of flavonoids compounds* ed. Geissman T.A., New York: Pergamon Press New York, 618, USA.

75. Whiting, D. A., 2001. Natural phenolic compounds 1900-2000: A bird's eye view of a century's chemistry. *Nat. Prod. Rep.* 18, 583-606.
76. Harborne, J.-B, Williams, C.-A., 2000. Advance in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504
77. Harborne, J. -B, 1988. The flavonoids advance in research since 1986. Edition Chapman and Hall. London, England.
78. Cooper-driver, G.-A., Bhattacharya, M., 1998. Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry* 49, 1165-1174.
79. Hecker, M., Preiss, C., Klemm, P., Busse, R., 1996. Inhibition by antioxydants of nitric oxide synthase expression in murine macrophages: role of nuclear factor KB and interferon regulatory factor. *Br. J. Pharmacol.* 118, 2178-2184.
80. Xu, Y. C., Leung, S. W., Yeung, D. Y., Hu, L. H., Chen, G. H., Che, C. M., Man, R. K., 2007. Structure-activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. *Phytochemistry* 68, 1179-1188.
81. Miana, G. A., Bashir, M., Evans, F. J., 1985. Isolation of prostratin from *Euphorbia cornigera*. *J. Med. Plants. Res.* 4, 291-356.
82. Karalai, C., Wiriyaichitra, P., Sorg, B., Hecker, E., 1995. Medicinal plants of Euphorbiaceae occurring and utilized in Thailand. V. skin irritants of the daphnane and tiglane type in latex of *Excoecaria bicolor* and the uterotonic activity of the leaves of the tree. *Phytotherapy Res.* 9, 482-488.
83. Ma, Q. G., Liu, W. Z., Wu, X. Y., Zhou, T. X., Qin, G. W., 1996. Diterpenoids from *Euphorbia fischeriana*. *Phytochemistry* 44, 663-666.
84. Appendino, G., Belloro, E., Tron, G. C., Jakupovic, J., Ballero, M., 1999. Diterpenoids from *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii*. *J. Nat. Prod.* 62, 1399-1401.
85. Baloch, I. B., Baloch, M. K., Saqib, Q. N., 2008. Anti-tumor 12-deoxyphorbol esters from *Euphorbia cornigera*. *J. Med. Chem.* 43, 247-281.
86. Aljančić, I. S., Pešić, M., Milosavljević, S. M., Todorović, N. M., Jadranin, M., Milosavljević, G., Povrenović, D., Banković, J., Tanić, N., Marković, I. D., Ruždijić, S., Vajs, V. E., Tešević, V. V., 2011. Isolation and biological evaluation of jatrophane diterpenoids from *Euphorbia dendroides*. *J. Nat. Prod.* 74, 1613-1620.
87. Urones, J. G., Barcala, P. B., Cuadrado, J. S., Marcos, I. S., 1988. Diterpenes from the latex of *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry* 27, 207-212.
88. Wu, D., Sorg, B., Hecker, E., 1994. Oligo- and macrocyclic diterpenes in Thymelaeaceae and Euphorbiaceae occurring and utilized in Yunnan (Southwest China) 6. Tiglane type diterpene esters from latex of *Euphorbia prolifera*. *Phytotherapy Res.* 8, 95-99.

89. Hecker, E., 1971. Pharmacognosy and phytochemistry, edit. By Wagner, H. and Horhammer, L., pp. 147-165, Berlin-Heidelberg-New York: Springer.
90. Hoppe, W., Brandl, F., Strell, I., Rohrl, M., Gassmann, I., Hecker, E., Bartsch, H., Kreibich, G., Szczepanski, V., 1967. X-ray structure analysis of neophorbol. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 6, 809-810.
91. Furstenberger, G., Hecker, E., 1977. New highly irritant *Euphorbia factors* from latex of *Euphorbia tirucalli* L. *Experientia* 33, 986-988.
92. McCormick, I.R.N., Nixon, P.E., Waters, T.N., 1976. On the structure of prostratin: An X-ray study. *Tetrahedron Lett.* 17, 1735-1736.
93. Petterson, R. C., Brinbaum, G. I., Ferguson, G., Islam, K.M.S., Sime, J.G., X-Ray investigation of several phorbol derivatives. The crystal and molecular structure of phorbol bromofuroate-chloroform solvate at -160° . *J. Chem. Soc. B*, 980-984.
94. Evans, F. J., 1986. Naturally occurring phorbol esters. Boca Raton, Florida: CRC Press.
95. Lal, A. R., Cambie, R. C., Rutledge, P. S., Woodgate, P. D., 1990. *Ent*-pimarane and *ent*-abietane diterpenes from *Euphorbia fidjiana*. *Phytochemistry* 29, 2239-2246.
96. Appendino, G., Jakupovic, S., Tron, G. C., Jakupovic, J., Milon, V., Ballero, M., 2000. Polycyclic diterpenoids from *Euphorbia characias*. *Fitoterapia* 71, 134-142.
97. Crespi-Perellino, N., Garofano, L., Arlandini, E., Pincioli, V., 1996. Identification of new diterpenoids from *Euphorbia calyptata* cell cultures. *J. Nat. Prod.* 59, 773-776.
98. Uemura, D., Hirata, Y., 1974. Diterpenoids from *Euphorbia jolkinii*. *Chem. Lett.* 819.
99. Ayatollahi, S. A., Ahmed, Z., Malik, A., Afza, N., Badar, Y., 1992. Cycloartanol, a new triterpenes from *Euphorbia clarkeana*. *J. Nat. Prod.* 55, 959-962.
100. Harraz, F. M., Gurek, F., Öksüz, S., Ulubelen, A., 1994. Triterpenes and fatty acids from *Euphorbia retusa*. *Turk. J. Chem.* 18, 251-257.
101. David Nes, W., Koike, K., Jia, Z., Sakamoto, Y., Satou, T., Nikaido, T., Griffin, J. F., 1998. 9β , 19-Cyclosterol analysis by ^1H and ^{13}C NMR, crystallographic observations, and molecular mechanics calculations. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 5970-5980.
102. Greca, M. D., Fiorentino, A., Monaco, P., Previtera, L., 1994. Cycloartane triterpenes from *Juncus effuses*. *Phytochemistry* 35, 1017-1022.
103. Akihisa, T., Kokke, W. C. M. C., Yokota, T., Tamura, T., Matsumoto, T., 1990. $4\alpha,14\alpha$ -dimethyl- 5α -ergosta-7,9(11),24(28)-trien- 3β -ol from *Phaseolus vulgaris* and *Gynostemma pentaphyllum*. *Phytochemistry* 29, 1647-1651.
104. Tanaka, R., Kasubuchi, K., Kita, S., Tokuda, H., Nishino, H., Matsunaga, S., 2000. Bioactive steroids from the whole herb of *Euphorbia chamaesyce*. *J. Nat. Prod.* 63, 99-103.

105. Kim, K. H., Moon, E., Choi, S. U., Kim, S. Y., Lee, K. R., 2013. Lanostane triterpenoids from the mushroom *Naematoloma fasciculare*. *J. Nat. Prod.* 76, 845-851.
106. Zhang, H., Cao, C.-M., Gallagher, R.-J., Day, V.-W., Montenegro, G., 2014. Withanolides from *Jaborosa caulescens* var. *bipinnatifida*. *Phytochemistry* 98, 232-235.
107. Su, J.-H., Tseng, Y.-J., Huang, H.-H., Ahmed, A. F., Lu, C.-K., Wu, Y.-C., Sheu, J.-H., 2006. 9,11-Secosterols from the corals *Sinularia iochmodes* and *Sinularia leptoclados*. *J. Nat. Prod.* 69, 850-852.
108. Yuan, C.-M., Tang, G.-H., Zhang, Y., Wang, X.-Y., Cao, M.-M., Guo, F., Li, Y., Di, Y.-T, Li, S.-L., Hua, H.-M., He, H.-P., Hao, X.-J., 2013. Bioactive limonoid and triterpenoid constituents of *Turraea pubescens*. *J. Nat. Prod.* 76, 1166-1174.
109. Akihisa, T., Kimura, Y., Koike, K., Shibata, T., Yoshida, Z.-Y., 1998. Isohelianol: A 3,4-seco-triterpene alcohol from *Sasanqua* oil. *J. Nat. Prod.* 409-412.
110. Anjaneyulu, V., Harischandra, P.-K., Ravi, K., Connolly, J. D., 1985. Triterpenoids from *Mangifera indica*. *Phytochemistry* 24, 2359-2367.
111. Inada, A., Murata, H., Inatomi, Y., Nakanishi, T., Darnaedi, D., 1997. Pregnanes and triterpenoid hydroperoxides from the leaves of *Aglaia grandis*. *Phytochemistry* 45, 1225-1228.
112. Xinping, H., Xiaobin, Z., Liping, D., Zhiwei, D., Wenhan, L., 2006. Cycloartane triterpenes from marine green alga *Cladophora fascicularis*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 24, 443-448.
113. Kato, T., Frei, B., Heinrich, M., Sticher, O., 1996. Antibacterial hydroperoxysterols from *Xanthosoma robustum*. *Phytochemistry* 41, 1191-1195.
114. Lacroix, D., Prado, S., Deville, A., Krief, S., Dumontet, V., Kasenene, J., Mouray, E., Bories, C., Bodo, B., 2009. Hydroperoxy-cycloartane triterpenoids from the leaves of *Markhamia lutea*, a plant ingested by wild chimpanzees. *Phytochemistry* 70, 1239-1245.
115. Azzar, R. A.-M., Essam, A.-S., Harraz, F.-M., Petereit, F., 2008. Chemical investigation of *Euphorbia schimperi* C. Presl. *Rec. Nat. Prod.* 2, 39-45.
116. Sutthivaiyakit, S., Thapsut, M., Prachayasittikul, V., 2000. Constituents and bioactivity of the tubers of *Euphorbia sessiliflora*. *Phytochemistry* 53, 947-950.
117. Giner, J.-L., Berkowitz, J. D., Andersson, T., 2000. Nonpolar components of the latex of *Euphorbia peplus*. *J. Nat. Prod.* 63, 267-269.
118. Barla, A., Birman, H., Kultur, S., Öksüz, S., 2006. Secondary metabolites from *Euphorbia helioscopia* and their vasodepressor activity. *Turk. J. Chem.* 30, 325-332.
119. Gonzalez, A. G., Breton, J. L., Dergado, M. J., Fraga, B. M., 1972. Steroids from *Euphorbia obtusifolia*. *Ann. Quim.* 68, 203-207.

120. Gewali, M. B., Hattori, M., Tezuka, Y., Kikuchi, T., Namba, T., 1990. Constituents the latex of *Euphorbia antiquorum*. *Phytochemistry* 29, 1625-1628.
121. Satyanarayana, V., David Krupadanam, G. L., Srimannarayana, G., 1991. Tetracyclic triterpenes from the latex of *Euphorbia nivulia*. *Fitoterapia* 29, 82-84.
122. Ferreira, M.-J., Madureira, A. M., Ascenso, J. R., 1998. A tetracyclic diterpene and triterpenes from *Euphorbia segetalis*. *Phytochemistry* 49, 179-183.
123. Burdi, D. R., Hasan, M., Uddin, V., 1991. Sterols and a glycoside from the flowers of *Inula grantioides*. *Pak. J. Pharm. Sci.* 4, 131-136.
124. Ferreira, M.-J., Ascenso, J. R., 1999. Steroids and a tetracyclic diterpene from *Euphorbia boetica*. *Phytochemistry* 51, 439-444.
125. Khan, A. Q., Malik, A., 1990. A new macrocyclic diterpene ester from the latex of *Euphorbia tirucalli*. *J. Nat. Prod.* 53, 728-731.
126. Lee, J., Kim, N. H., Nam, J. W., Lee, Y. M., Jang, D. S., Kim, Y. S., Nam, S. H., Seo, E. -K., Yang, M. S., Kim, J. S., 2010. Scopoletin from the flower buds of *Magnolia fargesii* inhibits protein glycation, aldose reductase, and cataractogenesis *ex Vivo*. *Arch. Pharm. Res.* 33, 1317-1323.
127. Houghton, P. J., 1985. Lignans and neolignans from *Buddleja davidii*. *Phytochemistry* 24, 819-826.
128. Li, Y.-C., Kuo, Y. -H., 2000. Four new compounds, ficusal, ficusesquilignan A, B, and fiscusolide diacetate from the heartwood of *Ficus microcarpa*. *Chem. Pharm. Bull.* 48, 1862-1865.
129. Li, S.-F., Di, Y.-T., Wang, Y.-H., Tan, C.-J., Frang, X., Zhang, Y., Zheng, Y.-T., Li, L., He, H.-P., Li, S.-P., Hao, X.-J., 2010. Anthraquinones and lignans from *Cassia occidentalis*. *Helv. Chim. Acta.* 93, 1795-1802.
130. Ranjan, R., Sahai, M., 2009. Coumarinolignans from the seeds of *Annona squamosa* Linn. *E- J. Chem.* 6, 518-522.
131. Liu, Y., Shi, H., Sun, Z., Ling, X., Tu, P., 2007. Enantiomer separation of the four diastereomers of guaiacyl glycerol from *Hydnocarpus annamensis* by capillary electrophoresis with HP- β -CD as a chiral selector. *J. Chromatogr. Sci.* 45, 605-609.
132. Francesca, C., 2005. Thèse de Doctorat: Chemistry and phytotoxicity of secondary metabolites Mediterranean plants, Napoli, Italy.
133. Matsuda, S., Katoda, S., Tai, T., Kikuchi, T., 1984. Isolation and structures of hedyotisol-A, -B, and -C. Novel dilignans from *Hedyotis lawsoniae*. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 5066-5069.
134. Uchiyama, T., Miyase, T., Ueno, A., Usmanghani, K., 1989. Terpenic glycosides from *Pluchea indica*. *Phytochemistry* 28, 3369-3372.

135. Li, S.-F., Di, Y.-T., Wang, Y.-H., Tan, C.-J., Frang, X., Zhang, Y., Zheng, Y.-T., Li, L., He, H.-P., Li, S.-L., Hao, X.-J., 2010. Anthraquinones and lignans from *Cassia occidentalis*. *Helv. Chim. Acta.* 93, 1795-1802.
136. Saucier, C., Guerra, C., Pianet, I., Laguerre, M., Glories, Y., 1997. Catechin-acetaldehyde condensation products in relation to wine-ageing. *Phytochemistry* 46, 229-234.
137. Solanky, K.-S., Bailey, N.-J., Holmes, E., Lindon, J.-C., David, A. L., Mulder, T. P., Duynhoven, J. P., Nicholson, J. K., 2003. NMR-based metabonomic studies on the biochemical effects of epicatechin in the rat. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4139-4145.
138. Donovan, J. L., Luthria, D. L., Stremple, P., Waterhouse, A. L., 1999. Analysis of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their 3'- and 4'-*O*-methylated analogs a comparison of sensitive methods. *J. Chromatogr. B.* 726, 277-283.
139. Qi, S.-H., Wu, D.-G., Ma, Y.-B., Luo, X.-D., 2003. A novel flavane from *Carpa guianensis*. *Acta Bot. Sin.* 45, 1129-1133.
140. Benavides, A., Montoro, P., Bassarello, C., Piantente, S., Pizza, C., 2006. Catechin derivatives in *Jatropha macrantha* stems: characterization and LC/ESI/MS/MS qualitative analysis. *J. Pharm. Biomed.* 40, 639-647.
141. Duke, S. O., Blair, A. C., Dayan, F. E., Johnson, R. D., Meepagala, K. M., Joanna.-Bajsa, D. C., 2009. Is (-)-catechin a novel weapon of spotted knapweed (*Centaurea stoebe*). *J. Chem. Ecol.* 35, 141-153.
142. Chen, Y.-G., Hai, L.-N., Liu, Y., Liao, X.-R., 2009. DNA cleavage agents from *Schisandra propinqua* var. *sinensis*. *Af. J. Biotechnol.* 8, 4650-4652.
143. Sang, S., Cheng, X., Stark, R. E., Rosen, R. T., Yang, C. S., Tang-Ho, C., 2002. Chemical studies on antioxidant Mechanism of tea catechins: analysis of radical reaction products of catechin and epicatechin with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10, 2233-2237.
144. Celiktas, O. Y., Hames, E. E., Bedir, E., Vardar, F., Ozek, T., Baser, K. H., 2007. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 100, 553-559.
145. Ferron, A., 1976. *Bactériologie médical à l'usage des étudiants en médecine.* 8^{ème} édition. Ed. Groun et Roques, France.
146. Avril, J. L., Dabarnet, H., Denis, F., Moteil, H., 1992. *Bactériologie clinique.* 1^{er} édition. Ed. Marketing, Paris, p. 14-15, 125, 167-266, Farnce.
147. Nataro, J. P., Kaper, J. B., 1998. Diarrheagenic *E. coli*. *Clin Microbial. Rev.* 11, 142-201.
148. Nauciel, C., 2000. *Bactériologie médicale.* Masson (Ed). Paris, 276, France.

149. Tripathi, P., Beaussart, A., Andre, G., Rolain, T., Lebeer, S., Vanderleyden, J., Hols, P., Dufrene, Y.F., 2012. Towards a nanoscale view of lactic acid bacteria. *Micron* 43, 1323-1330.
150. Matsuya, Y., Yu, Z., Yamamoto, N., Mori, M., Saito, H., Takeuchi, M., Ito, M., Nemoto, H., 2005. Synthesis of new phorbol derivatives having ethereal side chain and evaluation of their anti-HIV activity. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 4383-4388.

Résumé

Ce travail a pour objectif la valorisation d'une plante endémique et médicinale, appartenant à la famille Euphorbiaceae : *Euphorbia bupleuroides* Desf., utilisée dans la pharmacopée traditionnelle en Algérie. Il porte sur l'investigation phytochimique des racines de cette plante afin de mettre en évidence de nouveaux principes actifs susceptibles de posséder des propriétés pharmacologiques prometteuses. Cette étude concerne aussi le test de l'activité antibactérienne des extraits végétaux de l'espèce *Euphorbia bupleuroides* à savoir dichlorométhane et acétate d'éthyle.

Nos travaux d'extraction des racines de l'espèce *Euphorbia bupleuroides* suivis de séparations chromatographiques (VLC, CC et CPP), nous ont permis d'isoler et identifier par les différentes méthodes spectroscopiques (RMN, ESI, EI, UV et IR) 20 métabolites secondaires dont 2 diterpènes, 12 composés de nature triterpénique et 6 phénoliques.

A partir de l'extrait dichlorométhane des racines d'*E. bupleuroides* 17 métabolites secondaires ont été identifiés dont 3 structures nouvelles : 1 diterpène de type phorbol, 1 triterpène à squelette ergostane et 1 triterpène cycloartane. Les composés connus au nombre de 14 se répartissent en 1 diterpène, 9 triterpènes, 2 coumarines et 2 lignanes.

L'extrait acétate d'éthyle des racines de l'espèce *E. bupleuroides* fournit 3 métabolites secondaires comportant un stéroïde glucosylé et 2 flavanes.

L'élucidation structurale des produits isolés **1-20** a été établie par l'utilisation des différentes techniques de RMN 1D et 2D (^1H , ^{13}C *J*-modulé, DEPT, COSY H-H, HSQC *J*-modulé, HMBC et NOESY), UV, IR, la spectrométrie de masse basse et haute résolutions (ESI-MS, EI-MS et HR-ESI-MS), la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$ et la comparaison avec les données de la littérature.

Les extraits végétaux (DCM et AcOEt) de l'espèce *Euphorbia bupleuroides* ont manifesté une bonne activité antibactérienne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

La majorité des métabolites secondaires isolés sont des triterpènes à squelette cycloartane considérés comme marqueurs chimiotaxonomiques des plantes du genre *Euphorbia*.

Mots clés : Euphorbiaceae, *Euphorbia bupleuroides*, Diterpènes, Triterpènes, Phénols, RMN 1D et 2D, spectrométrie de masse ESI, Activité antibactérienne.

Abstract

This work aimed the valuation of endemic medicinal plant *Euphorbia bupleuroides* Desf. used in traditional medicine in Algeria. It deals with the phytochemical and biological investigations of the roots of this species. This study had as a goal the isolation of new secondary metabolites with interesting biological activities. It concerned also the assessment of antibacterial activity on extracts obtained from this species (dichloromethane and ethyl acetate).

Our work on the extraction of the roots of the species *Euphorbia bupleuroides*, followed by the chromatographic separations (VLC, CC and TLC) permitted us to isolate and identify, by spectroscopic analysis (NMR 1D and 2D, Mass, UV and IR), 20 secondary metabolites including 2 diterpenes, 12 triterpenes and 6 phenolics.

From the dichloromethane extract of the roots of *E. bupleuroides* 17 compounds have been identified including 3 new structures: 1 diterpene type phorbol, 1 ergostane-type triterpene and 1 cycloartane-type triterpene. The 14 known secondary metabolites consist of 1 diterpene, 9 triterpenes, 2 coumarines and 2 lignanes.

The ethyl acetate extract of the roots of the species *Euphorbia bupleuroides* allowed isolation of 3 secondary metabolites including 1 sterol glucoside and 2 flavans.

The structural elucidation of the isolated compounds **1-20** were established by the use of 1D and 2D NMR techniques (^1H , J -modulated ^{13}C , DEPT, COSY H-H, J -modulated HSQC, HMBC and NOESY), UV, IR, high-resolution mass spectrometry (HR-ESI-MS), measurement of the optical rotations $[\alpha]_{\text{D}}$ and by comparison with literature data.

The extracts of the species *Euphorbia bupleuroides* (DCM and EtOAc) exhibited a good antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* by the diffusion method on agar medium.

This phytochemical investigation indicated that the major secondary metabolites of *E. bupleuroides* were cycloartane-type triterpenes used as chemotaxonomic markers for the plants of *Euphorbia* genus.

Keywords: Euphorbiaceae, *Euphorbia bupleuroides*, Diterpenes, Triterpenes, Phenolics, NMR 1D and 2D, ESI, Antibacterial activity.

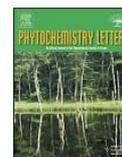
ملخص

هذا العمل يتمحور حول بحث وتثمين نبتة طبية محلية من عائلة *Euphorbia* ; Euphorbiaceae المستعملة في الطب الشعبي في الجزائر وذلك بإخضاعها لدراسة فيتوكيميائية وبيولوجية لعزل مركبات الايض الثانوي ذات نشاط بيولوجي فعال. تتضمن هذه الدراسة أيضا النشاط البكتيري لمستخلصات خامة (DCM و AcOEt) لنبتة *Euphorbia bupleuroides*. أدت المعالجة لجذور *Euphorbia bupleuroides* إلى عزل والتعرف على 20 مركب طبيعي وذلك باستعمال الطرق الكروماتوغرافية (CC, VLC و TLC) وباستعمال طرق التحليل الطيفي كمطيافية الرنين المغناطيسي النووي بجميع أنواعها، مطيافية الأشعة فوق البنفسجية و تحت الحمراء، مطيافية الكتلة، حساب زاوية التدوير النوعي و المقارنة مع الدراسات السابقة. تنقسم هذه المركبات إلى 2 ديتاربيانات، 12 تريتابينات و 6 فينول.

من خلال مستخلص DCM لنبتة *E. bupleuroides*، تم التعرف على 17 مركب منها 3 مركبات جديدة : ديتاربان واحد من نوع الفوربول، 1 تريتابان من نوع ارفوستان و تريتابان واحد من نوع سيكلو ارتان. المركبات المعروفة وعددها 14 تنقسم إلى 1 ديتاربان، 9 تريتابينات، 2 كومارين و 2 لينيان. تم عزل من مستخلص AcOEt لجذور نبتة *E. bupleuroides* 3 مركبات طبيعية منها 1 ستيرويد جليكوزيلي و 2 فلافان.

أظهرت المستخلصات الخامة (DCM و AcOEt) لنبتة *E. bupleuroides* فعالية ضد بكتيريا *Staphylococcus aureus*. معظم المركبات المتحصل عليها هي من نوع سيكلو ارتان التي تستعمل في التصنيف الكيميائي لنباتات نوع *Euphorbia*.

الكلمات المفتاحية: Euphorbiaceae، *Euphorbia bupleuroides*، ديتاربيانات، تريتابينات، فينول، مطيافية الرنين المغناطيسي، مطيافية الكتلة، النشاط البكتيري.

Terpenoids and other constituents from *Euphorbia bupleuroides*

Samira Aichour^a, Hamada Haba^{a,*}, Mohammed Benkhaled^a,
Dominique Harakat^b, Catherine Lavaud^b

^aLaboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (L.C.C.E), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Batna, Batna 05000, Algeria

^bInstitut de Chimie Moléculaire de Reims, CNRS UMR 7312, BP 1039, 51097 Reims Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 July 2014

Received in revised form 11 September 2014

Accepted 15 September 2014

Available online 27 September 2014

Keywords:

Euphorbia bupleuroides

Euphorbiaceae

Terpenoids

Phenolics

NMR

ABSTRACT

The phytochemical investigation of the roots of *Euphorbia bupleuroides* Desf. (Euphorbiaceae) yielded three new compounds named 4,20-dideoxy(4 α)phorbol-12-benzoate-13-isobutyrate (**1**), 25-hydroperoxycycloart-3 β -ol (**2**), and 3 β ,7 β -dihydroxy-4 α ,14 α -dimethyl-8 β ,9 β -epoxy-5 α -ergosta-24(28)-ene (**3**), together with 17 known compounds **4–20**. Their structures were established from an analysis of 1D (¹H, ¹³C and DEPT) and 2D NMR (COSY, HSQC, HMBC and NOESY) data, and of mass spectrometry (HRESIMS), and by comparison with literature data.

© 2014 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

There are more than 10,000 species in the Euphorbiaceae family (The Plant List, 2013). The *Euphorbia* species is the largest one with diterpenoids and triterpenoids as characteristic secondary metabolites (Giner et al., 2000). *Euphorbia* plants possess a number of interesting biological properties against cancer development such as antitumor (Tanaka et al., 2000), antiproliferative (Cateni et al., 2010), antioxidant and cytotoxic (Aslantürk et al., 2013), and modulation of multidrug resistance (Vasas et al., 2012). *Euphorbia bupleuroides* is a herbaceous plant with simple leaves growing in mountain rock area (Quezel and Santa, 1963). It is an endemic medicinal plant of Algeria used as an ancient remedy to extirpate thorns and to treat warts. It is well known that the decoction of roots is used in Algeria with anti-inflammatory purposes. As a continuation of our research focused on the discovery of bioactive compounds from *Euphorbia* species (Haba et al., 2007, 2013), the present paper reports the isolation and structure elucidation of one new diterpenoid (**1**), two new triterpenoids (**2** and **3**) (Fig. 1), in addition to 17 known compounds including 11 terpenoids and 6 phenolic compounds from the roots of *E. bupleuroides*. The structures of all isolated compounds **1–20** were established by

extensive analysis of the 1D and 2D NMR, MS, and OR data, as well as comparison with reported literature data.

2. Results and discussion

Compounds **1–20** were isolated from dichloromethane and ethyl acetate extracts of the roots of *E. bupleuroides* by repetitive chromatographic separation including vacuum liquid chromatography (VLC), column chromatography (CC) and TLC. The known compounds **4–20** have been deduced to be: 25-hydroperoxycycloart-23E-ene-3 β -ol (**4**) (Kato et al., 1996), 24-methylenecycloartanol (**5**) (Haba et al., 2007), jolkinolide E (**6**) (Lal et al., 1990), cycloart-23Z-ene-3 β ,25-diol (**7**) (Greca et al., 1994), cycloeucaleanol (**8**) (Haba et al., 2007), obtusifoliol (**9**), cycloartenol (**10**) and cycloart-3 β ,24,25-triol (**11**) (De Pascual Teresa et al., 1987; Haba et al., 2007), 3 β -hydroxycycloart-25-ene-24-hydroperoxide (**12**) (Öksüz et al., 1994), scopoletin (**13**) (Lee et al., 2010), deomiscosin C (**14**) (Ranjan and Sahai, 2009), hedyotisol A (**15**) and hedyotisol B (**16**) (Matsuda et al., 1984), (-)-catechin (**17**) (Qi et al., 2003), (-)-gallocatechin (**18**) (Chen et al., 2009), β -sitosterol (**19**) (Haba et al., 2007) and daucosterol (**20**) (Burdí et al., 1991).

Compound **1** was isolated as yellow oil with a negative optical rotation [α]_D²⁰ -49 (c 0.2, MeOH). It was shown by HRESIMS to have the molecular formula C₃₁H₃₈O₆Na through the presence of a pseudomolecular ion peak at *m/z* 529.2565 ([M+Na]⁺, calcd. 529.2566), which requires 13 degrees of unsaturation. The UV absorption band at 240 nm revealed the presence of an

* Corresponding author. Tel.: +213 33 868980; fax: +213 33 868980.
E-mail address: haba.hamada@yahoo.fr (H. Haba).

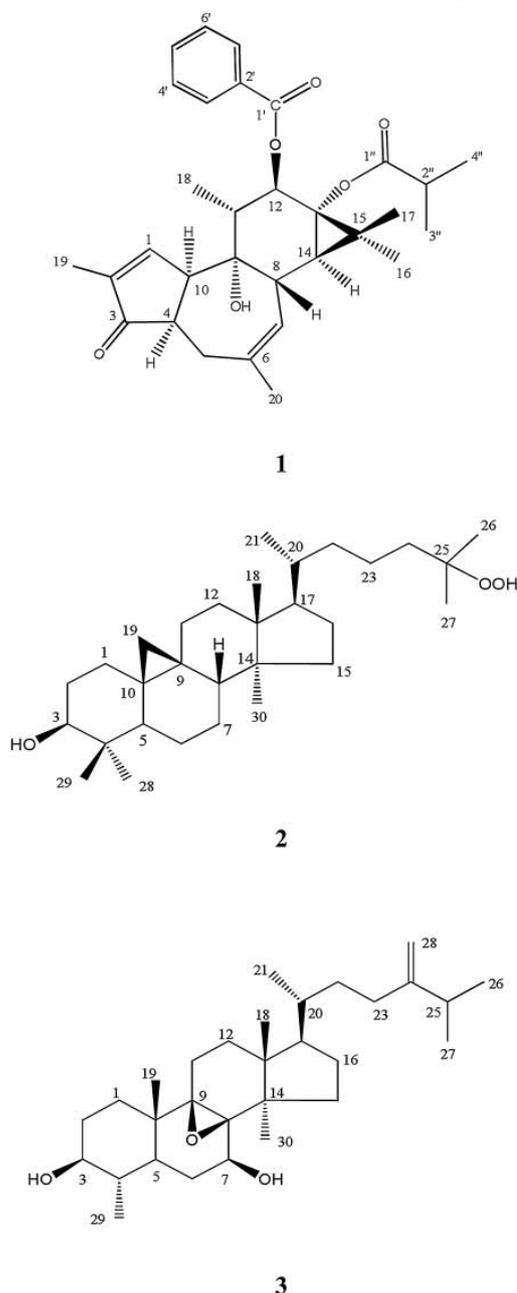


Fig. 1. Structures of isolated compounds 1–3.

unsaturated system. An analysis of its ^1H NMR spectral data (Table 1) indicated that compound **1** was very closely similar to those of 4,20-dideoxyphorbol-12-benzoate-13-isobutyrate called *Euphorbia* factor Pr₁ and previously isolated from *Euphorbia*

prolifera (Wu et al., 1994). Indeed, compound **1** possessed typical signals for phorbol derivative at δ_{H} 1.38 (3H, s, H₃-16), 1.21 (3H, s, H₃-17), 1.14 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H₃-18), 1.83 (3H, s, H₃-19), 1.79 (3H, s, H₃-20), 7.08 (1H, br s, H-1), 4.88 (1H, s, H-7), 5.58 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-12) and 0.85 (1H, d, $J = 5.0$ Hz, H-14). The ^{13}C NMR spectrum (Table 1) showed signal resonances due to seven methyls, one methylene, fourteen methines (among them, seven sp^2), and nine quaternary carbons (among them, three carbonyls and two sp^3 oxygenated carbons). Assignments of these protons and carbons by HSQC experiment and from analysis of HMBC correlations (Table 1), allowed the identification of the planar structure of **1** as 4,20-dideoxyphorbol-12-benzoate-13-isobutyrate identical to that of *Euphorbia* factor Pr₁. The main difference between **1** and *Euphorbia* factor Pr₁ was the signal resonance for H-1 up-shielded at 7.08 ppm (1H, br s) in **1** instead of 7.58 ppm (1H, m) reported for *Euphorbia* factor Pr₁ (Wu et al., 1994). On the other hand, compound **1** showed multiplicity of H-4 (2.74 ppm) as a doublet of triplets with coupling constants of $J = 7.1$ and 4.4 Hz, which were different to those observed for *Euphorbia* factor Pr₁ (ddd, $J = 10, 9, 4.5$ Hz). The multiplicity and coupling constants of H-4 indicated that this proton was α -oriented, in comparison with those reported for H-4 β phorbol derivatives (Appendino et al., 1999; Haba et al., 2007; Marco et al., 1999; Urones et al., 1988). The relative stereochemistry of **1** was confirmed from the NOESY spectrum (Fig. 2). The α -orientation of H-4 induced a NOE effect with proton H-10 α , and lack of correlation from H-8 β . The absence of NOE effect of H-8 β to H-14 confirmed that H-14 was α -oriented. NOE correlations observed between H-8 β and protons H-11 and H₃-17, ascertained that these protons were on the same side of the molecule (β -orientation), and involved that the cyclopropane ring was also β -oriented. The NOE effects observed between H-10 α /H₃-18, H₃-18/H-12, and H-14/H₃-16 indicated the α -orientation of all these protons (Fig. 2). The value of vicinal coupling constant of H-12 with H-11 β -axial ($J = 11.5$ Hz) confirmed that H-12 was α -axially oriented. Consequently, the benzoyl group linked to C-12 is β -equatorially oriented. Up to date, the proposed biogenetic pathway for tiglane diterpenoids is to be derived from the precursor casbene (Hecker, 1971). Moreover, all phorbol derivatives isolated from Euphorbiaceae family possess the configuration H-8 β , 9 α -OH, H-10 α , H-11 β , H-12 α , 13 α -OR and H-14 α (Aljančić et al., 2011; Marco et al., 1999; Urones et al., 1988). Their relative and absolute configurations were established previously according to X-ray diffraction analysis and chemical derivatization data and found to be identical with all phorbol diterpenes discovered in nature (Furstenberger and Hecker, 1977; McCormick et al., 1976; Hoppe et al., 1967; Pettersen et al., 1968). So, for a biogenetic basis, the same stereochemistry is assumed for these compounds which constitute a common stereochemical group. From these data, the absolute configuration at stereogenic centers of **1** could be assigned as 4R, 8S, 9R, 10R, 11R, 12R, 13S and 14R. Based on these spectral data, the new compound **1** was the epi-4 *Euphorbia* factor Pr₁ or 4,20-dideoxy(4 α)phorbol-12-benzoate-13-isobutyrate. Although 4-deoxyphorbol derivatives are known to be prone to epimerization at C-4 (Evans, 1986), compound **1** was detected in dichloromethane extract and consequently, could not be an artifact formed during separation procedures.

Compound **2** was obtained as a white powder. Its HRESIMS showed a quasimolecular ion peak at m/z 483.3813 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, calcd. 483.3816) corresponding to the molecular formula $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_3\text{Na}$, indicating that the molecule possessed five unsaturations. The ^{13}C NMR spectrum (Table 1) displayed signals consisting of seven methyls, twelve methylenes, five methines (among them one oxymethine attributed to C-3), six sp^3 quaternary carbons, and one oxygenated quaternary carbon. The ^1H NMR spectrum (Table 1) exhibited six tertiary methyl groups at δ_{H} 0.92 (3H, s, H₃-30), 0.99 (3H, s, H₃-28), 1.01 (3H, s, H₃-18), 0.83 (3H, s, H₃-29),

Table 1
¹H and ¹³C NMR data of compounds **1**, **2** and **3** in CDCl₃.

1			2			3				
Atom	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	HMBC (H to C)	Atom	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	HMBC (H to C)	δ_{H} (m, J Hz)	δ_{C}	HMBC (H to C)
1	7.08 br s	155.6	C-4, 10, 19	1	1.27–1.58 m	31.9	C-2, 19	1.61–1.63 m	30.2	C-5, 9, 19
2	–	143.2	–	2	1.59–1.79 m	30.3	C-1, 10	1.74–1.84 m	30.7	C-1, 10
3	–	211.8	–	3	3.31 dd 11.0, 4.2	78.8	C-4, 5, 28, 29	3.08 td 10.2, 5.2	77.2	C-1, 2, 4, 28
4	2.74 dt 7.1, 4.4	49.2	C-3, 5, 6, 10	4	–	40.4	–	1.67 m	38.1	C-2, 5, 6, 28
5a	3.45 dm 15.5	29.9	C-4, 7	5	1.32 d 4.5	47.0	C-4, 6, 9, 19	1.23 br s	47.9	C-4, 9, 28
5b	2.40 dd 15.5, 4.4	–	C-3, 4, 6, 7, 10, 20	6	0.81–1.62 m	21.1	C-7	1.40 m H-6b	37.7	C-7
6	–	134.8	–	–	–	–	–	2.40 dt 13.6, 7.5 H-6a	–	C-5
7	4.88 br s	128.5	C-20	7	1.13–2.02 m	26.4	C-8	4.37 dd 7.5, 3.3	80.5	C-5, 6
8	2 br s	41.0	–	8	1.55 dd 10.5, 6.0	47.9	C-9, 11, 14, 30	–	60.9	–
9-OH	5.3 br s	75.4	C-1, 10, 12	9	–	19.9	–	–	64.0	–
10	3.49 m	47.0	C-11	10	–	25.8	–	–	48.1	–
11	1.89 dq 11.5, 6.3	43.5	C-9, 18	11	1.09–1.34 m	26.1	C-9, 12	1.43–2.10 m	28.7	C-9, 12
12	5.58 d 11.5	78.0	C-11, 13, 15, 18	12	1.64 m	35.5	C-11, 13	1.79–2.04 m	30.1	C-13, 14, 18
13	–	65.0	–	13	–	45.3	–	–	47.6	–
14	0.85 d 5.0	37.8	C-7, 9, 12, 13, 15, 16, 17	14	–	46.3	–	–	48.1	–
15	–	25.5	–	15	1.33 m	32.7	C-16, 30	1.26–1.91 m	29.7	C-8, 16
16	1.38 s	16.7	C-8, 13, 14, 15, 17	16	1.31–1.94 m	28.0	C-17	1.35–1.99 m	27.0	C-15
17	1.21 s	24.3	C-8, 13, 14, 15, 16	17	1.61 m	52.0	C-16, 21	1.70 m	50.1	–
18	1.14 d 6.3	11.9	C-9, 11, 12	18	1.01 s	18.0	C-12, 13, 14, 17	0.69 s	16.4	C-13, 14, 17
19	1.83 s	10.6	C-1, 2, 3	19	0.36 d 3.7 (H-19 <i>exo</i>)	29.8	C-1, 8, 9, 10	1.50 s	18.4	C-1, 5, 9
20	1.79 s	28.9	C-5, 6, 7	–	0.58 d 3.7 (H-19 <i>endo</i>)	–	C-1, 8, 9	–	–	–
1'	–	166.0	–	20	1.49 m	36.2	C-17, 22	1.44 m	35.6	–
2'	–	130.2	–	21	0.90 d 6.5	18.3	C-17, 20, 22	0.96 d 6.5	18.7	C-17, 20, 22
3'	8.10 d 7.5	128.2	C-1', 4', 5', 6'	22	1.14–1.55 m	33.4	C-23	1.18–1.59 m	34.7	C-23, 24
4'	7.50 t 7.5	129.7	C-2', 3', 5', 7'	23	1.10–1.35 m	26.0	C-24	1.93–2.14 m	31.2	C-24
5'	7.56 t 7.5	133.1	C-3', 4', 6', 7'	24	0.80–1.02 m	37.5	C-23, 25	–	156.5	–
6'	7.50 t 7.5	129.7	C-2', 4', 5', 7'	25	–	78.9	–	2.26 sept 6.7	33.8	C-24, 30
7'	8.10 d 7.5	128.2	C-1', 3', 5', 6'	26	1.09 s	22.2	C-25, 27	1.05 d 6.7	21.8	C-24, 25, 27
1''	–	179.0	–	27	1.09 s	22.2	C-25, 26	1.05 d 6.7	21.9	C-24, 25, 26
2''	2.60 sept 7.0	34.2	C-1'', 3'', 4''	28	0.99 s	25.4	C-3, 4, 5, 29	4.69 d 0.9 H-28b	106.1	C-23, 25, 26
3''	1.19 d 7.0	18.5	C-1''	–	–	–	–	4.76 d 0.9 H-28a	–	C-23, 25
4''	1.19 d 7.0	18.6	C-1''	29	0.83 s	14.0	C-3, 4, 5, 28	0.98 d 6.7	16.1	C-3, 4, 5
–	–	–	–	30	0.92 s	19.3	C-8, 13, 14, 15	1.23 s	19.5	C-8, 13, 14

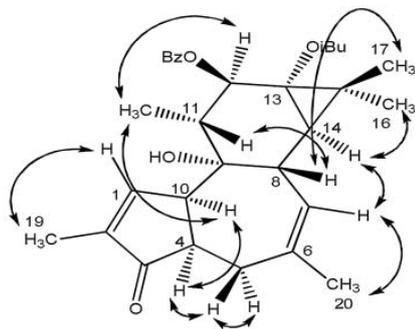


Fig. 2. Selected NOEs (H-H) effects for compound 1.

and 1.09 (6H, s, H₃-26, 27), and one secondary methyl group at δ_{H} 0.90 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H₃-21). These structural features confirmed the protostane-type triterpene nature of **2**. Furthermore, signals for a methylene of a cyclopropyl group were observed at δ_{C} 29.8 and δ_{H} 0.36 (H-19 *exo*) and 0.58 (H-19 *endo*) as two doublets ($J = 3.7$ Hz), suggesting a cycloartane triterpenoid skeleton. NMR spectral data of **2** were similar to those of 25-hydroperoxycycloart-23E-en-3 β -ol (**4**), which was previously isolated from *Xanthosoma robustum* (Araceae) (Kato et al., 1996) and isolated as a pure compound in our study. The quaternary carbon C-25 bore a hydroperoxy group as clearly evidenced from the value of its chemical shift at δ_{C} 78.9 instead of approximately 70 ppm in the case of a quaternary alcohol function. The main difference with compound **4**, was the absence of signals at δ_{H} 5.52/ δ_{C} 130.8 (CH-23) and δ_{H} 5.69/ δ_{C} 134.4 (CH-24) which were replaced by two methylene groups at δ_{H} 1.10–1.35/ δ_{C} 26.0 (CH₂-23) and 0.80–1.02/ δ_{C} 37.5 (CH₂-24). The hydrogenation of the $\Delta^{23,24}$ double bond induced an up-fielded signal of C-25 at δ_{C} 78.9 compared with that of **4** (82.3 ppm). These findings were further confirmed by the characteristic fragment ion peak in the ESI mass spectrum at m/z 337 [(M+Na) – 146]⁺, due to the loss of the side chain attached to C-17: CH₃(CH₂)₄C(CH₃)₂OOH. The relative stereochemistry of **2** was deduced from the NOESY spectrum and was in agreement with that reported for 25-hydroperoxycycloart-23E-en-3 β -ol (**4**) (Kato et al., 1996). Indeed, NOEs were depicted between H-3 α /H-5 α , H-5 α /H-6 α , H-5 α /H-7 α , H-7 α /H₃-30 and H₃-30/H-17 suggesting that proton H-17 was α -oriented and the side chain linked to C-17 had a β -orientation. The chemical shift of H₃-21 at 0.90 ppm and the NOESY correlation between H-17 α and H₃-21 indicated the 20R stereochemistry at carbon C-20 as observed in cycloartenol (Nes et al., 1998). Compound **2** displayed a positive optical rotation value of +26.4

in MeOH, as **4** (Kato et al., 1996) and the absolute configuration at chiral carbons was postulated as being 3S, 5R, 8R, 9S, 10R, 13S, 14R, 17S and 20R (Nes et al., 1998; Pascal et al., 1993). All the above data were consistent with the new structure of **2** identified as 25-hydroperoxycycloart-3 β -ol.

Compound **3** was obtained as a white powder and was assigned to the molecular formula C₃₀H₅₀O₃Na by its HRESIMS (m/z at 481.3647 [M+Na]⁺, calcd. 481.3658), requiring six degrees of unsaturation. The ¹³C NMR spectrum (Table 1) of **3** revealed signals consisting of seven methyls, ten methylenes, seven methines (among them, two oxymethines) and six quaternary carbons (among them two oxygenated and one olefinic carbons), which confirmed its triterpenic nature. The ¹H NMR spectral data of **3** (Table 1) are found to be closely similar to those of obtusifoliol **9** isolated in this work and previously from several *Euphorbia* species (De Pascual Teresa et al., 1987; Haba et al., 2007). The main difference was the absence of ¹³C NMR signals corresponding to two sp² carbon atoms C-8 and C-9 of obtusifoliol **9**, and the presence of three downfield signals attributed to three oxygenated carbons resonating at 60.9, 64.0 and 80.5 ppm in compound **3**. This fact suggested that the $\Delta^{8,9}$ double bond in **9** was oxidized here. HMBC spectrum showed ³ J correlations from methylene protons H-19 and H-30 with the two oxygenated carbons at 60.9 and 64 ppm attributed to an epoxy group between C-8 and C-9. The H-29 detected at δ_{H} 0.98 (3H, d, $J = 6.7$ Hz) exhibited HMBC correlations with carbons C-3 (77.2 ppm), C-4 (38.1 ppm) and C-5 (47.9 ppm). The proton H-5 was located at δ_{H} 1.23 by HSQC experiment. The COSY spectrum revealed a four spins correlated system from H-5 with H-6a (δ_{H} 2.40), H-6b (δ_{H} 1.40) and H-7 (δ_{H} 4.37). Thus, the position C-7 was hydroxylated (δ_{H} 4.37 and δ_{C} 80.5), and the deshielded carbon chemical shift instead to be at 55.8 ppm for a 7,8-epoxy-lanostane triterpenoid, attested that the hydroxyl was free (Kim et al., 2013; Tanaka et al., 2000). By comparison with data of 7 α -hydroxytriterpenoids, the values of coupling constants of H-7 as a doublet of doublets with H-6a $J_{\text{ax-ax}} = 7.5$ Hz, and H-6b $J_{\text{ax-ax}} = 3.3$ Hz, indicated that 7-OH was β -equatorially oriented (Tanaka et al., 2000). The down-fielded chemical shifts of protons at δ_{H} 2.40 (H-6a) and 1.50 (Me-19) β -axially oriented, suggested that the epoxy group is also β -oriented and induced a diamagnetic anisotropy effect (Fig. 3). Significant NOESY effects were revealed on the α face between H-7/Me-30, Me-30/H-17, H-7/H-15b, H-7/H-5, and H-7/H-6b, indicating the β orientation of the side chain linked to carbon C-17. Similarly, NOE correlations for the β face were observed between Me-19/H-6a, Me-19/H-4 and Me-18/H-20. From these data and the chemical shift of Me-21 at δ_{H} 0.96 and δ_{C} 18.7, the 20R orientation of the side chain was assigned as reported for obtusifoliol and related triterpenoids (Tanaka et al., 1999, 2000). The absolute configuration of **3** was established from the biogenetic grounds of ergostane triterpenoids and related compounds (Akihisa et al., 1990; Nes et al., 1998; Pascal et al., 1993).

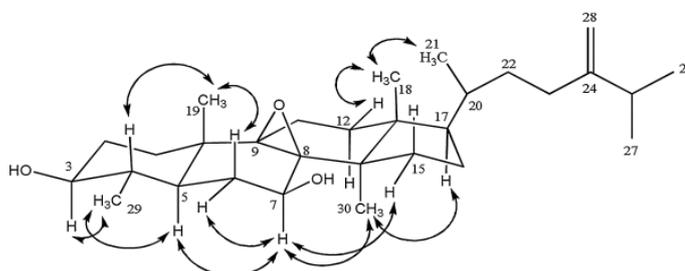


Fig. 3. Key NOEs (H-H) correlations for compound 3.

Therefore, carbons C-7, C-8 and C-9 were defined as 7S, 8S and 9R configuration. Finally, detailed analysis of ^1H , ^{13}C NMR, COSY, HSQC and HMBC spectra allowed assignment of all protons and carbons of compound **3** (Table 1). Compound **3** was elucidated as 3 β ,7 β -dihydroxy-4 α ,14 α -dimethyl-8 β ,9 β -epoxy-5 α -ergosta-24(28)-ene (**3**).

3. Conclusions

The present study reports the isolation and identification of three new compounds **1–3** with tiglane, cycloartane and ergostane skeleton respectively, together with seventeen known compounds **4–20**, from extracts of roots of *E. bupleuroides* Desf. To the best of our knowledge, this is the third isolation of tiglane-type diterpenes with H-4 α stereochemistry from *Euphorbia* plants (Aljančić et al., 2011; Haba et al., 2007). According to the previous chemical studies, it is very interesting to note that hydroperoxycycloartane-type triterpenes which were found in several species such as *Aglaiia grandis* (Inada et al., 1997), *Cladophora fasciculari* (Huang et al., 2006), and *Xanthosoma robustum* (Kato et al., 1996), have been isolated from only one *Euphorbia* species *E. cyparissias* (Öksüz et al., 1994) and this is the second report of their appearance in *Euphorbia* genus. Furthermore, this phytochemical investigation indicates that the major secondary metabolites of *E. bupleuroides* are cycloartane-type triterpenes.

4. Experimental

4.1. General experimental procedures

UV spectra were measured on a Kontron UVS900 lite, Uvikon 941 spectrophotometer. IR spectra were obtained using a Shimadzu IR-470 spectrometer. Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 241 polarimeter. ^1H NMR (600 MHz) and ^{13}C NMR (150 MHz) spectra were recorded on a Bruker Avance 600 spectrometer in CDCl_3 , and CD_3OD , using solvent signals for calibration ($^{13}\text{CDCl}_3$ at δ_{C} 77.4, $^{13}\text{CD}_3\text{OD}$ at δ_{C} 49.9 and residual C^1HCl_3 at δ_{H} 7.26, $\text{C}^1\text{H}_3\text{OH}$ at δ_{H} 3.34). 2D NMR experiments (COSY, HSQC, HMBC, and NOESY) were performed using standard Bruker microprograms. ESIMS were obtained using a MSQ Thermofinnigan instrument. HRESIMS experiments were recorded using a Micromass Q-TOF. VLC was performed on silica gel Merck Kieselgel 60 (70–230 mesh). Column chromatography was carried out using Merck Kieselgel 60 (70–230 mesh), and Sephadex LH-20. Analytical TLC was carried out on silica gel plates (Merck Kieselgel 60 F₂₅₄) and RP-18 (Kieselgel 60 F_{254S}) plates. The spots were visualized using UV light at 254 and 366 nm and spraying with 50% sulfuric acid reagent followed by heating.

4.2. Plant material

The roots of the plant *Euphorbia bupleuroides* Desf. were collected on May 2010 from Chenaoura in Batna area (Algeria). A voucher specimen was identified by Prof. Bachir Oudjehih of Agronomic Institute of Batna University under the reference number 662/LCCE.

4.3. Extraction and isolation

Powdered roots (800 g) of *E. bupleuroides* Desf. were macerated with EtOH–H₂O (70:30) (8 l, twice) for 3 days at room temperature. The hydroalcoholic extract was then treated successively with petroleum ether, dichloromethane, ethyl acetate, and *n*-butanol (200 ml, each time).

Dichloromethane extract (7 g) was subjected to silica gel vacuum liquid chromatography (VLC) using a gradient of solvents

hexane–EtOAc (100:0–0:100) and EtOAc–MeOH (100:0–0:100) to give 17 fractions (F1–F17). Fraction F4 was separated by silica gel CC using hexane–EtOAc (100:0–0:100) as eluent to afford 17 sub-fractions. Sub-fraction 1 submitted to purification by silica gel CC under the same conditions gave 27 mg of 24-methylenecholesterol **5** and 10 mg of β -sitosterol **19**. Prep. TLC RP-18 of sub-fraction 3 eluting with MeOH–H₂O (19:1), allowed isolation of compound **1** (3.4 mg). Sub-fraction 9 was further purified by silica gel CC by elution with a gradient of petroleum ether–acetone (99:1–95:5) to provide a mixture of cycloeucaleanol **8** and obtusifolioside **9** (7.4 mg), and fractions eluted with petroleum ether–acetone (97:3) were purified on prep. TLC RP-18 (eluent: MeOH) yielding compound **6** (3.1 mg). Fraction F5 of VLC was chromatographed over silica gel CC eluted with hexane–EtOAc (100:0–0:100). After repeated silica gel CC using the same solvents, Sephadex LH-20 CC eluting with dichloromethane, four compounds were obtained **2** (2.4 mg), **4** (3.2 mg), **7** (3.7 mg) and **12** (2.8 mg) by precipitation in chloroform. The combined VLC fractions F6 and F7 were subjected to CC over silica gel. Elution was performed by a gradient of hexane–EtOAc (100:0–0:100). Then, fractions eluted with hexane–EtOAc (85:15 and 70:30) were separately purified on prep. TLC RP-18 leading successively to compounds **3** (3.3 mg) and **10** (5.5 mg). Fraction F8 of VLC was purified by Sephadex LH-20 CC. Elution was performed by dichloromethane to give compound **13** (2.3 mg). Fractions F9 and F10 of VLC were mixed and subjected to silica gel CC eluted with petroleum ether–EtOAc (100:0–0:100) and fractions eluted with (40:60) were further purified on prep. TLC developed with CHCl_3 –MeOH (19:1) yielding compound **14** (3.3 mg). Finally, the combined VLC fractions F11 and F12 were subjected to purification by silica gel CC. Elution was performed with a gradient of hexane–EtOAc (90:10–0:100), of which fractions eluted with hexane–EtOAc (10:90) were applied to prep. TLC RP-18 using MeOH–H₂O (3:2) as eluent to provide compounds **15** (3.1 mg) and **16** (2.8 mg).

The EtOAc (8 g) was separated similarly over a VLC in the same conditions, to afford 12 fractions (F1–F12). Fraction F5 was purified on silica gel CC using mixture of CHCl_3 –MeOH (99:1–80:20) as eluent to give daucosterol **20** (4 mg). Fraction F6 showing a major component, was submitted to purification by CC on silica gel. Elution was performed with a gradient of CHCl_3 –MeOH (100:0–95:5) to provide compound **17** (3.1 mg), and fractions eluted with CHCl_3 –MeOH (95:5) were further purified by prep. TLC developed with CHCl_3 –MeOH (7:3) yielding compound **18** (4.6 mg).

4.3.1. 4,20-Dideoxy(4 α)phorbol-12-benzoate-13-isobutyrate (**1**)

Yellow oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ –49 (c 0.2, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} 240 nm; IR (CCl_4) ν_{max} 3407, 2920, 1720, 1643, 1590, 1402, 1256 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) see Table 1; HRESIMS m/z 529.2565 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{O}_6\text{Na}$ 529.2566).

4.3.2. 25-Hydroperoxycycloart-3 β -ol (**2**)

White powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +26.4 (c 0.15, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 3425, 2937, 2865, 1456, 1377, 1097, 1024 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) see Table 1; HRESIMS m/z 483.3813 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_3\text{Na}$ 483.3816).

4.3.3. 3 β ,7 β -Dihydroxy-4 α ,14 α -dimethyl-8 β ,9 β -epoxy-5 α -ergosta-24(28)-ene (**3**)

White powder; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ +32.3 (c 0.18, MeOH); IR (KBr) ν_{max} 3468, 2945, 2870, 1430, 1365, 1103, 1042 cm^{-1} ; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) and ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) see Table 1; HRESIMS m/z 481.3647 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_3\text{Na}$ 481.3658).

Acknowledgments

The authors wish to express thanks to the DGRSDT of the Algerian Minister of Higher Education and Scientific Research for

providing a research grant (Project 8/u05/853), the University of Reims Champagne-Ardenne (France), CNRS, Conseil Régional Champagne Ardenne, Conseil Général de la Marne, Ministry of Higher Education and Research (MESR) and EU-programme FEDER for the PIANET CPER project for providing research facilities and technical support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2014.09.011>.

References

- Akihisa, T., Kokke, W.C.M.C., Yokota, T., Tamura, T., Matsumoto, T., 1990. $4\alpha,14\alpha$ -dimethyl-5 α -ergosta-7,9(11),24(28)-trien-3 β -ol from *Phaseolus vulgaris* and *Cynostemma pentaphyllum*. *Phytochemistry* 29, 1647–1651.
- Aljančić, I.S., Pešić, M., Milosavljević, S.M., Todorović, N.M., Jadranin, M., Milosavljević, G., Povrenović, D., Banković, J., Tanić, N., Marković, I.D., Ruždijić, S., Vajs, V.E., Tešević, V.V., 2011. Isolation and biological evaluation of jatrophone diterpenoids from *Euphorbia dendroides*. *J. Nat. Prod.* 74, 1613–1620.
- Appendino, G., Belloro, E., Tron, G.C., Jakupovic, J., Ballero, M., 1999. Diterpenoids from *Euphorbia pithyusa* subsp. *cupanii*. *J. Nat. Prod.* 62, 1399–1404.
- Aslantürk, Ö.S., Çelik, T.A., 2013. Antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of extracts from medicinal plant *Euphorbia platyphyllos* L. *J. Med. Plants Res.* 7, 1293–1304.
- Burdi, D.R., Hasan, M., Uddin, V., 1991. Sterols and a glycoside from the flowers of *Inula grantioides*. *Pak. J. Pharm. Sci.* 4, 131–136.
- Cateni, F., Zilic, J., Zaccagna, M., Prociada, G., 2010. Cerebrosides with antiproliferative activity from *Euphorbia peplis* L. *Fitoterapia* 81, 97–103.
- Chen, Y.-G., Hai, L.-N., Liu, Y., Liao, X.-R., 2009. DNA cleavage agents from *Schisandra propinqua* var. *sinensis*. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 4650–4652.
- De Pascual Teresa, J., Urones J.C., Marcos, I.S., Basabe, P., Cuadrado, M.J.S., Fernandez Moro, R., 1987. Triterpenes from *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry* 26, 1767–1776.
- Evans, F.J., 1986. Naturally occurring phorbol esters. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Furstenberger, G., Hecker, E., 1977. New highly irritant euphorbia factors from latex of *Euphorbia tirucalli* L. *Experientia* 33, 986–988.
- Giner, J.-L., Berkowitz, J.D., Anderson, T., 2000. Nonpolar components of the latex of *Euphorbia peplis*. *J. Nat. Prod.* 63, 267–269.
- Greca, M.D., Fiorentino, A., Monaco, P., Previtera, L., 1994. Cycloartane triterpenes from *Juncus effusus*. *Phytochemistry* 35, 1017–1022.
- 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., Marcourt, L., Benkhaled, M., Long, C., 2013. Minor ent-abietane diterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. *Nat. Prod. Commun.* 8, 1519–1522.
- Hecker, E., 1971. In: Wagner, H., Horhammer, L. (Eds.), *Pharmacognosy and phytochemistry*. Springer, Berlin/Heidelberg/New York, pp. 147–165.
- Hoppe, W., Brandl, F., Strell, I., Rohrl, M., Gassmann, I., Hecker, E., Bartsch, H., Kreibich, G., Szczepanski, P., 1967. X-ray structure analysis of neophorbol. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 6, 809–810.
- Huang, X., Zhu, X., Deng, L., Deng, Z., Lin, W., 2006. Cycloartane triterpenes from marine green alga *Gadophora fascicularis*. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 24, 443–448.
- Inada, A., Murata, H., Inatomi, Y., Nakanishi, T., Darnaedi, D., 1997. Pregnanes and triterpenoid hydroperoxides from the leaves of *Aglaia grandis*. *Phytochemistry* 45, 1225–1228.
- Kato, T., Frei, B., Heinrich, M., Sticher, O., 1996. Antibacterial hydroperoxyterpenoids from *Xanthosoma robustum*. *Phytochemistry* 41, 1191–1195.
- Kim, K.H., Moon, E., Choi, S.U., Kim, S.Y., Lee, K.R., 2013. Lanostane triterpenoids from the mushroom *Naematoloma fasciculare*. *J. Nat. Prod.* 76, 845–851.
- Lal, A.R., Cambie, R.C., Rutledge, P.S., Woodgate, P.D., 1990. Ent-pimarane and ent-abietane diterpenes from *Euphorbia fijiiana*. *Phytochemistry* 29, 2239–2246.
- Lee, J., Kim, N.H., Nam, J.W., Lee, Y.M., Jang, D.S., Kim, Y.S., Nam, S.H., Seo, E.-K., Yang, M.S., Kim, J.S., 2010. Scopoletin from the flower buds of *Magnolia fargesii* inhibits protein glycation, aldose reductase, and cataractogenesis *ex vivo*. *Arch. Pharm. Res.* 33, 1317–1323.
- Marco, J.A., Sanz-Cervera, J.F., Checa, J., Palomares, E., Fraga, B.M., 1999. Jatrophone and tigiliane diterpenes from the latex of *Euphorbia obtusifolia*. *Phytochemistry* 52, 479–485.
- Matsuda, S., Katoda, S., Tai, T., Kikuchi, T., 1984. Isolation and structures of hedyotisol-A, -B, and -C. Novel dilignans from *Hedyotis lawsoniae*. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 5066–5069.
- McCormick, I.R.N., Nixon, P.E., Waters, T.N., 1976. On the structure of prostratin: an X-ray study. *Tetrahedron Lett.* 17, 1735–1736.
- Nes, W.D., Koike, K., Jia, Z., Sakamoto, Y., Satou, T., Nikaïdo, T., Griffin, J.F., 1998. 9β -19-cyclosterol analysis by ^1H and ^{13}C NMR, crystallographic observations, and molecular mechanics calculations. *J. Am. Chem. Soc.* 120, 5970–5980.
- Öksüz, S., Gil, R.R., Chai, H., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A., Ulubelen, A., 1994. Biologically active compounds from the Euphorbiaceae: 2. Two triterpenoids of *Euphorbia cyparissias*. *Planta Med.* 60, 594–596.
- Pascal, S., Taton, M., Rahier, A., 1993. Plant sterol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 268, 11639–11654.
- Petersen, R.C., Brinbaum, G.I., Ferguson, G., Islam, K.M.S., Sime, J.G., 1968. X-Ray investigation of several phorbol derivatives. The crystal and molecular structure of phorbol bromofuroate-chloroform solvate at -160°C . *J. Chem. Soc. B* 980–984.
- Qi, S.-H., Wu, D.-G., Ma, Y.-B., Luo, X.-D., 2003. A novel flavane from *Carpa guianensis*. *Acta Bot. Sin.* 45, 1129–1133.
- Quezel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, vol. 1–2. CNRS, Paris.
- Ranjan, R., Sahai, M., 2009. Coumarinolignans from the seeds of *Annona squamosa* Linn. *E-J. Chem.* 6, 518–522.
- Tanaka, R., Kasubuchi, K., Kita, S., Matsunaga, S., 1999. Obtusifoliol and related steroids from the whole herb of *Euphorbia damaesyce*. *Phytochemistry* 51, 457–463.
- Tanaka, R., Kasubuchi, K., Kita, S., Tokuda, H., Nishino, H., Matsunaga, S., 2000. Bioactive steroids from the whole herb of *Euphorbia damaesyce*. *J. Nat. Prod.* 63, 99–103.
- The Plant List, 2013. Version 1.1. Published on the Internet. <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January).
- Urones, J.C., Barcala, P.B., Cuadrado, M.J.S., Marcos, I.S., 1988. Diterpenes from the latex of *Euphorbia broteri*. *Phytochemistry* 27, 207–212.
- Vasas, A., Sulyok, E., Martins, A., Rédei, D., Forgo, P., Kele, Z., Zupko, I., Molnar, J., Pinke, G., Hohmann, J., 2012. Cyclomyrsinane and premyrsinane diterpenes from *Euphorbia falcata* modulate resistance of cancer cells to doxorubicin. *Tetrahedron* 68, 1280–1285.
- Wu, D., Sorg, B., Hecker, E., 1994. Oligo- and macrocyclic diterpenes in Thymelaeaceae and Euphorbiaceae occurring and utilized in Yunnan (Southwest China) 6. Tigiliane type diterpene esters from latex of *Euphorbia prolifera*. *Phytother. Res.* 8, 95–99.