

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

BADJI MOKHTAR ANNABA UNIVERSITY
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA



جامعة باجي مختار - عنابة -

Année 2014

Faculté des Sciences
Département de Chimie

THÈSE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de **DOCTORAT**

Thème

**Etude ethnobotanique et chimique
d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut.**

Chimie Organique -Option - **Phytochimie**

Présentée par

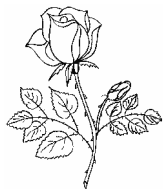
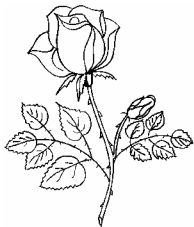
SMARA Ouanissa

Directeur de thèse Legseir Belgacem Professeur U. Badji Mokhtar Annaba

Devant le jury

Président	Delimi Rachid	Professeur	U. Badji Mokhtar	Annaba
Examineurs	Djerourou Abdelhafid	Professeur	U. Badji Mokhtar	Annaba
	Dendougui Hocine	Professeur	U. Kasdi Merbah	Ouargla
	Saidi Mokhtar	Professeur	U. Kasdi Merbah	Ouargla
	Ouahrani Med Ridha	Professeur	U. El-Oued	El-Oued

Dédicaces





A la mémoire de mon père



Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir.

Qui a été toujours dans mon esprit et dans mon cœur, je te dédie aujourd'hui ma réussite. Que Dieu, le miséricordieux, t'accueille dans son éternel paradis.



A ma très chère mère



Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.



A ma sœur et mes frères et leurs enfants



A mes tantes, mes oncles ainsi que mes cousins, cousines, mon beau-frère, mes belles-sœurs.

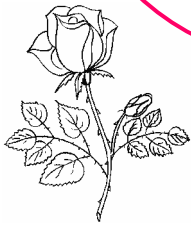


A mes chères copines chacun son nom



A tous ceux dont l'oubli du nom n'est pas celui du cœur.

Remerciements



Remerciements

*J*e tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur **Belgacem Legseir**, professeur à l'Université Badji Mokhtar, Annaba, pour avoir accepté de diriger ce travail. Je le remercie vivement pour son aide scientifique précieux et ses conseils qu'il a pu me fournir durant cette thèse et même avant ainsi que pour ses encouragements.

Le présent travail a été réalisé dans deux endroits:

*J*ai eu la chance et le plaisir de réaliser la majorité de ce travail au laboratoire de polyphénols R & D à Cap α Jacquou-Montpellier, France. Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à madame **Audile Vercauteren** et madame **Chantal Castagnino** pour m'avoir pour m'avoir accepté au sein de leurs laboratoire et de m'avoir permis de réaliser ce travail dans de bonnes conditions en me permettant d'utiliser tous les appareils du laboratoire et aussi pour leur aide, j'ai apprécié leur gentillesse.

*L*e reste du travail a été réalisé au laboratoire de pharmacognosie faculté de pharmacie Montpellier I, France. Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur **Joseph Vercauteren**, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de polyphénols R & D à Cap α en tant que président scientifique de ce laboratoire et au laboratoire de pharmacognosie faculté de pharmacie université Montpellier I, France, pour son aide, pour ses conseils précieux, son soutien et sa disponibilité durant mon stage qu'il trouve ma profonde reconnaissance. J'ai apprécié son dynamisme et son enthousiasme communicatifs, ainsi que la liberté qu'il m'a accordé.

*J*e souhaite exprimer ma profonde reconnaissance et mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont soutenu et aidé durant la réalisation de ce travail. Je remercie vivement, Melle **Audrey Julia**, Melle **Claire Vigor**, Madame **Cécile Morel-Salmi**, pour leurs aides, leurs soutiens, leurs encouragements et leurs conseils précieux tout au long de la période passée dans les deux laboratoires. Sans leurs aides je n'aurais pas pu terminer mes travaux de recherches et aussi pour leur orientation durant mon séjour en France, qu'elles trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont aussi aux membres de mon jury de thèse :

*J*e tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur **Rachid Delimi**, professeur à l'Université Badji Mokhtar, Annaba, d'avoir eu la gentillesse de présider le jury de soutenance de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

*J*e tiens également à remercier Monsieur **Abdelhafid Djerourou**, professeur à l'Université Badji Mokhtar, Annaba, pour avoir accepté d'examiner ce travail de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes remerciements les plus sincères.

*J*e n'aurais pas le courage de continuer ce travail sans la volonté et l'efficacité de Monsieur **Hocine Dendougui**, professeur à l'université Kasdi Merbah, Ouargla. Je tiens à lui exprimer mon grand respect et à le remercier pour son aide, pour ses conseils scientifiques et

d'avoir aussi accepté d'examiner ce travail de thèse. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour les heures investies dans la correction du présent manuscrit.

*J*e voudrais également remercier vivement Monsieur **Mokhtar Saidi**, Professeur à l'Université Kasdi Merbah, Ouargla, pour son soutien, ses conseils et pour avoir accepté d'examiner ce travail.

*J*e tiens à remercier vivement Monsieur **Ouahrani Mohamed Ridha** Professeur à l'Université d'el-oued pour l'honneur qu'il me fait d'être dans mon jury de thèse, pour sa participation scientifique et pour ses conseils.

J exprime aussi ma gratitude et ma reconnaissance à :

- *M*onsieur **Abdelkarim Cheriti** Professeur à l'université de Bechar,
- *M*onsieur **Touhami Lanez** Professeur à l'université d'El-Oued,
- *M*onsieur **Belkhir Dada Moussa** Professeur au centre universitaire Tamanrasset,
- *M*onsieur **Mohammed Hadjadj** Maître de conférences-A- à l'université Kasdi Merbah Ouargla.
- *M*onsieur **Ali Lounas** Maître de conférences-A- à l'université Kasdi Merbah Ouargla.
- *M*adame **Karima Dehak-oughlissi** Maître de conférences-A- à l'université Kasdi Merbah Ouargla.
- *M*onsieur **Abdelaziz Smara** Maître de conférences-A- à l'université Badji Mokhtar

*M*es précieux remerciements vont également à **Messaouda Dakmouche, Zhor Rahmani, Madame Karima Dehak-oughlissi et Rokia Charbi**, pour les précieux conseils, les encouragements, la gentillesse, le soutien et pour leurs disponibilités, qu'elles trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

*J*e remercie l'ensemble de ma famille et particulièrement ma mère, ainsi que ma sœur, mes tantes et mes frères pour le soutien et les encouragements qu'ils m'ont apportés durant ces années et même bien avant. Ils ont été une épaule sur laquelle je me suis si souvent reposée. Merci d'avoir cru en moi, d'avoir toujours été là pour moi et de m'avoir permis de réussir.

*D*ans ces quelques lignes, Je suis très reconnaissante envers toutes celles et ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'élaboration de cette thèse.

Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique d'une espèce endémique du Sahara septentrional d'Algérie. Elle appartient à la famille des Euphorbiaceae. L'endémisme de cette plante, ses utilisations en médecine traditionnelle et le fait qu'il n'y ait que peu de travaux qui l'ont ciblé nous ont encouragé à entamer cette étude.

Sur la base des résultats des analyses préliminaires, l'investigation phytochimique est appliqué sur la majorité des extraits des parties aériennes d'*Euphorbia guyoniana* Boissier et Reuter. Pour la séparation des extraits issus de cette espèce, différentes méthodes chromatographiques sont utilisées. Il s'agit de la chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant plusieurs révélations chimiques, la chromatographie sur colonne de gel de silice, la CLHP analytique et préparative ainsi que la chromatographie de partage centrifuge (CPC). L'utilisation des méthodes précédentes a permis l'identification d'un tanin hydrolysable, deux flavonoïdes de type flavonol et une coumarine simple.

Les structures moléculaires des quatre composés naturels isolés sont obtenues par caractérisation complète au moyen des méthodes spectroscopiques UV, MS, IR, et RMN 1D et 2D (1H, 13C-J. modulé, COSY, HSQC, HMBC) et par la comparaison des données à celles de la littérature.

Du point de vue biologique, une activité antioxydante importante a été observée pour la majorité des composés isolés des extraits.

Mots-clés : *Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter, Flavonoïdes, Flavonol, Tannin, Antioxydants, DPPH.

ملخص

هذا العمل هو دراسة كيميائية نباتية لواحدة من أصناف النباتات المتواجدة بشمال الصحراء الجزائرية. هذا النبات ينتمي إلى عائلة Euphorbiaceae. تواجد هذا النبات و استخداماته العديدة في الطب التقليدي و كذا عدم وجود دراسات كافية عليه، كلُّها أسباب دفعتنا إلى اقتحام البحث فيه.

إستنادا إلى نتائج التحليل الأولية تم التحقُّق الكيميائي الباقي لأغلب مستخلصات الأجزاء الظاهرة من نبات *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. لقد استخدمت طرق كروماتوغرافية مختلفة لفصل مستخلصات هذا الصنف من النباتات. الكروماتوغرافيا على طبقة رقيقة (CCM) بكواشف كيميائية عديدة، الكروماتوغرافيا على عمود من هلام السيليس، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (CLHP) التحليلية و التحضيرية، و كذا كروماتوغرافيا التقسيم بالطرد المركزي (CPC)، كلُّها طرقُ استخدمت في هذه الدراسة، ممَّا أدَّى إلى التعرف على دبع متحلل و اثنين من الفلافونويدات من الصنف فلافونال و كومرين بسيط.

تمَّ التعرف على البنى الجزيئية لأربعة مركبات طبيعية معزولة، و ذلك بالتشخيص التام بواسطة الطرق الطيفية: UV, MS, IR, et RMN 1D et 2D (1H, 13C-J. modulé, COSY, HSQC, HMBC) ، و كذا بمقارنة المعطيات مع ما هو موجود بالمراجع المختلفة.

من وجهة نظر بيولوجية، لقد لوحظ نشاط هامٌّ مضاد للتأكسد لأغلب المركبات المعزولة للمستخلصات.

الكلمات المفتاحية: *Euphorbia guyoniana* Boissier et Reuter، الفلافونيدات، الفلافونول، التانين، مضادات الأوكسدة، DPPH.

Abstract

This work is devoted to phytochemical study a species endemic to the Northern Sahara of Algeria. It belongs to the Family Euphorbiaceae. The Endemism of this plant, its uses in traditional medicine, and the fact that he did little work that targeted it have encouraged us to begin this study.

On the basis of the results of the preliminary analysis, the phytochemical investigation is applied to the majority of extracts of aerial parts of *Euphorbia guyoniana* Boissier and Reuter. For the separation of extracts of this species, different chromatographic methods are used. It comes to TLC thin (CCM) using several chemical revelations, silica gel column chromatography, analytical and preparative HPLC as well as partition chromatography centrifuge (CPC). The use of the previous methods allowed the identification of hydrolysable tannin, two type flavonol flavonoids and a simple coumarin.

The molecular structures of the four isolated natural compounds are obtained by complete characterization using spectroscopic methods UV, MS, IR and NMR 1D and 2D (1 H, 13 c - j. modulated, COSY, HSQC, HMBC) and by comparison of the data with those of the literature.

From the biological point of view, an important antioxidant activity was observed for the majority of the isolated compounds extracts.

Keywords: *Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter, flavonoids, Flavonols, Tannin, antioxidant, DPPH.

Abréviations

Abréviations

$\cdot\text{O}_2^-$	Anion superoxyde
$[\alpha]_D$	Pouvoir rotatoire spécifique à la longueur d'onde D du sodium
ABTS:	2, 2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) diammonium salt
AcOEt:	Acétate d'éthyle
AlCl_3	Chlorure d'aluminium
BHA :	3-tert-butyl-4-hydroxyanisole
BuOH:	butanol
CCC :	Chromatography contre -courant
CCM :	Chromatographie sur Couche Mince
CD_3OD :	Méthanol deutéré
CDCl_3 :	Chloroforme deutéré
CH_2Cl_2 :	Dichlorométane
CH_3OH	Méthanol
CLHP:	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CoA:	Coenzyme A
COSY :	Correlation Spectroscopy
CPC :	Chromatographie de partage centrifuge
CUPRAC:	Cupric Reducing Antioxydant Capacity
d:	Doublet
DCM:	Dichloromethane
dd:	Doublet dédoublé
DEPT:	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DHHDP:	Déhydrohexahydroxydiphéniques
DPPH:	2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
<i>E. g.</i>	<i>Euphorbia guyoniana</i>
EAR	Efficacité anti-radicalaire
EC_{50} :	Concentration efficace en composé phénolique pour faire disparaître 50 % du DPPH initial
ESI :	Spectrométrie de masse par électrospray
FBS B:	Réactif au Sel de Blue Solide B
FCPC:	Fast Centrifugal Partition Chromatography
Glucu:	Acide Glucuronide
H_2O :	Eau
HHDP :	Hexahydroxydiphénique appelé acide ellagiques
HMBC:	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC:	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HSQC:	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IC_{50} :	Concentration permettant d'inhiber 50% du signal de référence
IR :	Infra-rouge
J (Hz) :	Constante de couplage en Hertz
J-mod:	J-modulated spin-echo
KD:	Coefficient de Distribution
m:	Massif
MS^n	les fragmentations
MS^2	MS/MS

Abréviations

MS ³	MS/MS/MS
m/z :	Masse/charge d'un ion
MeOH :	Méthanol
NaOH :	Hydroxyde de Sodium
ORAC :	Oxygen Radical Absorbance Capacity
P.F :	Point de fusion
ppm:	Partie par million
RDA:	Rétro diels-Alder
Rf :	Rapport frontal (CCM)
RMN 1H :	Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN:	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN(<i>J</i> _{MOD}) ¹³ C:	Résonance magnétique nucléaire du carbone 13 en <i>J</i> modulé
rpm :	Rotations par minute
s :	Singulet
SM :	Spectrométrie de masse
TFA :	Acide trifluoroacétique
TGG	1, 2, 6 tri- <i>O</i> -galloyl-β-D-glucose
TRAP:	Total Radical Trapping Parameter
TRAP:	Ferric Reducing Antioxydant Power
Trolox:	6-hydroxy- 2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
u.m.a.	Unité de masse atomique
UV :	Ultraviolet
δ (ppm) :	Déplacement chimique en partie par million
ε :	Coefficient d'absorption (molaire ou massique)
λ _{max} :	Longueur d'onde d'absorption maximale

Liste des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	La page
I-1	Espèces du genre <i>Euphorbia</i> en Algérie	9
I-2	Travaux antérieurs du genre <i>Euphorbia</i>	12
II-1	Molécules impliquées dans la biosynthèse des flavonoïdes selon des enzymes spécifiques	34
II-2	Résumé des déplacements chimiques du cycle C pour les différents types de flavonoïdes	39
II-3	Exemple des dérivés coumariniques	42
V-1	Extraits préparés à partir d' <i>Euphorbia guyoniana</i>	82
V-2	Regroupe toute les analyses spectrales du composé I	94
V-3	Les ions m/z observés pour le composé II en mode ESI négatif	107
V-4	Données RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé (III) (500 MHz dans un mélange deutrée CD ₃ OD, D ₂ O (v/v 40/60) et la constante de couplage <i>J</i> en (Hz)	116
V-5	Les ions m/z observés pour le composé III en mode négatif	120
V-6	Données RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé (III) (500 MHz dans un mélange deutrée CD ₃ OD, D ₂ O (v/v 40/60) et la constante de couplage <i>J</i> en (Hz)	128
V-7	Les fractions de la première colonne	129
V-8	Les fractions de la deuxième colonne	130
V-9	Données RMN ¹ H et RMN ¹³ C du composé (IV) (500 MHz dans le méthanol deutrée CD ₃ OD et la constante de couplage <i>J</i> en (Hz)	140
V-10	Activités réductrices des composés isolés et leurs extraits sur le radical DPPH en solution. Mesures spectrophotométriques effectuées à 515 nm, 45 min après l'ajout du réactif	145
VI-1	Les conditions CLHP analytique pour les deux extraits	155

Liste des figures et des tableaux

VI-2	Les conditions CLHP-préparative pour l'extrait acétate d'éthyle	157
VI-3	Les conditions CLHP-préparative pour l'extrait butanolique	158
VI-4	Déplacement chimique (en ppm) des solvants deutérés utilisés	162

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
I.1	Position systématique des Euphorbiaceae	4
I.2	Position systématique des Euphorbiaceae au sein de l'ordre des Malpighiales	5
I.3	Structure de différents diterpènes du latex d' <i>Euphorbia</i>	10
I.4	Structures de quelques molécules isolées du genre <i>Euphorbia</i>	15
I.5	Carte de répartition géographique d' <i>Euphorbia guyoniana</i> au Sahara septentrional selon Africain plantes data bases	16
I.6	Photos (a, b, c, d) d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut.	18
II.1	Différents structures du cycle central des flavonoïdes	30
II.2	Structure des flavonoïdes: enchaînement C6-C3-C6	30
II.3	Schéma des sous-classes des flavonoïdes	31
II.4	Structure des différents types de flavonoïde	32
II.5	Structure des Chalcones et des Aurones	33
II.6	Structure principale des anthocyanes	34
II.7	Origine biosynthétique des flavonoïdes	37
II.8	Oxydation d'un flavonoïdes de (d) à (e)	40
II.9	a-Benzopyrone	40
II.10	La synthèse 2H-1-Benzopyran-2-one	41
II.11	Structures de base des coumarines	43
II.12	Structures des différents acides dérivant des tannins hydrolysables	45
II.13	La biosynthèse d'un tanin gallique glucosylé	47
II.14	Exemple de structure d'un tanin condensé (proanthocyanidol	48
III. 1	Schéma d'une chaîne de CPC	49

Liste des figures et des tableaux

III.2	Schéma descriptif de l'appareil de chromatographie de partage Centrifuge (CPC à disques « sandwichs ») utilisé au laboratoire	51
III.3	Exemple de disque et de cellules de partage des appareils CPC	52
III.4	Diagramme de phase ternaire issu d'après (Renault, J.H., 1997)	54
III.5	Chromatogramme obtenu après un développement par élution d'un composé X	57
III.6	Chromatogrammes obtenus après le développement par élution de deux composés présentant un facteur de sélectivité différent	58
III.7	Résolution R_s	60
III.8	Evolutions de l'efficacité de la colonne en fonction du type d'écoulement dans une cellule de partage en CPC, du débit de pompage en mode descendant et de la vitesse de rotation pour les systèmes biphasiques n-heptane/méthanol (1 :1, v/v) d'après (Marchal L., 2000)	61
III.9	Modes ascendant et descendant en CPC	62
IV.1	Structure de quelques antioxydants	69
IV.2	Différentes réactions des antioxydants avec les flavonoïdes	70
IV.3	Les réactions d'un antioxydant	73
V.1	Chromatogrammes LC/DAD-UV à 320 nm pour l'extrait acétate d'éthyle	83
V.2	Chromatogrammes LC/DAD-UV à 320 nm pour l'extrait butanolique	84
V.3	Chromatogramme LC/DAD-UV à 280 nm pour le bloc-CPC d'extrait acétate d'éthyle (4b)	85
V.4	Chromatogramme LC/DAD-UV à 280 nm pour le composé I	86
V.5	Spectre ultra-violet du composé I	87
V.6	Spectre de masse en mode d'ionisation positive du composé I	88
V.8	Spectre de masse en mode négative du composé I	89
V.9	Spectre MS^2 m/z à 465,05	90

Liste des figures et des tableaux

V. 10 (a, b, c et d)	Spectre RMN- ¹³ C J-modulé du composé I	91
V. 11	Spectre RMN- ¹ H du composé I	93
V. 12 (a et b)	Spectre COSY ¹ H- ¹ H du composé I	94
V.13 (a, b, c)	HSQC du composé I	95
V. 14 (a, b, c et d)	HMBC du composé I	96
V. 15	Schéma de corrélation HMBC du composé I	99
V. 16	Structure de 1, 2, 3-tri-galloyl-β-D-glucose (TGG)	100
V. 17	Schéma des fragmentations du spectre MS ² du composé I	101
V.18	Chromatogramme LC/DAD-UV à 320 nm pour le composé II	103
V.19	Chromatogramme LC/DAD-UV à 320 nm pour le composé III	103
V.20	Spectre Ultrat-Visible du composé II	104
V.21	Spectre IR du composé II	105
V.22	Spectrométrie de masse du composé II en mode négative	106
V. 23	Spectre MS ² m/z à 476,93 du composé II en mode négative	107
V.24	Spectre MS ³ m/z à 300,98 du composé II en mode négative	109
V.25	Spectre RMN ¹³ C-J-modulé du composé II (500 MHz)	109
V.26	Spectre RMN ¹ H du composé II (500 MHz)	110
V.27 (a, b, c)	Spectre RMN H-H COSY du composé II	111
V.28	Spectre HMBC du composé II (500MHz)	113
V.29	Schéma des corrélations HMBC du composé II	113
V. 30	Schéma de différentes fragmentations (MS, MS2, MS3) du composé II	114
V.31	Structure quercétine -3-O-β-glucuronide (composé II)	115
V. 32	Spectre Ultra-Visible du composé III	117
V.33	Spectre IR du composé III	118

Liste des figures et des tableaux

V.34	Spectre de masse du composé III	119
V.35	Spectre de masse MS ² du composé III	119
V.36	Spectre de masse MS ³ du composé III	120
V.37	Spectre RMN ¹³ C J-modulé du composé III	122
V. 38	Spectre RMN ¹ H du composé III	123
V. 39	RMN ¹ H-COSY du composé II	123
V. 40	Spectre HSQC du composé III	124
V. 41	Spectre HMBC du composé III	125
V.42	Spectre HMBC étalé de 3ppm à 8.5 ppm du composé III	125
V.43	Schéma des corrélations HMBC du composé III	126
V.44	Structure du composé III	126
V. 45	Schéma des fragmentations en (MS, MS ² , MS ³) du composé III	127
V.46	Photos (a, b et c) de quelques cristaux du produit isolés de l'extrait acétate d'éthyle des graines	131
V. 47	Spectre de masse du composé IV	132
V.48	Spectre de masse MS ² du composé IV	133
V.49	Spectre de carbone J-modulée du composé IV	134
V.50	Spectre de RMN ¹ H du composé IV	135
V. 51 (a, b)	Spectre COSY du composé III	136
V. 52 (a, b)	Spectre HSQC du composé IV	136
V .53	Schéma de la HMBC du composé IV	138
V .54	Structure du composé IV	138
V .55	Schéma de principaux fragments du composé IV	139
V .56	Structure de l'esculetine	139

Liste des figures et des tableaux

V.57	L'activité antioxydante EC ₅₀ des composés isolés	146
VI.1	Le test de la réaction à la cyanidine	149
VI.2	Schéma de protocole d'extraction 1 d' <i>Euphorbia</i> guyoniana Boiss. & Reut.	150
VI.3	Schéma de protocole d'extraction 2 des graines d' <i>Euphorbia</i> guyoniana Boiss. & Reut.	151
VI.4	Mécanisme réactionnel Sel de Bleu Solide B	153
VI.5	Mécanisme réactionnel d'un composé avec le réactif de NEU	154
VI.6	Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle par la CPC	159
VI.7	La courbe d'étalonnage de DPPH	164
VI.8 (a,b,c,d,e,f,g)	Les courbes cinétiques de concentrations différentes	165

Table des matières

SOMMAIRE

Remerciement	
Résumé	
Abréviation.....	I
Sommaire.....	III
Liste de figure.....	VII
Liste des tableaux.....	IX
Introduction générale.....	IVX

1- Partie Bibliographie

Chapitre –I- Euphorbiaceae

I-1-Position systématique, données botaniques et chimiques.....	2
I.1.1. Position systématique de la famille Euphorbiacées.....	2
I.1.2. Les plantes utiles de la famille des Euphorbiacées.....	6
I.1.3. Chimie des Euphorbiacées.....	8
I.2. Le genre <i>Euphorbia</i>	8
I.2.1. Présentation d' <i>Euphorbia</i>	8
I.2.2. Toxicité d' <i>Euphorbia</i>	9
I.2.3. Utilisation d' <i>Euphorbia</i>	11
I.2.4. Etudes phytochimiques antérieures du genre <i>Euphorbia</i>	11
I.3. L'espèce <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss.& Reut.....	15
I-3-1- systématique botanique.....	18
I.3.2. Toxicité d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut.....	19
I.3.3. Utilisation d' <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut.....	19
I.3.4. Travaux antérieurs et les composés isolés des <i>Euphorbia guyoniana</i> Boiss. & Reut.....	19
I.4. Conclusion.....	24
Références bibliographiques.....	25

Chapitre –II- Les métabolites secondaires phénoliques

II. Les métabolites secondaires.....	29
II.1. Les flavonoïdes.....	29
II.1.2. Les sous-classes des flavonoïdes.....	29
II.1.2.1. Les chalcones et les aures.....	32
II.1.2.2. Flavones et flavonols.....	33
II.1.2.3. Flavanones et dihydroflavonoles.....	34
II.1.2.4. Anthocyanes.....	34
II.1.3. La biosynthèse des flavonoïdes.....	34
II.1.4. Rôle des flavonoïdes chez l'homme et les plantes.....	37
II.1.5. RMN des flavonoïdes.....	38
II.1.5. 1. Les déplacements chimiques du cycle C pour les différents types de flavonoïdes...38	
II.1.5. 2. RMN ¹ H des flavonoïdes.....	39
II.1.6. La spectrométrie de masse.....	39
II.2. Les coumarines.....	40
II.2.1. Répartition, localisation et classification.....	41

Table des matières

II.3. Les tanins.....	44
II.3.1. Tanins hydrolysables.....	44
II.3.1.1. Structure des tanins hydrolysables.....	45
II.3.2. Tanins condensés.....	48
II.4. Conclusion.....	48
Références bibliographiques.....	49

Chapitre –III- Chromatographie de partage

III.1. Chromatographie de partage (CPC).....	52
III.2. Principe de la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC).....	53
III.3. Instrumentation utilisée.....	53
III.3.1. Pompe.....	54
III.3.2. Injecteur.....	55
III.3.3. Colonne chromatographique.....	55
III.3.3.1. Rotor.....	55
III.3.3.2. Détecteur et Enregistreur.....	58
III.3.3.3. Collecteur de fractions.....	58
III.4. Choix des solvants et diagrammes de phase.....	58
III.5. Les avantages et les inconvénients.....	60
III.5.1. Avantages.....	60
III.5.2. Inconvénients.....	60
III.6. Grandeurs chromatographiques.....	60
III.6.1. Coefficients de distribution KD.....	60
III.6.2. Volume de rétention V_r	61
III.6.3. Taux de rétention de phase stationnaire S_f	62
III.6.4. Sélectivité α	63
III.6.5. Nombre de plateaux théoriques N.....	64
III.6.6. Résolution R_s	64
III.6.7. Perte de charge.....	65
III.6.8. Débit et vitesse de rotation.....	65
III.7. Caractéristiques importantes en CPC.....	67
III.8. Conclusion.....	68
Références bibliographiques.....	69

Chapitre –IV-Antioxydants

IV.1. Généralité.....	72
IV.2. Définition d'un antioxydant.....	73
IV.2.1. Les antioxydants.....	73
IV.3. La capacité d'antioxydant.....	75
IV.4. Classification des antioxydants.....	75
IV.5. L'évaluation de la capacité antioxydante par le DPPH [*]	76
Références bibliographiques.....	79

Table des matières

2- Partie Résultats et discussions

V.1. Préparation des extraits bruts.....	82
V.2. Criblage chimique général préliminaire par CCM.....	82
V.2.1. Interprétation des CCM préliminaires.....	82
V.3. Criblage chimique général et analyses LC/DAD-UV préliminaires.....	83
V.2.2. Résultats et discussions.....	83
V.3. Investigation phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle.....	84
V.3.1. Analyse de l'extrait acétate d'éthyle par la chromatographie de partage centrifugeuse (CPC)	84
V.3.2. Fractionnement du bloc CPC (4b) par CLHP préparative.....	85
V.3.3. Identification du produit isolé de l'extrait acétate d'éthyle	86
V.3.3.1. Elucidation structurale du composé I	86
V.3.4. Identification des produits isolés de la première extraction	103
A. L'extrait butanol.....	103
V.3.4.1. Elucidation structurale du composé II	104
V.3.4.2. Elucidation structurale du composé III	116
V.3.5. Identification des produits isolés de la deuxième extraction.....	129
V.3.5.1. Elucidation structurale du composé IV (Cristaux) (l'escultine).....	129
V.4. Conclusion.....	140
Références bibliographiques.....	141

Test antioxydant

V.5. Pouvoir antioxydant des produits isolés.....	144
Références bibliographiques.....	147

3- Partie Expérimentale

VI.1. Matériel végétal.....	148
VI.2. Recherche de quelques principes actifs.....	148
VI.2.1 Recherche des alcaloïdes.....	148
VI.2.2. Flavonoïdes (test à la cyanidine).....	148
VI.3. Les protocoles des extractions.....	149
VI.3.1. (a) Extraction 1.....	149
VI.3.2. (b) Extraction 2.....	149
VI.4. Séparation et purification.....	152
VI.5. Méthodes chromatographiques analytiques.....	152
VI.5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).....	152
Réactif de Chlorure de fer III (Révélateur des tanins).....	152
Réactif au sel de Bleu Solide B (pour la détection des phénols et des tanins).....	153
Réactif de Neu ou NP/PEG (Révélateur des flavonoïdes).....	154
VI.5.2. Chromatographie liquide haute performance (CLHP).....	154
VI.6. Méthodes chromatographiques préparatives.....	156
VI.6.1. Chromatographie d'adsorption sur colonne ouverte.....	156
VI.6.2. Chromatographie liquide à haute pression préparative.....	157

Table des matières

VI.6.3. Chromatographie de partage centrifuge (CPC).....	158
VI.7. Méthodes Physico-chimiques.....	159
VI.7.1. Point de fusion (P.F.).....	159
VI.7.2. Pouvoir rotatoire $[\alpha]_D$	160
VI.7.3. Spectrophotométrie Ultraviolet (UV).....	160
VI.7.4. Spectrophotométrie infrarouge (IR).....	161
VI.7.5. Spectrométrie de masse (MS).....	161
VI.7.6. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN).....	161
RMN monodimensionnelle (RMN-1D).....	162
- RMN de proton (^1H).....	162
- RMN carbone (^{13}C) : DEPT et J-MODULE.....	162
RMN bidimensionnelles (RMN-2D).....	162
- Corrélations homonucléaires.....	162
- Corrélations hétéronucléaires.....	163
VI.7.7. Réactivité avec le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH).....	163
- La courbe de calibration.....	164
- Courbe cinétique.....	164
VI.8. Conclusion	168
Références bibliographiques.....	169
Conclusion générale et perspective.....	171
Références bibliographique.....	174



Introduction générale

Introduction générale

L'utilisation thérapeutique des vertus extraordinaires des plantes fait partie intégrante des pratiques ancestrales. En effet, l'homme a longtemps employé des remèdes traditionnels à base de plantes sans savoir à quoi étaient dues leurs actions bénéfiques. A l'heure actuelle, les plantes demeurent encore une source précieuse de nourriture et de remèdes à laquelle fait appel une large couche des populations mondiales, notamment celles des pays en voie de développement.

Bien qu'une grande partie du XX^{ème} siècle ait été consacrée à la mise au point de molécules de synthèse, la recherche de nouveaux agents bioactifs *via* le screening de sources naturelles n'a jamais été abandonnée. Les substances naturelles isolées à partir des végétaux ont montré des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse.

Le Sahara algérien connu pour son hostilité, dispose pourtant d'une grande diversité floristique. Cette richesse connaît une dégradation intense depuis quelques décennies. Les espèces évoluant dans ce milieu offrent généralement des molécules dotées d'activités biologiques intéressantes. Parmi ces composés, on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique.

Parmi les métabolites secondaires polaires, les flavonoïdes constituent un large groupe de polyphénols distribués dans tout le règne végétal. En plus de leur possibilité d'utilisation comme marqueurs chimiotaxonomiques, ils sont connus pour leur large spectre d'activités biologiques. Ils sont utilisés notamment comme anti-inflammatoire, antiulcéreux, anticancéreux, antibactériens, ...etc (**Correia, 2006**) [1], mais la plus importante est leur activité antioxydante (**L'huiller, 2007**) [2].

Les antioxydants sont des molécules ou micro constituants capables d'interférer avec les radicaux libres. Ils agissent par le piégeage directement et spécifiquement des radicaux libres par des mécanismes de transfert d'électrons et de protons. Ils peuvent également chélater des ions de métaux de transition (Fe^{2+} , Cu^+) dont le rôle biologique est de promouvoir la production de radicaux libres. Les études actuelles ont montré que les extraits végétaux et les molécules qui en sont isolées, constituent la majorité de ces antioxydants (**Nève, 2002**) [3].

La famille des Euphorbiaceae est connue pour être cosmopolite et d'une grande diversité tant sur le plan botanique que chimique. Elle offre plusieurs plantes d'intérêt économique, (**Hernández, 2003 ; Manga, 2004 ; Chhabra, 1994 ; Haba, 2008**) [4-7] et d'autres largement utilisées en médecine traditionnelle. Parmi les espèces représentant cette famille dans le Sahara algérien, *Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut. Cette espèce endémique à l'Algérie a fait l'objet de deux études phytochimiques antérieures. La première réalisée sur les parties aériennes a conduit à l'isolement et la caractérisation de deux diterpènes polyesters à squelette jatrophone, alors que la seconde menée sur les racines s'est

Introduction générale

soldée par l'isolement et l'identification de nombreux diterpènes et triterpènes de squelettes carbonés divers. La composition des extraits polaires de cette espèce reste cependant inconnue (Haba, 2007 et 2009 ; Ahmad, 2006) [8-10].

Dans ce contexte et dans l'objectif de contribuer à la valorisation des plantes poussant dans notre Sahara, nous nous sommes proposé d'étudier les extraits issus des parties aériennes de l'espèce *guyonianus tithymlus* (*Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter) Klotzsch & Garck récoltée dans la région d'Oued Souf. Notre choix s'est porté sur cette espèce à cause de ses nombreux usages en médecine traditionnelle et parce qu'elle n'a été que peu étudiée sur les plans phytochimique et pharmacologique.

Le présent travail a pour principal but de réaliser une investigation approfondie des fractions polaires et peu polaires des extraits qui n'ont pas fait l'objet d'études auparavant, avec l'espoir d'aboutir à une découverte enrichissante en utilisant certaines techniques chromatographiques comme la CLHP et la CPC ainsi que les diverses méthodes spectroscopiques UV, IR, NMR (1D, 2D), et MS.

Notre travail décrit dans cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une collaboration scientifique entre notre laboratoire (L.S.B.O) à l'université de Badji Mokhtar Annaba et le laboratoire de pharmacognosie de l'université de Montpellier 1 (France).

Il sera réparti en trois parties :

- Une première partie consacrée aux rappels bibliographiques qui englobent quatre chapitres :
 - Le premier chapitre présentera une étude botanique sur la famille, le genre et l'espèce suivie de la répartition de la plante.
 - Le deuxième chapitre se portera sur les métabolites secondaires et leurs biosynthèses.
 - Le troisième chapitre concernera l'appareil de chromatographie de partage centrifuge (CPC).
 - Le quatrième chapitre aura pour objet une présentation de l'activité antioxydante (la méthode de DPPH)
 - La deuxième partie où nous exposerons l'ensemble des résultats et discussion de l'étude phytochimique. Elle sera suivie de l'évaluation de l'activité antioxydante en utilisant le DPPH sur les extraits bruts et les composés isolés.
- Enfin une troisième partie qui décrira le matériel et les méthodes utilisés pour l'isolement et la purification des composés.

Références bibliographiques

1. Correia, H., et al., *Polyphenolic profile characterization of Agrimonia eupatoria L. by HPLC with different detection devices*. Biomedical chromatography, 2006. **20**: p. 88-94.
2. Lhuillier, A., et al., *Comparison of flavonoid profiles of Agauriasalicifolia (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2007. **1160**(1-2): p. 13-20.
3. Néve, J., *Modulation de l'apport alimentaire en anti-oxydants Optimisation of dietary intake of anti-oxidants*. Nutrition clinique et métabolisme, 2002. **16**. P : 292-300
4. Hernández, T., Canales M., Avila J.G., Duran A., Caballero J., Romo de Vivar, A., Lira, R., *Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México)*. Journal of Ethnopharmacology, 2003. **88** (2-3), P: 181-188.
5. Manga, H.M., Brick D., Marie D. E. P., Quetin-Leclercq J., *In vivo anti-inflammatory activity of Alchornea cordifolia (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae)*. Journal of Ethnopharmacology, 2004. **92** (2-3), P: 209-214.
6. Chhabra, S.C. and Mahunnah, R.L.A., *Plants used in traditional medicine by hayas of the kagera region, Tanzania*. J.Economic Botany, 1994. **84** (2), p: 121-129.
7. Haba, H., Lavaud. C., Harkat.H., Alabdul Magid., A.M. , Marcourt. L., Benkhaled.M., *Diterpenoids and triterpenoids from Euphorbia guyoniana*. J. Phytochemistry, 2007. **68** (9). P: 1255-1260.
8. Haba, H., Lavaud. C. Marcourt. L., Long. C., Harkat, H., Benkhaled.M., *Ent-abietane diterpenoids from Euphorbia guyoniana Boiss. & Reut.* Biochemical Systematics and Ecology XXX, 2009. P: 1-5.
9. Ahmed, A. A., Gherraf, N., El-Bassuony, A. A., Rhuati. S., Gad, M. H., Ohta, S., Hirata, T., *Guyonianin A and B, Two Polyester Diterpenes from Algerian Euphorbia guyoniana*. Natural Product Communications, 2006. **1**. P: 273-279.



I-Partie bibliographique



Chapitre I
L'Euphorbiaceae

I.1. Position systématique, données botaniques et chimiques

I.1.1. Position systématique de la famille Euphorbiaceae

La position systématique des Euphorbiaceae et, plus spécifiquement le genre *Euphorbia* L. ayant déjà fait l'objet d'une étude au sein du laboratoire de Chimie et Chimie de l'Environnement (L.C.C.E), Département de Chimie, Faculté des Sciences, Université de Batna (**Haba, 2008**) [1], nous nous proposons de n'aborder que, très brièvement, ce thème, à travers quelques remarques inhérentes aux dernières classifications.

La famille des Euphorbiaceae, avec ses 5000 à 10000 espèces regroupées dans près de 300 genres (**Spichiger^a, 2000**) [2] est l'une des familles les plus vastes et les plus cosmopolites que compte le sous embranchement des Angiospermes. Paradoxalement, il s'agit de l'une des moins connue du point de vue systématique. Deux explications peuvent être apportées à cet état de fait : tout d'abord en raison de sa distribution, puisque principalement localisée en des zones tropicales, mais aussi en raison de l'existence de « fleurs minuses » chez certains de ses représentants ne facilitant évidemment en rien toute étude botanique (**Webster, 1987**) [3].

Cependant, depuis un siècle et demi, quelques systématiciens se sont penchés et se penchent encore sur la classification de cette grande famille. En effet, la classification botanique, loin d'être statique, est une discipline en perpétuelle évolution. De nombreux travaux, intégrant un nombre toujours plus important de caractères tant morphologiques qu'anatomiques, conduiront à la création de nouveaux systèmes de classifications, ainsi qu'aux remaniements de certains d'entre eux. Jusqu'à ces vingt dernières années, aucune de ces modifications n'a eu de répercussions directes sur la famille des Euphorbiaceae en ce sens que l'ensemble des auteurs se sont toujours accordés à penser que la principale famille, représentative de l'ordre des Euphorbiaceae, définie par Lindley en 1833, restait les Euphorbiaceae (**Webster, 1987**) [3]. Les modifications apportées aux différents systèmes de classifications ne l'étaient véritablement qu'en amont de l'ordre des Euphorbiaceae (**Spichiger^a, 2000**) [2].

Ainsi, pour Engler (1896), la famille des Euphorbiaceae appartenait aux Spermaphytes, Angiospermes, Dicotylédones, Dialypétales, Thalamiflores et à l'ordre des Géraniales, sous ordre des Euphorbiaceae.

Cronquist (1981), situait la famille des Euphorbiaceae dans le super-ordre des Rosidae et l'ordre des Euphorbiales.

Dahlgren (1989), pour sa part, classait cette même famille dans le super-ordre des Malviflorae et l'ordre des Euphorbiaceae.

Thorne (1992) proposait, quant à lui une classification situant les Euphorbiaceae dans le super-ordre des Malvanae et l'ordre des Euphorbiales.

Ce n'est qu'avec l'apparition de la nouvelle classification phylogénétique, reposant sur les principes de la phénétique¹ et la cladistique², qu'un véritable bouleversement dans la systématique intervient.

Alors que précédemment les plantes à fleurs constituaient un embranchement dénommé *Magnoliophyta* qui avait été divisé en deux classes :

- Les monocotylédones (*monocotyledonae* ou *Liliopsida*)
- Les dicotylédones (*Dicotyledonae* ou *Magnoliopsida*)

De nombreuses études phylogénétiques conduisent à une dichotomie en marge de la division « classique » avec non plus les deux grandes classes précédemment citées, mais les angiospermes monoaperturés et les angiospermes supérieures ou Eudicotylédones.

Un groupe de chercheurs travaillant à l'élaboration d'un système de classifications phylogénétiques moléculaires, dénommé Angiosperm Phylogeny Group (APG), a publié, en 1998, une nouvelle classification, totalement novatrice, intégrant l'ensemble de ces données que nous nous proposons de retenir. Ainsi, les Euphorbiaceae appartiennent aux Angiospermes supérieurs ou Eudicotylédones, à l'ordre des Rosidaes, Rosidaes hypogynes, Gamacarpellées, discifères ou Glandulifères, à feuilles généralement simples, entières (Eurosides I), ordre des Malpighiales (**Figures 1 et 2**).

¹ Phénétique : approche par la quelle, le maximum de caractères est codé ; puis un algorithme mathématique permet de reconstruire un arbre « généalogique »

² Cladistique : méthode phylogénétique basée sur la reconnaissance des caractères primitifs et dérivés, son adoption ayant été rendue possible grâce à l'acceptation du principe de l'évolution.

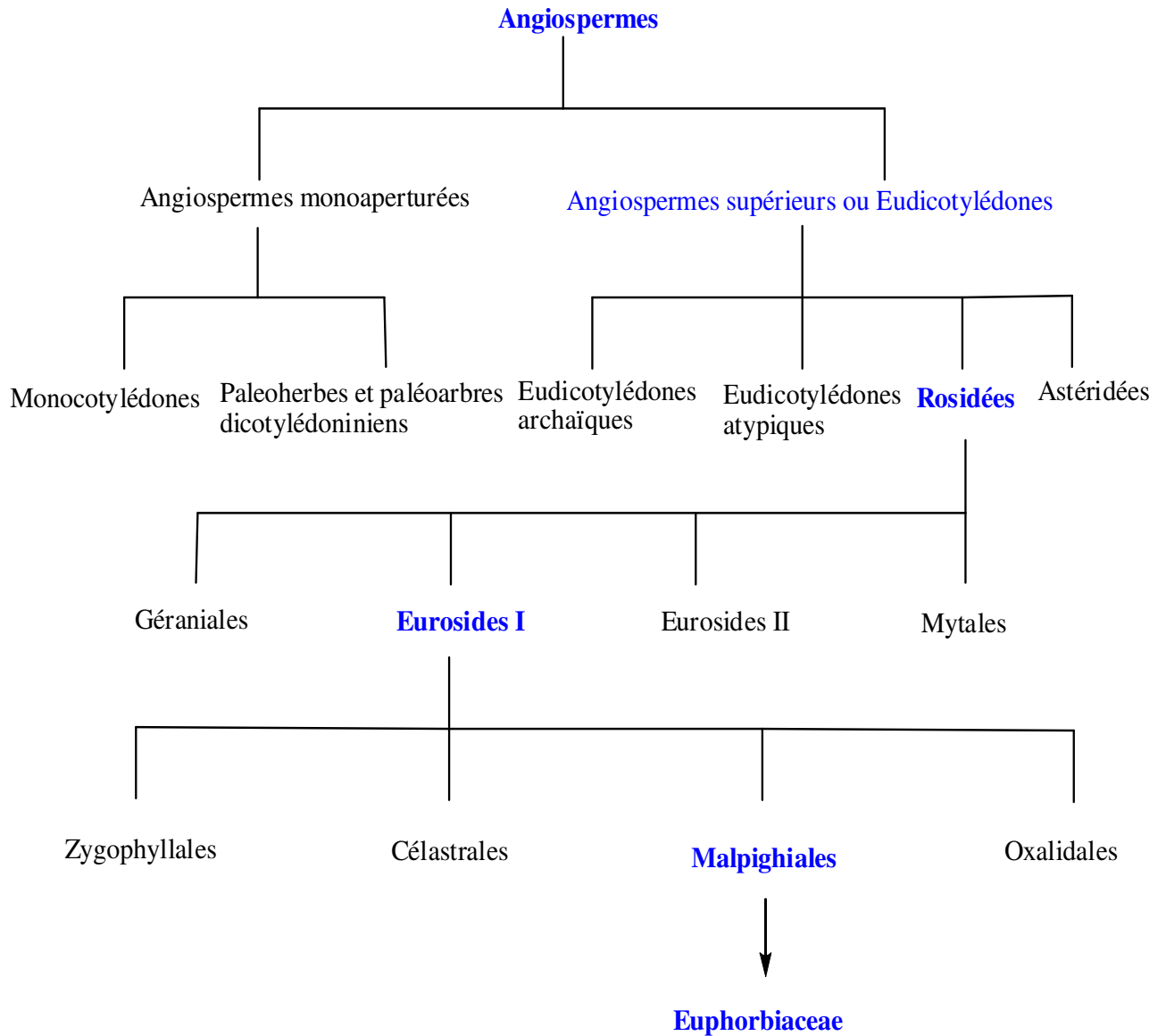


Figure I.1 : Position systématique des Euphorbiaceae (Spichiger^a, 2000) [2].

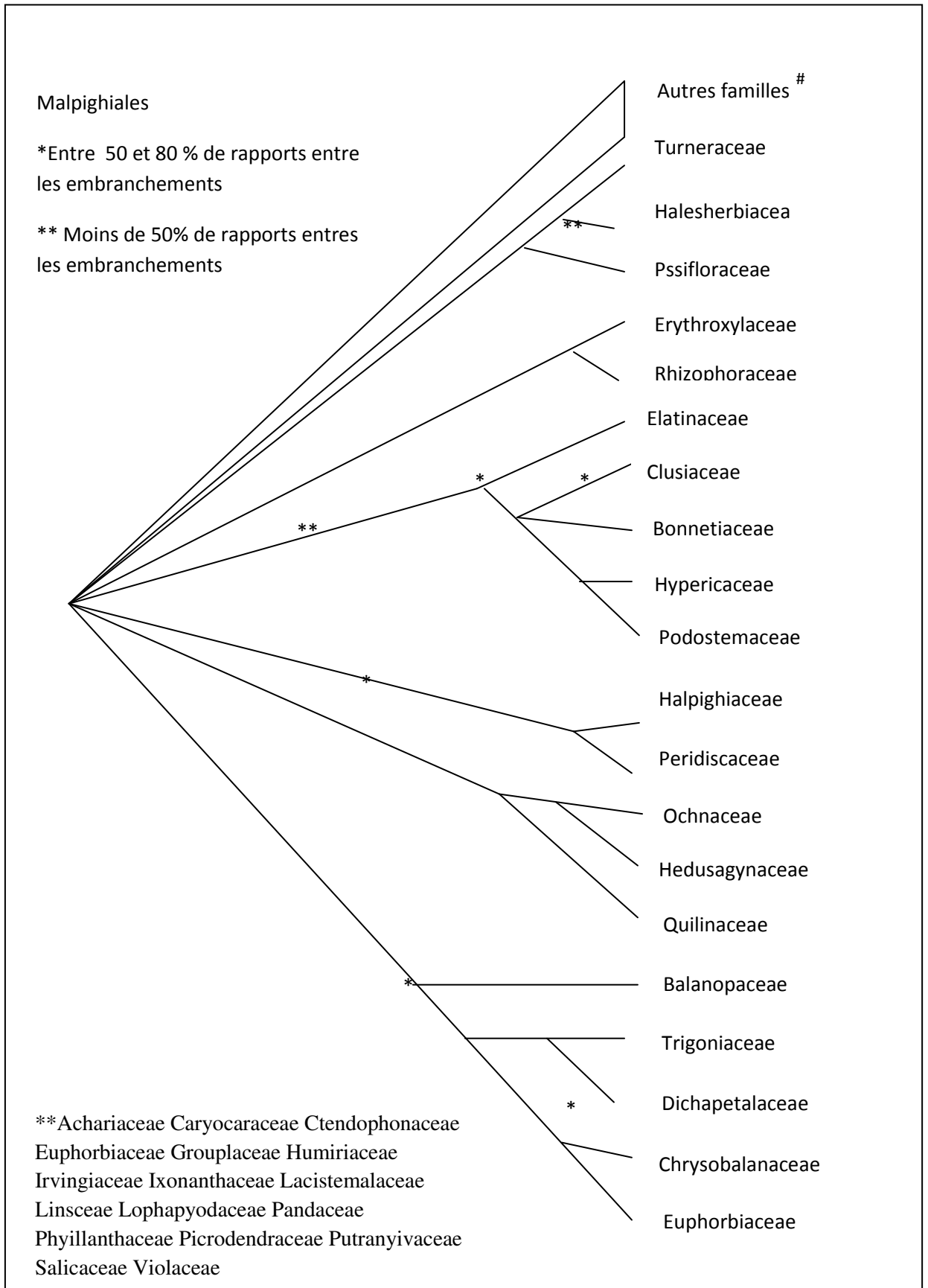


Figure I. 2 : Position systématique des Euphorbiaceae au sein de l'ordre des Malpighiales

La famille des Euphorbiaceae est une famille très polymorphe, aussi le terme de « caractère morphologiques généraux » n'est pas des plus appropriés. Nous nous proposons ici, simplement, de référencer les diverses formes biologiques que peuvent prendre les représentants de cette famille (Sichiger^a, 2000) [2].

Les Euphorbiaceae comptent parmi leurs membres aussi bien des plantes succulentes et des cactiformes que des arbres, arbustes, herbes et lianes. Ce sont généralement des plantes à latex.

Les feuilles, de formes très variables, sont souvent longuement pétiolées, alternes, voire plus rarement opposées, simples ou composées, palmatinervées (au moins à la base) ou pennatinervées. Certaines d'entre elles sont réduites à des épines. Le limbe est le plus souvent denté. Des glandes sécrétrices sont très souvent présentes sur le pétiole et/ou sur le limbe et/ou sur la marge du limbe.

Les inflorescences sont, elles aussi, très variables puisqu'il peut s'agir de cymes, de thyrses, de grappes, d'épis ou de panicules, généralement bisexués.

La fleur est cyclique, achlamyde ou haplochlamyde et, dans ce cas, actinomorphe et sépaloïde, trimère ou pentamère, oligo- à polystémone, hypogyne et unisexuée.

Les sépales, lorsqu'ils sont présents, sont libres ou soudés par la base.

Un disque nectarifère est parfois présent chez certains représentants de la famille.

La fleur mâle, généralement exempte de pétales, peut compter de 0 à un nombre indéfini de sépales et de 1 à un nombre indéfini d'étamines. Les anthères présentent une déhiscence qui peut être longitudinale, transversale ou encore poricide. Un ovaire rudimentaire est parfois présent.

La fleur femelle, elle aussi généralement dépourvue de pétales, compte de 0 à un nombre indéfini de sépales, et trois carpelles. L'ovaire est supère, la plus part du temps tricarpellé et triloculaire. Il est surmonté de 3 styles libres ou partiellement soudés par la base, eux même surmontés de 3 stigmates. Des staminodes sont parfois présents. La placentation est axile. Se dénombrent dans les loges, un à deux ovules, anatropes ou hémitropes.

Le fruit est une capsule tricoque à déhiscence oculicide, septicide ou encore un schizocarpe à déhiscence explosive. La graine est albuminée et caronculée (épaississement du micropyle).

I.1.2. Les plantes utiles de la famille des Euphorbiaceae

Considérant à l'origine polygénétique des Euphorbiaceae, leur distribution cosmopolite et leur grande diversité tant botanique que chimique, il n'est pas surprenant de constater que cette famille offrait et offre encore une grande quantité de plantes d'intérêt économique avec notamment (Schultes, 1987) [5]:

- Des plantes oléagineuses,
- Des plantes alimentaires,
- Des plantes fournissant du bois,
- Des plantes fournissant du papier,
- Des plantes à fibres,
- Des plantes fournissant des poisons.

A l'heure actuelle, un nombre de ces plantes jouent encore un rôle prépondérant dans la société (Spichiger^a, 2000 ; Shultes, 1987) [2, 5].

- *Ricinus Communis* L. dont l'huile est utilisée depuis très longtemps comme purgatif (dangereux car violent) et est déjà citée dans un papyrus du XVII^e siècle av. J.-C. L'huile fut utilisée comme lubrifiant pour les moteurs au début du XX^e siècle et l'est encore actuellement dans certaines applications (modélisme, moteurs à grande vitesse). Elle est également employée pour la fabrication de peintures et de vernis, ainsi qu'en cosmétologie (dentifrice). Par polymérisation de certains de ces dérivés, un polyamide appelé Rilsan[®] servant à la fabrication de pièces moulées, tissus et revêtements est obtenu (Reynaud, 2002) [6].
- *Manihot esculenta* Crantz est la seule plante toxique à travers le monde à présenter un intérêt alimentaire aussi fort. Toxique par la présence de cyanoglucosides, la consommation du rhizome (manioc) requiert au préalable une préparation adéquate. La farine de *Manihot esculenta* Crantz est également consommée ; il s'agit du tapioca.
- Les plantes à caoutchouc sont *Euphorbia* sp., *Manihot glaziovii* Müell Arg, *Mabea* sp. Et, la plus importante, *Hevea brasiliensis* Müell Arg. Cette dernière a, via sa domestication, profondément modifié, en moins d'un siècle, la vie de l'homme. Elle fournit, à elle seule, plus de 98 % de la production mondiale de caoutchouc naturel.
- Parmi les plantes d'intérêt médicinal, citons *Euphorbia cyparissias* L. dont les graines, renferment des saponosides, sont utilisées en tant que purgatif et anti-inflammatoire, *Jatropha curcas* L. dont les graines sont, là encore, préconisées en tant que purgatif et *Mercurialis annua* L. dispensé en tant que laxatif.

D'autres espèces, enfin, sont utilisées à des fins que nous pourrions qualifier de plus exotiques, à savoir : *Mallotus philippinensis* (Lam.) Müll. Arg. et *Chrozophora tinctoria* (L.) A. Juss., fournissant un colorant rouge et *Spium* sp. Dont la matière grasse est mise à profit pour la confection de bougies et de savons (Spichiger^b, 2000) [7].

Dans la médecine traditionnelle, les *Euphorbiaceae* sont utilisés dans de nombreuses régions dans le traitement de nombreuses affections telles que les maladies gastro-intestinales (Hernández, 2003) [8]. Ces espèces possèdent également des propriétés cicatrisantes (Esmeraldino, 2005) [9], antibactériennes, antifongiques et anti-inflammatoires, cicatrisantes, contre les ulcères et la conjonctivite (Manga, 2004) [10], utilisé dans le traitement de la diarrhée et contre la toux et les maux de ventre (Chhabra, 1994) [11], antioxydant, antidiurétique, et antimalarique (Chaabi, 2007) [12]. Cette famille est considérée comme une source des composés bio actifs (Baloch, 2009) [13].

En dernier lieu, nous citons les espèces du genre *Euphorbia* L., justifiant occasion par la même notre choix de mener des travaux de recherche phytochimique sur une espèce appartenant à ce genre.

Avec près de 300 genres et 10000 espèces cosmopolites, les trois genres l'Euphorbe, le Croton et Phyllanthus couvrent à eux seuls près de la moitié des espèces de la famille Euphorbiaceae dont 1600 espèces pour le genre *Euphorbia* (Judo, 2002 ; Spichiger^b, 2000) [14, 2].

I.1.3. Chimie des Euphorbiaceae

Il s'agit sans aucun doute de la classe de composés la plus caractéristique des Euphorbiaceae, les terpènes qui se retrouvent dans toutes les parties de la plante (racine, tige, feuille, fruit, graine), sont fortement irritants pour les muqueuses et possèdent des propriétés vésicantes (Hegnauer, 1973) [13].

Cette famille renferme aussi d'autres métabolites secondaires tel que les flavonoïdes, en général des flavonols (Rivière, 2009) [15], les composés cyanogénétiques (Prawat, 1995) [16], l'acide ellagique et tanins ellagiques (Mavar, 2004 ; Okuda, 1980) [17, 18] et les saponines (Aderibigbe, 1997) [19].

I.2. Le genre Euphorbia :

I.2.1. Présentation d'*Euphorbia*

L'*Euphorbia* vient du nom Euphorbos le médecin du roi *Juba II* de Mauritanie au 1er siècle avant Jésus Christ, et conservé par Linné (Jassbi, 2006) [20].

Plantes herbacées, arbustes et de nombreuses plantes succulentes ressemblent à première vue à des cactées. Les tiges très courtes, couchées, très ramifiées, étalées en cercle sur le sol. Feuilles simples et opposées, rarement stipulées. Fleurs de ce genre ont une structure quasiment identique, se limitant à un stigmate et une étamine, toujours vert vif et paraissent généralement en petits bouquets, cyathe très petites (moins de 2mm), constitué par une fleur femelle centrale et cinq cymes exiguës de fleurs mâles, réduites en général à une étamine, le tout enveloppé dans un involucre cupuliforme à 4-5 lobes présentant une glande charnue de forme variable. Carpelles soudés en ovaire supère à 3 loges uniovulées. Capsule tricoque, très généralement déhiscente (Quezel, 1962 ; Könnemann, 1997) [21, 22]. Fruit (schizocarpe) capsule tricoque explosif. Les graines quadrangulaires, pourtant de petits tubercules et dépourvues de caroncule (Florence, 1997) [23].

La majorité des *Euphorbes* sont connue par leur noms vernaculaires « bouhliba », qui signifie plante à sève laiteuse (Bellakhdar, 1997) [24], car les euphorbes contiennent un suc laiteux (liquide blanc) collant et irritant appelée latex. Ce latex provoque des irritations pour les peaux sensibles, et il est capable de provoquer des graves dégâts des muqueuses buccales et digestives, et qui peut causer, au contact des yeux, une cécité temporaire (Könnemann, 1997 ; Bruneton, 1999) [22, 25].

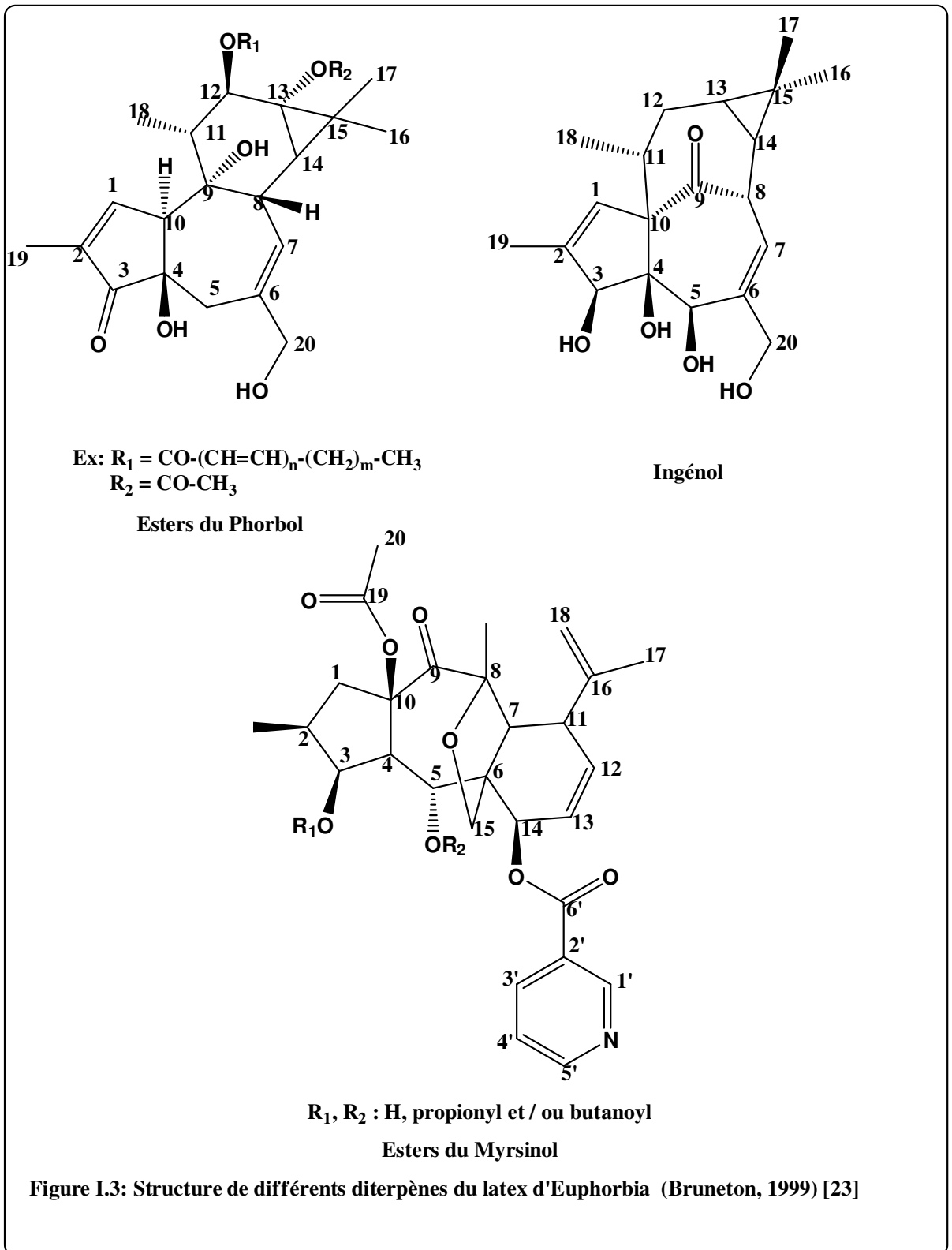
Parmi les espèces de ce genre trouvées en Algérie, celles qui sont illustrés dans le tableau (1) suivant :

Tableau I-1: Espèces du genre Euphorbia en Algérie (Quezel, 1963 ; Ozenda, 1991) [21, 26]

Espèces	Espèces
<i>E. calytrata</i> Cosson et DR.	<i>E. helioscopia</i> L.
<i>E. chamaesyce</i> L.	<i>E. nicaensis</i> All.
<i>E. cornuta</i> Pers.	<i>E. peplus</i> L.
<i>E. dracunculoides</i> Lam. ssp. <i>flamandi</i> (Batt)	<i>E. pithyusa</i> L.
<i>E. dracunculoides</i> Lam. ssp. <i>glebulosa</i> (Cosson et DR.)	<i>E. pubescens</i> Vahl.
<i>E. dracunculoides</i> Lam. ssp. <i>inconspicua</i> (Ball.)	<i>E. sanguinea</i> Hochst. et steud.
<i>E. echinus</i> Hook fil. et Coss.	<i>E. sunguinea</i> Hochst. Et Steud.
<i>E. guyoniana</i> Boiss. et Reut.	<i>E. terrciana</i> L.
<i>E. granulata</i> Forsk.	

I.2.2. Toxicité d'*Euphorbia*

Le genre *Euphorbia* contient le caoutchouc et des quantités importantes de résine, mais le point principal commun de ce genre est la présence de la sève blanche, qui apparaît à la cassure (tiges, feuilles, fruit et racines). La toxicité du latex d'*Euphorbia* due à la présence de l'Euphorbone ($C_{15}H_{24}O$) (Berthelot, 1912) [27], les esters diterpéniques (les esters de phorbol) à titre d'exemple un mélange complexe de dérivés acylés et acétylés en 12 et 13 (ou l'inverse) du phorbol, ingénol et du myrsinol. Le pouvoir irritant s'accroît lorsque la longueur de la chaîne augmente (Bruneton, 1999) [25].



I.2.3. Utilisations d'*Euphorbia*

Les Euphorbes ont de multiples utilisations, à titre médicinal, elles sont employées comme purgatif ou vésicant, contre les parasites intestinaux, l'asthme, les bronchites chroniques, la migraine (Chaabi, 2007) [12], pour traiter les morsures de serpent, dans le traitement de la dysenterie, du choléra, et de syphilis. Le latex des euphorbes est parfois employé pour pêcher en le jetant dans l'eau pour empoisonner les poissons. Il a été aussi exploité pour produire du caoutchouc (Karharo, 1974) [28].

Dans cette étude nous abordons quelques espèces du genre *Euphorbia* et leurs utilisations :

***Euphorbia resinifera* Berg** : La résine de cette espèce endémique marocaine appelée communément Euphorbe résinifère, est utilisée en applications locales comme révulsives. Pétrie avec de la farine ou de la semoule et du blanc d'œuf, elle est utilisée contre les rhumatismes et les paralysies. Elle est également employée pour soigner les piqûres, les morsures venimeuses et les algies dentaires. Les femmes emploient aussi un mélange à base de la résine d'euphorbe comme abortif malgré ses dangers. Le latex frais de cette plante est recommandé par les berbères de Beni- Mellal, contre les verrues, on la trouve aussi dans la composition des peintures des coques de bateaux (Könemann, 1997) [22].

***Euphorbia obtusifolia* Poiret** : Le latex de cette espèce est préconisé au Sahara occidental, en applications externes, en tant que remède contre les morsures de serpents et la gale animale.

***Euphorbia antiquorum* L.** : Cette plante originaire de l'Inde et du Sri Lanka, est utilisée entièrement pour traiter les infections cutanées. Le latex est employé contre la grippe et pour soigner les problèmes des voies respiratoires, principalement la bronchite.

***Euphorbia kansui* L.** : Les racines séchées de cette plante, connues sous le nom de « Kan Sui » dans la médecine traditionnelle chinoise, sont préconisées comme remède contre le cancer.

***Euphorbia cyparissias* L.** : Les graines de cette espèce renfermant des saponosides, sont utilisées pour leurs propriétés purgatives et anti-inflammatoires (Könemann, 1997) [22].

Euphorbia hirta : occupe une place privilégiée dans diverses pharmacopées traditionnelles d'Asie orientale et d'Afrique tropicale. Selon les pays et les ethnies, les indications thérapeutiques traditionnelles les plus variées lui sont conférées. Ainsi, elle entre dans le traitement d'affections gastro-intestinales, hépatiques, cardiaques, respiratoires et génitales. Diverses autres lui sont également attribuées, telles que des propriétés antalgiques, fébrifuges, anti-inflammatoires et cicatrisantes (Lanther, 2005) [29].

Euphorbia calyptata* et *E. retusa est utilisé en Algérie (Beni-Ounif) en application sur les cils, contre le trichiasis (Bellakhdar, 1997) [24].

I.2.4. Etudes phytochimiques antérieures du genre *Euphorbia*

De nombreuses investigations phytochimiques et pharmacologiques font l'objet du genre *Euphorbia*, particulièrement sur le latex. Ces études ont permis l'isolement et la

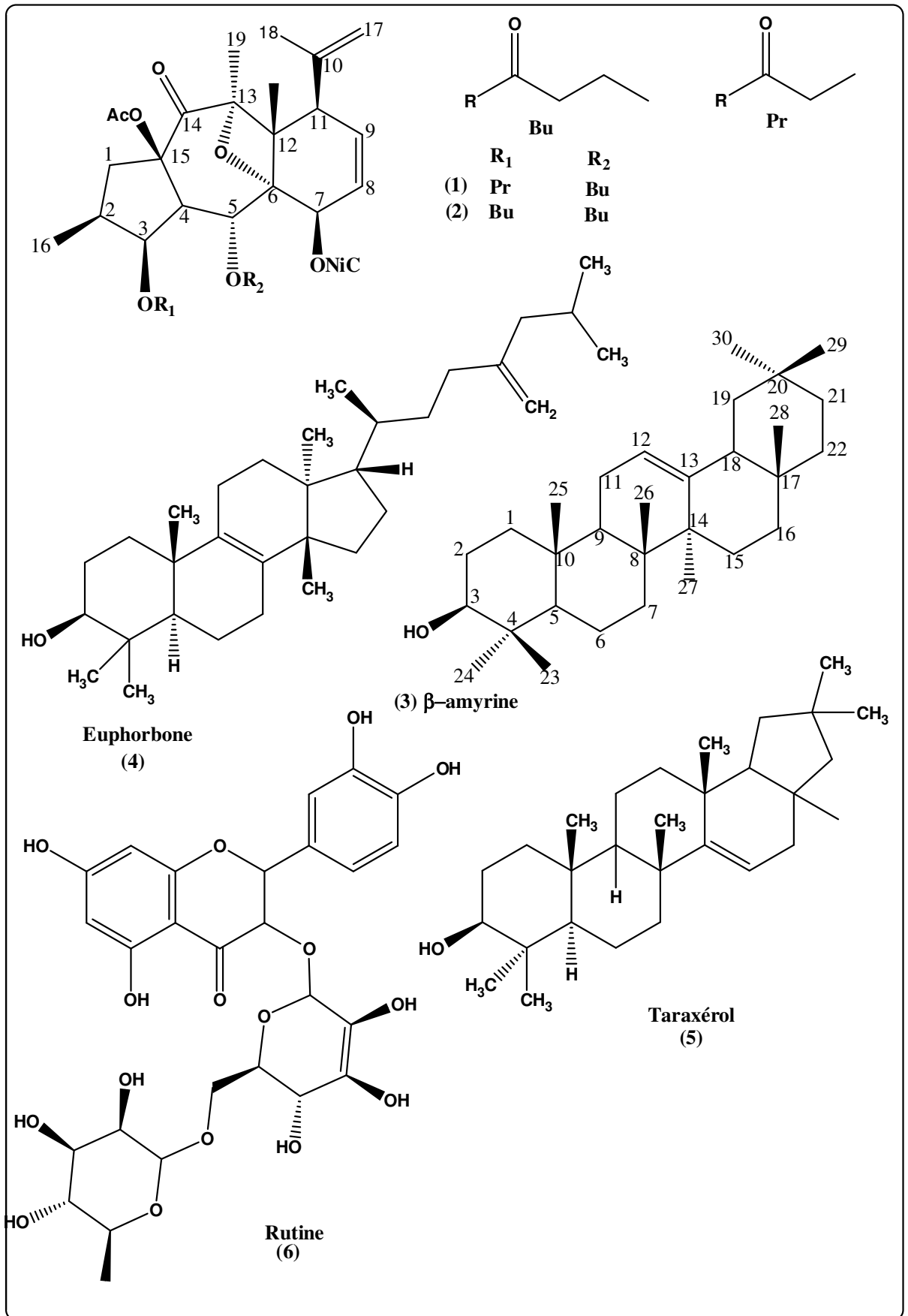
caractérisation d'un grand nombre de métabolites secondaires se répartissant principalement en : terpène et flavonoïdes, (Singla et Pathak, 1990) [30]. Ces résultats sont consignés dans le tableau I-2.

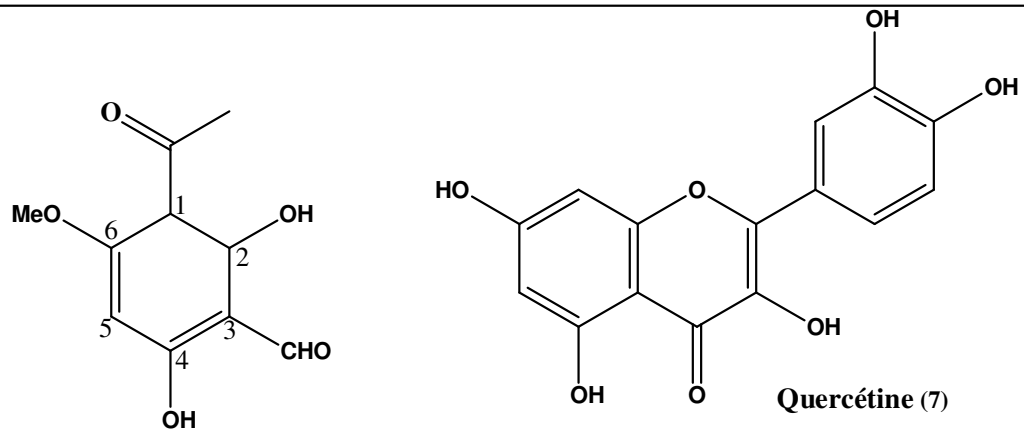
Tableau I-2 : Travaux antérieurs du genre *Euphorbia*

Classe phytochimique	Nom de l'espèce	Constituants identifiés	Références
Diterpènes	<i>E. decipiens</i>	15- <i>O</i> -acetyl-3- <i>O</i> -propionyl-5- <i>O</i> -butanoyl-7- <i>O</i> -nicotinoylmyrsinol (1)	Rechinger, 1964 [31]
	<i>E. cheiradenia</i>	15- <i>O</i> -acetyl-3,5- <i>O</i> -dibutanoyl-7- <i>O</i> -nicotinoylmyrsinol (2)	
Triterpènes et stéroïdes	<i>E. decipiens</i>	acetate d'amyrine, lupeol, acetate de lupeol, ginnone, ambreine, lupéone	Ulubelen <i>et al.</i> , 1986 [32]
	<i>E. petiolata</i>	Cycloartenol, 24-méthylencycloartanol	Rustaiyan <i>et al.</i> , 1982 [33]
	<i>E. falcata</i>	Obtusifoldienol, c-euphorbol, β-amyrine (3)	Aynehchi et Hakimzadeh, 1978 [34]
	<i>E. lanata</i>	Sitosteryl-3-β-D-glucoside	Aynehchi <i>et al.</i> , 1978 [35]
	<i>E. tinctoria</i>	Euphorbol (4)	Aynehchi et Kiumehr, 1972, 1974, 1977 [36-38]
	<i>E. myrsinites</i>	Taraxérol (5)	Aynehchi <i>et al.</i> , 1972 [39]
Sesquiterpènes	<i>E. chrysocoma</i>	(6R)-2-chloro-6-[(1S)-1,5-dimethylhex-4-enyl]-3-méthylcyclohex-2-en-1-one	Shi <i>et al.</i> 2005 [40]
	<i>E. larica</i>	kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside, quercetine-3- <i>O</i> -glucoside,	Ulubelen <i>et al.</i> , 1983 [41]

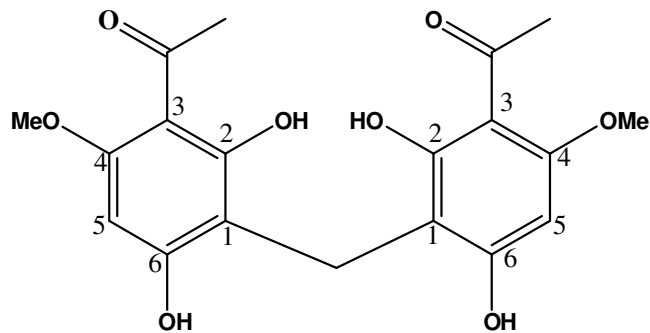
Flavonoïdes et coumarines	<i>E. lanata</i>	kaempferol-3-rutinoside, rutine (6), 6-methoxyapigénine	Aynehchi <i>et al.</i> , 1978 [35]
	<i>E. tinctoria</i>	kaempferol-7- <i>O</i> -rhamnoside, kaempferol-3- <i>O</i> -galactoside, quercétine-7- <i>O</i> -digalactoside, esculetine Quercétine (7), quercétine-7- <i>O</i> -glucoside,	Aynehchi et Ulubelen, 1974 [42]
Phénols	<i>E. decipiens</i>	méthyl (2,4-dihydroxy- 3-formyl-6-méthoxy) phényl cétone (8) et 1,1-bis (2,6-dihydroxy-3-acétyl-4-méthoxyphényl) méthane (9)	Ahmad <i>et al.</i> , 2002 [43] Jassbi, 2000 [44];
	<i>E. teheranica</i>	méthyl gallate	Jassbi, 1999 [45]
	<i>E. hylonoma</i>	octacosyl cis-ferulate	Ruan <i>et al.</i> , 2007 [46]
	<i>E. ebracteolata</i>	2,2',4,4'-tétrahydroxy-6,6'-diméthoxy-3,3'- diméthyl-7,5'-bisacétophénone, 2,4 dihydroxy-6-méthoxy-3- méthylacétophénone 4- <i>O</i> - α - Larabinofuranosyl-(1_6)- β -D- glucopyranoside et décahydro-1 α ,4 α ,7,7- tétraméthyl-1Hcycloprop[e]azulène-2,5 diol (1 α R,2R,4 α S,5S,7 α R,7 β R)	Yin <i>et al.</i> 2005 [47]

Les structures de quelques composés isolés du genre *Euphorbia* (1-9) sont les suivantes (figure 4) :





(8) methyl (2,4-dihydroxy-3-formyl-6-methoxy) phenylcetone



(9) 1,1-bis (2,6-dihydroxy-3-acetyl-4-methoxyphényl)methane

Figure I. 4 : Structures de quelques molécules isolés du genre *Euphorbia* (Bruneton, 1999) [24]

I.3. L'espèce *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.

Euphorbia guyoniana tithymalus (*Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter) Klotzsch & Garcke est une espèce endémique d'Algérie, localisée dans les régions sableuses, prédésertique et dans le Sahara septentrional (**figure 5**). C'est une plante puissante à souche souterraine et longuement traçante d'un vert vif de 30cm à 1m de haut [48]. L'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. est connue par son nom vernaculaire lebbina [49].

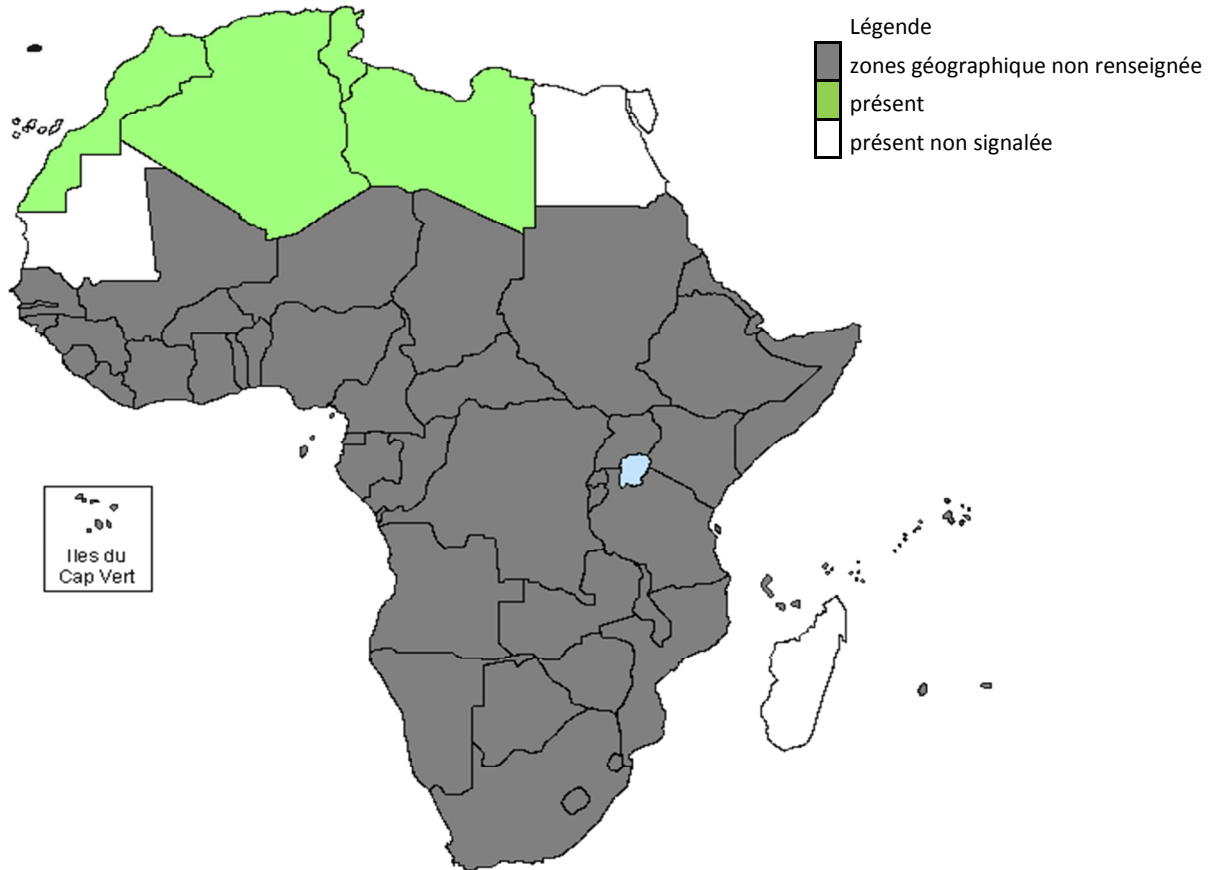


Figure I.5: Carte de répartition géographique d'*Euphorbia guyoniana* au Sahara septentrional selon Africain plantes data bases [50].

Les fleurs et cyathe se voient de loin, on voit soit des petites boules jaunes les fleurs soit des petites boules vertes les fruits. Les tiges dressées non charnues, il part du sol de nombreuses tiges. Les feuilles sont étroites et alternes se desséchant rapidement souvent absentes sur les rameaux fleuris. Il y a un seule cyathe terminal très petit moins de 2 mm. Les graines sans caroncules, noirâtres et munies de côtes longitudinales grise, glande de la cyathe arrondies, sans pointe [4, 22].



Photos (a) : Fleur et fruit



Photos (b) : Tige et feuilles d'*Euphorbia guyoniana*



Photos (c) : Tiges, fruits et graines



Photos (d) : la partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana*

Figure I.6 : Photos (a, b, c, d) d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.

Au dessèchement de toute la partie aérienne, la reprise de la croissance se fait durant la saison suivante à partir des bourgeons enterrés dans le sol ou au niveau du sol. Cette espèce s'adapte à la sécheresse par la réduction de la surface foliaire. En effet, les feuilles très petites, qui sont parfois absentes, diminuent la quantité d'eau perdue par transpiration (Ozenda, 1991) [26].

I.3.1. Systématique botanique

D'après les classifications botaniques classiques, les euphorbiacées sont classées dans les dicotylédones et l'espèce *Euphorbia guyoniana* est classée de l'ordre suivante [51] :

Règne : Plantae-plants

Embranchement : *Magnoliophyta*

Sous-embranchement : Angiospermes

Classe : *Magnoliopsida-dicotylidones*

Ordre : Malpighiales

Famille : Euphorbiaceae

Genre : *Euphorbia*

Espèce : *Euphorbia guyoniana*

Nom botanique : *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. mais selon la dernière classification *Euphorbia guyoniana* tithymalus (*Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter) Klotzsch & Garcke

I.3.2. Toxicité d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.

Le latex d'*Euphorbia guyoniana* provoque des rougeurs, sur la peau, des érythèmes ou des phlyctènes. Ce latex très irritant pour les yeux entraînant, par simple contact, même furtif, des larmoiements intenses, une augmentation de la pression intraoculaire et de la photophobie. A des doses plus élevées, interviennent des lésions graves de l'œil pouvant aller jusqu'à la cécité. Le contact direct n'est pas nécessaire pour provoqué une irritation des yeux car le principe d'irritation du latex est un effet volatils. Les troubles de la vue sont accompagnés généralement de toux de rhinite des écoulements nasals de laryngite et de brulure de lèvres. Une fois absorbé, le latex entraîne des symptômes plus ou moins sévères de gastro-entérite et d'inflammation des muqueuses du tube digestif (**Bellakhdar, 1997**) [24].

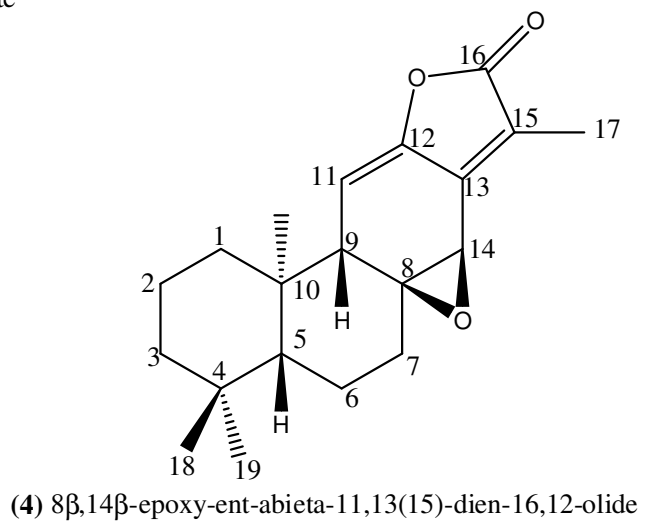
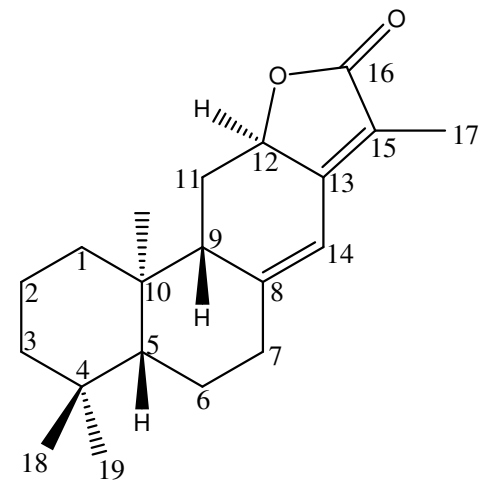
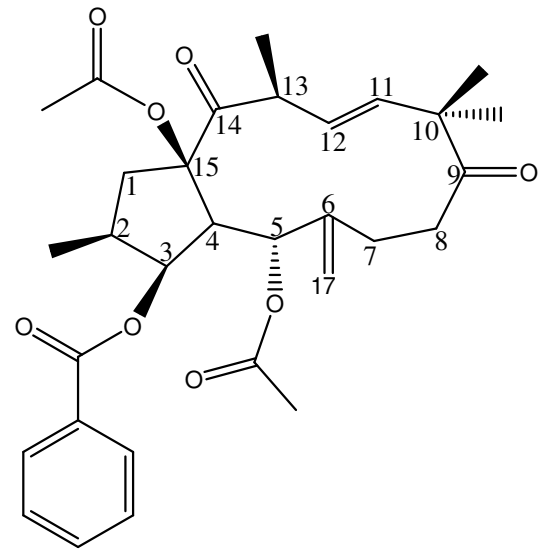
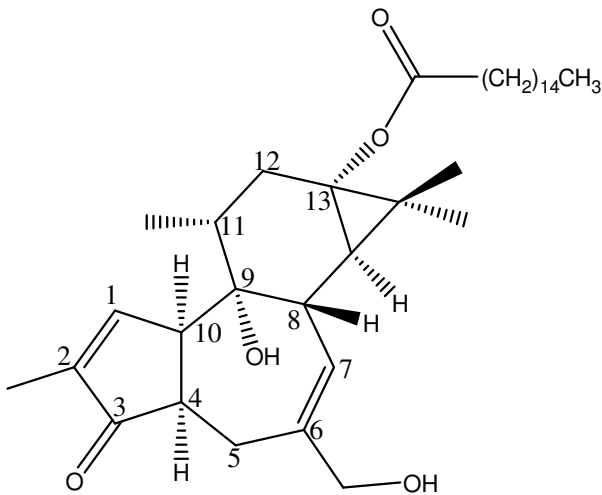
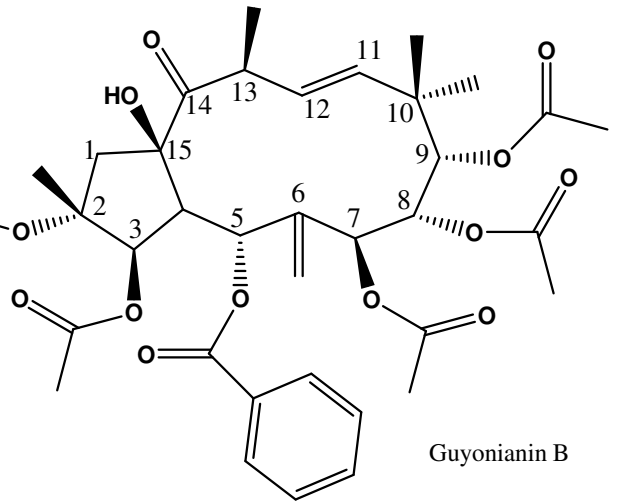
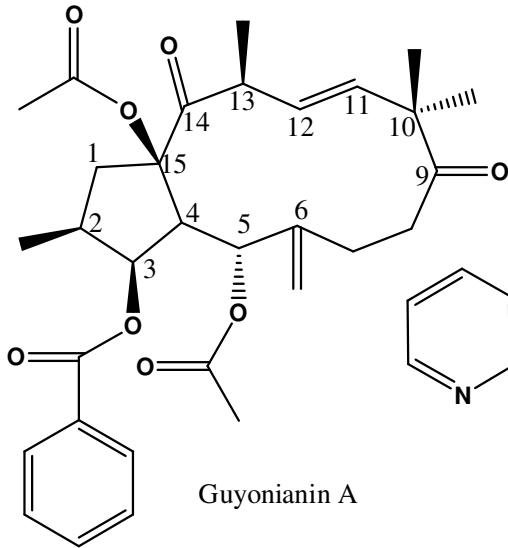
I.3.3. Utilisation d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.

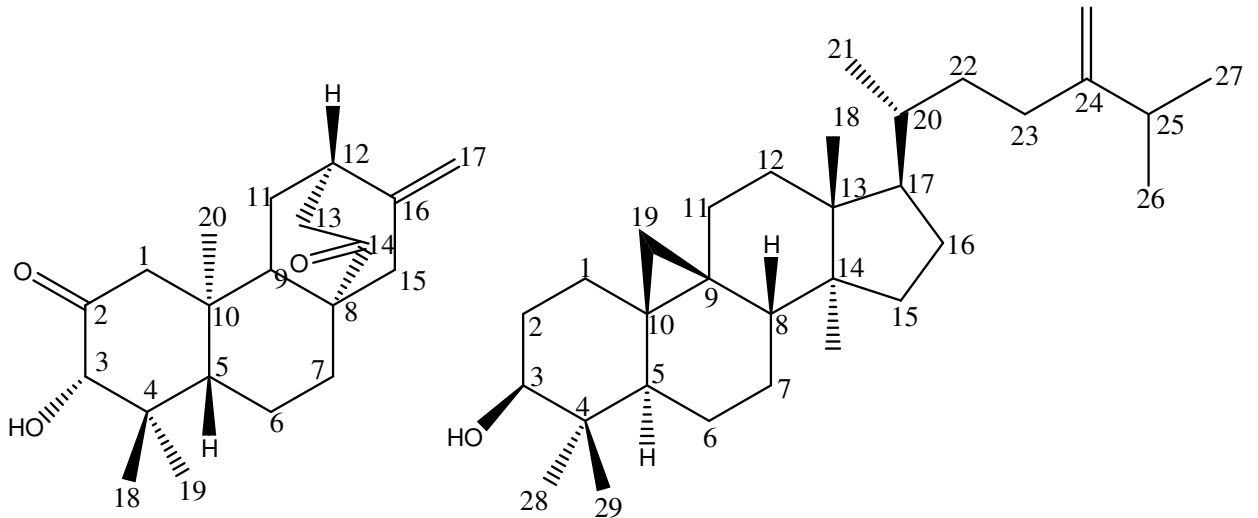
Le latex est utilisé par les populations locales pour attaquer les verrues et pour extirper les épines. On les appliques localement sur les morsures et piqûres venimeuses.

I.3.4. Travaux antérieurs et les composés isolés des *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.

Deux travaux phytochimiques pour extraire les principes actifs sont réalisés sur l'*Euphorbia* Boiss. & Reut. le premier est sur les parties aériennes de la plante, a permis d'isoler et de caractériser deux nouveaux diterpènes polyesters de type jatrophanes (Guyonianin A, Guyonianin B) (**Ahmed, 2006**) [52]. La deuxième étude est sur les racines d'*E. guyoniana* Boiss. et Reut. a permis d'isolés 20 composés terpéniques (5 diterpènes (1-5) et 15 triterpènes (6-20)), deux d'entre eux sont nouveaux. Les terpènes de types tiglianes, cycloartane et abietaiène (**Haba, 2007 et 2009**) [53,54].

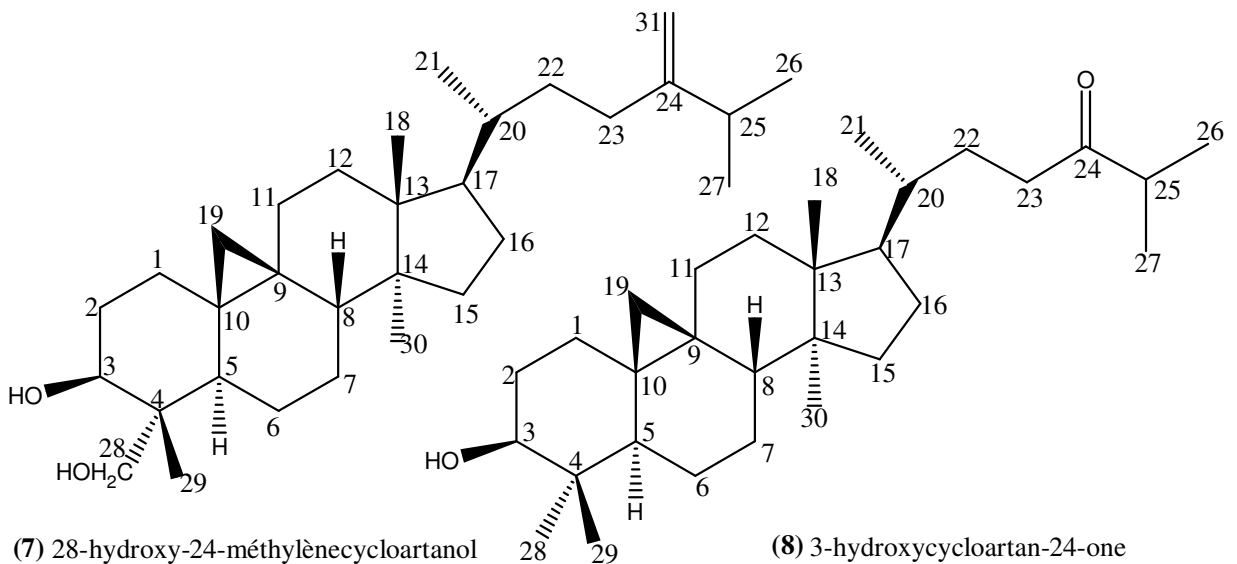
Des études biologiques et botaniques sont réalisées récemment sur la plantes.





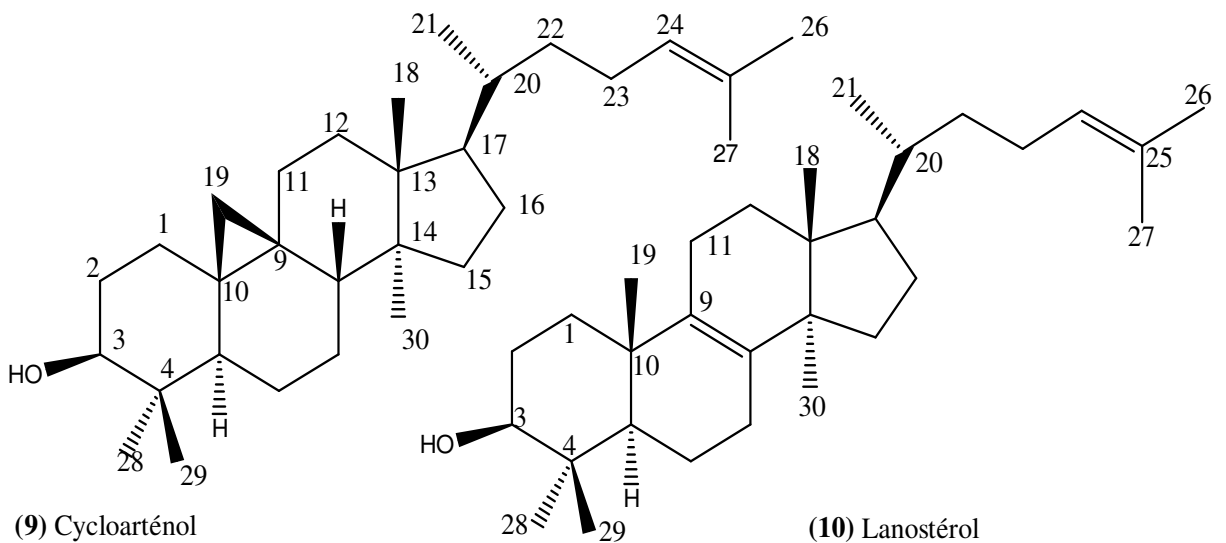
(5) 3 α -hydroxy-ent-atis-16(17)-ene-2,14-dione

(6) 24-méthylidèncycloartanol



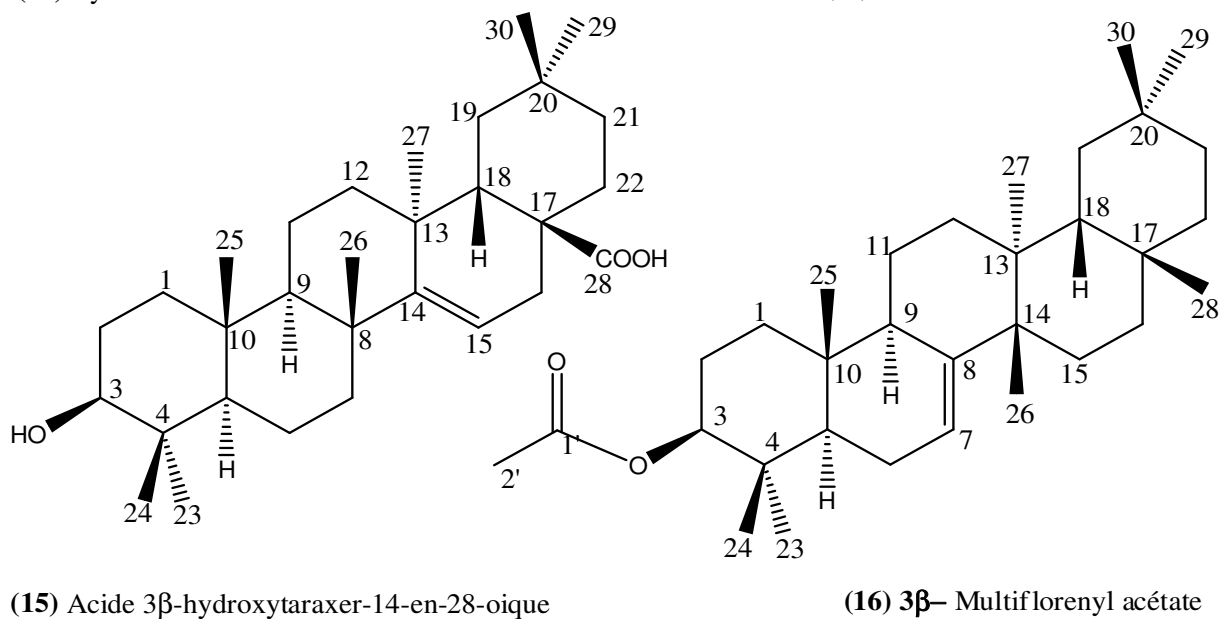
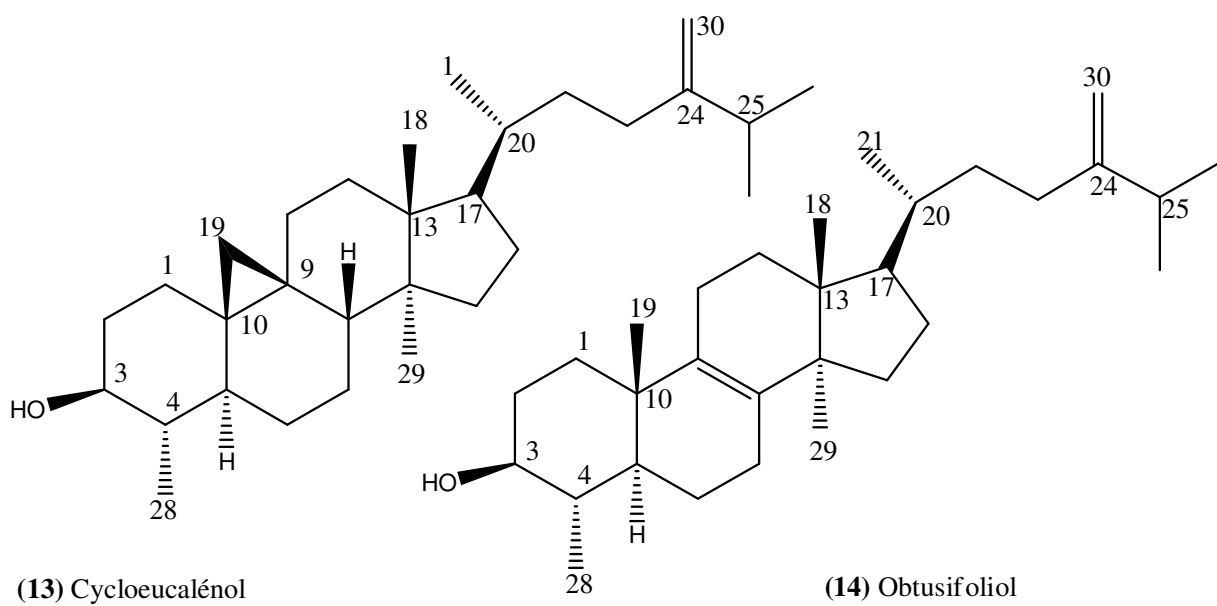
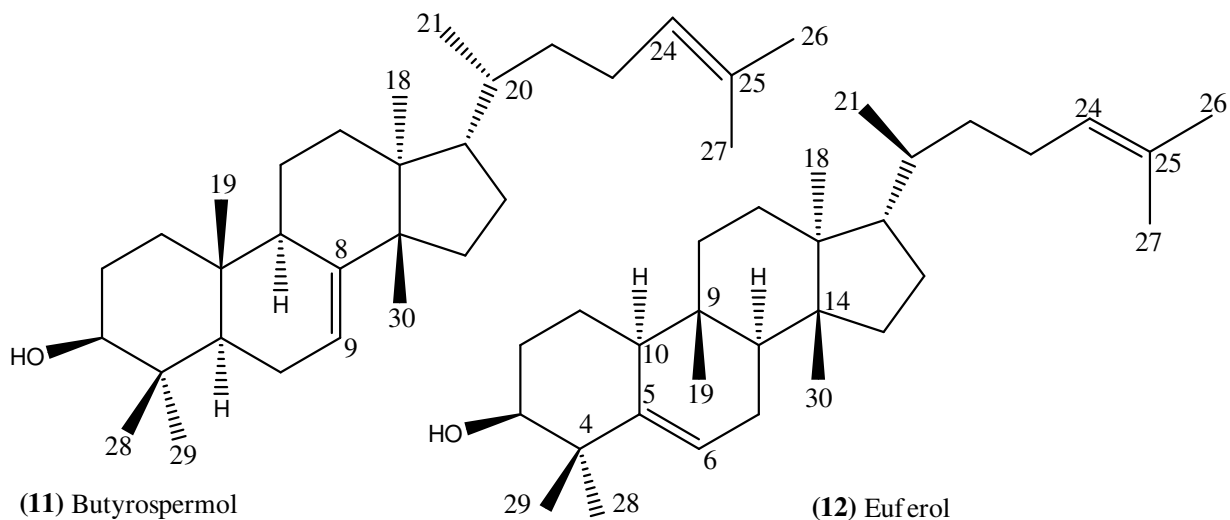
(7) 28-hydroxy-24-méthylèncycloartanol

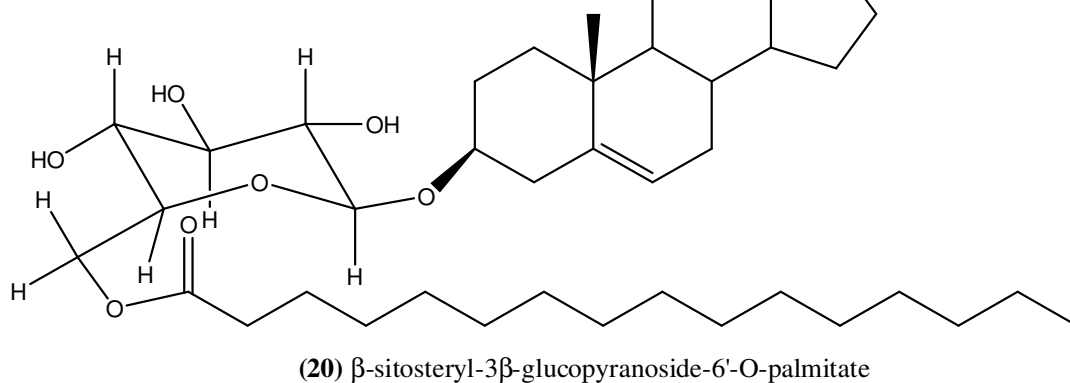
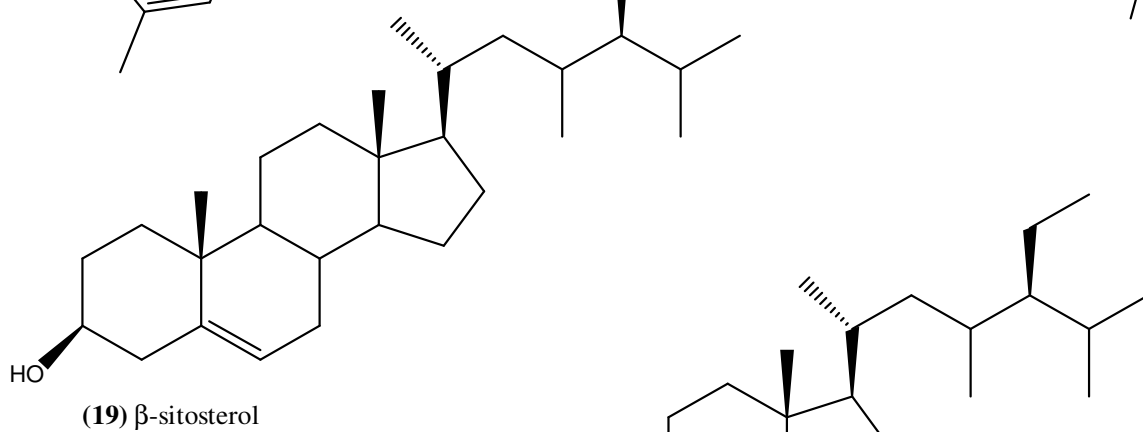
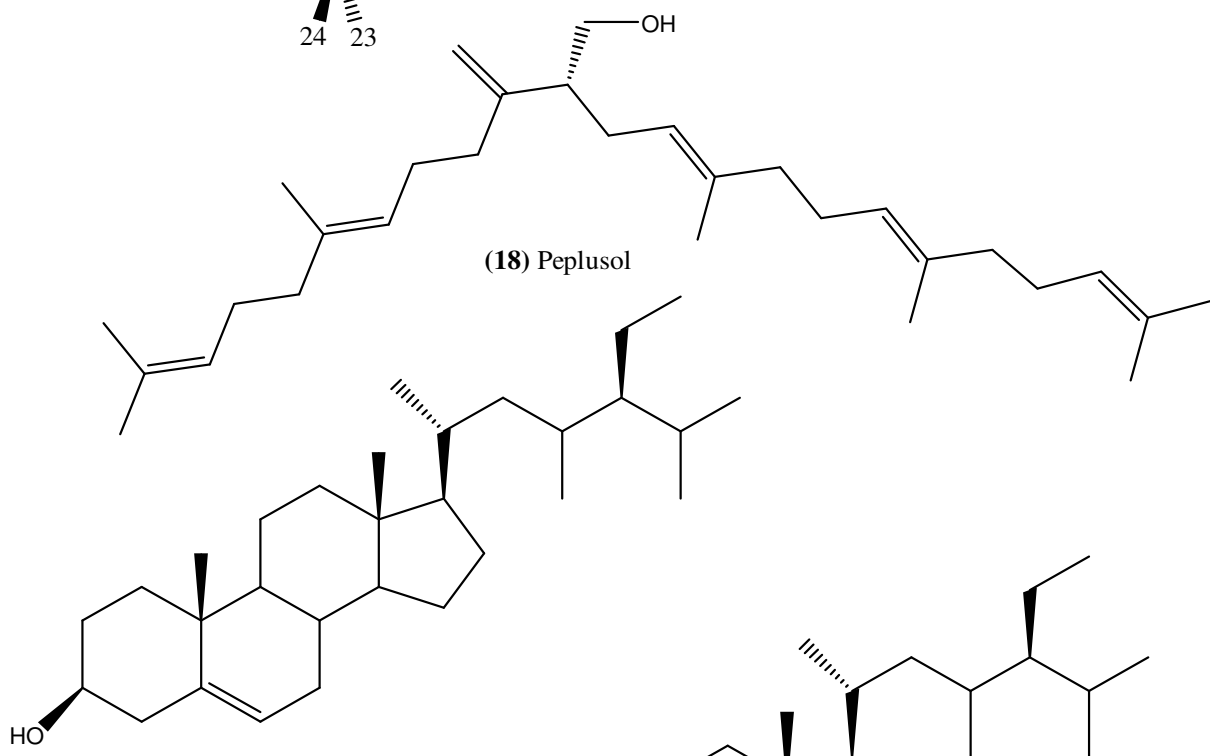
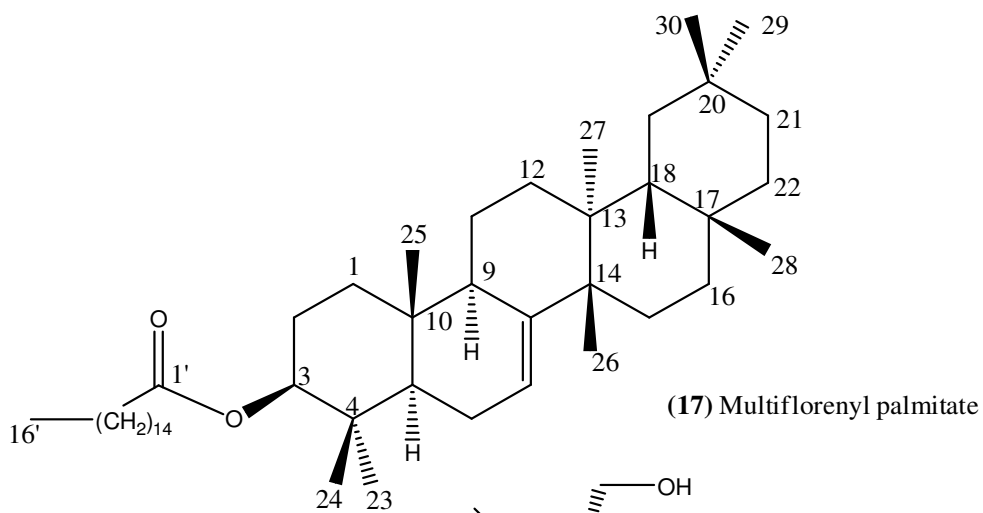
(8) 3-hydroxycycloartan-24-one



(9) Cycloarténol

(10) Lanostérol





Les deux études phytochimiques qui ont été réalisées récemment sur les parties aériennes et sur les racines de l'espèce *E. guyoniana*, cela au moment où nous avons entrepris notre investigation phytochimique sur la partie aérienne.

I.4. Conclusion

La synthèse de toutes les données bibliographiques concernant le genre *Euphorbia* nous encourage à réaliser une étude phytochimique approfondie de l'espèce endémique choisie *Euphorbia guyoniana tithymalus* (*Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter) Klotzsch & Garcke.

Références Bibliographiques

- 1 Haba, H., *Etude phytochimique de deux Euphorbiaceae sahariennes : Euphorbia guyoniana Boiss. et Reut. et Euphorbia retusa Forsk.*, Thèse de doctorat. Université El Hadj Lakhdar Batna, 2008. 287 pages.
- 2 (a) Spichiger, R.E., Savolainen, V.V., Figeat, M., *Botanique systématique des plantes à fleurs*. Ed. Presse polytechniques et universitaires Romandes, Lausanne, 2000.
- 3 Webster, G.L., *The saga of the spurge: a review of classification and relationships in the Euphorbiales*. Botanical Journal of Linnean Society, 1987. P: 94, 3-44.
- 4 <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html>. Consulter le 14/04/2009.
- 5 Schulte, R. E., Members of Euphorbiaceae in primitive and advanced societies. Botanical Journal of Linnean Society, 1987. P: 94, 77-96.
- 6 Reynaud, J., *La flore du pharmacien*. Technique et documentation, Paris, 2002.
- 7 (b) Spichiger, R.E., Savolainen, V. V., Figeat, M. and J. Daniel., *Botanique systématique des plantes à fleurs une approche phylogénétique nouvelle des Angiospermes des régions tempérées et tropicales*. 3ème édition, 2000.
- 8 Hernández, T., Canales M., Avila J.G., Duran A., Caballero J., Romo de Vivar, A., Lira, R., *Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México)*. Journal of Ethnopharmacology, 2003. **88** (2-3), P: 181-188.
- 9 Esmeraldino, L.E., Souza. A. M. and Sampaio. S. V., *Evaluation of the effect of aqueous extract of Croton urucurana Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rat skin. Phytomedicine, 2005. **12** (8), P: 570-576.
- 10 Manga, H.M., Brick D., Marie D. E. P., Quetin-Leclercq J., *In vivo anti-inflammatory activity of Alchornea cordifolia (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae)*. Journal of Ethnopharmacology, 2004. **92** (2-3), P: 209-214.
- 11 Chhabra, S.C. and Mahunnah, R.L.A., *Plants used in traditional medicine by hayas of the kagera region, Tanzania*. J.Economic Botany, 1994. **84** (2), p: 121-129.
- 12 Chaabi, M., Freund-Michel, V., Frossard, N., Randriantsoa, A., Andriantsitohaina, R., Lobstein, A., *Anti-proliferative effect of Euphorbia stenoclada in human airway smooth muscle cells in culture*. J. Ethnopharmacology, 2007. **109** (1). P: 134-139.
- 13 Hegnauer, R. *Chemotaxonomie der Pflanzen - Band 6*. Birkhäuser Verlag, Basel. 1973. P: 508 - 518, 759 et 790.
- 14 Judo, C., Kellogg. S., *Botanique systématique une perspective phylogénétique*, 2002.
- 15 Rivière, C., Rivière, C., Hong, V. N. T., Pieters, L., Dejaegher, B., Heyden, Y. V., Van, M. C., Quetin-Leclercq, J., *Polyphenols isolated from antiradical extracts of Mallotus metcalfeanus*. J. Phytochemistry, 2009. **70** (1). P: 86-94.
- 16 Prawat, H., Chulabhorn, M., Ruchirawat, S., Prawat, U., Tuntiwachwut-tikul, P., Tooptakong, U., Taylor, W.C., Pakawatchai, C., Brian, W., Skelton and white A. H., *Cyanogenic and non-cyanogenic glycosides from Manihot esculenta*. J. Phytochemistry, 1995. **40** (4). P: 1167-1173.

- 17 Manga, H.M., Brkic, D., Marie, D.E.P., Quetin-Leclercq J., *In vivo anti-inflammatory activity of Alchornea cordifolia (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae)*. Journal of Ethnopharmacology, 2004. **92** (2-3). P : 209-214.
- 18 Okuda, T., Mori, K. and Hatano, T., *The distribution of geraniin and mallotusinic acid in the order geraniales*. Phytochemistry, 1980. **19** (4). P: 547-551.
- 19 Aderibigbe, A.O., Johnson, C .O.L.E., Makkar, H. P.S., Becker K., Foidl, N., *Chemical composition and effect of heat on organic matter- and nitrogen-degradability and some antinutritional components of Jatropha meal*. Animal Feed Science and Technology, 1997. **67**. P: 223-243.
- 20 Jassbi, A. R., *Chemistry and biological activity of secondary metabolites in Euphorbia from Iran*. Phytochemistry, 2006. **67** (18). P : 1977-1984.
- 21 Quezel, P., *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*, 1962. Vol. 1-2. Paris.
- 22 Gordon, C., *Botanica Encyclopédie de botanique de botanique et d'horticulture plus de 10000 plantes du monde entier*. Ed. Colonne : Könemann, 1997.
- 23 Florence, J., *Flore de la Polynésie Française Cnabiaceae, Ceropiaceae, Euphorbiaceae, Moraceae*, 1997. Vol. **1**.
- 24 Bellakhdar, J., *La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle*. Ibis Press, 1997.
- 25 Bruneton, J., *Plantes toxiques végétaux dangereux pour l'homme et les animaux*. 3eme edition, 1999. P: 290-303.
- 26 Ozenda, P., *Flore et végétation du Sahara. 3eme édition*. CNRS Paris, 1991.
- 27 Berthelot, A. and Bertband, D.M., *The Intestinal Flora, Isolation of a Microbe Capable of Producing P-Iminazolylet hylamine from Histidine*. J. vegetable physiology and agriculture, 1912. P: 668-679.
- 28 Kerharo, J., Guichard, F. and Bouquet, A., *Les végétaux Ichtyotoxiques (Poisons de pêche)*. J. méd. Phar. Dakar, 1974. P : 355-387.
- 29 Lanhers, M.-C., Nicolas, J. P., Fleurentin, J., Weniger, B. *Euphorbia hirta L. J. Etnopharmacologia*, 2005. **36**. P : 9-23.
- 30 Singla, A.K., Pathak, K., *Phytoconstituents of Euphorbia species*. Fitoterapia LXI (6), P: 483-516.
- 31 Rechinger, K. H., Schiman-Czeika, H., *Flora iranica*, 1964. **6**. P: 33-34.
- 32 Ulubelen, A., Aynehchi, Y., Halfon, B., *Hydrocarbons from Euphorbia larica. Doga: Tip. Eczacilik*, 1986. **10**. P: 211-213.
- 33 Rustaiyan, A., Nazarians, L., Niknihad, A., *The isolation and structure determination of naturallyoccurring sesquiterpène lactons from composite*. Tran. J. Chem. Eng. 1982. **1**. P: 36.
- 34 Aynehchi, Y., Hakimzadeh, M. Z., *Chemical examination of Euphorbia falcata L. Q J Crude Drug Research*, 1978. **16**. P: 121-124.
- 35 Aynehchi, Y., Mirgoli, J., Negad, F. S., Ulubelen, A., *Chemical examination of Euphorbia lanata. Q. J. Crude Drug Research*, 1978. **16**. P: 163-166.
- 36 Aynehchi, Y., Mojtabaii, M., Yazdizadeh, K., *Chemical examination of Euphorbia myrsinites. J. Pharm. Sci.* 1972. **61**. P: 292-300.
- 37 Aynehchi, Y., Kiumehr, N., *Chemical examination of Euphorbia tinctoria. Acta Pharm. Suec.* 1974. **11**. P: 185-190.
- 38 Aynehchi, Y., Kiumehr, N., *Chemical examination of Euphorbia tinctoria Boiss. J. Pazhoohandeh*, 1977. **16**. P: 124-128.

- 39 Aynehchi, Y., Kiumehr, N., *Constituents of Euphorbia tinctoria*. Phytochemistry, 1972. **11**. P: 2887.
- 40 Shi, H.M., Long, B. S., Cui, X. M., Min, Z. D., *A new bisabolane sesquiterpenoid from Euphorbia chrysocoma*. J. Asian Nat. Prod. Research, 2005. **7** (6). P: 857-860.
- 41 Ulubelen, A., Öztürk, S., Halfon, B., Ayahenchi, Y., Mabry, T. J., *Flavonoids rom Euphorbia larica, E. virgata, E.chamaesyce and E.magalantha*, j. Nat. Prod.1983. **46**. P: 598
- 42 Aynehchi Y, Ulubelen A. Flavonoids of *Euphorbia tinctoria*. Istanbul Univ. Eczacilik Fak. Mecm. 1974. **10**. P: 17-20.
- 43 Ahmad, V. U., Hussain, H., Hussain, J., Jassbi, A. R., Bukhari, I. A., Yasin, A., Choudhary, M. I., Dar, A., *New bioactive diterpenoids from Euphorbia decipiens*. Zeitschrift Naturforsch, 2002. **57 (b)**. P: 1066-1071.
- 44 Jassbi, A. R., *Phytochemical Investigations on Some Medicinal Plants from Families Euphorbiaceae and Lamiaceae*. Thèse de doctorat. HEJ Research Institute of Chemistry, Karachi University. Pakistan, 2000.
- 45 Ahmad, V. U., Jassbi, A. R., *New diterpenoids from Euphorbia teheranica*. J. Nat. Prod. 1999, 62. P: 1016-1018.
- 46 Ruan, H. L., Zhou, X. F., Zhang, Y. H., Pi, H. F., Wu, J. Z., Sun, H. D., *Ferulic acid esters from Euphorbia hylonoma*. Fitoterapia, 2007, **78** (1). P: 72-73.
- 47 Yin, Z. Q., Fan, C. L., Ye, W. C., Jiang, R. W., Che, C. T., Mak, T. C. W., Zhao, S. X., Yao, X. S., *Acetophenone derivatives and sesquiterpene from Euphorbia ebracteolata*. Planta Med. 2005. **71** (10). P: 979-982.
- 48 Sahara-Nature. *html-link to-euphorbia guyoniana-sahara nature*. Consulté le 14/04/2009.
<http://www.saharanature.com/plantes.php?aff=nom&plante=euphorbia%20guyoniana>.
- 49 Chehma, A., *Etude floristique et nutritive des parcours camelins du sahara septentrional algerien cas des regions de ourgla et ghardaia*. 2005. Thèse de doctorat. Univ-Badji Mokhtar Annaba. 178 pages.
- 50 Telabotanica. *html-link to-Flore d'Afrique du NordBDAFN 1.00-tela botanica*. Le 04/05/ 2009. <http://www.tela-botanica.org/eflore/BDAFN/1.00/nn/143100/chorologie>.
- 51 *Tithymalus guyonianus* (Boiss. & Reut.)Klotzsch &Gracke-checklist View. Consulter le 04/03/2014. <http://www.gbit.org/species/5379503>.
- 52 Ahmed, A. A., Gherraf, N., El-Bassuony, A. A.,Rhuati. S., Gad, M. H., Ohta, S., Hirata, T., *Guyonianin A and B,Two Polyester Diterpenes from Algerian Euphorbia guyoniana*. Natural Product Communications, 2006. **1**. P: 273-279.
- 53 Haba, H., Lavaud. C., Harkat.H., Alabdul Magid., A.M., Marcourt. L., Benkhaled.M., *Diterpenoids and triterpenoids from Euphorbia guyoniana*. J. Phytochemistry, 2007. **68** (9). P: 1255-1260.
- 54 Haba, H., Lavaud. C. Marcourt. L., Long. C., Harkat, H., Benkhaled.M., *Ent-abietane diterpenoids from Euphorbia guyoniana Boiss. & Reut*. Biochemical Systematics and Ecology XXX, 2009. P: 1-5.



*Chapitre II Les
Métabolites Secondaires
Phénoliques*

II. Les métabolites secondaires

II.1. Les Flavonoïdes

Le terme flavonoïdes désigne une large gamme de composés naturels qui appartiennent à la famille des polyphénols. Ils sont considérés comme des pigments quasi universels des végétaux. Ce sont des molécules aromatiques polysubstituées ayant un rôle des métabolites secondaires, très répandue dans le règne végétal, généralement hydrosolubles, et sont responsables des couleurs que l'on observe dans les pétales des fleurs.

Ils assurent la protection des tissus contre les effets nocifs du rayonnement ultra-violet. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des micro-organismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques (**Rees, 1985 ; Bruneton, 1999 ; Jonathan, 1996**) [1- 3].

Plus de 4000 des flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et possède la même base regroupés en une douzaine de classes selon le degré d'oxydation du noyau pyranique (la structure de Benzo- γ -pyrone) (**Bruneton, 1999 ; Ameha, 2006**) [2, 4].

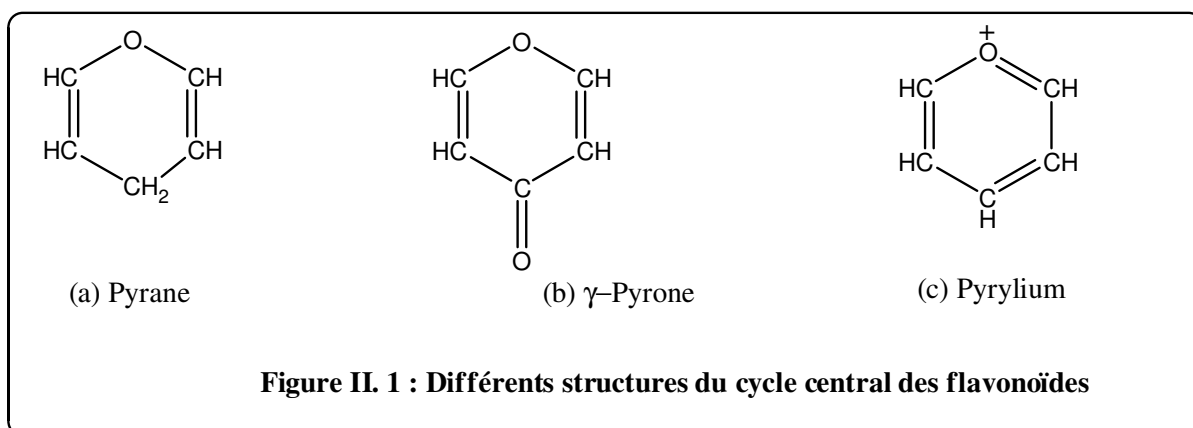
L'absorption quotidienne des flavonoïdes dans la nourriture habituelle, comme les fruits et autres légumes, est d'environ 1-2 g. Le thé vert est riche en catechine, et le contenu de ces composés peut atteindre 1 g/L. (**Bruneton, 1999; Havsteen, 2002**) [2, 5].

Selon les variations qu'on retrouve dans l'hétérocycle C (selon le degré d'oxydation du noyau pyranique central) (**Bruneton, 1999 ; D'archivio, 2007**) [2, 6] et aussi selon la position de la liaison entre le cycle B et C, la classe des flavonoïdes peut être subdivisée, à son tour, dans des sous classes (**Figure II 9**) (**Birt, 2001; Graf, 2005;**) [7, 8].

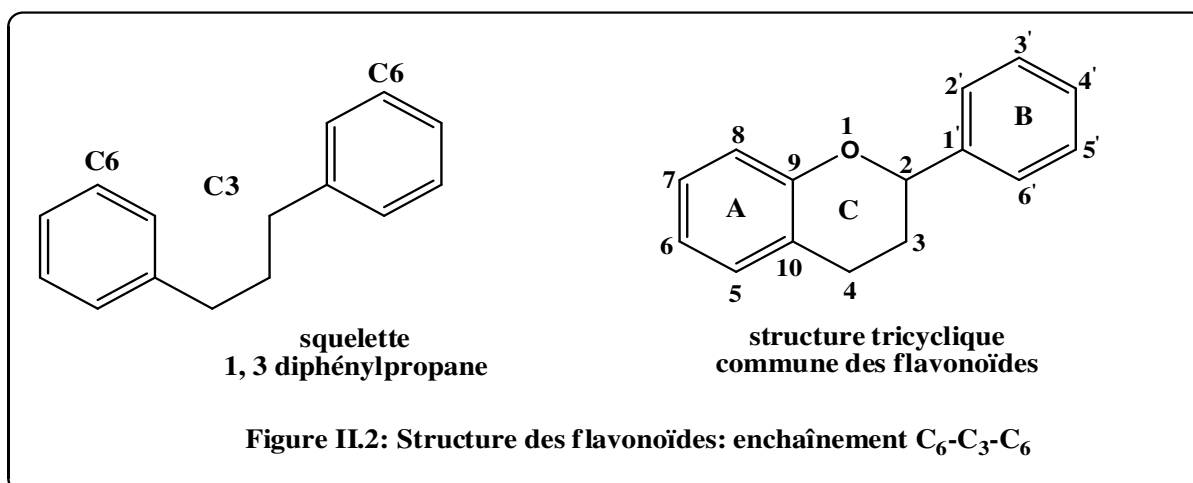
Les composés de chaque sous-classe se distinguent par le nombre, la position et la nature des substituants (groupements hydroxyles, méthoxyles et autres) sur les deux cycles aromatiques A et B et la chaîne en C3 intermédiaire. A l'état naturel, on trouve très souvent les flavonoïdes sous forme de glycosides. Une ou plusieurs fonctions hydroxyles des flavonoïdes sont glycosylés. La partie du flavonoïde autre que le sucre est appelée aglycone (**Bruneton, 2009**) [9].

II.1.2. Les sous-classes des flavonoïdes :

Généralement les Flavonoïdes, des produits naturels qui ont une structure variée. Selon (Geissman 1963) la structure des types de flavonoïdes varie par la nature de l'hétérocycle oxygéné ; cet hétérocycle dérive soit des formules du pyranes (a) ou du γ -pyrone (b), soit celle du pyrylium (c) (**figure II.1**) ; excepté dans le cas des auronés.

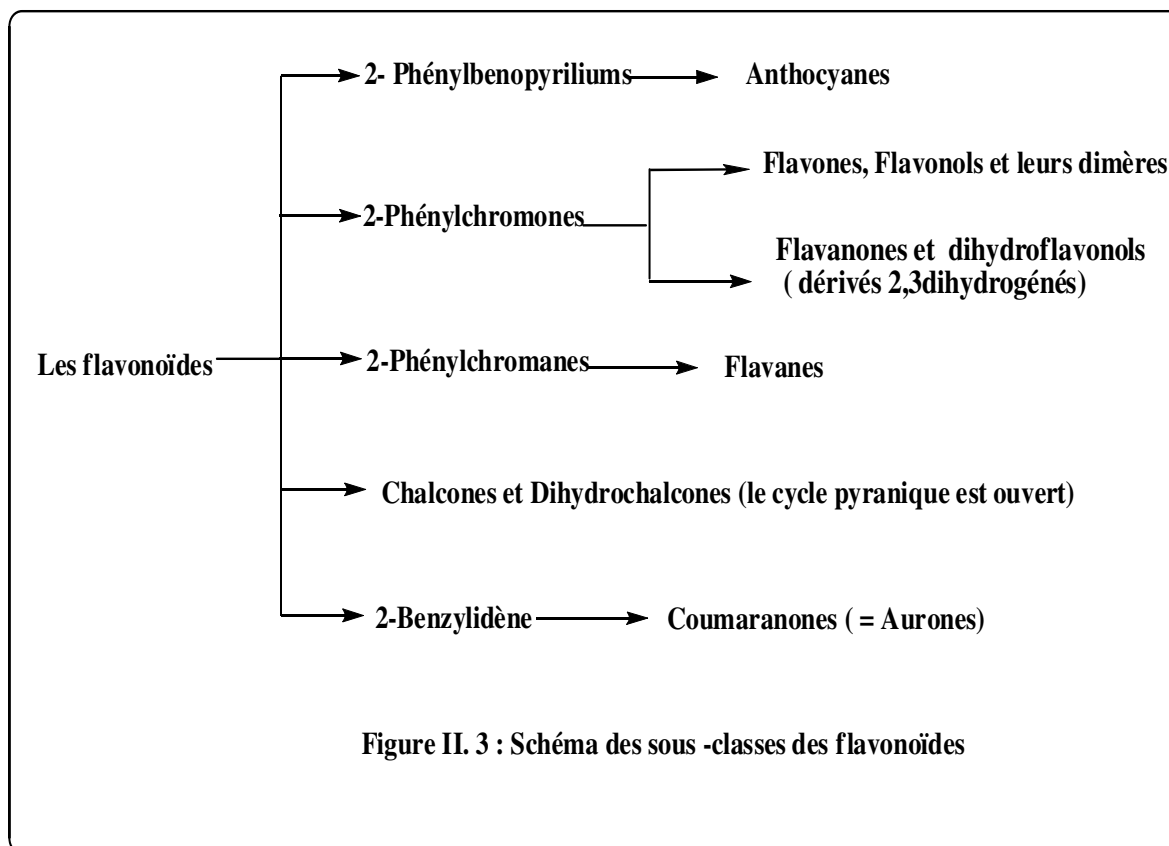


Les Flavonoïdes généralement ont une structure de carbone $C_6-C_3-C_6$ (**figure II.2**), ou plus précisément un squelette de diphenylpropane, décrit par une nomenclature spécifique (**Catherine, 1995**) [10].

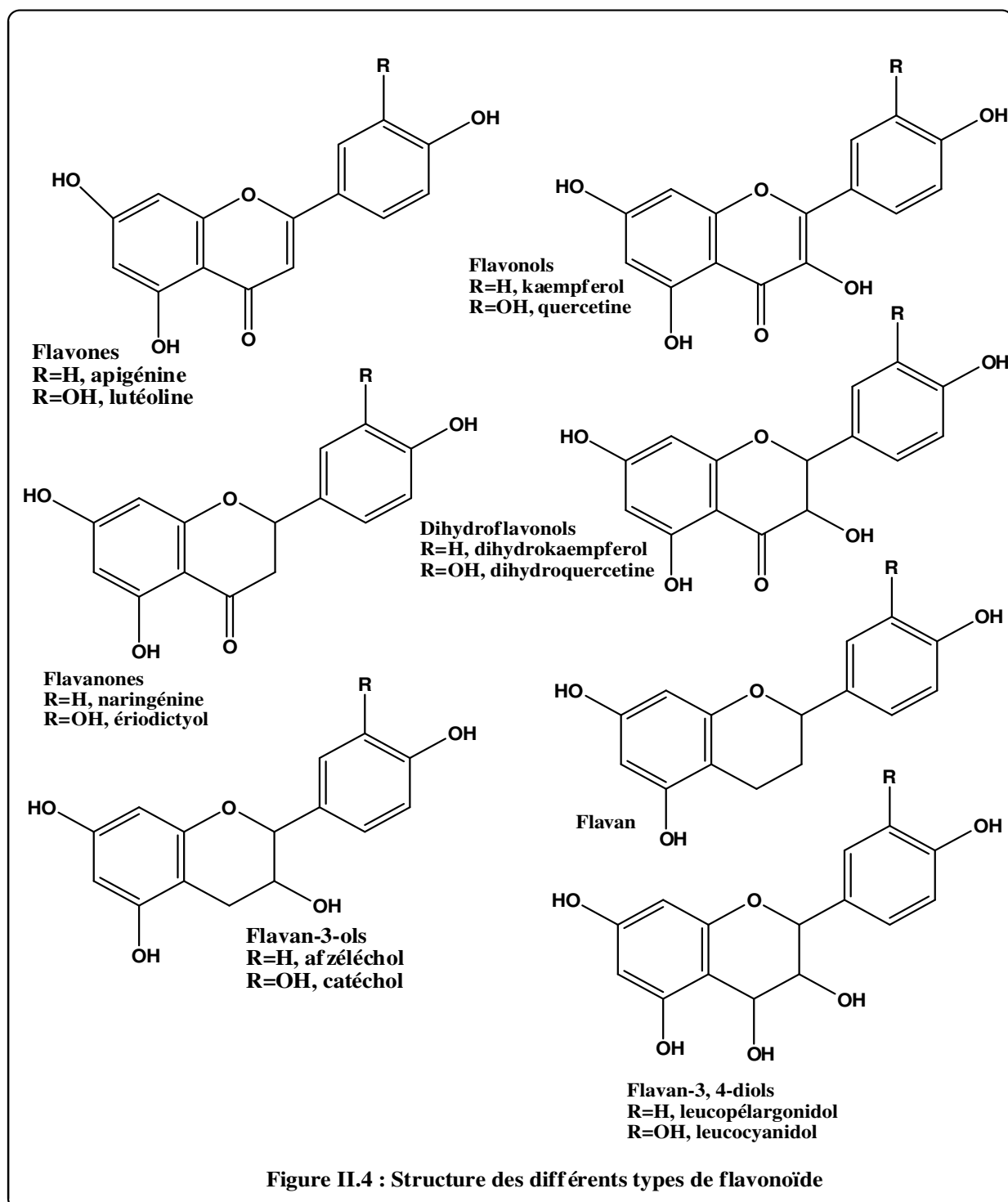


Selon la liaison du cycle aromatique au benzopyrane (Chromane), les deux cycles benzéniques sont nommés cycle **A** et cycle **B** (**figure II.2**). Le chaînon propyle C_3 peut être complété par une fonction éther formant ainsi un cycle central, appelé cycle **C** (**figure II.2**) (**Harborne, 1986**) [11].

On peut résumer que les flavonoïdes se divisent en plusieurs sous-classes qui se distinguent par une diversité fonctionnelle au niveau des positions 2, 3 et 4 du cycle **C** nous les présentons comme suit (**figure II.3**):



La figure citée au-dessus (**figure II.4**) montre la structure des différents types de flavonoïdes.

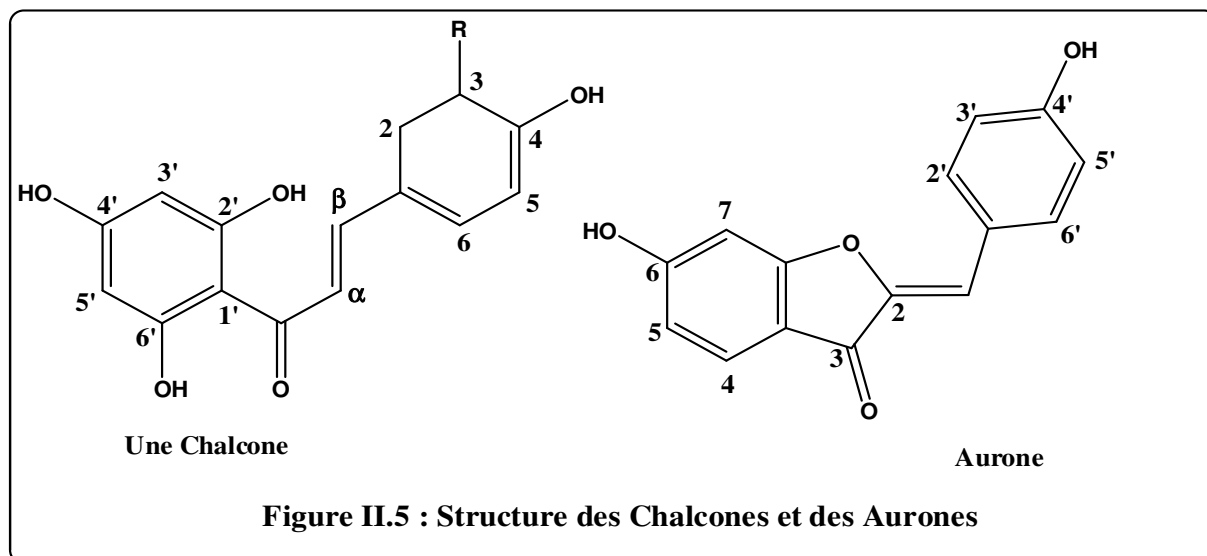


II.1.2.1. Les Chalcones et les aurones

Le squelette de la chalcone ouvre la voie de la biosynthèse des flavonoïdes (**figure II.4**), ils sont différents des autres types de flavonoïdes par l'ouverture du noyau central (le cycle C), elles sont constituées par deux unités aromatiques reliées par une chaîne tri carbonée, cétonique, α , β -insaturée, un squelette de 1,3-diphénylpropane $C_6-C_3-C_6$ (**figure II.2**).

Le noyau B est assez fréquemment monosubstitué ou non substitué, alors que le cycle A est le plus souvent identique à ceux des autres flavonoïdes (C₂, C₄, C₆). Les chalcones semblent assez fréquentes, en particulier chez les Fabiaceae, les Moraceae et les Rutaceae.

Les aurones sont caractérisées par une structure de 2-benzylidène coumaranone. Pour ces deux types de molécules, la numérotation des positions est différente des autres flavonoïdes (**figure II.5**).



II.1.2.2. Flavones et flavonols

Tous les types de flavonoïdes dérivent de la 4, 2', 4', 6'- tétrahydroxychalcone et par conséquent, possèdent tous au moins trois hydroxyles phénoliques en C-5, C-7 et C-4', cela étant, l'un d'entre eux peut être absent (**figure II.4**). Dans plus de 90% des cas, le cycle A des flavones et des flavonols est substitué par deux hydroxyles polyphénoliques en position C-5 et C-7 (**figure II.4**). Ces hydroxyles peuvent être libres ou étherifiés.

D'autres substitutions sont possibles : hydroxyles libres ou étherifiés en C-6 et/ou en C-8, isoprénylation ou méthylation en C-6 ou en C-8, implication du C-6 et / ou C-8 dans une liaison carbone - carbone avec un sucre.

D'une autre part, dans plus de 80% des cas, le cycle aromatique B est substitué en C-4' ou disubstitué en C-3' et C-4', ou moins fréquemment 3', 4', 5'-trisubstitué ; ces substituants peuvent être des groupes hydroxyles (OH) comme ils peuvent être méthoxyles (OCH₃), les autres positions, C-2' et C-6') ne sont qu'exceptionnellement substituées.

Les flavonols se distinguent des flavones par la présence d'un groupement (OH) en position C-3 (**figure II.2**) (**Bruneton, 2009**) [9].

II.1.2.3. Flavanones et dihydroflavonoles

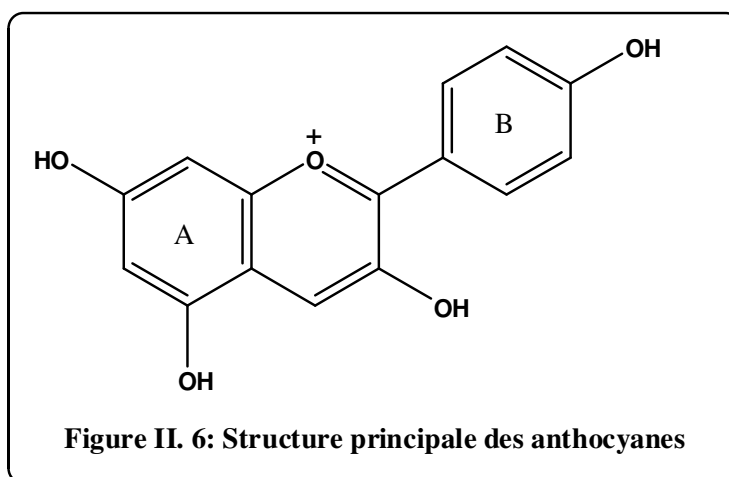
Les flavanones et les dihydroflavonoles sont caractérisés par l'absence de la double liaison C₂-C₃ et par la présence de centres d'asymétrie. Les variations structurales sont de même nature que celles décrites pour les flavones et les flavonoles.

Les dihydroflavonoles ont la même structure que les flavanones, mais ils se distinguent des flavanones par l'hydroxylation de la position C-3 (**figure II.2**) (**Bruneton, 2009 ; Harbone, 1986**) [9, 11].

II.1.2.4. Anthocyanes

Les anthocyanes forment un très large groupe des pigments solubles dans l'eau. Ils sont responsables de la couleur rouge (en milieu acide), pourpre et bleu (en milieu alcalin). Ils sont très répandus dans les plantes supérieures on les trouve surtout dans les fleurs, les fruits et les végétaux. Les anthocyanes comme les flavonoïdes ont des fonctions biologiques importantes pour la protection des plantes (**Youxi, 2009 ; D'Archivio, 2007**) (**figure II.6**) [12, 6].

La diversité des anthocyanes s'explique par les nombreuses possibilités de substitution des cycles A, B et la nature du sucre en position 3 (C₃). Ils se trouvent dans la nature sous forme hétérosidique ou anthocyanine (**Ribéreau-Gayon, 1967**) [13].



II.1.3. La biosynthèse des flavonoïdes

Depuis quelque décennies, les composés polyphénoliques ont suscité un grand intérêt scientifique, à cause de leur importance dans la physiologie des plantes et aussi de leurs rôles dans la pigmentation parce qu'ils sont impliqués dans la croissance et la reproduction des plantes. L'analyse et la compréhension du métabolite phénolique, plus particulièrement celui des flavonoïdes, constituent un réel défi pour un nombre d'équipes scientifiques. Ce sont

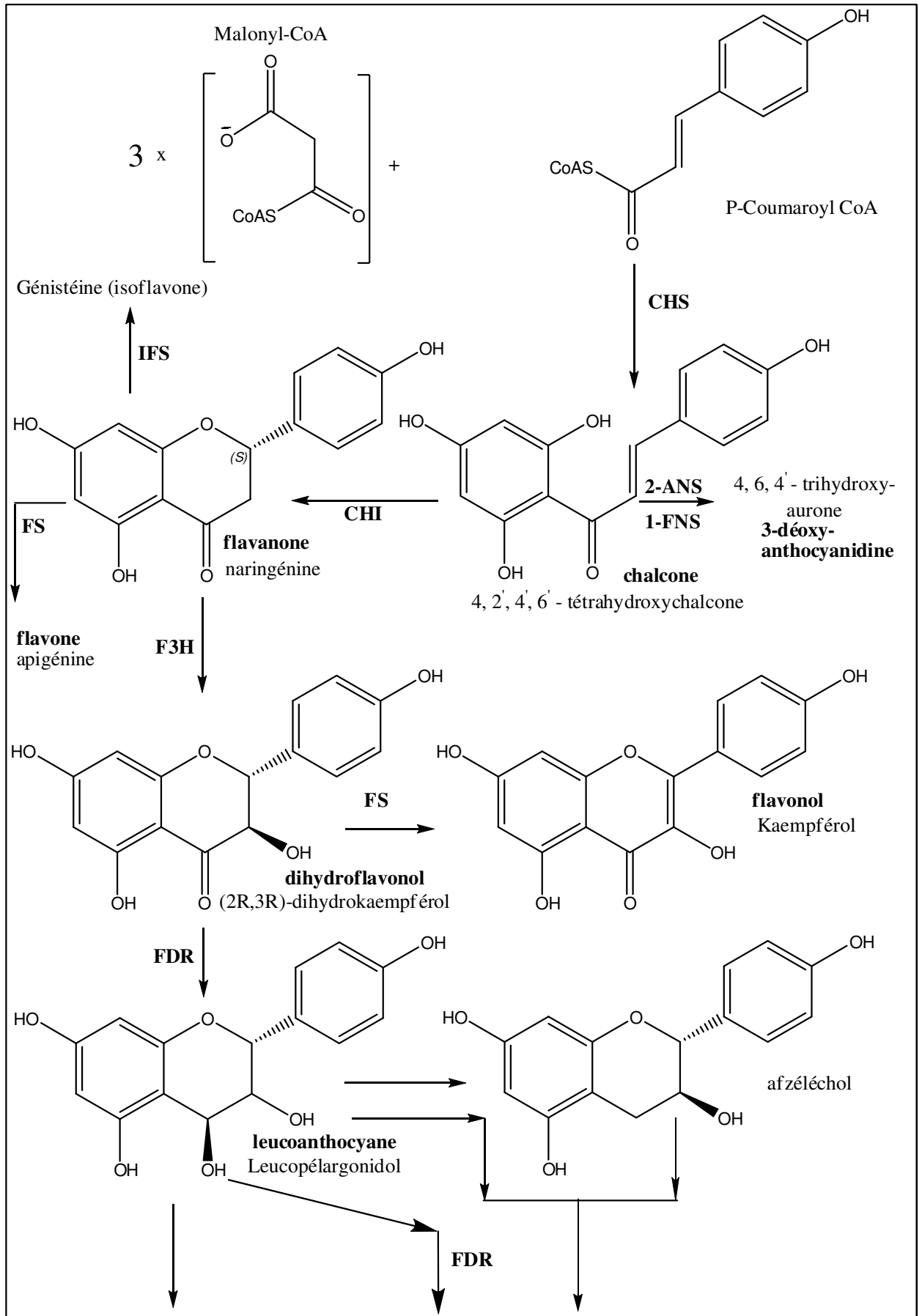
d'abord des méthodes classiques d'identification, qui ont permis les premières analyses, comme l'extraction de micro-organismes et la recristallisation des enzymes (**Manach, 2004**) [14].

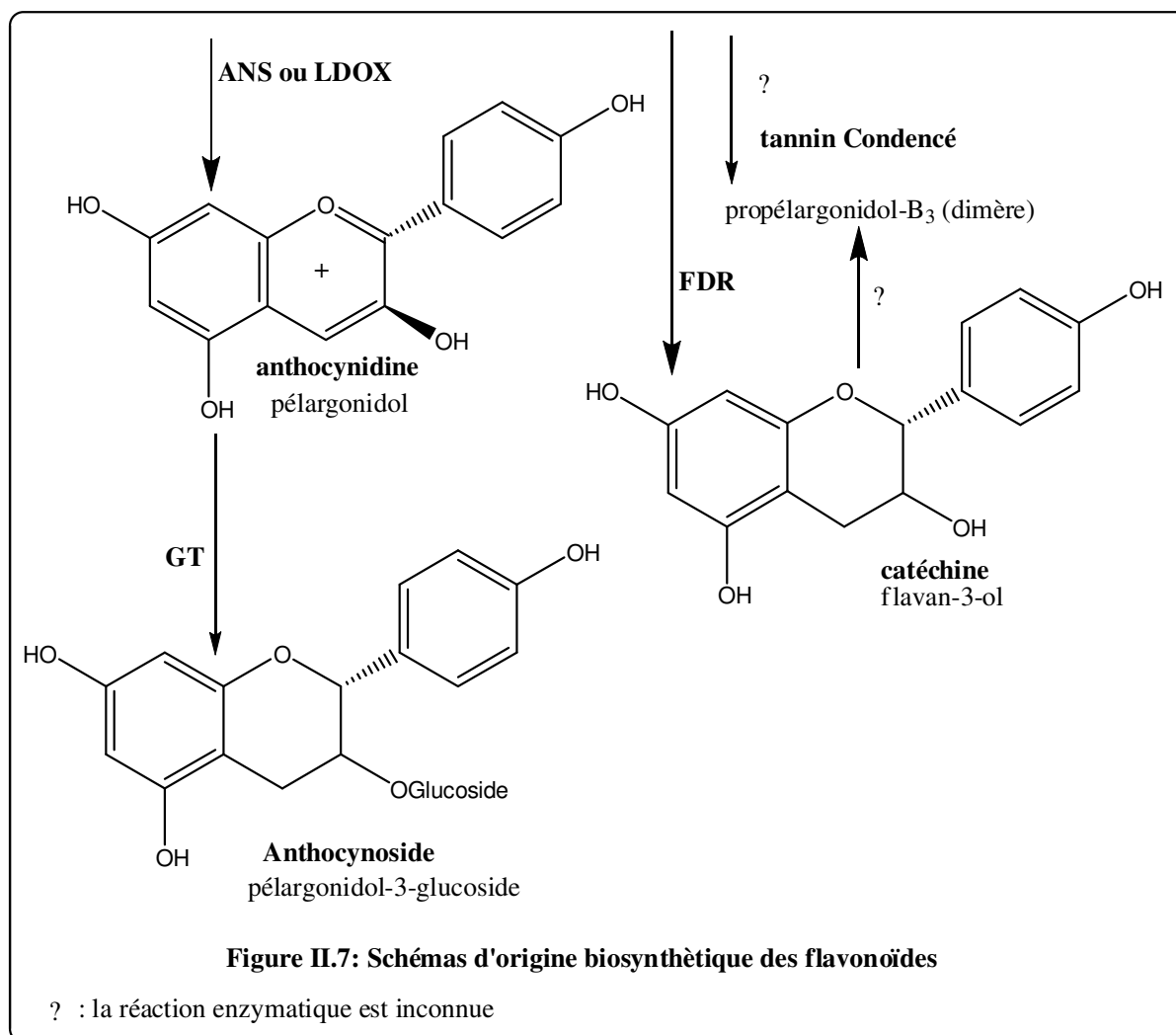
La condensation de triacétate « cycle A » et d'un acide hydroxycinnamique, en règle générale le 4-coumaroyl-coenzyme A (le cycle B), la cyclisation engendrant le cycle pyranique central (le cycle C) (**Bruneton, 1999**) [2]. Toutes les étapes de la biosynthèse des flavonoïdes ne sont pas clairement élucidées, mais elle constitue l'une des plus élaborées en rapport avec les autres métabolites secondaires (**figure II.7**) (**Bruneton, 2009**) [9], grâce à des réactions enzymatiques, dont nous proposons quelques étapes clefs (**Tableau II-1**).

Tableau II-1: Molécules impliquées dans la biosynthèse des flavonoïdes (Harborne, 1986 ; Youxi, 2009; Macheix, 2005) selon des enzymes spécifiques [11, 12, 15] :

Enzymes	Intermédiaires synthétisées
CHS (Chalcone synthase)	Chalcone
CHI (Chalcones Isomérase)	Flavanone
FS (Flavone Synthase)	Flavone
F3H (Flavanone-3-Hydroxylase)	Dihydroflavonol
FLS (Flavonol Synthase)	Flavonol
Chaîne enzymatique : FNR (Flavanone Réductase), ANS (Anthocyanidine Synthase), GT (Glucosyl Transférase)	Dérivés anthocyaniques

Le schéma de la biosynthèse des flavonoïdes est la suivante :





II.1.4. Rôle des flavonoïdes chez l'homme et les plantes

Les flavonoïdes sont des composés actifs majeurs de nombreuses préparations médicales utilisées depuis des temps très anciens. La médecine moderne utilise de manière croissante les flavonoïdes afin de traiter de nombreuses maladies, en utilisant leur capacité à inhiber spécifiquement certaines enzymes, pour stimuler certaines hormones ou neurotransmetteurs, et pour piéger les radicaux libres tels que les radicaux hydroxyles ($\dot{\text{O}}\text{H}$) et superoxydes (O_2^-) (Havsteen, 2002) [5].

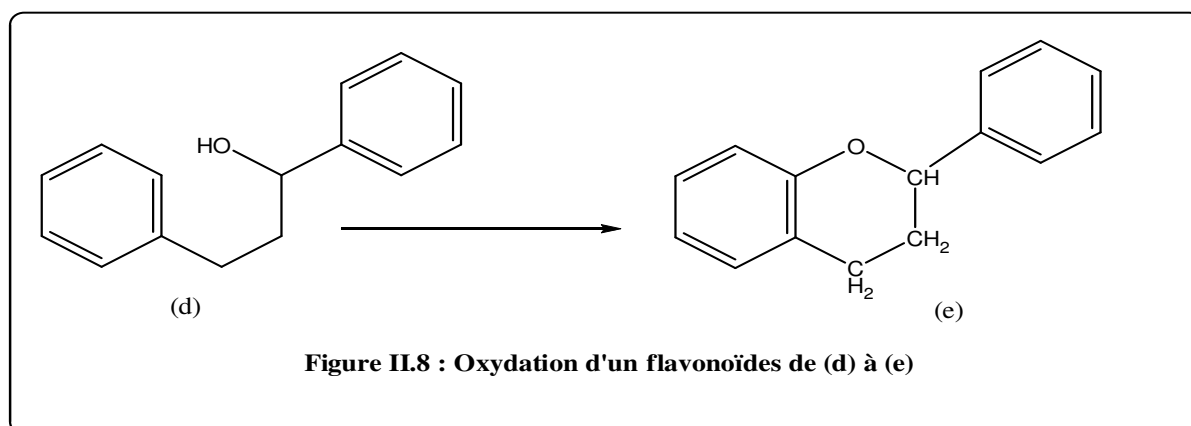
De plus plusieurs études ont montré que les flavonoïdes sont dotés d'activités anti-inflammatoires, cardioprotectrices, neuprotectrices, oestrogéniques et inhibitrices d'enzymes. En somme, les flavonoïdes sont d'un intérêt grandissant pour la santé humaine car ils favorisent, à travers leur consommation sous forme d'aliments qui doit être entre 50 et 800 mg par jour, tout dépend de la consommation des légumes et des fruits (Ameha, 2006) [4].

Plusieurs articles montrent que les flavonoïdes ont des activités biologiques, citons par exemple les activités antiallergiques, antivirales et anti-inflammatoires, anti-oxydante et anti-cancérogène.

La majorité des chercheurs s'intéressent à l'activité anti-oxydante car cette dernière est en général attribuée à sa capacité de piéger les radicaux libres, chélater les ions métalliques ou inhiber les systèmes enzymatiques responsables de la formation des radicaux libres (**Jonathan, 2000 ; Harbornes, 2000**) [16, 17].

Les travaux antérieurs (e.g. Das et pereira, 1990) ont montrés que le groupe carbonyle en C-4 et la double liaison entre C-2 et C-3 des flavonoïdes sont très important pour l'augmentation de l'activité antioxydante (**Harbornes, 2000**) [17].

La structure de l'élément en C₃ varie par son niveau d'oxydation qui est le plus élevé dans les flavonoïdes (**figure II.8**) ; par contre les catéchines et les dihydrochalcones sont les flavonoïdes les plus réduits (**Ribéreau-Guyon, 1967**) [13].



II.1.5. RMN des flavonoïdes

II.1.5. 1. Les déplacements chimiques du cycle C pour les différents types de flavonoïdes

Généralement les déplacements chimiques des carbones aromatiques des différents types de flavonoïde ne sont pas distinguables pour le cycle A et B, par contre les déplacements chimiques des trois carbones du cycle C sont souvent distinctifs. Le tableau II-2 résume les déplacements chimiques de ces 3 carbones pour les différents types d'aglycones (**Harborne, 1988**) [18].

Tableau II-2 : Résumé des déplacements chimiques du cycle C pour les différents types de flavonoïdes

Types aglycones	C-2	C-3	C-4 (=C=O)
Chalcones	136.9-145.4 (C α)	116.6-128 (C β)	188.6-194
Flavanones	75.0-80.3	42.8-44.6	189.5-195.5
Flavones	160.5-165.0	103.0-111.8	176.3-184.0
Flavonols	145.0-150.0	136.0-139.0	172.0-177.0
isoflavonols	149.8-155.4	122.3-125.9	174.5-181.0
Aurones	146.1-147.7	111.6-111.9 (=CH-)	182.5-182.7
Anthocyanes	155.0-168.0	136.0-158.0	135.0-144.0

II.1.5. 2. RMN¹H des flavonoïdes

Les signaux RMN¹H des flavonoïdes obtenus dans le TMS se produisent généralement dans la région de 0-9 ppm et un certain nombre de groupes sont bien séparés.

Les protons en position C-6 et C-8 dans les flavones, les flavonols et les isoflavones qui possèdent un modèle commun de substitution hydroxylés en position 5, 7 donne lieu à deux doublets ($J = 2,5$ Hz) dans la région de 6,0 à 6,5 ppm. Le doublet H-6 se produit régulièrement au champ plus élevé (blindé) que celui du signal du H-8, donc ce dernier apparaît aux champs moins blindés (déblindés).

Dans les trois types des flavonoïdes (les flavones, les flavonols et les isoflavones) O-glucosides, le signal du proton H-1" dans les différentes positions de flavonoïdes se produit à proximité de 5,0 ppm, alors que dans les flavonoïdes 3-O-glucosides, il apparaît en outre à champ faible à environ 5,8 ppm.

Généralement le glucose forme une liaison β dans les flavonoïdes glucosidiques et le proton H-1" du sucre lié en position β présente un couplage diaxial avec celui lié au C-2" (H-2") du sucre. Par ailleurs, le proton du C-1" apparaît généralement sous forme d'un doublet avec une constante de couplage d'environ 7 Hz (Mabry, 1970 ; Tatsis, 2007) [19,20].

II.1.6. La spectrométrie de masse des flavonoïdes

Dans les spectres de masse des flavonoïdes, les fragments (**figure II-9**) sont désignés par une lettre en fonction du cycle qu'ils contiennent (A ou B). La charge de l'ion observé est spécifiée en exposant. Les liaisons C-C (0-4) qui ont été fragmentées sur le cycle C, pour donner naissance au fragment considéré, sont également spécifiées en exposant.

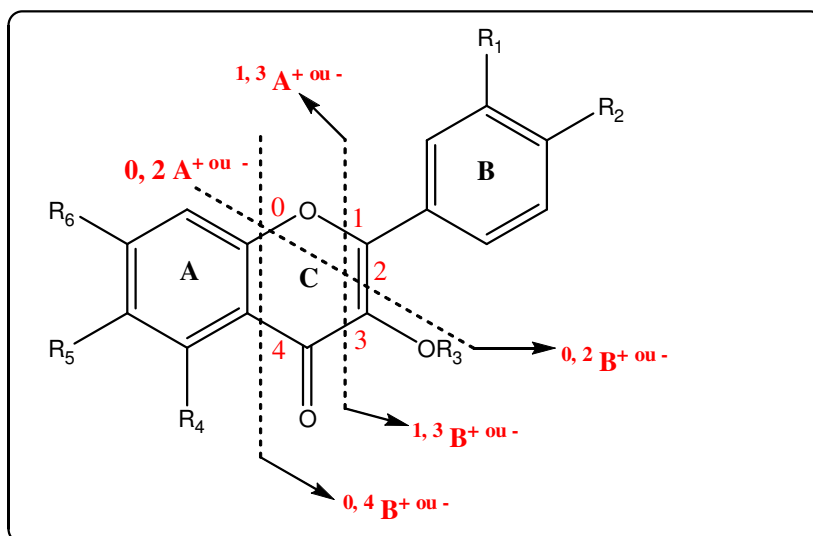


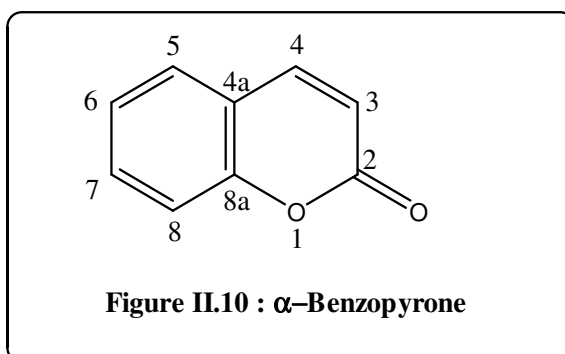
Figure II.9 : Exemples de fragmentation et nomenclature associée

Les ions $i, jA^{(+ \text{ ou } -)}$ et $i, jB^{(+ \text{ ou } -)}$ ainsi formés peuvent se fragmenter à leur tour. Ces fragmentations ultérieures correspondent généralement à des pertes de petites molécules neutres, comme par exemple, H_2O , CO , CO_2 , etc (Cuyckens, 2004) [21].

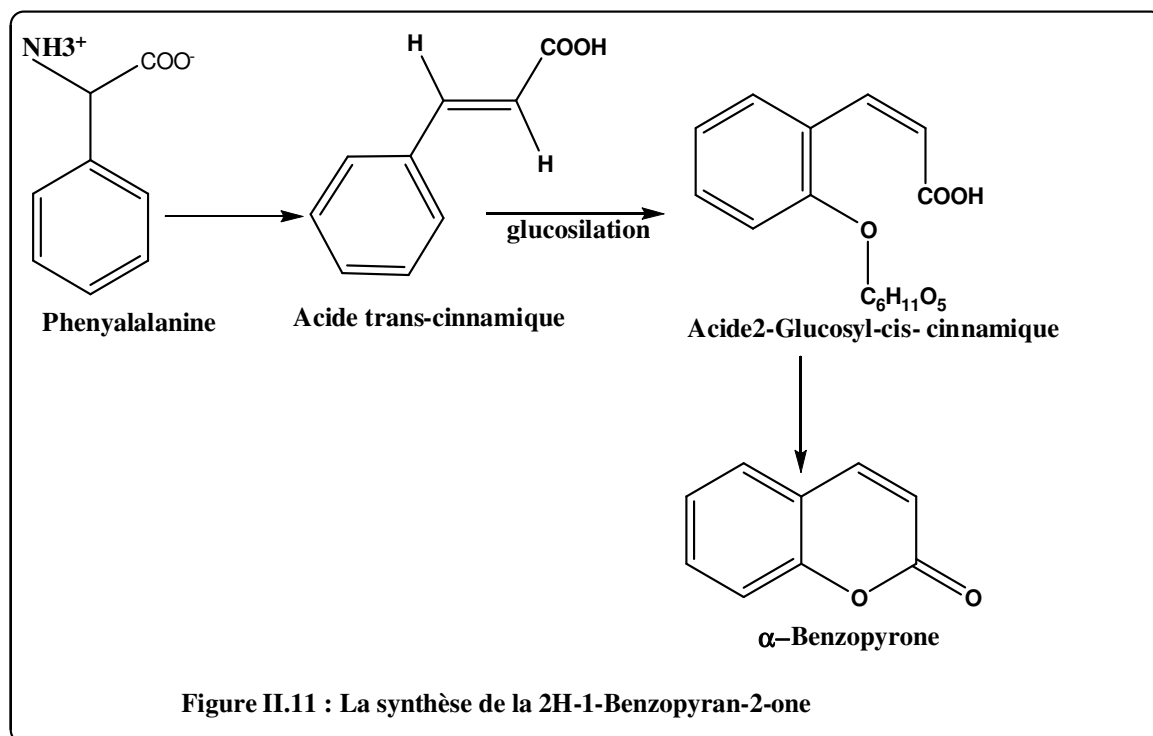
II.2. Les coumarines

Les coumarines sont une autre classe des métabolites secondaires, tirant leur nom de « coumarou », nom vernaculaire de la fève tonka *Coumarouna Odorata* appelée aussi (*Dipteryx Odorata* Willd., *Fabiaceae*) d'où fut isolée pour la première fois, en 1820, la coumarine.

Le terme coumarine désigne la classe des composés phénoliques dérivés de la molécule, la 2H-1-benzopyran-2-ones (α -benzopyrone) (figure II.10).



L' α -Benzopyrone dériverait de la cyclisation de l'acide orthohydroxycinnamique (Scott, 1995) [22] (figure II.11).



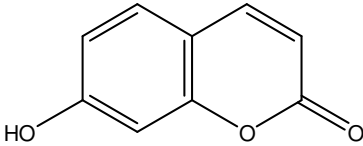
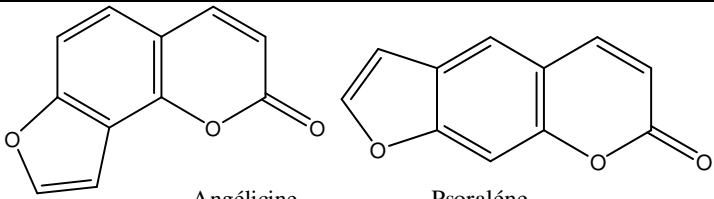
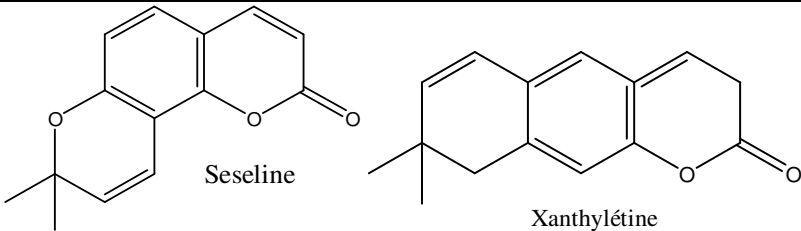
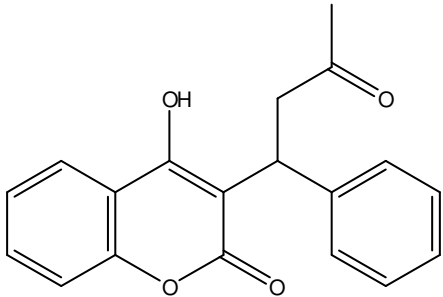
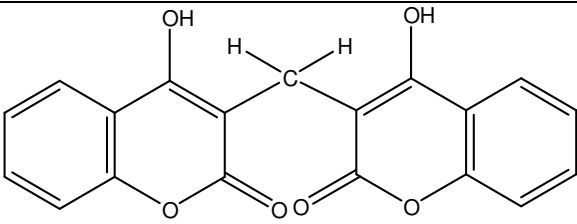
Plus d'un millier de coumarine ont été décrites et les plus simples d'entre elles sont largement distribuées dans tout le règne végétal. Le squelette de base des coumarines est constitué de deux cycles accolés de types **C-6** (**figure II.10**) avec neuf atomes de carbones possédant le noyau 2H -1-benzopyran -2- ones (**Gray, 1978**) [23].

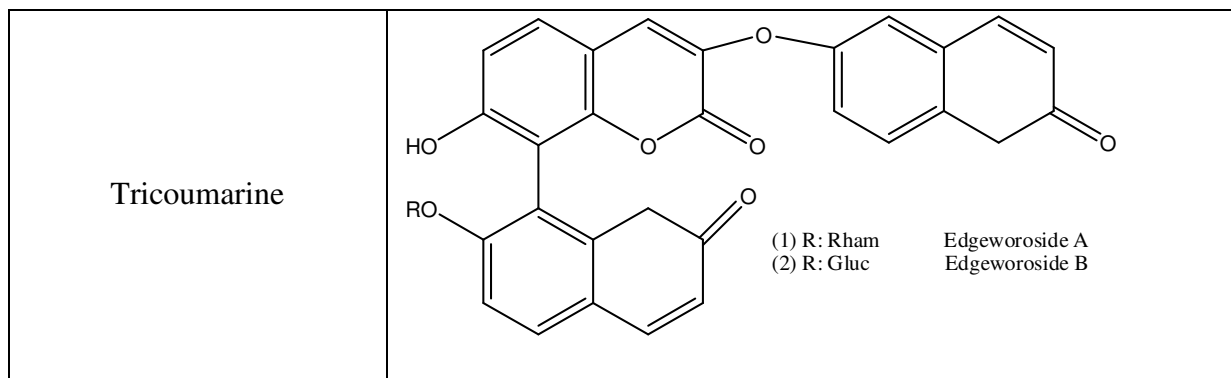
II.2.1. Répartition, localisation et classification

Les coumarines sont les constituants caractéristiques du règne végétal chlorophyllien, à l'exception les algues (**Gray, 1978**) [23]. Ils sont largement répandus dans les familles telles que Fabaceae, Asteraceae et surtout Apiaceae et Rutaceae chez lesquelles sont rencontrées les molécules les plus complexes. Les coumarines se trouvent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits et dans les huiles essentielles des graines. Elles sont fréquemment à l'origine des hétérosides (**Bruneton, 2009**) [9].

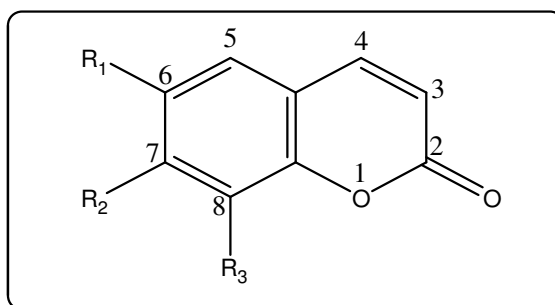
Les coumarines sont subdivisées en quatre catégories, les coumarines simples, furanocoumarine, pyranocoumarine et les coumarines pyrone-substitués **tableau II-3** (**Aoife, 2004**) [24].

Tableau II-3 : Exemple des dérivés coumariniques

Classification	Exemple
Coumarines simples	 <p>7-Hydroxycoumarine</p>
Furanocoumarines	 <p>Angélicine Psoralène</p>
Pyranocoumarine	 <p>Seseline Xanthylétine</p>
Les coumarines pyrone-substitués	 <p>Warfarine</p>
Dicoumarine	 <p>Dicoumarol</p>



Les coumarines simples sont substituées en C-7 par un hydroxyle phénolique. Selon la nature des substituants, plusieurs auteurs ont classés les coumarines en cinq catégories (**figure II.12**). La 7-hydroxycoumarine, connue sous le nom d'ombelliférone, est le précurseur des coumarines 6, 7-dihydroxylés et 6, 7, 8-trihydroxylés.



R ₁	R ₂	R ₃	Nom des Coumarines
H	OH	H	Ombelliférone
H	OCH ₃	H	Herniarine
OH	OH	H	Esculétol
OCH ₃	OH	H	Scopolétol
OCH ₃	OH	OH	Fraxétol

Figure II.12: Structures de base des coumarines

Les hydroxyles des coumarines simples peuvent être méthylés ou l'un d'eux peut être engagé dans une liaison hétérosidique, exemple la skimmine (7-O-glucosyl-ombelliférone), l'esculoside (6-O-glucosyl-esculétol) et la cichoriine (7-O-glucosyl-esculétol), la scopoline et le fraxoside (glucosides du scopolétol et fraxétol).

Les coumarines libres sont solubles dans les alcools et dans les solvants organiques tels que le dioxyde d'éthyle ou les solvants chlorés avec lesquels on peut les extraire. Les formes hétérosidiques sont plus ou moins solubles dans l'eau. L'intérêt pharmacologique des drogues à coumarines est limité (**Bruneton, 2009 ; Murray, 1963**) [9, 25].

II.3. Les tanins

Les tanins ont été utilisés depuis des temps ancestraux pour convertir la peau des animaux en cuir grâce à l'interaction des flavonoïdes avec les fibres de collagène de la peau, protéine riche en résidus proline et hydroxyproline.

Historiquement, l'importance des drogues à tanins est liée à leurs propriétés tannantes, c'est-à-dire à la propriété qu'ils ont de transformer la peau fraîche en matériau imputrescible : cuir (**Codorniu-Hernandez, 2003 ; bruneton, 2009**) [26, 9].

Selon la définition classique les tanins se sont des composés phénoliques hydrosolubles ayant une masse moléculaire comprise entre 500 et 3000 g/mol qui présentent, à coté de ces réactions classiques des phénols, la propriété de précipiter la gélatine, les protéines et les alcaloïdes selon **Bathe-Smith et Swain** (1962) et aussi par les métaux lourds (Fe, Pb, Zn, Cu). Cette définition a perdu son intérêt depuis la connaissance exacte des structures chimiques de ces polyphénols qui sont les proanthocyanidols et les polyesters des acides galliques et ellagiques. En 1987 **Mole et waterman** ont défini les tanins comme des produits naturels phénoliques qui peuvent précipiter les protéines à partir de leur solution aqueuse hydrosoluble (**Karamali, 2001**) [27].

Les tanins se dissolvent dans l'eau sous forme de solution colloïdale, mais leur solubilité varie selon le degré de polymérisation (elle diminue lorsque celui-ci augmente). Ils sont solubles dans les alcools et l'acétone. Les solutions aqueuses ont une stabilité variable selon la structure, généralement modérée.

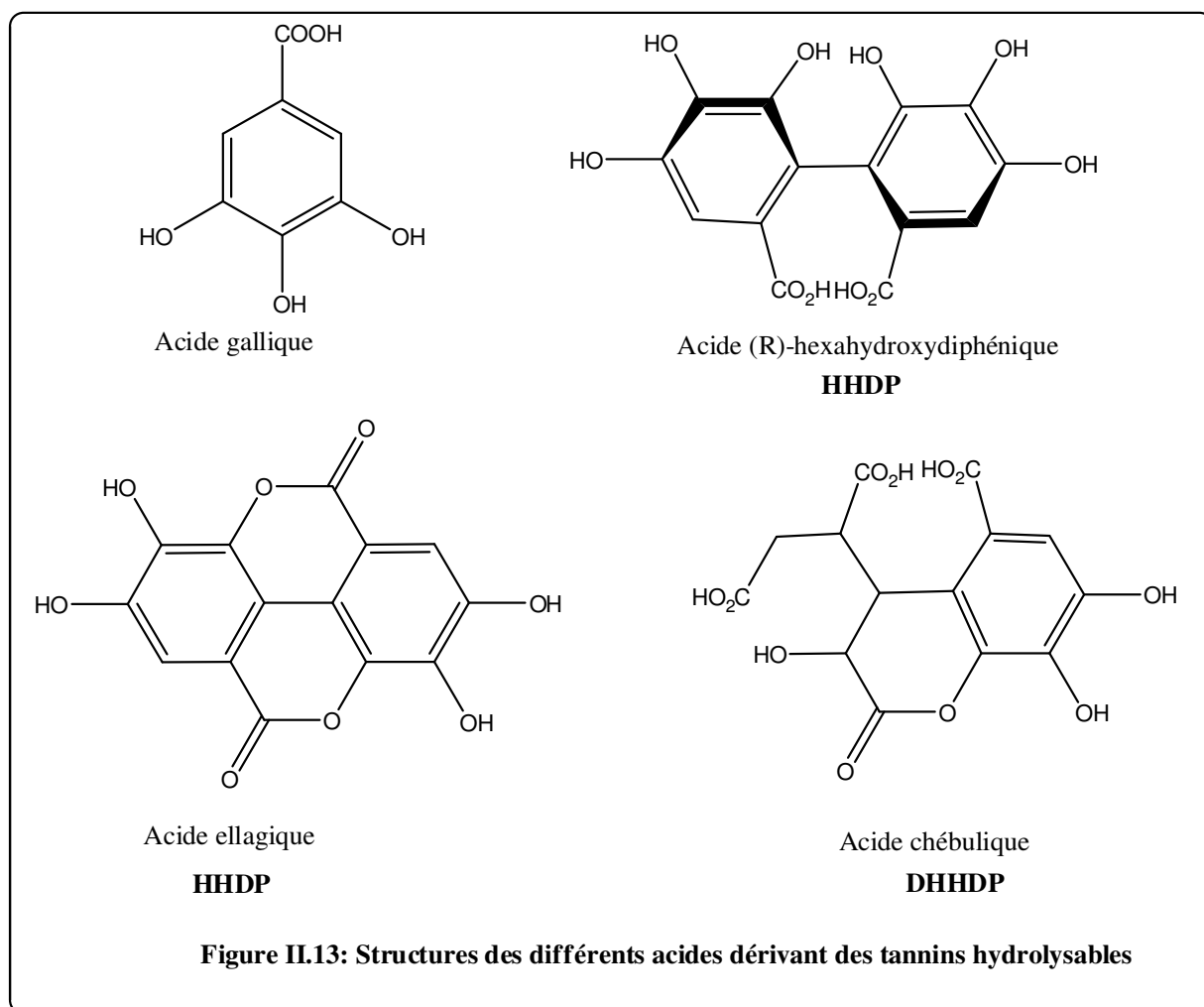
Habituellement on distingue deux groupes de tanins différents par leur structure aussi bien que par leur origine biogénétique : les tanins hydrolysables et les tanins condensés (**Bruneton, 2009 ; Doat, 1978**) [9, 28].

II.3.1. Tanins hydrolysables

Ce sont des olligo-ou des polyesters d'un sucre (ou d'un polyol apparenté) et d'un nombre variable de molécules d'acide phénol. Le sucre est très souvent le glucose. L'acide-phénol soit l'acide gallique dans le cas des tanins galliques, soit l'acide hexahydroxydiphénique appelé acide ellagiques (**HHDP**) et ses dérivés d'oxydation (déhydrohexahydroxydiphéniques = **DHHDP** : acide chébulique) dans le cas des tanins classiquement dénommés tanins ellagiques (**figure II.13**).

Depuis 1985, plusieurs représentants d'une nouvelle catégorie de tanins ont été isolés. Les tanins complexes sont des ellagitanins modifiés résultant de l'addition d'un dérivé phényl chromanique sur une molécule d'ester **HHDP** du glucose.

Les tanins galliques, ellagiques, déhydroellagiques (simple ou complexe) ont caractéristiques des Angiospermes Dicotylédones (**Bruneton, 2009**) [9].



II.3.1.1. Structure des tanins hydrolysables

Le penta-ester (1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucose) (**figure II.14**) est le tanin le plus commun. Il occupe une position centrale dans le métabolisme des tanins il occupe une position centrale dans le métabolisme des tanins.

En effet, la plupart des végétaux sont susceptibles de poursuivre le métabolisme de cette molécule et de ces homologues et ce dans deux directions :

1- Evaluation vers une molécule plus lourde

(hexa- à undécagalloylglucose) par formation, en 3, 4 et/ou en 6 du glucose, de chaînes latérales constituées de plusieurs acides galliques liés selon un mode méta-ou para-depsidique (les deux formes s'équilibrent en solution par migration d'acyle).

2- Formation des tanins ellagiques

Le couplage oxydatif C-2-C-2' des groupes galloyle de la molécule engendre un motif hexahydroxybiphénylique, dicarboxylique.

La penta substitution du glucose autorise plusieurs couplages entre les résidus galloyl en position relative 1,2 ou 1,3 pour former des esters hexahydroxy-diphénique ; la molécule peut être un ester mono-ou bis-HHDP.

Enfin, la condensation de ce type de molécule avec C-8 ou le C-6 d'un flavane (ou d'une flavone) qui conduit aux tanins complexes (**Bruneton, 2009**) [9].

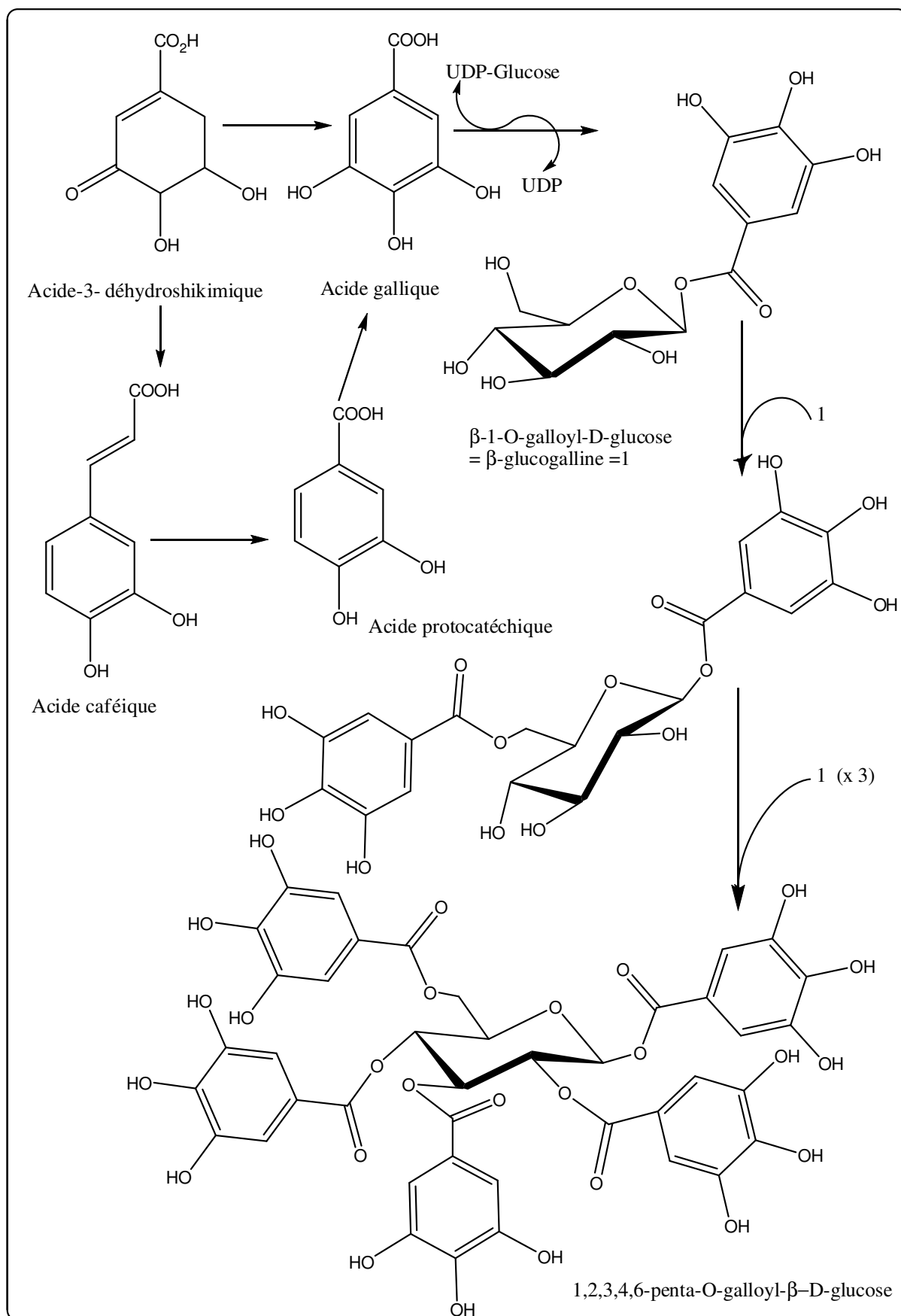
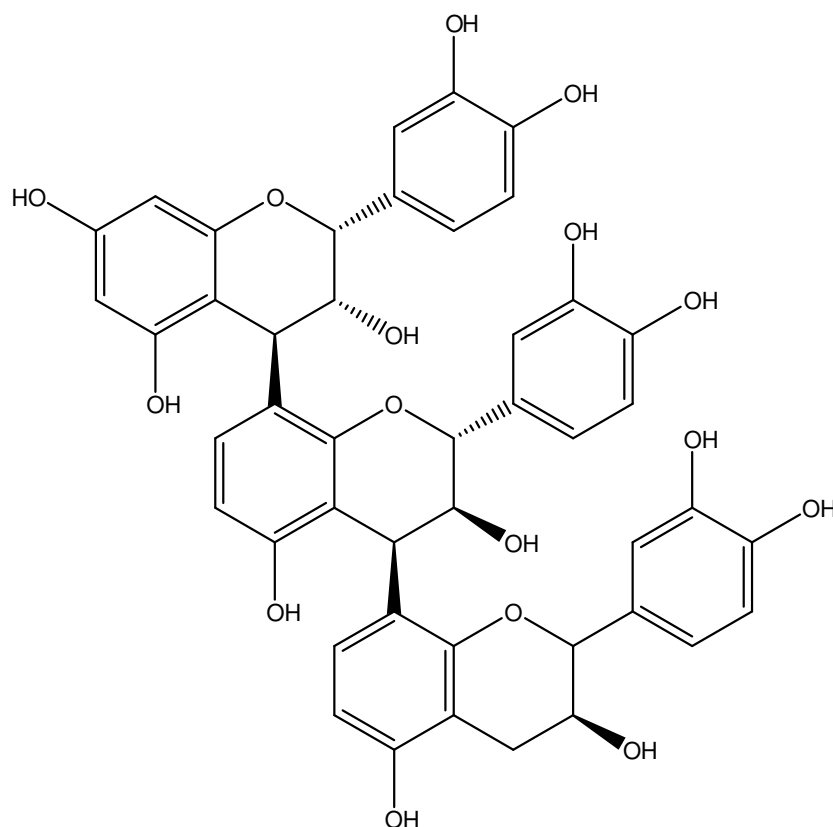


Figure II.14 : La biosynthèse d'un tanin gallique glucosylé

II.3.2. Tanins condensés

Les tanins condensés ou proanthocyanidols sont des polymères flavaniques. Ils sont constitués d'unités de flavan-3-ols liées entre elles par des liaisons carbone-carbone. Les proanthocyanidols ont été isolés ou identifiés dans tous les groupes végétaux (**figure II.15**).



Trimère épicatechol-(4 β ->8)-[picatechol-(4 β ->8)-catéchol

Figure II.15 : Exemple de structure d'un tanin condensé (proanthocyanidol)

II.4. Conclusion

Comme il vient d'être décrit sur les composés phénoliques (leur diversité structurale, leur intérêt médicinal et thérapeutique), ces composés révèlent important pour l'homme. C'est ce qui nous a encouragés à entreprendre ce travail dans le cadre d'un programme initié au laboratoire de synthèse organique bioorganique de l'université de Badji Mokhtar Annaba et au laboratoire de pharmacognosie faculté de pharmacie Montpellier I France.

Références bibliographiques

- 1 Rees, S. B., Harborne. J. B., *The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. Phytochem*, 1985. **24**. P: 2225 – 2231.
- 2 Bruneton, J., *Pharmacognosie- phytochimie, plantes médicinales*. 3eme édition 1999.
- 3 Jonathan, M. H., Kelvin, D. C., Ian, B. P., Trevor, A.M., Lawrie, J. B., *Soybean isoflavonoids and their metabolic products inhibit in vitro lipoprotein oxidation in serum*. *Nutritional Biochemistry*, 1996. **7**. P: 664-669.
- 4 Ameha, S., Kaleab, A., Fathy, K. E.F. *Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoïdes*. *Phytochemistry*, 2006. **67**. P: 2058–2070.
- 5 Havsteen, B. H., *The biochemistry and medical significance of the flavonoïds*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2002. **96** P: 67- 202.
- 6 D’archivio, M., Filesì, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., Masella, R., Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Is Super Santa*, 2007. **43** (4). P: 348-361.
- 7 Birt, D. F., Hendrich, S., Wang. W., *Dietary agents in cancer prevention: Flavonoids and isoflavonoids*. *Pharmacol. Ther.* 2001. **90** (2-3). P: 157-177.
- 8 Graf, B. A., Milbury, P. E., Blumberg, J. B., *Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence*. *J Med. Food*. 2005. **8**(3). P: 281-290.
- 9 Bruneton, J., *Pharmacognosie- phytochimie, plantes médicinales*. 4eme ed. 2009.
- 10 Catherine, A. Rice-Evans., *Structure antioxidant activity relationships of flavonoïdes and phenolic acids*. 1995.
- 11 Harborne, J. B., *The flavonoids. Advances in research since 1986*. Ed. Chapman & Hall. London, 1994.
- 12 Youxi, Y., *Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage*. 2009
- 13 Ribéreau-Guyon, P., *Les composés phénoliques des végétaux*. Edition Dunond. **1**. Paris, 1968.
- 14 Manach, C., Scalbert, A., Morand. C., Remesy, C., Jimenez, L., *Polyphenols: food sources and bioavailability*. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004. **79**(5). P : 727-747.
- 15 Macheix, J. J., Fleuri, A., Jay-Allemand C., *Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d’importance économique*. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne, 2005. P : 37-54.
- 16 Jonathan, L., *Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000.**29** (9). P: 900-912.
- 17 Harborne, J.B., *Current Advances in Mycorrhizae Research: G.W. Podila, D.D. Douds (Eds). American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota, USA. Phytochemistry*, 2000. **54** (7). P: 729-729.
- 18 Harborne, JB. The flavonoids: recent advances. In: Goodwin TW, ed. *Plant Pigments*. London, England: Academic Press, 1988. P: 299-343.

- 19 Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag. Berlin, 1970.
- 20 Tatsis, E. C., Boeren, S., Exarchou, V., Troganis, A. N., Vervoot, J., Gerothanassis, I. P., *Identification of the major constituents of Hybericum perforatum by LC/SPE/NMR and/or LC/MS*. Journal Photochemistry, 2007. **68**. P: 383-393.
- 21 Cuycknes, F., Claeys, M., *Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoïds*. J. Mass spectrum, 2004. **39**. P: 1-15.
- 22 Scott, T. A., Mercer. I. E., *Consise Encyclopedia Biochemistry and Molecular Biology*. 3^{eme} Edition de gruter, 1995. Britain.
- 23 Gray, A. I., Waterman, P. G., *Coumarins in the Rutaceae*. Phytochemistry, 1978. **17** (5). P: 845-864.
- 24 Aoife, L., Richard, O'K., *Studies on Coumarins and Coumarin-Retermine their Therapeutic Role in the Treatment of Concer*. Current Pharmaceutical Design, 2004 **10**. P: 3797-3811.
- 25 Murray, R. D., *Aromatic, Heteromatic chemistry, chemical society specialist petriodical , report*,1975. **3**. P: 463.
- 26 Codorniu-Hernandez, E., Mesa-Ibirico, A., Montero-Cabrera, L. A., Martinez-Luzardo, F., Borrmann, T., Stocher, W. D., *Theoretical study of flavonoïds and proline interactions. Aqueous and gas phases*. Journal of molecular structure, 2003. **623** (1-3). P: 63-73.
- 27 Karamli, k., Tuenis, R., *Tannins: classification and definition*. Nat. Prod. Rep. 2001. **18**. P: 641-649.
- 28 Doat, J., Enel, M. A., *Les tannins dans les bois tropicaux., revus*. Division Cellulose et de chimie Center Technique Forestier Tropical, 1978. **182**. P: 37-54.



Chapitre III
Chromatographie
de Partage

Ce chapitre est consacré au nouvel appareil CPC, son principe, son instrumentation et ses caractéristiques. Le model japonais distribuer par Everseiko (HPCPC) est utilisé pour la première purification de l'extrait acétate d'éthyle d'*Euphorbia guyoniana*.

III.1. Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

De nos jours, les techniques chromatographiques forment un ensemble d'outils utilisés couramment dans des domaines de recherche variées (chimie, biochimie, biologie...). Durant ces dernières décennies, ces techniques devenues nécessaire pour les chercheurs et les industriels ayant comme objectif de séparer les composants d'un mélange. Il en est ainsi pour les chimistes de substances naturelles, pour lesquels le fractionnement et/ou l'isolement de molécules pures à partir d'extraits végétaux est une tâche courante (**Delannay, 2006**) [1].

Dans les domaines pour lesquels la préservation de l'intégrité chimique et biologique des espèces isolées est essentielle, les techniques de chromatographie liquide-liquide sans support solide (dites à contre courant) telles que la chromatographie de partage centrifuge, semble être outils alternatifs intéressants. Même si elles ont longtemps souffert des problèmes d'appareillage et de la complexité de leur mise en œuvre, ces techniques tendent aujourd'hui à se vulgariser.

Le nombre impressionnant des techniques chromatographiques actuelles faisant appel aux principes de base de la chromatographie. c'est une indication supplémentaire de la puissance des découvertes de **Tswett** au début de 20^{ème} siècle (**Navak, 1975 ; Mandava, 1988**) [2, 3], **Cornish et Craig** en 1943-1944 (**Craig, 1949 ; Craig, 1944**) [4, 5], **Martin et Syngé** en 1950-1960 (**Scott, 1995**) [6], **Ito et Nunogaki** en 1966 et **Horváth** en 1970-1980 (**Horvath, 1976 ; Tiselius, 1943 ; Ito, 1966, 1969**) [7-10].

Cette nouvelle chromatographie contre- courant (CCC) a été à l'origine découverte après les études d'**Ito** et al. Le premier appareil a été construit au Japon en 1966 (**Ito, 1969**) [10] par **Ito et Nunogaki** dans lequel un long tube hélicoïdal autour d'une bobine, fait office de colonne chromatographique. Cet appareil est spécialement conçu pour différencier les particules en suspension ou des solutés dans des solutions dans un système de solvants soumis à une accélération centrifuge.

Cette nouvelle machine a été employée pour deux applications importantes : une, poursuivi par **Ito** en USA basée sur une large variété d'appareils CCC en utilisant un champ de gravité variable constituées un mécanisme de deux axes de giration et un arrangement rotatif seal-free pour la colonne ; et l'autre, poursuivi par **Nunogaki** au Japon basé sur un appareil de chromatographie de partage centrifuge CPC en utilisant un champ de constante de gravité constituée d'un mécanisme d'un seul axe de rotation et de deux joints de seal rotatifs pour entrer et débouché la phase mobile (**Foucault, 2001**) [11].

Plusieurs études publiées qui traitent beaucoup d'exemples de séparations à différents champs. Principalement, la CCC et la CPC sont basés sur un support- libre de chromatographie liquide - liquide avec deux liquides non miscibles préparé par un mélange de deux solvants ou plus. L'instrument garde un liquide stationnaire pendant que l'autre est pompé à travers lui, et le processus de la chromatographie se produit entre les deux phases liquides. Une amélioration pendant les dernières vingt ans, généralement les instruments de la CCC et la CPC étaient encore considérés comme des instruments qui manquent d'efficacité.

Ce manque est compensé par la haute sélectivité trouvée dans CCC et CPC (les deux phases liquides peuvent être réglées délicatement) et la haute proportion de la phase stationnaire et la phase mobile ont un effet positif sur la résolution (**Murayama, 1982**) [12]. Cependant, comme l'efficacité de la chromatographie liquide de haute performance a été officiellement améliorée par une meilleure connaissance de média, les chemins ont besoin d'être trouvés pour augmenter le transfert de masse entre les deux phases dans CCC et CPC pour améliorer leurs efficacités (**Marchal, 2000**) [13].

D'après la nomenclature de l'inventeur, les instruments peuvent être classés dans deux familles, c.-à-d. hydrodynamique ou **HDES**, et hydrostatique ou **HSES**. L'instrument **HDES**, principalement a été introduit par **Ito Yoichiro (Foucault, 2001)** [11].

Ito en 1981 et ses collaborateurs, est habituellement nommé CCC, par contre l'instrument **HSES**, principalement introduit en 1982 par le japonais **Nunogaki** (Laboratoires Sanki, Japon), cet instrument est généralement nommé CPC, ou chromatographie de partage centrifuge (**Marchal, 2003**) [14].

III.2. Principe de la Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC)

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) est définie comme une technique chromatographique originale liquide-liquide sans support solide, basée sur les différences de partage des solutés entre deux phases liquides non miscibles, préparées par mélange de 2, 3(ou plus) solvants et/ou solutions.

Une phase liquide est maintenue stationnaire dans la colonne (le rotor) par un champ de forces centrifuge constant. Ce champ de force est généré par la mise en rotation de la colonne contenant des cellules de partage, ces dernières étant reliées entre elles par des conduits de section inférieure à celle des cellules de partage. L'autre phase liquide dite mobile est pompée au travers de la phase stationnaire (**figure 1**). Les solutés sont séparés en fonction de leurs coefficients de partage respectifs (**Murayama, 1982**) [12].

III.3. Instrumentation utilisée

Les chaînes chromatographiques utilisées en CPC et de manière générale en chromatographie à contre courant sont composées des éléments usuels d'une chaîne chromatographique préparative classique, à savoir d'une pompe, d'un injecteur (ou échantillonneur), d'une colonne chromatographique, d'un détecteur, d'un enregistreur et d'un collecteur de fractions (**figure III. 1**).

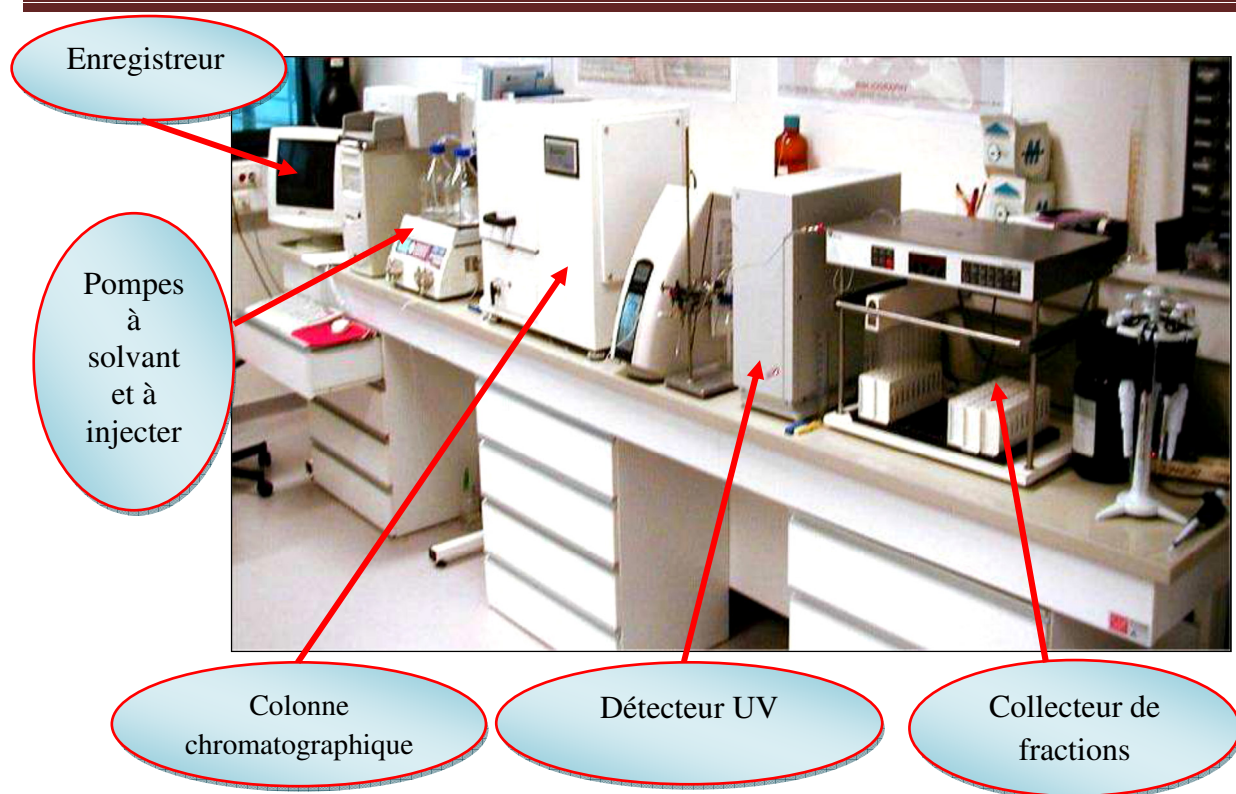


Figure III. 1 : Schéma d'une chaîne de CPC

III.3.1. Pompe

La Chromatographie de Partage Centrifuge est une technique préparative, donc il est nécessaire de disposer d'une pompe pouvant délivrer d'important volumes de solvants avec des pertes de charges de l'ordre de quelques dizaines de bars et parfois de plus de 100 bars, et ce en générant un minimum de pulsations. En effet, ces dernières sont négligeables à l'équilibre hydrodynamique entre les deux phases et l'on observe alors une diminution très sensible de la rétention de phase stationnaire (vide infra). De plus les pulsations générées en amont de la colonne peuvent se propager dans toute la colonne de liquide (ex. phénomène connu sous le nom de « coups de bélier » lors d'une surcharges massiques) avec les dangers liés à tout phénomènes ondulatoire tel que par exemple le risque de résonance et donc d'amplification du phénomène. Des expériences menées dans ce sens au laboratoire ont permis de confirmer l'intérêt de disposer d'une pompe générant le moins de pulsations possible.

Pour les appareils Des laboratoires, les pompes dites « CLHP » classiques en version semi-préparative (jusqu'à 50 ml/min) sont adaptées. Pour les appareils pilotes ou industriels, plusieurs solutions sont techniquement envisageables :

- Pompe à membrane industrielles (type LEWA) couplée à un amortisseur de pulsations,
- Deux pompes seringues montées en série afin de pouvoir délivrer le solvant de façon non limitative et continue,
- Une pompe industrielle à pistons adaptée en termes de débit et de perte de charge.

Par ailleurs, les pompes gradients binaires, ternaires ou quaternaires permettent d'alimenter la colonne à l'aide d'un plusieurs solvants ou mélange de solvants, en même temps. Cette dernière caractéristique s'avère indispensable lors d'un développement par gradient d'élution, pour lequel la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'expérience (**winterhalter, 2007**) [15].

III.3.2. Injecteur

L'injection de l'échantillon est une étape très importante pour la CPC. En effet, lorsque l'échantillon est peu soluble dans le milieu ou trop concentré (surcharge volumique ou massique), deux phénomènes peuvent se produire.

- a) Il peut avoir précipitation ou cristallisation des composés au sein de la pompe et/ou seringue d'injection, donc il est conseillé de choisir un mode d'injection (pompe seringue par exemple) ou de sélectionner un autre système de solvant,
- b) Il peut y avoir désaturation du système biphasique, les propriétés du système biphasique et les propriétés physico-chimiques des composés de l'échantillon conduisent définitivement à l'obtention de systèmes monophasiques au sein de la colonne CPC ; ces systèmes monophasiques étant impropres à la conduite d'expériences de purification (**Marchal, 2003**) [14].

III.3.3. Colonne chromatographique

Plusieurs fabricants et distributeurs proposent des chromatographes de partage centrifuge dont :

- La firme japonaise système instrument corporation, SIC (précédemment Sanki), dont les appareils sont distribués par Everseiko (<http://www.everseiko.co.jp>) sous le nom de HPCPC (High Performance Centrifuge Partition Chromatography) ;
- La firme française Armen Instrument (<http://www.armen-instrument.com>) les appareils distribués sous l'appellation CPC ;
- La firme française Kromaton Technologies (<http://www.kromaton.com>) les appareils sont distribués sous l'appellation FCPC (Fast Centrifugal Partition Chromatography) ;
- La firme française Partus Technologies (<http://www.partus-technologies.com>), dont l'unique appareil industriel est commercialisé sous l'appellation de *Partition 25*.

Chaque firme (excepté Partus) propose des gammes d'appareils allant des prototypes analytiques (capacité volumique de 80 ml pour SIC, 50 ml pour kromaton et Armen). Ces appareils peuvent être classés selon la fonction de la conception différente de leur rotor. Ainsi, on distinguera les appareils à rotor « sandwichs » des appareils à rotor monoblocs.

III.3.3.1. Rotor

Telle qu'elle est décrite par Nunogaki à l'origine, la colonne chromatographique de CPC est un rotor constitué de la superposition de disques de partage (**figure III.2**) (**Ito, 1981**) [16].

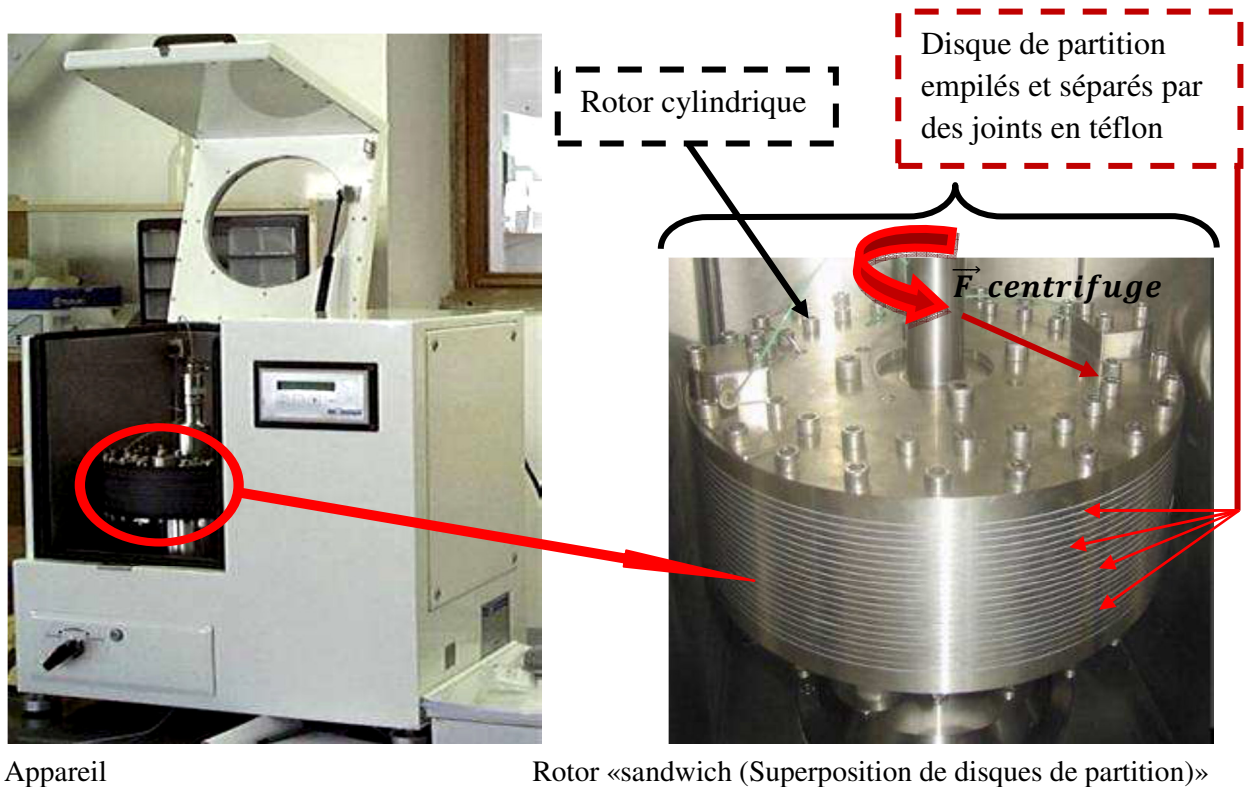
Ce type de colonne peut être qualifié de rotor « sandwich » car la colonne est issue de l'empilement successif de disque et des joints entre les disques en téflon. Les appareils sont commercialisés par SIC, Kromaton et Armen sont réalisés à partir de ce concept.

Plusieurs matériaux sont utilisés pour la fabrication de ces rotors, ceux-ci devant être inertes chimiquement et le moins lourd possible. Ainsi, les disques des HPCPC Sanki/SIC sont en Sulfure de Poly-(Phénylène) (PPS) ou en Poly-(chlorotrifluoroéthylène) tandis que ceux des FCPC Kromaton sont en Acier inox téflonnés ou non.

Pour toutes ces raisons, le système de solvants biphasique doit être précisément choisi, en considérant :

- la solubilité de l'échantillon,
- la concentration en analytes.
- le volume d'injection et la quantité d'analytes injectable idéaux pour obtenir une bonne séparation en mode par élution sont mentionnés la plupart du temps par le fabricant.

De façon générale, l'injection de l'échantillon est réalisée manuellement à l'aide d'une vanne d'injection équipée d'une boucle d'injection alimentée par une seringue reliée à l'entrée de la colonne et la sortie de la pompe.



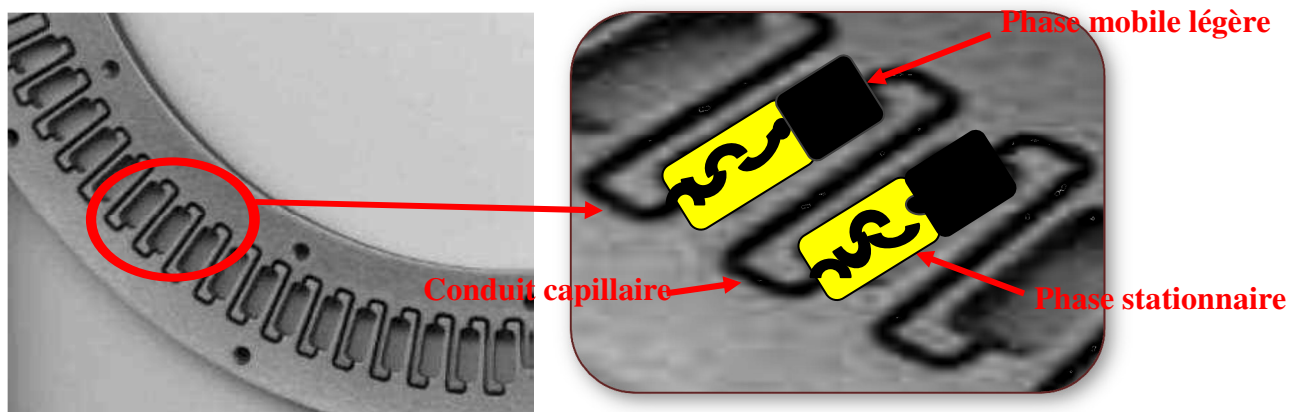
Appareil

Rotor «sandwich (Superposition de disques de partition)»

Figure III.2 : Schéma descriptif de l'appareil de chromatographie de partage centrifuge (CPC à disques « sandwichs ») utilisé au laboratoire

Les disques dans ces appareils comportent généralement des cellules de partage de sections rectangulaires (en 3 dimensions) disposées horizontalement, ces dernières étant

reliées les unes aux autres par de fins conduits capillaires. Les cellules de partage sont orientées radialement par rapport au centre des disques. Dans les HPCPC (Sanki/SIC) les cellules de partage sont « incrustées » dans des disques lors d'une étape de moulage. Chaque cellule présente une face « débouchante » et une face fermée (**figure III.3**).



Disque de partition de FCPC

Cellule de partage de FCPC

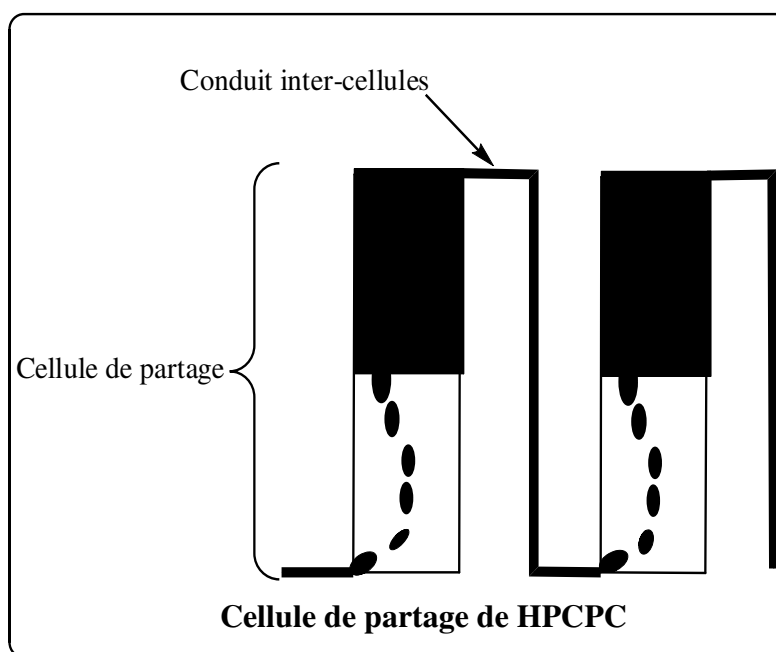


Figure III.3 : Exemple de disque et de cellules de partage des appareils CPC

Les cellules de partage dans les appareils HPCPC Sanki/SIC l'axe des cellules est parallèle à la force centrifuge.

La plupart des innovations faites ces dernières années ont eu comme principal objectif d'optimiser le brassage des phases au sein des cellules. Très récemment, la géométrie globale des cellules a été remise en question par **Faucoult, Cuillard** et al. Dans les appareils

d'Armen les cellules ne sont pas rectangulaire mais plutôt de forme cylindrique aplatie (Kinkel, 2006) [17].

III.3.3.2. Détecteur et Enregistreur

L'analyse de l'effluent à la sortie de la colonne peut s'effectuer soit en ligne, soit hors-ligne. Dans le cas de l'analyse hors-ligne d'un important volume d'effluent, l'opération peut s'avérer rapidement contraignante.

A l'inverse, l'analyse en ligne est beaucoup moins astreignante et nécessite toutefois le choix d'un détecteur. Ce choix doit dépendre de la nature (molécules organiques ioniques/non ioniques, minérales, polymères...) et des propriétés physicochimiques (acidité, point d'ébullition...) des analytes de l'échantillon.

Le détecteur Ultra Violet (UV) pourra être employé pour les molécules visibles en UV autrement dit absorbant dans les longueurs d'ondes du visible ($\lambda=200-600$ nm) pour les molécules minérales ou organiques.

Lorsque les analytes sont des acides ou de bases, la mesure de pH en ligne à l'aide d'un pH mètre peut donner des indications supplémentaires sur la composition de l'effluent. Les outils d'analyse structurale tels que le spectromètre de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) ou le Spectromètre de Masse (MS) peuvent être également couplés à la CPC (Spraud, 1997 ; Thiebault, 1992) [18,19].

III.3.3.3. Collecteur de fractions

Une fois que les analytes ont été séparés par la chromatographie de partage centrifugeuse (CPC), il convient de les récupérer. Pour cela, on peut procéder de façon manuelle en suivant simultanément les résultats des analyses de détection ou alors de façon automatique à l'aide d'un collecteur de fraction. Dans ce cas, la collecte est réalisée automatiquement la récupération de volumes définis d'effluent dans des récipients.

III.4. Choix des solvants et diagrammes de phase

Des échanges (transfère de masse) sont ainsi possibles entre les deux phases et le soluté n'est à aucun moment en contact avec un support solide. Les phénomènes d'adsorption irréversibles et/ou de dégradation des solutés par interactions moléculaires avec un support solide sont ainsi évités.

En CPC, le choix des systèmes diphasique de solvants est équivalent au choix du type de colonne et à celui de l'éluant en CLHP. C'est donc le système biphasique qui conditionne la qualité de séparation. Il faudra choisir un système biphasique de solvants ayant la bonne polarité pour chacune des deux phases et solubilisant bien l'échantillon. Tout en étant différents, les coefficients de partage des solutés à séparer doivent entourer la valeur 1. Face multitude des systèmes biphasiques de solvants utilisables en CPC, il est nécessaire d'adopter une approche logique et rigoureuse (Renault, J.H., 1997) [20].

De nombreux systèmes biphasiques sont décrits dans la littérature. Ces systèmes peuvent être constitués de deux, trois, quatre solvants ou plus, les **systèmes ternaires**

(figure III.4) étant les plus fréquemment utilisés. Pour ces dernières il faut se reporter au diagramme de phases pour pouvoir ajuster la composition et donc la polarité des deux phases.

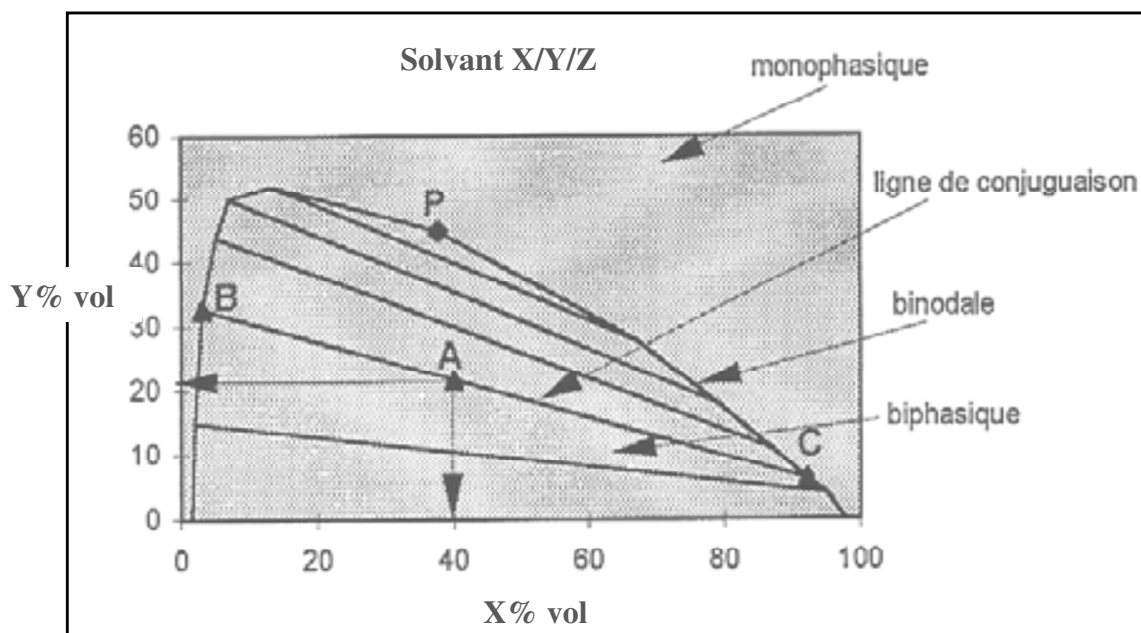


Figure III.4 : Diagramme de phase ternaire issu d'après (Renault, J.H., 1997) [20]

Cette représentation, illustrée dans la figure III.4, permet de visualiser aisément :

- **La binodale** qui est la frontière entre les domaines mono- et biphasique
- Les **lignes de conjugaison** permettent de connaître les compositions respectives des deux phases. Ainsi, un système **A** (figure III.4), correspondant à un mélange biphasique donnée des trois solvants, fournira une phase supérieure de composition **B** et une phase inférieure de composition **C**. Tous les mélanges à la ligne de conjugaison **BC** donneront les mêmes compositions **B** et **C** des deux phases mais dans des rapports de volumes différents.
- Le point **P** (qui n'existe pas toujours suivant les systèmes biphasiques) est l'endroit du diagramme de phases où la composition des phases inférieure et supérieure est identique, tous les coefficients de partage des solutés devenant égaux à 1.

Il est recommandé d'éviter les compositions de solvant trop proches du point P qui risquent de devenir monophasiques à l'intérieur de la colonne CPC.

La CPC nous permet également de travailler selon deux modes d'élution :

- **ascendant** : quant la phase supérieure est choisie comme phase mobile

- **descendant** : quand la phase inférieure est choisi comme phase mobile (**Renault, 1997 ; Rolet, 1992**) [21, 22].

III.5. Les avantages et les inconvénients

III.5.1. Avantages

Cette méthode versatile (plusieurs mode de développement) et très simple d'utilisation présente, entre autre, plusieurs avantages :

- l'absence de support solide implique qu'il n'y a pas d'absorptions irréversibles des solutés
- la dégradation et la dénaturation des produits sont alors limitées
- l'échantillon injecté peut être entièrement récupéré par évaporation des solvants, même en cas d'échec de la séparation
- plusieurs modes de développement peuvent être utilisés (élution (isocratique ou gradient), déplacement (échange d'ions, pH-zone refinig...) (**Renault, 1995 ; Maciuk, 2005**) [21-23].
- il est possible d'inverser une ou plusieurs fois le rôle des phases au cours de l'expérience (mode dual) (**Delannay. 2006**) [1].
- le développement d'appareils industriels a permis à présent d'envisager la purification à grande échelle de divers composés (ions, composés inorganiques, composés chiraux ou achiraux...) (**Margraff. 2005**) [24].

III.5.2. Inconvénients

Les inconvénients de ce système résident dans l'utilisation de solvants au sein d'une machine en rotation. En effet, l'appareillage doit être étanche pour éviter toutes fuites de solvants, et être robuste et hermétique pour résister à l'augmentation de la perte de charge dans la colonne en rotation (**Van Buel. 1995**) [25].

L'injection des composés à purifier impose l'utilisation de systèmes de solvants solubilisant parfaitement l'échantillon. Dans le cas contraire, les analytes de l'échantillon cristallisant ou apparaissant sous forme d'un précipité, peuvent contaminer la pompe et/ou la colonne. De plus, les échantillons contenant des produits fortement tensioactifs peuvent entraîner une « désaturation » du système de solvants biphasiques et perturber les expériences de CPC (**kromaton, 2011**) [12].

III.6. Grandeurs chromatographiques

III.6.1. Coefficients de distribution K_D

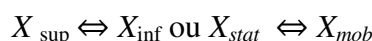
Le partage d'un composé entre deux phases dépend essentiellement des facteurs propres à sa diffusion (concentration, température, solubilité, polarité...). Le physicien et

chimiste **allemand Nernst** a introduit, en 1891, le coefficient de distribution K_D comme une constante physique caractéristique d'une substance donnée en chromatographie de partage. K_D^X est défini par le rapport des concentrations d'un soluté X dans la phase supérieure et dans la phase inférieure d'un système biphasique à l'équilibre lorsque ce soluté est dilué dans le système.

$$K_D^X = \frac{c_{sup}^X}{c_{inf}^X} \quad \text{ou} \quad K_D^X = \frac{c_{stat}^X}{c_{mob}^X} \quad \text{(Equation III.1)}$$

avec : K_D^X : coefficient de la distribution de la substance X
 c_{sup}^X : concentration de X dans la phase liquide supérieure
 c_{inf}^X : concentration de X dans la phase liquide inférieure
 c_{mob}^X : concentration de X dans la phase mobile
 c_{stat}^X : concentration de X dans la phase stationnaire

L'équilibre thermodynamique correspondant s'écrit :



III.6.2. Volume de rétention V_r .

Le volume de rétention est très important pour les techniques chromatographiques liquide/liquide, il s'apparente avec le temps de rétention. Les analytes émergent la colonne de la colonne avec un volume de rétention V_r propre (**Equation III.2 (a, b)**) dans le mode descendant et ascendant.

Lors du processus chromatographique, les différents solutés X émergent de l'appareil CPC suivant un ordre défini, après un volume de rétention V_r^X tel que :

$$V_r^X = V_{mob} + K_D^X V_{stat} \quad (a) \quad \text{(Equation III. 2)}$$

$$V_r^X = V_{mob} + \frac{1}{K_D^X} V_{stat} \quad (b)$$

avec :

V_r^X : Volume de rétention de la substance X
 V_{mob} : Volume occupé par la phase mobile dans la colonne
 V_{stat} : Volume occupé par la phase stationnaire dans la colonne

La représentation graphique de l'élution d'un composé dans des conditions de linéarité exprimée en concentration en fonction du temps ou en fonction du volume de l'effluent est une courbe de distribution typiquement gaussienne (**Figure III.5**). La mesure de la concentration peut s'effectuer par la mesure de l'absorbance, de la fluorescence...etc. En combinant les données fournies par le chromatogramme (**Figure III.5**) et l'équation 2, il est possible d'accéder assez rapidement au coefficient de distribution de chaque analyte.

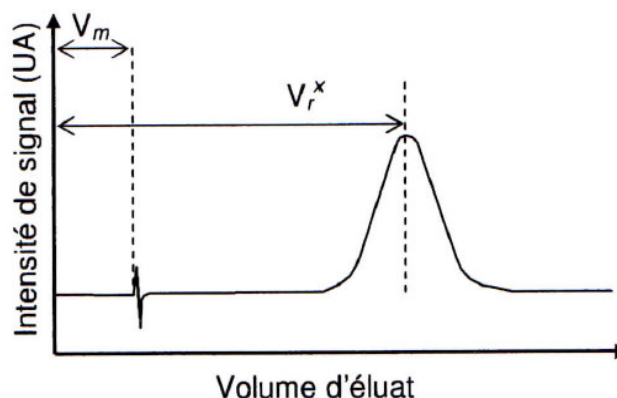


Figure III.5 : Chromatogramme obtenu après un développement par élution d'un composé X

Le coefficient de distribution des composés à séparer dont la valeur se rapproche de 1 sera préférentiellement recherché en mode de développement par élution en CPC. En mode de développement par déplacement, un coefficient de distribution soit très grand soit très petit sera nécessaire au processus chromatographique.

III.6.3. Taux de rétention de phase stationnaire S_f

Quand la colonne est remplie par la phase stationnaire et mise en rotation, la phase mobile est pompée dans le mode adapté (ascendant ou descendant) jusqu'à atteindre un état d'équilibre stable, suivie d'un remplissage partiel de la colonne par la phase mobile $S_f^{\%}$ (équation III.3).

De façon pratique, le pourcentage de rétention de phase stationnaire $S_f^{\%}$ peut être obtenu indirectement par la mesure du volume de phase stationnaire chassée de la colonne à la suite de la mise en équilibre. Il est alors calculé par la formule suivante de la mise en équilibre (Equation III.5) :

$$S_f^{\%} = 100 \times S_f = \frac{V_{stat}}{V_{col}} \times 100 \quad (\text{Equation III.3})$$

Avec : $S_f^{\%}$: Pourcentage volumique de phase stationnaire occupé de la colonne

S_f : taux de rétention de phase stationnaire ($S_f < 1$).

Où :

$$V_{col} = V_{mob} + V_{stat} \quad (\text{Equation III.4})$$

$$\Rightarrow V_{stat} = V_{col} - V_{mob}$$

$$S_f^{\%} = \frac{(V_{col} - V_m)}{V_{col}} \times 100 \quad (\text{Equation III.5})$$

Avec : V_m : volume de phase stationnaire chassé de la colonne lors de la mise en équilibre

V_{col} : volume total de la colonne

En CPC, le taux de rétention de phase stationnaire en début d'expérience doit être supérieur à 60% du volume de colonne pour que les séparations soient correctes.

III.6.4. Sélectivité α

Le facteur de sélectivité α caractérise la différence de rétention entre deux composés à séparer. Il est défini par le rapport des coefficients de partages respectifs de deux solutés élués consécutivement (**Equation III.6**).

$$\alpha = \frac{K_D^2}{K_D^1} \quad (\text{Equation III.6})$$

Avec :

- K_D^1 : Coefficient de partage du composé 1
- K_D^2 : Coefficient de partage du composé 2 et
- $K_D^2 > K_D^1$

Les phases mobile et stationnaire, élaborées par l'expérimentateur en fonction du problème de séparation à résoudre, sont à l'origine du facteur de sélectivité. La CPC possède généralement un facteur de sélectivité plus important qu'en chromatographie liquide haute performance à polarité de phases inversée. La sélectivité dépend du volume d'éluat et l'intensité de signal (**figure III.6**).

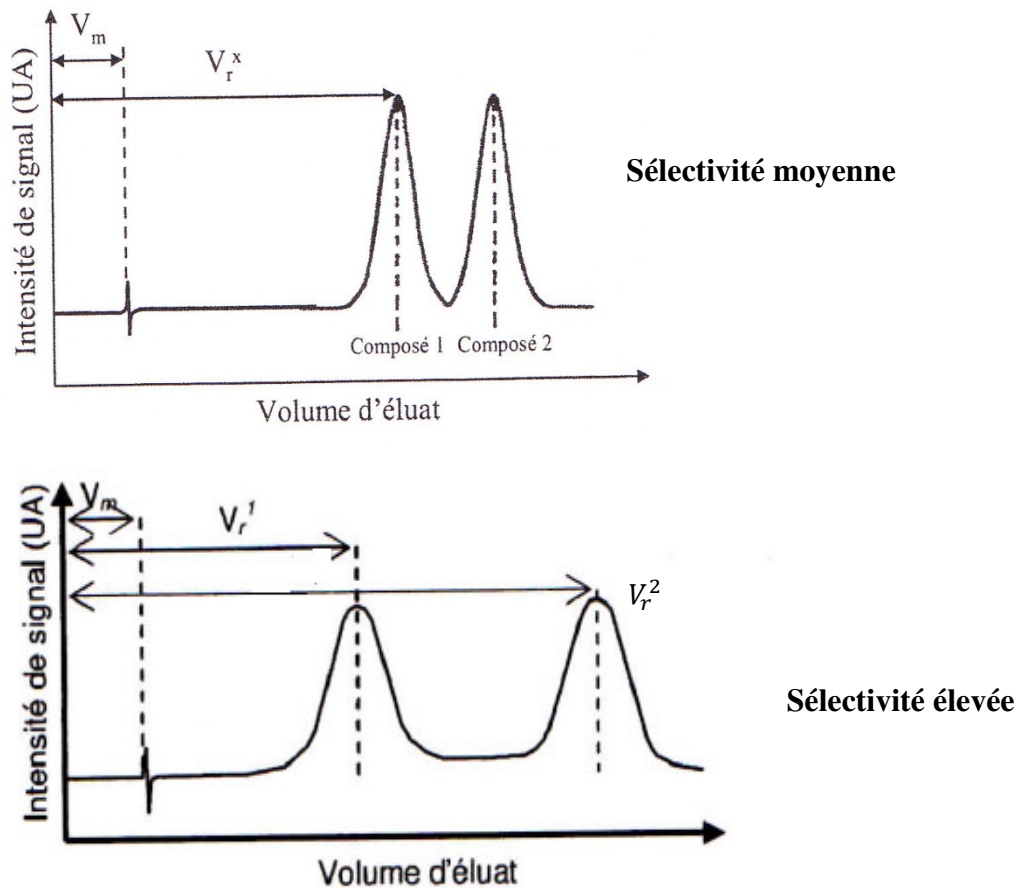


Figure.III.6: Chromatogrammes obtenus après le développement par élution de deux composés présentant un facteur de sélectivité différent.

III.6.5. Nombre de plateaux théoriques N

La CPC possède un nombre de plateaux théoriques N moyen (~500) alors que la CLHP à polarité de phases inversée présente généralement un nombre important de plateaux théoriques(> 1000). Mais ce problème est contourné par un facteur de sélectivité important en CPC et relativement faible en CLHP en phases inverses.

On admet que le processus de séparation chromatographique (continu) peut être décrit comme une succession de processus de transferts (discontinu) dans laquelle chaque transfert correspond à une zone d'équilibre thermodynamique appelée plateau théorique. Aussi le nombre de plateaux théoriques N permettra t-il d'estimer l'efficacité propre d'une colonne chromatographique. Plus N sera important, plus la colonne sera performante.

Dans le cas de pics d'élution symétriques assimilables à des pics gaussiens, N est exprimé comme suit :

$$N = \frac{V_r}{W_b} \times 16 \text{ ou } N = \frac{V_r}{W_{1/2}} \times 5,54 \quad (\text{Equation III. 7})$$

Avec :

V_r : volume de rétention

W_b : largeur à la base des pics d'élution

$W_{1/2}$: largeur des pics d'élution à mi-hauteur

III.6.6. Résolution R_s

La résolution permet d'apprécier la qualité de la séparation de deux composés élués consécutivement. Elle est calculée à partir de la relation suivante (**Equation III.8**) :

$$R_s = \frac{(V_r^2 - V_r^1)}{(W_2 - W_1)} \times 2 \quad (\text{Equation III. 8})$$

Avec :

V_r^1 : Volume de rétention du composé 1

V_r^2 : Volume de rétention du composé 2

W_1 : Largeur à la base du pic d'élution du composé 1

W_2 : Largeur à la base du pic d'élution du composé 2

Ainsi, plus les pics seront dissociés sur le chromatogramme, leur facteur de résolution sera meilleur (**figure III.7**).

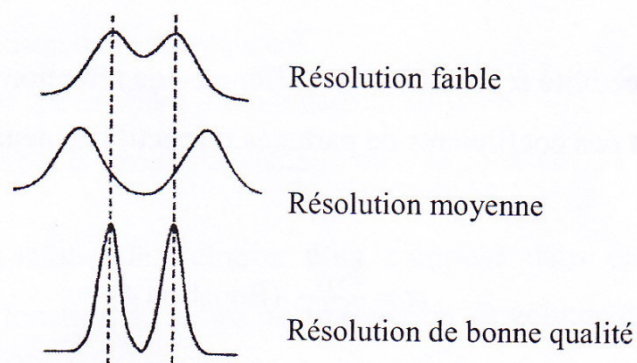


Figure III.7 : Résolution R_s

III.6.7. Perte de charge

La perte de charge ΔP , caractéristique de la CPC, prend en compte la différence de pression à l'entrée et à la sortie de la colonne. Elle est la résultante de la somme de deux composantes (**Van Buel, 1995**) [25].

- L'une dite **hydrodynamique** (ΔP_{hd}) et pouvant être considérée comme négligeable, prend en compte le passage d'un fluide visqueux dans une conduite cylindrique en régime laminaire, c'est-à-dire le débit de la phase mobile à travers un des canaux intercellulaires (loi de poiseuille) :

$$(\Delta P_{hd}) = \gamma \eta F \quad \text{(Equation III.9)}$$

Avec :

η : viscosité dynamique de la phase mobile

γ : coefficient dépend de la géométrie des canaux

F : débit de la phase mobile

- L'autre **hydrostatique** (ΔP_{hs}) définit la variation de pression existant au sein des cellules, entre les phases de densités différentes soumises à un champ de force centrifuge :

$$\nabla P_{hs} = n \Delta d \omega^2 R h \quad \text{(Equation III. 10)}$$

Avec :

n : nombre de cellules

$\omega^2 R$ = force centrifuge (ω la vitesse angulaire et R le rayon du rotor

h = hauteur de phase stationnaire dans la cellule

III.6.8. Débit et vitesse de rotation

Le débit de pompage de la phase mobile et la vitesse de rotation de la colonne sont des paramètres essentiels en CPC. En effet, il est établi que le facteur de séparation en CPC est

d'autant plus grand que le transfert de masse intervenant lors de la mise en contact des phases dans les cellules est important.

Les travaux de **Marchal et al.**, entre autres, réalisés à l'aide du « visual CPC » (disque de CPC composé d'une face supérieure transparente et permettant à l'aide d'une caméra haute-fréquence de visualiser les écoulements au sein des cellules de partage) ont permis de mettre en évidence que le type d'écoulement de la phase mobile dans les cellules de partage est lié à la vitesse de rotation et au débit de pompage (**Marchal, 2000**) [13]. Comme indiqué dans la **figure III.7**, en raison des effets dus à la force de **Coriolis**, quatre principaux types d'écoulement dans les cellules dans les cellules sont possibles, des écoulements sous formes :

- De jets grossiers linéaires ou ondulés aux parois des cellules,
- Des jets grossiers curvilignes,
- Des jets fins sinueux et variqueux,
- Des jets atomisés.

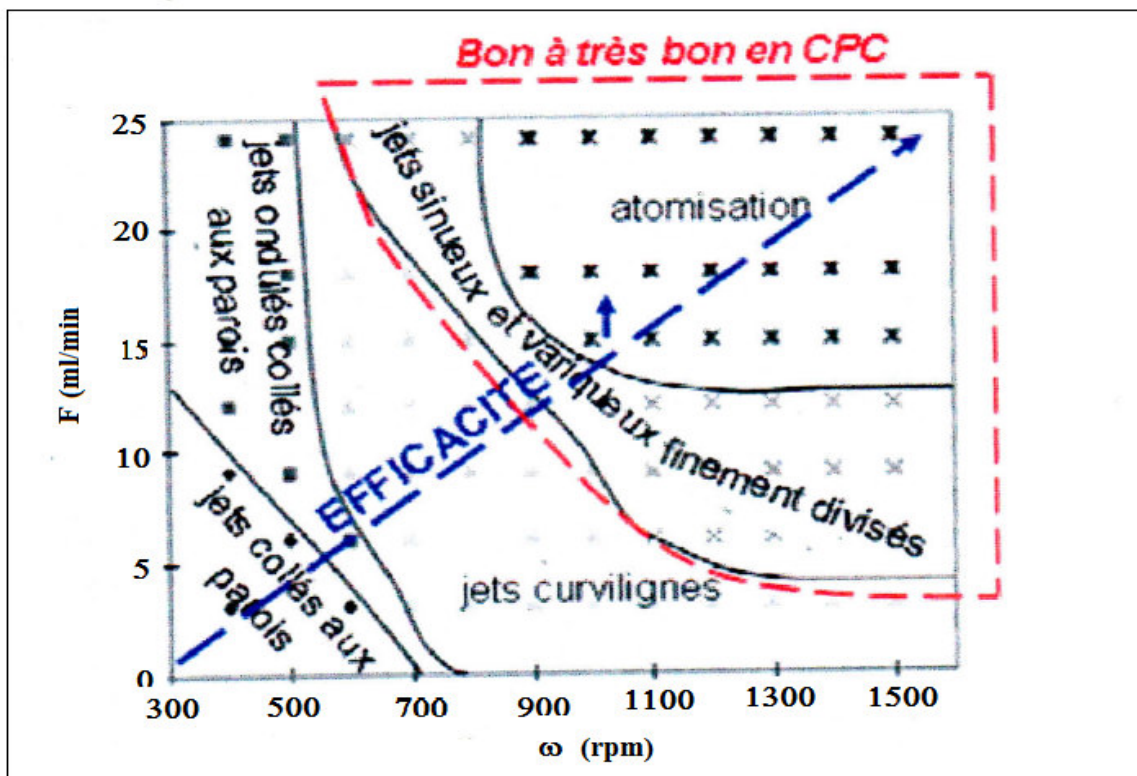


Figure III.8: Evolutions de l'efficacité de la colonne en fonction du type d'écoulement dans une cellule de partage en CPC, du débit de pompage en mode descendant et de la vitesse de rotation pour les systèmes biphasiques n-heptane/méthanol (1 :1, V/V) d'après (Marchal L., 2000)

III.7. Caractéristiques importantes en CPC

- Le débit de pompage de la phase et la vitesse de rotation de la colonne sont des paramètres essentiels en CPC. En effet, le facteur de séparation est d'autant plus grand que le transfert de masse, inversement lors de la mise en contact des phases dans les cellules, est important. Or le transfert de masse dépend du taux de rétention de la phase stationnaire S_f mais également du type d'écoulement de la phase mobile.

Il existe des jets grossiers linéaires ou ondulés accolés aux parois des cellules, des jets grossiers curvilignes, des jets fins sinueux et variqueux et des jets atomisés (Marchal, 2000) [13]. Ce dernier est le type jet généralement recherché. Il correspond à des débits et une vitesse de rotation élevés.

- Une vanne de commutation de modes (ascendant ou descendant) permet de choisir le rôle de chaque phase lors des expériences. Il est ainsi possible que la phase initialement mobile devienne la phase stationnaire ou vice et versa. L'expérience se déroule, alors, en mode dual.

La phase mobile est qualifiée d'ascendante lorsqu'elle est pompée dans la cellule à contre sens de la force centrifuge (mode ascendant).

La phase mobile est qualifiée de descendante si elle traverse la phase stationnaire dans le sens du champ de force centrifuge (mode descendant) (figure III.9).

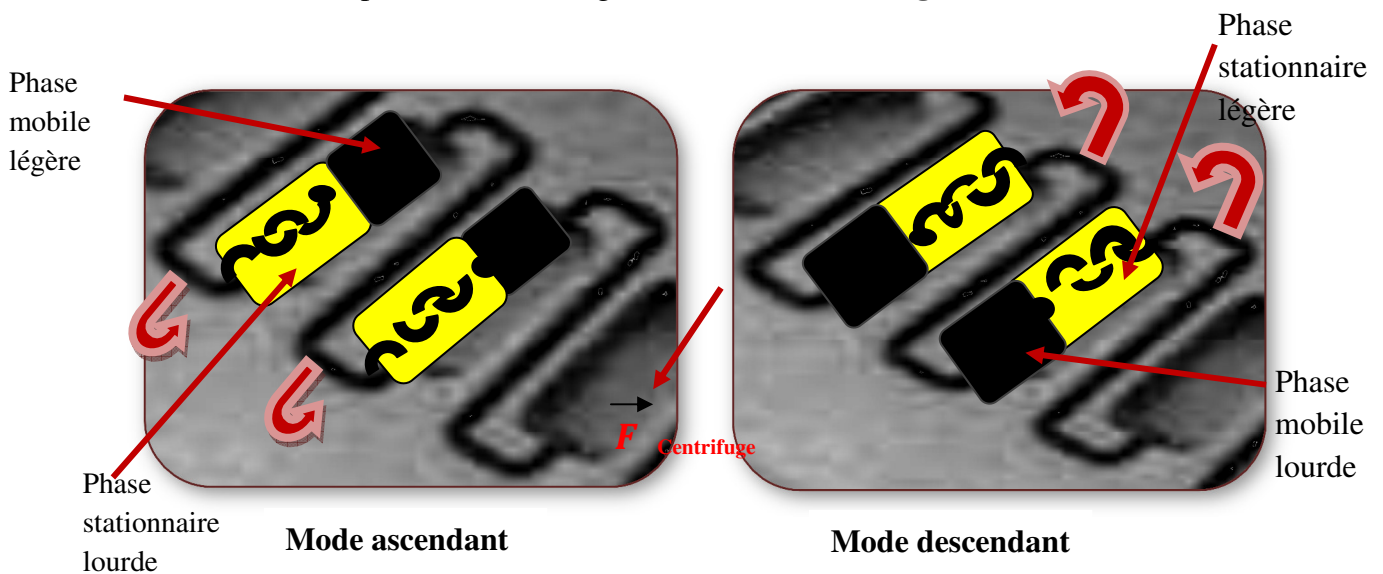


Figure III.9 : Modes ascendant et descendant en CPC

Selon Chovin en 1959, On distingue trois modes de développement : le mode frontal, le mode par élution et le mode par déplacement.

- Dans le mode frontal, les solutés sont injectés dans la colonne de façon continue jusqu'à ce que la phase stationnaire soit saturée. Ainsi, le soluté le moins retenu (ayant saturé le plus rapidement la phase stationnaire) est « élue » et récolté pur tandis que les autres sont récupérés sous la forme de mélanges.

Le but de cette technique est d'obtenir principalement des informations analytiques sur la composition du mélange de départ. Ce mode n'est appliqué que depuis récemment à la CPC pour une application en mode continu (True Moving Bed) (**Boudesocques, 2010**) [26].

- Dans le mode par élution, la force motrice conduisant à la séparation de chaque espèce chimique visée est la force éluante de la phase mobile. Ainsi, la sélection de la phase mobile dépend des propriétés intrinsèques des composés ciblés (constante diélectrique, force ionique...). Il faut également tenir compte des facteurs propres à la diffusion des molécules au sein du milieu (concentration, température...) modifiant leur mobilité.

Deux méthodes caractérisent ce mode de développement :

- (i) l'élution isocratique,
- (ii) le gradient d'élution (**Boudesocques, 2010**) [26].

(i) Dans la première la plus utilisée en CPC, la composition de la phase mobile reste inchangée durant le processus chromatographique. Dans ce cas, le composé ayant le moins d'affinité avec la phase stationnaire sera élué en premier.

La réussite de ce mode repose sur deux stratégies pour choisir un bon système de solvants:

- Utilisation d'un solvant « pont » solubilisant parfaitement les solutés dans un mélange binaire biphasique caractérisé par un important écart de polarité (ex : MeOH dans le mélange CH₃Cl/Eau ou Acétone dans le mélange Méthyl-isobutylacétone/Eau) (**Marston, 2006**) [27].

- utilisation de gammes de solvant obtenues par un mélange de 4 à 5 solvants différents. Ces gammes permettent de travailler sur une large plage de polarité : gamme OKA (n-Hexane/MeOH/n-BuOH/Eau), gamme ARIZNA-Margaff (n-Hept/Toluène/Acétone/Eau).

(ii) Contrairement au mode d'élution isocratique, dans le mode gradient d'élution, la composition de la phase mobile est modifiée au cours de l'expérience. La composition de la phase stationnaire reste, quant à elle inchangée. les systèmes de solvant contenant de l'acétate d'éthyle, de l'eau ou de n-Butanol sont des bon candidats pour cette méthode (**Mesnil, 2004**) [28].

III.8. Conclusion

La séparation en utilisant la CPC peut également nous donner de précieuses indications quant au contenu des extraits et guider notre choix. Il s'agit ici de méthodes analytiques possédant une très bonne séparation. Nous avons utilisés la firme japonaise (Everseiko) HP-CPC. La technique de séparation utilisée est présentée dans la partie expérimentale.

Pour notre étude, le fractionnement CPC a été réalisée pendant 100 min en mode ascendant, puis l'extrusion a ensuite été réalisée en remplaçant le contenu de la colonne par de la phase aqueuse fraîche, toujours en mode ascendant, ce qui a pour conséquence de pousser la phase stationnaire et donc les molécules ayant une forte affinité pour celle-ci, vers la sortie de la colonne, tout en conservant la séparation déjà amorcée pendant l'élution.

Références bibliographiques

- 1 Delannay, E., Toribio. A., Boudesocque, L., Nuzillard, J.M., Zèches-Hanrot, M., Dardennes, E., Le Dour, G., Sapi, J., Renault, J.H., *Multiple dual-mode centrifugal partition chromatography, a semi-continuous development mode for routine laboratory-scale purifications*. Journal of Chromatography A, 2006. **1127**. P: 45-51.
- 2 Navak, J., Janak, J., *Liquid column chromatography*. Ed. Deyl, Z., Macek, K., Janak, J., Amsterdam: Elsevier, 1975. **3**. P: 3-10.
- 3 Mandava, N. B., Ruth, J. M. *Introduction to chromatography in countercurrent chromatography-theory and practice*. Ed. Manadava, N. B., Ito, Y. New York. Marcel Dekker, Inc. 1988. **1**. P: 2.
- 4 Craig, L. C., Post, O. *Apparatus for countercurrent distribution*. Anal. Chem. 1949. **21** (4). P: 500-504.
- 5 Craig, L. C., *Identification of small amounts of organic compounds by distribution studies. II. Separation by counter-current distribution*. Journal of Biological Chemistry, 1944.**155**. P: 519-534.
- 6 Scott, R. P. W., *Techniques and practice of chromatography*. Ed: Scott, R. P. W. New York. Marcel Dekker, Inc. 1995. P: 3-24.
- 7 Horvath, Cs., Melander, W., Molnar, I., *Solvophobic Interactions in liquid Chromatography with Nonpolar Stationary Phases*. Journal chromatography A, 1976. **125**. P: 129-156.
- 8 Tiselius, A., *Studien über Adsorptionsanalyse*. I. Kolloid-Zeitschrift, 1943. **105** (2). P: 101-109.
- 9 Ito, Y., Weinstein, M.A., Aoki, J., Harada, R., Kimura, E., Nunogaki, K. *The coil planet centrifuge*. Nature, 1966. **212**. P: 985-987.
- 10 Ito, Y., Kimura, E., Nunogaki, K., Nunogaki, Y., *New micro liquid-liquid partition techniques with the coil planet centrifuge*. Anal. Chem. 1969. **41**. P: 1579-1584.
- 11 Foucault, A. P., *Enantioseparations in counter-current chromatography and centrifugal partition chromatography*. Journal of Chromatography A, 2001. **906**. P: 365-378
- 12 Murayama, W., Tobayashi Y., Kosuge Y., Yano H., Nunogaki Y., Nunogaki K., *Centrifugal partition chromatography (CPC) is a variant of countercurrent chromatography (CCC)*. Journal of Chromatography, 1982. P: 239,643.
- 13 Marchal, L., Foucault, A., Patissier G., Rosant, J.M., Legrand J. *Influence of flow patterns on chromatographic efficiency in centrifugal partition chromatography*. Journal of Chromatography A, 2000. **869** (1-2). P: 339-352.
- 14 Marchal, L., Intes. O., Foucault. A., Legrand, J., Nuzillard, J.M., Renault, J.H. *Rational improvement of centrifugal partition chromatographic settings for the production of 5-n-alkylresorcinols from wheat bran lipid extract: I. Flooding conditions--optimizing the injection step*. Journal of Chromatography A, 2003. **1005** (1-2). P: 51-6.
- 15 Winterhalter, P., *Application of counter current chromatography (CCC) to the analysis of natural pigments*. Trends in Food Science & Technology, 2007. **18**. P: 507-513.
- 16 Ito, I., *Efficient preparative counter-current chromatography with a coil planet centrifuge*. Journal of chromatography, 1981. **214**. P: 122-125.
- 17 Kinkel. J.N., Couillard. F., Intes. S., Foucault. A.P., Legrand. J., Marchal. L. *Development of pilot and industrial-scale CPC instruments for batch and*

- continuous injection 11th International Symposium on preparative and Industrial Chromatography and Allied Techniques Innsbruck, Australia, 15-18 October 2006.
- 18** Spraud, M., Braumann, U., Renault J.H., Thepenier, P., Nuzillard, J.M. Nuclear. Magnetic resonance monitoring of centrifugal partition chromatography in PH zone-refining Mode. *Journal chromatography A*, 1997. **766** (1-2). P: 255-260.
- 19** Thiebault, D., Rosset, R., *Hydrodynamic and hydrostatic high-speed countercurrent chromatography and its coupling with various kinds of detectors: application to biochemical separations*. *Journal of chromatography A*, 1992. **626** (1). P: 41-52.
- 20** Renault, J.H. *La chromatographie de partage centrifuge (CPC) : étude théorique et application à l'isolement de substances naturelles*, 1997. Université de Reims Champagne Ardenne : Reims. P : 233.
- 21** Renault, J.H. and Renault, Z., *La chromatographie de contre courant : une technique d'avenir pour la purification des substances naturelles, in spectra analyse*, 1995. P : 33-40.
- 22** Rolet, M., D. Thiebaut, and R. Rosset. *La chromatographie de partage centrifuge (CPC)*. *Analysis*, 1992. **20**. p : 1-11.
- 23** Maciuk, A., *Nouvelles méthodologies en chromatographie de partage liquide-liquide sans support solide : application à l'isolement de substances naturelles*. Thèse de Doctorat, mention Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne. France. 2005.
- 24** Margraff, Intes, O., Renault, J.H., Garret, P.J. Partitiron 25, a multipurpose industrial centrifugal chromatography: rotor design and preliminary results on efficiency and stationary phase retention, *Journal liquid chromatography and related technologies*, 2005. **28** (12-13). P: 1893-1902.
- 25** Van Buel, M.J., Van Der Wielen, L.A.M., Luyben, K.C. A. M., Foucault P., *In A Centrifugal partition chromatography. Chromatography Science Series*. Ed.Marcel dekker. New York, 1995. **68**. P: 51-69.
- 26** Boudesocques, A., *Nouvelles méthodologies de purification de peptides par chromatographie de partage centrifuge : Application de peptides bioactifs*. Thèse de doctorat. Univ-Reims Champagne-Ardenne. France, 2010.
- 27** Marston, A., Hostettmann, K., *Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis*. *Journal of Chromatography A*, 2006. **1112**. P: 181-194.
- 28** Mesnil, D., *La chromatographie de partage centrifuge : définition, application à *Lissocolinum bistratum*, comparaison avec la chromatographie liquide basse pression*. Thèse de doctorat. Univ-Nantes. France, 2004.



Chapitre IV
Antioxydants

IV.1. Généralité

Ces dernières années, l'intérêt porté aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés thérapeutiques, a augmenté considérablement. Un grand nombre de plantes aromatiques et médicinales, des médicaments ...etc contiennent des composés chimiques présentant des propriétés antioxydantes. De nombreuses études ont été réalisées sur certaines de ces plantes, par exemple, le romarin, la sauge, l'origan, qui a abouti à l'élaboration de formulations d'antioxydants naturels pour produits alimentaires, cosmétiques et dans d'autres applications. Toutefois, des informations scientifiques sur les propriétés antioxydantes de diverses plantes, en particulier celles qui sont moins largement utilisées dans la médecine culinaire et est encore assez rare. Par conséquent, l'évaluation de ces biens reste une tâche intéressante et utile, en particulier pour trouver de nouvelles sources pour les antioxydants naturels, des aliments fonctionnels et des nutraceutiques (produit fabriqué à partir d'aliments) (**Miliauskas, 2006**) [1].

On désigne généralement par antioxydant toute substance présente en faible concentration comparée à celle du substrat oxydable, retarde ou prévient de manière significative l'oxydation de ce substrat (**Avlessi, 2004**) [2]. L'antioxydant diminue ou empêche l'oxydation d'autres substances chimiques. Ils sont utilisés pour réduire l'oxydation du produit auquel ils sont mélangés. Leurs effets proviennent de deux mécanismes :

- 1) Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers.
- 2) Les antioxydants détruisent les hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres (**Ivonova, 2005**) [3].

L'oxydation des lipides représente un problème important pour certaines industries, puisqu'elle est responsable de la baisse de qualité et de la diminution de la durée de conservation des produits cosmétiques et alimentaires. L'addition des antioxydants aux aliments est la solution pour protéger les produits de l'oxydation (**Marongiu, 2004**) [4].

Les antioxydants jouent un rôle important dans le métabolisme humain. Les réactions biochimiques (systèmes enzymatiques) qui ont lieu dans notre organisme produisent des radicaux libres initiant des réactions d'oxydation en chaîne qui ont une réaction néfaste sur les cellules, en les abîment et en accélérant le processus de vieillissement de notre corps. Normalement, le corps humain maintient l'équilibre entre les antioxydants et les radicaux libres en produisant simultanément les deux types de substances dans le processus métabolique. Le déséquilibre entre ces deux types de composés conduit à un phénomène appelé *stress oxydatif*. L'initiation des phénomènes de réaction en chaînes dans l'organisme humain peut conduire à des pathologies comme le cancer, les allergies, les rhumatismes, Alzheimer ou de Parkinson, l'athérosclérose et d'autres. L'augmentation de la production des radicaux libres peut être due à la pollution, l'exposition prolongée au soleil,..... (**Cuendet, 1999; Hogan, 2009; Anastasiadi, 2010**) [5, 6, 7].

Les antioxydants synthétiques sont utilisés depuis de nombreuses années. Mais, récemment, beaucoup d'études ont porté sur la toxicité élevée des antioxydants synthétiques utilisées dans l'industrie alimentaires, comme le BHT (Butylhydroxytoluène), BHA (Butylhydroxyanisole),Le besoin de réduire l'utilisation de ces antioxydants impose l'orientation vers l'antioxydant naturel. Les plantes représentent une source très riche et renouvelable d'antioxydant naturel comme (Carvacrol, Eugénol, Tocophérol, Thymol). Le développement de méthodes de production de ces substances naturelles, spécialement à partir de plantes est un domaine prometteur et en pleine croissance (Avlessi, 2004 ; Marongiu, 2004) [2, 4].

IV.2. Définition d'un antioxydant

Durant ces dernières années la définition la plus utilisée des antioxydants a été proposée par Haliwell et ces collaborateurs « l'ajout des substances antioxydant même à faibles doses à des produits naturellement oxydable à l'air peut ralentir le phénomène d'oxydation en augmentant le temps au bout duquel intervient une altération décelable du produit » (Avlessi, 2004; Ivonova, 2005 ; Davies, 1995) [2, 3, 8].

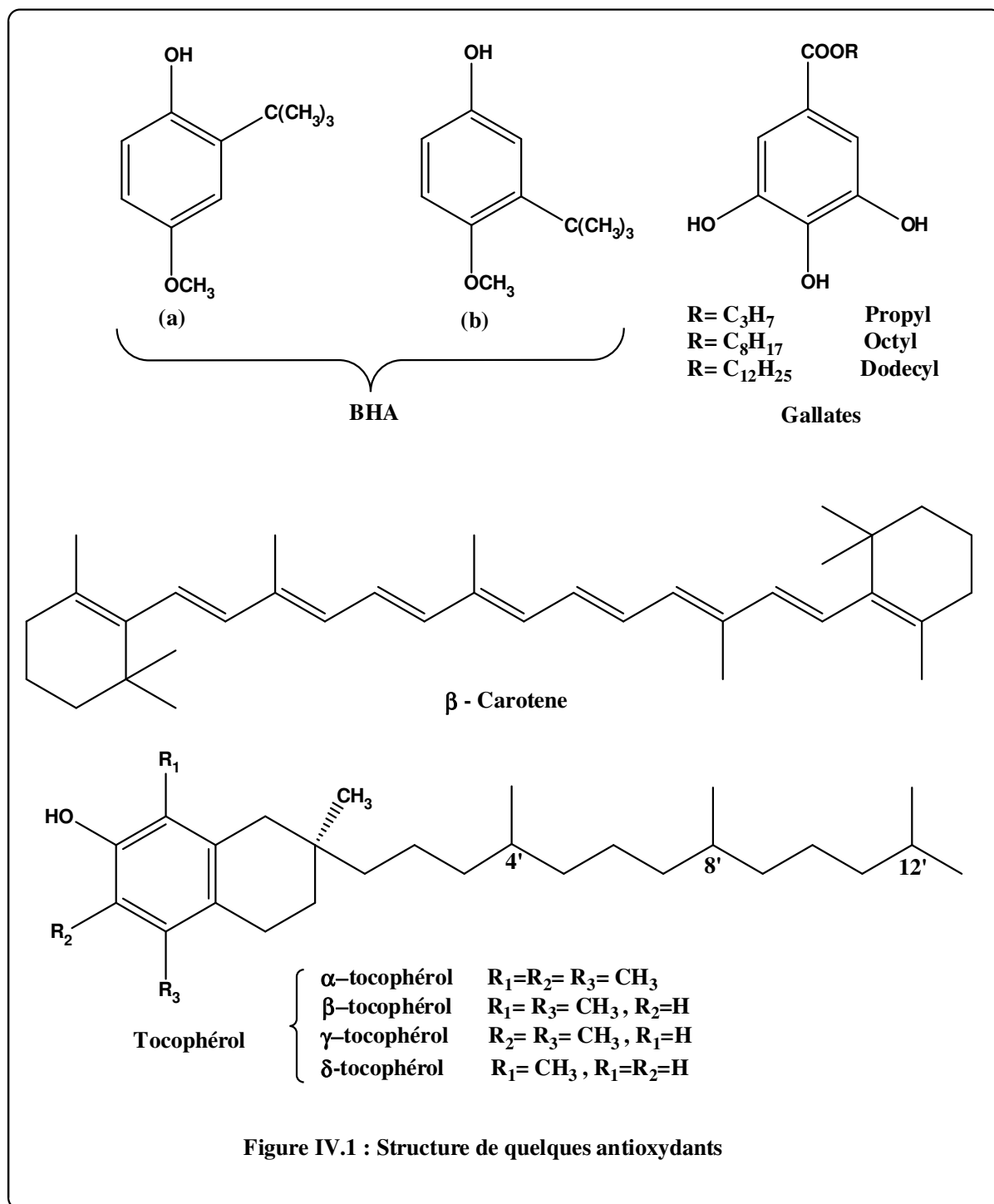
L'effet des antioxydants provient de deux mécanismes :

- 1) Ils neutralisent les radicaux libres et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers.
- 2) Les antioxydants détruisent les hydroperoxydes (composés intermédiaires formant des radicaux libres en interrompant la liaison O-O), diminuant ainsi la vitesse de formation de radicaux libres (Ivonova, 2005) [3].

IV.2.1. Les antioxydants

De nombreuses études cliniques suggèrent que les antioxydants sont les facteurs les plus importants pour les observations efficaces des aliments pour la réduction des maladies chroniques et les cancers par leurs activités antioxydantes. Ils ont une fonction de capturer les radicaux libres. Parmi les radicaux libres auxquelles notre organisme est exposé ; on retrouve les espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species : ROS) tels que les radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyles ($\cdot OH$) et peroxydes (RO_2^{\cdot}), alkoxy (RO^{\cdot}) et l'oxygène singulet (1O_2) (Miliauskas, 2006 ; Miller, 1997) [1, 9].

La première source de ces antioxydants naturels est les graines, les fruits et les légumes. Généralement dans les substances naturelles, la vitamine C, la vitamine E, β -carotènes (figure IV. 30), les acides phénoliques,etc sont des antioxydants alimentaires. La majorité de ces composés antioxydants ont des propriétés physiques et chimiques variées, quelques composés comme les gallates (figure IV.1) ont une activité antioxydante forte et d'autres sont faible citons les mono-phénols. Le caractère le plus important d'un antioxydant est la capacité de capturer les radicaux libres et les différents types d'oxygènes (Nève, 2002) [10].



Plusieurs méthodes ont été recommandées pour évaluer l'activité anti-oxydante des substances naturelles. Généralement, ils peuvent être classés dans deux méthodes:

- 1- Méthodes pour mesurer la capacité d'inhiber l'oxydation des lipides
- 2- Méthodes concentrées sur la capacité de piéger les radicaux libres (**Miguel, 2005**) [11].

L'activité antioxydante des radicaux libres dans la littérature a été reportée à un transfert de proton ou à un transfert d'électron (**figure IV.2**) (**Prakash ; Seyoum, 2006**) [12,13].

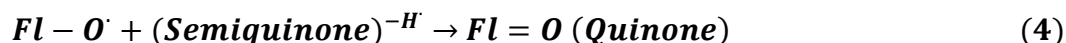


Figure IV.2 : Différentes réactions des antioxydants avec les flavonoïdes

IV.3. La capacité d'antioxydant

De nombreuses études ont conduit à évaluer la capacité antioxydante ; cependant, la plupart d'elles sont limités aux substances hydrophiles. Une confusion considérable et évidente dans la littérature quand on essaye de comparer la capacité antioxydante de molécules pures ou extraits par différentes méthodes. Malgré cela, l'activité de piéger le radical libre par des extraits a été étudiée avec les radicaux suivants:

- ABTS (2,2'-azino-bis (3- ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)),
- DPPH[•] (le cation et le radical libre stable de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl),
-
- TRAP (total radical trapping parameter),
- FRAP (ferric reducing antioxidant power),
- ORAC (oxygen radical absorbance capacity),
- CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity),
- Le Tocopherol ou la vitamine E est utilisée comme une substance antioxydante de lipophiles standards soluble pour évaluer la gamme d'activité qui est exprimée par différent système (**Miguel, 2005 ; Noipa, 2001**) [11, 14].

IV.4. Classification des antioxydants

Une façon très commune de classer les antioxydants est de les diviser en deux groupes distincts: le premier groupe et le second groupe (**Dapkevicius, 2002**) [15]. Une autre classification semblable des antioxydants les divisé comme suit:

- (a) une rupture de chaîne (vitamine E, phénoliques),
- (b) préventif (enzymes intracellulaire, tel que catalase, superoxyde dismutase (SOD) et autres),
- (c) complémentaire (vitamine C, β - Carotène, flavonoïdes) (Williams, 1997) [16].

Les antioxydants primaires inhibent l'étape de l'initiation et interrompent l'étape de propagation de la réaction en chaîne radicalaire. Les antioxydants agissent en transférant un atome d'hydrogène au radical peroxyde.

Les radicaux de l'antioxydant oxydé sont stabilisés par résonance et par conséquent ne sont pas capable de commencer ou propager la réaction oxydative (Wong, 1989) [17].

Une autre classe des antioxydants est les antioxydants secondaires ou préventifs. Ils incluent un métal comme agent de chélation, l'oxygène singulet, décolorent quelques destructeurs (Noipa, 2001) [14].

Les antioxydants peuvent réduire les radicaux primaires par 2 mécanismes :

- Par transfert d'électron singulet
- Ou par transfert d'atome d'hydrogène.

Les méthodes ABTS^{•+} (ou TEAC) et DPPH[•] jouent sur le transfert de l'électron singulet (Seyoum, 2006) (figure IV.3), alors que la méthode ORAC joue sur le transfert d'un atome d'hydrogène (Alvarez-Suarez, 2009) [18].

IV.5. L'évaluation de la capacité antioxydante par le DPPH[•]

Le composé chimique 2,2-picryldiphényl-1-hydrazyle fut l'un des premiers radicaux libres utilisés pour étudier la relation structure- activité antioxydant des composés phénolique (Popovici, 2009) [19].

Parmi les méthodes mentionnées au-dessus, la méthode de DPPH[•] est largement utilisée à cause de sa stabilité, et la simplicité de la réaction qui implique seulement la réaction directe entre le radical et l'antioxydant (Noipa, 2001) [14].

La méthode de DPPH[•] a été apportée la première fois par Blois (1958), qui a observé que le DPPH[•] a été réduit par thiol que contient la cystéine (acide aminé) et d'autre composés actifs. Plus tard, Brand-Williams, Cuvelier, et Berset (1995) ont révisé la méthode originale et le scavenging de DPPH est devenue une méthode populaire d'estimer la capacité antioxydante. Pour la méthode de DPPH[•], les facteurs qui influent sur le scavenging de l'activité antioxydante sont les solvants, pH, la concentration des échantillons et le temps de la réaction. Le fait que la dissolution de DPPH[•] doit être dans les solvants organiques tel que le méthanol et l'éthanol a limité l'usage de ce radical dans les solutions (Noipa, 2001 ; Lemanska, 2001) [14, 20]. Jusqu'à maintenant beaucoup de recherches ont développé des méthodes d'employer le DPPH[•] dans des solutions aqueuses. Chen et al. (2009) ont rapporté une synthèse colloïdale d'une stable solution de DPPH[•] dans l'eau, les nanoparticules de cette solution ont été utilisé comme un nouveau type standard de résonance paramagnétique

d'électron (EPR). Charma et Bhat (2009) ont rapporté l'activité anti radicalaire du radical libre de DPPH[•] dans le méthanol.

Cette méthode est basée sur la dégradation du radical DPPH[•]. Un antioxydant aura la capacité de donner un électron singulet au radical synthétique DPPH[•] (**figure IV. 32**) (**Milardovic, 2006**) [21]. De coloration violette pour le stabiliser en DPPH[•] de coloration jaune-verte. La mesure de la décroissance de la coloration violette au cours du temps permet de déterminer l'EC₅₀, temps au bout duquel 50% de coloration est perdue, ce terme est utilisé pour la première fois par Snchez-Moreno et al ; Lebeau et al (**Milardovic, 2006 ; Lebeau, 2000**) [21,22].

Généralement interprétée sur la base de la quantité d'un antioxydant nécessaire pour faire diminuer de 50% la quantité initiale de DPPH (EC₅₀), des comparaisons d'EC₅₀ sont réalisées. Le résultat est dépendant de la concentration en DPPH initiale. En ajoutant une référence connue, on pourrait standardiser la méthode. Cette méthode est fréquemment utilisée pour étudier des extraits végétaux et alimentaires pour mesurer ainsi leur capacité antioxydante (**Popovici, 2009**) [19].

De point de vue méthodologique, le test au radical libre DPPH[•] est recommandé pour des composés contenant des groupes SH⁻, NH⁻ et OH⁻. Il s'effectue à température ambiante, ceci permettant d'éliminer tout le risque de dégradation thermique des molécules thermolabiles. Ce test est largement utilisé au niveau de l'évolution des extraits hydrophiles (**Popovici, 2009**) [19].

Les tests au DPPH[•] fournis dans la littérature sont basés sur le même principe que celui décrit par **Brand-williams et al.**, mais les protocoles analytiques diffèrent dans plusieurs paramètres. Dans la méthode originale sont préparées des solutions de DPPH[•] de 50-100 µM, les absorbances sont lues à 515 nm et le temps de la réaction est de 30 min ; Ces conditions sont utilisées dans plusieurs travaux récents. D'autres méthodes utilisent, des solutions de DPPH[•] variant de 25 à 600 µM (préparées le plus souvent avec du méthanol ou éthanol) et des temps de réaction sont plus courts (5, 10 et 20 min) ou plus longs (60min, 100min et 120 min) (**Popovici, 2009**) [19].

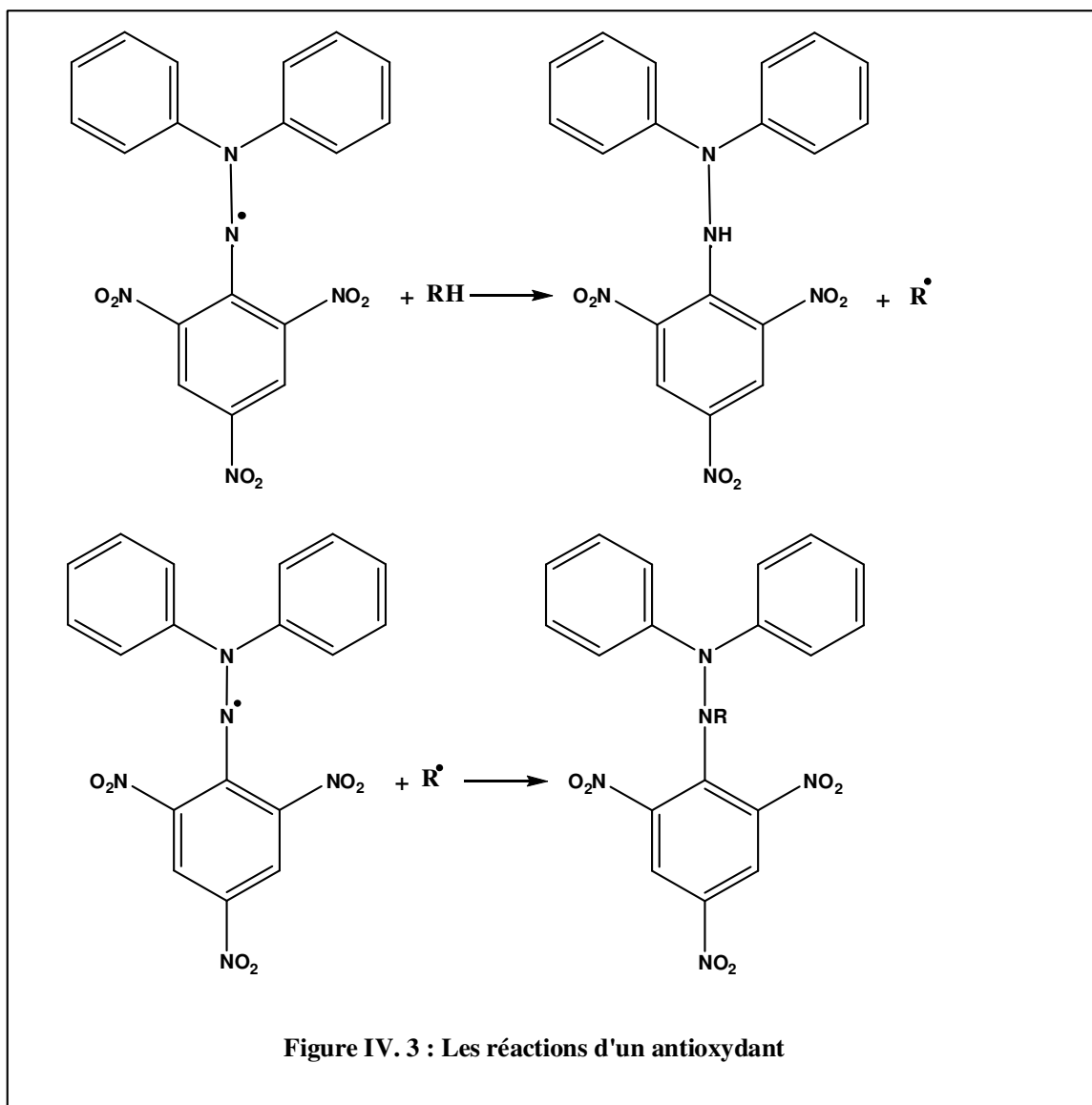


Figure IV. 3 : Les réactions d'un antioxydant

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'activité antioxydante dans ce travail des extraits bruts et des composés obtenus en vue de les valoriser en tant qu'antioxydant. La méthode et le protocole de mesurer la capacité anti-radicalaire réalisée à l'aide de DPPH $^\bullet$.

Références bibliographiques

- 1 Miliauskas, G., *Screening, isolation and evaluation of antioxidative compounds from Geranium macrorrhizum, Potentilla fruticosa and Rhaponticum carthamoides*. Univ-Wageningen. Pays-Bas, 2006.
- 2 Avlessi, F., Dangou, J., Wotto, V. D., Alitonou, G. A., et al., *Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de Clausena anisata (Wild) Hook*. C. R. Chimie, 2004. **7**. P: 1057-1061.
- 3 Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, and T. Yankova, T., *Phenols and antioxidant activity of Bulgarian medicinal plants*. Journal of Ethnopharmacology, 2005. **96**. P: 145 - 150.
- 4 Marongiu, B., Porcedda, S., Piras, A., Rosa, A., Deiana, M. and Dessi, A. *Activity of Supercritical Extract of Melissa officinalis Subsp. Officinalis and Melissa officinalis Subsp. Inodora* Phytoterapy Research, 2004. **18**. P: 789-792.
- 5 Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., *Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from Fragaria blumei*. Helv. Chim. Acta, 1997. **80**. P: 1144-1151.
- 6 Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Zoecklein, B., Zhou, K., *Antioxidant properties and bioactive components of Norton (Vitis aestivalis) and Cabernet Franc (Vitis vinifera) wine grapes*. LWT - Food Science and Technology, 2009. **42**. P: 1269-1274.
- 7 Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A-L., *Bioactives non-coloured poly phenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts*. Journal food research international, 2010. **43**. P: 805-813.
- 8 Davies, K.J.A., *Oxidative stress: the paradox of aerobic life*, in: Rice-Evans, C., Halliwell, B., and Lunt, G.G., *Free radicals and oxidative stress: environment, drugs and food additives*. Biochemical Society Symposium. London, 1995. P: 1-13.
- 9 Miller, M.J., Rice-Evans, C., *The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of Orange and Appel fruit juices and Blackcurrant*, 1997. **60** (3) P: 331-337.
- 10 Néve, J., *Modulation de l'apport alimentaire en anti-oxydants Optimisation of dietary intake of anti-oxidants*. Nutrition clinique et métabolisme, 2002. **16**. P : 292-300
- 11 Miguel, A., Puertas, M., Ana, M., Mesa, V., et al., *In vitro radical scavenging activity of two Columbian Magnoliaceae*. Naturwissenschaften, 2005. **92**. P: 381-384.
- 12 Prakash, A., Rigelhof, F., and Miller, E., *Antioxidant Activity*, Medallion laboratories Analytical Progress.
- 13 Seyoum, A., Asres, K., El-Fiky, F. K., *Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids*. Phytochemistry, 2006. **67**. P: 2058-2070.
- 14 Noipa, T., Srijaranai, S., Tuntulani, T., Ngeontae, W., *New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems*. Food Research International, 2011. **44**. P: 798-806.
- 15 Dapkevicius, A., *Isolation, identification and evaluation of natural antioxidants from aromatic herbs cultivated in Lithuania*. Thesis. Wageningen University, 2002. 165 pages.
- 16 Williams, R.L. and Elliott, M.S., *Antioxidants in grapes and wine: chemistry and health effects*, in *Natural antioxidants. Chemistry, health effects, and applications*. AOCS Press: Champaign, 1997. P: 150-173.
- 17 Wong, D.W.S., *Mechanism and Theory in Food Chemistry*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. P: 428.

- 18 Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Vidal, A., Battino, M., *Methodological Aspects about Determination of Phenolic Compounds and In Vitro Evaluation of Antioxidant Capacity in the Honey*. Current Analytical Chemistry, 2009. **5**. P: 293-302.
- 19 Popovici, C., Saykova, H., Tylkowski, B., Evaluation de l'activité antioxydant des composés phénoliques par la réaction avec le radical libre DPPH., *Revue de génie Industriel*, 2009. **4**. P: 25-39.
- 20 Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffers, A. E. M. F., Rietjens, I. M. C. M., *The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones*. Free Radical Biology and Medicine, 2001. **31** (7). P: 869-881.
- 21 Milardovic, S., Ivekovic, D., Grabaric, B.S., A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry*, 2006. **68** (2). P: 175-80.
- 22 Lebeau, J., Furman, C., Bernier, J-L., Duriez, P., Teissier, E., Cotelle, N., *Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoïdes*. Free Radical Biology & Medicine, 2000. **29** (9). P: 900-912.



Partie II
Résultats
et
Discussions

V.1. Préparation des extraits bruts

Dans le présent travail, 2 extraits bruts ont été préparés à partir d'une plante endémique de la région pré-désertique du Sahara septentrional, *Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter. Le matériel végétal et le protocole d'extraction standard sont décrits à la partie expérimentale (cf. VI.3.). L'épuisement successif de la drogue séchée par l'acétate d'éthyle et par le n-Butanol permet l'extraction des constituants majoritaires. Le résultat de ces extractions est présenté dans le tableau V-1.

Tableau V-1 : Extraits préparés à partir d'*Euphorbia guyoniana*.

Organe (poids initial)	Extrait	Poids	Rendement
Partie aérienne (550 g)	AcOEt	5,22 g	1 %
	n-BuOH	14,11 g	2,6 %

V.2. Criblage chimique général préliminaire par CCM

Des chromatographies sur couche mince (CCM) préliminaires ont été menées sur les extraits bruts de la plante pour avoir un aperçu de la nature des constituants que l'on peut rencontrer chez cette espèce. Pour cela, une partie des extraits ont été solubilisés dans le solvant approprié et déposés sur plaques de CCM qui ont ensuite été éluées dans les systèmes de solvants décrits à la partie expérimentale (cf. VI.5.1.) et révélés avec divers réactifs pour permettre une première orientation sur les classes de composés présentes dans les échantillons à analyser. L'observation des plaques CCM sous rayonnement UV à 254 nm et 366 nm.

V.2.1. Interprétation des CCM préliminaires

L'analyse chimique en CCM a permis de mettre en évidence la présence de flavonoïdes (réactif de NEU/PEG, fluorescence sous lumière UV à 366) l'examen sous UV à 366 nm montre plusieurs taches colorées en rouge, orange, jaune-vert et nous a permis d'observer une coloration fluorescentes jaune-vert (flavonoïdes) des extraits bruts butanolique et acétate d'éthyle (Wagner et Blatt, 2001). On peut aussi émettre l'hypothèse pour l'extrait acétate d'éthyle, qui apparaît en rouge quand il est révélé à la vanilline sulfurique, que ce sont les tanins. Pour valider cette hypothèse, nous avons utilisé un révélateur propre aux tanins. La coloration en rouge orange obtenue avec le réactif au sel de Bleu solide B et bleu-noir avec le réactif de chlorure de fer confirme que ces composés se sont des tanins (Wagner, 2001) [1].

L'objectif de ce travail est d'isoler les produits majoritaires des deux extraits de la partie aérienne de la plante étudiée.

V.3. Criblage chimique général et analyse LC/DAD-UV préliminaires

Pour les analyses LC/DAD-UV, les extraits bruts ont été préalablement solubilisés à raison de 1mg/ml dans un solvant adéquat : le méthanol pour l'extrait acétate d'éthyle et méthanol/eau (70/30) pour l'extrait n-Butanol. Après filtration, pour enlever les particules en suspension, les solutions d'échantillon ont été injectées dans un système CLHP (*cf.* VI.5.2.) dont les paramètres expérimentaux suivants :

- échantillon : 10µl de solution à 1mg/ml d'extrait ;
- colonne : Synergi 4U Hydro-Rp 80 A C18 Phenomenex (4 µm, 250 x 2 mm, Waters).
- Phase mobile: Débit 0,2 ml/min avec les gradients linéaires (*cf.* VI.5.2.)
- Détection : traces LC/UV à 280 nm et 320 nm révélées avec un détecteur à barrettes de diodes (190 nm-500 nm) et un autre à détection simultanées à deux longueurs d'onde.

V.2.2. Résultats et discussions

Les analyses LC/DAD-UV ont clairement montré la richesse en composés phénoliques de l'extrait butanolique et acétate éthyle d'*Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter. Cette observation nous a incité à concentrer notre travail sur ces deux extraits. Dans l'extrait acétate d'éthyle, on remarque également une déformation de la ligne de base, suggérant encore une fois la présence des tanins et un chromatogramme LC/UV de très bonne résolution pour l'extrait butanolique (**figure V.2**), les conditions expérimentales sont décrites dans la partie expérimentale (*cf.* VI.5.2.).

Notre choix s'est porté en particulier sur les extraits : butanolique et acétate d'éthyle de la partie aérienne de la plante, car ils n'ont jamais été étudiés auparavant (extraction des flavonoïdes), de plus peu de travaux phytochimiques antérieurs réalisés sur cette espèce. Tous ces critères réunis nous ont amenés à choisir les extraits précédents.

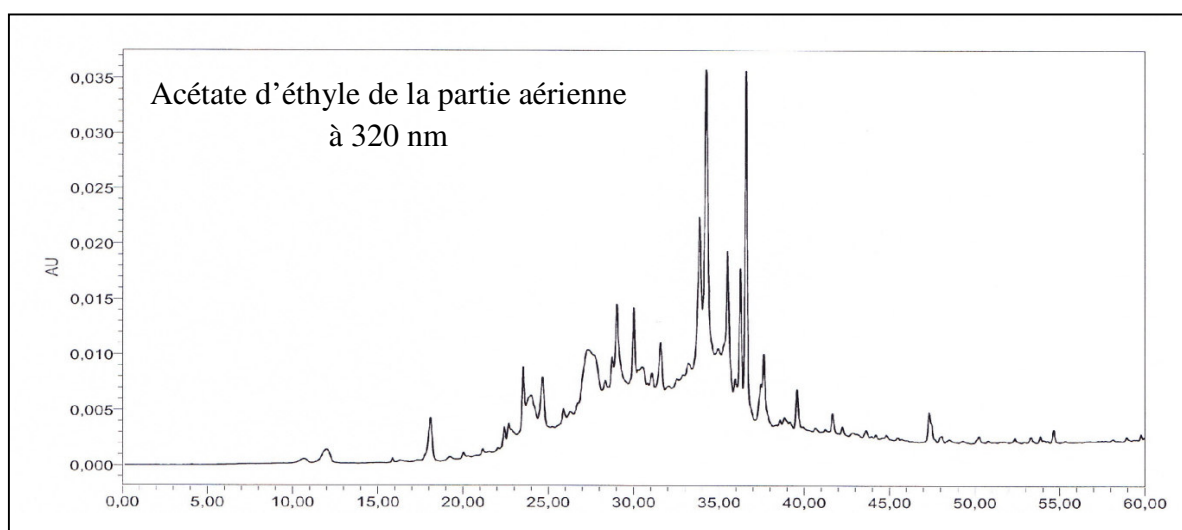


Figure V.1 : Chromatogramme LC/DAD-UV à 320 nm pour l'extrait acétate d'éthyle

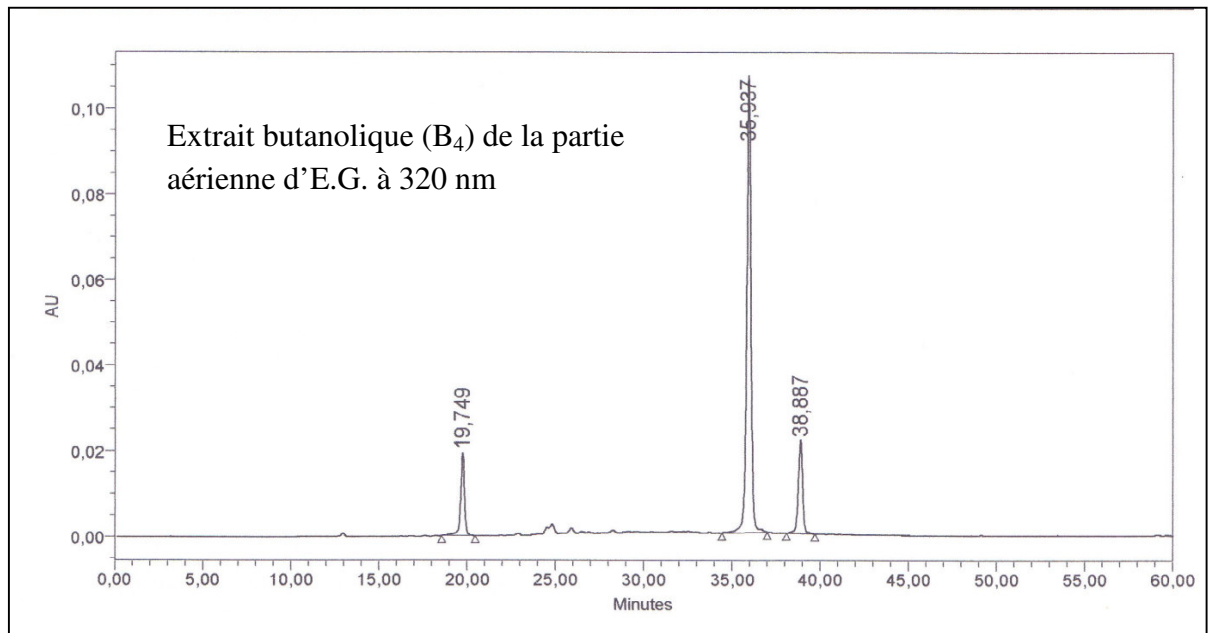


Figure: Chromatogrammes LC/DAD-UV à 320 nm pour l'extrait butanolique.

V.3. Investigation phytochimique de l'extrait acétate d'éthyle

V.3.1. Analyse de l'extrait acétate d'éthyle par la chromatographie de partage centrifugeuse (CPC)

Les extraits obtenus des parties aériennes de l'espèce ont été étudiée ensuite fractionnés en familles de molécules possédant des propriétés physico-chimiques similaires. Pour cela, la chromatographie de partage centrifuge (CPC) est utilisée. Le principe de séparation de cette technique repose sur le partage des solutés entre deux phases liquides non-miscibles en fonction de leur coefficient de partage. Ces phases permettent de supprimer les problèmes habituellement rencontrés chez les phases solides, à savoir les éventuels phénomènes de dégradation et surtout les pertes qui peuvent résulter de l'adsorption sur les phases solides.

La phase stationnaire est maintenue dans la colonne grâce à un champ de force centrifugeuse alors que l'autre, miscible, percole à travers la première. Cette technique présente de nombreux avantages tels que la sélectivité plus intéressante qu'en CLHP et la capacité de charge importante (Shibusawa, 2006 ; Shibusawa, 2004) [2,3]. Après l'obtention de l'extrait acétate d'éthyle, nous avons choisi pour un premier fractionnement, de séparer les molécules de cet extrait, en utilisant la chromatographie de partage centrifugeuse (CPC) comme un outil de purification.

En CPC, le choix du système biphasique de solvants est équivalent à la fois au choix du type de colonne et à celui de l'éluant en CLHP. C'est donc le système biphasique qui conditionne la qualité de la séparation. Il faudra choisir un système biphasique de solvants ayant la bonne polarité pour chacune des deux phases et solubilisant bien l'échantillon. Face à la multitude des systèmes biphasiques de solvants utilisables en CPC, il est nécessaire d'adopter une approche logique et rigoureuse.

De nombreux systèmes biphasiques utilisés en CPC sont décrits dans la littérature concernant l'extraction des substances naturelles (Renault, J.H., 1997) [4].

Le système de solvant biphasique employé est un système de quatre solvants encore appelé solvant quaternaire (cf. VI.6.3.). Le partage des solutés entre les deux phases a été testé par CCM, en utilisant comme solvant d'éluion la phase organique. Les conditions expérimentales sont décrites au paragraphe (cf. VI.4.3.) de la partie expérimentale.

Le fractionnement est suivi par la CCM, ce fractionnement a permis d'isoler 6 fractions dans le mode ascendant et 3 fractions dans le mode descendant. L'essentiel de la masse de l'extrait d'acétate d'éthyle est concentré dans les fractions 4b et 5b (cf. VI.6.3.).

La fraction 4b a été ensuite analysée par chromatographie à haute pression CLHP analytique (figure V.3), le système d'éluion est un gradient MeOH / H₂O (cf. VI.5.2.).

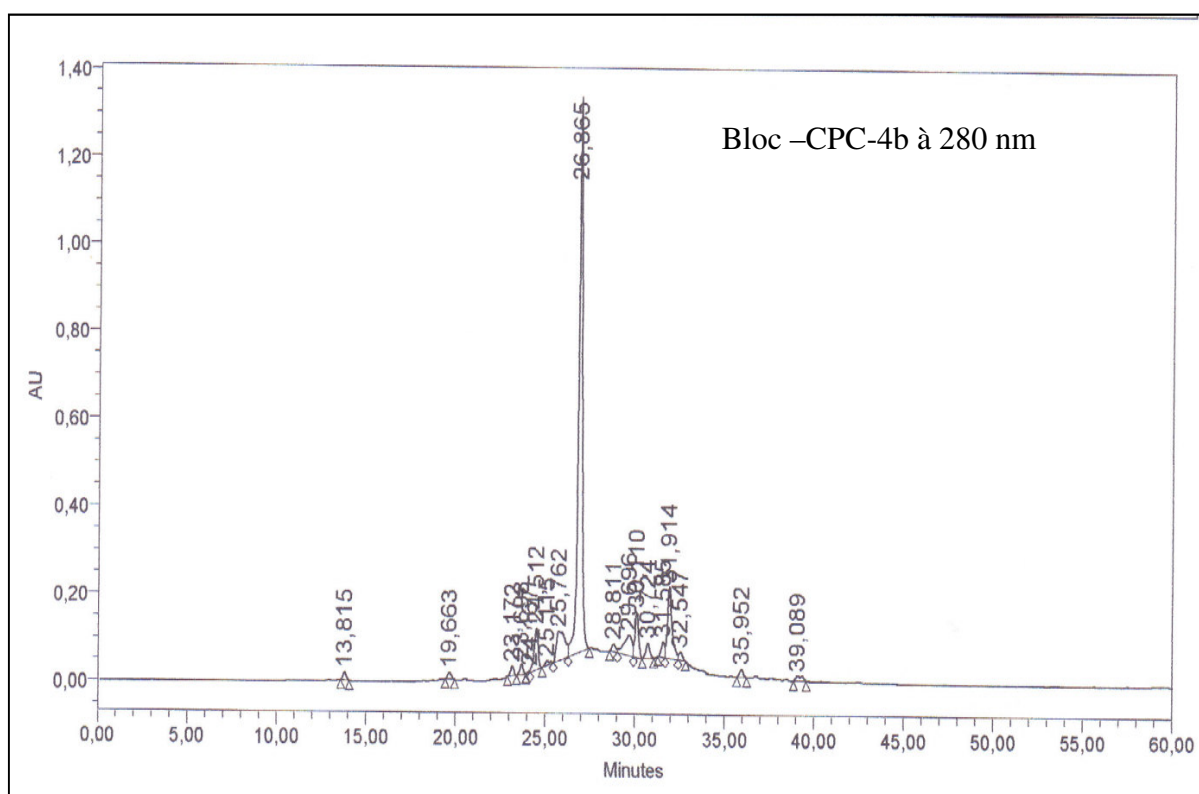


Figure V.3 : Chromatogramme LC/DAD-UV à 280 nm pour le bloc-CPC d'extrait acétate d'éthyle (4b)

V.3.2. Fractionnement du bloc CPC (4b) par CLHP préparative

Les conditions CLHP analytiques ont été transposées à l'échelle préparative en phase inverse afin de fractionner le bloc CPC-4b. Un total de 100 mg a été injecté et le pic majoritaire correspond au composé I a été récolté à la sortie du détecteur UV/Vis, cette purification est suivi par CLHP analytique (figure V.4). Les conditions de l'analyse par CLHP analytique et préparative sont décrites aux paragraphes VI.3.2. et VI.4.2.

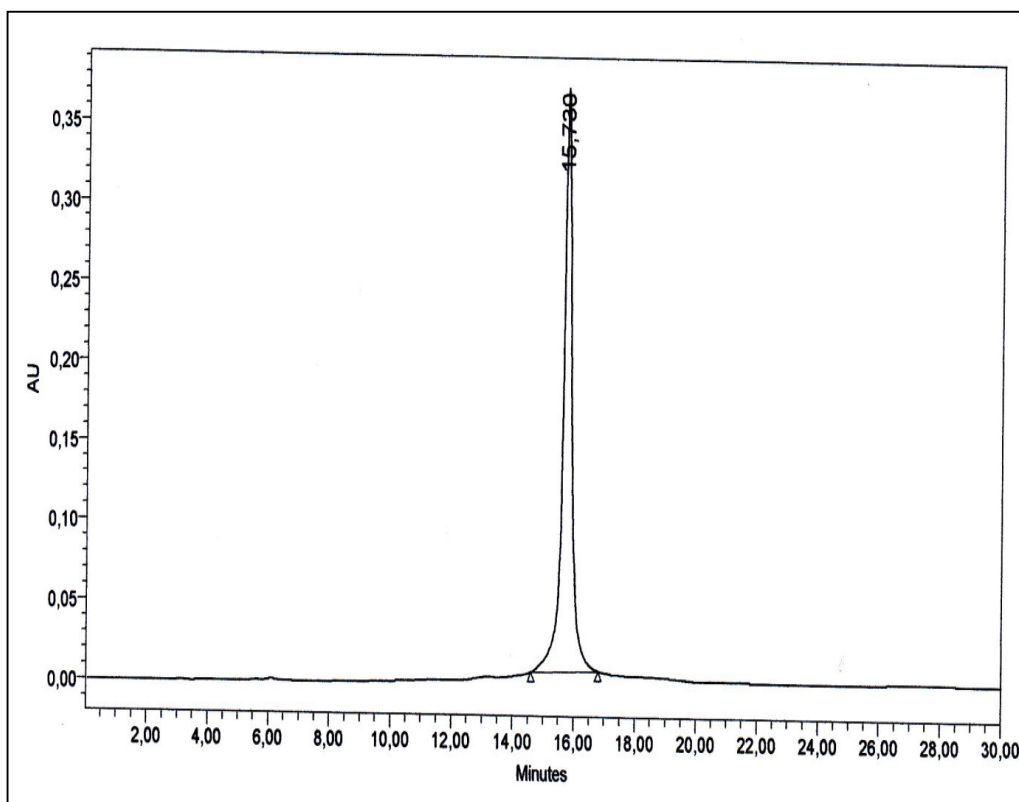


Figure V.4 : Chromatogramme LC/DAD-UV à 280 nm pour le composé I.

Cette étude nous a confirmé que la purification du composé **I** est à **100%** dans un temps de rétention $T_r = 15.730$ min.

II.3.3. Identification du produit isolé de l'extrait acétate d'éthyle

II.3.3.1. Elucidation structurale du composé I

Le composé a été obtenu sous forme d'une poudre jaune très pâle après lyophilisation. Ce produit est analysé par la chromatographie sur couche mince en présence de $FeCl_3$ le réactif spécifique des tannins hydrolysables. La couleur bleu-noir indique la présence des tannins galliques (au moins un OH dans la structure c'est -à- dire un groupe phénolique) (Shin-Kyo, 2003) [5] et aussi avec le réactif au sel de Bleu Solide B. Ceci est confirmé par le spectre UV dans le méthanol (figure V.5), donne une première indication de la famille des composés phénoliques. Le composé (**I**) montre une bande d'absorption proche de 280 nm caractéristique d'un tannin hydrolysable (Giordanengo, 2009) [6].

Le point de fusion du composé **I** (mp) $195,5 - 196,5^\circ C$; et le pouvoir rotatoire de ce composé est : $[\alpha]_D^{21,6} -87,81^\circ$ (0,0055, MeOH).

Le spectre Ultra-violet (figure V.5) enregistré dans le méthanol (MeOH) montre des absorptions maximums à λ_{max} ($\log \epsilon$) : 279 nm (3,52), 217 nm (3,91), ces bandes d'absorption donne une première suggestion que le composé **I** est un tannin gallique.

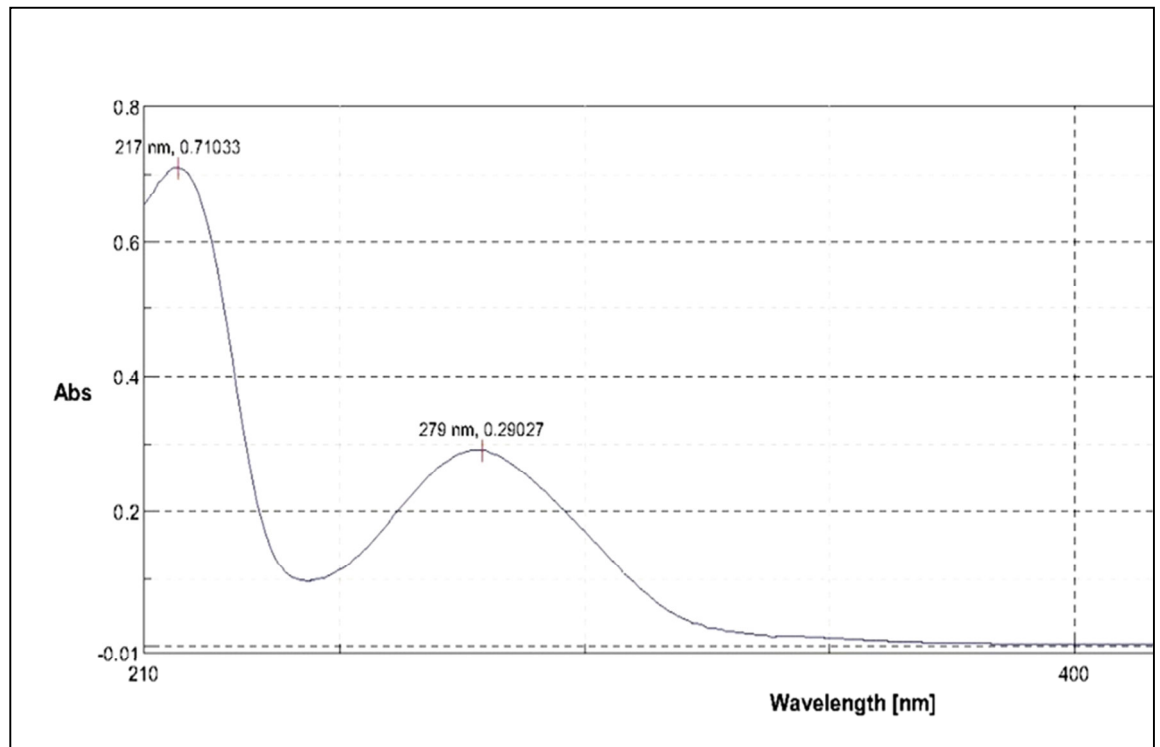


Figure V. 5 : Spectre ultra-violet du composé I

Le spectre IR (**figure V.6**) montre des bandes d'absorption relatives aux vibrations de valence des groupements suivants:

- ✓ Groupe hydroxyle à une longueur $3310,5 \text{ cm}^{-1}$
- ✓ deux fonctions carbonyles d'esters à $1697,3 \text{ cm}^{-1}$ et à $1610,1 \text{ cm}^{-1}$.
- ✓ doubles liaisons d'un cycle aromatique à $1534,9 \text{ cm}^{-1}$
- ✓ les fonctions esters à $1314,5 \text{ cm}^{-1}$ et $1196,1 \text{ cm}^{-1}$, le spectre montre également la présence des bandes d'absorptions des liaisons C-H à $1448,5 \text{ cm}^{-1}$
- ✓ des fonctions C-O à $1071,7 \text{ cm}^{-1}$ et $1028,0 \text{ cm}^{-1}$
- ✓ ce spectre montre aussi des bandes d'absorption des fonctions C=C-H à $869,1 \text{ cm}^{-1}$ et à $760,9 \text{ cm}^{-1}$.

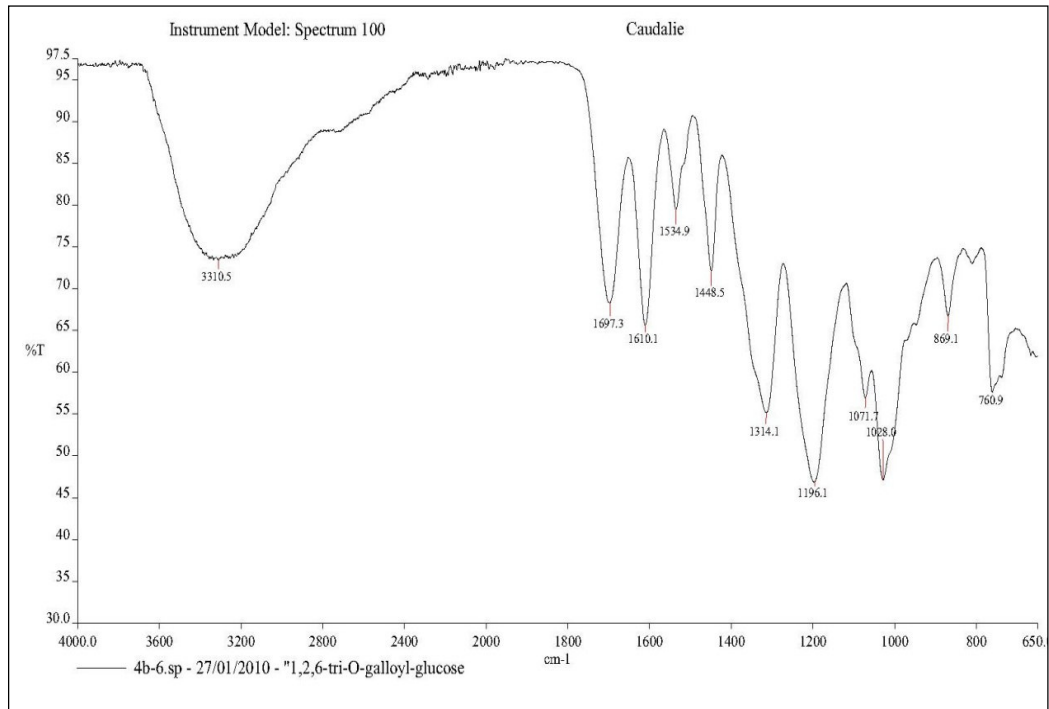


Figure V.6 : spectre IR du composé I

Une analyse de spectrométrie de masse par électroébulisaison, ou ESI (ElectroSpray Ionisation) à été réalisée du composé I. Le spectre ainsi obtenu montre un adduit de l'ion moléculaire avec le sodium $[M+Na]^+$ et un ion pseudo moléculaire à m/z 658,95 (100%) correspondant à une formule $C_{27}H_{24}O_{18}Na$ suggérant une masse moléculaire de 636 u.m.a. (figure V.7)

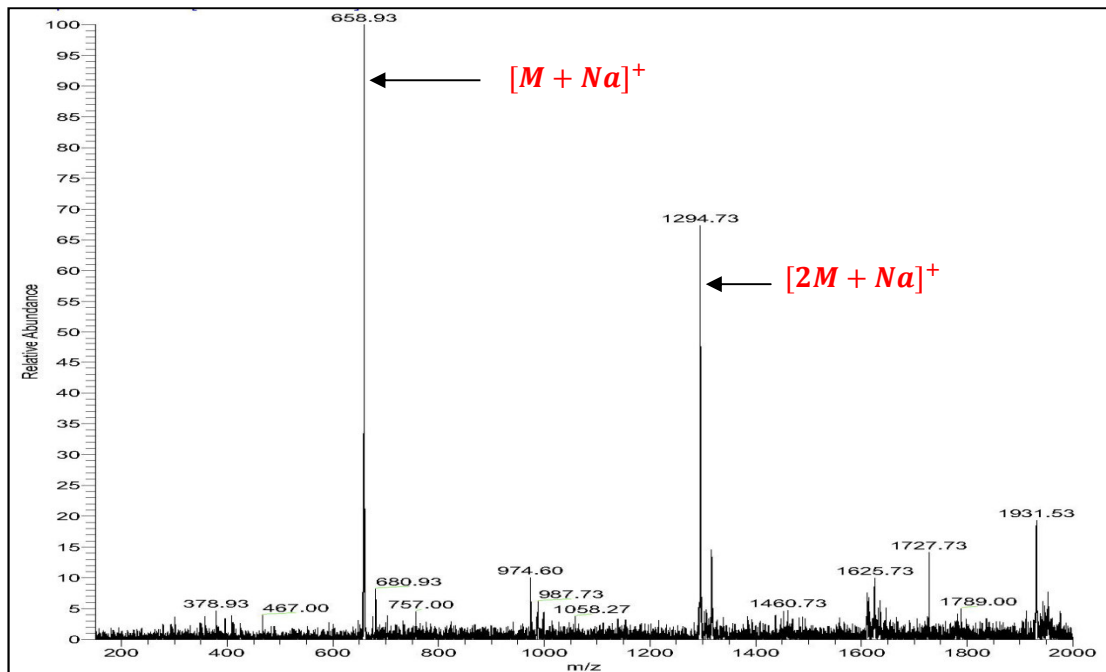


Figure V.7 : Spectre de masse en mode d'ionisation positive du composé I

On mode négative un ion pseudo moléculaire à $m/z = 634.93$ (100 %) correspondant au même masse moléculaire 636 u.m.a. et à la même formule brute $C_{27}H_{24}O_{18}$ (**figure V. 8**). La masse calculée de composé est de 636,3795 u.m.a.

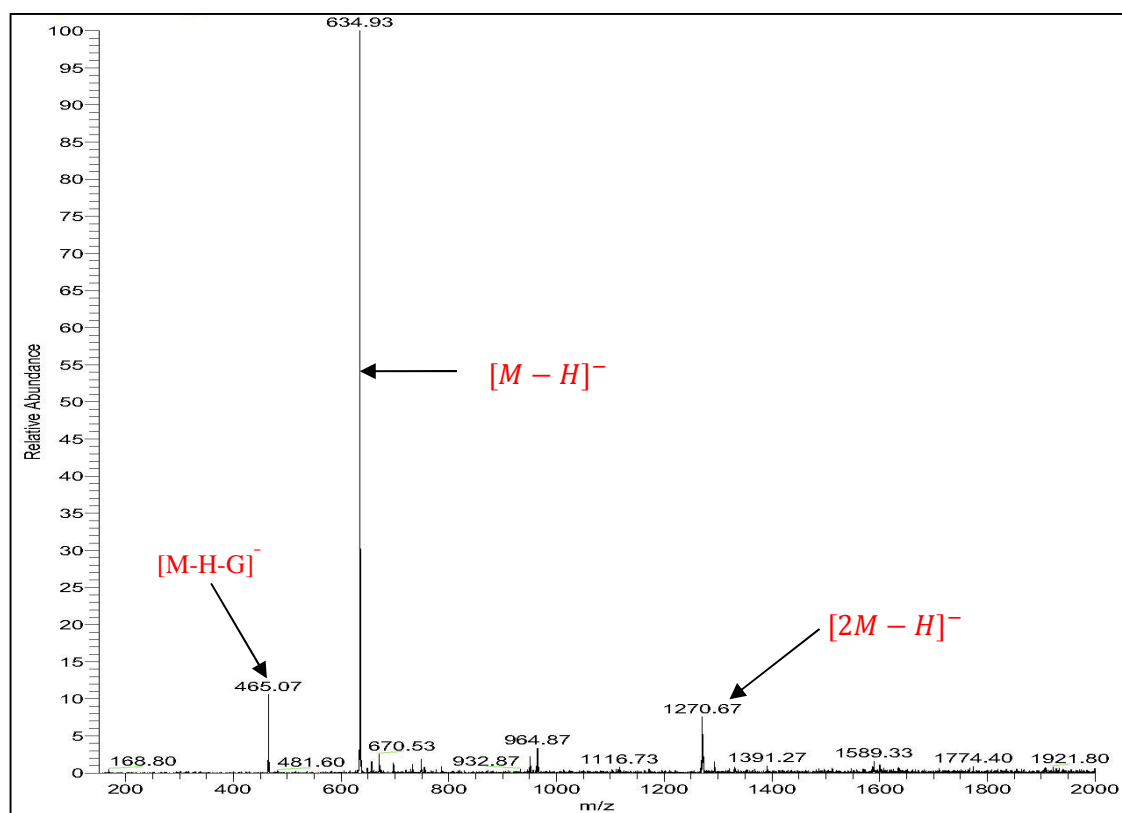


Figure V. 8 : Spectre de masse en mode négative du composé I

La formule brute $C_{27}H_{24}O_{18}$ nous oriente vers une structure comportant 16 insaturations :

- ✓ 15 insaturations équivalentes de trois unités d'acide gallique.
- ✓ une insaturation d'un sucre.

Ce qui nous laisse suggérer que le composé **I** appartient à la famille des tannins galliques (tannins hydrolysables). Les résultats sont conformes à ceux de la littérature (**Owen, 2003**) [7].

- ✓ La fragmentation en MS^2 de l'ion 634,93 en mode négative donne un ion pseudo moléculaire fils à m/z 465,05 (100%) $[M-H-170]^-$ correspond à une perte d'un acide gallique (**figure V.9**)
- ✓ La fragmentation de l'ion 483,08 (95%) $[M-H-153]^-$ correspond à une perte galloyl⁺ ($C_7H_5O_4^+$) (**Filip, C., 2004**) [8].

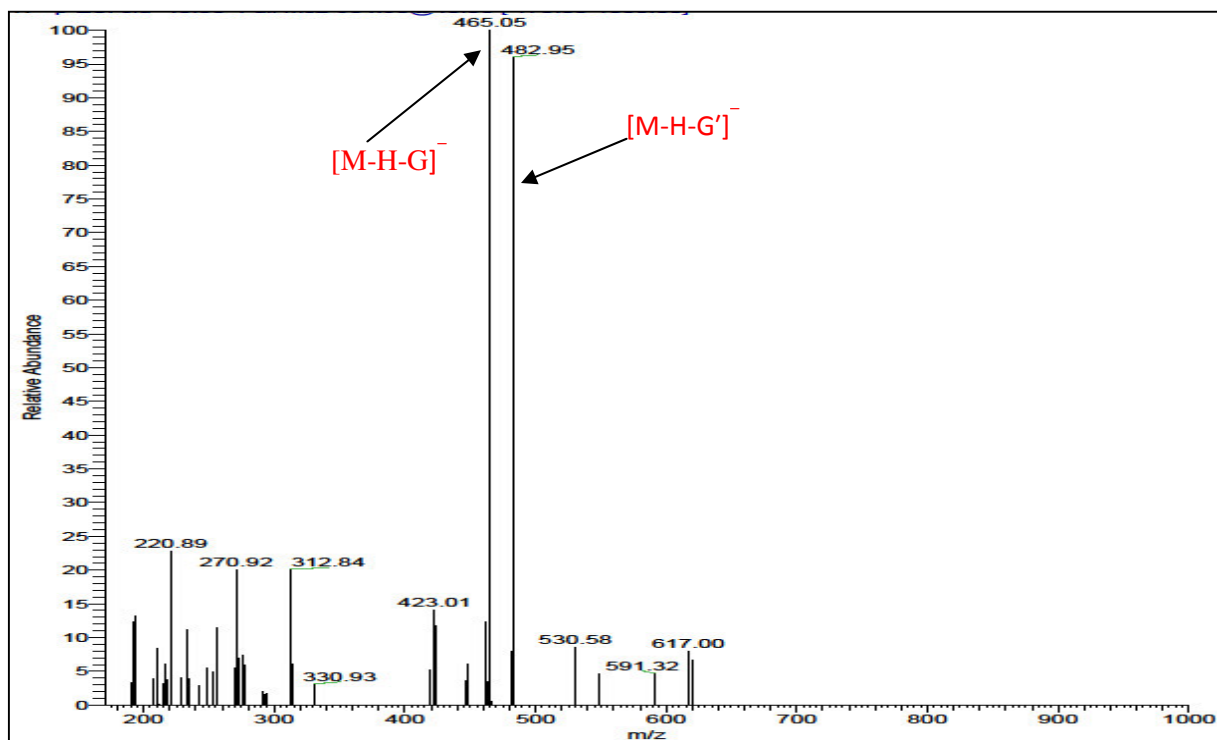


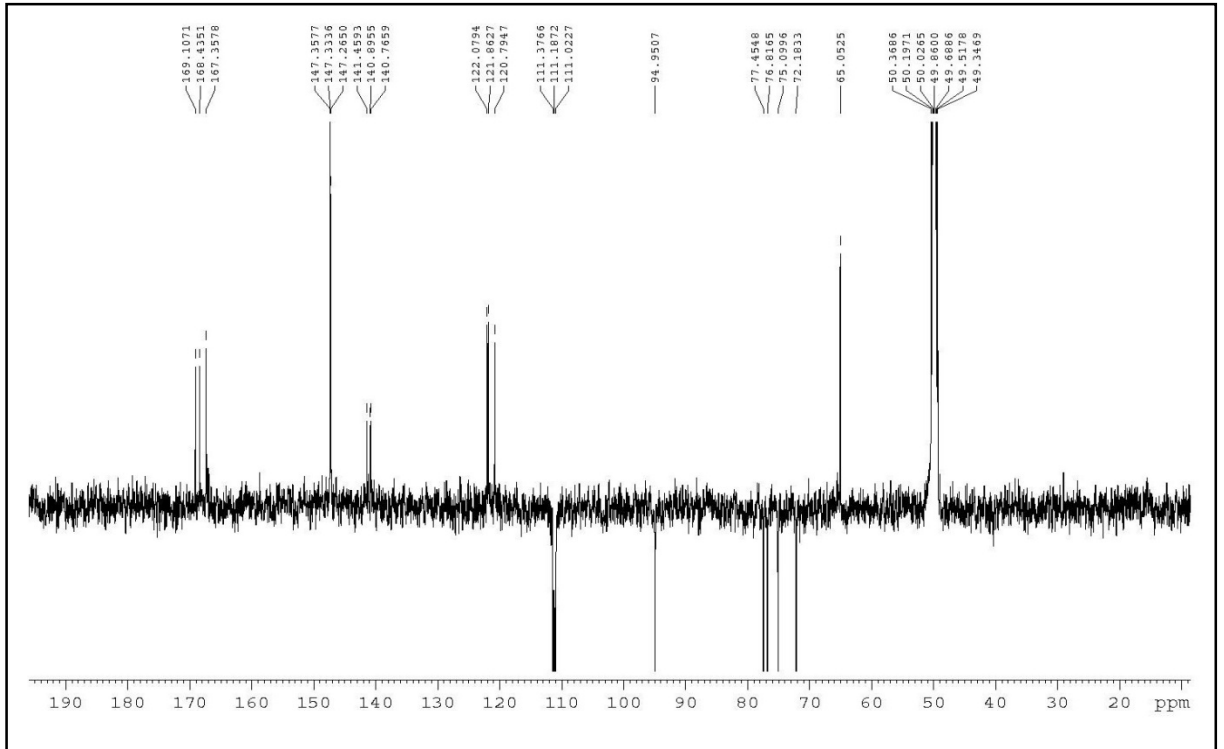
Figure V. 9 : Spectre MS² m/z à 634,93

G = acide gallique (M=170) ; G' = galloyl⁺ (C₇H₅O₄⁺, M= 153) ; naturel G = G'+OH⁻.

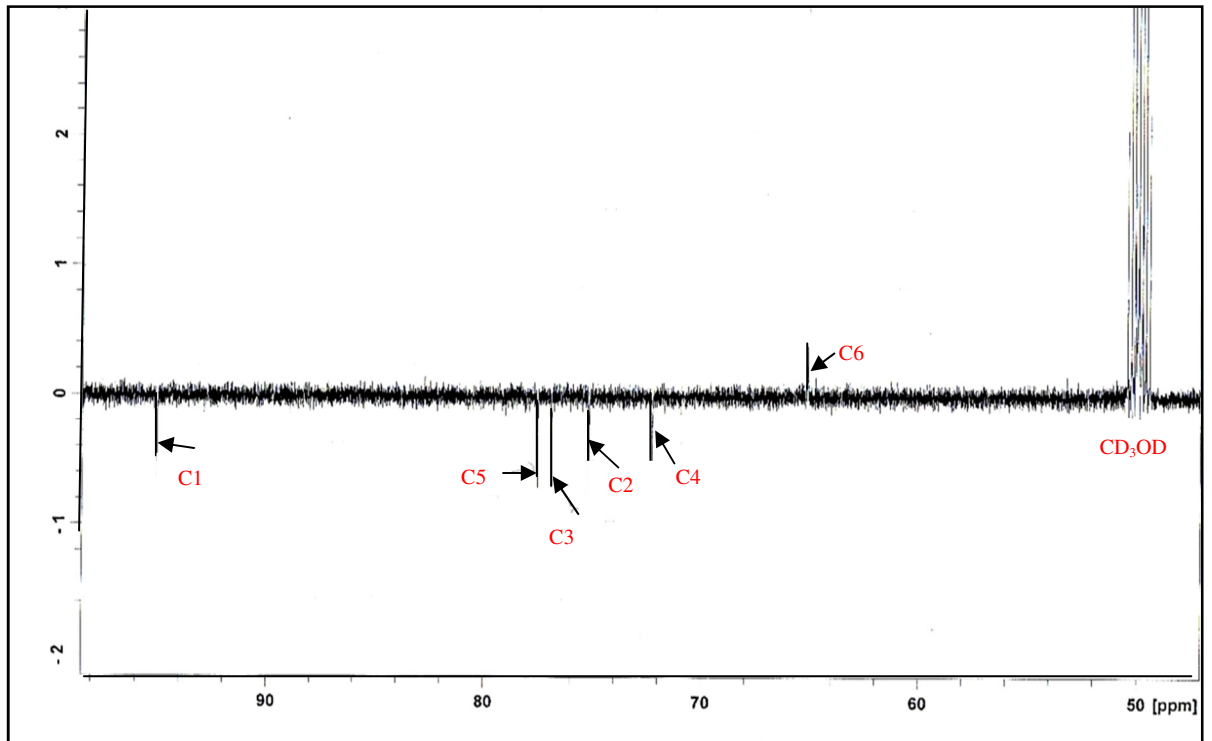
Le spectre RMN¹³C J-modulé à 25°C dans le CD₃OD (**figure V. 10**) présente 21 pics correspond aux 27 atomes de carbones :

- ✓ 11 carbones liés à des hydroxyles O-H, 9 d'entre eux hybridés sp² dans trois cycles aromatiques et les deux autres d'une hybridation sp³ dans un glucose.
- ✓ 6 carbones quaternaires, trois d'entre eux engagés en fonction carbonyle
- ✓ 6 carbones methines (C-H) aromatiques engagés dans trois cycles aromatiques
- ✓ Les six carbones restants se trouvent dans un glucose

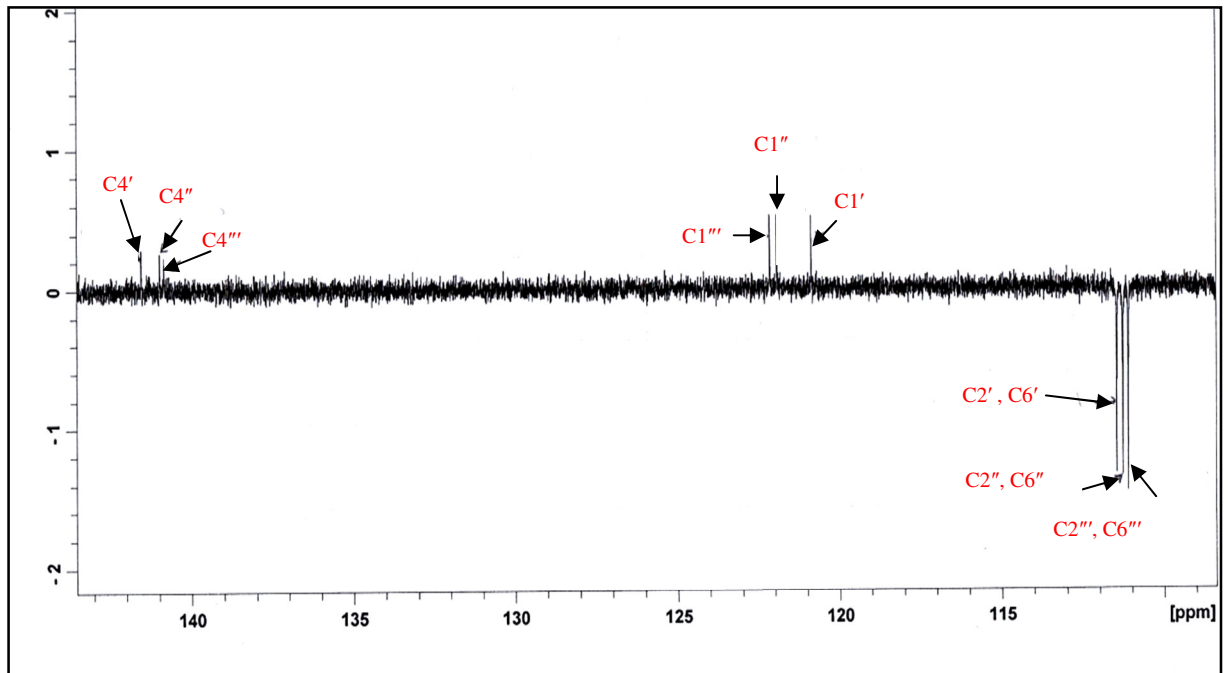
Les signaux à δ_C 111,45 ; 111,27 et 111,37 chaque signal sont attribués pour deux carbones aromatiques d'un acide gallique, respectivement laissant suggérer que se sont (C-2', C-6'), (C-2'', C-6'') et (C2''', C6'''). Le signal à δ_C 94,95 ppm caractéristiques d'un carbone anomérique. Toutes les données spectrales sont conformes aux données de la littérature (**Cheng, K. W. ; 2009**) [9].



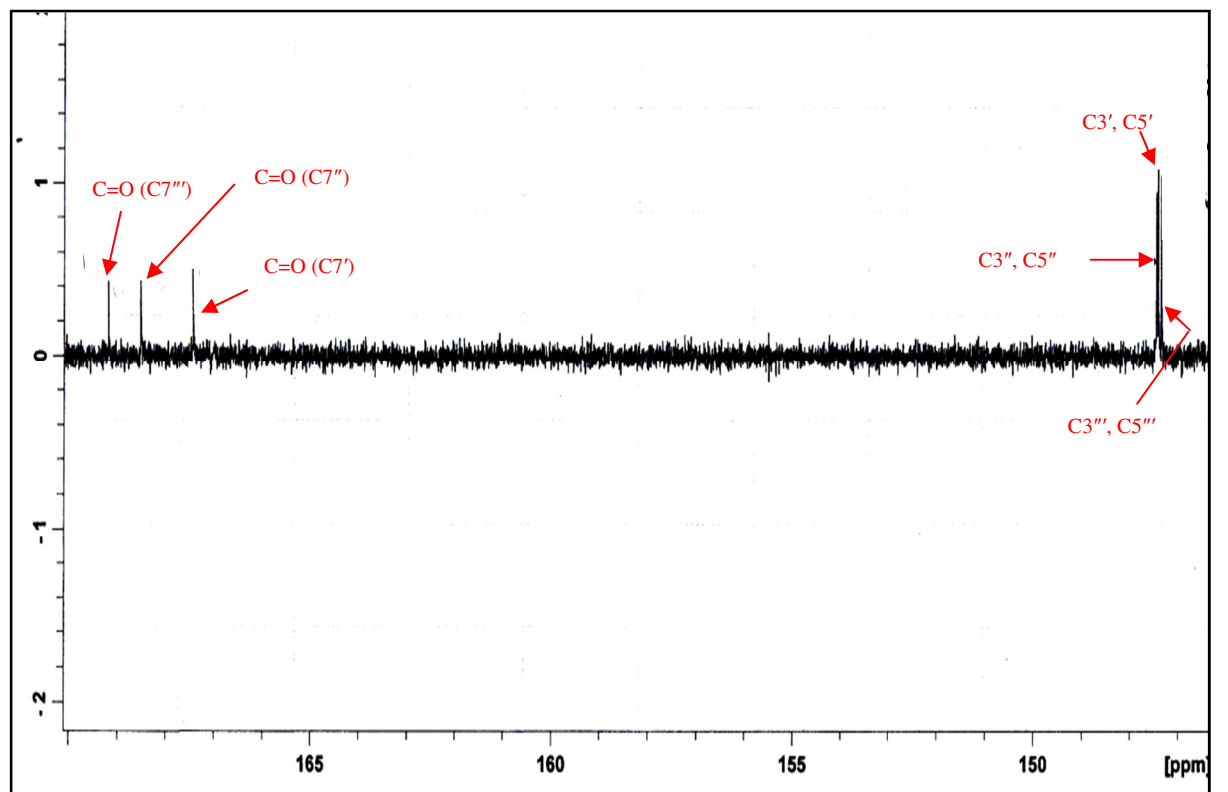
-a- Spectre RMN- ^{13}C J-modulé du composé I



-b- Spectre RMN- ^{13}C J-modulé étalé de (50-100 ppm) du composé I



-c- Spectre RMN-¹³C J-modulé étalé de (110-144ppm) du composé I



-d- Spectre RMN-¹³C J-modulé étalé (146-170) du composé I

Figure V. 10 (a, b, c, d): Spectre RMN-¹³C J-modulé du composé I

Partie II *** Résultats et discussions***

Le spectre RMN-¹H dans la CD₃OD (**figure V. 11**) montre les signaux suivants :

- ✓ trois signaux singulets à δ_H 7,00 ppm, 7,05 ppm et 7,10 ppm caractéristiques des protons aromatiques, chaque signal est attribué pour deux protons aromatiques. Confirmant la tri-substitution du cycle aromatique. On suggère que sont respectivement (H2', H6'), (H2'', H6'') et (H2''', H6''').
- ✓ Un doublet apparent à δ_H 5,92 ppm ($J = 7,05$ Hz) attribué un seul proton, caractéristique d'un proton anomérique.
- ✓ Deux triplets, un à δ_H 5,22 ppm est attribué pour un seul proton ($J = 9,00$ Hz), et l'autre à δ_H 3,68 ppm ($J = 9,40$ Hz) attribuant un proton, laissant suggérer que ce sont des protons du sucre.
- ✓ Un multiplet à δ_H 3,83 ppm est attribué pour deux protons, on suggère que ce sont des protons appartiennent aussi au sucre.
- ✓ Deux doublet de doublet l'une à δ_H 4,47 ppm (1H, dd, $J = 4,6 ; 12,00$ Hz) et l'autre à δ_H 4,58 ppm (1H, dd, $J = 12,00 ; 1,50$ Hz) caractéristique des protons méthylène du glucose.

On suggère que le composé **I** est un tannin de trois acides galliques liés entre eux par un glucose. L'attribution complète des signaux a été réalisé par l'analyse des spectres COSY H-H (**figure V.12**); HSQC (**figure V.13**) et la corrélation hétéronucléaire HMBC (**figure V.14**).

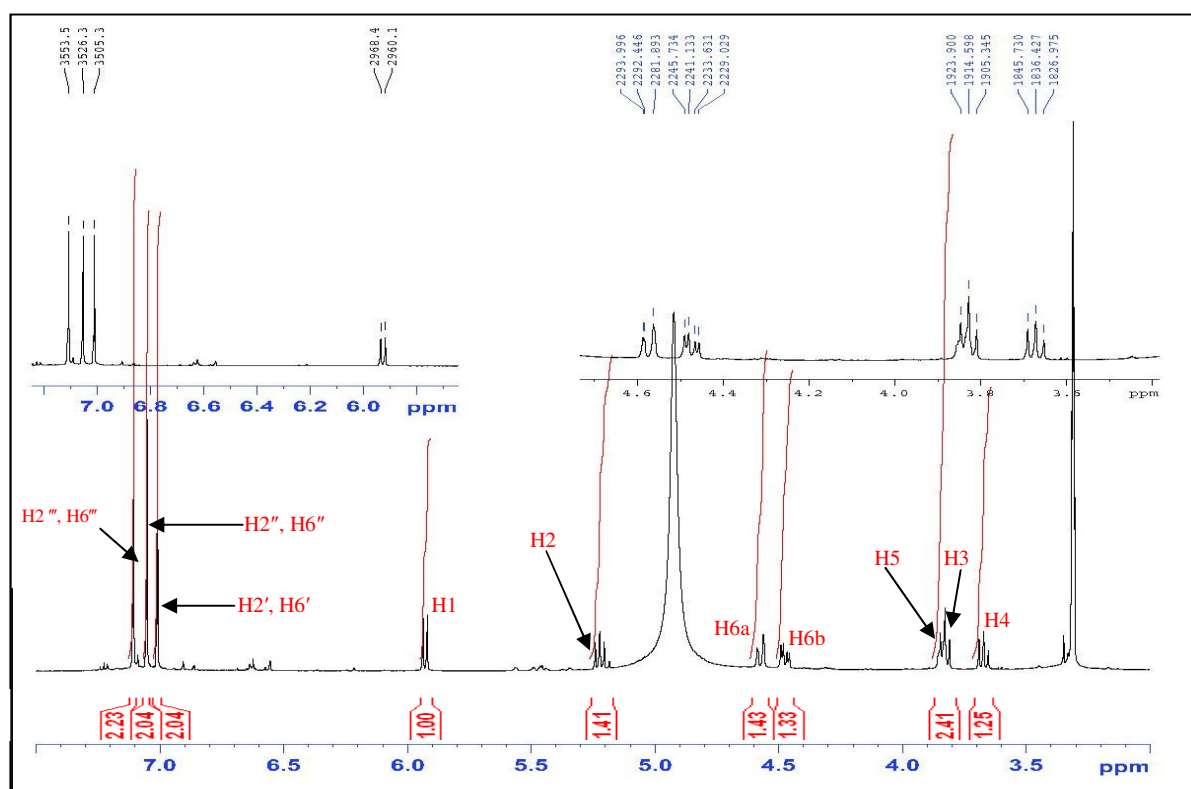
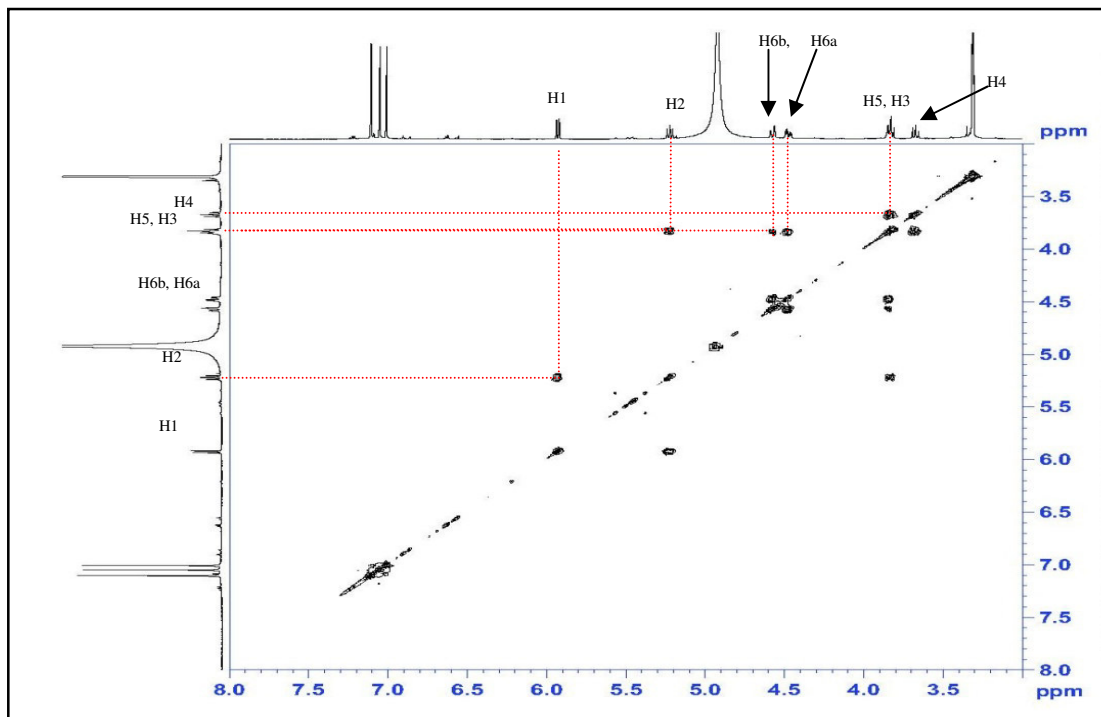
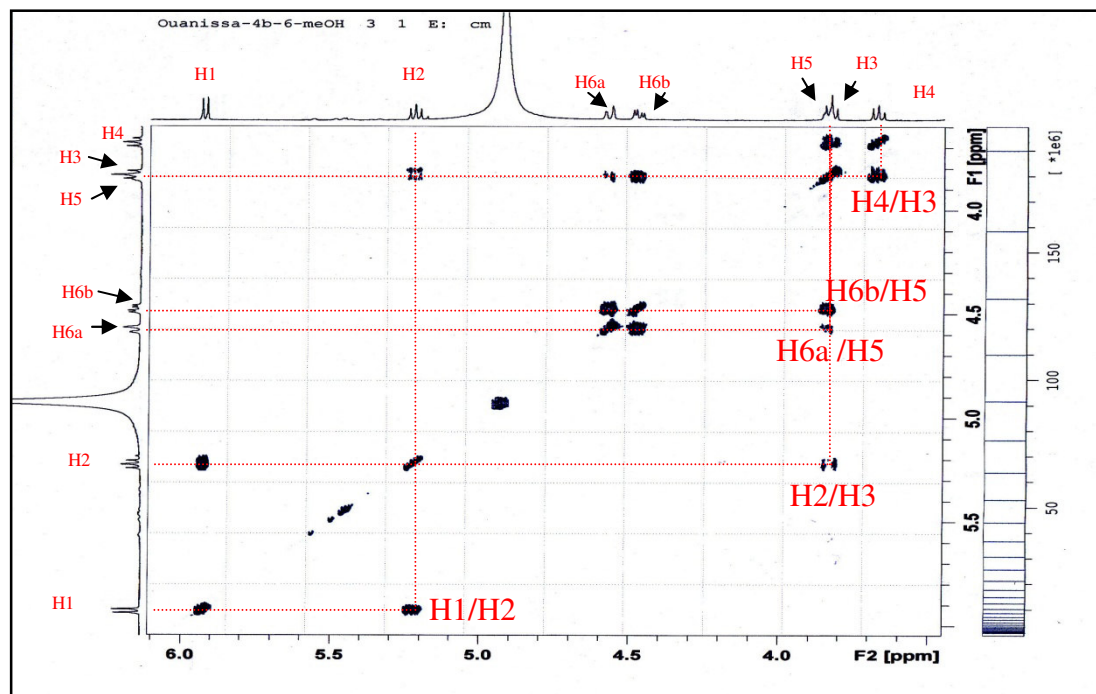


Figure V.11: Spectre RMN-¹H du composé I



-a- Spectre COSY ¹H-¹H

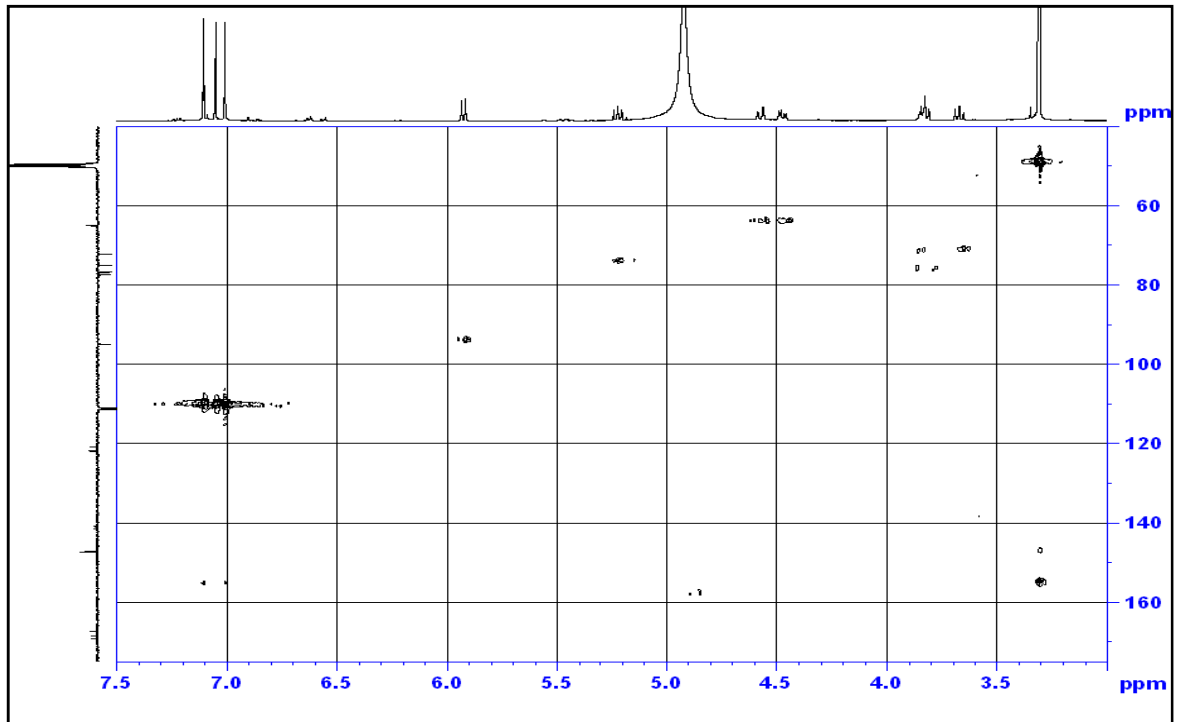


-b- Spectre étalé (3,5 à 6 ppm)

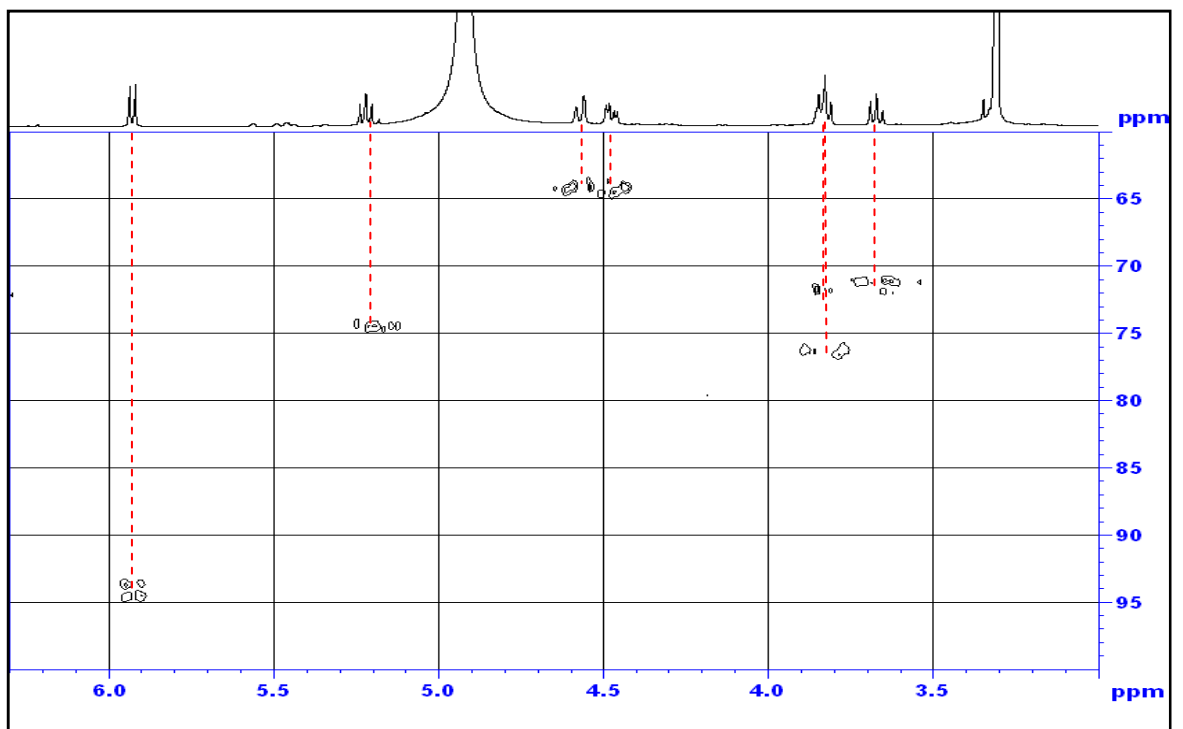
Figure V.12 (a, b) : Spectre COSY ¹H-¹H du composé I

Partie II *** Résultats et discussions***

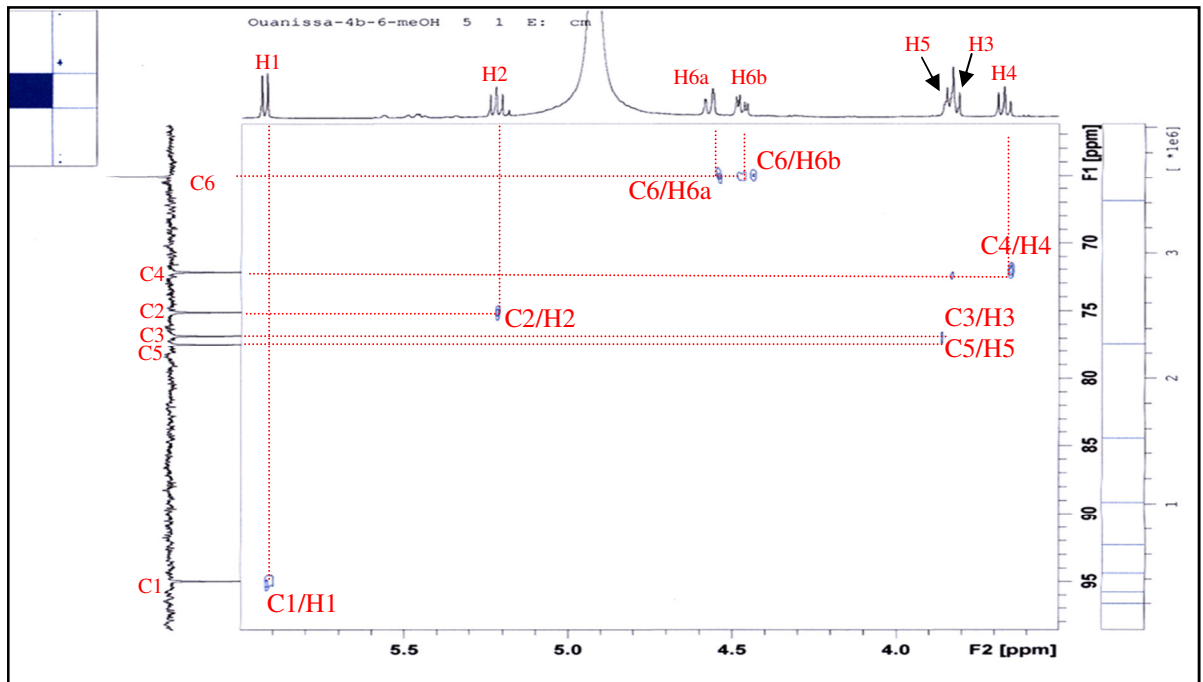
Le spectre de la HSQC pour ce composé montre les corrélations entre le carbone et son hydrogène (**figure V.13**)



-a- Spectre HSQC du composé I

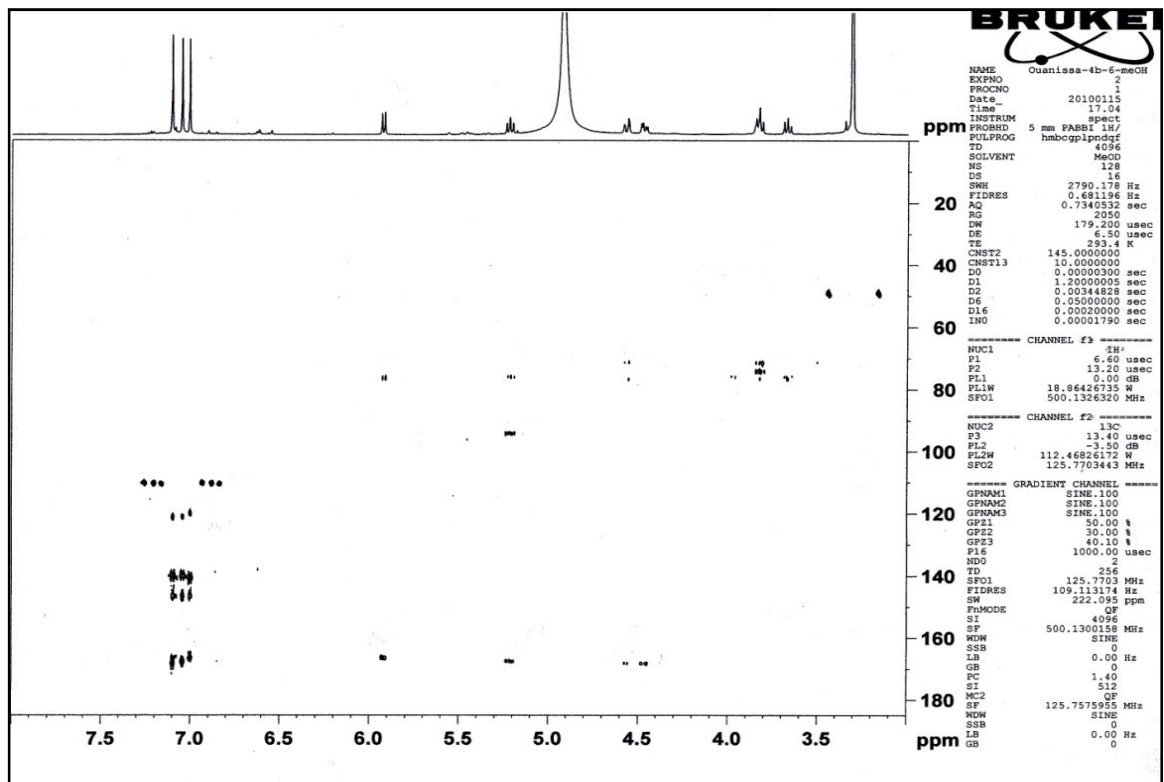


-b- Spectre HSQC du composé I étalé de 3ppm à 6.5 ppm

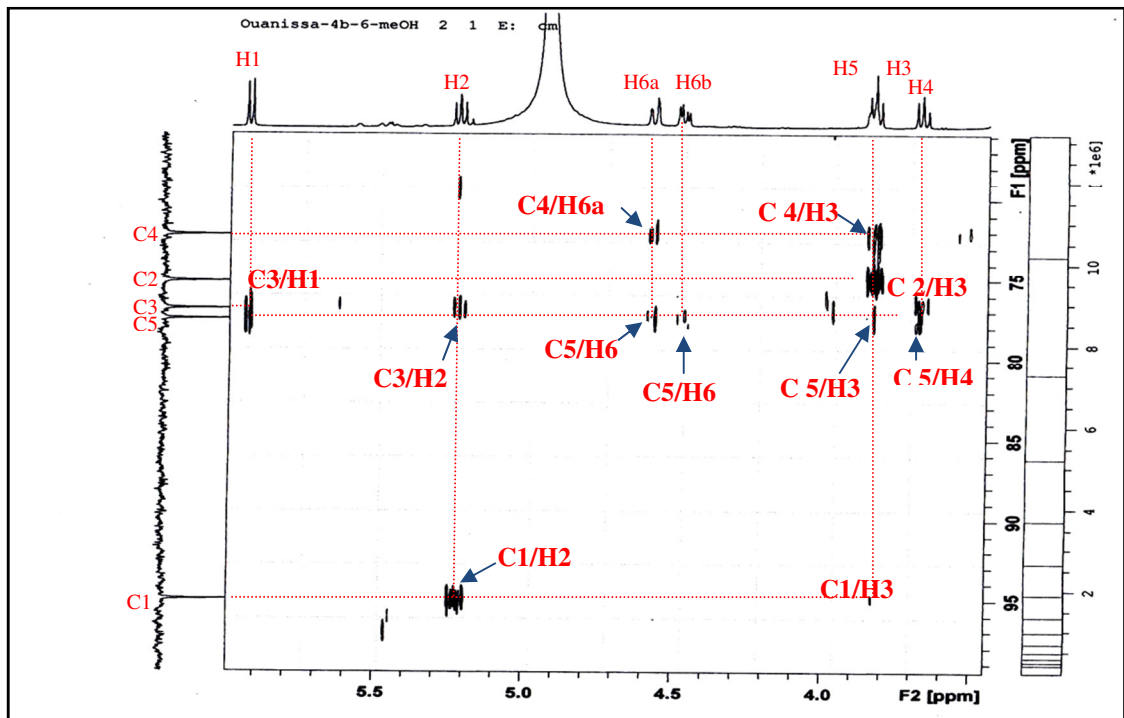


-c- Spectre étalé de 3,5 à 6 ppm du composé I

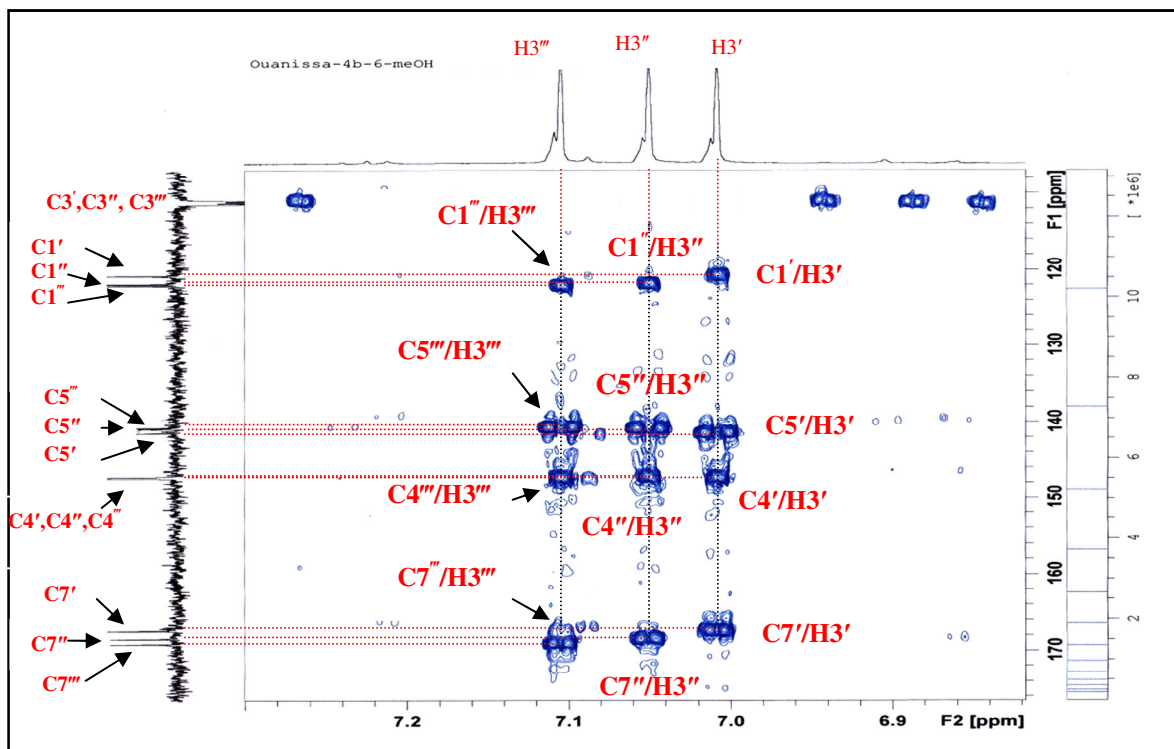
Figure V.13 (a, b, c) : Spectre HSQC du composé I



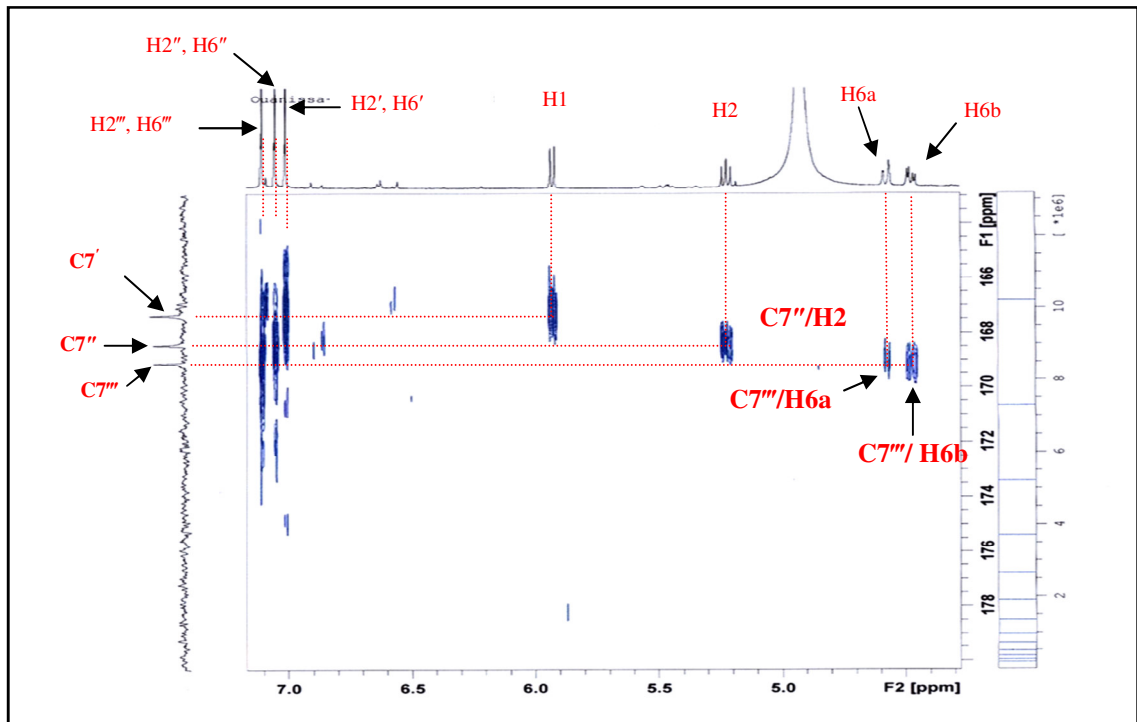
-a- Spectre HMBC du composé I



-b- Spectre HMBC du composé I étalé (3,5 à 6 ppm)



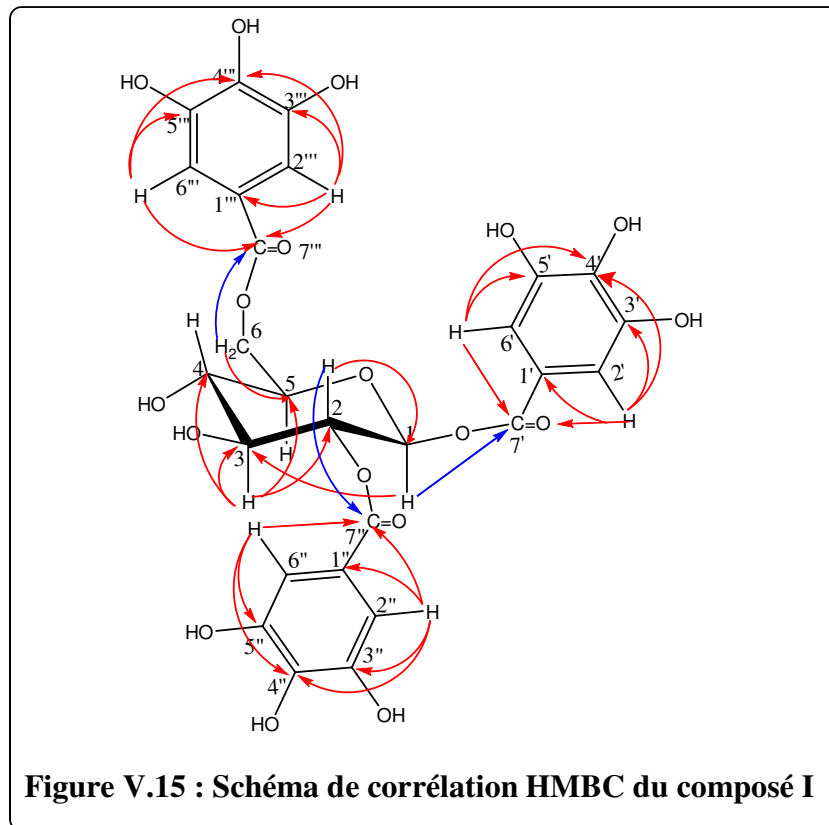
-c- Spectre HMBC du composé I étalé de 6,8 à 7,3 ppm



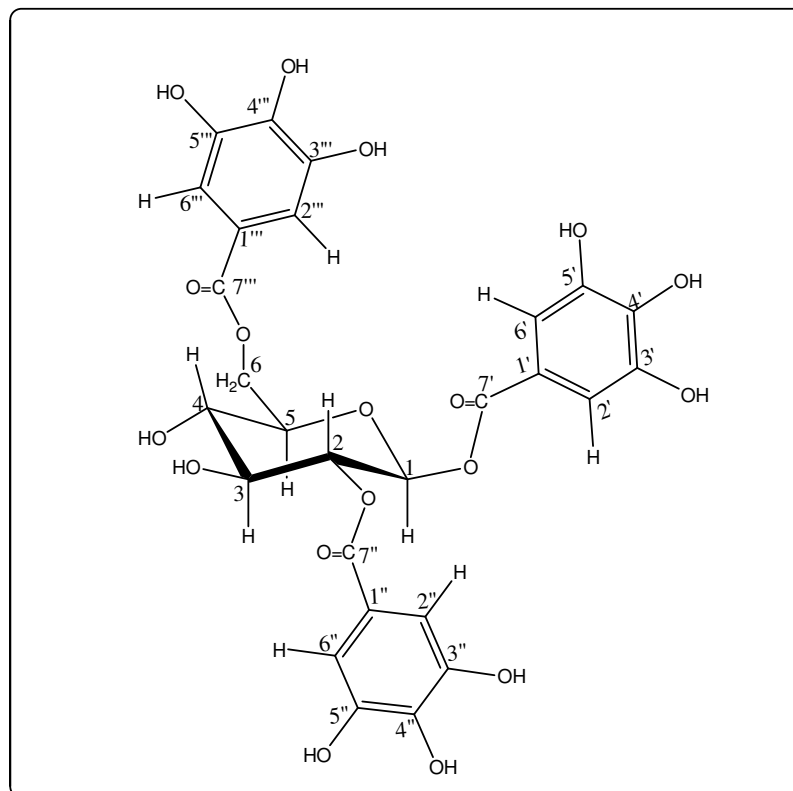
-d- Spectre étalé de (4 à 7 ppm)

Figure V.14 (a, b, c, d): Spectre HMBC du composé I

Les corrélations hétéronucléaires HMBC (figure V.14) entre les protons des carbones C-1, C-2 et C-6 et les carbones C-7', C-7'' et C-7''' des squelettes des trois acides galliques ont permis de confirmer la position d'attache du sucre (figure V.15).



Selon les données spectrales précédentes du composé I, on confirme qu'il est un tannin gallique (tannin hydrolysable) sous la structure 1, 2, 6- tri-galloyl- β -D-glucose (TGG) (figure V.16).



Ce qui justifie notre proposition les fragmentations (**figure V. 17**) suivantes :

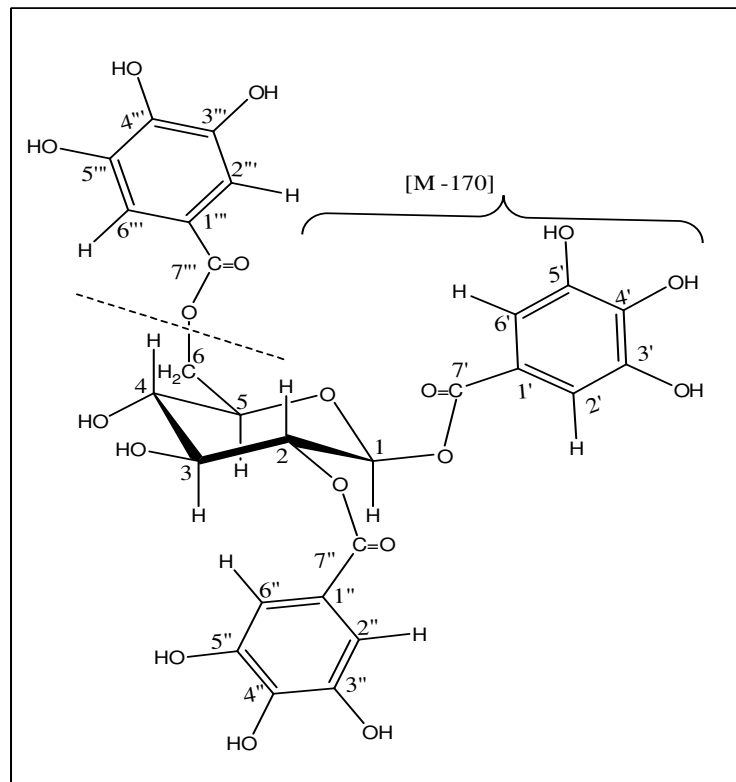


Figure V. 17 : Schéma des fragmentations du spectre MS² du composé I

Le spectre RMN-¹H, les déplacements chimiques et les constantes de couplages, RMN-¹³C ; ainsi que les attributions des signaux des spectres de corrélations ¹H-¹³C à courte distance HSQC, à longue distance HMBC et ¹H-¹H COSY sont représentés au **tableau V-2** suivant :

Partie II *** Résultats et discussions***

Tableau V-2 : Regroupe toute les analyses spectrales du composé I

1, 2, 6 tri- galloyl- β -D-glucose (I)						
Glucose	Position	δ_H (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)	HMBC (1H vers ^{13}C)	H-H COSY	HSQC (1H vers ^{13}C)
	1	5,92d (7,05)	95,05	C-3, C=O	H-2	C-1
	2	5,22 t (9,0)	75,09	C-1, C-3, C=O	H-3	C-2
	3	3,83 m	76,80	C-2, C-4, C-5		C-3
	4	3,68 t (9,40)	72,20	-		C-4
	5	3,83 m	77,44	-	H-4	C-5
	6a	4,47 dd (4,6;12,00)	65,05	C-4, C-5, C=O	H-5	C-6
	6b	4,58 dd (12,00 ; 1,55)		C-5, C=O	H-5	C-6
Galloyl (en1)						
	C=O(C7')	-	167,44	-		
	1'	-	120,87	-		
	2'	7,00 (s)	111,45	C=O, C-1', C-3', C-4', C-6'		
	3'	-	147,41 ^a	-		
	4'	-	141,54	-		
	5'	-	147,41 ^a	-		
	6'	7,00 (s)	111,45	C=O, C-2', C-4', C-5'		
Galloyl (en2)						
	C=O(C7'')	-	168,52	-		
	1''	-	121,94	-		
	2''	7,05 (s)	111,27	C=O, C-1'', C-3'', C-4'', C-6''		
	3''	-	147,44a	-		
	4''	-	140,97b	-		
	5''	-	147,44a	-		
	6''	7,05 (s)	111,27	C=O, C-2'', C-4'', C-5''		
Galloyl (en6)						
	C=O(C7''')	-	169,19	-		
	1'''	-	122,16	-		
	2'''	7,10 (s)	111,37	C=O, C-1''', C-3''', C-4''', C-6'''		
	3'''	-	147,34	-		
	4'''	-	140,84	-		
	5'''	-	147,34	-		
	6'''	7,10 (s)	111,37	C=O, C-2''', C-4''', C-5'''		

a, b interchangeable

V.3.4. Identification des produits isolés de la première extraction

A. L'extrait butanol

L'extrait butanolique a subi une purification avec CLHP préparative. Les conditions CLHP analytique ont été transposées à l'échelle préparative en phase inverse. Un total de 200 mg a été injecté, deux pics majoritaires correspondent aux composés **II** et **III** ont été récoltés à la sortie du détecteur UV/Vis. Cette purification est suivie par CLHP analytique (**figure V.18 et V.19**). Les conditions de l'analyse par CLHP analytique et préparative sont décrites dans le paragraphe (**VI.3.2**) partie expérimentale.

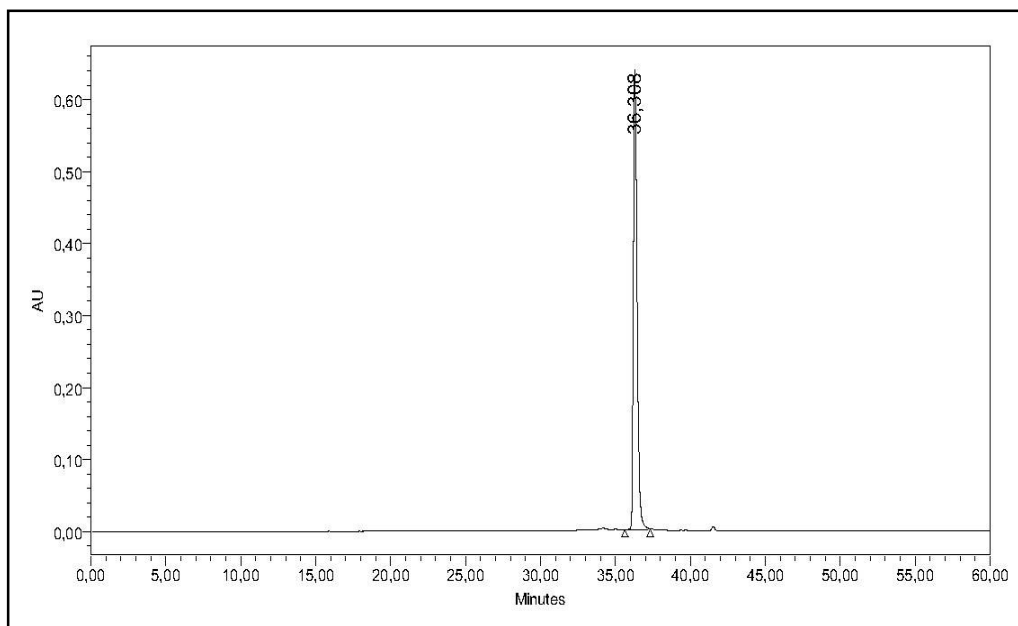


Figure V.18 : Chromatogramme LC/DAD-UV à 320 nm du composé II

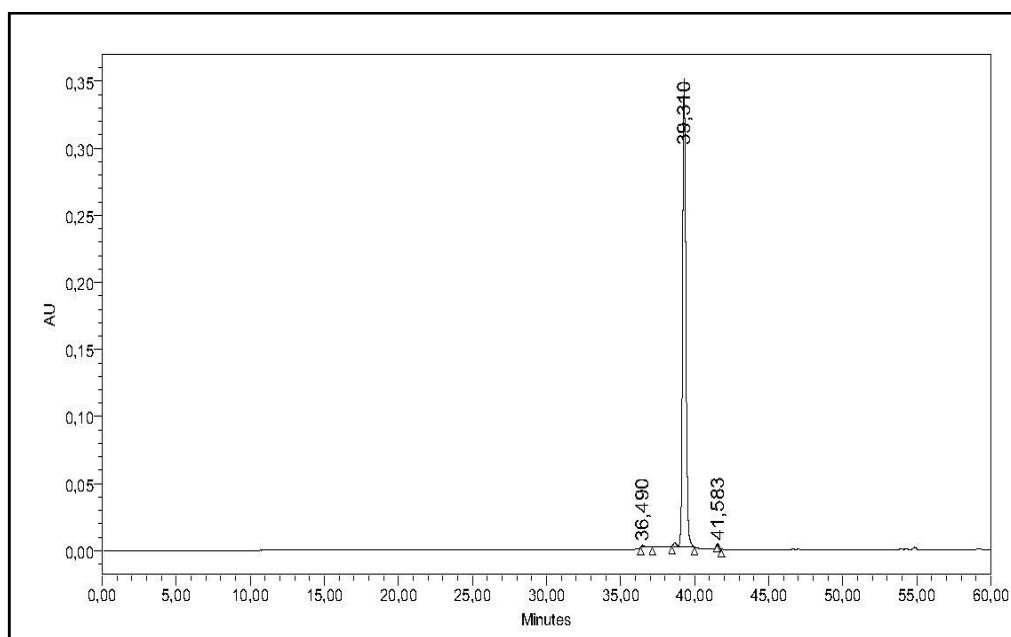


Figure V.19 : Chromatogramme LC/DAD-UV à 320 nm du composé III

V.3.4.1. Elucidation structurale du composé II

Le premier composé de l'extrait butanolique est obtenu sous forme d'une poudre jaune après lyophilisation. Ce produit est analysé par la chromatographie sur couche mince en présence de plusieurs réactifs universels et spécifiques. L'utilisation de l'acide amino-2-éthylidiphénylborique (Réactif de NEU) ce réactif spécifique des flavonoïdes montre des taches fluorescentes jaunes-orange à 365 nm indiquant la présence d'un flavonoïde.

Le point de fusion de ce composé **II** est 182,4°C et son pouvoir rotatoire est : $[\alpha]_D^{21,6} - 22,02$ (0,0307, MeOH).

Une première confirmation de la famille des composés phénoliques a été donnée par le spectre Ultrat-Violet dans le méthanol. Ce dernier montre deux bandes d'absorption dans le méthanol l'une a λ_{max} nm (log ϵ) ; **257** (3,24), un épaulement **298** (2,86), et une deuxième bande à **358** nm (3,08) caractéristiques d'un flavonol ou d'un flavonol substitué en C-3 (**figure V.20**) (**Simonyan, 1972**) [10].

D'après **Mabry** le spectre UV dans le méthanol de la plupart des flavonols et flavones possèdent deux pics d'absorption maximum dans la région 240-400 nm. Les deux pics communément appelés bande **I** (généralement entre 300 nm et 380 nm) représentant la conjugaison entre les cycles B et C (Cinnamoyl), et la bande **II** (généralement entre 240 nm et 280 nm) représentant la conjugaison entre les cycles A et C (Benzoyl). Pour les flavonols, une augmentation du nombre de groupes hydroxyles sur le cycle B induit un déplacement de la bande I de 3 nm à 10 nm.

La bande **I** du spectre enregistré dans le méthanol, donne des informations sur le type de flavonoïdes et l'oxydation car on peut faire la différence entre les flavones (la bande **I** : 305-350 nm) et les flavonols (la bande **I** : 352-385 nm) (**Mabry, 1970**) [11].

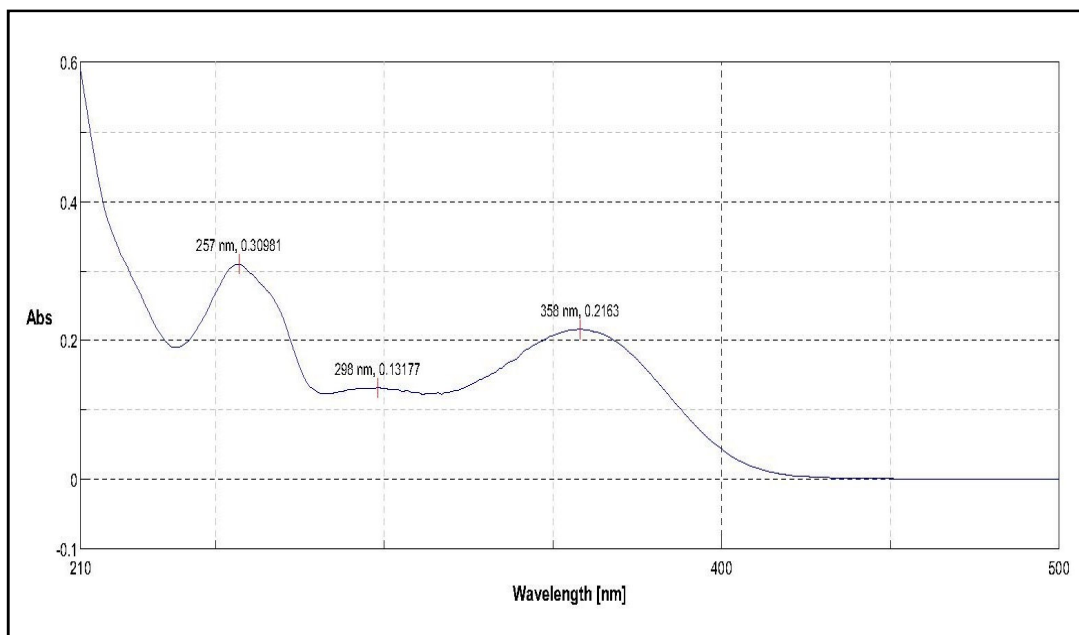


Figure V.20 : Spectre Ultrat-Violet du composé II dans le méthanol

Le spectre Infra Rouge (IR) indique la présence des groupements mentionnés ci-dessous, (**figure V.21**). Nous notons que ces résultats sont identiques à ceux de la littérature (**Azimova, 2013**) [12]:

- ✓ Le groupe hydroxyle à $3334,9\text{ cm}^{-1}$
- ✓ Les groupes carbonyles (COOH) à $1720,9\text{ cm}^{-1}$
- ✓ Le groupe carbonyle (C=O γ -pyrone) à $1652,6\text{ cm}^{-1}$
- ✓ Une double liaison C=C d'un cycle aromatique à $1603,7\text{ cm}^{-1}$
- ✓ La fonction C-O glycoside à $1082,1\text{ cm}^{-1}$; $1037,9\text{ cm}^{-1}$ et la dernière à $1018,8\text{ cm}^{-1}$

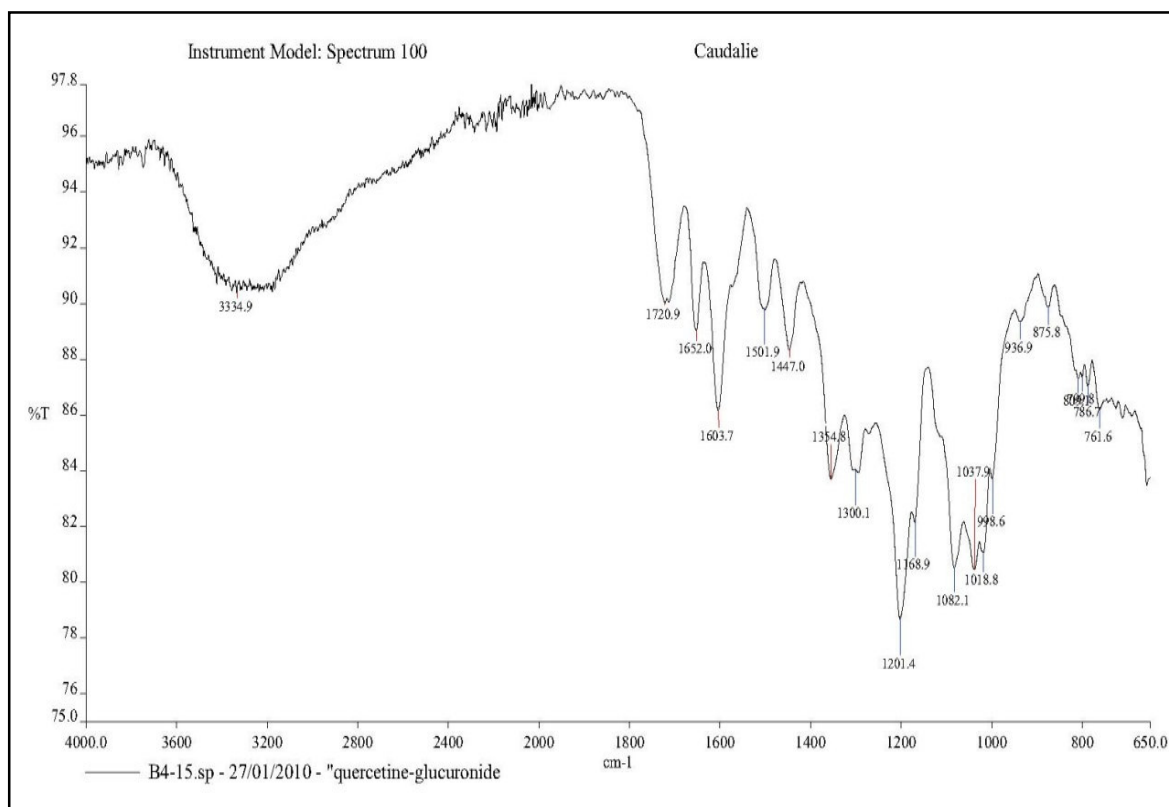


Figure V.21 : Spectre infra rouge du composé II

Le spectre de masse obtenu en ElectroSpray (ESI-MS) en mode négatif (**figure V.22**) présente un ion pseudomoléculaire à m/z 476,93. Ce dernier nous a permis d'envisager une masse moléculaire du composé de 478 u.m.a. Ainsi nous pouvons proposer la formule brute suivante $C_{21}H_{18}O_{13}$, la masse molaire calculée pour ce composé est 478,366 u.m.a.

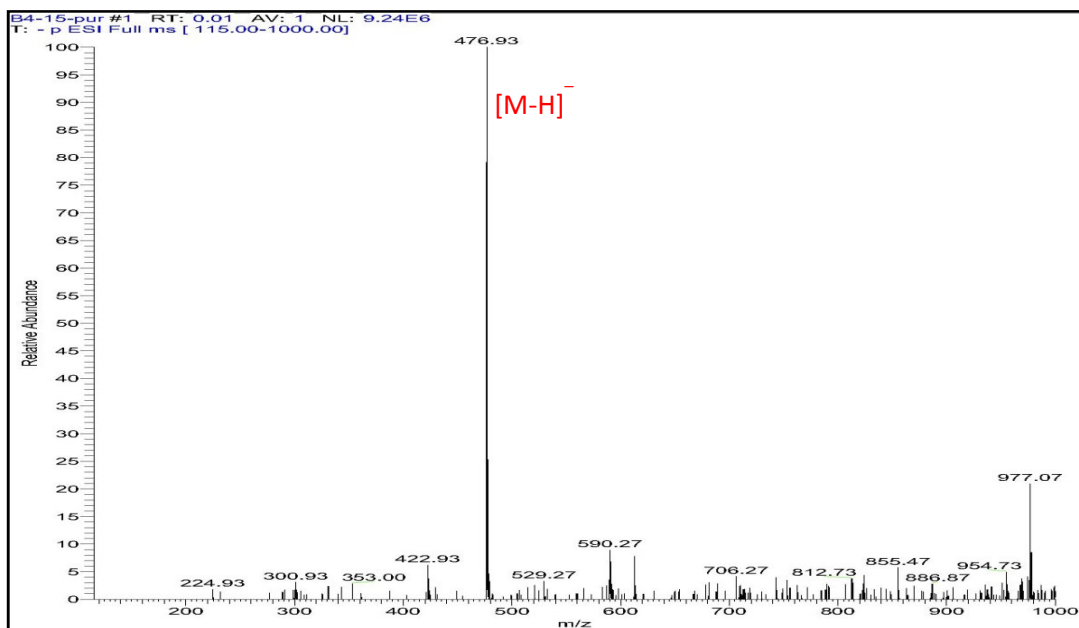


Figure V.22 : Spectre de masse du composé II en mode négative

La formule brute nous oriente vers une structure comportant 13 insaturations :

- ✓ 11 insaturations pour la génine du flavonol ou flavonol substitué en C-3
- ✓ 2 insaturations pour le sucre : 1 pour son cycle et l'autre pour le carboxyl dont il est attaché.

Ce qui confirme la présence d'un flavonol ou d'un flavonol substitué en C-3 (comme on l'a indiqué à partir du spectre UV) les fragmentations soit MS² ou bien MS³ (Cuycknes, 2004) [13]. Une fragmentation de l'ion 476,93 en MS² conduit à la formation d'un ion fils à m/z 300,98 [M-Glucu]⁻ caractéristique de la perte d'un acide glucuronique (figure V.23)

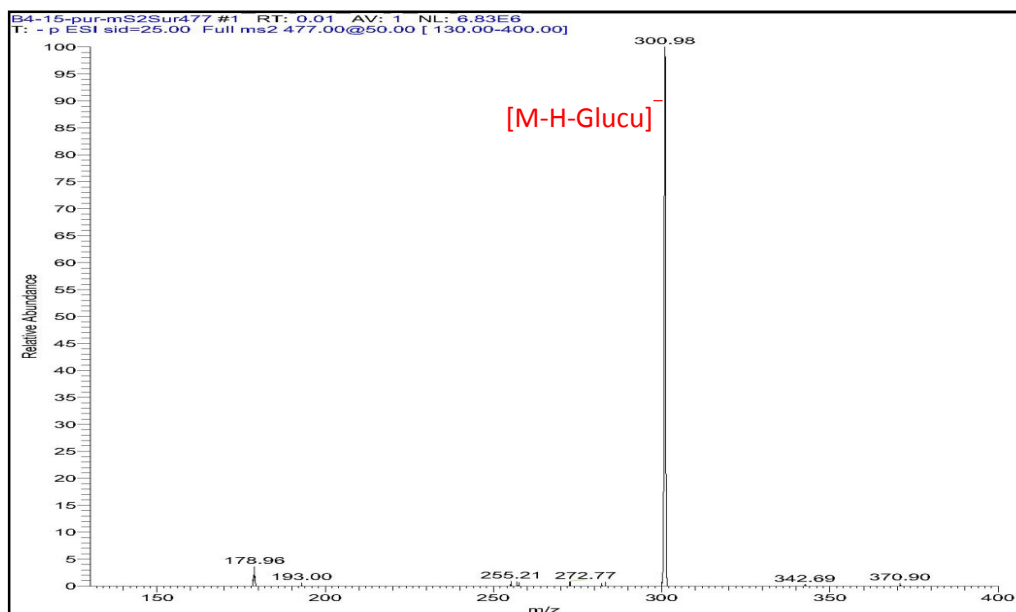


Figure V.23 : Spectre MS² m/z à 476,93 du composé II en mode négative

Partie II -Résultats et discussions

La fragmentation de cet ion fils en MS³ conduit à des ions pseudo moléculaires (figure V-24), toutes les fragmentations en mode négatif sont illustrés aux tableaux V-3.

Tableau V-3 : Les ions m/z observés pour le composé II en mode ESI négatif

Ions fragments	Ions m/z observés	Intensité relative	Spectres
[M-H] ⁻	477	100	MS
[M-H-Glucu] ⁻	301	100	MS ²
[M-H-Glucu-CO] ⁻	273	60	MS ³
^{1,2} A ⁻	179	100	MS ³
[M-H-Glucu-112] ⁻	189	93	MS ³
^{1,2} A ⁻ -CO ; ^{1,3} A ⁻	151	58	MS ³

Ces résultats sont similaires à ceux de la littérature (Hevesi, 2009 ; Duenas, 2008) [14,15].

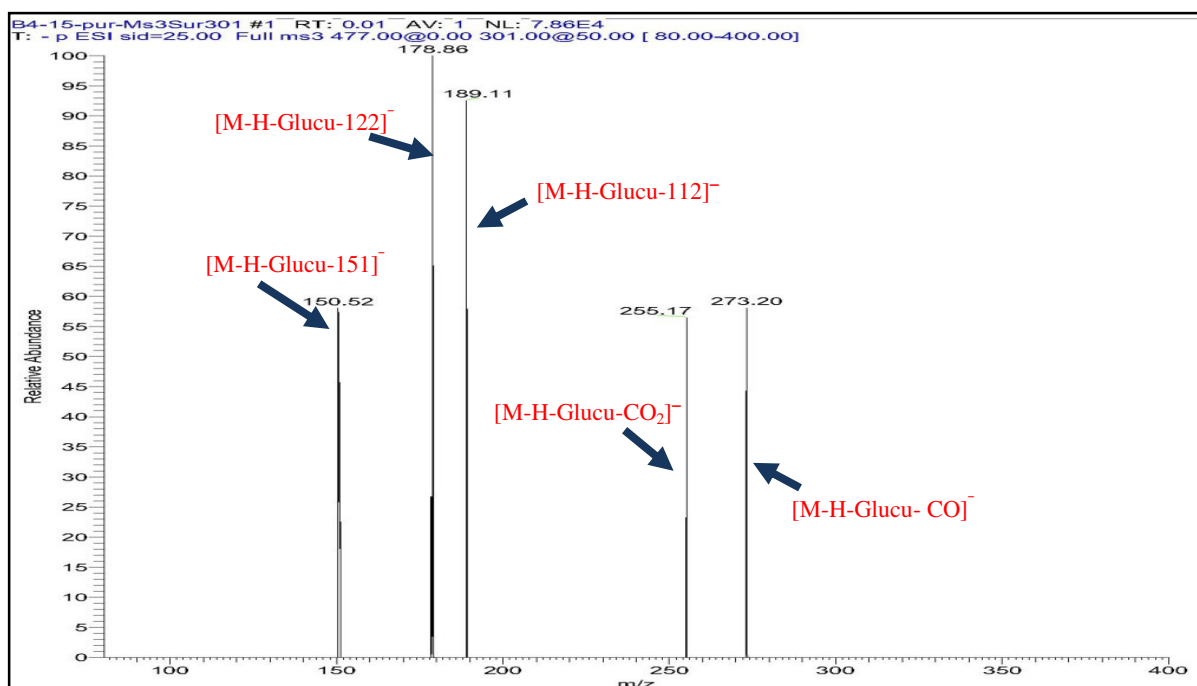


Figure V.24 : Spectre MS³ m/z à 300,98 du composé II en mode négative

Selon le paragraphe (II.1.6.) la fragmentation MS² de l'ion Y₀⁻ fait apparaître les ions ^{1,3}A⁻ à m/z 151 et ion ^{1,2}A⁻ à m/z 179 caractéristiques d'un flavonol portant deux groupements hydroxyles sur le cycle A (Lhuillier, 2007) [16].

Le spectre RMN¹³C J-modulé (**figure V.25**) indique la présence de vingt et un carbones qui sont les suivants :

- ✓ 7 Carbones engagés dans les fonctions alcools, quatre d'entre eux d'hybridation sp² dans deux cycles aromatiques et les carbones restants d'hybridations sp³ dans un glucose.
- ✓ 7 Carbones quaternaires, 2 d'entre eux engagés en fonction carbonyle
- ✓ 5 Carbones méthines (C-H) aromatiques engagés dans deux cycles aromatiques
- ✓ Les deux carbones restants se trouvent dans un sucre

L'analyse du spectre RMN ¹³C montre aussi que le composé **II** est un flavonol mono substitué en C-3 (la substitution due à la présence d'un seul sucre). Les flavonols en général, possèdent trois hydroxyles en C-5, C-7 et en C-4'. Les hydroxyles du cycle A sont en C-5 et C-7. Ils peuvent être libres ou étherifiés. L'absence des signaux des groupes de méthoxyles (OCH₃) dans le spectre RMN¹³C du composé **II** nous oriente vers la présence des groupements hydroxyles dans la génine du flavonol (*cf.* **II.1.2.2.**). De cette étude on peut tirer que :

- ✓ Selon le paragraphe (**II.1.5.**), le signal déblindé (δ_C 136,28 ppm) est attribué au carbone C-3, alors que ceux blindés apparaissant respectivement à δ_C 159,89 ppm et δ_C 180,12 ppm sont attribués aux carbones C-2 et C-4.
- ✓ L'apparition des deux signaux observés en RMN ¹³C J-modulé (*figure V.26*), l'un blindé (δ_C 100,73 ppm) et l'autre déblindé (δ_C 95,55 ppm), suggère que ces signaux sont respectivement ceux des carbones C-6 et C-8 du cycle A.
- ✓ Le signal déblindé observé pour le carbone C-3 (δ_C 136,28 ppm) et ceux blindés apparaissant respectivement pour les carbones C-2 (δ_C 159,89 ppm) et C-4 (δ_C 180,12 ppm), laisse suggérer que C-3 est la position d'attachement du sucre à l'aglycone. Ces résultats sont conformes aux données de la littérature (**Niassy, 2004**) [17].

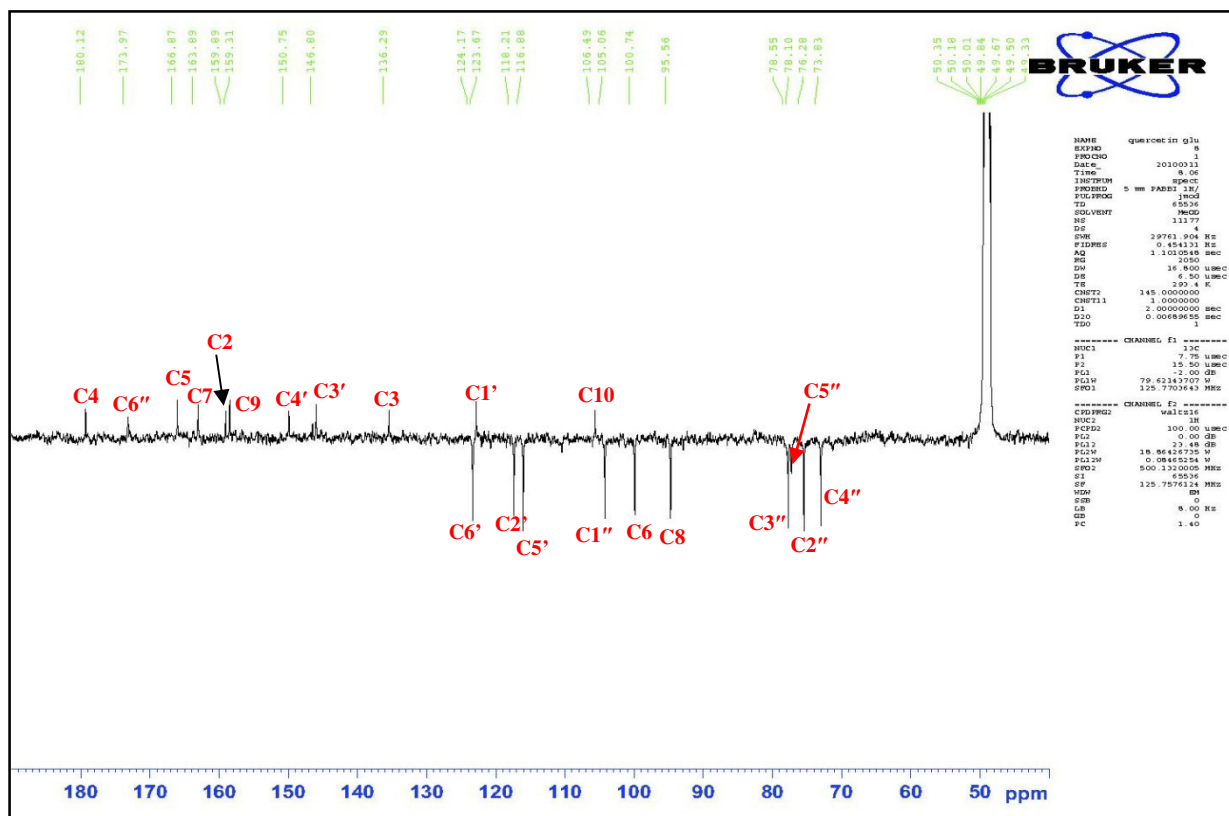


Figure V.25: Spectre RMN¹³C-J-modulé du composé II

Le déplacement chimique du proton anomérique (H-1'') du sucre lié directement au groupe hydroxyle flavonoïde dépend à la fois de la nature du flavonoïde, la stéréochimie et la position de l'attachement au flavonoïde.

Le spectre RMN¹H du composé II (figure V.26) montre 5 signaux aromatiques leurs carbones sont hybridés sp² dans la région (δ_H 7.7- 6.2 ppm), la répartition de ces protons est la suivantes :

- ✓ Deux singulets larges (δ_H 6,2 et 6,4 ppm) du cycle A, ce qui confirme la di-substitution de ce cycle. Généralement la substitution de ce cycle en position C-5 et C-7. Les signaux observés correspondent aux protons aromatiques H-6, H-8.
- ✓ Les deux doublets larges et un singulet large (δ_H 6,84 ($J = 8,4$ Hz), 7,6 ($J = 8,75$ Hz) et 7,7ppm) sont les signaux des protons aromatiques du cycle B, confirmant ainsi la di-substitution de ce cycle. Généralement la substitution en position C-3' et C-4' est la plus commune dans les flavonols. Les signaux observés conviendraient aux protons H-6', H-5' et H-2'. Nos résultats sont en parfait accord avec ceux de la littérature (Moon, 2001) [18].
- ✓ Les signaux des trois protons présentés sous forme de multiplets (m) à 3,48 ppm ; 3,55 ppm et à 3,60 ppm et le doublet à 3,74 ppm (constante de couplage $J = 9,9$ Hz) intégrant tous pour un seul proton sont ceux de la partie sucre.

Partie II -Résultats et discussions

- ✓ Le proton anomérique du sucre est visible à δ_H 5,36 ppm sous forme d'un doublet de constante de couplage $J = 7,60$ Hz, confirme que le sucre est sous forme de β -D- glucuronide (Tatsis, 2007 ; Castillo-Munoz, 2009) [19,20].

L'allure du spectre RMN¹H montre que dans les régions aromatiques on observe un noyau B di-substitué (br s (H₂'), dd br (H₅', H₆')) et un noyau A di-substitué en position 5 et 7 ce qui indique que la génine est une quercétine ou une molécule voisine.

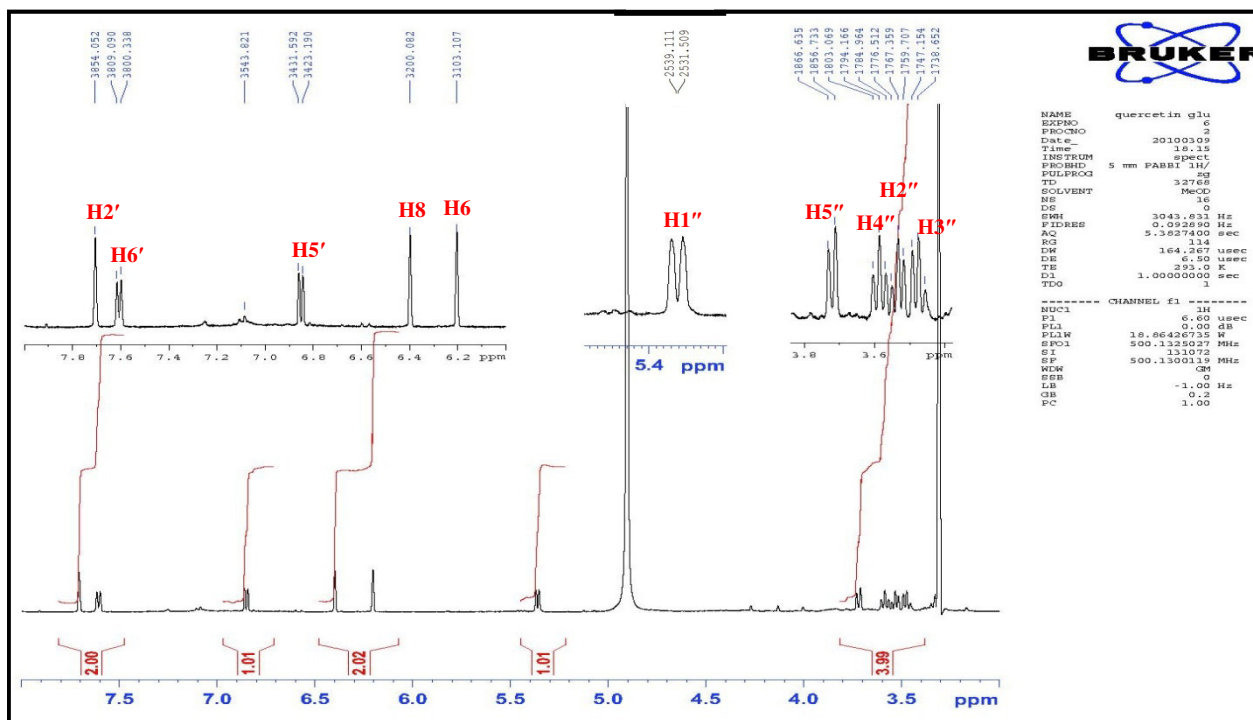
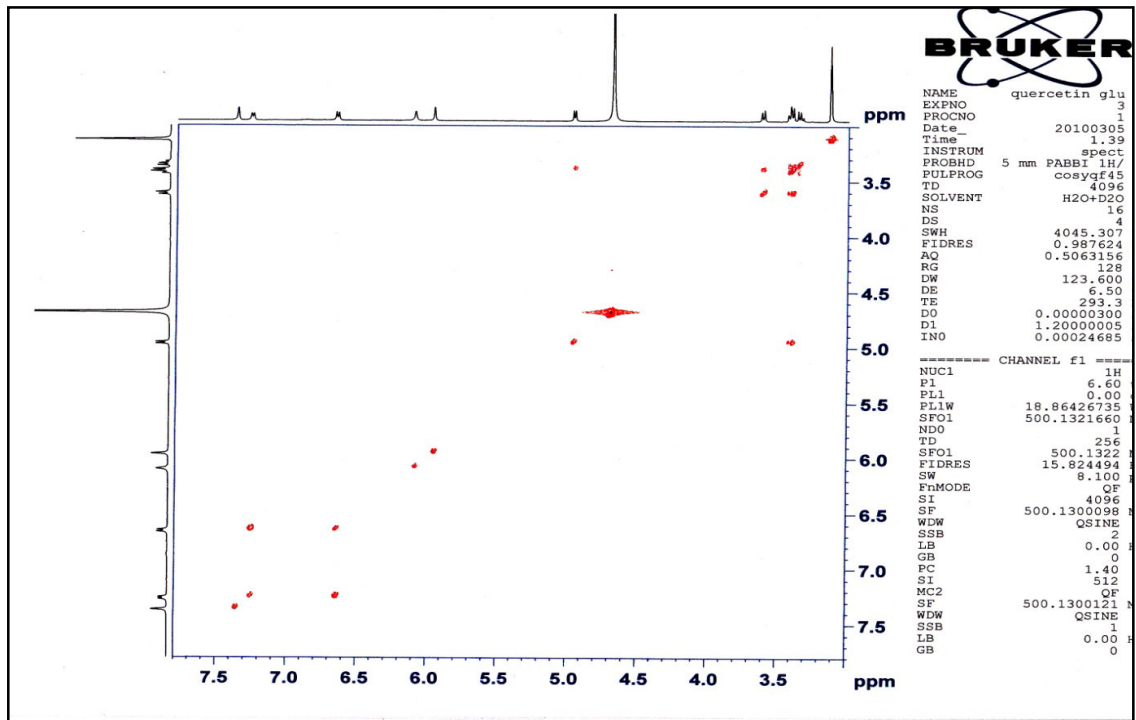
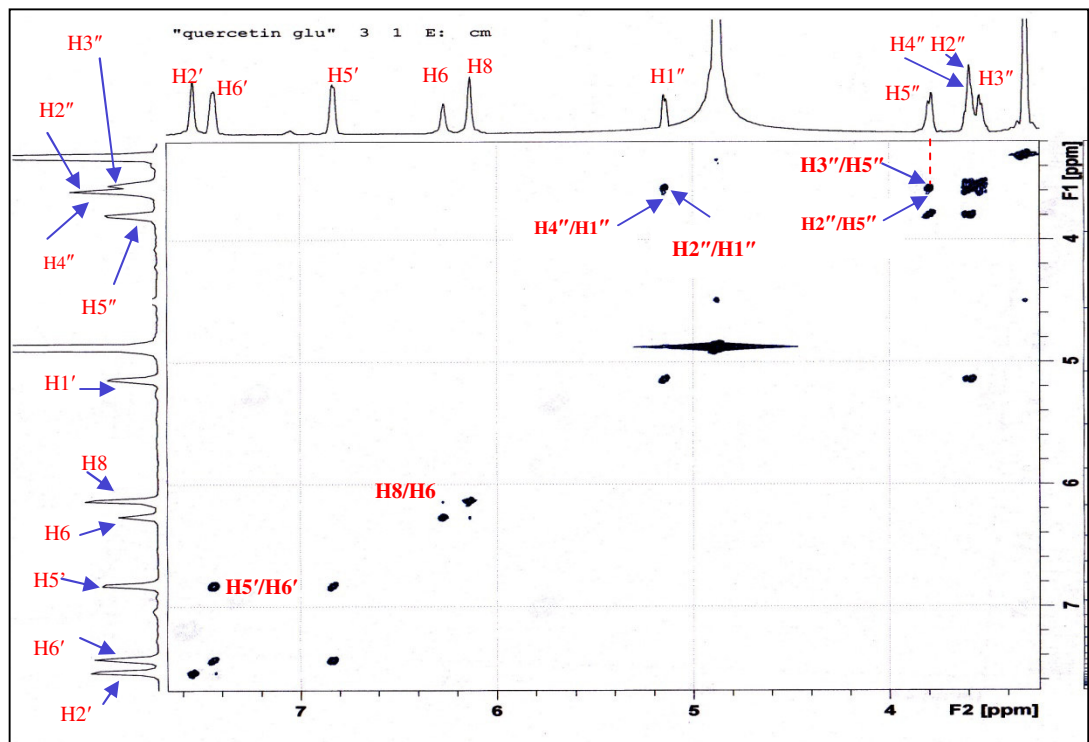


Figure V.26 : Spectre RMN¹H du composé II

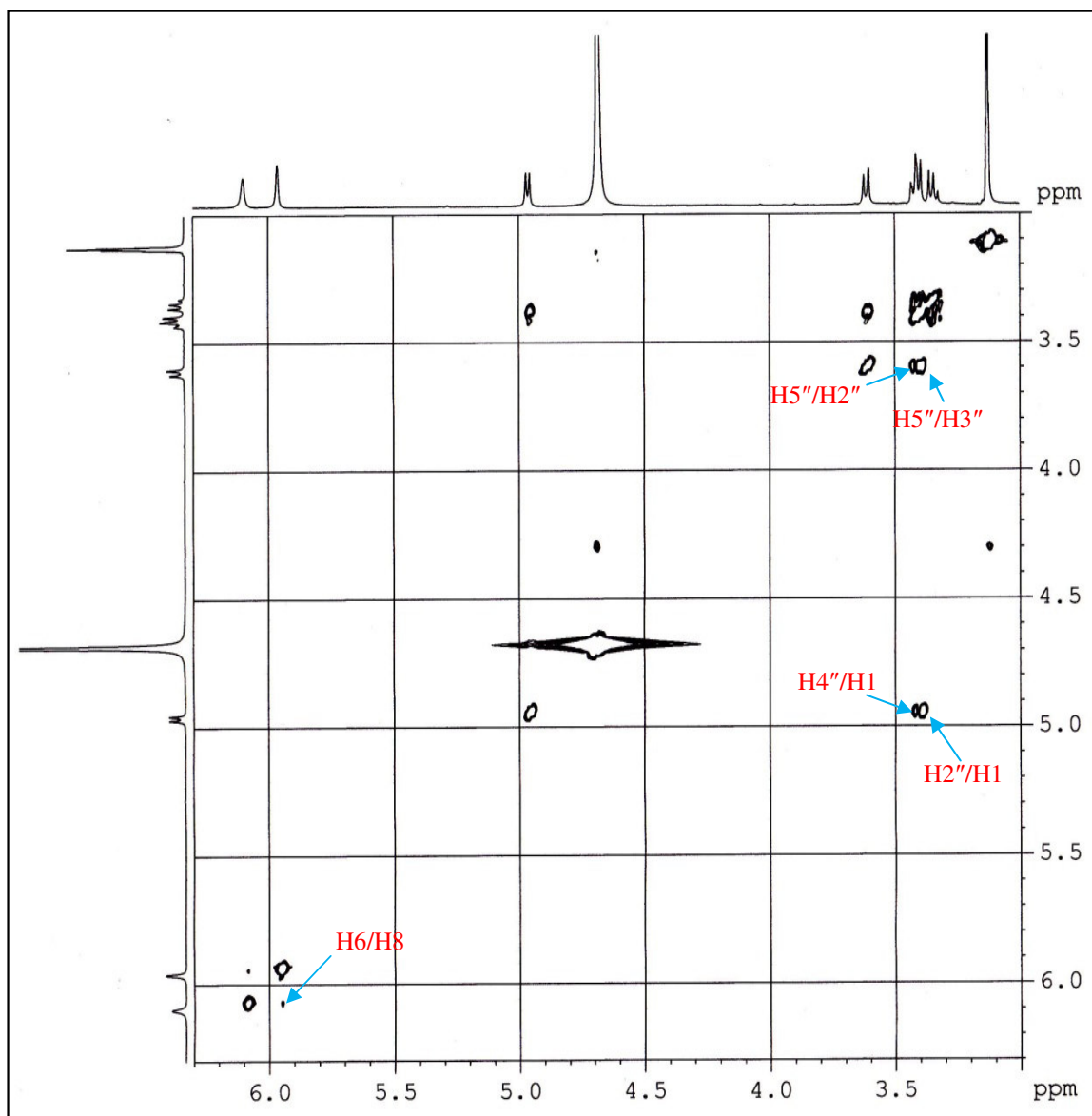
Le spectre RMN¹H-¹H COSY montre des corrélations homonucléaires entre les protons du composé II (figure V.27) :



-a-Spectre COSY du composé II



-b-COSY étalé (3 à 7,7 ppm) du composé II



-c-COSY étalé (3-6,3 ppm) du composé II

Figure V.27 : (a, b et c): Spectre RMN H-H COSY du composé II

L'expérience HMBC (figure V.28) permet de déterminer les positions des substitutions de la molécule. Le signal à $\delta_H = 5,38$ ppm ($H1''$) de proton anomérique du sucre corrèle d'une part avec le signal à $\delta_C = 78,5$ ppm ($C-3''$) du sucre et d'autre part avec le signal à $\delta_C = 136,3$ ppm ($C-3$) de l'aglycone, indiquant ainsi que le carbone C-3 de l'aglycone est la position de l'attachement du sucre.

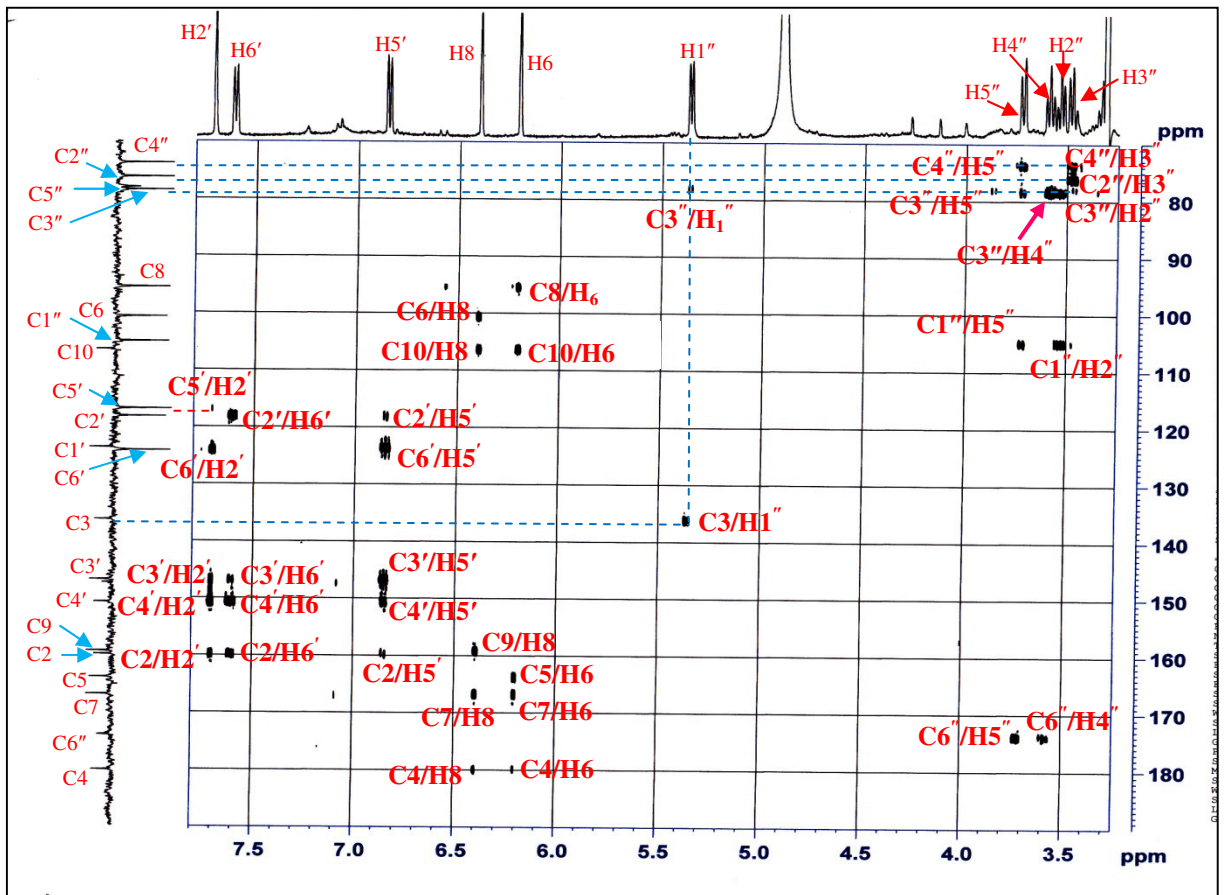


Figure V.28 : Spectre HMBC du composé II

Le schéma suivant (figure V.29) présente les corrélations longue distance (HMBC)

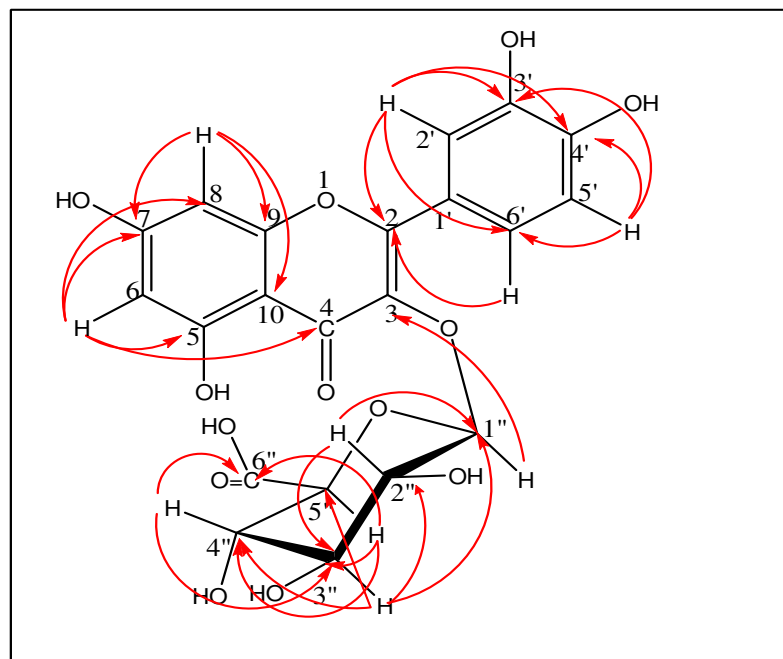


Figure V.29 : Schéma des corrélations HMBC du composé II

Pour justifier l'identification précédente du composé **II**, les chemins de fragmentations selon la retro Diels-Alder (RDA) ayant permis d'obtenir les principaux fragments en spectrométrie de masse (SM, SM² et SM³) sont présentés dans la figure V.30.

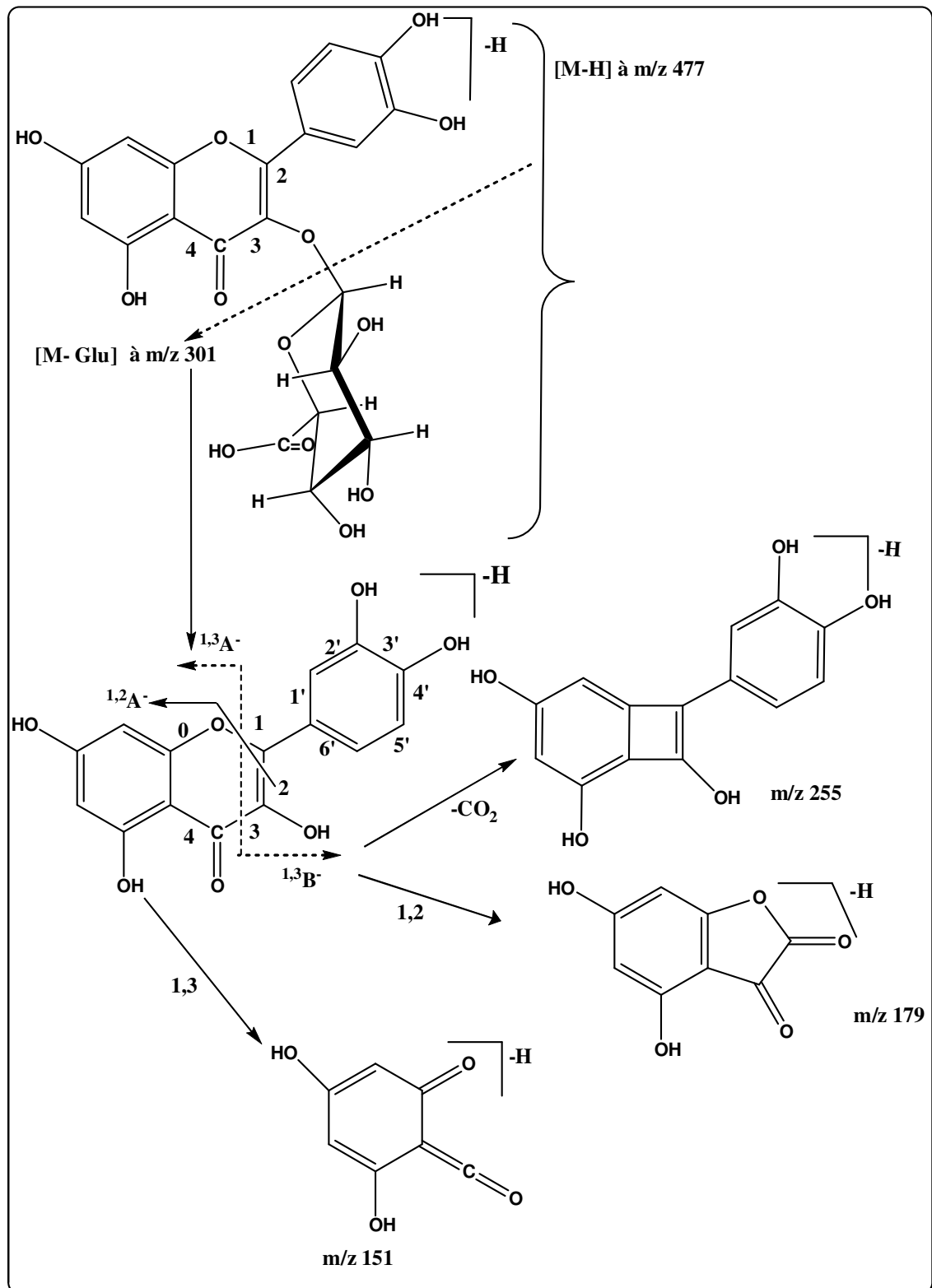


Figure V.30 : Schéma de différentes fragmentations (MS, MS², MS³) du composé II (Lhuillier, 2007 ; Fabre, 2001) [21, 22]

Les attributions réalisées sont également confirmées par les expériences de résonances magnétiques nucléaires RMN¹H, RMN¹³C, RMN¹H-¹H Cosy et HMBC confirment que le composé (**II**) est un quercétine-3O-β-D-glucuronide (Miquelianine) (**figure V.31**).

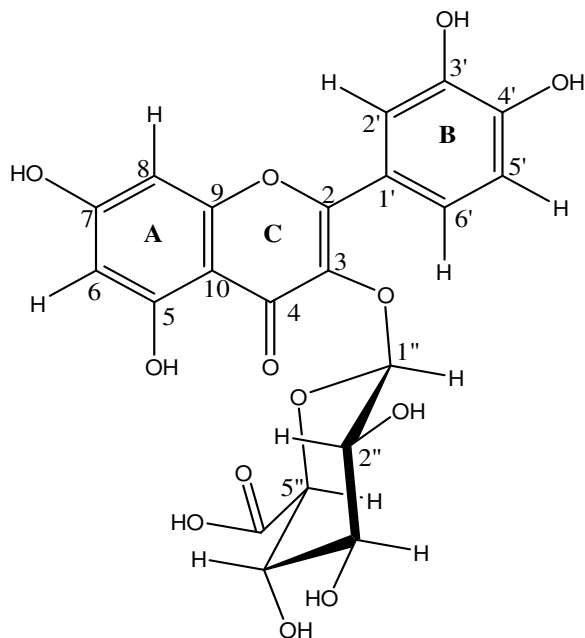


Figure V.31 : Structure quercétine -3-O-β-glucuronide (composé II)

Les attributions de tous les signaux des spectres du proton, de carbone et la HMBC du composé **II** sont présentés dans le tableau V-5. Tous les résultats sont identiques à celles obtenus par (Hevsi, 2009) [14].

Partie II -Résultats et discussions

Tableau V-4 : Données RMN¹H (125.75 MHz), RMN¹³C J-modulé (500 MHz) du composé II et HMBC dans le CD₃OD, et la constante de couplage *J* en (Hz).

Quercétine -3O-β-D-glucuronide (composé II)				
Position	δ _H (ppm)	<i>J</i> (Hz)	δ _C (ppm)	HMBC (H vers C)
2	-	-	159,89	-
3	-	-	136,28	-
4	-	-	180,12	-
5	-	-	163,88	-
6	6,20 (br s)	-	100,73	C-8, C-10, C-5, C-7, C-4
7	-	-	166,87	-
8	6,40 (br s)	-	95,55	C-6, C-9, C-10, C-7, C-4
9	-	-	159,30	-
10	-	-	106,48	-
1'	-	-	123,67	-
2'	7,70 (br s)	-	118,21	C-5', C-6', C-3', C-4', C-2
3'	-	-	146,80	-
4'	-	-	150,74	-
5'	6,84 (br d)	8,40	116,87	C-2', C-6', C-3', C-4', C-2
6'	7,6 (br d)	8,75	124,16	C-2', C-3', C-4', C-2
1''	5,38 (d)	7,75	105,05	C-3'', C-3
2''	3,55 (m)	-	76,28	C-1'', C-3''
3''	3,48 (m)	-	78,54	C-2'', C-4'', C-1'', C-5''
4''	3,60 (m)	-	73,82	C-3'', C-6''
5''	3,74 (d)	9,9	78,09	C-4'', C-3'', C-6''
6''	-	-	173,97	-

V.3.4.2. Elucidation structurale du composé III

Après lyophilisation du deuxième composé issu de l'extrait butanolique, ce dernier est obtenu sous forme d'une poudre jaune pâle. Ce produit a également fait l'objet d'analyse par la chromatographie sur couche mince en présence de plusieurs réactifs universels et spécifiques. La fluorescence jaunes-orangée à 365 nm obtenue après pulvérisation par le réactif de NEU indique la présence d'un flavonoïde (Victorio, 2009) [23].

Le point de fusion (PF) de ce composé est de 164,4 – 166,2° C, et le pouvoir rotatoire selon la loi de Beer-Lambert est $[\alpha]_D^{21,6} + 8,831$ (0,000385, MeOH).

Le spectre Ultra-Violet dans le méthanol (figure V.32) du composé III montre deux bandes d'absorption à des longueurs d'ondes maximum λ_{max} nm (log_e) : 351 nm (4,01) pour la première bande, un épaulement à 299 nm (3,93) et la deuxième bande à 266 nm (4,17). Les deux bandes caractéristiques d'un flavonol ou d'un flavonol substitué en C-3 (Mabry, 1970) [11]. Ce spectre montre une première indication sur la famille du composé.

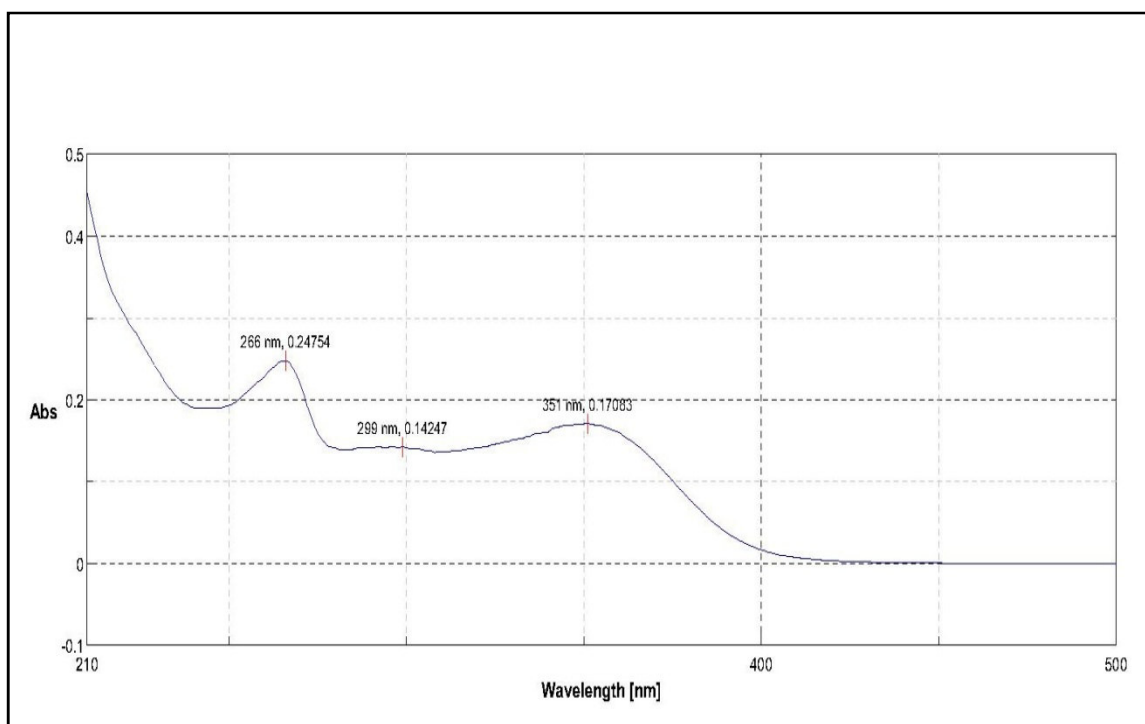


Figure V.32 : Spectre Ultra-Violet du composé III

Le spectre Infra Rouge de composé III obtenu (figure V.33) montre les groupements suivants :

- ✓ Un hydroxyle à 3208,6 cm^{-1} ,
- ✓ La fonction carboxyle (COOH) à 1722,7 cm^{-1} ,
- ✓ Le groupe carbonyle (C=O γ -pyrone) à 1651,9 cm^{-1} ,

- ✓ Double liaison C=C ($1604,1 \text{ cm}^{-1}$, $1497,8 \text{ cm}^{-1}$),
- ✓ Le spectre montre la présence des bandes d'absorptions des liaisons C-H à ($1438,3 \text{ cm}^{-1}$),
- ✓ Fonction C-O glycoside ($1079,7$, $1013,3 \text{ cm}^{-1}$)

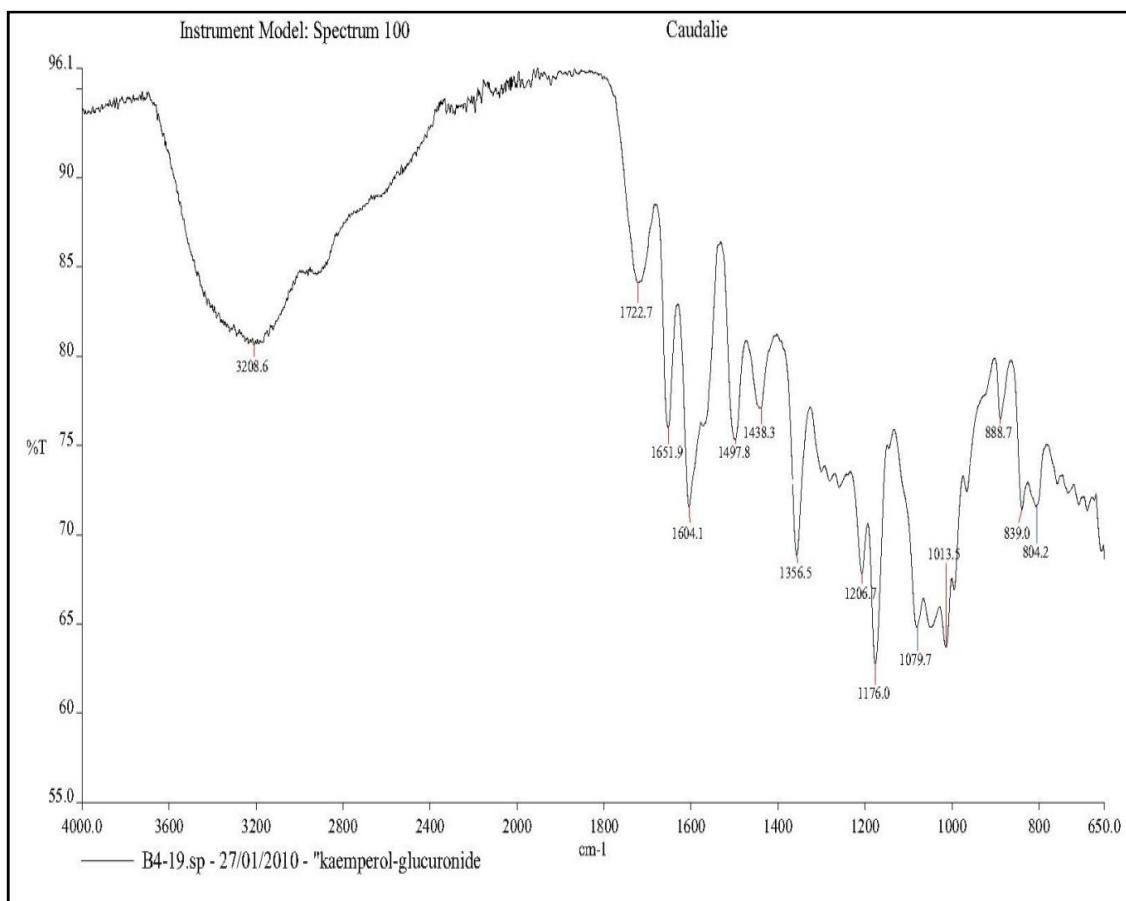


Figure V.33 : Spectre Infrarouge du composé III

Le spectre de masse du composé III (figure V.34) obtenu en électrospray en mode négatif (ESI-SM), montre un ion pseudomoléculaire à m/z 461 $[M-H]^-$, correspondant à une masse moléculaire de 462 u.m.a. et à une formule brute de $C_{21}H_{18}O_{12}$, la masse molaire calculée est 462,3667 u.m.a.

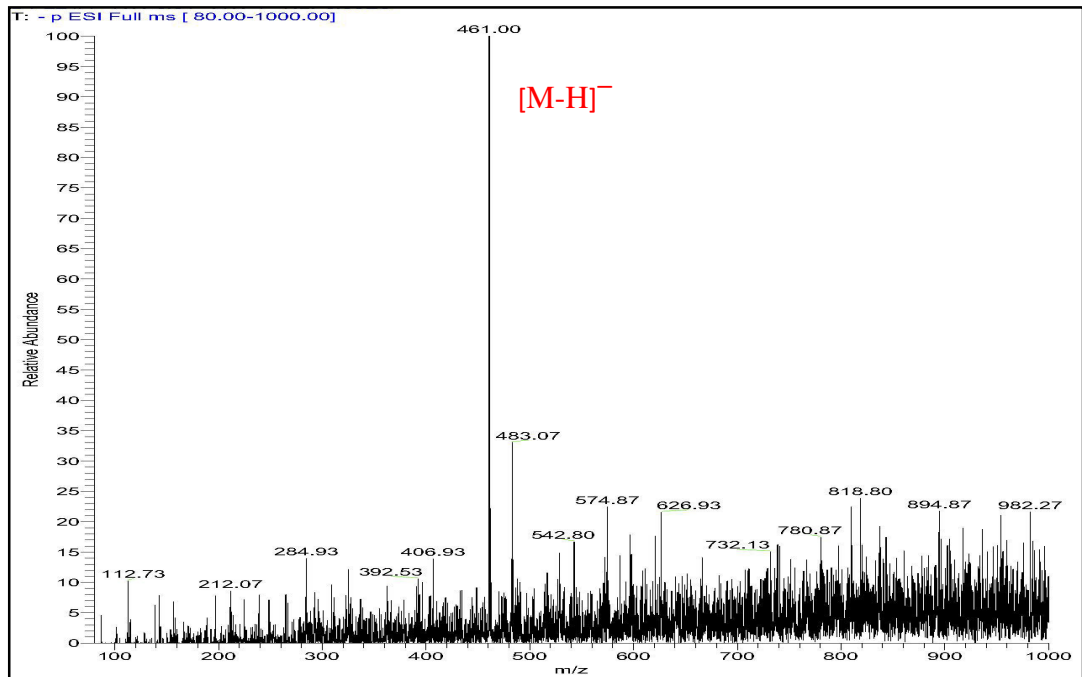


Figure V.34 : Spectre ESI-MS du composé III

La formule brute nous oriente vers une structure comportant 13 insaturations :

- ✓ 11 insaturations pour la génine du flavonol ou flavonol substitué en C-3
- ✓ 2 insaturations pour le sucre : 1 pour son cycle et l'autre pour le carboxyl dont il est attaché.

Une fragmentation selon la Retro-Diels Alder de l'ion majoritaire 461,0 en MS² conduit à la formation d'un ion fils à m/z 285,07 [M-H-176]⁻ caractéristique de la perte d'un acide glucuronique (figure V.35).

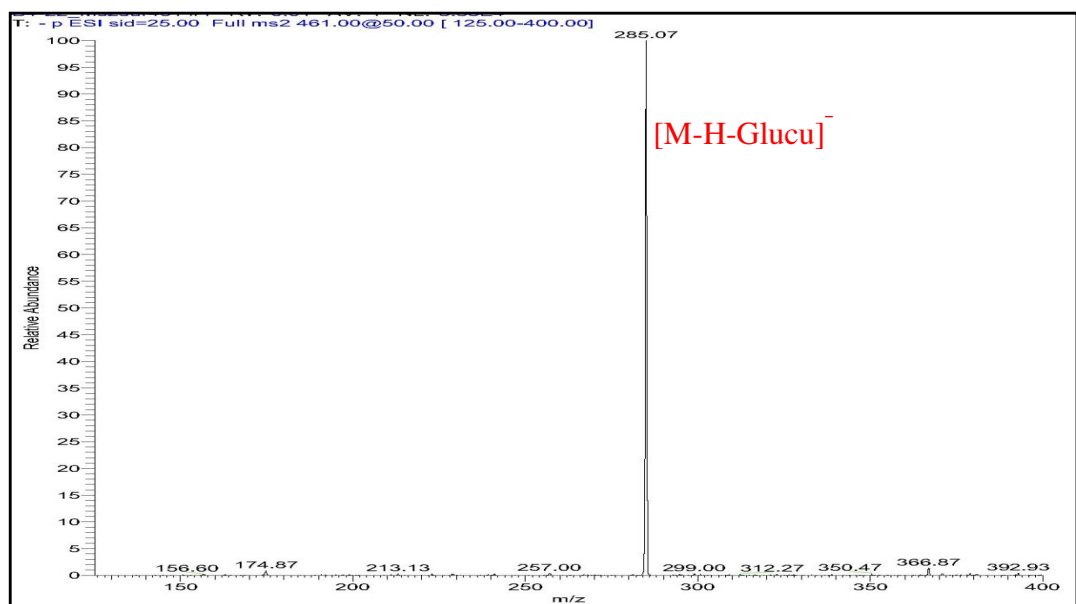


Figure V.35 : Spectre de masse MS² du composé III

La fragmentation de l'ion 285,07 en MS³ en mode négatif (figure V.36) conduit aux ions à m/z 256,87 [M-H-Glucu-CO]⁻, 240,93 [M-H-Glucu-CO₂]⁻.

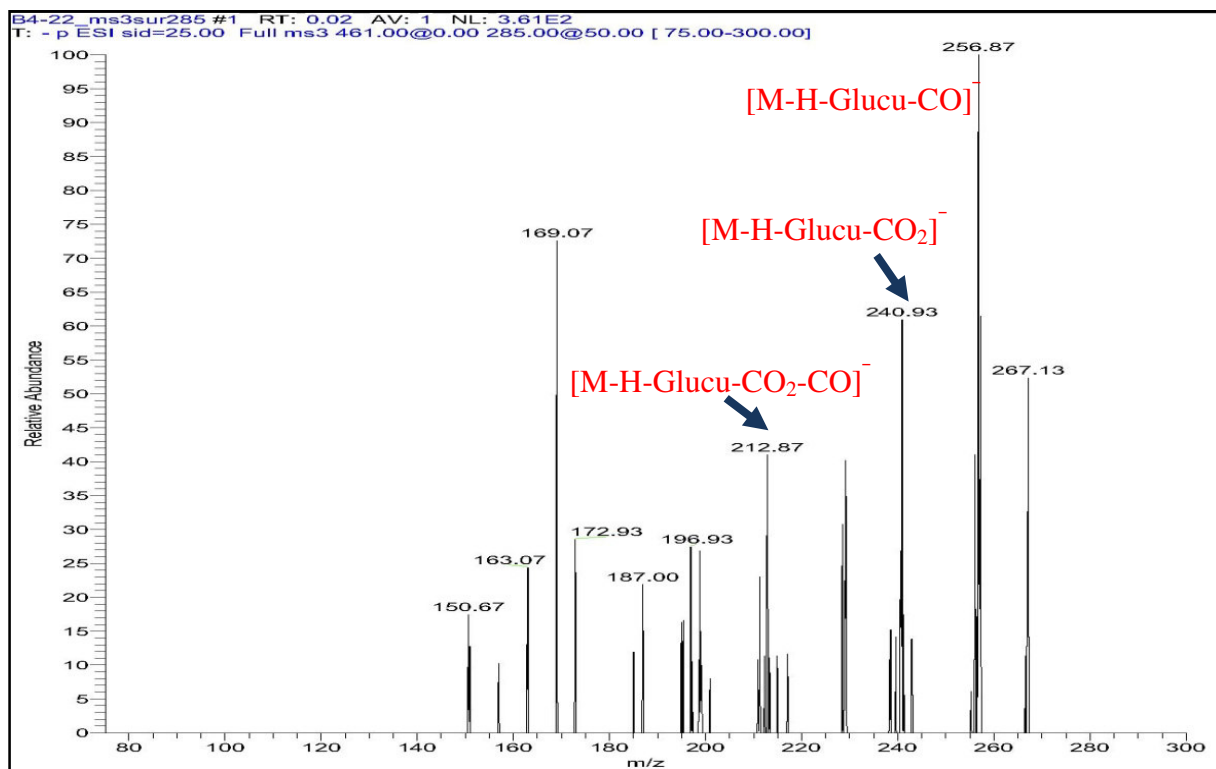


Figure V.36 : Spectre de masse MS³ du composé III

Toutes les fragmentations en mode négatif pour le composé III sont illustrées au tableau V-5.

Tableau V-5 : Les ions m/z observés pour le composé III en mode négatif

Ions fragments	Ions m/z observés	Intensités relatives	Specters
[M-H] ⁻	461	100	MS
[M-H-Glucu] ⁻	285	100	MS ²
[M-H-Glucu-CO] ⁻	257	100	MS ³
[M-H-Glucu-CO ₂] ⁻	241	51	MS ³
[M-H-Glucu-CO ₂ -CO] ⁻	213	42	MS ³
[M-H-Glucu-118] ⁻	167	72	MS ³
^{1,3} A ⁻	151	17	MS ³

Ces résultats sont identiques à celle présentés dans la littérature (**Hevesi, 2009 ; Lhuillier, 2007**) [14, 21].

Malgré les avancées de la spectrométrie de masse au cours de ces dernières années, cette technique n'est pas suffisante pour l'identification des structures flavonoïdes mais elle est un préalable indispensable aux techniques de RMN mono et bidimensionnelles.

Pour confirmer la structure du composé **III**, une analyse RMN¹³C J-modulé (**figure V.37**) dans un mélange deutérée CD₃OD, D₂O (v/v **40/60**) a permis la présence de 21 carbones.

- ✓ 6 carbones engagés dans les fonctions alcools, trois d'entre eux d'hybridation sp² dans deux cycles aromatiques et les trois autres d'hybridation sp³ dans le sucre.
- ✓ 7 carbones quaternaires, 2 Carbones quaternaires engagés en fonction carbonyle
- ✓ 6 Carbones méthines (C-H) aromatiques engagés dans deux cycles aromatiques
- ✓ Les 2 carbones restants se trouvent dans un sucre

L'analyse de ce spectre nous a montré aussi la présence d'un seul sucre ce qui indique que le composé **III** est un flavonol monosubstitué. L'absence des signaux des groupes de méthoxyles dans le spectre RMN¹³C du composé **III** nous oriente vers la présence des groupements hydroxyles dans la génine du flavonol.

- ✓ D'après **Harbone** et al en 1988 (cf. **II.1.5. 1.**), le signal déblindé à δ_C 135,21 ppm attribué au carbone C-3, alors que les signaux apparaissent blindés à δ_C 157,75 ppm et à δ_C 176,06 ppm, ces signaux sont respectivement ceux des carbones C-2 et C-4. Les signaux précédents appartiennent au cycle C (**Harborne, 1994 ; Satak, 2007**) [24, 25].
- ✓ D'après **Niassy** et al en 2004, le signal déblindé observé pour le carbone C-3 et ceux blindés pour les carbones C-2 et C-4, laisse suggérer que C-3 est la position d'attachement du sucre à l'aglycone.
- ✓ L'apparition de deux signaux, l'un blindé à δ_C 100,00 ppm et l'autre déblindé à δ_C 95,42 ppm, selon l'étude précédente (cf. **V.3.4.1.**) en suggère que ces signaux sont respectivement C-6 et C-8 du cycle A.
- ✓ Les signaux observés à δ_C 132,19 ppm et à δ_C 116,17 ppm, suggère que ces carbones appartiennent au cycle B ainsi que le signal du carbonyle (δ_C 160,11 ppm).

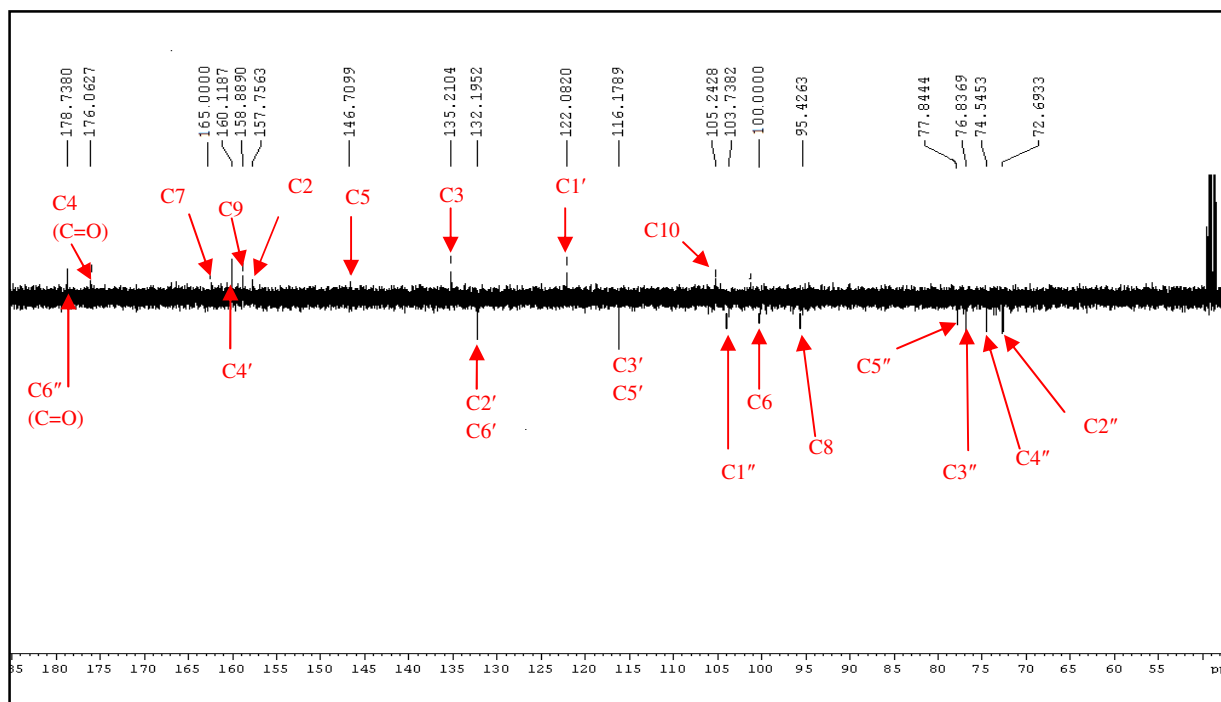


Figure V.37 : Spectre RMN¹³C J-modulé du composé III

Pour confirmer la structure du composé **III** une analyse spectroscopique par la RMN¹H (**figure V.38**) a été réalisée dans un mélange deutérée CD₃OD, D₂O (v/v 40/60) et la constante de couplage *J* en (Hz). Cette technique a permis de mettre en évidence la présence de six protons aromatiques d'hybridation sp² dans la région (6,15-7,85 ppm) la répartition de ces composé est la suivante:

- ✓ Deux doublets une à δ_H 6,85 (d, $J = 7,2$ Hz) et l'autre à δ_H 7,85 (d, $J = 7,1$ Hz), intégrant chacun pour 2 protons, confirmant la présence d'un système A₂X₂ sur le cycle B ce qui nous a affirmé la mono-substitution de ce cycle
- ✓ Deux broads singulets à δ_H 6,15 et à δ_H 6,29 sont attribués aux deux protons aromatiques du cycle A (C-6 et C-8), ce qui nous permet de confirmer la di-substitution du cycle A. Souvent la substitution de ce cycle est en C-5 et C-7.
- ✓ Un signal des hydroxyles aromatiques à δ_H 8,05.
- ✓ Un broad signal à δ_H 5,00 (br s) caractéristique d'un proton anomérique d'un sucre (**Mabry, 1970 ; tatsis, 2007 ; Wang, 2008**) [11, 19, 26].
- ✓ Les signaux sous forme de multiplets (m) à 3,46 ppm ; 3,57 ppm et à 3,60 ppm sont attribués aux quatre protons de la partie sucre.

Ces données confirment que la génine est un kaempferol ou une molécule voisine.

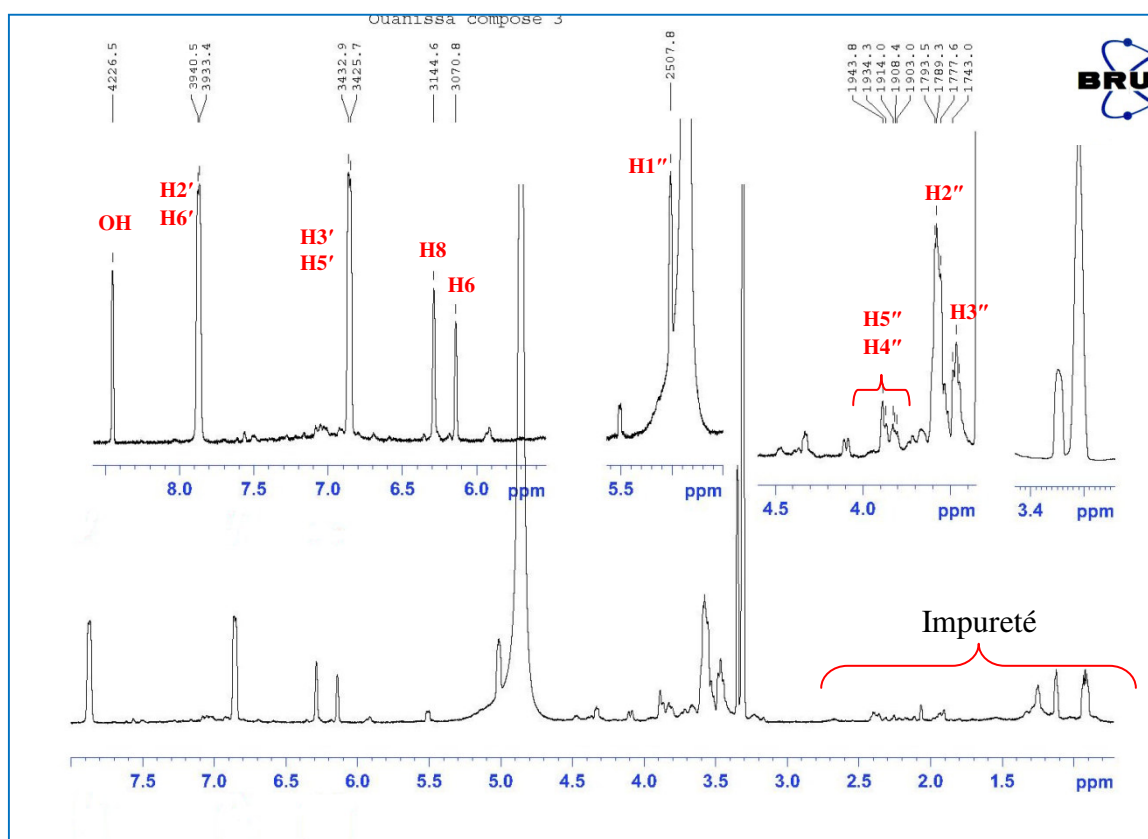


Figure V.38 : Spectre RMN¹H du composé III

Les positions des protons sont déterminées à partir du spectre COSY du couplage proton-proton (figure V.39).

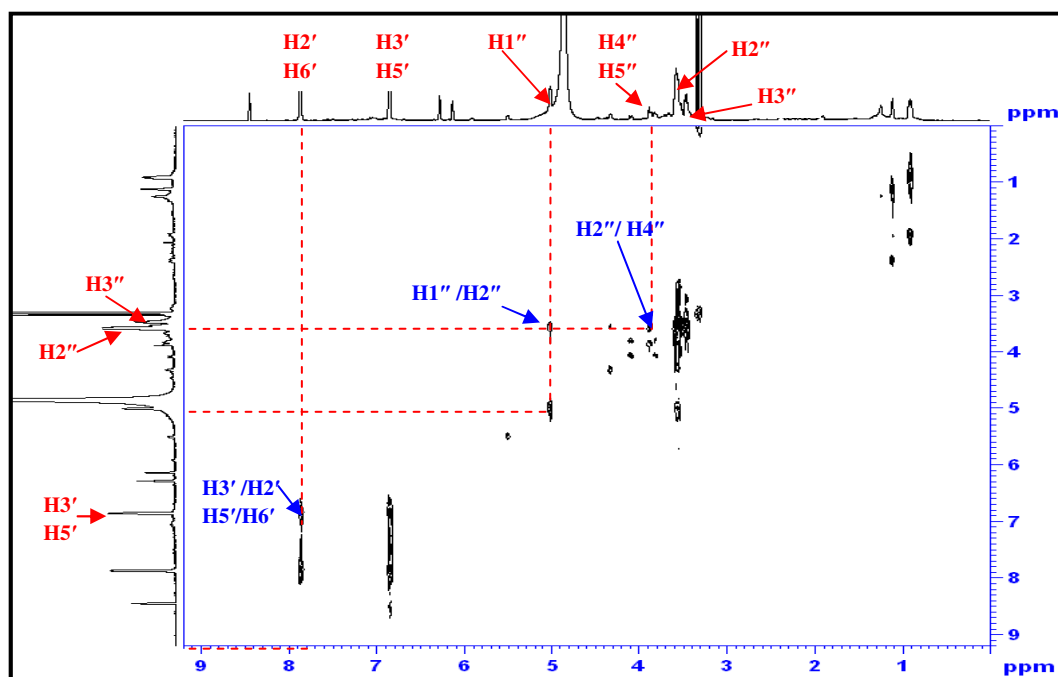


Figure V.39 : Spectre COSY-¹H-¹H du composé III

Le spectre de corrélation hétéronucléaire HSQC a conduit à des connexions géminales RMN- ^{13}C - ^1H du composé **III**. Il a montré des corrélations des protons aromatiques avec leurs carbones ainsi que les protons du sucre avec leurs carbones (**figure V.40**).

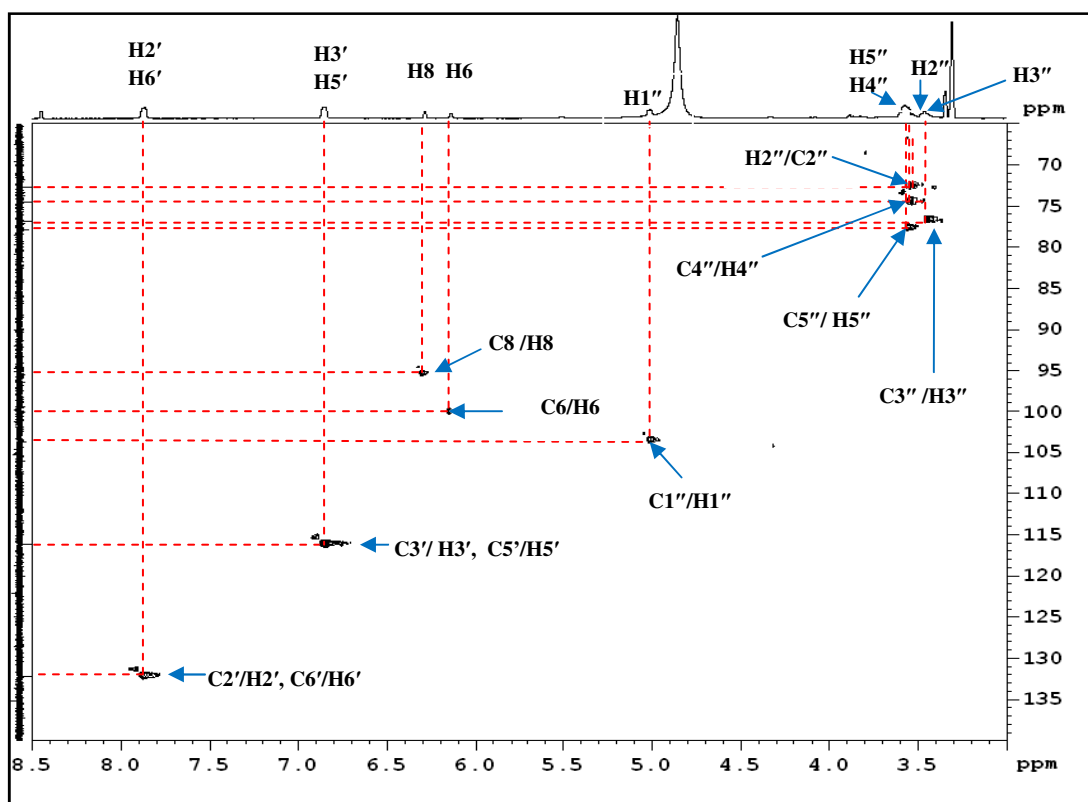


Figure V.40: Spectre HSQC du composé III

Une corrélation hétéronucléaire à longue distance HMBC (**figure V.41, V.42**) a permis de déterminer la position de l'attache de sucre d'une part et les positions des substitutions de la molécule d'une autre part. Le signal à $\delta_{\text{H}} = 5,00$ ppm ($\text{H1}''$) de proton anomérique du sucre corrèle avec C-3 de l'aglycone, indiquant que le carbone C-3 de l'aglycone est la position de liaison du sucre.

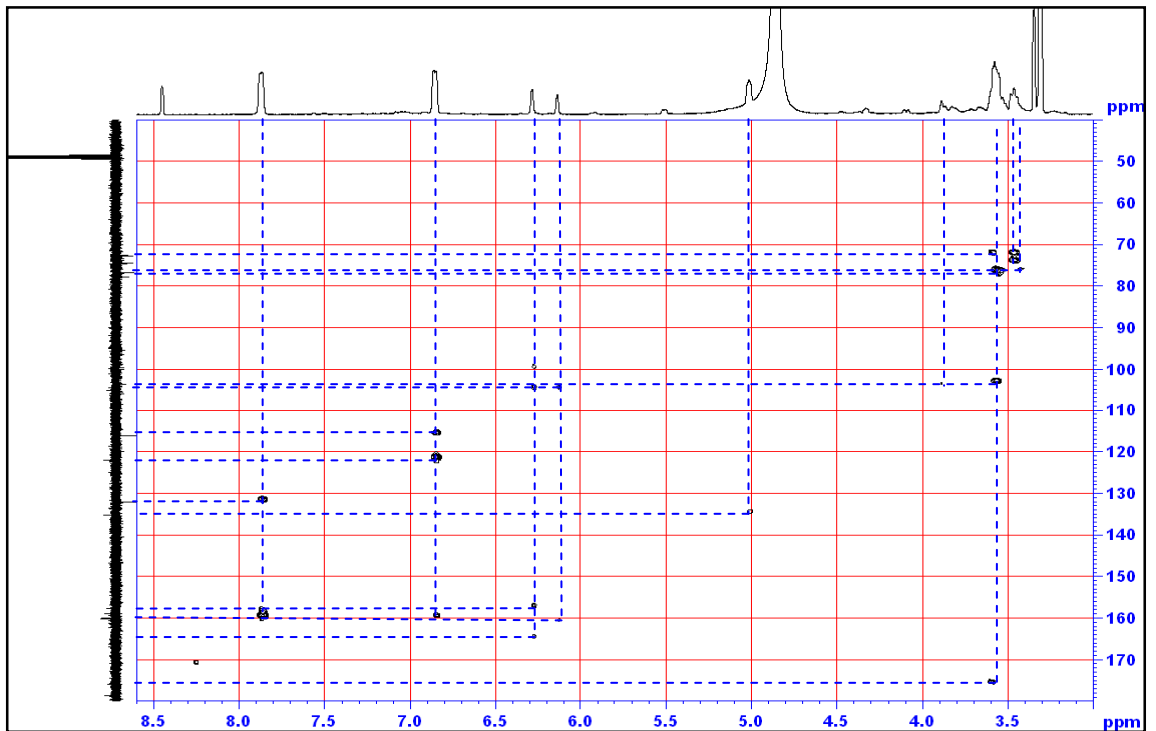


Figure V.41 : Spectre HMBC du composé III

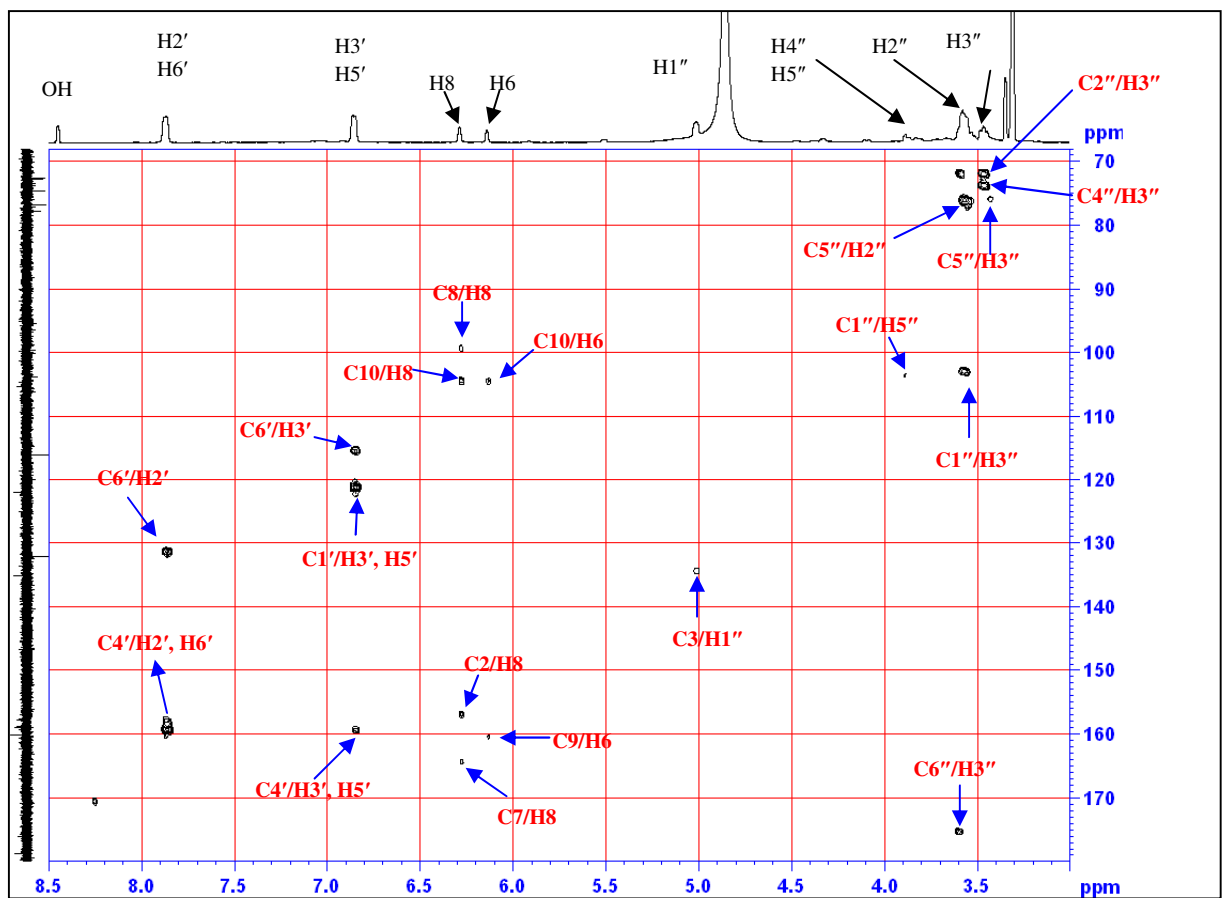


Figure V.42 : Spectre HMBC étalé de 3 ppm à 8.5 ppm du composé III

Le schéma suivant (**figure V.43**) présente les corrélations à longue distance HMBC

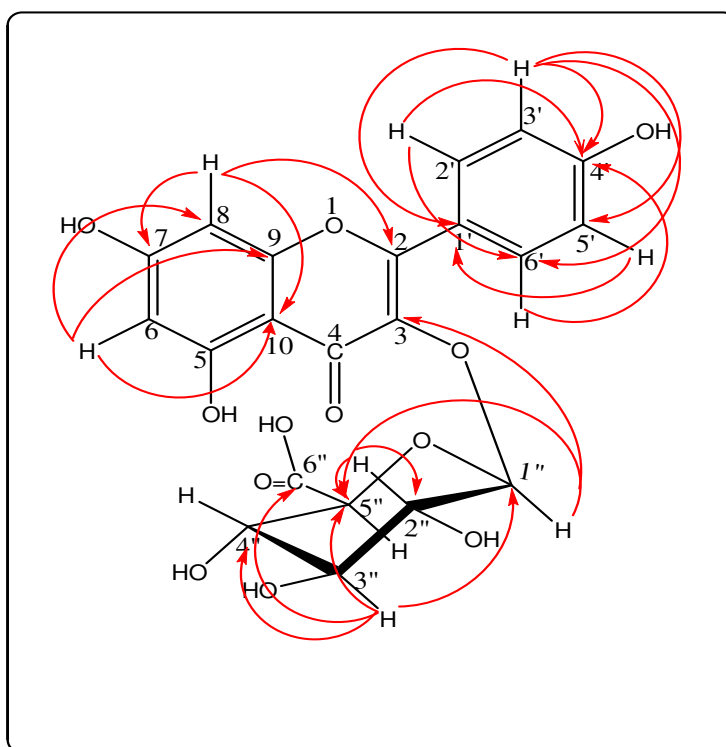


Figure V.43 : Schéma des corrélations HMBC du composé III

L'étude des spectres RMN¹H, RMN¹³C-J modulé, RMN¹H-¹H-COSY, HMBC et la HSQC confirme que le composé **III** est un kaempferol-3O-β-D-glucuronide.

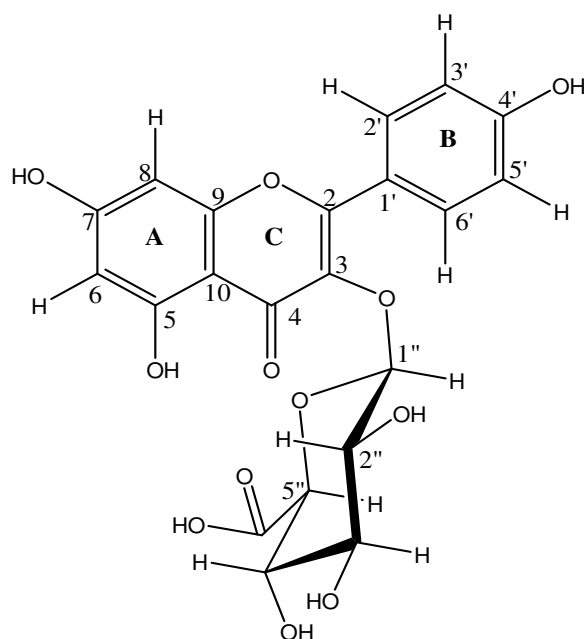


Figure V.44 : Structure du composé III

Ce qui justifie l'identification précédente du composé **III**, les chemins de fragmentations en ESI en mode négatif ayant permis d'obtenir les principaux fragments en spectrométrie de masse (SM, SM² et SM³) sont présentés dans la figure V.45.

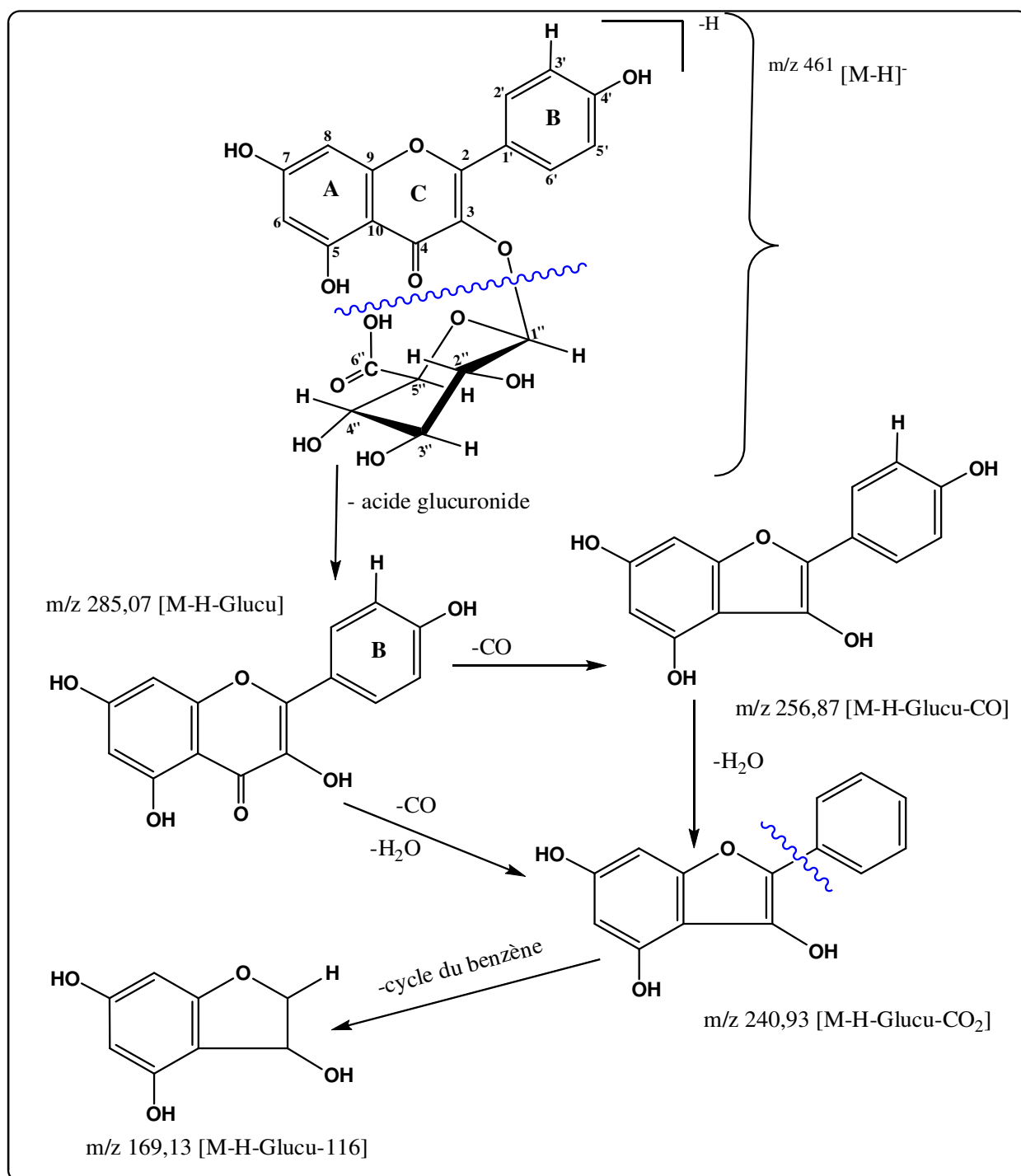


Figure V.45 : Schéma des fragmentations en (MS, MS², MS³) du composé **III** (Lhuillier, A., 2007) [16]

Les attributions de tous les signaux des spectres : proton, carbone, les corrélations HMBC, HSQC et COSY du composé **III** sont présentés dans le tableau V-6.

Partie II -Résultats et discussions

Tableau V-6 : Données RMN¹H, RMN¹³C, HMBC et HSQC du composé (III) dans un mélange deutérée CD₃OD, D₂O (v/v 40/60) et la constante de couplage *J* en (Hz).

Kaempferol -3O-β-D-glucuronide (composé III)					
position	δ _H (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ _C (ppm)	HMBC (H vers C)	HSQC (H vers C)	H-H COSY
2	-	157,75	-		
3	-	135,21	-		
4	-	176,06	-		
5	-	146,70	-		
6	6,15 br s	100,00	C9, C10	H6/C6	
7	-	165,00	-		
8	6,29 br s	95,42	C2, C6, C7, C10	H8/C8	
9	-	158,88	-		
10	-	105,24	-		
1'	-	122,08	-		
2'	7,85 br d (7,1)	132,19	C4', C6'	H2'/C2'	H3'
3'	6,85 br d (7,2)	116,17	C1', C4', C6'	H3'/C3'	
4'	-	160,11	-		
5'	6,85 br d (7,2)	116,17	C1', C4'	H5'/C5'	
6'	7,85 br d (7,1)	132,19	C4'	H6'/C6'	H5'
1''	5,00 br s	103,73	C3	H1''/C1''	H2''
2''	3,57 m	72,69a	C1'', C2''	H2''/C2''	H4''
3''	3,46 m	76,83a	C2'', C4'', C5'', C1'', C6''	H3''/C3''	
4''	3,6 m	74,54	-	H4''/C4''	
5''	3,6 m	77,84a	-	H5''/C5''	
6''	-	178,73	-		

V.3.5. Identification des produits isolés de la deuxième extraction

V.3.5.1. Elucidation structurale du composé IV (Cristaux)

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle des graines d'*Euphorbia guyoniana* Boissier et Reuter nous avons procédé des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice (Silicagel), en utilisant plusieurs réactifs universels et spécifiques. Cette étude nous a montré la richesse de l'extrait des graines obtenu par extraction solide-liquide. Les conditions de cette extraction sont décrites à la partie expérimentale (cf. VI.3.2 (b)).

L'extrait d'acétate d'éthyle des graines d'*E. g.* (ACG) (572 mg) a subi un premier fractionnement par colonne chromatographique (cf. VI.6.1), en utilisant des gradients composé de trois solvants (dichlorométhane, acétate d'éthyle, méthanol), les systèmes et les proportions sont décrits à la partie expérimentale (cf. VI.6.2.). Les fractions résultantes de cette colonne sont regroupées dans le tableau V-7.

Tableau V-7 : Les fractions de la première colonne

Les fractions	Nombres fractions	Poids (mg)
F1	F1	20
F2	F2	1
F3	F3	17
F4	F4	27,7
F5	F5	81
<u>F6-f7</u>	<u>F6</u>	<u>75,4</u>
F8	<u>F7</u>	<u>8,5</u>
F9	<u>F8</u>	<u>31,4</u>
F10-12	<u>F9</u>	<u>52,7</u>
F13-14	<u>F10</u>	<u>22,5</u>
F15	F11	3,7
F16-17	F12	6,6
F18-19	F13	7,7

Partie II -Résultats et discussions

L'analyse par chromatographique sur couche mince des différents fractions obtenus a permis d'observer que les fractions **F6, F7, F8, F9** et **F10** ne sont pas purs mais elles possèdent un produit majoritaire sous forme d'une tache verte fluorescente (**Wagner, 2001**) [1]. Le Rapport de front (**Rf**) est de l'ordre de **0,36** dans le système d'élution et le réactif de révélation sont les suivants:

Toluène/Formiate d'éthyle/Acide formique (v/v/v : 5/4/1)

- Révélateur : le réactif de NEU

Les fractions précédentes sont rassemblées pour capturer le produit majoritaire. **173,6** mg des fractions rassemblés (**ACG-F7**) a été fractionné par une deuxième colonne de gel de silice selon les conditions décrites à la partie expérimentale (*cf.* **VI.6.1.**).

Les résultats obtenus de cette colonne sont illustrés dans le tableau **V-8** suivant :

Tableau V-8 : Les fractions de la deuxième colonne

Les fractions	Nombres fractions	Poids (mg)
F1-22	N1	4,8
F 23-27	N2	1,8
F28-41	N3 (ACGC2)	22,8
F42	N4	1,7
F43-54	N5	32,9
F55-56	N6	3,7
F57-60	N7	12,7
F59-61-63	N8	Des traces
F64-90	N9	39,7

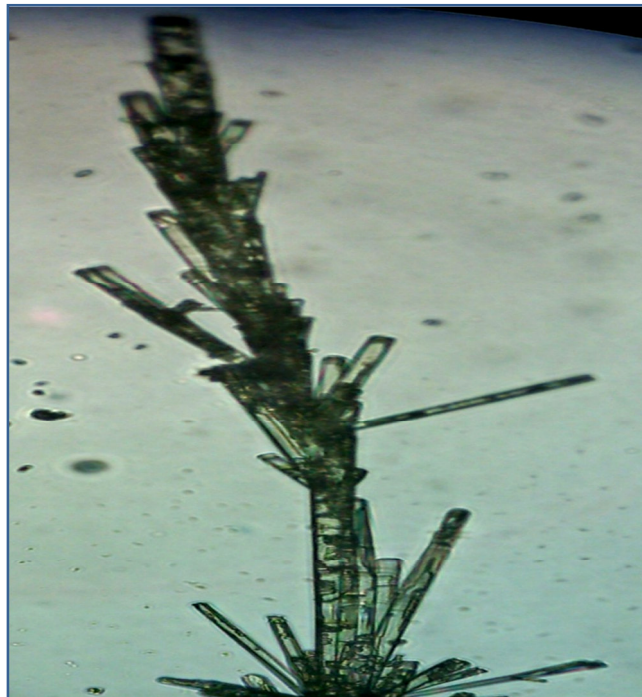
La séparation précédente est suivie par chromatographie sur couche mince qui nous a permis de sélectionner neuf fractions et nous a permis aussi d'obtenir une fraction (**ACGC2**) pure sous forme des cristaux incolores en longues aiguilles (le composé **IV**) (**figure V.46**).



-a- Photos des cristaux



-b- Photos des cristaux



-c- Photos des cristaux

Figure V.46 : Photos (a, b et c) de quelques cristaux du produit isolés de l'extrait acétate d'éthyle des graines

La purification des cristaux (le composé **IV**) est réalisé par plusieurs solvants organiques apolaires et moins polaires, mais le solvant qui a donné une millieure purification est le dichlorométhane. Les cristaux ensuite sont dissouts dans le méthanol après une heure de sonication nous avons pu faire une CCM avec différents révélateurs. a titre d'exemple le

chlorure de fer **III** (FeCl_3), ce dernier montre une tache bleu-noir justifié la présence d'une coumarine (**Wagner, 2001**) [1].

La spectrométrie de masse peut apporter une grande contribution à l'identification structurale des composés isolés. Pour connaître la masse moléculaire, et la formule brute du composé **IV**, une analyse de spectrométrie de masse par électrospray (ESI-MS) a été effectuée. Le spectre ainsi obtenu (**figure V.47**) montre un ion pseudo moléculaire à m/z 177 $[\text{M-H}]^-$, correspond à une masse moléculaire de 178 u.m.a. et à une formule brute $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_4$. La masse moléculaire calculée de ce composé est 178,144 u.m.a.

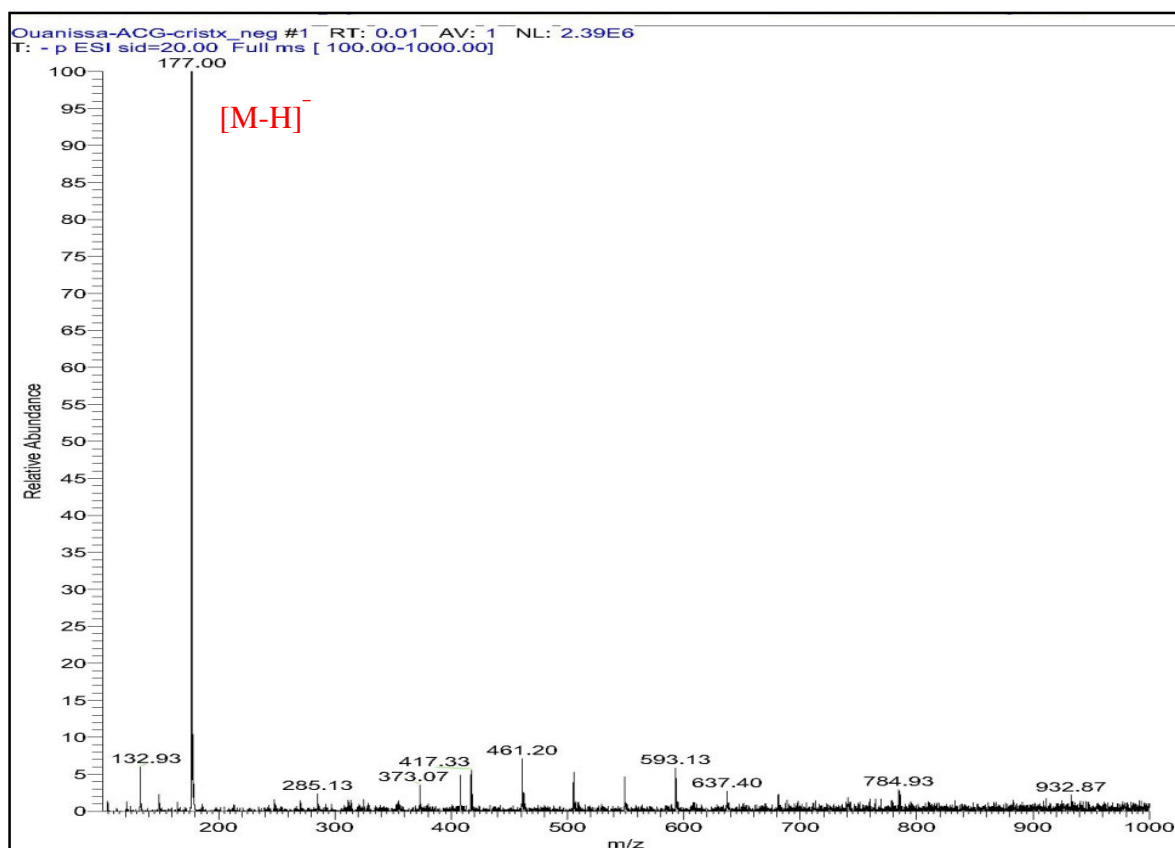


Figure V.47 : Spectre de masse du composé IV

Cette formule brute nous oriente vers une structure comportant 7 insaturations :

- ✓ 4 insaturations pour un cycle aromatique
- ✓ 3 insaturations pour le deuxième cycle ce qui justifie la présence d'un hétérocycle.

Pour avoir des informations sur le composé, une fragmentation a été réalisée sur l'ion pseudo moléculaire 177,00 en MS^2 a conduit à l'ion fils à m/z 132,93 $[\text{M-H}-44]^-$, caractéristique d'une perte d'un acide dioxyde de carbone (**figure V.48**).

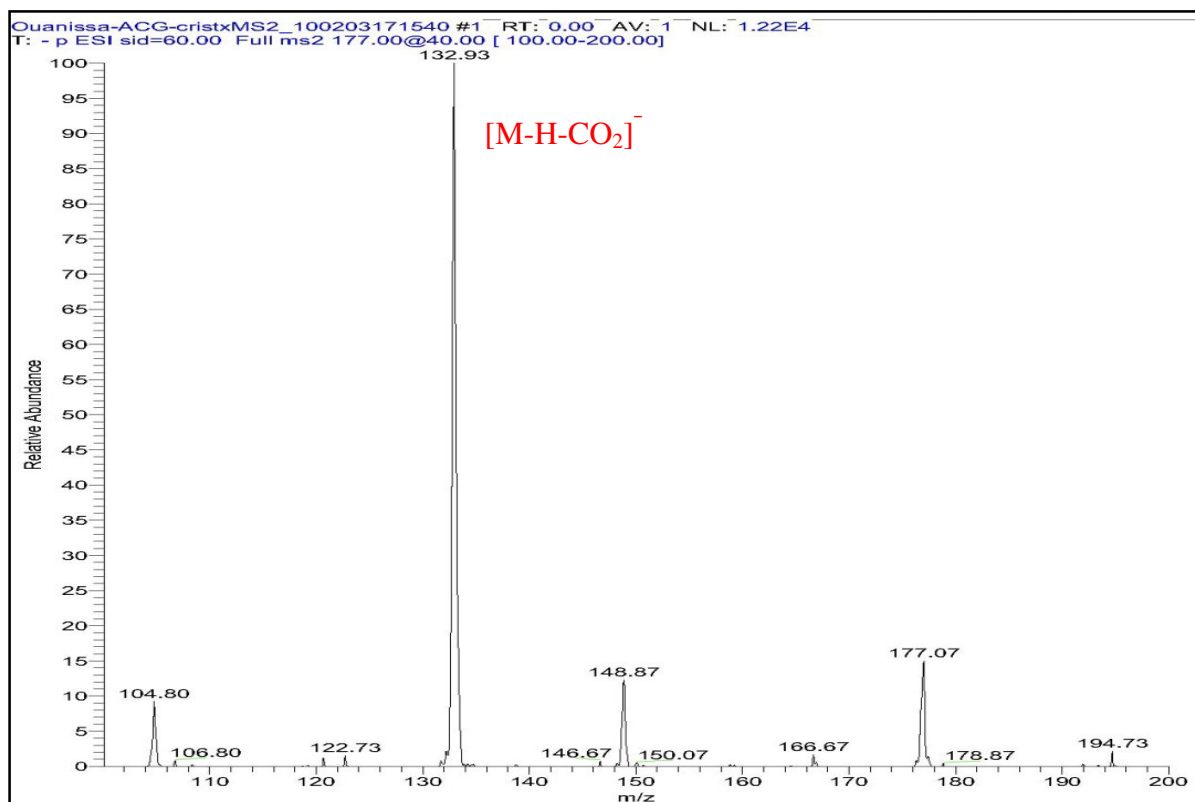


Figure V.48 : Spectre de masse MS² du composé IV

L'analyse du spectre RMN-¹³C J-modulé (**figure V.49**) dans le méthanol deutérée a fourni plus d'indication. Ce spectre montre les signaux suivants :

- Un carbonyle du lactone à 164,30 ppm.
- Quatre atomes de carbones d'une hybridation sp² à 112,46 ppm, 146,08 ppm, 103,50 ppm et 112,98 ppm, correspond à des carbones aromatiques, suggère que ces signaux sont respectivement ceux des carbones C-3, C-4, C-5 et C-8.
- Deux carbones hydroxylées à 150,54 ppm et 152,04 ppm, laisse suggère que ces signaux sont respectivement les carbones C-6 et C-7.
- Deux atomes de carbones quaternaires à 144,58 ppm et à 112,77 ppm, suggérant que ces signaux sont respectivement C-9 et C-10.

. Ces données spectrales conformes aux données de la littérature (**Munoz-Cendales, 2005**) [27], laissant suggèrent qu'il s'agit d'une structure coumarinique simple.

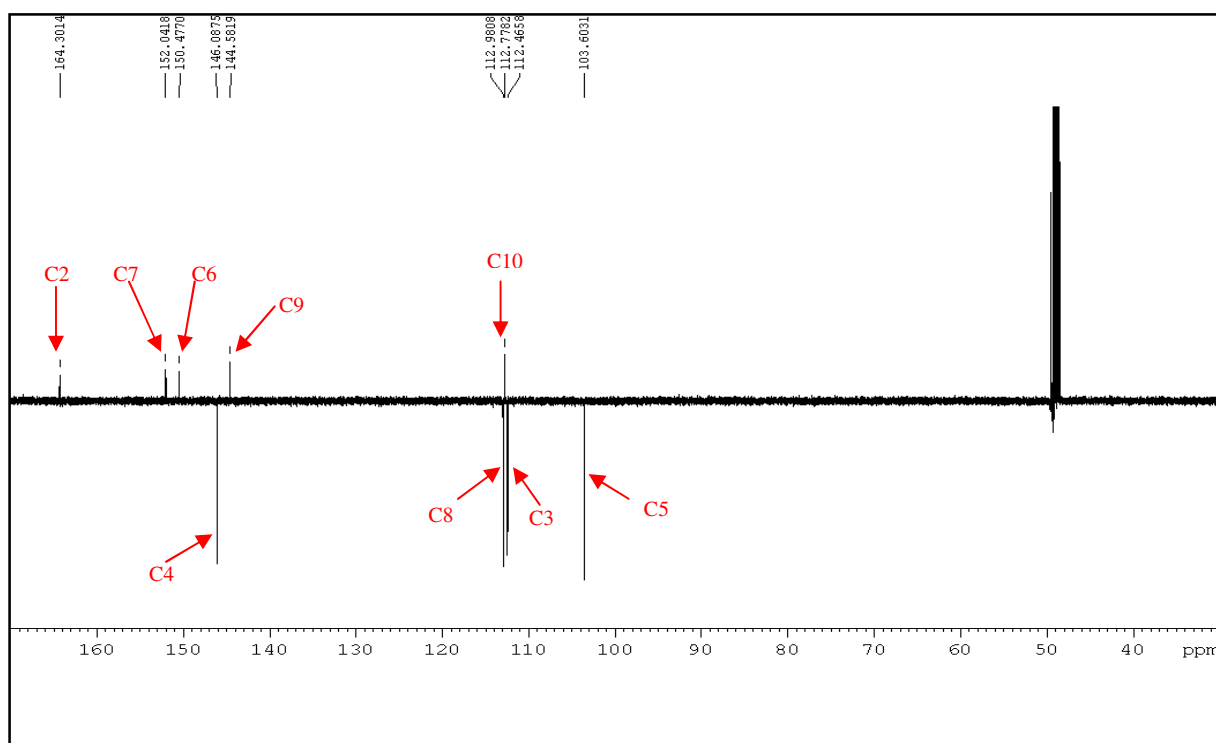


Figure V.49: Spectre de carbone J –modulée du composé IV

Pour plus d'information sur la structure de composé **IV** une analyse par la RMN¹H (**figure V.50**) dans le CD₃OD nous a permis de détecter la présence de quatre protons aromatiques que sont les suivants :

- Un système AB d'un cycle aromatique en position *ortho* à 6,18 ppm et à 7,78 ppm ($J = 9,35$ Hz) caractéristique des protons de H-3 et H-4.
- Deux singulets dans la zone des protons aromatiques à 6,75 ppm et à 6,93 ppm, d'une intégration un proton pour chacun. La position *para* de ces noyaux repose sur le fait qu'ils ne présentent aucun couplage décelable, caractéristique des protons H-5 et H-8.
- Le spectre ne montre aucune autre substitution orientée vers une structure dihydroxylée en position C-6 et C-7.

Ces signaux sont conformes aux données de la littérature (**El-Bassuony1, 2006 ; Guerraf, 2006**) [28, 29].

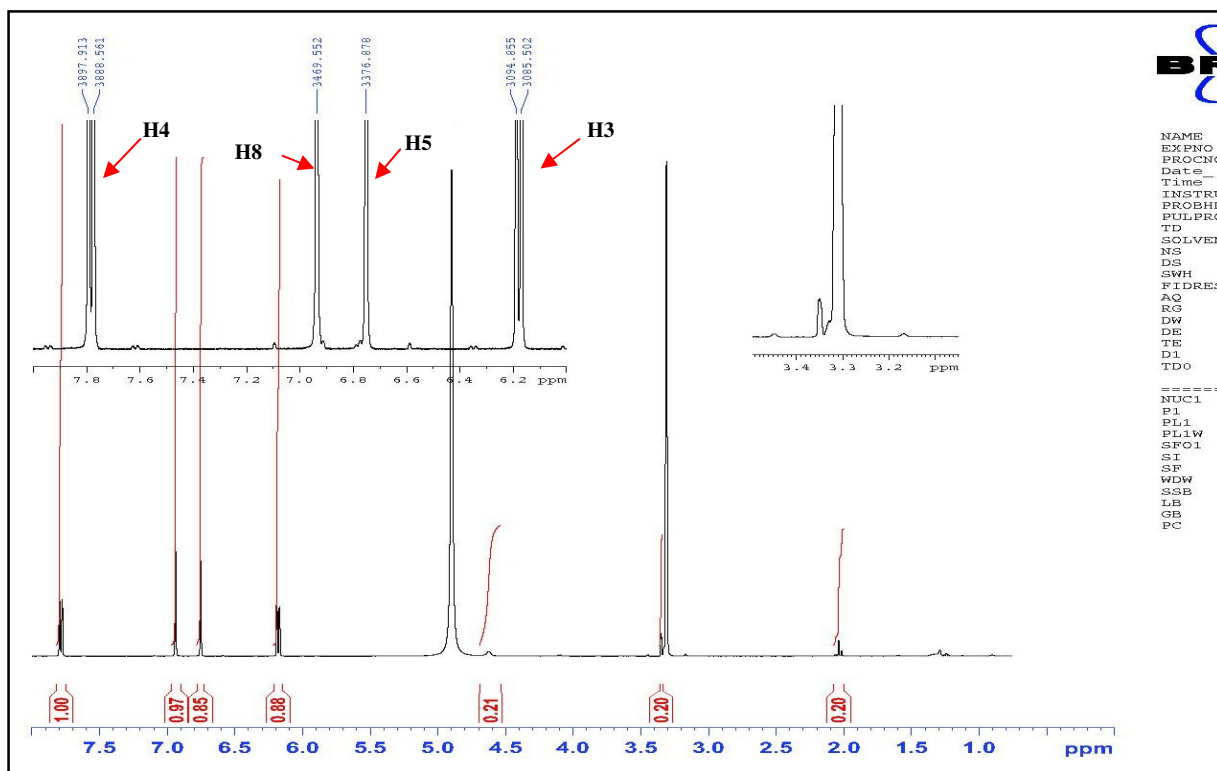
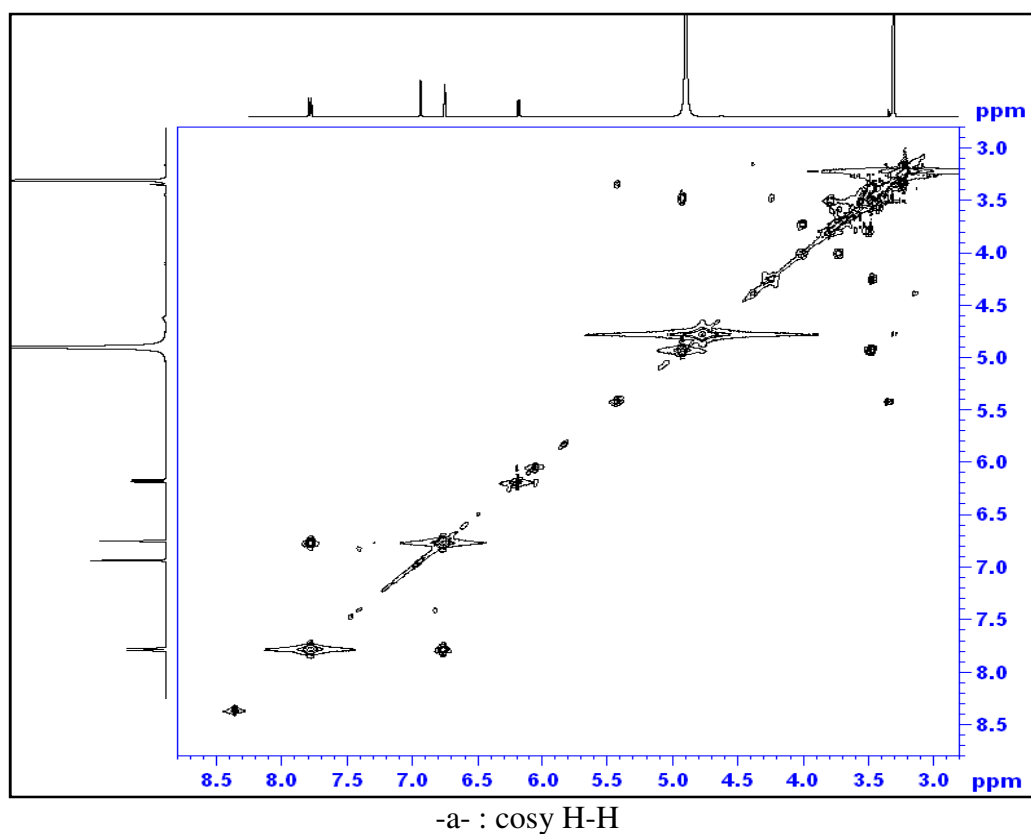
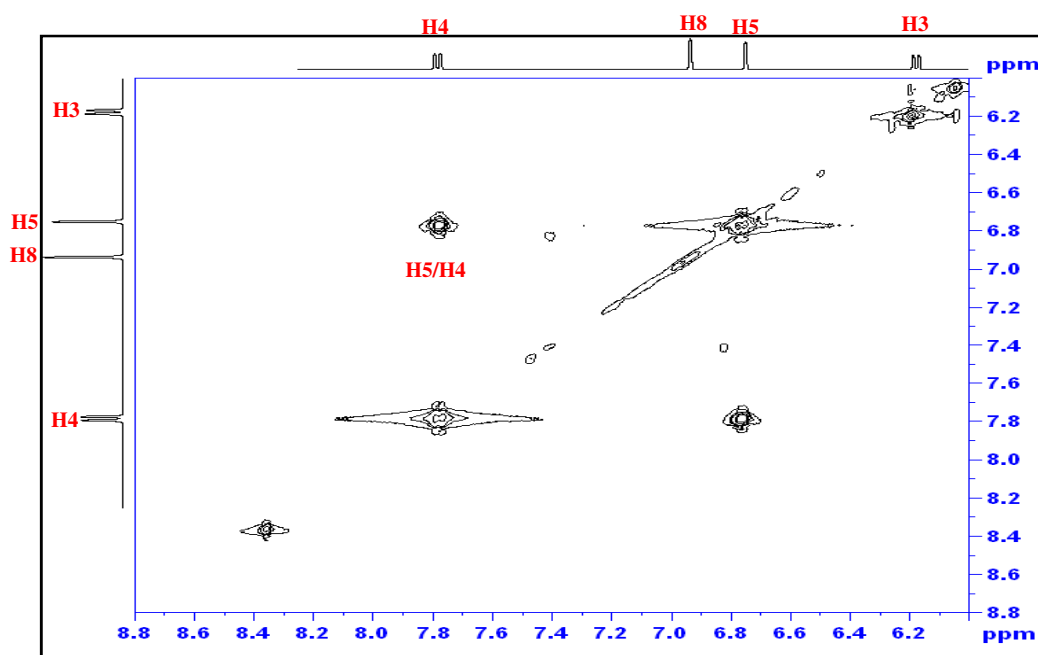


Figure 50 : Spectre de RMN¹H du composé IV

L'expérience COSY H-H (Correlation Spectroscopy) révèle le couplage attendu entre le proton H-4 résonant à 7,78 ppm et le proton H-5 résonant à 6,75 ppm (figure V.51).

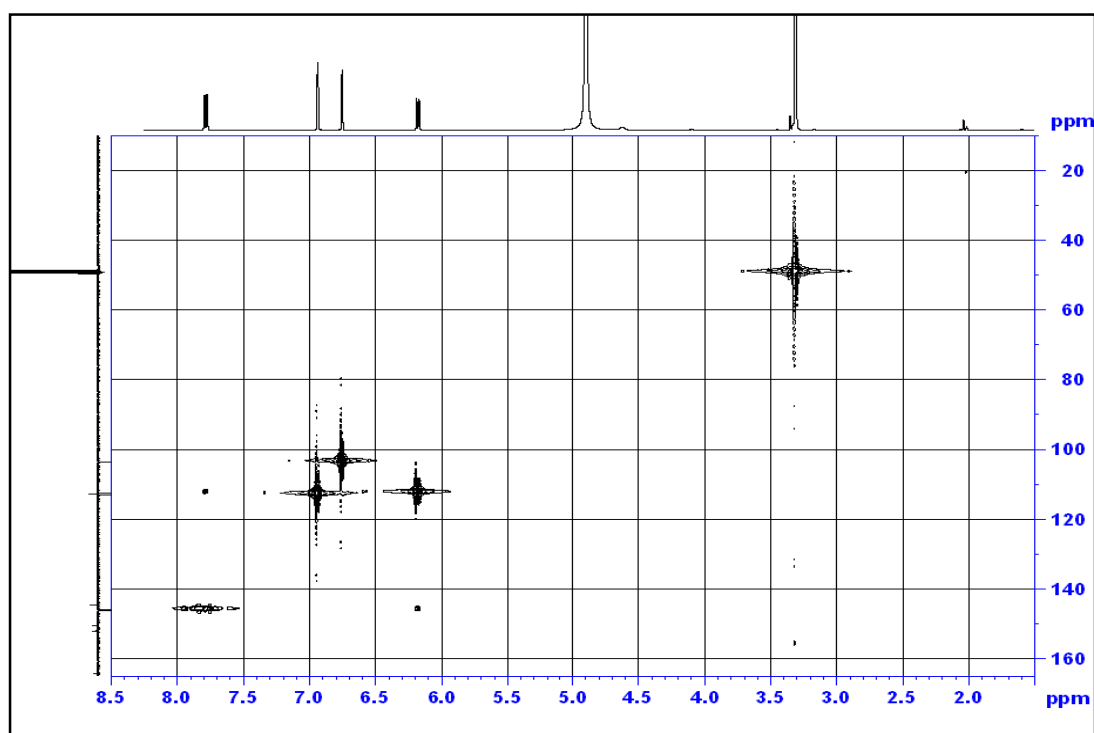




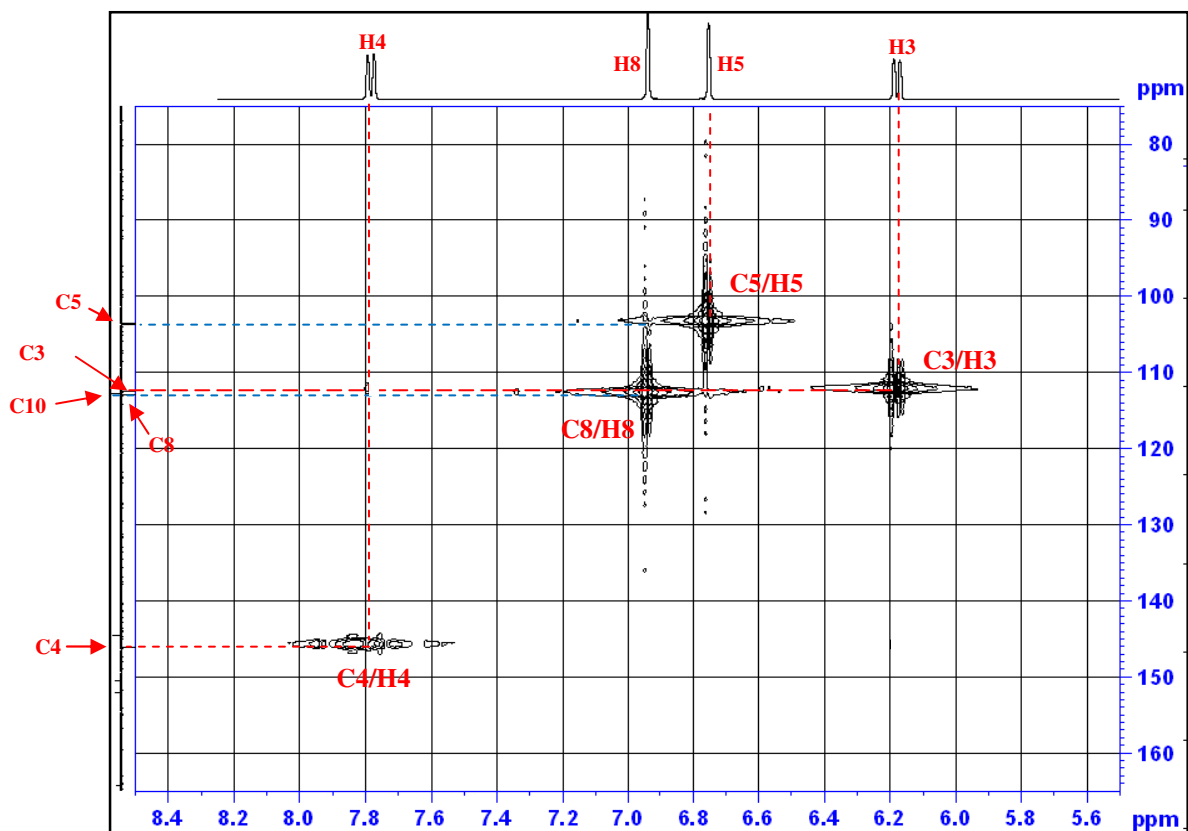
-b-: COSY ^1H - ^1H étalé

Figure V.51 (a, b): COSY ^1H - ^1H du composé IV

Une analyse du spectre de corrélations hétéronucléaires HSQC du composé IV a démontré des corrélations des protons et leurs carbones (figure V.52).



-a- : spectre HSQC



-b- : spectre HSQC étalé de 5,5 ppm à 8,5 ppm

Figure V.52 (a, b): Spectre HSQC du composé IV

Pour confirmer la structure proposée une analyse HMBC a été réalisée sur ce composé IV (figure V.53). Le spectre dans le méthanol deutérée (500 MHz) montre également des corrélations à deux, trois et quatre liaisons (2J , 3J et 4J)

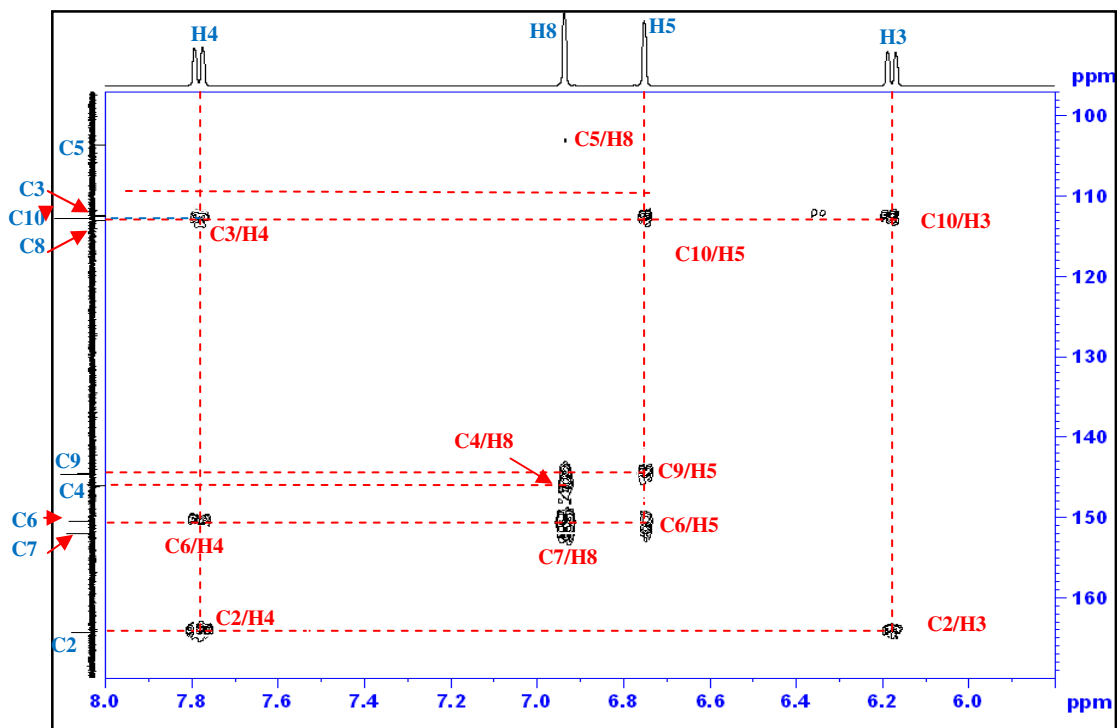


Figure V.53 : Spectre HMBC du composé IV

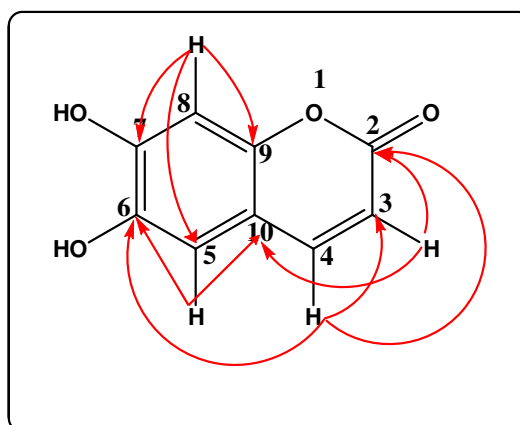


Figure V.54 : Schéma de la HMBC du composé IV

Pour justifier l'identification du composé IV qui porte nom esculetine, des fragmentations ayant permis d'obtenir les principaux fragments en spectroscopie de masse (SM^2) en ESI en mode négatif sont présentés dans la figure V.55.

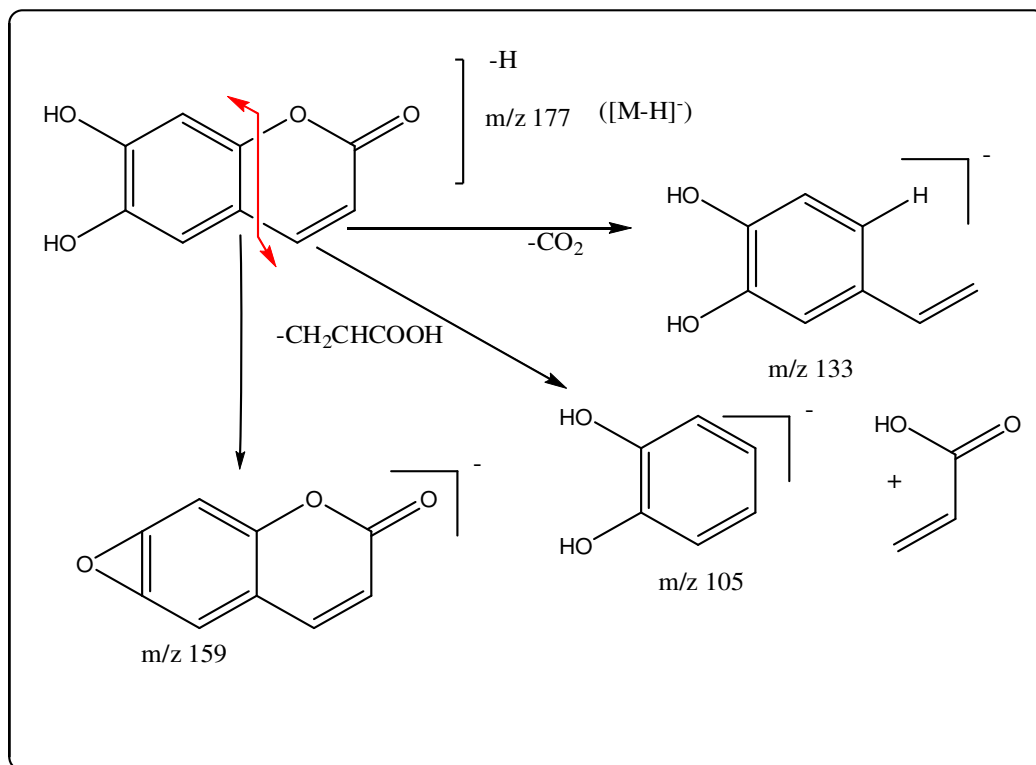


Figure V.55 : Schéma de principaux fragments du composé IV

L'étude des spectres RMN¹H, RMN¹³C-J modulé, RMN¹H-¹H-COSY, HMBC et la HSQC confirme que le composé **IV** est une coumarine simple (esculetine), sa structure sera la suivante (**figure V.56**).

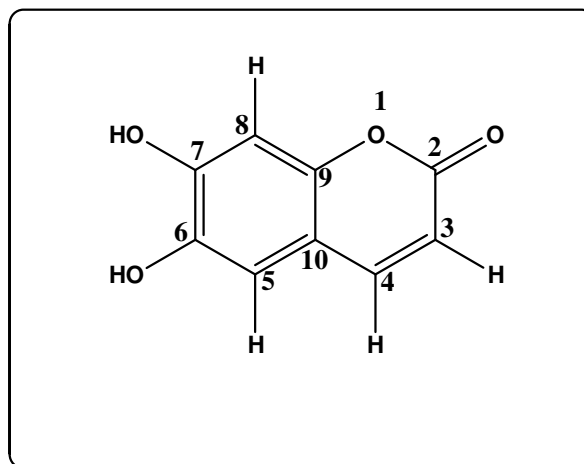


Figure V.56 : Structure de l'esculetine

Les attributions de tous les signaux des spectres du proton, de carbone et la corrélation HMBC et la HSQC du composé **IV** sont présentés dans le tableau **V-9**.

Tableau V-9: Données RMN¹H (125.75 MHz), RMN¹³C (500 MHz), HMBC et HSQC du composé IV dans le méthanol deutré CD₃OD et la constante de couplage *J* en (Hz).

Les cristaux = Escultine (composé IV)				
position	δ_H (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)	HMBC (H vers C)	HSQC (H vers C)
2	-	164,30	-	-
3	6,18 (d, <i>J</i> = 9,35)	112,46	C2, C10	C3
4	7,78 (d, <i>J</i> = 9,35)	146,08	C2, C3, C6	C4
5	6,75 s	103,60	C6, C9, C10	C5
6	-	150,54	-	-
7	-	152,04	-	-
8	6,93 s	112,98	C4, C5, C7	C8
9	-	144,58	-	-
10	-	112,77	-	-

V.4. Conclusion

L'étude réalisée sur les extraits acétate d'éthyle et butanolique issus de la partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. et Reut. ainsi que l'extrait acétate d'éthyle des graines d'*Euphorbia guyonina* Boiss. & Reut. nous a permis d'isoler leurs produits majoritaires et de les identifier. Il s'agit du tannin nommé 1, 2, 3-tri-galloyl- β -D-glucose (TGG) à partir du premier extrait, deux flavonols glycosilés, la quercétine-3*O*- β -D-glucuronide (Miquelianine) et le kaempferol-3*O*- β -D-glucuronide de l'extrait butanolique. Une coumarine simple l'esculetine a été isolée à partir de l'acétate d'éthyle des graines.

Références Bibliographiques

- 1 Wagner, H. and Blatt. S., *Plant drug analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2eme Edition, 2001.
- 2 Shibusawa, Y., Yamakawa, Y., Noji, R., Yanagida, A., Shindo, H., Ito, Y., *Three-phase solvent systems for comprehensive separation of a wide variety of compounds by high-speed counter-current chromatography*. Journal of Chromatography A, 2006. P: 119-125.
- 3 Shibusawa, Y., Fujiwara, T., Shindo, H., Ito, Y., *Purification of alcohol dehydrogenase from bovine liver crude extract by dye-ligand affinity counter-current chromatography*. Journal of Chromatography B, 2004. **799**. P: 239-244.
- 4 Renault, J.H. *La chromatographie de partage centrifuge (CPC) : étude théorique et application à l'isolement de substances naturelles*. Université de Reims Champagne Ardenne. Reims, 1997. P : 233.
- 5 Shin-Kyo, C., Ji-Ae, N., So-Young, J., Sang-In, K., Lee, H. J., Chung, T. H., Song, K.S., *A prolyl endopeptidase-inhibiting antioxidant from Phyllanthus ussurensis*. Arch. Pharm. Research, 2003. **26** (12). P: 1024-1028.
- 6 Giordanengo, T., Charpentier, J.-P., Boizot, N., Roussel, S., Roger, J.-M., Chaix, G., Mourey, N., Oakscan : *Procédé de mesure rapide et non destructif des polyphénols du bois de chêne de tonnellerie*. Revue Française d'œnologie, 2009. P: 10-15.
- 7 Owen, R. W., Haubner, R., Hull, W. E., Eeben, Spiegelhalder, B., Bartsch, H., Haber, B., *Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre*. Food and Chemical Toxicology, 2003. **41**. P: 1727-1738.
- 8 Filip, C., Magda, C., *Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoïdes*, 2004. **39**. P: 1-15.
- 9 Cheng, K.-W., Yang, R.-Y., Tsou, S. C. S., Lo, C. S. C., Ho, C.-T., Lee, T.-C., Wang, M., *Analysis of antioxidant activity and antioxidant constituents of Chinese toon*. Journal of Functional Foods, 2009. **1** (3). P: 253-259.
- 10 Simonyan, A.V., Hinkarenko, A.L.S., Oganessian, E.T., *Use of the cyanidine reaction in the analysis of flavonoids*. Journal of Khimiko-Farmatsevticheskii, 1972. **6** (10). P: 59-62.
- 11 Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag. Berlin, 1970.
- 12 Azimova, S. S., Vinogradova, V. T., *Natural compounds flavonoïdes plant sources , structures and properties*. N Y: Springer. New York, 2013.
- 13 Cuycknes, F., Claeys, M., *Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoïdes*. J. Mass spectrum. 2004. **39**. P: 1-15
- 14 Hevesi Tóth, B., *Polyphenol composition and antioxidant capacity of Epilobium species*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009. **49**. P: 26-31.
- 15 Dueñas, M., Mingo-Chornet, H., Pérez-Alonso, J. J., Paola-Naranjo R. D., González-Paramás, A. M., Santos-Buelga, C., *Preparation of quercetin glucuronides and characterization by HPLC AD-ESI/MS*. European Food Research and Technology, 2008. **227**. P: 1069-1076.
- 16 Lhuillier, A., *contribution a l'étude phytochimique de quatre plantes margaches: agauria salicifolia hook.f ex oliver, aguaria polyphylla baker(ericaceae), tambourissa trichophylla baker(monimiaceae) et embelia concinna baker (myrsinaceae)*. Thèse de doctorat. 2007. Institut de polytechnique. Toulouse, 200 Pages.

- 17 Niassy, B., Um, B. H., Lobstein, A., Wagner, B., Koné, M., Anton, R., *Flavonoïdes de Tephrosia deflexa et Tephrosia albifoliolis*. Comptes Rendus Chimie, 2004. **7** (10-11). P: 993-996.
- 18 Moon, J.-h., Tsushiba, T., Nakahara, K., Terao, J., *Identification of quercetin 3-o-b-D-Glucuronide as an antioxydative meabolite in rat plasma after oral administration of quercetin*. Free Radical Biology & Medicine, 2001. **30** (11). P: 1274-1285.
- 19 Tatsis, E. C., Boeren, S., Exarchou, V., Troganis, A. N., Vervoot, J., Gerothanassis, I. P., *Identification of the major constituents of Hybericum perforatum by LC/SPE/NMR and/or LC/MS*. Journal Photochemistry, 2007. **68**. P: 383-393.
- 20 Castillo-Munoz, N., Gomez-Alonso, S., Garcia-romero, E., Gomez, M. V., Velders, A. H., Hermosin-Gutiérrez, I., *Flavonol 3-O-Glucosides series of vitis vinifera Cv.petit Verdot Red Wine Grapes*. J. Agricultural and Food Chemistry, 2009. **57** (1). P: 209-219.
- 21 Lhuillier, A., Fabre, N., Moyano, F., Martins, N., Claparols, C., Fourasté, I., Moulis, C., *Comparison of flavonoid profiles of Agauria salicifolia (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2007. **1160** (1-2). P: 13-20.
- 22 Fabre, N., Rustan, I., Hoffman, E., Quetin-Leclercq, J., *Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry*. J.American Society for mass spectrometry, 2001. **12**. P: 707-715.
- 23 Harborne, J.B., *The flavonoïdes advances in research since 1986*. Ed. Chapman & Hall/CRC. London, 1994.
- 24 Wang, Q., De-Ran, X., Xin-Hong, S., Min-Jian, Q., *Flavones from Potentilla discolor Bunge*. J. Chim. Nat. Med. 2009. **7** (5). P: 361-364.
- 25 Victorio, C.P., C.L.S. Lage, and R.M. Kuster, *Flavonoid extraction from Alpinia zerumbet (Pers.) Burt et Smith leaves using different techniques and solvents*. EMC - Dentisterie, ELéctica Quimica, 2009. **34** (1). P: 19-34.
- 26 Satake, T., et al., *The Anti-thrombotic Active Constituents from Centella asiatica*. Biol. Pharm. Bull. 2007. **30** (5). P: 935-940.
- 27 Munoz-Cendales, D. R., Cuca-Suárez, L. E., Orozo P. C. I. *Isolation and structure of some secondary metabolites from solanum validinervium (Solanaceae) section geminade*. Actual Biol, 2005. **27** (1). P: 49-52.
- 28 El-Bassuony¹, A.A., Abdel-Hamid, N.M., *Antibacterial coumarins isolated from Launaea Resedifolia*. Chimie des matières premières végétales, 2006 (1) P: 65-68.
- 29 Gherraf, N., El-Bassuony, A. A., Zellagui, A., Rhouati, S., et al., *Isolation of coumarins and coumarin glucoside from Launaea resedifolia*.Asian Journal of Chemistry, 2006. **18** (3). P: 2348-2352.



Test-Antioxydant

V.5. Pouvoir antioxydant des produits isolés

Lors de la caractérisation du matériel utilisé au cours de nos recherches nous avons décidé d'évaluer l'activité antioxydante en utilisant le test de DPPH.

L'activité antioxydante peut être évaluée en suivant des réactants par plusieurs méthodes. Il se trouve que le DPPH peut être dosé par spectrophotométrie vers 515 nm. Dans ce but, on peut, utiliser un spectrophotomètre pour suivre la réaction du radical libre DPPH avec les antioxydants. L'appareillage et la méthode d'évaluation sont décrits à la partie expérimentale (VI.7.7). Comme il n'existe pas de mesure absolue de la capacité antioxydante d'un composé, les résultats sont souvent portés par rapport à un antioxydant de référence, comme l'acide gallique et la quercétine...etc.

Dans notre travail de recherche nous avons soumis simultanément au test de molécules standards suivantes :

- ✓ Acide gallique
- ✓ La quercétine

Nous allons voir par la suite les résultats du test effectuée.

Pour s'affranchir de l'influence de la concentration, dans la majorité des études, la réactivité est estimée par la concentration effective EC_{50} (ou l'inverse $1/EC_{50}$) de l'antioxydant, qui correspond à une réduction de 50% de l'activité (de l'absorbance) du DPPH^{*} dans le milieu réactionnel. La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son EC_{50} est petite. L'indice EC_{50} montre les concentrations de l'antioxydant qui sont nécessaires pour faire décroître la concentration initiale du DPPH^{*} à 50% (Sanchez-Moreno, 1999 ; Sanchez-Moreno, 2006) [1, 2].

Pour mieux caractériser le pouvoir anti-radicalaire, dans la deuxième approche des paramètres cinétiques sont introduits, tels que le temps T_{EC50} nécessaire pour atteindre l'équilibre, la constante de vitesse de la réaction ou le coefficient directeur de la courbe cinétique (Scherer, 2006) [3].

L'estimation de T_{EC50} permet d'introduire la classification suivante: $T_{EC50} < 5$ min (réaction rapide), 5-30 min (réaction intermédiaire) et $T_{EC50} > 30$ min (réaction lente) (Scherer, 2013 ; Brand-williams, 1995) [4, 5]. L'indice de l'efficacité anti-radicalaire ($EAR = 1/(EC_{50}.T_{EC50})$) relie la concentration du DPPH^{*} et le temps T_{EC50} dans l'essai avec la concentration effective EC_{50} de l'échantillon, et résulte dans un paramètre constant pour chaque solution ou extrait (Popovici, 2009) [6].

Le test antioxydant avec le DPPH pour les extraits et la majorité des composés isolés de la partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana* Boissier et Reutier généralement ont montré des résultats positifs intéressants au test anti-radicalaire avec le DPPH en utilisant la spectrophotométrie. Plus la présence des groupements hydroxyles importantes plus les composés qui contiennent ce type de groupements fonctionnels vont inhiber le DPPH. Ce fait peut expliquer la différence d'activité antioxydante des molécules

Le mode opératoire détaillé est décrit à la partie expérimentale (*cf.* VI.7.7) et les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau V-11 au-dessus. Les antioxydants testés ont été classés suivant la classification proposée par Sanchez et al. (Popovici, 2009) [6].

Tableau V-10 : Activités réductrices des composés isolés et leurs extraits sur le radical DPPH en solution. Mesures spectrophotométriques effectuées à 515 nm, 45 min après l'ajout du réactif.

Composés isolés et extraits	*EC 50 (µg/ml)	*EAR	L'activité anti-radicalaire
**Acide gallique	1,79	18,70 .10 ⁻³	Très élevée
1,2,6 tri -O-galloyl-β-D-glucose	3,08	10,82.10 ⁻³	Elevée
Fraction CPC-4 (4b)	3,37	9,90.10 ⁻³	Elevée
**Quercétine	4,77	6,99.10 ⁻³	Elevée
Quercétine -3O-β -D-glucuronide	8,33	4,00.10 ⁻³	Intermédiaire
L'extrait butanolique	11,73	2,84.10 ⁻³	Intermédiaire
Kaempferol-3O-β-D-glucuronide	22,25	1,50.10 ⁻³	Intermédiaire

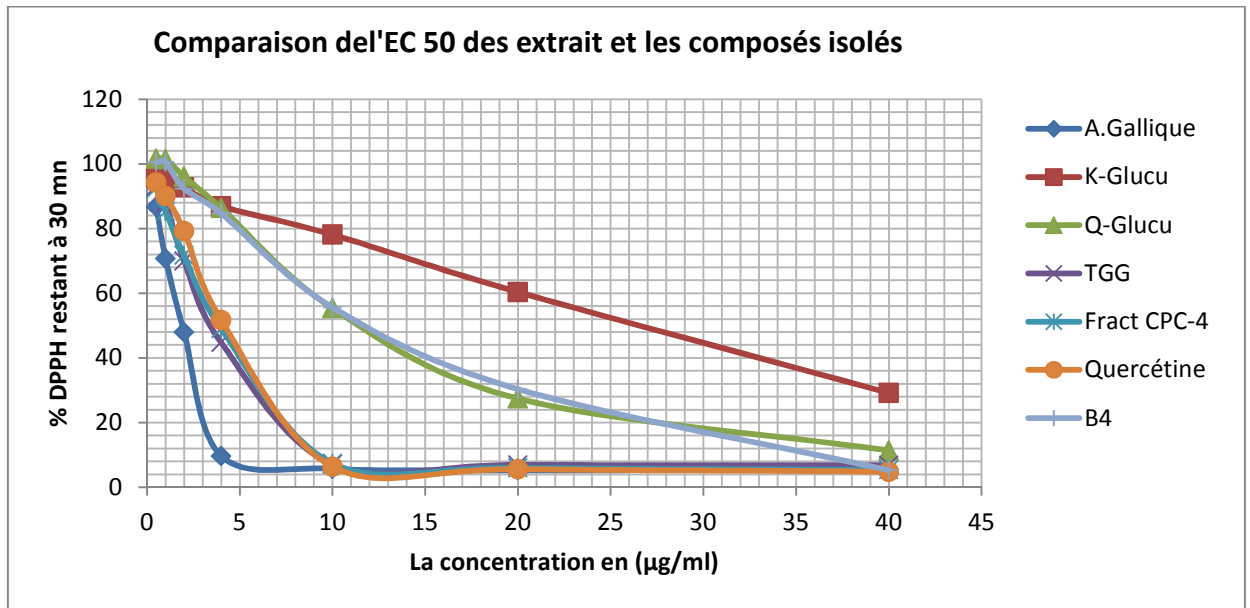
*Calculée selon la formule indiquée sous VI.7.7 à partir de la moyenne de 2 mesures

**le composé de référence est l'acide gallique et la quercétine comme témoin

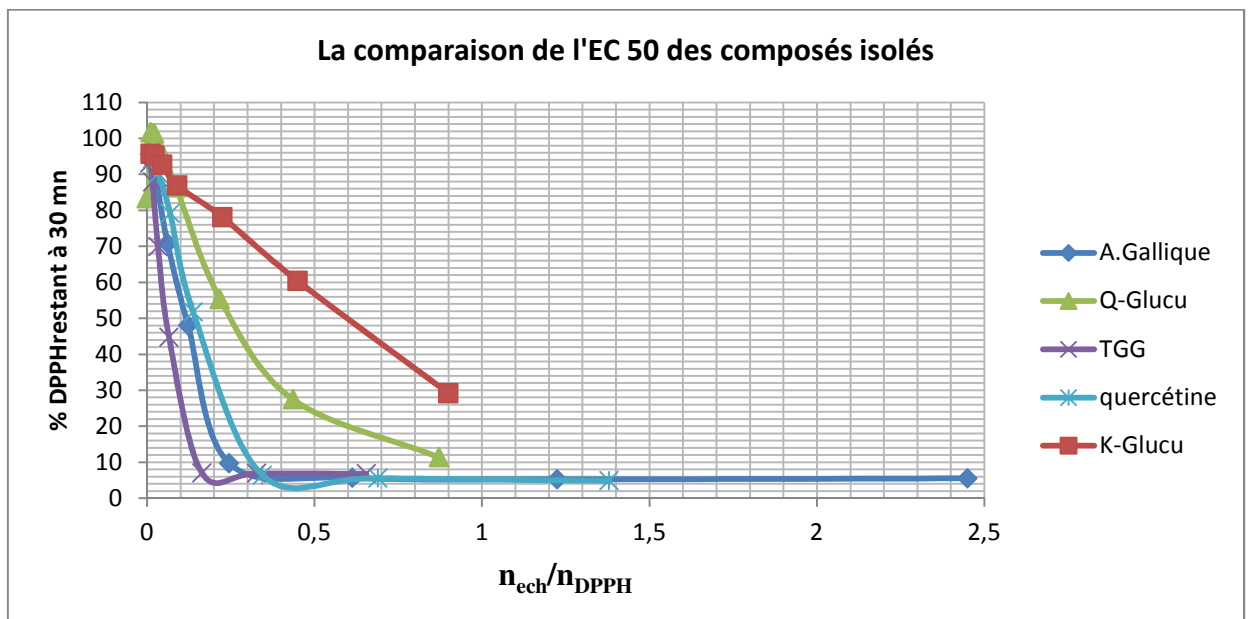
Le test antioxydant on utilisant le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) par la méthode de Brand-williams est décrit à la partie expérimentale (VI.7.7).

Les courbes cinétiques des extraits, des composés isolés et l'acide gallique sont présenté à la partie expérimentale (*cf.* figure VI.7.7).

Les courbes de la concentration efficace pour réduire 50 % de DPPH[•] sont présentés à la figure V.59.



-b-



-b-

Figure V.57 (a, b) : L'activité antioxydante EC50 des composés isolés

Ces résultats pourraient donner une nouvelle source des composés anti-radicalaires. Au vu des résultats obtenus au cours de nos travaux, nous pouvons conclure que cette plante peu constituer une source des composés bioactifs.

Références bibliographiques

1. Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., Saura-Calixto, F., *Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents*. Food Research International. 1999.32. P: 407-412.
2. Sanchez-Moreno, C., Plaza, L., Ancos, B.D., Cano, M.P., *Nutritional characterisation of commercial traditional pasteurised tomato juices: carotenoids, vitamin C and radical-scavenging capacity*. Food Chemistry. 2006. **98**. P: 749–756.
3. Scherer, R., Godoy, H. T., *Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method*. Food Chemistry. 2009. **112**. P: 654–658.
4. Scherer, R., Lemos, M. F., Lemos, M. F., Martinelli, G. C., et al., *Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilianspearmint (Mentha spicata L.)*. Industrial Crops and Products. 2013. **50**. P: 408– 413.
5. Brand-Williams, W., M.E. Curvelier, and C. Beset, *Use of a Free Radical Method to Evaluate Aantioxydant Activity*. Lebensm. -wiss. u.-Technol, 1995. **28**. P: 25-30.
6. Popovici, C., Saykova, I., Tylkowski, B., *Evaluation de l'activité antioxydante des composés phénoliques par la réaction avec le radical DPPH*. Revue de génie industriel. 2009. **4**. P: 25-39.



Partie III
Expérimentale

VI.1. Matériel végétal

La partie aérienne de la plante *Euphorbia guyoniana titymalus* (*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.) klotzsch and Gracke a été recueillie en Avril 2006, et en avril 2009 de la région de oued – Souf, Sud-est de l'Algérie. Cette plante est identifiée par Dr A. Chahma département d'Agriculture, Université de Kasdi Merbah Ouargla.

VI.2. Recherche de quelques principes actifs

VI.2.1 Recherche des alcaloïdes

Elle a été effectuée par des réactions de précipitation avec les réactifs généraux des alcaloïdes (**Mayer et Dragendorff**). Un extrait basique a été préparé à partir de 10g de poudre humectée avec l'ammoniaque diluée et 50 ml de l'acétate d'éthyle. Après une macération de 24h à la température ambiante le macéré a été filtré sur papier filtre et lavé à l'eau distillée et pour obtenir une solution neutre on ajoute une solution d'acide sulfurique à 2%. Le procédé a consisté de prendre 1 ml de ce cette solution dans deux tubes à essai et à ajouté 5 gouttes du réactif de Mayer dans le premier tube et 5 gouttes du réactif de dragendorff dans le second tube, l'apparition de précipité blanc dans le premier et de précipité rouge-brun indique la présence des alcaloïdes. Le résultat de ce test est négatif ce qui indique l'absence des alcaloïdes.

VI.2.2. Flavonoïdes (test à la cyanidine)

La solution à analyser est un infusé à 5% c'est-à-dire 5 g de poudre de la plante dans 100 ml d'eau distillée bouillante, infuser pendant 15 mn, puis filtrer. On ajoute 5 ml de l'infusé 5 ml d'alcool chlorhydrique, 1 ml d'alcool isoamylique et quelques copeaux de magnésium, l'apparition d'une coloration :

- Rose -orangée indique la présence de flavones
- Rose –violacée indique la présence des flavonols
- Rouge indique la présence de flavanols et flavonols

Cette réaction dites à la cyanidine, après la réalisation de ce teste, nous avons refait le teste sur l'extrait butanolique de l'extraction **1 (figure VI.1)** on présence de la quercétine et la narigine comme témoin, nous avons obtenu une coloration rouge indique la présence des flavonols (**figure VI.1**) (**Simonyan, 1972**) [1].

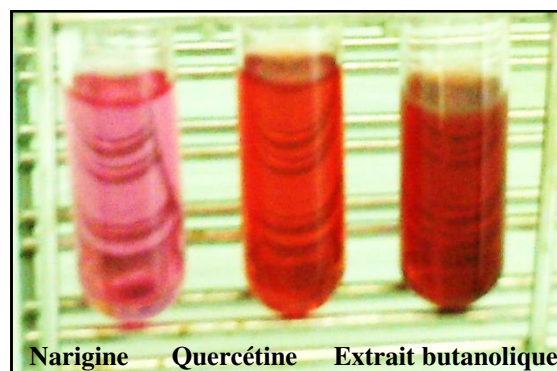


Figure VI.1: Le test de la réaction à la cyanidine

VI.3. Les protocoles des extractions

VI.3.1. (a) Extraction 1

La première méthode d'extraction que nous avons employée est la macération successive par des solvants de polarité croissante. La partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. est broyée en poudre fine (**550 g**), puis subit une délipidation avec l'hexane après 29 h et 30 min d'agitation mécanique à température ambiante, le mélange hétérogène est filtré sur filtre de papier plissé. La poudre est séchée puis lixiviée par l'eau acétone dans les proportions 2/3 (v/v) pendant une nuit. La solution obtenue est partiellement dégraissée avec l'hexane (une seule fois (extraction liquide / liquide), puis extraite successivement par des solvants de polarité croissante (extraction liquide / liquide) avec l'acétate d'éthyle (une seule fois) et le n-Butanol (trois fois) 24 heures, après tout les extraits sont évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif (Büchi Rotavapor ; maximum 40°C) et le résidu sec lyophilisé et pesé : on parle alors des 4 extraits obtenus qui sont présentés aux (**figure VI.2**) ci-après.

VI.3.2. (b) Extraction 2

La deuxième méthode d'extraction est réalisée sur la poudre des graines de la plante (**figure VI.3**). La poudre est délipidée avec l'hexane pendant 24 heures sous agitation mécanique à température ambiante, le mélange hétérogène est filtré. La poudre est séchée puis subi une macération avec des solvants de polarité croissante : le dichlorométhane, acétate d'éthyle et le n-butanol. Les extraits obtenus sont évaporée sous vide, puis lyophilisé et pesés.

Partie –III-expérimentale

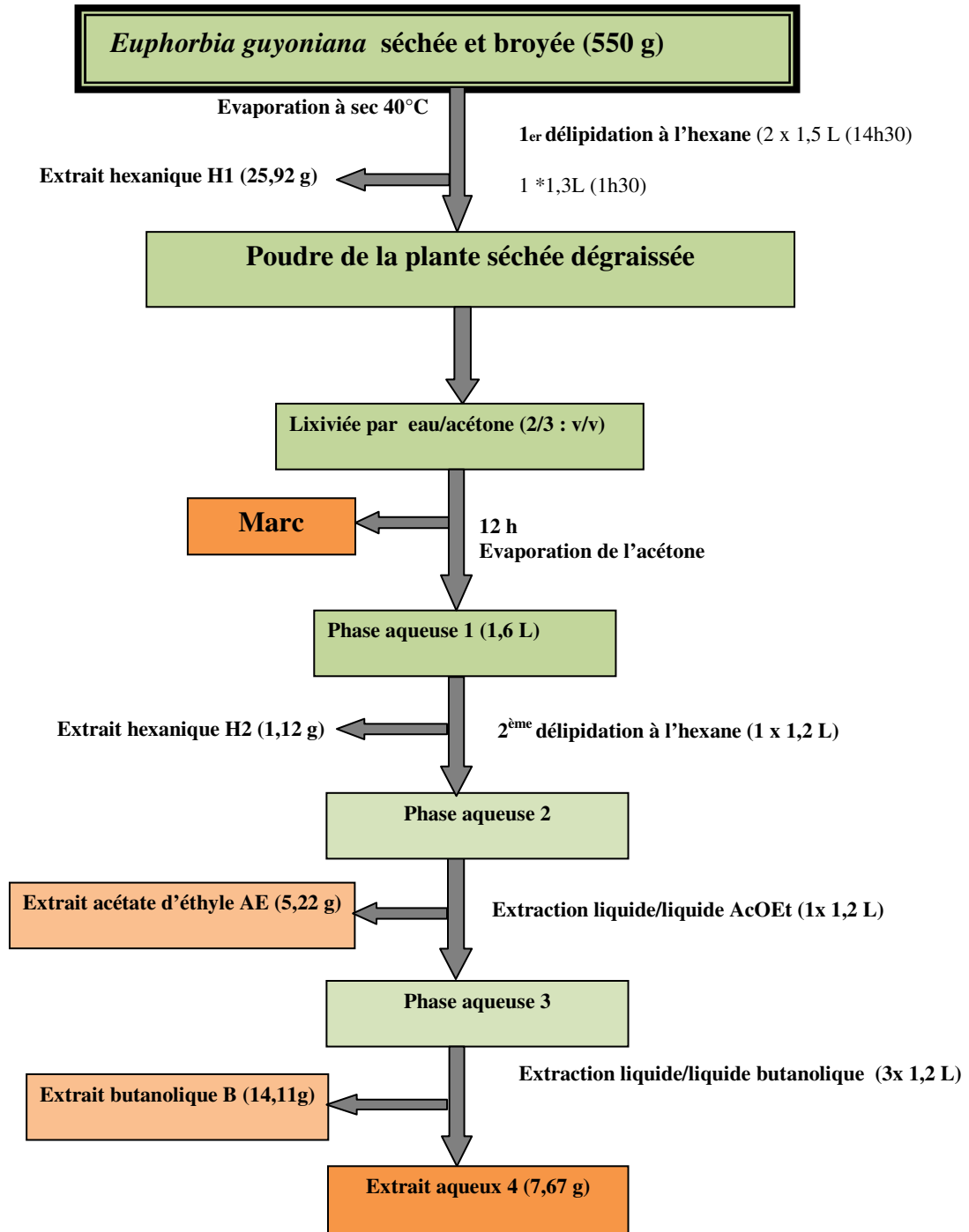


Figure VI.2 : Schéma de protocole d'extraction 1 d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut

*****Partie –III-expérimentale*****

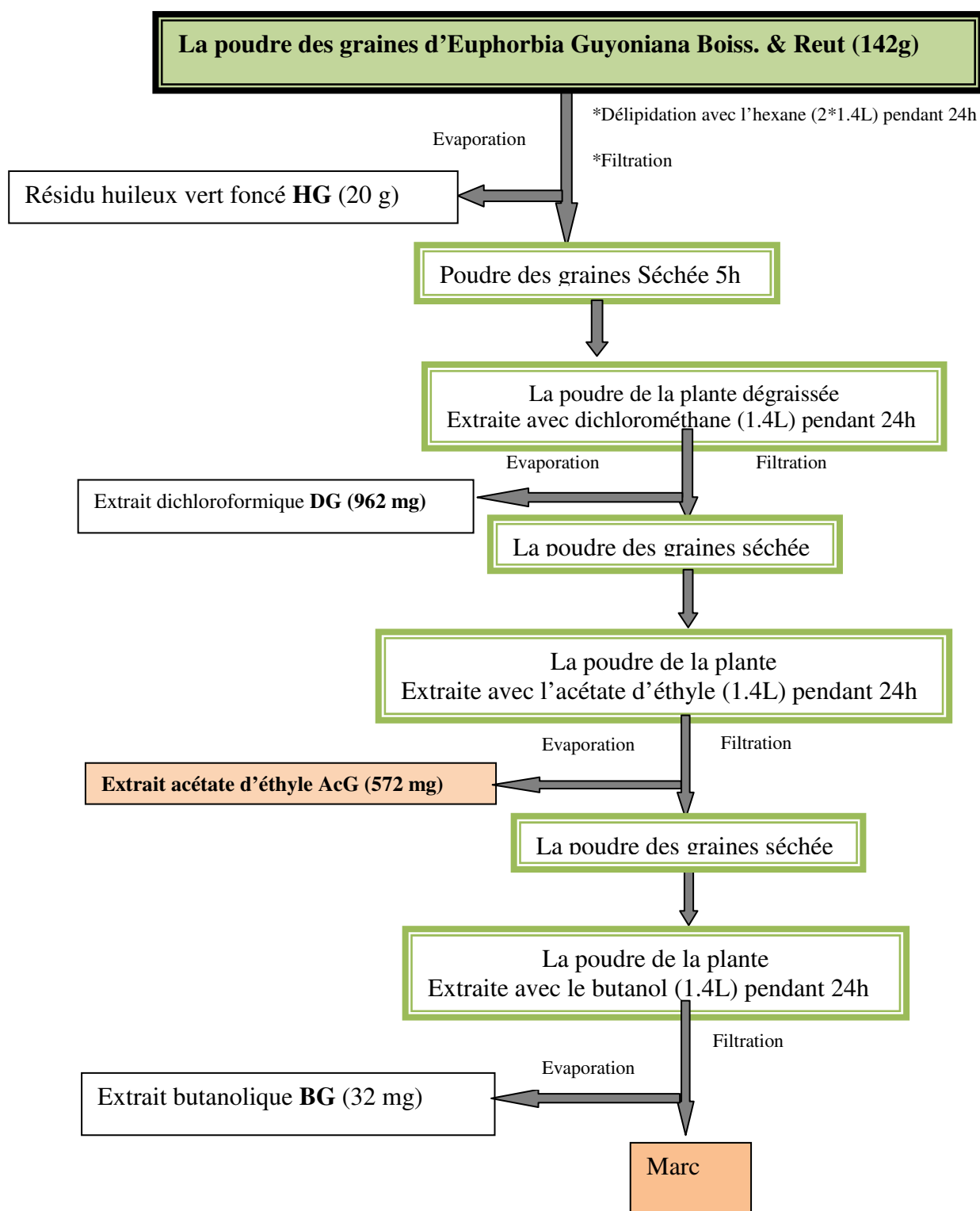


Figure VI.3 : Schéma de protocole d'extraction 2 des graines d'*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.

VI.4. Séparation et purification

Les extraits de la partie aérienne de la plante obtenus sont analysés par chromatographie sur couche mince et la chromatographie liquide de haute performance (CLHP) afin d'avoir une idée sur le nombre de produit à séparer et donc pouvoir choisir la méthode de séparation.

Notre travail a porté sur l'extrait acétate d'éthyle et butanolique à cause de sa richesse en produits.

VI.5. Méthodes chromatographiques analytiques

VI.5.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La technique de détection utilisée en chromatographie sur couche mince est simple et reproductibles. Elle est également relativement sensible car elle permette la détection de la majorité des substances présentes même en faibles quantités.

Dans le présent travail, la chromatographie sur couche mince est employée après les purifications et elles permettent de vérifier la présence et le degré de pureté des produits étudiés. Les analyses qualitatives ont été réalisées par chromatographie sur couche mince (CCM) en phase normale sur plaques d'aluminium recouvertes de silice (Silicagel 60 F254, Merck). Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre contenant l'éluant approprié. Les phases mobiles utilisées sont constituées d'un mélange tertiaire et quaternaire par des solvants combinés aux proportions suivantes :

- Toluène/Formiate d'éthyle/Acide formique (v/v/v : **50/40/10**) pour la fraction CPC-4 de l'extrait acétate d'éthyle
- Acétate d'éthyle/Acide formique/Acide acétique/Eau (v/v/v/v: **100/11/11/26**).
- Toluène/formiate d'éthyle/acide formique (v/v/v : **50/40/10**) pour la fraction de l'extrait acétate d'éthyle des graines.

Les plaques CCM sont examinées en lumière visible et sous U.V. (254 et 365 nm), avant et après révélation par les réactifs appropriés. Après on détermine le rapport frontal de chaque constituant (**équation 11**).

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le constitant}}{\text{Distance parcourue par le front de l'éluant}} \quad \text{Equation 11}$$

L'utilisation de différents réactifs permet de comparer les profils des fractions séparées et de les rassembler en fonction de leurs similitudes. Les réactifs principaux utilisés au cours de ce travail de recherche sont comme suit.

Réactif de Chlorure de fer III (Révélateur des tanins).

Ce réactif est préparé à partir d'une solution composée de 500 mg de chlorure de fer III, 25 ml d'éthanol. Après pulvérisation de solution sur la plaque, une coloration

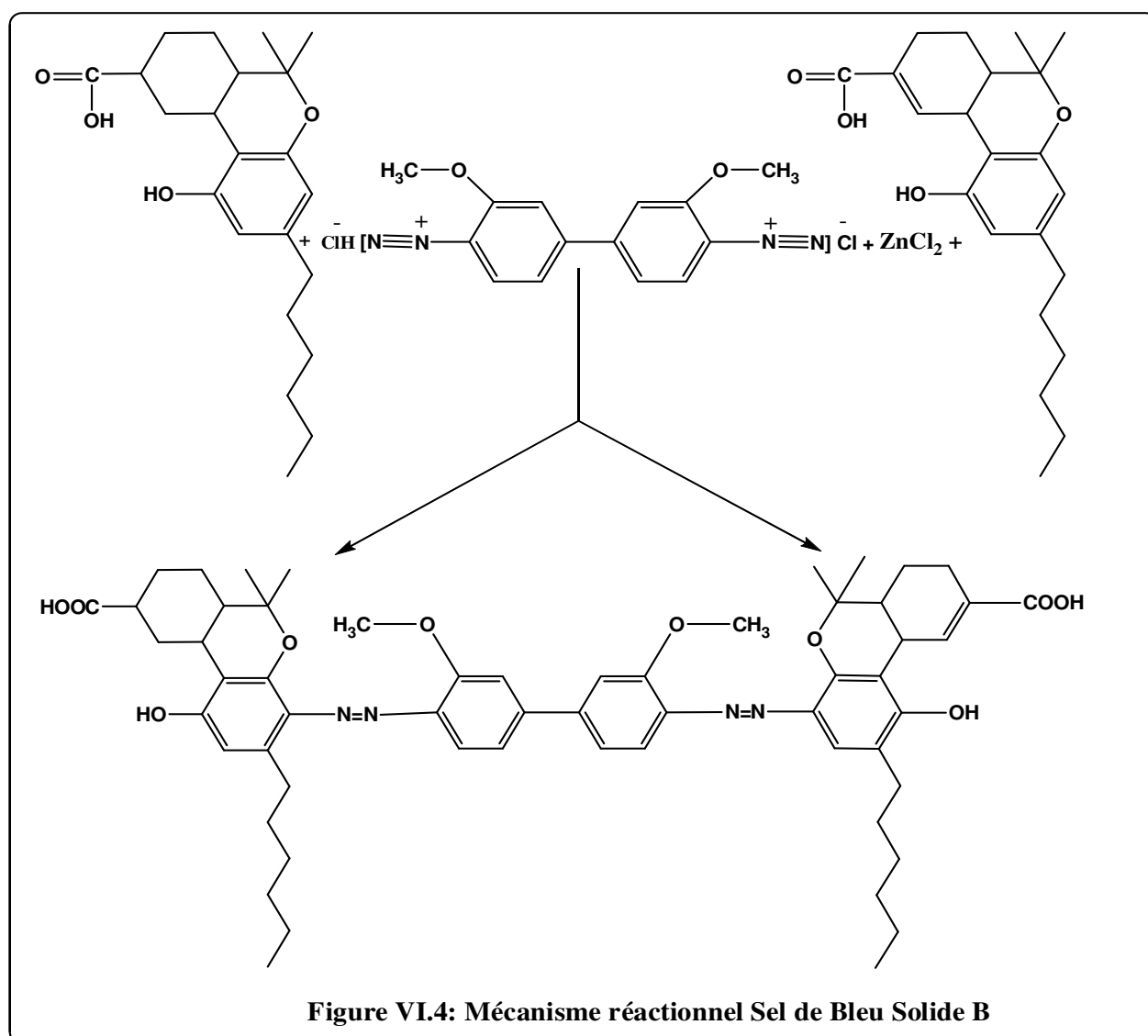
Partie –III-expérimentale

bleu-noire apparaisse immédiatement indique la présence de tanins galliques (le cas du composé **I**) et la coloration vert-noire indique la présence de tanins catéchiques (**Wagner et Blatt, 2001**) [2].

Réactif au sel de Bleu Solide B (pour la détection des phénols et des tanins).

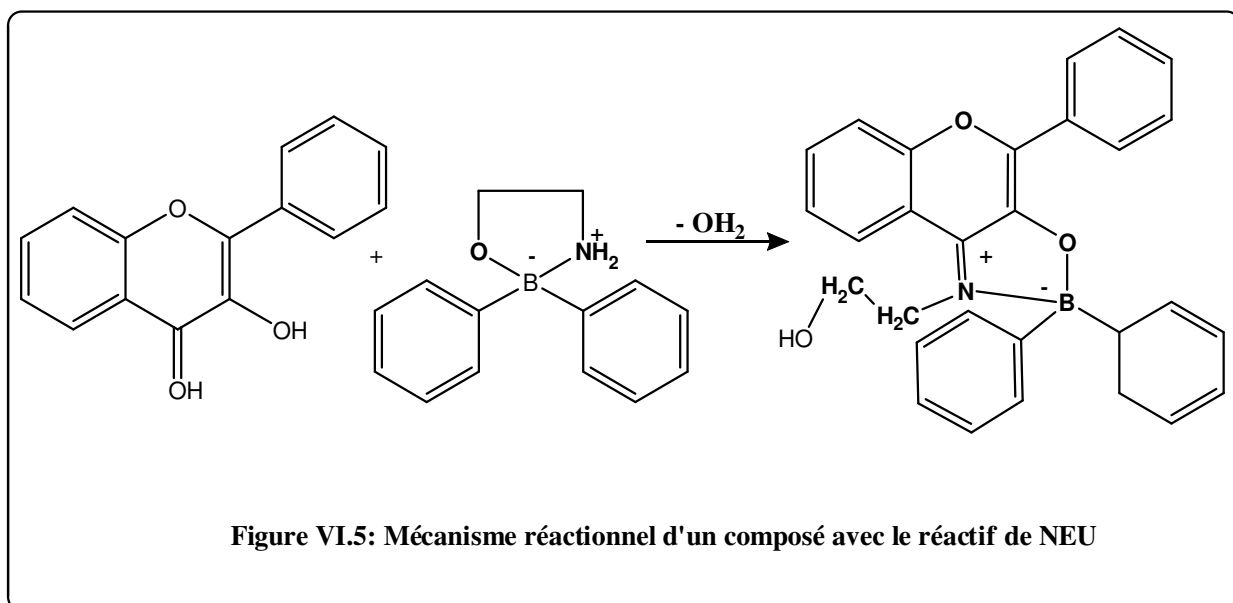
Le sel de bleu solide (3,3'-diméthoxy-biphenyl-4,4'-bis (diazonium dichloride) appelé **FBS B** est un réactif utilisé dans la mise en évidence des composés phénoliques (**figure VI.4**). C'est une solution à 0,5 g de sel de bleu solide (sel de diazonium du di-*O*-anisidine) dans 100 ml d'eau distillée (ou de Méthanol) suivi d'une agitation jusqu'à dissolution total.

La pulvérisation de **FBS B** préparé fraîchement sur le chromatogramme. Ce dernier est sécher et vaporiser avec une solution **B** 0,1M d'une solution éthanolique de NaOH puis observé dans l'UV visible. Le réactif forme un complexe avec le groupement phénol des composés considérés. Les tanins apparaissent sous forme de taches rouge vif [**Wagner et Blatt, 2001**] [2].



Réactif de Neu ou NP/PEG (Révélateur des flavonoïdes).

Ce réactif est préparé à partir de deux solutions : une solution méthanolique d'amino-2-éthylidiphénylborique à 0,1% (solution A) (**figure VI.5**) et une solution éthanolique de polyéthylène glycol (PEG) à 5%. La solution A est préparée à partir de 1 g d'acide amino-2-éthylidiphénylborique et de 100 mL de méthanol et la solution B est composée de 5 g de PEG 3000 et de 100 ml d'éthanol. Pulvérisation de la solution A et après la solution B. Chauffer la plaque de CCM à 110 °C pendant 2 minutes environ (**Wagner et Blatt, 2001**) [2]. L'Observation est en lumière UV à 365 nm, les flavonoïdes apparaissent sous forme de taches fluorescentes jaunes, vertes ou orange.



VI.5.2. Chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

La chromatographie liquide à haute performance est une technique basée sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie sur colonne sans en présenter les inconvénients que sont : la séparation lente, l'absence de détecteurs et la quantité considérable d'échantillon nécessaire. C'est un appareillage plus sophistiqué qui permet de mettre en œuvre, selon la nature de la phase stationnaire, aussi bien des phénomènes de partage, qui sont les plus courants, que des phénomènes d'absorption, d'échanges d'ions ou d'exclusion. La phase stationnaire est une colonne de silice en phase inverse **C18**.

La méthode de séparation qu'elle utilise fait appel aux mêmes éléments de base que ceux employés pour la chromatographie classique sur colonne, soit un ou plusieurs solvants et une colonne remplie avec une phase stationnaire. Dans ce cas, la colonne est précédée d'une pré-colonne (phase inverse **C18** également) qui permet d'éviter les colmatages éventuels occasionnés par l'accumulation de molécules de très grosse taille. Ces colonnes en phase inverse (**C18**) permettent la séparation des composés polaires, solubles dans l'eau ou dans les mélanges hydro-alcooliques.

Partie –III-expérimentale

La grande différence par rapport à la chromatographie classique réside dans la durée d'élution. Cette vitesse est obtenue par l'application d'une pression élevée grâce à une pompe qui maintient constant le débit de l'éluent.

Cette technique se distingue également de la chromatographie classique par l'utilisation d'un détecteur dont le message est enregistré puis exploité par un détecteur relié au système. Il est souvent difficile de trouver rapidement les conditions opératoires qui mèneront à une bonne séparation. Dans ce cas, CLHP analytique conduit au choix des conditions expérimentales de la séparation (**Rouessac, 2000**) [3].

Dans notre étude les analyses CLHP/DAD-UV ont été effectuées à l'aide d'une chaîne CLHP Alliance 2695 (Waters, Milford, MA), et d'un détecteur UV à barrettes de photodiode 2996 (Waters) « Photodiode Array Detector » ainsi qu'un détecteur UV (détection simultanée à deux longueurs d'onde) modèle 2487 (Waters), piloté par un logiciel Empower (Waters-Alliance). Les chromatogrammes d'*Euphorbia guyoniana* ont été réalisés en phase inverse sur une colonne HPLC de type Synergi 4U Hydro-Rp 80 A C18 (Phenomenex) (4 µm, 250 x 2 mm, Waters).

La phase mobile est :

- (A) : méthanol + 0,0025 % trifluoroacétique (TFA)
- (B) : l'eau + 0.0025 % d'acide trifluoroacétique (TFA)

Le gradient effectué pour l'extrait brut de la phase butanoliques à 320 nm et la fraction CPC-4 à 280 nm sont représentés au **tableau VI-1**:

Tableau VI-1 : Les conditions CLHP analytique pour les deux extraits

Temps	Débit (ml/min)	A (H ₂ O+0,0025% TFA)	B (MeOH+0,0025% TFA)	λ (nm)
0	0,2	100	0	320
60	0,2	0	100	et
75	0,2	0	100	280
78	0,2	100	0	
100	0,2	100	0	

Pour toutes les analyses, les solvants utilisés sont de qualité HPLC (Sigma-Aldrich) et les longueurs d'onde de mesure fixées selon l'échantillon à analysés.

En règle générale, pour l'analyse HPLC/UV d'extrait butanoliques et de la fraction CPC-4, des solutions à 0,2 mg/ml ont été utilisées. La solution filtrée à travers un filtre 0,45

µm et le four est maintenu à 30 °C. Le solvant d'injection était de composition identique à celui employé lors de l'analyse et le volume d'injection fixé à 10 µl.

VI.6. Méthodes chromatographiques préparatives

VI.6.1. Chromatographie d'adsorption sur colonne ouverte

La chromatographie d'adsorption : c'est une chromatographie liquide-solide. La phase stationnaire est un adsorbant solide plaire. L'adsorption est la fixation des molécules, par une phase stationnaire. Cette fixation est due à l'établissement de liaisons secondaires de surface (liaison dipôle-ion, ou dipôle-dipôle ou liaison de van der waals) entre l'adsorbant et la molécule adsorbée. Dans cette forme de chromatographie, la phase stationnaire est contenue dans une colonne. L'éluant qui peut-être sous la pression d'une pompe ou non, entre par une extrémité et sort par l'autre. Il peut-être un solvant unique ou un mélange de solvant.

Sous l'action de l'éluant des liaisons qu'elles établissent avec l'adsorption, les molécules vont se déplacer différemment dans la colonne et prendre un certain retard les uns par rapport aux autres pendant la migration. Elles vont donc se présenter avec un certains retard en sortie de colonne.

L'éluant peut se faire sous forme isocratique ou sous forme d'un gradient. En principe, la phase mobile est composée des mêmes solvants que ceux utilisés pour la CCM analysées comme décrit précédemment.

La méthode généralement utilisée en première intention pour le fractionnement d'extraits bruts ou de fractions complexes est la chromatographie sur colonne ouverte. La taille de la colonne, la granulométrie de la phase stationnaire et la composition initiale de la phase mobile sont déterminées d'après la qualité de l'échantillon à fractionner (extrait brut ou fraction enrichie) et au moyen d'analyses CCM préalables (**Hostettmann, 1997**) [4].

Dans le présent travail, la phase stationnaire est du Silicagel 60 (Merck) de granulométrie 70-230 µm. Les mécanismes de séparation sont les mêmes que ceux qui ont été décrits pour la CCM (*cf.* **VI.5.1**).

L'extrait brut de l'extrait acétate d'éthyle des graines (**572** mg) dissout dans le méthanol est mélangé avec une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur le gel de silice de la colonne préparée auparavant. L'extrait acétate d'éthyle des graines (**AcG**) et sa fraction (**ACG-F7**) est adsorbé sur une quantité de phase stationnaire correspondant à 2-3 fois sa masse et l'introduction de l'extrait a donc eu lieu sous forme solide.

L'extrait acétate d'éthyle (**ACG**) a subi deux fractionnements (deux colonne de gel de silice successives), en utilisant deux gradients.

La première colonne de gel de silice :

Deux systèmes d'éluant utilisés dans la première colonne, étaient composés de CH₂Cl₂ / AcOEt / MeOH dans des proportions déterminées au préalable sur couche mince avant la séparation.

Partie –III-expérimentale

- Le premier éluant CH₂Cl₂ / AcOEt dans les proportions suivantes (**100/0 ; 0/100**).
- Le deuxième éluant AcOEt / MeOH dans les proportions suivantes (**100 /0 ; 50 /50 ; 0 /100**). 13 fractions sont recueillies **tableau 7** partie résultats et discussion (*cf. II.3.5.1.*). une chromatographie sur couche mince a été réalisée sur les fractions, et les fractions similaires sont rassemblées en utilisant le système suivant :

Toluène/Formiate d'éthyle/Acide formique (v/v/v : 5/4/1)

- Révélateur : le réactif de NEU

La deuxième colonne de gel de silice :

Le système d'élution est CH₂Cl₂ / MeOH de polarité croissante :

- DCM / MeOH : 100/0 ; 99/1 ; 98/2 ; 95/5 ; 90/10 ; 75/25 ; 50/50 et 0/100.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le **tableau 8** partie résultats et discussion (*cf. II.3.5.1.*).

VI.6.2. Chromatographie liquide à haute performance préparative

La purification des composés a été réalisée par la chromatographie préparative, qui constitue d'un système de pompes Bischoff (ISC), d'un détecteur ultra violet visible Knauer K-2501, et contrôlé par un logiciel (Pic 3). La séparation a été réalisée sur une colonne Waters C₁₈ Atlantis T3, (250 mm x 19 mm, 10µm) et une pré-colonne Waters Atlantis T3, 10µm. Le système de solvants de la phase mobile (**A**: eau, **B** : méthanol) différents gradient utilisés pour séparer les échantillons :

Un gradient isocratique est utilisé pour l'extrait acétate d'éthyle de 25-75 % (B) pendant 60 min à 280 nm **tableau VI-2**.

Tableau VI-2 : les conditions CLHP-préparative pour l'extrait acétate d'éthyle

Temps (Sec)	Débit (ml/min)	A (eau)	B (méthanol)	λ (nm)
0	15	25	75	280
60		25	75	

Un linéaire gradient de 20-100 % (B) est utilisé pour purifier l'extrait butanolique à 320 nm. Les fractions ont été collectées manuellement dans des tubes de 20 ml **tableau VI-3**.

Tableau VI-3 : Les conditions CLHP-préparative pour l'extrait butanolique

Temps (Sec)	Débit (ml/min)	A (H ₂ O+0,0025% TFA)	B (MeOH+0,0025% TFA)	λ (nm)
0	15	80	20	320
60		20	80	

VI.6.3. Chromatographie de partage centrifuge (CPC)

La Chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) a été utilisée pour séparer initialement les composés de l'extrait acétate d'éthyle d'*Euphorbia guyoniana*. Ce fractionnement a été effectué grâce à un appareil CPC EverSeiko (LLB-M, France).

La colonne est une partition de disque circulaire avec 2136 canaux en polyphénylénsulfite (PPS), longueur de cellules 15 mm, et la section de cellules 0,0588 cm². La capacité de la colonne est d'environ 230 ml.

La vitesse de rotation est 0-2000 RPM, la pression 60 bars. La dimension de rotor Ø 200 mm ; H 75 mm, et le rayon de centrifugation moyen est de 82,5 mm. Les dimensions (L x P x H) sont (310 x 470 x 500 mm).

Le système CPC a été connecté à un modèle de pompe Bischoff têtes préparatives (0,1-19,9 ml/min). Les fractions ont été collectées avec un collecteur de fraction modèle SuperFrac Pharmacia Biotech. L'échantillon a été injecté manuellement à l'aide d'une seringue à une boucle de 7ml.

Cette appareil nous a permis de travailler sur les modes d'élutions :

- Ascendant : quand la phase supérieure choisie devient phase mobile
- Descendant : quand la phase inférieure choisie devient phase mobile

Le système utilisé (**Q1**) : Hexane/Acétate d'éthyle/Ethanol/Eau (v/v/v/v : **1/8/2/7**).

La pression de stabilité est de 24 bars en mode ascendant et le débit de 3 ml/min. la purification a été réalisé sur 2,5 g de l'extrait brute d'acétate d'éthyle dilué dans 6,5 ml de la phase stationnaire puis injecté. L'éluant en sortie de colonne a été récupéré et collecté dans des tubes à l'aide d'un collecteur fractions automatique 4ml/ minute (**figure VI.6**).

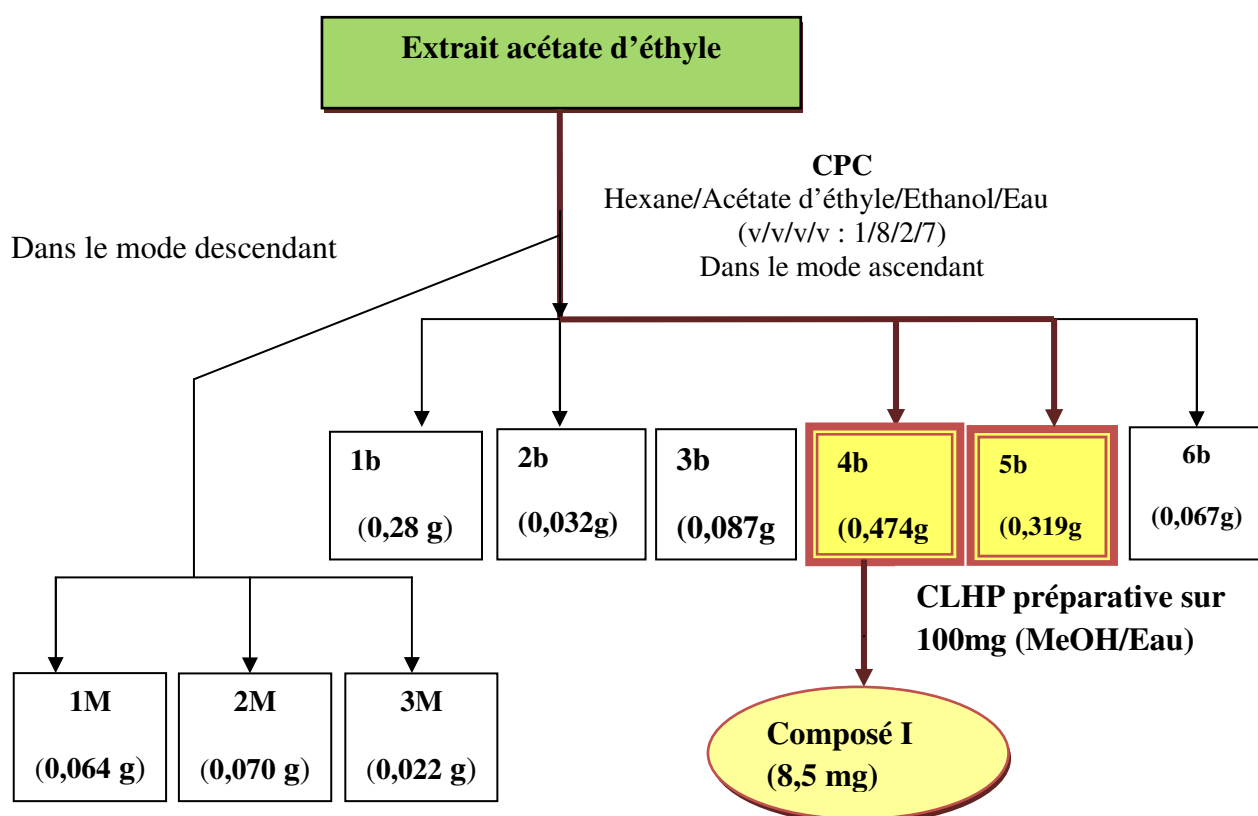


Figure VI.6 : Fractionnement de l'extrait acétate d'éthyle par la CPC

Cette séparation a conduit à l'obtention, dans le mode ascendant, de 5 fractions et, dans le mode descendant, de trois fractions. Seul 2 sont quantitativement exploitables, il s'agit des fractions en mode ascendant, 4 (4b) et 5 (5b), d'un poids de respectivement de 475 mg et 320 mg.

VI.7. Méthodes Physico-chimiques

VI.7.1. Point de fusion (P.F.)

Le point de fusion c'est une technique qui permet de connaître la température à la quelle un composé pur passe de l'état solide à l'état liquide. Elle est mesurée généralement sous pression atmosphérique normal (1 atmosphère) car la variation en fonction de pression très peu.

Il existe différents appareils de mesurée de point de fusion reposant tous sur la restitution d'un gradient de température. Ils peuvent être constitués soit d'une plaque métallique telle que le **Blanc de Köhler**, soit d'un bain d'huile tel le **Tube de Thièle**.

Le point de fusion généralement est un moyen simple de vérifier la pureté d'un solide. on prélève souvent deux températures :

- Celles à la quelle apparaît la première goutte de liquide.

- Celles à la quelles font le dernier cristal.

La présence d'impureté dans le composé entraînant une diminution de la température de fusion.

Dans notre étude les points de fusion ont été mesurés à l'aide d'un appareil de fusion de Stuart model « melting point SMP3, Grande-Bretagne » à partir de la température ambiante jusqu'à 360°C, la pente de 10°C et le plateau de 80°C. Le bloc de chauffage peut accueillir jusqu'à 3 échantillons et un capteur à résistance de platine pour contrôler la température. Les valeurs ont été relevées après observation du changement d'état au microscope.

VI.7.2. Pouvoir rotatoire : $[\alpha]_D$

Le pouvoir rotatoire également appelé activité optique, est la propriété qu'ont certains milieux d'un faisceau lumineux. Les composés induisant une déviation du vecteur vers la droite (dextrogyres) ou vers la gauche, lévogyres). Le pouvoir rotatoire est une mesure de la pureté des composés.

Dans le présent travail le pouvoir rotatoire des composés isolés a été déterminé au moyen d'un polarimètre de type (JASCO-P-1010, Japon), équipé d'une lampe de sodium. La solution est introduite dans une cellule de 10 cm, à température ambiante, en utilisant la raie D du sodium (589 nm) comme source lumineuse. La valeur de $[\alpha]_D$ exprimée en degrés, a été calculée au moyen de la formule suivante :

$$[\alpha]_D^T = \frac{1000 \cdot \alpha}{C \cdot l} \quad \text{équation 12}$$

α : angle de rotation en degrés lu sur le polarimètre (moyenne de 5 lectures)

C : concentration de la solution mesurée en mg/mL.

l : longueur de la cuve de mesure en dm.

T : température lors de la mesure.

Dans la partie résultats et discussions, les concentrations se rapportant aux mesures polarimétriques sont exprimées par convention en mg/ml.

VI.7.3. Spectrophotométrie Ultraviolet (UV)

La technique spectrophotométrie UV visible est une méthode simple et rapide qui fournisse des informations sur la nature chimique, les propriétés physico-structurales optiques des composés. C'est une méthode quantitative et qualitative de grande unité pour les analyses chimiques. Dans les composés, chaque fonction absorbe à une longueur d'onde bien déterminée. Ceci permet de caractériser les molécules. La mesure de l'absorption UV permet également de connaître ou de déterminer la composition chimique d'un mélange, par comparaison avec des témoins.

Dans le présent travail, les spectres UV des composés isolés ont été mesurés en solution méthanolique à l'aide d'un spectrophotomètre UV/Vis de type (JASCO-V-530). Les mesures sont effectuées dans des cuves de quartz à trajet optique de 1 cm. Les résultats obtenus sont présentés dans la partie résultats et discussions **II** sous la forme: λ_{\max} nm (log ϵ),

Partie –III-expérimentale

où λ_{\max} nm représente les longueurs d'onde des maxima en nm. ϵ est l'absorbance molaire à ces longueurs d'onde, si la couche de solution traversée (l) est exprimée en centimètres et la concentration (c) en moles par litre dans la formule suivante (loi de Beer-Lambert):

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \quad \text{équation 13}$$

VI.7.4. Spectrophotométrie infrarouge (IR)

Parmi les méthodes à la disposition du chimiste pour l'analyse structurale, la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie infrarouge jouent des rôles complémentaires. Elle permet de connaître les groupes fonctionnels présents dans la molécule et reste parfois le seul moyen de lever les ambiguïtés pouvant subsister quant à la structure d'une molécule.

Le spectre infrarouge des molécules est enregistré au moyen d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer « Spectrum 100 » FT-IR Spectromètre (U.S.A). Les échantillons sont déposés sous forme solide après lyophilisation.

VI.7.5. Spectrométrie de masse (MS)

Ces dernières années, l'analyse par spectrométrie de masse des flavonoïdes s'est accrue avec le développement de techniques d'ionisation dites « douces » : l'électrospray (ESI) et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) qui ont en outre permis l'analyse de très faibles quantités d'échantillons bruts. L'ESI et l'APCI sont des techniques qui génèrent principalement des ions moléculaires pour des métabolites relativement petits tels que les flavonoïdes (Wolfender, 2000) [5].

L'ionisation par Electrospray (*Electro Spray Ionisation*) ESI: ionisation produite par application, à pression atmosphérique, d'un champ électrique fort sur un liquide traversant un capillaire à faible débit. Ce champ provoque une accumulation de charges à la surface du liquide, situé à l'extrémité du capillaire. La rupture de la phase liquide forme des gouttelettes hautement chargées (Spray). L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes va provoquer leur rétrécissement jusqu'au sommet où des forces coulombiennes répulsives vont approcher le niveau des forces de cohésion de celle-ci et provoquer leur explosion. Ces gouttelettes subissent alors une cascade de fissions donnant des gouttelettes de plus en plus petites, jusqu'au moment où le champ électrique en leur surface devient suffisant pour provoquer la désorption des ions. Ces ions ainsi produits sont porteurs d'un grand nombre de charges s'il existe plusieurs sites ionisables sur la molécule.

Les spectres ESI ont été enregistrés en modes positifs et négatifs sur un spectromètre. LCQ Advantage « Thermo finnigan ».

VI.7.6. Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

La résonance magnétique nucléaire ou RMN est une technique utilisée pour l'analyse des structures de nombreuses molécules chimiques. Elle sert principalement à la détermination structurale des composés. Les principaux noyaux étudiés sont le proton ^1H , le carbone ^{13}C , le phosphore ^{31}P et l'azote ^{15}N .

Partie –III-expérimentale

Cette méthode repose essentiellement sur le phénomène de magnétisme. En effet, les noyaux de certains atomes (^1H , ^{13}C , etc...) possèdent un moment magnétique nucléaire, c'est-à-dire qu'ils se comportent des aimants microscopiques caractérisés par une grandeur quantique appelée « le spin » (Silverstein, 2007) [7].

La technique étudie le comportement des noyaux atomiques en présence d'un champ magnétique appliqué aux produits entraîne un dédoublement des niveaux d'énergie du spin nucléaire, de sorte qu'on puisse introduire des transitions entre eux, suite à l'absorption d'une radiation électromagnétique adéquate. Les échantillons sont dissous dans un solvant deutéré qui peut être du méthanol, du chloroforme, de la pyridine, de l'eau, etc... Ces solvants possèdent des déplacements chimiques spécifiques (tableau VI-4). Le tube contenant l'échantillon est soumis aux champs magnétique permettant l'obtention des spectres utiles à la l'élucidation structurale.

Tableau VI-4 : Déplacement chimique (en ppm) des solvants deutérés utilisés

Solvants	$\delta ^1\text{H}$ (ppm)	$\delta ^{13}\text{C}$ (ppm)
Méthanol-d4	4,87 (1) ; 3,31(5)	49
D ₂ O	4,79	177,21

RMN monodimensionnelle (RMN-1D)

- RMN de proton (^1H)

Le spectre RMN du proton est une méthode puissante utilisée dans la détermination structurale des composées organiques inconnus. Il fournit de nombreuses informations telles que, les différents types d'hydrogènes présents dans la molécule analysée, les différents types d'hydrogènes présents dans l'environnement électronique, le nombre d'hydrogènes « voisins » d'un hydrogène donné et le déplacement chimique caractéristique de chaque proton.

- RMN carbone (^{13}C) : DEPT et J-MODULE

Dans cette expérience, chaque atome de carbone qui est dans un environnement unique provoque une crête distincte sue un spectre. Généralement cette technique permet de mettre en évidence tous les carbones de la molécule. L'analyse se base sur les déplacements chimiques observés en fonction de l'environnement de chacun des atomes de carbone. Cette expérience permet la mise en évidence des carbones primaires (CH_3), secondaires (CH_2), tertiaire (CH), et dans une moindre mesure les carbones quaternaires. La différence majeure entre le DEPT et le J-modulé, réside dans le fait que les carbones quaternaires sont détectés avec le J-modulé alors qu'ils ne le sont pas dans le DEPT.

RMN bidimensionnelles (RMN-2D)

Les expériences RMN-2D reposent sur une succession de trois intervalles de temps, le temps de préparation, le temps d'évolution et le temps de détection. Dans certain autres expériences, il peut s'ajouter une autre période avant la détection, c'est le temps de mixage (Silverstein, 2007) [6].

- Corrélations homonucléaires

❖ **COSY** (1H – 1H): cette expérience fournit des informations sur les couplages homonucléaires $2J$ et $3J$ (protons séparés par deux ou trois liaisons) entre les protons voisins et ceux qui sont adjacents. Dans le présent travail on a trouvé $1J$ (une liaison) dans certain composés

- Corrélations hétéronucléaires

❖ **HSQC** (1H–C) : cette technique permet d'observer les couplages chimiques entre les carbones et les protons directement liés entre eux.

❖ **HMBC** (2JH–C, 3JH–C) : cette technique permet la détection des couplages longue distance $2JH-C$ et $3JH-C$.

Dans notre études les spectres de résonance magnétique nucléaire sont enregistrés à 20 °C sur un appareil de type Brüker Avance 500 (fréquences de 500.13 MHz (1H) et 125.75 MHz (^{13}C)) selon la quantité de produit à analyser et la résolution souhaitée. Les expériences bidimensionnelles réalisées sont : COSY, HSQC, HMBC.

Les échantillons sont solubilisés dans les solvants deutérés CD_3OD et D_2O dans des tubes analytiques de 5 mm de diamètre. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm et les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hz.

VI.7.7. Réactivité avec le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH)

L'activité antioxydante des composés phénoliques en général est liée à la mobilité d'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle. En présence d'un radical libre R^\bullet , l'atome H est transféré sur ce dernier alors transformé en une molécule stable RH. Le DPPH $^\bullet$ donne une absorption maximale à 515 nm, cette dernière, après la réduction par un antioxydant ou un radical le DPPH change sa couleur violet vers le jaune (parjo, 2000 ; 2004) [7, 8] (équation14) selon l'équation suivante :

$$DPPH_R = \left(\frac{DPPH_{ech}}{DPPH_{Blanc}} \right) 100 \quad \text{équation (14)}$$

DPPH $^\bullet_R$: DPPH restant,

DPPH $^\bullet_{ech}$: DPPH échantillon,

DPPH $^\bullet_{Blanc}$: DPPH blanc

Partie –III-expérimentale

Pour mesurer l'activité antioxydante et suivre la réaction entre le DPPH et l'antioxydant nous avons utilisé un spectrophotomètre Tecan « Infinite M 200 », équipé d'un logiciel I-control 1,3 dans le méthanol. Cet appareil est constitué de deux éléments principaux.

- le « Rapid Kinetic Accessory », qui mélange rapidement les réactifs (généralement > 20 ms) les réactifs dans une cellule de chemin optique, qui se loge dans un compartiment porte-cellule, dans le présent travail les réactifs sont mélangés rapidement dans une période de 5s dans des plaques multi puits transparents, et l'obtention des résultats chaque 5mn.
- Le système de détection spectrophotométrique qui permet de détecter par absorption UV-visible le DPPH dont l'absorbance est de 515 nm. L'appareil est équipé d'un thermostat à 25°C pour toutes les expériences, et l'absorbance de DPPH dans le méthanol CLHP.

Ce test a été réalisé dans les conditions précédentes pendant durée de 45 min. Les concentrations des extraits et fractions testés sont : 12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 250 ; 500 ; 1000 µg/ml. On ajoute 10µl de DPPH (100 µM) à 240 µl de chaque concentration.

- La courbe de calibration

Avant de commencer les tests de l'activité antioxydante, la stabilité et l'intervalle de linéarité des solutions de DPPH[•] doit être évalués et les résultats sont présentés graphiquement (la courbe de calibration). Les solutions du DPPH[•] présentés précédemment à base du méthanol ont été testées (**figure 90**). Selon l'équation (15) de la courbe calibration, on observe qu'il n'y a pas de différence significative dans l'absorbance entre 0 et 45 min pour les concentrations testées et une très bonne linéarité de l'absorbance en fonction de la concentration.

$$A(515) = 0,0084 C_{DPPH} + 0,0368 ; R^2 = 0,9996$$

Equation (15)

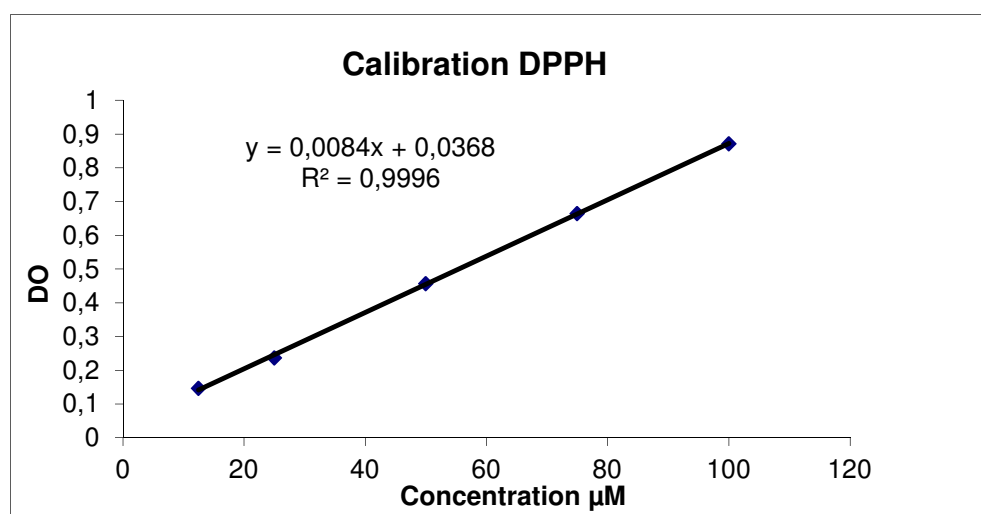
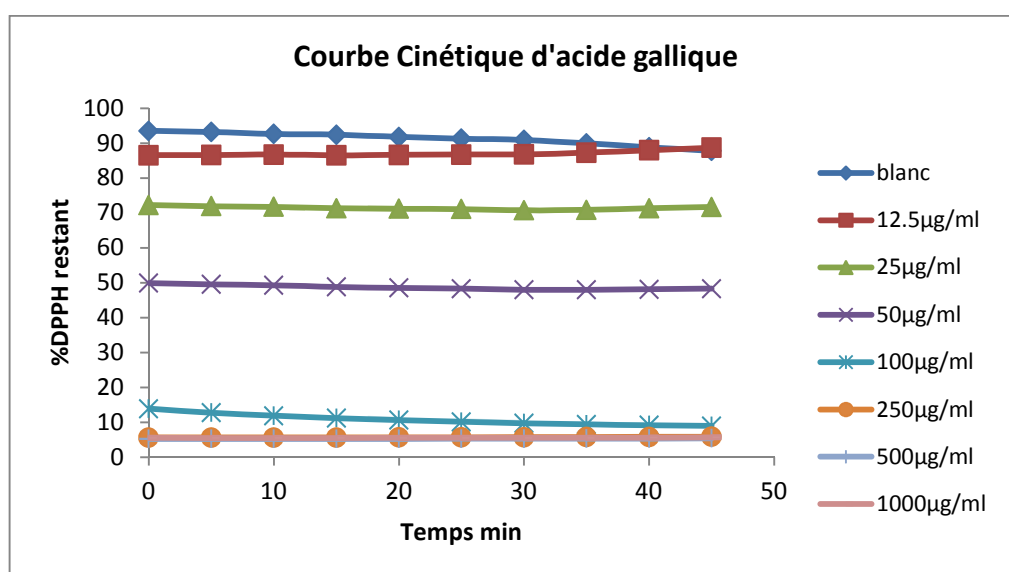


Figure VI-7 : La courbe d'étalonnage de DPPH

- Courbe cinétique

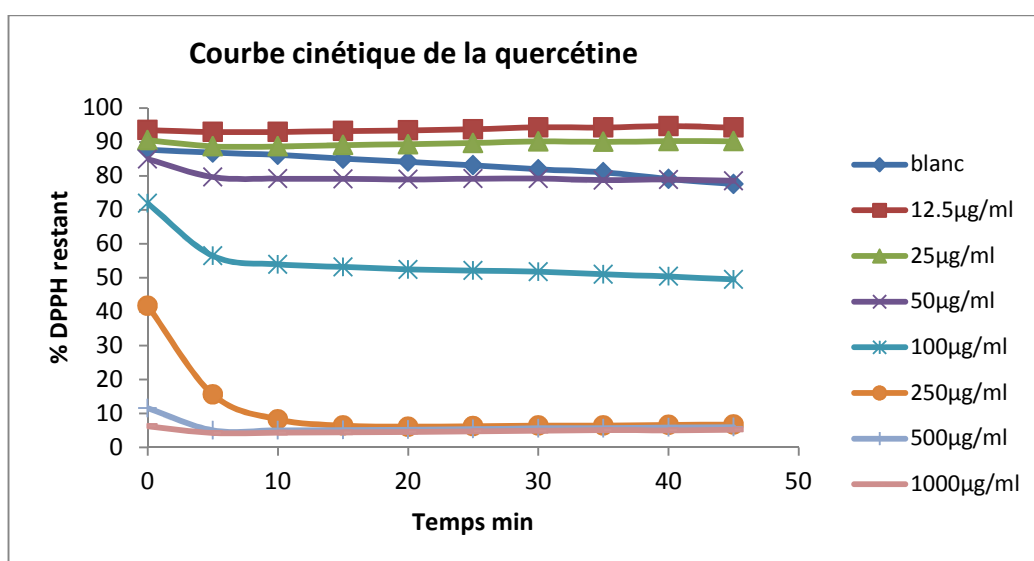
Les courbes cinétiques (figure VI-8) sont tracées pour chaque extraits et composés isolés, à partir de ces graphes, les valeurs de % DPPH restant lorsque on atteint le plateau et le nombre de mole de produit /nombre de mole de DPPH, sont transférés sur un autre graphe qui permet de mesurer le pouvoir réducteur et de calculer soit la concentration d'un composé inhibant 50% la concentration initiale de DPPH (CI₅₀) soit la concentration efficace pour diminuer 50% la concentration initiale de DPPH (CE₅₀). Le pouvoir antioxydant d'un composé est d'autant plus élevé que son CE₅₀ est petit. Notre référence est l'acide gallique.

Les courbes cinétiques des composés et d'acide gallique



-a-

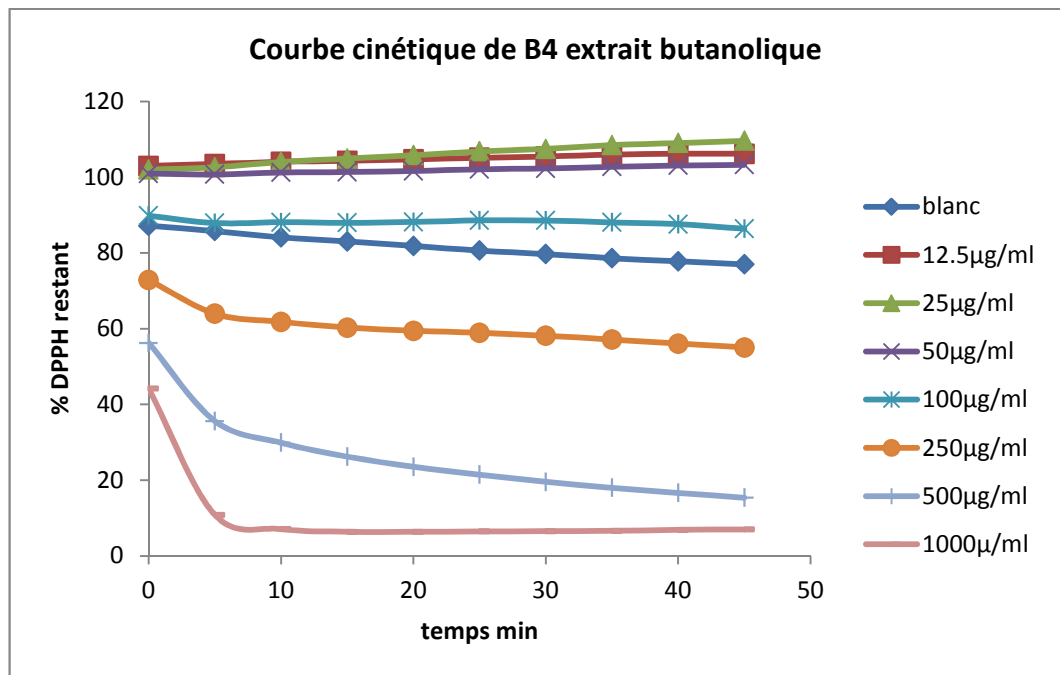
La courbe cinétique de la quercétine



-b-

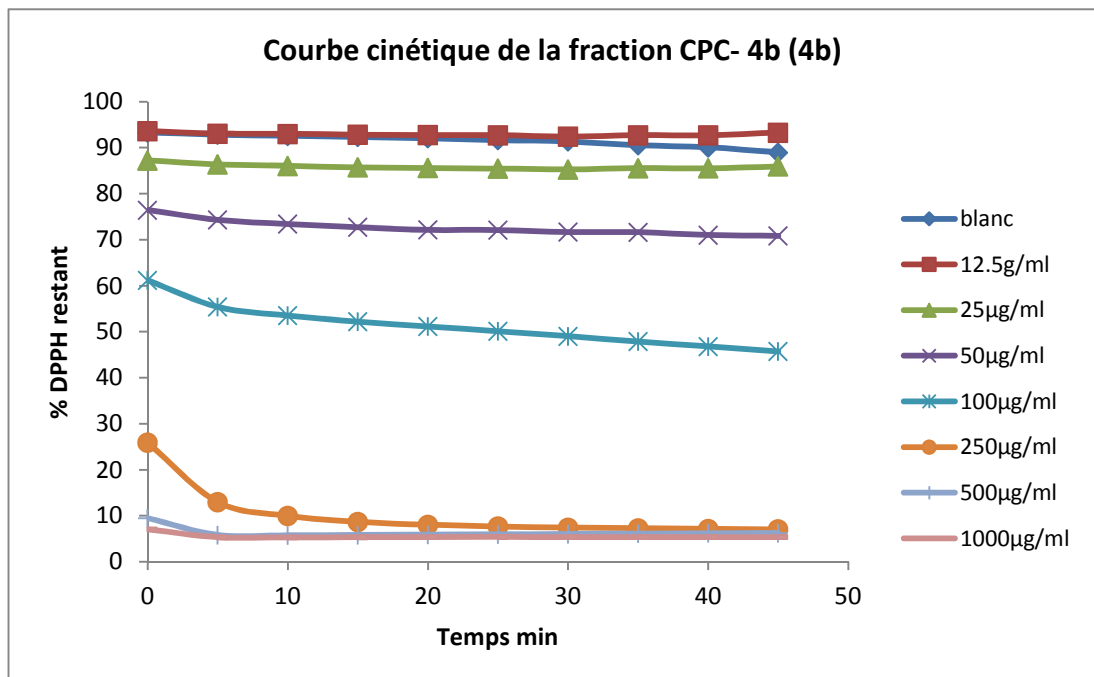
Partie –III-expérimentale

La courbe cinétique de l'extrait butanolique



-c-

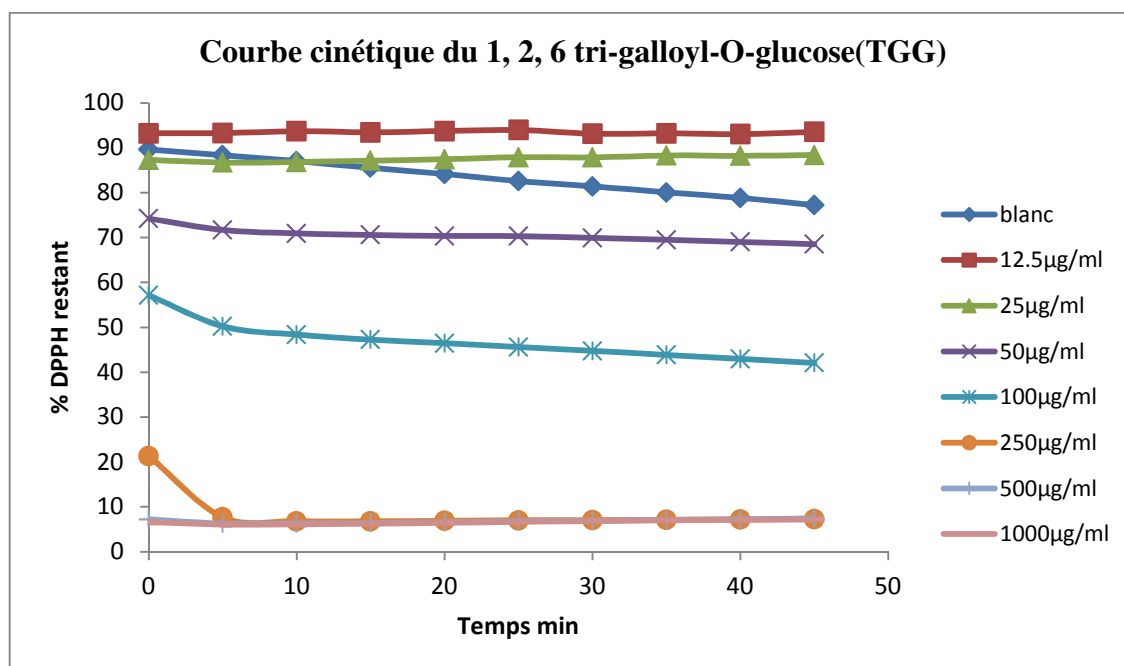
La courbe cinétique de la fraction CPC-4



-d-

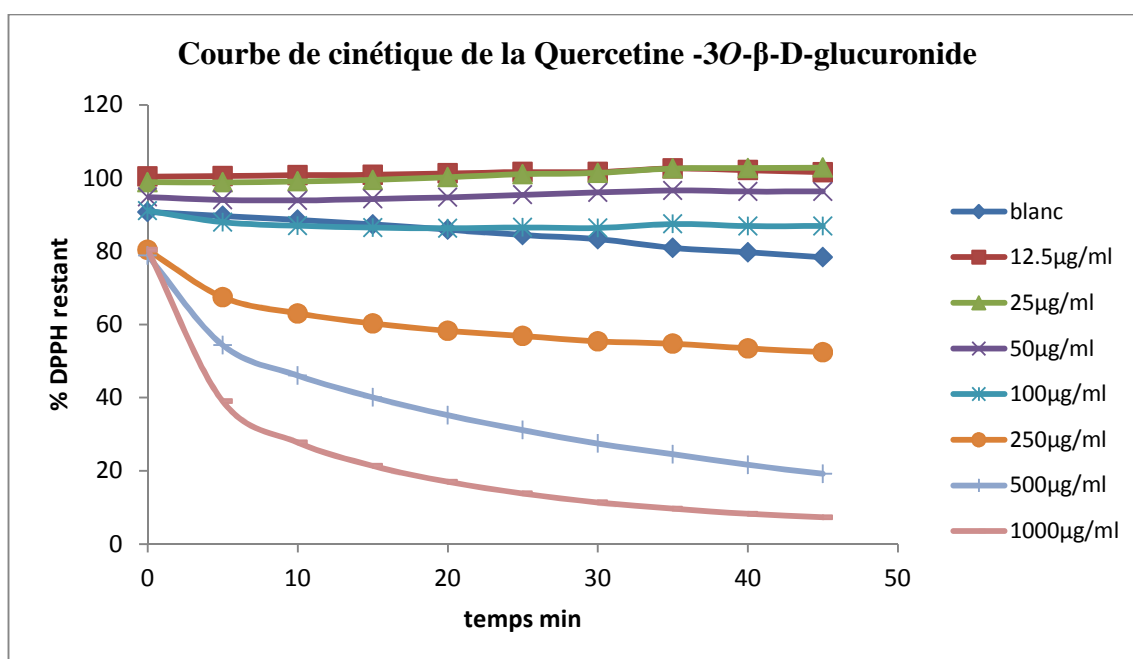
Partie -III-expérimentale

Le composé isolé de la fraction CPC-4 (le tannin (gallique (1, 2, 6 tri- galloyl- β -D-glucose), TGG)



-e-

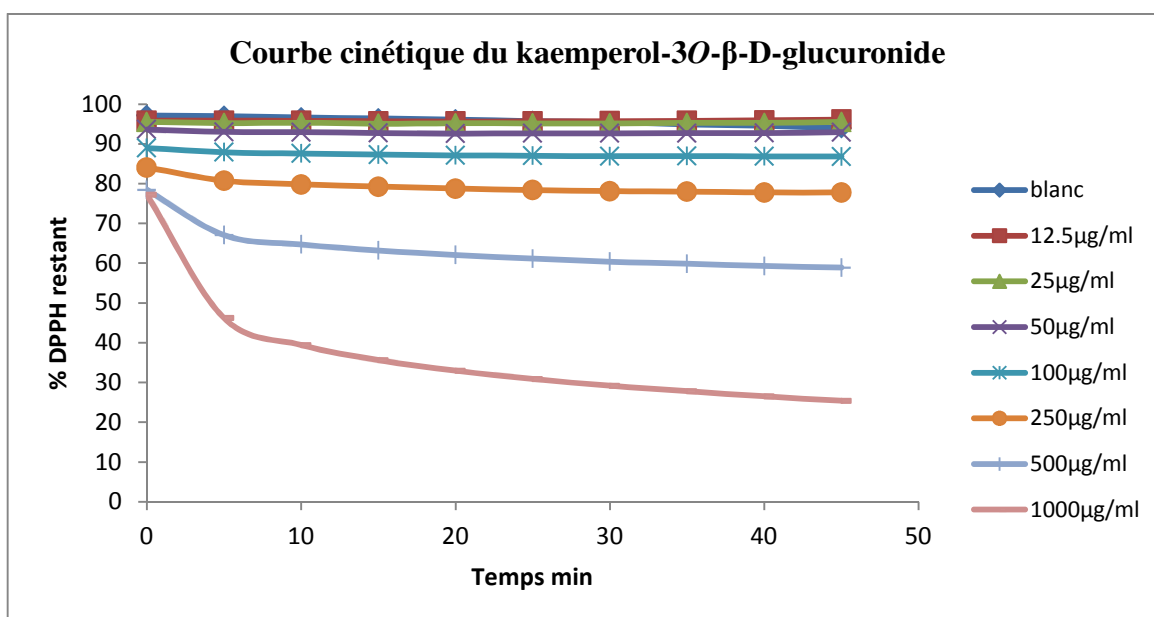
La courbe cinétique du composé isolé de l'extrait butanolique (la Quercétine -3O- β -D-glucuronide).



-f-

Partie –III-expérimentale

La courbe cinétique du composé isolé de l'extrait butanolique (le kaempferol-3O-β-D-glucuronide)



-g-

Figure VI-8 (a,b,c,d,e,f,g) : Les courbes cinétiques de concentrations différentes

On constate que pour les composés examinés, la réaction est biphasée, avec une diminution rapide de l'absorbance dans les premières minutes (10min), suivie d'une étape lente, jusqu'au stade de l'équilibre. Alors on distingue deux zones : une zone à forte cinétique de piégeage du radical observée au bout des premières minutes pour certaines concentrations généralement de 50µg/ml jusqu'au 1000µg/ml pour tous les composés sauf l'acide gallique.

III.8. Conclusion

Cette troisième partie a eu pour but la présentation du cheminement et la description des méthodes que nous avons suivies pour l'identification et l'isolement des composés actifs existants dans une source d'origine végétale. Nous avons vu la description du matériel végétal choisi d'*Euphorbia guyoniana* Boissier et Reuter.

Dans cette étude nous avons présenté le principe :

- ✓ des techniques d'extraction solide-liquide (macération, extraction par les différents solvants).
- ✓ des méthodes de caractérisation des extraits (CCM, CLHP).
- ✓ des méthodes utilisées pour le fractionnement et la purification des extraits (extraction liquide-liquide, chromatographie de partage centrifuge, chromatographie préparative).

*****Partie –III-expérimentale*****

- ✓ des tests appliqués afin de déterminer l'activité antioxydante des extraits (Test DPPH).

Le fait d'avoir caractérisé le matériel végétal et d'avoir présenté les étapes nécessaires pour l'extraction et l'analyse des principes actifs extraits nous a permis de mieux choisir les conditions de déroulement de nos travaux de recherche dont les résultats sont discutés dans la partie résultats et discussion de ce manuscrit.

Références bibliographies

- 1 Simonyan. A.V., A.L.S.hinkarenko, and E.T.Oganesyan, *Use of the cyanidine reaction in the analysis of flavonoids*. 1972: p. 59-62.
- 2 Wagner.H and Blatt.S, *Plant drug analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. . 2nd Edition ed. 2001.
- 3 Rouessac, F., Rouessac. A., *Analyse chimique méthodes et techniques industrielles modernes cours et exercices résolus*. 5éme ed. Dunod. Paris. 2000. P : 55-74.
- 4 Hostettmann, K., Marston, M., Hostettmann, M. *Preparative Chromatography Techniques – Applications in Natural Product Isolation*. 2nd édition, Springer Verlag, Berlin. 1997. P: 10-11 et 53.
- 5 Wolfender, J.-L., Waridel, P., Ndjoko, K., Hobby, K.R., Major, H., Hostettmann, K., *Evaluation of Q-TOF-MS/MS and multiple stage IT-MSn for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extract*. *Analisis*, 2000. 28 (10) P: 895-906.
- 6 Silverstein, W. K., *Identification spectrométrique de composés organiques*. 2éme éd. De boeck. 2007.
- 7 Parejo, I., Viladomat. F., Bastida. J., Schmeda-Hirschmann. G., Burillo. J., et al., *Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from fennel (Foeniculum Vulgare Mill.) waste*. *Agriculture and food chemistry*, 2004. 52. P: 189061897.
- 8 Parejo, I., Codina. C., Petrakis. C., Kefalas. P., *Evaluation of scavenging activity assessed by Co (II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH (2, 2-diphenyl-picrylhydrazyl) free radical assay*. *Journal of pharmacological and toxicological Methods*, 2000. 44. P: 507-5012.



Conclusion générale

Conclusion générale et perspective

L'objectif de cette thèse était de déterminer les constituants des extraits de la partie aérienne de l'espèce *Euphorbia guyonianus tithymalus* (*Euphorbia guyoniana* Boissier et Reuter) Klotzsch et Garcke. A cet effet, nous avons mis en œuvre le fractionnement et l'identification des produits naturels isolés à partir des extraits de l'espèce choisie. Cette plante est endémique au Sahara septentrional d'Algérie appartenant à la grande famille d'Euphorbiaceae.

L'étude bibliographique réalisée sur la plante a montré que les flavonoïdes de la partie aérienne n'ont pas fait l'objet d'étude phytochimique auparavant. Cependant, nous notons que récemment, des études sont réalisées sur l'espèce mais elles se sont concentrées sur les terpènes.

Au cours de ce travail, nous avons isolé les métabolites secondaires majoritaires des extraits étudiés. Il s'agit des extraits butanolique et à l'acétate d'éthyle de la partie aérienne et l'extrait acétate d'éthyle des graines. L'utilisation du nouvel appareil sans support solide en l'occurrence la chromatographie de Partage Centrifuge (CPC) offre une méthode intéressante, non seulement dans le domaine de l'analyse d'extraits végétaux, mais aussi dans la chimie en général. La méthodologie de purification a été essentiellement fondée sur la combinaison de différentes méthodes chromatographiques solide-liquide sur différents supports (chromatographie sur couche mince, chromatographie sur colonne, chromatographie liquide à haute performance analytique et préparative).

La détermination structurale des métabolites secondaires isolés a été réalisée grâce à l'utilisation de techniques physico-chimiques et spectroscopiques usuelles telles que la spectroscopie ultraviolet (UV), la spectrométrie de masse (SM), spectroscopie de résonance magnétique (RMN) et l'intra-rouge (IR).

En ce qui concerne la spectrométrie de masse en Ionisation Electro-Spray (ESI-SM) a permis la détermination du poids moléculaire ainsi que la formule brute des métabolites secondaires isolés. L'étude structurale combinée ; spectroscopie RMN monodimensionnelle (^1H , ^{13}C , DEPT, Jmod) et bidimensionnelles (COSY, HSQC et HMBC), la mesure du pouvoir rotatoire et sa comparaison avec les données de la littérature nous a permis de réaliser la détermination structurale définitive des composés isolés.

Ces démarches nous a conduit à l'isolement et à l'identification des métabolites secondaires appartenant à trois classes des flavonoïdes (**figure 85**):

- Tannin hydrolysable (1, 2, 6 tri-*O*-galloyl- β -D-glucose),
- Deux flavonols, la quercetine -3*O*- β -D-glucuronide et le Kaempferol-3*O*- β -D-glucuronide,

Ces deux types ont été isolés à partir de la partie aérienne.

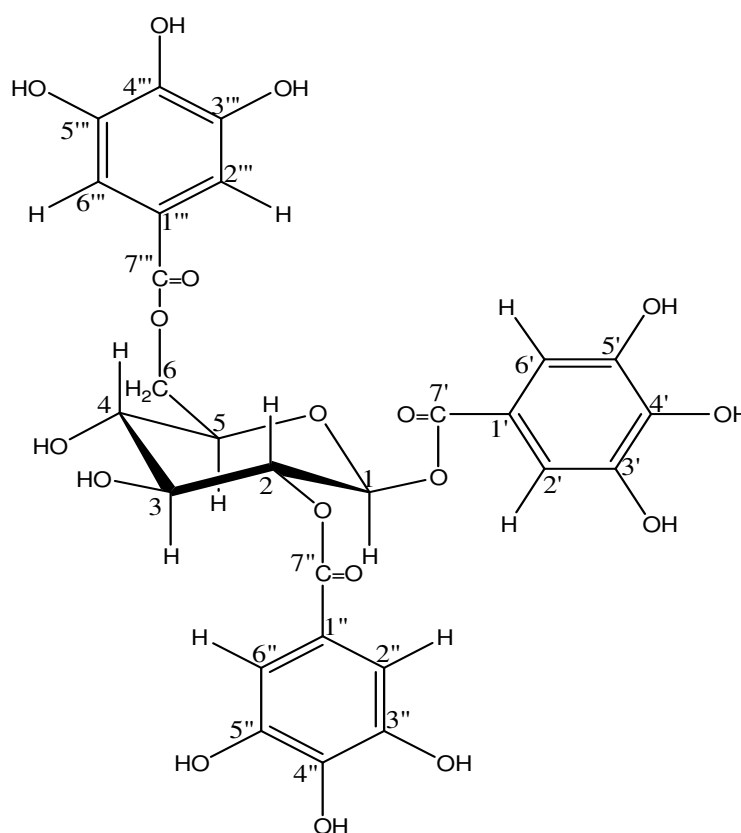
- Une coumarine simple, l'esculetine a été isolée à partir des graines.

Conclusion générale

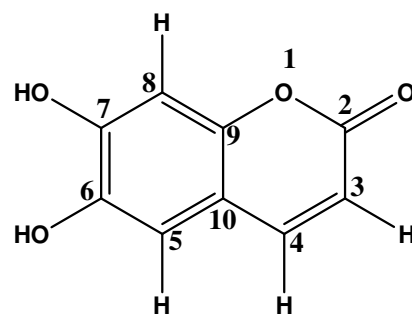
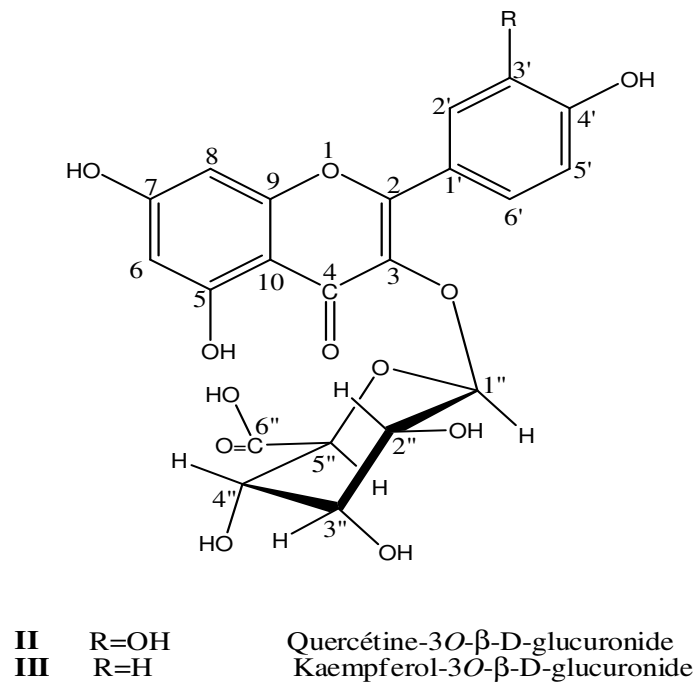
Concernant le test de détection de l'activité antioxydante et inhibitrice pour les extraits et les métabolites secondaires isolés, elle a été réalisée en utilisant le DPPH[•] car cette méthode est simple, rapide et facile à réaliser. Les composés isolés ont réagi positivement et ont amené à des résultats prometteurs. Une activité très forte a été observée au composé I isolé (le tannin gallique) à faible concentration.

L'activité antioxydante retrouvée dans les extraits et composés d'*E. g. tithymalus* confère à la plante des vertus thérapeutiques contre certaines pathologies telles que le cancer, l'athérosclérose, l'asthme et l'arthrite.

En conclusion, ce travail consacré à l'étude phytochimique de la partie aérienne d'*Euphorbia guyoniana tithymalus* (*Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut.) Klotzsch & Garcke constitue sans doute une contribution importante pour la famille Euphorbiaceae en général et l'espèce en particulier.



I 1, 2, 6 tri-O-galloyl-b-D-glucose



IV Esculetine

Figure 85 : les métabolites secondaires isolés (**I**, **II**, **III**, **IV**) de la partie aérienne de la plantes

Nos perspectives de recherche pour le futur sont les suivantes :

- ✓ Poursuivre l'étude phytochimique des espèces du genre *Euphorbia* afin d'isoler les métabolites secondaires contenus dans les extraits et faire une comparaison entre les espèces de ce genre.
- ✓ Etudier l'activité antioxydante avec différentes méthodes.

PhytoChem & BioSub Journal (PCBS Journal) is a peer-reviewed research journal published by Phytochemistry & Organic Synthesis Laboratory. The PCBS Journal publishes innovative research papers, reviews, mini-reviews, short communications and technical notes that contribute significantly to further the scientific knowledge related to the field of Phytochemistry & Bioactives Substances (Medicinal Plants, Ethnopharmacology, Pharmacognosy, Phytochemistry, Natural products, Analytical Chemistry, Organic Synthesis, Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Chemistry, Biochemistry, Computational Chemistry, Molecular Drug Design, Pharmaceutical Analysis, Pharmacy Practice, Quality Assurance, Microbiology, Bioactivity and Biotechnology of Pharmaceutical Interest)

It is essential that manuscripts submitted to PCBS Journal are subject to rapid peer review and are not previously published or under consideration for publication in another journal. Contributions in all areas at the interface of Chemistry, Pharmacy, Medicine and Biology are welcomed.

Editor in Chief

Pr Abdelkrim CHERITI

Phytochemistry & Organic Synthesis Laboratory

Co-Editor

Pr Nasser BELBOUKHARI

Bioactive Molecules & Chiral Separation Laboratory

University of Bechar, 08000, Bechar, Algeria

Editorial Board

Afaxantidis J. (France), Akkal S. (Algeria), Al Hamel M. (Morocco), Allouch A. (Lebanon), Aouf N. (Algeria), Asakawa Y. (Japan), Atmani A. (Morocco), Awad Allah A. (Palestine), Azarkovitch M. (Russia), Baalioumer A. (Algeria), Badjah A.Y. (KSA), Balansard G. (France), Barkani M. (Algeria), Belkhiri A. (Algeria), Benachour D. (Algeria), Ben Ali Cherif N. (Algeria), Benayache F. (Algeria), Benayache S. (Algeria), Benharathe N. (Algeria), Benharref A. (Morocco), Bennaceur M. (Algeria), Bensaid O. (Algeria), Berada M. (Algeria), Bhalla A. (India), Bnouham M. (Morocco), Bombarda E. (France), Boucekara M. (Algeria), Boukebouz A. (Morocco), Boukir A. (Morocco), Bressy C. (France), Chehma A. (Algeria), Chemat F. (France), Chul Kang S. (Korea), Dadamoussa B. (Algeria), Daiche A. (France), Daoud K. (Algeria), De la Guardia M. (Brazilia), Dendoughi H. (Algeria), Derdour A. (Algeria), Djafri A. (Algeria), Djebar S. (Algeria), Djebli N. (Algeria), Dupuy N. (France), El Abed D. (Algeria), EL Achouri M. (Morocco), El Hatab M. (Algeria), El Omar F. (Lebanon), Ermel G. (France), Esnault M. A. (France), Govender P. (South Africa), Jouba M. (Turkey), Hacini S. (Algeria), Hadj Mahamed M. (Algeria), Halilat M. T. (Algeria), Hamed El Yahia A. (KSA), Hamrouni A. (Tunisia), Hania M. (Palestine), Iqbal A. (Pakistan), Gaydou E. (France), Ghanmi M. (Morocco), Gharabli S. (Jordan), Gherraf N. (Algeria), Ghezali S. (Algeria), Gouasmia A. (Algeria), Greche H. (Morocco), Kabouche Z. (Algeria), Kacimi S. (Algeria), Kajima J.M. (Algeria), Kaid-Harche M. (Algeria), Kessat A. (Morocco), Khelil-Oueld Hadj A. (Algeria), Lahreche M.B. (Algeria), Lanez T. (Algeria), Leghseir B. (Algeria), Mahiuo V. (France), Marongu B. (Italia), Marouf A. (Algeria), Meddah B. (Morocco), Melhaoui A. (Morocco), Merati N. (Algeria), Mesli A. (Algeria), Mushfik M. (India), Nefati M. (Tunisia), Ouahrani M. R. (Algeria), Oueld Hadj M.D. (Algeria), Pons J.M. (France), Radi A. (Morocco), Rahmouni A. (Algeria), Reddy K.H. (South Africa), Reza Moein M. (Iran), Rhouati S. (Algeria), Roussel C. (France), Saidi M. (Algeria), Salgueiro L.D (Portugal), Salvador J. A. (Spain), Seghni L. (Algeria), Sharma S. (India), Sidiqi S. K. (India), Souri E. (Turkey), Tabcheh M. (Lebanon), Tabti B. (Algeria), Taleb S. (Algeria), Tazerouti F. (Algeria), Vantuyne N. (France), Villemin D. (France), Yayli N. (Turkey), Youcefi M. (Algeria), Ziyat A. (Morocco), Zouieche L. (Algeria), Zyoud A.H. (Palestine).

PhytoChem & BioSub Journal

Peer-reviewed research journal on Phytochemistry & Bioactives Substances

ISSN 2170 - 1768

PCBS Journal

*PCBS
Journal*

Volume 8 N° 1

2014



Edition LPSO
Phytochemistry & Organic Synthesis Laboratory
<http://www.pcbsj.webs.com> , Email: phytochem07@yahoo.fr

The Coumarin from *Euphorbia guyoniana* Boissier and Reuter

OUANISSA SMARA^{1,3}, CLAIRE VIGOR², AUDREY JULIA², CECILE MORAL-SALMI²,
JOSEPH VERCAUTEREN² & BELGACEM LEGSEIR¹

¹Laboratory of Bio-organic and Synthesis LSBO, Faculty of Science, University of Badji Mokhtar Annaba, 23000, Algeria.

²Laboratory of Pharmacognosy, University of Montpellier 1, Faculty of Pharmacy, 15 Void Charles Flahault B.P. 14491, 34093 Montpellier CEDEX 5, France.

³Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Material Sciences, University Kasdi Merbah Ouargla, 30000, Algeria

Received: November 17, 2013; Accepted: March 05, 2014

Corresponding author Email ouanissasm@yahoo.fr

Copyright © 2014-POSJ

DOI:10.163.pcbsj/2014.8.1.8

Abstract. Esculetin is a phenolic compound that is found in various natural plant products and induces apoptosis in several types of human cancer cells. However, the underlying mechanisms of its action are not completely understood. In the present work a phytochemical study of ethyl acetate extracted from the aerial parts of *Euphorbia guyoniana* plant endemic of Algeria, led to the isolation of a compound (esculetin). The purification of this compound was by column chromatography and TLC. The identification of the structure was used by usual spectroscopic methods such as ESI-MS, NMR (1D and 2D). Coumarins *Euphorbia guyoniana* were not isolated earlier.

Key Words: Euphorbiaceae, *Euphorbia*, *guyoniana*, coumarin and esculetin

1. Introduction

Euphorbia guyoniana Boissier and Reuter is an endemic plant of the Saharan plant growing in sandy and desert habitat, in the south of Algeria. This plant belongs to the Euphorbiaceae family; *Euphorbia* species are well-known to be generally toxic, skin irritants *Euphorbia* *Guyoniana* traditionally used to treat snakebites (Quezel, 1962; Bellakhdar, 1997).

This endemic plant of Algeria, is located in sandy regions, pre-desert and in the north of Sahara. It is a powerful herb in length and creeping underground stem, bright green 30 Cm to 100 Cm in height. *Euphorbia guyoniana* has a local name “lebina”. It was previously worked on by (Ahmed, 2006) and he reported the isolation of diterpenoids isolated from the aerial parts and by (Haba, 2007) who reported the isolation of triterpenoids from the roots. The purposes of this work were developed and evaluated efficient and simple procedures for extraction of secondary metabolites.

Coumarins are widespread in some families; they are almost in all parts of plants and especially in fruits and seeds. Coumarins are often glycosides (**Bruneton, 2009**).

Esculetin (6, 7-dihydroxycoumarin) is a naturally occurring coumarin derivative that is found in various natural plant products and was reported to have beneficial pharmacological and biochemical activities (**Park, 2008**) and chemotherapeutic activities against several types of cancers (**Kok, 2009**).

2. Materials and Methods

General Experimental Procedures

The solvents were analytical grade quality, purchased from Sigma-Aldrich Acros Organic and VWR-Prolabo. Water was produced in laboratory of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Montpellier 1, France (MilliQ-water 18.2 M Ω (ELGA-II-MK, 230V ac-50 Hz-60 VA). Column silica powder and TLC silica F₂₅₄ plates from Merck, and developed in mobile phase below. Components were visualized under ultra-violet light (λ 254 and 365 nm) and detected by Natural product (2-aminoethyl-phenyl-borate) 0.1% in methanol and PEG 5% (polyethylene-glycol-3000, Fluka) in ethanol. FT-IR measurements were carried out at room temperature on a Perkin- Elmer "Spectrum 100" FT-IR Spectrometer (America), all the samples were deposited as a solid after lyophilization. But Mass spectra were performed with an apparatus LCQ Advantage "Thermo finnigan" ESI in negative and positive mode. NMR spectra obtained at 22°C on Brüker Advance 500 operating at 500.13 MHz for ¹H and 125.75 MHz for ¹³C. Chemicals shifts (δ) are given in ppm, and coupling constants (*J*) are reported in Hz. Samples were dissolved in deuterated solvent (CD₃OD).

Plant Material

The seeds of *Euphorbia guyoniana* Boiss. and Reut. were collected in April 2008 from Oued-Souf region, in the south eastern part of Algeria. This plant identified by Dr A. Chahma Department of Agriculture, Faculty of Science, University Kasdi Merbah Ouargla, Algeria.

Extraction and Isolation

142 g from seeds was ground into fine powder, then delipited with hexane (24 hours of maceration). The powder was dried and then degreased by dichloromethane 24 hours. The dried powder of seeds was extracted successively with solvent of increasing polarity: ethyl acetate (2 x 1,4 L) and n-butanol (2 x 1,4 L) 24 hours for each extract, the pooled solvents were removed under reduced pressure (40°C maximum) to yield (572 mg) of EtOAc and (32 mg) of n-butanol. Each step was followed by thin layer chromatography. In this study we are interested in ethyl acetate extract.

The ethyl acetate extract (572 mg) dissolved in methanol is mixed with a small amount of silica gel; the mixture was dried in vacuum and then evaporated to spraying of a homogeneous powder. The latter was deposited on the silica gel column (0.9 x 25 Cm, 70 - 230 mesh) previously prepared. The ethyl acetate extract was subjected to a first fractionation, using the flowing gradients dichloromethane / ethyl acetate up to 100 % EtOAc and then followed by the gradient of ethyl acetate / methanol up to 100 % MeOH to collect 13 fractions noted F1-F13.

Chromatographic analysis of the different fractions of the extract has noted that the fractions F6, F7, F8, F9 and F10 are not pure, but they have a major product as green fluorescent spot. It's $R_f = 0.36$ in the following system elution:

The system: toluene/ethyl formiate/ formic acid (v/v/v: 5/4/1)
Revealing reagent Np/PEG (**wagner, 2001**).

Fractions F6, F7, F8, F9 and F10 are collected for these fractions which contain the same major product. 173.6 mg of this mixture of ethyl acetate seeds fractions (ACG-F7) was chromatographed on second silica gel column (70 - 230 mesh) using dichloromethane, gradient of dichloromethane / methanol up to collect nine fractions of 100 ml volume.

The column is followed by thin layer chromatography, this column also allowed us to obtain a pure fraction as colorless crystals in long needles (ACG-C2) 22.8 mg (**compound I**) after evaporating solvent.

3. Results and Discussions

Identifications of the compound isolated from the ethyl acetate extract

After purification of the crystals the compound **I** (fig.1) was obtained as colourless needles (fig.2). The molecular formula was determined as C₉H₆O₄. The analysis of mass spectrometry was performed by high-resolution electrospray (ESI-MS). The spectrum obtained shows us a molecular ion at m / z 177.00 [M – H]⁻. In the ¹H NMR spectrum (500 MHz, CD₃OH), showed two singlet signals at δ 6.65 (1H, s) and 6.93 (1H, s) and two doublets at δ 6.18 (*d*, *J*= 9.35Hz, 1H) and 7.78 (*d*, *J*= 9.35 Hz, 1H). ¹³C NMR spectrum (125.75 MHz, CD₃OH) displayed signal at δ 164.30 of carbon carbonyl, four carbon of methine at δ 112.46, 146.08, 103.60 and 112.98 ppm, two hydroxylated carbons at δ 112.77, 144.58 ppm and two quaternary carbon atoms at δ 152.04, 150.47 ppm. ¹H NMR, ¹³C NMR-J mod., HSQC and HMBC identified that the compound **I** is the esculetin (**El-Bassuony1, 2006; Gherraf, 2006**) table 1.

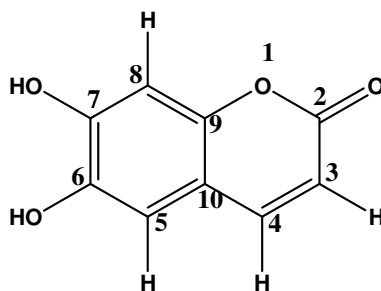


Fig.1: 6,7-Dihydroxycoumarin(Esculetin) structure



Fig.2: Esculetin cristal

Table 1: ^1H NMR and ^{13}C NMR data of compound I (500 MHz in methanol CD_3OD deuterated and the coupling constant J (Hz)).

Crystals = Esculetin (compound I)				
Position	δ_{H} (ppm), J (Hz)	δ_{C} (ppm)	HMBC (H to C)	HSQC (H to C)
2	-	164.30	-	-
3	6.18 (<i>d</i> , $J = 9.35$)	112.46	C2	C3
4	7.78 (<i>d</i> , $J = 9.35$)	146.08	C2, C8, C9	C4
5	6.75 <i>s</i>	103.60	C6, C7, C9	C5
6	-	144.58	-	-
7	-	112.77	-	-
8	6.93 <i>s</i>	112.98	C4, C5, C9	C8
9	-	152.04	-	-
10	-	150.54	-	-

Conclusion

The study of the seeds of *Euphorbia guyoniana* by column chromatography on silica gel isolated coumarin is not previously obtained from this plant. Our results showed that the compound obtained and identified by the usual spectroscopic methods (1D, 2D) is Esculetine form of colorless needle crystals.

Acknowledgments

Miss Smara would like to thank specially Mr Dendougui and Mr Gherraf for their help for support at the heart of this study and for their encouragement.

References

- Ahmed, A.A., Gherraf, N., El-Bassuony, A. A., Rhuati, S., et al., *Guyonianin A and B, Two Polyester Diterpenes from Algerian Euphorbia guyoniana*. Natural Product Communications, 2006. **1**: p. 1-7.
- Bellakhdar, J., *La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle*. Ibis Press. 1997.
- Bruneton, J., *Pharmacognosie- phytochimie, plantes médicinales. 3eme ed* 1999.
- El-Bassuony, A.A., Abdel-Hamid, N.M., *Antibacterial coumarins isolated from Launaea Resedifolia*. 2006., Chimie des matières premières végétales. (1) p: 65-68.
- Gherraf, N., El-Bassuony, A. A., Zellagui, A., Rhuati, S., et al., *Isolation of coumarins and coumarin glucoside from Launaea resedifolia*. Asian Journal of Chemistry. 2006. **18** (3). P: 2348-2352.
- Haba, H., Lavaud, C., Harkat, H., Alabdul Magid, A., *Diterpenoids and triterpenoids from Euphorbia guyoniana*. Phytochemistry, 2007. **68**(9): p. 1255-1260.
- Kok, S.-H., Yeh, C. C., Chen, M. L., Kuo, Y.-P. M., *Esculetin enhances Trail-induced apoptosis through DR5 upregulation in human oral cancer SAS cells*. Oral Oncology, 2009. **45**(12): p. 1067-1072.
- Park, C., Jin, C.-Y., Kim, G.-Y., Choi, I.-W., *Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia U937 cells through activation of JNK and ERK*. Toxicology and Applied Pharmacology 2008. **227**: p. 219-228.
- Quezel, P., *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales* Vol. 1-2. 1962, Paris.
- Wagner. H., and Blatt. S., *Plant drug analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2nd Edition. 2001.

Received: March 02, 2014 / Accepted: June 14, 2014 / Published: June 30, 2014.

Abstract: In this work, aerial parts of *Euphorbia guyoniana* were studied. The use of preparative high pressure liquid chromatography allowed to isolate two flavonoids and a gallic tannins: Quercetine-3-O- β -D-glucuronide, kaempferol-3-O- β -D-glucuronide and 1, 2, 6 tri-O-galloyl- β -D-glucose. Identifications were carried out using spectroscopic methods. In addition, scavenger potential of these compounds was studied using DPPH test.

Key words: *Euphorbia guyoniana*, flavonoids, quercetin-3O-glucuronide, kaempferol-3O-glucuronide, gallic tannin.

1. Introduction

The Euphorbiaceae family is one of the largest families in the kingdom, the genus *Euphorbia* contains about 1600 species characterized by the presence of a white liquid (latex) [1]. This genus has been the subject of numerous scientific investigations [2].

In the present work, the authors studied an endemic species that grows in the pre-desert region of the northern Sahara; it is also found in the sandy dunes and rocks of the Sahara, the genus *Euphorbia*, *guyoniana* *tithymalus* (*Euphorbia guyoniana* Boissier & Reuter) Klotzsch & Garck and traditionally used as an antidote for snakes venoms [3,4]. Recent studies on *Euphorbia guyoniana* Boissier and Reuter concerned the terpenoid [5-7].

In this paper the authors show for the first time the existence of flavonols in the aerial parts of *Euphorbia guyoniana*, Quercetin and Kaempferol belongs to this type of flavonoids [8]. Flavonols are present in almost all foods and they have an interesting biological activity for health. They are also able to prevent the

growth of some human cancer cells such as colon, ovarian, and gastrointestinal tract [9].

The authors have isolated two flavonols quercetin glucuronide and kaempferol glucuronide from butanol extract and tannin (1,2,6-tri-galloyl- β -D-glucose) isolated from the ethyl acetate extract.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

All solvents were HPLC grade, analytical grad from Sigma Aldrich, Acros Organics VWR-Prolabo, Quercetin (Aldrich) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma). MilliQ Water 18.2 MW (ELGA-II-MK, 230 V ac, 50Hz-60 VA). TLC plates and silica gel columns, F254 plates from Merck.

2.2 Plant material

The aerial parts of *Euphorbia guyoniana* Boiss. & Reut. was collected in April 2006 from Oued-Souf region in the south-eastern of Algeria, identified by Dr. A. Chahma (Department of Agriculture, Faculty of science, University of Kasdi Merbah Ouargla, Algeria).

Corresponding author: Smara Ouanissa, research fields: chemistry, mathematics and matter sciences. E-mail: OUANISSASM@yahoo.fr.

2.3 Analytical HPLC conditions

The chromatographic system consists of an Alliance 2695 (Waters, Milford, MA) equipped with a photodiode array detector 2996 (Waters) and a model 2487 (Waters) "Dual Wavelength Absorbance Detector", Controlled by Empower software (Waters Alliance). The column Synergi 4U Hydro-Rp 80 A C18 (Phenomenex), (250 mm × 2x mm, Waters) the particle diameter of 4 μm, the flow rate of 0.2 mL/min, and the oven is maintained at 30 °C. The separation was performed by gradient elution (eluent A: Water + 0.0025% TFA, eluent B: methanol + 0.0025 TFA). The increment was 20-100% solvent B for 60 min and 0%-100% for 20 min. Concentration is 1 mg/mL for each sample, and the solution filtered through a 0.45 mm filter.

2.4 Preparative HPLC

Purification of the compounds was performed by preparative chromatography, which is a system of pumps Bischoff (ISC) and ultraviolet visible detector Knauer K-2501 controlled by software (Pic 3). Waters column C18 Atlantis T3 (250 mm × 19 mm, 10 μm) and a pre-column Waters Atlantis T3, 10 μm. The purification was performed at wavelengths of 280 nm and 320 nm depending on the sample. The solvents in the mobile phase (A: water, B: methanol) different gradients were used to separate different samples.

2.5 Centrifugal partition chromatography (CPC)

CPC is a technique of partition chromatography liquid/liquid by interposing centrifugal force. It is

therefore lost [10, 11].

The experiments were performed using a centrifugal partition chromatography, the CPC model EverSeiko LLB-M, France. The column is a circular disk partition with 2136 channels in poly-phenylensulfite (PPS), cell length 15 mm, and the cell section 0.0588 cm². The capacity of the column is approximately 230 mL. The speed is 0-2000 RPM, pressure 60 bar. The dimension of rotor Φ 200 mm; H 75 mm, and the centrifuging radius is 82.5 mm average. The dimensions (L × W × H: 310 × 470 × 500 mm). The CPC system was connected to a pump model Bischoff preparative heads (0.1 to 19.9 mL/min). Fractions were collected with a fraction collector model Super Frac Pharmacia Biotech. The sample was injected manually using a syringe with a loop of 7 mL.

This apparatus allowed us to work on the elution modes:

(1) Ascending: when the upper phase is selected as mobile phase.

(2) Descending: when the lower phase is selected as mobile phase.

The system used (Q1): Hexane/ethyl acetate/ethanol/water (v/v/v/v: 1/8/2/7). Pressure of stability is 24 bars in ascending mode and the flow rate of 3 mL/min. Purification was performed on 2.5 g of ethyl acetate extract diluted in 6.5 mL of stationary phase and then injected; the recovery is made in the test tube with a fraction collector.

This separation leads to obtain in the ascending mode, 5 fractions and in the descending mode, three fractions. Only two are quantitatively exploitable, the

The mass spectra were performed by LCQ Advantage apparatus "Thermo Finnigan" ESI in positive and negative mode. Infrared spectra registered on a Perkin-Elmer "Spectrum 100" FT-FT-spectrometer (USA). Samples are solid after lyophilization.

2.8 Nuclear magnetic resonance (NMR)

NMR spectra were obtained at 25 °C with a Bruker Advance 500 MHz. The chemical shifts (δ) are given in ppm and coupling constants (J) in Hz. Samples were dissolved in deuterated solvents methanol (CD_3OD) and water (D_2O), 1H peak 500, 13 MHz and ^{13}C at 125 MHz.

2.9 DPPH antioxidant activity

The antioxidant activity of the phenolic compounds in general is related to the mobility of hydrogen of the hydroxyl group. In the presence of a free radical $R\cdot$, the H atom is transferred to this radical then transformed into a stable molecule RH [12, 13]. $DPPH\cdot$ gives an absorption maximum at 515 nm, after reduction by an antioxidant or a radical. The DPPH changes its color purple to yellow [14, 15] using the following equation (1).

$$DPPH = (DPPH_{ech} / (DPPH_{blanc})) * 100 \quad (1)$$

To measure the antioxidant activity and follow the reaction between DPPH and the antioxidant, we used a Tecan Spectrophotometer "Infinite M 200" with software I-Control 1.3 in methanol. This latter mixture rapidly (5 s) reagents in multiwall plates transparent and results each 5 min, the detection

on the initial concentration of DPPH (2).

$$A(515) = 0,0084 C_{DPPH} + 0,0368; R^2 = 0,9996$$

The kinetic curves are plotted for each extracts and isolated compounds, from these graphs, the values of % DPPH remaining when you reach the plateau is the number of moles of product/number of moles of DPPH. These values are transferred to another graph used to measure the reducing power and calculate effective concentration to reduce 50% of initial concentration of DPPH (EC50) (3). Our reference is gallic acid, and the value of EC50 is the most low antioxidant activity is high.

3. Results and Discussion

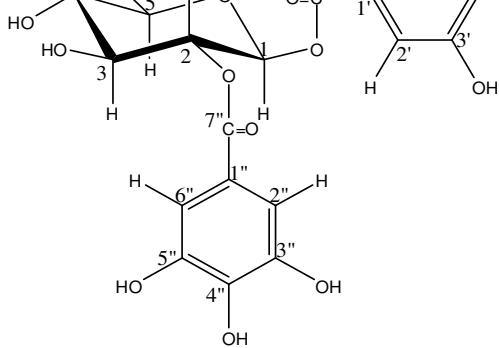
The n-butanol extract of *Euphorbia guyoniana* and CPC fraction were analyzed by HPLC, three compounds were isolated. UV spectra in methanol HPLC, give a first indication of the family of phenolic compounds isolated. The compound (I) shows an absorption band at 280 nm characteristic of a gallic tannin, and the absorption bands at 240 to 270 nm (second band) and the first band 320-380 nm characteristic of a flavonol compounds (II, III) (Fig. 1) [16].

3.1 Structure determination

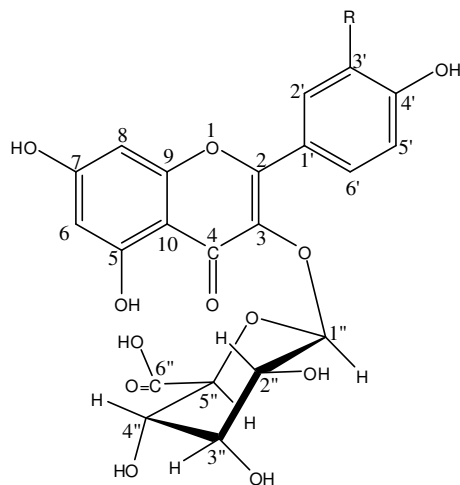
3.1.1 Compound I (1,2,6 tri-*O*-galloyl- β -D-glucose)

The compound gives a positive reaction with $FeCl_3$; it suggests the presence of a phenolic group in its structure. The structure was determined by spectroscopic methods, IR, UV-Vis, mass spectrometry ESI-MS, NMR (1D and 2D).

The compound (I) very pale yellow powder, mp



I 1, 2, 6 tri-O-galloyl- β -D-glucose



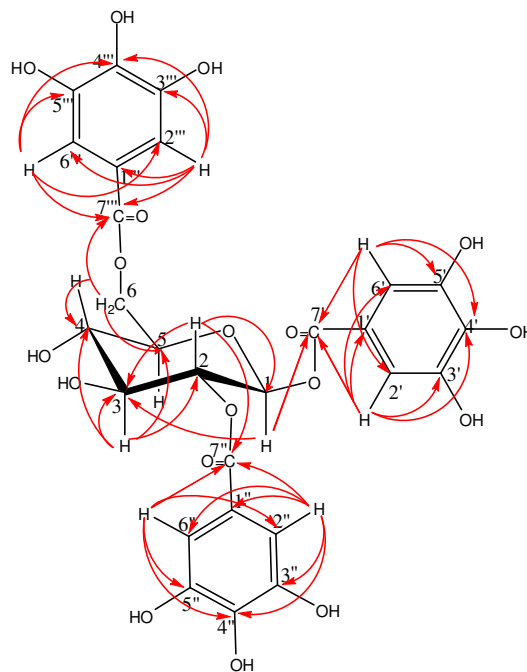
II R=OH Quercétine-3O- β -D-glucuronide
III R=H Kaempferol-3O- β -D-glucuronide

Fig. 1 Structure of the three compounds isolated from *Euphorbia guyoniana*.

from 195.5-196.5 °C; $[\alpha]_D^{21.6} = -87.81$ °C (0.0055, MeOH), UV λ_{\max} (MeOH) nm (log ϵ): 279 nm (3.52), 217 nm (3.91); IR indicates the presence of hydroxyl (3310.5 cm^{-1} carbonyl (1697.3 cm^{-1}) and C = C of an aromatic ring (1534.9 cm^{-1}), the ester functions (1314.5 cm^{-1} and 1196.1 cm^{-1}), CO alcohol (1071.7

$^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (500 MHz, CD_3OD) shows characteristic signals of the aromatic proton δ_{H} 7.00 (2H, s, H2', H6'); δ_{H} 7.05 (2H, s, H2'', H6''); δ_{H} 7.10 (2H, s, H2''', H6'''). The anomeric proton is visible δ_{H} 5.92 (1H, d, $J = 7.05$ Hz).

The chemical shift assignment of ^1H and $^{13}\text{C-NMR}$ is favored by the study of the spectrum H-H COSY, HSQC; the authors observe distant correlations provided by the HMBC spectrum. In HSQC spectrum, we observe the correlations: H1/C1, H2/C2, H3/C3, H4/C4, H5/C5 and H6/C6. All data (table 2) are used to locate the three galloyls and confirm the structure of compound I (1,2,6-tri-galloyl- β -glucose). The results are similar as data to the literature [18].



HMBC- 1, 2, 6-tri-galloyl- β -D-glucose (TGG)
Fig. 2 Correlation HMBC (H to C) of 1, 2, 6 tri-galloyl- β -D-glucose.

cm⁻¹; 1300.1 cm⁻¹; 1201.4 cm⁻¹) and also shows the presence of absorption bands of CH bonds in (1447.0 cm⁻¹), CO ether (1168.9 cm⁻¹), CO alcohol (1082.1 cm⁻¹ 1037.9 cm⁻¹ and 1018.8 cm⁻¹), and C = CH (948.6 cm⁻¹, 936.9 cm⁻¹; 875.8 cm⁻¹, and 761.6 cm⁻¹).

The mass spectrum Electro-Spray (ESI-MS) in

150]⁻, 255.17 [*M* - *H* - 176 - 46]⁻, 273 [*M* - *H* - 176 - 28]⁻ already presented in the literature [19] and may correspond to the fragmentation schema proposed below.

¹H-NMR of the compound II (Table 2) shows singlets (δ_H 6.2 and 6.4 ppm) is to aromatic protons

Table 1 Mass spectrum and fragmentation of compounds.

Componds	Ion full scan MS			MS/MS experiments		
	MW	[M-H] ⁻	Fragments ^a	Natural loss	Precursor ion scan	Product ion scan ^b
1, 2, 6 tri-galloyl-β-D-glucose	636	635	465, 483	170, 152	-	-
Quercetin-3- <i>O</i> -β-D-glucuronide	478	477	301	176	301	151, 179, 189, 255, 273
Kaempferol-3- <i>O</i> -β-D-glucuronide	462	461	285	176	285	285, 169, 240, 267

Table 2 ¹H-NMR and ¹³C-NMR data of compound II (500 MHz in CD₃OD, and the coupling constant *J* in Hz).

Quercetin-3- <i>O</i> -β-D-glucuronide (compound II)				
Position	δ _H (ppm)	<i>J</i> (Hz)	δ _C (ppm)	HMBC (H to C)
2	-	-	159,9	-
3	-	-	136,3	-
4	-	-	180,1	-
5	-	-	163,9	-
6	6,40 (s)	-	100,9	C-8, C-9, C-5, C-7, C-4
7	-	-	166,9	-
8	6,20 (s)	-	95,6	C-6, C-9, C-10, C-7, C-4
9	-	-	159,30	-
10	-	-	106,5	-
1'	-	-	123,7	-
2'	7,70 (s)	-	118,2	C-5', C-6', C-3', C-4', C-2
3'	-	-	146,8	-
4'	-	-	150,7	-
5'	6,84 (d)	8,40	116,9	C-2', C-6', C-3', C-4', C-2
6'	7,6 (d)	8,75	124,2	C-2', C-3', C-4', C-2
1''	5,38 (d)	7,75	105,1	C-3'', C-3
2''	3,55 (m)	-	76,3	C-1'', C-3''
3''	3,48 (m)	-	78,5	C-2'', C-4'', C-1'', C-5''
4''	3,60 (m)	-	73,8	C-3'', C-6''
5''	3,74 (d)	9,9	78,1	C-4'', C-3'', C-6''
6''	-	-	173,9	-

twenty-one carbon, the analysis of these signals confirmed that the quercetin is a genin and the sugar is a hexose linked to a carbonyl δ_C 173.97 ppm ^{13}C -NMR in the signal is deshielded for carbon C-3 (δ_C 136.28 ppm) and shielded for C-2 (δ_C 159.89 ppm) and C-4 (δ_C 180.12 ppm). This signal shows that the C-3 is the position of attachment of the sugar to the aglycone [21]. ^1H -NMR spectra and HMBC confirm that the compound (II) is a quercetin-3-O- β -D-glucuronide (table 2). These results are identical to those obtained by [19].

Compound (III): pale yellow powder, mp 164.4-166.2 C°, $[\alpha]_D^{21.6} + 8.81$ (0.000385, MeOH), UV λ_{max} (MeOH) nm (log ϵ): 351 nm (4.01), a shoulder at 299 nm (3.93), 266 nm (4.17); IR shows a hydroxyl 3208.6 cm^{-1} , carbonyl (1722.7 cm^{-1} , 1651.9 cm^{-1} , 1604.1 cm^{-1}), C = C of an aromatic ring (1497.8 cm^{-1}), the ester functions in 1356.5 cm^{-1} , 1206.7 cm^{-1} , 1079.7 cm^{-1}) and shows the presence of absorption bands of the CH bonds in (1438.3 cm^{-1}), CO ether (1176.0 cm^{-1} , and C = CH (888.5 cm^{-1} , 839.0 cm^{-1} , 804.2 cm^{-1}).

The mass spectrum of ESI-MS (table I) in negative mode shows ion pseudo-molecular at m/z 461 $[M - H]^-$ corresponding to a molecular weight of 462 u. m. a. and a molecular formula $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_{12}$. The fragment of 461.0 at m/z 285.07 $[M - H - 176]^-$ characteristic of a loss of acid glucuronide, the fragment (MS₃) 285.07 at m/z : 256.87 $[M - H - 176 - 28]^-$, 169.07 $[M - H - 176 - 116]^-$, 240.93 $[M - H - 176 - 44]^-$ and 267.13 $[M - H - 16 - 18]^-$.

^1H -NMR spectrum of the MeOH-d₄ (table IV)

analysis (table 3), confirms that the genin Kaempferol is linked to acid glucuronide, carbonyl signal at δ_C 178.73 ppm. The deshielded signal of C₃ at δ_C 135.21 ppm, and the signal shielded C₄ (δ_C 176.06 ppm) and

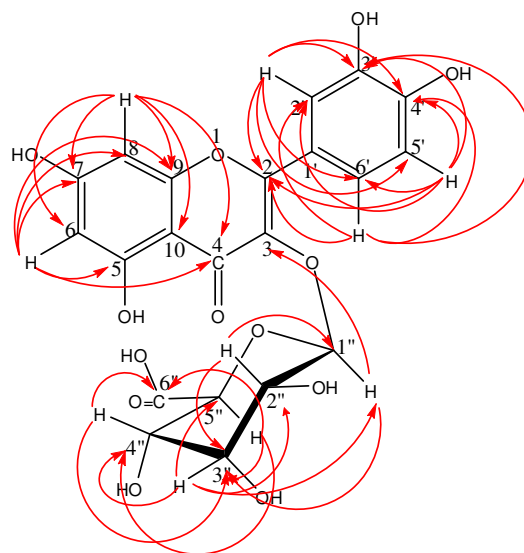


Fig. 3 HMBC of quercetin-3O- β -D-glucuronide.

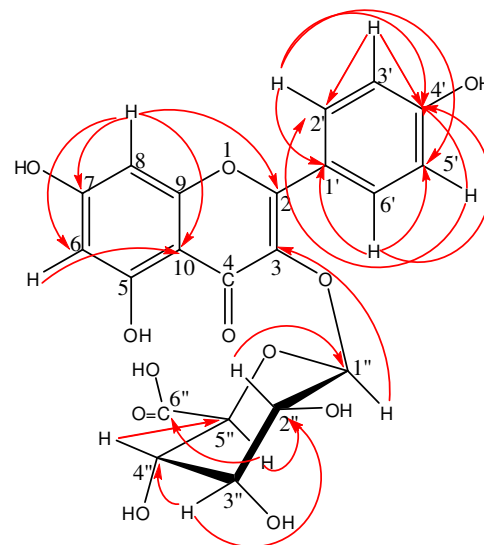


Fig. 4 HMBC Kaempferol-3O- β -D-glucuronide.

7	-	165,00	-	
8	6,29 s	95,42	C2, C6, C7, C10	
9	-	158,88	-	
10	-	105,24	-	
1'	-	122,08	-	
2'	7,85 d (5,1)	132,19	C1', C4', C5'	H3'
3'	6,85 d (7,2)	116,17	C2', C4'	
4'	-	160,11	-	
5'	6,85 d (7,2)	116,17	C2', C4'	
6'	7,85 d (5,1)	132,19	C1', C4', C5'	H5'
1''	5 s	103,73	C3	H2''
2''	3,57 m	72,69a	C1''	
3''	3,46 m	76,83a	C2'', C4''	
4''	3,6 m	74,54	C5''	
5''	3,6 m	77,84a	C2'', C6''	
6''	-	178,73	-	

Table 4 Results of scavenging DPPH.

Compound isolated from extracts	EC 50 (µg/mL)
Gallique acid	1,7826
1,2,6 tri- <i>O</i> -galloyl-β-D-glucose	3,0800
Fraction CPC-4 (4b)	3,3666
Quercetin	4,7676
Quercetin-3O-β-D-glucuronide	8,3333
Butanolic extract	11,7320
Kaempferol-3O-β-D-glucuronide	22,2500

C₂ (δ_C 157.75 ppm) shows that the attachment of the glucuronide acid in position 3 of Kaempferol. Analysis of the spectra H-H COSY and HSQC confirm the structure of Kaempferol-3O-β-D-glucuronide. The results are similar to the literature.

4. Antioxidant Results

Acid gallic > 1,2,6-tri-galloyl-β-D-glucose > Quercetin = CPC-4b Fraction > Quercetin-3O-β-D-glucuronide > Kaempferol-3O-β-D-glucuronide.

5. Conclusions

Euphorbia guyoniana is an important plant in Algeria, it is socio-economically and traditionally important for local populations where the culture thrives. The authors isolated the flavonoids (flavonol type) for the first time from this endemic plant: the Quercetin-3O-β-D-glucuronide and kaempferol-3O-β-D-glucuronide. It also allowed us to isolate hydrolyzable tannin (gallic tannin): 1,2,6 tri-*O*-galloyl-β-D-glucose. To our knowledge, this is the first report describing the antioxidant activity of Algeria *Euphorbia guyoniana* extracts against DPPH radical. This test shows the importance of this plant.

Acknowledgments

Special acknowledgments to Pr Dendougui for the help and support they provided during this study. Special thanks to Pr. Lanez, Pr. Dada Moussa and Mr. Gherraf for their encouragements.

- Traditionnelle* Isis Press.
- [5] Ahmed, A. A., Guerrf, N., El-Bassuony, A. A., and Rhuati, S., 2006. "Guyonianin A and B, Two Polyester Diterpenes from Algerian Euphorbia guyoniana." *Natural Product Communications* 1: 1-7.
- [6] Haba, H., Lavaud, C., and Harkat, H., 2007. "Diterpenoids and triterpenoids from Euphorbia guyoniana." *Phytochemistry* 68 (9): 1255-1260.
- [7] Hegazy, M. E. F., Mohamed, A. E. H., Aoki, N., Lkeuchi, T., 2010. "Bioactive jatrophone diterpenes from Euphorbia guyoniana." *Phytochemistry* (71): 249-253.
- [8] Bruneton, J., 1999. *Pharmacognosie-phytochimie, plantes médicinales, 3 eme ed.*
- [9] Cai, Q., Rahnh, R. O., and Zhanga, R., 1997. "Dietary flavonoids, quercetin, luteolin and genistein, reduce oxidative DNA damage and lipid peroxidation and quench free radicals." *Cancer Letters* 1 (19): 99-107.
- [10] Renault, J. H., and Zeches, Henault, M., 1995. "La chromatographie de contre courant: une technique d'avenir pour la purification des substances naturelles." *Spectra Analyse* p. 33-40.
- [11] Rolet, M., Thiebaut, D., and Rosset, R., 1992. "La CPC (chromatographie de partage centrifuge)." *Analysis* (20): 1-11.
- [12] Milardovic, S., Ivekovic, D. and Grabaric, B. S., 2006. "A novel amperometric method for antioxidant activity
- [15] Parejo, C., Codina, C., and Petrakis, C., 2000. "Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminal chemiluminescence and DPPH (2,2-diphenyl-picrylhydrazyl) free radical assay." *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* (44): 507-5012.
- [16] Simonyan, A. V., Hinkarenko, A. LS., and Oganesyanyan, E.T., 1972. *Use of the cyanidine reaction in the analysis of flavonoids* p. 59-62.
- [17] Owen, R. W., Haubner, R., and Hull, W. E., 2003. "Isolation and structure elucidation of the major individual polyphenols in carob fibre." *Food and Chemical Toxicology* 41 (12): 1727-1738.
- [18] Cheng, K. W., Yang, R. Y., Tsou, S. C. S., Lo, C.S.C., 2009. "Analysis of antioxidant activity and antioxidant constituents of Chinese toon." *Journal of Functional Foods* 1 (3): 253-259.
- [19] Hevesi Tóth B., 2009. "Polyphenol composition and antioxidant capacity of Epilobium species." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (49): 26-31.
- [20] Harborne, J. B., 1986. *The Flavonoids Advances in reseach* edited by C. Hall.
- [21] Niassy, B., Um, B. H., Lobstein, and A., Weniger, B., 2004. "Flavonoïdes de Tephrosia deflexa et Tephrosia albifoliolis." *Comptes Rendus Chimie* 7 (10-11): 993-996.