

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
**UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
**DEPARTEMENT DE CHIMIE**  
en cotutelle avec  
**UNIVERSITE LOUIS PASTEUR STRASBOURG**  
**FACULTE DE PHARMACIE**

N° d'ordre :

Série :

## **THESE**

Présentée pour obtenir le Doctorat en Sciences

de L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR

**Discipline : Sciences Pharmaceutiques**

**Spécialité : Pharmacognosie**

Et

de L'UNIVERSITE MENTOURI DE CONSTANTINE

**Discipline : Chimie Organique**

**Spécialité : Phytochimie**

par

**Mehdi CHAABI**

Diplômé de Magistère en Pharmacochimie

**Etude phytochimique et biologique d'espèces végétales africaines :**  
***Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae),**  
***Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae),**  
***Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae).**

**A soutenir publiquement le 03 juin 2008 devant le jury :**

### **JURY**

Présidente	Mme	F. BENAYACHE	Professeur	Université Mentouri, Constantine
Directeur de thèse	Mme	A. LOBSTEIN	Professeur	Université Louis Pasteur de Strasbourg
Co-directeur de thèse	M.	S. BENAYACHE	Professeur	Université Mentouri, Constantine
Examineur	M.	M. HIBERT	Professeur	Université Louis Pasteur de Strasbourg
Examineur	Mme	Z. MERAIHI	Professeur	Université Mentouri, Constantine
Examineur	M.	M. BENKHALED	Professeur	Université El-Hadj Lakhdar, Batna

الحمد لله الذي خلق آدم من تراب و علمه الأسماء كلها

رضاك خير من الدنيا وما فيها \*\*\* يا باري النفس قاصيها و دانيها

فليس للنفس آمال تحققها \*\*\* إلا رضاك فذا أسمى أمانيتها

فنظرة منك يا سؤلي ويا أملِي \*\*\* خير لي من الدنيا وما فيها

والصلاة والسلام على من خاطبه ربه بالوحي يدعوهُ للعلم فقال له :

إقرأ باسم ربك

سيدي يا رسول الله

صَلِّتْ عَلَيْكَ مَلَائِكَةُ الرَّحْمَانِ \*\*\* وَسَرَى الضِّيَاءُ بِسَائِرِ الْأَكْوَانِ

لَمَّا طَلَعَتِ الْوُجُودَ مَزُودًا \*\*\* بِحَمِي الْإِلَهِ وَرَايَةَ الْقُرْآنِ

# DÉDICACES

*À mes très chers parents*

*À ma très chère femme*

*À mes frères et sœurs*

*À tous ceux qui me sont chers*

## Remerciements

De prime abord, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à mes professeurs **Annelise LOBSTEIN et Samir BENAYACHE** pour avoir encadré patiemment ce travail, pour leurs précieuses remarques constructives et leur suivi pour mener à terme ce travail.

Je ne pourrais remercier jamais assez Monsieur le professeur **Marcel HIBERT** qui m'a ouvert ses bras pour m'accueillir dans l'UMR 7175 dont il a la direction. Il a bien voulu me faire l'honneur de siéger dans le jury, malgré toutes ses responsabilités et ses nombreuses occupations. Je le remercie très vivement et le prie de trouver ici un témoignage de mes sentiments respectueux.

Je remercie chaleureusement Madame le professeur **Fadila BENAYACHE**, pour avoir accepté de prendre part au jury de soutenance, tout le plaisir est pour moi ; je la remercie aussi pour sa grande gentillesse et sa disponibilité.

Mes vifs remerciements aussi à Madame le professeur **Zahia MERAIHI** qui est l'une des professeurs que j'aime et que je respecte beaucoup ; le destin a voulu encore une fois qu'elle me fasse l'honneur d'être présente dans le jury de ma thèse, après celui de mon Magister et après m'avoir encadré pour le mémoire de D.E.S. de Biochimie.

Je suis également très honoré que Monsieur **Mohamed BENKHALED** ait accepté de juger et de siéger dans le jury de ma thèse. Qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma respectueuse gratitude.

Mes remerciements vont également à toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, et notamment à :

Madame le Docteur Nelly FROSSARD,

pour la collaboration fructueuse, assistée de Madame le Docteur Véronique FREUND-MICHEL.

Madame le Docteur Claire LUGNIER,

pour m'avoir bien accueilli dans son laboratoire et appris avec rigueur les tests d'inhibition de phosphodiesterases. Merci également à Hélène Justiniano pour son aide technique fort appréciée.

Monsieur le Professeur Robert ANTON

pour l'accueil chaleureux que vous m'avez toujours réservé au Laboratoire de Pharmacognosie. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

Messieurs Bernard KUBALLA et Bernard WENIGER

pour votre simplicité, votre bonne humeur et votre disponibilité : mes sincères remerciements.

Cyril ANTHEAUME

pour ta gentillesse, ta grande compétence dans le domaine de la RMN et ta contribution à l'élucidation structurale des composés isolés.

Enfin, je ne voudrais pas oublier tous mes collègues et les stagiaires que j'ai côtoyé au Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg ainsi qu'au Laboratoire VAREN de l'Université Mentouri de Constantine, notamment Saliou, Catherine, Martine, l'Haj et bien d'autres encore...

# ABREVIATIONS

- AcOEt : Acétate d'éthyle
- AlCl<sub>3</sub> : Chlorure d'aluminium
- APCI : Ionisation Chimique à Pression Atmosphérique
- BuOH : butanol
- CCM : Chromatographie sur Couche Mince
- CI<sub>50</sub> : Concentration Inhibitrice 50
- CLHP : Chromatographie Liquide à Haute Performance
- CMLBH : Cellules Musculaires Lisses Bronchiques Humaines
- COSY : COrelated SpectroscopY
- CPT ou TFC: Contenu en Phénols Totaux
- d : doublet
- dd : doublet dédoublé
- ddd : doublet de doublet de doublet
- DEPT : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
- δ (ppm) : Déplacement chimique en partie par million
- DPPH<sup>•</sup> : radical 1,1-Diphényl-2 picrylhydrazyl
- EC<sub>1</sub> : concentration d'efficacité voisine de 1mM de Fe<sup>2+</sup>
- ESI : Electrospray (ionisation par électronébulisation)
- EtOH : Ethanol
- GAE : équivalent en acide gallique
- HCl : Acide chlorhydrique
- HMBC : Heteronuclear Multiple Bond Correlation
- HSQC : Heteronuclear Single Quantum Coherence
- OH : Radical hydroxyl
- IL-1β : Interleukine-1bêta
- IR : Infra-rouge
- J* (Hz) : Constante de couplage en Hertz
- Jmod : J-modulated spin-echo
- m : multiplet
- NBT : Bleu de nitrotétrazolium
- NEU : 2 - aminoéthyl-diphénylborate de sodium à 1 % dans le méthanol
- NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

RL(O)/(N): Radica(l)ux libre(s)(oxygéné)/azoté  
RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
ROESY : Rotating overhauser effect correlation Spectroscopy  
RSA : Relation Structure-activité  
s : singulet  
SM : Spectrométrie de masse  
SRSA : Superoxyde Radical Scavenging Activity  
t : triplet  
test LB : Test Liebermann-Burchard  
TFA : Acide trifluoroacétique  
TPTZ : 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine  
TOCSY : Total Correlated Spectroscopy  
Trd : triplet de doublet  
UV : Ultraviolet  
 $\lambda$  : longueur d'onde  
 $O_2^{\bullet -}$  : anion superoxyde

# Sommaire

<b>Introduction générale</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : Etude ethnopharmacologique d'<i>Euphorbia stenoclada</i> Baill. (Euphorbiaceae)</b>	<b>3</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>4</b>
<b>2. Présentation de la plante</b>	<b>6</b>
<b>3. Classification botanique</b>	<b>7</b>
<b>4. Bilan bibliographique sur le genre <i>Euphorbia</i></b>	<b>8</b>
4.1. Activités pharmacologiques	8
4.2. Etudes phytochimiques	9
<b>5. L'asthme</b>	<b>11</b>
5.1. Généralités	11
5.2. Le remodelage bronchique : caractéristiques histopathologiques dans l'asthme	12
5.3. Causes et facteurs de risque	14
5.4. Les allergènes	15
5.4.1. Les pneumoallergènes	15
5.4.2. Les trophoallergènes	15
5.4.3. Les allergènes médicamenteux	15
5.4.4. Les allergènes professionnels	16
5.4.5. La pollution atmosphérique	16
5.4.6. Le tabagisme	16
5.4.7. Les virus	16
5.4.8. Autres facteurs favorisants	16
5.5. Médicaments antiasthmatiques	17
5.5.1. Le médicament de contrôle	17
5.5.2. Le médicament de secours	17
<b>6. Matériel et méthodes</b>	<b>18</b>
6.1. Extraction et isolement	18
6.2. Traitement des cellules et test de prolifération cellulaire	21
6.3. Activité antiradicalaire (test au DPPH)	22
6.3.1. Principe du test	22
6.3.2. Protocole	23
6.4. Dosage des polyphénols totaux	24
6.4.1. Principe	24
6.4.2. Protocole	24
6.4.3. Courbe étalon de l'acide gallique	24
6.5. Statistiques	25
<b>7. Résultats</b>	<b>26</b>
7.1. Effet anti-prolifératif de l'extrait ES et fractionnement bioguidé	26
7.2. Identification des constituants de la fraction E	31
7.2.1. Identification du constituant présent dans la sous-fraction FE5	31
7.2.2. Identification du constituant présent dans la sous-fraction FE1	32
7.2.3. Identification de l'hypéroside	33
7.3. Identification du composé majoritaire présent dans la fraction FA	35



7.4. Etude de relation structure/activité	36
7.5. Analyse d'un infusé de parties aériennes d' <i>E. stenoclada</i>	37
7.6. Activité antiradicalaire et teneur en polyphénols totaux d' <i>E. stenoclada</i>	38
7.6.1. La teneur en polyphénols totaux	38
7.6.2. Activité antiradicalaire	39
7.6.3. Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité anti-radicalaire	39
<b>8. Discussion</b>	<b>40</b>
<b>Références</b>	<b>44</b>
<b>publication 1 : Anti-proliferative effect of <i>Euphorbia stenoclada</i> in human airway smooth muscle cells in culture</b>	<b>51</b>
<b>Chapitre 2 : Etude phytochimique d'<i>Anogeissus leiocarpus</i> Guill. &amp; Perr. (Combrtaceae)</b>	<b>57</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>58</b>
<b>2. Les triterpènes : Structure et identification</b>	<b>59</b>
2.1 Définition	59
2.2 Structure	59
2.2.1 Aglycone	59
2.2.2. Les sucres	60
2.2.3. Propriétés physiques	61
2.3. Elucidation structurale	63
2.3.1. Méthode classique	63
2.3.2. Méthode moderne	63
2.3.2.1. RMN du <sup>1</sup> H	64
2.3.2.2. RMN du <sup>13</sup> C	64
2.3.2.3. RMN à deux dimensions	65
<b>3. Description de la plante</b>	<b>67</b>
<b>4. Classification</b>	<b>67</b>
<b>5. Etude bibliographique d'<i>Anogeissus leiocarpus</i></b>	<b>68</b>
5.1. Etudes phytochimiques antérieures sur le genre <i>Anogeissus</i>	68
5.2. Études biologiques antérieures sur le genre <i>Anogeissus</i>	70
5.3. Utilisations traditionnelles	70
<b>6. Matériel et méthodes</b>	<b>71</b>
6.1. Extraction et isolement	71
6.2. Conditions chromatographiques utilisées en CLHP analytique et préparative	72
<b>7. Profils chromatographiques</b>	<b>74</b>
<b>8.1 Identification des triterpènes</b>	<b>77</b>
8.1.1. Elucidation structurale du composé <b>Alec1A</b>	77
8.1.2. Elucidation structurale du composé <b>Alec1B</b>	87
8.1.3. Elucidation structurale du composé <b>Alec2C</b>	98
8.1.4. Elucidation structurale du composé <b>Alec2D</b>	106
8.1.5. Elucidation structurale du composé <b>Alec2E</b>	114
<b>8.2. Identification des dérivés ellagiques</b>	<b>124</b>
8.2.1. Elucidation structurale du composé <b>Alec3-1</b>	124
8.2.2. Elucidation structurale du composé <b>Alec3-2</b>	128
8.2.3. Elucidation structurale du composé <b>Alec3-3</b>	131
<b>9. Discussion</b>	<b>134</b>
<b>Références</b>	<b>136</b>
<b>Publication 2 : Triterpenes and polyphenols from <i>Anogeissus leiocarpus</i></b>	

<b>Chapitre 3 : Fractionnement bioguidé d'actifs anti-oxydants de <i>Limoniastrum feei</i> (Girard) Batt. (Plumbaginaceae)</b>	<b>145</b>
<b>Introduction</b>	<b>146</b>
<b>1. Le stress oxydant</b>	<b>148</b>
1.1. Historique	148
1.2. Les radicaux libres (RL)	149
1.3. Principaux radicaux libres oxygénés et leur origine	149
1.3.1. L'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ )	149
1.3.2. Le radical hydroxyle ( $^{\bullet}OH$ )	150
1.3.3. Le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )	151
1.3.4. L'oxygène singulet (O)	151
1.3.5. Les radicaux peroxydes et alcoxydes	152
1.3.6. Le monoxyde d'azote et le dioxyde d'azote	153
1.3.7. L'anion peroxydinitrite ( $OONO^-$ )	153
1.4. Rôles des Radicaux libres oxygénés (RLO) dans la physiologie	154
1.5. Détection des espèces réactives à l'oxygène et à l'azote	155
1.5.1. Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)	155
1.5.2. Les sondes fluorescentes	156
1.5.3. Les composés chimioluminescents	156
1.5.4. Les méthodes enzymatiques	156
1.6. Genèse des radicaux libres	157
1.6.1. Source endogène	157
1.6.2. Source exogène	160
1.7. Les moyens de défense contre les radicaux libres	162
1.7.1. Les moyens de défense endogènes	162
1.7.2. Les moyens de défense exogènes	164
<b>2. La famille des Plumbaginaceae</b>	<b>168</b>
2.1. Phytochimie de la famille des Plumbaginacées	168
2.2. Exemples de composés identifiés dans la famille des Plumbaginacées	169
2.3. Etudes pharmacologiques du genres <i>Limonium</i>	170
2.4. Caractéristiques de l'espèce étudiée : <i>Limoniastrum feei</i>	170
2.5. Taxonomie	171
<b>3. Matériels et méthodes</b>	<b>172</b>
3.1. Le matériel végétal	172
3.2. Evaluation de l'activité anti-oxydante	172
3.2.1. Essai au DPPH	172
3.2.2. Essai FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)	172
3.3.3. Essai du radical superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) (système xanthine/xanthine oxydase)	175
3.3.4. Dosage des polyphénols	177
3.4. Conditions de Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)	177
3.4.1. CLHP analytique	177
3.4.2. CLHP semi-préparative	177
<b>4. Résultats et discussion</b>	<b>179</b>
4.1. Schéma général d'extraction de <i>Limoniastrum feei</i>	180
4.2. Rendements d'extraction	180
4.3. Analyse par CLHP analytique des extraits obtenus	180
4.4. Activités anti-oxydantes des extraits	182
4.4.1. Activité antiradicalaire (test du radical DPPH $^{\bullet}$ )	182
4.4.2. Activité anti-oxydante de l'extrait AcOEt des feuilles de <i>L. feei</i>	183

4.5. Corrélation entre l'activité antiradicalaire et la teneur en polyphénols totaux	183
4.6. Fractionnement de l'extrait AcOEt de feuilles de <i>L. feei</i>	185
4.7. Résultats de l'essai au DPPH des fractions issues de l'extrait AcOEt (F)	185
4.8. Analyse par CLHP analytique (280 nm) des deux fractions sélectionnées	186
4.9. Purification de la fraction active 80-196 par CLHP semi-préparative	187
<b>5. Identification des produits purs isolés</b>	<b>188</b>
5.1. Identification du composé <b>1</b>	188
5.2. Identification du composé <b>2</b>	190
5.3. Identification du composé <b>3.1</b>	196
5.4. Identification du composé <b>3.2</b>	201
5.5. Identification du composé <b>4</b>	207
5.6. Identification du composé <b>5</b>	214
5.7. Identification du composé <b>6</b>	217
<b>6. Comparaison de l'activité anti-radicalaire (tests DPPH, FRAP et SRSA) des polyphénols isolés</b>	<b>221</b>
<b>Références</b>	<b>223</b>
<b>Publication 3 : Activity-Guided isolation of antioxidant principles from <i>Limoniastrum feei</i> (Zeitschrift Für Naturforschung C)</b>	<b>230</b>
<b>Résumé</b>	<b>250</b>

## Introduction générale

Historiquement, les hommes ont toujours puisé dans la Nature de quoi se nourrir, se vêtir et se soigner. Sur terre, quatre personnes sur cinq se servent des plantes pour conjurer leurs maux ; quatre femmes sur cinq, en particulier dans les pays émergents, ne disposent d'aucun autre type de remède pour leurs enfants. En Afrique, en Asie et en Amérique latine, nombreux sont les pays qui font appel à la médecine traditionnelle pour répondre à certains de leurs besoins au niveau des soins de santé primaire. En Afrique, jusqu'à 80% de la population a recours à la médecine traditionnelle pour se soigner.

**Quand elle n'est pas un choix, la phytothérapie est donc une nécessité.**

Les plantes produisent déjà 70% de nos médicaments. Déjà environ 170 000 molécules bioactives ont été identifiées à partir de plantes : digitaline, quinine, morphine, colchicine, artémisinine... Pourtant, moins de la moitié des plantes aujourd'hui ont été étudiées pour leurs propriétés thérapeutiques.

C'est en 2002 que l'Organisation Mondiale de la Santé a mis en place sa première stratégie globale en matière de **médecine traditionnelle**. Cette stratégie a pour but

- d'aider les pays à élaborer des politiques nationales d'évaluation et de réglementation des pratiques de la médecine traditionnelle,
- d'encourager l'utilisation de produits traditionnels dont l'innocuité, l'efficacité et la qualité auront été rigoureusement contrôlées,
- de veiller à ce que le recours aux médicaments essentiels à base de plantes soit disponible et abordable,
- de promouvoir l'usage thérapeutique judicieux de la médecine traditionnelle,
- de rassembler de la documentation sur les médicaments et remèdes traditionnels.

Dans les pays industrialisés, c'est sous forme de **thérapies complémentaires** que les plantes sont aujourd'hui surtout utilisées. En Europe et en Amérique du Nord, plus de 50% de la population a eu recours au moins une fois à des compléments alimentaires à base de plantes. C'est encore beaucoup plus au Canada et en Allemagne, par exemple.

Le premier chapitre de ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'une collaboration scientifique entre l'Université Louis Pasteur de Strasbourg et l'Université d'Antananarivo de Madagascar. Il s'agit en effet de valider les usages traditionnels de plantes malgaches, dans le but de les introduire dans une pharmacopée nationale en cours d'élaboration. Notre travail s'est focalisé sur une espèce endémique, *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae) utilisée en médecine traditionnelle pour traiter les affections broncho-pulmonaires. Après avoir vérifié l'activité d'une préparation traditionnelle sur un modèle cellulaire (inhibition de la prolifération de cellules musculaires lisses bronchiques), nous avons isolé par fractionnement guidé ses constituants actifs.

Le second chapitre est consacré à l'étude phytochimique de l'écorce d'un arbre des savanes africaines, *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae). Nous y avons identifié des triterpènes oléanoliques ainsi que des polyphénols dérivés de l'acide ellagique. La présence dans les combretacées de triterpènes de type oléanolique a été discutée sur un plan chimiotaxonomique.

Enfin, une troisième partie expose les résultats de l'étude phytochimique et pharmacologique d'une plante endémique algérienne semi-désertique *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Cette espèce a été sélectionnée sur des critères écologiques : elle subit en effet un stress oxydant important (stress hydrique, irradiation UV, températures élevées, etc.) susceptible d'orienter ses voies métaboliques vers la synthèse de constituants naturellement pourvus de propriétés anti-oxydantes. Un fractionnement bioguidé nous a permis d'isoler et d'identifier ces anti-oxydants naturels. Ce travail a été initié par le Professeur Samir Benayache de l'Université Mentouri de Constantine, phytochimiste spécialiste de la Flore des dayas, au sud de l'Algérie.

# **Chapitre 1**

## **Etude ethnopharmacologique**

***d'Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae)**

## 6. Introduction

L'asthme est une maladie chronique des poumons caractérisée par des problèmes respiratoires et des symptômes comme l'essoufflement, le sifflement, la contraction de la poitrine et la toux. Les symptômes de l'asthme varient en fonction de l'âge et sa sévérité diffère d'un individu à l'autre. Selon le « Global Burden of Asthma Report », ([www.medicalnewstoday.com/articles/70770.php](http://www.medicalnewstoday.com/articles/70770.php)), l'asthme affecte environ 300 millions de personnes dans le monde et 100 millions de nouveaux cas s'ajouteront en 2025.

Durant plusieurs décennies, le traitement de l'asthme a été considérablement amélioré, surtout à cause de la disponibilité de plusieurs classes de médicaments ayant des mécanismes d'action différents (pour revue, voir Chu et Drazen, 2005).

En Afrique, les carences de ressources économiques et le manque d'accès aux soins entravent la gestion efficace de l'asthme ; ainsi, la prévalence de cette maladie a augmenté d'une façon marquante dans les dernières années. L'urbanisation continue et l'occidentalisation du mode de vie en Afrique contribuerait à augmenter le nombre d'asthmatiques durant la prochaine décennie (en général, l'asthme est plus répandu en zones urbaines qu'en zones rurales) ([www.medicalnewstoday.com/articles/70770.php](http://www.medicalnewstoday.com/articles/70770.php)).

Le « Global Burden of Asthma Report » estime que près de 50 millions d'africains sont asthmatiques. De plus, dans certains pays d'Afrique, la thérapie par les agonistes- $\beta$  inhalés et les glucocorticostéroïdes ne sont pas inclus dans la liste des médicaments essentiels, même s'ils sont actuellement recommandés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).

A notre connaissance, aucune étude épidémiologique sur l'asthme à Madagascar n'a été publiée. Les maladies infectieuses sont étroitement liées aux conditions de vie, à la salubrité de l'environnement et à la pauvreté en général, elles représentent toujours une proportion majeure de la mortalité dans toutes les tranches d'âge (Rivière *et al.*, 2005). Dans la région nord de Madagascar les infections respiratoires aiguës touchent 12,6% des personnes consultées dans les centres de santé de base, ce qui constitue la deuxième maladie infectieuse dépistée après le paludisme (30 à 40 %) (Rivière *et al.*, 2005).

Les patients malgaches se tournent vers la médecine traditionnelle et se soignent par les plantes utilisées pour leurs vertus anti-asthmatiques. Cette médecine traditionnelle s'appuie essentiellement sur les connaissances empiriques des tradipraticiens locaux ainsi que sur la richesse de la biodiversité de la flore tropicale malgache. Les enquêtes ethnobotaniques effectuées dans la région nord-ouest de Madagascar ont montré que 12% des plantes

inventoriées sont utilisées pour le traitement de maladies qui touchent le système respiratoire (l'asthme, la bronchite, la toux, la coqueluche et l'hémoptysie) (Ratsimiala *et al.*, 2005).

Citons par exemple *Euphorbia hirta*, une espèce très répandue dans toutes les régions tropicales et subtropicales du monde. Cette petite plante herbacée est reconnue pour ses effets expectorants (en Inde), antispasmodiques (en Afrique équatoriale, dans les Antilles françaises, en Inde, en République dominicaine, à Trinidad) et antitussifs (en Australie). Elle est aussi réputée pour ses effets 'sédatifs' de l'appareil respiratoire, parfois utilisée associée à des sédatifs bronchiques tels que *Gridelia robusta*, dans des préparations pour inhalation (Lanhers *et al.*, 2005).

Nous nous sommes intéressés à une autre Euphorbe, endémique à Madagascar : *Euphorbia stenoclada*. Il s'agit non pas comme *E. hirta* d'une herbacée mais d'un arbuste dont les parties aériennes sont utilisées par la population locale en infusé pour le traitement de l'asthme et de bronchites aiguës (Lin *et al.*, 2002).

Notre objectif a été d'essayer de valider scientifiquement les usages traditionnels antiasthmatiques des parties aériennes d'*Euphorbia stenoclada* :

- En utilisant un modèle cellulaire, nous avons isolé par fractionnement bioguidé les constituants participant à l'activité mise en évidence dans un extrait se rapprochant de l'usage traditionnel (extrait aqueux).
- Nous avons par ailleurs montré qu'*Euphorbia stenoclada* renferme des constituants anti-oxydants susceptibles de réduire le stress oxydatif auquel sont soumis les personnes atteintes d'asthme.



## 7. Présentation de la plante

Le genre *Euphorbia* est le plus répandu de la famille des euphorbiacées et comprend 2000 espèces caractérisées par la production d'un latex laiteux (Jassbi, 2002).

*Euphorbia stenoclada* Baill. est un arbuste xérophyte de 1,8 à 4,6 mètres de hauteur. Il a plusieurs noms vernaculaires comme 'Euphorbe arborescente', et est désigné par les malgaches par 'Famata' ou 'Famatse'.

Il s'agit d'une espèce endémique à Madagascar et a été récoltée dans la région de Tuléar, située au Sud-Est de Madagascar.

Elle a été sélectionnée sur des critères ethnopharmacologiques car elle est utilisée par la population locale en infusé pour le traitement d'asthme et de bronchites aiguës. (Lin *et al.*, 2002).



**Figure 1. Carte géographique de Madagascar**  
(Source : [http://www.abcmadagascar-voyages.com/pageID\\_4119428.html](http://www.abcmadagascar-voyages.com/pageID_4119428.html))

### 3. Classification botanique

- **Embranchement** : Spermaphyte
- **S/embranchement** : Angiospermes (Magnoliophyta)
- **Classe** : Dicotylédones (Magnoliopsidae)
- **Sous classe** : Rosidae
- **Famille** : Euphorbiaceae
- **Sous-famille** : Euphorbioideae
- **Tribu** : Euphorbieae
- **Sous-tribu** : Euphorbiinae
- **Genre** : *Euphorbia*
- **Espèce** : *stenoclada* Baill.



**Figure 2. Arbuste d'*E. stenoclada***

(source : [http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Euphorbia\\_stenoclada.jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Euphorbia_stenoclada.jpg))

## 4. Bilan bibliographique sur le genre *Euphorbia*

### 4.1. Activités pharmacologiques

Le genre *Euphorbia* a fait l'objet de nombreux travaux scientifiques mettant en évidence des activités variées. (cf. Tableau 1). La majorité d'entre elles concernent surtout des effets anti-prolifératifs (anti-tumoral, apoptotique, cytotoxique) et antimicrobienne (anti-virale, antibactérienne, anti-fongique).

**Tableau 1 : Activités biologiques du genre *Euphorbia***

Nom de l'espèce	Activités	Références
<i>E. lagascae</i> <i>E. fusiformis</i> <i>E. peplus</i>	antibactérienne	Duarte <i>et al.</i> , 2007 Natarajan <i>et al.</i> , 2005 Cateni <i>et al.</i> , 2003
<i>E. lagascae</i>  <i>E. chamaesyce</i> <i>E. peplus</i>	anti-tumorale	Pusztai <i>et al.</i> 2007 Duarte <i>et al.</i> , 2006 Tanaka <i>et al.</i> , 2006 Ogbourne <i>et al.</i> , 2004
<i>E. fischeriana</i> <i>E. cheiradenia</i> <i>E. kansui</i>	apoptotique	Luo et Wang, 2006 Amirghofran <i>et al.</i> , 2006 Yu <i>et al.</i> , 2005
<i>E. decipiens</i> <i>E. decipiens</i>	anti-uréase	Lodhi <i>et al.</i> , 2006 Ahmad <i>et al.</i> , 2003
<i>E. tirucalli</i>	anti-arthrite	Bani <i>et al.</i> , 2007
<i>E. cornigera</i> <i>E. cactus</i> <i>E. ebracteolata</i> <i>E. characias</i>	cytotoxique	Baloch <i>et al.</i> , 2006 Al-Fatimi <i>et al.</i> , 2005 Shi <i>et al.</i> , 2005a Magan <i>et al.</i> , 2004
<i>E. hirta</i>	antimicrobienne	Sudhakar <i>et al.</i> , 2006
<i>E. hirta</i> <i>E. kansui</i>	anti-allergique	Singh <i>et al.</i> , 2006 Nunomura <i>et al.</i> , 2006
<i>E. milii</i> <i>E. pulcherrima</i>	molluscicide	Sermsart <i>et al.</i> , 2005 Singh et Singh, 2005
<i>E. kansui</i> <i>E. jolkini</i>	anti-cancéreuse	Miyata <i>et al.</i> , 2006 Kuo <i>et al.</i> , 2006
<i>E. peplus</i>	anti-inflammatoire	Corea <i>et al.</i> , 2005
<i>E. paralias</i>	antidiarrhéique	Atta <i>et al.</i> , 2005
<i>E. royleana</i>	immunosuppressive	Bani <i>et al.</i> , 2005
<i>E. thymifolia</i> <i>E. jolkini</i> <i>E. segetalis</i>	anti-virale	Yang <i>et al.</i> , 2005 Cheng <i>et al.</i> , 2004 Madureira <i>et al.</i> , 2003
<i>E. decipiens</i>	anti-nociceptive	Ahmad <i>et al.</i> , 2005
<i>E. hirta</i>	anti-plasmodiale	Tona <i>et al.</i> , 2004

L'espèce *E. stenoclada* sélectionnée n'a, quant à elle, pas été étudiée auparavant.

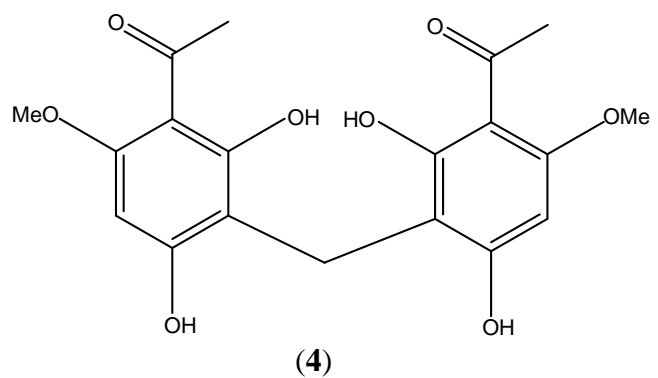
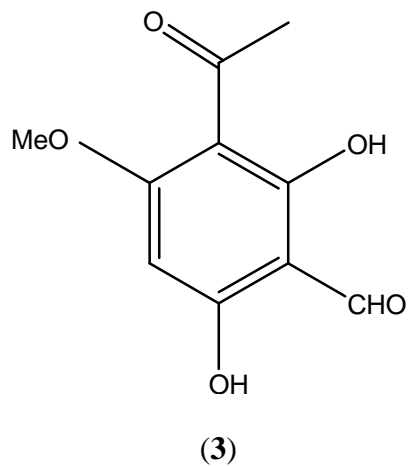
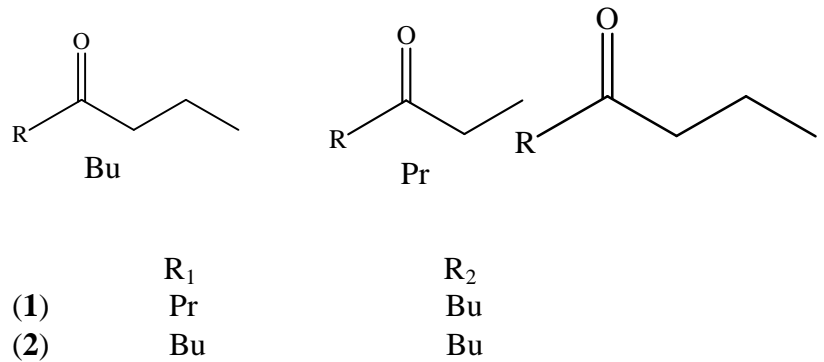
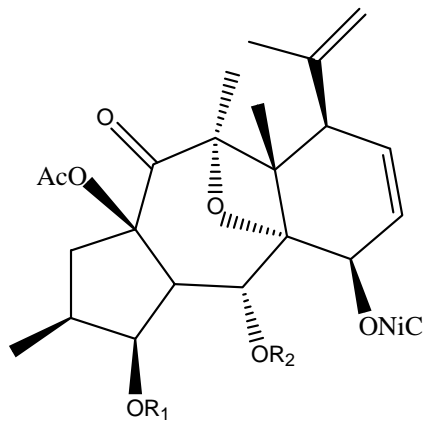
## 4.2. Etudes phytochimiques

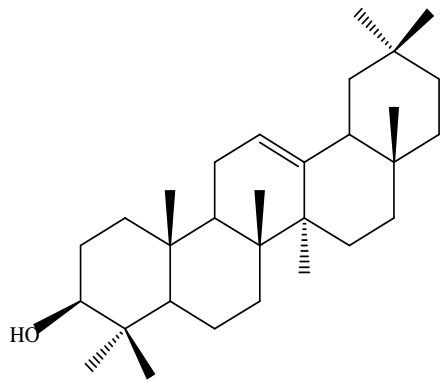
Différentes classes du métabolisme secondaire ont été identifiées dans ce genre : terpènes, flavonoïdes, (Singla et Pathak, 1990). Ces résultats sont consignés dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Etudes phytochimiques antérieures du genre *Euphorbia***

Classe phytochimique	Nom de l'espèce	Constituants identifiés	Références
Diterpènes	<i>E. decipiens</i> <i>E. teheranica</i> <i>E. cheiradenia</i> <i>E. marschalliana</i> <i>E. heteradena</i>	15- <i>O</i> -acetyl-3- <i>O</i> -propionyl-5- <i>O</i> -butanoyl-7- <i>O</i> -nicotinoylmyrsinol (1)  15- <i>O</i> -acetyl-3,5- <i>O</i> -dibutanoyl-7- <i>O</i> -nicotinoylmyrsinol (2)	Rechinger, 1964
	<i>E. guyoniana</i>	4,12-dideoxy(4a)phorbol-13-hexadecanoate 24-methylenecycloartane-3,28-diol	Haba, 2007
Triterpènes et stéroïdes	<i>E. decipiens</i>	acetate d'amyrine, lupeol, acetate de lupeol, ginnone, ambreine, lupéone	Ulubelen <i>et al.</i> , 1986
	<i>E. petiolata</i>	Cycloartenol, 24-methylenecycloartanol	Rustaiyan <i>et al.</i> , 1982
	<i>E. falcata</i>	Obtusifoldienol, c-euphorbol, β –amyrine (5)	Aynehchi et Hakimzadeh, 1978 Aynehchi <i>et al.</i> , 1978
	<i>E. lanata</i>	Sitosteryl-3-β-D-glucoside	
	<i>E. tinctoria</i>	euphorbol	Aynehchi et Kiumehr, 1972, 1974, 1977 Aynehchi <i>et al.</i> , 1972
	<i>E. myrsinites</i>	taraxérol	
Sesquiterpènes	<i>E. chrysocoma</i>	(6R)-2-chloro-6-[(1S)-1,5-dimethylhex-4-en-1-yl]-3-methylcyclohex-2-en-1-one	Shi <i>et al.</i> 2005b
Flavonoïdes et coumarines	<i>E. larica</i>	kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside, quercetine-3- <i>O</i> -glucoside, kaempferol-3-rutinoside, rutine, 6-methoxyapigenine	Ulubelen <i>et al.</i> , 1983
	<i>E. lanata</i>	kaempferol-7- <i>O</i> -rhamnoside, kaempferol-3- <i>O</i> -galactoside, quercetine-7- <i>O</i> -digalactoside, esculetine	Aynehchi <i>et al.</i> , 1978
	<i>E. tinctoria</i>	quercetine, quercetine-7-glucoside, kaempferol rhamnoside	Aynehchi et Ulubelen, 1974
Phénols	<i>E. decipiens</i>	methyl (2,4-dihydroxy-3-formyl-6-methoxy) phenyl cetone (3) et	Ahmad <i>et al.</i> , 2002

		1,1-bis (2,6-dihydroxy-3-acetyl-4-methoxyphényl) methane (4)	
	<i>E. teheranica</i>	methyle gallate	Jassbi, 2000; Ahmad et Jassbi, 1999
	<i>E. hylonoma</i>	octacosyl cis-ferulate	Ruan <i>et al.</i> , 2007
	<i>E. ebracteolata</i>	2,2',4,4'-tetrahydroxy-6,6'-dimethoxy-3,3'- dimethyl-7,5'-bisacetophenone, 2,4-dihydroxy-6-methoxy-3- methylacetophenone 4- <i>O</i> - $\alpha$ -L- arabinofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-glucopyranoside et decahydro-1 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,7,7-tetramethyl-1H- cycloprop[e]azulene-2,5-diol (1 $\alpha$ R,2R,4 $\alpha$ S,5S,7 $\alpha$ R,7 $\beta$ R)	Yin <i>et al.</i> 2005





(5)

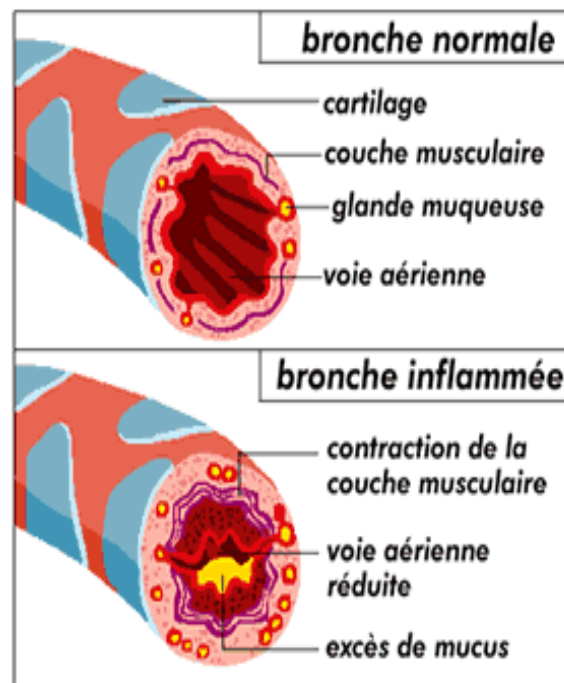
**Figure 3. Structures de quelques molécules isolées du genre *Euphorbia*.**

Plusieurs Euphorbes comme *Euphorbia hirta* et *E. stenoclada* sont utilisées par la population malgache pour le traitement d'asthme et de d'autres maladies des voies respiratoires. Notre intérêt est basé sur l'étude de l'effet de *E. stenoclada* sur la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques.

## 5. L'asthme

### 5.1. Généralités

L'asthme est une maladie particulièrement invalidante apparaissant généralement au cours des premières années de la vie, mais également à l'âge adulte, et qui ne bénéficie, à l'heure actuelle, d'aucun traitement curatif (Gergen *et al.*, 2001).



**Figure 4. Modifications morphologiques dans une bronche inflammée**

Différentes études épidémiologiques ont rapporté une augmentation de la prévalence de l'asthme, chez les sujets jeunes, au cours des trente dernières années, dans différents pays, dont la France (Neukirch *et al.*, 1995). Cette prévalence se situe, chez l'enfant, entre 2,1 et 32,2 %, en fonction des pays.

Une définition consensuelle de l'asthme a établi qu'il s'agit d'une maladie chronique des voies aériennes, caractérisée par une inflammation de la paroi bronchique (figure 4) (National Institute of Health, 1997). Cette inflammation est responsable des symptômes (dyspnée

paroxystique sifflante, essoufflement, sensation d'oppression thoracique, toux) et d'une insuffisance respiratoire de degré variable qui est, au moins en partie, réversible spontanément ou à l'aide d'un traitement.

Le processus inflammatoire dans l'asthme se caractérise par une accumulation dans la paroi bronchique, d'éosinophiles, de lymphocytes T de phénotype CD4+ ou CD8+, de lymphocytes T  $\gamma\delta$  et de cellules B, de macrophages, de cellules dendritiques, de mastocytes et de plaquettes (Djukanovic *et al.*, 1990). La plupart de ces types cellulaires présentent des marqueurs d'activation à leur surface (figure 6). Le degré de sévérité de l'asthme détermine les modalités des traitements des patients. Ceux-ci agissent sur la survenue des symptômes (médicaments bronchodilatateurs, agonistes de type  $\beta$ 2-adrénergiques) et servent à limiter l'inflammation (corticoïdes). L'effet des corticoïdes, qui se traduit par une diminution des symptômes et du nombre de crises et par une amélioration de l'obstruction bronchique, semble consécutif à leurs propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives. En effet, une inhibition de la synthèse de différentes cytokines, chimiokines et facteurs de croissance est observée (Barnes *et al.*, 1996).

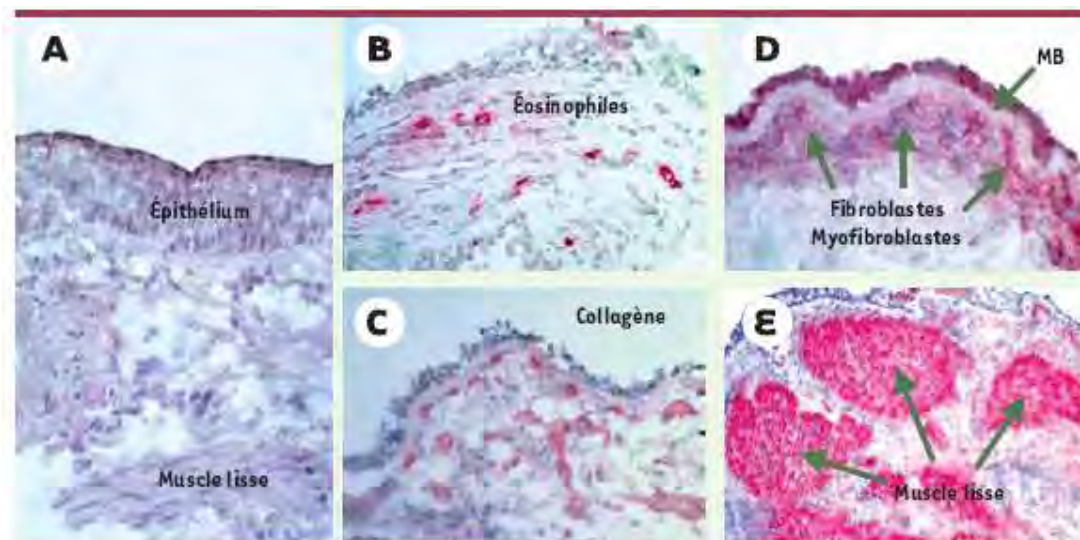
## **5.2. Le remodelage bronchique : caractéristiques histopathologiques dans l'asthme**

Différentes études cliniques ont établi que, malgré un traitement par les corticoïdes bien conduit, entre 5 et 10 % (selon les pays) de patients asthmatiques présentent un déclin progressif et irréversible de leur fonction respiratoire (Lange *et al.*, 1998). A cette évolution péjorative peut se surajouter une obstruction bronchique irréversible, responsable d'une insuffisance respiratoire chronique et d'un handicap fonctionnel parfois sévère (Chung *et al.*, 1999). Ce sont ces cas qui rendent compte de la plus grande partie des coûts liés à l'asthme, coûts directs en rapport avec l'hospitalisation et le traitement médical, ou coûts indirects, liés pour l'essentiel à l'absentéisme scolaire ou professionnel (Chung *et al.*, 1999). La survenue de ces altérations fonctionnelles respiratoires serait la conséquence d'un épaississement progressif de la paroi bronchique dû à un processus de remodelage tissulaire (Elias *et al.*, 1999).

Sur le plan histopathologique, le remodelage bronchique se caractérise par une desquamation de l'épithélium accompagnée d'une augmentation de l'espace situé entre les cellules épithéliales basales, une hypertrophie et une hyperplasie du muscle lisse, une hypertrophie des cellules glandulaires, associée à une hypersécrétion de mucus et à une fragmentation des fibres d'élastine du tissu conjonctif. Un épaississement de la membrane

basale, accompagné d'une fibrose sous-épithéliale, caractérisée par un dépôt de collagène, de téna-scine et de fibronectine avec une augmentation du nombre de fibroblastes et de myofibroblastes est également observé (Elias *et al.*, 1999) ; Bousquet *et al.*, 2000) (Figures 5-6).

Ces modifications structurales sont observées dans les bronches segmentaires et semblent spécifiques de l'asthme. Ainsi, l'analyse de prélèvements bronchiques de sujets atteints de broncho-pneumopathie chronique obstructive, une autre maladie inflammatoire pulmonaire chronique s'accompagnant d'une détérioration irréversible de la fonction respiratoire (Barnes *et al.*, 2000), montre plutôt une métaplasie épithéliale, sans épaissement de la membrane basale et un processus de fibrose qui prédomine uniquement dans les voies aériennes distales et le parenchyme pulmonaire (Jeffery *et al.*, 2001).



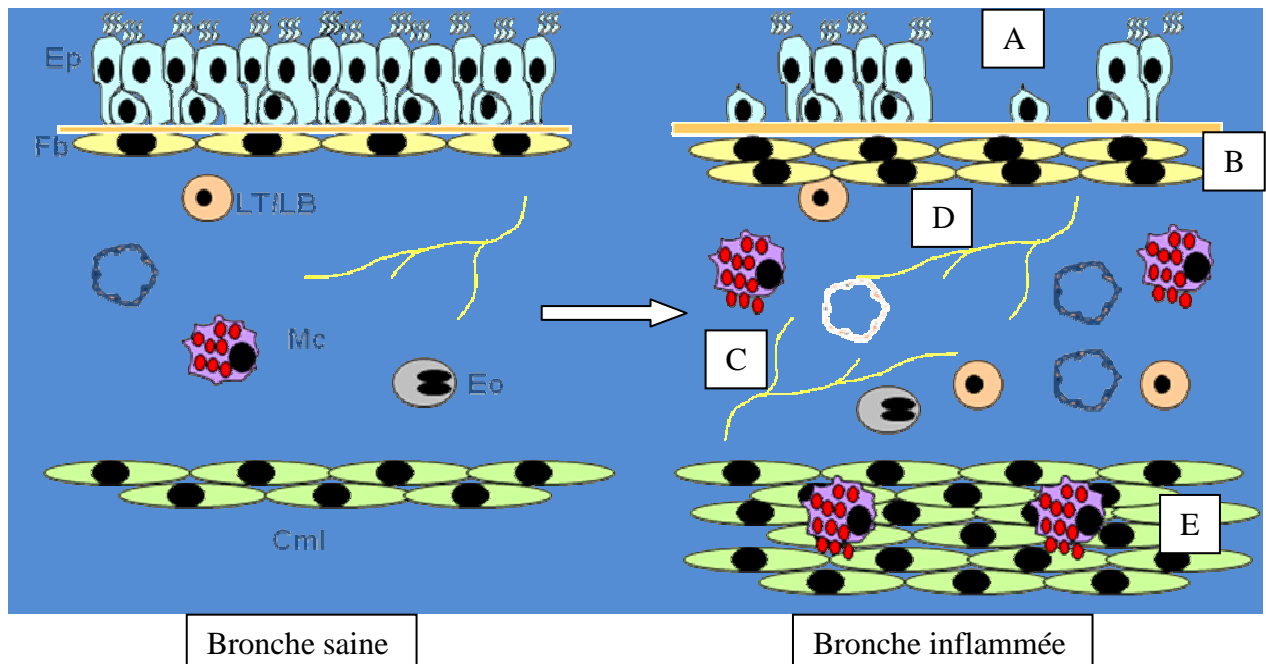
**Figure 5. Caractéristiques histopathologiques du remodelage bronchique dans l'asthme.**

- Sur une coupe provenant d'une biopsie bronchique d'un sujet témoin (A), l'épithélium est intact et la muqueuse bronchique ne présente pas d'infiltrat de cellules inflammatoires, ni de fibrose sous-épithéliale. La masse musculaire est limitée.
- Sur des coupes issues de biopsies bronchiques de patients asthmatiques (B-E), l'épithélium est lésé (B, C et D), la membrane basale (MB) est épaissie (D), la masse musculaire est augmentée de façon notable (E) et la muqueuse bronchique est infiltrée par des éosinophiles (B), des fibroblastes et des myofibroblastes (C et D), qui sécrètent du collagène (C).

Des immunomarquages ont été effectués sur des cryosections fixées en acétone en utilisant des anticorps reconnaissant spécifiquement les éosinophiles (B), les fibroblastes et les myofibroblastes (D), le collagène de type IV (C) et les cellules musculaires lisses (E), suivis d'une révélation à la phosphatase alcaline (grossissement  $\times 300$ ).

(source : Benayoun *et al.*, 2003).





**Figure 6. Modifications structurales en cas d'asthme.**

Fb : fibroblastes ; Ep : Epithélium ; Mc : mastocytes ; cml : cellules musculaires lisses ; Eo : Eosinophiles ; LT/LB : lymphocytes T/lymphocytes B ;

- A. Desquamation de l'épithélium
- B. Fibrose sous - épithéliale
- C. Augmentation de la vascularisation
- D. Augmentation de l'innervation sensitive
- E. Hyperprolifération des muscles lisses

## 5.2. Causes et facteurs de risque

Il est fondamental pour l'avenir de l'asthmatique de déterminer la cause de son asthme. Lorsque l'allergène est identifié, on parle d'asthme allergique, atopique ou encore d'hyperréactivité bronchique spécifique. La substance allergisante peut se présenter sous forme inhalée (dans l'air) ou sous forme ingérée (aliments ou médicaments). Dans l'air, les plus fréquemment en cause sont les poussières de maison, les pollens, les moisissures, ou encore des éléments présents dans l'environnement professionnel du malade : farine du boulanger par exemple. Dans certains cas, l'élément responsable de l'asthme ne peut être mis en évidence. On parle d'hyperréactivité bronchique non spécifique. Dans les deux cas, il convient de rechercher des facteurs aggravants de la maladie asthmatique tel le tabagisme (actif ou passif), un effort physique ou un stress. Sont également recherchés : un

reflux gastro-œsophagien ou une vascularite. La notion d'un terrain familial ou personnel allergique peut se retrouver lors du diagnostic d'asthme. (Godard, 2005)

### **5.3. Les allergènes**

L'étiologie allergique, très majoritaire chez l'enfant, décroît sensiblement avec l'âge. Chez l'enfant, l'asthme est dans 90 à 95 % d'origine allergique même s'il n'est pas toujours facile de mettre clairement en évidence l'allergène impliqué. (Godard *et al.*, 2000 ; Godard, 2005)

#### **5.4.1. Les pneumoallergènes**

Ce sont des allergènes présents dans l'air ambiant et qui, inhalés en quantité minime, sont capables de sensibiliser les sujets et de déclencher les symptômes en arrivant au niveau des muqueuses respiratoires. Citons par exemple :

- les allergènes polliniques,
- les acariens,
- les protéines animales provenant d'animaux domestiques, d'expérience ou de compagnie,
- les arthropodes (tels que criquets ou blattes) peuvent être responsables d'asthme dans certaines régions chaudes et humides,
- les moisissures et les levures atmosphériques,
- les bactéries, qui ont peut-être un rôle allergisant mais l'asthme induit par une allergie bactérienne semble exceptionnel.

#### **5.4.2. Les trophoallergènes**

Les aliments et les boissons peuvent être responsables de manifestations respiratoires par le biais de sensibilisation allergique.

#### **5.4.3. Les allergènes médicamenteux**

Ces allergènes se rencontrent dans l'industrie pharmaceutique, dans les locaux de production notamment ainsi que dans les milieux hospitaliers. Ils sont ainsi susceptibles de toucher tous les professionnels de santé ainsi que les patients.

#### **5.4.4. Les allergènes professionnels**

On estime à 10% la part professionnelle des asthmes apparus à l'âge adulte. Citons par exemple l'asthme à la farine de blé pour les boulangers, aux isocyanates pour les peintres, aux poussières de bois pour les menuisiers ou ébénistes.

#### **5.4.5. La pollution atmosphérique**

Les bronches et alvéoles sont largement ouverts sur l'extérieur et offrent aux nuisances une surface de l'ordre de 90 à 100 m<sup>2</sup>. Les gaz ou particules rencontrés dans l'atmosphère relèvent essentiellement de :

- La pollution acido-particulaire : le dioxyde de soufre (SO<sub>2</sub>), les particules en suspension et les aérosols acides (sulfates),
- La pollution photo-oxydante : l'ozone et le dioxyde d'azote.

Les principales sources de pollution sont les foyers fixes de combustion, les usines d'incinération des déchets ménagers et industriels, le trafic automobile.

#### **5.4.6. Le tabagisme**

Chez l'asthmatique, le tabac est un cofacteur indiscutable : 20 % des asthmatiques sont des fumeurs. Par lui-même, l'aérosol tabagique provoque une inflammation des voies aériennes avec hypersécrétion, paralysie (et destruction) ciliaire. Le tabagisme actif est par ailleurs responsable d'une augmentation des IgE sériques.

#### **5.4.7. Les virus**

Les études épidémiologiques montrent que près de 50 % des crises d'asthme du jeune enfant sont liées à une virose respiratoire. Avant l'âge de deux ans, le virus respiratoire syncytial est le plus souvent en cause (40 à 70 % des cas).

#### **5.4.8. Autres facteurs favorisants**

Ils sont nombreux. Citons par exemple :

- les infections à germe banales,
- l'asthme avec intolérance à l'aspirine,
- l'asthme lié à une sensibilité aux sulfites (soit 4 à 8 % des asthmatiques),
- l'asthme et le reflux gastro-œsophagien (RGO)
- l'asthme d'effort, qui se caractérise par la survenue d'une obstruction bronchique à l'arrêt de l'effort, typiquement 5 à 15 minutes après.

## 5.5. Médicaments antiasthmatiques

Il existe deux principaux types de médicaments contre l'asthme: les médicaments de contrôle (prévention) et les médicaments de secours. (Li, 2006). Pour la majorité des asthmatiques, le médecin prescrit les deux types de médicaments:

### 5.5.1. Le médicament de contrôle

Il est utilisé quotidiennement chez l'asthmatique, en préventif.

**Tableau 3 : Exemples de spécialités pharmaceutiques utilisées en prévention de crises d'asthme**

Classe thérapeutique	Médicaments commercialisés	Caractéristiques
Corticostéroïdes inhalés (voie pulmonaire)	budésonide (Pulmicort <sup>®</sup> ) fluticasone (Flovent <sup>®</sup> )	Ils permettent une pénétration directe dans les poumons et une diminution des effets secondaires observés lors d'une administration orale; Ils réduisent l'inflammation (gonflement, rougeur et mucosités) des voies respiratoires.
Corticostéroïdes (voie orale)	Prednisone, Prednisolone (PediaPred <sup>®</sup> et Dexamethasone <sup>®</sup> )	Ils sont préconisés si l'inflammation des voies respiratoires est grave et si le patient n'a pas le plein contrôle de ses symptômes d'asthme.
Bronchodilatateurs à action prolongée	salmétérol (Serevent <sup>®</sup> ) formotérol (Foradil <sup>®</sup> , Oxeze <sup>®</sup> )	Ils aident à garder les voies respiratoires ouvertes, à relaxer les muscles et à prévenir les crises d'asthme. Ils ne devraient pas être utilisés à titre de médicament de secours. Ils sont toujours prescrits avec un corticostéroïde inhalé.
Théophylline	TheoDur <sup>®</sup> Uniphyll <sup>®</sup> Phyllocontin <sup>®</sup> TheoLair <sup>®</sup>	Il s'agit d'un bronchodilatateur qui fonctionne directement sur les muscles des voies respiratoires pour les relaxer. Elle n'est pas couramment utilisée pour traiter les symptômes d'asthme. Elle est utilisée en soirée, lorsque l'essoufflement nuit au sommeil.
Antagonistes des récepteurs de leucotriènes	zafirlukast (Accolate <sup>®</sup> ) montelukast (Singulair <sup>®</sup> )	Les antagonistes des récepteurs de leucotriènes agissent contre une des composantes inflammatoires de l'asthme et protègent contre la bronchoconstriction.

### 5.5.2. Le médicament de secours

Il doit être toujours gardé à portée de la main en cas d'urgence : lorsque la respiration devient difficile, en cas de crise d'asthme ou d'exercice physique. Le médicament de secours ne contrôle pas les symptômes d'asthme, à long terme. Mais il agit rapidement, réduit les effets des déclencheurs d'asthme, comme l'exercice physique et l'air froid. Son effet est cependant de courte durée.

**Tableau 4 : Exemples de spécialités pharmaceutiques utilisées en cas de crises d'asthme**

Classe thérapeutique	Médicaments commercialisés	Caractéristiques
Bronchodilatateurs $\beta_2$ agonistes	salbutamol (Ventolin <sup>®</sup> Apo-Salvent <sup>®</sup> Novo Salmol <sup>®</sup> ) fenoterol (Berotec <sup>®</sup> ) terbutaline (Bricanyl <sup>®</sup> )	Ils permettent de soulager les symptômes de la toux, de l'oppression thoracique, de la respiration sifflante et de l'essoufflement.

## 6. Matériel et méthodes

### 6.1. Extraction et isolement

Les parties aériennes d'*Euphorbia stenoclada* (ES) ont été collectées en été 2003 dans la région de Tuléar (au sud-est de Madagascar) et authentifiée par un botaniste confirmé, Mr A. Rakotozafy. Un échantillon (ref 4768) a été déposé dans l'herbier du parc botanique de Tsimbazaza.

11g du mélange de feuilles et tiges ont été séchés, finement broyés et mis en contact avec de l'EtOH 95° (en respectant un rapport 1 :10, soit 100 ml pour 10g de poids sec de matériel végétal), sous agitation magnétique à température ambiante. L'extraction a été renouvelée trois fois, chaque macération durant 5h. Les 3 extraits successifs ont été filtrés, combinés et évaporés à sec sous pression réduite. L'extrait obtenu (appelé 'extrait EtOH') a été ensuite mis en suspension dans de l'eau distillée (200 ml) et soumis à une extraction liquide-liquide au cyclohexane (3 × 200 ml). L'extrait total ainsi délipidé (appelé 'ES-tot') a été évaporé à sec sous pression réduite. Le rendement d'extraction obtenu est de 13,2% (p/p) soit 1,46 g d'ES-tot.

Un gramme de (ES-tot) a été solubilisé dans du méthanol puis fractionné par flash chromatographie en phase inverse (FLASH 40+M, KP-C18-HS, 40 mm × 150 mm, Biotage<sup>®</sup>, Dyax Corp. Company), en utilisant un gradient d'élution de 10 à 100% MeOH (débit de 40 mL/min). 37 fractions ont ainsi été récupérées puis analysées par CCM analytique (gel de silice F<sub>254</sub>, ref 5554, Merck) en utilisant comme éluant un mélange d'acétate d'éthyle/acide formique/acide acétique/eau) (100:11:11:27 ; v/v/v/v). Les spots sont détectés sous lampe ultra-violette à 254 et 366nm et révélés avec le réactif de NEU (2 - aminoéthyl-diphénylborate de sodium à 1 % dans le méthanol).

Les fractions similaires sont ainsi regroupées en 5 fractions nommées FA à FE.

L'évaluation biologique a porté sur ces 5 fractions de manière à ne sélectionner que la fraction active (FE). Celle-ci a été ensuite purifiée par CLHP-C18 semi-préparative (250 × 21 mm, Nucleodur<sup>®</sup>, Macherey-Nagel) selon les conditions chromatographiques détaillées dans le tableau 5, en utilisant un débit de 10ml/min et en effectuant une détection à 370 nm (115 UV detector, Gilson).

**Tableau 5** : Gradient d'élution utilisé en CLHP semi-préparative

Temps (min)	0,01M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)	MeOH (%)
0	95	5
5	95	5
15	50	50
40	30	70
45	0	100
50	0	100

Le fractionnement de (FE) a permis d'isoler 6 sous-fractions dont la pureté a été contrôlée par CLHP-C18 analytique (250 mm×4,6 mm, Nucleodur<sup>®</sup>, Macherey-Nagel ; 9010 pump et Prostar photodiode array detector, Varian) dans les conditions chromatographiques détaillées dans le tableau 6, en utilisant un débit de 1ml/min et en utilisant un détecteur à barette de diodes (Prostar Diode Array Detector, Varian).

**Tableau 6** : Gradient d'élution utilisé en CLHP analytique.

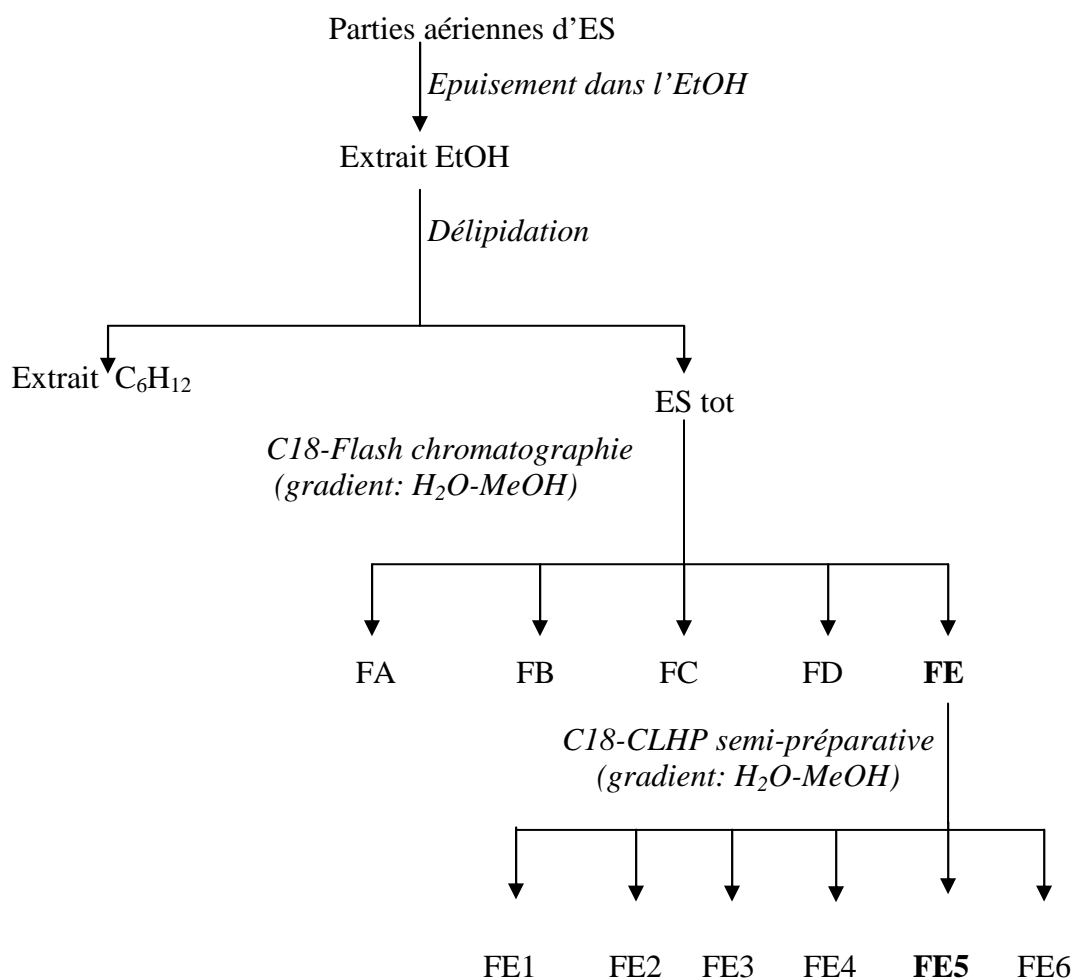
Temps (min)	0,01M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)	MeOH (%)
0	95	5
10	50	50
35	30	70
40	0	100
45	0	100
50	95	5

**Tableau 7 :** Gradient d'élution utilisé en CLHP analytique.

Temps (min)	0,01M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)	MeOH (%)
0	95	5
10	50	50
45	30	70
50	20	80
55	0	100
65	0	100
70	95	5

Les constituants de la fraction active (FE) ont été identifiés par CLHP/UV/SM (CLHP, Agilent; Polaris column; Bruker 3000+ mass spectrometer) et co-élution avec leurs standards respectifs. Les spectres de masse sont obtenus en modes positif et négatif.

L'ensemble du fractionnement de l'extrait d'*Euphorbia stenoclada*, suivant une approche bioguidée, est résumé dans la Figure 7.



**Figure 7.** Protocole d'extraction et de purification d'*E. stenoclada*

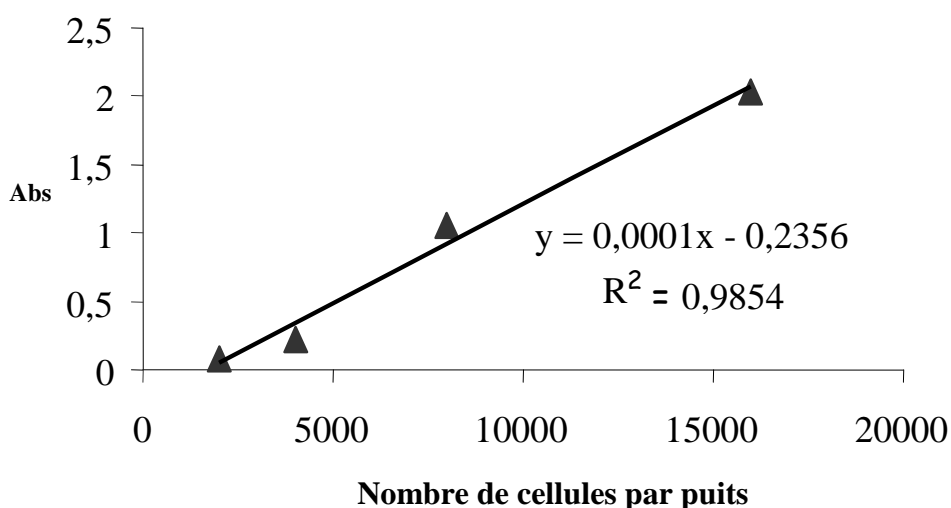
## 6.2. Traitement des cellules et test de prolifération cellulaire

Les cellules musculaires lisses bronchiques humaines (CMLBH) ont été traitées par l'interleukine-1-béata ( IL-1 $\beta$ , 10U/ml, R&D Systems, Lille, France) ou son solvant de dilution pendant 4 jours ; le milieu est changé quotidiennement (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12, sérum de veau foetal 10 %, L-Glutamine (2 mM), acides aminés non essentiels (1 :100), penicilline 50 U/ml), streptomycine (50  $\mu$ g/ml) (Invitrogen), insuline (5  $\mu$ g/ml) (Lilly, St Cloud, France).

Les cellules sont prétraitées par l'extrait total (ES tot), les 5 fractions FA à FE, les six sous-fractions FE1 à FE6, dans leurs solvants respectifs (1% EtOH en milieu de culture) pendant 1h avant traitement avec l'IL-1 $\beta$ , chaque jour pendant 4 jours.

La prolifération cellulaire est mesurée avec le test XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide), ("Cell Proliferation kit II XTT", Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), selon les recommandations du fournisseur. L'essai est basé sur la capacité des cellules vivantes à réduire le sel XTT en composés formazan de couleur orange. Le colorant formé est hydrosoluble et son intensité estimée par spectrophotométrie. L'intensité de la coloration est proportionnelle au nombre des cellules vivantes et l'absorbance est immédiatement mesurée à 450 nm. Les cellules sont déposées dans des plaques de 96 puits (3000 cellules par puit) dans un milieu de sevrage (sérum de veau foetal dilué (0.3%), milieu DMEM-F12, L-Glutamine, acides aminés non essentiels, penicilline-streptomycine) et laissées adhérer pendant 3h, puis traitées comme décrit précédemment pendant 4 jours. Les cellules sont laissées réagir avec l'XTT (1 mg/mL) pendant 3 h.





**Figure 8. Courbe étalon des cellules**

10 $\mu$ g de l'extrait sont dissous dans 1 ml d'éthanol à 50% et évalués pour leur effet anti-prolifératif sur les CMLBH. De la même manière, toutes les fractions et sous-fractions sont dissoutes dans de l'éthanol à 50% à 1% de concentration finale et évaluées pour leur effet anti-prolifératif. Le choix du solvant a été effectué en raison de la bonne dissolution des extraits et surtout pour son atoxicité pour les cellules par comparaison avec le DMSO 5% et 1% (concentration finale) et l'éthanol absolu 1%.

Une relation de structure/activité (RSA) a été faite par comparaison de l'activité anti-proliférative de la quercétine (Chromadex, ASB-00017045-500) et quelques uns de ses dérivés commercialement disponibles : 3'-méthylquercétine (Chromadex, ASB-00009525-005), pentaméthylquercétine (Chromadex ASB-00017080-010), hypéroside = quercétine-3-*O*-galactoside (Chromadex, ASB-00008916-005), quercitrine = quercétine-3-*O*-rhamnoside (Chromadex, ASB-00017170-005) et isoquercitrine = quercétine-3-*O*-glucoside (Chromadex, ASB-00009505-005).

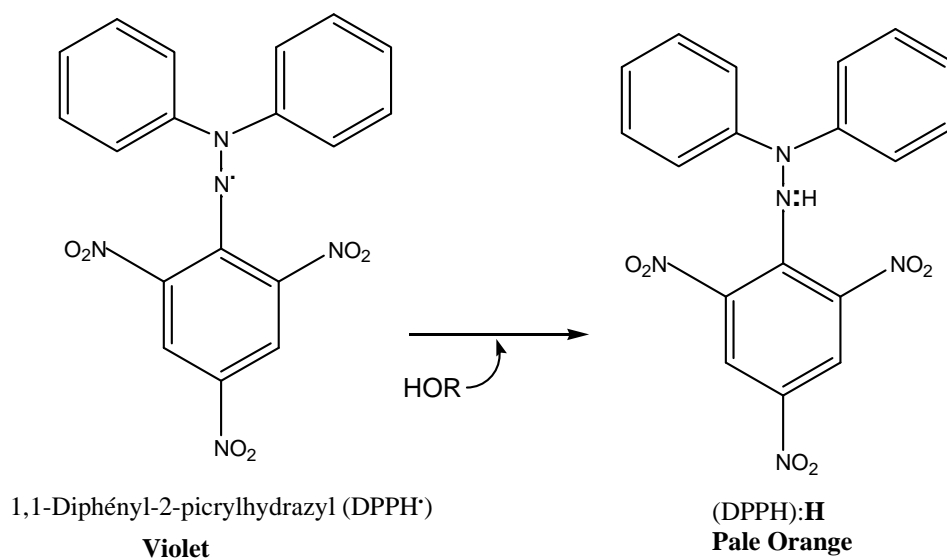
Leur évaluation biologique a été effectuée à 2 concentrations : 10 et 20 $\mu$ g/mL.

### **6.3. Activité antiradicalaire (test au DPPH)**

#### **6.3.1. Principe du test**

Le DPPH $\bullet$  (1,1-Diphényl-2-picrylhydrazyl) est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517nm. En présence de composés anti-radicalaires, le radical DPPH $\bullet$

est réduit et change de couleur en virant au jaune. Les absorbances mesurées à 517 nm servent à calculer le pourcentage d'inhibition du radical DPPH<sup>•</sup>, qui est proportionnel au pouvoir anti-radicalaire de l'échantillon.



**Figure 9. Réduction du radical DPPH<sup>•</sup>**

### 6.3.2. Protocole

Le protocole utilisé est celui décrit par Parejo *et al.*, 2002 et a été résumé dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 8** : Protocole expérimental (test du DPPH)

	DPPH <sup>•</sup>	échantillon	MeOH/H <sub>2</sub> O (50%)
Blanc échantillon	0	0,75ml	1,5ml
Blanc DPPH (100%)	1,5ml	0	0,75ml
Echantillon	1,5ml	0,75ml	0
Incubation pendant 20 min à température ambiante			

La mesure se fait au spectrophotomètre après 5 minutes de réaction. Ce temps a été fixé après des études de cinétique de réaction entre 5 minutes et 30 minutes, le pourcentage de décoloration à 517 nm en était inchangé. Celui-ci est calculé en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ décoloration} = 1 - \frac{(\text{DO échantillon} - \text{DO blanc échantillon})}{\text{DO blanc DPPH}} \times 100$$

Il est fonction de la concentration de l'échantillon testé. La courbe semi-logarithmique obtenue permet d'établir la  $CI_{50}$  de l'échantillon qui correspond à la concentration permettant 50% de décoloration.

Les dilutions des échantillons testés sont comprises entre 1 et 100 pour un premier test, puis l'intervalle est réduit autour de la  $CI_{50}$  estimée. Chaque concentration est testée en 3 répétitions et chaque échantillon est testé en triplicatas.

## 6.4. Dosage des polyphénols totaux

### 6.4.1. Principe

Les teneurs en polyphénols totaux des extraits, fractions et sous-fractions sont déterminées au moyen du réactif de Folin-Ciocalteu (Parejo et al., 2002). Ce dernier est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration bleue produite possède une absorption maximale aux environs de 750 nm. L'absorbance, par référence à une gamme étalon obtenue avec un acide phénolique (acide gallique), permet de déterminer la quantité de polyphénols totaux présente dans un extrait. Elle est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par g de matière sèche.

### 6.4.2. Protocole

**Tableau 9** : Protocole expérimental (test Folin-Ciocalteu)

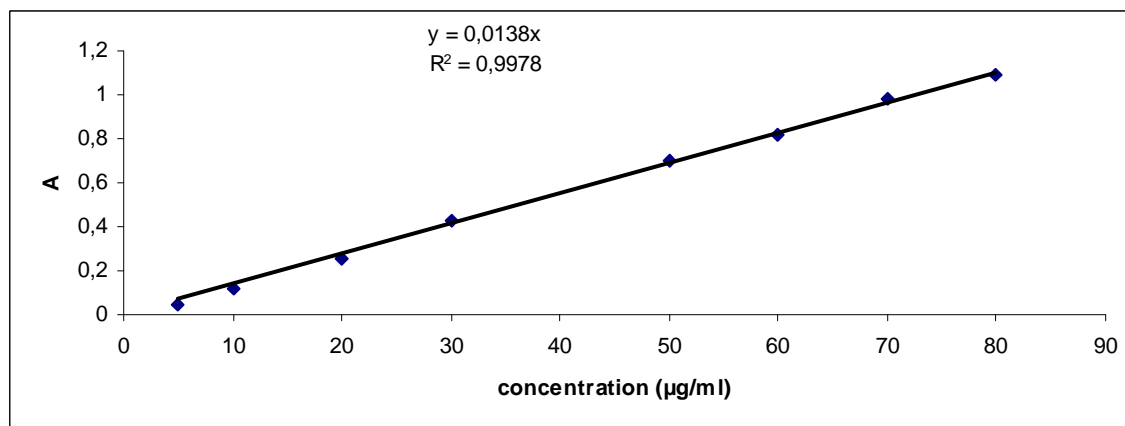
	Blanc	Echantillon
Extrait (100 µg/ml) (µl)	-	100
H <sub>2</sub> Od (µl)	500	400
Réactif de Folin 1N (µl)	250	250
Incuber pendant 2 min		
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 20% (µl)	1250	1250
Volume total (µl)	2000	2000
Agiter, puis incuber pendant 40 min à l'obscurité et à température ambiante, mesurer l'absorbance à 725 nm.		

### 6.4.3. Courbe étalon de l'acide gallique

La gamme de concentrations d'acide gallique utilisée pour le dosage des polyphénols et les absorbances respectives mesurées à 725nm sont représentés dans le tableau 10.

**Tableau 10** : Absorbances de la gamme de concentration d'acide gallique

Acide gallique [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Absorbance
5	0,043
10	0,115
20	0,255
30	0,424
50	0,7
60	0,817
70	0,986
80	1,094



**Figure 10. Courbe étalon de l'acide gallique**

### 6.5. Statistiques

Les résultats des tests de prolifération, la détermination du pouvoir anti-radicalaire et le dosage des polyphénols ont été effectués en triplicatas. Pour le test de prolifération, les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM (écart-type à la moyenne). Les données ont été analysées par le test de Student, le test de Student-Newman-Keuls en cas de comparaison de plus de 2 variables, ou par le test de Dunnett pour la comparaison des données dose-réponse avec un niveau de signification  $P < 0,05$ .

Les concentrations inhibitrices 50 ( $CI_{50}$ ) sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (écart-type à la moyenne) pour les tests anti-prolifératif et anti-radicalaire. L'estimation des polyphénols totaux est exprimée en mg d'équivalent acide gallique. La corrélation entre l'activité antiradicalaire et les phénols totaux des échantillons est réalisée par une régression linéaire.

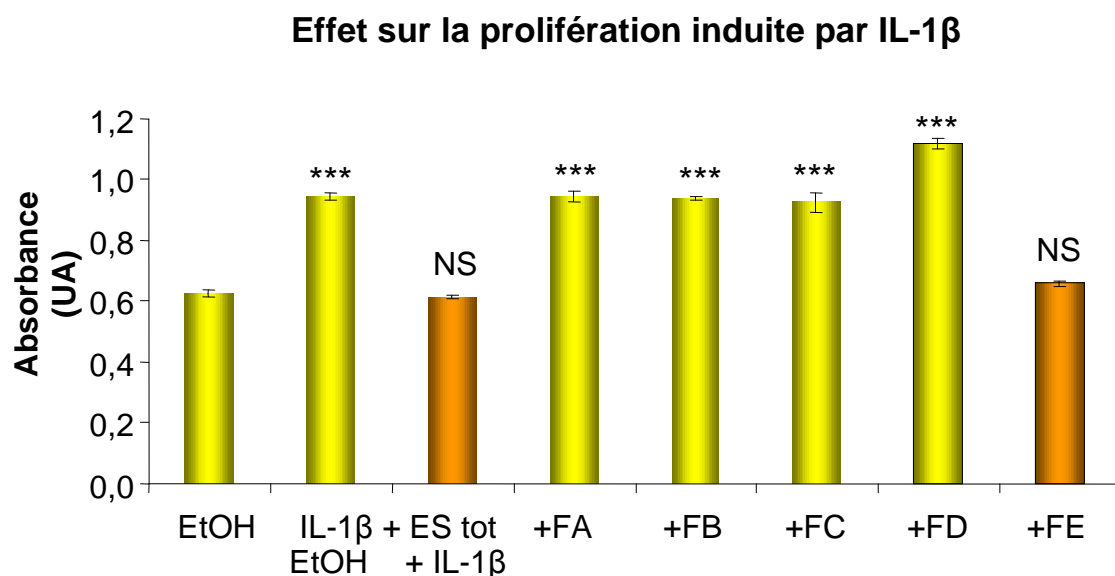
## 7. Résultats

### 7.1. Effet anti-prolifératif de l'extrait ES et fractionnement bioguidé

L'IL-1 $\beta$  induit une augmentation de la prolifération basale des CMLBH de  $49,2 \pm 2,3\%$   $p < 0.001$  à 10U/mL (figure 11). Cette concentration sera utilisée pour tous les essais suivants.

La prolifération des cellules induite par IL-1 $\beta$  est totalement inhibée par l'extrait ES tot ( $102,9 \pm 2,1\%$  d'inhibition à 10 $\mu$ g/mL;  $p < 0.001$ ), avec une  $CI_{50}$  de  $0,73 \pm 0,08\mu$ g/mL (figures 12 et 13).

Les fractions FA à FD ne montrent aucun effet inhibiteur de la prolifération des CMLBH induite par l'IL-1 $\beta$  (figure 12). La fraction FE est la seule active, avec un effet antiprolifératif ( $100,0 \pm 1,6\%$  inhibition à 10 $\mu$ g/mL;  $p < 0.001$ ), avec une  $CI_{50} = 0,38 \pm 0,02\mu$ g/mL (figure 11 et 13).

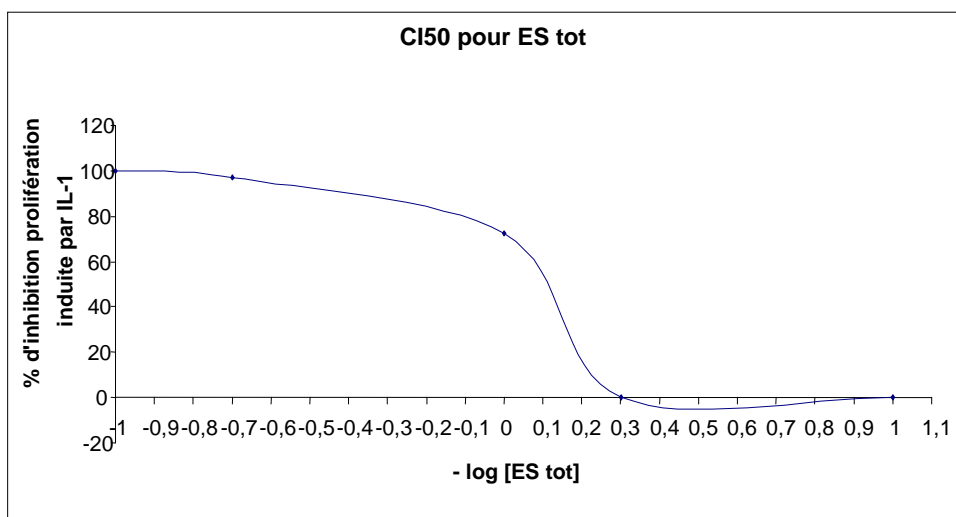


**Figure 11. Activité des fractions de ES sur la prolifération des CMLBH induite par l'IL-1 $\beta$**

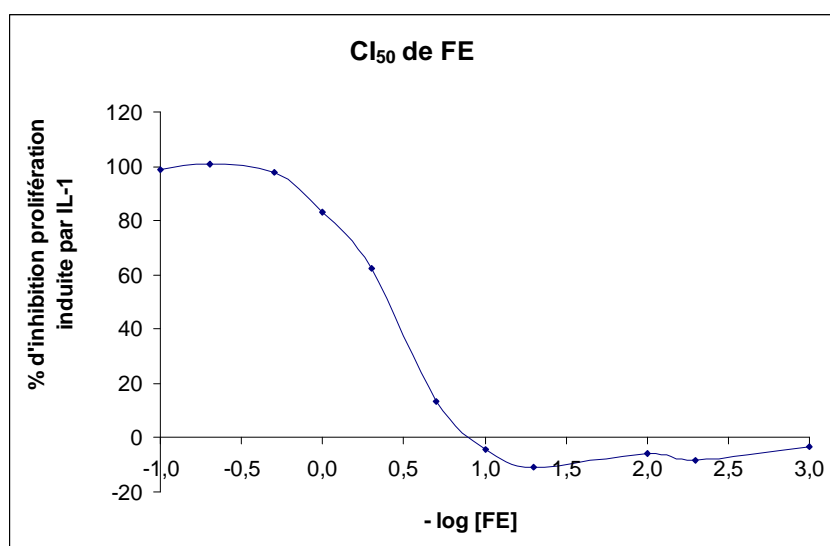
ES tot : Extrait éthanolique d'*E. stenoclada* FA-FE : fractions issues de ES tot (cf. figure 7)

NS : Prolifération basale non significative des CMLBH.

\*\*\* : Prolifération basale significative des CMLBH

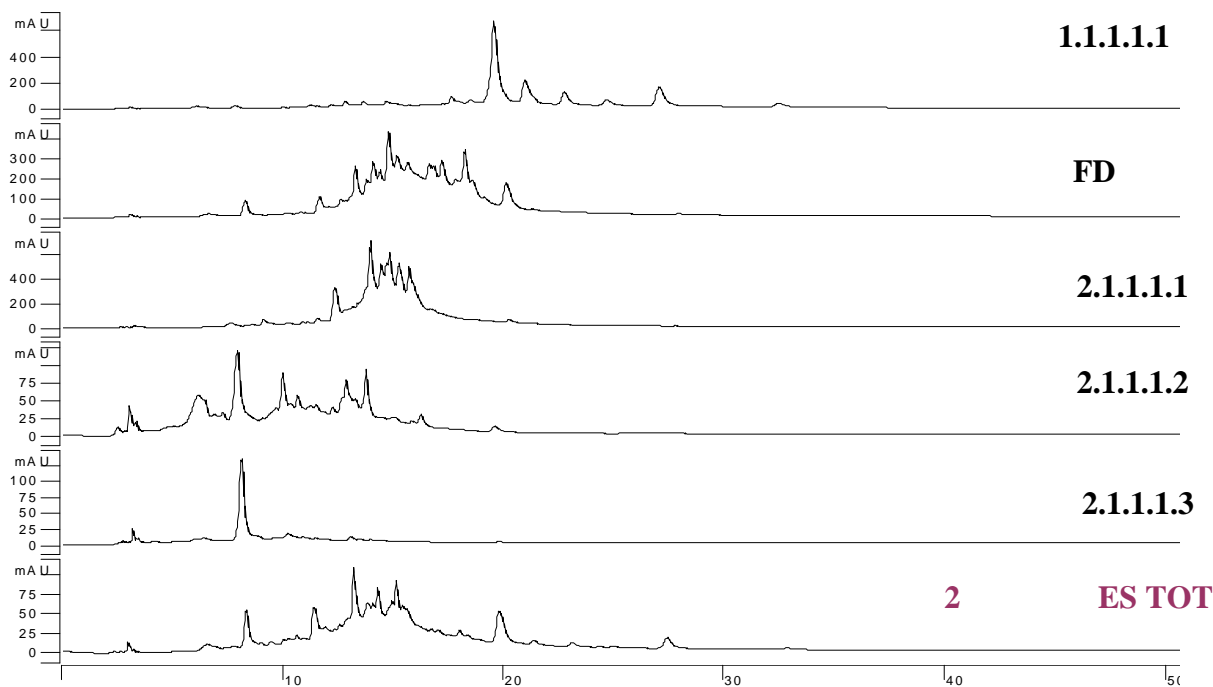


**Figure 12. Courbe dose-réponse de l'extrait ES tot**



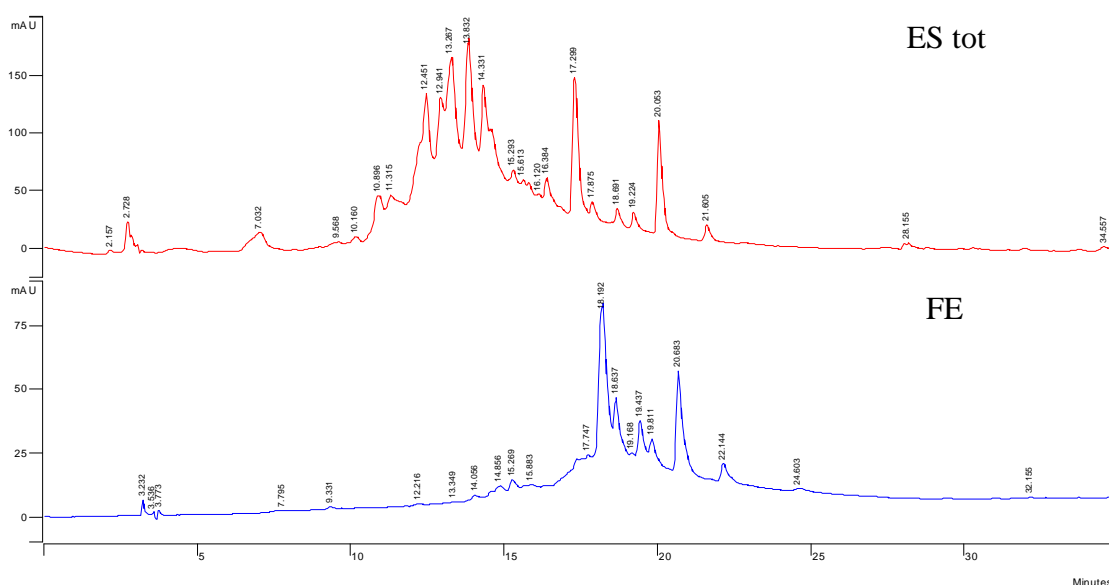
**Figure 13. Courbe dose-réponse de la fraction FE**

Les profils CLHP analytiques des différentes fractions FA-FE montrent leur nette différence de composition (figure 14).



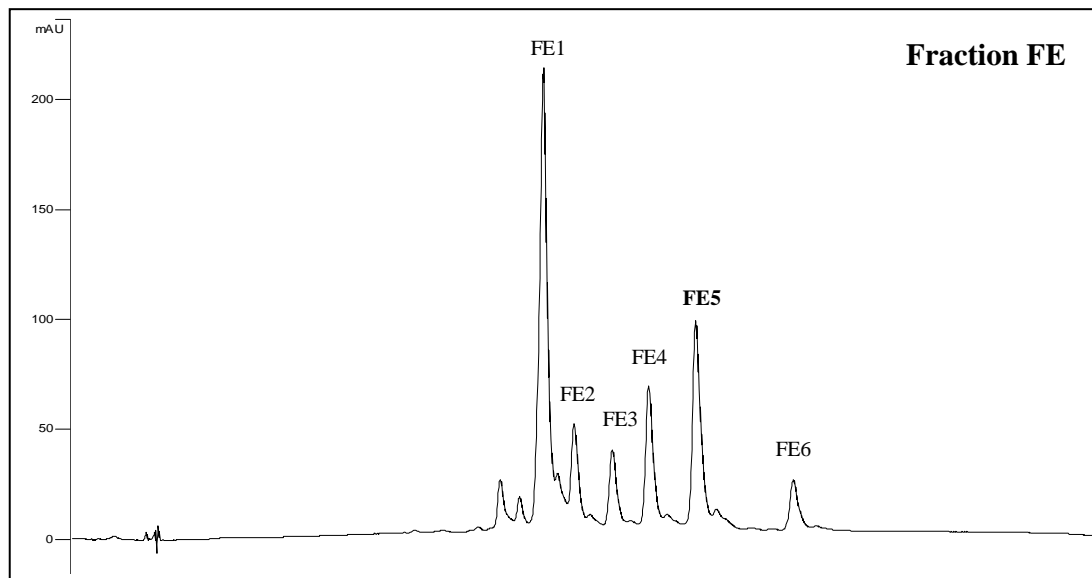
**1.1.1.1.7 Figure 14. Profils CLHP (280 nm) des fractions (FA à FE) issues de l'extrait total (ES tot).**

L'analyse par CLHP-UV de la fraction active FE (figure 15) montre que cette fraction renferme exclusivement des flavonols : leurs profils UV présentent deux bandes maximales caractéristiques.



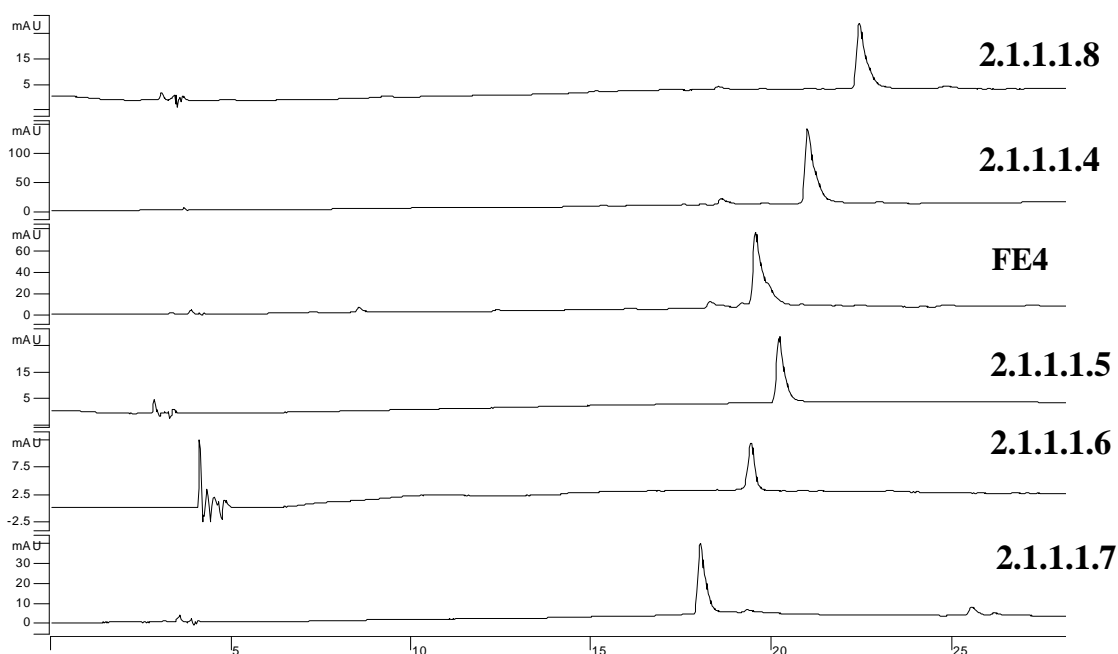
**Figure 15. Profils CLHP (280 nm) de la fraction FE et de l'extrait total ES tot.**

La fraction FE ayant concentrée les constituants actifs, nous avons optimisé son analyse chromatographique (tableau 7), dans le but de les isoler pour pouvoir les identifier (Figure 16).



**Figure 16. Profil CLHP (280 nm) de la fraction active FE**

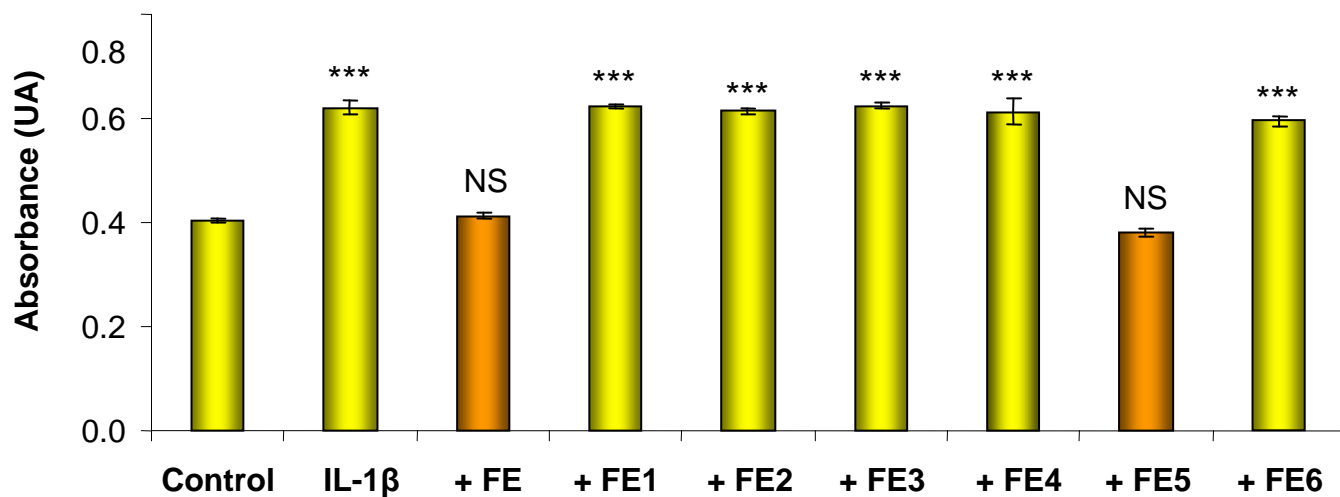
La fraction E a été fractionnée en 6 sous-fractions (FE1 à FE6) par CLHP semi-préparative. Chaque sous-fraction a été analysée par CLHP analytique couplée à un détecteur à barette de diodes (200 à 700 nm) afin de vérifier leur degré de pureté (figure 17).



**Figure 17. Profil CLHP (280 nm) des sous-fractions (FE1 à FE6) issues de la fraction active FE purifiée par CLHP semi-préparative.**



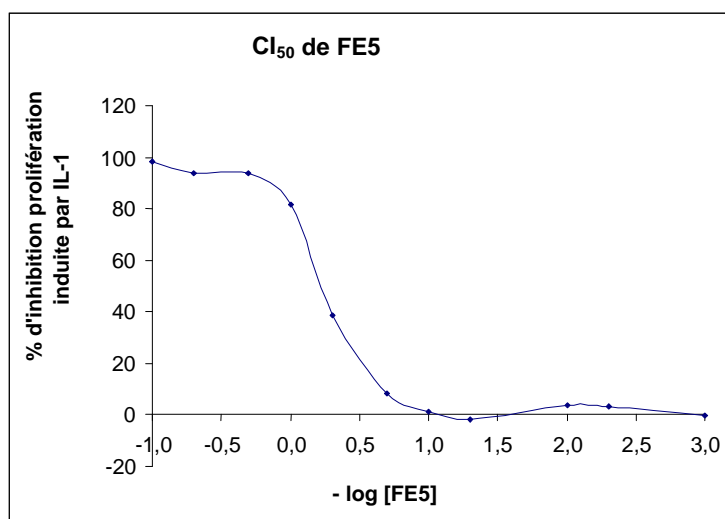
Seule la sous-fraction FE5 inhibe totalement la prolifération des CMLBH induite par IL-1 $\beta$  ( $105,7 \pm 1,2$  % inhibition;  $p < 0.001$ ) (figure 18). Sa  $CI_{50}$  a été calculée et est de  $0,49 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$  (figure 19).



**Figure 18. Activité de la fraction active FE et des sous fractions (FE1 à FE6) sur la prolifération des CMLBH induite par l'IL-1 $\beta$**

NS : Prolifération basale non significative des CMLBH

\*\*\* : Prolifération basale significative des CMLBH

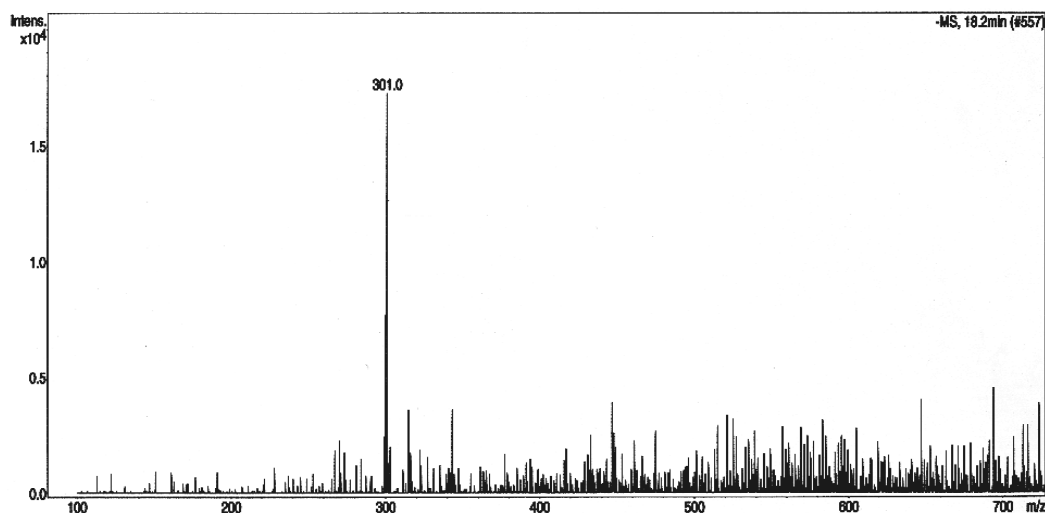


**Figure 19. Courbe dose-réponse de la sous-fraction FE5.**

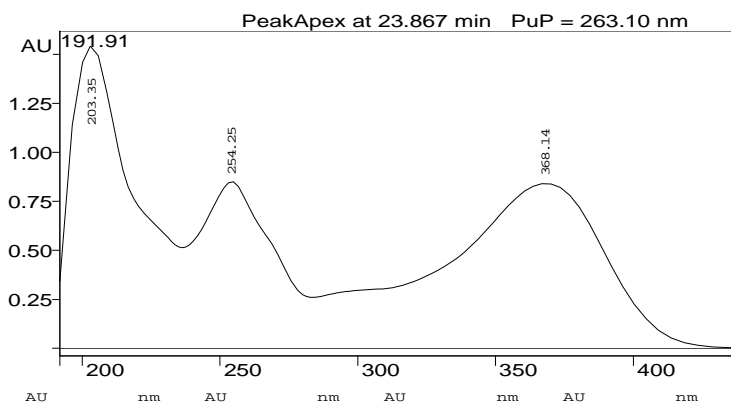
## 7.2. Identification des constituants de la fraction E

### 7.2.1. Identification du constituant présent dans la sous-fraction FE5

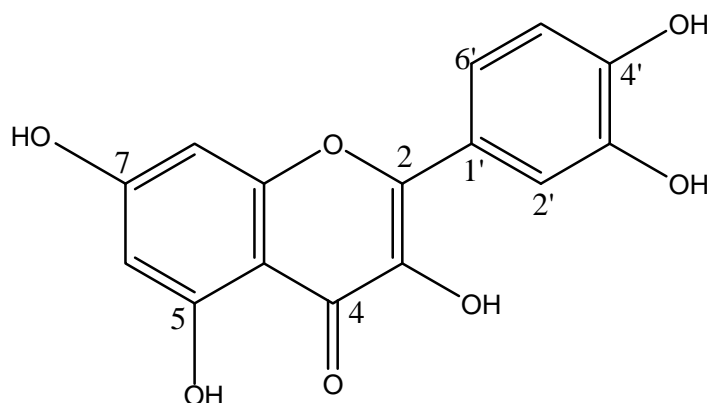
Le constituant présent dans cette sous-fraction a été identifié par CLHP couplée à un détecteur à barette de diodes et à un spectromètre de masse (CLHP-UV-SM), et par co-injection avec un standard commercial (Chromadex, ASB-00017045-500). Il s'agit de la quercétine (Tr = 27,07 min,  $\lambda_{\max}$ : 254 et 368 nm, et  $[M-H]^- = 301,0$  Da (figure 20-22).



**Figure 20. Spectre de masse LC-UV-MS (ESI : Electrospray Ionisation) de la quercétine en mode négatif  $[M-H]^-$**



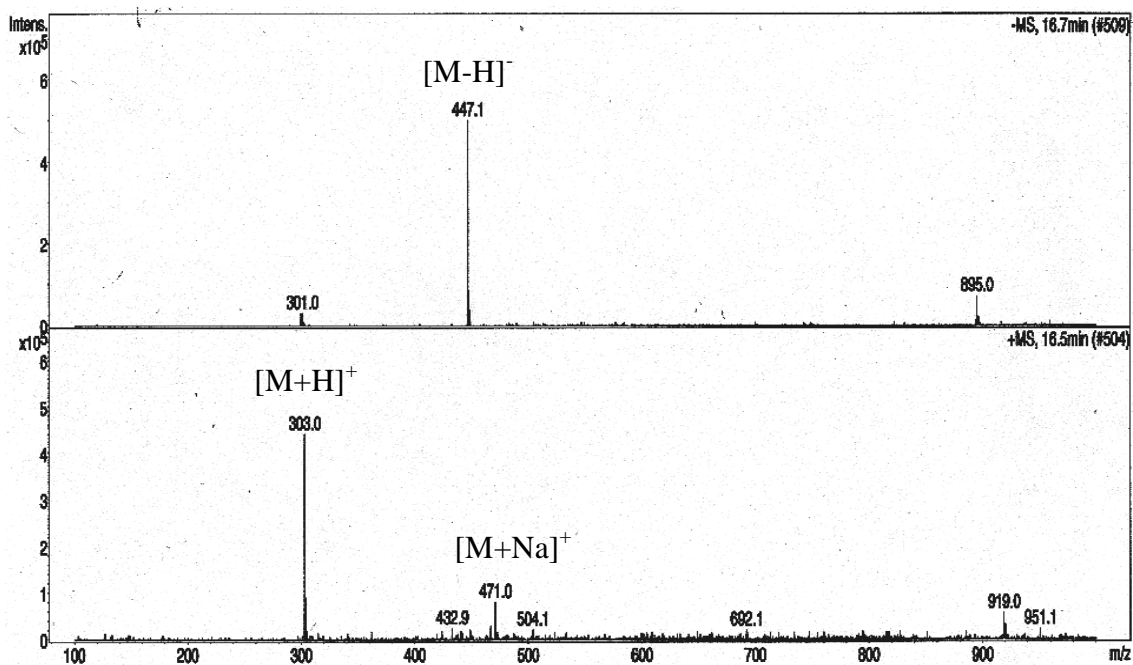
**Figure 21. Spectre UV de la quercétine**



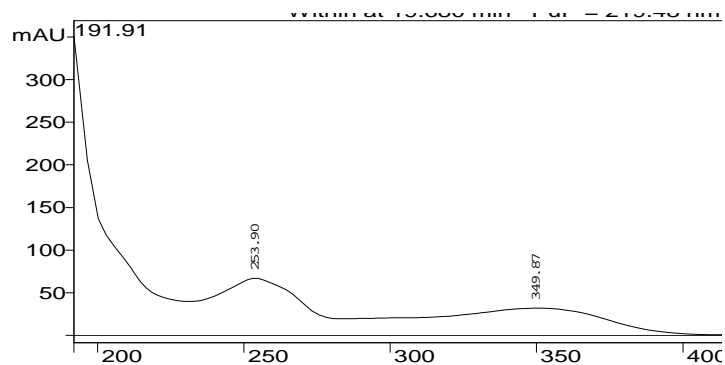
**Figure 22. Structure de la quercétine  
ou 3,3',4',5,7-pentahydroxy-2-phenylchromen-4-one**

### 7.2.2. Identification du constituant présent dans la sous-fraction FE1

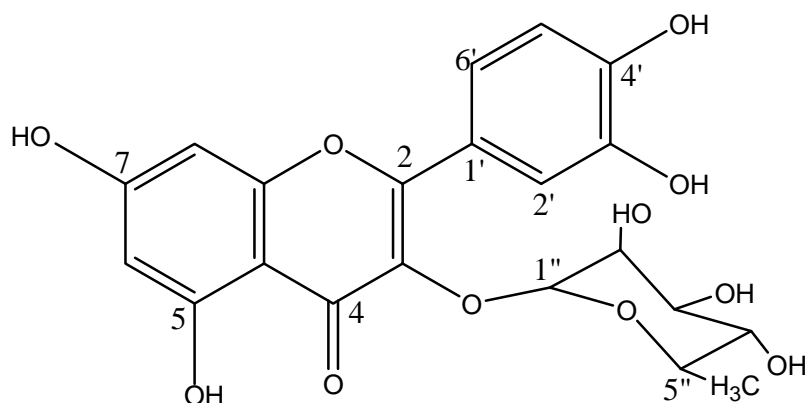
Le composé majoritaire présent dans la sous-fraction FE1 a été identifié par CLHP couplée à un détecteur à barette de diodes et à un spectromètre de masse (CLHP-UV-SM) et par co-injection avec un standard commercial à la quercitrine (Chromadex, ASB-00017170-005) (Tr = 19,52 min), UV maximal ( $\lambda_{\text{max}}$ ) : 253 nm et 349 nm ; masse moléculaire (PM)  $[M-H]^- = 447,1$  Da. (figures 23-25).



**Figure 23. Spectre de masse LC-UV-MS (ESI : Electrospray Ionisation)  
de la quercitrine en mode négatif  $[M-H]^-$  et positif  $[M+Na]^+$**



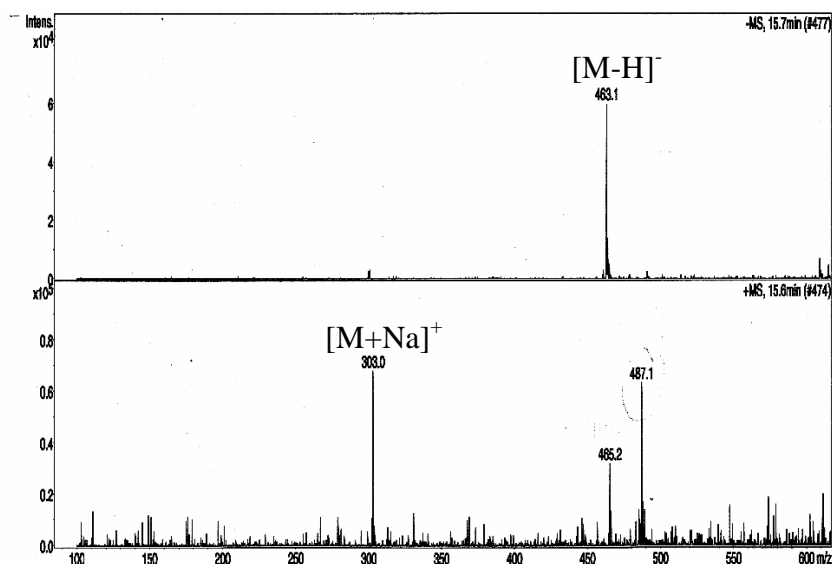
**Figure 24. Spectre UV de la quercitrine**



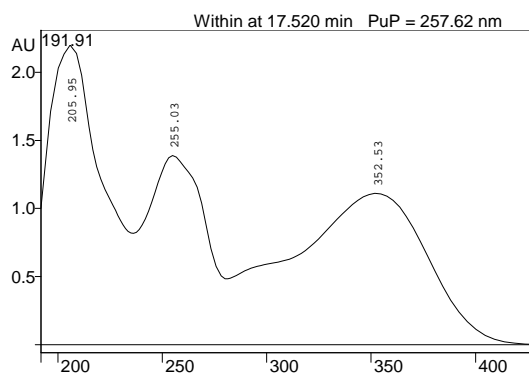
**Figure 25. Structure de la quercitrine  
ou quercétine-3-O- $\alpha$ -rhamnopyranoside**

### 7.2.3. Identification de l'hypéroside

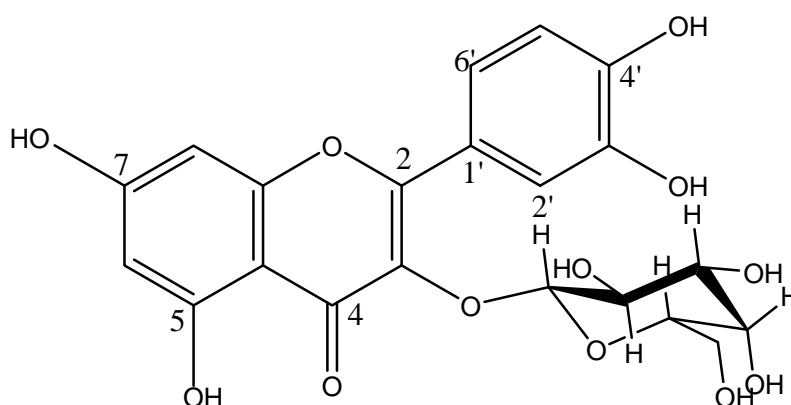
L'hypéroside a été identifié dans les mêmes conditions que précédemment (Tr = 19,3 min,  $\lambda_{\max}$ : 255 et 352 nm, et  $[M^+]$  = 462,0 Da (figure 26-28). La confirmation de la structure a été opérée par co-élution avec un standard commercial (Chromadex, ASB-00008916-005).



**Figure 26. Spectre de masse LC-UV-MS (ESI : Electrospray Ionisation) de l'hyperoside en mode négatif  $[M-H]^-$  et positif  $[M+Na]^+$**



**Figure 27. Spectre UV de l'hyperoside**



**Figure 28. Structure de l'hyperoside ou quercétine-3-O-β-galactopyranoside**

### 7.3. Identification du composé majoritaire présent dans la fraction FA

La présence d'acide gallique dans la fraction FA a été établie par co-injection d'un standard acide gallique Chromadex (ASB-00007040-010) avec la fraction FA, dans les conditions CLHP précitées (figure 29-31).

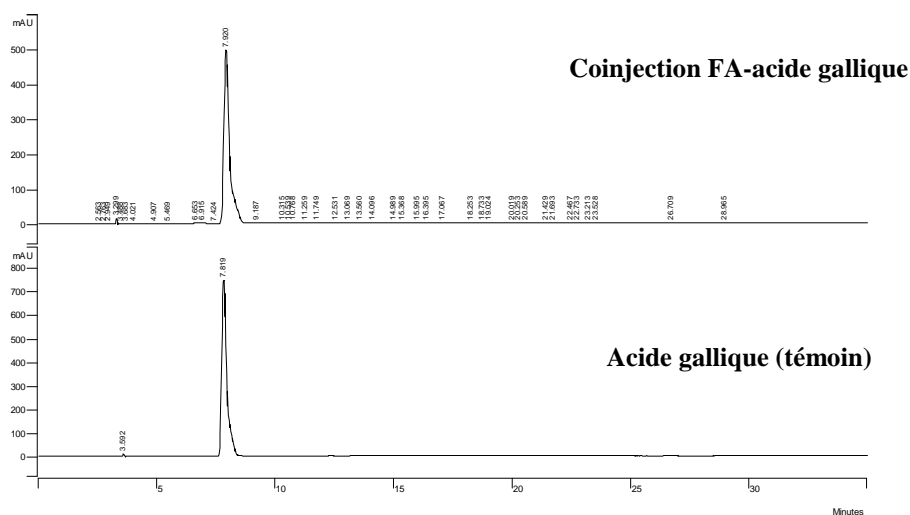


Figure 29. Profils CLHP (280nm) de la fraction FA co-injectée avec l'acide gallique et celui du témoin d'acide gallique

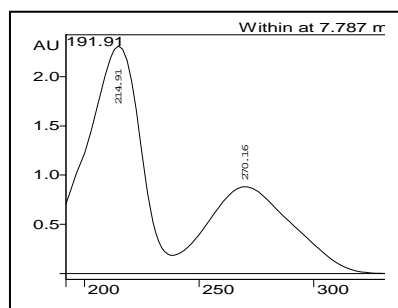


Figure 30. Profil UV de l'acide gallique

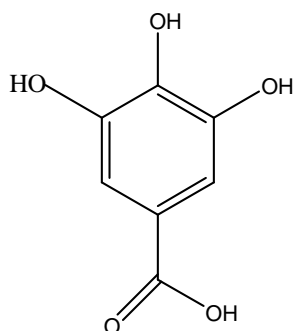
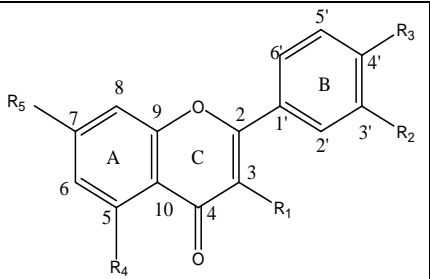


Figure 31. Structure de l'acide gallique

#### 7.4. Etude de relation structure/activité

La quercétine et la quercitrine diffèrent seulement dans la position C-3 de leur cycle C : substitution de l'hydroxyle par un rhamnose dans le cas de la quercitrine. Or, seule la quercétine s'est avérée active sur le modèle cellulaire choisi. Nous avons ainsi voulu comparer l'activité de différents flavonols glycosylés et méthoxylés témoins (tableau 11), pour tenter de comprendre l'effet observé sur les CMLBH et, le cas échéant, proposer d'autres sources naturelles riches en dérivés actifs.

**Tableau 11. Structure des flavonols utilisés dans l'étude de RSA**

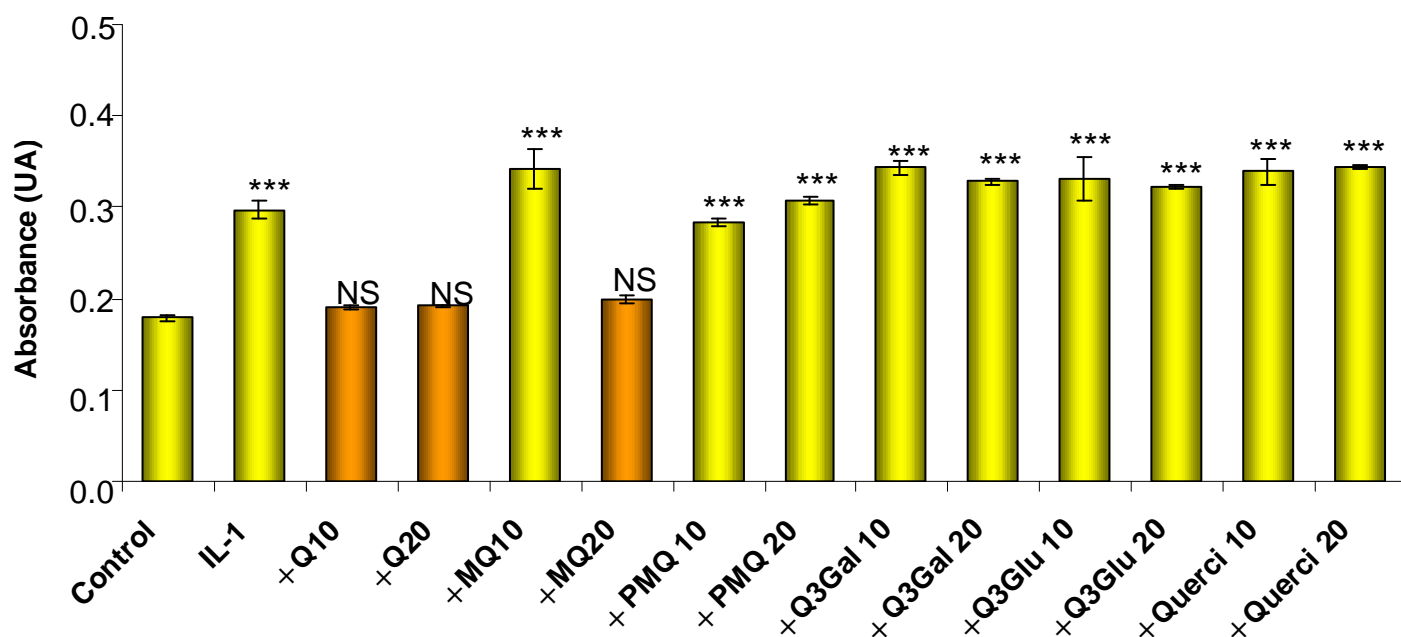
	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>	<b>R5</b>
<b>Quercétine (Q)</b>	OH	OH	OH	OH	OH
<b>Quercitrine (Querci)</b>	rhamnose	OH	OH	OH	OH
<b>Isoquercitrine (Q3Glu)</b>	glucose	OH	OH	OH	OH
<b>Hypéroside (Q3Gal)</b>	galactose	OH	OH	OH	OH
<b>Isorhamnétine (MQ)</b>	OH	OMe	OH	OH	OH
<b>Pentaméthylquercétine (PMQ)</b>	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe

L'évaluation des dérivés 3-O hétérosidiques sur la prolifération des CMLBH induite par l'IL-1 $\beta$ , a montré qu'aucun des dérivés n'est actif dans nos conditions expérimentales, suggérant que le groupement hydroxyle en position 3 du cycle C doit rester non substitué (figure 32).

L'étude des dérivés méthoxylés de la quercétine montre que la substitution de l'hydroxyle en C-3' par un méthoxyle (3'-méthylquercétine ou isorhamnétine) (tableau 11) abolit l'activité à 10  $\mu$ g/mL alors qu'elle est restaurée en doublant la concentration. Les propriétés antiprolifératives de la pentaméthylquercétine sont perdues aux 2 concentrations étudiées.

Ces résultats suggèrent que le maintien des groupements hydroxyles libres est nécessaire pour conserver l'activité d'inhibition de la prolifération des CMLBH induite par l'IL-1 $\beta$  dans la

mesure où leur substitution par un méthoxy ou un sucre (rhamnose, glucose ou galactose) diminue ou abolit cet effet (figure 32).



**Figure 32. Comparaison de l'activité d'inhibition de la prolifération des CMLBH induite par l'IL-1 $\beta$ , de la quercétine et ses dérivés.**

Q : quercétine ; MQ : 3'-méthylquercétine ou isorhamnétine ; PMQ : pentaméthylquercétine ; Q3Gal : quercétine 3-O-galactoside ou hypéroside ; Q3Glu : quercétine 3-O-glucoside ou isoquercitrine ; Querci : quercétine 3-O-rhamnoside ou quercitrine.

10 et 20 : Concentrations des flavonols testés, soit respectivement 10 $\mu$ g/mL et 20 $\mu$ g/mL

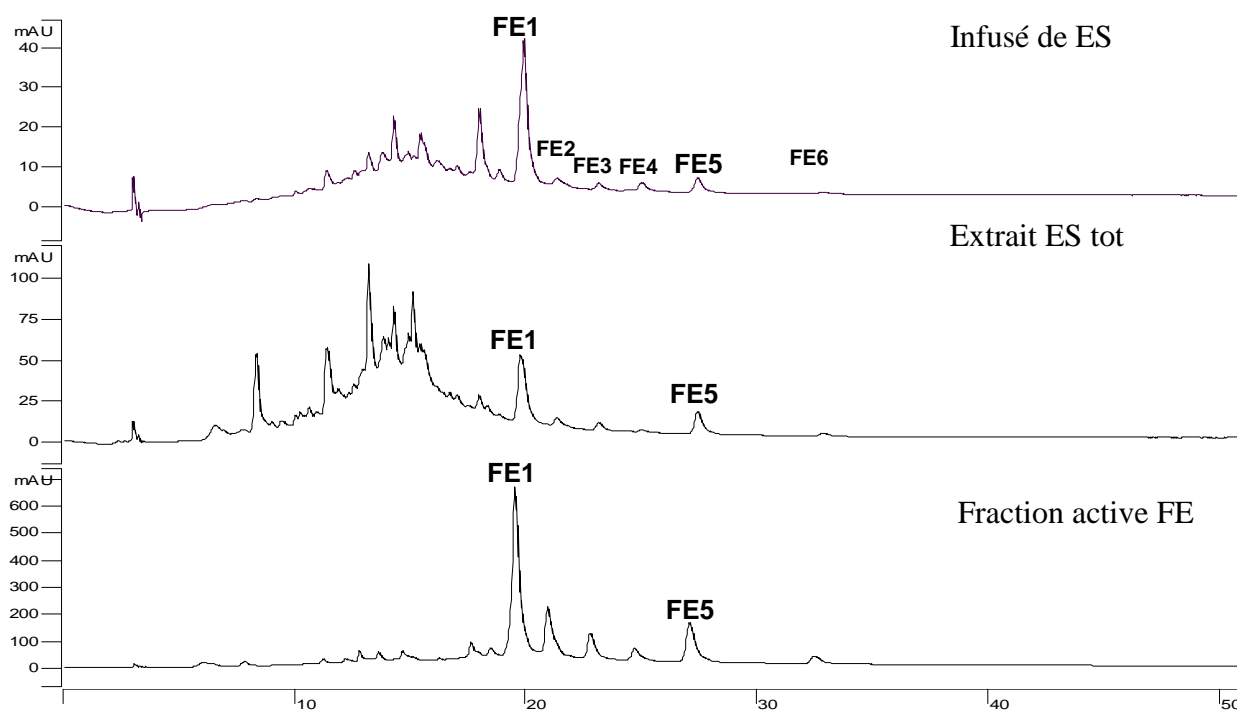
NS : Prolifération basale non significative des CMLBH

\*\*\* : Prolifération basale significative des CMLBH

### 7.5. Analyse d'un infusé de parties aériennes d'*E. stenoclada*

L'évaluation du potentiel anti-asthmatique a été réalisée au départ sur un extrait éthanolique. Nous avons voulu vérifier si la quercétine, identifiée comme le principal constituant actif dans le modèle expérimental choisi, était également présente dans un infusé de parties aériennes d'*E. stenoclada*. La drogue pulvérisée a été donc traitée de manière équivalente à une préparation traditionnelle malgache: infusion de 10 min puis filtration de l'infusé après refroidissement. Après concentration à sec, cet infusé a été repris dans du méthanol (10 mg/ml) et analysé par CLHP analytique selon les conditions chromatographiques précitées (tableau 6). La comparaison des profils de l'infusé, de l'extrait éthanolique total (ES tot) et de la fraction active (FE) confirme la présence majoritaire de quercitrine (FE1) et la présence de quercétine (FE5).





**Figure 33. Comparaison des profils CLHP (280 nm) d'un infusé, d'un extrait éthanolique d'*E. stenoclada* et d'une fraction repérée par bioguidage.**

FE1 = quercitrine, FE5 = quercétine, (les sous-fractions FE2 à FE4 et FE6 n'ont pas été identifiées)

Ainsi, la préparation traditionnelle de parties aériennes d'*E.stenoclada*, renferme majoritairement un hétéroside de quercétine susceptible de constituer une sorte de « réserve » de principes actifs : après absorption et hydrolyse intestinale, cet hétéroside de flavonol libèrerait de la quercétine, plus lipophile et plus active (figure 33).

## 7.6. Activité antiradicalaire et teneur en polyphénols totaux d'*E. stenoclada*

### 7.6.1. La teneur en polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols totaux des différentes fractions obtenues à partir de l'extrait brut d'*E. stenoclada* (ES tot) sont comprises entre 20 mg et 377 mg GAE /g.

Ce sont les fractions FC, FD et FE qui sont les plus riches en polyphénols. Les spectres UV des composés majoritaires de la fraction FC correspondent à des oligomères procyanidoliques. La fraction FA ayant le plus faible taux en polyphénols renferme majoritairement de l'acide gallique (tableau 12).

**1.1.1.1.2 Tableau 12. Activité antiradicalaire de l'extrait total (ES tot) et teneur en polyphénols totaux des différentes fractions et des composés purifiés d'*E. stenoclada*.**

Echantillons	Activité antiradicalaire (test DPPH) $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>	Polyphénols totaux <sup>b</sup>
ES tot	$0,8 \pm 0,5$	$172,5 \pm 8,6$
FA	$36,5 \pm 1,3$	$20,1 \pm 0,5$
FB	$9,5 \pm 0,1$	$111,6 \pm 9,9$
FC	$2,5 \pm 0,7$	$377,5 \pm 10,0$
FD	$3,2 \pm 0,6$	$303,8 \pm 7,57$
FE	$11,6 \pm 0,4$	$258,8 \pm 3,58$
Quercétine	$1,1 \pm 0,0$ (3,63 $\mu\text{M}$ )	-
Acide gallique	$0,8 \pm 0,0$ (4,7 $\mu\text{M}$ )	-
Acide ascorbique (contrôle)	$1,5 \pm 0,2$ (8,51 $\mu\text{M}$ )	-

a. Les résultats sont exprimés en  $CI_{50}$ , moyenne  $\pm$  ECM (n=3)

b. Les résultats représentent des moyennes  $\pm$  ECM (n=3) et sont exprimés en mg d'équivalent en acide gallique (GAE) par g de matière sèche.

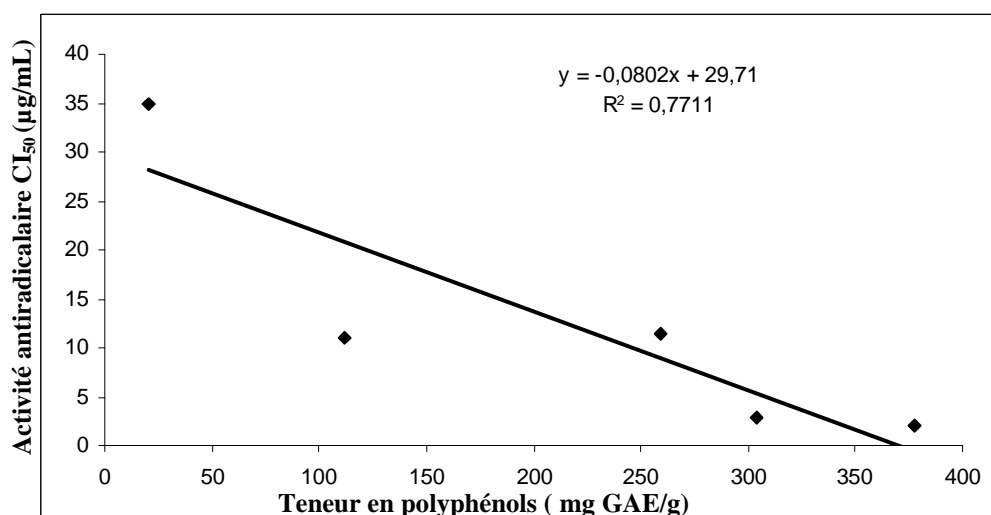
### 7.6.2. Activité antiradicalaire

Les valeurs de  $CI_{50}$  des différentes fractions ou composés purifiés sont situées entre 0,8 et 36,5  $\mu\text{g/mL}$ . La fraction la plus active (ES tot) a une  $CI_{50}$  de  $0,8 \pm 0,5$   $\mu\text{g/mL}$ . La fraction FE, renfermant exclusivement des flavonols, a un effet antiradicalaire modéré ( $CI_{50}$  :  $11,6 \pm 0,4$   $\mu\text{g/mL}$ ). La quercétine pure a une forte activité antiradicalaire ( $CI_{50}$  :  $1,1 \pm 0,0$   $\mu\text{g/mL}$ ), équivalente à celle de l'acide ascorbique utilisé comme contrôle positif ( $CI_{50}$  :  $1,5 \pm 0,2$   $\mu\text{g/mL}$ ). (Tableau 12).

### 7.6.3. Corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité anti-radicalaire

Parmi les 6 échantillons analysés, les 3 fractions (FC, FD et FE) ainsi que l'extrait brut (ES tot) sont riches en polyphénols (teneur supérieure à 150 mg GAE/g) et présentent une bonne activité antioxydante ( $CI_{50}$  compris entre 0,8 et 11  $\mu\text{g/mL}$ ).

Les extraits ou fractions ayant une activité antiradicalaire élevée sont généralement riches en polyphénols (Figure 34).



**Figure 34. Droite de corrélation entre la teneur en polyphénols totaux et l'activité antiradicalaire des échantillons testés**

## 8. Discussion

Les parties aériennes d'*E. stenoclada* sont utilisées à Madagascar en infusion pour traiter les désordres respiratoires comme les bronchites aiguës et l'asthme. Un bilan bibliographique a montré que le genre *Euphorbia* est souvent utilisé traditionnellement pour traiter ce type de pathologies respiratoires : c'est le cas par exemple d'*E. hirta* L. en Inde (Singh *et al.*, 2005) ou d'*E. lunulata* Bunge au sud de la Chine (Nishimura *et al.*, 2005). Cependant, peu d'études ont été effectuées dans le but de valider leur usage traditionnel, incluant l'identification de leurs composés actifs.

Les Euphorbes ont surtout été étudiées pour leur richesse en terpènes contenus dans leur latex. Certains d'entre eux manifestent des activités anti-inflammatoire (Corea *et al.*, 2005), anti-nociceptive (Ahmad *et al.*, 2005) et anti-tumorale (Ferreira *et al.*, 2005). Les flavonoïdes isolés des Euphorbes ont été étudiés pour leur effet antiulcèreux (Lin *et al.* 1988), antibactérien (Vijaya *et al.*, 1995) et antiviral (Ahn *et al.*, 2002).

Une étude récente décrit l'effet de l'acide gallique et la quercétine isolés de l'espèce *E. lunulata* Bunge sur différentes lignées cellulaires. Cet acide phénolique et ce flavonol semblent mimer l'effet de l'IL-10, aux effets anti-asthmatiques (Nishimura *et al.*, 2005). L'hélioscopinine-A, un autre polyphénol isolé d'une autre espèce, *E. helioscopia* L., exerce un effet inhibiteur du leucotriène D4 qui induit la contraction de la trachée des rats, et inhibe l'antigène induisant une broncho-constriction chez le hamster (Park, *et al.* 2001).

En collaboration avec Dr. Nelly Frossard, responsable de l'équipe « Inflammation et Environnement dans l'asthme EA3771 », nous avons opté pour un modèle cellulaire basé sur l'inhibition de la prolifération de cellules musculaires lisses bronchiques, induite par une cytokine, l'IL-1 $\beta$ . Ce modèle est en effet validé par des études sur des CMLB canines (Yang *et al.*, 2000) et les CMLB de cobayes (De *et al.*, 1995). Pour estimer la viabilité cellulaire, nous avons utilisé le test XTT qui permet d'estimer l'activité du métabolisme mitochondrial par la réduction de l'XTT en formazan soluble de couleur orange.

Un fractionnement bio-guidé de l'extrait éthanolique (ES tot) préparé à partir des parties aériennes d'*E. stenoclada* Baill. nous a permis de montrer que la seule fraction active (FE5) l'était par la présence de quercétine. Cet effet anti-prolifératif sur le muscle lisse bronchique n'a pas été rapporté auparavant. Ce résultat est en accord avec plusieurs autres études montrant l'activité anti-proliférative de la quercétine sur d'autres types cellulaires (Kandaswami *et al.*, 2005; Lambert *et al.*, 2005). De plus, plusieurs études expérimentales ont montré les effets bénéfiques de la quercétine dans le traitement de l'asthme. En effet, ce flavonol inhibe l'obstruction bronchique et l'hyper-réactivité bronchique chez les cobayes (Dorsch *et al.*, 1992), et a un effet relaxant *in vitro* sur la trachée de cobayes pré-contractée par l'histamine, le carbachol ou le chlorure de potassium (Ko *et al.*, 1999, 2002 et 2003) et est un inhibiteur de la libération d'histamine *in vitro* par les mastocytes péritonéaux de rats (Haggag *et al.*, 2003).

Nos résultats élargissent les propriétés de la quercétine en mettant en évidence sa capacité inhibitrice de la prolifération du muscle lisse bronchique induite par une cytokine inflammatoire. Ils valident également le test cellulaire utilisé, qui est parfaitement adapté aux criblage d'extraits végétaux et permet par fractionnement bioguidé d'identifier le(s) constituant(s) responsable(s) du potentiel anti-asthmatique décelé dans un mélange complexe.

L'étude de RSA, bien qu'elle concerne un nombre limité de composés, a démontré l'effet anti-prolifératif supérieur de la quercétine par rapport à d'autres flavonols substitués. Il paraît que, d'une part, la méthylation du cycle B réduit de 50% l'activité de la quercétine, alors que la substitution totale de tous les groupements hydroxyles l'inhibe totalement. Ainsi, la présence de groupements hydroxyles libres dans le cycle B paraît être importante pour l'activité antiproliférative de la quercétine. D'autre part, la glycosylation en C-3 (rhamnose, glucose ou galactose) abolit complètement cette activité. Ce résultat confirme l'importance de l'hydroxyle libre en position 3 dans le maintien de l'activité.

D'autres travaux cités dans la littérature montrent que des dérivés de la quercétine substitués par un ou plusieurs méthoxyles sont plus actifs que la quercétine elle-même induisant une relaxation de la trachée de cobaye pré-contractée par l'histamine, le carbacol ou le chlorure de potassium (Ko *et al.*, 1999). Ces auteurs ont en effet rapporté que la 3-*O*-méthylquercétine isolée de *Rhamnus nakaharai*, une Rhamnacee utilisée dans la médecine traditionnelle taïwanaise dans le traitement de l'inflammation et de l'asthme, induit une activité relaxante de la trachée de cobaye *ex vitro* par inhibition de phosphodiésterases (Ko *et al.*, 2002). Plus récemment, le même groupe a rapporté que la 3-*O*-méthylquercétine est active *in vivo*, inhibant l'inflammation et l'hyper-réactivité bronchique dans un modèle d'asthme murin (Ko *et al.*, 2004).

Les asthmatiques sont soumis à un stress oxydatif permanent, et de ce fait il a été suggéré qu'une supplémentation en antioxydants diminuerait les symptômes de l'asthme (Nadeem *et al.*, 2003). De plus, des études épidémiologiques mettent en exergue la corrélation entre la consommation régulière d'aliments riches en polyphénols et la fonctionnalité pulmonaire (Cook *et al.*, 1997 ; Strachan *et al.*, 1991) et les symptômes respiratoires (Forastiere *et al.*, 2000 ; Miedema *et al.*, 1993), suggérant que des antioxydants pris sous forme d'aliments ou de compléments alimentaires, pourraient modifier le développement de pathologies respiratoires chez des individus à risques.

Une teneur élevée en polyphénols a été trouvée dans une des sous-fractions obtenue lors du fractionnement de l'extrait d'*Euphorbia stenoclada*, la fraction FC, et s'explique par la présence de tanins caractérisés par leur spectres UV et leur coloration rouge brique avec le réactif vanilline-sulfurique sur plaque CCM. Le genre *Euphorbia* est en effet connu pour sa composition élevée en tanins hydrolysables (Abdulladzhanova *et al.*, 2001 et 2003; Ahn *et al.* 1996).

Dans le test au DPPH, les fractions les plus actives, FC et FD, ont des  $CI_{50}$  micromolaires. Il est bien établi que les composés polyphénoliques peuvent agir comme agents réducteurs, antioxydants donneurs d'hydrogène et piègeurs d'oxygène singulet (Rice-Evans *et al.* 1996; Kandaswami et Middleton, 1994). L'acide gallique, présent dans la fraction FA, manifeste l'activité antiradicalaire la plus marquée, et même supérieure à celle de l'acide ascorbique, choisi comme témoin.

En conclusion, cette étude a permis de montrer qu'un extrait de parties aériennes d'*Euphorbia stenoclada* présente un potentiel anti-asthmatique, en étant capable d'inhiber la prolifération du muscle lisse bronchique humain, responsable de l'inflammation de la paroi bronchique. Celle-ci entraîne à terme une insuffisance respiratoire caractéristique chez les asthmatiques. Nous avons pu montrer le rôle déterminant de la quercétine qui, bien que minoritaire sous forme d'aglycone, existe dans l'infusé traditionnel sous forme d'hétérosides. Ceux-ci sont vraisemblablement hydrolysés après absorption pour libérer la forme aglycone active, voire hydrolysés si les préparations traditionnelles se font par décoction aqueuse prolongée. L'extrait total d'*E. stenoclada* présente également des propriétés antiradicalaires marquées, liées en partie à la présence d'acide gallique et de tanins hydrolysables.

Même si d'autres études s'avèrent nécessaires pour confirmer ces propriétés d'*E. stenoclada*, en particulier dans un modèle murin d'asthme, le présent travail ouvre de nouvelles perspectives dans le traitement de pathologies respiratoires basées sur des données ethnopharmacologiques.

## Références

Abdulladzhanova NG, Mavlyanov S M, Dalimov DN. Polyphenols of certain plants of the Euphorbiaceae family. Chem Nat Comp 2003; 39(4): 399-400.

Abdulladzhanova NG, Mavlyanov SM, Dalimov DN. Phenolic compounds of *Euphorbia ferganensis*. Chem Nat Comp 2001; 37(2): 193-4.

Ahmad VU, Hussain H, Bukhari IA, Hussain J, Jassbi AR, Dar A. Antinociceptive diterpene from *Euphorbia decipiens*. Fitoterapia 2005; 76(2): 230-2.

Ahmad VU, Hussain J, Hussain H, Jassbi AR, Ullah F, Lodhi MA, Yasin A, Choudhary MI. First natural urease inhibitor from *Euphorbia decipiens*. Chem Pharm Bull 2003; 51(6): 719-23.

Ahmad VU, Hussain H, Hussain J, Jassbi AR, Bukhari IA, Yasin A, Choudhary MI, Dar A. New bioactive diterpenoids from *Euphorbia decipiens*. Z Naturforsch 2002; 57 b: 1066-71.

Ahmad VU, Jassbi AR. New diterpenoids from *Euphorbia teheranica*. J Nat Prod 1999; 62: 1016-8.

Ahn BT, Kang SS. Phenolic compounds from aerial parts of *Euphorbia pekinensis* (II). Saengyak Hakhoechi 1996; 27(2): 142-5.

Ahn MJ, Kim CY, Lee JS, Kim TG, Kim SH, Lee CK, Lee BB, Shin CG, Huh H and Kim J. Inhibition of HIV-1 integrase by galloyl glucoses from *Terminalia chebula* and flavonol glycoside gallates from *Euphorbia pekinensis*. Planta Med 2002; 68: 457-9.

Al-Fatimi M, Friedrich U, Jenett-Siems K. Cytotoxicity of plants used in traditional medicine in Yemen. Fitoterapia 2005; 76(3-4): 355-8.

Amirghofran Z, Bahmani M, Azadmehr A, Javidnia K. Induction of apoptosis in leukemia cell lines by *Linum persicum* and *Euphorbia cheiradenia*. J Cancer Res Clin Oncol 2006; 132(7): 427-32.

Atta AH, Mouneir SM. Evaluation of some medicinal plant extracts for antidiarrhoeal activity. Phytother Res 2005; 19(6): 481-5.

Aynehchi Y, Hakimzadeh MZ. Chemical examination of *Euphorbia falcata* L. Q J Crude Drug Res 1978; 16: 121-4.

Aynehchi Y, Mirgoli J, Negad FS, Ulubelen A. Chemical examination of *Euphorbia lanata*. Q. J Crude Drug Res 1978; 16: 163-6.

Aynehchi Y, Kiumehr N. Chemical examination of *Euphorbia tinctoria* Boiss. Pazhoohandeh 1977; 16: 124-8.

Aynehchi Y, Kiumehr N. Chemical examination of *Euphorbia tinctoria*. Acta Pharm Suec 1974; 11: 185-90.

- Aynehchi Y, Ulubelen A. Flavonoids of *Euphorbia tinctoria*. Istanbul Univ Eczacilik Fak Mecm 1974;10: 17-20.
- Aynehchi Y, Kiumehr N. Constituents of *Euphorbia tinctoria*. Phytochemistry 1972; 11: 2887.
- Aynehchi Y, Mojtabaii M, Yazdizadeh K. Chemical examination of *Euphorbia myrsinites* J Pharm Sci 1972; 61: 292-3.
- Bani S, Kaul A, Khan B, Gupta VK, Satti NK, Suri KA, Qazi GN. Anti-arthritic activity of a biopolymeric fraction from *Euphorbia tirucalli*. J Ethnopharmacol 2007; 110(1): 92-8.
- Bani S, Kaul A, Khan B, Ahmad SF, Suri KA, Satti NK, Amina M, Qazi GN. Immunosuppressive properties of an ethyl acetate fraction from *Euphorbia royleana*. J Ethnopharmacol 2005; 99(2): 185-92.
- Barnes PJ. Mechanisms of action of glucocorticoids in asthma. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154: 21-7.
- Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease. N Engl J Med 2000; 343: 269-80.
- Benayoun L, Pretolani M. Le remodelage bronchique dans l'asthme : mécanismes et enjeux thérapeutiques. Medecine/Sciences 2003; 19: 319-26.
- Bousquet J, Jeffery P, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 1720-45.
- Cateni F, Zilic J, Falsone G, Scialino G, Banfi E. New cerebrosides from *Euphorbia peplis* L.: antimicrobial activity evaluation. Bioorg Med Chem Lett 2003; 13(24): 4345-50.
- Cheng HY, Lin TC, Yang CM, Wang KC, Lin LT, Lin CC. Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits both virus entry and late stage replication of herpes simplex virus type 2 *in vitro*. J Antimicrob Chemother 2004; 53(4): 577-83.
- Chu EK, Drazen JM. Asthma: One hundred years of treatment and onward. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171: 1202-05.
- Chung KF, Godard P. ERS task force: difficult therapyresistant asthma. Eur Respir J 1999; 13: 1198-208.
- Cook DG, Carey IM, Whincup PH, Papacosta O, Chirico S, Bruckdorfer KR, Walker M. Effect of fresh fruit consumption on lung function and wheeze in children. Thorax 1997; 52: 628-33.
- Corea G, Fattorusso E, Lanzotti V, Di Meglio P, Maffia P, Grassia G, Ialenti A, Ianaro A. Discovery and biological evaluation of the novel naturally occurring diterpene pepluanone as antiinflammatory agent. J Med Chem 2005; 48(22): 7055-62.



De S, Zelazny ET, Souhrada JF, Souhrada M. IL-1 beta and IL-6 induce hyperplasia and hypertrophy of cultured guinea pig airway smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 1995; 78: 1555-63.

Djukanovic R, Roche WR, Wilson JW, Beasley CRW, Twentyman OP, Howarth PH. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 434-57.

Dorsch W, Bittinger M, Kaas A, Muller A, Kreher B, Wagner H. Anti-asthmatic effects of *Galphimia glauca*, gallic acid, and related compounds prevent allergen- and platelet-activating factor-induced bronchial obstruction as well as bronchial hyperreactivity in guinea pigs. *Int Arch Allergy Immunol* 1992; 97(1): 1-7.

Duarte N, Ferreira MJ, Martins M, Viveiros M, Amaral L. Antibacterial activity of ergosterol peroxide against *Mycobacterium tuberculosis*: dependence upon system and medium employed. *Phytother Res* 2007; 21(7): 601-4.

Duarte N, Gyemant N, Abreu PM, Molnar J, Ferreira MJ. New macrocyclic lathyrane diterpenes, from *Euphorbia lagascae*, as inhibitors of multidrug resistance of tumour cells. *Planta Med* 2006; 72(2): 162-8.

Elias JA, Zhu Z, Chupp G, Homer RJ. Airway remodeling in asthma. *J Clin Invest* 1999; 104: 1001-6.

Ferreira MJ, Gyemant N, Madureira AM and Molnar J. Inhibition of P-glycoprotein transport activity in a resistant mouse lymphoma cell line by diterpenic lactones. *Anticancer Res* 2005; 25: 3259-62.

Forastiere F, Pistelli R, Sestini P, Fortes C, Renzoni E, Rusconi F, Dell'Orco V, Ciccone G, Bisanti L. Consumption of fresh fruit rich in vitamin C and wheezing symptoms in children. SIDRIA Collaborative Group, Italy (Italian Studies on Respiratory Disorders in Children and the Environment). *Thorax* 2000; 55: 283-8.

Gergen PJ. Understanding the economic burden of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: S445-8.

Godard P. Pneumologie, soins infirmiers. Edition Masson; 2005: 77-8.

Godard P, Chanez P, Bousquet P, Demoly P, Pujol JP, Michel FB. Asthmologie, 2<sup>ème</sup> édition, Masson; 2000: 308.

Haba H, Lavaud C, Harkat H, Alabdul Magid A, Marcourt L, Benkhaled M. Diterpenoids and triterpenoids from *Euphorbia guyoniana*. *Phytochemistry* 2007; 68(9): 1255-60.

Haggag EG, Abou-Moustafa MA, Boucher W and Theoharides TC. The effect of a herbal water-extract on histamine release from mast cells and on allergic asthma. *J Herbal Pharmacother* 2003; 3: 41-54.

Jassbi AR. Chemistry and biological activity of secondary metabolites in *Euphorbia* from Iran. *Phytochemistry* 2002; 67: 1977-84.

Jassbi AR. Phytochemical Investigations on Some Medicinal Plants from Families Euphorbiaceae and Lamiaceae. Ph.D. Thesis, HEJ Research Institute of Chemistry, Karachi University; 2000.

Jeffery PK. Remodeling in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: S28-38.

Kandaswami C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT and Lee MT. The anti-tumour activities of flavonoids. *In Vivo* 2005; 19: 895-909.

Kandaswami C, Middleton E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol* 1994; 366: 351-76.

Ko WC, Shih CM, Chen MC, Lai YH, Chen JH, Chen CM and Lin CN. Suppressive effects of 3-*O*-methylquercetin on ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness. *Planta Med* 2004; 70: 1123-7.

Ko WC, Chen MC, Wang SH, Lai YH, Chen JH and Lin CN. 3-*O*-methylquercetin more selectively inhibits phosphodiesterase subtype 3. *Planta Med* 2003; 69: 310-15.

Ko WC, Wang HL, Lei CB, Shih CH, Chung MI and Lin CN. Mechanisms of relaxant action of 3-*O*-methylquercetin in isolated guinea pig trachea. *Planta Med* 2002; 68: 30-5.

Ko WC, Kuo SW, Sheu JR, Lin CH, Tzeng SH and Chen CM. Relaxant effects of quercetin methyl ether derivatives in isolated guinea pig trachea and their structure-activity relationships. *Planta Med* 1999; 65: 273-5.

Kuo PL, Cho CY, Hsu YL, Lin TC, Lin CC. Putranjivain A from *Euphorbia jolkini* inhibits proliferation of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells via blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 213(1): 37-45.

Lambert JD, Hong J, Yang GY, Liao J and Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J of Clin Nutr* 2005; 81: 284S-291S

Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med* 1998; 339: 1194-200.

Lanhers MC, Nicolas JP, Fleurentin J, Weniger B. *Euphorbia hirta* L. *Ethnopharmacologia* 2005; 36: 9.

Li JT. Pharmacotherapy of asthma. In: *Lung biology in health and disease*, Vol. 212. New York : Taylor & Francis group; 2006 : 1-408.

Lin LY, Yuan HS. The constituents of the anti-ulcer fractions of *Euphorbia hirta*. *Zhonghua Yaoxue Zazhi* 1988; 40(1): 49-51.

Lodhi MA, Hussain J, Abbasi MA, Jassbi AR, Choudhary MI, Ahmad VU. A new *Bacillus pasteurii* urease inhibitor from *Euphorbia decipiens*. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2006; 21(5): 531-5.

- Luo H, Wang A. Induction of apoptosis in K562 cells by jolkinolide B. *Can J Physiol Pharmacol* 2006; 84(10): 959-65.
- Madureira AM, Ascenso JR, Valdeira L, Duarte A, Frade JP, Freitas G, Ferreira MJ. Evaluation of the antiviral and antimicrobial activities of triterpenes isolated from *Euphorbia segetalis*. *Nat Prod Res* 2003; 17(5): 375-80.
- Magan R, Marin C, Salas JM, Barrera-Perez M, Rosales MJ, Sanchez-Moreno M. Cytotoxicity of three new triazolo-pyrimidine derivatives against the plant trypanosomatid: *Phytomonas* sp. isolated from *Euphorbia characias*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(6): 651-6.
- Miedema I, Feskens EJ, Heederik D, Kromhout D. Dietary determinants of long-term incidence of chronic nonspecific lung diseases. The Zutphen Study. *Am J Epidemiol* 1993; 138: 37-45.
- Miyata S, Wang LY, Yoshida C, Kitanaka S. Inhibition of cellular proliferation by diterpenes, topoisomerase II inhibitor. *Bioorg Med Chem* 2006; 14(6): 2048-51.
- Nadeem A, Chhabra SK, Masood A, Raj HG. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2003; 111(1): 72-8.
- Natarajan D, Britto SJ, Srinivasan K, Nagamurugan N, Mohanasundari C, Perumal G. Antibacterial activity of *Euphorbia fusiformis*-a rare medicinal herb. *J Ethnopharmacol* 2005; 102(1): 123-6.
- National Institute of Health, May 1997. Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma. Expert Panel report 2. Atlanta, Ga. National Heart, Lung and Blood Institute Publication n° 97-4051A.
- Neukirch F, Pin I, Knani J, Henry C, Pison C, Liard R, Romazzini S, Bousquet J. Prevalence of asthma and asthma-like symptoms in three French cities. *Respir Med* 1995; 89: 685-92.
- Nishimura T, Wang LY, Kusano K, Kitanaka S. Flavonoids that mimic human ligands from the whole plants of *Euphorbia lunulata*. *Chem Pharm Bull* 2005; 53(3): 305-8.
- Nunomura S, Kitanaka S, Ra C. 3-*O*-(2,3-dimethylbutanoyl)-13-*O*-decanoylingenol from *Euphorbia kansui* suppresses IgE-mediated mast cell activation. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(2): 286-90.
- Ogbourne SM, Suhrbier A, Jones B, Cozzi SJ, Boyle GM, Morris M et al. Antitumor activity of 3-ingenyl angelate: plasma membrane and mitochondrial disruption and necrotic cell death. *Cancer Res* 2004; 64(8): 2833-9.
- Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J, et al. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem* 2002; 50(23): 6882-90.
- Pusztai R, Ferreira MJ, Duarte N, Engi H, Molnar J. Macrocyclic lathyrene diterpenes as antitumor promoters. *Anticancer Res* 2007; 27(1A): 201-5.

- Ratsimiala Ramonta IM, Ramananjanahary RH. Etudes ethnobotanique , biologique et ecologique de quelques plantes anti-diarrhéiques de la région nord-ouest de Madagascar. *Ethnopharmacologia* 2005; 36: 51.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxydant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20(7): 933-56.
- Rivière C, Nicolas JP, Caradec ML, Désiré O, Schmitt A. Les plantes médicinales de la région nord de Madagascar : Une approche ethnopharmacologique. *Ethnopharmacologia* 2005; 36: 37.
- Ruan HL, Zhou, XF, Zhang YH, Pi HF, Wu JZ, Sun HD. Ferulic acid esters from *Euphorbia hylonoma*. *Fitoterapia* 2007; 78(1): 72-3.
- Sermisart B, Sripochang S, Suvajeejarun T, Kiatfuengfoo R. The molluscicidal activities of some *Euphorbia milii* hybrids against the snail *Indoplanorbis exustus*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2005; 36(4): 192-5.
- Shi HM, Williams ID, Sung HH, Zhu HX, Ip NY, Min ZD. Cytotoxic diterpenoids from the roots of *Euphorbia ebracteolata*. *Planta Med* 2005a; 71(4): 349-54.
- Shi HM, Long BS, Cui XM, Min ZD. A new bisabolane sesquiterpenoid from *Euphorbia chrysocoma*. *J Asian Nat Prod Res* 2005b; 7(6): 857-60.
- Singh GD, Kaiser P, Youssouf MS, Singh S, Khajuria A, Koul A, Bani S, Kapahi BK, Satti NK, Suri KA, Johri RK. Inhibition of early and late phase allergic reactions by *Euphorbia hirta* L. *Phytother Res* 2006; 20(4): 316-21.
- Singh A, Singh SK. Molluscicidal evaluation of three common plants from India. *Fitoterapia* 2005; 76(7-8): 747-51.
- Singh SK, Yadav RP, Tiwari S and Singh A. Toxic effect of stem bark and leaf of *Euphorbia hirta* plant against freshwater vector snail *Lymnaea acuminata*. *Chemosphere* 2005; 59: 263-70.
- Singla AK, and Pathak k. Phytoconstituents of *Euphorbia* species. *Fitoterapia* 1990; 6: 483-516.
- Strachan DP, Cox BD, Erzinclioglu SW, Walters DE, Whichelow MJ. Ventilatory function and winter fresh fruit consumption in a random sample of British adults. *Thorax* 1991; 46:624-9.
- Sudhakar M, Rao ChV, Rao PM, Raju DB, Venkateswarlu Y. Antimicrobial activity of *Caesalpinia pulcherrima*, *Euphorbia hirta* and *Asystasia gangeticum*. *Fitoterapia* 2006; 77(5): 378-80.
- Tanaka R, Wada S, Yamada T, Yamori T. Potent antitumor activity of 3,4-seco-8betaH-Ferna-4(23),9(11)-dien-3-oic acid (EC-2) and 3,4-seco-Oleana-4(23),18-dien-3-oic acid (EC-4), evaluated by an *in vitro* human cancer cell line panel. *Planta Med* 2006; 72(14): 1347-9.

Tona L, Cimanga RK, Mesia K, Musuamba CT, De Bruyne T, Apers S, Hernans N, Van Miert S, Pieters L, Totte J, Vlietinck AJ. *In vitro* antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol* 2004; 93(1): 27-32.

Ulubelen A, Aynehchi Y, Halfon B. Hydrocarbons from *Euphorbia larica*. *Doga: Tip Eczacilik* 1986; 10: 211-3.

Vijaya K, Ananthan S and Nalini R. Antibacterial effect of theaflavin, polyphenon 60 (*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella spp.* a cell culture study. *J Ethnopharmacol* 1995; 49: 115-8.

Yang C M, Luo SF, Wang CC, Chiu CT, Chien CS, Lin CC, Hsiao LD. Tumour necrosis factor-alpha- and interleukin-1beta-stimulated cell proliferation through activation of mitogen-activated protein kinase in canine tracheal smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2000; 130(4): 891-9.

Yang CM, Cheng HY, Lin TC, Chiang LC, Lin CC. *Euphorbia thymifolia* suppresses herpes simplex virus-2 infection by directly inactivating virus infectivity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005; 32(5-6): 346-9.

Yin ZQ, Fan CL, Ye WC, Jiang RW, Che CT, Mak TCW, Zhao SX, Yao XS. Acetophenone derivatives and sesquiterpene from *Euphorbia ebracteolata*. *Planta Med* 2005; 71(10): 979-82.

Yu FR, Lian XZ, Guo HY, McGuire PM, Li RD, Wang R, Yu FH. Isolation and characterization of methyl esters and derivatives from *Euphorbia kansui* (Euphorbiaceae) and their inhibitory effects on the human SGC-7901 cells. *J Pharm Pharm Sci* 2005; 8(3): 528-35.

<http://www.huntington.org/BotanicalDiv/ISI2003/isi/2003-24.html> [consulté le 0/07/2007]

<http://www.euphorbia-international.org/> [consulté le 25/12/2007]

[www.medicalnewstoday.com/articles/70770.php](http://www.medicalnewstoday.com/articles/70770.php) [consulté le 13/05/2007]

## Anti-proliferative effect of *Euphorbia stenoclada* in human airway smooth muscle cells in culture

M. Chaabi<sup>a</sup>, V. Freund-Michel<sup>b</sup>, N. Frossard<sup>b</sup>, A. Randrianisoa<sup>c</sup>,  
R. Andriantsitohaina<sup>d</sup>, A. Lobstein<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>UMR-CNRS 7175 Pharmacogénie et Molécules Naturelles Bioactives, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, Strasbourg I Illkirch, France

<sup>b</sup>EA 1773 Inflammation et Environnement Dans l'Arbre, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, Strasbourg I, Illkirch, France

<sup>c</sup>IMRA, Antananarivo, Madagascar

<sup>d</sup>UMR-CNRS 624-INSERM 771, Angers, France

Received 3 February 2006; received in revised form 5 July 2006; accepted 16 July 2006

Available online 21 July 2006

### Abstract

The ethanolic extract of a Malagasy species *Euphorbia stenoclada* (ES) (Euphorbiaceae), traditionally used as a herbal remedy against asthma and acute bronchitis, was tested to evaluate possible anti-proliferative activity on human airway smooth muscle cells (HASMCS).

The ES ethanolic extract totally abolished the interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) induced proliferation of HASMC ( $IC_{50} = 0.73 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$ ). No cytotoxic effect was observed up to  $20 \mu\text{g/mL}$ . A bioassay-guided fractionation of the ethanolic extract was performed by reversed-phase (RP) flash chromatography, giving five fractions (FA to FE) where fraction FE was the only active one ( $IC_{50} = 0.38 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ ). The purification of this bioactive fraction FE was carried out by RP-HPLC affording six sub-fractions 1–6, and only sub-fraction 5 kept the anti-proliferative activity. Its major constituent was identified as quercetin ( $IC_{50} = 0.49 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ ) by means of HPLC/UV/MS and co-elution with the authentic standard. Quercitrin was also identified in the fraction FE but was inactive. A structure-activity relationship with flavonols determined that methylation reduced the anti-proliferative activity whereas glycosylation abolished it.

The present study shows that the anti-proliferative properties of *Euphorbia stenoclada* are mediated through the presence of quercetin that may explain the traditional use of this plant as a remedy against asthma.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Asthma; Proliferation; Airway smooth muscle; Quercetin; Flavonoids; *Euphorbia stenoclada* (Euphorbiaceae)

### 1. Introduction

In the framework of our research on bioactive principles from Malagasy species (Rakotonanson et al., 2003; Um et al., 2003), we examined the endemic species *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), locally known as 'farata' or 'hamase'. It is a spiny shrub belonging to the xerophytic vegetation grown in South-East of Madagascar (Tulear area). It belongs to the genus *Euphorbia* or spurge, the largest genus of Euphorbiaceae with about 1600 species characterized by the presence of white

milky latex. The compounds isolated from this genus include flavonoids, triterpenoids, alkaloids, amino acids and alkaloids (Singh and Pechak, 1990). Flavonoids from Euphorbiaceae family are well documented for their various activities such as anti-tumour (Bomzer et al., 1996), anti-inflammatory (Boni et al., 2000), antioxidant (Liu et al., 2002), anti-diabetic (Yoshida et al., 1988), anti-diarrheic (Agata et al., 1991) or anti-malaric (Tona et al., 1999). The genus *Euphorbia* has been subject of intense phytochemical examination, because of its medicinal uses for the treatment of numerous diseases including skin diseases, gonorrhoea, migraine, intestinal parasites and wart cures. But neither phytochemical nor pharmacological studies have been conducted on *Euphorbia stenoclada* yet.

*Euphorbia stenoclada* is traditionally used by the Malagasy population as an infusion of the aerial parts to treat respiratory diseases such as acute bronchitis and asthma. Bronchial asthma is a rather widespread disease in Madagascar, characterized

\* Corresponding author at: Département 'Pharmacogénie et Molécules Naturelles Bioactives' (C) 'Biotechnologies, Biostructure et Innovations Thérapeutiques', UMR-CNRS/ULP 7175, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, Strasbourg I, 74 route de Rhin, BP24, 67401 Illkirch Cedex, France. Tel.: +33 3 90 24 42 39; fax: +33 3 90 24 45 11.

E-mail address: [maelina.lobstein@pharmacia-strasbourg.fr](mailto:maelina.lobstein@pharmacia-strasbourg.fr) (A. Lobstein).

as an hyper-reactive airway disorder associated with recurrent and reversible wheezing episodes, and respiratory symptoms such as cough and shortness of breath (Péat and Mellis, 2002; Szeffer, 2002; Wood, 2002). Asthma is also associated with structural changes of the airways, including infiltration of inflammatory cells, epithelial desquamation, sub-epithelial fibrosis, and increased thickness of the smooth muscle layer (for review: Joubert and Hamid, 2005).

Therefore, our study aimed at evaluation of potential anti-proliferative effects on the airway smooth muscle of *Euphorbia stenoclada* (ES) aerial parts. Hence, we treated human airway smooth muscle cells in primary culture (HASMC) with interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), a pro-inflammatory cytokine present in large quantities in asthmatic airways and known for its proliferative effect on these cells (De et al., 1993, 1995), with or without ES extracts pre-treatment. This anti-proliferative assay was also used to perform a bioassay-guided fractionation assay to identify the active compounds of ES.

## 2. Material and methods

### 2.1. Plant material and extraction

Aerial parts of ES were collected in summer 2003 from the Tuléar region, in the South Eastern part of Madagascar, and authenticated by A. Rakotonjafy (Ethnobotany department, IMRA, Madagascar). A voucher specimen (ref. 4768) was deposited in the herbarium of the botanical and zoological park of Tsimbazaza (Antananarivo, Madagascar). Eleven grams of a mixture of leaves and stems were finely grounded and macerated three times in 95% ethanol (EtOH) at room temperature during 24 h. The filtered extracts were combined and evaporated under reduced pressure, resuspended in water, defatted with cyclohexane (three times liquid/liquid partitions), and dried to afford a 1.46 g of ethanolic extract (13.2% w/w) (Fig. 1).

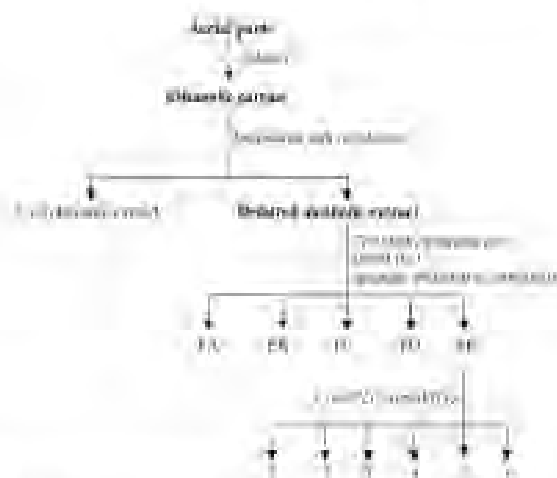


Fig. 1. Scheme of the bioassay-guided fractionation of the ethanolic extract from ES aerial parts. After ethanolic extraction and defatting with cyclohexane, the extract was fractionated by C18-Flash chromatography into five fractions FA to FE. The active fraction FE was further fractionated by the same way into six sub-fractions 1–6, and subjected to the anti-proliferative assay.

### 2.2. Fractionation, isolation and structure/activity relationship (SAR)

Fractionation of the bioactive ethanolic extract of ES was carried out by a bio-guided approach (Fig. 1). About 10  $\mu$ g of the ethanolic residue was dissolved in 1 mL of 50% EtOH/water for evaluation of the anti-proliferative property on human airway smooth muscle cell in culture (HASMC). One gram of the defatted ethanolic extract was dissolved in methanol, and fractionated on an octadecyl silica gel column (flash chromatography, 40 mm  $\times$  150 mm, Biotage<sup>®</sup>, Dyax Corp. Company) using a stepwise elution with water/methanol from 10% to 100% methanol (flow rate = 40 mL/min). Thirty-seven fractions were collected and analysed by means of TLC (thin layer chromatography) (silica gel plates F<sub>254</sub>, 5554, Merck) with EtOAc/acetic acid/water, 100/11/11:27 (v/v/v/v) as the eluent system. Spots were detected at 254 and 366 nm wavelength, and revealed with NP/PEG (1% methanolic diphenylboric acid/ $\beta$ -ethanolamino-ester/polyethylene glycol) reagent. Similar fractions were combined and afforded five fractions (FA to FE). These five fractions were dissolved in 50% EtOH/water at a 1% final concentration for assessment of the anti-proliferative activity. The active fraction (fraction FE) was purified by a semi-preparative reversed-phase HPLC (250 mm  $\times$  21 mm, Nucleodur<sup>®</sup>, Macherey-Nagel) eluted with 0.01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (phase A) and MeOH (phase B) in the following conditions: from 95% to 50% for 10 min (A), from 50% to 30% for 25 min (A) and to 100% for 5 min (B), followed by washing and reconditioning of the column. Fractions were monitored at 370 nm (LIS UV detector, Gilson) (Fig. 2). The purification afforded six sub-fractions, controlled by analytical reversed-phase HPLC (9010 pump and Prostar photodiode array detector, Varian) as mentioned above, dried and dissolved in 50% EtOH/water as the most suitable solvent for ES fractions for less cytotoxic side-effects on HASMC as compared with DMSO or ethanol alone (data not shown).

The constituents of the active fraction FE were identified by means of reversed-phase HPLC/UV/MS (HPLC, Agilent; Polaris column; Bruker 3000+ mass spectrometer) and co-eluted with the respective standards in the previously reported elution conditions (Escorpi and Gonzalez, 2000). Mass spectra were obtained in negative and positive modes.

Structure/activity relationship (SAR) was studied by comparing the anti-proliferative activity of quercetin and its methylated (*O*-methylquercetin and pentamethylquercetin) and glycosylated derivatives (hyperoside, quercitrin, and isoquercitrin) (all standards supplied by Chromadex) at 10 and 20  $\mu$ g/mL.

### 2.3. Primary culture of human airway smooth muscle cells

Human bronchial smooth muscle cells (HASMC) were cultured from human bronchial smooth muscle obtained from healthy lung transplant donors after sudden death (Centre for Biological Resources (CRB), Dr. M. Marnet, Nancy, France). The smooth muscle cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM/F12) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), penicillin (50 U/mL), streptomycin

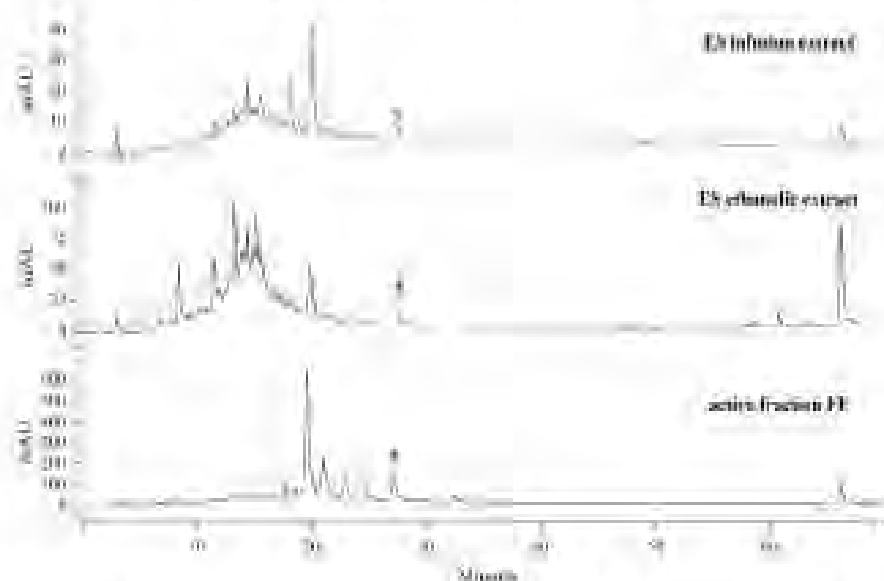


Fig. 2. RP-HPLC profile (280 nm) of ES infusion extract, ES ethanolic extract and active fraction FE. The comparison of the profile of the active fraction FE with ES ethanolic extract (from which it was extracted), along with the infusion (apocynin extract) of ES as traditionally used in nature treatment by Malagasy patients.

(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), non-essential amino acids (1:100), L-glutamine (2 mM) (all products from Invitrogen), and insulin (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Lilly, St Cloud, France) in a humidified chamber (37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ ) with the medium changed every other day (all products supplied by Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cells were used for experiments at passage 7.

#### 2.4. Cell treatment

Cells were treated with human IL-1 $\beta$  (10 U/mL, R and D Systems, Lille, France) or its solvent for 4 days with medium changed daily. Cells were pre-treated with the ES ethanolic extract, the five fractions FA to FE, the six sub-fractions 1–6 or with ethanol (1% in culture medium) as a blank for 1 h before IL-1 $\beta$  treatment, every day for 4 days. Concentration–response curves to the aforementioned compounds were performed in order to calculate its potency expressed as inhibitory concentration 50 ( $\text{IC}_{50}$ ).

Cell proliferation was measured by the XTT assay (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxamide, "Cell Proliferation kit II XTT", Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded in 96-well culture plates (3000 cells per well) in low-FBS (0.3%), insulin-free, DMEM-F12 medium, allowed to adhere for 3 h, and were then treated for 4 days with medium changed everyday. Cells were then exposed to XTT (1 mg/mL) for 3 h and absorbance measured at 450 nm.

#### 2.5. Expression of results and statistical analysis

Proliferation studies were performed three times in triplicate. Results are expressed as a percentage of proliferation compared with controls and are presented on graphs as mean  $\pm$  S.E.M. (standard error of the mean). Data were analysed by a two-tailed

Student's *t*-test, a Student–Newman–Keuls test when comparing more than two variables, or a Dunnett test when comparing dose–response data, at a  $p < 0.05$  level of significance.  $\text{IC}_{50}$  are expressed as mean  $\pm$  S.D. (standard deviation), based on concentration-dependent curves performed three times in triplicate.

### 3. Results

#### 3.1. Anti-proliferative effect of ES ethanolic extract and bio-guided fractionation

IL-1 $\beta$ -induced proliferation of HASMC was maximum at 10 U/mL (49.2  $\pm$  2.3% increase over baseline proliferation,  $p < 0.001$ ; data not shown), and this concentration was used in the following experiments. IL-1 $\beta$ -induced proliferation of HASMC (51.6  $\pm$  1.9% increase over baseline proliferation,  $p < 0.001$ ) was totally abolished by ES ethanolic extract (102.9  $\pm$  2.1% inhibition at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $p < 0.001$ ), with an  $\text{IC}_{50}$  of 0.73  $\pm$  0.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Fractions FA to FD did not show any inhibitory effect on IL-1 $\beta$ -induced proliferation of HASMC. Fraction FE was the only active fraction, and totally abolished IL-1 $\beta$ -induced proliferation of HASMC (100.0  $\pm$  1.6% inhibition at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $p < 0.001$ ), with an  $\text{IC}_{50}$  of 0.38  $\pm$  0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Analysis by HPLC–UV–DAD of this active fraction revealed the exclusive presence of flavonols. These results suggest that the bioactive compound(s) of ES exhibiting anti-proliferative activity is (are) only present in fraction E and has (have) a flavonolic structure.

Fraction E was subsequently fractionated into six sub-fractions, named 1–6, using a semi-preparative reversed-phase HPLC. Each of these sub-fractions contained a unique product, identified by means of reversed-phase HPLC/UV/MS. Sub-fraction 5 only displayed the ability to totally abolish proliferation of HASMC induced by IL-1 $\beta$  (103.7  $\pm$  1.2%



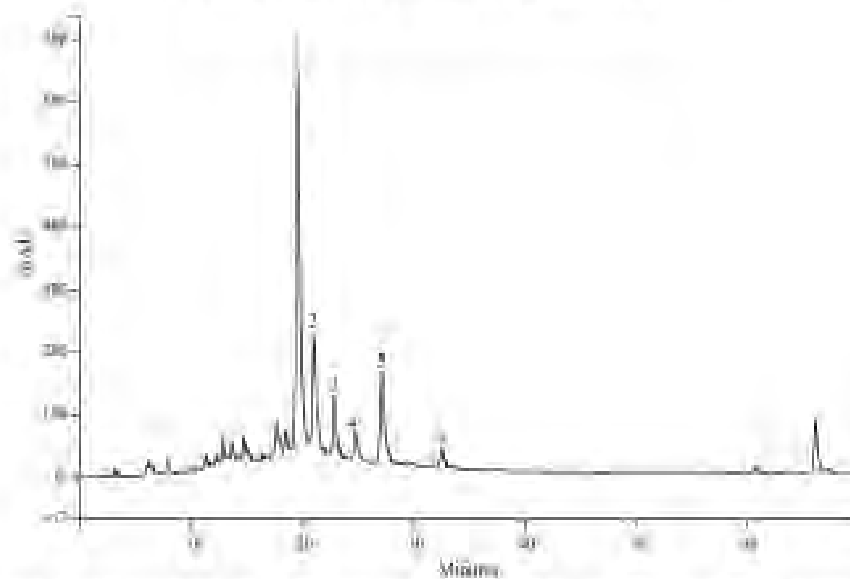


Fig. 3. HPLC profile (280 nm) of the active fraction FE. The most active fraction (FE) prepared from ES ethanolic extract presents six major compounds (flavonols exclusively) detected at 280 nm. 1 and 5 were identified by means of HPLC-UV-MS as quercetin and quercetin, respectively.

inhibition,  $p < 0.001$ ) with an  $IC_{50}$  of  $0.49 \pm 0.12 \mu\text{g/mL}$ . The five other sub-fractions (1–4 and 6) did not show any anti-proliferative effect. The solvent itself (50% EtOH/water at a 1% final concentration) did not modify IL-1 $\beta$ -induced proliferation of HASMC (data not shown).

### 3.2. Identification of the bioactive compound

To identify the compound isolated from sub-fraction 5 that displays the anti-proliferative activity towards IL-1 $\beta$ -induced proliferation of HASMC, the whole fraction FE was analysed by RP-HPLC-DAD-MS (reversed-phase-high performance liquid

chromatography-diode array detector-mass spectrometry). The major compound of fraction FE was determined as quercetin contained in sub-fraction 1 (retention time ( $R_t$ ) of 19.52 min, UV maximal absorption ( $\lambda_{\text{max}}$ ) at 253 and 249 nm and molecular weight (MW) of 447.1). Sub-fractions 2–4 and 6 were eluted at  $R_t$ : 20.93, 22.78, 24.7 and 32.48 min, respectively, and had a flavonolic UV profile. Quercetin was therefore not the active compound of FE. A second flavonol was detected in FE, identified as quercetin. It was contained in sub-fraction 5 ( $R_t$ : 27.07 min,  $\lambda_{\text{max}}$ : 254 and 368 nm, and MW: 301.0) (Fig. 3). Confirmation of the structure was done by co-elution with authentic standards.


	R1	R2	R3	R4	R5
Q	OH	OH	OH	OH	OH
MQ	OH	OMe	OH	OH	OH
PMQ	OMe	OMe	OMe	OMe	OMe
IL	galactose	OH	OH	OH	OH
IQ	glucose	OH	OH	OH	OH
QC	rhamnose	OH	OH	OH	OH

Fig. 4. Structure of flavonols used in the SAR study. The flavonol concentrations used in SAR activity are 10/10 and 20/20  $\mu\text{g/mL}$ . Q, quercetin; QC, quercetin (or quercetin 3-O-rhamnoside); IQ, isoquercetin (or quercetin 3-O-glucoside); IL, hyperin (or quercetin 3-O-galactoside); MQ, 3-methyl quercetin; PMQ, pentamethylquercetin.

### 3.3. Structure/activity relationship

Since quercetin and quercitrin only differ in nature of the substituent in position C-3 (position 3 of the C ring), we conducted a study of structure/activity relationship, by comparing the anti-proliferative activity of quercetin with glycosylated or methylated derivatives (Fig. 4). None of the quercetin heterosides displayed any activity on the IL-1 $\beta$ -induced proliferation of HASMC, suggesting that the hydroxyl group in position 3 of the C ring needs to be kept unsubstituted. Studies conducted with two methylated derivatives showed that the flavonol with one hydroxyl function on the B ring (also called catechol moiety) substituted with a methoxy in position 3 (*O*-methylquercetin) was no longer active at 10  $\mu$ g/mL; however, its anti-proliferative effect was restored at higher concentrations. In contrast, the anti-proliferative properties of the methoxylated quercetin derivative (pentamethylquercetin) were lost, even at higher concentrations. These results then suggest that all free hydroxyl groups of quercetin are necessary to its anti-proliferative activity, and that any substitution, whether methylation or glycosylation, lowers if not totally abolishes this effect.

### 4. Discussion and conclusions

The present study provides evidence that an ethanolic extract of *Euphorbia stuebelii* inhibits IL-1 $\beta$ -induced proliferation of the human airway smooth muscle, and identifies quercetin as the major anti-proliferative compound of *Euphorbia stuebelii*.

*Euphorbia stuebelii* aerial parts are used in Madagascar as an infusion to treat respiratory disorders such as acute bronchitis and asthma. Other *Euphorbia* spp. are also traditionally used to treat these diseases in other countries, as for instance *Euphorbia hirta* L. in India (Singh et al., 2005) or *Euphorbia lasiocarpa* Bunge in South China (Nishimura et al., 2005). However, only few studies have been conducted in order to understand their traditional uses including identification of their active components and their mechanisms of action.

Although terpenes of *Euphorbiaceae* have been shown to exhibit anti-inflammatory (Corea et al., 2005), antinociceptive (Ahmad et al., 2005) or anti-tumour (Ferreira et al., 2005) properties, the active compounds isolated in this study from *Euphorbia stuebelii* were polyphenols and not terpenes. Flavonoids isolated from other *Euphorbia* spp. have also been studied for their anti-ulcer (Lin and Yuan, 1988), antibacterial (Vijaya et al., 1995) and antiviral properties (Ahn et al., 2002). A recent study described the effect of gallic acid and quercetin isolated from *Euphorbia lasiocarpa* Bunge on several cell lines. These phenolic acid and flavonol could mimic some effects of IL-10, a cytokine with some anti-inflammatory effects in asthma (Nishimura et al., 2005). Helioscopinin-A, another polyphenol isolated from *Euphorbia helioscopia* L., exerts an inhibitory effect of leukotriene D<sub>4</sub>-induced tracheal contraction in rats and also on antigen-induced bronchial constriction in an experimental asthma model in the guinea pig (Park et al., 2001). Thus, it has been observed from this study that a polyphenolic constituent of *Euphorbia stuebelii* can inhibit the airway smooth muscle cell proliferation induced by inflammatory agents such as IL-1 $\beta$ .

Our bio-guided fractionation based on HASMC proliferation showed that the compound that supports the anti-proliferative activity of the ethanolic extract prepared from ES aerial parts was exclusively quercetin. This anti-proliferative effect on the human airway smooth muscle has never been reported earlier. However, this result is in accordance with numerous studies showing the anti-proliferative activity of quercetin in other cell types, such as in cancer cell lines (for reviews: Kanadaswami et al., 2005; Lambert et al., 2005). In addition, various experimental studies have shown benefits of quercetin in the treatment of asthma: this flavonol has been shown to inhibit bronchial obstruction and airway hyperresponsiveness in the guinea pig (Otschi et al., 1992), to display *in vitro* relaxant effects on guinea pig trachea pre-contracted with histamine, carbachol or KCl (Ko et al., 1999, 2002, 2003) or to inhibit the release of histamine *in vitro* from rat peritoneal mast cells (Haggag et al., 2003). The present study extends its properties as an inhibitor of airway smooth muscle proliferation thus adds knowledge about possible potential anti-asthmatic properties of quercetin *in vivo*.

The structure–activity relationship conducted in this study also provides some new information on quercetin that was the most potent anti-proliferative compound among other substituted flavonols: it seems that, on one hand, a methyl substitution in the B ring induces a 50% decrease in the activity of quercetin whereas a total methylation of the quercetin's hydroxyl groups totally abolished it. Therefore, the presence of free hydroxyl groups on the B ring seems to be necessary for the anti-proliferative activity of quercetin. On the other hand, 3-glycosylation by (rhamnose, glucose or galactose) completely abolished the activity. This result confirms the importance of the 3-OH position substitution of quercetin as a corner stone in the activity. Other works in the literature showed that quercetin derivatives having one or more methyl substitution were more active than quercetin itself to relaxation of isolated guinea pig trachea contracted with histamine, carbachol or KCl (Ko et al., 1999). These authors reported further that 3-*O*-methylquercetin isolated from *Rhynchospora nakaharae* (Hayata), Hayata, a species used in folk medicine in Taiwan for the treatment of inflammation and asthma, exhibited relaxant activity on the guinea pig trachea *in vitro* by inhibition of phosphodiesterases (Ko et al., 2002). Recently, the same group reported that 3-*O*-methylquercetin is active *in vivo* in mice, inhibiting inflammation and airway hyper-responsiveness in a murine model of asthma (Ko et al., 2004).

In conclusion, we have clearly shown that *Euphorbia stuebelii* displays anti-proliferative activity on the human airway smooth muscle, due to the presence of quercetin. Even though further studies are needed to confirm these properties of *Euphorbia stuebelii* *in vivo*, and in particular validated in a murine model of asthma, the present work opens new perspectives for asthma treatment based on ethnopharmacological studies.

### References

- Aguiar, I., Hatanoto, T., Nakaya, Y., Sugaya, T., Yoshida, T., Nishida, S., Otschi, T., 1991. Tannins and related polyphenols of *Euphorbiaceae* plants. VIII. Emacolin A and emacopinin A, and accompanying polyphenols from

- Ephedra maculata* L. and *E. supina* Rafin. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 39, 881–883.
- Ahmad, Y.U., Hussain, H., Balthazi, I.A., Hussain, J., Jazbi, A.R., Dar, A., 2005. Antinociceptive diuretic from *Ephedra decipiens*. *Fitoterapia* 76, 230–232.
- Ahn, M.J., Kim, C.Y., Lee, J.S., Kim, T.G., Kim, S.H., Lee, C.K., Lee, B.B., Shin, C.G., Huh, H., Kim, J., 2002. Inhibition of HIV-1 integrase by galloyl glucuronide from *Terminalia cathartica* and flavonol glycoside gallates from *Ephedra poliostrachys*. *Planta Medica* 68, 457–459.
- Bani, S., Kadi, A., Jaggi, B.S., Sani, K.A., Sani, O.P., Sharma, O.P., 2000. Anti-inflammatory activity of the hydroalcoholic fraction of *Ephedra ayleana* Link. *Fitoterapia* 71, 655–662.
- Bomzer, J., Madhavi, D.L., Singletary, K., Smith, M.A., 1996. *In vivo* anticancer activity of fruit extracts from *Vaccinium* species. *Planta Medica* 62, 212–216.
- Correa, G., Fontana, E., Lanzetta, V., Di Maggio, P., Maffia, P., Granata, G., Ialenti, A., Iannaro, A., 2005. Discovery and biological evaluation of the novel naturally occurring diuretic peflutamide as anti-inflammatory agent. *Journal of Medicinal Chemistry* 48, 7055–7062.
- De, S., Zeleny, E.T., Sothirada, J.F., Sothirada, M., 1999. Interleukin-1 beta stimulates the proliferation of cultured airway smooth muscle cells via platelet-derived growth factor. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 9, 645–651.
- De, S., Zeleny, E.T., Sothirada, J.F., Sothirada, M., 1995. IL-1 beta and IL-6 induce hyperplasia and hypertrophy of cultured guinea pig airway smooth muscle cells. *Journal of Applied Physiology* 78, 1555–1563.
- Dornick, W., Bittinger, M., Kana, A., Mulker, A., Kruber, B., Wagner, H., 1992. Anti-asthmatic effects of *Galphimia glauca*, gallic acid, and related compounds prevent allergen- and platelet-activating factor-induced bronchial obstruction as well as bronchial hyperreactivity in guinea pigs. *International Archives of Allergy and Immunology* 97, 1–7.
- Escarpa, A., Gonzalez, M.C., 2003. Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. *Journal of Chromatography, A* 897, 161–170.
- Fernán, M.J., Gyzanski, N., Madamira, A.M., Muñoz, J., 2005. Inhibition of P-glycoprotein transport activity in a resistant mouse lymphoma cell line by diuretic lactones. *Anticancer Research* 25, 3259–3262.
- Haggag, E.G., Abo-Mouraf, M.A., Boucher, W., Theodorides, T.C., 2003. The effect of a herbal water-extract on histamine release from mast cell-lined on allergic asthma. *Journal of Herbal Pharmacotherapy* 3, 41–54.
- Joubert, P., Hamid, Q., 2005. Role of airway smooth muscle in airway remodeling. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116, 713–716.
- Kanacharwan, C., Lee, L.T., Lee, P.P., Heung, J.J., Ka, F.C., Huang, Y.T., Lee, M.T., 2005. The anti-tumor activities of flavonoids. *In Vivo* 19, 895–909.
- Ka, W.C., Kao, S.W., Shau, J.R., Liu, C.H., Tsang, S.H., Chen, C.M., 1999. Relaxant effects of quercetin methyl ether derivatives in isolated guinea pig trachea and their structure–activity relationships. *Planta Medica* 65, 273–275.
- Ka, W.C., Wang, H.L., Lei, C.B., Shih, C.H., Chung, M.I., Liu, C.N., 2002. Mechanisms of relaxant action of 3-O-methylquercetin in isolated guinea pig trachea. *Planta Medica* 68, 30–35.
- Ka, W.C., Chan, M.C., Wang, S.H., Lai, Y.H., Chen, J.H., Liu, C.N., 2003. 3-O-Methylquercetin more selectively inhibits phosphodiesterase subtype 3. *Planta Medica* 69, 310–315.
- Ka, W.C., Shih, C.M., Chen, M.C., Lai, Y.H., Chan, J.H., Chen, C.M., Liu, C.N., 2004. Suppressive effects of 3-O-methylquercetin on ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness. *Planta Medica* 70, 1123–1127.
- Lambert, J.D., Hong, J., Yang, G.Y., Liao, J., Yang, C.S., 2005. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 284S–291S.
- Liu, L.Y., Yuan, H.S., 1998. The constituents of the anti-ulcer fractions of *Ephedra sinica*. *Zhonghua Yaoxue Zazhi* 40, 49–51.
- Liu, C.-C., Cheng, H.-Y., Yang, C.-M., Liu, T.-C., 2002. Antioxidant and antiviral activities of *Ephedra distachya* L. *Journal of Biomedical Sciences* 9, 656–664.
- Nishimura, T., Wang, L.-Y., Kumano, K., Kimura, S., 2005. Flavonoids that mimic tumor ligands from the whole plants of *Ephedra sinensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 53, 305–308.
- Park, K.H., Koh, D., Lee, S., Jung, I., Kim, K.H., Lee, C.H., Kim, K.-H., Lim, Y., 2001. Anti-allergic and anti-asthmatic activity of isoliquiritin-A, a polyphenol compound, isolated from *Ephedra holoserotina*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 11, 133–142.
- Pau, J.K., Maffia, C.M., 2002. Early predictors of asthma. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2, 167–173.
- Rakotonirainy, O., Rabeman, I., Lobstein, A., Um, B.H., Schest, C., Anton, R., Randrianarisoa, A., Andrianirahina, R., 2005. Vasorelaxing properties and bio-guided fractionation of *Cudrlopsis grevei*. *Planta Medica* 69, 179–181.
- Singh, A.K., Pratik, L., 1990. Phytoconstituents of *Ephedra sinensis*. *Fitoterapia* 6, 483–516.
- Singh, S.K., Yadav, R.P., Tewari, S., Singh, A., 2005. Toxic effect of stem bark and leaf of *Ephedra sinica* plant against freshwater vector snail *Lymnaea acuminata*. *Chemosphere* 59, 263–270.
- Seafair, S.J., 2002. The natural history of asthma and early intervention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109, S549–S553.
- Tona, L., Ngimbé, N.P., Tshala, M., Moina, K., Cimanga, K., Apen, S., De Bruyne, T., Nsamen, L., Totté, J., Vlietinck, A.J., 1999. Antimicrobial activity of 20 crude extracts from nine African medicinal plants used in Kinshasa, Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 68, 193–209.
- Um, B.H., Lobstein, A., Weniger, B., Spiegel, C., Yim, F., Rakotonirainy, O., Andrianirahina, R., Anton, R., 2003. New coumarins from *Cudrlopsis grevei*. *Fitoterapia* 74, 638–642.
- Vijaya, K., Ananthan, S., Nalini, R., 1995. Antibacterial effect of the flavon, polyphenol 60 (*Cassia sinensis*) and *Ephedra sinica* on *Staphylococcus aureus*—a cell culture study. *Journal of Ethnopharmacology* 49, 115–118.
- Wood, R.A., 2002. Pediatric asthma. *Journal of the American Medical Association* 288, 745–747.
- Yoshida, T., Chen, L., Shingu, T., Okada, T., 1988. Tannin and related polyphenols of *Ephedraceae* plants. IV. *Ephedra* A and B, novel dimeric dehydrodolginitin from *Ephedra sinica* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 36, 2940–2949.

## **Chapitre 2 :**

### **Etude phytochimique**

***d'Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae)**

## 1. Introduction

Les **triterpènes** sont des métabolites secondaires non-stéroïdiques, ubiquitaires, de source marine ou terrestre, identifiés à la fois dans la faune ou la flore, présents naturellement sous forme libre, d'éthers, d'esters ou d'hétérosides. Les triterpènes sont biosynthétisés à partir de six unités isopréniques et dérivent tous du squalène. Il s'agit d'isopenténoïdes constitués de 30 atomes de carbones et possédant des squelettes acycliques, mono-, di-, tri-, tetra- ou pentacycliques. Ces derniers sont les plus répandus (Mahato et Kundu, 1994).

Les **saponosides** sont des glycosides de haut poids moléculaire, constitués d'unités osidiques liée à un triterpène ou un stéroïde aglycone (Hostettman et Marston, 1995).

Plus de 90 familles botaniques savent biosynthétiser des **saponosides** et leurs formes dépourvues de chaînes osidiques, appelées **sapogénines**. Citons par exemple certaines plantes alimentaires (soja, lentilles), certaines légumineuses (alfalfa) et certaines plantes médicinales (thé, Ginseng). Le fait que les triterpènes (sous forme aglycone ou glycosylées) soient localisés dans des organites possédant une activité énergétique importante suggère leur rôle dans la régulation du métabolisme du végétal et son développement. La plupart d'entre eux sont physiologiquement actifs (Hostettman et Marston, 1995).

Parmi les familles botaniques décrites pour leurs saponosides triterpéniques, nous nous sommes intéressés aux **Combretacées**, constituée d'environ 600 espèces d'arbres, arbustes ou lianes, réparties en 20 genres (Garcez *et al.*, 2003). Le genre *Combretum* est le plus vaste et comprend 370 espèces. Il est suivi du genre *Terminalia* avec 200 espèces alors que le genre *Anogeissus* est constitué de 19 espèces (<http://132.236.163.181>).

Cette famille renferme différents types de triterpènes pentacycliques incluant des acides oléanolique et ursanoïque, des friedelines, des cycloartanes et des dammaranes (Keterere *et al.*, 2001).

L'espèce *Anogeissus leiocarpus* n'a pas fait l'objet d'études phytochimiques poussées surtout en ce qui concerne la présence des saponosides.

Le but de ce travail est d'analyser la composition chimique des écorces de cette espèce traditionnellement utilisées en Afrique pour traiter des affections cutanées.

## 2. Les triterpènes : structure et identification (Hostettmann et Marston, 1995)

### 2.1 Définition

Les **saponosides** sont des hétérosides de stérols ou de triterpènes. Les noms de ‘saponosides’ et de ‘saponines’ qui correspondent aux formes aglycones, dérivent du latin *sapo* = savon qui évoque le caractère moussant de leurs solutions aqueuses ; ses propriétés tensioactives sont caractéristiques de ce groupe d’hétérosides. La définition classique des saponosides est ainsi fondée sur ces trois propriétés fondamentales.

On peut définir les saponosides comme des entités chimiques constituées :

- d’une partie lipophile appelée aglycone, génine ou sapogénine;
- d’une partie hydrophile ou chaîne osidique.

Les saponosides sont fréquemment rencontrés chez les végétaux supérieurs, en particulier chez les Dicotylédones, mais sont synthétisés également par certains animaux marins.

### 2.2 Structure

#### 2.2.1 Aglycone

Les aglycones des saponosides peuvent être

- **des triterpènes** (squelette à 30 carbones)
  - pentacycliques : de type oléanane, ursane lupane, hopane, taraxastane, friedelane, serratane ou holostane
  - tétracycliques : de type dammarane, lanostane, ou cucurbitane.
- **des stéroïdes** (squelette à 24-29 carbones)
  - de type spirostane,
  - de type furostane
  - de type phytostérol.

Il faut noter également l'existence de structures apparentées comme les glucoalcaloïdes de type stéroïde, dénommées « saponosides basiques ». Ces substances azotées sont généralement rattachées aux alcaloïdes.

### 2.2.2. Les sucres

Les chaînes osidiques portées par les saponosides existent essentiellement sous la forme pyranne, rarement sous la forme furanne : D-glucose, acide D-glucuronique, 2-amino-2-déoxyglucose, D-galactose, acide D-galacturonique, D-mannose, D-allose, L-rhamnose, L-fucose, D-quinovose, L-arabinose, D-xylose, D-ribose, et D-apiose.

Ces sucres peuvent être partiellement estérifiés par divers acides organiques : formique, acétique, butyrique, isobutyrique, tiglique, angélique ou férulique.

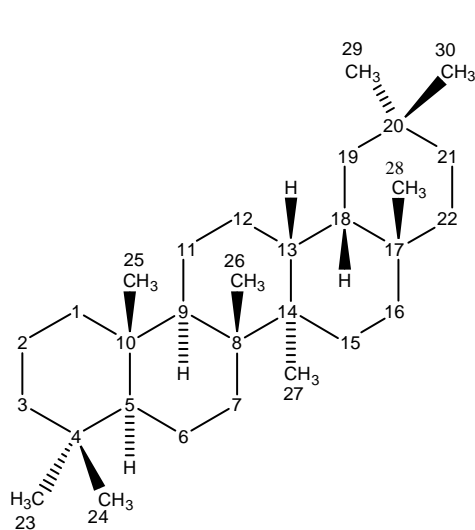
Le nombre de sucres fixés sur l'aglycone est très variable. Des saponosides contenant jusqu'à douze unités de monosaccharides ont été identifiés, mais la plupart n'en possèdent que deux à cinq. La chaîne osidique peut être linéaire ou ramifiée.

La position d'attache des chaînes osidiques sur l'aglycone permet de distinguer :

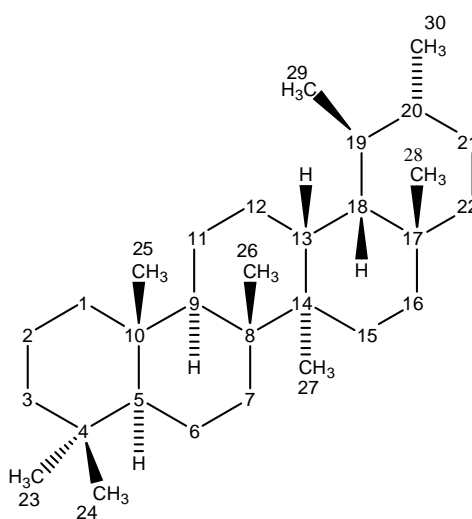
- **les saponosides monodesmosidiques** : ils comportent une seule chaîne osidique liée généralement sur le carbone 3 de l'aglycone par une liaison éther oxyde ;
- **les saponosides bidesmosidiques**, possédant deux chaînes osidiques. L'une est liée au carbone 3, l'autre est fixée à l'aglycone par une liaison éther oxyde, le plus souvent en C26 pour les dérivés stéroïdiques, par une liaison ester en C28 pour les dérivés triterpéniques et en C20 pour les dérivés triterpéniques de type dammarane (Paris *et al.*, 1981; Pinkas *et al.*, 1972).
- **les saponosides tridesmosidiques**, possèdent trois chaînes osidiques fixées en trois positions différentes de l'aglycone. Citons comme exemple les saponosides d'*Astragalus membranaceus* (Brandao *et al.*, 1992).

### 2.2.3. Propriétés physiques

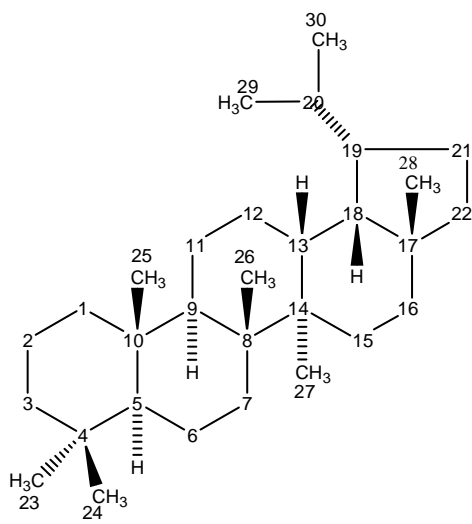
Les saponosides se présentent sous forme de poudres amorphes souvent hygroscopiques, incolores, ou légèrement colorées en beige, inodores et de saveur âcre. Ces poudres possèdent en général un effet sternutatoire. Presque tous les saponosides sont solubles dans l'eau. Ils sont généralement solubles dans le méthanol surtout à chaud, peu solubles ou insolubles dans les autres alcools, mais solubles dans l'EtOH à 60-80% et dans le BuOH saturé d'eau. Ils sont pratiquement insolubles dans le  $\text{CHCl}_3$  ou l'éther.



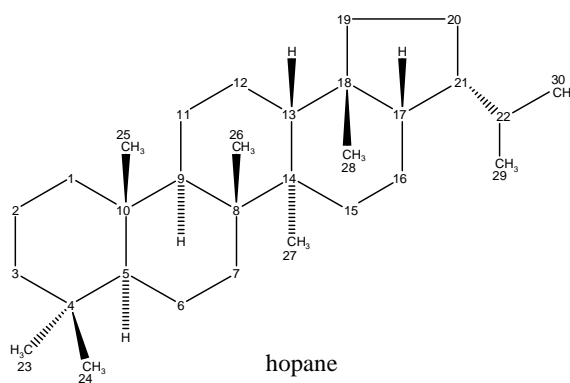
oléanane



ursane

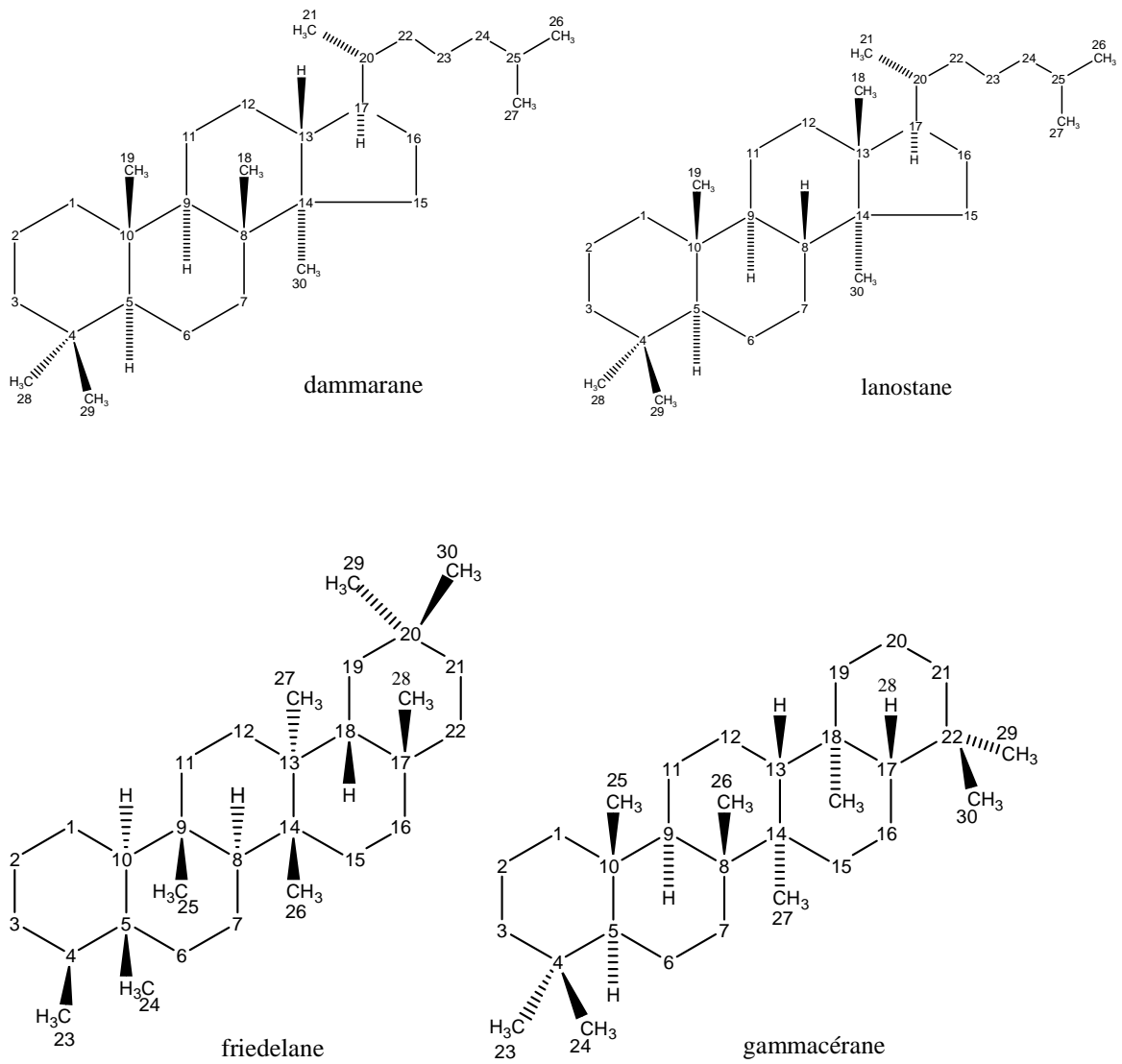


lupane



hopane

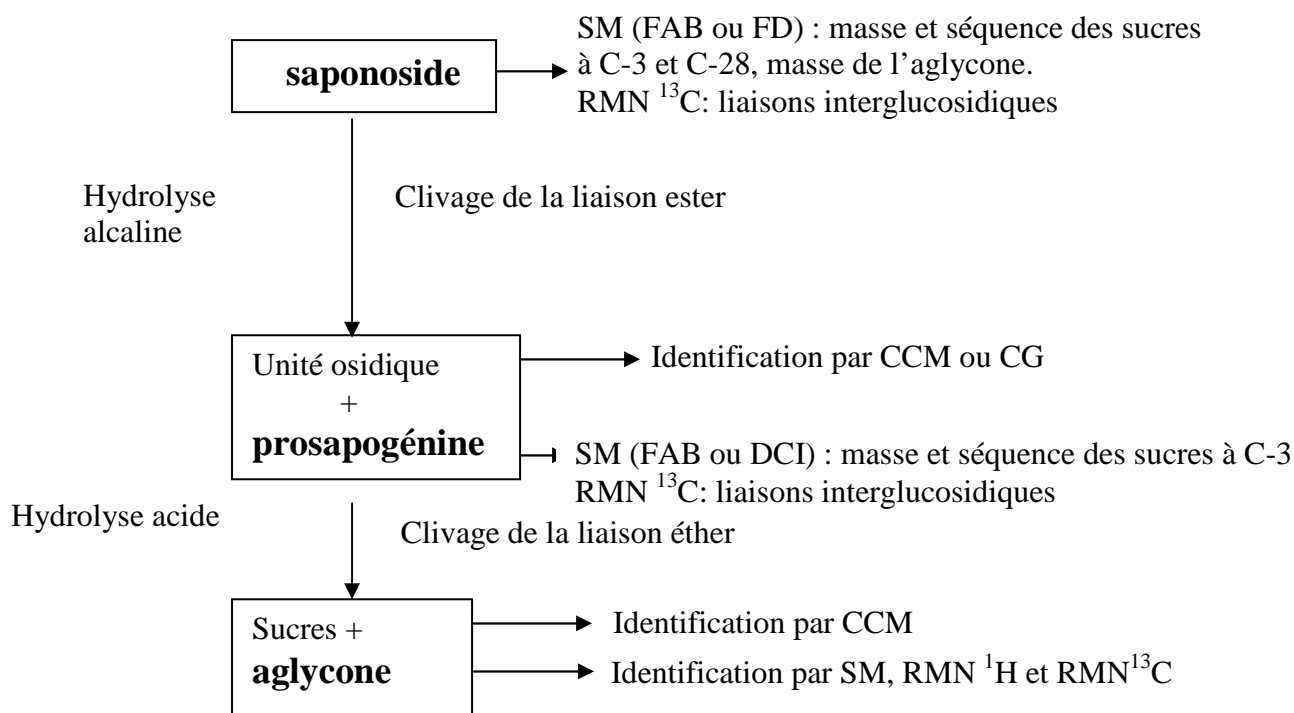




**Figure 1 :** Structures et numérotation de triterpénoïdes aglycones.

## 2.3. Elucidation structurale

### 2.3.1. Méthode classique



**Figure 2** : Schéma d'identification classique des saponosides.

### 2.3.2. Méthodes modernes

Elle est basée sur la combinaison des techniques spectroscopiques de RMN mono- et bidimensionnelle, sans avoir recours aux méthodes chimiques d'hydrolyse.

Ainsi, les RMN du <sup>1</sup>H et du <sup>13</sup>C sont actuellement les méthodes les plus efficaces dans l'étude structurale des saponosides. Leur intérêt s'est accru grâce aux progrès techniques permettant l'enregistrement des spectres à haut champ et l'élaboration de séquences impulsionsnelles mono ou bidimensionnelles. Elles apportent des informations sur tous les éléments structuraux : la nature de l'aglycone, la nature des sucres, les liaisons hétérosidiques ainsi que la configuration des sucres (Mahato *et al.*, 1982).

### 2.3.2.1. RMN $^1\text{H}$

Avec la RMN  $^1\text{H}$ , les informations sont apportées, non seulement, par les déplacements chimiques mais aussi par la multiplicité des signaux et les constantes de couplage. Cette technique est particulièrement précieuse pour la détermination de la configuration des sucres (Mahato *et al.*, 1982). L'étude structurale des aglycones est conduite par comparaison avec des substances de référence. La difficulté majeure réside dans la détermination des chaînes osidiques. En effet, les signaux relatifs aux sucres sont situés dans un intervalle restreint entre 3 ppm et 6 ppm. Pour des saponosides possédant plusieurs sucres, l'attribution des signaux est souvent délicate du fait de la complexité du spectre dans cette région, même s'il est enregistré à haut champ. (Dans ce cas, l'utilisation d'une séquence multiimpulsionnelle peut pallier aux limites imposées par le spectre monodimensionnel).

### 2.3.2.2. RMN $^{13}\text{C}$

Il s'agit de la méthode la plus utilisée dans l'étude structurale des saponosides. Elle est particulièrement précieuse pour la détermination des liaisons interglycosidiques, la configuration et la conformation des sucres. Ces éléments sont obtenus grâce aux spectres totalement découplés et à la séquence monodimensionnelle DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) (Lanzetta *et al.*, 1984 ; Sadler *et al.*, 1988) qui précise sans équivoque le nombre de CH, CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub>.

Les signaux relatifs aux sucres sont situés dans la zone de 60 à 110 ppm. L'expérience montre que les déplacements chimiques de chaque unité monosaccharidique à l'intérieur de la chaîne polysaccharidique sont similaires à ceux des monosaccharides, si on ne tient pas compte des effets de substitution.

Ces effets provoquent une augmentation du déplacement chimique du carbone directement impliqué dans la liaison (effet  $\alpha$ ). Ceci s'accompagne généralement d'une diminution du déplacement chimique du carbone voisin en position  $\beta$ .

En définitive, cette approche se résume de la manière suivante :

- Les carbones anomériques dans les pyranoses et leurs dérivés résonnent à champs faibles : 90-110 ppm ;

- Les carbones portant des –OH secondaires dans les pyranoses donnent des signaux entre 65-85 ppm ; les signaux des carbones alcoylés sont déplacés de 5-10 ppm vers les champs faibles par rapport aux carbones hydroxylés correspondants ;
- Les carbones portant des –OH primaires résonnent entre 60 et 64 ppm ;
- L'acylation de l'hydroxyle provoque un déblindage de 1,5-4 ppm, vers les champs faibles du carbone.

Ces différentes règles ont été mises à profit dans l'étude structurale des saponosides de nombreuses espèces végétales.

### 2.3.2.3. RMN à deux dimensions

Les séquences multi-impulsionnelles (Sadler *et al.*, 1988) aboutissent à l'obtention de figures de corrélation qui favorisent une interprétation sans équivoque des spectres monodimensionnels et qui permettent l'établissement de la séquence de la chaîne osidique et de la position des liaisons hétérosidiques. Parmi ces procédés, nous distinguons la COSY H-H (COrelation SpectroscopY) 45, la COSY relayée, la COSY retardée, la HOHAHA (HOmonuclear HArtman-Hahn), la ROESY (Rotating frame nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) et la NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY).

Nous illustrons à l'aide d'exemples, ces techniques utilisées pour l'élucidation des structures des saponosides :

- **La COSY 45** permet de mettre en évidence les couplages  $^2J$  et  $^3J$  et de les distinguer d'après l'orientation des taches de corrélation vis-à-vis de la diagonale (Siddiqui *et al.*, 1992).
- **La COSY relayée** permet de mettre en évidence les couplages  $^3J$  et  $^4J$ . Aux moyens de la COSY et de la COSY relayée, nous pouvons interpréter les spectres de RMN  $^1H$  monodimensionnels et attribuer sans équivoque les signaux aux protons correspondants (Babadjamian *et al.*, 1988).
- **La COSY retardée**, appelée également **RMN de couplage à longue distance**. Les couplages  $^4J$  les plus courants suivent un chemin en faucille et les  $^5J$  un zig-zag prolongé (couplages en M ou en W). Ces observations sont utiles pour déterminer la

configuration anomérique de certains sucres et pour identifier des protons diastéréotopiques (Babadjamian *et al.*, 1988 ; Massiot *et al.*, 1990).

- **La HOHAHA** permet de mettre en évidence les couplages  $^5J$  (Yoshikawa *et al.*, 1992).
- **La ROESY** consiste à observer des effets Overhauser dans le référentiel tournant, ce qui permet l'établissement précis d'une séquence hétérosidique. Elle apporte également la confirmation de certaines attributions de résonance et de configuration des sucres (Massiot *et al.*, 1988).
- **La NOESY** mesure également des effets Overhauser et apporte les mêmes informations que la ROESY.

En outre, l'attribution des résonances des carbones et des protons peut être réalisée sans ambiguïté au moyen d'une expérience de corrélation C-H ( $^2J$  et  $^3J$ ) **COLOC** (COrrélation spectroscopy via Long range Coupling) (Derome *et al.*, 1989) et/ou d'une expérience de détection inverse  $^1H$ - $^{13}C$ . L'expérience **HMQC** (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) peut mettre en évidence le couplage  $^1J$  (Muller *et al.*, 1979) tandis que l'expérience **HMBC** (Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity) met en évidence les couplages hétéronucléaires  $^2J$  et  $^3J$  (Bax *et al.*, 1986).

Notons enfin que la technique **INADEQUATE** (Incredible Natural abundance Double Quantum Transfer Experiment) peut mettre en évidence des couplages  $^1J$  C-C (Breitmaier *et al.*, 1987 ; Perera *et al.*, 1993). Cette méthode est particulièrement précieuse pour les informations qu'elle apporte mais elle impose des quantités importantes d'échantillons.

L'espèce *A. leiocarpus* n'ayant pas fait l'objet d'étude phytochimique approfondie, nous nous sommes proposé d'identifier les principaux constituants isolés et purifiés à partir de l'écorce de cet arbre.

### 3. Description de la plante

*Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (synonyme: *Anogeissus schimperi* Hochst. ex Hutch & Dalziel) (Combretaceae) est également désigné sous le nom vernaculaire de ‘bouleau d’Afrique’. Il s’agit d’un arbre commun des forêts de savanes de l’Afrique de l’ouest (Oliver-Bever 1986; Hennenberg *et al.*, 2005). Il peut atteindre 15m de haut, possède des épines droites de 1-3 cm, terminant de courts rameaux. Ces derniers portent des feuilles blanchâtres, de petite taille (2-3 cm de long sur 10-15 mm de large), au limbe parcouru de 4-5 nervures, ceux à la pointe acuminée. Cette espèce possède de petites fleurs odorantes, réunies en panicule terminal. Le fruit se présente sous forme de petite capsule sphérique, de 5 mm de diamètre. (<http://assoc.pagespro-orange.fr/senegal.bourbonnais/Anne%20marie.htm>)



**Figure 3 :** Photo de spécimen d’*Anogeissus leiocarpus*.

source : [http://www.metafro.be/prelude/prelude\\_pic/Anogeissus\\_leiocarpus.jpg](http://www.metafro.be/prelude/prelude_pic/Anogeissus_leiocarpus.jpg)

### 4. Classification

- **Embranchement :** Spermaphyte
- **Sous-embranchement :** Angiospermes (Magnoliophyta)
- **Classe :** Dicotylédones (Magnoliopsida)
- **Sous classe :** Rosidae
- **Ordre :** Myrtales
- **Famille :** Combretaceae
- **Genre :** *Anogeissus*
- **Espèce :** *leiocarpus*

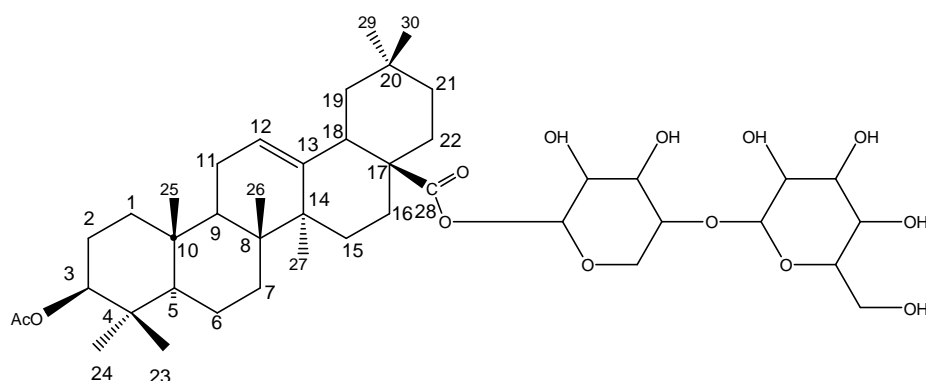
## 5. Etude bibliographique d'*Anogeissus leiocarpus*

### 5.1. Etudes phytochimiques antérieures sur le genre *Anogeissus*

#### ➤ Saponosides triterpéniques

Le seul saponoside décrit dans le genre a été isolé à partir des feuilles de l'espèce *Anogeissus latifolia* (Chaturvedi *et al*, 1992).

Il s'agit du 3-*O*-acétyl-oléan-12-en-28-oïque-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→4)-*O*-β-D-xylopyranoside.



**Figure 4 :** saponoside isolé d'*Anogeissus latifolia*, feuilles

**Tableau 1 :** Etudes phytochimiques antérieures du genre *Anogeissus*.

Espèce	Classe phytochimique	Composés identifiés	Références
<i>A. schimperii</i>	Tanins	17%	(Aspinal <i>et al.</i> , 1961)
	Acide ellagique et dérivés	Acide 3,3',4'-tri- <i>O</i> -méthylflavellagique (1) et acide 3,3'-di- <i>O</i> -méthylellagique	(Nduji <i>et al.</i> , 1988)
	Acides gras	Acide palmitique (29,4%), acide oléique (15,4%), et acide linoléique (38,6%)	(Mackie <i>et al.</i> , 1961)
	Gomme	Polysaccharides	(Aspinall et Christensen, 1961)
	Acides phénoliques	Acides gentisique, acide protocatéchique et acide gallique Acides shikimique et quinique	(Nduji <i>et al.</i> , 1983) Reddy <i>et al.</i> , 1961)

<i>A. leiocarpus</i>	Acides gras, hydrocarbures, triglycérides et cholestérol	acides carboxyliques (acides tétradécanoïque, hexadécanoïque et octadécanoïque), acides insaturés (acide linoléique et acide oléique) (acide 11,14-eicosadiénoïque méthyl ester et son isomère)	(Adigun <i>et al.</i> , 2001)
<i>A. latifolia</i>	Acide ellagique et dérivés (écorce)	Acide 3,3',4-tri- <i>O</i> -méthylflavellagique  Acide 3,3'-di- <i>O</i> -méthylellagique-4'- $\beta$ -D-xyloside et acide 3,4,3'-tri- <i>O</i> -méthylflavellagique-4'- $\beta$ -D-glucoside  Acide ellagique, acide 3,3',4-tri- <i>O</i> -méthylellagique, Acide tétra- <i>O</i> -méthylellagique	(Reddy <i>et al.</i> , 1974)  (Deshpande <i>et al.</i> , 1976)  (Reddy <i>et al.</i> , 1965) (Reddy <i>et al.</i> , 1974)
<i>A. latifolia</i>	Flavonoïdes	quercétine, myricétine, (+)-leucocyanidine	(Reddy <i>et al.</i> , 1965)
	(gomme) polysaccharides	Polyglycosides  glucuronomannanes	(Tischer <i>et al.</i> , 2002)  (Aspinall <i>et al.</i> , 1967)
	Huile essentielle (graines)	1,6%	(Augustus <i>et al.</i> , 2001)
<i>A. leiocarpus</i>	Acide ellagique et dérivés	Acide 3,4,3'-tri- <i>O</i> -méthylflavellagique et son dérivé glucosylé	(Adigun <i>et al.</i> , 2000)
	polysaccharides	leiocarpane A  leiocarpanes A et B glucuronomannanes	(Aspinall <i>et al.</i> , 1975), Aspinall et Carlyle 1969), (Aspinall et McNab, 1969), (Aspinall <i>et al.</i> , 1969)  (Aspinall <i>et al.</i> , 1965) (Aspinall <i>et al.</i> , 1967)
<i>A. acuminata</i>	Lignanes	Anolignanes A, B et C; (-) secoisolaricirésinol; 2,4-di- <i>O</i> -méthylanolignane; 2,4-di- <i>O</i> -méthylanolignane	(Rimando <i>et al.</i> , 1994a)
	Flavano-ellagitannins	anogeissinine (I) et anogeissusine A (II) et B (III), vescalagine, castaline, castalagine, acutissimine C, grandinine, eugénigrandine A	(Lin <i>et al.</i> , 1991)
		Ptérostilbène (I), dihydrodéhydrodiconiféryl alc. (II) et conocarpane	(Rimando <i>et al.</i> , 1994b)



## 5.2. Études biologiques antérieures sur le genre *Anogeissus*

**Tableau 2 : Activités biologiques du genre *Anogeissus***

Espèce	Activités	Extraits / Composés actifs	Références
<i>A. leiocarpus</i>	Antimicrobienne	Extrait 50% EtOH	(Adigun <i>et al.</i> , 2001), (Sanogo <i>et al.</i> , 1998), (Almagboul <i>et al.</i> , 1988)
	Antibactérienne		(Taiwo <i>et al.</i> , 1999), (Rotimi <i>et al.</i> , 1988)
	Antifongique		(Govindarajan <i>et al.</i> , 2004) (Batawila <i>et al.</i> , 2005)
	Antimalarique, leishmanicide, trypanocidaire, antihelminthe	Extraits MeOH et CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	(Okpekon <i>et al.</i> , 2004), (Vonhron-Senecheau <i>et al.</i> , 2003)
<i>A. acuminata</i>	Anti VIH-1	Anolignanes A, B et C; (-) secoisolaricirésinol; 2,4-di- <i>O</i> -méthylanolignane; 2,4-di- <i>O</i> -méthylanolignane	(Rimando <i>et al.</i> , 1994a)
	Cytotoxique	ptérostilbène (I), dihydrodéhydrodiconiféryl alcool (II) et conocarpane.	(Rimando <i>et al.</i> , 1994b)
<i>A. latifolia</i>	Antioxydante		(Govindarajan <i>et al.</i> , 2004a)
	Cicatrisante	50% EtOH	(Govindarajan <i>et al.</i> , 2004b)
	Anti-ulcère	Extrait 50% EtOH	(Govindarajan <i>et al.</i> , 2006)
	Antimicrobienne	Extrait 50% EtOH	(Govindarajan <i>et al.</i> , 2006)

## 5.3. Utilisations traditionnelles

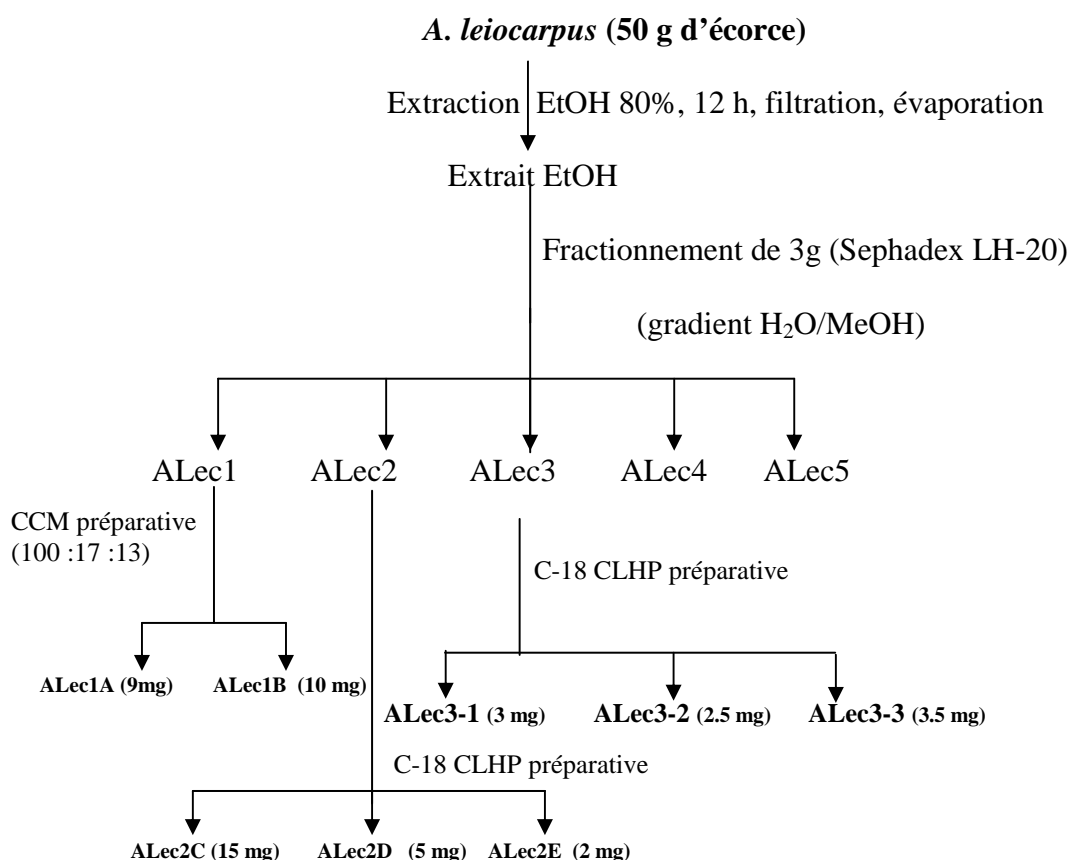
L'espèce *Anogeissus leiocarpus* est utilisée traditionnellement dans différentes indications :

- écorce du tronc: contre l'anorexie, la constipation, le paludisme, l'ictère, l'asthme, toux et bronchite.
- Feuilles : contre la jaunisse, les rhumes de cerveau, l'asthme, toux et bronchite.
- Rameaux feuillés: en cas de migraine, de dysenterie amibienne.

(Sanogo *et al.*, 1998).

## 6. Matériel et méthodes

### 6.1. Extraction et isolement



**Figure 5.** Protocole d'extraction et de purification d'*A. leiocarpus*.

Les écorces d'*A. leiocarpus* ont été collectées dans le parc national de Niokolo Koba au sud-est du Sénégal en Novembre 2004 et identifiées par le botaniste Dr. M.S. Mbaye de l'Université Cheikh Anta Diop, de Dakar. Un échantillon (8580, 26-X-1941) a été déposé à l'herbier du laboratoire de botanique, à l'Institut Fondamental d'Afrique Noire (IFAN) de Dakar.

A partir de 50 g d'écorces finement broyées et macérées dans 80% EtOH sous agitation magnétique à température ambiante ( $3 \times 500$  ml); les extraits obtenus ont été filtrés, combinés et évaporés à sec sous pression réduite (extrait EtOH) (3,1g ; 6,21% p/p) (Figure 5). Un aliquot de 3g de l'extrait EtOH a été fractionné sur colonne de Sephadex-LH20 avec un gradient d'élution H<sub>2</sub>O/MeOH selon les conditions suivantes :

Fractions	MeOH	H <sub>2</sub> O	Volume (ml)
1-4	0	100	100
5-8	10	90	=
9-11	20	80	=
12-15	30	70	=
16-19	40	60	=
20-23	50	50	=
24-27	60	40	=
28-31	70	30	=
32-35	80	20	=
36-39	90	10	=
40-43	100	0	=
44-52	100	0	=

Les fractions semblables ont été rassemblées en fonction de leur similitude de profils CCM. Ainsi, 5 fractions majoritaires ont été récupérées (ALec1 à 5). La fraction ALec1 (60 mg) a été fractionnée par CCM préparative sur gel de silice avec comme solvant de migration un mélange AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O (100 :17 :13 ; v/v/v) pour donner lieu aux composés ALec1A (9 mg) et ALec1B (10 mg). La purification de la fraction ALec2 par CLHP-C18 selon les conditions d'élution sous-cités (tableau 5) a conduit à l'obtention de 3 produits purs ALec2C (15 mg), ALec2D (5mg), ALec2E (2 mg), et 3 autres produits purifiés à partir de la fraction 3: ALec3-1 (3 mg), ALec3-2 (2,5 mg) et ALec3-3 (2 mg).

Les spots ont été détectés sous lampe ultra-violette à 254 et 366 nm et révélés avec le réactif de NEU (2-aminoéthyl-diphénylborate à 1 % dans du MeOH) pour les polyphénols et par le réactif à la vanilline-sulfurique pour les terpènes.

## 6.2. Conditions chromatographiques utilisées en CLHP analytique et préparative

La pureté des produits a été contrôlée par CLHP-C18 analytique (pompes 9010 et détecteur à barrettes de diodes Prostar, Varian) dans les conditions chromatographiques suivantes :

Débit (1 ml/min), détection à 370 nm pour les ellagitannins et 205 nm pour les terpènes.

**Tableau 3 :** Conditions chromatographiques CLHP analytique des fractions ALec1 à 5.

Temps (minutes)	0,01M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)	Acétonitrile (%)
0	98	2
60	50	50
80	0	100
85	0	100
90	98	2

**Tableau 4 :** Conditions chromatographiques CLHP analytique des produits purs (ALec3-1 à 3 ; ALec1A et 1B ; ALec2C à E)

Temps (minutes)	0,01M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)	Acétonitrile (%)
0	95	5
10	50	50
15	30	70
20	20	80
25	0	100
30	0	100
35	95	5

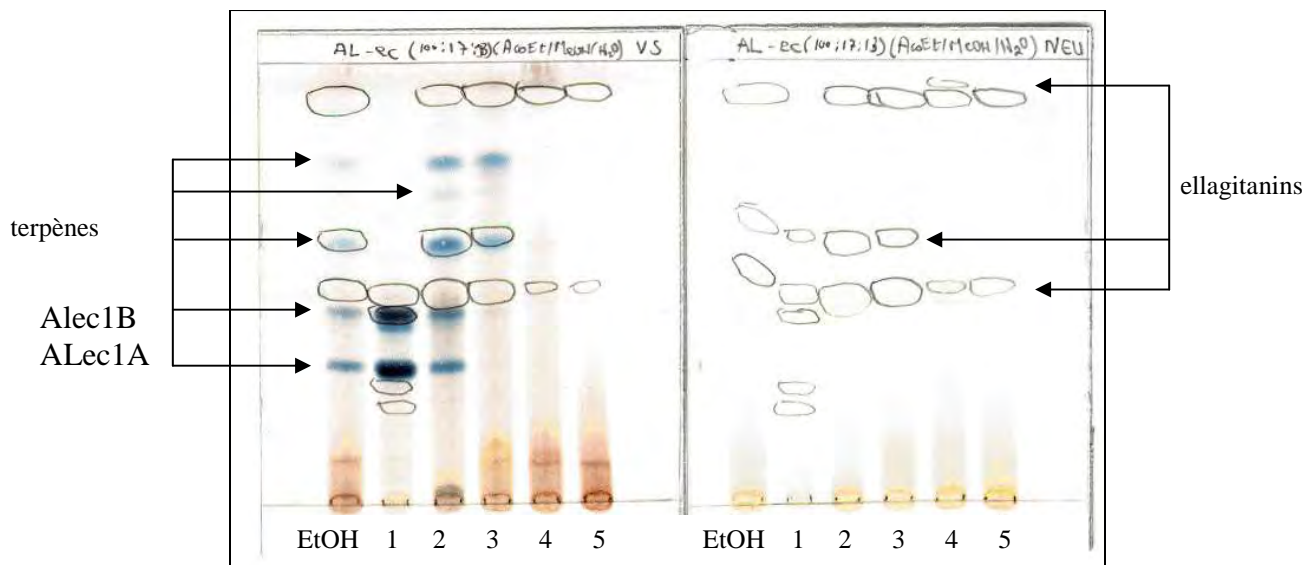
La purification par CLHP-C18 semi-préparative (250 × 21mm, Nucleodur<sup>®</sup>, Macherey-Nagel) a été opérée selon les conditions chromatographiques suivantes :

Débit (10 ml/min), détection à 370 nm (115 UV detector, Gilson).

**Tableau 5 :** CLHP semi-préparative des fractions ALec2 et ALec3.

Temps (minutes)	0,01M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (%)	Acétonitrile (%)
0	95	5
5	95	5
15	50	50
20	30	70
25	20	80
30	0	100
35	0	100

## 7. Profils chromatographiques



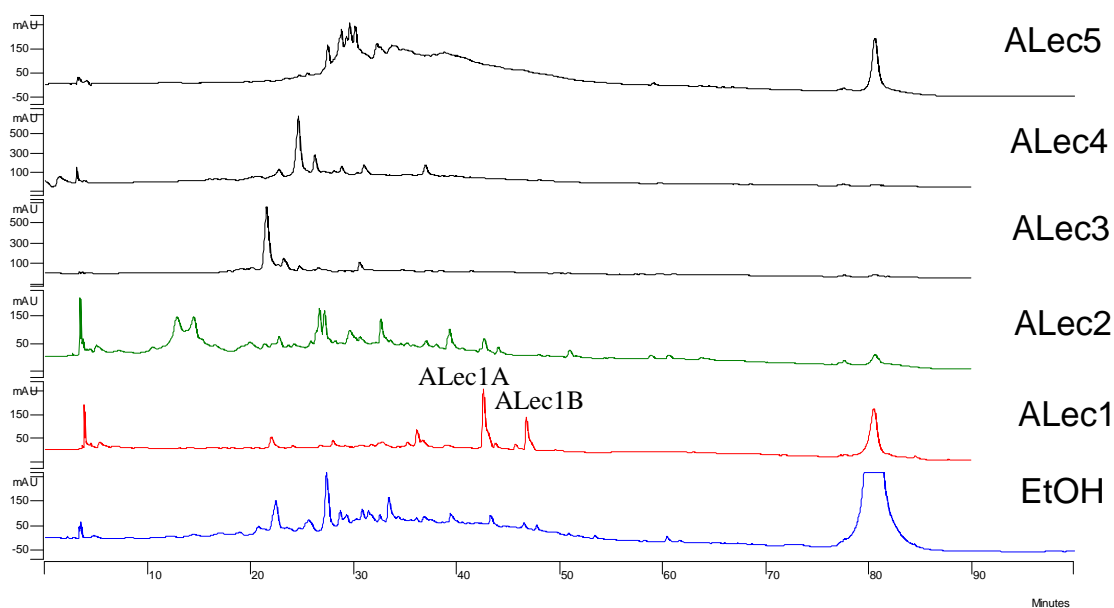
**Figure 6 :** Profils CCM sur gel de silice de l'extrait total (EtOH) et de ses 5 fractions (Alec1 à 5).

à gauche : révélation à la vanilline-sulfurique

à droite : révélation au réactif de NEU

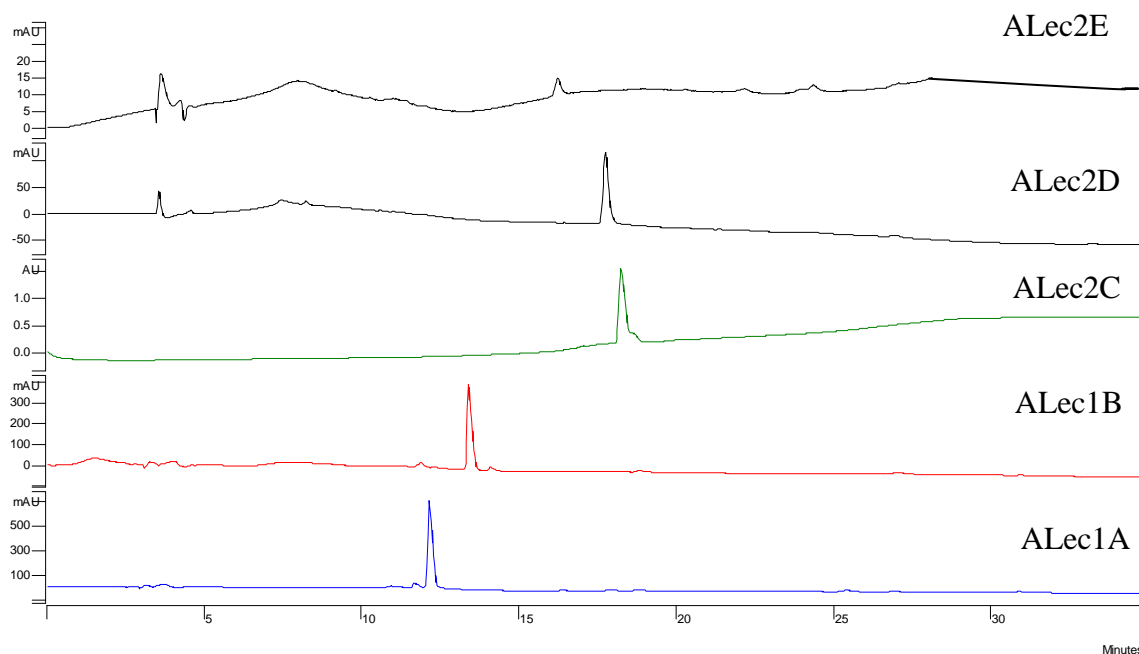
Solvant de migration : AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O (100 :17 :13 ; v/v/v)

Le profil CCM (partie gauche du chromatogramme) montre des taches de couleur bleu violacée après révélation au réactif de vanilline-sulfurique, indicateur de la présence de terpènes. La révélation au réactif de NEU présente des spots de fluorescence jaune à 365 nm, indicateur de la présence de composés aromatiques. (figure 6)



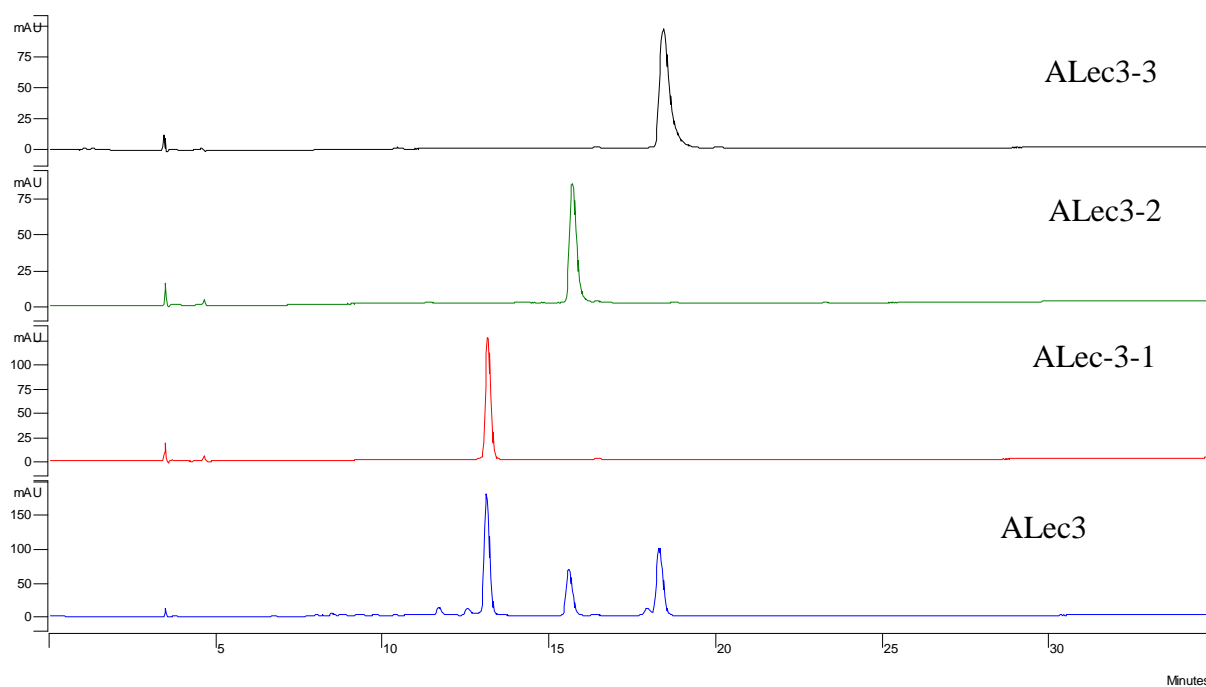
**Figure 7 :** Profils CLHP (205 nm) de l'extrait total (EtOH) et des différentes fractions qui en dérivent (Alec1 à 5) [5 mg/ml]

Les profils CLHP analytiques de l'extrait total et les fractions ALec1 à 5 obtenus selon les conditions détaillées dans le tableau 3, permet de repérer la fraction ALec1 qui renferme majoritairement 2 pics (dénommés ALec1A et ALec1B) dont le profil UV correspond à des terpènes. Ces résultats confirment la coloration bleue et l'intensité des spots observés en CCM (figure 6).



**Figure 8 :** Profils CLHP (205 nm) des produits purs isolés des fractions ALec1 et ALec2. [1 mg/ml]

La figure 8 présente les profils CLHP analytiques des composés terpéniques ALec1A, ALec1B, ALec2C, ALec2D et ALec2E purifiés à partir de leur fractions respectives ALec1 et ALec2.



**Figure 9 :** Profils CLHP (205 nm) des produits purs isolés de la fraction ALec3 [1 mg/ml]

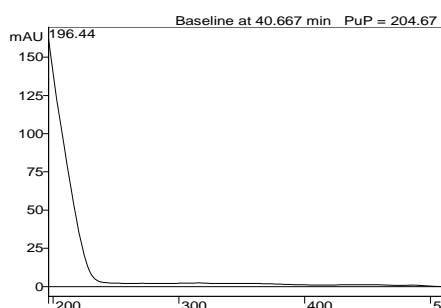
La figure 9 montre les profils CLHP des 3 dérivés ellagiques ALec3-1, ALec3-2, ALec3-3 purifiés à partir de la fraction ALec3.

## 8.1. Identification des triterpènes

### 8.1.1. Elucidation structurale du composé ALec1A

Le produit ALec1A a été purifié par CCM préparative à partir de la fraction ALec1.

9 mg de poudre blanche du composé ALec1A ont été obtenus. Le test Lieberman-Burchard est positif (couleur rouge) indiquant un triterpène de type oléanane ou ursane. La nature triterpénique est confirmée par spectrométrie de masse et par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ .



**Figure 10** : Profil UV-type des composés ALec1A et B, ALec2C à 2E.

La masse moléculaire du composé obtenu par **ESI-MS** a donné un ion pseudo-moléculaire  $[\text{M}^+]$  à  $m/z = 682$  Da.

Les spectres **RMN  $^{13}\text{C}$** ,  **$^{13}\text{C}$  DEPT 135** et  **$^{13}\text{C}$  DEPT 90** (figures 13-14) montrent 36 carbones dont un groupement carbonyle, deux carbones éthyléniques, 5 méthines, 5 méthyles, 3 méthylènes oxygénés, 8 méthylènes 7 méthines oxygénés et 7 quaternaires. Ainsi, on déduit la formule brute du composé ALec1A ( $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_{12}$ ), ce qui suggère la présence d'un triterpène conjugué à un hexose (saponoside monodesmoside).

Dans le spectre **RMN  $^1\text{H}$**  enregistré dans pyr-*d*5 (figures 11-12), le signal doublet résonant à  $\delta$  3,98 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz) correspond au proton H-3. Dans le spectre **RMN COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$**  (figure 13), le proton à  $\delta$  3,98 corrèle avec celui à  $\delta$  4,42 ppm (1H, m, H-2) et ce dernier avec  $\delta$  1,36 ppm (1H, t,  $J = 12,4$ , H-1 $\beta$ ) et 2,29 ppm (1H, dd, 12,4;4,8, H-1 $\alpha$ ). Ce résultat montre que C-3 et C-2 sont oxygénés et que C-1 porte 2H. La grande constante de couplage de H-3 à  $\delta$  3,98 ( $J = 8,0$  Hz) montre une corrélation type axial-axial entre H-2 et H-



3. Les déplacements chimiques des carbones C-2 et C-3 [ $\delta_c$  69,0 (C-2) et 79,8 (C-3)] confirment la configuration de 2 $\alpha$  et 3 $\beta$  OH, qui a été bien illustrée par (Kojima *et al.*, 1989).

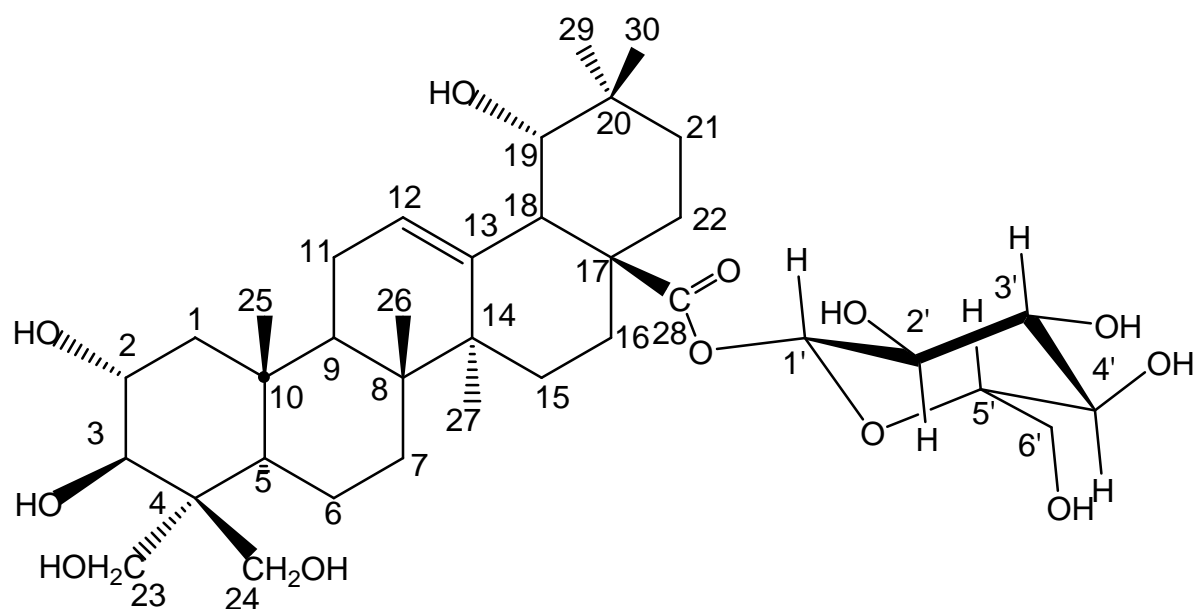
Les spectres RMN  $^1\text{H}$  (figures 11-12) et RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (figures 16-17) montrent 5 groupements méthyles singulets, A partir des 5 méthyles dans les spectres de corrélation RMN 2D HMBC (figures 18-20), HSQC (figures 14-15) et COSY (figure 15), on peut identifier tous les carbones et protons de l'aglycone. Les données RMN  $^{13}\text{C}$  de C-29 et C-30 ( $\delta$  28,7 et 24,6, respectivement) indiquent le type oléanane (ils sont plus blindés dans le cas des ursanes : ceux-ci résonnent dans ce cas entre 16-18 ppm et 20-22 ppm, respectivement). Le squelette oléanane est confirmé par les déplacements chimiques caractéristiques des carbones C-12 à 123,5 ppm et C-13 à 144,3 ppm qui sont clairement en faveur d'une structure de type  $\beta$ -amyrine (ces carbones résonent respectivement à 124 et 139 ppm dans le cas des ursanes,  $\alpha$ -amyrine). Par ailleurs l'absence des signaux correspondants aux groupements méthyles 23 et 24 et la présence de trois groupements  $\text{CH}_2\text{OH}$  à, 62,1, 64,3 et 62,8 ppm confirme que les carbones 23 et 24 sont hydroxylés.

Le blindage du carbone anomérique de l'hexose ( $\delta_c$  95,8) montre une liaison ester entre l'oside et le saponénine (en cas de liaison éther, il devrait être déblindé autour de  $\delta$  100-110 ppm). La comparaison des déplacements chimiques des carbones du sucre [ $\delta_c$  78,9 (C-3)] avec ceux de la littérature suggère qu'il s'agit d'une configuration D-glucopyranose. En effet, dans le cas du D-galactopyranose le C-3 est plus blindé [ $\delta_c$  73,8 (C-3)] (Agrawal, 1992). La grande constante de couplage (8,0 Hz) de H-1' montre une interaction H-1' axial/H-2' axial d'où une configuration  $\beta$  du sucre.

Les spectres COSY H-H, le proton à  $\delta_H$  = 3,5 (H-18) corrèle avec le proton à  $\delta_H$  = 5,47 (H-12) (petit couplage).

Ainsi la structure du saponoside triterpénique ALec1A été établie comme étant le **2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ , 23, 24-pentahydroxyoléan-12-èn-28-oate,  $\beta$ -D-glucopyranoside ou trachelospéroside E1.**

Ce composé a déjà été isolé à partir des fruits de *Rudgea viburnioides* (Young *et al.*, 1998) et de *Trachelospermum asiaticum* (Fumiko etTatsuo, 1987), mais décrit pour la première fois dans la famille des combretacées.



**2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,23,24- pentahydroxy-oléan-12-èn-28-oate,  $\beta$ -D-glucopyranoside  
(trachélospéroside E1).**

**Tableau 6** : Données RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de Alec1A (pyridine- $d_5$ ).

N°	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	type	HMBC
1 a	2,29	(1H, t, 11,9)	47,6	CH <sub>2</sub>	
1 b	1,36	(1H, dd, 12,4;4,8)			
2	4,42	(1H, m)	69,0	CH	
3	3,98	(1H, d, 8,0)	79,7	CH	
4	-		46,4	Cq	
5	2,05	m	48,7	CH	
6 a	1,97	(1H, s large)	19,4	CH <sub>2</sub>	
6 b	1,66	(1H, m)			
7 a	1,97	(1H)	33,0	CH <sub>2</sub>	
7 b	2,01	(1H)			
8	-		40,3	Cq	
9	2,03	(1H, s large)	48,3	CH	
10	-		38,3	Cq	
11	2,07	(2H, s large)	24,5	CH <sub>2</sub>	C-12;C-13;C-25;C-10.C-8;C-9
12	5,47	(1H, s large)	123,2	CH	
13	-		144,3	Cq	
14	-		42,1	Cq	
15 a	2,34	(1H, dd)	29,0	CH <sub>2</sub>	
15 b	1,17	(1H, d, 8,1)			
16	2,77	(1H, td, 2,8;13,5)	27,9	CH <sub>2</sub>	C-28;C-17;C-15
17	-		47,9	Cq	
18	3,5	(1H, s large)	44,6	CH	C-28;C-13;C-12;C-16;C-17
19	3,53	(1H, d large, 5,4)	81,0	CH	C-20;C-18
20	-		35,5	Cq	
21 a	1,02	(1H, m)	28,9	CH <sub>2</sub>	C-30;C-28
21 b	2,03				
22 a	1,45	(1H, dd, 2,8; 9,2)	33,2	CH <sub>2</sub>	
22 b	1,66	(1H, m)			
23 a	4,0	(1H, m)	64,3	CH <sub>2</sub>	
23 b	4,61	(1H, d, 10,2)			
24 a	4,85	(1H, dd, 4,3;10,8)	62,8	CH <sub>2</sub>	
24 b	4,25	(1H, d, 10,8)			
25	1,15 s	(3H, s)	17,5	CH <sub>3</sub>	C-10;C-1
26	1,17 s	(3H, s)	17,2	CH <sub>3</sub>	C-7;C-8;C-14
27	1,53 s	(3H, s)	24,8	CH <sub>3</sub>	C-13;C-15;C-14
28	-		177,2	Cq	
29	1,11 s	(3H, s)	28,7	CH <sub>3</sub>	C-19;C-20;C-21;C-30
30	0,95 s	(3H, s)	24,6	CH <sub>3</sub>	C-19;C-20;C-21
1'	6,34	(1H, d, 8,0 Hz)	95,8	CH	C-28;C-3'
2'	4,18	(1H, t)	74,1	CH	
3'	4,27	(1H, t)	78,9	CH	
4'	4,35	(1H, t)	71,0	CH	
5'	4,33	(1H, m)	79,8	CH	
6'	4,42	(2H)	62,1	CH <sub>2</sub>	

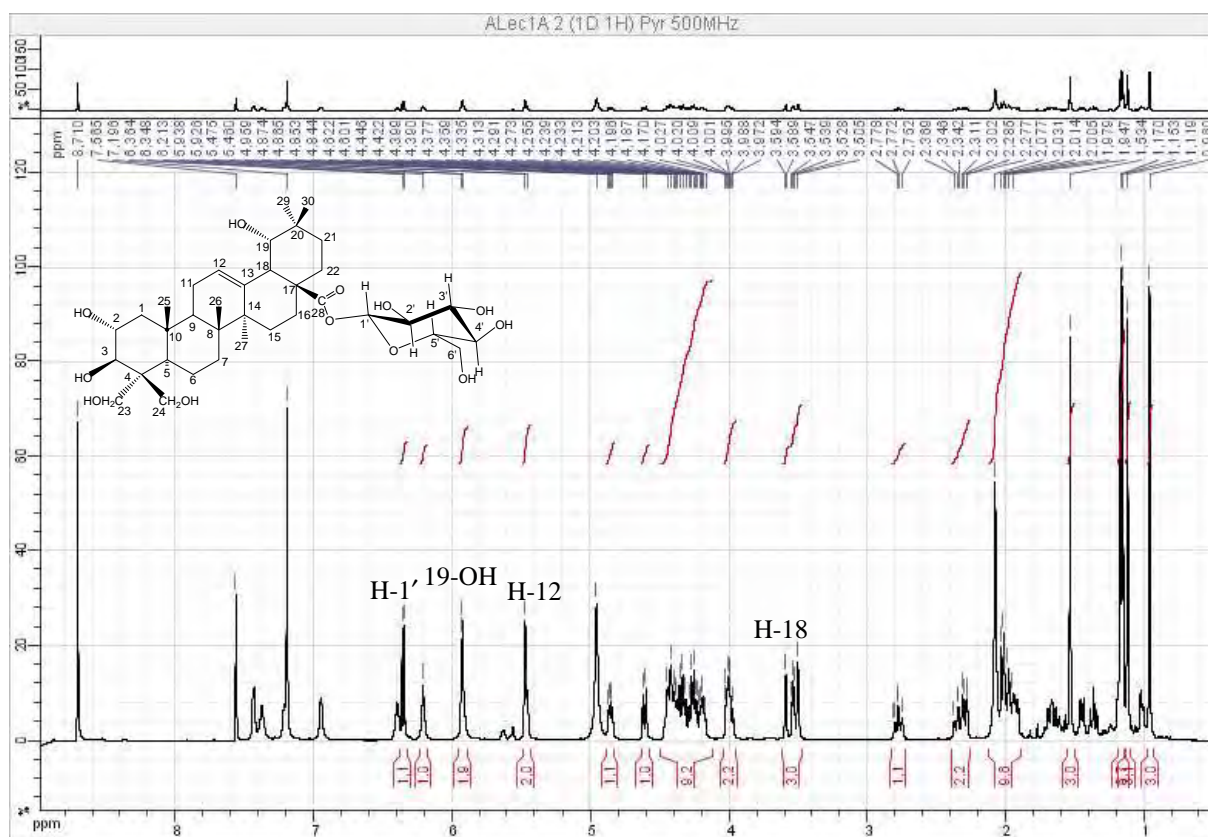


Figure 11 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALeC1A (pyridine- $d_5$ ).

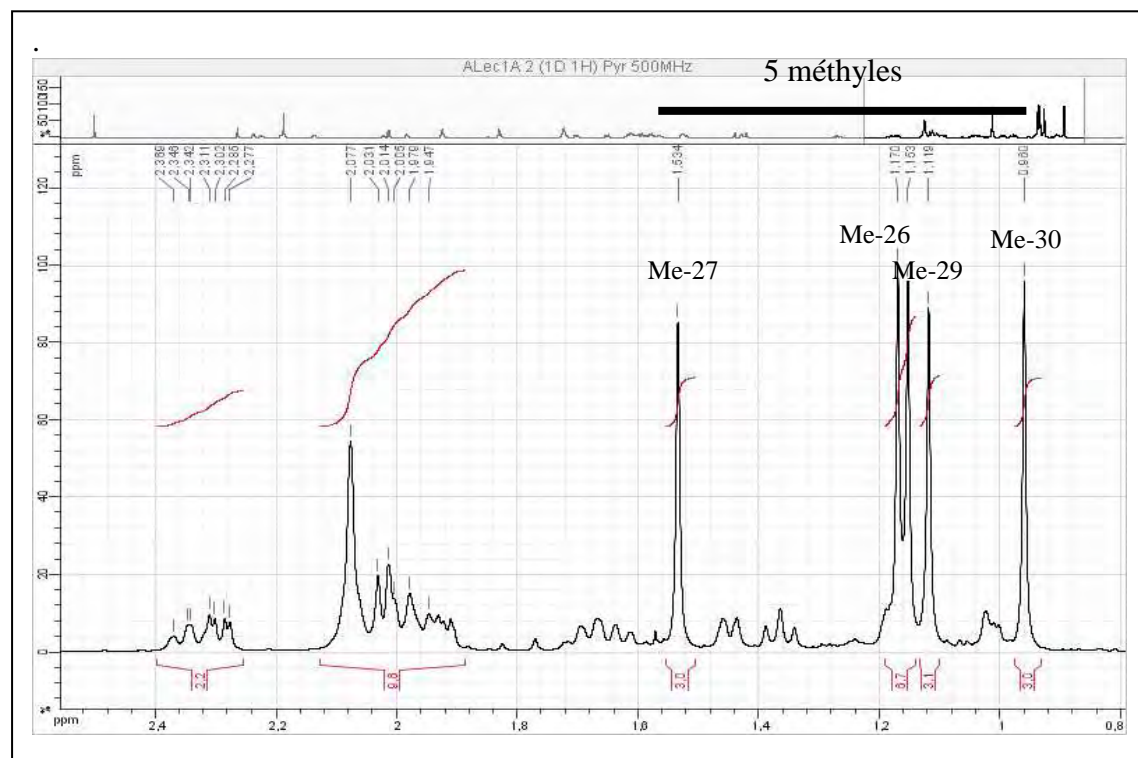


Figure 12 : Spectre étalé RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALeC1A (pyridine- $d_5$ ).

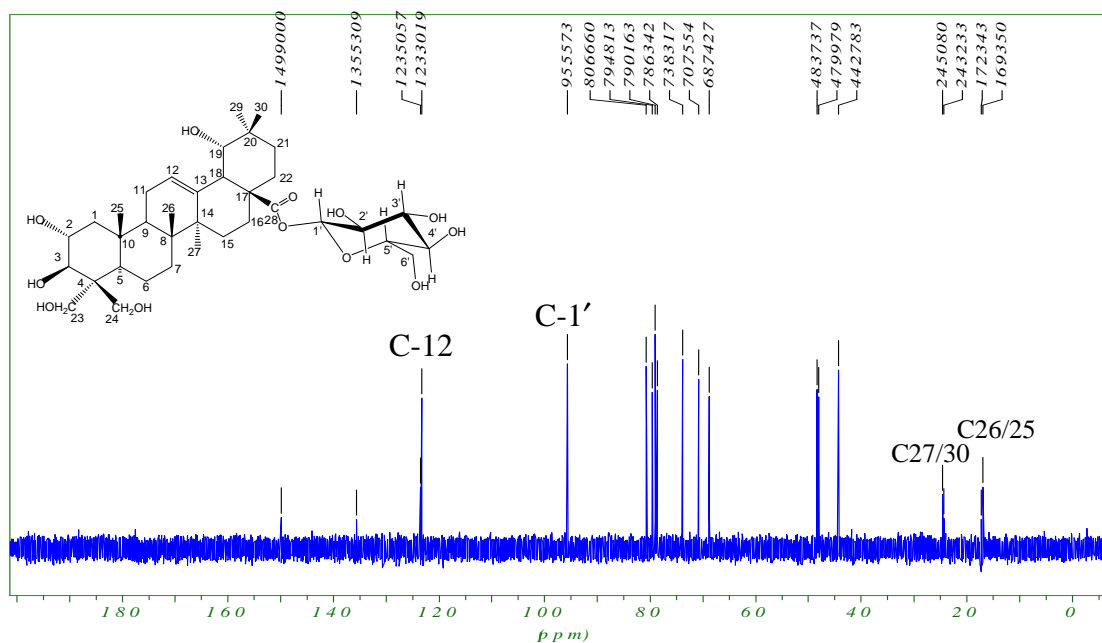


Figure 13 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT90 (125 MHz) du composé ALec1A (pyridine- $d_5$ ).

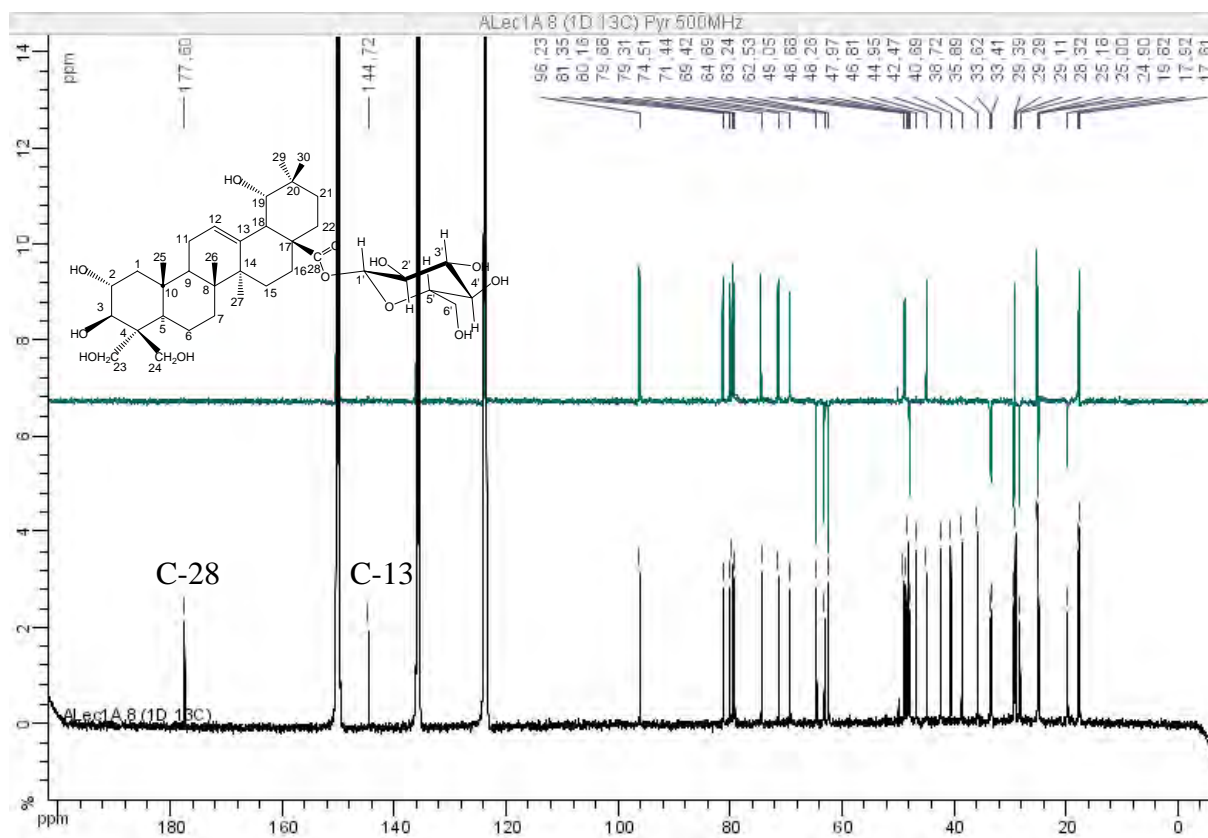
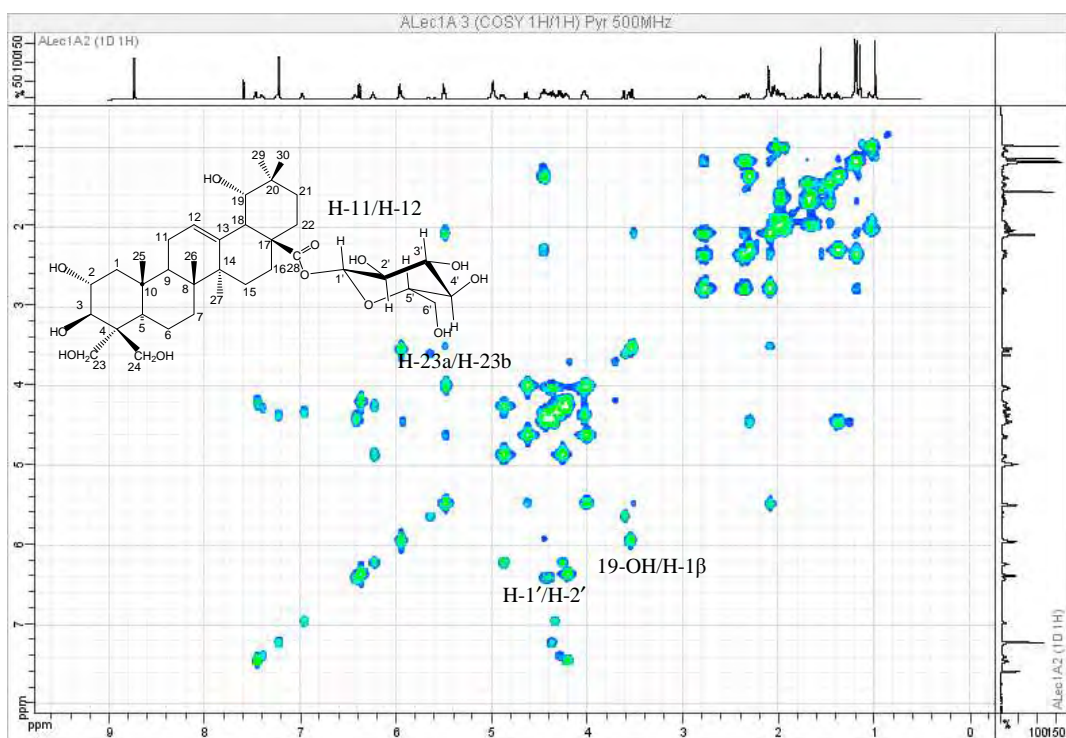
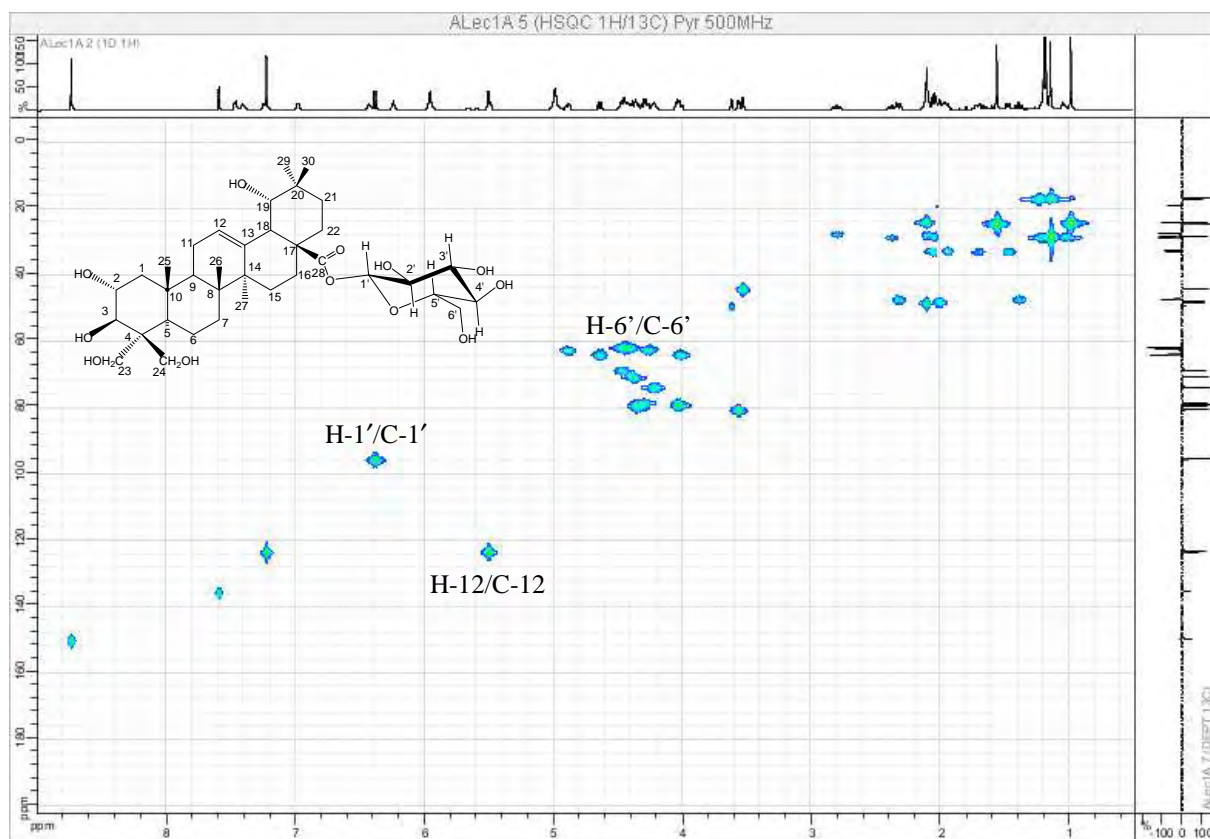


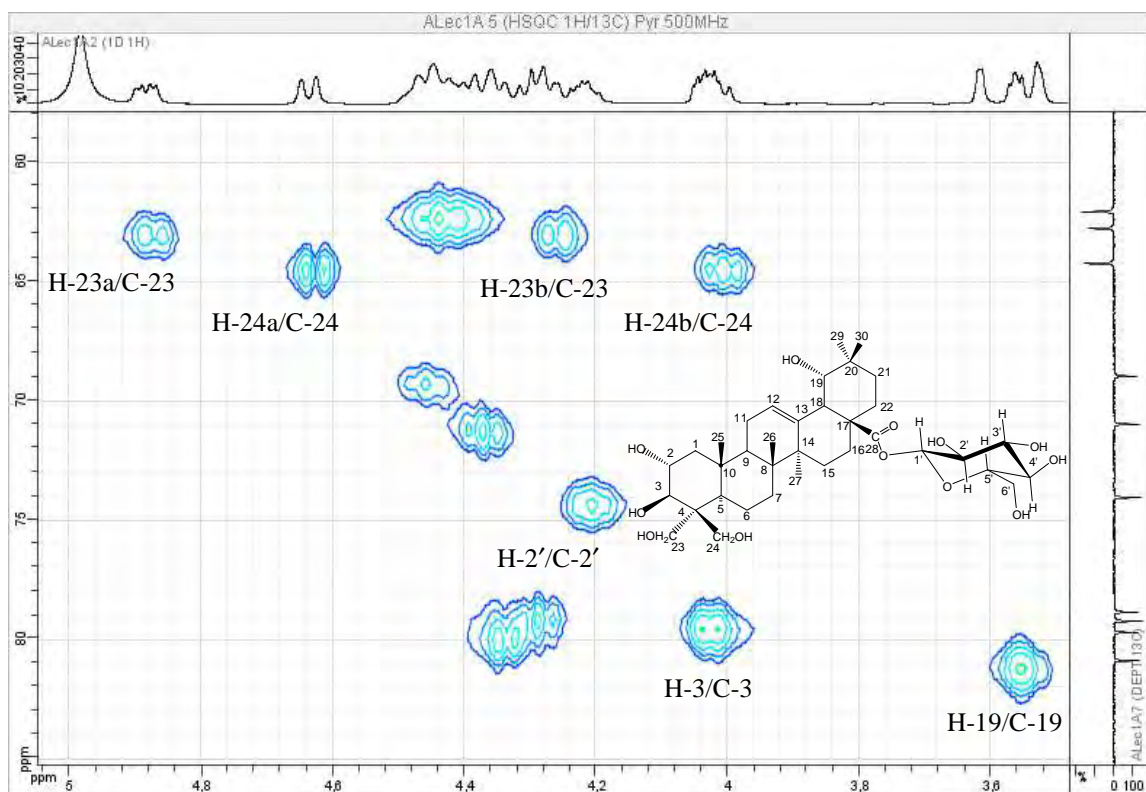
Figure 14 : Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT135 et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de ALec1A (pyridine- $d_5$ ).



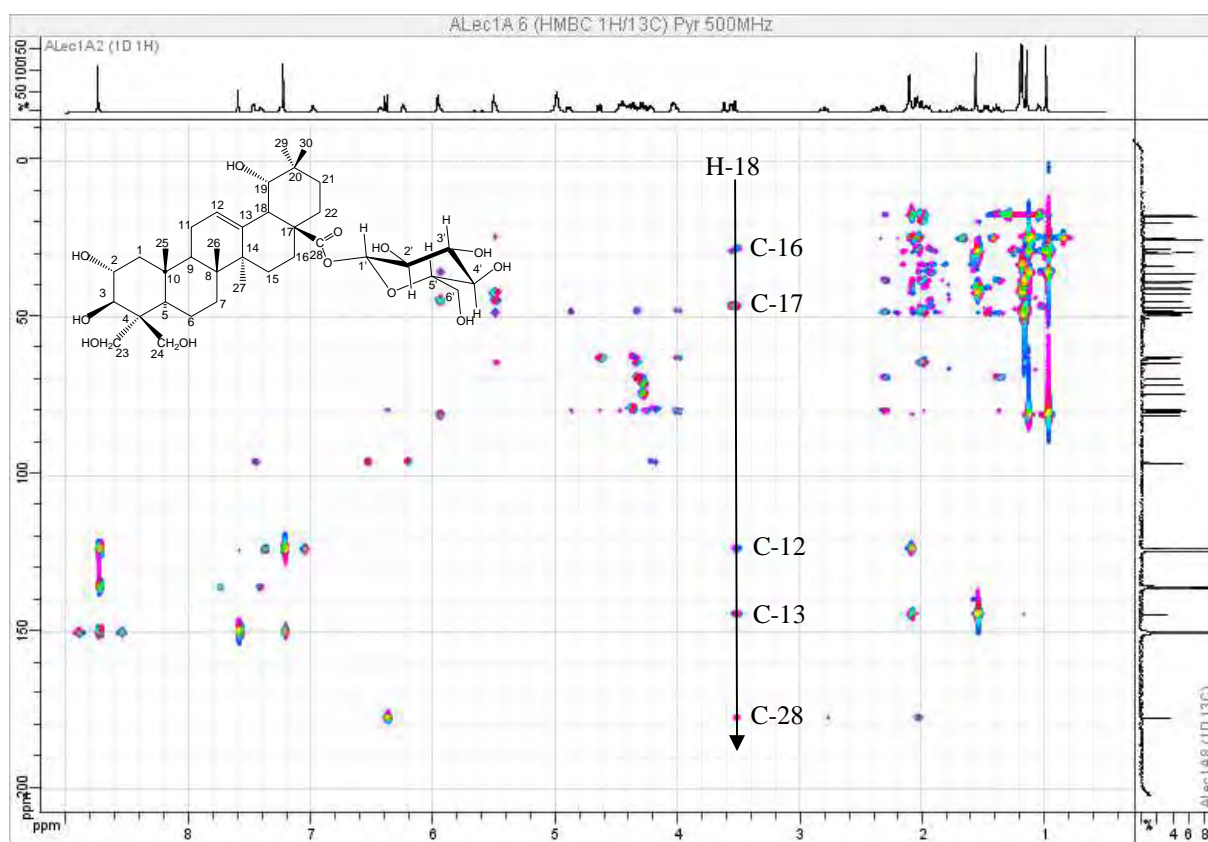
**Figure 15** : Spectre RMN COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALec1A (pyridine-*d*5).



**Figure 16** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (500 MHz) du composé ALec1A (pyridine-*d*5).



**Figure 17 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (500 MHz) du composé ALec1A (pyridine-*d*5).



**Figure 18 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (500 MHz) du composé ALec1A (pyridine-*d*5).

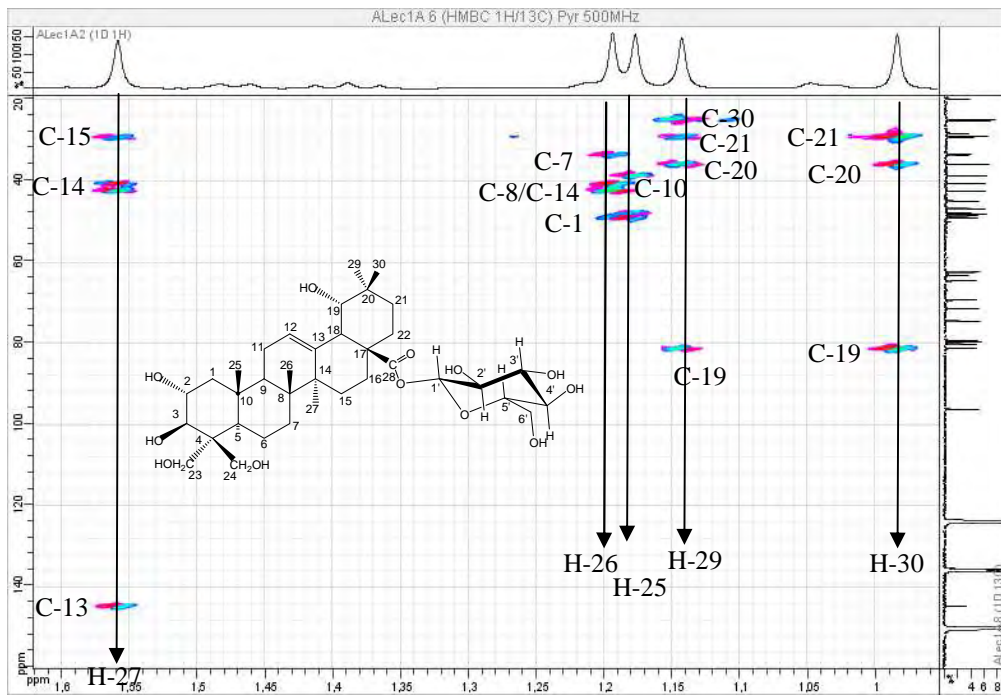


Figure 19 : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (500 MHz) du composé ALec1A (pyridine-*d*5).

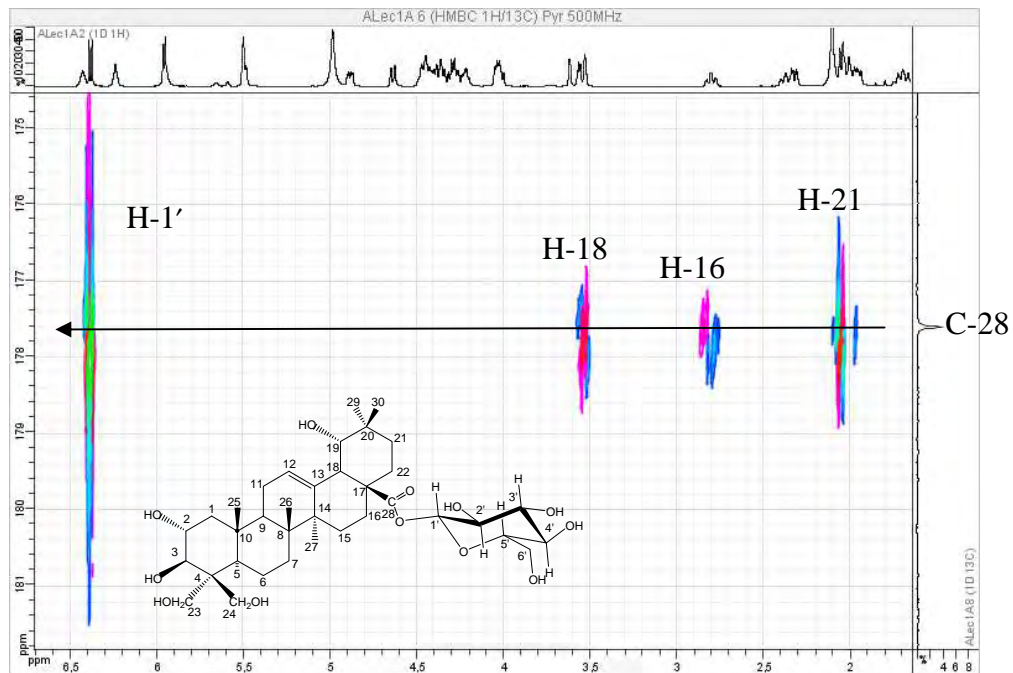
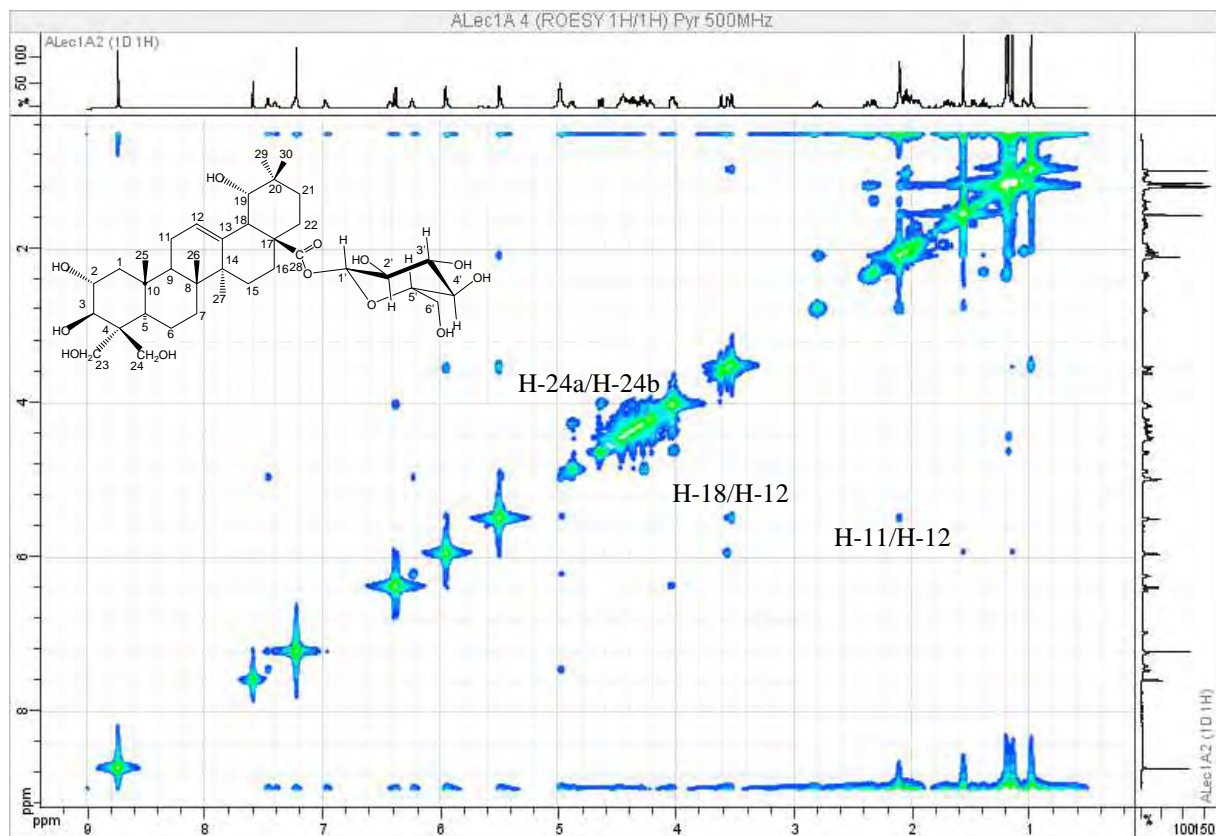
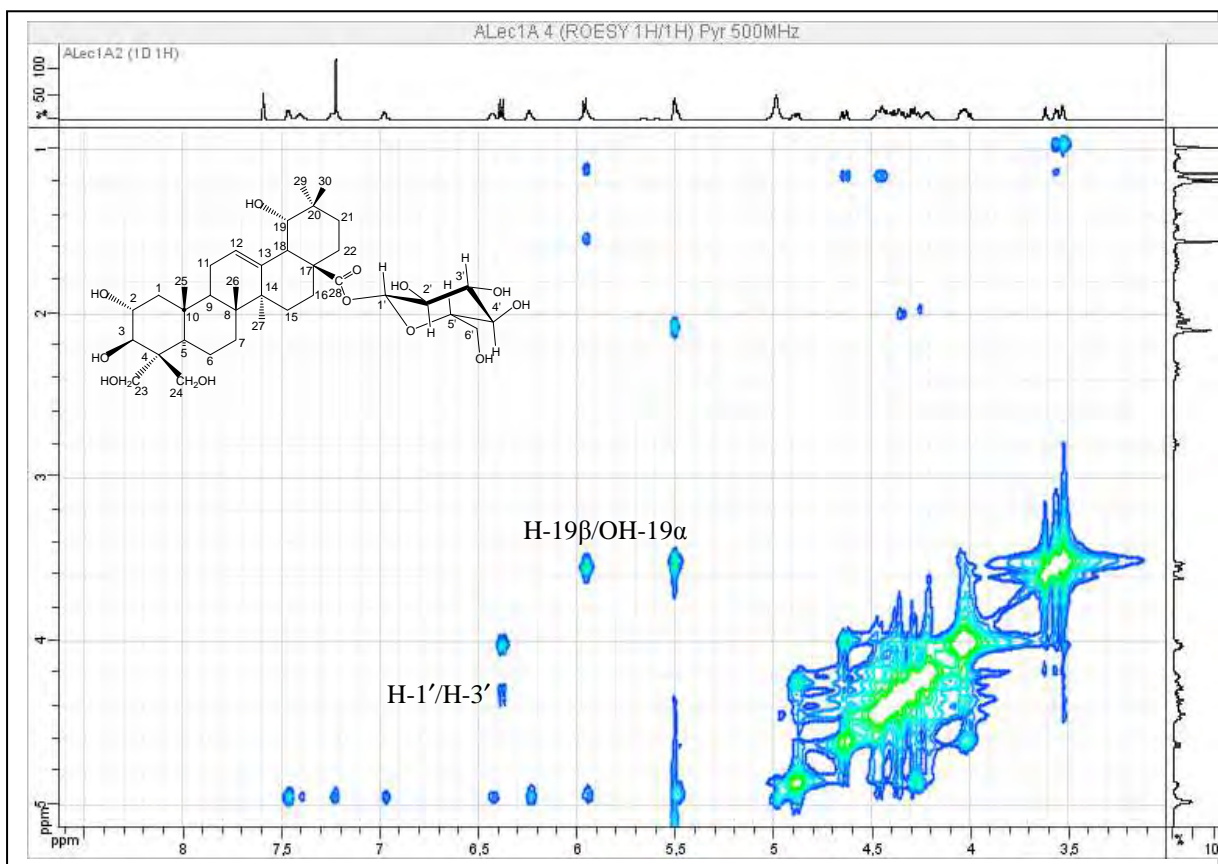


Figure 20 : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (500 MHz) du composé ALec1A (pyridine-*d*5).

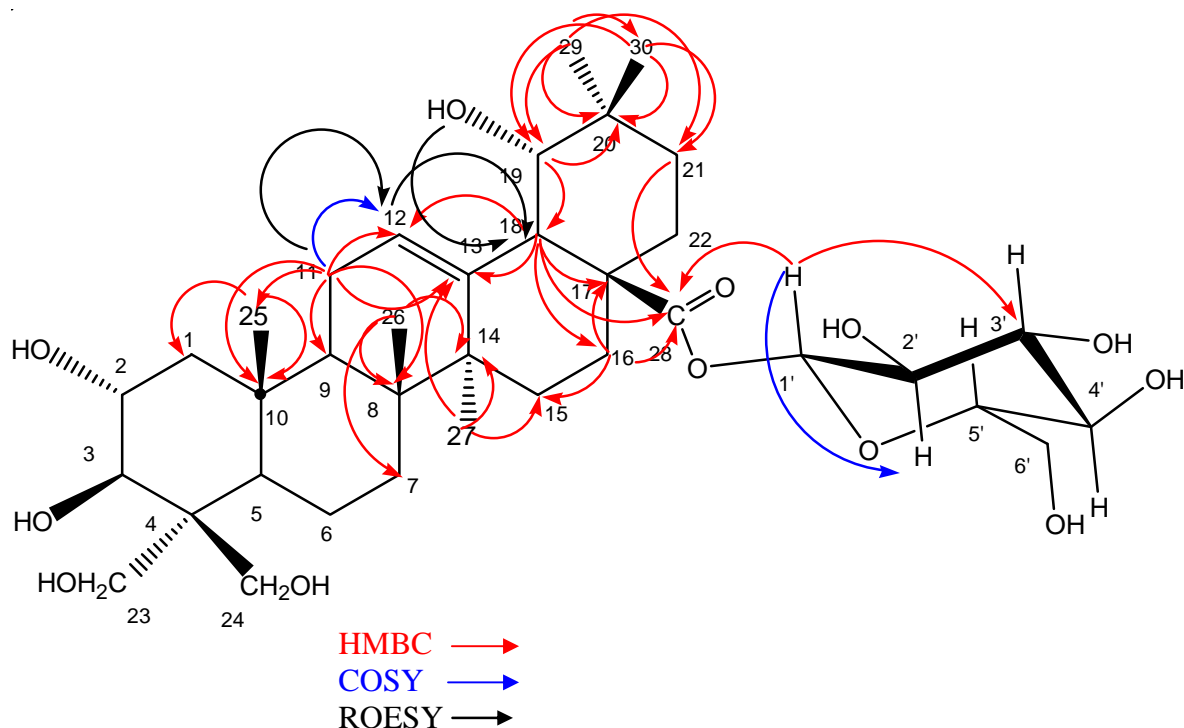




**Figure 21** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY (500 MHz) du composé ALec1A (pyridine- $d_5$ ).



**Figure 22** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY (500 MHz) du composé ALec1A (pyridine- $d_5$ ).



### Les différentes corrélations observées dans Alec1A

#### 8.1.2. Elucidation structurale du composé Alec1B

10 mg de poudre blanche du composé ALec1B ont été obtenus après purification par CCM préparative de la fraction ALec1 (figure 5). Le test Lieberman-Burchard positif (couleur rouge) indique la classe chimique comme étant triterpène de type oléane ou ursane. La nature terpénique est confirmée par le spectre UV à 205 nm (figure 10).

La masse moléculaire du composé obtenue par ESI a donné un ion pseudo-moléculaire  $[M^+]$  à  $m/z = 666$  Da.

Les spectres RMN  $^{13}C$ ,  $^{13}C$  DEPT 135 et  $^{13}C$  DEPT 90 (figures 25-26) montrent 36 carbones : un groupement carbonyle, deux carbones éthyléniques, 6 méthyles, 2 méthylènes oxygénés, 8 méthylènes et trois méthines oxygénés. Ceci permet de déduire la formule brute du composé ALec1B ( $C_{36}H_{58}O_{11}$ ), ce qui suggère la présence d'un triterpène substitué par un hexose (saponoside monodesmoside).

Le spectre IR (infra-rouge) donne une bande d'absorption caractéristique d'un groupement hydroxyle ( $3352\text{ cm}^{-1}$ ). Le spectre proton montre la présence d'un proton éthylénique à  $\delta_H$  5,39 (1H, t large,  $J = 3,5$  Hz). Par ailleurs les données du spectre DEPT 135 et du spectre  $^{13}C$  confirment la présence d'une double liaison éthylénique correspondant aux carbones C-12 et C-13 à  $\delta_C$  123,7 et 144,4 ppm respectivement. Ce qui est en faveur d'un

triterpène de type oléanane (figures 23-24). Les groupements méthyles sont caractéristiques des triterpènes à des déplacements chimiques permettant de les attribuer de manière non équivoque à C-25 ( $\delta$  17,2), C-26 ( $\delta$  17,5), C-23 ( $\delta$  24,2), C-30 ( $\delta$  24,6), C-27 ( $\delta$  24,8) et C-29 ( $\delta$  28,7). L'absence du signal correspondant au méthyle 24 et la présence d'un groupement CH<sub>2</sub>OH à  $\delta$  62,8 en plus du groupement CH<sub>2</sub>OH correspondant à l'hexose indiquent que ce groupement est en position C-24. L'attribution de ces signaux permet d'identifier tous les  $\delta$  des protons et des carbones de l'aglycone, grâce aux données fournies par les expériences HMBC, COSY et HSQC. (figures 27-33).

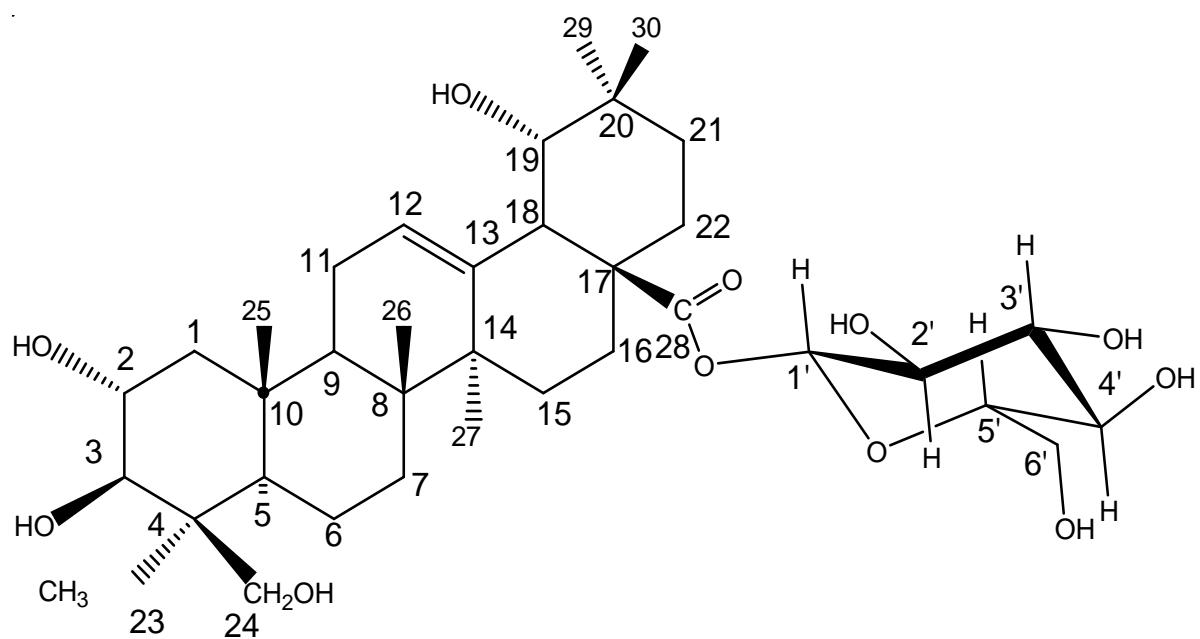
Le proton  $\delta$  3.53 (1H, d,  $J = 10$  Hz, H-3,  $\delta_c$  85,7) et  $\delta_H$  4.28 (1H, ddd,  $J = 10 ; 4,6 ; H-2$ ,  $\delta_c$  68,7) montre une configuration dihydroxyle 2 $\alpha$ , 3 $\beta$ - (tableau 7). Cette configuration a été confirmée par le spectre ROESY avec la corrélation entre H-2 $\beta$  et H-25 (figure 28). Le spectre RMN <sup>1</sup>H montre un signal à  $\delta$  5,96 (d,  $J = 6,1$  Hz) correspondant à l'hydroxyle OH-19 (figure 23).

La comparaison de  $\delta_c$  (RMN <sup>13</sup>C) avec les  $\delta_c$  de sucres de références suggère que l'unité osidique est le  $\beta$ -D-glucopyranoside [ $\delta_c$  79,0 (C-3)]. En effet, dans le cas du D-galactopyranose le C-3 est plus blindé [ $\delta_c$  73,8 (C-3)] (Agrawal, 1992).

Le <sup>1</sup>H $\delta$  6,36 (d,  $J = 8,1$ Hz) et  $\delta_c$  95,9 du proton et carbone anomérique indique une liaison ester avec la forme  $\beta$  du sucre (tableau 7). Normalement, le carbone anomérique d'une liaison éther avec le sucre résonne autour de  $\delta_c$  100-110 ppm, alors que dans le cas d'une liaison ester, il résonne entre 94-98 ppm.

Ainsi la structure du saponoside triterpénique **Alec1B** a été déduite comme étant le **2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,24-tétrahydroxyoléan-12-èn-28-oate,  $\beta$ -D-glucopyranoside ou séricoside.**

La présence de ce composé a été signalée dans *Terminalia glaucescens* (Atta-ur-Rahman *et al.*, 2005), l'écorce de *Terminalia macroptera* (Conrad *et al.*, 1998), les racines de *Terminalia sericea* (Bombardelli *et al.*, 1974), l'écorce de *Combretum molle* (Asres *et al.*, 2001) et les tiges et racines de *Paradrymonia macrophylla* (Terreaux *et al.*, 1996).



**2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,24-tétrahydroxyléan-12-èn-28-oate,  $\beta$ -D-glucopyranoside ou séricoside.**

**Tableau 7** : Données RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) et HMBC de Alec1B (pyridine- $d_5$ )

N°	$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$	type	HMBC
1 a	2,23	(1H, dd, 12,4;3,8)	47,5	CH <sub>2</sub>	C-2,C-3,C-10,C-25
1 b	1,26	(1H, m)			
2	4,28	t (1H)	68,7	CH	
3	3,53	(1H, d, 10)	85,7	CH	C-2,C-24,C-23
4	-		43,9	Cq	
5	1,16	(1H,d, 11,2)	56,7	CH	
6 a	1,65	(1H, m)	19,5	CH <sub>2</sub>	
6 b	1,54	(1H, m)			
7 a	1,45	(1H, m)	33,0	CH <sub>2</sub>	
7 b	2,04	(1H, d, 9)			
8	-		40,3	Cq	
9	1,94	(1H,t, 9,2)	48,5	CH	C-26,C-11,C-10
10	-		38,5	Cq	
11	2,05		24,5	CH	C-9,C-12,1-13
12	5,38	(1H, t large, 3,5)	123,7	CH	
13	-		144,3	Cq	
14	-		42,1	Cq	
15 a	2,35	(1H, t, 13,3)	29,0	CH <sub>2</sub>	
15 b	1,26	(1H, m)			
16 a	2,81	(1H, td, 3; 11,6)	27,9	CH <sub>2</sub>	C-28
16 b	2,12	(1H,d, 12,4)			
17	-		46,5	Cq	
18	3,51	(1H,s large)	44,6	CH	C-12,C-13, C-16,C-17,C-28
19	3,55	(1H, s large)	81,0	CH	
20	-		35,5	Cq	
21	2,03		28,9	CH <sub>2</sub>	
22 a	1,43		33,5	CH <sub>2</sub>	C-28
22 b	1,51				
23	1,56	(3H, s)	24,1	CH <sub>3</sub>	C-3,C-4,C-5,C-24
24a	3,73	(1H, m)	65,6	CH <sub>2</sub>	C-3,C-4,C-23
24b	4,44	(1H, t, 9,8)			
25	1,03	(3H, s)	17,2	CH <sub>3</sub>	C-1,C-5,C-10
26	1,13	(3H, s)	17,5	CH <sub>3</sub>	C-8,C-9
27	1,58	(3H, s)	24,8	CH <sub>3</sub>	C-13,C-14,C-15
28	-		177,2	Cq	
29	1,12	(3H, s)	28,7	CH <sub>3</sub>	C-19,C-20,C-21,C-30
30	0,96	(3H, s)	24,6	CH <sub>3</sub>	C-19,C-20,C-21
1'	6,36	(1H,d, 8,1)	95,9	CH	C-3',C-28
2'	4,21	(1H, m)	74,2	CH	
3'	4,28	(1H,t, 7,8)	79,0	CH	
4'	4,35	(1H)	71,1	CH	
5'	4,03	(1H)	79,3	CH	
6'	4,4	(2H)	62,2	CH <sub>2</sub>	

**Tableau 8** : Corrélations COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et HMBC de ALec1B

N°	COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H	ROESY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H	HMBC
1 a 1 b	H-1b H-2	H-1b	
2	H-3,H-1a,H-1b		
3			
4			
5			
6 a 6 b			
7 a 7 b			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15 a 15 b		15 b	
16 a 16 b	H-16b,H-15a -	H-16b	
17			
18			
19β		H-30	
20			
21			
22 a 22 b			
23			
24a 24b	H-23b	H-23b	
25	H-11	H-2β	
26			
27			
28			
29			
30			
1'	H-5'		
2'	H-2'		
3'			
4'			
5'	H-6'		
6'			
19-OHα		H-19β	C-19,C-18,C-20

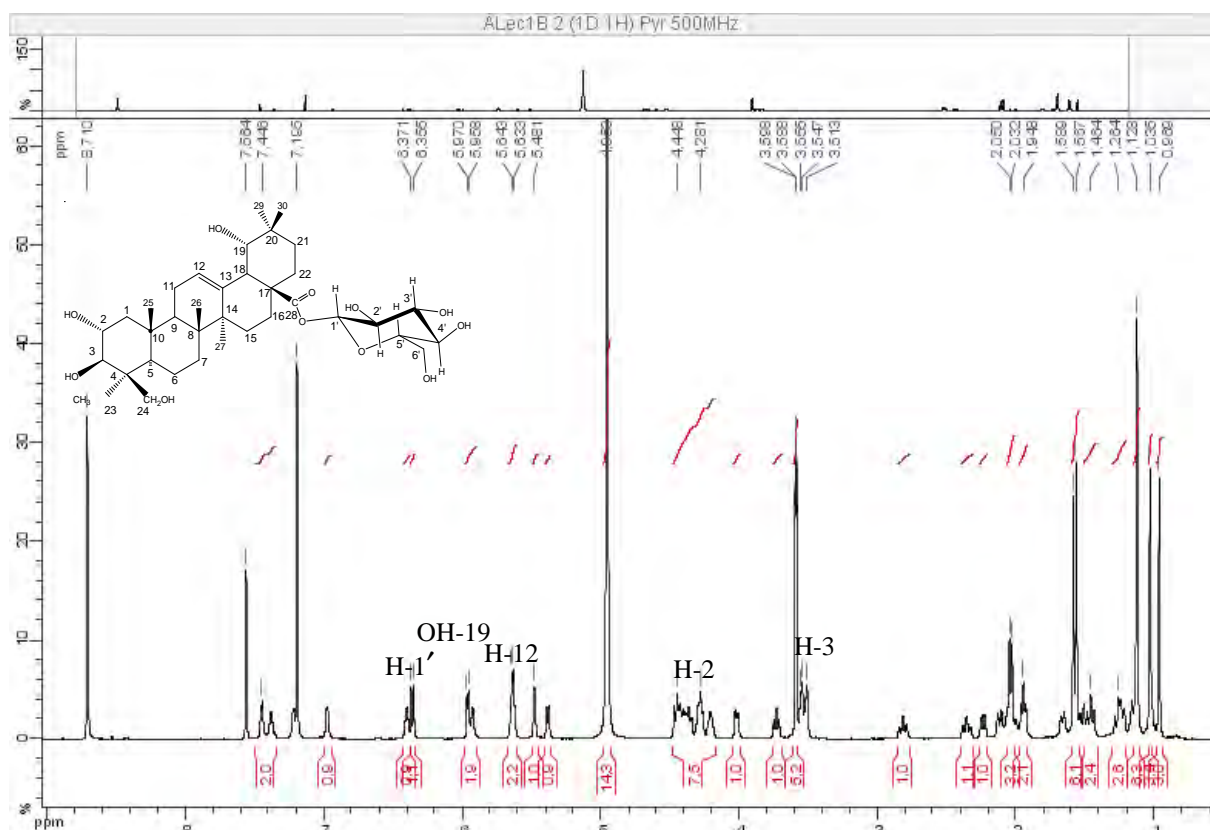


Figure 23 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALec1B (pyridine- $d_5$ ).

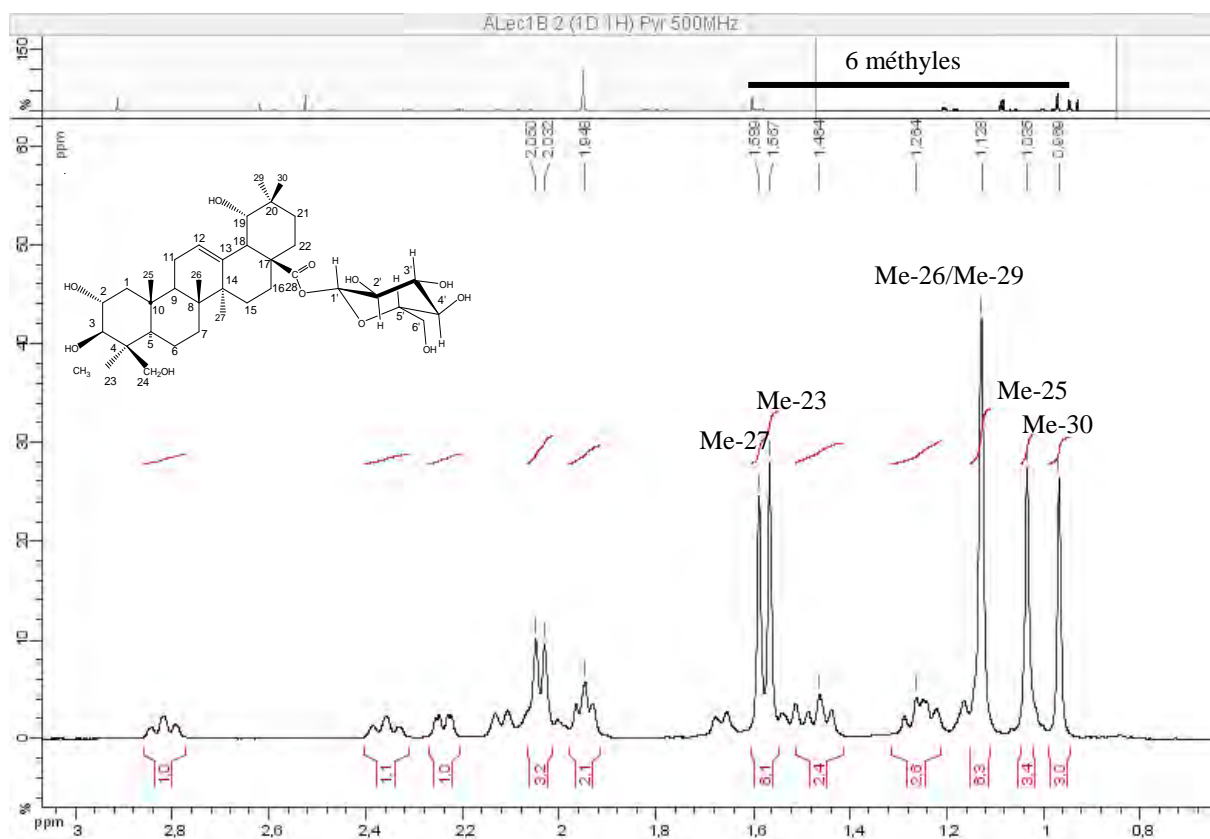
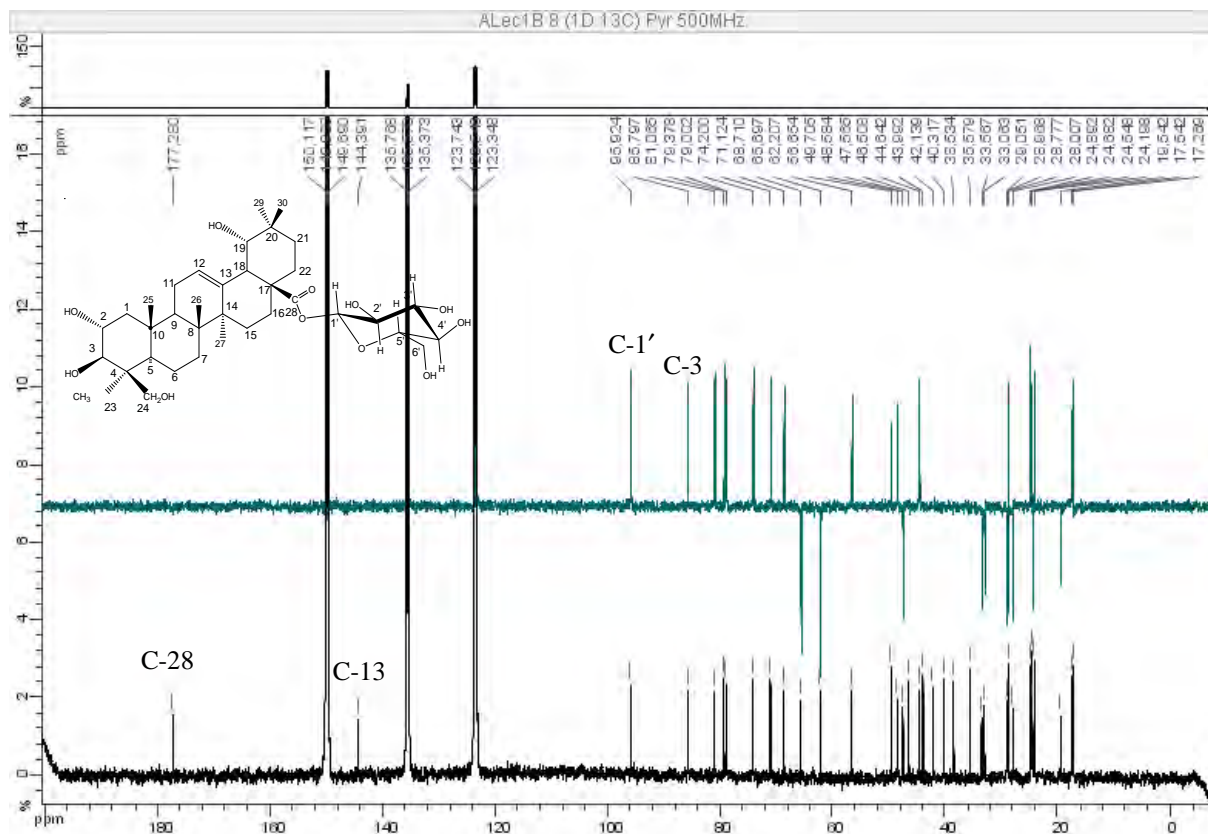
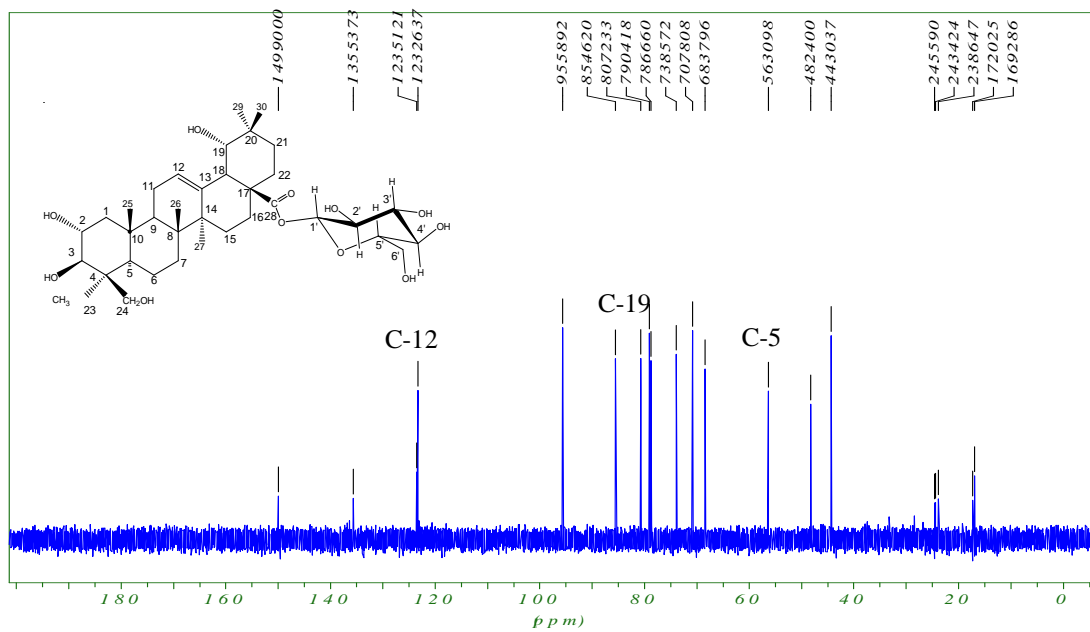


Figure 24 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALec1B (pyridine- $d_5$ ).

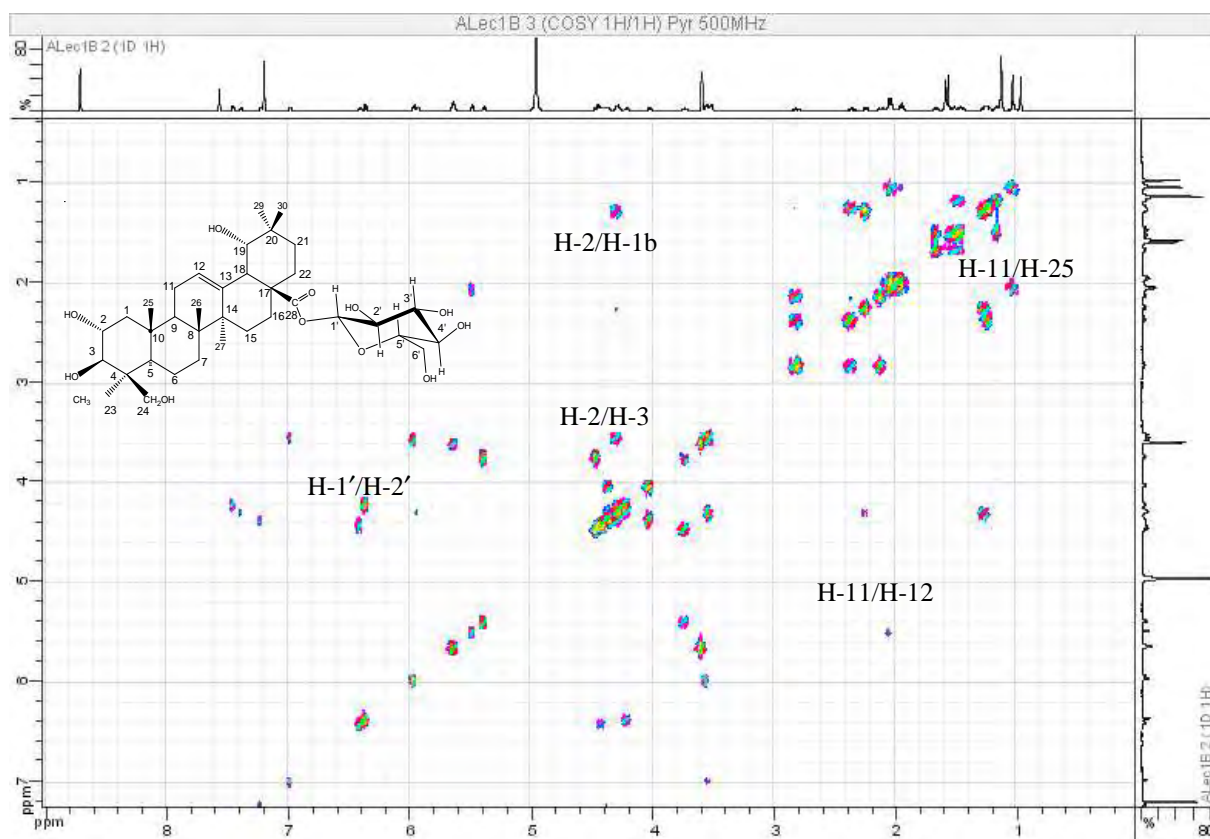


**Figure 25 :** Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT135 et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de ALec1B (pyridine-*d*5).

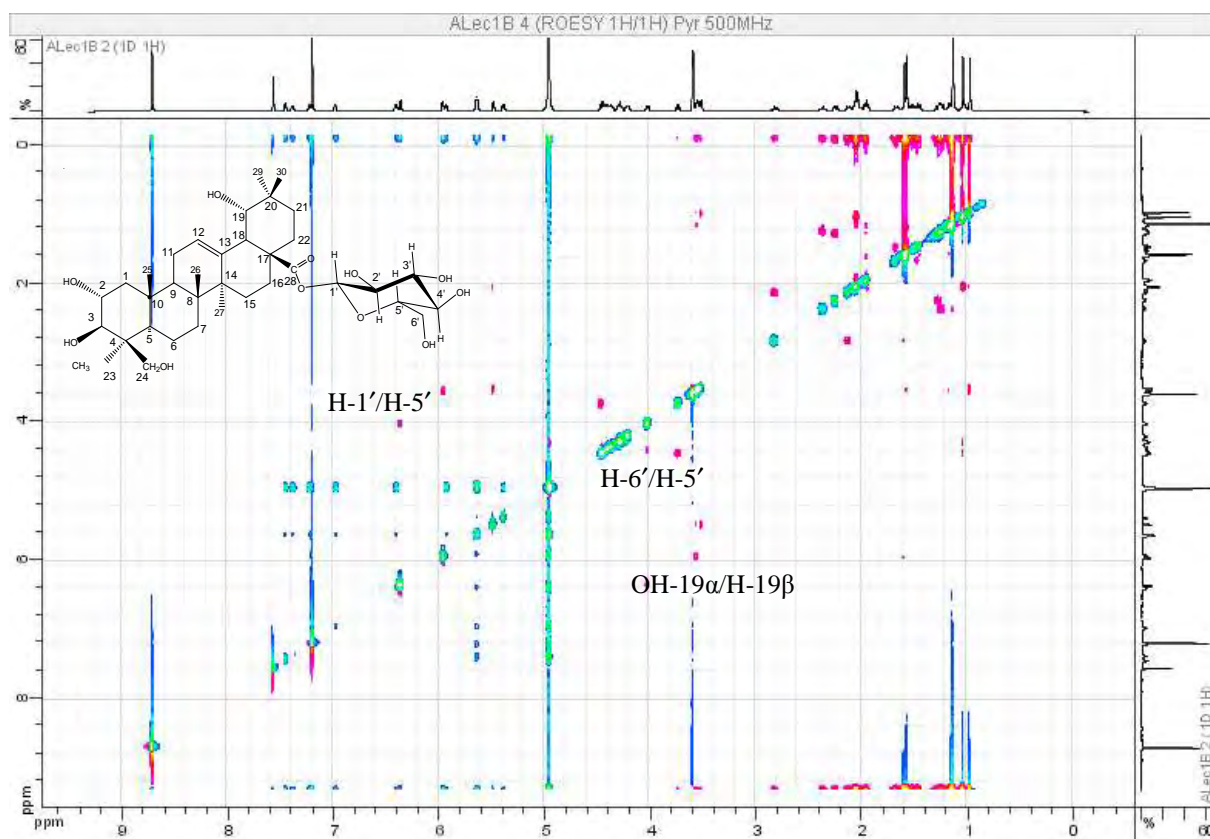


**Figure 26 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT90 (125 MHz) de ALec1B (pyridine-*d*5).

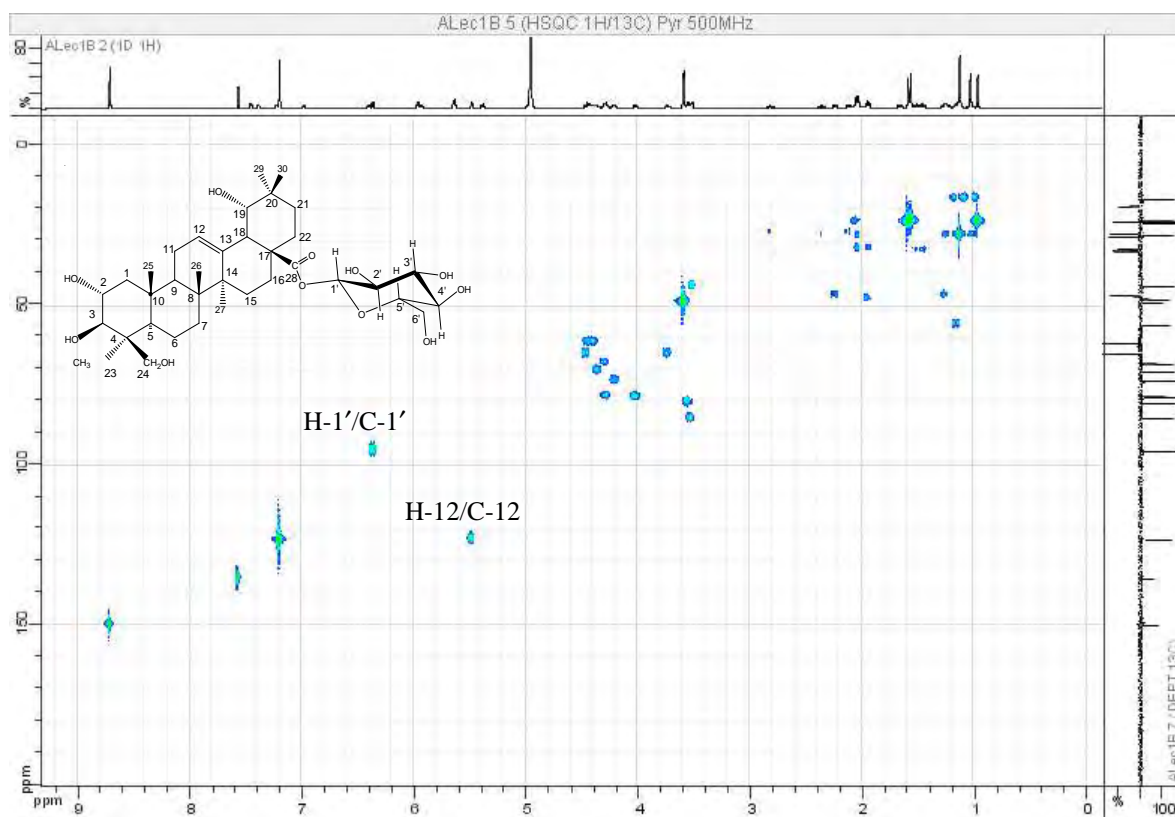




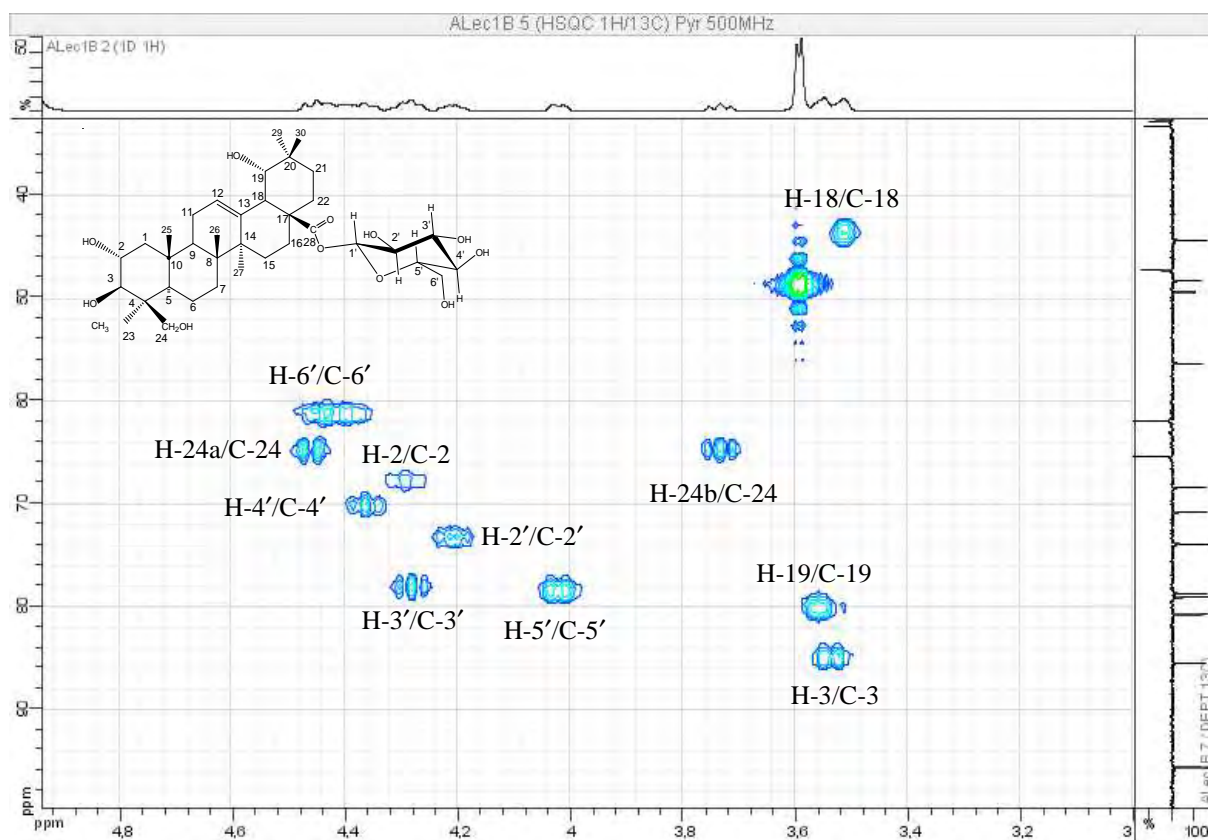
**Figure 27** : Spectre RMN COSY- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALec1B (pyridine-*d*5).



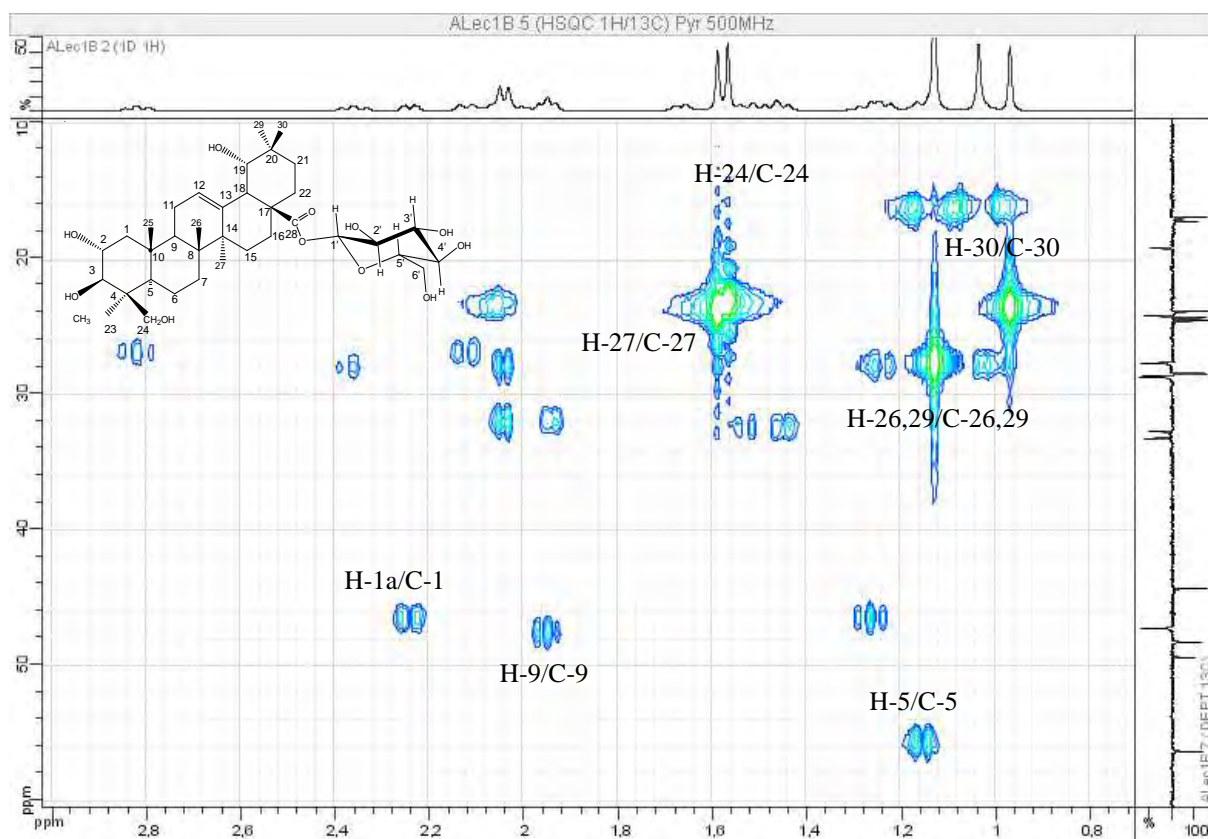
**Figure 28** : Spectre RMN ROESY- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALec1B (pyridine-*d*5)



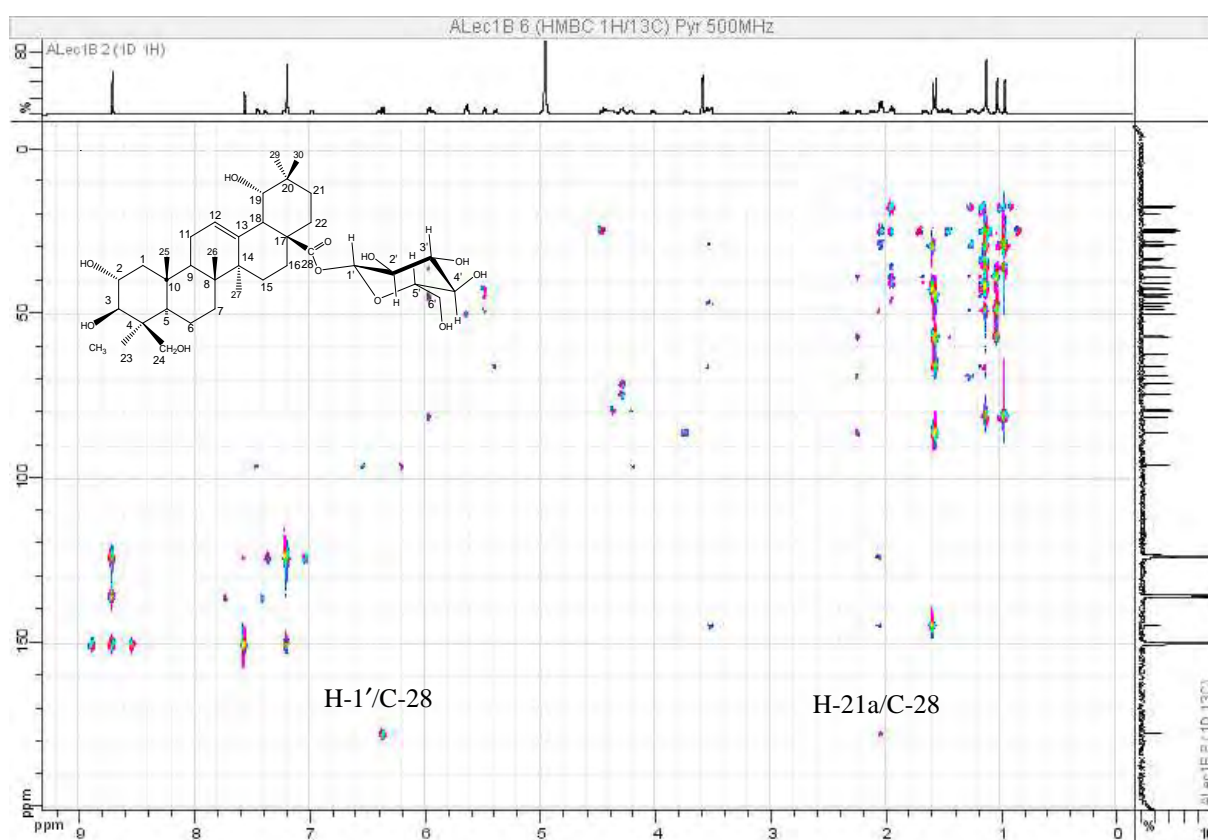
**Figure 29 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (500 MHz) du composé ALec1B (pyridine-*d*5).



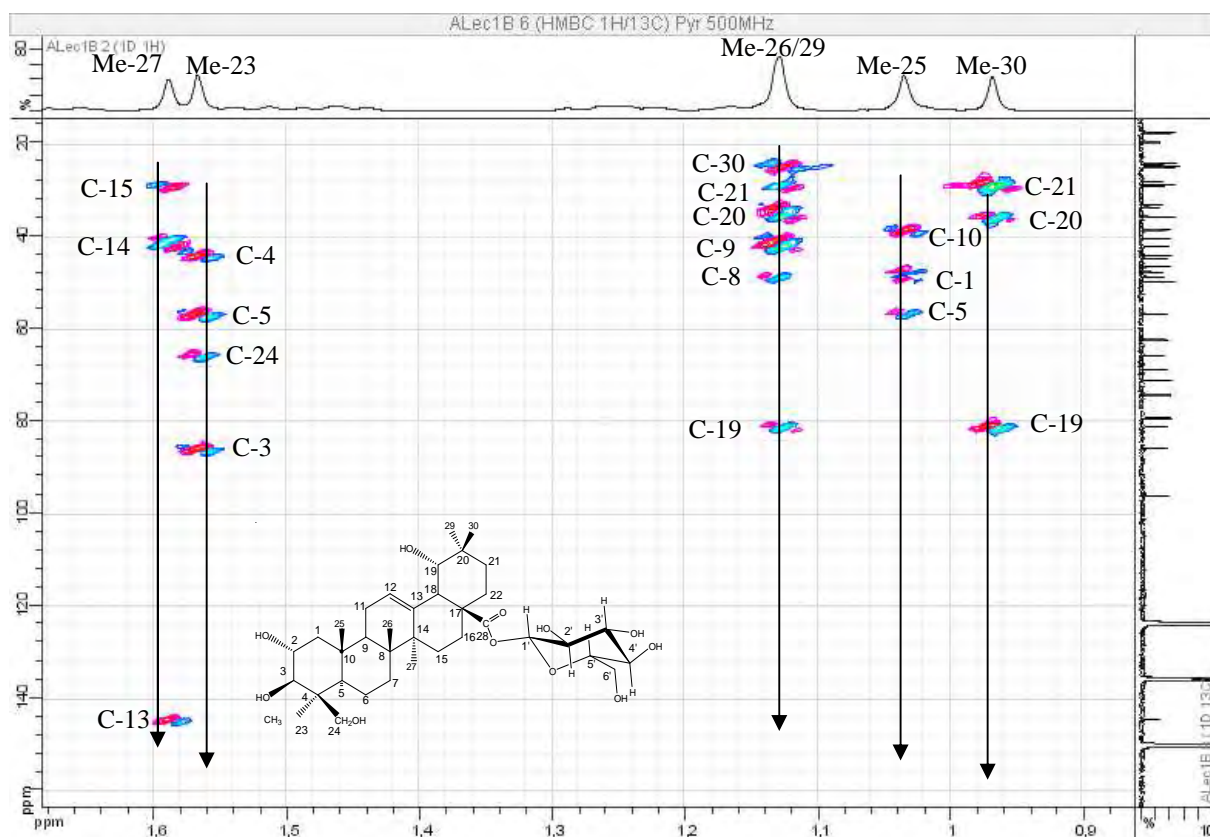
**Figure 30 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (500 MHz) du composé ALec1B (pyridine-*d*5).



**Figure 31** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (500 MHz) du composé ALec1B (pyridine-*d*5).



**Figure 32** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (500 MHz) du composé ALec1B (pyridine-*d*5).



**Figure 33** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (500 MHz) du composé ALec1B (pyridine- $d_5$ ).

### 8.1.3. Elucidation structurale du composé ALec2C

15 mg de ALec2C ont été purifiés par CLHP préparative à partir de la fraction ALec2. Le produit purifié se présente sous forme d'une poudre blanche. Le test Lieberman-Burchard est positif (couleur rouge), suggérant une structure triterpénique de type oléanane ou ursane. Son spectre UV montre aussi un  $\lambda_{\max}$  à 205 nm ce qui atteste sa nature terpénique (figure 10).

Le spectre de masse a donné un ion pseudo-moléculaire  $[M^+]$  à  $m/z = 520$ ; ce qui correspond à la formule brute  $C_{30}H_{48}O_7$  ce qui confirme qu'il s'agit d'un triterpène à 30 carbones. On déduit la présence de six unités d'insaturations d'après la formule brute de la molécule dont 5 insaturations due au système pentacyclique et une insaturation attribuée à une double liaison.

Le spectres RMN  $^1H$  montre des caractéristiques spectrales typiques d'un triterpène poly-oxygéné. La différence de masse entre le composé ALec1A et ALec2C est de (162), ce qui correspond à la perte du glucose de ALec1A, donc ALec2C pourrait être la sapogénine du trachélospéroside E1 ( $C_{36}H_{58}O_{12}$ ). Cette suggestion est appuyée davantage par les spectres RMN  $^1H$ , HMBC et HSQC qui montrent une grande similitude structurale entre ALec-2C et ALec1A. La comparaison des spectres carbone et proton de ALec2C avec ceux de ALec1A et ALec1B a permis de localiser les groupements hydroxyles de ALec2C en positions C-2, C-3, C-19, C-23 et C-24.

Le spectre RMN  $^1H$  figures (34-35) suggère la présence de 2 hydroxyles primaires à C-23 et C-24 (2 paires de doublets à  $\delta$  4,61 et 3,99 ; et 4,87 et 4,26, tous deux avec une constante de couplage de 11Hz). On note aussi la présence d'un proton oléfinique  $\Delta^{12}$  ( $\delta$  5,53 ; s large) qui justifie l'insaturation signalée dans la formule brute de ALec2C. De plus, le spectre RMN  $^1H$  (figures 34-35) montre 5 groupements méthyles tertiaires ( $\delta$  1,03 ; 1,09; 1,11; 1,17 et 1,56). Ces valeurs sont similaires à celles trouvées dans ALec1A.

Ce même spectre montre un doublet  $\delta$  4,34 (1H, d,  $J = 9,3$  Hz) correspondant au proton H-3 qui corrèle dans le spectre COSY  $^1H$ - $^1H$  (figures 36) avec le proton à  $\delta$  4,44 ppm (1H, ddd, 4,0;7,3;11,3, H-2) et ce dernier avec le proton à  $\delta$  1,39 ppm (1H, t,11,9) et 2,3 (1H,dd,11,5;3,2). Ce résultat montre que C-3 et C-2 sont oxygénés et que C-1 porte 2H. La grande constante de couplage de H-3 à  $\delta$  4,34 ( $J = 9,3$  Hz) montre une interaction type axial-axial entre H-2 et H-3. Leurs déplacements chimiques respectifs en  $^{13}C$  [ $\delta_c$  68,6 (C-2) et 79,4

(C-3)] (tableau 9), confirment la configuration de 2 $\alpha$  et 3 $\beta$ -OH, qui a été bien illustrée par Kojima *et al.*, (1989).

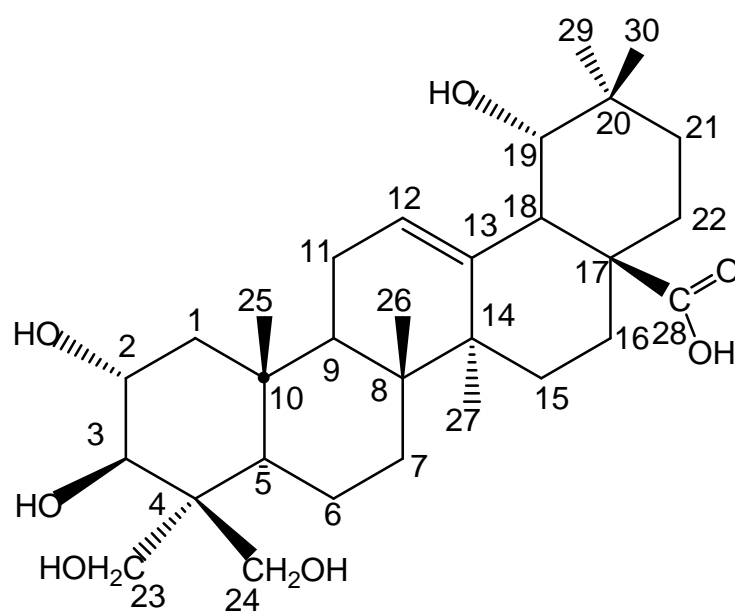
La configuration  $\beta$  a été attribuée à l'hydroxyméthine H-19 à cause de la constante de couplage  $^3J$  (4,9 Hz) avec H-18, indiquant une configuration *cis*.

Les attributions complètes des RMN  $^1H$  et  $^{13}C$  ont été effectués par **COSY  $^1H$ - $^1H$**  (figures 36) et **HSQC** (figures 38-39) pour les connectivités directes  $^1J_{H-C}$  et l'HMBC pour les corrélations longue distance  $^2J_{H-C}$  et  $^3J_{H-C}$  (figures 40-42).

Les valeurs  $\delta_c$  du  $^{13}C$  (tableau 9) sont superposables à celles de ALec1A (tableau 6).

Ainsi la structure de l'aglycone ALec2C a été établie comme étant l'**acide 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,23,24-pentahydroxyléan-12-èn-28-oïque ou trachéospérogénine E**.

Ce composé a été isolé de l'écorce de *Terminalia bellerica* (Mahato *et al.*, 1992) ainsi que de *Trachelospermum asiaticum* (Fumiko etTatsuo, 1987).



**acide 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,23,24-pentahydroxyléan-12-èn-28-oïque  
ou trachéospérogénine E**

**Tableau 9** : Données RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de ALec2C (pyridine- $d_5$ ).

N°	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	type	HMBC
1 a	2,3	(1H,dd,11,5;3,2 )	47,1	CH <sub>2</sub>	
1 b	1,39	(1H, t,11,9)			
2	4,44	(1H, ddd, 4,0;9,3;11,9)	68,6	CH	C-3
3	4,34	(1H, d, 9,3)	79,4	CH	C-1,C-23,C-2
4	-		48,0	Cq	
5	3,86	(1H, q, 7,0)	56,6	CH	
6 a	1,62	(1H, s large)	18,8	CH <sub>2</sub>	
6 b	1,97	(1H, s large)			
7 a	1,67		32,8	CH <sub>2</sub>	
7 b	1,32				
8	-		40,0	Cq	
9	2,0		47,8	CH	
10	-		38,0	Cq	
11	2,09		24,5	CH <sub>2</sub>	
12	5,53	(1H, s large)	122,8	CH	C-14,C-18,C-9
13	-		144,5	Cq	
14	-		41,5	Cq	
15			29,1	CH <sub>2</sub>	
16			28,1	CH <sub>2</sub>	
17	-		45,6	Cq	
18	3,61	(1H, s large)	44,4	CH	
19	3,57	(1H, d, 4,9)	80,8	CH	
20	-		35,7	Cq	
21			29,2	CH <sub>2</sub>	
22 a	2,01		33,3	CH <sub>2</sub>	
22 b	2,17				
23 a	4,87	d (1H, d, 11,0)	62,4	CH <sub>2</sub>	C-5,C-3
23 b	4,26	d ( 1H, d, 10,8)			C-3
24 a	4,61	(1H, d, 11,3)	63,9	CH <sub>2</sub>	C-24
24 b	3,99	(1H, d, 10,7)			
25	1,11	(3H, s)	16,5	CH <sub>3</sub>	C-1,C-10
26	1,03	(3H, s)	16,7	CH <sub>3</sub>	C-14
27	1,56	(3H, s)	24,8	CH <sub>3</sub>	C-15,C-14,C-13,C-8
28	-		178,4	Cq	
29	1,17	(3H, s)	28,5	CH <sub>3</sub>	C-21,C-20,C-19,C-30
30	1,09	(3H, s)	24,4	CH <sub>3</sub>	C-21,C-20,C-19

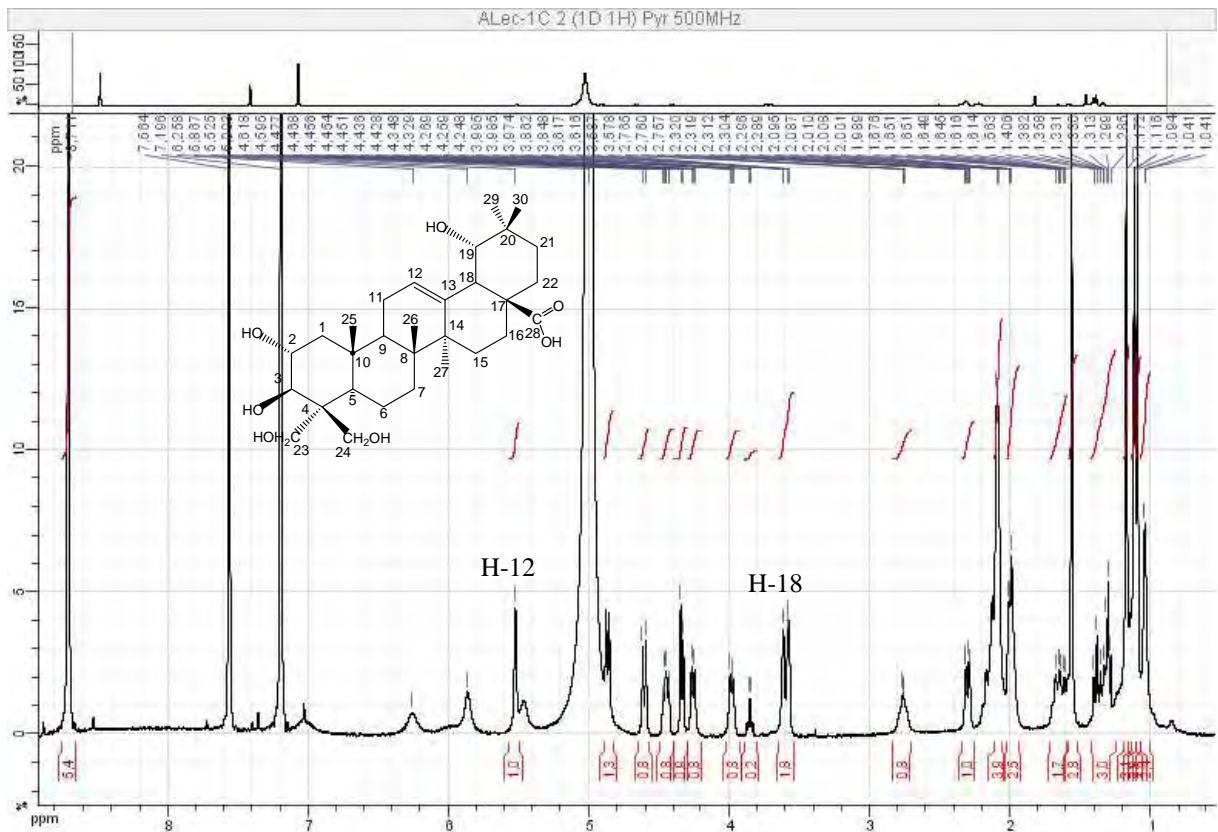


Figure 34 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALeC2C (pyridine- $d_5$ ).

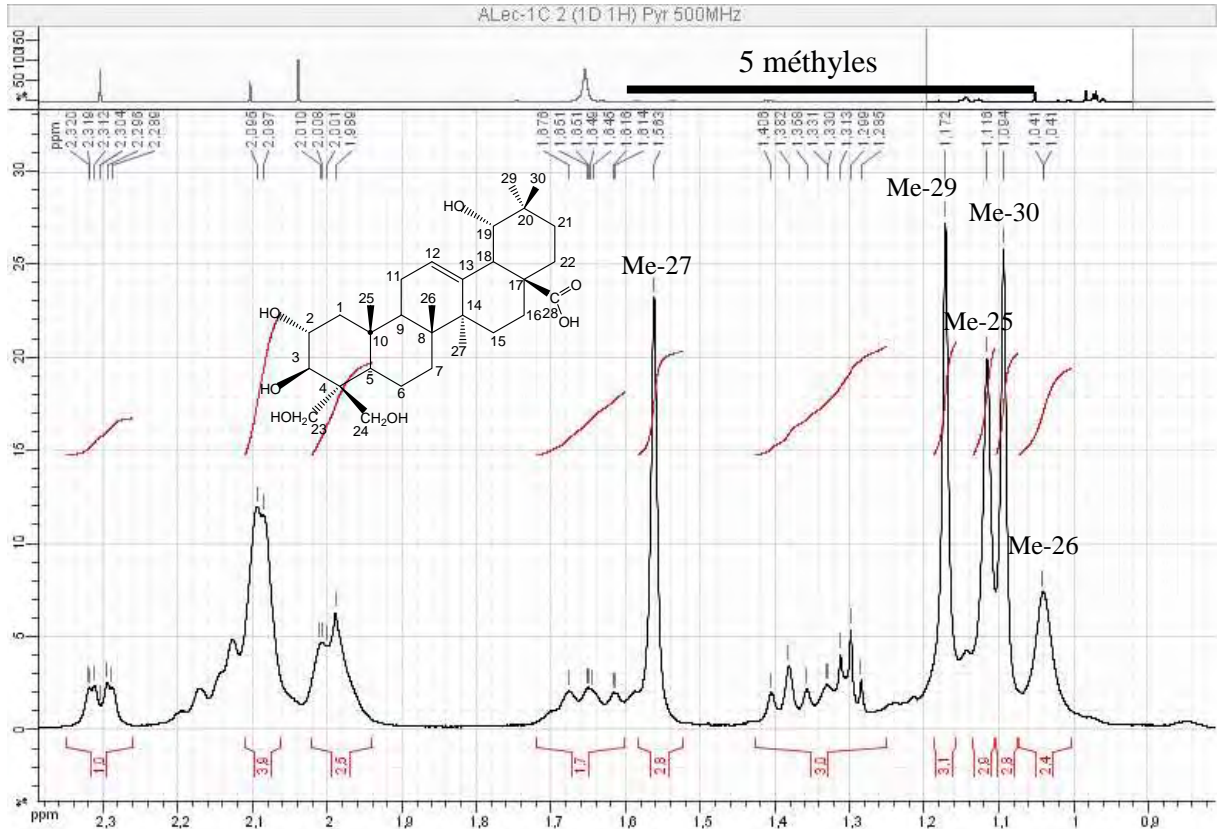
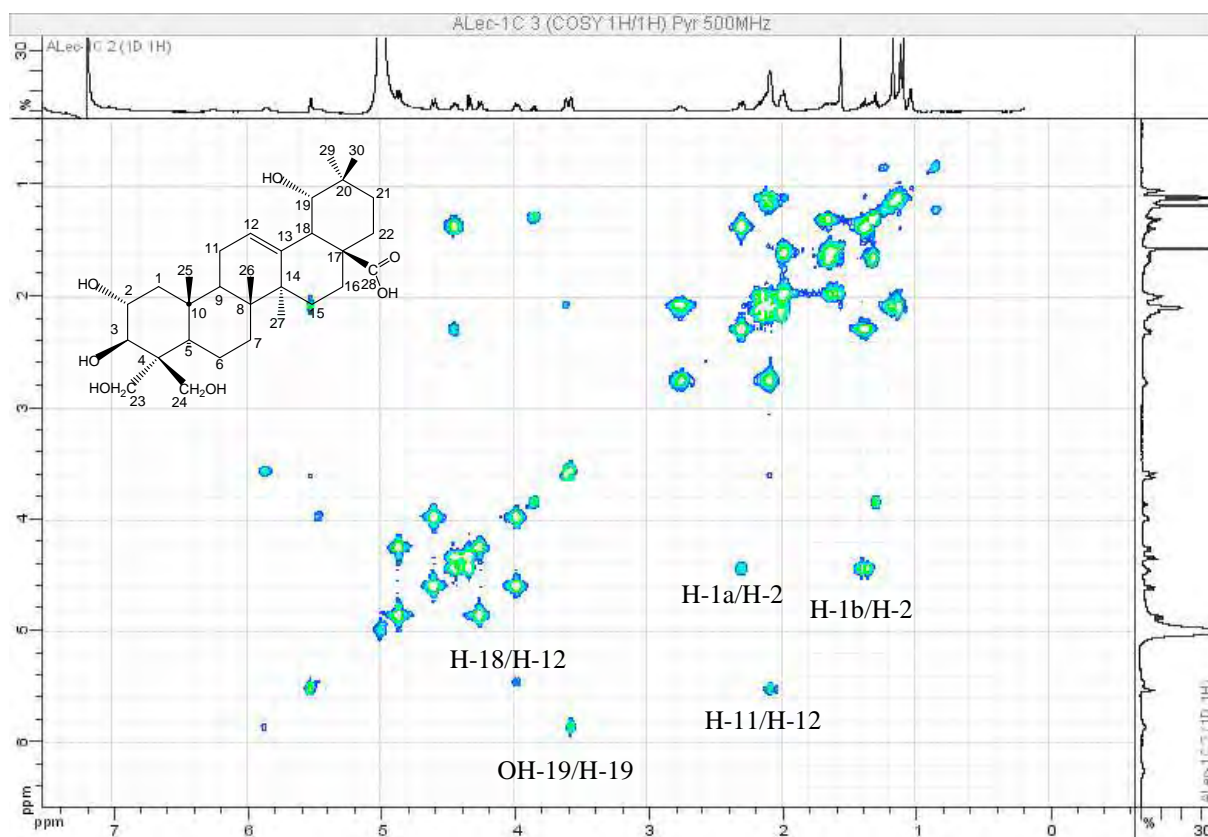
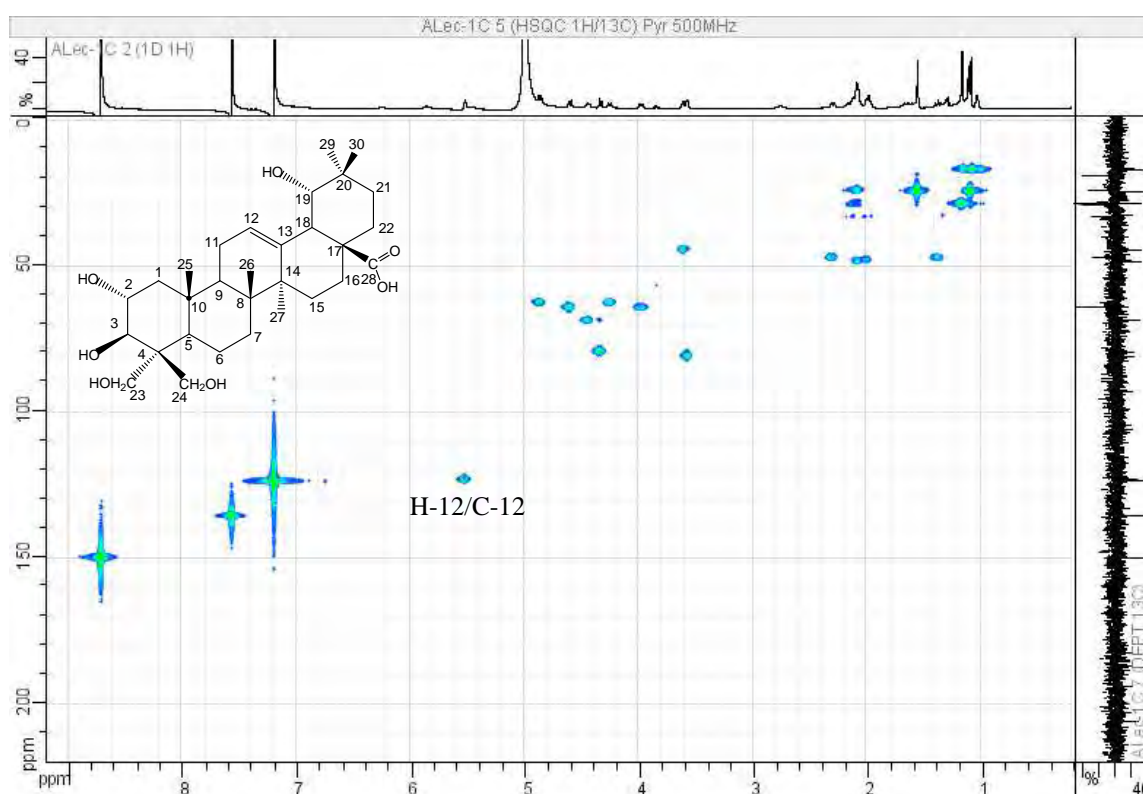


Figure 35 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALeC2C (pyridine- $d_5$ ).

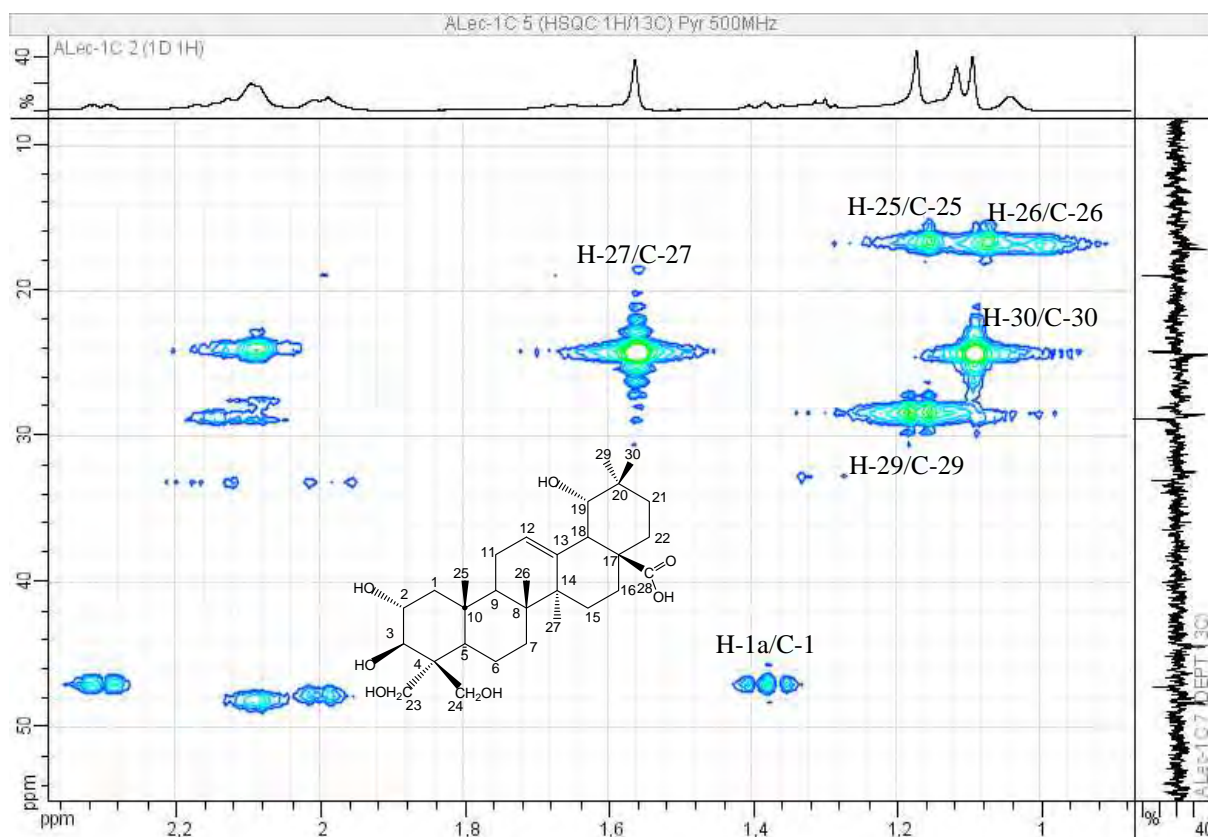




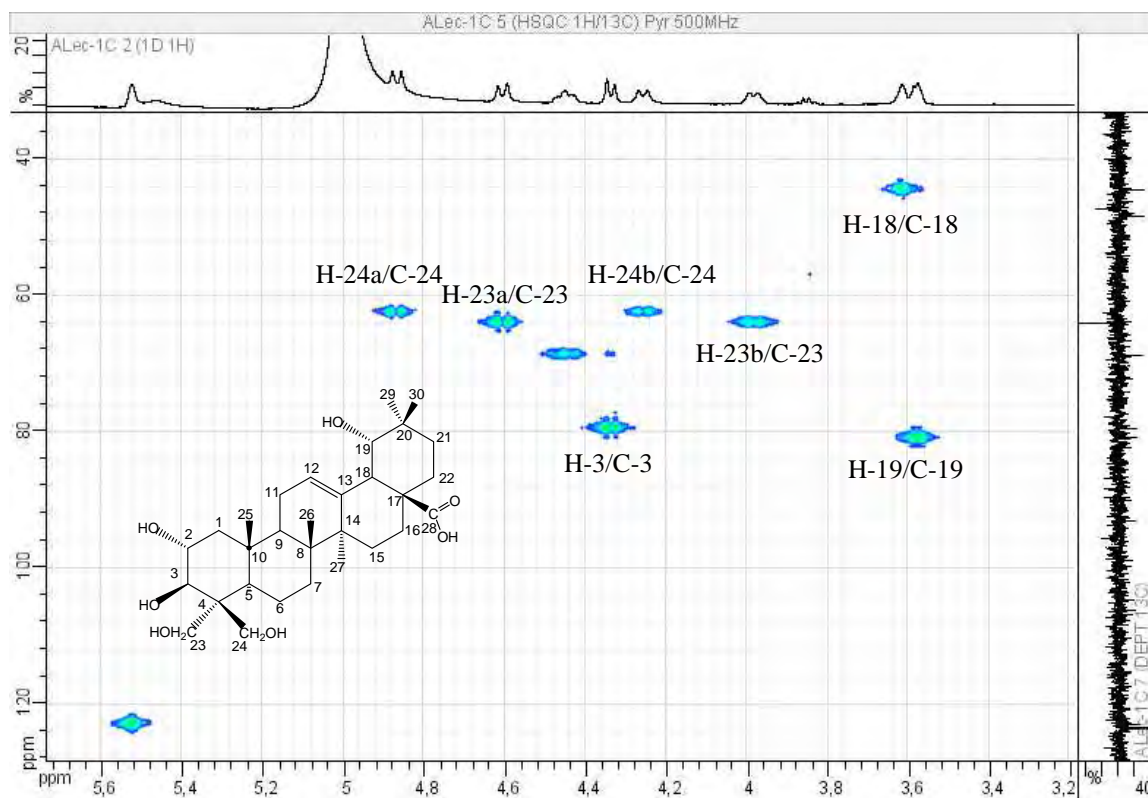
**Figure 36 :** Spectre RMN COSY- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALec2C (pyridine- $d_5$ ).



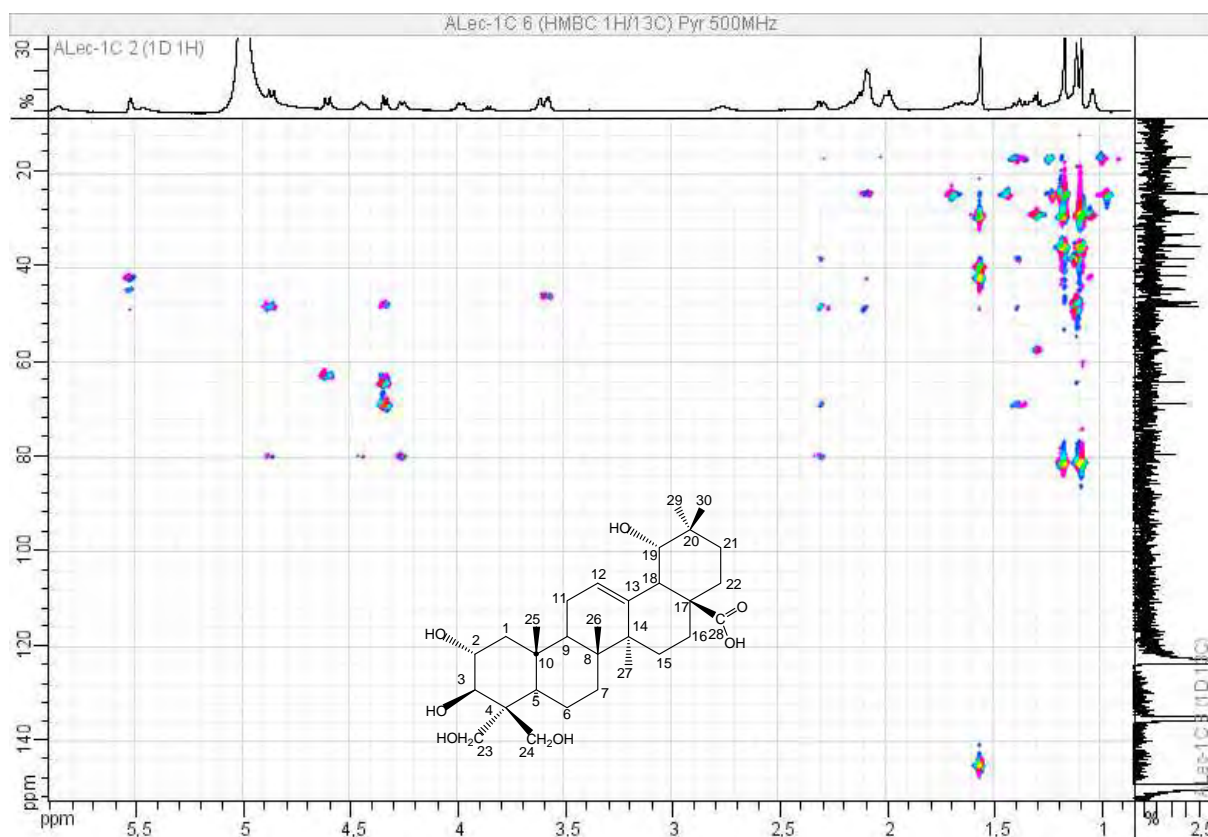
**Figure 37 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (500 MHz) du composé ALec2C (pyridine- $d_5$ ).



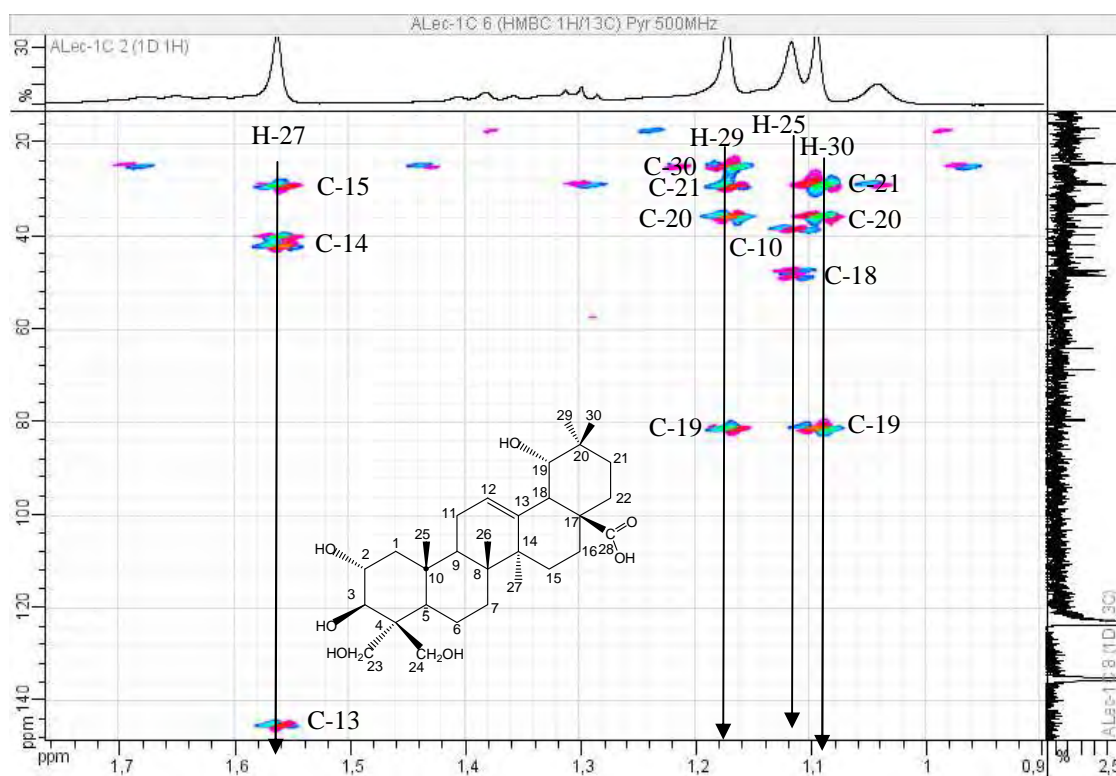
**Figure 38** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (500 MHz) du composé ALec2C (pyridine-*d*5).



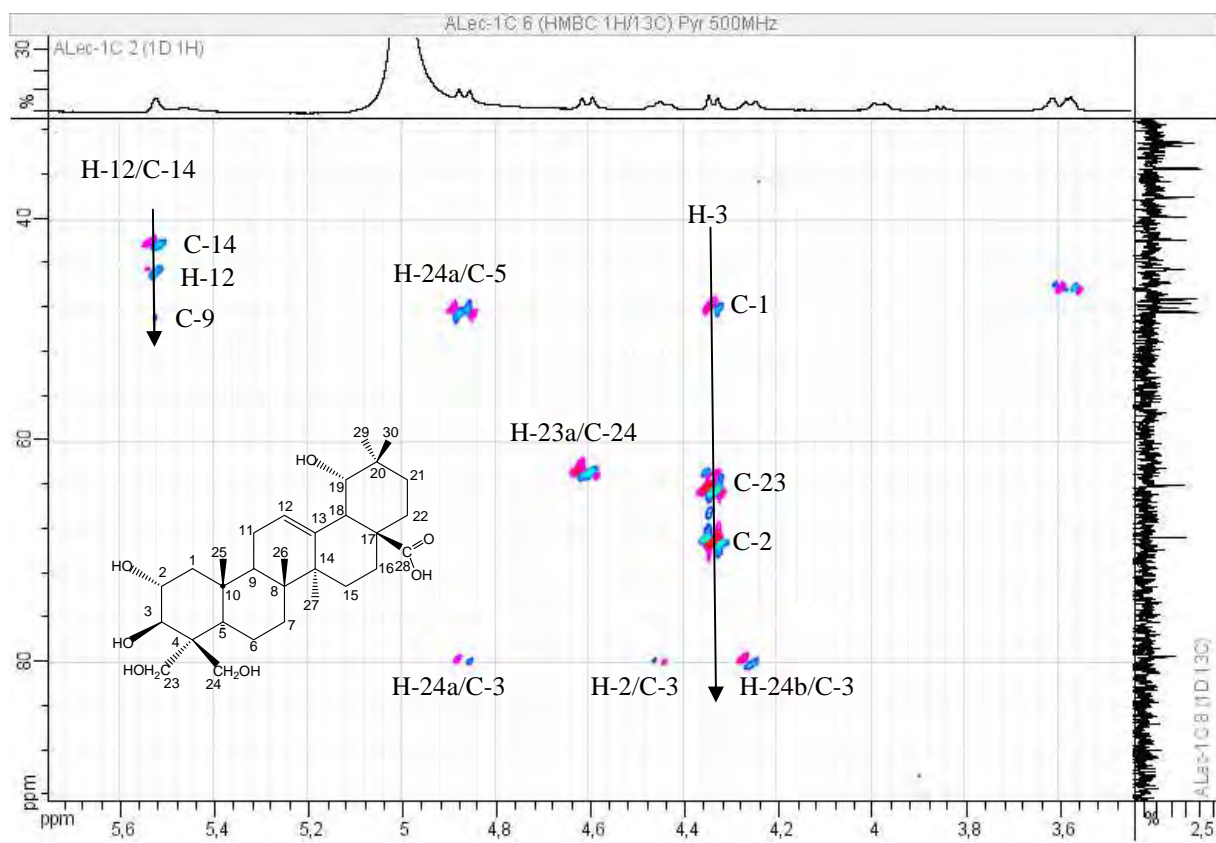
**Figure 39** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (500 MHz) du composé ALec2C (pyridine-*d*5).



**Figure 40 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (500 MHz) du composé ALec2C (pyridine- $d_5$ ).



**Figure 41 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (500 MHz) du composé ALec2C (pyridine- $d_5$ ).



**Figure 42** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (500 MHz) du composé ALec2C (pyridine- $d_5$ ).

#### 8.1.4. Elucidation structurale du composé ALec2D

Le composé ALec2D (5 mg) a été purifié par CLHP préparative à partir de la fraction ALec2. (figure 5). Il se présente sous forme d'une poudre blanche. Le test Lieberman-Burchard est positif (couleur rouge) indiquant la classe chimique comme étant un triterpène de type oléane ou ursane. La structure triterpénique a été confirmée par le spectre UV à 205 nm (figure 10).

La masse moléculaire du composé obtenue par ESI a donné un ion pseudo-moléculaire à  $[M^+]$   $m/z = 504$  Da.

Les spectres RMN  $^{13}C$ ,  $^{13}C$  DEPT 135 (figure 46) montrent 30 carbones : un groupement carbonyle, deux carbones éthyléniques, 6 méthyles tertiaires, 1 méthylène oxygéné, 8 méthylènes, 3 méthines oxygénés, 3 méthines non oxygénés et 6 carbones quaternaires. Ainsi, on déduit la formule brute du composé ALec2D ( $C_{30}H_{48}O_6$ ), ce qui suggère comme un triterpène pentacyclique. La différence de masse montre que la structure de notre composé est celle de ALec1B amputé d'un glucose, ce qui correspond à la perte du glucose de ALec1B. Nous en déduisons que ALec2D pourrait être la sapogénine du séricoside ( $C_{36}H_{58}O_{11}$ ), l'acide séricique. La comparaison des spectres RMN  $^{13}C$  de ALec1B et ALec2D montre en effet une superposition des  $\delta_c$  des deux aglycones (figure 47).

Le spectre IR (infra-rouge) présente des bandes d'absorption de groupements hydroxyles ( $3352\text{ cm}^{-1}$ ) et un carbonyle ( $C=O\ 1695\text{ cm}^{-1}$ ).

Le point de fusion mesuré de ALec2D est de  $282\text{-}284^\circ\text{C}$ .

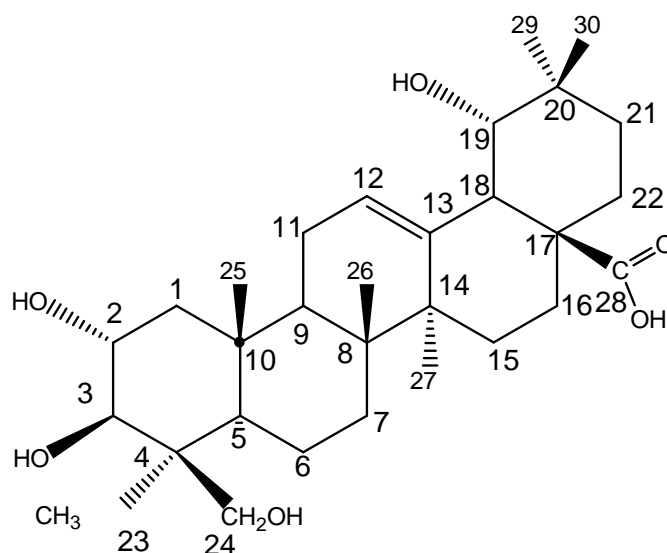
Le spectre RMN  $^1H$  montre un proton oléfinique  $\delta_H\ 5,53$  (1H, s large) (figure 43). La présence d'une double liaison en C-12 a été confirmée par le  $\delta_c$  de C-12 ( $\delta_c\ 123,1$ ) et C-13 ( $\delta_c\ 145$ ) caractéristique de  $\Delta^{12}$  oléanène (Mahato et Kundu, 1994). L'identification des méthyles a permis comme dans les cas précédents d'identifier tous les autres  $\delta$  des protons et des carbones de l'aglycone grâce aux corrélations HMBC et HSQC. (figures 48-52).

Le proton  $\delta\ 3,55$  (1H, d, 9,25, H-3,  $\delta_c\ 85,7$ ) et  $^1H\delta\ 4,3$  (1H, ddd,  $\delta_c\ 68,6$ ) montre, une configuration dihydroxyle  $2\alpha, 3\beta-$ . La valeur élevée de la constante de couplage  $J_{H-2-H-3}$

indique une position axial-axial (*trans*) de H-2/H-3 et confirme la stéréochimie de H-2 $\beta$  et H-3 $\alpha$  (2  $\alpha$ -OH, 3  $\beta$ -OH) (figure 45) (tableau 10).

Ainsi la structure de la sapogénine triterpénique **Alec2D** a été déterminée à l'**acide 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,24-tétrahydroxyléan-12-èn-28-oïque** ou **acide séricique**.

Ce composé a été identifié dans les racines de *Terminalia sericea* (Bombardelli *et al.*, 1974), les écorces de *T. ivorensis* (Iwu et Anyanwu, 1982) et *T. macroptera* (Conrad *et al.*, 1998) et enfin les racines de *Rosa multiflora* (Yeo *et al.*, 1998).



**Acide 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,24-tétrahydroxyléan-12-èn-28-oïque (acide séricique).**

**Tableau 10** : Données RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de Alec-2D (pyridine- $d_5$ ).

N°	$^1\text{H}$	$J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$	type	HMBC
1a 1b			47,4	$\text{CH}_2$	C-2,C-3,C-5,C-10,C-25
2	4,3	(1H, ddd)	68,6	CH	
3	3,55	(1H,d, 9,25)	85,7	CH	C-2,C-4,C-23,C-24
4	-		43,9	$\text{C}_q$	
5	1,85	(1H,s)	56,6	CH	
6a 6b			19,3	$\text{CH}_2$	
7a 7b	2,14 1,35	(1H, dd)	33,6	$\text{CH}_2$	
8	-		40,0	$\text{C}_q$	
9	2,0		48,5	CH	
10	-		38,5	$\text{C}_q$	
11			24,5	$\text{CH}_2$	
12	5,53	(1H, s large)	123,1	CH	C-9,C-14,C-18
13	-		145	$\text{C}_q$	
14	-		42,1	$\text{C}_q$	
15a 15b	1,1 1,46		29,1	$\text{CH}_2$	
16a 16b			28,1	$\text{CH}_2$	
17	-		46,0	$\text{C}_q$	
18	3,63	(1H, d)	44,8	CH	C-12,C-13,C-16,C-17,C-28
19	3,61	(1H, d)	81,2	CH	
20	-		35,7	$\text{C}_q$	
21a 21b			29,2	$\text{CH}_2$	
22a 22b	2,25 1,52	(1H, dd)	33,6	$\text{CH}_2$	
23	1,57	(3H, s)	24,1	$\text{CH}_3$	C-3,C-4,C-5,C-24
24a 24b	3,73 4,46	(1H, d) (1H, d)	65,6	$\text{CH}_2$	C-3,C-4,C-23
25	1,01	(3H, s)	17,4	$\text{CH}_3$	C-1,C-5,C-10
26	1,03	(3H, s)	17,1	$\text{CH}_3$	C-7,C-8,C-9,C-14
27	1,61	(3H, s)	24,8	$\text{CH}_3$	C-13,C-14,C-15
28	-		181,2	$\text{C}_q$	
29	1,17	(3H, s)	28,8	$\text{CH}_3$	C-19,C-20,C-21,C-30
30	1,1	(3H, s)	24,8	$\text{CH}_3$	C-19,C-20,C-21

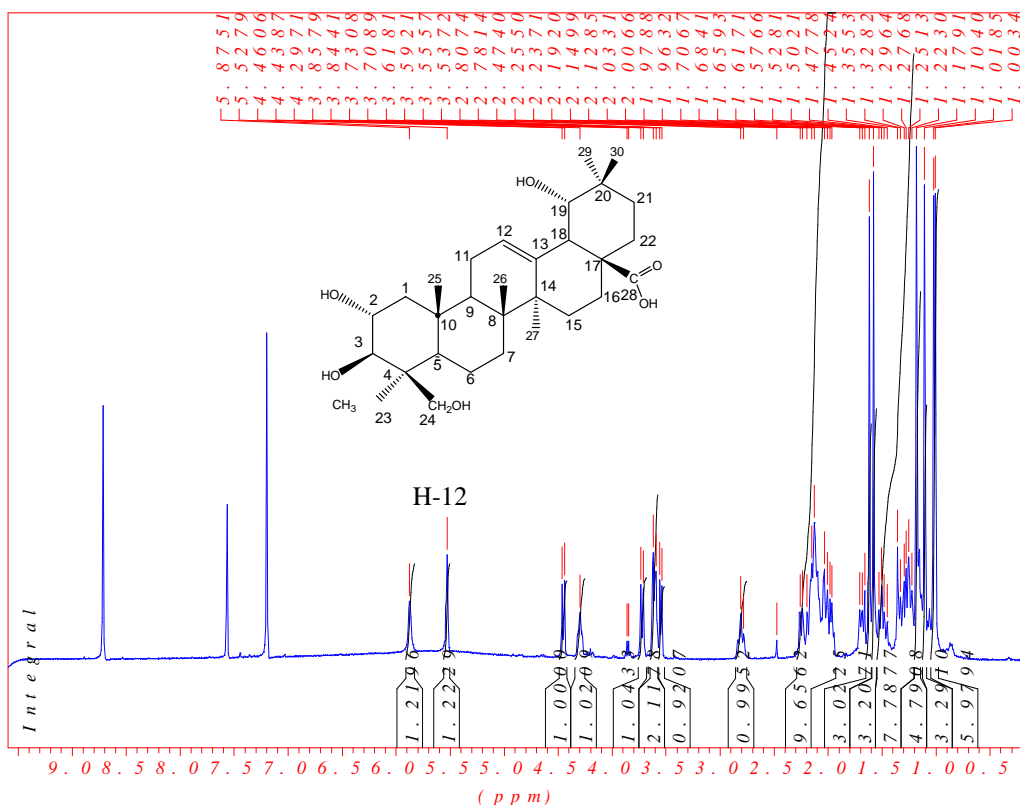


Figure 43 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALec2D (pyridine- $d_5$ ).

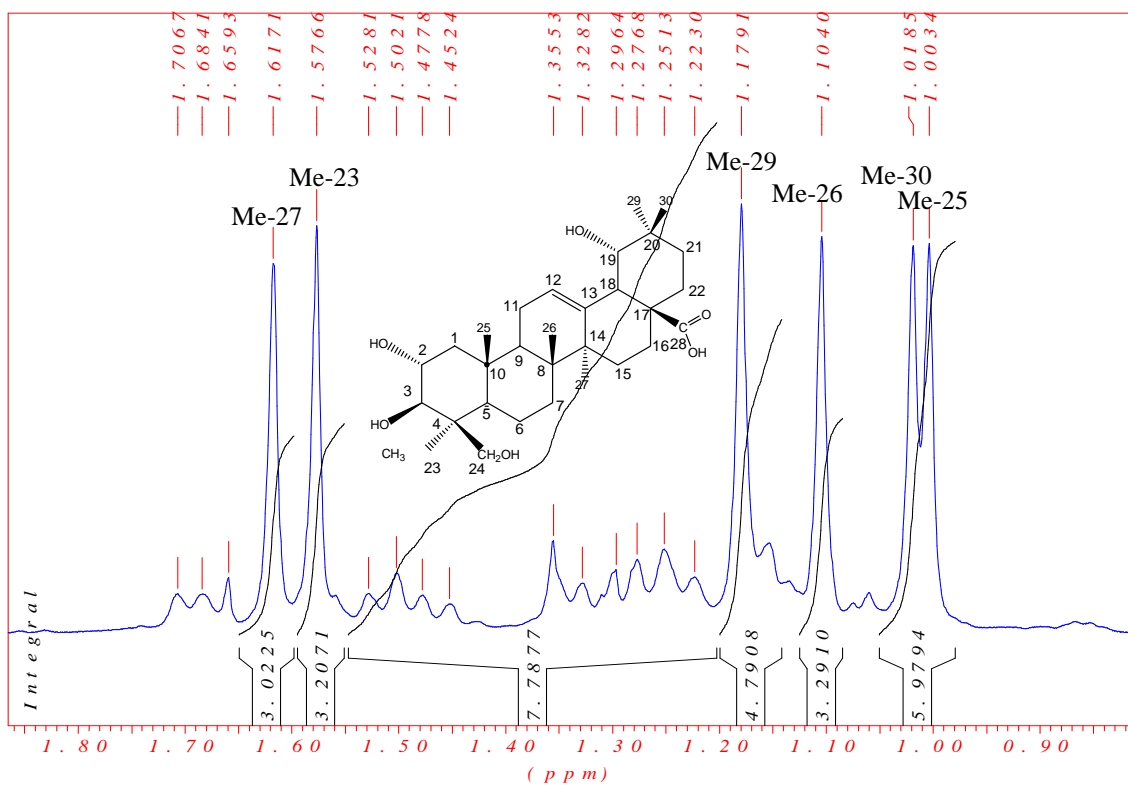


Figure 44 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALec2D (pyridine- $d_5$ ).



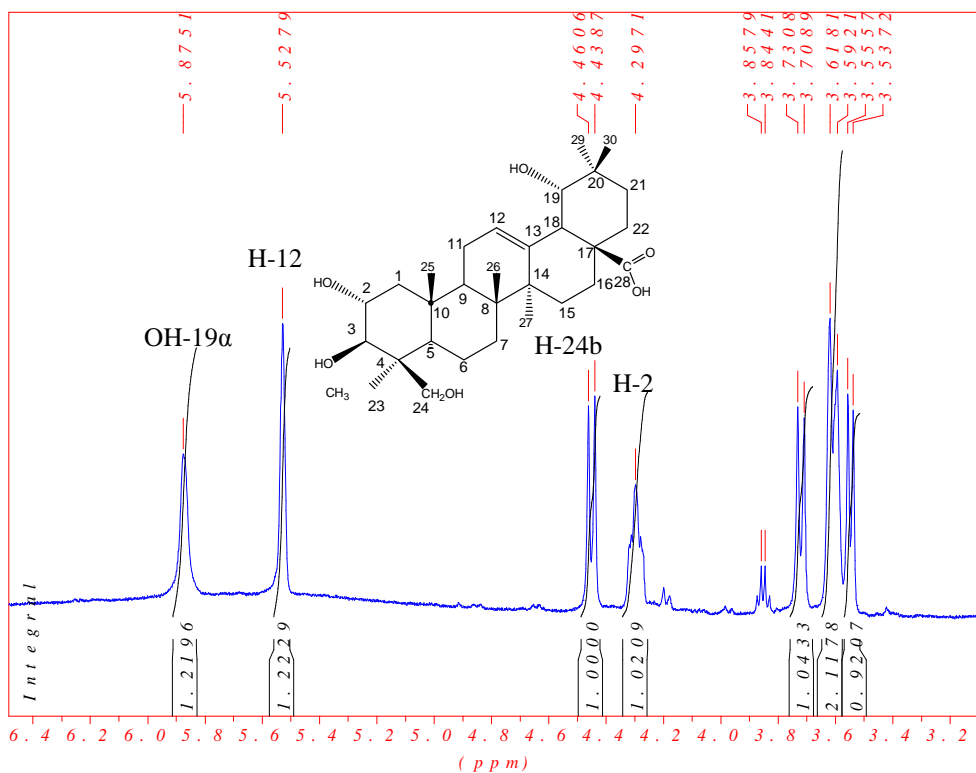


Figure 45 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALec2D (pyridine- $d_5$ ).

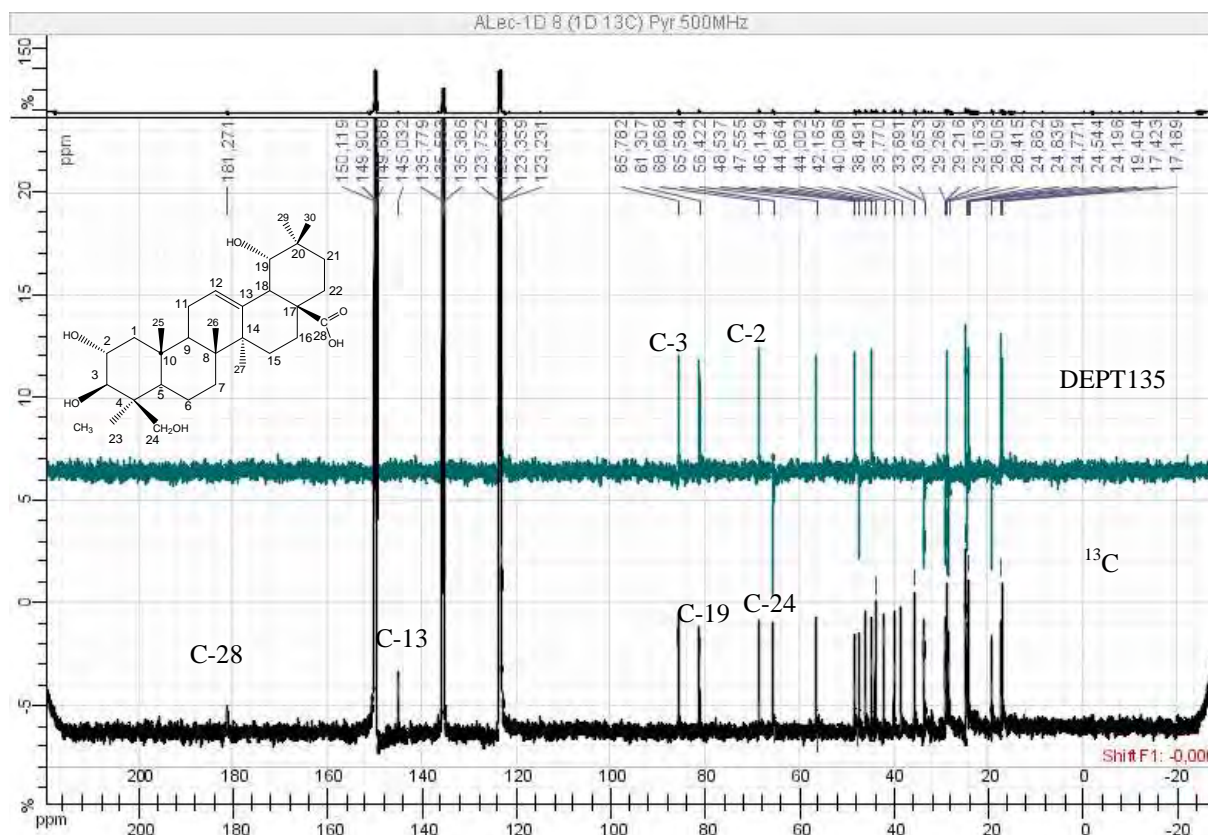


Figure 46 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  DEPT135 et  $^{13}\text{C}$  superposés (125 MHz) du composé ALec2D (pyridine- $d_5$ ).

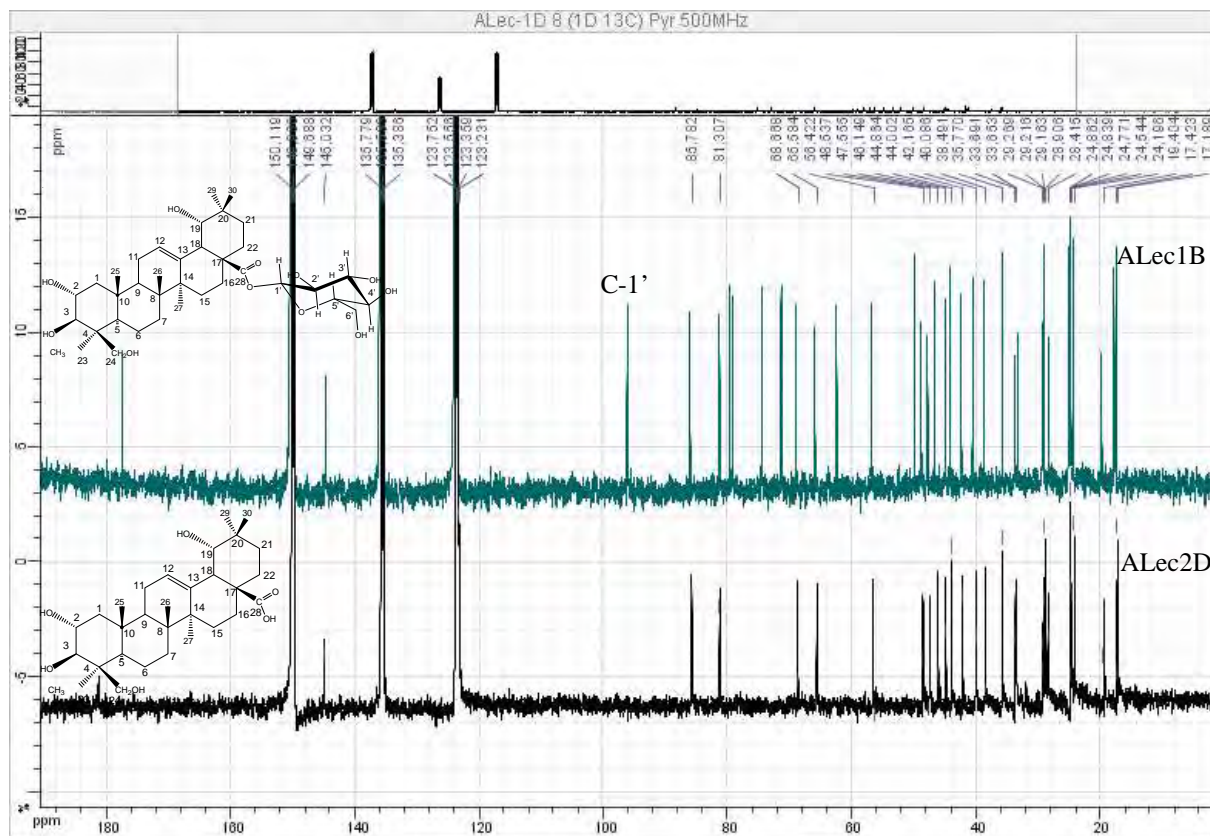


Figure 47 : Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) superposés de ALeC2D et ALeC1B (pyridine-*d*5).

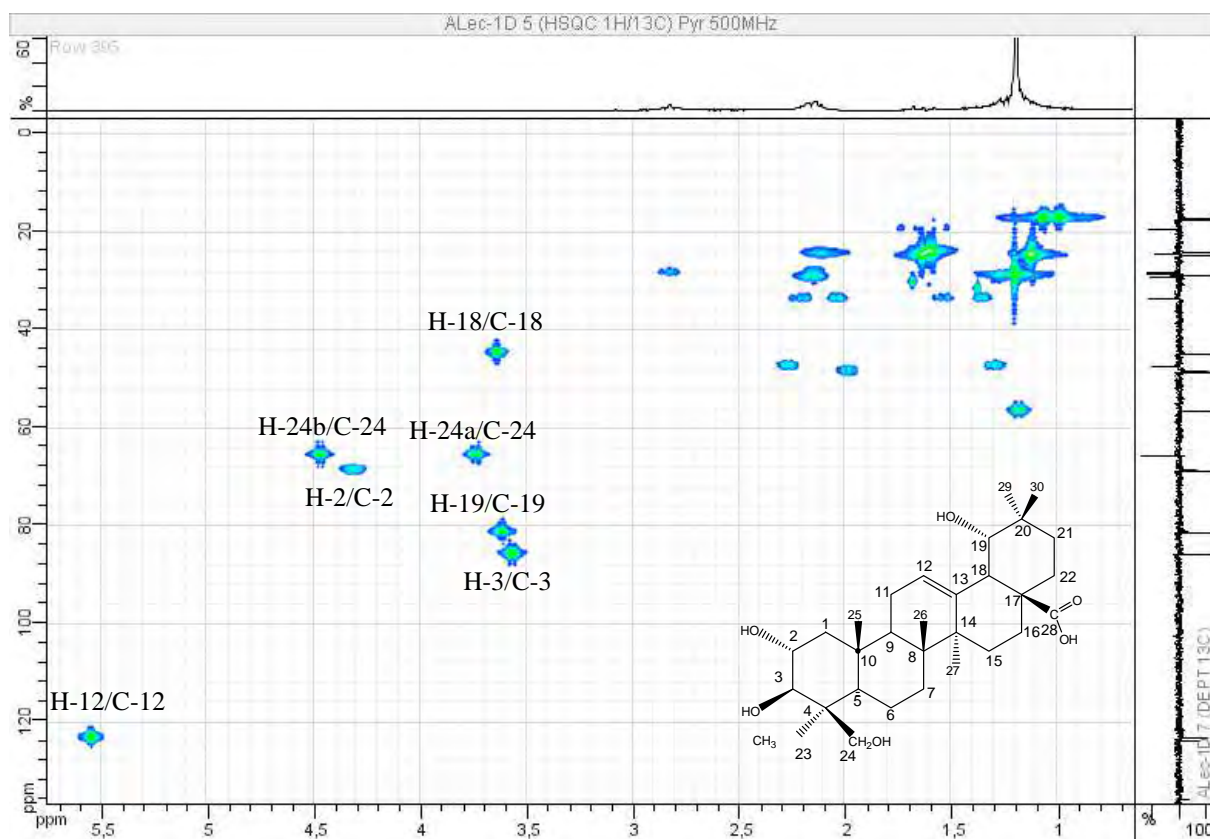
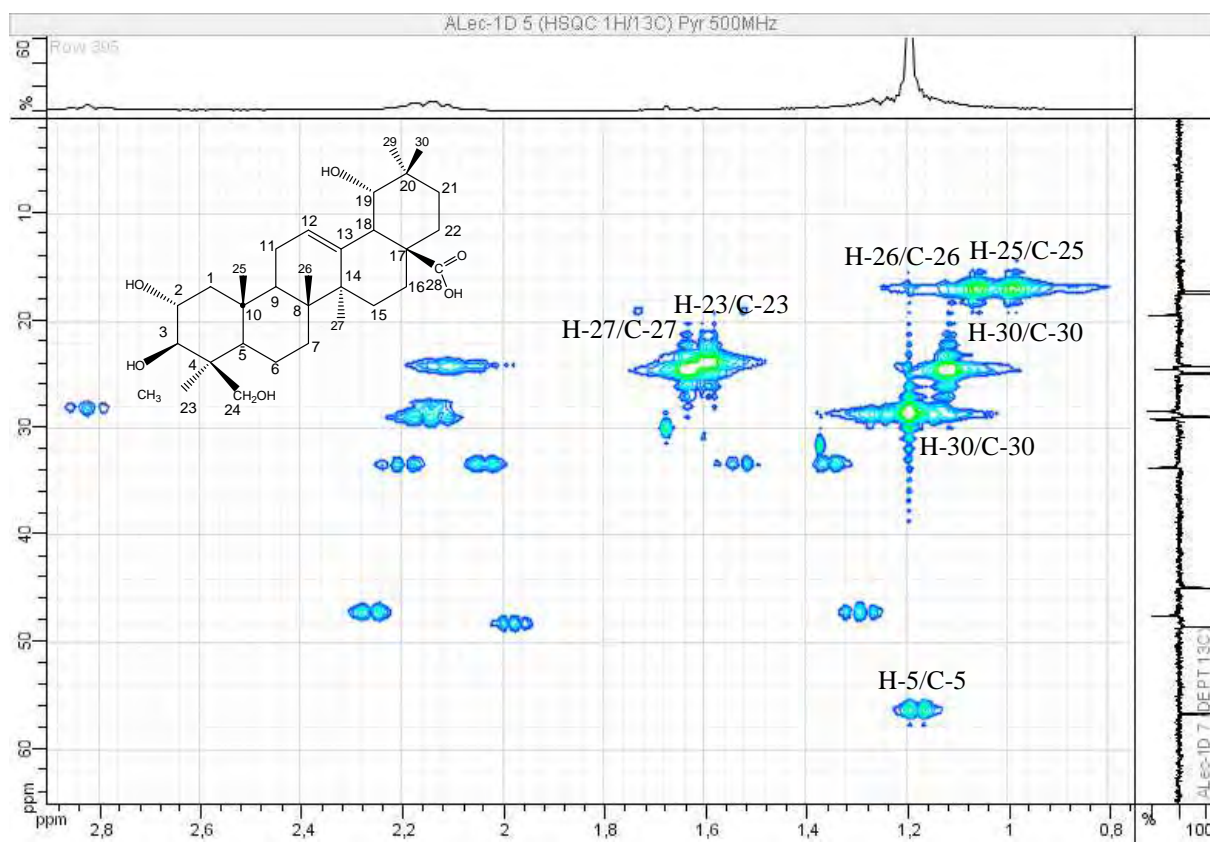
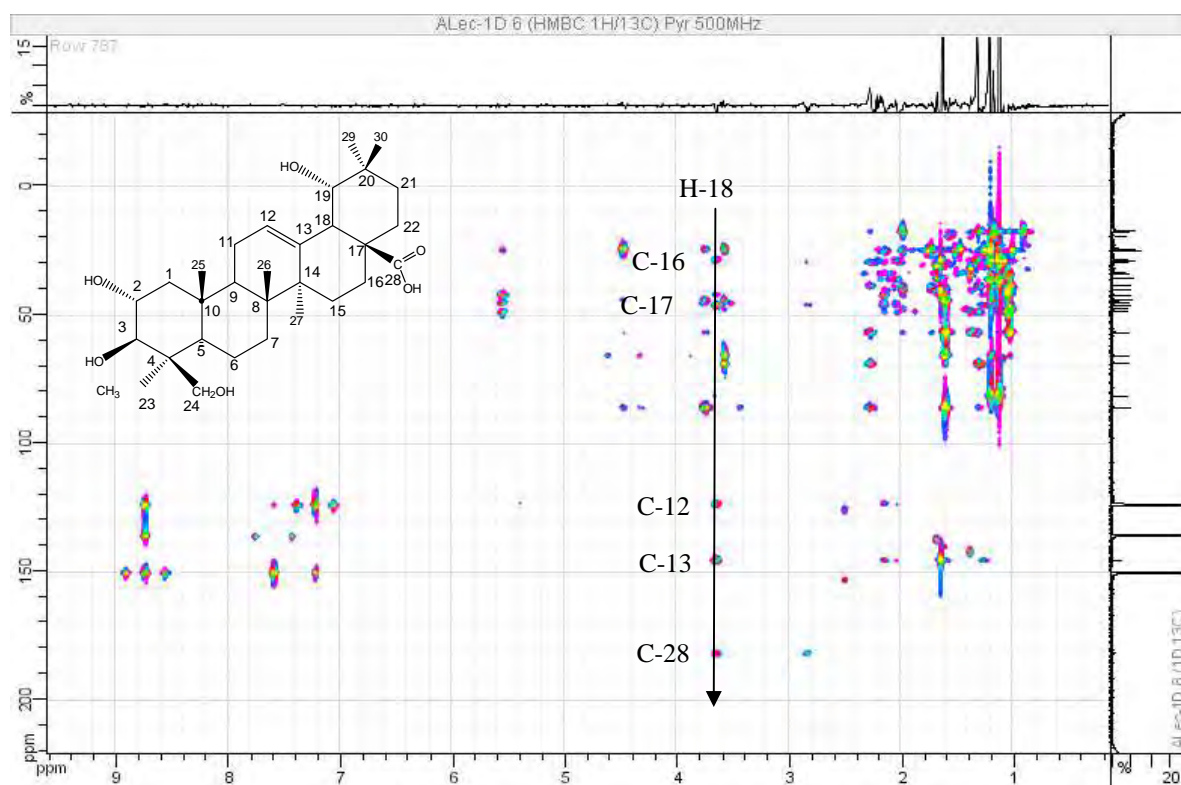


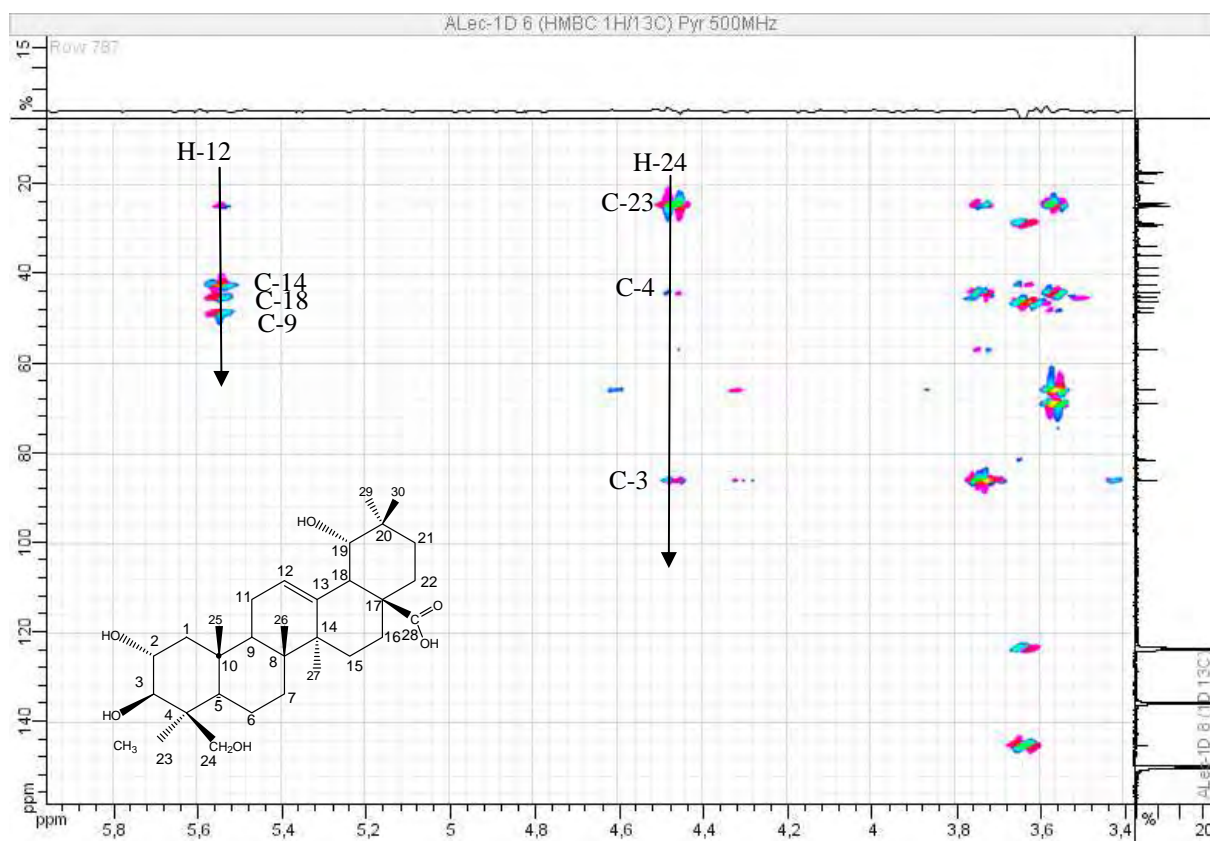
Figure 48 : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (500 MHz) du composé ALeC2D (pyridine-*d*5).



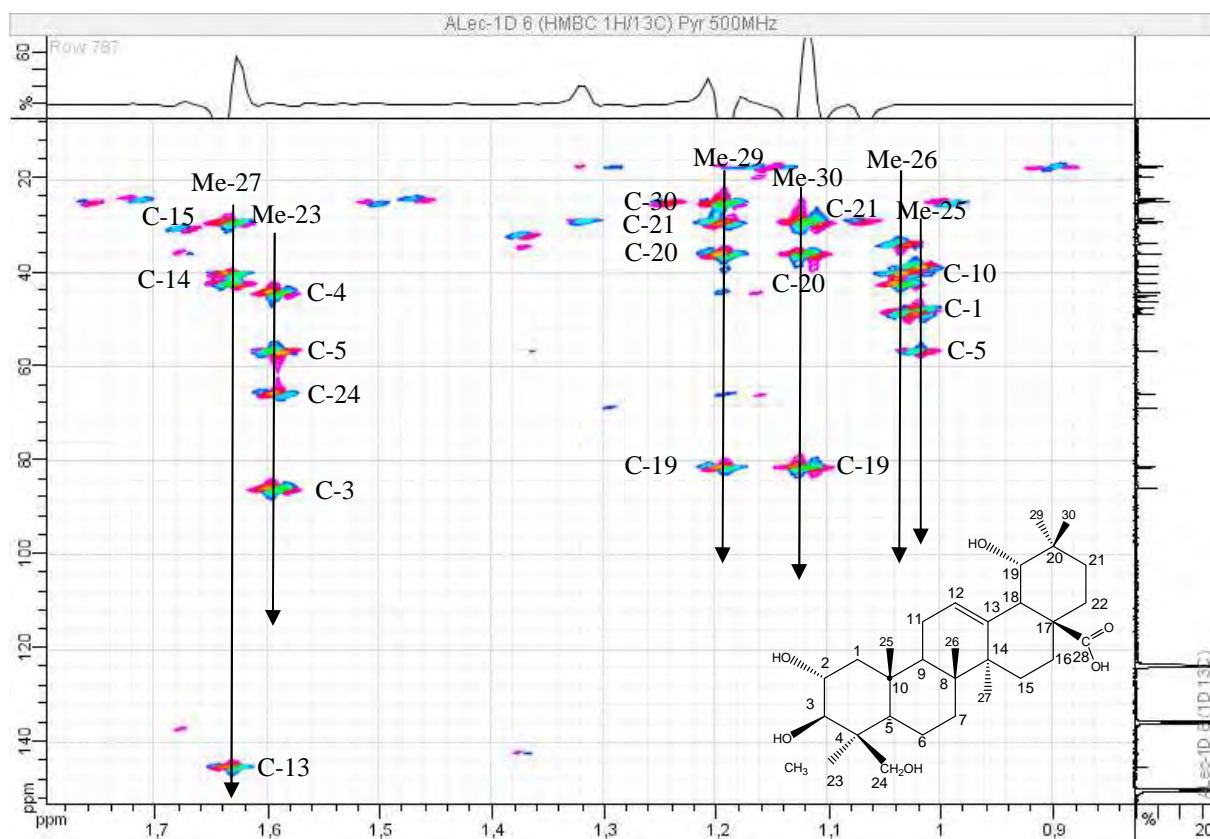
**Figure 49** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (500 MHz) du composé ALec2D (pyridine-*d*5).



**Figure 50** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (500 MHz) du composé ALec2D (pyridine-*d*5).



**Figure 51 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (500 MHz) du composé ALec2D (pyridine- $d_5$ ).



**Figure 52 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (500 MHz) du composé ALec2D (pyridine- $d_5$ ).

### 8.1.5. Elucidation structurale du composé ALec2E

Le composé ALec2E (2 mg) a été obtenu sous forme de poudre blanche, après purification par CLHP préparative de la fraction ALec2 (figure 5). Le test Lieberman-Burchard positif (couleur rouge) suggère la présence d'un triterpène de type oléanane ou ursane. La nature triterpénique est confirmée par l'allure du spectre UV (figure 10).

La masse moléculaire du composé obtenue par ESI a donné un ion pseudo-moléculaire à  $[M^+]$   $m/z = 504$  Da.

Les spectres **RMN**  $^{13}\text{C}$ , **DEPT 135** (figure 55) montrent 30 carbones : 1 groupement carbonyle, 2 carbones éthyléniques, 6 méthyles tertiaires, 1 méthylène oxygéné, 8 méthylènes, 3 méthines oxygénés, 3 méthines non oxygénés et 6 carbones quaternaires, ce qui correspond à la formule brute  $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_6$ . Confirmant ainsi la structure de la sapogénine comme étant un triterpène.

Les données **RMN**  $^{13}\text{C}$  de C-29 et C-30 ( $\delta$  28,7 et 24,6, respectivement) indiquent le type oléanane à cause du signal entre 32-33 et 22-24 ppm des C-29 et C-30, respectivement ; en effet, les signaux C-29 et C-30 des ursanes résonnent entre 16-18 ppm et 20-22 ppm, respectivement (tableau 11) (figure 55).

On note aussi la présence d'un proton oléfinique  $\Delta^{12}$  ( $\delta$  5,53 ; s large, le  $\delta_c$  de C-12 ( $\delta_c$  123,4) et C-13 ( $\delta_c$  144,8), caractéristique d'un oléanène (Mahato et Kundu, 1994) (tableau 11).

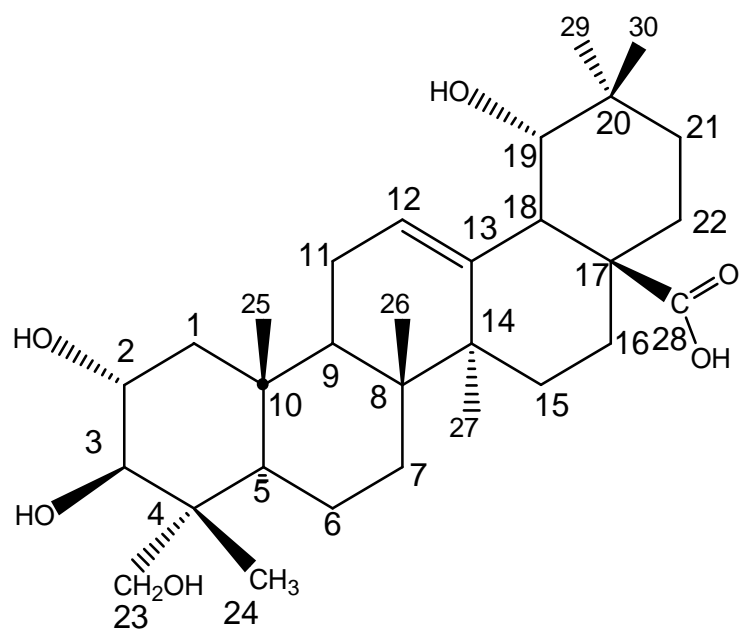
L'absence du signal correspondant au méthyle 23 et la présence d'un groupement hydroxyméthylène à  $\delta_c$  66,3 suggère que ce groupement est en position (C-23) et le méthyle en C-24 (tableau 11).

Le proton  $\delta_H$  4,23 (1H, d, 10, H-3,  $\delta_c$  78,1) et  $\delta_H$  4,2 (1H, ddd, 4;10; 12,4,  $\delta_c$  68,7) montre, une configuration dihydroxyle  $2\alpha, 3\beta$ - (tableau 11) (Kojima *et al.*, 1989). Le spectre **ROESY** montre des corrélations H-2 $\beta$ /H-25 et H-3 $\beta$ /H25 (tableau 12), (figure 61).

Les corrélations **HSQC** et **HMBC** ont permis d'attribuer les  $\delta_H$  et  $\delta_c$  de Alec2E (figures 56-60).

Ainsi, Alec2E a été identifié comme étant l'**acide 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,23-tétrahydroxyoléan-12-èn-28-oïque (arjungénine)**.

La présence de cette sapogénine a déjà été rapportée dans *Terminalia bellerica* (Nandy *et al.*, 1989) mais rapportée pour la première fois dans la famille des combretacées.



**Acide 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,19 $\alpha$ ,23-tétrahydroxyléan-12-èn-28-oïque (arjungénine)**

**Tableau 11** : Données RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) et  $^{13}\text{C}$  (125 MHz) de Alec2E (pyridine- $d_5$ ).

N°	$^1\text{H}$	$J(\text{Hz})$	$^{13}\text{C}$	type	HMBC
1a	2,27	(1H,dd)	47,3	CH <sub>2</sub>	
1b	1,39	dd			
2	4,23	(1H,ddd, 4;10; 12,4)	68,7	CH	
3	4,2	(1H,d, 10)	78,1	CH	
4	-		43,5	Cq	
5	1,85	(1H,s)	47,9	CH	
6	1,47 1,73		18,5	CH <sub>2</sub>	
7	1,68 1,33		32,8	CH <sub>2</sub>	
8	-		39,9	Cq	
9	2,08		48,3	CH	
10	-		38,4	Cq	
11	2,12		24,1	CH <sub>2</sub>	
12	5,53	(1H,s large)	123,4	CH	C-9,C-14,C-18
13	-		144,8	Cq	
14	-		42,1	Cq	
15a	1,1		30,3	CH <sub>2</sub>	
15b	1,46				
16a	2,8	(1H, t large)	28,3	CH <sub>2</sub>	
16b	2,1				
17	-		45,9	Cq	
18	3,61		44,7	CH	C-12,C-13,C-16,C-17,C-28
19	3,6	(1H,t, 7,4)	81,0	CH	
20	-		35,6	Cq	
21a	2,13		29,1	CH <sub>2</sub>	
21b	1,2				
22	2,13		33,5	CH <sub>2</sub>	
23a	3,72	(1H)	66,3	CH <sub>2</sub>	C-3,C-4,C-5,C-24
23b	4,18	(1H)			
24	1,06	(3H, s)	14,1	CH <sub>3</sub>	C-3,C-4,C-5,C-23
25	1,09	(3H, s)	17,1	CH <sub>3</sub>	C-1,C-5,C-10
26	1,05	(3H, s)	17,5	CH <sub>3</sub>	C-7,C-8,C-9,C-14
27	1,55	(3H, s)	24,7	CH <sub>3</sub>	C-8,C-13,C-14,C-15
28	-		180	Cq	
29	1,17	(3H, s)	28,7	CH <sub>3</sub>	C-19,C-20,C-21,C-30
30	1,09	(3H, s)	24,6	CH <sub>3</sub>	C-19,C-20,C-21

**Tableau 12** : Corrélations COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  et ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  de ALec2E.

N°	COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$	ROESY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$
1 a	H-1b, H-2	H-1b
1 b	H-2	
2		H-25
3		H-25
4		
5	H-6a	
6 a		H-6b
6 b		
7 a	H-7b	H-7b
7 b		
8		
9		
10		
11	H-12	
12		H-18
13		
14		
15 a		
15 b		
16 a	H-16b, H-15	H-16b
16 b	-	
17		
18		H-12
19 $\beta$		
20		
21		
22 a		
22 b		
23a	H-23b	H-23b
23b		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
19-OH $\alpha$	H-19 $\beta$	



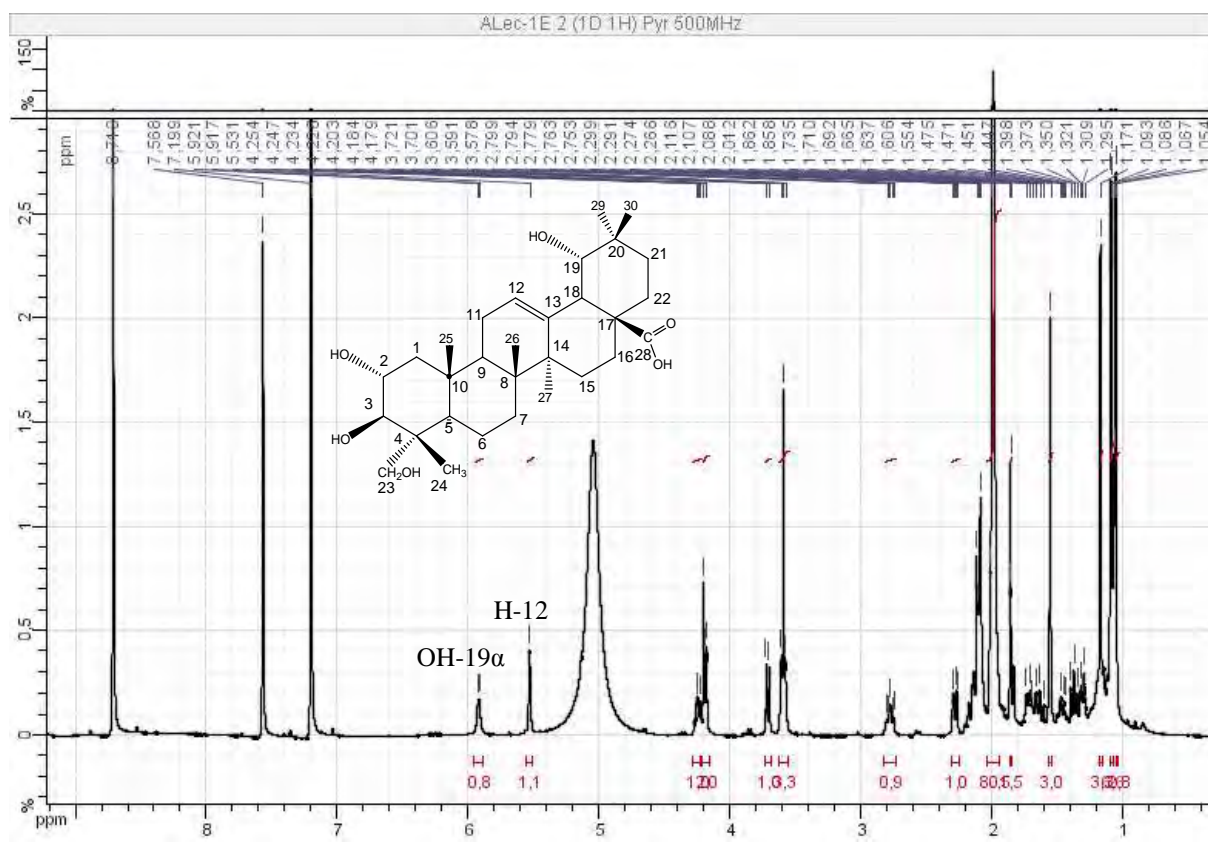


Figure 52 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALec2E (pyridine- $d_5$ ).

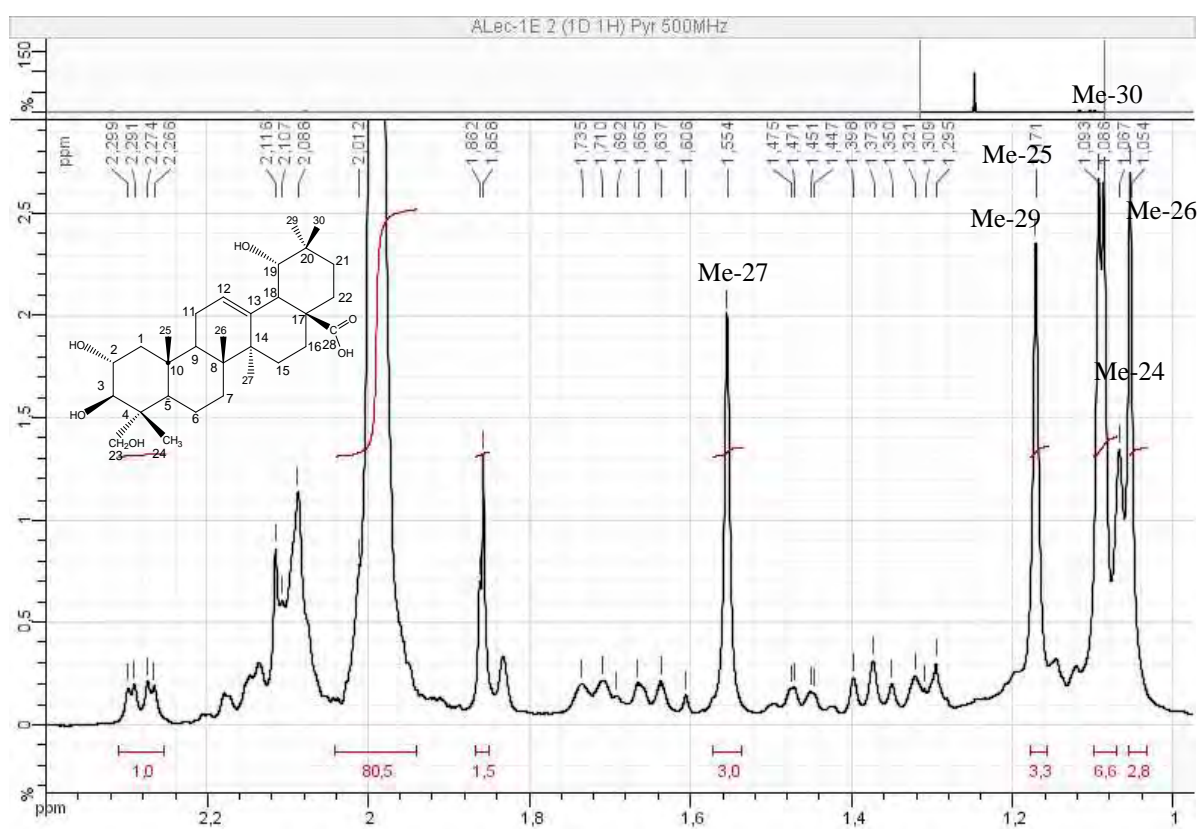


Figure 53 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALec2E (pyridine- $d_5$ ).

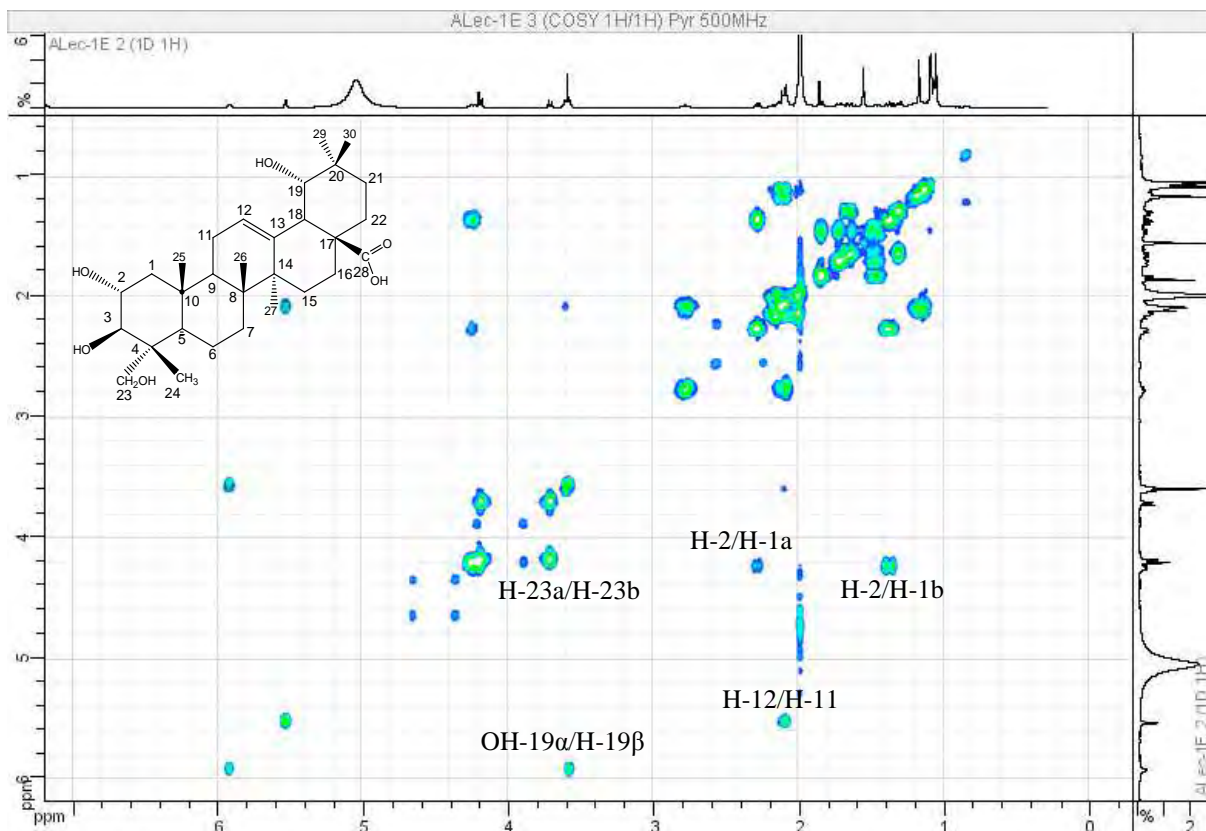


Figure 54 : Spectre RMN COSY- $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALec2E (pyridine- $d_5$ ).

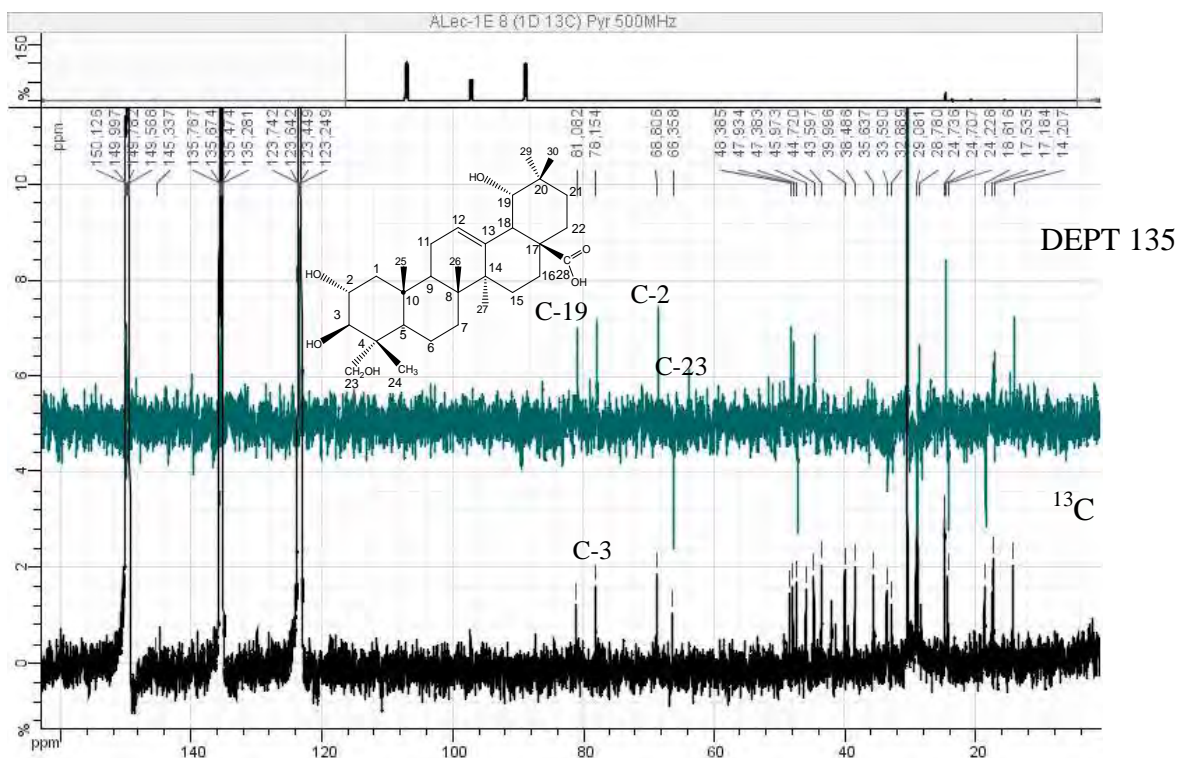
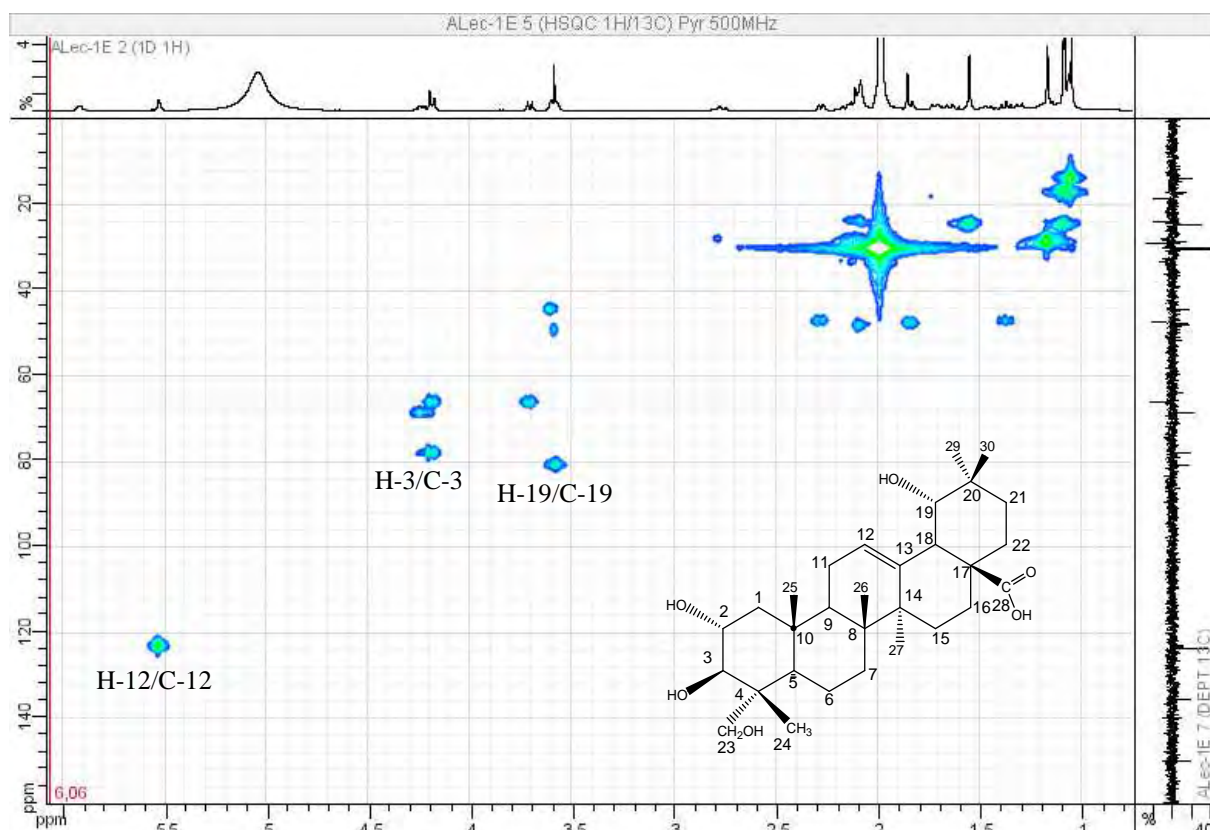
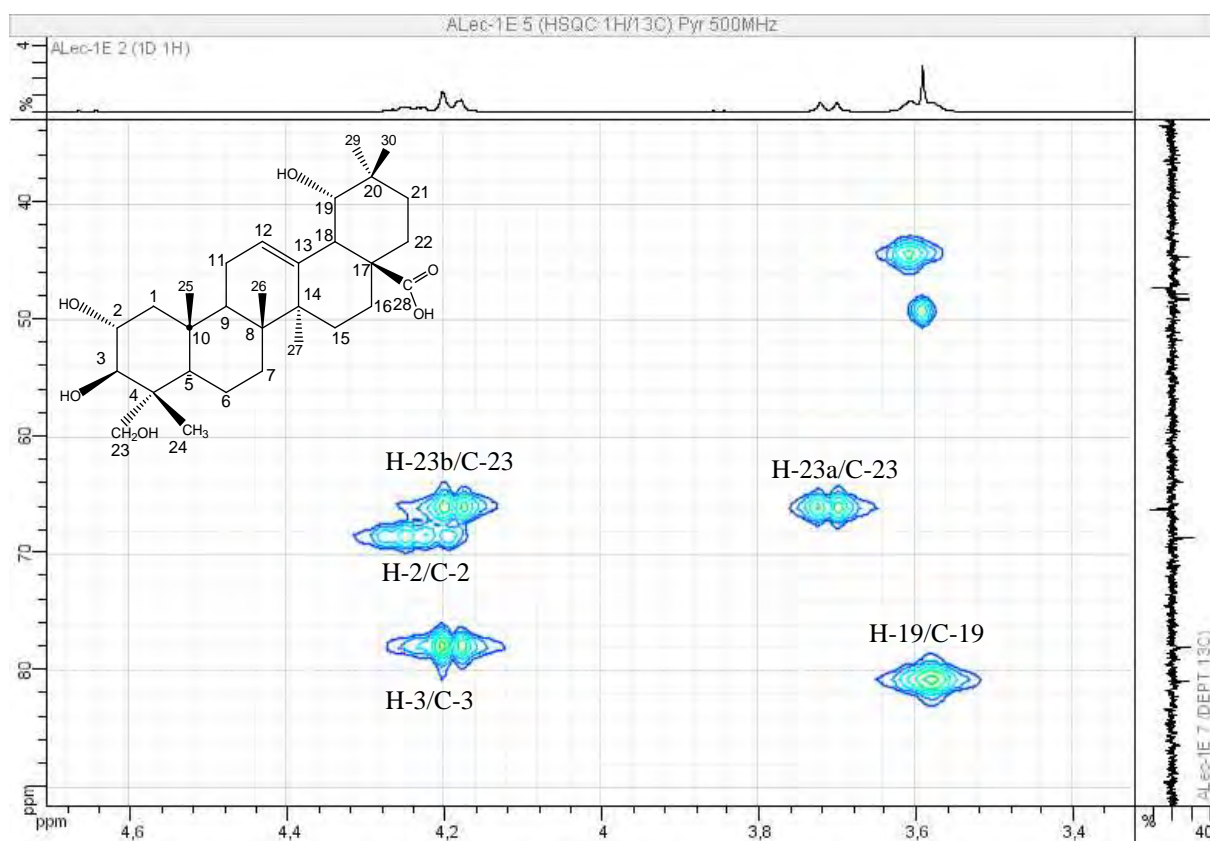


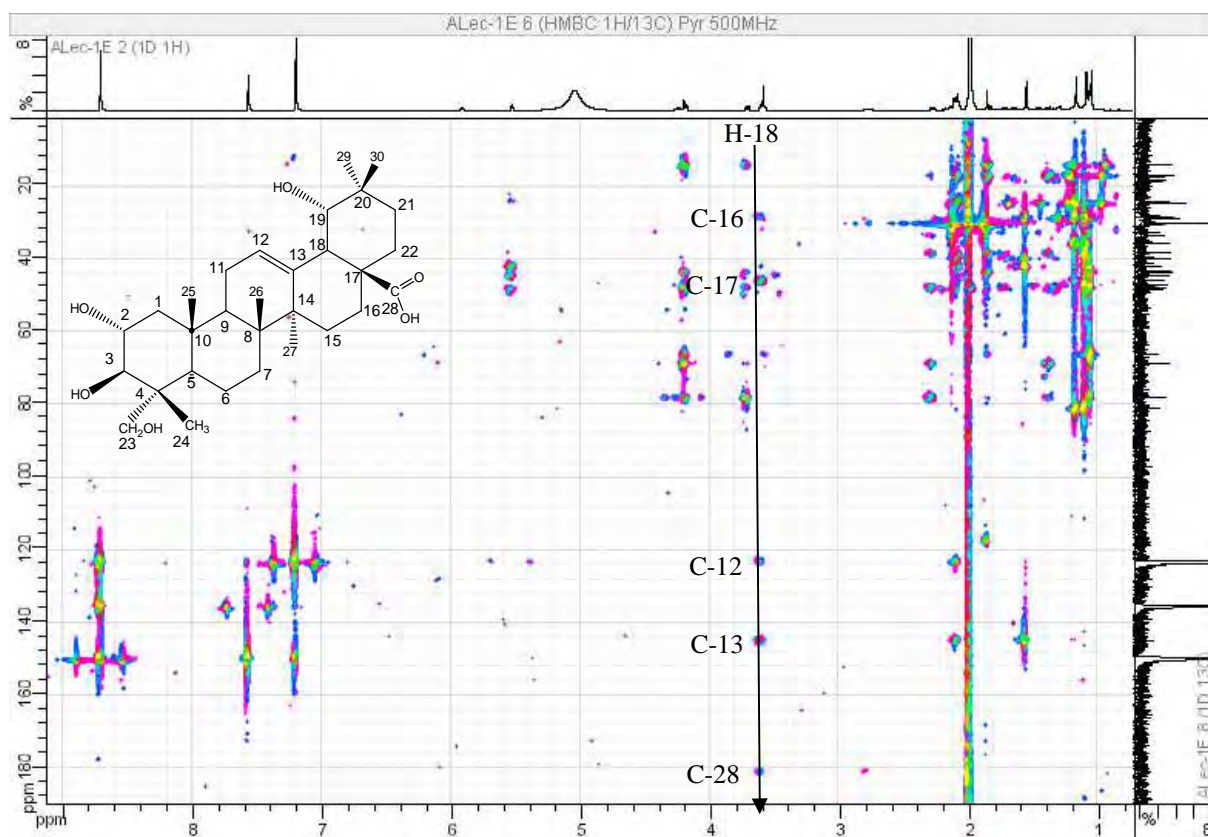
Figure 55 : Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT135 et  $^{13}\text{C}$  superposés (125 MHz) du composé ALec2E (pyridine- $d_5$ ).



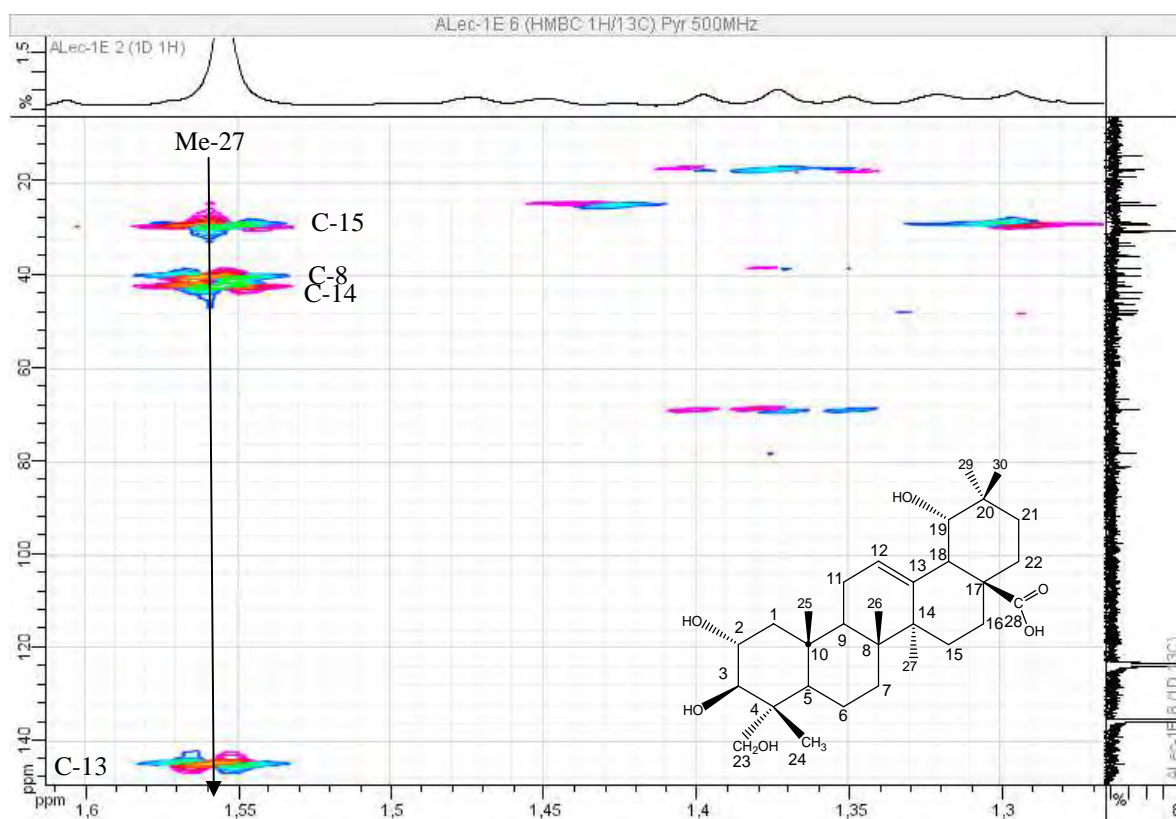
**Figure 56** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (500 MHz) du composé ALec2E (pyridine-*d*5).



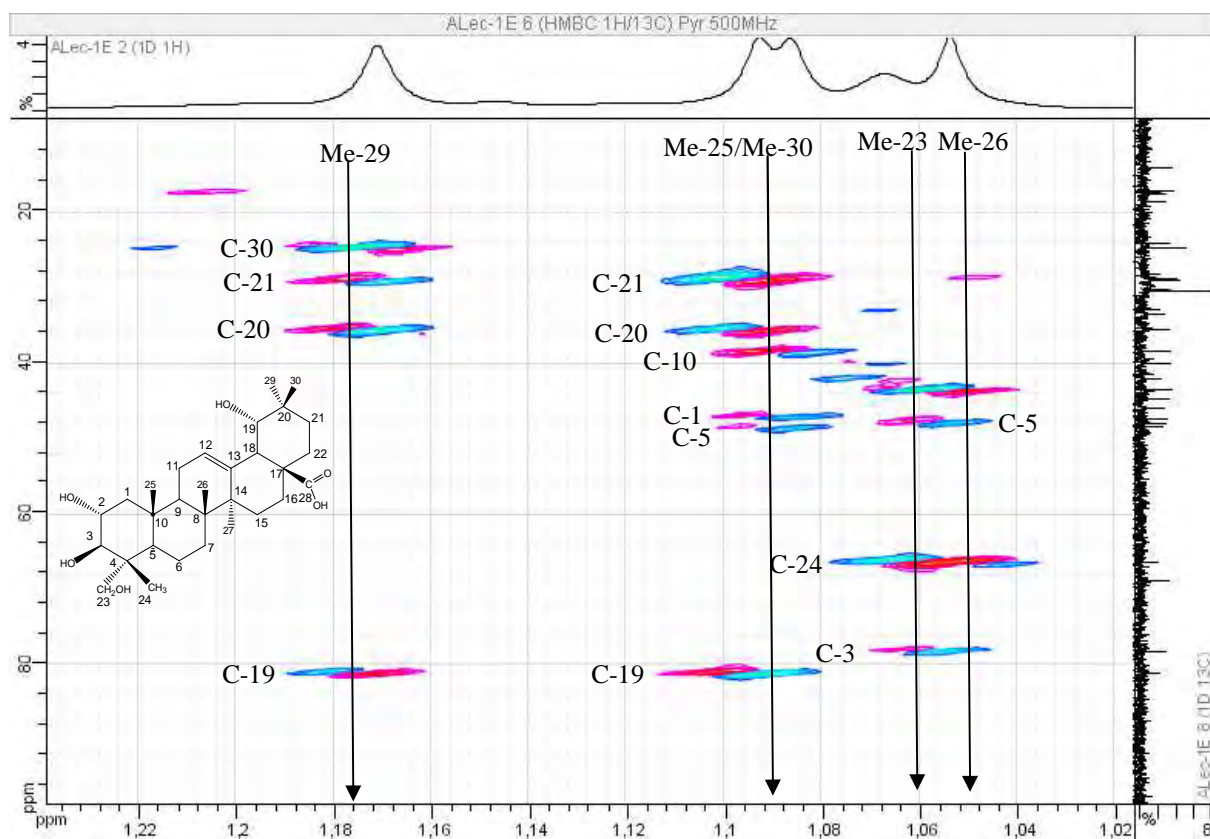
**Figure 58** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (500 MHz) du composé ALec2E (pyridine-*d*5).



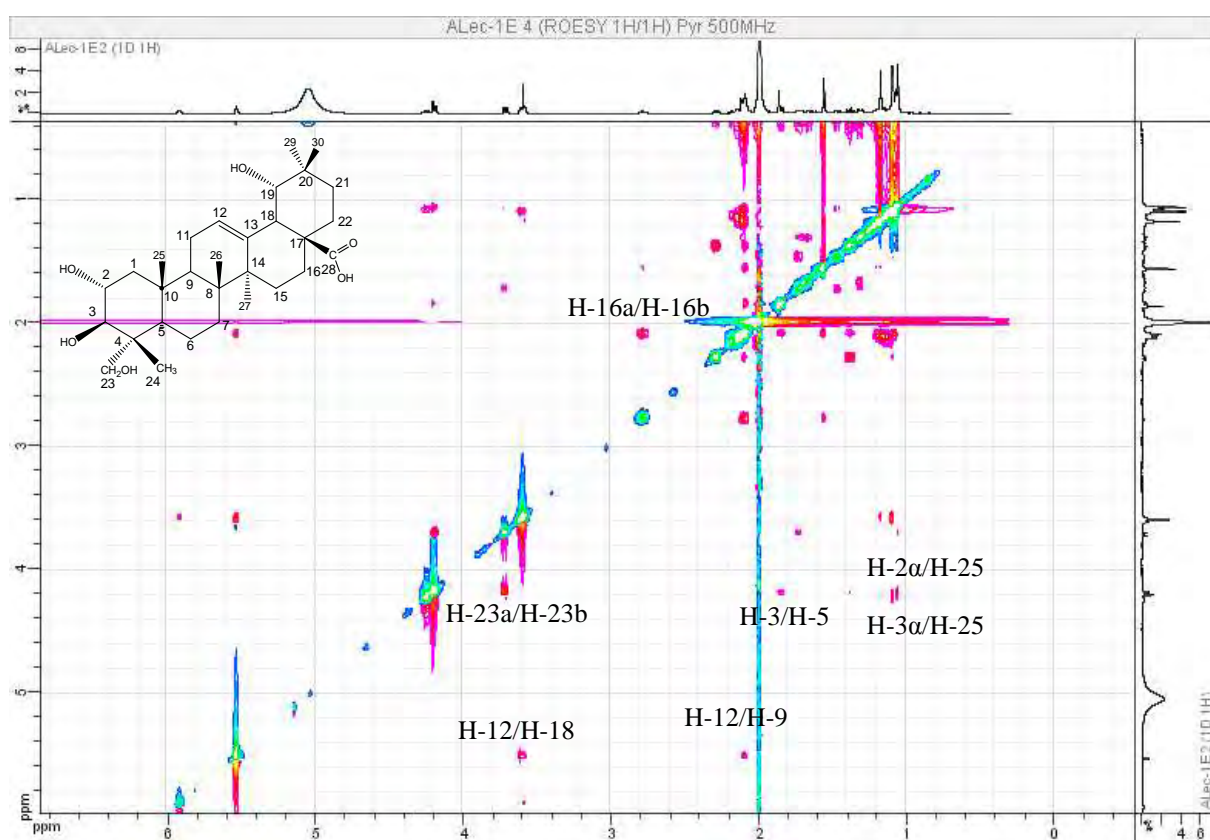
**Figure 58 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (500 MHz) du composé ALec2E (pyridine-*d*5).



**Figure 59 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (500 MHz) du composé ALec2E (pyridine-*d*5).

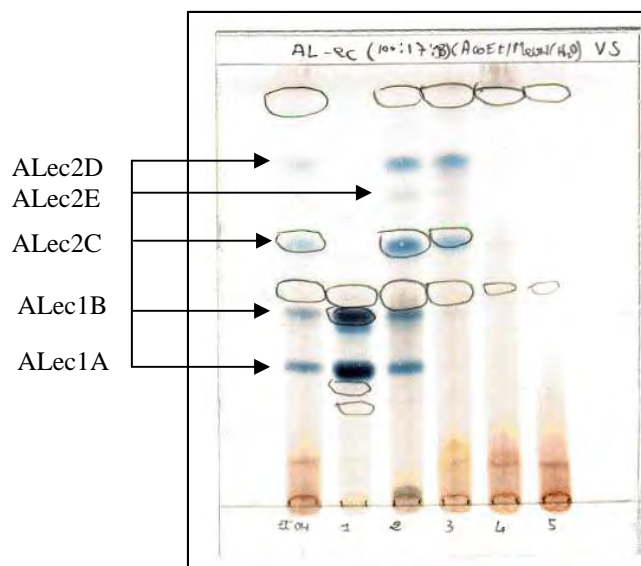


**Figure 60 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (500 MHz) du composé ALec2E (pyridine- $d_5$ ).

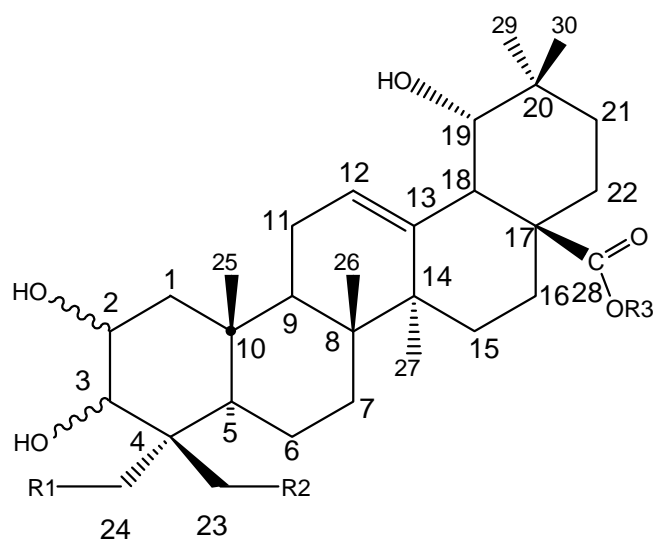


**Figure 61 :** Spectre RMN ROESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (500 MHz) du composé ALec2E (pyridine- $d_5$ ).

Ainsi, 5 triterpènes oléanoliques ont été isolés de l'écorce d'*Anogeissus leiocarpus* : deux monodesmosidiques (Alec 1A et 1B) et trois aglycones (Alec 2C, 2D et 2E). Leurs différences de polarité et leurs structures sont représentés figures 62 et 63, respectivement.



**Figure 62 :** Identification des 5 triterpènes oléanoliques par CCM analytique en fonction de leur polarité



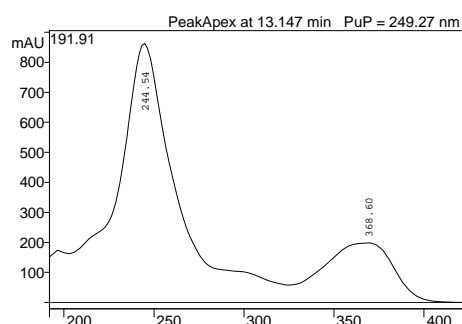
	OH-2	OH-3	R1 (C-23)	R2 (C-24)	R3
<b>Alec1A</b>	$\alpha$	$\beta$	OH	OH	Glucose
<b>Alec1B</b>	$\alpha$	$\beta$	H	OH	Glucose
<b>Alec2C</b>	$\alpha$	$\beta$	OH	OH	H
<b>Alec2D</b>	$\alpha$	$\beta$	H	OH	H
<b>Alec2E</b>	$\alpha$	$\beta$	OH	H	H

**Figure 63 :** Structures des 5 triterpènes oléanoliques isolés de l'écorce d'*Anogeissus leiocarpus*

## 8.2. Identification des dérivés ellagiques

### 8.2.1. Elucidation structurale du composé ALec3-1

Le produit ALec3-1 a été purifié par CLHP semi-préparative à partir de la fraction ALec3 (figure 5). 3 mg de poudre jaune ont été obtenus. Le spectre UV de ce composé montre deux bandes maximales à 244 nm et 368 nm (figure 64), ce qui suggère une nature aromatique.

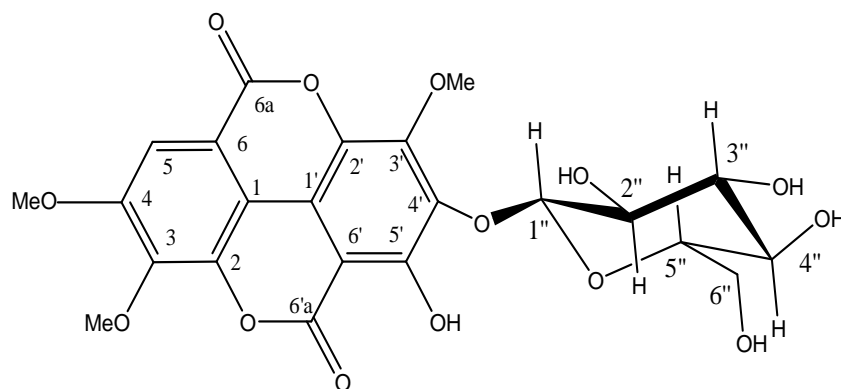


**Figure 64** : Spectre UV du composé ALec3-1

La masse moléculaire du composé obtenu par API-MS (mode négatif) a donné un ion quasi-moléculaire de  $[M-H]^-$  : 521,2 Da. D'où une masse moléculaire de  $M^+$  : 522,2 Da, correspondant à la formule brute  $C_{23}H_{22}O_{14}$ .

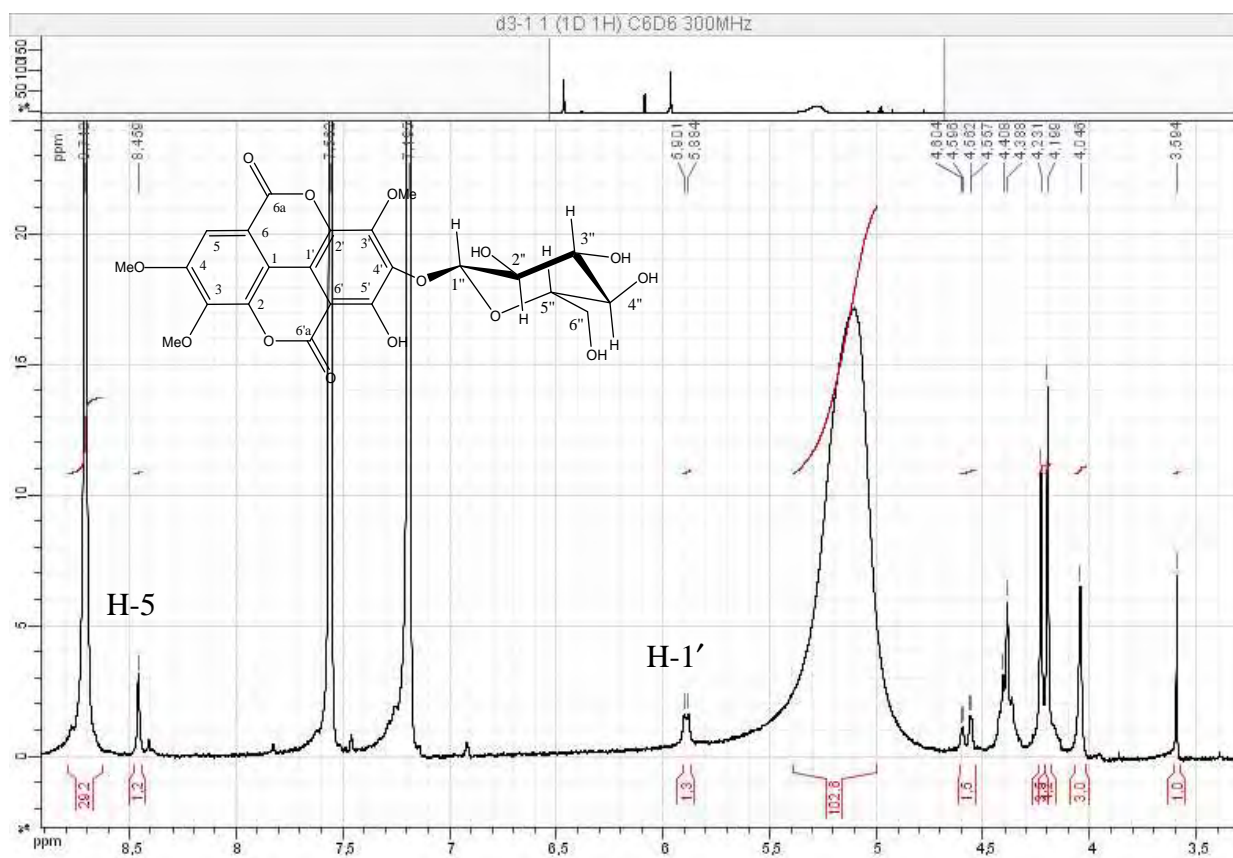
Le spectre RMN  $^1H$  montre un doublet à  $\delta_H$  5,89 ppm correspondant au proton anomérique du sucre H-1'. La grande constante de couplage ( $J = 8,0$  Hz) oriente vers une configuration  $\beta$  du sucre. Les spectres RMN  $^1H$  et RMN  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC montrent trois méthoxyes à  $\delta$  4,04 ; 4,19 et 4,23 ppm et un proton aromatique à  $\delta$  8,45 ppm (figures 65-68) (tableau 12).

Par comparaison avec les données RMN trouvées dans la littérature (Serafin *et al.*, 2007), le composé ALec3-1 a été identifié comme étant l'**acide 3,4,3'-tri-O-méthylflavellagique-4'- $\beta$ -D-glucoside**.



**Tableau 13** : Données RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) de Alec3-1 (pyridine- $d_5$ ).

N°	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)
5	8,45	(1H, s)
OMe-3	4,23	(3H, s)
OMe-3'	4,19	(3H, s)
OMe-4	4,04	(3H, s)
1''	5,89	(1H, d, 8,0)
2''	-	-
3''	-	-
4''	-	-
5''	-	-
6''	4,55 et 4,6	(2H, dd)



**Figure 65** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) du composé ALec3-1 (pyridine- $d_5$ ).



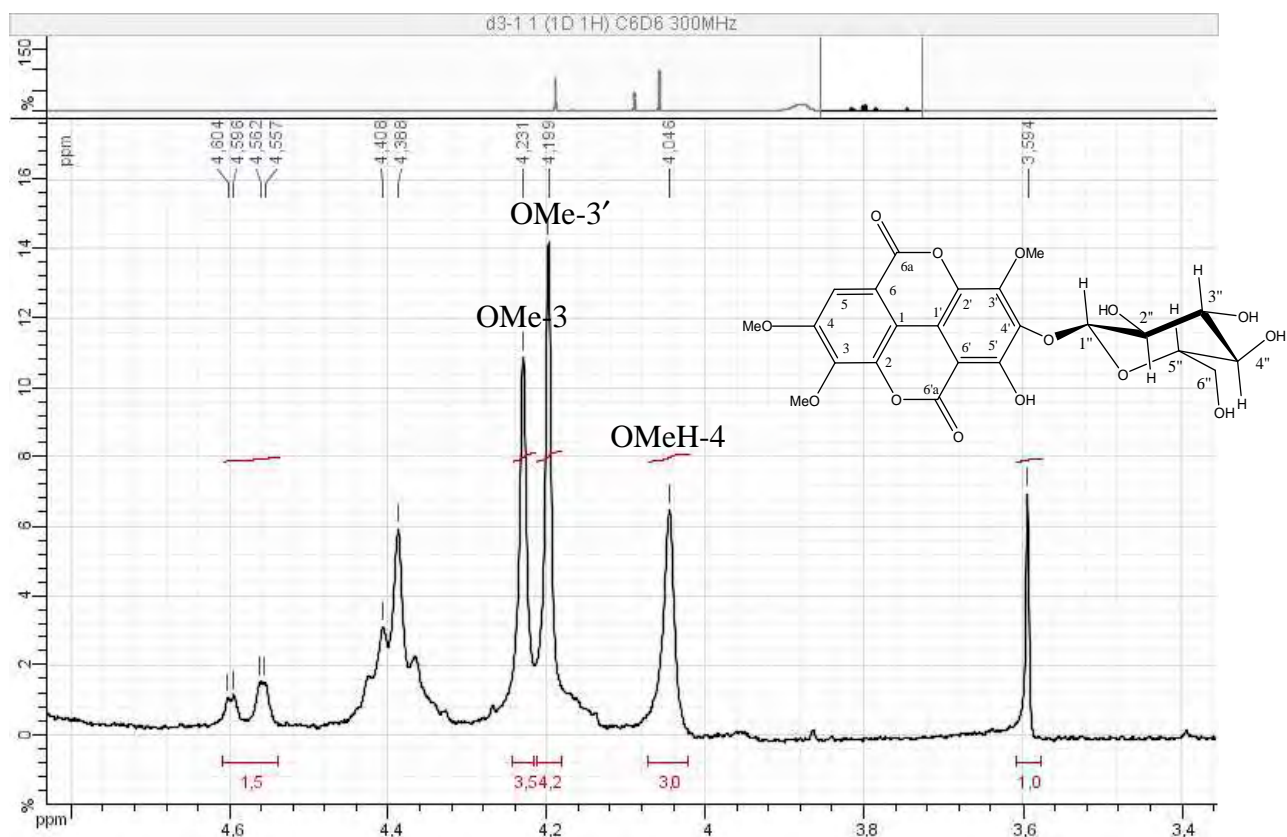


Figure 66 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) du composé ALec3-1 (pyridine- $d_5$ ).

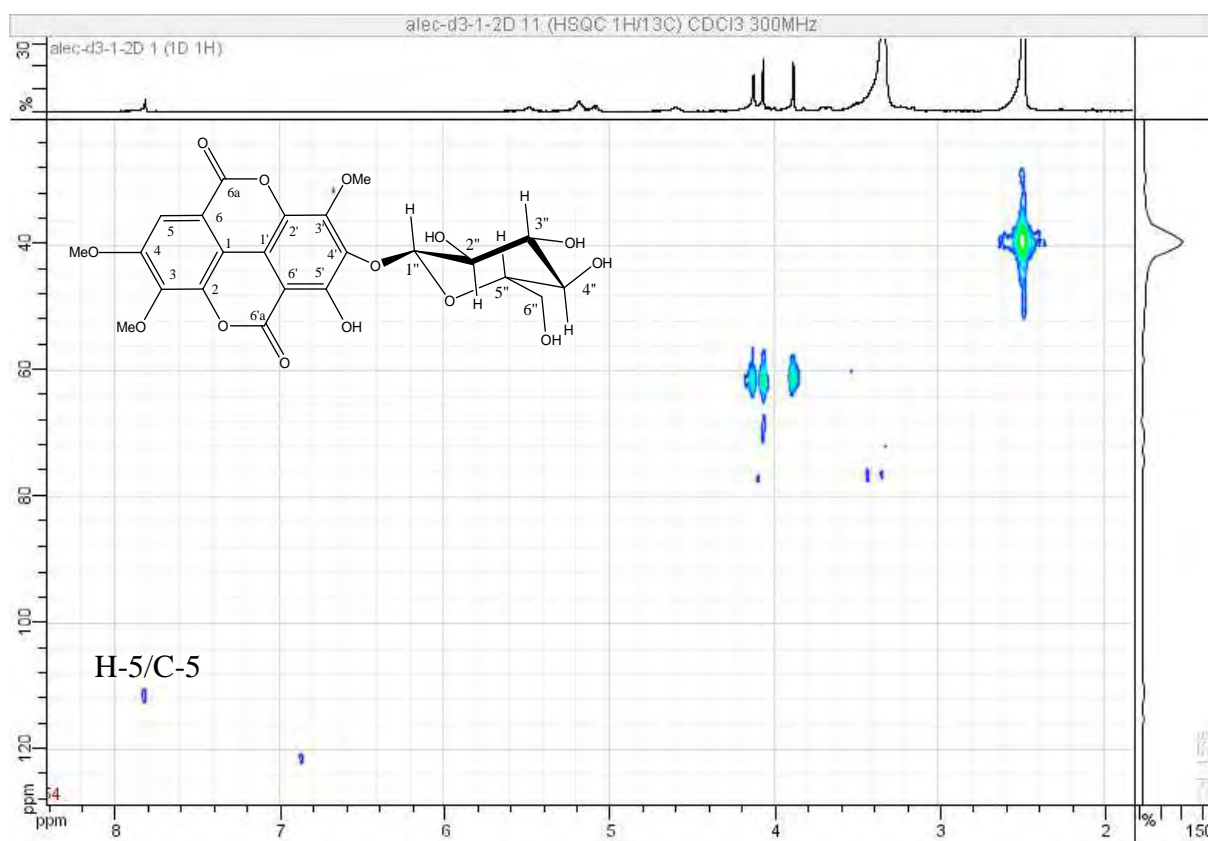
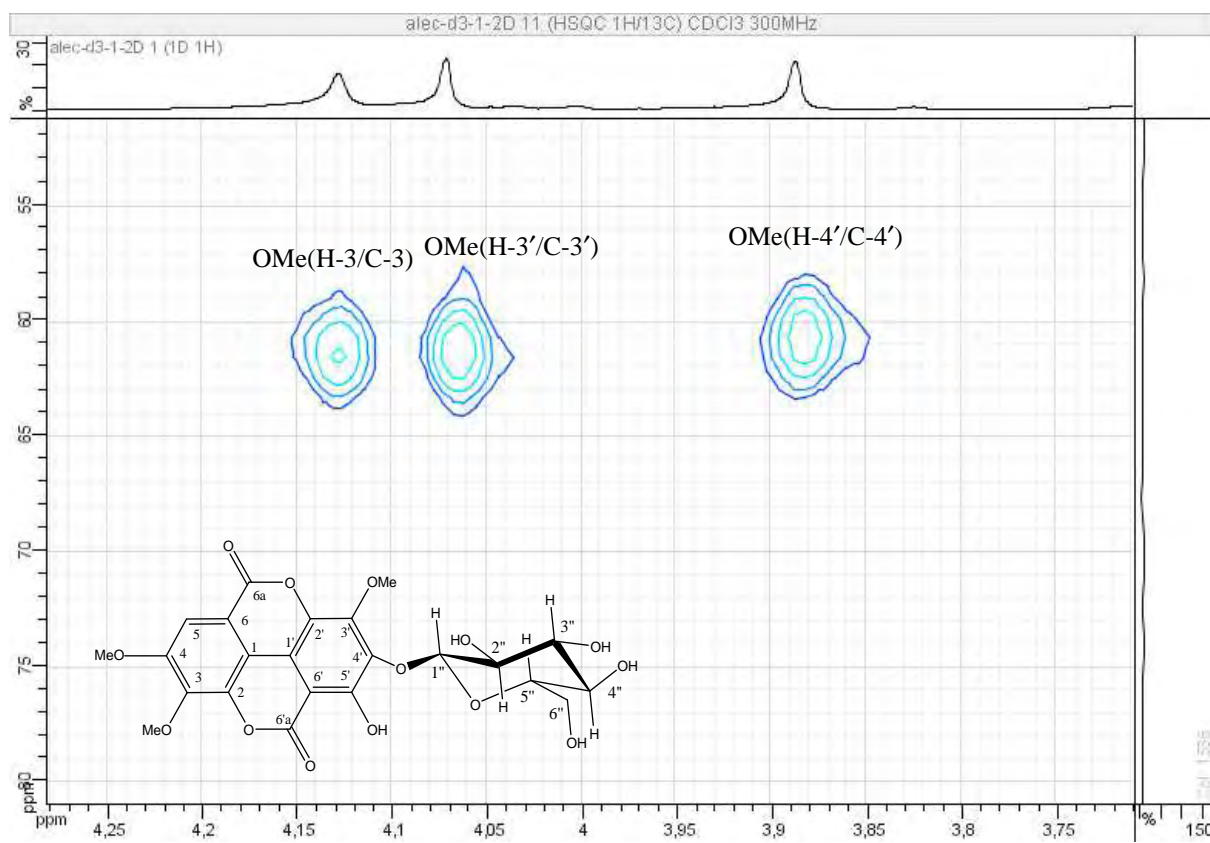


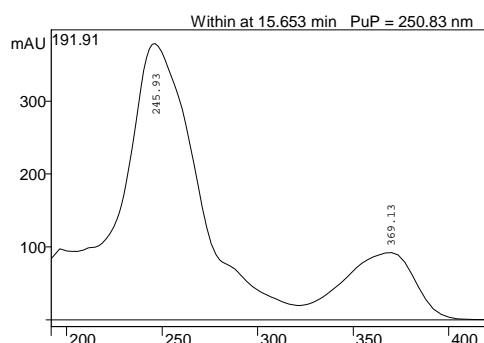
Figure 67 : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (300 MHz) du composé ALec3-1 (pyridine- $d_5$ ).



**Figure 68** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (300 MHz) du composé ALEC3-1 (pyridine- $d_5$ ).

## 8.2.2. Elucidation structurale du composé Alec3-2

Ce composé a été purifié par CLHP semi-préparative à partir de la fraction ALec3. Il se présente sous forme d'une poudre jaune (2,5 mg). Son spectre UV montre également 2 bandes maximales (245 nm et 369 nm) suggérant qu'il s'agit aussi d'un dérivé ellagique, comme Alec3-1 (figure 69).

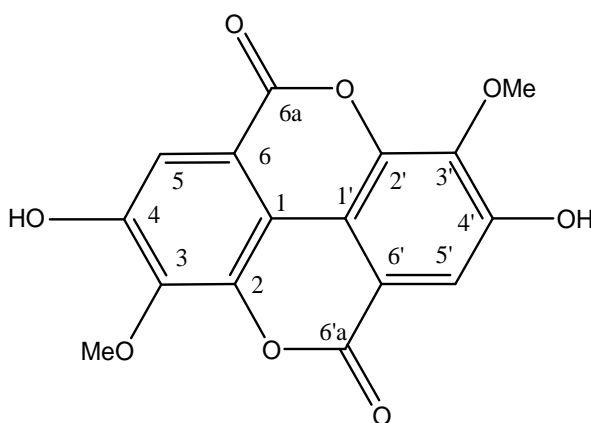


**Figure 69** : Spectre UV du composé Alec3-2

La masse moléculaire du composé obtenu par API-MS (mode négatif) a donné un ion quasi-moléculaire de 330 Da correspondant à la formule brute  $C_{16}H_{10}O_8$ .

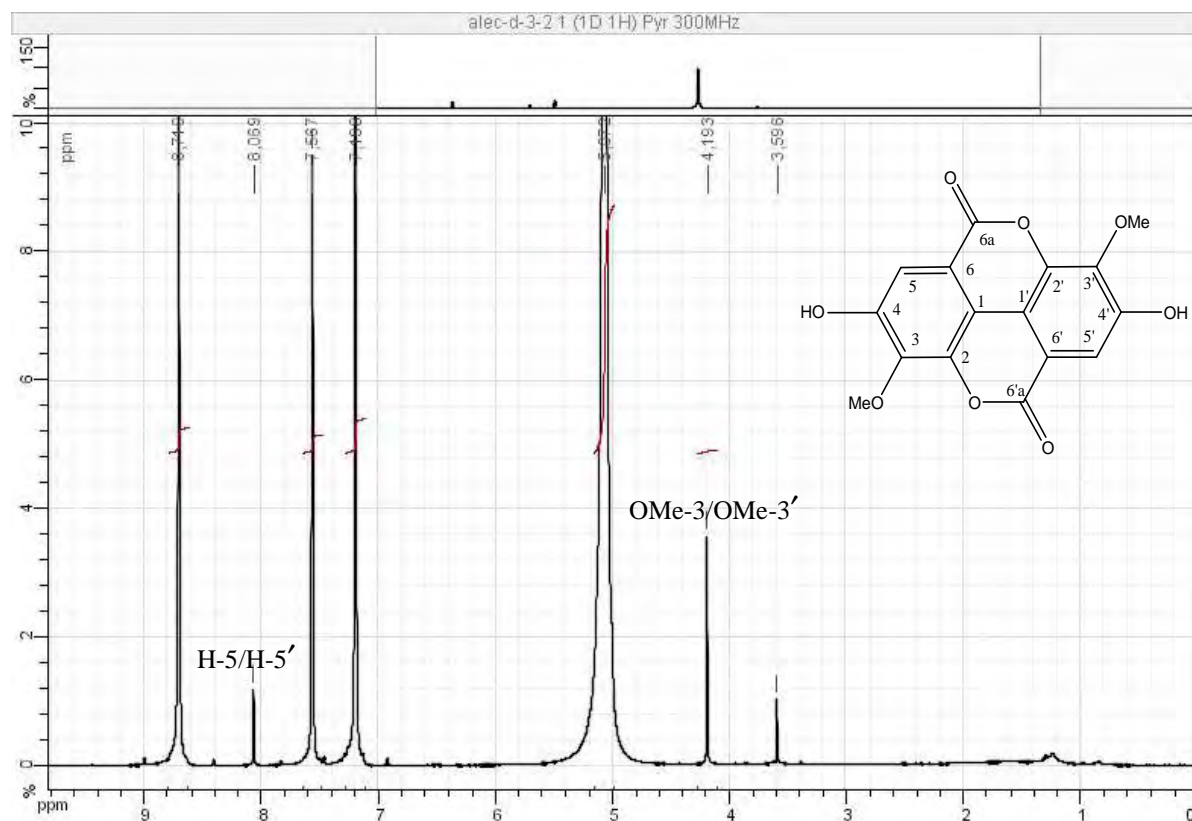
Le spectre RMN  $^1H$  dans la pyridine- $d_5$  présente un singulet à  $\delta$  8,06 (2H) et 2 méthoxyles à  $\delta$  4,19 (6H) en faveur d'un système di-*O*-méthyle ellagique (figure 70 et tableau 14). Le spectre RMN HMBC montre des corrélations entre les protons 5/5' et les carbones C-5/5'; C-3/3'; C-6a/6'a (figure 71 et tableau 12).

Ces résultats corroborent ceux trouvés dans la littérature (Khac *et al.*, 1990) et nous permet d'identifier Alec3-2 sans ambiguïté à l'**acide 3,3'-di-*O*-méthylellagique**.

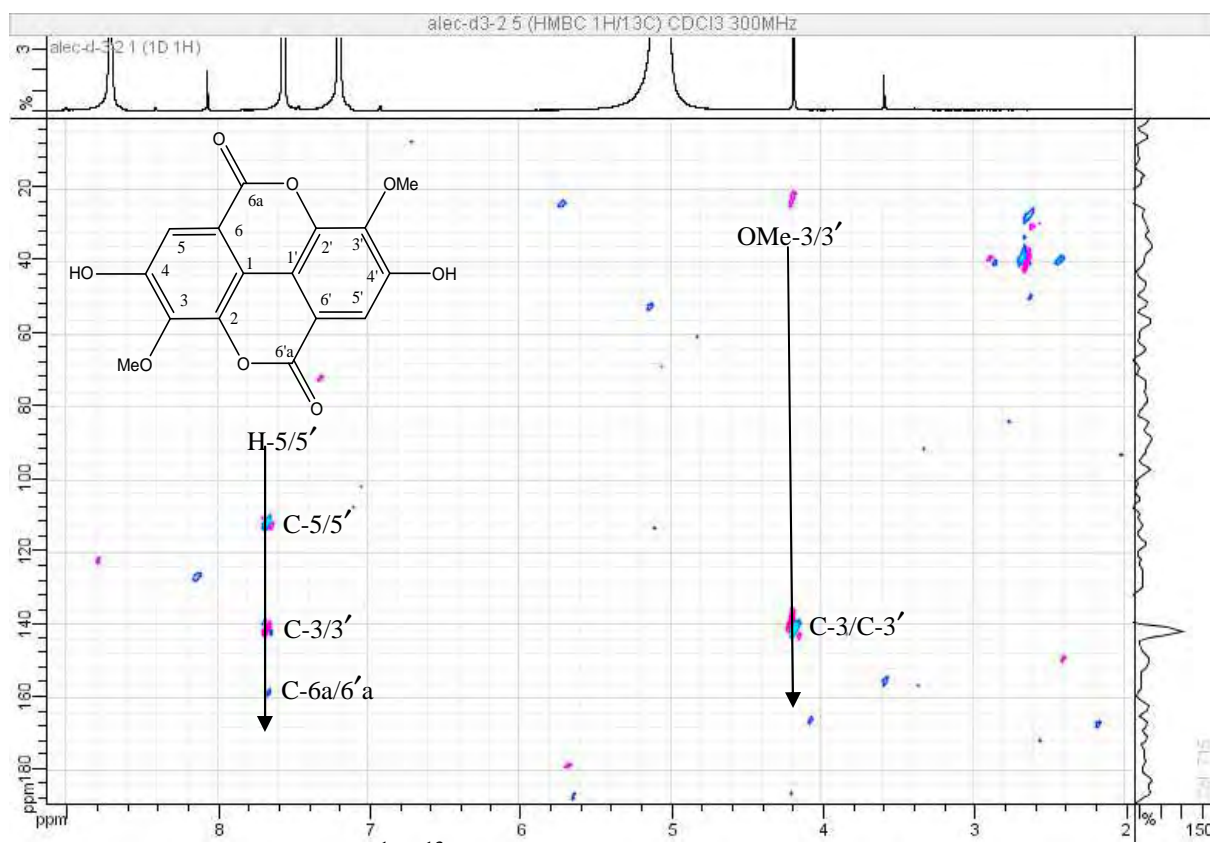


**Tableau 14** : Données RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) de Alec3-2 (pyridine- $d_5$ ).

N°	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	HSQC
5/5'	8,06 (2H, s)	111,7	C-5/5'; C-3/3'; C-6a/6'a
OMe-3/3'	4,19 (6H, s)	140,5	C-3/3'



**Figure 70** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  du (300 MHz) composé ALec3-2 (pyridine- $d_5$ ).



**Figure 71** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (300 MHz) du composé ALEC3-2 (pyridine- $d_5$ ).

### 8.2.3. Elucidation structurale du composé Alec3-3

Le produit ALec3-3 a été purifié par CLHP semi-préparative à partir de la fraction ALec2 et se présente sous forme de poudre jaune (3,5 mg). Son spectre UV montre 2 bandes maximales (244 nm et 373 nm) indiquant qu'il s'agit tout comme les deux composés identifiés précédemment d'un dérivé ellagique (figure 72).

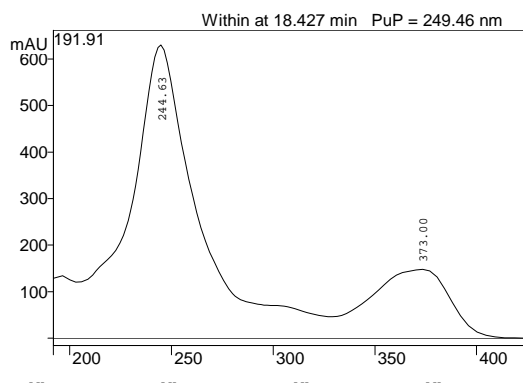


Figure 72 : Spectre UV du composé ALec3-3

Le spectre de masse obtenu par API-ES en mode négatif présente un ion quasi-moléculaire à  $[M-H]^- = 359$  Da. d'où une masse molaire de 360 Da, qui correspond à la formule brute  $C_{17}H_{12}O_9$ .

Le spectre RMN  $^1H$  dans la pyridine- $d_5$  (figures 73-74) présente un singulet aromatique à  $\delta$  8,05 (1H) et 3 méthoxyles à  $\delta$  4,05 ;  $\delta$  4,16 ;  $\delta$  4,2 (9H) en faveur d'un système tri-*O*-méthyllellagique (tableau 15).

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature (Nduji et Okwute, 1988, Serafin *et al.*, 2007) et nous permet d'identifier le composé Alec3-3 à l'**acide 3,3',4'-tri-*O*-méthylflavellagique**.

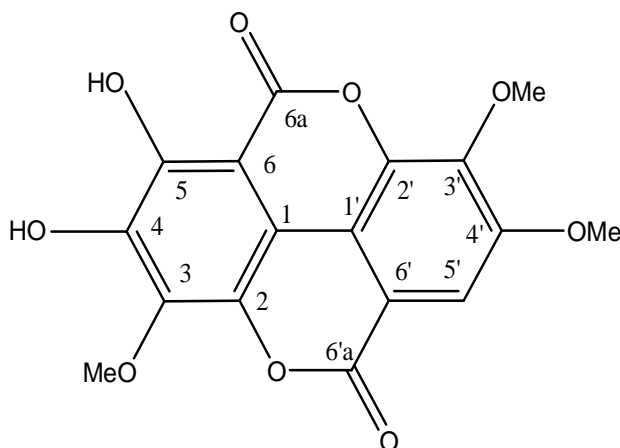
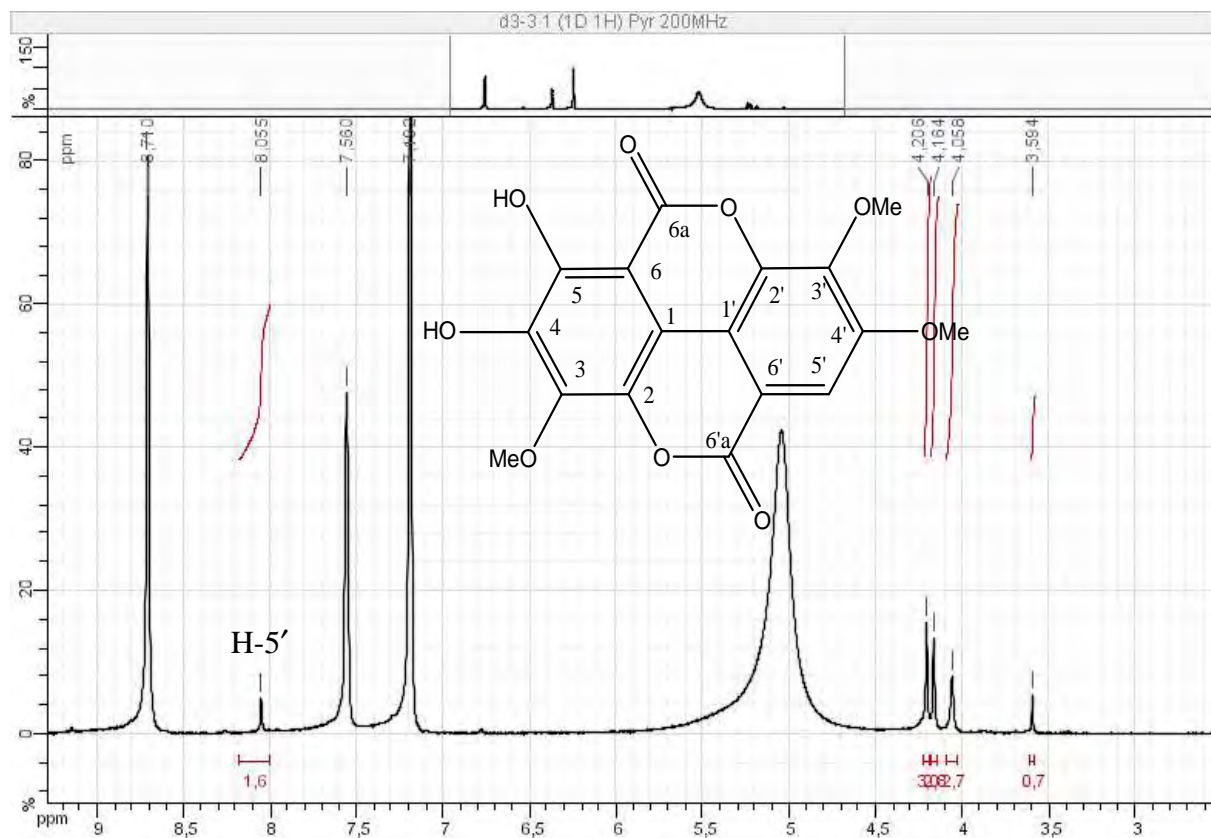
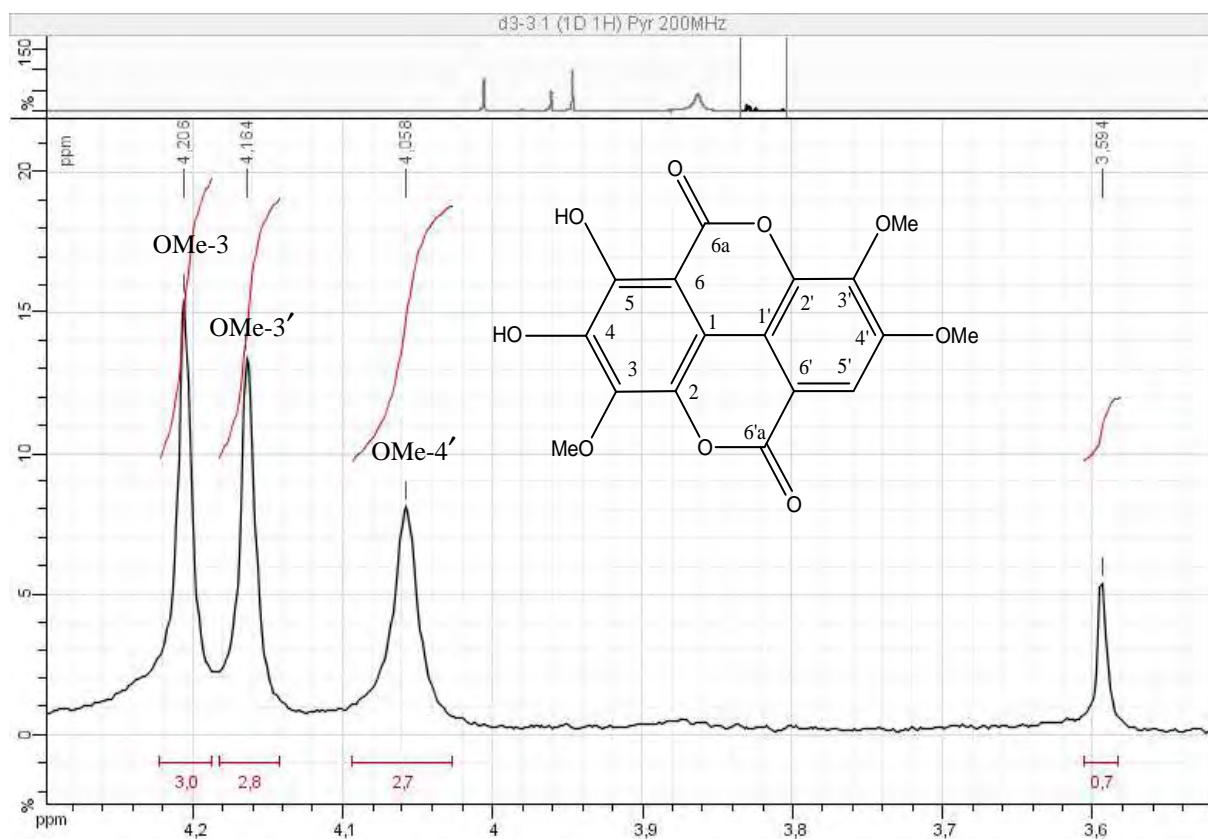


Tableau 15 : Données RMN  $^1H$  (200 MHz) de Alec3-3 obtenus dans la pyridine- $d_5$

N°	$\delta_H$	$J$ (Hz)
5'	8,05	(1H, s)
OMe-3	4,2	(3H, s)
OMe-3'	4,16	(3H, s)
OMe-4'	4,05	(3H, s)



**Figure 73** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) du composé ALec3-3 (pyridine- $d_5$ ).



**Figure 74 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) du composé ALec3-3 (pyridine- $d_5$ ).

Au total,

En plus des 5 triterpènes oléanoliques, 3 constituants supplémentaires ont été identifiés. Il s'agit de dérivés de l'acide ellagique par ailleurs déjà identifiés dans cette espèce : *A. leiocarpus* (Adigun *et al.*, 2000; Nduji et Okwute, 1988).



## 9. Discussion

La famille des Combretacées renferme 20 genres et comporte plus de 600 espèces (Garcez *et al.*, 2003). Les genres *Combretum* et *Terminalia* renferment chacun plus de 200 espèces (Katerere *et al.*, 2003). Le genre *Anogeissus* est plus réduit car il ne comprend que 19 espèces (<http://132.236.163.181>).

La présence des **triterpènes** de type oléanane a été déjà rapportée dans l'espèce *A. latifolia* (Chaturvedi, 1992). On retrouve cette classe de molécules dans d'autres Combretacées, notamment dans les genres *Combretum* et *Terminalia*. Leur présence a ainsi déjà été signalée dans :

- *Terminalia bellerica* (Nandy *et al.*, 1989),
- *T. glaucescens* (Atta-ur-Rahman *et al.*, 2005),
- *T. sericea* (Bombardelli *et al.*, 1974),
- *T. ivorensis* (Iwu et Anyanwu, 1982),
- *T. arjuna* (Row *et al.*, 1970; Anjaneyulu et Rama Prasad, 1982; Upadhyay *et al.*, 2001; Ali *et al.*, 2003),
- *T. brasiliensis* (Araujo et Chaves, 2005),
- *T. myriocarpa* (Majumdar *et al.*, 2005) et
- *T. macroptera* (Conrad *et al.*, 1998, 2001)

ainsi que dans

- *Combretum nigricans* (Jossang *et al.*, 1996),
- *C. quadrangulare* (Adnyana *et al.*, 2000, 2001),
- *C. molle* (Asres *et al.*, 2001),
- *C. leprosum* (Facundo *et al.*, 2005),
- *C. padoides* (Rogers, 1989) et enfin
- *C. imberbe* (Katerere *et al.*, 2003; Rogers, 1988).

Bien que les triterpènes oléanoliques soient répandus chez les combretacées, deux d'entre eux identifiés au cours de ce travail, le trachélospéroside E1 est rapporté pour la première fois dans cette famille alors que les autres sont décrits pour la première fois dans le genre *Anogeissus*.

Les 3 **dérivés d'acide ellagique** isolés ont été déjà identifiés dans d'autres espèces d'*Anogeissus* :

- *A. leiocarpus* (Adigun *et al.*, 2000; Nduji et Okwute, 1988),
- *A. latifolia* (Reddy *et al.*, 1965, 1974; Deshpande *et al.*, 1976; Govindarajan *et al.*, 2005) et
- *A. acuminata* (Lin *et al.*, 1991).

Deux des 3 dérivés ellagiques (acide 3,3',4'-tri-*O*-méthylflavellagique et acide 3,4,3'-tri-*O*-méthylflavellagique-4'- $\beta$ -D-glucoside) ont été isolés à partir d'autres Combretacées comme :

- *Combretum kraussii* (Brookes *et al.*, 1999),
- *Pteleopsis hylodendron* (Atta-ur-Rahman *et al.*, 2001),
- *Terminalia macroptera* (Silva *et al.*, 2000) et
- *T. procera* (Anjaneyulu *et al.*, 1976).

Nos résultats confirment ainsi sur des critères chimiques, le rattachement du genre *Anogeissus* à la famille des Combretacées.

## Références

Adigun JO, Amupitan JO, Kelly DR. Chemical analysis and antimicrobial effects of petroleum spirit extract of *Anogeissus leocarpus*. Nigerian Journal of Chemical Research 2001; 6: 37-42.

Adigun JO, Amupitan JO, Kelly DR. Isolation and investigation of antimicrobial effect of 3,4,3'-Tri-O-methylflavellagic acid and its glucoside from *Anogeissus leocarpus*. Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia 2000; 14(2): 169-74.

Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. Phytochemistry 1992; 31(10): 3307-30.

Almagboul AZ, Bashir AK, Salih AKM, Farouk A, Khalid SA. Antimicrobial activity of certain Sudanese plants used in folkloric medicine. Screening for antibacterial activity (V). Fitoterapia 1988; 59(1): 57-62.

Aspinall GO and Christensen TB. *Anogeissus schimperi* gum. J Chem Soc 1961; 3461-8.

Aspinall GO, Chaudhari AS. Base-catalyzed degradations of carbohydrates. X. Degradation by b-elimination of methylated degraded leiocarpan A. Can J Chem 1975; 53(14): 2189-93

Aspinall GO, Carlyle JJ. *Anogeissus leiocarpus* gum. IV. Exterior chains of leiocarpan A. J Chem Soc C 1969; 5: 851-6.

Aspinall GO, McNab JM. *Anogeissus leiocarpus* gum. III. Interior chains of leiocarpan A. J Chem Soc C 1969; 5: 845-51.

Aspinall GO, Carlyle JJ, McNab JM, Rudowski A. *Anogeissus leiocarpus* gum. II. Fractionation of the gum and partial hydrolysis of leiocarpan A. J Chem Soc C 1969; 5: 840-5.

Aspinall, GO. Exudate gums and their structural relation to other groups of plant polysaccharides. Pure Appl Chem 1967; 14(1): 43-55.

Aspinall GO, McNab JM. Location of 2-O-( $\beta$ -D-glucopyranosyluronic acid)-D-mannose units in leiocarpan A. Chemical Communications 1965.

Asres K, Bucar F, Knauder E, Yardley V, Kendrick H, Croft SL. *In vitro* antiprotozoal activity of extract and compounds from the stem bark of *Combretum molle*. Phytother Res 2001; 15: 613-17.

Atta-ur-Rahman, Zareen S, Choudhary MI, Akhtar MN, Shujaat S, Ngounou FN. Some Chemical Constituents of *Terminalia glaucescens* and their Enzymes Inhibition Activity. Z Naturforsch B 2005; 60(3): 347.

Atta-ur-Rahman, Ngounou FN, Choudhary MI, Malik S, Makhmoor T, Nur-e-Alam et al. New Antioxidant and Antimicrobial Ellagic Acid Derivatives from *Pteleopsis hylodendron*. Planta Med 2001; 67: 335-9.

Augustus GDPS, Seiler GJ. Promising oil producing seed species of Western Ghats (Tamil Nadu, India). *Ind Crop Prod* 2001; 13(2): 93-100.

Babadjamian A, Elias R, Faure R, Ollivier EV, Balansard G. Two- Dimensional NMR Studies of Triterpenoid Glycosides.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Assignments of Hederasaponin C [3-*O*- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-Arabinopyranosyl-Hederagenin 28-*O*- $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Glucopyranosylester]. *Spectroscopy Lett* 1988; 21: 565-73.

Batawila K, Kokou K, Koumaglo K, Gbeassor M, de Foucault B, Bouchet Ph, Akpagana K. Antifungal activities of five Combretaceae used in Togolese traditional medicine. *Fitoterapia* 2005; 76(2): 264-8

Bax A, Summers MF. Proton and carbon-13 assignments from sensitivity-enhanced detection of heteronuclear multiple-bond connectivity by 2D multiple quantum NMR *J Am Chem Soc* 1986; 108: 2093-4.

Bombardelli E, Bonati A, Gabetta B, Mustich G. Triterpenoids from *Terminalia sericea*. *Phytochemistry* 1974; 13: 2559-62.

Brandao MGL, Lacaille-Dubois MA, Teixeira MA, Wagner H. Triterpene saponins from the roots of *Ampelozizyphus amazonicus*. *Phytochemistry* 1992; 31: 352-4.

Breitmaier E, Voelter W. Carbon-13 NMR Spectroscopy. High-Resolution Methods and Applications in Organic Biochemistry, Ed. W. VCH; 1987: 3.

Chaturvedi SK. A new saponin from the leaves of *Anogeissus latifolia*. *Acta Ciencia Indica, Chemistry* 1992; 18(2): 153-4

Conrad J, Vogler B, Klaiber I, Roos G, Walter U, Kraus W. Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark. *Phytochemistry* 1998; 48: 647-50.

Derome AE. The use of n.m.r. spectroscopy in the structure determination of natural products: two-dimensional methods. *Nat Prod Rep* 1989; 6: 111-41.

Deshpande VH, Patil AD, Rama Rao AV, Venkatraman K. 3,3'-Di-*O*-methylellagic acid-4'- $\beta$ -D-xyloside and 3,4,3'-tri-*O*-methylflavellagic acid-4'- $\beta$ -D-glucoside from *Anogeissus latifolia* Bark. *Indian J Chem* 1976; 14B: 641-3

Fumiko A et Tatsuo Y. Glycosides of 19 $\alpha$ -Hydroxyoleanane-type triterpenoids from *Trachelospermum asiaticum* (*Trachelospermum*. IV). *Chem Pharm Bull* 1987; 35(5): 1833-38.

Garcez FR, Garcez WS, Martins M, Lopes FA. Triterpenoids, lignan and flavans from *Terminalia argentea* (Combretaceae). *Biochem Syst Ecol* 2003; 31: 229-32.

Govindarajan R, Vijayakumar M, Singh M, Rao ChV, Shirwaikar A, Rawat AK, Pushpangadan P. Antiulcer and antimicrobial activity of *Anogeissus latifolia*. *J Ethnopharmacol* 2006; 106(1): 57-61.

- Govindarajan R, Vivijayakumar M, Rao CV, Shirwaikar A, Rawat AKS, Mehrotra S, et al. Antioxidant potential of *Anogeissus latifolia*. Biol Pharm Bull 2004a; 27(8): 1266-9.
- Govindarajan R, Vijayakumar M, Rao CV, Shirwaikar A, Mehrotra S, Pushpangadan P. Healing potential of *Anogeissus latifolia* for dermal wounds in rats. Acta Pharm 2004b; 54(4): 331-8.
- Hennenberg KJ, Goetze D, Minden V, Traoré D, Porembski S. Size class distribution of *Anogeissus leiocarpus* (Combretaceae) along forest-savanna ecotones in northern Ivory Coast J Trop Ecol 2005; 21: 1-9.
- Iwu MM, Anyanwu BN. Anti-inflammatory and anti-arthritic properties of *Terminalia ivorensis*. Fitoterapia 1982; 53: 25-34.
- Katerere DR, Gray AI, Nash RJ, Waigh RD. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae Phytochemistry 2003; 63: 81-8.
- Khac DD, Tran Van S, Campos AM, Lallemand JY, Fetizon M. Ellagic compounds from *Diplopanax stachyanthus*. Phytochemistry 1990; 29(1): 251-56.
- Kojima H, Ogura H. Configurational studies on hydroxy groups at C-2, 3 and 23 or 24 of oleanene and ursane-type triterpenes by NMR spectroscopy. Phytochemistry 1989; 28(6): 1703-10.
- Lanzetta R, Laonigro G, Parilli M, Breitmaier E. Glycosides from *Muscaricomosum*. 6. Use of homo- and heteronuclear two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy for the structure determination of the novel glycoside muscaroside C. Can J Chem 1984; 62: 2874-8.
- Lin T, Tanaka T, Nonaka G, Nishioka I, Young TJ. Tannins and related compounds. CVIII. Isolation and characterization of novel complex tannins (flavano-ellagitannins), anogeissinin and anogeissusins A and B, from *Anogeissus acuminata* (Roxb ex DC.) Guill. et Perr. var. *lanceolata* Wall. ex Clarke. Chem Pharm Bull 1991; 39(5): 1144-7.
- Mackie A, Mieras DG. Seeds of selected tropical plants. I. Component acids of the fats or oils. Journal of the Science of Food and Agriculture 1961; 12: 202-5.
- Mahato SB, Kundu AP. <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids- a compilation and some salient features. Phytochemistry 1994; 37(6): 1517-75.
- Mahato SB, Nandy AK, Kundu AP. Pentacyclic triterpenoid saponins and their glycosides from *Terminalia bellerica*. Tetrahedron 1992; 48: 2483-94.
- Mahato SB, Ganguly AN, Sahu NP. Steroid saponins. Phytochemistry 1982; 21: 959-78.
- Massiot G, Lavaud C, Delaude C, Van binst G, Miller SF, Fales HM. Saponins from *Tridesmostemon claessenssi*. Phytochemistry 1990; 29: 3291-98.

Massiot G, Lavaud C, Le Men-Olivier L, Van binst G, Miller SF, Fales HM. Structural elucidation of alfalfa root saponins by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance analysis. *J Chem Soc Perkin Trans1*; 1988: 3071-79.

Muller L. Sensitivity enhanced detection of weak nuclei using heteronuclear multiple quantum coherence. *J Am Chem Soc* 1979; 101: 4481-4.

Nandy AK, Podder G, Sahu NP, Mahato SB. Triterpenoids and their glucosides from *Terminalia bellerica*. *Phytochemistry* 1989; 28: 2769-72.

Nduji AA, Okwute SK. Co-occurrence of 3,3',4'-tri-*O*-methylflavellagic acid and 3,3'-di-*O*-methylellagic acid in the bark of *Anogeissus schimperii*. *Phytochemistry* 1988; 27(5): 1548-50.

Nduji AA, Okwute, SK. Studies on marke (*Anogeiss schimperii*): Part III. Isolation of gentisic, protocatechuic and gallic acids from marke leaves. *Leather Sci* 1983; 30(9): 278-9.

Okpekon T, Yolou S, Gleye C, Roblot F, Loiseau P, Bories et al. Antiparasitic activities of medicinal plants used in Ivory Coast. *J ethnopharmacol* 2004; 90(1): 91-7.

Oliver-Bever B. *Medicinal Plants in Tropical West Africa*. Cambridge: Cambridge University Press,; 1986: 87.

Paris M, Hurabielle M. *Abrégé de Matière Médicale*, Paris Ed. Masson. 1981: Tome 1.

Perera P, Andersson R, Bohlin L, Andersson C, Li D, Owen NL, Dunkel R, Mayne CL, Pugmire RJ, Grant DM, Cox PA. Structure determination of a new saponin from the plant *Alphitonia zizyphoides* by NMR spectroscopy. *Magn Res Chem* 1993; 31: 472-80.

Pinkas M, Trotin F, Bezager-Beauquesne L. Les saponosides. *Prod Prob Pharm* 1972; 27: 187-98.

Reddy KK, Rajadurai S, Nayudamma Y. Dhava (*Anogeissus latifolia*) tannins. III. Polyphenols of bark, sapwood, and heartwood of dhava. *Indian Journal of Chemistry* 1965; 3(7): 308-10.

Reddy KRS, Srimannarayana G, Rao NVS. Isolation of 3,3',4'-tri-*O*-methylflavellagic acid from bark of *Anogeissus latifolia*. *Curr Sci* 1974; 43(17): 544-5.

Reddy KK, Sastry KNS, Rajadurai S, Nayudamma Y. Studies in biosynthesis of tannins in indigenous plants. III. Polyols, plant acids, and amino acids of dhava. *Bull Central Leather Research Inst* 1961; 8: 64-6.

Rimando AM, Pezzuto JM, Farnsworth NM. New lignans from *Anogeissus acuminata* with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. *J Nat Prod* 1994a; 57(7): 896-904.

Rimando AM, Pezzuto JM, Farnsworth NR, Santisuk T, Reutrakul V. Revision of the NMR assignments of pterostilbene and of dihydrodehydrodiconiferyl alcohol: cytotoxic constituents from *Anogeissus acuminata*. *Nat Prod Lett* 1994b; 4(4): 267-72.

Rogers CB. Pentacyclic triterpenoid rhamnosides from *Combretum imberbe* leaves. *Phytochemistry* 1988; 27: 3217-20.

Rogers CB. New mono- and desmosidic triterpenoids isolated from *Combretum padoides* leaves. *J Nat Prod* 1989; 56: 528-33.

Rotimi V O, Laughon B E, Bartlett J G, Mosadomi H A. Activities of Nigerian chewing stick extracts against *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides melaninogenicus*. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 1988; 32(4): 598-600.

Sadler IH. The use of n.m.r. spectroscopy in the structure determination of natural products: one-dimensional methods. *Nat Prod Rep* 1988; 5: 101-27.

Sanogo R, Crisafi G, Germano MP, De Pasquale R, Bisignano G. Evaluation of Malian traditional medicines: screening for antimicrobial activity. *Phytother Res* 1998; 12: S154-S156.

Serafin S, Nart V, Malheiros A, Maria de Souza M, Luiz Fischer, Giuliano Delle Monache, Franco Delle Monache, Filho VF. Bioactive Phenolic Compounds from Aerial Parts of *Plinia glomerata*. *Z Naturforsch* 2007; 62c: 196-200.

Siddiqui BS, Faizi GS, Siddiqui S. Triterpenoids from the fresh fruit coats of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry* 1992; 31: 4275-78.

Taiwo O, Xu HX, Lee SF. Antibacterial activities of extracts from Nigerian chewing sticks. *Phytother Res* 1999; 13(8): 675-9.

Terreaux C, Maillard MP, Gupta MP, Hostettmann K. Triterpenes and triterpene glycosides from *Paradrymonia macrophylla*. *Phytochemistry* 1996; 42: 495-99.

Tischer CA, Iacomini M, Wagner R, Gorin PAJ. New structural features of the polysaccharide from gum ghatti (*Anogeissus latifolia*). *Carbohydr Res* 2002; 337: 2205-10.

Vonthron-Senecheau C, Weniger B, Ouattara M, Bi Fezan T, Kamenan A, Lobstein A, Brun R, Anton R. *In vitro* antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected Ivorian plants. *J ethnopharmacol* 2003; 87(2-3): 221-5.

Ye D, Shulin P, Xiaorong Z, Lisheng D, Mingkui W. Triterpenoid from *Rubus buergeri*. *Zhiwu Xuebao* 2001; 43(6): 644-46.

Yeo H, Park SY, Kim J. A-ring contracted triterpenoid from *Rosa multiflora*. *Phytochemistry* 1998; 48: 1399-1401.

Yoshikawa K, Shimono N, Arihara S. Antisweet natural products. VI. Jujubasaponins IV, V and VI from *Zizyphus jujuba* MILL. *Chem Pharm Bull* 1992; 40: 2275-8.

Young M, Claudia M, Araújo AR, da Silva CA, Lopes MN, Trevisan LMV, Bolzani VS. Triterpenes and saponins from *Rudgea viburnioides*. *J Nat Prod* 1998; 61: 936-8.

<http://fr.wikipedia.org/wiki/Combretaceae>

## Triterpenes and polyphenols from *Anogeissus leiocarpus* (Combretaceae)

Mehdi Chaabi<sup>a,b</sup>, Samir Benayache<sup>b</sup>, Fadila Benayache<sup>b</sup>, Saliou N'Gom<sup>a</sup>,  
Mamadou Kone<sup>c</sup>, Robert Anton<sup>a</sup>, Bernard Weniger<sup>a</sup>, Annelise Löbstein<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Pharmacognosie et Molécules Naturelles Biactives, Faculté de Pharmacie de Strasbourg,  
BP 60024, 67401 Illkirch cedex, France

<sup>b</sup>Laboratoire de Valorisation des Ressources Naturelles, Faculté des Sciences de l'Université Menoufi de Constantine,  
Route Ain El-Bey, 25000 Constantine, Algeria

<sup>c</sup>Laboratoire de Chimie organique, Faculté des Sciences et Techniques, BP 5414, Dakar, Senegal

Received 15 February 2007; accepted 19 May 2007

**Keywords:** *Anogeissus leiocarpus*; Combretaceae; Saponin; Oleanane-type triterpene; Ellagic acid derivative

### 1. Subject and source

*Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perz (synonym: *Anogeissus schimper* Hochst. ex Hutch & Dalziel) (Combretaceae) is a woody species commonly found in forest savannahs of West Africa (Oliver-Reyes, 1986; Hermsberg et al., 2005). Its bark was collected in Niakobé Kofa National Park in southeastern Senegal, in November 2004 and identified by the botanist Dr. Mhaye, M.S. (University Cheikh Anta Diop, Dakar). A voucher specimen (8580, 26.X.1941) was deposited in the Herbarium, Laboratory of Botany, Institut Fondamental d'Afrique Noire (IFAN), Dakar.

### 2. Previous work

In previous phytochemical studies, polyphenolic compounds identified as 3,3,5'-tri-*O*-methylgallic acid, 3,4,5-tri-*O*-methylgallic acid-4'- $\beta$ -*D*-glucoside, gentisic, protocatechic, and gallic acids, and the tannins chebulagic acid, chebulinic acid and ellagic acid were reported from *A. leiocarpus* (Ndaïf et al., 1982; Ndaïf and Ouwat, 1983; Adigun et al., 2000). Long chained hydrocarbons (tricosane and octacosane), saturated carboxylic acids (tetradecanoic, hexadecanoic and octadecanoic acids), unsaturated acids (linoleic and oleic acids and their methyl esters), together with triglycerides and cholesterol, were also isolated from the petroleum ether extract of whole plant of this species (Adigun et al., 2001). The unique saponin mentioned in the genus was identified as 3-*O*-acetyl-olean-12-en-28-*oic-O* [ $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*]- $\beta$ -*D*-xylopyranoside, isolated from the leaves of *Anogeissus latifolia*

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 90 24 42 39; fax: +33 3 90 31 43 11.  
E-mail address: [annelise.loebstein@pharma.u-strasbg.fr](mailto:annelise.loebstein@pharma.u-strasbg.fr) (A. Löbstein).



(Chaturvedi, 1992). To our knowledge, no other triterpene has been reported from this genus, famous for the polysaccharide content of its gum ("gum ghatti") (Fischer et al., 2002).

No traditional uses of the bark of *A. leucarpus* are reported in the literature. However, the bark of the related species *A. latifolia* is used in the treatment of skin diseases, snake and scorpion bites, stomach diseases, colics, cough and diarrhoea (Jain, 1991). The leaves of *A. leucarpus* are also used in the treatment of various health problems including skin diseases, fever, diarrhoea, malaria, and stomach infections (Sanogo et al., 1998; Fyhrquist et al., 2002; Okpekon et al., 2004). Because of its high content of tannins (23%), it is also used in leather tannery (Nhuji and Okwome, 1987). A previous study carried out on this species demonstrated good antiproliferative activity of a methylene chloride extract of *A. leucarpus* leaves (Mouhram-Sénécheau et al., 2003).

### 3. Present study

In this study, the isolation and identification are reported of five known triterpenes and triterpene glycosides isolated for the first time from the genus *Apocynum*, namely sericoside 1, its related aglycone sericic acid 2, trachelosperoside E1 3, its related aglycone trachelosperogenin E 4, and arjungenin 5 (Fig. 1).

Compound 1 was previously reported in *Terminalia glaucescens* (stem bark) (Akin-Adesakin et al., 2005), *Terminalia macroptera* (bark) (Courad et al., 1998), *Terminalia sericea* (Bombardelli et al., 1974) (roots), *Combretum molle* (stem bark) (Axens et al., 2001) and *Parastyracis macrophylla* (stems and roots) (Terreux et al., 1996). Compound 2 was previously identified in *T. sericea* (Bombardelli et al., 1974) (roots), *Terminalia ivorensis* (stem bark) (Twa and Anyanwa, 1982), *T. macroptera* (bark) (Courad et al., 1998) and *Rosa multiflora* (roots) (Yeo et al., 1998). Compound 3 was previously isolated from *Rudgia rhomboides* (fruit rinds) (Young et al., 1993) and *Trachelospermum asiaticum* (whole plant) (Fumiko and Tatsuo, 1987). Compound 4 was previously reported from *T. asiaticum* (whole plant) (Fumiko and Tatsuo, 1987) and *Terminalia bellerica* (bark) (Mishra et al., 1992) and 5 was identified in *Terminalia arjuna* (whole plant) (Houda et al., 1976), *T. bellerica* (stem bark) (Nandy et al., 1989), *Combretum nigricans* (bark) (Jossang et al., 1996), and *Combretum quadrangulare* (seeds) (Adnyana et al., 2000, 2001).

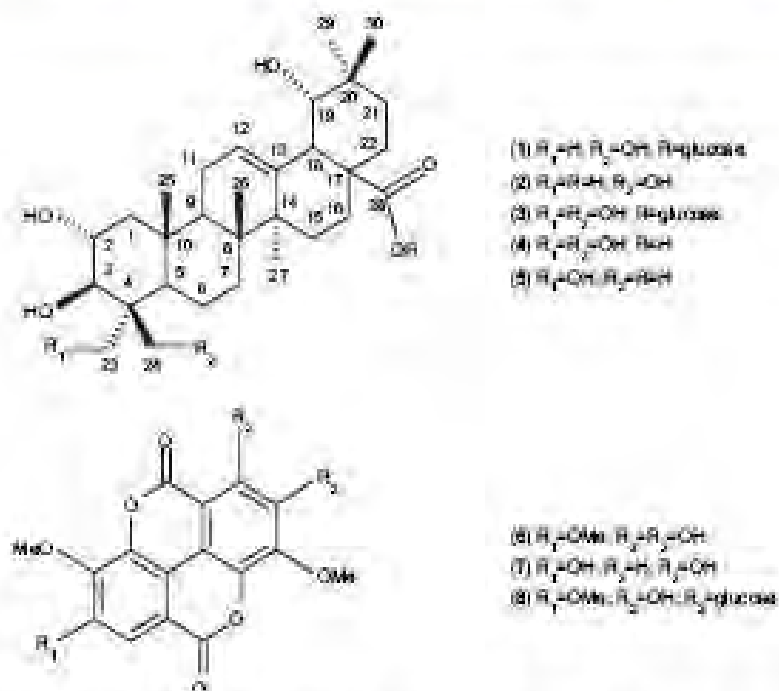


Fig. 1. Structure of triterpenes (1–5 and 6) (lignic acid derivatives 6–8) (all) (all) from *A. leucarpus* bark: sericoside 1; sericic acid 2; trachelosperoside E1 3; trachelosperogenin E 4; arjungenin 5; 3,3',4'-tri-*O*-methoxyflavone lignic acid 6; 3,3'-di-*O*-methoxyflavone lignic acid 7 and 3,4,3'-tri-*O*-methoxyflavone lignic acid-4'- $\beta$ -*D*-glucoside 8.

Three ellagic acid derivatives, identified as 3,3',4'-tri-*O*-methylflavellagic acid 6, 3,3'-di-*O*-methylflavellagic acid 7 and 3,4,3'-tri-*O*-methylflavellagic acid-4'- $\beta$ -*D*-glucoside 8, were also isolated from the bark of *A. leiocarpus* (Fig. 1). Their occurrence in this species confirms previous phytochemical studies (Adigun et al., 2000; Nduji and Okwute, 1988).

All of the compounds were identified unambiguously on the basis of their UV and  $^1\text{H}$ NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra. All experimental data were in agreement with the respective data in the literature.

A sample (50 g) of the bark of *A. leiocarpus* was finely powdered and extracted for 12 h (3  $\times$ ) with 80% EtOH/H<sub>2</sub>O (500 ml). The extracts were pooled and evaporated under reduced pressure to yield a residue (3.1 g, 6.21% w/w). Fractionation was carried out using a Sephadex LH-20 column with a stepwise gradient elution with H<sub>2</sub>O/MeOH. Fractions were combined according to their TLC profiles, yielding five major fractions. Fraction 1 (60 mg) (200 ml) (90:10) was purified by preparative TLC (silica gel) using EtOAc/MeOH/H<sub>2</sub>O (100:17:13) as eluent, to afford compounds 1 (9 mg) and 3 (10 mg). The purification of fraction 2 (500 ml) (80:20 to 40:60) (225 mg) by preparative RP-HPLC using H<sub>2</sub>O/acetonitrile gradient elution, afforded compounds 2 (15 mg), 4 (5 mg), 5 (2 mg), 6 (3 mg), 7 (2.5 mg) and 8 (3.5 mg).

#### 4. Chemotaxonomic significance

The Combretaceae family comprises 20 genera and more than 600 species (Ezell, 1970; Garcez et al., 2003). *Combretum* and *Terminalia* are the largest genera, with over 200 species each (Katerere et al., 2003). The genus *Anogeissus* comprises 19 species (<http://132.236.163.181>).

The occurrence of okanane-type triterpenes was previously reported in *A. latifolia* (Chaturvedi, 1992). This class of compounds occurs also in other Combretaceae genera, particularly in the genera *Terminalia* and *Combretum*. Their occurrence has been reported in *T. bellerica* (Nandy et al., 1989), *T. glaucescens* (Atta-ur-Rahman et al., 2005), *T. sericea* (Bombardelli et al., 1974), *T. ivorensis* (Iwu and Anyanwu, 1982), *T. arjuna* (Row et al., 1970; Anjaneyulu and Rama Prasad, 1982; Upadhyay et al., 2001; Ali et al., 2003), *Terminalia brasiliensis* (Araujo and Chaves, 2005), *Terminalia myriocarpa* (Majumdar et al., 2005) and *T. macroptera* (Conrad et al., 1998, 2001), as well as in *C. nigricans* (Jossang et al., 1996), *C. quadrangulare* (Adnyana et al., 2000, 2001), *C. molle* (Asres et al., 2001), *Combretum leprosum* (Facundo et al., 2005), *Combretum padoides* (Rogers, 1989) and *Combretum imberbe* (Katerere et al., 2003; Rogers, 1988).

Although clemanane-type triterpenes appear widespread in the Combretaceae, compound 3 is reported for the first time herein in this family and it is the first report of the presence of compounds 1, 2, 4 and 5 in the genus *Anogeissus*.

Ellagic acid derivatives 6–8, on the other hand, were previously isolated from *A. latifolia* bark and heartwood (Reddy et al., 1965, 1974; Deshpande et al., 1976; Deshpande and Patil, 1981; Govindarajan et al., 2005), as well as from *A. leiocarpus* (Nduji and Okwute, 1988; Adigun et al., 2000) and *Anogeissus acuminata* (Lin et al., 1991). The presence of a great amount of gallic acid, the precursor of ellagic acid and hydrolysable tannins, was reported in *A. latifolia* bark and related to the potent antioxidant activity exhibited by this plant (Govindarajan et al., 2004). The ellagic acid derivatives 6–8 were previously identified in other Combretaceae, such as *Combretum kraussii* (Brookes et al., 1999), *Pteleopsis hylodendron* (Atta-ur-Rahman et al., 2001), *T. macroptera* (Silva et al., 2000) and *Terminalia procera* (Anjaneyulu et al., 1976).

Thus, the results of the present phytochemical study of *A. leiocarpus* bark are in chemotaxonomic accordance with the previous phytochemical data reported for the *Anogeissus* genus and the Combretaceae family.

#### Acknowledgements

The authors would like to express their gratitude to Lieve Declercq and Hugo Corstjens for their collaboration and to the E. Lauder Company for its financial support.

#### References

- Adigun, J.O., Anupitan, J.O., Kelly, D.R., 2000. Bull. Chem. Soc. Ethiop. 14, 169.
- Adigun, J.O., Anupitan, J.O., Kelly, D.R., 2001. Niger. J. Chem. Res. 6, 37.
- Adnyana, J.K., Tenka, Y., Awale, S., Banskota, A.H., Tera, K.Q., Kabata, S., 2000. Chem. Pharm. Bull. 48, 1114.

- Adiyana, I.K., Tezuka, Y., Baskota, A.H., Tran, K.Q., Kaloupek, S., 2001. *J. Nat. Prod.* 64, 360.
- Ali, A., Abdullāh, S.T., Hamid, H., Ali, M., Alam, M.S., 2008. *Indian J. Chem.* 42B, 2905.
- Anjaneyulu, A.S.R., Rama Prasad, A.V., 1982. *Phytochemistry* 21, 2057.
- Anjaneyulu, A.S.R., Ramachandra Rao, L., Sree, A., 1976. *Curr. Sci.* 45, 864.
- Araujo, D.S., Chaves, M.H., 2005. *Quim. Nova* 28, 996.
- Asres, K., Bucar, F., Knudsen, E., Yordley, V., Kendrick, H., Croft, S.L., 2001. *Phytother. Res.* 15, 613.
- Amu-ur-Rahman, Ngoumou, F.N., Choudhury, M.J., Malik, S., Makhlouf, T., Nur-o-Alam, M., Zareen, S., Loutfi, D., Ayafor, J.F., Soudagan, B.L., 2001. *Planta Med.* 67, 335.
- Amu-ur-Rahman, Zareen, S., Choudhury, M.J., Akhtar, M.N., Shujaat, S., Ngoumou, F.N., 2005. *Z. Naturforsch. B* 60 (3), 347.
- Bombardelli, E., Bonati, A., Galema, B., Mustich, G., 1974. *Phytochemistry* 13, 2559.
- Brookes, K.B., Doudoukiss, O.V., Katsoulis, I.C., Veale, D.J.H., 1999. *S. Afr. J. Chem.* 52, 127.
- Chaturvedi, S.K., 1992. *Acta Chem. Indica Chem.* 18, 153.
- Conrad, J., Vogler, B., Kläiber, I., Reeb, S., Walter, U., Kraus, W., 1998. *Phytochemistry* 48, 647.
- Conrad, J., Vogler, B., Kläiber, I., Reeb, S., Guse, J.H., Roos, G., Kraus, W., 2001. *Nat. Prod. Lett.* 15, 35.
- Deshpande, V.H., Patil, A.D., Rama Rao, A.V., Venkatraman, K., 1976. *Indian J. Chem.* 14B, 641.
- Deshpande, V.H., Patil, A.D., 1981. *Indian J. Chem.* 20B, 1010.
- Ezell, A.W., 1970. *J. Gov. Herbar. Rhod.* 7, 159.
- Facundo, V.A., Rios, K.A., Medeiros, C.M., Militao, J.S.L.T., Miranda, A.L.P., Epifanio, R.A., Carvalho, M.P., Andrade, A.T., Pinto, A.C., Rezende, C.M., 2005. *J. Braz. Chem. Soc.* 16, 1309.
- Furuko, A., Tazuo, Y., 1987. *Chem. Pharm. Bull.* 35, 1833.
- Fyfequist, P., Mwambi, L., Haggstoft, C.-A., Vuorela, H., Hiltunen, R., Vuorela, P., 2002. *J. Ethnopharmacol.* 79, 169.
- Garcex, F.R., Garcex, W.S., Martins, M., Lopes, F.A., 2008. *Biochem. Syst. Ecol.* 31, 229.
- Govindanjan, R., Vijayakumar, M., Rao, C.V., Shirwaikar, A., Rawat, A.K.S., Mehrotra, S., Pushpangadan, P., 2004. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1266.
- Govindanjan, R., Vijayakumar, M., Shirwaikar, A., Rawat, A.K.S., Mehrotra, S., Pushpangadan, P., 2005. *Nat. Prod. Sci.* 11, 174.
- Hennenberg, K.J., Goetze, D., Minden, V., Tineré, D., Porembkii, S., 2005. *J. Trop. Ecol.* 21, 273.
- Honda, T., Murai, T., Tsuyuki, T., Takahashi, T., 1976. *Chem. Pharm. Bull.* 24, 178.
- Iwu, M.M., Anjuresu, B.N., 1982. *Fitoterapia* 53, 25.
- Jain, S.K., 1991. *Dictionary of Indian Folk Medicine and Ethnobotany*. Deep Public., New Delhi, India.
- Jossang, A., Scalliman, M., Mialou, E., Bodo, B., 1996. *Phytochemistry* 41, 591.
- Kaczere, D.R., Gray, A.I., Nash, R.J., Wigh, R.D., 2003. *Phytochemistry* 63, 81.
- Lin, T.-C., Tanaka, T., Nomika, G., Nishioka, I., Young, T.-J., 1991. *Chem. Pharm. Bull.* 39, 1144.
- Mahato, S.B., Nandy, A.K., Kundu, A.P., 1992. *Tenshedron* 48, 2483.
- Majumdar, K., Biswas, M., Sen, U.K., Das, S., 2005. *J. Indian Chem. Soc.* 82, 673.
- Nandy, A.K., Podder, G., Sahu, N.P., Mahato, S.B., 1989. *Phytochemistry* 28, 2769.
- Ndiji, A.A., Okwue, S.K., SindhuRao, V.S., Margaret, T.Y., Vijayanarayya, T., 1982. *Leather Sci.* 29, 406.
- Ndiji, A.A., Okwue, S.K., 1983. *Leather Sci.* 30, 278.
- Ndiji, A.A., Okwue, S.K., 1987. *J. Leather Res.* 5, 25.
- Ndiji, A.A., Okwue, S.K., 1988. *Phytochemistry* 27, 1548.
- Okpelen, T., Yéou, S., Gleye, C., Roblot, F., Loiseau, P., Boies, C., Grellier, P., Frappier, F., Laurens, A., Hocquemiller, R., 2004. *J. Ethnopharmacol.* 90, 91.
- Oliver-Bever, B., 1986. *Medicinal Plants in Tropical West Africa*. Cambridge University Press, Cambridge, 87 pp.
- Roddy, K.K., Rajadurai, S., Niyudemma, Y., 1965. *Indian J. Chem.* 3, 308.
- Roddy, K.R.S., Srimannarayana, G., SubbaRao, N.V., 1974. *Curr. Sci. India* 43, 544.
- Rogers, C.B., 1988. *Phytochemistry* 27, 3217.
- Rogers, C.B., 1989. *J. Nat. Prod.* 52, 528.
- Row, I.R., Murty, P.S., Rao, G.S.R.S., Sastry, C.S.P., Rao, K.V.J., 1970. *Indian J. Chem.* 8, 716.
- Sonogo, R., Chisoff, G., Germano, M.P., De Pasquale, R., Bisignano, G., 1998. *Phytother. Res.* 12, 5154.
- Silva, O., Gomes, E.T., Wolfender, J.-L., Marston, A., Hostettmann, K., 2000. *Pharm. Res.* 17, 1396.
- Terreux, C., Maillard, M.P., Gupta, M.P., Hostettmann, K., 1996. *Phytochemistry* 42, 495.
- Tischer, C.A., Iacomini, M., Wagner, R., Gorin, P.A.J., 2002. *Carbohydr. Res.* 337, 2205.
- Upadhyay, R.K., Pandey, M.B., Jha, R.N., Singh, V.P., Pandey, V.B., 2001. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 3, 207.
- Venkton-Sénécheau, C., Weniger, B., Ouattara, M., Tu, H., Kamerling, A., Lobstein, A., Brun, R., Anton, R., 2003. *J. Ethnopharmacol.* 87, 221.
- Yeo, H., Park, S.-Y., Kim, J., 1998. *Phytochemistry* 48, 1399.
- Young, M., Claudia, M., Araújo, A.R., da Silva, C.A., Lopes, M.N., Trevisan, L.M.V., Bolzani, V.S., 1998. *J. Nat. Prod.* 61, 986.

**Chapitre 3 :**

**Fractionnement bioguidé**

**d'actifs antioxydants de *Limoniastrum feei* (Girard)**

**Batt. (Plumbaginaceae)**

## Introduction

Depuis l'ère préhistorique, les plantes sont à la base de la quasi-totalité des médicaments, et ce bien avant le développement des médicaments synthétiques au 19<sup>ème</sup> siècle (Dahanukar *et al.*, 2000; Exarchou *et al.*, 2002). Elles ont été utilisées dans de nombreux domaines incluant par exemple la médecine, la nutrition, l'assaisonnement, les boissons, les teintures et les cosmétiques. L'effet conservateur de plusieurs plantes aromatiques (épices, condiments) suggère la présence de constituants anti-oxydants et antimicrobiens (Hirasa et Takemasa, 1998). L'intérêt accru des anti-oxydants d'origine naturelle dans le but d'augmenter la conservation des aliments s'explique par le fait que certains anti-oxydants synthétiques présentent des risques de cancérogénicité (Velioglu *et al.*, 1998).

De nombreuses **plantes**, alimentaires ou médicinales, renferment des constituants anti-oxydants. L'apport régulier en phytonutriments possédant des capacités anti-oxydantes significatives est associé à une faible prévalence de maladies liées au stress oxydatif (cancers, maladies cardiovasculaires et athérosclérose) (Bravo, 1998) et à un faible taux de mortalité (Anderson *et al.*, 2001).

Les constituants anti-oxydants d'origine végétale appartiennent à plusieurs classes chimiques, dont les caroténoïdes et les **polyphénols**. Dans les plantes, la synthèse et l'accumulation des polyphénols est généralement stimulée en réponse à différents stress, biotiques ou abiotiques (Dixon et Paiva, 1995 ; Sreenivasulu *et al.*, 2000 ; Naczki et Shahidi, 2004). Ces stress peuvent être de différentes natures : rayonnement UV intense et prolongé, pollution atmosphérique, salinité, par exemple (Navarro *et al.*, 2006). Une corrélation entre la capacité anti-oxydante et la tolérance au chlorure de sodium a ainsi été démontrée dans plusieurs espèces comme *Pisum sativum* (Hernández *et al.*, 2000) et *Cassia angustifolia* (Agarwal et Pandey 2004).

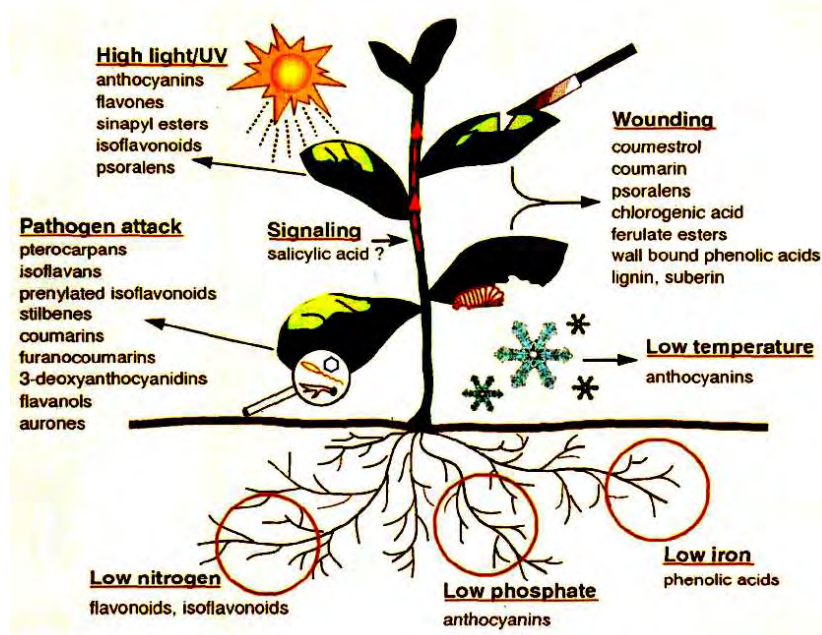
Les **flavonoïdes** représentent un large groupe de composés phénoliques de faible poids moléculaire, biosynthétisés dans tous les végétaux (Bravo, 1998). Ils présentent de multiples activités biologiques : anti-cancérogène, anti-inflammatoire, anti-virale (Hertog et Holland, 1996), anti-agrégant plaquettaire, veinotonique, par exemple. Leurs mécanismes d'action sont aujourd'hui en grande partie élucidés (Aherne et O'Brien, 1999). Ce sont également de très bons anti-oxydants, des chélateurs de cations divalents et des piègeurs de radicaux libres (Middelton, 1996 ; Mora *et al.*, 1990). A ce titre, ils sont aujourd'hui incorporés dans de nombreux produits de santé comme les compléments alimentaires, dans le but de préserver l'organisme du vieillissement cellulaire et de maladies chroniques.

Les **flavones** et les **anthocyanes** augmentent la réponse à la lumière visible de forte intensité. Ils sont probablement synthétisés par les végétaux dans le but d'atténuer l'intensité de la lumière qui atteint les cellules photosynthétiques. Ce sont néanmoins les radiations UV qui induisent la synthèse des flavonoïdes (particulièrement les dérivés du kaempférol) et les esters de sinapates dans le genre *Arabidopsis* ainsi que les isoflavonoïdes et les psoralènes chez d'autres espèces (Lois, 1994). En qualité de filtres UV naturels, ces composés pourraient conférer au végétal des moyens de protection contre les dommages causés notamment par les UV<sub>B</sub> et entraînant une mort cellulaire et ce, en protégeant l'ADN, évitant sa dimérisation et sa dégradation.

Ce chapitre présente l'étude phytochimique d'une espèce végétale croissant en milieu semi-désertique, *Limoniastrum feei*, soumis à un environnement très oxydatif : actions des UV<sub>B</sub>, stress hydrique important et prolongé, température élevée dépassant les 45°C. Cette plante a été sélectionnée à la suite d'un criblage de plusieurs espèces sahariennes, sur la base de leurs activités anti-oxydantes. Le but de ce travail a été d'identifier les métabolites secondaires impliqués directement dans le système défensif de la plante contre les facteurs de génération d'un stress oxydant naturellement induit par son biotope extrême.

## 2. Le stress oxydant

### 2.1. Historique



**Figure 1 :** Rôle protecteur des métabolites secondaires biosynthétisés par la plante.

Depuis le début du 20<sup>ème</sup> siècle, les chimistes ont étudié les anti-oxydants, caractérisés par leur capacité à s'oxyder à la place d'autres molécules. Leur impact sur la santé n'a été étudié par les biologistes que dans les années 60 grâce aux travaux effectués sur les vitamines et les flavonoïdes, suivies par les travaux sur l'acide ascorbique à la fin des années 70 (Cameron *et al.*, 1976). Le rôle des anti-oxydants comme agents protecteurs vis-à-vis des cancers a été beaucoup étudié, tant sur leurs mécanismes d'action, l'identification de leurs cibles, que leurs interactions moléculaires (Wattenberg *et al.*, 1978 ; Young *et al.*, 1981 ; Ames, 1983 ; Willett *et al.*, 1984 ; American Institute for Cancer Research; 1997). Il n'est donc pas surprenant que l'emploi d'anti-oxydants soit très répandu aux Etats-Unis : en effet, on estime que plus de la moitié de la population américaine a recours à des suppléments diététiques à visée anti-oxydante, un tiers concernant des multivitamines et un huitième de la vitamine E et/ou de la vitamine C (Radimer *et al.*, 2004).

## 1.2. Les radicaux libres (RL)

Les radicaux libres (RL) sont des atomes ou des molécules dont une orbitale contient un électron non apparié.

- Ce sont les sous-produits des réactions d'oxydation et de réduction.
- Ils sont cliniquement hyperactifs et capables d'extraire un électron des molécules voisines pour combler la vacance de leur orbitale.
- Ils induisent des dommages et des lésions sur l'ADN, les protéines cellulaires essentielles et les lipides membranaires.
- Ils initient des réactions en cascade, telle que la peroxydation lipidique (d'où altération des membranes et mort cellulaire).

Leur hyperproduction est à la base des explications physiopathologiques des grandes maladies dites neurodégénératives : sclérose en plaques, maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer et vieillissement cérébral. (Olanow, 1993).

## 1.3. Principaux radicaux libres oxygénés et leur origine

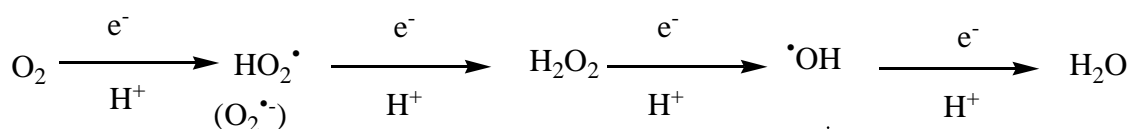
Plusieurs initiateurs de processus transmis par les RL comme la peroxydation lipidique, la destruction oxydative des protéines et l'ADN, les dommages cellulaires, sont aujourd'hui bien connus. Parmi ces initiateurs, citons les RL, les métaux de transition, les polluants, les médicaments, les produits alimentaires, les radiations, voire même le champ magnétique (Denisov et Afanas'ev, 2005).

Ils produisent tous des radicaux libres, comme le superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), l'hydroxyle ( $^{\bullet}OH$ ), le perhydroxyle et le monoxyde d'azote ( $NO^{\bullet}$ ).

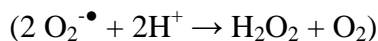
### 1.3.1. L'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ )

L'anion superoxyde est une forme réduite de l'oxygène moléculaire généré par la capture d'un électron. Il s'agit d'un radical libre initial formé dans la chaîne respiratoire mitochondriale. La mitochondrie génère l'énergie utilisant 4 électrons dans la chaîne réactionnelle, réduisant l'oxygène en eau. Quelques électrons échappés de la chaîne réactionnelle de la mitochondrie réagissent directement avec l'oxygène et forment les anions superoxyde (Harman *et al.*, 2000).

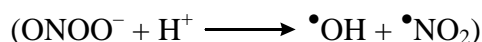




L'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) joue un rôle important dans la formation des espèces réactives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), le radical hydroxyle (•OH), ou l'oxygène singulet (O). (Stief, 2003).

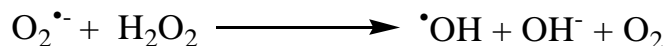


L'anion superoxyde peut réagir avec le monoxyde d'azote (NO<sup>•</sup>) pour former le peroxyde d'azote (ONOO<sup>-</sup>), qui peut générer des composés toxiques comme le radical hydroxyle (•OH) et le dioxyde d'azote. (Halliwell *et al.*, 1997).



### 1.3.2. Le radical hydroxyle (•OH)

Le radical hydroxyle (•OH) est le radical libre le plus réactif et peut être formé à partir de l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène en présence des ions métalliques comme le cuivre ou le fer.



Les radicaux hydroxyles ont le potentiel de l'électron le plus élevé (2310 mV) et sont extrêmement réactifs (Korycka-Dahl et Richardson 1978). En général, les composés aromatiques ou les composés comportant des liaisons multiples carbone-carbone subissent des réactions d'addition en présence de radicaux libres hydroxylés. Dans les composés saturés, un radical hydroxyle capte un atome d'hydrogène de la liaison carbone-hydrogène la plus faible pour donner un radical libre. Les radicaux libres néoformés peuvent réagir avec les lipides, les polypeptides, les protéines et l'ADN, spécialement la thiamine et la guanosine (Ashok et Ali, 1999). Les radicaux hydroxyles se lient également facilement aux doubles liaisons. La barrière énergétique de l'addition des radicaux hydroxyles aux doubles liaisons est plus faible que l'abstraction d'un atome d'hydrogène, ce qui favorise l'addition en cas de compétition. Quand un radical hydroxyle réagit avec les composés aromatiques, il peut s'additionner par l'intermédiaire de la double liaison conduisant au radical hydroxy-cyclohexadiényle (Padmaja et Madison, 1999). Celui-ci peut subir d'autres réactions, comme celle avec l'oxygène, qui

produit le radical peroxyde, ou se décompose en radicaux de type phénoxyde par élimination d'eau.

### 1.3.3. Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Le peroxyde d'hydrogène peut générer à travers une réaction de dismutation, l'anion superoxyde par l'intermédiaire de la superoxyde dismutase. Les enzymes comme l'acide oxydase et la xanthine oxydase produisent aussi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à partir de l'anion superoxyde. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diffuse facilement à travers la membrane plasmique. C'est la molécule la moins réactive parmi les espèces réactives de l'oxygène. Elle est stable à des pH et des températures physiologiques, en absence d'ions métalliques. Le peroxyde d'hydrogène peut générer le radical hydroxyle en présence d'ions métalliques et l'anion superoxyde (Haliwell *et al.*, 1997).



Le peroxyde d'hydrogène peut produire l'oxygène singulet par réaction avec l'anion superoxyde ou avec l'acide hypochlorique (HOCl) ou les chloramines dans les êtres vivants (Stief, 2000, 2003). Il peut ainsi dégrader certains hèmes des protéines, comme l'hémoglobine, pour libérer les ions de fer.

### 1.3.4. L'oxygène singulet (O)

L'équipe de Takayama (2003) a rapporté que les phosphatidylcholine hydroperoxydes métastables présentes dans les organismes vivants produisent de l'oxygène singulet durant leur dégradation en présence du Cu<sup>2+</sup> à l'obscurité.

L'oxygène singulet est un non-radical en état excité. Il peut être formé à partir du peroxyde d'hydrogène qui réagit avec l'anion superoxyde, avec HOCl ou les chloramines dans les cellules et les tissus (Stief, 2003).

Par comparaison avec les autres espèces réactives de l'oxygène, l'oxygène singulet est plutôt faible et non toxique pour les tissus des mammifères. Cependant, il a été montré qu'il est impliqué dans l'oxydation du cholestérol (Girotti et Korytowski, 2000). L'oxydation et la dégradation du cholestérol par l'oxygène singulet est en effet accélérée par la coprésence d'esters d'acide gras méthylés. Chez les êtres humains, l'oxygène singulet est aussi bien un

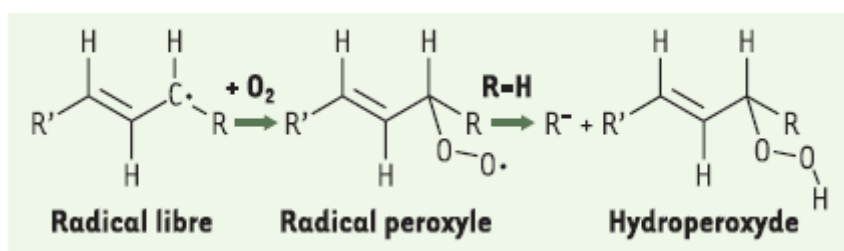
signal, avec un potentiel thérapeutique pour lutter contre des pathogènes variés comme les bactéries, les virus et même les cellules cancéreuses (Stief, 2003).

### 1.3.5. Les radicaux peroxyes et alcoxyes

Les radicaux peroxyes ( $\text{ROO}^\bullet$ ) sont formés par réaction directe de l'oxygène avec des radicaux alkylés ( $\text{R}^\bullet$ ), mettant en jeu par exemple, la réaction entre les radicaux lipidiques et l'oxygène. La décomposition des peroxydes alkylés ( $\text{ROOH}$ ) conduit aux radicaux peroxye ( $\text{ROO}^\bullet$ ) et alcoxye ( $\text{RO}^\bullet$ ). L'irradiation par des rayons UV ou la présence de métaux de transition peut causer l'homolyse des peroxydes pour produire les radicaux peroxye et alcoxye.



Les radicaux peroxyes et alcoxyes sont de bons agents oxydants, ayant plus de 1000 mV de potentiel réducteur standard (Decker, 1998). Ils peuvent capturer un atome d'hydrogène de molécules ayant un potentiel réducteur standard plus faible. Cette réaction est fréquemment observée dans l'étape de propagation de la peroxydation lipidique. Très souvent le radical alkyle formé de cette réaction peut réagir avec l'oxygène pour former un autre radical peroxye résultant de la chaîne réactionnelle. Des radicaux peroxyes se dégradent pour libérer l'anion superoxyde ou peuvent réagir entre eux pour générer l'oxygène singulet (Halliwell et Gutteridge, 1985). Les radicaux alcoxye et peroxye aromatiques sont moins réactifs que les radicaux respectifs à chaîne ouverte à cause de la délocalisation des électrons dans le cycle (figure 2).



**Figure 2** : mécanisme de génération des radicaux peroxye et hydroperoxyde.

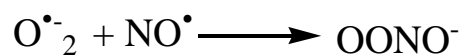
### 1.3.6. Le monoxyde d'azote et le dioxyde d'azote

Le monoxyde d'azote ( $\text{NO}^\bullet$ ) est un radical libre avec un électron apparié. Il est formé à partir de L-arginine par la NO synthase (Fang *et al.*, 2002). L'oxyde d'azote est un radical qui n'est pas très réactif, mais la production excessive du  $\text{NO}^\bullet$  est impliquée dans la reperfusion ischémique, et les maladies inflammatoires chroniques et neurodégénératives comme l'arthrite rhumatoïde et l'inflammation du colon. L'oxyde d'azote dans le plasma humain peut consommer les concentrations d'acide ascorbique et d'acide urique, et initier la peroxydation lipidique (Halliwell, 1996).

Le dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2^\bullet$ ) est formé à partir de la réaction du radical peroxyde et du  $\text{NO}^\bullet$ , de l'air pollué et la fumée de cigarette (Noguchi et Niki 1999). Le  $\text{NO}_2^\bullet$  s'additionne aux doubles liaisons et capte les hydrogènes labiles pour initier la peroxydation lipidique et la production de radicaux libres. Il oxyde aussi l'acide ascorbique (Papavasiliou, 1999a).

### 1.3.7. L'anion peroxydinitrite ( $\text{OONO}^-$ )

Le monoxyde d'azote peut réagir avec l'anion superoxyde pour générer du peroxydinitrite.



L'anion peroxydinitrite est une espèce cytotoxique qui cause des lésions tissulaires et oxyde les lipoprotéines à faible densité (LDL) (Halliwell, 1997). L'anion peroxydinitrite apparaît être un radical libre important qui cause des dommages tissulaires générés sur les sites d'inflammation (Papavasiliou, 1999a). Il est impliqué dans les désordres neurodégénératifs ainsi que plusieurs affections rénales (Knight 1999). Le peroxydinitrite ( $\text{OONO}^-$ ) peut causer la modification et l'oxydation des protéines, bases d'ADN mimant le rôle oxydant du radical hydroxyle (McVean *et al.*, 1999). Son rôle comme oxydant biologique provient de sa grande capacité de diffusion à travers les membranes cellulaires (Knight, 1999). La nitrotyrosine, qui peut être formée à partir de réactions de l'anion peroxydinitrite avec les acides aminés, a été trouvée dans les tissus associés à l'âge (Knight, 1999).

#### 1.4. Rôles des Radicaux libres oxygénés (RLO) dans la physiologie

Les RLO présentent un paradoxe en ce qui concerne leur fonction biologique : d'une part, ils préviennent la maladie par l'implication du système immunitaire, médiation de la signalisation cellulaire et jouant un rôle essentiel dans l'apoptose. D'autre part, ils peuvent endommager d'importantes macromolécules dans les cellules et peuvent intervenir dans la cancérogénèse et les maladies cardiovasculaires (Fang *et al.*, 2002).

La formation des RLO est une conséquence naturelle du métabolisme aérobie qui est importante pour la maintenance de l'homéostasie (balance entre les oxydants constitutifs et les anti-oxydants) de l'oxygène tissulaire (Castro *et al.*, 2001). L'homéostasie de l'oxygène est maintenue par une série de réactions d'oxydo-réduction (redox) incluant le transfert d'électrons entre deux espèces chimiques : les composés qui perdent des électrons (oxydants) et ceux qui acceptent des électrons (réducteurs). Quand l'homéostasie de l'oxygène n'est pas maintenue, l'environnement cellulaire devient oxydativement stressé.

Les principales cibles cellulaires des radicaux libres sont :

- **L'ADN** : les RL peuvent induire des effets mutagènes ou l'arrêt des réplifications de l'ADN. Ils agissent en provoquant des altérations de bases, des pontages ADN-protéines ou des ruptures de brins. Les cassures observées sont dues aux radicaux  $\text{OH}^\bullet$  issus de la réaction de Fenton en présence de fer ferreux chélaté à certains acides aminés ou aux groupes phosphates de l'ADN. La prévention de ce processus par l'addition de catalase montre le rôle du peroxyde d'hydrogène dans les lésions de l'ADN.
- **Les macromolécules** : les RL sont également responsables d'inactivation enzymatique en particulier des sérine-protéases, d'une fragmentation des macromolécules (collagène, protéoglycanes, acide hyaluronique), de formation de dimères ou d'agrégats protéiniques dans les membranes cytoplasmiques. Les acides aminés les plus sensibles à leur action sont le tryptophane, la tyrosine, la phénylalanine, la méthionine et la cystéine.
- **Les lipides** : ils sont une cible privilégiée des RL qui provoquent l'oxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) des phospholipides membranaires. Le phénomène d'auto-oxydation ou peroxydation lipidique consiste en l'attaque par un RL, d'origine exogène ou endogène, de dérivés lipidiques. (Singal *et al.*, 1988).

Le radical formé ( $\text{R}^\bullet$ ) subit un réarrangement interne, dû à une tautomérie liée au déplacement de la double liaison la plus proche de l'électron célibataire, et existe donc sous 2 formes en

équilibre (Fulbert *et Cals.*, 1992). En présence d'oxygène, il se forme un radical peroxyde (ROO<sup>•</sup>) qui déstabilise une deuxième molécule d'AGPI et conduit à un hydroperoxyde lipidique (ROOH) et à un nouveau radical R<sup>•</sup>. Cette auto-oxydation se propage et s'amplifie d'un acide gras à l'autre (Singal *et al.*, 1988).

## 1.5. Détection des espèces réactives à l'oxygène et à l'azote

Une multitude de méthodes sont disponibles pour détecter les RLO (radicaux libres oxygénés) et les RLA (radicaux libres azotés). Les quatre techniques les plus utilisées sont la « résonance de spin électronique » (RSE), une méthode basée sur la fluorescence, une méthode basée sur l'augmentation de la chimioluminescence, et enfin une méthode enzymatique. Aucune méthode disponible n'étant capable de mesurer de façon appropriée les RLO et les RLA dans toutes les conditions, de multiples techniques et contrôles sont nécessaires pour dépister avec succès la formation des RL.

### 1.5.1. Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)

La RPE, connue également sous le nom de « résonance de spin électronique » (RSE), est la méthode la plus sophistiquée et la plus directe pour la détection des RL. Elle a été utilisée pour leur détection dans les cellules, les tissus, ainsi que chez l'animal. A cause de la courte durée de vie des RL, un piège à spin est important pour augmenter le signal. Les « pièges de spin » ne piègent pas les RL eux-même, ils réagissent avec le radical pour former une espèce détectable par RPE plus stable. Une large gamme de sondes RPE sont disponibles pour la détection de différents RL (Halliwell et Whiteman, 2004).

Les sondes les plus classiquement employées dans la détection des O<sub>2</sub><sup>•</sup> et OH<sup>•</sup> sont

- la 5,5-diméthyl-pyrroline-N-oxide (DMPO)
- la 5-diéthyl-phosphono 5-méthyl pyrroline-N-oxyde (DEPMPO) et
- les hydroxylamines cycliques.

### 1.5.2. Les sondes fluorescentes

Elles sont aussi utilisées pour mesurer les espèces  $O_2^{\bullet-}$ ,  $NO^{\bullet}$ ,  $H_2O_2$  et  $ONOO^{\bullet}$  dans les cellules et les tissus. En général, ces sondes ne sont pas spécifiques à un radical donné. Quelques sondes sont auto-oxydables, ce qui augmente la fluorescence.

Les sondes les plus communes sont :

- le dihydroéthidium, adapté pour le radical  $O_2^{\bullet-}$ ,
- la dihydrorhodamine, adaptée pour les radicaux  $OH^{\bullet}$ ,  $ONOO^{\bullet}$  et  $NO_2^{\bullet-}$ ,
- le dichlorofluorescéine diacétate, pour  $H_2O_2$ , les peroxydases et  $ONOO^{\bullet}$ ,
- et le 4-amino-5-méthylamino-2',7'-difluorofluorescéine diacétate, pour le radical  $NO^{\bullet}$ .

### 1.5.3. Les composés chimioluminescents

La mesure des RLO basée sur la chimioluminescence est une autre méthode plus quantitative que les méthodes précédentes basées sur la fluorescence. Les sondes communément utilisées sont la coelenterazine, le 2-méthyl-6-(4-méthoxyphényl)-3,7-dihydroimidazo [1,2-a]pyrazin-3-one, hydrochlorite (MCLA), le 3-aminophthalhydrazide (luminal) et le bis-N-méthylacridinium nitrate (lucigénine). Le radical  $O_2^{\bullet-}$  est souvent mesuré en utilisant la chimioluminescence pour laquelle tous les agents, excepté la coelenterazine, sont spécifiques. La coelenterazine est aussi sensible au radical  $OH^{\bullet}$ . D'une façon similaire à celle décrite pour les techniques fluorimétriques, des inhibiteurs sélectifs peuvent être utilisés pour clarifier la spécificité du signal chimioluminescent. Des précautions dans l'utilisation et la manipulation de la sonde sont parfois nécessaires en raison d'éventuelles auto-oxydations et cyclisations des RL qui pourraient artificiellement augmenter le signal (plus commun avec la lucigénine à forte doses).

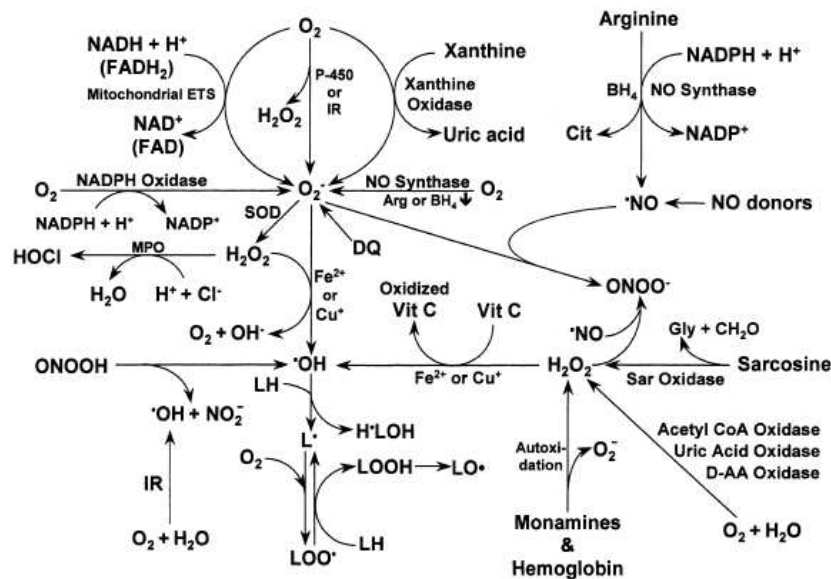
### 1.5.4. Les méthodes enzymatiques

En plus des méthodes déjà décrites pour la mesure des RLO, il existe des essais enzymatiques qui se focalisent sur le processus cellulaire ou les produits intermédiaires synthétisés et pouvant être utilisés avec des modèles cellulaires ou tissulaires. Dans cette catégorie, on retrouve le test au nitro bleu de tétrazolium (non spécifique pour le  $O_2^{\bullet-}$ ), la réduction du cytochrome C ( $O_2^{\bullet-}$ ), l'aconitase ( $O_2^{\bullet-}$ ), méthode basée sur le cycle d'acide

citrique), un essai utilisant la peroxidase de raifort ( $H_2O_2$ ), l'essai de Greiss (sous-produits de  $NO^\bullet$ ), et les S-nitrosothiols (indicateurs de l'activité anti- $ONOO^-$ ) (Kader *et al.*, 2007).

## 1.6. Genèse des radicaux libres

### 1.6.1. Sources endogènes



**Figure 3 :** Sources endogènes des radicaux libres.

(source : Fang *et al.*, *Nutrition* 2002;18:873)

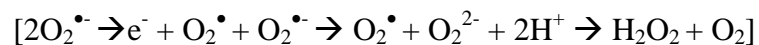
Les enzymes pro-oxydantes, incluant la NADPH-oxydase (Babior, 1999), la NO-synthase (Stuehr *et al.*, 1990) ou la chaîne du cytochrome P-450 (Stief, 2000) peuvent générer des RLO (figure 3).

Lors du transport des électrons dans la chaîne respiratoire des cellules aérobies, la respiration oxydative est la principale source d'énergie. L'acétylcoenzyme A issue des métabolismes glucidique, protidique et lipidique entre dans le cycle de Krebs pour l'oxydation complète du reste acétyle en  $CO_2 + H_2O$ . Les électrons sont transportés sous forme de coenzymes réduites ( $FADH_2$ ,  $NADH$ ,  $NADPH$ ) qui vont transférer leur pouvoir réducteur sur les systèmes transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire et permettre la synthèse d'ATP. L'étape ultime de la chaîne respiratoire mitochondriale est la synthèse d'eau à partir de l'oxygène :





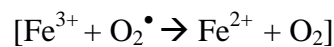
Une réduction incomplète de l'O<sub>2</sub> peut apparaître pour 1 à 2% de l'oxygène moléculaire conduisant à la formation de RLO : l'oxygène singulet (O) et surtout l'anion O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Si l'anion superoxyde est libéré dans un milieu dépourvu de protons, il peut exercer ses effets délétères : de tels milieux se rencontrent au sein des doubles couches phospholipidiques des membranes cellulaires dont la structure aurait tendance à augmenter la durée de vie des radicaux libres. Si cet anion est libéré dans un milieu protoné, il subit une dismutation, phénomène au cours duquel l'anion O<sub>2</sub><sup>•-</sup> cède son électron célibataire à un autre anion superoxyde qui devient l'anion O<sub>2</sub><sup>2-</sup> ; ce dernier réagit alors avec les protons du milieu pour donner le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> :



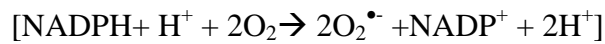
En présence de fer ferreux, le peroxyde d'hydrogène se décompose en OH<sup>-</sup> et OH<sup>•</sup> selon la réaction de Fenton. (Fulbert et Cals; 1992)



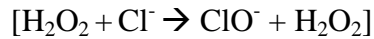
L'anion superoxyde permet aussi de reformer du fer ferreux à partir du fer ferrique :



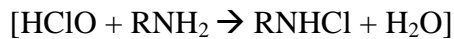
L'oxygène formé peut à nouveau entrer dans la chaîne respiratoire et donner O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Globalement, cette suite de réactions est appelée « cycle d'Haber-Weiss ». La vitesse de la réaction de dismutation de l'O<sub>2</sub><sup>•-</sup> est maximale à pH 4,8, mais est très lente à pH 7. Une enzyme intervient dans l'organisme pour accélérer cette réaction : la superoxyde dismutase (SOD), qui multiplie par 10<sup>10</sup> la vitesse de la réaction au pH de l'organisme. Au cours de la défense antibactérienne, lors de réactions inflammatoires qui accompagnent toute infection, les cellules phagocytaires activées vont libérer des enzymes, des médiateurs chimiques tels que l'histamine et la sérotonine, et l'anion superoxyde accompagné d'autres dérivés oxygénés comme l'acide hypochloreux (HClO), le radical hydroxyle (OH<sup>•</sup>), le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et l'oxygène singulet (O). La phagocytose des germes bactériens s'accompagne, en effet, d'une production massive d'anions superoxyde par le métabolisme leucocytaire : c'est ce qu'on appelle la « flambée respiratoire ». Une NADPH oxydase, activée par la protéine kinase C et l'acide arachidonique libéré par la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) intervient et permet la synthèse des anions superoxydes au prix d'une forte consommation d'oxygène (Henderson *et al.*, 1989).



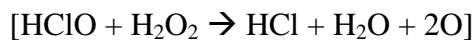
Les radicaux superoxydes constituent l'élément clé de ce mécanisme. Ils subissent ensuite une dismutation, soit spontanée, soit enzymatique. Enfin, une enzyme présente dans le phagosome, la myéloperoxydase, une catalase, en présence de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et d'ions  $\text{Cl}^-$  génère la formation de dérivés halogénés toxiques :



L'acide hypochloreux ( $\text{HClO}$ ) peut à son tour réagir avec les fonctions aminées ou l'ion ammonium pour donner des chloramines :



En présence de peroxyde d'hydrogène, l'acide hypochloreux donne naissance à l'oxygène singulet:

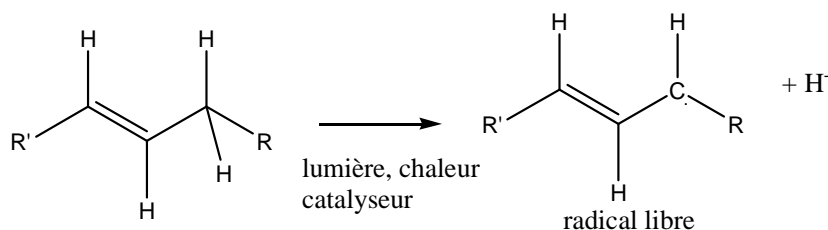


Un leucocyte activé contient donc de fortes proportions de radicaux  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{OH}^\bullet$ , ( $\text{O}$ ) singulet et chloramines, aux propriétés bactéricides. Ainsi, les RL peuvent avoir des effets positifs : ils participent à la lutte contre l'infection en lysant les bactéries phagocytées. Un déficit dans la production des RL par les leucocytes (granulomatose septique) ou une baisse de l'activité de la myéloperoxydase (en cas de corticothérapie par exemple) se caractérise ainsi par une sensibilité particulière aux infections (Fang *et al.*, 2002) (figure 3).

Les lipoxygénases produisent des RL par un mécanisme d'oxydation. Elles ont besoin d'acides gras polyinsaturés (AGPI) libres. La phospholipase liée à la membrane produit des AGPI et des lysolécithines. Ces derniers modifient les structures des membranes cellulaires et les AGPI libres s'oxydent pour former les hydroperoxydes lipidiques. La lipoxygénase aux ions  $\text{Fe}^{2+}$  est dans un état inactivée. Une fois que  $\text{Fe}^{2+}$  s'oxyde en  $\text{Fe}^{3+}$ , la lipoxygénase peut convertir les AGPI en hydroperoxydes (Spiteller, 2001). Il existe 3 lipoxygénases chez les mammifères : les 5-, 12-, et 15- lipoxygénases (Hari *et al.*, 2000). Ces enzymes peuvent oxyder l'acide arachidonique, un AGPI riche dans le système nerveux central, en acide

hydroperoxyeicosatétraénoïque. Les localisations primaires des 5-, 12-, et 15-lipoxygénases sont les leucocytes et lymphocytes, les plaquettes sanguines et les leucocytes, et les cellules respiratoires, respectivement (Hari *et al.*, 2000). La 15-lipoxygénase a été identifiée dans les lésions athérosclérotiques, ce qui suggère que cette enzyme peut être incluse dans la formation des lipides oxydés *in vivo* (Knight, 1999).

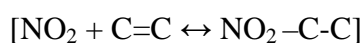
### 1.6.2. Sources exogènes



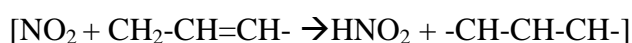
**Figure 4 :** Sources exogènes des radicaux libres.

L'organisme est soumis à l'agression de différents agents capables de donner naissance à des RL. Les rayonnements UV induisent la synthèse des radicaux  $\text{O}_2^\bullet$ ,  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}$  singulet et des molécules génératrices de RL, comme  $\text{H}_2\text{O}_2$  par l'intermédiaire d'agents photosensibilisants. Les radiations ionisantes provoquent également la génération de RLO. L'ingestion d'alcool est suivie de la formation de RL selon divers mécanismes (figure 4). La xanthine oxydase et l'aldéhyde oxydase peuvent oxyder le principal métabolite de l'éthanol, l'acétaldéhyde, avec production d' $\text{O}_2^\bullet$ . L'éthanol stimule également la production d'anion  $\text{O}_2^\bullet$  par induction de la synthèse des NADPH oxydase, NADPH cytochrome réductase, et du cytochrome  $\text{P}_{450}$ . L'alcool peut également diminuer l'activité des enzymes de protection comme SOD-GSH-Px (Schisler et Singh, 1989). De même, les concentrations sériques en sélénium et vitamine E sont abaissées chez les alcooliques et corrélées avec une atteinte hépatique plus ou moins sévère.

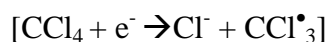
Des toxiques tels que l'oxyde d'azote (NO) et le dioxyde d'azote ( $\text{NO}_2$ ), présents dans notre environnement (suies, goudron, tabac, polluants industriels), participent également à la genèse de radicaux libres : ils sont responsables d'une auto-oxydation des AGPI saturés des alvéoles pulmonaires. La réaction peut être réversible :



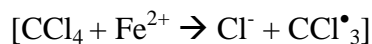
ou irréversible



NO et NO<sub>2</sub> peuvent aussi réagir avec le peroxyde d'hydrogène produit par les macrophages au niveau des alvéoles pulmonaires et donner naissance à des radicaux OH<sup>•</sup>. La fumée de cigarette joue un rôle majeur dans la formation de ces espèces radicalaires : elle contient du NO et du NO<sub>2</sub>, renferme de fortes concentrations en composés insaturés et stimule, par son action irritante, les macrophages des alvéoles pulmonaires. D'autres toxiques agissent par transfert d'électrons. Il en est ainsi du tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) dont la toxicité s'exerce par l'intermédiaire des radicaux CCl<sub>3</sub><sup>•</sup> qui ont été mise en évidence dans des hépatocytes de rat par RPE. La réaction de CCl<sub>4</sub> en CCl<sub>3</sub><sup>•</sup> s'effectue, soit sous l'action de cytochromes P<sub>450</sub> hépatiques :



soit en présence de fer ferreux :



Il a été démontré que le CCl<sub>3</sub><sup>•</sup> était capable d'induire l'auto-oxydation des AGPI, et donc de provoquer une augmentation importante des hydroperoxydes lipidiques (Knecht et Mason, 1988).

Enfin, des antibiotiques anticancéreux, tels que les anthracyclines, sont également capables de générer des RL. La formation d'espèces radicalaires serait responsable de leur mode d'action anticancéreux et de leur toxicité. Ces agents thérapeutiques agissent selon un mécanisme de transfert d'électrons. Ainsi, selon des travaux réalisés sur des cultures de cellules tumorales mammaires, l'adriamycine est bioactivée en radical semiquinone de l'adriamycine (SQ<sup>•</sup>) par réduction enzymatique par les cytochromes P<sub>450</sub>. (Sinha *et al.*, 1989). Ce radical peut réagir avec l'oxygène pour former l'anion superoxyde. Pour une autre anthracycline, la daunorubicine (DOS), la réduction en radical libre (DOS<sup>•</sup>) se réalise alors que la molécule est déjà intercalée dans l'ADN.

## 1.7. Les moyens de défense contre les radicaux libres

### 1.7.1. Les moyens de défense endogènes (Avisar *et al.*, 1989, Lee *et al.*, 2004 ; Papas 1999b)

Pour protéger ses tissus contre les agressions radicalaires, l'organisme humain possède des systèmes enzymatiques, tels que les superoxyde-dismutases et la catalase qui ont un rôle de protection, ainsi que les glutathion-peroxydases (GSH-Px) qui ont un rôle de détoxification.

- Les **superoxyde-dismutases** (SOD) dont il existe deux formes, se rencontrent chez les eucaryotes. La plus importante, présente dans le cytoplasme de toutes les cellules, a pour cofacteurs le cuivre et le zinc (CuZn-SOD). L'autre enzyme a pour cofacteur le manganèse (Mn-SOD) et est située dans les mitochondries.
  - Les superoxyde-dismutases exercent une action cellulaire protectrice : elles catalysent la dismutation de l'anion superoxyde. La localisation des SOD explique que les membranes externes et les espaces interstitiels soient moins bien protégés que les structures intracellulaires.
  - Les superoxyde-dismutases sont utilisées en thérapeutique : dans les maladies inflammatoires chroniques, les anions superoxydes relargués par les phagocytes activés stimulent et amplifient la réponse inflammatoire. L'administration de SOD peut prévenir les lésions tissulaires dues à l'anion superoxyde. Les SOD semblent également réduire l'étendue de l'infarctus du myocarde.
  
- Les **glutathion-peroxydases** (GSH): les glutathion-peroxydases sélénio-dépendantes sont des protéines qui contiennent 4 atomes de sélénium situés aux centres actifs de l'enzyme sous forme de sélénocystéine. (tableau 1).

**Tableau 1: Les enzymes anti-oxydantes (Lee *et al.*, 2004).**

Enzymes	Fonctions
Superoxyde dismutase	Elimination du superoxyde
Catalase	Elimination de l'hydroperoxyde
Glutathion peroxydase	Elimination de l'hydroperoxyde
Glutathion disulfide reductase	Réduction de la glutathione oxydée
Glutathion-S-transferase	Elimination de l'hydroperoxyde lipidique
Methionine sulfoxyde reductase	Réparation des résidus méthionine oxydés
Peroxydase	Décomposition du peroxyde d'hydrogène et du lipide hydroperoxyde

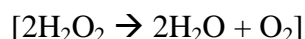
Un déficit en sélénium entraîne une chute de l'activité de l'enzyme et une réplétion la restaure. Avissar *et al.*, 1989 ont, à partir des cultures cellulaires, individualisé 2 formes de GSH-Px qui diffèrent par leur structure, leur activité et leurs sites antigéniques.

- Une **forme glycosylée** riche en ponts disulfures, à localisation extracellulaire.

Les GSH-Px ont une action détoxiquante vis-à-vis de 2 substrats : Le peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes (ROOH) dérivés des lipides.

L'activité détoxiquante des GSH-Px face aux hydroperoxydes nécessite une autre enzyme, la PLA2. Cette dernière libère les peroxydes d'acides gras des membranes cellulaires en hydrolysant les fonctions esters des phospholipides membranaires. Les peroxydes libérés dans le cytosol sont alors transformés par la GSH-Px tandis que la chaîne d'acides gras manquante est re-synthétisée.

- La **catalase**, qui permet de métaboliser le peroxyde d'hydrogène :

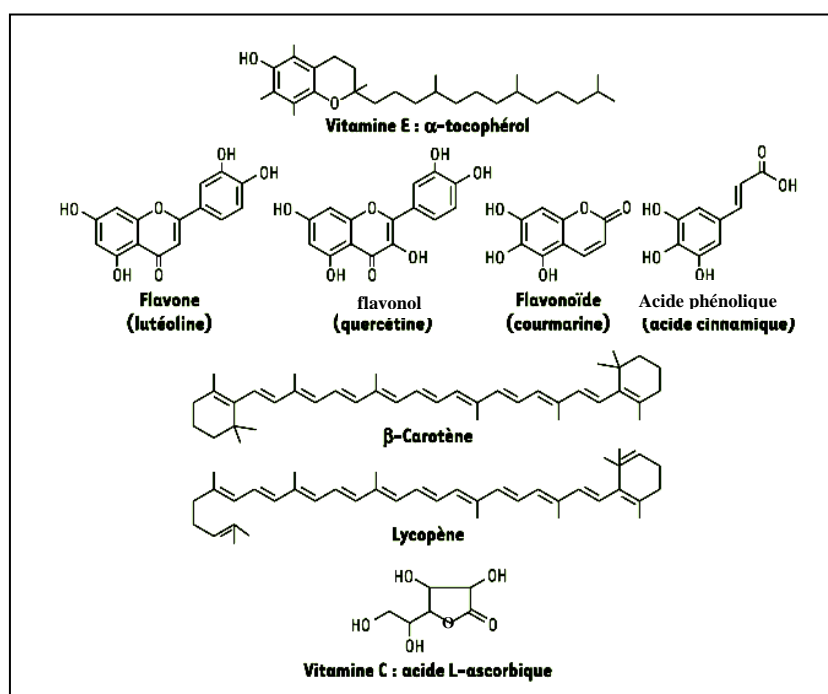


Elle est localisée dans les peroxysomes des cellules et empêche le peroxyde d'hydrogène de participer à la réaction de Fenton. Mais son rôle semble mineur par rapport à celui de la GSH-Px pour prévenir la peroxydation lipidique : son affinité pour le peroxyde d'hydrogène est inférieure à celle de la GSH-Px.

### 1.7.2. Les moyens de défense exogènes

Toute substance capable de capter l'électron célibataire d'un RL sans donner elle-même un produit radicalaire est défini comme un piègeur de RL. Ces piègeurs se caractérisent par leur affinité élevée pour les RL et leur spécificité pour certains d'entre eux.

Il existe des « piègeurs occasionnels » de RL. Ce sont des molécules endogènes qui captent les électrons célibataires aux dépens de leur propre intégrité, comme par exemple les acides gras insaturés, les fonctions thiols de protéines, l'ADN et les acides aminés phénoliques. Les autres principaux piègeurs de RL sont les chélateurs du fer et du cuivre et les anti-oxydants (caroténoïdes, tocophérols, la vitamine C et les flavonoïdes).



**Figure 5 :** Les anti-oxydants naturels

- Les caroténoïdes : Ils sont très nombreux et représentent la principale source alimentaire de rétinol. En plus de leur activité de provitamine A, les caroténoïdes sont capables d'inactiver l'oxygène singulet et les radicaux libres. L'effet anti-oxydant du  $\beta$ -carotène serait dû à une interaction entre le radical et le système de doubles liaisons conjuguées de la chaîne insaturée du piègeur. Le  $\beta$ -carotène est particulièrement réactif vis-à-vis des lipoperoxydes : le radical peroxyde se fixerait sur un carbone de la chaîne polyinsaturée et serait stabilisé par résonance. L'effet anti-oxydant des

caroténoïdes serait dépendant de la pression d'oxygène. Différents systèmes *in vitro* ont confirmé leur rôle protecteur.

➤ La vitamine E ou  $\alpha$ -tocophérol

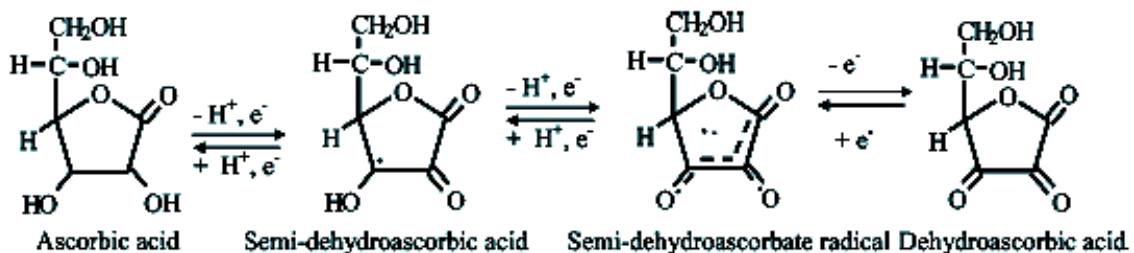
Leur structure lui permet de capter les RL :

- dans les zones lipophiles des membranes cellulaires, grâce à sa chaîne phytyle,
- dans les zones hydrophiles, à la surface des membranes plasmiques, grâce à son hydroxyle phénolique. L' $\alpha$ -tocophérol réagit avec les radicaux oxygénés lipidiques en empêchant leur propagation (Liebler *et al.*, 1986).

L' $\alpha$ -tocophérol est également un puissant inhibiteur de la formation des nitrosamides, en captant l'acide nitreux. Ainsi transformé, celui-ci ne peut plus réagir avec les fonctions amides des molécules pour donner des nitrosamides.

➤ La vitamine C :

Son action est très controversée quant à son effet protecteur ou activateur face à la toxicité de l'oxygène. Selon le pH, la vitamine C peut prendre une forme réduite ou oxydée. Le passage de l'une à l'autre se fait par l'intermédiaire d'un radical libre, le radical ascorbyle, et en présence de glutathion/glutathion-réductase. La vitamine C forme donc un couple redox avec une forme intermédiaire radicalaire capable de capter l'oxygène singulet et certaines espèces radicalaires. C'est ainsi qu'elle protégerait la peau de la toxicité induite par les rayonnements UV mais, à forte concentration, la vitamine C peut se comporter comme un oxydant générateur de radicaux libres (figure 6) (Lee *et al.*, 2004).



**Figure 6 :** Les oxydations séquentielles d'un électron de l'acide L-ascorbique.

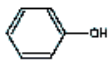
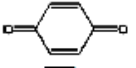
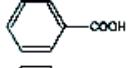
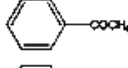
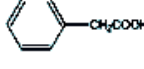
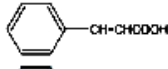
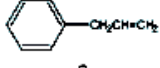
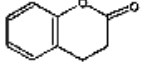
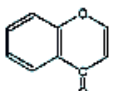
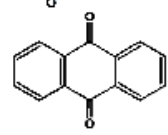
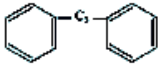
Outre ces moyens de défense précédemment décrits dont peuvent disposer les tissus vivants contre les agressions radicalaires, l'organisme serait capable d'acquérir une



certain tolérance ou résistance vis-à-vis des RL. Ainsi, un prétraitement par une dose non létale de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est capable d'induire, chez *Salmonella typhimurium*, la synthèse de certaines protéines qui lui permettront ultérieurement de résister à la cytotoxicité de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Christman *et al.*, 1985). Ces protéines, mises en évidence chez tous les organismes vivants et conservées au cours de l'évolution, appartiennent à une famille protéique dont la synthèse peut être induite ou stimulée lors de stress divers, essentiellement physique et chimique (particulièrement oxydant).

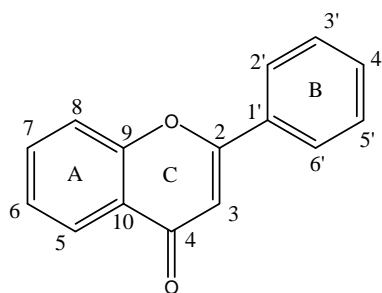
➤ Les polyphénols :

Ils sont ubiquitaires dans les plantes, avec plus de 8000 structures identifiées (Bravo, 1998). Les flavonoïdes, la classe de polyphénols la plus importante, sont des aglycones ou des glycosides avec un cycle benzopyrone. Ils comprennent des flavones, des flavonols, des flavanones, des flavanonols, et des anthocyanines basés sur les structures communes des squelettes de carbones (figure 7).

Class	Basic skeleton	Basic structure
Simple phenols	C <sub>6</sub>	
Benzoquinones	C <sub>6</sub>	
Phenolic acids	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	
Acetophenones	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
Phenylacetic acids	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
Hydroxycinnamic acids	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Phenylpropens	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Coumarins	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Chromones	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Anthraquinones	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	
Flavonoids	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	

**Figure 7 :** Structures des différentes classes de polyphénols.

Chaque groupe des flavonoïdes diffère selon le nombre de groupement hydroxyle, méthoxyle, et autres substituants sur les deux cycles benzéniques (Lee *et al.*, 2004) (figure 8).



**Figure 8** : Numérotation des flavonoïdes.

Les mécanismes anti-oxydants des polyphénols sont basés sur leur pouvoir donneur d'hydrogène et chélateur d'ions métalliques (Bravo, 1998). Après avoir donné l'atome d'hydrogène, les composés phénoliques sont stabilisés par résonance, qui ne participent pas facilement dans les autres réactions radicalaires. Cependant, les polyphénols agissent comme pro-oxydants sous certaines conditions, lorsqu'ils sont en concentrations élevées ou en présence d'ions métalliques et de pH élevé. Les structures chimiques aussi affectent les activités anti-oxydantes. Les flavonoïdes qui ont des activités anti-oxydantes les plus fortes présentent dans leurs structures chimiques un groupement *O*-diphénolique, une double liaison 2-3 conjuguée avec la fonction 4-oxo, et des groupements hydroxyles dans les positions 3 et 5. Les activités anti-oxydantes des flavonoïdes sont influencées par l'hydroxylation et la présence d'unité de sucres (Bravo, 1998). Les flavonoïdes sont de bons capteurs de radicaux hydroxyles et peroxydes. Ils peuvent former des complexes avec les métaux et inhibent l'oxydation lipidique initiée par un métal (Hendrich *et al.*, 1999).

## 2. La famille des Plombaginacées

Cette famille cosmopolite est trouvée dans tous les milieux : salins, régions froides et tropicales (L. Watson et M. J. Dallwitz, 1992). Elle comprend des plantes herbacées ou des arbustes, parfois des plantes grimpantes et des lianes. Leurs feuilles sont simples, glanduleuses, sans stipules, en rosette basales, ou alternes sur les tiges aériennes. Les inflorescences sont en racèmes, en cymes ou en capitules denses. Les fleurs sont actinomorphes, hermaphrodites, tétracycliques, penta-mères.

Les Plombaginacées comportent 775 espèces, regroupées en 24 genres : *Acantholimon*, *Aegialitis*, *Armeria*, *Bamiana*, *Buciniczea*, *Cephalorhizum*, *Ceratostigma*, *Chaetolimon*, *Dictyolimon*, *Dyerophytum*, *Eremolimon*, *Ghasnianthus*, *Goniolimon*, *Ikonnikovia*, *Limoniastrum*, *Limoniopsis*, *Limonium*, *Meullerolimon*, *Neogontscharovia*, *Plumbagella*, *Plumbago*, *Popoviolimon*, *Psylliostachys*, *Vassilczenkoa*.

### 2.1. Phytochimie de la famille des Plombaginacées

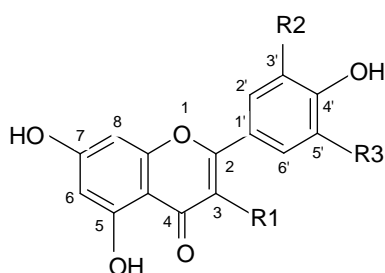
La littérature fait état principalement de la présence de flavonoïdes, d'anthocyanes et de sesquiterpènes.

**Tableau 2 :** Investigation bibliographique sur la phytochimie des genres les plus étudiés (*Limonium* et *Plumbago*).

Composés	Espèces	Références
3,5,7,3',4',6'-hexahydroxyflavone et myricétine 3-O- $\alpha$ -L-(2'-galloyl) arabinopyranoside	<i>Limonium gmelinii</i> <i>Limonium popovii</i>	(Korul'kina <i>et al.</i> , 2004)
apigénine 7-O-glucoside, quercitrine orientine	<i>Plumbago scandense</i> <i>Plumbago auriculata</i>	(Ribeiro de Paiva <i>et al.</i> , 2002)
quercétine, quercétine 3-O-rhamnoside, kaempférol, apiine, apigénine, myricétine, myricétine 3-O-rhamnoside, lutéoline, lutéoline-7-O-glucoside	<i>Limonium axillare</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1999) ; (Bashir <i>et al.</i> , 1994)
acide gallique, acide férulique,	<i>Limonium axillare</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1999) ;

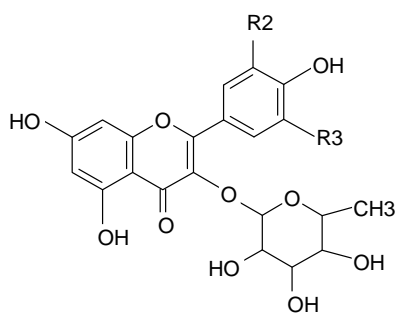
acide isoféruleique		(Bashir <i>et al.</i> , 1994)
acide chlorogénique	<i>Plumbago scandens</i> <i>Plumbago auriculata</i>	(Ribeiro de Paiva <i>et al.</i> , 2002)
acide syringique, acide gallique, acide ellagique	<i>Limonium gmelinii</i>	(Korul'kina <i>et al.</i> , 2004)
ombelliférone, aesculétine, impératorine et isoimpératorine, xanthotoxol, bergaptine	<i>Limonium axillare</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1999)
séseline, 5-méthoxyséseline, subérosine, xanthylétine et xanthoxylétine	<i>Plumbago zeylanica</i>	(Lie-Chwen <i>et al.</i> , 2003)
acide ellagique, géraniline	<i>Limonium axillare</i>	(Ahmed <i>et al.</i> , 1999)

## 2.2. Exemples de composés identifiés dans la famille des Plombaginacées



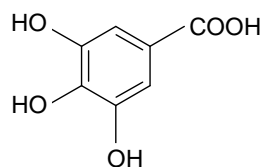
R1, R2=OH, et R3=H, quercétine

R1, R2, R3=OH, myricétine

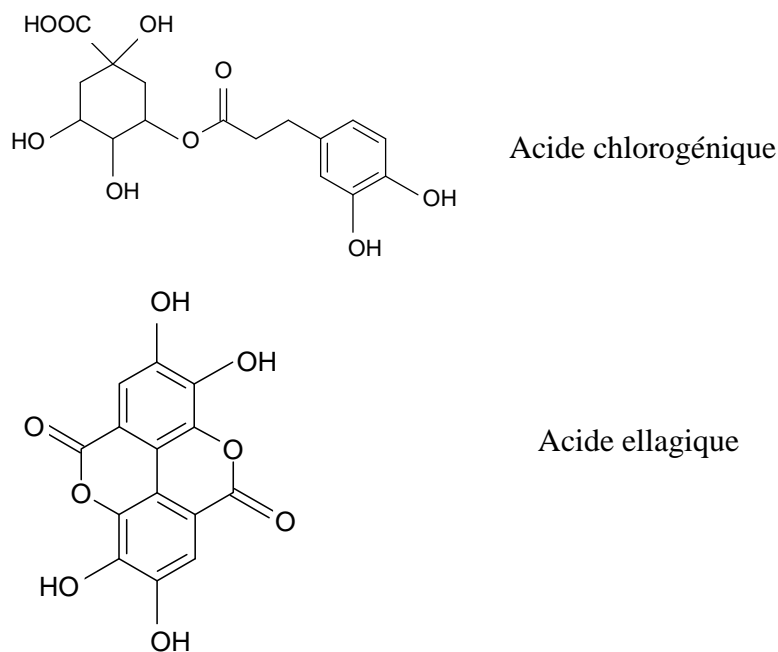


R2=OH, R3=H, quercétine 3-*O*-rhamnoside

R2, R3=OH, myricétine 3-*O*-rhamnoside



Acide gallique



**Figure 9** : Structure de quelques composés identifiés dans la famille des Plombaginacées.

### 2.3. Etudes pharmacologiques du genre *Limonium*

Un fractionnement par bioguidage a concerné *Limonium brasiliense* et a permis d'isoler 5 composés anti-oxydants : la myricétine 3-*O*- $\alpha$ -rhamnopyranoside, la (-)-épigallocatechine 3-*O*-gallate, la (-)-épigallocatechine, la (+)-gallocatechine, et l'acide gallique (Murray *et al.*, 2004).

L'extrait aqueux de l'espèce *Limonium wrightii* a été testé pour son potentiel antiradicalaire. Une des molécules actives a été isolée et identifiée comme étant l'acide gallique, avec une  $CI_{50}$  de 2,63 $\mu$ g/ml pour l'essai au DPPH (Aniya *et al.*, 2002).

### 2.4. Caractéristiques de l'espèce étudiée: *Limoniastrum feei*

Il s'agit d'une espèce dite saharo-arabique stricte (Msanda *et al.*, 2002), qui croît dans tout le Sahara septentrional algérien et marocain (Ozenda, 2004). Il s'agit d'un arbuste bas, de 10 à 40 cm, à feuilles plus longues et plates serrés en rosettes au sommet des rameaux ; sa hampe florifère sans feuilles, se termine par des inflorescences courtes, très fragiles, à fleurs entourées de bractées coriaces épineuses et d'un rouge violacé (Ozenda, 2004).

Cette espèce xérophyte est réputée pour sa forte résistance aux conditions climatiques extrêmes. C'est une plante grasse qui sécrète des sels (Stocker *et al.*, 1974).



**Figure 10 :** Parties aériennes de *Limoniastrum feei* (Girard) Batt.

Source : <http://www.sahara-nature.com/album/picture.php?/2375/category/514-limoniastrum>

## 2.5. Taxonomie

Règne :	Plantae
Sous-règne :	Tracheobionta
Division :	Magnoliophyta
Classe :	Magnoliopsida
Sous-classe :	Caryophyllidae
Ordre :	Plumbaginales
Famille :	Plumbaginaceae
Genre :	<i>Limoniastrum</i>
Espèce :	<i>feei</i>

L'interrogation des bases de données bibliographiques (Sci-Finder) a permis de confirmer que cette espèce n'a fait l'objet **d'aucune étude phytochimique et biologique antérieure.**

### 3. Matériels et méthodes

#### 3.1. Le matériel végétal

La plante entière de *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae) a été collectée en période de floraison, en avril 2003, dans la région de Béchar, au sud ouest d'Algérie (Figure 11). Son identification botanique a été faite par le Professeur Khalfallah de l'Institut de Biologie de Constantine. Un échantillon (LF98B0501) a été déposé à l'herbier de l'université de Mentouri de Constantine.

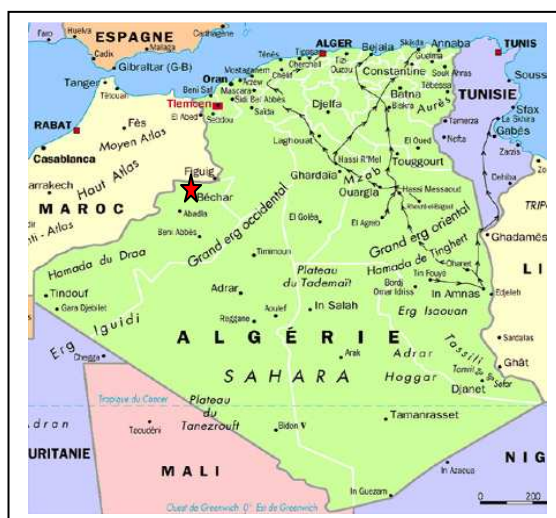


Figure 11 : Carte géographique d'Algérie (★ lieu de récolte)

([www.photos-de-voyage.info/algerie/itineraire.php](http://www.photos-de-voyage.info/algerie/itineraire.php).)

#### 3.2. Evaluation de l'activité anti-oxydante

##### 3.2.1. Essai au DPPH

Le protocole opératoire a été développé dans le chapitre 1. (Parejo *et al.*, 2002)

##### 3.2.2. Essai FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma)

Comme son nom l'indique, cette technique a été développée pour mesurer la capacité du plasma à réduire le fer ferrique ( $Fe^{3+}$ ) en fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ). En effet le  $Fe^{3+}$  participe à la formation du radical hydroxyle par la réaction de Fenton. Le  $Fe^{2+}$  à un pH faible forme un complexe avec la 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-s-triazine (TPTZ) de couleur bleue qui a une absorption maximale à 594 nm. Ainsi, la formation de ce complexe indiquera un pouvoir réducteur et déterminera la capacité d'un composé à se comporter comme un anti-oxydant. Les valeurs sont obtenues par comparaison de l'absorbance à 594 nm du mélange réactionnel contenant l'échantillon à tester avec celle d'un mélange réactionnel contenant une

concentration connue en  $\text{Fe}^{2+}$ . En effet, les résultats s'expriment en  $\text{EC}_1$  c'est-à-dire en concentration d'efficacité voisine de 1mM de  $\text{Fe}^{2+}$ . L'établissement d'une droite d'étalonnage avec  $\text{Fe}^{2+}$ , permet de trouver l'absorbance correspondant à 1. (Benzie *et al.*,1996), (Pulido *et al.*, 2000).

Ce test nous servira à évaluer l'activité anti-oxydante des composés purs uniquement.

### Matériel

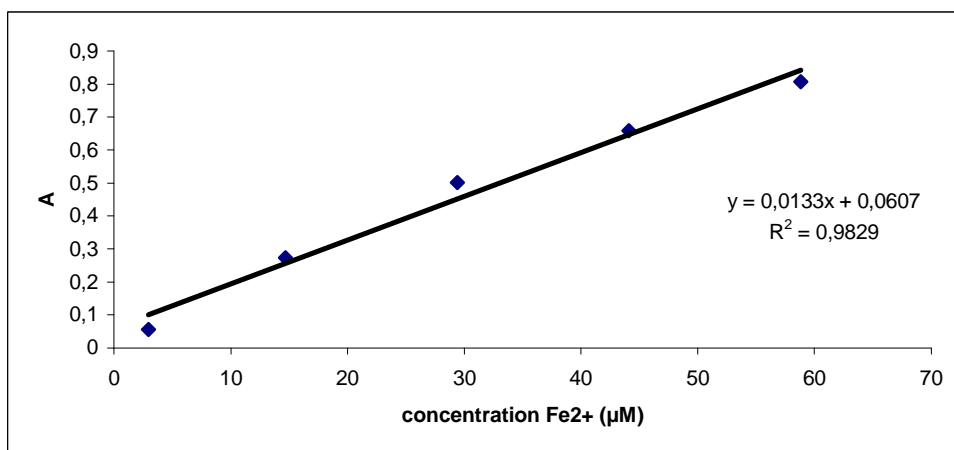
- Le réactif FRAP est préparé de la manière suivante :
  - 1 volume de solution mère de TPTZ (Fluka, ref 93285) à 10 mM dans l'acide chlorhydrique à 40 mM.
  - 1 volume de solution aqueuse de  $\text{FeCl}_3$  (Prolabo, ref 1.05512.0250) à 20 mM avec quelques microlitres d'HCl à 1 M.
  - 10 volumes de solution de tampon acétique à 40 mM et pH 3,6 ; ce réactif doit être préparé extemporanément.
- Spectrophotomètre UV visible : Shimadzu UV 1205.

### Méthode

On mesure l'absorbance à 594 nm de concentrations croissantes de l'échantillon testé. On obtient ainsi une droite dont l'équation est du type  $A_{594} = a \times C + b$ . ( $A_{594}$  étant l'absorbance à 594 nm et C la concentration de l'échantillon testé). Cette équation nous permet de calculer l' $\text{EC}_1$ . L'essai est réalisé en triplicata et chaque concentration est testée en trois répétitions. La mesure se fait au spectrophotomètre après 30 minutes de réaction, à l'abri de la lumière.

On détermine la droite d'étalonnage à partir d'une gamme de concentration d'une solution de  $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  dissout dans du méthanol. La gamme de concentration comporte 5,88, 4,41, 2,94, 1,47 et  $0,294 \times 10^{-2}$  mM de  $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ .

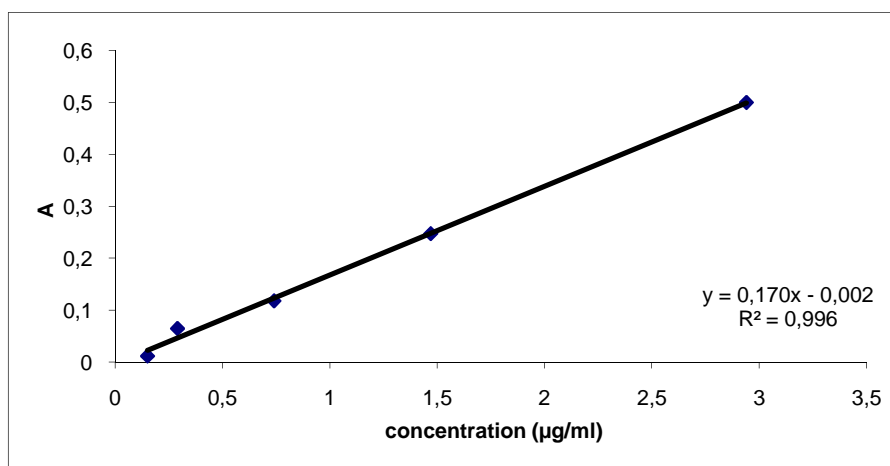




**Figure 12** : Courbe étalon du fer ferreux

On peut ainsi calculer l'absorbance théorique correspondante à 1 mM de solution mère de Fe<sup>2+</sup>. Celle-ci correspond à 0,393.

Le produit de référence permettant de comparer l'activité des différents échantillons testés est l'acide ascorbique. Son EC<sub>1</sub> correspond à 1,62 ± 0,62 μg/ml.



**Figure 13** : Détermination de l'EC<sub>1</sub> de l'acide ascorbique.

Les échantillons sont testés à des concentrations finales suivantes : 50, 10, 5, 2,5 et 1 μg/ml.

#### Essai

	Réactif FRAP (μl)	Eau distillée (μl)	Echantillon (μl)	Méthanol (μl)
Echantillon	1800	180	60	0
Blanc	1800	180	0	60

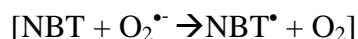
### 3.3.3. Essai du radical superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (système xanthine/xanthine oxydase)

Les méthodes de production et de réduction de l'anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) sont résumées dans le tableau 3 :

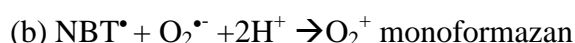
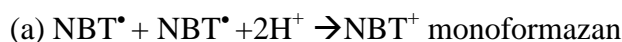
**Tableau 3** : Les différents tests de réduction du radical superoxyde.

Générateurs de l'anion O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Détecteur de l'anion O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
Enzymatique	Ferricytochrome C
Chimique	Nitro Bleu de tétrazolium (NBT)
Electrochimique	Produits d'auto-oxydation
Photochimique	Chimioluminescence
Radiolytique	Spectre RPE

Nous avons sélectionné la méthode de la xanthine/xanthine oxydase, comme source d'anion O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Le mécanisme de la réaction entre l'anion O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et le NBT est très complexe et quelques étapes proposées sont encore controversées. En fait, la réduction du NBT en monoformazan débute par la formation du radical tétrazolynile :



Ensuite, deux réactions sont possibles : la dismutation (a) ou la réduction du radical NBT<sup>•</sup> Par un deuxième anion O<sub>2</sub><sup>•-</sup> (b). Dans les deux cas, il ya formation de monoformazan.



La constante de vitesse de la reaction du NBT avec l'anion O<sub>2</sub><sup>•-</sup> à pH 9,8 est de 5,94x10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>Sec<sup>-1</sup> (Bielski *et al.*, 1977). Cette réduction du NBT peut être suivie à 560 nm, et la quantité de NBT réduit est transformée en µmol/min par l'utilisation d'un coefficient d'extinction de 1,5x10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>Sec<sup>-1</sup> (Auclair et Voisin, 1984).

La réduction du NBT en formazan a été largement utilisée comme signe de l'intervention de l'anion O<sub>2</sub><sup>•-</sup> dans les systèmes chimique et biologique (Auclair et Voisin, 1984). Cependant, cette réaction est non spécifique, car selon certains auteurs (Bors *et al.*, 1978), la SOD n'inhiberait que partiellement la réaction.

Tout comme l'essai au DPPH, cet essai évalue la capacité d'un produit à capturer un radical libre, l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Ce radical est généré *in vitro* par le système

hypoxanthine/xanthine oxydase. Dans cette méthode, le radical réduit le NBT<sup>2+</sup> (Nitro-Blue Tétrazolium) de couleur jaune, en bleu de formazan de couleur pourpre qui absorbe à 560 nm. Ainsi un composé anti-oxydant capable de capturer l'anion superoxyde empêchera la formation du bleu de formazan et la solution restera jaune. Les absorbances obtenues permettent de calculer un pourcentage d'inhibition de la réduction du NBT<sup>2+</sup> par rapport à un témoin constitué du milieu réactionnel dépourvu de composé anti-oxydant. On peut ensuite tracer une courbe représentant le logarithme du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en composé testé, et déterminer la CI<sub>50</sub> (concentration inhibant 50% de l'activité) du composé. (Parejo *et al.*, 2002)

### Matériel

- Tampon phosphate pH 7,2 à 50 mM.
- Solution d'hypoxanthine à 0,2 mM.
- Solution de xanthine oxydase à 1,2 U/ml.
- Spectrophotomètre UV visible : Shimadzu UV 1205.

### Méthode

On mesure un pourcentage de décoloration à 560 nm en fonction de la concentration de l'échantillon testé.

Les échantillons sont testés pour des concentrations comprises entre 10 µg/ml et 0,5 µg/ml dans de l'éthanol. Chaque concentration est testée en triplet. La mesure est faite après 10 minutes d'incubation à l'abri de la lumière.

### Essai

	Tampon phosphate pH 7,2 (µl)	Solution d'hypoxanthine à 0,2 ml (µl)	Eau distillée (µl)	Echantillon (µl)	Solution de NBT à 1 mM (µl)	Solution de xanthine oxydase à 1,2 U/ml (µl)
Blanc contrôle	950	157,6	315,2	-	157,6	-
Contrôle	950	157,6	157,6	-	157,6	157,6
Blanc échantillon	950	157,6	157,6	157,6	157,6	-
Echantillon	950	157,6	-	157,6	157,6	157,6

Calcul du pourcentage d'inhibition :

$$\% \text{ inhibition} = 1 - \frac{(\text{DO}_{\text{Echantillon}} - \text{DO}_{\text{Blanc échantillon}})}{(\text{DO}_{\text{contrôle}} - \text{DO}_{\text{blanc contrôle}})} \times 100$$

### 3.3.4. Dosage des polyphénols

Le mode opératoire a été développé dans le chapitre 1.

## 3.4. Conditions de Chromatographie liquide à haute performance (CLHP)

### 3.4.1. CLHP analytique

Les conditions analytiques sont celles reportée dans la littérature (Escarpa *et al.*, 2000)

- Colonne: Nucléodur C18,100-10, 250 x 4,6 mm (Macherey Nagel).
- Détecteur : spectrophotomètre UV visible à barettes de diodes (Varian Prostar).
- Pompe : Varian Prostar.
- Débit : 1 ml/min

**Tableau 4 :** Conditions chromatographiques des analyses par CLHP analytique.

Temps (min)	% eau (0,1% acide trifluoroacétique)	% acétonitrile
0	95	5
10	50	50
15	30	70
20	20	80
25	0	100
30	0	100
35	95	5

### 3.4.2. CLHP semi-préparative

- Débit : 10 ml/mn
- Colonne : Nucléodur100-10, C18, 250 × 21mm (Macherey Nagel)
- Pompe : Gilson.
- Détecteur : Spectrophotomètre UV (Gilson).

**Tableau 5 :** Conditions chromatographiques d'analyse par CLHP préparative (1)

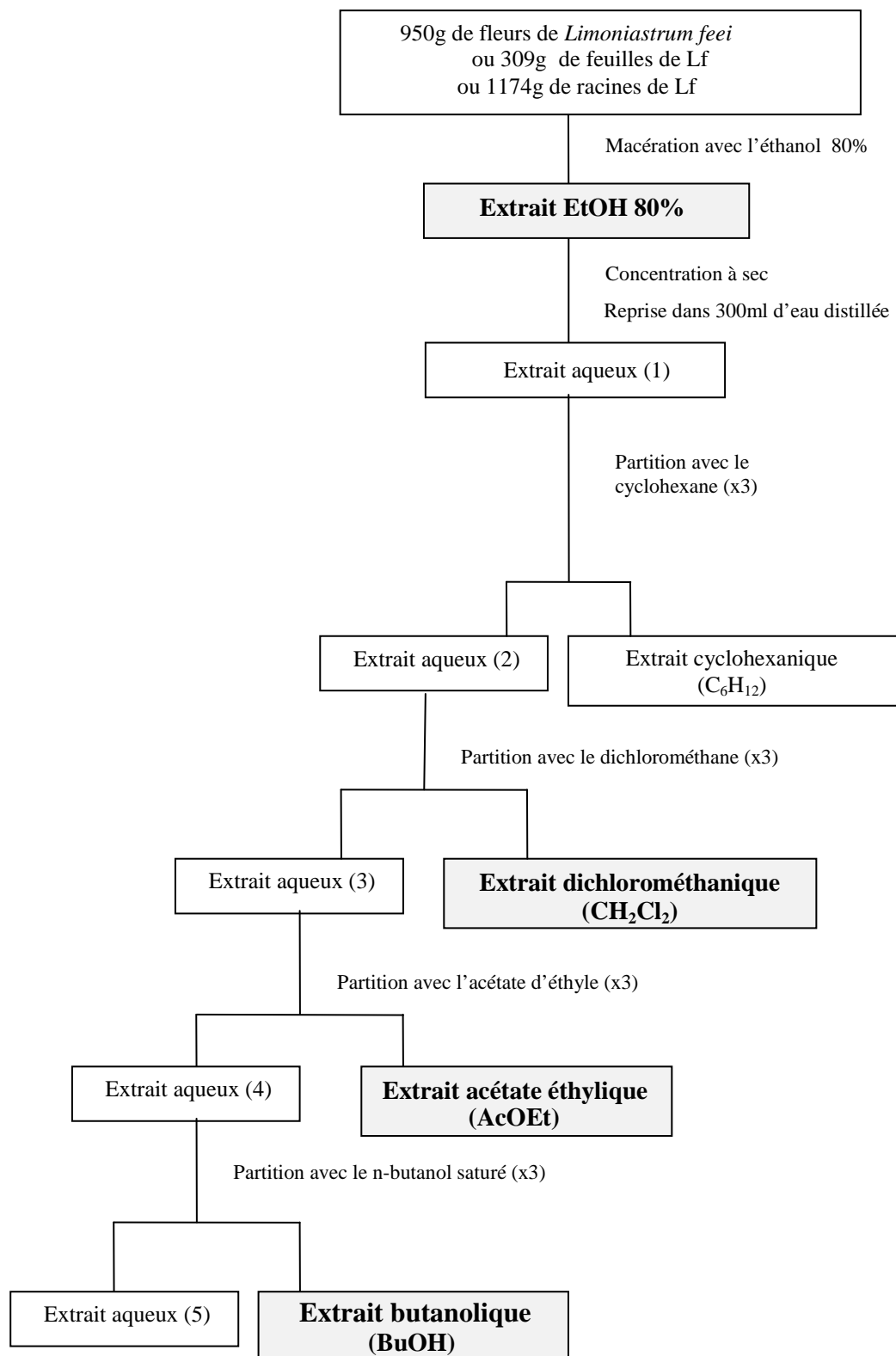
Temps (min)	% eau (0,1% acide trifluoroacétique)	% acétonitrile
0	95	5
5	95	5
25	50	50
30	0	100

**Tableau 6 :** Conditions chromatographiques d'analyse par CLHP préparative (2)

Temps (min)	% eau (0,1% acide trifluoroacétique)	% acétonitrile
0	95	5
5	95	5
15	50	50
20	30	70
22	0	100

## 4. Résultats et discussion

### 4.1. Schéma général d'extraction de *Limoniastrum feei*



**Figure 14** : Protocole d'extraction utilisé pour les 3 drogues (racines, feuilles et fleurs)

## 4.2. Rendements d'extraction

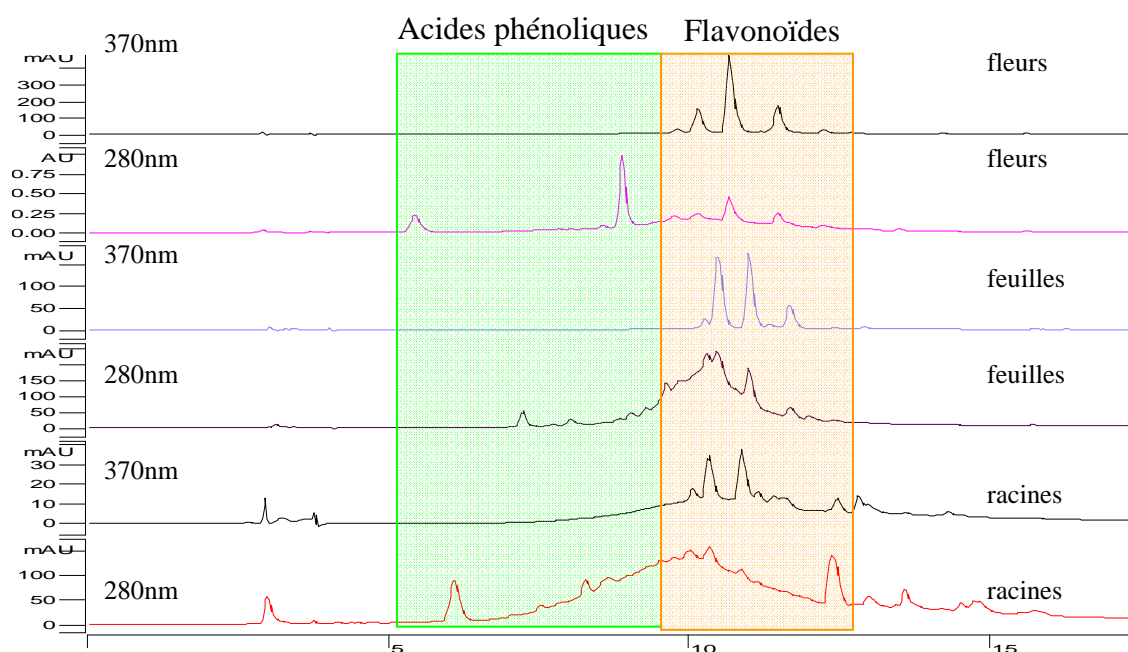
**Tableau 7 :** Extraits obtenus après épuisement des feuilles (F ; 309g), des fleurs (FL ; 950g) et des racines (R ; 1174g) de *Limoniastrum feei*.

	(F)	(FL)	(R)
<b>EtOH 80%</b>	25,5	181,4	78,4
<b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub></b>	2,5	2,1	2,5
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	1,2	4,7	4,5
<b>AcOEt</b>	4,2	10,2	7,3
<b>BuOH</b>	8,6	45,7	20,4

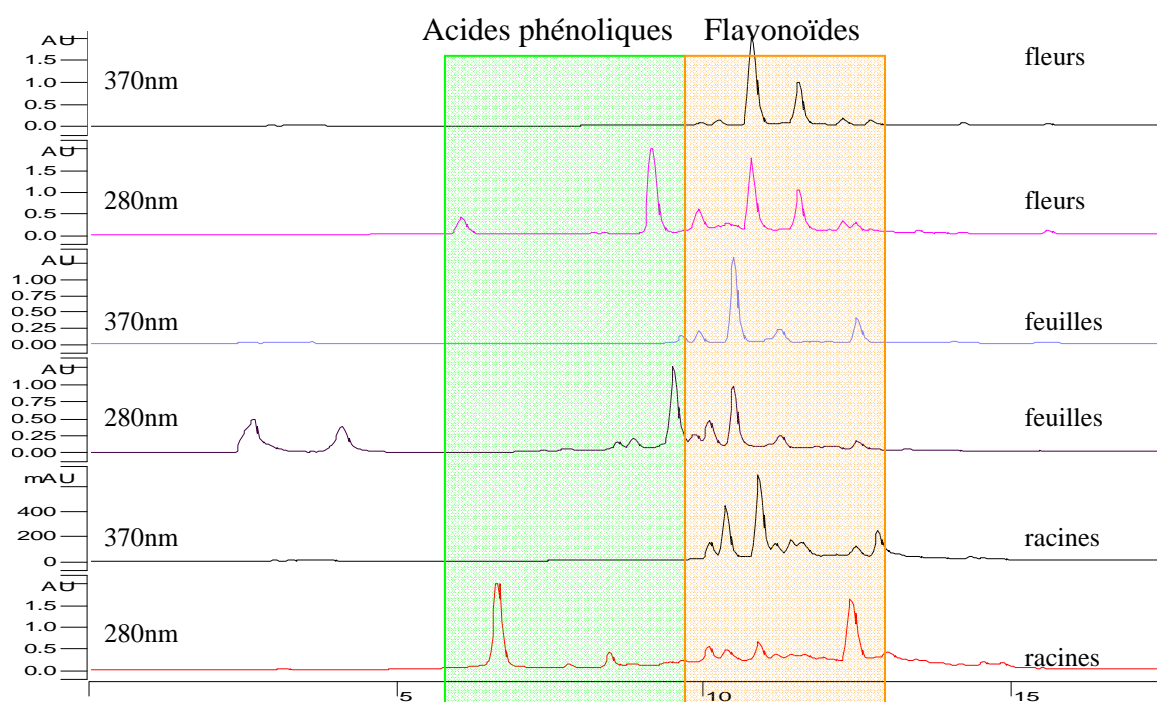
Les valeurs sont exprimées en gramme.

## 4.3. Analyse par CLHP analytique des extraits obtenus

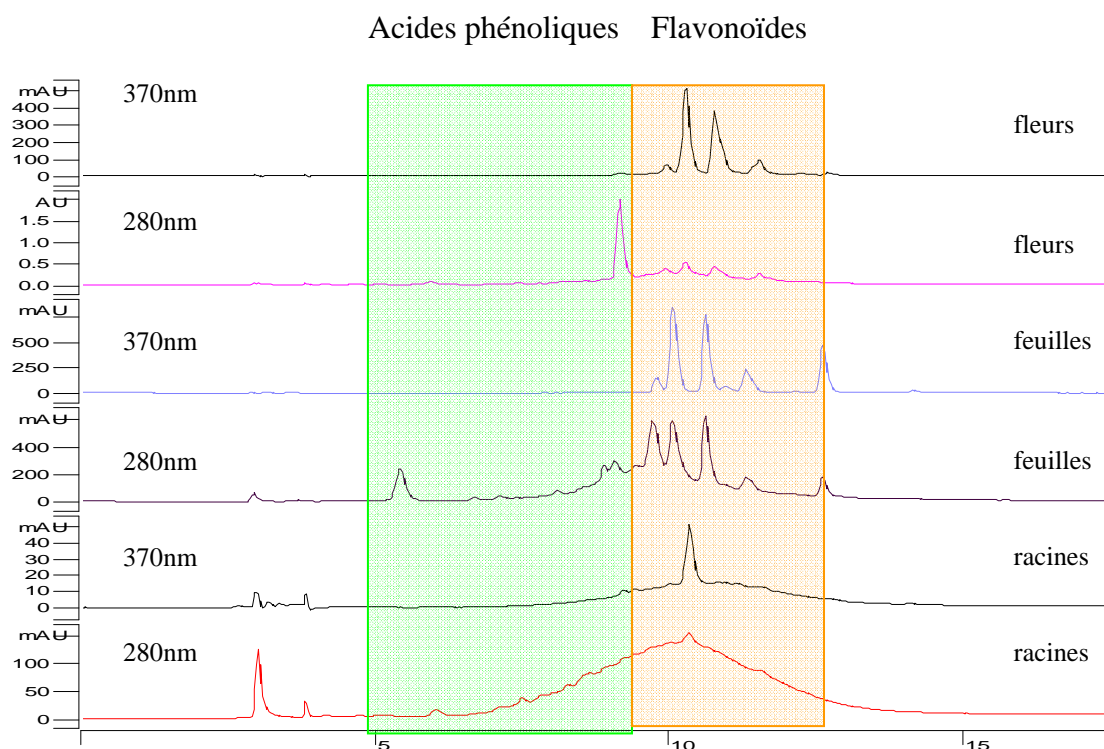
### A. Extraits EtOH 80%



## B. Extraits AcOEt



## C. Extraits BuOH



**Figure 15 :** Profils CLHP analytiques (280 et 370 nm) des extraits EtOH, AcOEt et BuOH des 3 drogues étudiées.



D'après les profils CLHP des trois extraits (éthanoliques, acétate d'éthyle et butanolique) obtenus après épuisement des trois drogues analysées (fleurs, feuilles et racines), on remarque la présence de flavonoïdes et d'acides phénoliques dans tous les extraits. Ces polyphénols ont été repérés grâce au détecteur à barrettes de diodes qui donne les profils UV des principaux pics observés et permet de les différencier grâce à leur maxima d'absorption. En effet, les acides phénoliques présentent une bande maximale à 325 nm alors que les flavonoïdes ont deux bandes maximales à environ 250 nm et 350 nm.

#### 4.4. Activités anti-oxydantes des extraits

##### 4.4.1. Activité antiradicalaire (test du radical DPPH<sup>•</sup>)

**Tableau 8 :** Activité antiradicalaire (test DPPH) des différents extraits obtenus après épuisement de *Limoniastrum feei*

Extraits	CI <sub>50</sub> (R)	CI <sub>50</sub> (FL)	CI <sub>50</sub> (F)
<b>EtOH 80%</b>	3,3 ± 1,43	1,75 ± 0,74	0,38 ± 0,06
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	44,04 ± 12,37	5,75 ± 0,74	8,67 ± 4,49
<b>AcOEt</b>	1,44 ± 0,08	1,63 ± 0,32	1,21 ± 0,19
<b>BuOH</b>	3,93 ± 0,89	2,82 ± 0,24	1,30 ± 0,24

R = extrait de racines ; FL = extrait de fleurs ; F = extrait de feuilles

Les valeurs des CI<sub>50</sub> sont exprimées en µg/mL (moyenne ± écart-type, en triplicata).

Ces résultats montrent que l'extrait hydro-alcoolique des feuilles est 5 à 8 fois plus actif que les extraits hydro-alcooliques des fleurs et des racines, respectivement (tableau 8). En général, les extraits AcOEt sont plus actifs que les extraits CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et BuOH. Ceux obtenus à partir des fleurs et des feuilles ont des profils chromatographiques très proches et renferment majoritairement des flavonoïdes et des acides phénoliques reconnaissables par leurs profils UV caractéristiques. L'extrait AcOEt obtenu à partir des feuilles de *Limoniastrum feei* a été sélectionné pour évaluer sa capacité anti-oxydante en utilisant d'autres tests complémentaires.

#### 4.4.2. Activité anti-oxydante de l'extrait AcOEt des feuilles de *L. feei*

**Tableau 9 :** activité anti-oxydante de l'extrait AcOEt (F)

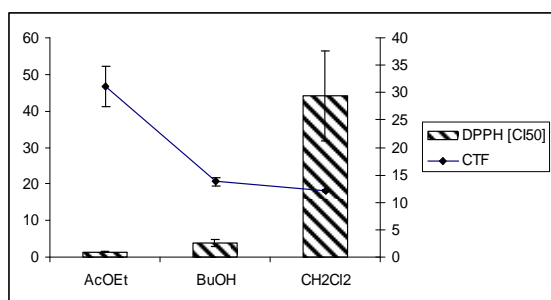
Extrait	(O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ) : CI <sub>50</sub> (µg/ml)	Essai FRAP : EC <sub>1</sub> (µM équivalent en Fe <sup>2+</sup> /ml)
AcOEt de feuilles	3,61 ± 0,56	2,25 ± 0,12

(moyenne ± écart-type, en triplicata).

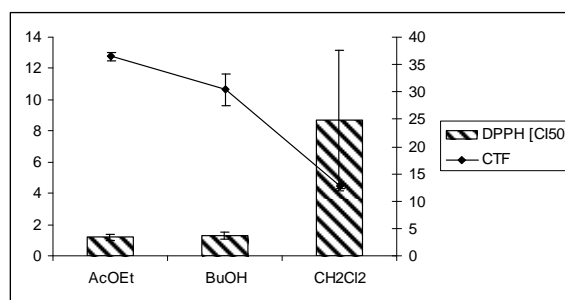
Les CI<sub>50</sub> de l'extrait AcOEt (F) sont du même ordre de grandeur (1,21 ± 0,19 ; 3,61 ± 0,56) dans les tests utilisés (test DPPH, superoxyde, respectivement) suggérant que cet extrait renferme des composés anti-oxydants agissant selon des mécanismes complémentaires.

#### 4.5. Corrélation entre l'activité antiradicalaire et la teneur en polyphénols totaux

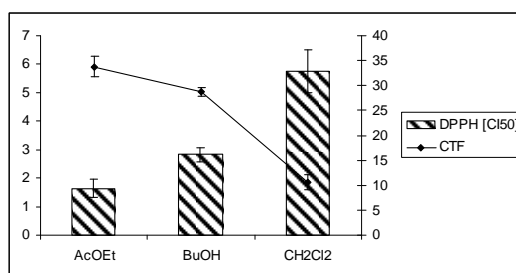
##### A. Extraits de racines de *L. feei* : R = 0,60



##### B. Extraits de feuilles de *L. feei* : R = 0,97



##### C. Extraits de fleurs de *L. feei* : R = 0,99



**Figure 16 :** Corrélations entre l'activité antiradicalaire et la teneur en polyphénols totaux des extraits de racines (Fig A), de feuilles (Fig B) et de fleurs (Fig C)  
Test DPPH exprimé en CI<sub>50</sub> µg/ml; TFC: Contenu en phénols totaux (équivalent en acide gallique / mg matière sèche).

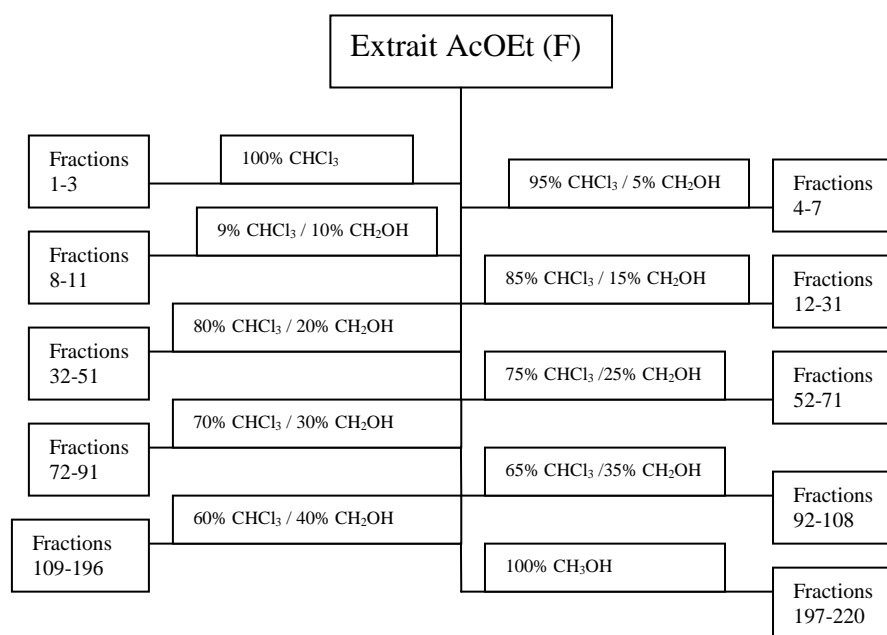
La régression linéaire de l'activité antiradicalaire et le contenu en polyphénols totaux (TFC) des extraits (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, AcOEt et BuOH) préparés à partir des racines, des feuilles ou des fleurs montre une bonne corrélation pour les extraits de feuilles et de fleurs (coefficient de corrélation R = 0,97 et 0,99, respectivement). Dans le cas des extraits de racines, la corrélation est plus faible (R=0,6), en raison probablement de leur richesse en coumarines et non de flavonoïdes.

L'excellente corrélation entre teneur en polyphénols et activité anti-oxydante s'explique par un mécanisme de transfert électronique (Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005). Elle a été déjà observée pour des fruits, qui sont d'autant plus anti-oxydant qu'ils sont riches en polyphénols (Parejo *et al.*, 2002 ; Guo *et al.*, 1997). Les effets pharmacologiques attribués aux polyphénols s'expliquent en partie par leur capacité de capturer des radicaux libres et de complexer des métaux (Bahorun *et al.*, 2004; Rice-Evans *et al.*, 1996).

La comparaison de l'activité anti-radicalaire (test au DPPH) de l'extrait AcOEt de *L. feei* (CI<sub>50</sub> :1,21 ± 0,19) avec des extraits équivalents (AcOEt) préparés à partir de plantes médicinales (Parejo *et al.*, 2002) permet de souligner le fort potentiel anti-oxydant de l'espèce saharienne que nous avons sélectionnée :

- *Achillea millefolium* : CI<sub>50</sub> = 9,29 ± 0,2 µg/ml
- *Artemisia dracunculus* : CI<sub>50</sub> = 10,87 ± 0,3 µg/ml
- *Foeniculum vulgare* : CI<sub>50</sub> = 12,06 ± 1,66 µg/ml
- *Lavandula latifolia* : CI<sub>50</sub> = 24,26 ± 1,68 µg/ml
- *Melilotus officinalis* : CI<sub>50</sub> = 101,73 ± 14,39 µg/ml.

#### 4.6. Fractionnement de l'extrait AcOEt de feuilles de *L. feei*



**Figure 17** : Schéma de fractionnement de l'extrait AcOEt (F).

Un fractionnement a été réalisé par chromatographie sur gel de silice de l'extrait AcOEt des feuilles de *L. feei* (figure 17). Sept fractions ont été finalement regroupées, en fonction des similitudes de leurs profils CCM. Leur pouvoir anti-radicalaire a été évalué à l'aide du test DPPH

#### 4.7. Résultats de l'essai au DPPH des fractions issues de l'extrait AcOEt (F)

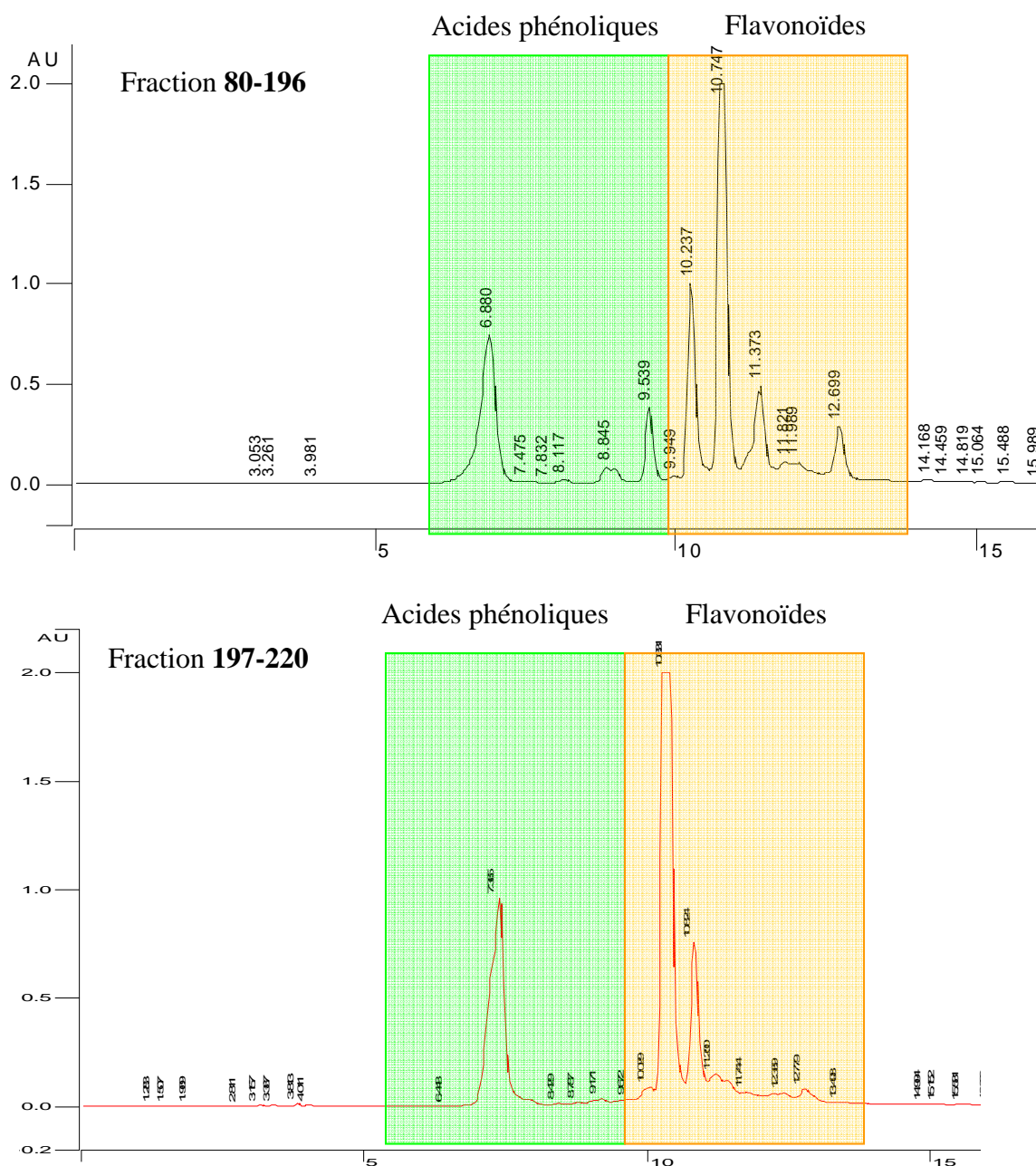
**Tableau 11** : Activité antiradicalaire des différentes fractions issues de l'extrait AcOEt (F)

Fractions	CI <sub>50</sub> (µg/ml)
1-12	>>100
13-27	>>100
28-41	30,93 ± 17,84
42-67	9,07 ± 2,47
68-79	18,35 ± 4,42
<b>80-196</b>	<b>1,74 ± 0,13</b>
<b>197-220</b>	<b>1,44 ± 0,09</b>

(moyenne ± écart-type, en triplicata).

Ce sont les deux fractions les plus polaires (**80-196**) et (**197-220**) qui ont le potentiel anti-oxydant le plus marqué. Ces deux fractions ont été analysées par CLHP, afin de comparer leur profil polyphénolique.

#### 4.8. Analyse par CLHP analytique (280 nm) des deux fractions sélectionnées

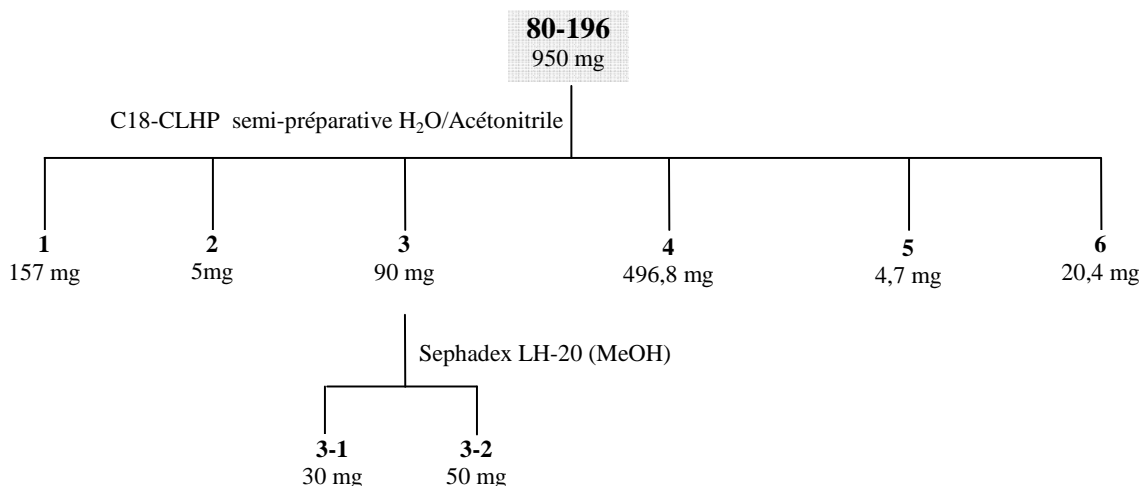


**Figure 18** : Profil CLHP ( $\lambda=280$  nm) des deux fractions les plus anti-radicalaires (test au DPPH)

On constate que les produits majoritaires contenus dans la fraction (197-220) se retrouvent également dans la fraction (80-196). Il s'agit d'un acide phénolique et de deux flavonoïdes, repérés grâce à leurs spectres UV (figure 18).

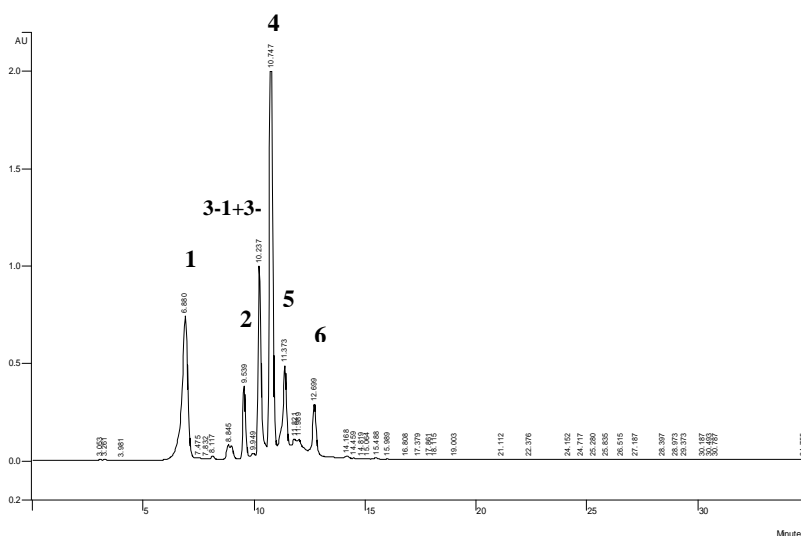
La fraction (80-196) étant quantitativement 14 fois plus importante que la première, elle a été sélectionnée pour continuer la purification et l'isolement des constituants actifs.

#### 4.9. Purification de la fraction active 80-196 par CLHP semi-préparative



**Figure 19** : Schéma de fractionnement et purification de la fraction 80-196.

L'analyse par CLHP analytique de la fraction active (80-196) permet de repérer 7 constituants (figure 20).



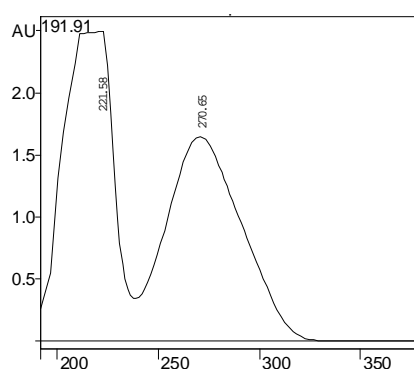
**Figure 20** : Profil CLHP ( $\lambda = 280$  nm) de la fraction active (80-196).

Leur purification a été réalisée par CLHP semi-préparative et par passage sur colonne de Sephadex LH-20.

## 5. Identification des produits purs isolés

### 5.1. Identification du composé 1

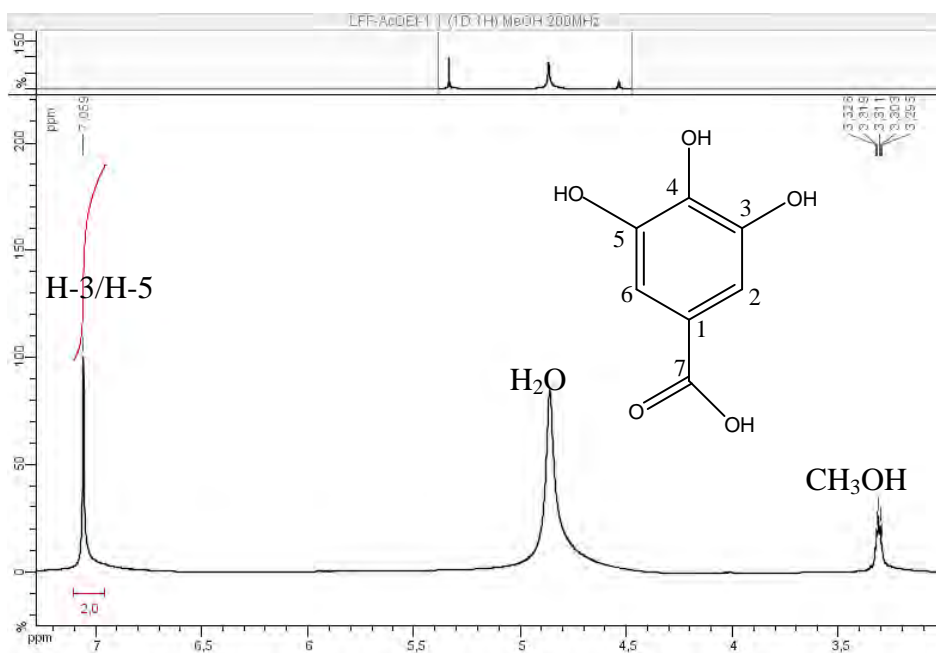
Le composé **1** est isolé sous forme de cristaux gris. Son spectre UV (figure 21) présente un maximum d'absorption à 270 nm caractéristique des transitions  $\pi \rightarrow \pi^*$  aromatiques (Silvestein *et al.*, 1991) et laisse envisager la présence d'un système aromatique.



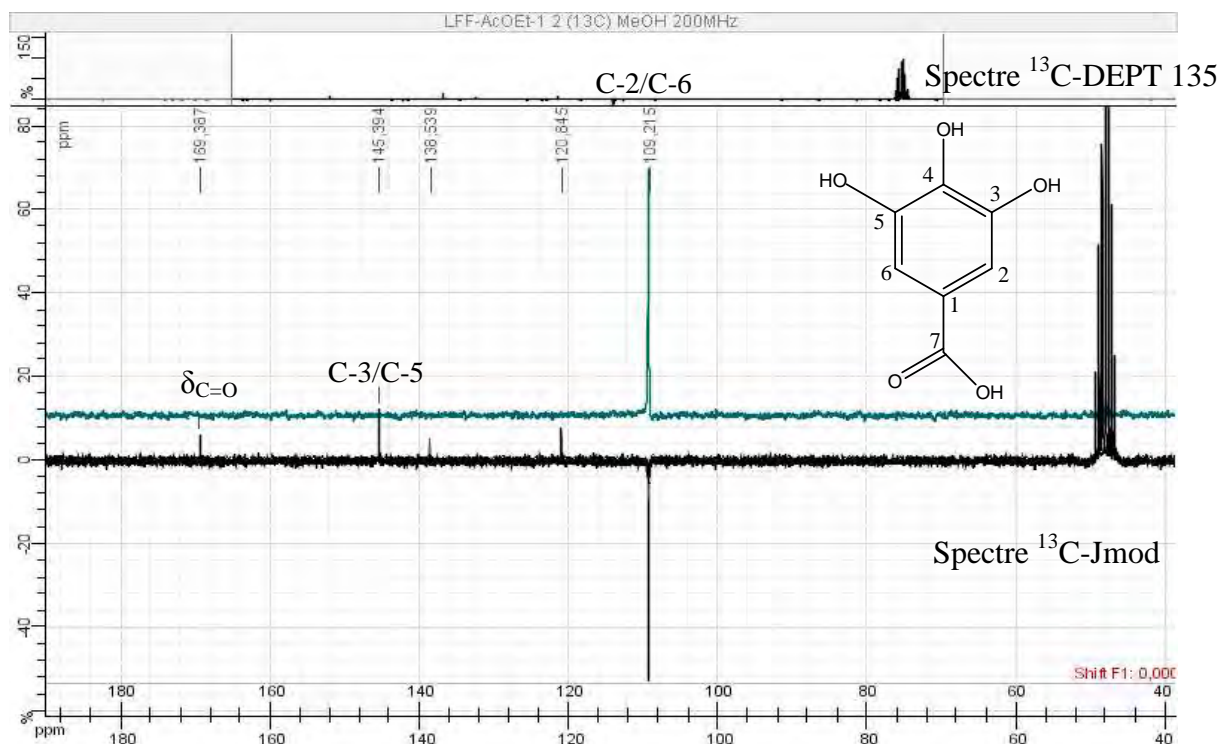
**Figure 21** : Profil UV du composé **1**

Le spectre de masse du composé **1** obtenu par une ionisation chimique à pression atmosphérique-Electrospray (APCI-ES) en mode négatif, présente un ion moléculaire  $[M-H]^-$  de 169,1 Da. Ainsi la masse moléculaire du composé **1** est de 170,1 Da.

D'après les spectres RMN  $^{13}C$  -Jmod et DEPT135 superposés, il ressort que le composé **1** possède dans sa structure 2 CH- éthyléniques et 5 carbones quaternaires : une fonction acide carboxylique conjuguée à  $\delta_c$  169.3 et trois carbones quaternaires oxygénés dont deux carbones équivalents à 145.3 ppm, ce qui correspond à la formule brute  $C_7H_6O_5$  (figure 23).



**Figure 22** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) du composé **1** dans  $\text{MeOH-}d_4$



**Figure 23** : Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  Jmod et  $^{13}\text{C}$  DEPT135 (50 MHz) superposés du composé **1** dans  $\text{MeOH-}d_4$ .

Les données des spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  (tableau 12) indiquent que le composé **1** est un acide phénolique. En fait, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz dans le  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) présente un seul signal singulet dans la zone aromatique  $\delta_{\text{H}} = 7,05$  ppm et correspond à deux protons (figure 22), ce qui signifie que le composé **1** est aromatique et possède deux protons équivalents.

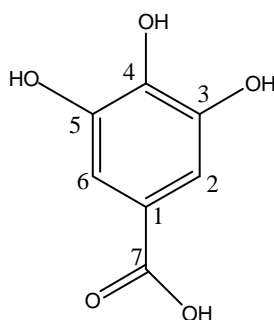


**Tableau 12** : Données RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **1**

Atomes	RMN $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	RMN $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), m
1	120,8	-
2/6	109,2	7,05 (2H, s)
3/5	145,3	-
4	138,5	-
7	169,3	-

Ainsi le composé **1** correspond à l'**acide gallique**. Ces données sont conformes à celles de la littérature (Gottlieb *et al.*, 1991).

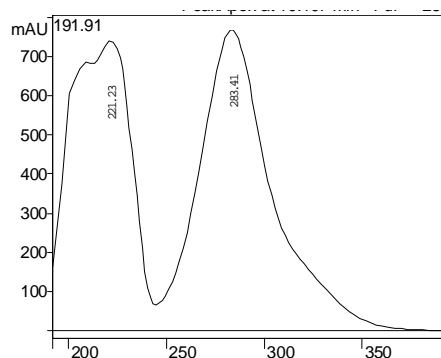
Cet acide phénolique est décrit pour la première fois dans le genre *Limoniastrum*.



composé **1** : structure de l'**acide gallique**

## 5.2. Identification du composé **2**

Le composé **2** est isolé sous forme de cristaux gris. Son spectre UV présente un maximum d'absorption à 283 nm (figure 24).



**Figure 24** : Profil UV du composé **2**

Le spectre de masse du composé **2** en mode d'ionisation API négative présente un ion quasi-moléculaire  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , = 329,3672 Da, d'où la masse moléculaire = 330,3672 Da.

Les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  Jmod et  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 montrent la présence de 7 carbones  $\text{sp}^3$  et 7 carbones  $\text{sp}^2$ , dont cinq carbones quaternaires oxygénés parmi lesquels une fonction cétone (le signal du carbone quaternaire à  $\delta$  204,9 confirme dans le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  la présence d'une fonction cétone dans la molécule), ce qui correspond à la formule brute  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_9$  (figure 27).

. Le spectre RMN  $^1\text{H}$  révèle la présence de deux protons aromatiques à  $\delta$  5,98 (d,  $J = 2,2$  Hz); 6,22 (d,  $J = 2,2$  Hz). La valeur de la constante de couplage indique que ces deux protons sont en position méta. Le singulet d'intégration 3H à  $\delta$  2,72 est assigné à un groupement méthyle attaché à une fonction cétone aromatique. La comparaison des déplacements chimiques des carbones du sucre [ $\delta_c$  78,4 (C-3)] avec ceux de la littérature suggère qu'il s'agit d'une configuration D-glucopyranose. En effet, dans le cas du D-galactopyranose le C-3 est plus blindé [ $\delta_c$  73,8 (C-3)] (Agrawal, 1992). La grande constante de couplage (8,0 Hz) de H-1' montre une interaction H-1' axial/H-2' axial d'où une configuration  $\beta$  du sucre.

Ainsi, le doublet de proton à  $\delta$  5,06 ( $J = 7,1$  Hz) est attribué au proton anomérique du  $\beta$ -D-glucoside (H-1'). La grande constante de couplage du proton anomérique H-1' ( $J = 7,1$  Hz) entre  $J_{\text{H1-H2}}$  correspond à une orientation axiale-axiale entre ces deux protons, ce qui implique une configuration  $\beta$  du sucre (figures 25-26). Les signaux à  $\delta$  3,74 ; 3,94 (m, 2H) et 3,44-3,54 (m, 4H) correspondent aux protons du glucose. Le  $\delta_c$  102,1 ppm du carbone anomérique indique la liaison éther du sucre  $\beta$ . Dans le cas d'une liaison ester le carbone anomérique résonnerait à  $\delta_c$  94-98 ppm (figure 27). La jonction du proton anomérique avec la génine est confirmée par le spectre de corrélation longue distance HMBC où une tâche de corrélation entre H-1' et C-2 est observée (figure 30).

La structure alternative possible 2,6-dihydroxy-4-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl) acétophénone a été exclue car la structure symétrique de ce composé conduirait à la présence d'uniquement quatre carbones aromatiques, observables dans le spectre RMN  $^{13}\text{C}$ . En fait, le spectre indique que C-2 et C-6 à  $\delta$  162,7 ppm et 166,3 ppm, respectivement ne sont pas équivalents. De même, les carbones C-3 et C-5 à  $\delta = 95,5$  ppm et 98,2 ppm, respectivement (tableau 13) ne sont pas équivalents.

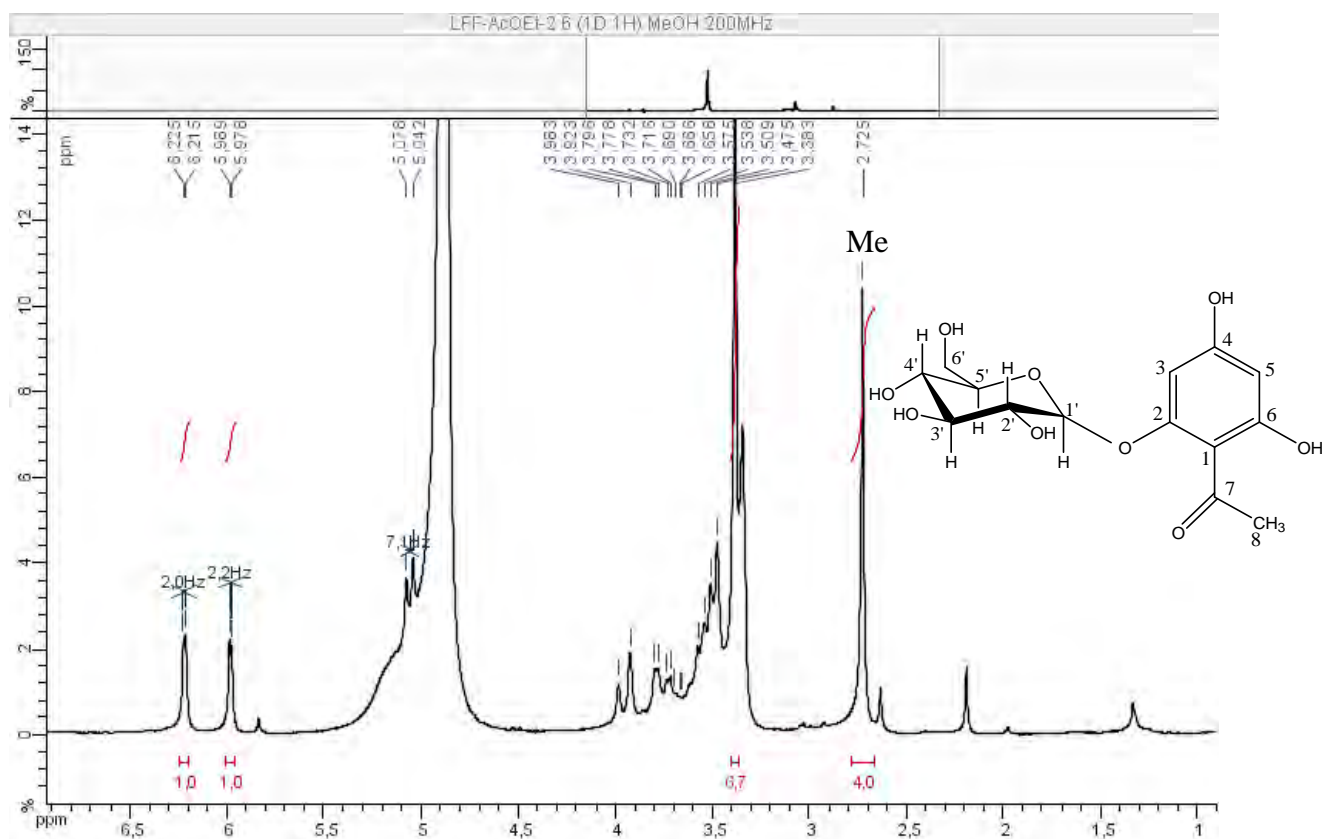


Figure 25 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) du composé **2** dans  $\text{MeOH-}d_4$

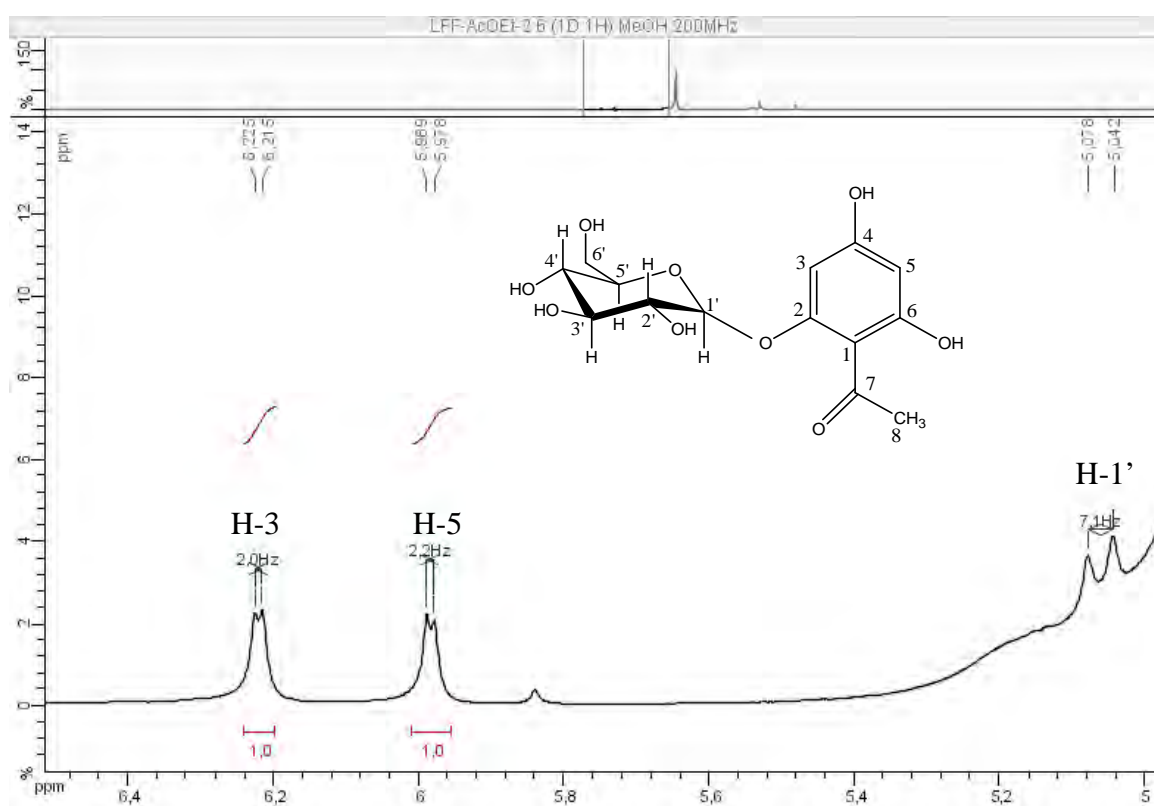
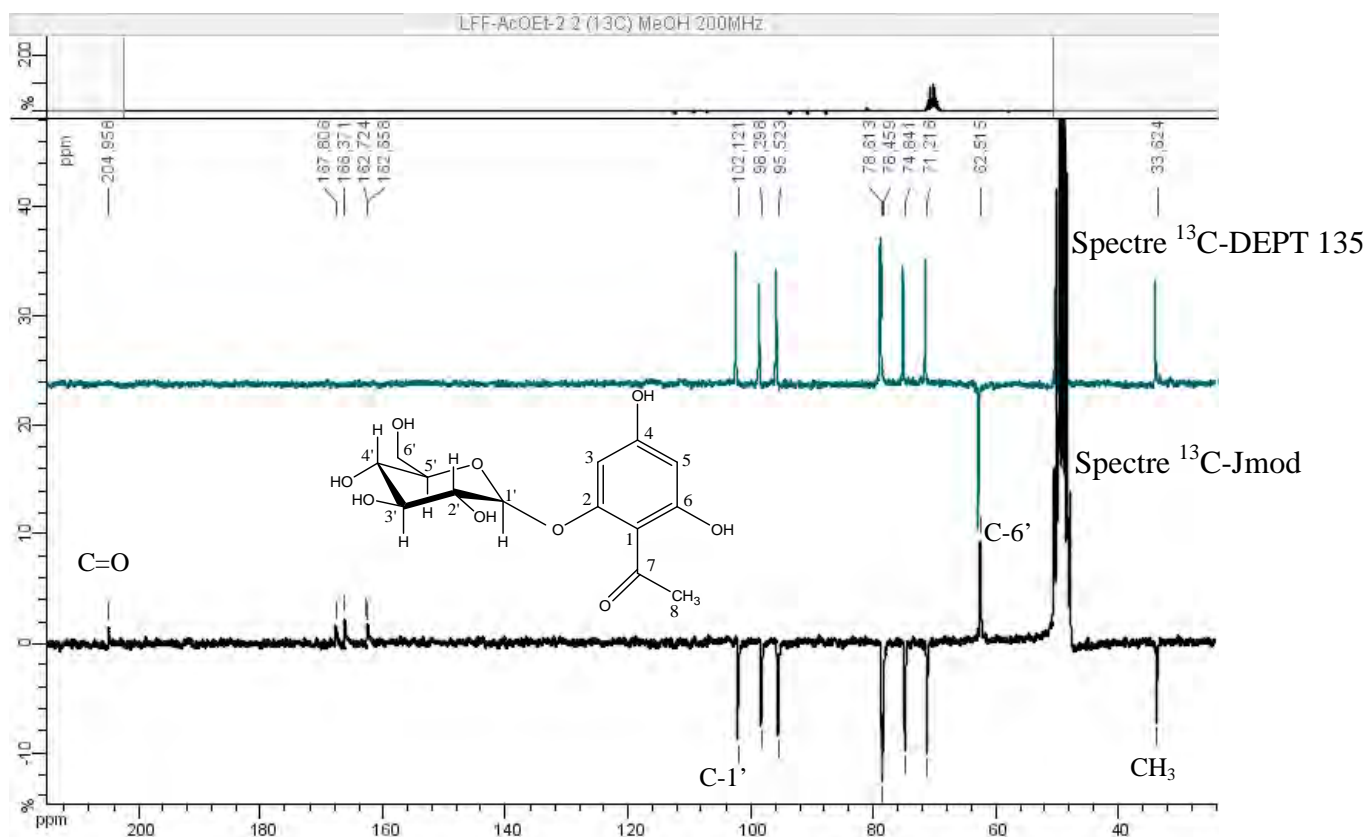
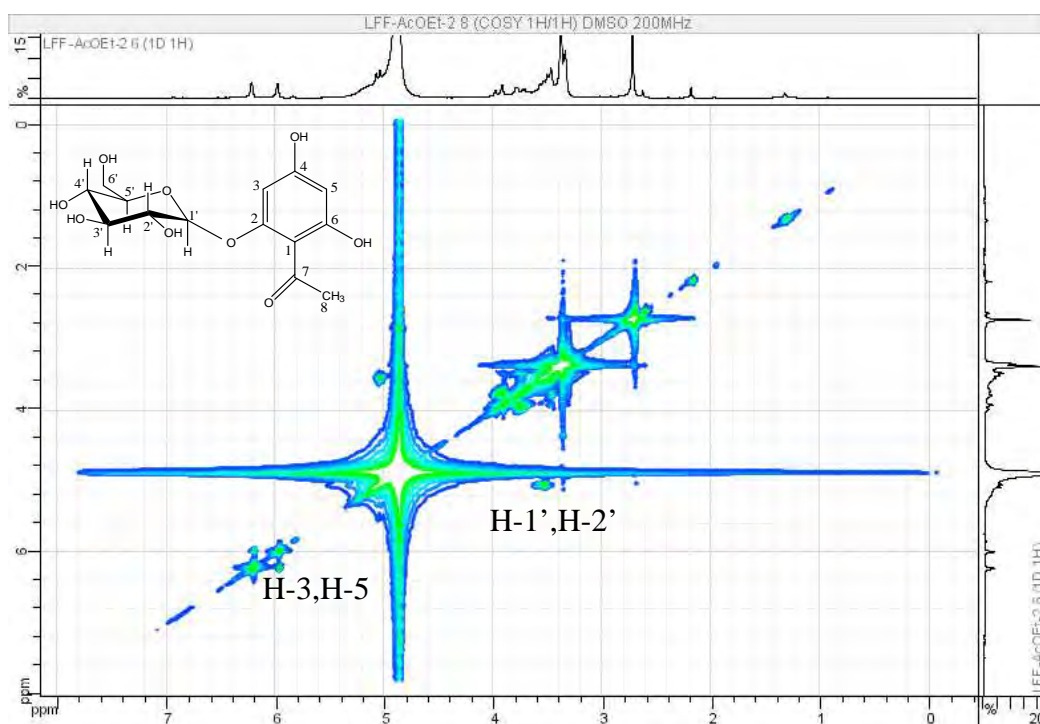


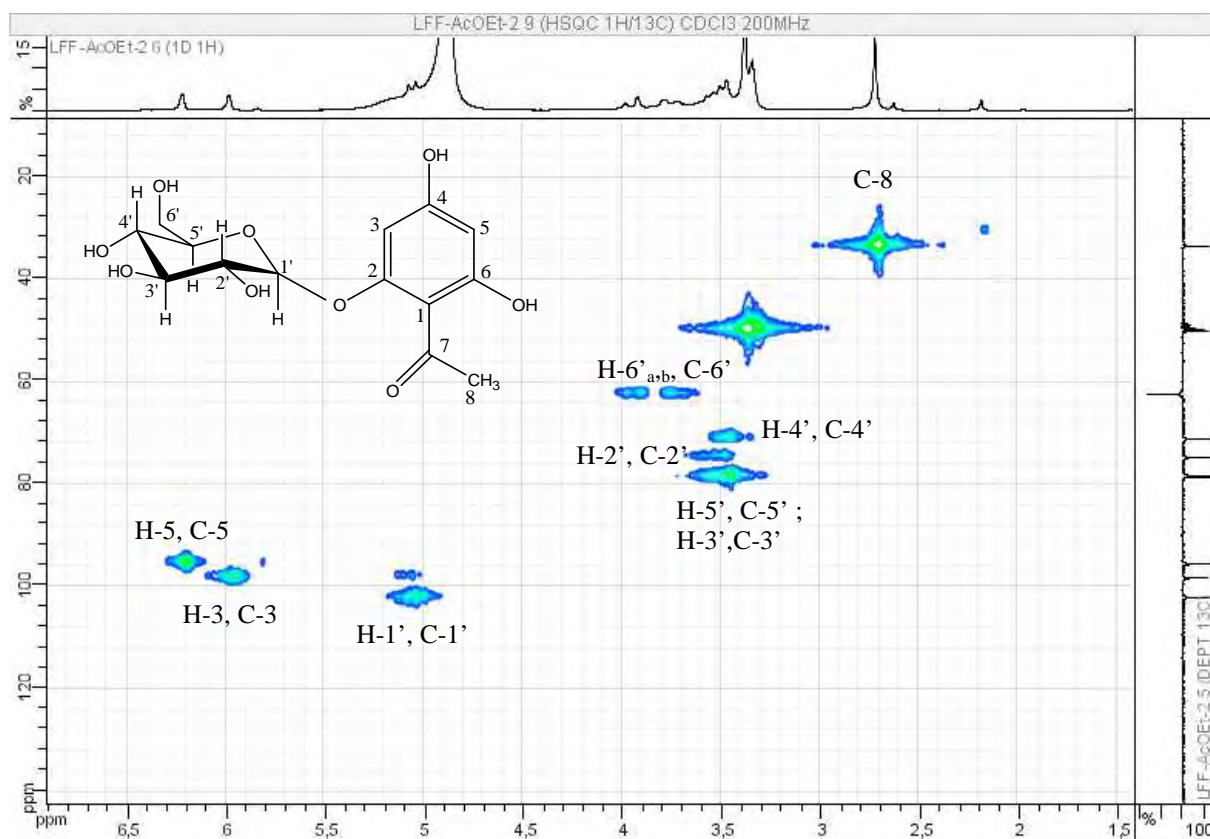
Figure 26 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) du composé **2** dans  $\text{MeOH-}d_4$ .



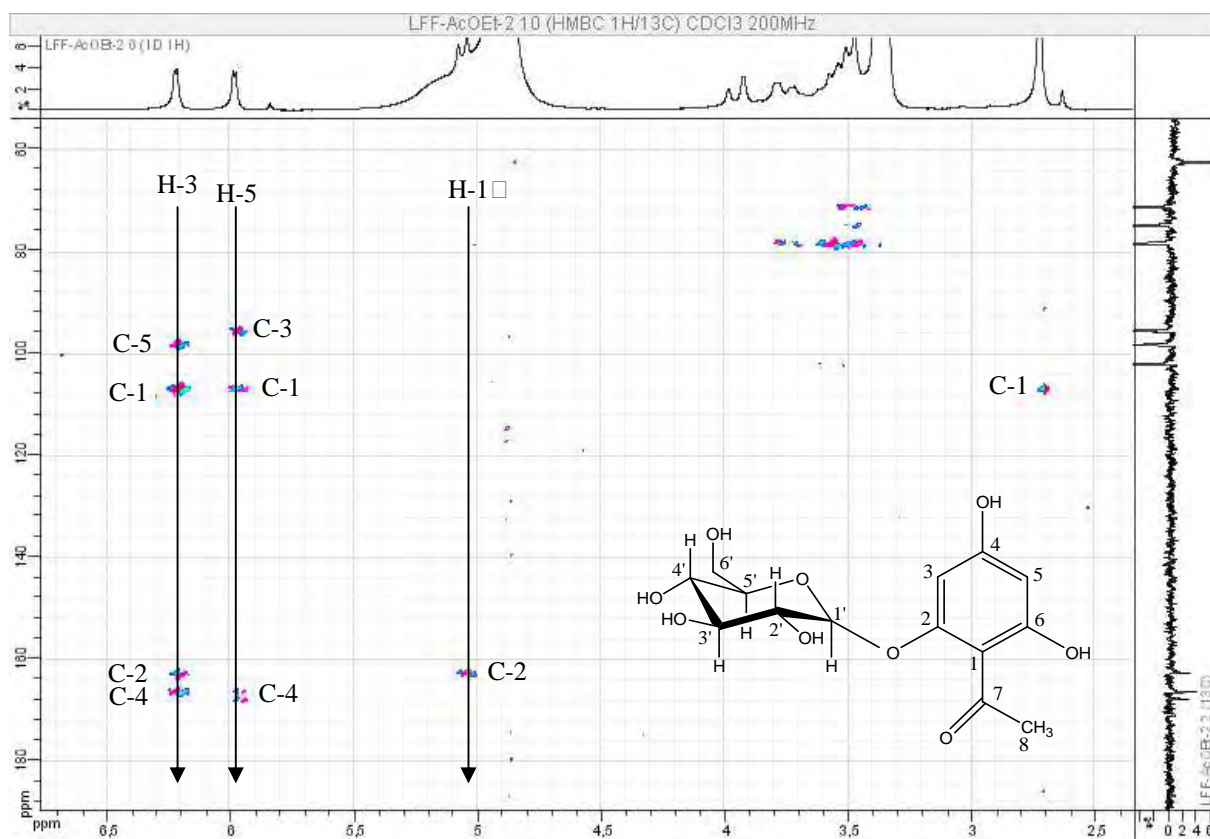
**Figure 27** : Spectres RMN  $^{13}\text{C}$  Jmod et  $^{13}\text{C}$  DEPT135 (50 MHz) du composé **2** dans  $\text{MeOH-}d_4$ .



**Figure 28** : Spectre RMN COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (200 MHz) du composé **2** dans  $\text{MeOH-}d_4$ .



**Figure 29** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ -  $^{13}\text{C}$  HSQC (200 MHz) du composé **2** dans  $\text{MeOH-}d_4$ .



**Figure 30** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ -  $^{13}\text{C}$  HMBC (200 MHz) du composé **2** dans  $\text{MeOH-}d_4$ .

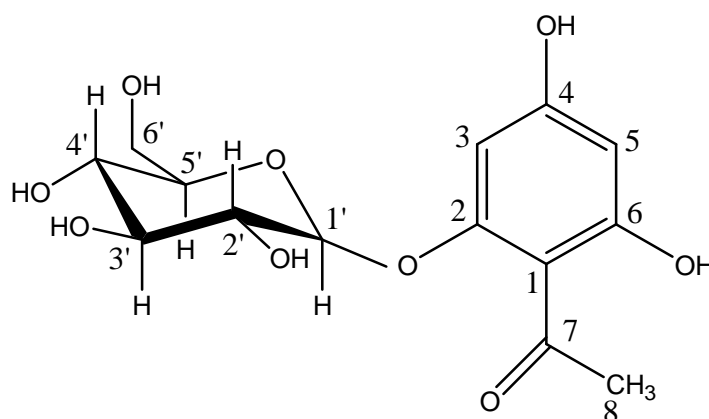
**Tableau 13** : Données RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **2**.

Atomes	RMN <sup>13</sup> C δ (ppm)	RMN <sup>1</sup> H δ (ppm), m, J (Hz)
1	106,4	-
2	162,7	-
3	95,5	6,22 (1H, d, 2,2)
4	167,8	-
5	98,2	5,98 (1H, d, 2,2)
6	166,3	-
7	204,9	-
8	33,6	2,72, s
1'	102,1	5,06 (1H, d, 7,1)
2'	74,8	3,54 (1H)
3'	78,4	3,44 (1H)
4'	71,2	3,45 (1H)
5'	78,6	3,44 (1H)
6'	62,5	3,74 ; 3,94 (2H)

L'ensemble de ces données spectroscopiques et analytiques est conforme avec celles reportées dans la littérature (Suksamrarn *et al.*, 1997) pour le composé **2**.

Celui-ci a été identifié comme étant la **4,6-dihydroxy-2-O-(β-D-glucopyranosyl) acétophénone** ou **myrciaphénone A**.

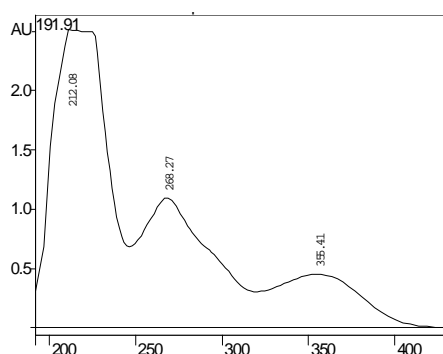
Ce composé est décrit pour la première fois dans la famille des plombaginacées.



composé **2** : structure de la **4,6-dihydroxy-2-O-(β-D-glucopyranosyl) acétophénone**  
ou **myrciaphénone A**

### 5.3. Identification du composé 3.1

Le composé **3.1** isolé est sous forme de poudre jaune. Son spectre UV présente deux bandes d'absorption maximale à 268 nm (bande II) et 355 nm (bande I), ce qui indique la nature flavonoïdique de ce composé (figure 31).



**Figure 31** : Profil UV du composé **3.1**

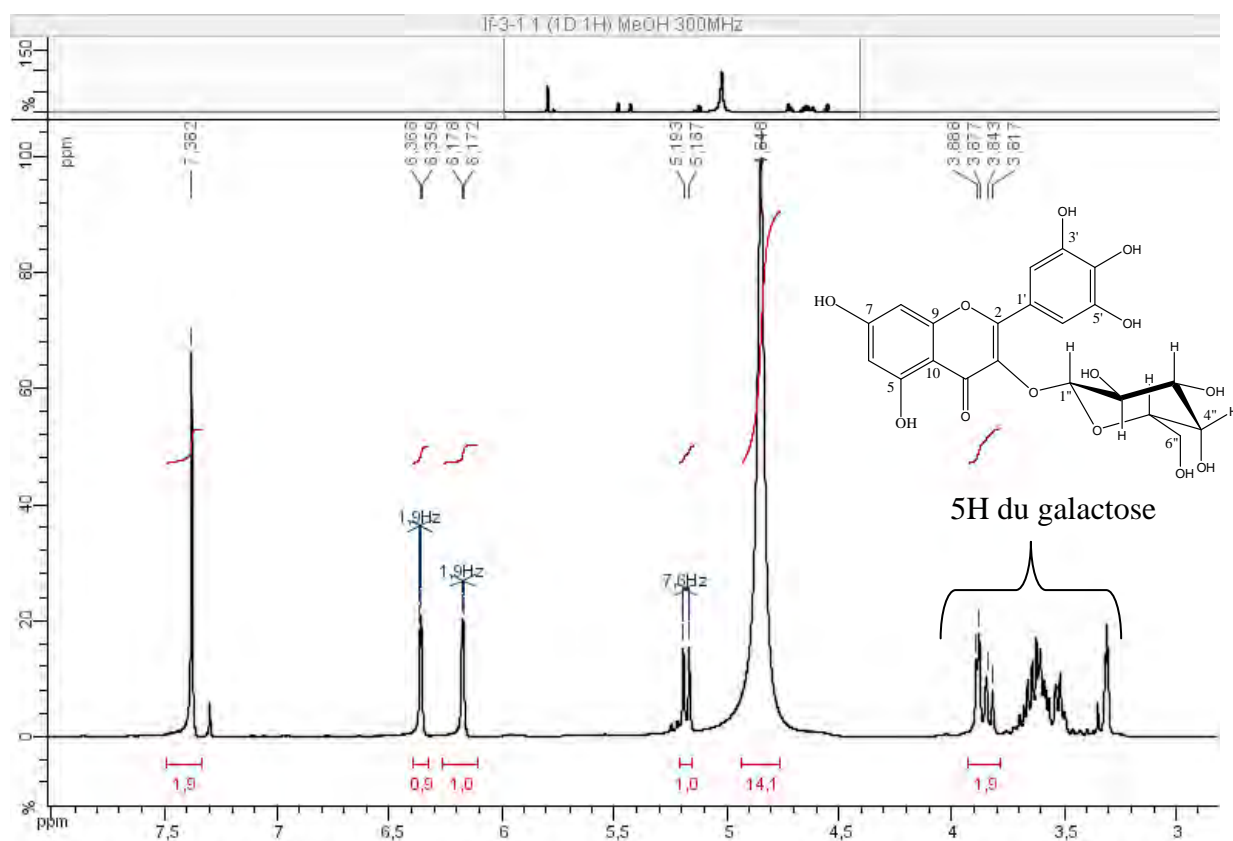
Le spectre de masse du composé **3.1** par ionisation à pression atmosphérique (API) en mode négatif, montre un ion moléculaire  $[M-H]^-$  de 479,0939 m/z, d'où une masse moléculaire correspondant à 480,0939 Da indique la formule brute  $C_{21}H_{20}O_{13}$ , ce qui confirme la masse pseudo-moléculaire.

Le spectre RMN  $^1H$  présente des signaux caractéristiques de protons aromatiques. Les protons à  $\delta$  6,17 (1H, d,  $J = 1,9$  Hz) et 6,35 (1H, d,  $J = 1,9$  Hz) couplent en système AB caractéristiques du cycle A des flavonoïdes (H-6 et H-8) (figures 32-33). La constante de couplage ( $J = 1,9$  Hz) indique la position méta de ces protons l'un par rapport à l'autre. Dans le cycle B, le singulet à  $\delta$  7,38, d'intégration pour 2H correspondant aux protons équivalents H-2'/H-6'. La comparaison des déplacements chimiques des carbones du sucre [ $\delta_c$  74,1 (C-3)] avec ceux de la littérature suggère qu'il s'agit d'une configuration D-galactopyranose. En effet, dans le cas du D-glucopyranose le C-3 est plus déblindé [ $\delta_c$  76,7 (C-3)] (Agrawal, 1992). La grande constante de couplage (8,0 Hz) de H-1' montre une interaction H-1' axial/H-2' axial d'où une configuration  $\beta$  du sucre. La grande constante de couplage du proton anomérique H-1'' ( $J = 7,6$  Hz) du proton anomérique à  $\delta$  5,18 ppm indique une configuration  $\beta$  du sucre (figures 32-33, tableau 14). Le déplacement chimique  $\delta_c$  104,6 ppm du carbone anomérique indique la liaison éther du sucre  $\beta$  (figure 31, tableau 14). Dans le cas d'une liaison ester le carbone anomérique résonnerait autour de  $\delta_c$  94-98 ppm. Par ailleurs, les

données RMN  $^{13}\text{C}$  du sucre confirme la structure galactose qui lui a été attribuée (Markham, 1982).

Le spectre HMBC qui montre une corrélation entre H-1'' ( $\delta$  5,18 ppm) et le carbone C-3 (figure 34). Les corrélations longue distance observées dans le spectre HMBC entre le proton H-6 et les carbones C-5, C-7 et C-8 ; entre le proton H-8 et les carbones C-6 et C-7 ; et enfin entre les protons H-2'/H-6' et les carbones C-2, C-1', C-4' et C-3'/5' (figure 34-35) confirment la structure du composé **3.1** comme étant la **myricétine-3-O- $\beta$ -galactopyranoside**. Ces résultats sont conformes à ceux trouvés dans la littérature (Agrawal, 1989).

Ce composé est décrit pour la première fois dans le genre *Limoniastrum*.



**Figure 32** : Spectre  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz) du composé **3.1** dans  $\text{MeOH-}d_4$



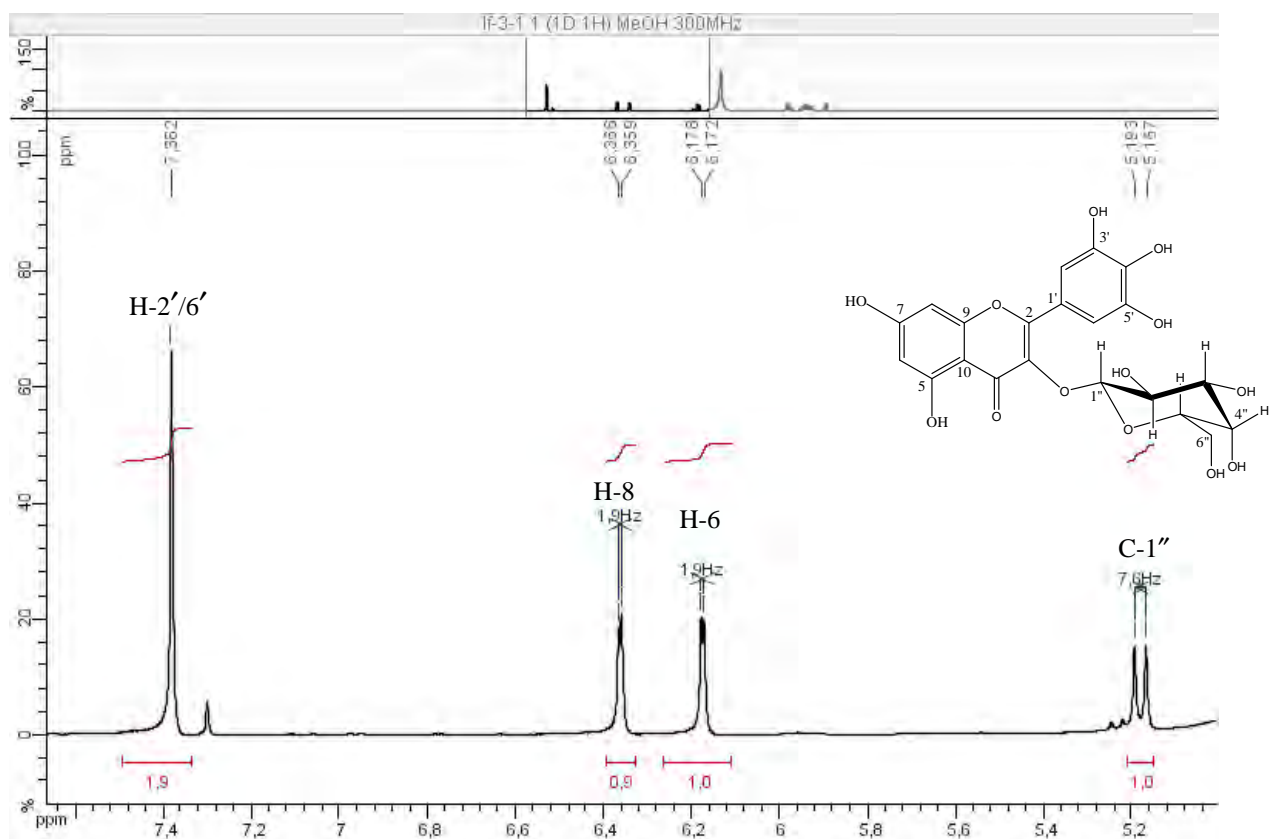


Figure 33 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) du composé **3.1** dans MeOH- $d_4$

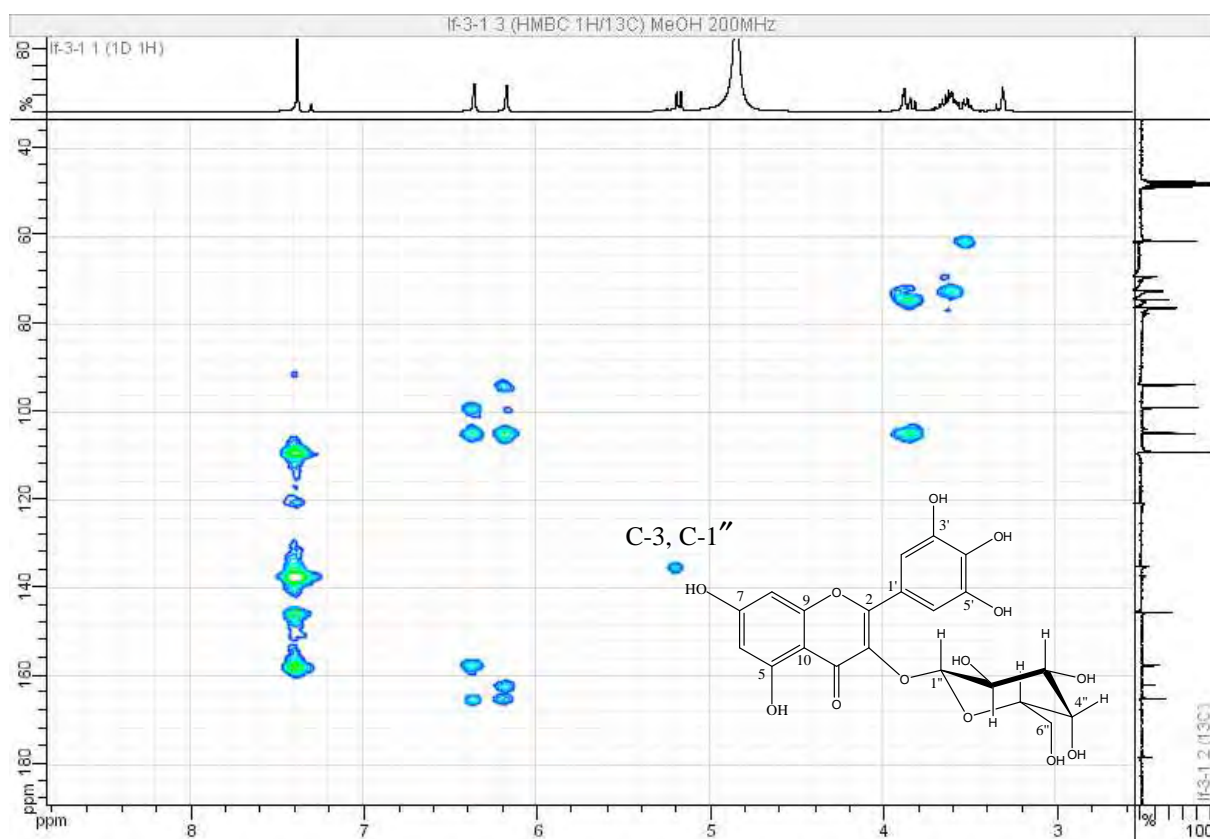
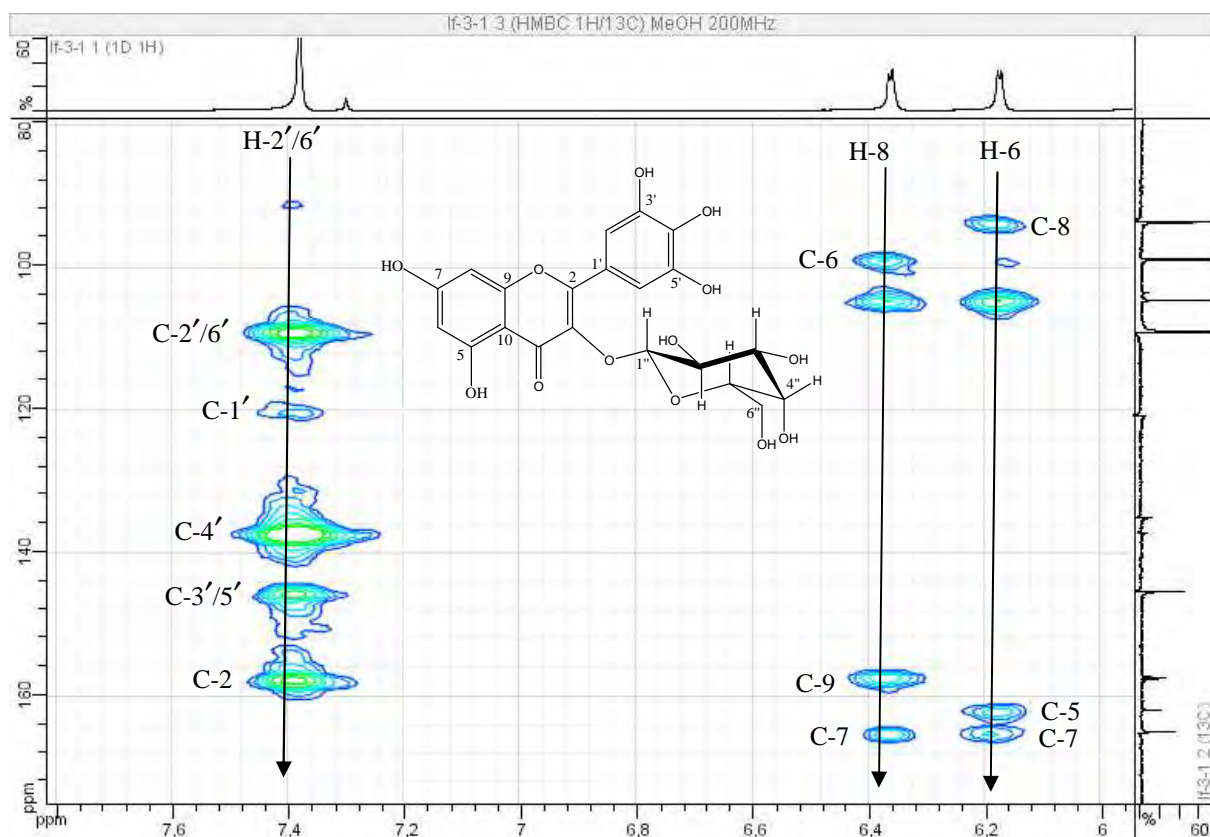
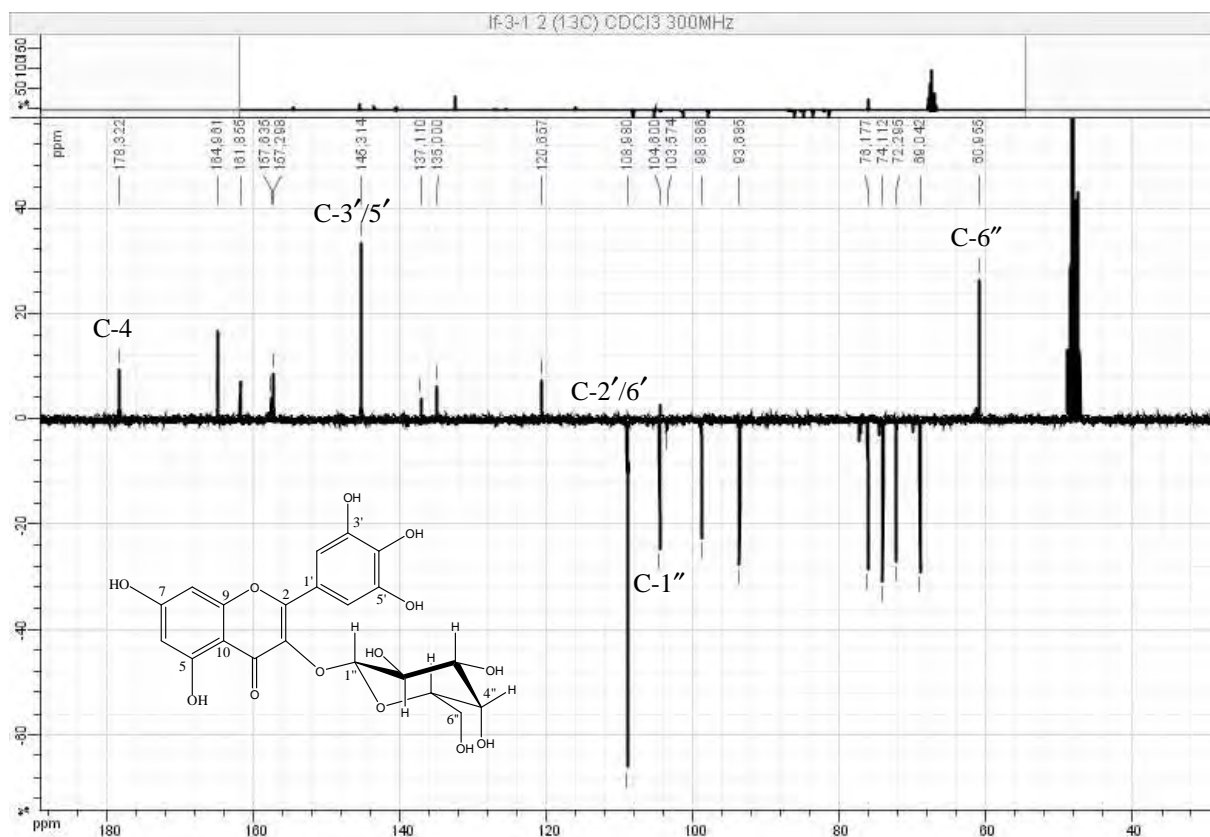


Figure 34 : Spectre HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN (200 MHz) du composé **3.1** dans MeOH- $d_4$



**Figure 35** : Spectre HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  RMN (200 MHz) du composé **3.1** dans  $\text{MeOH-}d_4$

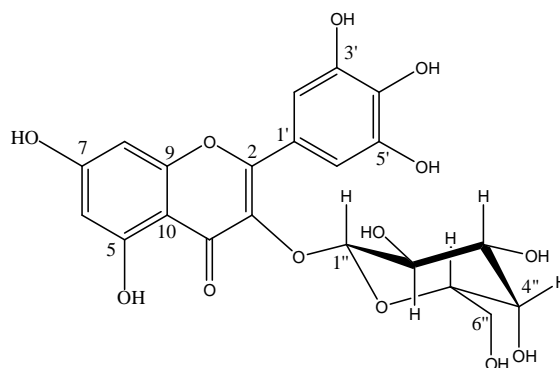


**Figure 36** : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  Jmod et  $^{13}\text{C}$  DEPT135 (75 MHz) du composé **3.1** dans  $\text{MeOH-}d_4$

**Tableau 14** : Données RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **3.1**

Atomes	RMN $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	RMN $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), m, J (Hz)
2	157,6	-
3	135,3	-
4	178,3	-
5	161,8	-
6	98,8	6,17 (1H, d, 1,9)
7	164,9	-
8	93,6	6,35 (1H, d, 1,9)
9	157,2	-
10	103,5	-
1'	120,6	-
2'/6'	108,9	7,38 (2H, s)
3'/5'	145,3	-
4'	137,1	-
1''	104,6	5,18 (1H, d, 7,6)
2''	72,2	nd
3''	74,1	nd
4''	69,0	nd
5''	76,1	nd
6''	60,9	nd

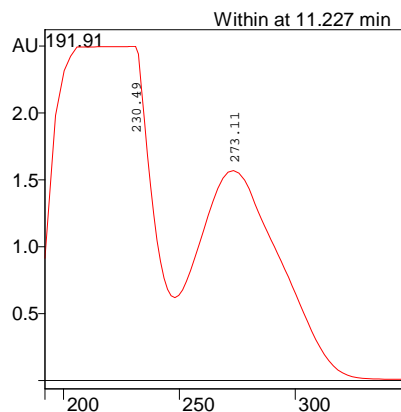
nd : non déterminé



Composé **3.1** : structure de la **myricétine-3-O- $\beta$ -galactopyranoside**

## 5.4. Identification du composé 3.2

Le composé **3.2** isolé est une poudre blanche. Son spectre UV présente une bande d'absorption maximale à 273 nm (figure 37).



**Figure 37** : Profil UV du composé **3.2**

Le spectre de masse du composé **3.2** par ionisation à pression atmosphérique (API) en mode négatif montre un ion quasi-moléculaire  $[M-H]^-$  de 457,28 m/z, d'où la masse moléculaire de 458,28 Da.

Le spectre RMN Jmod (figure 39) montre 22 carbones, dont 12 carbones quaternaires, 6 CH-oléfiniques, 1 méthylène, 2 méthines et 1 groupement ester, d'où la formule brute  $C_{22}H_{18}O_{11}$ , ce qui est conforme à la masse molaire.

Le spectre RMN  $^1H$  montre trois singulets d'intégration 2H chacun attribués aux protons H-6/H-8 (2H,  $\delta$  5,95 ppm), H-2'/H-6' (2H,  $\delta$  6,5 ppm), et H-2''/H-6'' (2H,  $\delta$  6,94) ppm. Les  $\delta_{H-4\alpha}$  2,92 ppm (dd,  $J_{4\alpha-4\beta}=15,9$  Hz,  $J_{4\alpha-3}=4,4$  Hz) et  $\delta_{H-4\beta}$  2,79 (d,  $J_{4\beta-3}=4,4$  Hz) présentent la stéréochimie du cycle C de l'épigallocatechine (figure 38). La présence d'un ester gallique est mise en évidence par le  $\delta_{COO}$  166,7 (figure 39). Le point d'attache de l'ester gallique est obtenu par HMBC où on observe une tâche de corrélation entre  $\delta_{H-3}$  5.54 ppm et le carbonyle à  $\delta_{COO}$  166,7 ppm (figure 41).

Le spectre RMN COSY  $^1H-^1H$  montre des corrélations entre les hydrogènes H-3/H-4 $\beta$  (figure 43).

Le spectre NOESY  $^1H-^1H$  montre des corrélations spatiales entre H-2/H-3 ; H-2/H-2',H-6' (figure 44).

Les autres corrélations en  $^1J_{(H-C)}$  du spectre HSQC (figure 42) et  $^2J-^3J_{(H-C)}$  du spectre HMBC (figures 40-41) en plus de la comparaison des données RMN avec ceux de la

littérature (Moon *et al.*, 2006 ; Davis *et al.*, 1996) ont permis d'attribuer sans équivoque le composé **3.2** à l'épigallocatechine-3-*O*-gallate.

Ce composé est identifié pour la première fois dans le genre *Limoniastrum*.

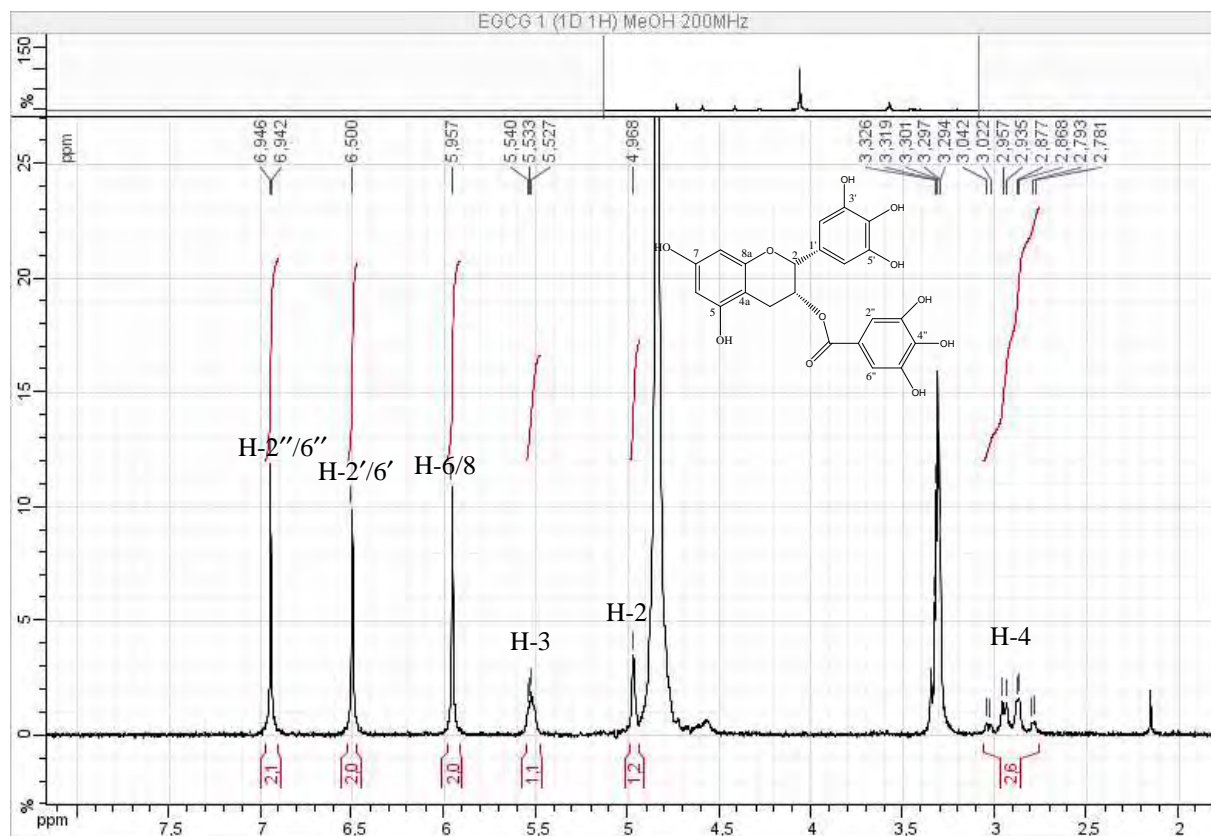


Figure 38: Spectre RMN <sup>1</sup>H (200 MHz) du composé **3.2** dans MeOH-*d*<sub>4</sub>

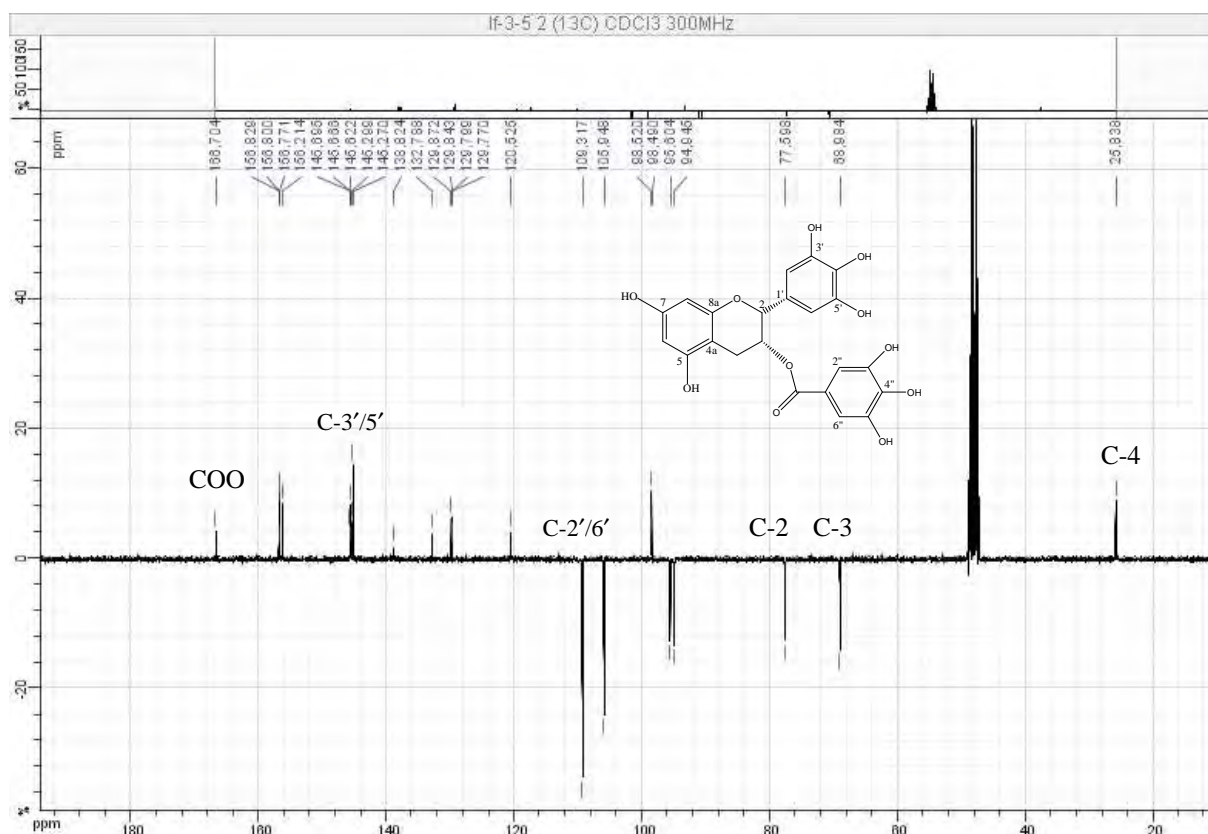


Figure 39 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  Jmod (75 MHz) du composé **3.2** dans MeOH- $d_4$

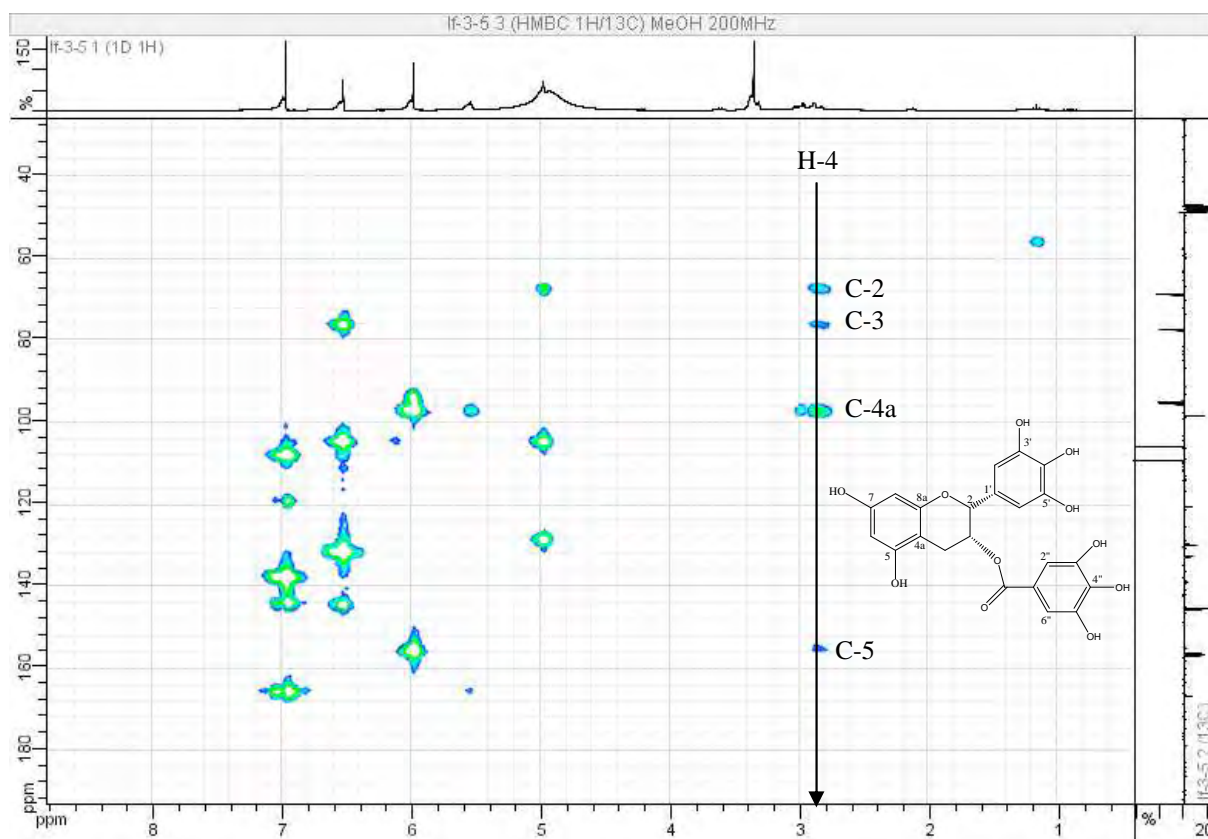


Figure 40 : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (200 MHz) du composé **3.2** dans MeOH- $d_4$

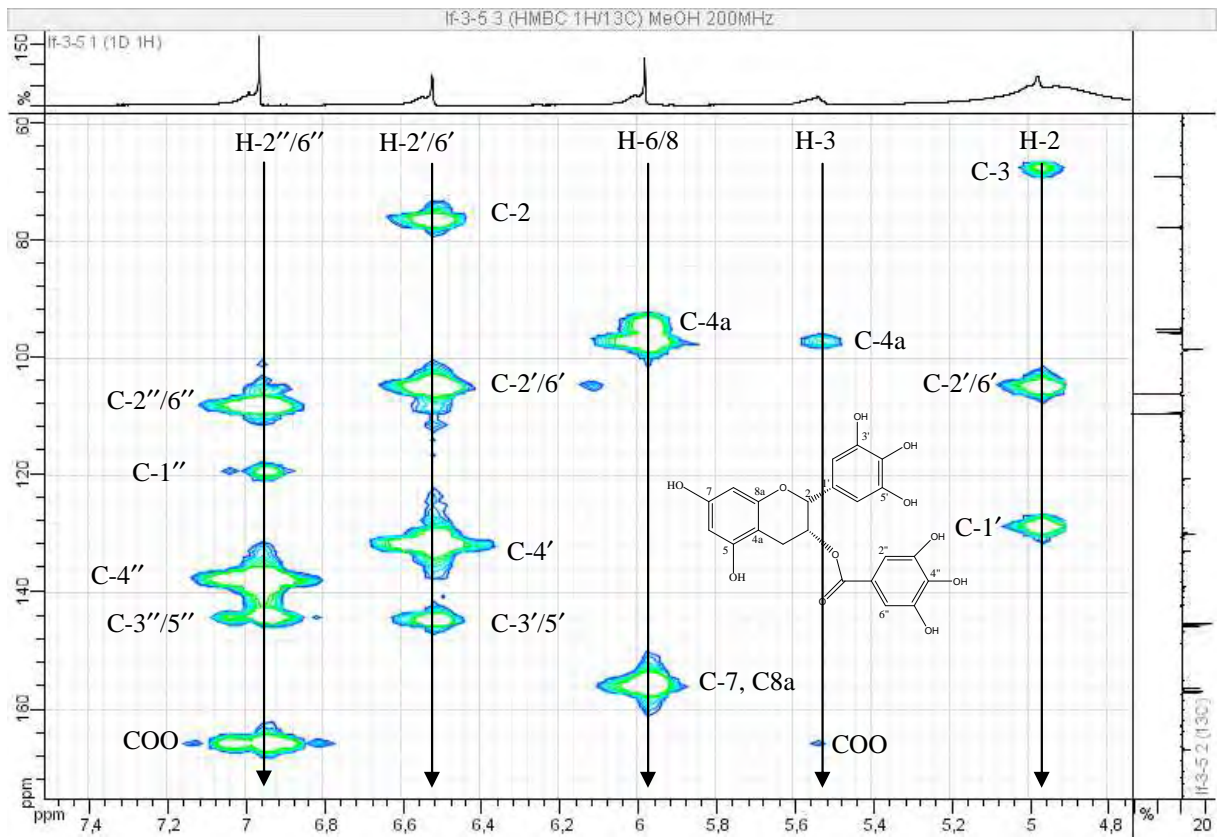


Figure 41: Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (200 MHz) du composé **3.2** dans  $\text{MeOH-}d_4$

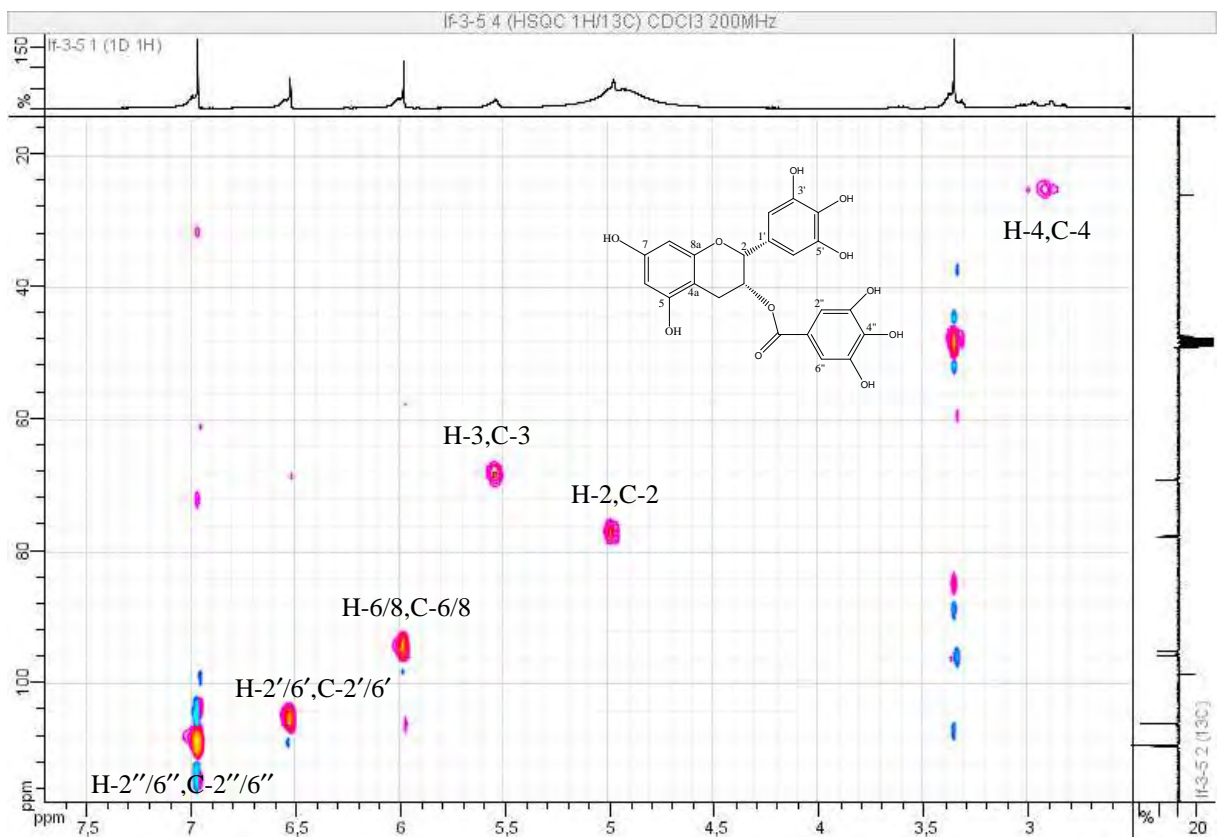
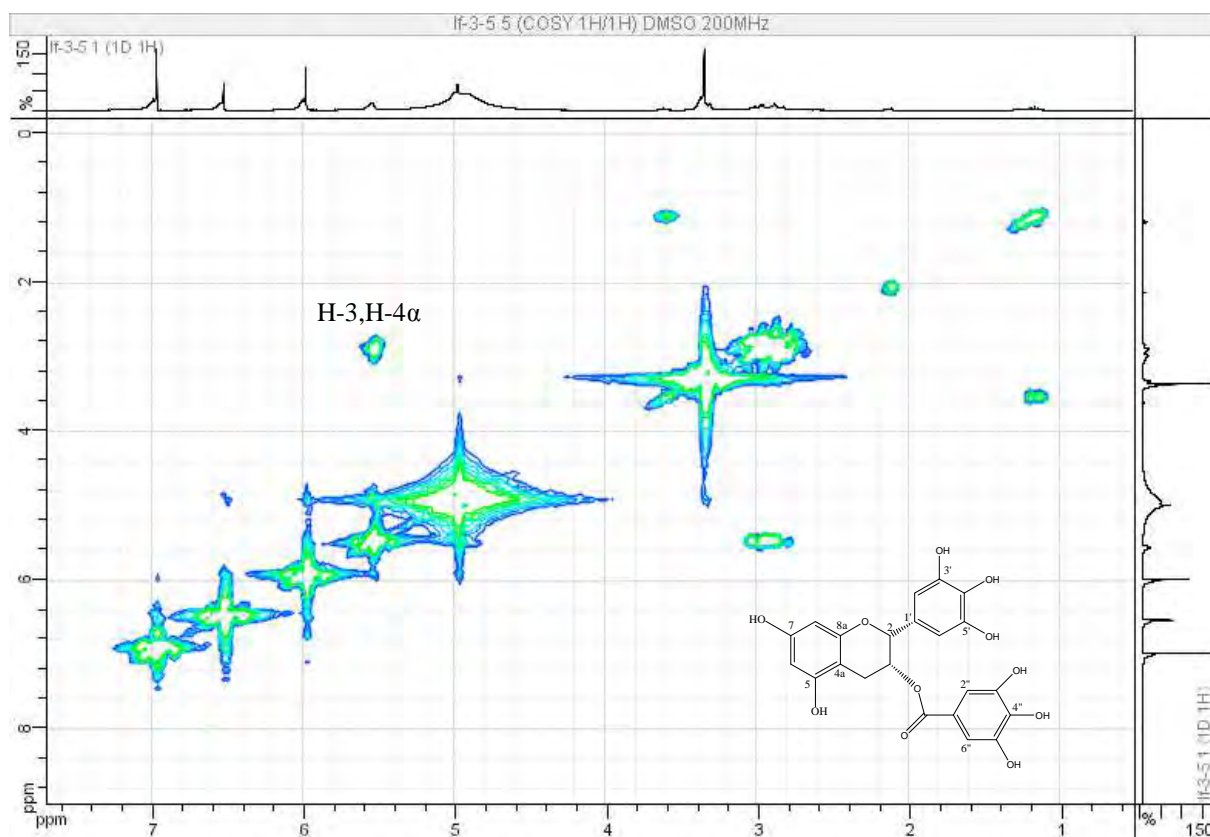
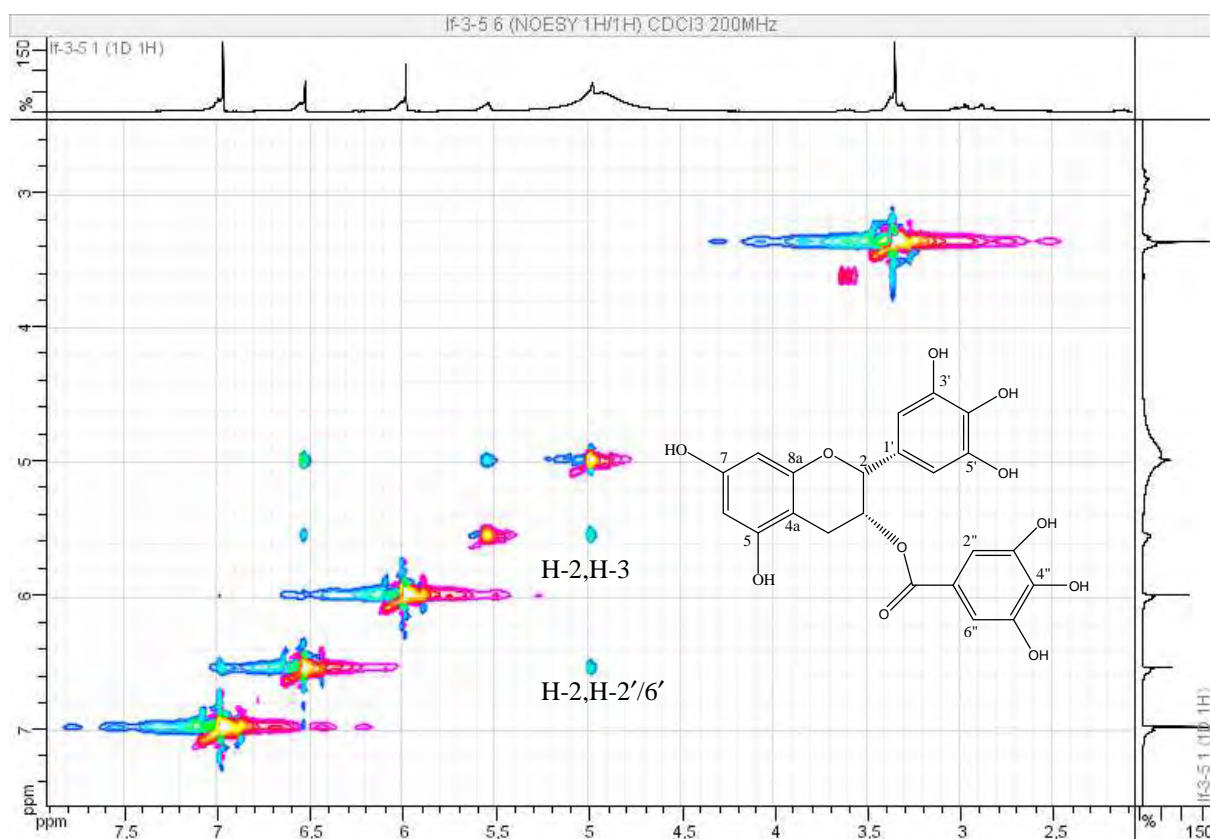


Figure 42 : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (200 MHz) du composé **3.2** dans  $\text{MeOH-}d_4$



**Figure 43** : Spectre RMN COSY  $^1\text{H}$ -  $^1\text{H}$  (200 MHz) du composé **3.2** dans  $\text{MeOH-}d_4$

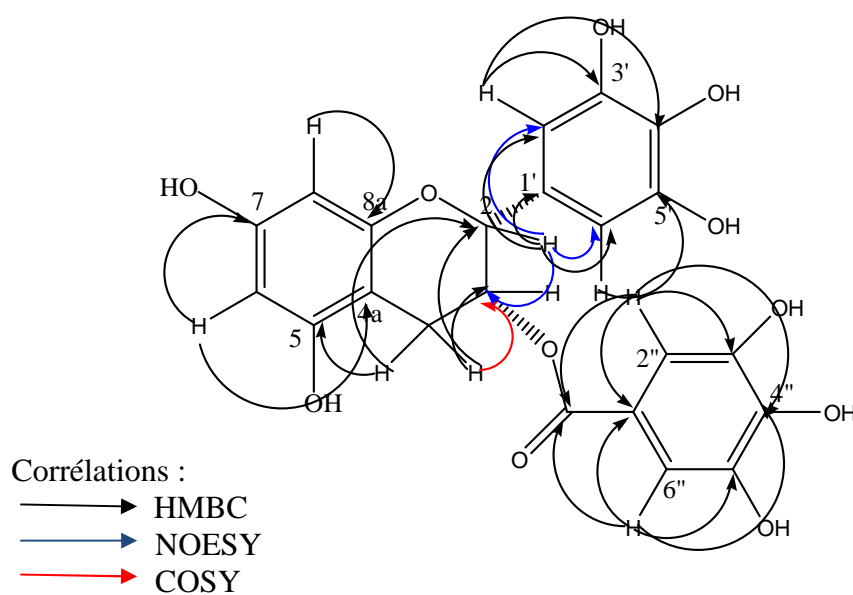


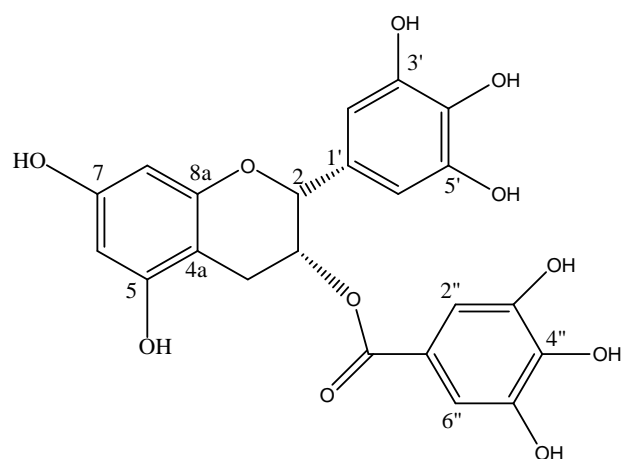
**Figure 44** : Spectre RMN NOESY  $^1\text{H}$ -  $^1\text{H}$  (200 MHz) du composé **3.2** dans  $\text{MeOH-}d_4$



**Tableau 15** : Données RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **3.2**

Atomes	RMN $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	RMN $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), m, J (Hz)
2	77,5	4,96 (1H, s large)
3	68,9	5,54 (1H)
4 $\alpha$	25,8	2,92 (1H, dd, 15,9; 4,4)
4 $\beta$		2,79 (1H, d, 15,9)
4a	98,4	-
5	156,2	-
6	94,9	5,95 (1H, s)
7	156,8	-
8	95,6	5,95 (1H, s)
8a	156,8	-
1'	129,8	-
2'/6'	105,9	6,5 (2H, s)
3'/5'	145,2	-
4'	132,7	-
1''	120,5	-
2''/6''	109,3	6,94 (2H, s)
3''/5''	145,6	-
4''	138,8	-
COO	166,7	-





Composé **3.2** : structure de l'épigallocatechine-3-*O*-gallate

### 5.5. Identification du composé 4

Le composé **4** est isolé sous forme d'une poudre jaune. Son spectre UV présente deux bandes d'absorption maximale à 259 nm (bande II) et 348 nm (bande I), ce qui indique sa nature flavonoïdique (figure 45).

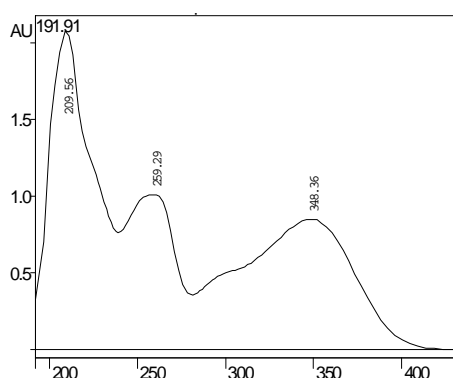


Figure 45 : Profil UV

du composé **4**

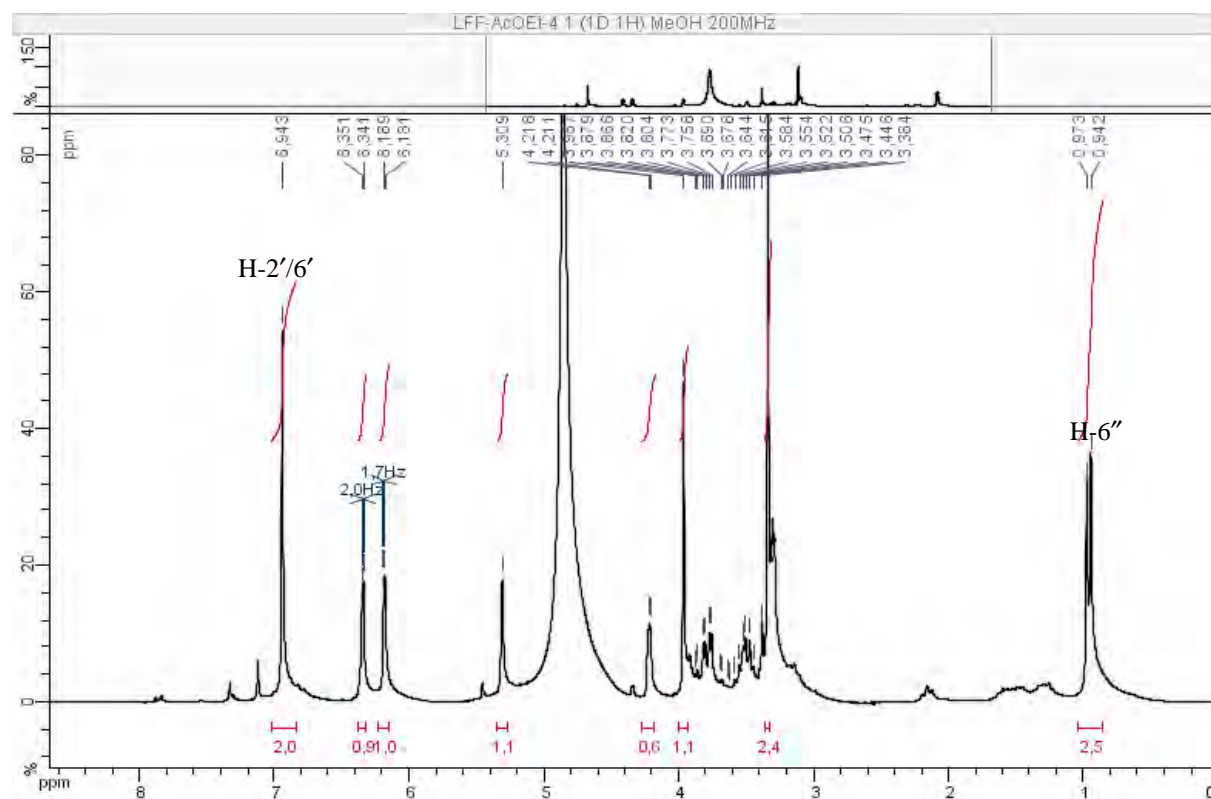
Le spectre de masse du composé **4** obtenu par ionisation à pression atmosphérique (API) en mode négatif montre un ion quasi-moléculaire  $[M-H]^-$  de 463,0723 Da. La masse moléculaire de ce composé est donc de 464,0801 Da correspondant à la formule brute  $C_{21}H_{20}O_{12}$ .

Le spectre RMN  $^1H$  présente des signaux caractéristiques de protons aromatiques. Les protons à  $\delta$  6,10 ppm (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-6) et  $\delta$  6,26 ppm (1H, d,  $J = 2,0$  Hz, H-8) couplent en système AB caractéristiques du cycle A des flavonoïdes. La faible constante de couplage ( $J = 2,0$  Hz) indique la position méta des 2 protons. Dans le cycle B, le singulet à  $\delta$  6,86 ppm, à

intégration 2H correspondant aux protons équivalents H-2'/H-6' (figures 46-47). Le spectre RMN  $^1\text{H}$  montre un singulet large correspondant au proton anomérique à  $\delta$  5,22 ppm. La constante de couplage du proton anomérique  $J = 2,0$  Hz indique la configuration  $\alpha$  du sucre. On note aussi la présence d'un doublet à  $\delta$  0,87 ppm (1H, d,  $J = 6,2$  Hz) caractéristique du groupement méthyle du rhamnose (figures 46-47, tableau 16). Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$ -Jmod montre également les signaux caractéristiques du rhamnose dans la zone  $\delta$  70-73 ppm (figure 49). Le blindage de C-3 ( $\delta$  135,6 ppm) et le déblindage des carbones C-2 ( $\delta$  157,3 ppm) et C-4 ( $\delta$  178,9 ppm) comparativement à l'aglycone, suggère que la position d'attache du rhamnose avec l'aglycone se situe sur le carbone C-3 (tableau 16).

L'ensemble de ces données spectrales ainsi que la comparaison des données trouvées dans la littérature (Agrawal, 1989) nous ont permis de déterminer la structure du composé **4** comme étant la **myricétine-3-O- $\alpha$ -rhamnopyranoside**.

Ce composé est identifié pour la première fois dans le genre *Limoniastrum*.



**Figure 46** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) du composé **4** dans MeOH- $d_4$

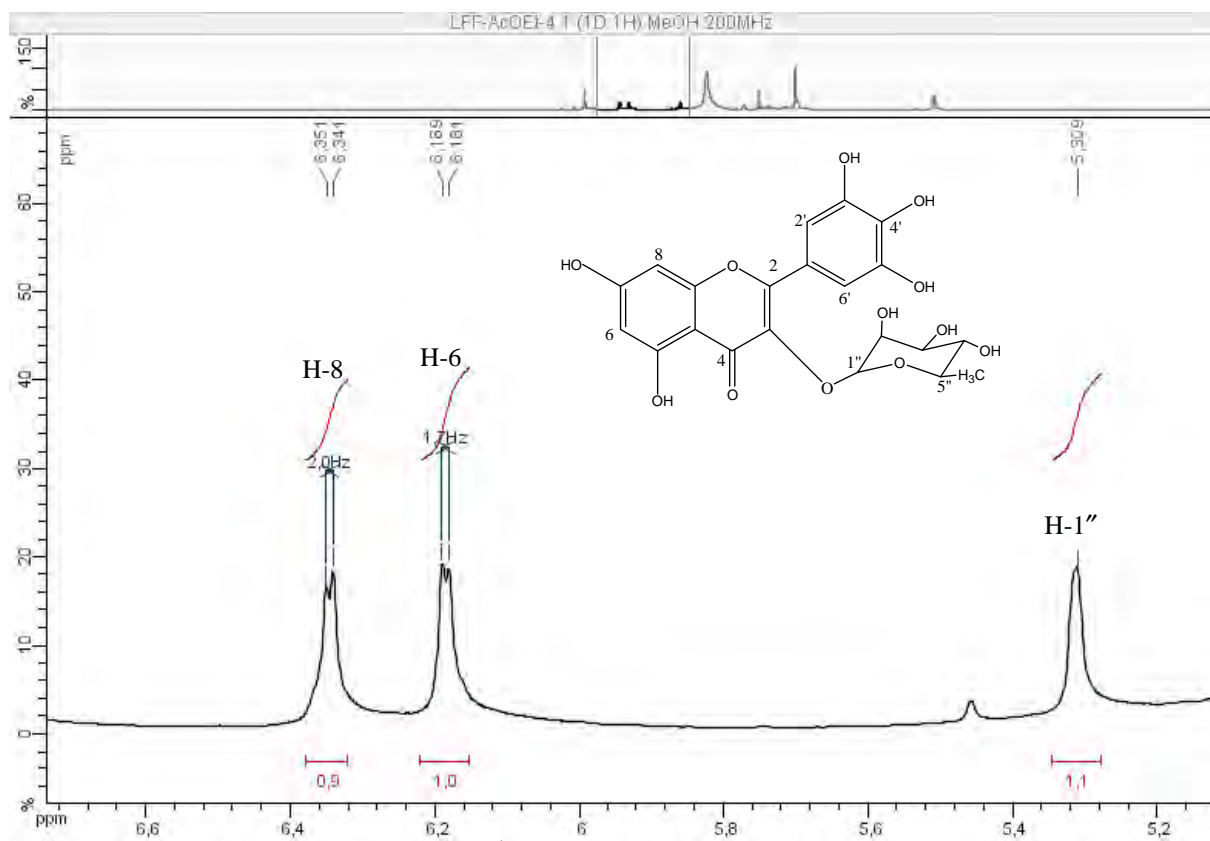


Figure 47 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) du composé 4 dans MeOH- $d_4$

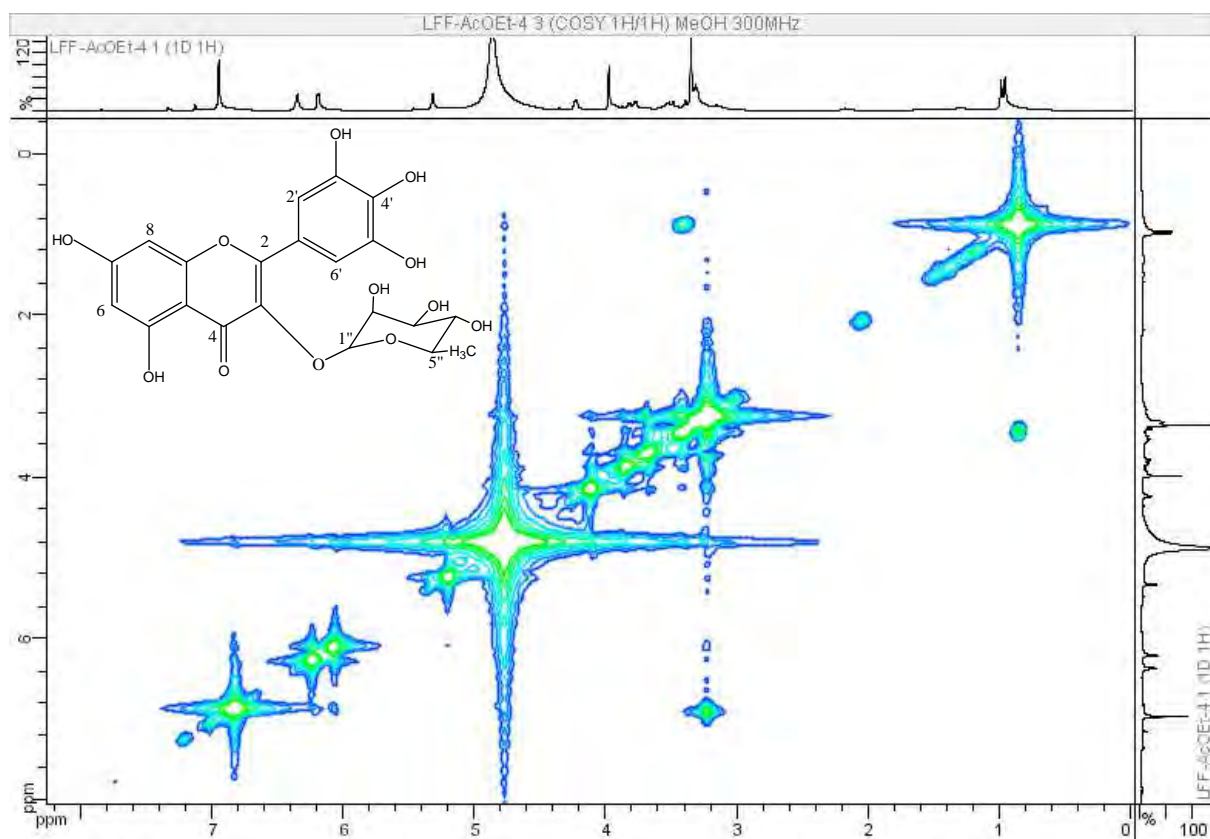


Figure 48 : Spectre RMN COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (300 MHz) du composé 4 dans MeOH- $d_4$

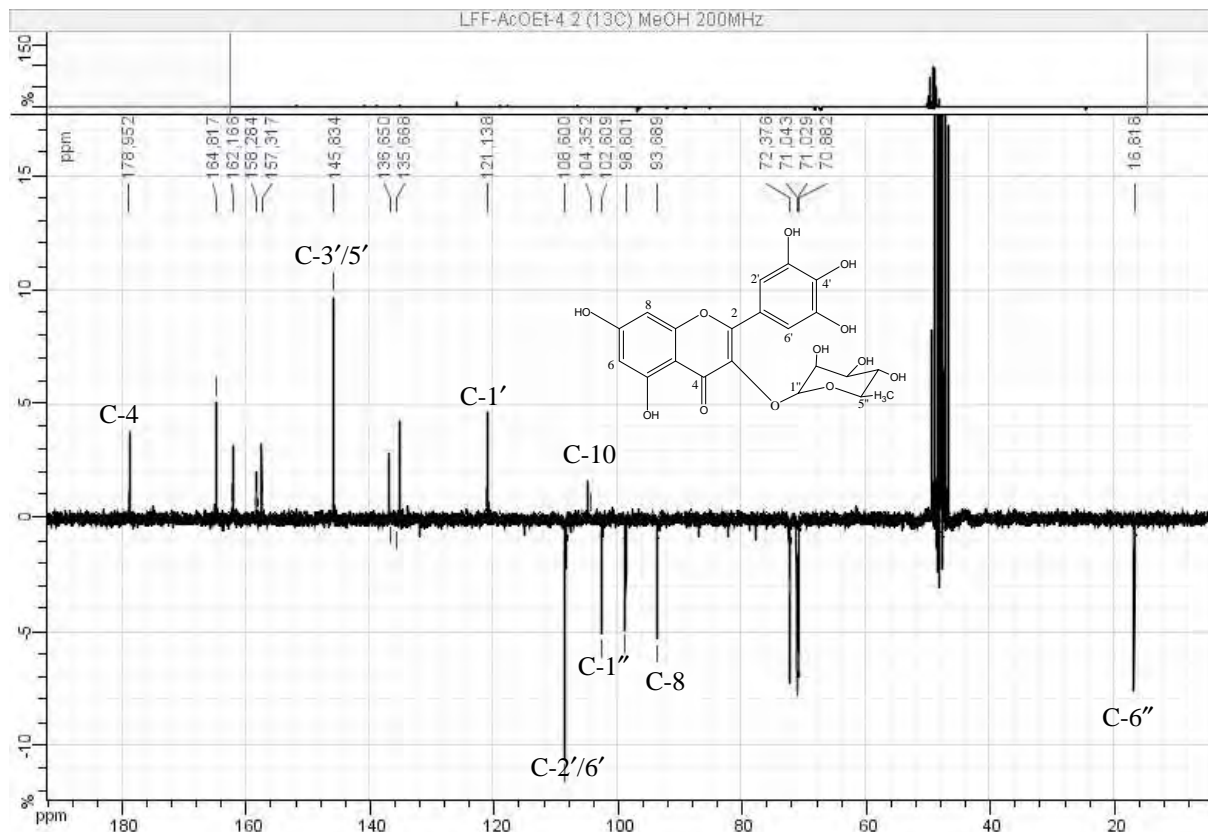
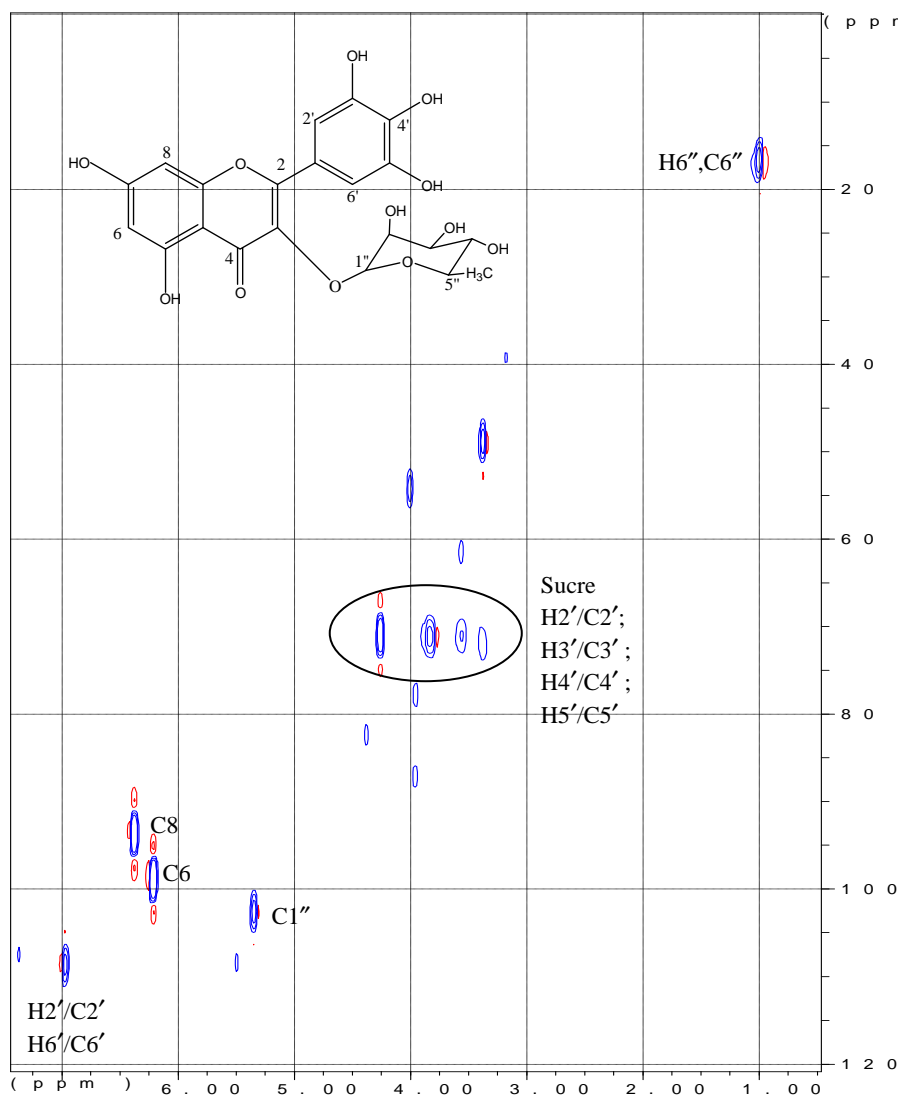
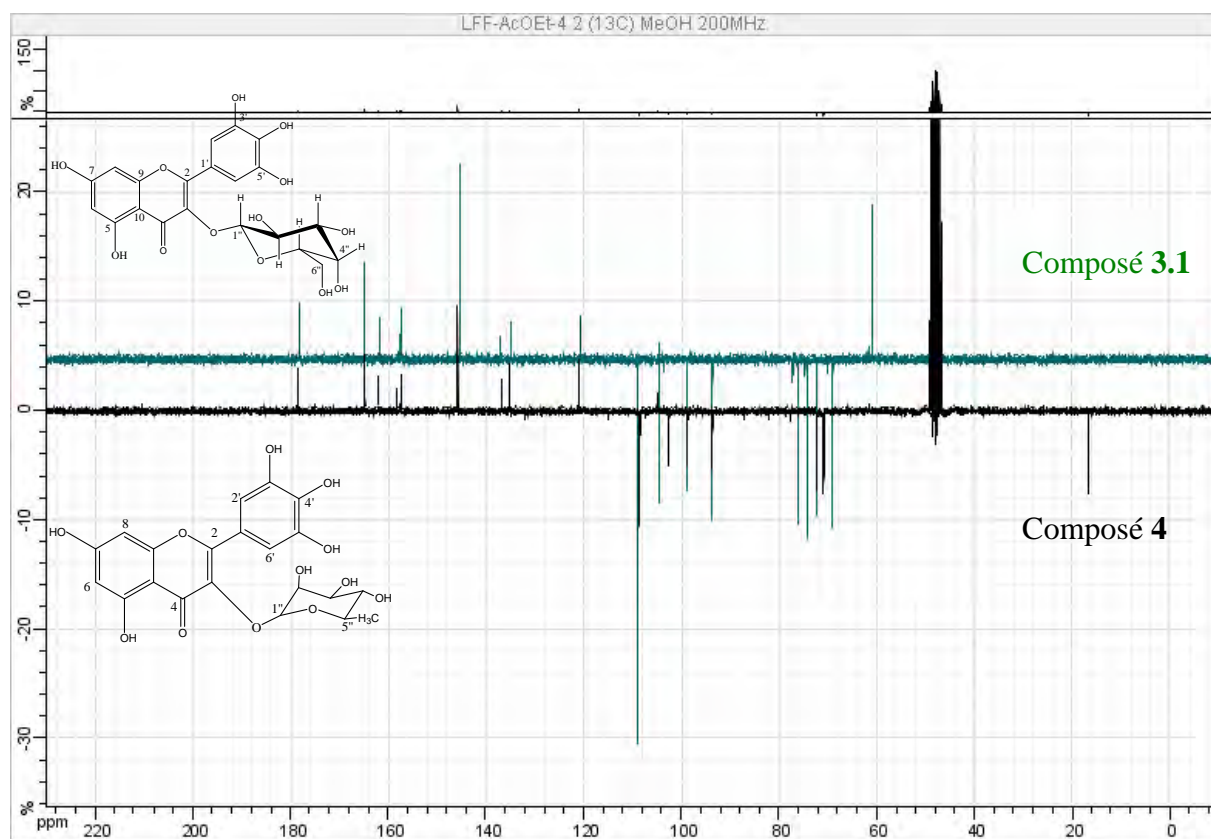


Figure 49 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$ -JMod (50 MHz) du composé 4 dans MeOH- $d_4$



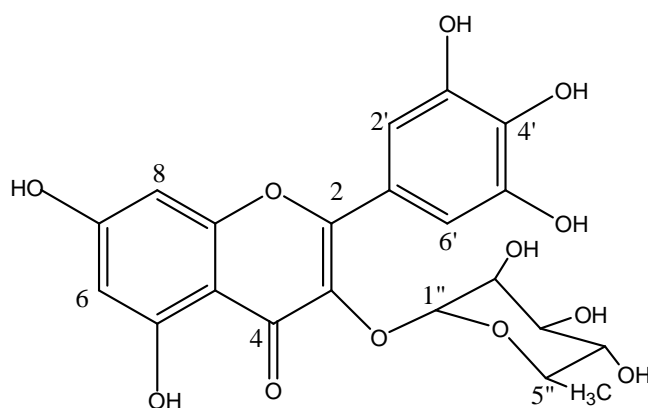
**Figure 50** : Spectre RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (300 MHz) du composé **4** dans  $\text{MeOH-}d_4$



**Figure 51** : Superposition des spectres RMN  $^{13}\text{C}$ -JMod (50 MHz) des composés 4 et 3.1 dans MeOH- $d_4$

**Tableau 16** : Données RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé 4

Atomes	RMN $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)	RMN $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), m, J (Hz)
2	157,3	-
3	135,6	-
4	178,9	-
5	162,1	-
6	98,8	6,10 (1H, d, 2,0)
7	164,8	-
8	93,6	6,26 (1H, d, 2,0)
9	158,2	-
10	104,3	-
1'	121,1	-
2'/6'	108,6	6,86 (2H, s)
3'/5'	145,8	-
4'	136,6	-
1''	102,6	5,22 (1H, s large)
2''	70,8	nd
3''	71,0	nd
4''	72,3	nd
5''	71,0	nd
6''	16,8	0,87 (1H, d, 6,2)

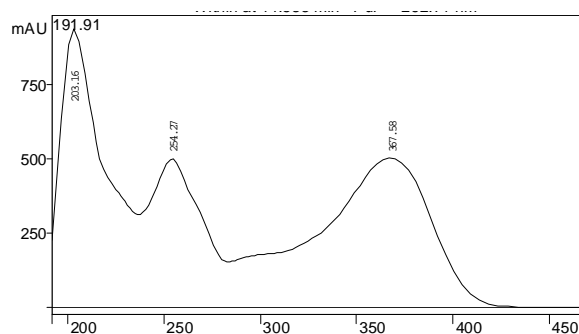


**Composé 4** : Structure de la **myricétine-3-O- $\alpha$ -rhamnopyranoside**



## 5.6. Identification du composé 5

Le composé **5** est obtenu sous forme d'une poudre jaune. Son spectre UV (figure 52) montre 2 bandes maximales à 254 nm (bande II) et 367 nm (bande I). L'absorption intense de la bande I (dans la zone 352-385 nm) caractérise un flavonol (3-OH libre) (Mabry, 1970).



**Figure 52:** Profil UV du composé **5**

Le spectre de masse du composé **5** obtenu par ionisation à pression atmosphérique API en mode d'ionisation négatif présente un ion moléculaire  $[M-H]^-$  de 300,9920 Da, ce qui indique une masse exacte de 301,9998 Da.

La partie aromatique du spectre RMN  $^1H$  montre les signaux caractéristiques suivants :  $\delta$  7,66 (d : H-2',  $J = 2,0$  Hz),  $\delta$  7,5 (dd : H-6',  $J = 8,6 ; 2,0$  Hz) et  $\delta$  6,87 (d : H-5',  $J = 8,6$  Hz), et  $\delta$  6,17 ; 6,40 (d : H-6, H-8 respectivement,  $J = 2,0$  Hz) (figures 53-54) (tableau 17).

Ce composé correspond donc à la quercétine qui est décrite pour la première fois dans le genre *Limoniastrum*.

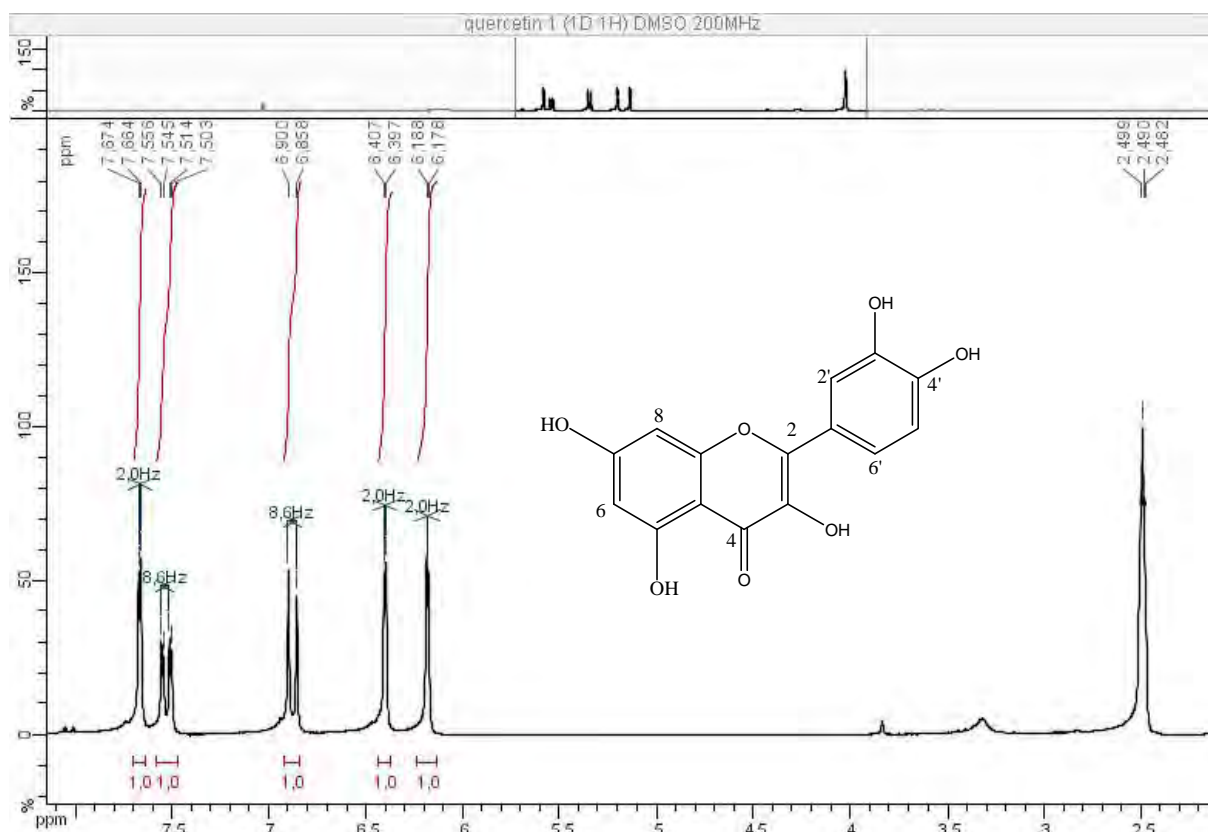


Figure 53 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) du composé **5** dans DMSO- $d_6$

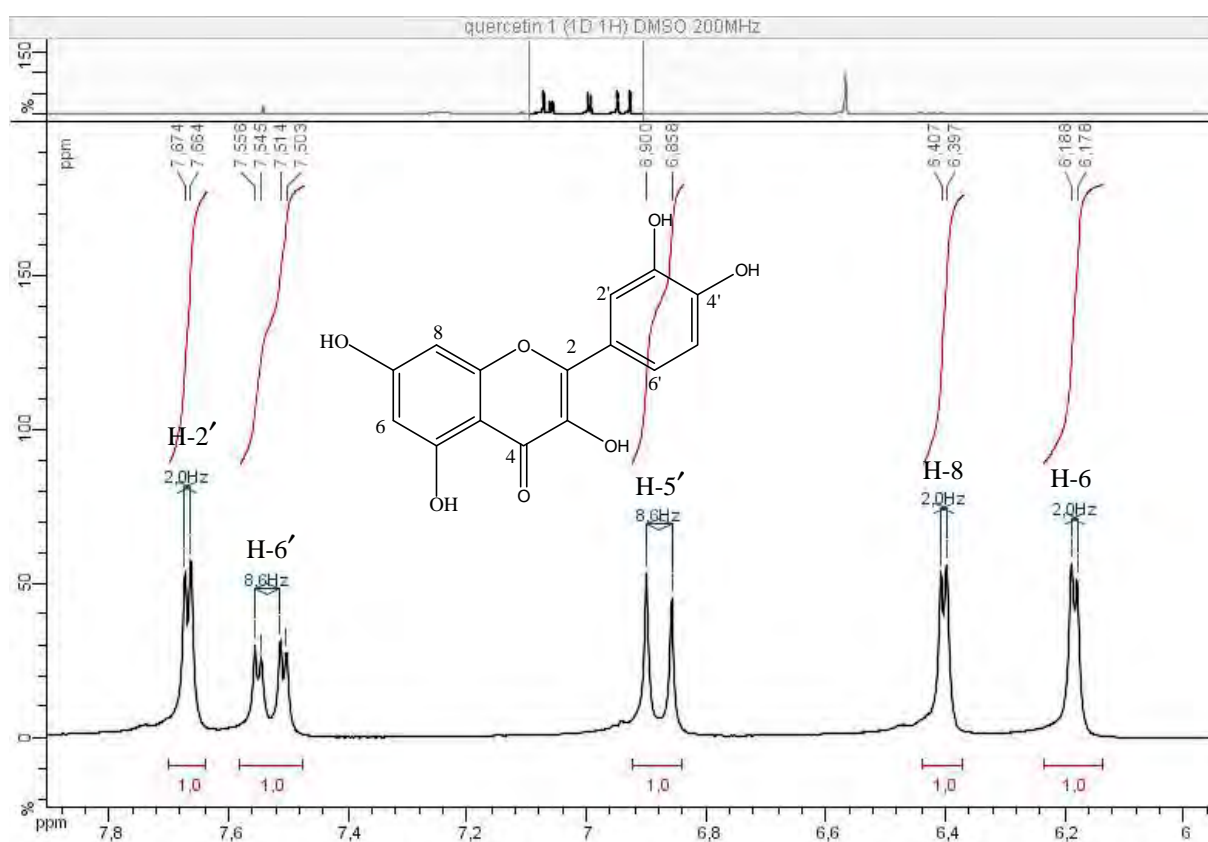
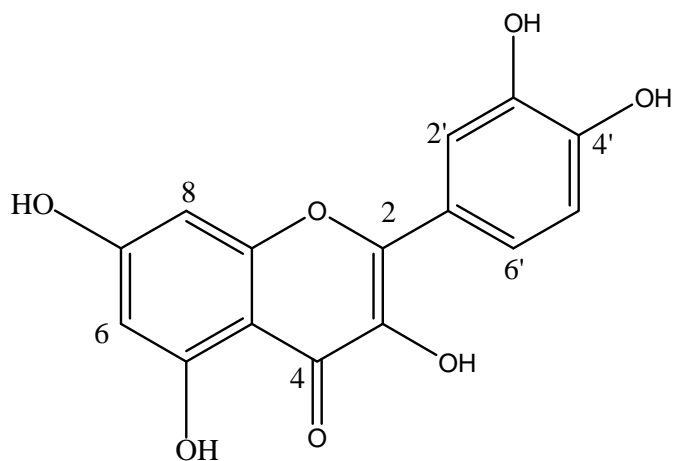


Figure 54 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) du composé **5** dans DMSO- $d_6$

**Tableau 17** : Données RMN  $^1\text{H}$  du composé **5**

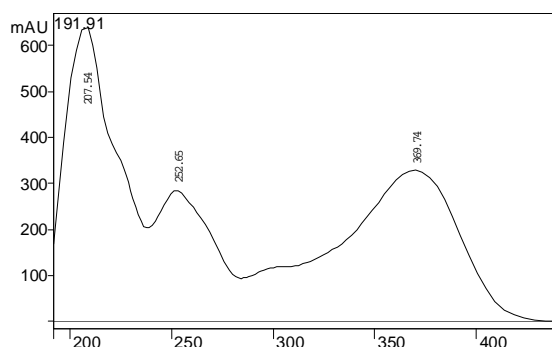
atomes	RMN $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), m, J (Hz)
2	-
3	-
4	-
5	-
6	6,17 (1H, d, 2,0)
7	-
8	6,40 (1H, d, 2,0)
1'	-
2'	7,66 (1H, d, 2,0)
3'	-
4'	-
5'	6,87 (1H, d, 8,6)
6'	7,5 (1H, dd, 2,0 ; 8,6)



Composé **5** : structure de la **quercétine**

## 5.7. Identification du composé 6

Le composé **6** est obtenu sous forme d'une poudre jaune. Son spectre UV montre 2 bandes maximales à 252 nm (bande II) et 369 nm (bande I). L'absorption intense de la bande I (dans la zone 352-385 nm) caractérise un flavonol (3-OH libre) (Mabry, 1970) (figure 55).



**Figure 55** : Profil UV du composé **6**

Le spectre de masse du composé **6** obtenu en mode d'ionisation ESI positive, présente un ion moléculaire  $[M+H]^+$  de 319,2 Da, indiquant une masse moléculaire de 318,2 Da.

La partie aromatique du spectre RMN  $^1H$  montre un système 2H AB à  $\delta$  6,16 et 6,36 (singulets larges : H-6, H-8), et un singulet d'intégration 2H à  $\delta$  7,33 correspondant aux H-2'/6' équivalents (figure 56) (tableau 18).

Le spectre RMN  $^{13}C$ -Jmod permet de distinguer les signaux de 15 carbones dont les déplacements chimiques correspondent à ceux des flavonols (Agrawal, 1989). Ainsi, on peut distinguer : 4 carbones éthyléniques, dont 2 équivalents (C-2'/6' :  $\delta$  108,6 ppm), une fonction cétone à  $\delta$  177,4 ppm, 6 carbones quaternaires oxygénés dont 2 équivalents (C-3'/5' :  $\delta$  146,8 ppm) et 4 carbones quaternaires non oxygénés (figure 57) (tableau 14).

La comparaison de ces données avec celles trouvées dans la littérature (Agrawal, 1989) permet d'identifier sans équivoque le composé **6** à la **myricétine**.

Il est décrit pour la première fois dans le genre *Limoniastrum*.

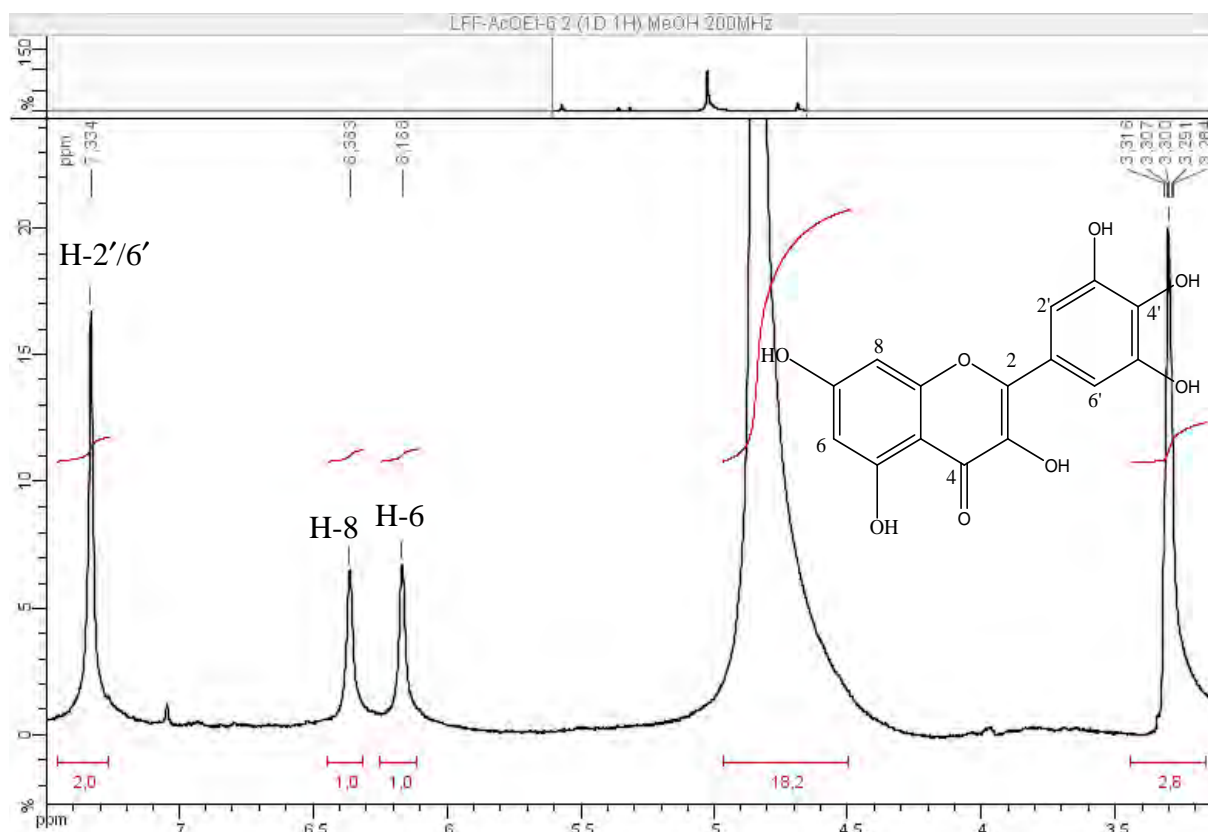


Figure 56 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz) du composé **6** dans MeOH- $d_4$

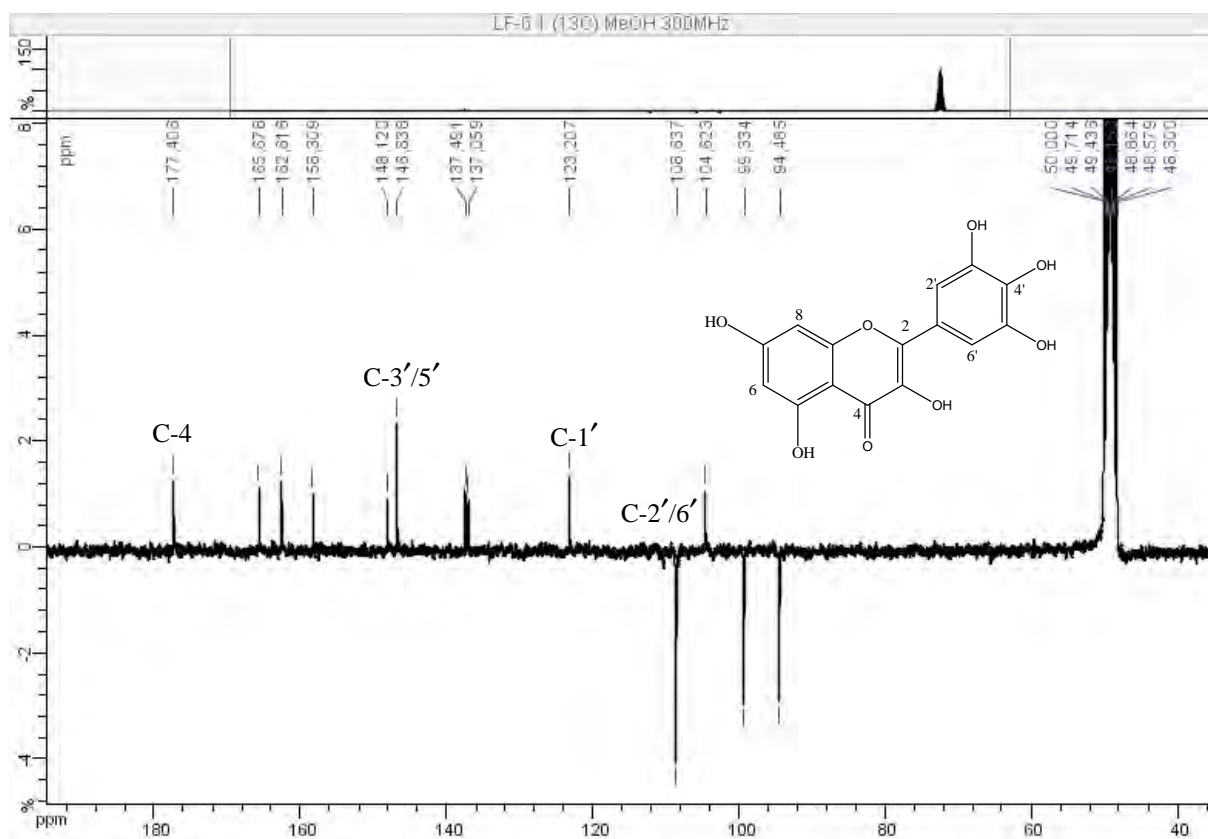
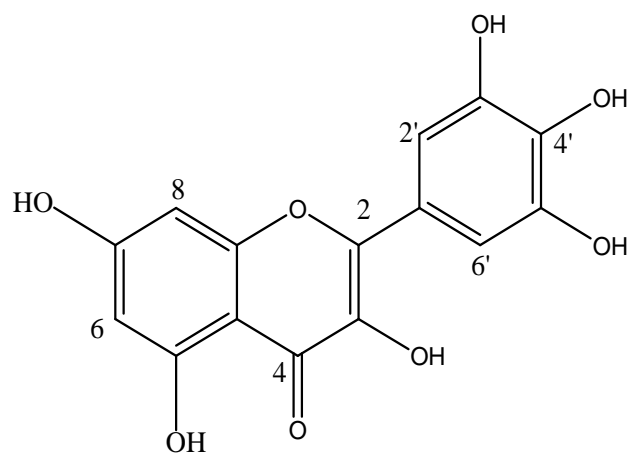


Figure 57 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$ -Jmod (75 MHz) du composé **6** dans MeOH- $d_4$

Tableau 18 : Données RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **6**

Atomes	RMN <sup>13</sup> C δ (ppm)	RMN <sup>1</sup> H δ (ppm), m, J (Hz)
2	158,3	-
3	137,0	-
4	177,4	-
5	162,6	-
6	99,3	6,16 (1H, s large)
7	165,6	-
8	94,4	6,36 (1H, s large)
9	148,1	-
10	104,6	-
1'	123,2	-
2'/6'	108,6	7,33 (2H, s)
4'	137,4	-
3'/5'	146,8	-



Composé **6** : structure de la **myricétine**

La purification des six pics majeurs de la fraction **80-196** a été effectuée par CLHP semi-préparative et Sephadex LH-20 et a donné lieu à 7 composés purs qui ont été identifiés par un ensemble de techniques spectroscopiques (RMN 1D et 2D, ESI-MS, UV) et coinjection avec les standards authentiques comme étant :

- l'acide gallique (**1**),
- la myrciaphenone A (**2**),
- la myricétine-3-*O*- $\beta$ -galactopyranoside (**3-1**),
- l'épigallocatechine-3-*O*-gallate (**3-2**),
- la myricétine-3-*O*- $\alpha$ -rhamnopyranoside (**4**),
- la quercétine (**5**) et
- la myricétine (**6**).

Ces composés phénoliques ont été identifiés dans plusieurs espèces de *Limonium* telles que *Limonium axillare* (Ahmed *et al.*, 1999 ; Bashir *et al.*, 1994), *L. brasiliense* (Murray *et al.*, 2004), *L. wrightii* (Aniya *et al.*, 2002) et *L. sinense* (Lin *et al.*, 2000).

Nos résultats permettent ainsi de rapprocher sur des critères chimiotaxonomiques les genres *Limonium* et *Limoniastrum*, dans la famille des Plombaginacées.

## 6. Comparaison de l'activité anti-radicalaire (tests DPPH, FRAP et SRSA) des polyphénols isolés.

**Tableau 19** : Résultats des activités antiradicalaires des produits purs.

	DPPH <sup>a</sup>	FRAP <sup>b</sup>	SRSA <sup>c</sup>
<b>Extrait AcOEt</b>	1,21 ± 0,19	2,25 ± 0,12	3,61 ± 0,56
<b>1</b>	0,94 ± 0,68	0,83 ± 0,15	3,49 ± 0,99
<b>2</b>	60,92 ± 3,34	7,61 ± 1,68	NS >>10
<b>3-1</b>	2,84 ± 0,69	2,89 ± 0,02	2,85 ± 0,2
<b>3-2</b>	2,54 ± 0,45	2,2 ± 0,06	2,1 ± 0,08
<b>4</b>	1,82 ± 0,26	1,38 ± 0,39	3,83 ± 0,82
<b>5</b>	2,23 ± 0,13	1,48 ± 0,19	5,79 ± 0,49
<b>6</b>	3,27 ± 0,55	1,60 ± 0,14	1,86 ± 0,12
<b>Acide ascorbique</b>	<b>0,59 ± 0,12</b>	<b>1,62 ± 0,62</b>	<b>5,8 ± 0,79</b>

Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type de triplicatas.

<sup>a, c</sup> Les valeurs sont exprimées en CI<sub>50</sub> (µg/ml).

<sup>b</sup> Les valeurs sont exprimées en EC1 (µM d'équivalent de Fe<sup>2+</sup>/ml).

Les activités anti-oxydantes des composés purs ont été comparées avec celles de l'extrait AcOEt de feuilles de *Limoniastrum feei* et l'acide ascorbique pris comme référence positive (tableau 19).

Ainsi, dans le **test DPPH**, tous les composés isolés, à l'exception du composé (**2**), ont montré un effet anti-oxydant potentiel. L'acide gallique (**1**) est aussi efficace que le témoin de référence (acide ascorbique). En fait, les composés (**1**), (**3-2**) et (**5**) sont utilisés en routine comme des substances de référence dans les tests anti-oxydants (Erlund, 2004).

Dans le test **FRAP**, l'acide gallique est également le composé le plus actif, en étant même 2 fois plus actif que l'acide ascorbique. Les autres composés (**4-6**) ont également un fort pouvoir réducteur (CI<sub>50</sub> < 2 µg/ml). Nos résultats sont en accord avec les données trouvées dans la littérature : l'équipe de Schlesier (2002) a par exemple montré que l'acide gallique est le composé le plus actif dans les tests DPPH et FRAP par comparaison avec d'autres anti-oxydants. D'autres études ont montré que les substances phénoliques, comme les



flavonoïdes et les acides phénoliques, sont considérablement plus anti-oxydants que la vitamine C et la vitamine E (Cao *et al.*, 1997 ; Vinson *et al.*, 1995).

L'acide gallique a été identifié comme le composé actif d'un extrait aqueux de *Limonium wrightii* avec un effet antiradicalaire marqué (Bashir *et al.*, 1994). L'acide gallique est également le composé majeur présent dans le thé noir (Hodgson *et al.*, 2000), accompagné d'EGCG, de quercétine et de myricétine (Ahmed *et al.*, 2002 ; Luximon-Ramma *et al.*, 2005). Ces polyphénols sont reconnus comme étant responsables des propriétés anti-oxydantes du thé vert (Murray *et al.*, 2004).

Dans le test **SRSA** mesurant la capacité de composés à neutraliser le radical superoxyde, c'est la myricétine qui a le pouvoir anti-oxydant le plus élevé ( $CI_{50} = 1,86 \mu\text{g/ml}$ ), en étant même trois fois plus active que l'acide ascorbique. Les composés (**1**, **3-5**) ont une activité anti-radicalaire équivalente à la vitamine C.

En raison de la complexité des processus d'oxydation-réduction, il est clair qu'aucune méthode prise séparément n'est capable de fournir une idée globale du profil anti-oxydant d'un échantillon (Parejo *et al.*, 2002 ; Prior *et al.*, 2005). De plus, la capacité anti-oxydante totale a besoin de refléter aussi bien la capacité lipophile qu'hydrophile. Pour l'activité physiologique, elle a besoin de refléter et différencier aussi bien le transfert d'atome d'hydrogène (extinction de la fluorescence du radical) que le transfert électronique (réduction du radical libre). L'évaluation d'un profil anti-oxydant global nécessite par conséquent d'avoir recours à des tests mettant en jeu différents types de radicaux libres oxygénés (RLO) et différents types de radicaux libres azotés (RLA), comme  $\text{HO}^\bullet$  et  $\text{ONOO}^\bullet$ . Le développement de méthodes spécifiques pour chaque source de radical s'avère dès lors intéressant (Prior *et al.*, 2005).

En conclusion,

*Limoniastrum feei* est une espèce semi-désertique biosynthétisant de nombreux polyphénols aux propriétés anti-radicalaires marquées. Le potentiel réducteur d'un extrait hydro-alcoolique s'explique par la présence notamment d'acide gallique, de quercétine, de myricétine et d'épigallocatechine gallate, connus pour leurs capacités anti-oxydantes. Ces derniers contribuent très probablement à la lutte contre le stress oxydant auquel l'espèce est soumise, en raison de son environnement particulier.

## Références

Agarwal S, Pandey V. Antioxidant enzyme responses to NaCl stress in *Cassia angustifolia*. *Biol Plant* 2004; 48: 555–60.

Agrawal PK. *Studies in Organic Chemistry 39: Carbon-<sup>13</sup> NMR of flavonoids*. Elsevier. Amsterdam; 1989: 140, 338-339, 497.

Agrawal PK. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 1992; 31(10): 3307-30.

Aherne SA, O'Brien NM. The flavonoids, myricetin, quercetin and rutin, protect against cholestan-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol-induced toxicity in Chinese hamster ovary cells *in vitro*. *Nutr Res* 1999; 19: 749– 60.

Ahmed S, Rahman A, Hasnain A, Lalonde M, Goldberg VM, Haqqi TM. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 beta-induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(8): 1097–1105.

Ahmed KM, Kandil FE, Mabry TJ. An anticancer tannin and other phenolics from *Limonium axillare* (Plumbaginaceae). *Asian J Chem* 1999; 11(1): 261–63.

Ames BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 1983; 221: 1256 –64.

Anderson K J, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM. Walnut polyphenolics inhibit *in vitro* human plasma and LDL oxidation. *Biochemical and molecular action of nutrients. J Nutrition* 2001; 131: 2837–42.

Aniya Y, Miyagi C, Nakandakari A, Kamiya S, Imaizumi N, Ichiba T. Free radical scavenging action of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa islands. *Phytomedicine* 2002; 9: 239–44.

Ashok B, Ali R. The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp Gerontol* 1999; 34: 293–303.

Auclair C et voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction constants. Dissociation-ionization constants. Ed. Chapman and Hall, 3<sup>ème</sup> edition. London; 1984.

Avissar N, Whitin JC, Allen PZ. Plasma selenium-dependent glutathione peroxydase. *J Biol Chem* 1989; 2: 15850-55.

Bahorun T, Luximon-Ramma A, Crozier A, Aruoma OI. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidins and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *J Sci Food Agric* 2004; 84: 1553–61.

Bashir AK, Abdalla AA, Wasfi IA, Hassan ES, Amiri MH, Crabb TA. Flavonoids of *Limonium axillare*. *Int J Pharmacognos* 1994; 32(4): 366–72.

Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70–6.

Bielski BMJ et Richter HW. A study of the superoxyde radical chemistry by stopped-flow radiolysis and radiation induced oxygen consumption. *J Am Chem Soc* 1977; 9: 3019-22.

Bors W, Michel C, Saran M, Lengfelder E. The involvement of oxygen radical during the autoxidation of adrenaline. *B B A* 1978; 4: 162-72.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998; 56: 317– 33.

Cameron E, Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976; 73: 3685–9.

Cao G, Sofic E, Prior R L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 749–60.

Castro L, Freeman BA, Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition* 2001; 17: 161: 163–65.

Christman MF, Morgan RW, Ames BN. Positive control for defenses against oxidative stress and some heat shocks proteins in *Salmonella thyphimurium*. *Cell* 1985; 4:753-62.

Dahanukar SA, Kulkarni RA, Rege, NN. Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Indian J Pharmacol* 2000; 32: 81–118.

Davis AL, Cai Y, Davies AP, Lewis JR. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR Assignments of Some Green Tea Polyphenols . *Magn Reson Chem* 1996; 34: 887-90.

Decker EA. antioxidant mechanisms. In: Akoh CC, Min DB, editors. *Food lipids, chemistry, nutrition, and biotechnology*. New York: Marcel Dekker; 1998: 397–401.

Denisov ET, Afanas'ev IB. *Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology*. Francis & Taylor Group; 2005: 694.

Dixon RA, Paiva N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 1995; 7: 1085-97.

Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res* 2004; 24: 851–74.

Escarpa A, Gonzalez MC. Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. *J Chromatogr A* 2000; 897: 161–70.

Exarchou V, Nenadis N, Tsimidou M, Gerothanassis I P, Troganis A, Boskou D. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage and summer savory. *J Agric Food Chem* 2002; 50(19): 5294–99.

Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872–9.

- Fulbert JC, Cals MJ. Les radicaux libres en biologie clinique. *Pathol Biol* 1992; 49(1): 66-77.
- Gottlieb H E, Kumar S, Sahai M, Ray AB. Ethyl brevifolin carboxylate from *Flueggea microcarpa*. *Phytochemistry* 1991; 30: 2435-38.
- Guo C, Cao G, Sofic E, Prior RL. High-performance liquid chromatography coupled with coulometric array detection of electroactive components in fruits and vegetables. Relationships to oxygen radical absorbance capacity. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 1787-96.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: How should you do it and what do the results mean. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 231-55.
- Halliwell B. Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 1997; 55: S44-9.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med* 1985; 8(2): 89-193.
- Hari M, Tolga UZ, Kiminobu S, Tingyu Q. Putative role of neuronal 5-lipoxygenase in aging brain. *FASEB J* 2000; 14(10): 1464-9.
- Harman D. Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 928: 1-21.
- Henderson LM, Chappell JB, Jones OTG. Superoxyde generation is inhibited by phospholipase A. *Biochem J* 1989; 2: 249-55.
- Hendrich S, Wang GJ, Lin HK, Xu X, Tew BY, Wang HJ, Murphy PA. Isoflavone metabolism and bioavailability. In: Papas AM, editor, *Antioxidant status, diet, nutrition and health*. Boca Raton, Fla.: CRC press; 1999: 211-30.
- Hernández JA, Jiménez A, Mullineaux P, Sevilla F Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. *Plant, Cell Environ* 2000; 23: 853-862.
- Hertog MGL, Holland PCH. Potential health effects of the dietary flavonol quercetin. *Eur J Clin Nutr* 1996; 50: 63-71.
- Hirasa K, Takemasa M. *Spice science and technology*. New York: Marcel Dekker, 1998.
- Hodgson JM, Morton LW, Puddey IB, Beilin LJ, Croft KD. Gallic acid metabolites are markers of black tea intake in humans. *J Agric Food Chem* 2000; 48(6): 2276-80.
- Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 1841-56.
- Kader KN, Coyle CH. Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Implications for Cardiovascular Device Engineering. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2007; 83B: 138-44.

- Knight JA. Free radicals, antioxidants, aging, & disease. Washington D.C.: AACC Press, 1999: 21–43.
- Korul'kina LM, Shul'ts EE, Zhusupova GE, Abilov ZhA, Erzhanov KB, Chaudri MI. Biologically active compounds from *Limonium gmelinii* and *L. popovii*. I. Chem Nat Compounds 2004; 40(5): 465-71.
- Korycka-Dahl MB, Richardson T. Activated oxygen species and oxidation of food constituents. Crit Rev Food Sci Nutr 1978; 10: 209–41.
- Lee J, Koo N, Min DB. Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. Comp Rev Food Sci Food Safety 2004; 3: 21-33.
- Liebler DC, Kling DS, Ree DJ. Antioxidant protection of phospholipids bilayers by  $\alpha$ -tocopherol. J Biol Chem 1986; 2(51): 12114-19.
- Lie-Chwen L, Ling-Ling Y, Cheng-Jen C. Cytotoxic naphthoquinones and plumbagic acid glucosides from *Plumbago zeylanica*. Phytochemistry 2003; 62(4): 619-22.
- Lin LC, Chou CJ. Flavonoids and phenolics from *Limonium sinense*. Planta Med 2000; 66(4): 382–3.
- Lois R. Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. I. Mechanisms of UV resistance in *Arabidopsis*. Planta 1994; 194: 498-503.
- Luximon-Ramma A, Bahorun T, Crozier A, Zbarsky V, Datla KP, Dexter DT et al. Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. Food Res Int 2005; 38:357–67.
- Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, Berlin; 1970: 98, 126, 264.
- Markham K.R. Technique of flavonoid identification, Biological Techniques series Academic Press, 1982.
- McVean M, Kramer-Stickland K, Liebler DC. 1999. Oxidants and antioxidants in ultraviolet-induced nonmelanoma skin cancer. In: Papas AM, editor. Antioxidant status, diet, nutrition, and health. Boca Raton, Fla.: CRC Press. p 401–30.
- Moon YH, Kim G, Lee JH, Jin XJ, Kim DW, Kim D. Enzymatic synthesis and characterization of novel epigallocatechin gallate glucosides. J Mol Catal, B Enzym 2006; 40: 1–7.
- Mora A, Paya M, Rios JL, Alcaraz MJ. Structure activity relationship of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymatic lipid peroxidation. Biochem Pharmacol. 1990; 40: 793– 97.
- Msanda F, El Aboudi A, Peltier JP. Originalité de la flore et de la végétation de l'Anti-Atlas sud-occidental (Maroc) Feddes Repert 2002; 113: 603–15.

- Murray AP, Rodriguez S, Frontera MA, Tomas MA, Mulet MC. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z Naturfo C* 2004; 59: 477–80.
- Naczki M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A* 2004; 1054: 95-111.
- Navarro JM, Flores P, Garrido C, Martinez V. Changes in the contents of antioxidant compounds in pepper fruits at ripening stages, as affected by salinity. *Food Chem* 2006; 96: 66-73.
- Noguchi N, Niki E. Chemistry of active oxygen species and antioxidants. In: Padmaja S, Madison SA. Hydroxyl radical-induced oxidation of azo-dyes: a pulse radiolysis study. *J Phys Org Chem* 1999; 12: 221–6.
- Olanow CW. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends Neurosci* 1993; 16: 439-44.
- Ozenda P. Flore et végétation du sahara. 3<sup>ème</sup> édition. Paris: CNRS Editions; 2004 :365-66.
- Papas AM. Determinants of antioxidant status in humans. In: Papas AM, editor. Antioxidant status, diet, nutrition, and health. Boca Raton, Fla.: CRC Press; 1999a: 21–36.
- Papas AM. Other antioxidants. In: Papas AM, editor. Antioxidant status, diet, nutrition, and health. Boca Raton, Fla.: CRC Press; 1999b: 231–48.
- Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J, Codina C. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 6882–90.
- Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements *J Agric Food Chem* 2005; 53: 4290–4302.
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *J Agric Food Chem* 2000; 48 (8): 3396 -3402.
- Radimer KL, Bindewald B, Hughes J, Ervin B, Swanson C, Picciano MF. Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2000. *Am J Epidemiol* 2004; 160: 339– 49.
- Ribeiro de Paiva S, de Almeida Fontoura L, Figueiredo MR, Mazzei J L, Kaplan MAC. Chromatographic profile of two Plumbaginaceae species: *Plumbago scandens* L. and *Plumbago auriculata* LAM. *Quimica Nova* 2002; 25(5): 717-21.
- Rice-Evans CA, Sampson J, Bramley PM, Holloway DE. Why do we expect carotenoids to be antioxidants *in vivo* ? *Free Radic Res* 1997; 26: 381–98.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 7: 933–56.

- Schlesier K, Harwat M, Böhm V, Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radic Res* 2002; 36(2): 177–87.
- Silvestein RM, Bassler GC, Morill TC. Spectrometric identification of organic compounds, 5ème edition. John Wiley & Sons; Inc., New York; 1991: 289-314.
- Singal PK, Petkau JM. Free radicals in health and disease. *Mol Cell Biochem* 1988; 84(2): 121-22.
- Sinha BK, Mimnaugh EG, Myers CE. Andryamycin activation and oxygen free radical formation in human breast tumor cells. *Cancer Res* 1989; 49: 3844-48.
- Spiteller G. Lipid oxidation in aging and age-dependent disease. *Exp Gerontol* 2001; 36: 1425–57.
- Sreenivasulu N, Grimm B, Wobus U, Weschke W. Differential response of antioxidant compounds to salinity stress in salt-tolerant and salt-sensitive seedlings of foxtail millet (*Setaria italica*). *Physiol Plant* 2000; 109: 35-442.
- Stief TW. The physiology and pharmacology of singlet oxygen. *Med Hypoth* 2003; 60: 567–72.
- Stief TW. The blood fibrinolysis/deep-sea analogy: a hypothesis on the cell signals singlet oxygen/photons as natural antithrombotics. *Thromb Res* 2000; 99: 1–20.
- Stocker O. Water- and Photosynthesis-Relations of Desert Plants in the South Algerian Sahara: III. Annual Course and Constitutional Types 1974; 163(6): 480–529.
- Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF. FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. *Biochem Biophys Res Comm* 1990; 168: 558–65.
- Suksamrarn A, Eiamong S, Piyachaturawat P, Byrne LT. A phloroacetophenone glucoside with choleric activity from *Curcuma comosa*. *Phytochemistry* 1997; 45(1): 103-5.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah, BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 4113–17.
- Vinson JA, Dabbagh YA, Serry MM, Jang J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *J Agric Food Chem* 1995; 43: 2800–02.
- Wattenberg LW. Inhibitors of chemical carcinogenesis. *Adv Cancer Res* 1978; 26: 197–226.
- Willett WC, MacMahon B. Diet and cancer—an overview (second of two parts). *N Engl J Med* 1984; 310: 697–703.
- Young VR, Newberne PM. Vitamins and cancer prevention: issues and dilemmas. *Cancer* 1981; 47: 1226–40.

Watson L and Dallwitz M J, 1992 onwards. The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval. Version: 29th July 2006. <http://delta-intkey.com>

American Institute of Cancer Research/World Cancer Research Fund. In: World Cancer Research Fund, editor. Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective. Washington (DC) American Institute for Cancer Research; 1997.



**Activity-Guided Isolation of Antioxidant Principles from**  
***Limoniastrum feei* (Girard) Batt.**

Mehdi Chaabi<sup>a,b</sup>, Nouredine Beghidja<sup>b</sup>, Samir Benayache<sup>b</sup>, and Annelise Lobstein<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> LC1 UMR-CNRS 7175, 'Biotechnologies, Biomolécules et Innovations Thérapeutiques',

Faculté de Pharmacie de Strasbourg, 78 route du Rhin, 67401 Illkirch, France.

Fax : +33 3 90 24 43 10. E-Mail : annelise.lobstein@pharma.u-strasbg.fr

<sup>b</sup> Laboratoire de Valorisation des Ressources Naturelles, Route Ain El-Bey. 25000

Constantine, Algérie

\*Author of correspondence and reprint requests

## Abstract

Bioguided fractionation of a leaves extract from *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae) led to the isolation of seven polyphenolic constituents: gallic acid (**1**), myrciaphenone A (**2**), myricetin-3-*O*- $\beta$ -galactopyranoside (**3-1**), epigallocatechin gallate (**3-2**), myricetin 3-*O*- $\alpha$ -rhamnopyranoside (**4**), quercetin (**5**) and myricetin (**6**). Gallic acid was the most antioxidant compound in DPPH [ $(0.94 \pm 0.68) \mu\text{g/mL}$ ] and FRAP [ $(0.83 \pm 0.15) \mu\text{M Fe}^{2+}/\text{mL}$ ] tests, whereas myricetin was a more specific superoxide radical scavenger since it was the most active product in superoxide nitroblue tetrazolium hypoxanthine/xanthine oxidase test [ $(1.86 \pm 0.12) \mu\text{g/mL}$ ].

*Key words:* *Limoniastrum feei*, Polyphenols, Oxidative Stress

## Introduction

Plumbaginaceae is a cosmopolitan family which includes 775 species grouped in 24 genera (Watson and Dallwitz, 1992). *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. is a species endemic to Algeria and Morocco (Quezel and Santa, 1963) which can resist to extremely arid conditions (Stocker, 1974). A recent study revealed its good antibacterial activity (Belboukhari and Cheriti, 2005). However, to the best of our knowledge, no phytochemical studies have been conducted as yet on the genus *Limoniastrum*.

Oxidative stress is caused by imbalance in the oxidant/antioxidant equilibrium. Reactive oxygen species (ROS), generated either by endogenous or exogenous factors, are associated with the pathogenesis of various diseases such as inflammation, atherosclerosis, diabetes, cancer and arthritis (Halliwell and Gutteridge, 2000). During the past decade, interest in polyphenols, including flavonoids, has considerably increased. This is mainly due to the

discovery of their various biological properties, principally their antioxidant effects and therefore their possible role in the prevention of several chronic diseases involving oxidative stress. Polyphenols inhibit cGMP and cAMP phosphodiesterases, xanthine oxidase and elastase, for example (Plessi *et al.*, 1998).

The aim of the present study was to assess the antioxidant activity of a semidesertic species, *L. feei*, and to isolate its active constituents using a bioguided fractionation approach with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) assay, an electron transfer (ET)-based method. The results were compared with those of two other complementary assays: FRAP (ferric reducing ability of plasma), another ET-based method, as well as the superoxide anion scavenging assay, a hydrogen atom transfer (HAT)-based method.

## **Material and Methods**

### *Reagents and drugs*

All chemicals used were of at least analytical grade. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) and 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) were obtained from Sigma Chemicals Co. (St. Louis, USA). Anhydrous sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), cupric sulfate pentahydrate (CuSO<sub>4</sub> • 5H<sub>2</sub>O), ferric chloride hexahydrate (FeCl<sub>3</sub> • 6H<sub>2</sub>O), Folin–Ciocalteu phenol reagent, hydrochloric acid (HCl), glacial acetic acid, methanol, and sodium acetate trihydrate were obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and Neu reagent from Roth (Karlsruhe, Germany).

### *Plant material*

The whole plant *L. feei* (Plumbaginaceae) was collected in Bechar region, in south west of Algeria, in the flowering stage in April 2003. It was identified by Prof. Khalfallah from the Institute of Biology of Constantine (Algeria). A voucher specimen (LF98B0501) was deposited in the herbarium of University Mentouri of Constantine.

The dried plant material, [ 309 g of leaves (L), 950 g of roots (R) and 1174 g of flowers (FL)] was exhaustly extracted with 80% EtOH and then evaporated under reduced pressure to yield 25.5 g (8.2% w/w), 78.4 g (8.2% w/w) and 181.4 g (15.4% w/w) extracts, respectively (Table I).

#### *Extraction and bioguided fractionation*

Crude hydro-alcoholic extracts were extracted by liquid-liquid partition with solvents of increasing polarity: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc and finally with *n*-BuOH (Fig. 1). The yield of each extract is reported in Table I. The comparison of their antiradical activity using the DPPH<sup>•</sup> test showed that the EtOAc leaves extract was the most active (Table II); thus, fractionation of the EtOAc leaves extract was pursued on a silica gel open column (150 g, mesh 60 cm × 3 cm) using stepwise gradient elution (50 mL/fraction) : C<sub>6</sub>H<sub>12</sub> (3 L); 1:1 (v/v) C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>/CHCl<sub>3</sub> (1.5 L); CHCl<sub>3</sub> (2 L); 5% CHCl<sub>3</sub> in MeOH (400 mL); 10% CHCl<sub>3</sub> in MeOH (250 mL); 15% CHCl<sub>3</sub> in MeOH (200 mL); 20% CHCl<sub>3</sub> in MeOH (300 mL); 30% CHCl<sub>3</sub> in MeOH (300 mL); 40% CHCl<sub>3</sub> in MeOH (300 mL); and finally 50% CHCl<sub>3</sub> in MeOH (400 mL). Fractions were combined according to their TLC profiles (silica gel F<sub>254</sub>; 5554, Merck) using EtOAc/MeOH/H<sub>2</sub>O (100:17:13) (v/v/v) as eluent system. Plates were then revealed with Natural Product/PEG (1% methanolic diphenylboric acid/β-ethanolamino ester/polyethylene glycol) reagent and detected at 254 and 366 nm to afford 7 major fractions (Fig. 1). According to the antiradical activity of the seven fractions tested by the DPPH assay, purification was continued on fractions 80 - 196 by means of semipreparative C18-HPLC, using 0.01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (phase A) and acetonitrile (phase B) as eluents. The elution was carried out under the following conditions: in 20 min from 5% to 50% B, then in 5 min from 50% A to 100% B. Fractions were monitored at 280 nm (115 UV detector, Gilson) (volume of injection: 400 μL). The purification afforded 6 sub-fractions which were controlled by analytical C18-HPLC. Thus, pure compounds obtained were **1** (157 mg), **2** (5 mg), **4** (496.8 mg), **5** (4.7 mg) and **6**

(20.4 mg). The sub-fraction 3 was further purified with Sephadex LH-20 column chromatography (10 g, 30 cm × 1.5 cm) using MeOH (200 mL) as eluent and afforded compounds **3-1** (30 mg) and **3-2** (50 mg) (Fig. 1).

### *Material*

The NMR spectra were recorded on Bruker DRX NMR (200 MHz and 300 MHz) spectrometers. Samples were dissolved in deuterated methanol (CD<sub>3</sub>OD). Mass spectroscopy was carried out on an Agilent LC/MSD instrument. Absorbances were measured in a Shimadzu UV 1205 spectrophotometer. Semipreparative C18-HPLC: pump, Gilson 305; UV detector, Gilson 115; column Nucleodur<sup>®</sup>, Macherey-Nagel 250 × 21 mm; 10 μm, Hoerd, France). Analytical C18-HPLC: pump, Varian 9010; DAD UV detector, Varian Prostar<sup>®</sup>, Les Ulis, France; column Nucleodur<sup>®</sup>, Macherey-Nagel 250 × 4.6 mm; 5 μm). TLC: silica gel F<sub>254</sub>, (5554, Merck), Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich).

### *Determination of total phenolic contents (TPC)*

An aliquot of 100 μL of extract was mixed with 2.5 mL of Folin–Ciocalteu phenol reagent and allowed to react for 5 min. Then, 2.5 mL of saturated Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution were added and allowed to stand for 1 h before the absorbance of the reaction mixture was read at 725 nm. The total phenolic content (TPC) of the extract was expressed as mg gallic acid equivalents per gram of plant material on dry basis (Parejo *et al.*, 2002).

### *Free radical scavenging activity*

The samples were measured in terms of hydrogen donating or radical scavenging ability using the stable radical DPPH<sup>•</sup>. The percentage of DPPH<sup>•</sup> decolouration of the sample was calculated according to the equation: % decolourization =  $[1 - (Abs_{sample}/Abs_{control})] \times 100$ , where  $Abs_{sample}$  is the absorption of sample and  $Abs_{control}$  is the absorption of the blank without sample. Decolouration was plotted against the sample extract concentration, and a logarithmic

regression curve was established in order to calculate the IC<sub>50</sub>, which is the amount of sample necessary to decrease by 50% the absorbance of DPPH<sup>•</sup> (Parejo *et al.*, 2002).

#### *Superoxide anion scavenging activity*

The superoxide radicals were generated *in vitro* by the hypoxanthine/xanthine oxidase system. The scavenging activity of the extract was determined by the NBT reduction method. In this method, O<sub>2</sub><sup>•-</sup> reduces the yellow dye (NBT<sup>2+</sup>) to produce the blue formazan, whose absorbance was measured spectrophotometrically at 560 nm. Antioxidants are able to inhibit the formation of purple NBT. The results are expressed as the percentage inhibition of the NBT reduction with respect to the reaction mixture without a sample (buffer only) and were calculated with the equation: % inhibition =  $\{[(C_{\text{abs}} - CB_{\text{abs}}) - (S_{\text{abs}} - SB_{\text{abs}})] / (C_{\text{abs}} - CB_{\text{abs}})\} \times 100$ , where  $S_{\text{abs}}$ ,  $SB_{\text{abs}}$ ,  $C_{\text{abs}}$ , and  $CB_{\text{abs}}$  were the absorbance of the sample, the blank sample, the control, and the blank control, respectively (Parejo *et al.*, 2002).

#### *Ferric reducing ability of plasma (FRAP)*

The ability to reduce ferric ions was measured using a modified version of a previously described method (Benzie and Strain, 1996). An aliquot (200 µL) of an extract (with appropriate dilution, if necessary) was added to 3 mL of FRAP reagent (10 parts of 300 mM sodium acetate buffer at pH 3.6, 1 part of 10 mM TPTZ solution and 1 part of 20 mM FeCl<sub>3</sub> • 6H<sub>2</sub>O solution) and the reaction mixture was incubated in a water bath at 37 °C. The increase in absorbance at 593 nm was measured after 30 min. The antioxidant capacity based on the ability to reduce ferric ions of the extract was expressed as µM equivalent of Fe<sup>2+</sup>/mL.

## **Results and Discussion**

The comparison of the antiradical activities of crude hydro-alcoholic extracts of *L. feei* showed that the leaves (L) extract was 5- and 8-fold more active than the flower (FL) and root

(R) extracts, respectively (Table II). In general, EtOAc extracts were more active than CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and BuOH extracts (Table II), suggesting that they were more enriched in antiradical compounds. Indeed, TLC and HPLC profiles of EtOAc extracts of L and FL were quite similar and showed that they contain mainly flavonoids and phenolic acids (data not shown). These observations were strengthened with linear regression analysis of antiradical activity and total phenolic content (Fig. 2). We showed a good correlation between the antiradical effect and the total phenolic content of extracts (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc and BuOH) with R = 0.97 and 0.99 for L and FL extracts respectively, which suggest that polyphenols present in these extracts are responsible for the scavenging activity. However, there is a mild correlation between the phenolic content and the antioxidant activity in R extracts (R = 0.6). Moreover, the excellent linear correlations between the “total phenolic profiles” and “the antioxidant activity” is not surprising if one considers similar chemistry of the two assays which is based in both on the electron transfer mechanism (Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005). Other studies have shown a high correlation between the total antioxidant activity and phenolic contents (Parejo *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 1997).

Flavonoids are potent antioxidants *in vitro*, but antioxidation is, however, only one of the many mechanisms through which flavonoids can exert their actions (Erlund, 2004). Indeed, the actions ascribed to polyphenols are almost certainly mediated partly by their free radical scavenging, antioxidant and metal complexing actions (Bahorun *et al.*, 2004; Rice-Evans *et al.*, 1996).

The anti-DPPH activity of *L. feei* EtOAc leaves extract [CI<sub>50</sub> = (1.21 ± 0.19) µg/mL] was compared with corresponding extracts prepared from some medicinal plants : *Achillea millefolium*; *Artemisia dracunculus*; *Foeniculum vulgare*; *Lavandula latifolia*; *Melilotus officinalis* [CI<sub>50</sub> = (9.29 ± 0.2) µg/mL; (10.87 ± 0.3) µg/mL; (12.06 ± 1.66) µg/mL; (24.26 ± 1.68) µg/mL; (101.73 ± 14.39) µg/mL, respectively] (Parejo *et al.*, 2002) and highlighted that *L. feei* was far more active. Thus, activity-guided fractionation using the DPPH assay was

continued on the EtOAc leaves extract, which gave 7 fractions, combined according to their TLC profiles (Fig. 1). These fractions were again tested for their antiradical power. Fractions 80 - 196 were as active as fractions 197 - 220 (Table III) and possessed all the compounds of the latter fraction (data not shown), and furthermore, fractions 80 - 196 weighed 14-fold more than fractions 197 - 220) (Fig. 1); Thus, purification was pursued on fractions 80 - 196. The purification of the 6 major peaks of this fraction was carried out by semipreparative HPLC and Sephadex LH-20 chromatography and afforded 7 pure compounds (Fig. 1) identified by combined spectroscopic techniques (1D and 2D NMR, ESI-MS, UV and co-injection with authentic standards) (copies of the original spectra are obtainable from the author of correspondence). These are gallic acid (**1**), myrciaphenone A (**2**), myricetin-3-*O*- $\beta$ -galactopyranoside (**3-1**), epigallocatechin gallate (EGCG) (**3-2**), myricetin 3-*O*- $\alpha$ -rhamnopyranoside (**4**), quercetin (**5**) and myricetin (**6**) (Fig. 3). These polyphenolic compounds are encountered in different *Limonium* species like *L. axillare* (Ahmed *et al.*, 1999; Bashir *et al.*, 1994), *L. brasiliense* (Murray *et al.*, 2004), *L. wrightii* (Aniya *et al.*, 2002) and *L. sinense* (Lin and Chou, 2000). Thus, our results show a close chemotaxonomic relationship between *Limonium* and *Limoniastrum*.

The antioxidant activities of pure compounds were compared with the activities of the EtOAc extract and ascorbic acid taken as the reference antioxidant. Therefore, in the DPPH assay, all compounds isolated, with the exception of **2**, showed a potent antioxidant effect, where gallic acid was as active as the reference antioxidant (ascorbic acid) ( $IC_{50} = 0.94 \mu\text{g/ml}$ ). In fact, compounds **1**, **3-2** and **5** are routinely used as reference drugs in antioxidant tests (Erlund, 2004). In the same way, gallic acid was also the most active compound in the FRAP assay; moreover, it was 2-fold more active than the reference compound ascorbic acid, but the other compounds **4** - **6** also had strong reducible power ( $IC_{50} < 2 \mu\text{g/mL}$ ). Another research team has found that gallic acid was the most active compound in DPPH and FRAP assays in comparison with other antioxidants (Schlesier *et al.*, 2002). Some studies have



indicated that phenolic substances, such as flavonoids and phenolic acids, are considerably more potent antioxidants than vitamins C and E (Cao *et al.*, 1997; Vinson *et al.*, 1995). Gallic acid (**1**) has been identified as the active compound of the water extract of *Limonium wrightii* with a strong free radical scavenging action (Bashir *et al.*, 1994). It is noteworthy that gallic acid is the major compound in black tea (Hodgson *et al.*, 2000). Black teas are also rich in EGCG, quercetin and myricetin (Ahmed *et al.*, 2002; Luximon-Ramma *et al.*, 2005). These compounds are well recognized as being responsible for the antioxidant properties of tea (Murray *et al.*, 2004). In the superoxide scavenging activity assay, unlike the two last tests, myricetin was the most antioxidant compound ( $IC_{50} = 1.86 \mu\text{g/mL}$ ); it was 3-fold more active than ascorbic acid. Compounds **1**, **3** - **5** were also a little or a lot more active than the reference vitamin C.

Owing to the complexity of the oxidation/antioxidation processes, it is obvious that no single testing method is capable of providing a comprehensive picture of the antioxidant profile of a studied sample (Parejo *et al.*, 2002; Prior *et al.*, 2005). In addition, the total antioxidant capacity needs to reflect both lipophilic and hydrophilic capacity, and at least for physiological activity it needs to reflect and differentiate both the hydrogen atom transfer (radical quenching) and the electron transfer (radical reduction). Moreover, to fully elucidate its antioxidant capacity, tests evaluating the effectiveness against various reactive oxygen species (ROS)/reactive nitrogen species (RNS), such as  $\text{HO}^\bullet$  and  $\text{ONOO}^\bullet$  are needed, and this may require future development of additional methods specific to each radical source (Prior *et al.*, 2005 ).

In conclusion, *Limonistraum feei* is a natural source rich in polyphenols (gallic acid, quercetin, myricetin and EGCG) possessing strong antioxidant activity, which could have a direct action on different diseases in relation with ROS/RNS.

## References

- Ahmed K. M., Kandil F. E., and Mabry T. J. (1999), An anticancer tannin and other phenolics from *Limonium axillare* (Plumbaginaceae). *Asian J. Chem.* **11**, 261–263.
- Ahmed S., Rahman A., Hasnain A., Lalonde M., Goldberg V. M., and Haqqi T. M. (2002), Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 beta-induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **33**, 1097–1105.
- Aniya Y., Miyagi C., Nakandakari A., Kamiya S., Imaizumi N., and Ichiba T. (2002), Free radical scavenging action of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa islands. *Phytomedicine* **9**, 239–244.
- Bahorun T., Luximon-Ramma A., Crozier A., and Aruoma O. I. (2004), Total phenol, flavonoid, proanthocyanidins and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *J. Sci. Food Agric.* **84**, 1553–1561.
- Bashir A. K., Abdalla A. A., Wasfi I. A., Hassan E. S., Amiri M. H. and Crabb T. A. (1994), Flavonoids of *Limonium axillare*. *Int. J. Pharmacognos.* **32**, 366–372.
- Belboukhari A. and Cheriti N. (2005), Antimicrobial activity of aerial part crude extract from *Limoniastrum feei*. *Asian J. Plant Sci.* **4**, 496–498.
- Benzie I. F. F. and Strain J. J. (1996), The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxydant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70–76.
- Cao G., Sofic E., and Prior R. L. (1997), Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 749–760.
- Erlund I. (2004), Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr. Res.* **24**, 851–874.
- Guo C., Cao G., Sofic E., and Prior R. L. (1997), High-performance liquid chromatography coupled with coulometric array detection of electroactive components in fruits and

- vegeTables. Relationships to oxygen radical absorbance capacity. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 1787–1796.
- Halliwell B. and Gutteridge J. M. (2000), Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**, 136–147.
- Hodgson J. M., Morton L. W., Puddey I. B., Beilin L. J., and Croft K. D. (2000), Gallic acid metabolites are markers of black tea intake in humans. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2276–2280.
- Huang D., Ou B., and Prior R. L. (2005), The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1841–1856.
- Lin L. C. and Chou C. J. (2000), Flavonoids and phenolics from *Limonium sinense*. *Planta Med.* **66**, 382–383.
- Luximon-Ramma A., Bahorun T., Crozier A., Zbarsky V., Datla K. P., Dexter D. T. and Aruoma O. I. (2005), Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanidins in Mauritian black teas. *Food Res. Int.* **38**, 357–367.
- Murray A. P., Rodriguez S., Frontera M. A., Tomas M. A., and Mulet M. C. (2004), Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z. Naturforsch.* **59c**, 477–480.
- Parejo I., Viladomat F., Bastida J., Rosas-Romero A., Flerlage N., Burillo J., and Codina C. (2002), Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6882–6890.
- Plessi M., Bertelli D., Rastelli G., Albasini A., and Monzani A. (1998), Fruits of *Ribes*, *Rubus*, *Vaccinium* and *Prunus* genus. Metal contents and genome. *Fresenius' J. Anal. Chem.* **361**, 353–354.

- Prior R. L., Wu X., and Schaich K. (2005), Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4290–4302.
- Quezel P. and Santa S. (1963), *Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales*. CNRS Editions, Paris, p. 350-1170.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J., and Paganga G. (1996), Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **7**, 933–956.
- Schlesier K., Harwat M., Böhm V., and Bitsch R. (2002), Assessment of antioxidant activity by using different *in vitro* methods. *Free Radic. Res.* **36**, 177–187.
- Stocker O. (1974), Water- and photosynthesis-relations of desert plants in the south Algerian sahara: III. Annual Course and Constitutional Types **163**, 480–529.
- Vinson J. A., Dabbagh Y.A., Serry M. M., and Jang J. (1995), Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an *in vitro* oxidation model for heart disease. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 2800–2802.
- Watson L. and Dallwitz M. J. (1992). *The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval*. Version: 29th July 2006. <http://delta-intkey.com/angio/>

**Table I.** Yield (g) of successive liquid/liquid extractions with increasing polarity solvents of leaves (L), flowers (FL), and roots (R).

	L	FL	R
EtOH 80%	25.5	181.4	78.4
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	2.5	2.1	2.5
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.2	4.7	4.5
EtOAc	4.2	10.2	7.3
BuOH	8.6	45.7	20.4

**Table II.** Radical scavenging activities (DPPH test) of crude EtOH 80% extract along with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, BuOH extracts from roots (R), flowers (FL) and leaves (L) of *Limoniastrum feei*. Results are expressed as IC<sub>50</sub> (μg/mL), mean ± SD (standard deviation) of triplicate.

	IC <sub>50</sub> (R)	IC <sub>50</sub> (FL)	IC <sub>50</sub> (L)
EtOH 80%	3.3 ± 1.43	1.75 ± 0.74	0.38 ± 0.06
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	44.04 ± 12.37	5.75 ± 0.74	8.67 ± 4.49
EtOAc	1.44 ± 0.08	1.63 ± 0.32	1.21 ± 0.19
BuOH	3.93 ± 0.89	2.82 ± 0.24	1.30 ± 0.24

**Table III.** Radical scavenging activities (DPPH test) of 7 major fractions obtained after silica gel fractionation of an EtOAc leaves extract. Results are expressed as IC<sub>50</sub> [ $\mu$ g/mL], mean  $\pm$  SD (standard deviation) of triplicate.

Fractions	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ g/mL]
1-12	NS
13-27	NS
28-41	30.93 $\pm$ 17.84
42-67	9.07 $\pm$ 2.47
68-79	18.35 $\pm$ 4.42
80-196	1.74 $\pm$ 0.13
197-220	1.44 $\pm$ 0.09

NS, not significant (IC<sub>50</sub>>100  $\mu$ g/mL)

**Table IV.** Radical scavenging activities (DPPH, FRAP and superoxide) of 7 pure polyphenols purified by semipreparative C18-HPLC in comparison with their respective EtOAc extract.

Results are expressed as mean  $\pm$  SD (standard deviation) of triplicate.

Sample	DPPH <sup>a</sup>	FRAP <sup>b</sup>	Superoxide <sup>a</sup>
EtOAc extract	1.21 $\pm$ 0.19	2.25 $\pm$ 0.12	3.61 $\pm$ 0.56
Gallic acid (1)	0.94 $\pm$ 0.68	0.83 $\pm$ 0.15	3.49 $\pm$ 0.99
Myrciaphenone A (2)	60.92 $\pm$ 3.34	7.61 $\pm$ 1.68	NS >>10
Myricetin-3- <i>O</i> - $\beta$ -galactopyranoside (3-1)	2.84 $\pm$ 0.69	2.89 $\pm$ 0.02	2.85 $\pm$ 0.2
Epigallocatechin gallate (3-2)	2.54 $\pm$ 0.45	2.2 $\pm$ 0.06	2.1 $\pm$ 0.08
Myricetin 3- <i>O</i> - $\alpha$ -rhamnopyranoside (4)	1.82 $\pm$ 0.26	1.38 $\pm$ 0.39	3.83 $\pm$ 0.82
Quercetin (5)	2.23 $\pm$ 0.13	1.48 $\pm$ 0.19	5.79 $\pm$ 0.49
Myricetin (6)	3.27 $\pm$ 0.55	1.60 $\pm$ 0.14	1.86 $\pm$ 0.12
Ascorbic acid	0.59 $\pm$ 0.12	1.62 $\pm$ 0.62	5.8 $\pm$ 0.79

<sup>a</sup> Values expressed as IC<sub>50</sub> [ $\mu$ g/mL].

<sup>b</sup> Values expressed in EC1 as  $\mu$ M equivalent on Fe<sup>2+</sup>/mL.

## Figure legends

**Fig. 1.** Scheme of bioguided extraction and purification of *L. feei* EtOAc leaves extract. The same steps were followed to obtain different extracts of roots and flowers (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc and BuOH).

**Fig. 2.** Correlations between total phenolic content and antiradical activity of different extracts (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, EtOAc, BuOH) obtained from roots, leaves and flowers of *L. feei*.

TPC, total phenolic content (gallic acid equivalents/mg dry weight); DPPH assay expressed in IC<sub>50</sub> (μg/mL); R, root extract (R = 0.6); L, leaves extract (R = 0.97); FL, flower extract (R = 0.99).

**Fig. 3.** Chemical structure of compounds **2 - 6**.



**Fig. 1.**

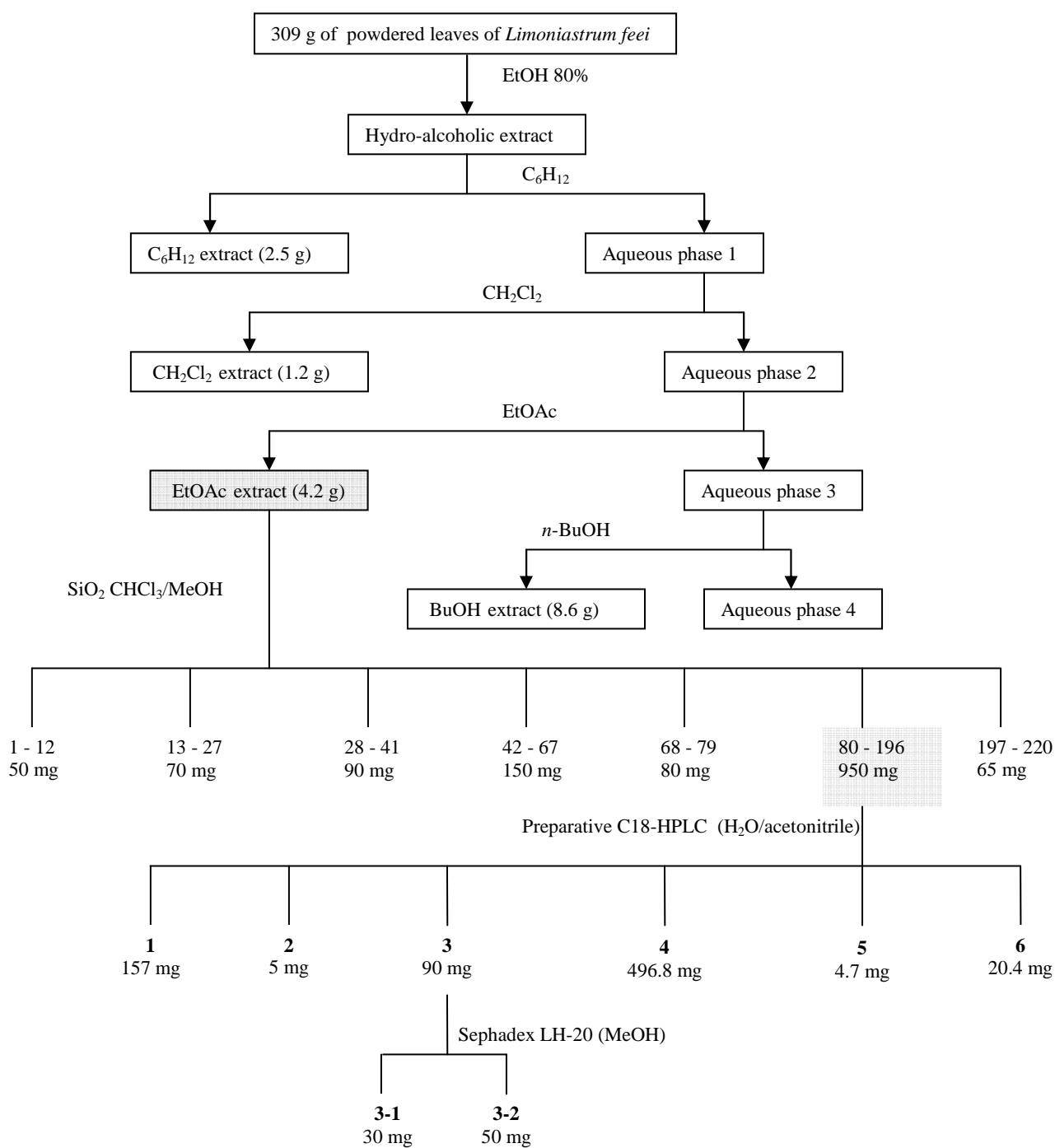
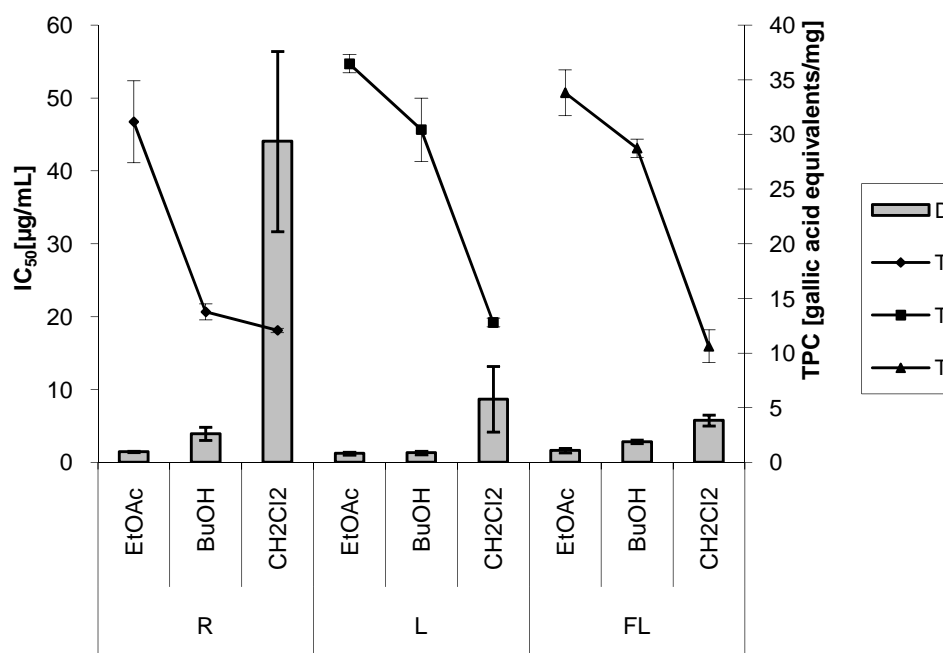
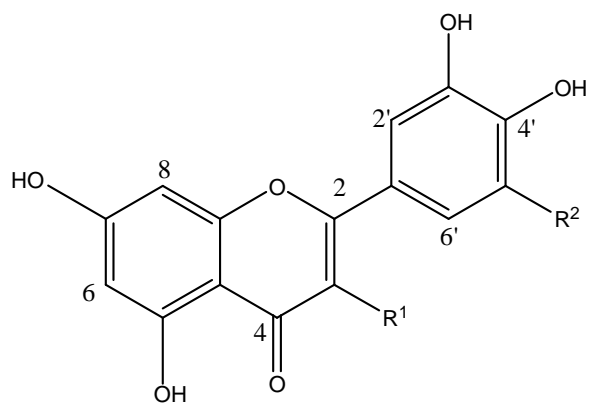


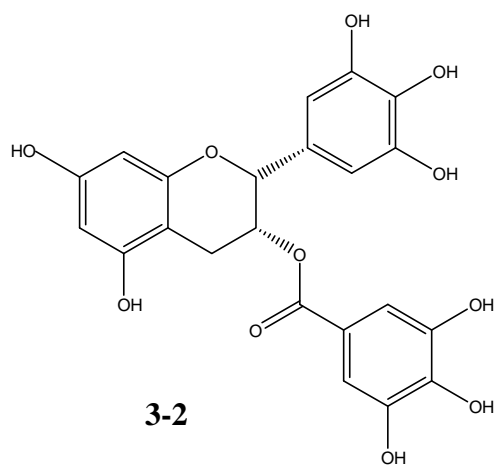
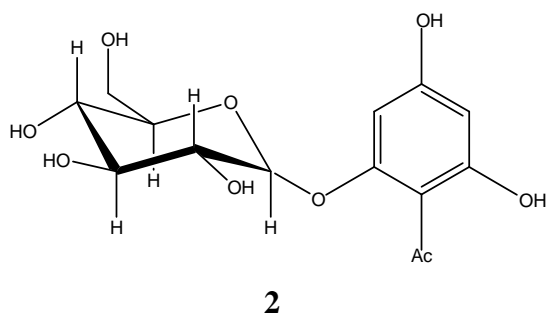
Fig. 2.



**Fig. 3.**



	<b>R<sup>1</sup></b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>3-1</b>	O-Glu	OH
<b>4</b>	O-Rha	OH
<b>5</b>	OH	H
<b>6</b>	OH	OH



## Résumé

Nos travaux de recherche ont été consacrés à l'étude chimique et pharmacologique de trois espèces végétales africaines : une Euphorbiacée endémique de Madagascar : *Euphorbia stenoclada*, une Combretacée pantropicale d'Afrique de l'Ouest : *Anogeissus leiocarpus* et enfin une Plombaginacée saharo-arabique : *Limoniastrum feei*.

Ils nous ont conduit à l'isolement et l'identification de 19 molécules, dont 2 nouvelles dans la famille, 9 identifiées pour la première fois dans le genre et 4 caractérisées pour la première fois dans l'espèce étudiée :

- huit molécules ont été identifiées dans l'écorce d'*Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae) dont cinq triterpènes pentacycliques dérivés de la  $\beta$ -amyrine, décrits pour la première fois pour cette espèce ; un d'entre eux, nommé trachélospéroside E1, est signalé pour la première fois dans la famille des combretacées.
- quatre dérivés de flavonols ont été identifiés dans les parties aériennes d'*Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae) ; il s'agit de polyphénols nouvellement décrits dans l'espèce.
- Sept polyphénols ont été identifiés pour la première fois dans les feuilles de *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae) dont la myrciaphenone A dont la présence est nouvellement décrite dans la famille.

Le premier chapitre concerne l'étude d'une espèce de la flore malgache *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae), recommandée par les tradipraticiens malgaches pour soigner certaines pathologies respiratoires (bronchite chronique, asthme). L'évaluation préliminaire d'un extrait aqueux (infusé de parties aériennes séchées) et d'un extrait alcoolique sur la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques humaines (CMLBH), responsables en partie du remodelage bronchique observé chez les asthmatiques, a montré une forte inhibition des deux extraits de la prolifération des CMLBH induite par une cytokine pro-inflammatoire, l'interleukine 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ). Nous avons utilisé ce modèle biologique pour isoler les constituants responsables de l'activité observée, et évaluer en parallèle la corrélation entre l'activité antiproliférative et l'activité anti-oxydante de l'extrait alcoolique.

Nous avons ainsi montré que la quercétine, identifiée par LC-UV-MS dans la sous-fraction la plus active, est le principal constituant responsable de l'activité antiproliférative

( $CI_{50} = 1,62 \mu M$ ) de l'extrait alcoolique ( $CI_{50} = 0,73 \pm 0,08 \mu g/mL$ ). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature : plusieurs études pré-cliniques ont en effet montré les effets bénéfiques de la quercétine dans l'asthme, en inhibant notamment l'obstruction bronchique et l'hyper-réactivité bronchique. Par contre, d'autres flavonols comme la quercitrine et l'hypéroside, également identifiés dans l'extrait d'*E. stenoclada*, se sont révélés inactifs sur le modèle expérimental choisi. La comparaison de l'activité antiproliférative de CMLBH induite par IL-1 $\beta$  de dérivés glycosylés et méthoxylés de la quercétine a montré que l'*O*-méthylation diminue l'effet antiprolifératif alors que la glycosylation l'inhibe complètement.

Dans la mesure où les personnes présentant des troubles respiratoires comme les asthmatiques sont soumis à un stress oxydatif permanent, nous avons exploré par ailleurs la capacité anti-radicalaire de l'extrait d'*E. stenoclada* et évalué la corrélation existant entre ses propriétés anti-oxydantes d'une part et son potentiel anti-asthmatique, d'autre part. De fortes teneurs en polyphénols ont été retrouvées, avec la présence majoritaire d'acide gallique, aux propriétés antiradicalaires marquées ( $CI_{50} = 4,7 \mu M$ ).

Le second chapitre est consacré à l'étude phytochimique de l'écorce d'un arbre de savanes africaines : *Anogeissus leiocarpus* Guill. & Perr. (Combretaceae), traditionnellement utilisé pour traiter certaines pathologies cutanées (eczéma).

Ainsi, 5 triterpènes oléanoliques monodesmosidiques et leurs aglycones ont été identifiés pour la première fois dans le genre :

- le séricoside et son aglycone l'acide séricique
- le trachélospéroside E1 et son aglycone trachélospérogénine E et
- l'arjungénine.

La présence de trachélospéroside E1 est signalée pour la première fois dans les Combretacées. Les triterpènes de type oléanolique étant retrouvés dans la majorité des genres appartenant à cette même famille botanique (*Terminalia*, *Rudgea*, *Trachelospermum* et *Combretum*, par ex), ils constituent des marqueurs chimiotaxonomiques potentiels.

Nous nous sommes par ailleurs intéressés aux polyphénols de l'écorce d'*A. leiocarpus*. Trois dérivés de l'acide ellagique ont ainsi également été caractérisés :

- l'acide 3,3',4'-tri-*O*-méthylflavellagique

- l'acide 3,3'-di-*O*-méthyllellagique et
- le 3,4,3'-tri-*O*-méthylflavellagique-4- $\beta$ -D-glucoside.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude de 3 drogues (feuilles, fleurs et racines) d'une plante poussant dans le Sahara du sud algérien et marocain : *Limoniastrum feei* (Girard) Batt. (Plumbaginaceae). Il s'agit d'une xérophyte réputée pour sa résistance à des conditions climatiques extrêmes (stress hydrique et UV, sécheresse prolongée...). Notre objectif a été de vérifier la présence de métabolites anti-oxydants, susceptibles de permettre à la plante de survivre dans des conditions climatiques et environnementales défavorables.

Ainsi, à partir d'extraits hydro-alcooliques totaux, une première évaluation de l'activité anti-oxydante a été réalisée, en utilisant le test d'inhibition du radical DPPH $\bullet$ . Ce même test nous a permis de procéder à un fractionnement bioguidé afin d'identifier les constituants responsables de l'activité anti-radicalaire décelée dans un extrait. Une fois les molécules purifiées, deux autres tests complémentaires ont été utilisés afin de comparer leur éventuelle sélectivité vis-à-vis de différents radicaux libres : l'essai SRSA (Superoxyde Radical Scavenging Activity) utilisant la xanthine oxydase pour produire l'anion superoxyde (O $_2^{\bullet-}$ ) et le test FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) qui mesure la production du radical hydroxyle ( $\bullet$ OH) par la réaction de Fenton.

Parmi les 15 extraits testés, c'est un extrait enrichi en polyphénols, préparé à partir des feuilles de *L. feei*, qui s'est avéré le plus actif dans le test DPPH (CI $_{50}$ : 1,21  $\pm$  0,19  $\mu$ g/ml). Sa purification a donné lieu à l'identification par RMN 1D et 2D, UV et ESI-MS de 7 polyphénols, isolés pour la première fois du genre *Limoniastrum* :

- l'acide gallique
- la myrciaphénone A
- la myricétine-3-*O*- $\beta$ -galactopyranoside
- l'épigallocatechine gallate
- la myricétine-3-*O*- $\alpha$ -rhamnopyranoside
- la quercétine et
- la myricétine.

L'acide gallique s'est révélé être le plus actif vis-à-vis du radical DPPH• (CI<sub>50</sub> = 0,94 ± 0,68 µg/ml) et du radical •OH (EC1 = 0,83 ± 0,15 µM Fe<sup>2+</sup>/ml), tandis que la myricétine a présenté une activité anti-radicalaire plus spécifique de l'anion O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> (CI<sub>50</sub> = 1,86 ± 0,12 µg/ml).

Ces résultats confortent la capacité d'une espèce semi-désertique à produire, naturellement, une grande quantité de métabolites anti-oxydants qui participent probablement à son adaptation à son environnement extrême.

L'ensemble de ce travail a conduit à la publication de deux articles, comme premier auteur :

1. M Chaabi, V Freund-Michel, N Frossard, A Randriantsoa, R Andriantsitohaina, A Lobstein. Anti-proliferative effect of *Euphorbia stenoclada* in human airway smooth muscle cells in culture. **Journal of Ethnopharmacology** 2007, 109, 134-139.
2. M Chaabi, S Benayache, F Benayache, S N'Gom, M Koné, R Anton, B Weniger, A Lobstein. Triterpenes and polyphenols from *Anogeissus leiocarpus* (Combretaceae). **Biochemical Systematics and Ecology** 2008, 36(1), 59-62.

Un troisième article, également en premier auteur, a été soumis et est actuellement en cours d'évaluation :

3. M Chaabi, N Beghidja, S Benayache, A Lobstein. Activity-guided isolation of antioxidant principles from *Limoniastrum feei* (Girard) Blatt. **Zeitschrift für** 63c, # - # (2008); received

## Publications

1. M Chaabi, S Benayache, F Benayache, S N'Gom, M Koné, R Anton, B Weniger, A Lobstein. Triterpenes and polyphenols from *Anogeissus leiocarpus* (Combretaceae). **Biochemical Systematics and Ecology** 2008, 36(1), 59-62.
2. M Chaabi, C Antheaume, B Weniger, H Justiniano, C Lugnier, A Lobstein. Biflavones of *Decussocarpus rospigliosii* as phosphodiesterases inhibitors. **Planta Medica** 2007, 73(12), 1284-1286.
3. M Chaabi, V Freund-Michel, N Frossard, A Randriantsoa, R Andriantsitohaina, A Lobstein. Anti-proliferative effect of *Euphorbia stenoclada* in human airway smooth muscle cells in culture. **Journal of Ethnopharmacology** 2007, 109, 134-139.
4. M Chaabi, N. Beghidja, S Benayache, A Lobstein. Activity-guided isolation of antioxidant principles from *Limoniastrum feei* (Girard) Blatt. **Zeitschrift für Naturforschung** 63c, # - # (2008); received.
5. V Lamy, S Roussi, M Chaabi, F Gossé, N Schall, A Lobstein, F Raul. Chemopreventive effects of lupulones, a hop  $\beta$ -acids, on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon. **Carcinogenesis** 2007, 28(7), 1575-1581.
6. D Tchamo Nougoué, C Antheaume, M Chaabi, B Lenta Ndjakou, S Ngouela, A Lobstein, E Tsamo. Anthraquinones from the fruits of *Vismia laurentii*, **Phytochemistry** 2008, 69(4), 1024-1028.
7. N Seiler, M Chaabi, S Roussi, F Gossé, A Lobstein, F Raul. Synergism between apple procyanidins and lysosomotropic drugs: potential in chemoprevention. **Anticancer Research** 2006, 26, 3381-3386.
8. M Chaabi, A Zellagui, S Rhouati. Scopoletin and essential oil from *Lycium arabicum* Schweinf ex Boiss growing in Algeria. **Journal of Algerian Chemical Society** 2004, 14 (2), 189-196.
9. ME Maldonado-Celis, C Foltzer-Jourdainne, F Gossé, M Chaabi, A Lobstein, F Raul. Apple procyanidins activate different apoptotic pathways in primary human colon cancer cells and their derived metastatic cells. **Carcinogenesis** : submitted.

## Communications orales

1. **Etude des effets antiprolifératif et antioxydant d'*Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae).** 2<sup>ème</sup> journées de l'Institut Fédératif de Recherche 85. (Strasbourg-France, 15-16 Septembre 2005).
2. **Inhibitory effect of natural biflavones on phosphodiesterase isozymes.** International Symposium "Phytomedecine 2007": Phytotherapy and Herbal Medicinal Products (Constantine-Algérie, 16-19 Mars 2007).



## Communications par affiche

1. Les déchets d'oranges, substrats pour la production de l' $\alpha$ -amylase par *Aspergillus niger*, approche d'optimisation statistique : Matrice de Plackett et Burman 1946. M. Alyane, M. Chaabi, Z. Meraihi. Colloque International : "Bio Tech World 2007" pour le Thème : Quelles Biotechnologies Pour les Pays du Sud » (Oran-Algeria, 24-25 November 2007).
2. Vismiaturucallone, a new antimalarial tetracyclic triterpene from *Vismia laurentii* (Guttiferae). D.T. Nougoué, J. Ngoupayo, M. Chaabi, S. N'gom, B.L. Ndjakou, S. Ngouela, C. Antheaume, F.F. Boyom, J. Gut, P.J. Rosenthal, A. Lobstein, E. Tsamo. 55<sup>th</sup> Annual Congress of The Society for Medicinal Plant Research (Graz-Austria, 2-6 September 2007).
3. **Bioactive constituents of sea fennel (*Crithmum maritimum* L.)**  
S. Ngom, M. Chaabi, S. Herrmann, C. Mincker, N. Mekideche, A. Lobstein. 4<sup>ème</sup> journées de l'Institut Fédératif de Recherche 85. (Strasbourg-France, 12-13 Avril 2007).
4. **Anthraquinones from *Vismia laurentii* (Guttiferae) induce apoptosis in colon cancer cells.**  
D. Tchamo Nougoué, M. Chaabi, J. Peluso, C. Antheaume, C. D. Muller, E. Tsamo, A. Lobstein. 4<sup>ème</sup> journées de l'Institut Fédératif de Recherche 85. (Strasbourg-France, 12-13 Avril 2007).
5. **Antiprotozoal activity of saponins from *Anogeissus leiocarpus* (Combretaceae)**  
M. Chaabi, S. Benayache, C. Vonthron-Sénécheau, B. Weniger, R. Anton and A. Lobstein. 54<sup>th</sup> Annual Congress of The Society for Medicinal Plant Research (Helsinki-Finland, 29Août - 02 septembre 2006). *Planta Medica* 72(11), P-7.
6. **Antimalarial and antitrypanosomal activities of West Cameroon medicinal plants**  
B. Lenta Ndjakou, B. Weniger, F. Tantangmo, M. Chaabi, S. Ngouela, E. Tsamo and R. Anton. 54<sup>th</sup> Annual Congress of The Society for Medicinal Plant Research (Helsinki-Finland, 29Août - 02 septembre 2006). *Planta Medica* 72(11), P-8.
7. **Bio-guided isolation of anti-salmonellae compounds of *Thonningia sanguinea*, an Ivorian medicinal plant.**  
J.D. N'guessan, B. Weniger, A. Ramanou, P. Andre, M. Chaabi, and F. Guede-guina. 54<sup>th</sup> Annual Congress of The Society for Medicinal Plant Research (Helsinki-Finland, 29Août-02 septembre 2006). *Planta Medica* 72(11), P-9.
8. **APOPTOTIC PROPERTIES OF APPLE PROCYANIDINS OF HUMAN CANCER CELLS.**  
M. Chaabi, S. N'Gom, F. Gossé, R. Anton, A. Lobstein, F. Raul. Natural Products: a chance for the future of mankind (Leysin, 28-31 May 2006).
9. **Phytochemical study of *Limoniastrum feei*, a species from the semi-desertic Dayas flora.**  
M. Chaabi, N. Beghidja, S. Benayache, B. Weniger, R. Anton, A. Lobstein. Natural Products: a chance for the future of mankind (Leysin, 28-31 May 2006).

10. **Antiproliferative and antioxidant activities from *Euphorbia stenoclada* Baill. (Euphorbiaceae).**  
M. Chaabi, V. Freund-Michel, N. Frossard, C. Simmler, A. Randriantsoa, R. Andriantsitohaina, A. Lobstein.  
 11<sup>th</sup> Symposium NAPRECA (Natural Products Research Network for Eastern and Central Africa), (Antananarivo-Madagascar, 9-11 Août 2005).
11. **Biflavonoids from *Decussocarpus rospigliosii* as PDE inhibitors.**  
M. Chaabi, H. Justiniano, G. Schlewer, C. Antheaume, F. Alzate, B. Weniger, C. Lugnier, A. Lobstein.  
 53<sup>rd</sup> Annual Congress of The Society for Medicinal Plant Research. (Florence-Italie, 21-25 Août 2005).
12. **Bioactive polyphénols from *Euphorbia stenoclada* as inhibitors of human airway smooth muscle proliferation.**  
M. Chaabi, V. Freund-Michel, N. Frossard, R. Andriantsitohaina, A. Lobstein.  
 53<sup>rd</sup> Annual Congress of The Society for Medicinal Plant Research. (Florence-Italie, 21-25 Août 2005).
13. **Phytochemical study of *Tephrosia deflexa*.**  
 M. Karé, B. Niassy, M. Chaabi, A. Lobstein, R. Anton, A. Boulanger, B. Muckensturm, M. Koné.  
 53<sup>rd</sup> Annual Congress of The Society for Medicinal Plant Research. (Florence Italie, 21-25 Août 2005).
14. **Etude phytochimique et activité antimicrobienne de *Lycium arabicum* Schweinf ex Boiss.**  
M. Chaabi, A. Zellagui, A. Touil, F. Sahli, S. Rhouati.  
 VI<sup>ème</sup> Journées de Chimie. (Constantine-Algérie 13-15 Avril 2004).
15. **The effect inhibition study from : *Ranunculus bullatus* and *Genista microcephala* at bacteria and fungi.**  
 Zellagui, M. Chaabi, L. Dehimat, S. Chibani, S. Rhouati.  
 II<sup>ème</sup> Séminaire National de Chimie. (Tébessa-Algérie 18-19 Mai 2004).
16. **Etude analytique des espèces *Ranunculus bullatus* et *Parentucellia viscosa*.**  
M. Chaabi, A. Zellagui, S. Rhouati.  
 IV<sup>ème</sup> Symposium National de Chimie Organique Industrielle et Pharmaceutique. (Oran-Algérie, 22-23 octobre 2002).