

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE FRÈRES MENTOURI CONSTANTINE 1  
FACULTE DES SCIENCES EXACTES  
DEPARTEMENT DE CHIMIE



Université Frères Mentouri  
Constantine 1

N° d'ordre : 25/D3C/2019  
Série : 03/CH/2019

## THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat de troisième cycle  
(LMD)

Spécialité : Chimie Pharmaceutique

Option : Analyses Physicochimiques, Contrôle de la Qualité et Synthèse de  
Substances Bioactives

Par

Imad MENNAI

### Recherche et Détermination Structurale de Molécules Bioactives de Plantes Sahariennes – Activités Biologiques

#### Devant le jury :

Pr. ZAMA Djamila	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Présidente
Pr. BENAYACHE Fadila	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Directrice de thèse, Rapporteuse
Dr. LORENZO-MORALES Jacob	Université de la Laguna, Tenerife, Espagne	Co-Directeur de thèse, Co-rapporteur
Pr. MEKKIOU Ratiba	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Examinatrice
Pr. AMEDDAH Souad	Université Frères Mentouri, Constantine 1	Examinatrice
Pr. HABA Hamada	Université El Hadj Lakhdar, Batna 1	Examinateur

20 Mars 2019

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ (32)

صدق الله العظيم

## *Dédicaces*

♥ *À mes chers parents Mabrouka & Miloud ...*

♥ *À ma chère femme Esma*

♥ *À mes chères sœurs : Maroua et Safa*

♥ *À tous mes amis & collègues ...*

♥ *À tous ceux qui me sont chers.*

*Merci!*

*Imad*

# Remerciements

Mes remerciements sont d'abord à Allah de m'avoir donné la force, le courage et la patience nécessaire pour mener ce travail à bout.

Cette thèse de Doctorat est le résultat d'un travail de collaboration entre deux laboratoires ; l'Unité de Recherche Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques (VARENBIOMOL), Faculté des Sciences Exactes, Université Frères Mentouri Constantine 1, sous la direction du madame la Professeur **Fadila BENAYACHE**, à qui je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche et particulièrement pour ses conseils précieux, ses efforts, ses critiques constructives, sa compétence scientifique et sa grande patience qui ont permis de mener à bon terme ce travail, et pour le soutien qu'elle m'a témoigné tout au long de cette étude.

J'ai eu la chance et le plaisir d'effectuer une partie de ce travail de recherche dans le laboratoire de Chimiothérapie antiparasitaire de " l'Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias ", de l'université de la Laguna, Tenerife, Espagne, sous la direction du docteur **Jacob LORENZO-MORALES**. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions. Pour son aide et pour les discussions enrichissantes et fructueuses entretenues durant ma présence dans son laboratoire, qu'il soit assuré de ma profonde gratitude.

J'adresse de chaleureux remerciements à Monsieur le professeur **Samir BENAYACHE** de l'université Frères Mentouri Constantine 1, pour avoir mis à ma disposition deux plantes sahariennes endémiques, pour m'avoir accordé un stage dans le cadre de son accord-programme PHC Tassili 12 MDU 856, Code Campus France : 27025YJ, titre : Valorisation des extraits végétaux, étude phytochimique et pharmacologique, applications socio-économiques, entre l'université Frères Mentouri Constantine 1 (responsable du projet Pr. Samir BENAYACHE) et l'université de Strasbourg (responsable du projet Pr. Eric MARCHIONI). Je le remercie également pour ses encouragements, sa disponibilité et ses précieux conseils.

Je remercie la Pr. **Isabel LÓPEZ BAZZOCCHI** et Dr. **Ignacio Antonio JIMÉNEZ DÍAZ** de m'avoir permis d'effectuer une partie de mon travail au sein du laboratoire de chimie organique de l'Instituto Universitario de Biorgánica Antonio González, Université de la Laguna, Tenerife, Espagne.

Mes remerciements vont aussi à madame : **Anne BOOS**, maître de conférences à l'université de Strasbourg de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), France, pour sa supervision durant mon stage pour la réalisation du dosage des éléments inorganiques.

Je suis également très honoré que la professeure **Souad AMEDDAH** de l'Université Frères Mentouri Constantine 1, ait accepté de juger ma thèse et de siéger dans le jury de sa soutenance ; je la remercie également d'avoir autorisé et dirigé la réalisation des essais biologiques dans son laboratoire, pour sa grande gentillesse, sa disponibilité et ses conseils judicieux.

Je remercie vivement monsieur **Ahmed MENAD** professeur à l'Université Frères Mentouri, Constantine 1 ainsi que son équipe de recherche, pour la réalisation des essais biologiques.

Je tiens aussi à remercier la professeure **Djamila ZAMA** pour ses conseils, son aide et pour le grand honneur qu'elle me fait en acceptant de présider le jury de ma thèse.

Je tiens aussi à remercier la professeure **Ratiba MEKKIOU**, pour ses conseils, son aide et d'avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Mes vifs remerciements s'adressent également, à monsieur le professeur **Hamada HABA**, de l'Université El Hadj Lakhdar, Batna 1, qui m'honore en acceptant de faire partie du jury de ma thèse.

J'adresse mes remerciements aussi à **Mr. Chawki BENSOUICI**, Maître de recherche au Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt) de Constantine pour son aide, sa sympathie et sa gentillesse. Soyez assuré de toute ma gratitude.

Je suis aussi très reconnaissant à toute l'équipe de chercheurs de notre Unité de Recherche VARENBIOMOL qui ont contribué par leur soutien et amitié à la progression de mon travail de thèse. Je cite en particulier : **Naima, Ilhem, Yasmine, Maroua, Ines, Sara, ...**

Je remercie également tous mes collègues du laboratoire de Chimiothérapie antiparasitaire et en particulier : **Ines, Attenerie, Maria, Soumia et Olfa**.

Je voudrais également remercier les ingénieurs de notre Unité de Recherche : monsieur **Hichem HAZMOUNE** et madame **Naouel TEBBOUB** pour leur aide et leur disponibilité.

Je remercie tous mes chers collègues : **Mohammed, Rabeh, Salah, Issam eddine, Zakaria, Sofiane et Abdelkader** qui m'ont donné leur soutien et ont contribué avec leurs encouragements à la réalisation de ce travail.

Toutes les expressions de reconnaissance pour mes parents qui voulaient tout le temps que je pousse mes études jusqu'au bout avec un soutien incontestable, Merci pour tout, je vous admire...

Un grand merci pour mes sœurs **Maroua et Safa**, pour tout l'amour qu'elles n'ont jamais hésité à me prouver, merci pour tout.

Finalement, un merci du fond du cœur à ma femme **Esma** qui est toujours à mes côtés, qui m'a aidé, m'a encouragé, m'a soutenu et surtout m'a supporté pendant les moments difficiles.

# TABLE DES MATIÈRES

Dédicace.....	i
Remerciements.....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
La liste des tableaux.....	iv
La liste des figures.....	v
La liste des abréviations.....	vi
<b>Introduction générale.....</b>	<b>1</b>

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

### **Chapitre I : Familles Apiaceae et Frankeniaceae, Synthèse bibliographique** 3

I.1. Introduction.....	4
I.2. La famille Apiaceae.....	4
I.2.1. Introduction.....	4
I.2.2. Classification botanique.....	4
I.2.3. Activités Biologiques.....	5
I.3. Le genre <i>Pituranthos</i> .....	6
I.3.1. Introduction.....	6
I.3.2. Description botanique du genre <i>Pituranthos</i> .....	6
I.3.3. Activités biologiques.....	7
I.3.4. Investigations phytochimiques du genre <i>Pituranthos</i> .....	7
I.4. La famille Frankeniaceae.....	7
I.4.1. Introduction.....	7
I.4.2. Classification botanique.....	8
I.4.3. Activités biologiques.....	8
I.5. Le genre <i>Frankenia</i> .....	8
I.5.1. Description botanique du genre <i>Frankenia</i> .....	8
I.5.2. Activités biologiques.....	10
I.5.3. Investigations phytochimiques du genre <i>Frankenia</i> .....	10
I.6. Conclusion.....	14

### **Chapitre II : Métabolites secondaires** 15

II.1. Introduction.....	16
II.2. Les familles des métabolites secondaires.....	17
II.3. Les composés polyphénoliques.....	17
II.3.1. Définition.....	17
II.3.2. Classification.....	17

II.3.2.A. Les acides phénoliques.....	18
II.3.2.B. Les coumarines.....	18
II.3.2.B.1 Définition.....	18
II.3.2.B.2. Classification.....	19
II.3.2.B.3. Activités pharmacologiques des coumarines.....	20
II.3.2.C. Les flavonoïdes.....	20
II.3.2.C.1. Définition et classification.....	20
II.3.2.C.2. L'intérêt des flavonoïdes.....	21
II.4. Les composés polyacéthyléniques polyinsaturés : les polyynes.....	22
II.4.1. Définition et structure.....	22
II.4.2. L'intérêt des composés polyacéthyléniques.....	23
II.5. Conclusion.....	23

## **PARTIE EXPERIMENTALE**

### **Chapitre III : Étude des activités biologiques *in vitro***

III.1. Évaluation de l'activité antiparasitaire <i>in vitro</i> .....	25
III.1.1. Évaluation de l'activité antileishmanienne <i>in vitro</i> .....	25
III.1.1.A. Activité anti-promastigote forme.....	25
III.1.2. Évaluation de l'activité antiamibienne.....	26
III.1.2.A. Activité anti-trophozoite d' <i>Acanthameoba</i> .....	26
III.1.3. Évaluation de l'activité antitrypanosomiale.....	26
III.1.3.A. Activité anti-épimastigotes forme.....	26
III.2. Test de cytotoxicité des molécules sur des macrophages J 774.....	27
III.3. Pouvoir antioxydant.....	28
III.3.1. Introduction.....	28
III.3.2. Définition l'activité anti-radicalaire.....	28
III.3.3. Méthode du radical DPPH.....	29
III.3.4. Piégeage de l'ABTS <sup>•+</sup> .....	30
III.3.5. Méthode de réduction du cuivre (CUPRAC).....	30
III.3.6. Test de chélation des ions métalliques.....	30
III.3.7. Méthode de blanchiment du $\beta$ -carotène.....	30
III.3.8. Méthode du superoxyde de DMSO alcalin.....	31
III.3.9. Test de la réduction du fer (FRAP).....	31
III.3.10. Analyses statistiques.....	31
III.4. Évaluation de l'activité antibactérienne.....	32
III.5. Conclusion.....	32

## Chapitre IV : Étude phytochimique des espèces : *Pituranthos battandieri* et *Frankenia thymifolia*

33

IV.1. Investigation phytochimique de l'espèce <i>Pituranthos battandieri</i> Maire.....	34
IV.1.1. Choix du matériel végétal.....	34
IV.1.2. Classification dans la systématique botanique.....	34
IV.1.3. Description botanique.....	34
IV.1.4. Distribution géographique.....	35
IV.1.5. Travaux antérieurs réalisés sur l'espèce <i>Pituranthos battandieri</i> Maire.....	35
IV.1.6. Protocole Expérimental.....	38
IV.1.6.A. Récolte du matériel végétal.....	38
IV.1.6.B. Extraction.....	38
IV.1.7. Évaluation des teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes totaux.....	41
IV.1.7.A. Dosage des polyphénols totaux.....	41
IV.1.7.B. Dosage des flavonoïdes totaux.....	41
IV.1.8. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits.....	42
IV.1.8.A. Effet Scavenger du radical DPPH.....	42
IV.1.8.B. Activité du piégeage de l'ABTS <sup>•+</sup> .....	42
IV.1.8.C. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	42
IV.1.8.D. Activité de la chélation des ions métalliques.....	43
IV.1.8.E. Test de blanchiment du β-carotène.....	43
IV.1.8.F. Effet scavenger du superoxyde produit par DMSO alcalin.....	44
IV.1.8.G. Test de la réduction du fer (FRAP).....	44
IV.1.8.I. Analyses statistiques.....	44
IV.1.9. Évaluation de l'activité antiparasitaire des extraits de <i>Pituranthos battandieri</i> .....	45
IV.1.9.A. Protocole Expérimental.....	45
IV.1.9.B. Screening antiparasitaire <i>in vitro</i> des extraits de <i>P. battandieri</i> .....	45
IV.1.9.C. Fractionnement bioguidé de l'extrait CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> des parties aériennes (DP).....	47
IV.1.9.D. Fractionnement bioguidé de l'extrait éther de pétrole des racines (EPR).....	64
IV.1.10. Fractionnement de l'extrait <i>n</i> -butanol des racines de <i>P. battandieri</i> .....	72
IV.1.11. Dosage des éléments inorganiques de l'extrait <i>n</i> -butanol par ICP-AES et ICP-MS.....	75
IV.1.11.A. Introduction.....	75
IV.1.11.B. Principe d'ICP-AES.....	76
IV.1.11.C. Principe d'ICP-MS.....	77
IV.1.11.D. Mode opératoire.....	77
IV.1.11.E. Résultats.....	78
IV.2. Étude phytochimique et biologique de l'espèce <i>Frankenia thymifolia</i> Desf.....	79
IV.2.1. Choix du matériel végétal.....	79

IV.2.2. Classification dans la systématique botanique.....	79
IV.2.3. Description botanique.....	79
IV.2.4. Distribution géographique.....	80
IV.2.5. Travaux antérieurs sur l'espèce <i>Frankenia thymifolia</i> .....	80
IV.2.6. Protocole expérimental d'extraction.....	80
IV.2.6.A. Récolte du matériel végétal.....	80
IV.2.6.B. Extraction.....	81
IV.2.7. Évaluation des teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux des extraits .....	83
IV.2.8. Recherche d'activités biologiques des extraits.....	83
IV.2.8.A. Évaluation de l'activité antiparasitaire des extraits.....	83
IV.2.8.B. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits.....	84
IV.2.8.C. Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits.....	84
IV.2.8.C.1. Principe.....	84
IV.2.8.C.2. Matériel bactériologique.....	84
IV.2.8.C.3. Protocole.....	84
IV.2.9. Séparation chromatographique des extraits.....	86
IV.2.9.A. Séparation et purification des composants de l'extrait acétate d'éthyle (FT-E).....	86
IV.2.9.A.1. Étude des fractions de l'extrait acétate d'éthyle.....	87
IV.2.9.B. Séparation et purification des composants de l'extrait <i>n</i> -butanol (FT-B).....	90
IV.2.9.B.1. Étude des fractions de l'extrait <i>n</i> -butanol (FT-B).....	91
IV.10. Conclusion.....	97

## **Chapitre V : Résultats et discussion, élucidation structurale des composés isolés 98**

V.1. Introduction.....	99
V.2. Identification des composés isolés de <i>Pituranthos battandieri</i> Maire.....	99
V.2.A. Identification des composés isolés de la phase dichlorométhane.....	99
V.2.A.1. Élucidation structurale du composé P1 .....	99
V.2.A.2. Élucidation structurale du composé P2 .....	114
V.2.A.3. Élucidation structurale du composé P3 .....	122
V.2.A.4. Élucidation structurale des composés P4 et P5 .....	130
V.2.A.5. Élucidation structurale du composé P6 .....	143
V.2.A.6. Élucidation structurale du composé P7 .....	159
V.2.A.7. Conclusion.....	164
V.3. Identification des composés isolés de <i>Frankenia thymifolia</i> Desf.....	164
V.3.A. Élucidation structurale des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle.....	164
V.3.A.1. Élucidation structurale du composé F1 .....	164
V.3.A.2. Élucidation structurale du composé F2 .....	171



V.3.A.3. Conclusion.....	175
V.3.B. Identification des composés isolés de la phase <i>n</i> -butanol.....	175
V.3.B.1. Éluclation structurale du composé F4 .....	175
V.3.B.2. Éluclation structurale du composé F6 .....	184
V.3.B.3. Éluclation structurale du composé F7 .....	187
V.3.B.4. Éluclation structurale du composé F9 .....	193
V.3.B.5. Conclusion.....	199
<b>Chapitre VI : Résultats et discussion, activités biologiques</b>	<b>200</b>
VI.1. Introduction.....	201
VI.2. Évaluation des teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux .....	201
VI.2.1. Les extraits de <i>Pituranthos battandieri</i> .....	201
VI.2.2. Les extraits de <i>Frankenia thymifolia</i> .....	202
VI.3. Évaluation de l'activité antioxydante.....	203
VI.3.1. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>P. battandieri</i> .....	203
VI.3.1.A. L'effet scavenger du radical DPPH .....	203
VI.3.1.B. L'effet scavenger du radical-cation ABTS.....	205
VI.3.1.C. L'effet scavenger du radical superoxyde produit par DMSO alcalin.....	206
VI.3.1.D. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène.....	208
VI.3.1.E. Test de la réduction du fer (FRAP).....	209
VI.3.1.F. Test de la réduction du cuivre (CUPRAC).....	210
VI.3.1.G. Étude, corrélation et comparaison des résultats de l'activité antioxydante des extraits de <i>P. battandieri</i> .....	212
VI.3.2. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de <i>F. thymifolia</i> .....	213
VI.3.2.A. L'effet scavenger du radical DPPH .....	213
VI.3.2.B. L'effet scavenger du radical-cation ABTS.....	215
VI.3.2.C. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène.....	217
VI.3.2.D. L'effet scavenger du radical superoxyde produit par DMSO alcalin.....	219
VI.3.2.E. Le pouvoir chélateur ferreux.....	220
VI.3.2.F. Test de la réduction du cuivre (CUPRAC).....	222
VI.3.2.G. Test de la capacité antioxydante par réduction du fer (le pouvoir réducteur).....	223
VI.3.2.H. Étude, corrélation et comparaison des résultats de l'activité antioxydante des extraits de <i>F. thymifolia</i> et des composés isolés .....	225
VI.4. L'activité antiparasitaire des extraits de <i>P. battandieri</i> et <i>F. thymifolia</i> .....	226
VI.4.1. L'activité antiparasitaire des extraits <i>P. battandieri</i> .....	226
VI.4.2. L'activité antiparasitaire des fractions, sous fractions et des composés isolés de <i>P. battandieri</i> .....	229
VI.4.2.A. L'activité antileishmanienne des fractions, sous fractions et des produits isolés de <i>P. battandieri</i> .....	229

VI.4.2.B. L'activité antitrypanosomiale des fractions, sous fractions et des produits isolés de <i>P. battandieri</i> .....	234
VI.4.2. L'activité antiparasitaire des extraits de <i>F. thymifolia</i> .....	239
VI.5. L'activité cytotoxique des produits isolés de <i>P. battandieri</i> .....	241
VI.6. L'activité antimicrobienne des extraits de <i>F. thymifolia</i> .....	244
VI.7. Dosage des éléments minéraux dans l'extrait <i>n</i> -BuOH de <i>P. battandieri</i> (BPR).....	246
VI.8. Conclusion.....	248
<b>Conclusion générale</b> .....	<b>250</b>
Les références bibliographiques.....	254
Annexes	
Abstract	
الملخص	
Résumé	

## Liste des Tableaux

N°	Titre	Page
	<b>Chapitre I : Familles Apiaceae et Frankeniaceae : Synthèse bibliographique</b>	
I.1	Classification botanique de la famille des Apiaceae	4
I.2	Classification botanique de la famille Frankeniaceae	7
I.3	Quelques composés isolés du genre <i>Frankenia</i>	10
I.4	Quelques composés identifiés de l'espèce <i>Frankenia pulverulenta</i>	12
	<b>Chapitre II : Métabolites secondaires</b>	
II.1	Quelques familles de métabolites secondaires	15
	<b>Chapitre IV : Étude phytochimique des espèces : <i>Pituranthos battandieri</i> et <i>Frankenia thymifolia</i></b>	
IV.1	Masses et rendements des extraits	39
IV.2	Screening antiparasitaire des extraits de <i>P. battandieri</i> contre les différents parasites	46
IV.3	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (DP).	46
IV.4	Screening antiparasitaire des fractions de l'extrait dichlorométhane de <i>P. battandieri</i> contre les différents parasites	48
IV.5	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction F4	48
IV.6	Screening antiparasitaire des sous-fractions de F4 contre les différents parasites	49
IV.7	Résultats de la séparation de la sous-fraction F4D	53
IV.8	Screening antiparasitaire des sous-fractions F4D-1 à F4D-8 contre les différents parasites	53
IV.9	Résultats de la séparation F4D-4	53
IV.10	Screening antiparasitaire des sous-fractions de F4D contre les différents parasites	53
IV.11	Résultats de la séparation de la sous-fraction F4D-8	57
IV.12	Screening antiparasitaire de F4D-8A, F4D-8B et F4D-8C contre les parasites testés	57
IV.13	Résultats de la séparation de la sous-fraction F4D-8A	57
IV.14	Screening antiparasitaire de F4D-8A-1 à F4D-8A-6 contre les parasites testés	57
IV.15	Résultats de la séparation de F4D-8C	60
IV.16	Screening antiparasitaire de F4D-8C-1 et F4D-8C-2 contre les parasites testés	60
IV.17	Fractionnement de l'extrait éther de pétrole des racines de <i>P. battandieri</i> (EPR)	65
IV.18	Screening antiparasitaire contre <i>T. cruzi</i> , <i>A. castellanii</i> , <i>L. donovani</i> et <i>L. amazonensis</i> , des fractions de l'extrait EPR	65
IV.19	Résultats de la séparation de la fraction F3	65

<b>IV.20</b>	Screening antiparasitaire de F3A à F3D contre les parasites testés	65
<b>IV.21</b>	Screening antiparasitaire de F3B-1 à F3B-6 contre <i>T. cruzi</i>	67
<b>IV.22</b>	Résultats de la séparation de la fraction F3B	67
<b>IV.23</b>	Résultats de la séparation de la fraction F6	67
<b>IV.24</b>	Screening antiparasitaire de F6-1 à F6-5 contre <i>L. amazonensis</i>	67
<b>VI.25</b>	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait n-butanol des racines de <i>P. battandieri</i>	73
<b>VI.26</b>	Masses et rendements des extraits	83
<b>VI.27</b>	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de <i>F. thymifolia</i> (FT-E)	87
<b>VI.28</b>	Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait FT-B	91
	<b>Chapitre V : Résultats et discussions (élucidation structurale)</b>	
<b>V.1</b>	Déplacements chimiques $\delta$ (ppm) $^{13}\text{C}$ (150 MHz) et $^1\text{H}$ (600 MHz) du composé <b>P1</b>	114
<b>V.2</b>	Déplacements chimiques $\delta$ (ppm) $^{13}\text{C}$ (150 MHz) et $^1\text{H}$ (600 MHz) du composé <b>P2</b>	112
<b>V.3</b>	Déplacements chimiques $\delta$ (ppm) $^{13}\text{C}$ (150 MHz) et $^1\text{H}$ (600 MHz) du composé <b>P3</b>	129
<b>V.4</b>	Déplacements chimiques $\delta$ (ppm) $^{13}\text{C}$ (150 MHz) et $^1\text{H}$ (600 MHz) du composé <b>P4</b>	142
<b>V.5</b>	Déplacements chimiques $\delta$ (ppm) $^{13}\text{C}$ (150 MHz) et $^1\text{H}$ (600 MHz) du composé <b>P5</b>	143
<b>V.6</b>	Déplacements chimiques $\delta$ (ppm) $^{13}\text{C}$ (150 MHz) et $^1\text{H}$ (600 MHz) du composé <b>P6</b>	159
<b>V.7</b>	Données de la spectroscopie de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) et RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) du composé <b>P7</b>	163
<b>V.8</b>	Données de la RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ du composé <b>F1</b>	170
<b>V.9</b>	Données de la RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ du composé <b>F2</b>	175
<b>V.10</b>	Données de la RMN $^1\text{H}$ et $^{13}\text{C}$ du composé <b>F4</b>	183
<b>V.11</b>	Données de la spectroscopie de RMN $^1\text{H}$ du composé <b>F6</b>	187
<b>V.12</b>	Données de la série spectrale UV-Visible ( $\lambda_{\text{max}}$ nm) du composé <b>F7</b>	190
<b>V.13</b>	Données de la spectroscopie de RMN $^1\text{H}$ du composé <b>F7</b>	193
<b>V.14</b>	Données de la série spectrale UV-Visible ( $\lambda_{\text{max}}$ nm) du composé <b>F9</b>	195
<b>V.15</b>	Données de la spectroscopie de RMN $^1\text{H}$ du composé <b>F9</b>	198
	<b>Chapitre VI : Résultats et discussions, activités biologiques</b>	
<b>VI.1</b>	Limites de détection (LOD) de quelques éléments analysés par ICP-MS (ppb)	221

## Liste des Figures

N°	Titre	Page
	<b>Chapitre I : Familles Apiaceae et Frankeniaceae : Synthèse bibliographique</b>	
<b>I.1</b>	<i>Frankenia thymifolia</i>	9
<b>I.2</b>	<i>Frankenia pulverulenta</i>	9
<b>I.3</b>	<i>Frankenia laevis</i>	9
<b>I.4</b>	<i>Frankenia triandra</i>	10
<b>I.5</b>	Quelques structures de composés isolés du genre <i>Frankenia</i>	12
<b>I.5</b>	Quelques structures de composés isolés du genre <i>Frankenia</i> (suite)	13
<b>I.6</b>	Quelques structures de composés identifiés de l'espèce <i>Frankenia pulverulenta</i>	14
	<b>Chapitre II : Métabolites secondaires</b>	
<b>II.1</b>	Squelette des dérivés de l'acide benzoïque	18
<b>II.2</b>	Squelette des dérivés de l'acide cinnamique	18
<b>II.3</b>	Coumarine	18
<b>II.4</b>	Structures chimiques de quelques classes de coumarines	19
<b>II.5</b>	Noyau flavone	20
<b>II.6</b>	Éléments essentiels pour l'activité antioxydante	21
<b>II.7</b>	Polyacéthyléniques en C <sub>17</sub> isolés de l'espèce <i>Pituranthos tortuosus</i>	22
<b>II.8</b>	Structures de falcarinol et falcarindiol	23
	<b>Chapitre III : Étude des activités biologiques <i>in vitro</i></b>	
<b>III.1</b>	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH	29
	<b>Chapitre IV : Étude phytochimique des espèces : <i>Pituranthos battandieri</i> et <i>Frankenia thymifolia</i></b>	
<b>IV.1</b>	Photo de <i>Pituranthos battandieri</i> Maire ssp. <i>abbreviatus</i> Maire (Prise par Benayache Samir, Avril 2010)	35
<b>IV.2</b>	Les différents composés isolés de l'espèce <i>Pituranthos battandieri</i>	36
<b>IV.2</b>	Les différents composés isolés de l'espèce <i>Pituranthos battandieri</i> (suite)	37
<b>IV.2</b>	Les différents composés isolés de l'espèce <i>Pituranthos battandieri</i> (suite)	38
<b>IV.3</b>	Protocole d'extraction de <i>Pituranthos battandieri</i> Maire	40
<b>IV.4</b>	Profil chromatographique de l'extrait CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> dans le système hexane/AcOEt (5:5)	47
<b>IV.5</b>	Plaque CCM analytique de la fraction F4 dans le système hexane/EtOAc (7:3)	50
<b>IV.6</b>	Plaque CCM analytique des fractions F4A-F4D dans le système hexane/EtOAc (7:3)	51
<b>IV.7</b>	Plaque CCM analytique des fractions F4D-4 et F4D-0 dans le système CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (9,5:0,5)	51
<b>IV.8</b>	Plaque CCM analytique de F4D-4 et F4D-5 dans le système CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (9,5:0,5)	54
<b>IV.9</b>	Plaque CCM analytique du produit P1 dans le système CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (9,5:0,5)	55
<b>IV.10</b>	Plaque CCM analytique des sous-fractions F4D-5C, F4D5D, F4D-5E et F4D-5F dans le système CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (9,5:0,5)	55
<b>IV.11</b>	Plaque CCM analytique des sous-fractions F4D-5C, F4D-5D et F4D-5E dans le système CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (9,5:0,5)	56
<b>IV.12</b>	Purification de la fraction F4D-8 par un chromatotron	56
<b>IV.13</b>	Plaque CCM analytique des sous-fractions F4D-8A, F4D8B et F4D-8C dans le système CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /AcOEt (9,5:0,5)	58
<b>IV.14</b>	Plaque CCM analytique des produits P6 et P7 dans le système hexane/acétone (6:4)	59

<b>IV.15</b>	Plaque CCM analytique du mélange F4D-8C-1-M et le produit P1 dans le système CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /acétone (9,8:0,2)	61
<b>IV.16</b>	Schéma de séparation et purification bioguidées des produits isolés de l'extrait CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> des parties aériennes de l'espèce <i>P. battandieri</i> contre <i>T. cruzi</i>	62
<b>IV.17</b>	Schéma de séparation et purification bioguidées des produits isolés de l'extrait CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> des parties aériennes de l'espèce <i>P. battandieri</i> contre <i>L. amazonensis</i>	63
<b>IV.18</b>	Profil chromatographique de l'extrait éther de pétrole dans le système hexane/AcOEt (5:5)	64
<b>IV.19</b>	Profil chromatographique de la sous-fraction F3B dans le système hexane/AcOEt (5:5)	66
<b>IV.20</b>	Profil chromatographique de la sous-fraction F3B-6 dans le système hexane/AcOEt (9:1)	68
<b>IV.21</b>	Schéma de séparation et purification bioguidées des produits isolés de l'extrait éther de pétrole des racines de <i>P. battandieri</i> et CI <sub>50</sub> des sous-fractions et des produits contre <i>L. amazonensis</i>	70
<b>IV.22</b>	Schéma de séparation et purification bioguidées des produits isolés de l'extrait éther de pétrole des racines de <i>P. battandieri</i> et CI <sub>50</sub> des sous-fractions et des produits contre <i>T. cruzi</i>	71
<b>IV.23</b>	Appareil ICP/AES de L'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC),Strasbourg	76
<b>IV.24</b>	Schéma de l'appareillage d'un spectromètre ICP-AES	76
<b>IV.25</b>	Appareil ICP/MS de L'Institut IPHC, Strasbourg	77
<b>IV.26</b>	<i>Frankenia thymifolia</i> Desf. d'après Ozenda	80
<b>IV.27</b>	<i>Frankenia thymifolia</i> Desf.	80
<b>IV.28</b>	Protocole d'extraction de <i>Frankenia thymifolia</i>	82
<b>IV.29</b>	Profil chromatographique de l'extrait FT-E dans le système hexane/AcOEt (5:5)	86
<b>IV.30</b>	Plaque CCM analytique du produit F1 dans le système hexane/AcOEt (5:5)	88
<b>IV.31</b>	Plaque CCM analytique du produit F2 dans le système hexane/AcOEt (5:5)	88
<b>IV.32</b>	Plaque CCM analytique du produit F3 dans le système hexane/AcOEt (8:2)	88
<b>IV.33</b>	Schéma de séparation et purification des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de l'espèce <i>Frankenia thymifolia</i> Desf.	89
<b>IV.34</b>	Profil chromatographique de l'extrait FT-B dans le système CHCl <sub>3</sub> /MeOH (6:2)	90
<b>IV.35</b>	Plaque CCM analytique du produit F4 dans le système CHCl <sub>3</sub> /MeOH (7:3) (λ=254 nm)	92
<b>IV.36</b>	Plaque CCM analytique du produit F5 dans le système CHCl <sub>3</sub> /MeOH (9:1)	92
<b>IV.37</b>	Plaque CCM analytique du produit F6 dans le système AcOEt/MeOH (6:3)	93
<b>IV.38</b>	Plaque CCM analytique du produit F7 dans le système CHCl <sub>3</sub> /MeOH (9:1)	93

<b>IV.39</b>	Le produit F8 sur plaque CCM sous UV 365 nm dans le système CHCl <sub>3</sub> /Acétone (9:1)	94
<b>IV.40</b>	Le produit F9 sur plaque CCM sous UV 365 nm dans le système AcOEt/MeOH/H <sub>2</sub> O (8:1:1)	94
<b>IV.41</b>	Plaque CCM analytique du produit F10 dans le système CHCl <sub>3</sub> /MeOH (8:2)	95
<b>IV.42</b>	Plaque CCM analytique du produit F11 dans le système CHCl <sub>3</sub> /MeOH (8:2)	95
<b>IV.43</b>	Schéma de séparation et purification des composés isolés de l'extrait <i>n</i> -butanol des parties aériennes de l'espèce <i>Frankenia thymifolia</i> Desf.	96
<b>Chapitre V : Résultats et discussions (élucidation structurale)</b>		
<b>V.1</b>	Interactions HSQC (flèche bleue) et HMBC (flèche rouge) observées pour la molécule <b>P1</b>	103
<b>V.2</b>	Interactions HMBC observées pour la molécule <b>P1</b>	106
<b>V.3</b>	Entité présente dans le composé <b>P1</b>	107
<b>V.4</b>	Entité faisant partie du substituant du squelette furanocoumarine	108
<b>V.5</b>	Entité faisant partie du substituant du squelette furanocoumarine	110
<b>V.6</b>	Interactions COSY (flèche bleue) et HMBC (flèche rouge) observées pour la molécule <b>P1</b>	111
<b>V.7</b>	Structure finale du composé <b>P1</b> , 8-geranyloxyorsoralène	113
<b>V.8</b>	Corrélations COSY observées pour la molécule <b>P2</b>	116
<b>V.9</b>	Structure du composé <b>P2</b> , 8-géranyleoxy-5-méthoxyorsoralène	121
<b>V.10</b>	Corrélations COSY observées pour la molécule <b>P3</b>	124
<b>V.11</b>	Structure partielle 1 du composé <b>P3</b>	126
<b>V.12</b>	Structure du composé <b>P3</b> , phelloptérine	129
<b>V.13</b>	Corrélations HMBC observées pour la molécule <b>P4</b>	131
<b>V.14</b>	Corrélations HMBC observées pour la molécule <b>P4</b>	132
<b>V.15</b>	Structure partielle 1 du composé <b>P4</b>	132
<b>V.16</b>	Structure finale du composé <b>P4</b> , <i>trans-para</i> -coumarate d'éthyle	134
<b>V.17</b>	Structure partielle 1 du composé <b>P5</b>	135
<b>V.18</b>	Structure partielle 2 du composé <b>P5</b>	137
<b>V.19</b>	Structure partielle 3 du composé <b>P5</b>	138
<b>V.20</b>	Structure du composé <b>P5</b>	141
<b>V.21</b>	Structure finale du composé <b>P5</b>	141

V.22	Structure finale des composés <b>P4</b> et <b>P5</b>	142
V.23	Entité 1 faisant partie du composé <b>P6</b>	146
V.24	Entité 2 présente dans le composé <b>P6</b>	149
V.25	Entité 3 présente dans le composé <b>P6</b>	153
V.26	Structure plane du composé <b>P6</b>	154
V.27	Structure finale du composé <b>P6</b> , (-)-(3R, 10S)-panaxydiol	158
V.28	Structure plane du composé <b>P7</b>	161
V.29	Structure finale du composé <b>P7</b> , (-)-(3R, 8R)-falcarindiol	161
V.30	Structure finale du composé <b>F1</b> , naringénine	169
V.31	Structure finale du composé <b>F2</b> , quercétine	173
V.32	Structure partielle du composé <b>F4</b>	178
V.33	Structure finale du composé <b>F4</b>	179
V.34	Structure finale du composé <b>F4</b> , gallate de méthyle 3,4-diméthyl ether	182
V.35	Le composé <b>F6</b> sur papier Wattman III sous UV (365 nm)	184
V.36	Structure finale du composé <b>F6</b> , quercétine 3- <i>O</i> -méthyl éther	186
V.37	Le composé <b>F7</b> sur papier wattman sous radiation UV	187
V.38	Structure partielle du composé <b>F7</b>	188
V.39	Co-chromatographie avec des sucres témoins de la partie osidique obtenue après hydrolyse acide	192
V.40	Structure finale du composé <b>F7</b> , 3'- <i>O</i> -galactopyranosyl quercétine.	192
V.41	Structure partielle du composé <b>F9</b>	195
V.42	Co-chromatographie avec des sucres témoins de la partie osidique obtenue après hydrolyse acide	197
V.43	Structure finale du composé <b>F9</b> , 4'- <i>O</i> -glucopyranosyl quercétine	198
<b>Chapitre VI : Résultats et discussions, activités biologiques</b>		
VI.1	Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de <i>P. battandieri</i> .	201
VI.2	Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de <i>F. thymifolia</i>	202
VI.3	Activité de piégeage du radical DPPH par des extraits de <i>P. battandieri</i> , de BHA, de BHT et du l' $\alpha$ -tocophérol.	203
VI.4	Les valeurs des IC <sub>50</sub> des extraits de <i>P. battandieri</i> et des standards BHA, BHT et l' $\alpha$ -tocophérol (Test du DPPH•)	204
VI.5	Activité de piégeage du radical-cation ABTS par des extraits de <i>P. battandieri</i> , de BHA, BHT	205



<b>VI.6</b>	Les valeurs des IC <sub>50</sub> des extraits de <i>P. battandieri</i> et de standards (BHA et BHT) (Test du radical-cation ABTS)	206
<b>VI.7</b>	Activité de piégeage du superoxyde (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ) par des extraits de <i>P. battandieri</i> , de l'acide ascorbique et de l'α-tocophérol.	207
<b>VI.8</b>	Les valeurs des IC <sub>50</sub> des extraits de <i>P. battandieri</i> et des standards (acide ascorbique, α-tocophérol) (Test du radical-anion superoxyde)	207
<b>VI.9</b>	La cinétique de blanchiment du β-carotène des extraits de <i>P. battandieri</i> et standard BHA en fonction du temps	208
<b>VI.10</b>	Activité antioxydante relative des extraits EPR, BPR et du BHT dans le système acide linoléique/β-carotène.	209
<b>VI.11</b>	Les valeurs des A <sub>0,5</sub> des extraits de <i>P. battandieri</i> et des standards l'acide ascorbique, l'acide tannique et l'α-tocophérol (Test du FRAP)	210
<b>VI.12</b>	Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) par des extraits de <i>P. battandieri</i> , et des standards (BHA, BHT).	211
<b>VI.13</b>	Les valeurs des A <sub>0,5</sub> des extraits de <i>P. battandieri</i> et des standards (BHA et BHT) (Test du CUPRAC)	211
<b>VI.14</b>	Activité de piégeage du radical DPPH par des extraits de <i>F. thymifolia</i> , des composés isolés (F1, F2 et F6) et de BHA, BHT et de l'α-tocophérol	213
<b>VI.15</b>	Les valeurs des IC <sub>50</sub> des extraits de <i>F. thymifolia</i> et de standards BHA, BHT et l'α-tocophérol (Test du DPPH•)	214
<b>VI.16</b>	Activité de piégeage du radical-cation ABTS par des extraits de <i>F. thymifolia</i> , des composés isolés (F1, F2 et F6) et des standards.	216
<b>VI.17</b>	Les valeurs des IC <sub>50</sub> des extraits de <i>F. thymifolia</i> et de standards BHA, BHT (Test du ABTS <sup>•+</sup> )	217
<b>VI.18</b>	La cinétique de blanchiment du β-carotène des extraits de <i>F. thymifolia</i> et le standard BHA en fonction du temps	218
<b>VI.19</b>	Activité antioxydante relative des extraits FT-E, FT-B et FT-C et du BHT dans le système acide linoléique/β-carotène	218
<b>VI.20</b>	Activité de piégeage du radical superoxyde produit par DMSO alcalin par des extraits de <i>F. thymifolia</i> , de l'acide ascorbique et de l'α-tocophérol.	219
<b>VI.21</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des extraits de <i>F. thymifolia</i> et de standards (acide ascorbique, α-tocophérol) [Test du superoxyde (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> )]	220
<b>VI.22</b>	Effet Chélateur des extraits FT-B et FT-E de <i>F. thymifolia</i> , et de l'EDTA	221
<b>VI.23</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des extraits de <i>F. thymifolia</i> et de standard (EDTA) Chaque valeur représente une moyenne ± SD (n = 3), P < 0,05	221
<b>VI.24</b>	Test de réduction du cuivre (CUPRAC) par des extraits de <i>F. thymifolia</i> , des composés isolés (F1, F2 et F6) et des standards (BHA, BHT).	222
<b>VI.25</b>	Les valeurs des A <sub>0,5</sub> des extraits de <i>F. thymifolia</i> et de standards (BHA, BHT et l'α-tocophérol) (Test du CUPRAC)	223
<b>VI.26</b>	Test de réduction du Fer (le pouvoir réducteur) des extraits de <i>F. thymifolia</i> et des standards (BHA, l'acide ascorbique).	224
<b>VI.27</b>	Les valeurs des A <sub>0,5</sub> des extraits de <i>F. thymifolia</i> et de standards l'acide ascorbique, BHA et l'α-tocophérol (le pouvoir réducteur)	224
<b>VI.28</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des extraits de <i>P. battandieri</i> et de standard Chlorhexidine contre <i>A. castellanii</i>	227
<b>VI.29</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des extraits de <i>P. battandieri</i> et de standard Pentamidine contre <i>L. donovani</i>	227
<b>VI.30</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des extraits de <i>P. battandieri</i> et de standard Miltefosine contre <i>L. amazonensis</i>	227
<b>VI.31</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des extraits de <i>P. battandieri</i> et de standard Benznidazole contre <i>T. cruzi</i>	227

<b>VI.32</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des fractions, sous fractions de l'extrait DP et de standard Miltefosine contre <i>L. amazonensis</i>	229
<b>VI.33</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des sous fractions et des composés isolés de l'extrait DP et de standard Miltefosine contre <i>L. amazonensis</i>	230
<b>VI.34</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des fractions et sous fractions l'extrait EPR et de standard Miltefosine contre <i>L. amazonensis</i>	231
<b>VI.35</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des sous fractions et des composés isolés de l'extrait EPR et de standard Miltefosine contre <i>L. amazonensis</i>	232
<b>VI.36</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des fractions et sous fractions l'extrait DP et de standard Benznidazole contre <i>T. cruzi</i>	233
<b>VI.37</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des sous fractions et composés isolés de l'extrait DP et de standard Benznidazole contre <i>T. cruzi</i>	234
<b>VI.38</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des fractions et sous fractions de l'extrait EPR et de standard Benznidazole contre <i>T. cruzi</i>	235
<b>VI.39</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des sous fractions et composés isolés de l'extrait EPR et de standard Benznidazole contre <i>T. cruzi</i>	237
<b>VI.40</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des extraits de <i>F. thymifolia</i> et de standard Chlorhexidine contre <i>A. castellanii</i>	238
<b>VI.41</b>	Les valeurs des CI <sub>50</sub> des extraits de <i>F. thymifolia</i> et de standard Miltefosine contre <i>L. amazonensis</i>	239
<b>VI.42</b>	L'effet cytotoxique des produits isolés de <i>P. battandieri</i> sur des macrophages J 774	240
<b>VI.43</b>	Les valeurs des LC <sub>50</sub> des composés isolés de <i>P. battandieri</i> et des standards Miltefosine et Benznidazole sur des macrophages J 774	241
<b>VI.44</b>	Les valeurs des CC <sub>50</sub> des composés isolés de <i>P. battandieri</i> et des standards Miltefosine et Benznidazole sur des macrophages J 774	241
<b>VI.45</b>	Les valeurs des SI-L <sup>(*)</sup> des composés isolés de <i>P. battandieri</i> et du standard Miltefosine <sup>(*)</sup> SI-L: L'indice de sélectivité (LC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> ) pour <i>L. amazonensis</i>	242
<b>VI.46</b>	Les valeurs des SI-T <sup>(*)</sup> des composés Isolés de <i>P. battandieri</i> et du standard Benznidazole <sup>(*)</sup> SI-T: L'indice de sélectivité (LC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> ) pour <i>T. cruzi</i>	242
<b>VI.47</b>	Boîtes de Pétri des quatre souches bactériennes utilisées, avant incubation	243
<b>VI.48</b>	Boîtes de Pétri des quatre souches bactériennes utilisées, après incubation	243
<b>VI.49</b>	les valeurs des diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'extrait FT-B contre 4 souches bactériennes	243
<b>VI.50</b>	les valeurs des diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'extrait FT-E contre 4 souches bactériennes	244
<b>VI.51</b>	les valeurs des diamètres des zones d'inhibition (mm) de gentamicine contre 4 souches bactériennes	244
<b>VI.52</b>	Concentration des éléments majeurs par ICP-MS dans l'extrait BPR (mg/kg)	245
<b>VI.53</b>	Concentration des éléments mineurs par ICP-MS dans l'extrait BPR (mg/kg)	245

## Liste des abréviations

### Solvants et réactifs

<b>AcOEt</b>	Acétate d'éthyle
<b>AcONa</b>	Acétate de sodium
<b>AlCl<sub>3</sub></b>	Trichlorure d'aluminium
<b>BuOH</b>	Butanol
<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	Méthanol deutéré
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Chloroforme deutéré
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Chloroforme
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Dichlorométhane
<b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b>	Diméthylsulfoxyde deutéré
<b>EtOH</b>	Éthanol
<b>MeOH</b>	Méthanol
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre</b>	Sulfate de sodium anhydre

### Classification botanique et techniques chromatographiques

<b>NCBI</b>	Le centre américain de l'information biotechnologique
<b>CC</b>	Chromatographie sur couche
<b>CCM</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>Si 60</b>	Silice normale

### Déterminations structurales

<b>RMN</b>	Résonance Magnétique Nucléaire
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Résonance Magnétique Nucléaire du carbone 13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Résonance Magnétique Nucléaire du proton
<b>DEPT</b>	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
<b>COSY</b>	Correlated Spectroscopy
<b>HMBC</b>	Heteronuclear multiple bonding connectivity
<b>HSQC</b>	Heteronuclear single bonding connectivity
<b>δ<sub>C</sub> (ppm)</b>	Déplacement chimique du carbone en ppm
<b>δ<sub>H</sub> (ppm)</b>	Déplacement chimique du proton en ppm
<b><i>J</i> (Hz)</b>	Constante de couplage exprimé en hertz
<b>λ<sub>max</sub> (nm)</b>	Longueur d'onde maximale
<b>μg</b>	Micro-gramme
<b>UV</b>	Ultra-Violet
<b>Glc</b>	Glucose
<b>Gla</b>	Galactose

### Activités biologiques

<b>DP</b>	Extrait dichlorométhane de <i>Pituranthos battandieri</i>
<b>AP</b>	Extrait acétate d'éthyle de <i>Pituranthos battandieri</i>
<b>HP</b>	Extrait hexane de <i>Pituranthos battandieri</i>
<b>BPA</b>	Extrait <i>n</i> -butanol de <i>Pituranthos battandieri</i>

## *Liste des abréviations*

<b>EPR</b>	Extrait éther de pétrole de <i>Pituranthos battandieri</i> (des racines)
<b>BPR</b>	Extrait <i>n</i> -butanol de <i>Pituranthos battandieri</i> (des racines)
<b>FT-C</b>	Extrait chloroforme de <i>Frankenia thymifolia</i>
<b>FT-E</b>	Extrait acétate d'éthyle de <i>Frankenia thymifolia</i>
<b>FT-B</b>	Extrait <i>n</i> -butanol de <i>Frankenia thymifolia</i>
<b>DPPH•</b>	Radical 1,1-Diphényl-2-PicrylHydrazyl
<b>BHA</b>	Butyl Hydroxy Anisole
<b>BHT</b>	Butyl Hydroxy Toluene
<b>CUPRAC</b>	Cupric reducing antioxidant capacity
<b>NBT</b>	Nitro-bleu de tétrazolium
<b>FRAP</b>	Ferric reducing ability of plasma
<b>ABTS<sup>+</sup></b>	Sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3 ethylbenzothiazoline-6-sulfonique
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentration inhibitrice à 50%
<b>I%</b>	Pourcentage d'inhibition
<b>EDTA</b>	Acide éthylènediaminetétraacétique (Ethylenediaminetetraacetic acid)
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>µg EQ/mg d'extrait</b>	Microgramme d'équivalent quercétine par milligramme d'extrait
<b>µg EAG/mg d'extrait</b>	Microgramme d'équivalent d'acide gallique par milligramme d'extrait

### Dosage des éléments inorganiques

<b>ICP-AES</b>	Spectrométrie d'émission Atomique couplée à un Plasma Induit (Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry)
<b>ICP-MS</b>	La spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

# *Introduction générale*

### Introduction générale

Depuis toujours, et partout sur le globe, l'Homme a su s'adapter à son environnement pour se nourrir, s'habiller, se protéger et se soigner. Vu ce que la nature lui offrait, il apparaît clairement que les sources animale et végétale ont été largement exploitées. Ainsi la consommation des plantes par l'Homme, comme nous pouvons l'imaginer, a dû suivre un processus étroitement lié à son évolution et à son développement. En effet, si l'Homme a certainement commencé à utiliser les plantes comme nourriture et autres besoins de base, il est arrivé après beaucoup de temps et de patience à en sortir ce l'on appelle molécules. Entre ces deux phases se placeraient la connaissance, l'utilisation thérapeutique des plantes et la collection des plantes médicinales. Même de nos jours, la majorité des populations ont recours à des plantes médicinales pour se soigner, soit par manque d'accès aux médicaments prescrits par la médecine moderne, soit parce que ces plantes ont souvent une réelle efficacité. La recherche de molécules nouvelles demeure étroitement liée aux plantes, car la plupart des molécules bioactives ont des structures très élaborées et très complexes que seule la nature peut « imaginer ». C'est cette complexité structurale qui fait que l'isolement et la détermination de biomolécules sont devenus une priorité des domaines de la chimie, de la médecine et de la pharmacie. En effet, même si, certaines de ces biomolécules ne sont pas actives à l'état natif, elles peuvent subir des transformations structurales ou servir de modèles pour la conception de nouveaux médicaments.

L'Algérie est connue pour ses ressources naturelles. Elle dispose d'une flore extrêmement riche et variée. Une évaluation actualisée (Dobignard et Chatelain, 2010), reporte environ 4450 taxons, dont 3950 d'espèces indigènes et 6,5 % endémiques. Ce potentiel de plantes médicinales comporte des milliers d'espèces présentant divers intérêts, et est toujours peu exploré du point de vue chimique et pharmacologique.

Dans ce cadre et dans la continuité du programme de recherche de notre unité sur les plantes sahariennes algériennes, ce travail a pour objectif la recherche et la détermination structurale de nouvelles molécules à activité biologique potentielle.

Ainsi deux plantes sahariennes, l'une appartenant à la famille Apiaceae et l'autre à la famille Frankeniaceae ont été sélectionnées en vue d'étudier leur composition chimique et leurs activités biologiques.

La sélection de ces deux espèces est basée d'une part sur l'endémisme et d'autre part sur le fait qu'elles n'ont pas fait l'objet d'investigations phytochimiques approfondies.

Nos travaux consistent en l'extraction, l'isolement bioguidé, l'identification structurale et les tests de toxicité sur les cellules macrophages des métabolites secondaires antiparasitaires de l'espèce

*Pituranthos battandieri* Maire (Apiaceae), ainsi que l'évaluation de ses activités, antioxydante et antibactérienne.

Ils consistent également en l'investigation phytochimique d'extraits de *Frankenia thymifolia* Desf., l'évaluation des leurs activités biologiques ainsi que celles des métabolites secondaires isolés et purifiés.

Les principales parties de notre travail constituant six chapitres, sont reportées comme suit :

❖ **Le premier chapitre** est consacré à une synthèse bibliographique sur les deux familles Apiaceae et Frankeniaceae, ainsi que les deux genres *Pituranthos* et *Frankenia* et des résultats d'investigations phytochimiques antérieures reportant leurs métabolites secondaires les plus courants.

❖ **Le deuxième chapitre** décrit les principales familles de métabolites secondaires isolés des plantes des familles Apiaceae et Frankeniaceae. On distingue en particulier les composés phénoliques, les coumarines et les composés polyacéthyléniques.

❖ Nous consacrons **le troisième chapitre** à l'étude des activités biologiques (antiparasitaire – cytotoxique - antioxydante et antibactérienne) avec la description des matériels et méthodes.

❖ **Le quatrième chapitre** comprend l'étude phytochimique des deux espèces sélectionnées dans notre programme *Pituranthos battandieri* (Apiaceae) et *Frankenia thymifolia* (Frankeniaceae). Cette étude porte sur l'évaluation bioguidée de l'activité antiparasitaire des extraits, des fractions et des produits isolés de l'espèce *P. battandieri*, l'évaluation de l'activité antioxydante par plusieurs méthodes des extraits des deux plantes, l'évaluation des teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux et les activités antimicrobienne et antiparasitaire des extraits de *F. thymifolia* ainsi que les tests de toxicité contre les macrophages J 774 des molécules antiparasitaires isolées de *P. battandieri*.

❖ **Le cinquième chapitre** reporte les résultats obtenus suivis de discussions, notamment la détermination structurale des métabolites secondaires isolés à partir de ces deux espèces, à savoir : des coumarines, des composés polyacéthyléniques, des flavonoïdes, des acides phénoliques, et autres. Les études d'analyse structurale ont été réalisées en utilisant diverses expériences de résonance magnétique nucléaire ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HSQC, HMBC, GOESY) et de la spectrométrie de masse à haute résolution.

❖ **Le sixième chapitre** renferme les résultats et les discussions relatives à l'évaluation des activités antiparasitaire cytotoxique et antioxydante des extraits, des fractions et de quelques produits isolés.

Nous finissons par une conclusion générale à travers laquelle nous essayons de faire le point sur les principaux résultats obtenus ainsi que les perspectives que ce travail a permis d'entrevoir.

# ***PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE***

## ***Chapitre I :***

### ***Familles Apiaceae et Frankeniaceae : Synthèse bibliographique***



## I.1. Introduction

La flore algérienne estimée à plusieurs milliers d'espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, est caractérisée par sa diversité florale en raison de son biotope très varié constitué de régions méditerranéennes et sahariennes. Parmi ces familles, les Apiaceae et les Frankeniaceae qui renferment un grand nombre d'espèces médicinales et aromatiques. Les espèces de ces deux familles sont réputées pour accumuler des métabolites secondaires bioactifs. C'est surtout cette caractéristique qui justifie notre choix quant à la sélection des deux espèces *Pituranthos battandieri* Maire (Apiaceae) et *Frankenia thymifolia* Desf. (Frankeniaceae) pour rechercher des molécules nouvelles susceptibles de présenter des activités biologiques intéressantes à développer.

## I.2. La famille Apiaceae

### I.2.1. Introduction

La famille Apiaceae, est une famille de plantes dicotylédones relativement homogène, caractérisée notamment par son inflorescence typique, l'ombelle. Cette famille a été également jusqu'à il y a quelques années très fréquemment décrite sous le nom d'Ombellifères, en relation avec la structure en ombelles des inflorescences. C'est une famille vaste de 2500 à 3000 espèces, se répartissant dans toutes les régions tempérées et surtout dans l'hémisphère Nord (Sayed-Ahmad et al., 2017). Elle occupe une place importante dans la flore algérienne où elle est représentée par 56 genres, 130 espèces (dont 24 endémiques) et 26 sous espèces (Quezel et Santa, 1963). L'espèce la plus réputée du point de vue économique et alimentaire reste la carotte.

### I.2.2. Classification botanique

Selon la classification de Cronquist réalisée en 1981 (Tableau I.1), cette famille est située dans l'ordre des Apiales (Cronquist, 1981).

**Tableau I.1:** Classification botanique de la famille des Apiaceae

Classification	
Règne	Plantae
Sous- règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Apiales
Famille	Apiaceae (L.)

### I.3.2. Activités biologiques

Les Apiaceae comportent de nombreuses plantes alimentaires et aromatiques (Spichiger et al., 2004) comme *Anethum graveolens* L. (l'aneth), *Apium graveolens* L. (le céleri), *Carum carvi* L. (le carvi), *Coriandrum sativum* (le coriandre), *Cuminum cyminum* (le cumin), *Daucus carota* (la carotte), *Foeniculum vulgare* (le fenouil), *Pastinaca sativa* L. (le panais), *Petroselinum crispum* (le persil) et *Pimpinella anisum* L. (l'anis). En effet, la médecine traditionnelle reconnaît à plusieurs espèces de la famille Apiaceae des vertus thérapeutiques certaines, et la plupart des Apiaceae utilisées comme condiments sont également réputées pour leurs nombreuses propriétés médicinales (Sayed-Ahmad et al., 2017). Les plus importantes sont :

- *Pimpinella anisum* (l'anis vert), relaxant et utilisé dans les troubles digestifs (Tirapelli et al., 2007).
- *Petroselinum sativum* (persil) possède des propriétés carminatives et stomachiques. Elle est également diurétique. En usage externe, les feuilles sont utilisées pour calmer les piqûres d'insectes, les irritations cutanées, les contusions et les ecchymoses (Debuigne et Couplan, 2006).
- *Coriandrum sativum* (coriandre), très efficace dans les affections gastro-intestinales (Abdelhalim et al., 2017).
- *Angelica archangelica* (l'angélique officinale) antispasmodique (Goetz, 2017).
- *Foeniculum vulgare* (fenouil) en plus de ses propriétés diurétiques et carminatives, possède des activités antioxydantes, anti-inflammatoires et anticancéreuses (Badgujar et al., 2014; Syed et al., 2018).
- *Angelica* : l'huile essentielle de différentes espèces du genre *Angelica* est utilisée pour le traitement des plusieurs maladies dont le paludisme, les maladies gynécologiques, la fièvre, l'anémie et l'arthrite (Sowndhararajan et al., 2017).

### I.4. le genre *Pituranthos*

#### I.4.1. Description botanique du genre *Pituranthos*

Le genre *Pituranthos* renferme plus de 20 espèces, dont certaines sont spécifiques à l'Afrique du Nord, et sont souvent rencontrées dans les régions arides ou désertiques (Kaabeche, 1990; Quezel et Santa, 1963).

Quezel a décrit le genre *Pituranthos* comme une plante vivace, totalement aphyllé, à tiges très ramifiées, portant des ombelles à involucre et involucelles polyphylles et des péricarpes ovoïdes à 6 bandelettes.

Le potentiel floristique algérien de ce genre nommé « Guezzah », est constitué de quatre espèces: *P. reboudii*, *P. chloranthus*, *P. scoparius* et *P. battandieri*.

- ***Pituranthos reboudii*** (Coss. et Dur.) Benth. et Hook. (Synonyme: *Deverra reboudii* Coss. et Dur.) : Tiges longues de 10-20 cm. Souche ligneuse ramifiée émettant de nombreuses rosettes de feuilles 1-2 fois triséquées, longues de 1-3 cm. Feuilles caulinaires supérieures linéaires. Ombelles terminales et latérales courtement pédonculées, larges de 2-3 cm à 2-7 rayons, se localise dans les pâturages arides (Quezel et Santa, 1963).
- ***Pituranthos chloranthus*** (Coss. et Dur.) Benth. et Hook.  
Ozenda a décrit l'espèce *Pituranthos chloranthus* (Coss. et Dur.) comme une plante dont les tiges sont ramifiées dès la base, plus ou moins dichotomes et portant des ombelles longuement pédonculées; pétales verdâtres à nervures dorsales pubescentes et larges, fruits poilus (Ozenda, 2004).
- ***Pituranthos scoparius*** (Coss. et Dur.) Benth. et Hook.  
L'espèce *Pituranthos scoparius* selon (Quezel et Santa, 1963), est une plante dont les tiges sont rameuses et jonciformes. Elles sont simples dans leur moitié inférieure et deviennent sous forme de touffes dressées et non ramifiées à la partie supérieure. Les feuilles sont réduites à des écailles. Les fleurs de couleur blanche sont réunies en ombelles latérales courtement pédonculées de 1 à 3 cm. Les fruits sont plus longs que larges et sont recouverts de poils dressés. Cette espèce, est endémique d'Afrique du Nord et est très répandue en Algérie, surtout dans le Sahara septentrional. *P. scoparius* appelé aussi localement « Guezzah », est largement utilisé en médecine traditionnelle en Algérie et en Tunisie (Haba, 2002).

### I.4.2. Activités biologiques du genre *Pituranthos*

Le genre *Pituranthos* est très utilisé en pharmacopée traditionnelle dans différentes régions d'Afrique du Nord (Algérie, Tunisie et Maroc). Les propriétés pharmacologiques de certaines de ses espèces ont été validées par les tests appropriés.

En Afrique du Nord et Moyen Orient, les espèces *P. scoparius*, *P. chloranthus*, *P. triradiatus* et *P. tortuosus*, sont utilisées contre le diabète, la fièvre, les infections urinaires, les douleurs d'estomac, les parasites intestinaux et comme agent régulateur de la menstruation chez les femmes (Ashkenazy et al., 1983; Bellakhdar, 1997; Hammiche et Maiza, 2006).

*P. scoparius* est aussi utilisée dans le traitement de l'asthme, de l'hépatite et pour soulager les douleurs liées aux rhumatismes (Boudjelal et al., 2013).

### I.4.3. Investigations phytochimiques du genre *Pituranthos*

Les plantes du genre *Pituranthos* ont fait l'objet de nombreuses études phytochimiques et biologiques. Ces investigations phytochimiques ont permis l'isolement et l'identification d'un nombre important de métabolites secondaires qui sont essentiellement, des flavonoïdes (Abdel-Nasser et al., 1998; Touil et al., 2006), coumarines (Halim et al., 1995), isocoumarines (Haba et al., 2004), furanocoumarins (Abdel-Kader, 2003; Ashkenazy et al., 1983; Esseid et al., 2017), composés polyacéthyléniques et acides gras (Chen et al., 2015; Schulte et Pötter, 1977). Ces investigations ont montré que les espèces de ce genre possèdent des effets antioxydants, antiprolifératives, cytotoxiques, antifongiques et antimutagènes (Abdelwahed et al., 2008; Adida et al., 2016; Krifa et al., 2011). Les espèces de ce genre sont également connues pour leur richesse en huiles essentielles possédant des activités biologiques importantes à savoir : antioxydante, antimicrobienne, antifongique, antigénotoxique, cytotoxique (Abdallah et Ezzat, 2014; Neffati et al., 2008; Neffati et al., 2009; Yangui et al., 2008).

## I.5. La famille Frankeniaceae

### I.5.1. Introduction

La famille Frankeniaceae est une famille de plantes dicotylédones qui comprend de 10 à 90 espèces réparties en 1 à 4 genres (Gundersen, 1927; Torres Carro et al., 2016). Selon le centre américain pour les informations biotechnologiques (National Center for Biotechnology Information, NCBI), cette famille présente quatre genres incluant, *Frankenia*, *Hypericopsis*, *Anthobryum*, *Niederleinia*. Ce sont des plantes herbacées vivaces, rarement annuelles, et des arbustes ou sous-arbrisseaux persistants. Ce

sont des végétaux halophytes, et l'on trouve à leur surface de nombreuses glandes excrétrices de sel. Les feuilles sont décussées ou verticillées par quatre, simples, entières et exstipulées. Le limbe présente souvent des marges révolutes, ce qui est une adaptation à la sécheresse (Kubitzki, 2003; Quezel et Santa, 1963).

### I.5.2. Classification botanique

Selon la classification de Cronquist réalisée en 1981 (Tableau I.2 ), cette famille est située dans l'ordre des violales (Cronquist, 1981).

**Tableau I.2.** Classification botanique de la famille Frankeniaceae

Classification	
Règne	Plantae
Sous- règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Dilleniidae
Ordre	Violales
Famille	Frankeniaceae

### I.5.3. Activités Biologiques

Une étude bibliographique sur les plantes de la famille Frankeniaceae, reporte que cette dernière a été très peu étudiée phytochimiquement. Ce manque d'engouement à l'investigation phytochimique de ces plantes est probablement lié à leur exploitation limitée en médecine traditionnelle. En effet, la littérature montre que ces trois genres : *Hypericopsis*, *Anthobryum* et *Niederleinia* qui appartient à la famille Frankeniaceae, ne sont pas exploités en médecine populaire.

## I.6. Le genre *Frankenia*

### I.6.1. Description botanique du genre *Frankenia*

Le genre *Frankenia* représente presque tout seul toute la famille Frankeniaceae. Ce genre comporte une soixante-dizaine d'espèces (Govaerts, 2001; "The Plant List-*Frankenia*-" 2013), dont douze sont

présentées en Afrique du Nord parmi lesquelles cinq au Sahara (Govaerts, 2001). Ce sont généralement des plantes de sols salins (Quezel et Santa, 1963).

Le genre *Frankenia* est composé de plantes vivaces herbacées ou sous-arbrisseaux possédant des feuilles opposées sans stipules et soudées à la base, souvent éricoïdes, pourvues de bourgeons feuillés à leur aisselle. Elles constituent des fleurs roses ou violacées contenant des calices de 4 à 5 pièces soudées, une corolle de 4 à 5 pièces libres, des pétales de longueurs ligulées et de 4 à 5 étamines. L'ovaire est généralement supère et l'uniloculaire est à graines nombreuses de style allongé. Le fruit est une capsule incluse dans le calice (Ozenda, 2004). Ce sont des plantes communes des terrains salés des Hauts-Plateaux et du Sahara septentrional (Megdiche Ksouri et al., 2011). En raison de leur extrême variabilité, la détermination des espèces s'avère toujours délicate.

Selon NCBI, parmi les espèces que comprend le genre *Frankenia*, on peut citer : *F. thymifolia* (Figure I.1), *F. pulverulenta* (Figure I.2), *F. laevis* (Figure I.3), *F. triandra* (Figure I.4), *F. hirsuta*., *F. Florida*, *F. pallida* et *F. corymbosa*.



**Figure I.1:** *Frankenia thymifolia*



**Figure I.2:** *Frankenia pulverulenta*



**Figure I.3:** *Frankenia laevis*



**Figure I.4:** *Frankenia triandra*

### **I.6.2. Activités Biologiques**

Les études bibliographiques menées sur les espèces de ce genre ont montré que seules trois espèces sont signalées comme plantes médicinales dans la littérature, notamment *F. pulverulenta* utilisée en Arabie Saoudite pour ses propriétés analgésiques et carminatives (Youssef, 2013) et en Tunisie pour ces propriétés antivirales contre le virus de l'herpès (*Herpes simplex* type 1) (Ben Sassi et al., 2008), et ses propriétés neuroprotectrices dans les cellules PC 12 (Ben Mansour et al., 2016). En Amérique du sud, *Frankenia triandra* est utilisée dans la médecine populaire comme agent antiseptique

D'après une étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées en Maroc, les feuilles de *F. corymbosa* sont utilisées dans le traitement de la cystite chez la femme (Ghourri et al., 2014). Par contre, en Algérie, les espèces de ce genre ont une exploitation très limitée en médecine traditionnelle.

### **I.6.2. Investigations phytochimiques du genre *Frankenia***

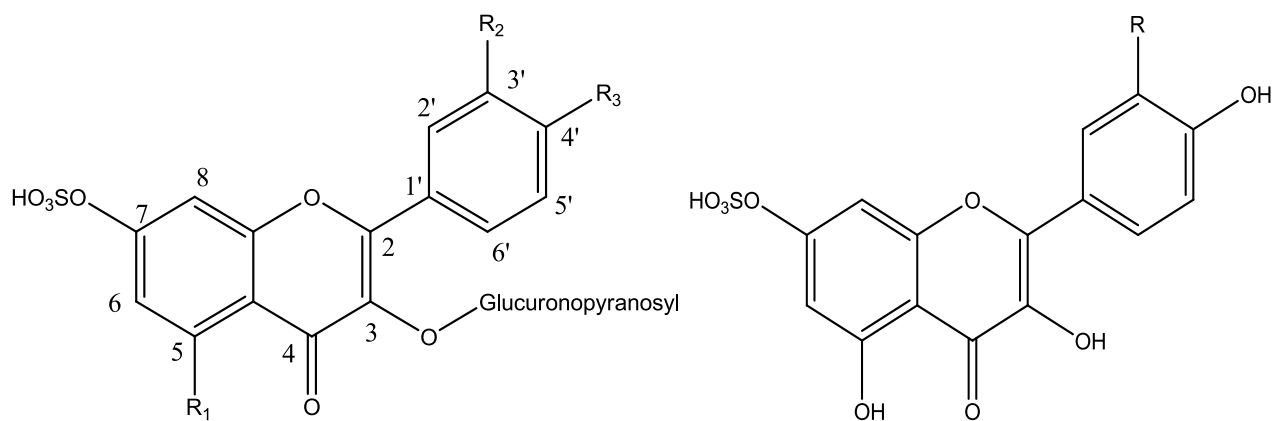
Peu d'études phytochimiques ont été effectuées sur ce genre, les investigations phytochimiques réalisées ont concerné seulement les trois espèces *F. pulverulenta* (parties aériennes et souterraines), *F. laevis* (parties aériennes et souterraines) et *F. thymifolia* (parties souterraines). Ces études ont montré la présence de flavonoïdes, de coumarines et de composés phénoliques (sulfatés et non sulfatés).

Le tableau **I.3** et la figure **I.5** reportent des composés isolés de ce genre.

Tableau I.3 : Quelques composés isolés du genre *Frankenia*

Composés	Espèces	Références
3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-O-β-D-glucuronopyranoside-7-O-sulfate ( <b>I.1</b> )	<i>F. pulverulenta</i>	(Harborne, 1975)
3,4',5,7-tétrahydroxyflavone-3-O-β-D-glucuronopyranoside-7-O-sulfate ( <b>I.2</b> )	<i>F. pulverulenta</i>	(Harborne, 1975)
3,4',5,7-tétrahydroxy-3'-méthoxyflavone, 3-O-β-D-glucuronopyranoside-7-O-sulfate ( <b>I.3</b> )	<i>F. pulverulenta</i>	(Harborne, 1975)
3,4',5,7-tétrahydroxyflavone-7-O-sulfate ( <b>I.4</b> )	<i>F. pulverulenta</i>	(Harborne, 1975)
3,4',5,7-tétrahydroxyflavone-3'-méthoxy-7-O-sulfate ( <b>I.5</b> )	<i>F. pulverulenta</i>	(Harborne, 1975)
Acide ellagique 3-méthoxy-2-O-sulfate ( <b>I.6</b> )	<i>F. laevis</i>	(Hussein, 2004)
Acide ellagique 3-méthoxy-7-O-sulfate ( <b>I.7</b> )	<i>F. laevis</i>	(Hussein, 2004)
Acide ellagique 3,8-diméthoxy-2-O-sulfate ( <b>I.8</b> )	<i>F. laevis</i>	(Hussein, 2004)
3,4',5,7-tétrahydroxyflavone-3,7-di-O-sulfate ( <b>I.9</b> )	<i>F. laevis</i>	(Hussein, 2004)
8-Chloro-4-méthoxy-2,6-dihydroxyacétophénone-2-O-sulfate de sodium ( <b>I.10</b> )	<i>F. laevis</i>	(Hussein, 2004)
Acide 4,5-dihydroxy-3-méthoxybenzoïque-5-O-sulfate de sodium ( <b>I.11</b> )	<i>F. laevis</i>	(Hussein, 2004)
Pinoresinol 4-sulfate ( <b>I.12</b> )	<i>F. thymifolia</i>	(Harkat et al., 2007)
1,2,3,4,5,7-hexaméthoxynaphthalène ( <b>I.13</b> )	<i>F. thymifolia</i>	(Harkat et al., 2007)
3,4-diméthoxy-5-hydroxybenzoate de méthyle ( <b>I.14</b> )	<i>F. thymifolia</i>	(Harkat et al., 2007)
Xanthotoxine ( <b>I.15</b> )	<i>F. thymifolia</i>	(Harkat, 2008)





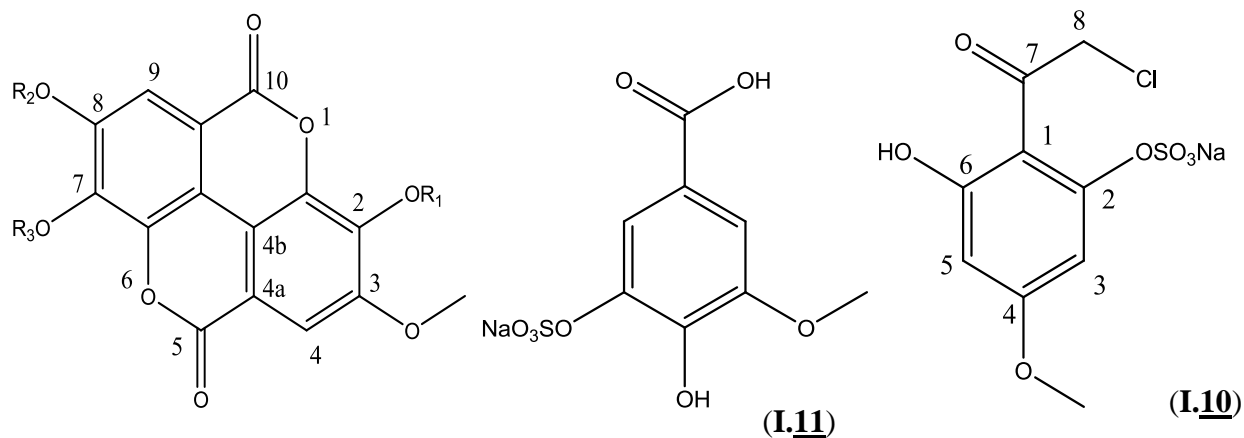
(I.1) :  $R_1 = R_2 = R_3 = OH$

(I.4) :  $R = H$

(I.2) :  $R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$

(I.5) :  $R = OMe$

(I.3) :  $R_1 = R_3 = OH, R_2 = OMe$



(I.6) :  $R_1 = SO_3H, R_2 = R_3 = H$

(I.7) :  $R_1 = H, R_2 = Me, R_3 = SO_3H$

(I.8) :  $R_1 = SO_3H, R_2 = Me, R_3 = H$

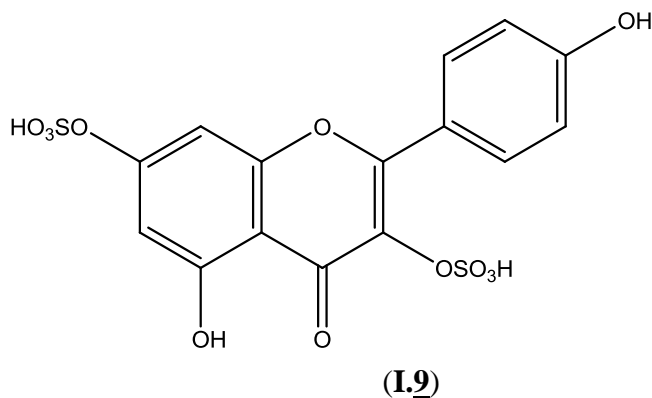
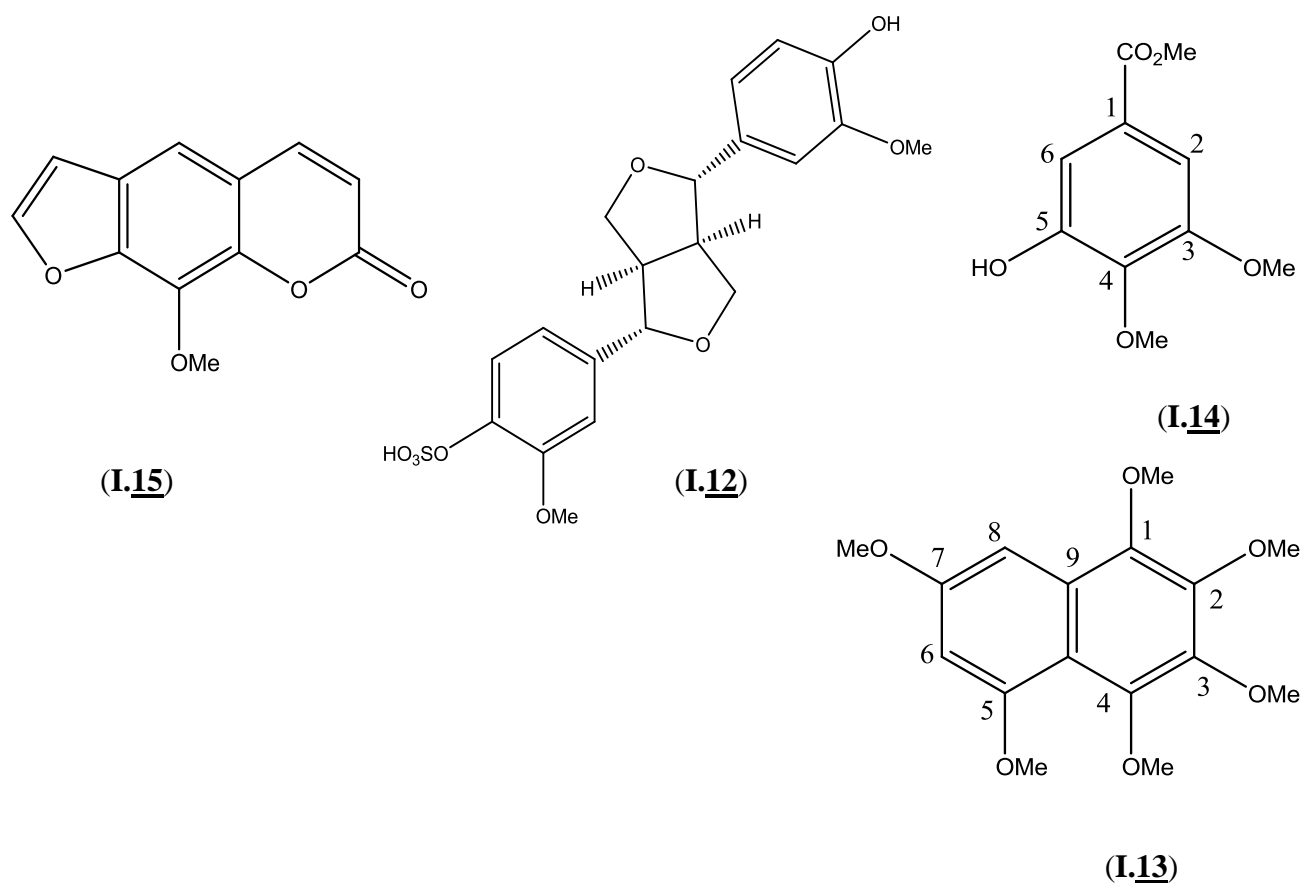


Figure I.5 : Quelques structures de composés isolés du genre *Frankenia*



**Figure I.5 :** Quelques structures de composés isolés du genre *Frankenia* (suite)

Cependant les composés **I.16** à **I.19** (Tableau I.4 et Figure I.6) ont été identifiés dans l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes et souterraines de l'espèce *F. pulverulenta*.

**Tableau I.4 :** Quelques composés identifiés de l'espèce *Frankenia pulverulenta*

Composés	Espèces	Références
Catéchine ( <b>I.16</b> )	<i>F. pulverulenta</i>	(Ben Mansour et al., 2017)
Dimère de procyanidine (B2) ( <b>I.17</b> )	<i>F. pulverulenta</i>	(Ben Mansour et al., 2017)
Quercétine ( <b>I.18</b> )	<i>F. pulverulenta</i>	(Ben Mansour et al., 2017)
Acide gallique ( <b>I.19</b> )	<i>F. pulverulenta</i>	(Ben Mansour et al., 2017)

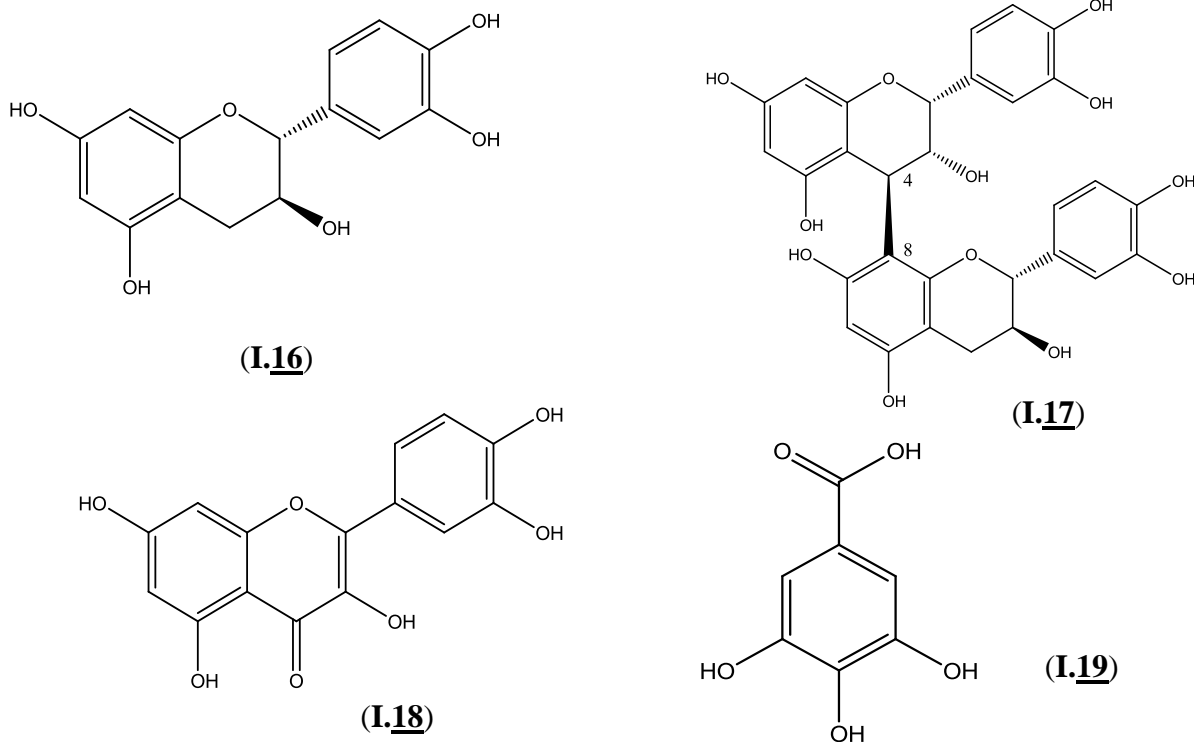


Figure I.6 : Quelques structures de composés identifiés de l'espèce *Frankenia pulverulenta*

## I.8. Conclusion

Les espèces de la famille Apiaceae sont parmi les plus connues des plantes à fleurs. Elles ont été largement utilisées en médecine traditionnelle dans notre pays pour certaines propriétés thérapeutiques. Certaines de ces propriétés ont été reportées pour des espèces de la famille Frankeniaceae.

Nos recherches bibliographiques approfondies réalisées sur les deux familles (Apiaceae et Frankeniaceae), soulignent leur richesse en métabolites secondaires notamment les coumarines, les flavonoïdes et les composés phénoliques et montrent que les investigations phytochimiques et biologiques des espèces *F. thymifolia* et *P. battandieri* restent très limitées à ce jour.

***Chapitre II :***  
***Métabolites secondaires***

### II.1. Introduction

Même si l'Homme a dû certainement observer les animaux pour la sélection des plantes de sa nourriture, les plantes et l'Homme ont toujours été liés et ce, depuis les civilisations les plus anciennes. Grâce à l'expérimentation et l'évolution de ses connaissances, l'Homme a su distinguer les plantes comestibles, des plantes toxiques et même reconnaître et répertorier les plantes médicinales. Ainsi les plantes ont été non seulement utilisées par l'Homme comme sources alimentaires, comme matériaux et pour leurs effets bénéfiques ou toxiques, mais elles ont été domestiquées et cultivées.

Du point de vue médicinal, et malgré l'avancée phénoménale de l'industrie pharmaceutique chimique, de nos jours, les plantes reviennent en force dans nos vies et leurs utilisations devenues nécessaires, représentent des alternatives de plus en plus sûres. Les plantes médicinales et l'herboristerie font penser certes à des traditions lointaines de nos ancêtres mais durant ces dernières décennies, l'analyse, l'évaluation par des tests biologiques d'extraits d'origine végétale et le développement des techniques de séparation et de mesures physicochimiques ont donné un sérieux coup de pouce à la pharmacie moderne. En effet, outre l'utilisation de multiples produits dérivés des plantes (tisanes, phytothérapie, compléments alimentaires, huiles essentielles,...), les investigations phytochimiques d'extraits végétaux, les recherches bioguidées et l'évolution technologique considérable des appareils de mesures physiques d'analyses ont ouvert un large éventail à la recherche et à la détermination de structure des métabolites secondaires bioactifs des plantes. Parmi les composés bioactifs du métabolisme secondaire des plantes, certains présentent des structures tellement complexes qu'il serait quasi-impossible de les imaginer et surtout de les préparer par une synthèse de chimie organique. De ce fait, certains médicaments et certains squelettes de médicaments sont de purs fruits du hasard, mais sont bien des métabolites secondaires de plantes.

Dans les plantes on distingue ainsi deux groupes de métabolites: les métabolites primaires et les métabolites secondaires.

Les métabolites primaires sont les molécules de base qui se trouvent dans toutes les cellules, ils sont classés en quatre principaux groupes: les acides nucléiques, les lipides, les protéines et les glucides.

Les métabolites secondaires sont des molécules ayant une répartition limitée dans l'organisme de la plante, ils jouent des rôles essentiels dans les relations entre les plantes et leur environnement.

Un bon nombre d'entre eux ont un rôle défensif pour les plantes. Les métabolites secondaires marquent de manière originale une famille un genre ou une espèce de plante et permettent parfois d'établir une taxonomie chimique spécifique.

Parmi les principales familles de métabolites secondaires isolées des plantes de la famille Apiaceae, on distingue en particulier : les composés phénoliques, les coumarines (furanocoumarines) et les composés polyacétyléniques.

## II.2. Les familles des métabolites secondaires

Les familles des métabolites secondaires sont nombreuses et très diversifiées. Chaque famille est répartie en sous-familles selon leur squelette de base. Le tableau II.1 reporte quelques-unes de ces familles.

**Tableau II.1 :** Quelques familles de métabolites secondaires.

Familles	Sous-familles
Composés phénoliques	Coumarines, Flavonoïdes, Tannins, Anthroquinones
Terpénoïdes	Monoterpènes, Sesquiterpènes, Diterpènes, Triterpènes, Polyterpènes
Composés azotés	Acides aminés non protéiques, Amines, Alcaloïdes

## II.3. Les composés phénoliques

### II.3.1. Définition

Les composés phénoliques sont le plus grand groupe de substances d'origine végétale, et beaucoup d'entre eux ont été trouvés dans les aliments à base de plantes. La diversité et la large distribution de ce type de métabolites secondaires dans les plantes ont conduit à différentes façons de catégoriser ces composés naturels. Ils comportent une grande diversité de structures, divisées en flavonoïdes et non flavonoïdes. La première classe, basée sur un squelette en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>, comprend plusieurs groupes, qui se distinguent par le degré d'oxydation de l'hétérocycle central en C<sub>3</sub> par exemple anthocyanes, flavonols, flavanols. La seconde est représentée par les acides phénols, qui comprennent les acides benzoïques en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> et les acides hydroxycinnamiques, constitués d'un noyau phénolique et d'une chaîne latérale insaturée en C<sub>3</sub>, structure de type C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (Bruneton, 1993).

Toutes les classes de composés phénoliques comportent un grand nombre de structures qui diffèrent par le nombre et la position de groupements hydroxyles et méthoxyles sur le squelette de base. Ces structures peuvent également être diversement substituées (glycosylées, estérifiées, acylées, etc.) (Boussaha, 2015).

### II.3.2. Classification

Selon les critères décrits ci-dessous, on peut distinguer les composés phénoliques par les principaux groupes suivants : les acides phénoliques, les coumarines et les flavonoïdes.

### II.3.2.A. Les acides phénoliques

Les acides phénoliques sont des composés polyphénoliques non flavonoïdes présents beaucoup plus dans les fruits, les légumes et un certain nombre de plantes agricoles et médicinales (Alu'datt et al., 2017; Roche et al., 2017). Les acides phénoliques sont formés d'un squelette à sept et neuf atomes de carbone et regroupent deux types principaux : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques.

Les acides hydroxybenzoïques (*p*-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, syringique, salicilique, gentsique ...) sont formés à partir de l'acide benzoïque et possèdent une structure en C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> (Figure II.1). Les acides hydroxycinnamiques dérivent de l'acide *p*-coumarique, lui-même formé à partir de l'acide cinnamique par la cinnamate-4-hydroxylase. Ils possèdent des squelettes en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> (Figure II.2).

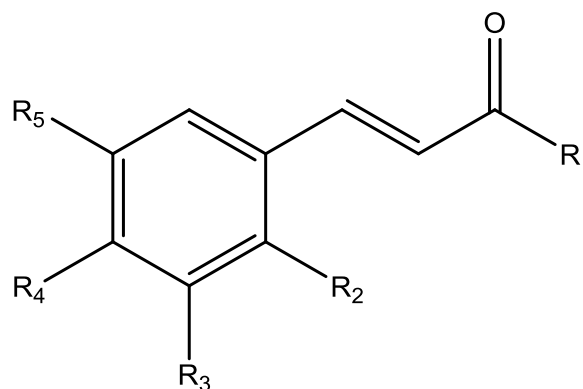
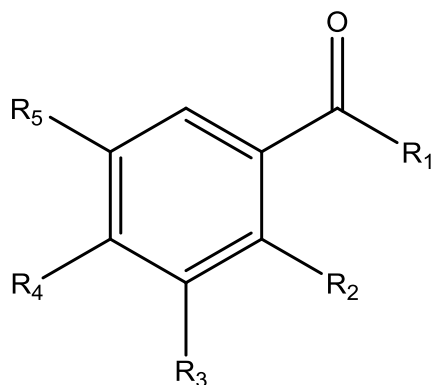


Figure II.2 : Squelette des dérivés de l'acide cinnamique

Figure II.1 : Squelette des dérivés de l'acide benzoïque

### II.3.2.B. Les Coumarines

#### II.3.2.B.1. Définition

Les coumarines sont des molécules largement répandues dans tout le règne végétal, ce sont des 2H-1-benzopyran-2-ones. Elles sont considérées comme étant les lactones des acides 2-hydroxy-7-cinnamiques (Bruneton, 1993) dont le squelette de base est reporté dans la Figure II.3.

Elles existent sous forme libre ou encore liée à des sucres (hétérosides) dans la plupart des familles de dicotylédones incluant la famille Apiaceae. Elles se localisent dans toutes les parties de la plante et notamment dans les fruits (Guignard et Potier, 2004).

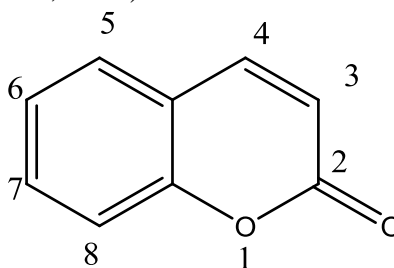
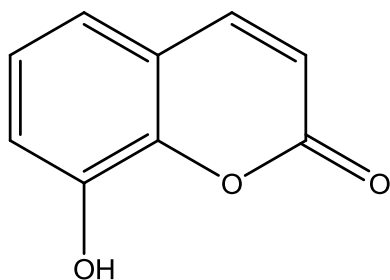


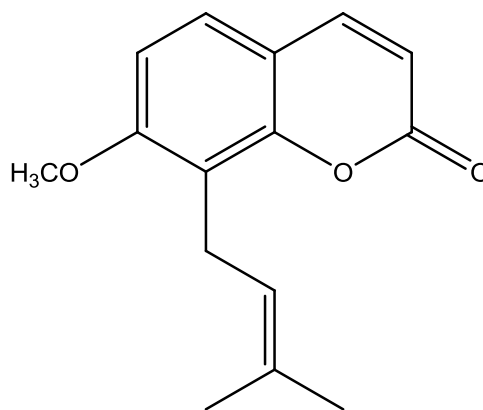
Figure II.3 : Coumarine

## II.3.2.B.2. Classification

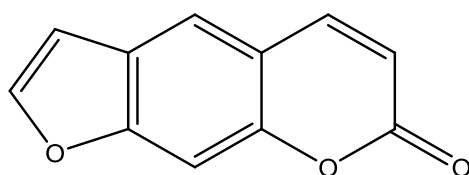
La coumarine est le point de départ d'une famille de composés, qui se forment par une substitution sur un cycle aromatique. Selon la nature des substitutions, les coumarines sont classées en six catégories (Figure II.3) : coumarines simples, coumarines prénylées, furanocoumarines (linéaires et angulaires), pyranocoumarines, coumarines dimériques et coumarines trimériques.



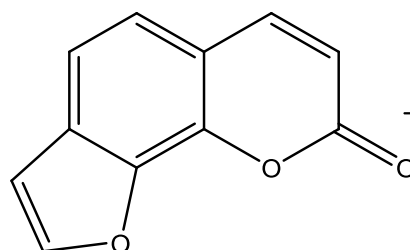
**II-1** Umbelliférone  
(Coumarine simple)



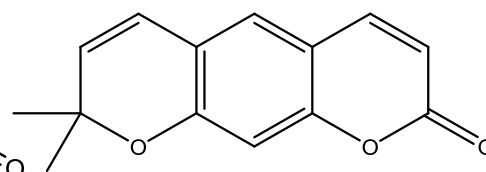
**II-2** Osthol (Coumarine prénylée)



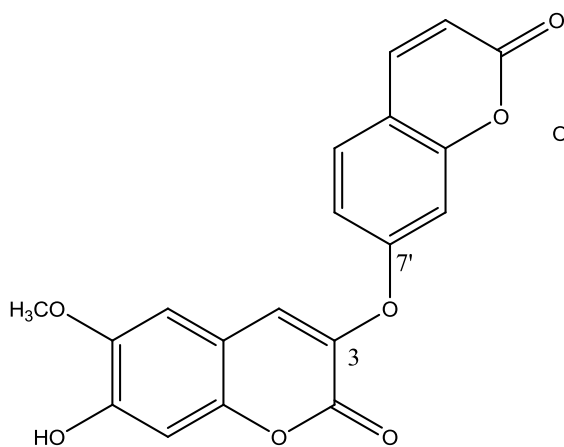
**II-3** Psoralène  
(furanocoumarine linéaire)



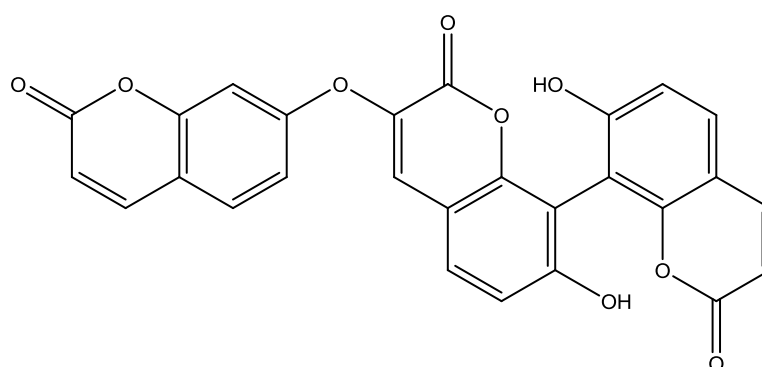
**II-4** Angélicine  
(furanocoumarine angulaire)



**II-5** Xanthylétine  
(Pyranocoumarine)



**II-6** Daphnorétine  
(Coumarine dimérique)



**II-7** Triumbéllatine  
(Coumarine trimérique)

**Figure II.3** : Structures chimiques de quelques classes de coumarines



### II.3.2.B.3. Activités pharmacologiques des coumarines

Comme les flavonoïdes, les coumarines possèdent des activités biologiques importantes et diverses, qui varient selon la substitution sur le cycle benzopyrane, telles que les activités antifongique, anti-tumorale, anti-agrégation plaquettaire, inhibitrice de plusieurs enzymes, antivirale, anti-inflammatoire, anticoagulante, diurétique, analgésique et cytotoxique contre les cellules cancéreuses (Ajay Kumar et al., 2015; Barnard et al., 2002; Kostova, 2005; Kostova et al., 2006; Marumoto et Miyazawa, 2012; Thakur et al., 2015).

Les furanocoumarines se retrouvent dans de nombreux aliments végétaux communs consommés par les humains et sont connus pour être absorbés dans la circulation sanguine rapidement après leur consommation (Melough et al., 2018). Certains furocoumarines présentent aussi une bonne activité proliférative contre plusieurs lignées de cellules cancéreuses humaines (Liu et al., 2018).

### II.3.2.C. Les flavonoïdes

#### II.3.2.C.1. Définition et Classification

Les flavonoïdes sont des composés naturels de la famille des polyphénols présents en quantités importantes dans une grande variété de fruits et de légumes consommés quotidiennement par l'Homme. Les flavonoïdes sont des substances phénoliques isolées à partir d'un large éventail de plantes vasculaires, avec plus de 8000 composés connus (Min et al., 2018).

Les flavonoïdes sont des dérivés du noyau flavone ou 2-phenyl chromone (Figure II.4) portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides.

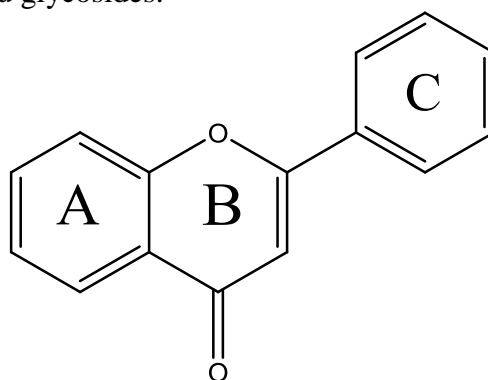


Figure II.4 : Noyau flavone

Ces diverses substances se rencontrent à la fois sous forme libre ou sous forme de glycosides. On les trouve, d'une manière très générale, dans toutes les plantes vasculaires, où elles peuvent être localisées dans divers organes : racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruits (Bruneton, 1993), et aussi dans le miel.

Structuralement, les flavonoïdes se répartissent en plusieurs classes de molécules, dont les plus importantes sont les flavones, les flavonols, les flavanones, les dihydroflavonols, les isoflavones, les isoflavanones, les chalcones, les aurones, les anthocyanes et les tanins.

### II.3.2.C.2. L'intérêt des flavonoïdes

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les flavonoïdes. Ils se sont surtout illustrés en thérapeutique comme anti-cancérogènes, antivirales, anti-inflammatoires, anti-tumoraux et antioxydants (Min et al., 2018; Ninfali et al., 2017; Salaritabar et al., 2017).

Les flavonoïdes sont aussi des métabolites secondaires que les plantes produisent pour se protéger d'autres organismes. On peut classer l'intérêt des flavonoïdes en deux rôles principaux :

#### ✓ Le rôle biologique et physiologique

Les flavonoïdes déterminent la saveur des fruits, Ils jouent un rôle important dans la croissance et le développement des plantes, ils protègent les plantes contre l'attaque des micro-organismes et les parasites et ceci par leur couleur et odeur (Brunetti et al., 2018; Zeng et al., 2018).

De nombreuses études ont établi des relations entre les structures chimiques des flavonoïdes et leur capacité de piéger les radicaux libres afin de déterminer les éléments majeurs de l'activité antioxydante (Baldim et al., 2017; Naeimi et Alizadeh, 2017), la Figure II.5 montre les sites essentiels pour l'activité antioxydante des flavonoïdes.

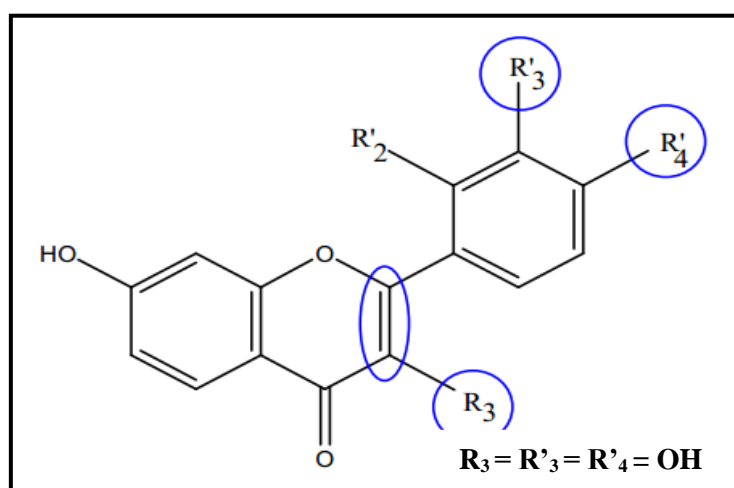


Figure II.5 : Éléments essentiels pour l'activité antioxydante

## ✓ Le rôle thérapeutique

Les études récentes montrent que la consommation élevée de fruits, de légumes, riches en polyphénols et flavonoïdes a été liée à la réduction des risques de nombreuses maladies chroniques, y compris le cancer (Menendez et al. 2008; Gates et al. 2009), les maladies cardiovasculaires (Knekt et al. 2002; Arts et Hollman 2005) et de nombreuses maladies dégénératives. En effet, les flavonoïdes ont été rapportés pour posséder plus d'utilité dans les activités antioxydants, antivirales, anti-tumorales, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antiparasitaires, antiallergiques et anti-cancéreuses (Ajay Kumar et al., 2015; George et al., 2017; Lesjak et al., 2018; Min et al., 2018; Naeimi et Alizadeh, 2017; Ninfali et al., 2017; Salaritabar et al., 2017; Seleem et al., 2017; Teles et al., 2018).

## II.4. Les composés polyacéthyléniques polyinsaturés : les polyynes

### II.4.1. Définition et structure

Les composés polyacéthyléniques sont des produits caractéristiques de la famille des Astéracées et quelques familles apparentées. Les polyacéthylènes sont constitués généralement d'une chaîne carbonée en C<sub>18</sub>, C<sub>17</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>13</sub>, C<sub>11</sub> et C<sub>10</sub>.

Ils constituent une importante classe du métabolisme secondaire de plusieurs espèces de la famille des Asteracées (Zidorn et al., 2005), et particulièrement le genre *Pituranthos* (Schulte et Pötter, 1977). La Figure II.6 montre quelques composés polyacéthyléniques isolés du genre *Pituranthos* et en l'occurrence *Pituranthos tortuosus* ayant avec une chaîne carbonée en C<sub>17</sub>. Il s'agit de : (2Z,9Z)-Heptadeca-2,9-diène-4,6-diyne-1-ol (II-8), faltarinol (II-9) et faltarinon (II-10).

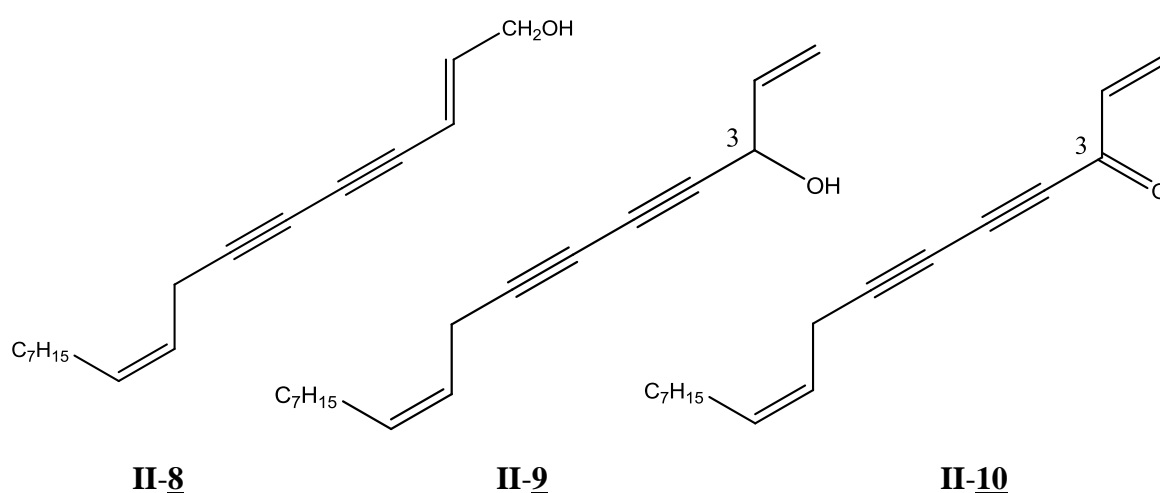


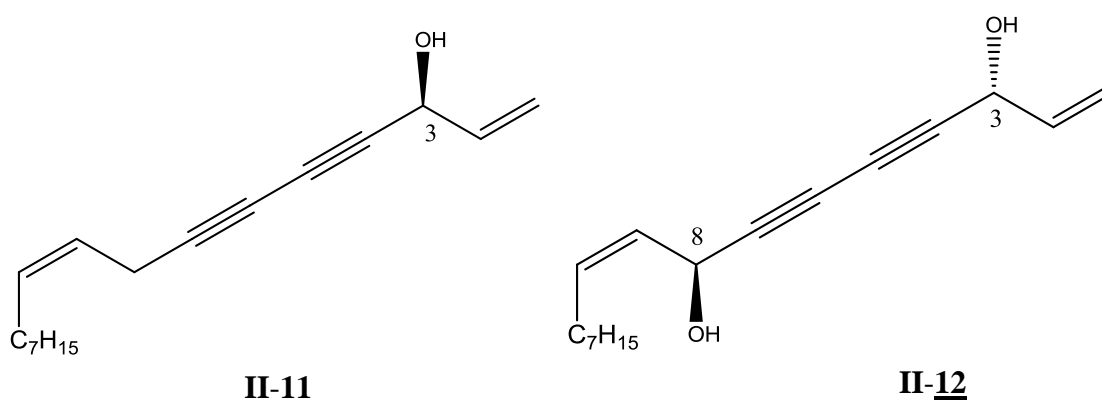
Figure II.6 : Polyacéthyléniques en C<sub>17</sub> isolés de l'espèce *Pituranthos tortuosus*

Les études de Lam (1988) et Bauer (2000) ont révélé beaucoup d'informations utiles au sujet de la structure, la chimie, et l'activité biologique de cette nouvelle classe de composés.

#### II.4.2. L'intérêt des composés polyacéthyléniques

Les composés acétyléniques isolés de la famille Apiaceae ont montré des activités biologiques importantes et diverses comme : anti-inflammatoires, antiagrégants plaquettaire, antioxydants, phototoxiques, neurotoxiques, cytotoxiques, antimutagènes, antifongiques, antimicrobiennes, antiparasitaires (Bae et al., 2000; Christensen et Brandt, 2006; Meot-Duros et al., 2010; Miyazawa et al., 1996; Wink, 2012; Zidorn et al., 2005).

À titre d'exemple, le falcarinol naturel soit le stéréoisomère (3S) (**II-11**) a été signalé comme le polyacétylène le plus bioactif présent dans les carottes, il les protège contre l'attaque des champignons et a montré une activité cytotoxique contre les cellules des tumeurs cancéreuses du colon. C'est pourquoi cet alcool gras est également connu sous le nom de carotatoxine. Le falcarindiol naturel soit le stéréoisomère (3S, 8S) (**II-12**) a également montré de bonnes activités cytotoxique, antimicrobienne et antimutagène (Meot-Duros et al., 2010; Miyazawa et al., 1996). Par ailleurs, comme le falcarinol, le falcarindiol, (Figure **II.7**) a montré une activité fongicide sur la maladie de la résistance de plante (Baranska et al., 2005; Baranska et Schulz, 2005).



**Figure II.7 :** Structures de falcarinol et falcarindiol

#### II.5. Conclusion

À l'issue de ce survol relatif aux différentes classes de substances naturelles, il faut souligner la grande variété structurale des composés phénoliques et polyacéthyléniques. Chacune de ces classes comporte une grande diversité de composés qui possèdent une large gamme d'activités biologiques. On citera en particulier les coumarines, dont plusieurs propriétés biologiques leurs sont reconnues.

# ***PARTIE EXPERIMENTALE***

## ***Chapitre III :***

### ***Étude des activités biologiques in vitro***

### III.1. Évaluation de l'activité antiparasitaire *in vitro*

#### III.1.1. Évaluation de l'activité antileishmanienne *in vitro*

##### III.1.1.A. Activité anti-promastigote forme

###### La culture *in vitro*

Deux souches de *Leishmania* ont fait l'objet de notre étude à savoir *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) et *Leishmania donovani* (MHOM/BR/77/LTB0018). Les *Leishmania* sous forme promastigote sont cultivés à 26°C dans le milieu RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) contenant 0,5% de phénol et 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (RPMI 1640 modified medium (Gibco, Grand Island, US)).

###### Activité antileishmanienne

La méthode de Cabrera-Serra et al., (2007) est utilisée. Elle est basée sur la réduction d'une molécule à potentiel fluorimétrique l'Alamar Blue. À l'état oxydé cette molécule possède une coloration bleue, une fois réduite par des cellules vivantes elle devient de couleur rose fortement fluorescent. Le suivi de cette réaction peut être réalisé par méthode colorimétrique ou fluorimétrique.

Pour les études *in vitro*, les extraits, les fractions et les molécules à tester sont dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) avec une concentration finale entre 1 et 100 µg/ml.

Toutefois, des dilutions supplémentaires ont été effectuées dans du milieu RPMI 1640 (sans phénol et contenant du sérum de veau fœtal décomplémenté) pour avoir une concentration de DMSO au maximum de 0,1% (Trivedi et al., 1990). Les promastigotes, récoltés durant la phase stationnaire, sont dénombrés à l'aide d'un compteur de cellules automatisé (Beckman coulter Z2, USA) puisensemencés sur une plaque de 96 puits à une concentration de  $1 \times 10^6$  parasites/ml dans le milieu RMPI (sans phénol et contenant du sérum de veau fœtal décomplémenté). Le volume final est de 200 µl dans chaque puits. La miltefosine (Æterna Zentaris Inc, Québec) et le pentamidine (Aventis, France) ont été utilisés comme témoins positif. Finalement, un volume de 20 µl d'Alamar Blue (Invitrogen, USA) est ajouté à chaque puits et les plaques sont mises dans les incubateurs à 26°C et sous agitation. Après 72 heures d'incubation, l'absorbance de chaque plaque est mesurée à 570 nm et 630 nm avec un lecteur de microplaques (BioRad, USA).

###### Détermination de la CI<sub>50</sub>

Les valeurs des CI<sub>50</sub> (concentrations des échantillons qui inhibent 50% de la croissance du parasite) sont calculées par les régressions linéaires des tests ou l'abscisse est représentée par la concentration des échantillons testés et l'ordonnée par le pourcentage d'inhibition du parasite (Logiciel Sigma Plot 12.0).

### III.1.2. Évaluation *in vitro* de l'activité anti-amibienne

Une souche de référence *Acanthamoeba castellanii* Neff. (ATCC 30010) a fait l'objet de notre étude. Les amibes sont cultivées pendant 3 jours à 25°C dans du milieu PYG (protéase peptone à 0,75% (m/v), extrait de levure à 0,75% (m/v) et glucose à 1,5% (m/v)).

#### III.1.2.A. Activité anti-trophozoite d'*Acanthamoeba*

Cette activité est réalisée selon la méthode de (Martín-Navarro et al., 2008), en utilisant l'Alamar Blue comme révélateur. Tout d'abord les amibes sont dénombrées à l'aide d'un compteur de cellules automatisé (BECKMAN Coulter Z2) puisensemencés dans une plaque de 96 puits à une concentration de  $1 \times 10^4$  parasites/ml dans le milieu PYG, à raison de 50 µl/puits. Les plaques sont incubées à la température ambiante pendant 15 minutes pour permettre au parasite d'adhérer au fond des puits. En effet, cette fixation est vérifiée à l'aide d'un microscope inversé Leika DMIL (Leika, Wetzlar, Allemagne). Entretemps, les extraits, les fractions et les molécules, à tester sont dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) avec une concentration finale entre 1 et 100 µg/ml. Toutefois, des dilutions supplémentaires sont effectuées dans le même milieu pour avoir une concentration de DMSO au maximum de 0,1% (Ezz Eldin et Sarhan, 2014). Un volume de 50 µl des différentes dilutions est ajouté à chaque puits. La Chlorhexidine (Alfa Aesar, USA) a été utilisée comme témoin positif. Finalement, un volume de 10 µl d'Alamar Blue est ajouté à chaque puits et les plaques sont incubées à 26°C et sous agitation. Après 96 heures d'incubation, l'absorbance de chaque plaque est mesurée à 570 nm et 630 nm avec un lecteur de microplaques (BioRad, USA).

#### Détermination de la CI<sub>50</sub>

Les valeurs des CI<sub>50</sub> (concentrations des échantillons qui inhibent 50% de la croissance du parasite) ont été calculées par les régressions linéaires des tests ou l'abscisse est représentée par la concentration des échantillons testés et l'ordonnée par le pourcentage d'inhibition du parasite (Logiciel Sigma Plot 12.0).

### III.1.3. Évaluation *in vitro* de l'activité antitrypanosomiale

#### III.1.1.A. Activité anti-épimastigotes forme

##### La culture *in vitro*

Une souche du genre *Trypanosoma* a fait l'objet de notre étude à savoir *Trypanosoma cruzi* Y. T. *cruzi* sous forme épimastigotes qui sont cultivés à 26°C dans le milieu LIT (Rosewell Park Memorial Institute) contenant 0,5% de phénol et 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (LIT modified medium; Gibco, Grand Island, USA).

### **Activité antitrypanosomiale**

Cette activité a été évaluée selon la méthode de Cabrera-Serra et al., (2007). Elle est basée sur la réduction d'une molécule à potentiel fluorimétrique l'Alamar Blue.

Pour les études *in vitro*, les extraits, les fractions et les molécules à tester sont dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) avec une concentration finale entre 1 et 100 µg/ml. Toutefois, des dilutions supplémentaires ont été effectuées dans du milieu LIT (sans phénol et contenant du sérum de veau fœtal décomplémenté) pour avoir une concentration de DMSO au maximum de 0,1%. Les épimastigotes récoltés durant la phase stationnaire, sont dénombrés à l'aide d'un compteur de cellules automatisé (Beckman coulter Z2, USA) puisensemencés sur une plaque de 96 puits à une concentration de  $1 \times 10^5$  parasites/ml dans le milieu LIT (sans phénol et contenant du sérum de veau fœtal décomplémenté). Le volume final est de 200 µl dans chaque puits. Le benznidazole (Æterna Zentaris Inc, Québec) a été utilisé comme témoin positif. Finalement, un volume de 20 µl d'Alamar Blue (Invitrogen, USA) est ajouté à chaque puits et les plaques sont mises dans les incubateurs à 26°C et sous agitation. Après 72 heures d'incubation, l'absorbance de chaque plaque est mesurée à 570 nm et 630 nm avec un lecteur de microplaques (BioRad, USA).

### **Détermination de la CI<sub>50</sub>**

Les valeurs des CI<sub>50</sub> ont été calculées par les régressions linéaires des tests ou l'abscisse est représentée par la concentration des échantillons testés et l'ordonnée par le pourcentage d'inhibition du parasite (Logiciel Sigma Plot 12.0).

## **III.2. Test de cytotoxicité des molécules sur les macrophages J 774**

La cytotoxicité des molécules actives sur les cellules macrophagiques J 774A.1 (ATCC TIB-67) a été déterminée selon la méthode décrite par Lorenzo-Morales et al., (Lorenzo-Morales et al., 2010; Sifaoui et al., 2017). Pour ce faire, les macrophages cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco / Life Technologies, Madrid, Espagne) ont été comptées etensemencées dans des plaques à 96 puits ( $10^5$  cellules/ml) puis les molécules à tester ont été diluées dans le même milieu et ajoutées dans un volume total de 100 µl. En tant que témoin négatif, les cellules ont été incubées avec le milieu seul. Enfin, 10 µl d'Alamar Blue ont été ajoutés dans chaque puit et le mélange a été incubé pendant 24h à 37°C et sous atmosphère de 5% de CO<sub>2</sub>. Après cela, les plaques ont été analysées en utilisant un lecteur de plaque multimode EnSpire (Perkin Elmer, Madrid, Espagne) avec une longueur d'onde d'excitation de 570 nm et une longueur d'onde d'émission de 585 nm. Les valeurs de cytotoxicité [Cytotoxicité calculées à 50% (CC<sub>50</sub>)] ont été calculées en utilisant le logiciel d'analyse statistique Sigma Plot 12.0. Les résultats obtenus ont été exprimés en moyenne ± écart-type. Les différences à



$p < 0,05$  étaient considérées comme statistiquement significatives. Les molécules donnant des pourcentages de cytotoxicité entre 0 et 10% ne sont pas cytotoxiques, celles donnant des pourcentages compris entre 10 et 25% sont considérées faiblement cytotoxiques, celles donnant des pourcentages compris entre 25 et 40% sont considérées modérément cytotoxiques et celles montrant des pourcentages au-delà de 40% sont reconnues fortement cytotoxiques (Lorenzo-Morales et al., 2005).

### III.3. Pouvoir antioxydant

#### III.3.1. Introduction

Depuis ces dernières années, l'importance accordée aux antioxydants naturels, en relation avec leurs propriétés pharmacologiques et thérapeutiques, a augmenté considérablement. Des recherches scientifiques dans diverses spécialités ont été développées pour l'extraction, l'identification et la quantification de ces composés à partir de plusieurs sources naturelles à savoir, les plantes médicinales et les produits agroalimentaires (Shivakumar et Kumar, 2018; Zhang et al., 2018).

#### III.3.2. Définition l'activité anti-radicalaire

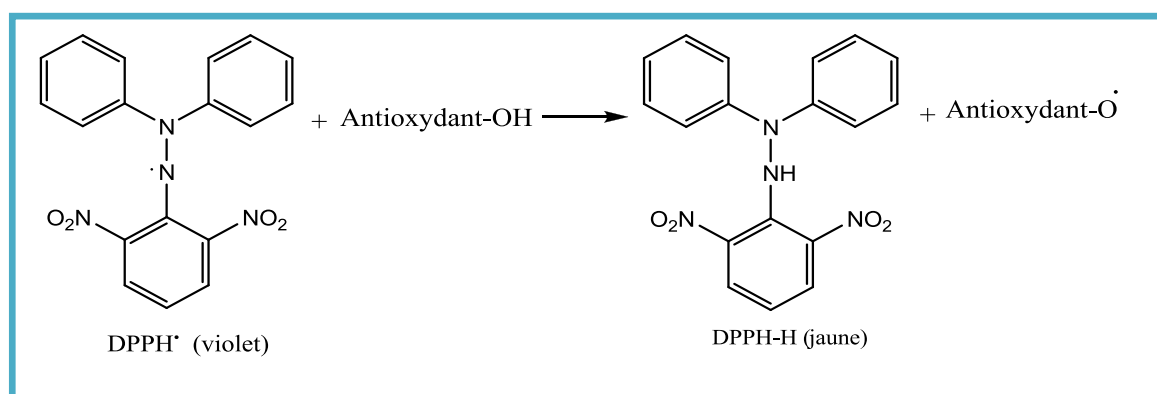
Les radicaux libres sont produits dans notre organisme sous l'action de différents facteurs déclenchant externes (UV, radiations ionisantes, métaux de transition, fumées de combustion, poussières d'amiante et de silice, antiseptiques, médicaments, pesticides, solvants,...), mais également dans le cadre de phénomènes biologiques importants, comme la respiration cellulaire. Parmi ces radicaux on retrouve les espèces réactives de l'oxygène tels que les radicaux superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) et peroxydes ( $ROO^{\cdot}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ). La production permanente de ces molécules réactives dans notre corps est généralement contrôlée par l'action de systèmes enzymatiques (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase,...) ou d'antioxydants (vitamine E,  $\beta$ -carotène, ...). Lorsque cet équilibre précaire est rompu en faveur des radicaux libres, il se produit un « stress oxydatif ». De nombreuses méthodes ont été mises au point pour déterminer l'activité antioxydante d'aliments, d'extraits ou de molécules, on peut les classer en deux catégories, les tests mesurant le transfert d'électrons ou d'hydrogène vers un radical coloré stable facile à détecter (DPPH, TEAC) et ceux faisant intervenir une compétition (ORAC, décoloration du  $\beta$ -carotène et de la crocine) entre l'antioxydant et une cible à protéger (pigments, lipides).

Parmi les méthodes qui sont fréquemment utilisées pour évaluer, *in vitro* et *in vivo*, l'activité antioxydante par piégeage de radicaux différents, les peroxydes  $ROO^{\cdot}$  par les méthodes ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Prior, 2015) et TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) (Gupta, 2015) ; les ions ferriques par la méthode FRAP (Ferric ion Reducing Antioxidant

Parameter) (Bolanos de la Torre et al., 2015); ou les radicaux ABTS<sup>•</sup> (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) (Le Grandois et al., 2017), ainsi que la méthode utilisant le radical libre (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle) (DPPH<sup>•</sup>) (Granato et al., 2018).

### III.3.3. Méthode du DPPH

Cette méthode utilise le DPPH<sup>•</sup> comme un radical libre relativement stable et qui absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm. Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette), en présence des molécules dites antioxydantes afin de mesurer leur capacité à le réduire. La forme réduite (diphényl picrylhydrazine) de couleur jaune n'absorbe plus à 515 nm, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance. La figure III.1 montre la réaction entre le DPPH<sup>•</sup> et les antioxydants.



**Figure III.1.** Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

Le piégeage des radicaux libres par des antioxydants est tributaire de deux types de mécanismes (Amorati et Valgimigli, 2018):

- La libération de l'atome d'hydrogène du groupement hydroxyle (cinétique rapide de certains acides et dérivés phénoliques);
- La libération d'un électron (cinétique lente des dérivés glycosylés et des anthocyanes).

Le mécanisme principal d'action avec les composés phénoliques est le piégeage des radicaux libres par le transfert de l'atome H sur le DPPH<sup>•</sup> alors transformé en une molécule stable DPPH-H (Embuscado, 2015).

La capacité à fixer des radicaux libres, donc à arrêter la propagation de la réaction en chaîne, (la capacité anti-radicalaire) ne peut être mesurée directement, mais par contrôle de l'effet de la réactivité.

### III.3.4. Piégeage de l'ABTS<sup>•+</sup>

Le radical-cation ABTS<sup>•+</sup> (sel d'ammonium de l'acide 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) est un radical libre et stable, utilisé fréquemment pour évaluer le pouvoir antioxydant des fluides biologiques, des mélanges complexes ou bien des produits purs. Ce radical cation est facilement formé par oxydation en présence du persulfate de potassium pour donner une solution colorée en vert-bleu. La concentration de ce radical peut être déterminée en mesurant l'absorbance à 734 nm (Rivero-Pérez et al., 2007).

### III.3.5. Méthode de réduction de cuivre (CUPRAC)

La méthode CUPRAC (Cupric ion Reducing Antioxidant Capacity) est basée sur le suivi de la diminution de l'absorbance du complexe Néocuproïne (Nc), cuivre (Cu<sup>+2</sup>) Nc<sub>2</sub>-Cu<sup>+2</sup>. En effet, en présence d'un agent antioxydant, le complexe cuivre-néocuproïne est réduit et cette réaction est suivie par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 450 nm (Apak et al., 2005, 2004).

### III.3.6. Chélation des ions métalliques

Les composés polyphénoliques participent à l'inhibition de la formation des radicaux libres par la chélation de métaux de transition tels que le fer (Fe<sup>2+</sup>) et le cuivre (Cu<sup>+</sup>), qui sont essentiels pour de nombreuses fonctions physiologiques. Ils participent notamment dans la composition des hémoprotéines et de cofacteurs d'enzymes du système de défense antioxydant, Fe pour la catalase, Cu pour la céruloplasmine et Cu et Zn pour la superoxyde dismutase. Néanmoins, ils peuvent aussi être responsables de la production de radicaux OH<sup>•</sup> par la réduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> lors de la réaction de Fenton (Boonsong et al., 2016; Ebrahimzadeh et al., 2008). En effet, complexer les ions du fer et du cuivre sous une forme qui bloque leur activité redox est un mécanisme d'action antioxydant.

Les composés polyphénoliques notamment les flavonoïdes, sont des chélatants de ces ions métalliques au niveau de différents sites.

### III.3.7. Méthode de blanchiment du β-carotène

Cette méthode est basée sur la détermination de la capacité d'inhibition de l'oxydation du β-carotène. Dans ce test, l'oxydation de l'acide linoléique produit des radicaux peroxydes qui attaquent les onze doubles liaisons du β-carotène, ce qui provoque sa décoloration soit la perte de sa coloration rouge. La présence d'un antioxydant (échantillon à tester ou molécule de référence) dans ce milieu va neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et donc inhiber l'oxydation et par conséquent ralentir le blanchiment du β-carotène. Ces réactions sont suivies par spectrophotométrie

à 470 nm (Cheurfa et Allem, 2016). Vu la forte absorption du  $\beta$ -carotène, cette méthode est sensible, mais est plus lente que celle du DPPH. Elle est largement utilisée dans l'évaluation de l'activité antioxydante de différents types d'échantillons tels que les composés purs, les extraits de plantes...

### III.3.8. Méthode du superoxyde de DMSO alcalin

Dans cette méthode, la concentration d'oxygène dissous dans le DMSO correspond à la concentration de superoxyde dans le système DMSO alcalin. Donc, le radical superoxyde est généré dans un système non enzymatique (Kunchandy and Rao, 1990; Reddy et al., 2008). Le principe de ce test consiste à mélanger dans une solution aqueuse, l'anion superoxyde (préalablement préparé dans une solution de NaOH), l'échantillon à tester et le nitro-bleu de tétrazolium (NBT). Ce dernier, en présence de l'anion superoxyde, peut subir une réaction de réduction pour se transformer en colorant formazan provoquant ainsi un changement de coloration. En présence d'un antioxydant donneur d'hydrogène, les anions superoxydes sont piégés et la réduction du NBT est ainsi empêchée.

### III.3.9. Test de la réduction du fer (le pouvoir réducteur)

Le pouvoir antioxydant d'une solution est déterminé par le test de pouvoir réducteur de Fer FRAP 'Ferric reducing ability of plasma'. À faible pH et à 37°C, le complexe tripyridyltriazine ferrique (TPTZ- $\text{Fe}^{3+}$ ) est ajouté à l'échantillon. Les antioxydants présents réduisent le complexe en sa forme  $\text{Fe}^{2+}$  qui peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur bleu vert dans le milieu réactionnel à 700 nm. En d'autre terme, le système  $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  confère à la méthode la sensibilité pour la détermination « semi quantitative » des concentrations des polyphénols, qui participent à la réaction redox. Ce test est rapide et donne des résultats répétables pour des solutions biologiques ou pour des solutions pures d'antioxydants (Amarowicz et al., 2004).

### III.3.10. Analyses statistiques

Les résultats des tests effectués sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD d'analyses en trois essais.

Les valeurs des  $\text{CI}_{50}$  (concentration inhibitrice à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par le test t de Student (Student's *t*-test) et le test ANOVA univarié. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

### III.4. Évaluation de l'activité antibactérienne

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer l'activité antibactérienne *in vitro*, parmi lesquelles la méthode de diffusion sur disques (Antibiogramme). C'est une technique utilisée en bactériologie médicale appelée méthode de disques ou méthode par diffusion en milieu gélosé, elle consiste à utiliser des disques de papier imprégnés des différentes substances à tester, puis déposés à la surface d'une gélose uniformément ensemencée avec une suspension de la bactérie à étudier. Après incubation, les colonies se développent à la surface de la gélose laissant des zones vierges autour des disques appelées zones d'inhibition. Plus le diamètre de la zone d'inhibition est grand, plus la souche est sensible à la substance testée, plus il est petit plus la bactérie est résistante. Donc, le diamètre de ces zones d'inhibition est proportionnel à l'activité antibactérienne de la substance sur la souche testée. Les antibiotiques sont utilisés comme des références et se différencient pour chaque souche bactérienne (François et al., 2011; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012).

### III.5. Conclusion

Ce chapitre reporte les techniques et méthodes utilisées pour la recherche des activités biologiques *in vitro* notamment les activités : antileishmanienne ; anti-amibienne ; antitrypanosomiale ; cytotoxique sur les macrophages J 774 ; antioxydante par sept méthodes : radical DPPH, radical-cation ABTS, blanchiment du  $\beta$ -carotène, radical-anion superoxyde  $O_2$ , le pouvoir chélateur ferreux, CUPRAC et FRAP ; antibactérienne par la méthode de diffusion sur disques. L'adaptation de ces techniques et méthodes à nos travaux nous a permis de tester des extraits de deux espèces sélectionnées dans notre étude, *P. battandieri* et *F. thymifolia*.

Les résultats encourageants obtenus au cours de ces tests nous ont incités à procéder à l'investigation phytochimique et le fractionnement bioguidé des extraits les plus actifs (voir chapitre IV) et de tester individuellement les composés isolés à la recherche des molécules responsables des activités étudiées. Les résultats de ces tests sont reportés dans le dernier chapitre VI.

***Chapitre IV :***  
***Étude phytochimique des***  
***espèces : Pituranthos***  
***battandieri et Frankenia***  
***thymifolia***

## IV.1. Étude phytochimique et biologique de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire

### IV.1.1 Choix du matériel végétal

Dans cette étude, plusieurs critères ont guidé notre choix, notamment:

- L'endémisme de cette espèce qui nous a encouragés à explorer et à rechercher la nature de ses métabolites secondaires.
- Les résultats des investigations phytochimiques obtenus des autres espèces du même genre notamment leur richesse en métabolites secondaires de types furanocoumarine, flavonoïde et polyacétylénique (Abdallah et Ezzat, 2014; Abdel-Kader, 2003; Abdel-Nasser et al., 1998; Abdelwahed et al., 2008, 2005; Adida et al., 2014; Aloui et al., 2018; Belyagoubi-Benhammou et al., 2017; Chikhouné et al., 2017; Haba et al., 2004; Hammiche et Maiza, 2006; Ksouri et al., 2017; Malti et al., 2018; Nait Said, 2007; Touil et al., 2006).
- Les activités biologiques attribuées aux plantes de cette famille notamment antidiabétiques, antioxydantes, antifongiques, antimicrobiennes, antivirales, anti-HIV, antitumorales, antiparasitaires et cytotoxiques (Ahmed et al., 2011; Belyagoubi-Benhammou et al., 2017; Harchaoui et al., 2018; Khacheba et al., 2017; Krifa et al., 2016).

### IV.1.2. Classification dans la systématique botanique

*Pituranthos battandieri* Maire ssp. *Abbreviatus* Maire, synonyme : *Deverra battandieri* (Maire)

Chrtek. est classé comme suit (Govaerts, 2001; "The Plant List-*Pituranthos*-" 2013)

**Règne:** Plantae.

**Embranchement:** Tracheophyta.

**Classe:** Magnoliopsida.

**Ordre:** Araliales.

**Famille:** Apiaceae.

**Genre:** *Pituranthos* (*Deverra*).

**Espèce:** *Pituranthos battandieri*.

**Nom botanique :** *Pituranthos battandieri* Maire.

**Synonyme :** *Deverra battandieri* (Maire) Chrtek.

### IV.1.3. Description botanique

*P. battandieri* Maire ssp. *abbreviatus* Maire, (Synonyme : *Deverra battandieri* Chrtek), est une plante endémique du Sahara algéro-marocain. Plante à Feuilles basales toujours persistantes sous les

tiges. Tige grêles à ramification plus ou moins étalées, développées et persistantes 1-3 séchées. Plante d'un vert glauque. Stigmates pourpres. Se localise dans les rocailles, pâturages désertiques (Figure IV.1). Cette espèce admet deux sous-espèces (Quezel et Santa, 1963) :

- ssp. *abreviatus* Maire;
- ssp. *Leptactis* Maire.



**Figure IV.1** : Photo de *Pituranthos battandieri* Maire ssp. *abreviatus* Maire  
(Prise par Benayache Samir, Avril 2010)

#### IV.1.4. Distribution géographique

Elle est endémique au Sahara algérien, au Sahara marocain et au sud Oranais (Ozenda, 2004).

#### IV.1.5. Travaux antérieurs réalisés sur l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire

D'après nos recherches bibliographiques effectuées sur le genre *Pituranthos*, la seule investigation phytochimique de cette espèce a été réalisée dans par notre laboratoire (Esseid, 2018). Ces travaux ont permis l'isolement et la détermination d'un nombre important de métabolites secondaires de type coumarine, flavonoïde, stéroïde et phénolique.

Ces molécules sont :

Un mélange de  $\beta$ -sitostérol (IV.1.a) et de stigmastérol (IV.1.b) (50-50%), la xanthotoxine (IV.2), la phellopterine (IV.3), la vanilline (IV.4), le xanthotoxol (IV.5), la (R)-pituranthosine A (IV.6), la (R,S)-pituranthosine B (IV.7), la R-(+)-marmine (IV.8), la (R)-(+)-héraclénine (IV.9), la (S)-(-)-pituranthosine C (IV.10), la R-(+)-byakangelicol (IV.11), la R-(+)-byakangelicine (IV.12), la pituranthosine D (IV.13), un mélange de daucostérol (IV.14.a) et de stigmastérol 3-O- $\beta$ -glucopyranoside (72-28%) (IV.14.b), l'isorhamnétine (IV.15), l'acide vanillique (IV.16), la  $\beta$ -hydroxypropiovanillone (IV.17), l'apigénine (IV.18), le 8-[(R)-6',7-dihydroxygeranyloxy]psoralène (IV.19), le (R)-8-hydroxyaegelinol (IV.20), la biochanine A (IV.21), le mannitol (IV.22) et la cacticine (IV.23) (Figure IV.2).





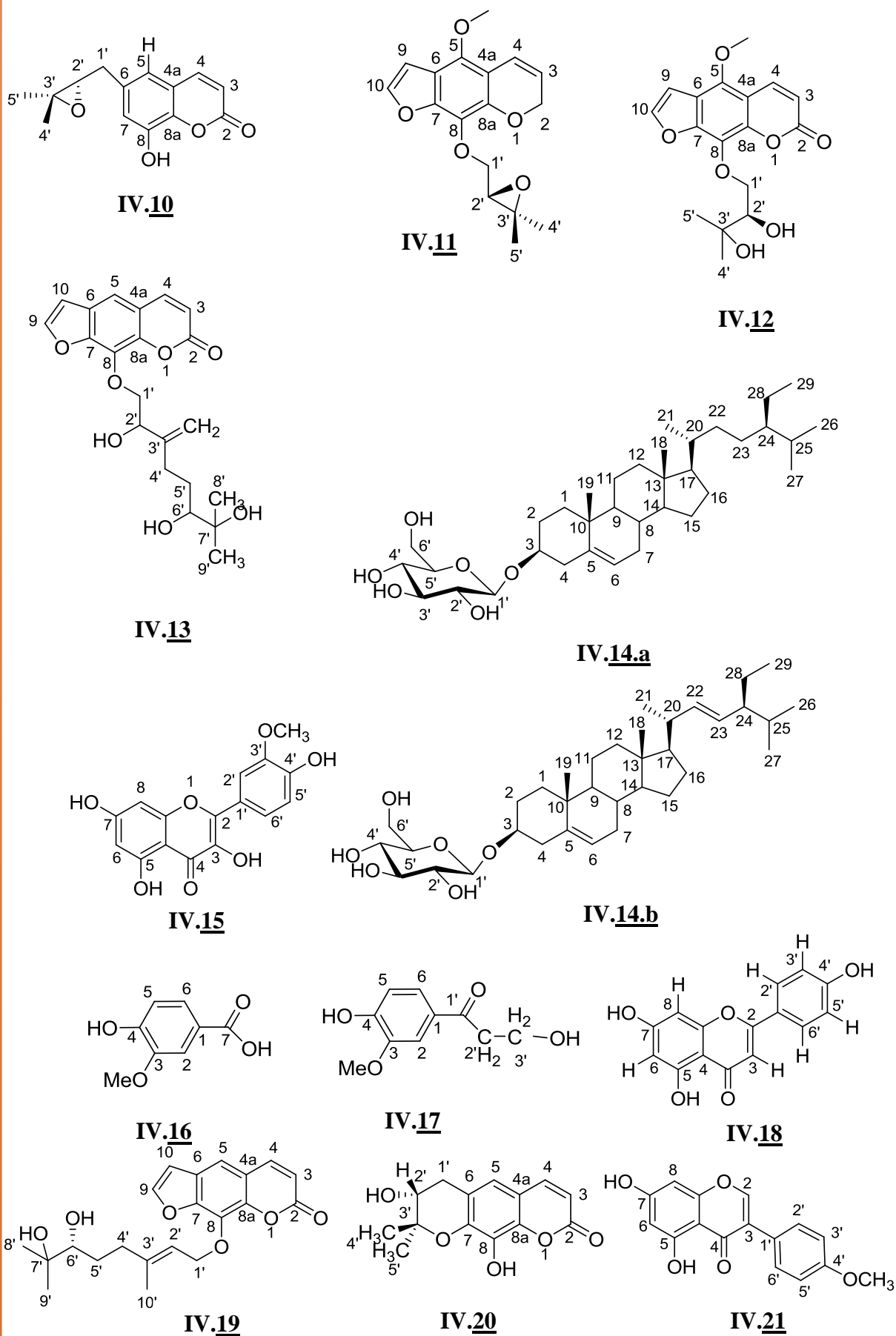
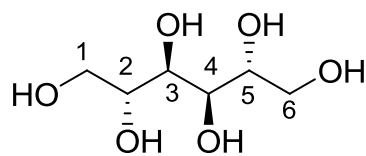
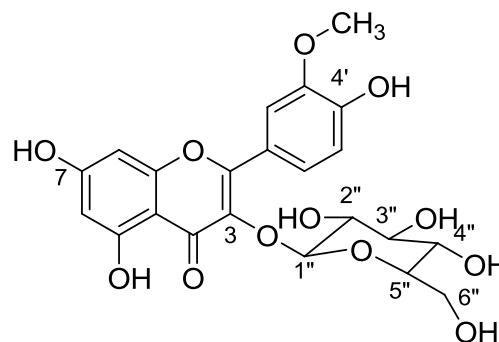


Figure IV.2 : Les différents composés isolés de l'espèce *Pituranthos battandieri* (suite)



IV.22



IV.23

Figure IV.2 : Les différents composés isolés de l'espèce *Pituranthos battandieri* (suite)

## IV.1.6 Protocole Expérimental

### IV.1.6.A. Récolte du matériel végétal

La plante *Pituranthos battandieri* Maire, a été récoltée au mois d'avril 2017 de la région de Béchar (Sud algérien) à côté du barrage de Djorf Torba (les coordonnées de GPS : 30°31'0" N et 2°45'0" O) et authentifiée par M. Mohamed Benabdelhakem, directeur de l'agence de la préservation de la nature, de Béchar. Un spécimen (PBA 54/04/10) a été conservé dans l'herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri, Constantine 1.

### IV.1.6.B. Extraction

#### ➤ Pour les parties aériennes

Après séchage dans un endroit sec et aéré à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes de la plante sont broyées entièrement, puis pesées (M = 3030 g). Le matériel végétal a subi une macération dans un mélange éthanol/eau dans les proportions (70/30 ; v/v) pendant 24 heures. Cette macération est répétée 3 fois avec renouvellement du solvant. Les 3 extraits hydro-éthanoliques sont réunis puis concentrés à 1 litre environ sous pression réduite, à une température n'excédant pas 35°C. La solution ainsi obtenue est diluée sous agitation magnétique avec de l'eau distillée à raison de 400 ml pour 1 kg de matière sèche (1300 ml). Après un repos d'une nuit à 4°C et filtration, la solution subit des extractions successives de type liquide-liquide en utilisant des solvants de polarité croissante en commençant par le *n*-hexane, puis le dichlorométhane, puis l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol, chaque extraction est répétée trois fois.

Les quatre phases organiques ainsi obtenues (*n*-hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont séchées par du sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), puis filtrées et concentrées sous pression réduite à sec et pesées. La phase aqueuse a été lyophilisée.

#### ➤ Pour les racines

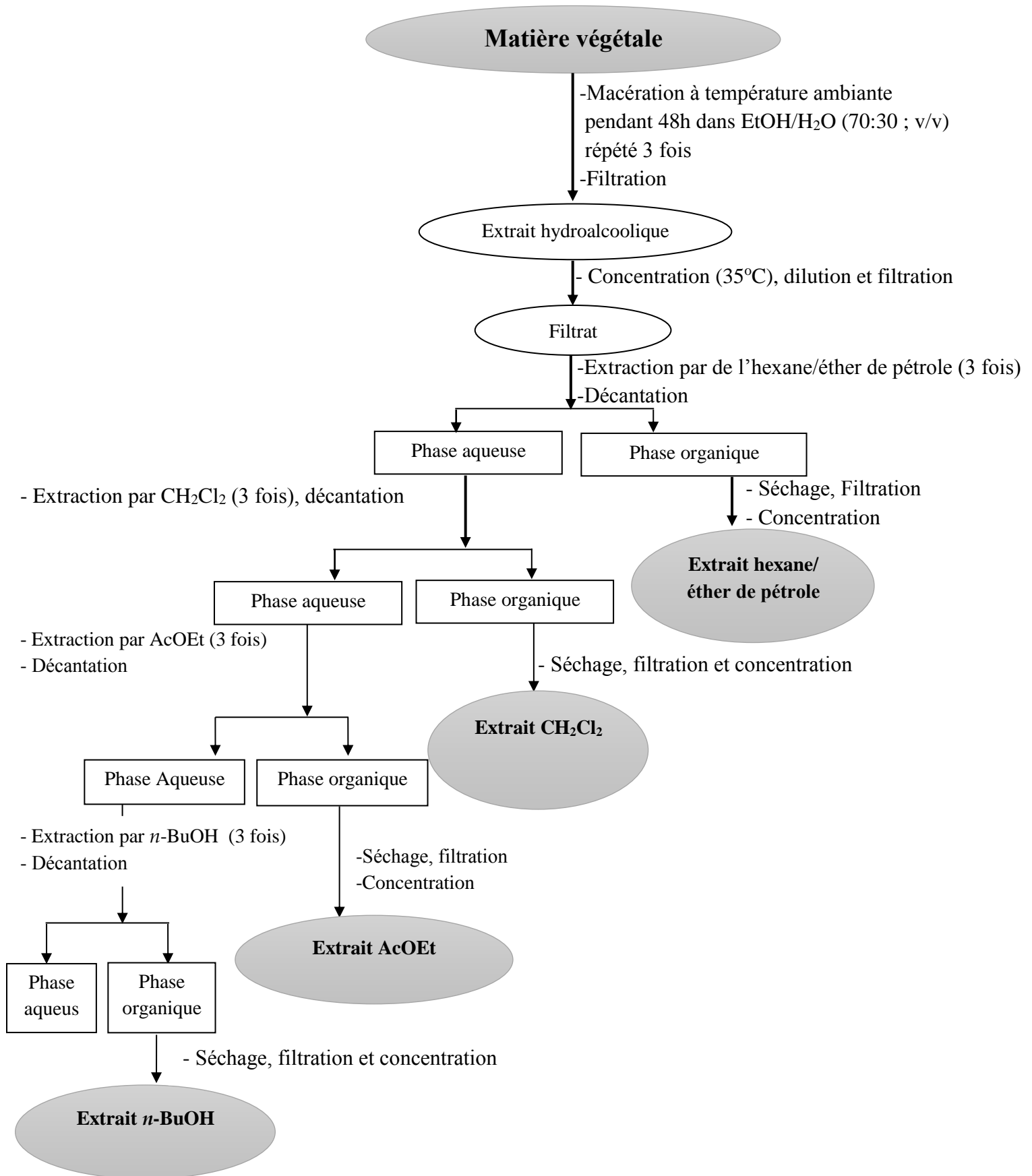
Les racines ont subi les mêmes étapes d'extraction que celles utilisées pour les parties aériennes reportées précédemment dans le cadre de la thèse de Esseid Chahrazed (Esseid, 2018). Nous nous sommes intéressés dans le cadre de ce travail, aux extraits éther de pétrole et *n*-butanol.

Les masses et les rendements évalués par rapport au poids du matériel végétal sec sont reportés dans le tableau **IV.1**.

**Tableau IV.1** : Masses et rendements des extraits

Matériel végétal	Extrait	Masse (g)	Rendement (%)
Les parties aériennes de <i>Pituranthos battandieri</i> Maire (3030 g)	Brut	160	5,31
	<i>n</i> -hexane (HP)	6	0,20
	dichlorométhane (DP)	42	1,39
	acétate d'éthyle (AP)	4	0,13
	<i>n</i> -butanol (BPA)	40	1,32
	aqueux (QP)	45	1,48
Les racines de la plante <i>Pituranthos battandieri</i> Maire (500 g)	éther de pétrole (EPR)	2,83	0,57
	chloroforme	4,27	0,85
	acétate d'éthyle	2,9	0,58
	<i>n</i> -butanol (BPR)	12	3

Le processus d'extraction est résumé par l'organigramme reporté dans la Figure **IV.3**.



**Figure IV.3 : Protocole d'extraction de *Pituranthos battandieri* Maire.**

### IV.1.7. Évaluation des teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux

#### IV.1.7.A. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en composés phénoliques totaux des extraits : dichlorométhane (DP), acétate d'éthyle (AP) et *n*-butanol (BPA) des parties aériennes, éther de pétrole (EPR) et *n*-butanol (BPR) des racines de *P. battandieri* est estimée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Granato et al., 2018; Singleton et al., 1999). Le réactif de Folin Ciocalteu, mélange des acides phosphotungstique ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) et phosphomolybdique ( $H_3PMO_{12}O_{40}$ ), est réduit en présence de polyphénols en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon.

Le test débute par la dissolution de 5 mg d'acide gallique dans 5 ml d'eau distillée pour obtenir une solution mère de concentration 1 mg/ml (1000 µg/ml). À partir de laquelle on prépare une série de solutions filles (des solutions diluées) de concentrations 5, 10, 50, 100, 150, 200 µg/ml. 100 µl de chaque solution fille sont introduits dans des tubes à essai, suivis de l'addition de 250 µl de réactif de Folin (1N) et 400 µl d'eau distillée. Après agitation puis repos pendant 2 minutes, 1250 µl de carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) à 2% ont été ajoutés. Les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 40 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à 725 nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (0-200 µg/ml) et exprimée en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par milligramme d'extrait (µg EAG/mg d'extrait).

#### IV.1.7.B. Dosage des flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux des extraits : DP, AP et BPA des parties aériennes, EPR et BPR des racines de *P. battandieri* a été déterminée par la méthode de trichlorure d'aluminium ( $AlCl_3$ ) (Quettier-Deleu et al., 2000). Le principe de la méthode est basé sur la formation d'un complexe entre  $Al^{+3}$  et les flavonoïdes.

Pour quantifier les flavonoïdes dans nos extraits ; 1 ml de chaque extrait et du standard (dissous dans le méthanol) avec les dilutions convenables est ajouté à un volume égal d'une solution d' $AlCl_3$  (2% dans le méthanol). Le mélange est vigoureusement agité et l'absorbance à 430 nm est lue après 10 minutes d'incubation.

Une courbe d'étalonnage est établie avec la quercétine et les résultats sont exprimés en microgrammes d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

### IV.1.8. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits

#### IV.1.8.A. Effet Scavenger du radical DPPH

Les activités anti-radicalaires des extraits : DP, AP et BPA des parties aériennes, EPR et BPR des racines de *P. battandieri* ont été évaluées par le test du DPPH• (1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl) on se basant sur la méthode de Blois (Blois, 1958). Brièvement, une solution de 0,4 mM de DPPH• est préparée dans le méthanol et 160 µl de cette solution ont été ajoutés à 40 µl d'échantillon dilué dans du méthanol à des concentrations différentes. Trente minutes plus tard, l'absorbance est mesurée à 517 nm. L'acide ascorbique, le BHT et l'α-tocophérol ont été utilisés comme témoins positifs. Une valeur faible de l'absorbance du mélange réactionnel indique une activité de piégeage des radicaux libres élevée.

Le pourcentage d'inhibition du radical DPPH (I %) a été calculé selon l'équation (1).

$$(1) : I \% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100.$$

Où  $A_0$  est l'absorbance de la solution DPPH• seule,  $A_1$  est l'absorbance de la solution DPPH• + l'extrait / l'acide ascorbique / le BHT / l'α-tocophérol.

#### IV.1.8.B. Activité du piégeage de l'ABTS<sup>•+</sup>

La capacité du piégeage de l'ABTS<sup>•+</sup> des extraits : DP, AP et BPA des parties aériennes, EPR et BPR des racines de *P. battandieri* a été déterminée selon la méthode de Re (Re et al., 1999); avec de légères modifications. L'ABTS<sup>•+</sup> (bleu-vert) a été produit par la réaction entre 7 mM d'ABTS (incolore) dans l'eau et 2,45 mM de persulfate de potassium. Le mélange réactionnel est stocké dans l'obscurité à température ambiante pendant 12 h avant utilisation. Avant utilisation, l'ABTS<sup>•+</sup> a été dilué avec de l'éthanol pour obtenir une absorbance de  $0,708 \pm 0,025$  à 734 nm. Ensuite, 160 µl de la solution d'ABTS<sup>•+</sup> ont été ajoutés à 40 µl de la solution d'extrait à différentes concentrations. Après 10 min, l'absorbance a été mesurée à 734 nm en utilisant un lecteur de microplaques à 96 puits.

Les pourcentages d'inhibition ont été calculés pour chaque concentration par rapport à l'absorbance du blanc. L'α-tocophérol, BHA et BHT ont été utilisés comme antioxydants standards. Le pourcentage d'inhibition du radical-cation ABTS (I %) a été calculé en utilisant l'équation (2) suivante :

$$(2) : I \% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100.$$

Où  $A_0$  est l'absorbance de la solution ABTS<sup>•+</sup> seule,  $A_1$  est l'absorbance de la solution ABTS<sup>•+</sup> + l'extrait / le BHA / le BHT / l'α-tocophérol.

#### IV.1.8.C. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La capacité de réduction des extraits EPR et BPR de *P. battandieri* a été déterminée par la méthode CUPRAC décrite par Apak (Apak et al., 2004).

Une solution est préparée avec le mélange des volumes de : 50  $\mu\text{l}$  Cu (II) (10 mM), 50  $\mu\text{l}$  néocuproïne (7,5 mM), et 60  $\mu\text{l}$  de solution tampon  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (1 M,  $\text{pH} = 7,0$ ). Différentes concentrations de chaque extrait ont été ajoutées au mélange initial afin de rendre le volume final de 200  $\mu\text{l}$ . Les microplaques de 96 puits ont été mises à l'abri de la lumière, et après 1 h, l'absorbance est mesurée à 450 nm. La capacité de réduction des extraits a été comparée à celles du BHA et du BHT. Les résultats ont été calculés en  $A_{0.5}$  ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

#### IV.1.8.D. Activité de la chélation des ions métalliques

L'activité de chélation des ions métalliques des extraits EPR et BPR de *P. battandieri* par l'ion ferreux  $\text{Fe}^{+2}$  a été mesurée selon la méthode de Decker (Decker et Welch, 1990), des volumes de 40  $\mu\text{l}$  de chaque extrait de différentes concentrations ont été ajoutés à une solution de : 40  $\mu\text{l}$   $\text{FeCl}_2$  (0,2 mM) et 40  $\mu\text{l}$  d'éthanol. La réaction a été amorcée par l'addition de 80  $\mu\text{l}$  de férène (0,5 mM). Le mélange a été agité vigoureusement et laissé au repos à une température ambiante pendant 10 min.

Après que le mélange a atteint l'équilibre, l'absorbance a été déterminés à 562 nm, les résultats ont été donnés en pourcentage d'inhibition et calculé en utilisant l'équation (3) suivante :

$$(3) : I \% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100.$$

Où  $A_0$  est l'absorbance de la solution des ions  $\text{Fe}^{2+}$  seule,  $A_1$  est l'absorbance de la solution des ions  $\text{Fe}^{+2}$  + l'extrait / L'EDTA.

L'EDTA a été utilisé comme témoin positif.

#### IV.1.8.E. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène

L'activité de blanchiment du  $\beta$ -carotène des extraits EPR et BPR de *P. battandieri* a été évaluée en adoptant la méthode Krishnaiah (Krishnaiah et al., 2011). L'émulsion de  $\beta$ -carotène/acide linoléique a été préparée par la dissolution de 0,5 mg de  $\beta$ -carotène dans 1 ml du chloroforme, 25  $\mu\text{l}$  de l'acide linoléique et 200 mg de tween 40. Après l'évaporation complète du chloroforme à 40 °C et à pression réduite. On ajoute 100 ml d'eau distillée saturée en oxygène. À 2,5 ml de l'émulsion précédente on ajoute (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de chaque extrait ou d'antioxydant de référence (BHA et BHT) préparé dans le méthanol. La cinétique de décoloration de l'émulsion en présence et en absence de l'extrait ou d'antioxydant de référence est suivie à 490 nm à des intervalles de temps réguliers pendant 2 heures.

Finalement, le pourcentage de l'inhibition de la peroxydation lipidique est calculé selon l'équation (4).

$$(4) : I \% = [A_{t=2h} / A_{t=0}] \times 100.$$

Où  $A_{t=2h}$  est l'absorbance de l'émulsion contenant l'extrait après 2 heures.  $A_{t=0}$  est l'absorbance initiale de l'émulsion contenant l'extrait.



#### IV.1.8.F. Effet scavenger du superoxyde produit par DMSO alcalin

L'activité de piégeage des radicaux superoxydes des extraits EPR et PBR de *P. battandieri* a été déterminée par la méthode de Kunchandy et Rao (Kunchandy et Rao, 1990). Brièvement, 40 µl de chaque extrait dilué est mélangé avec 130 µl de DMSO alcalin (20 mg de NaOH dissous dans 1 ml de MeOH, le volume est porté à 100 ml par du DMSO) et 30 µl de NBT (10 mg dans 10 ml d'eau distillée).

L'absorbance est mesurée à 560 nm. La diminution de l'absorbance avec les antioxydants indique une consommation du superoxyde généré. L'acide tannique et l' $\alpha$ -tocophérol ont été utilisés comme antioxydants standards.

Le pourcentage d'inhibition de la production d'anion superoxyde (activité scavenger) a été calculé en utilisant l'équation (5).

$$(5) : I \% = [(A_1 - A_0) / A_1] \times 100.$$

Où  $A_0$  est l'absorbance de la solution en absence de l'extrait,

$A_1$  est l'absorbance de la solution en présence de l'extrait / l'acide tannique / l' $\alpha$ -tocophérol.

#### IV.1.8.G. Test de la réduction du fer (FRAP)

Le pouvoir réducteur des extraits EPR et BPR de *P. battandieri* a été déterminé selon la méthode décrite par Benzie et Strain (Benzie et Strain, 1996). Un volume de 10 µl de solution d'échantillon à différentes concentrations et 40 µl de solution de tampon phosphate (pH 6,6) ont été ajoutés à 50 µl de potassium ferricyanide [ $K_3Fe(CN)_6$ ] (1% dans l'eau distillée). L'ensemble est incubé à 50°C pendant 20 minutes à l'étuve. Un volume de 50 µl d'acide trichloracétique (10%) est ensuite ajouté puis 40 µl d'eau distillée et 10 µl de  $FeCl_3$  1% fraîchement préparé dans de l'eau distillée. Un blanc négatif est préparé dans les mêmes conditions en remplaçant l'extrait par le méthanol. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique/ l'acide tannique / l' $\alpha$ -tocophérol dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les résultats ont été calculés en  $A_{0.5}$  (µg/ml) correspondant à la concentration indiquant 0,50 d'absorbance.

#### IV.1.8.I. Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été faites en triplicata et les données exprimées en moyenne  $\pm$  écart-type (SD). Les valeurs des  $CI_{50}$  (Concentrations inhibitrices à 50%) sont calculées par la méthode de régression linéaire à partir de la courbe [% inhibition = f (concentrations)]. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification sont faites par le test t de Student (Student's *t*-test) et le test ANOVA univarié. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil de 0,05.

### IV.1.9. Évaluation de l'activité antiparasitaire des extraits de *Pituranthos battandieri* Maire

#### IV.1.9.A. Protocole expérimental

L'extrait brut et les extraits de *n*-hexane (HP), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (DP), AcOEt (AP), *n*-BuOH (BPA) et aqueux (QP) des parties aériennes de *P. battandieri*, ainsi que les extraits éther de pétrole (EPR) et *n*-BuOH (BPR) des racines ont été testés pour leur activité antiparasitaire contre *L. amazonensis*, *L. donovani*, *T. cruzi* et *A. castellanii* str. Neff. Selon les mêmes protocoles détaillées dans le chapitre précédant (Chapitre III). Ainsi, les fractions, les sous-fractions et les produits isolés de chaque extrait ont été testés pour leur activité antiparasitaire et leurs CI<sub>50</sub> ont été calculés suivant les mêmes procédures détaillées précédemment (voir Chapitre III).

#### IV.1.9.B. Screening antiparasitaire *in vitro* des extraits de *P. battandieri*

Dans un premier temps, l'extrait brut et les extraits HP, DP, AP et BPA des parties aériennes et les extraits EPR et BPR des racines de *P. battandieri*, ont été testés pour leur activité antiparasitaire contre quatre parasites : *L. amazonensis*, *L. donovani*, *T. cruzi* et *A. castellanii* Neff. à des concentrations de 100 - 400 µg/ml.

Les résultats de ce screening antiparasitaire sont reportés dans le tableau IV.2.

**Tableau IV.2 :** Screening antiparasitaire des extraits de *P. battandieri* contre les différents parasites

Extractions/Parasites	Concentration (µg/ml)	<i>T. cruzi</i>			<i>A. castellanii</i>			<i>L. donovani</i>			<i>L. amazonensis</i>		
		400	200	100	400	200	100	400	200	100	400	200	100
Parties aériennes de <i>P. battandieri</i>	Brute	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-
	<i>n</i> -hexane	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-
	<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	EtOAc	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-
	<i>n</i> -BuOH	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	Aqueux	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Des racines de <i>P. battandieri</i>	<b>Ether de pétrole</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
	<i>n</i> -BuOH	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-

Clé: (-) inactive, (+) bonne activité, (+) forte activité

**Tableau IV.3 :** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (DP)

Lots de fractions	N° de la fraction	Système d'élution (%)			Poids (g)
		% Hexane	% AcOEt	% MeOH	
1	DP1	100	0	0	3,9
2	DP2	90	10	0	4,5
3	DP3	80	20	0	4,6
4	DP4	60	40	0	5,7
5	DP5	50	50	0	2,4
6	DP6	40	60	0	3,4
7	DP7	30	70	0	3,9
8	DP8	20	80	0	4,4
9	DP9	0	100	0	2,9
10	DP10	0	0	100	4,1

D'après ces résultats, on constate que les extraits dichlorométhane et *n*-hexane des parties aériennes et l'extrait éther de pétrole des racines ont donné des activités contre les quatre parasites testés à des concentrations de 400 et 200 µg/ml. Ces résultats ont été confirmés par le calcul des CI<sub>50</sub> de chaque extrait que nous avons reportés dans le chapitre VI (Résultats et discussion). L'extrait dichlorométhane des parties aériennes a été choisi pour le fractionnement bioguidé sur la base de sa réactivité vis-à-vis des parasites testés et de sa disponibilité en quantité appréciable (42 g) par rapport aux autres extraits.

#### IV.1.9.C. Fractionnement bioguidé de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> des parties aériennes (DP)

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait dichlorométhane des parties aériennes (DP), nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium, la meilleure séparation a été obtenue avec le système de solvant hexane/AcOEt dans les proportions (5:5) (Figure IV.4).



Figure IV.4 : Profil chromatographique de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> dans le système hexane/AcOEt (5:5)

##### ➤ Séparation sur colonne

Environ 41 g de l'extrait dichlorométhane (DP) sont dissous dans du méthanol et mélangés à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur une colonne confectionnée avec 300 g de gel de silice (type 60, 63-200 mesh, Macherey-Nagel) préparée dans le dichlorométhane. L'élution a débuté avec le *n*-hexane pur puis la polarité a été augmentée par addition d'acétate d'éthyle. Des fractions de 500 ml sont recueillies et analysées par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques sont examinées sous UV (254 et 365 nm), puis révélées par la solution H<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HOAc (80:16:4) et chauffées à 100°C, pendant quelques

**Tableau IV.4 :** Screening antiparasitaire des fractions de l'extrait dichlorométhane de *P. battandieri* contre les différents parasites

	Fractions/Parasites Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	<i>T. cruzi</i>			<i>A. castellanii</i>			<i>L. donovani</i>			<i>L. amazonensis</i>		
		400	200	100	400	200	100	400	200	100	400	200	100
Des fractions de l'extrait $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	F1 (DP1)	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+
	F2 (DP2)	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
	<b>F3 (DP3)</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
	<b>F4 (DP4)</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
	F5 (DP5-DP7)	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
	F6 (DP8-DP10)	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-

Clé: (-) inactive, (+) bonne activité, (+) forte activité

**Tableau IV.5 :** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de la fraction F4

N° de la sous-fraction	Système d'élution (%)			Poids (mg)
	Hexane	AcOEt	MeOH	
F4A	90	10	0	198,2
F4B	80	20	0	616,7
F4C	70	30	0	1554,4
<b>F4D</b>	<b>60</b>	<b>40</b>	<b>0</b>	<b>1645,5</b>
F4E	40	60	0	445,3
F4F	0	100	0	56,4
F4G	0	0	100	568,3

Tableau IV.6 : Screening antiparasitaire des sous-fractions de F4 contre les différents parasites

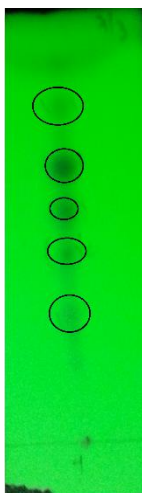
Sous-fractions Parasites/ Concentration (µg/ml)	<i>T. cruzi</i>					<i>L. donovani</i>					<i>L. amazonensis</i>				
	400	200	100	50	25	400	200	100	50	25	400	200	100	50	25
F4A	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
F4B	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
F4C	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
<b>F4D</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	-
F4E	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
F4F	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
F4G	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Clé: (-) inactive, (+) bonne activité, (+) forte activité

minutes. Les pots présentant le même profil chromatographique sont réunis donnant ainsi 10 fractions (DP1-DP10). Les résultats de l'opération sont regroupés dans le tableau **IV.3**.

Un screening de l'activité antiparasitaire a été réalisé sur les différentes fractions contre *L. amazonensis*, *L. donovani*, *T. cruzi* et *A. castellanii* à des concentrations de 100-400 µg/ml. Les fractions qui ont montré les mêmes résultats sont réunies donnant ainsi 6 fractions de F1-F6, les résultats sont reportés dans le tableau **IV.4**.

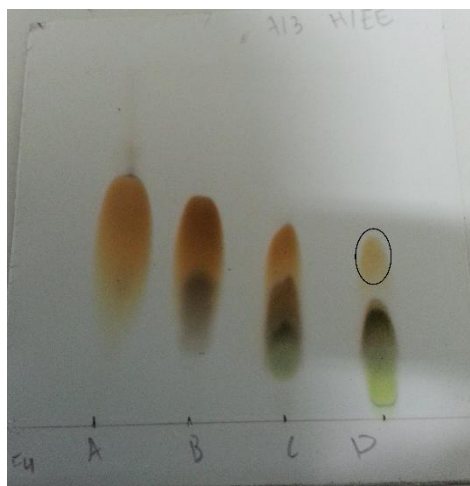
Nos résultats ont révélé que les fractions F3 et F4 présentait une forte activité antileishmanienne et antitrypanosomiale. Ces résultats sont en accord avec les valeurs de  $CI_{50}$  de fractions F3 et F4 contre les quatre parasites, reportées dans le chapitre **VI** relatif aux résultats et discussion de l'étude biologique. Pour continuer la recherche des composés antiparasitaires, nous avons sélectionné la fraction F4 pour son poids (5,7 g) et sa richesse d'après les tests chromatographiques (Figure **IV.5**).



**Figure IV.5** : Plaque CCM analytique de la fraction F4 dans le système hexane/EtOAc (7:3)

#### ➤ Fractionnement bioguidé de la fraction F4

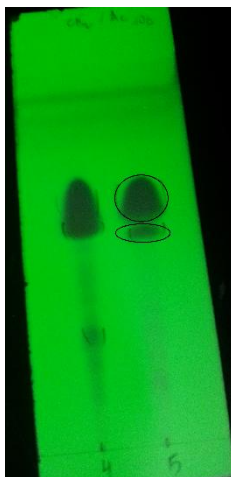
Après analyse sur une plaque analytique de gel de silice (Figure **IV.5**), la fraction F4 de masse 5,7 g a été rechromatographiée sur une colonne de gel de silice (type 60, 40-63 µm, flash colonne, Macherey-Nagel) éluée par le système hexane/AcOEt/MeOH en gradient de polarité pour donner sept sous-fractions (F4A-F4G) (Tableau **IV.5** et Figure **IV.6**).



**Figure IV.6 :** Plaque CCM analytique des fractions F4A-F4D dans le système hexane/EtOAc (7:3)

Un screening de l'activité antiparasitaire a été réalisé sur les différentes sous-fractions (F4A-F4G) vis-à-vis de *L. amazonensis*, *L. donovani*, *T. cruzi* à des concentrations de 25-400 µg/ml. Les résultats obtenus sont reportés sur le tableau **IV.6**.

Les résultats ont révélé que la plupart des sous-fractions (F4A-F4G) présentaient un effet antiparasitaire contre tous les parasites testés à 400 et 200 µg/ml. De ce fait, nous avons sélectionné la sous-fraction F4D pour sa poids (1645,5 mg) et sa richesse d'après les tests chromatographiques. (Figure **IV.7**).



**Figure IV.7 :** Plaque CCM analytique des fractions F4D-4 et F4D-5 dans le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (9,5:0,5)



➤ **Étude de la sous-fraction F4A**

Montrant un spot unique après élution sur une plaque analytique de gel de silice normale, la sous-fraction **F4A** (198,2 mg) est a été obtenue sous forme d'une huile que nous avons injectée en CG/MS. Le chromatogramme obtenu a montré la présence de plusieurs composés. L'analyse par RMN de cette huile a révélé un mélange d'acide gras. Nous avons noté ce mélange **M1**.

➤ **Fractionnement bioguidé de la sous-fraction F4D**

Cette sous-fraction est rechromatoraphiée sur une colonne de gel de Sephadex LH-20 éluee par le système *n*-hexane-CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:1:1). Des volumes de 25 ml sont recueillis et suivis par chromatographie sur couche mince en utilisant le système *n*-hexane/AcOEt. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec la solution H<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-AcOH (80:16:4) et chauffées pendant trois à cinq minutes sur une plaque chauffante. Les sous-fractions présentant le même profil chromatographique sont regroupées, numérotés F4D-1 à F4D-8 et soumises à un screening antiparasitaire contre *L. amazonensis* et *T. cruzi* à des concentrations de 25-400 µg/ml. Les résultats sont reportés dans le tableau **IV.6**.

Les résultats sont reportés dans les tableaux **IV.7** et **IV.8**.

**Tableau IV.8 :** Screening antiparasitaire des sous-fractions F4D-1 à F4D-8 contre les différents parasites

N° de la sous-fraction Parasites/ Concentration (µg/ml)	<i>T. cruzi</i>					<i>L. amazonensis</i>				
	400	200	100	50	25	400	200	100	50	25
F4D-1	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
F4D-2	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
F4D-3	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<b>F4D-4</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>F4D-5</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
F4D-6	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
F4D-7	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
<b>F4D-8</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Clé: (-) inactive, (+) bonne activité, (+) forte activité

**Tableau IV.7 :** Résultats de la séparation de la sous-fraction F4D

Lots	N° de la sous-fraction	Poids (mg)
1-9	F4D-1	98,2
10-13	F4D-2	166,7
14-19	F4D-3	155
20-30	<b>F4D-4</b>	<b>140</b>
31-36	<b>F4D-5</b>	<b>150</b>
37-45	F4D-6	56,4
46-49	F4D-7	98,5
50-59	<b>F4D-8</b>	<b>282</b>

**Tableau IV.10 :** Screening antiparasitaire des sous-fractions de F4D contre les différents parasites

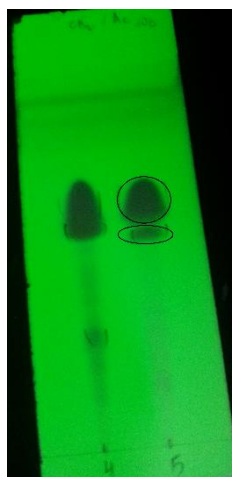
N° de la sous-fraction Parasites/ Concentration ( µg/ml)	<i>T. cruzi</i>					<i>L. amazonensis</i>				
	400	200	100	50	25	400	200	100	50	25
<b>F4D-5A</b>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
F4D-5B	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
F4D-5C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>F4D-5D</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>F4D-5E</b>	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
F4D-5F	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-

Clé: (-) inactive, (+) bonne activité, (+) forte activité

**Tableau IV.9 :** Résultats de la séparation F4D-4

Lots	N° de la sous-fraction	Observations	Poids (mg)
1-7	F4D-5-0	rien	2
8-9	<b>F4D-5A</b>	Produit pure ( <b>P1</b> )	16
10-11	F4D-5B	Mélange complexe	15
12-19	F4D-5C	2 taches séparables	70,5
20-40	<b>F4D-5D</b>	3 taches séparables	29,1
41-48	<b>F4D-5E</b>	2 taches séparables	16,2
49	F4D-5F	Mélange complexe	9,4

Nos résultats ont révélé que F4D-1 à FD-8 présentait un effet antiparasitaire contre *T. cruzi* et *L. amazonensis* à des concentrations 400 et 200 µg/ml. D'autre part, les fractions F4D-4, F4D-5 et F4D-8 manifestaient une meilleure activité inhibitrice de ces parasites, nous avons alors sélectionné les fractions F4D-5 et F4D-8 pour leurs poids (150 et 282 mg, respectivement) et la simplicité de sa composition chimique d'après les tests chromatographiques (Figure IV.7). Les concentrations inhibitrices à 50% des différentes sous-fractions testées confirment ces résultats (chapitre VI : Résultats et discussion).



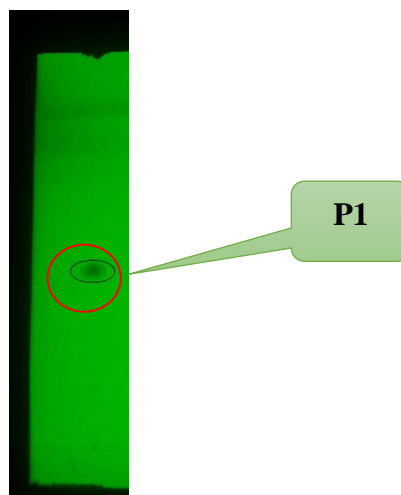
**Figure IV.7 :** Plaque CCM analytique de F4D-4 et F4D-5 dans le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (9,5:0,5)

#### ➤ Fractionnement bioguidé de la sous-fraction F4D-5

F4D-5 est rechromatographiée sur une flash colonne de gel de silice (type 60, 40-63 µm, Macherey-Nagel) éluée par le système *n*-hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en gradient de polarité. Des volumes de 5 ml sont recueillis, le suivi de leur composante chimique est réalisé par chromatographie sur couche mince de gel de silice normale en utilisant les systèmes *n*-hexane-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> et *n*-hexane/AcOEt. Après élution et séchage à l'air libre, les plaques analytiques sont révélées par la lumière UV (254 et 365 nm) et les spots observés sont délimités au crayon à mine de graphite. Les plaques sont ensuite pulvérisées avec le révélateur acide (H<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-AcOH ; 80:16:4) puis chauffées sur une plaque chauffante pendant trois à cinq minutes. Les sous-fractions présentant le même profil chromatographique sont rassemblées donnant ainsi F4-5-0 où aucun composant chimique n'est détecté et F4-5A à F4-5F qui ont été soumis à un screening antiparasitaire contre *L. amazonensis* et *T. cruzi* à des concentrations de 25-400 µg/ml. Les tableaux IV.9 et IV.10 reportent les résultats de cette petite colonne après regroupement des pots et les résultats du screening antiparasitaire, respectivement.

## ➤ F4D-5A

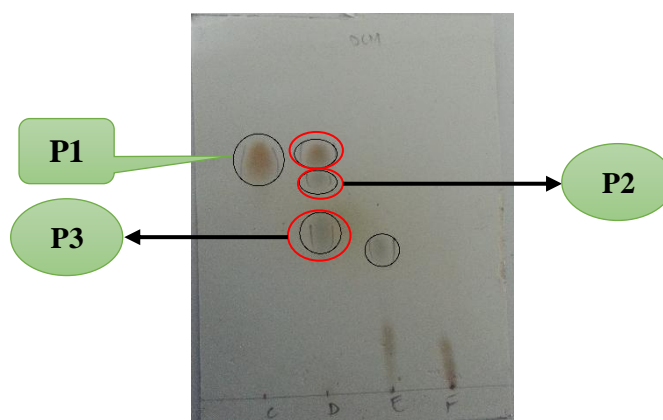
F4D-5A a montré un spot unique sous les lampes UV (254 et 365 nm) et après révélation (Figure IV.8), nous le reportons sous le code **P1**. Ce produit a montré une activité antiparasitaire remarquable contre les deux parasites testés malgré le fait qu'il a cristallisé lors de l'ajout des parasites (Chapitre VI).



**Figure IV.8** : Plaque CCM analytique du produit **P1** dans le système  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$  (9,5:0,5)

## ➤ F4D-5D

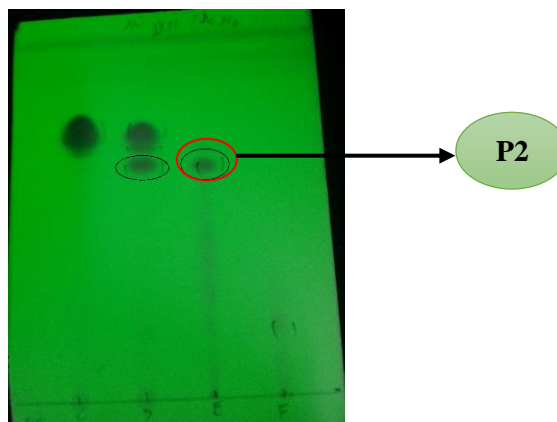
Cette sous-fraction (29,1 mg) a été purifiée sur plaques préparatives de gel de silice éluées par le système  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acétone}$  (9,8:0,2) (Figure IV.9) pour donner les composés **F4D-5D-2** (9,4 mg) et **F4D-5D-3** (15 mg), à l'état pur que nous reportons sous les codes **P2** et **P3** respectivement. Ces produits sont soumis à l'évaluation de l'activité antiparasitaire. Ces produits sont soumis à l'évaluation de l'activité antiparasitaire. Le **F4D-5D-1** (4 mg) était identique au produit **F4D-5A** et que nous avons codé **P1**.



**Figure IV.9** : Plaque CCM analytique des sous-fractions F4D-5C, F4D-5D, F4D-5E et F4D-5F dans le système  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$  (9,5:0,5)

### ➤ F4D-5E

Cette sous-fraction (16,2 mg) a été purifiée sur plaques préparatives de gel de silice éluées par le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone (9,8:0,2) (Figure IV.10) pour donner le composé **F4D-5E-2** (8,4 mg) à l'état pur.

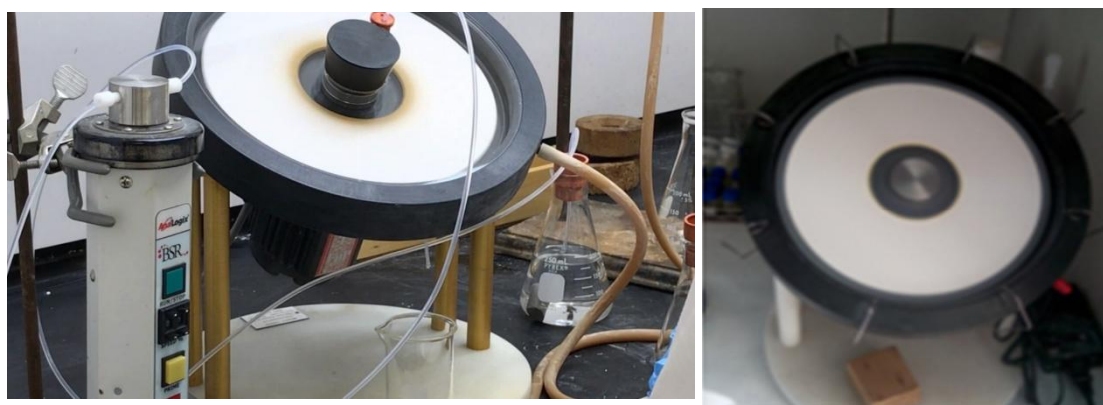


**Figure IV.10** : Plaque CCM analytique des sous-fractions F4D-5C, F4D-5D et F4D-5E dans le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (9,5:0,5)

Après analyse, le produit pur **F4D-5E-2** (4 mg) était identique au produit **F4D-5D-2** et que nous avons codé **P2**.

### ➤ Fractionnement bioguidé de la sous-fraction F4D-8

Cette sous-fraction est rechromatographiée sur un « chromatotron » (Centrifugal Thin-Layer Chromatograph) (Figure IV.11) éluée par le système *n*-hexane-AcOEt en gradient de polarité.



**Figure IV.11** : Purification de la fraction F4D-8 par un chromatotron

Des volumes de 5 ml sont recueillis, le suivi de leur composition chimique est réalisé par CCM sur des plaques analytiques de gel de silice déposée sur un support en aluminium et éluées par des systèmes *n*-hexane/AcOEt. Après révélation à la lampe UV (254 et 365 nm) et par la solution H<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-AcOH (80:16:4), les pots présentant des profils chromatographiques similaires sont regroupés donnant F4D-8A, F4D-8B et F4D-8C (tableau IV.11) que nous avons soumis à un screening antiparasitaire contre *L. amazonensis* et *T. cruzi* à des concentrations de 25-400 µg/ml (tableau IV.12).

**Tableau IV.11** : Résultats de la séparation de la sous-fraction F4D-8

Lots	N° de la sous-fraction	Observations	Poids (mg)
1-27	F4D-8A	3 taches séparables	159,4
28-40	F4D-8B	3 taches séparables	62,1
41-89	F4D-8C	2 taches séparables	25,6

**Tableau IV.13** : Résultats de la séparation de la sous-fraction F4D-8A

Lots	N° de la sous-fraction	Système d'élution (%)			Poids (mg)
		Hexane	AcOEt	MeOH	
1-5	F4D-8A-1	100	0	0	50,8
6-8	F4D-8A-2	95	5	0	40
9-10	F4D-8A-3	90	10	0	30
11-12	F4D-8A-4	80	20	0	36,5
13	F4D-8A-5	0	100	0	1,6
14-19	F4D-8A-6	0	0	100	2,5

**Tableau IV.12** : Screening antiparasitaire de F4D-8A, F4D-8B et F4D-8C contre les parasites testés

N° de la sous-fraction / Parasites/ Concentration (µg/ml)	<i>T. cruzi</i>					<i>L. amazonensis</i>				
	400	200	100	50	25	400	200	100	50	25
F4D-8A	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
F4D-8B	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
F4D-8C	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

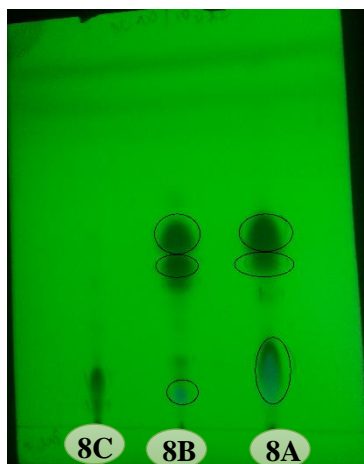
Clé: (-) inactive, (+) bonne activité, (+) forte activité

**Tableau IV.14** : Screening antiparasitaire de F4D-8A-1 à F4D-8A-6 contre les parasites testés

N° de la sous-fraction / Parasites/ Concentration (µg/ml)	<i>T. cruzi</i>					<i>L. amazonensis</i>				
	400	200	100	50	25	400	200	100	50	25
F4D-8A-1	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
F4D-8A-2	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
F4D-8A-3	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
F4D-8A-4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
F4D-8A-5	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
F4D-8A-6	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-

Clé: (-) inactive, (+) bonne activité, (+) forte activité

Nos résultats ont révélé que F4D-8A, F4D-8B et F4D-8C présentaient un effet antiparasitaire contre *T. cruzi* et *L. amazonensis* à des concentrations 400, 200 et 100 µg/ml. On note cependant une meilleure activité de F4D-8A et F4D-8C. Nos tests chromatographiques ont montré que F4D-8A, F4D-8B et F4D-8C présentaient des profils simples (Figure IV.12), ce qui nous a encouragé à procéder à leur fractionnement.



**Figure IV.12 :** Plaques CCM analytique des sous-fractions F4D-8A, F4D-8B et F4D-8C dans le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt (9,5:0,5)

#### ➤ Fractionnement bioguidé de F4D-8A

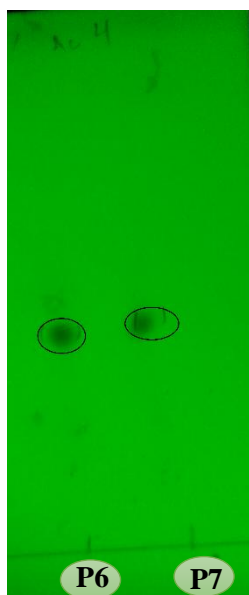
F4D-8A est rechromatographiée sur une flash colonne de gel de silice (type 60, 40-63 µm, Macherey-Nagel) éluée par le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone en gradient de polarité. Le tableau IV.13 reporte les résultats de ce fractionnement après regroupement des lots selon les tests chromatographiques. Les sous-fractions obtenues sont soumises à un screening antiparasitaire contre *L. amazonensis* et *T. cruzi* à des concentrations de 25-400 µg/ml (Tableau IV.14).

D'après nos résultats, nous avons constaté que les sous-fractions F4D-8A-3 et F4D-8A-4 sont les plus actives contre *T. cruzi* et *L. amazonensis* par rapport aux autres fractions. Vu les quantités faibles obtenues et vu les résultats des tests chromatographiques de ces fractions, nous avons procédé à leur purification sur plaques analytiques de gel de silice.

#### ➤ Purification des sous-fractions F4D-8A-3 et F4D-8A-4

Ces deux sous-fractions F4D-8A-3 (30 mg) et F4D-8A-4 (36,5 mg) ont été purifiées sur plaques analytiques de gel de silice éluées par le système hexane/acétone (6:4) (Figure IV.13) pour donner **F4D-8A-3-A** (4 mg) sous-forme d'un mélange de deux produits que nous n'avons pas pu séparer et que nous reportons sous les codes **P4** et **P5**. Ces deux sous-fractions (F4D-8A-3 et F4D-8A-4) ont également permis d'isoler les composés **F4D-8A-3-B** (7,5 mg) et **F4D-8A-4-C** (25 mg), respectivement, à l'état pur que nous reportons sous le code **P6** et **P7**, respectivement.

Nous avons soumis tous ces produits à l'évaluation de l'activité antiparasitaire pour déterminer leur  $CI_{50}$ .



**Figure IV.13** : Plaque CCM analytique des produits **P6** et **P7** dans le système hexane/acétone (6:4)

➤ **Fractionnement bioguidé de la sous-fraction F4D-8C**

Cette sous-fraction est rechromatographiée sur colonne de gel de silice (type 60, 40-63  $\mu\text{m}$ , Macherey-Nagel) éluée par le système  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /acétone en gradient de polarité, donnant F4D-8C-1 et F4D-8C-2 (Tableau **IV.15**) que nous avons soumises à l'évaluation de l'activité antiparasitaire contre *T. cruzi* et *L. amazonensis* (Tableau **IV.16**).

D'après ces résultats, nous avons constaté que la sous-fraction F4D-8C-1 est plus active contre *T. cruzi* et *L. amazonensis* que F4D-8C-2. Vu la faible quantité de F4D-8C-1 et vu les résultats des tests chromatographiques, nous avons procédé à sa purification sur plaques analytiques de gel de silice.

➤ **Purification de la sous-fraction F4D-8C-1**

La purification a été faite sur plaques analytiques de gel de silice avec le système éluant  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /acétone (9,8:0,2) pour donner le produit F4D-8C-1-3 (4 mg) et F4D-8C-1-M (6 mg) (Figure **IV.14**). Le composé F4D-8C-1-M est en fait un mélange de deux produits que nous n'avons pas pu séparer et que nous reportons sous les codes **P8** et **P9**. Ce mélange a été soumis à l'évaluation de l'activité antiparasitaire. La  $CI_{50}$  de ce mélange a été calculée (Chapitre **VI**).



**Tableau IV.15** : Résultats de la séparation de F4D-8C

Lots	N° de la sous-fraction	Système d'élution (%)		Poids (mg)
		CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Acétone	
1-10	F4D-8C-1	100	0	16,4
		95	5	
		90	10	
		85	15	
11-26	F4D-8C-2	80	20	5,6
		70	30	
		0	100	

**Tableau IV.16** : Screening antiparasitaire de F4D-8C-1 et F4D-8C-2 contre les parasites testés

N° de la sous-fraction  Parasites/ Concentration (µg/ml)	<i>T. cruzi</i>					<i>L. amazonensis</i>				
	400	200	100	50	25	400	200	100	50	25
F4D-8C-1	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
F4D-8C-2	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-

Clé: (-) inactive, (+) bonne activité, (++) forte activité

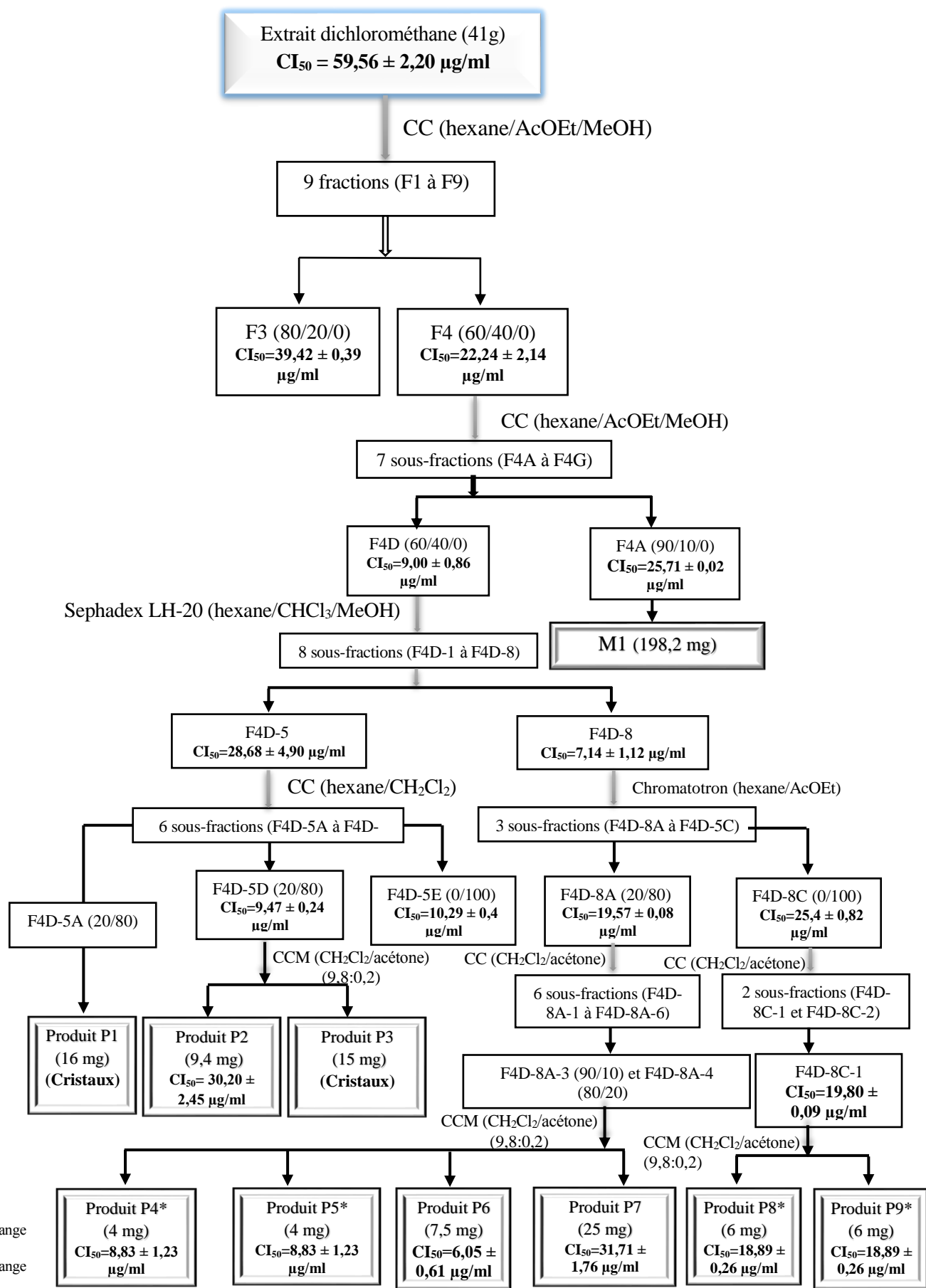


**Figure IV.14 :** Plaques CCM analytiques du mélange F4D-8C-1-M et le produit **P1** dans le système CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acétone (9,8:0,2)

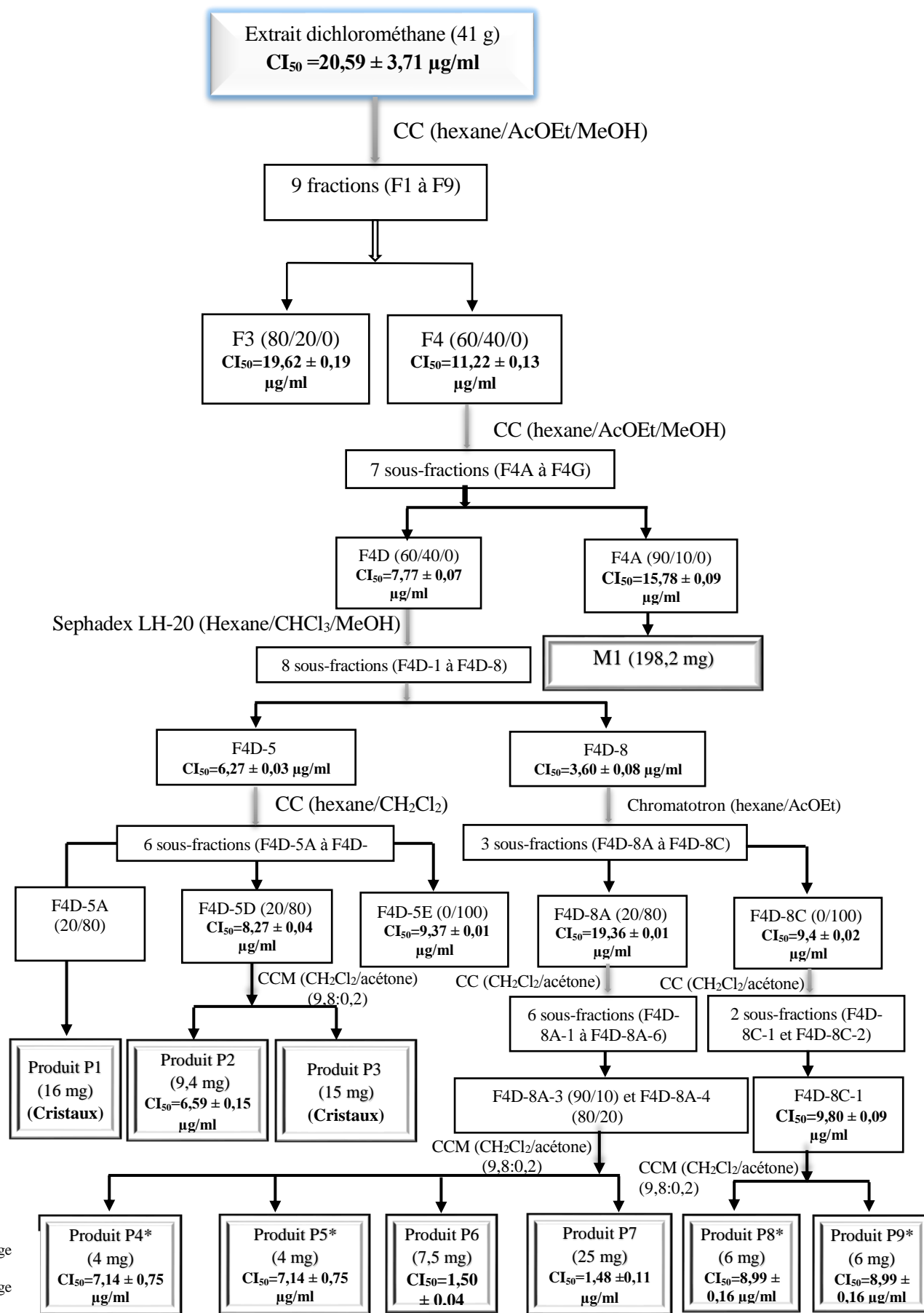
Ainsi, le produit pur **F4D-8C-1-3** (Figure **IV.14**) était identique au produit **F4D-5A** et que nous avons codé **P1**.

En résumé, la séparation et la purification bioguidées des fractions issues du fractionnement bioguidé par chromatographie sur colonne de gel de silice normale de l'extrait dichlorométhane des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire a permis la séparation et la purification de **neuf produits actifs contre *T. cruzi* et *L. amazonensis* (P1 à P9)**.

Le protocole de fractionnement bioguidé contre *T. cruzi*, isolement et purification des fractions de la phase dichlorométhane de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire est représenté dans la figure **IV.15**. Celui du fractionnement bioguidé contre *L. amazonensis*, isolement et purification des fractions de la phase dichlorométhane de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire est représenté dans la figure **IV.16**.



**Figure IV.15** : Schéma de séparation et purification bioguidées des produits isolés de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> des parties aériennes de l'espèce *P. battandieri* contre *T. cruzi*

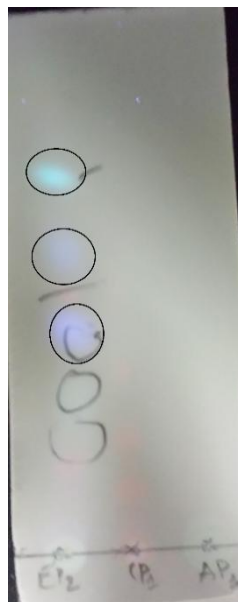


(\*) P4 et P5 en mélange  
 (\*) P8 et P9 en mélange

**Figure IV.16 :** Schéma de séparation et purification bioguidées des produits isolés de l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> des parties aériennes de l'espèce *P. battandieri* contre *L. amazonensis*

#### IV.1.9.D. Fractionnement bioguidé de l'extrait éther de pétrole des racines (EPR) de *P. battandieri*

Avant d'entamer la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait éther de pétrole des racines (EPR), nous avons procédé à des tests chromatographiques sur couche mince de gel de silice déposée sur une feuille d'aluminium, la meilleure séparation a été obtenue avec le système de solvant hexane/AcOEt dans les proportions (5:5) (Figure IV.17).



**Figure IV.17** : Profil chromatographique de l'extrait éther de pétrole dans le système hexane/AcOEt (5:5)

##### ➤ Séparation sur colonne

Environ 1 g de l'extrait éther de pétrole est dissout dans un petit volume de méthanol et mélangé à une petite quantité de gel de silice, l'ensemble est séché sous vide, puis pulvérisé jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. Cette dernière est déposée sur une colonne confectionnée avec 30 g de gel de silice (type 60, 63-200 mesh, Macherey-Nagel) préparée dans du *n*-hexane. L'élution a débuté avec la même polarité (*n*-hexane) puis a été augmentée par addition d'acétate d'éthyle. Des fractions de 50 ml sont recueillies et analysées par chromatographie sur couche mince (CCM). Les plaques sont examinées sous UV (254 et 365 nm), puis révélées à la solution H<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-AcOH (80:16:4) et chauffées à 100°C, pendant quelques minutes. Les lots ont été regroupés selon leur profil chromatographique sur couche mince donnant ainsi 8 fractions et soumis à des tests d'activité antiparasitaire contre *L. amazonensis*, *L. donovani*, *T. cruzi* et *A. castellanii* Neff. à des concentrations de 100 à 400 µg/ml.

Les résultats de ce regroupement et ces tests sont présentés dans les tableaux IV.17 et IV.18, respectivement.

**Tableau IV.18 :** Screening antiparasitaire contre *T. cruzi*, *A. castellanii*, *L. donovani* et *L. amazonensis*, des fractions de l'extrait EPR

Fractions /Parasites Concentration (µg/ml)	<i>T. cruzi</i>			<i>A. castellanii</i>			<i>L. donovani</i>			<i>L. amazonensis</i>		
	400	200	100	400	200	100	400	200	100	400	200	100
F1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
F2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>F3</b>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
F4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<b>F5</b>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
<b>F6</b>	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
F7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
F8	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Clé: (-) inactive, (+) bonne activité, (+) forte activité

**Tableau IV.20 :** Screening antiparasitaire de F3A à F3D contre les parasites testés

N° de la sous-fraction Parasites/ Concentration (µg/ml)	<i>T. cruzi</i>			<i>L. amazonensis</i>		
	400	200	100	400	200	100
F3A	+	+	-	-	-	-
<b>F3B</b>	+	+	+	+	+	-
F3C	-	-	-	+	-	-
F3D	-	-	-	-	-	-

Clé: (-) inactive, (+) bonne activité, (+) forte activité

**Tableau IV.17 :** Fractionnement de l'extrait éther de pétrole des racines de *P. battandieri* (EPR)

Lots	N° de la fraction	Système d'élution (%)		Poids (mg)
		Hexane	AcOEt	
1-2-3	F1	100 94	0 6	8,1
4	F2	90	10	93,2
5-6	<b>F3</b>	<b>85</b>	<b>15</b>	58,9
7-8	F4	80	20	118,5
9-10-11	<b>F5</b>	<b>75</b>	<b>25</b>	292,7
		<b>70</b>	<b>30</b>	
12	<b>F6</b>	<b>60</b>	<b>40</b>	50,5
13	F7	40	60	34,4
14	F8	100	0	124,7

**Tableau IV.19 :** Résultats de la séparation de la fraction F3

Lots	N° de la sous-fraction	Système d'élution (%)			Poids (mg)
		Hexane	AcOEt	MeOH	
1-6	F3A	100	0	0	6,6
		95	5		
		90	10		
7-8	<b>F3B</b>	85	15	0	<b>39,8</b>
9-14	F3C	80	20	0	3,5
		75	25		
		70	30		
15-19	F3D	60	40	0	3,4
		50	50	0	
		100	0	0	
		0	0	100	

Nos résultats ont révélé que la fraction F3 présentait un meilleur effet antiparasitaire vis-à-vis de *L. amazonensis*, *L. donovani* et *T. cruzi*. De ce fait, nous l'avons sélectionnée pour la séparation et la purification de ses composants chimiques. Les masses et la richesse des fractions F5 et F6 qui ont manifesté une bonne activité antiparasitaire contre *L. amazonensis*, nous ont incités à rechercher leurs composants. La fraction F8 qui se trouve être la plus active contre *A. castellanii*, a également été choisie pour un fractionnement bioguidé contre ce parasite.

#### ➤ Fractionnement bioguidé de la fraction F3

Après analyse sur une plaque analytique de gel de silice, la fraction F3 de masse 58,9 mg a été rechromatographiée sur une colonne de gel de silice (type 60, 40-63  $\mu\text{m}$ , Macherey-Nagel) éluée par le système hexane/AcOEt/MeOH en gradient de polarité pour donner 4 sous-fractions (F3A-F3D). Ces sous-fractions sont soumises à des tests de recherche d'activité antiparasitaire contre *T. cruzi* et *L. amazonensis* à des concentrations de 100 à 400  $\mu\text{g/ml}$ .

Les résultats de ce regroupement et ces tests sont présentés dans les tableaux **IV.19** et **IV.20**, respectivement.

D'après nos résultats reportés dans le tableau **IV.20**, la sous-fraction F3B est plus active contre les parasites testés par rapport aux autres sous-fractions. Nous l'avons alors sélectionnée pour séparation et purification.

#### ➤ Fractionnement bioguidé de la sous-fraction F3B

Cette sous-fraction (39,8 mg) a été séparée sur plaques analytiques de gel de silice éluées par le système hexane/AcOEt (9:1) (Figure **IV.18**) pour donner six bandes F3B1-F3B6 (Figure **IV.21**). Ces bandes ont été éluées et testées sur *T. cruzi* à des concentrations de 100 à 400  $\mu\text{g/ml}$ .

Les résultats de ces tests sont présentés dans le tableau **IV.22**



**Figure IV.18** : Profil chromatographique de la sous-fraction F3B dans le système hexane/AcOEt (5:5)

**Tableau IV.21** : Résultats de la séparation de la fraction F3B

N° de la bande	Observations	Poids (mg)
F3B-1	Mélange complexe	25,3
F3B-2	Mélange de produits en très faible quantité	1,5
F3B-3	Mélange de produits en très faible quantité	1,7
F3B-4	Mélange de deux produits (non traité car en quantité faible)	2,6
F3B-5	Mélange complexe	1,1
F3B-6	2 taches séparables	7

**Tableau IV.22** : Résultats de la séparation de la fraction F6

Lots	N° de la sous-fraction	Système d'élution (%)		Poids (mg)
		Hexane	diéthyle éther	
1-4	F6-1	100	0	8,1
5-6	F6-2	80	20	12,4
7-9	F6-3	60	40	10,9
10-13	F6-4	50	50	8,5
14-17	F6-5	0	100	12,7

**Tableau IV.20** : Screening antiparasitaire de F3B-1 à F3B-6 contre *T. cruzi*

N° de la sous-fraction Parasites/ Concentration (µg/ml)	<i>T. cruzi</i>		
	400	200	100
F3B-1	-	-	-
F3B-2	+	-	-
F3B-3	-	-	-
<b>F3B-4</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
F3B-5	-	-	-
<b>F3B-6</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>

Clé: (-) inactive, (+) bonne activité, (+) forte activité

**Tableau IV.23** : Screening antiparasitaire de F6-1 à F6-5 contre *L. amazonensis*

N° de la sous-fraction Parasites/ Concentration (µg/ml)	<i>L. amazonensis</i>		
	400	200	100
F6-1	-	-	-
<b>F6-2</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
F6-3	-	-	-
F6-4	-	-	-
F6-5	-	-	-

Clé: (-) inactive, (+) bonne activité, (+) forte activité



D'après ces résultats, les sous-fractions F3B-2, F3B-4 et F3B-6 sont les plus actives à 400 µg/ml par rapport les autres sous-fractions. Vu les quantités faibles obtenues, nous n'avons pu nous intéresser qu'à la purification de la sous-fraction **F3B-6**.

➤ **Étude de la sous-fraction F3B-4**

Vu la quantité faible obtenue et les tests chromatographiques effectués sur cette sous-fraction, nous n'avons pas pu séparer les deux molécules qu'elle contenait. Nous l'avons alors soumise à l'analyse structurale. Les deux produits qu'elle contenait sont codés **P10** et **P11** et évalués (Chapitre VI : Résultats et discussion).

➤ **Étude de la sous-fraction F3B-6**

Cette sous-fraction, testée sur plaque analytique de gel de silice 60 a montré deux taches dont une très minoritaire (Figure IV.19).



**Figure IV.19** : Profil chromatographique de la sous-fraction F3B-6 dans le système hexane/AcOEt (9:1)

Ainsi, cette sous-fraction jugée intéressante a subi une purification par chromatographie sur une plaque analytique (20 X 20 cm) de gel de silice normale éluée par le système hexane/AcOEt (9:1). Pour donner le produits **P12** (8 mg).

❖ **Fractionnement bioguidé de la fraction F6**

Cette fraction est rechromatographiée sur une colonne de gel de silice (type 60, 40-63 µm, Macherey-Nagel) éluée par le système hexane/diéthyle éther en gradient de polarité. Des lots de 10 ml ont été recueillis et analysés par CCM. Les lots ont été regroupés selon leur profil chromatographique et leur activité antiparasitaire a été testée contre *L. amazonensis*.

Les résultats de ce regroupement et ces tests sont présentés dans les tableaux **IV.22** et **IV.23**, respectivement.

La sous-fraction F6-2 est la plus active contre le parasite testé à 400, 200 et 100 µg/ml, elle est sélectionnée pour être fractionnée et purifiée.

#### ❖ Étude de la sous-fraction F6-2

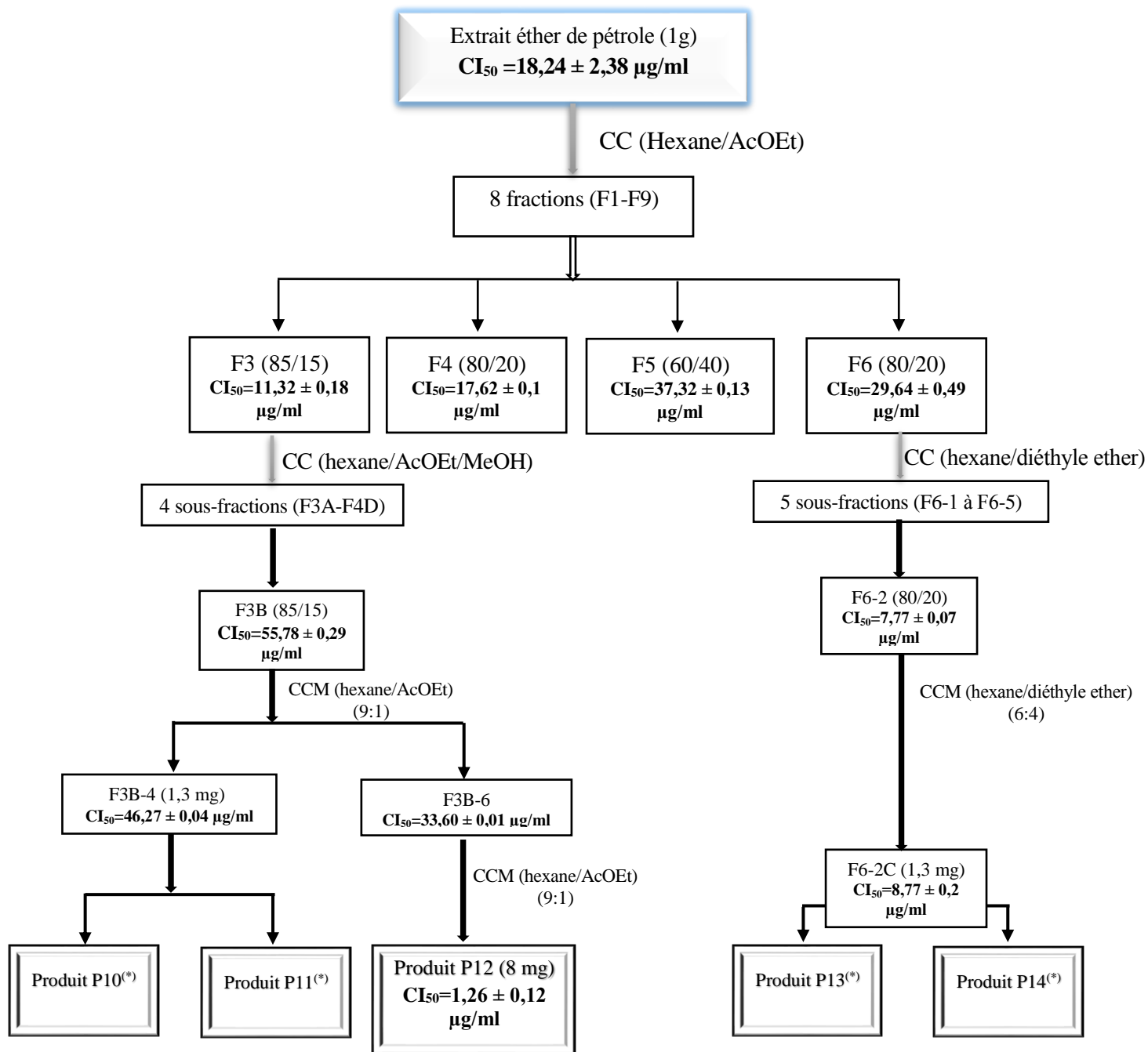
La sous-fraction **F6-2** (12,5 mg) a été traitée sur une plaque préparative de gel de silice en utilisant comme système d'élution le mélange hexane/diéthyle éther (6:4), pour donner **F6-2C**, un mélange de deux produits que nous avons codé **P13** et **P14** (1,3 mg). Vu la quantité faible obtenue, nous n'avons pu séparer ces deux produits. Ce mélange a manifesté une bonne activité antileishmanienne et la valeur de leur  $CI_{50}$  a été calculée (Chapitre **VI** : Résultats et discussion).

#### ❖ Fractionnement bioguidé des fractions F5 et F4

Ces deux fractions ont été rechromatographiées sur colonne de gel de silice, et les sous-fractions obtenues ont été testées contre *L. amazonensis* et *T. cruzi*. Malgré le fait que quelques sous-fractions ont présenté une bonne activité antiparasitaire, nous n'avons pu isoler aucun produit pur. Les résultats de ces tests sont reportés dans le chapitre **VI** (Résultats et discussion).

En résumé, la séparation et la purification des fractions issues du fractionnement bioguidé par chromatographie sur colonne de gel de silice normale de l'extrait éther de pétrole des racines de *Pituranthos battandieri* Maire a permis la séparation de **cinq produits (P10 à P14)**.

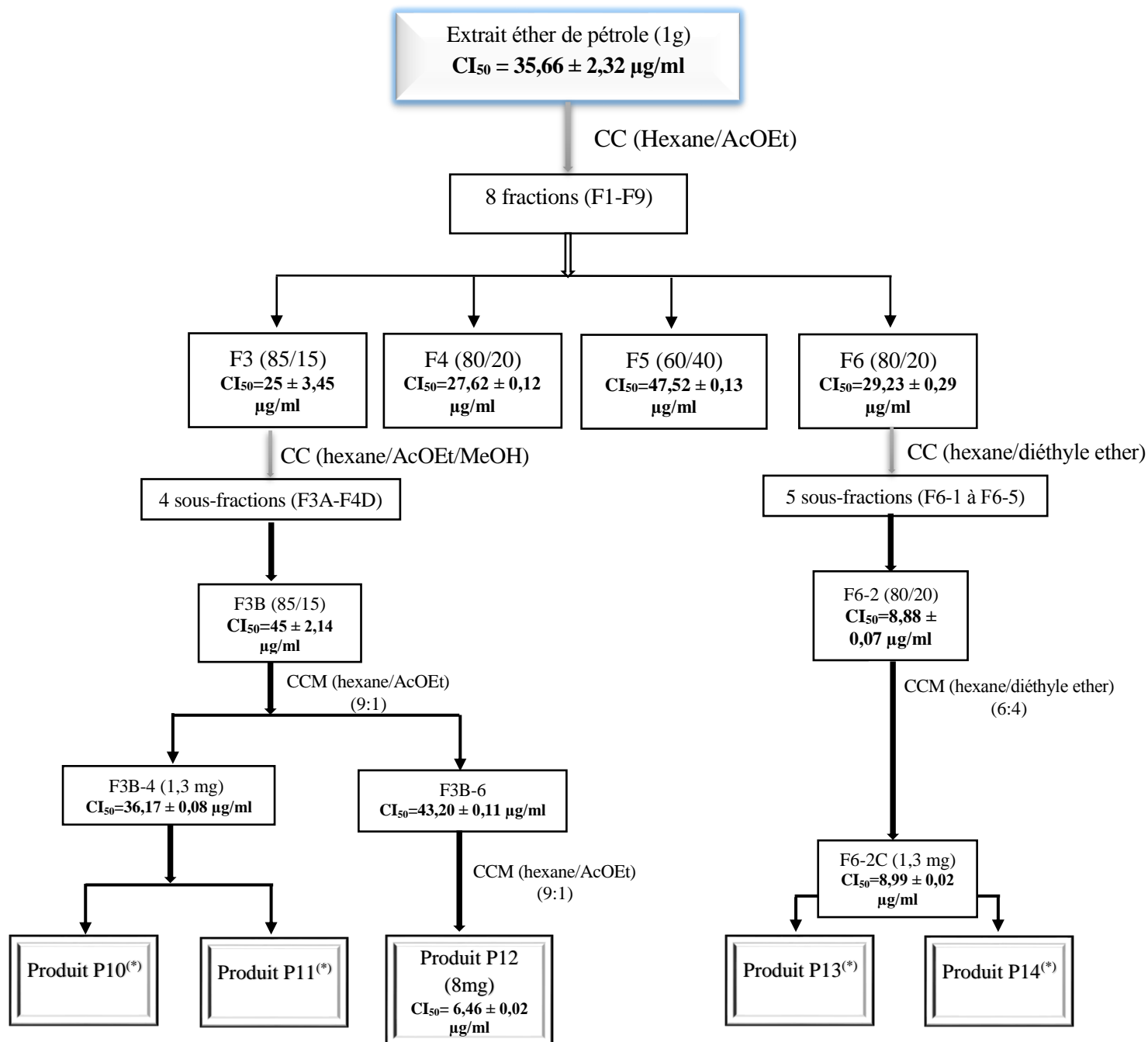
Le protocole de fractionnement bioguidé, isolement et purification des fractions de la phase éther de pétrole de l'extrait hydroalcoolique des racines de l'espèce *Pituranthos battandieri* Maire et les résultats de l'activité antiparasitaire (contre *L. amazonensis* et *T. cruzi*) de ces fractions sont représentés dans les figures **IV.20** et **IV.21**, respectivement.



(\*) P13 et P14 en mélange

(\*) P10 et P11 en mélange

**Figure IV.20** : Schéma de séparation et purification bioguidées des produits isolés de l'extrait éther de pétrole des racines de *P. battandieri* et  $CI_{50}$  des sous-fractions et des produits contre *L. amazonensis*



(\*) P13 et P14 en mélange

(\*) P10 et P11 en mélange

**Figure IV.21** : Schéma de séparation et purification bioguidées des produits isolés de l'extrait éther de pétrole des racines de *P. battandieri* et  $CI_{50}$  des sous-fractions et des produits contre *T. cruzi*

**V.1.10. Fractionnement de l'extrait *n*-butanol des racines de *P. battandieri***

Pour mettre au point le meilleur système d'élution, l'extrait *n*-butanol obtenu a été testé par chromatographie analytique sur couche mince, les taches sont visualisées sous la lumière UV (254 et 365 nm) suivie par la révélation à l'acide sulfurique et chauffage. La meilleure séparation obtenue était avec le système de solvants: CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8:3).

Une masse d'environ 10 g de l'extrait *n*-butanol est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Merck) préparée dans le chloroforme. L'élution est réalisée par le système CHCl<sub>3</sub>/MeOH, en commençant par le chloroforme pur et en augmentant la polarité par l'addition progressive du méthanol, avec un fractionnement tous les 50 ml. Le suivi de la composition des fractions a été effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm), puis révélées avec l'anisaldéhyde et chauffées à 100°C pendant 3 mn. Les pots de même composition sont rassemblés donnant 29 fractions (Tableau **IV.24**).

**Tableau IV.24 :** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait *n*-butanol des racines de *P. battandieri*

Système d'éluion (%)		Pots	N° de la fraction	Poids (mg)
CHCl <sub>3</sub>	MeOH			
100	0	1-10	PB1	25,3
		11	PB2	4,5
		12	PB3	6
		13-15	PB4	17,8
99	1	16-25	PB5	10,9
		26-31	PB6	12
		32-33	PB7	14,5
		34-44	PB8	28,3
		45-53	PB9	89,2
98	2	54-69	PB10	100,9
97	3	70-86	PB11	115,8
96	4	87-93	PB12	78,5
<b>95</b>	<b>5</b>	<b>94</b>	<b>PB13</b>	<b>12,4</b>
		95-96	PB14	40,8
		97-100	PB15	145,6
		101-110	PB16	114,5
94	6	111-116	PB17	118,9
		117-123	PB18	245,4
93	7	124-136	PB19	255,6
		137-152	PB20	278,2
90	10	153-161	PB21	145,6
85	15	162-174	PB22	45,8
<b>80</b>	<b>20</b>	<b>175-199</b>	<b>PB23</b>	<b>248,7</b>
75	25	200-203	PB24	47,9
70	30	204-220	PB25	124,6
65	35	221-253	PB26	147,7
60	40			
55	45			
50	50			
45	55			
40	60			
35	65	254-261	PB27	246,3
30	70	262-280	PB28	289,5
25	75			
20	80			
15	85			
10	90			
5	95	281-313	PB29	248,6
0	100			

### ❖ Étude de la fraction PB23

Vu la quantité appréciable de cette fraction, nous avons opté de la séparer par la chromatographie sur papier Watman N°3. Après des tests analytiques, nous avons sélectionné le système BAW (4,1,5) phase organique.

Après dépôt de la fraction, élution et séchage à l'air libre, les feuilles sont visualisées sous la lumière UV (254 et 365). Les six bandes observées ont délimitées au crayon à mine de graphite, séparées, coupées en petits morceaux et trempées dans l'éthanol bouillant.

Après filtration et évaporation, nous avons obtenu les six sous-fractions correspondantes PB23-1 à PB23-6

#### ❖ Purification de la sous-fraction PB23-1

La purification de cette sous-fraction (25 mg) sur plaques préparatives de gel de silice éluées par le système CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8:3), a permis d'isoler le produit **PB23-1-1** (7 mg) à l'état pur que nous reportons sous le code **P15**.

#### ❖ Purification de la sous-fraction PB23-2

Après analyse sur une plaque analytique de gel de silice, la sous-fraction PB23-2 (20,8 mg) a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF<sub>254</sub> éluées par le système chloroforme/méthanol (8:3), pour donner le produit **PB23-2-1** (5 mg) à l'état pur que nous reportons sous le code **P16**.

#### IV.1.11. Dosage des éléments inorganiques de l'extrait *n*-butanol par ICP-AES et ICP-MS

##### IV.1.11.A. Introduction

Pour se développer et s'épanouir, une plante a besoin d'eau, de lumière et d'éléments nutritifs. Parmi ces éléments nutritifs, les éléments minéraux qui sont indispensables à une bonne croissance et un bon développement des plantes, végétatif ou génératif mais également pour la résistance aux maladies et ravageurs. Ces éléments sont nécessaires pour compléter le cycle de vie d'un organisme. Sur les 92 éléments connus sur la Terre, 17 sont essentiels à toutes les plantes. Ils sont divisés en macronutriments et micronutriments (Soltner, 2009). Les macronutriments comprennent **C, H, O, Ca, K, Mg, N, S** et **P**, dont **C, H** et **O** représentent environ 95% de la matière sèche des plantes et les autres sont généralement présents à  $>1000 \text{ mg.kg}^{-1}$  poids sec (Salgueiro et al., 2000).

Les micronutriments (également appelés oligo-éléments) comprennent **Cl, B, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni** et **Zn**, qui sont généralement présent à  $<100 \text{ mg kg}^{-1}$  de poids sec. Elles sont indispensables au bon fonctionnement du métabolisme de la plante (Juranović Cindrić et al., 2015).

Les éléments qui favorisent la croissance et peuvent être essentiels pour des taxons particuliers mais ne sont pas requis par toutes les plantes sont appelés éléments bénéfiques. Les cinq éléments bénéfiques les plus étudiés sont **Al, Co, Na, Se** et **Si**. Tous ces éléments favorisent la croissance de divers taxons dans certaines conditions environnementales; toutefois, la fonction et la concentration varient pour chaque élément et chaque espèce végétale (Qing-hua et al., 2012).

Aujourd'hui, encore une majorité des populations surtout les pays en voie de développement, se soignent uniquement avec des remèdes traditionnels à base de plantes. Certaines de ces propriétés sont corrélées aux composés organiques présents dans la plante, mais certains oligo-éléments sont également connus pour réduire les lésions cutanées, telles que **Zn, Se, Cu, Mn, Si** et **Li** (Salgueiro et al., 2000). En effet, la détermination de leur teneur en composés minéraux est très importante, car la concentration et la nature de l'élément absorbé sont spécifiques à la plante, l'élément peut devenir toxique pour l'espèce et pour le milieu (Jia et al., 2011). Plusieurs études décrivent les coumarines et les composés phénoliques en tant que constituants caractéristiques des espèces du genre *Pituranthos*, mais il n'existe aucun rapport sur la teneur en éléments minéraux des plantes du genre *Pituranthos*.

L'objectif de cette étude se concentre sur la détermination de la teneur en macroéléments et en éléments-traces de l'extrait butanolique de *P. battandieri* (BPA) après la digestion par microonde par spectroscopie d'émission atomique par plasma à couplage inductif (ICP-AES) et spectroscopie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS).



#### IV.1.11.B. Principe d'ICP-AES

ICP-AES c'est la Spectrométrie d'émission Atomique couplée à un Plasma Induit par Haute Fréquence et l'analyse de métaux par ICP-AES repose sur la mesure des radiations émises par les atomes passés dans un état excité, sous forme atomique ou ionisée, grâce à un plasma à très haute température. L'atome excité est instable, donc il tend à revenir à un état fondamental plus stable en libérant son excédent d'énergie par émission de photons

L'appareil utilisé est un appareil Varian 720ES (Figure IV.22)

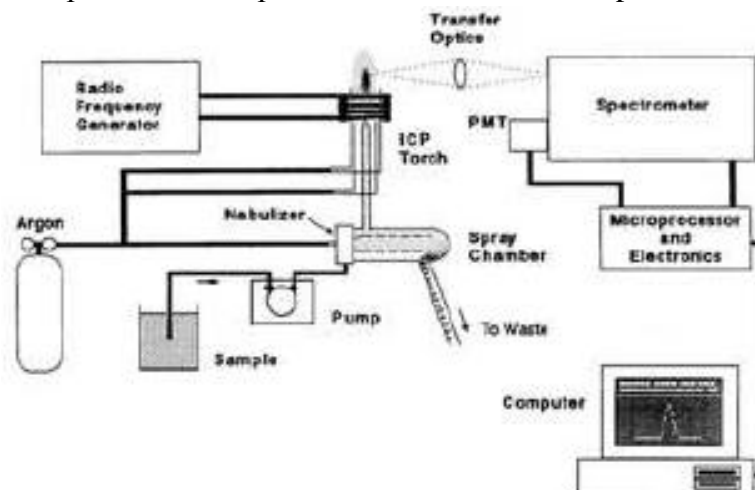


**Figure IV.22 :** Appareil ICP/AES de L'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), Strasbourg

Cet appareil se décompose en quatre parties :

- le système d'introduction de l'échantillon ;
- le système d'atomisation et d'excitation ;
- le système optique ;
- le système de détection.

L'ensemble de la composition d'un spectromètre ICP-AES est reporté sur la figure IV.23.



**Figure IV.23 :** Schéma de l'appareillage d'un spectromètre ICP-AES

#### IV.1.11.C. Principe d'ICP-MS

La spectrométrie ICP-MS (Figure IV.24) est une technique d'analyse chimique permettant de déterminer la présence de plusieurs éléments chimiques présents dans un échantillon.

Elle repose sur la séparation et la quantification des éléments constitutifs de l'échantillon en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ).

Autrement dit, c'est une technique permettant de doser en quelques minutes plus de 50 éléments stables ou radioactifs (période radioactive  $> 8000$  ans) sur les solutions à des teneurs très inférieures à  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (ppb) et ayant une dynamique de mesure de  $10^6$  (ppt  $\rightarrow$  ppm).

L'échantillon est amené jusqu'à la torche à plasma par une pompe péristaltique. Au contact de l'argon, l'échantillon est nébulisé, puis transporté jusqu'au centre du plasma où les températures atteignent 6000 à 8000 °C. L'échantillon est alors atomisé puis ionisé dans sa totalité sous-forme de cations monovalents.

Cette technique est basée sur le couplage d'une torche à plasma générant des ions et un spectromètre de masse quadripolaire pour séparer ces ions en masse.

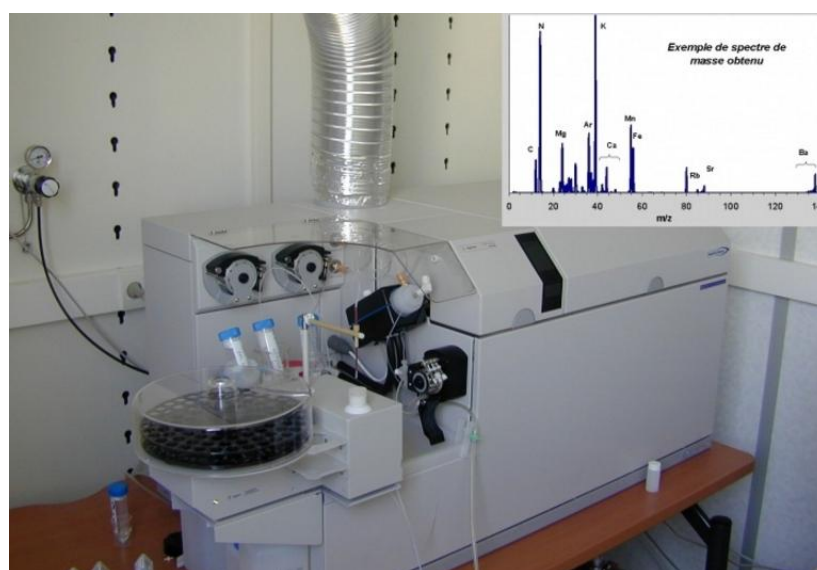


Figure IV.24 : Appareil ICP/MS de L'Institut IPHC, Strasbourg

#### IV.1.11.D. Mode opératoire

##### ➤ Préparation des échantillons

La méthode de préparation de l'échantillon se fait de la manière suivante :

La minéralisation en réacteur micro-onde est la méthode la plus courante. Le volume maximum est de 6 ml pour supprimer tout risque d'explosion lors du chauffage aux micro-ondes.

Une aliquote (0,25 g) de l'extrait *n*-BuOH de *P. battandieri* (racines) est mise en solution avec 2,5 ml d'acide nitrique (HNO<sub>3</sub>) (69 %, Fluka) et de 1,5 ml d'eau ultra pure, le tout est placé dans un réacteur. Un deuxième réacteur préparé avec uniquement 2,5 ml acide nitrique et 1,5 ml d'eau ultra pure est utilisé comme blanc. Les 2 réacteurs sont placés dans un système micro-onde pour une durée de 1 heure à une température de 220 °C sous et sous une pression de 20 bars. À la fin de la minéralisation, les réacteurs sont refroidis à environ 50 °C et les minéralisates sont transférés dans des tubes en polypropylène préalablement pesés. Les réacteurs sont soumis à un rinçage quantitatif à l'eau ultra-pure. Les eaux de rinçage sont collectées dans le tube en polypropylène correspondant, jusqu'à l'obtention du poids de la solution de départ.

La perte de poids qui a été observée sur les 2 pesées est due à l'évaporation de l'eau et de l'acide nitrique au cours de la minéralisation.

Les tubes étant restés ouverts pendant 2h, il y a un risque de contamination par l'air ambiant. Cette contamination sera évaluée avec les teneurs mesurés dans le blanc.

#### ➤ L'analyse par ICP-AES

L'analyse par ICP-AES est effectuée en mesurant l'intensité d'émission des éléments à des longueurs d'onde sélectionnées et en comparant cette intensité à l'intensité mesurée sur des étalons (standards). Puis on calcule la droite d'étalonnage et la limite de détection. Les résultats ont été par la suite reportés à l'échantillon en mg/kg.

#### ➤ L'analyse par ICP-MS

Afin d'être analysé en ICP-MS, les solutions obtenues (échantillon et blanc) ont été diluées 10 fois. Dans des tubes adéquats, on prélève 400 µl de chaque solution (échantillon et blanc) et on y ajoute 40 µl d'une solution d'indium à 1 ppm qui est utilisé comme standard interne. Les volumes obtenus sont complétés avec de l'eau ultra pure jusqu'à 4,0 ml. L'indium est important en ICP-MS pour ajuster les erreurs de cette technique d'analyse. Finalement, l'échantillon a été analysé par ICP/MS qui permet de déterminer et quantifier les éléments inorganiques de faible concentration dans les échantillons.

#### IV.1.11.E. Résultats

Les résultats obtenus sont reportés et discutés dans le 6<sup>ème</sup> chapitre (Chapitre VI : Résultats et discussion).

## IV.2. Étude phytochimique et biologique de l'espèce *Frankenia thymifolia* Desf.

### IV.2.1. Choix du matériel végétal

Dans cette étude, plusieurs critères ont guidé notre choix, notamment :

- L'endémisme de l'espèce *Frankenia thymifolia* Desf. au Nord d'Afrique (Quezel et Santa, 1963).
- Les activités biologiques attribuées aux plantes de cette famille notamment anti-inflammatoire, antioxydantes, antifongiques, antimicrobiennes, antivirales et neuroprotectives (Ben Mansour et al., 2017, 2016; Megdiche Ksouri et al., 2011; Saïdana et al., 2010; Torres Carro et al., 2016).

### IV.2.2. Classification dans la systématique botanique

**Règne :** Plantae

**Sous-règne :** Tracheobionta

**Division :** Magnoliophyta

**Classe :** Magnoliopsida

**Sous-classe :** Dilleniidae

**Ordre :** Violales

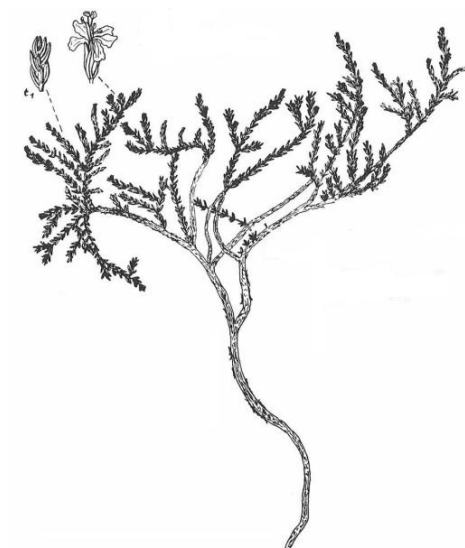
**Famille :** Frankeniaceae

**Genre :** *Frankenia*

**Espèce :** *Frankenia thymifolia*

### IV.2.3. Description botanique de l'espèce *Frankenia thymifolia* Desf.

Plante vivace, aux feuilles petites, persistantes et imbriquées étroitement les unes les autres (Figure IV.25 et IV.26). Les tiges sont ligneuses à la base, rampantes et portent des rameaux redressés. Les fleurs sont petites, sessiles et solitaires le long des rameaux. Les pétales sont de couleur rose pâle et libre. Le calice est gamosépale tubuleux. le fruit est une capsule incluse dans le calice (Chaieb, 1998; Quezel et Santa, 1963).



**Figure IV.25 :** *Frankenia thymifolia*  
Desf. d'après Ozenda



**Figure IV.26 :** *Frankenia thymifolia* Desf.

#### IV.2.4. Distribution géographique

Elle est endémique à l'Afrique du nord (Algérie et Tunisie) (Quezel et Santa, 1963).

#### IV.2.5. Travaux antérieurs sur l'espèce

Une étude bibliographique approfondie sur les espèces de ce genre a montré qu'elles n'ont fait l'objet que d'une investigation phytochimique approfondie en Algérie. Cette seule étude a été réalisée sur les racines de *F. thymifolia* et a permis l'isolement et l'identification de 4 produits dont trois originaux (Harkat, 2008).

#### IV.2.6. Protocole expérimental

##### IV.2.6.A. Récolte du matériel végétal

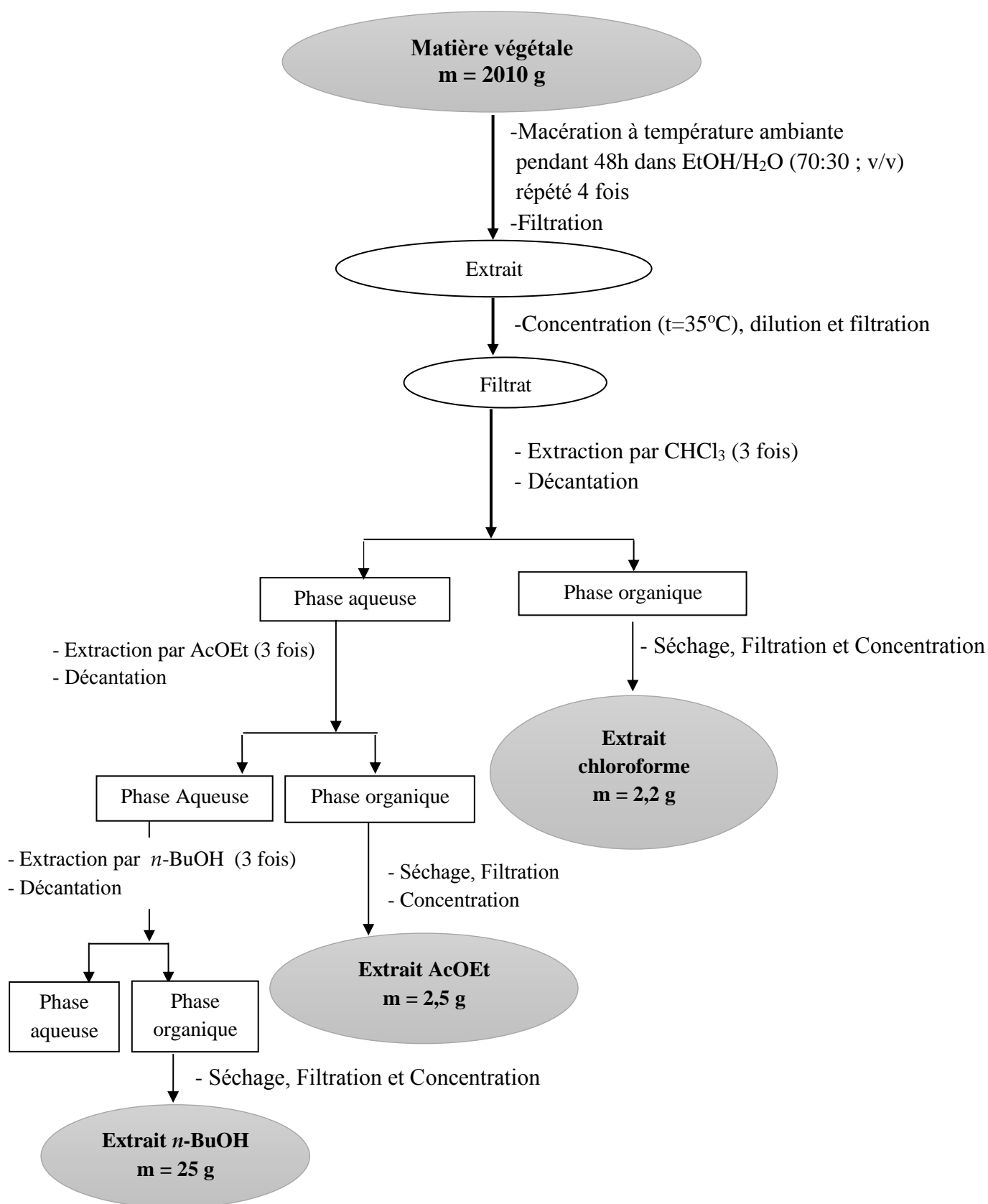
La plante *F. thymifolia* a été récoltée au mois de mai de l'année 2013 des sebkhas de Kenadsa, située dans le sud-ouest de la wilaya de Bechar (Sud algérien). Elle a été authentifiée par M. Mohamed Benabdelhakem, directeur de l'agence de la préservation de la nature, de Béchar. Un spécimen (FTh/05/13) a été déposé à l'Herbier de l'unité de recherche VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri Constantine 1.

Après séchage dans un endroit sec et aéré, à l'abri des rayons solaires, les parties aériennes (feuilles, fleurs) ont été coupées en petits morceaux et pesées (2010 g).

Les produits chimiques qui ont été utilisés pour les essais effectués sur cette plante étaient de qualité analytique.

#### IV.2.6.B. Extraction de la plante

Les parties aériennes, feuilles et fleurs (2010 g) de *F. thymifolia* sont broyées, puis mises à macérer à température ambiante pendant 48 h dans un mélange EtOH/H<sub>2</sub>O dans les proportions (70/30 ; v/v). L'opération a été répétée quatre fois avec renouvellement du solvant, et toujours pendant 48 h. Après filtration, les quatre solutions hydro-alcooliques sont réunies puis concentrées sous vide à une température n'excédant pas 35°C. L'extrait obtenu est dilué avec de l'eau distillé à raison de 400 ml pour 1 Kg de matière sèche sous agitation magnétique. La solution ainsi obtenue est laissée au frais pendant une nuit puis filtrée. Le filtrat subit une extraction de type liquide-liquide dans une ampoule à décanter en utilisant des solvants de polarité croissante, en commençant par le chloroforme, ensuite l'acétate d'éthyle et en dernier le *n*-butanol. Chaque extraction est répétée trois fois. Les phases organiques ainsi obtenues sont séchées par du sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) puis filtrées, concentrées sous pression réduite à sec et pesées. Le protocole expérimental montrant les différentes étapes du processus d'extraction est représenté dans l'organigramme indiqué dans la figure **IV.27**.



**Figure IV.27** : Protocole d'extraction de *Frankenia thymifolia*.

Les masses et les rendements évalués par rapport au poids du matériel végétal sec sont reportés dans le tableau **IV.25**.

**Tableau IV.25** : Masses et rendements des extraits

Matériel végétal	Extrait chloroforme FT-C	Extrait acétate d'éthyle FT-E	Extrait <i>n</i> -butanol FT-B
Poids (g)	2,2	2,5	25
Rendement (%)	0,11	0,12	1,24

Avant le fractionnement et la séparation, ces extraits ont été soumis à l'évaluation des phénols totaux, des flavonoïdes totaux et de tests de recherche d'activités biologiques (antioxydante, antiparasitaire et antibactérienne).

#### IV.2.7. Évaluation des teneurs en polyphénols en flavonoïdes totaux des extraits

Le taux des polyphénols dans les extraits de l'espèce *Frankenia thymifolia* a été déterminé selon la méthode de Folin-Ciocalteu par spectrophotométrie de la même manière que pour les extraits de l'espèce *Pituranthos battandieri* (Granato et al., 2018; Singleton et al., 1999).

De même, le taux de flavonoïdes dans les extraits de cette espèce (*Frankenia thymifolia*) a été déterminé par la méthode du trichlorure d'aluminium (AlCl<sub>3</sub>) de la même manière que celle utilisée pour les extraits de l'espèce *Pituranthos battandieri* (Quettier-Deleu et al., 2000).

#### IV.2.8. Recherche d'activités biologiques des extraits

##### IV.2.8.A. Évaluation de l'activité antiparasitaire des extraits

Au début, les trois extraits de *F. thymifolia* ont été soumis à un screening antiparasitaire vis-à-vis des 4 parasites suivants : *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, *Acanthamoeba castellanii* str. Neff. et *Trypanosoma cruzi* Y. Pour cela, les extraits sont dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) avec une concentration de 400, 200 et 100 µg/ml, et suivant le protocole détaillé au chapitre **III**.

Pour les extraits qui ont montré une activité contre un parasite, les tests sont refaits pour calculer les CI<sub>50</sub> (concentration de l'échantillon qui inhibe 50% de la croissance du parasite). Pour ce test, les extraits sont préparés à des concentrations entre 1 et 100 µg/ml, et suivant le protocole détaillé au chapitre précédent.



### IV.2.8.B. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits

La détermination du pouvoir antioxydant des extraits de l'espèce *F. thymifolia* a été effectuée par plusieurs méthodes (méthode de piégeage du radical DDPH, méthode du radical-cation ABTS, méthode de blanchiment du  $\beta$ -carotène et méthode du radical superoxyde de DMSO alcalin) selon les protocoles décrits précédemment en suivant les mêmes étapes que celles utilisées pour les extraits de l'espèce *P. battandieri*.

Ainsi que le pouvoir réducteur des extraits de l'espèce *F. thymifolia* a été effectué par plusieurs tests (test de la réduction du cuivre (CUPRAC), test de la réduction du fer (FRAP), test de chélation des ions métalliques et test HORAC) selon les protocoles décrits précédemment en suivant les mêmes étapes que celles utilisées pour les extraits de l'espèce *P. battandieri*.

### IV.2.8.C. Évaluation de l'activité antibactérienne des extraits

#### IV.2.8.C.1. Principe

L'antibiogramme est une technique basée sur l'application de disques, imprégnés des extraits à tester, sur la surface de gélose préalablementensemencée par les bactéries choisies (François et al., 2011).

L'étude de l'activité antibactérienne des extraits acétate d'éthyle (FT-E) et *n*-butanol (FT-B) de l'extrait hydroalcoolique des parties aériennes de l'espèce étudiée a été effectuée au laboratoire de bactériologie au niveau du Centre Hospitalier Universitaire de Constantine (CHU).

#### IV.2.8.C.2. Matériel bactériologique

Les souches bactériennes utilisées sont des souches cliniques provenant du CHU de Constantine: *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) et *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*). La gentamicine a été utilisée comme antibiotique de référence à 10  $\mu$ g/ml.

Les milieux de cultures utilisées sont la gélose M-H (Mueller-Hinton), pour tester des extraits sur les souches étudiées et la gélose Chapman (pour *S. aureus*) et la gélose Hektoen (pour *K. oxytoca*, *P. aeruginosa* et *E. coli*) pour l'isolement et l'ensemencement des bactéries.

#### IV.2.8.C.3. Protocole

La solution mère a été préparée en solubilisant 60 mg de l'extrait FT-B dans une solution de 6 ml d'un mélange eau/MeOH (90/10) (SM1), et la (SM2) a été préparée en solubilisant 60 mg de l'extrait FT-E dans 6 ml du même mélange hydroalcoolique. À partir de cette solution mère on a préparé plusieurs dilutions : 1, 3, 7 et 10 mg/ml (François et al., 2011; Rukayadi et al., 2008).

➤ **Repiquage de souches**

Le repiquage de souches est effectué par ensemencement en surface de gélose Chapman ou gélose Hektoen, à l'aide d'une anse de platine préalablement flambée au bec bunsen et refroidie. Les boîtes subissent une incubation pendant 24h à 37°C.

➤ **Préparation des disques**

Nous avons utilisé des disques de papier wattman N°3 imprégnés dans les solutions préparées à différentes concentrations pour chaque extrait, les disques imprégnés dans l'eau distillée stérile seront utilisés comme témoins. Les disques, une fois préparés, sont placés dans un tube à essai et stérilisés dans un autoclavage pendant 20 minutes à 120°C.

➤ **Préparation de l'inoculum**

- Cinq colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une anse de platine.
- L'anse est déchargée dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

L'ensemencement doit se faire dans les 15 min qui suivent la préparation de l'inoculum.

➤ **Ensemencement**

- Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne.
- On l'essore en le pressant fermement sur la paroi interne du tube, afin de décharger au maximum.

L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, on recharge l'écouvillon à chaque fois.

➤ **Dépôt des disques**

- À l'aide d'une pince stérile, les disques imbibés dans les extraits à tester et les disques témoins de l'eau distillée stérile sont prélevés soigneusement et puis déposés sur la gélose.
- Les boîtes de Pétri sont ensuite fermées et laissées diffuser à température ambiante.
- Les boîtes sont mises (couvercle en bas) à l'étuve réglée à une température de 37°C pendant 24h.

➤ **La lecture**

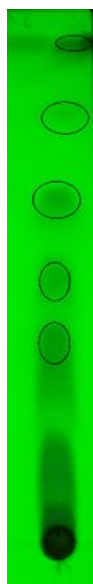
Après les 24 heures d'incubation, le diamètre de la zone d'inhibition est mesuré à l'aide d'une règle. La valeur de ce diamètre détermine l'efficacité de la matière active.

### IV.2.9. Séparation chromatographique des extraits

Les résultats des dosages des polyphénols et flavonoïdes totaux et des tests d'évaluation des activités antioxydante, antiparasitaire et antibactérienne des extraits de *F. thymifolia* que nous avons reportés et discutés dans le 6<sup>ème</sup> chapitre (Résultats et discussion) nous ont encouragés à procéder à l'investigation phytochimique des extraits FT-E et FT-B.

#### IV.2.9. A) Séparation et purification des composants de l'extrait acétate d'éthyle (FT-E)

L'extrait FT-E a été soumis en premier lieu à une analyse par chromatographie analytique sur couche mince de gel de silice déposé sur une feuille d'aluminium, pour rechercher le meilleur système d'élution. La meilleure séparation obtenue était avec le système de solvants *n*-hexane/acétate d'éthyle (5:5) (Figure IV.28).



**Figure IV.28 :** Profil chromatographique de l'extrait FT-E dans le système hexane/AcOEt (5:5)

#### ➤ Séparation sur colonne

Une masse d'environ 2,1 g de l'extrait acétate d'éthyle est déposée sur une colonne de gel de silice (type 60, 230-400 mesh, Macherey-Nagel) préparée dans de le *n*-hexane. L'élution est réalisée en commençant par le *n*-hexane pur avec augmentation progressive de la polarité par addition d'acétate d'éthyle puis de méthanol vers la fin, avec un fractionnement tous les 25 ml. Le suivi de ce fractionnement est effectué par chromatographie sur couche mince de gel de silice sur support aluminium. Les plaques sont visualisées sous lumière UV (254 et 365 nm) puis révélées avec la solution H<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HOAc (80:16:4) et chauffées pendant 3 minutes à 100°C. La progression de cette colonne est rassemblée dans le tableau IV.26.

**Tableau IV.26 :** Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait acétate d'éthyle de *F. thymifolia* (FT-E)

Lots de fractions	N° de la fraction	Système d'élution (%)			Poids (mg)
		Hexane	AcOEt	MeOH	
1	FA1	100	0	0	40
2		90	10	0	
3		80	20	0	
4	FA2	75	35	0	48
5		70	30	0	
6		65	35	0	
7	FA3	60	40	0	83
8		50	50	0	
9	FA4	40	60	0	60
10	FA5	20	80	0	202,5
11	FA6	0	100	0	306,8
12	FA7	0	50	50	122,1
13	FA8	0	0	100	255,6
14	FA9	0	0	100	405,8

#### IV.2.9.A.1. Étude des fractions de l'extrait acétate d'éthyle

##### ➤ Étude de la fraction FA3

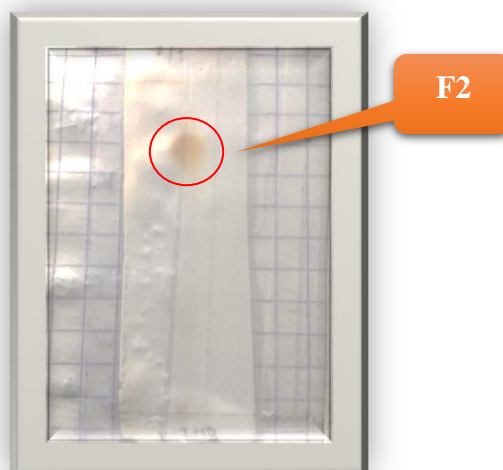
Après des tests sur plaques analytiques de gel de silice 60 en vue de la sélection du système d'élution. Nous avons retenu le système: (hexane/AcOEt/MeOH 3:1:0,5). Ainsi la fraction FA3 (83 mg) a été déposée sur des plaques préparatives de gel de silice normale. En fin d'élution, les plaques soumises à la lumière UV (254 et 365 nm) ont montré trois bandes: la bande N°2 et la bande N°3 plus intenses, admettent des fluorescences violette sombre et jaune pâle, respectivement sous la radiation 365 nm.

Après récupération et élution avec du méthanol, puis une purification sur plaques analytiques de gel de silice normale, éluee par le système (hexane/AcOEt ; 5:5), ces deux bandes ont donné les produits **F1** (m= 54 mg), et **F2** (m= 12 mg), respectivement (Figure IV.29 et IV.30).

La première bande a mené à un produit qui n'a donné aucun signal en RMN du proton, nous l'avons donc ignoré car nous supposons qu'il doit s'agir d'un solvant résiduel qui a été évaporé lors de la concentration de l'échantillon.



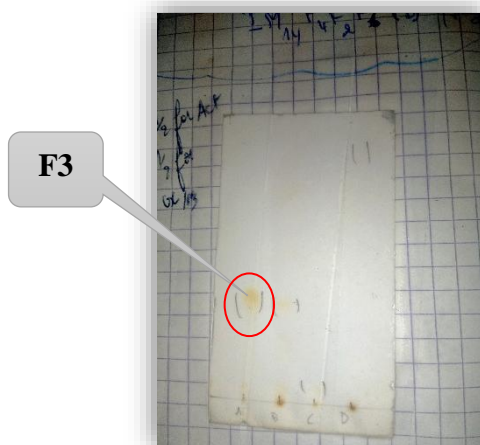
**Figure IV.29** : Plaque CCM analytique du produit **F1** dans le système hexane/AcOEt (5:5)



**Figure IV.30** : Plaque CCM analytique du produit **F2** dans le système hexane/AcOEt (5:5)

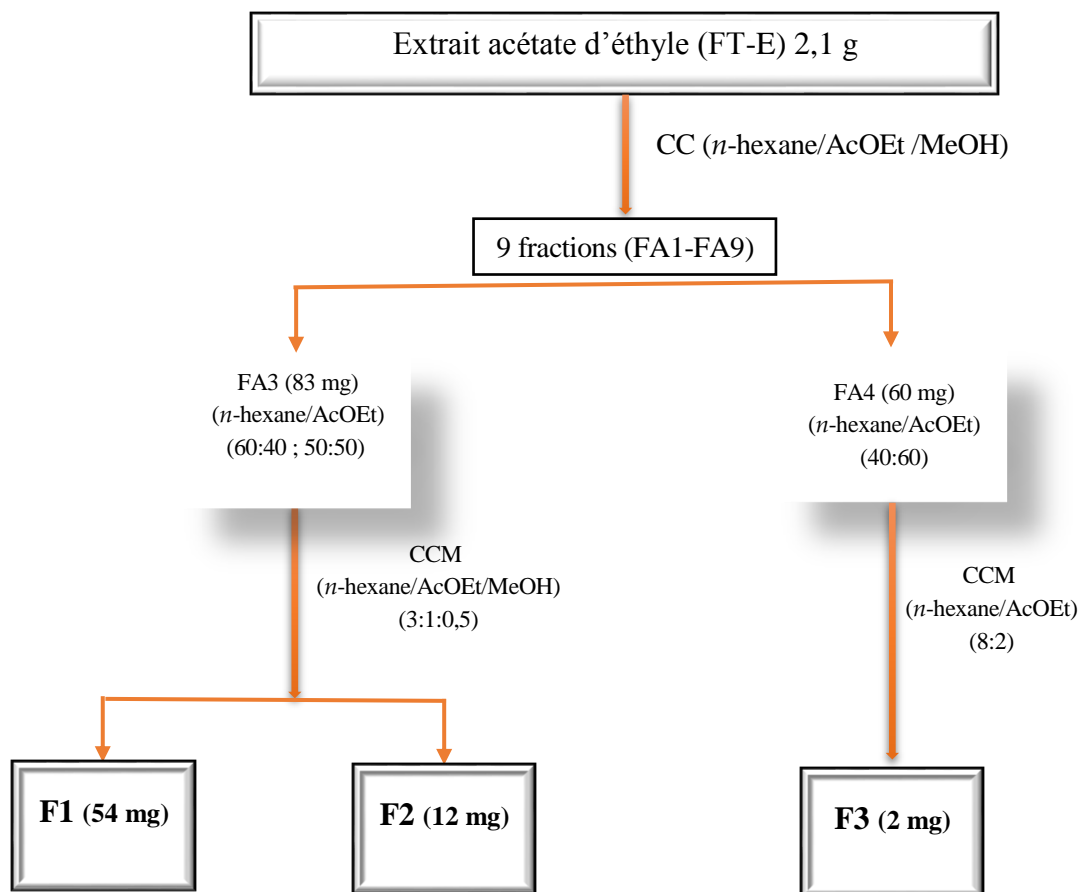
### ➤ Étude de la fraction FA4

La fraction FA4 (60 mg) montrant quatre spots sous la lampe UV (254 et 365 nm) sur une plaque analytique de gel de silice normale avec une intensité plus marquée pour le spot N°4, a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF<sub>254</sub> éluées par le système hexane/AcOEt (8:2), pour donner après purification dans le même système (deux éluions), le composé **F3** (2 mg) à l'état pur (Figure IV.31). Les spots N°2 et 3 ont mené à deux produits après séparation sur plaques préparatives de gel de silice qui n'ont donné aucun signal en RMN du proton.



**Figure IV.31** : Plaque CCM analytique du produit **F3** dans le système hexane/AcOEt (8:2)

Le protocole de fractionnement, isolement et purification des composés issus de l'extrait acétate d'éthyle de *Frankenia thymofilia* est représenté dans la Figure IV.32.



**Figure IV.32** : Schéma de séparation et purification des composés isolés de l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de l'espèce *Frankenia thymifolia* Desf.

### IV.2.9.B) Séparation et purification des composants de l'extrait *n*-butanol (FT-B)

Le fractionnement de l'extrait *n*-butanol a été réalisé par chromatographie sur colonne, et a débuté par une analyse sur une plaque analytique de gel de silice 60, afin de rechercher le meilleur système pour la séparation. Celui-ci s'est avéré être : CHCl<sub>3</sub>/MeOH dans les proportions 6/2 (Figure IV.33).



**Figure IV.33** : Profil chromatographique de l'extrait FT-B dans le système CHCl<sub>3</sub>/MeOH (6:2)

Une partie de l'extrait *n*-butanol (10 g) a été chromatographiée sur une colonne de gel de silice (type 60, 70-230 mesh, Sigma-Aldrich) préparée dans du chloroforme. L'élution a débuté par du chloroforme 100% puis on augmente la polarité par addition progressive de méthanol.

Des fractions de 50 ml sont recueillies et analysées par chromatographie sur couche mince puis regroupées selon la similitude de leur profil chromatographique sur des plaques analytiques de gel de silice révélées par la lumière UV (254 nm et 365 nm) puis à l'anisaldéhyde et chauffées à 100°C pendant 3 minutes. Les résultats de la progression de cette colonne sont rassemblés dans le tableau IV.27.

**Tableau IV.27** : Résultats de la séparation par chromatographie sur colonne de l'extrait FT-B

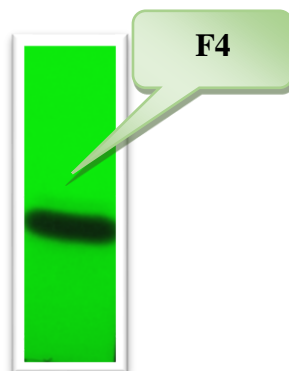
Lots de tubes rassemblés	N° de la fraction	Poids (mg)	Système d'élution (%)	
			% CHCl <sub>3</sub>	% MeOH
1-10	FB1	10,6	100	0
10-20	FB1	12,5	90	10
<b>21-31</b>	<b>FB2</b>	<b>65</b>	80	20
32-39	FB3	34,2	80	20
<b>40-43</b>	<b>FB4</b>	<b>55</b>	75	25
<b>44-46</b>	<b>FB5</b>	<b>30</b>	70	30
<b>47-48</b>	<b>FB6</b>	<b>25</b>	65	35
<b>49-51</b>	<b>FB7</b>	<b>24,2</b>	65	35
<b>52-56</b>	<b>FB8</b>	<b>44,5</b>	65	35
<b>57-61</b>	<b>FB9</b>	<b>51,6</b>	60	40
62-65	FB10	65,4	60	40
66-68	FB11	89	60	40
69-72	FB11	85,6	60	40
<b>73-74</b>	<b>FB13</b>	<b>121,5</b>	<b>55</b>	<b>45</b>
75-81	FB14	116	55	45
82-84	FB15	123	55	45
85-90	FB16	126	50	50
91-93	FB17	200	50	50
94-100	FB18	119,5	45	55
101-111	FB19	118	40	60
112-120	FB20	128,3	35	65
121-129	FB21	229	30	70
130-136	FB22	155,6	25	75
137-144	FB23	226	20	80
145-149	FB24	308	15	85
150-155	FB25	121,5	10	90
156-160	FB26	310	05	95
161-171	FB27	319	0	100

#### IV.2.9.B.1. Étude des fractions de l'extrait *n*-butanol (FT-B)

##### ➤ Étude de la fraction FB2

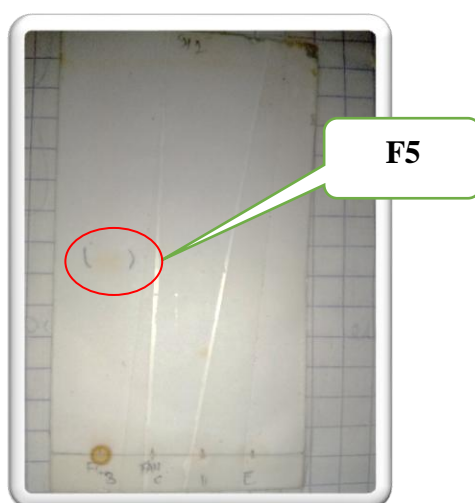
La fraction est testée sur plaque CCM analytique de gel de silice, après élution par le système AcOEt/MeOH (10:1) et révélation de la plaque sous lumière UV 254 nm, nous avons remarqué que notre fraction renferme un composé majoritaire. Nous avons choisi une purification sur une petite colonne gel de Sephadex LH-20 éluee par du méthanol fraîchement distillé. L'élution de la colonne a été suivie avec une lampe UV 365 nm dans une chambre noire. Cette colonne a montré la formation d'une bande de fluorescence jaune que nous avons récupérée en premier lieu (B1). Cette colonne a également montré la formation de deux autres bandes (une de fluorescence marron et une de fluorescence jaune) séparées de la bande jaune (B1) par une bande (B2) incolore sous la lampe 365 nm, mais colorée sous la lampe 254 nm. Cette bande B2 a été récupérée et concentrée pour donner le composé pur **F4** (20 mg) (Figure IV.34).





**Figure IV.34** : Plaque CCM analytique du produit **F4** dans le système  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (7:3) ( $\lambda=254$  nm)

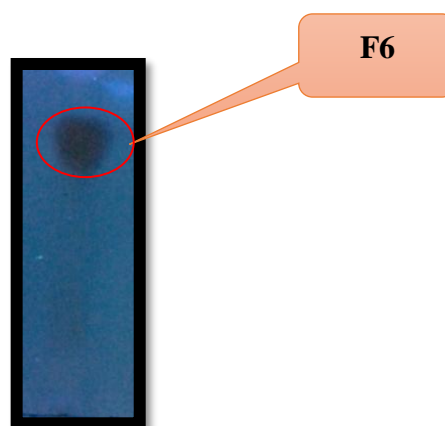
La bande de fluorescence jaune (B1), recristallisée dans du  $\text{CHCl}_3$  avec un peu de MeOH a mené à l'obtention du composé **F5** sous forme de cristaux blancs (16 mg) (Figure IV.35).



**Figure IV.35** : Plaque CCM analytique du produit **F5** dans le système  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1)

#### ➤ Étude de la fraction FB4

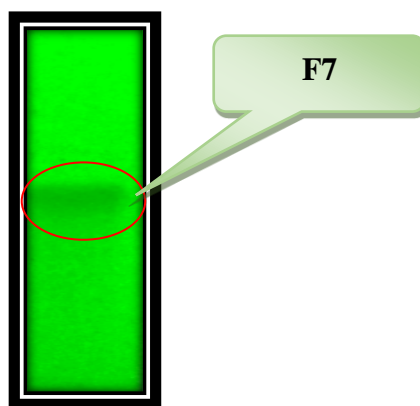
Ce travail a débuté par la recherche du meilleur système d'élution sur plaque CCM analytiques après plusieurs tests, nous avons retenu le système :  $\text{AcOEt}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  : 6/1/1. Après élution et révélation la plaque a montré entre autres une tache intense avec une fluorescence violette sombre sous radiation UV 365 nm et jaune intense après révélation avec l'anisaldéhyde. La fraction a alors été déposée sur plaques analytique de gel de silice normale. La bande B, plus intense que les autres, a donné après élution avec le système  $\text{AcOEt}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (6:1:1) le composé FB4-B que nous avons noté **F6** (14 mg) (Figure IV.36).



**Figure IV.36** : Plaque CCM analytique du produit **F6** dans le système AcOEt /MeOH (6:3)

#### ➤ Étude de la fraction **FB5**

Après des tests sur plaques analytiques de gel de silice en vue de la sélection du système d'élution, nous avons retenu le système :  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  : 9/1. Après révélation la plaque a montré entre autres une tache intense avec une fluorescence jaune sous radiation UV 365 nm et jaune intense après révélation avec l'anisaldéhyde. La bande A, plus intense que les autres, a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF<sub>254</sub> éluées par le même système. Repiquée sur une plaque de gel de silice éluée par le système  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1), elle a donné le composé FB5-A que nous avons noté **F7** (10 mg) (Figure IV.37).

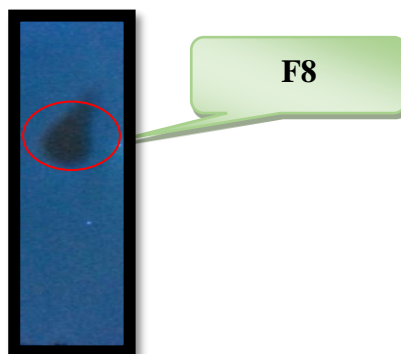


**Figure IV.37** : Plaque CCM analytique du produit **F7** dans le système  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1)

#### ➤ Étude de la fraction **FB6**

Après des tests sur plaques analytiques de gel de silice en vue de la sélection du système d'élution, nous avons retenu le système :  $\text{AcOEt}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  : 6/1/1. Après révélation la plaque a montré entre autres une tache intense avec une fluorescence noire violette sous radiation UV 365 nm et jaune intense après révélation avec l'anisaldéhyde.

La fraction a alors été déposée sur plaques analytique de gel de silice normale. La bande A, plus intense que les autres, a donné après élution avec un mélange d'AcOEt/MeOH/H<sub>2</sub>O : 6/1/1, le composé FB6 que nous avons noté **F8** (Figure IV.38) (15 mg).

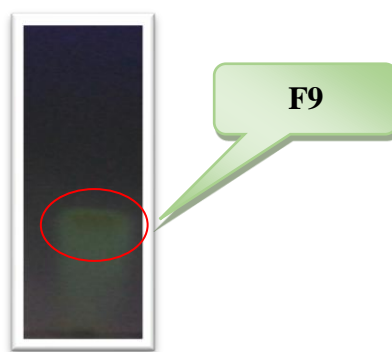


**Figure IV.38** : Le produit **F8** sur plaque CCM sous UV 365 nm dans le système AcOEt /MeOH (6:3)

L'examen par chromatographie sur couche mince et l'analyse par RMN de ce produit majoritaire **F8** (15 mg) montrent qu'il est identique à **F6** isolé déjà à partir de la fraction FB4 du même extrait.

#### ➤ Étude de la fraction FB7

La fraction FB7 montre la formation d'un précipité. Ce précipité a été lavé plusieurs fois avec du CHCl<sub>3</sub> avec un peu de MeOH pour donner un composé jaunâtre pas très soluble dans le méthanol. Testé sur plaque analytique de gel de silice, élue par le système (CHCl<sub>3</sub>, Acétone) dans les proportions 9/1, ce précipité donne un spot unique de fluorescence jaune sous lumière UV ( $\lambda = 365$  nm) ; révélée à l'anis aldéhyde et chauffée pendant 3 minutes, la plaque présente toujours un spot unique signifiant la pureté de ce produit que nous avons codé **F9** (10 mg) (Figure IV.39).



**Figure IV.39** : Le produit **F9** sur plaque CCM sous UV 365 nm dans le système CHCl<sub>3</sub>/ Acétone (9:1)

#### ➤ Étude des fractions FB8 et FB9

Ces fractions ont été séparées par chromatographie préparative sur couche épaisse (CCE). Les plaques sont été éluées par le système CHCl<sub>3</sub> /MeOH (8:2). Après élution et révélation par la lampe

UV (254 et 365 nm), chacune d'elles a montré une bande intense de fluorescence violette pour la première et bleue fluorescente pour la seconde. Ces deux bandes (**S-FB8**) et (**S-FB9**) issues de ces fractions **FB8** et **FB9** respectivement ont été grattées, éluées au MeOH puis rechromatographiées sur des plaques préparatives de gel de silice HF<sub>254</sub> éluées par le même système CHCl<sub>3</sub>/MeOH dans les proportions (8:2) pour donner les produits **F10** (12 mg) et **F11** (10 mg), respectivement (Figures **IV.40** et **IV.41**).



**Figure IV.40** : Plaque CCM analytique du produit **F10** dans le système CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8:2)



**Figure IV.41** : Plaque CCM analytique du produit **F11** dans le système CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8:2)

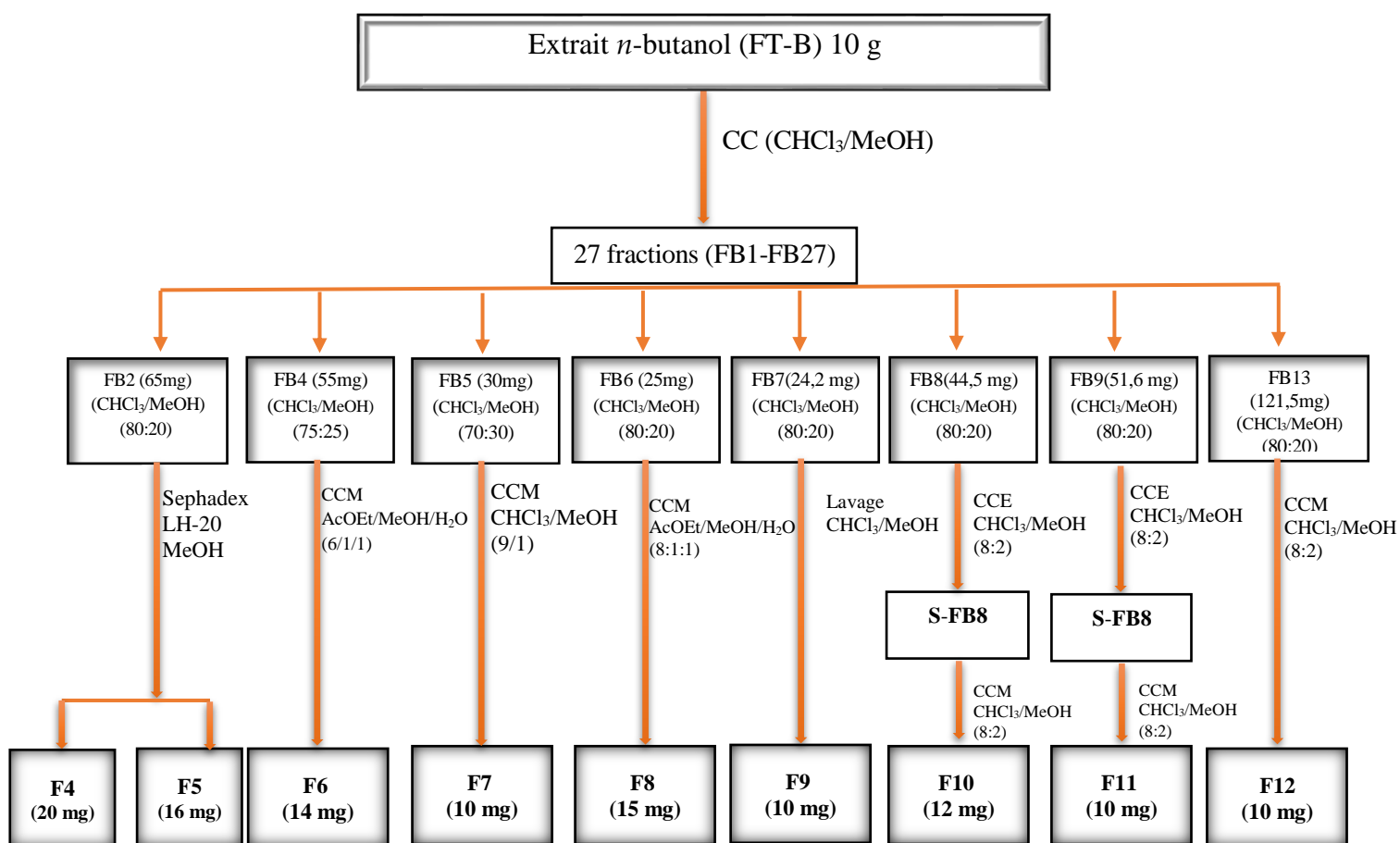
L'examen par chromatographie sur couche mince et l'analyse par RMN du produit **F10** (12 mg) montrent qu'il est identique à **F6** isolé à partir de la fraction FB4 du même extrait (FT-B).

Les deux autres bandes de **S-FB8** et **S-FB9** ont mené à deux produits après purification sur plaques analytique de gel de silice qui n'ont donné aucun signal en RMN du proton.

### ➤ Étude de la fraction **FB13**

La fraction **FB13** (121,5 mg) a subi une séparation sur plaques préparatives de gel de silice HF<sub>254</sub> éluées par le système CHCl<sub>3</sub>/MeOH (8:2), pour donner le produit **FB13-A** (10 mg) à l'état pur que nous reportons sous le code **F12**.

Le protocole de fractionnement, isolement et purification des fractions de la phase butanolique de l'extrait hydro-alcoolique des parties aériennes de l'espèce *Frankenia thymifolia* est représenté dans la figure **IV.42**.



**Figure IV.42** : Schéma de séparation et purification des composés isolés de l'extrait *n*-butanol des parties aériennes de l'espèce *Frankenia thymifolia* Desf.

En résumé, le fractionnement par chromatographie sur colonne de gel de silice normale des extraits *n*-butanol et acétate d'éthyle des parties aériennes de *Frankenia thymifolia* Desf. suivi de séparation et de purification sur plaques préparatives de gel de silice 60, a permis l'isolement de **douze produits (F1 à F12)**.

#### IV.2.10. Conclusion

L'évaluation antiparasitaire *in vitro* des extraits de *P. battandieri* Maire contre *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* et *Acanthamoeba castellanii* str. Neff. a révélé que l'extrait dichlorométhane des parties aériennes (DP) et éther de pétrole (EPR) possèdent une activité antileishmanienne, antitrypanosomiale importante. Le fractionnement bioguidé de ces deux extraits par des techniques chromatographiques a conduit à l'isolement et à la caractérisation de neuf produits antiparasitaires du premier (DP) et 5 produits antiparasitaires du second (EPR).

Tous ces produits ont été soumis aux tests d'activité antiparasitaire et aux tests de toxicité sur les cellules macrophages afin d'en établir les concentrations inhibitrices de 50 % (CI<sub>50</sub>) et le pourcentage de cytotoxicité.

L'investigation phytochimique de la phase butanolique de l'extrait hydro alcoolique de *P. battandieri* (BPR) a mené à la séparation de 2 produits.

Les extraits chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'extrait hydro alcoolique des parties aériennes de *Frankenia thymifolia* Desf. ont été soumis à un screening antiparasitaire. Par la suite, la mise à profit des techniques chromatographiques sur les fractions les moins complexes issues des colonnes de gel de silice 60, des phases acétate d'éthyle et *n*-butanol a mené à la séparation et la purification de 12 produits en quantité appréciable.

Tous ces produits ont été soumis aux analyses physico-chimiques afin d'en établir les structures. Les résultats et discussion de ces analyses seront développés au chapitre V.

L'activité antioxydante des extraits de *P. battandieri* et *F. thymifolia* et quelques des produits isolés a été évaluée par plusieurs méthodes. Alors que l'activité antibactérienne a été évaluée pour les extraits de *F. thymifolia*.

Les résultats et discussion de ces tests seront développés au chapitre VI.

*Chapitre V :*  
*Résultats et discussions*  
*(élucidation structurale)*

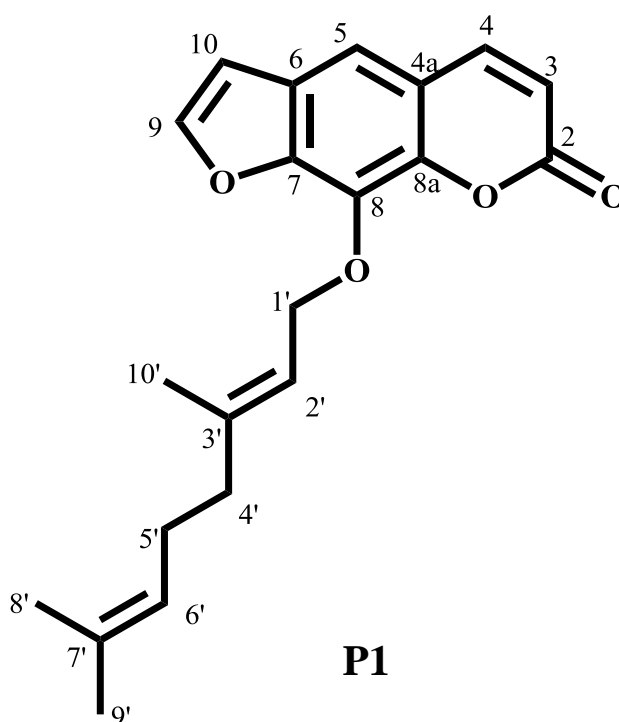
## V.1. Introduction

Ce chapitre concerne les élucidations structurales de 13 composés parmi les 27 isolés dans le cadre de nos travaux. Les structures de ces composés ont été élucidées par la combinaison des différentes méthodes spectrales à savoir la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN monodimensionnelle ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et DEPT) et bidimensionnelle (HSQC, COSY, HMBC et GOESY), ainsi que la spectrométrie de masse à haute résolution en modes d'ionisation électrobulbation et impact électronique (HR-ESIMS et HR-EIMS), par la mesure du pouvoir rotatoire et par la comparaison avec les données de la littérature.

## V.2. Identification des composés isolés de *Pituranthos battandieri* Maire

### V.2.A. Identification des composés isolés de la phase dichlorométhane

#### V.2.A.1. Élucidation structurale du composé P1

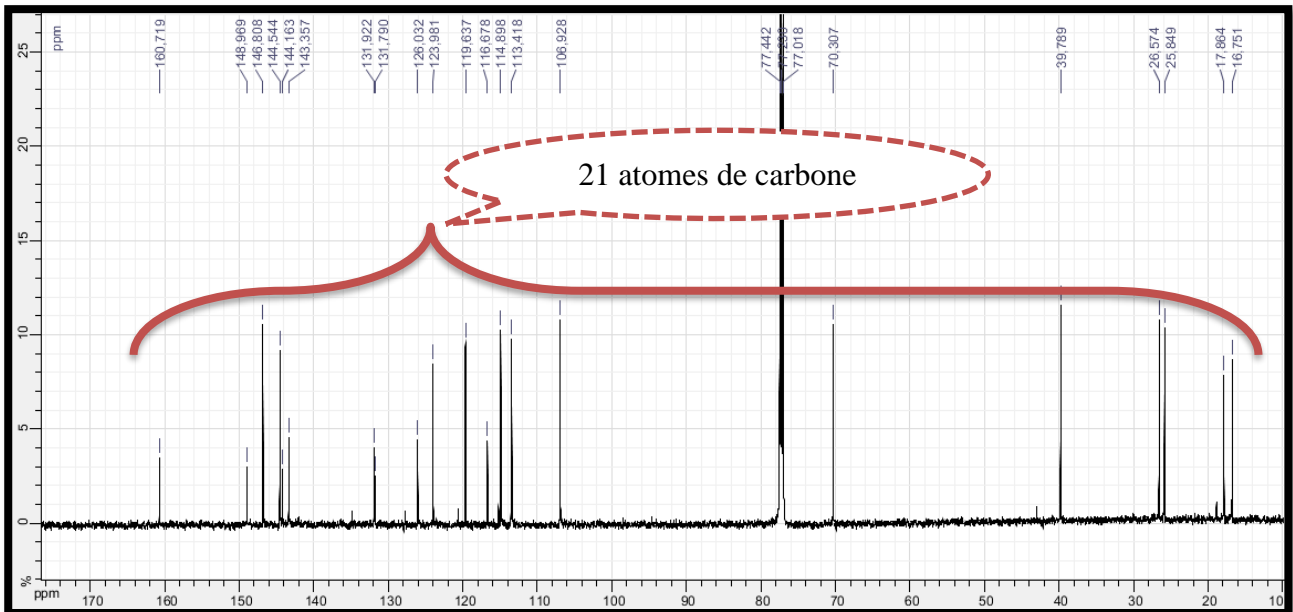


Le composé **P1** se présente sous forme d'une poudre blanche soluble dans le chloroforme et le dichlorométhane.

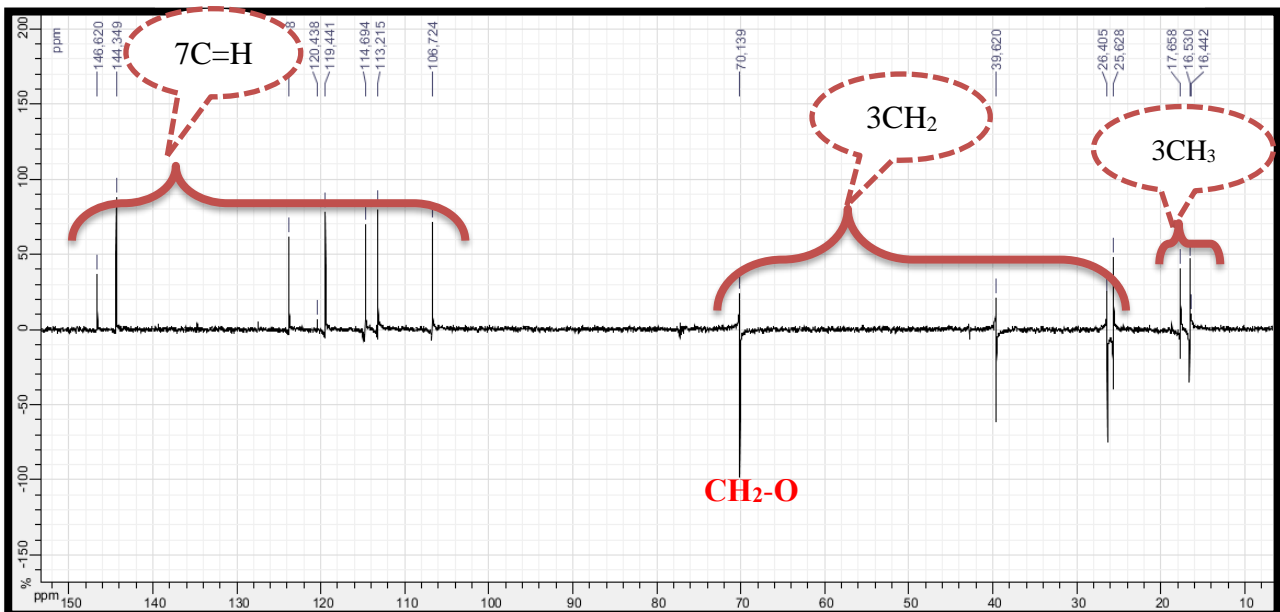
L'analyse des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  et DEPT  $135^\circ$  (150 MHz dans le  $\text{CDCl}_3$ ), (Spectre V.1 et Spectre V.1.1, respectivement), montre la présence de 21 atomes de carbone, incluant :

- Huit carbones quaternaires hybridés  $\text{sp}^2$ .
- Sept groupements CH hybridés  $\text{sp}^2$ .
- Trois groupements  $\text{CH}_2$  hybridés  $\text{sp}^3$  dont 1 oxygéné.
- Trois groupements méthyles.





Spectre V.1 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P1

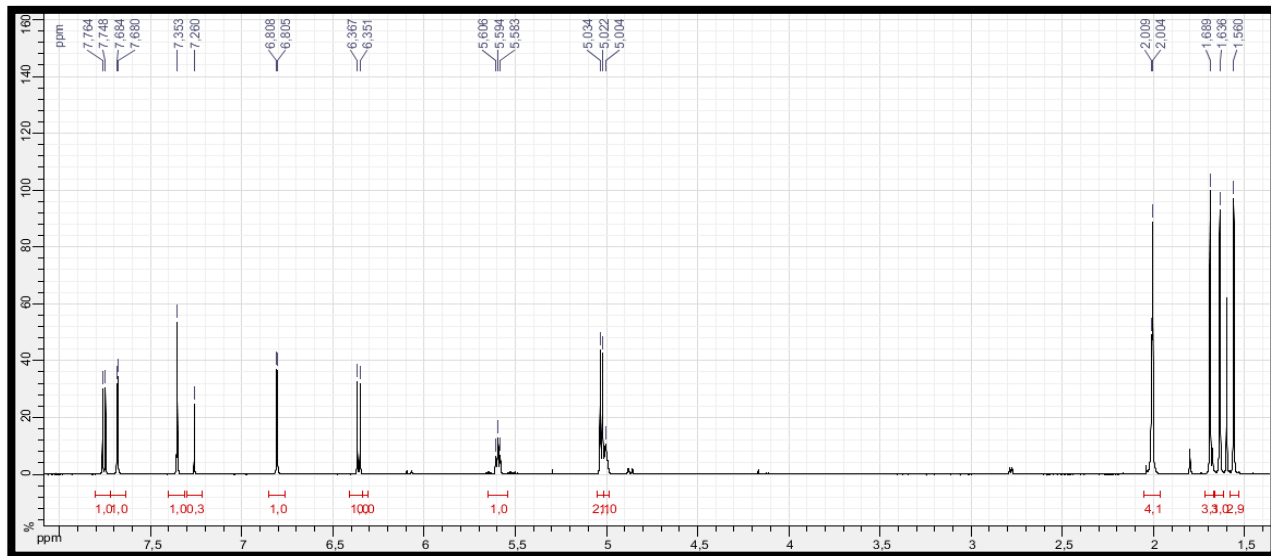


Spectre V.1.1 : Spectre DEPT  $135^\circ$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P1

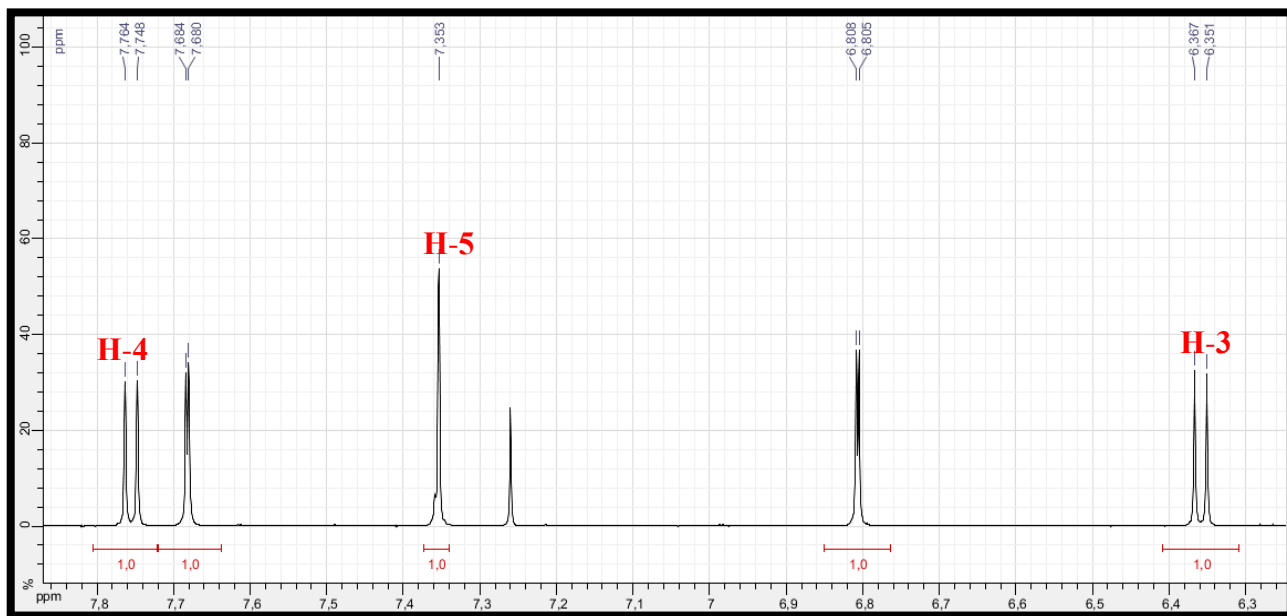
L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre V.2) et son étalement (Spectre V.2.1) montrent des signaux caractéristiques d'une furanocoumarine qui sont :

- Un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,36$  ppm avec une constante de couplage  $J = 9,6$  Hz attribuable au H-3. Le C-3 est repéré à  $\delta_{\text{C}} = 114,70$  ppm grâce à l'analyse du spectre HSQC (Spectre V.3.1 et Figure V.1).
- Un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7,76$  ppm avec une constante de couplage  $J = 9,6$  Hz attribuable au H-4. Le C-4 est repéré à  $\delta_{\text{C}} = 144,35$  ppm grâce à l'analyse du spectre HSQC.

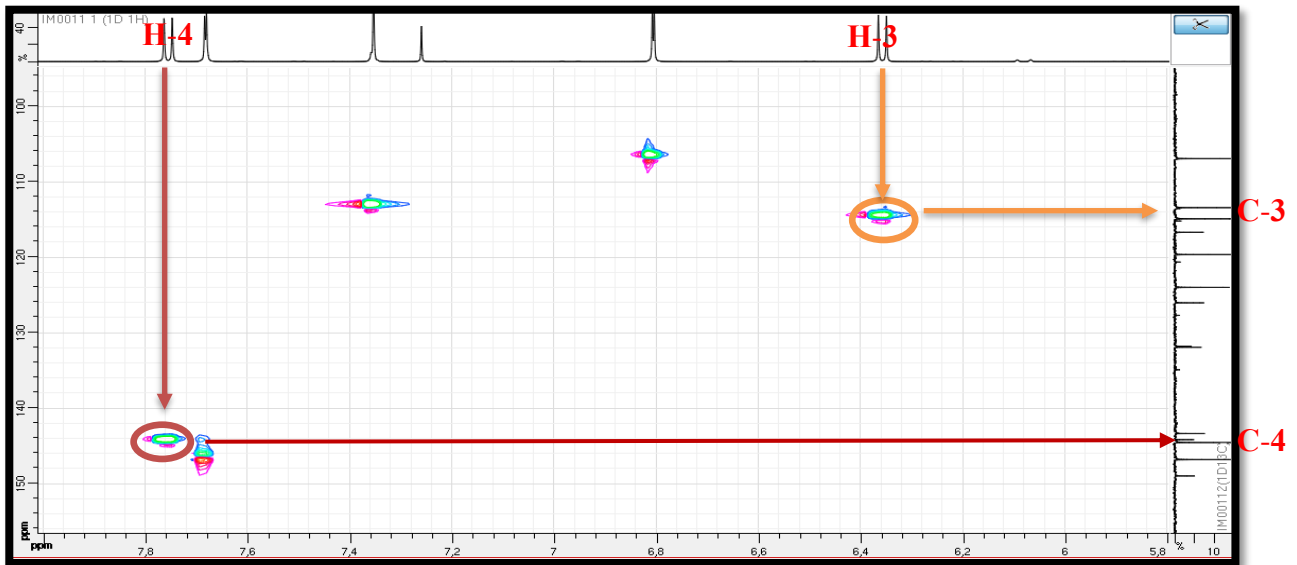
- Un singulet à  $\delta_H = 7,35$  ppm attribuable à H-5 vu sa corrélation avec C-4 observée sur le spectre HMBC (Spectre V.4.1 et Figure V.1).



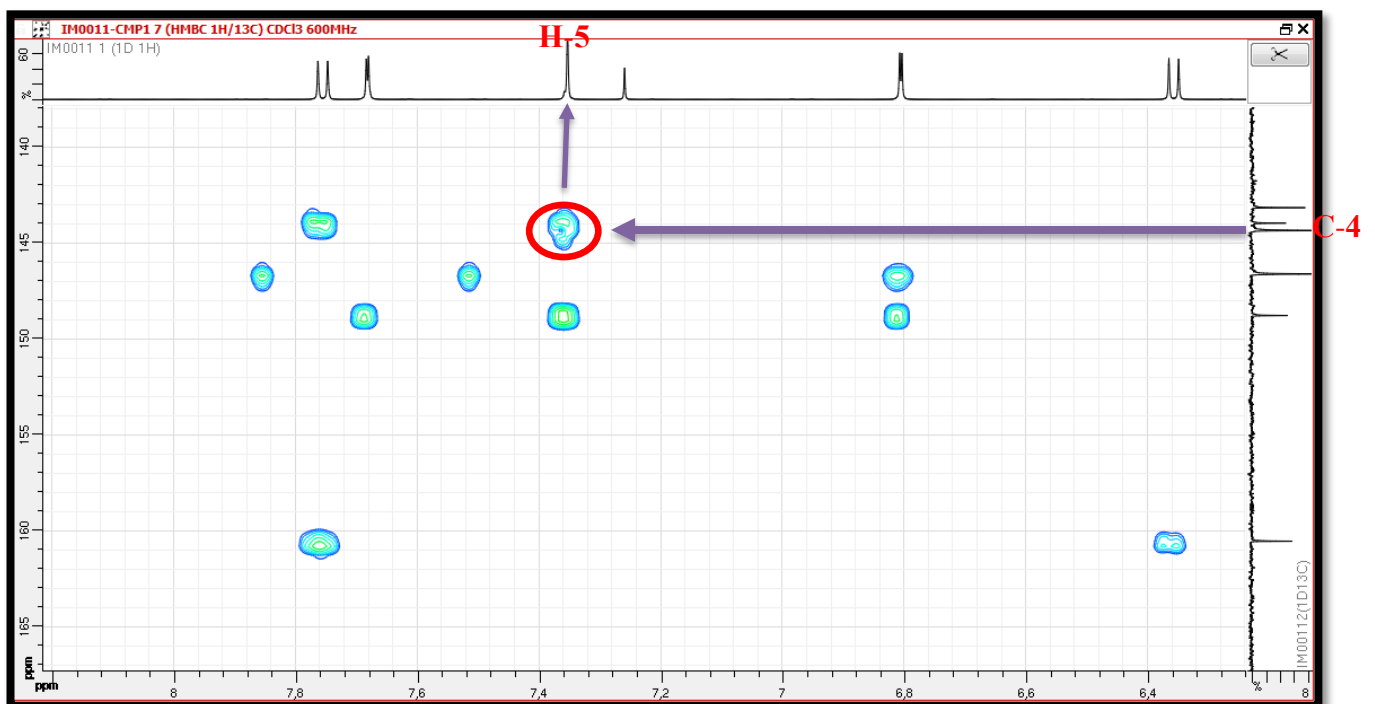
Spectre V.2 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P1



Spectre V.2.1 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P1



**Spectre V.3.1 :** Spectre HSQC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P1**



**Spectre V.4.1 :** Spectre HMBC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P1**

La multiplicité de H-5 (singulet) suppose une substitution des positions C-6 et C-7. La résonance du carbone C-5 est relevée à  $\delta_C = 113,23$  ppm (Spectre HSQC). Le spectre proton (Spectre V.2.2) montre par ailleurs un système AX à  $\delta_H = 6,81$  et  $7,68$  ppm ( $J = 2,2$  Hz). Ces deux protons sont attribuables aux protons du cycle furanique de cette furanocoumarine. Sur le spectre GOESY (Spectre V.5), l'irradiation du proton H-5 provoque une augmentation de l'intensité du signal de H-4 et de celle du proton résonant à  $\delta_H = 6,81$  ppm. Cette observation permet d'attribuer ce proton au H-10 d'une furanocoumarine linéaire. Cette hypothèse est appuyée par la corrélation relevée entre ce proton et le carbone C-5 sur le spectre HMBC. De ce fait le proton résonant à  $\delta_H = 7,68$  ppm sera

attribué au H-9 de cette furanocoumarine. Sur le spectre HSQC, la résonance du carbone C-9 est relevée à  $\delta_C = 146,62$  ppm et celle de C-10 à  $\delta_C = 106,74$  ppm (Figure V.1).

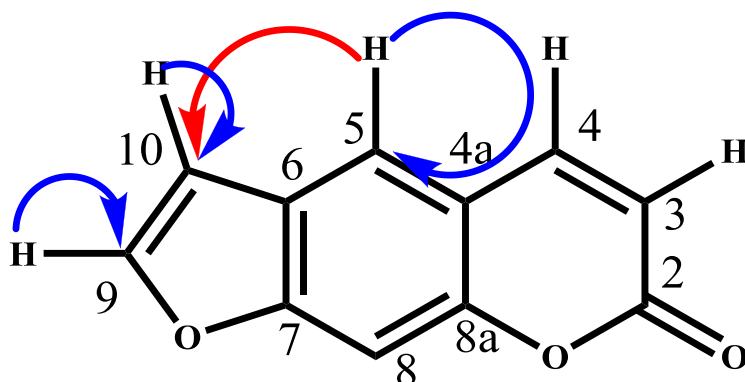
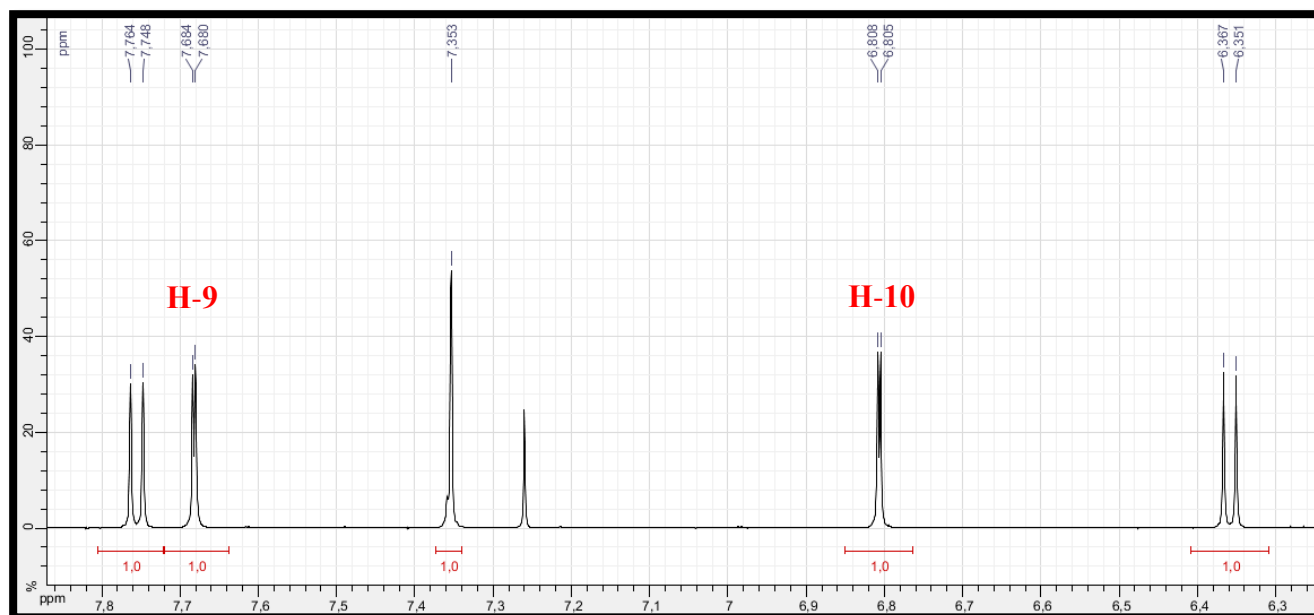
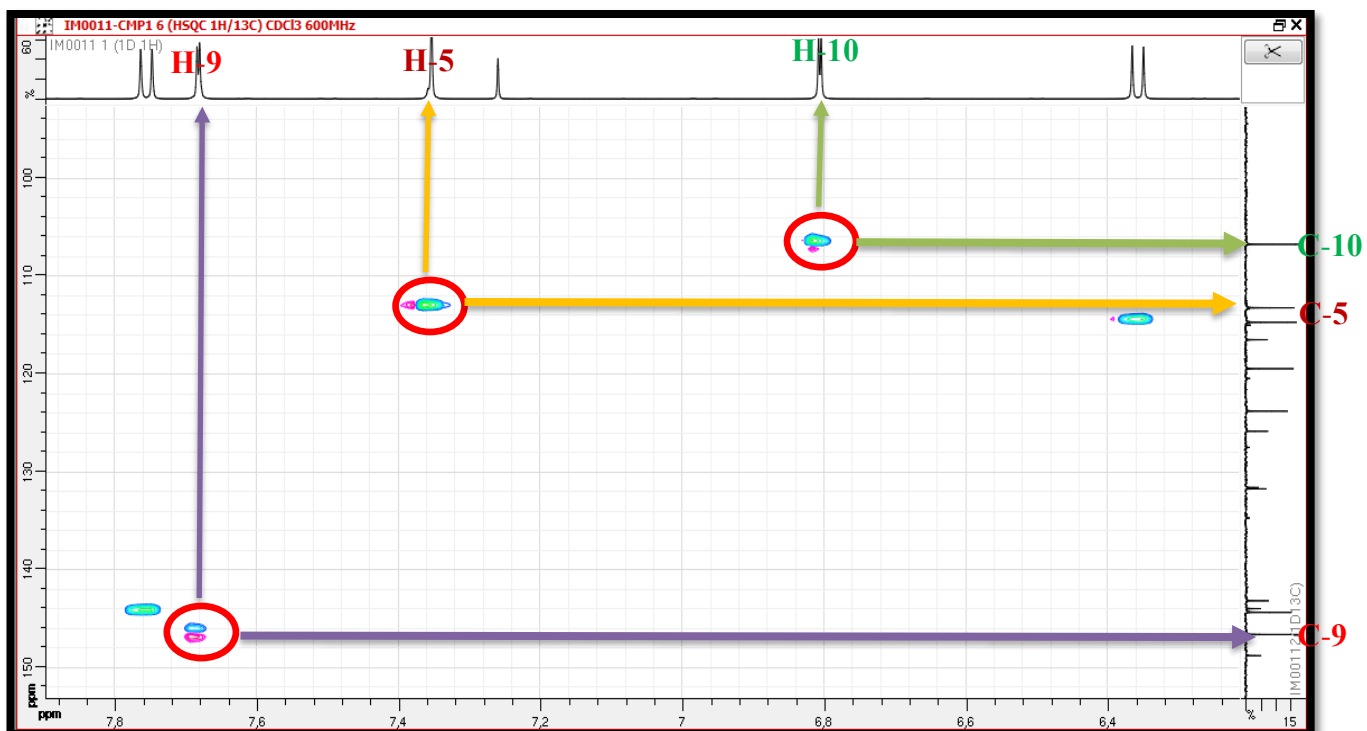


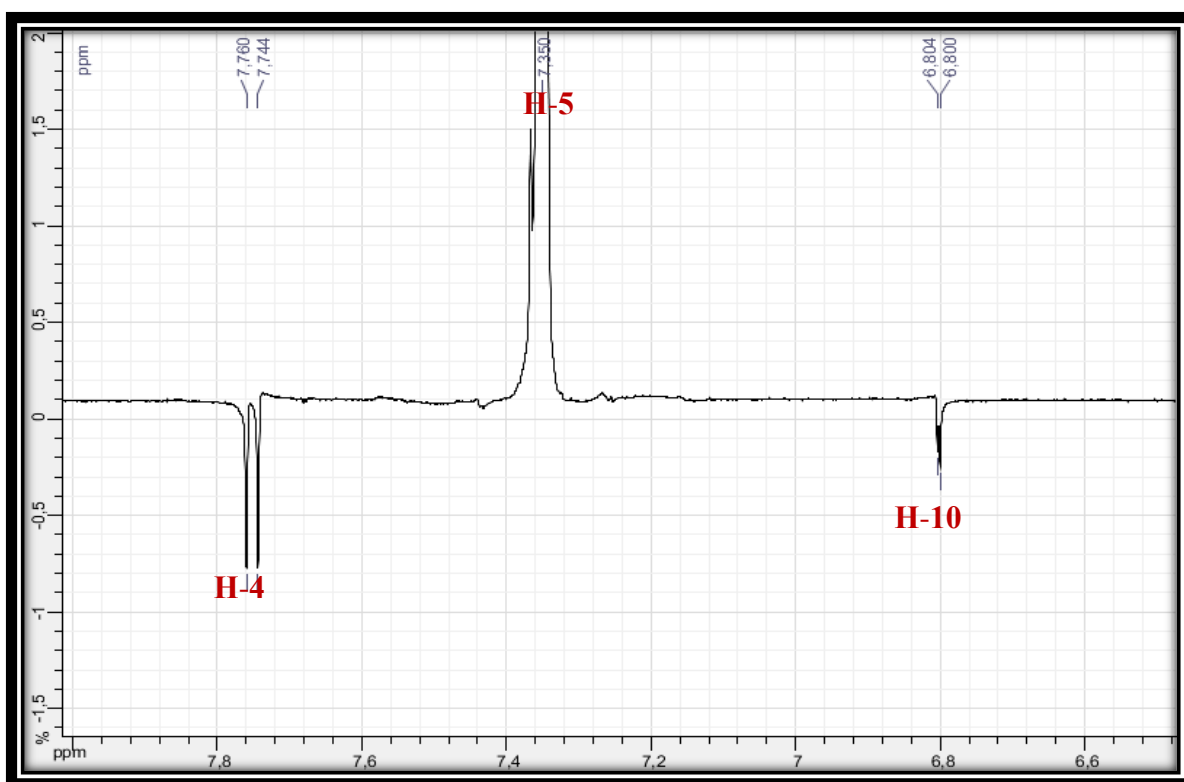
Figure V.1 : Interactions HSQC (flèche bleue) et HMBC (flèche rouge) observées pour la molécule P1



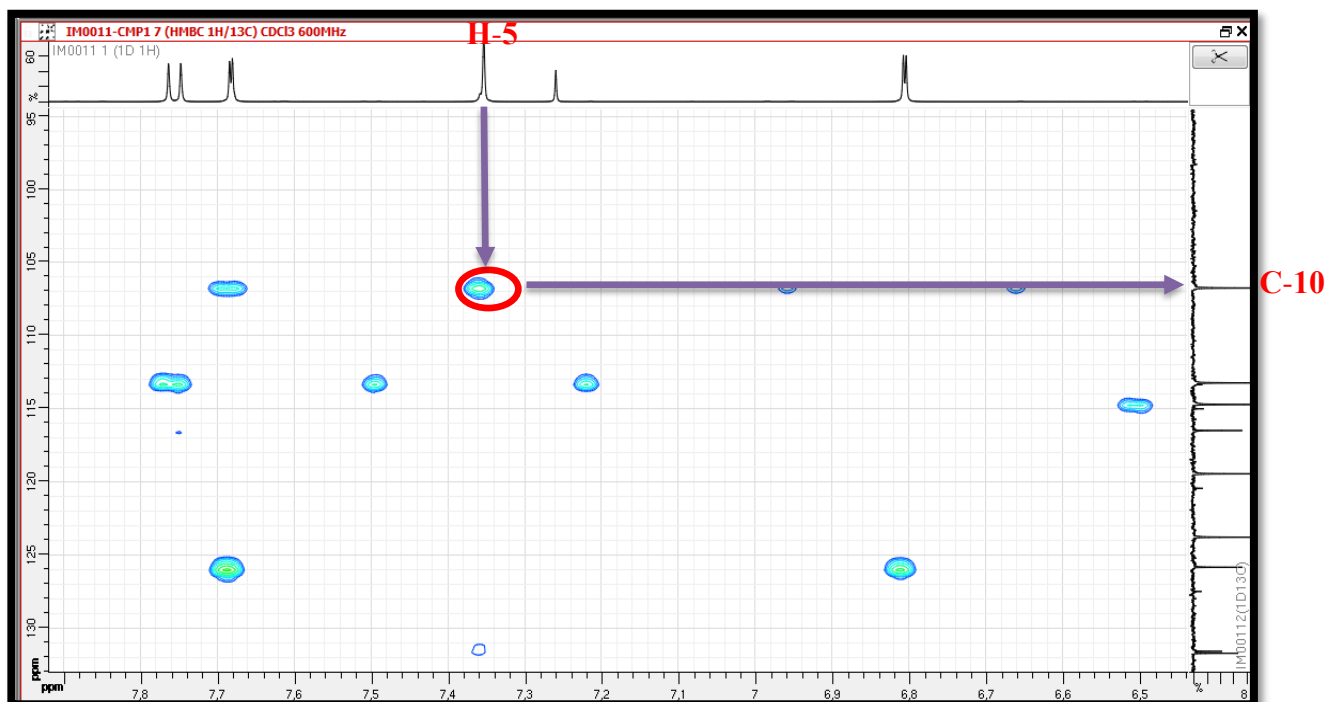
Spectre V.2.2 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P1



Spectre V.3.2 : Spectre HSQC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P1

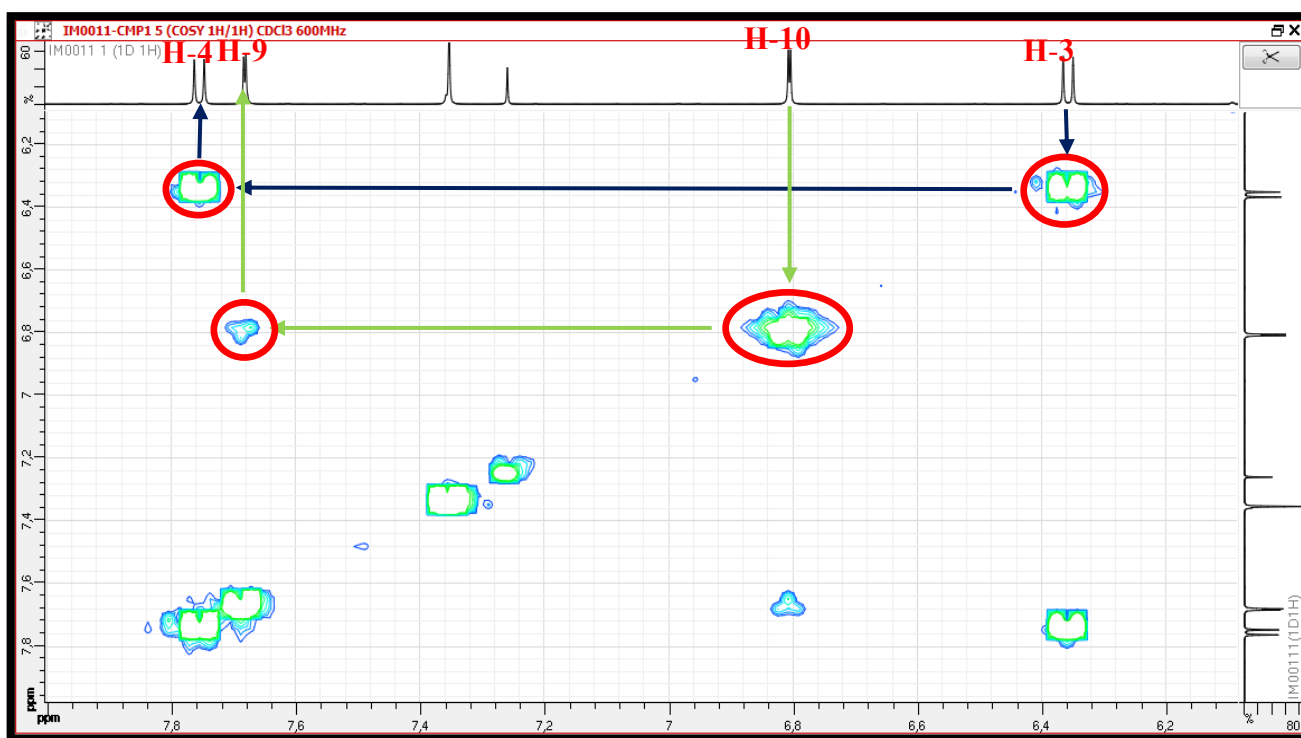


Spectre V.5 : Spectre GOESY étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P1



Spectre V.4.2 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé P1

Ces données sont en bon accord avec le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre V.6.1), qui montre des taches de corrélation entre les protons concernés par les couplages scalaires de la furanocoumarine.



Spectre V.6.1. Spectre COSY étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé P1

Les carbones quaternaires du squelette furanocoumarine peuvent être attribués grâce à l'analyse du spectre HMBC (Spectre V.4.3). En effet, le carbone C-2 sera attribué au signal à  $\delta_C = 160,53$  ppm grâce à ses corrélations avec les protons H-3, H-4. Le carbone C-4a sera attribué au signal à  $\delta_C = 116,49$  ppm grâce à ses corrélations avec les protons H-3, H-4 et H-5. Toujours sur le spectre HMBC, les protons H-4 et H-5 corréleront tous les deux avec le carbone aromatique oxygéné ( $\delta_C = 143,97$  ppm), ce carbone ne peut être que le C-8a. Le même spectre (Spectre V.4.3), montre également des taches de corrélation entre les protons H-5, H-9, H-10 et le carbone aromatique oxygéné à  $\delta_C = 148,78$  ppm attribuable à C-7. Ce spectre montre aussi des corrélations entre les protons H-9, H-10 et le carbone quaternaire aromatique résonant à  $\delta_C = 125,84$  ppm, attribuable à C-6. Ces corrélations sont représentées dans la figure V.2.

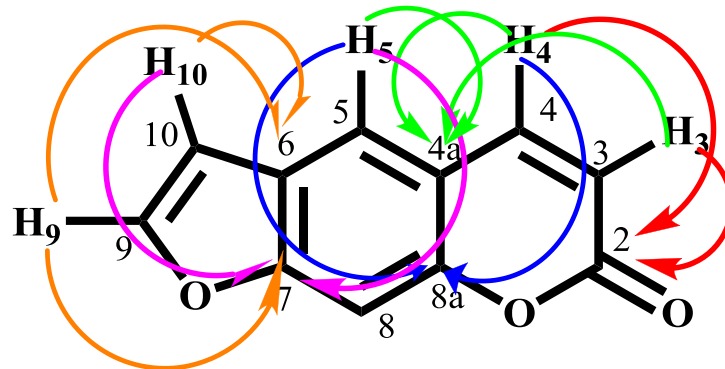
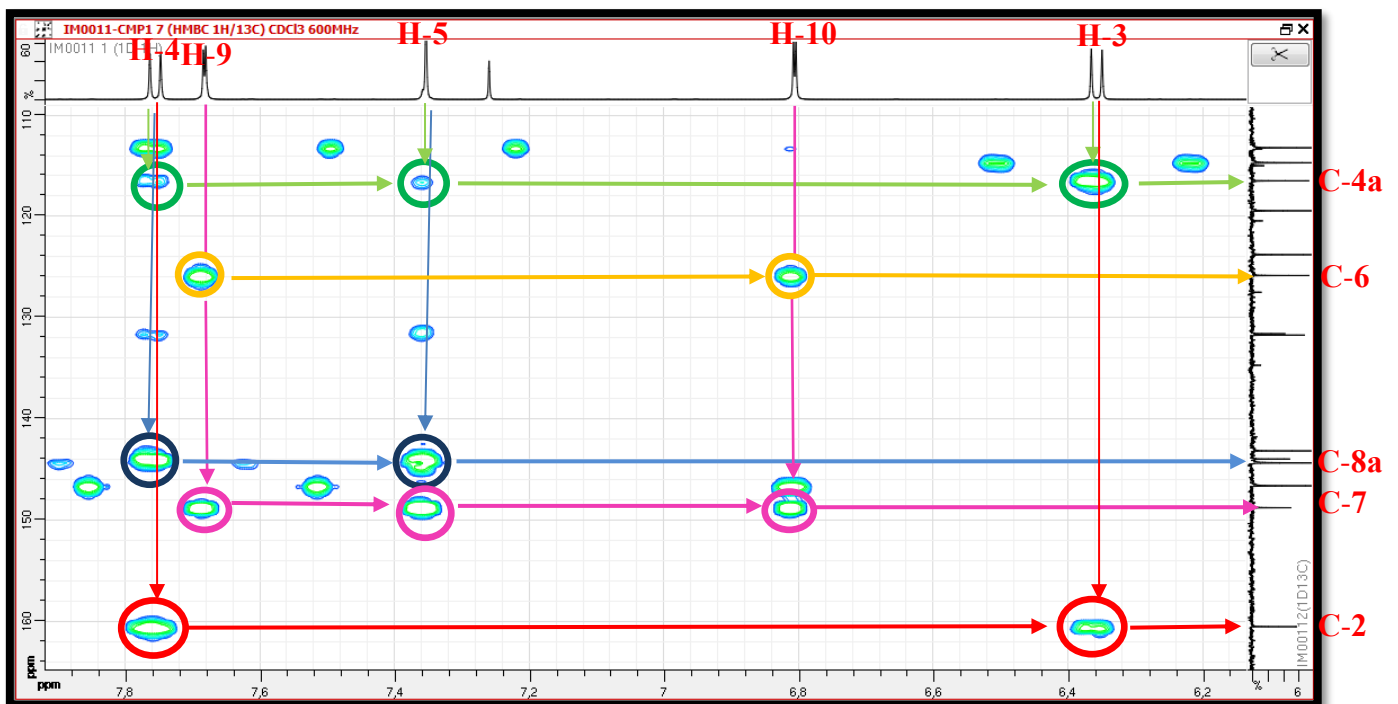


Figure V.2 : Interactions HMBC observées pour la molécule P1



Spectre V.4.3 : Spectre HMBC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P1

Vu la présence d'autres signaux dans les spectres RMN de ce composé, et vu la présence de H-5, il est évident que cette furanocoumarine est substituée en position C-8. Il s'agit donc à ce stade de notre analyse, d'établir la structure de ce substituant. En effet, sur le spectre proton (Spectre V.2.3) on trouve en particulier un signal sous forme d'un doublet d'intégration 2H,  $J = 7,2$  Hz à  $\delta_H = 5,03$  ppm attribuable à un  $\text{CH}_2$  oxygéné ( $\delta_C = 70,11$  ppm). Sur le spectre COSY, les protons de ce  $\text{CH}_2$  montrent une tache de corrélation avec le proton d'un CH résonant sous forme d'un triplet ( $J = 7,2$  Hz) à  $\delta_H = 5,59$  ppm ( $\delta_C = 119,44$  ppm). D'après les valeurs des déplacements chimiques de ce proton et de son carbone porteur, il est évident que ce groupement méthyne est éthylénique. La multiplicité du signal du proton de ce groupement CH indique que le carbone éthylénique délimitant cette double liaison est quaternaire (Figure V.3).

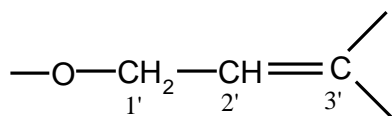
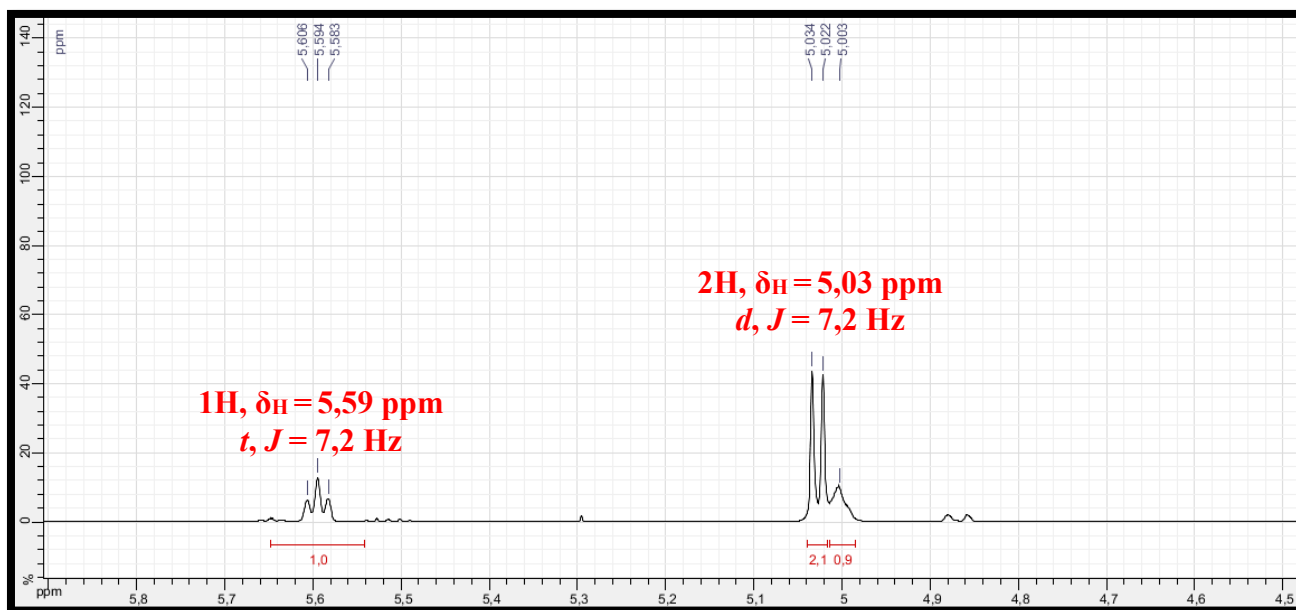


Figure V.3 : Entité présente dans le composé P1



Spectre V.2.3 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P1



Une analyse attentive des spectres de RMN  $^1\text{H}$  et DEPT  $135^\circ$  permet de relever deux groupements  $\text{CH}_2$  résonant sous forme de deux multiplets à  $\delta_{\text{H}} = 2,00$  ppm ( $\delta_{\text{C}} = 39,59$  ppm) et  $\delta_{\text{H}} = 2,01$  ppm ( $\delta_{\text{C}} = 26,38$  ppm). Sur le spectre HMBC (Spectre V.4.4), le carbone résonant à  $\delta_{\text{C}} = 39,59$  ppm, montre une corrélation nette avec le proton  $\text{H}-2'$ . Cette corrélation indique que ce groupement méthylène est attaché au carbone quaternaire éthylénique  $\text{C}-3'$ . Nous pouvons alors le numéroter  $\text{C}-4'$  et numéroter ses protons  $\text{H}_2-4'$ . Toujours sur le spectre HMBC (Spectre V.4.5), le carbone  $\text{C}-2'$  montre une tache de corrélation avec les protons du  $\text{CH}_3$  résonant sous forme d'un singulet à  $\delta_{\text{H}} 1,65$  ppm ( $\delta_{\text{C}} 16,56$  ppm). Cette observation oriente sans ambiguïté vers le fait que ce méthyle est également attaché au carbone quaternaire éthylénique  $\text{C}-3'$ . Cette observation est d'ailleurs bien appuyée par la valeur du déplacement chimique des protons de ce méthyle. Un examen attentif de ce spectre HMBC permet de localiser le signal du carbone éthylénique quaternaire  $\text{C}-3'$  à  $\delta_{\text{C}} = 143,16$  ppm grâce à ses corrélations avec les protons de ce méthyle et les protons  $\text{H}_2-1'$ .

A ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer l'entité reportée dans la Figure V.4 dans le substituant de cette furanocoumarine.

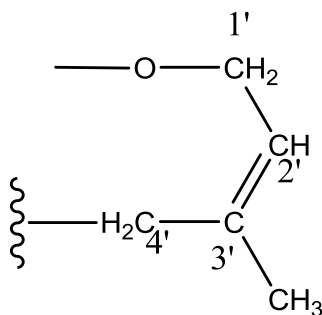
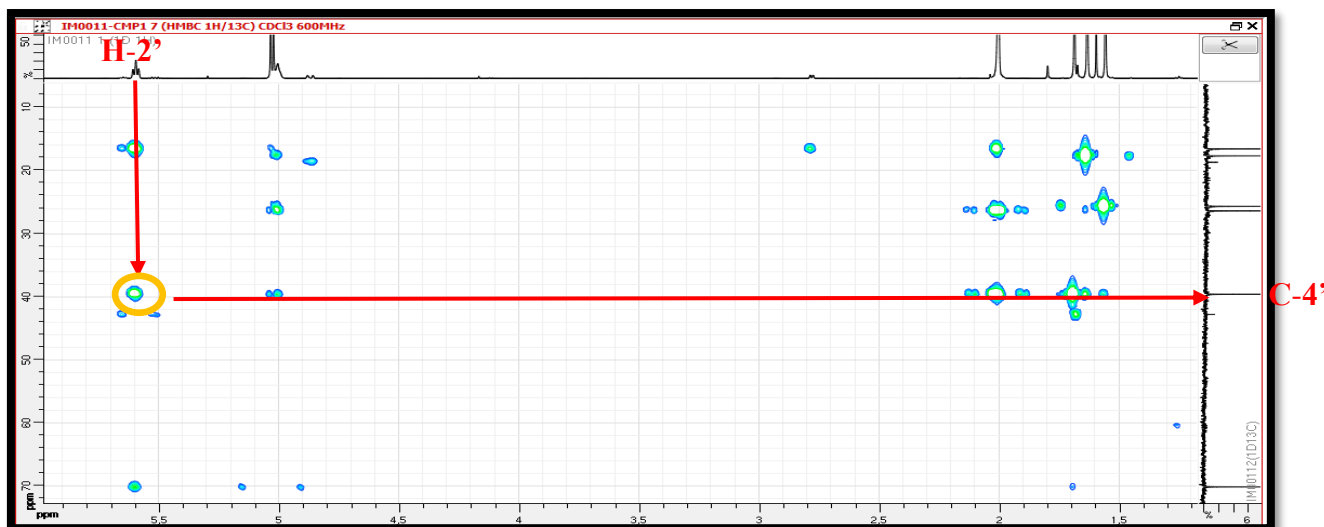
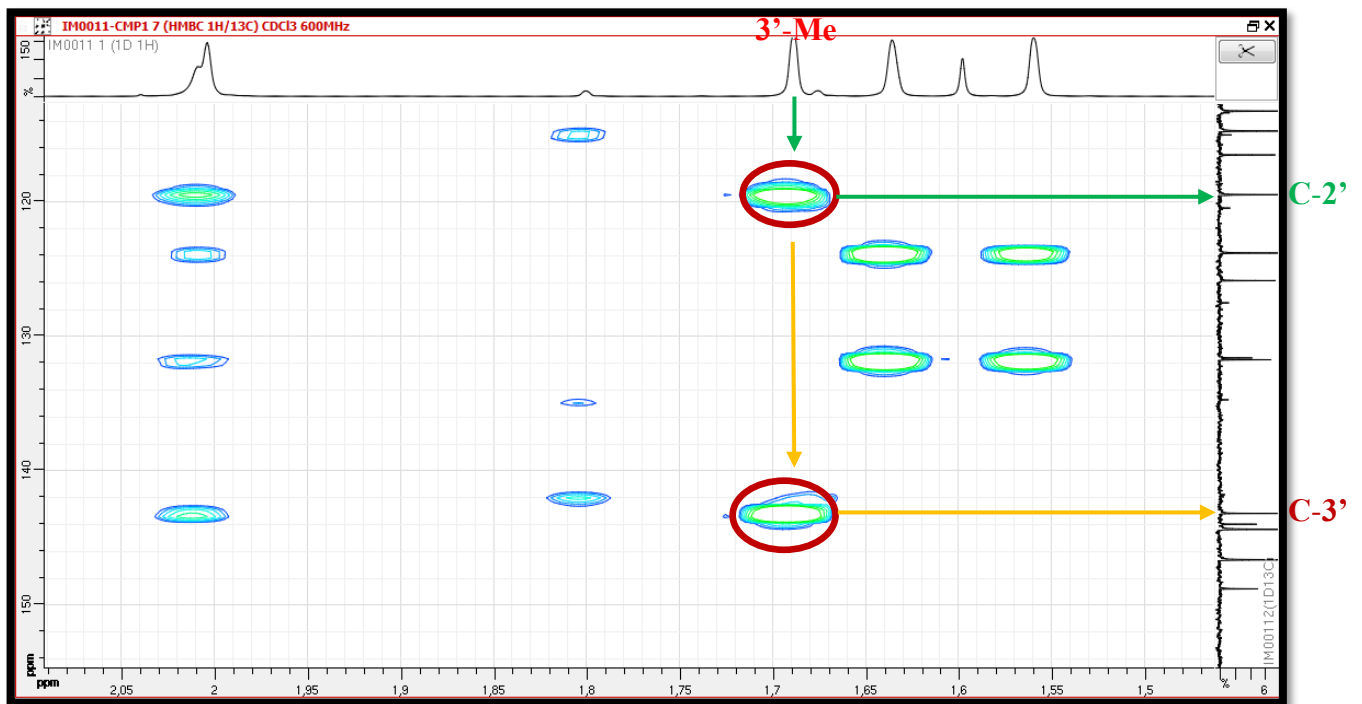


Figure V.4 : Entité faisant partie du substituant du squelette furanocoumarine



Spectre V.4.4 : Spectre HMBC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P1



**Spectre V.4.5 :** Spectre HMBC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P1**

Par ailleurs, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre V.2.4), montre la présence de deux groupements méthyles résonant sous forme de singulets à  $\delta_{\text{H}}$  1,63 et 1,55 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  25,65 et 17,67; respectivement) et celle d'un groupement méthyne résonant sous forme d'un multiplet  $\delta_{\text{H}}$  5,00 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  123,79 ppm). D'après la valeur des déplacements chimiques de son proton et de son carbone, il s'agit d'un CH éthylénique. Sur le spectre HMBC (Spectre V.4.6), les protons du premier groupement méthyle ( $\delta_{\text{H}}$  1,63 ppm) montrent une tache de corrélation avec le carbone du second ( $\delta_{\text{C}}$  17,67 ppm) et les protons du second groupement méthyle ( $\delta_{\text{H}}$  1,55 ppm) montrent une tache de corrélation avec le carbone du premier ( $\delta_{\text{C}}$  25,65 ppm); cette observation indique qu'ils sont portés par le même atome de carbone, vu la multiplicité des signaux de leurs protons, le carbone qui les porte est obligatoirement quaternaire. Toujours sur le spectre HMBC (Spectre V.4.6), les protons de ces deux méthyles montrent des taches de corrélation avec le carbone du CH éthylénique à  $\delta_{\text{C}}$  123,79 ppm et avec un carbone dont la résonance apparaît à  $\delta_{\text{C}}$  131,73 ppm. D'après la valeur de son déplacement chimique, ce dernier carbone ne peut être qu'éthylénique et quaternaire. C'est donc ce carbone qui porte les deux méthyles à  $\delta_{\text{H}}$  1,63 et 1,55 ppm. Cette situation est d'ailleurs en parfait accord avec les valeurs des déplacements chimiques des protons de ces deux méthyles. Le CH éthylénique résonant  $\delta_{\text{C}}$  123,79 ppm sera donc le deuxième carbone de la double liaison. Ces autres données orientent vers la présence dans le substituant en C-8 de la furanocoumarine, de l'entité représentée dans la figure **V.5**.

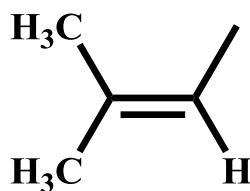
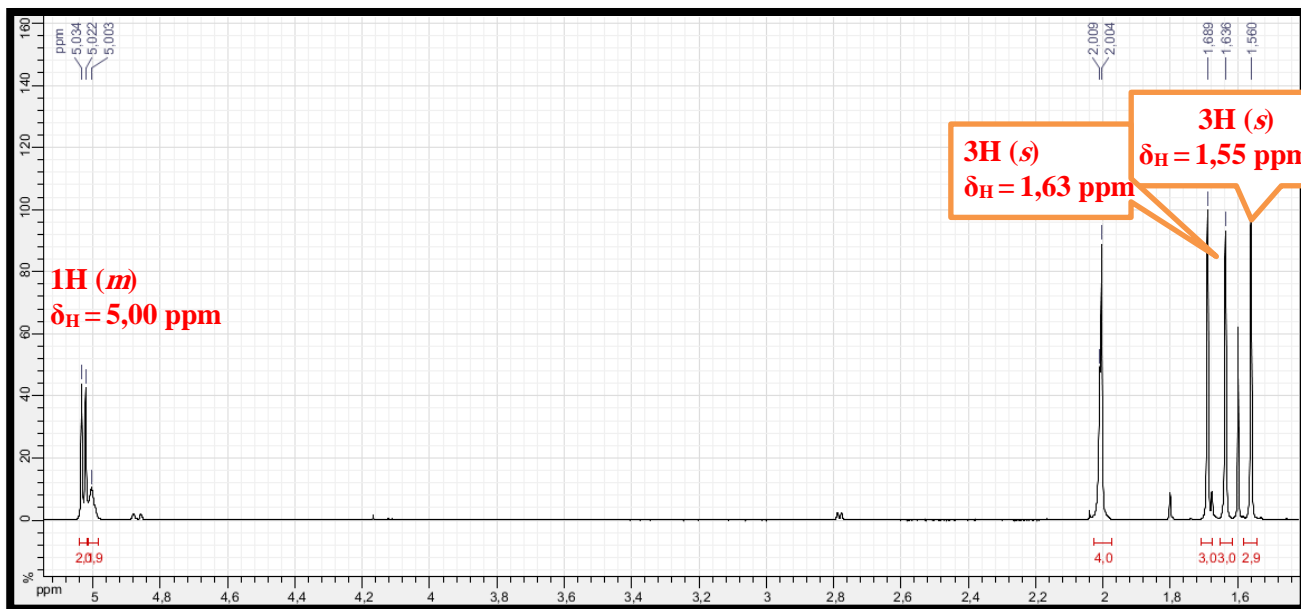
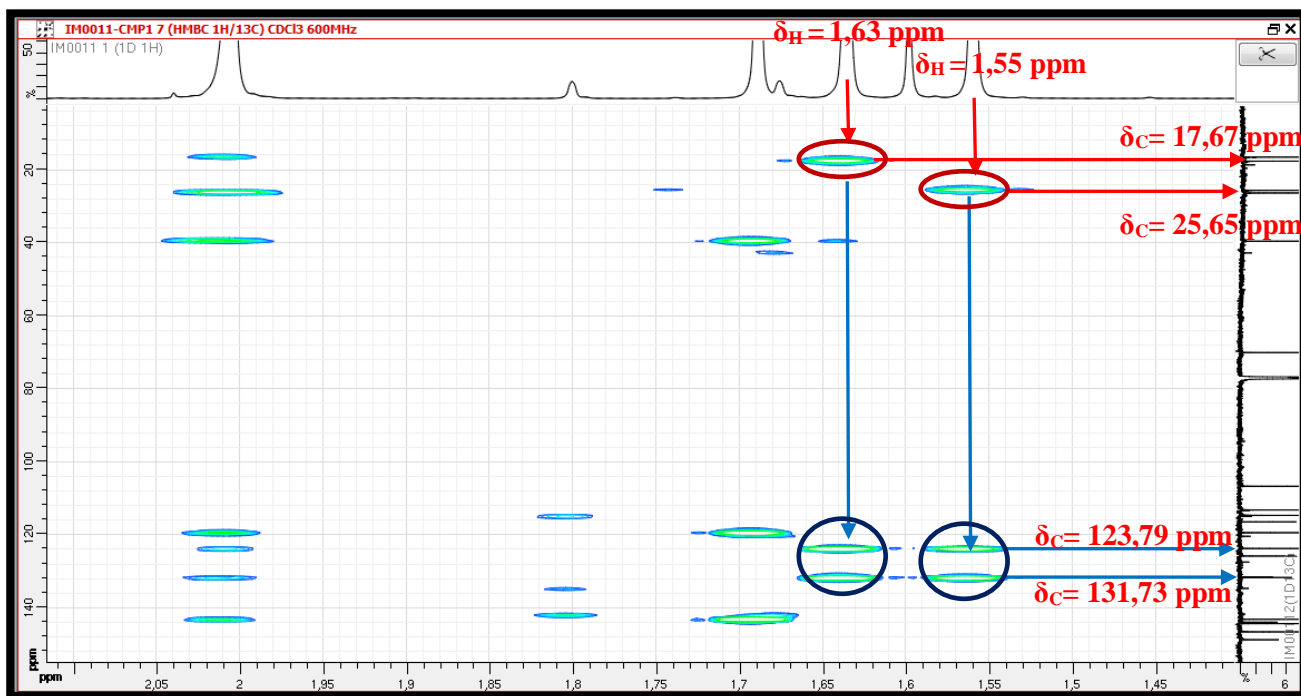


Figure V.5 : Entité faisant partie du substituant du squelette furanocoumarine

Spectre V.2.4 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P1Spectre V.4.6 : Spectre HMBC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P1

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre V.4.7), le carbone C-4' et le carbone du méthylène précédemment signalé et dont la résonance apparaît à  $\delta_C$  26,38 ppm ( $\delta_H$  2,01 ppm) montrent clairement des taches de corrélation avec le proton éthylénique de l'entité précédente. Cette donnée permet de placer ce dernier méthylène entre le C-4' et ce méthyne éthylénique. Ainsi le carbone de ce méthylène représentera donc la position C-5', et de ce fait, le carbone du méthyne éthylénique représentera la position C-6'. Ceci est d'ailleurs bien visible sur le spectre COSY (Spectre V.6.2), qui montre une corrélation claire entre les protons H<sub>2</sub>-5' et le proton éthylénique H-6'. Ainsi le substituant en C-8 de cette furanocoumarine est un geranyloxy (Figure V.6).

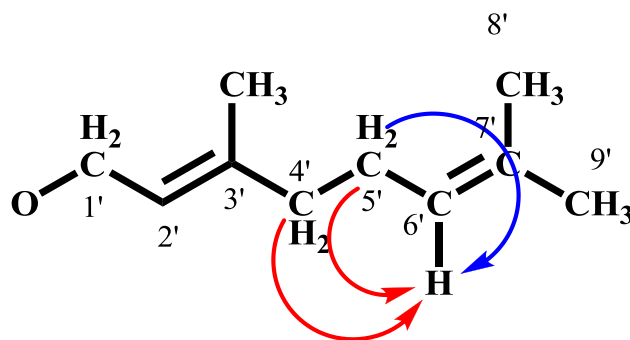
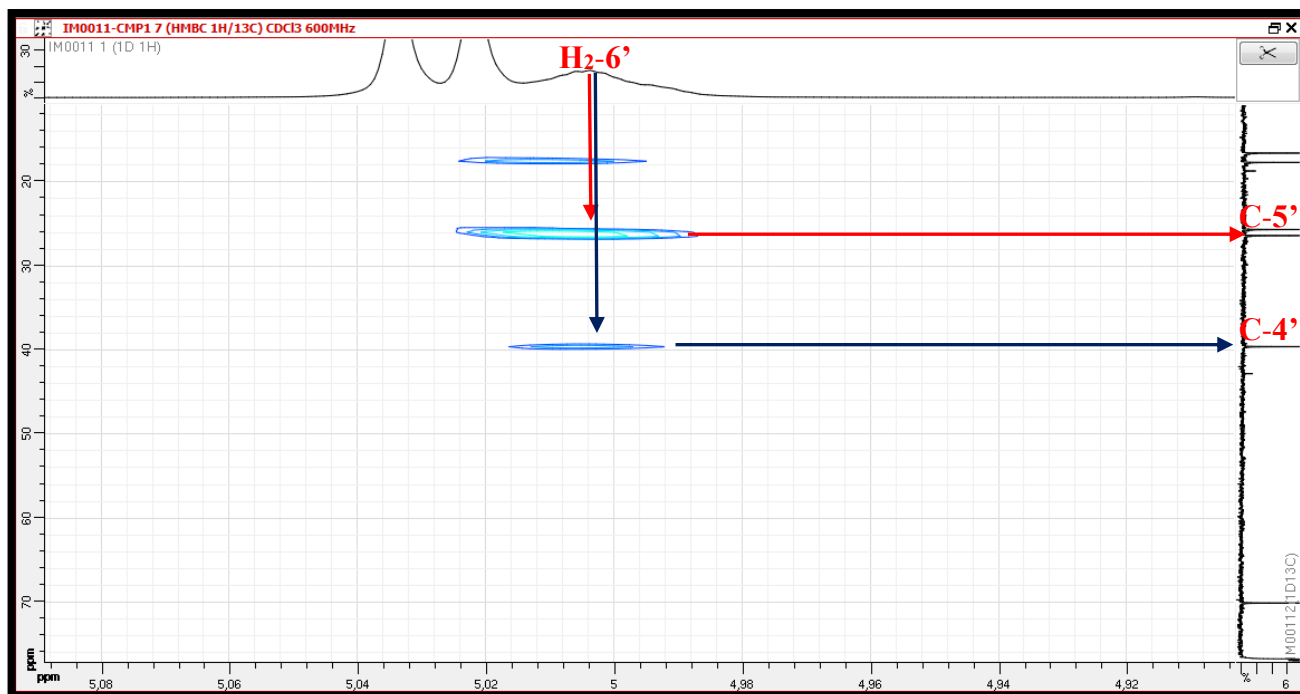
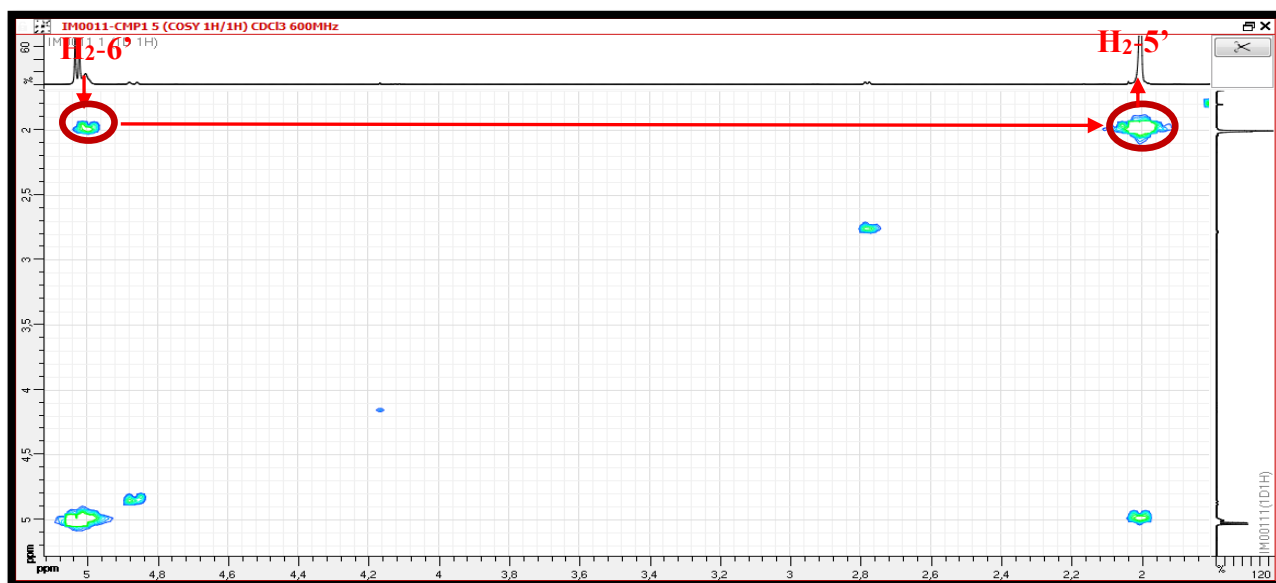


Figure V.6 : Interactions COSY (flèche bleue) et HMBC (flèche rouge) observées pour la molécule P1



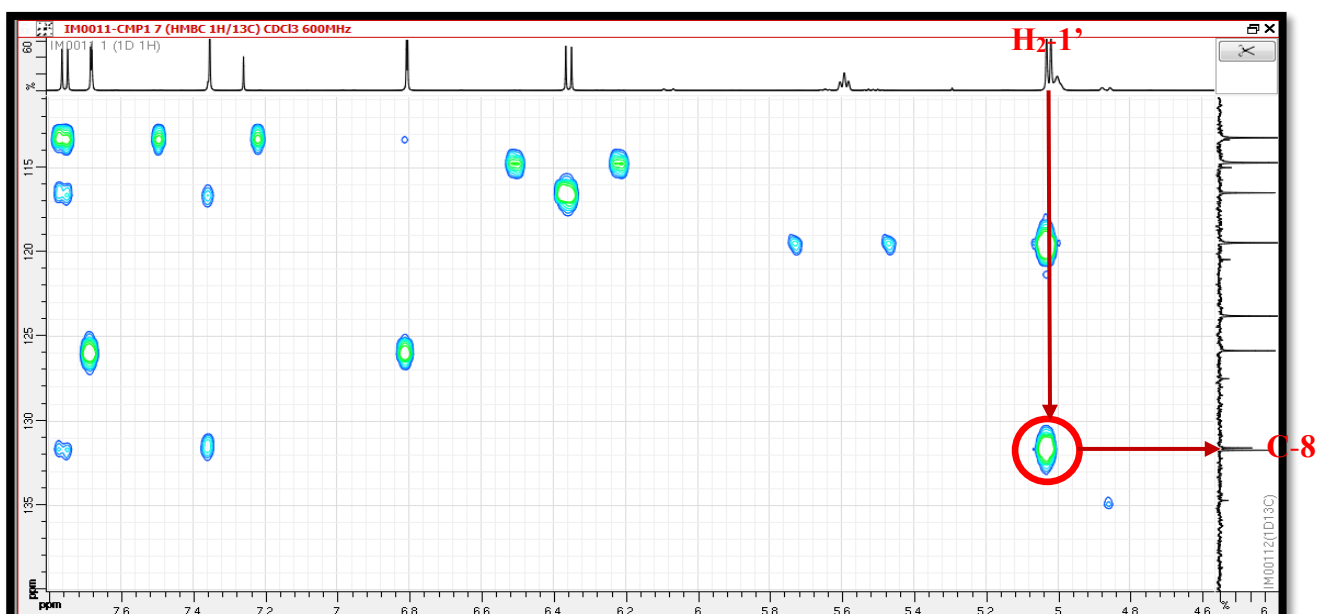
Spectre V.4.7 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm) du composé P1



**Spectre V.6.2 :** Spectre COSY étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P1**

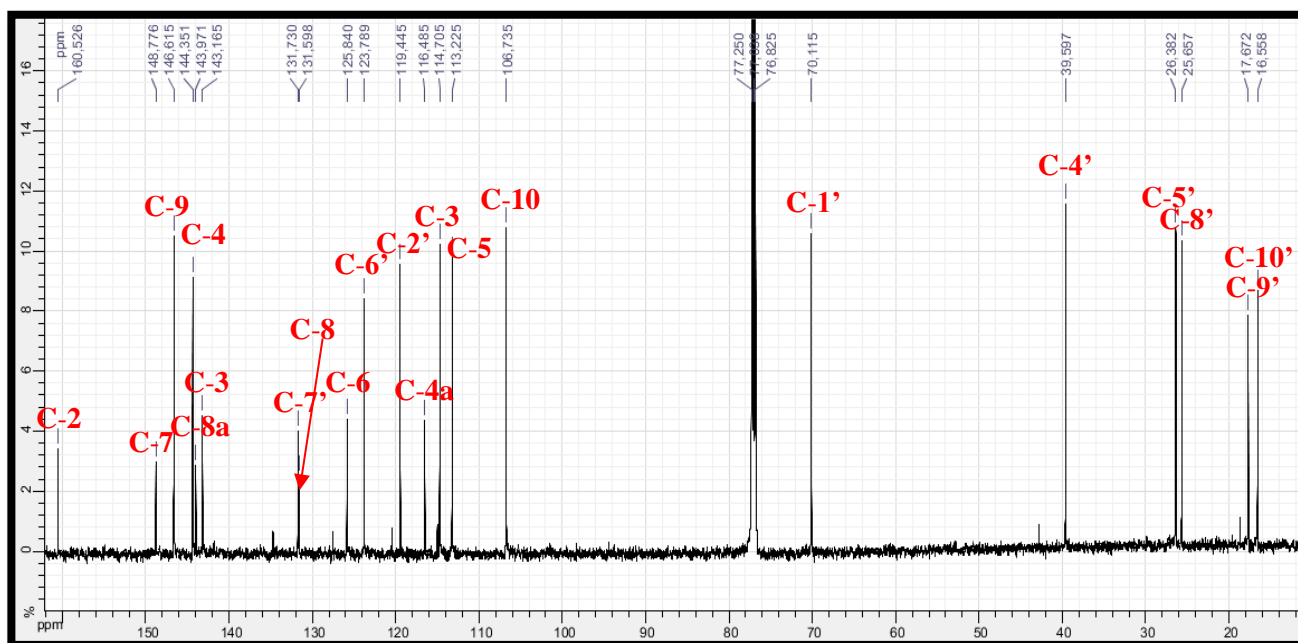
Ce substituant renferme une double liaison entre C-2' et C-3' que nous avons représentée avec une configuration *trans* (E) grâce aux données de la bibliographie relatives aux schémas de biogenèse du géraniol (Bouvier et al., 2005; Ruzicka, 1953).

Il faut noter qu'à ce stade, nous avons expliqué et attribué à leurs noyaux respectifs, tous les signaux des spectres RMN à l'exception de la résonance à  $\delta_{\text{C}}$  131,60 ppm. Un retour vers le spectre HMBC (Spectre V.4.8) permet de relever aisément une corrélation entre le carbone relatif à cette résonance et les protons  $\text{H}_2-1'$ . Ce carbone ne peut être que le C-8 de la furanocoumarine car il ne corrèle avec aucun autre proton de la chaîne. Cette attribution en bon accord avec la valeur du déplacement chimique de ce carbone qui correspond bien à celle d'un carbone aromatique oxygéné ( $\delta_{\text{C}}$  131,60 ppm).



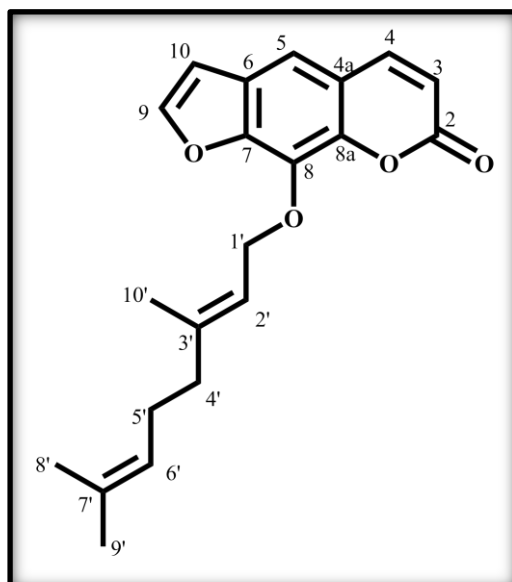
**Spectre V.4.8 :** Spectre HMBC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P1**

L'attribution des carbones de la molécule est représentée dans le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Spectre V.7).



**Spectre V.1 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P1** avec toutes les indications

Sur la base de ces résultats et par comparaison avec ceux de la littérature (Row et al., 2006; Stevenson et al., 2003), la structure du composé **P1** a pu être établie en tant que **8-geranyloxypsoralène** (Figure V.7), Cette molécule est connue pour ses activités cytotoxiques et antibactériennes (Marumoto et Miyazawa, 2012; Razavi et al., 2009), et nos résultats ont été prouvés son activité antiparasitaire de cette molécule (Chapitre VI).



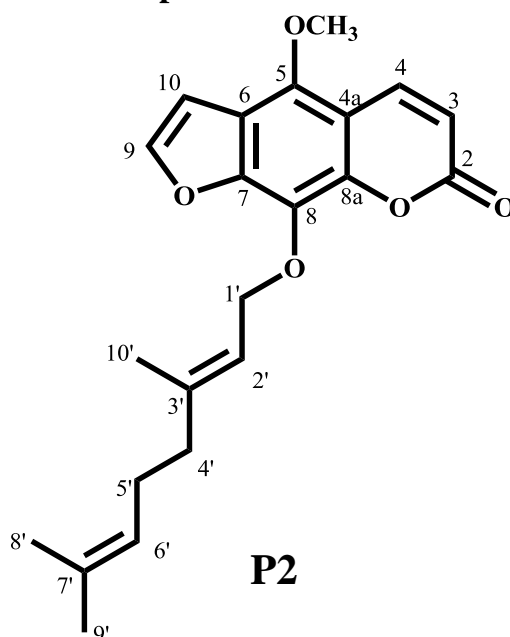
**Figure V.7 :** Structure finale du composé **P1**, **8-geranyloxypsoralène**

L'analyse combinée des spectres proton, DEPT, HSQC et HMBC a permis d'attribuer l'ensemble des signaux aux noyaux respectifs comme reporté dans le Tableau V.1.

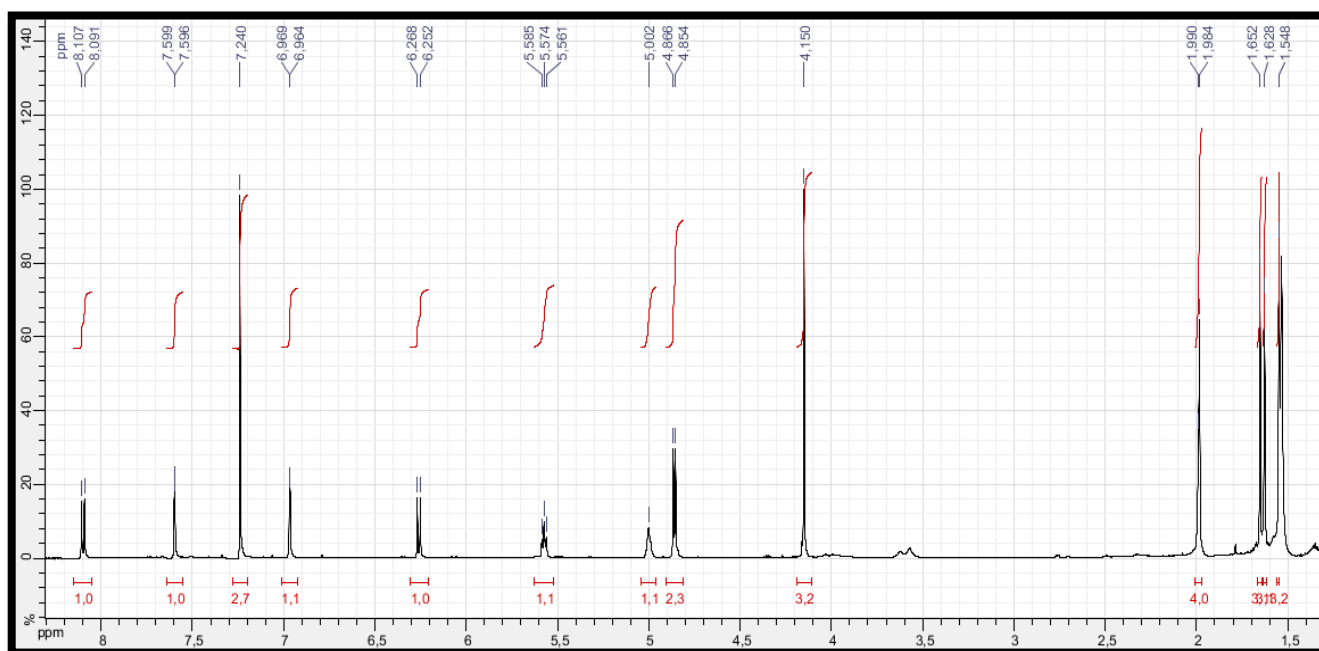
**Tableau V.1** : Déplacements chimiques  $\delta$  (ppm)  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) et  $^1\text{H}$  (600 MHz) du composé **P1**

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
2	160,53	-	-	-	-
3	114,70	6,36	1H	<i>d</i>	9,6
4	144,35	7,76	1H	<i>d</i>	9,6
4a	116,49	-	-	-	-
5	113,23	7,35	1H	<i>s</i>	-
6	125,84	-	-	-	-
7	148,78	-	-	-	-
8	131,60	-	-	-	-
8a	143,97	-	-	-	-
9	146,62	7,68	1H	<i>d</i>	2,2
10	106,74	6,81	1H	<i>d</i>	2,2
1'	70,11	5,03	2H	<i>d</i>	7,2
2'	119,44	5,59	1H	<i>t</i>	7,2
3'	143,16	-	-	-	-
4'	39,59	2,0	2H	<i>m</i>	-
5'	26,38	2,01	2H	<i>m</i>	-
6'	123,79	5,0	1H	<i>m</i>	-
7'	131,73	-	-	-	-
8'	25,65	1,63	3H	<i>s</i>	-
9'	17,67	1,55	3H	<i>s</i>	-
10'	16,56	1,65	3H	<i>s</i>	-

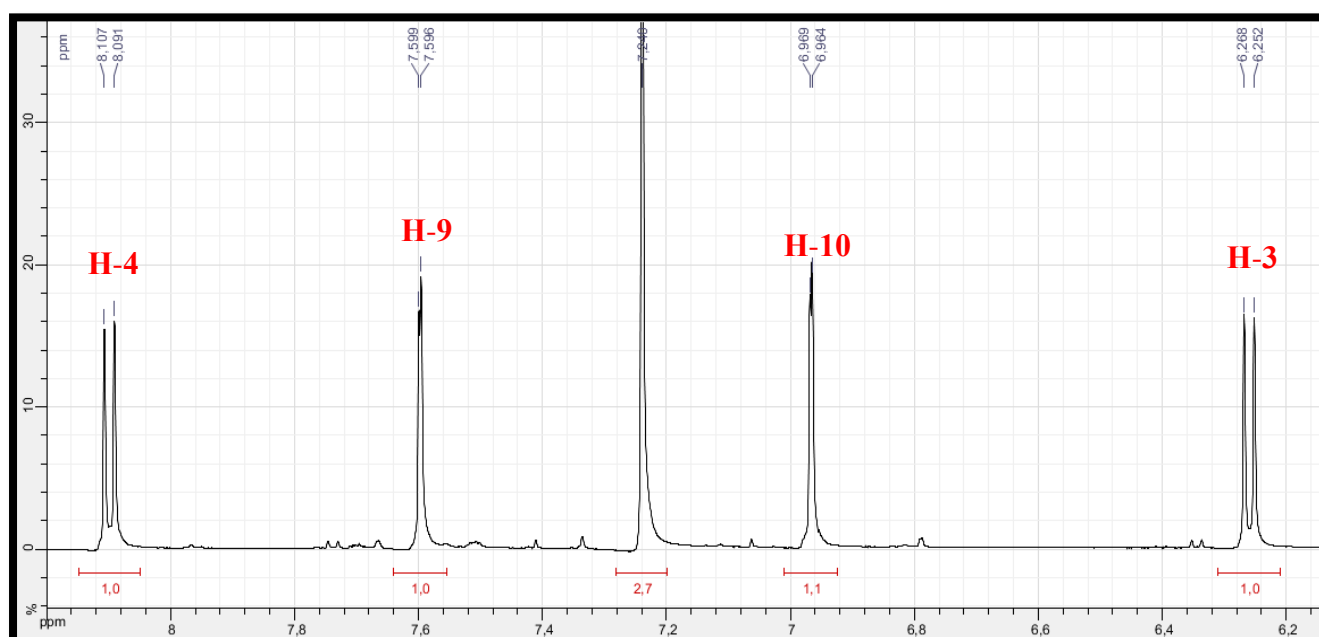
### V.2.A.2. Élucidation structurale du composé P2



Le spectre proton (Spectre V.7.1), montre la présence de deux systèmes AX caractéristiques d'un squelette de type furanocoumarine. Le premier à  $\delta_H = 6,26$  et  $8,10$  ppm ( $J = 9,6$  Hz), couplage confirmé par le spectre COSY (Spectre V.8.1) est attribuable à H-3 et H-4, respectivement. Le deuxième à  $\delta_H = 6,97$  et  $7,60$  ppm ( $J = 2,4$  Hz) est attribuable à H-10 et H-9, respectivement. Le couplage vicinal de ces deux noyaux est également confirmé par le spectre COSY (Spectre V.8.1 et Figure V.8).

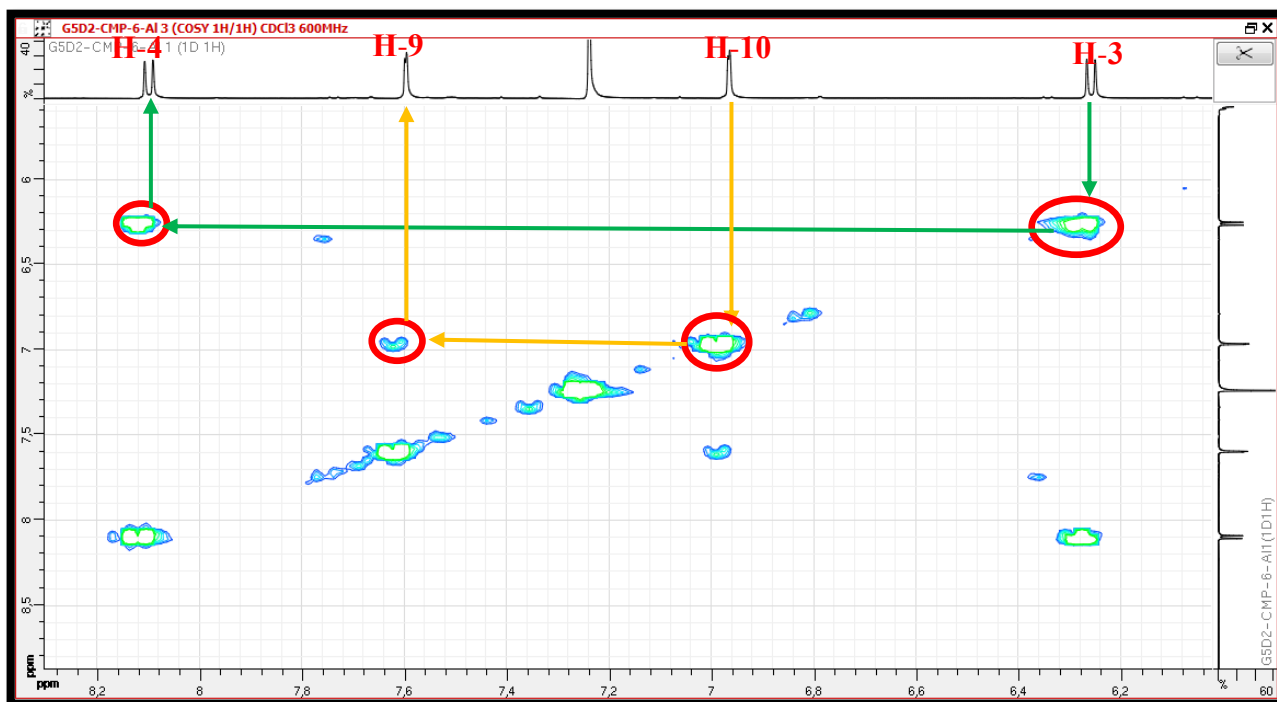


Spectre V.7 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P2



Spectre V.7.1 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P2





Spectre V.8.1 : Spectre COSY étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P2**

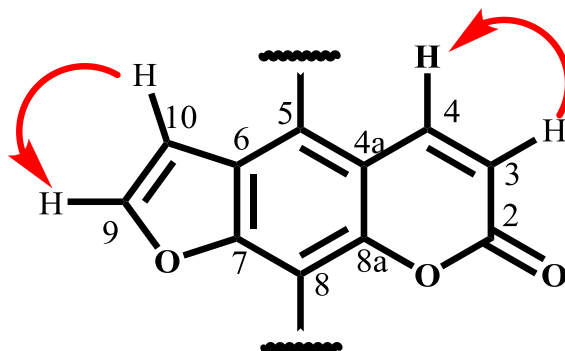
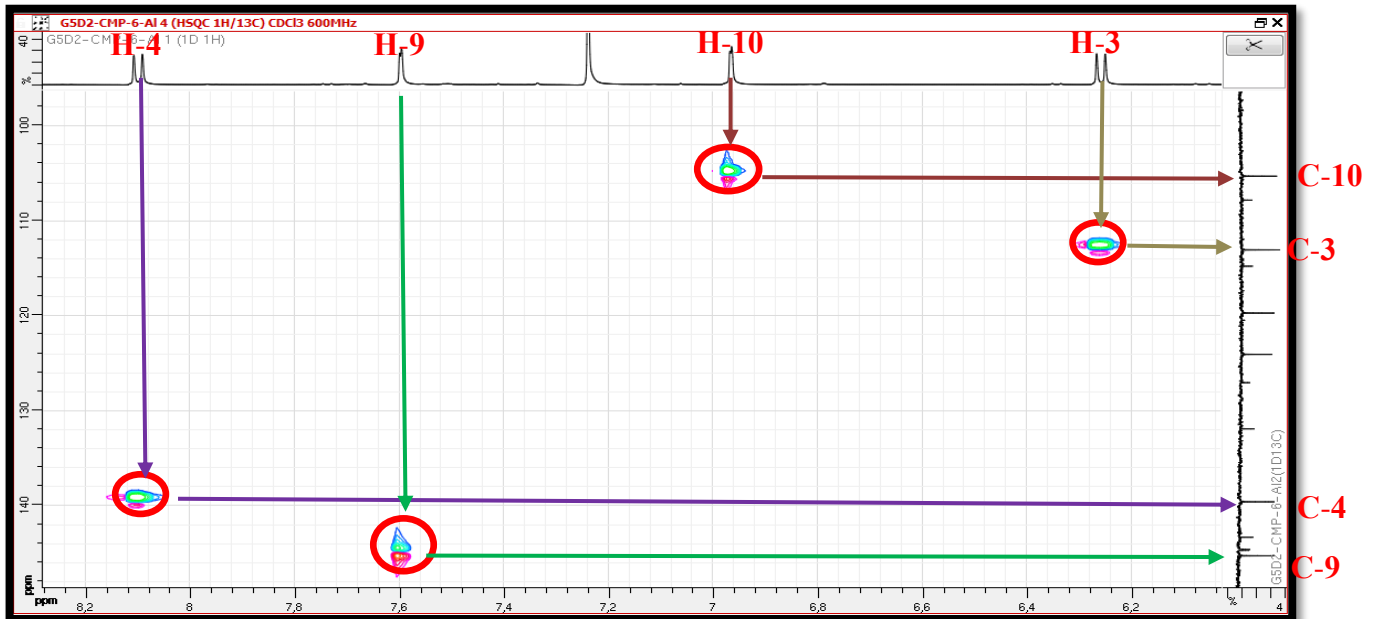


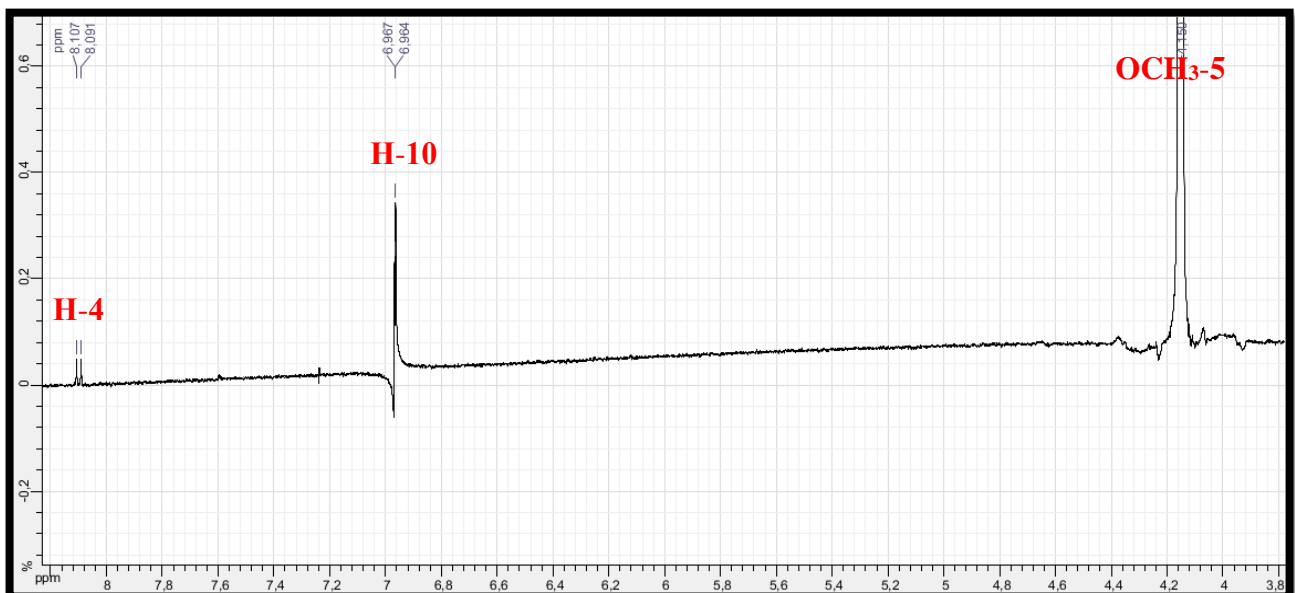
Figure V.8 : Corrélations COSY observées pour la molécule **P2**

Le spectre HSQC (Spectre V.9.1) permet de localiser les carbones C-4 à  $\delta_c = 139,59$  ppm, C-3 à  $\delta_c = 113,05$  ppm, C-9 à  $\delta_c = 145,28$  ppm, C-10 à  $\delta_c = 105,29$  ppm.



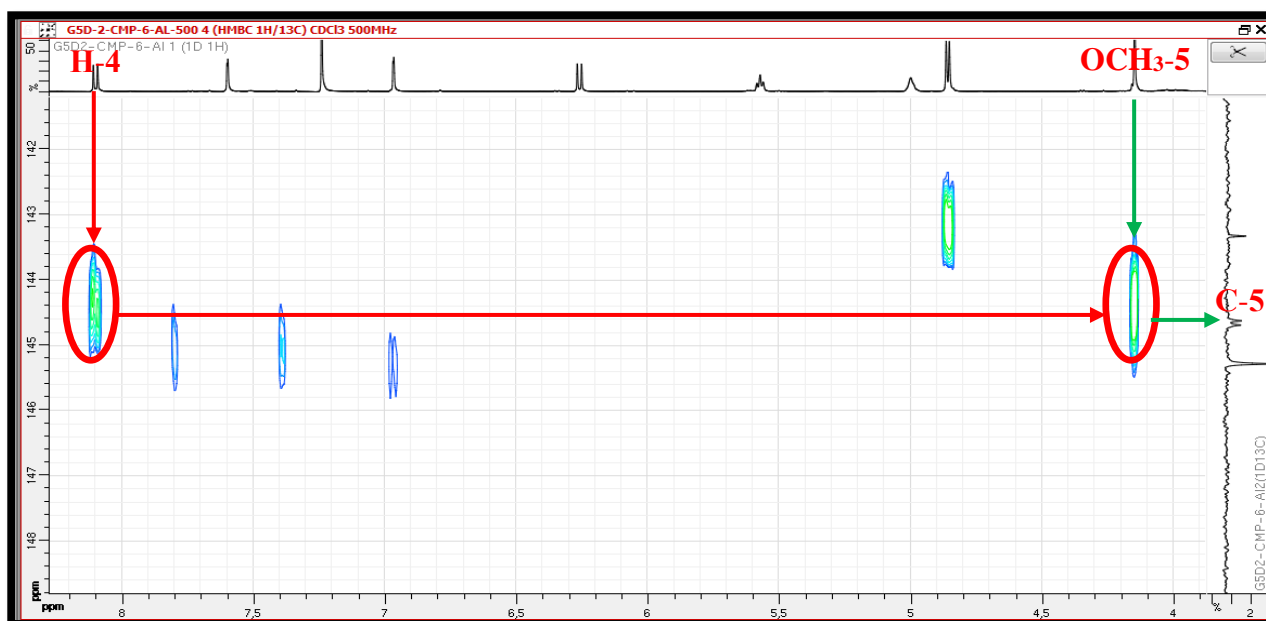
**Spectre V.9.1** : Spectre HSQC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P2**

Par ailleurs, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre V.7), montre un singulet relatif à un groupement méthoxyle résonant à  $\delta_{\text{H}}$  4,15 ppm. De plus, sur le spectre GOESY (Spectre V.10), l'irradiation des protons de ce groupement méthoxyle provoque l'augmentation des signaux des noyaux de H-4 et H-10, ceci oriente vers la présence du groupement  $\text{CH}_3\text{-O}$  en position C-5 du squelette furanocoumarique.



**Spectre V.10** : Spectre GOESY (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P2**

L'examen du spectre HMBC (Spectre V.11.1) permet de localiser le carbone porteur de ce groupement méthoxyle soit donc le C-5 à  $\delta_C$  144,68 ppm grâce à la corrélation observée entre les protons de ce méthoxyle et ce carbone. Ceci est d'ailleurs confirmé par ce même spectre où l'on relève la présence d'une tache de corrélation entre ce carbone et le proton H-4.



**Spectre V.11.1** : Spectre HMBC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P2**

À ce stade de notre analyse, il apparaît clairement après comparaison des spectres de ce composé à ceux du composé **P1**, que nous sommes en présence d'une furanocoumarine linéaire substituée en position C-5 par un méthoxyle et en C-8 par un groupement géranyloxy vu la similarité des spectres de ces deux composés.

En effet, le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Spectre V.12) de ce composé montre 22 signaux, c'est-à-dire un carbone de plus que celui de **P1**. Les signaux du groupement géranyloxy ont été attribués sans aucune ambiguïté grâce aux analyses des spectres proton, HSQC (Spectre V.9.1) et HMBC (Spectre V.11.2 et Spectre V.11.3) :

C-1' à  $\delta_C$  70,51 ppm grâce à sa corrélation avec H<sub>2</sub>-1' (*d*, 4,86,  $J = 7,2$  Hz) sur le spectre HSQC.

C-2' à  $\delta_C$  119,70 ppm grâce à sa corrélation avec H-2' (*t*, 5,57,  $J = 7,2$  Hz) sur le spectre HSQC.

C-5' à  $\delta_C$  26,63 ppm grâce à sa corrélation avec H<sub>2</sub>-5' (*m*, 1,98) sur le spectre HSQC.

C-4' à  $\delta_C$  39,82 ppm grâce à sa corrélation avec H<sub>2</sub>-4' (*m*, 1,99) sur le spectre HSQC.

C-6' à  $\delta_C$  124,06 ppm grâce à sa corrélation avec H-6' (*m*, 5,00) sur le spectre HSQC.

C-8' à  $\delta_C$  17,88 ppm grâce à sa corrélation avec H<sub>3</sub>-8' (*s*, 1,63) sur le spectre HSQC.

C-9' à  $\delta_C$  25,87 ppm grâce à sa corrélation avec H<sub>3</sub>-9' (*s*, 1,55) sur le spectre HSQC.

C-10' à  $\delta_C$  16,74 ppm grâce à sa corrélation avec H<sub>3</sub>-10' (*s*, 1,65) sur le spectre HSQC.

C-3' à  $\delta_C$  143,32 ppm grâce à la valeur de son déplacement chimique et à ses corrélations avec H-2', H-4' et H-10' sur le spectre HMBC.

C-7' à  $\delta_C$  131,90 ppm grâce à la valeur de son déplacement chimique et à ses corrélations avec H-5', H<sub>3</sub>-8' et H<sub>3</sub>-9' sur le spectre HMBC.

Par ailleurs, le carbone du substituant méthoxyle en C-5 est localisé à  $\delta_C$  61,01 ppm grâce à sa corrélation avec les protons du OCH<sub>3</sub> sur le spectre HSQC. Quant aux carbones quaternaires du squelette furanocoumarine, ils ont été attribués à leur résonance respective grâce à une analyse attentive du spectre relatif à l'expérience HMBC et à la valeur de leur déplacement chimique. On relève en effet ;

C-2 à  $\delta_C$  162,73 ppm grâce à la valeur de son déplacement chimique et à ses corrélations avec H-3 et H-4 sur le spectre HMBC.

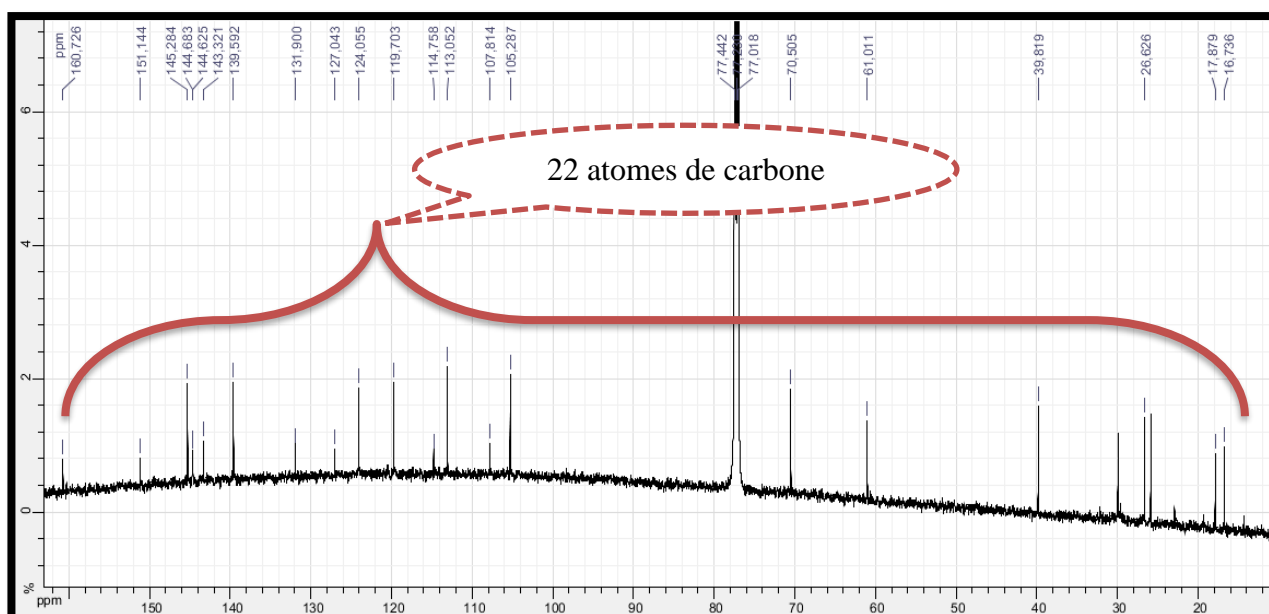
C-4a à  $\delta_C$  107,83 ppm grâce à la valeur de son déplacement chimique et à sa corrélation avec H-3 sur le spectre HMBC.

C-6 à  $\delta_C$  114,76 ppm grâce à la valeur de son déplacement chimique et à ses corrélations avec H-10 et H-9 sur le spectre HMBC.

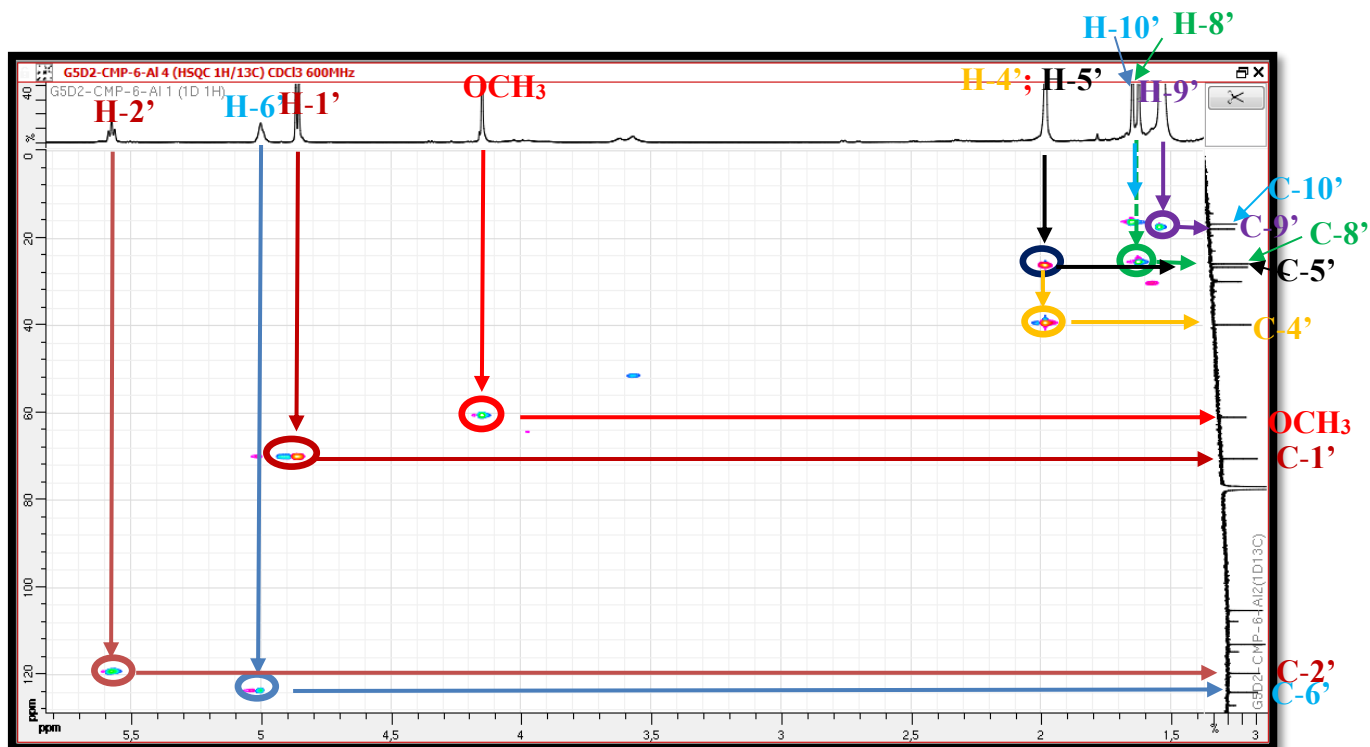
C-7 à  $\delta_C$  151,14 ppm grâce à la valeur de son déplacement chimique et à ses corrélations avec H-10 et H-9 sur le spectre HMBC.

C-8 à  $\delta_C$  127,04 ppm grâce à la valeur de son déplacement chimique et à sa corrélation avec H-2' sur le spectre HMBC.

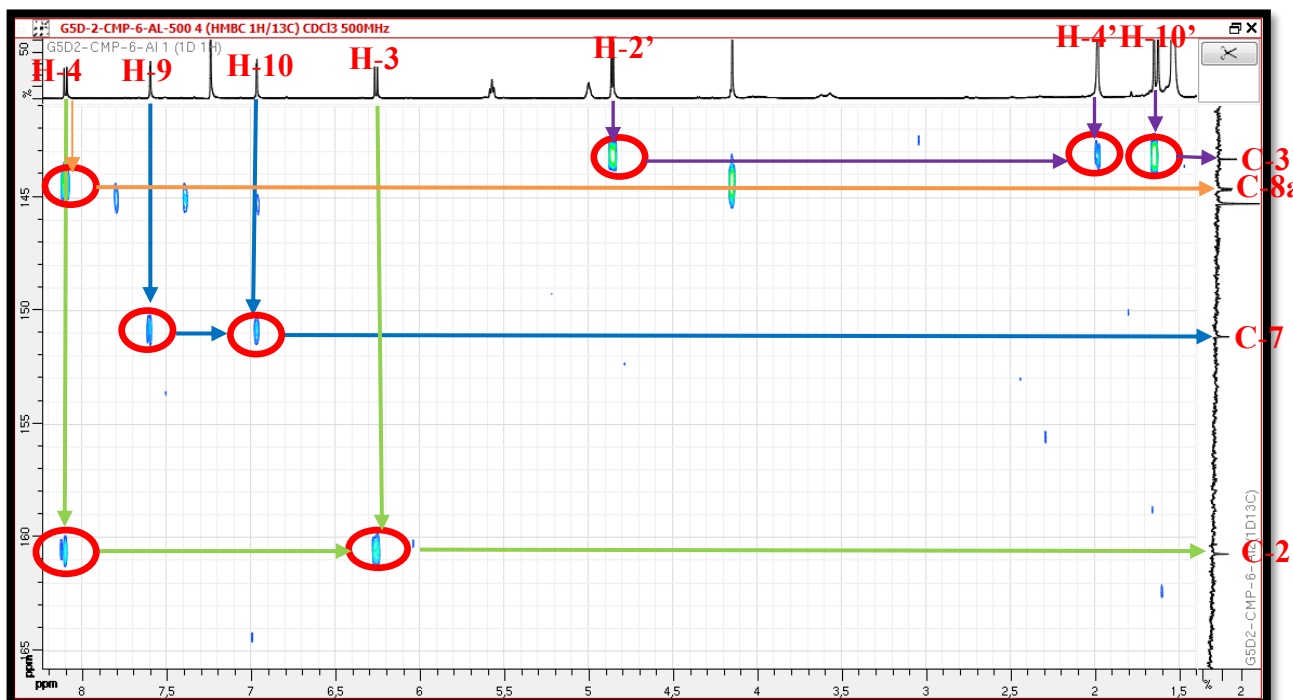
C-8a à  $\delta_C$  144,63 ppm grâce à la valeur de son déplacement chimique et à sa corrélation avec H-4 sur le spectre HMBC.



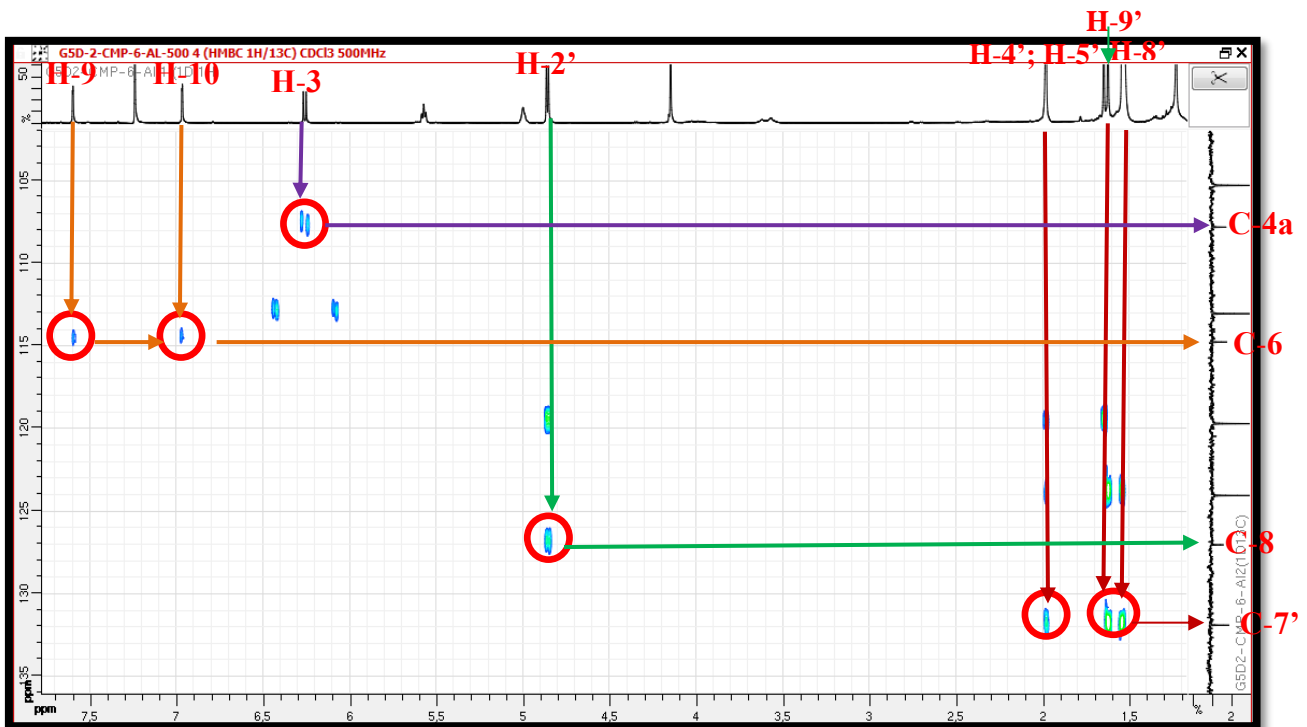
Spectre V.12 : Spectre RMN <sup>13</sup>C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm) du composé P2



Spectre V.9.1 : Spectre HSQC étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé P2

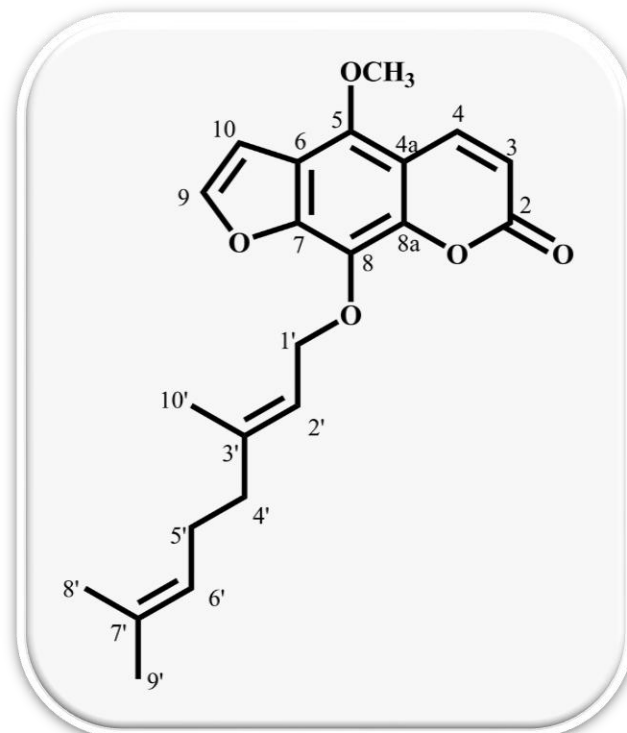


Spectre V.11.2 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé P2



**Spectre V.11.3** : Spectre HMBC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P2**

L'ensemble de ces données regroupées dans le tableau **V.2**, et confirmées avec celles de la littérature (Franke et al., 2001) ont permis de conclure que le composé **P2** ne peut être que la **8-géranioxy-5-méthoxypsoralène** (Figure **V.9**). Cette molécule est nouvelle pour l'espèce *P. battandieri* et est douée d'une activité inhibitrice potentielle de la  $\beta$ -secrétase (Marumoto et Miyazawa, 2012). Par ailleurs, nos résultats ont été démontré des activités antiparasitaire et cytoxique de cette molécule (Chapitre **VI**).

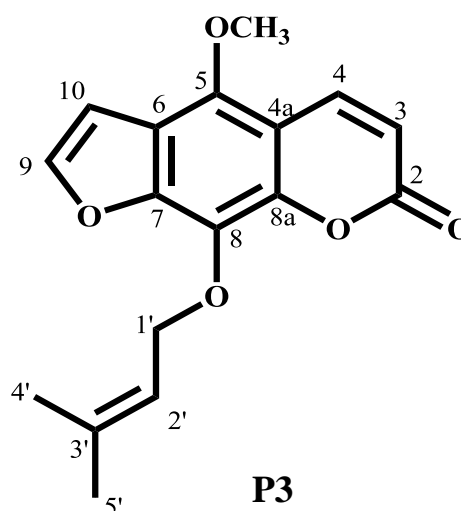


**Figure V.9** : Structure du composé **P2**, 8-géranioxy-5-méthoxypsoralène

**Tableau V.2 :** Déplacements chimiques  $\delta$  (ppm)  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) et  $^1\text{H}$  (600 MHz) du composé **P2**

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
2	160,73	-	-	-	-
3	113,05	6,26	1H	<i>d</i>	9,6
4	139,59	8,10	1H	<i>d</i>	9,6
4a	107,81	-	-	-	-
5	144,68	-	-	-	-
6	114,76	-	-	-	-
7	151,14	-	-	-	-
8	127,04	-	-	-	-
8a	144,63	-	-	-	-
9	145,28	7,60	1H	<i>d</i>	2,4
10	105,29	6,97	1H	<i>d</i>	2,4
1'	70,51	4,86	2H	<i>d</i>	7,2
2'	119,70	5,57	1H	<i>t</i>	7,2
3'	143,32	-	-	-	-
4'	39,82	1,99	2H	<i>m</i>	-
5'	26,63	1,98	2H	<i>m</i>	-
6'	124,06	5,0	1H	<i>m</i>	-
7'	131,90	-	-	-	-
8'	25,87	1,63	3H	<i>s</i>	-
9'	17,88	1,55	3H	<i>s</i>	-
10'	16,74	1,65	3H	<i>s</i>	-
5-OMe	61,01	4,15	3H	<i>s</i>	-

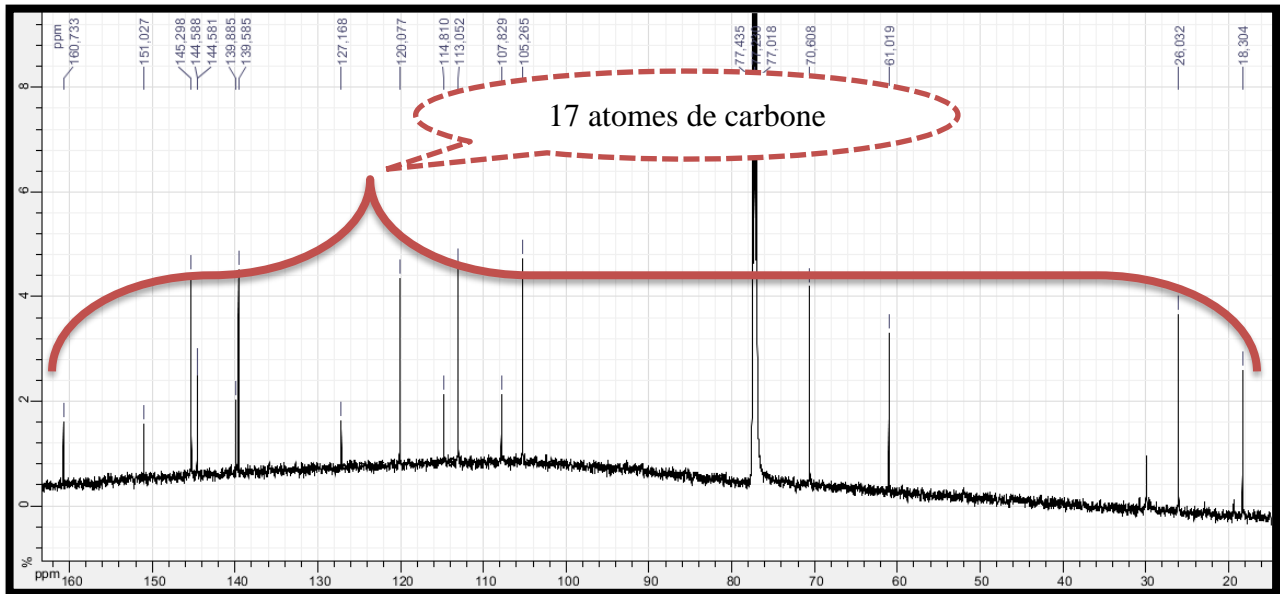
### V.2.A.3. Élucidation structurale du composé P3



Le composé **P3** se présente sous forme de fines aiguilles incolores solubles dans le chloroforme, le dichlorométhane et le méthanol.

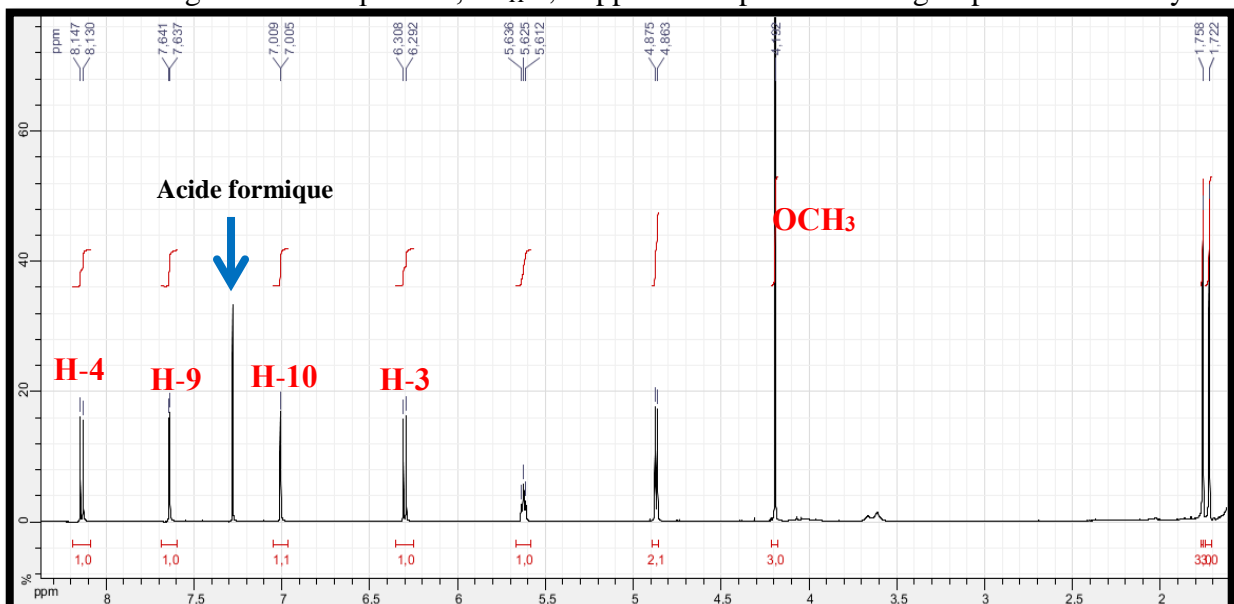
L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz dans le  $\text{CDCl}_3$ ), (Spectre V.13), montre la présence de 17 atomes de carbone, incluant :

- Huit carbones quaternaires hybridés  $\text{sp}^2$ .
- Cinq groupements  $\text{CH}$  hybridés  $\text{sp}^2$ .
- Un groupements  $\text{CH}_2$  oxygéné.
- Trois groupements méthyles dont 1 oxygéné.



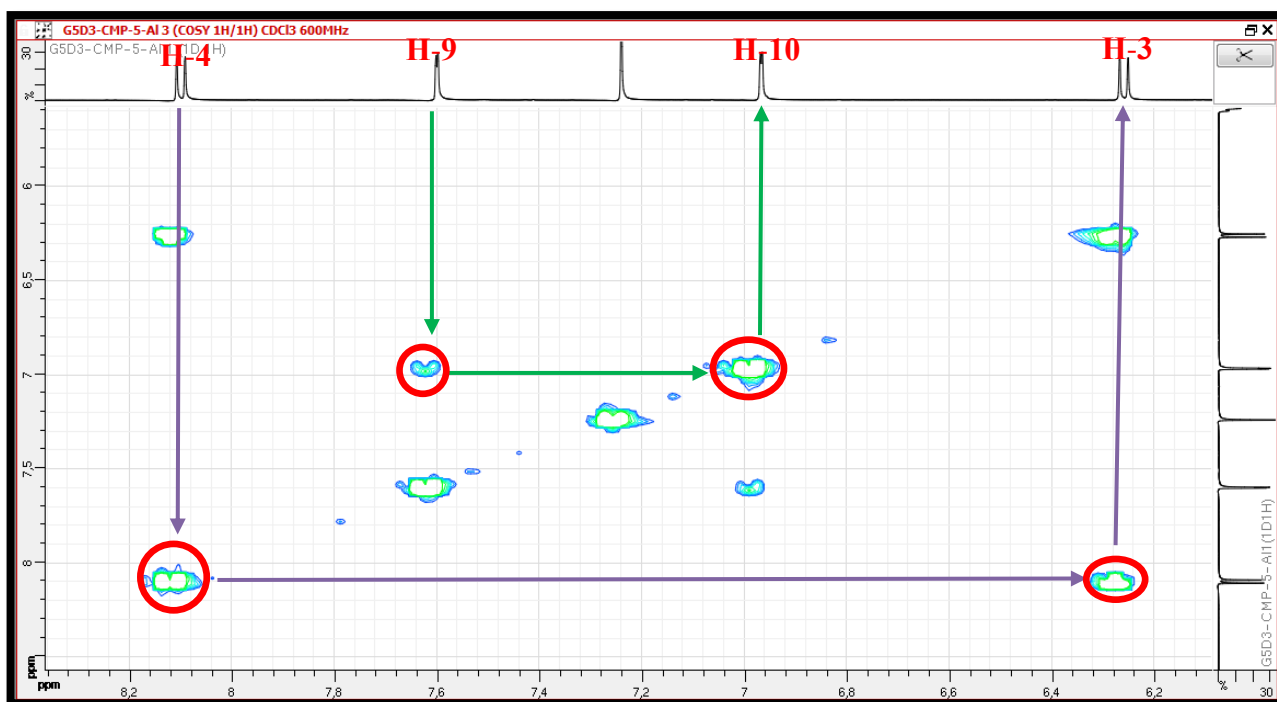
**Spectre V.13 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P3**

Le spectre RMN du proton (Spectre V.14) met en évidence des protons caractéristiques d'une furanocoumarine linéaire de type psoralène, notamment le H-3 à 6,3 ppm ( $d$ ,  $J = 9,6$  Hz) ( $\delta_{\text{C}}$  113,05), le H-4 à 8,14 ppm ( $d$ ,  $J = 9,6$  Hz) ( $\delta_{\text{C}}$  139,59), le H-9 à 7,64 ppm ( $d$ ,  $J = 2,4$  Hz) ( $\delta_{\text{C}}$  145,28) et le H-10 à 7,01 ppm ( $d$ ,  $J = 2,4$  Hz) ( $\delta_{\text{C}}$  105,08). Ces attributions sont confirmées par le spectre COSY (Spectre V.15.1), qui montre à cet effet, une tache de corrélation entre les deux protons de chacune de ces deux paires de noyaux (Figure V.10). Ce spectre montre également la présence d'un singulet de trois protons, à  $\delta_{\text{H}}$  4,19 ppm correspondant à un groupement méthoxyle.

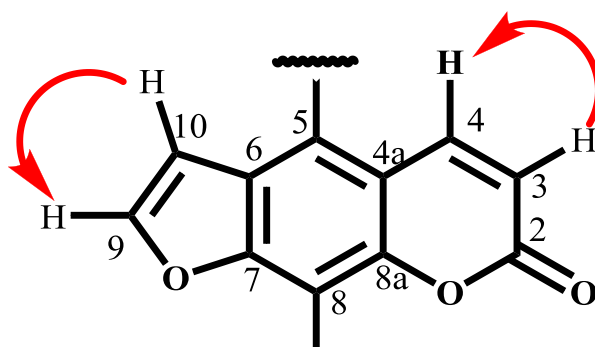


**Spectre V.14 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P3**



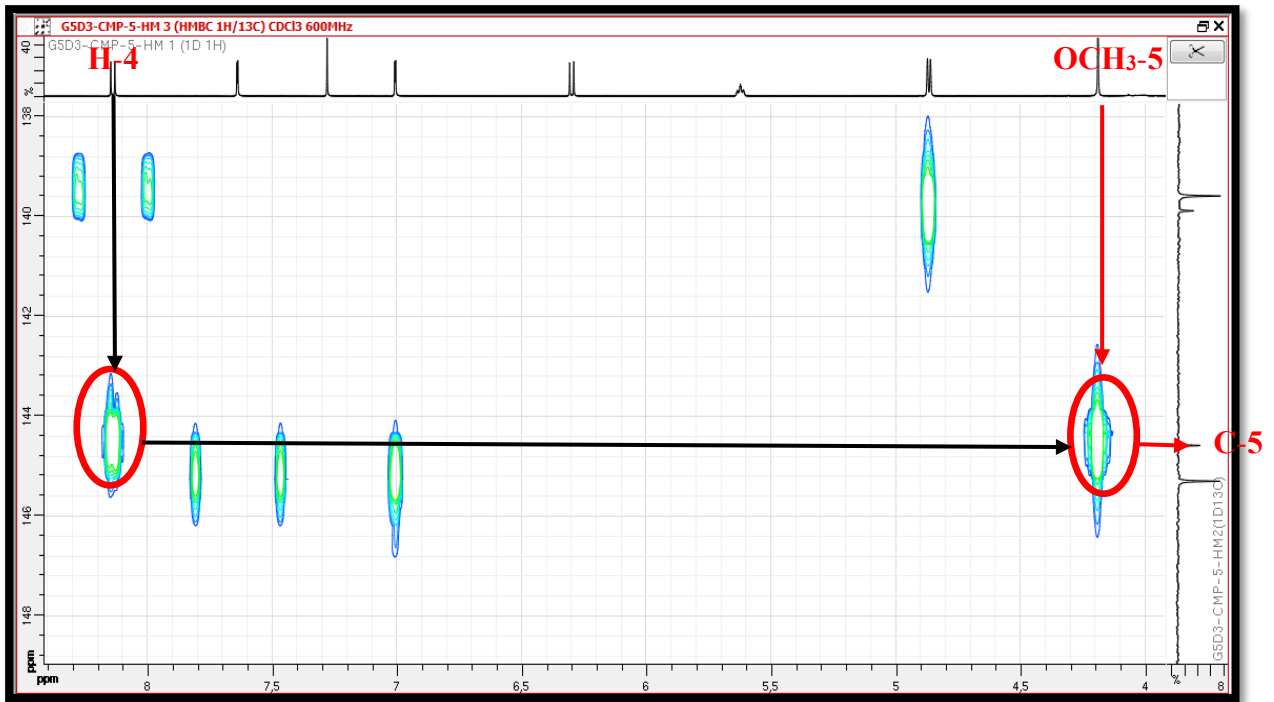


**Spectre V.15.1** : Spectre COSY étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P3**



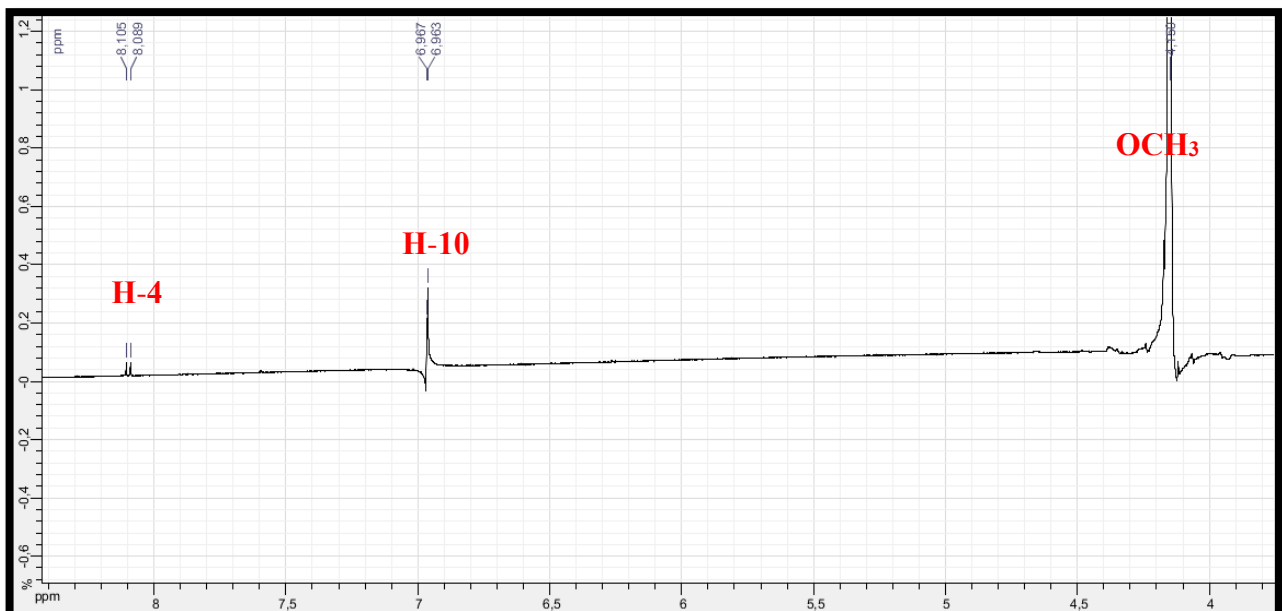
**Figure V.10** : Corrélations COSY observées pour la molécule **P3**

Le spectre HMBC (Spectre V.16.1) montre des taches de corrélation entre les protons de ce groupement méthoxyle et le carbone porteur de ce méthoxyle, ce qui permet de localiser ce carbone à  $\delta_{\text{C}}$  144,58 ppm. Sur ce même spectre HMBC (Spectre V.16.1), ce carbone corréle avec le proton du squelette furanocoumarique H-4. Ces observations permettent alors d'attribuer ce carbone à  $\delta_{\text{C}}$  144,58 ppm à la position C-5 de cette furanocoumarine.



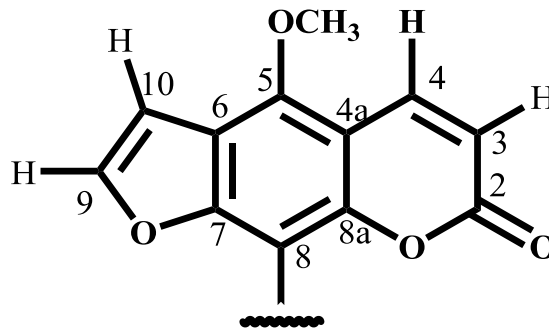
**Spectre V.16.1** : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé **P3**

L'examen du spectre GOESY (Spectre V.17) confirme la localisation de ce groupement méthoxyle sur le C-5. En effet, l'irradiation des protons de ce méthoxyle provoque une augmentation d'intensité des signaux des noyaux (H-4 et H-10). Ce résultat permet de déduire qu'il s'agit bien d'une furanocoumarine linéaire substituée en position C-5 par un méthoxyle.



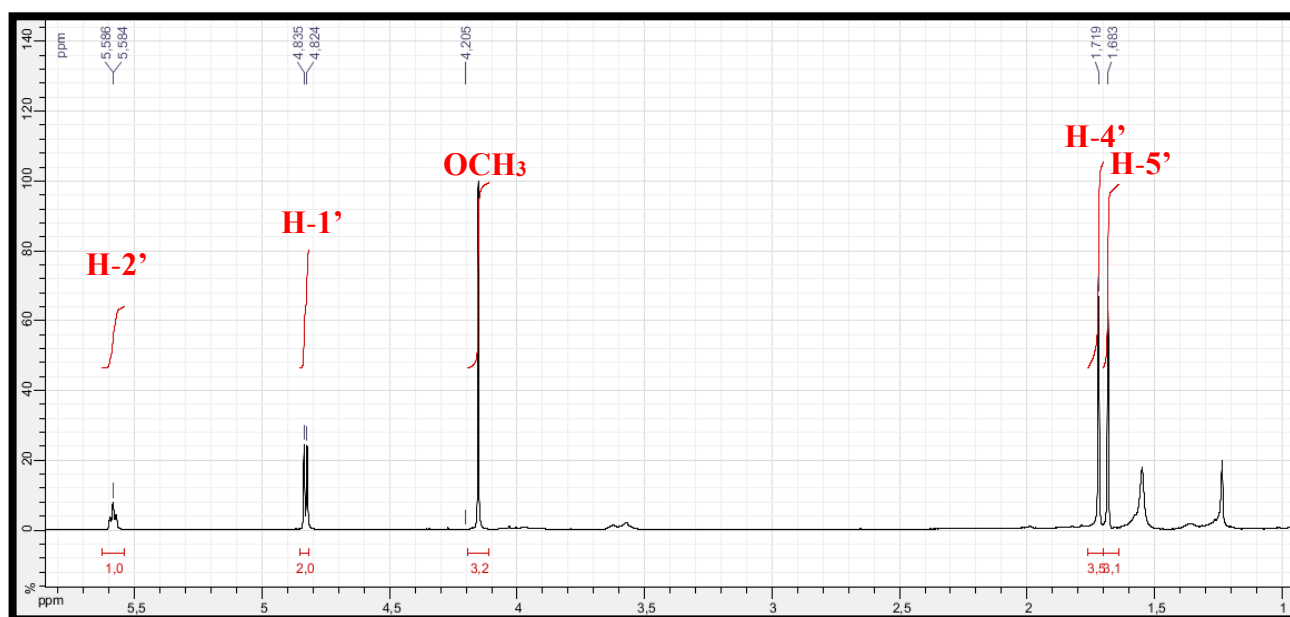
**Spectre V.17** : Spectre GOESY étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé **P3**

À ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer la structure partielle 1 du composé **P3** (Figure V.11).

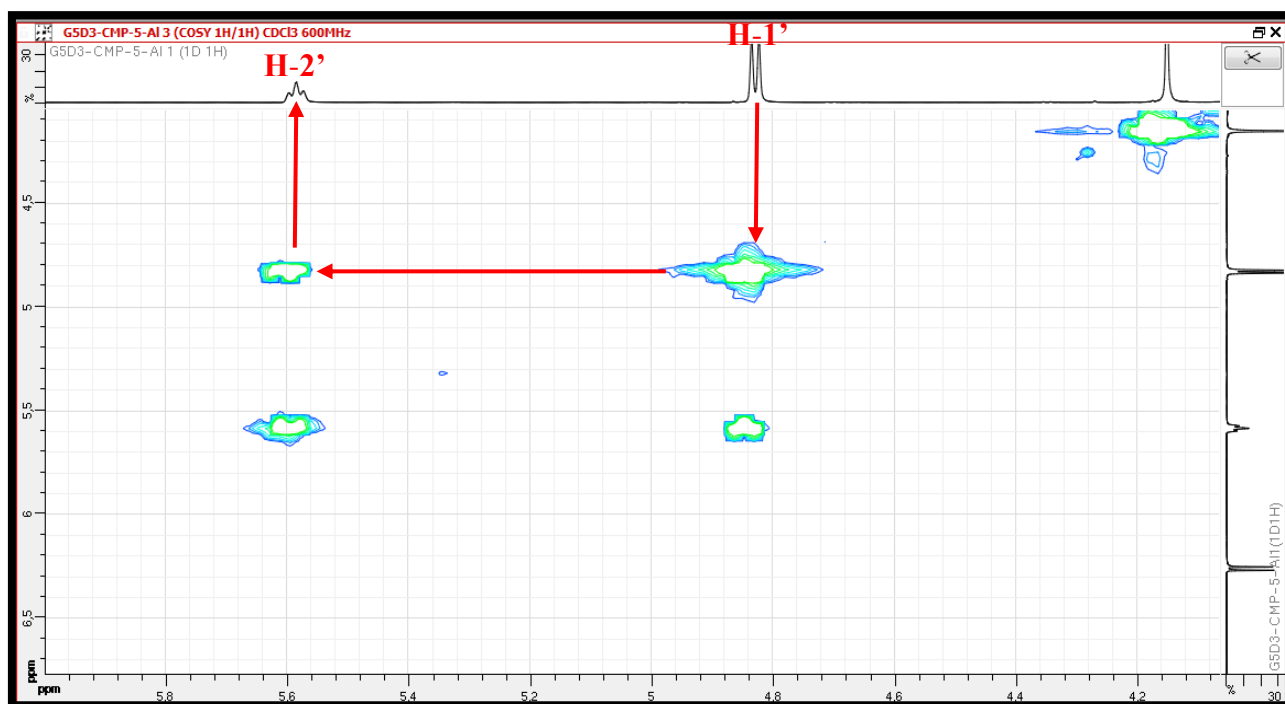


**Figure V.11** : Structure partielle 1 du composé **P3**

En faisant abstraction des signaux de l'entité 5-méthoxypsoralène, on trouve sur le spectre proton des signaux caractéristiques d'un groupement diméthylallyle. En effet, sur ce spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre V.14.1) on relève, un doublet relatif à un groupement méthylène à  $\delta_{\text{H}}$  4,83 ppm ( $J = 7,2$  Hz), un triplet relatif à un groupement méthyne à  $\delta_{\text{H}}$  5,59 ppm ( $J = 7,2$  Hz) et deux singulets relatifs à deux méthyles à  $\delta_{\text{H}}$  1,72 et 1,68 ppm. La valeur de la constante de couplage relevée dans le signal du groupement méthylène ainsi que la multiplicité de son signal orientent vers un couplage vicinal avec le proton du groupement méthyne. De plus, la valeur de déplacement chimique de ce groupement indique qu'il est lié à un atome d'oxygène. Tandis que la valeur du déplacement chimique (5,59 ppm) du groupement méthyne indique qu'il est éthylénique. Ceci est d'ailleurs bien confirmé sur le spectre COSY (Spectre V.15.2), qui montre des corrélations entre les protons de ces deux groupes de noyaux. Donc, nous pouvons attribuer les numérotations C-1' au carbone du méthylène et C-2' au carbone du méthyne. La multiplicité du signal de ce groupement CH (H-2') indique que le carbone éthylénique délimitant sa double liaison soit le C-3', est quaternaire. En effet, le spectre HMBC montre des taches de corrélation nettes entre les protons H<sub>2</sub>-1' et les carbones éthyléniques à  $\delta_{\text{C}}$  120,70 et  $\delta_{\text{C}}$  139,86 ppm ; permettant ainsi leur attribution à C-2' et C-3', respectivement et confirmant la nature éthylénique et quaternaire du carbone C-3'. Il ne reste plus alors qu'à placer sur ce carbone, les deux méthyles résonants sous forme de singulets à  $\delta_{\text{H}}$  1,72 et 1,68 ppm. On note que les valeurs de leur déplacement chimique sont en parfait accord avec cette hypothèse. Nous numérotions alors les carbones de ces deux groupements méthyles C-4' et C-5', respectivement.

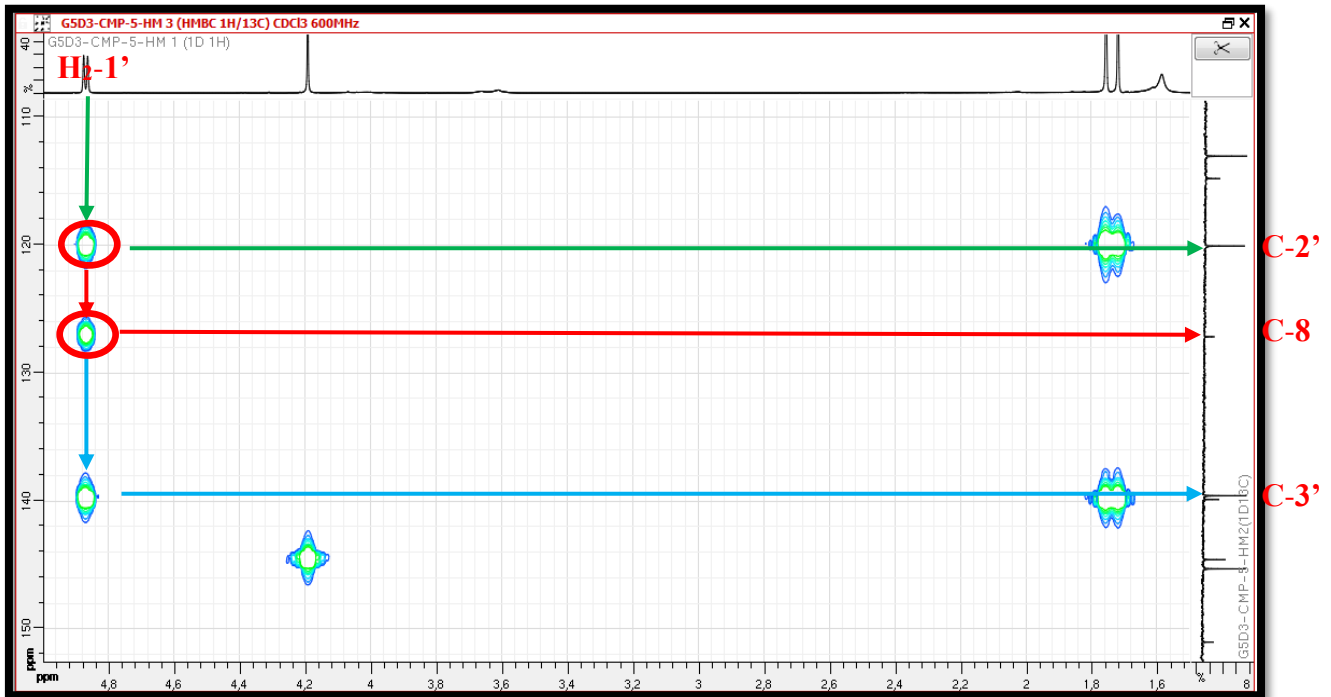


**Spectre V.14.2** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P3**



**Spectre V.15.2** : Spectre COSY étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P3**

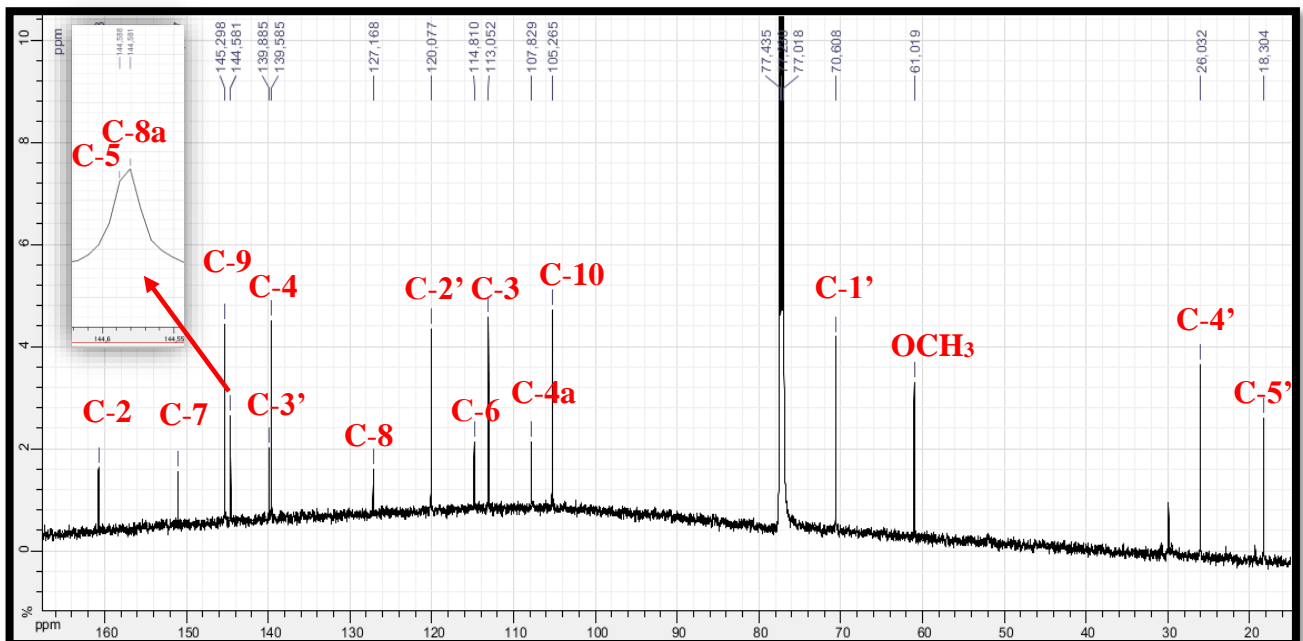
Par ailleurs et toujours sur le spectre HMBC (Spectre V.16.1), les protons  $\text{H}_2\text{-1}'$  corrélient avec un carbone quaternaire aromatique résonant à  $\delta_{\text{C}} = 127,17$ . Il est évident que ce carbone n'est autre que le C-8 du noyau psoralène dont la jonction avec cette chaîne est réalisée par le biais d'un atome d'oxygène.



**Spectre V.16.1** : Spectre HMBC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P3**

Ainsi en suivant les mêmes analyses que pour les composés **P1** et **P2**, notamment la combinaison des données des spectres proton, HSQC et HMBC, nous avons pu attribuer l'ensemble des signaux à leurs noyaux respectifs comme reporté dans le Tableau **V.3**.

Les données de la RMN  $^{13}\text{C}$  sont rassemblées dans le spectre V.13.



**Spectre V.13** : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P3** avec toutes les indications

Sur la base de ces résultats, et par comparaison avec ceux de la littérature (Kang et al., 2008), la structure du composé **P3** a pu être établie en tant que la **5-méthoxyimpératorine** connue également sous le nom de **phelloptérine** (Figure V.12). Cette molécule est connue pour ses activités antidiabétiques (Han et al., 2018; Nizamutdinova et al., 2008). Dans notre travail, nous avons prouvé l'activité antiparasitaire de cette molécule contre deux parasites (Chapitre VI).

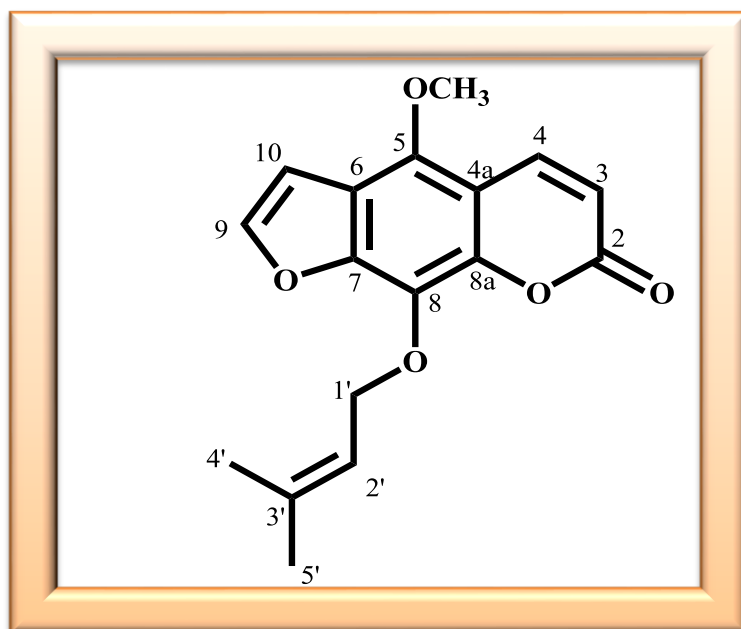
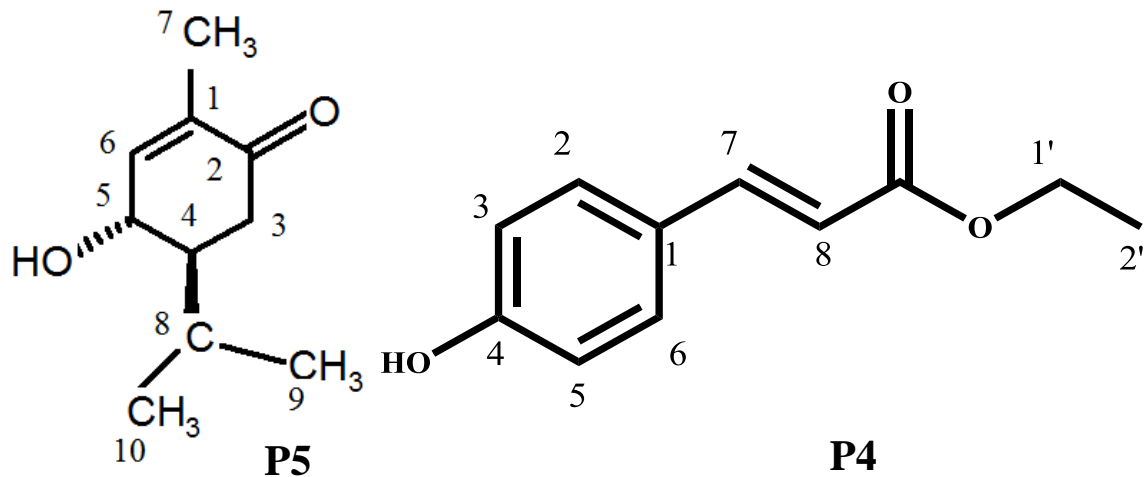


Figure V.12 : Structure du composé **P3**, phelloptérine

Tableau V.3 : Déplacements chimiques  $\delta$  (ppm)  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) et  $^1\text{H}$  (600 MHz) du composé **P3**

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
2	160,73	-	-	-	-
3	113,05	6,30	1H	<i>d</i>	9,6
4	139,59	8,14	1H	<i>d</i>	9,6
4a	107,83	-	-	-	-
5	144,59	-	-	-	-
6	114,81	-	-	-	-
7	151,03	-	-	-	-
8	127,17	-	-	-	-
8a	144,58	-	-	-	-
9	145,28	7,60	1H	<i>d</i>	2,4
10	105,08	7,01	1H	<i>d</i>	2,4
1'	70,61	4,83	2H	<i>d</i>	7,2
2'	120,70	5,59	1H	<i>t</i>	7,2
3'	139,86	-	-	-	-
4'	26,03	1,72	3H	<i>s</i>	-
5'	18,30	1,68	3H	<i>s</i>	-
5-OMe	61,01	4,15	3H	<i>s</i>	-

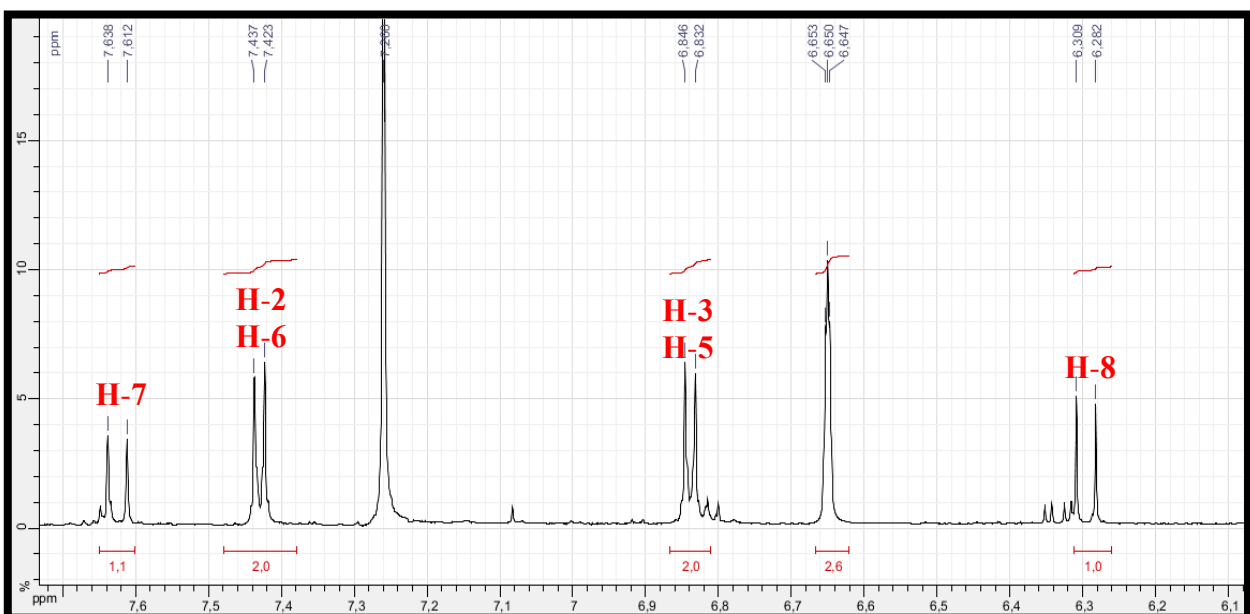
## V.2.A.4. Élucidation structurale des composés P4 et P5



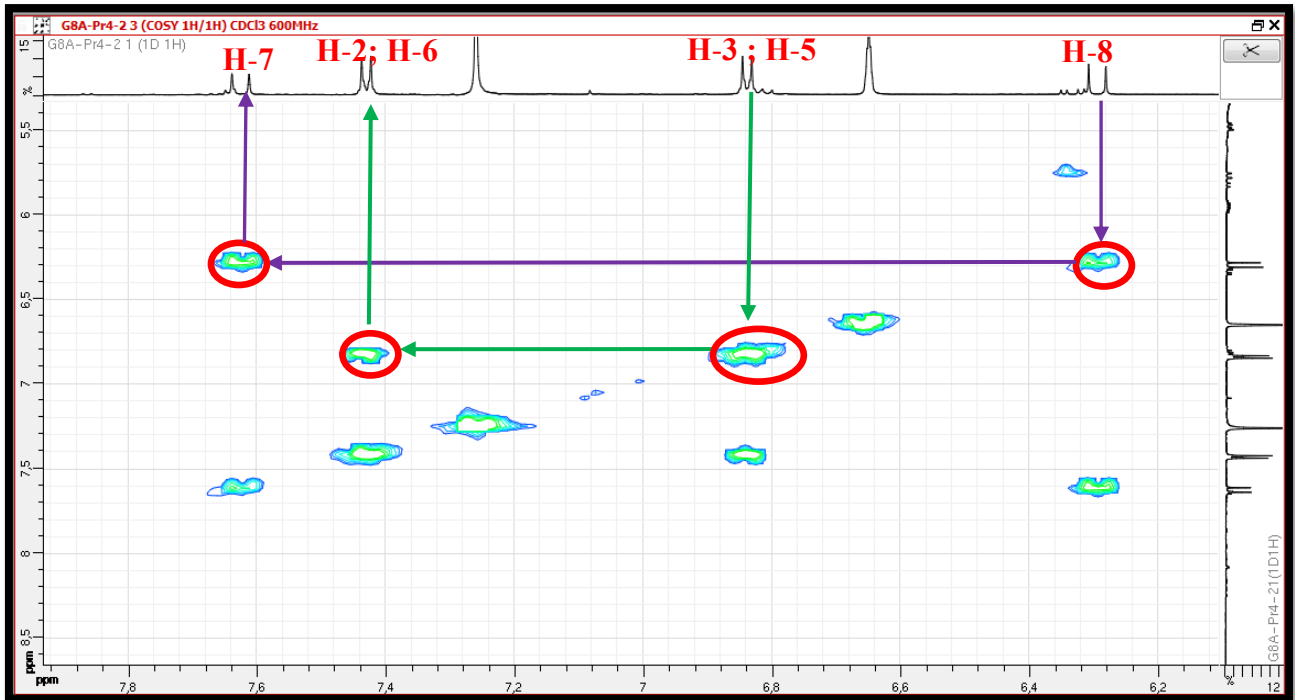
Le mélange des composés **P4** et **P5**, a été obtenu sous forme d'une poudre blanche soluble dans le dichlorométhane et le chloroforme.

L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre V.18.1) de ce mélange, montre vers les champs faibles des signaux caractéristiques d'un dérivé d'acide phénolique, dont le noyau aromatique est *para*-substitué notamment :

- À  $\delta_{\text{H}}$  7,63 et  $\delta_{\text{H}}$  6,30 ppm, un système AB d'intégration 1H pour chaque doublet ( $J = 16,2$  Hz) caractéristiques des protons d'une double liaison, de configuration *trans* conjuguée avec le noyau aromatique. Ces protons sont attribuables par conséquent aux protons H-7 et H-8 respectivement de ce dérivé d'acide phénolique. Ceci est d'ailleurs vérifié sur le spectre COSY (Spectre V.19.1) qui montre une corrélation nette entre ces deux noyaux.
- Deux systèmes de doublets d'intégration 2H chacun caractérisant le noyau aromatique *para*-substitué à  $\delta_{\text{H}}$  7,43 (H-2 & H-6) et  $\delta_{\text{H}}$  6,84 ppm (H-3 & H-5) ( $J = 8,9$  Hz).

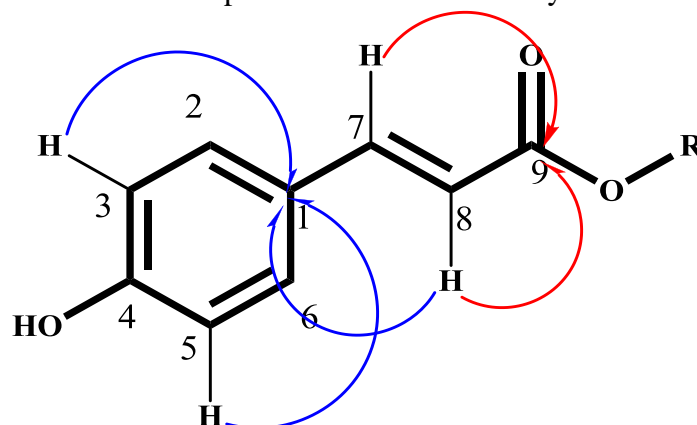


Spectre V.18.1 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P4**



**Spectre V.19.1 :** Spectre COSY étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P4**

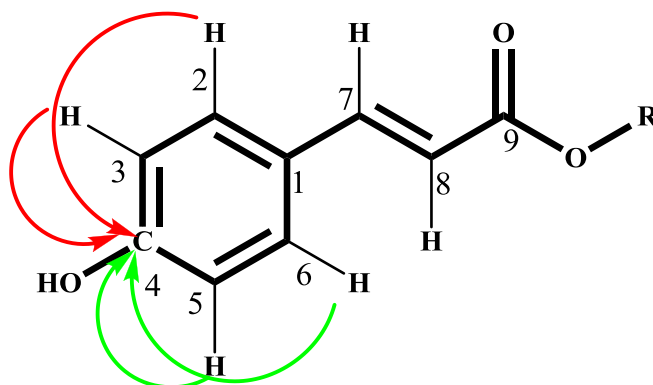
L'idée d'un dérivé d'acide phénolique est confirmée par le spectre HMBC (Spectre V.20.1) où l'on relève des corrélations entre les protons de la double liaison H-7 ( $\delta_c$  144,39 ppm) et H-8 ( $\delta_c$  116,06 ppm) et le carbone du carbonyle résonant à  $\delta_c$  167,56 ppm (C-9) dont la valeur du déplacement chimique oriente vers un ester. Toujours sur le spectre HMBC, le proton H-8 montre une tache de corrélation avec le carbone quaternaire aromatique repéré grâce à ce spectre à  $\delta_c$  127,42 ppm et correspondant au point de jonction (C-1) entre le noyau aromatique et la partie énolate de ce dérivé d'acide phénolique. Cette attribution est appuyée par la corrélation observée sur le même spectre entre ce carbone et les protons H-3 et H-5 du noyau aromatique (Figure V.13).



**Figure V.13 :** Corrélations HMBC observées pour la molécule **P4**

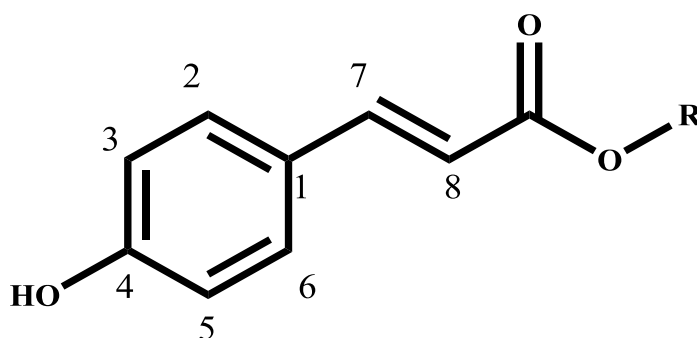


Par ailleurs, ce spectre (HMBC) montre des taches de corrélation entre les protons H-2 & H-6 et H-3 & H-5 et le carbone quaternaire aromatique résonnant à  $\delta_c$  157,77 ppm (C-4) confirmant ainsi la *para*-substitution du cycle aromatique par un groupement hydroxylé vu la valeur du déplacement chimique de ce carbone quaternaire (Figure V.14).

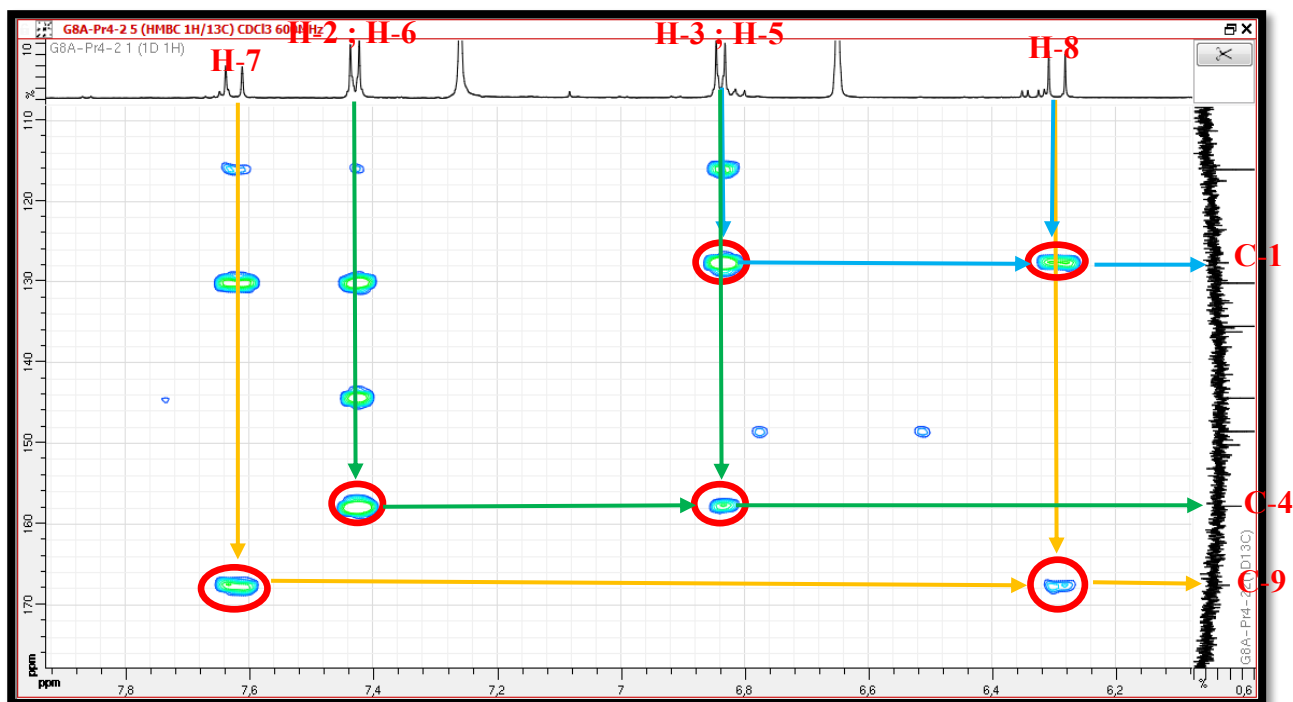


**Figure V.14 :** Corrélations HMBC observées pour la molécule **P4**

À ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer pour le composé **P4**, la structure partielle 1 reportée dans la figure V.15.

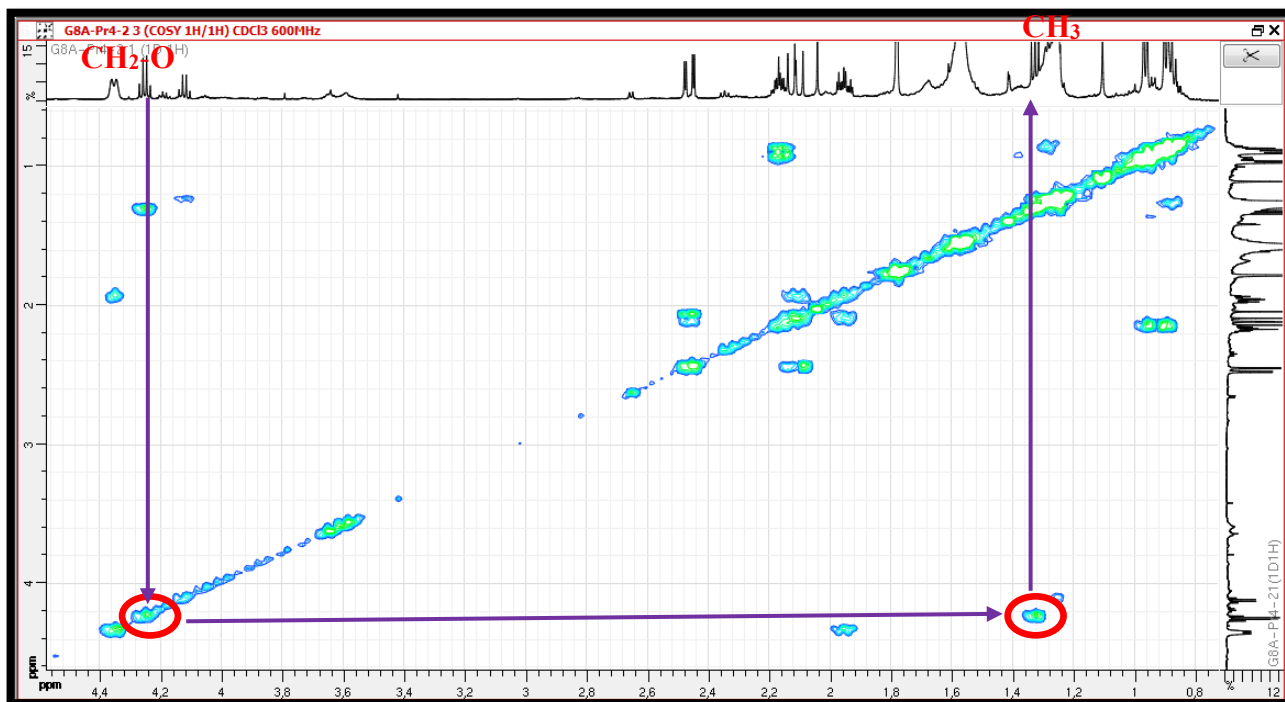


**Figure V.15 :** Structure partielle 1 du composé **P4**



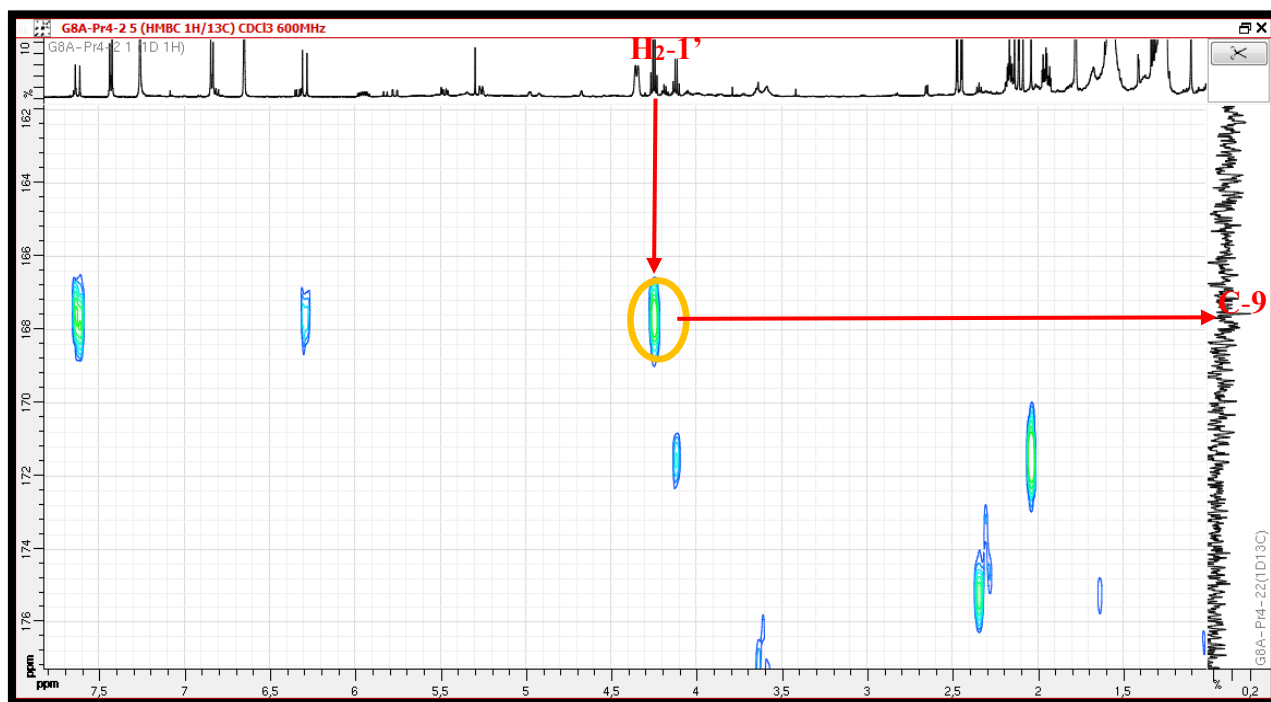
Spectre V.20.1 : Spectre HMBC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P4

Par ailleurs, le spectre RMN  $^1\text{H}$  montre également un quadruplet d'intégration 2H à  $\delta_{\text{H}}$  4,25 ( $J = 7,2$  Hz), attribuable à un groupement méthylène oxygéné vu la valeur de son déplacement chimique. Sur le spectre COSY (Spectre V.19.2), les protons de ce méthylène montrent une corrélation avec les protons d'un méthyle résonant sous forme d'un triplet à  $\delta_{\text{H}}$  1,33 ppm ( $J = 7,2$  Hz).



Spectre V.19.2 : Spectre COSY étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P4

Sur le spectre HMBC (Spectre V.20.2), les protons du groupement CH<sub>2</sub> oxygéné résonnant à  $\delta_H$  4,25 (*t*,  $J = 7,2$  Hz ;  $\delta_C$  60,58) que nous numérotons C-1', montre une tache de corrélation avec le carbonyle d'ester résonnant à  $\delta_C$  167,56 ppm soit le carbone C-9, indiquant alors que le composé **P4** est un ester dérivé de l'acide *para*-coumarique et de l'éthanol (Figure V.16).



Spectre V.20.2 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm) du composé **P4**

La combinaison des résultats des analyses des spectres HSQC, COSY et HMBC, indique que cette molécule est donc le *trans-para*-coumarate d'éthyle (Yasukazu et al., 2008) (Figure V.16), elle est nouvelle dans le genre *Pituranthos*.

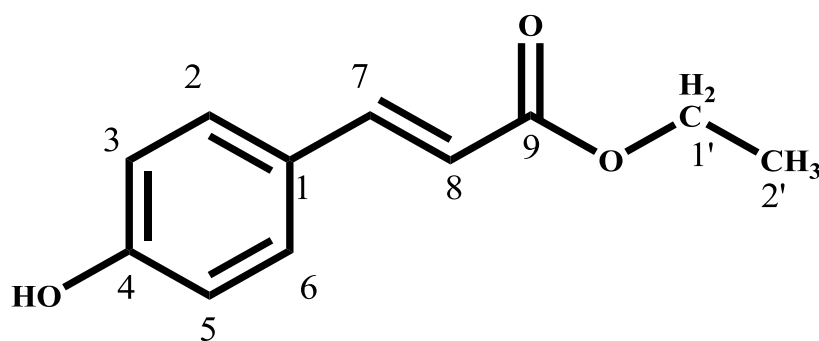


Figure V.16 : Structure finale du composé **P4**, *trans-para*-coumarate d'éthyle

D'autre part, et toujours sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre V.18.2) de ce mélange, on observe la présence d'un CH éthylénique résonant sous forme d'un doublet de quadruplets à  $\delta_{\text{H}}$  6,65 (*dq*,  $J = 8,9 ; 1,8$  Hz). Sur le spectre relatif à l'expérience COSY (Spectre V.19.3), on relève des taches de corrélation entre ce proton éthylénique et un proton résonant sous forme d'un doublet large à  $\delta_{\text{H}}$  4,35 (*dl*,  $J = 8,9$  Hz) et les protons d'un groupement méthyle résonant sous forme d'un doublet à  $\delta_{\text{H}}$  1,78 (*d*,  $J = 1,8$  Hz). Ces observations indiquent en premier lieu un couplage vicinal entre le proton éthylénique et le proton d'un méthyne oxygéné et en second lieu un couplage allylique entre ce proton éthylénique et un groupement méthyle, ce qui permet de déduire la présence d'un carbone quaternaire éthylénique dans cette molécule comme reporté dans figure V.17. Nous numérotions ce carbone quaternaire éthylénique C-1.

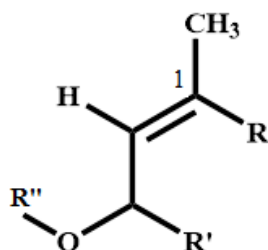
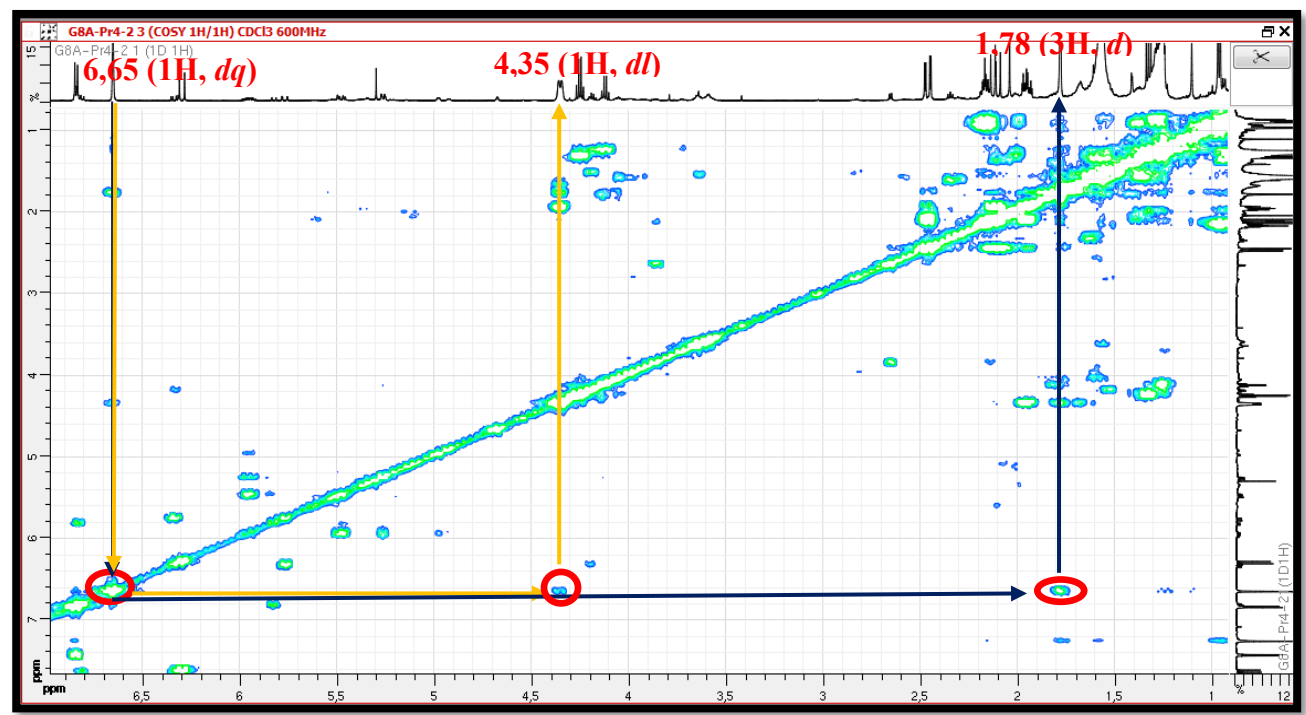
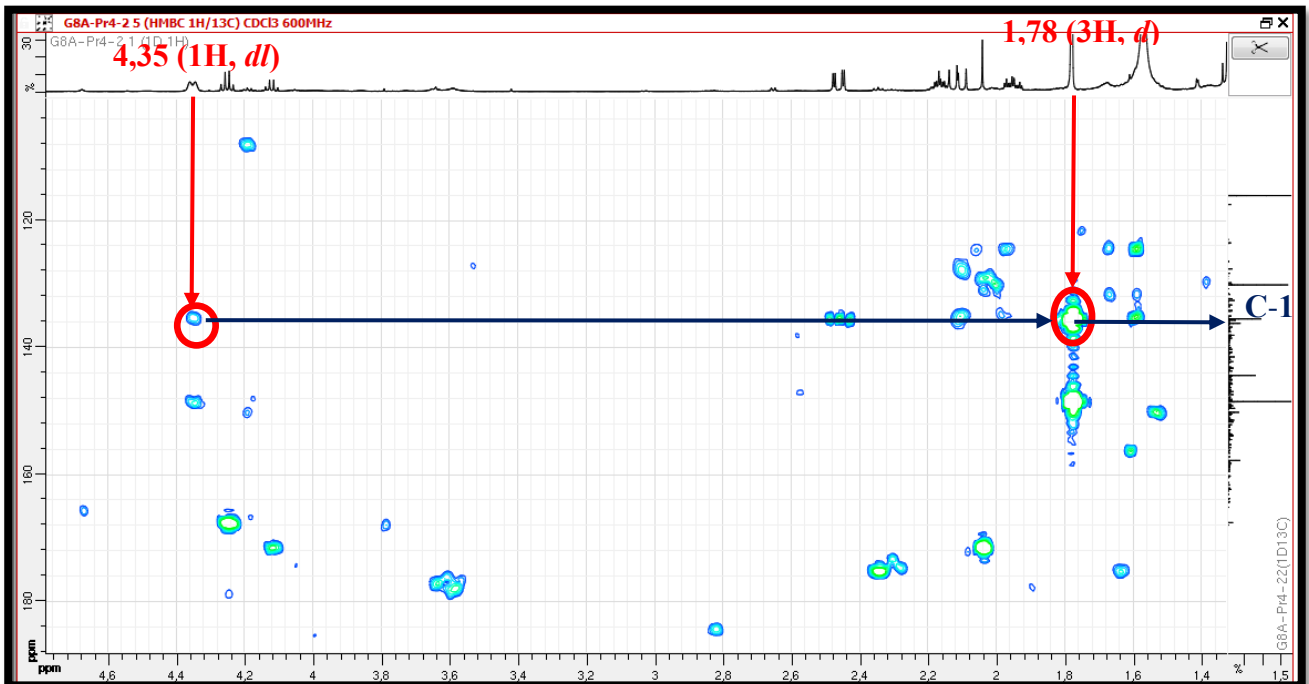


Figure V.17 : Structure partielle 1 du composé P5



Spectre V.19.3 : Spectre COSY étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P5

Sur le spectre relatif à l'expérience HMBC (Spectre V.20.3), les protons du groupement méthyle et le proton du méthyne oxygéné précédemment évoqués permettent de localiser le carbone quaternaire éthylénique C-1 à  $\delta$ c 135,48 ppm. Sur le même spectre (Spectre V.20.4), les protons du groupement méthyle, le proton éthylénique montrent une tache de corrélation avec le carbone quaternaire résonnant à  $\delta$ c 200,06 ppm. Cette corrélation permet de placer ce carbone sur le C-1 et de lui affecter par conséquent la position C-2. Cette position lui convient parfaitement car la valeur de son déplacement chimique correspond bien à celui d'une cétone conjuguée avec une double liaison.



Spectre V.20.3 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm) du composé P5



Spectre V.20.4 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm) du composé P5

Toujours sur le spectre HMBC (Spectre V.20.5), les carbones quaternaires hybridés  $sp^2$ , C-1 et C-2 montrent des taches de de corrélation nettes avec les deux protons d'un groupement méthylène résonant sous forme de deux doublets de doublets à  $\delta_H$  2,46 ppm ( $J = 16,2 ; 3,6$  Hz) et 2,12 ppm ( $J = 16,2 ; 13,5$  Hz), le carbone de ce groupement méthylène est relevé à  $\delta_C$  36,55 ppm. Vu les corrélations de ces protons avec C-1 et C-2, ils seront notés H-3a et H-3b, respectivement, leur carbone porteur sera noté C-3. Le caractère diastéréotopique de ces deux protons (H-3a et H-3b) est en faveur de la présence d'au moins un carbone asymétrique dans cette molécule ceci d'une part. D'autre part, d'après la multiplicité de leurs signaux, il est clair que la position 4 renferme un proton. En effet, l'examen du spectre COSY (Spectre V.19.4) montre des taches de corrélation entre les deux protons de la position C-3 et le proton d'un méthyne résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_H$  1,96 ( $\delta_C$  50,32). Ce proton sera alors noté H-4 et son carbone C-4. À ce stade de notre analyse, nous pouvons attendre la présence de l'entité reportée dans la figure V.18 dans ce composé P5.

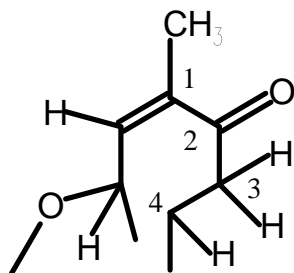
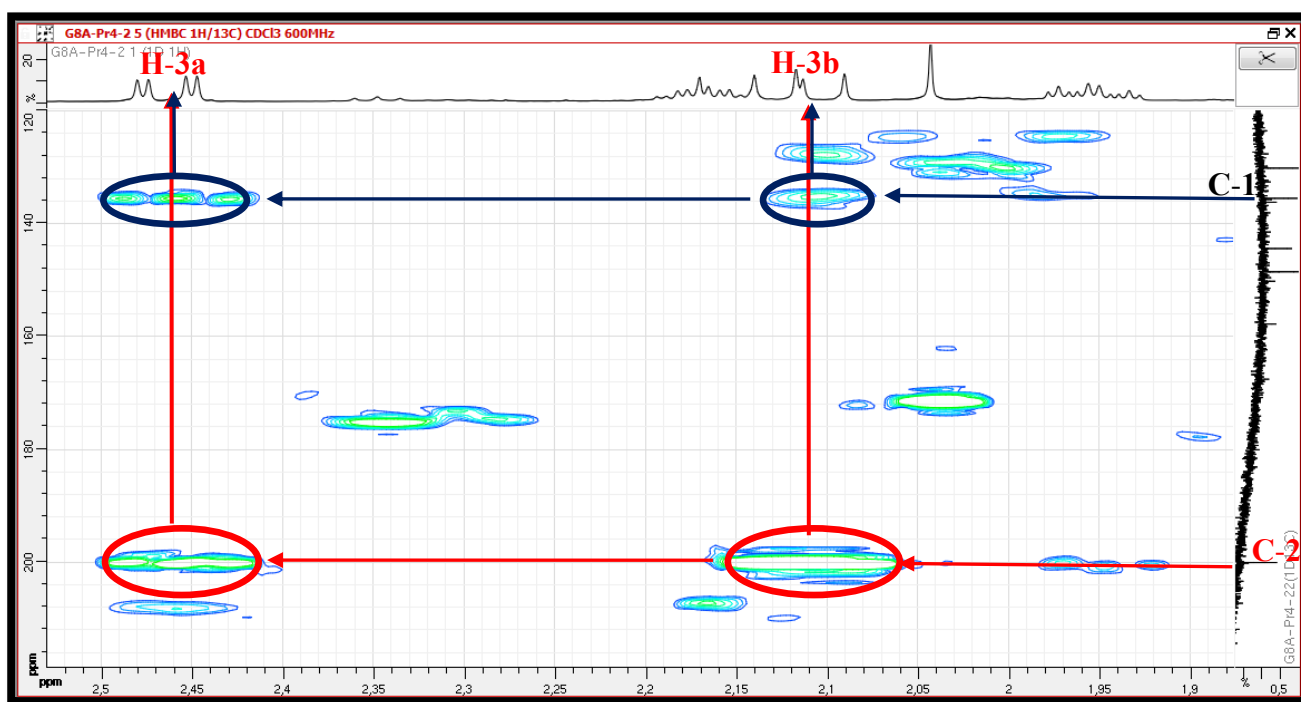
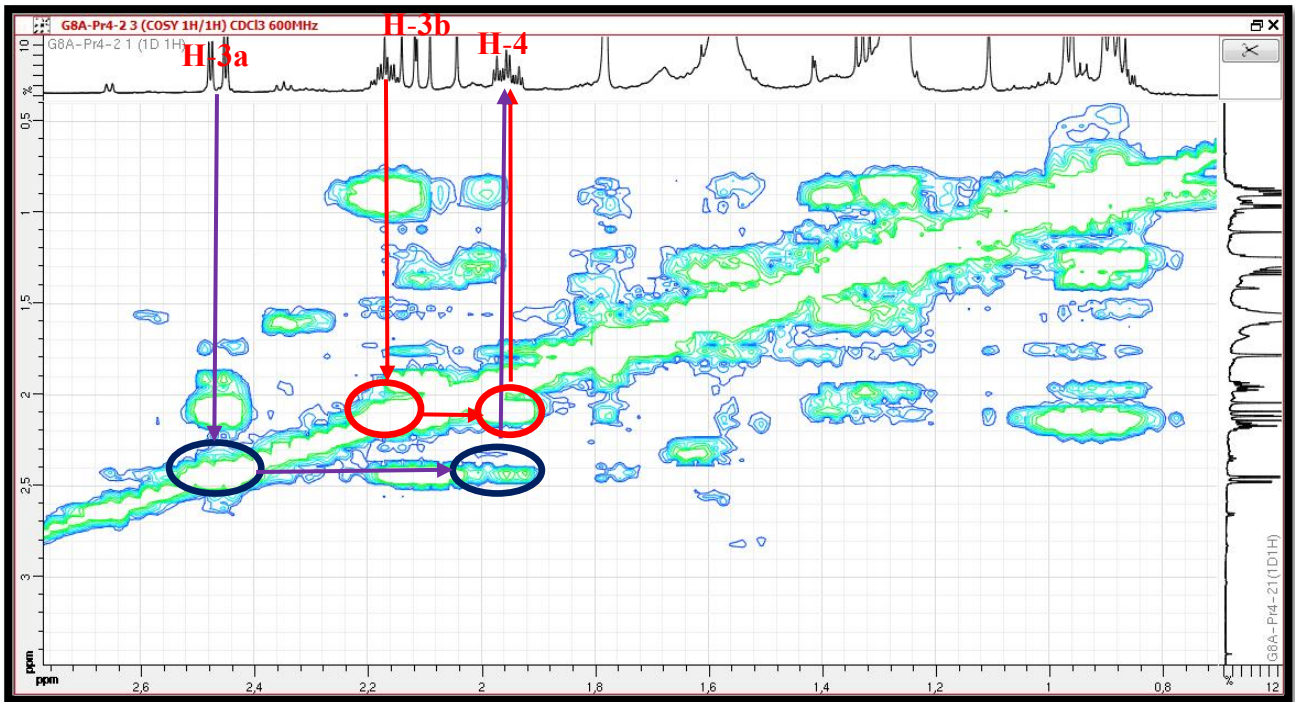


Figure V.18 : Structure partielle 2 du composé P5



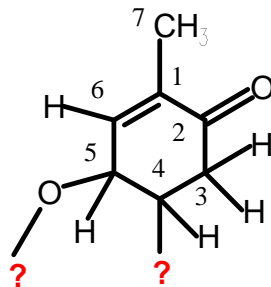
Spectre V.20.5 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm) du composé P5



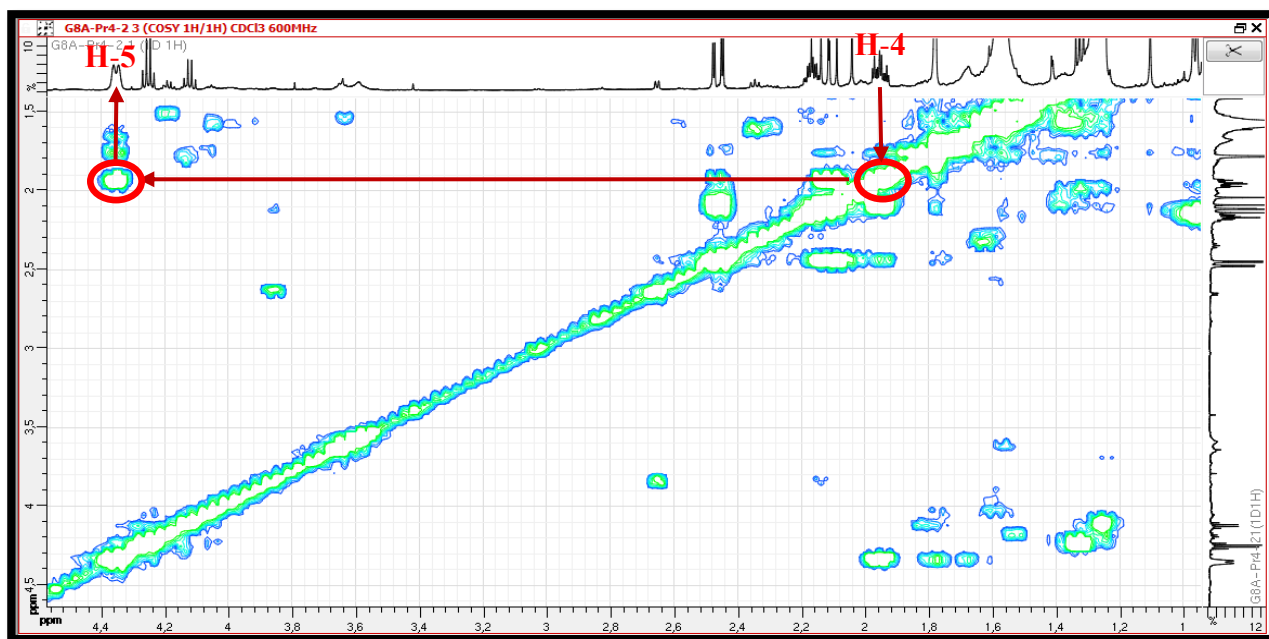
**Spctre V.19.4 :** Spectre COSY étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P5**

Un retour vers le spectre COSY (Spectre V.19.5), permet de relever un couplage vicinal net entre le proton H-4 et le proton du groupement CH oxygéné précédemment évoqué et résonant à  $\delta_{\text{H}}$  4,35 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  69,39 ppm). La présence de ce couplage indique une jonction entre le carbone C-4 et le carbone de ce méthyne oxygéné auquel nous attribuerons la position C-5. De ce fait le carbone du CH éthylénique sera noté C-6 et son proton H-6. On peut également affecter la position C-7 au carbone du méthyle porté par C-1, ses protons seront alors notés H<sub>3</sub>-7.

À ce stade de notre analyse nous sommes donc en présence d'un composé cyclique dérivé du cyclohex-1-ène (Figure V.19).



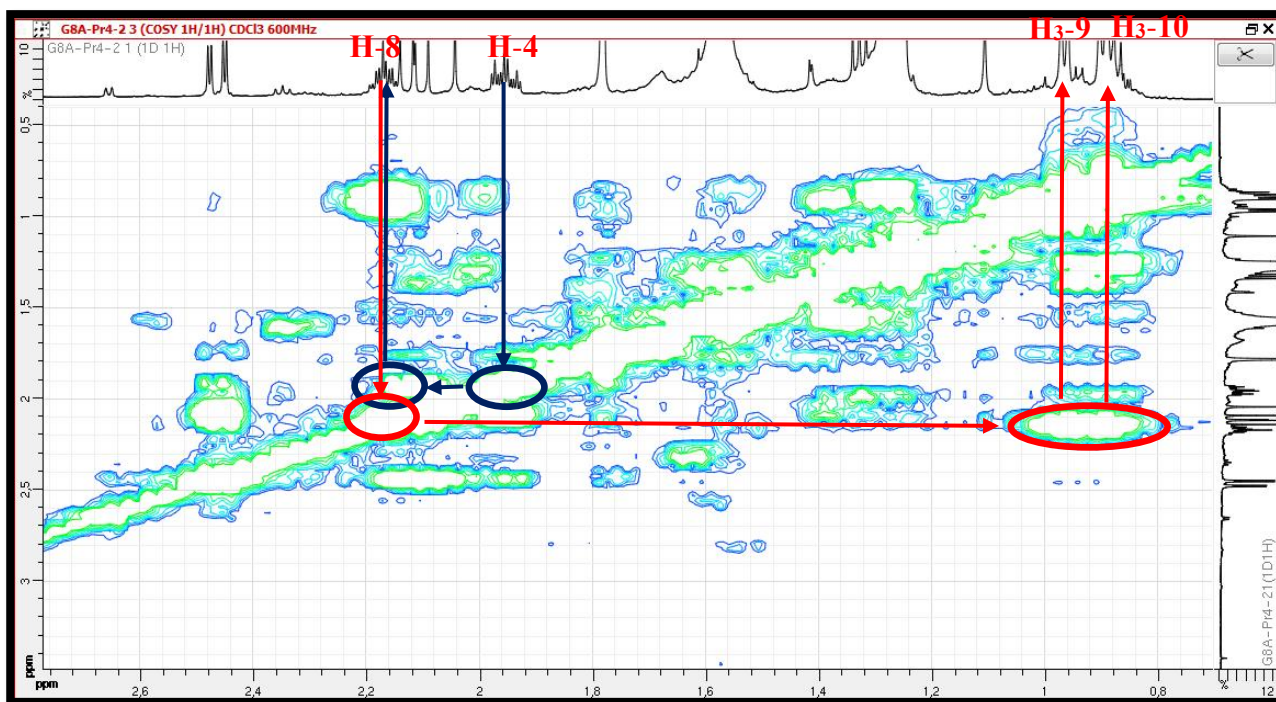
**Figure V.19 :** Structure partielle 3 du composé **P5**



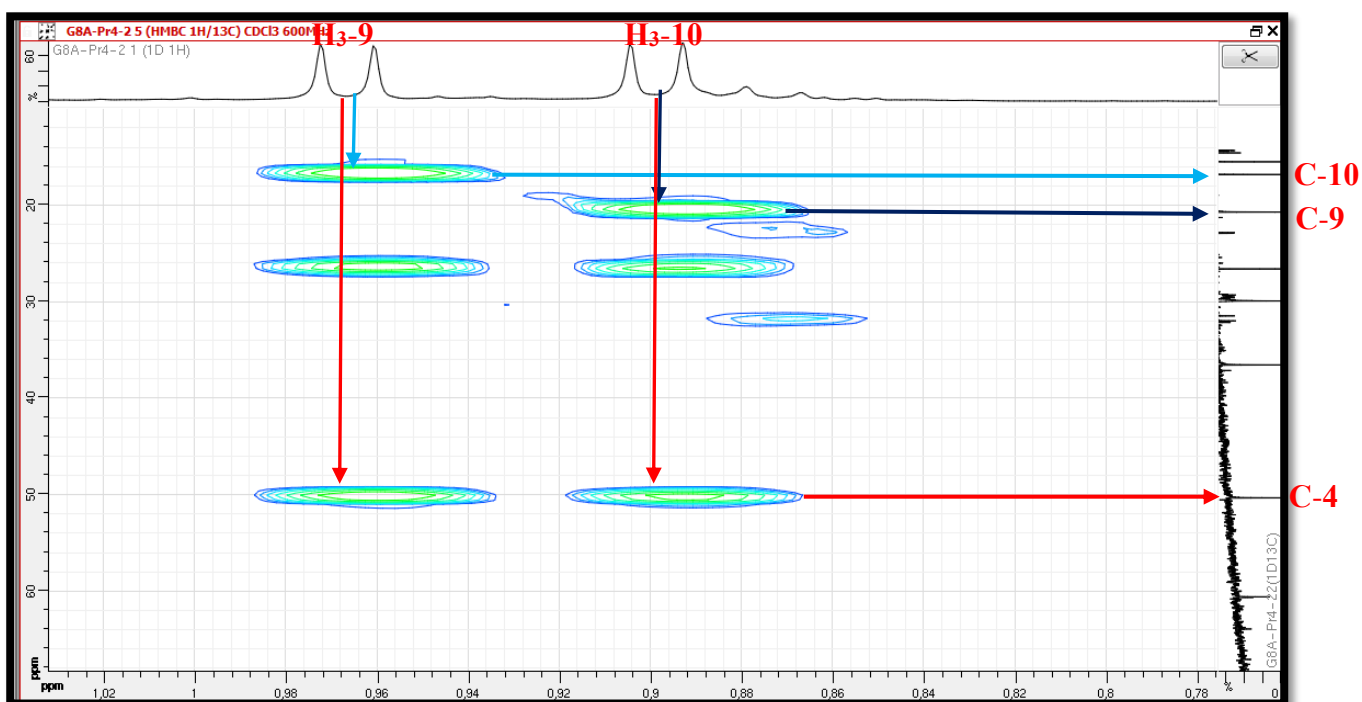
**Spectre V.19.5** : Spectre COSY étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  ppm) du composé **P5**

Un examen approfondi du spectre COSY (Spectre V.19.6), permet de repérer des taches de corrélation entre le proton H-4 et un proton résonant sous forme de multiplet à  $\delta_H$  2,17 ppm ; nous pouvons numéroter ce proton H-8. Toujours sur le même spectre, ce proton H-8 montre des taches de corrélation avec les protons de deux groupements méthyles résonant sous forme de deux doublets à  $\delta_H$  0,97 ppm ( $\delta_C$  20,71 ppm) et  $\delta_H$  0,90 ppm ( $\delta_C$  16,82 ppm) orientant vers le fait que ces deux méthyles sont portés par le même carbone C-8. Cette hypothèse est confirmée par les corrélations observées entre les protons de l'un de ces deux méthyles avec le carbone de l'autre et *vice versa* dans le spectre HMBC (Spectre V.20.6). On peut alors noter les protons ces deux groupements méthyles comme H<sub>3</sub>-9 et H<sub>3</sub>-10 et les carbones correspondants C-9 et C-10.





Spectre V.19.6 : Spectre COSY étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé P5



Spectre V.20.6 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé P5



Les deux molécules **P4** et **P5** sont nouvelles pour le genre *Pituranthos* (Figure V.22), et le composé **P4** possède une activité antioxydante remarquable (Yasukazu et al., 2008). Dans ces travaux nous avons montré que ce mélange possède des activités antiparasitaire et cytotoxique remarquables (Chapitre VI).

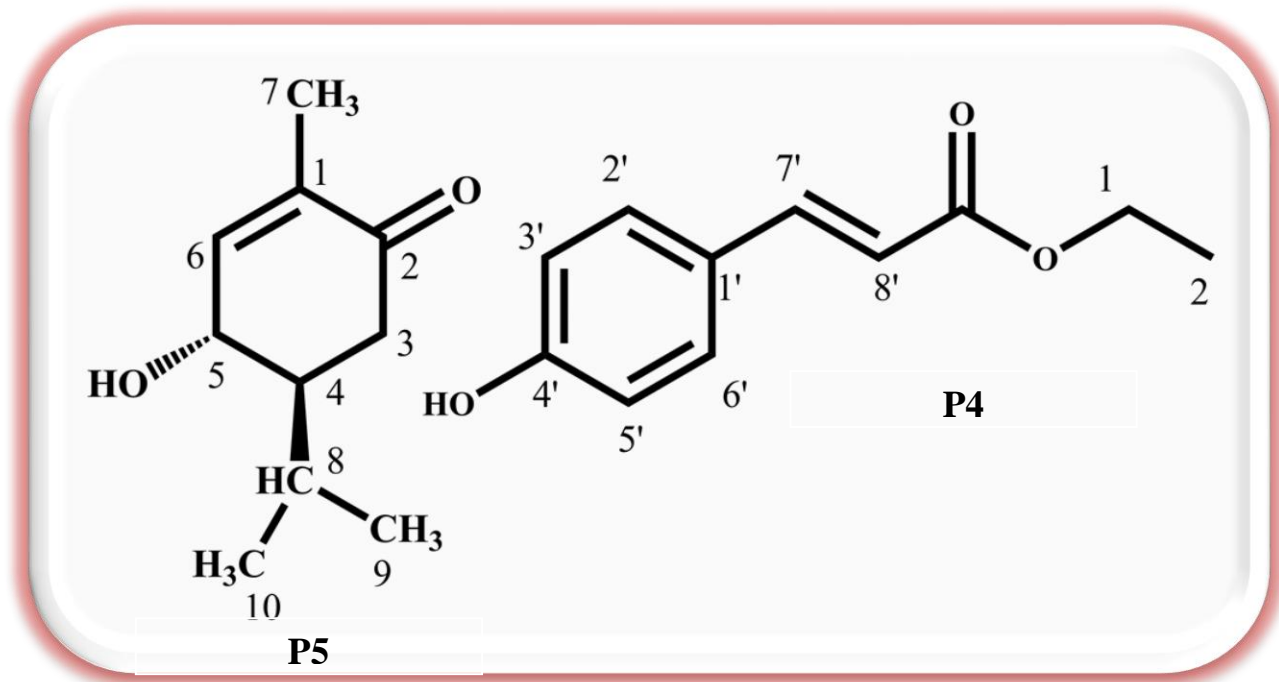


Figure V.22 : Structure finale des composés **P4** et **P5**

Les déplacements chimiques des noyaux caractérisant ces deux composés (**P4** et **P5**), les attributions des signaux et les constantes de couplage sont reportés dans le tableau V.4 et V.5, respectivement.

Tableau V.4 : Déplacements chimiques  $\delta$  (ppm)  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) et  $^1\text{H}$  (600 MHz) du composé **P4**

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
1	127,42	-	-	-	-
2; 6	130,13	7,43	2H	<i>d</i>	8,9
4	157,77	-	-	-	-
3; 5	116,06	6,84	2H	<i>d</i>	8,9
7	144,39	7,63	1H	<i>d</i>	16,2
8	116,06	6,30	1H	<i>d</i>	16,2
9	167,56	-	-	-	-
1'	60,58	4,25	2H	<i>q</i>	7,2
2'	14,34	1,33	3H	<i>t</i>	7,2

**Tableau V.5** : Déplacements chimiques  $\delta$  (ppm)  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) et  $^1\text{H}$  (600 MHz) du composé **P5**

Position	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	Intégration	Multiplicité	$J(\text{Hz})$
1	135,49	-	-	-	-
2	200,06	-	-	-	-
3a	36,55	2,46	1H	<i>dd</i>	16,2 ; 3,6
3b		2,12	1H	<i>dd</i>	16,2 ; 13,5
4	50,32	1,96	1H	<i>m</i>	-
5	69,39	4,35	1H	<i>m</i>	-
6	148,50	6,65	1H	<i>dq</i>	8,9 ; 1,8
7	15,51	1,78	3H	<i>t</i>	1,8
8	26,60	2,17	1H	<i>m</i>	-
9	16,82	0,90	3H	<i>d</i>	7,2
10	20,71	0,97	3H	<i>d</i>	7,2

### V.2.A.5. Élucidation structurale du composé P6

Le spectre de masse du composé **P6** enregistré en mode électronébulisation positive sur un spectromètre à haute résolution muni d'un analyseur à temps de vol (TOF-HR-ESIMS(+)) (Spectre V.21), donne un pic quasi moléculaire à  $m/z = 283,1673$  Da (100 %). La recherche haute résolution de la composition élémentaire donne une formule brute :  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{Na}$  (calculée pour 283,1674) orientant vers une formule brute  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_2$ , soit une molécule comportant 6 insaturations.

#### Elemental Composition Report

Page 1

#### Multiple Mass Analysis: 2 mass(es) processed

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -10.0, max = 1000.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 2

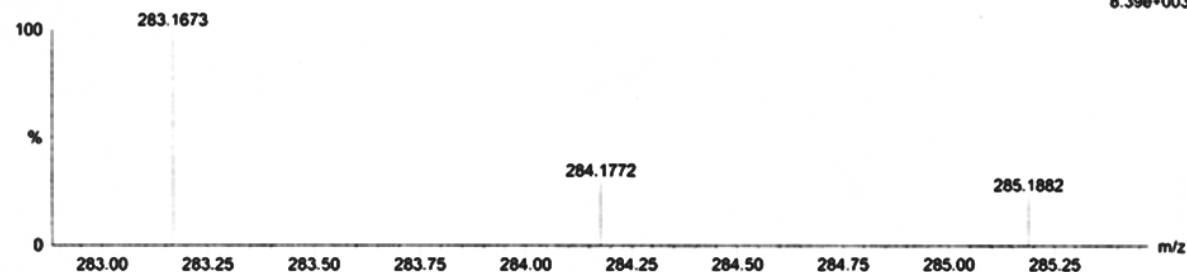
#### Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

374 formula(e) evaluated with 1 results within limits (all results (up to 1000) for each mass)

Elements Used:

C: 0-120 H: 0-140 O: 0-20 Na: 0-1 133Cs: 0-1

(ESI 17-1036) Antonio J ( Cp-3) 6 (0.281)

1: TOF MS ES+  
8.39e+003

Minimum: 30.00

Maximum: 100.00

100.0 5.0 -10.0

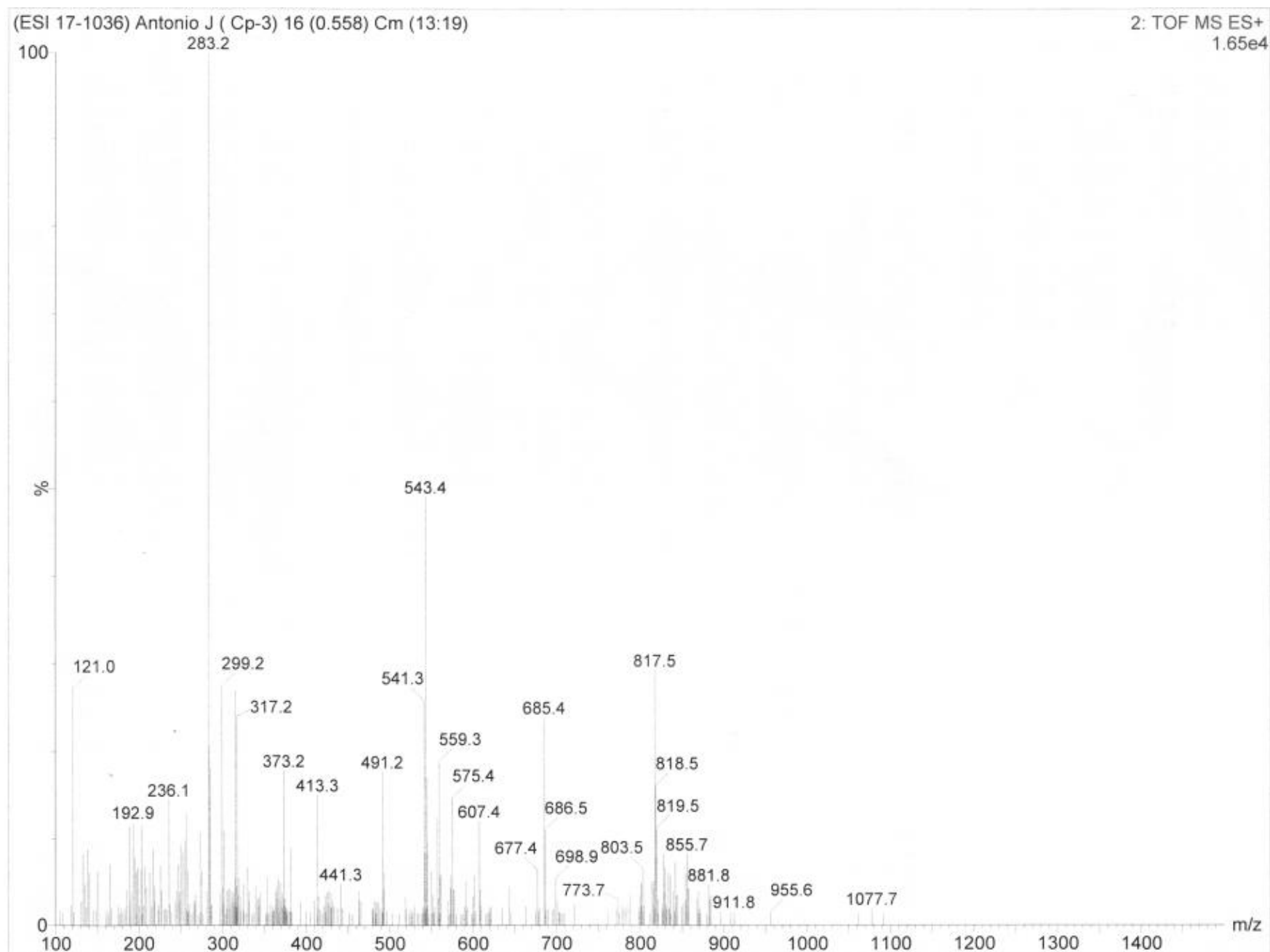
1000.0

Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
------	----	------------	-----	-----	-----	-------	---------

283.1673	100.00	283.1674	-0.1	-0.4	5.5	154.3	C17 H24 O2 Na
284.1772	30.41	---					

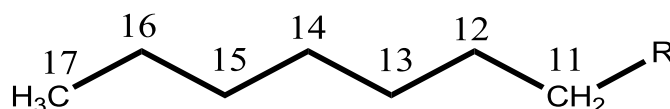
**Spectre V.21** : Spectre TOF-HR-ESI-MS (+) du composé **P6**

Le spectre de masse enregistré en mode ESI (+) (Spectre V.22) montre en plus de l'ion adduit  $[M+Na]^+$  à  $m/z = 283,2$ , d'autres ions adduits notamment à  $m/z = 543,4$  et  $803,5$  correspondant à  $[2M+Na]^+$  et  $[3M+Na]^+$ , respectivement. La présence de ces ions adduits conforte et confirme la formule brute de cette molécule. Par ailleurs la présence de l'ion à  $m/z = 264,9$  (2,77 %) correspondant à la perte de  $H_2O$  de cette molécule, indique la présence d'un groupement hydroxyle (OH). On relève également la présence de l'ion  $m/z = 246,9$  (7,03 %) correspondant à la perte de deux molécules d'eau de la part de l'ion adduit  $[M+Na]^+$ , ceci indique la présence de deux groupements hydroxyles dans cette molécule. On retient à ce stade de notre analyse, que le composé **P6** est un diol vu qu'il ne comporte que deux atomes d'oxygène. Par ailleurs, la présence de l'ion  $m/z = 121,0$  (27,48 %) correspondant à  $C_7H_{14}Na$  indiquant donc la formation d'un heptène à partir de cette molécule, est en faveur de la présence d'une chaîne en  $C_7$ . Ainsi, les 6 insaturations et les deux hydroxyles sont l'autre partie de la molécule ( $C_{10}H_9O_2$ ).



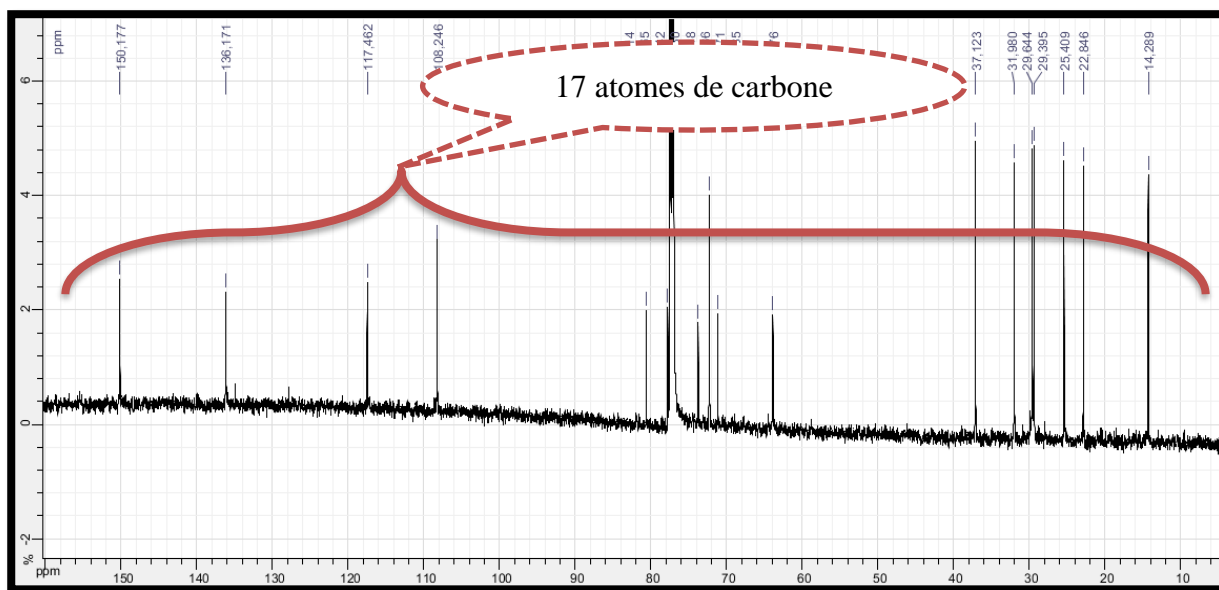
Spectre V.22 : Spectre ESI-MS (+) du composé P6

On relève en effet, sur les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  (Spectre V.23) et DEPT (Spectre V.24) la présence de 6  $\text{CH}_2$  hybridés  $\text{sp}^3$  et non oxygénés d'après les valeurs de leurs déplacements chimiques, à  $\delta$ c 37,12 ; 25,41 ; 29,44 ; 29,19 ; 31,98 ; 22,85 ppm et un  $\text{CH}_3$  à  $\delta$ c 14,29 ppm. D'après ces données, il est clair que la chaîne en  $\text{C}_7$  est obligatoirement linéaire (Figure V.23) et ses atomes de carbone peuvent être numérotés C-11 à C-17.

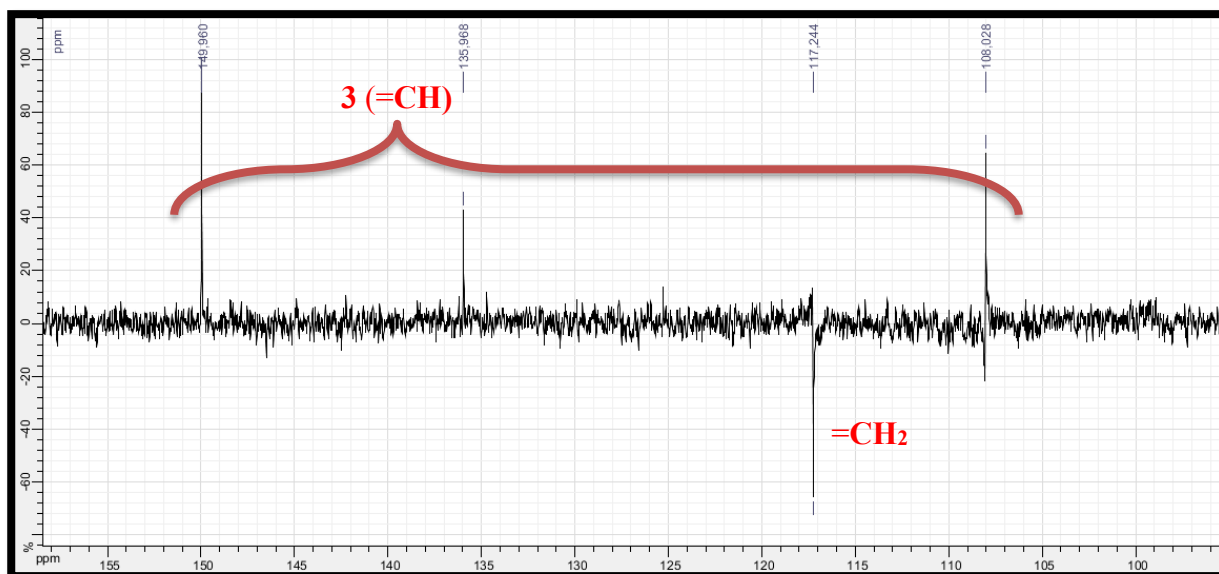


**Figure V.23** : Entité 1 faisant partie du composé P6

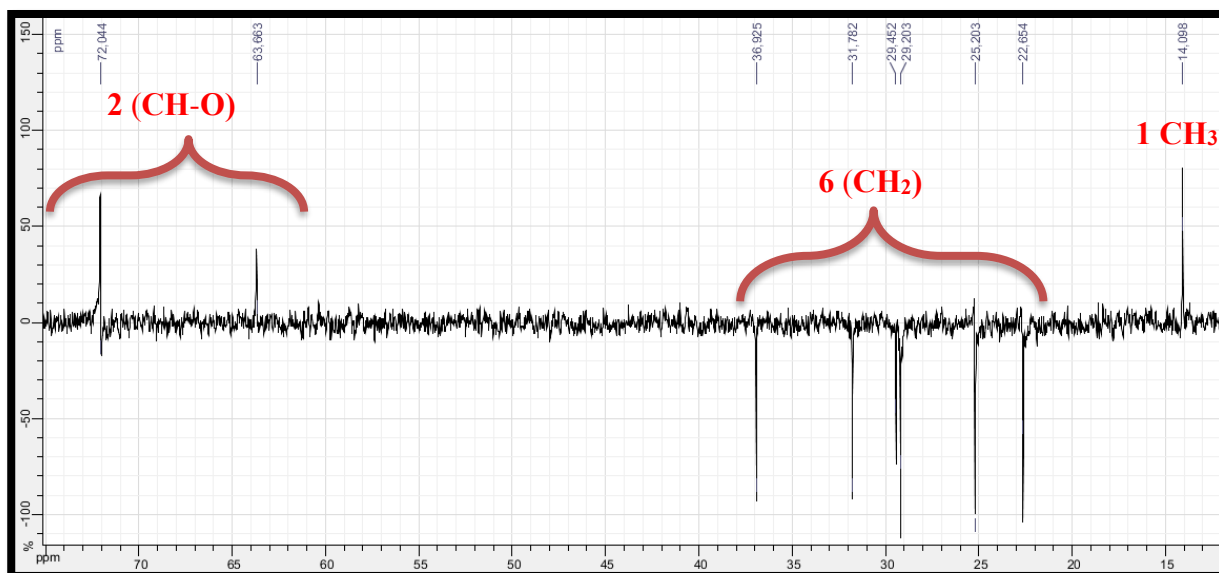
En plus des 7 carbones de la chaîne, les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  (Spectre V.23) et DEPT  $135^\circ$  (Spectre V.24.1 et Spectre V.24.2), mettent en évidence la présence des 10 autres atomes de carbone en accord avec les données de la spectrométrie de masse soit la présence de 17 atomes de carbone.



**Spectre V.23** : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P6



**Spectre V.24.1** : Spectre DEPT 135° étalé (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P6**

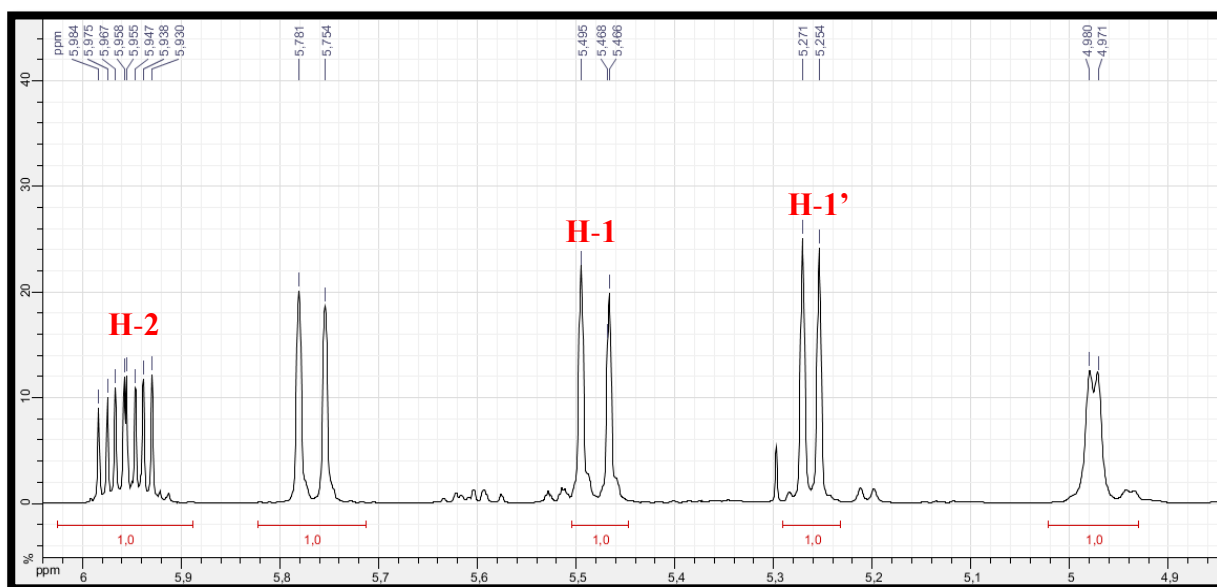


**Spectre V.24.2** : Spectre DEPT 135° étalé (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P6**

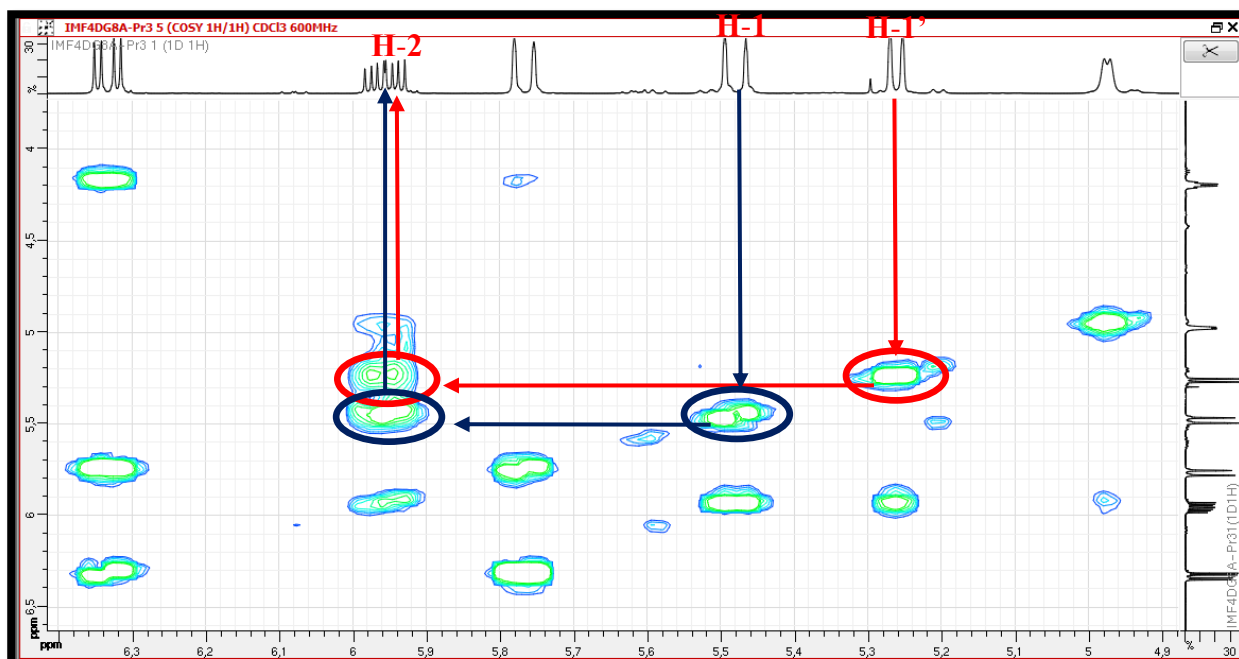
L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre V.25.1) de ce composé, montre vers les champs faibles des signaux caractéristiques d'un groupement vinyle porté par un méthyle. Les signaux des protons de ce système à 4 spins apparaissent à  $\delta_{\text{H}}$  5,48 ppm (*dl* ;  $J = 16,8$  Hz), 5,26 ppm (*dl* ;  $J = 10,2$  Hz) et 5,96 ppm (*ddd* ;  $J = 16,8$  ; 10,2 ; 5,4 Hz) pour les protons H-1, H-1' et H-2, respectivement, du groupement vinyle et à  $\delta_{\text{H}}$  4,98 ppm ( $J = 5,4$  Hz), pour le proton du méthyle portant ce groupement vinyle. L'examen du spectre COSY (Spectre V.26.1) confirme ces hypothèses en montrant les taches de corrélation attendues. D'après le spectre HSQC (Spectre V.27.1), le carbone C-1 est relevé à  $\delta_{\text{C}}$  117,46 ppm, le carbone C-2 à  $\delta_{\text{C}}$  136,17 ppm. Les valeurs des déplacements chimiques de ces carbones confirment bien leur nature éthylénique. Le carbone du méthyle C-3 est relevé à  $\delta_{\text{C}}$



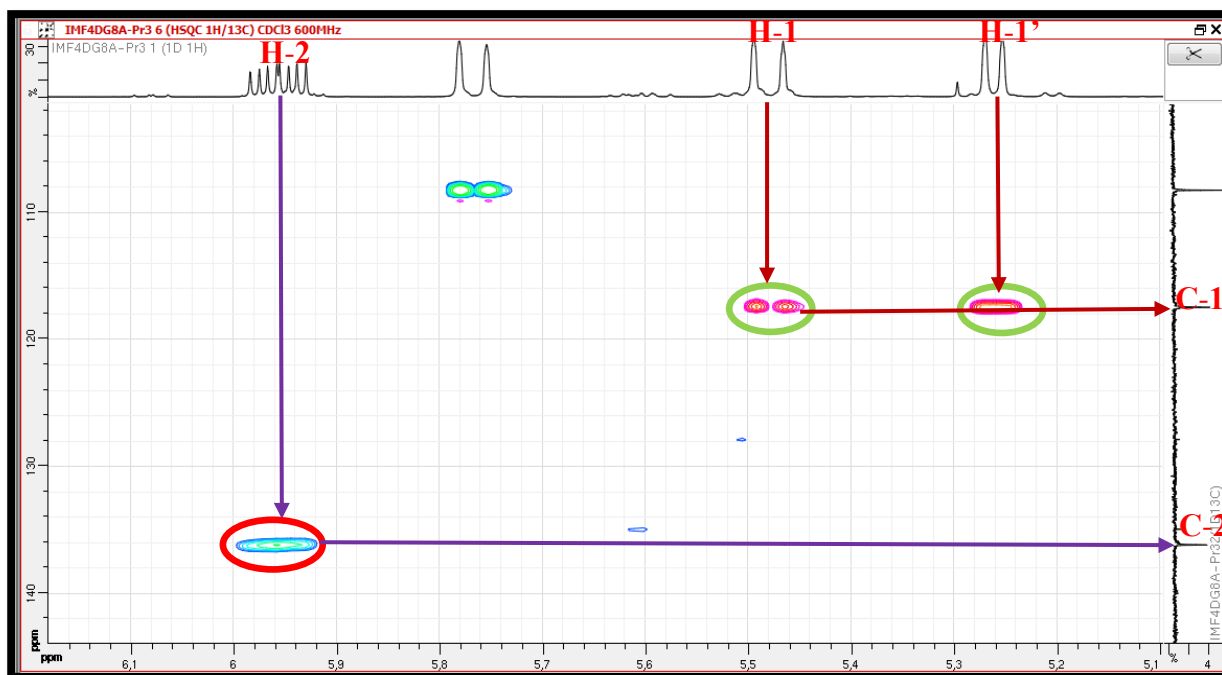
63,88 ppm. La valeur du déplacement chimique de ce carbone indique qu'il est oxygéné, en effet, l'abaissement relatif de son déplacement chimique est probablement dû à un groupement électro-donneur voisin. D'après la formule brute de cette molécule ( $C_{17}H_{24}O_2$ ) et les données de la spectrométrie de masse (présence de deux OH), le groupement oxygéné attaché à ce carbone C-3 ne peut être qu'un hydroxyle.



Spectre V.25.1 : Spectre RMN  $^1H$  étalé (600 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P6

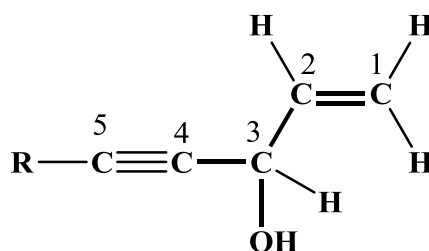


Spectre V.26.1 : Spectre COSY étalé (600 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé P6

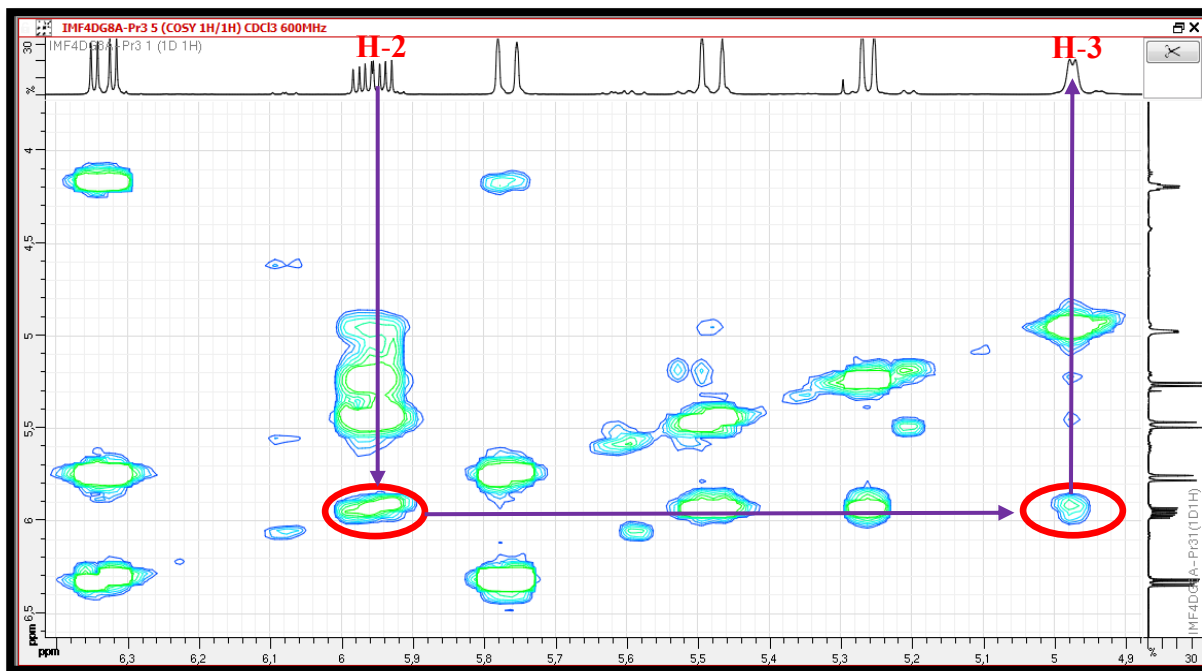


**Spectre V.27.1** : Spectre HSQC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P6**

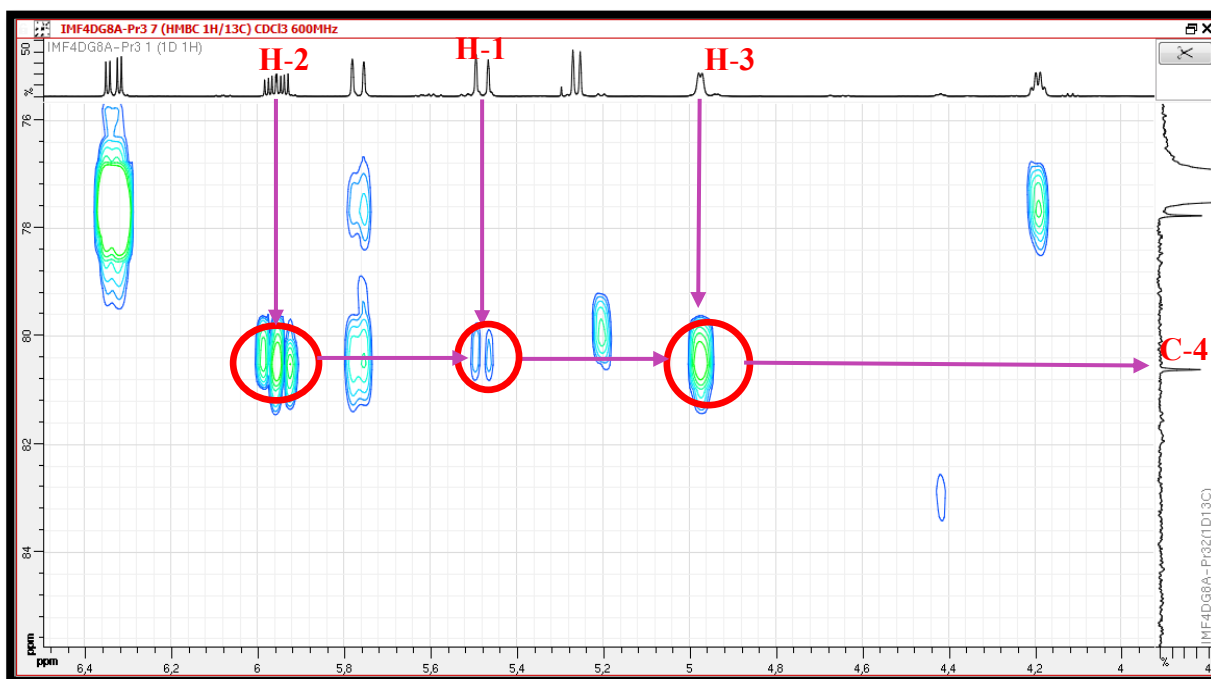
La multiplicité de H-3 (doublet) oriente vers la présence d'un carbone quaternaire en position C-4. Cette hypothèse est confirmée par le spectre HMBC (Spectre V.28.1), où l'on relève des taches de corrélation entre les protons H-1, H-2 et H-3 et le carbone quaternaire à  $\delta_{\text{C}} = 80,61$  ppm que nous pouvons alors attribuer à C-4. La valeur du déplacement chimique de C-4 est en faveur de la présence d'une triple liaison à ce niveau vu le nombre d'insaturations attendu dans cette partie de la molécule et la richesse du genre *Pituranthos* en composés acétyléniques. Cette triple liaison est donc délimitée par le carbone de la position C-5. Le carbone C-5 est aisément attribué à la résonance à  $\delta_{\text{C}} = 71,14$  ppm grâce à sa corrélation avec H-3 sur le même spectre (HMBC) (Spectre V.28.2). À ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer la présence de l'entité reportée dans la Figure V.24 dans cette molécule en plus de celle indiquée plus haut. La présence de cette triple liaison à ce niveau explique bien l'abaissement relatif du déplacement chimique du carbone C-3.



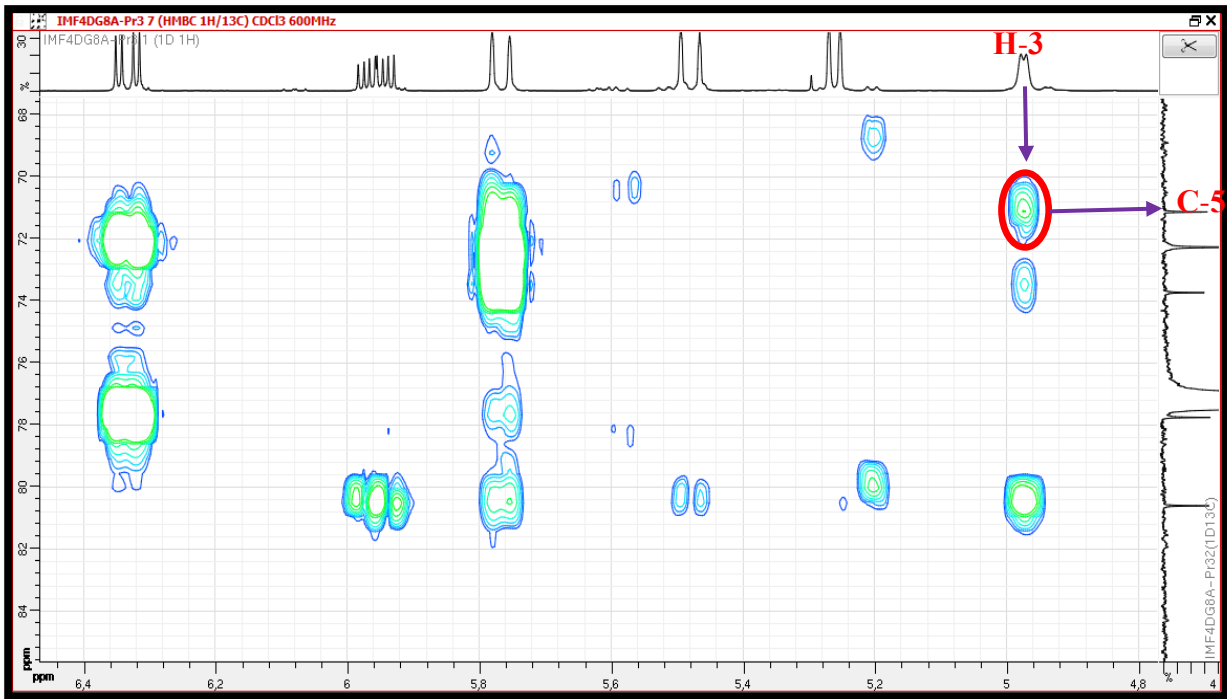
**Figure V.24** : Entité **2** présente dans le composé **P6**



Spectre V.26.2 : Spectre COSY étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé P6

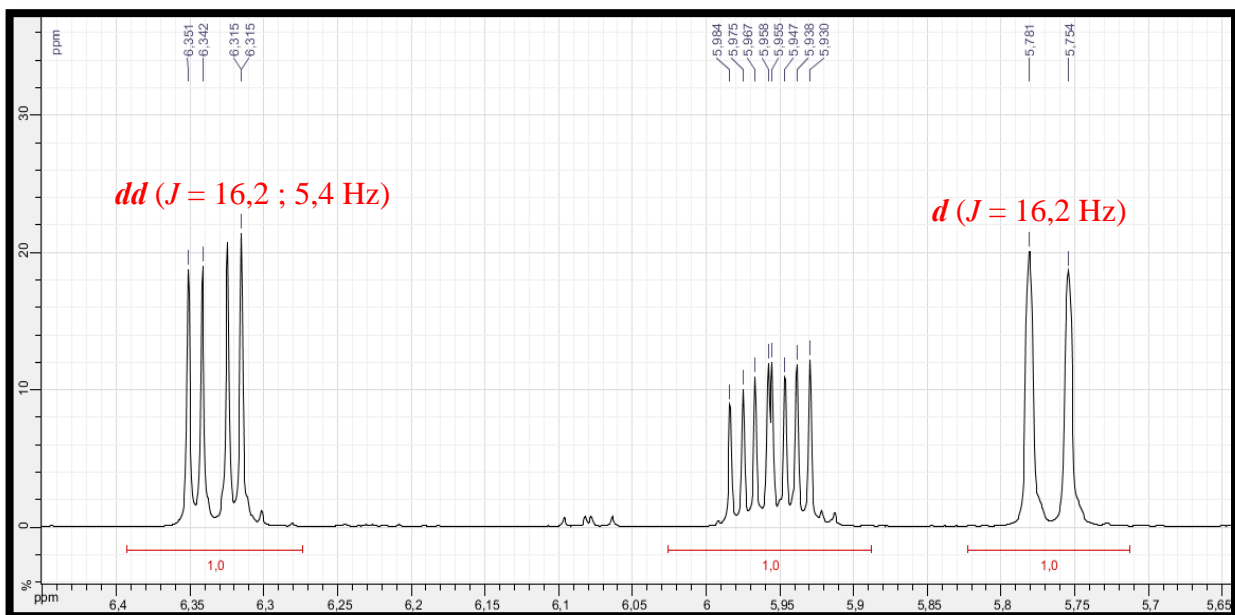


Spectre V.28.1 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé P6

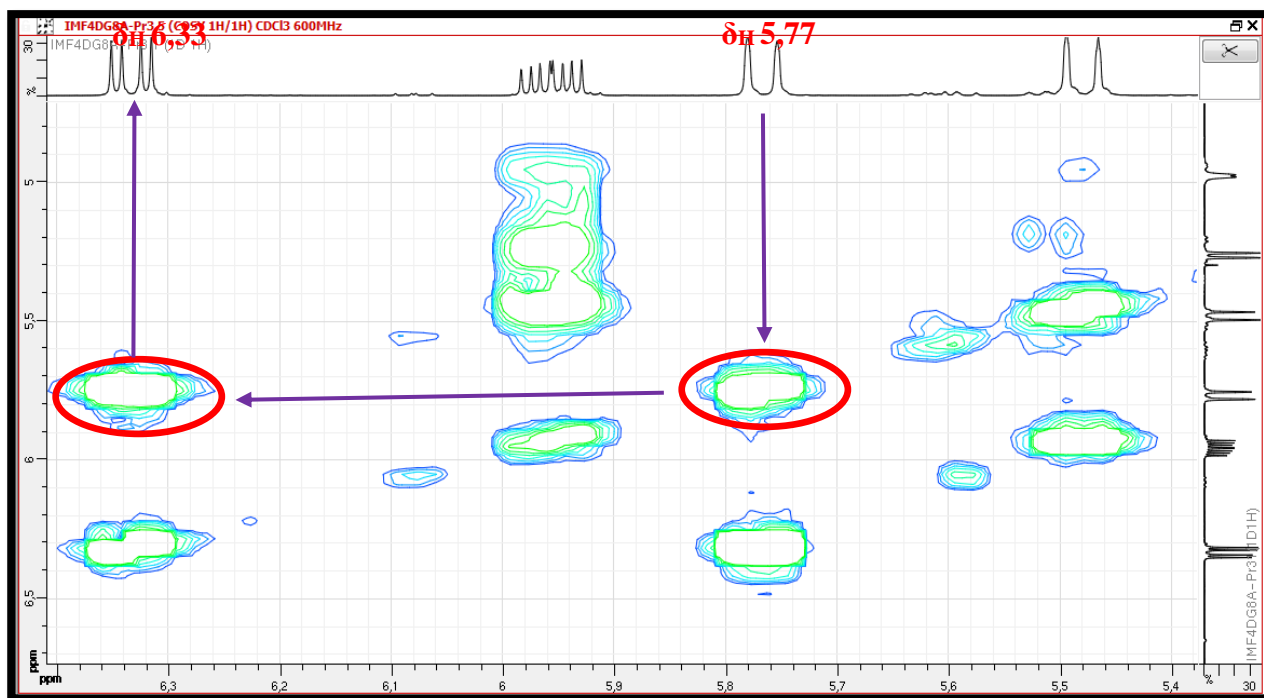


**Spectre V.28.2 :** Spectre HMBC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P6**

Un retour vers le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre V.25.2) permet de relever la présence d'une deuxième double liaison caractérisée par deux signaux, un signal résonant à  $\delta_{\text{H}}$  5,77 ppm sous forme d'un doublet ( $J = 16,2$  Hz) et le deuxième à  $\delta_{\text{H}}$  6,33 ppm sous forme d'un doublet de doublets ( $J = 16,2 ; 5,4$  Hz). D'après le spectre COSY (Spectre V.26.3), ces deux protons couplent entre eux ; Ils sont donc vicinaux et appartiennent bien à la même double liaison. La valeur de la constante de couplage ( $J = 16,2$  Hz) indique une disposition *trans* de ces deux protons.



**Spectre V.25.2 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P6**



**Spectre V.26.3** : Spectre COSY étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P6**

La multiplicité du signal à  $\delta_{\text{H}}$  5,77 ppm indique qu'il est à côté d'un carbone quaternaire, par contre celle du signal à  $\delta_{\text{H}}$  6,33 ppm caractérise un proton couplé avec un autre proton en plus du carbone éthylénique précédemment invoqué. En effet, ce couplage est très clair sur le spectre COSY (Spectre V.26.4) qui montre une corrélation entre ce proton et le proton d'un méthine résonant sous forme d'un quadruplet à  $\delta_{\text{H}}$  4,17 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  72,27). D'après les valeurs des déplacements de ce proton et de son carbone et connaissant la formule brute de cette molécule et sachant qu'il s'agit d'un diol, il est évident que ce méthine est hydroxylé. Vu la multiplicité du signal de son proton, il est clair qu'il est lié à un méthylène. En effet, et toujours sur le spectre COSY (Spectre V.26.4), le proton de ce méthine hydroxylé montre une tache de corrélation avec les protons d'un méthylène résonant sous forme d'un multiplet à  $\delta_{\text{H}}$  1,53 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  37,12 ppm) confirmant ainsi cette hypothèse. D'après nos données précédentes, ce groupement méthylène dont le carbone résonne à  $\delta_{\text{C}}$  37,12 ppm, fait partie de la chaîne en  $\text{C}_7$  présente dans cette molécule, il représentera alors la position C-11. En conséquence la position C-10 sera affectée au méthine hydroxylé, le CH de la double liaison résonant à  $\delta_{\text{H}}$  6,33 ppm ( $\delta_{\text{C}}$  150,18) sera la position C-9 et le deuxième CH de cette double liaison ( $\delta_{\text{H}}$  5,77 ;  $\delta_{\text{C}}$  108,25 ppm) représentera la position C-8. À ce stade de notre analyse, nous pouvons proposer la présence de l'entité reportée dans la Figure **V.25** dans cette molécule.

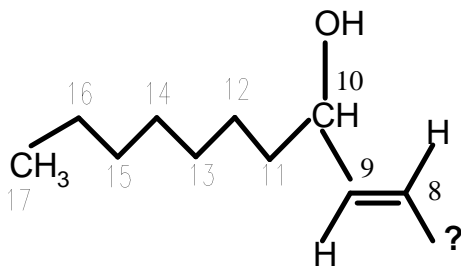
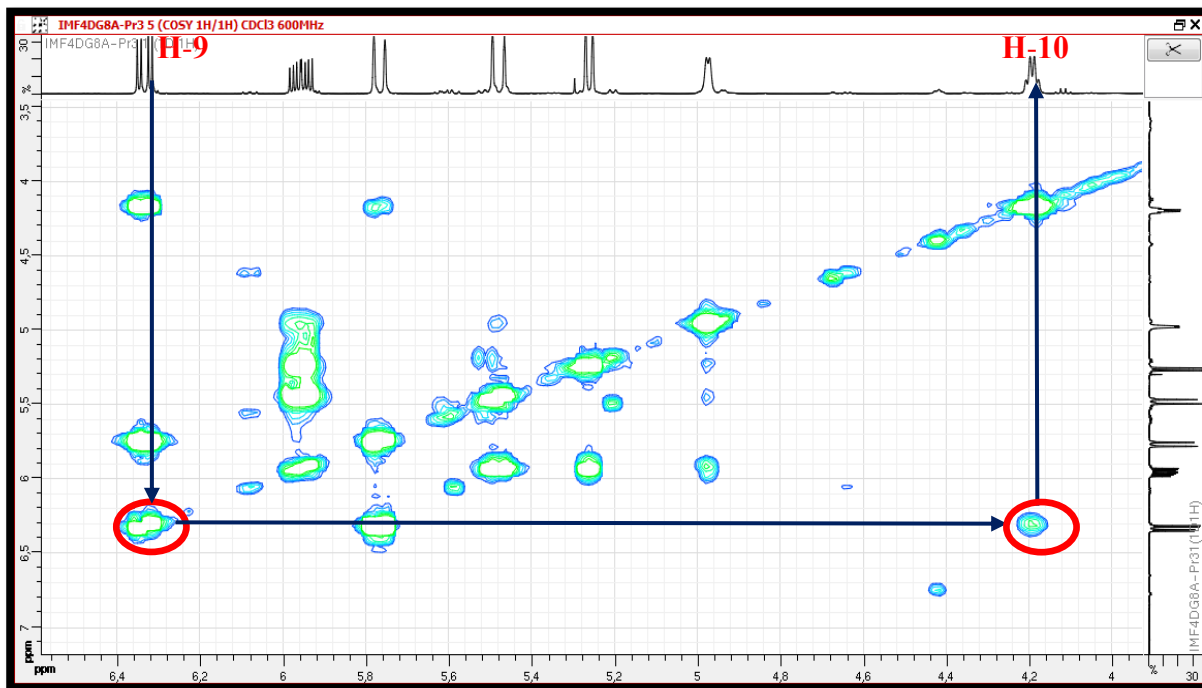
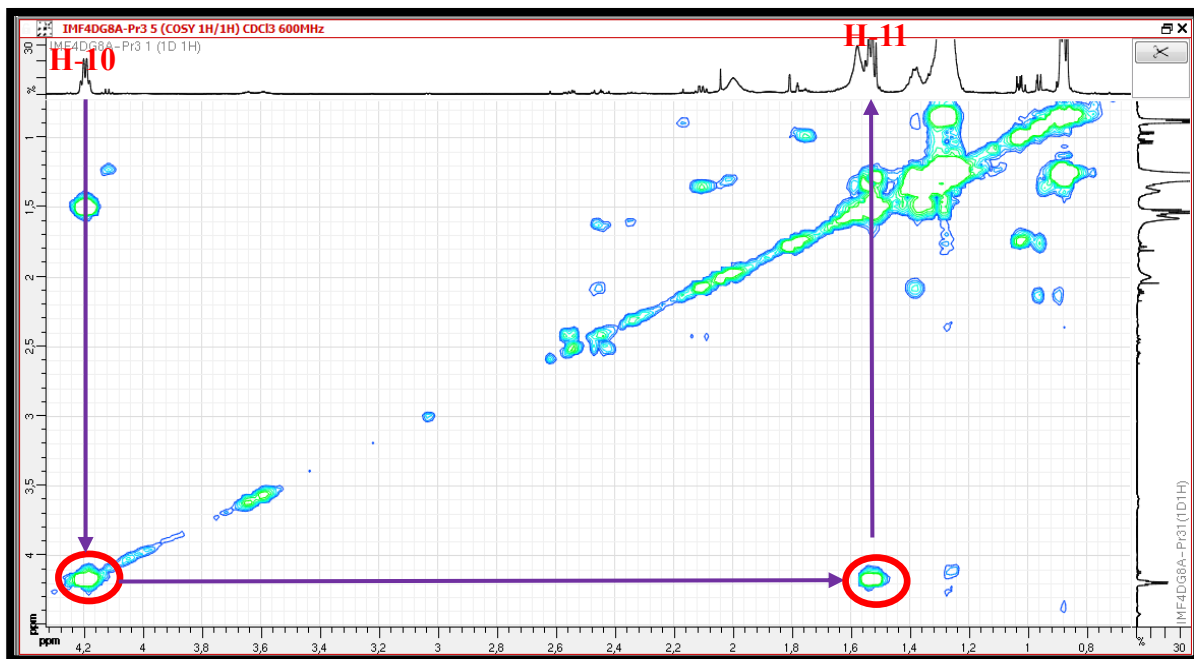
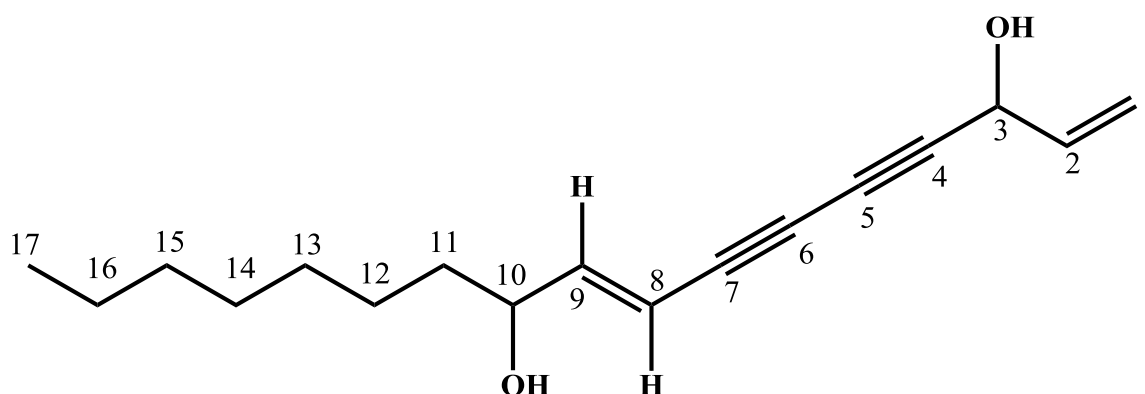


Figure V.25 : Entité 3 présente dans le composé P6

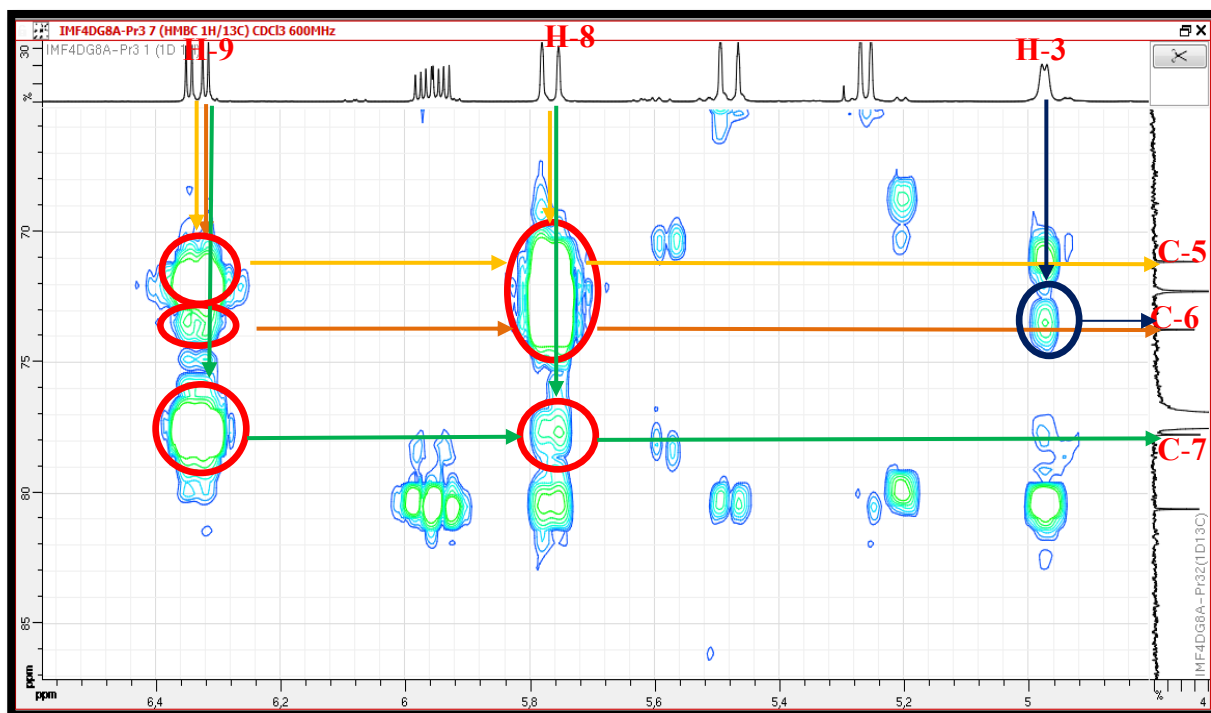
Spectre V.26.4 : Spectre COSY étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé P6Spectre V.26.5 : Spectre COSY étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé P6

À ce stade de notre détermination de la structure du composé **P6**, et en tenant compte de l'entité reportée plus haut, nous avons utilisé 15 atomes de carbones, 24 atomes d'hydrogène et 2 atomes d'oxygène ; nous avons également utilisé 4 insaturations des six attendues. Ainsi, il reste deux atomes de carbone et deux insaturations à placer dans cette molécule. Un examen attentif des spectres DEPT et RMN<sup>13</sup>C, montre que les carbones non utilisés à ce stade sont deux carbones quaternaires résonant à  $\delta_C$  73,74 ppm et  $\delta_C$  77,77 ppm. Selon nos données, ces deux carbones doivent être engagés dans une triple liaison et occuper alors les positions C-6 et C-7. Ceci est en parfait accord avec le spectre HMBC (Spectre V.28.3) qui montre des corrélations entre les deux protons H-8 et H-9 et ces deux carbones. On relève également une tache de corrélation entre le carbone résonant à  $\delta_C$  73,74 ppm et H-3. Ceci permet d'affecter ce carbone à la position C-6 et par conséquent celui résonant à  $\delta_C$  77,77 ppm à la position C-7. L'ensemble de ces données permet d'identifier ce composé **P6** comme : **(E)-heptadéca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diol**, connu sous le nom **panaxydiol** (Figure V.26).

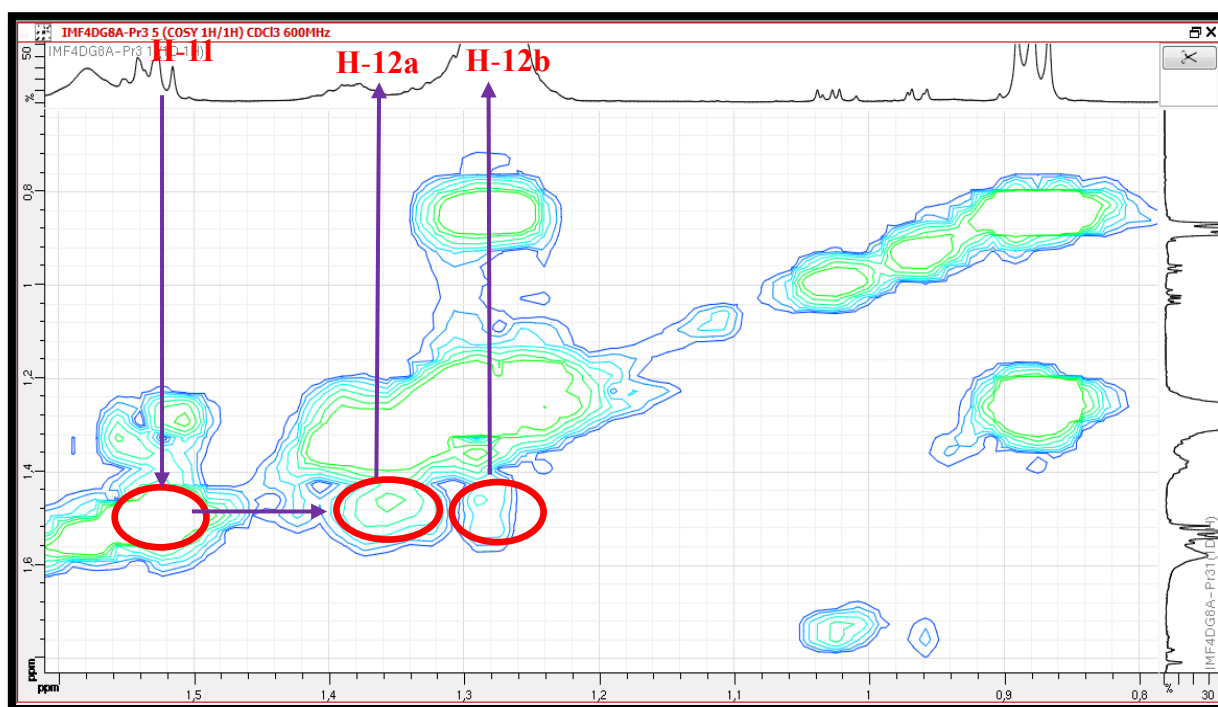


**Figure V.26** : Structure plane du composé **P6**

Les 5 groupements CH<sub>2</sub> des positions 12 à 16 ont été attribués à leurs signaux respectifs grâce à l'analyse des spectres COSY (Spectre V.26.6) et HSQC (Spectre V.27.3). En effet, les protons H<sub>2</sub>-11 montrent des taches de corrélation avec un CH<sub>2</sub> dont les protons diastéréotopiques, résonnent sous forme de deux multiplets, le premier à  $\delta_H$  = 1,38 ppm et le second à  $\delta_H$  = 1,30 ppm ( $\delta_C$  = 25,41 ppm) permettant ainsi leur positionnement sur le carbone C-12. Ceci est d'ailleurs appuyé par le spectre HSQC (Spectre V.29.7) qui montre que ces deux protons sont portés par le même carbone (C-12).

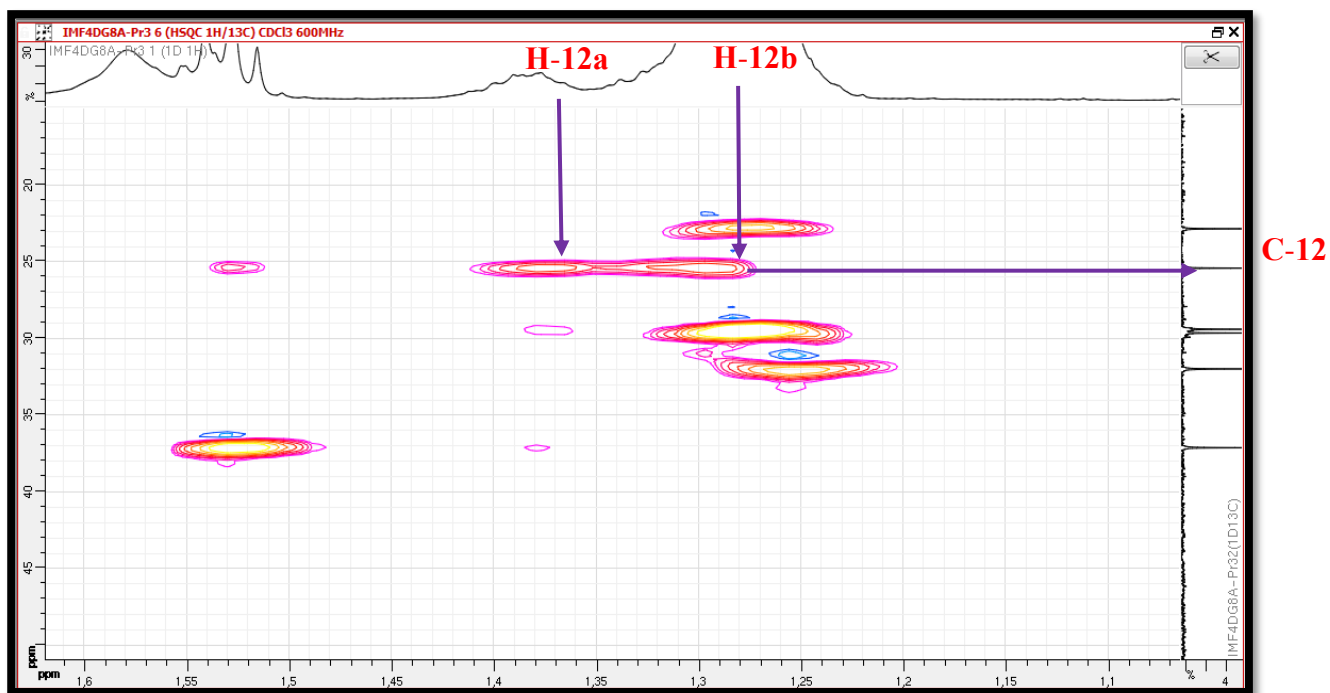


Spectre V.28.3 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé P6



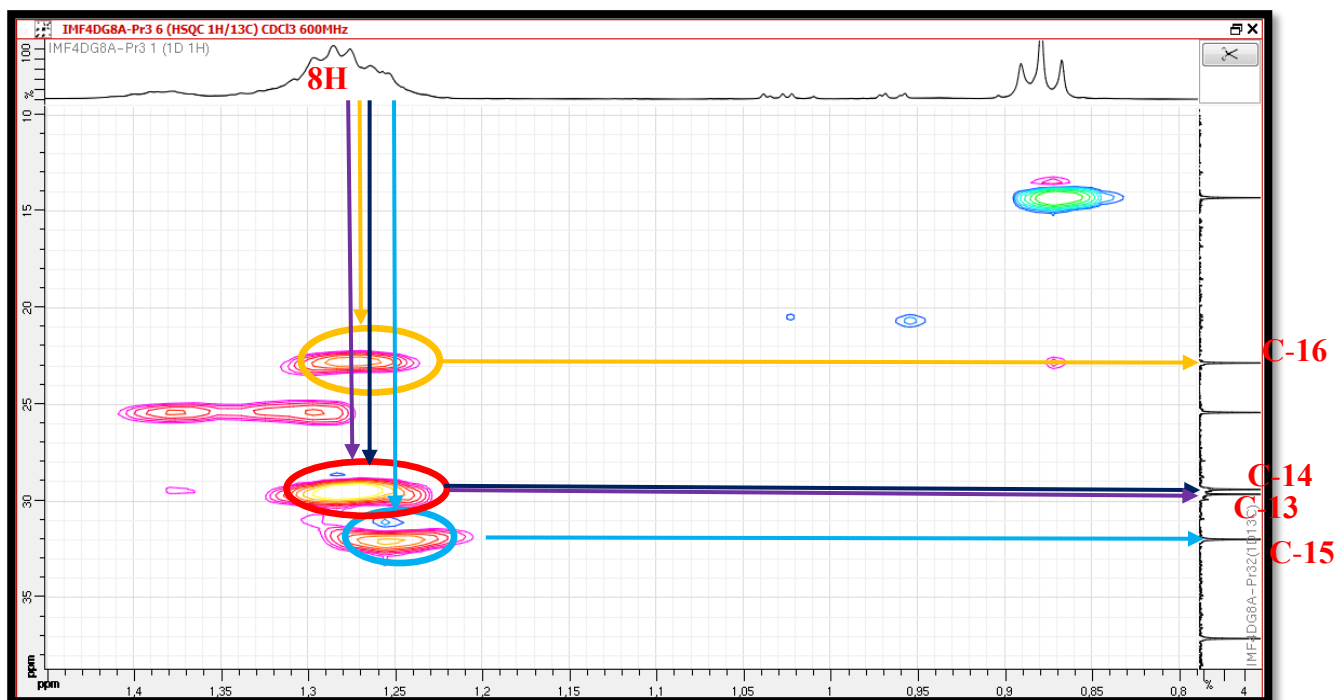
Spectre V.26.6 : Spectre COSY étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé P6



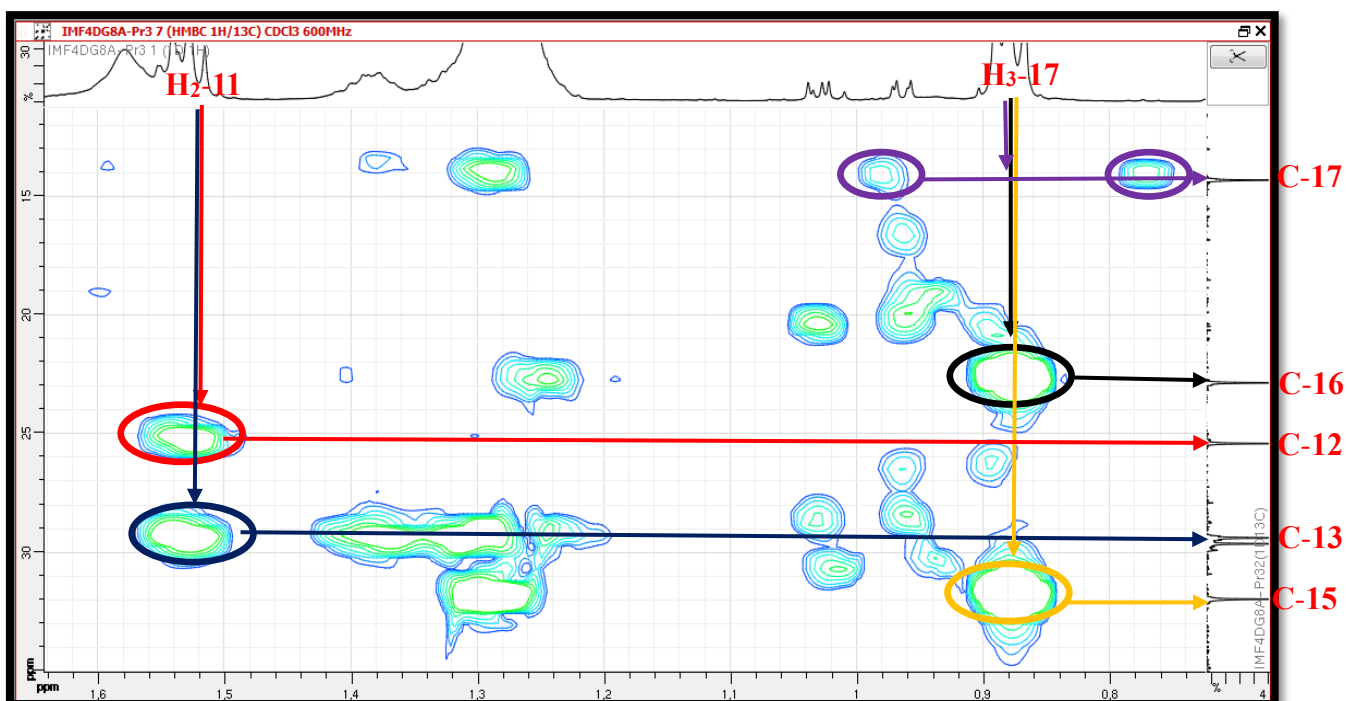


**Spectre V.27.3** : Spectre HSQC étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P6**

Il reste à attribuer les signaux de la chaîne linéaire entre C-13 et C-16. En effet, le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre V.25.3) permet de relever la présence des signaux assez proches d'intégration 8H résonant entre  $\delta_{\text{H}}$  1,25-1,28 ppm sous forme de multiplets. Par ailleurs, les spectres RMN  $^{13}\text{C}$  (Spectre V.23), DEPT  $135^\circ$  (Spectre V.24) et COSY (Spectre V.26) montrent que ces quatre groupements  $\text{CH}_2$  résonnent à  $\delta_{\text{C}}$  31,98 ; 29,44 ; 29,19 ; 22,85 ppm. Sur le spectre HMBC (Spectre V.28.4), les protons  $\text{H}_2$ -11 corrèle avec le C-12 et le carbone résonant à  $\delta_{\text{C}}$  29,44 ppm, ceci signifie que ce dernier carbone est le C-13. Toujours sur le même spectre HMBC (Spectre V.28.4), les carbones résonants à  $\delta_{\text{C}}$  31,98 et 22,85 ppm montrent des taches de corrélation avec les protons du méthyle résonant à  $\delta_{\text{H}}$  0,88 ppm sous forme d'un triplet ( $J = 7,2$  Hz ;  $\delta_{\text{C}}$  14,29 ppm), orientant vers le fait que ce méthyle terminal est en position vicinal avec l'un de ces deux carbones. Sur la base des corrélations observées sur le spectre HMBC, le carbone résonant à  $\delta_{\text{C}}$  31,98 a été attribué au C-15 celui résonant à 22,85 ppm au C-16. Par conséquent le carbone résonant à  $\delta_{\text{C}}$  29,19 ppm sera attribué au C-14.



Spectre V.30.2 : Spectre HSQC étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé P6



Spectre V.31.4 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé P6

À ce stade de notre analyse structurale, il reste à rechercher les configurations absolues des centres chiraux C-3 et C-10. Pour cela, nous avons mesuré le pouvoir rotatoire de cette molécule et fait appel aux résultats de la bibliographie connus sur cette molécule. Ce composé a été trouvé optiquement actif avec  $[\alpha]_D^{25} = -25.4$  ( $c$  0,13 g/100 ml,  $\text{CHCl}_3$ ), cela suppose que notre molécule est lévogyre. D'après les résultats de travaux bibliographiques menés sur cette molécule (Prasad et Swain, 2011), la valeur négative de la rotation optique indique une configuration (R) du centre chiral C-3 et une configuration (S) du centre chiral C-10. Par conséquent, le composé **P6** a été identifié comme étant le (-)-(3R, 10S)-(E)-heptadéca-1,8-diene-4,6-diyne-3,10-diol, connue sous le nom (-)-(3R, 10S)-panaxydiol (Figure V.27).

Cette molécule est identifiée pour la première fois dans la famille Apiaceae. Nous décrivons ses propriétés antiparasitaire et cytotoxique pour la première fois dans la littérature (Chapitre VI).

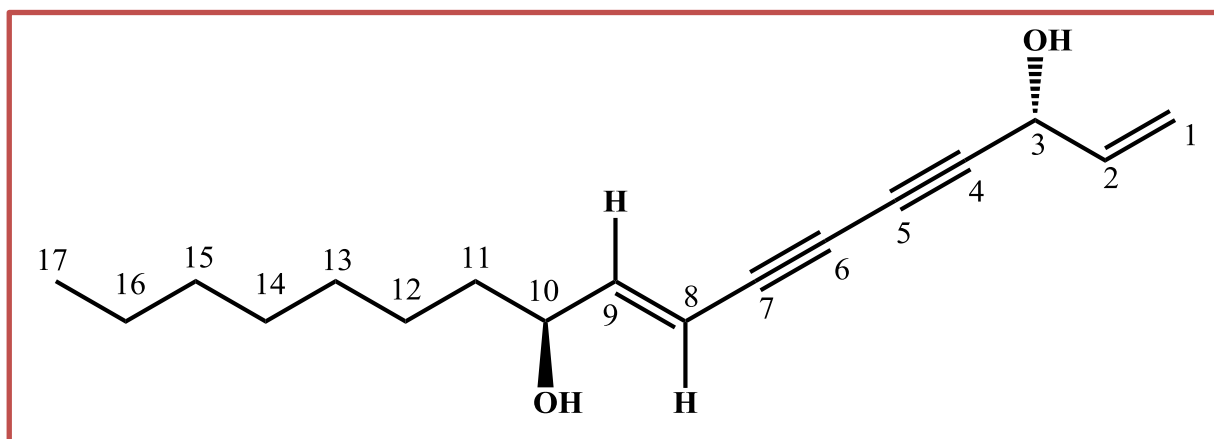


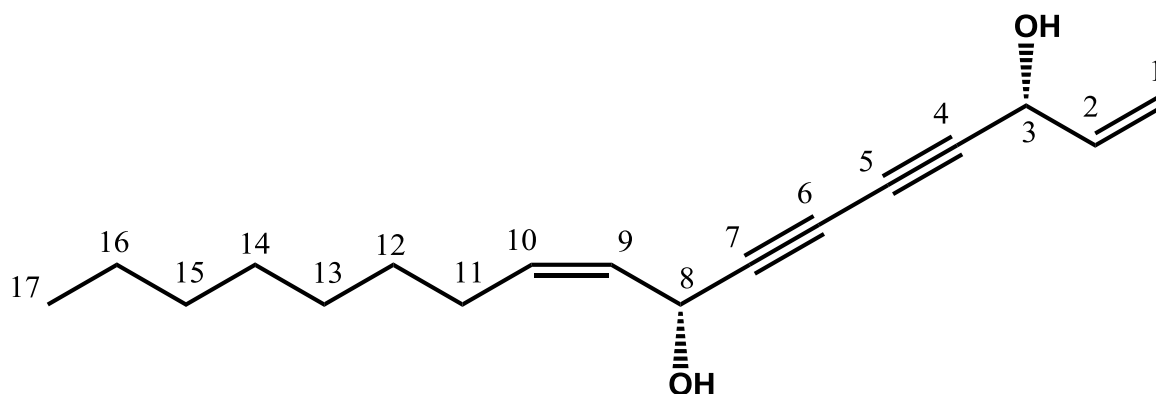
Figure V.27 : Structure finale du composé **P6**, (-)-(3R, 10S)-panaxydiol

Les données des spectres RMN sont reportées dans le tableau V.6.

**Tableau V.6 :** Déplacements chimiques  $\delta$  (ppm)  $^{13}\text{C}$  (150 MHz) et  $^1\text{H}$  (600 MHz) du composé **P6**

Position	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Intégration	Multiplicité	$J$ (Hz)
<b>1</b>	117,46	5,48	1H	<i>dl</i>	16,8
<b>1'</b>		5,26	1H	<i>dl</i>	10,2
<b>2</b>	136,17	5,96	1H	<i>ddd</i>	16,8 ; 10,2 ; 5,4
<b>3</b>	63,88	4,98	1H	<i>dl</i>	5,4
<b>4</b>	80,61	-	-	-	-
<b>5</b>	71,14	-	-	-	-
<b>6</b>	73,74	-	-	-	-
<b>7</b>	77,77	-	-	-	-
<b>8</b>	108,25	5,77	1H	<i>d</i>	16,2
<b>9</b>	150,18	6,33	1H	<i>dd</i>	16,2 ; 5,9
<b>10</b>	72,27	4,17	1H	<i>q</i>	5,9
<b>11</b>	37,12	1,53	2H	<i>m</i>	-
<b>12a</b>	25,41	1,38	1H	<i>m</i>	-
<b>12b</b>		1,30	1H	<i>m</i>	-
<b>13</b>	29,44	1,28	2H	<i>m</i>	-
<b>14</b>	29,19	1,28	2H	<i>m</i>	-
<b>15</b>	31,98	1,25	2H	<i>m</i>	-
<b>16</b>	22,85	1,28	2H	<i>m</i>	-
<b>17</b>	14,29	0,88	3H	<i>t</i>	7,2

### V.2.A.6. Élucidation structurale du composé **P7**



**P7**

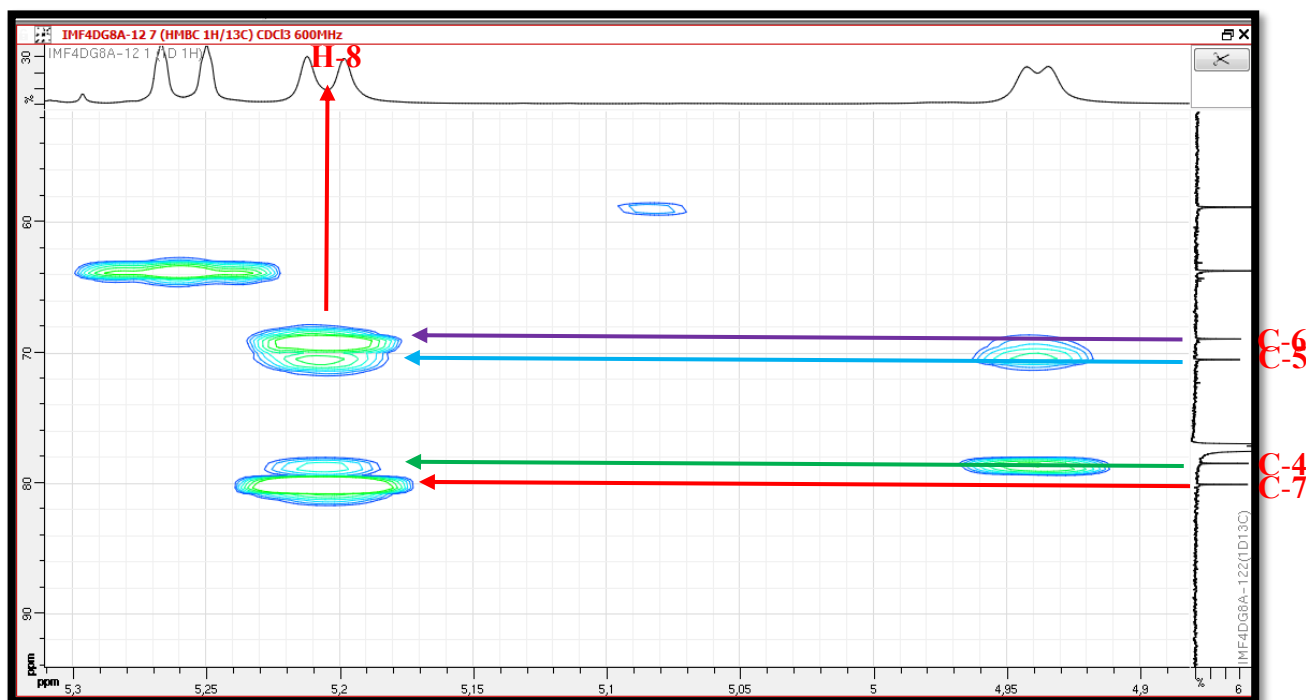
Le composé **P7** se présente sous forme d'une huile de couleur jaune.

L'examen approfondi des spectres RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135° et l'analyse combiné de ces spectres avec les spectres COSY, HSQC et HMBC montre que ce composé est très similaire au composé **P6**. D'après nos analyses, la différence entre ces deux composés (**P6** et **P7**) est la position

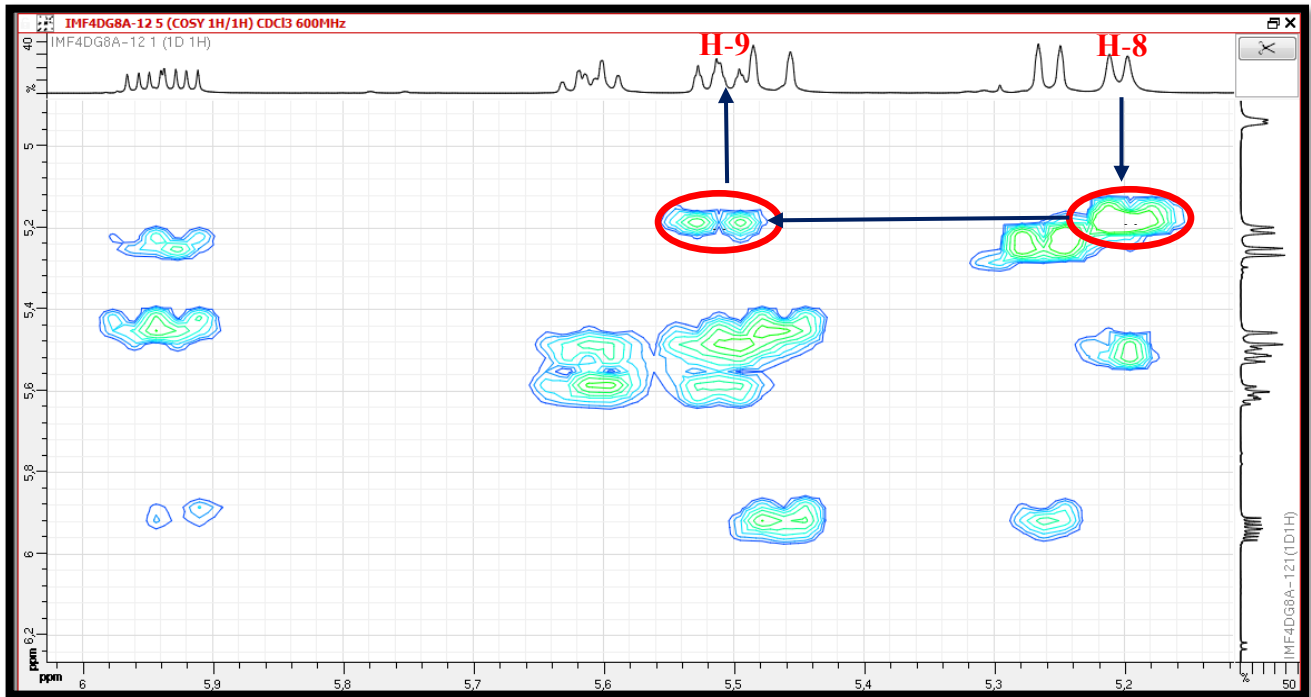
du deuxième groupement hydroxyle et par conséquent la position de la deuxième double liaison et également sa configuration. En effet, le composé **P7** présente deux groupements hydroxyles aux positions C-3 et C-8, ce qui est différent du composé **P6** où les deux groupements hydroxyles sont dans les positions C-3 et C-10.

En effet, sur le spectre HMBC (Spectre V.29.1), Les carbones acétyléniques C-4, C-5, C-6 et C-7 résonant à  $\delta_C$  78,46 ; 70,51 ; 68,92 et 80,24 respectivement, montrent des taches de corrélation avec un proton résonant à  $\delta_H$  5,20 ppm sous forme d'un doublet large ( $J = 8,0$  Hz). Par conséquent, ce proton est attribué au H-8. La valeur du déplacement de son carbone C-8 ( $\delta_C = 58,82$  ppm) oriente vers une oxygénation à ce niveau. Il est à noter que sa position vis-à-vis de la triple liaison est responsable de l'abaissement relatif de son déplacement chimique. La multiplicité de ce proton H-8 (doublet) oriente vers la présence d'un CH en position vicinale. En effet, sur le spectre COSY (Spectre V.30.1), le proton H-8 montre une tache de corrélation nette avec le proton éthylénique résonant à  $\delta_H$  5,51 ppm sous forme d'un doublet de doublets attribué au H-9 ( $J = 10,4 ; 7,5$  Hz), ce qui confirme que le deuxième groupement hydroxyle est en position C-8 entre le carbone acétylénique C-7 et le carbone éthylénique C-9.

Par ailleurs, la valeur de constante de couplage entre les protons éthyléniques H-9 et H-10 ( $J = 10,4$  Hz) indique bien une configuration « *cis* » de la double liaison de la molécule **P7**.

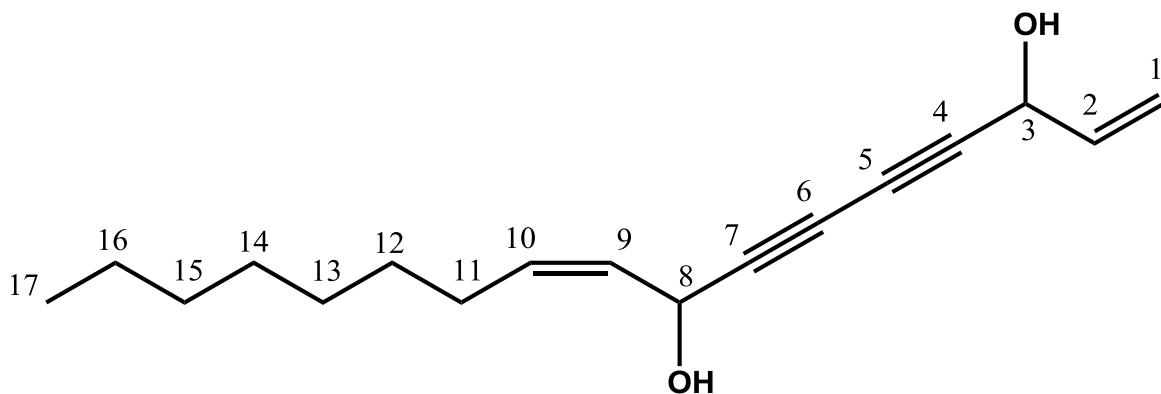


Spectre V.29.1 : Spectre HMBC étalé (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm) du composé **P7**



**Spectre V.30.1** : Spectre COSY étalé (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P7**

Par la suite, l'attribution des carbones et des protons a été réalisée de la même façon à celle du composé **P6**, à partir d'une combinaison des données de la RMN bidimensionnelle [HSQC (Spectre V.31), COSY (Spectre V.30) et HMBC (Spectre V.29)]. Le composé **P7** est donc le (**Z**)-**heptadéca-1,9-diene-4,6-diyne-3,8-diol**, connue sous le nom de **falcarindiol** (Zheng et al., 1999) (Figure V.28).



**Figure V.28** : Structure plane du composé **P7**

En matière de stéréochimie des centres chiraux C-3 et de C-8, ce composé a été trouvé optiquement actif avec un  $[\alpha]_D^{25} = -10,1$  ( $c$  0,11 g/100 ml,  $\text{CHCl}_3$ ), cela suppose que notre molécule est lévogyre. D'après les travaux de Tamura et al. (2010), cet ordre de valeur de la rotation optique est en accord avec la configuration (**R**) pour les deux centres chiraux C-3 et C-8. Ainsi, le composé **P7** a été caractérisé en tant que (**3R, 8R**)-(-)-(**Z**)-**heptadéca-1,9-diene-4,6-diyne-3,8-diol**, connue

sous le nom de **(3*R*, 8*R*)-(-)-faltarindiol**. Cette molécule est décrite pour la première fois dans la littérature, comme produit naturel avec un pouvoir rotatoire négatif et une configuration (*R*) pour C-3 et C-8 (Schmiech et al., 2009; Tamura et al., 2010) (Figure V.29). Le faltarindiol est connu pour ces propriétés biologiques importantes (antifongique, antimutagénique, cytotoxique et autre...) (Fujioka et al., 1999; Lechner et al., 2004; Meot-Duros et al., 2010; Miyazawa et al., 1996). Dans nos présents travaux, nous décrivons sa propriété antiparasitaire pour la première fois (Chapitre VI).

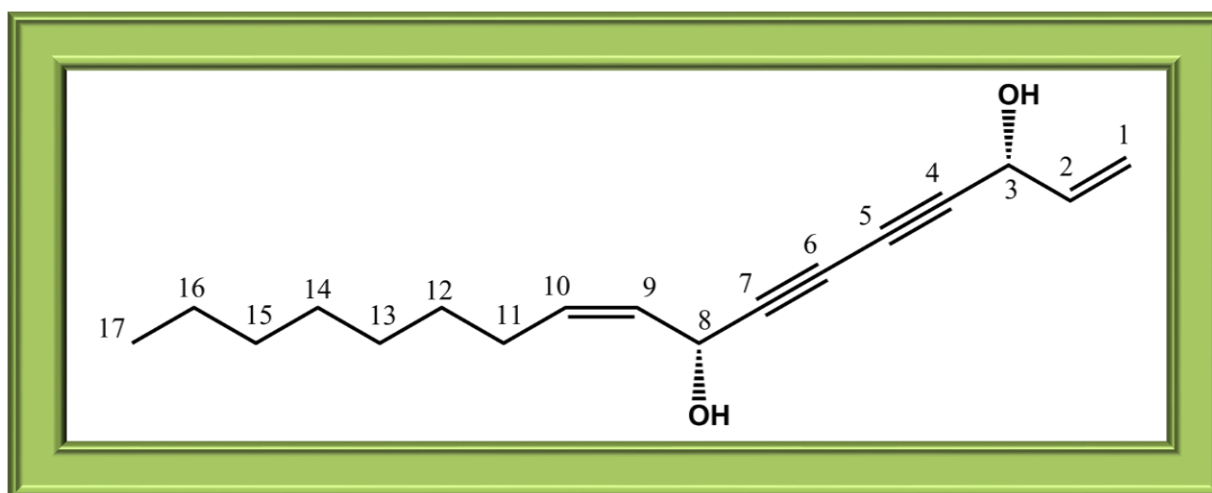
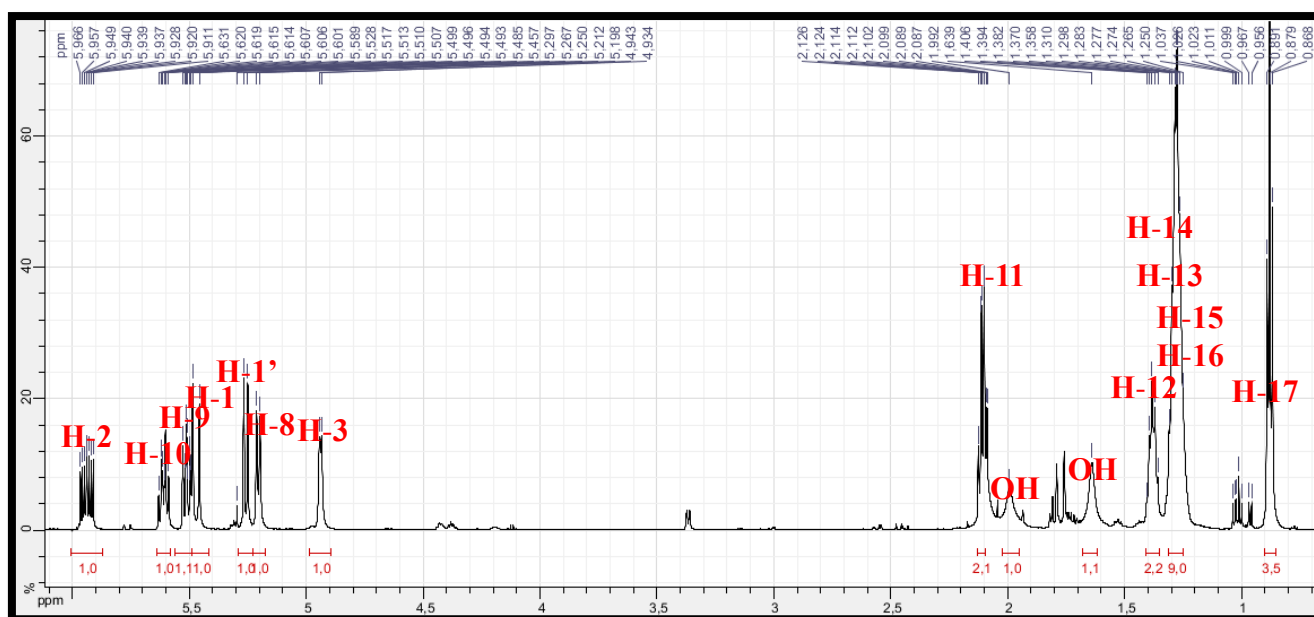
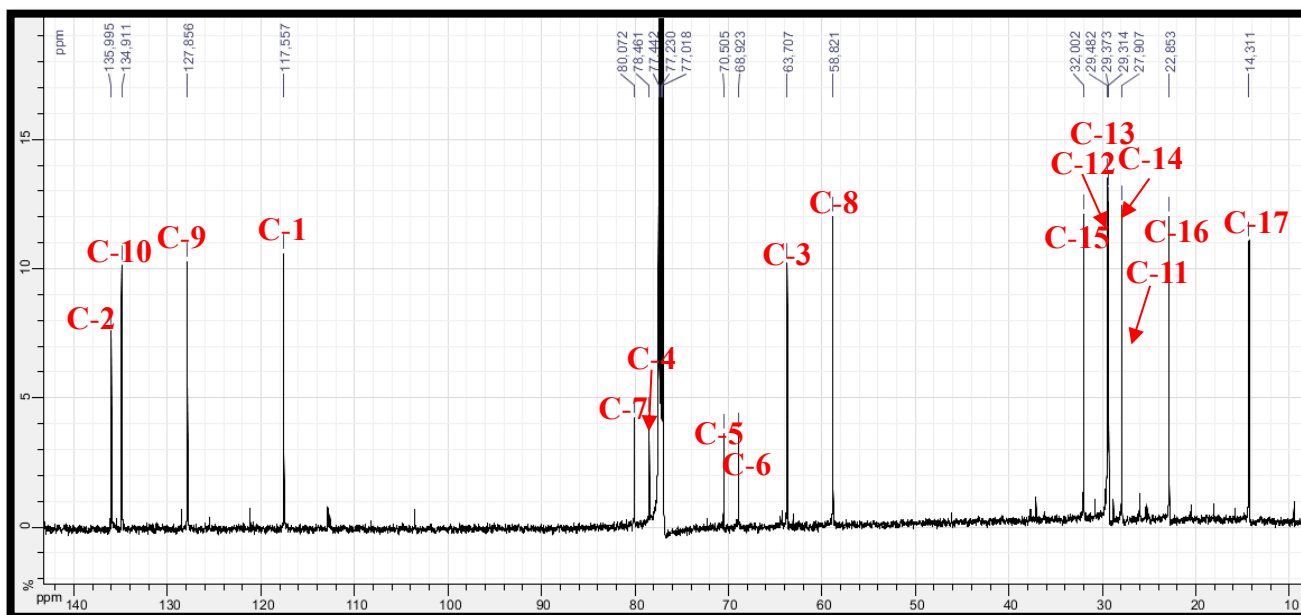


Figure V.29 : Structure finale du composé **P7**, (-)-(3*R*, 8*R*)-faltarindiol

Les attributions des tous les protons et carbones de cette molécule sont reportées sur les spectres RMN  $^1\text{H}$  (Spectre V.32) et RMN  $^{13}\text{C}$  (Spectre V.33), respectivement.



Spectre V.32 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P7**



Spectre V.33 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm) du composé **P7**

Toutes les données de la RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , de ce nouveau composé sont reportées dans le tableau V.7.

Tableau V.7 : Données de la spectroscopie de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz) et RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz) du composé **P7**

Position	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Intégration	Multiplicité	$J$ (Hz)
1	117,56	5,47	1H	<i>d</i>	16,8
1'		5,26	1H	<i>d</i>	10,2
2	135,99	5,96	1H	<i>ddd</i>	16,8; 10,2; 5,4
3	63,71	4,96	1H	<i>d</i>	5,4
4	78,46	-	-	-	-
5	70,51	-	-	-	-
6	68,92	-	-	-	-
7	80,24	-	-	-	-
8	58,82	5,20	1H	<i>dl</i>	7,5
9	127,86	5,51	1H	<i>dd</i>	10,4 ; 7,5
10	134,91	5,61	1H	<i>ddt</i>	10,4 ; 7,2 ; 1,8
11	27,91	2,11	2H	<i>dq</i>	7,2 ; 1,8
12	29,48	1,38	2H	<i>qn</i>	7,2
13	29,37	1,28	2H	<i>m</i>	-
14	29,31	1,28	2H	<i>m</i>	-
15	32,00	1,28	2H	<i>m</i>	-
16	22,85	1,28	2H	<i>m</i>	-
17	14,31	0,88	3H	<i>t</i>	7,2



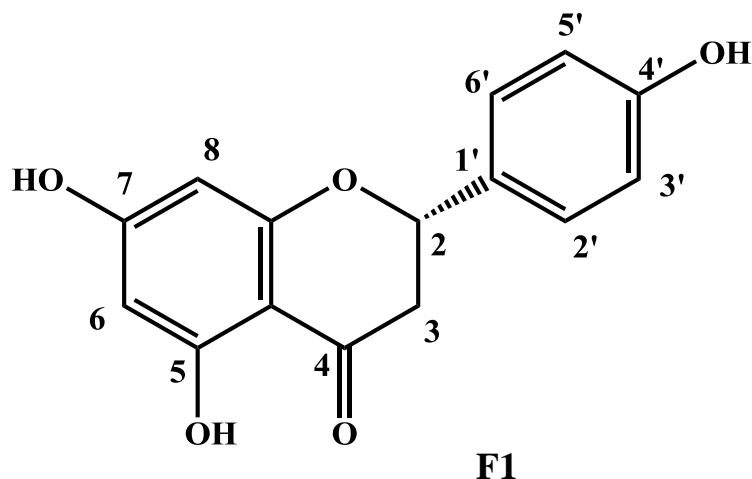
### V.2.A.7. Conclusion

L'étude phytochimique réalisée sur l'extrait dichlorométhane des parties aériennes de *Pituranthos battandieri* Maire a conduit à l'isolement de **14** produits dont **7** ont été identifiés, parmi lesquelles **1** nouveau. Les composés isolés et identifiés sont : 8-geranyloxy-psoralène (**P1**), 8-geranyloxy-5-méthoxypsoralène (**P2**), phelloptérine (**P3**), mélange de *trans-para*-coumarate d'éthyle (**P4**) et (+)-5 $\alpha$ -Hydroxy-2-oxo-*p*-menth-6(1)-ène (**P5**) (35% - 65% , respectivement), (-)-(3*R*, 10*S*)-panaxydiol (**P6**) et (-)-(3*R*, 8*R*)-falcarindiol (**P7**).

## V.3. Identification des composés isolés de *Frankenia thymifolia* Desf.

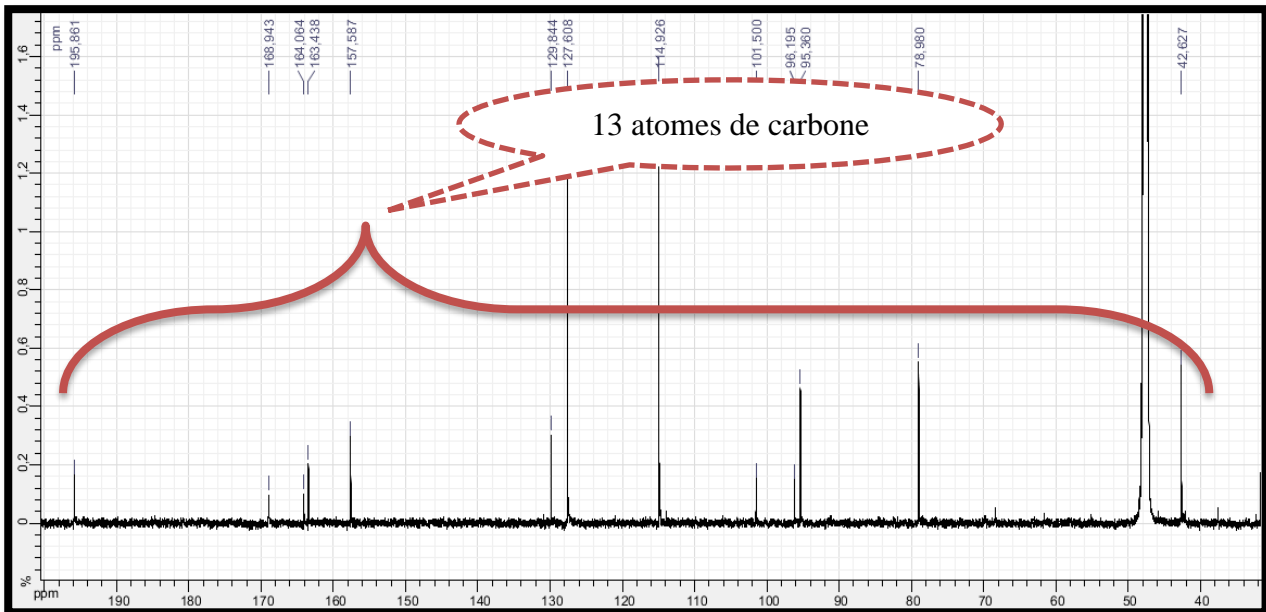
### V.3.A. Identification des composés isolés de la phase acétate d'éthyle

#### V.3.A.1. Élucidation structurale du composé F1

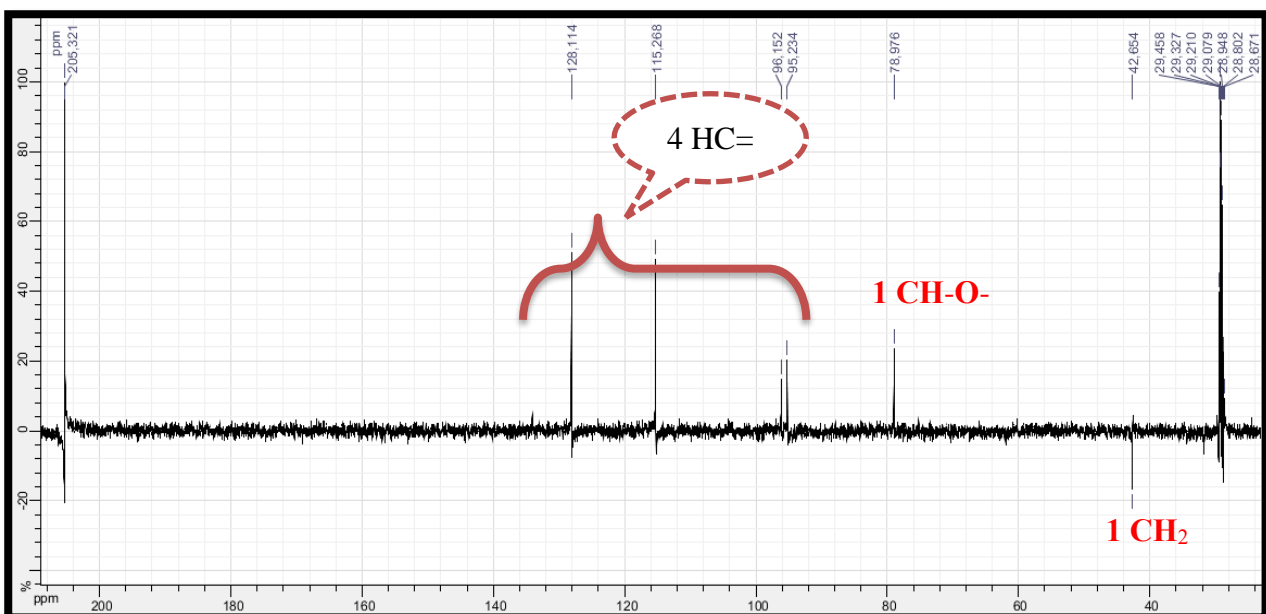


L'analyse des spectres RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz dans le MeOH- $d_4$ ) et DEPT 135° (150 MHz dans l'acétone- $d_6$ ) (Spectre V.36 et Spectre V.37, respectivement), montre la présence des 13 atomes de carbone, incluant :

- Sept carbones quaternaires hybridés sp<sup>2</sup> dont 1 caractéristique d'une fonction cétone.
- Cinq groupements CH dont quatre hybridés sp<sup>2</sup> et 1 hybridés sp<sup>3</sup> et oxygéné.
- Un groupement CH<sub>2</sub> hybridé sp<sup>3</sup>.



**Spectre V.36 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé **F1**



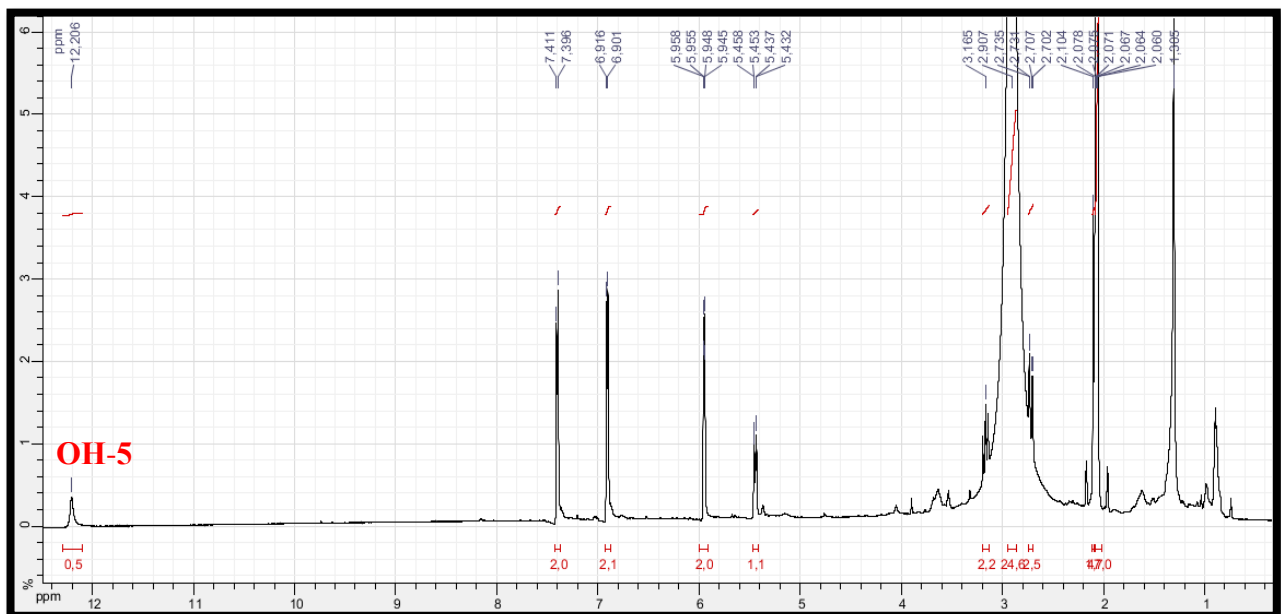
**Spectre V.37 :** Spectre DEPT  $135^\circ$  (150 MHz,  $\text{acétone-}d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé **F1**

L'examen du spectre RMN  $^1\text{H}$  (Spectre V.38) enregistré dans l'acétone- $d_6$  ainsi que ses spectres étalés (Spectre V.38.1 et V.38.2) montre qu'il s'agit d'un flavonoïde de type flavanone caractérisé par :

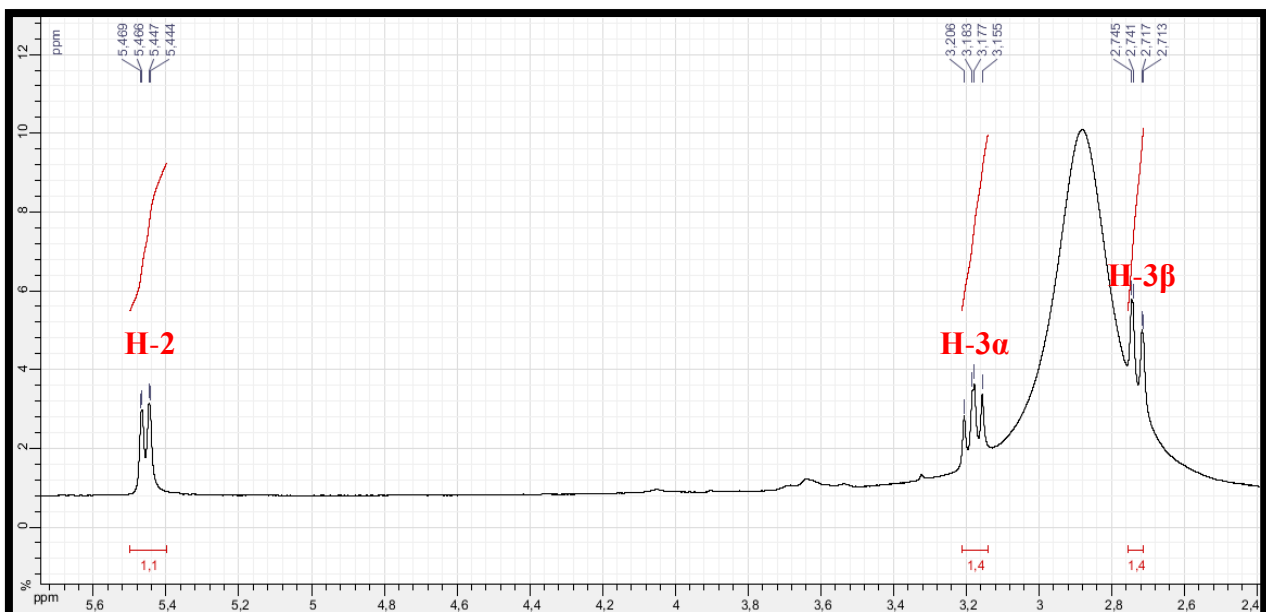
- Un doublet de doublets d'intégration 1 H, à  $\delta_{\text{H}}$  5,44 ( $J = 13,2 ; 2,4$  Hz) attribuable au proton H-2. Ce proton H-2 admet une orientation  $\beta$  compte tenu de la biogenèse de cette classe de substances naturelles.

- Un doublet de doublets d'intégration 1 H, à  $\delta_H$  3,16 ( $J = 16,0$  ; 13,2 Hz) attribuable au proton H-3 $\alpha$ .
- Un doublet de doublets d'intégration 1 H, à  $\delta_H$  2,71 ( $J = 16,0$  ; 2,4 Hz) attribuable au proton H-3 $\beta$ .
- Un singulet d'intégration 1H à  $\delta_H = 12,21$  ppm que l'on ne peut attribuer qu'au proton d'un OH en position 5 (OH-5).

La valeur 16 Hz de la constante de couplage, indique une couplage géminale entre les deux protons H-3 $\alpha$  et H-3 $\beta$ .



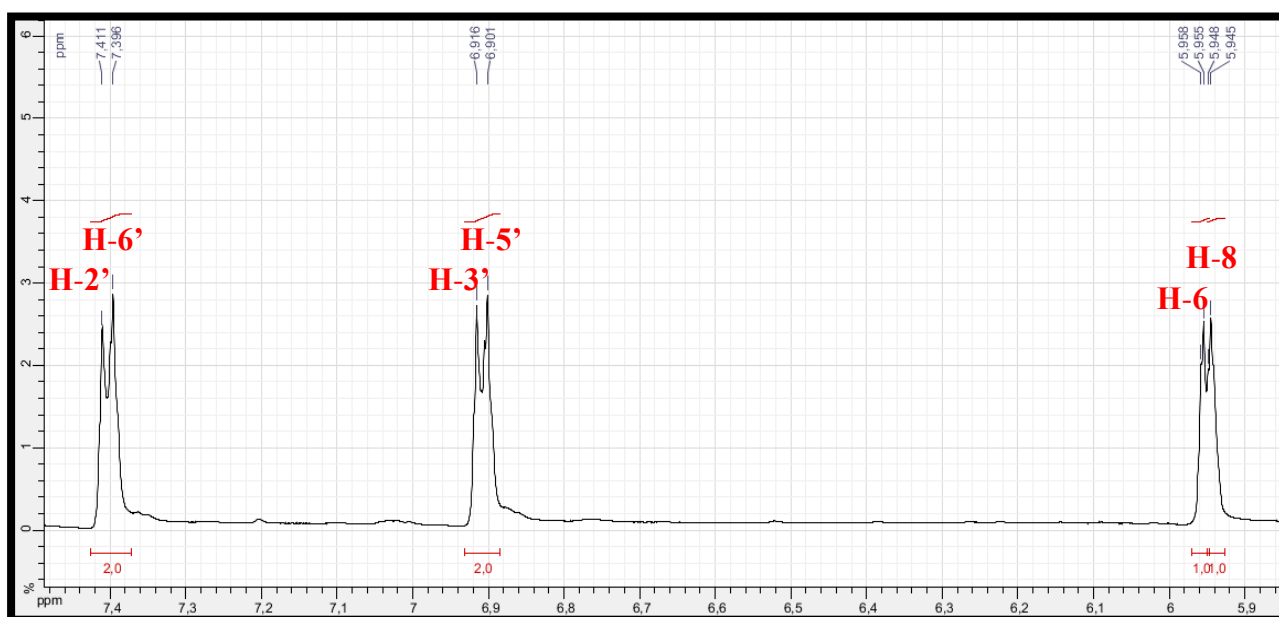
Spectre V.38 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, acétone- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé F1



Spectre V.38.1 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz, acétone- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé F1

En plus de ces signaux, le spectre RMN  $^1\text{H}$  montre :

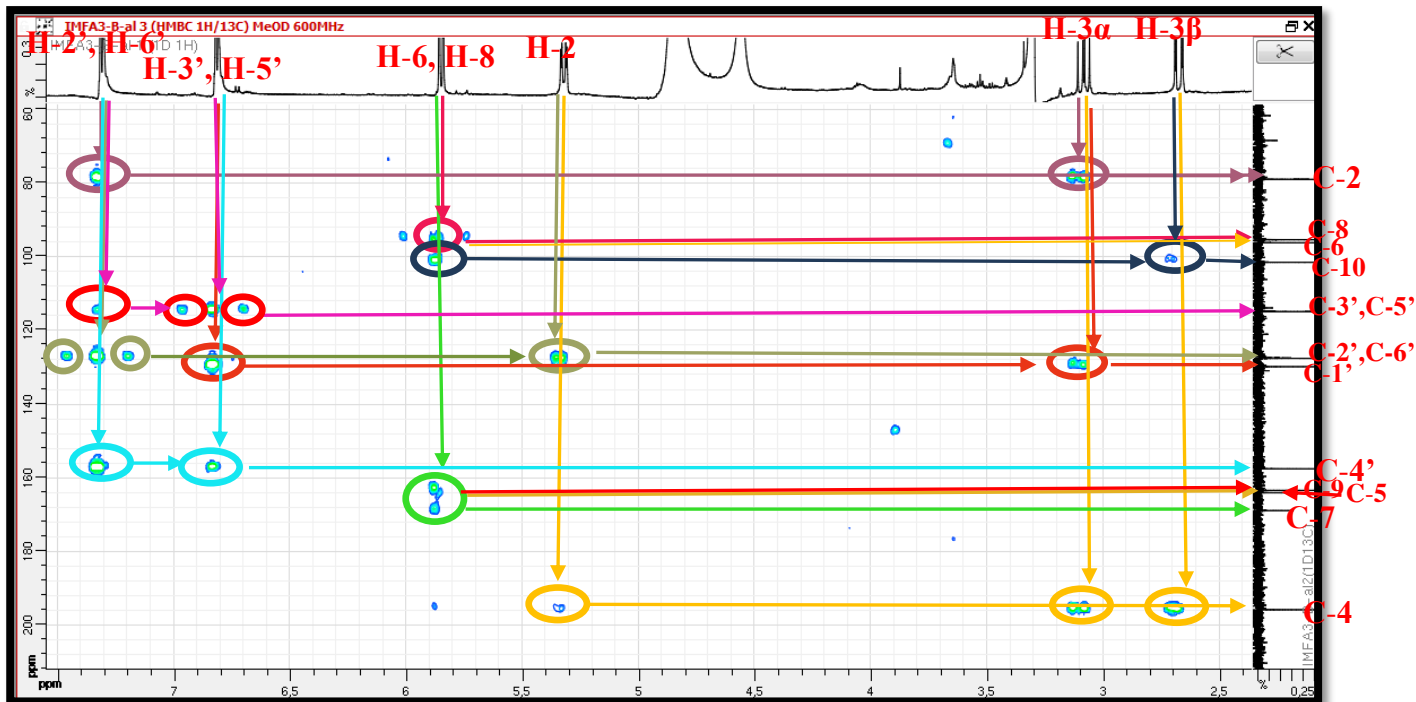
- Une *para*-substitution du noyau B déduite de l'existence de deux doublets d'intégration 2H chacun à  $\delta_{\text{H}} = 7,40$  ( $J = 8,0$  Hz) et 6,91 ppm ( $J = 8,0$  Hz), attribuables aux protons H-2', H-6' et H-3', H-5', respectivement.
- Une substitution du noyau A en position 7 déduite de la présence du OH-5 et deux doublets d'intégration 1H chacun avec la même constante de couplage ( $J = 2$  Hz) à  $\delta_{\text{H}} = 5,95$  et 5,96 ppm, attribuables aux protons H-8 et H-6, respectivement.



**Spectre V.38.2 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz, acétone- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé **F1**

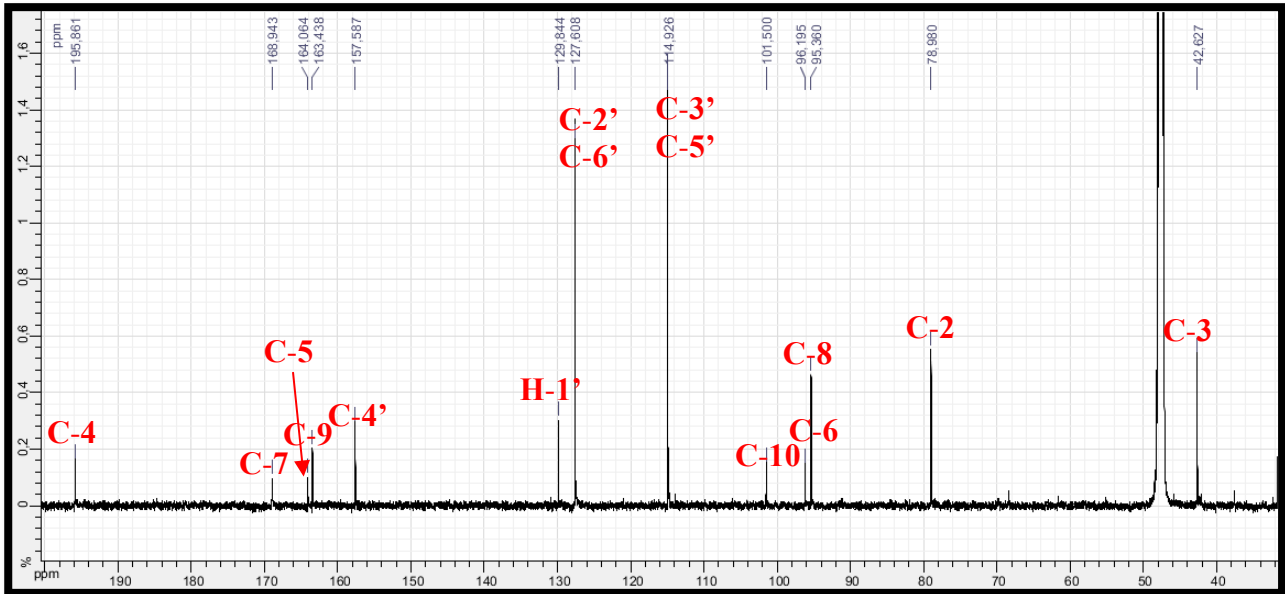
L'examen du spectre HMBC (Spectre V.39.1) montre une tache de corrélation des protons H-6 et H-8 avec le carbone quaternaire oxygéné résonant à  $\delta_{\text{C}} = 168,94$  ppm, permettant son attribution au C-7. L'un de ces deux protons, le proton H-8 montre une tache de corrélation avec un CH hybridé  $\text{sp}^2$  (d'après le spectre DEPT  $135^\circ$ ) résonant à  $\delta_{\text{C}} = 96,20$  ppm, ce carbone ne peut être que le C-6 du noyau A. Le même proton H-8 montre une autre tâche de corrélation avec le carbone oxygéné résonant à  $\delta_{\text{C}} = 163,44$  ppm permettant ainsi son attribution à C-9. Par ailleurs, le proton H-6 montre une tache de corrélation avec un CH hybridé  $\text{sp}^2$  (d'après le spectre DEPT  $135^\circ$ ) résonant à  $\delta_{\text{C}} = 95,36$  ppm, qui est obligatoirement C-8 du noyau A et les trois protons H-6, H-8 et H-3 $\beta$  permettent l'attribution de C-10 à la résonance à  $\delta_{\text{C}} = 101,50$  ppm. Alors que le H-6 mène sans ambiguïté à l'attribution du C-5 au signal à  $\delta_{\text{C}} = 164,06$  ppm. De même les protons H-3 $\alpha$ , H-6' et H-2' permettent l'attribution du C-2 à  $\delta_{\text{C}} = 78,98$  ppm (le seule CH-O hybridé  $\text{sp}^3$  d'après le spectre DEPT  $135^\circ$ ). L'attribution du signal du C-3 à  $\delta_{\text{C}} = 41,85$  ppm est déduite de l'analyse du spectre DEPT  $135^\circ$  qui montre un seul  $\text{CH}_2$  hybridé  $\text{sp}^3$ . D'autre part, les protons H-3 $\alpha$ , H-2' et H-6' mènent à la localisation du signal de C-1' à  $\delta_{\text{C}} = 129,84$  ppm. De même le proton H-2 permet

l'attribution de C-2' et C-6' aux 2 CH aromatiques magnétiquement équivalents résonant à  $\delta_c = 127,61$  ppm. Cette attribution est confirmée par la présence d'une tache d'autocorrélation des protons H-2' et H-6' avec les carbones magnétiquement équivalents résonant à  $\delta_c = 127,61$  ppm. De même les deux protons H-3' et H-5' mènent également à l'attribution de leurs carbones porteurs C-3' et C-5' à  $\delta_c = 114,93$  ppm grâce aux taches d'autocorrélation de ces protons observés dans le spectre HMBC. Les protons H-2' et H-6' mènent également à l'attribution de C-4' à la résonance à  $\delta_c = 157,59$  ppm. Le carbone C-4 de la flavanone a été attribué à la résonance à  $\delta_c = 195,86$  ppm. Cette attribution est confirmée par les corrélations entre ce carbone et les protons H-2, H-3 $\alpha$  et H-3 $\beta$ .

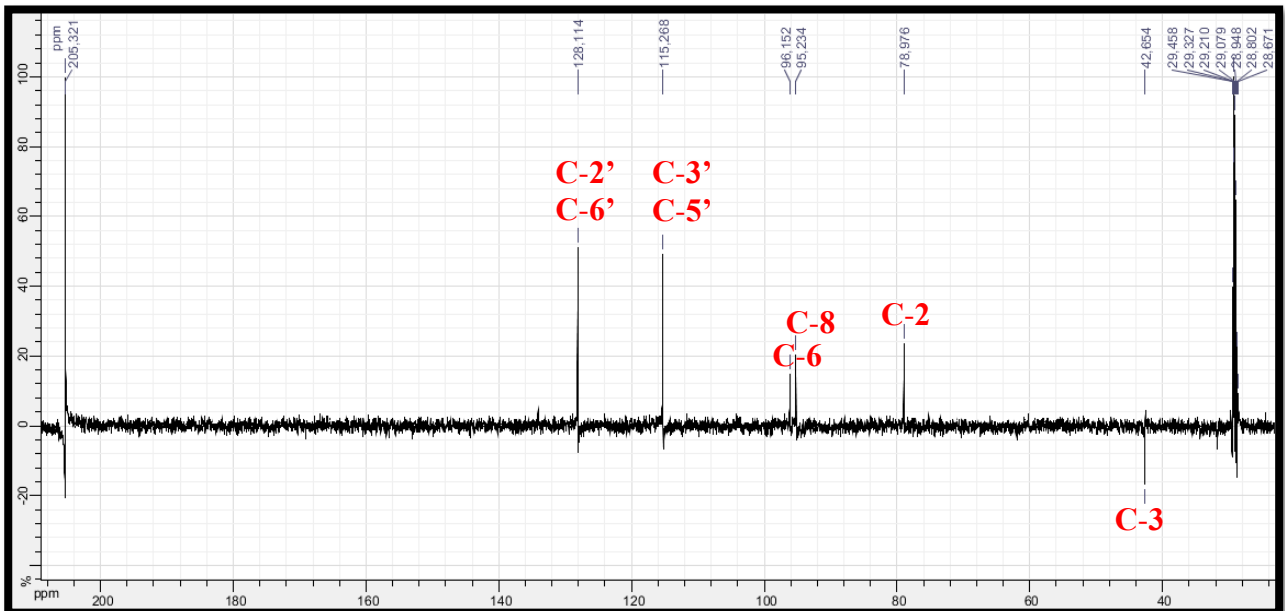


**Spectre V.39.1** : Spectre HMBC étalé (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>,  $\delta$  ppm) du composé **F1**

L'analyse des spectres RMN <sup>13</sup>C (Spectre V.36) et DEPT 135° (Spectre V.37) consolide ces propositions.



Spectre V.36 : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz,  $\text{MeOH-}d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé F1



Spectre V.37 : Spectre DEPT 135° (150 MHz,  $\text{acétone-}d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé F1

La combinaison de l'ensemble de ces données mènent à la structure : **5,7,4'-trihydroxyflavanone** connue sous le nom **naringénine** (Jeon et al., 2008; Maltese et al., 2009) (Figure V.30). La stéréochimie de la position C-2 est déterminée (2R) grâce à la biogenèse des flavanones qui impose une orientation  $\alpha$  au cycle B. Cette molécule est bien entendu, signalée pour la première fois dans la famille Frankeniaceae, elle est douée d'activités antioxydante, antitumorale et cytotoxique (Jeon et al., 2008; Kanno et al., 2005; Rice-Evans et al., 1997). Cette molécule est responsable d'interactions avec des médicaments, par inhibition du CYP3A4 (Pingili et al., 2016).

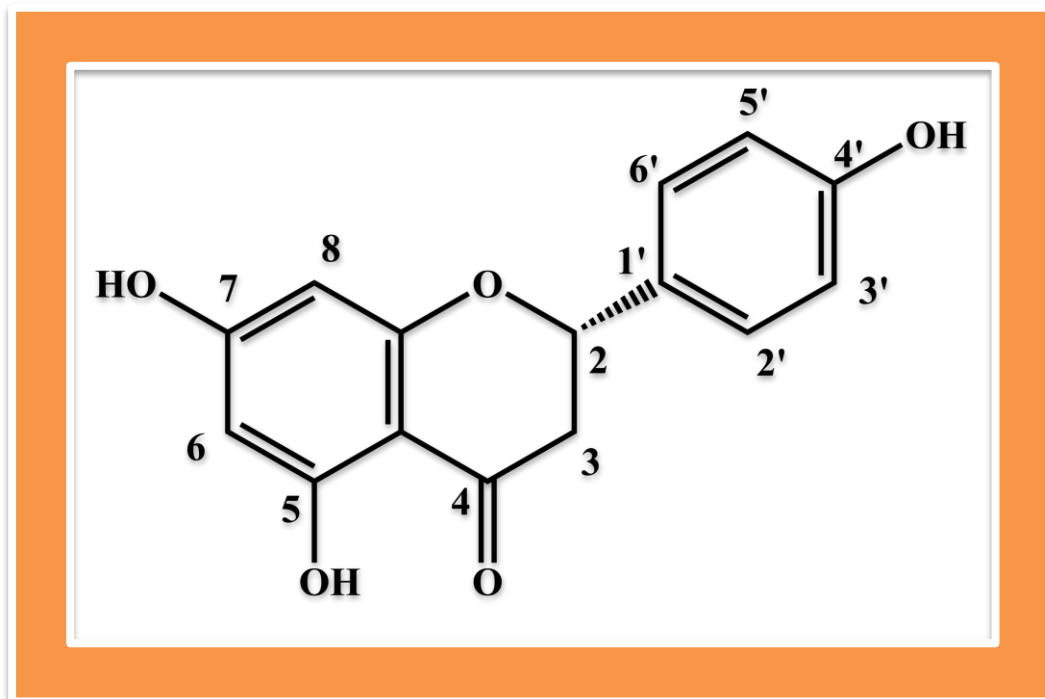


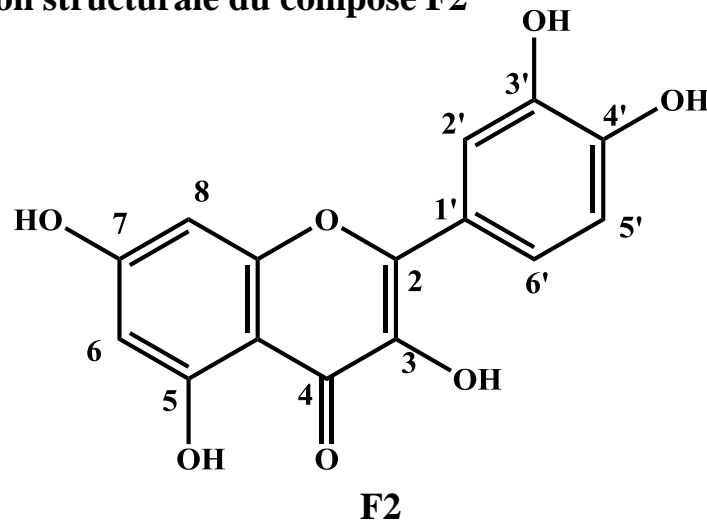
Figure V.30 : Structure finale du composé **F1**, naringénine

Les résultats de la RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  sont rassemblés dans le tableau V.8.

Tableau V.8 : Données de la RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **F1**

Position	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	Multiplicité, $J$ (Hz)
<b>2</b>	78,98 (CH)	5,44	( <i>dd</i> , 13,2 ; 2,4)
<b>3<math>\alpha</math></b>	41,85 (CH <sub>2</sub> )	3,16	( <i>dd</i> , 16 ; 13,2)
<b>3<math>\beta</math></b>		2,71	( <i>dd</i> , 16 ; 2,4)
<b>4</b>	195,86 (C)	-	-
<b>5</b>	164,06 (C)	-	-
<b>6</b>	96,20 (CH)	5,95	( <i>d</i> , 2)
<b>7</b>	168,94 (C)	-	-
<b>8</b>	95,36 (CH)	5,94	( <i>d</i> , 2)
<b>9</b>	163,44(C)	-	-
<b>10</b>	101,50 (C)	-	-
<b>1'</b>	129,84 (C)	-	-
<b>2', 6'</b>	127,61 (CH)	7,40	( <i>d</i> , 8)
<b>3', 5'</b>	114,93 (CH)	6,91	( <i>d</i> , 8)
<b>4'</b>	157,59 (C)	-	-
<b>OH-5</b>	-	12,21	( <i>s</i> )

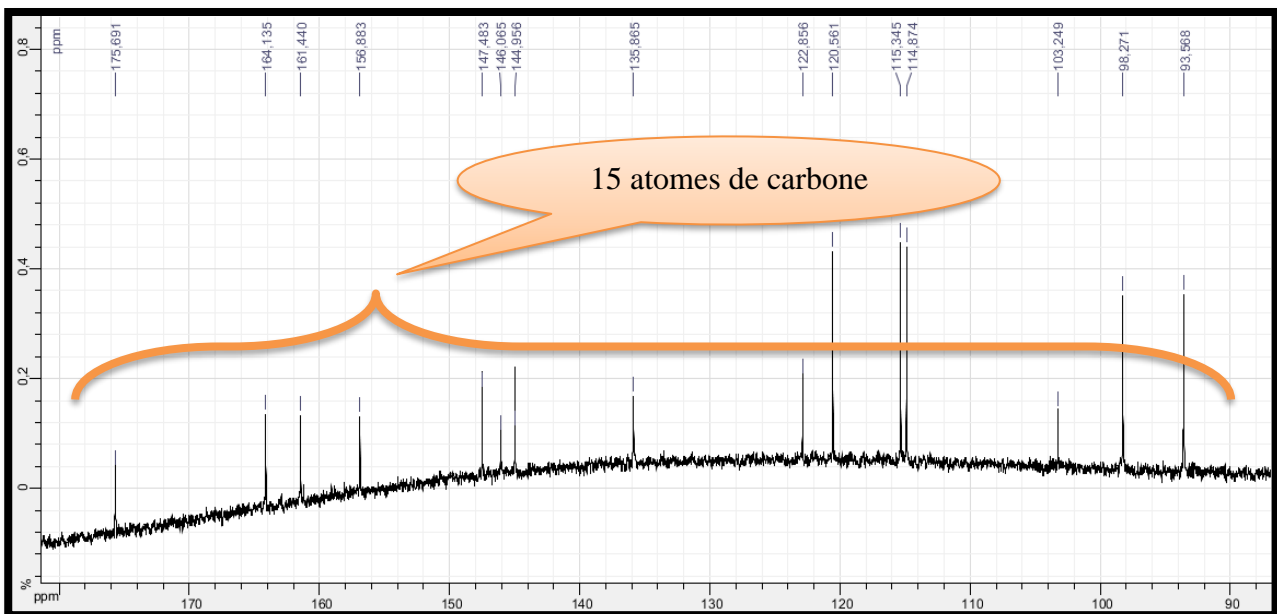
## V.3.A.2. Élucidation structurale du composé F2



Le composé **F2** se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans l'acétone et méthanol. La fluorescence jaune de ce produit sous la lumière de Wood (365 nm) est caractéristique d'un flavonol (3-OH libre) (Harborne, 2013).

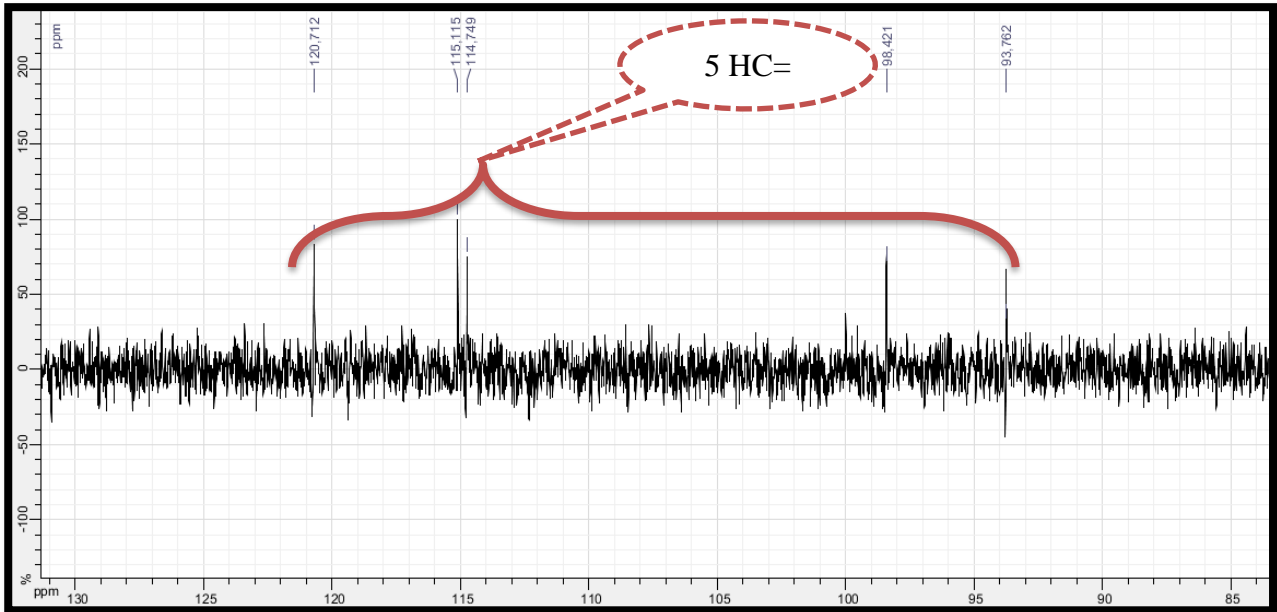
L'analyse du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, acétone- $d_6$ ) et DEPT 135° (150 MHz, MeOH- $d_4$ ), (Spectre V.38 et Spectre V.39, respectivement), montre la présence des 15 atomes de carbone, incluant :

- dix carbones quaternaires hybridés  $\text{sp}^2$  dont 1 caractéristique d'une fonction cétone .
- Cinq groupements CH hybridés  $\text{sp}^2$ .



**Spectre V.38** : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, acétone- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé **F2**

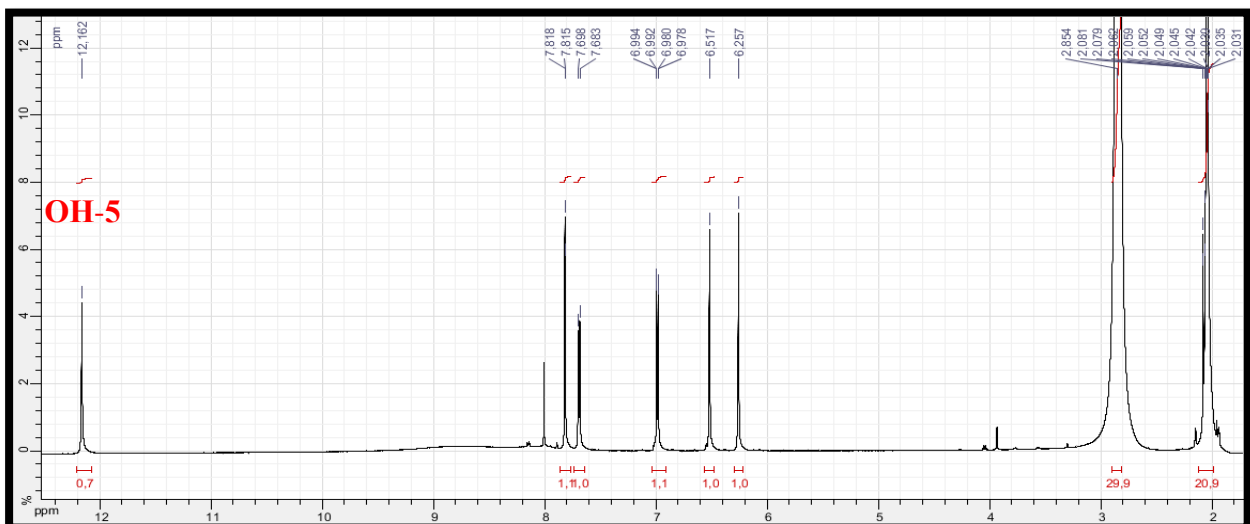




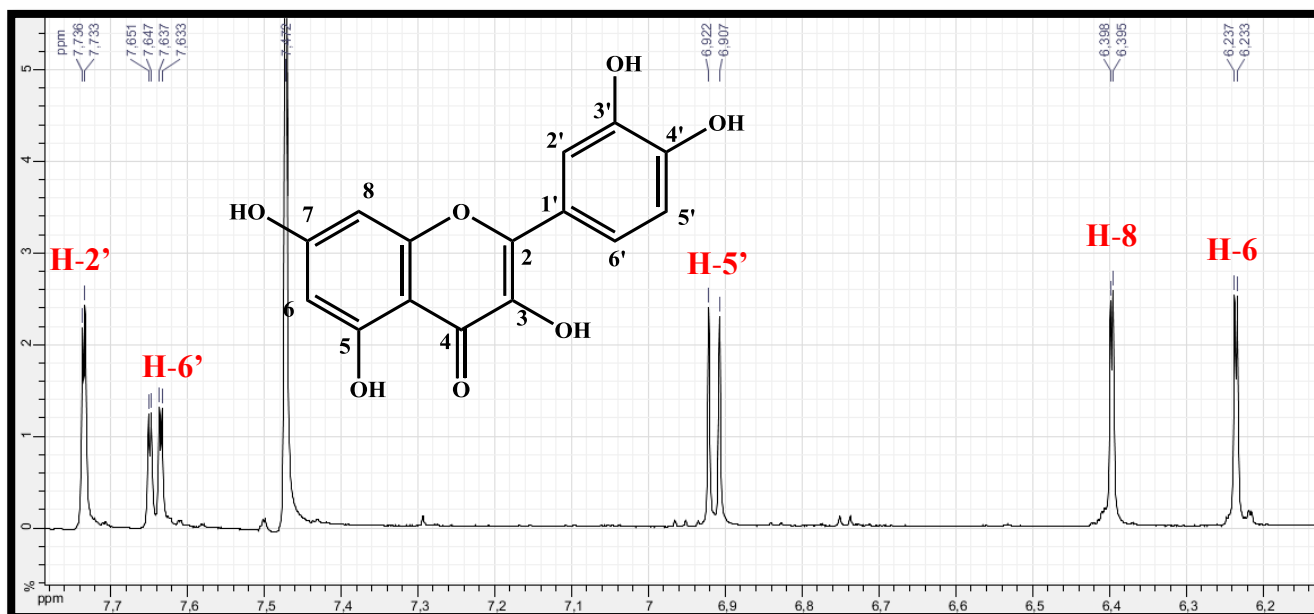
**Spectre V.39** : Spectre DEPT (150 MHz, MeOH- $d_4$ ,  $\delta$  ppm) du composé **F2**

L'examen des spectres RMN  $^1\text{H}$  enregistrés dans l'actéone- $d_6$  (Spectre V.40.) et dans le chloroforme- $d$  (Spectre V.41) et (Spectre V.41.1) montre la présence des signaux caractéristiques d'un squelette de type flavone que l'on peut identifier par :

- Un singulet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 12,16$  ppm que l'on ne peut attribuer qu'au proton d'un OH en position 5 (OH-5).
- Une tri-substitution du noyau B déduite de l'existence d'un doublet dédoublé ( $J = 8,6 ; 2,0$  Hz) d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7,64$  ppm et deux doublets d'intégration 1H chacun à  $\delta_{\text{H}} = 7,73$  ( $J = 2,0$  Hz) et 6,91 ppm ( $J = 8,6$  Hz), attribuables aux protons H-6', H-2' et H-5', respectivement.
- Une substitution du noyau A en position 7 déduite de la présence du OH-5 et de deux doublets d'intégration 1H chacun avec la même constante de couplage ( $J = 1,9$  Hz) à  $\delta_{\text{H}} = 6,40$  et 6,24 ppm, attribuables aux protons H-8 et H-6 respectivement.

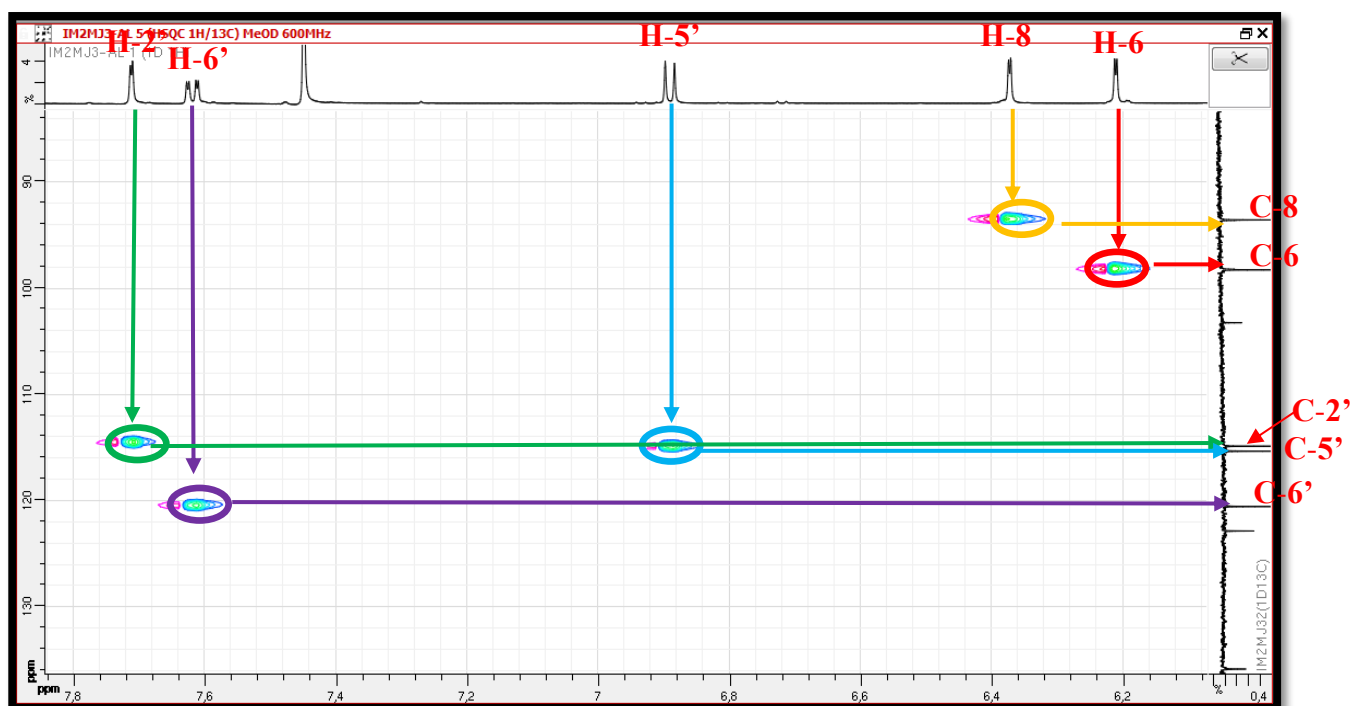


**Spectre V.40** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz, acétone- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé **F2**



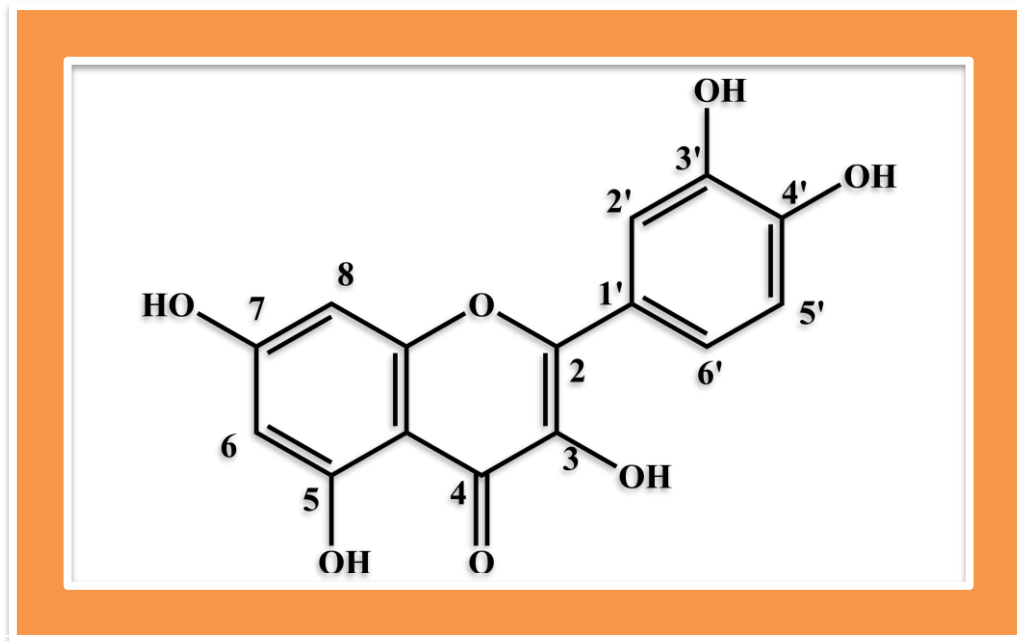
Spectre V.41.1 : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (600 MHz,  $\text{CHCl}_3-d$ ,  $\delta$  ppm) du composé **F2**

L'examen du spectre HSQC (Spectre V.42) permet de localiser C-2' à  $\delta_C = 115,35$  ppm ; C-6' à  $\delta_C = 121,56$  ppm ; C-5' à  $\delta_C = 114,87$  ppm ; C-8 à  $\delta_C = 93,57$  ppm et C-6 à  $\delta_C = 98,27$  ppm.



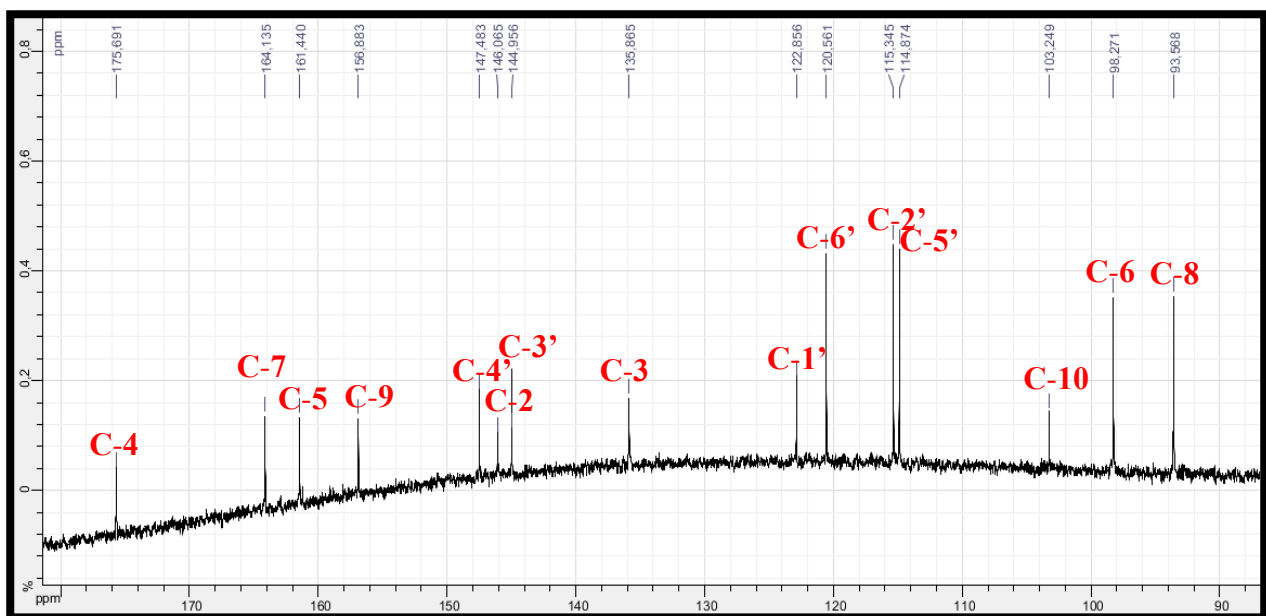
Spectre V.42 : Spectre HSQC (600 MHz,  $\text{CHCl}_3-d$ ,  $\delta$  ppm) du composé **F2**

La combinaison des résultats de la RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ainsi que ceux du spectre HSQC mène à la structure de la **quercétine** reportée dans la Figure V.31. Cette molécule est considérée comme l'un des antioxydants les plus puissants. La quercétine ainsi que la rutine sont reconnues pour être parmi les plus actifs des flavonoïdes, ses propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antihistaminiques (antiallergiques) ont été approuvées au cours de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* (Erlund, 2004; Formica et Regelson, 1995; Harwood et al., 2007).



**Figure V.31** : Structure finale du composé **F2**, quercétine

Les résultats de notre analyse et notamment ceux du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (Spectre V.43) sont en excellent accord avec ceux de la littérature (Li et al., 2008). Les données de la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  sont regroupées dans le tableau V.9.



**Spectre V.43** : Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (150 MHz, acétone- $d_6$ ,  $\delta$  ppm) du composé **F2**

**Tableau V.9 :** Données de la RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  du composé **F2**

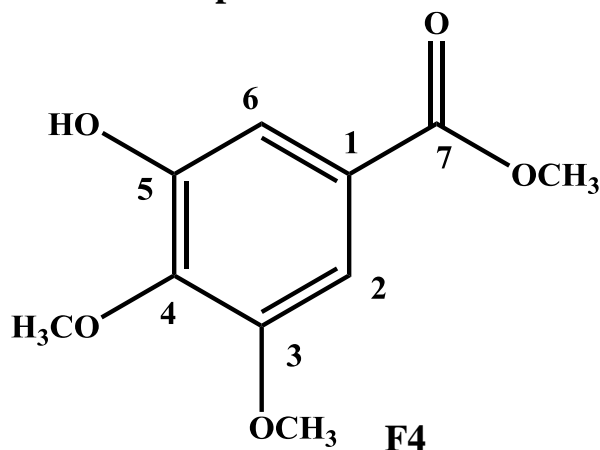
Position	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	Multiplicité, $J$ (Hz)
<b>2</b>	146,07 (C)	-	-
<b>3</b>	135,87 (C)	-	-
<b>4</b>	175,69 (C)	-	-
<b>5</b>	161,44 (C)	-	-
<b>6</b>	98,27 (CH)	6,24	( <i>d</i> , 1,9)
<b>7</b>	164,14 (C)	-	-
<b>8</b>	93,57 (CH)	6,40	( <i>d</i> , 1,9)
<b>9</b>	156,88 (C)	-	-
<b>10</b>	103,25 (C)	-	-
<b>1'</b>	122,86 (C)	-	-
<b>2'</b>	115,35 (CH)	7,73	( <i>d</i> , 2)
<b>3'</b>	144,96 (C)	-	-
<b>4'</b>	147,48 (C)	-	-
<b>5'</b>	114,87 (CH)	6,91	( <i>d</i> , 8,6)
<b>6'</b>	121,56 (CH)	7,64	( <i>dd</i> , 8,6 ; 2)
<b>OH-5</b>	-	12,21	( <i>s</i> )

### V.3.A.3. Conclusion

L'étude phytochimique réalisée sur l'extrait acétate d'éthyle des parties aériennes de *Frankenia thymifolia* Desf. a conduit à l'isolement de 3 produits dont 2 identifiés, parmi lesquelles 1 nouveau dans la famille, il s'agit de : la naringénine (**F1**) et la quercétine (**F2**).

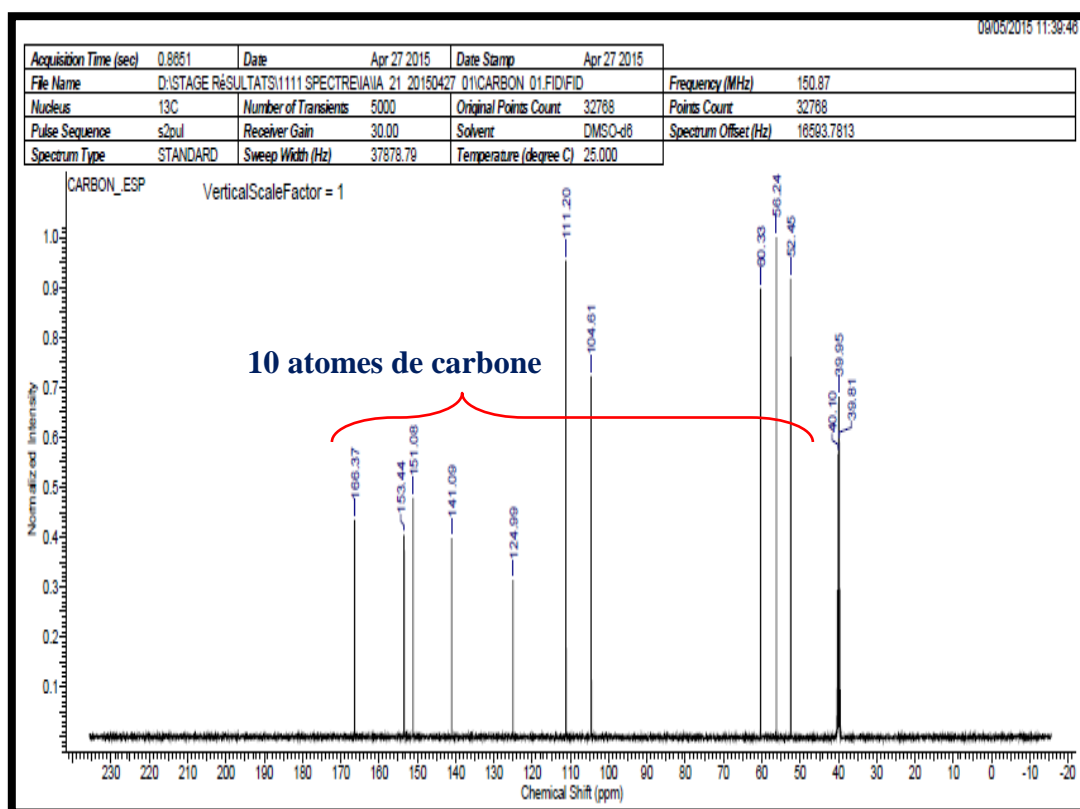
### V.3.B. Identification des composés isolés de la phase *n*-butanol

#### V.3.B.1. Élucidation structurale du composé **F4**



Les spectres de RMN  $^{13}\text{C}$  (Spectre V.44), DEPT (Spectre V.45) montrent la présence de 10 atomes de carbone dans cette molécule et permettent de les répartir en :

- 3  $\text{CH}_3$  dont les déplacements chimiques  $\delta_{\text{C}} = 52,45$  ;  $56,24$  et  $60,33$  ppm indiquent qu'il s'agit de 3 groupements méthoxyles.
- 2  $\text{CH}$  dont les déplacements chimiques  $\delta_{\text{C}} = 104,61$  et  $111,20$  ppm indiquent qu'il s'agit de 2  $\text{CH}$  aromatiques.
- 5 carbones quaternaires ( $\text{C}_q$ ) dont les déplacements  $\delta_{\text{C}} = 166,37$  ;  $153,44$  ;  $151,08$  ;  $141,09$  et  $124,99$  ppm indiquent pour le premier qu'il s'agit d'un carbonyle d'un groupement ester, les 3 suivants sont caractéristiques de carbones aromatiques oxygénés, le dernier est caractéristique d'un carbone quaternaire non oxygéné (lié à un atome de carbone).



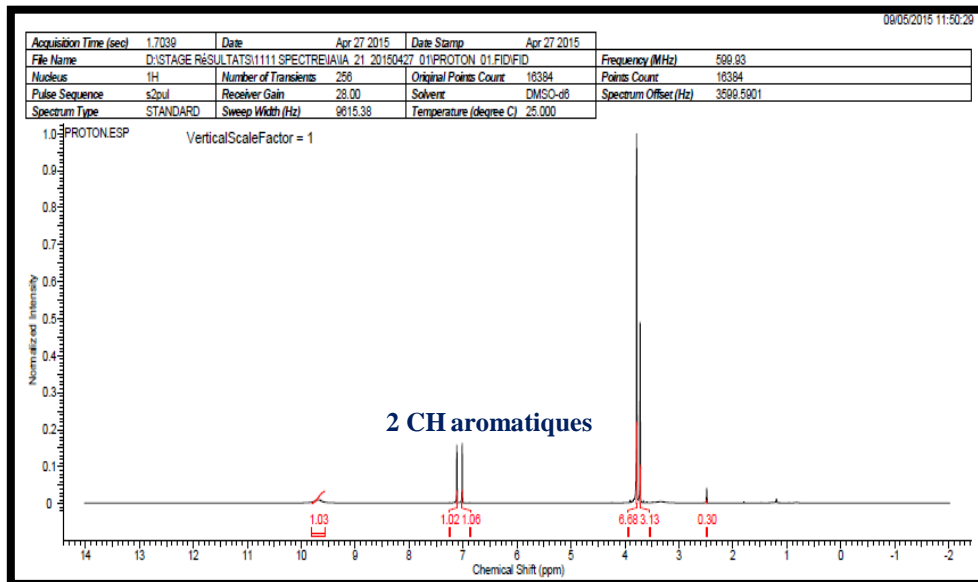
**Spectre V.44 :** Spectre RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO- $d_6$ , 150 MHz,  $\delta$  ppm) du composé **F4**

Les analyses simultanées des spectres RMN  $^1\text{H}$  (Spectre V.46) et HSQC (Spectre V.47) permettent d'attribuer d'une part, les carbones des 3 groupements méthoxyles à leurs protons respectifs, notamment :

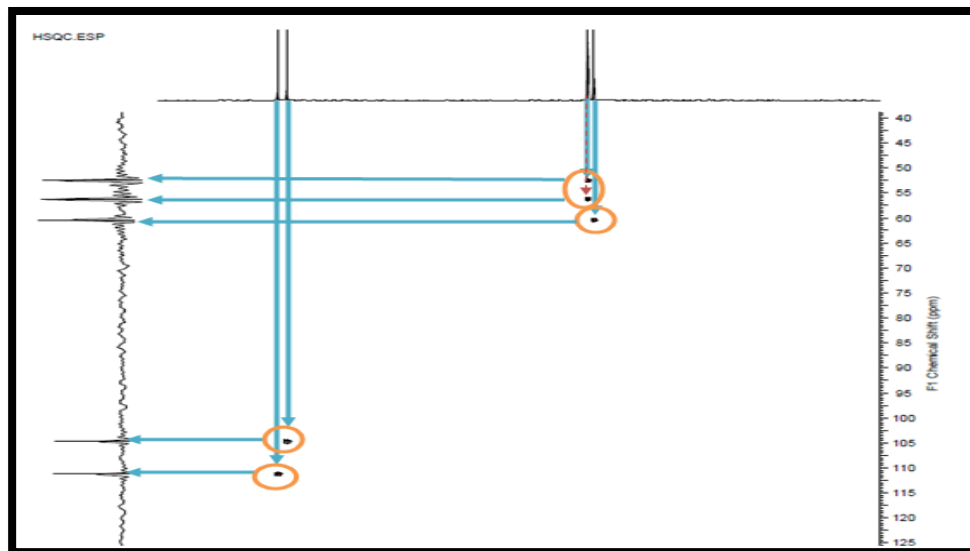
- Le carbone à  $\delta_{\text{C}} = 52,45$  ppm aux protons du méthoxyle à  $\delta_{\text{H}} = 3,79$  ppm.
- Le carbone à  $\delta_{\text{C}} = 56,24$  ppm aux protons du méthoxyle à  $\delta_{\text{H}} = 3,79$  ppm.

- Le carbone à  $\delta_C = 60,33$  ppm aux protons du méthoxyle à  $\delta_H = 3,72$  ppm.

D'autre part, les carbones des deux CH aromatiques à leurs protons respectifs, notamment le CH à  $\delta_C = 104,61$  ppm au proton à  $\delta_H = 7,02$  ppm, et le CH à  $\delta_C = 111,20$  ppm au proton à  $\delta_H = 7,12$  ppm.



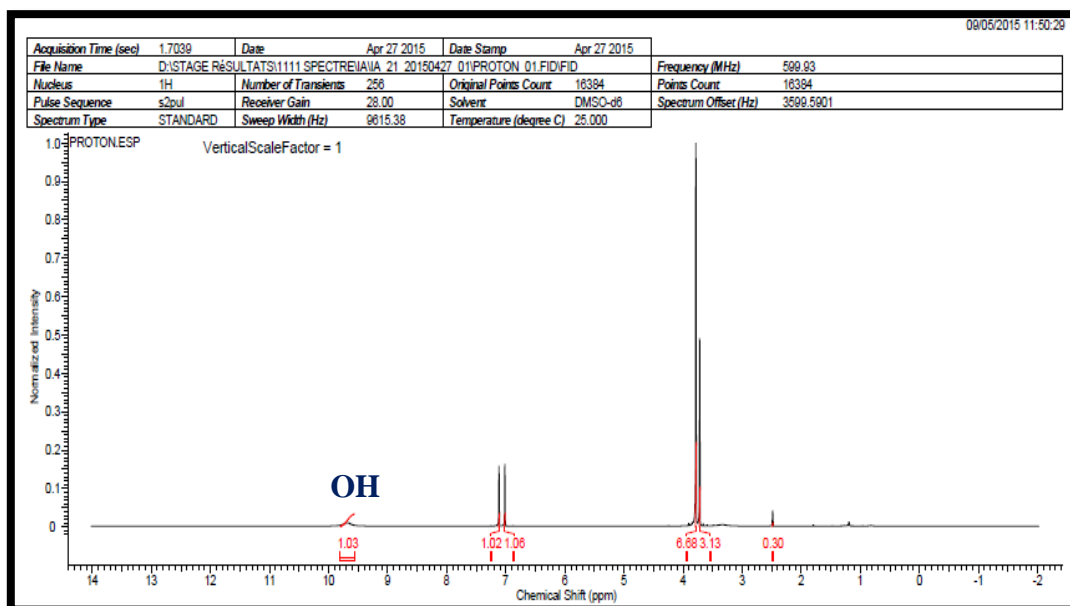
**Spectre V.46 :** Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz,  $\delta$  ppm) du composé **F4**



**Spectre V.47 :** Spectre HSQC (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz) du composé **F4**

Un décompte de l'ensemble des atomes invoqués permet de déduire une formule brute partielle en : **C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>O<sub>5</sub>**.

L'examen approfondi du spectre RMN <sup>1</sup>H (Spectre V.46) permet de relever un signal sous forme d'un massif d'intégration 1H à  $\delta_H = 9,8$  ppm ce signal est caractéristique d'un groupement OH phénolique.

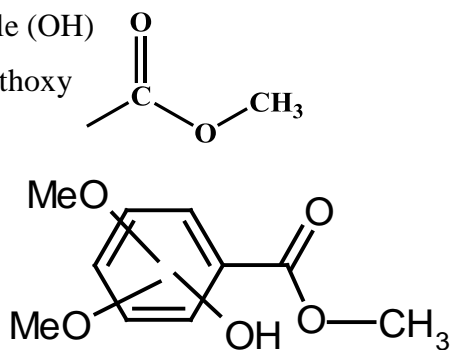


**Spectre V.46** : Spectre RMN <sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz, δ ppm) du composé **F4**

De ce fait la formule brute de cette molécule est: **C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>** soit une molécule comportant 5 degrés d'insaturation ( $\Omega = 10 + 1 - (12/2) = 5$ ).

Cette formule brute et l'ensemble des données de la RMN sont compatibles avec la présence d'un noyau aromatique tétrasubstitué (Figure V.32), ces substituants ne peuvent par conséquent être que :

- 2 méthoxyles (2 O-CH<sub>3</sub>)
- Un groupement hydroxyle (OH)
- Un groupement carbométhoxy



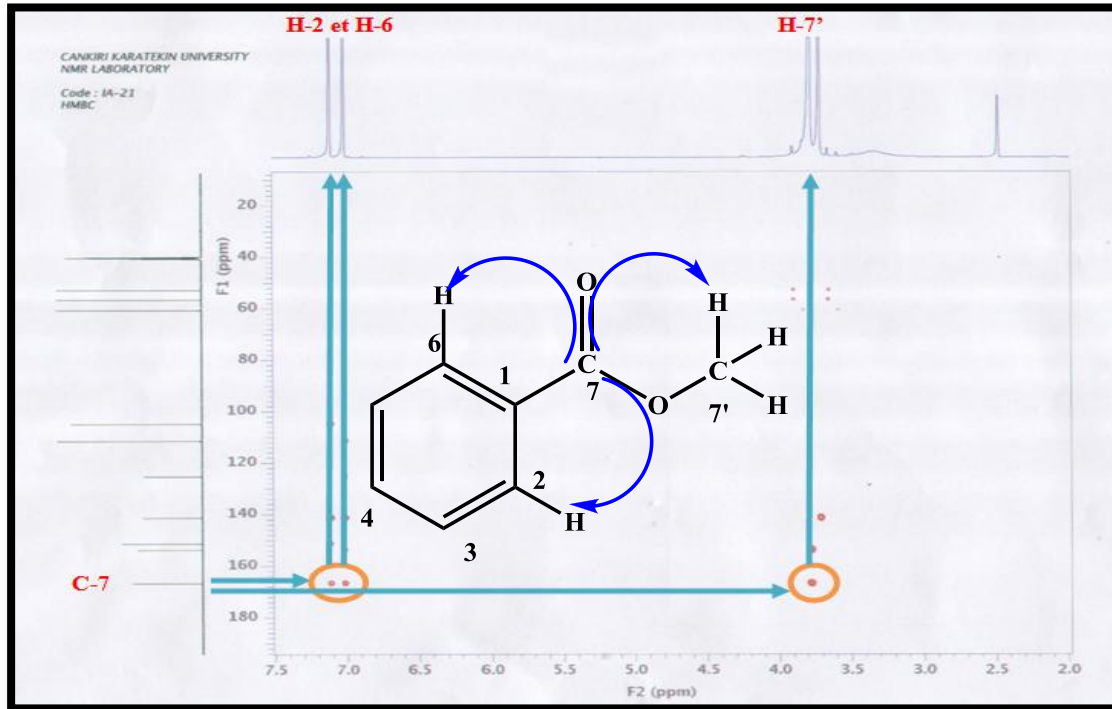
**Figure V.32** : Structure partielle du composé **F4**

Étant donnée l'inéquivalence magnétique des carbones aromatiques, il est clair que cette molécule n'admet aucun élément de symétrie. Le positionnement des substituants O-CH<sub>3</sub> et OH se fera selon les résultats de l'analyse du spectre HMBC (Spectre V.48.1), qui montre en effet :

- Une corrélation nette entre les protons d'un des méthoxyles à  $\delta_H = 3,79$  ppm ( $\delta_C = 52,62$  ppm) et le carbone du carbonyle à  $\delta_C = 166,37$  ppm ce qui confirme bien la présence du groupement carbométhoxy.

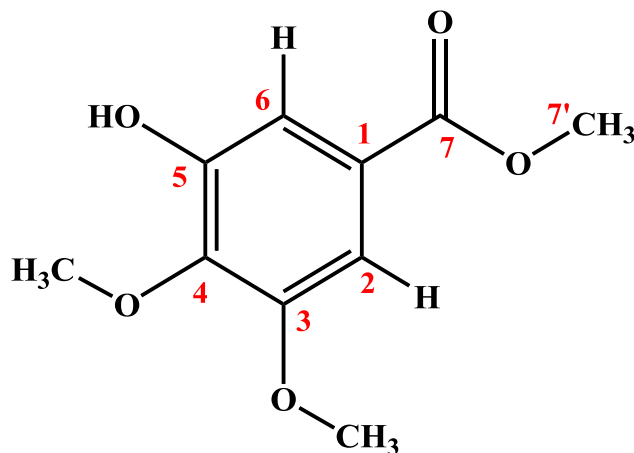
- Le carbonyle du groupement carbométhoxy montre des corrélations nettes avec les deux protons aromatiques ce qui les place en ortho et ortho prime par rapport à lui sur le noyau aromatique.

En numérotant le carbone aromatique porteur de ce groupement carbométhoxy C-1 nous pouvons donc numéroté ces deux CH, C-2 et C-6, le carbone du carbonyle C-7 et le carbone du méthoxyle qu'il porte C-7', ainsi il apparait clairement que les positions C-3, C-4 et C-5 sont oxygénées.



**Spectre V.48.1** : Spectre HMBC étalé (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz) du composé **F4**

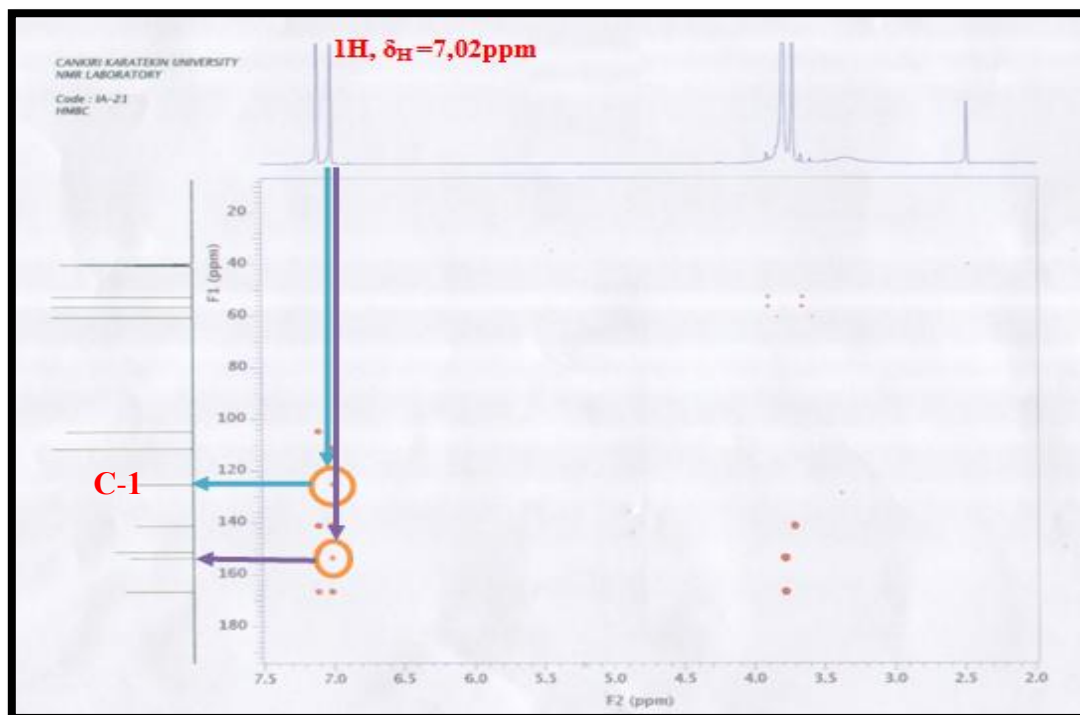
Suite à l'inéquivalence magnétique de H-2 et H-6, il est clair que les deux méthoxyles doivent être en position ortho, de ce fait la position C-4 est obligatoirement méthoxylée. Il en sera de même pour la position C-3. L'hydroxyle pourra alors être placé en position C-5 comme reporté dans la Figure V.33.



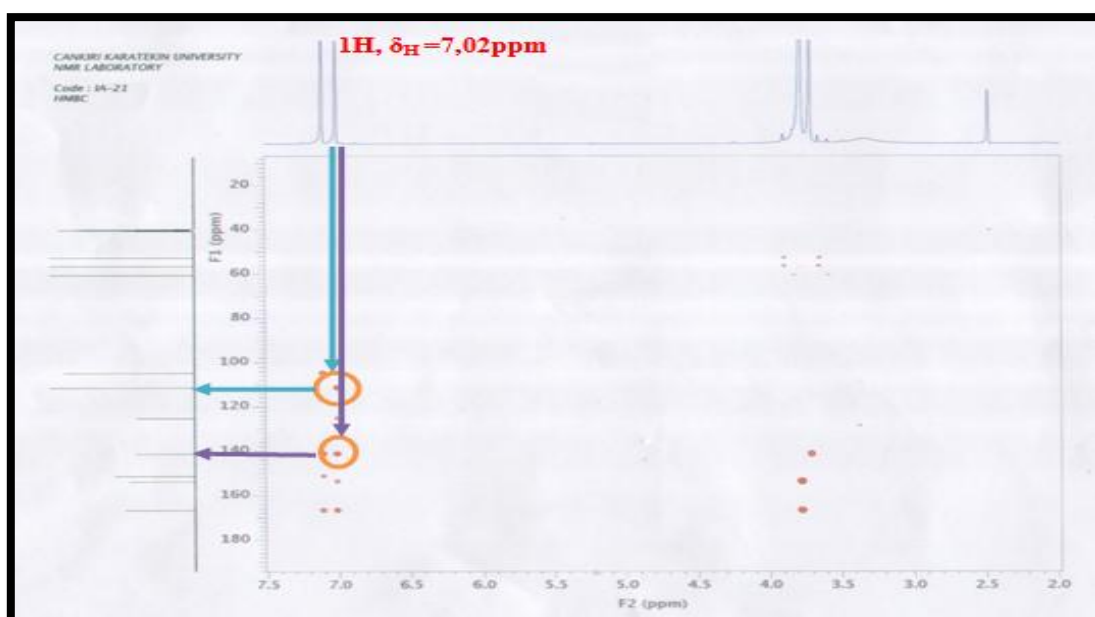
**Figure V.33** : Structure finale du composé **F4**



L'attribution de l'ensemble des atomes de carbone peut être achevée en continuant notre analyse sur le spectre HMBC. Sur ce spectre le proton à  $\delta_H = 7,02$  ppm montre des taches de corrélation avec le carbone C-1 à  $\delta_C = 124,99$  ppm, le carbone à  $\delta_C = 111,20$  ppm soit le carbone porteur de l'autre proton et les deux carbones quaternaires oxygénés à  $\delta_C = 141,09$  et  $\delta_C = 153,44$  ppm (Spectre V.48.2).

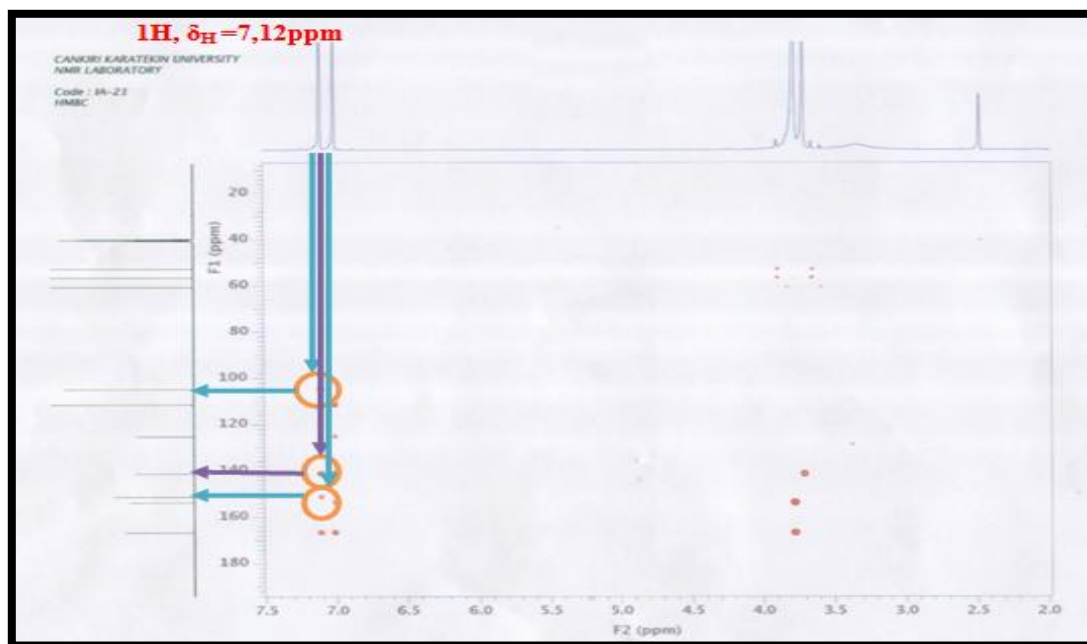


Spectre V.48.2 : Spectre HMBC étalé (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz) du composé F4



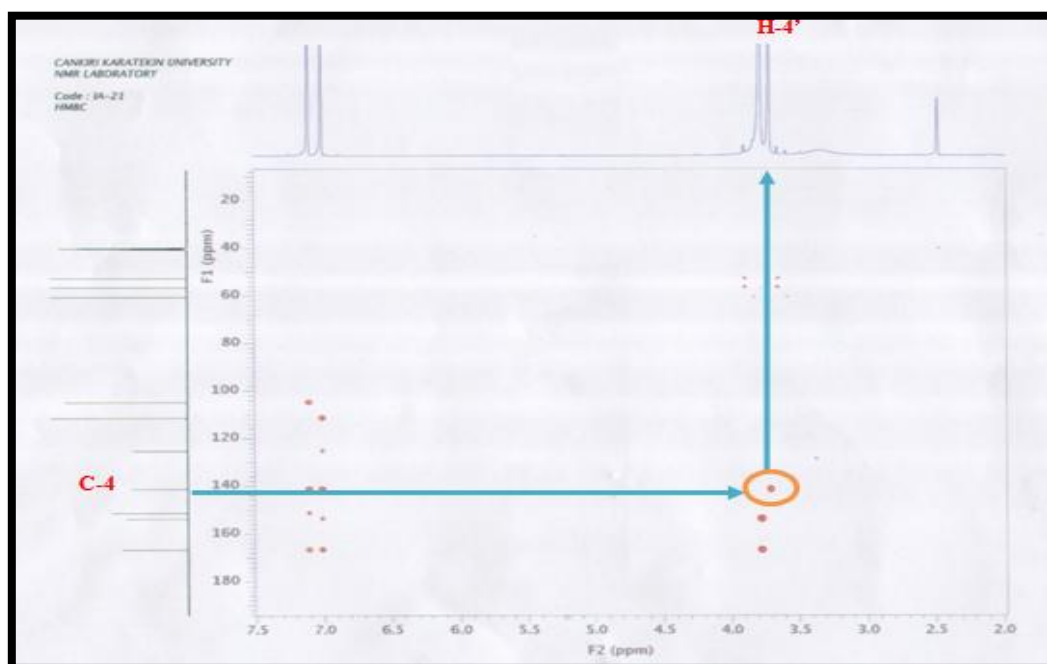
Spectre V.48.2 : Spectre HMBC étalé (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz) du composé F4

Quant au proton à  $\delta_H = 7,12$  ppm, il montre des taches de corrélation avec le carbone porteur de l'autre proton à  $\delta_C = 104,61$  ppm et les deux carbones quaternaires oxygénés à  $\delta_C = 141,09$  et  $\delta_C = 151,08$  ppm (Spectre V.48.2).



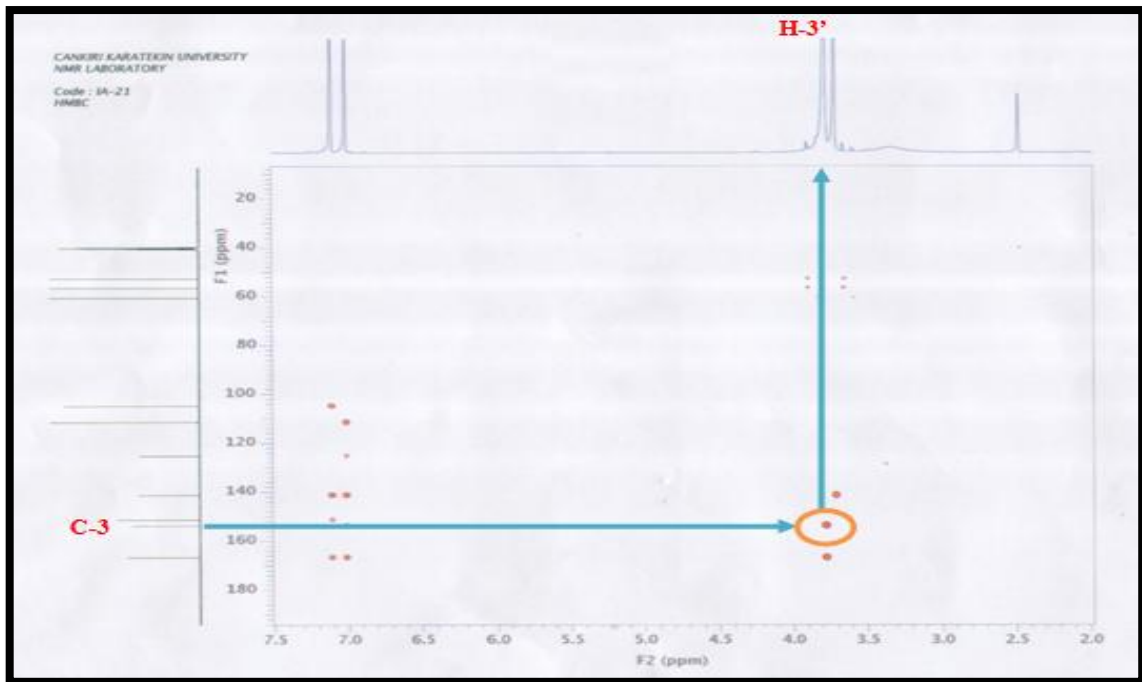
**Spectre V.48.2 :** Spectre HMBC étalé (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz) du composé F4

Ces observations permettent d'attribuer le carbone à  $\delta_C = 141,09$  à la position C-4. La détermination de C-4 permet d'attribuer le méthoxyle en C-4 grâce à la corrélation entre ses protons et ce carbone. Ceci est en effet clair, car les protons de ce méthoxyle H<sub>3-4'</sub> à  $\delta_H = 3,72$  ppm ( $\delta_C = 60,33$ ppm) montre une belle tache de corrélation avec ce carbone (Spectre 48.2).



**Spectre V.48.2 :** Spectre HMBC étalé (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 600 MHz) du composé F4

Les deux carbones quaternaires C-5 porteur de l'hydroxyle et C-3 porteur du méthoxyle seront différencier grâce à la corrélation attendue entre l'un deux et les protons H<sub>3</sub>-3' l'autre méthoxyle à  $\delta_H = 3,79$  ppm ( $\delta_C = 56,24$  ppm). En effet, on relève aisément une corrélation entre ces protons et le carbone à  $\delta_C = 153,44$  ppm que l'on attribue alors sans ambiguïté à C-3 (Spectre 48.2). Le carbone à  $\delta_C = 151,08$  ppm sera par conséquent attribué à la position C-5.



Cette analyse structurale mène à un dérivé de l'acide gallique connu sous le nom de 3,4-diméthoxy-5-hydroxy benzoate de méthyle ou gallate de méthyle 3,4-diméthyl ether (Figure V.34).

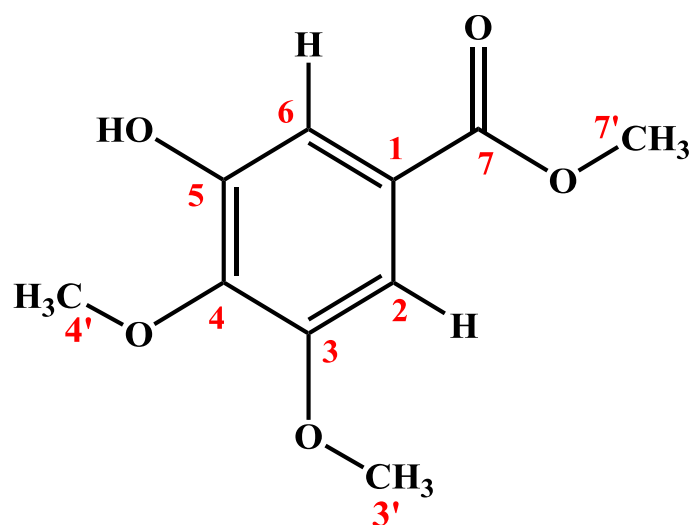
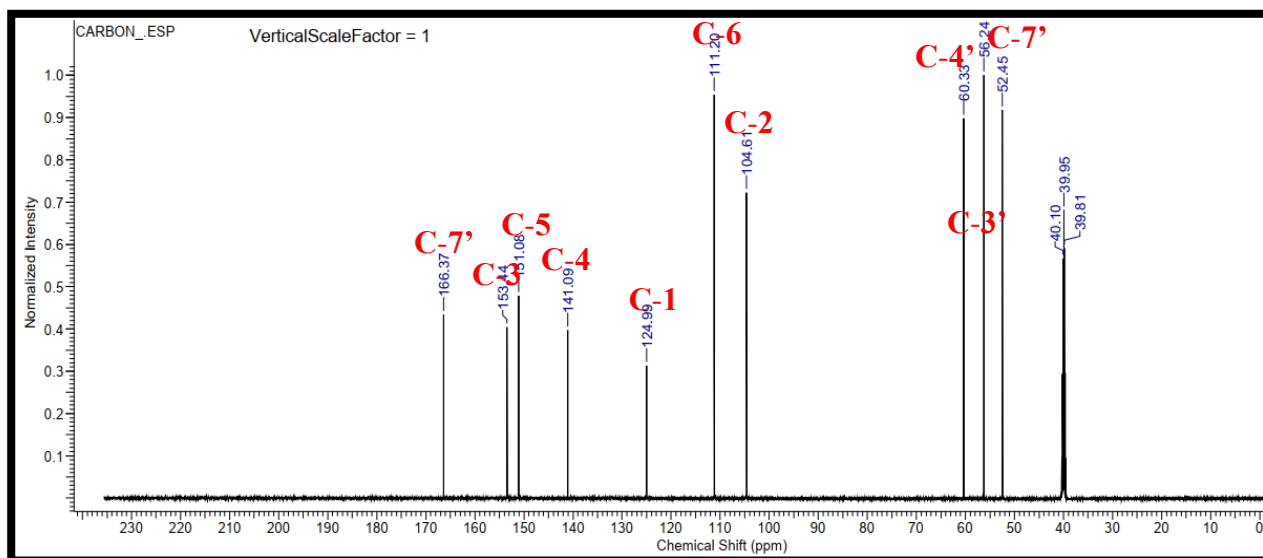


Figure V.34 : Structure finale du composé F4, gallate de méthyle 3,4-diméthyl ether

Toutes les données relevées des spectres de RMN sont reportées dans le Tableau V.10.

Les attributions des deux carbones C-7' et C-3' ont été accomplies en faisant appel aux résultats bibliographiques (Harkat et al., 2007) (Spectre V.32).

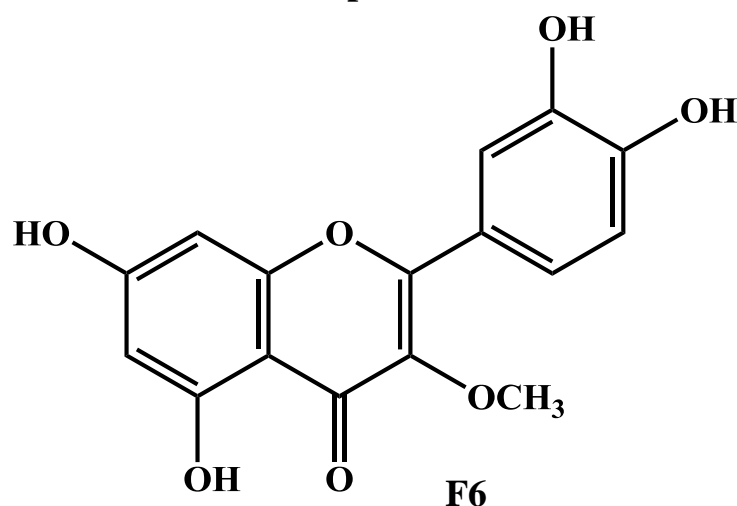


Spectre V.44 : Spectre RMN <sup>13</sup>C (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 150 MHz, δ ppm) du composé F4

Tableau V.10 : Données de la RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C du composé F4

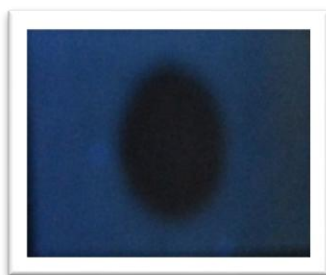
Position	δ <sub>H</sub> (ppm)	δ <sub>C</sub> (ppm)
1	-	124,99
2	7,02 1H <i>sl</i>	104,72
3	-	153,44
3-OCH <sub>3</sub>	3,79 3H <i>s</i>	56,24
4	-	141,59
4-OCH <sub>3</sub>	3,72 3H <i>s</i>	60,43
5	-	151,08
6	7,12 1H <i>sl</i>	111,24
7	-	166,37
7-OCH <sub>3</sub>	3,79 3H <i>s</i>	52,62
OH	9,8	-

## V.3.B.2. Éluclation structurale du composé F6



Le composé F6 se présente sous forme d'une poudre soluble dans le méthanol.

Ce composé de fluorescence violette sombre sous la lumière de Wood (Figure V.35) laisse envisager une structure de type flavone ou flavonol substitué en position C-3 (Harborne, 2013).



**Figure V.35** : Le composé **F6** sur papier Wattman III sous UV (365 nm)

➤ **Interprétation du spectre RMN  $^1\text{H}$**

L'examen du spectre de RMN  $^1\text{H}$  (Spectre V.49) et son étalement (Spectre V.49.1) montrent la présence de signaux caractéristiques d'un squelette flavonique, il s'agit de :

- ✓ Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7,91$  ppm ( $J = 2,0$  Hz) attribuable à H-2' du noyau B d'un flavonoïde.
- ✓ Un signal sous forme d'un doublet de doublets d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 7,55$  ppm ( $J = 8,5 ; 2,0$  Hz) attribuable à H-6' du noyau B.
- ✓ Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,8$  ppm ( $J = 8,5$  Hz) attribuable à H-5' du noyau B.

Ces trois signaux sont caractéristiques d'un cycle B substitué en C-3' et C-4'.

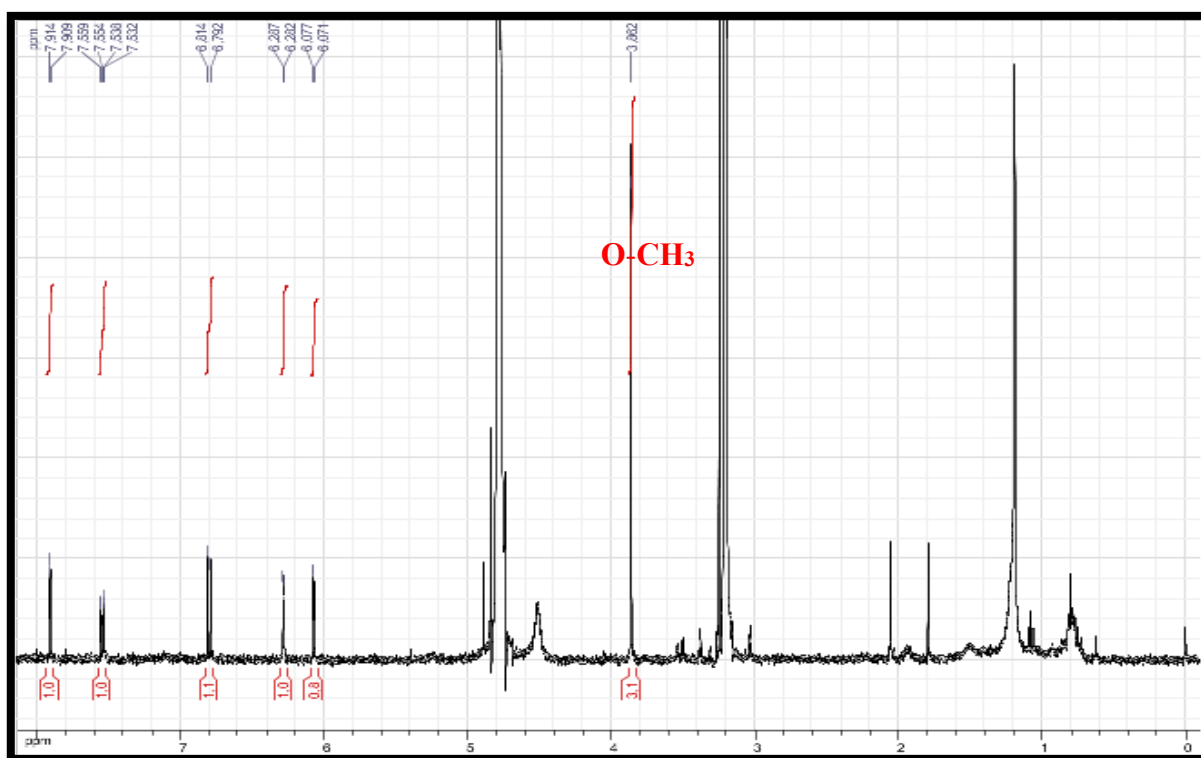
- ✓ Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à  $\delta_{\text{H}} = 6,28$  ppm ( $J = 2,0$  Hz) attribuable à H-8 du noyau A.

- ✓ Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à  $\delta_H = 6,07$  ppm ( $J = 2,0$  Hz) attribuable à H-6 du noyau A.

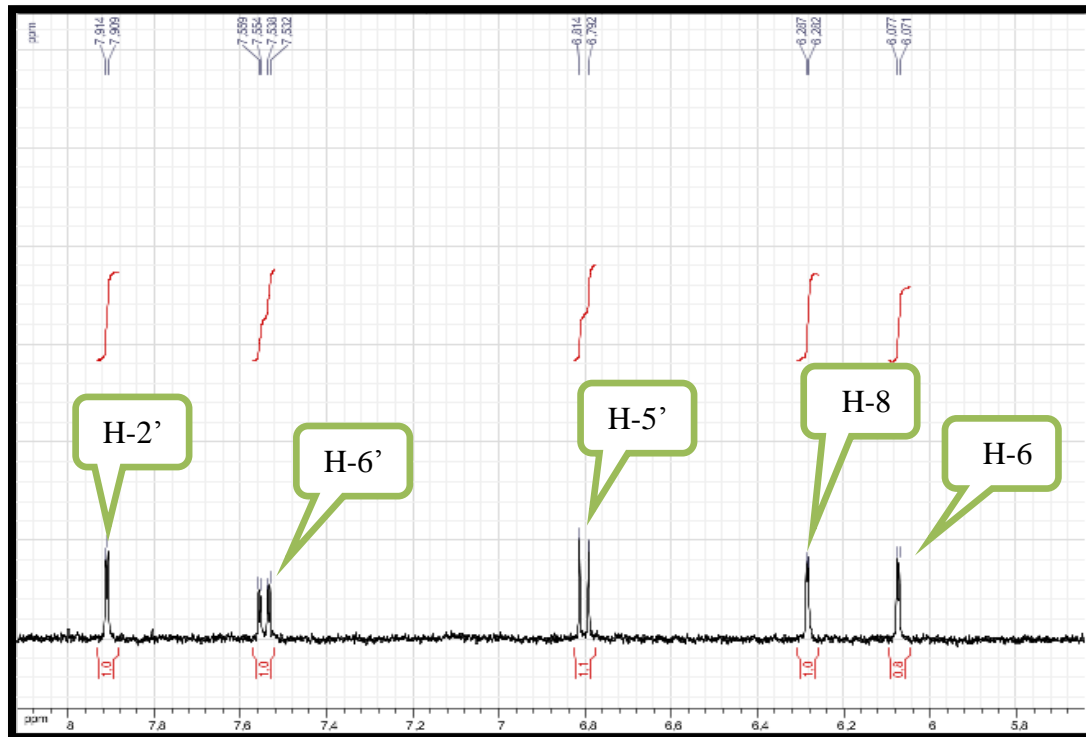
Ces deux signaux indiquent la disubstitution du cycle A en C-5 et en C-7.

- ✓ Un signal sous forme d'un singulet d'intégration 3H à  $\delta_H = 3,86$  ppm indiquant la présence d'un groupement méthoxyle dans cette molécule.

Vu le fait que cette molécule ne comporte pas de proton en position C-3 et qu'elle admet une fluorescence violette sombre sous lumière de Wood, ce groupement méthoxyle ne peut être qu'en position C-3.

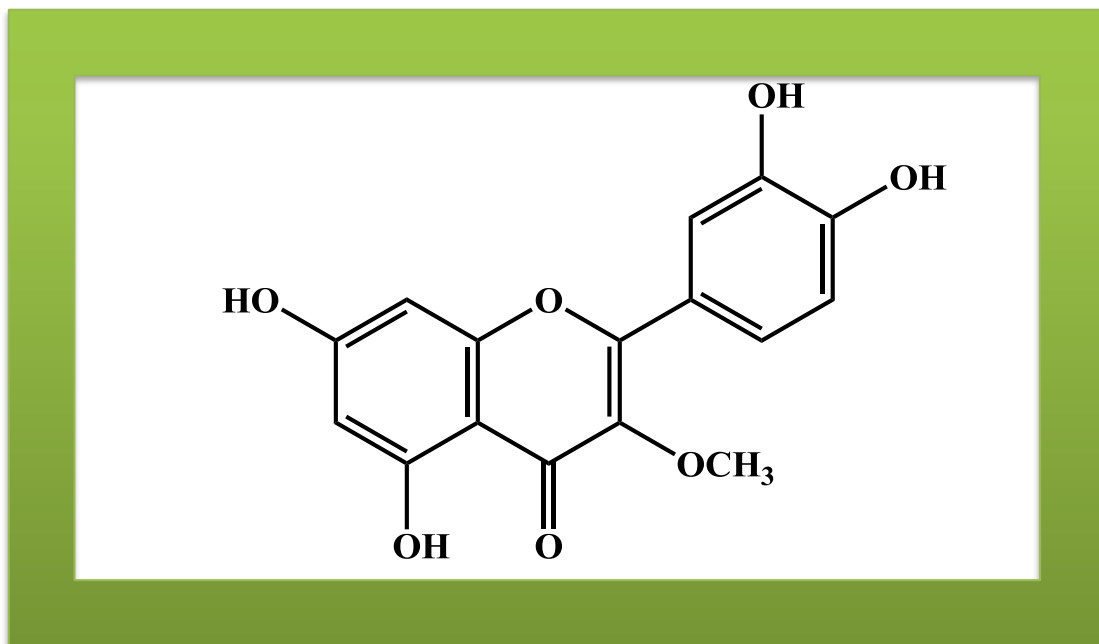


**Spectre V.49** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (MeOH- $d_4$ , 400 MHz,  $\delta$  ppm) du composé F6



**Spectre V.49.1** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé ( $\text{MeOH-}d_4$ , 400 MHz,  $\delta$  ppm) du composé **F6**

La combinaison des résultats de la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  et la couleur de la fluorescence sous la lumière de Wood mène à la structure reportée dans la figure V.36. Il s'agit de la 5,7,3',4'-tetrahydroxy-3-methoxy flavone ou quercétine 3-*O*-méthyl éther. Cette molécule est signalée pour la première fois dans la famille Frankeniaceae, elle est douée d'activités antioxydante et antiinflammatoire remarquables (Aliouche et al., 2007; Wei et al., 2001).



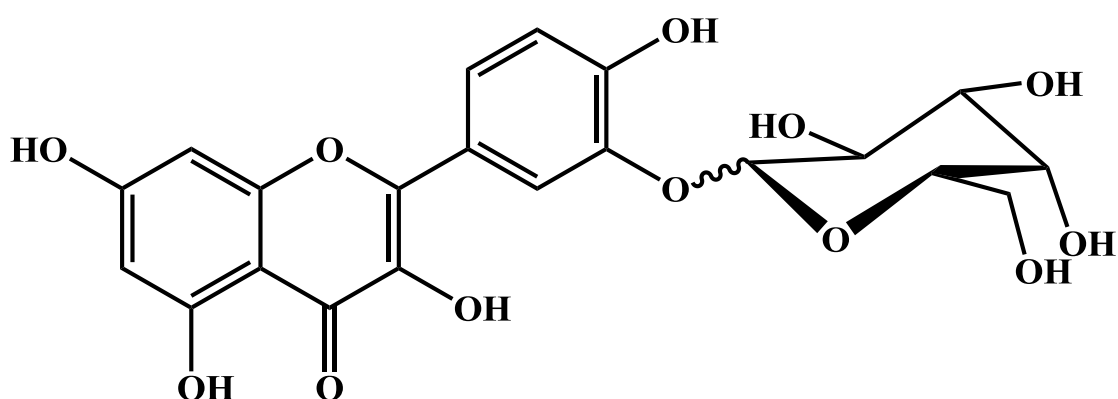
**Figure V.36** : Structure finale du composé **F6**, quercétine 3-*O*-méthyl éther

Le Tableau V.11 rassemble les résultats de la RMN  $^1\text{H}$ .

**Tableau V.11** : Données de la spectroscopie de RMN  $^1\text{H}$  du composé **F6**

$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Intégration	Multiplicité	$J$ (Hz)	Attribution
7,91	1H	<i>d</i>	2,0	H-2'
7,55	1H	<i>dd</i>	8,5 ; 2,0	H-6'
6,8	1H	<i>d</i>	8,5	H-5'
6,28	1H	<i>d</i>	2,0	H-8
6,07	1H	<i>d</i>	2,0	H-6
3,86	3H	<i>s</i>	-	O-CH <sub>3</sub>

### V.3.B.3. Élucidation structurale du composé **F7**



**F7**

#### ➤ Fluorescence sous radiation UV ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ )

Le composé **F7** se présente sous forme d'une poudre soluble dans le méthanol. Ce produit de fluorescence jaune sous la lumière de Wood (radiation UV,  $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) laisse envisager une structure de type flavonol (Figure V.37) (Harborne, 2013).



**Figure V.37** : Le composé **F7** sur papier wattman sous radiation UV



➤ L'examen de la série spectrale UV-Vis

L'étude de la série spectrale UV-Vis (Spectre V.50) donne les indications suivantes :

- ✓ Le spectre d'absorption UV-Vis enregistré dans le méthanol montre deux bandes. La première ayant un maximum d'absorption à  $\lambda_{\max} = 370$  nm et la 2<sup>ème</sup> ayant un maximum d'absorption à  $\lambda_{\max} = 255$  nm, caractéristiques des bandes I et II d'un flavonol, vu sa fluorescence jaune (Markham, 1982).
- ✓ L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +49$  nm) avec une augmentation de l'intensité optique comparativement à celui enregistré dans le méthanol, suppose la présence d'un OH libre en C-4'. L'apparition d'une nouvelle bande à  $\lambda = 322$  nm indique la présence d'un OH libre en position C-7. Le réenregistrement de ce spectre en présence de NaOH après un délai de 5 minutes environ, montre un début de décomposition du spectre confirmant la présence d'un OH libre en C-4' et d'un OH libre en C-3.
- ✓ Le déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +57$  nm) enregistré après addition de  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  comparativement à celui enregistré dans le méthanol révèle la présence d'un OH libre en 5 et confirme celle du OH libre en C-3. Ce spectre comparé à celui en présence de  $\text{AlCl}_3$  avant addition de HCl ne montre aucune différence notable, indiquant l'absence de groupements ortho di-OH dans cette molécule.
- ✓ L'addition de NaOAc provoquant un déplacement bathochrome de la bande II ( $\Delta\lambda = +15$  nm) confirme la présence du OH en position C-7.

Ces résultats permettent de proposer la structure partielle reportée dans la Figure V.38.

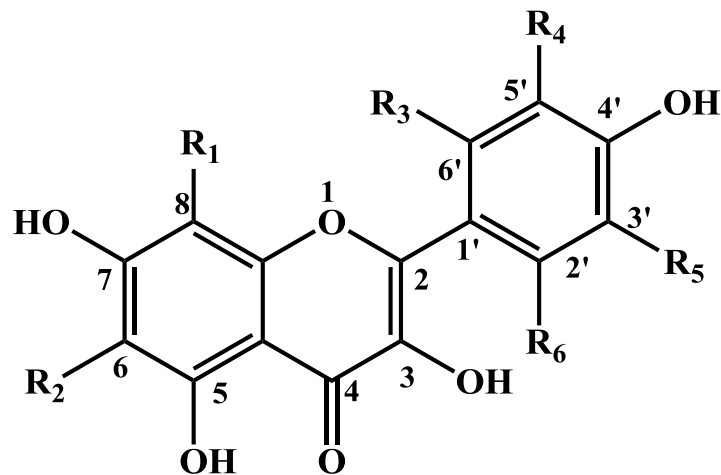
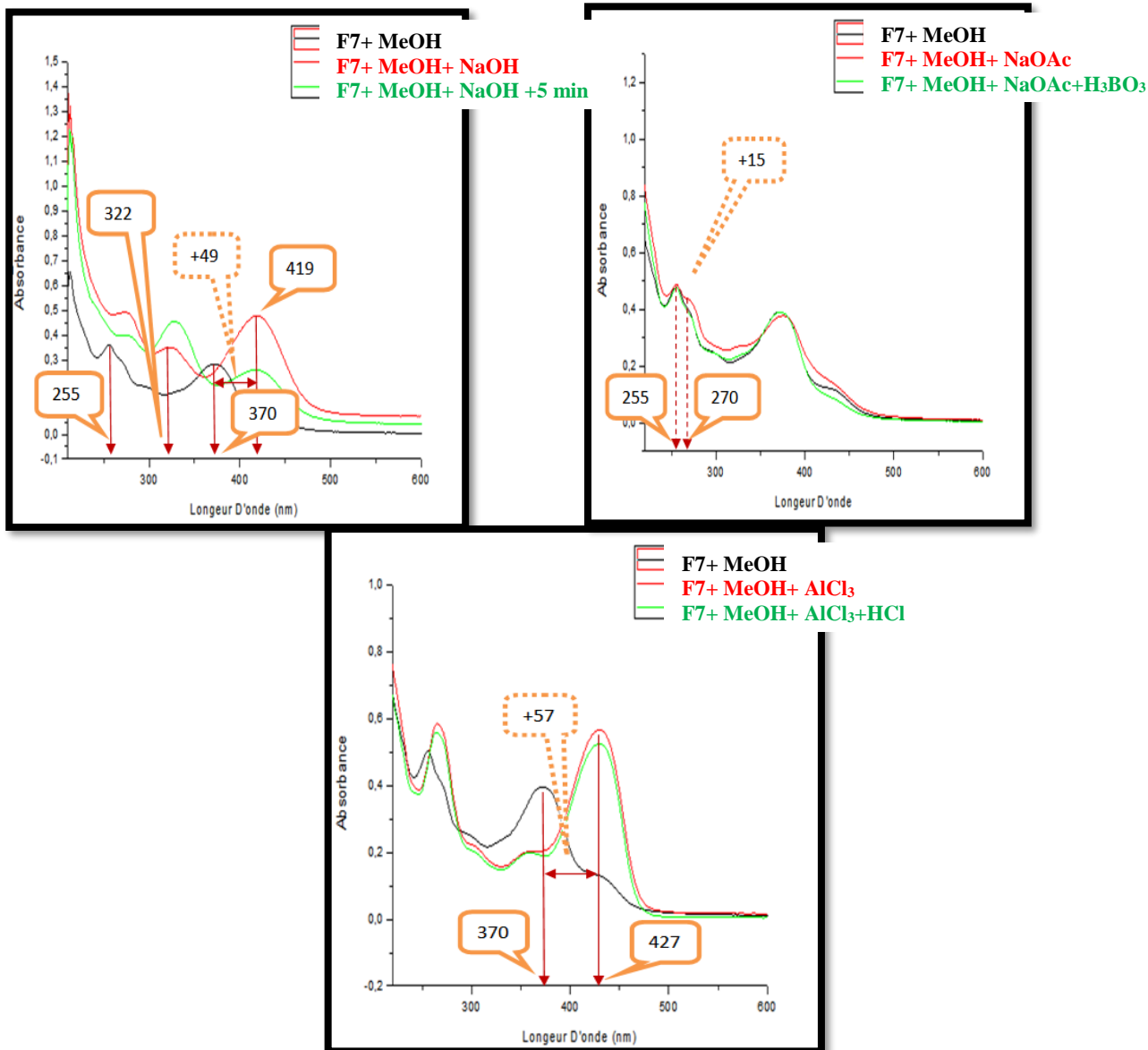


Figure V.38 : Structure partielle du composé F7



**Spectre V.50** : Série spectrale UV-Visible du composé **F7**

Les résultats de la spectrophotométrie UV-Vis sont reportés dans le tableau V.12.

**Tableau V.12** : Données de la série spectrale UV-Visible ( $\lambda_{\max}$  nm) du composé **F7**

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Nouvelle bande (nm)	Commentaires
MeOH	370	255	-	Flavonol-3-OH
+NaOH Décomposition du spectre avec NaOH après 5 min	419	275	322	OH en C-4' et OH en C-3 OH en C-7
+AlCl <sub>3</sub>	429	264	-	OH libre en C-5 et en C-3
+AlCl <sub>3</sub> /HCl	427	264	-	Pas de systèmes ortho di-OH
+NaOAc	376	270	-	Confirmation de OH en C-7
+NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	372	255	-	Pas de systèmes ortho di-OH
Décomposition du spectre avec NaOH après 5 min				

### ➤ Interprétation du spectre RMN <sup>1</sup>H

L'examen du spectre de RMN <sup>1</sup>H (Spectre V.51) et son étalement (Spectre V.51.1) montrent la présence de signaux confirmant la nature flavonique de ce composé, il s'agit de :

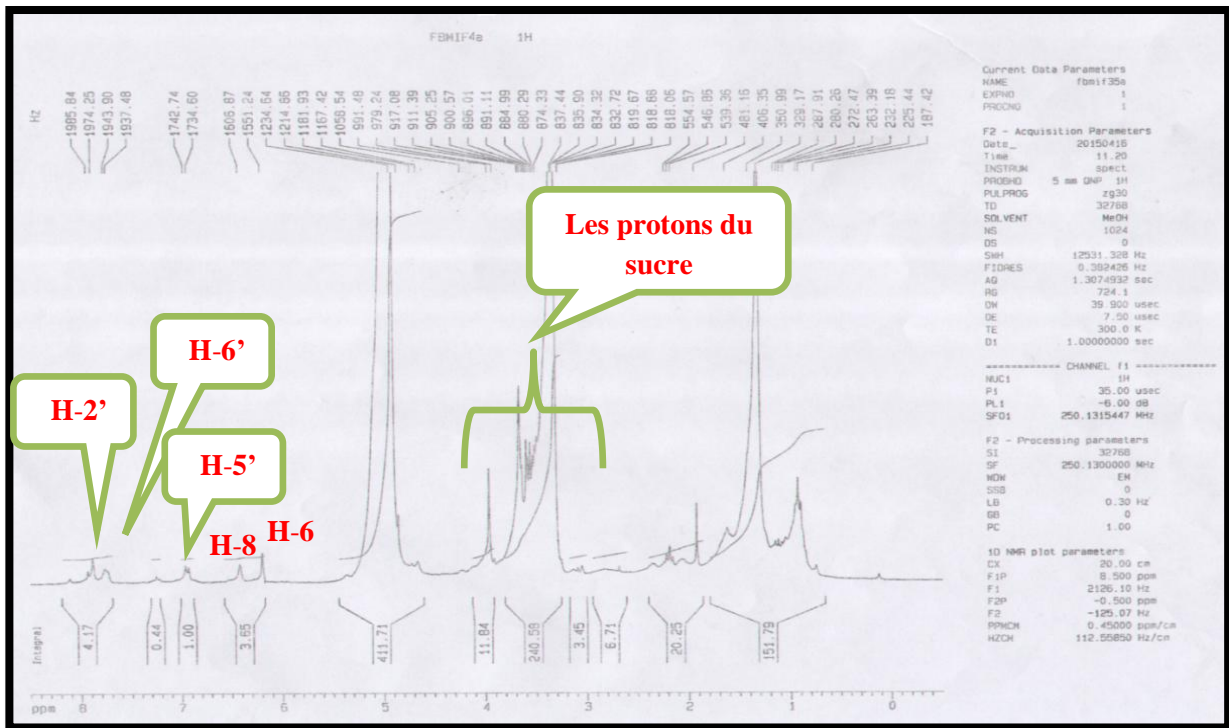
- ✓ Un signal sous forme d'un singulet large d'intégration 1H à  $\delta_H = 7,91$  ppm attribuable à H-2' du noyau B d'un flavonoïde.
- ✓ Un signal sous forme d'un doublet large d'intégration 1H à  $\delta_H = 7,75$  ppm ( $J = 8,1$  Hz) attribuable à H-6' du noyau B.
- ✓ Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à  $\delta_H = 6,95$  ( $J = 8,1$  Hz) attribuable à H-5' du noyau B.

Ces trois signaux sont caractéristiques d'un cycle B substitué en C-3' et C-4'.

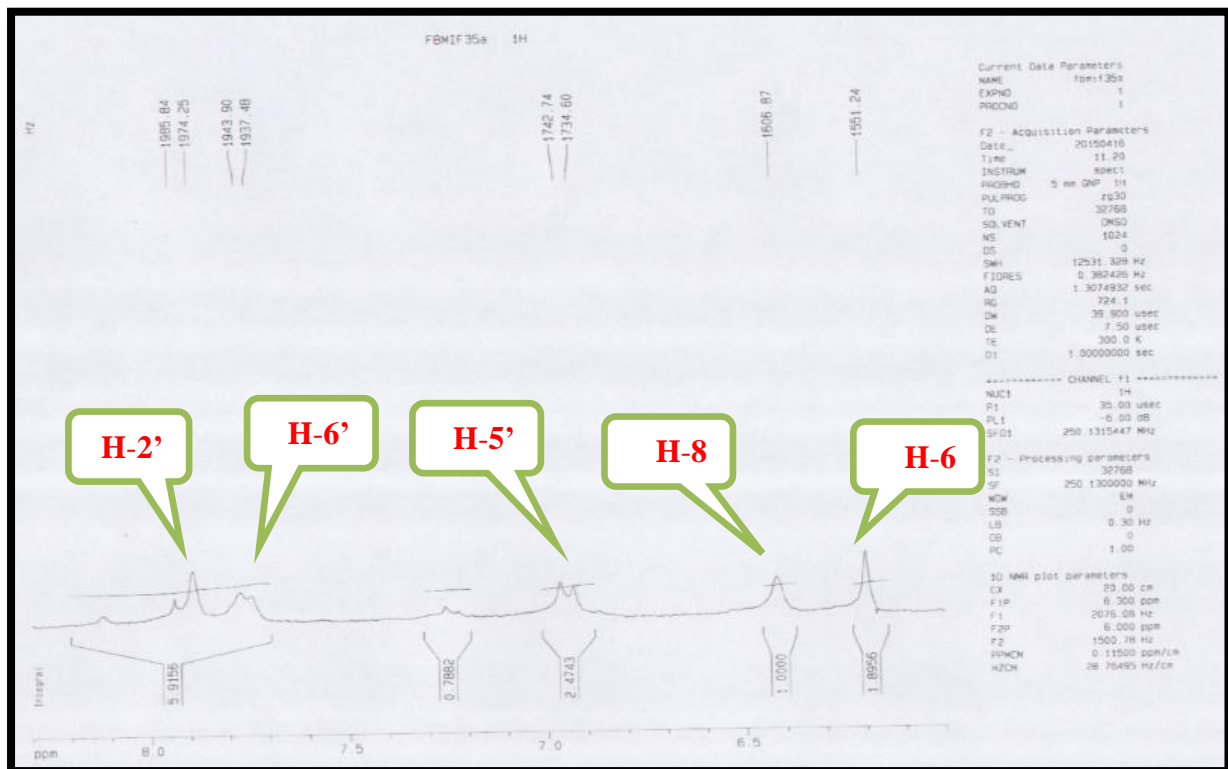
- ✓ Un signal sous forme d'un singulet large d'intégration 1H à  $\delta_H = 6,42$  ppm attribuable à H-8 du noyau A.
- ✓ Un signal sous forme d'un singulet large d'intégration 1H à  $\delta_H = 6,27$  ppm attribuable à H-6 du noyau A.

Ces deux signaux indiquent la disubstitution du cycle A en C-5 et en C-7.

L'examen de l'ensemble des spectres de RMN <sup>1</sup>H montre la présence de signaux caractéristiques des protons d'un sucre, ces derniers résonnent entre 3,5 et 3,9 ppm. En tenant compte des résultats de la série spectrale UV-Vis, il apparaît clairement que le substituant sucre est en position C-3'.



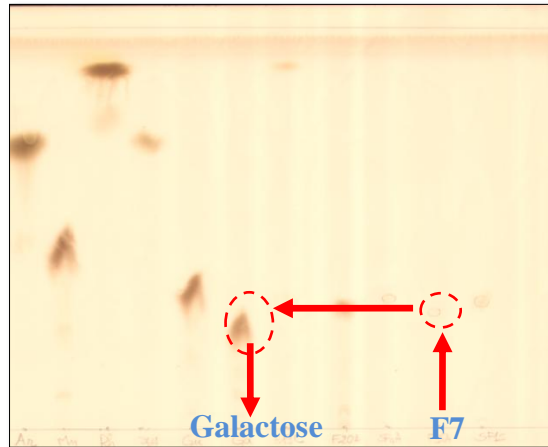
**Spectre V.51** : Spectre RMN <sup>1</sup>H (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 250 MHz, δ ppm) du composé **F7**



**Spectre V.51.1** : Spectre RMN <sup>1</sup>H étalé (MeOH-*d*<sub>4</sub>, 250 MHz, δ ppm) du composé **F7**

Il nous reste à déterminer la nature du sucre dont le signal du proton anomérique est recouvert par le signal de l'eau de contamination du méthanol deutéré. Comme ce signal est aux environs de 5 ppm, il est fort possible que la jonction sucre aglycone soit à travers un pont oxygène, ainsi une hydrolyse acide devrait nous permettre de déterminer ce groupement glycosyle. En effet, après la

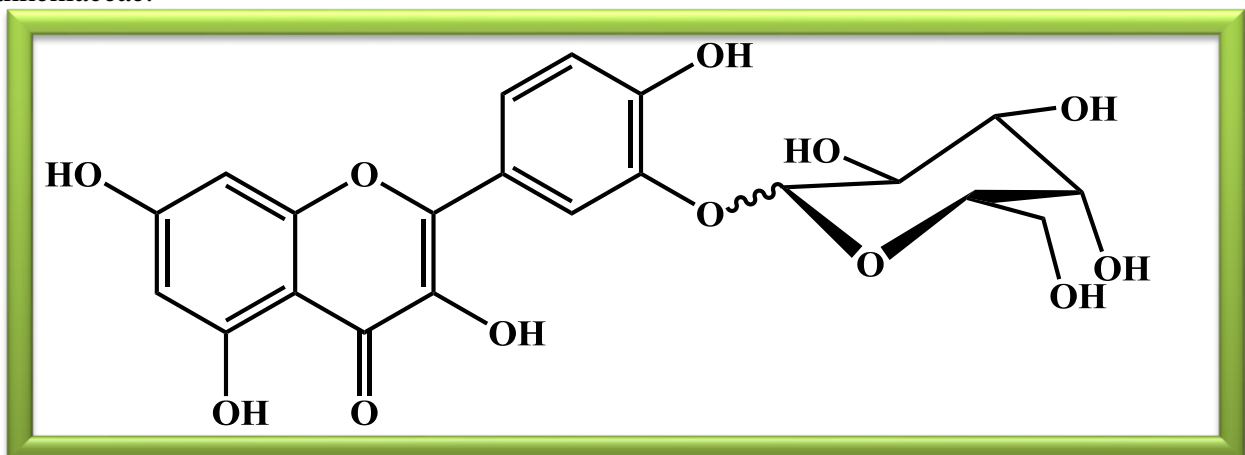
réaction d'hydrolyse acide et refroidissement du mélange réactionnel, nous avons procédé à une extraction liquide-liquide par de l'acétate d'éthyle pour récupérer l'aglycone. Par ailleurs nous avons concentré au maximum la phase aqueuse et nous l'avons co-chromatographiée en présence de sucres témoins (Figure V.39).



**Figure V.39** : Co-chromatographie avec des sucres témoins de la partie osidique obtenue après hydrolyse acide

Après élution de la plaque et chauffage à l'étuve pendant 5 min, on relève clairement que l'entité sucre est le galactose.

La combinaison des résultats de la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  et de la série spectrale UV mène à la structure reportée dans la Figure V.36. Il s'agit de la **3'-O-galactopyranosyl quercétine** (Machida et al. 2009). En général la jonction galactose-O-aglycone est de type  $\beta$ . Mais comme le signal du proton anomérique n'est pas visible et que l'enregistrement du spectre RMN  $^{13}\text{C}$  n'a pas été possible, nous ne pouvons pas spécifier la configuration ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) du carbone anomérique de ce sucre avec les données que nous avons, ainsi nous proposons la structure reportée dans la Figure V.40 pour la molécule **F7**. Cette molécule est isolée pour la première fois dans la famille Frankeniaceae.



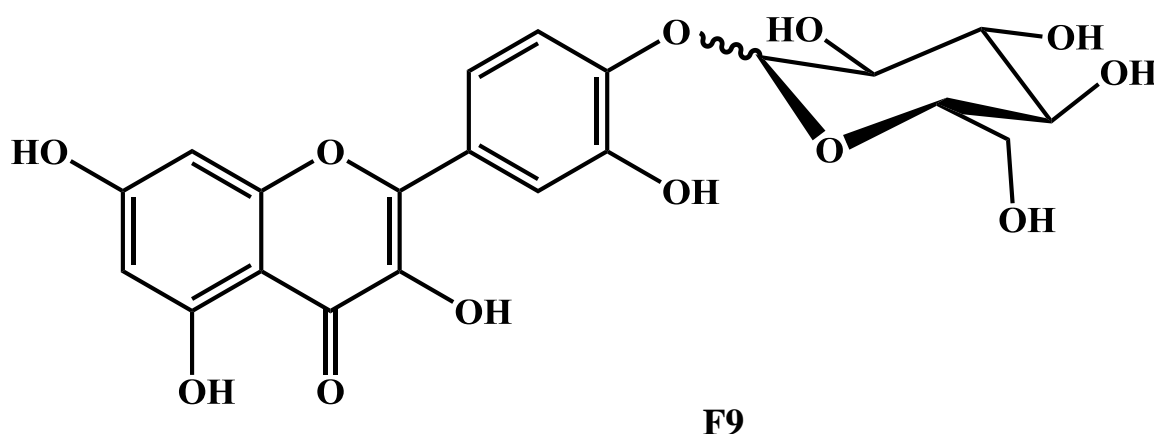
**Figure V.40** : Structure finale du composé **F7**, 3'-O-galactopyranosyl quercétine.

Le Tableau V.12 rassemble les résultats de la RMN  $^1\text{H}$ .

**Tableau V.12** : Données de la spectroscopie de RMN  $^1\text{H}$  du composé **F7**

$\delta$ (ppm)	intégration	Multiplicité	$J$ (Hz)	Attribution
7,91	1H	<i>sl</i>	-	H-2'
7,75	1H	<i>dl</i>	8,1	H-6'
6,95	1H	<i>dl</i>	8,1	H-5'
6,42	1H	<i>sl</i>	-	H-8
6,20	1H	<i>sl</i>	-	H-6
3,5-3,9	6H	<i>m</i>	-	H-2'', H-3'', H-4'', H-5'', H <sub>2</sub> -6'' du sucre

#### V.3.B.4. Éluclidation structurale du composé **F9**



Le composé **F9** se présente sous forme d'une poudre soluble dans le méthanol.

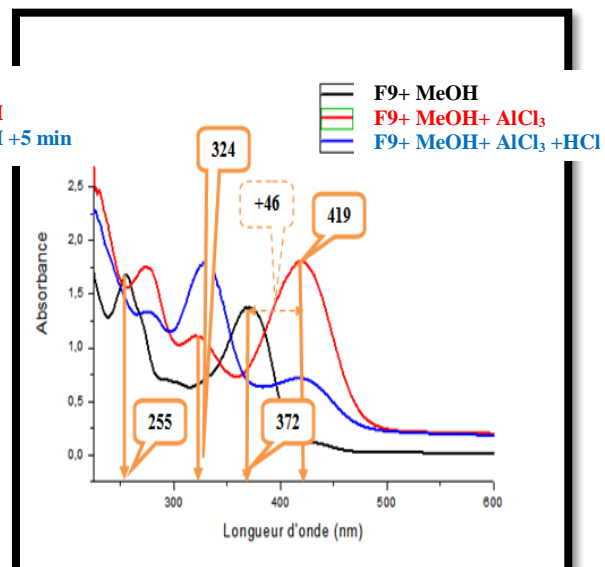
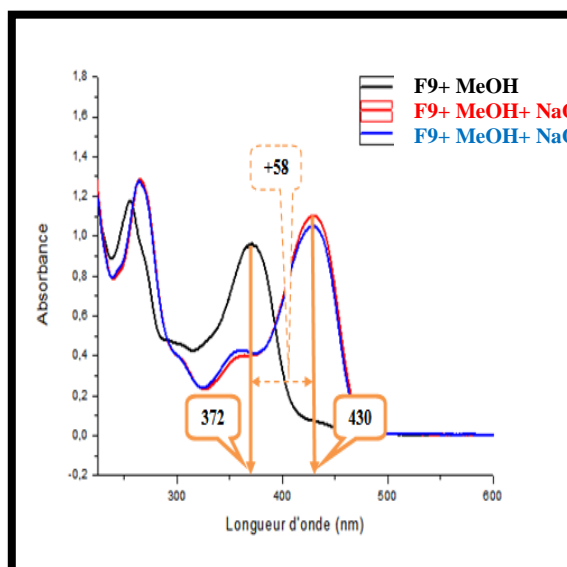
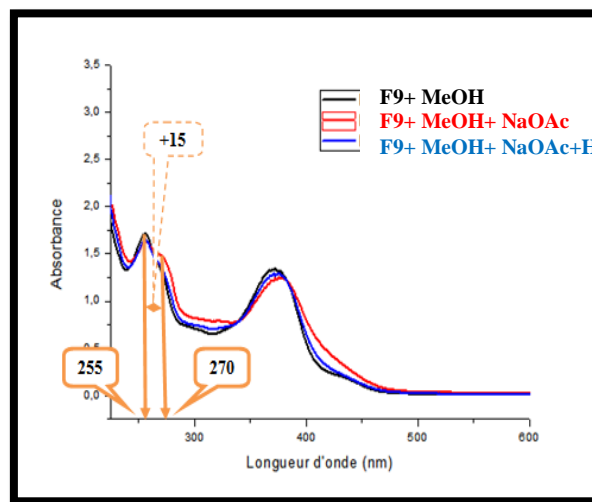
##### ➤ L'examen de la série spectrale UV-Vis

L'étude de la série spectrale UV-Vis (Spectre V.52) donne les indications suivantes :

- ✓ Le spectre d'absorption UV-Vis enregistré dans le méthanol montre deux bandes, la première ayant un maximum d'absorption à  $\lambda_{\text{max}} = 372$  nm et la 2<sup>ème</sup> ayant un maximum d'absorption à  $\lambda_{\text{max}} = 255$  nm, confirment la nature flavonol 3-OH de cette molécule. L'addition de NaOH provoquant un déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +46$  nm) avec une stabilité de l'intensité optique comparativement à celui enregistré dans le méthanol suppose la présence d'un 4'-OR dans cette molécule. L'apparition d'une nouvelle bande à  $\lambda = 324$  nm laisse supposer la présence d'un OH libre en position C-7. Ce spectre enregistré

en présence de NaOH après un délai de 5 minutes environ, ne montrant pas de décomposition confirme bien un flavonol 4'-OR.

- ✓ Le déplacement bathochrome de la bande I ( $\Delta\lambda = +58$  nm) enregistré après addition de  $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$  comparativement à celui enregistré dans le méthanol révèle la présence d'un OH libre en C-5. Ce spectre comparé à celui en présence d' $\text{AlCl}_3$  avant addition de HCl ne montre pas de déplacement hypsochrome de la bande I, indiquant l'absence de groupements ortho di-OH dans cette molécule.
- ✓ L'addition de NaOAc provoquant un déplacement bathochrome de la bande II ( $\Delta\lambda = +15$  nm) confirme la présence d'un OH libre en position C-7.



Spectre V.52 : Série spectrale UV-Visible du composé F9

Ces résultats reportés dans le Tableau V.13, permettent de proposer à ce stade, la structure partielle reportée dans la Figure V.41.

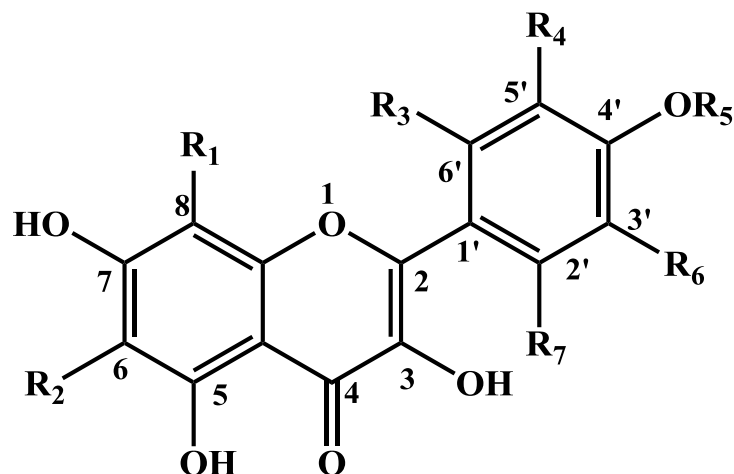


Figure V.41 : Structure partielle du composé F9

Tableau V.13 : Données de la série spectrale UV-Visible ( $\lambda_{\max}$  nm) du composé F9

Réactifs	Bande I (nm)	Bande II (nm)	Nouvelle bande	Commentaires
MeOH	372	255	-	Flavonol-3-OH
+NaOH stabilité du spectre avec NaOH après 5 min	419	274	324	OR en C-4' et OH en C-3 OH en C-7
+AlCl <sub>3</sub> +AlCl <sub>3</sub> /HCl	430 428	266 264	- -	OH en C-3 OH en C-5 Pas de systèmes ortho di-OH
+NaOAc	375	256	-	OH en 7
+NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	372	256	-	Pas de systèmes ortho di-OH
Stabilité du spectre avec NaOH après 5 min				

#### ➤ Interprétation du spectre RMN <sup>1</sup>H

L'examen du spectre de RMN <sup>1</sup>H (Spectre V.53) et son étalement (Spectre V.53.1) montre la présence de signaux caractéristiques d'un squelette flavonoïque, il s'agit de :

- ✓ Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à  $\delta_H = 7,89$  ppm ( $J = 1,8$  Hz) attribuable à H-2' du noyau B d'un flavonoïde.
- ✓ Un signal sous forme d'un doublet large d'intégration 1H à  $\delta_H = 7,77$  ppm ( $J = 8,5$  Hz) attribuable à H-6' du noyau B.



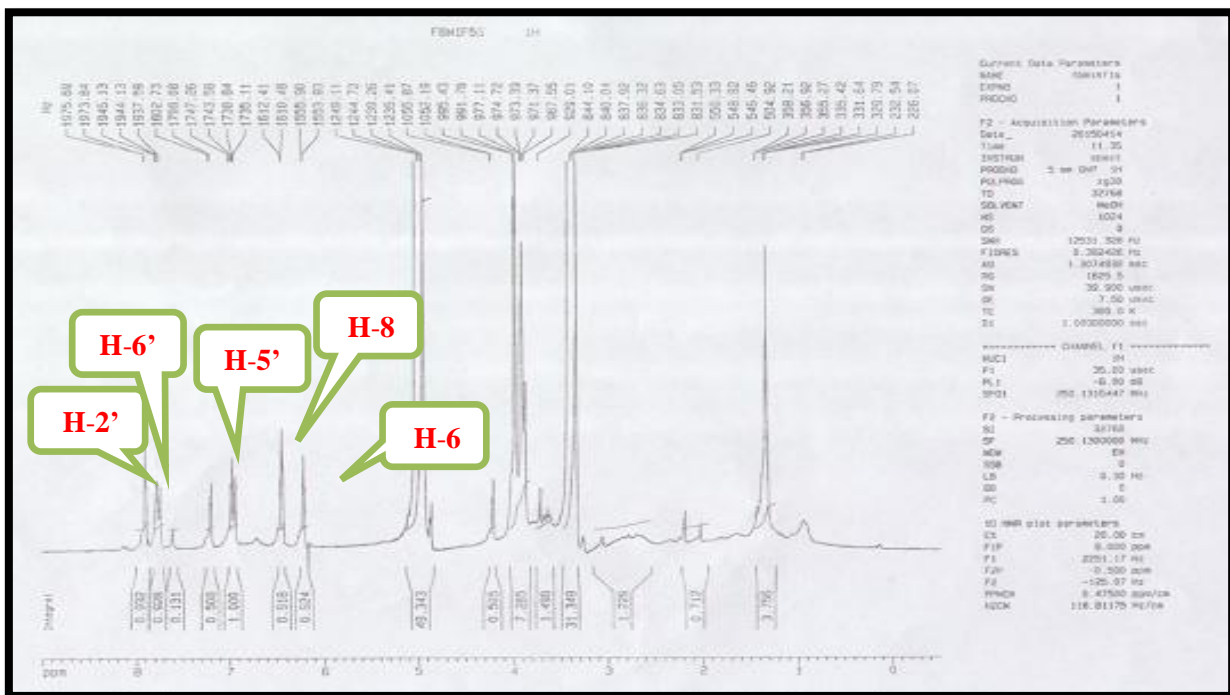
- ✓ Un signal sous forme d'un doublet d'intégration 1H à  $\delta_H = 6,95$  ppm ( $J = 8,5$  Hz) attribuable à H-5' du noyau B.

Ces trois signaux sont caractéristiques d'un cycle B substitué en C-3' et C-4'.

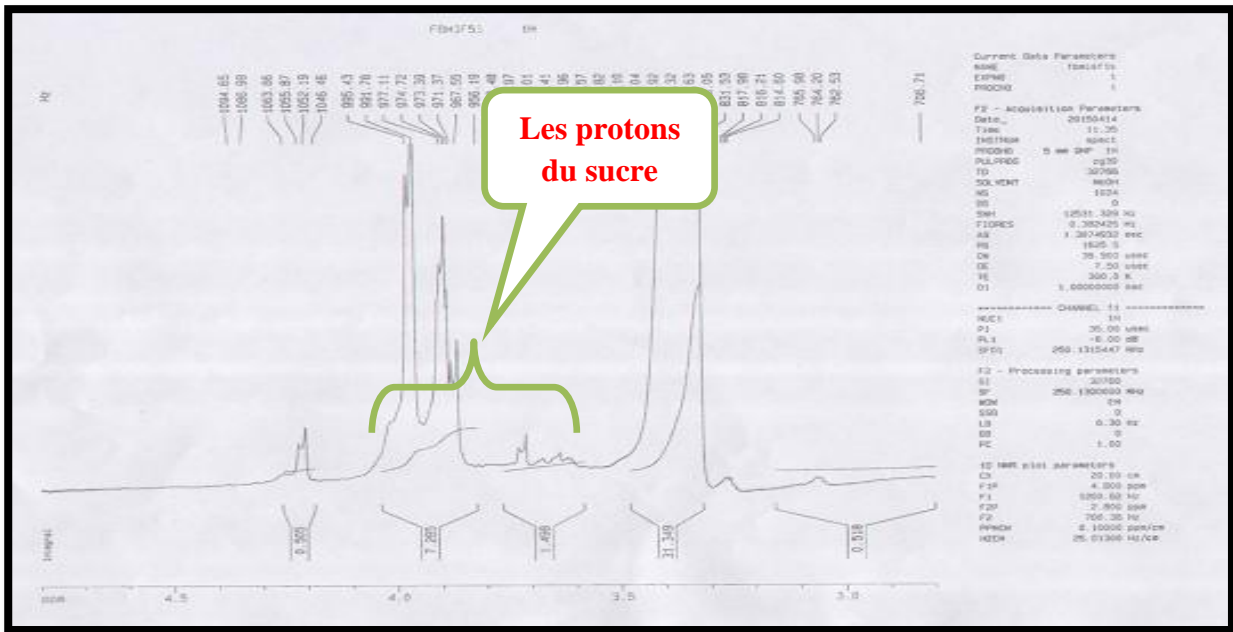
- ✓ Un signal sous forme d'un singulet large d'intégration 1H à  $\delta_H = 6,45$  ppm attribuable à H-8 du noyau A.
- ✓ Un signal sous forme d'un singulet large d'intégration 1H à  $\delta_H = 6,22$  ppm attribuable à H-6 du noyau A.

Ces deux signaux indiquent la disubstitution du cycle A en C-5 et en C-7.

L'examen de l'ensemble du spectre de RMN  $^1\text{H}$  montre la présence de signaux caractéristiques des protons d'un sucre, ces derniers résonnent entre  $\delta_H = 3,1-3,9$  ppm. Tenant compte des résultats de la série spectrale UV-Vis, il apparaît clairement que ce substituant sucre ne peut être qu'en position C-4'.

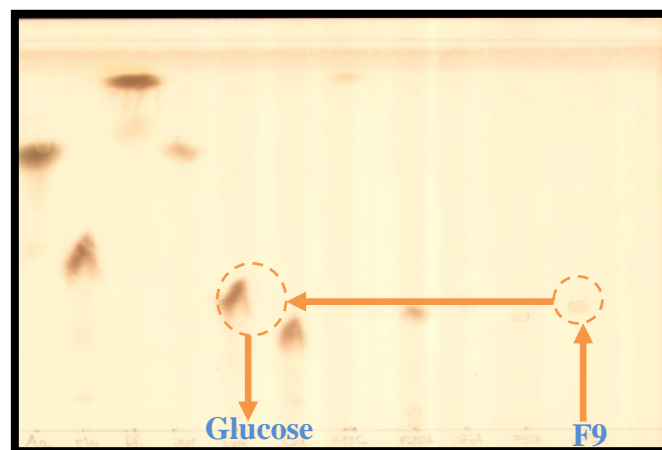


**Spectre V.53** : Spectre RMN  $^1\text{H}$  (MeOH- $d_4$ , 250 MHz,  $\delta$  ppm) du composé **F9**



**Spectre V.53.1 :** Spectre RMN  $^1\text{H}$  étalé (MeOH- $d_4$ , 250 MHz,  $\delta$  ppm) du composé **F9**

Il nous reste à déterminer la nature du sucre. Pour cela nous avons procédé à l'hydrolyse acide de notre composé. En effet, après la réaction d'hydrolyse acide et refroidissement du composé, nous avons procédé à une extraction liquide-liquide par de l'acétate d'éthyle pour récupérer l'aglycone. Par ailleurs, nous avons concentré au maximum la phase aqueuse et nous l'avons co-chromatographiée en présence de sucres témoins (Figure V.42).



**Figure V.42 :** Co-chromatographie avec des sucres témoins de la partie osidique obtenue après hydrolyse acide

Après élution de la plaque et chauffage à l'étuve pendant 5 min, on relève clairement que l'entité sucre est le glucose. La combinaison des résultats de la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  et de la série spectrale UV mène à la structure reportée dans la Figure V.40. Il s'agit de la **4'-O-glucopyranosyl quercétine**. La O-glucosylation est déduite d'une part, du fait que le sucre se soit détaché de

l'aglycone lors de la réaction d'hydrolyse acide et d'autre part du fait que le signal du proton anomérique apparaît sous le signal de l'eau de contamination du méthanol deutéré, c'est-à-dire que son déplacement chimique se situe au voisinage de 5 ppm. En matière de configuration du carbone anomérique ( $\alpha$  ou  $\beta$ ), bien qu'en général le glucose comme le galactose se lie à l'aglycone à travers une jonction  $\beta$ , nous n'avons rien ici pour le confirmer vu que le signal du proton anomérique n'est pas visible et vu que l'enregistrement du spectre  $^{13}\text{C}$  n'a pas été possible. Cette observation permet de proposer à ce stade de nos travaux la structure reportée dans la Figure V.43. Cette molécule est isolée pour la première fois dans la famille Frankeniaceae.

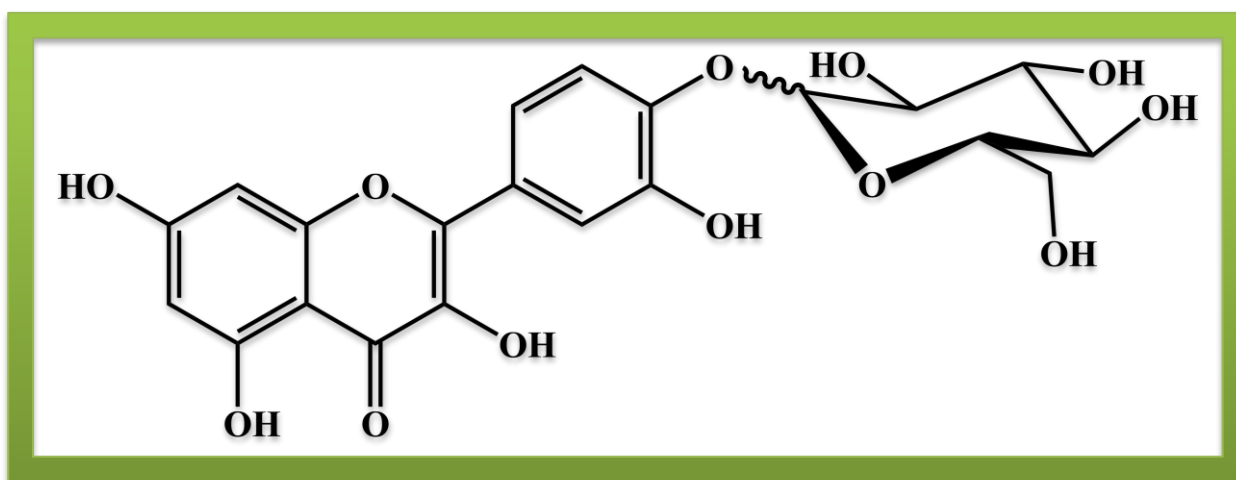


Figure V.43 : Structure finale du composé F9, 4'-O-glucopyranosyl quercétine

L'ensemble de ces données est reporté dans le tableau V.14.

Tableau V.14 : Données de la spectroscopie de RMN  $^1\text{H}$  du composé F9

$\delta$ (ppm)	Intégration	Multiplicité	$J$ (Hz)	Attribution
7,89	1H	<i>d</i>	1,8	H-2'
7,77	1H	<i>dl</i>	8,5	H-6'
6,95	1H	<i>d</i>	8,5	H-5'
6,45	1H	<i>sl</i>	-	H-8
6,22	1H	<i>sl</i>	-	H-6
3,1-3,9	6H	<i>m</i>	-	H-2'', H-3'', H-4'', H-5'' et H <sub>2</sub> -6'' du sucre

**V.3.B.5. Conclusion**

L'étude phytochimique réalisée sur la fraction *n*-butanol des parties aériennes de *Frankenia thymifolia* Desf. a conduit à l'isolement de **9** produits dont **5** ont été identifiés, il s'agit de : gallate de méthyle 3,4-diméthyl éther (**F4**), quercétine 3-*O*-méthyl éther (**F6**), 3'-*O*-galactopyranosyl quercétine (**F7**), 4'-*O*-glucopyranosyl quercétine (**F9**) ainsi que le composé **F5**, quercétine (isolé de la phase acétate d'éthyle et également de la phase *n*-butanol).

***Chapitre VI :***  
***Résultats et discussions***  
***(activités biologiques)***

## VI.1. Introduction

Ce chapitre renferme les résultats de dosage des polyphénols et flavonoïdes totaux des extraits de *Pituranthos battandieri* et *Frankenia thymifolia* ainsi que les résultats obtenus dans les tests de recherche d'activités biologiques *in vitro* à savoir les activités antioxydante antiparasitaire, antibactérienne des extraits étudiés et de leurs composants isolés.

## VI.2. Évaluation des teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux

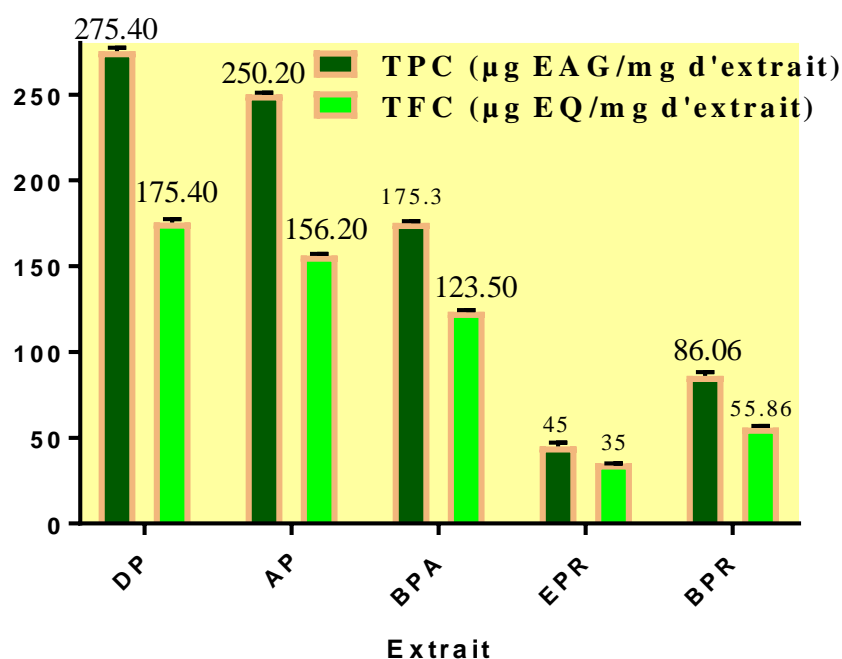
### VI.2.1. Les extraits de *Pituranthos battandieri* Maire

La teneur en flavonoïdes est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine est exprimée en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$ ).

La teneur en polyphénols est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique est exprimée en microgramme d'équivalents de quercétine par milligramme d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$ ).

Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes totaux des extraits dichlorométhane (DP), acétate d'éthyle (AP) et *n*-butanol (BPA) des parties aériennes; éther de pétrole (EPR) et *n*-butanol (BPR) des racines de *P. battandieri* ont été exprimées en  $\mu\text{g}$  d'équivalents d'acide gallique par mg d'extrait ( $\mu\text{g EAG/mg d'extrait}$ ) pour les polyphénols et en  $\mu\text{g}$  d'équivalents de quercétine par mg d'extrait ( $\mu\text{g EQ/mg d'extrait}$ ) pour les flavonoïdes.

Les histogrammes de la Figure VI.1 représentent les quantités en ( $\mu\text{g}$ ) des flavonoïdes et des polyphénols dans les extraits étudiés.

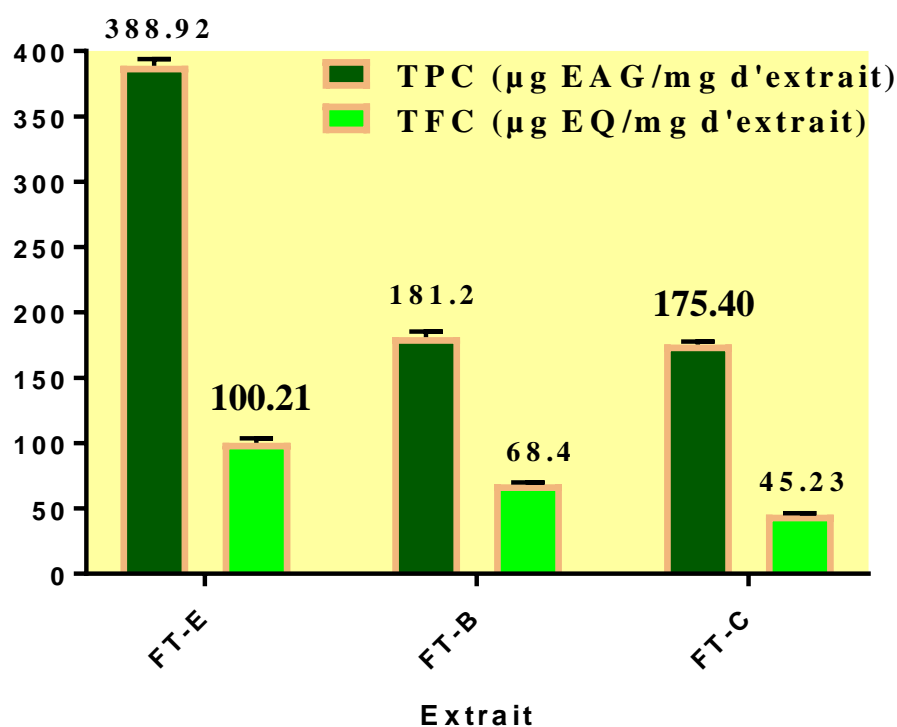


**Figure VI.1 :** Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de *P. battandieri*.

La figure VI.1 ci-dessus montre que les concentrations les plus élevées en polyphénols et en flavonoïdes ont été déterminées dans les extraits dichlorométhane (DP) et acétate d'éthyle (AP) des parties aériennes suivis par l'extrait butanolique (BPA). Alors que les concentrations les plus faibles ont été déterminées dans les extraits des racines : *n*-BuOH et éther de pétrole, respectivement. Ces résultats sont en accord avec beaucoup d'autres études qui montre une richesse particulière des extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle en polyphénols et en flavonoïdes totaux.

### VI.2.2. Les extraits de *Frankenia thymifolia* Desf.

Les histogrammes de la Figure VI.2 représentent les quantités en ( $\mu\text{g}$ ) de flavonoïdes et des polyphénols dans les extraits chloroforme (FT-C), acétate d'éthyle (FT-E) et *n*-butanol (FT-B) de *F. thymifolia*.



**Figure VI.2 :** Les teneurs en polyphénols et en flavonoïdes des extraits de *F. thymifolia*

Les résultats ont montré que les trois extraits ont des teneurs élevées en polyphénols totaux avec une teneur plus élevée pour l'extrait acétate d'éthyle (FT-E) ( $388,92 \pm 4,98 \mu\text{g EAG/mg d'extract}$ ). Les résultats obtenus ont révélé également que les trois extraits ont des teneurs plus assez élevées en flavonoïdes totaux avec une meilleure teneur de l'extrait FT-E ( $100,21 \pm 3,42 \mu\text{g EQ/mg d'extract}$ ).

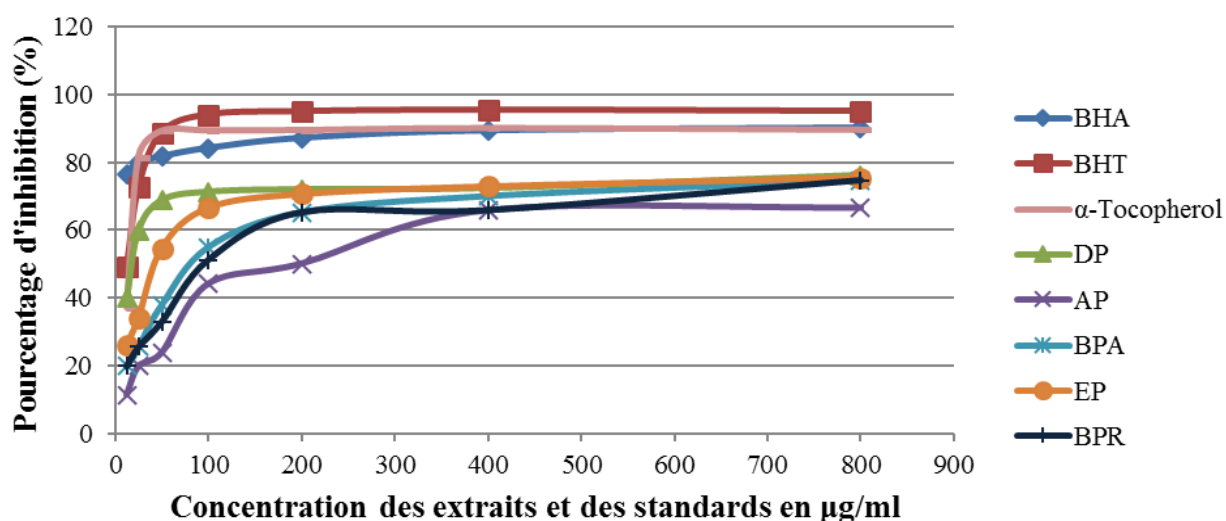
### VI.3. Évaluation de l'activité antioxydante

#### VI.3.1. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *P. battandieri*

Six méthodes ont été utilisées pour évaluer l'activité antioxydante des extraits dichlorométhane (DP), acétate d'éthyle (AP), et *n*-butanol (BPA) des parties aériennes de *P. battandieri*; éther de pétrole (EPR) et *n*-butanol (BPR) des racines de *P. battandieri*. On note que les valeurs des IC<sub>50</sub> ou A<sub>0,5</sub> exprimées en µg/ml ont été déterminées graphiquement à partir de la droite de régression de pourcentage d'inhibition ou d'absorbance en fonction de la concentration pour chaque extrait ou standard testé.

##### VI.3.1.A. L'effet scavenger du radical DPPH

Les courbes montrant le pourcentage d'inhibition (%) du radical libre DPPH en fonction de la concentration de tous les extraits de *P. battandieri* et des standards (BHA, BHT et α-tocophérol) sont représentées dans la figure VI.3.



**Figure VI.3 :** Piégeage du radical DPPH par des extraits de *P. battandieri*, du BHA, du BHT et de l'α-tocophérol.

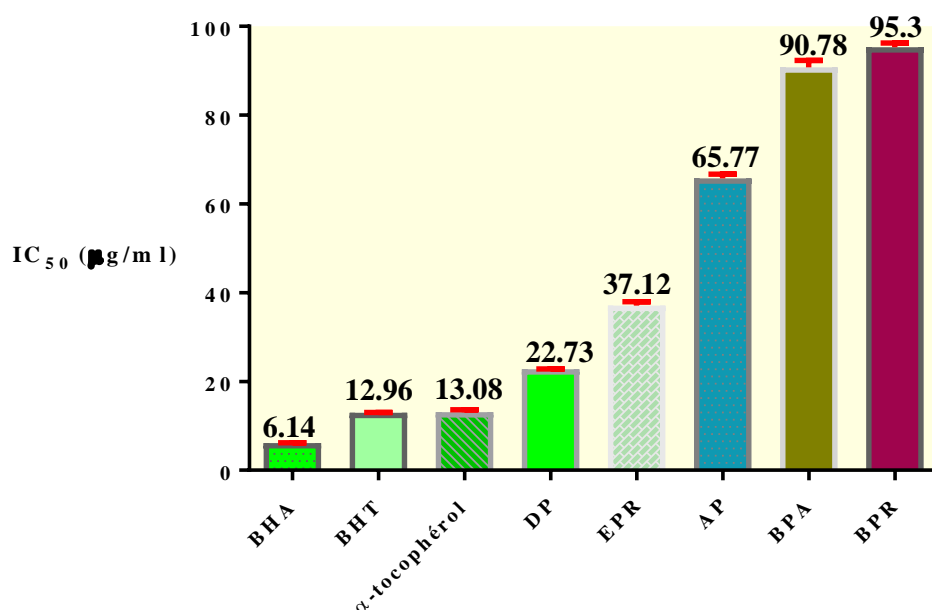
Selon la figure précédente (Figure VI.3.), nous observons que les courbes ont la même allure ce qui implique la même interprétation: Plus la concentration est élevée, plus l'activité anti-radicalaire est élevée jusqu'à atteindre un plateau. Au-delà de cette limite, l'activité reste constante.

Les extraits DP, AP, BPA, EPR et BPR ont réagi positivement au test du radical DPPH mais à différents degrés. Cette figure montre que l'extrait dichlorométhane (DP) présente le meilleur pourcentage d'inhibition le plus élevé avec  $71,28 \pm 1,2$  % à la concentration de 100



$\mu\text{g/ml}$ . Les extraits EPR, AP, BPA et BPR montrent à la même concentration, des pourcentages d'inhibition élevés à moyens avec  $66,54 \pm 1,5 \%$  ;  $55,6 \pm 1,2 \%$  ;  $51,26 \pm 2,2 \%$  ;  $44,13 \pm 2,6 \%$ , respectivement. A la même concentration, le BHT et l' $\alpha$ -tocophérol utilisés comme standards ont montré des pourcentages d'inhibition de  $94 \pm 0,31 \%$  et  $89,38 \pm 0,19 \%$ , respectivement. L'activité antiradicalaire de l'extrait DP s'explique par sa richesse en composés phénoliques comme signalé précédemment par son taux élevé en polyphénols.

La concentration d'un extrait ou d'un standard provoquant 50% d'inhibition du DPPH ( $\text{IC}_{50}$ ) est représentée dans la figure VI.4.



**Figure VI.4 :** Les valeurs des  $\text{IC}_{50}$  des extraits de *P. battandieri* et des standards BHA, BHT et l' $\alpha$ -tocophérol (Test du DPPH•)  
Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD ( $n = 3$ ),  $P < 0,05$

D'après les résultats des valeurs de  $\text{IC}_{50}$  mentionnées dans la figure VI.4, l'extrait DP est doté d'un pouvoir antioxydant élevé avec un  $\text{IC}_{50}$  de  $22,73 \pm 0,11 \mu\text{g/ml}$  comparativement aux  $\text{IC}_{50}$  des extraits EPR, AP, BPA et BPR et, est modéré par rapport à la solution standard du BHA et celle du BHT qui sont de  $6,14 \pm 0,41$  ;  $12,99 \pm 0,41 \mu\text{g/ml}$ , respectivement. Les extraits AP et les extraits butanoliques BPA et BPR semblent avoir des effets inhibiteurs modérés sur le radical DPPH avec des  $\text{IC}_{50} = 65,77 \pm 0,92$  ;  $90,78 \pm 1,52$  et  $95,3 \pm 0,95 \mu\text{g/ml}$ , respectivement, par rapport aux standards.

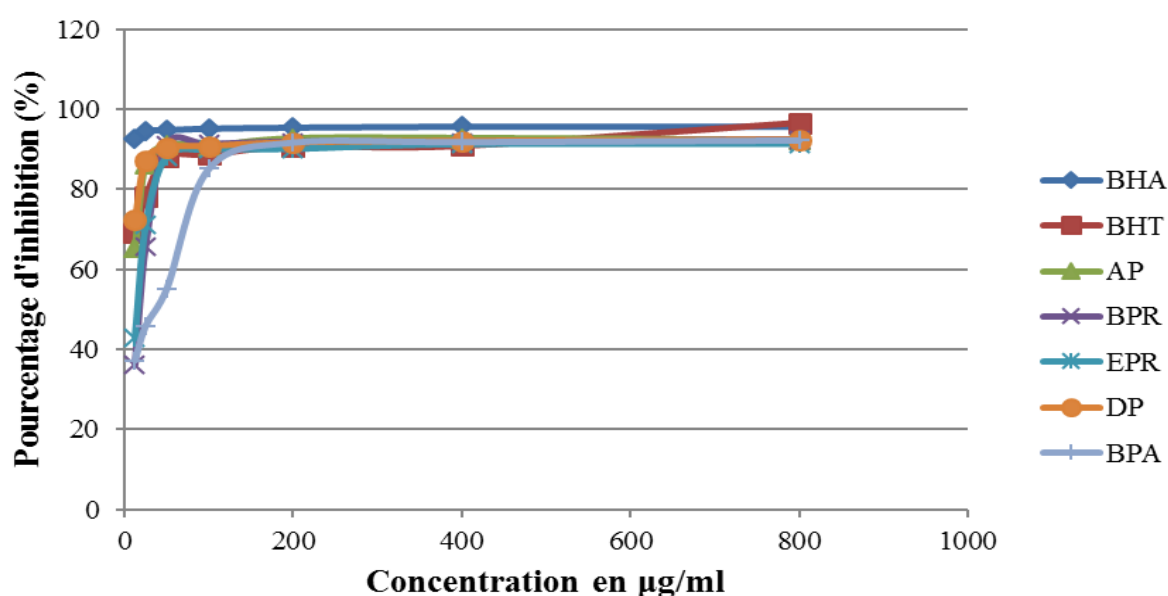
Ces résultats sont en bon accord avec les données du dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux qui montrent une richesse remarquable des extraits DP et AP comparativement aux extraits butanoliques BPR et BPA.

L'activité de l'extrait EPR est due probablement à sa richesse en molécules moyennement polaires à savoir les coumarines et les polyynes qui ont été isolés et identifiés dans le cadre de ces travaux et à d'autres polyphénols présents dans cet extrait.

Ceci confirme également les résultats de nombreuses études qui ont pu établir une relation étroite entre le contenu en composés phénoliques des extraits et leur capacité à piéger les radicaux libres (Balasundram et al., 2006; Beer et al., 2017; Perron et Brumaghim, 2009).

### VI.3.1.B. L'effet scavenger du radical-cation ABTS

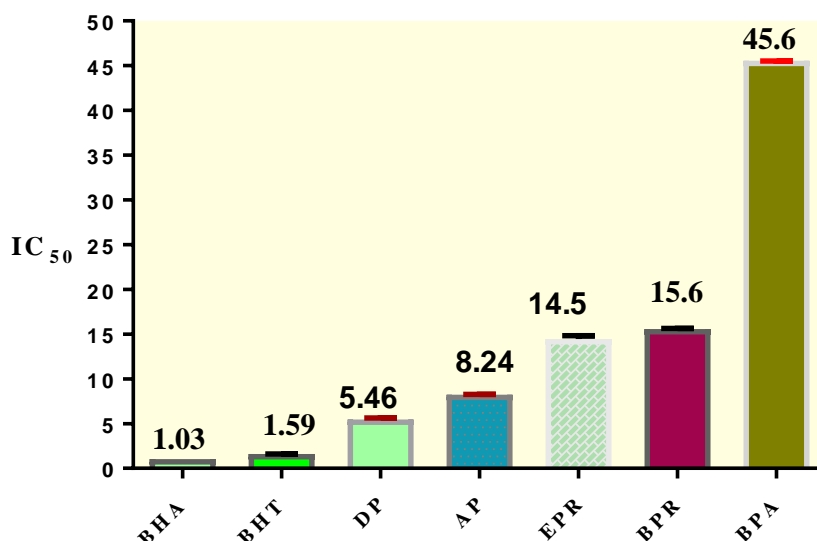
Les courbes montrant le pourcentage d'inhibition (%) du radical-cation ABTS en fonction de la concentration de tous les extraits de *P. battandieri* et des standards (BHA et BHT) sont représentées dans la figure VI.5.



**Figure VI.5 :** Activité de piégeage du radical-cation ABTS par des extraits de *P. battandieri*, de BHA, BHT

D'après la figure VI.5, en général, les extraits DP, AP, BPA, EPR et BPR ont donné une bonne activité au test du radical-cation ABTS. On relève sur cette figure que l'extrait dichlorométhane DP présente toujours le meilleur pourcentage d'inhibition,  $72,44 \pm 2,2$  % à une concentration de  $12,5 \mu\text{g/ml}$ , par rapport aux standards utilisés. En effet, à la même concentration, le BHA et le BHT ont donné  $92,83 \pm 0,41$  % et  $69,21 \pm 0,09$  %, respectivement. Tandis que les extraits AP, EPR, BPA et BPR et à la même concentration, présentent des pourcentages d'inhibition élevés à modérés de  $65,44 \pm 1,15$  % ;  $43,05 \pm 0,2$  % ;  $37,17 \pm 1,2$  % ;  $36,17 \pm 0,6$  %, respectivement, par rapport à ceux des deux standards.

Les concentrations des extraits et des standards provoquant 50% d'inhibition de l'ABTS<sup>•+</sup> (IC<sub>50</sub>) sont représentées dans la figure VI.6.



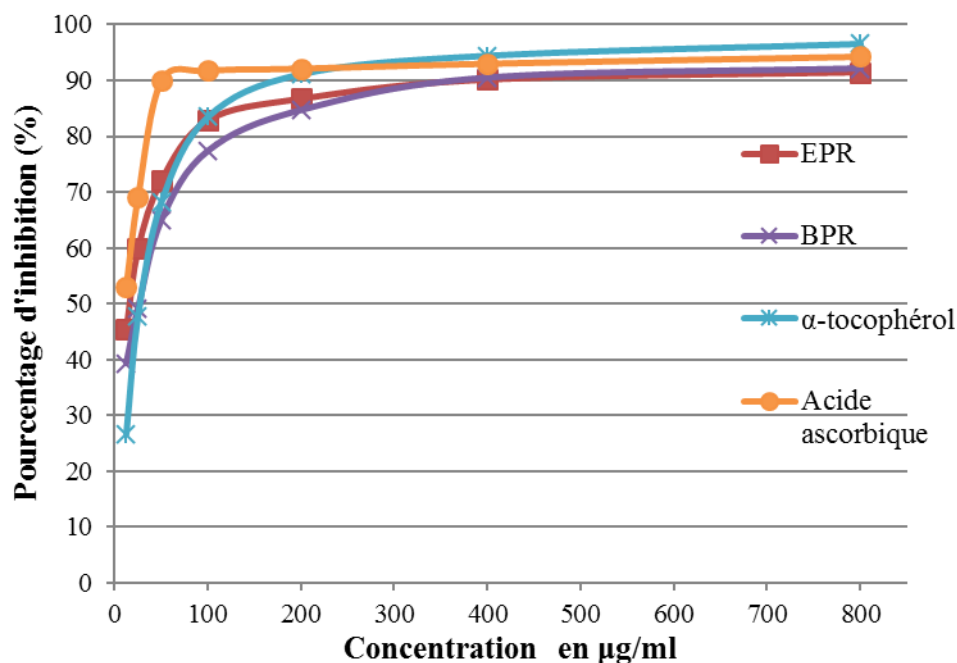
**Figure VI.6 :** Les valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits de *P. battandieri* et de standards (BHA et BHT) (Test du radical-cation ABTS)

D'après les résultats des valeurs des IC<sub>50</sub> mentionnées dans la figure VI.6, l'extrait DP est doté d'un pouvoir antioxydant puissant avec un IC<sub>50</sub> de  $5,46 \pm 0,01$  µg/ml comparativement à la IC<sub>50</sub> des extraits AP, EPR, BPR et BPA, et modéré par rapport à la solution standard du BHA et BHT qui sont de  $1,03 \pm 0,03$  ;  $1,59 \pm 0,01$  µg/ml, respectivement. Ces résultats nous ont permis aussi de classer ces extraits en fonction de leurs activité antioxydante comme suit : DP > AP > EPR > BPR > BPA.

Ces résultats sont en bon accord avec les données du dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux des extraits DP et AP et avec les données de la littérature qui ont pu établir une corrélation entre le contenu en composés phénoliques des extraits d'une espèce du genre *Pituranthos* et leur capacité à piéger les radicaux libres (Bouaziz et al., 2009).

### VI.3.1.C. L'effet scavenger du radical superoxyde produit par le DMSO alcalin

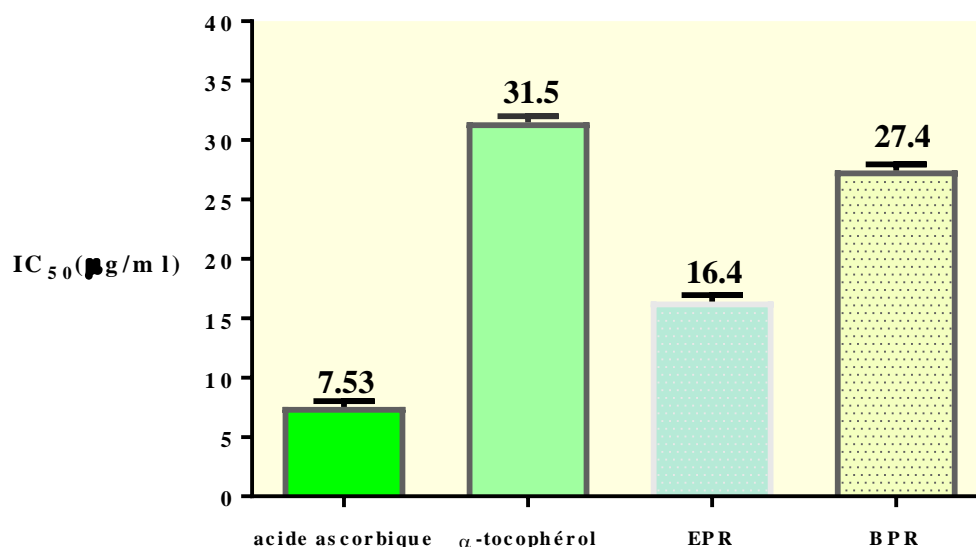
Les courbes montrant le pourcentage d'inhibition (%) de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) en fonction de la concentration de tous les extraits de *P. battandieri* et des standards (acide ascorbique et α-tocophérol) sont représentées dans la figure VI.7.



**Figure VI.7 :** Activité de piégeage du superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) par des extraits de *P. battandieri*, de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$ -tocophérol.

D'après la figure VI.7, nos résultats ont révélé que tous les extraits présentent un effet scavenger d'une manière dose dépendante. La figure VI.8 montre que l'extrait éther de pétrole (EPR) présente un très bon pourcentage d'inhibition ( $72,06 \pm 1,2$  %) à concentration de 50  $\mu\text{g/ml}$  par rapport l'extrait BPR ( $64,98 \pm 1,5$  %) et l' $\alpha$ -tocophérol ( $68,17 \pm 2,4$  %). On note cependant, qu'à la même concentration, l'acide ascorbique a montré le meilleur pourcentage avec  $89,88 \pm 0,51$  %.

Ces résultats ont été confirmés par le calcul des concentrations provoquant 50 % d'inhibition du radical-anion superoxyde ( $IC_{50}$ ) et qui sont représentées dans la figure VI.8.



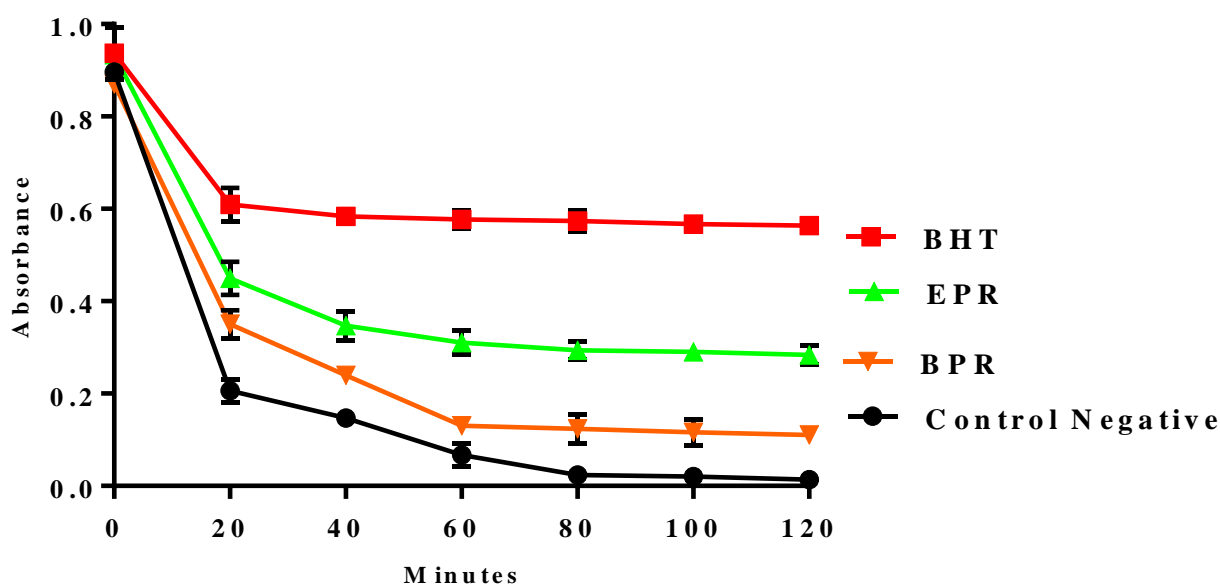
**Figure VI.8 :** Les valeurs des  $IC_{50}$  des extraits de *P. battandieri* et des standards (acide ascorbique,  $\alpha$ -tocophérol) (Test du radical-anion superoxyde) Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD ( $n = 3$ ),  $P < 0,05$

Les résultats des  $IC_{50}$  (Figure VI.8) montre que l'extrait EPR présente un effet scavenger puissant ( $IC_{50} = 16,4 \pm 0,51 \mu\text{g/ml}$ ), deux fois plus fort que l' $\alpha$ -tocophérol ( $31,5 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$ ) utilisé comme standard suivi par l'extrait BPR ( $IC_{50} = 27,4 \pm 0,51 \mu\text{g/ml}$ ). Comparativement à l'acide ascorbique ( $IC_{50} = 7,53 \pm 0,49 \mu\text{g/mL}$ ), cet extrait manifeste une capacité de piégeage du radical-anion superoxyde significative.

L'activité de l'extrait EPR est probablement due à la présence des furanocoumarines et polyynes identifiés dans cet extrait dans le cadre de ce travail (Chapitre V).

### VI.3.1.D. Test de blanchiment du $\beta$ -carotène

Les cinétiques de blanchiment du  $\beta$ -carotène en fonction de la présence ou de l'absence des extraits EPR et BPR et celle du standard BHA est montrée dans la figure VI.9.



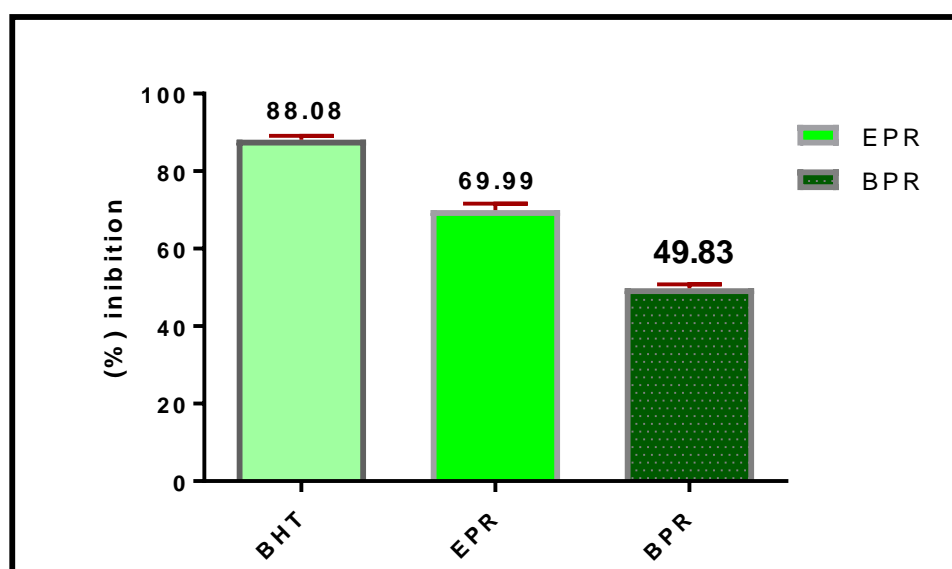
**Figure VI.9 :** La cinétique de blanchiment du  $\beta$ -carotène des extraits de *P. battandieri* et standard BHA en fonction du temps

Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD ( $n = 3$ ),  $P < 0,05$

La figure VI.9 montre que les courbes ont la même allure. En effet, à l'instant  $t_0$  les valeurs des absorbances des extraits EPR, BPR ainsi que celle du standard sont très proches et ont un seuil d'absorbance d'environ 1. Cela s'explique par le fait qu'à ce moment, il n'y a pas de radicaux formés dans le milieu réactionnel.

Après 1 heure de réaction, l'absorbance des extraits EPR, BPR, du standard ainsi que celle du contrôle négatif commence à diminuer progressivement indiquant le début de la formation des radicaux libres générés par l'acide linoléique dans le milieu réactionnel suite à la dégradation des doubles liaisons par le tween 40.

L'étude de la cinétique du blanchiment du  $\beta$ -carotène montre qu'elle diminue progressivement avec le temps, atteignant un état d'équilibre après 2 heures car le nombre de radicaux libres devient important. Après cette période, la diminution de l'absorbance reste constante indiquant que toutes les doubles liaisons présentes dans le  $\beta$ -carotène sont dégradées, ce qui se termine par l'épuisement irréversible du jaune par la transformation en une couleur blanche. C'est le blanchiment total du  $\beta$ -carotène (Karadag et al., 2009).



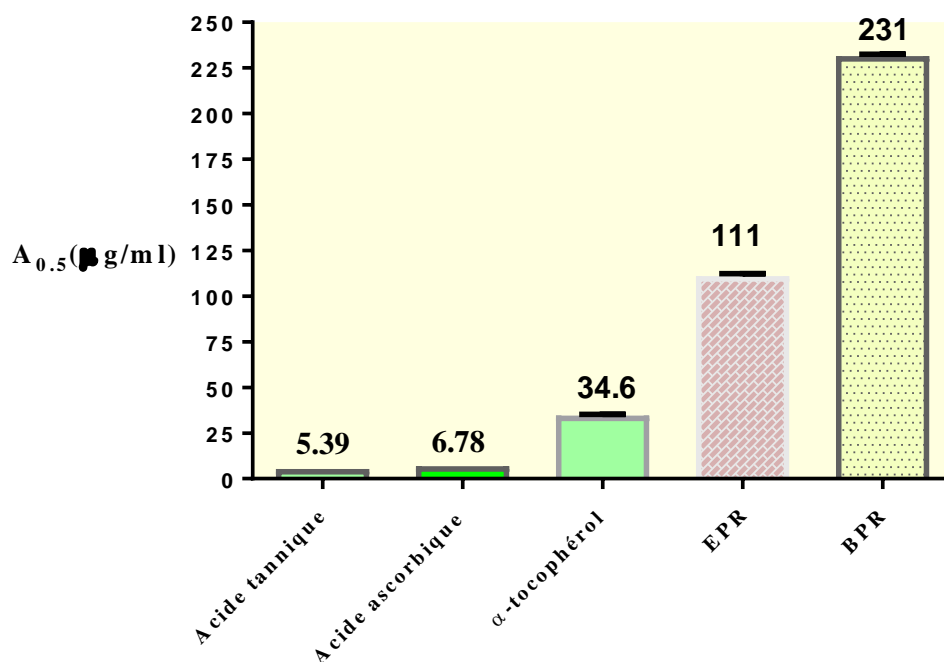
**Figure VI.10 :** Activité antioxydante relative des extraits EPR, BPR et du BHT dans le système acide linoléique/ $\beta$ -carotène.

Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05

Les résultats du blanchiment du  $\beta$ -carotène (Figure VI.10) indiquent que l'extrait EPR possède une activité antioxydante significative avec un pourcentage d'inhibition de  $66,99 \pm 0,42$  % comparativement à celle du BHA qui montre un pourcentage d'inhibition plus important ( $88,08 \pm 1,62$ %) et supérieur à l'extrait BPR ( $49,83 \pm 2,42$  %).

### VI.3.1.E. Test de la capacité antioxydante par réduction du Fer (FRAP)

L'absorbance d'un extrait ou d'un standard correspondant à 50% de la réduction du fer ferrique ( $A_{0,5}$ ) est représentée dans la figure VI.11.

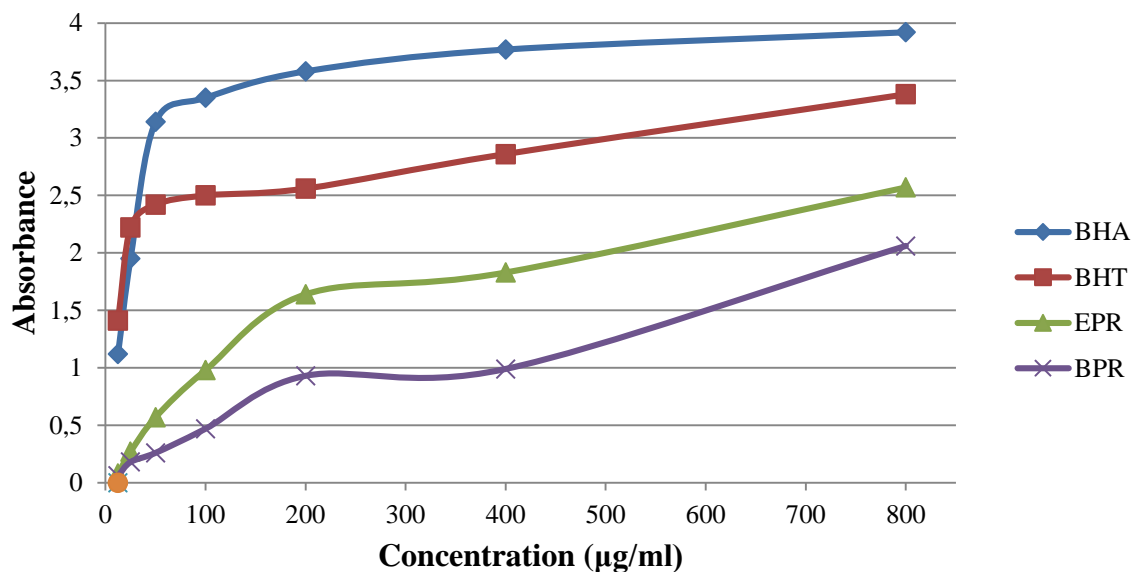


**Figure VI.11** : Les valeurs des  $A_{0.5}$  des extraits de *P. battandieri* et des standards : l'acide ascorbique, l'acide tannique et l' $\alpha$ -tocophérol (Test FRAP)  
Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD ( $n = 3$ ),  $P < 0,05$

Nos résultats ont révélé que l'extrait éther de pétrole (EPR) manifestait une capacité de réduction du fer ( $A_{0.5} = 111 \pm 1,32 \mu\text{g/ml}$ ) deux fois plus grande que l'extrait BPR et modérée par rapport au standard l' $\alpha$ -tocophérol ( $A_{0.5} = 34,6 \pm 0,57 \mu\text{g/ml}$ ), et plus faible que celles des deux références standards (acide ascorbique  $A_{0.5} : 5,39 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ , acide tannique  $A_{0.5} : 6,78 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ ). Tandis que l'extrait *n*-butanol (BPR) présentait une capacité de réduction plus faible ( $A_{0.5} = 231 \pm 1,05 \mu\text{g/ml}$ ) comparativement à la  $A_{0.5}$  des références standards.

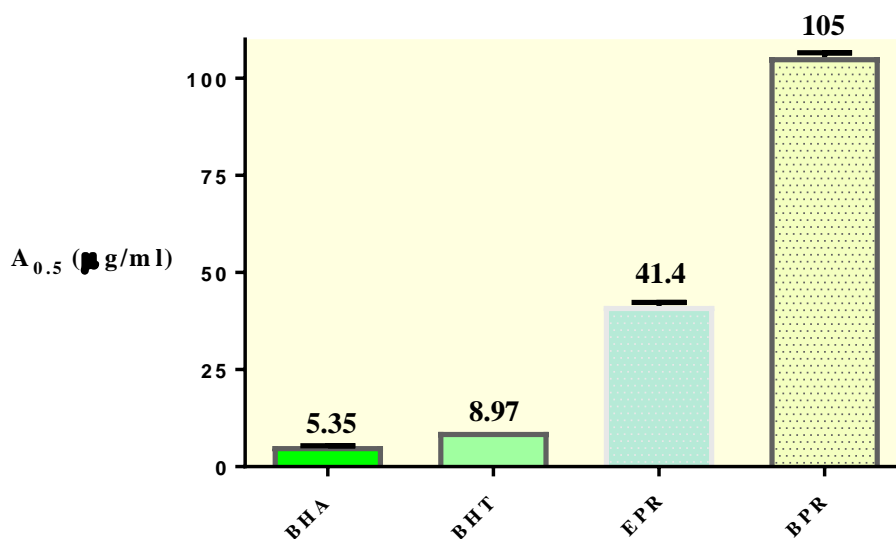
#### VI.3.1.F. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

Les courbes montrant l'absorbance (A) qui correspond à la réduction de cuivre en fonction de la concentration de deux extraits de *P. battandieri* et des standards (BHA, BHT) sont représentées dans la figure VI.12.



**Figure VI.12 :** Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC) par des extraits de *P. battandieri*, et des standards (BHA, BHT).

Nos résultats indiquent que l'extrait EPR a montré une capacité antioxydante par réduction du cuivre modérée par rapport à celles des standards BHA et BHT. Par contre l'extrait BPR a manifesté une activité antioxydante plus faible par rapport aux standards. Ces résultats ont été confirmés par la comparaison des absorbances qui correspondent à 50% de la réduction de cuivre ( $A_{0,5}$ ) et qui sont représentées dans la figure VI.13.



**Figure VI.13 :** Les valeurs des  $A_{0,5}$  des extraits de *P. battandieri* et des standards (BHA et BHT) (Test du CUPRAC)

Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05



D'après la figure VI.13, la capacité antioxydante de réduction du cuivre de l'extrait EPR ( $A_{0,5} = 41,4 \pm 0,85 \mu\text{g/ml}$ ) est deux fois plus importante que celle de l'extrait BPR ( $A_{0,5} = 105 \pm 1,15 \mu\text{g/ml}$ ) mais près de cinq fois moins importante que celle du BHT utilisé comme standard ( $A_{0,5} = 8,97 \pm 0,02 \mu\text{g/ml}$ ).

### VI.3.1.G. Étude, corrélation et comparaison des résultats de l'activité antioxydante des extraits de *P. battandieri*

L'ensemble des résultats obtenus par les tests au radical DPPH et radical-cation ABTS indique que les extraits DP, EPR et AP montrent un effet antioxydant plus important que les extraits BPR et BPA, il semble que ces résultats corrélerent avec leurs contenus en polyphénols et en flavonoïdes sauf dans le cas de EPR. Ainsi, il a été reporté que les composés phénoliques, notamment les acides phénoliques, les flavonoïdes et les coumarines sont les groupes les plus importants de métabolites secondaires et de composés bioactifs que comportent les plantes. Ils ont été signalés avoir de multiples effets biologiques, y compris l'activité antioxydante (Borges Bubols et al., 2013; Borges et al., 2005; Foti et al., 1996; Venugopala et al., 2013). L'étude de la structure-activité des coumarines a montré que l'activité antioxydante des dérivés de la coumarine pouvait être attribuée à la nature donneuse d'électrons des substituants tels que -OH, -CH<sub>3</sub> et -Cl sur le squelette coumarine pour réduire les radicaux libres et prévenir les dommages cellulaires (Ishihara et al., 2006; Kancheva et al., 2010; Thuong et al., 2010).

Le pouvoir antioxydant de l'extrait DP et EPR de *P. battandieri* pourrait être dû à un ou plusieurs constituants chimiques isolés ou identifiés précédemment (Chapitre V) qui agissent de manière synergique. La différence entre ces deux extraits peut être expliquée par la présence de plusieurs substances actives comme les furanocoumarines dans l'extrait DP comparativement à l'extrait EPR.

Ainsi, l'ensemble des résultats obtenus par les tests des : radical-anion superoxyde, blanchiment du  $\beta$ -carotène, réduction du Fer (FRAP) et réduction de cuivre (CUPRAC) indique que l'extrait EPR montrent un effet antioxydant plus important que l'extrait BPR selon les différents mécanismes impliqués dans chaque méthode.

Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux réalisés sur des espèces du genre *Pituranthos*, et qui ont montré une activité antioxydante remarquable de l'extrait acétate d'éthyle et chloroforme des parties aériennes de l'espèce *Pituranthos scoparius* (Belyagoubi-Benhammou et al., 2017).

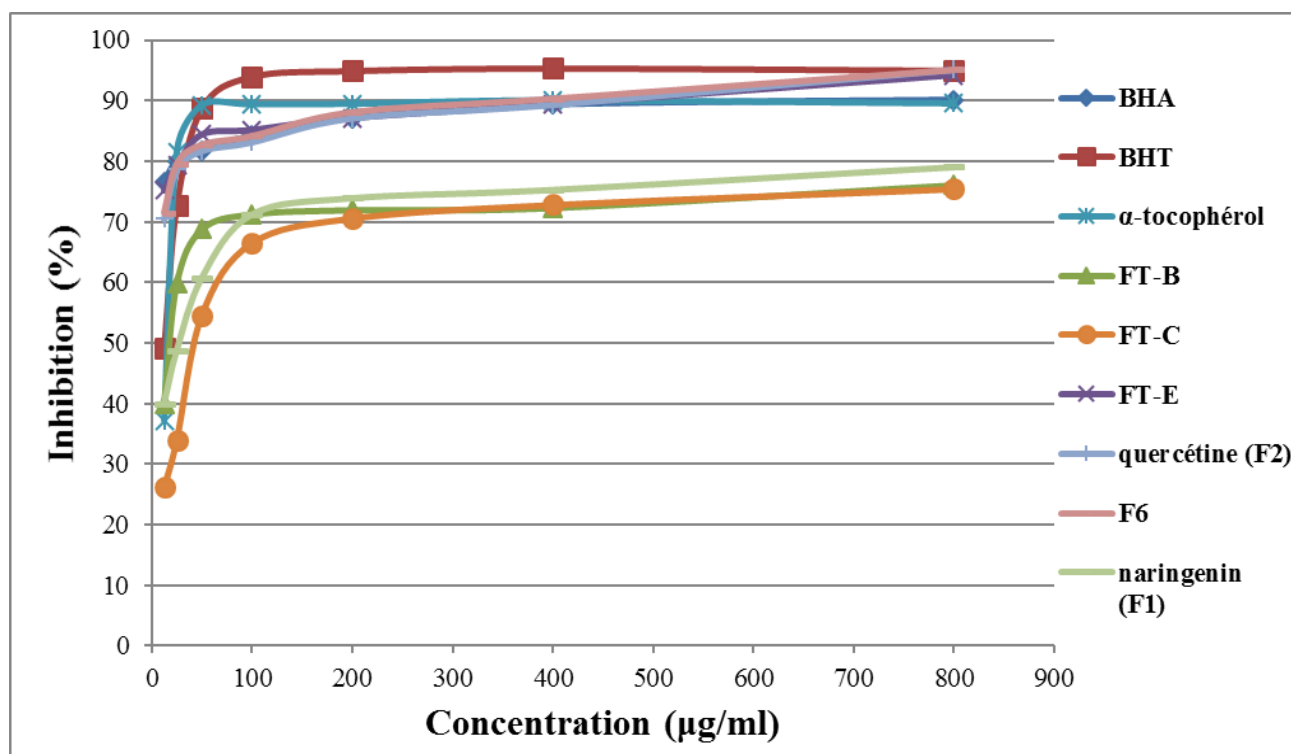
### VI.3.2. Évaluation de l'activité antioxydante des extraits de *F. thymifolia*

Les propriétés antioxydantes des extraits de *F. thymifolia* [ $\text{CHCl}_3$  (FT-C), acétate d'éthyle (FT-E), *n*-BuOH (FT-B)] ont été évaluées par sept méthodes : radical DPPH, radical-cation, ABTS, blanchiment du  $\beta$ -carotène, radical-anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), le pouvoir chélateur ferreux, CUPRAC et le pouvoir réducteur (FRAP).

On note que les valeurs de l' $\text{IC}_{50}$  ou  $A_{0,5}$  exprimées en  $\mu\text{g/ml}$  ont été déterminées graphiquement à partir de la droite de régression de pourcentage d'inhibition ou d'absorbance en fonction de la concentration pour chaque extrait ou standard testé.

#### VI.3.2.A. L'effet scavenger du radical DPPH

Les courbes montrant le pourcentage d'inhibition (%) du radical libre DPPH en fonction de la concentration de tous les extraits de *F. thymifolia*, les composés isolés (F1, F2 et F6) et des standards (BHA, BHT et  $\alpha$ -tocophérol) sont représentées dans la figure VI.14.



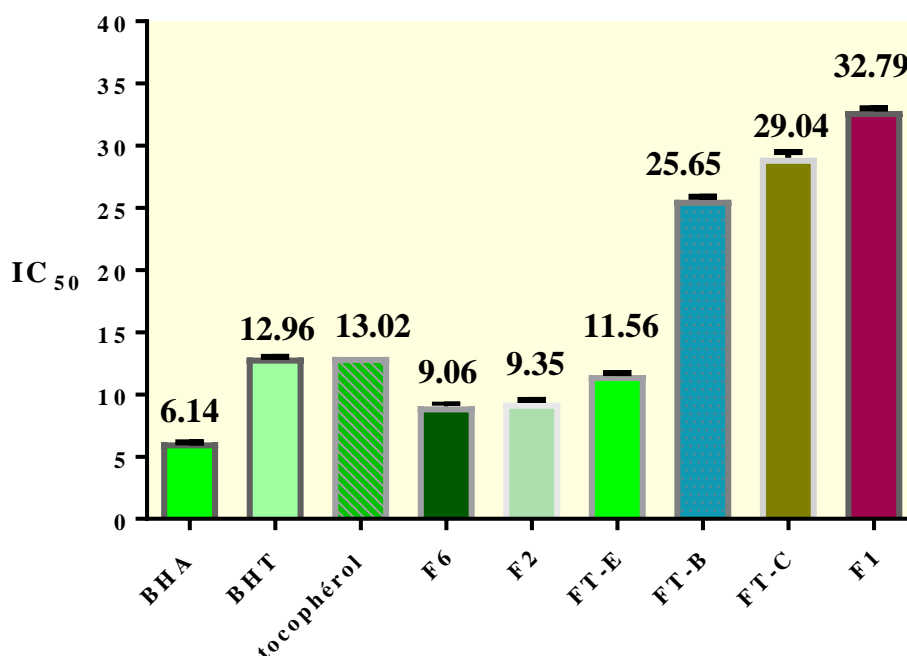
**Figure VI.14 :** Activité de piégeage du radical DPPH par des extraits de *F. thymifolia*, des produits isolés (F1, F2 et F6) et du BHA, BHT et de l' $\alpha$ -tocophérol.

Selon la figure précédente (Figure VI.14), les résultats obtenus montrent que tous les extraits, et les composés isolés testés présentent l'effet scavenger d'une manière dose dépendante.

Les extraits FT-E, FT-B et FT-C ont réagi positivement au test du radical DPPH mais à différents degrés. Cette figure montre que l'extrait acétate d'éthyle (FT-E) présente le meilleur pourcentage d'inhibition  $75,25 \pm 0,9 \%$  à concentration de  $12,5 \mu\text{g/ml}$  par rapport aux standards utilisés. En effet, à la même concentration, le BHT a donné  $49,09 \pm 0,76 \%$  et l' $\alpha$ -tocophérol  $37,21 \pm 1,82 \%$ . Alors que les extraits FT-B et FT-C et à la même concentration, présentent des pourcentages d'inhibition moyens de  $39,94 \pm 2,5 \%$ ;  $26,12 \pm 3,2 \%$ , respectivement. Ceci peut s'expliquer par la richesse de l'extrait FT-E en composés phénoliques signalés précédemment par son taux élevé en polyphénols et flavonoïdes totaux.

Les composés isolés (F1, F2 et F6) présentaient un effet scavenger du radical DPPH significatif avec des pourcentages d'inhibition élevés ( $81,73 \pm 1,6 \%$ ,  $82,73 \pm 0,7 \%$ ,  $60,77 \pm 0,9 \%$ , respectivement) à la concentration  $50 \mu\text{g/ml}$  comparativement au BHA utilisé comme standard ( $81,73 \pm 0,10 \%$ ).

Les valeurs des  $IC_{50}$  des extraits et les composés isolés ont été calculées et représentées dans la figure VI.15.



**Figure VI.15** : Les valeurs des  $IC_{50}$  des extraits de *F. thymifolia* et de standards BHA, BHT et l' $\alpha$ -tocophérol (Test du DPPH•)

Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P <0,05

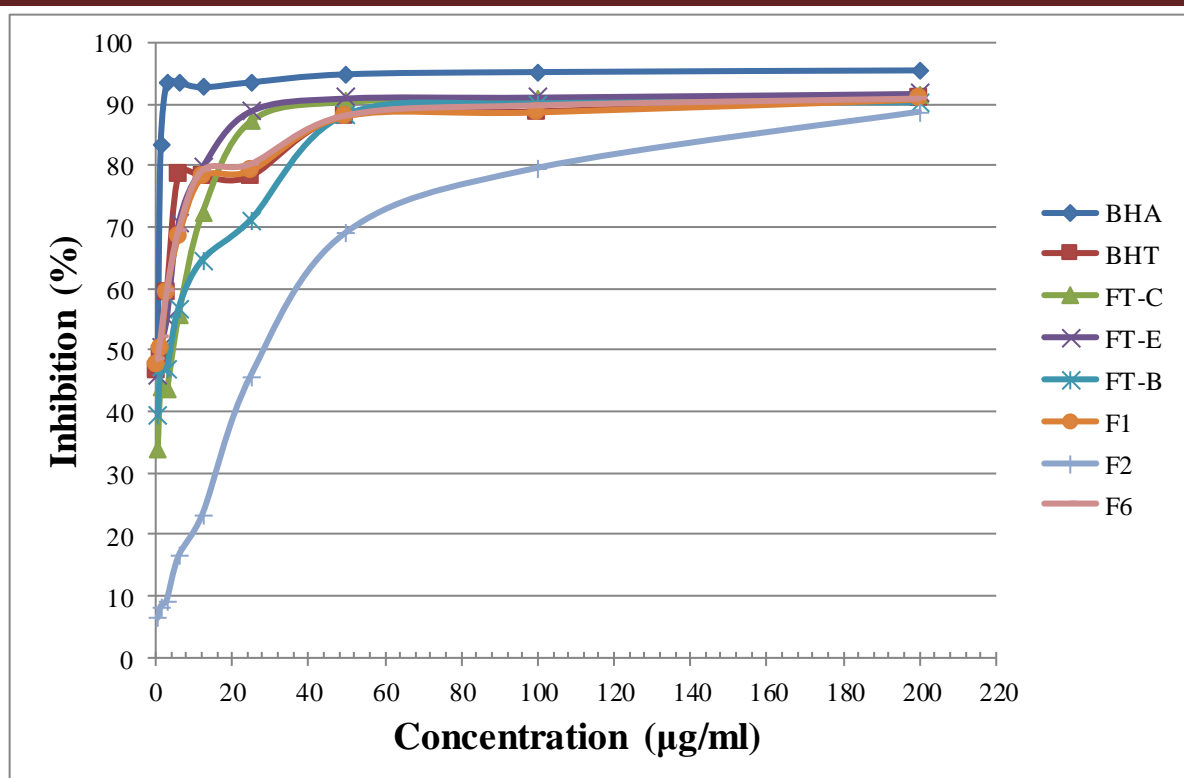
D'après les valeurs des  $IC_{50}$  mentionnées dans la figure VI.15, l'extrait FT-E présente une activité significative *in vitro* et dépendante de la concentration vis-à-vis des radicaux DPPH avec une  $IC_{50}$  de  $11,56 \pm 0,11$   $\mu\text{g/ml}$  comparativement à la  $IC_{50}$  de la solution des standards le BHT et l' $\alpha$ -tocophérol qui sont de  $12,99 \pm 0,41$  et  $13,02 \pm 1,17$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivement. Les extraits FT-B et FT-C montrent un effet inhibiteur du radical DPPH moins important que FT-E avec une  $IC_{50} = 25,65 \pm 1,02$  ;  $29,02 \pm 3,23$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivement.

Ces résultats sont en bon accord avec les données du dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux qui montrent une richesse remarquable de l'extrait FT-E comparativement aux extraits FT-B et FT-C. Il est connu que, d'une manière générale les polyphénols et les flavonoïdes sont de bons antioxydants et que cette activité est directement liée à leur structure (Rice-Evans et al., 1996). Ceci confirme également les résultats de nombreuses études qui ont pu établir une relation étroite entre le contenu en composés phénoliques des extraits des plantes du genre *Frankenia* et leur capacité à piéger les radicaux libres (Ben Mansour et al., 2017; Megdiche Ksouri et al., 2011; Torres Carro et al., 2016).

Pour les composés isolés, la quercétine 3-méthyl ether (**F6**) et la quercétine (**F2**) sont les composés les plus actifs et présentent un effet de piégeage supérieur à celui des standards (BHT et l' $\alpha$ -tocophérol) avec des  $IC_{50} = 9,06 \pm 0,46$  ;  $9,35 \pm 0,35$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivement. L'activité importante de la quercétine (**F2**) et son dérivé (**F6**) est due à la présence de groupements hydroxyles dans ces molécules (Formica et Regelson, 1995; Heim et al., 2002; López-Alarcón et Denicola, 2013; Pisoschi et Pop, 2015; Rice-Evans et al., 1997).

### VI.3.2.B. L'effet scavenger du radical-cation (ABTS)

La figure VI.16 montre les courbes des pourcentages d'inhibition (%) du radical-cation ABTS en fonction de la concentration de tous les extraits de *F. thymifolia*, des composés isolés et des standards (BHA, BHT).

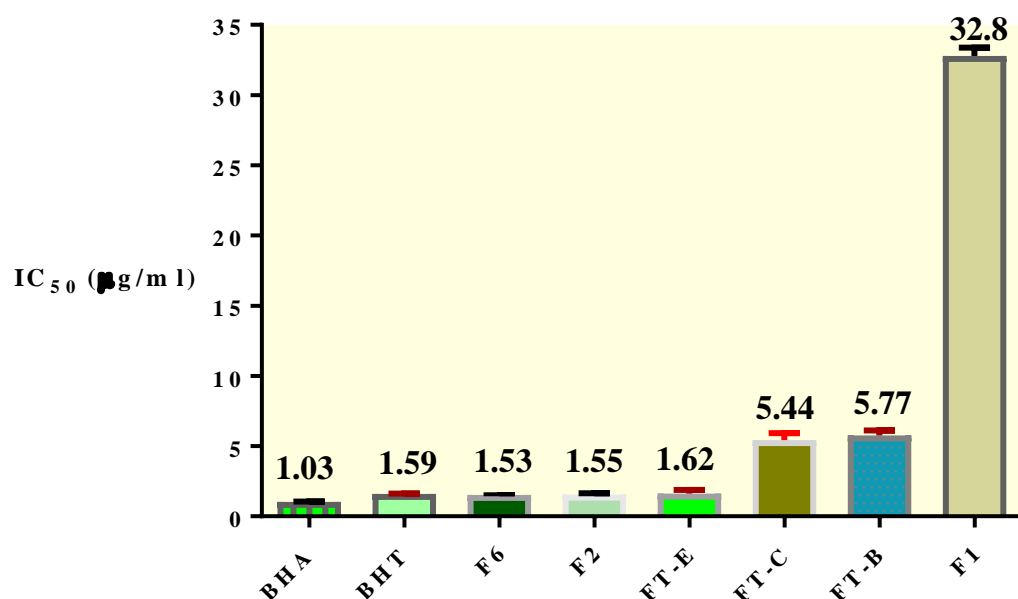


**Figure VI.16 :** Activité de piégeage du radical-cation ABTS par des extraits de *F. thymifolia*, des produits isolés (F1, F2 et F6) et des standards.

Nos résultats montrent que les différents extraits de *F. thymifolia* ont présenté un pourcentage (%) de l'effet de scavenger dépendant de la concentration en extraits. Les activités de piégeage de l'ABTS<sup>•+</sup> par les extraits FT-E, FT-B et FT-C sont significatives comparées à celles des standards. En effet, FT-E présente toujours la meilleure activité inhibitrice par rapport à FT-C et FT-B aux concentrations comprises entre 0,78 et 25 µg/. Au-delà de 25 µg/ml, les activités sont presque similaires.

Concernant les composés isolés, les profils d'activité anti-radicalaire obtenus révèlent que la quercétine (F2) et son dérivé (F6) possèdent une activité antioxydante remarquable avec  $47,52 \pm 0,35$  % et  $48,52 \pm 0,48$  %, respectivement à la première concentration testée (0,78 µg/ml) comparativement aux standards [BHA ( $48,56 \pm 0,32$  %), BHT ( $46,52 \pm 0,32$  %)].

Ces résultats ont mené à des concentrations inhibitrices 50% (IC<sub>50</sub>) très proches (Figure VI.17).



**Figure VI.17** : Les valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits de *F. thymifolia* et des standards BHA, BHT (Test du ABTS<sup>+</sup>)

Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05

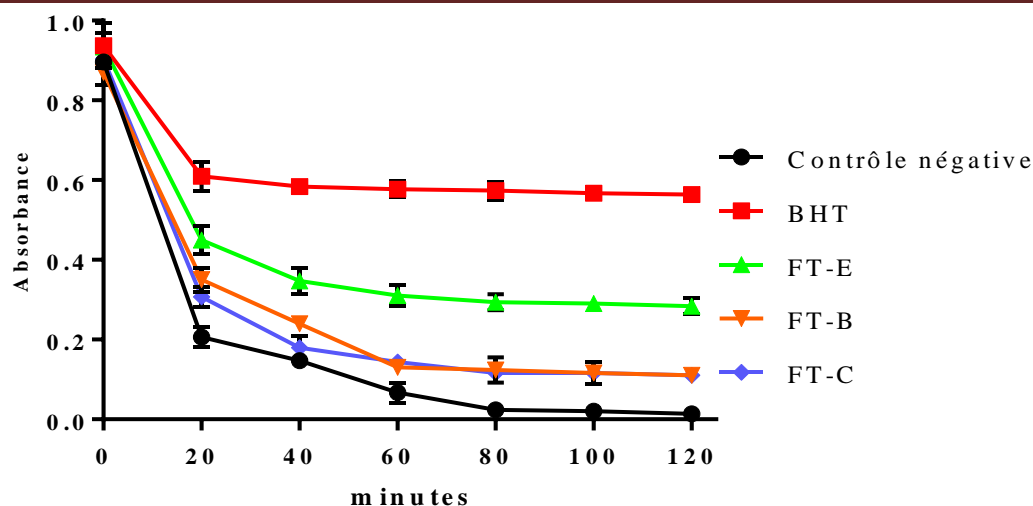
Parmi les extraits, FT-E montre l'effet inhibiteur sur le radical-cation ABTS, le plus puissant avec une IC<sub>50</sub> de  $1,62 \pm 0,1$  µg/ml suivi par l'extrait FT-C avec une IC<sub>50</sub> =  $5,44 \pm 0,2$  µg/ml et l'extrait FT-B avec une IC<sub>50</sub> de  $5,77 \pm 0,14$  µg/ml, sachant que l'IC<sub>50</sub> de notre standard le BHA est de  $1,03 \pm 0,00$  µg/ml.

La quercétine 3-méthyl éther (F6) montre un effet antioxydant puissant avec une IC<sub>50</sub> =  $1,53 \pm 0,1$  µg/ml, proche de celui de la quercétine (F2) et du standard, le BHT ( $1,59 \pm 0,03$  µg/ml). La naringénine (F1) s'est révélée beaucoup moins active.

Ces résultats sont en bon accord avec ceux du dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux et corrélent avec les résultats de test du radical DPPH.

### VI.3.2.C. Test de blanchiment du β-carotène

Les courbes des cinétiques des réactions du blanchiment du β-carotène en fonction de la présence ou de l'absence des composés phénoliques des extraits FT-E, FT-C et FT-B et celle du standard (BHT) sont représentées dans la figure VI.18.

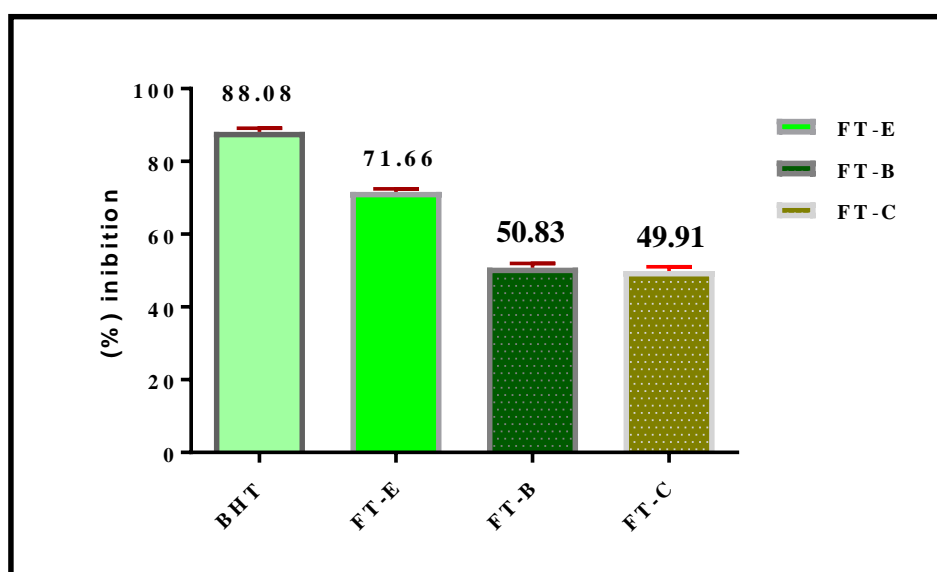


**Figure VI.18 :** Courbes des cinétiques des réactions de blanchiment du  $\beta$ -carotène en présence et en absence des extraits de *F. thymifolia* et du BHT en fonction du temps. Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05

L'oxydation de l'acide linoléique produit des hydroperoxides, qui sont des radicaux libres dérivés attaquant le chromophore de  $\beta$ -carotène et aboutissent au blanchiment de son émulsion réactionnelle.

D'après les résultats mentionnés dans la figure VI.18, il est évident que l'extrait FT-E ainsi que le standard BHT inhibent d'une manière efficace l'oxydation couplée de l'acide linoléique et du  $\beta$ -carotène suivi par l'extrait FT-B et FT-C.

À 100  $\mu$ g/ml, l'inhibition maximale de FT-E ( $71,68 \pm 0,78$  %) est significativement supérieure à celle de FT-B ( $50,83 \pm 1,11$  %), FT-C ( $49,91 \pm 1,09$  %) et inférieure à celle du standard le BHT ( $88,08 \pm 1,01$  %) (Figure VI.19).



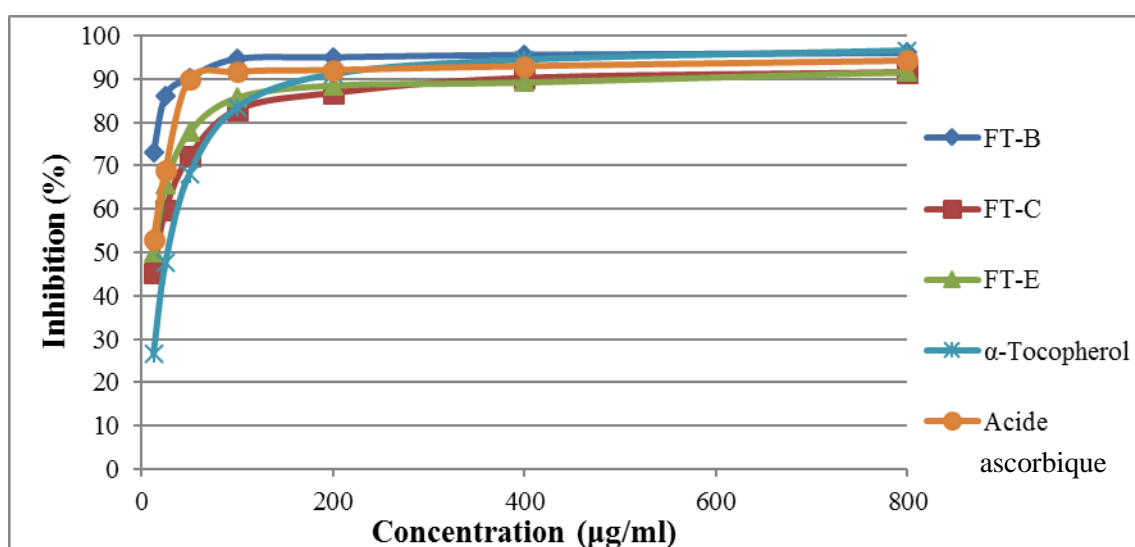
**Figure VI.19 :** Activité antioxydante relative des extraits FT-E, FT-B et FT-C et du BHT dans le système acide linoléique/ $\beta$ -carotène.

Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05

Les résultats de ce test soulignent bien la présence de molécules antioxydantes au niveau des extraits FT-E, FT-B et FT-C car seul ce type de molécules peut neutraliser les radicaux libres dérivés de l'acide linoléique et prévenir l'oxydation et le blanchiment du  $\beta$ -carotène (Figure VI.19).

#### VI.3.2.D. L'effet scavenger du superoxyde produit par le DMSO alcalin

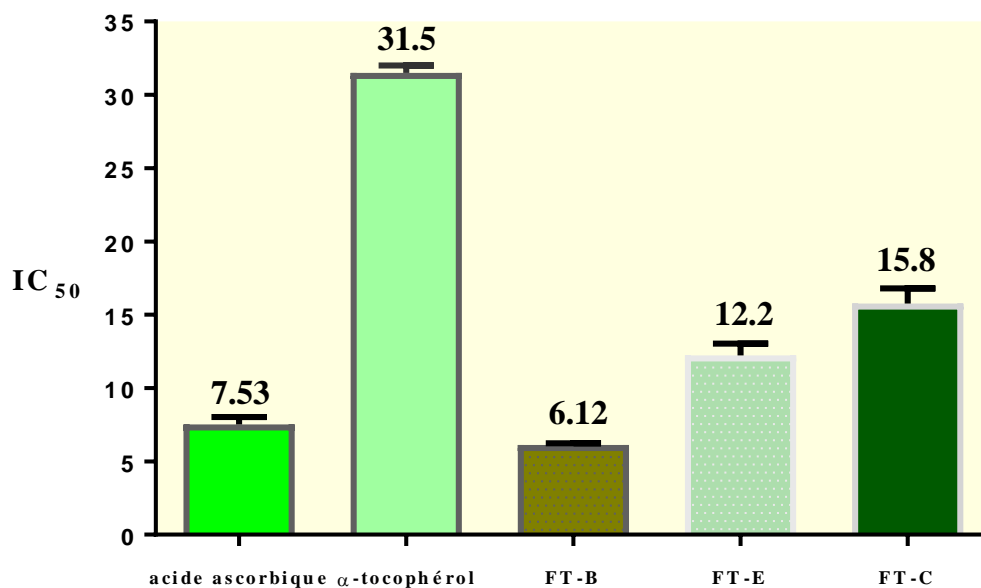
Les courbes montrant le pourcentage d'inhibition (%) du superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) en fonction de la concentration de tous les extraits de *F. thymifolia* et des standards (acide ascorbique et  $\alpha$ -tocophérol) sont représentées dans la figure VI.20.



**Figure VI.20 :** Activité de piégeage du radical superoxyde produit par le DMSO alcalin des extraits de *F. thymifolia*, de l'acide ascorbique et de l' $\alpha$ -tocophérol.

L'effet scavenger du radical-anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) induite par les extraits de *F. thymifolia* est déterminé par la diminution de l'absorbance à  $\lambda=546$  nm. La figure VI.20 montre que tous les extraits FT-B, FT-E et FT-C inhibent la formation du superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) d'une façon dépendante de la dose. A la concentration 100  $\mu$ g/ml, l'extrait FT-B montre le pourcentage d'inhibition le plus élevé ( $94,64 \pm 0,62$  %) suivi par l'extrait FT-E ( $85,76 \pm 0,93$  %) et en dernier l'extrait FT-C qui a présenté le pourcentage le plus bas ( $82,83 \pm 0,95$  %) comparativement aux antioxydants standards, l'acide ascorbique ( $91,76 \pm 0,45$  %) et l' $\alpha$ -tocophérol ( $83,45 \pm 1,81$  %). Ces résultats sont en bon accord avec les valeurs des  $IC_{50}$  qui sont représentés dans la figure VI.21.



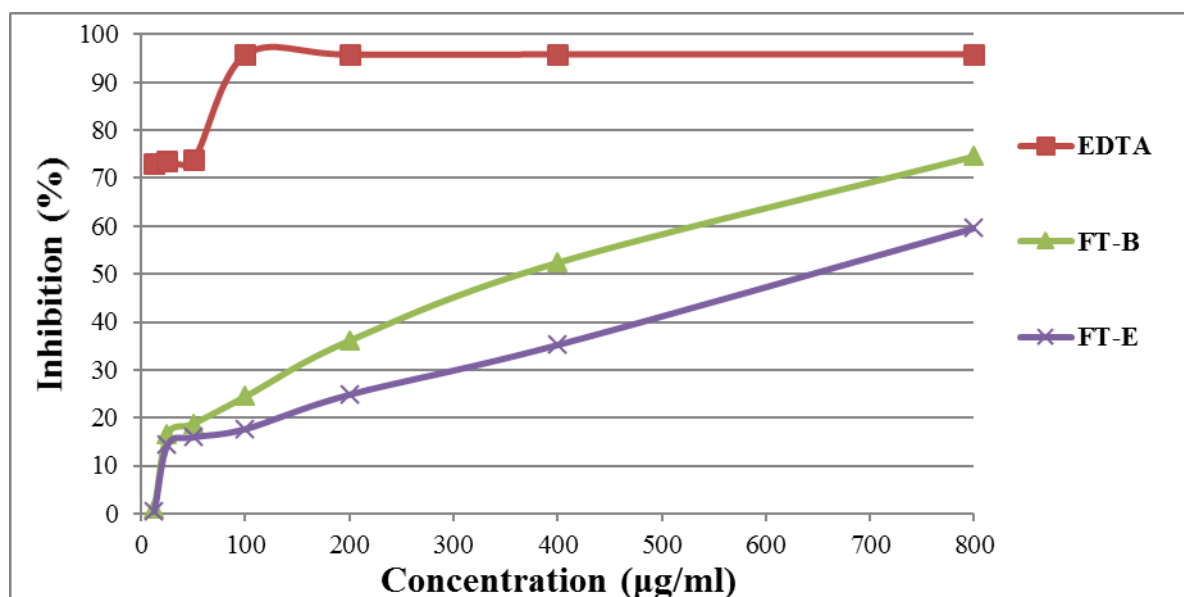


**Figure VI.21** : Les valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits de *F. thymifolia* et des standards (acide ascorbique, α-tocophérol) (test du superoxyde)  
Chaque valeur représente une moyenne ± SD (n = 3), P < 0,05

D'après la figure VI.21, l'extrait FT-B présente l'effet scavenger le plus puissant avec une IC<sub>50</sub> = 6,12 ± 0,11 µg/ml, comparativement à l'extrait FT-E (IC<sub>50</sub> = 12,2 ± 0,8 µg/ml), FT-C (IC<sub>50</sub> = 15,8 ± 1,05 µg/ml), et les standards : l'acide ascorbique (7,59 ± 1,16 µg/ml) et l'α-tocophérol (31,52 ± 2,22 µg/ml). Cet effet pourrait être dû à la présence de constituants antioxydants comme les flavonoïdes et les acides phénoliques qui ont été isolés et identifiés dans ces extraits dans le cadre de ces travaux.

### VI.3.2.E. Le pouvoir chélateur ferreux (ou l'activité de la chélation des ions ferreux)

Le test du pouvoir chélateur du fer mesure la capacité des antioxydants à entrer en compétition chélatrice avec le ferrozine visant l'ion ferreux.

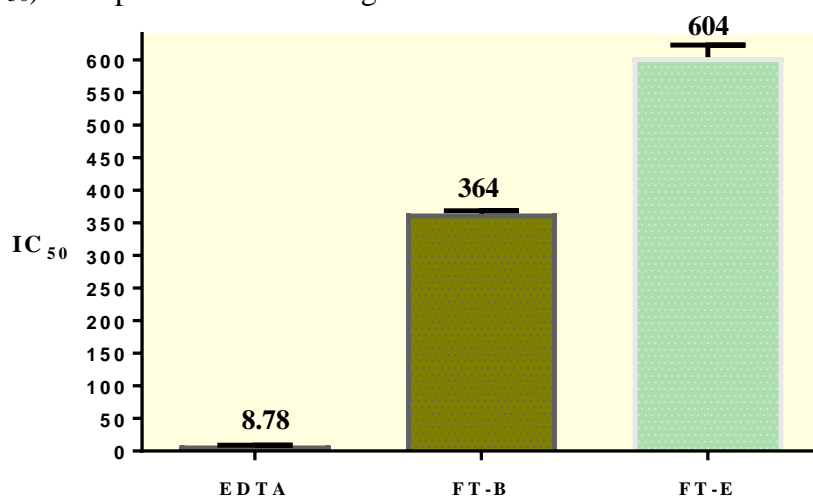


**Figure VI.22 :** Effet Chélateur des extraits FT-B et FT-E de *F. thymifolia*, et de l'EDTA

La figure VI.22 montre les effets de la chélation des ions ferreux sur les extraits FT-E et FT-B, par rapport à l'EDTA, en tant que standard. Nous remarquons que l'activité de chélation du  $Fe^{+2}$  augmente avec l'augmentation de la concentration des extraits.

En effet, l'extrait FT-B présente un effet chélateur des ions ferreux maximum  $74,66 \pm 0,5$  % supérieur à FT-E ( $59,63 \pm 4,98$  %), à la concentration  $800 \mu\text{g/ml}$ , ce qui représente une activité faible par rapport au standard utilisé. En effet, l'EDTA a donné  $95,78 \pm 0,10$  % à la concentration de  $100 \mu\text{g/ml}$ .

La concentration d'un extrait ou d'un standard provoquant 50% d'inhibition de la chélation du  $Fe^{+2}$  ( $IC_{50}$ ) est représentée dans la figure VI.23.

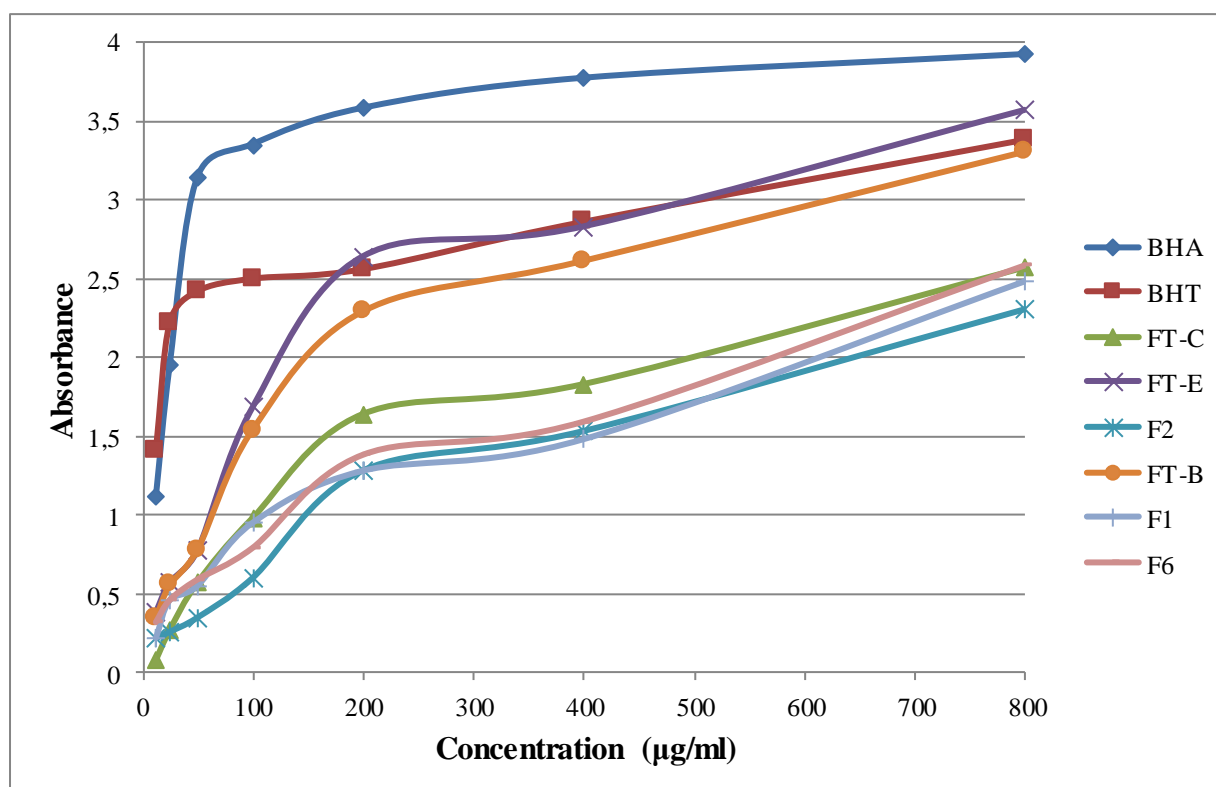


**Figure VI.23 :** Les valeurs des  $IC_{50}$  des extraits de *F. thymifolia* et de standard (EDTA)  
Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05

Le pouvoir chélateur des extraits FT-B et FT-E était plus faible ( $IC_{50}$  :  $364 \pm 4,16$  ;  $604 \pm 18,4$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivement) que celles du références standard EDTA ( $IC_{50}$  :  $8,78 \pm 0,47$   $\mu\text{g/ml}$ ), ce qui suggère que la capacité de chélation du  $\text{Fe}^{+2}$  est modérée et nécessite une concentration élevée pour avoir un effet significatif (Figure VI.23).

### VI.3.2.F. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

Les courbes montrant l'absorbance (A) qui correspond à la réduction du cuivre en fonction de la concentration des extraits de *F. thymifolia*, des composés isolés (F1, F2 et F6) et des standards (BHA, BHT) sont représentées dans la figure VI.24.

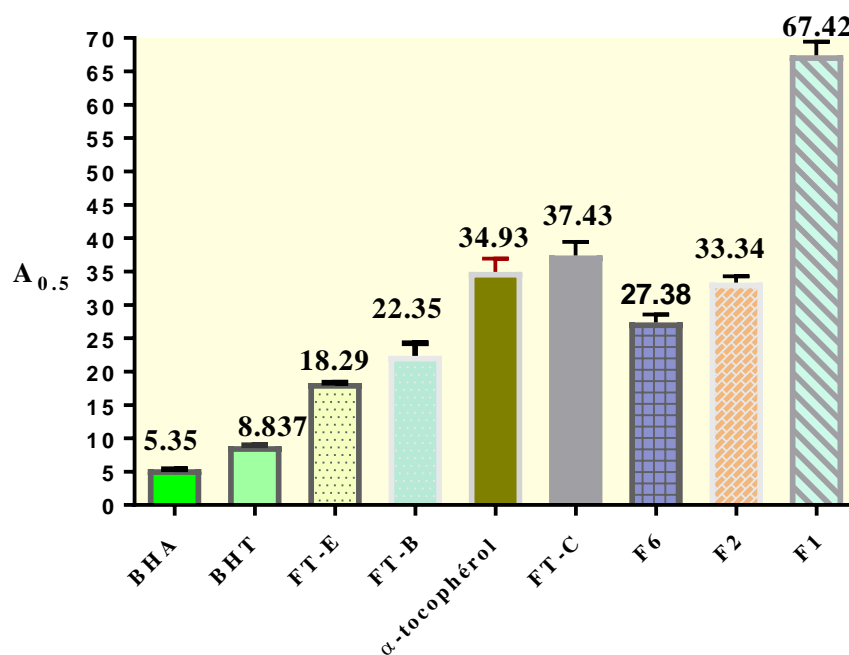


**Figure VI.24 :** Test de réduction du cuivre (CUPRAC) par les extraits de *F. thymifolia*, des produits isolés (F1, F2 et F6) et des standards (BHA, BHT).

D'après la figure VI.24, l'extrait FT-E montre une meilleure activité inhibitrice dans le test CUPRAC avec une absorbance de  $A = 2,64 \pm 0,02$  par rapport à FT-B ( $A = 2,29 \pm 0,11$ ), FT-C ( $A = 1,64 \pm 0,24$ ) et du standard BHT ( $A = 2,56 \pm 0,05$ ) à la concentration  $200 \mu\text{g/ml}$ .

A la même concentration, la quercétine 3-méthyl ether (F6) montre la meilleure activité inhibitrice dans le test CUPRAC ( $A = 1,38 \pm 0,04$ ) comparativement à la quercétine (F2) ( $A = 1,28 \pm 0,01$ ) et naringenin (F1) ( $A = 1,28 \pm 0,05$ ).

Les résultats du calcul des absorbances qui correspondent à la réduction des 50% du cuivre sont reportés sur la Figure VI.25.



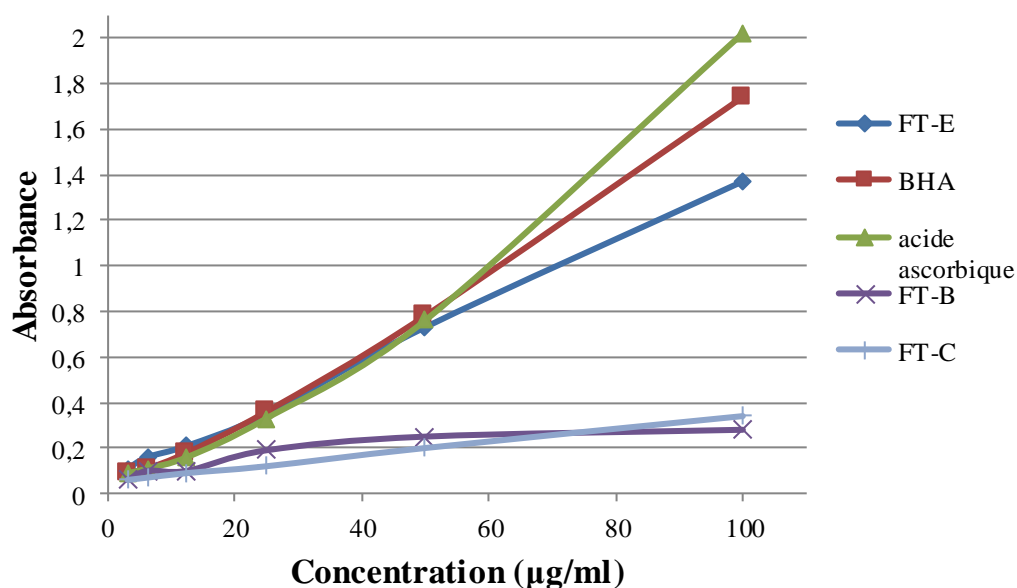
**Figure VI.25 :** Les valeurs des  $A_{0,5}$  des extraits de *F. thymifolia* et de standards (BHA, BHT et l' $\alpha$ -tocophérol) (Test du CUPRAC)  
Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05

La capacité de réduction du cuivre de l'extrait FT-E ( $A_{0,5} = 18,29 \pm 0,2 \mu\text{g/ml}$ ) est près de deux fois supérieure à celle de l' $\alpha$ -tocophérol ( $A_{0,5} = 34,93 \pm 1,2 \mu\text{g/ml}$ ) et à celle de FT-C ( $A_{0,5} = 37,43 \pm 3,2 \mu\text{g/ml}$ ). Elle est supérieure à celle de FT-B ( $A_{0,5} = 22,35 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$ ).

Concernant la capacité de réduction des composés isolés, la quercétine-3-méthyl ether (**F6**) manifeste la meilleure capacité avec une  $A_{0,5} = 27,38 \pm 3,2 \mu\text{g/ml}$  suivi par la quercétine (**F2**) avec une  $A_{0,5} = 33,34 \pm 2,2 \mu\text{g/ml}$  et en dernier naringenin (**F1**) avec une  $A_{0,5} = 67,42 \pm 3,6 \mu\text{g/ml}$ .

### VI.3.2.G. Test de la capacité antioxydante par réduction du fer (le pouvoir réducteur)

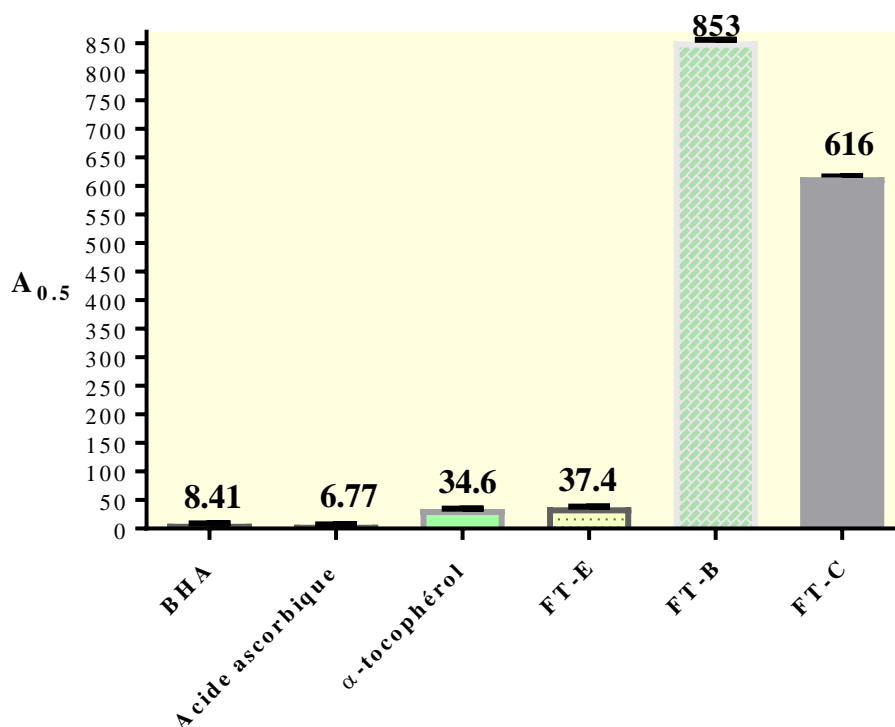
Les courbes montrant l'absorbance (A) qui correspond à la réduction du fer en fonction de la concentration des extraits de *F. thymifolia* et des standards (l'acide ascorbique et le BHA) sont représentées dans la figure VI.26.



**Figure VI.26 :** Test de réduction du Fer (le pouvoir réducteur) des extraits de *F. thymifolia* et des standards (BHA, l'acide ascorbique).

La figure VI.26 montre que l'extrait FT-E a le pouvoir de réduire le fer ferrique du complexe ferricyanure ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux via l'augmentation de l'absorbance avec la concentration. Cet extrait a manifesté un pouvoir réducteur plus importante ( $A = 1,37 \pm 0,08$ ) par rapport à l'extrait FT-C ( $A = 0,34 \pm 0,04$ ) et FT-B ( $A = 0,28 \pm 0,06$ ) à la concentration 100  $\mu\text{g/ml}$ . Cependant cet extrait est moins efficace par rapport aux molécules utilisées comme références (BHA :  $A = 1,74 \pm 0,07$ ; l'acide ascorbique  $A = 1,44 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$ ) à la même concentration.

Les absorbances des extraits ou standards correspondant à 50% de la réduction de fer ferrique ( $A_{0,5}$ ) est représentée dans la figure VI.27



**Figure VI.27 :** Les valeurs des  $A_{0.5}$  des extraits de *F. thymifolia* et des standards, l'acide ascorbique, le BHA et l' $\alpha$ -tocophérol (le pouvoir réducteur)  
Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05

La valeur de  $A_{0.5} = 37,4 \pm 1,03 \mu\text{g/ml}$  montre que l'extrait FT-E possède un excellent pouvoir réducteur, 16 fois supérieur à FT-C ( $A_{0.5} = 616 \pm 3,02 \mu\text{g/ml}$ ) et 23 fois supérieur à FT-B ( $A_{0.5} = 853 \pm 3,01 \mu\text{g/ml}$ ). Néanmoins, nous remarquons que le pouvoir réducteur de cet extrait est inférieur à celui des standards (l' $\alpha$ -tocophérol :  $A_{0.5} = 34,6 \pm 2,38 \mu\text{g/ml}$ , BHA :  $A_{0.5} = 8,41 \pm 0,67 \mu\text{g/ml}$ ).

### VI.3.2.H. Étude, corrélation et comparaison des résultats de l'activité antioxydante des extraits de *F. thymifolia* et des composés isolés

L'ensemble des résultats obtenus par les tests du radical DPPH, radical-cation ABTS, blanchiment du  $\beta$ -carotène, CUPRAC et du pouvoir réducteur (FRAP) indique que l'extrait acétate d'éthyle FT-E montrent un effet antioxydant puissant et plus important que les extraits FT-B et FT-E. L'extrait butanolique FT-B montre une bonne activité antioxydante supérieure à celle de FT-C dans le test du radical-anion  $\text{O}_2^{\cdot-}$  et le pouvoir chélateur ferreux.

Il semble que ces résultats corrélient avec le contenu en polyphénols et en flavonoïdes de ces extraits. En effet, le dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux ont montré une richesse remarquable de l'extrait FT-E par rapport aux extraits FT-B et FT-C.

Ceci confirme également les résultats de nombreuses études qui reportent que les composés phénoliques, notamment les acides phénoliques, les flavonoïdes et les coumarines sont les groupes les plus importants de métabolites secondaires et de composés bioactifs que comportent les plantes. Ils ont été signalés avoir de multiples effets biologiques, y compris l'activité antioxydante (Borges et al., 2013; Borges et al., 2005; Foti et al., 1996; Venugopala et al., 2013). En effet, l'activité antioxydante de l'extrait FT-E pourrait être due à la quercétine qui est une molécule antioxydante de référence (Erlund, 2004; Formica et Regelson, 1995) et à la naringenin qui a également montré une bonne activité antioxydante (Rice-Evans et al., 1997). Ces molécules ou autres flavonoïdes peuvent agir par synergie pour donner un pouvoir antioxydant important. Dans ce contexte, la quercétine (**F2**), la quercétine-3-méthyl ether (**F6**), le gallate de méthyle 3,4-diméthyl ether (**F3**) et des composés isolés (**F5-F12**) pourraient être à la base de l'activité antioxydante remarquable de l'extrait FT-B. A noter que parmi les flavonoïdes isolés figurent des antioxydants puissants. (Erlund, 2004; Heim et al., 2002; Rice-Evans et al., 1997).

Ces résultats ont été également révélés par Ben Mansour et al., 2016; Megdiche Ksouri et al., 2011 qui ont évalué l'activité antioxydante des extraits de *F. thymifolia* récolté en Tunisie.

D'après les tests du radical DPPH, radical-cation ABTS, et CUPRAC des composés isolés, la quercétine-3-méthyl ether (**F6**) a montré une activité importante par rapport à la quercétine (**F2**) et naringenin (**F1**). Ces résultats ont été confirmés par d'autres études effectuées sur l'activité antioxydante de la quercétine et la quercétine-3-méthyl éther (Aliouche et al., 2007; Dok-Go et al., 2003). En effet, l'activité antioxydante de la quercétine et son dérivé la quercétine -3-méthyl éther est due à plusieurs facteurs, parmi lesquelles la présence d'au moins quatre groupements hydroxyles dans ces molécules (Heim et al., 2002; Rice-Evans et al., 1996; Van Acker et al., 1996).

#### **VI.4. L'activité antiparasitaire des extraits de *P. battandieri*, *F. thymifolia* et des composés isolés**

##### **VI.4.1. L'activité antiparasitaire des extraits de *P. battandieri***

L'activité antileishmanienne, antitrypanosomiale et antiamibienne des extraits : brute (CrP), hexane (HP), dichlorométhane (DP), acétate d'éthyle (AP), *n*-BuOH (BPA) des parties aériennes et éther de pétrole (EPR) et *n*-BuOH (BPR) des racines de *P. battandieri* a été évaluée sur deux souches de *Leishmania* : *L. donovani*, *L. amazonensis* ; une souche de *Trypanosoma* : *Trypanosoma cruzi* et finalement une souche d'*Acanthamoeba* :

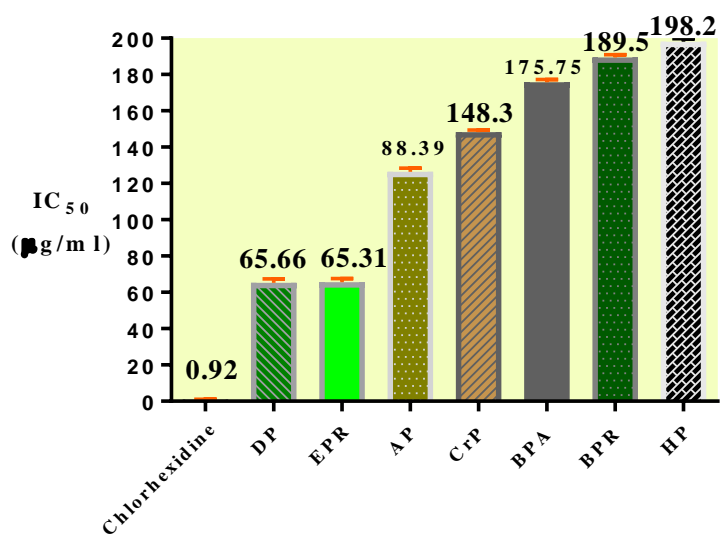
*Acanthamoeba castellanii* str. Neff. Pour ce faire, différentes concentrations d'extraits sont incubées avec la forme promastigotes de *L. donovani*, *L. amazonensis*, épimastigote de *T. cruzi* et trophozoïte d'*A. castellanii*.

Les résultats sont exprimés par les valeurs de IC<sub>50</sub> (concentration de l'extrait ou standard qui inhibe 50% de la croissance du parasite) en µg/ml et ils sont calculées en utilisant le logiciel Sigma Plot 12.0 à partir d'un graphe exprimant le pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration de l'extrait ou standard.

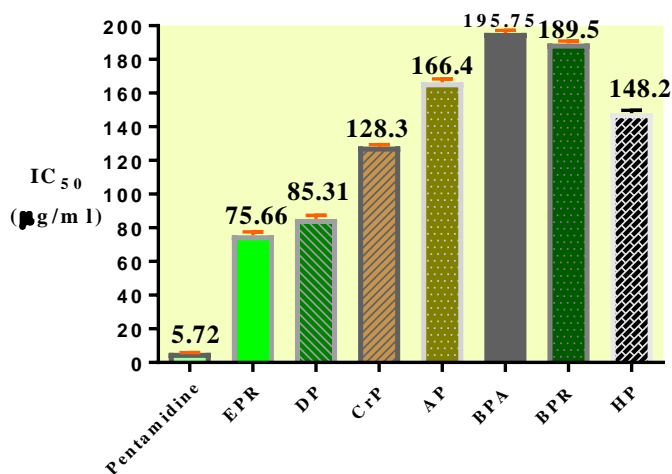
On note que les fractions et sous fractions qui ont des valeurs de IC<sub>50</sub> supérieur à 100 µg/ml ne sont pas présentées.

Les Figures VI.28, VI.29, VI.30 et VI.31 montrent les valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits de *P. battandieri* contre *A. castellanii*, *L. donovani*, *L. amazonensis* et *T. cruzi* avec des références standards, Chlorhexidine, Pentamidine, Miltefosine et Benznidazole, respectivement.

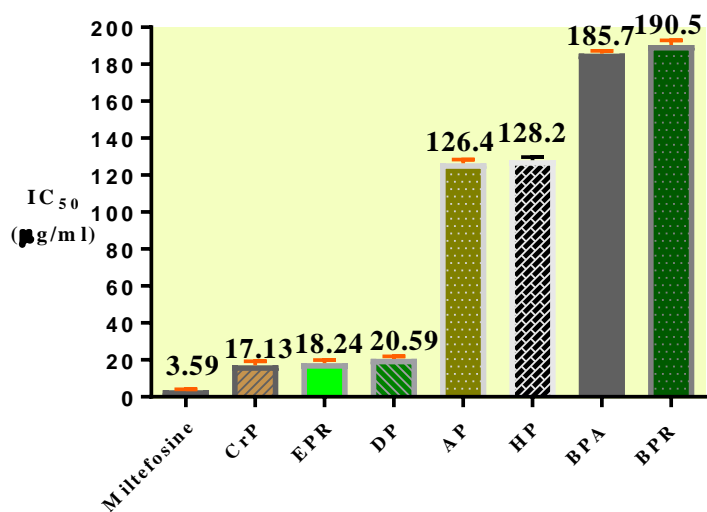




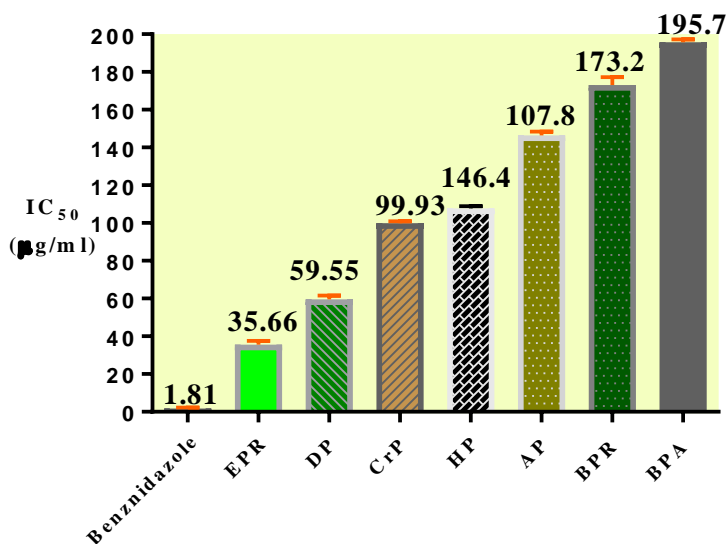
**Figure VI.28 :** Les valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits de *P. battandieri* et du standard Chlorhexidine contre *A. castellanii*  
Chaque valeur représente une moyenne ± SD (n = 3), P <0,05



**Figure VI.29 :** Les valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits de *P. battandieri* et du standard Pentamidine contre *L. donovani*  
Chaque valeur représente une moyenne ± SD (n = 3), P <0,05



**Figure VI.30 :** Les valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits de *P. battandieri* et du standard Miltefosine contre *L. amazonensis*  
Chaque valeur représente une moyenne ± SD (n = 3), P <0,05



**Figure VI.31 :** Les valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits de *P. battandieri* et du standard Benznidazole contre *T. cruzi*  
Chaque valeur représente une moyenne ± SD (n = 3), P <0,05

Nos résultats ont révélé que les extraits dichlorométhane (DP) et éther de pétrole (EPR) présentaient une bonne activité antileishmanienne, antitrypanosomiale et anti-*Acanthamoeba* comparativement aux extraits CrP, HP, AP, BPA, BPR avec cependant une meilleure activité pour l'extrait EPR contre *T. cruzi*. En effet, l'activité antitrypanosomiale de cet extrait ( $IC_{50} = 35,66 \pm 1,71 \mu\text{g/ml}$ ) est supérieure (près de deux fois plus) à celle de l'extrait DP ( $IC_{50} = 59,55 \pm 2,20 \mu\text{g/ml}$ ). En plus, il apparaît que la souche *L. amazonensis* est la plus sensible à l'extrait brute (CrP) avec une  $IC_{50} = 17,13 \pm 2,42 \mu\text{g/ml}$  que les autres extraits. Cependant les trois extraits (EPR, DP et CrP) sont moins efficaces par rapport aux médicaments de références testés pour chaque parasite. Par exemple, l'activité antileishmanienne de Miltefosine ( $IC_{50} = 3,59 \pm 0,51 \mu\text{g/ml}$ ) est supérieure (six fois plus) à celle de l'extrait EPR ( $IC_{50} = 18,24 \pm 0,56 \mu\text{g/ml}$ ) et près de sept fois plus que celle de l'extrait DP ( $IC_{50} = 20,59 \pm 3,71 \mu\text{g/ml}$ ).

Ces activités parasitaires prometteuses nous ont encouragés à réaliser l'investigation phytochimique bioguidée de ces extraits afin de déterminer ses composantes chimiques en vue de rechercher les molécules responsables de ces activités.

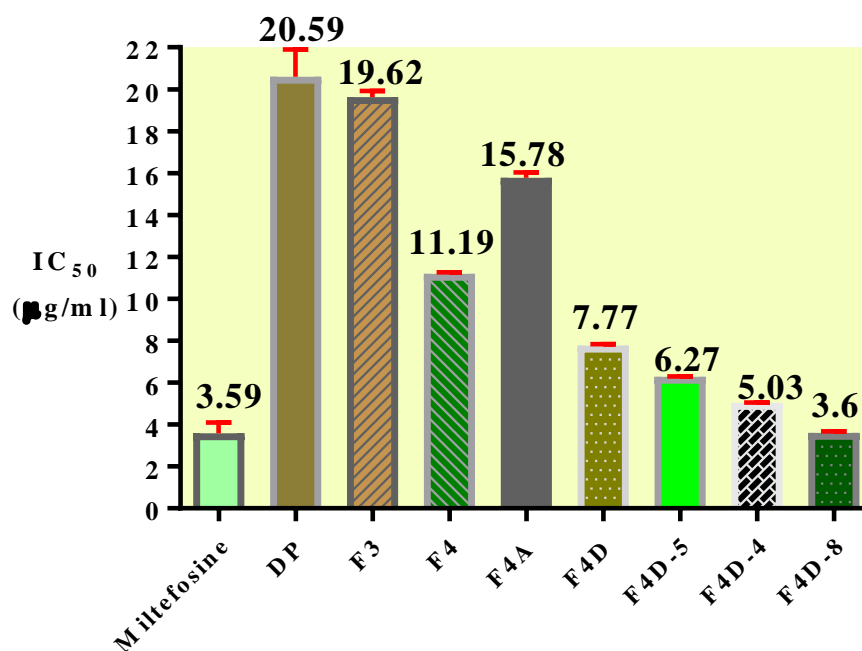
#### **VI.4.2. L'activité antiparasitaire des fractions, sous fractions et des composés isolés de *P. battandieri***

##### **VI.4.2.A. L'activité antileishmanienne des fractions, sous fractions et des produits isolés de *P. battandieri***

###### **➤ L'extrait dichlorométhane (DP)**

L'extrait dichlorométhane (DP) a subi un fractionnement bioguidé par les essais biologiques afin d'isoler et d'identifier les molécules responsables des activités étudiées. Le fractionnement bioguidé de cet extrait a conduit à l'isolement et l'identification de **neuf** molécules actives sur les deux parasites testées (*L. amazonensis* et *T. cruzi*).

Les Figures VI.32 montrent les valeurs des  $IC_{50}$  des fractions et sous fractions actives de l'extrait dichlorométhane (DP) contre *L. amazonensis* avec une référence standard, la Miltefosine.



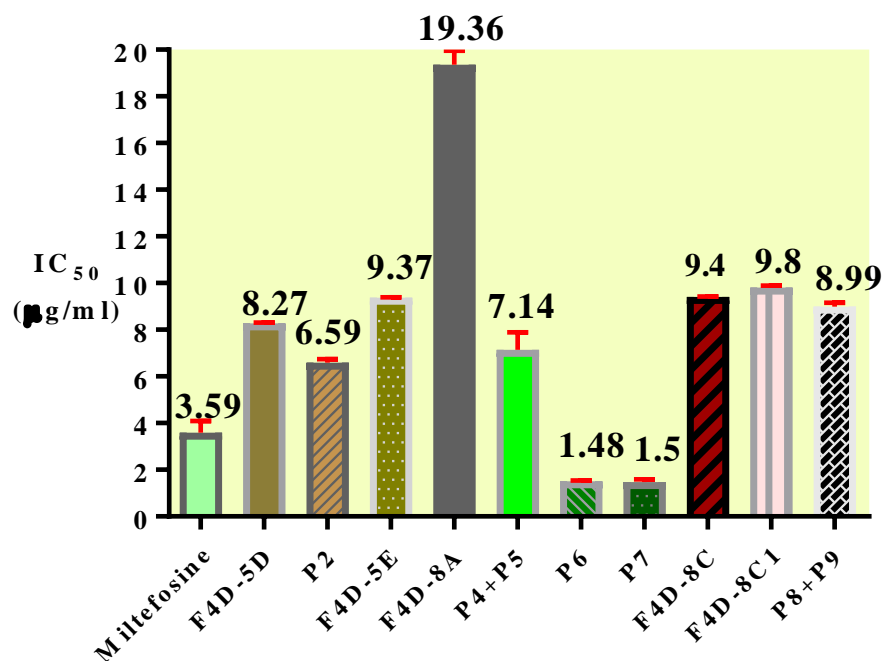
**Figure VI.32 :** Les valeurs des IC<sub>50</sub> des fractions, sous fractions de l'extrait DP et du standard Miltefosine contre *L. amazonensis*  
Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05

La figure VI.32 montre que le fractionnement bioguidé de l'extrait dichlorométhane DP a mené à l'obtention de sous fractions dotés d'une activité antileishmanienne remarquable comparable à le référence standards (Miltéfosine). En effet, les promastigotes de *L. amazonensis* apparaissent plus sensibles à la sous fraction F4D-8 avec IC<sub>50</sub> = 3,60  $\pm$  0,08 µg/ml que les autres sous fractions, en plus l'activité de cette sous fraction est similaire à l'activité de la Miltefosine d'après les tests statistiques de comparaison (test de comparaisons multiples de Tukey, P > 0,99).

Ces résultats nous ont poussés à purifier ces sous fractions actives afin d'isoler et identifier les molécules responsable de ces remarquables activités.

Les Figures VI.33 montrent les valeurs de IC<sub>50</sub> des composés isolés de F4D-8, F4D-5 de l'extrait (DP) contre *L. amazonensis* avec une référence standard, la Miltefosine.

On note que la sous fraction F4A est un mélange d'acides gras (après l'analyse par GC/MS et RMN), elle a montré une activité antiparasitaire modérée mais il n'a pas été possible de séparer ses constituants.



**Figure VI.33 :** Les valeurs des IC<sub>50</sub> des sous fractions et des composés isolés de l'extrait DP et du standard la Miltefosine contre *L. amazonensis*. Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05

On note que l'ordre de présentation des valeurs des IC<sub>50</sub> est basé sur le fractionnement bioguidé représenté dans la figure IV.16, en effet, chaque composé est représenté après la sous fraction qui le contient.

D'après la figure VI.33, les composés (-)-faltarindiol (**P7**) et (-)-panaxydiol (**P6**) manifestent les meilleurs pourcentages d'inhibition par rapport aux produits **P4** et **P5**, **P2**, **P8** et **P9** avec une IC<sub>50</sub> = 1,48  $\pm$  0,11 ; 1,50  $\pm$  0,04 µg/ml, respectivement contre le parasite testé. Il apparaît que ces composés (**P7** et **P6**) sont plus efficaces que le médicament antileishmanien la Miltefosine, et les valeurs de leurs IC<sub>50</sub> sont inférieures (deux fois moins) à la valeur de l'IC<sub>50</sub> = 3,59  $\pm$  0,51 µg/ml de la molécule de référence.

D'autre part, nous remarquons que l'activité antiparasitaire des composés isolés est importante comparativement aux sous fractions qui contiennent ces composés, ceci suggère l'absence d'une synergie entre les différents composés présents dans ces sous fractions, et que ces composés sont les molécules responsables de ces activités.

Malgré le fait que les composés 8-géranlyoxypsoralène (**P1**) et la phelloptérine (**P3**) ont présenté une activité antileishmanienne modérée observée au microscope optique, nous n'avons pas pu calculer leurs IC<sub>50</sub> car ils forment des cristaux lors de l'ajout du parasite.

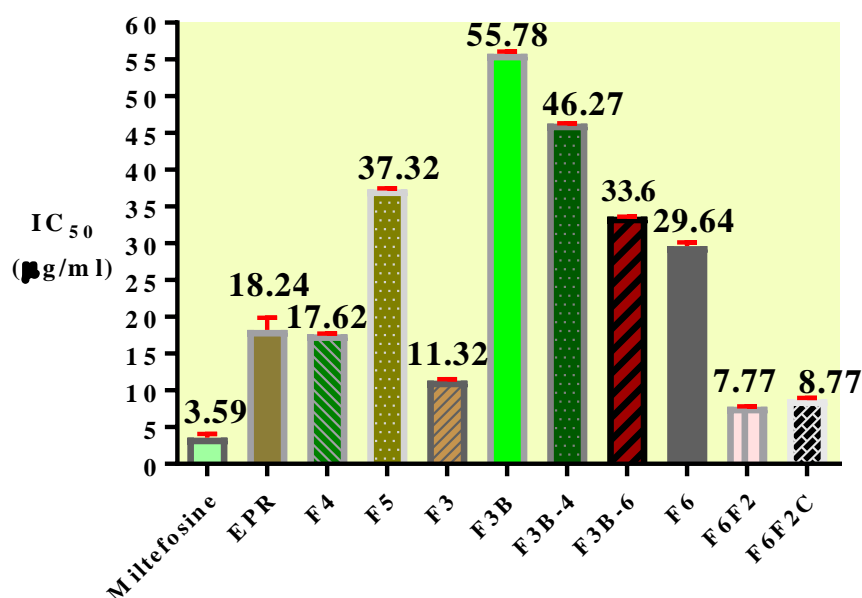
Les composés **1**, **2**, **3**, **8** et **9** sont des furanocoumarines qui possèdent une large gamme d'activités biologiques (Marumoto and Miyazawa, 2012; Musa et al., 2008; Nizamutdinova et al., 2008; Phatchana and Yenjai, 2014; Santana et al., 2004; Venugopala et al., 2013) mais leurs activités antileishmanienne n'a pas été explorée. En effet, c'est la première fois que les propriétés antileishmaniennes de ces molécules, sont reportées dans la littérature.

D'autre part, le (-)-faltarindiol (**P7**) et le (-)-panaxydiol (**P6**) sont des polyynes qui possèdent diverses propriétés biologiques : cytotoxique, antibactérienne et antimutagénique (Cheng et al., 2011; Meot-Duros et al., 2010; Miyazawa et al., 1996) mais leur activité antileishmanienne est décrite pour la première fois dans la littérature.

### ➤ L'extrait éther de pétrole (EPR)

L'extrait éther de pétrole (EPR) a subi un fractionnement bioguidé par les essais antiparasitaire afin d'isoler et d'identifier les molécules responsables des activités étudiées. Le fractionnement bioguidé de cet extrait a conduit à l'identification de **cinq** molécules actives sur les deux parasites testées (*L. amazonensis* et *T. cruzi*).

Les Figures VI.34 montrent les valeurs des  $IC_{50}$  des fractions et sous fractions actives de l'extrait éther de pétrole (EPR) contre *L. amazonensis* avec une référence standard, la Miltefosine.

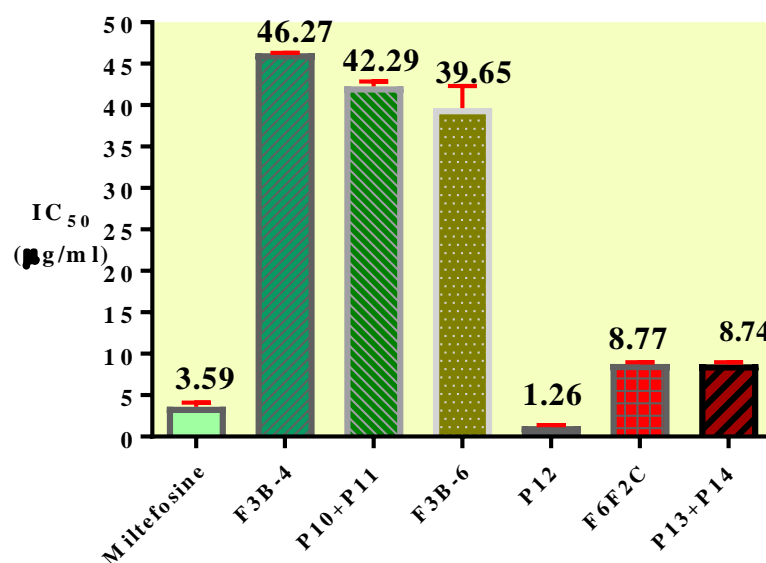


**Figure VI.34 :** Les valeurs des  $IC_{50}$  des fractions et sous-fractions de l'extrait EPR et du standard la Miltefosine contre *L. amazonensis*  
Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05

Les histogrammes de la figure VI.34 montrent que le fractionnement bioguidé de l'extrait éther de pétrole a permis l'obtention de sous fractions possédant une activité antileishmanienne remarquable par rapport au le médicament de référence (Miltefosine). En effet, les promastigotes de *L. amazonensis* apparaissent plus sensibles aux sous fractions F6F2 et F6F2C avec des  $IC_{50} = 7,77 \pm 0,07$  ;  $8,77 \pm 0,2$   $\mu\text{g/ml}$ , respectivement, qu'aux autres sous fractions, de plus, l'activité de ces sous fractions est remarquable par rapport à celle de la Miltefosine. D'autre part, l'extrait EPR a présenté une activité plus forte que les fractions F5, F6 et les sous fractions F3B, F3B-4 et F3B-6, ce qui laisse penser qu'une synergie entre les différentes molécules présentes dans l'extrait EPR est à l'origine de cette activité.

Ces résultats nous ont encouragés à purifier ces sous fractions actives afin d'avoir une idée sur la composition chimique de cet extrait.

Les Figures VI.35 montrent les valeurs de  $IC_{50}$  des produits isolés de F3B-4, F3B-6 et F6F2C de l'extrait (EPR) contre *L. amazonensis* avec une référence standard, la Miltefosine.



**Figure VI.35 :** Les valeurs des  $IC_{50}$  des sous fractions et des composés isolés de l'extrait EPR et de standard Miltefosine contre *L. amazonensis*. Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P <0,05

D'après la figure VI.35, le composé (**P12**) manifeste le meilleur pourcentage d'inhibition par rapport aux composés **P10** et **P11**, **P13** et **P14** avec une  $IC_{50} = 1,26 \pm 0,12$   $\mu\text{g/ml}$ , et au médicament Miltefosine ( $IC_{50} = 3,59 \pm 0,51$   $\mu\text{g/ml}$ ) contre le parasite testé. Ce produit (**P12**) appartient à la famille des polyynes, et admet une structure similaire à celles des composés **P6**

et **P7**. Les composés **P13** et **P14** qui sont sous forme d'un mélange présentent une activité antileishmanienne importante avec une  $IC_{50} = 8,74 \pm 0,24 \mu\text{g/ml}$  comparativement aux composés **P10** et **P11**. Nous remarquons également que les activités des sous fractions F3B-4 et F6F2C sont similaires aux mélanges de **P10** avec **P11** et **P13** avec **P14** respectivement, ceci pourrait être en faveur du fait que ces activités sont dues à ces composés.

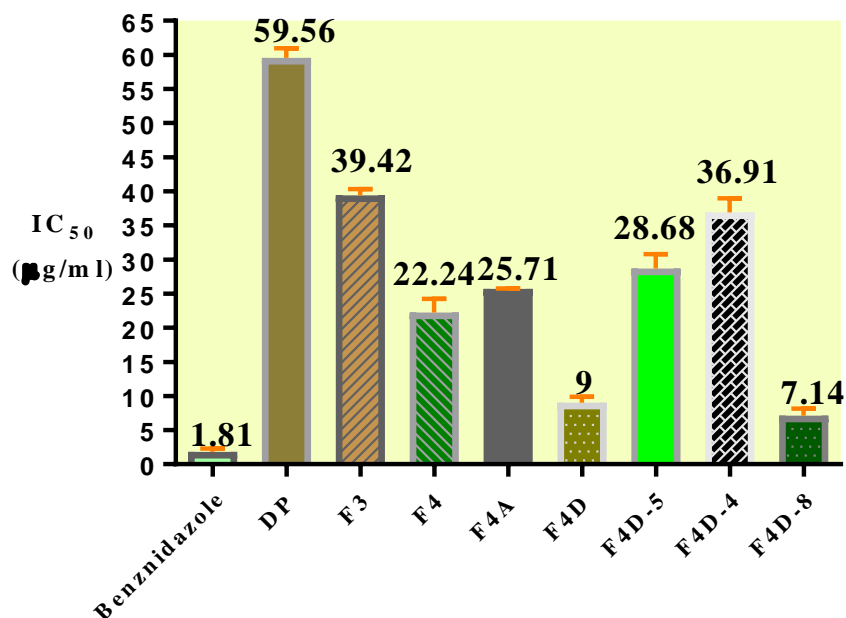
Enfin, les composés **P10**, **P11**, **P13**, **P14** sont des furanocoumarines présentant des structures similaires aux composés **P1**, **P2**, **P3**, **P8** et **P9** mais des activités antileishmaniennes différentes. Nous envisageons de les séparer, les tester séparément et étudier leur relation structure-activité comme des perspectives.

#### VI.4.2.B. L'activité antitrypanosomiale des fractions, sous fractions et des produits isolés de *P. battandieri*

##### ➤ L'extrait dichlorométhane (DP)

Le fractionnement bioguidé de l'extrait (DP) a conduit à l'isolement et l'identification de **neuf** molécules actives sur les deux parasites testés (*L. amazonensis* et *T. cruzi*).

Les Figures VI.36 montrent les valeurs des  $IC_{50}$  des fractions et sous fractions actives de l'extrait DP contre *T. cruzi* avec une référence standard, le Benznidazole.



**Figure VI.36 :** Les valeurs des  $IC_{50}$  des fractions et sous fractions l'extrait DP et du standard, le Benznidazole contre *T. cruzi*

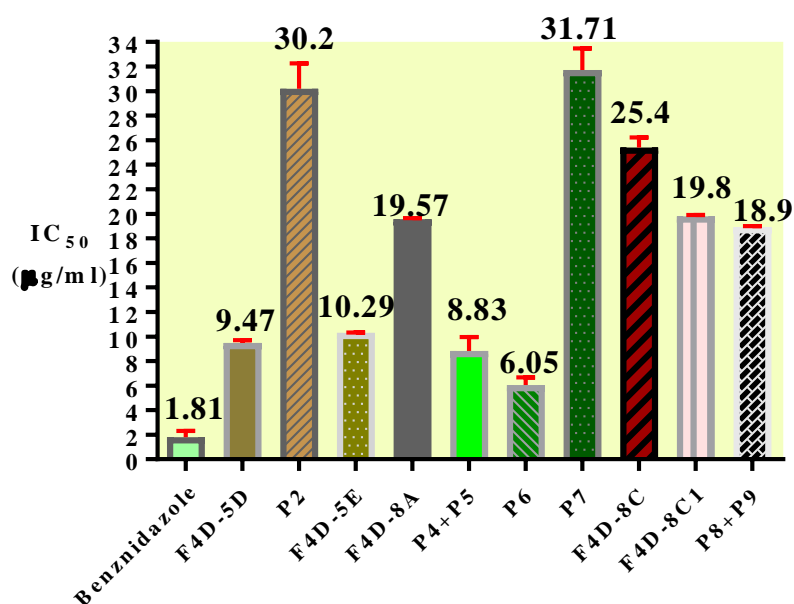
Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD ( $n = 3$ ),  $P < 0,05$

La première remarque d'après une comparaison entre les figures VI.36 et VI.32 (contre *L. amazonensis*) est que les fractions et sous fractions actives contre *T. cruzi* sont actives aussi

contre *L. amazonensis* à des degrés différents. En effet, les épimastigotes de *T. cruzi* apparaissent moins sensibles aux sous fractions F4D-5, F4D-8 et F4D-4 que les promastigotes de *L. amazonensis*.

La figure VI.36 montre que la sous fraction F4D-8 présente la meilleure concentration inhibitrice contre *T. cruzi* avec une  $IC_{50} = 7,14 \pm 1,12 \mu\text{g/ml}$  par rapport aux autres sous fractions F4D-5 et F4D-4 et aussi par rapport aux fractions originales F4 ( $IC_{50} = 22,24 \pm 2,14 \mu\text{g/ml}$ ) et F4D ( $IC_{50} = 9,00 \pm 0,86 \mu\text{g/ml}$ ). L'activité de cette sous fraction est modérée comparativement à celle du standard, le Benznidazole qui montre une  $IC_{50} = 1,81 \pm 0,50 \mu\text{g/ml}$  contre le parasite testé.

Les sous fractions actives contre *T. cruzi* ont conduit aux produits **P1** à **P9** dotés d'un pouvoir antitrypanosomiale et qui sont représentés dans les figures VI.37 avec les valeurs de leurs  $IC_{50}$  comparativement toujours au Benznidazole.



**Figure VI.37 :** Les valeurs des  $IC_{50}$  des sous fractions et composés isolés de l'extrait DP et du standard, le Benznidazole contre *T. cruzi*  
Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05

On note que l'ordre de présentation des valeurs des  $IC_{50}$  est basé sur le digramme de la figure IV.15 (fractionnement bioguidé), donc chaque composé est représenté après la sous fraction qui le contenait.

Selon la figure VI.37, l'activité antitrypanosomiale manifestée par le (-)-panaxydiol (**P6**), avec une  $IC_{50} 6,05 \pm 0,61 \mu\text{g/ml}$  est cinq fois plus forte que celle du (-)-falcarindiol (**P7**) et du 8-géranyloxypsoralène (**P2**) et 3 fois plus forte que celle du mélange des produits **P8** et **P9**.



Cependant, ce composé a présenté une activité antitrypanosomiale modérée par rapport à celle du Benznidazole ( $IC_{50} = 1,81 \pm 0,50 \mu\text{g/ml}$ ).

D'autre part, les sous fractions F4D et F4D-5D ont montré une activité antitrypanosomiale plus forte que celle des molécules pures (**P2**, **P7**, **P8** et **P9**), ce qui laisse penser qu'une synergie entre les différentes molécules présentes dans ces sous fractions est à l'origine de ces activités. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Misbah et al., 2013 et Sifaoui et al., 2014 et qui ont confirmé que le fractionnement des extraits et fractions actifs peut conduire à la perte de leurs activités en raison de l'effet synergique et additif entre les composants présents.

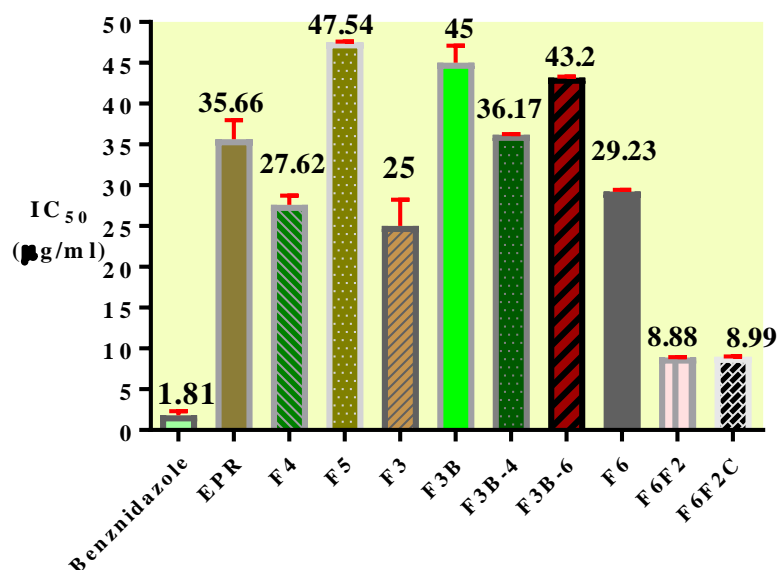
Néanmoins que les composés 8-géranxyloxy-psoralène (**P1**) et phelloptérine (**P3**) ont présenté une activité antitrypanosomiale modérée observée par le microscope optique mais nous n'avons pas pu calculer leurs  $IC_{50}$  puisque ils forment des cristaux lors de l'ajout du parasite.

En matière de comparaison entre l'activité antileishmanienne et antitrypanosomiale des composés (**P1-P9**), il apparaît que le (-)-panaxydiol (**P6**) est le plus actif d'entre eux, et cette activité est comparable à celles des références standards (Miltefosine et Benznidazole). En plus, ces activités sont décrites pour la première fois pour cette molécule (**P6**) et les autres **P1-P5** et **P7**. Cependant certains auteurs ont rapporté des effets thérapeutiques de ces molécules sur des cellules humaines et animales.

### ➤ L'extrait éther de pétrole (EPR)

Le fractionnement bioguidé de cet extrait a conduit à l'identification de **cinq** molécules actives sur les deux parasites testées (*L. amazonensis* et *T. cruzi*).

Les Figures VI.38 montrent les valeurs des  $IC_{50}$  des fractions et sous fractions actives de l'extrait éther de pétrole (EPR) contre *T. cruzi* avec une référence standard, le Benznidazole.

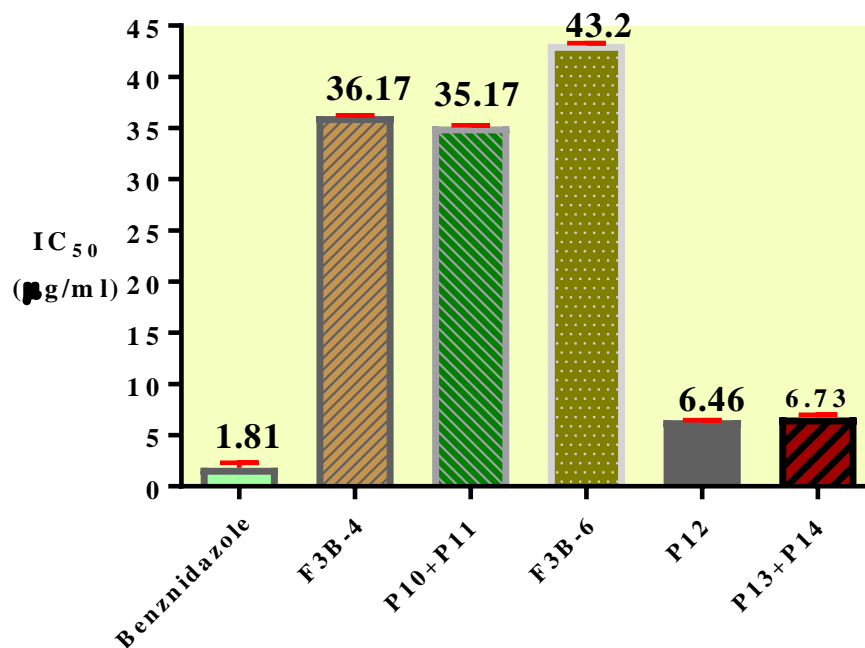


**Figure VI.38 :** Les valeurs des IC<sub>50</sub> des fractions et sous fractions de l'extrait EPR et de standard Benznidazole contre *T. cruzi*

Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05

Selon la figure VI.38, l'activité antitrypanosomiale manifestée par les sous fractions F6F2 et F6F2C avec les valeurs des IC<sub>50</sub>  $8,88 \pm 0,07$  et  $8,99 \pm 0,02$  µg/ml, respectivement est quatre fois plus forte que celle de l'extrait éther de pétrole (EPR), et trois fois et demi plus forte que celle de la fraction originale F6, ce qui signifie que le fractionnement bioguidé de cet extrait a mené à des sous fractions dotées d'un pouvoir antiparasitaire remarquable. Néanmoins ce pouvoir est modéré en comparant avec celui du Benznidazole (IC<sub>50</sub> =  $1,81 \pm 0,50$  µg/ml). Par contre, le fractionnement bioguidé de F3 (IC<sub>50</sub> =  $25 \pm 3,45$  µg/ml) a conduit à des sous fractions possédant une activité faible contre *T. cruzi* par rapport à la fraction originale (F3). Malgré le fait que la fraction F4 a présenté une activité antitrypanosomiale supérieure à F5 et F6, elle n'a pas donné de produits purs en raison de sa complexité et sa faible quantité.

Les sous fractions actives contre *T. cruzi* (F6F2C, F3B-4 et F3B-6) ont conduit aux composés **P10** à **P14** dotés d'un pouvoir antitrypanosomiale et qui sont représentés dans la figure VI.39 avec les valeurs de leurs IC<sub>50</sub> comparativement toujours avec la molécule de référence le Benznidazole.



**Figure VI.39 :** Les valeurs des IC<sub>50</sub> des sous fractions et produits isolés de l'extrait EPR et du standard, le Benznidazole contre *T. cruzi*  
Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05

Nos résultats ont révélé que le composé **P12** et le mélange de deux composés **P13** et **P14** présentaient un effet inhibiteur des épimastigotes de *T. cruzi* avec des valeurs des IC<sub>50</sub>  $6,46 \pm 0,02$  et  $6,73 \pm 0,25$  µg/ml, respectivement, cinq fois plus fortes que le mélange de deux composés **P10** et **P11** qui a une valeur IC<sub>50</sub>  $35,17 \pm 0,08$  µg/ml.

D'autre part, l'activité antitrypanosomiale de ces composés (**P12**, **P13** et **P14**) est modérée par rapport à celle du standard, le Benznidazole dont la valeur de l'IC<sub>50</sub> est  $1,81 \pm 0,50$  µg/ml.

Concernant la comparaison entre les deux activités antiparasitaires de ces composés, il apparaît que le composé **P12** est le plus actif d'entre eux, contre les promastigotes de *L. amazonensis* et les épimastigotes de *T. cruzi*. En effet, ce produit a manifesté une inhibition antiparasitaire comparable avec celles des références standards (Miltefosine et Benznidazole).

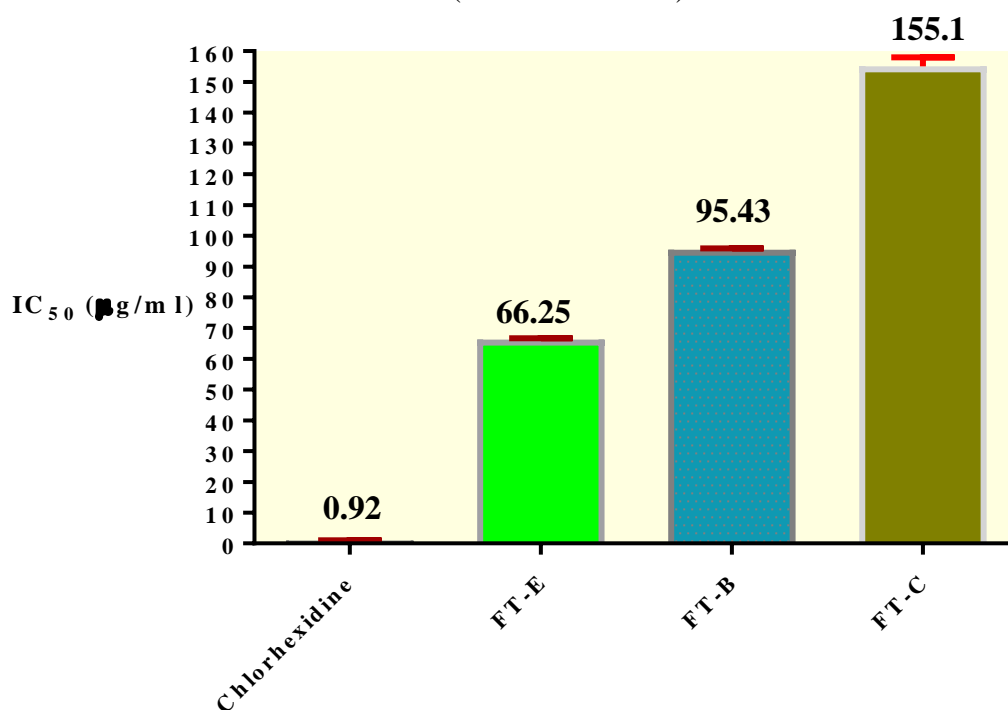
Comme le composé **P12** appartient à la même famille que **P6** et **P7** (des polyynes) et possède une structure similaire à eux, ces résultats sont bien corrélés.

Les composés **P10**, **P11**, **P13** et **P14** sont des furanocoumarines qui ont été déjà identifiées dans le genre *Pituranthos* (Esseid, 2018), cependant, leurs effets sur le parasite *Trypanosoma cruzi* n'avaient pas été étudiés auparavant.

### VI.4.2. L'activité antiparasitaire des extraits de *F. thymifolia*

L'activité antileishmanienne, antitrypanosomiale et anti-*Acanthamoeba* des extraits acétate d'éthyle (FT-E), chloroforme (FT-C) et *n*-butanol (FT-B) de *F. thymifolia* a été évaluée sur deux souches de *Leishmania* : *L. donovani*, *L. amazonensis* ; une souche de *Trypanosoma* : *Trypanosoma cruzi* et finalement une souche d'*Acanthamoeba* : *Acanthamoeba castellanii* str. Neff. Pour ce faire, différentes concentrations d'extraits sont incubées avec la forme promastigotes du *L. donovani*, *L. amazonensis*, épimastigote de *T. cruzi* et trophozoïte d'*A. castellanii*.

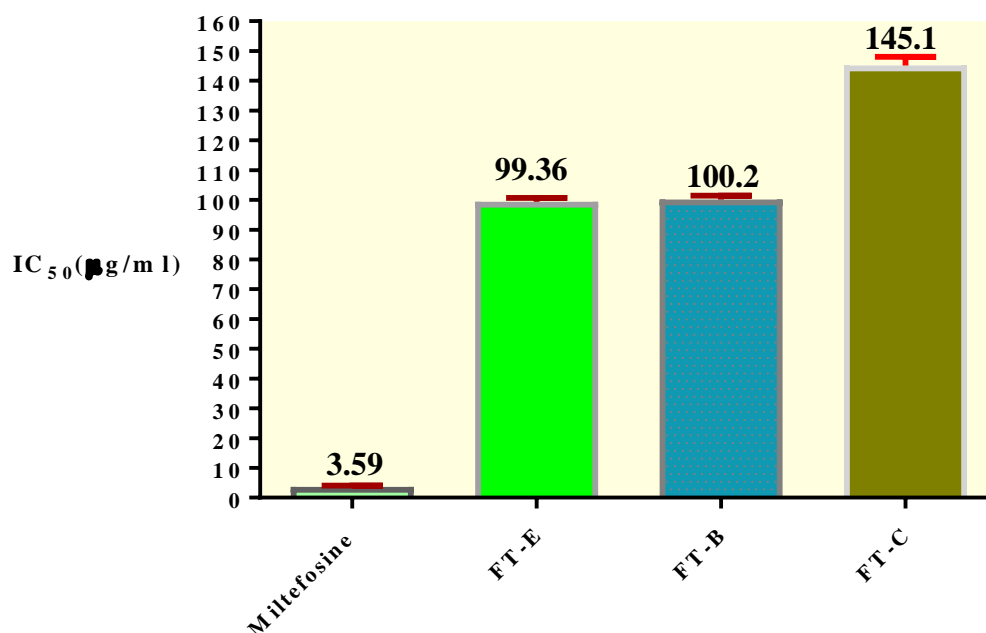
La Figure VI.40 montre les valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits de *F. thymifolia* contre *A. castellanii* avec la référence standard (la Chlorhexidine).



**Figure VI.40** : Les valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits de *F. thymifolia* et de standard Chlorhexidine contre *A. castellanii*

Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05

La Figure VI.41 montre les valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits de *F. thymifolia* contre *L. amazonensis* avec la référence standard (la Miltefosine).



**Figure VI.41 :** Les valeurs des IC<sub>50</sub> des extraits de *F. thymifolia* et du standard, la Miltefosine contre *L. amazonensis*  
Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05

D'après les figures VI.40 et VI.41, l'extrait acétate d'éthyle (FT-E) est le plus actif que les extraits FT-B et FT-C contre les deux parasites *A. castellanii* et *L. amazonensis*. En effet, cet extrait présente des valeurs des IC<sub>50</sub> = 66,25  $\pm$  0,41 ; 99,36  $\pm$  1,46  $\mu$ g/ml contre *A. castellanii* et *L. amazonensis* respectivement. Cependant, cet extrait est beaucoup moins efficace que les médicaments utilisés contre *A. castellanii* et *L. amazonensis*: Chlorhexidine (IC<sub>50</sub> = 0,92  $\pm$  0,10  $\mu$ g/ml) et Miltefosine (IC<sub>50</sub> = 3,59  $\pm$  0,51  $\mu$ g/ml), respectivement.

Ce résultat suggère que l'activité antiparasitaire de l'extrait FT-E peut être dû à la présence des molécules qui possèdent une activité antileishmanienne et anti-*Acanthamoeba* comme la quercétine (Calzada et al., 1995; Tasmir et al., 2006) ou de la synergie de plusieurs molécules. Il serait ainsi judicieux de faire un fractionnement bioguidé par des bio-essais et de tester l'activité des fractions, afin d'isoler les molécules responsables de cette activité.

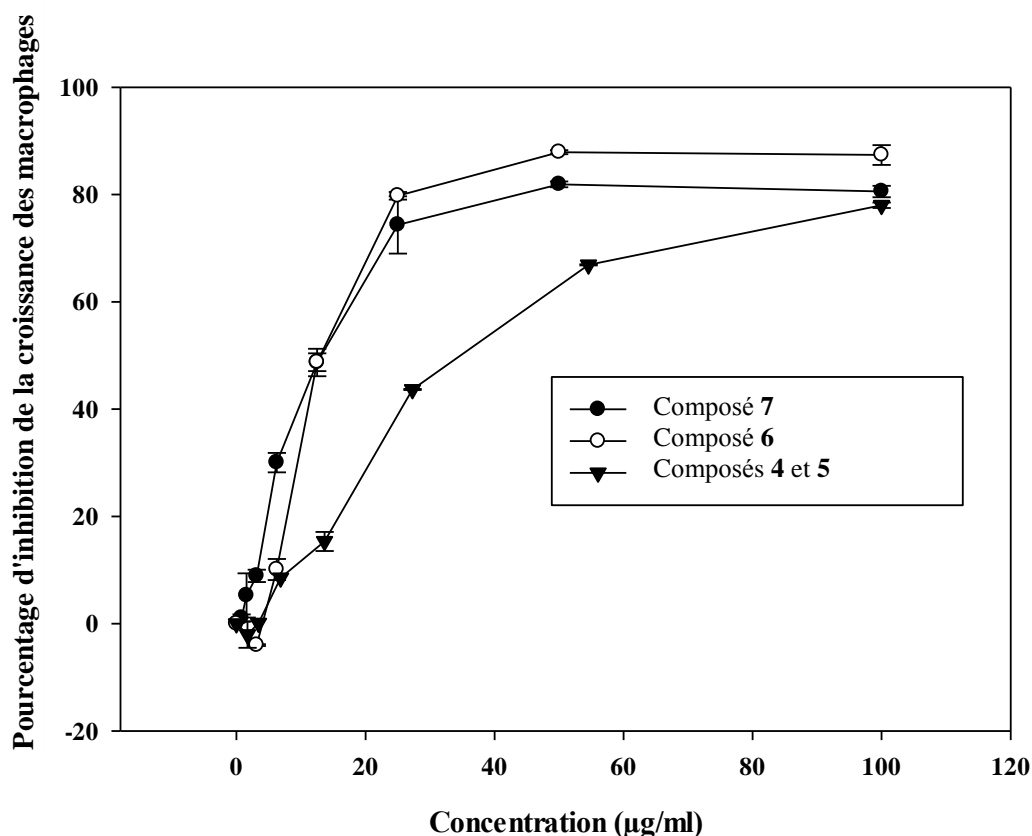
En ce qui concerne l'activité antitrypanosomiale ou l'activité contre *L. donovani*, malheureusement, tous les extraits de *F. thymifolia* se sont révélés inactifs à des concentrations de 100, 200 et 400  $\mu$ g/ml.

**VI.5. L'activité cytotoxique des produits isolés de *P. battandieri***

Les composés **P2**, **P4**, **P5**, **P6** et **P7** isolés du l'extrait DP de l'espèce *P. battandieri* ont été testés sur des macrophages de la lignée cellulaire J 774.A1 pour déterminer leur cytotoxicité.

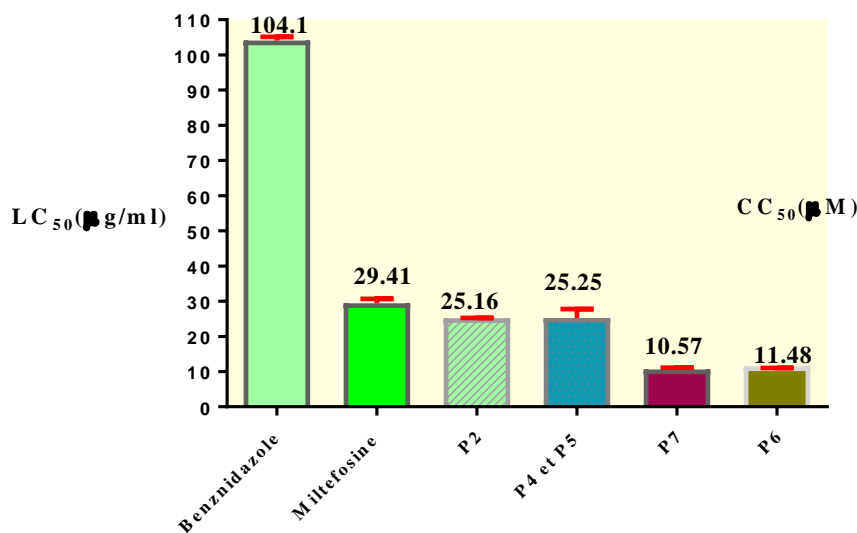
Les résultats sont exprimés par les valeurs des LC<sub>50</sub> (concentration du composé ou standard qui cause la mort de 50 % des macrophages) en µg/ml et par les valeurs de CC<sub>50</sub> (concentration du composé ou standard qui correspond à 50 % de cytotoxicité de la lignée cellulaire) en µM. Ces valeurs sont calculées en utilisant le logiciel Sigma Plot 12.0 à partir d'un graphe exprimant le pourcentage d'inhibition de la croissance des macrophages en fonction de la concentration de composé ou standard.

La Figures VI.42 montre l'effet cytotoxique des composés isolés **P6**, **P7**, **P4** et **P5** de *P. battandieri* sur des macrophages J 774.

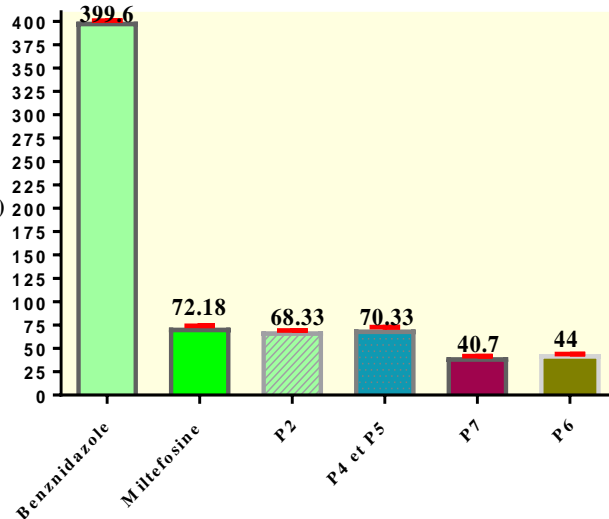


**Figure VI.42 :** L'effet cytotoxique des produits isolés de *P. battandieri* sur des macrophages J774  
Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P <0,05

Les Figures VI.43 et VI.44 montrent les valeurs des  $LC_{50}$  et  $CC_{50}$ , respectivement pour les composés **P2**, **P4**, **P5**, **P6** et **P7** sur des macrophages J 774 avec des références standards, la Miltefosine et le Benznidazole.



**Figure VI.43 :** Les valeurs des  $LC_{50}$  des composés isolés de *P. battandieri* et des standards Miltefosine et Benznidazole sur des macrophages J 774  
Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P < 0,05



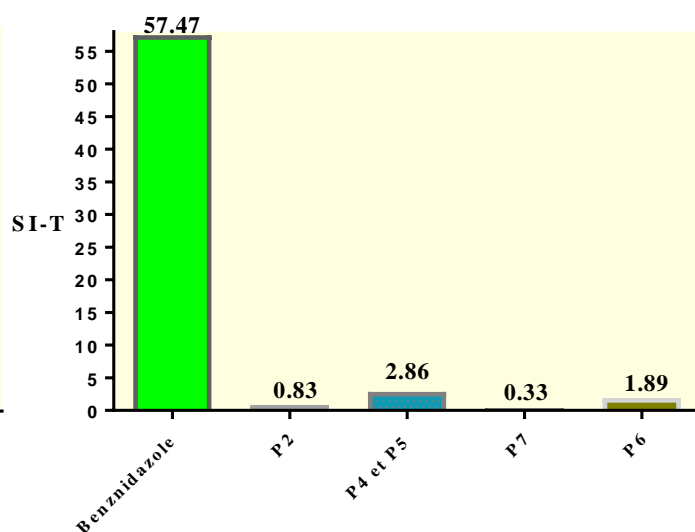
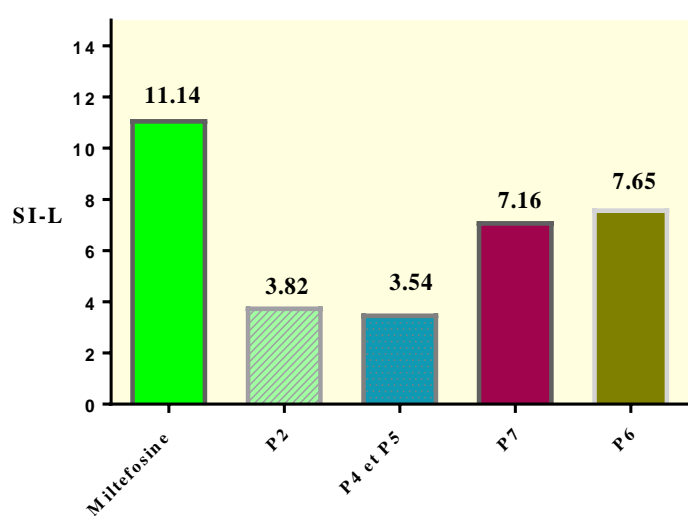
**Figure VI.44 :** Les valeurs des  $CC_{50}$  des composés isolés de *P. battandieri* et des standards Miltefosine et Benznidazole sur des macrophages J 774  
Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P

Les composés isolés **P2**, **P4**, **P5**, **P6** et **P7** ont été évalués pour l'activité cytotoxique sur des macrophages de la lignée cellulaire J 774 avec des références standards. Des effets cytotoxiques faibles ont été observés pour trois composés : **P2**, le mélange de **P4** et **P5**, avec des  $CC_{50}$ (s) comprises entre 68 et 70  $\mu\text{M}$  et statistiquement similaires à la  $CC_{50}$  du médicament antileishmanien la Miltefosine ( $CC_{50} = 72,18 \pm 1,2 \mu\text{M}$ ). Alors que les composés isolés **P6** et **P7** ont manifestés une cytotoxicité importante avec des  $CC_{50}$ (s) :  $40,7 \pm 1,1$  et  $44 \pm 0,2 \mu\text{M}$ , respectivement, comparativement aux deux médicaments, la Miltefosine et le Benznidazole ( $CC_{50} = 72,18 \pm 1,2$  ;  $399,6 \pm 1 \mu\text{M}$ , respectivement).

L'effet cytotoxique des furanocoumarines a été prouvé par plusieurs auteurs comme le 8-géranxyloxypsoralène (Razavi et al., 2009; Venugopala et al., 2013) mais celle du géranxyloxy-5-méthoxyypsoralène (**P2**) n'a pas été étudiée auparavant. Il en est de même pour l'effet cytotoxique des composés **P4** et **P5**.

D'autre part, malgré l'effet cytotoxique des deux polyynes, le falcarindiol et le panaxydiol signalé dans la littérature par plusieurs tests (Meot-Duros et al., 2010; Satoh et al., 2007; Um et al., 2010; Yeo et al., 2017; Zidorn et al., 2005), les tests sur les macrophages de la lignée cellulaire J 774 n'ont pas été reportés. Pour les autres tests sur ces molécules, nos données ont mené à des résultats conformes à ceux de la littérature.

L'indice de sélectivité (ou l'index thérapeutique) qui est le rapport entre  $LC_{50}$  et  $IC_{50}$  pour chaque parasite a été calculé et représenté dans les figures VI.45 et VI.46.



**Figure VI.45 :** Les valeurs des SI-L<sup>(\*)</sup> des composés isolés de *P. battandieri* et du standard, la Miltefosine

<sup>(\*)</sup>SI-L: L'indice de sélectivité ( $LC_{50} / IC_{50}$ ) pour *L. amazonensis*

**Figure VI.46 :** Les valeurs des SI-T<sup>(\*)</sup> des composés isolés de *P. battandieri* et du standard, le Benznidazole

<sup>(\*)</sup>SI-T: L'indice de sélectivité ( $LC_{50} / IC_{50}$ ) pour *T. cruzi*

Nos résultats ont prouvé que les deux composés **P6** et **P7** présentent des valeurs des indices de sélectivité SI-L significatives par rapport à l'indice du médicament antileishmanien : la Miltefosine (SI-L : 11,14). En effet, les composés qui possèdent une indice de sélectivité supérieur à 2 sont considéré comme des agents antileishmaniens sélectifs (Suffness, 1990). Les valeurs SI-T de tous les composés testés sont plus faibles que celle du médicament antitrypanosomiale : le Benznidazole (SI-T : 57,47), dont l'activité est cinq fois plus importante que celle de la Miltefosine.



VI.6. L'activité antibactérienne des extraits de *F. thymifolia*

La Figures VI. 47 et VI.48 montrent les boîtes de Pétri avant et après incubation, respectivement.



Figure VI.47 : Boîtes de Pétri des quatre souches bactériennes utilisées, avant incubation

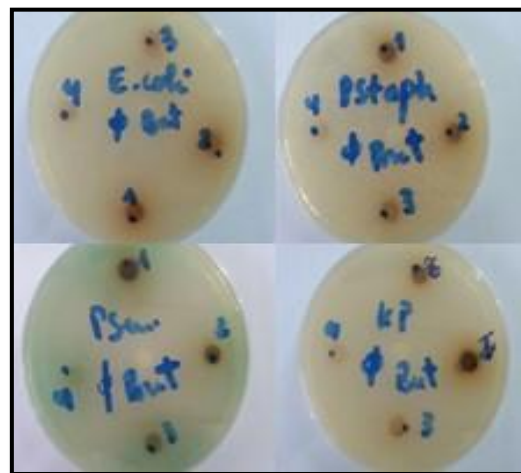


Figure VI.48 : Boîtes de Pétri des quatre souches bactériennes utilisées, après incubation

Les résultats obtenus sont représentés dans les figures VI.49, VI.50 et VI.51.

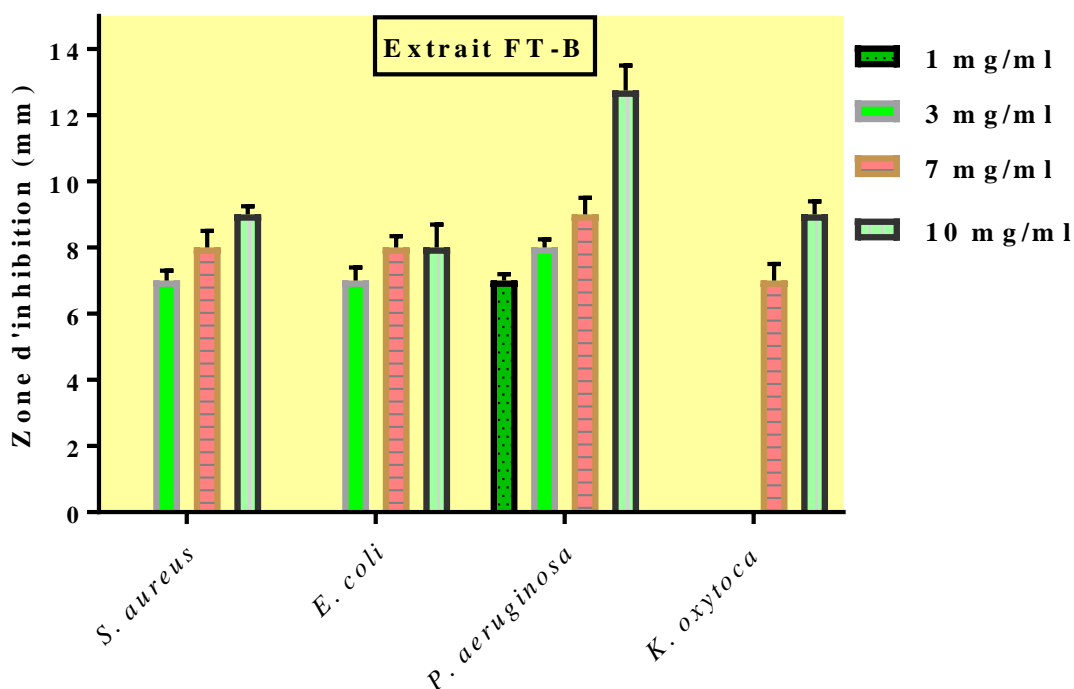
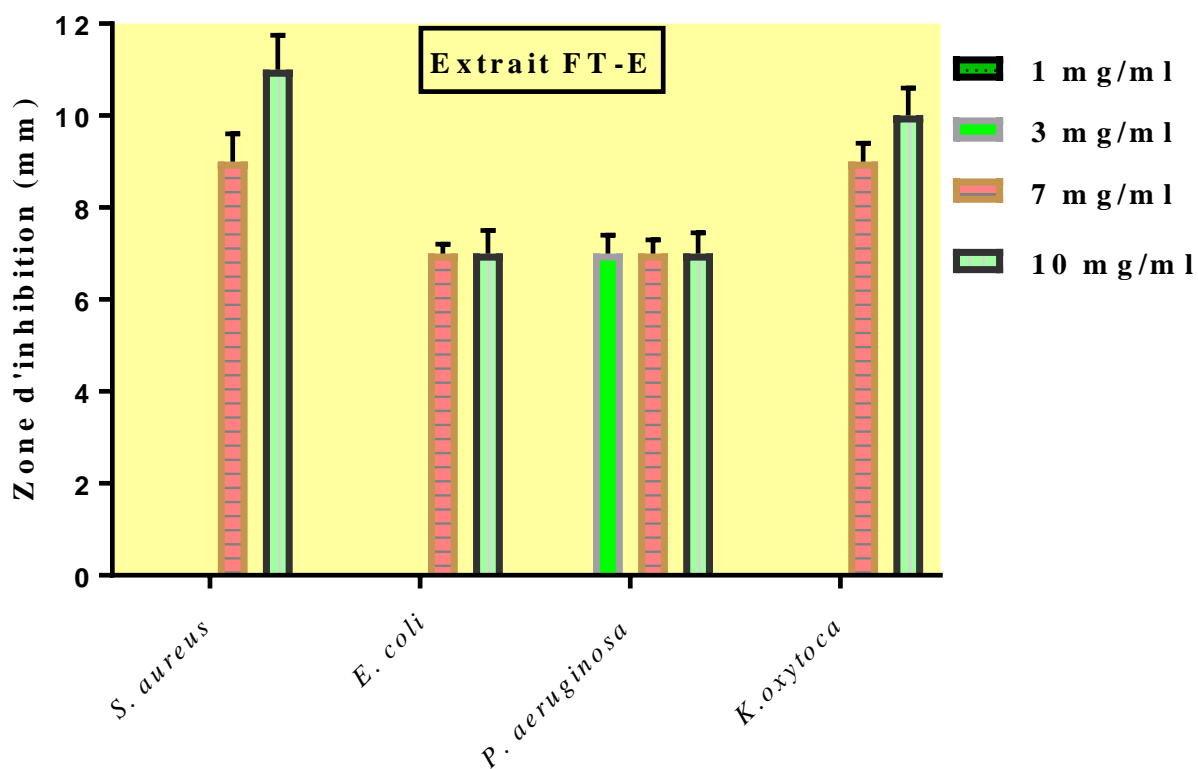
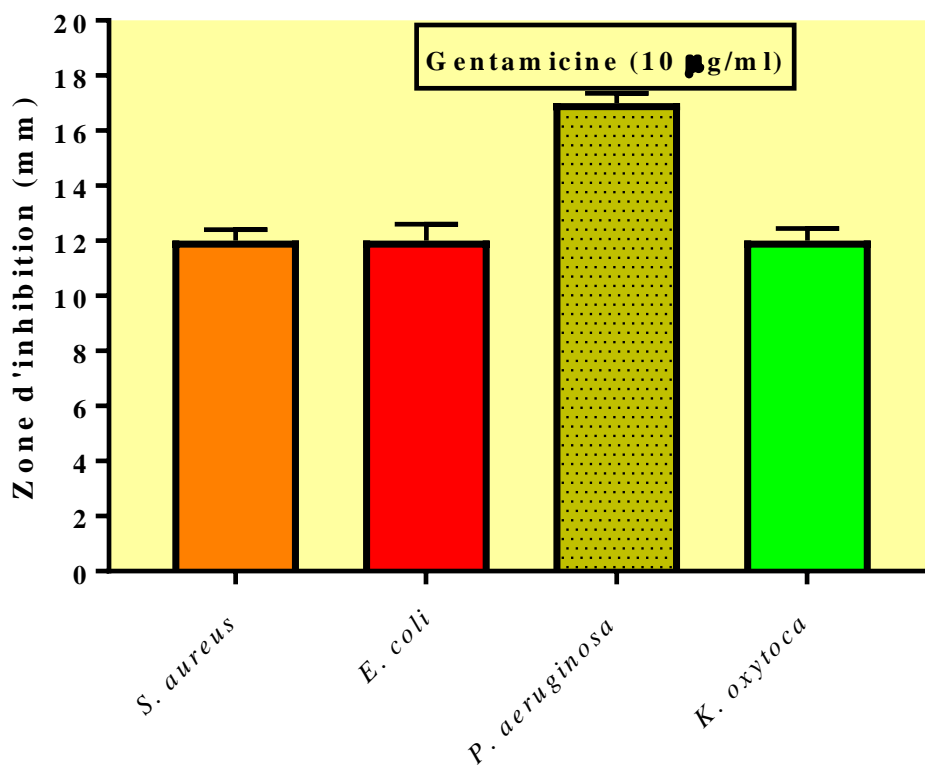


Figure VI.49 : les valeurs des diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'extrait FT-B contre 4 souches bactériennes  
Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P <0,05



**Figure VI.50 :** les valeurs des diamètres des zones d'inhibition (mm) de l'extrait FT-E contre 4 souches bactériennes

Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P <0,05



**Figure VI.51 :** les valeurs des diamètres des zones d'inhibition (mm) de gentamicine contre 4 souches bactériennes

Chaque valeur représente une moyenne  $\pm$  SD (n = 3), P <0,05

Les résultats de l'activité antibactérienne qui a été réalisée sur les deux extraits (FT-E et FT-B) de *F. thymifolia* ont montré que ces extraits avaient une activité plus ou moins significative selon la nature de la souche et la concentration utilisée comparativement à la gentamicine.

La comparaison des extraits a montré que l'extrait FT-B était le plus actif vis-à-vis des bactéries à gram positif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) à des concentrations 3, 7 et 10 mg/ml, tandis que l'extrait FT-E est le plus actif contre *Staphylococcus aureus* et *klebsiella oxytoca* (gram négatif) à des concentrations 7 et 10 mg/ml. En effet, on peut alors confirmer que ces souches sont sensibles à ces extraits. Ces résultats sont relativement faibles en comparaison avec les zones d'inhibitions de l'antibiotique utilisé : gentamicine (entre 12 et 18 mm) à 10 µg/ml.

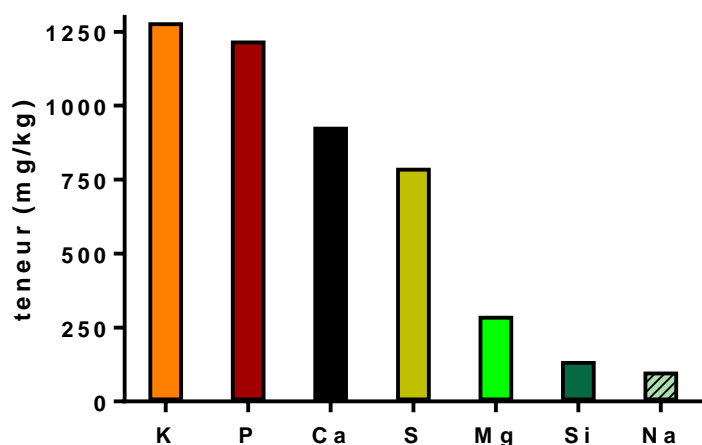
### VI.7. Dosage des éléments minéraux dans l'extrait *n*-BuOH de *P. battandieri* (BPR)

Les résultats des limites de détection (LOD) de quelques éléments-traces analysés par ICP-MS sont présentés dans le tableau VI.1.

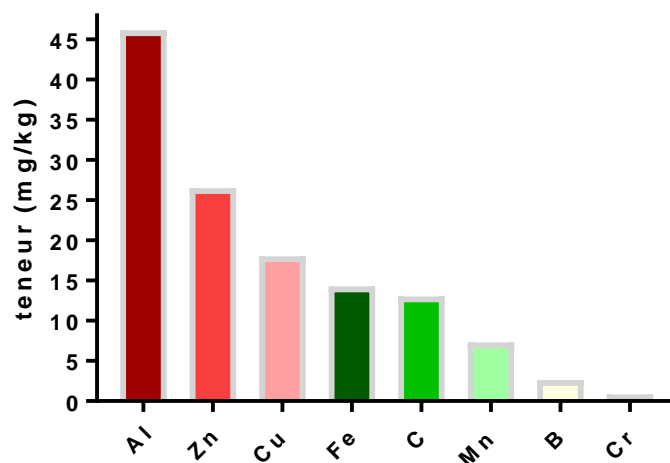
**Tableau VI.1** Limites de détection (LOD) de quelques éléments analysés par ICP-MS (ppb)

Extrait	LOD (ppb) des éléments minéraux										
	Al	Ca	Cu	Fe	Ca	Mg	Na	P	S	Si	Zn
<b>BPR</b>	12	137,36	12,52	9,12	55,37	53,24	24,39	17,80	24,60	9,45	10,25

Les résultats de l'analyse des éléments inorganiques (majeurs et traces) par ICP-MS sont présentés dans les figures VI.52 et VI.53 ci-dessous, respectivement.



**Figure VI.52 :** Concentration des éléments majeurs par ICP-MS dans l'extrait BPR (mg/kg)



**Figure VI.53 :** Concentration des éléments mineurs par ICP-MS dans l'extrait BPR (mg/kg)

D'après ces figures, les éléments majeurs présents en quantité significative dans l'extrait BPR sont le Potassium (K), le Phosphore (P), le Calcium (Ca), le Soufre (S) et le Magnésium (Mg). Ces éléments également appelés des **macronutriments**, sont essentiels à notre plante et à la majorité des plantes vasculaires et ils ont des concentrations internes adéquates à leurs besoins. Les autres minéraux sont classés comme des **micronutriments** appelés aussi oligo-éléments. Ils ne dépassent pas les 0,01 % de la matière sèche dans l'extrait BPR. Ce sont le fer (Fe) et, le Sodium (Na), le manganèse (Mn), le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le silicium (Si)... etc. Le défaut de certains de ces éléments peut déterminer des maladies de carence.

## VI.8. Conclusion

Ce chapitre reporte les résultats de nos travaux de recherche d'activités *in vitro*: antioxydante, antiparasitaire, cytotoxique et antibactérienne des extraits de *P. battandieri* et *F. thymifolia* et des composés purs isolés.

Sur la base des résultats obtenus de l'activité antioxydante, nous concluons que les extraits dichlorométhane (DP), éther de pétrole (EPR) de *P. battandieri*, acétate d'éthyle (FT-E) et *n*-BuOH (FT-B) de *F. thymifolia* possèdent des propriétés antioxydantes puissantes par rapport aux autres extraits dans tous les modèles d'oxydation (DPPH•, ABTS<sup>•+</sup>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, blanchiment du β-carotène/acide linoléique, CUPRAC et FRAP). L'effet antioxydant prouvé par *P. battandieri* et *F. thymifolia* apparaît comme une conséquence de la présence d'un certain nombre de constituants actifs et d'interactions synergiques entre certains métabolites secondaires de cette plante. Parmi eux, la quercétine (**F2**), la quercétine-3-méthyl ether (**F6**) et la naringénine (**F1**) ont été isolés de *F. thymifolia* et ont montré un pouvoir antioxydant intéressant.

L'évaluation antiparasitaire des extraits de deux plantes contre *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* et *Acanthamoeba castellanii* a révélé que l'extrait CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (DP) et éther de pétrole (EPR) de *P. battandieri* possèdent des activités antiparasitaires remarquables. En effet, le fractionnement bioguidé de ces extraits actifs a conduit à l'isolement et à la caractérisation de quatorze composés actifs (**P1-P14**) dans un est nouveau dans la littérature (**P7**). Ce composé (-)-falcarindiol (**P7**) et (-)-panaxydiol (**P6**) ont montré une activité antileishmanienne puissante avec des valeurs de IC<sub>50</sub> allant de 0,48 à 0,50 µg/ml, une activité antitrypanosomiale remarquable avec des valeurs de IC<sub>50</sub> allant de 6,05 à 31,71 µg/ml, une faible cytotoxicité sur les cellules macrophages J 774 (LC<sub>50</sub> 10,57-11,48 µg/ml) et une indice de sélectivité importante (SI-L 7,16-7,65). Cette étude rapporte aussi pour la première fois l'activité antiparasitaire des extraits de *P. battandieri* et *F. thymifolia* et les composés isolés.

Concernant l'activité antibactérienne, les deux extraits FT-E et FT-B possèdent une activité modérée contre les souches testées comparativement à la gentamicine.

# *Conclusion générale*

## Conclusion générale

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une contribution à la valorisation des ressources naturelles d'origine végétale de l'Algérie. Son but principal est l'investigation phytochimique et biologique de deux espèces :

- *Pituranthos battandieri* Maire (Apiaceae) ; espèce endémique au Sahara algéro-marocain.
- *Frankenia thymifolia* Desf. (Frankeniaceae) ; espèce endémique à l'Afrique de Nord.

Après macération hydroalcoolique des parties aériennes et des racines (prises séparément) de l'espèce *P. battandieri*, filtration, concentration sous pression réduite puis dilution à l'eau distillée sous agitation magnétique des extraits hydroalcooliques, les solutions obtenues subissent des affrontements successifs par l'éther de pétrole, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol donnant les 8 extraits correspondants. Nos investigations ont débuté par l'évaluation *in vitro* de l'activité antiparasitaire des extraits hydroalcooliques et de leurs extraits dérivés. Ces extraits ont montré des activités remarquables contre les parasites *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* et *Acanthamoeba castellanii*. On note en particulier de meilleures activités des extraits dichlorométhane des parties aériennes et éther de pétrole des racines. Ces deux extraits ont alors été soumis à des fractionnements, séparations et purifications bioguidés. Ces travaux menés par diverses techniques de chromatographie liquide ont permis l'obtention de **14 composés (P1-P14)** actifs sur *L. amazonensis* et *T. cruzi*. Les structures de **7** de ces composés antiparasitaires (**P1-P7**) ont été établies.

Les composés isolés et déterminés sont :

- Trois furanocoumarines linéaires : 8-geranyloxy-psoralène (**P1**), 8-geranyloxy-5-méthoxypsoralène (**P2**), phelloptérine (**P3**).
  - *trans-para*-coumarate d'éthyle (**P4**)
  - (+)-5 $\alpha$ -Hydroxy-2-oxo-*p*-menth-6(1)-ène (**P5**)
  - Deux composés polyacétyléniques : (-)-(3R, 10S)-panaxydiol (**P6**) et (-)-(3R, 8R)-falcarindiol (**P7**).
- } Mélange 35% - 65%

Tous ces composés sont nouveaux pour l'espèce sauf la phelloptérine (**P3**). Le composé **P7** sous la forme lévogyre est nouveau dans la littérature comme un produit naturel, cependant il a été isolé comme produit naturel sous la forme dextrogyre. Ces **7** composés ont été évalués d'une part pour leur activité antiparasitaire et d'autre part pour leur activité cytotoxique sur les macrophages de la lignée cellulaire J 774.A1. Les composés (-)-falcarindiol (**P7**) et (-)-panaxydiol (**P6**) manifestent les meilleurs pourcentages d'inhibition contre les parasites testés avec de faibles niveaux de toxicité sur les macrophages.

D'autre part, l'extrait Dichlorométhane a montré une activité antioxydante significative par rapport aux autres extraits dans différents tests corrélant ainsi avec ses teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux.

L'investigation phytochimique de *Frankenia thymifolia* a mené à l'isolement de **12** composés et l'identification structurale à ce stade de notre travail, de **8** d'entre eux composés. Les composés identifiés sont des flavonoïdes et un dérivé de l'acide gallique.

- naringinine (**F1**)
- quercétine (**F2**)
- gallate de méthyle 3,4-diméthyl éther (**F4**)
- quercétine 3-*O*-méthyl éther (**F6**)
- 3'-*O*-galactopyranosyl quercétine (**F7**)
- 4'-*O*-glucopyranosyl quercétine (**F9**)

Les composés **F1**, **F6**, **F7**, **F9** sont nouveaux pour la famille Frankeniaceae.

Les structures des composés isolés ont été déterminées par la combinaison des différentes méthodes spectrales à savoir la spectrophotométrie UV-Visible, la RMN monodimensionnelle (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et DEPT) et bidimensionnelle (HSQC, COSY, HMBC et GOESY), ainsi que la spectrométrie de masse haute résolution en modes électrospray et impact électronique (HRESI-MS et HR-EI-MS) et par la comparaison avec les données de la littérature.

Les propriétés antioxydantes des extraits CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-BuOH de *F. thymifolia* ainsi que les composés isolés **F1**, **F2** et **F6** ont été testées par sept méthodes : radical DPPH, radical-cation ABTS, blanchiment du β-carotène, radical-anion superoxyde, le pouvoir chélateur ferreux, CUPRAC et le pouvoir réducteur (FRAP). Nos résultats ont montré que par comparaison au standards utilisés, l'extrait AcOEt possède un pouvoir antioxydant plus important que les extraits *n*-BuOH et CHCl<sub>3</sub>. De même, le composé **F6** a montré une activité antioxydante plus importante que la quercétine (**F2**) et la naringénine (**F1**). L'extrait AcOEt a également manifesté une activité antiparasitaire plus importante que les deux autres extraits contre les deux parasites *A. castellanii* et *L. amazonensis*. Les extraits *n*-BuOH et AcOEt ont montré une activité antibactérienne modérée sur les souches bactériennes *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella oxytoca* par rapport à la gentamicine utilisée comme référence.

Nos résultats confirment bien la richesse des espèces du genre *Pituranthos* et du genre *Frankenia* en métabolites secondaires biologiquement actifs, et sont bien en accord avec les travaux antérieurement publiés sur ces deux genres.



Ces travaux ont fait l'objet d'une publication internationale parue, une autre soumise, cinq communications internationales et trois nationales dans des congrès de spécialité.

## *Références bibliographiques*

### Références bibliographiques



- Abdallah, H.M., Ezzat, S.M., 2014. Effect of the method of preparation on the composition and cytotoxic activity of the essential oil of *Pituranthos tortuosus*. Z. Für Naturforschung C. 66, 143–148. <https://doi.org/10.1515/znc-2011-3-408>
- Abdelhalim, A., Aburjai, T., Hanrahan, J., Abdel-Halim, H., 2017. Medicinal plants used by traditional healers in Jordan, the Tafila region. Pharmacogn. Mag. 13, 95. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.203975>
- Abdel-Kader, M.S., 2003. New ester and furocoumarins from the roots of *Pituranthos tortuosus*. J Braz Chem Soc. 14, 48–51. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000100008>
- Abdel-Nasser, S., Khalifa, T., Hussien, M.G., Okada, Y., Yuka, M.N.M., Nishino, H., Okuyama, T., 1998. A New flavonoid glycoside from *Pituranthos tortuosus* Desf., Benth & Hook. Nat Med. 52, 191–194.
- Abdelwahed, A., Skandrani, I., Kilani, S., Neffati, A., Sghaier, M.B., Bouhleb, I., Boubaker, J., Ammar, R.B., Mahmoud, A., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L., 2008. Mutagenic, antimutagenic, cytotoxic, and apoptotic activities of extracts from *Pituranthos tortuosus*. Drug Chem Toxicol. 31, 37–60. <https://doi.org/10.1080/01480540701688634>
- Adida, H., Benariba, N., Bechiri, A., Chekroun, E., Djaziri, R., 2016. Étude phytochimique et évaluation du pouvoir antiradicalaire des extraits de *Pituranthos scoparius*. Phytothérapie 14, 207–212. <https://doi.org/10.1007/s10298-015-0932-4>
- Ashkenazy, D., Friedman, J., Kashman, Y., 1983. The furocoumarin composition of *Pituranthos triradiatus*. Planta Med. 47, 218–220. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969990>
- Ajay Kumar, K., Renuka, N., Pavithra, G., Vasanth Kumar, G., 2015. Comprehensive review on coumarins: molecules of potential chemical and pharmacological interest. J Chem Pharm Res. 7, 67–81.
- Aliouche, L., Zater, H., Zama, D., Bentamene, A., Seghiri, R., Mekkiou, R., Benayache, S., Benayache, F., 2007. Flavonoids of *Serratula cichoracea* and their antioxidant activity. Chem Nat Compd. 43, 618–619. <https://doi.org/10.1007/s10600-007-0208-9>
- Aloui, L., Kossentini, M., Zouari, S., 2018. Characterization of aromatic compounds and antioxidant activity of essential oils from Tunisian *Pituranthos tortuosus* (Coss.) Maire (Apiaceae). J Essent Oil Bear Plants. 21, 769–778. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1475264>
- Alu'datt, M.H., Rababah, T., Alhamad, M.N., Al-Mahasneh, M.A., Almajwal, A., Gammoh, S., Ereifej, K., Johargy, A., Alli, I., 2017. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. Food Chem. 218, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.057>

## Références bibliographiques

Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A., 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chem.* 84, 551–562. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00278-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00278-4)

Amorati, R., Valgimigli, L., 2018. Methods to measure the antioxidant activity of phytochemicals and plant extracts. *J Agric Food Chem.* 66, 3324–3329. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01079>

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademi'r, S.E., Altun, M., 2005. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method. *Free Radic Res.* 39, 949–961. <https://doi.org/10.1080/10715760500210145>

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *J Agric Food Chem.* 52, 7970–7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>



Badgujar, S.B., Patel, V.V., Bandivdekar, A.H., 2014. *Foeniculum vulgare* Mill: a review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. *BioMed Res. Int.* 2014, 1-32. <https://doi.org/10.1155/2014/842674>

Bae, B.H., Im, K.S., Choi, W.C., Hong, J., Lee, C.-O., Choi, J.S., Son, B.W., Song, J.-I., Jung, J.H., 2000. New acetylenic compounds from the stony coral *Montipora* sp. *J Nat Prod.* 63, 1511–1514. <https://doi.org/10.1021/np0002076>

Baldim, J.L., Alcântara, B.G.V. de, Domingos, O. da S., Soares, M.G., Caldas, I.S., Novaes, R.D., Oliveira, T.B., Lago, J.H.G., Chagas-Paula, D.A., 2017. The correlation between chemical structures and antioxidant, prooxidant, and antitrypanosomatid properties of flavonoids. *Oxid Med Cell Longev.* 2017, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2017/3789856>

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.042>

Baranska, M., Schulz, H., 2005. Spatial tissue distribution of polyacetylenes in carrot root. *Analyst* 130, 855–859. <https://doi.org/10.1039/B500975H>

Baranska, M., Schulz, H., Baranski, R., Nothnagel, T., Christensen, L.P., 2005. *In situ* simultaneous analysis of polyacetylenes, carotenoids and polysaccharides in carrot roots. *J Agric Food Chem.* 53, 6565–6571. <https://doi.org/10.1021/jf0510440>

Barnard, D.L., Xu, Z.-Q., Stowell, V.D., Yuan, H., Smees, D.F., Samy, R., Sidwell, R.W., Nielsen, M.K., Sun, L., Cao, H., Li, A., Quint, C., Deignan, J., Crabb, J., Flavin, M.T., 2002. Coumarins and pyranocoumarins, potential novel pharmacophores for inhibition of measles virus replication. *Antivir Chem Chemother.* 13, 39–59. <https://doi.org/10.1177/095632020201300104>

Bauer, R., 2000. *Herbs, Botanicals and Teas*. CRC Press.

## Références bibliographiques

- Beer, D. de, Joubert, E., Gelderblom, W.C.A., Manley, M., 2017. Phenolic compounds: a review of their possible role as *in vivo* antioxidants of wine. *South Afr J Enol Vitic.* 23, 48–61. <https://doi.org/10.21548/23-2-2155>
- Bellakhdar, J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle : médecine arabe ancienne et savoirs populaires. Ibis press. Paris.
- Ben Hadj Ahmed, S., Sghaier, R.M., Guesmi, F., Kaabi, B., Mejri, M., Attia, H., Laouini, D., Smaali, I., 2011. Evaluation of antileishmanial, cytotoxic and antioxidant activities of essential oils extracted from plants issued from the leishmaniasis-endemic region of Sned (Tunisia). *Nat Prod Res.* 25, 1195–1201. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.534097>
- Ben Mansour, R., Megdiche-Ksouri, W., Cluzet, S., Krisa, S., Richard, T., Ksouri, R., 2016. Assessment of antioxidant activity and neuroprotective capacity on PC12 cell line of *Frankenia thymifolia* and related phenolic LC-MS/MS Identification. *Evid Based Complement Alternat Med.* <https://doi.org/10.1155/2016/2843463>
- Ben Mansour, R., Megdiche-Ksouri, W., Cluzet, S., Krisa, S., Richard, T., Ksouri, R., 2017. LC-MS identification and preparative HPLC isolation of *Frankenia pulverulenta* phenolics with antioxidant and neuroprotective capacities in PC12 cell line. *Pharm Biol.* 55, 880–887. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1278452>
- Ben Sassi, A., Harzallah-Skhiri, F., Bourgougnon, N., Aouni, M., 2008. Antiviral activity of some Tunisian medicinal plants against *Herpes simplex* virus type 1. *Nat Prod Res.* 22, 53–65. <https://doi.org/10.1080/14786410701589790>
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 239, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Belyagoubi-Benhammou, N., Belyagoubi, L., Bechlaghem, N., Ghembaza, N., Atik-Bekkara, F., 2017. Assessment of antioxidant potential and phytochemical analysis of *Pituranthos scoparius* crude extract and its fractions. *Orient Pharm Exp Med.* 17, 51–57. <https://doi.org/10.1007/s13596-016-0253-7>
- Blois, M.S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bolanos de la Torre, A.A.S., Henderson, T., Nigam, P.S., Owusu-Apenten, R.K., 2015. A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. *Food Chem.* 174, 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.009>
- Boonsong, S., Klaypradit, W., Wilaipun, P., 2016. Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. *Agric Nat Resour.* 50, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2015.07.002>
- Bouaziz, M., Dhoub, A., Loukil, S., Boukhris, M., Sayadi, S., 2009. Polyphenols content, antioxidant and antimicrobial activities of extracts of some wild plants collected from the south of Tunisia. *Afr J Biotechnol.* 8, 7017–7027.

## Références bibliographiques

Boudjelal, A., Henchiri, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A., Ruberto, G., 2013. Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. *J Ethnopharmacol.* 148, 395–402. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.03.082>

Bouvier, F., Rahier, A., Camara, B., 2005. Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog Lipid Res.* 44, 357–429. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.09.003>

Bruneton, J., 1993. *Pharmacognosie: phytochimie, plantes médicinales.* Technique et documentation-Lavoisier.

Brunetti, C., Fini, A., Sebastiani, F., Gori, A., Tattini, M., 2018. Modulation of phytohormone signaling: a primary function of flavonoids in plant-environment interactions. *Front. Plant Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01042>

Borges Bubols, G., da Rocha Vianna, D., Medina-Remon, A., von Poser, G., Maria Lamuela-Raventos, R., Lucia Eifler-Lima, V., Cristina Garcia, S., 2013. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. *Mini Rev Med Chem.* 13, 318-334(17). <https://doi.org/info:doi/10.2174/138955713804999775>

Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L., Uriarte, E., 2005. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Curr Med Chem.* 12, 887–916. <https://doi.org/10.2174/0929867053507315>



Cabrera-Serra, M.G., Lorenzo-Morales, J., Romero, M., Valladares, B., Piñero, J.E., 2007. *In vitro* activity of perifosine: a novel alkylphospholipid against the promastigote stage of *Leishmania* species. *Parasitol Res.* 100, 1155–1157. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0408-4>

Calzada, F., Lopéz, R., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R., 1995. Flavonoids of the aerial parts of *Helianthemum Glomeratum*. *Int J Pharmacogn.* 33, 351–352. <https://doi.org/10.3109/13880209509065393>

Chaieb, M., 1998. *Flore succinte et illustrée des zones arides et sahariennes de Tunisie.* Association pour la protection de la nature et de l'environnement; L'Or du temps.

Chen, Y., Peng, S., Luo, Q., Zhang, J., Guo, Q., Zhang, Y., Chai, X., 2015. Chemical and pharmacological progress on polyacetylenes isolated from the family Apiaceae. *Chem. Biodivers.* 12, 474–502. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201300396>

Cheng, W.-L., Lin, T.-Y., Tseng, Y.-H., Chu, F.-H., Chueh, P.-J., Kuo, Y.-H., Wang, S.-Y., 2011. Inhibitory effect of human breast cancer cell proliferation via p21-mediated G1 cell cycle arrest by araliadiol isolated from *Aralia cordata* Thunb. *Planta Med.* 77, 164–168.

Cheurfa, M., Allem, R., 2016. Évaluation de l'activité anti-oxydante de différents extraits des feuilles d'*Aloysia triphylla* (L'Hérit.) d'Algérie *in vitro*. *Phytothérapie* 14, 181–187. <https://doi.org/10.1007/s10298-015-0969-4>

## Références bibliographiques

Chikhoun, A., Pavleca, J.D., Shashkov, M., Berroua, Z., Chebbi, K., Bougherra, H., Zeroual, B., Aliane, K., Gagaoua, M., Boudjellal, A., Vovk, I., Križman, M., 2017. Antioxidant effect induced by the essential oil of *Pituranthos scoparius* in a formulation of a whey spread emulsion. *J Food Process Preserv.* 41, e13163. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13163>

Christensen, L.P., Brandt, K., 2006. Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 41, 683–693. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.01.057>

CLSI, C. and L.S.I., 2012. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 11th Edition.

Cronquist, A., 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press.



Debuigne, G., Couplan, F., 2006. Petit Larousse des plantes qui guérissent, 1ère édition. Larousse.

Decker, E.A., Welch, B., 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agric Food Chem.* 38, 674–677. <https://doi.org/10.1021/jf00093a019>

Delort, E., Jaquier, A., Decorzant, E., Chapuis, C., Casilli, A., Frérot, E., 2015. Comparative analysis of three Australian finger lime (*Citrus australasica*) cultivars: Identification of unique citrus chemotypes and new volatile molecules. *Phytochemistry* 109, 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.023>

Denev, P., Kratchanova, M., Ciz, M., Lojek, A., Vasicek, O., Nedelcheva, P., Blazheva, D., Toshkova, R., Gardeva, E., Yossifova, L., Hyrsl, P., Vojtek, L., 2014. Biological activities of selected polyphenol-rich fruits related to immunity and gastrointestinal health. *Food Chem.* 157, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.022>

Dobignard, A., Chatelain, C., Fischer, M., Orso, J., Jeanmonod, D., 2010. Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord. Ed. Conservatoire et Jardin Botaniques, Genève.

Dok-Go, H., Lee, K.H., Kim, H.J., Lee, E.H., Lee, J., Song, Y.S., Lee, Y.-H., Jin, C., Lee, Y.S., Cho, J., 2003. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids, quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *Brain Res.* 965, 130–136. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)04150-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)04150-1)



Ebrahimzadeh, M.A., Pourmorad, F., Bekhradnia, A.R., 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *Afr J Biotechnol.* 7, 3188–3192. <https://doi.org/10.5897/AJB08.476>

## Références bibliographiques

Embuscado, M.E., 2015. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. *J Funct Foods*. 18, 811–819. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.005>

Erlund, I., 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res*. 24, 851–874. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2004.07.005>

Esseid, C., Hamadou, M.H., Ameddah, S., Ahmed, M., León, F., Brouard, I., Marchioni, E., Benayache, S., Benayache, F., 2017. Chemical constituents and antioxidant activity of a polar extract from *Pituranthos battandieri* Maire. *Int J Pharmacogn Phytochem Res*. 9, 559–566.

Esseid, C., 2018. Isolement et détermination structurale de métabolites secondaires de plantes sahariennes (Thèse de Doctorat). Université Frères Mentouri Constantine 1.

Ezz Eldin, H.M., Sarhan, R.M., 2014. Cytotoxic effect of organic solvents and surfactant agents on *Acanthamoeba castellanii* cysts. *Parasitol Res*. 113, 1949–1953. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3845-5>



François, D., Ploy, M.-C., Christian, M., Édouard, B., Roland, Q., 2011. *Bactériologie médicale, Techniques usuelles*, Elsevier Masson.

Franke, K., Porzel, A., Masaoud, M., Adam, G., Schmidt, J., 2001. Furanocoumarins from *Dorstenia gigas*. *Phytochemistry* 56, 611–621. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00419-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00419-2)

Formica, J.V., Regelson, W., 1995. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*. 33, 1061–1080. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(95\)00077-1](https://doi.org/10.1016/0278-6915(95)00077-1)

Foti, M., Piattelli, M., Baratta, M.T., Ruberto, G., 1996. Flavonoids, coumarins, and cinnamic acids as antioxidants in a micellar system. Structure–Activity Relationship. *J Agric Food Chem*. 44, 497–501. <https://doi.org/10.1021/jf950378u>

Fujioka, T., Furumi, K., Fujii, H., Okabe, H., Mihashi, K., Nakano, Y., Matsunaga, H., Katano, M., Mori, M., 1999. Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants. V. A new furanocoumarin and faltarindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica*. *Chem. Pharm. Bull*. 47, 96–100. <https://doi.org/10.1248/cpb.47.96>



George, V.C., Dellaire, G., Rupasinghe, H.P.V., 2017. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: role in genome stability. *J Nutr Biochem*. 45, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.11.007>



## Références bibliographiques

- Goetz, P., 2017. Les antispasmodiques en phytothérapie. *Phytothérapie* 15, 182–188. <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1149-5>
- Govaerts, R., 2001. *Frankenia* L. Plants of the World Online. Kew Science. Plants World Online. URL <http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:16452-1> (Date de consultation : 12/07/2018).
- Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L.D., Hidalgo, F.J., Miyashita, K., Camp, J. van, Alasalvar, C., Ismail, A.B., Elmore, S., Birch, G.G., Charalampopoulos, D., Astley, S.B., Pegg, R., Zhou, P., Finglas, P., 2018. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chem.* 264, 471–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.012>
- Guignard, J.-L., Potier, P., 2004. *Biochimie végétale*, 2e édition. ed. Dunod, Paris.
- Gundersen, A., 1927. The Frankeniaceae as a link in the classification of dicotyledones. *Torreyia* 27, 65–71.
- Gupta, D., 2015. Methods for determination of antioxidant capacity: a review 6(2), 546–566.



- Haba, H., 2002. Détermination de structure de composés d'une ombellifère : *Pituranthos scoparius* (mémoire de magister). Université El Hadj Lakhdar de Batna 1.
- Haba, H., Benkhaled, M., Massiot, G., Long, C., Lavaud, C., 2004. Alkylated Isocoumarins from *Pituranthos Scoparius*. *Nat Prod Res.* 18, 409–413. <https://doi.org/10.1080/14786410310001639259>
- Halim, A.F., Saad, H.-E.A., Lahloub, M.F., Ahmed, A.F., 1995. Pituranthoside from *Pituranthos triradiatus*. *Phytochemistry* 40, 927–929. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00236-Z](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00236-Z)
- Hammiche, V., Maiza, K., 2006. Traditional medicine in Central Sahara: Pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. *J Ethnopharmacol.* 105, 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.11.028>
- Han, H.S., Jeon, H., Kang, S.C., 2018. Phellopterin isolated from *Angelica dahurica* reduces blood glucose level in diabetic mice. *Heliyon* 4, e00577. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00577>
- Harborne, J.B., 1975. Flavonoid sulphates: A new class of sulphur compounds in higher plants. *Phytochemistry* 14, 1147–1155. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)98585-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)98585-6)
- Harborne, J.B., 2013. *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*. Springer.
- Harchaoui, L., Chabane, D., Ouafi, S., 2018. Analgesic and anti-inflammatory properties of aqueous extract of *Deverra scoparia* Coss. and Dur. obtained from Tamanrasset, Algeria. *Trop J Pharm Res.* 17, 1523–1529–1529.
- Harkat, H., 2008. Hétérocycles oxygénés et composés aromatiques de *Frankenia thymifolia* Desf. : formation d'hétérocycles oxygénés et isolement de substances naturelles (Thèse de Doctorat). Université El Hadj Lakhdar, Batna 1.

## Références bibliographiques

Harkat, H., Haba, H., Marcourt, L., Long, C., Benkhalel, M., 2007. An unusual lignan sulfate and aromatic compounds from *Frankenia thymifolia* Desf. *Biochem Syst Ecol.* 35, 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.10.007>

Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J.F., Flamm, G.W., Williams, G.M., Lines, T.C., 2007. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of *in vivo* toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol.* 45, 2179–2205. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.05.015>

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 13, 572–584. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(02)00208-5)

Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 53, 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>

Hussein, S.A.M., 2004. Phenolic sodium sulphates of *Frankenia laevis* L. *Pharm. - Int J Pharm Sci.* 59, 304–308.



Ishihara, M., Yokote, Y., Sakagami, H., 2006. Quantitative structure-cytotoxicity relationship analysis of coumarin and its derivatives by semi empirical molecular orbital method. *Anticancer Res* 26, 2883–2886.



Jeon, S.H., Chun, W., Choi, Y.J., Kwon, Y.S., 2008. Cytotoxic constituents from the bark of *Salix hulteni*. *Arch Pharm Res.* 31, 978–982. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1255-9>

Jia, L.-H., Li, Y., Li, Y.-Z., 2011. Determination of wholesome elements and heavy metals in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) from Xinjiang and Henan by ICP-MS/ICP-AES. *J Pharm Anal.* 1, 100–103. [https://doi.org/10.1016/S2095-1779\(11\)70017-X](https://doi.org/10.1016/S2095-1779(11)70017-X)

Juranović Cindrić, I., Zeiner, M., Požgaj, M., Šilić, T., Stinger, G., 2015. Elemental characterisation of the medical plant *Alchemilla velebitica*. *J Trace Elem Med Biol., Special Section: 10th Nordic Symposium on Trace Elements in Human Health and Disease*, edited by Jan Aaseth 31, 274–278. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2014.09.008>

## Références bibliographiques

### K

- Kaabeche, M.**, 1990. Les groupements végétaux de la région de bou saada (Algérie); essai de synthèse sur la végétation steppique du Maghreb. Paris 11.
- Kancheva, V.D., Boranova, P.V., Nechev, J.T., Manolov, I.I.**, 2010. Structure–activity relationships of new 4-hydroxy bis-coumarins as radical scavengers and chain-breaking antioxidants. *Biochimie, Adv Biomol Med Chem.* 92, 1138–1146. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.02.033>
- Kang, J., Zhou, L., Sun, J., Han, J., Guo, D.-A.**, 2008. Chromatographic fingerprint analysis and characterization of furocoumarins in the roots of *Angelica dahurica* by HPLC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup> technique. *J Pharm Biomed Anal.* 47, 778–785. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.03.010>
- Kanno, S., Tomizawa, A., Hiura, T., Osanai, Y., Shouji, A., Ujibe, M., Ohtake, T., Kimura, K., Ishikawa, M.**, 2005. Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol Pharm Bull.* 28, 527–530. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.527>
- Karadag, A., Ozcelik, B., Saner, S.**, 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Anal. Methods* 2, 41–60. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9067-7>
- Khacheba, I., Boussoussa, H., Djeridane, A., Bekhaoua, A., Bensayah, N., Yousfi, M.**, 2017.  $\alpha$ -Glucosidase inhibitory effect and antioxidant activity of the extracts of eighteen plant traditionally used in Algeria for diabetes. *Curr Enzyme Inhib.* 13, pp. 67-78.
- Kostova, I.**, 2005. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Curr Med Chem-Anti-Cancer Agents.* 5, 29–46. <https://doi.org/10.2174/1568011053352550>
- Kostova, I., Raleva, S., Genova, P., Argirova, R.**, 2006. Structure-Activity relationships of synthetic coumarins as HIV-1 inhibitors. *Bioinorg Chem Appl.* <https://doi.org/10.1155/BCA/2006/68274>
- Koyro, H.-W., Geissler, N., Hussin, S., Huchzermeyer, B.**, 2008. Survival at extreme locations: Life strategies of halophytes - The long way from system ecology, whole plant physiology, cell biochemistry and molecular aspects back to sustainable utilization at field sites. Chapitre dans : *Biosaline Agriculture and High Salinity Tolerance.* Birkhäuser Basel, Basel, pp. 1–20. [https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8554-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8554-5_1)
- Krifa, M., Gharad, T., Haouala, R.**, 2011. Biological activities of essential oil, aqueous and organic extracts of *Pituranthos tortuosus* (Coss.) Maire. *Sci. Hortic.* 128, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.12.016>
- Krifa, M., Meshri, S.E.E., Bentouati, N., Pizzi, A., Sick, E., Chekir-Ghedira, L., Rondé, P.**, 2016. *In vitro* and *in vivo* anti-melanoma effects of *Pituranthos tortuosus* essential oil via inhibition of FAK and Src activities. *J Cell Biochem.* 117, 1167–1175. <https://doi.org/10.1002/jcb.25400>

## Références bibliographiques

Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food Bioprod Process. 89, 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.04.008>

Ksouri, A., Dob, T., Belkebir, A., Dahmane, D., Nouasri, A., 2017. Volatile compounds and biological activities of aerial parts of *Pituranthos scoparius* (Coss. and Dur.) Schinz (Apiaceae) from Hoggar, southern Algeria. Trop J Pharm Res. 16, 51-58–58. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v16i1.7>

Kubitzki, K., 2003. Frankeniaceae, Chapitre dans : kubitzki, klaus, bayer, C. (Eds.), flowering plants dicotyledons: malvales, capparales and non-betalain caryophyllales, the families and genera of vascular plants. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 209–212. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-07255-4\\_24](https://doi.org/10.1007/978-3-662-07255-4_24)

Kunchandy, E., Rao, M.N.A., 1990. Oxygen radical scavenging activity of curcumin. Int J Pharm. 58, 237–240. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90201-E](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90201-E)



Lam, J., 1988. Chemistry and biology of naturally-occurring acetylenes and related compounds (NOARC). Presented at the conference on the chemistry and biology of naturally-occurring acetylenes and related compounds., distributors for the U.S. and Canada, Elsevier Science Pub. Co.

Lechner, D., Stavri, M., Oluwatuyi, M., Pereda-Miranda, R., Gibbons, S., 2004. The anti-staphylococcal activity of *Angelica dahurica* (Bai Zhi). Phytochemistry 65, 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2003.11.010>

Le Grandois, J., Guffond, D., Hamon, E., Marchioni, E., Werner, D., 2017. Combined microplate-ABTS and HPLC-ABTS analysis of tomato and pepper extracts reveals synergetic and antagonist effects of their lipophilic antioxidative components. Food Chem. 223, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.008>

Lesjak, M., Beara, I., Simin, N., Pintać, D., Majkić, T., Bekvalac, K., Orčić, D., Mimica-Dukić, N., 2018. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. J Funct Foods. 40, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.10.047>

Li, Y.-L., Li, J., Wang, N.-L., Yao, X.-S., 2008. Flavonoids and a New Polyacetylene from *Bidens parviflora* Willd. Molecules 13, 1931–1941. <https://doi.org/10.3390/molecules13081931>

Liu, X., Wu, Q.-X., Shi, Y.-P., 2005. Terpenoids from the Flower of *Cacalia Tangutica*. J Chin Chem Soc. 52, 369–374. <https://doi.org/10.1002/jccs.200500055>

## Références bibliographiques

Liu, Y.-P., Wen, Q., Hu, S., Ma, Y.-L., Jiang, Z.-H., Tang, J.-Y., Fu, Y.-H., Qiu, S.-X., 2018. Furanocoumarins with potential antiproliferative activities from *Clausena lenis*. Nat Prod Res. 0, 1–7. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1463530>

Lorenzo-Morales, J., Martín-Navarro, C.M., López-Arencibia, A., Santana-Morales, M.A., Afonso-Lehmann, R.N., Maciver, S.K., Valladares, B., Martínez-Carretero, E., 2010. Therapeutic potential of a combination of two gene-specific small interfering RNAs against clinical strains of *Acanthamoeba*. Antimicrob Agents Chemother. 54, 5151–5155. <https://doi.org/10.1128/AAC.00329-10>

Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Abreu-Acosta, N., Ballart, D., Martínez, E., Valladares, B., 2005. RNA interference (RNAi) for the silencing of extracellular serine proteases genes in *Acanthamoeba*: Molecular analysis and effect on pathogenicity. Mol Biochem Parasit. 144, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.07.001>

López-Alarcón, C., Denicola, A., 2013. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. Anal Chim Acta. 763, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.11.051>



Maltese, F., Erkelens, C., Kooy, F. van der, Choi, Y.H., Verpoorte, R., 2009. Identification of natural epimeric flavanone glycosides by NMR spectroscopy. Food Chem. 116, 575–579. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.023>

Malti, C.E.W., Boussaïd, M., Belyagoubi, L., Paoli, M., Gibernau, M., Tomi, F., Bekkara, F.A., Bekhechi, C., 2018. Chemical variability of the essential oil of *Pituranthos scoparius* from Algeria. Chemistry & Biodiversity 15, e1800149. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800149>

Markham, K.R., 1982. Techniques of flavonoid identification, Biological techniques series. Academic Press, London ; New York.

Marumoto, S., Miyazawa, M., 2012. Structure–activity relationships for naturally occurring coumarins as  $\beta$ -secretase inhibitor. Bioorgan Med Chem. 20, 784–788. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.12.002>

Martín-Navarro, C.M., Lorenzo-Morales, J., Cabrera-Serra, M.G., Rancel, F., Coronado-Álvarez, N.M., Piñero, J.E., Valladares, B., 2008. The potential pathogenicity of chlorhexidine-sensitive *Acanthamoeba* strains isolated from contact lens cases from asymptomatic individuals in Tenerife, Canary Islands, Spain. J Med Microbiol. 57, 1399–1404. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/003459-0>

Megdiche Ksouri, W., Chaouachi, F., M'Rabet, R., Medini, F., Zaouali, Y., Trabelsi, N., Ksouri, R., Noumi, E., Chedly, A., 2011. Antioxidant and antimicrobial properties of *Frankenia thymifolia* Desf. fractions and their related biomolecules identification by gas chromatography/ mass spectrometry (GC/MS) and high performance liquid chromatography (HPLC). J Med Plants Res. 5, 5754–5765.

## Références bibliographiques

- Melough, M.M., Cho, E., Chun, O.K., 2018. Furocoumarins: a review of biochemical activities, dietary sources and intake, and potential health risks. *Food Chem Toxicol.* 113, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.030>
- Meot-Duros, L., Cérantola, S., Talarmin, H., Le Meur, C., Le Floch, G., Magné, C., 2010. New antibacterial and cytotoxic activities of falcarindiol isolated in *Crithmum maritimum* L. leaf extract. *Food Chem Toxicol.* 48, 553–557. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.031>
- Min, N., Leong, P.T., Lee, R.C.H., Khuan, J.S.E., Chu, J.J.H., 2018. A flavonoid compound library screen revealed potent antiviral activity of plant-derived flavonoids on human enterovirus A71 replication. *Antivir Res.* 150, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.12.003>
- Misbah, H., Aziz, A.A., Aminudin, N., 2013. Antidiabetic and antioxidant properties of *Ficus deltoidea* fruit extracts and fractions. *Bmc Complem Altern M.* 13, 118. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-118>
- Miyazawa, M., Shimamura, H., Bhuva, R.C., Nakamura, S., Kameoka, H., 1996. Antimutagenic Activity of Falcarindiol from *Peucedanum praeruptorum*. *J Agric Food Chem.* 44, 3444–3448. <https://doi.org/10.1021/jf960025a>
- Musa, M., Cooperwood, J., Khan, M.O., 2008. A review of coumarin derivatives in pharmacotherapy of breast cancer. *Curr Med Chem.* 15, 2664–2679. <https://doi.org/10.2174/092986708786242877>

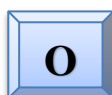


- Naeimi, A.F., Alizadeh, M., 2017. Antioxidant properties of the flavonoid fisetin: An updated review of *in vivo* and *in vitro* studies. *Trends Food Sci Tech.* 70, 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.003>
- Nait Said, N., 2007. Étude phytochimique des extraits chloroformiques des plantes : "*Pituranthos chloranthus*" et "*Marrubium vulgare*" (Mémoire de magister). Université El Hadj Lakhdar de Batna 1.
- Neffati, A., Skandrani, I., Ben Saghiaier, M., Bouhlel, I., Kilani S., Ghedira, K., Neffati, M., Chraief, I., Hammani, M., Chekir-Ghedira, L., 2008. Chemical composition, mutagenic and antimutagenic activities of essential oils from (Tunisian) *Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba*. *J Essent Oil Res.* 20, 471–477.
- Neffati, A., Bouhlel, I., Ben Sghaier, M., Boubaker, J., Limem, I., Kilani, S., Skandrani, I., Bhourri, W., Le Dauphin, J., Barillier, D., Mosrati, R., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., 2009. Antigenotoxic and antioxidant activities of *Pituranthos chloranthus* essential oils. *Environ Toxicol Pharmacol.* 27, 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.10.010>

## Références bibliographiques

Ninfali, P., Antonini, E., Frati, A., Scarpa, E.-S., 2017. C-glycosyl flavonoids from *Beta vulgaris Cicla* and betalains from *Beta vulgaris rubra*: antioxidant, anticancer and antiinflammatory activities—a review. *Phytother Res.* 31, 871–884. <https://doi.org/10.1002/ptr.5819>

Nizamutdinova, I.T., Jeong, J.J., Xu, G.H., Lee, S.-H., Kang, S.S., Kim, Y.S., Chang, K.C., Kim, H.J., 2008. Hesperidin, hesperidin methyl chalone and phellopterin from *Poncirus trifoliata* (Rutaceae) differentially regulate the expression of adhesion molecules in tumor necrosis factor- $\alpha$ -stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Int Immunopharmacol.* 8, 670–678. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.01.011>



Ozenda, P., 2004. Flore et végétation du Sahara. Éditions du centre national de la recherche scientifique, Paris.



Perron, N.R., Brumaghim, J.L., 2009. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys.* 53, 75–100. <https://doi.org/10.1007/s12013-009-9043-x>

Phatchana, R., Yenjai, C., 2014. Cytotoxic coumarins from *Toddalia asiatica*. *Planta Med.* 80, 719–722. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1368568>

Pingili, R., Vemulapalli, S., Mullapudi, S.S., Nuthakki, S., Pendyala, S., Kilaru, N., 2016. Pharmacokinetic interaction study between flavanones (hesperetin, naringenin) and rasagiline mesylate in wistar rats. *Drug Dev Ind Pharm.* 42, 1110–1117. <https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1115868>

Pisoschi, A.M., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review *Eur J Med Chem.* 97, 55–74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>

Prasad, K.R., Swain, B., 2011. Total synthesis of panaxytriol and panaxydiol. *Tetrahedron-Asymmetr.* 22, 1261–1265. <https://doi.org/10.1016/j.tetasy.2011.07.007>

Prior, R.L., 2015. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J Funct Foods.* 18, 797–810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>

## Références bibliographiques

### Q

- Qing-hua, Y., li, Y., Qing, W., Xiao-qin, M., 2012. Determination of major and trace elements in six herbal drugs for relieving heat and toxicity by ICP-AES with microwave digestion. J Saudi Chem Soc. 16, 287–290. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.01.014>
- Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J.-C., Bailleul, F., Trotin, F., 2000. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. J Ethnopharmacol. 72, 35–42. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00196-3](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00196-3)
- Quezel, P., Santa, S., 1962-1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol:1-2, Éditions du centre national de la recherche scientifique. Paris.

### R

- Razavi, S.M., Zahri, S., Nazemiyeh, H., Zarrini, G., Mohammadi, S., Abolghassemi-Fakhri, M.-A., 2009. A furanocoumarin from *Prangos uloptera* roots, biological effects. Nat Prod Res. 23, 1522–1527. <https://doi.org/10.1080/14786410802691909>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Bio Med. 26, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Reddy, B.S., Reddy, R.K.K., Reddy, B.P., Ramakrishna, S., Diwan, P.V., 2008. Potential *in vitro* antioxidant and protective effects of *Soymida febrifuga* on ethanol induced oxidative damage in HepG2 cells. Food Chem Toxicol. 46, 3429–3442. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.034>
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Bio Med. 20, 933–956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G., 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci. 2, 152–159. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)
- Rivero-Pérez, M.D., Muñiz, P., González-Sanjosé, M.L., 2007. Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. J Agric Food Chem. 55, 5476–5483. <https://doi.org/10.1021/jf070306q>
- Roche, A., Ross, E., Walsh, N., O'Donnell, K., Williams, A., Klapp, M., Fullard, N., Edelstein, S., 2017. Representative literature on the phytonutrients category: Phenolic acids. Crit Rev Food Sci. 57, 1089–1096. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.865589>

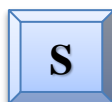


## Références bibliographiques

Row, E.C., Brown, S.A., Stachulski, A.V., Lennard, M.S., 2006. Synthesis of 8-geranyloxypsoralen analogues and their evaluation as inhibitors of CYP3A4. *Bioorgan Med Chem.* 14. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.01.046>

Rukayadi, Y., Shim, J.-S., Hwang, J.-K., 2008. Screening of Thai medicinal plants for anticandidal activity. *Mycoses.* 51, 308–312. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01497.x>

Ruzicka, L., 1953. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia.* 9, 357–367. <https://doi.org/10.1007/BF02167631>



Saïdana, D., Mahjoub, M.A., Mighri, Z., Chriaa, J., Daamiand, M., Helal, A.N., 2010. Studies of the essential oil composition, antibacterial and antifungal activity profiles of *Frankenia laevis* L. from Tunisia. *J Essent Oil Res.* 22, 349–353. <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700343>

Salaritabar, A., Darvishi, B., Hadjiakhoondi, F., Manayi, A., Sureda, A., Nabavi, S.F., Fitzpatrick, L.R., Nabavi, S.M., Bishayee, A., 2017. Therapeutic potential of flavonoids in inflammatory bowel disease: A comprehensive review. *World J Gastroenterol* 23, 5097–5114. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i28.5097>

Salgueiro, M.J., Zubillaga, M., Lysionek, A., Sarabia, M.I., Caro, R., De Paoli, T., Hager, A., Weill, R., Boccio, J., 2000. Zinc as an essential micronutrient: A review. *Nutr Res.* 20, 737–755. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(00\)00163-9](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00163-9)

Santana, L., Uriarte, E., Roleira, F., Milhazes, N., Borges, F., 2004. Furocoumarins in medicinal chemistry. synthesis, natural occurrence and biological activity. *Curr Med Chem.* 11, 3239–3261. <https://doi.org/10.2174/0929867043363721>

Satoh, Y., Satoh, M., Isobe, K., Mohri, K., Yoshida, Y., Fujimoto, Y., 2007. Studies on panax acetylenes: absolute structure of a new panax acetylene, and inhibitory effects of related acetylenes on the growth of L-1210 cells. *Chem. Pharm. Bull.* 55, 561–564. <https://doi.org/10.1248/cpb.55.561>

Sayed-Ahmad, B., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., Merah, O., 2017. The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Ind Crops Prod.* 109, 661–671. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.027>

Schmiech, L., Alayrac, C., Witulski, B., Hofmann, T., 2009. Structure determination of bisacetylenic oxylipins in carrots (*Daucus carota* L.) and enantioselective synthesis of falcarindiol. *J Agric Food Chem.* 57, 11030–11040. <https://doi.org/10.1021/jf9031475>

Schulte, K.E., Pötter, B., 1977. Polyacetylene aus *Pituranthus tortuosus* (Desf.) Benth. u. Hook. *Arch Pharm. (Weinheim).* 310, 945–963. <https://doi.org/10.1002/ardp.19773101202>

Seleem, D., Pardi, V., Murata, R.M., 2017. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-*Candida albicans* activity *in vitro*. *Arch Oral Biol.* 76, 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.08.030>

## Références bibliographiques

- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D., 1992. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci.* 32, 67–103. <https://doi.org/10.1080/10408399209527581>
- Shivakumar, A., Kumar, M.S.Y., 2018. Critical review on the analytical mechanistic steps in the evaluation of antioxidant activity. *Crit Rev Anal Chem.* 48, 214–236. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1400423>
- Sifaoui, I., López-Arencibia, A., Ticona, J.C., Martín-Navarro, C.M., Reyes-Batlle, M., Mejri, M., Lorenzo-Morales, J., Jiménez, A.I., Valladares, B., Lopez-Bazzocchi, I., Abderabba, M., Piñero, J.E., 2014. Bioassay guided isolation and identification of anti-*Acanthamoeba* compounds from Tunisian olive leaf extracts. *Exp Parasitol.* 145, S111–S114. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.02.018>
- Sifaoui, I., López-Arencibia, A., Martín-Navarro, C.M., Reyes-Batlle, M., Mejri, M., Valladares, B., Lorenzo-Morales, J., Abderabba, M., Piñero, J.E., 2017. Selective activity of Oleanolic and Maslinic Acids on the Amastigote form of *Leishmania* Spp. *Iran J Pharm Res: IJPR.* 16, 1190.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent, in: *Methods in Enzymology, Oxidants and Antioxidants Part A.* Academic Press, pp. 152–178. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Smirnoff, N., Cumbes, Q.J., 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 28, 1057–1060. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80182-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80182-7)
- Soltner, D., 2009. *Les Bases de la production végétale.*, Tome III, Collection Sciences et techniques agricoles, Csta.
- Sowndhararajan, K., Deepa, P., Kim, M., Park, S.J., Kim, S., 2017. A review of the composition of the essential oils and biological activities of *Angelica* Species. *Sci Pharm.* 85, 33. <https://doi.org/10.3390/scipharm85030033>
- Spichiger, R.-E., Savolainen, V.V., Figeat, M., Jeanmonod, D., 2004. *Botanique systématique des plantes à fleurs*, 3<sup>eme</sup> édition. ed. Presses polytechnique et universitaires romandes, Lausanne.
- Stevenson, P.C., Simmonds, M.S.J., Yule, M.A., Veitch, N.C., Kite, G.C., Irwin, D., Legg, M., 2003. Insect antifeedant furanocoumarins from *Tetradium daniellii*. *Phytochemistry.* 63, 41–46. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00748-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00748-3)
- Suffness, M., Pezzuto, J.M., 1990. Assays related to cancer drug discovery. *Methods Plant Biochem Assays Bioactivity.* 6, 71–133.
- Syed, F.Q., Elkady, A.I., Mohammed, F.A., Mirza, M.B., Hakeem, K.R., Alkarim, S., 2018. Chloroform fraction of *Foeniculum vulgare* induced ROS mediated, mitochondria-caspase-dependent apoptotic pathway in MCF-7, human breast cancer cell line. *J Ethnopharmacol.* 218, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.029>

## Références bibliographiques

### T

- Tamura, S., Ohno, T., Hattori, Y., Murakami, N., 2010. Establishment of absolute stereostructure of faltarindiol, algicidal principle against *Heterocapsa circularisquama* from Notopterygii Rhizoma. *Tetrahedron Lett.* 51, 1523–1525. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2010.01.047>
- Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T.J., Tosun, F., Rüedi, P., 2006. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 50, 1352–1364. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1352-1364.2006>
- Teles, de A., Braga, R., Diniz, T.C., Pinto, C., Coimbra, T., Júnior, de O., Gonçalves, R., Gama e Silva, M., Lavor, D., Martins, É., Fernandes, A.W.C., Oliveira, D., Paula, A., Ribeiro, de A., Rodrigues, F.P., Silva, D., Marcelino, A.A., Cavalcante, T.C.F., Júnior, Q., José, L., Almeida, da S., Guedes, J.R., 2018. Flavonoids as therapeutic agents in alzheimer's and parkinson's diseases: a systematic review of preclinical evidences. *Oxid Med Cell Longev.* <https://doi.org/10.1155/2018/7043213>
- Thakur, A., Singla, R., Jaitak, V., 2015. Coumarins as anticancer agents: a review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. *Eur J Med Chem.* 101, 476–495. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.07.010>
- Thuong, P.T., Hung, T.M., Ngoc, T.M., Ha, D.T., Min, B.S., Kwack, S.J., Kang, T.S., Choi, J.S., Bae, K., 2010. Antioxidant activities of coumarins from Korean medicinal plants and their structure–activity relationships. *Phytother Res.* 24, 101–106. <https://doi.org/10.1002/ptr.2890>
- Tirapelli, C.R., de Andrade, C.R., Cassano, A.O., De Souza, F.A., Ambrosio, S.R., da Costa, F.B., de Oliveira, A.M., 2007. Antispasmodic and relaxant effects of the hidroalcoholic extract of *Pimpinella anisum* (Apiaceae) on rat anococcygeus smooth muscle. *J Ethnopharmacol.* 110, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.031>
- Torres Carro, R., D'Almeida, R.E., Isla, M.I., Alberto, M.R., 2016. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Frankenia triandra* (J. Rémy) extracts. *S Afr J Bot.* 104, 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.09.020>
- Touil, A., Rhouati, S., Creche, J., 2006. Flavonoid glycosides from *Pituranthos chloranthus*. *Chem Nat Compd.* 42, 104–105. <https://doi.org/10.1007/s10600-006-0048-z>
- Trivedi, A.B., Kitabatake, N., Doi, E., 1990. Toxicity of dimethyl sulfoxide as a solvent in bioassay system with HeLa cells evaluated colorimetrically with 3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromide. *Agric. Biol. Chem.* 54, 2961–2966. <https://doi.org/10.1080/00021369.1990.10870409>

## Références bibliographiques

### U

Um, Y.R., Kong, C.-S., Lee, J.I., Kim, Y.A., Nam, T.J., Seo, Y., 2010. Evaluation of chemical constituents from *Glehnia littoralis* for antiproliferative activity against HT-29 human colon cancer cells. *Process Biochem.* 45, 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.08.016>

### V

Van Acker, S.A.B.E., Van Den Berg, D., Tromp, M.N.J.L., Griffioen, D.H., Van Bennekom, W.P., Van Der Vijgh, W.J.F., Bast, A., 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Bio Med.* 20, 331–342. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02047-0](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02047-0)

Venugopala, K.N., Rashmi, V., Odhav, B., 2013. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *Biomed Res Int.* 2013, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2013/963248>

### W

Wei, B.L., Lu, C.M., Tsao, L.T., Wang, J.P., Lin, C.N., 2001. *In vitro* anti-inflammatory effects of quercetin 3-*O*-methyl ether and other constituents from *Rhamnus* species. *Planta Med.* 67, 745–747. <https://doi.org/10.1055/s-2001-18339>

Wink, M., 2012. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. *Molecules* 17, 12771–12791. <https://doi.org/10.3390/molecules171112771>

### Y

Yangui, T., Bouaziz, M., Dhouib, A., Sayadi, S., 2008. Potential use of Tunisian *Pituranthos chloranthus* essential oils as a natural disinfectant. *Lett Appl Microbiol.* 48, 112–117. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02499.x>

Yasukazu O., Sachiko K., Takuma S., 2008. Antioxidant and photo-antioxidant activities of phenylpropanoids. *J Jpn Petrol Inst.* 51, 348–355. <https://doi.org/10.1627/jpi.51.348>

Yeo, C.-R., Yong, J.-J., Popovich, D.G., 2017. Isolation and characterization of bioactive polyacetylenes *Panax ginseng* Meyer roots. *J Pharmaceut Biomed.* 139, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.02.054>

Youssef, R.S.A., 2013. Medicinal and non-medicinal uses of some plants found in the middle region of Saudi Arabia. *J Med Plants Res.* 7, 2501–2517. <https://doi.org/10.5897/JMPR12.798>

## Références bibliographiques

### Z

Zeng, X., Xi, Y., Jiang, W., 2018. Protective roles of flavonoids and flavonoid-rich plant extracts against urolithiasis: a review. *Crit Rev Food Sci.* 0, 1–11.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1439880>

Zhang, H., Yin, M., Huang, L., Wang, J., Gong, L., Liu, J., Sun, B., 2018. Evaluation of the cellular and animal models for the study of antioxidant activity: a review. *J Food Sci.* 82, 278–288.  
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.13605>

Zheng, G., Lu, W., Cai, J., 1999. Stereoselective total synthesis of (3R,8S)-falcarindiol, a common polyacetylenic compound from Umbellifers. *J Nat Prod.* 62, 626–628.  
<https://doi.org/10.1021/np980418z>

Zidorn, C., Jöhrer, K., Ganzera, M., Schubert, B., Sigmund, E.M., Mader, J., Greil, R., Ellmerer, E.P., Stuppner, H., 2005. Polyacetylenes from the Apiaceae vegetables carrot, celery, fennel, parsley, and parsnip and their cytotoxic activities. *J Agric Food Chem.* 53, 2518–2523.  
<https://doi.org/10.1021/jf048041s>

### Sites

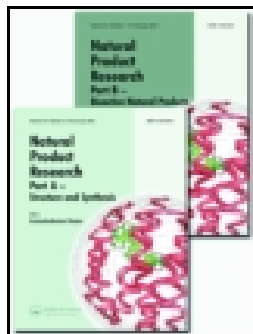
The Plant List-*Frankenia*-, 2013.

[URL http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Frankeniaceae/Frankenia/](http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Frankeniaceae/Frankenia/) (Date de consultation: 1/12/2019).

The Plant List-*Pituranthos*-, 2013.

<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Pituranthos> (Date de consultation: 1/12/2019)

*Annexe*  
*(Articles)*



# Natural Product Research

Formerly Natural Product Letters


ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20>


## Chemical composition, *in vitro* antiparasitic, antimicrobial and antioxidant activities of *Frankenia thymifolia* Desf.

Imad Mennai, Mourad Hanfer, Chahrazed Esseid, Samir Benayache, Souad Ameddah, Ahmed Menad & Fadila Benayache

To cite this article: Imad Mennai, Mourad Hanfer, Chahrazed Esseid, Samir Benayache, Souad Ameddah, Ahmed Menad & Fadila Benayache (2019): Chemical composition, *in vitro* antiparasitic, antimicrobial and antioxidant activities of *Frankenia thymifolia* Desf., Natural Product Research

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1561685>

 View supplementary material 

 Published online: 24 Jan 2019.






 Submit your article to this journal 

 View Crossmark data 

SHORT COMMUNICATION



## Chemical composition, *in vitro* antiparasitic, antimicrobial and antioxidant activities of *Frankenia thymifolia* Desf.

Imad Mennai<sup>a</sup> , Mourad Hanfer<sup>b</sup> , Chahrazed Esseid<sup>a</sup> , Samir Benayache<sup>a</sup> ,  
Souad Ameddah<sup>b</sup>, Ahmed Menad<sup>b</sup> and Fadila Benayache<sup>a</sup> 

<sup>a</sup>Unité de recherche: Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques, Université Frères Mentouri, Constantine, Algérie; <sup>b</sup>Laboratoire de Biologie et Environnement, Université Frères Mentouri, Constantine, Algérie

### ABSTRACT

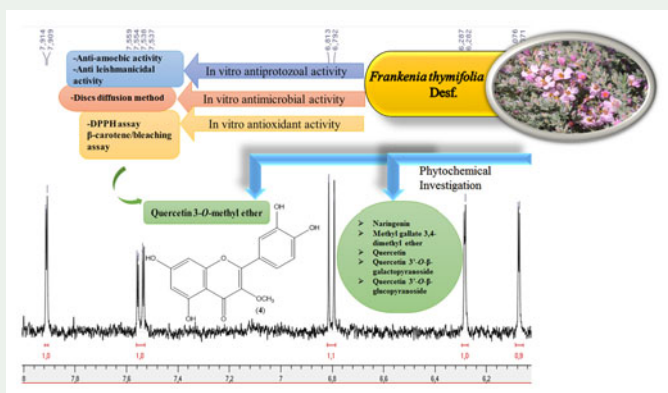
This study was performed on the derived fractions [chloroform (FT-C), ethyl acetate (FT-E) and *n*-butanol (FT-B)] of the 70% ethanol extract prepared from *Frankenia thymifolia*, endemic to North Africa. The fractions showed high total phenolic and flavonoid contents particularly FT-E. These results agreed with their antioxidant effects. Indeed, all the fractions were able to scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, with a better power of FT-E. These results were supported by the inhibition of  $\beta$ -carotene oxidation assay. The fractions showed moderate activity against *Acanthamoeba castellanii* and *Leishmania amazonensis* with a better activity of FT-E against *A. castellanii*. Moreover, FT-B exhibited an interesting antimicrobial activity against all tested bacteria. The phytochemical investigation of the most active fractions (FT-E and FT-B) led to the isolation and structural determination of six compounds. The observed biological activities may be associated with the presence of quercetin and its derivatives found in the chemical composition of these fractions.


### ARTICLE HISTORY


Received 5 November 2018  
Accepted 13 December 2018

### KEYWORDS

Antioxidant activity;  
antimicrobial activity;  
antiparasitic activity;  
*Frankenia thymifolia*;  
flavonoids; polyphenols



CONTACT Fadila Benayache  [fbenayache@yahoo.fr](mailto:fbenayache@yahoo.fr)

 Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1561685>.

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group



## 1. Introduction

Epidemiological studies showed that consumption of fruits and vegetables with high phenolic and flavonoid contents are correlated with reduced cardiovascular diseases (Arts and Hollman 2005), inflammation (Rahman et al. 2006) and cancer mortality (Gates et al. 2009). Thus, plant extracts with high total phenolic and flavonoid contents are likely to be often frightening antioxidants (Cheriet et al. 2017). Moreover, leishmaniasis and trypanosomiasis are widespread parasitic diseases which affect hundreds of millions of people each year, especially in developing countries, recently, antiprotozoal drug discovery has focused on the evaluation of extracts and drugs of plant origin (Sifaoui et al. 2014). In these contexts we were interested in the genus *Frankenia* which represents the most important genus in Frankeniaceae family with about forty species among which twelve are distributed in North Algeria and five in the Sahara (Ozenda 2004). They are usually saline soil plants which are almost unexplored. *Frankenia thymifolia* Desf. is endemic to North Africa (Quezel and Santa 1963), few reports have been reported on the species growing in Tunisia (Megdiche-Ksouri et al. 2011; Ben Mansour et al. 2016), while, only one phytochemical study has been reported on the species growing in Algeria (Harkat et al. 2007). To the best of our knowledge, no study on the antiparasitic activity of this plant has been performed yet. As a part of our continuing investigation of Algerian medicinal plants (Kerbab et al. 2015; Aïssaoui et al. 2018), the present study reports for the first time the leishmanicidal, amoebicidal, antioxidant and antimicrobial properties of the Algerian *F. thymifolia*. The chemical composition of the two most active fractions as well as the phenolic and flavonoid contents of the three derived fractions were performed as contribution to the phytochemical and pharmacological knowledge of this species.

## 2. Results and discussion

FT-C, FT-E and FT-B fractions were analyzed for their total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC) using gallic acid and quercetin as standards, respectively. According to the results, the three fractions had remarkably high total phenolic and flavonoid contents. Indeed, FT-E had the highest TPC ( $388.92 \pm 4.98$  mg GAE/g extract) and TFC ( $100.21 \pm 3.42$  mg QE/g extract) followed by FT-B ( $181.20 \pm 4.05$  mg GAE/g extract and  $68.40 \pm 1.65$  mg QE/g extract, respectively). TPC and TFC of FT-C fraction were  $175.40 \pm 2.32$  mg GAE/g extract and  $45.23 \pm 1.06$  mg QE/g extract, respectively. The high phenolic and flavonoid contents of these fractions were in agreement with the results of their antioxidant activity. Indeed, all the fractions were able to scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical and showed a significant and concentration dependant activity. FT-E, the most polyphenol-rich and flavonoid-rich displayed the highest activity ( $IC_{50} = 11.55 \pm 0.43$   $\mu$ g/mL) followed by FT-B ( $IC_{50} = 25.65 \pm 1.02$   $\mu$ g/mL) and FT-C ( $IC_{50} = 29.02 \pm 3.23$   $\mu$ g/mL) compared to ascorbic acid ( $IC_{50} = 6.67 \pm 0.22$   $\mu$ g/mL) and butylated hydroxytoluene (BHT) ( $IC_{50} = 22.32 \pm 1.19$   $\mu$ g/mL) which are used as positive controls. These results were supported by the assessment of the antioxidant activity of the three fractions by the inhibition of  $\beta$ -carotene oxidation assay. Indeed, FT-E showed the highest inhibition in  $\beta$ -carotene bleaching test ( $71.66 \pm 1.24\%$  at 100  $\mu$ g/mL) compared to BHT ( $88.08 \pm 2.63\%$  at

100 µg/mL) used as control, while, FT-B and FT-C exhibited similar inhibitions ( $50.83 \pm 1.65\%$  and  $49.91 \pm 1.06\%$ , respectively) at the same concentration.

Moreover, the three fractions were screened for their antiparasitic properties, at the same concentration (400 µg/mL) against *Acanthamoeba castellanii* str. Neff., *Leishmania amazonensis*, *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* by the modified Alamar Blue<sup>®</sup> assay (Cabrera-Serra et al. 2007). The obtained data showed moderate anti-leishmanial activities of FT-E and FT-B ( $IC_{50} = 99.36 \pm 1.46$  and  $100.13 \pm 1.36$  µg/mL, respectively) against *L. amazonensis*. Regarding the antiamebic activity, it should be noted that FT-E fraction was the most potent to inhibit growth of the trophozoite stage of *A. castellanii* ( $IC_{50} = 66.25 \pm 0.41$  µg/mL) followed by FT-B ( $IC_{50} = 95.43 \pm 1.44$  µg/mL). FT-C fraction showed weak anti-leishmanial and antiamebic activities against both parasites *L. amazonensis* and *A. castellanii* with  $IC_{50}$  values  $>100$  µg/mL. Chlorhexidine was used as positive control against *A. castellanii* and exhibited  $IC_{50} = 0.92 \pm 0.10$  µg/mL while, miltefosine was used as positive control against *L. amazonensis* and exhibited  $IC_{50} = 3.59 \pm 0.51$  µg/mL.

Antimicrobial potential of *F. thymifolia* fractions was assessed in terms of inhibition zone of bacterial growth. The results displayed that FT-B and FT-C fractions inhibited microorganism growth, depending on the strains sensibility and fraction concentration. According to the results presented in Table 1, FT-B fraction exhibited an interesting antibacterial activity against all pathogenic bacteria tested as compared to FT-E. *P. aeruginosa* (Gram negative) was the most sensitive strain to FT-B in all tested concentrations (1, 3, 7 and 10 mg/mL), followed by *S. aureus* (Gram positive) (3, 7 and 10 mg/mL). Moreover, the inhibition zone against all strains increased when the concentration increased from 1 to 10 mg/mL. These results agreed with those reported on *F. thymifolia* from Tunisia (Megdiche-Ksouri et al. 2011).

The biological data allowed to guide the fractionation and purification of FT-E and FT-B by silica gel and Sephadex LH20 columns, preparative TLC and/or crystallization. Six compounds were isolated and identified: naringenin (1) (Jeon et al. 2008), methyl gallate 3,4-dimethyl ether (2) (Harkat et al. 2007), quercetin (3) (Li et al. 2008), quercetin 3-O-methyl ether (4) (Krenn et al. 2003), quercetin 3'-O-β-galactopyranoside (5) (Machida et al. 2009) and quercetin 3'-O-β-glucopyranoside (6) (Wu et al. 2008).

**Table 1.** Antibacterial activity of FT-E and FT-B fractions of *F. thymifolia*.

Concentration (mg/mL)	Inhibition zone diameter IZ (mm ± SD) <sup>b</sup>								Control <sup>a</sup>
	FT-B				FT-E				
Bacteria strain	1	3	7	10	1	3	7	10	0.01
<i>Staphylococcus aureus</i>	00 ± 0.00	07 ± 0.30	08 ± 0.50	09 ± 0.25	00 ± 0.00	00 ± 0.00	09 ± 0.60	11 ± 0.75	12 ± 0.40
<i>Escherichia coli</i>	00 ± 0.00	07 ± 0.40	08 ± 0.35	08 ± 0.70	00 ± 0.00	00 ± 0.00	07 ± 0.20	07 ± 0.50	12 ± 0.60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	07 ± 0.20	08 ± 0.25	09 ± 0.50	12 ± 0.75	00 ± 0.00	07 ± 0.40	07 ± 0.30	07 ± 0.45	17 ± 0.35
<i>Klebsiella oxytoca</i>	00 ± 0.00	00 ± 0.00	07 ± 0.50	09 ± 0.40	00 ± 0.00	00 ± 0.00	09 ± 0.40	10 ± 0.60	12 ± 0.45

<sup>a</sup>Positive control (Gentamycin): 10 µg/mL.

<sup>b</sup>SD: standard deviation. IZ: inhibition zone.

The diameter of discs was 6 mm. No antimicrobial activity: IZ <1 mm. Weak antimicrobial activity: IZ = 6 mm. Slight antimicrobial activity: IZ from 7 to 8 mm. Moderate antimicrobial activity: IZ from 9 to 10 mm. High antimicrobial activity: IZ from 11 to 12 mm. Strong antimicrobial activity: IZ >13 mm.

The structures were established by chemical and spectral analyses, mainly UV, 1D- and 2D-NMR (COSY, HSQC and HMBC) as well as by comparing their spectroscopic data with those reported in the literature. Compounds **2** and **3** were previously identified in *F. thymifolia* (Harkat et al. 2007) and *F. pulverulenta* (Ben Mansour et al. 2017), respectively, while, the others are reported for the first time from Frankeniaceae family.

Quercetin and its derivatives are the main components (compounds **3–6**) of FT-B and FT-E, thus, the obtained results were correlated with the antioxidant potential of these fractions. Indeed, the evaluation of the antioxidant activity of the isolated compounds **1**, **3** and **4** showed that quercetin (**3**) and its derivative (**4**) had the highest radical scavenging activities with  $IC_{50} = 9.35 \pm 0.35$  and  $9.06 \pm 0.46 \mu\text{g/mL}$ , respectively. These results agreed with literature data (Aliouche et al. 2007; Aïssaoui et al. 2018). It can be suggested that the activities of FT-E and FT-B fractions may be probably due to the presence of the phenolic acid and flavonoids isolated in this work. Regarding the antiparasitic activity of these fractions, many studies have shown that quercetin and its derivatives possessed a strong antiprotozoal activity against *A. castellanii* (Badria et al. 2014).

Overall, our results showed that *F. thymifolia* is a source of valuable bioactive fractions and molecules.

### 3. Conclusion

The present work reports for the first time the leishmanicidal and amoebicidal activities of *Frankenia thymifolia* fractions. Furthermore, the three fractions showed high phenolic and flavonoid contents, the ethyl acetate fraction (FT-E) was the most phenolic- and flavonoid-rich followed by the *n*-butanol fraction (FT-B). These results were in good agreement with their antioxidant activity. Indeed, all the fractions showed significant and concentration depending activities against DPPH radical, with a better effect of FT-E. These results agreed with those of the inhibition of  $\beta$ -carotene oxidation assay. Moreover, FT-B exhibited a significative antimicrobial activity against all tested bacteria.

The phytochemical investigation of the most active fractions (FT-E and FT-B) led to the isolation and characterization of six secondary metabolites, five flavonoids and a gallic acid derivative among which four were reported for the first time from Frankeniaceae family. In conclusion, this study provides a scientific background for the use of *F. thymifolia* as antioxidant and antiparasitic sources in Algeria.

### Acknowledgments

The authors would like to thank DGRSDT and PNE (MESRS), Algeria and Dr. Jacob Lorenzo-Morales from Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, Pr. Isabel L. Bazzocchi and Dr. Ignacio A. Jiménez from Universitario de Bio-Orgánica Antonio González, Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna for their help and the 600 MHz NMR spectra.

### Supplementary material

Experimental details together with Tables (S1–S4) and Figures (S1 and S2) relating to this paper are available online.

## Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## ORCID

Imad Mennai  <http://orcid.org/0000-0003-1930-5878>  
Mourad Hanfer  <http://orcid.org/0000-0003-4757-0150>  
Chahrazed Esseid  <http://orcid.org/0000-0002-8642-9849>  
Samir Benayache  <http://orcid.org/0000-0003-2298-2466>  
Fadila Benayache  <http://orcid.org/0000-0002-2282-6343>

## References

- Aïssaoui H, Mencherini T, Esposito T, De Tommasi N, Gaggero P, Benayache S, Benayache F, Mekkiou R. 2018. *Heliotropium bacciferum* Forssk. (Boraginaceae) extracts: chemical constituents, antioxidant activity and cytotoxic effect in human cancer cell lines. *Nat Prod Res.* doi:10.1080/14786419.2018.143743.
- Aliouche L, Zater H, Zama D, Bentamene A, Seghiri R, Mekkiou R, Benayache S, Benayache F. 2007. Flavonoids of *Serratula cichoracea* and their antioxidant activity. *Chem Nat Compd.* 43(5):618–619.
- Arts IC, Hollman PC. 2005. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 81(1 Suppl):317S–325S.
- Badria FA, Hetta MH, Sarhan RM, Ezz El-Din MH. 2014. Lethal effects of *Helianthemum lippii* (L.) on *Acanthamoeba castellanii* cysts *in vitro*. *Korean J Parasitol.* 52(3):243–249.
- Ben Mansour R, Megdiche-Ksouri W, Cluzet S, Krisa S, Richard T, Ksouri R. 2016. Assessment of antioxidant activity and neuroprotective capacity on PC12 cell line of *Frankenia thymifolia* and related phenolic LC-MS/MS identification. *Evid Based Complement Alternat Med.* Volume 2016, Article 2843463, 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2843463>
- Ben Mansour R, Megdiche-Ksouri W, Cluzet S, Krisa S, Richard T, Ksouri R. 2017. LC-MS identification and preparative HPLC isolation of *Frankenia pulverulenta* phenolics with antioxidant and neuroprotective capacities in PC12 cell line. *Pharm Biol.* 55(1):880–887.
- Cabrera-Serra MG, Lorenzo-Morales J, Romero M, Valladares B, Piñero JE. 2007. *In vitro* activity of perifosine: a novel alkylphospholipid against the promastigote stage of *Leishmania* species. *Parasitol Res.* 100(5):1155–1157.
- Cheriet T, Hanfer M, Boudjelal A, Baali N, Mancini I, Seghiri R, Ameddah S, Menad A, Benayache F, Benayache S. 2017. Glycosyl flavonoid profile, *in vivo* antidiabetic and *in vitro* antioxidant properties of *Linaria reflexa* Desf. *Nat Prod Res.* 31(17):2042–2048.
- Gates MA, Vitonis AF, Tworoger SS, Rosner B, Titus-Ernstoff L, Hankinson SE, Cramer DW. 2009. Flavonoid intake and ovarian cancer risk in a population-based case-control study. *Int J Cancer.* 124(8):1918–1925.
- Harkat H, Haba H, Marcourt L, Long C, Benkhaled M. 2007. An unusual lignan sulfate and aromatic compounds from *Frankenia thymifolia* Desf. *Biochem Syst Ecol.* 35(3):176–179.
- Jeon SH, Chun W, Choi YJ, Kwon YS. 2008. Cytotoxic constituents from the bark of *Salix hulteni*. *Arch Pharm Res.* 31(8):978–982.
- Kerbab K, Mekhelfi T, Zaiter L, Benayache S, Benayache F, Picerno P, Mencherini T, Sansone F, Aquino RP, Rastrelli L. 2015. Chemical composition and antioxidant activity of a polar extract of *Thymelaea microphylla* Coss. et Dur. *Nat Prod Res.* 29(7):671–675.
- Krenn L, Miron A, Pemp E, Petr U, Kopp B. 2003. Flavonoids from *Achillea nobilis* L. *Z Naturforsch, C, J Biosci.* 58(1–2):11–16.
- Li YL, Li J, Wang N, Yao XS. 2008. Flavonoids and a New Polyacetylene from *Bidens parviflora* Willd. *Molecules.* 13(8):1931–1941.

- Machida K, Matsuoka E, Kikuchi M. 2009. Five new glycosides from *Hypericum erectum* Thunb. J Nat Med. 63(2):223–226.
- Megdiche-Ksouri W, Chaouachi F, M'Rabet R, Medini F, Zaouali Y, Trabelsi N, Ksouri R, Noumi E, Chedly A. 2011. Antioxidant and antimicrobial properties of *Frankenia thymifolia* Desf. fractions and their related biomolecules identification by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) and high performance liquid chromatography (HPLC). J Med Plants Res. 5:5754–5765.
- Ozenda P. 2004. Flore et végétation du Sahara. Editions du centre national de la recherche scientifique. Paris.
- Quezel P, Santa S. 1963. Nouvelle Flore de l'Algérie et des Régions Désertiques Méridionales. Editions du centre national de la recherche scientifique. Paris. Vol. II. p. 686.
- Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA. 2006. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. Biochem Pharmacol. 72(11):1439–1452.
- Sifaoui I, López-Arencibia A, Ticona JC, Martín-Navarro CM, Reyes-Batlle M, Mejri M, Lorenzo-Morales J, Jiménez AI, Valladares B, Lopez-Bazzocchi I, et al. 2014. Bioassay guided isolation and identification of anti-*Acanthamoeba* compounds from Tunisian olive leaf extracts. Exp Parasitol. 145:S111–S114.
- Wu T, Abdulla R, Yang Y, Aisa HA. 2008. Flavonoids from *Gossypium hirsutum* flowers. Chem Nat Compd. 44(3):370–371.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

### Chemical composition, in vitro antiparasitic, antimicrobial and antioxidant activities of *Frankenia thymifolia* Desf.

Imad Mennai<sup>a</sup>, Mourad Hanfer<sup>b</sup>, Chahrazed Esseid<sup>a</sup>, Samir Benayache<sup>a</sup>, Souad Ameddah<sup>b</sup>, Ahmed Menad<sup>b</sup> and Fadila Benayache<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>*Unité de recherche : Valorisation des Ressources Naturelles, Molécules Bioactives et Analyses Physicochimiques et Biologiques, Université Frères Mentouri, Constantine 1, Route d'Aïn El Bey 25017 Constantine, Algérie. imadmennai@gmail.com (IM); esseidchahrazed@yahoo.fr (CE); sbenayache@yahoo.com (SB); fbenayache@yahoo.fr (FB).*

<sup>b</sup>*Laboratoire de Biologie et Environnement, Université Frères Mentouri Constantine 1, Route d'Aïn El Bey, 25017 Constantine, Algérie. hanfer.mourad@umc.edu.dz (MH); amedsouad@yahoo.fr (SA); menaht@yahoo.fr (AM)*

\* Corresponding author. Email: Fadila [fbenayache@yahoo.fr](mailto:fbenayache@yahoo.fr)

#### ABSTRACT

This study was performed on the derived extracts [chloroform (FT-C), ethyl acetate (FT-E) and *n*-butanol (FT-B)] of the 70% ethanol extract prepared from *Frankenia thymifolia*, an endemic species to North Africa. The extracts showed high total phenolic and flavonoid contents with a wealth more marked for FT-E. These results agreed with their antioxidant effects. Indeed, all the extracts were able to scavenge 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, with a better power of FT-E. These results were supported by the inhibition of  $\beta$ -carotene oxidation assay. The extracts showed moderate activity against *Acanthamoeba castellanii* and *Leishmania amazonensis* with a better activity of FT-E against *A. castellanii*. Moreover, FT-B exhibited an interesting antimicrobial activity against all tested bacteria. The fractionation of the most active extracts led to the isolation and structural determination of six compounds. The activities of these extracts may be associated with the presence of quercetin and its derivatives found in their chemical composition.

**Keywords:** *Frankenia thymifolia*; Polyphenols; Flavonoids; Antioxidant activity; Antimicrobial activity; Antiparasitic activity.

## Experimental

### 1. General experimental procedures

NMR spectra were recorded at 300 °K on Bruker Avance 600, 300 and DPX 250 spectrometers with standard pulse sequences operating at 600, 300 and 250 MHz for  $^1\text{H}$  and 150, 75 and 62.85 MHz for  $^{13}\text{C}$ , respectively.  $\text{MeOH-}d_4$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ , or  $\text{acetone-}d_6$ , were used as solvents with TMS as internal standard. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in ppm and coupling constants ( $J$ ) are given in Hz. Silica gel 60 (particle size 63-200  $\mu\text{m}$ , Macherey-Nagel) and Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech) were used for column chromatography, whereas Polygram Sil G/UV<sub>254</sub> was used for analytical and preparative TLC (Macherey-Nagel). The developed TLC plates were visualized by UV light and then by spraying with  $\text{H}_2\text{O-H}_2\text{SO}_4\text{-HOAc}$  (80:16:4) system, followed by heating at 100 °C during 3 mn. All the used solvents were analytical grade from Panreac. Reagents and deuterated solvents were purchased from Sigma-Aldrich. For bioassays Schneider's medium (Sigma-Aldrich), RPMI 1640 and LIT medium (Gibco<sup>®</sup>), Alamar Blue<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, Life Technologies), EnSpire<sup>®</sup> Multimode Plate Reader (Perkin Elmer), Leika DMIL inverted microscope (Leika, Wetzlar, Germany), were used. Miltefosine and Chlorhexidine used as reference drugs, were provided by *Æterna Zentaris*.

### 2. Plant material

The aerial parts of *Frankenia thymifolia* have been collected on May 2013 in Sebkhia of Kenadsa in the area of Bechar in the southwest of Algeria and authenticated by M. Mohamed Benabdelhakem, director of the nature preservation agency, Bechar. A voucher specimen (FTh/05/13) of the plant material has been deposited in the Herbarium of the research unit VARENBIOMOL, Université Frères Mentouri, Constantine 1.

### 3. Extraction and isolation

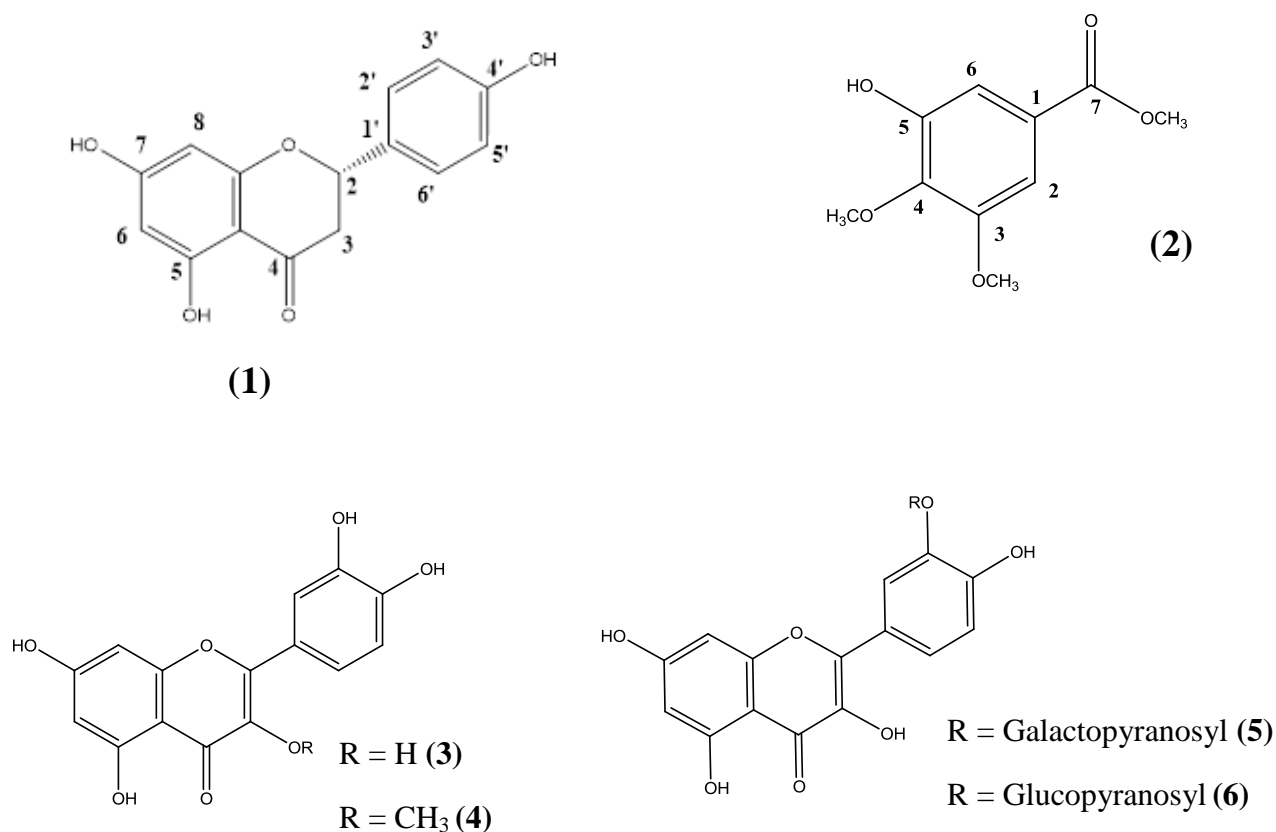
Air-dried aerial parts (2010 g) of *F. thymifolia* (Frankeniaceae) were macerated at room temperature with  $\text{EtOH-H}_2\text{O}$  (70:30 v/v) for 48 h, three times. After filtration, the filtrate was concentrated (750 mL) and dissolved in  $\text{H}_2\text{O}$  (850 mL). The resulting solution was extracted successively with  $\text{CHCl}_3$ , EtOAc and *n*-butanol. The organic phases were dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered and concentrated *in vacuo* at room temperature to obtain the following extracts:

chloroform (FT-C, 2.2 g), EtOAc (FT-E, 2.5 g) and *n*-butanol (FT-B, 25 g). The FT-E extract (2.1 g) was fractionated by CC (silica gel; hexane/EtOAc with increasing polarity) to yield 9 fractions (1–9) obtained by combining the eluates on the basis of TLC analysis. Fraction 3 (83 mg) (hexane/EtOAc 60:40) was purified on preparative plates of silica gel eluted with hexane/EtOAc/MeOH 3:1:0.5, to give naringenin (**1**) (54 mg) and quercetin (**3**) 12 mg).

A part of the FT-B extract (10 g) was fractionated by CC (silica gel; CHCl<sub>3</sub>/MeOH with increasing polarity) to yield 27 fractions (1–27) obtained by combining the eluates on the basis of their TLC behavior. Fraction 2 (65 mg) (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 80:20) was submitted to Sephadex LH-20 column eluted with MeOH to give 4 Sub-fractions (sub1–sub4). After evaporation, sub1 afforded methyl gallate 3,4-dimethyl ether (**2**) (20 mg). Sub2 gave after purification by recrystallization in CHCl<sub>3</sub> and a little amount of MeOH, quercetin (**3**) (16 mg). Fraction 4 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 75:25) (55 mg) was submitted to preparative TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O 6:1:1, two elutions) to afford quercetin 3-*O*-methyl ether (14 mg) (**4**). Fraction 5 (30 mg) (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 70:30) gave, after purification on preparative plates of silica gel, quercetin 3'-*O*-β-D-galactopyranoside (**5**) (10 mg). Fraction 6 (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 65:35) showed the formation of a precipitate which was filtered (25 mg) and rinsed with CHCl<sub>3</sub> to give quercetin 3'-*O*-β-D-glucoside (**6**) (15 mg) (Figure S1).

**Acid hydrolysis.** The pure glycosides were treated with 2 M HCl at 100°C for 1 h. The hydrolysates were extracted with EtOAc. The aglycones were identified by their UV spectra in methanol and by comparison of their R<sub>f</sub> with authentic samples. Sugars were identified in the aqueous residue by comparison with authentic samples on silica gel plates impregnated with 0.2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution, eluted with Me<sub>2</sub>CO/H<sub>2</sub>O 9:1 and revealed with aniline malonate.





**Figure S1.** Structures of compounds 1–6 isolated from *F. thymifolia*

#### 4. Determination of total phenolic content (TPC)

The TPC of the three extracts were determined spectrophotometrically using Folin-Ciocalteu reagent (Singleton et al. 1999) with slight modifications. 1000  $\mu$ L of extract (dissolved in Ethanol) was mixed with 250  $\mu$ L Folin-Ciocalteu reagent (1N) and allowed to stand at room temperature for 2 min. 1250  $\mu$ L of sodium carbonate (20%) was added, then the mixture was mixed and allowed to stand at room temperature in the dark for 2 h. The absorbance was measured at 765 nm with a spectrophotometer. Quantification was based on the standard curve of gallic acid (0-0.2 mg/ml). The results were expressed as gallic acid equivalents mg GAE/g extract (Table S1). All measurements were replicated three times.

#### 5. Determination of total flavonoid content (TFC)

Total flavonoid content was estimated by the aluminum chloride  $\text{AlCl}_3$  colorimetric assay (Ordoñez et al. 2006). 5 mg of samples or a standard solution of quercetin were weighed and dissolved in 5 mL of methanol. To 2 mL of sample, 2 mL of 2%  $\text{AlCl}_3$  ethanol solution was added. After incubation at room temperature for 1 h, the absorbance was measured at 430 nm.

TFC was calculated as quercetin equivalent in mg/g of extract (mg QE/g extract) based on the calibration curve. Results were expressed as mg quercetin equivalents (QE)/g extract (Table S1).

## 6. Antioxidant activities

### 6-1. Antioxidant capacity by 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical assay

1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activities of the extracts and compounds **1**, **2** and **3** were conducted by the method described by Braca et al. (Braca et al. 2001) with minor modifications. The free radical scavenging activity was measured in terms of hydrogen donating or radical scavenging ability using the stable radical DPPH. Briefly, 1 mL of methanolic solution of DPPH (0.2 mM) was added to 1 mL of the different concentrations of the extracts and the tested compounds and allowed to react in the dark at room temperature for 60 min. The absorbance of the mixture was measured spectrophotometrically at 517 nm. DPPH radical scavenging activity of extracts was calculated according to the formula:

$$\text{DPPH radical scavenging rate (\%)} = [(A_{\text{blank sample}} - A_{\text{test sample}}) / A_{\text{blank sample}}] \times 100$$

The IC<sub>50</sub> (the concentration of antioxidant which eliminate 50% of DPPH radicals) was defined for all extracts and control standard antioxidant (vitamin C) (Table S1). The study was carried out in triplicate at each concentration.

In this method, DPPH in methanol without the tested extract or compound served as the control sample.

### 6-2. $\beta$ -Carotene/linoleic acid bleaching assay

Antioxidant activity of the samples was determined using  $\beta$ -carotene bleaching test (Taga et al. 1984).  $\beta$ -Carotene (2 mg) was dissolved in 20 mL of chloroform and were added, linoleic acid (40 mg) and tween 40 (400 mg) to 4 mL of this solution. Chloroform was removed using a rotary evaporator at 40°C for 5 min, and to the residue, 100 mL of ultra-pure oxygenated water was added, slowly with vigorous agitation, to form an emulsion. The emulsion (5 mL) was added to a tube containing 0.2 mL of the sample solution and the absorbance was immediately measured at 470 nm against a blank, consisting of an emulsion without  $\beta$ -carotene. The tubes were placed in a water bath at 50°C and the oxidation of the emulsion was monitored spectrophotometrically by measuring absorbance at 470 nm over a 20 min period. Sample extract and reference compound (BHT) were prepared in ethanol.

The antioxidant activity was expressed as inhibition percentage with reference to the control after 120 min incubation using the following equation:

$$I \% = (\text{Absorbance after 2 h} / \text{initial absorbance}) \times 100$$

Inhibition percentage of the studied samples was compared to that of the positive control (BHT) (Table S1 and Figure S2).

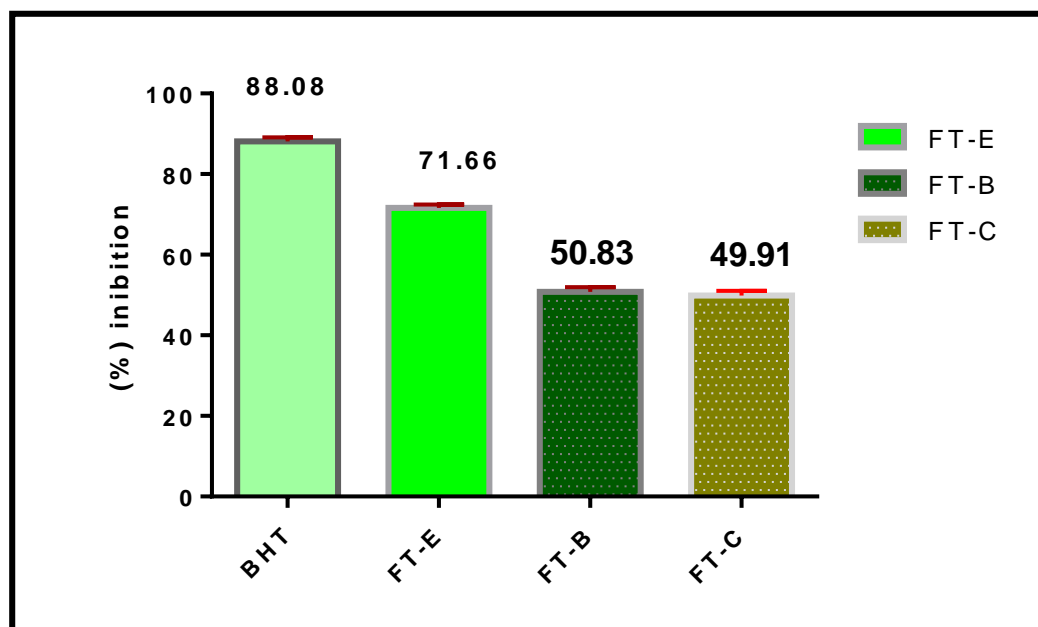
**Table S1.** Total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and Antioxidant activity of *F. thymifolia* extracts and compounds **1**, **3** and **4** by the DPPH and  $\beta$ -carotene assays<sup>a</sup>.

			Antioxidant activity	
	TPC (mg GAE/g extract)	TFC (mg QE/g extract)	DPPH assays IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL) <sup>a</sup>	$\beta$ -carotene assays Inhibition (%)
FT-C	175.40 $\pm$ 2.32	45.23 $\pm$ 1.06	29.02 $\pm$ 3.23	49.91 $\pm$ 1.06
FT-E	388.92 $\pm$ 4.98	100.21 $\pm$ 3.42	11.55 $\pm$ 0.43	71.66 $\pm$ 1.24
FT-B	181.20 $\pm$ 4.05	68.40 $\pm$ 1.65	25.65 $\pm$ 1.02	50.83 $\pm$ 1.65
<b>1</b>	-	-	32.84 $\pm$ 1.11	-
<b>3</b>	-	-	9.35 $\pm$ 0.35	-
<b>4</b>	-	-	9.06 $\pm$ 0.46	-
Ascorbic acid <sup>b</sup>	-	-	6.67 $\pm$ 0.22	-
BHT <sup>b</sup>	-	-	22.32 $\pm$ 1.19	88.08 $\pm$ 2.63

Notes: FT-C = *F. thymifolia* chloroform extract; FT-E = *F. thymifolia* ethyl acetate extract; FT-B = *F. thymifolia* *n*-butanol extract.

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> Values expressed are means  $\pm$  SD of three parallel measurements ( $p < 0.05$ ).

<sup>b</sup> Reference compounds.



**Figure S2.** Percentage inhibition determined by  $\beta$ -carotene bleaching effect of FT-E, FT-B and FT-E from *F. thymifolia* and standard (BHT). Each value represents a mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ),  $p < 0.05$

## 7. Antiparasitic activity

### 7-1. Parasite strains

The activity of the extracts was evaluated against promastigotes stage of *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), *Leishmania donovani* (MHOM/IN/90/GE1F8R) strains, epimastigotes stage of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) and trophozoite stage of *Acanthamoeba castellanii* str. Neff. (ATCC 30010). The results are reported in Table S2.

**Table S2.** Antiparasitic screening of extracts from the aerial parts of *Frankenia thymifolia* against the different parasites used.

Extracts*/Parasites	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>	<i>Leishmania donovani</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
FT-E	++	+	-	-
FT-B	+	+	-	-
FT-C	+	+	-	-

Key: - Inactive, + moderate activity, ++ good activity.

\*all the extracts were assayed at 400 µg/mL.

### 7-2. In vitro effect on the promastigote forms of *Leishmania amazonensis*

The leishmanicidal activity of the extracts were determined by the modified Alamar Blue® assay as described by Cabrera-Serra et al. (2007). For the *in vitro* studies, all drugs were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and further dilutions were made in RPMI 1640 medium. Promastigotes were adapted for culture in RPMI 1640 liquid medium (Gibco-BRL) supplemented with 20% heat inactivated fetal bovine serum, vitamins and amino acids, at 26°C. Logarithm phase cultures of promastigotes were used for experimental purposes, and the *in vitro* susceptibility assay was performed in sterilized 96-well microtiter plates (Corning™). Parasites were added to sterilized microtitre plates with 96 wells (Corning) at a concentration of  $1 \times 10^6$ /well (200 µL/well). The final volume was 200 µL in each well. After addition of 10% of Alamar Blue Assay Reagent® (Biosource, Europe, Nivelles, Belgium), the plates were incubated at 26°C. After 72 h, the plates were analyzed with an Enspire microplate reader (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) using a test wavelength of 570 nm and a reference wavelength of 630 nm. The Percentage of inhibition and 50% inhibitory

concentration (IC<sub>50</sub>) was determined by linear regression analysis with 95% confidence limits (Table S3).

### 7-3. Cultures of *Acanthamoeba castellanii* Neff. and in vitro anti-*Acanthamoeba* activity

The strain of *Acanthamoeba castellanii* Neff. (ATCC 30010) was provided by the American Type Culture Collection. This axenic strain was cultured in PYG medium (0.75% (w/v) proteose peptone, 0.75% (w/v) yeast extract and 1.5% (w/v) glucose) including gentamycin (40 µg/mL) (Biochrom AG, Cultek, Granollers, Barcelona, Spain) at a constant temperature of 28°C. Stock solution of the tested extracts and standard amoebicidal (Chlorhexidine (98% of purity) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and the final concentration of this solvent was kept constant at 1% (In this test, the concentration 1% of dimethyl sulfoxide (DMSO) was used to prepare the stock solution and the serial dilutions of the tested extracts had no effect on the parasites).

The anti-*Acanthamoeba* activity of the extracts was determined as previously described (Sifaoui, et al. 2014). Briefly, *Acanthamoeba* strains were seeded on a 96-well micro titer plate with 50 µL from a stock solution of 10<sup>4</sup> cells mL<sup>-1</sup>. Amoebae were allowed to adhere for 15 min process which was checked using a Leika DMIL inverted microscope. After that, parasites in log phase growth were counted and diluted and were also added to these wells. Finally, the plates were observed under the inverted microscope after 96 h of incubation at 27°C. Chlorhexidine was used as the reference anti-*Acanthamoeba* agents. A negative control was carried in the same conditions without extract (Table S3).

### 7-4 . Statistical analysis

All experiments were performed three times each in duplicate and the mean values were also calculated. A paired two-tailed t-test was used for analysis of the data. Values of *P* < 0.05 were considered significant. The obtained inhibition curves statistical analysis was undertaken using the Sigma Plot 12.0 software program (Systat Software Inc).

**Table S3.** Anti-amoebic, Anti leishmanicidal activities of *F. thymifolia* extracts and standards

Extracts	IC <sub>50</sub> (µg/ml)	
	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>
FT-E	66.25 ± 0.41	99.36 ± 1.46

FT-B	95.43 ± 1.44	100.13 ± 1.36
FT-C	> 100	> 100
Chlorhexidine	0.92 ± 0.10	-
Miltefosine	-	3.59 ± 0.51

## 8. Screening for antimicrobial activity

The antimicrobial activity of *F. thymifolia* extracts was evaluated on four common pathogenic bacteria: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* (Gram negative) and from the gram positive, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). This evaluation was done by discs diffusion method (Yadav et al. 2015). Bacterial organisms were grown on GN and MH for 24 h in plats at 37°C. The plates were then incubated at 30°C 48 h to 72 h. The diameters of inhibition zone of both extracts and standard were measured (Table S4). All microorganisms were obtained from laboratoire de bactériologie du centre hospitalier universitaire de Constantine (CHU), Constantine, Algeria. Gentamycin was used as standard.

Table S4. Antibacterial activity of FT-E and FT-B extracts of *F. thymifolia*

Concentration (mg/mL) Bacteria strain	Inhibition zone diameter IZ (mm ± SD) <sup>b</sup>								
	FT-B				FT-E				Control <sup>a</sup>
	1	3	7	10	1	3	7	10	0.01
<i>Staphylococcus aureus</i>	00±0.00	07±0.30	08±0.50	09±0.25	00±0.00	00±0.00	09±0.60	11±0.75	12±0.40
<i>Escherichia coli</i>	00±0.00	07±0.40	08±0.35	08±0.70	00±0.00	00±0.10	07±0.20	07±0.50	12±0.60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	07±0.20	08±0.25	09±0.50	12±0.75	00±0.00	07±0.40	07±0.30	07±0.45	17±0.35
<i>Klebsiella oxytoca</i>	00±0.00	00±0.00	07±0.50	09±0.40	00±0.00	00±0.00	09±0.40	10±0.60	12±0.45

<sup>a</sup>Positive control (Gentamycin): 10 µg/mL

<sup>b</sup>SD: standard deviation. IZ: inhibition zone.

The diameter of discs was 6 mm. No antimicrobial activity: IZ <1 mm. Weak antimicrobial activity: IZ = 6 mm. Slight antimicrobial activity: IZ from 7 to 8 mm. Moderate antimicrobial activity: IZ from 9 to 10 mm. High antimicrobial activity: IZ from 11 to 12 mm. Strong antimicrobial activity: IZ >13 mm.

## 11. Structural characterization of isolated compounds

### **Naringenin (1)**

C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>; <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J*/Hz): 12.21 (1H, *s*, OH-5), 7.40 (2H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-2', H-6'), 6.91 (2H, *d*, *J* = 8.0 Hz, H-3', H-5'), 5.95 (1H, *brs*, H-6), 5.94 (1H, *brs*, H-8), 5.44 (1H, *dd*, *J* = 13.2, 2.4 Hz, H-2), 3.16 (1H, *dd*, *J* = 16.0, 13.2 Hz, H-3α), 2.71 (1H, *dd*, *J* = 16.0, 2.4 Hz, H-3β); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 195.86 (C-4), 168.94 (C-7), 164.06 (C-5), 163.44 (C-9), 157.59 (C-4'), 129.84 (C-1'), 127.61 (C-2', C-6'), 114.93 (C-3', C-5'), 101.50 (C-10), 96.20 (C-6), 95.36 (C-8), 78.98 (C-2), 41.85 (C-3).

### **Methylgallate 3,4-dimethyl ether (2)**

C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J*/Hz): 9.80 (1H, *brs*, OH), 7.12 (1H, *brs*, H-6), 7.02 (1H, *brs*, H-2), 3.79 (3H, *s*, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.9 (3H, *s*, 3-OCH<sub>3</sub>), 3.72 (3H, *s*, 4-OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm): 166.37 (C-7), 153.44 (C-3), 151.08 (C-5), 141.59 (C-4), 124.99 (C-1), 111.24 (C-6), 104.72 (C-2), 61.43 (4-OCH<sub>3</sub>), 56.24 (3-OCH<sub>3</sub>), 52.62 (7-OCH<sub>3</sub>).

### **Quercetin (3)**

C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>; <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>, δ ppm, *J*/Hz): 7.82 (1H, *d*, *J* = 2.0, H-2'), 7.69 (1H, *dd*, *J* = 8.6; 2.0, H-6'), 6.99 (1H, *d*, *J* = 8.6, H-5'), 6.52 (1H, *d*, *J* = 1.9, H-8), 6.26 (1H, *d*, *J* = 1.9, H-6). <sup>13</sup>C NMR (150 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>): 175.69 (C-4), 164.14 (C-7), 161.44 (C-5), 156.88 (C-9), 147.48 (C-4'), 146.07 (C-2), 144.96 (C-3'), 135.87 (C-3), 122.86 (C-1'), 121.56 (C-6'), 115.35 (C-2'), 114.87 (C-5'), 103.25 (C-10), 98.27 (C-6), 93.57 (C-8).

### **Quercetin 3-*O*-methyl ether (4)**

C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>, δ ppm, *J*/Hz): 7.91 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 7.55 (1H, *dd*, *J* = 8.5, 2.0 Hz, H-6'), 6.80 (1H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.28 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.07 (1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-6), 3.86 (3H, *s*, 3-OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>, δ ppm): 177.08 (C-4), 162.20 (C-7), 161.40 (C-5), 158.62 (C-9), 154.85 (C-2), 147.01 (C-4'), 145.06 (C-3'), 139.85 (C-3), 123.73 (C-1'), 122.24 (C-6'), 116.11 (C-2'), 114.30 (C-5'), 108.41 (C-10), 99.65 (C-6), 94.86 (C-8), 56.73 (3-OCH<sub>3</sub>).

### **Quercetin 3'-*O*-β-D-galactopyranoside (5)**

C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>; <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>, δ ppm, *J*/Hz): 7.91 (1H, *brs*, H-2'), 7.75 (1H, *brd*, *J* = 8.1, H-6'), 6.95 (1H, *d*, *J* = 8.1 Hz, H-5'), 6.42 (1H, *brs*, H-8), 6.20 (1H, *brs*, H-6), 5.27

(1H, *d*, *J* = 7.6 Hz, H-1'' of the galactopyranosyl), 3.50–3.90 (sugar protons). The nature of the sugar moiety was established by acidic hydrolysis and comparison with authentic samples.

### **Quercetin 3'-O-β-D-glucopyranoside (6)**

C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>; <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>, δ ppm, *J*/Hz): 7.89 (1H, *d*, *J* = 1.8 Hz, H-2'), 7.77 (1H, *brd*, *J* = 8.5, H-6'), 6.95 (1H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-5'), 6.45 (1H, *brs*, H-8), 6.22 (1H, *brs*, H-6), 5.27 (1H, *d*, *J* = 7.4, H-1'' of the glucopyranosyl), 3.10–3.90 (sugar protons). The nature of the sugar moiety was established by acidic hydrolysis and comparison with authentic samples.

### **References**

- Braca A, De Tommasi N, Di Bari L, Pizza C, Politi M, Morelli I. 2001. Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *J Nat Prod.* 64:892–895.
- Cabrera-Serra MG, Lorenzo-Morales J, Romero M, Valladares B, Piñero JE. 2007. In vitro activity of perifosine: a novel alkylphospholipid against the promastigote stage of *Leishmania* species. *Parasitol Res.* 100:1155–1157.
- Ordoñez AAL, Gomez JD, Vattuone MA, Isla MI. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. *Food Chem.* 97:452–458.
- Sifaoui I, López-Arencibia A, Ticona JC, Martín-Navarro CM, Reyes-Batlle M, Mejri M, Lorenzo-Morales J, Jiménez AI, Valladares B, Lopez-Bazzocchi I, et al. 2014. Bioassay guided isolation and identification of anti-*Acanthamoeba* compounds from Tunisian olive leaf extracts. *Exp Parasitol.* 145:S111–S114.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. 1999. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: *Methods Enzymol.* 25, 119 (1974).
- Taga MS, Miller EE, Pratt DE. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J Am Oil Chem Soc.* 61:928–931.
- Yadav S, Trivedi N, Bhatt J. 2015. Antimicrobial activity of fresh garlic juice: An *in vitro* study. *AYU Int Q J Res Ayurveda.* 36:203.



*Résumés en Anglais, Arabe et  
Français*

# الملخص

عُني هذا العمل بالدراسة الفيتوكيميائية و البيولوجية لنوعين محليين من النباتات الجزائرية، وقد تمحور موضوعها حول كل من : النبتة *Pituranthos battandieri* Maire من العائلة الخيمية (Apiaceae)، و النبتة *Frankenia thymifolia* Desf. من العائلة الجرملية (Frankeniaceae)؛ حيث اعتمدنا في اختيارهما على عدة معايير من أبرزها: أنهما نبتتين صحراويتين محليتين.

ويكمن الهدف الأساسي لهذه الدراسة في فصل و تحديد بنى نواتج الأيض الثانوي للنبتتين المختارتين، وكذا تقييم الفعالية البيولوجية المتمثلة في الفعالية المضادة للأكسدة؛ الفعالية المضادة للطفيليات، الفعالية المضادة للبكتيريا و سمية الخلايا المناعية للمستخلصات العضوية المشتقة و لبعض المركبات المفصلة من كل نبتة.

في البداية، قمنا باختبار الفعالية المضادة للطفيليات للمستخلص الكلي الهيدروكولي للجزء العلوي و السفلي للنبتة *P. battandieri* الذي أثبت فعالية جد قيمة ضد كل من الطفيليات: *Leishmania amazonensis* و *Trypanosoma cruzi*. هذا ما دفعنا للقيام بالفصل الموجه بالتجارب البيولوجية لهذا المستخلص لأجل تحديد المركبات المسؤولة عن هذه الفعالية وتقييمها. مستخلصا الديكلوروميثان و الايثر البترولي المشتقين من المستخلص الكلي أثبتا فعالية جد معتبرة ضد الطفيليات المدروسة، و باستخدام العديد من الطرق الكروماتوغرافية، أدى الفصل الموجه لكل منهما إلى الحصول على أربعة عشر مركبا فعالا مضادا للطفيليات، وقد تم التعرف على بنية 7 منها (P1-P7). من بين المركبات المعزولة، نذكر: 2 من البوليبيين، أحدها يعتبر مركبا طبيعيا جديدا ذو تدوير ضوئي سالب، 3 من الكومارين الخماسي، 1 أحادي التربين و 1 مشتق فينولي.

المركب الجديد (P7)-falcarindiol (-) و المركب (P6)-panaxydiol (-) أعطا نتائج قيمة جدا ضد الطفيليات المدروسة مقارنة بالأدوية المرجعية.

من جهة أخرى، تم تقييم الفعالية المضادة للأكسدة لكل المستخلصات المشتقة من المستخلص الكلي باستخدام عدة طرق على غرار: الجذر الحر DPPH و غيرها. هذه التجارب أثبتت أن المستخلصين السابقين و مستخلص اسيتات الايثيل يمتلكون فعالية مضادة للأكسدة معتبرة مقارنة بالمركبات المرجعية.

في الجانب الثاني من الدراسة، أدى الفصل باستخدام عديد الطرق الكروماتوغرافية للمستخلصين (اسيتات الإيثيل و البوتانول) للجزء العلوي للنبتة الثانية المختارة *F. thymifolia* إلى عزل 12 مركبا، وقد تم التعرف على 8 منها، أغلبهم من الفلافونويدات.

كما تم تحديد بنية المركبات المعزولة من خلال تجميع المعلومات المتحصل عليها بالطرق التحليل الفيزيو- كيميائية. وتتمثل هذه الطرق أساسا في التحليل الطيفي باستخدام الأشعة فوق البنفسجية UV، الرنين النووي المغناطيسي أحادي البعد (البروتون و الكربون 13)، ثنائي البعد (GOESY, COSY, HSQC, HMBC)، مطيافية الكتلة عالية الدقة وكذلك بمقارنة النتائج مع معطيات المراجع.

من جانب آخر، تم اختبار النشاط المضاد للأكسدة للمستخلصين السابقين إضافة إلى مستخلص الكلوروفوم للنبتة الثانية و بعض المركبات المعزولة باستخدام سبعة طرق معتمدة نذكر منها : طريقة الجذر الحر DPPH. وقد أظهرت نتائج الاختبارات أن مستخلص اسيتات الايثيل يمتلك قدرة مرجعية و مضادة للأكسدة معتبرة مقارنة مع غيره من المستخلصات، كما أن هذه النتائج تتوافق مع كمية البولييفنول و الفلانويد الكلي المقدر لكل مستخلص.

علاوة على ذلك، فقد تم تقييم الفعالية المضادة للطفيليات و البكتيريا للمستخلصات الثلاثة، حيث أظهرت أن مستخلص اسيتات الإيثيل يمتلك فعالية معتبرة مضادة لكل من: *A. castellanii* و *L. amazonensis*، في حين أن كلا المستخلصين (اسيتات الايثيل و البوتانول) لم يبديا فعالية مضادة للبكتيريا معتبرة.

**الكلمات المفتاحية:** العائلة الخيمية ؛ العائلة الجرملية ؛ *Pituranthos battandieri* ؛ *Frankenia thymifolia* ؛ الفصل الموجه بالتجارب البيولوجية ؛ RMN 1D et 2D ؛ اختبارات بيولوجية.

# Résumé

Ce travail est consacré à l'étude phytochimique et biologique de deux espèces algériennes, *Pituranthos battandieri* Maire (Apiaceae) plante endémique au Sahara algéro-marocain et *Frankenia thymifolia* Desf. (Frankeniaceae) endémique à l'Afrique du nord. L'endémisme de ces espèces nous a encouragés à réaliser ce travail.

Notre objectif consiste en l'isolement et la détermination structurale de molécules bioactives à partir de différents extraits de ces deux plantes ainsi que l'évaluation *in vitro* de leurs activités antiparasitaire, antibactérienne, antioxydante et de l'activité cytotoxique sur des macrophages de la lignée cellulaire J774 des produits antiparasitaires isolés des extraits de *P. battandieri* par fractionnement, séparation et purification bioguidés.

Les tests d'évaluation de l'activité antiparasitaire des extraits des parties aériennes et souterraines de *P. battandieri* contre *Leishmania amazonensis*, et *donovani*, *Trypanosoma cruzi* et *Acanthamoeba castellanii* ont montré des pouvoirs antiparasitaires importants. Le fractionnement bioguidé des extraits les plus actifs (dichlorométhane et éther de pétrole des parties aériennes et des parties souterraines, respectivement) par diverses techniques chromatographiques, a conduit à l'isolement de **14 composés actifs** sur *L. amazonensis* et *T. cruzi*, dont **7 (P1-P7)** ont été identifiés. Il s'agit de **2 polyynes** dont **1 nouveau** comme produit naturel, **3 furanocoumarines**, **1 monoterpène** et **1 composé phénolique**. Parmi les composés testés, le (-)-faltarindiol (**P7**) et le (-)-panaxydiol (**P6**) ont manifesté des activités antileishmanienne et antitrypanosomiale importantes avec une faible toxicité sur les macrophages J 774.

L'activité antioxydante des différents extraits de cette espèce a été évaluée par plusieurs méthodes. Les extraits dichlorométhane et acétate d'éthyle des parties aériennes et éther de pétrole des parties souterraines ont présenté une activité antioxydante remarquable comparativement aux standards utilisés.

L'investigation phytochimique des extraits AcOEt et *n*-BuOH des parties aériennes de *F. thymifolia* a conduit à l'isolement de **12 composés**, parmi lesquels **7 flavonoïdes** et **un dérivé de l'acide gallique** ont été caractérisés.

L'élucidation structurale des composés a été réalisée par la combinaison de leurs données spectroscopiques : (UV-Vis), RMN 1D (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C et DEPT), RMN 2D (COSY, HSQC, HMBC, et GOESY), de spectrométrie de masse à haute résolution en modes EI et ESI (HR-EI-MS et HR-ESIMS) et par la comparaison avec les données de la littérature.

Les pouvoirs antioxydants des extraits CHCl<sub>3</sub>, AcOEt et *n*-BuOH de *F. thymifolia* ainsi que ceux des composés isolés **F1**, **F2** et **F6** ont été évalués par plusieurs méthodes : radical DPPH, radical-cation ABTS, blanchiment du β-carotène, radical-anion superoxyde, pouvoir chélateur ferreux, CUPRAC et FRAP. Les résultats indiquent clairement un potentiel antioxydant élevé des extraits et des composés testés. Ces résultats sont en bon accord avec les données du dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux.

Par ailleurs, les résultats de l'évaluation de l'activité antiparasitaire ont montré que l'extrait AcOEt a manifesté un effet antiparasitaire remarquable par rapport aux extraits *n*-BuOH et CHCl<sub>3</sub> contre les parasites *A. castellanii* et *L. amazonensis*. Tandis que les extraits AcOEt et *n*-BuOH ont présenté une activité antibactérienne modérée sur les souches bactériennes testées.

**Mots clés** : Apiaceae ; Frankeniaceae ; *Pituranthos battandieri* ; *Frankenia thymifolia* ; Fractionnement bioguidé ; Polyynes ; Furanocoumarines ; Flavonoïdes ; RMN 1D et 2D ; Activités Biologiques.

# Summary

This work is devoted to phytochemical and biological studies of two Algerian species, *Pituranthos battandieri* Maire (Apiaceae), an endemic plant of the Algerian-Moroccan Sahara and *Frankenia thymifolia* Desf. (Frankeniaceae) endemic of North Africa. The endemism of these species has encouraged us to conduct this work.

Our objective consists of the isolation and structural determination of bioactive molecules starting from various extracts of these two plants as well as the *in vitro* evaluation of their antiparasitic, antibacterial and antioxidant activities. The cytotoxicity on murine macrophage of J 774 cell line of the antiparasitic compounds isolated from *P. battandieri* by bio-guided fractionation, separation and purification was also evaluated.

The evaluation of the antiparasitic activity of the extracts from aerial parts and roots (taken separately) of *P. battandieri* against *Leishmania amazonensis* and *donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Acanthamoeba castellanii* showed significant antiparasitic properties. The bio-guided fractionation of the most active extracts (dichloromethane and petroleum ether from aerial parts and the roots, respectively) by various chromatographic techniques, led to the isolation of **14 active compounds** on *L. amazonensis* and *T. cruzi*, of which **7 (P1-P7)** have been identified. These compounds were **2 polyynes** including **1 new** as a natural product, **3 furanocoumarins**, **1 monoterpene** and **1 phenolic compound**. Among the tested compounds, (-)-falcariindiol (**P7**) and (-)-panaxydiol (**P6**) exhibited significant antileishmanial and antitrypanosomal activities with low toxicity to J 774 macrophages.

The antioxidant activities of the various extracts of this species were evaluated by several methods. The dichloromethane and ethyl acetate extracts of the aerial parts and petroleum ether of the roots showed remarkable antioxidant effects compared to the standards used.

The phytochemical investigation of AcOEt and *n*-BuOH extracts from the aerial parts of *F. thymifolia* led to the isolation of **12 compounds**, of which **7 flavonoids** and a **gallic acid derivative** were characterized.

The structural elucidation of the compounds was carried out by the combination of their spectroscopic data: (UV-Vis), 1D-NMR (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and DEPT), 2D-NMR (COSY, HSQC, HMBC, and GOESY), high resolution mass spectrometry with EI and ESI ionization modes (HR-EI-MS and HR-ESIMS) and by comparison with literature data.

The antioxidant powers of CHCl<sub>3</sub>, AcOEt and *n*-BuOH extracts from *F. thymifolia* as well as those of the isolated compounds **F1**, **F2** and **F6** were evaluated by several methods: radical DPPH, radical-cation ABTS, bleaching of β-carotene, radical- anion superoxide, ferrous chelating power, CUPRAC and FRAP. The results clearly indicated high antioxidant potentials of the extracts and compounds tested. These results were in good agreement with the total polyphenol and flavonoid contents data.

Moreover, the results of the evaluation of the antiparasitic activity showed that the AcOEt extract showed a remarkable antiparasitic effect compared to *n*-BuOH and CHCl<sub>3</sub> extracts, against *A. castellanii* and *L. amazonensis* parasites. While, AcOEt and *n*-BuOH extracts showed moderate antibacterial activity on the bacterial strains tested.

**Key words :** Apiaceae ; Frankeniaceae ; *Pituranthos battandieri* ; *Frankenia thymifolia* ; Bio-guided fractionation ; Polyynes ; Furanocoumarins ; Flavonoids 1D- and 2D-NMR ; Biological activities.