

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Hadj Lakhdar - BATNA 1

Faculté des Sciences de la Matière

Département de Chimie



THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du
Diplôme de Doctorat

par :

MOKHTARI MOUNA

Thème :

Recherche des métabolites secondaires dans les espèces *Thymus algeriensis* et *Diplotaxis erucoides*

Spécialité : Chimie Organique

Soutenue le 21/10 / 2021

Devant le jury :

Président :	BENKHALED Mohammed	Professeur	Université Batna-1
Rapporteur :	HABA Hamada	Professeur	Université Batna-1
Co-encadreur :	CHABANI Sonia	Maitre de conférences A	ENSEREDD Batna
Examineurs :	ATMANI D jebbar	Professeur	Université Bejaia
	AKKAL Salah	Professeur	Université Constantine-1
	DIBI Ammar	Professeur	Université Batna-1

Année universitaire 2020/2021

Remerciements

*Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE) de la Faculté des Sciences de la matière de l'université Batna 1 sous la direction du Professeur **Haba Hamada**, Enseignant chercheur au Département de Chimie et sous la direction du Maître de conférences Docteur **Chabani Sonia**, Enseignante à l'école nationale supérieure des Energies Renouvelables, Environnement et Développement Durable Batna.*

Mes remerciements vont tout d'abord à Dieu, le tout puissant pour m'avoir donné la santé, la volonté et la patience.

*Je tiens tout particulièrement à exprimer ma reconnaissance et ma profonde gratitude au Professeur **Haba Hamada** qui a mis à ma disposition son expérience, ainsi que son suivi constant jusqu'à l'achèvement de cette thèse.*

*Je témoigne ma profonde reconnaissance au Docteur **Chabani Sonia** qui n'a pas cessé de me transmettre son savoir faire, sa disponibilité permanente et l'aide précieuse qu'elle m'a apportée en me guidant par les différentes discussions scientifiques afin d'aboutir à mon objectif.*

*Je remercie vivement Monsieur **Benkhaled Mohammed**, Professeur à l'Université Batna-1, pour avoir accepté d'honorer la présidence du Jury.*

*Que Monsieur **Atmani Djebbar**, Professeur à l'Université de Bejaia, soit remercié de nous honorer par sa présence et d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Que Monsieur **Dibi Ammar**, Professeur à l'Université Batna 1 trouve ici notre sincère gratitude pour avoir bien voulu de nous honorer avec sa présence et de juger cette thèse.*

*Nos remerciements vont également à Monsieur **Akkal Salah**, Professeur à l'Université Constantine 1, pour avoir accepté de faire partie des membres du jury et de juger cette thèse. J'adresse mes sincères remerciements au Docteur **Mouffouk Soumia** du département de Chimie de Batna 1, pour m'avoir aidé dans la réalisation de l'activité antioxydante, au sein du laboratoire de chimie et chimie de l'environnement (LCCE). J'aimerais aussi la remercier pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa grande générosité.*

*Je remercie le Docteur **Aberkane Mohamed Cherif**, Enseignant Chercheur au Département de Chimie à l'Université Batna 1. Je lui suis profondément reconnaissant pour le soutien moral permanent et son aide constante aux moments délicats.*

Mes chaleureux remerciements et mes reconnaissances vont notamment aux enseignants et administrateurs du Département de Chimie, pour leurs aides morales et leurs conseils à tout instant pour mener à bien ce travail.

*Je tiens à remercier vivement le Docteur **Abdulmagid Alabdul magid**, Maître de conférences A de l'Université de Reims Champagne-Ardenne, France, pour la réalisation des spectres de RMN et masse.*

Mes remerciements vont également aux équipes de la pédagogie, des laboratoires du Département de Chimie.

Beaucoup de personnes ont contribué, de près ou de loin, à l'accomplissement de ce travail, je ne saurai les nommer tous, mais je tiens à leur exprimer mes vifs remerciements.

Dédicaces

Je dédie ce travail

À mes chers parents

Sans vous, je n'aurais jamais pu aller jusqu'au bout.

À la mémoire de mon frère **LOTFI**

À mon cher mari **KAMEL**, pour tes précieux conseils et surtout ta patience et ta disponibilité à tout moment. Merci infiniment.

À mes très chers et adorables enfants **ANFEL, AKRAM et TESNIM**.

À ma très Chère sœur **SELMA** qui m'a soutenue au moment où j'en avais le plus besoin.

À mes très chers frères et sœurs. Merci pour tous ces moments de partage, d'échange, de rire. Merci pour votre soutien et support moral que vous m'avez accordé.

À mes très chers neveux **FADI, ACIL, LOUAI et WAIL**.

À ma grande famille

Sommaire

Notations utilisées

Introduction 1

Partie I : Rappel bibliographique

Chapitre 1 : Présentation du genre *Thymus*

I.1 Famille Lamiaceae.....	4
I.1.1 Caractère morphologique.....	5
I.1.2 Pharmacopée traditionnelle.....	5
I.2 Genre <i>Thymus</i>	5
I.2.1 Propriétés biologiques et utilisation en médecine traditionnelle.....	5
I.2.2 Etudes chimiques antérieures sur le genre <i>Thymus</i>	6
❖ Acides phénoliques.....	6
❖ Flavonoïdes.....	10
❖ Terpènes.....	15
I.3 Espèce <i>Thymus algeriensis</i> Boiss. & Reut.	16
I.3.1 Description morphologique.....	16
I.3.2 Classification taxonomique.....	17
I.3.3 Noms populaires de <i>T. algeriensis</i>	17
I.3.4 Propriétés biologiques des huiles essentielles de <i>T. algeriensis</i>	17
I.3.5 Travaux antérieurs sur l'espèce <i>T. algeriensis</i>	18
I.3.6 Huiles essentielles.....	19
I.3.6.1 Composition chimique des huiles essentielles de <i>Thymus algeriensis</i>	19

Chapitre 2 : Présentation du genre *Diplotaxis*

I.5 Famille Brassicaceae.....	21
I.5.1 Caractères morphologiques.....	21
I.5.2 Usage traditionnel.....	21
I.6 Genre <i>Diplotaxis</i>	22
I.7 Espèce <i>Diplotaxis erucoïdes</i>	21
I.7.1 Description morphologique.....	22
I.7.2 Classification taxonomique.....	23
I.7.3 Utilisation de <i>Diplotaxis erucoïdes</i>	23
I.8 Etudes chimiques antérieures sur le genre <i>Diplotaxis</i>	23
❖ <i>D. erucoïdes</i> et <i>D. virgata</i>	23

❖ <i>D. harra</i>	24
❖ <i>D. acris</i>	26
Chapitre 3 : Généralités sur les composés phénoliques, les terpènes et les monoglycérides	
I.9 Polyphénols.....	28
I.9.1 Généralité	28
I.9.2 Classification des polyphénols.....	28
I.9.2.1 Non flavonoïdes	28
I.9.2.1.1 Acides phénoliques simples	28
❖ Acides hydroxybenzoïques	28
❖ Acides hydroxycinnamiques	29
I.9.2.1.2 Biosynthèse des phénols simples et acides phénols	29
I.9.2.2 Flavonoïdes	31
I.9.2.2.1 Classification.....	31
❖ Flavanones	32
❖ Flavan-3-ols ou flavanols.....	33
❖ Flavones et flavonols.....	33
I.9.2.2.2 Biosynthèse des flavonoïdes	34
I.9.3 Propriétés biologiques	36
❖ Polyphénols	36
❖ Flavonoïdes	36
I.10 Composés Terpéniques	36
I.10.1 Définition	36
I.10.2 Classification	37
❖ Monoterpènes	38
❖ Triterpènes.....	38
I.10.3 Biosynthèse des triterpènes	39
I.11 Glycérides	42
I.11.1 Définition	42
I.11.2 Types de glycérides	42
❖ Glycérides neutres	42
❖ Phosphoglycérides.....	42
I.11.3 Monoglycérides	43
I.11.4 Synthèse des monoglycérides	43
I.11.5 Utilisations chimiques	44

Partie II : Partie expérimentale

II.1 : Techniques préparatives de séparation

II.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)	45
II.1.2 Chromatographie sur couche épaisse (CCE)	45
II.1.3 Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)	45
II.1.4 Chromatographie liquide sous vide (VLC)	46

II.2 Chimie structurale

II.2.1 Spectrométrie de masse	46
II.2.2 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN	46
II.2.3 Spectrométrie Ultraviolet-Visible (UV-Vis)	46
II.2.4 Pouvoir rotatoire	46

II.3 Etude phytochimique de l'espèce *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut.

II.3.1 Extraction	47
II.3.2 Fractionnement et purification de l'extrait chloroformique	48
II.3.2.1 Fraction F7	50
II.3.2.2 Fraction F8	50
II.3.2.3 Fraction F9	51
II.3.2.4 Fraction F10	51
II.3.3 Fractionnement et purification de l'extrait <i>n</i> -butanol	52
II.3.3.1 Fraction F9	53
II.3.4 Composés isolés de l'espèce <i>Thymus algeriensis</i>	54

II.4 Etude phytochimique de l'espèce *Diplotaxis erucoïdes* (L.) DC.

II.4.1 Extraction	57
II.4.2 Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle	58
II.4.2.1 Fraction F2	60
II.4.2.2 Fraction F5	61
II.4.3 Fractionnement et purification de l'extrait <i>n</i> -butanol	62
II.4.3.1 Fraction F4	64
II.4.4 Composés isolés de l'espèce <i>Diplotaxis erucoïdes</i>	66

II.5 Activités biologiques

II.5.1 Activité antibactérienne	68
II.5.1.1 Préparation des précultures	69

II.5.1.2 Préparation de la suspension bactérienne (inoculum)	69
II.5.1.3 Réalisation des tests antibactériens	70
II.5.2 Dosage des polyphénols totaux	70
II.5.2.1 Teneur totale en flavonoïdes.....	70
II.5.3 Activité antioxydante	71
II.5.3.1 Test de piégeage des radicaux libres (DPPH).....	71
II.5.3.2 Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC).....	71
II.5.3.3 Pouvoir réducteur du fer (FRAP)	71
II.5.3.4 Teste de phosphomolybdate (PPM).....	72
II.5.3.5 Dosage du thiocyanate ferrique	72
II.5.4 Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	72
II.5.5 Activité anti-hémolytique.....	73
❖ Prélèvement et préparation d'échantillons de sang	73
❖ Détermination de la concentration inhibitrice de l'hémolyse à 50% (CIH ₅₀). 73	73
❖ Test de fragilité osmotique érythrocytaire d'extraits bruts	73
II.5.6 Analyses statistiques.....	73

Partie III : Résultats et discussion

III.1 Caractérisation structurale des produits obtenus de *T. algeriensis*

III.1.1 Identification structurale du composé TA1	75
III.1.2 Identification structurale du composé TA2	83
III.1.3 Identification structurale du composé TA3	86
III.1.4 Identification structurale du composé TA4	88
III.1.5 Identification structurale du composé TA5	92
III.1.6 Identification structurale du composé TA6	94
III.1.7 Identification structurale du composé TA7	98
III.1.8 Identification structurale du composé TA8	100
III.1.9 Identification structurale du composé TA9	107
III.1.10 Identification structurale du composé TA10	117

III.2 Conclusion	120
------------------------	-----

III.3 Caractérisation structurale des produits obtenus de *D. erucoïdes*

III.3.1 Identification structurale du composé DE1	122
III.3.2 Identification structurale du composé DE2	132
III.3.3 Identification structurale du composé DE3	137
III.3.4 Identification structurale du composé DE4	143

III.3.5 Identification structurale du composé DE5	150
III.3.6 Identification structurale du composé DE6	156
III.3.7 Identification structurale du composé DE7	159
III.3.8 Identification structurale du composé DE8	169
III.4 Conclusion	169
III.5 L'activité biologique	
III.5.1 Étude biochimique de l'espèce <i>Thymus algeriensis</i>	171
III.5.1.1 Teneur totale en phénols et flavonoïdes	171
III.5.1.2 Activités antioxydantes	172
III.5.1.3 Activité anti-inflammatoire <i>in vitro</i>	176
III.5.1.4 Activité anti-hémolytique.....	177
III.5.1.5 Activité antibactérienne.....	177
III.5.2 Étude biochimique de l'espèce <i>Diplotaxis eruroides</i>	180
III.5.2.1 Activité antibactérienne.....	180
III.5.3 Conclusion	182
Conclusion.....	183
Bibliographie	187
Résumé	

Notations utilisées

AcOEt	Acétate d'éthyle
CHCl ₃	Chloroforme
CH ₂ Cl ₂	Dichlorométhane
CDCl ₃	Chloroforme deutéré
CD ₃ OD	Méthanol deutéré
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EP	Ether de pétrole
EtOH	Ethanol
MeOH	Méthanol
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
Na ₂ SO ₄	Sulfate de sodium
Na ₂ CO ₃	Carbonate de sodium
CCM	Chromatographie sur couche mince
CC	Chromatographie sur colonne ouverte
CCE	Chromatographie sur couche épaisse
VLC	Chromatographie liquide sous vide
SiO ₂	Gel de silice normale
RP-18	Silice greffée en C-18
COSY H-H	Correlation spectroscopy H-H
ESI-MS	Spectrométrie de masse
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
RMN ¹ H	Résonance magnétique nucléaire du proton
RMN ¹³ C	Résonance magnétique nucléaire du carbone 13
UV	Ultra-violet
uma	Unité de masse atomique
ppm	Partie par million
<i>s</i>	Singulet
<i>sl</i>	Singulet large
<i>d</i>	Doublet
<i>dd</i>	Doublet de doublet
<i>t</i>	Triplet
<i>dl</i>	Doublet large

<i>m</i>	Multiplet
<i>dq</i>	Doublet de quadruplet
<i>quint</i>	Quintuplet
ax	Axial
éq	Equatorial
λ :	Longueur d'onde
δ	Déplacement chimique en ppm
<i>J</i>	Constante de couplage en Hz
<i>m/z</i>	Masse/charge d'un ion
$[\alpha]_D$	Pouvoir rotatoire
R	Radical
Gal	Galactose
Glu	Glucose
Glc	Glucuronide
Rha	Rhamnose
Rut	Rutinoside
Xyl	Xylose
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. faecalis</i>	<i>Staphylococcus faecalis</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
APR	Pouvoir anti-radicalaire relatif
BHA	Hydroxyasole butylé
BHT	Hydroxytoluène butylé
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyl
EGA	Equivalent gramme d'acide galique
EQ	Equivalent de la quercétine
FRAP	Pouvoir réducteur du fer
PPM	Phosphomolybdate
PR	Pouvoir réducteur
PA	Pouvoir antioxydant
Fer	Feruloyl
CoA	Coenzyme-A

°C	Degré Celsius
F	Fraction
Hz	Hertz
nm	Nanomètre
EC ₅₀	Concentration effective à 50 %
IC ₅₀	Concentration efficace à 50 %

INTRODUCTION

Introduction

Depuis l'antiquité, les plantes aromatiques et médicinales (PAM) suscitent beaucoup d'intérêt en tant que source de produits naturels ayant plusieurs applications dans la vie de l'homme pour se nourrir, se soigner, ...etc. Ces plantes ont joué un rôle particulier dans les anciennes civilisations par leur vertu thérapeutique d'une part, et d'autre part, par leur utilisation en agriculture, cosmétique, ...etc. Durant l'évolution de l'espèce humaine, un savoir faire a été acquis et soigneusement revalorisé à l'importance de ces plantes dans la vie quotidienne de l'homme dans plusieurs régions du monde. En effet, les plantes médicinales ont été examinées pour leurs utilisations potentielles comme remèdes pour le traitement de diverses maladies causées par le stress oxydatif, l'infection bactérienne et / ou virale ; et pour la conservation des aliments contre l'oxydation lipidique et la contamination microbienne. En outre, ces plantes sont de riches sources d'une variété de composés biologiquement actifs, principalement phénoliques, et ces composés sont connus pour présenter des propriétés biologiques prometteuses [1].

La région méditerranéenne possède une grande diversité floristique et une richesse en taxons endémiques et sub-endémiques, cette richesse est estimée à environ 25000 espèces de plantes vasculaires, ce qui correspond vraisemblablement à 9,2 % de la flore mondiale, sur un territoire représentant seulement 1,5% de la surface terrestre [2]. Parmi les pays de cette région, on y trouve l'Algérie qui se caractérise par une diversité climatique et floristique. En effet, la flore algérienne constitue un véritable réservoir phylogénétique, avec environ 4000 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires [3]. Cependant, la flore médicinale algérienne reste relativement méconnue, car seules 146 espèces végétales sur les quelques milliers, sont inventoriées comme médicinales [4]. Par ailleurs, la recherche scientifique menée sur les plantes utilisées en médecine traditionnelle reçoit un intérêt particulier au niveau de plusieurs franges de la société et un engouement croissant pour identifier de nouveaux agents antioxydants, antimicrobiens, antiviraux, anti-inflammatoires, ...etc [5,6].

Dans le cadre des études ethnobotaniques et ethnopharmacologiques effectuées sur les plantes médicinales dans notre laboratoire et destinées principalement à la valorisation de la flore locale par la découverte de nouvelles biomolécules, nous avons sélectionné deux espèces nommées *Thymus algeriensis* et *Diplotaxis eruroides* poussant dans la région des Aurès, en fixant comme principal objectif l'extraction, la séparation et l'identification des métabolites

secondaires de ces deux plantes ainsi que leurs activités biologiques antioxydantes, anti-inflammatoires, antibactériennes ;....etc .

La première plante *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. appartient au genre *Thymus* (Thym) de la famille Lamiaceae, une grande partie de ces plantes sont utilisées et connues depuis longtemps en tant que herbes aromatiques et médicinales. Cette famille est considérée comme l'une des principales familles productrices d'huiles essentielles et aussi une source riche en flavonoïdes et polyphénols. L'Algérie est l'un des pays les plus riches en variétés d'espèces de Thym. En effet, *Thymus algeriensis* est utilisé en médecine traditionnelle comme expectorant, antispasmodique, antitussif, ...etc. Les huiles essentielles trouvées dans les plantes du genre *Thymus* notamment l'espèce *T. algeriensis* ont montré les activités biologiques anti microbiennes et anti inflammatoires [7].

La deuxième plante étudiée est *Diplotaxis eruroides* (L.) DC., une herbe annuelle hivernale méditerranéenne, appartenant à une large famille de plantes d'une importance scientifique et économique majeure, qui est la famille Brassicaceae [8,9]. Deux classes chimiques de métabolites secondaires actifs caractérisent la majorité des taxons constituant cette famille à savoir les polyphénols et les glucosinolates. Ces composés chimiques ont en effet diverses applications pharmaceutiques et cosmétiques en raison particulièrement de leurs propriétés anticancéreuses, antimicrobiennes et antioxydantes.

Outre l'introduction et la conclusion générale, cette thèse comportera trois parties qui décrivent l'essentiel des travaux théoriques et expérimentales effectués dans le cadre de cette recherche :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique faisant ressortir en premier lieu la description botanique et la caractérisation morphologique de deux espèces étudiées *Thymus algeriensis* et *Diplotaxis eruroides* et leurs familles respectives Lamiaceae et Brassicaceae. Cette partie est suivie par la présentation des principales études phytochimiques antérieures et les activités biologiques réalisées sur plusieurs taxons de ces deux familles. Ces rappels théoriques sont parachevés par une étude exhaustive portant sur les principaux métabolites secondaires présents dans ces familles incluant particulièrement les composés phénoliques, les flavonoïdes, les terpénoïdes et les monoglycérides tout en présentant leur définition, classification, biosynthèse et propriétés biologiques.

- Dans la deuxième partie, le premier volet est réservé à l'étude expérimentale qui a été menée sur les deux plantes objet de cette investigation chimique et biologique, à savoir *T. algeriensis* et *D. erucoïdes*, en utilisant des techniques d'extraction permettant de préparer à partir des matériels végétaux les différents extraits organiques (éther de pétrole, chloroforme, acétate d'éthyle et *n*-butanol) et les diverses méthodes chromatographiques (VLC, CC et CCE) et spectroscopiques (UV-Vis, RMN 1D et 2D, ESI-MS), de séparation, de purification et d'élucidation structurale des métabolites secondaires contenus dans les fractions issues de ces deux plantes. Enfin, le dernier volet englobe la présentation du matériel et de la méthodologie permettant d'effectuer le dosage des flavonoïdes et des polyphénols totaux par les méthodes colorimétriques usuelles, suivi par la réalisation des tests biologiques *in vitro* (activités antioxydantes, antibactériennes, anti-inflammatoires et anti-hémolytiques) sur les extraits organiques de ces deux plantes.
- La troisième partie comporte les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse et leur discussion. Le premier volet de cette partie est consacré à l'identification structurale, par analyse conjointe des données spectrales obtenues grâce aux différentes techniques spectroscopiques particulièrement la RMN monodimensionnelle (^1H et ^{13}C) et bidimensionnelle ou de corrélation (COSY, HSQC et HMBC), des biomolécules isolées qui sont au nombre de 18, réparties en flavonoïdes, polyphénols, triterpénoïdes et glycérides. Dans le deuxième volet, il est inclu la discussion des résultats des tests biologiques englobant les activités antioxydantes, antibactériennes, anti-inflammatoires et antihémolytiques des extraits organiques issus des deux espèces *T. algeriensis* et *D. erucoïdes*.

PARTIE I

RAPPEL

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1
PRÉSENTATION DU
GENRE *THYMUS*

I.1 Famille Lamiaceae

La famille **Lamiaceae** ou (**lamiacées**) est une des plus importantes familles de plantes à fleurs. Les espèces de cette famille sont des angiospermes dicotylédones appartenant à l'ordre des Lamiales. Cette famille est également connue sous le nom **Labiatae** (**labiacées**) ou encore Labiatae (**labiées**), du latin labium signifiant lèvre, en référence à la forme caractéristique de ses fleurs. La famille Lamiaceae comprend environ 263 genres et entre 6900 à 7200 espèces [10]. Les plus grands genres sont *Salvia* (900), *Scutellaria* (360), *Stachys* (300), *Plectranthus* (300), *Hyptis* (280), *Teucrium* (250), *Vitex* (250), *Thymus* (220) et *Nepeta* (200). En Algérie, elle est représentée par 28 genres et 146 espèces [11]. Ces plantes sont distribuées dans les régions tempérées avec une prépondérance dans la région méditerranéenne. Elles sont rares dans la région présaharienne et dans l'étage supérieur du Hoggar, sauf les trois espèces *Marrubium deserti*, *Salvia aegyptiaca* et *Teucrium polium* qui sont plus largement répandues (Figure I.1) [12].

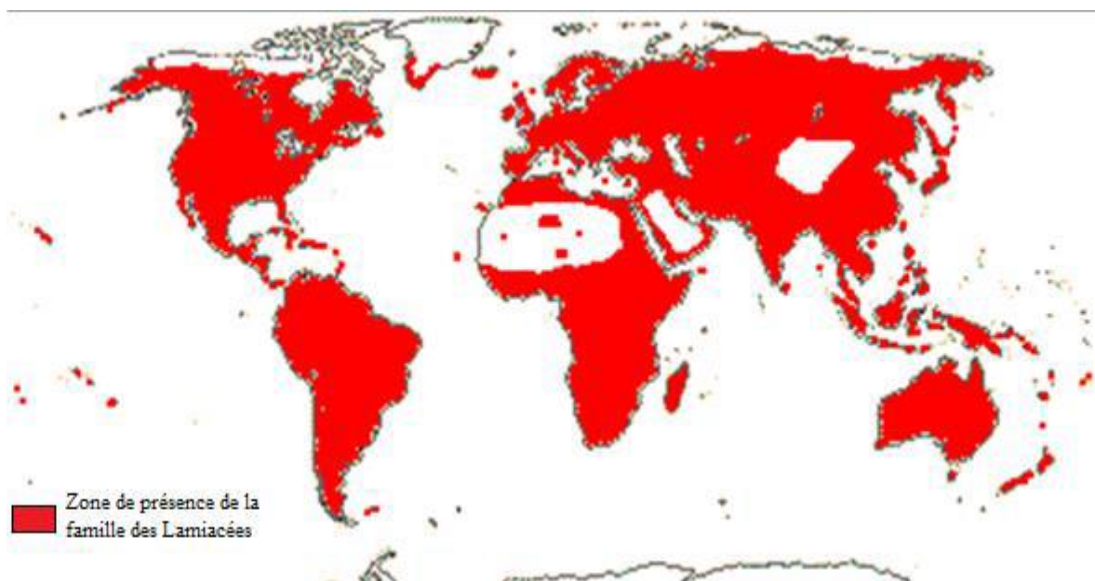


Figure I.1: Carte de répartition géographique de la famille des lamiacées

Depuis l'antiquité, nombreuses plantes de la famille Lamiaceae sont cultivées dans les jardins afin de les utiliser dans l'art culinaire, en parfumerie, et en thérapie. Il est bien connu que chaque espèce possède un mélange complexe et spécial de composés possédant des activités biologiques différentes selon leur composition chimique. Ce qui leur confère de nombreuses propriétés pharmacologiques : antibactériennes, antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antivirales et anticancéreuses [13].

I.1.1 Caractère morphologique

Les Lamiaceae sont des plantes herbacées vivaces ou annuelles, souvent densément glandulaires et aromatiques. Leurs tiges sont généralement à quatre angles. Les feuilles sont généralement simples et toujours opposées. Les fleurs sont hermaphrodites ou males-stériles (fonctionnellement femelles) et forment des verticillés qui sont souvent disposés en épis, en têtes, en racèmes ou en cymes. Les calices sont habituellement à cinq lobes et à deux lèvres ; le calice est rarement à une lèvre ou actinomorphe. Les corolles sont symphoniques et à deux lèvres ; rarement, elles sont à une ou plus ou moins actinomorphes. Ils ont généralement quatre étamines, rarement réduite à deux ; la paire supérieure (postérieure) est généralement plus courte que l'inférieure (antérieure). L'ovaire est supérieur, double carpelle, mais apparaissant également à quatre lobes à maturité. Le style est unique, généralement gynobasique, brièvement vif ci-dessus. Le fruit se compose de quatre noisettes sèches (très rarement charnues) à une graine [14].

I.1.2 Pharmacopée traditionnelle

Les plantes de la famille Lamiaceae sont utilisées en médecine traditionnelle comme diurétique, antisyphilitique, anti-diarrhéique, cicatrisante, antiseptique et dans le traitement de nombreuses affections telles que les problèmes intestinaux ou encore le météorisme (ballonnement du ventre, dû à des gaz) [15].

I.2 Genre *Thymus*

Le genre *Thymus* appartenant à la famille des Lamiaceae, comprend environ 400 espèces. Les plantes de ce genre sont principalement herbacées, vivaces ou petits arbustes présents dans la région méditerranéenne, qui est le centre du genre entier, et sont également caractéristiques en Asie, en Europe du Sud et en Afrique du Nord [16,18].

Historiquement, les parties aériennes des espèces de *Thymus*, riches en constituants volatils, ont été couramment utilisées comme tisanes, condiments et épices. En outre, elles ont montré de nombreuses propriétés telles que tonique, carminative, digestive, antispasmodique, antimicrobienne, antioxydante, antivirale, et des activités anti-inflammatoires [17,18].

I.2.1 Propriétés biologiques et utilisation en médecine traditionnelle

Le thym est une plante importante. Outre son utilisation aromatique dans la cuisine provençale, il est utilisé pour ses vertus thérapeutiques diverses telles que : antifongique, anti

inflammatoire, et antibactérienne. Les études ont montré que les extraits méthanolique et hexanique des parties aériennes de *Thymus vulgaris* inhibent la croissance de *Mycobacterium tuberculosis* (bactérie qui cause la tuberculose) et exhibent aussi des propriétés anthelminthiques [19,20].

Le thym "Zaatar" est très utilisé en médecine traditionnelle sous plusieurs formes : les feuilles sont utilisées en infusion contre la toux, en décoction pour guérir les maux de tête, l'hypertension et les gastrites et en usage externe comme cicatrisantes et antiseptiques. Ses feuilles sont riches en huiles essentielles dont les propriétés ont été mises à profit en phytothérapie. Cette huile est très antiseptique et utilisée à ce titre pour soigner les infections pulmonaires. Son action antiseptique s'exerce également sur le système digestif et notamment en cas de diarrhée et elle est aussi vermifuge [19]. Il est considéré aussi comme l'un des remèdes populaires les plus utiles et efficaces, dans le traitement des affections respiratoires ; le rhume, la grippe, et l'angine. Il contribue également dans le nettoyage et la cicatrisation des plaies, et aussi l'expulsion des gaz intestinaux [21].

I.2.2 Etudes chimiques antérieures sur le genre *Thymus*

De nombreuses espèces de *Thymus* ont fait, à ce jour, l'objet d'études phytochimiques et biologiques révélant l'existence de plusieurs composés bioactifs tels que les acides phénoliques, les flavonoïdes, les terpénoïdes et les huiles essentielles.

❖ Acides phénoliques

L'acide rosmarinique est l'un des plus importants polyphénols antioxydants dans le thym et il est aussi largement trouvé dans les plantes de la famille Lamiaceae [22]. Les acides phénoliques trouvés dans le genre *Thymus* sont présentés dans le Tableau I.1 et Figure I.2.

Tableau I.1 : Acides phénoliques du genre *Thymus*

Composé	Source biologique	Réf
<i>Dérivés de l'acide caféique</i>		
Acide caféique <u>1</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. quinquecostatus</i> <i>T. capitatus</i> <i>T. glabrescens</i>	[23-29]

	<i>T. pulegioides</i> <i>T. comosus</i>	
Acide chlorogénique <u>2</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. webbianus</i> <i>T. capitatus</i> <i>T. glabrescens</i> <i>T. pulegioides</i> <i>T. comosus</i>	[23-28] [25,26]
Cafféate d'éthyle <u>3</u>	<i>T. serpyllum</i>	[23]
Acide caféique glucoside <u>4</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
3,5-dicafféoyl acide quinique <u>5</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. webbianus</i>	[23]
Acide rosmarinique <u>6</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. sipyleus</i> <i>T. quinquicostatus</i> <i>T. glabrescens</i> <i>T. pulegioides</i> <i>T. comosus</i> <i>T. capitatus</i>	[23-29]
Acide lithospermique <u>7</u>	<i>T. serpyllum</i>	[23]
Acide rosmarinique glucosylé <u>8</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
Acide isomelitrique A <u>9</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
Rosmarinate de méthyle <u>10</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i>	[23, 28, 29]
Acide salvianolique I <u>11</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
Acide salvianolique K <u>12</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
Acide caftarique <u>13</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. comosus</i> <i>T. pulegioides</i>	[25,27]
<i>Autres acides phénoliques</i>		
Acide gentisique <u>14</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. comosus</i>	[23, 25]

Acide protocatéchique <u>15</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
Acide hydroxybenzoïque <u>16</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
	<i>T. serpyllum</i>	[23]
Acide férulique <u>17</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. capitatus</i> <i>T. glabrescens</i> <i>T. pulegioides</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. comosus</i>	[23-28]
Acide <i>p</i> -coumarique <u>18</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. webbianus</i> <i>T. capitatus</i> <i>T. glabrescens</i> <i>T. pulegioides</i> <i>T. comosus</i>	[23- 27]
Acide gallique <u>19</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. webbianus</i> <i>T. capitatus</i>	[23, 24]
Acide syringique <u>20</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. capitatus</i>	[23,24]
Acide hydroxybenzoïque- <i>O</i> - hexoside <u>21</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
Acide vanillique <u>22</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
	<i>T. serpyllum</i>	
	<i>T. capitatus</i>	[24]
Acide trans-2-hydroxy cinnamique <u>23</u>	<i>T. capitatus</i>	[24]
Acide quinique <u>24</u>	<i>T. vulgaris</i>	[28]
Rosmarinate de <i>n</i> -propyle <u>25</u>	<i>T. serpyllum</i>	[29]

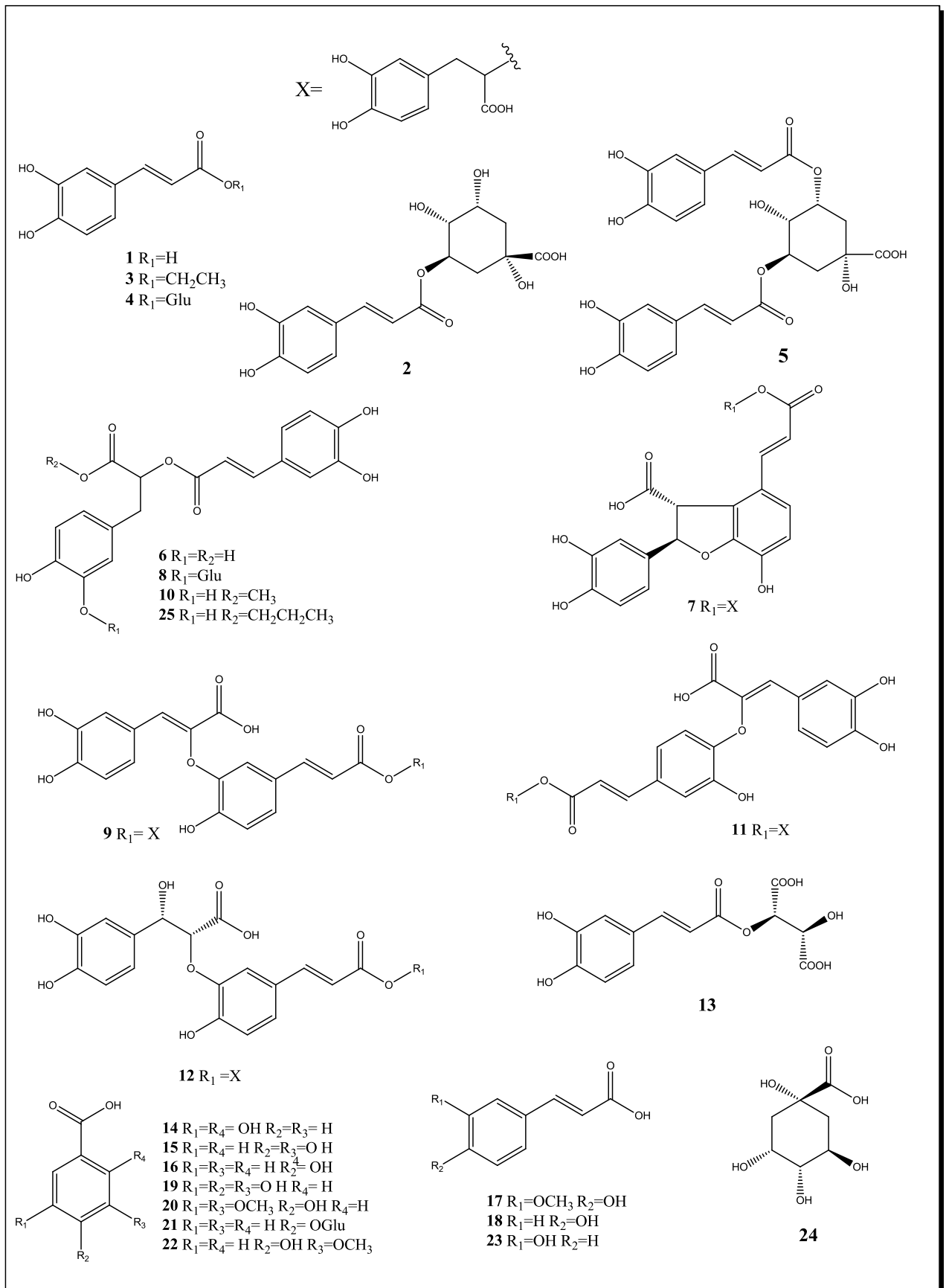


Figure I.2 : Structures des acides phénoliques

❖ Flavonoïdes

Les principaux métabolites secondaires du genre *Thymus* sont les flavonoïdes [30]. Le tableau I.2 rassemble un nombre considérable d'espèces du genre *Thymus* et leur contenu flavonique (Figure I.3) :

Tableau I.2 : Distribution des flavonoïdes dans les espèces du genre *Thymus*

Composé	Source biologique	Réf
<i>Flavones</i>		
Lutéoline <u>26</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. sipyleus</i> <i>T. herba-barona</i> <i>T. striatus</i> <i>T. webbianus</i> <i>T. capitatus</i> <i>T. hirtus</i> <i>T. numidicus</i> <i>T. brousoonetti</i>	[23,24] [31-33]
Cynaroside <u>27</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. sipyleus</i> <i>T. willdenowii</i> <i>T. brousoonetti</i> <i>T. piperella</i>	[23] [33,34] [45]
Lutéoline-7- <i>O</i> -D-rutinoside <u>28</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. capitatus</i>	[23] [35]
Lutéoline-7- <i>O</i> -D-glucuronide <u>29</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. sipyleus</i> <i>T. brousoonetti</i>	[23] [33]
Lutéoline-3'- <i>O</i> -D-glucuronide <u>30</u>	<i>T. willdenowii</i>	[34]
Lutéoline-3',7- <i>O</i> -diglucoside <u>31</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
Lutéoline-acétyle- <i>O</i> -glycoside <u>32</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]

Lutéoline-7- <i>O</i> -(6''-feruloyl)- β -glucopyranoside <u>33</u>	<i>T. sipyleus</i>	[23]
7-Méthoxy lutéoline <u>34</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. membranaceus</i>	[36,38]
Apigénine <u>35</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. herba-barona</i> <i>T. striatus</i> <i>T. webbianus</i> <i>T. glabrescens</i> <i>T. praecox</i> <i>T. capitatus</i> <i>T. hirtus</i> <i>T. numidicus</i> <i>T. piperella</i>	[23,26] [24] [31] [32] [45]
7-Méthoxy apigénine <u>36</u>	<i>T. vulgaris</i>	[37]
7-4'-Diméthoxy apigénine <u>37</u>	<i>T. vulgaris</i>	[37]
Apigénine-7- <i>O</i> -rutinoside <u>38</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
Cosmosiine <u>39</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. webbianus</i> <i>T. piperella</i>	[23] [45]
Apigénine-7- <i>O</i> -glucuronide <u>40</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i>	[23]
Vicénine-2-(Apigénine-6,8-di- <i>C</i> -glucoside) <u>41</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. webbianus</i> <i>T. piperella</i>	[23] [45]
Thymusine <u>42</u>	<i>T. herba-barona</i> <i>T. striatus</i>	[23]
Thymonine <u>43</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. striatus</i>	[39,40] [23]
Pebrelline <u>44</u>	<i>T. striatus</i> <i>T. piperella</i>	[23,45]
Gardenine B <u>45</u>	<i>T. striatus</i>	[23]

Diosmétine <u>46</u>	<i>T. hirtus</i>	[31]
5-desméthylnobilétine <u>47</u>	<i>T. striatus</i> <i>T. vulgaris</i>	[23,40]
Cirsilinéol <u>48</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. herba-barona</i>	[23]
Cirsiliol <u>49</u>	<i>T. herba-barona</i>	[41]
8-Méthoxycirsilinéol <u>50</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. herba-barona</i>	[39,41]
Sorbifoline <u>51</u>	<i>T. herba-barona</i>	[41]
Salvigénine <u>52</u>	<i>T. striatus</i>	[23]
Ladaneine <u>53</u>	<i>T. striatus</i> <i>T. piperella</i>	[23,45]
Cirsimaritine <u>54</u>	<i>T. serpyllum</i> <i>T. herba-barona</i> <i>T. vulgaris</i>	[23,41]
Xanthomicrol <u>55</u>	<i>T. striatus</i> <i>T. herba-barona</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. vulgaris</i>	[23] [39] [42]
Sideritoflavone <u>56</u>	<i>T. herba-barona</i> <i>T. vulgaris</i>	[23,42]
Acacétine <u>57</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i>	[39]
Hispiduline <u>58</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i>	[39]
Scutellarine <u>59</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i>	[39]
Genkwanine <u>60</u>	<i>T. serpyllum</i> <i>T. herba-barona</i>	[39,41]
Chrysoériol <u>61</u>	<i>T. membranaceus</i>	[38]
<i>Flavanones</i>		
Pebrelline <u>62</u>	<i>T. piperella</i>	[45]
5,6-Dihydroxy-7,3',4'-triméthoxyflavone <u>63</u>	<i>T. piperella</i>	[45]
Eriodictyol <u>64</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]

	<i>T. serpyllum</i>	[23,26]
	<i>T. herba-barona</i>	[23,41]
	<i>T. webbianus</i>	[23]
	<i>T. pulegioides</i>	[26]
	<i>T. glabrescens</i>	[26]
	<i>T. praecox</i>	[26]
	<i>T. piperella</i>	[45]
Eriocitrine <u>65</u>	<i>T. serpyllum</i>	[23]
Pyracanthoside <u>66</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
Eriodictyol-7- <i>O</i> -glucuronide <u>67</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i>	[23]
Naringénine <u>68</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. herba-barona</i> <i>T. webbianus</i> <i>T. pulegioides</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. glabrescens</i> <i>T. praecox</i> <i>T. piperella</i>	[23,26,41,45]
Naringénine-7- <i>O</i> -glucoside <u>69</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
Naringénine-7- <i>O</i> -rutoside <u>70</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
Prénylnaringénine <u>71</u>	<i>T. serpyllum</i>	[23]
Hesperidine <u>72</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
5-Hydroxy-7,4'-diméthoxyflavone <u>73</u>	<i>T. piperella</i>	[45]
<i>Flavonole et dihydroflavonole</i>		
Quercétine <u>74</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. capitatus</i> <i>T. pulegioides</i> <i>T. glabrescens</i> <i>T. praecox</i>	[23,24,26]
Rutine <u>75</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. pulegioides</i> <i>T. serpyllum</i>	[23,26]

	<i>T. glabrescens</i> <i>T. praecox</i>	
Isoquercitrine <u>76</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
Isorhamnétine <u>77</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
Isorhamnétine-3- <i>O</i> -glucoside <u>78</u>	<i>T. vulgaris</i>	[23]
Taxifoline <u>79</u>	<i>T. vulgaris</i> <i>T. quinquecostatus</i> <i>T. pulegioides</i> <i>T. serpyllum</i> <i>T. glabrescens</i> <i>T. praecox</i>	[23,26]
Aromadédrine <u>80</u>	<i>T. quinquecostatus</i>	[23]

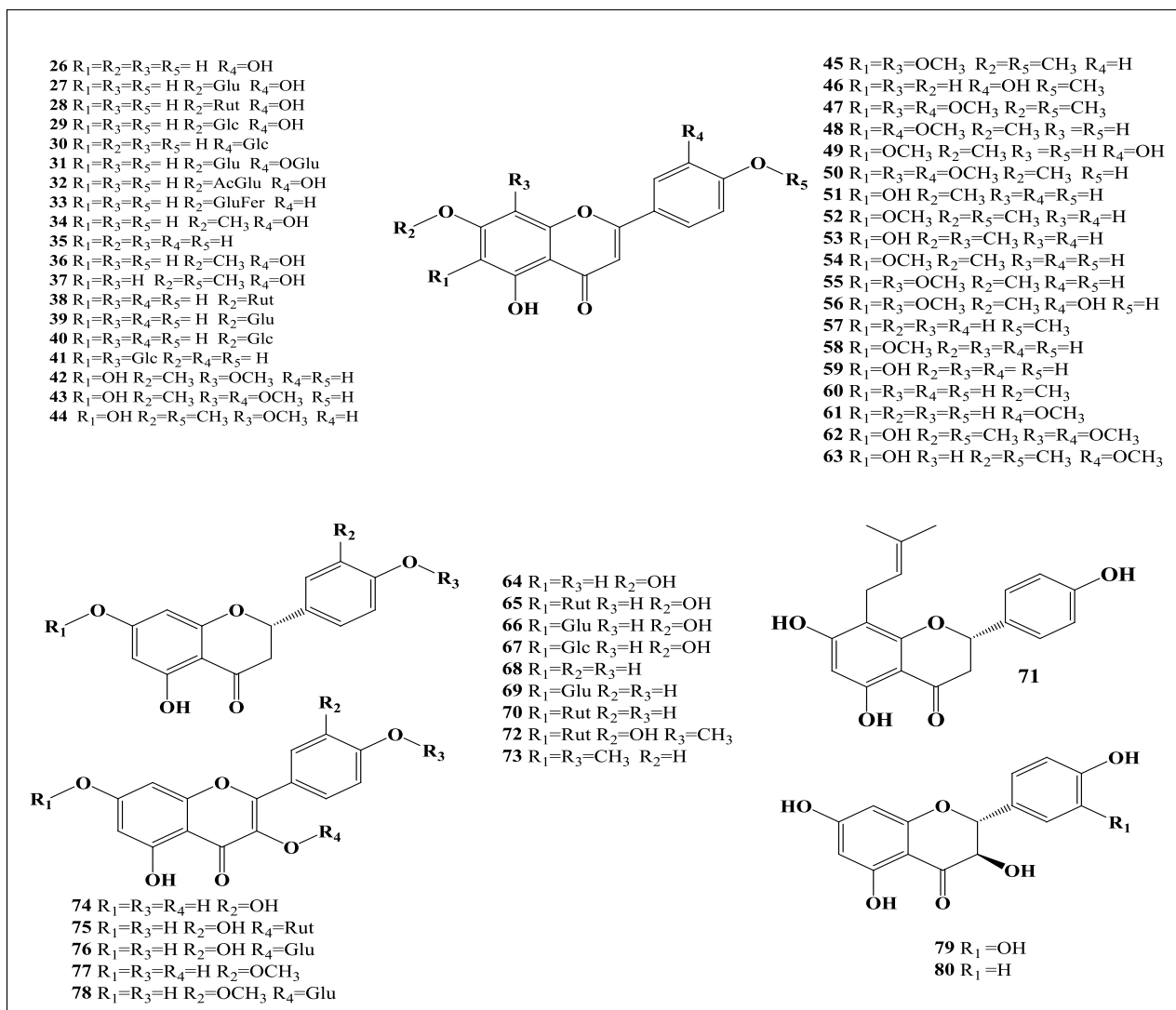


Figure I.3 : Structures des flavonoïdes

❖ Terpènes

L'étude réalisée sur les parties aériennes de l'espèce *Thymus vulgaris* L. a permis l'isolement de quatre monoterpènes glycosylés (**81-84**), dont un nouveau le (R)-*p*-cymen-9-yl- β -D-glucopyranoside **81** et trois connus. Le tableau I.3 et Figure I.4 contiennent les monoterpènes glycosylés isolés.

Tableau I.3 : Monoterpènes de l'espèce *Thymus vulgaris*

Source biologique	Composé	Réf
<i>Thymus vulgaris</i>	(R)- <i>p</i> -cymen-9-yl β -D-glucopyranoside 81 2- β -D-glucopyranosylthymoquinols 82 5- β -D-glucopyranosylthymoquinols 83 (-)-angelicoidenol- β -D-glucopyranoside 84	[46]

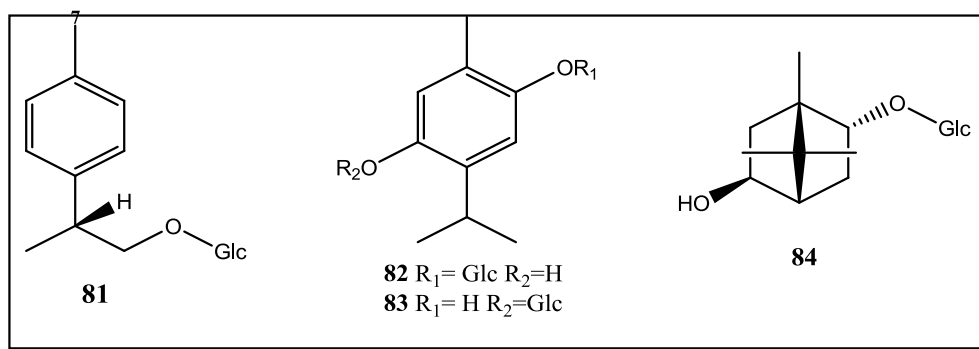
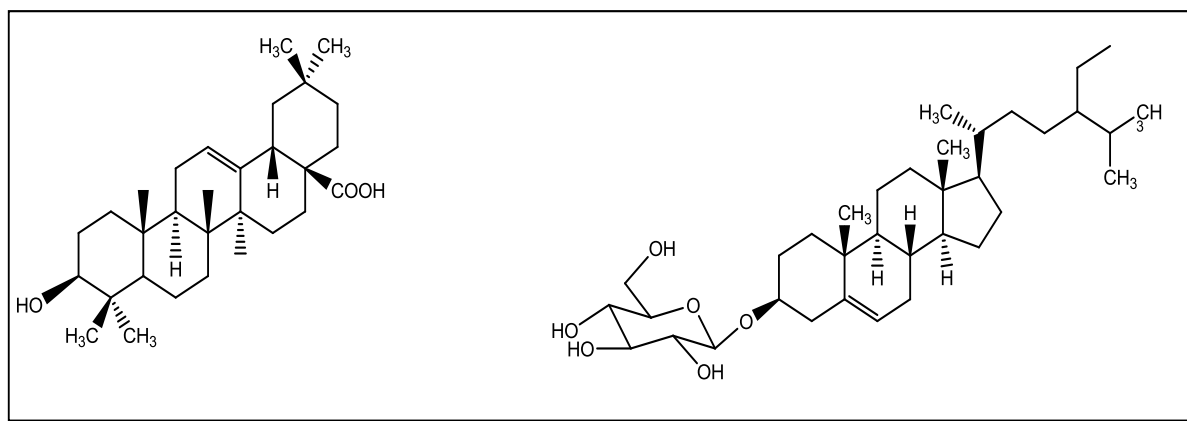
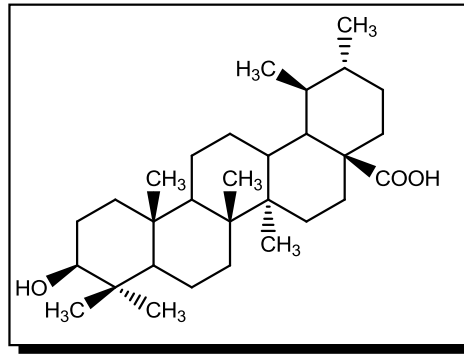


Figure I.4 : Structures des monoterpènes

L'investigation phytochimique de l'extrait méthanolique de *T. serpyllum* a conduit à l'isolement et l'identification de trois triterpènes **85-87** [47].

Acide 3- β -hydroxyolean-12-en-28-oïque **85**3-O- β -D-Glucopyranosyl-sitostérol **86**

Acide dihydro ursolonique **87**

I.3 Espèce *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut.

T. algeriensis est une espèce très répandue dans le nord-africain. Cette plante est endémique à la Libye, Tunisie, Algérie et Maroc [48]. *T. algeriensis* est largement utilisée, fraîche ou sèche, uniquement comme herbe culinaire [48,49].

I.3.1 Description morphologique

Les feuilles florales sont peu différentes des feuilles caulinaires, peu dilatées. Les fleurs sont de 5 à 6 mm. La pelouse est dans toutes les régions montagneuses. La longueur peut dépasser les 10 cm contrairement au serpolet [11].

Thymus algeriensis Boiss. & Reut. est une espèce endémique dotée d'une odeur forte et aromatisante très agréable. Les tiges sont ligneuses et ramifiées, les feuilles sessiles ou courtement pétiolées sont décussées, lancéolées et enroulées sur les bords, avec calice ayant une lèvre supérieure tridentée et une lèvre inférieure à deux divisions étroites et ciliées. La corolle est tubuleuse moins de deux fois plus longue que le calice, avec une lèvre supérieure dressée et une lèvre inférieure à trois lobes subégaux. Ces fleurs (de 5 à 6 mm) sont groupées en épis, de couleur violette, pale (Figure I.5) [50].

Figure I.5 : *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut.

I.3.2 Classification taxonomique [11]

- ❖ Règne : Plantae
- ❖ Sous règne : Tracheobionta
- ❖ Division : Magnoliophyta
- ❖ Classe : Magnoliopsida
- ❖ Sous classe : Astéridae
- ❖ Ordre : Lamiales
- ❖ Famille : Lamiaceae
- ❖ Genre : *Thymus*
- ❖ Espèce : *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut.

I.3.3 Noms populaires de *T. algeriensis*

En Afrique du nord, on trouve des espèces de *Thymus* au Maroc, en Algérie, à Tunisie et en Libye. *T. algeriensis* est le plus commun dans les quatre pays, et ses noms populaires en langues tamazight et arabe dialectal sont : azoukni, djertil, djouchchen, mezouchen, hamriya, hamzoucha, mezoukech, rebba, touchna [51].

I.3.4 Propriétés biologiques des huiles essentielles de *T. algeriensis*

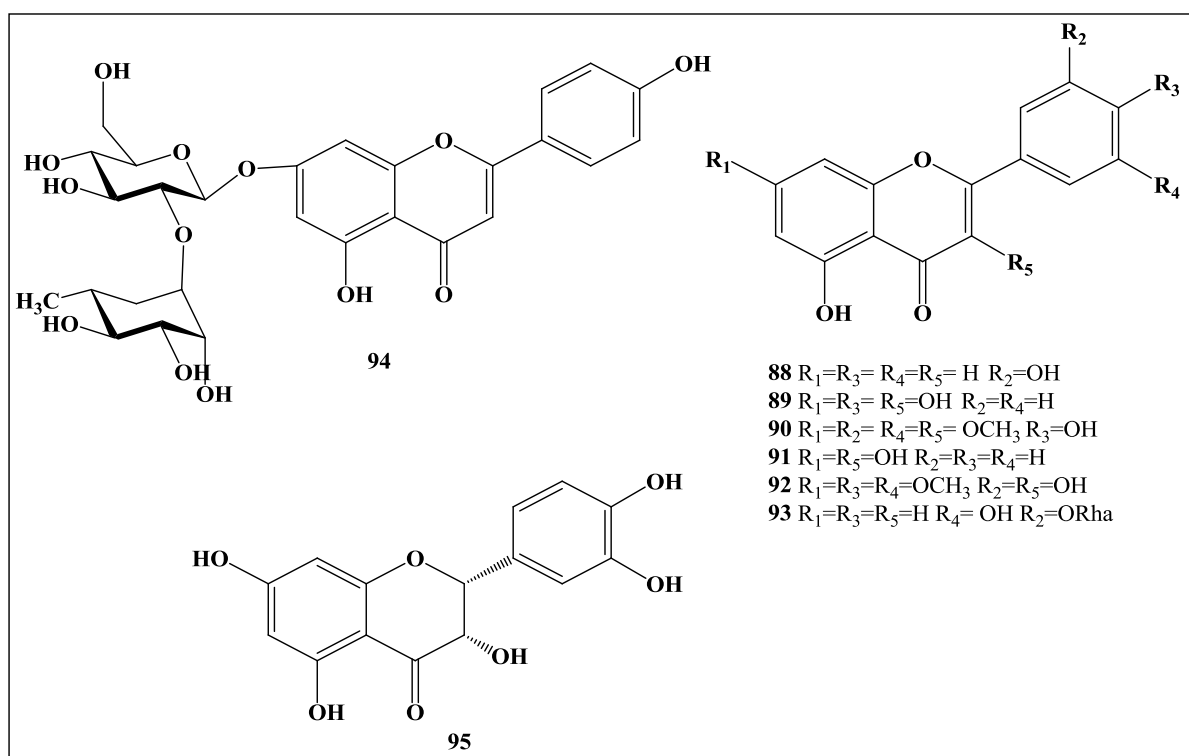
Une étude réalisée sur *T. algeriensis* de la région d'El-Guettfa (M'sila-Algérie) a montré que l'huile essentielle extraite des feuilles de cette plante présente une forte activité d'inhibition contre le cancer du côlon et un inhibiteur modéré du cancer hépatocellulaire tandis que l'activité antioxydante est faible. En outre l'activité antimicrobienne de cette huile est assez importante contre *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* et *Candida glabrata* [52]. De plus, l'huile extraite de la plante *T. algeriensis* poussant au Maroc présente une activité antifongique relativement faible. La même constatation a été rapportée par Giordani et al. (2008) qui ont montré que, parmi les huiles de sept plantes aromatiques et médicinales poussant en Algérie, l'huile essentielle de *T. algeriensis* a présenté la plus faible activité antifongique contre *Candida albicans*. Ceci peut être dû à la présence dans cette l'huile des composants comme l' α -pinène (20,5%), le β -pinène (8,02%) et le limonène (4,85%) reconnus par leurs faibles pouvoirs antimicrobiens [53].

I.3.5 Travaux antérieurs sur l'espèce *T. algeriensis*

Les études phytochimiques réalisées sur la plante *T. algeriensis* ont conduit à l'isolation de plusieurs flavonoïdes (Figure I.6).

Tableau I.4 : Flavonoïdes de l'espèce *Thymus algeriensis*

L'espèce	Composé	Réf
<i>T. algeriensis</i>	Quercétine 74 Rutine 75 Isorhamnétine 77 Chrysine 88 Kaempférol 89 5-3'-dihydroxy-3,7,4',5'-tetraméthoxyflavone 90 Galangine 91 5-desméthyl sinensétine 92 Lutéoline-7-O-rhamnoside 93 Naringine 94 -(-)épicatechine 95	[54]

Figure I.6 : Flavonoïdes de l'espèce *Thymus algeriensis*

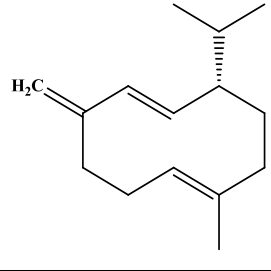
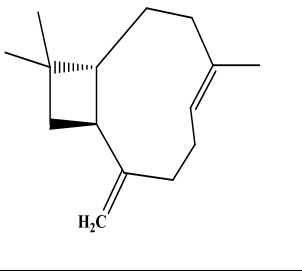
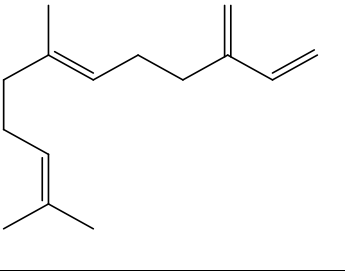
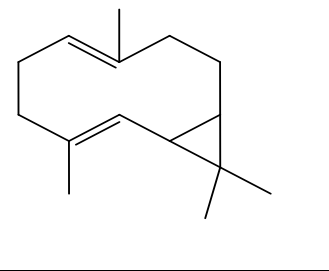
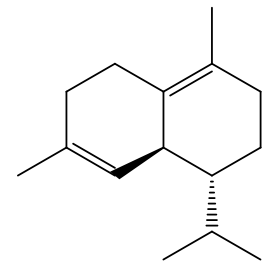
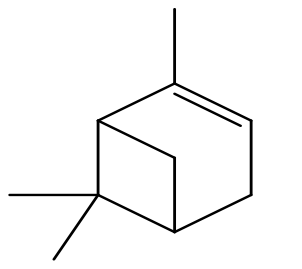
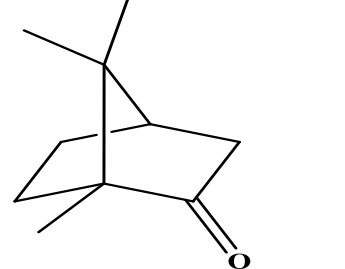
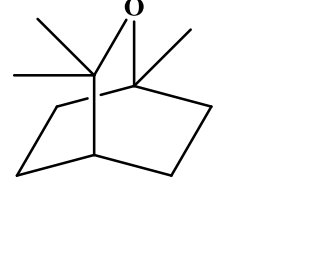
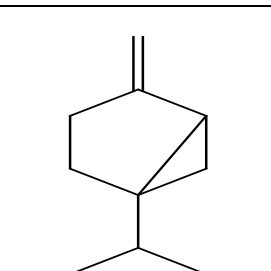
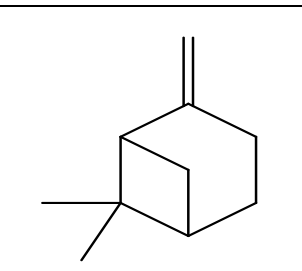
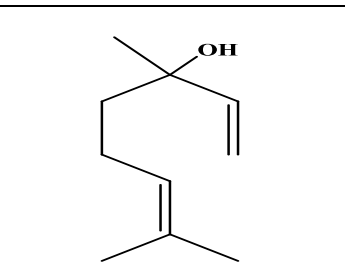
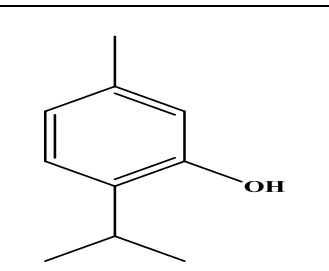
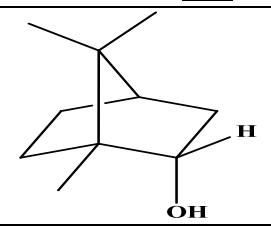
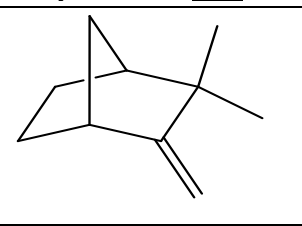
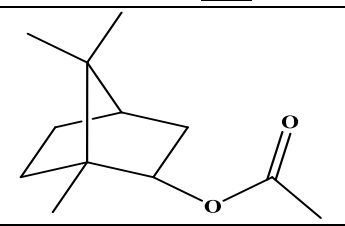
I.3.6 Huiles essentielles

Les huiles essentielles sont des mélanges liquides de composés volatils qui sont généralement collectés par une distillation à la vapeur d'eau des plantes aromatiques. Les huiles essentielles sont reconnues pour leurs bienfaits thérapeutiques, y compris les effets antiviraux, antimicrobiens, anti-inflammatoires et antioxydants [55]. Il est à noter que les huiles essentielles extraites de thym sont utilisées comme agents antiseptiques dans plusieurs domaines pharmaceutiques et comme aromatisants et agents désinfectants pour de nombreux types de produits alimentaires [56].

I.3.6.1 Composition chimique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis*

La composition chimique de nombreuses huiles essentielles varie en fonction de différents facteurs, incluant le stade de développement des plantes, les organes prélevés, la période et la zone géographique de récolte [57]. En effet, les études réalisées sur *T. algeriensis* poussant dans différentes régions, ont montré une variabilité des profils chimiques. Les principaux composés des huiles essentielles de *T. algeriensis* de la région des Aures sont le germacrène D (29,6%) et le β -caryophyllène (11 %). D'autres composés sont également présents mais à des teneurs moins importantes : E- β -farnésène (7,8 %), bicyclogermacrène (4,4%), et δ -cadinène (4%) [58], tandis que les essences de *T. algeriensis* originaire de Khedara et Fatoum Souda (Souk ahras-Algérie) contiennent l' α -pinène (27,14-25,52%), camphre (8,77-8,45%) en plus du 1,8-cinéole (7,69-7,68%), du sabinène (5,25-5,61%) et du β -pinène (2,66-3,12%) [59]. D'autres études ont montré que le linalol (78,8%) et le thymol (62,7%) représentent les principaux constituants des échantillons d'huiles essentielles de *T. algeriensis* achetés auprès de différents herboristes de Blida [58]. 85 composés sont identifiés dans les huiles essentielles extraites de *T. algeriensis* collectées à différentes périodes (avant, pendant et après la floraison) de la région d'El-Guettfa (M'sila-Algérie), dans lesquels la famille des monoterpènes oxygénés forme la partie principale, de 40,56 à 70,66%. Cette huile est dominée par cinq composants principaux : camphre (17,45- 32,56%), bornéol (11,16-22,2%), camphène (7,53-12,86%), 1,8-cinéole (5,16-11,21%) et acétate de bornyle (3,86-7,92%) [53].

Tableau I.5 : Structures des principaux composés des huiles essentielles de *T. algeriensis*

			
Germacrène D <u>96</u>	β-Caryophyllène <u>97</u>	E-β-Farnésène <u>98</u>	Bicyclogermacrène <u>99</u>
			
δ-Cadinène <u>100</u>	α-Pinène <u>101</u>	Camphre <u>102</u>	1,8-Cinéole <u>103</u>
			
Sabinène <u>104</u>	β-Pinène <u>105</u>	Linalol <u>106</u>	Thymol <u>107</u>
			
Bornéol <u>108</u>	Camphène <u>109</u>	Acétate de bornyle <u>110</u>	

CHAPITRE 2
PRÉSENTATION DU
GENRE *DIPLOTALYSIS*

I.5 Famille Brassicaceae

La famille Brassicaceae (Crucifère) ou la famille du chou est une famille de floraison économiquement importante comprenant environ 372 genres et 4060 espèces distribués dans le monde entier [60,61].

Les Crucifères constituent une famille importante de plantes (moutarde, chou, radis, navet, cresson, roquette, wasabi, colza, etc.) qui sont généralement préconisées en alimentation, mais elles sont utilisées en cosmétiques, tinctoriales ainsi qu'en industrie pharmaceutique [62].

Les plantes de cette famille ont été employées comme antidiabétiques, antibactériennes, antifongiques, anticancéreux et antirhumatismales. Elles ont montré également une activité insecticide puissante [63].

I.5.1 Caractères morphologiques

La majorité des espèces de la famille Brassicaceae sont annuelles, bisannuelles ou vivaces, le plus souvent herbacées, mais parfois arbustives. Les inflorescences sont souvent dépourvues de bractées et en panicules ou en corymbes. Les fleurs sont plutôt petites, mais colorées et groupées afin d'attirer les insectes. En dehors de quelques exceptions, elles sont régulières et comportent des cercles à 2 segments : un calice à 4 sépales, une corolle à 4 pétales disposés en croix, un androcée avec 2 étamines courtes et 4 étamines plus longues soit toujours 6 étamines et un pistil supère à 2 carpelles soudés. Le fruit est une silique ou une silicule à déhiscence paraplacentaire, rarement indéhiscente [64].

I.5.2 Usage traditionnel

Les plantes de la famille des brassicacées sont très utilisées en médecine traditionnelle marocaine, elle est utilisées soit par voie externe ou par voie interne [65, 66]:

- ✓ Les feuilles de chou (*Brassica oleracea*) sont utilisées en cataplasme pour soulager les douleurs rénales.
- ✓ Les espèces *Lepidium sativum*, *Brassica nigra* et *Nasturtium officinale* sont utilisées pour le traitement des maladies de l'appareil respiratoire.
- ✓ D'autres espèces comme *Brassica napus*, *B. nigra* et *Erica vesicaria* sont employées par voie interne comme réchauffants.
- ✓ Les feuilles et les tiges d'*Eruca sativa* (jarjir) sont utilisées comme fortifiants, réchauffants et stimulants.

En médecine traditionnelle chinoise, l'espèce *Erysimum cheranthoides* est utilisée pour traiter les maladies cardiaques et aussi pour soulager les fièvres [67].

I.6 Genre *Diplotaxis*

Le genre *Diplotaxis* comprend environ 32 à 34 espèces, distribué de l'Europe centrale à l'Inde et à l'Afrique de l'Ouest. Il y a un intérêt croissant pour les plantes du genre *Diplotaxis*, puisque certaines de ses espèces (*D. tenuifolia* et *D. muralis*) sont cueillies ou cultivées pour la consommation humaine comme salade de roquette, tandis que d'autres sont des mauvaises herbes arables fréquentes (*D. erucoides*) [68].

I.7 Espèce *Diplotaxis erucoides*

Diplotaxis erucoides (L.) DC. (roquette à paroi blanche) est une plante vivace de 5–50 cm de hauteur appartenant à la famille Brassicaceae. Elle est répandue dans de nombreuses zones sablonneuses et calcaires du bassin méditerranéen [69,70].

I.7.1 Description morphologique

C'est une espèce annuelle à fleurs blanches veinées de violet sur les nervures basales. Sa tige de 30 à 50 cm est rameuse dès la base et feuillée. Les pédicelles sont 2-3 fois plus courts que les siliques et les sépales plus courts que le pédicelle. Les graines ovales se rencontrent distinctement sur 2 rangs (Figure I.7) [11].



Figure I.7 : *Diplotaxis erucoides*

I.7.2 Classification taxonomique [11]

- ❖ Règne : Plantae
- ❖ Division : Magnoliophyta
- ❖ Classe : Magnoliopsida
- ❖ Ordre : Brassicales
- ❖ Famille : Brassicaceae
- ❖ Genre : *Diplotaxis*
- ❖ Espèce : *Diplotaxis erucoïdes* (L.) DC.

I.7.3 Utilisation de *Diplotaxis erucoïdes*

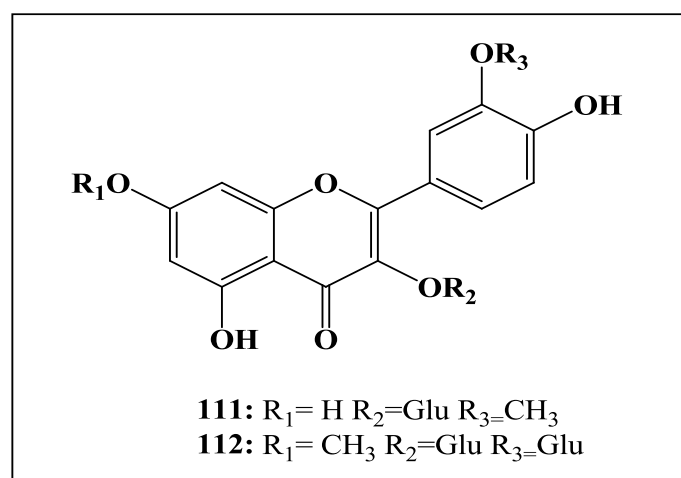
Les feuilles sont utilisées en salade, elles ont un goût de moutarde. Les romains lui trouvaient des vertus aphrodisiaques.

I.8 Etudes chimiques antérieures sur le genre *Diplotaxis*

Quelques travaux phytochimiques effectués sur le genre *Diplotaxis* comportant plusieurs espèces comestibles, ont montré particulièrement la richesse de ce genre en flavonoïdes et glucosinolates.

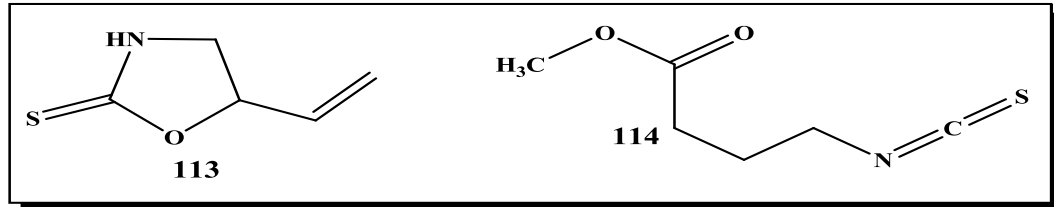
❖ *D. erucoïdes* et *D. virgata*

L'étude de l'extrait *n*-butanolique de deux espèces *D. erucoïdes* et *D. virgata* a abouti à l'identification de deux flavonoïdes : l'isorhamnétine-3-*O*- α -L-glucopyranoside **111** et le rhamnétine-3,3'-di-*O*- β -D-glucopyranoside **112** et plusieurs composés de type glucosinolate. Ces deux composés présentent une activité anti-radicalaire (Test au DPPH) et une activité antibactérienne [69, 70].

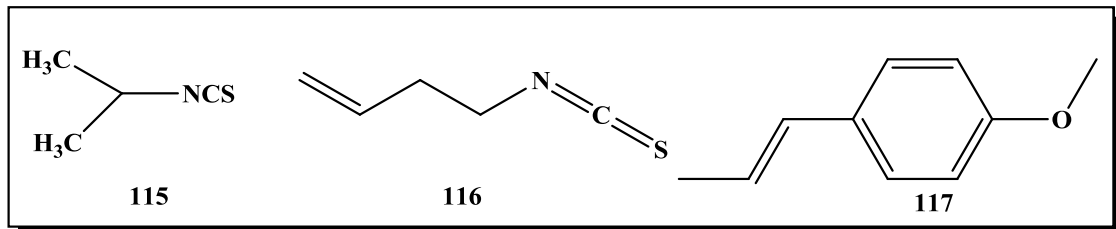


❖ *D. harra*

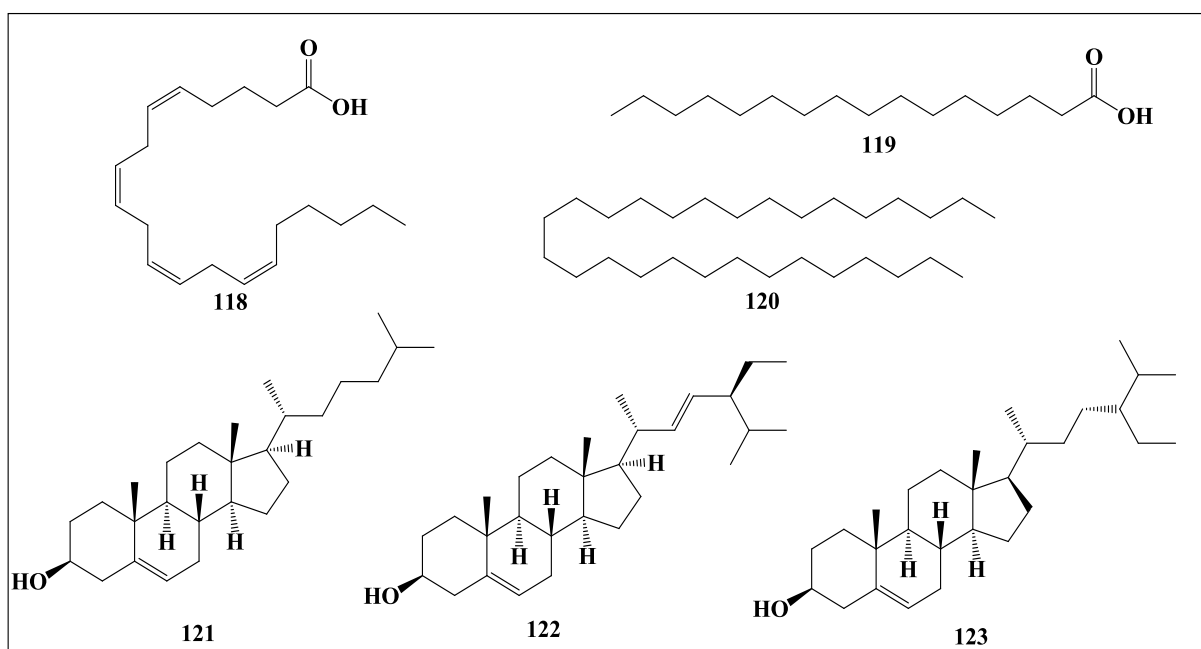
Une étude faite en 1999 sur l'extrait méthanolique de cette plante a conduit à l'identification des glucosinolates suivants : goitrine **113** et le 4-méthylisothiocyanatobutyrate **114** [71].



Dans la même étude, l'analyse des huiles essentielles effectuée sur cette espèce a permis de caractériser d'autres glucosinolates : l'isopropylisothiocyanate **115**, le 3-butényl isothiocyanate **116** et un composé phénolique l'anéthol **117**.

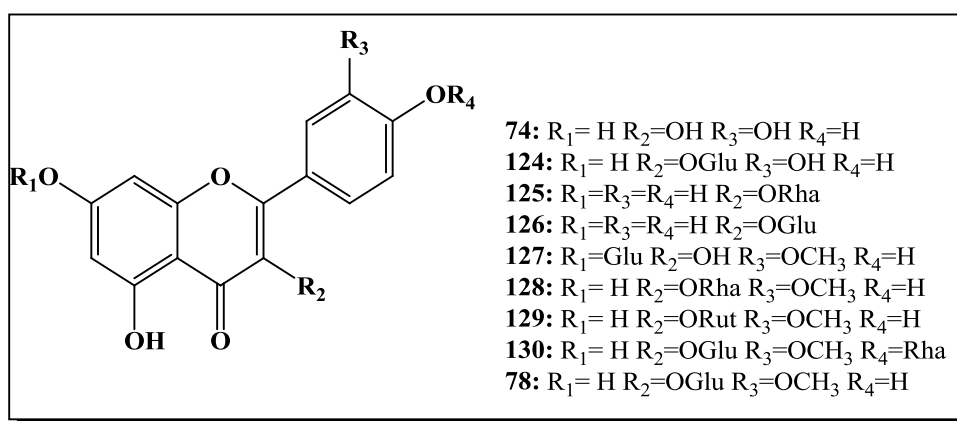


Dans les parties saponifiables et insaponifiables de l'extrait étheropétrolique issue de la même espèce, les composés suivants ont été trouvés : acide arachidonique **118**, acide palmitique **119**, nonacosane **120**, cholestérol **121**, stigmasterol **122** et β -sitostérol **123** [71].

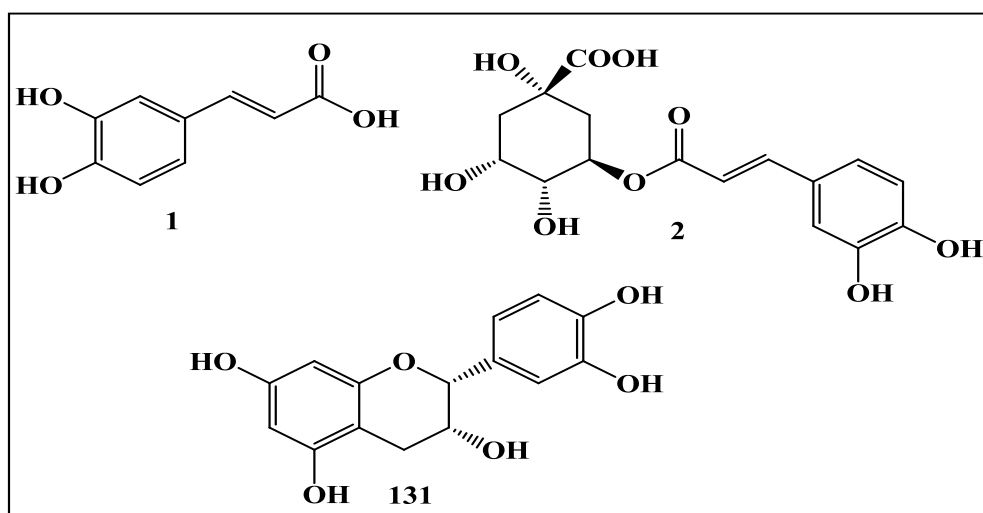


Une activité antibactérienne plus élevée des acides gras libres de la plante *D. harra* contre les bactéries Gram positif et Gram négatif a été observé, tandis que les constituants volatils de cette espèce sont plus actifs contre les levures (activité antifongique).

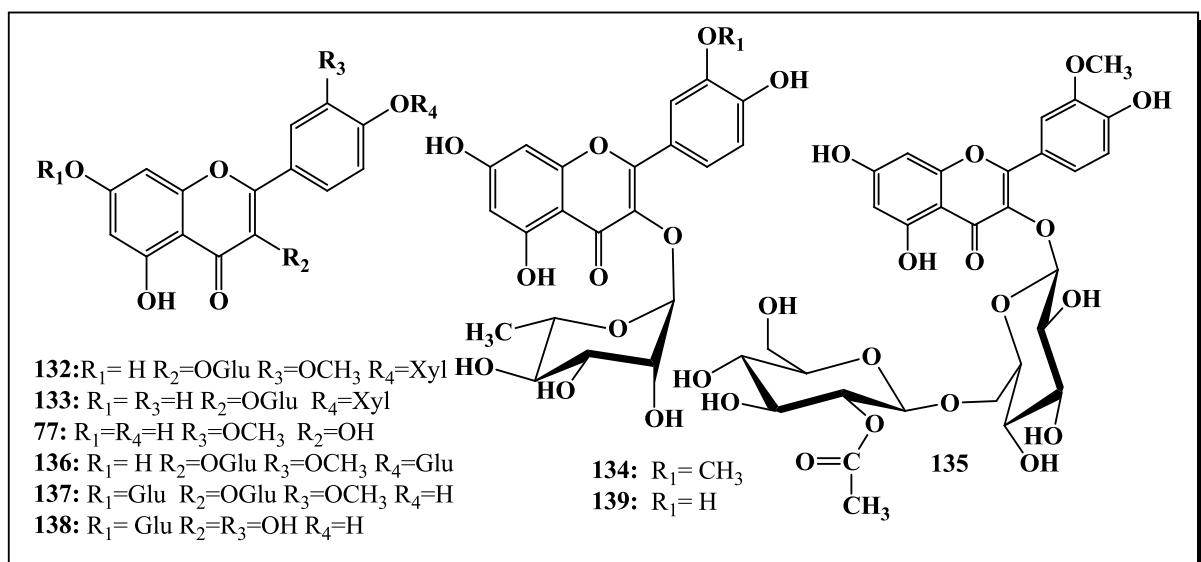
En 2011, deux études chimiques et biologiques effectuées sur l'extrait éthanolique de l'espèce *D. harra* ont mené à l'identification de neuf flavonoïdes nommés quercétine⁷⁴, quercétine-3-*O*- β -glucoside¹²⁴, apigénine-3-*O*- β -rhamnoside¹²⁵, kaempférol-3-*O*- β -glucoside¹²⁶, isorhamnétine-7-*O*- β -glucoside¹²⁷, isorhamnétine-3-rhamnoside¹²⁸, isorhamnétine-3-*O*-rutinoside¹²⁹, isorhamnétine-3-glucosyl-4'-rhamnoside¹³⁰, isorhamnétine-3-*O*- β -glucoside⁷⁸ [72,73].



Une autre étude a été faite en 2013 sur l'extrait méthanolique des feuilles et des fleurs de la plante *D. harra*, a montré la présence de polyphénols. En effet, l'analyse HPLC a permis d'identifier deux composés phénoliques : l'acide caféique **1** et l'acide chlorogénique **2** et un flavonoïde : l'épicatéchine **131**. Cet extrait est doté d'une activité antioxydante importante et une activité antimicrobienne moyenne grâce à la présence de ces polyphénols [74].



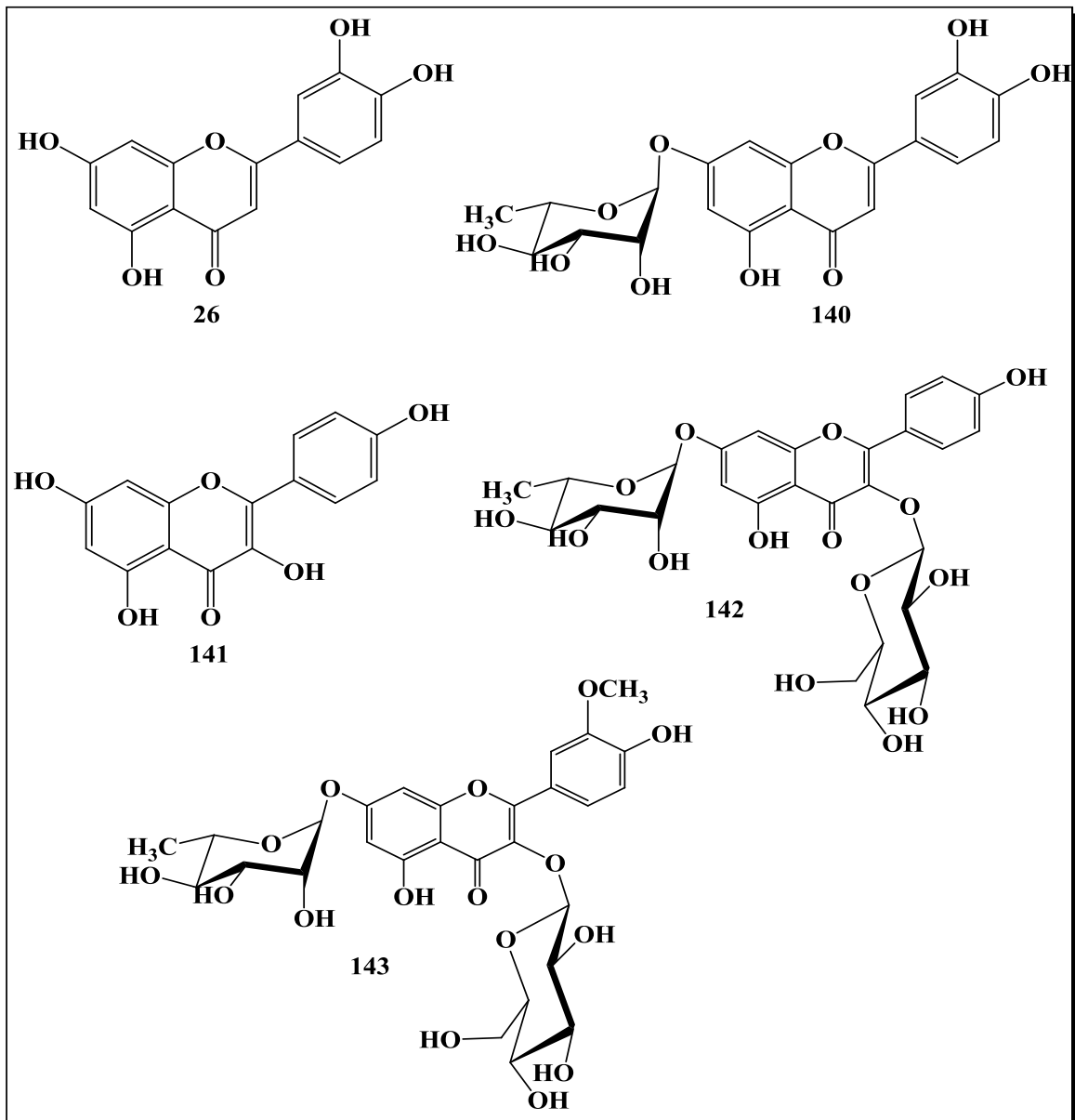
Dans la même année, Kassem et ses collaborateurs [75] ont réalisé une étude phytochimique sur l'extrait méthanolique de la plante entière *D. harra*. Cette étude a conduit à la mise en évidence de deux nouveaux flavonoïdes : l'isorhamnétine-3-*O*- β -glucopyranoside-4'-*O*- β -xylopiranoside **132** et le kaempférol-3-*O*- β -glucopyranoside-4'-*O*- β -xylopiranoside **133** et douze autres connus: l'isorhamnétine **77**, l'isorhamnétine-3-*O*- α -rhamnoside **134**, l'isorhamnétine-3-*O*-[2'''-*O*-acétyl- β -glucopyranosyl(1-6)- β -glucopyranoside **135**, l'isorhamnétine-3,4'-di-*O*- β -glucoside **136**, l'isorhamnétine-3,7-di-*O*- β -glucoside **137**, la quercétine-7-*O*- β -glucoside **138**, la quercétine-3-*O*- α -rhamnoside **139**, l'isorhamnétine-3-*O*- β -glucoside **78**, la quercétine **74**, la quercétine-3-*O*- β -glucoside **124**, le kaempférol-3-*O*- β -glucoside **126**, l'isorhamnétine-7-*O*- β -glucoside **127**. Ces quatorze flavonoïdes possèdent une activité antivirale [75].



En 2017, une autre étude sur l'extrait méthanolique de la plante *D. harra* a montré la présence du flavonoïde : l'isorhamnétine-3,7-di-*O*- β -glucoside **137**. Ce dernier présente une activité cytotoxique contre les cellules inflammatoires et cancéreuses de l'intestin [76].

❖ *D. acris*

L'investigation phytochimique menée sur les parties aériennes de l'espèce *D. acris* a permis d'identifier 11 flavonoïdes : lutéoline **26**, lutéoline 7-*O*- α -rhamnopyranoside **140**, kaempférol **141**, kaempférol 3-*O*- β -glucopyranoside **126**, kaempférol 3-*O*- β -glucopyranoside-7-*O*- α -rhamnopyranoside **142**, quercétine **74**, quercétine 3-*O*- β -glucopyranoside **124**, quercétine 7-*O*- β -glucopyranoside **138**, isorhamnétine **77**, isorhamnétine 3-*O*- β -glucopyranoside **78** et isorhamnétine 3-*O*- β -glucopyranoside-7-*O*- α -rhamnopyranoside **143** [77].



CHAPITRE 3
GÉNÉRALITÉS SUR LES COMPOSÉS
PHÉNOLIQUES, LES TERPÈNES ET
LES MONOGLYCÉRIDES

I.9 Polyphénols

I.9.1 Généralité

Les polyphénols ou « Les composés phénoliques » sont des composés aromatiques portant plus qu'une fonction hydroxyle sur un noyau benzénique. Ils sont largement répandus dans tous les végétaux. Les chercheurs ont pu identifier plus de 8000 polyphénols [78], divisés en diverses classes chimiques, allant de simples molécules par exemple les acides phénoliques à des composés complexes comme les tanins [79].

I.9.2 Classification des polyphénols

Les composés phénoliques sont regroupés en deux grandes classes selon leur squelette carboné de base : les non flavonoïdes et les flavonoïdes.

I.9.2.1 Non flavonoïdes

Ce groupe contient de nombreux composés parmi lesquels on décèle les acides phénoliques, les lignanes, les stilbènes, les coumarines et les xanthones.

I.9.2.1.1 Acides phénoliques simples

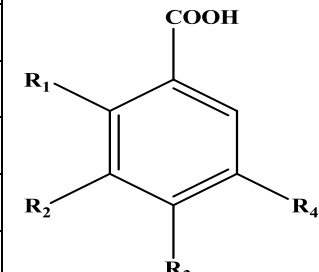
Les acides phénoliques font partie des métabolites secondaires les plus simples, dont le squelette est basé sur le C6-C1 et au maximum C6-C3. Deux importantes classes ont été distinguées : les acides hydroxybenzoïques et les acides hydroxycinnamiques [79].

❖ Acides hydroxybenzoïques

Ce sont des dérivés de l'acide benzoïque avec un squelette carboné C6-C1 portant au moins une fonction acide et un hydroxyle. Le tableau I.6 mentionne les principaux représentants de ce groupe [80].

Tableau I.6 : Structure chimique des principaux acides hydroxybenzoïques

R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Acides phénoliques
H	H	H	H	Acide benzoïque
H	H	OH	H	Acide hydroxy benzoïque
H	OH	OH	H	Acide protocatéchique
H	OCH ₃	OH	H	Acide vanillique
H	OH	OH	OH	Acide gallique
H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide syringique
OH	H	H	H	Acide salicylique
OH	H	H	OH	Acide gentisique



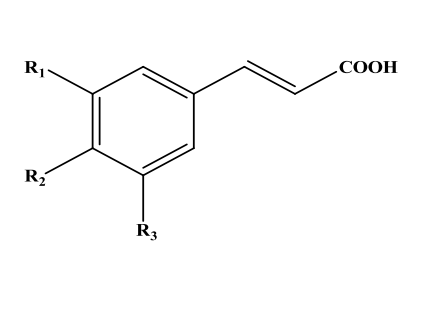
❖ Acides hydroxycinnamiques

Ce sont des dérivés de l'acide cinnamique, leur structure de base est de type (C6-C3), constituée d'un noyau benzénique porteur d'un ou plusieurs hydroxyles et d'une chaîne aliphatique à 3 carbones.

On les trouve à l'état libre ou combiné (esters, amide, glucosides), ils acylent fréquemment les métabolites les plus divers [81]. Les acides les plus fréquents dans l'alimentation sont l'acide férulique, l'acide caféique ensuite l'acide *p*-coumarique et l'acide sinapique (Tableau I.7) [82].

Tableau I.7 : Structure chimique des principaux acides hydroxycinnamiques [80]

R ₁	R ₂	R ₃	Acides phénoliques
H	H	H	Acide cinnamique
H	OH	H	Acide <i>p</i> -coumarique
OH	OH	H	Acide caféique
OCH ₃	OH	H	Acide férulique
OCH ₃	OH	OCH ₃	Acide sinapique



I.9.2.1.2 Biosynthèse des phénols simples et des acides phénols

L'origine biosynthétique des composés phénoliques des végétaux est la voie shikimate, elle est la plus importante [83].

La condensation de l'acide shikimique avec une nouvelle molécule de PEP (acide phosphoénolpyruvique) conduit à la formation de l'acide chorismique qui est réarrangé en acide préphénique (Figure I.8).

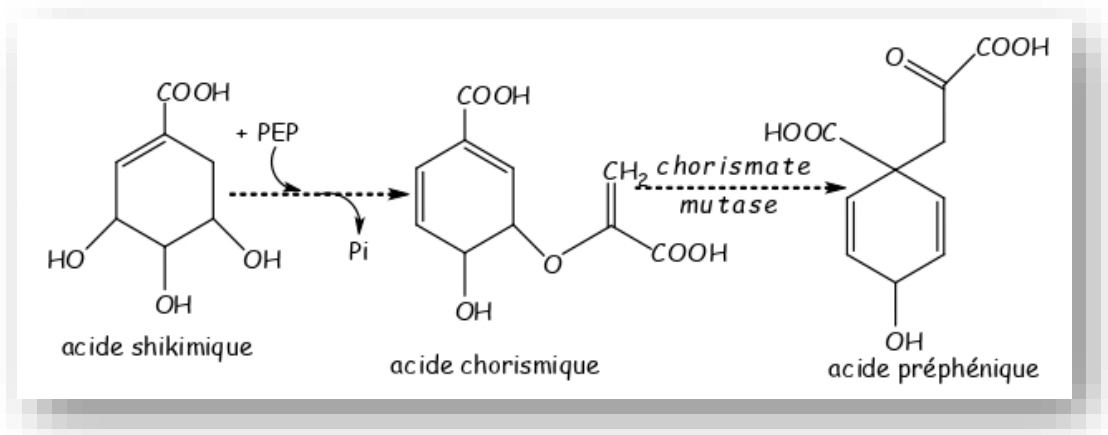


Figure I.8 : Biosynthèse de l'acide préphénique

La décarboxylation et la déshydratation de l'acide préphénique est à l'origine de l'acide phénylpyruvique. Selon les groupes de végétaux, le mode de formation de la tyrosine et de la phénylalanine à partir de cet acide change et fait appel à la transamination (Figure II.9).

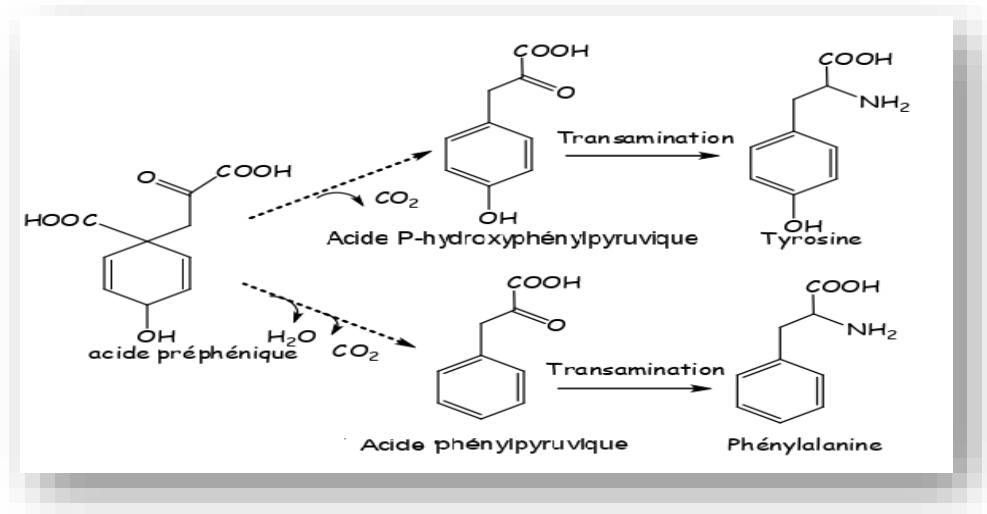


Figure II.9 : Biosynthèse de la tyrosine et de la phénylalanine

La désamination de la phénylalanine donne l'acide cinnamique qui est à l'origine de la plupart des composés aromatiques (acide benzoïques, acétophénones, lignanes, lignines et coumarines) [83].

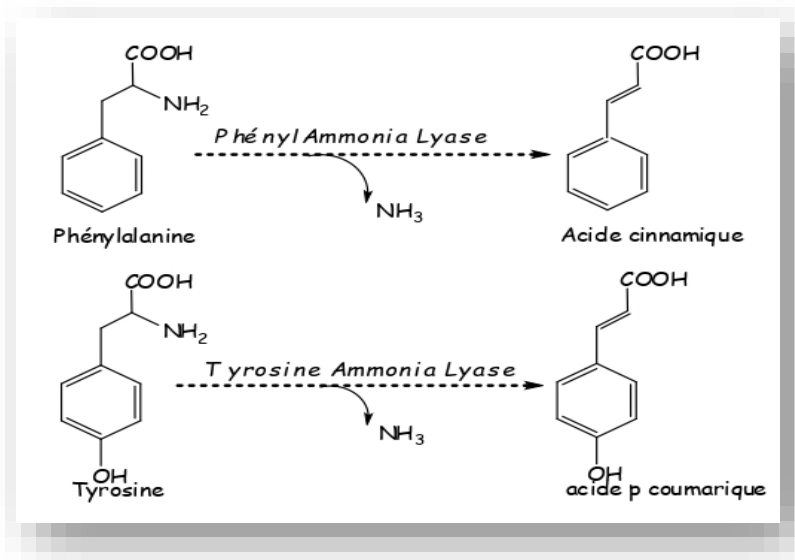


Figure II.10 : Biosynthèse de l'acide cinnamique

La dégradation de la chaîne latérale des acides cinnamiques conduit aux composés de type C6-C1 (dérivés de l'acide benzoïque). La décarboxylation de ces acides permet d'obtenir les composés phénoliques simples (Figure I.11) [81].

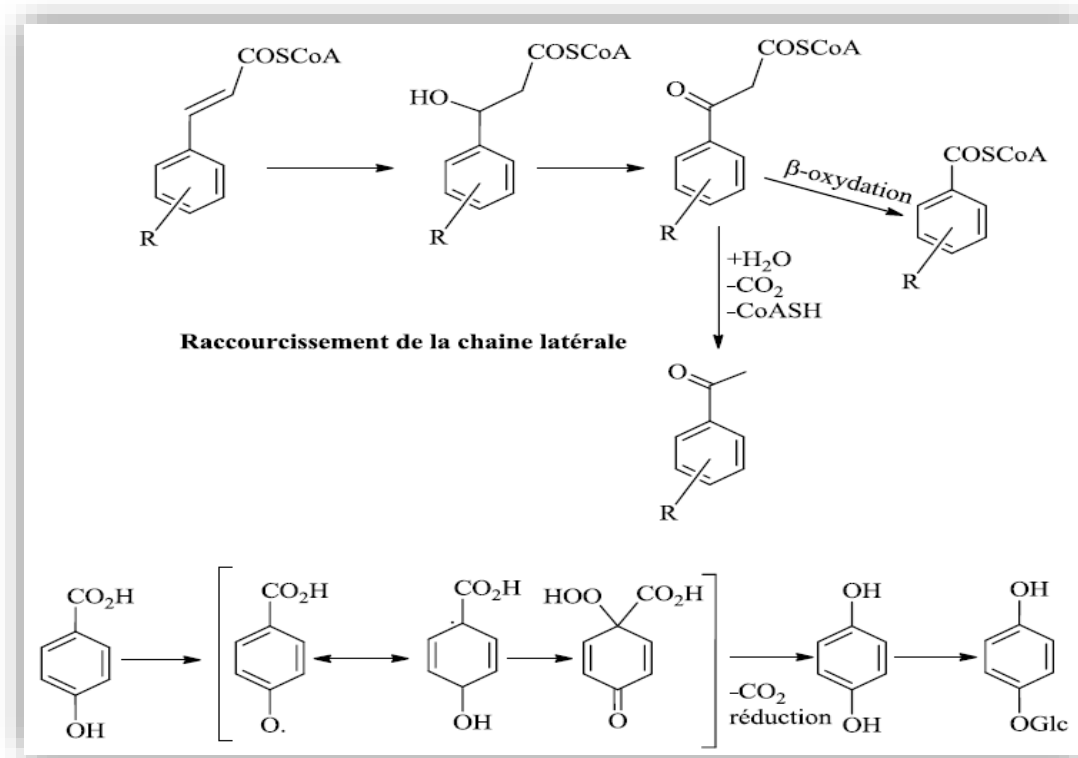


Figure I.11 : Biogénèse des phénols simples et acides phénols

I.9.2.2 Flavonoïdes

Les flavonoïdes constituent un groupe amplement répandu dans le règne végétal. On dénombre environ 6000 composés naturels qui sont quasiment universels chez les plantes vasculaires et leur nombre ne cesse d'accroître [84]. Ce sont des pigments responsables des couleurs jaune, orange, et rouge des fruits et des fleurs [85]. Ils possèdent tous le même élément structural de base à 15 atomes de carbones nommé diphenylpropane (C6-C3-C6), constitué de 2 unités aromatiques reliés par une chaîne en 3 carbones (Figure I.12) [86].

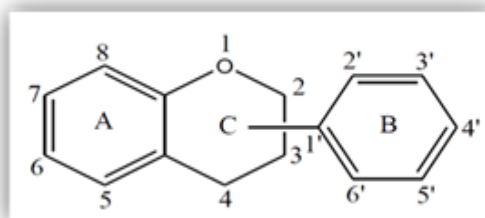


Figure I.12 : Structure de base des flavonoïdes

I.9.2.2.1 Classification

La structure de l'hétérocycle central C permet de distinguer les principales sous-classes des flavonoïdes : les flavanones, les flavones, les flavonols, les isoflavones, les flavanols et les anthocyanes (Figure I.13) [78].

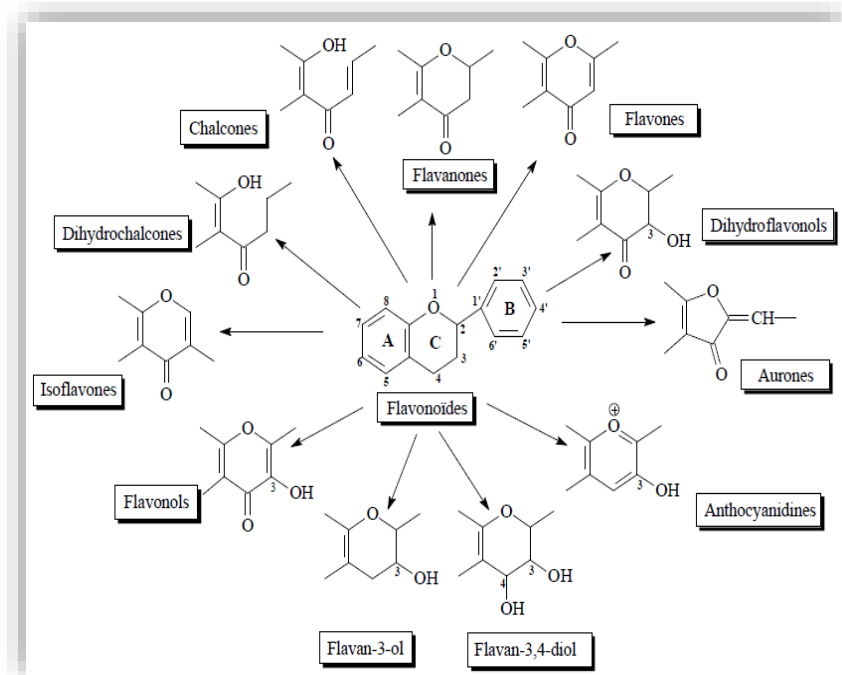


Figure I.13 : Représentation des principales classes et sous-groupes des flavonoïdes au niveau de l'hétérocycle C

❖ Flavanones

Ces molécules sont caractérisées par la présence d'un centre d'asymétrie en position 2 et par l'absence de la double liaison entre le C2 et le C3 (Figure I.14). Dans les flavanones naturelles, le carbone 2 est généralement de configuration S. Elles existent sous forme libre ou sous forme glycosylée [78].

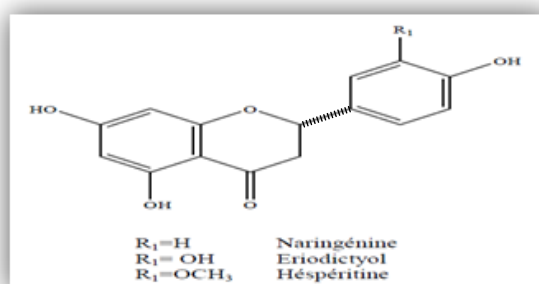


Figure I.14 : Structure chimique des principales flavanones

Les principales sources des flavanones sont les plantes aromatiques (notamment la menthe), la tomate ainsi que les agrumes (oranges amères, pamplemousses, citrons, mandarines, clémentines et oranges douces). Parmi les formes libres les plus répandues des flavanones, on cite la naringénine, on la trouve dans le pamplemousse et l'orange amère. Le plus souvent, les flavanones existent sous forme glycosylée en position 7, tel que

l'hespéridine, qui est rencontrée dans le citron, l'orange douce et la mandarine, et les néohesperidosides qui sont responsables du goût amer du pamplemousse et de l'orange [87].

❖ Flavan-3-ols ou flavanols

Les flavan-3-ols sont hydroxylés en C3. Ils se caractérisent par l'absence du groupe carboxyle en C4 de l'hétérocycle C et se distinguent suivant les substitutions par des hydroxyles sur les cycles A et B (Figure I.15) [88].

Les flavan-3-ols sont très présents dans les fruits comme les raisins, les abricots, les bananes, les cerises, les pêches ... etc [89].

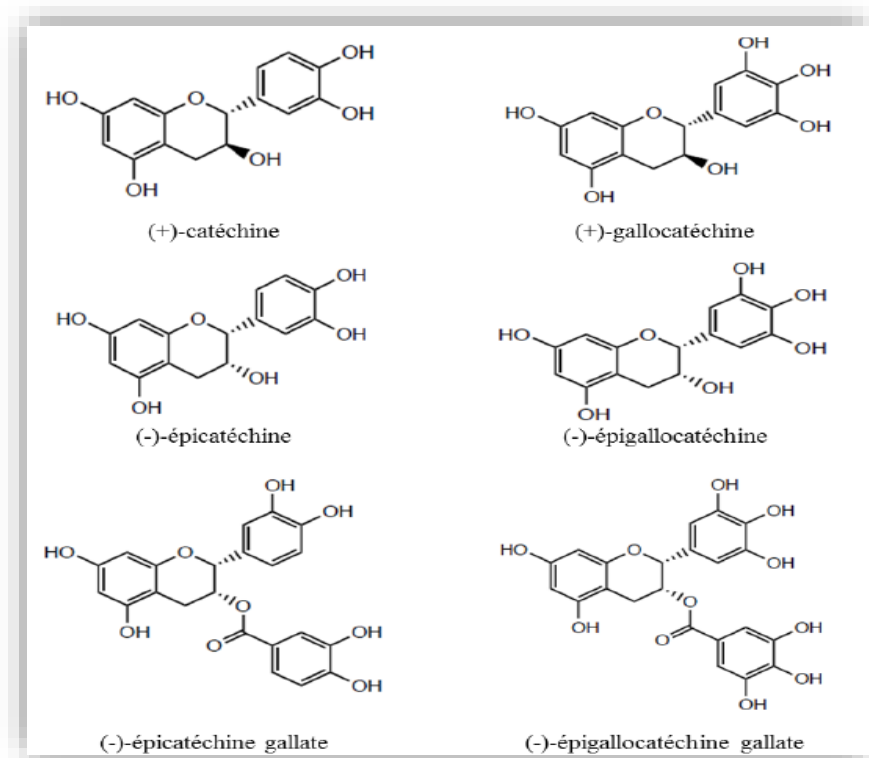


Figure I.15 : Structures des monomères communs de flavanols

❖ Flavones et flavonols

Les flavonols (Figure I.16) et les flavones (Figure I.17) ont en commun une double liaison entre le C2 et le C3 et une fonction carbonyle (C=O) en C4 sur l'hétérocycle central C du squelette de base. Les flavonols sont en outre hydroxylés en position C3.

Les flavonols sont les flavonoïdes les plus répandus dans le règne végétal, leur coloration varie du blanc au jaune, ils sont particulièrement représentés par la quercétine, la myricétine et le kaempférol. Les flavonols qui s'accumulent dans les tissus des végétaux sont pratiquement sous la forme glycosylé [89].

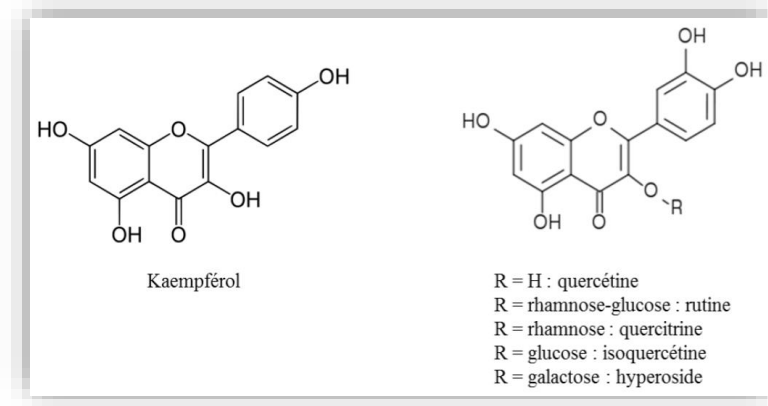


Figure I.16 : Représentation des structures chimiques principales des flavonols

Les flavones (Figure I.17) sont particulièrement représentées dans l'alimentation par l'apigénine et la lutéoline. Contrairement aux flavonols, elles sont moins répandues dans les fruits et les légumes. Par conséquent, leur apport alimentaire est très faible [89].

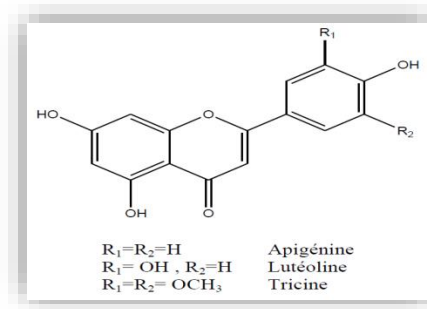


Figure I.17 : Représentation des structures chimiques principales des flavones

I.9.2.2.2 Biosynthèse des flavonoïdes

Les composés de départ sont la 3-malonyl-CoA et le *p*-coumaroyl-CoA. C'est l'acétyl-CoA carboxylase qui conduit au malonyl-CoA où trois molécules de cette dernière et une molécule de *p*-coumaroyl-CoA produisent à l'aide de la chalcone synthase, la structure de base en C-15 sous forme d'une chalcone soit la 4,2',4',6'-tetrahydroxychalcone [90-92]. Cette chalcone est l'intermédiaire caractéristique de la biosynthèse des divers flavonoïdes. Elle est métabolisée sous l'action de la chalcone isomérase en flavanone naringénine. Cette dernière, réagit avec la flavone synthase ou la (2S)-flavanone-3-hydroxylase pour donner les flavones, apigénine, dihydroflavonol et (2R-3R) dihydrokaempférol, respectivement.

- ✓ Les deux enzymes mentionnées ci-dessus fonctionnent différemment, la première introduit la double liaison entre les deux carbones C₂ et C₃ tandis que la seconde catalyse l'hydroxylation du carbone en position C₃ ;

- ✓ Le dihydroflavonol, en présence de la flavonol synthase ou la dihydroflavonol-4-réductase, se métabolise en flavonol, kaempférol, flavane-3,4-diol et en leucoanthocyanidol [93,94].

Toutes ces étapes sont reportées dans la figure I.18

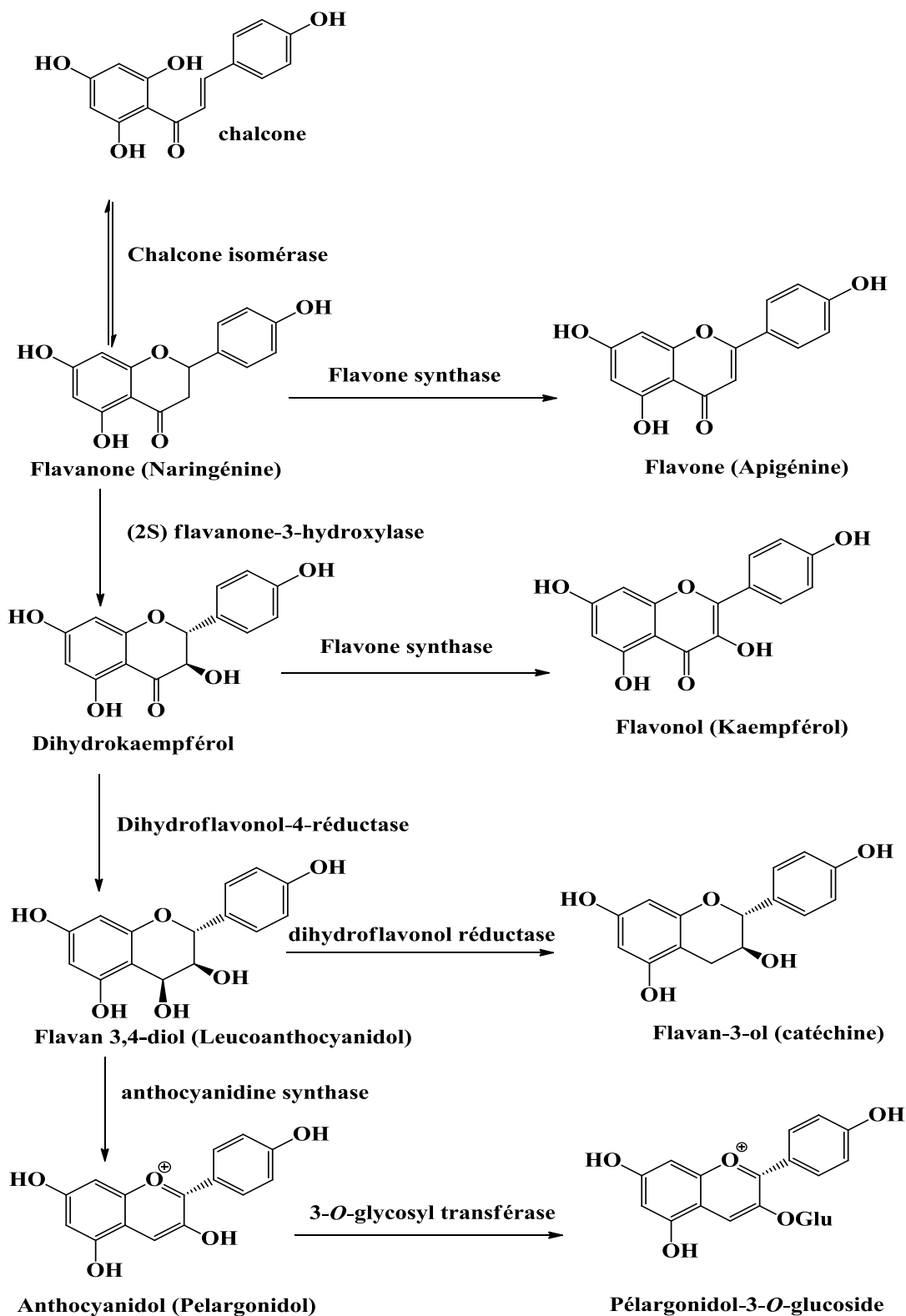


Figure I.18 : Biosynthèse des flavonoïdes

I.9.3 Propriétés biologiques

❖ Polyphénols

Les polyphénols fournissent aux cellules de l'organisme humain une protection contre les méfaits causés par le vieillissement ou l'exposition prolongée à des éléments tels que les rayons UV du soleil et les infections, ceci est dû à leurs activités antioxydantes remarquables. Suite aux résultats de quelques études, les polyphénols seraient impliqués dans la prévention des maladies cardiovasculaires et peut-être dans d'autres pathologies telles que les maladies neurodégénératives, l'ostéoporose, le diabète, et les cancers. Ces composés sont ainsi devenus en quelques années les molécules préférées des nutritionnistes, des épidémiologistes, des industriels de l'agroalimentaire et des laboratoires pharmaceutiques et cosmétiques [95].

❖ Flavonoïdes

Les flavonoïdes montrent plusieurs activités : anti-inflammatoires, antioxydantes, inhibitrices d'enzymes, et prévention des maladies cardiovasculaires. Pharmacologiquement, les aglycones sont particulièrement plus efficaces par rapport aux hétérosides.

Certains ont des activités hépatoprotectrices, diurétiques, vasodilatatrices, antibactériennes, chimoprotectrices, anti-inflammatoires, antidiabétiques, inhibitrices de l'aldolase réductase et antiallergiques [96-98].

La majorité des activités biologiques des flavonoïdes est due à leur pouvoir antioxydant et chélateur. Plusieurs études ont montré qu'un régime alimentaire riche en flavonoïdes peut avoir des effets bénéfiques sur la santé. Grâce à leur capacité à inhiber l'oxydation des LDL, les flavonoïdes ont révélé des effets cardioprotecteurs importants [99, 100].

Une autre étude a montré qu'un apport élevé en flavonoïdes peut diminuer la mortalité causée par les maladies coronariennes et abaisse les risques de ces maladies de 38% chez les femmes ménopausées [101].

Une étude réalisée sur 806 hommes âgés, a démontré qu'il y a une relation inverse entre la consommation de catéchine, un flavonoïde prédominant dans le thé, et la mortalité par les maladies cardiaques [102].

I.10 Composés terpéniques

I.10.1 Définition

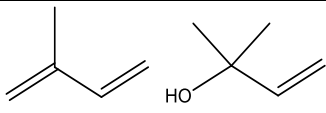
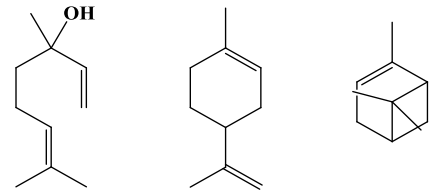
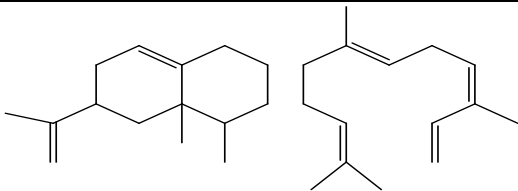
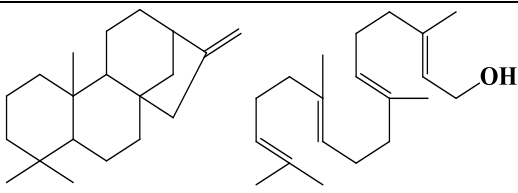
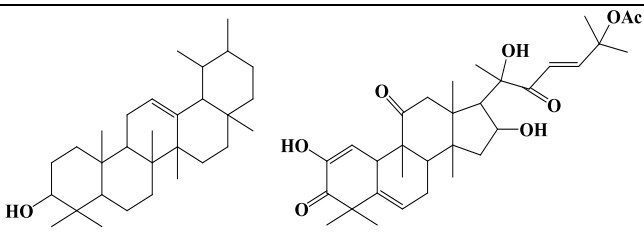
Les terpènes forment un groupe de produits naturels très diversifiés largement représenté et d'un intérêt chimique considérable. Ils constituent le principe odoriférant des végétaux. Cette odeur est due à la libération des molécules très volatiles contenant 10, 15 et 20 atomes

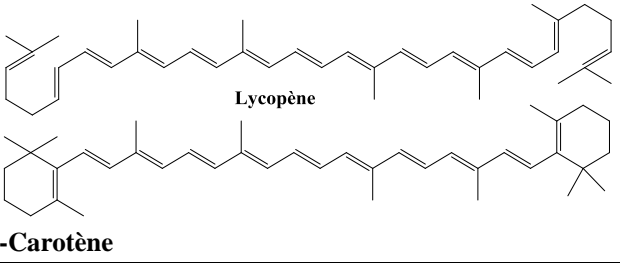
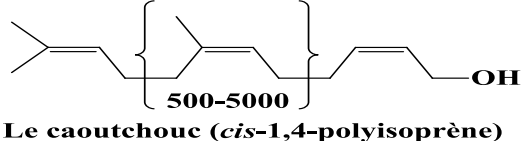
de carbone. Extraites, ces molécules sont utilisées comme épice (girofle) ou comme parfum (rose, lavande). Ils ont un caractère commun, formés d'unités isopréniques (C_5H_8). Ils sont formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2-méthyl butadiène, appelées unités isopréniques $(C_5H_8)_n$. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des anneaux. De ce fait, une classification rationnelle basée sur ce nombre qu'ils renferment, est possible [103,104].

I.10.2 Classification

Les terpénoïdes sont classés selon le nombre d'unités isoprène dans leur structure de base comme illustré par le tableau I.8 [105].

Tableau I.8 : Classification des terpènes

Classe	Formule brute	N° d'isoprène	Exemples
Hémiterpènes	C_5H_8	1	 Isoprène Méthylbutenol
Monoterpènes	$C_{10}H_{16}$	2	 Linalool Limonène α -Pinène
Sesquiterpènes	$C_{15}H_{24}$	3	 5-epi-Aristolochène α -Farnésène
Diterpènes	$C_{20}H_{32}$	4	 Kaurène Géranylgéranol
Triterpènes	$C_{30}H_{48}$	6	 α -Amyrine Cucurbitacine-E

Tétraterpènes	$C_{40}H_{64}$	8	 <p>Lycopène</p> <p>β-Carotène</p>
Polyterpènes	$(C_5H_8)_n$	45-30000	 <p>500-5000</p> <p>Le caoutchouc (<i>cis</i>-1,4-polyisoprène)</p>

❖ Monoterpènes

Ils sont constitués par 10 atomes de carbone, et sont issus du couplage de deux unités isopréniques « tête à queue ». Ils peuvent être linéaires, monocycliques ou bicycliques (Figure I.19). Ils sont volatils, entraînés à la vapeur d'eau, d'odeur souvent agréable et représentent la majorité des constituants des huiles essentielles [106].

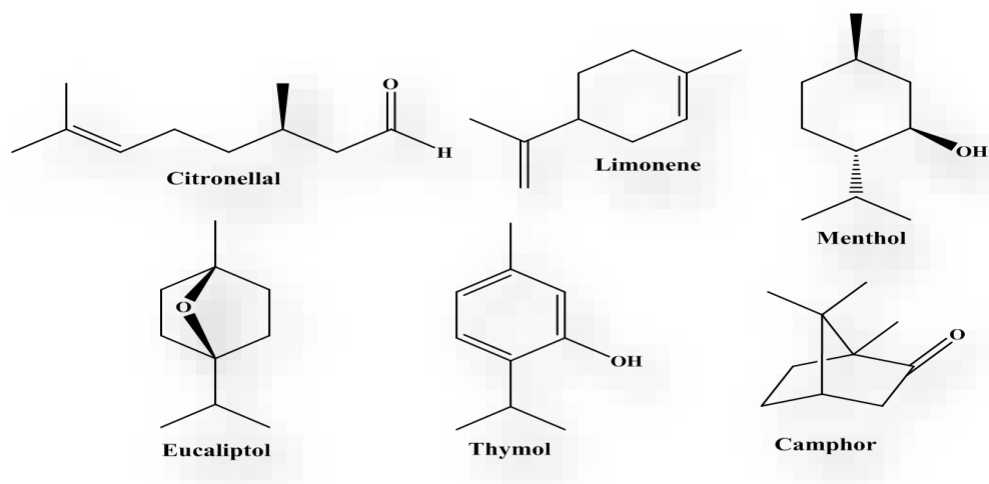


Figure I.19 : Exemples de quelques monoterpènes

❖ Triterpènes

Les triterpènes constituent une partie importante des substances lipidiques de toutes les plantes ; plus de 4000 triterpénoïdes ont été isolés [107]. Ce sont des molécules composées de 30 atomes de carbone construits à partir de plusieurs entités isopréniques, et sont issus de la cyclisation de l'époxysqualène et parfois directement du squalène [108,109]. Les structures des triterpènes et des stéroïdes (Figure I.20) peuvent être subdivisées en environ 40 types principaux [107].

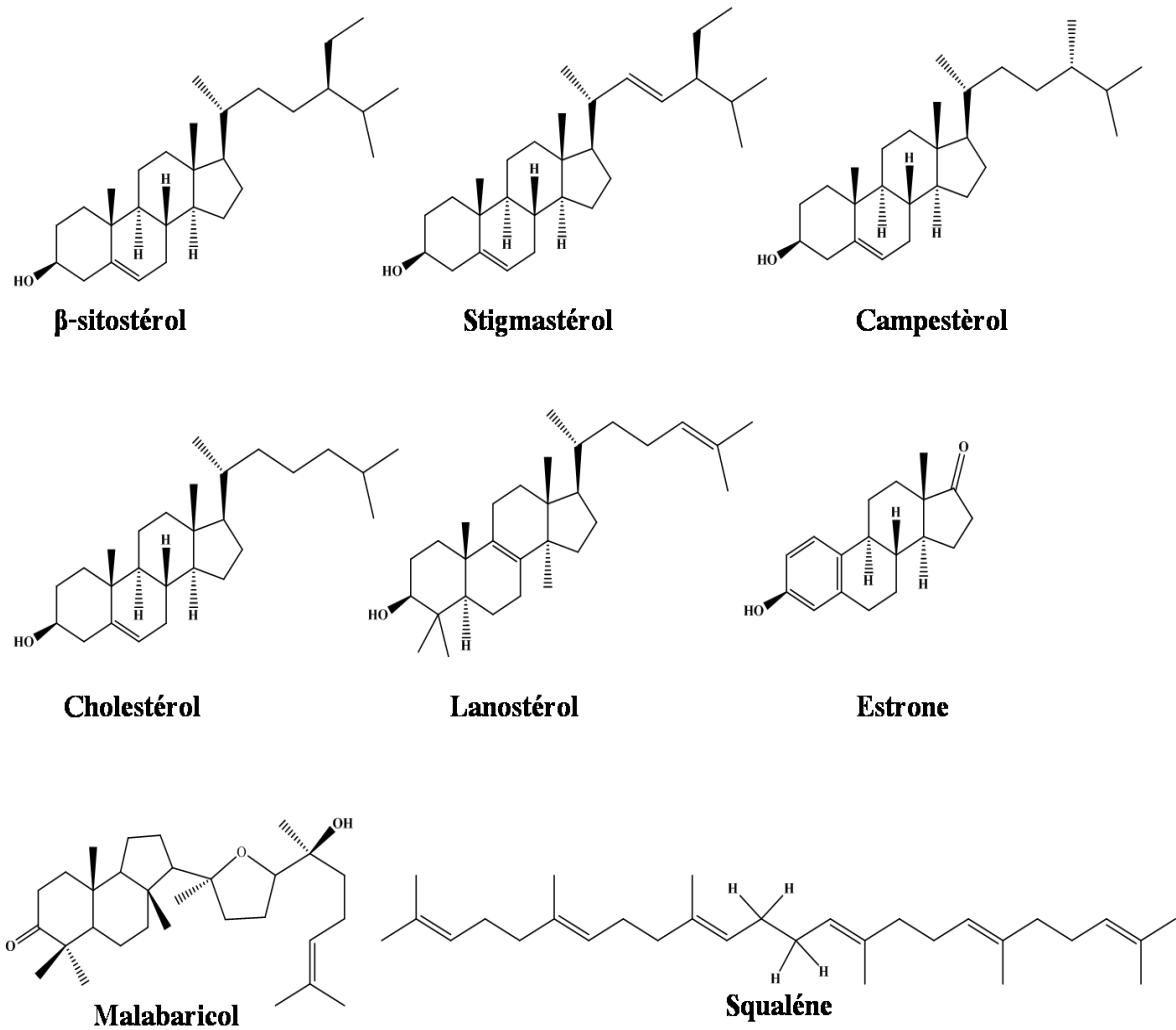


Figure I.20 : Exemples de quelques triterpènes et stéroïdes [107]

I.10.3 Biosynthèse des triterpènes

Les triterpènes sont produits à partir du squalène, qui est formé par la condensation de deux unités farnésyl de pyrophosphate (FPP) qui sont produite par la condensation d'unités isopréniques par la voie mévalonique (Figure I.21).

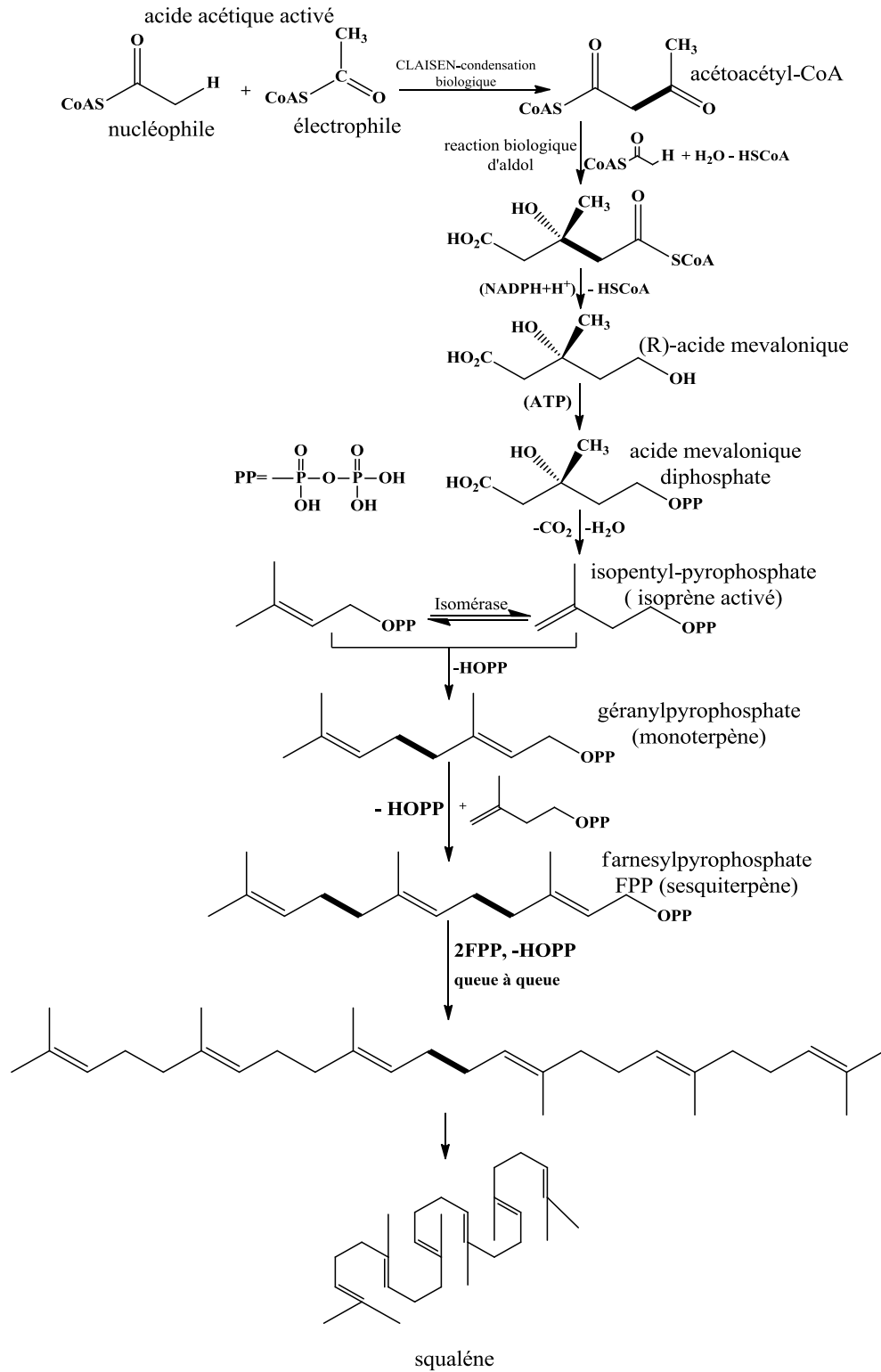


Figure I.21 : Schéma de la biogenèse du squalène [110]

Le squalène est ensuite converti en 2,3-squalène époxyde (Figure II.22) par une squalène époxydase, puis est cyclisé grâce à une oxydosqualènecyclase pour donner les différentes classes de triterpénoïdes.

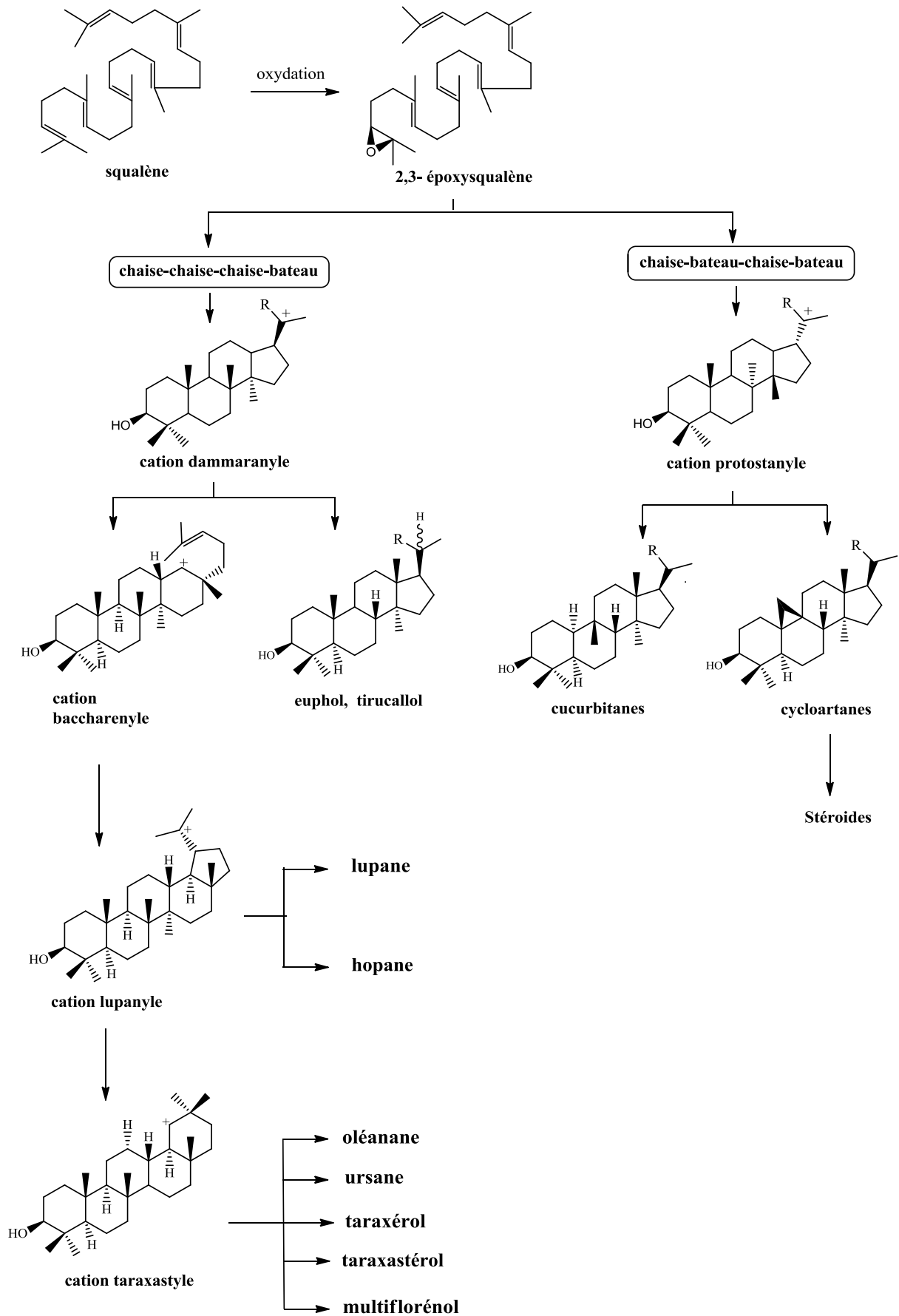


Figure I.22 : Différents squelettes de triterpénoïdes

I.11 Glycérides

I.11.1 Définition

Les glycérides sont des esters lipidiques de la molécule de glycérol et des acides gras. Leur fonction principale est le stockage de l'énergie. En raison de sa structure et de ses propriétés, le glycérol participe à la formulation ou à la synthèse de nombreux composés tels que les produits alimentaires, cosmétiques, produits pharmaceutiques et détergents liquides [111].

I.11.2 Types de glycérides

Les glycérides peuvent être subdivisés en deux catégories :

- ❖ **Glycérides neutres** : ils sont non ioniques et non polaires.
- ❖ **Phosphoglycérides** : ils contiennent une région polaire, le groupe phosphoryle.

Ces deux types de glycérides peuvent être considérés comme des composés possédant une « épine dorsale » à trois carbones de la molécule de glycérol [111]. L'estérification du glycérol avec un acide gras produit un glycéride neutre. L'estérification peut se produire à une, deux ou aux trois positions (Figure I.23) produisant :

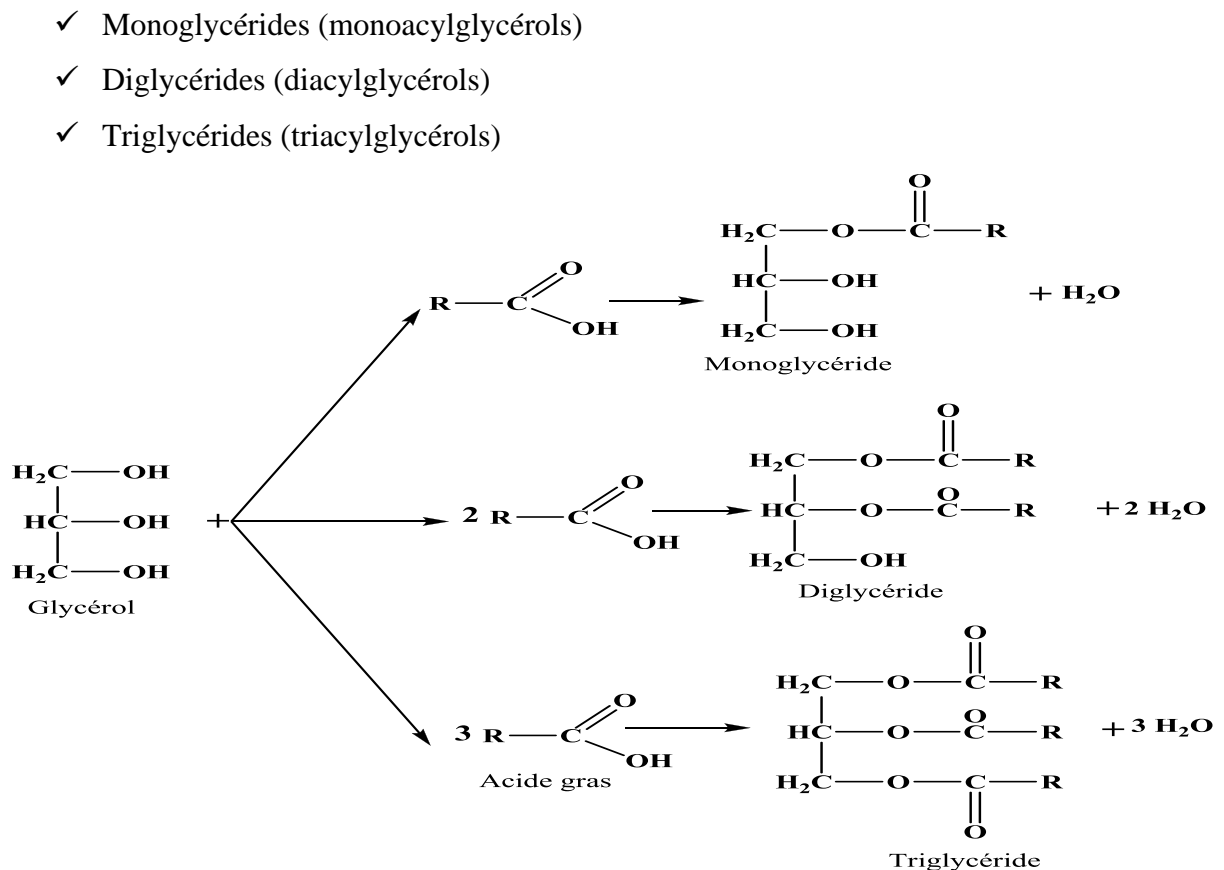


Figure I.23 : Synthèse de mono-, di- et tri-glycérides à partir d'acide gras et de glycérol

I.11.3 Monoglycérides

Il s'agit du type de glycéride le plus répandu et le plus important, correctement appelé monoacylglycérol [111]. Il consiste en un acide gras lié de manière covalente à la molécule de glycérol par liaison ester. Sur la base de la position de la liaison ester sur la partie glycérol, se sont en outre classés en:

- 1-monoacylglycérols
- 2-monoacylglycérols

I.11.4 Synthèse des monoglycérides

Il existe deux principales voies synthétiques pour obtenir des MG :

- ✓ Estérification directe du glycérol par des acides gras (Figure I.22).
- ✓ Trans estérification du glycérol avec des esters méthyliques d'acides gras (EMAG) (Figure I.24).

L'ancienne méthode nécessite un catalyseur acide, par exemple sulfurique, phosphorique ou sulfonique [112,113] alors que la nouvelle approche est une réaction qui implique un catalyseur basique avec une forte base telles que KOH ou Ca(OH)₂ à haute température [114]. La glycérolyse de EMAG est une voie intéressante pour la synthèse de MG.

L'utilisation d'esters méthyliques au lieu des acides gras et du glycérol correspondant dans la préparation des MG présente plusieurs avantages. Par exemple, les esters méthyliques qui sont préparés à partir de graisses par des réactions de méthanolyse des graisses facilement purifiés et moins corrosifs. De plus, dans le cas de la glycérolyse des graisses, des acides se produisent plus rapidement que l'estérification des acides gras par le glycérol [115].

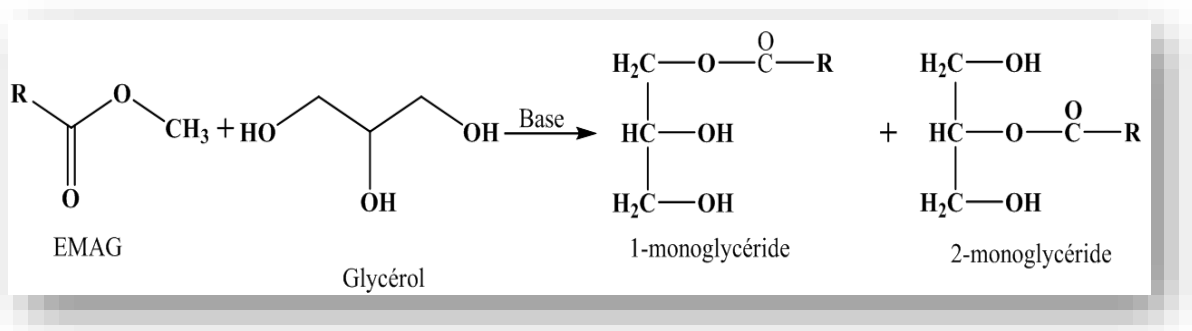


Figure I.24 : Synthèse de monoglycéride par trans estérification (glycérolyse) de EMAG avec du glycérol

I.11.5 Utilisations chimiques

La majorité des monoglycérides (MG) sont utilisés dans les industries alimentaires, pharmaceutiques et autres, et sont bénéfiques pour la santé [116,117].

PARTIE II

PARTIE

EXPÉRIMENTALE

II.1 Techniques préparatives de séparation

L'étude chimique d'une plante se repose principalement sur la purification, l'isolement, et l'identification structurale des métabolites secondaires. Ceci est généralement réalisé à l'aide de différentes méthodes chromatographiques : chromatographie sur colonne, sur couche mince et épaisse préparative et chromatographie liquide sous vide (VLC).

II.1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM)

Cette chromatographie est utilisée pour le suivi et le contrôle des purifications. Les chromatogrammes sur couche mince permettent de vérifier la présence et l'état de pureté des produits. Les analyses par chromatographie sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice.

- En phase normale, Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck® 250 µm (20 × 20 cm).
- En phase inverse, RP 18 F_{254S}, Merck® 200 µm (20 x 20 cm).

Le développement des plaques s'effectue dans des cuves en verre saturées avec l'éluant approprié. La phase mobile est constituée d'un mélange binaire ou tertiaire de solvants selon le type des produits et leurs polarités. Le révélateur utilisé est la vanilline sulfurique ou bien un mélange d'acide (acide sulfurique 25 % et acide acétique 25%) et 50 % d'eau.

II.1.2 Chromatographie sur Couche Epaisse (CCE)

La purification par CCE préparative a été réalisée sur des plaques en verre recouvertes de silice en phase normale Kieselgel60 F₂₅₄, Merck® 250 µm (20 × 20 cm).

II.1.3 Chromatographie liquide sur colonne ouverte (CC)

Elle est réalisée sur des colonnes en verre ouvertes, plusieurs types de phases ont été mises en œuvre. La taille et le diamètre de la colonne sont déterminés en fonction de la masse d'échantillon à purifier. L'extrait à fractionner est adsorbé sur une quantité de silice correspondant à environ 1-2 fois sa masse et le dépôt de l'extrait a lieu sous forme solide (enrobage).

Les phases stationnaires utilisées dans cette étude sont :

- Le gel de silice en phase normale (Kieselgel Merck® 70-230 mesh), en utilisant 40 fois le poids de l'échantillon à purifier.
- Le gel de silice greffée (Lichroprep RP-18 Merck® 40-63 µm), en employant 30 fois le poids de l'échantillon à purifier.
- Polyamide SC6.
- Sephadex LH-20.

II.1.4 Chromatographie liquide sous vide (VLC)

La chromatographie liquide sous vide (VLC) est une technique rapide et moins consommatrice de solvants. Elle permet d'obtenir un fractionnement grossier de l'extrait brut. Elle est effectuée dans un entonnoir cylindrique filtrant sur verre fritté n° 4, avec un vide, permettant d'accélérer le débit. La phase stationnaire est la silice en phase normale (Kieselgel Merck® 70-230 mesh) ou bien la silice greffée (Lichroprep RP-18 Merck® 40-63 µm). Le volume de silice utilisé correspond à 10 fois le poids de l'échantillon.

II.2 Chimie structurale

II.2.1 Spectrométrie de masse

Les spectres de masse ESI-MS (Electro-Spray Ionisation) des composés isolés ont été enregistrés en mode positif et négatif, respectivement, sur un spectromètre de type micromasse ESI-Q-TOF.

II.2.2 Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire RMN

Les spectres RMN monodimensionnels (¹H et ¹³C) et bidimensionnels (COSY, HMBC, HSQC) sont enregistrés sur un appareil de type Brüker à 500 MHz pour ¹H et 125 MHz pour ¹³C. Les échantillons ont été dissous dans des solvants deutérés CD₃OD ou CDCl₃ selon la solubilité des composés. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS) ; les constantes de couplage sont exprimées en Hz.

II.2.3 Spectrométrie Ultraviolet-Visible (UV-Vis)

Les spectres UV-Vis des composés ont été mesurés dans le méthanol à l'aide d'un spectrophotomètre de type UV-2300 à double faisceau. Les mesures se font dans des cuves de quartz à trajet optique de 1 cm.

II.2.4 Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire des composés a été déterminé au moyen d'un polarimètre de type Perkin-Elmer 241 à 20 °C. La valeur du pouvoir rotatoire ([α]_D) est exprimée en degrés et le solvant de solubilisation et la concentration sont indiqués dans chaque cas.

II.3 Etude phytochimique de l'espèce *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut.

L'identification botanique de la plante *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. a été réalisée par le Professeur Bachir Oudjehih, enseignant à l'Institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques de l'Université de Batna 1, sous le numéro 741 / LCCE. La récolte a été faite au mois d'Avril 2014 dans les montagnes de Chelia, à 70 Km à l'Est de Batna. Le matériel végétal a été mis à l'ombre et laissé sécher à température ambiante.

II.3.1 Extraction

Les parties aériennes de l'espèce *T. algeriensis*, séchées et broyées (1200 g), sont macérées à température ambiante dans un mélange de solvants H₂O-MeOH (20 :80, 2×12 l) pendant 48 h. Après filtration et évaporation à température 40°C, 500 ml de l'extrait aqueux subit une extraction liquide-liquide avec l'éther de pétrole (5 x 200 ml), chloroforme (5 x 200 ml) et le *n*-butanol (5 x 200 ml).

Les trois phases organiques ainsi obtenues (EP, CHCl₃ et *n*-BuOH) sont séchées sur sulfate de sodium (Na₂SO₄) anhydre puis filtrées et concentrées à sec, ce qui a conduit à l'obtention de 19,57 g d'extrait éther de pétrole, 7,52 g d'extrait chloroformique et 28,64 g d'extrait *n*-butanol (Figure II.1).

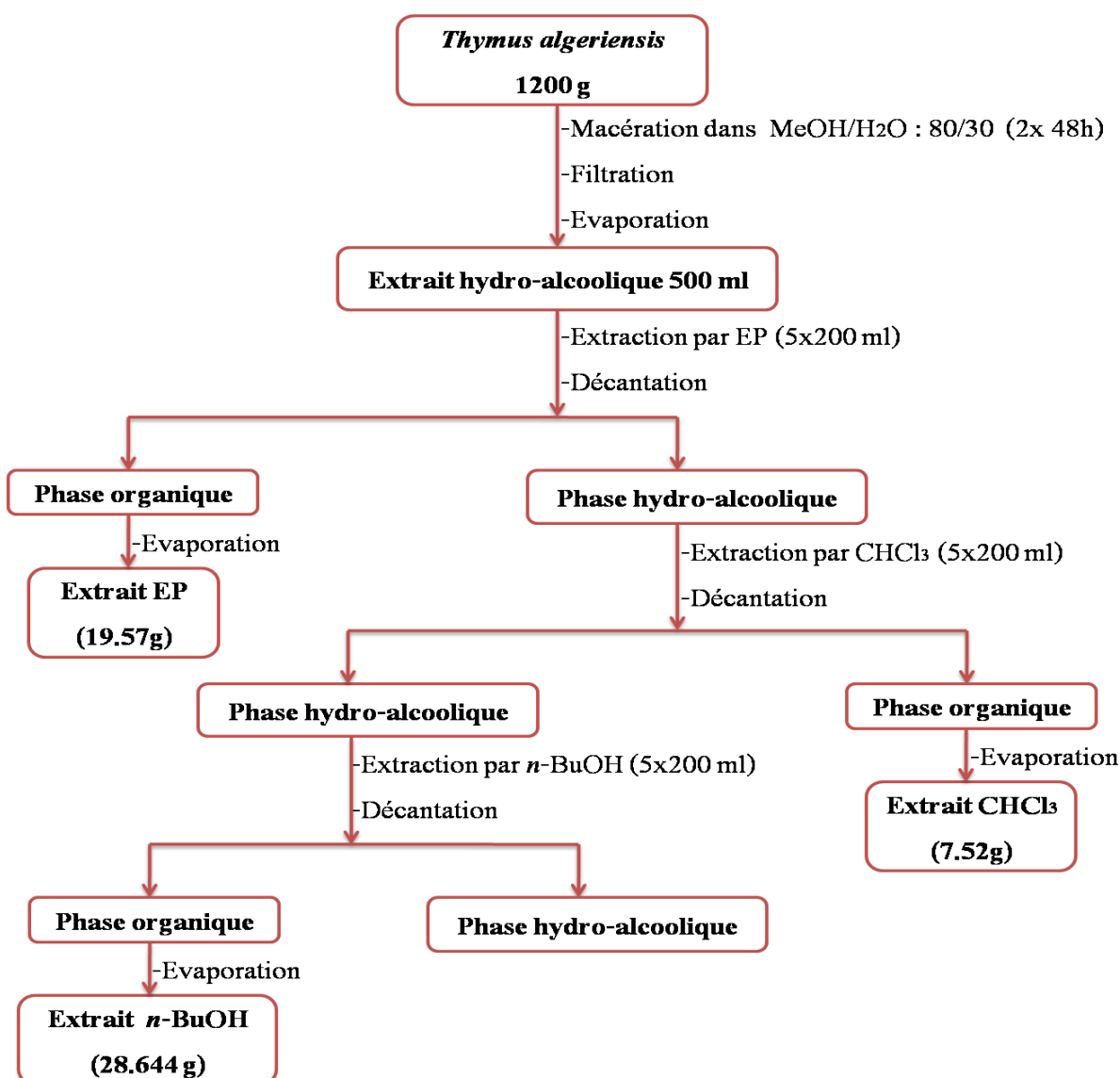


Figure II.1 : Schéma d'extraction des parties aériennes de la plante *Thymus algeriensis*

Le rendement de cette extraction par rapport à la matière sèche est reporté dans le tableau suivant :

Tableau II.1 : Rendement des extraits de *Thymus algeriensis*

Extrait	EP	CHCl ₃	<i>n</i> -BuOH
Rdt %	1,63	0,63	2,39

Les CCM effectuées sur les trois extraits, dans différents systèmes de solvants, montrent la richesse des extraits chloroformique et *n*-butanol en métabolites secondaires (Figure II.2).

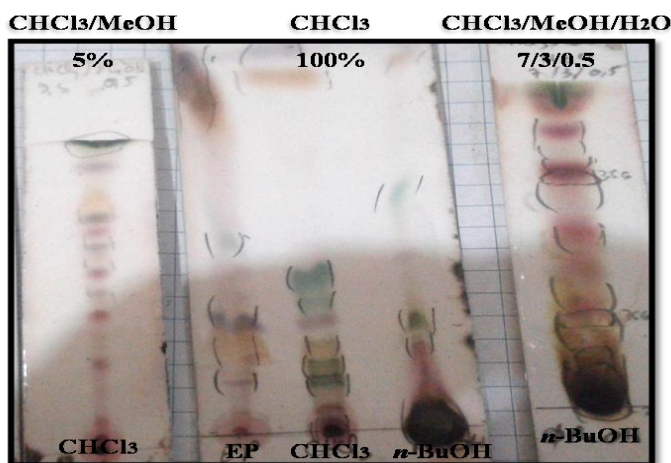


Figure II.2 : CCM des différents extraits de *Thymus algeriensis*

II.3.2 Fractionnement et purification de l'extrait chloroformique

6,5 g de l'extrait chloroformique ont été soumis à une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale. L'élution est réalisée au début par l'hexane dont on augmente la polarité par l'addition de l'acétate d'éthyle (100 :0 à 0 :100) et ensuite par un gradient AcOEt/MeOH (100 :0 à 10 :90). 12 fractions ont été regroupées selon leurs profil en CCM (Tableau II.2).

Tableau II.2 : Fractionnement de l'extrait CHCl₃

Eluant colonne	Fractions collectées	Poids (mg)
Hexane pur	F1	7
Hexane /AcOEt (99/1)		
Hexane /AcOEt (97/3)		
Hexane /AcOEt (95/5)	F2	29,4
Hexane /AcOEt (93/7)	F3	3,2

Hexane /AcOEt (90/10)		
Hexane /AcOEt (80/20)	F4	4,1
Hexane /AcOEt (70/30)	F5	2,1
Hexane /AcOEt (60/40)	F6	17,4
Hexane /AcOEt (50/50)	F7	1506
Hexane /AcOEt (30/70)	F8	162,5
AcOEt pur	F9	1048
AcOEt/MeOH (99/1)		
AcOEt/MeOH (97/3)	F10	1282,8
AcOEt/MeOH (95/5)		
AcOEt/MeOH (95/5)	F11	1715
AcOEt/MeOH (90/10)		
AcOEt/MeOH (50/50)	F12	220

Ces fractions sont soumises par la suite à des opérations de purification. Ainsi, 9 composés ont été isolés (Figure II.3).

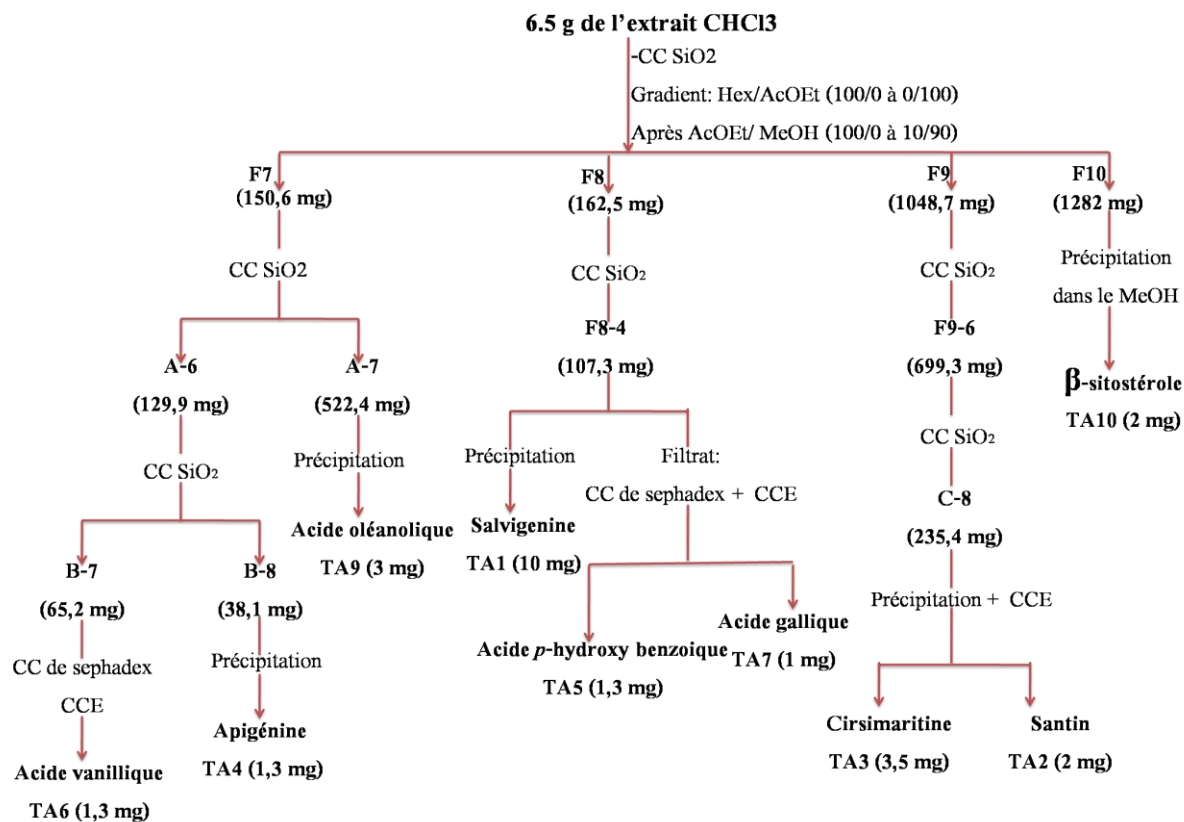


Figure II.3 : Schéma de purification des produits de l'extrait CHCl₃ de la plante *Thymus algeriensis*.

II.3.2.1 Fraction F7

La fraction F7 (1506 mg) a fait l'objet d'une chromatographie sur une colonne de gel de silice normale. L'élution est réalisée par un mélange de solvants hexane/AcOEt (100:0 à 0:100). Le rassemblement des fractions similaires en CCM a donné 10 sous-fractions.

La sous-fraction A-6 (129,9 mg) a subi un fractionnement sur une colonne de gel de silice normale éluée avec un mélange de solvant hexane/AcOEt (100:0 à 0:100) pour conduire à 8 sous-fractions (B-1 à B-8). La sous-fraction B-7 (65,2 mg) a été filtrée sur une colonne de Sephadex LH-20 puis purifiée par plaque préparative de silice normale dans le mélange de solvants ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$: 9/1) fournissant ainsi le composé **TA4** (1,3 mg).

La sous fraction B-8 (38,1 mg) purifiée sur une colonne de Sephadex LH-20 avec le CHCl_3 comme éluant, aboutit au composé **TA6** (1,3 mg) (Figure II.4).



Figure II.4 : CCM en phase normale du composé **TA6**

Le composé **TA9** (3 mg) est obtenu à l'état pur à partir de la sous-fraction A-7 par précipitation dans le méthanol.

II.3.2.2 Fraction F8

La fraction F8 est mise à chromatographier sur une colonne de gel de silice en phase normale en utilisant un mélange de solvants hexane/ CH_2Cl_2 (100:0 à 0:100), puis par un gradient de méthanol dans le dichlorométhane (0 :100 à 100 :0) pour fournir 8 sous-fractions.

La sous-fraction F8-4 (107,3 mg) contient un produit majoritaire (composé **TA1** d'une masse 10 mg) qui est précipité dans le MeOH. Après récupération du produit précipité, la CCM du filtra montre la présence de deux taches. Le filtra a subi une séparation sur une colonne de Sephadex LH-20 dans le chloroforme puis purifié par une plaque préparative de silice normale dans le mélange de solvants (EP/AcOEt: 5/5) pour donner les composés **TA5** (1,3 mg) et **TA7** (1 mg) à l'état pur (Figure II.5).

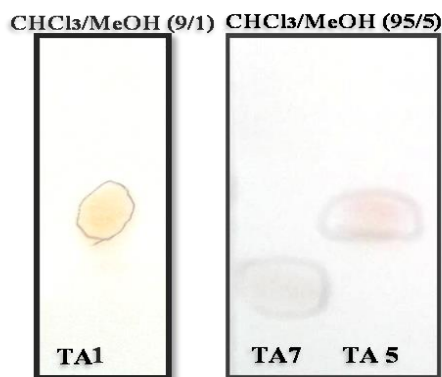


Figure II.5: CCM en phase normale des composés **TA1**, **TA5** et **TA7**

II.3.2.3 Fraction F9

La fraction F-9 (1048,7 mg) est soumise à une chromatographie sur colonne de gel de silice normale est éluée par un gradient de solvants EP/AcOEt (100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 et 30:70) pour donner 8 sous-fractions (F9-1 à F9-8). La sous-fraction F9-6 (699,3 mg) est purifiée à son tour sur une colonne de gel de silice normale en utilisant comme éluant EP/AcOEt (100-0 à 50-50) conduisant ainsi à 9 sous fractions (F-9-1 à F-9-9).

La sous-fraction F-9-8 (235,4 mg) se précipite dans le MeOH. Après filtration et récupération du précipité, sa CCM révèle la présence de deux taches (Figure II.6). Le précipité a été traité sur plaques préparatives de silice normale dans le mélange de solvants (EP/AcOEt: 5/5) afin d'aboutir aux deux composés **TA2** (2 mg) et **TA3** (3,5 mg) à l'état pur.



Figure II.6 : CCM en phase normale des composés **TA2** et **TA3**

II.3.2.4 Fraction F10

Le composé **TA10** (2 mg) est obtenu par précipitation dans le méthanol de la fraction F-10 (1282 mg) (Figure II.7).



Figure II.7 : CCM en phase normale du composé TA10

II.3.3 Fractionnement et purification de l'extrait *n*-butanol

10 g de l'extrait *n*-butanol ont été fractionnés sur une colonne de polyamide. L'élution a été faite par le mélange H₂O/MeOH allant de 100/0 à 0/100. A l'issue de ce fractionnement primaire, 20 fractions sont recueillies (Tableau II.3 et Figure II.8).

Tableau II.3 : Fractionnement de l'extrait *n*-butanol

Eluant colonne	Fraction collectées	Poids en mg
H ₂ O pur	F1	1383
H ₂ O pur	F2	1473,5
H ₂ O pur	F3	434,5
H ₂ O pur	F4	1033,7
H ₂ O /MeOH (80/20)	F5	156,3
H ₂ O /MeOH (80/20)	F6	133,7
H ₂ O /MeOH (80/20)	F7	85,8
H ₂ O /MeOH (80/20)	F8	165,9
H ₂ O /MeOH (60/40)	F9	148,3
H ₂ O /MeOH (60/40)	F10	105,2
H ₂ O /MeOH (60/40)	F11	74,3
H ₂ O /MeOH (60/40)	F12	187,7
H ₂ O /MeOH (40/60)	F13	145,1
H ₂ O /MeOH (40/60)	F14	116,1
H ₂ O /MeOH (40/60)	F15	135,7
H ₂ O /MeOH (40/60)	F16	27
H ₂ O /MeOH (20/80)	F17	155,5
H ₂ O /MeOH (20/80)	F18	82,1
H ₂ O /MeOH (20/80)	F19	75,8
MeOH pur	F20	150,6

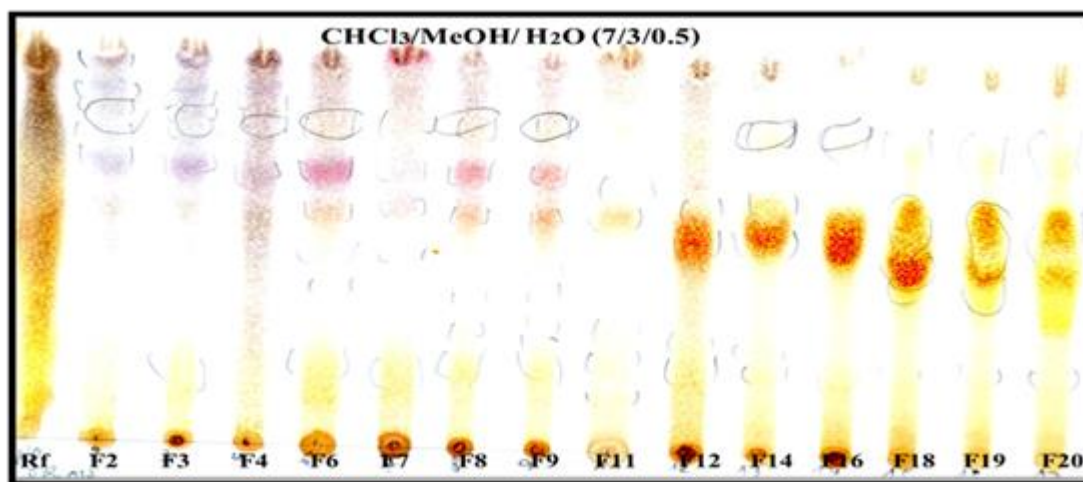


Figure II.8 : CCM récapitulative de l'extrait *n*-butanol

II.3.3.1 Fraction F9

La fraction F-9 (148,3 mg) est chromatographiée sur une colonne ouverte en utilisant le gel de silice normale comme phase stationnaire. L'éluion est réalisée par le mélange $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ allant de 100-0 à 0-100 pour fournir 12 sous-fractions (F-9-1 à F-9-12) (Figure II.9).

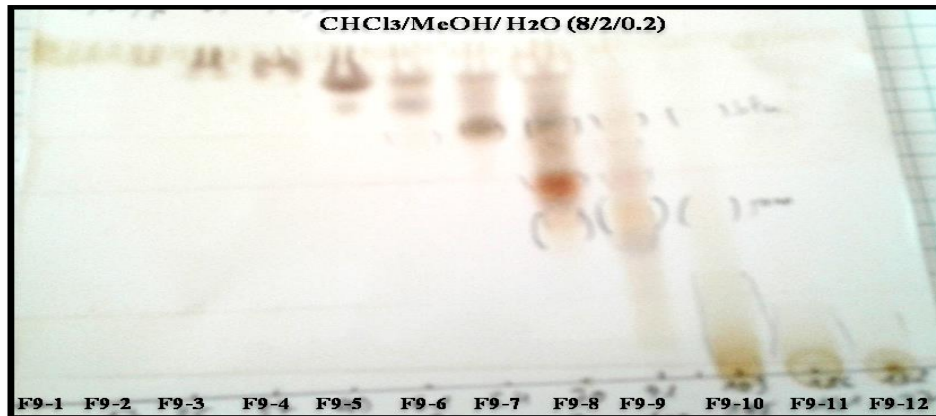


Figure II.9 : CCM en phase normale des sous fractions étudiée de la fraction F9

La sous-fraction F9-10 (48,2 mg) est séparée sur une colonne de gel de silice en phase normale éluee par le mélange de solvants $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (100-0, 95-5, 90-10, 88-12, 85-15, 80-20, 70-30, 60-40, 50-50) afin d'obtenir 7 sous fractions (A-1 à A-7). La sous fraction A-5 (10,9 mg) est filtrée sur une colonne de Sephadex LH-20 puis purifiée sur une plaque préparative de silice normale dans le mélange de solvants $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$: 7/3/0,5 fournissant ainsi le composé **TA8** (1,4 mg) (Figure II.10).

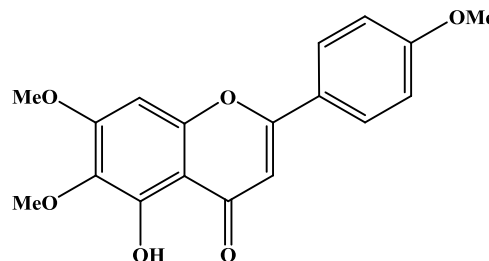
CHCl₃/MeOH/H₂O (8/2/0,2)

Figure II.10 : CCM en phase normale du composé TA8

II.3.4 Composés isolés de l'espèce *Thymus algeriensis*

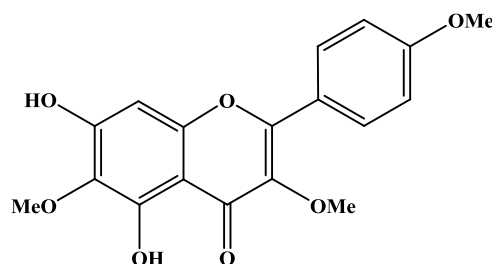
❖ Composé TA1

- **Nom** : Salvigenine
- **Formule brute** : C₁₈H₁₆O₆
- **ESI-MS**:(mode positif)
 $m/z = 350,9560 [M+Na]^+$
 $m/z = 759,1702 [2M+Na]^+$
- **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C**
 (125 MHz) dans le CDCl₃
 Tableau III-1b, page 82



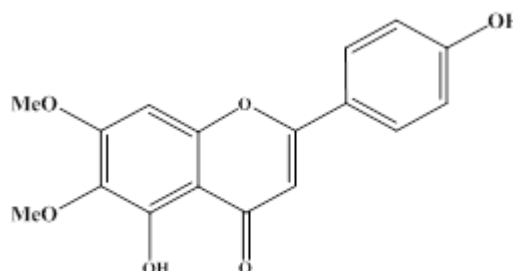
❖ Composé TA2

- **Nom** : Santin
- **Formule brute** : C₁₈H₁₆O₇
- **ESI-MS**:(mode positif)
 $m/z = 366,9798 [M+Na]^+$
 $m/z = 711,0505 [2M+Na]^+$
- **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C**
 (125 MHz) dans le CDCl₃
 Tableau III-2, page 85



❖ Composé TA3

- **Nom** : Cirsimaritine
- **Formule brute** : C₁₇H₁₄O₆
- **ESI-MS**:(mode positif)



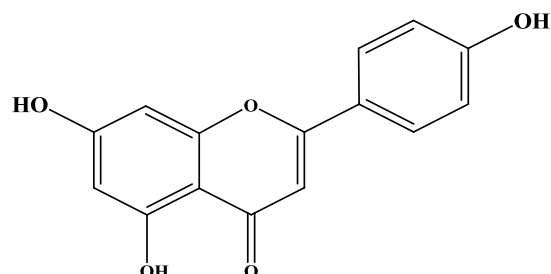
$$m/z = 336,9692 [M+Na]^+$$

$$m/z = 651,0370 [2M+Na]^+$$

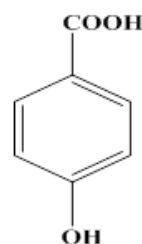
- **RMN 1H** (500 MHz) et **RMN ^{13}C** (125 MHz) dans le $CDCl_3$
Tableau III-3, page 88

❖ **Composé TA4**

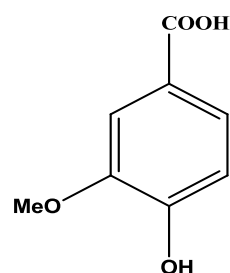
- **Nom** : Apigénine
- **Formule brute** : $C_{15}H_{10}O_5$
- **ESI-MS**:(mode positif)
 $m/z = 309 [M+K]^+$
- **RMN 1H** (500 MHz) et **RMN ^{13}C** (125 MHz) dans le CD_3OD
Tableau III-4, page 92

❖ **Composé TA5**

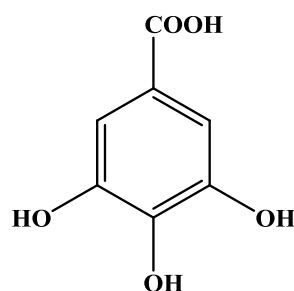
- **Nom** : Acide *p*-hydroxybenzoïque
- **Formule brute** : $C_7H_6O_3$
- **RMN 1H** (500 MHz) et **RMN ^{13}C** (125 MHz) dans le CD_3OD
Tableau III-5, page 94

❖ **Composé TA6**

- **Nom** : Acide vanillique
- **Formule brute** : $C_8H_8O_4$
- **RMN 1H** (500 MHz) et **RMN ^{13}C** (125 MHz) dans le CD_3OD
Tableau III-6, page 97

❖ **Composé TA7**

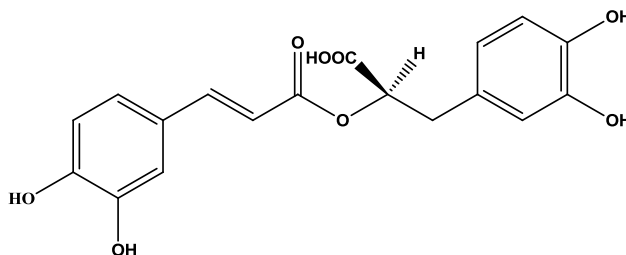
- **Nom** : Acide gallique
- **Formule brute** : $C_7H_6O_5$
- **ESI-MS**: (Mode négatif)
 $m/z = 169 [M-H]^-$
 $m/z = 339 [2M-H]^-$



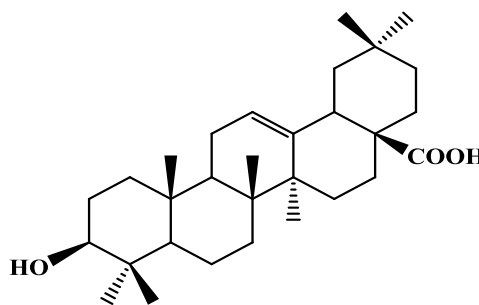
- **RMN ^1H** (500 MHz) et **RMN ^{13}C** (125 MHz) dans le CD_3OD
Tableau III-7, page 100

❖ **Composé TA8**

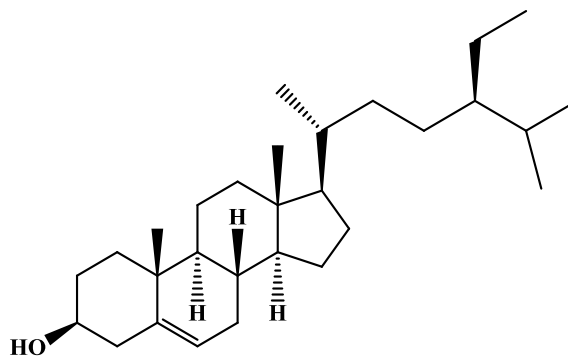
- **Nom** : Acide rosmarinique
- **Formule brute** : $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$
- **ESI-MS**: (Mode négatif)
 $m/z = 359,07681$ $[\text{M}-\text{H}]^-$
 $m/z = 719,16058$ $[2\text{M}-\text{H}]^-$
- $[\alpha]_{\text{D}} = +73,3^\circ$ (C= 0,2, MeOH)
- **RMN ^1H** (500 MHz) et **RMN ^{13}C** (125 MHz) dans le CD_3OD
Tableau III-8, page 107

❖ **Composé TA9**

- **Nom** : Acide oléanolique
- **Formule brute** : $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$
- $[\alpha]_{\text{D}} = +80,3^\circ$ (C= 0,95, CHCl_3)
- **ESI-MS**: (Mode positif)
 $m/z = 479,3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$
 $m/z = 935,6$ $[2\text{M}+\text{Na}]^+$
- **RMN ^1H** (500 MHz) et **RMN ^{13}C** (125 MHz) dans ($\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$)
Tableau III-9, page 116

❖ **Composé TA10**

- **Nom** : β -sitostérol
- **Formule brute** : $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$
- $[\alpha]_{\text{D}} = -30$ (C 0,8, CHCl_3)
- **ESI-MS**: (Mode négatif)
 $m/z = 413,27$ $[\text{M}-\text{H}]^-$
- **RMN ^1H** (500 MHz) et **RMN ^{13}C** (125 MHz) dans le CDCl_3
Tableau III-10, page 119



II.4 Etude phytochimique de l'espèce *Diplotaxis eruroides* (L.) DC.

La plante *Diplotaxis eruroides* (L.) DC. a été récoltée au mois de Novembre 2018 dans la région d'El Madher (Batna). Son identification a été faite par Pr. Bachir Oudjehih du département d'Agronomie de l'Institut des Sciences Vétérinaires et Agronomiques, Université de Batna 1, Algérie.

II.4.1 Extraction

1400 g de *Diplotaxis eruroides* (L.) DC., sont mis à macérer dans une solution d'éthanol/eau à 70% pendant 48 h. Cette opération est répétée deux fois avec renouvellement du solvant. Après filtration et concentration, un volume de 400 ml est obtenu. Ce dernier est soumis à une extraction liquide-liquide, en premier par l'éther de pétrole (250 ml, 4 fois) puis l'acétate d'éthyle (250 ml, 4 fois) et enfin le *n*-butanol (250 ml, 4 fois). L'évaporation à sec des phases organiques, a donné 15,59 g pour l'extrait éther de pétrole, 14,17 g de l'extrait acétate d'éthyle et 18,48 g de l'extrait *n*-butanol (Figure II.11).

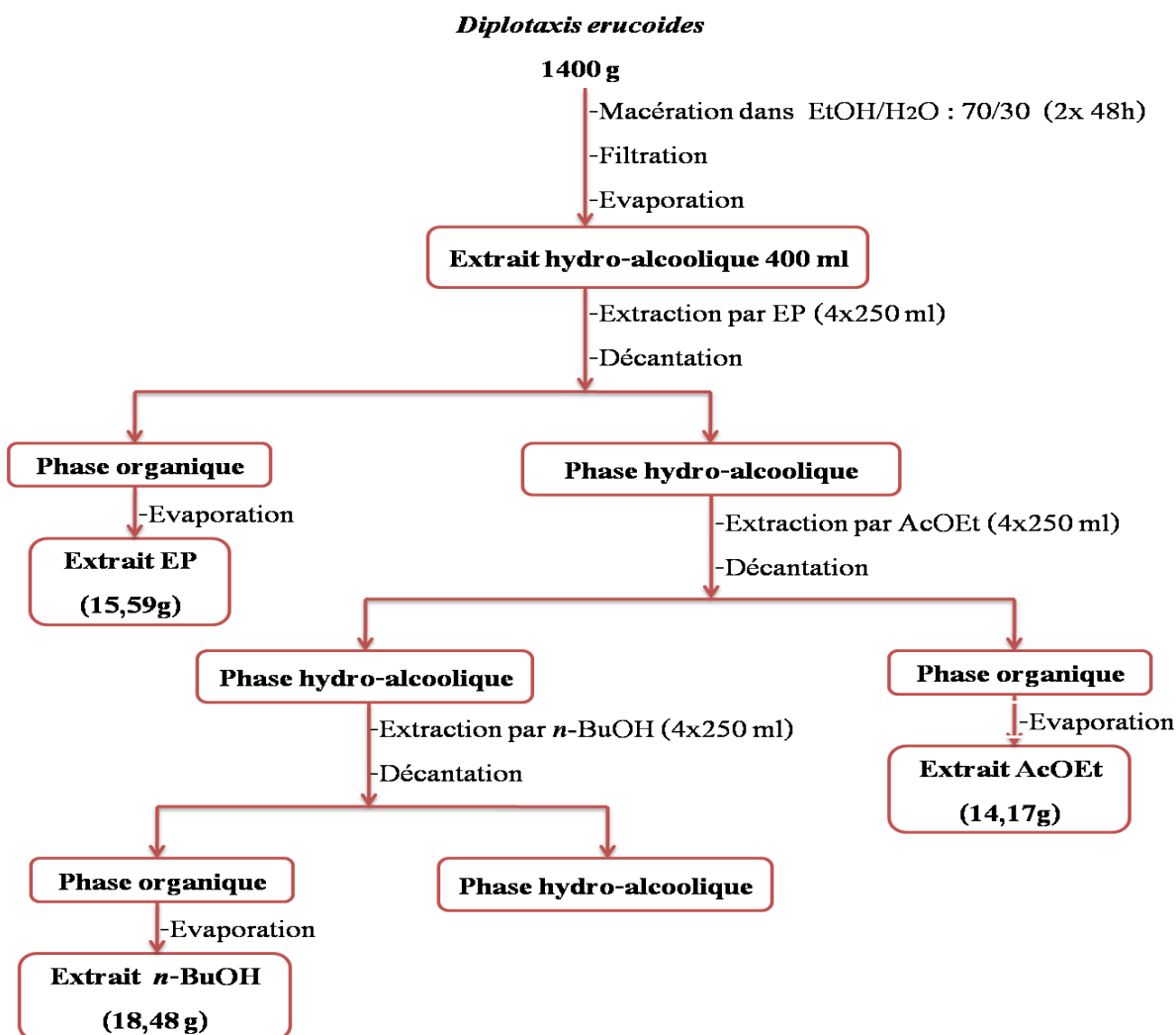


Figure II.11: Schéma d'extraction des parties aériennes de la plante *Diplotaxis eruroides*

Les CCM réalisées sur les trois extraits de la plante *D. eruroides* dans différents systèmes de solvants, montrent bien leurs richesses en produits (Figure II.12).

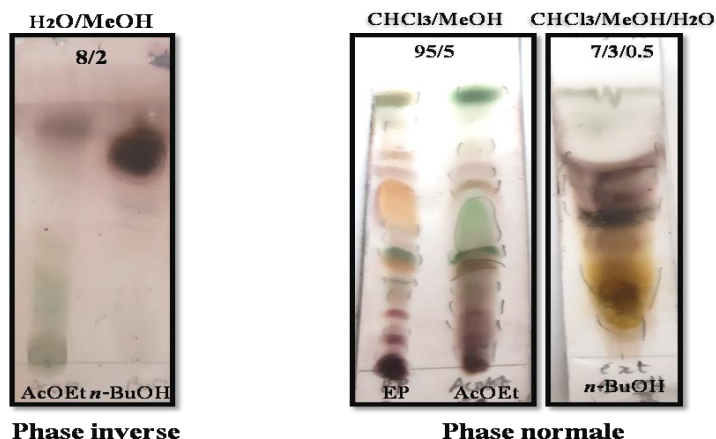


Figure II.12 : CCM des différents extraits de la plante *D. eruroides*

Le calcul du rendement par rapport à la matière sèche de cette extraction est reporté dans le tableau II.4

Tableau II.4 : Rendement des extraits de *Diplotaxis eruroides*

Extrait	EP	AcOEt	<i>n</i> -BuOH
Rdt %	1,11	1,01	1,32

II.4.2 Fractionnement et purification de l'extrait acétate d'éthyle

Le fractionnement de 7 g de l'extrait AcOEt a été réalisé par chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le gel de silice en phase normale comme phase stationnaire. L'élution est effectuée par un mélange de solvants EP/AcOEt (100-0 à 0-100), puis MeOH/AcOEt (0-100 à 100-0) (Tableau II.5). Des fractions de 100 ml ont été recueillies, puis évaporées à sec afin d'être analysées par CCM et regroupées. Ce fractionnement a permis de récupérer neuf fractions nommées F-1 à F-9 (Figure II.13).

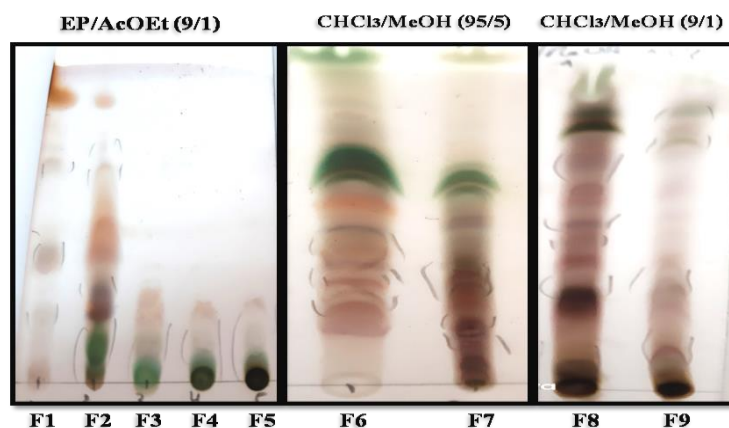


Figure II.13 : CCM en phase normale des fractions de la VLC de l'extrait AcOEt

Tableau II.5 : Fractionnement de l'extrait AcOEt

Eluant colonne	Fractionsregroupées	Poids en mg
EP pur	F1	9
EP/AcOEt (97/3)		
EP/AcOEt (95/5)		
EP/AcOEt (90/10)		
EP/AcOEt (80/20)	F2	28
EP/AcOEt (70/30)		
EP/AcOEt (70/30)	F3	52,1
EP/AcOEt (60/40)	F4	31,5
EP/AcOEt (60/40)	F5	88,2
EP/AcOEt (50/50)		
EP/AcOEt (30/70)		
EP/AcOEt (10/90)	F6	250,8
AcOEt pur		
AcOEt/MeOH (97/3)		
AcOEt/MeOH (95/5)		
AcOEt/MeOH (90/10)	F7	284,6
AcOEt/MeOH (80/20)		
AcOEt/MeOH (80/20)		
AcOEt/MeOH (70/30)	F8	484,8
AcOEt/MeOH (50/50)		
AcOEt/MeOH (50/50)	F9	2072,3
MeOH pur		

Les fractions résultantes ont été soumises aux différentes opérations de purification. Ce qui a mené à l'isolement de 5 composés (Figure II.14).

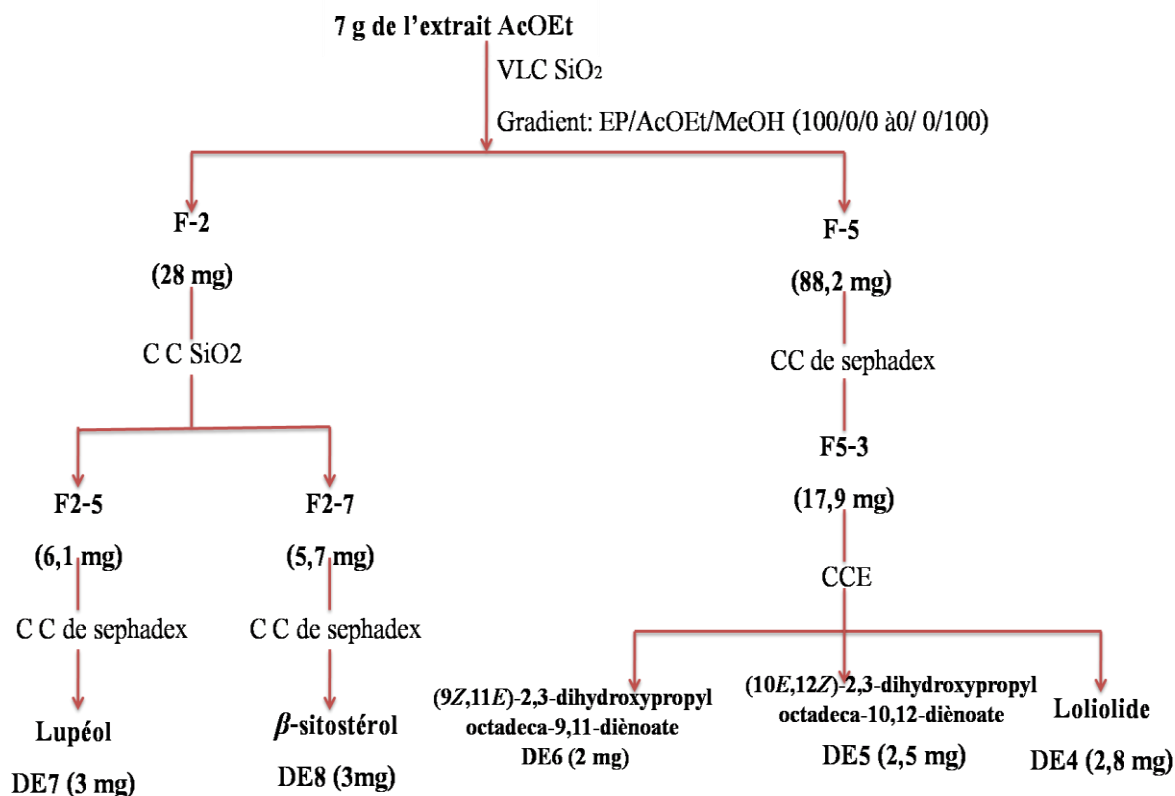


Figure II.14: Schéma de purification des produits de l'extrait AcOEt de *Diplotaxis erucoides*

II.4.2.1 Fraction F2

La fraction F2 (28 mg) est mise à chromatographier sur une colonne de gel de silice en phase normale. L'élution est réalisée par un mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle. Ce fractionnement a permis d'obtenir 17 sous-fractions (F2-1 à F2-17) (Figure II.15).

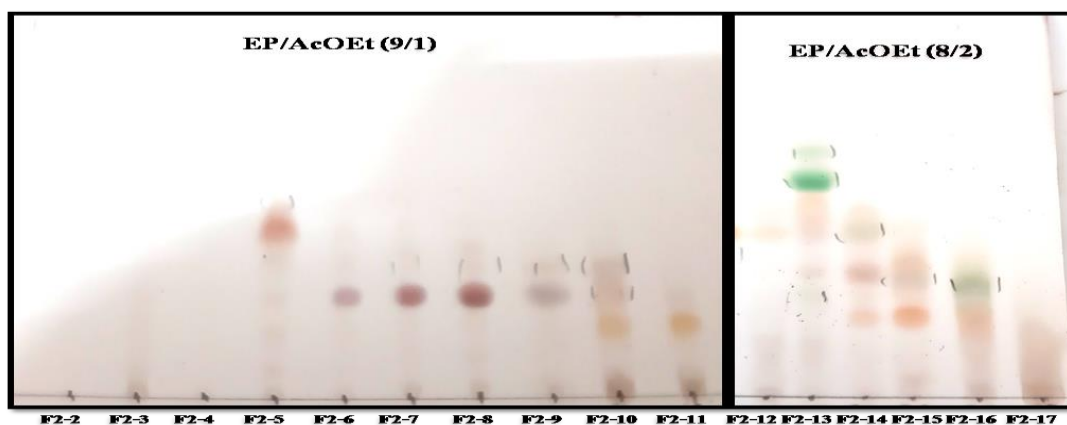


Figure II.15 : CCM en phase normale des sous fractions étudiée de la fraction F2

La sous-fraction F2-5 (6,1 mg) a été purifiée par une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 éluee par le chloroforme pour donner le composé **DE7** (3 mg).

Le composé **DE8** (3 mg) est obtenu par la filtration de la sous-fraction F2-7 (5,7 mg) sur une colonne de Sephadex LH-20 en utilisant le chloroforme comme éluant.



Figure II.16 : CCM en phase normale des composés **DE7** et **DE8**

II.4.2.2 Fraction F5

La fraction **F5** d'une masse de 88,2 mg est fractionnée par une chromatographie sur colonne de gel de silice en phase normale. L'éluant est effectué en premier lieu avec l'EP dont on augmente la polarité par l'addition de AcOEt (100-0 à 0-100). A l'issue de ce fractionnement, 4 sous-fractions sont collectées (F5-1 à F5-4) (Figure II.17).



Figure II.17 : CCM en phase normale des sous-fractions étudiée de la fraction **F5**

La sous-fraction F5-3 (42,6 mg) est appliquée à une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 où l'éluant est faite par le dichlorométhane. Ainsi, 6 sous-fractions ont été obtenues (F5-3-1 à F5-3-6).

Les sous-fractions F5-3-3, F5-3-4 et F5-3-5 regroupées (17,9 mg), sont soumises à une CCE préparative en phase normale avec l'éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9/1). Les produits résultants sont filtrés sur une colonne de Sephadex LH-20 dans le CH_2Cl_2 . Ces opérations ont permis d'obtenir les composés **DE4** (2,8 mg), **DE5** (2,5 mg) et **DE6** (2 mg) (Figure II.18).



Figure II.18 : CCM en phase normale des composés DE4, DE5 et DE6

II.4.3 Fractionnement et purification de l'extrait *n*-butanol

7 g de l'extrait *n*-butanol est initialement soumis à un fractionnement sur gel de silice en phase normale par chromatographie liquide sous vide (VLC) en utilisant le système de solvants CHCl₃/MeOH/ H₂O. Ce fractionnement s'est soldé par l'obtention de 31 fractions de 100 ml. Après analyse des fractions obtenues par CCM en utilisant des systèmes de solvants appropriés, les fractions présentant des profils identiques sur CCM ont été réunies pour fournir 8 fractions majoritaires (Tableau II.6, Figure II.19).

Tableau II.6: Fractionnement de l'extrait *n*-butanol

Eluant colonne	Fractions Regroupées	Poids en mg
CHCl ₃ pur	F1	5,5
CHCl ₃ /MeOH (95/5)		
CHCl ₃ /MeOH (95/5)	F2	42,9
CHCl ₃ /MeOH (93/7)		
CHCl ₃ /MeOH (90/10)	F3	74,4
CHCl ₃ /MeOH (80/20)		
CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (80/20/2)	F4	1292
CHCl ₃ /MeOH (70/30)		
CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (70/30/5)	F5	2001,7
CHCl ₃ /MeOH (40/60)		
CHCl ₃ /MeOH (50/50)	F6	1417,8
CHCl ₃ /MeOH (50/50)		
CHCl ₃ /MeOH (30/70)	F7	664,8
MeOH pur		
	F8	721,5

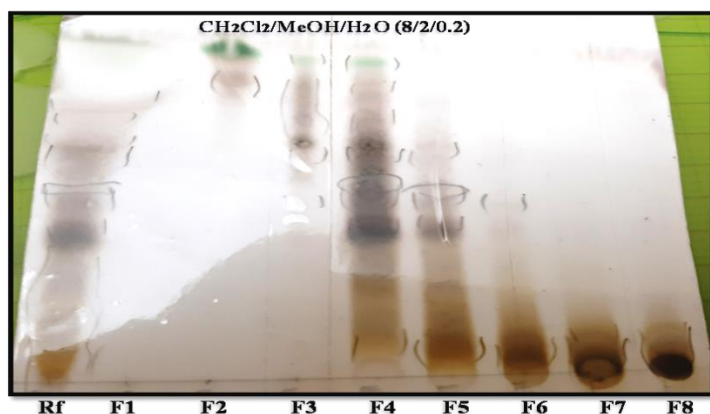


Figure II.19 : CCM en phase normale des fractions de la VLC de l'extrait *n*-butanol

Plusieurs techniques de purification ont été appliquées pour isoler trois composés purs (Figure II.20).

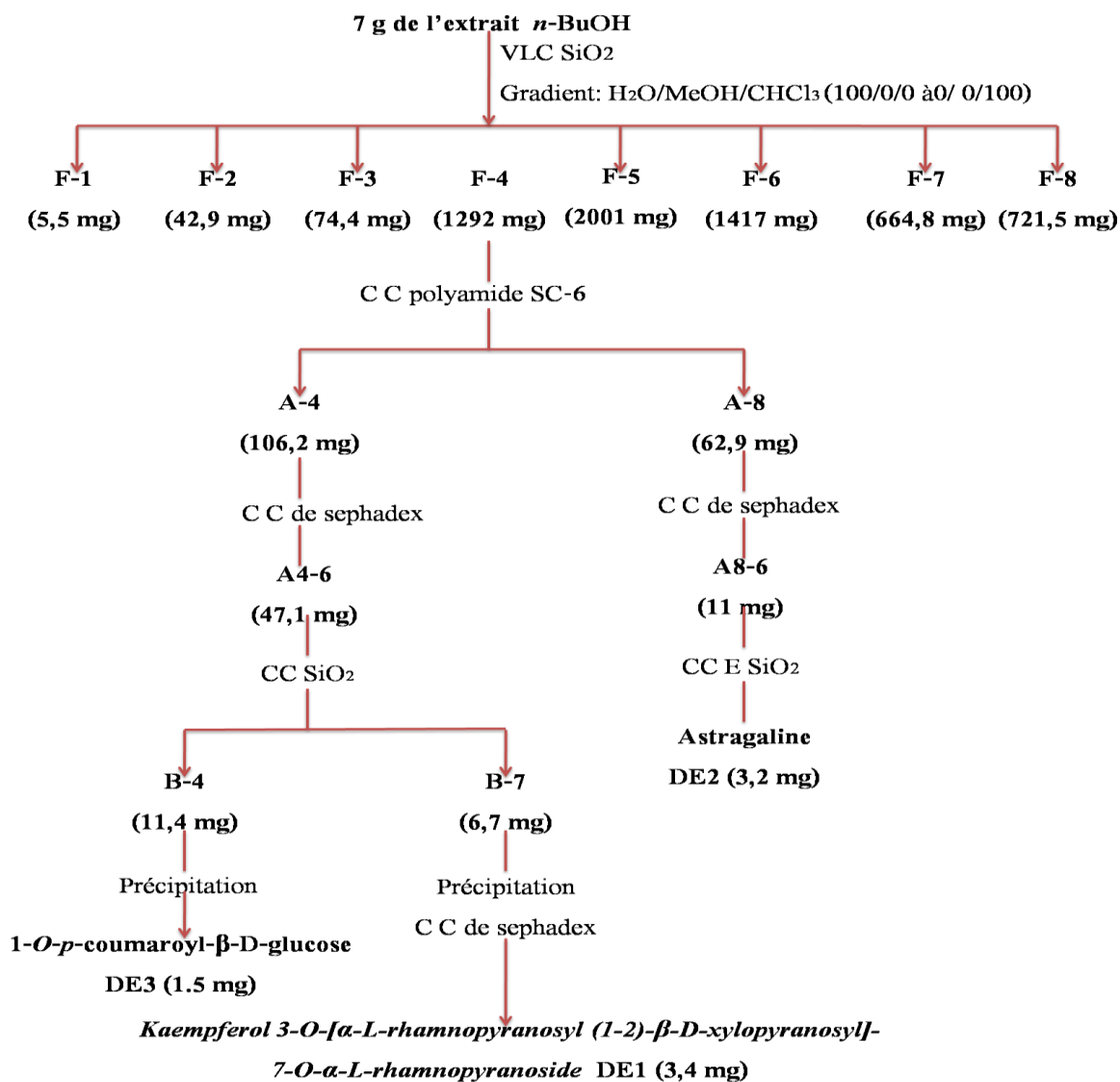


Figure II.20 : Schéma de purification des produits de l'extrait *n*-BuOH de *D. erucoides*

II.4.3.1 Fraction F4

Cette fraction d'une masse de 1,292 g a subi une chromatographie sur colonne de polyamide SC-6 éluée par le système H₂O/MeOH (100/0 à 0/100). Après fractionnement et rassemblement, 10 sous-fractions ont été obtenues (A1 à A10) (Figure II.21).

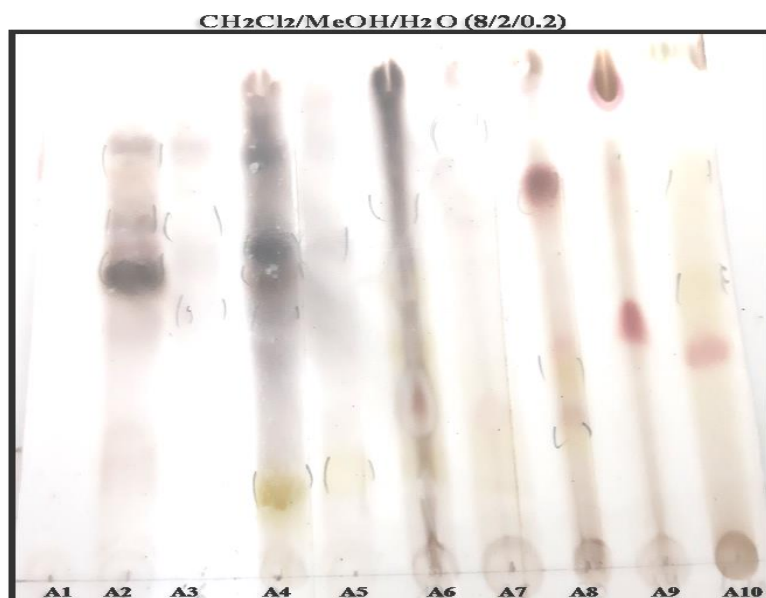


Figure II.21: CCM en phase normale des sous fractions étudiées de la fraction F4

La sous-fraction A4 (106,2 mg) est soumise à une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 éluée par le MeOH, a permis de recueillir 7 sous-fractions (A4-1 à A4-7) (Figure II.22).

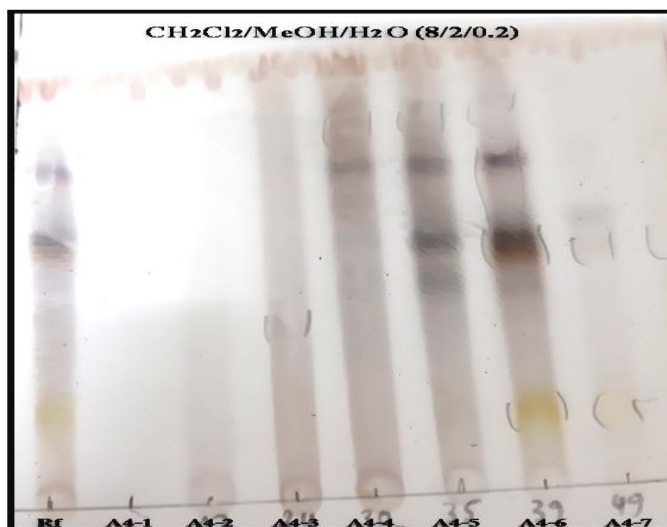


Figure II.22 : CCM en phase normale des sous fractions étudiée de la fraction A4

La sous-fraction A4-6 d'une masse de 47,1 mg, est séparée sur colonne de gel de silice avec un système d'élution $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (100/0 à 50/50). 8 sous fractions (B1 à B8) sont obtenues (Figure II.23).

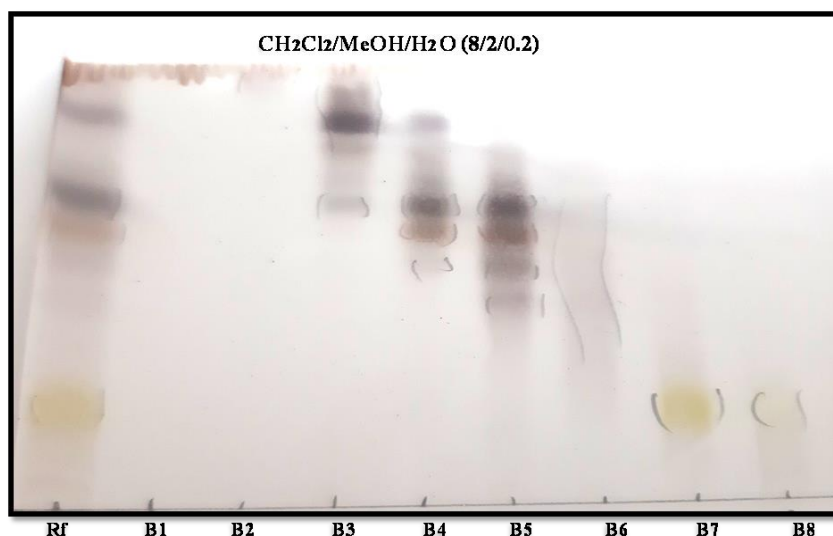


Figure II.23 : CCM en phase normale des sous fractions étudiées de la fraction A4-6

Le composé **DE3** (1,5 mg) a été obtenu par précipitation de la sous-fraction B4 (11,4 mg) dans le MeOH.

La sous-fraction B7 (6,7 mg) contient un produit majoritaire qui se précipite dans le diéthyl éther. Le produit obtenu est filtré dans une colonne de Sephadex LH-20 en employant le MeOH comme éluant, ce qui a conduit au composé **DE1** (3,4 mg).

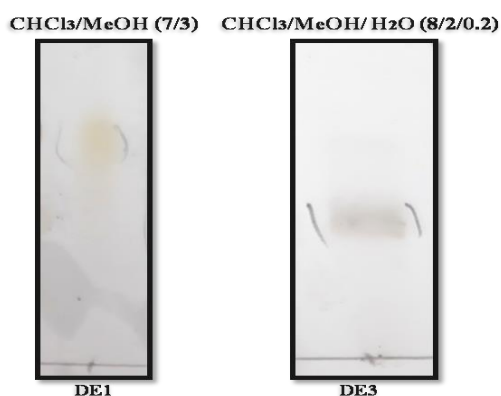


Figure II.24 : CCM en phase normale des composés **DE1** et **DE3**

Les 9 sous-fractions (A8-1 à A8-9) sont obtenus de la sous-fraction A8 (62,9 mg) en utilisant une chromatographie sur colonne de Sephadex LH-20 éluee par un mélange de solvants $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (80/20).

La sous-fraction A8-6 (11 mg) est purifiée par une plaque préparative en phase normale dans le mélange (CHCl₃/MeOH/H₂O: 7/3/0,3). Cette purification a conduit à l'isolement du composé **DE2** (3,2 mg) (Figure II.25).

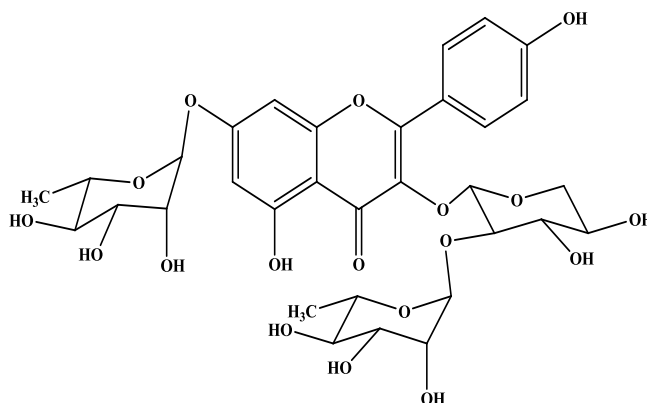


Figure II.25 : CCM en phase normale du composé **DE2**

II.4.4 Composés isolés de l'espèce *Diplotaxis erucoides*

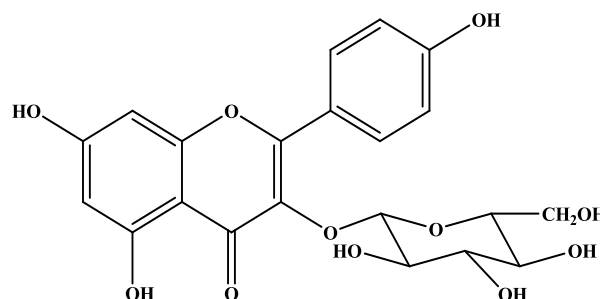
❖ Composé DE1

- **Nom** : *Kaempferol 3-O-[α-L-rhamnopyranosyl (1-2)-β-D-xylopyranosyl]-7-O-α-L-rhamnopyranoside* (composé nouveau)
- **Formule brute** : C₃₂H₃₈O₁₈
- **ESI-MS**: Mode négatif
 $m/z = 709,1985$ [M-H]⁻
- **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C** (125 MHz) dans le MeOD
Tableau III-11, page 131



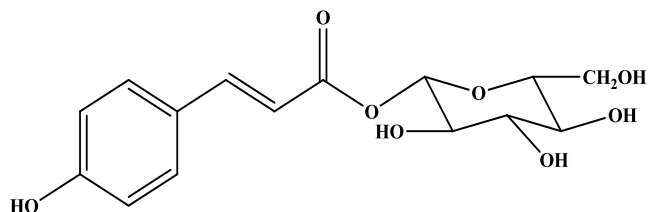
❖ Composé DE2

- **Nom** : Astragaline
- **Formule brute** : C₂₁H₂₀O₁₁
- $[\alpha]_D^{20} = +16^\circ$ (C = 0,8, MeOH)
- **ESI-MS**: Mode négatif
 $m/z = 447,0926$ [M-H]⁻
- **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C** (125 MHz) dans le MeOD
Tableau III-12, page 136

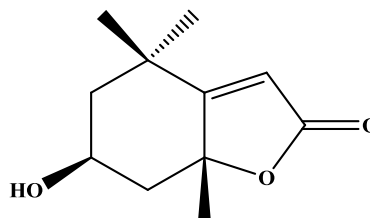


❖ **Composé DE3**

- **Nom** : 1-*O-p*-coumaroyl- β -D-glucose
- **Formule brute** : C₁₅H₁₈O₈
- **ESI-MS**: Mode négatif
 $m/z = 325,0924$ [M-H]⁻
- **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C**
(125 MHz) dans le MeOD
Tableau III-13, page 143

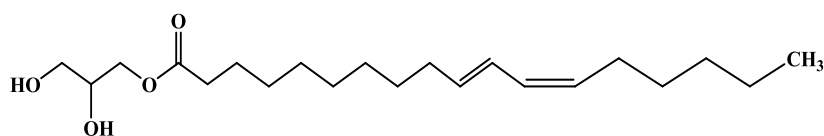
❖ **Composé DE4**

- **Nom** : Loliolide
- **Formule brute** : C₁₁H₁₆O₃
- $[\alpha]_D^{20} = -41^\circ$ (C = 0,06, CHCl₃)
- **ESI-MS**: Mode positif
 $m/z = 219,0998$ [M+Na]⁺
 $m/z = 415,3031$ [2M+Na]⁺
- **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C**
(125 MHz) dans le MeOD
Tableau III-14, page 150

❖ **Composé DE5**

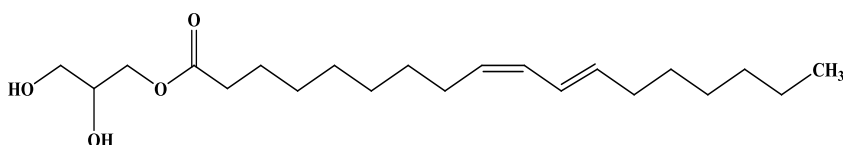
Nom : (10*E*,12*Z*)-2,3-dihydroxypropyl octadeca-10,12-diénoate

- **Formule brute** : C₁₈H₃₁O₂
- **RMN ¹H** (500 MHz)
et **RMN ¹³C** (125 MHz)
dans le MeOD
Tableau III-15, page 156

❖ **Composé DE6**

Nom : (9*Z*,11*E*)-2,3-dihydroxypropyl octadeca-9,11-diénoate

- **Formule brute** : C₁₈H₃₁O₂
- **ESI-MS**: Mode positif
 $m/z = 355$ [M+H]⁺



- **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C** (125 MHz) dans le MeOD

Tableau III-16, page 160

❖ **Composé DE7**

- **Nom** : Lupéol
- **Formule brute** : C₃₀H₅₀O
- **[α]_D** = +22,4° (C=0,18, MeOH)
- **ESI-MS**: Mode positif
 $m/z = 449 [M+Na]^+$
 $m/z = 876 [2M+Na]^+$
- **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C**
 (125 MHz) dans le CDCl₃

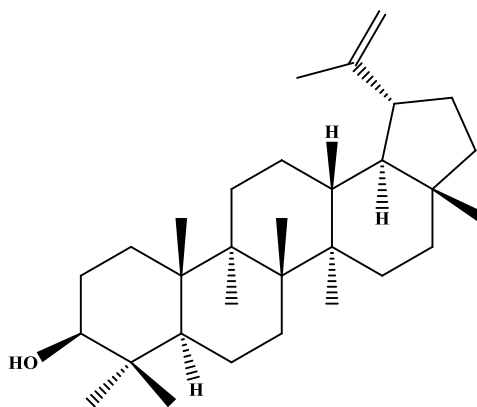


Tableau III-17, page 170

❖ **Composé DE8**

- **Nom** : β-sitostérol
- **Formule brute** : C₂₉H₅₀O
- **[α]_D** = -30 (C 0,8, CHCl₃)
- **ESI-MS**: Mode négatif
 $m/z = 413,27 [M-H]^-$
- **RMN ¹H** (500 MHz) et **RMN ¹³C**
 (125 MHz) dans le CDCl₃

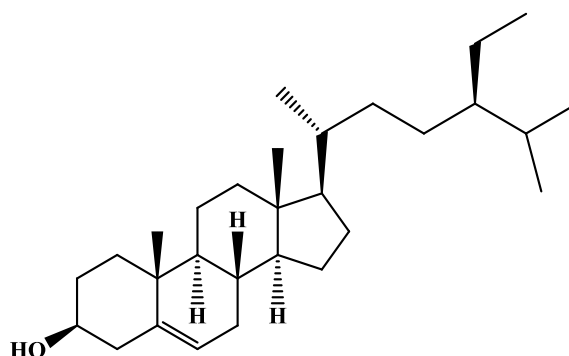


Tableau III-10, page 119

II.5 Activités biologiques**II.5.1 Activité antibactérienne**

L'activité antibactérienne des extraits bruts des deux plantes *Thymus algeriensis* et *Diplotaxis erucoïdes* a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé, dite méthode de diffusion sur disques [118], contre quatre souches bactériennes. Deux à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) et deux à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Pseudomonas aeruginosa* DMS 1117). Ces souches proviennent de l'Institut Pasteur d'Alger, Algérie.

II.5.1.1 Préparation des précultures

Les souches bactériennes à tester ont été cultivées dans des boîtes de pétrie contenant de la gélose nutritive par la méthode de stries des quatre quadrants dans des conditions stériles et à des températures optimales selon la souche concernée pendant 24 h.

Le dépôt de l'échantillon ou de la suspension de germe est effectué en une strie dans un quart de la boîte qui constituera le premier quadrant (A). Un isolement est effectué à l'aide d'une pipette Pasteur selon les étapes suivantes (Figure II.26):

- A. Dépôt de l'échantillon,
- B. Stries serrées sur la première moitié de la boîte,
- C. Après avoir tourné la boîte de 90°, des stries serrées sont à nouveau effectuées sur une moitié de boîte,
- D. Le dernier quadrant estensemencé sans rentrer au contact des quadrants précédents.

Ainsi, par cette méthode, le dernier quadrant contient des colonies isolées schématisées en E et en pratique en F, qui vont servir à la préparation de l'inoculum.

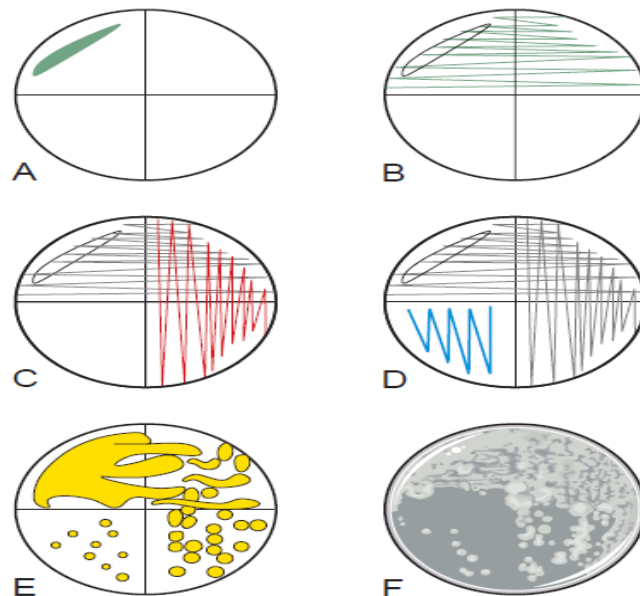


Figure II.26 : Les étapes de préparation des précultures

II.5.1.2 Préparation de la suspension bactérienne (inoculum)

Il est recommandé d'inoculer les suspensions bactériennes, ajustées pour obtenir une densité bactérienne de 0,5 McFarland pour la très grande majorité des bactéries. Les colonies isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester ont été mises dans 5 ml de bouillon nutritif, ensuite incubées pendant 10-24 h à 37 °C. Une lecture de la densité optique

de 1 ml d'inoculum a été effectuée par un spectrophotomètre à 625 nm. Son opacité doit être équivalente à 0,5 McFarland. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture cellulaire s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

II.5.1.3 Réalisation des tests antibactériens

L'inoculum est ensemencé sur des boîtes de pétri contenant la gélose Mueller-Hinton à l'aide d'un écouvillon. Cet écouvillon stérile est trempé auparavant dans la suspension bactérienne et essoré sur le bord du tube. La surface entière de la gélose a été étalée à trois reprises, en tournant la boîte à environ 60° après chaque application dont le but d'avoir une distribution homogène des bactéries.

Des disques de papier Whatman (6 mm) ont été imprégnés de 10 µl des solutions d'extrait à différentes concentrations (100, 50, 25, 12,5, 6,25 µg ml⁻¹) et déposés soigneusement sur la surface de la gélose inoculée avec une pince stérile. Les disques des témoins négatifs ont été imprégnés de DMSO. Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37 ° C pendant 24 h. Les tests ont été effectués en triple. L'activité antibactérienne est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition produite autour des disques.

II.5.2 Dosage des polyphénols totaux

La quantification du contenu phénolique total a été estimée par le test de Folin-Ciocalteu 200 µl d'échantillons dilués (extraits et standard) ont été mélangés avec 1 ml de réactif Folin – Ciocalteu (1/10) [119]. Après 4 min, 800 µl de carbonate de sodium (Na₂CO₃; 75 g l⁻¹) ont été ajoutés. Les solutions résultantes ont été placées dans un endroit sombre pendant 2 heures et les absorbances ont été mesurées à 765 nm. L'acide gallique a été utilisé pour la courbe d'étalonnage standard et les résultats ont été exprimés en microgrammes d'équivalents d'acide gallique par mg d'extrait brut.

II.5.2.1 Teneur totale en flavonoïdes

La teneur totale en flavonoïdes a été déterminée par la méthode au trichloroaluminium [119]. En bref, 1 ml de solution de trichloroaluminium (AlCl₃; 2%) a été ajouté à 1 ml d'échantillons (extraits et quercétine). Le mélange a été agité et incubé à température ambiante pendant 10 min. Les absorbances ont été lues à 430 nm pour chaque échantillon. La quercétine a été utilisée pour établir la courbe d'étalonnage et les résultats ont été donnés en microgrammes équivalents de quercétine par milligramme d'extrait.

II.5.3 Activité antioxydante

II.5.3.1 Test de piégeage des radicaux libres (DPPH)

Un volume de 25 µl d'échantillons (extraits et standards) a été ajouté à 975 µl de solution de DPPH préparée dans du méthanol (0,025 mg ml⁻¹). Le mélange réactionnel a été incubé dans l'obscurité à température ambiante pendant 30 min. Après incubation, les absorbances ont été mesurées à 517 nm [119]. Le pourcentage d'activité d'élimination des radicaux DPPH de chaque échantillon a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Activité de piégeage DPPH (\%)} = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Echantillon}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

Où

A_{Blanc} : est l'absorbance du blanc

$A_{\text{Echantillon}}$: est l'absorbance des extraits bruts ou des étalons.

Les expériences ont été réalisées en triple et les résultats ont été transmis en moyenne (valeurs \pm SD).

II.5.3.2 Test de la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC)

L'activité antioxydante par le test CUPRAC a été déterminée selon la méthode d'Apak et al [119]. 50 µl de solution de CuCl₂ (10 mM) ont été ajoutés à 50 µl de néocuprine (7,5 mM) et 60 µl de solution tampon d'acétate d'ammonium (1 M; pH 7,0). Ensuite, 40 µl de différentes concentrations d'extraits et de standards ont été ajoutées au mélange. Les échantillons ont été protégés de la lumière pendant 1 heure et les absorbances ont été mesurées à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les résultats ont été exprimés en $A_{0,5}$ (µg ml⁻¹) et la capacité de réduction des extraits a été comparée à celles du BHA et du BHT comme standards.

II.5.3.3 Pouvoir réducteur du fer (FRAP)

Le test FRAP a été appliqué selon la méthode décrite par Oyaizu en 1986, basée sur la réduction de l'ion ferrique (Fe³⁺) en ion ferreux (Fe²⁺) par un composé antioxydant ou un extrait brut [119]. 100 µl d'extraits bruts ou d'étalons à différentes concentrations ont été ajoutés à 500 µl de tampon phosphate (0,2 M; pH 6,6) et 500 µl de ferricyanure de potassium (1%). Le mélange réactionnel a été incubé à 50 ° C pendant 20 min, puis 500 µl de CCl₃COOH (10%) ont été ajoutés. La solution résultante a été centrifugée pendant 10 min (3000 tr/min). Un volume de 500 µl de la solution surnageante a été mélangé avec 500 µl d'eau distillée et 125 µl de FeCl₃ (1%) fraîchement préparé. Les absorbances ont été lues à 700 nm et les résultats ont été calculés comme $A_{0,5}$ (µg ml⁻¹).

II.5.3.4 Teste de phosphomolybdate (PPM)

La capacité antioxydante totale des extraits organiques a été évaluée par un essai au phosphomolybdène [118]. Cette méthode est basée sur la réduction du molybdate Mo VI en molybdate Mo V par les composés antioxydants, avec la formation d'un complexe vert de phosphomolybdate Mo V qui présente un maximum d'absorption à 695 nm.

100 µl d'extraits ont été ajoutés à 900 µl de mélange de réactifs (acide sulfurique 0,6 M, phosphate de sodium 28 mM et molybdate d'ammonium 4 mM). Les solutions résultantes ont été incubées à 95 ° C pendant 90 min. Après refroidissement à température ambiante, les absorbances ont été mesurées à 695 nm. La capacité antioxydante des extraits a été exprimée en µg équivalents d'acide ascorbique par mg d'extrait (µg EAA mg⁻¹ d'extrait sec).

II.5.3.5 Dosage du thiocyanate ferrique

L'activité de peroxydation lipidique des échantillons (extraits et standards) a été déterminée selon la méthode de Takao et al [118]. 400 µl d'échantillons à la concentration de 100 µg ml⁻¹ ont été ajoutés à 400 µl d'acide linoléique (2,52%) et 800 µl de solution tampon phosphate (pH 7,4). Le mélange a été incubé à 40 ° C pendant 1 heure, ensuite, 100 µl de la solution résultante ont été ajoutés à 5 ml d'éthanol dilué (70%) et 100 µl de NH₄SCN (30%). Après 3 min, 100 µl du chlorure de fer (II) préparé dans de l'acide chlorhydrique (3,5%) ont été ajoutés. Les absorbances ont été lues pendant 7 jours à 500 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Le pourcentage d'inhibition de la peroxydation lipidique a été calculé selon l'équation suivante:

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (A_{\text{Echantillon}} / A_{\text{Blanc}})] \times 100$$

II.5.4 Activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'effet anti-inflammatoire *in vitro* d'extraits bruts (PE, CHCl₃ et *n*-BuOH) de la plante *T. algeriensis* a été évalué par la méthode de dénaturation de l'albumine d'œuf [120].

200 µl d'albumine d'œuf (à partir d'œuf de poule frais) ont été ajoutés à 2,8 ml de solution saline tamponnée au phosphate (PBS, pH 6,4) et 2 ml de différentes concentrations d'échantillons (extraits et diclofénac sodique comme standard). Les tubes obtenus ont été incubés pendant 15 minutes à 37°C puis chauffés pendant 5 minutes à 70°C. Après refroidissement à température ambiante, les absorbances ont été mesurées à 660 nm. Une solution témoin a été préparée en remplaçant les échantillons par de l'eau bidistillée et le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé comme suit :

$$\text{Inhibition (\%)} = [1 - (A_{\text{Echantillon}} / A_{\text{Blanc}})] \times 100$$

II.5.5 Activité anti-hémolytique

➤ *Prélèvement et préparation d'échantillons de sang*

Le sang provenant de volontaires masculins sains par ponction veineuse a été stocké dans des tubes héparinés et centrifugé à 3500 tr/min pendant 15 minutes. Après centrifugation, le plasma a été prélevé et les globules rouges ont été suspendus dans 10 volumes de NaCl à 0,9%, ensuite centrifugés à 2500 tr/min pendant 10 min. Les globules rouges résultants ont été lavés trois fois avec la même solution.

➤ *Détermination de la concentration inhibitrice de l'hémolyse à 50% (CIH₅₀)*

Pour déterminer la concentration de NaCl correspondant à l'inhibition à 50% des érythrocytes, 500 µl d'échantillon sanguin ont été ajoutés à 5 ml des différentes solutions hypotoniques (7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 et 0 g l⁻¹). Les solutions ont été immédiatement mélangées par retournement plusieurs fois et incubées pendant 30 min à 37 ° C. Les tubes ont ensuite été mélangés à nouveau et centrifugés pendant 5 min à 1500 tr/min. L'absorbance du surnageant a été lue à 540 nm en utilisant une solution de NaCl à la concentration de 7,0 g l⁻¹ sous forme de blanc. Cette procédure a été répétée trois fois pour les différents sangs et la moyenne a été prise [121].

➤ *Test de fragilité osmotique érythrocytaire d'extraits bruts*

L'activité anti-hémolytique des extraits de *T. algeriensis* a été réalisée en utilisant le modèle de fragilité osmotique érythrocytaire. En effet, 4,5 ml de solution saline hypotonique NaCl (CIH₅₀ = 4 g l⁻¹), ont été ajoutés à 500 µl d'extraits bruts à différentes concentrations et 500 µl de la suspension érythrocytaire. Les tubes ont été incubés pendant 30 min à 37 ° C puis centrifugés à 1500 tr/min pendant 5 min. L'absorbance du surnageant a été mesurée à 540 nm. Les pourcentages d'inhibition de l'hémolyse des extraits bruts ont été déterminés avec la formule suivante:

$$\% \text{ Inhibition de l'hémolyse} = [(A_{\text{Blanc}} - A_{\text{Echantillon}}) / A_{\text{Blanc}}] \times 100$$

II.5.6 Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été réalisées en triple et les résultats ont été donnés en moyenne ± SD (p <0,05) de trois répétitions pour chaque échantillon. Les données ont été analysées par ANOVA unidirectionnelle (GraphPad Prism 5) et par test Tukey. Les résultats ont été exprimés en µg d'EAA mg⁻¹ d'extrait pour la capacité antioxydante totale, la CI₅₀ a été appliquée pour l'activité de piégeage des radicaux DPPH et le pourcentage d'inhibition (%) a

été utilisé pour mesurer les activités anti-inflammatoires, anti-hémolytiques et ferriques du thiocyanate. L' $A_{0.5}$ a été calculé pour déterminer l'activité CUPRAC.

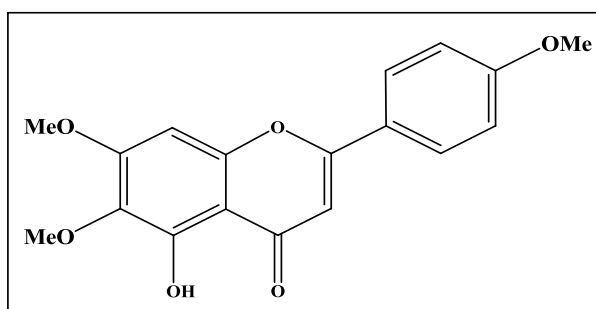
PARTIE III
RÉSULTATS ET
DISCUSSION

III.1 Caractérisation structurale des produits obtenus de *T. algeriensis*

L'étude chimique des deux extraits CHCl_3 et *n*-BuOH de l'espèce *T. algeriensis* a conduit à l'isolement de dix métabolites secondaires purs dont neuf composés isolés de l'extrait CHCl_3 et un de l'extrait *n*-BuOH.

Plusieurs méthodes d'analyse spectroscopique ont été employées (RMN ^1H , RMN ^{13}C , HSQC, COSY, HMBC, UV et spectrométrie de masse), pour identifier les composés isolés. En plus, une comparaison avec les données de la littérature a été utilisée.

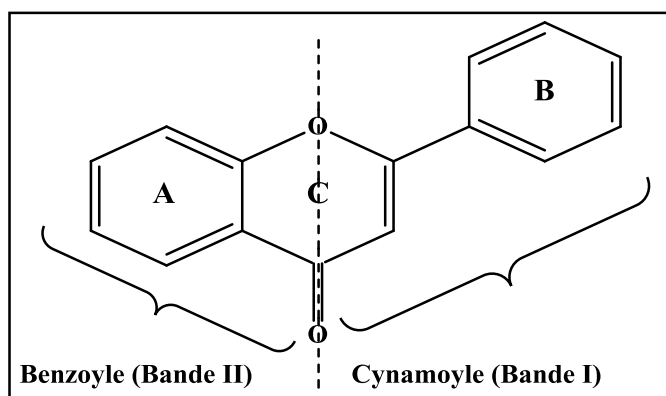
III.1.1 Identification structurale du composé TA1



5-hydroxy-6,7,4'-triméthoxyflavone (Salvigénine)

Ce composé est obtenu sous forme de cristaux jaunes solubles dans le chloroforme. Il est visible sous la lumière UV à 254 et 366 nm et se colore en jaune par pulvérisation de sa CCM par une solution de vanilline sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre UV du composé **TA1** (Figure III.1) enregistré dans le MeOH montre deux bandes maximales d'absorption à 277,31 nm (bande II) correspondant à l'absorption du système benzoyle (cycle A) et 328,19 nm (bande I) attribuée à l'absorption du système cinnamoyle (cycle B). Ces deux bandes sont caractéristiques d'un squelette flavonoïque de type flavone.



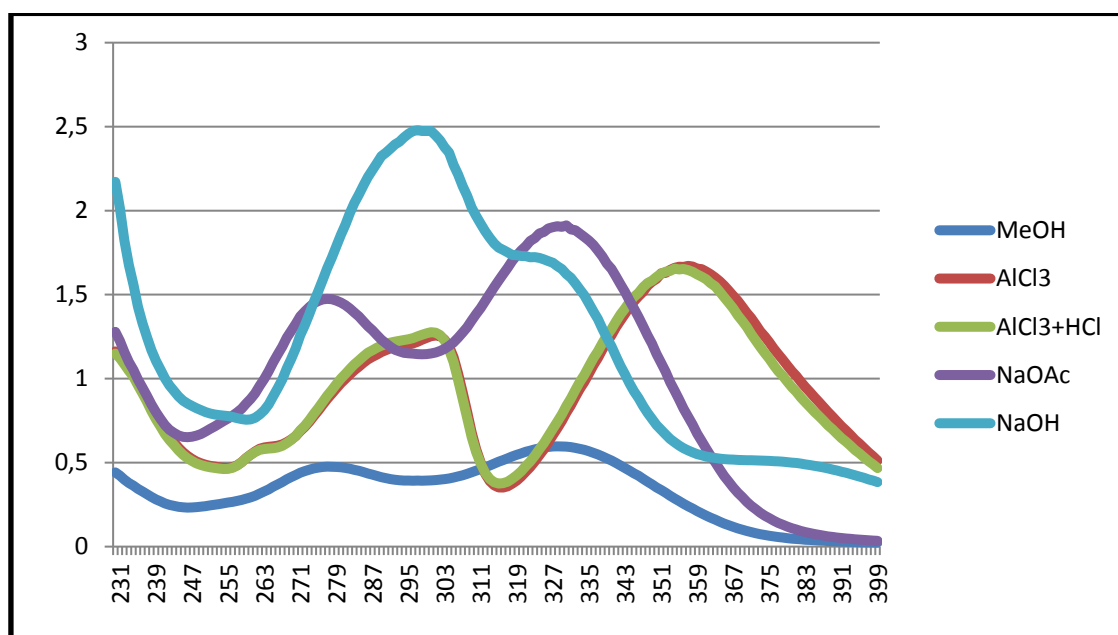
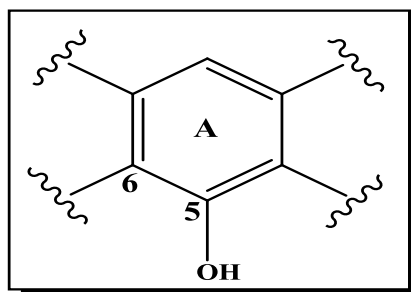


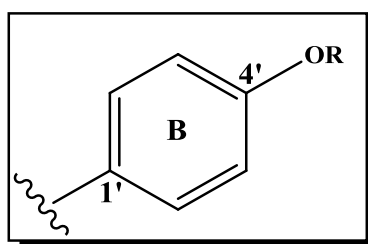
Figure III.1: Spectre UV du composé TAI

L'analyse des spectres UV (Figure III.1) en présence de différents réactifs (NaOH, NaOAc, AlCl₃ et HCl) montre :

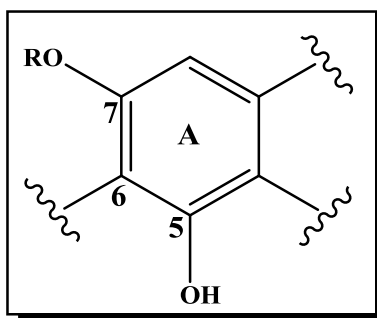
- ✓ Un effet bathochrome de la bande I de +20 nm après l'addition d'AlCl₃. Cet effet reste après l'ajout du HCl, ce qui suggère la présence d'un OH libre en position 5 ;



- ✓ L'absence d'un déplacement hypsochrome de la bande II en comparant les deux spectres enregistrés dans AlCl₃ et AlCl₃+HCl indique l'absence d'un système ortho-dihydroxylé sur le cycle B ;
- ✓ L'addition de NaOH induit un faible déplacement de la bande II, révélant la présence d'un groupement (O-R) en position 4'.



- ✓ La très faible diminution de la bande I suite à l'addition de NaOAc atteste de la présence d'un groupement (O-R) en position 7.



L'ensemble des données de la série spectrale UV est reporté dans le tableau suivant :

Tableau III.1a : Données UV du composé TA1

Réactifs	Déplacement en nm	
	Bande II	Bande I
MeOH	277,31	328,19
AlCl ₃	301,06	357,08
AlCl ₃ + HCl	300,18	354,22
NaOH	296,62	323,85
NaOAc	277,11	327,78

Le spectre de masse ESI de ce composé (Figure III.2), enregistré en mode positif, montre plusieurs pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 329,036$ $[M+H]^+$, $663,072$ $[2M+H]^+$, $350,956$ $[M+Na]^+$ et $678,94$ $[2M+Na]^+$ correspondant à une masse moléculaire égale à 328 uma et une formule brute en C₁₈H₁₆O₆.

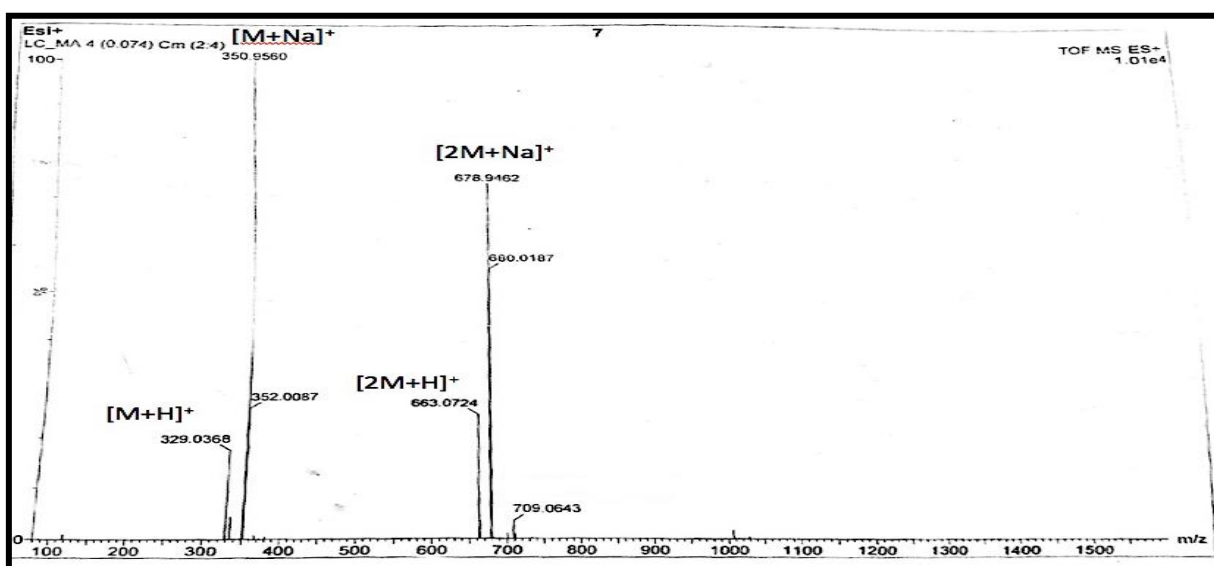


Figure III.2: Spectre de masse ESI⁺ du composé TA1

L'analyse combinée des spectres RMN ^1H (Figure III.3), COSY H-H (Figure III.4) et HSQC J -modulé (Figure III.5) du composé **TA1** permet de visualiser les signaux suivants :

- ✓ Deux signaux d'intégration 2H chacun sous forme de doublet à δ_{H} 7,88 (2H, d , $J = 8,9\text{Hz}$) et δ_{H} 7,05 (2H, d , $J = 8,9\text{Hz}$) indiquant la présence d'un système A_2X_2 caractéristique d'un noyau aromatique para-substitué. Selon le spectre COSY, ces protons appartiennent au même système de spins, attribuables aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' respectivement du cycle B d'une flavone. Leurs carbones sont assignés par l'analyse du spectre HSQC à δ_{C} 128 (C-2'/C-6') et δ_{C} 114,5 (C-3'/C-5').

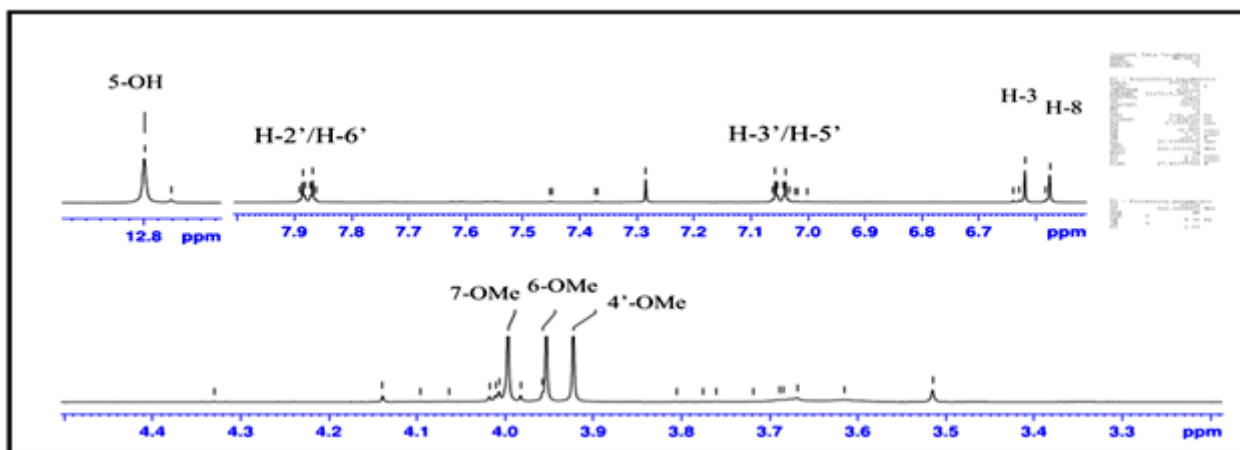


Figure III.3: Spectre RMN ^1H du composé **TA1** (CDCl_3)

- ✓ Un signal d'intégration 1H sous forme d'un singulet observé à δ_{H} 6,62. Son carbone résonne à δ_{C} 104,2 selon l'expérience HSQC. Les valeurs des déplacements chimiques laisseraient supposer qu'il s'agit du proton H-3 d'une flavone ;
- ✓ Un autre signal à δ_{H} 6,58 sous forme d'un singulet s'intégrant pour un proton, ne présentant aucun couplage sur le spectre COSY, est attribué soit au proton H-8 ou H-6 du cycle A. ce signal couple sur le spectre HSQC avec un carbone à δ_{C} 90,6. Son déplacement chimique relativement blindé suggère qu'il s'agit du carbone C-8 ;

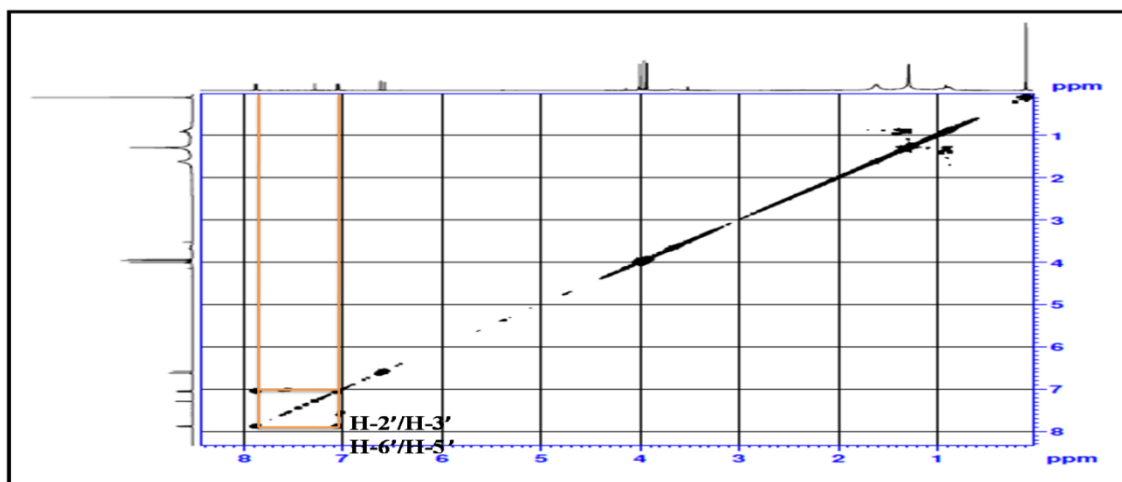


Figure III.4: Spectre COSY H-H du composé **TA1**

- ✓ Trois singulets s'intégrant pour 3 protons chacun à δ_H 3,99 ; 3,95 et 3,92 attribués aux trois groupements méthoxyles. Leurs carbones sont repérés à δ_C 56,3 ; 60,9 et 55,6 respectivement.

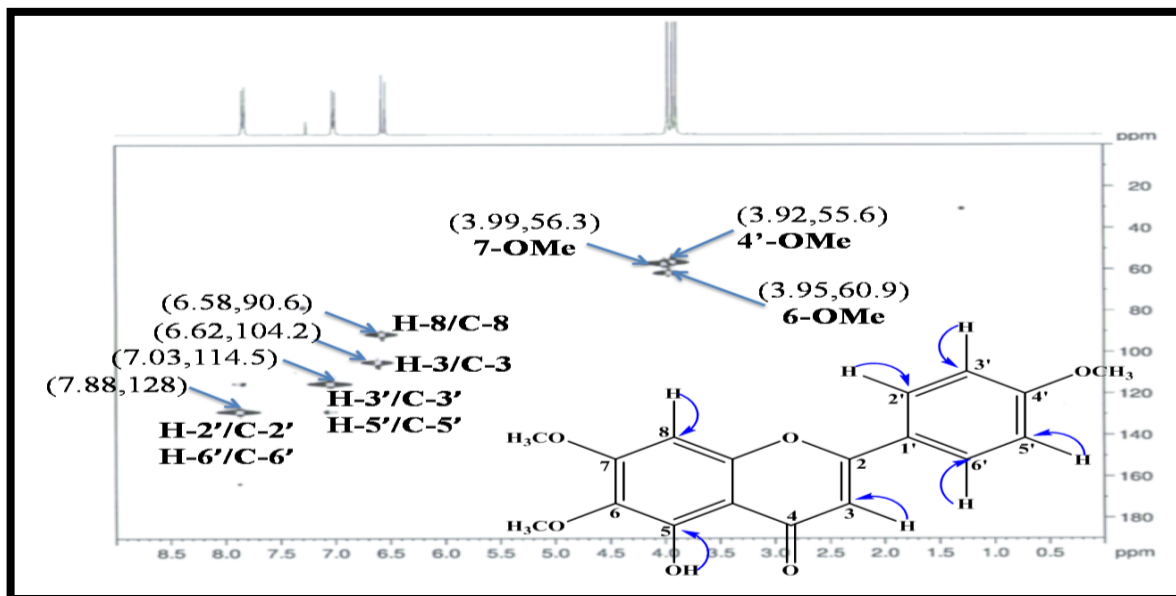
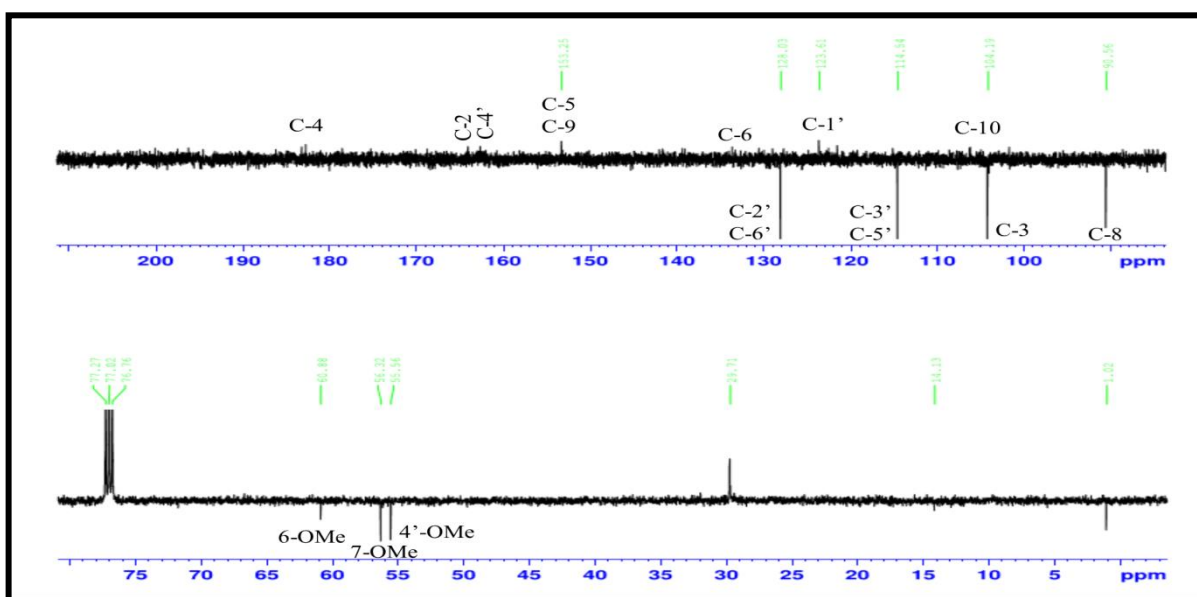


Figure III.5: Spectre HSQC du composé TA1

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé TA1 (Figure III.6) montre 15 signaux correspondant aux 18 atomes de carbone, qui sont répartis comme suit :

- ✓ Un carbonyle à $\delta_C = 182,5$ correspondant au carbone C-4;
- ✓ Six CH aromatiques raisonnant entre 90 et 130 ppm;
- ✓ Huit carbones aromatiques quaternaires;
- ✓ Trois carbones méthoxyliques.

Figure III.6: Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé TA1 ($CDCl_3$)

L'expérience HMBC conduit à l'établissement des principaux couplages hétéronucléaires H/C longue distance du composé **TA1**. En effet, ce spectre (Figure III.7) permet de visualiser les corrélations suivantes :

- ✓ Les protons H-2'/H-6' du cycle B de la flavone corrélient en 3J avec un carbone quaternaire éthylénique résonnant à δ_c 164 (C-2) et avec un autre carbone quaternaire oxygéné à δ_c 162,5 attribué au carbone C-4'.
- ✓ Les protons H-3' et H-5' du cycle B couplent en 3J avec un carbone à δ_c 123,6, ne pouvant être que le carbone C-1' de la flavone. D'autres couplages sont détectés entre les protons H-3' et H-5' et le carbone C-4' (Figure III.8).

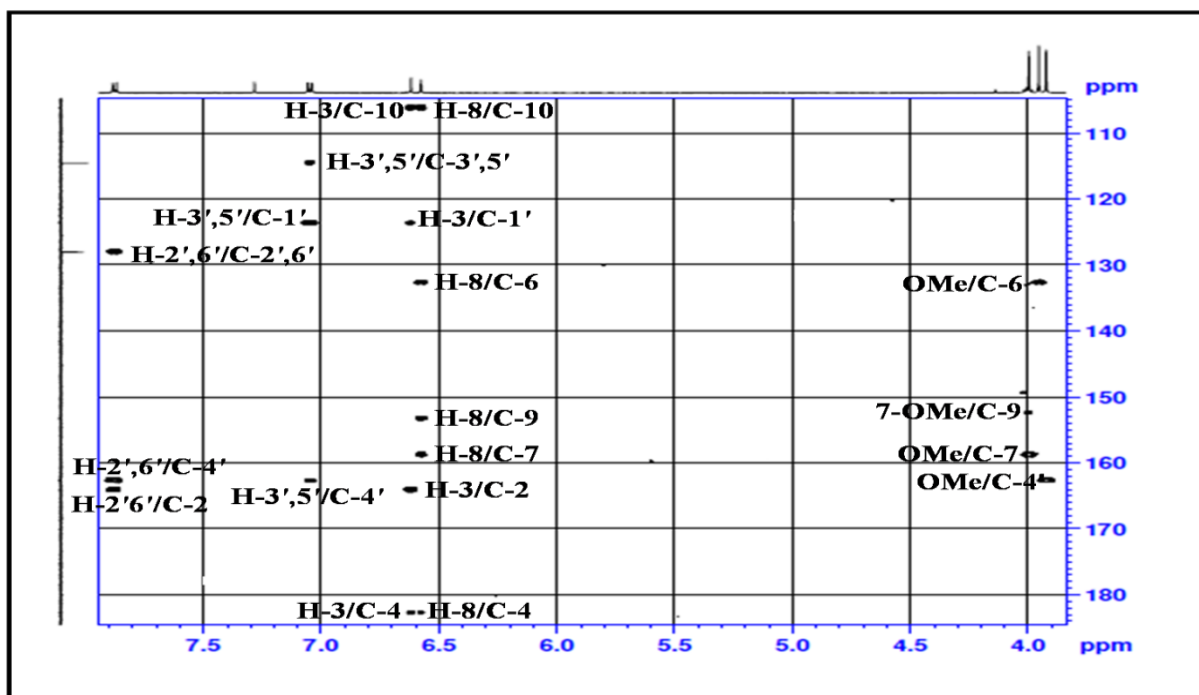


Figure III.7 : Spectre HMBC du composé **TA1**

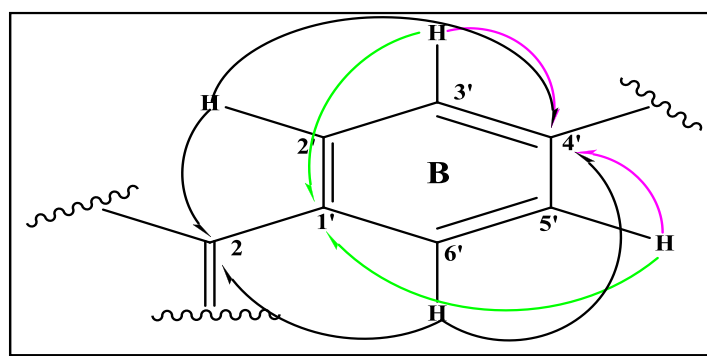


Figure III.8 Corrélations HMBC des protons aromatiques au niveau du cycle B du composé

TA1

Ce spectre (Figure III.7) permet d'observer aussi les couplages entre :

- ✓ Le proton H-3 et les carbones C-2 et C-1' déjà assignés et avec deux autres carbones, un quaternaire résonant à δ_c 106 correspondant au carbone C-10 et un carbonyle sortant à δ_c 182,5 attribuable au carbone C-4 ;
- ✓ Le proton H-8 déjà identifié et deux carbones quaternaires à δ_c 153,2 et 158,5 en 2J , attribuables respectivement aux carbones C-9 et C-7 et en 3J avec le carbone C-10 déjà attribué et un carbone quaternaire détecté à δ_c 133,5 (C-6) (Figure III.9).

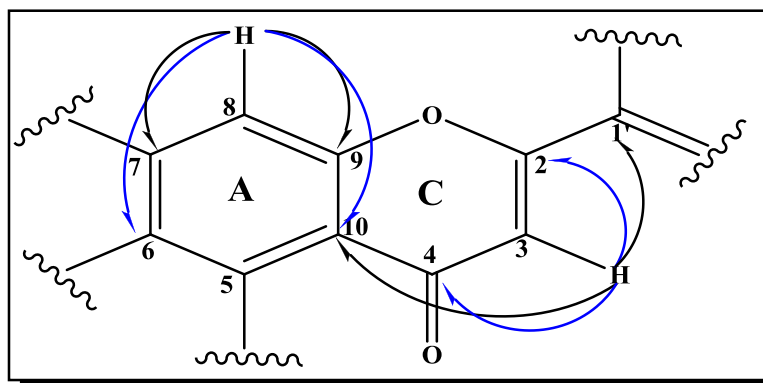


Figure III.9: Corrélations HMBC des protons H-3 et H-8 au niveau des cycles A et C du composé **TA1**

Le branchement des groupements méthoxyles aux cycles A et B de la flavone est mis en évidence par les corrélations visualisées sur le spectre HMBC entre les protons résonant à 3,92 ppm du groupement méthoxyle et le carbone C-4' (δ_c 162,57) du cycle B, de même qu'entre les protons des deux groupements méthoxyles à 3,95 et 3,99 ppm et les carbones C-6 (δ_c 133,5) et C-7 (δ_c 158,5) du cycle A (Figure III.10).

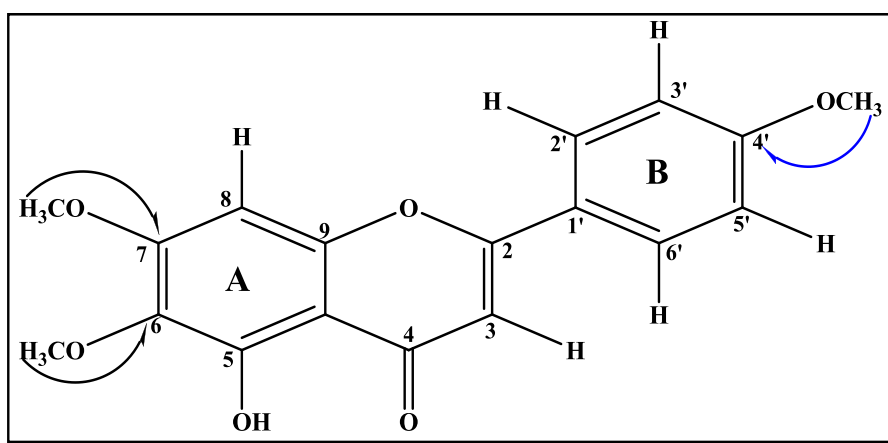
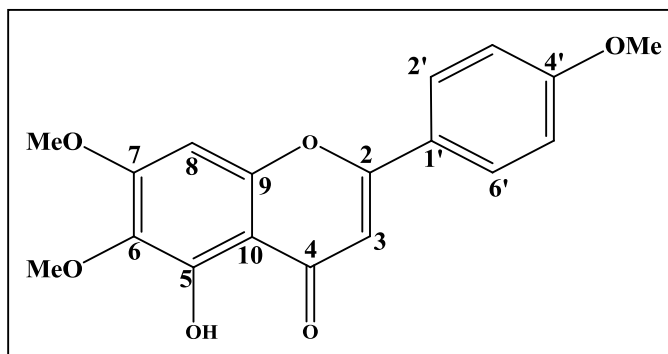


Figure III.10 : Corrélations HMBC des protons méthoxyliques du composé **TA1**

A ce niveau d'analyse tous les protons et carbones du composé **TA1** ont été caractérisés.

La comparaison de ces données spectroscopiques (Tableau III.1b) avec celles reportées dans la littérature, permet d'identifier le composé **TA1** comme étant une flavone nommée 5-hydroxy-6,7,4'-tri-méthoxyflavone connue sous le nom de Salvigénine [122]. Il a été trouvé dans les espèces du genre *Thymus* : *T. baicalensis*, *T. sibiricus* [123] et *T. striatus* [23].

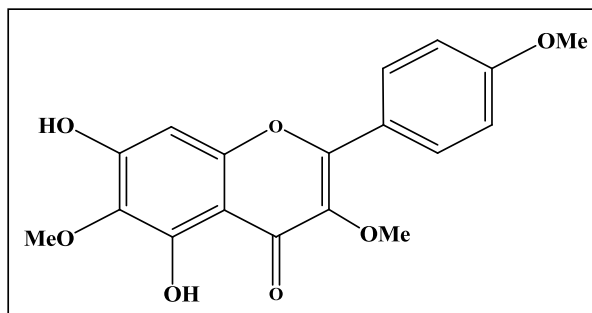


5-hydroxy-6,7,4'-triméthoxyflavone (Salvigénine)

Tableau III.1b : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C du composé **TA1** dans CDCl_3

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
2	164	-
3	104,2	6,62 (s)
4	182,5	-
5	153,1	-
6	133,5	-
7	158,5	-
8	90,6	6,58 (s)
9	153,2	-
10	106	-
1'	123,6	-
2'	128	7,88 (d, 8,9)
3'	114,5	7,05 (d, 8,9)
4'	162,5	-
5'	114,5	7,05 (d, 8,9)
6'	128	7,88 (d, 8,9)
6-OMe	60,9	3,95 (s)
7-OMe	56,3	3,99 (s)
4'-OMe	55,6	3,92 (s)

III.1.2 Identification structurale du composé TA2



5,7-dihydroxy-3,6,4'-triméthoxy flavone (Santin)

Le composé **TA2** se présente sous forme d'une poudre jaune, visible en UV (254 et 366 nm). Il est soluble dans le chloroforme et se colore en jaune après révélation de sa CCM, par une solution de vanilline sulfurique et chauffage. Sa fluorescence violette sombre sous lumière de Wood (366nm) laisse supposer qu'il s'agit d'une flavone ou d'un flavonol substitué en position C- 3.

Le spectre UV de ce composé (Figure III.11) enregistré dans le méthanol montre des bandes avec des maxima d'absorption à 299,39 et 364,07 nm caractéristique d'un flavonoïde substitué en 3 (3-OR).

On enregistre un déplacement bathochromique de 6 nm, sur la bande I (358 ,29 nm), après l'addition de l'acétate de sodium indiquant la présence d'un OH libre en C-7. De plus la superposition des deux spectres (NaOAc et NaOAc+ H₃BO₃) prouve l'absence d'un système orthodihydroxylé dans le cycle A.

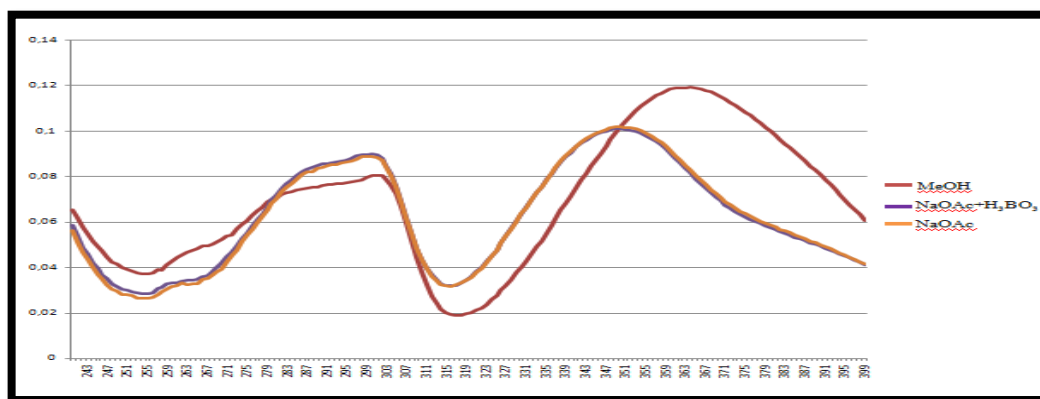


Figure III.11: Spectre UV du composé TA2

Son spectre de masse ESI-MS (Figure III.12), obtenu en mode positif, présente deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 366,9798 [M+Na]^+$ et $711,0505 [2M+Na]^+$, indiquant une masse moléculaire $M = 344$ uma correspondant à une formule brute en C₁₈H₁₆O₇. La différence de masse entre les composés **TA2** ($M = 344$) et **TA1** ($M = 328$) est de l'ordre de 16 uma, suggère la présence d'un oxygène en plus dans la structure du composé **TA2**.

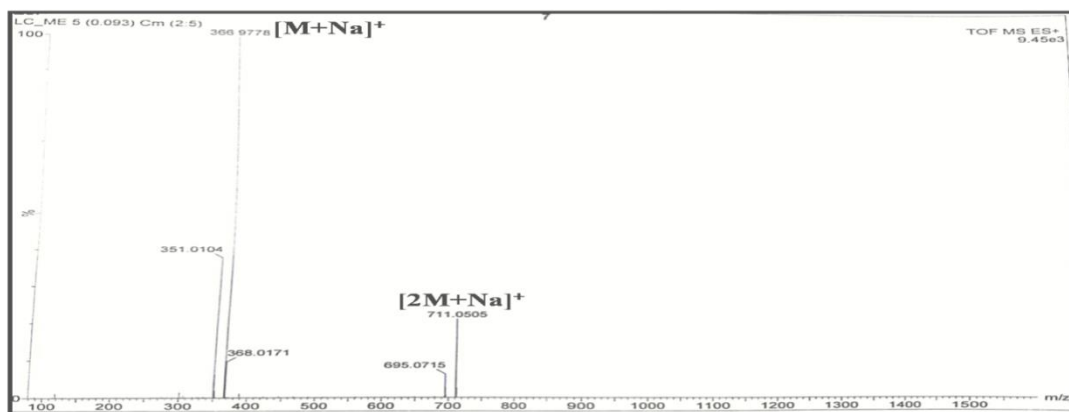


Figure III.12 Spectre de masse ESI⁺ du composé TA2

Une grande similitude est constatée entre le spectre RMN ¹H de ce composé et celui du composé précédent TA1 (Figures III.13). En effet, on reconnaît facilement les protons :

- ✓ H-3'/H-5' (δ_H 6,95 ; *d*, *J* = 8,9 Hz) ;
- ✓ H-2'/H-6' (δ_H 7,85 ; *d*, *J* = 8,9 Hz) ;
- ✓ H-8 (δ_H 6,55, s) ;
- ✓ Un proton fortement déblindé repéré à 12,8 (1H, s) correspondant au groupement hydroxyle en position 5 ;
- ✓ Trois groupements méthoxytes sortant à δ_H 4,05 ; 3,95 (OMe-C6) et 3,92 (OMe-C4).

La différence réside dans l'absence du signal de proton sortant à 6,62 ppm (H-3) sur le spectre RMN ¹H (Figures III.13).

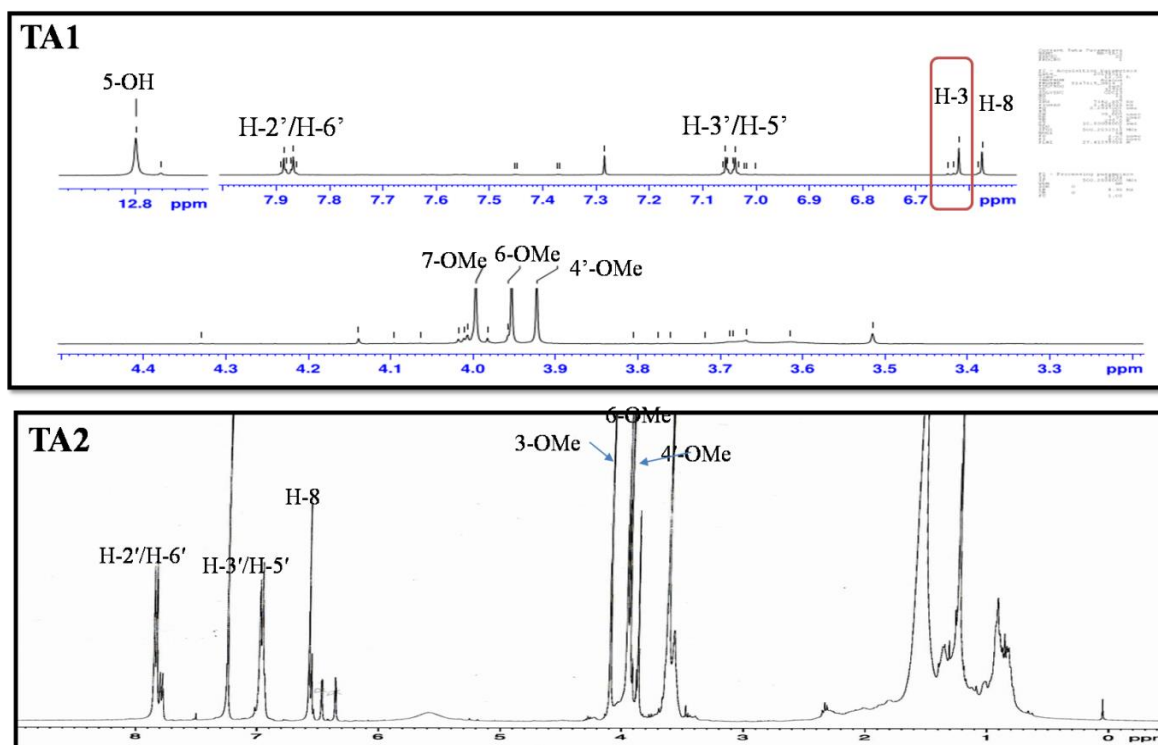
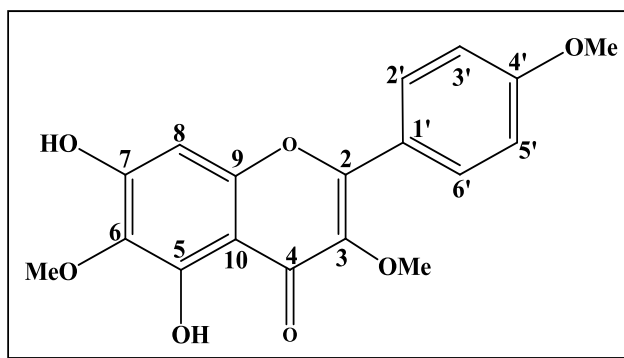


Figure III.13 : Spectres RMN ¹H des composés TA2 et TA1 (CDCl₃)

L'attribution des groupements méthoxyles en C-3 et hydroxyle en C-7 a été faite en se basant sur l'analyse de la série spectrale UV et par comparaison avec les données de la littérature [124].

L'ensemble des données spectroscopiques (Tableau III.2) et la comparaison avec la littérature permettent d'identifier le composé **TA2** comme étant 5,7-dihydroxy-3,6,4'-triméthoxyflavone [124].

Ce composé, appelé aussi Santin, est décrit pour la première fois dans le genre *Thymus*. Antérieurement, il a été rencontré dans certaines espèces de la famille Asteraceae : *Parthenium hysterophorus* et *Tanacetum parthenium* [125,126]. Il est doté d'une activité antituberculeuse [127].

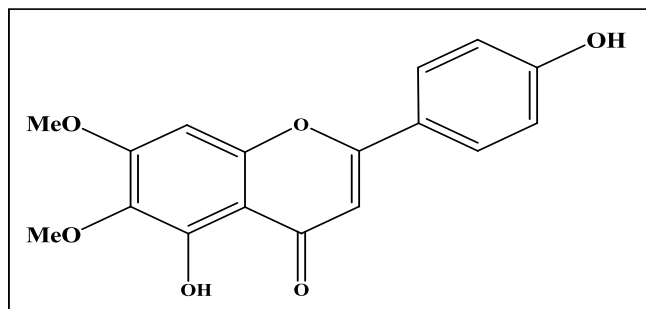


5,7-dihydroxy-3,6,4'-triméthoxyflavone (Santin)

Tableau III.2 : Déplacements chimiques en RMN¹H du composé **TA2** dans CDCl₃

Position	δ_H (m, J en Hz)	Position	δ_H (m, J en Hz)
2	-	1'	-
3	-	2'	7,85 (d, 8,9)
4	-	3'	6,95 (d, 8,9)
5	-	4'	-
6	-	5'	6,95 (d, 8,9)
7	-	6'	7,85 (d, 8,9)
8	6,55 (s)	3-OMe	4,05 (s)
9	-	6-OMe	3,95 (s)
10	-	4'-OMe	3,92 (s)
		5-OH	12,8 (s)

III.1.3 Identification structurale du composé TA3



5,4'-dihydroxy-6,7-diméthoxy flavone (cirsimaritine)

Ce composé nommé cirsimaritine est purifié sous forme d'une poudre jaune. Il est visible sous la lumière UV (254 et 366 nm). La présence d'une tache jaune sur CCM après révélation par une solution acide et chauffage, laisse supposer qu'il s'agit d'un flavonoïde.

Son spectre UV (Figure III.14) obtenu dans le MeOH montre deux valeurs maximales d'absorbance à 280 et 344,56 nm, révélant qu'il s'agit d'une flavone. L'addition de NaOH provoque un effet bathochrome de +46 nm de la bande I (390,55 nm), ce qui permet de déduire que l'hydroxyle en position 4' du cycle B est libre. On enregistre également un déplacement bathochromique de +10 nm de la bande I (355,43 nm) après l'addition de AlCl₃, ce qui indique la présence d'un hydroxyle libre en position C-5.

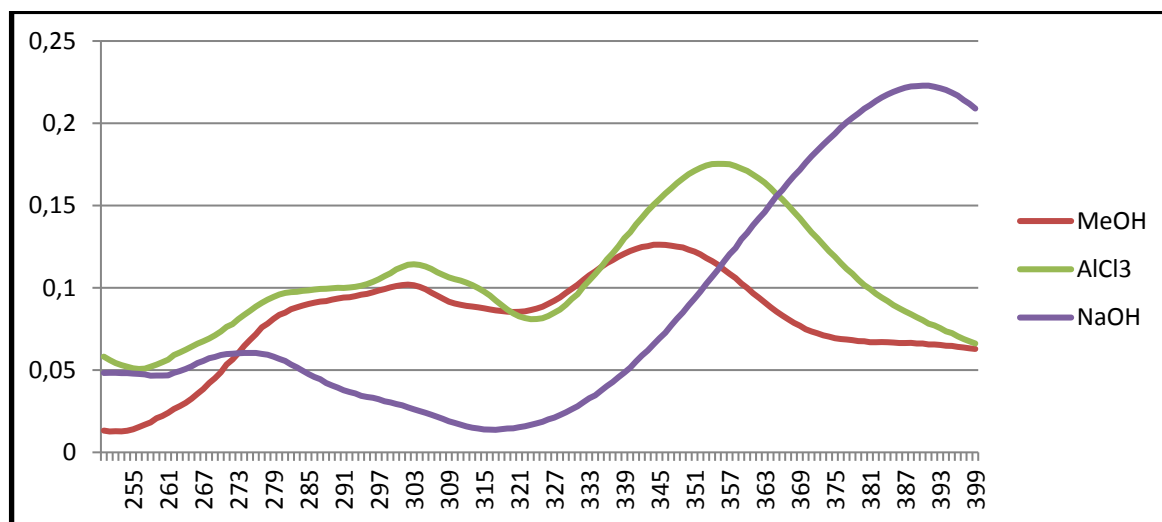


Figure III.14: Spectre UV du composé TA3

Le spectre de masse ESI-MS de ce composé (figure III.15), enregistré en mode positif, donne deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 336,9692$ $[M+Na]^+$ et $651,0370$ $[2M+Na]^+$ correspondant à une masse moléculaire de 314 uma et une formule brute en C₁₇H₁₄O₆.

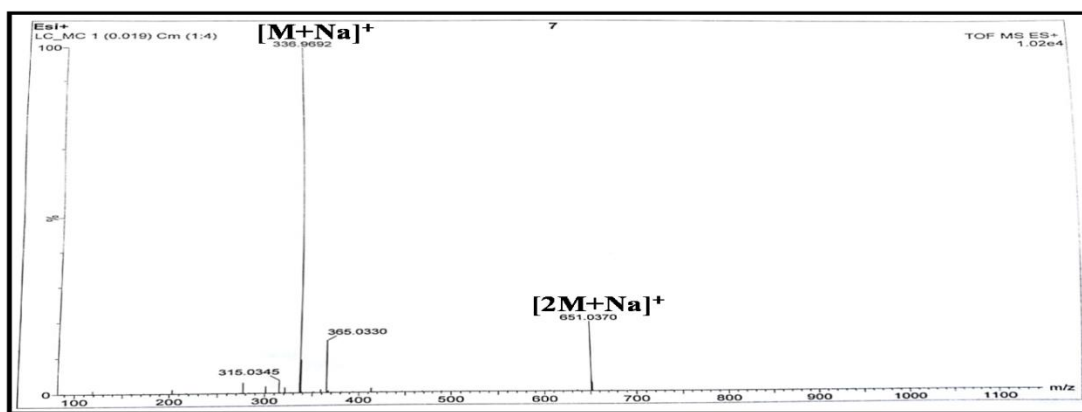


Figure III.15: Spectre de masse ESI⁺ du composé TA3

Le spectre RMN ¹H du composé TA3 montre une allure semblable à celui du composé TA1 déjà caractérisé, notamment au niveau de la zone aromatique. L'unique différence réside au niveau du nombre de groupements méthoxyles du composé TA3 égale à 2, soit un méthoxyle en moins par rapport au composé TA1 (Figure III.16).

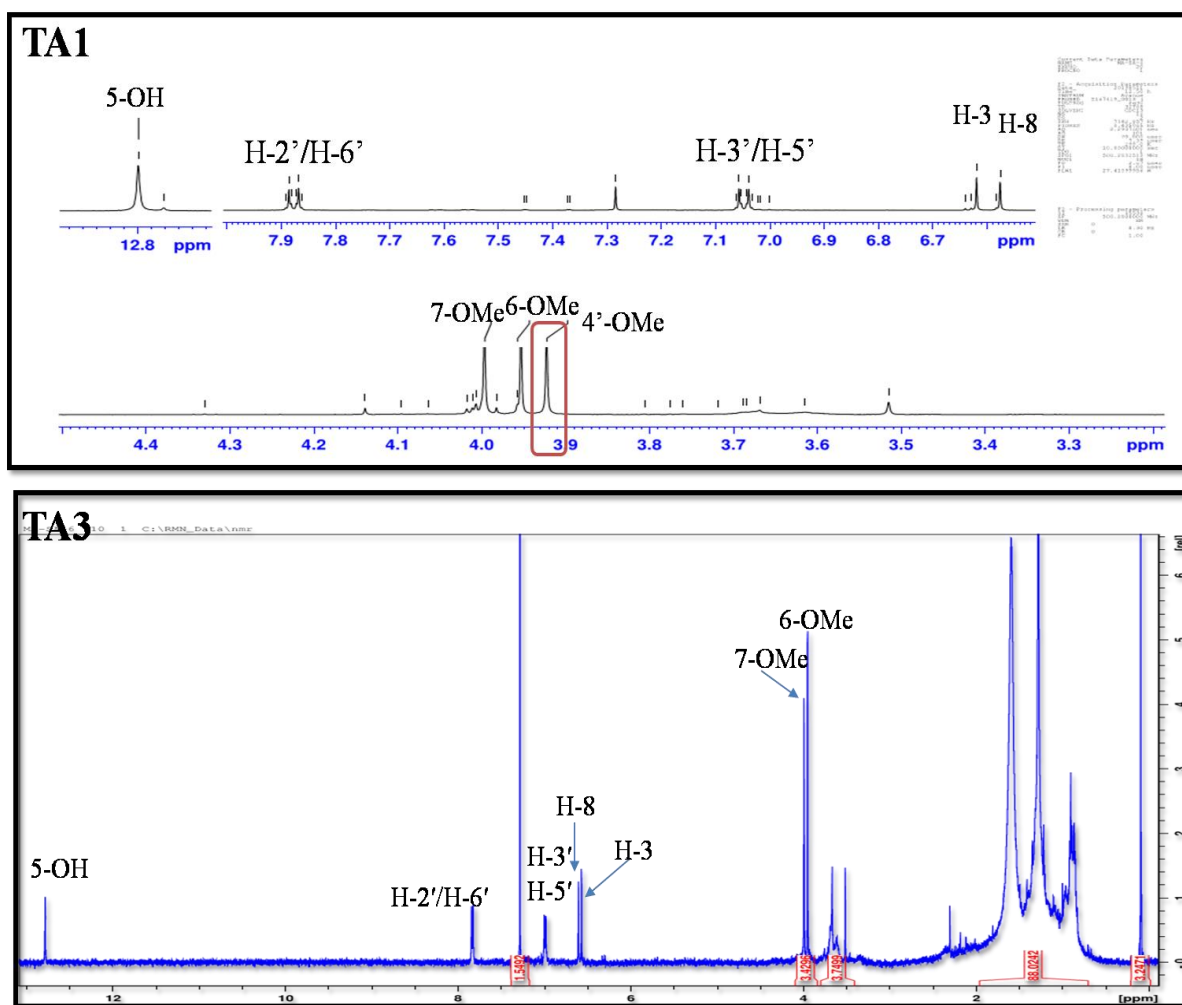
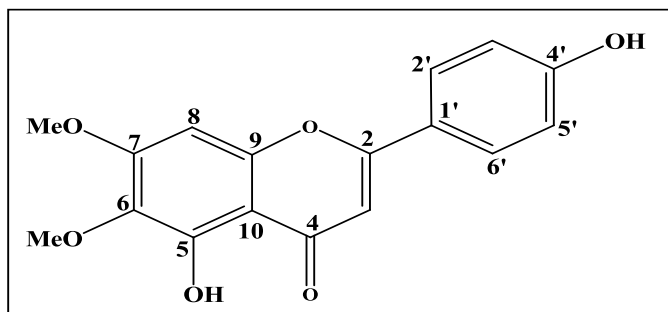


Figure III.16: Spectres RMN ¹H des composés TA3 et TA1 (CDCl₃)

L'ensemble de ces données spectrales (Tableau III.3) et la comparaison avec celles rapportées dans la littérature [122] confirment que le présent composé est le 5,4'-dihydroxy-6,7-diméthoxyflavone (cirsimaritrine). Ce composé a été isolé antérieurement des espèces : *Thymus serpyllum*, *T. herba-barona* et *T. vulgaris* [23,41].

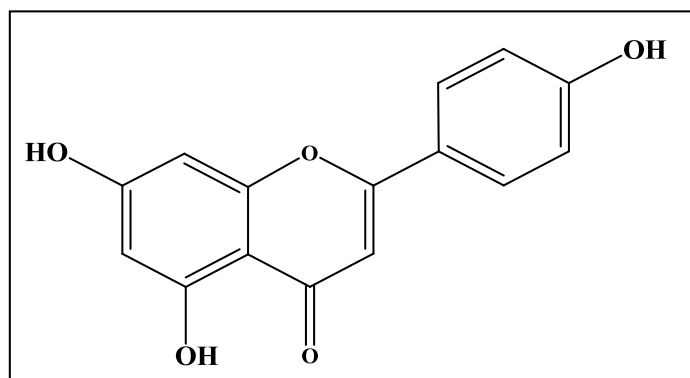


5,4'-dihydroxy-6,7-diméthoxyflavone

Tableau III.3 : Déplacements chimiques en RMN ^1H du composé TA3 dans CDCl_3

Position	δ_{H} (m, J en Hz)	Position	δ_{H} (m, J en Hz)
2	-	1'	-
3	6,58 (s)	2'	7,83 (d, 8,8)
4	-	3'	6,98 (d, 8,8)
5	-	4'	-
6	-	5'	6,98 (d, 8,8)
7	-	6'	7,83 (d, 8,8)
8	6,62 (s)	6-OMe	3,95 (s)
9	-	7-OMe	3,98 (s)
10	-	5-OH	12,8 (s)

III.1.4 Identification structurale du composé TA4



Apigénine

Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune, il se colore en jaune après révélation par la vanilline sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre UV (Figure III.17) du composé **TA4** enregistré dans le méthanol révèle la présence d'une bande I à 350 nm relatif d'une flavone. Un déplacement bathochromique de la bande I après l'addition d' AlCl_3 , indique la présence d'un hydroxyle libre en position 5.

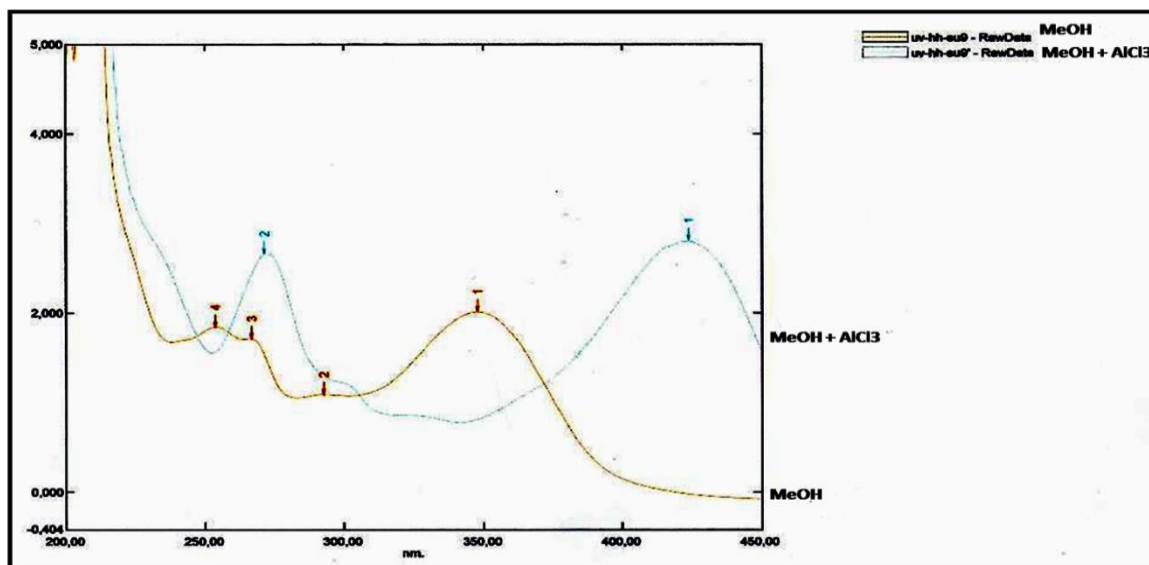


Figure III.17: Spectre UV du composé **TA4**

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III.18) de ce composé, montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 309$ $[\text{M}+\text{K}]^+$, correspondant à une masse moléculaire de 270 uma et une formule brute en $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$, soit une différence de - 44 uma par rapport au composé **TA3** déjà caractérisé.

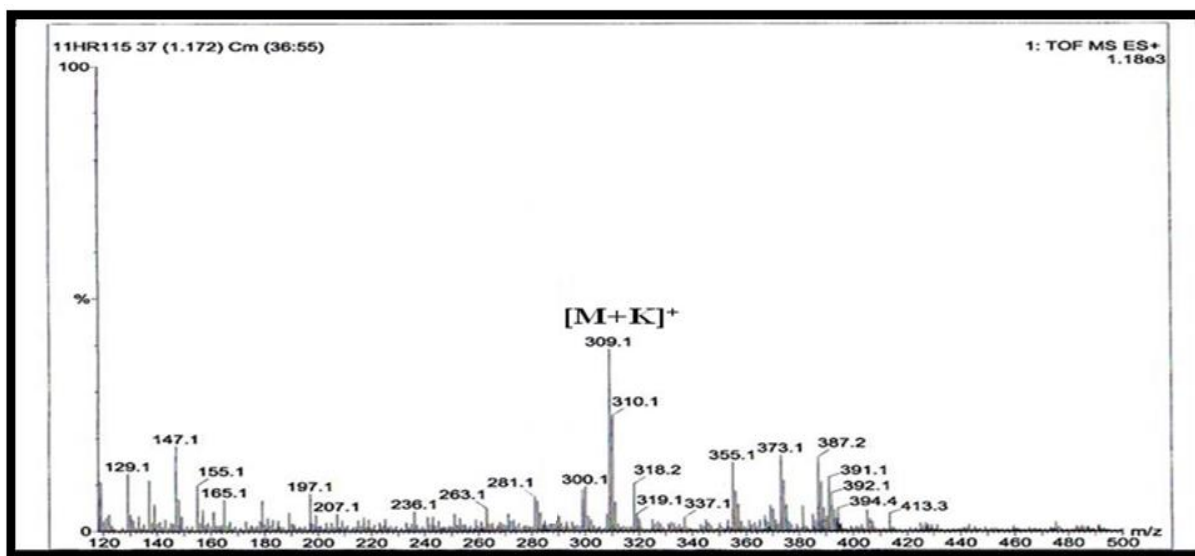


Figure III.18: Spectre de masse ESI-MS du composé **TA4**

Le spectre RMN ^1H du composé **TA4** enregistré dans le CD_3OD (Figure III.19) montre de grandes similitudes à celui du composé précédent **TA3**, particulièrement au niveau des cycles B et C de la flavone. En effet, on identifie aisément les protons :

- ✓ H-2'/H-6' et H-3'/H-5' du cycle B résonant respectivement à δ_{H} 7,40 (d , $J = 8,8\text{Hz}$) et 6,90 (d , $J = 8,8\text{ Hz}$) ;
- ✓ H-6 et H-8 du cycle A, repérés respectivement à δ_{H} 6,21 (sl) et 6,49 (sl) ;
- ✓ Un signal singulet à δ_{H} 6,59 correspondant au proton H-3 ;
- ✓ En outre, on remarque la disparition des signaux des deux groupements méthoxyles.

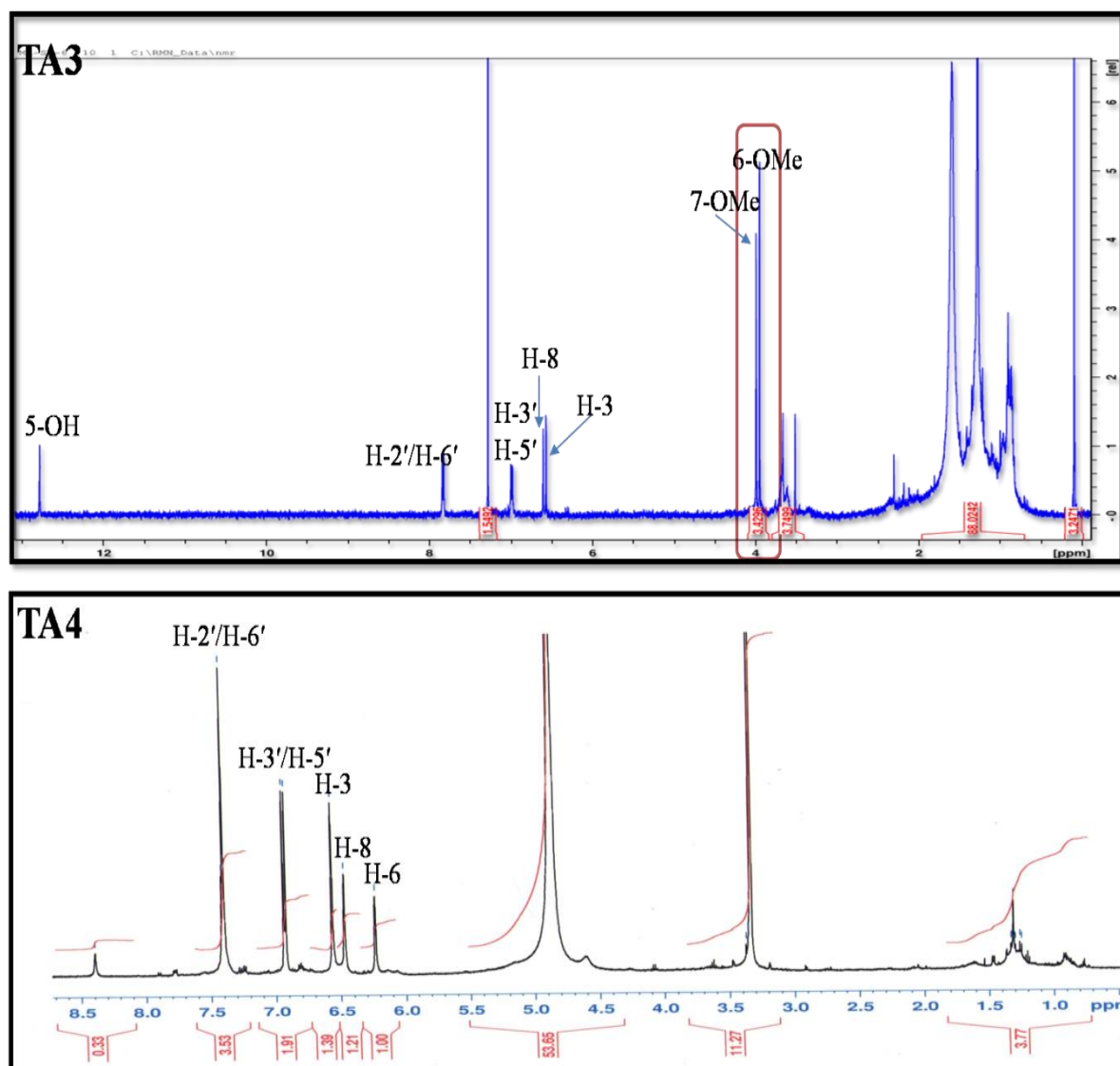


Figure III.19: Spectres RMN ^1H des composés **TA4** et **TA3**

En comparaison avec les données de la littérature le spectre RMN ^{13}C (Figure III.20) de ce composé montre la présence de huit signaux de carbones quaternaires résonant à δ_{C} 164,6 (C-2), 182,4 (C-4), 161,81 (C-5), 164,9 (C-7), 149,5 (C-9), 103,9 (C-10), 122,3 (C-1') et δ_{C}

158 (C-4'), et cinq signaux de carbones méthines CH repérés à δ_c 102,4 (C-3), 98,7 (C-6), 93,5 (C-8), 127,5 (C-2'/C-6') et δ_c 115,3 (C-3'/C-5') [128].

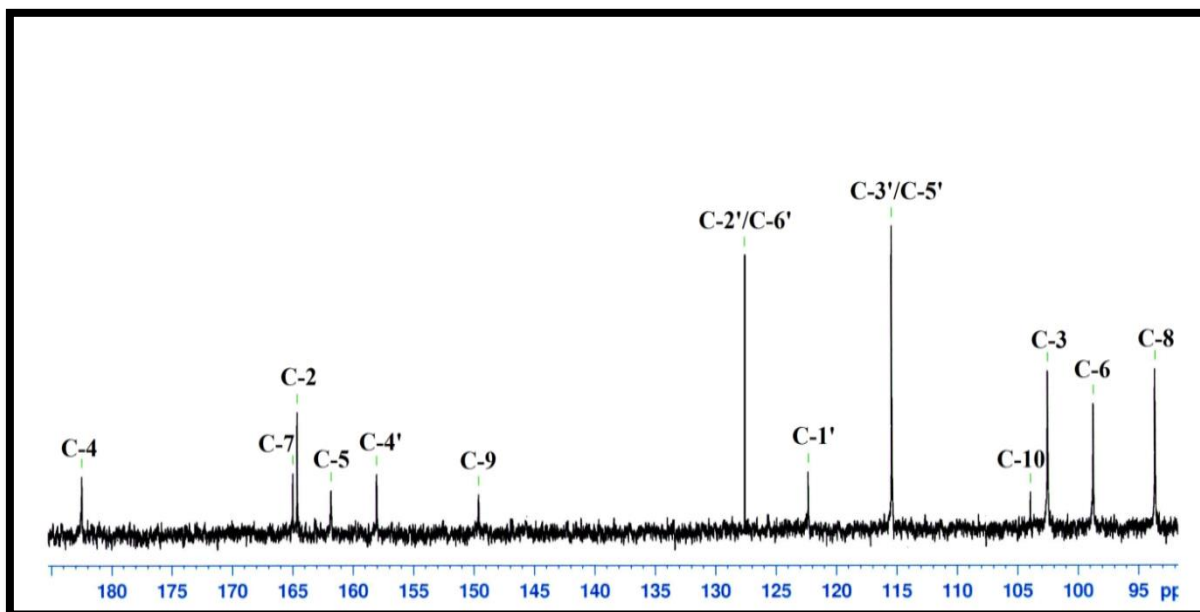
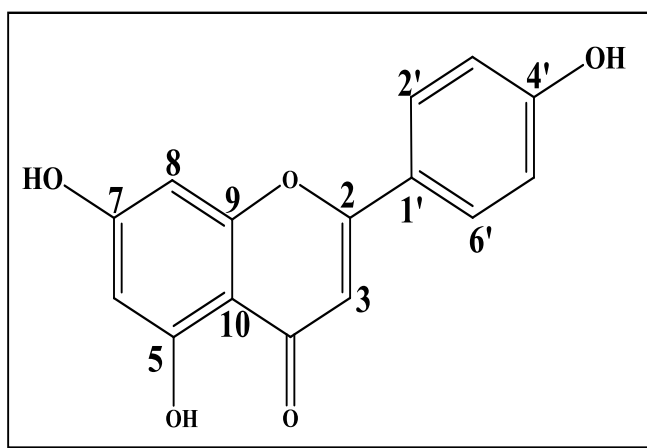


Figure III.20: Spectre RMN ^{13}C du composé **TA4** (CD_3OD)

L'ensemble des données spectrales obtenues permet d'attribuer sans ambiguïté au composé **TA4** la structure suivante 4',5,7-trihydroxyflavone, connue sous le nom d'Apigénine. Elle a été isolé de différentes plantes du genre *Thymus* comme *T. vulgaris*, *T. serpyllum*, *T. herba-barona*, *T. striatus*, *T. webbianus*, *T. glabrescens*, *T. praecox* [23, 26], *T. capitatus* [24], *T. hirtus*, *T. numidicus* [31-32], *T. piperella* [45]. Ce composé exhibe nombreux effets biologiques et pharmacologiques à savoir antimicrobien, antioxydant, antitumoral, anti-inflammatoire, antiprolifératif, antiviral et antidiabétique [129].



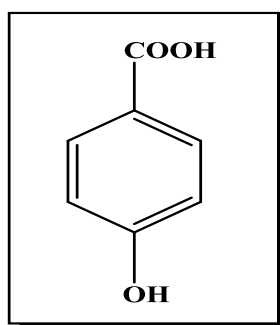
Apigénine

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **TA4** sont réunis dans le tableau III.4.

Tableau III.4 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C du composé **TA4** dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
2	164,6	-
3	102,4	6,59 (s)
4	182,4	-
5	161,8	-
6	98,7	6,21 (sl)
7	164,9	-
8	93,5	6,49 (sl)
9	149,5	-
10	103,9	-
1'	122,3	-
2'	127,5	7,40 (d, 8,8)
3'	115,3	6,90 (d, 8,8)
4'	158	-
5'	115,3	6,90 (d, 8,8)
6'	127,5	7,40 (d, 8,8)

III.1.5 Identification structurale du composé TA5



Acide p-hydroxybenzoïque

Ce composé est isolé sous forme d'une poudre blanche. Il est visible sous la lumière UV à $\lambda = 254$ et 366 nm, ne montrant aucune coloration après pulvérisation de sa CCM par une solution d'acide et chauffage.

Le spectre RMN ^1H (Figure III.21) de ce composé indique sa simplicité par le nombre des signaux qu'il présente dans la zone aromatique.

On observe deux signaux sous forme de doublet à δ_{H} 7,87 (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz) et δ_{H} 6,81 (2H, *d*, $J = 8,8$ Hz) d'un système AA'BB' correspondant aux protons H-2/H-6 et H-3/H-5 d'un cycle aromatique *para* substitué.

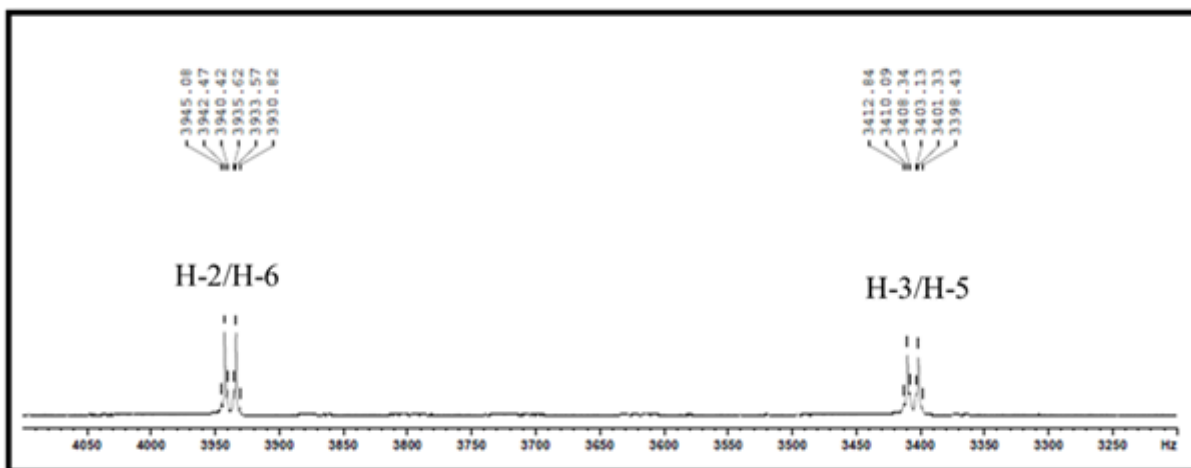


Figure III.21: Spectre RMN ^1H du composé **TA5**

Ceci est clairement confirmé par l'observation sur le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (Figure III.22) de deux pics sortant à 133,1 et 116,15 ppm plus intenses que les autres pics attestant de la présence de deux carbones pour chaque signal. On visualise aussi trois signaux de carbones quaternaires où l'un d'entre eux est attribué à un carbone d'une fonction acide en raison de son déplacement chimique déblindé à δ_{C} 170.

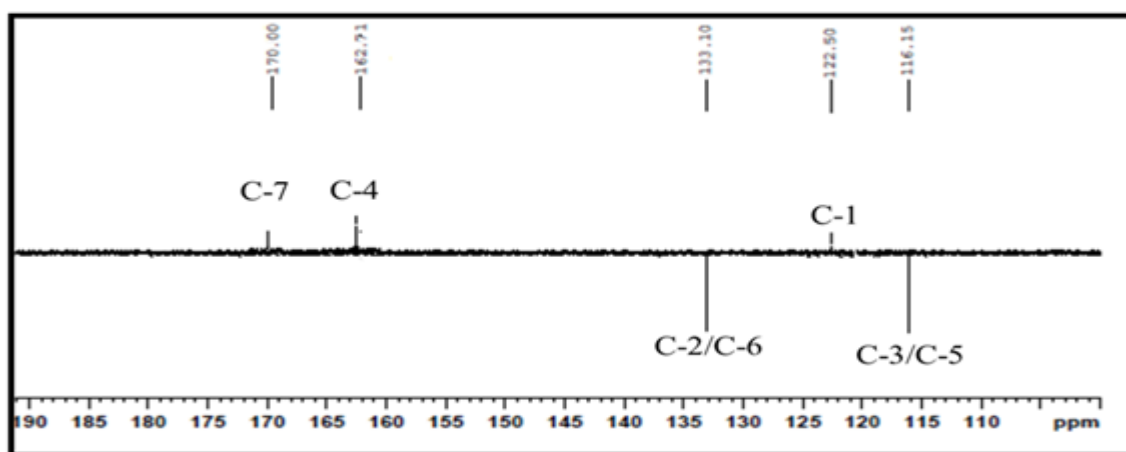
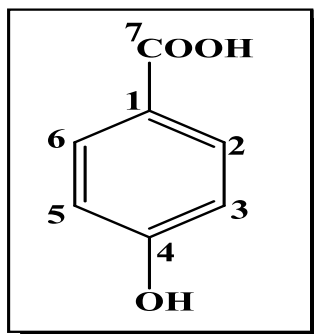


Figure III.22: Spectre RMN ^{13}C *J*-modulé du composé **TA5**

Les valeurs de déplacements chimiques de ces carbones et protons, comparées avec les données de la littérature [130], permettent d'attribuer au composé **TA5** la structure d'Acide *p*-hydroxybenzoïque, isolé antérieurement des espèces *Thymus vulgaris* et *T. serpyllum* [23].

Ce composé et ses dérivés ont trouvé une large application comme conservateurs et stabilisants alimentaires (antioxydants). L'acide *p*-hydroxybenzoïque est principalement connu comme base pour la préparation de ses esters, connu sous le nom les parabènes, qui sont utilisés comme conservateurs dans les cosmétiques et quelques solutions ophtalmiques [131].



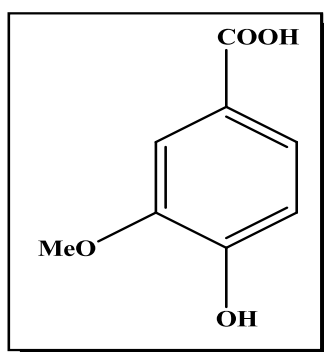
Acide p-hydroxybenzoïque

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III.5.

Tableau III.5 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C du composé TA5 dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	122,5	-
2	133,1	7,87 (d, 8,8)
3	116,15	6,81 (d, 8,8)
4	162,71	-
5	116,15	6,81 (d, 8,8)
6	133,1	7,87 (d, 8,8)
7	170	-

III.1.6 Identification structurale du composé TA6



Acide vanillique

Le composé **TA6** est purifié sous forme d'une poudre blanche visible à la lumière UV (254 et 366 nm). Il donne une coloration jaune pâle après révélation de sa CCM par la vanilline sulfurique et chauffage.

Ce qui est remarquable sur le spectre RMN ^1H (Figure III.23) de ce composé (**TA6**) est l'absence de la symétrie au niveau du noyau aromatique en comparaison avec celui du composé précédent (**TA5**) l'acide *p*-hydroxybenzoïque. D'ailleurs, on visualise la présence d'un système de spins de type ABX où ses protons localisés à δ_{H} 7,59 (*d*, $J = 1,8$ Hz, H-2), 6,77 (*d*, $J = 8,2$ Hz, H-5) et 7,50 (*dd*, $J = 8,2 ; 1,8$ Hz, H-6) sont caractéristiques d'un noyau aromatique 1,3,4-trisubstitué. Leurs carbones sont assignés respectivement à δ_{C} 115,6 (C-2), 114,1 (C-5) et 122 (C-6) selon l'expérience HSQC (Figure III.24).

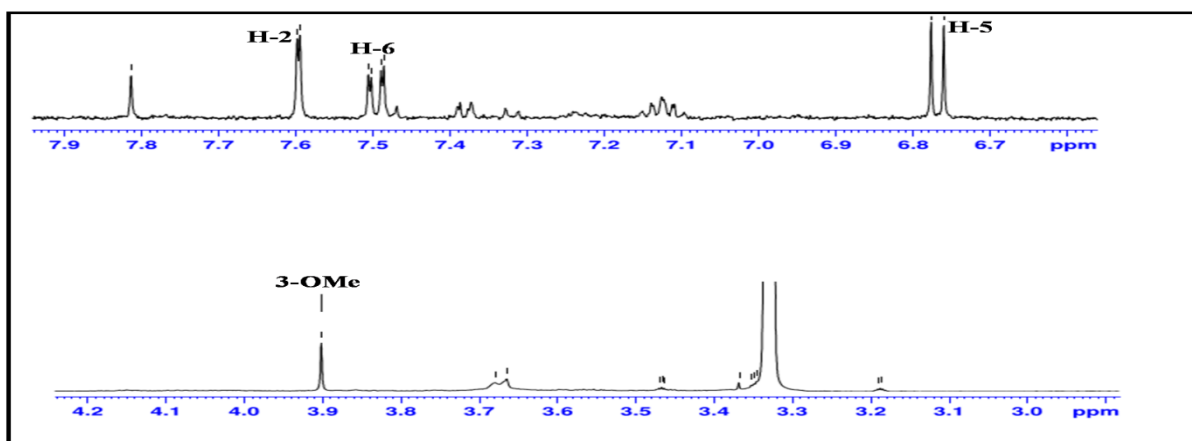


Figure III.23 : Spectre RMN ^1H du composé **TA6** (CD_3OD)

On observe aussi un signal singulet d'intégration 3H sortant à δ_{H} 3,9 correspondant à un groupement méthoxyle. Son carbone est assigné à δ_{C} 56,7 selon l'expérience HSQC (Figure III.24).

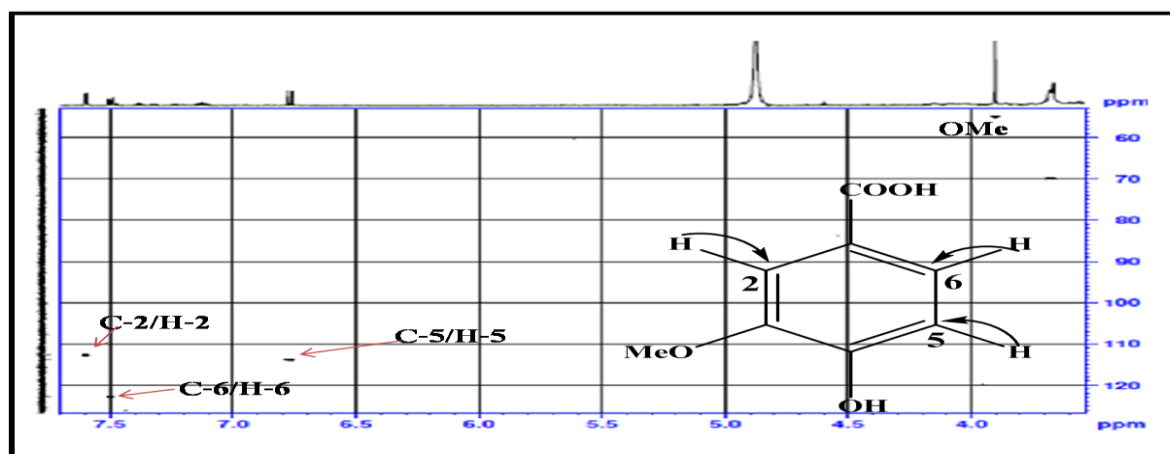


Figure III.24: Spectre HSQC du composé **TA6**

L'analyse du spectre COSY H-H (Figure III.25) de ce composé indique les couplages scalaires entre les protons H-5/H-6 et H-2/H-6.

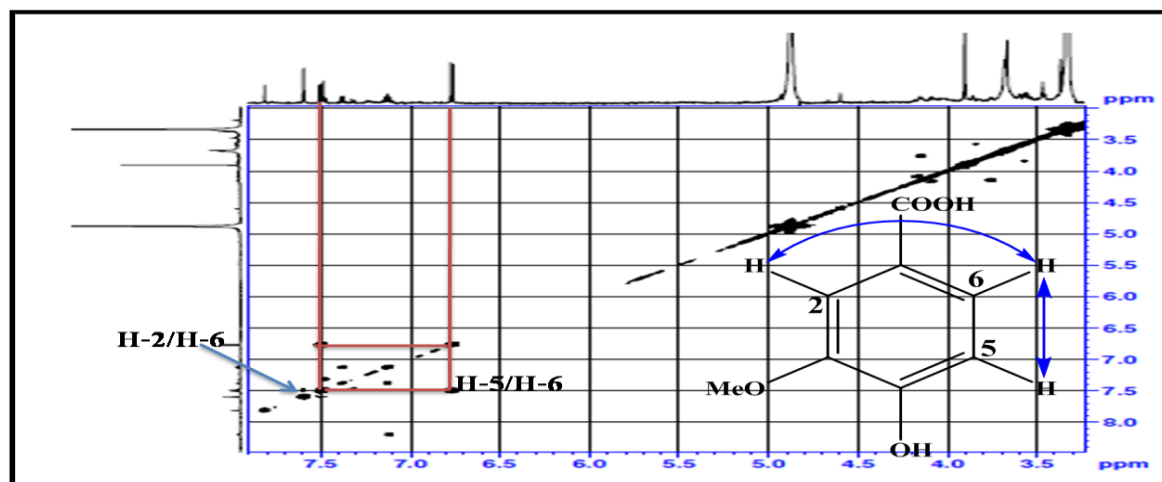


Figure III.25: Spectre COSY H-H du composé TA6

Le spectre RMN ^{13}C du composé TA6 (Figure III-26) présente les signaux de 8 atomes de carbone :

- ✓ Trois CH aromatiques apparaissant à δ_{C} 115,6 (C-2), 114,1 (C-5) et 122,0 (C-6) ;
- ✓ Quatre carbones aromatiques quaternaires à δ_{C} 123,9 (C-1), 153,1 (C-3), 149,6 (C-4) et 170,0 (C-7) ;
- ✓ Un groupement méthoxyle détecté à δ_{C} 56,7.

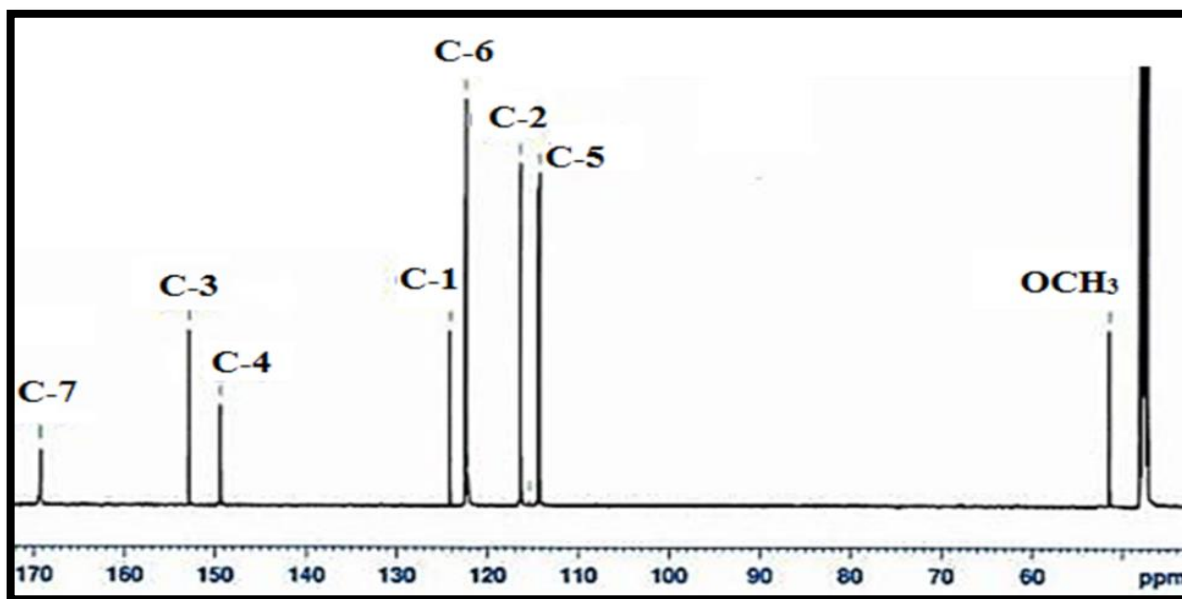
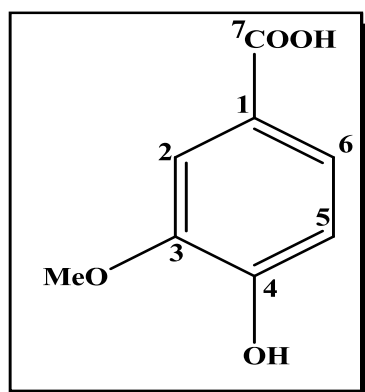


Figure III.26 Spectre RMN ^{13}C du composé TA6

Toutes ces données spectrales nous conduisent à identifier ce composé comme étant l'Acide vanillique. Cette attribution est confirmée par la comparaison avec les données de la littérature [132].



Acide vanillique

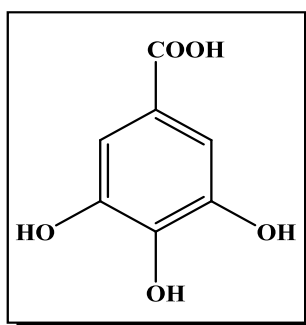
Ce composé a été trouvé antérieurement dans les espèces *Thymus vulgaris*, *T. serpyllum* [23] et *T. capitatus* [24]. Il est utilisé comme agent aromatisant. C'est une forme oxydée de la vanilline. La plus grande quantité d'acide vanillique se trouve dans les racines d'*Angelica sinensis*, une herbe indigène de la Chine, qui est utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise pour reconstituer le sang, traitement des menstruations anormales et d'autres maladies féminines [133,134].

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont regroupés dans le tableau III.6.

Tableau III.6 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C du composé TA6 dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	123,9	-
2	115,6	7,59 (d, 1,8)
3	153,1	-
4	149,6	-
5	114,1	6,77 (d, 8,2)
6	122	7,50 (dd, 8,2; 1,8)
7	170	-
3-OMe	56,7	3,9 (s)

III.1.7 : Identification structurale du composé TA7



Acide gallique

Le composé **TA7** a été obtenu sous forme d'une poudre blanche. Il est visible sous UV (254 et 366 nm) et donne une coloration bleue après pulvérisation de sa CCM par une solution acide et chauffage.

L'analyse de son spectre de masse (ESI-MS), en mode négatif (Figure III.27) a permis la détermination de sa masse moléculaire à 170 uma, grâce aux deux pics d'ions pseudomoléculaires observés à $m/z = 339$ $[2M-H]^-$ et 169 $[M-H]^-$, soit une masse moléculaire de 170 uma correspondant à une formule brute en $C_7H_6O_5$ suggérant la présence de 5 insaturations. Ces constatations sont en faveur d'un composé phénolique.

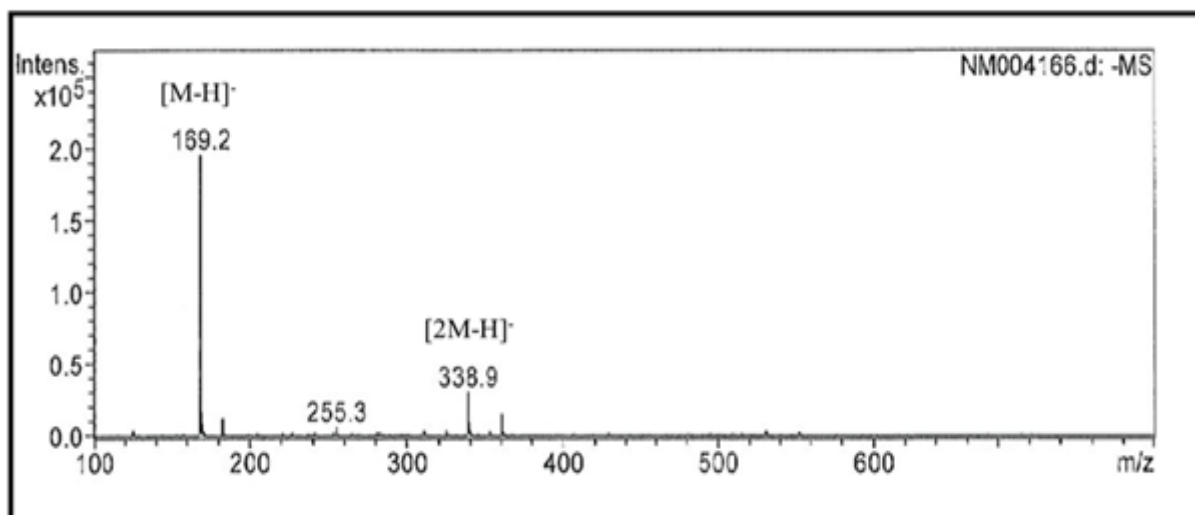


Figure III.27 : Spectre de masse ESI du composé TA7

Le spectre RMN 1H , enregistré dans CD_3OD (Figure III.28) montre la présence d'un seul signal à δ_H 7,02 (2H, s) suggérant une symétrie et une substitution élevée au niveau du noyau aromatique.

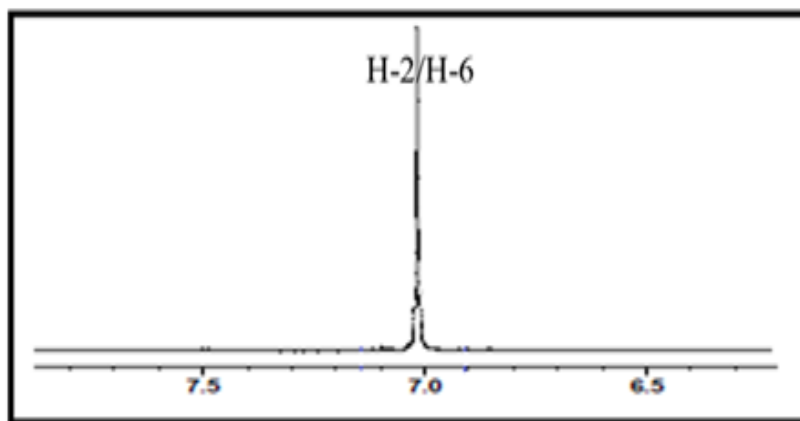


Figure III.28: Spectre RMN¹H du composé TA7

Ce constat est supporté aisément par l'analyse du spectre RMN ¹³C J-modulé (Figure III.29) du composé TA7 qui montre 5 signaux répartis comme suit :

- ✓ Un signal intense à δ_c 108,8 correspondant à deux CH aromatiques C-2/C-6 ;
- ✓ Un autre signal sortant à δ_c 145,5 correspondant aux deux carbones quaternaires C-3/C-5 ;
- ✓ Deux signaux résonant à δ_c 121,2 et 137,8 attribuables respectivement au carbone quaternaire C-1 et au carbone oxygéné C-4 ;
- ✓ Le carbone résonant à δ_c 168,16 est celui d'un groupement acide COOH.

Ces attributions ont été confirmées par comparaison avec les données de la littérature [135].

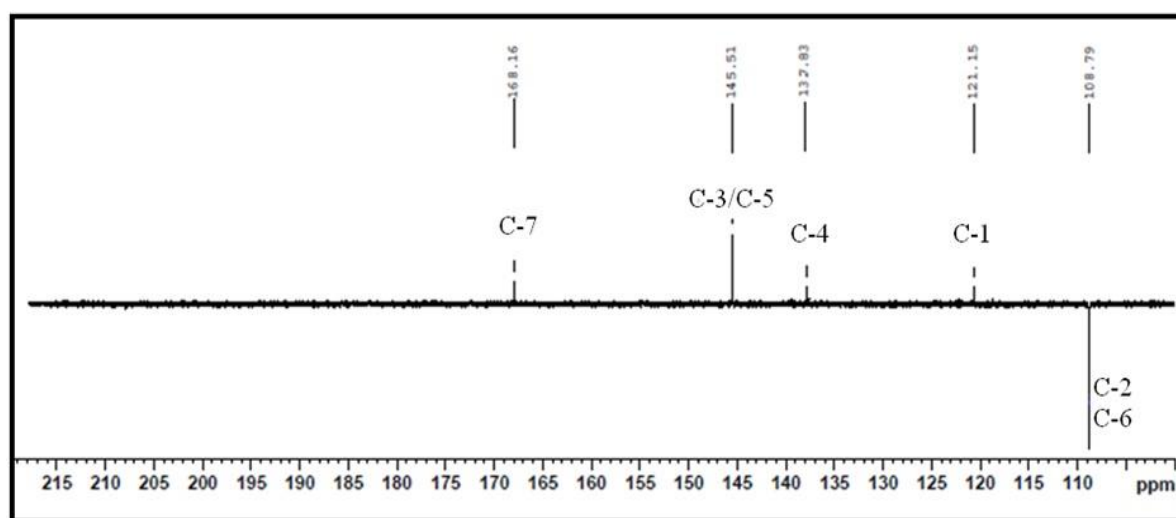
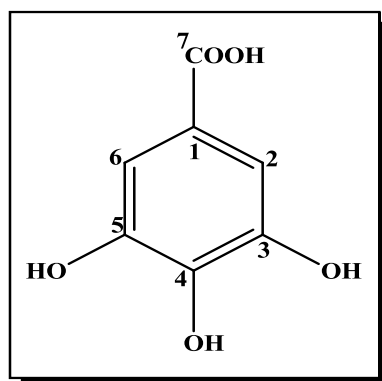


Figure III.29: Spectre RMN¹³C J-modulé du composé TA7(CD₃OD)

Le composé TA7 est, par conséquent, identifié comme étant un dérivé de l'acide benzoïque constitué d'un noyau aromatique porteur de trois groupements hydroxyles et d'un groupement carboxyle connu sous le nom acide gallique.



Acide gallique

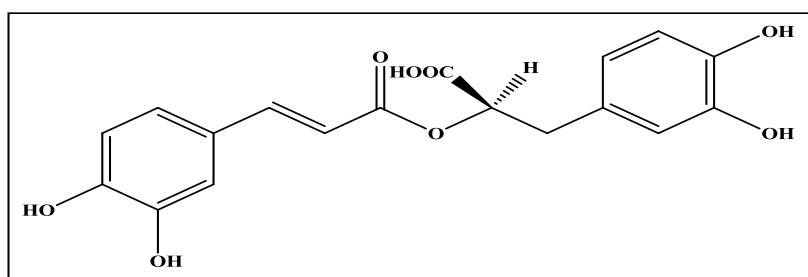
L'acide gallique est un composé polyhydroxyphénolique, isolé antérieurement des espèces : *Thymus vulgaris*, *T. webbianus* et *T. capitatus* [23,24]. Il est utilisé comme piègeur de radicaux libres et comme inducteur de différenciation et apoptose dans la leucémie, le cancer du poumon et les lignées de cellules d'adénocarcinome du côlon, ainsi que dans les lymphocytes normaux cellulaires [136].

Les déplacements chimiques des protons et carbones du composé **TA7** sont réunis dans le tableau III.7.

Tableau III.7 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C du composé **TA7** dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	121,2	-
2	108,2	7,02 (s)
3	145,5	-
4	137,8	-
5	145,5	-
6	108,2	7,02(s)
7	168,2	-

III.1.8 Identification structurale du composé **TA8**



Acide rosmarinique

Le composé **TA8** se présente sous forme d'une poudre beige soluble dans le méthanol. Ce composé est visible sous la lumière UV (254 et 366 nm). Il se colore en marron après révélation de sa CCM par la vanilline sulfurique et chauffage.

Le spectre de masse ESI-MS du composé **TA8** enregistré en mode négatif (Figure III.30) montre deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 359,07681$ $[M-H]^-$ et $719,16058$ $[2M-H]^-$. Ceci correspond à une masse moléculaire de 360 uma et une formule brute en $C_{18}H_{16}O_8$.

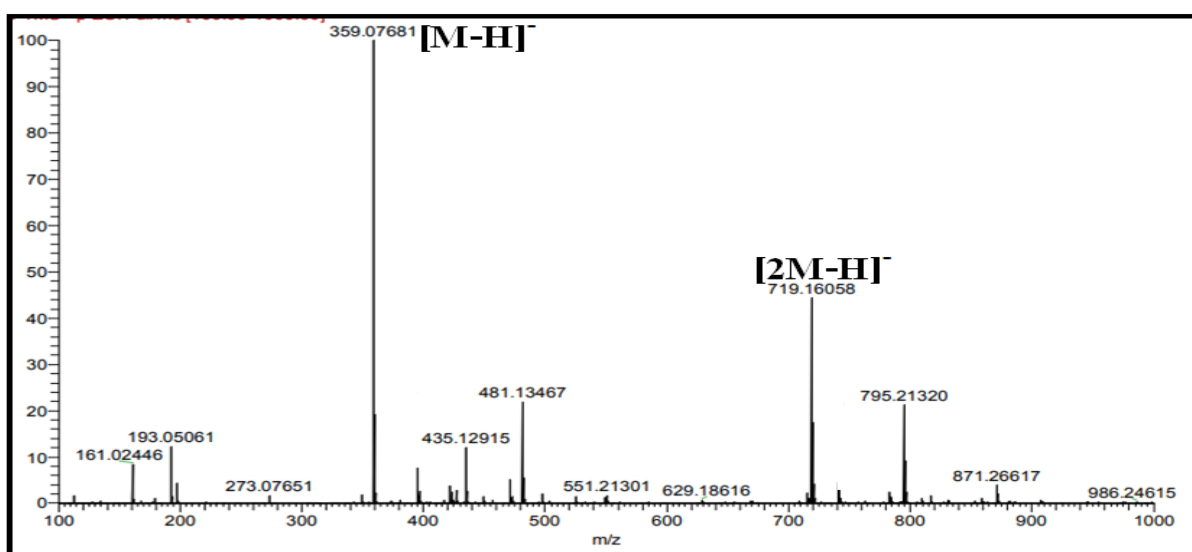


Figure III.30 : Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé **TA8**

On observe sur le spectre RMN 1H effectué dans CD_3OD (Figure III. 31) la présence de deux signaux résonant à δ_H 7,52 et 6,29 sous forme d'un doublet (d , $J=15,9Hz$) et s'intégrant pour un proton chacun, correspondant à deux protons oléfiniques nommés H-7' et H-8'. La grande constante de couplage indique une géométrie *trans* de la double liaison.

L'analyse des spectres RMN 1H et COSY (Figure III. 34) montre la présence de deux noyaux aromatiques 1,3,4-tri substitués grâce à la présence de deux systèmes de spins ABX constitués de trois protons aromatiques [137]. Le premier à δ_H 6,78 (d , $J = 2$ Hz), δ 6,68 (d , $J = 8$ Hz) et δ 6,65 (dd , $J = 8 ; 2$ Hz) attribuables aux protons désignés (H-2, H-5 et H-6) respectivement et le deuxième à δ_H 7,04 (d , $J = 2$ Hz), δ_H 6,94 (dd , $J = 8,3 ; 2$ Hz) et δ_H 6,78 (d , $J = 2$ Hz) correspondant aux protons (H-2', H-6' et H-5'). Leurs carbones sont assignés par l'analyse du spectre HSQC (Figure III.32) à δ_C 116,2, 114,9 et 120,6 d'une part et d'autre part à δ_C 113,7, 121,5 et 115,1 respectivement.

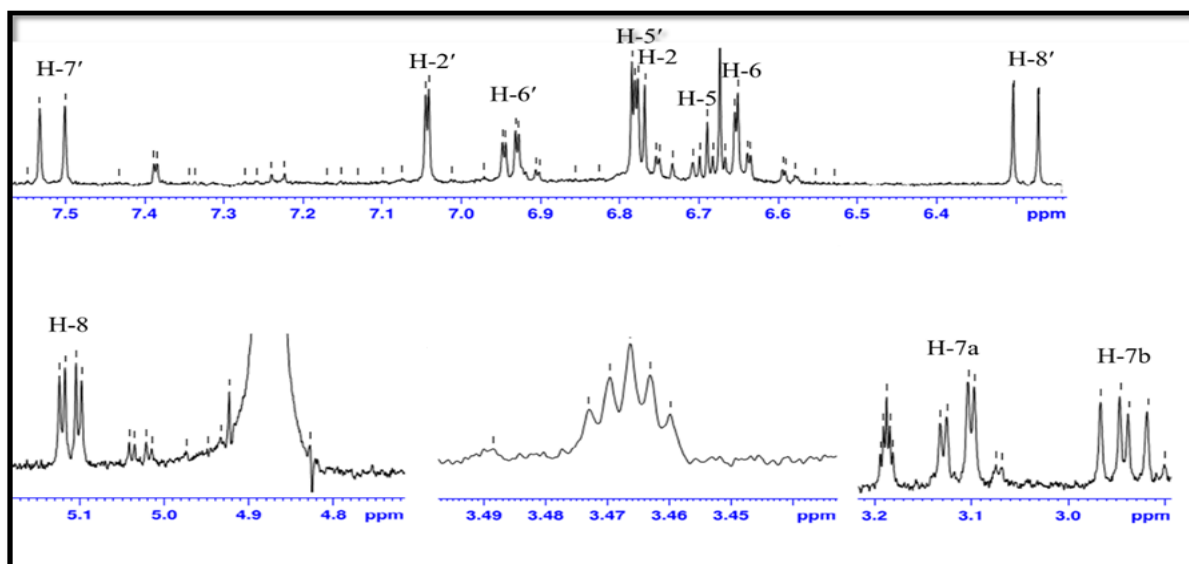


Figure III.31: Spectre RMN¹H du composé TA8 (CD₃OD)

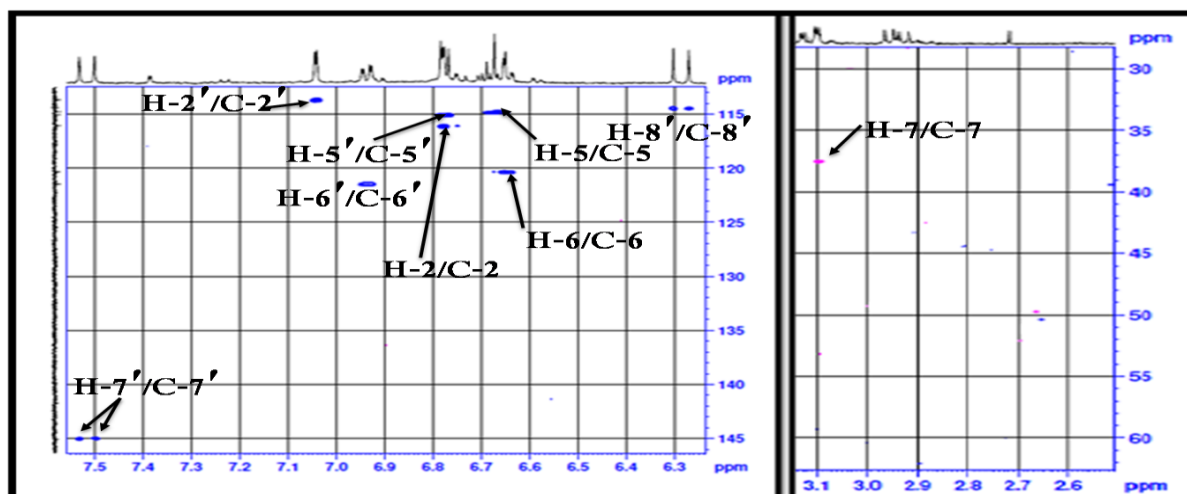


Figure III.32 Spectre HSQC du composé TA8

En plus de ces signaux, le spectre RMN ¹H de ce composé montre trois signaux de protons qui forment un seul système de spins d'après l'expérience COSY H-H (Figures III.33 et III.34). Deux doublet de doublet dont l'un résonne à δ_H 2,94 (1H, *dd*, $J=14,3; 9,8$) et l'autre à δ_H 3,12 (1H, *dd*, $J=14,3; 3,3$) assignés aux protons géminés H₂-7 et un doublet de doublet déblindé résonant à δ_H 5,11 (1H, *dd*, $J=9,8; 3,3\text{Hz}$) attribué au proton oxyméthine H-8. Ce dernier décrit des couplages correspondant sur le spectre COSY H-H (Figure III.34). L'expérience HSQC (Figure III.32) permet d'attribuer les déplacements chimiques de ces carbones.

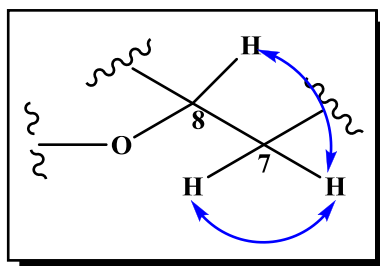
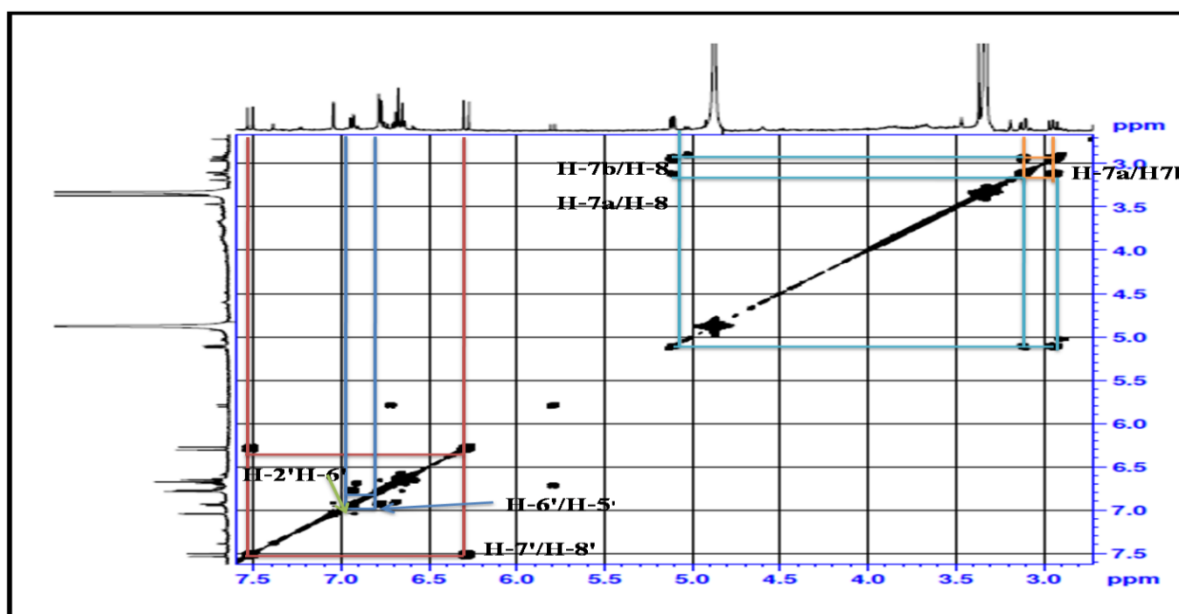
Figure.III.33 Couplages COSY H-H des protons H₂-7 et H-8

Figure III.34: Spectre COSY H-H du composé TA8

Sur le spectre RMN ^{13}C (Figure III.35), on distingue facilement les signaux relatifs aux deux cycles aromatiques notamment :

- ✓ Six signaux correspondant aux six méthines à δ_{C} 116,2 (C-2), 114,9(C-5), 120,4 (C-6), 113,7(C-2'), 115,1(C-5') et 121,5(C-6') ;
- ✓ Quatre carbones oxygénés à δ_{C} 144,8 (C-3) ; 143,8 (C-4) ; 145,1 (C-3') et 148 (C-4') ;
- ✓ Deux carbones quaternaires résonant à δ_{C} 130 (C-1), et 126,8 (C-1').

On visualise aussi la présence de :

- ✓ Deux carbones oléfiniques sont localisés à δ_{C} 145 et 114,5 ;
- ✓ Un carbone du groupement COOH qui apparait à δ_{C} 177,2;
- ✓ Un carbone d'une fonction ester δ_{C} 168 ;
- ✓ Un carbone d'une fonction alcool à δ_{C} 77,4 ;
- ✓ Un carbone méthylène à δ_{C} 37,5.

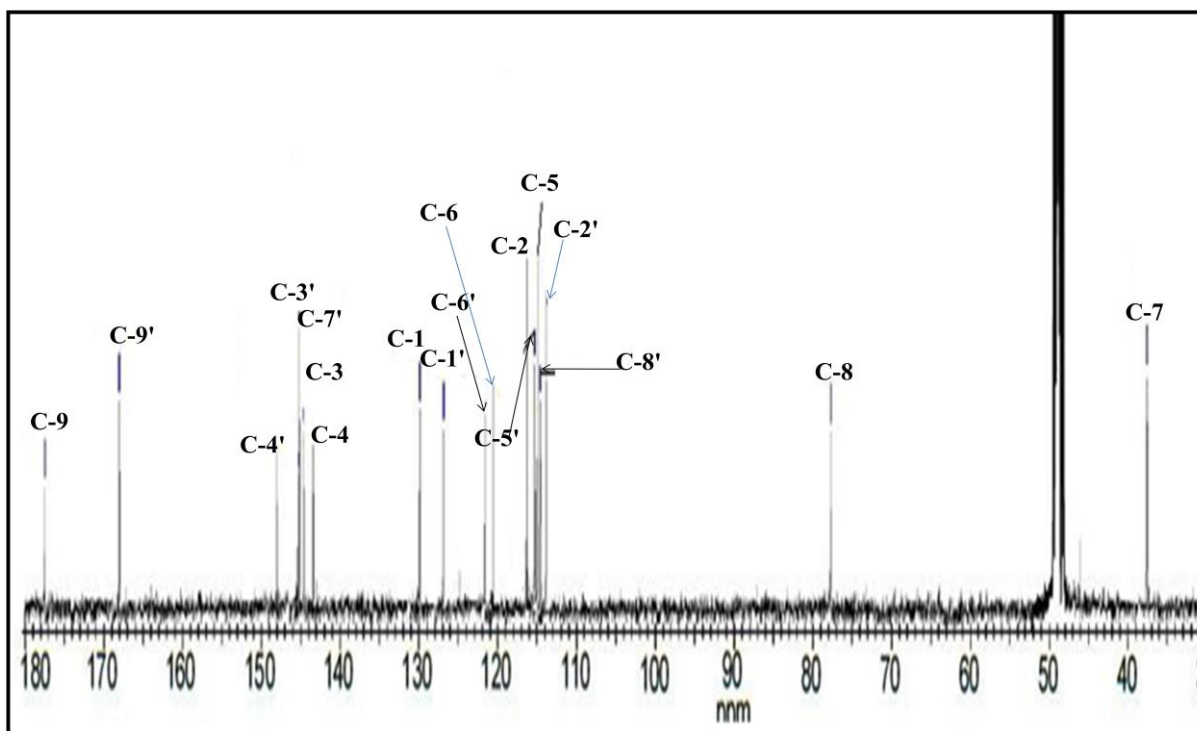


Figure III.35 : Spectre RMN^{13}C du composé **TA8**

L'attribution des protons et carbones constituant le composé **TA8** est effectuée par analyse des couplages hétéronucléaires longue distance en $^2\text{Jet } ^3J$. En effet, le spectre HMBC (Figures III.36 et III.37) permet de visualiser les couplages entre :

- ✓ Le proton oléfinique H-8' et le carbone quaternaire aromatique C-1' (126,8 ppm) ;
- ✓ Le deuxième proton oléfinique H-7' et le carbone C-2'. Ce proton corrèle aussi avec un carbone résonnant à δc 168 attribuable à un carbonyle d'une fonction ester C-9' ;
- ✓ Les protons H-2' et H-6' du cycle aromatique et le carbone éthylénique C-7'.

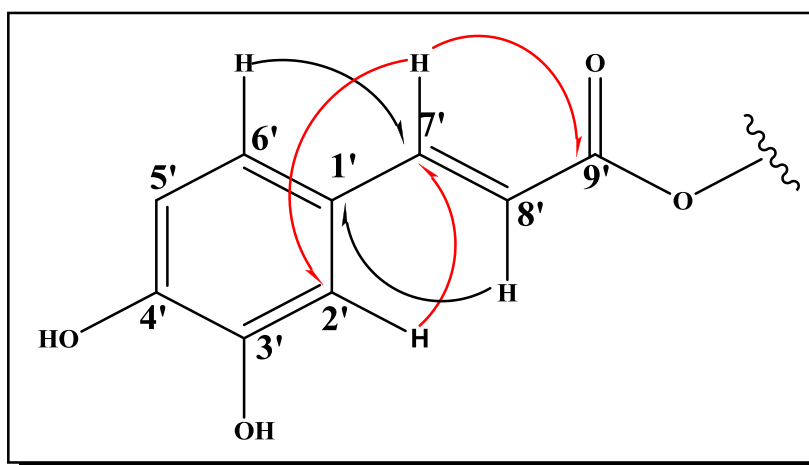


Figure III.36: Corrélations HMBC des protons et carbones oléfiniques

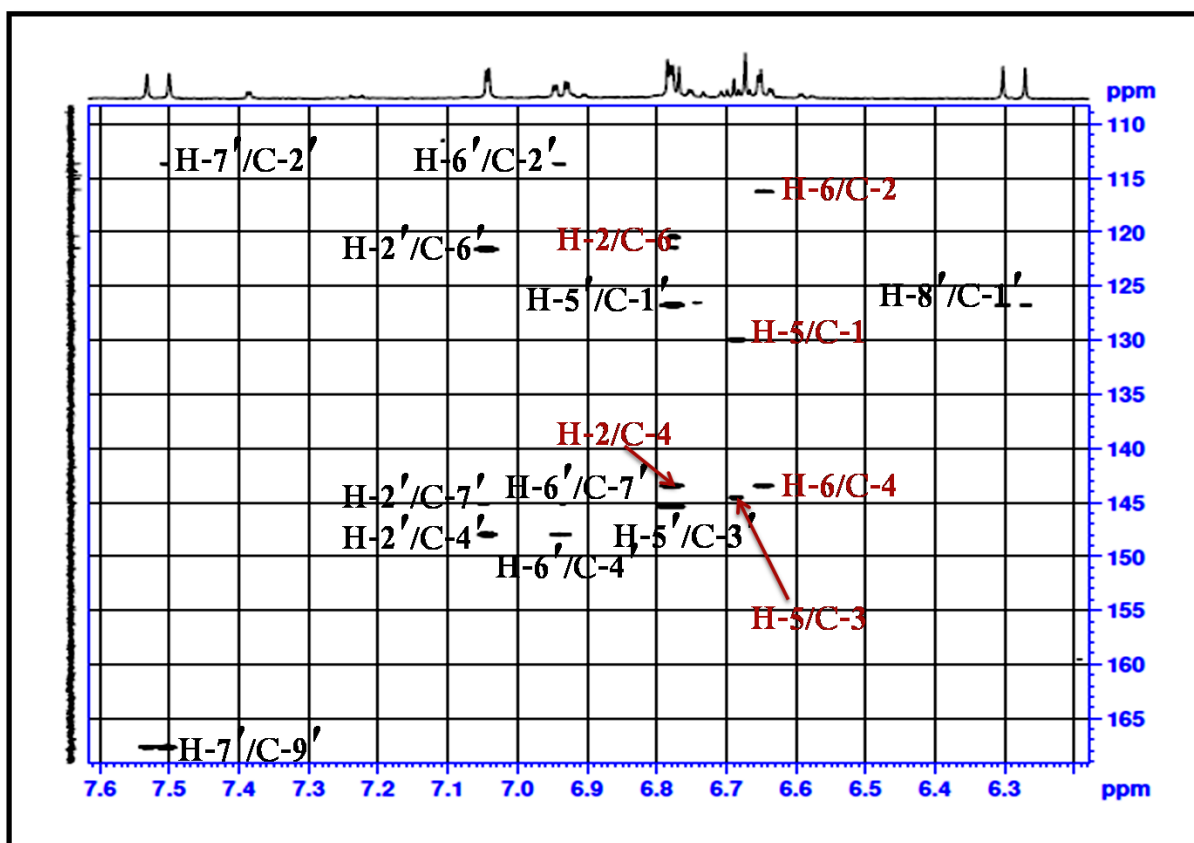


Figure III.37 : Spectre HMBC du composé TA8

A ce stade, les constantes spectrales obtenues sont caractéristiques d'une unité acyle appelée cafféoyle (Figure III.38).

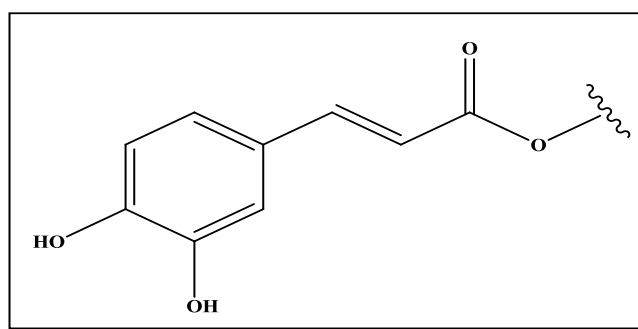


Figure III.38: groupement cafféoyle

Pour le deuxième cycle aromatique, le même spectre (Figure III.37) montre des couplages entre (Figure III.39) :

- ✓ Le proton H-2 et les carbones C-6 et C-4 ;
- ✓ Le proton H-5 et les carbones C-1 et C-3 ;
- ✓ Les protons H-7 avec les carbones C-1 et C-2.

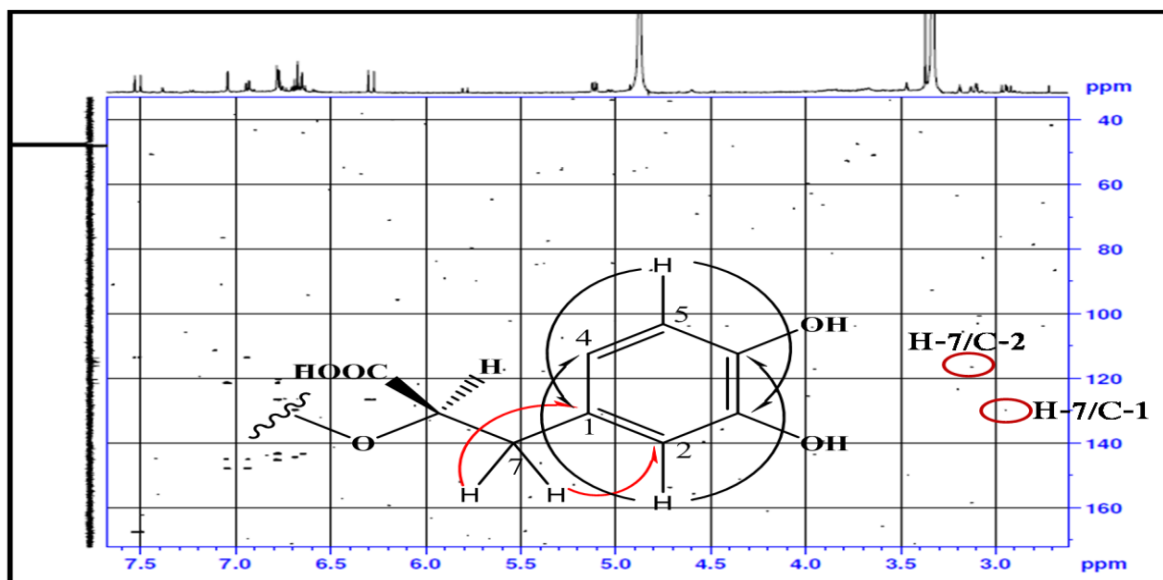
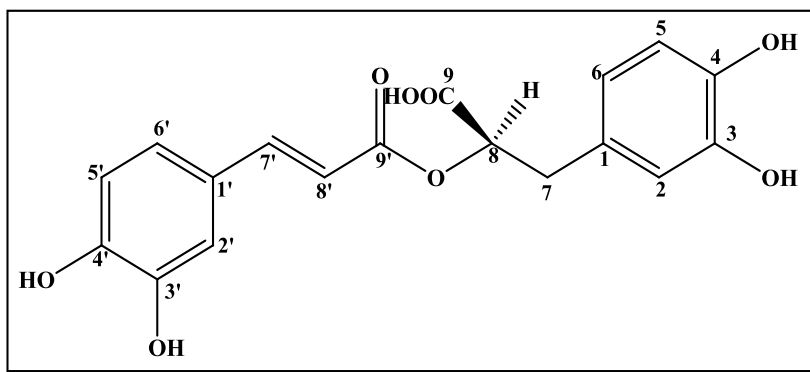


Figure III.39: Corrélations HMBC de la deuxième partie du composé TA8

L'ensemble de ces attributions, la comparaison des données spectroscopiques avec celles de la littérature [138, 139] et la mesure du pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{25} + 73,3^\circ$ (C= 0,2, MeOH), sont en faveur de la structure d'acide rosmarinique.



Acide rosmarinique

Le nom de ce composé vient du nom de la plante à partir de la quelle il a été isolé pour la première fois, le romarin (*Rosmarinus officinalis*) en 1958 [140]. Il a été trouvé antérieurement dans plusieurs espèces de genre *Thymus*: *T. vulgaris*, *T. serpyllum*, *T. sipyleus*, *T. quinquecostatus*, *T. glabrescens*, *T. pulegioides*, *T. comosus* et *T. capitatus* [33].

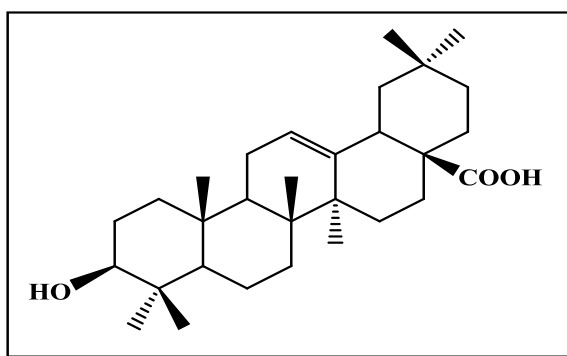
L'acide rosmarinique a une gamme d'activités biologiques bénéfiques, telles que anti-inflammatoire, antioxydant, antiapoptotique et antifibrotique [141-143].

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont illustrés dans le tableau III.8.

Tableau III.8: Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C du composé TA8 dans CD_3OD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	130	-
2	116,2	6,78 (d, 2)
3	144,8	-
4	143,8	-
5	114,9	6,68 (d, 8)
6	120,4	6,65 (dd, 8 ; 2)
7a	37,5	3,12 (dd, 14,3 ; 3,3)
7b	37,5	2,94 (dd, 14,3; 9,8)
8	77,4	5,11 (dd, 9,8; 3,3)
9	177,2	-
1'	126,8	-
2'	113,7	7,04 (d, 2)
3'	145,1	-
4'	148	-
5'	115,1	6,78 (d, 2)
6'	121,5	6,94 (dd, 8,3 ; 2)
7'	145	7,52 (d, 15,9)
8'	114,5	6,29 (d, 15,9)
9'	168	-

III.1.9 Identification structurale du composé TA9



Acide oléanolique

Le composé TA9 est purifié sous forme d'une poudre blanche amorphe, soluble dans le MeOH.

Il est invisible sous la lumière UV (254 et 366 nm) et il donne une tache rouge après révélation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse ESI-MS du composé **TA9**, enregistré en mode positif (Figure III.40), révèle deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 479,3$ $[M+Na]^+$ et $935,6$ $[2M+Na]^+$, soit une masse moléculaire de 456 uma. Ce qui nous permet d'attribuer à cette molécule la formule moléculaire $C_{30}H_{48}O_3$ ayant 7 degrés d'insaturation. Cette formule brute est en faveur d'un composé de type triterpène.

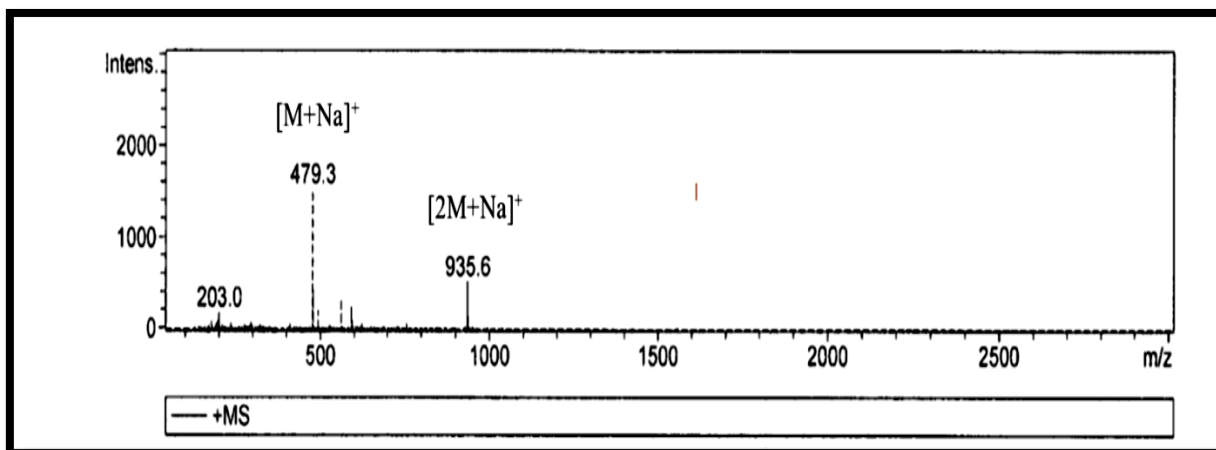


Figure III.40: Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé **TA9**

L'analyse du spectre RMN 1H (Figures III.41 et III.42) de ce composé, montre dans la région blindée sept singulets fins, s'intégrant pour trois protons chacun, attribuables aux méthyles résonant à δ_H 0,98, 0,78, 0,92, 0,80, 1,15, 0,91 et 0,94. Leurs carbones sont détectés par l'analyse du spectre HSQC (Figure III. 43) à δ_C 28,3 ; 15,8 ; 15,5 ; 17,1 ; 26,1 ; 33,3 et 23,7 respectivement. Ils correspondent aux sept méthyles angulaires d'un squelette triterpénique pentacyclique.

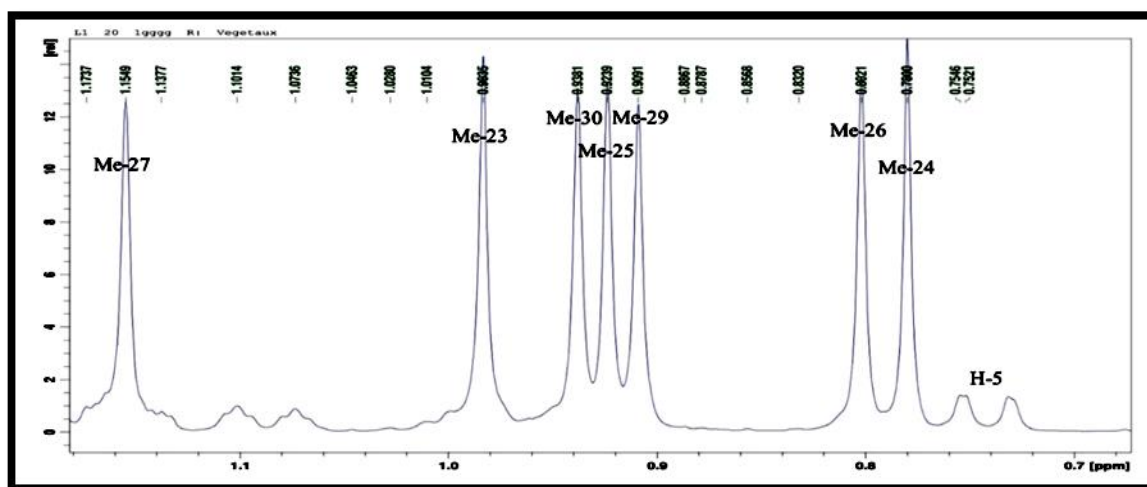


Figure III.41 : Spectre RMN 1H des méthyles du composé **TA9**

De plus, on observe trois signaux déblindés à δ_H 5,27 (*t*, $J=3,5$ Hz), 3,18 (*dd*, $J = 10; 6,2$ Hz) et 2,84 (*dd*, $J=13,6 ; 4,1$ Hz) attribuables respectivement au proton éthylénique H-12, et aux protons oxyméthine H-3 et méthine H-18, des triterpènes pentacycliques de type oléan-12-ène corrélant avec leur carbones à δ_C 122,8 (C-12) ; 79,1 (C-3) et 41,7 (C-18) respectivement sur le spectre HSQC *J*-modulé (Figure III.43). Le déplacement chimique du proton H-18 (δ_H 2.84) est significatif à la présence d'un groupement carbonyle en C-28 (acide ou ester).

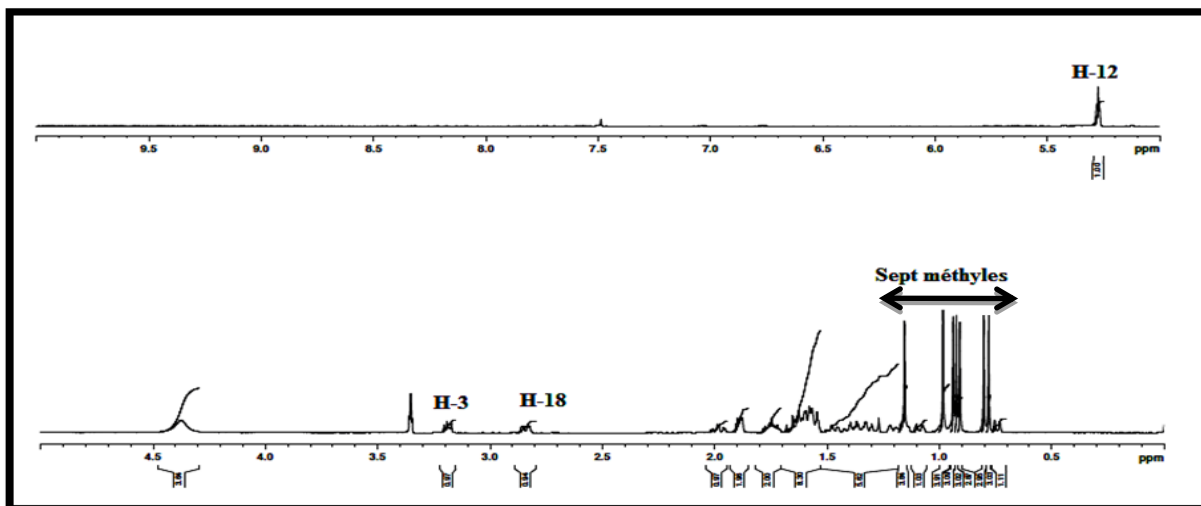


Figure III.42: Spectre RMN¹H du composé TA9 (CDCl₃ + CD₃OD)

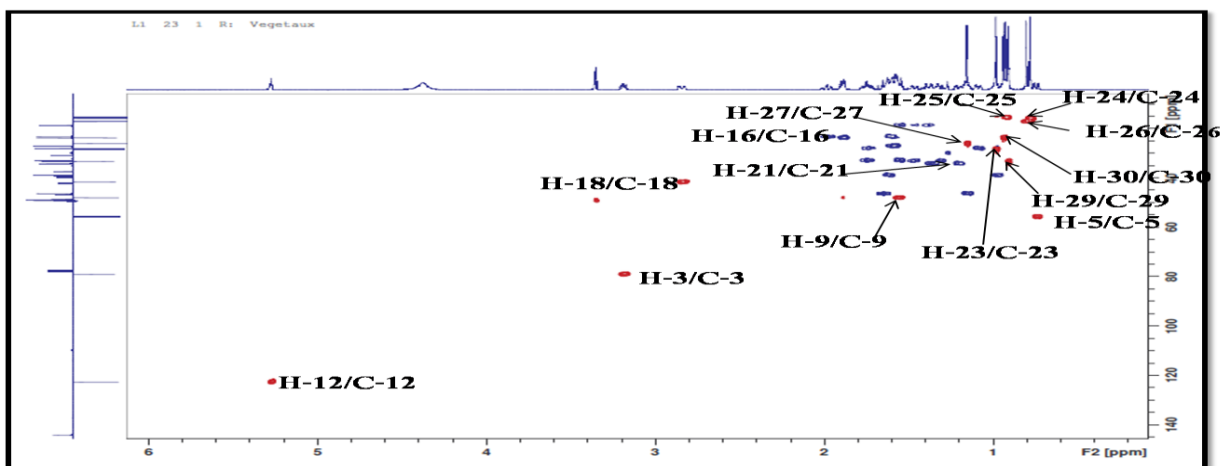


Figure III.43 : Spectre HSQC *J*-modulé du composé TA9

Sur le spectre RMN ¹³C *J*-modulé (Figures III.44), les signaux des carbones suivants sont observés :

- ✓ Sept méthyles résonant à δ_C 15,5 ; 15,8 ; 17,1 ; 23,7 ; 26,1 ; 28,3 et 33,3 ;
- ✓ Un ensemble de carbones résonant entre 18 et 56 ppm, attribuables aux CH₂, CH et C quaternaires ;
- ✓ Les carbones éthyléniques C-12 et C-13 de la double liaison résonnent respectivement à δ_C 122,8 et 144,6 ;

- ✓ Un carbonyle à δ_c 181,5 attribuable à un acide ;
- ✓ Le carbone d'oxyméthine C-3 à δ_c 79,1.

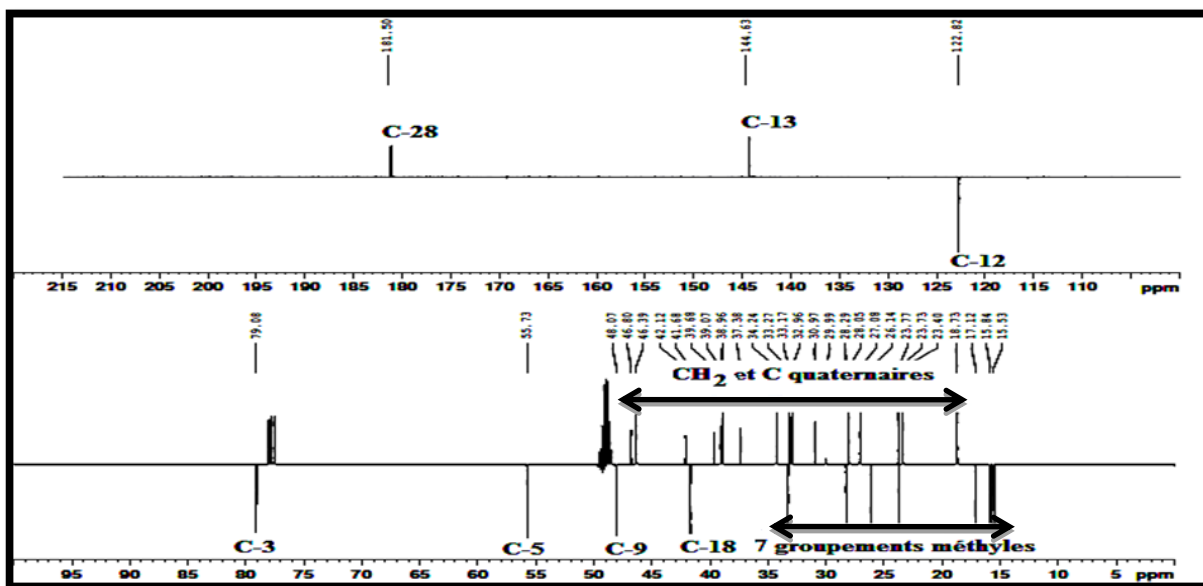


Figure III.44 : Spectre RMN¹³C J-modulé du composé TA9 (CDCl₃ + CD₃OD)

A partir des protons caractéristiques identifiés précédemment, l'expérience COSY H-H (Figures III.45 et III.46) permet de localiser les déplacements chimiques de plusieurs protons de la génine triterpénique. On reconnaît entre autres:

- ✓ Les deux protons H₂-2 (δ_H 1,58) à partir de leurs corrélations avec le proton H-3 connu ;
- ✓ Les protons H₂-1 (δ_H 1,60; 0,97) couplant avec les protons H₂-2 ;
- ✓ Les protons H₂-11 (δ_H 1,88) à partir de leur couplage avec le proton éthylénique H-12;
- ✓ Les deux protons géminés H₂-19 (δ_H 1,65; 1,15) présentant des couplages avec H-18.

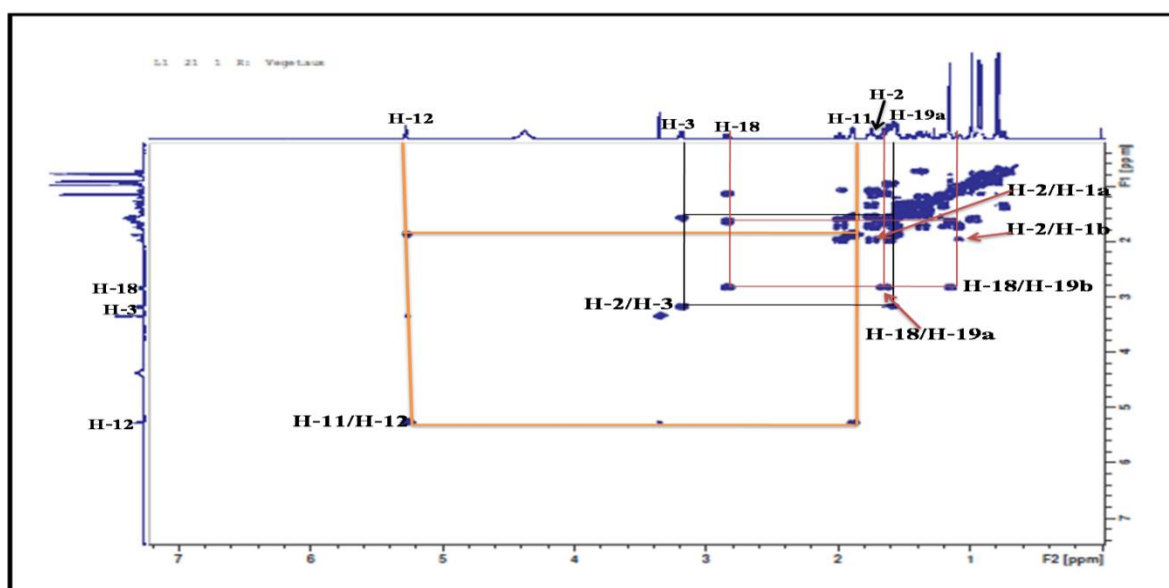


Figure III.45 : Spectre COSY H-H du composé TA9

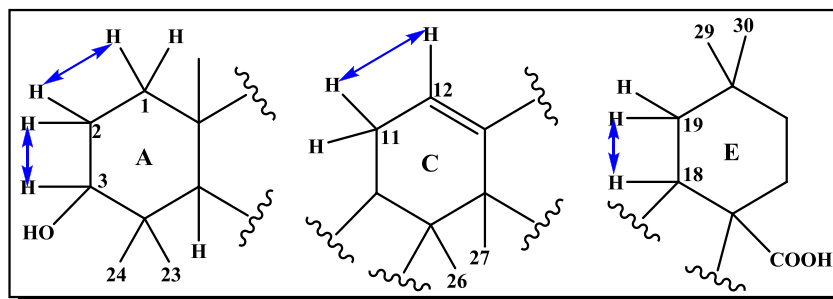


Figure III.46: Couplages COSY

Le spectre HMBC (Figure III.47) révèle un couplage en 3J entre le proton oxyméthine H-3 (δ_H 3,18 ; dd ; $J= 10; 6,2$ Hz) et les deux groupements méthyles à δ_C 28,3 et 15,8 ne pouvant être que les deux méthyles géminés Me-23 et Me-24, leurs protons sont repérés par HSQC à δ_H 0,98 et 0,78 respectivement, aussi ce proton couple avec deux groupements méthylènes à δ_C 38,7 et 27, correspondant aux carbones C-1 et C-2 du cycle A.

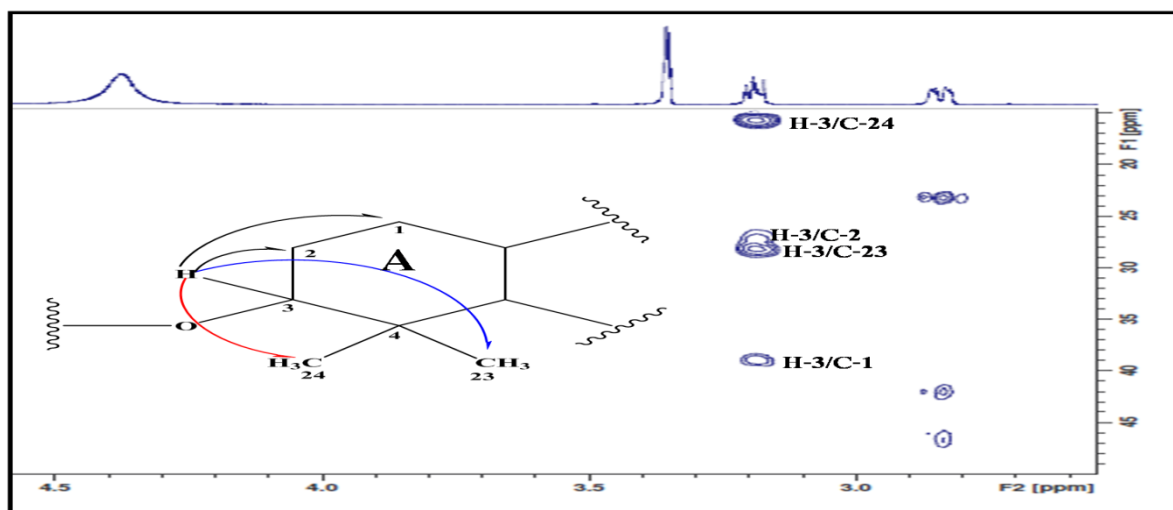


Figure III.47: Partie du spectre HMBC indiquant les corrélations du proton oxyméthine H-3

De plus, le spectre HMBC (Figure III.48) montre des couplages entre les protons des deux groupements méthyles Me-23 et Me-24 et un carbone méthine à δ_C 55,7 qui ne peut être que le carbone C-5, son proton est localisé par HSQC à 0,92 ppm (Figure III.43). Ce carbone couple aussi avec un méthyle à δ_C 15,5 correspondant au Me-25. Ses protons sont déterminés par HSQC à 0,92 ppm.

Les protons du groupement méthyle en position C-25 couplent en HMBC avec un carbone quaternaire à 37,4 ppm attribuable au carbone C-10 et un carbone méthine à 48,1 ppm ne pouvant être que le carbone C-9 du cycle B. Ce dernier corrèle sur le spectre HMBC (Figure III.48) en 3J avec deux groupements méthyles à δ_H 0,92 (s , 3H, Me-25) et à δ_H 0,8 (s , 3H, Me-26). Les protons de ce dernier couplent en HMBC avec C-9 déjà détecté et trois

carbones : un groupement méthylène à δ_C 32,9 et deux carbones quaternaires à δ_C 39,1 et 42,1. Ils correspondent aux carbones C-7, C-8 et C-14. Les protons du carbone C-7 sont identifiés par HSQC à δ_H 1,75 (*m*, H-a) et 1,57 (*m*, H-b).

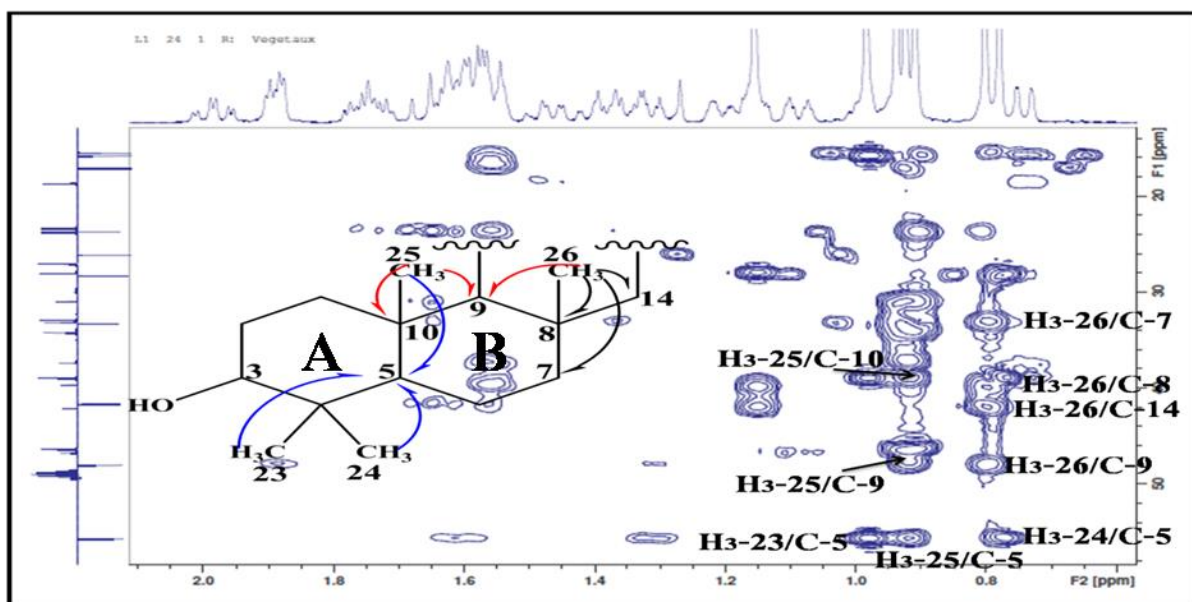


Figure III.48 : Corrélations HMBC des groupements méthyles (Me-23-Me26)

D'autres corrélations sont visualisées entre les deux carbones quaternaires C-8 et C-14 et des protons d'un méthyle à δ_H 1,15 sous forme d'un singulet, qui correspond au Me-27, son carbone est détecté par HSQC (Figure III.43) à δ_C 26,1. Aussi, les protons de ce groupement méthyle (Me-27) couplent en HMBC (Figure III.49) avec un carbone éthylénique quaternaire à δ_C 144,6 attribuable au carbone C-13 du cycle C.

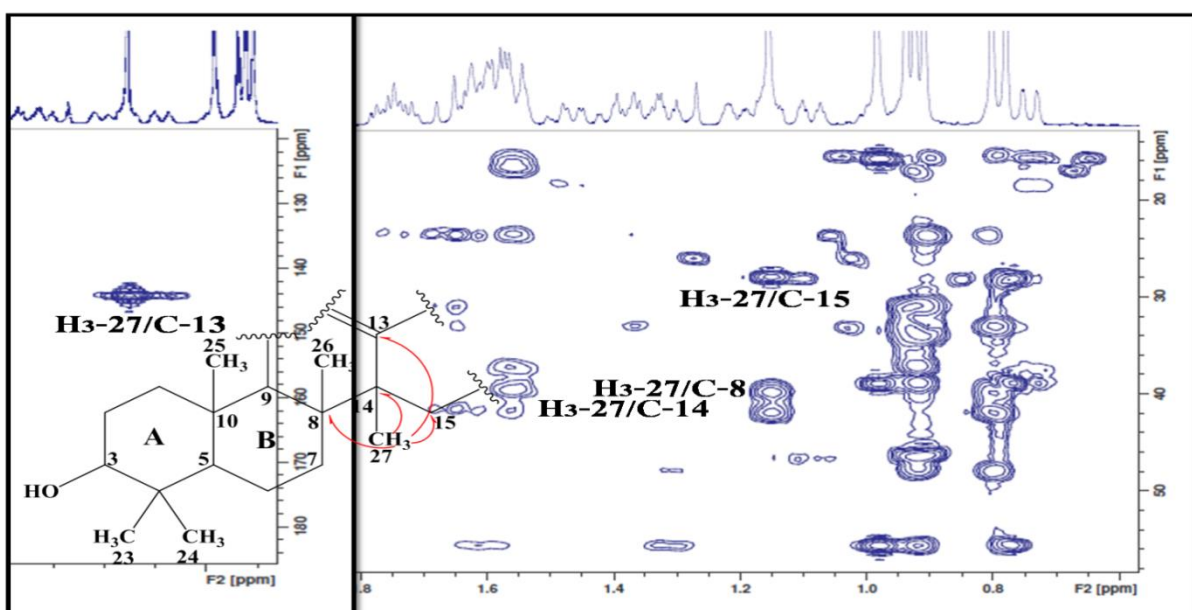


Figure III.49 : Corrélations HMBC du groupement méthyle (Me-27)

Le proton éthylénique H-12 (5,27, *t*) montre des taches de corrélation sur le spectre HMBC (Figure III. 50) avec les deux carbones quaternaire C-9 et C-14 déjà identifiés et avec un groupement méthylène à δ_C 23,8 ne pouvant être que le carbone C-11. L'un des protons de ce carbone est identifié par HSQC à δ_H 1,88 (*dt*, $J = 7,1; 3,5$ Hz) couplant en HMBC avec C-9, C-12 et C-13. A cette étape d'interprétation tous les protons et carbones des cycles A, B et C ont été déterminés.

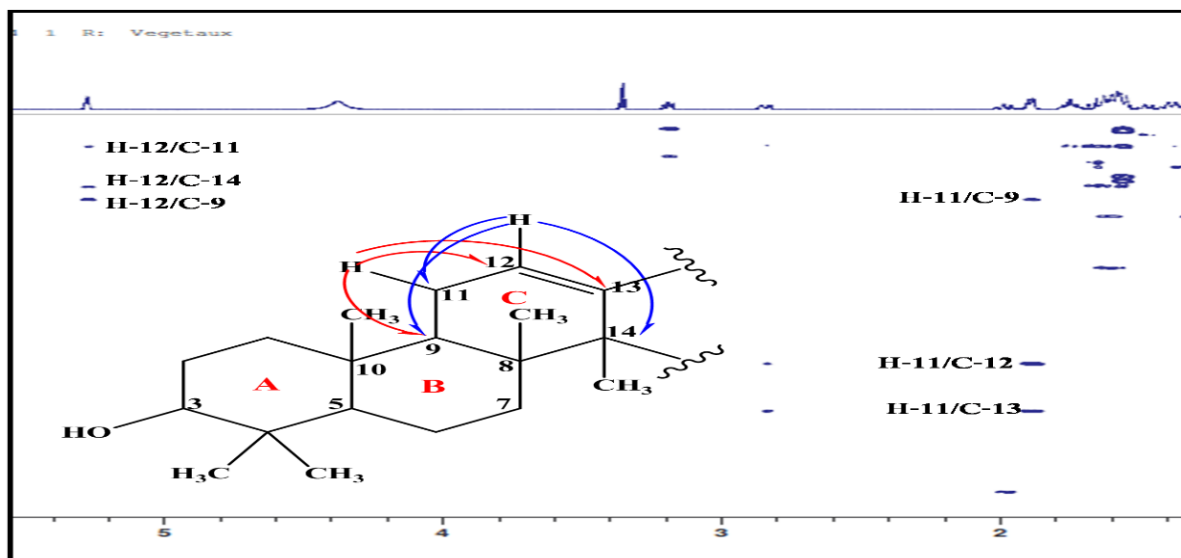


Figure III.50 : Corrélations HMBC des protons H-11 et H-12

On observe aussi sur le spectre HMBC (Figure III.49) un couplage en 3J des protons du groupement méthyle CH₃-27 avec un carbone méthylène CH₂-15 (δ_C 28,1). Ses protons sont localisés à δ_H 1,73 (*m*, H-15a) et δ_H 1,07 (*m*, H-15b) par HSQC (Figure III.51).

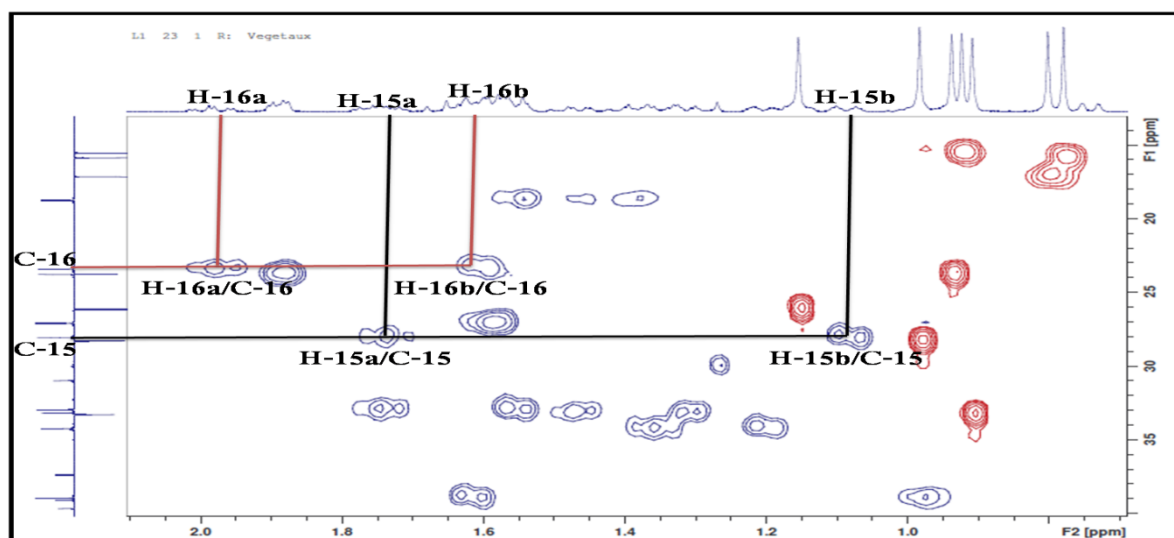


Figure III.51 : Spectre HSQC du composé TA9

Le spectre COSY (Figure III.52) montre les couplages suivants : H-15a/H-15b, H-15a/H-16a (δ_H 1,98, *td*, $J = 13,5, 3,9$ Hz), H-15b/H-16a, H-16a/H-16b (δ_H 1,61, *m*). Le spectre HSQC (Figure III.51) permet d'attribuer le déplacement chimique du carbone C-16 à δ_C 23,4.

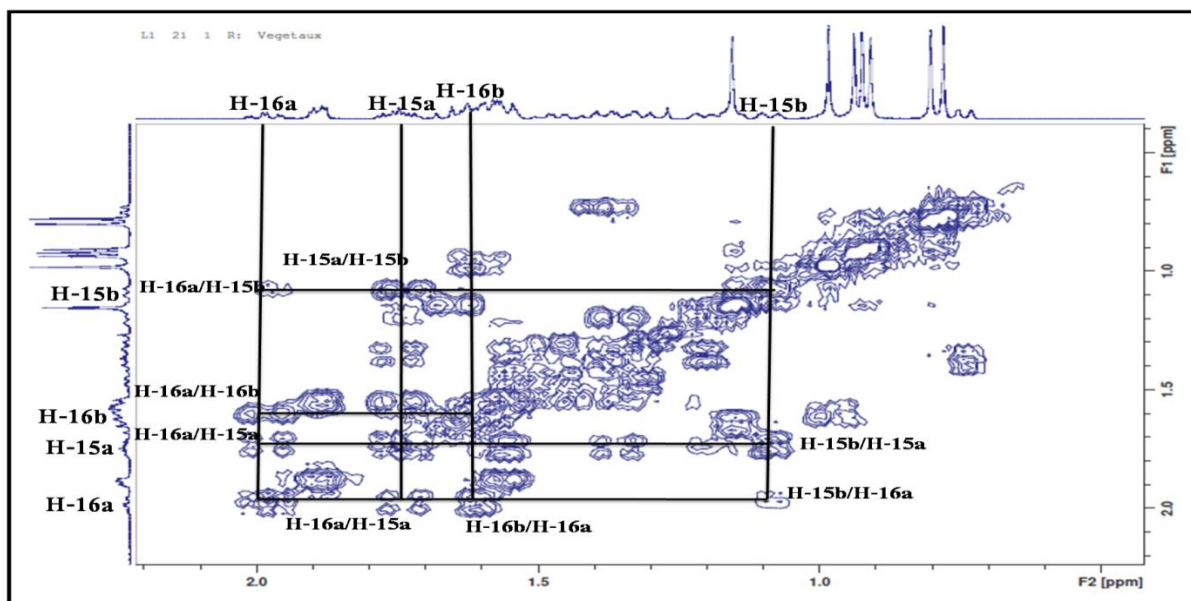


Figure III.52 : Corrélation COSY entre les protons H₂-15 et H₂-16 du composé DE9

Le proton méthine H-18 assigné précédemment couple en HMBC avec les deux carbones éthyléniques C-12 et C-13 et avec un carbone quaternaire à δ_C 46,8 ne pouvant être que le carbone C-17 et aussi avec le carbone d'acide à 181,5 ppm (C-28). Ce dernier corrèle à son tour avec les protons H-15a et H-16a, impliquant ainsi la formation d'un cycle à six chaînons D (Figure III.53).

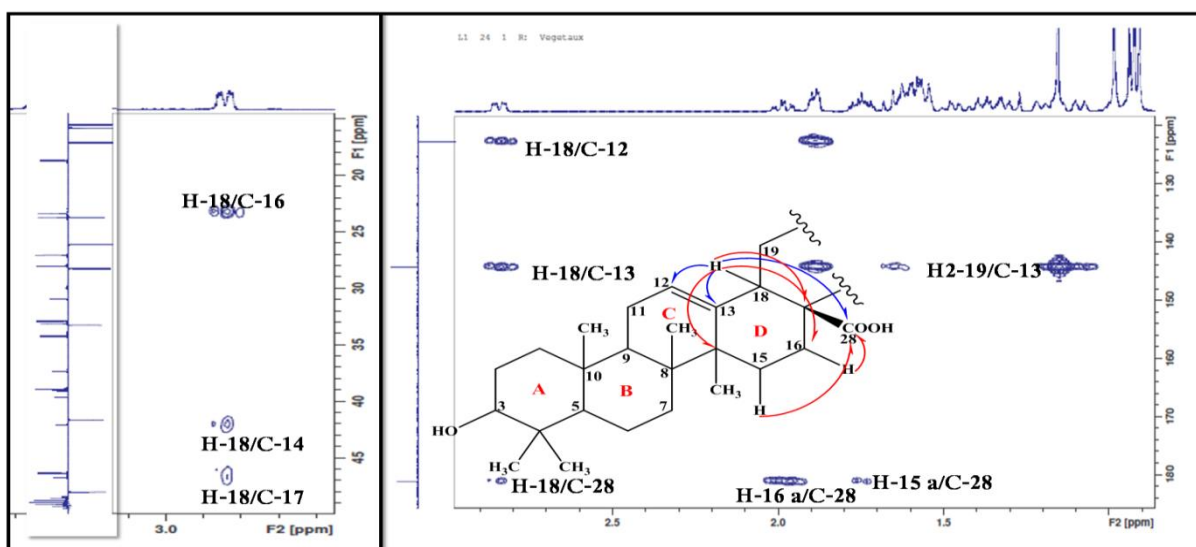


Figure III.53 : Corrélations HMBC des protons H-18, H-15 et H-16

Sur le spectre HMBC (Figure III.54) de ce composé, on observe des tâches de corrélation entre les protons du groupement méthyle M-29 à 0,91 ppm et le carbone C-19 déjà détecté et trois carbones à δ_C 30,9 ; 34,2 et 23,7 correspondant aux C-20 et C-21 et le groupement méthyle Me-30 respectivement. Aussi, les protons de ce dernier (Me-30) résonant à 0,94 ppm couplent avec le carbone C-20. Les protons H₂-21 sont assignés à 1,36 (*m*, H-21a) et 1,20 (*m*, H-21b) par analyse de l'expérience HSQC.

Une autre corrélation est visualisée entre le proton H-21 résonant à 1,36 ppm et un carbone méthylène sortant à δ_C 33,2 ne pouvant être que le carbone C-22 (Figure III.54). Les protons de ce carbone sont identifiés par HSQC à δ_H 1,48 (H-22a, *m*) et 1,31 (H-22b, *m*).

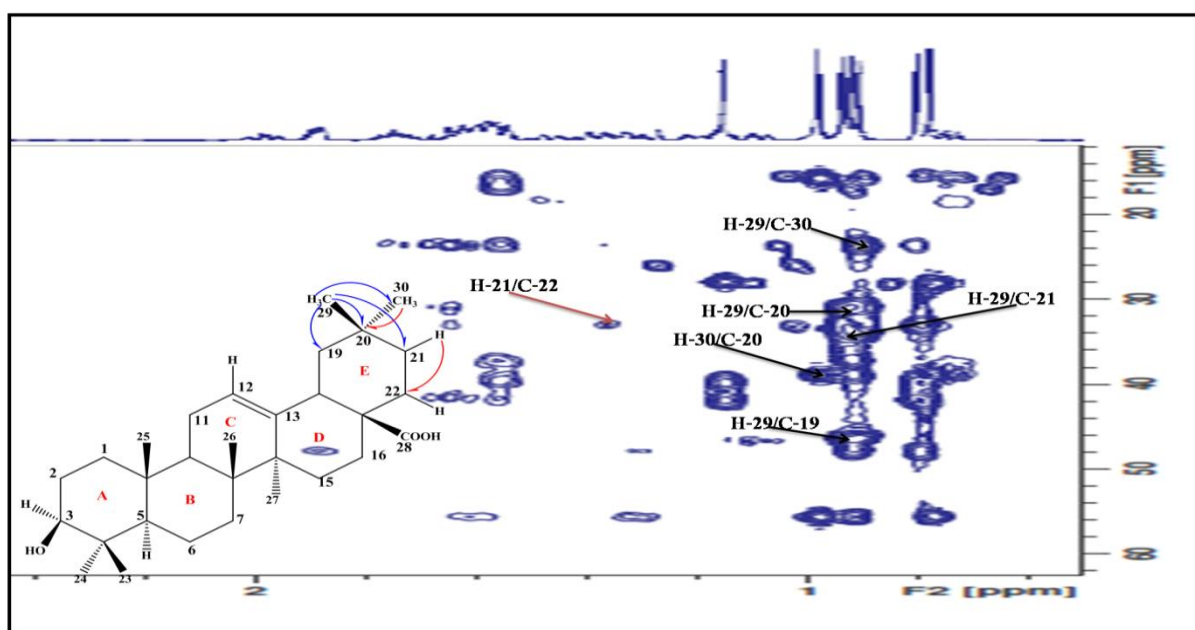
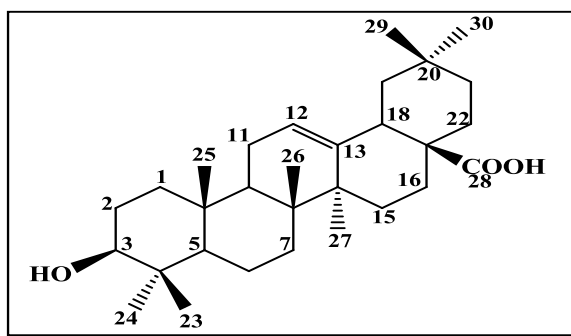


Figure III.54 : Corrélations HMBC des protons H-21, H-29 et H₃-30

L'ensemble de ces données (tableau III.9) ainsi que la comparaison avec celles de la littérature [144], conduit à l'identification du composé **TA9** comme étant l'acide oléanolique.



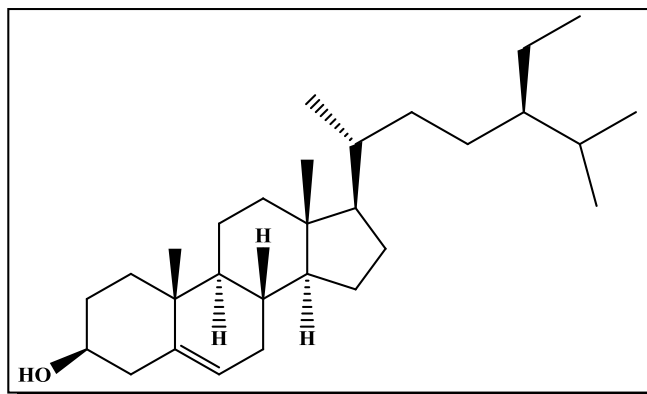
Acide oléanolique

L'acide oléanolique est particulièrement répandu dans les plantes appartenant à la famille Oleaceae, parmi lesquelles l'olivier (*Olea europaea*) [145]. Ce composé a été antérieurement isolé de plusieurs espèces du genre *Mentha* (Lamiaceae): *M. citrata*, *M. arvensis* var. *piperascens* MAL, *M. spicata* et *M. rotundifolia* [146]. Il est connu pour ses activités antibactérienne, antidiabétique et anti-inflammatoire et pour la protection du foie. En outre, il présente des activités antitumorale, anti-hyperlipidémie et antimicrobienne [147-148].

Tableau III.9: Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C du Composé TA9 dans ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$)

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)	Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	38,9	1,60 (m, H-a) 0,97 (m, H-b)	16	23,4	1,98 (td, 13,5; 3,9 H-a) 1,61 (m, H-b)
2	27,1	1,58 (m)	17	46,8	-
3	79,1	3,18 (dd, 10; 6,2)	18	41,7	2,84 (dd, 13,6; 4,1)
4	39,7	-	19	46,4	1,65 (m, H-a) 1,15 (m, H-b)
5	55,7	0,75 (dl, 10)	20	30,9	-
6	18,7	1,54 (m, H-a) 1,37 (m, H-b)	21	34,2	1,36 (m, H-a) 1,20 (m, H-b)
7	32,9	1,75 (m, H-a) 1,57 (m, H-b)	22	33,2	1,48 (m, H-a) 1,31 (m, H-b)
8	39,1	-	23	28,3	0,98(s)
9	48,1	1,58 (m)	24	15,8	0,78 (s)
10	37,4	-	25	15,5	0,92 (s)
11	23,8	1,88 (dt, 7,1; 3,5)	26	17,1	0,80 (s)
12	122,8	5,27 (t, 3,5)	27	26,1	1,15 (s)
13	144,6	-	28	181,5	-
14	42,1	-	29	33,3	0,91 (s)
15	28,1	1,73 (m, H-a) 1,07 (m, H-b)	30	23,7	0,94 (s)

III.1.10 Identification structurale du composé TA10



β -sitostérol

Le composé **TA10** est obtenu sous forme d'une poudre blanche, soluble dans le chloroforme. Il est invisible sous la lumière UV (254 et 366 nm) et se colore en rose après pulvérisation de sa CCM et chauffage à 100°C.

Le spectre de masse ESI-MS du composé **TA10** enregistré en mode négatif (Figure III.55) montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 413,27$ $[M-H]^-$. Ceci correspond à une masse moléculaire de 414 uma et une formule brute en $C_{29}H_{50}O$. Ces données préliminaires et la comparaison de sa CCM avec un échantillon témoin plaident en faveur d'une structure de type phytostérol.

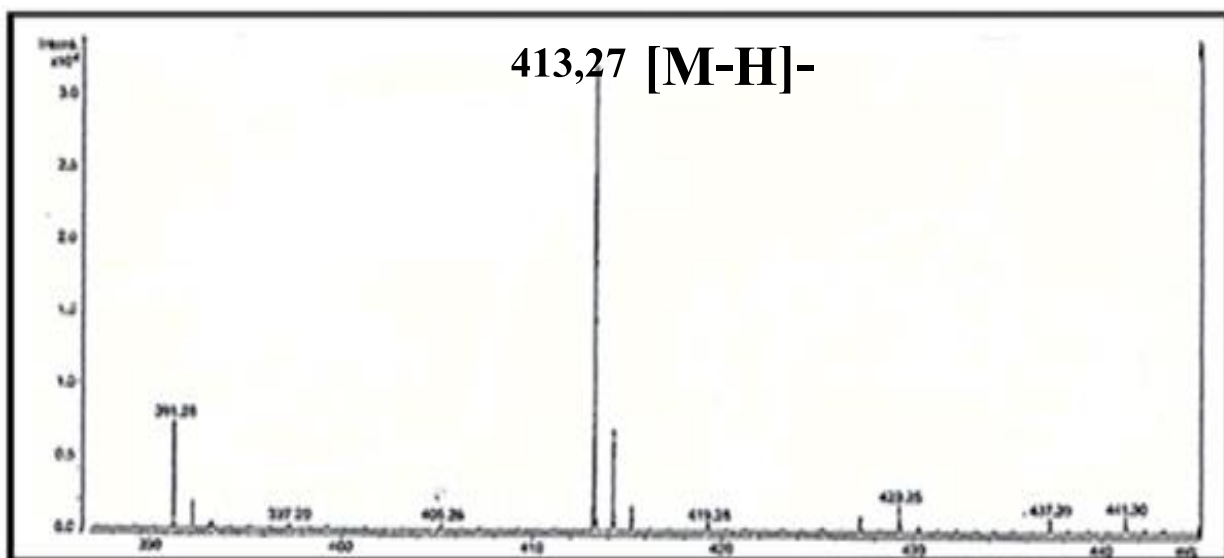


Figure III.55: Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé **TA10**

L'examen de son spectre RMN 1H (Figure III.56) enregistré dans le $CDCl_3$ montre la présence des signaux caractéristiques des phytostérols notamment :

- ✓ Un doublet de doublet à δ_H 5,45 (1H , *dd*, $J= 5,2; 2,3\text{Hz}$) correspondant au proton éthylénique H-6 ;
- ✓ Un triplet de triplet d'intégration 1H à δ_H 3,59 (1H , *tt*, $J= 11,3; 5,1\text{Hz}$) attribuable à un proton d'un groupement hydroxyméthine CH-3 d'un stérol ;
- ✓ Six méthyles résonant à δ_H 1,05 (Me-19), 0,97 (Me-21), 0,72 (Me-18), 0,88 (Me-26), 0,86 (Me-27) et 0,90 (Me-29) d'un phytostérol.

Une série de pics très dense se situant entre 0,7 et 2,4 ppm, suggérant la présence d'un nombre élevé de groupements méthylènes et méthines.

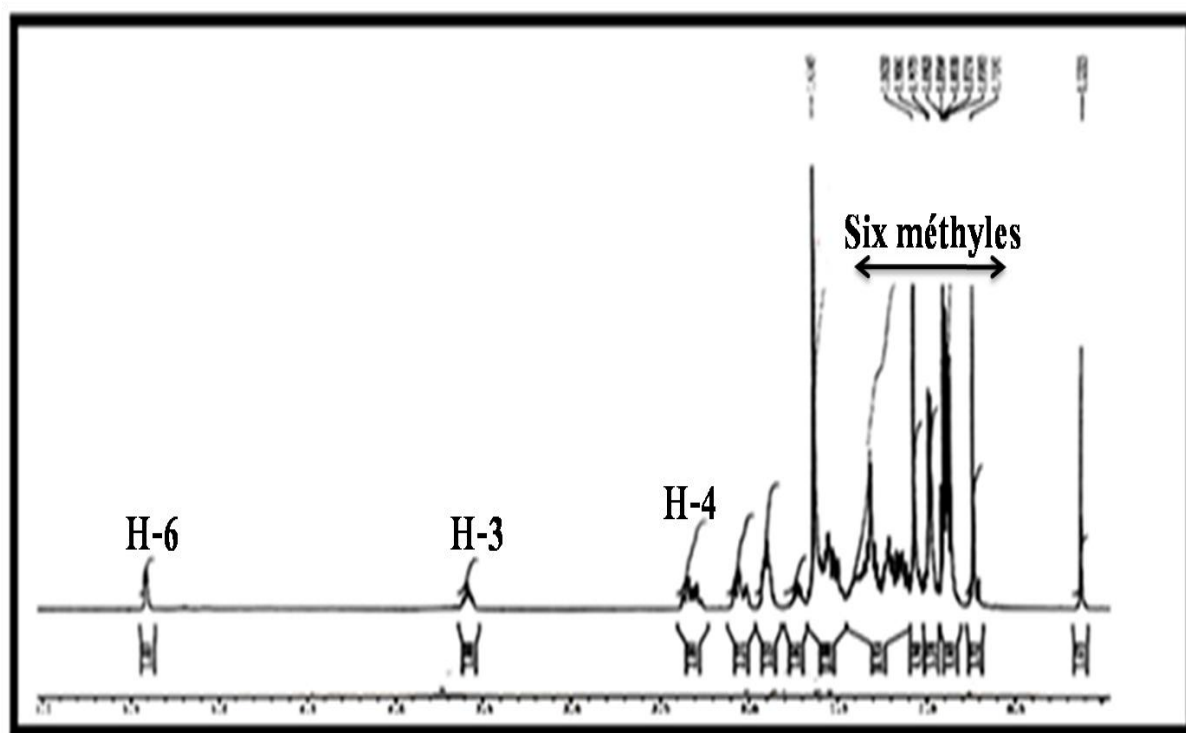


Figure III.56 : Spectre RMN ^1H du composé TA10 (CDCl_3)

Le spectre RMN ^{13}C *J*-modulé (Figure III.57) présente des signaux de carbones caractéristiques des phytostéroles.

- ✓ Deux carbones résonant à δ_C 140,7 et 121,7 correspondant aux carbones éthyléniques C-5 et C-6 respectivement ;
- ✓ Un carbone hydroxylé à δ_C 71,8 assigné au carbone C-3 ;
- ✓ Six groupements méthyles à δ_C 11,8 ; 19,4 ; 18,8 ; 19,8 ; 19,0 et 11,9 attribués aux carbones C-18, C-19, C-21, C-26, C-27 et C-29 respectivement ;

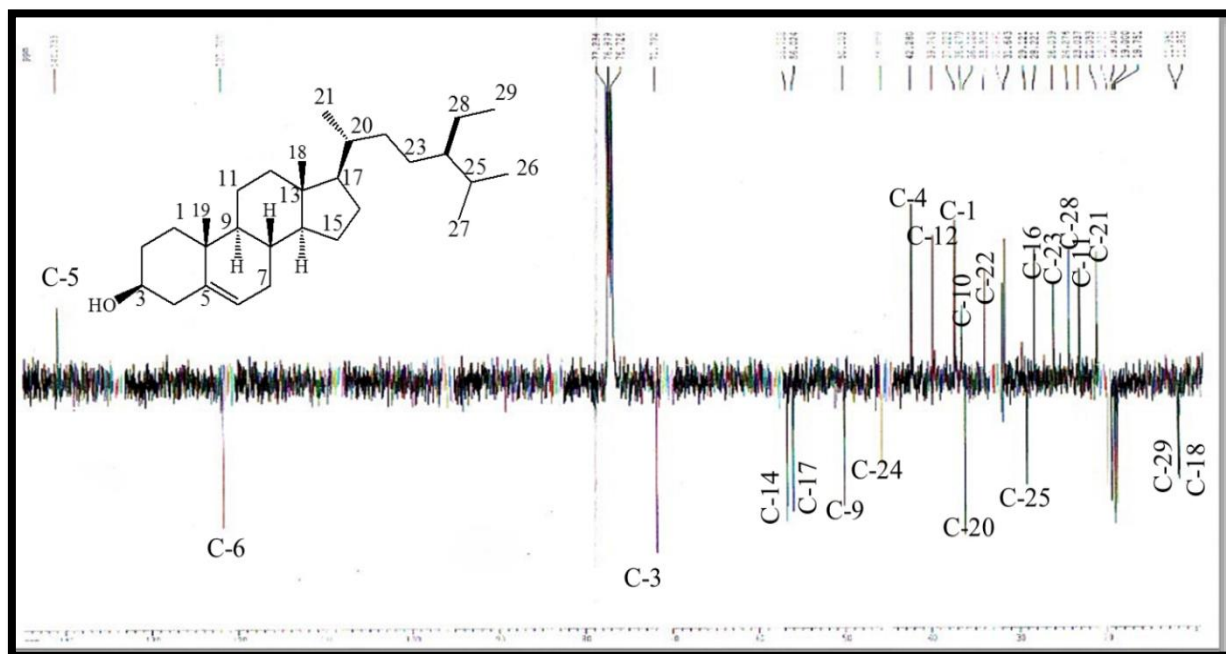
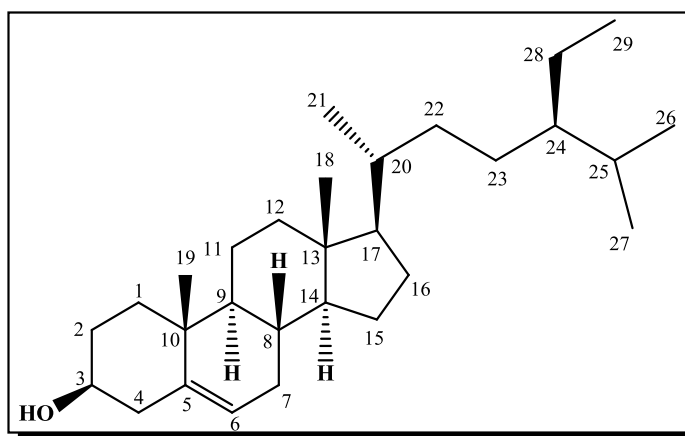


Figure III.57: Spectre RMN ^{13}C du composé **TA10** (CDCl_3)

L'ensemble des données spectroscopiques (tableau III.10) du composé **TA10** sont conformes à celles de la littérature [149].



β -sitosterol

Le β -sitostérol a été isolé de l'espèce *Mentha longifolia* (Lamiaceae) [150]. Il a fait l'objet de nombreuses études pharmacologiques révélant qu'il possède des propriétés antibactérienne, antitumorale [151], antipyrétique, immunomodulatrice et anti-inflammatoire [152].

Tableau III.10 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C du composé **TA10** dans CDCl_3

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)	Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	37,2	1,90 (m, H-a) 1,15 (m, H-b)	16	28,2	1,90 (m, H-a) 1,30 (m, H-b)
2	31,6	1,88 (m, H-a) 1,57 (m, H-b)	17	56,0	1,15 (m)
3	71,8	3,59 (tt, 11,3 ; 5,1)	18	11,8	0,72 (s)
4	42,3	2,36 (dd, 13,1 ; 5,1Ha) 2,29 (t, 13,1 H-b)	19	19,4	1,05 (s)
5	140,7	-	20	36,1	1,40 (m)
6	121,7	5,45 (dd, 5,2; 2,3)	21	18,8	0,97 (d, 6,5)
7	31,8	2,08 (m, H-a) 1,56 (m, H-b)	22	33,9	1,48 (m, H-a) 1,31 (m, H-b)
8	31,7	1,49 (dd, 11,2; 4,6)	23	26,0	1,21 (m)
9	50,1	0,97 (m)	24	45,8	0,97 (m)
10	36,5	-	25	29,1	0,72 (m)
11	21,1	1,55 (m, H-a) 1,53 (m, H-b)	26	19,8	0,88 (d, 6,8)
12	39,7	2,08 (m, H-a) 1,22 (m, H-b)	27	19,0	0,86 (d, 6,8)
13	42,2	-	28	23,0	1,32 (m, H-a) 1,29 (m, H-b)
14	56,7	1,00 (m)	29	11,9	0,90 (t, 6,5)
15	21,1	1,63 (m, H-a) 1,11 (m, H-b)			

III.2 Conclusion

Ce travail décrit une étude phytochimique effectuée sur les parties aériennes d'une plante médicinale appelée *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut de la famille Lamiaceae. Cette investigation phytochimique a porté sur les extraits CHCl_3 et *n*-BuOH de cette espèce et a permis d'isoler et d'identifier dix produits naturels dont quatre flavonoïdes, quatre acides phénoliques et deux triterpénoïdes se répartissant comme suit:

➤ Quatre flavonoïdes :

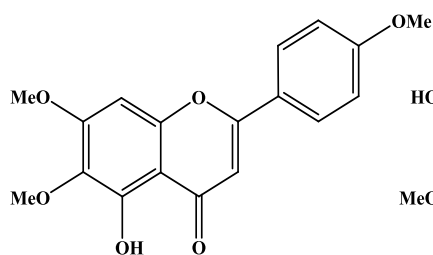
- 5-hydroxy-6,7,4'-triméthoxyflavone (Salvigénine) ;
- 5,7-dihydroxy-3,6,4'-triméthoxyflavone (Santin) ;
- 5,4'-dihydroxy-6,7-diméthoxyflavone (Cirsimaritine) ;
- Apigénine.

➤ Quatre acides phénoliques :

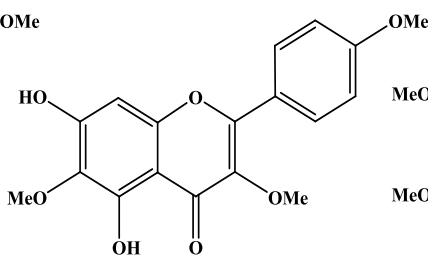
- Acide *p*-hydroxybenzoïque ;
- Acide vanillique ;
- Acide gallique ;
- Acide rosmarinique.

➤ Deux triterpénoïdes :

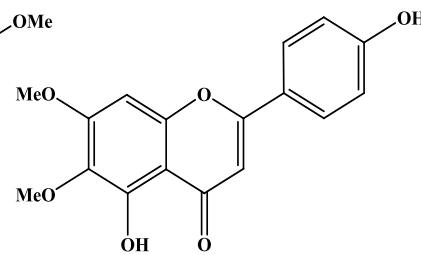
- Acide oléanolique ;
- β -sitostérol.



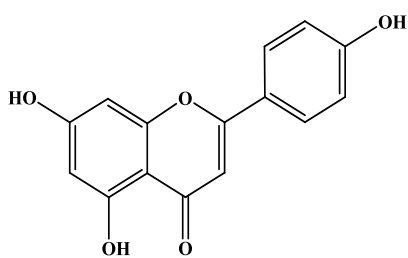
Salvigénine (1)



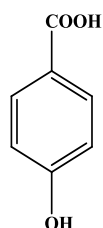
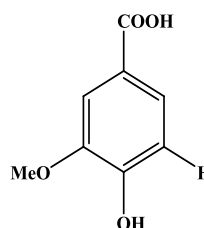
Santin (2)



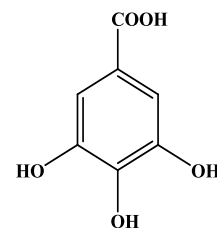
Cirsimaritine (3)



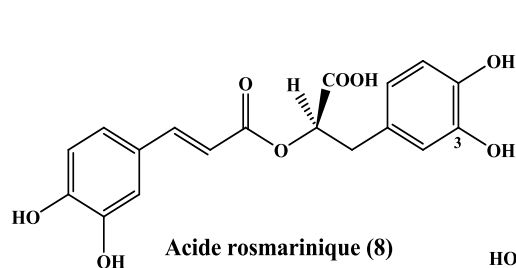
Apigénine (4)

Acide *p*-hydroxybenzoïque (5)

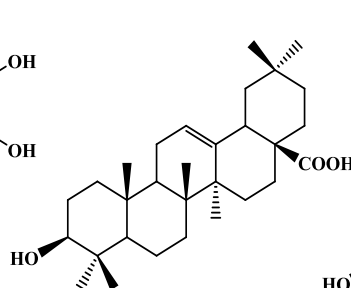
Acide vanillique (6)



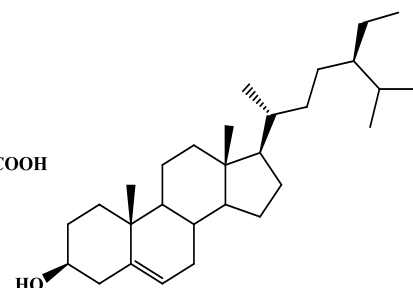
Acide gallique (7)



Acide rosmarinique (8)



Acide oléanolique (9)

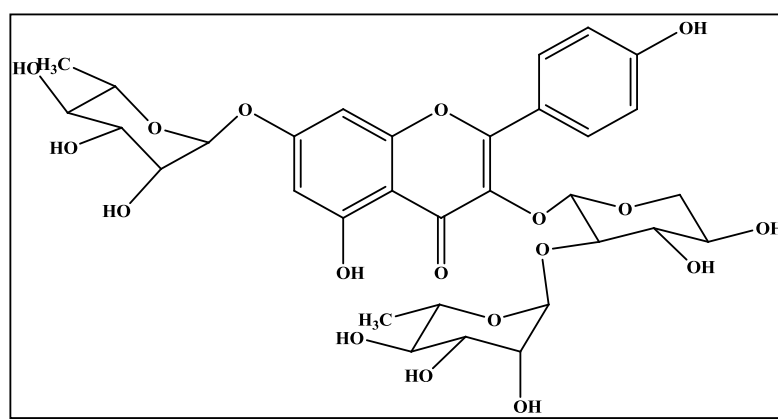
 β -sitostérol (10)

III.3 Caractérisation structurale des produits obtenus de *D. eruroides*

Plusieurs techniques de purification ont été appliquées sur les deux extraits AcOEt et *n*-butanol, conduisant ainsi à l'isolement de 8 composés naturels purs.

Les produits isolés ont été caractérisés par les méthodes d'analyses spectroscopiques RMN 1D du proton et carbone, RMN 2D conjuguant les expériences COSY H-H, HSQC et HMBC, la spectrométrie de masse ESI, la mesure du pouvoir rotatoire et la comparaison avec les données de la littérature.

III.3.1 Identification structurale du composé DE1



Kaempférol-3-O-[[α -L-rhamnopyranosyl (1-2)- β -D-xylopyranosyl]]-7-O- α -L-rhamnopyranoside

Ce composé est isolé sous forme de cristaux jaunes solubles dans le méthanol. Il présente une tache visible sous la lumière UV à 254 et 366 nm. La coloration jaune foncé de cette tache après révélation de la CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100 °C laisse supposer qu'il s'agit d'un flavonoïde. La fluorescence violette sombre de ce composé sous la lampe UV à 366 nm suggère qu'il s'agit d'une flavone ou flavonol substitué en 3 (3-OR).

Le spectre de masse ESI-MS du composé **DE1** enregistré en mode négatif (Figure III.58) montre la présence d'un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 709,1985$ $[M-H]^-$ donnant une masse moléculaire de 710 uma et correspondant à une formule brute en $C_{32}H_{38}O_{18}$.

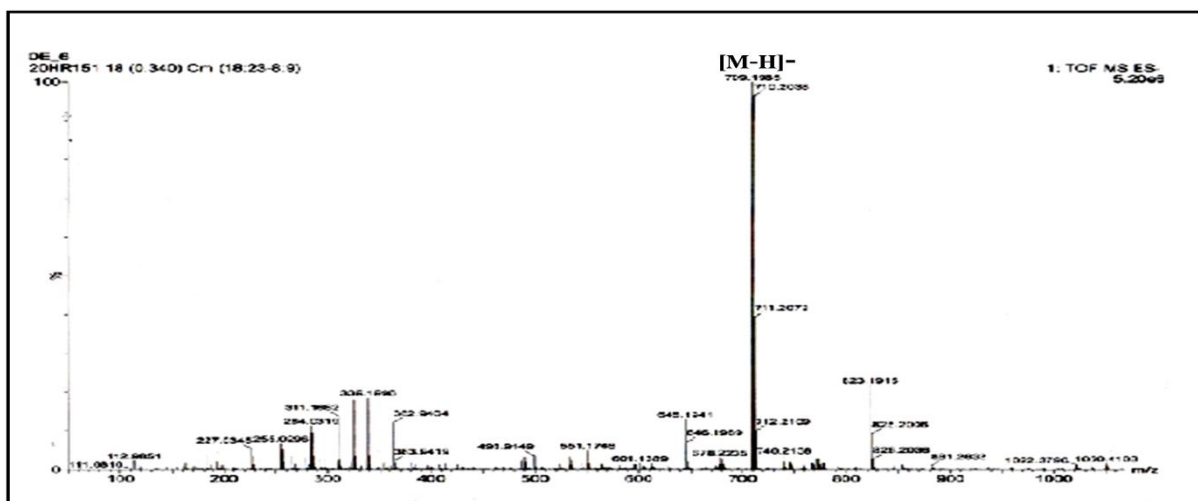


Figure III.58: Spectre de masse ESI-MS (mode négatif) du composé **DE1**

L'examen du spectre RMN ^1H , enregistré dans le MeOD (Figure III.59) du composé **DE1** révèle la présence :

- ✓ Des signaux de protons aromatiques résonant entre 6,4 et 8,1 ppm ;
- ✓ Trois signaux d'intégration 1H chacun localisés à δ_{H} 5,63 (H-1'', *d*, $J = 7$ Hz), 5,56 (*sl*) et 5,22 (*sl*), caractéristiques de protons anomères de 3 unités osidiques ;
- ✓ Plusieurs signaux entre 3 et 4 ppm caractéristiques de protons osidiques ;

Toutes ces données laissent supposer que le composé **DE1** est un flavonoïde glycosylé.

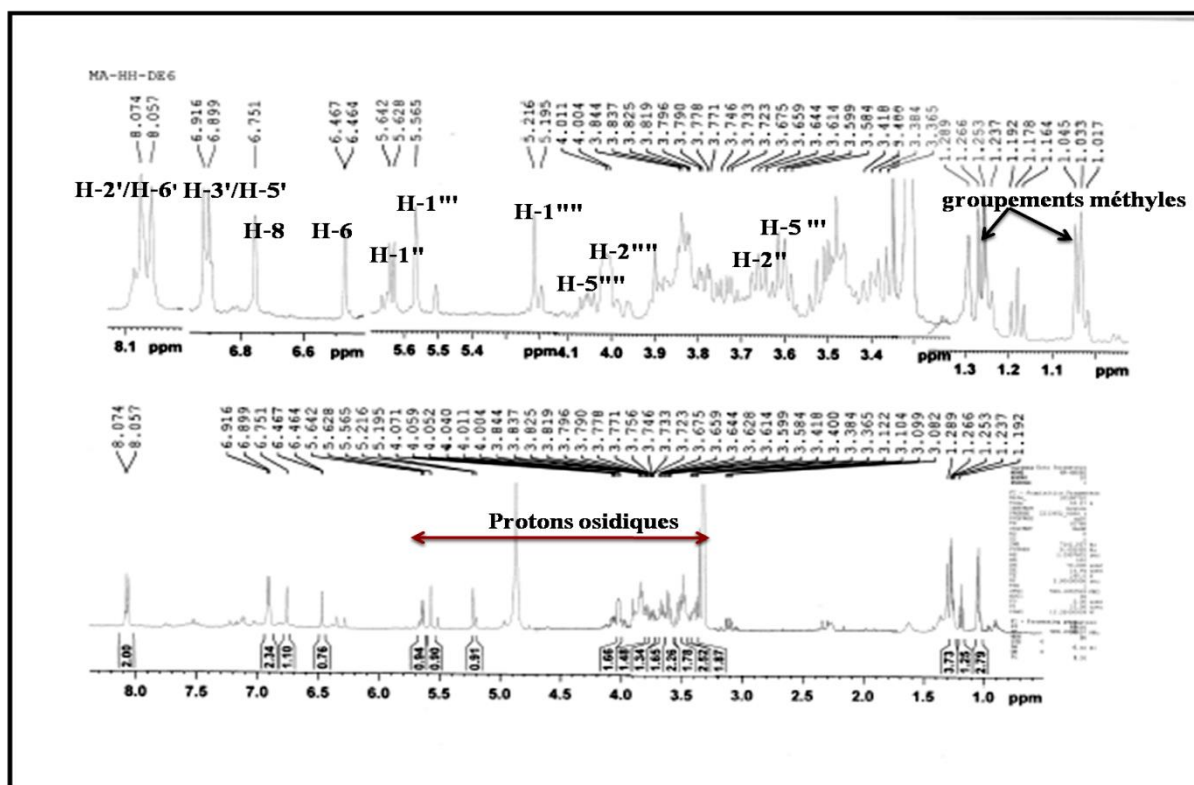


Figure III.59: Spectre RMN ^1H du composé **DE1**

L'analyse conjointe des spectres RMN ^1H , COSY H-H (Figure III.60) et HSQC J -modulé (Figure III.61) met en exergue :

- ✓ Deux signaux sous forme de doublet chacun à δ_{H} 8,06 (2H) et 6,91 (2H) avec une constante de couplage $J = 8,5$ Hz traduisant un couplage de type *ortho* correspondant à quatre protons d'un noyau aromatique parasubstitué. Selon le spectre COSY H-H, ces protons appartiennent à un même système de spins, attribuables aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' respectivement du cycle B du flavonoïde. Leurs carbones sont détectés par l'analyse du spectre HSQC à δ_{C} 116,2 (C-3' et C-5') et 132,2 (C-2' et C-6').

Deux signaux à δ_{H} 6,46 (1H, *d*, $J = 1,5$ Hz) et 6,75 (1H, *sl*), attribués respectivement aux protons H-6 et H-8 du cycle A de flavonoïde. Ceci est confirmé par expérience COSY H-H (Figure III.60). Leurs carbones sont assignés par l'examen du spectre HSQC à δ_{C} 100,5 (C-6) et 95,5 (C-8).

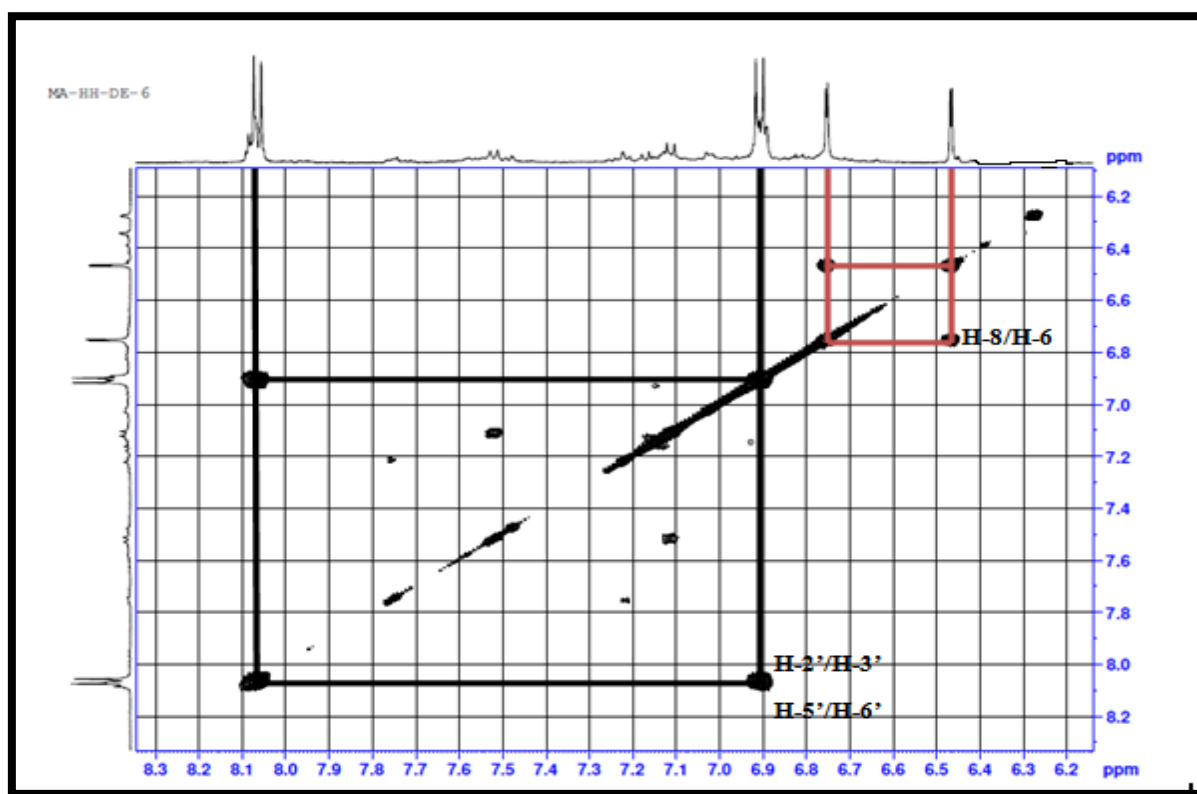


Figure III.60 : Spectre COSY H-H de l'aglycone du composé DE1

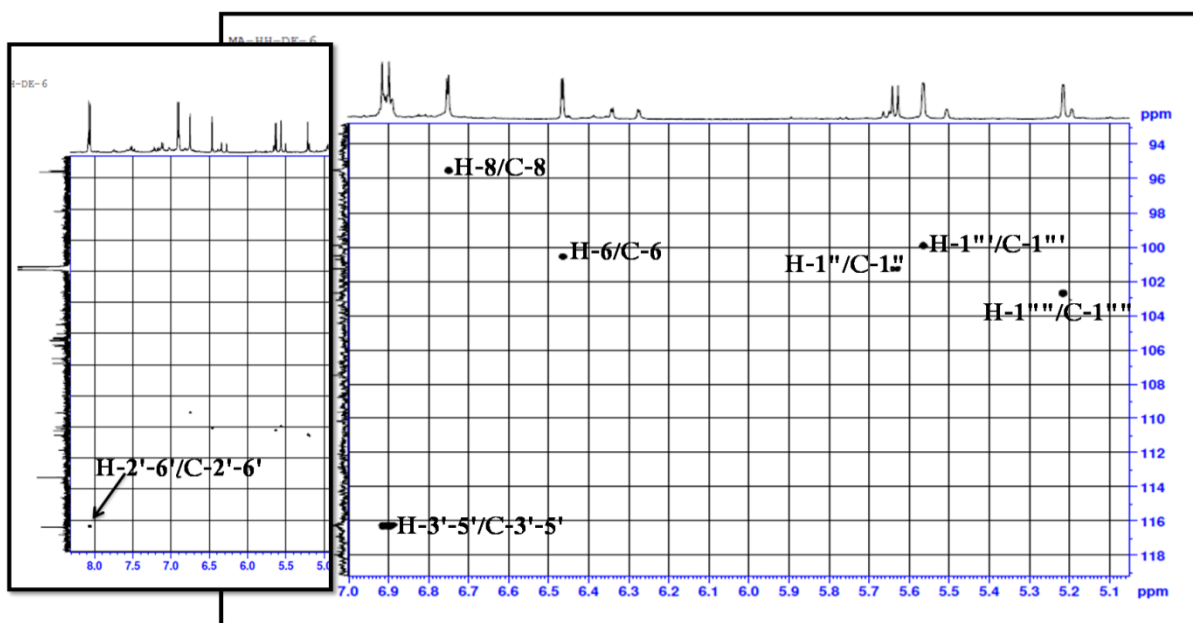


Figure III.61: Spectre HSQC du composé **DE1**

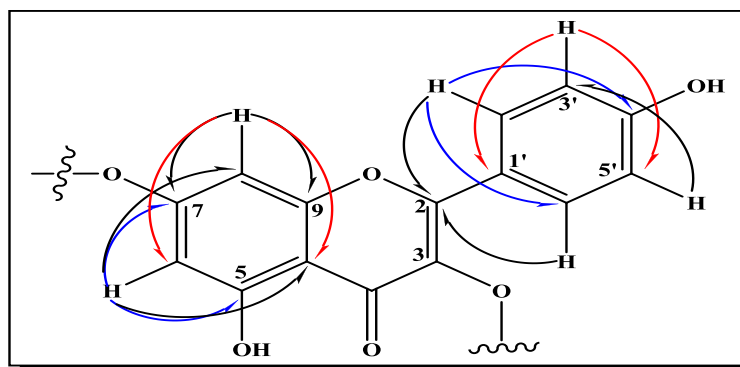
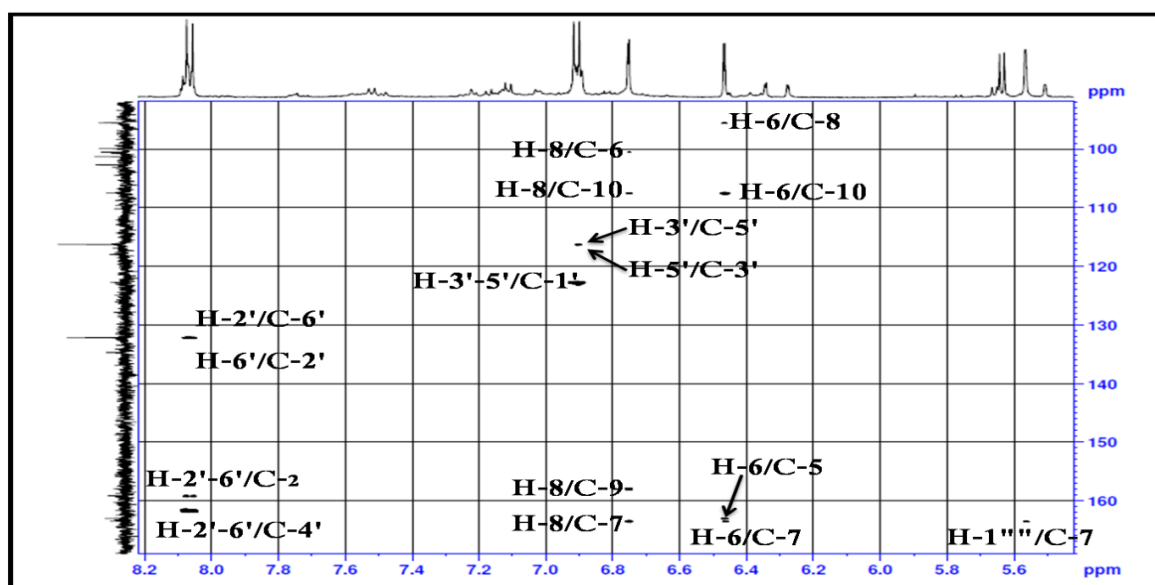
A l'issue de cette première analyse, il apparaît bien que le composé **DE1**, est un flavonol de type kaempférol porteur de trois unités osidiques dont il reste à identifier et confirmer leur nature ainsi que leur point de branchement sur l'aglycone.

▪ Identification de la partie aglycone

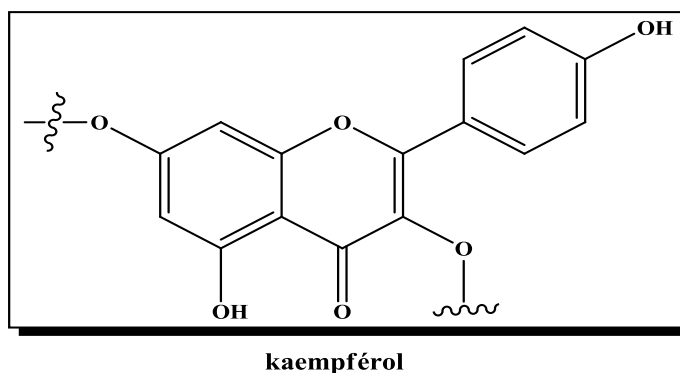
L'expérience HMBC (Figure III.63) conduit à l'établissement des principaux couplages hétéronucléaires H/C à longue distance du composé **DE1**. En effet, ce spectre permet de visualiser les corrélations suivantes (Figures III.62) :

- ✓ Les protons H-2'/H-6' avec les carbones quaternaires C-2 (δ_C 159,1) et C-4' (δ_C 161,7) ;
- ✓ Les protons H-3'/H-5' et le carbone quaternaire résonant à δ_C 122,7 attribuable au carbone C-1' ;
- ✓ Le proton H-8 (δ_H 6,75) et quatre carbones dont trois quaternaires à δ_C 100,5 ; 107,5 ; 158 et 163,5 attribuables respectivement aux carbones C-6, C-10, C-9 et C-7. Ces deux derniers sont oxygénés ;
- ✓ Le proton H-6 (δ_H 6,46) et quatre carbones C-10, C-7 déjà identifiés et C-5, C-8 résonant à δ_C 163 et 95,5 respectivement.

Le spectre HMBC permet d'observer également les couplages H-6'/C-2', H-5'/C-3', H-3'/C-5' et H-2'/C-6'.

Figure III.62: Corrélations HMBC de la partie génine du composé *DEI*Figure III.63: Spectre HMBC de la partie génine du composé *DEI*

Ces attributions permettent à ce stade de confirmer que la génine de cette molécule est de type kaempférol.



▪ Partie osidique

L'analyse du spectre COSY (Figures III.64) permet d'identifier un premier système de spins à six protons appartenant à un pentose dont l'anomère H-1'' résonne à δ_H 5,63 (*d*, $J = 7$ Hz). Le proton H-2'' [δ_H 3,66 (*t*, $J = 7,5$ Hz)] corrèle avec le proton anomère H-1'' et avec le proton H-3'' [δ_H 3,51 (*t*, $J = 9,5$ Hz)]. Le proton H-4'' résonnant sous forme d'un triplet à δ_H 3,49 ($J = 9,5$ Hz) corrèle avec les protons H-5''eq [δ_H 3,74 (*dd*, 11,5 ; 5), H-5''a] et H-5''ax [δ_H 3,1 (*dd*, 11,5; 7,8), H-5''b] [153].

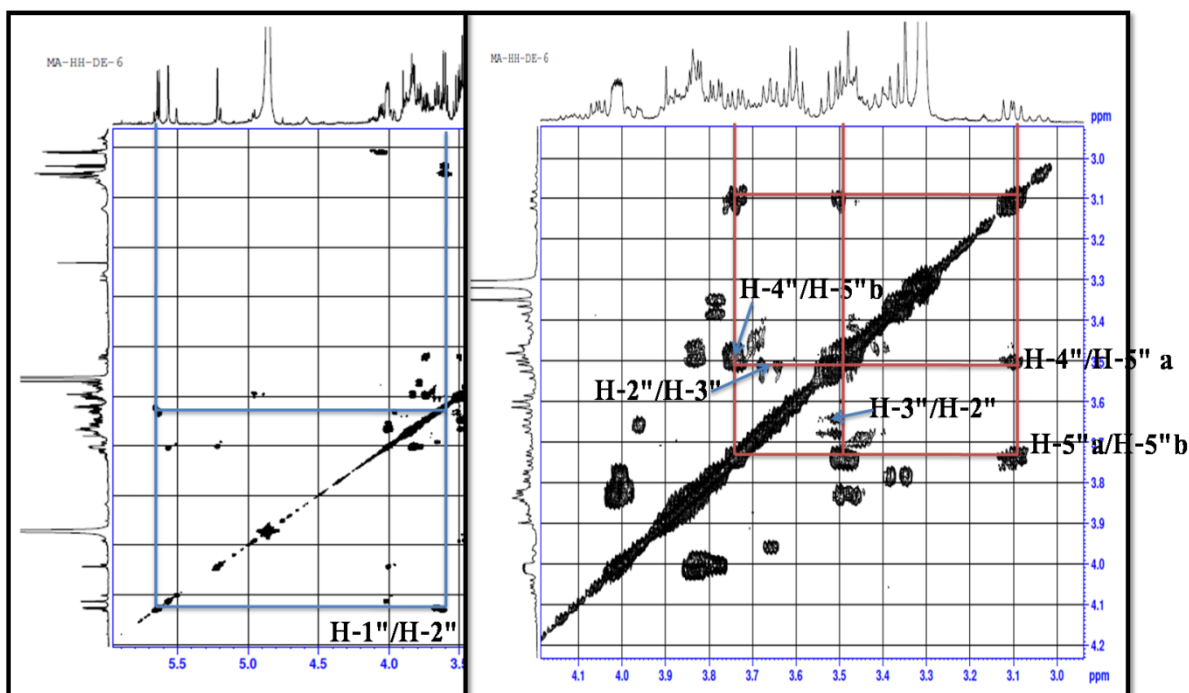


Figure III.64: Spectre COSY montrant les couplages du β -D-xylose

Les valeurs des constantes de couplage sont toutes supérieures à 7 Hz indiquant une position *trans*-diaxiale de ces protons. Ce pentose est identifié à un β -D-xylose (Figure III.65).

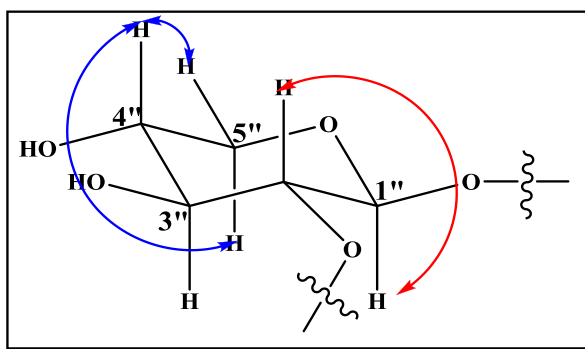


Figure III.65: Corrélations COSY du β -D-xylose

Partant du second proton anomère H-1''' [δ_H 5,22 (s)], un autre système de spins à huit protons d'un déoxyhexose est identifié sur le spectre COSY H-H (Figures III.66), et cela à travers les couplages H-1'''/H-2''' [δ_H 4,01 (dd, $J = 3,5 ; 1,2$)], H-2'''/H-3''' [δ_H 3,77 (dd, $J = 9,5 ; 3,2$ Hz)], H-3'''/H-4''' [δ_H 3,36 (t, 9,5 Hz)], H-4'''/H-5''' [δ_H 4,06 (dd, 9,8 ; 6)] et enfin H-5'''/CH₃-6''' [δ_H 1,12 (d, $J = 6$ Hz)]. Cette dernière corrélation en plus de la multiplicité du proton H-1''' sous forme de singulet large et de la faible valeur de la constante de couplage $J_{H3'''-H2'''} = 3,5$ Hz, traduisant une position équatoriale du proton H-2''', permettent d'identifier un α -L-rhamnose.

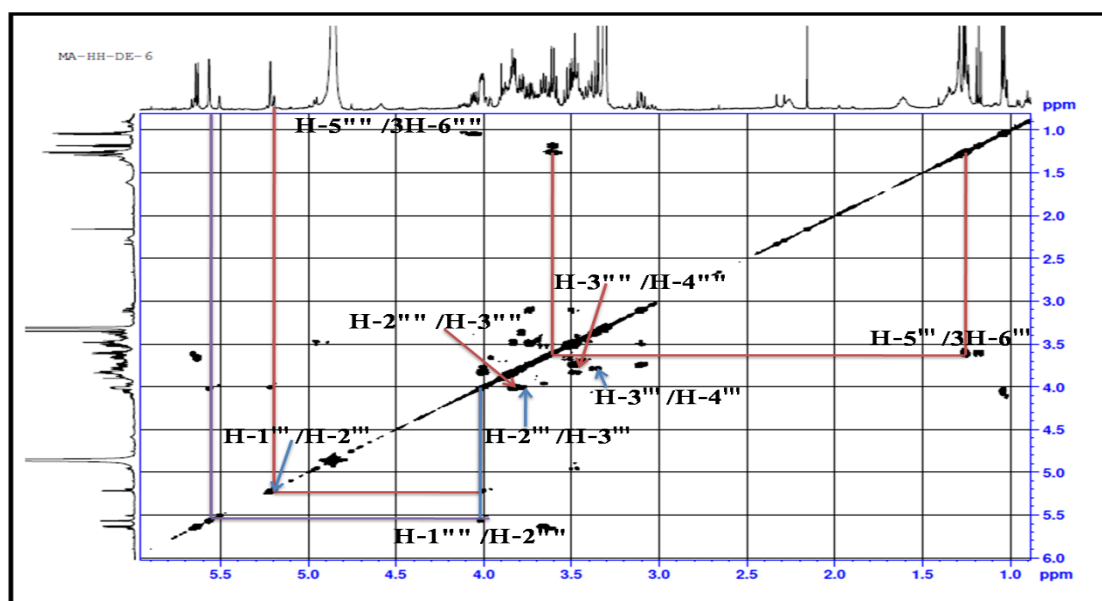


Figure III.66: Spectre COSY du α -L-rhamnose

A partir du troisième proton anomérique H-1'''' [δ_H 5,56 (sl)], un système de spins à huit protons a été également assigné, selon le spectre COSY (Figures III.66), attribuables aux protons d'un déoxyhexose. En effet, les couplages entre les protons suivants sont visualisés :

- ✓ H-1'''' [δ_H 5,56 (sl)] et H-2'''' [δ_H 4,02 (dd, $J = 3,4 ; 1,1$ Hz)] ;
- ✓ H-2'''' et H-3'''' [δ_H 3,83 (dd, $J = 9,5 ; 3,2$ Hz)], la faible valeur de la constante de couplage $J_{H3''''-H2''''} = 3,2$ Hz traduit une position équatoriale du proton H-2'''' ;
- ✓ H-3'''' et H-4'''' [δ_H 3,48 (t, $J = 9,5$ Hz)] ;
- ✓ H-4'''' et H-5'''' [δ_H 3,6 (dd, $J = 10,2 ; 6,4$ Hz)] ;
- ✓ Les protons H₃-6'''' résonnent sous forme d'un doublet à δ_H 1,04 couplant avec le proton H-5'''' au regard d'une constante de couplage $J = 6,5$ Hz.

Cette dernière corrélation et la position équatoriale du proton H-2'''' permettent d'identifier un α -L-rhamnose. Les carbones de ces trois unités osidiques ont été caractérisés par expérience HSQC (Figure III.67).

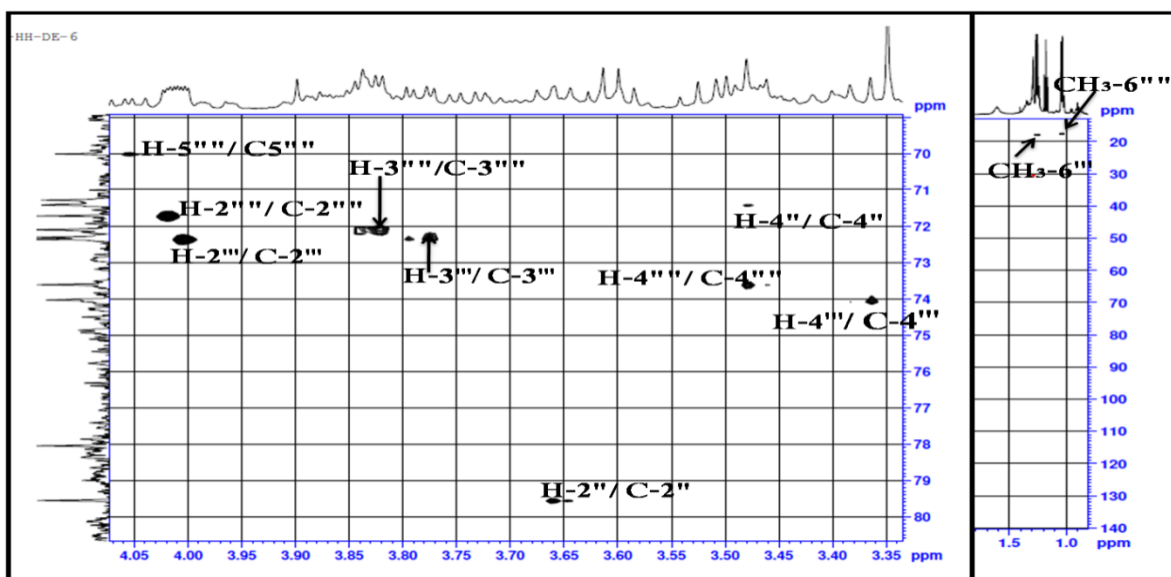


Figure III.67: Spectre HSQC de la partie osidique du composé DE1

L'analyse du spectre HMBC (Figures III.68 et III.69) permet d'établir l'enchaînement des trois sucres à l'aglycone en montrant le couplage du proton anomère H-1''' du rhamnose à δ_H 5,56 ppm avec le carbone C-7 du Kaempférol d'une part et d'autre part, le deuxième proton anomérique H-1'' (rhamnose) avec le carbone situé à δ_C 79,5 (C-2'' du xylose) mène à connecter les deux sucres identifiés comme étant un diglycoside : [α -L-rhamnopyranosyl (1-2)- β -D-xylopyranosyl]. Ce diglycoside est branché en C-3, Ceci est confirmée en se basant sur la valeur de déplacement chimique de ce carbone à 134,7 ppm et également, sur la valeur de déplacement chimique très caractéristique du carbone C-2 égale à 159,1 ppm [154].

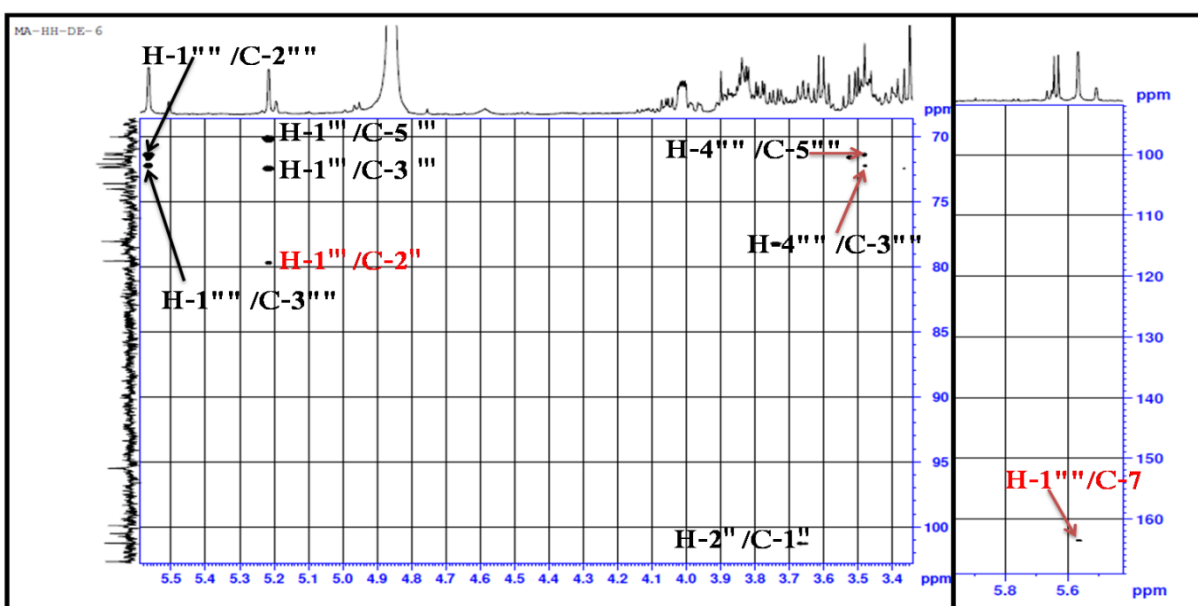


Figure III.68: Spectre HMBC de la partie osidique du composé DE1

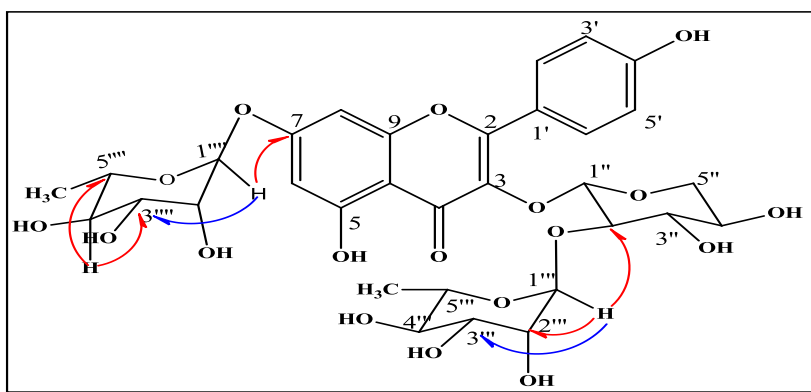
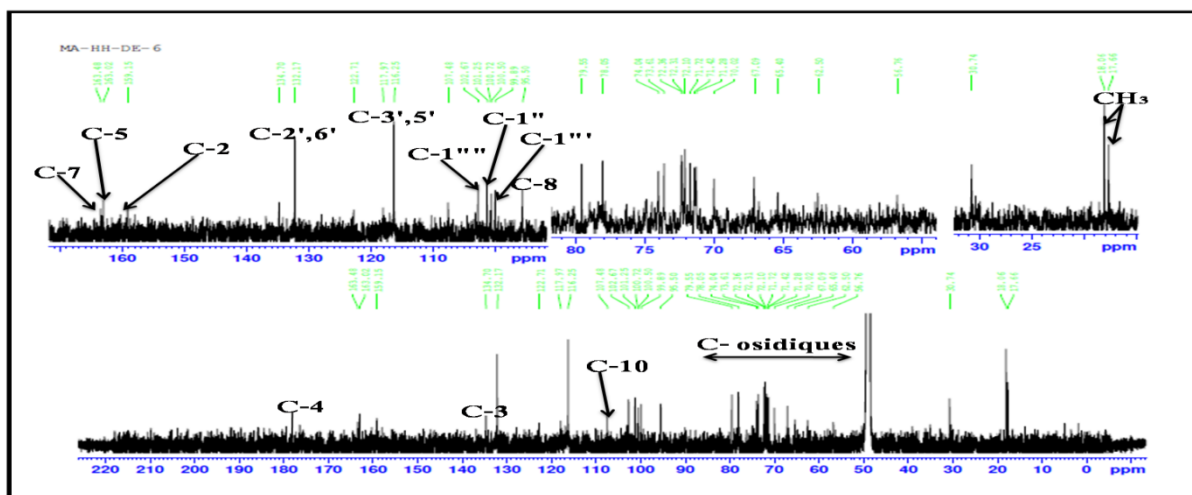
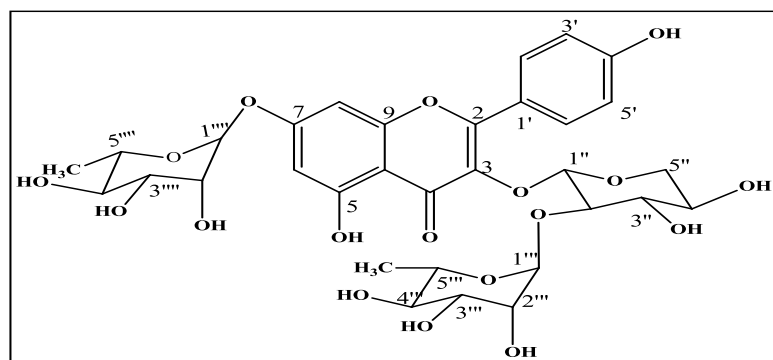


Figure III.69: Corrélations HMBC de la partie osidique

Le spectre RMN ^{13}C du composé **DE1** (Figure III.70) montre les déplacements chimiques de tous les carbones de ce composé.

Figure III.70: Spectre RMN ^{13}C du composé **DE1**

Ainsi, toutes ces données spectroscopiques, nous permettent d'identifier la structure du composé **DE1** comme étant un flavonol de type kaempférol nommé : Kaempférol-3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-xylopyranosyl]-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside. Ce composé est isolé pour la première fois du règne végétal.



Kaempférol 3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)- β -D-xylopyranosyl]-7-*O*- α -L-rhamnopyranoside

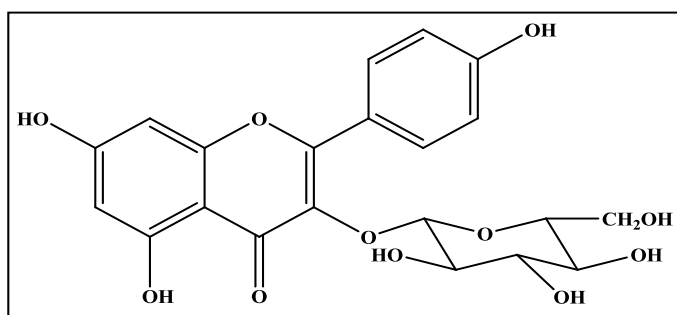
Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont donnés par le tableau III.11.

Tableau III.11: Déplacements chimiques en RMN¹H et ¹³C du composé **DE1** dans MeOD

Position	δ_C (ppm)	δ_H (m, J en Hz)
2	159,15	-
3	134,7	-
4	179,0	-
5	163,02	-
6	100,5	6,46 (d, 1,5)
7	163,48	-
8	95,5	6,75 (d, 1,5)
9	159	-
10	107,5	-
1'	122,7	-
2'	132,2	8,06 (d, 8,5)
3'	116,2	6,91 (d, 8,5)
4'	161,7	-
5'	116,2	6,91 (d,8,5)
6'	132,2	8,06 (d, 8,5)
3-Xyl		
1''	101,2	5,63 (d, 7)
2''	79,5	3,66 (t, 7,5)
3''	77,5	3,51 (t, 9,5)
4''	71,4	3,49 (t, 9,5)
5''	67,2	3,74 (dd, 11,5; 5, H-5''a) 3,1 (dd,11,5, 7,8 H-5''b)
2''-Rha		
1'''	102,7	5,22 (sl)
2'''	72,4	4,01 (dd, 3,5 ; 1,2)
3'''	72,3	3,77 (dd, 9,5 ; 3,2)
4'''	74	3,36 (t, 9,5)
5'''	70	4,06 (dd, 9,8 ; 6)
6'''	17,7	1,26 (d, 6)

7-Rha		
1'''	99,9	5,56 (sl)
2'''	71,7	4,02 (dd, 3,4 ; 1,1)
3'''	72,1	3,83 (dd, 9,5 ; 3,2)
4'''	73,6	3,48 (t, 9,5)
5'''	71,3	3,6 (dd, 10,2 ; 6,4)
6'''	18,1	1,04 (d, 6,5)

III.3.2 Identification structurale du composé DE2



Kaempférol 3-O-β-glucoside (Astragaline)

Ce composé se présente sous forme d'une poudre jaune soluble dans le méthanol. Il se colore en jaune après révélation par la vanilline sulfurique et chauffage à 100 °C, ceci suggère une nature flavonoïdique de ce composé.

Le spectre de masse ESI-MS du composé **DE2** enregistré en mode négatif (Figure III.71), montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 447,0926$ $[M-H]^-$, ceci correspondant à une masse moléculaire de 448 uma et une formule brute en $C_{21}H_{20}O_{11}$.

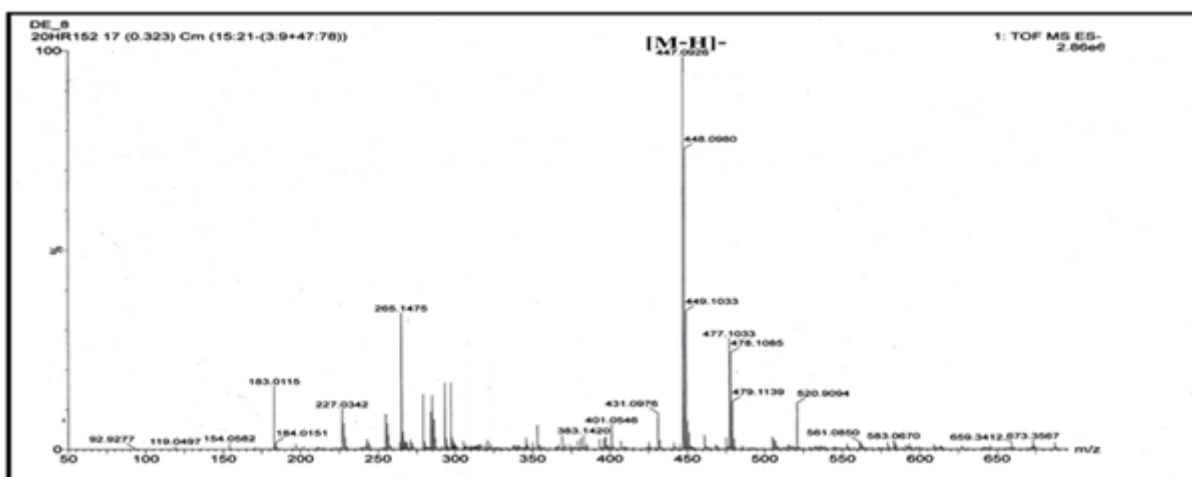


Figure III.71: Spectre de masse ESI-MS du composé **DE2**

Les spectres RMN ^1H et ^{13}C , enregistrés dans le MeOD (Figures III.72 et III.73) du composé **DE2**, montrent une grande similarité avec ceux du composé **DE1** précédemment élucidé. En effet, ils permettent de reconnaître quasiment tous les signaux de protons et carbones de la génine (kaempférol) à savoir :

- ✓ Deux doublets à δ_{H} 8,05 (*d*, $J = 8,7$ Hz) et 6,88 (*d*, $J = 8,7$ Hz), s'intégrant pour 2 protons chacun, attribuables aux protons H-2'/H-6' et H-3'/H-5' du cycle B. Leurs carbones résonnent à δ_{C} 132,2 et 116,1 respectivement ;
- ✓ Deux singulets larges s'intégrant 1H chacun sortant à δ_{H} 6,32 et 6,15 sont attribués respectivement aux protons H-8 et H-6 du cycle A.

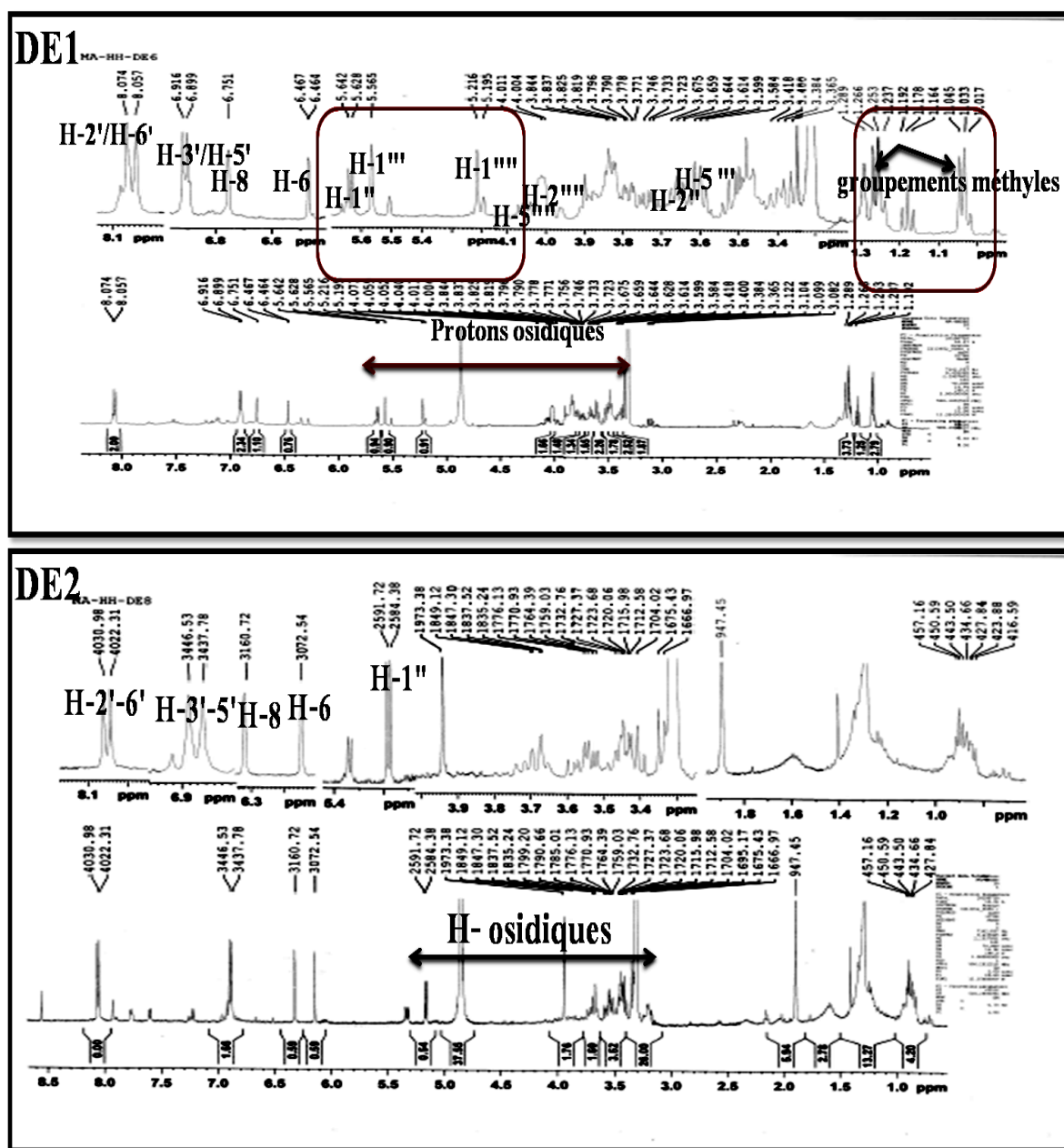


Figure III.72: Spectres RMN ^1H des composés **DE1** et **DE2** (MeOD)

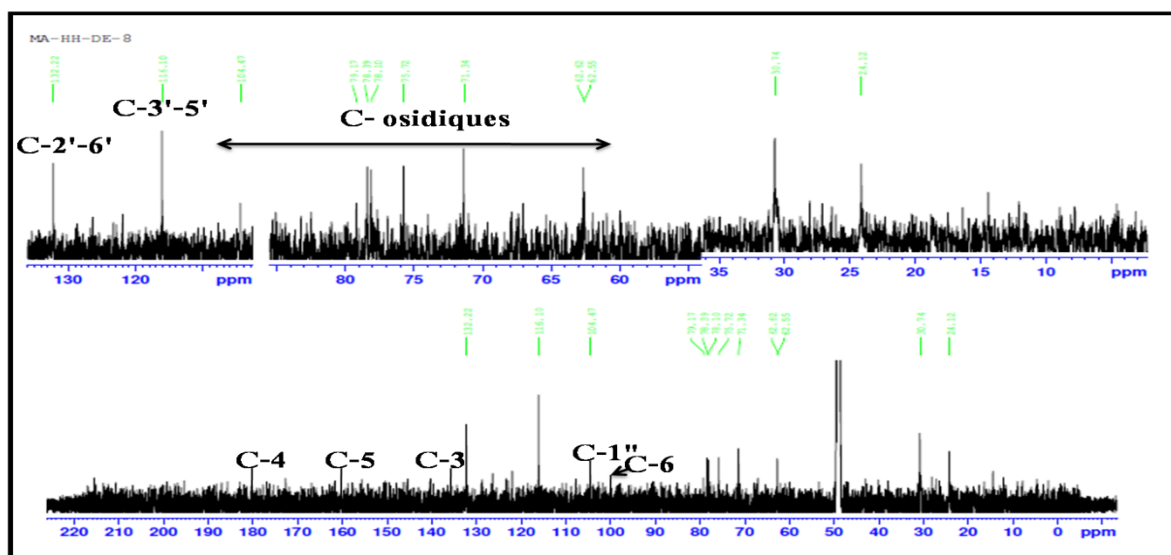


Figure III.73: Spectre RMN ^{13}C du composé **DE2** (MeOD)

La différence est notée dans la présence d'un seul proton anomérique résonant à δ_{H} 5,18 (d , $J = 7,3$ Hz). Ce qui implique que le composé **DE2** comporte une seule unité osidique.

A l'issue de cette première analyse, il apparaît que le composé **DE2**, est un flavonol de type kaempférol porteur d'une unité osidique dont il reste à l'identifier et montrer son point de branchement sur l'aglycone.

▪ Identification de la partie osidique

Cette identification est évidemment effectuée au moyen de l'expérience COSY H-H (Figure III.74). En effet, en partant du premier proton anomérique H-1'' [δ_{H} 5,18 (d , $J = 7,3$ Hz)], un système de spins à sept protons d'un hexose est visualisé. Les corrélations suivantes ont été observées :

- ✓ H-1''/ H-2'' [δ_{H} 3,45 (dd , $J = 8,6 ; 7,2$ Hz)] ;
- ✓ H-2''/ H-3'' [δ_{H} 3,42 (t , $J = 8,5$)] ;
- ✓ H-3''/ H-4'' [δ_{H} 3,32 (m)] ;
- ✓ H-4''/ H-5'' [δ_{H} 3,20 (m)] ;
- ✓ H-5''/H-6''a [δ_{H} 3,69 (dd , $J = 12,1 ; 2,3$ Hz)] et H-6''b [δ_{H} 3,53 (dd , $J = 11,9 ; 5,2$)].

Les grandes valeurs de constantes de couplage indiquent que cet hexose est un glucose. La valeur de la constante de couplage résultant de l'interaction vicinale H-1'/H-2' axiale/axiale atteste de la présence d'une jonction O - β -glucosidique.

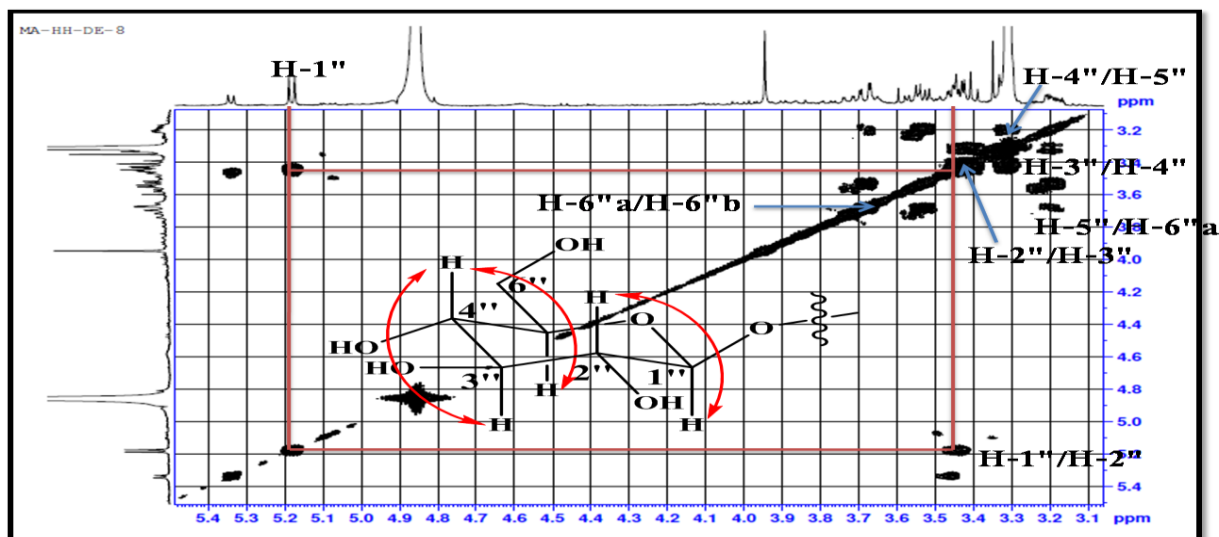


Figure III.74: Spectre COSY H-H identifiant le β -D-glucose (DE2)

Leurs carbones sont assignés par l'expérience HSQC (Figure III.75) à δ_c 104,5 (C-1''), 75,7 (C-2''), 78,1 (C-3''), 71,3 (C-4''), 78,4 (C-5'') et 62,6 (C-6'').

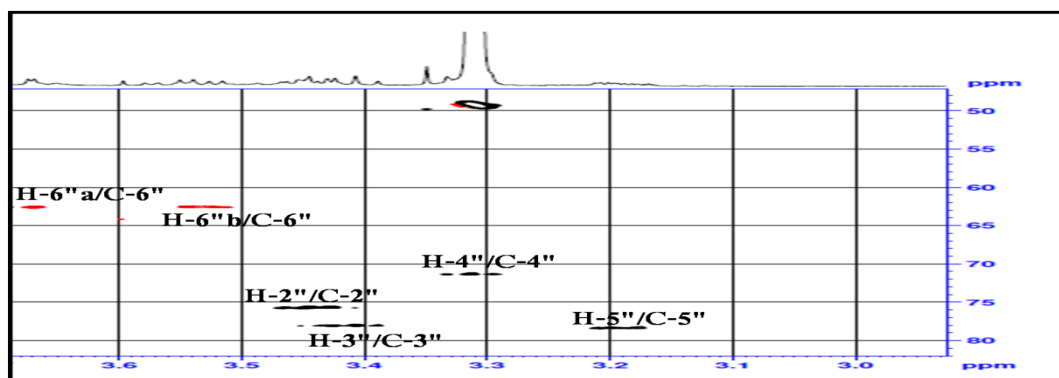
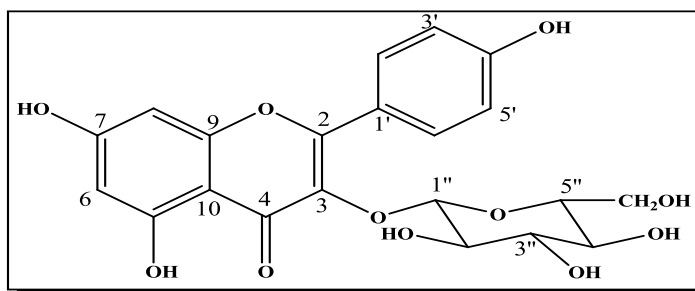


Figure III.75: Spectre HSQC de la partie osidique du composé DE2

Le déplacement chimique du carbone C-2 (158 ppm) permet de déduire que l'unité osidique est accrochée en position 3 du kaempférol car dans le cas de flavonols libres en C-3, ce carbone (C-2) résonnerait aux alentours de 148 ppm [155].

Tous les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé (Tableau III.12) assignés conjointement par les expériences RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY H-H, HSQC et HMBC et par comparaison avec les données de la littérature [156, 157], permettent ainsi d'identifier le composé **DE2** à la Kaempférol-3-*O*- β -D-glucoside (Astragaline) isolée antérieurement de *Diplotaxis harra* et *D. acris* [73,74] et de nombreuses espèce appartenant à divers genres de la famille Brassicaceae. On citera *Alyssum alyssoides*, *Arabis glabra* et *Moringa oleifera* [158-160]. L'Astragaline présente des propriétés antioxydantes, antidiabétiques, anti-inflammatoires, anticancéreuses, antiulcéreuses et anti-obésité. Aussi, ce composé pourrait être utilisé dans les produits cosmétiques [161].

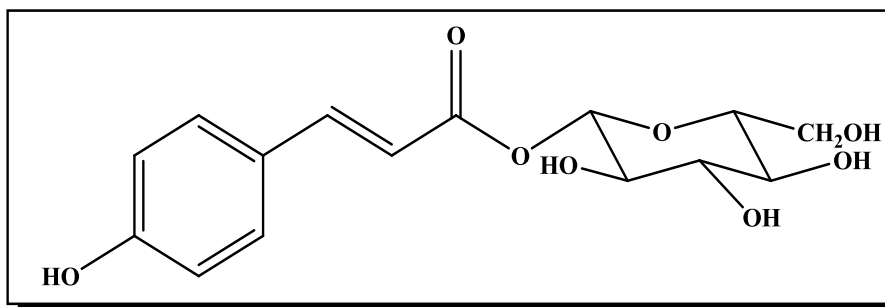


Kaempférol 3-O-β-D-glucoside (Astragaline)

Tableau III.12: Déplacements chimiques en RMN¹H et ¹³C du Composé DE2 dans MeOD

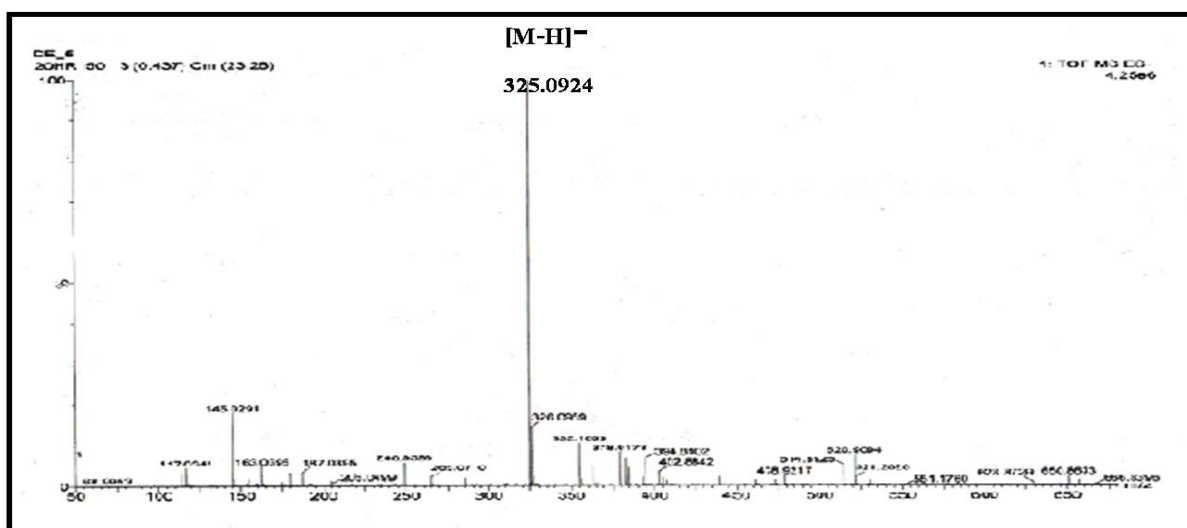
Position	δ _C (ppm)	δ _H (m, J en Hz)
2	158,0	-
3	135,4	-
4	179,5	-
5	161,0	-
6	99,5	6,15 (sl)
7	169,0	-
8	95,4	6,32 (sl)
9	158,5	-
10	105,0	-
1'	123,0	-
2'	132,2	8,05 (d, 8,7)
3'	116,1	6,88 (d, 8,7)
4'	161,0	-
5'	116,1	6,88 (d, 8,7)
6'	132,2	8,05 (d, 8,7)
Glu		
1''	104,5	5,18 (d,7,3)
2''	75,7	3,45 (dd, 8,6 ;7,2)
3''	78,1	3,42 (t, 8,5)
4''	71,3	3,32 (m)
5''	78,4	3,2 (m)
6''	62,6	3,69 (dd, J= 12,1 ; 2,3) 3,53 (dd, J= 11,9 ; 5,21)

III.3.3 Identification structurale du composé DE3

*1-O-p-coumaroyl-β-D-glucose*

Le composé **DE3** est isolé sous forme de cristaux jaunes solubles dans le méthanol. Il présente sur CCM une tache visible à 254 et 366 nm, se révélant en marron après pulvérisation de sa CCM par une solution acide puis chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse ESI (Figure III.76) de ce composé, enregistré en mode négatif, montre un pic d'ion pseudomoléculaire à $m/z = 325,0924$ $[M-H]^-$, correspondant à une masse moléculaire de 326 uma et une formule brute en $C_{15}H_{18}O_8$.

Figure III.76: Spectre de masse ESI du composé **DE3**

Le spectre RMN 1H (Figure III.77) de ce composé indique la présence de deux signaux aromatiques sous forme d'un doublet d'intégration 2H chacun à δ_H 6,82 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz) et 7,49 (2H, *d*, $J = 8,5$ Hz), suggérant la présence d'un noyau aromatique para-substitué. Ces protons désignés H-3,5 et H-2,6 appartiennent à un même système de spins selon l'expérience COSY H-H (Figure III.77). Leurs carbones sont localisés par l'analyse du spectre HSQC (Figure III.78) à δ_C 116,9 (C-3/C-5) et 131,4 (C-2/C-6).

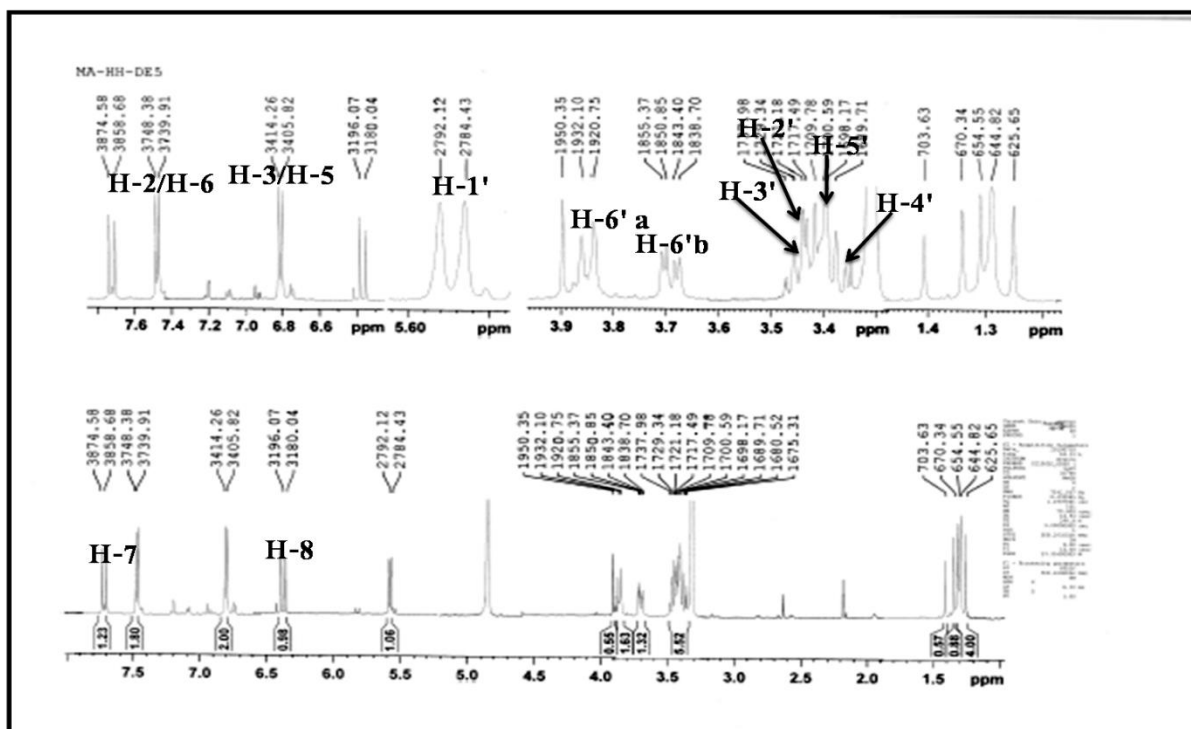


Figure III.77: Spectre RMN ^1H du composé $\text{DE3}(\text{MeOD})$

De plus, on peut aussi noter sur le spectre RMN ^1H (Figure III.76) la présence de deux doublets d'intégration 1H chacun, de protons oléfiniques sortant à δ_{H} 7,77 (d , $J = 15,9$ Hz, H-7) et 6,38 (d , $J = 16$ Hz, H-8). La grande constante de couplage entre les protons oléfiniques H-7 et H-8 traduit une géométrie *trans* de la double liaison. L'expérience COSY (Figure III.78) montre clairement que ces protons sont inclus dans un même système de spins. Leurs carbones sont attribués par l'expérience HSQC (Figure III.79) à δ_{C} 147,9 (C-7) et 114,5 (C-8).

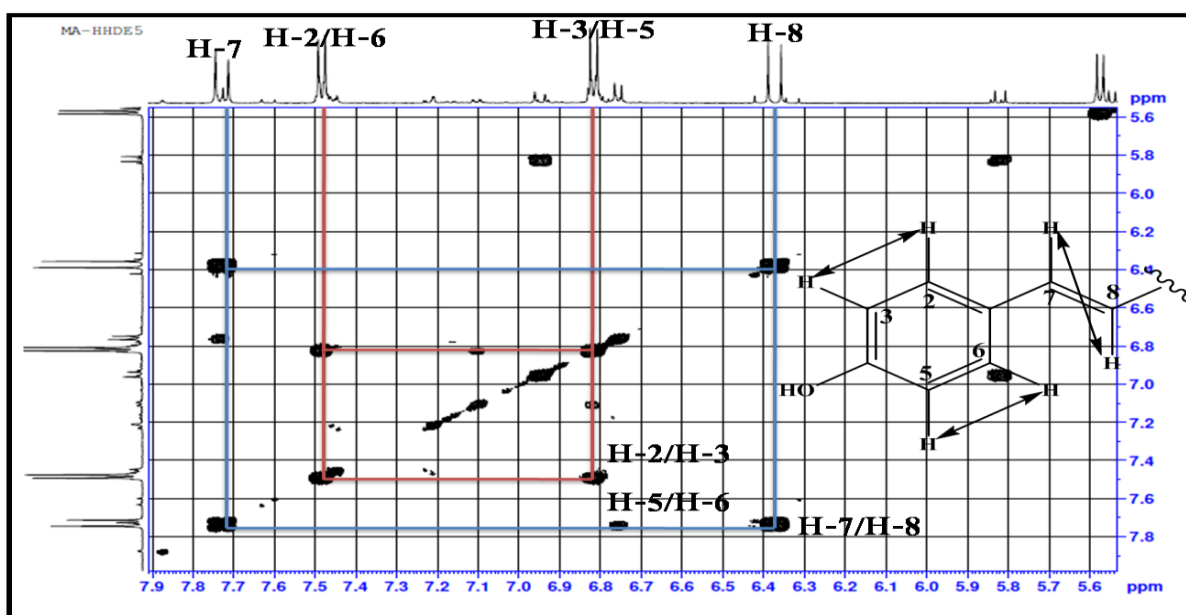


Figure III.78: Partie du spectre COSY H-H du composé DE3

Le spectre RMN ^1H (Figure III.77) exhibe également des signaux caractéristiques de protons osidiques repérés dans l'intervalle 3,30-5,60 ppm mettant en évidence l'existence d'une seule unité osidique, et dont le proton anomère, est localisé à δ_{H} 5,55 (*d*, $J = 7,7$ Hz). Son carbone est assigné par l'analyse du spectre HSQC à δ_{C} 95,8 (Figure III.79).

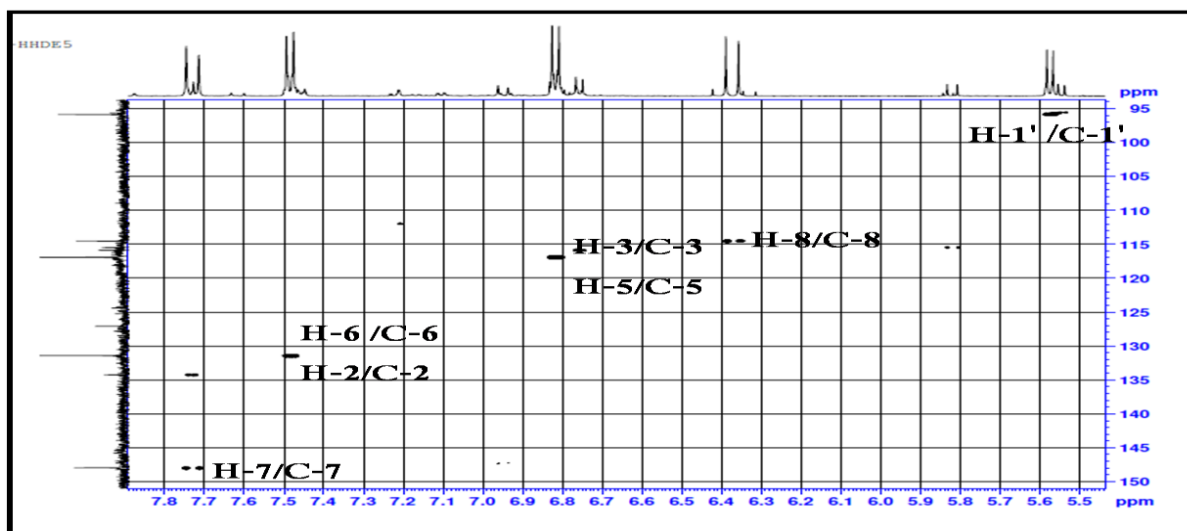


Figure III.79: Partie du spectre HSQC du composé DE3

Le spectre COSY H-H (Figure III.80) permet d'identifier sept protons d'un hexose, à travers les couplages H-1'/H-2' (3,43 ppm, *t*, $J = 9,2$ Hz), H-2'/H-3' (3,46 ppm, *t*, $J = 8,6$ Hz), H-3'/H-4' (3,38 ppm, *t*, $J = 8,4$ Hz), H-4'/H-5' (3,4 ppm, *m*) et enfin H-5'/H-6'a (3,85 ppm, *dl*, $J = 11,3$ Hz) et H-6'b (3,7 ppm, *dd*, $J = 11,9 ; 4,6$ Hz). La valeur de constante de couplage ($J_{1'-2'} = 7,7$ Hz) permet d'identifier un glucose de configuration β .

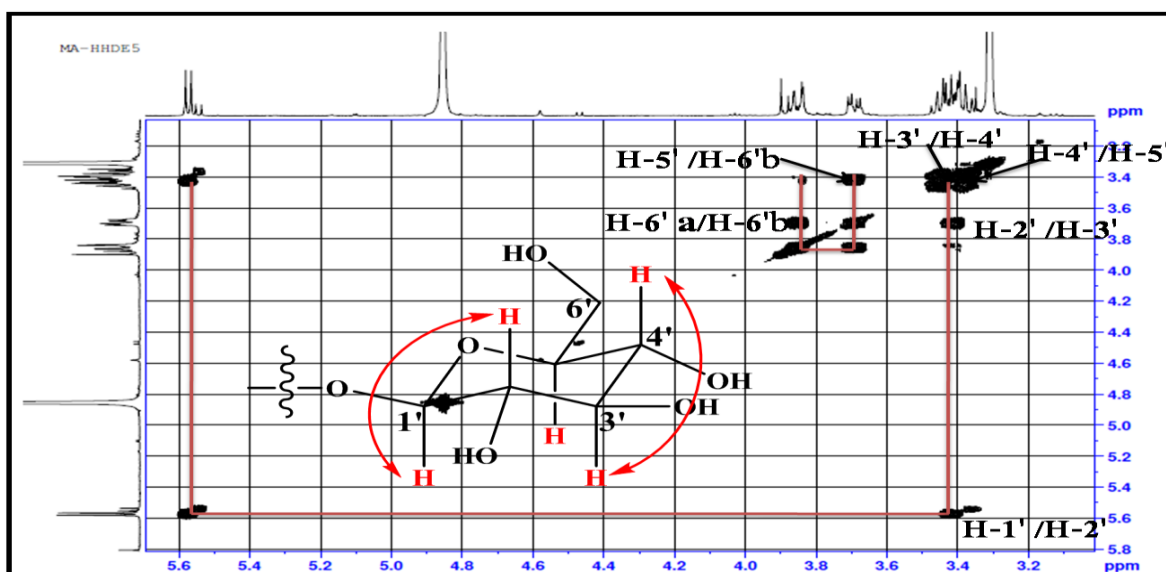


Figure III.80: Spectre COSY H-H du glucose

Les déplacements chimiques des carbones de ce sucre sont déterminés par analyse du spectre HSQC (Figure III.81) à δ_c 74,1 (C-2'), 78,1 (C-3'), 71,1 (C-4'), 78,8 (C-5') et 62,4 (C-6').

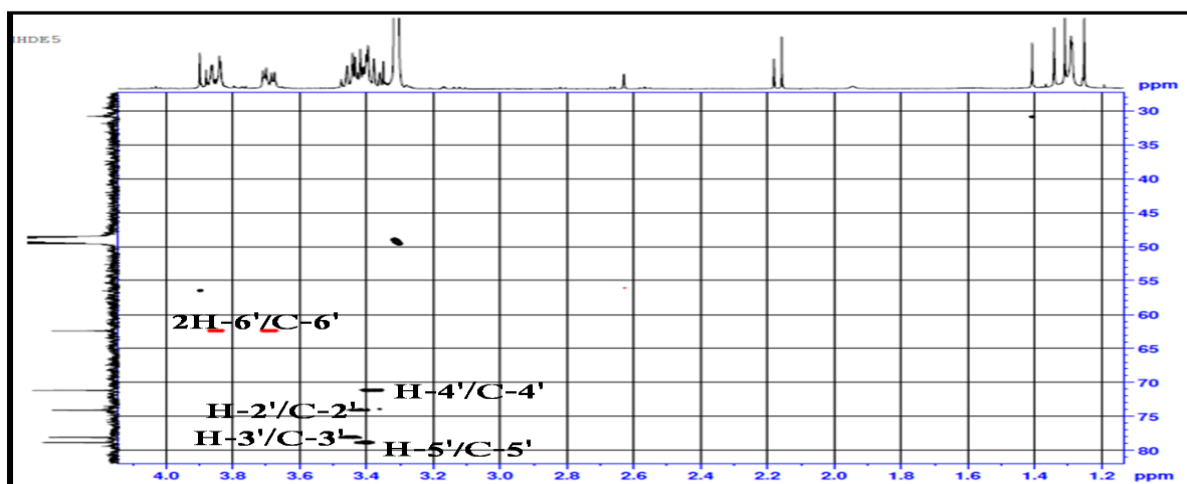


Figure III.81: Spectre HSQC du glucose

Dans le spectre RMN ^{13}C (Figure III.82) du composé **DE3**, on distingue 13 signaux correspondant à 15 atomes de carbone répartis comme suit :

- ✓ 1 carbonyle d'une fonction ester à 167,7 ppm (C-9) ;
- ✓ 1 carbone aromatique oxygéné à 161,6 ppm (C-4) ;
- ✓ 1 carbone aromatique quaternaire non oxygéné résonant à 127 ppm ;
- ✓ 2 CH oléfiniques résonant à 114,5 ppm (C-8) et 147,9 (C-7) ;
- ✓ 4 CH aromatiques attribués aux quatre méthines résonant à 116,9 ppm (C-3/C-5) et 131,4 (C-2/C-6) ppm ;
- ✓ 6 carbones osidiques entre 62,3 et 96 ppm.

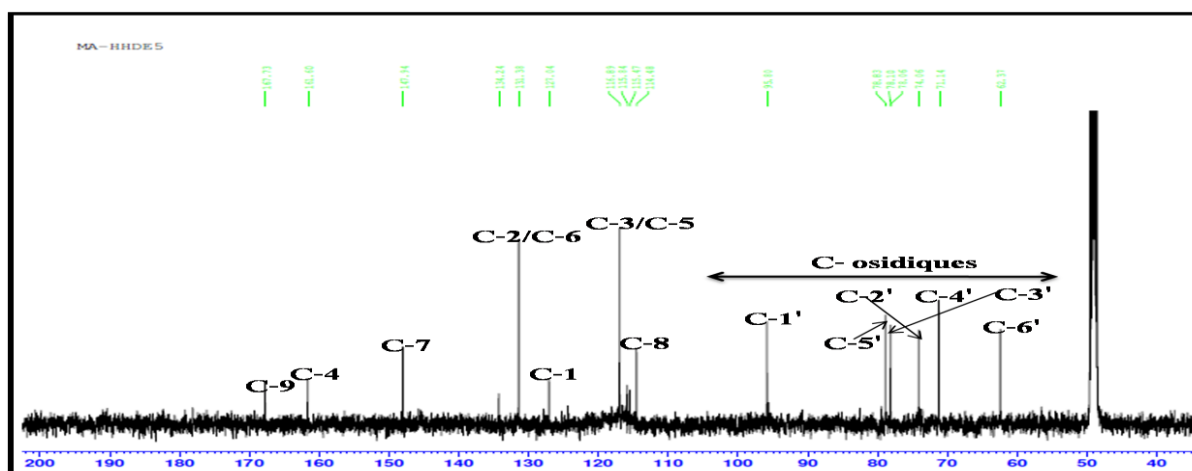


Figure III.82: Spectre RMN ^{13}C du composé **DE3** (MeOD)

L'analyse du spectre HMBC (Figure III.83) permet de suggérer la présence d'un groupement *p*-coumaroyle par l'observation des corrélations entre les protons oléfiniques H-7 et H-8 avec le carbone d'un carbonyle à 167,7 ppm (C-9) et les carbones C-1, C-2 et C-6 du noyau aromatique (Figure III.84).

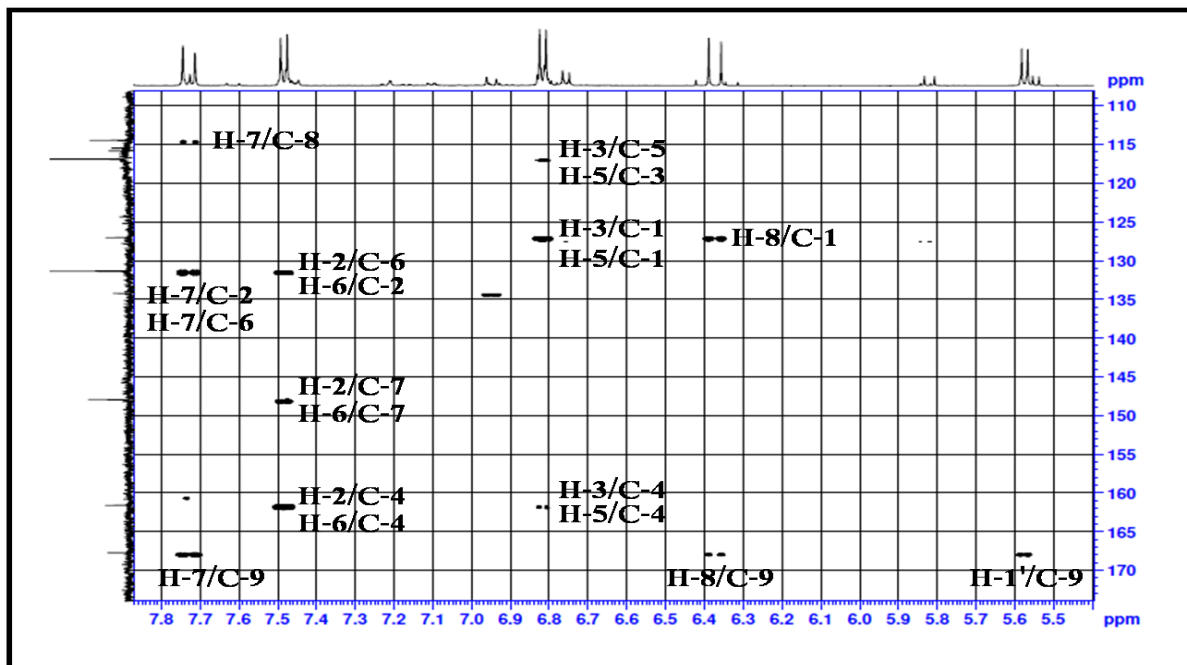


Figure III.83 : Spectre HMBC du composé DE3

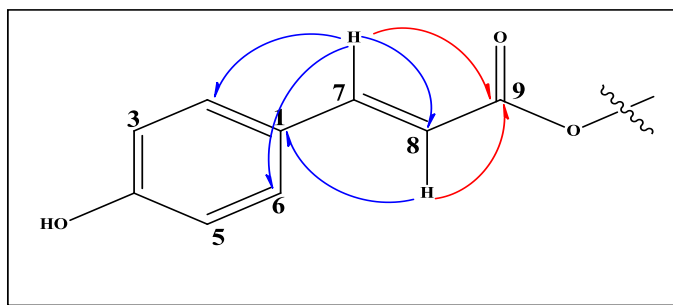


Figure III.84 : Corrélations HMBC des protons H-7 et H-8

Ce spectre montre aussi un couplage en 3J entre le proton anomère H-1' du glucose (δ_H 5,55) et le carbonyle ester C-9 (Figure III.85).

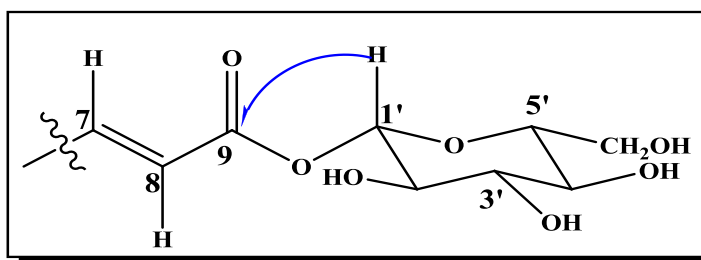
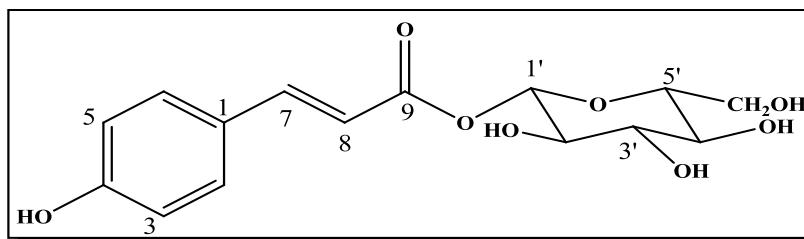


Figure III.85 : Corrélation HMBC de la partie acyle du composé DE3

Toutes ces données spectrales (Tableau III.13) établies par RMN ^1H , ^{13}C , COSY H-H, HMBC et HSQC, ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [162,163], permettent d'attribuer sans ambiguïté pour le composé **DE3** la structure suivante: 1-*O-p*-coumaroyl- β -D-glucose. Ce composé a été isolé précédemment dans les espèces *Camellia reticulata* (Theaceae) [164] et *Luffa cylindrica* (Cucurbitaceae) [165]. Il est identifié pour la première fois dans le genre *Diplotaxis*. En effet, ce composé présente des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes [166,167].



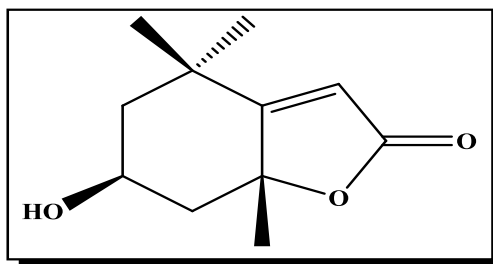
1-O-p-coumaroyl- β -D-glucose

Les déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont rassemblés dans le tableau III.13 ci-dessous.

Tableau III.13: Déplacements chimiques en RMN ^1H et ^{13}C du composé **DE3** (MeOD)

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	127	-
2	131,4	7,49 (d, 8,5)
3	116,9	6,82 (d, 8,5)
4	161,6	-
5	116,9	6,82 (d, 8,5)
6	131,4	7,49 (d, 8,5)
7	147,9	7,77 (d, 15,9)
8	114,5	6,38 (d, 16)
9	167,7	-
1'	95,8	5,55 (d, 7,7)
2'	74,1	3,43 (t, 7,7)
3'	78,1	3,46 (t, 8,6)
4'	71,1	3,38 (t, 8,4)
5'	78,8	3,4 (m)
6'	62,4	3,85 (dl, 11,3, H-6'a) 3,7 (dd, 11,9 ; 4,6, H-6'b)

III.3.4 Identification structurale du composé DE4



Loliolide

Le composé **DE4** est isolé sous forme de cristaux incolores solubles dans le méthanol. Il présente sur CCM une tache visible à 254 nm, se révélant marron après pulvérisation de sa CCM par une solution acide puis chauffage à 100 °C.

Son spectre de masse ESI-MS, enregistré en mode positif (Figure III.86), exhibe deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 219,0998$ $[M+Na]^+$ et $415,3031$ $[2M+Na]^+$ correspondant à une masse moléculaire égale à 196 uma et une formule brute en $C_{11}H_{16}O_3$ montrant ainsi 4 degrés d'insaturation.

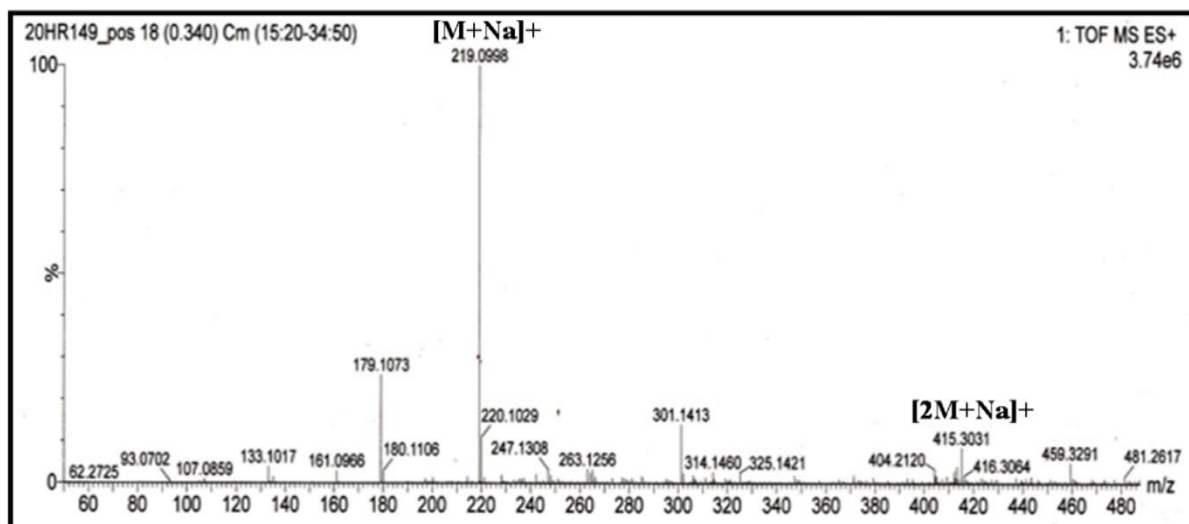


Figure III.86: Spectre de masse ESI-MS (mode positif) du composé **DE4**

L'analyse des spectres RMN 1H (Figure III.87) et HSQC (Figure III.88) du composé **DE4** indique la présence de :

- ✓ Trois signaux sous forme de singulet d'intégration 3H chacun à δ_H 1,28 ; 1,47 et 1,77 attribuables à trois groupements méthyles portés par des carbones quaternaires vu leur multiplicité. Leurs carbones sont détectés selon l'expérience HSQC à δ_C 31,0, 27,0 et 27,4 respectivement.

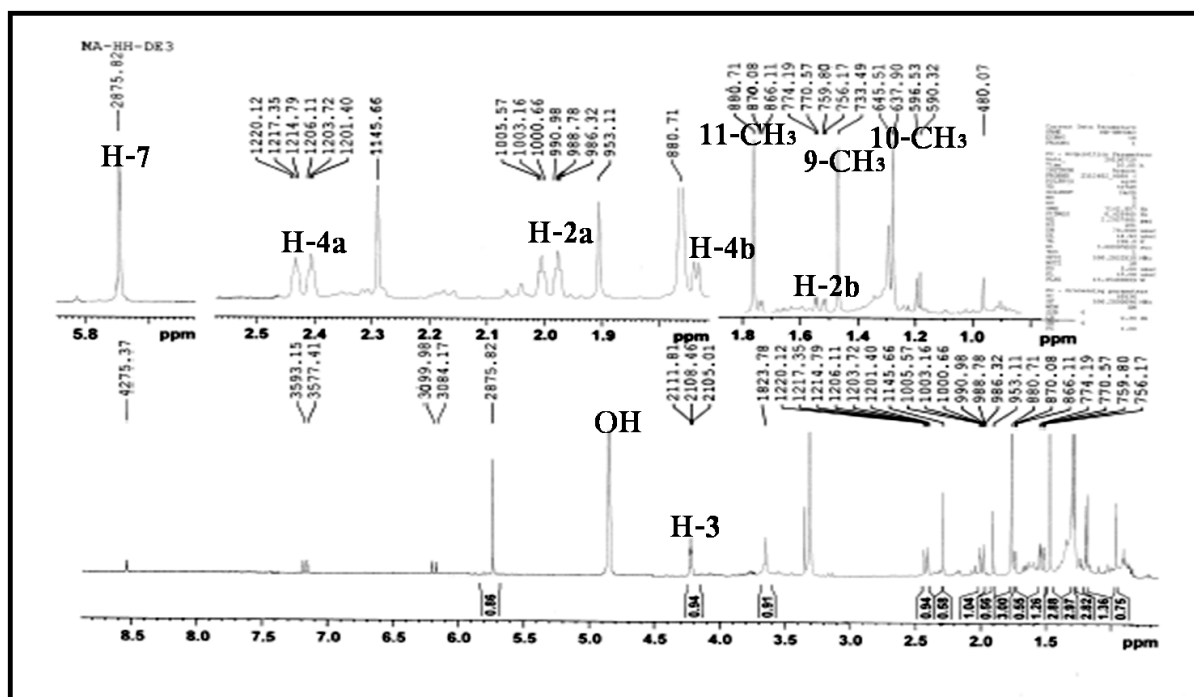


Figure III.87: Spectre RMN $1H$ du composé *DE4* (MeOD)

- ✓ Un signal d'intégration 1H à 4,2 ppm (*quintuplet*, $J = 3,5$ Hz) couple sur le spectre HSQC avec un carbone à δ_c 67,2. La multiplicité de ce proton indique qu'il est voisin à deux groupements méthylènes, ce proton est nommé H-3 ;
- ✓ Un proton vinylique noté H-7 qui apparaît sous forme de singulet à 5,75 ppm corrélé avec son carbone C-7 à δ_c 113,3 sur le spectre HSQC ;

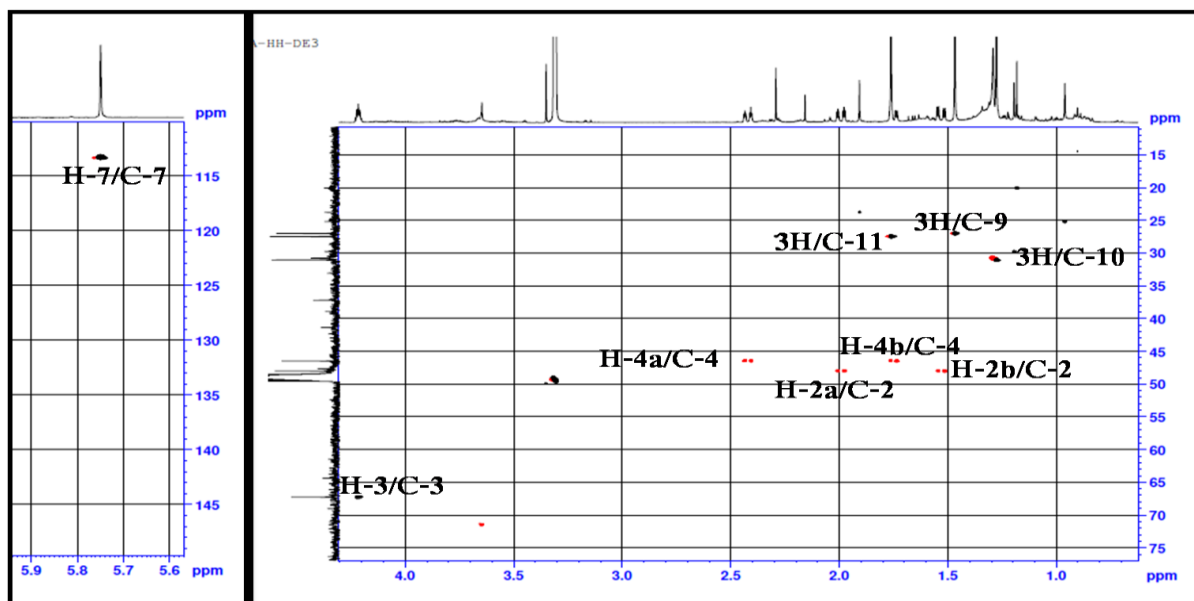


Figure III.88: Spectre HSQC du composé *DE4*

- ✓ Un signal sous forme de singulet d'intégration 1H à δ_H 4,85, ne montrant aucune tache de corrélation sur le spectre HSQC correspond à un groupement hydroxyle (OH) ;
- ✓ Deux signaux d'intégration 1H chacun, le premier sous forme de doublet de triplet à δ_H 2,42 ($dt, J = 13,7 ; 2,4$ Hz) et le second sous forme d'un doublet de doublet à δ_H 1,75 ($dd, J = 13,6 ; 4$ Hz), attribuable au même carbone nommé C-4 résonant à δ_C 46,4 selon l'expérience HSQC. La multiplicité de ces deux protons géminés permet de déduire que leur environnement chimique est différent (protons diastéréotopiques) [168];
- ✓ Deux signaux d'intégration 1H chacun à δ_H 1,99 ($dt, J = 14,4 ; 2,3$ Hz) et δ_H 1,52 ($dd, J = 14,4 ; 3,6$ Hz) caractéristiques d'un groupement CH_2 dont les deux protons géminés sont magnétiquement non équivalents, montrant deux taches de corrélation sur le spectre HSQC avec un même carbone à δ_C 48 noté C-2.

Le spectre RMN¹³C (Figure III.89) de ce composé révèle la présence de 9 atomes de carbone.

- ✓ Un carbone éthylénique à δ_C 113,3 (C-7) déjà identifié ;
- ✓ Trois signaux à δ_C 31 ; 27,4 et 27 sont attribués aux trois groupements méthyles ;
- ✓ Un carbone méthine oxygéné à δ_C 67,2;
- ✓ D'autres carbones à δ_C 185,7 ; 48 (C-2) ; 46,4 (C-4) et 37,2.

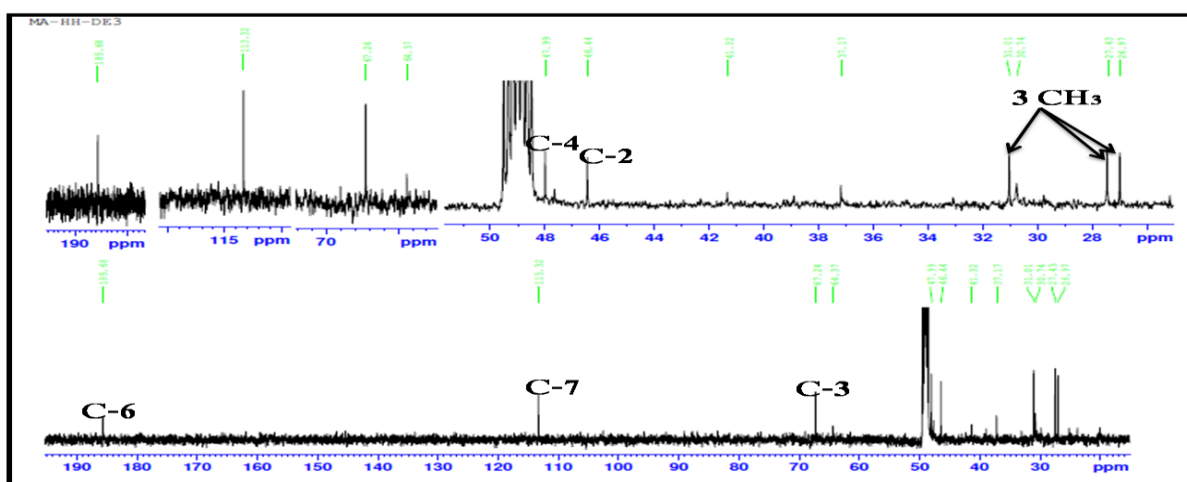


Figure III.89: Spectre RMN ¹³C du composé DE4

Le spectre COSY H-H (Figure III.91) montre des couplages longue distance H/H entre les protons du groupement méthyle résonant à δ_H 1,28 et les protons d'un deuxième CH_3 à δ_H 1,47 ppm. Ces mêmes protons exhibent une autre tâche de corrélation avec l'un des protons de CH_2 résonant à δ_H 1,52 (H-2b).

Le proton du carbone oxygéné C-3 résonant sous forme d'un quintuplet à δ_H 4,2 ppm ($J = 3,5$ Hz) exhibe des taches de corrélation sur le spectre COSY H-H avec les deux protons H₂-2. Ce même proton (H-3) révèle deux autres taches de couplage avec les protons résonants à δ_H 2,42 (H-4a) et δ_H 1,75 (H-4b).

Les valeurs de déplacement chimique du proton H-3 (4,2 ppm) et de son carbone (C-3, 67,2 ppm) indiquent clairement l'oxygénation de cette position. Alors que la valeur de la constante de couplage ($J = 3,5$ Hz) et la multiplicité du proton H-3 sous forme de quintuplet suggèrent des interactions axiale-équatoriale et équatoriale-équatoriale avec les protons des deux groupements CH₂-2 et CH₂-4 ($J_{\text{éq-ax}} = J_{\text{éq-éq}}$) (Figure III.90) [169].

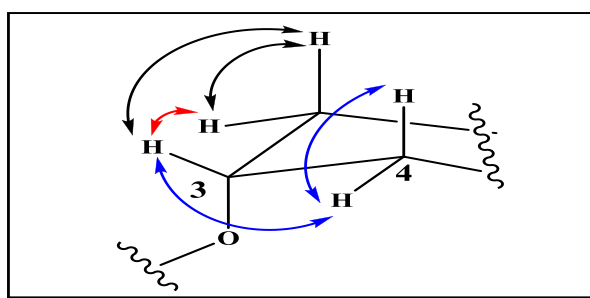


Figure III.90: Corrélations COSY H-H du proton H-3 avec les CH₂-2 et CH₂-4

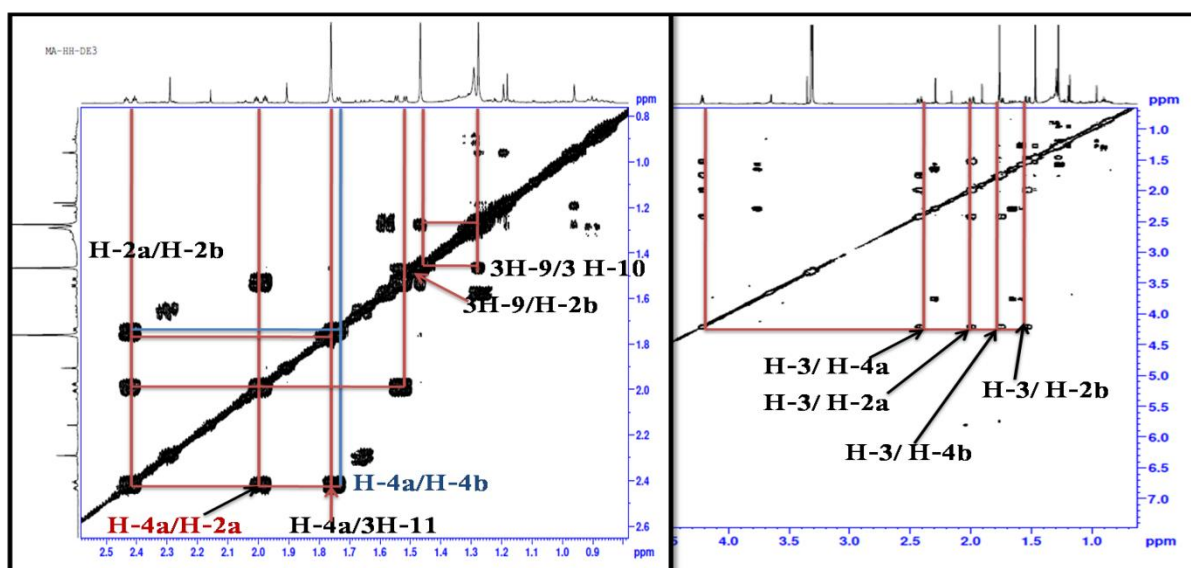


Figure III.91: Spectre COSY H-H du composé DE4

Sur le spectre HMBC (Figures III.92 et 94), le proton du H-4b montre une tache de corrélation en 2J avec un carbone quaternaire oxygéné à δ_C 89 (C-5). Ce carbone présente un couplage avec les protons du groupement méthyle résonant à δ_H 1,77 (δ_C 27,4) en 2J , lesquels exhibent à leur tour, deux taches de corrélation en 3J avec le carbone quaternaire éthylénique à δ_C 185,7 (C-6) et le carbone du CH₂-4.

L'ensemble des observations récoltées de cette analyse permet de relier le groupement CH_2 (δ_{C} 46,4 ; C-4) avec le carbone quaternaire oxygéné C-5 à δ_{C} 89 d'une part, et d'autre part de placer sur ce même carbone (C-5), le groupement CH_3 -11 à δ_{C} 27,4 (Figure III.93).

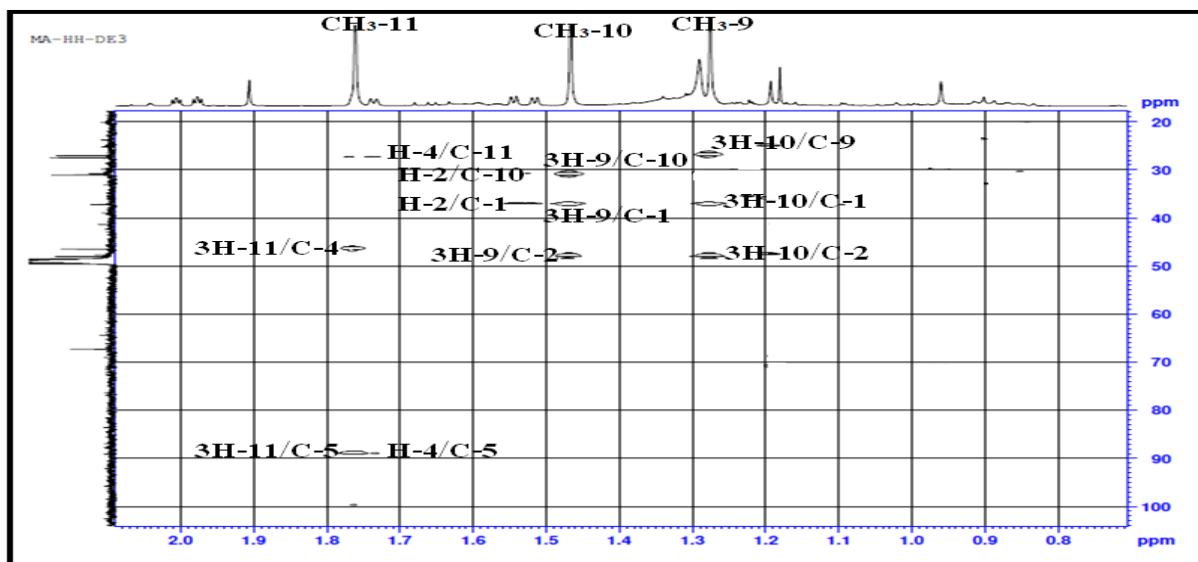


Figure III.92: Corrélations HMBC des groupements méthyles du composé DE4

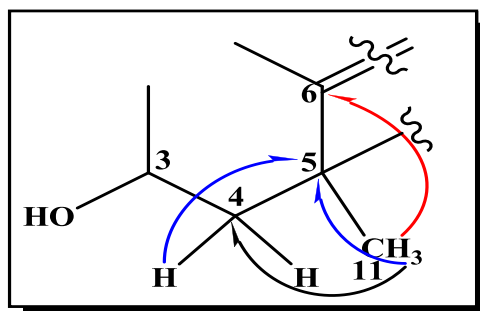


Figure III.93: Corrélations HMBC du 11- CH_3 et H-4

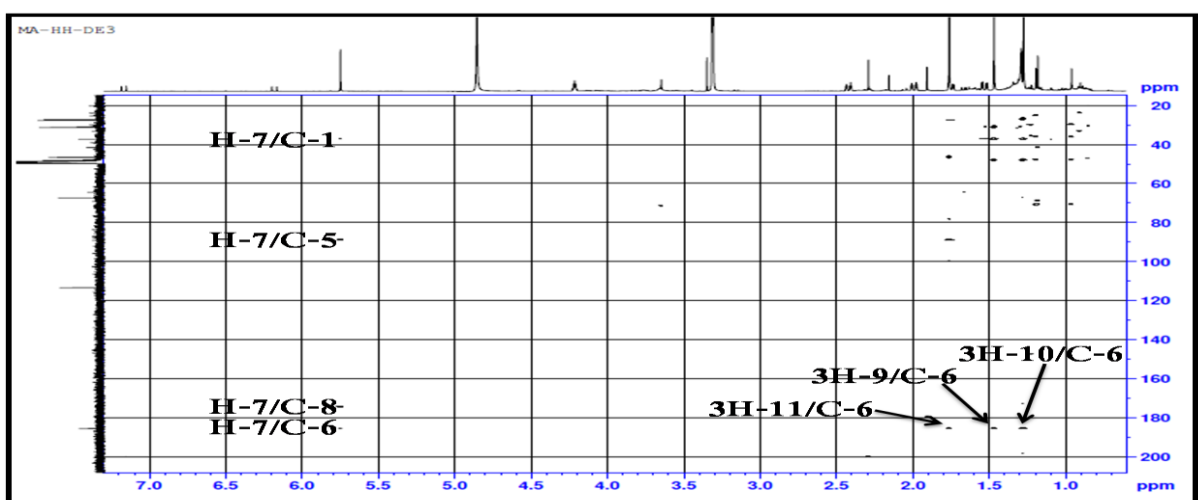


Figure III.94: Corrélations HMBC du composé DE4

Par ailleurs et toujours sur le spectre HMBC, le proton du deuxième groupement CH₂ (δ_{H} 1,52, H₂-6) montre en 3J et en 2J des taches de corrélation avec le carbone d'un groupement CH₃ (δ_{C} 31) et le carbone quaternaire à δ_{C} 37,2 (C-1). Ce dernier exhibe des couplages avec les protons de deux groupements méthyles résonant chacun à δ_{H} 1,47 (δ_{C} 27, C-9) et à δ_{H} 1,28 (δ_{C} 31, C-10). Ainsi, ces deux derniers présentent des taches de corrélation en 3J avec le carbone quaternaire C-6 (Figure III.95).

Ces données permettent de déduire que ces méthyles sont tous les deux portés par le carbone quaternaire C-1 et que ce dernier est lié au carbone quaternaire C-6.

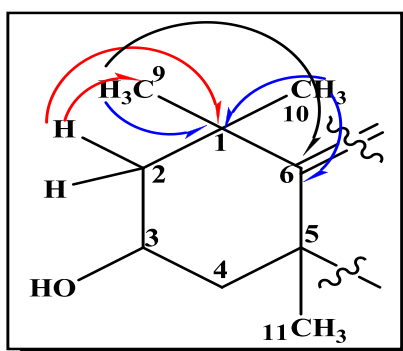


Figure III.95: Corrélations HMBC du H-2b, 9-CH₃ et 10-CH₃

D'autres couplages HMBC sont visualisés en 3J entre le proton éthylénique H-7 et les carbones quaternaires C-1 et C-5 déjà assignés.

En outre, le même proton éthylénique corrèle en 2J avec le carbone quaternaire éthylénique C-6 déjà identifié et le carbone du carbonyle à δ_{C} 172 (C-8).

Il en résulte que les trois carbones porteurs d'atomes d'oxygène résonant à δ_{C} 172,0 ; 89,0 et 67,2 correspondent aux carbones C-8, C-5 et C-3 respectivement ; cela suggère la présence d'un ester, ou lactone, et un alcool secondaire. Sur la base de ces données, les quatre sites d'insaturation déduits à partir de la formule moléculaire C₁₁H₁₆O₃ pourraient s'expliquer par une structure bicyclique ayant un cycle α - β -insaturé- γ -lactone [170]. Ceci permet de proposer la structure plane reportée dans la figure III.96.

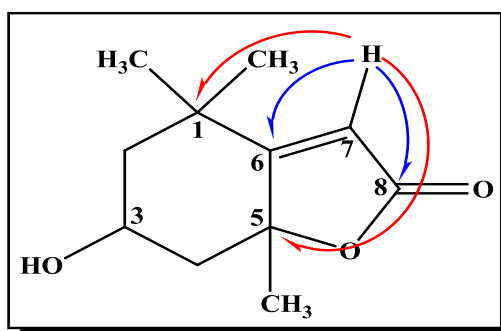
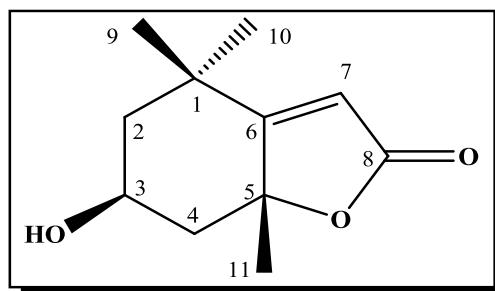


Figure III.96: Corrélations HMBC du proton H-7

Les données des spectres RMN¹H, ¹³C, HSQC, HMBC et COSY coïncident avec celles rapportées dans la littérature. Elles nous ont permis d'identifier le produit **DE4** comme étant une molécule de type C-11 terpène lactone, décrite sous le nom de loliolide [171].

Ce composé est originaire de l'espèce *Lolium perenne*. Sa structure a été élucidée par Hodges et Porte en 1964 puis synthétisé par Marx et Sondheimer en 1966 [172, 173]. Par ailleurs, il est identifié pour la première fois dans le genre *Diplotaxis*.

Le loliolide est un composé phytotoxique et ayant divers effets biologiques, tels que l'inhibition de la croissance des algues, activité antimicrobienne, et effets immunosuppresseurs [174].

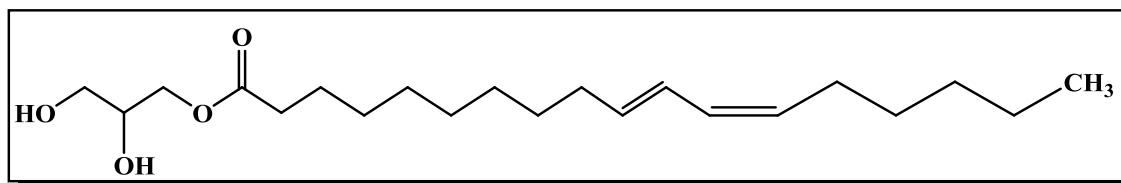


Loliolide

Tableau III.14 : Déplacements chimiques en RMN¹H et RMN¹³C du composé **DE4** dans le MeOD

Position	δ_C (ppm)	δ_H (m, J en Hz)
1	37,2	-
2	48	1,99 (dt, 14,4; 2,3; H-2a) 1,52 (dd, 14,4 ; 3,6; H-2b)
3	67,2	4,2 (quint, 3,3)
4	46,4	2,42 (dt, 13,7; 2,4; H-4a) 1,75 (dd, 13,6 ; 4; H-4b)
5	89	-
6	185,7	-
7	113,3	5,75 (s)
8	172	-
9	27	1,47 (s)
10	31	1,28 (s)
11	27,4	1,77 (s)

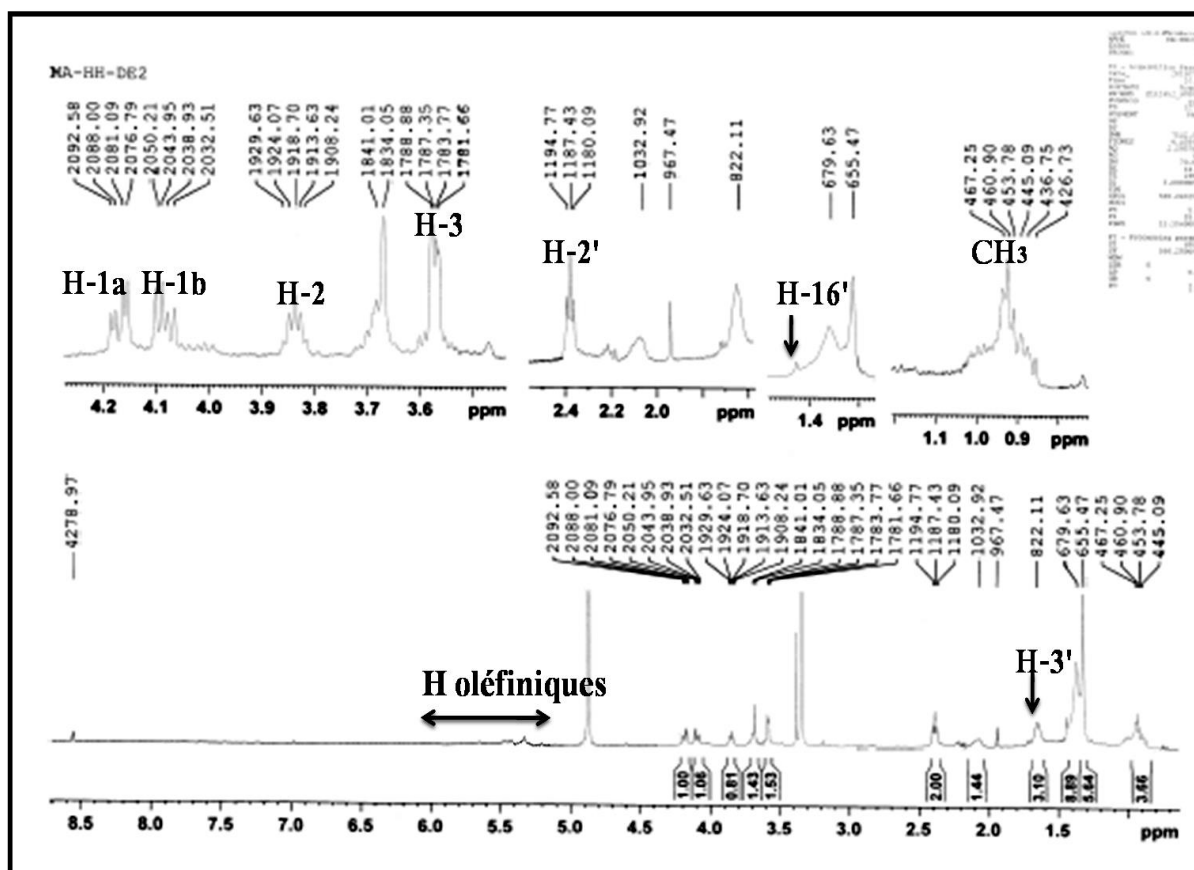
III.3.5 Identification structurale du composé DE5



(10E,12Z)-2,3-dihydroxypropyl octadeca-10,12-diénoate

Le composé **DE5** a été isolé sous forme d'une poudre jaune clair, donnant une couleur marron après révélation de sa CCM par une solution d'acide sulfurique et chauffage à 100°C.

L'analyse combinée des spectres RMN ^1H (Figure III.97), HSQC (Figure III.98) et COSY H-H (Figure III.99) du composé **DE5** montre la présence de deux signaux sous forme de doublet de doublets d'intégration 1H chacun repérés à δ_{H} 4,08 et 4,16 ppm assignés à des protons géminés oxyméthyléniques CH_2O nommés H-1a et H-1b respectivement. Leur carbone résonne à δ_{C} 66,5 selon l'expérience HSQC.

Figure III.97: Spectre RMN ^1H du composé **DE5** (MeOD)

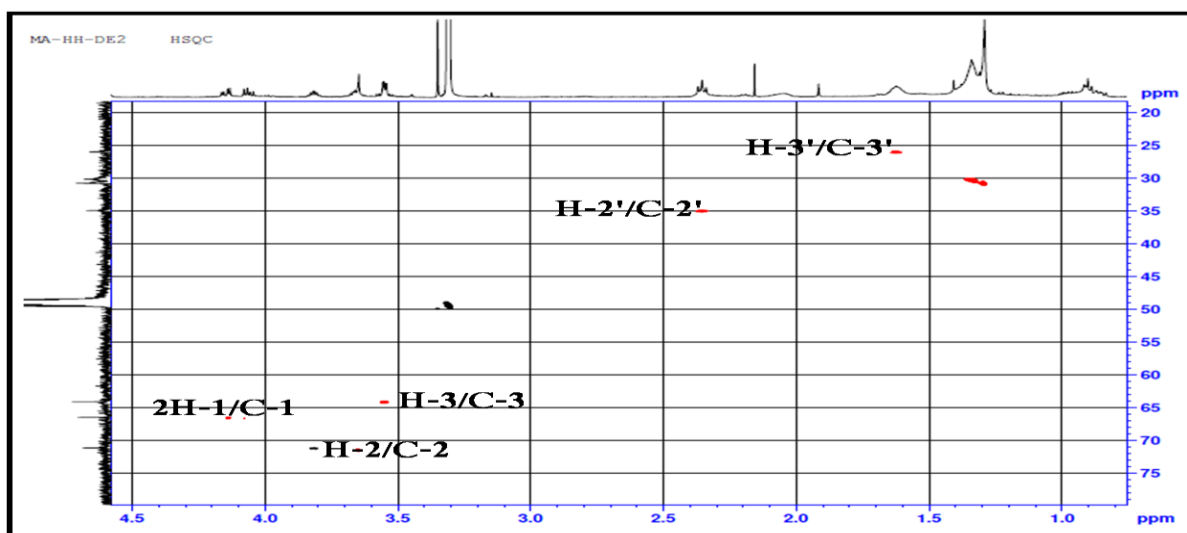


Figure III.98: Spectre HSQC du composé DE5

Selon le spectre COSY (Figure III.99), ces protons appartiennent à un même système de spins, eux-mêmes corrélant avec un proton repéré à 3,83 ppm (*quint*, $J = 5,4$ Hz) attribué à un hydroxyméthine -CHOH désigné H-2. Son carbone est détecté par l'expérience HSQC à δ_c 71,2. Ce dernier proton (H-2) montre sur le spectre COSY H-H une corrélation avec des protons résonant sous forme d'un doublet de doublet à δ_H 3,75, attribuables aux protons H₂-3 d'un hydroxyméthylène CH₂OH. Leur carbone est assigné par l'analyse du spectre HSQC à δ_c 64,1.

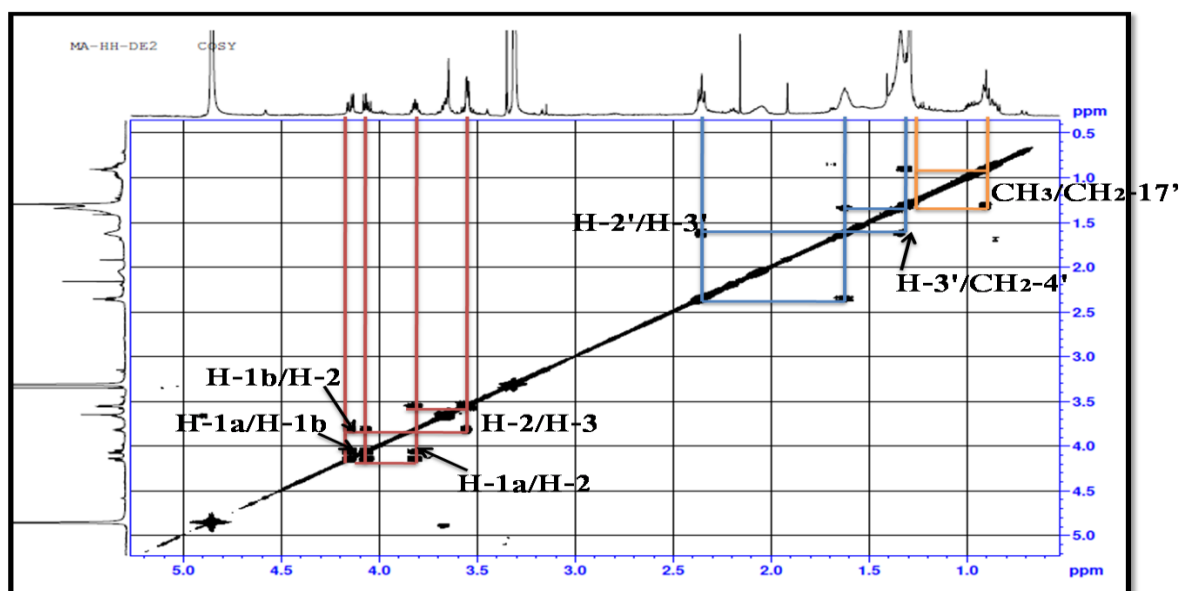


Figure III.99: Spectre COSY H-H du composé DE5

Ce système de spins révélant un enchainement aliphatique constitué de HO-CH₂-CH(OH)-CH₂-O- suggère la présence d'une unité glycérol [175].

Par ailleurs, le spectre RMN ^1H (Figure III.97) exhibe un triplet à δ_{H} 2,38 correspondant à des protons d'un CH_2 en α d'une fonction carbonyle, corrélant avec leur carbone à δ_{C} 34,9 sur le spectre HSQC. Ces protons sont nommés $\text{H}_2\text{-2}'$.

L'examen du spectre de l'expérience COSY H-H permet de voir les corrélations de ces protons ($\text{H}_2\text{-2}'$) avec deux proton méthyléniques $\text{H}_2\text{-3}'$ à δ_{H} 1,65, Leur carbone est détecté par l'expérience HSQC à δ_{C} 26,0($\text{C-3}'$) correspondant à un CH_2 en β de la fonction carbonyle. Les protons $\text{H}_2\text{-3}'$ montrent des couplages avec un massif de proton à 1,24-1,43 ppm de groupements $(-\text{CH}_2-)_n$ de la chaîne d'un acide gras. Les protons d'un groupement méthylène du massif $(-\text{CH}_2-)_m$ couplent sur COSY avec des protons repérés à 0,92 ppm (t , $J = 6,3$ Hz) attribués au méthyle terminal de la chaîne grasse (Figure III.100).

Les signaux observés entre 5,30-6,30 ppm sous forme de multiplet correspondent à des protons oléfiniques. Ces protons indiquent la présence des doubles liaisons dans la chaîne d'acide gras.

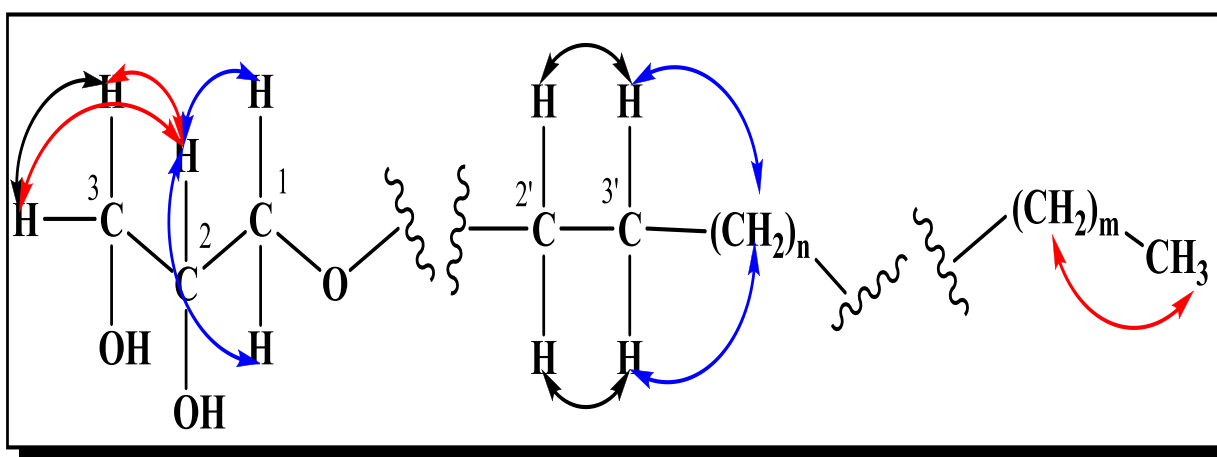


Figure III.100: Principales corrélations COSY H-H du composé **DE5**.

L'analyse du spectre RMN ^{13}C (Spectre III.101) de ce composé révèle l'existence de :

- ✓ Deux carbons méthyléniques à δ_{C} 34,9 et 26,0 correspondant respectivement aux CH_2 α et β de la fonction carbonyle ($\text{C-2}'$ et $\text{C-3}'$) ;
- ✓ Deux autres CH_2 résonant à δ_{C} 66,5 (C-1) et 64,1 (C-3) du glycérol ;
- ✓ Un CH à δ_{C} 71,2 (C-2) du glycérol ;
- ✓ Quatre carbones résonant dans l'intervalle δ_{C} 121,1-135 attribués aux carbones éthyléniques.

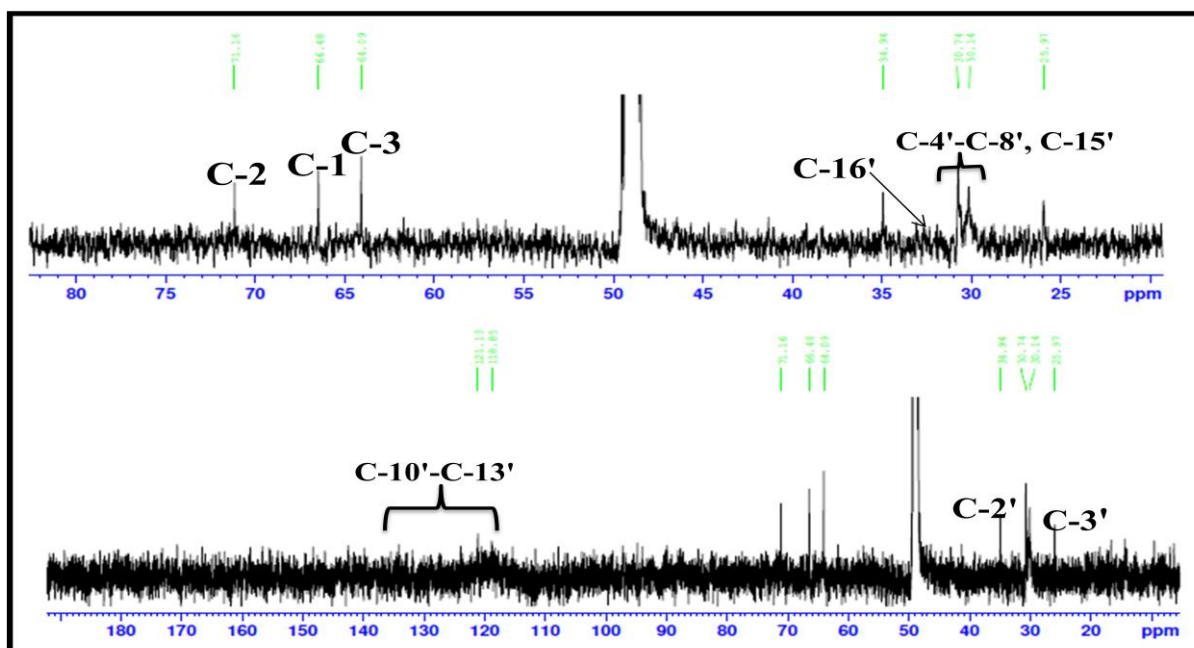


Figure III.101: Spectre RMN ^{13}C du composé **DE5** (MeOD)

Les deux protons oxyméthylénique $\text{CH}_2\text{-1}$ déjà assignés exhibent des taches de corrélation en 2J et 3J avec CH-2 et $\text{CH}_2\text{-3}$ respectivement du glycérol (Figure III.102).

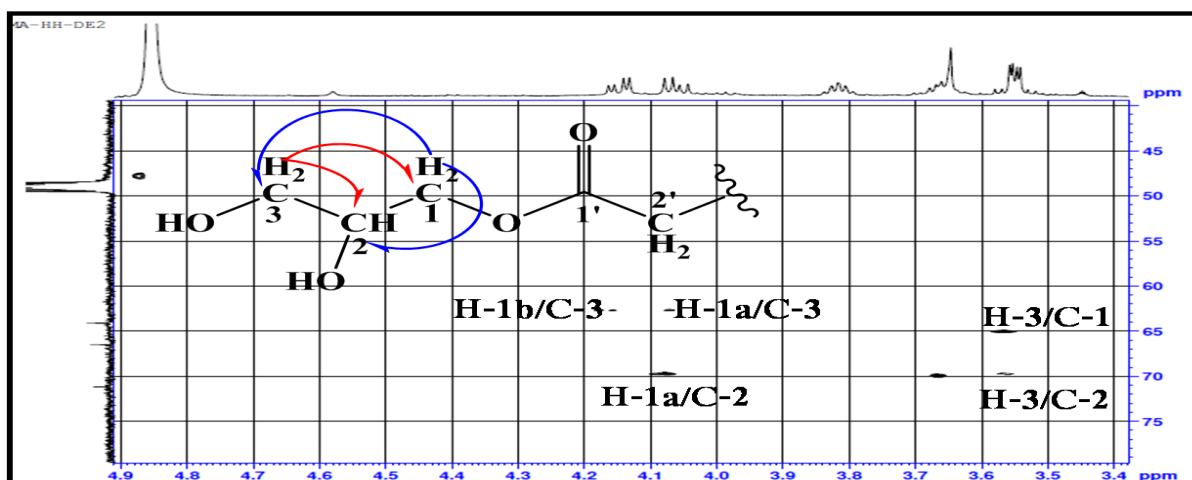


Figure III.102: Corrélations HMBC de la partie glycérol

La présence d'un carbonyle est confirmée par l'expérience HMBC (Figure III.103) qui montre des corrélations $^3J_{\text{H-C}}$ entre le carbone du carbonyle repéré à δ_{C} 174 (C-1') et les protons oxyméthyléniques $\text{CH}_2\text{-1}$ de l'unité glycérol. Ce même carbonyle corrèle en 2J avec les protons méthyléniques à δ_{H} 2,38 ($\text{CH}_2\text{-2}'$) de la chaîne grasse insaturée. Ceci permet de confirmer que l'acide gras insaturé est lié au glycérol en position C-1. Il s'agit donc d'un acide monoglycérolipide (**DE5**).

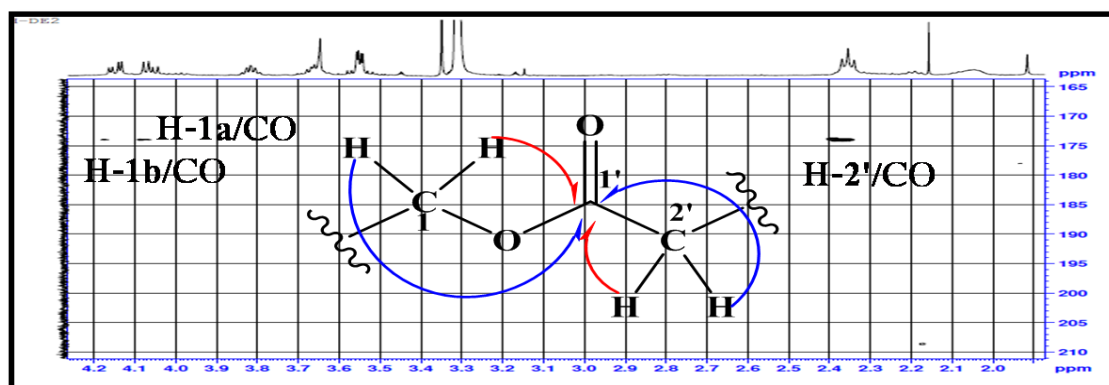


Figure III.103: Corrélation HMBC du carbonyle

On observe sur le spectre HMBC (Figure III.104) les corrélations entre les protons repérés à 2,38 ppm (2H-2', *t*) et deux carbones résonants à 26,0 ppm (C- 3') et 28,5 ppm ne pouvant être que le carbone C- 4' de la chaîne grasse, ce carbone montre une corrélation avec les protons méthyléniques (H₂-3'). Et aussi entre le carbone C-2' déjà attribué et les protons résonant à δ_H 1,42 assignés aux protons du carbone C-4', ces mêmes protons (H₂-4') corréleront avec un autre carbone résonant à 29,4 qui correspond au carbone C-5'. D'autres corrélations sont visualisées entre un massif de protons à 1,24-1,43 ppm de groupements (CH₂)_n et les carbones résonant entre 28,0-30,5 ppm. En outre, les protons du groupement méthyle terminal déjà assignés présentent deux taches de corrélation avec les carbones localisés à δ_C 22,1 et 31,5.

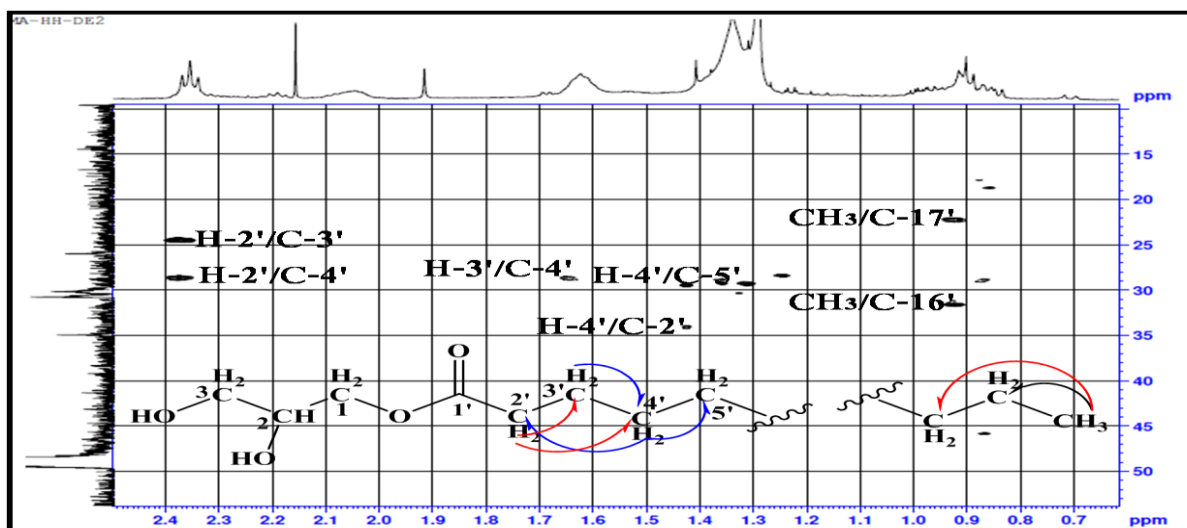


Figure III.104: Corrélation HMBC de la chaîne grasse

Les corrélations HMBC ont permis de retrouver deux fragments principaux du monoglycérolipide **DE5**. Les jonctions au niveau des signaux aliphatiques n'ont pas pu être effectuées à cause du recouvrement de ces signaux.

L'analyse du spectre de masse ESI-MS (Figure III.105) montre la présence d'un pic d'ion moléculaire à $m/z = 279$ uma $[M-H-C_3H_7O_2]$ qui correspond au fragment de la chaîne grasse, ce qui nous permet de confirmer sans ambiguïté la chaîne grasse comme étant Octadécadiénoate ($C_{18}H_{31}O_2$) comportant deux doubles liaisons.

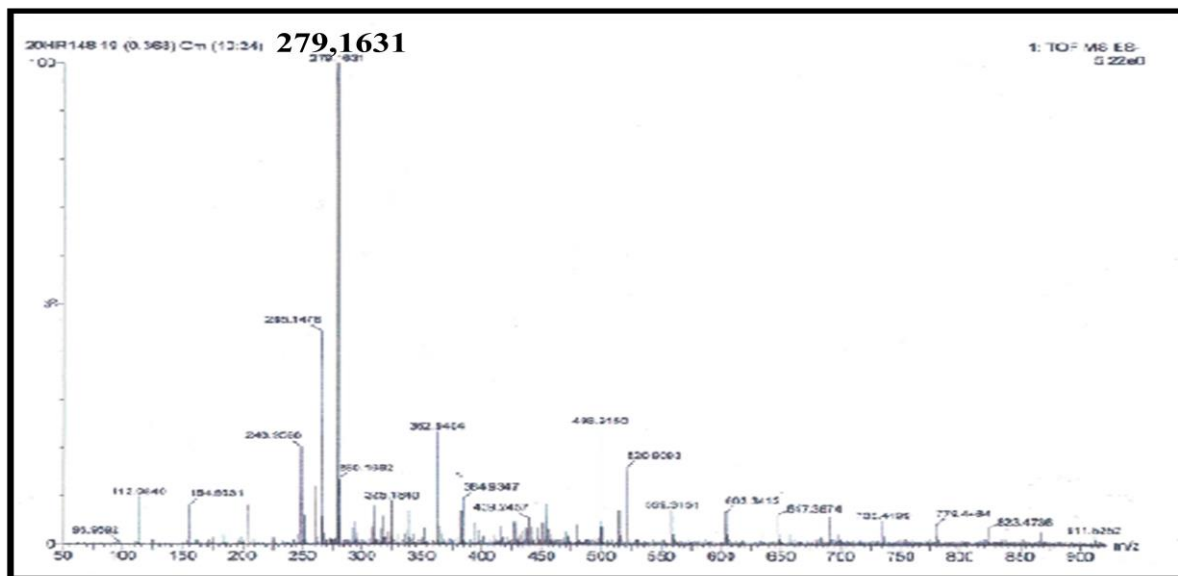
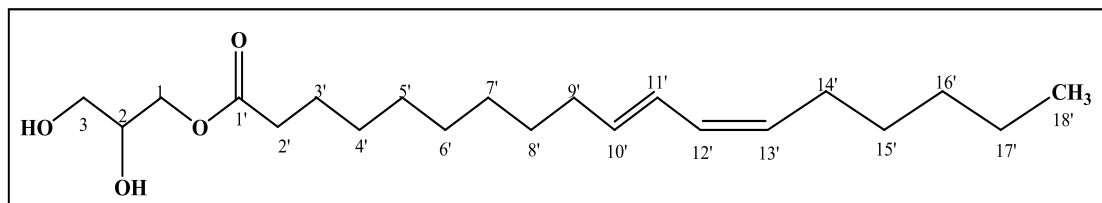


Figure III.105: Spectre de masse ESI-MS du composé **DE5**

L'emplacement et la géométrie de l'insaturation relative au niveau des carbones C-10' (*trans*) et C-12' (*cis*) a été établie sur la base des données spectrales RMN ^{13}C , elle concorde avec celle de la littérature [176].

Toutes ces constantes spectrales, ainsi que la comparaison avec les données de la littérature [176], permettent de proposer pour le composé **DE5** la structure : (10*E*,12*Z*)-2,3-dihydroxypropyl octadeca-10,12-diénoate. Ce composé a été isolé pour la première fois dans le genre *Diplotaxis*.



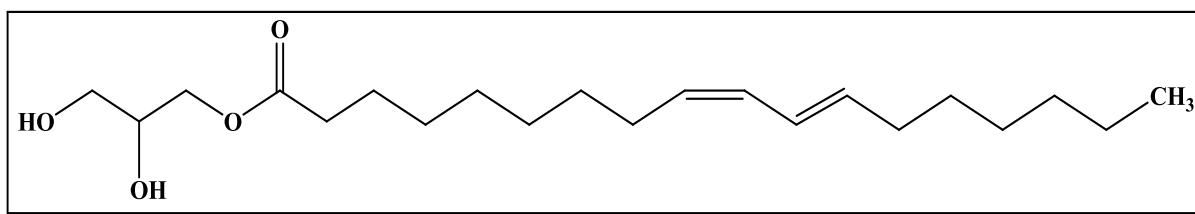
(10*E*,12*Z*)-2,3-dihydroxypropyl octadeca-10,12-diénoate

Les valeurs de déplacements chimiques des protons et carbones de ce composé sont représentées dans le tableau III-15.

Tableau III.15 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du Composé **DE5** dans le MeOD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	66,5	4,16 (dd, 11,5; 4,6; H-a) 4,08 (dd, 11,3 ; 6,3; H-b)
2	71,2	3,84 (quint, 5,4)
3	64,1	3,75 (dd, 5,1 ; 1,5)
1'	175,0	-
2'	34,9	2,38 (t, 7,3)
3'	26,0	1,65 (m)
4'-8',15'	28,0-30,5	1,24-1,43 (m)
9'	30,7	Nd
10'- 13'	121-135	5,30-6,30
14'	Nd	Nd
16'	31,5	1,42 (m)
17'	22,1	1,24-1,43 (m)
18'	14,0	0,92 (t, 6,3)

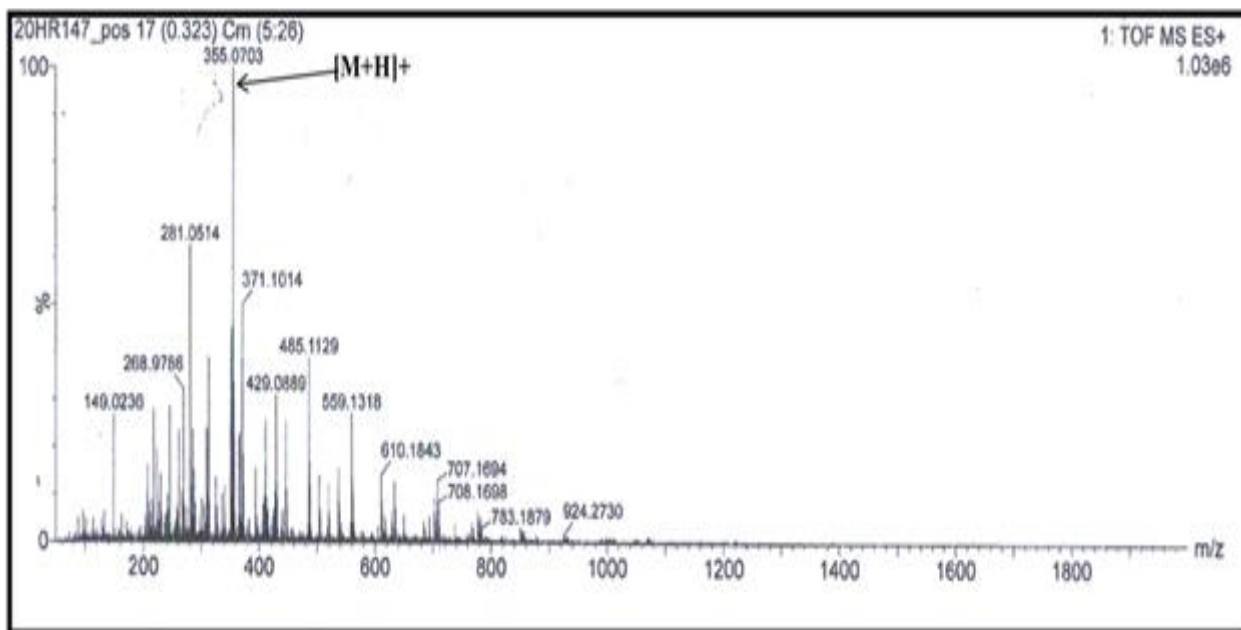
III.3.6 Identification structurale du composé DE6



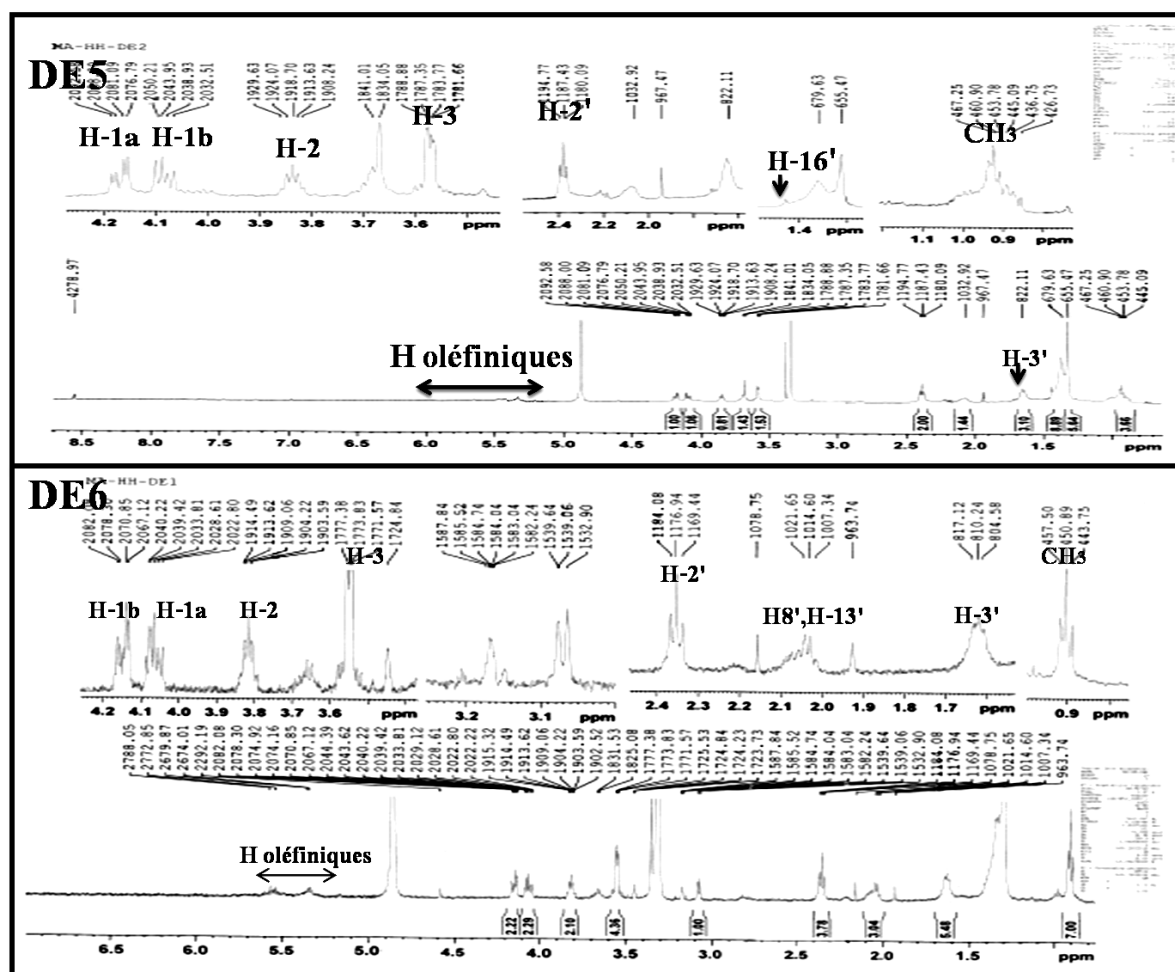
(9Z,11E)-2,3-dihydroxypropyl octadeca-9,11-diénoate

Ce composé est obtenu sous forme d'une poudre jaune clair invisible en UV, se colorant en orange après pulvérisation de sa CCM par l'acide sulfurique et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse ESI-MS du composé **DE6** enregistré en mode positif (Figure III.106) révèle la présence d'un pic d'ion pseudomoléculaires à $m/z = 355,0703$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, correspondant à une masse moléculaire de 354 uma et une formule brute en $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{O}_2$, il possède la même masse moléculaire que le produit **DE5** décrit précédemment. Il s'agit donc de deux isomères.

Figure III.106: Spectre de masse ESI-MS du composé **DE6**

Le spectre RMN ^1H du composé **DE6** est identique à celui du composé **DE5** (Figure III.107) au niveau de la partie glycérol et de la chaîne grasse.

Figure III.107: Spectre RMN ^1H des composés **DE5** et **DE6** (MeOD)

L'analyse de spectre RMN ^1H (Figure III.107) de ce composé indique également la présence de :

- ✓ Deux protons géminés oxyméthyléniques à δ_{H} 4,07 (*dd*, $J = 11,0 ; 5,8$ Hz) et 4,15 (*dd*, $J = 11,2 ; 3,8$ Hz) ;
- ✓ Un signal d'intégration 1H à δ_{H} 3,82 (*quint*, $J = 5,4$ Hz) ;
- ✓ Un signal d'intégration 2H à δ_{H} 3,56 (*dd*, $J = 5,8 ; 3,5$ Hz) ;

Ces protons sont caractéristiques d'un groupement glycérol acylé.

En plus de ces signaux, le spectre RMN ^1H montre les signaux de protons de la chaîne d'acide gras insaturé :

- ✓ Un signal à δ_{H} 2,35 d'intégration 2H sous forme de triplet ($J = 7,2$ Hz) ;
- ✓ Un signal à δ_{H} 1,62 d'intégration 2H sous forme de multiplet ;
- ✓ Un massif à 1,25-1,40 ppm de groupements $(\text{CH}_2)_n$;
- ✓ Un signal à δ_{H} 2,05 d'intégration 2H sous forme de multiplet ;
- ✓ Un signal à δ_{H} 0,9 d'intégration 3H sous forme de triplet ($J = 6,9$ Hz) du groupement méthyle CH_3 terminal ;
- ✓ Des protons oléfiniques à δ_{H} 5,3-6,4 sous forme de multiplet.

Sur le spectre RMN ^{13}C (Figure III.108) du composé **DE6** sont visualisés 20 signaux correspondant à 20 atomes de carbone :

- ✓ Un groupement méthyle à δ_{C} 14,5 ;
- ✓ Deux carbones méthyléniques à δ_{C} 34,9 et 24,8 correspondent respectivement aux CH_2 en α et β de la fonction carbonyle ;
- ✓ Deux autre CH_2 résonant à δ_{C} 66,5 et 64,0 du glycérol ;
- ✓ Un CH à δ_{C} 71,1 du glycérol ;
- ✓ Quatre carbones résonant à δ_{C} 122,9 et 135,8 sont attribués aux carbones oléfiniques ;
- ✓ Un CH_2 à δ_{C} 33,6 assigné au carbone situé en position α des carbones éthyléniques (-HC=HC- CH_2 -) ;
- ✓ Deux carbones méthyléniques à δ_{C} 23,8 et 33,1 correspondent respectivement aux CH_2 en α et β de groupement méthyle terminal ;
- ✓ Un carbone du carbonyle à δ_{C} 174,0 ;
- ✓ Six carbones de groupement méthyléniques résonant entre 28,0 et 30,0 ppm.

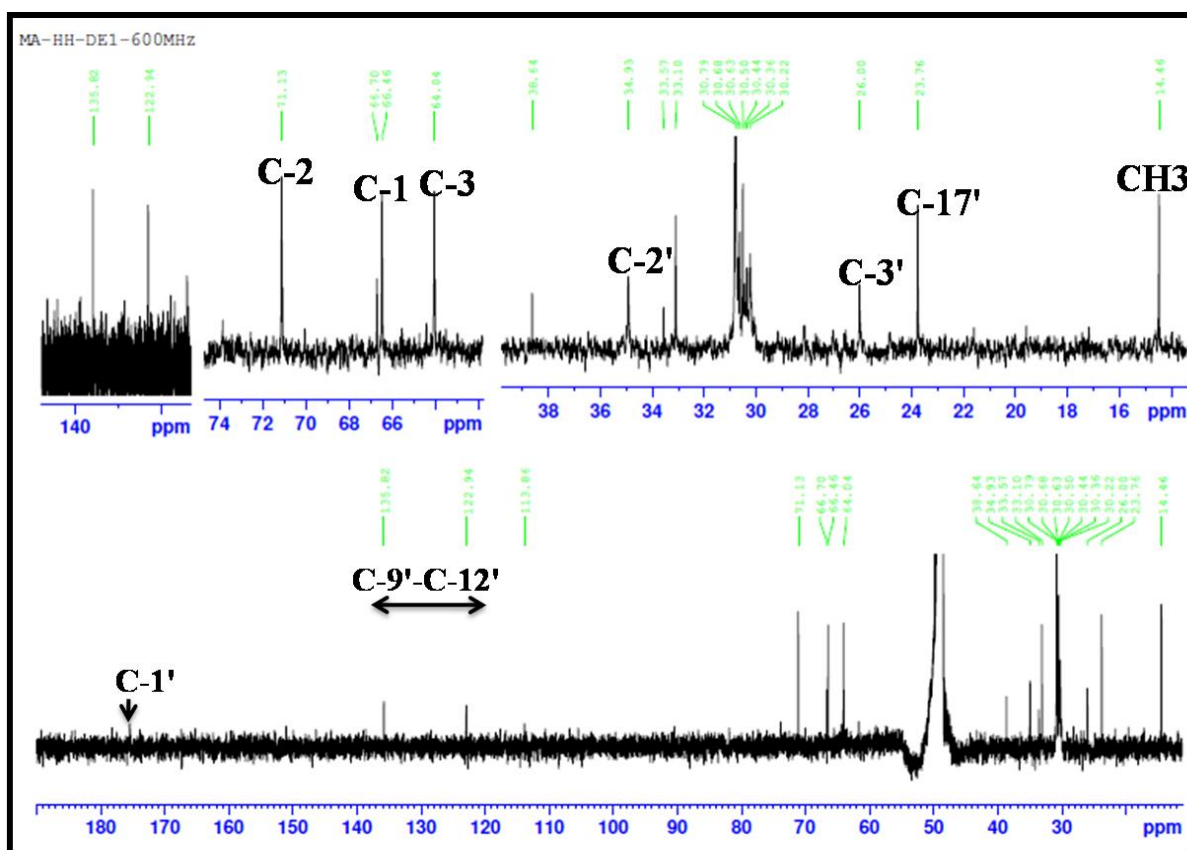
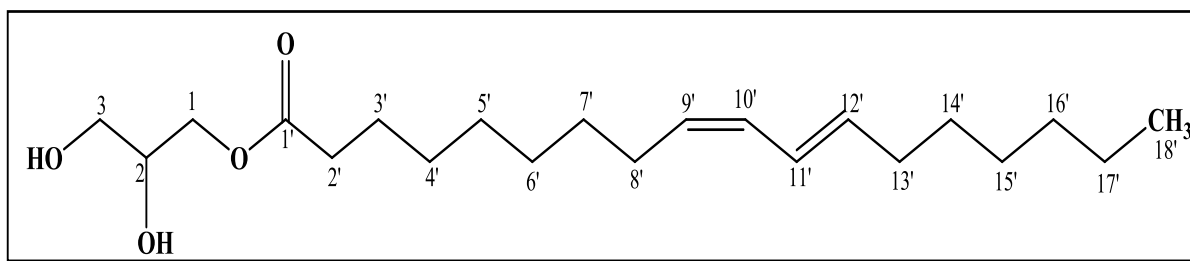


Figure III.108: Spectre RMN ^{13}C du composé **DE6** (MeOD)

Bien que le composé **DE6**, ait une structure similaire à celle du composé **DE5** déjà identifié, la différence se situe au niveau de la géométrie des doubles liaisons.

L'ensemble de ces données spectroscopiques (Tableau III-16) et la comparaison avec la littérature nous conduit à proposer pour ce composé la structure moléculaire suivante : (9*Z*,11*E*)-2,3-dihydroxypropyl octadeca-9,11-diénoate (**DE6**) [176-177]. Il a été trouvé pour la première fois dans le genre *Diplotaxis*.

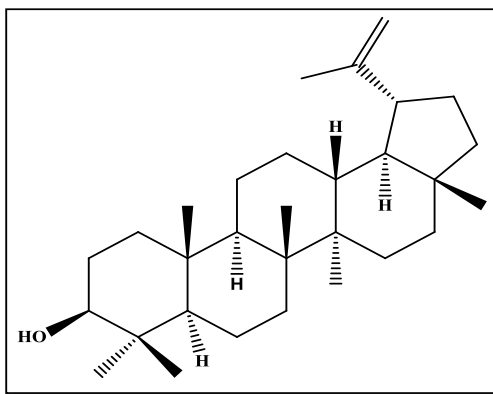


(9*Z*,11*E*)-2,3-dihydroxypropyl octadeca-9,11-diénoate

Tableau III.16 : Déplacements chimiques en RMN ^1H et RMN ^{13}C du Composé **DE6** dans le MeOD

Position	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (m, J en Hz)
1	66,5	4,07 (dd, 11; 5,8; H1a) 4,15 (dd, 11,2 ; 3,8; H1b)
2	71,1	3,82 (quint, 5,4)
3	64,0	3,56 (dd, 5,8 ; 3,5)
1'	174.0	-
2'	34,9	2,35 (t, 7,2)
3'	24,8	1,62 (m)
(4'-7', 14', 15')	28,0-30,0	1,25-1,40 (m)
8'	Nd	2,05 (m)
9'-12'	122,9-135,8	5,30-6,40 (m)
13'	33,6	2,05 (m)
16'	33,1	1,25-1,40 (m)
17'	23,8	1,24-1,43 (m)
18'	14,5	0,9 (t, 6,9)

III.3.7 Identification structurale du composé DE7



Lupéol

Ce composé est purifié sous forme d'une poudre blanche soluble dans le chloroforme. Sa CCM est invisible à la lumière UV (254 et 366 nm) se colorant en orange-marron après révélation par une solution acide et chauffage à 100 °C.

Le spectre de masse ESI-MS (Figure III.109) de ce composé en mode positif montre deux pics d'ions pseudomoléculaires à $m/z = 449$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ et 876 $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ indiquant que la masse moléculaire est 426 uma compatible avec la formule moléculaire $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$.

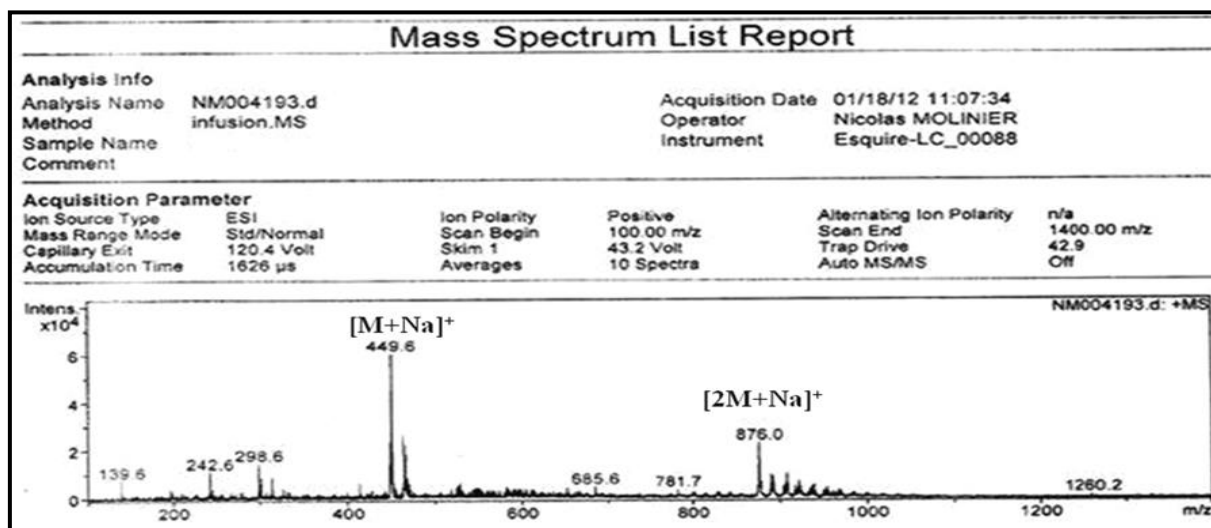


Figure III.109: Spectre de masse ESI-MS du composé **DE7**

L'observation des spectres RMN ^1H (Figure III.110), COSY H-H (Figure III.111) et HSQC *J*-modulé (Figure III.112) de ce composé, permet d'identifier sept signaux singulet à champ fort à δ_{H} 1,02, 0,82, 0,88, 1,08, 0,99, 0,83 et 1,74 s'intégrant pour trois protons chacun correspondant à des groupements méthyles.

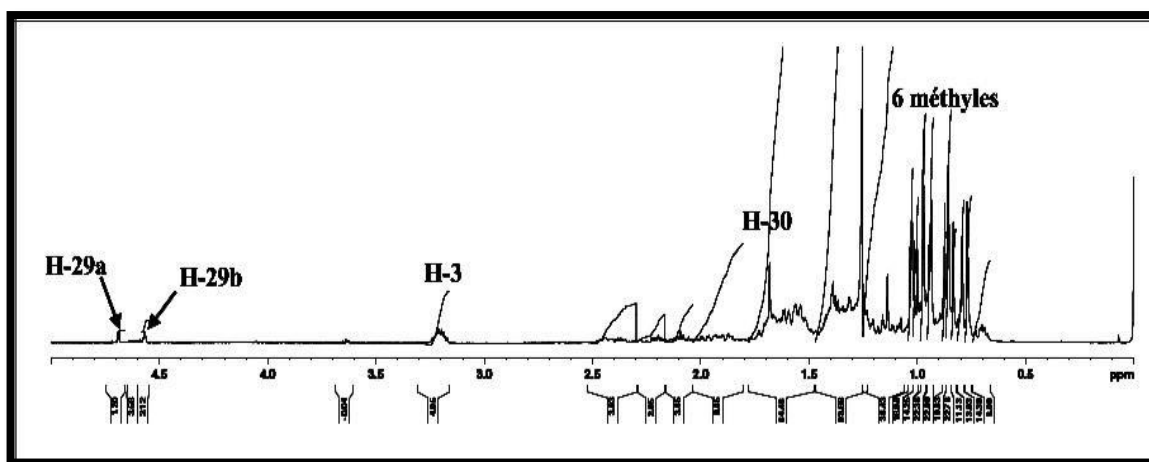


Figure III.110: Spectre de RMN ^1H du composé **DE7** (CDCl_3)

Le déblindage de Me-30 (δ_{H} 1,74 ppm) indique qu'il est lié à un carbone insaturé hybridé sp^2 . Ces protons montrent des corrélations sur le spectre COSY (Figure III.111) avec deux protons géminés qui correspondent aux protons oléfiniques H-29a et H-29b, résonant à 4,68 et 4,58 ppm sous forme de singulet large sur le spectre RMN ^1H (Figure III.110). Ces protons couplent sur le spectre HSQC avec leur carbone à δ_{C} 109,3. Ceci permet de suggérer la présence d'un groupement isoprényle dans la structure de ce composé.

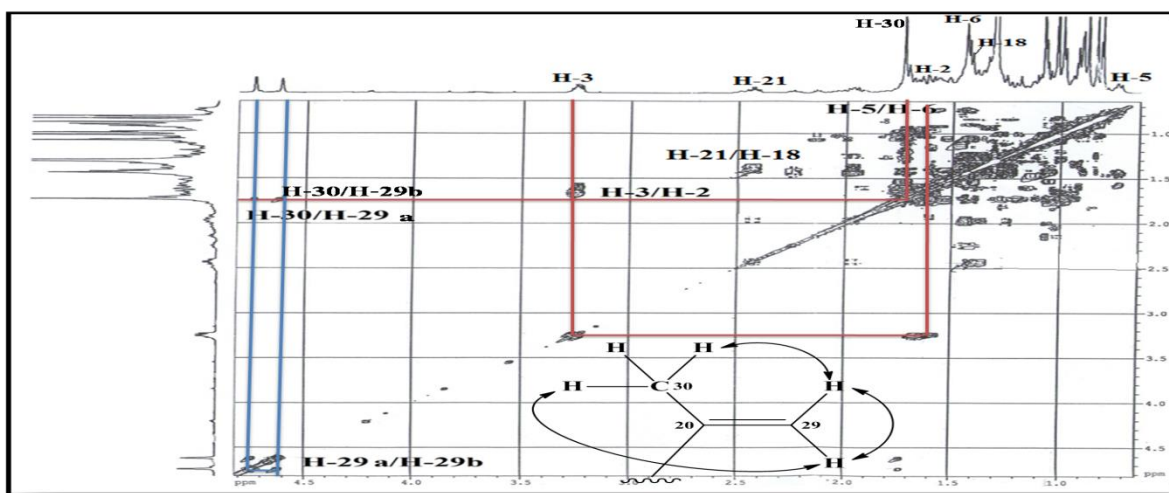


Figure III.111: Spectre COSY H-H du composé DE7

En plus, un autre signal est visualisé à δ_H 3,20 (m) attribuable à un groupement hydroxyméthine 3-CHOH, son carbone est déterminé par analyse du spectre HSQC à δ_C 79,0 (Figure III.112). Toutes ces données attestent que ce composé a une nature triterpénique.

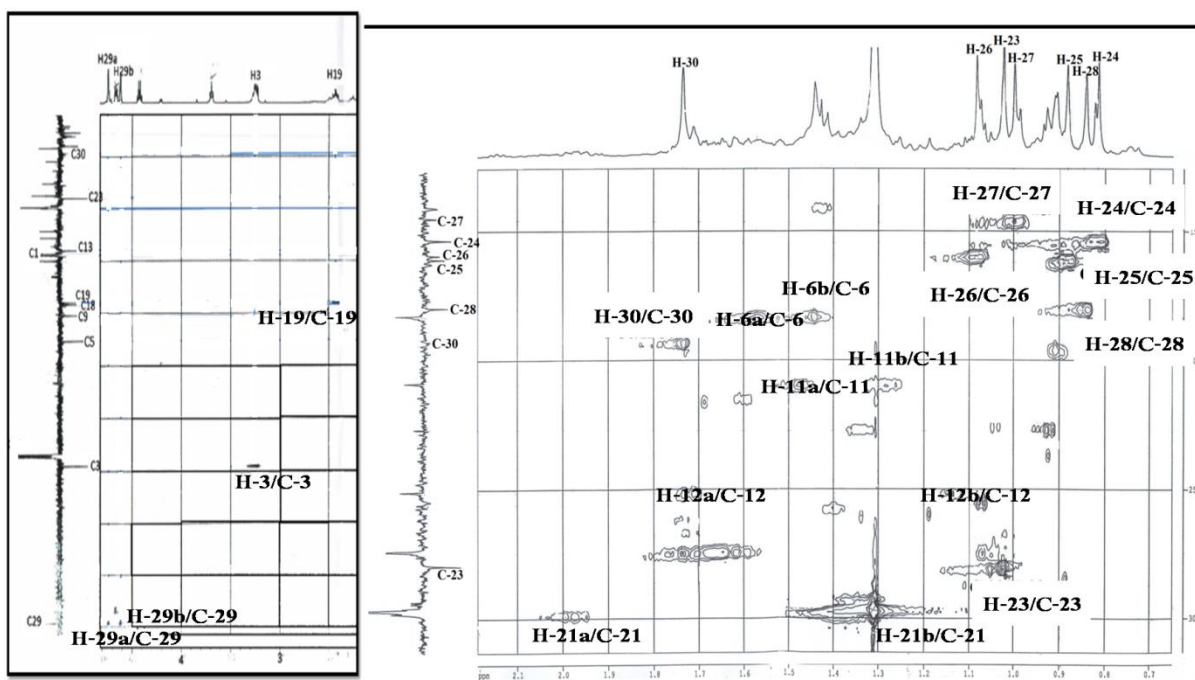


Figure III.112: Spectre HSQC J-modulé du composé DE7

Les données fournies par l'analyse du spectre RMN ^{13}C J-modulé (Figure III.113) de DE7 est en accord avec la classe proposée pour ce composé. En effet, ce spectre montre :

- ✓ Trois groupements CH entre 45 et 55,2 ppm correspondant aux carbones des jonctions entre les différents cycles des triterpènes
- ✓ Un ensemble de carbones localisés dans l'intervalle de 18 à 43 ppm, attribuables aux CH_2 et C quaternaires ;

- ✓ Sept groupements méthyliques résonant entre 14,5 et 27,9 ppm ;
- ✓ Un carbone oxydé apparaissant à δ_c 78,9, suggérant la présence d'un groupement hydroxyle substituant le carbone en C-3 du triterpène ;
- ✓ Deux carbones éthyléniques, l'un secondaire à 109,3 ppm et l'autre quaternaire à 151 ppm, mettant ainsi en évidence le caractère lupane du triterpène.

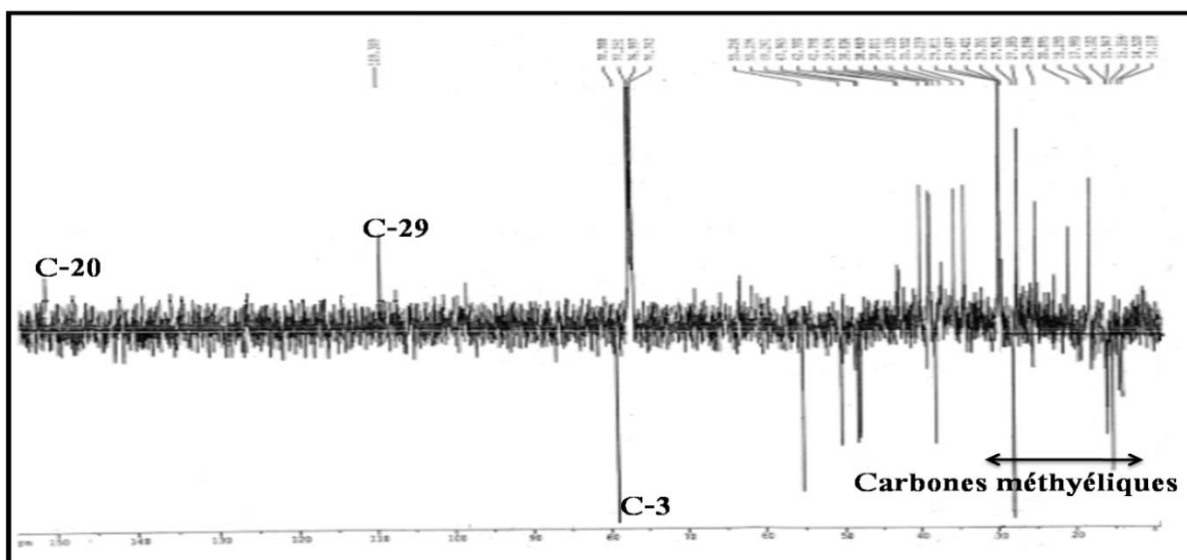


Figure III.113: Spectre de RMN ^{13}C J-modulé du composé **DE7** (CDCl_3)

Le spectre HMBC (Figure III.114) exhibe les corrélations longue distance en 2J et 3J . En effet, il montre le couplage entre le proton hydroxyméthine H-3 et les carbones sortant à δ_c 28,2 et 15,4 ne pouvant être que les deux méthyles géminés Me-23 et Me-24. Leurs protons sont repérés par HSQC à δ_H 1,02 et 0,82 respectivement (Figure III.112).

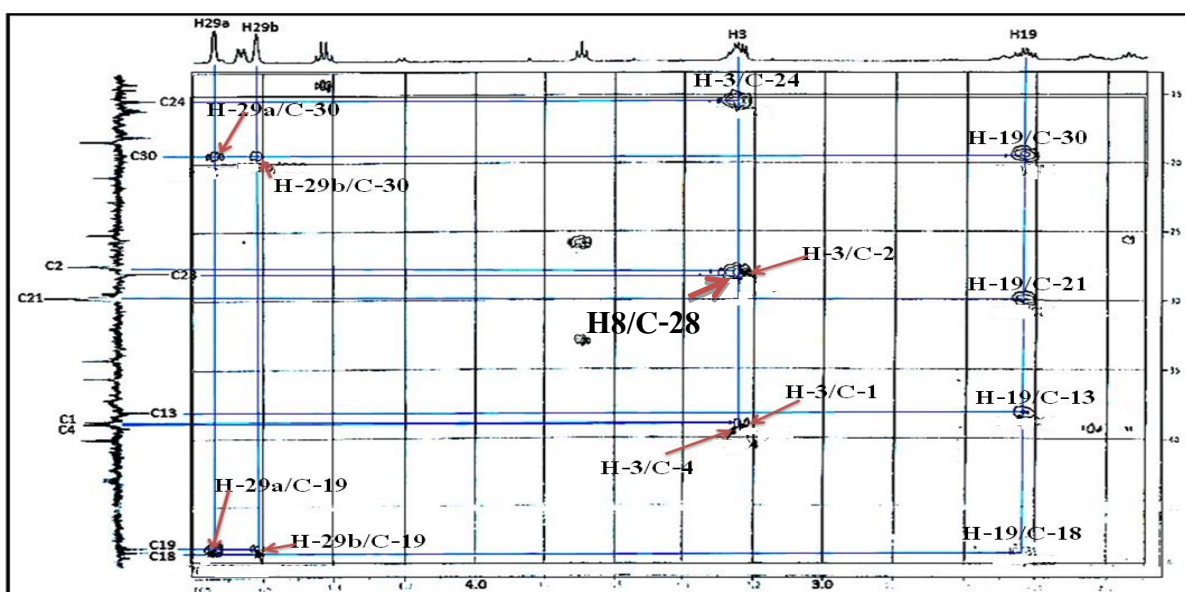


Figure III.114: Partie du spectre HMBC indiquant les corrélations du proton hydroxyméthine H-3.

Ce même proton H-3 présente d'autres tâches de corrélation avec un carbone quaternaire à δ_c 39,9 attribuable au carbone C-4 et aussi avec deux groupements méthylènes à δ_c 38,7 et 27,4 correspondant aux carbones C-1 et C-2 (Figure III.115). Les déplacements chimiques des protons H-1a (δ_H 1,72), H-1b (δ_H 0,96), H-2a (δ_H 1,65) et H-2b (δ_H 1,58) sont déterminés par l'analyse du spectre HSQC.

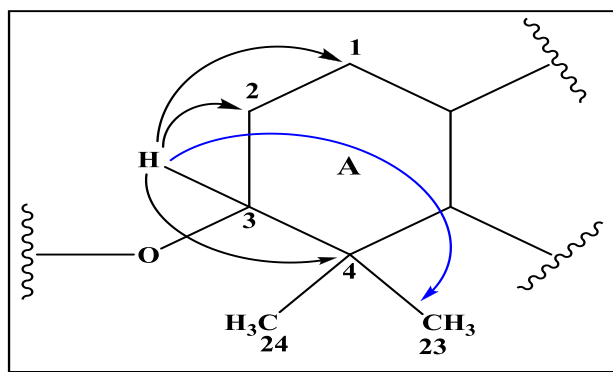


Figure III.115 : Corrélations HMBC du proton H-3

En plus, les protons des deux groupements méthyles Me-23 et Me-24 déjà assignés couplent en HMBC (Figure III.116) avec un carbone méthine à δ_c 55,3 qui ne peut être que le carbone C-5, son proton est localisé par HSQC à 0,69 ppm. Ce dernier montre des corrélations en HMBC avec les carbones des Me-23 et Me-24 et un autre méthyle à δ_c 15,9 correspondant au Me-25, les protons du carbone C-25 sont déterminés par HSQC à 0,88 ppm.

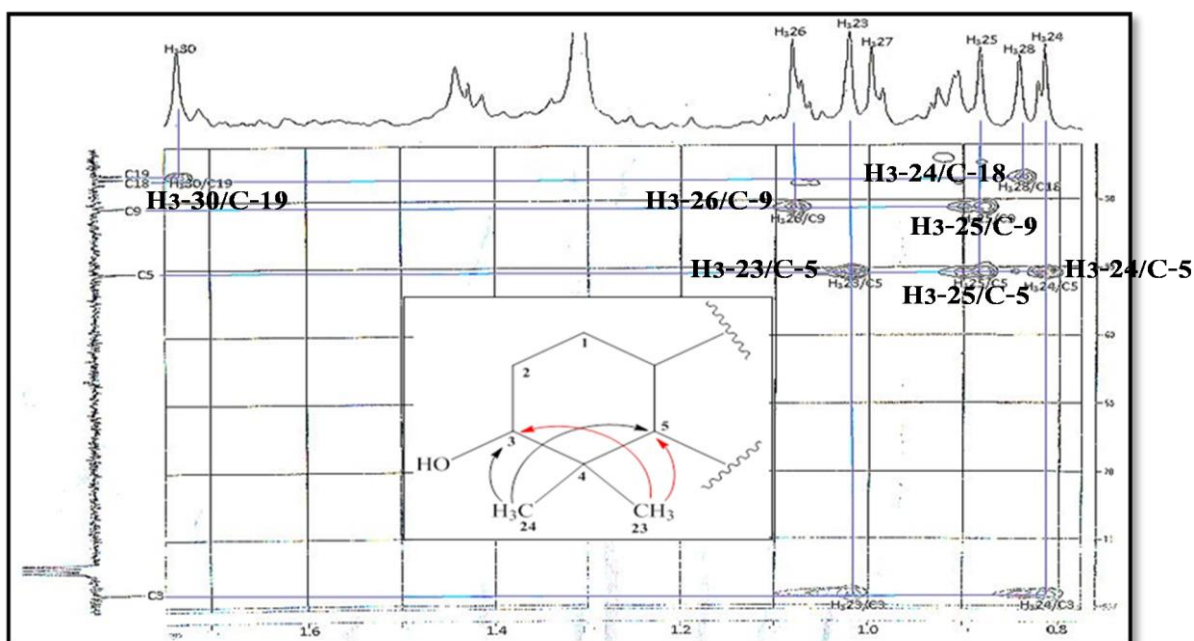


Figure III.116: Corrélations HMBC des méthyles en C-23 et C-24

Les protons du méthyle Me-25 corrélient sur le spectre HMBC (Figure III.116) avec plusieurs carbones, le carbone C-5 déjà attribué, un carbone quaternaire à 37,1 ppm attribuable au carbone C-10 et un méthine à 50,4 ppm ne pouvant être que le carbone C-9. Ce dernier corrélie en 3J avec deux groupements méthyles à δ_H 0,88 (s, 3H, Me-25) et à δ_H 1,08 (s, 3H, Me-26). Le déplacement chimique du carbone C-26 est assigné par expérience HSQC à 16,1 ppm.

Ce spectre (Figure III.117) montre également le couplage entre les protons du méthyle M-26 et le carbone C-7 repéré à δ_C 34,2, ses protons sont identifiés par HSQC à δ_H 1,48 (H-7a)/1,42 (H-7b). Ces derniers corrélient à leur tour avec deux carbones quaternaires à δ_C 41,0 et 42,8 correspondant aux carbones C-8 et C-14.

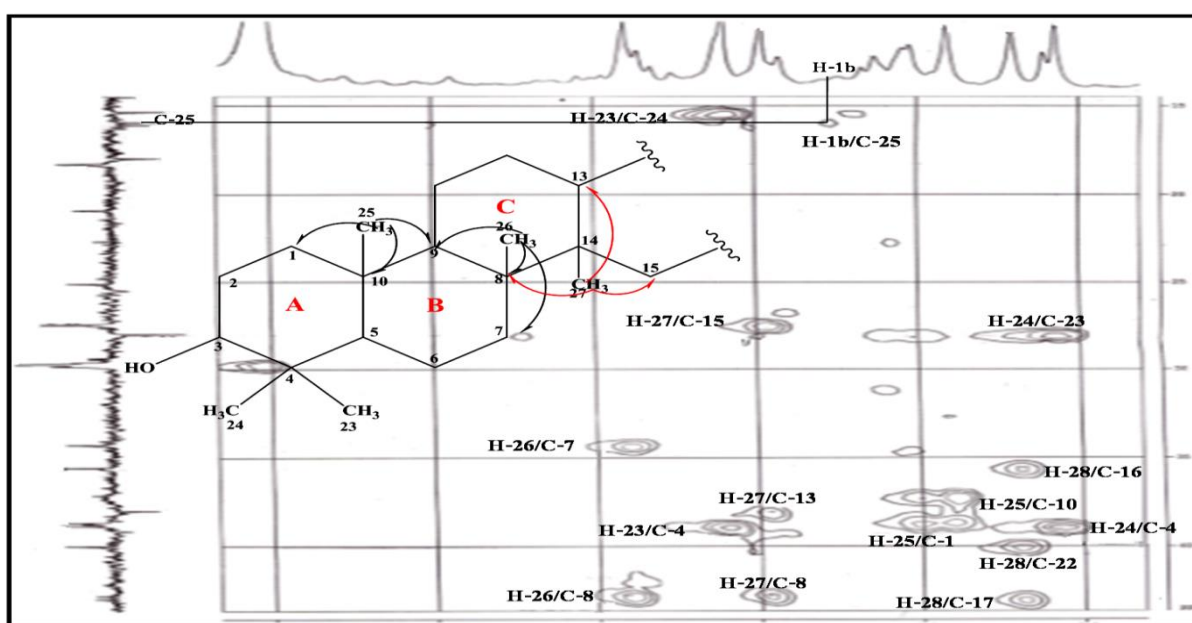


Figure III.117 : Corrélations HMBC des groupements méthyles (Me-25, Me-26 et Me-27)

D'autres corrélations sont visualisées entre le carbone quaternaire C-8 et un méthyle à δ_H 0,99 qui correspond au Me-27 (Figure III.117), son carbone est détecté par HSQC à δ_C 14,5. Aussi, ce groupement méthyle (Me-27) couple en HMBC avec un carbone méthine à δ_C 38,0 attribuable au carbone C-13 et un groupement méthylène à δ_C 27,9 ne pouvant être que le carbone C-15. Les protons des carbones cités précédemment sont identifiés par HSQC à δ_H 1,68 (H-13), 1,62 (H-15a) et 1,04 (H-15b).

Des couplages scalaires sont observés sur le spectre COSY (Figure III.118) entre les protons : H-13/H-12a (δ_H 1,73) et H-12a/H-11a (1,47). Les carbones C-11 et C-12 ont été identifiés par expérience HSQC à δ_C 20,9 et 25,1 respectivement.

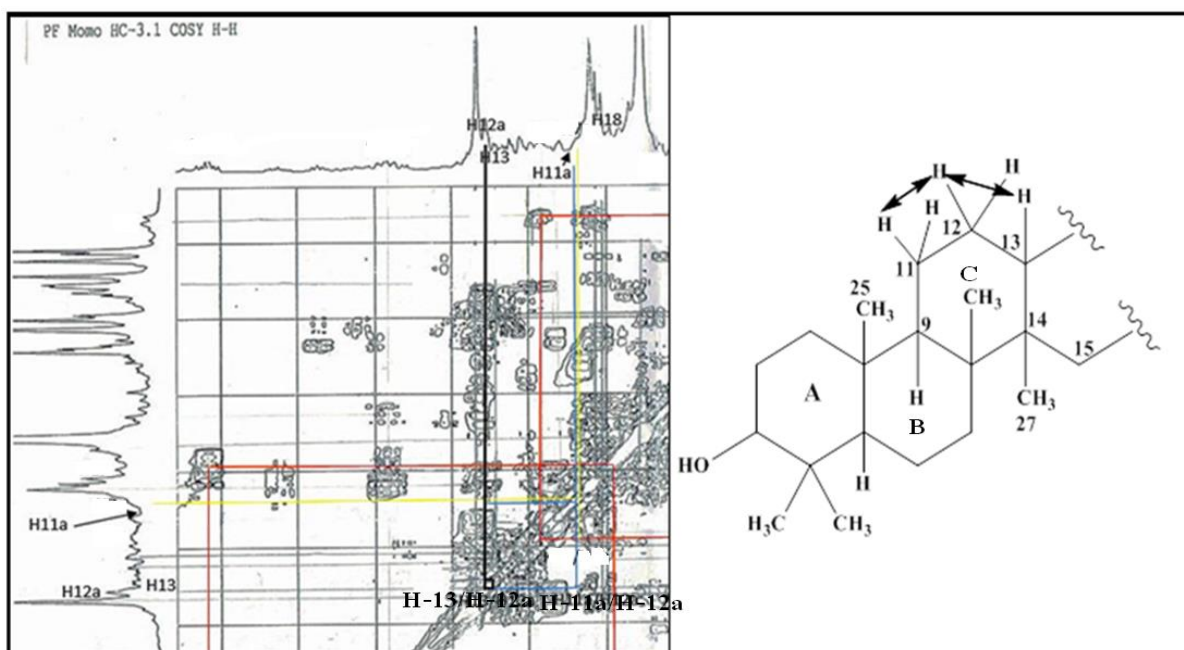


Figure III.118: Corrélations COSY du cycle C

Toujours sur le spectre COSY H-H, les deux protons géminés H-16a et H-16b résonant à δ_H 1,52 et 1,41 ppm respectivement, dont leur carbone (C-16) est repéré à 35,6 ppm couplent avec les protons H₂-15 assignés précédemment. En outre, le carbone C-16 corrèle en HMBC avec les protons du groupement méthylène H₃-28 à δ_H 0,83 qui couplent à leur tour avec un groupement méthylène à δ_C 40,2 attribuable au carbone C-22, un groupement méthine à 48,3 ppm caractéristique du carbone C-18 et un carbone quaternaire à δ_C 43,0 (C-17) (Figure III.119). Les déplacements chimiques des protons H-22a, H-22b et H-18 sont déterminés par HSQC à 1,43, 1,24 et 1,39 respectivement.

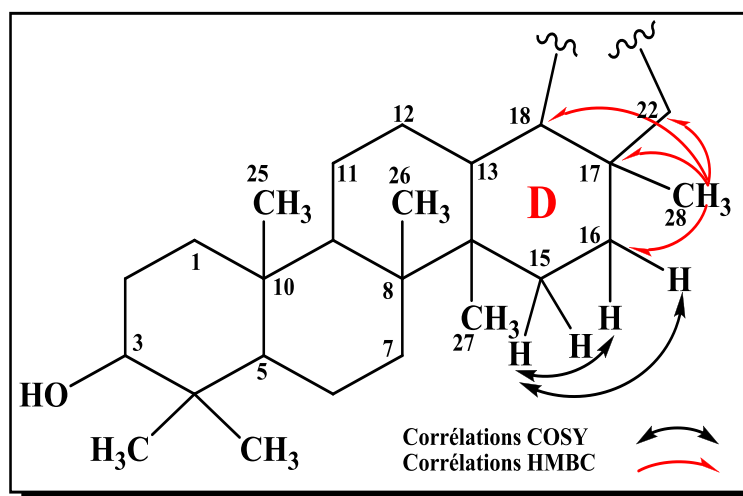


Figure III.119: Corrélations COSY et HMBC du cycle D.

En expérience COSY H-H (Figures III.118 et III.120), le proton méthine H-19 résonant à δ_H 2,42 sous forme de multiplet couple en 3J avec le proton H-18 et avec les deux protons méthylène H-21a et H-21b résonant à δ_H 1,97 et 1,27. A l'aide de l'expérience HSQC les valeurs des déplacements chimiques des carbones C-19 et C-21 sont détectés à δ_C 48,0 et 29,8 respectivement.

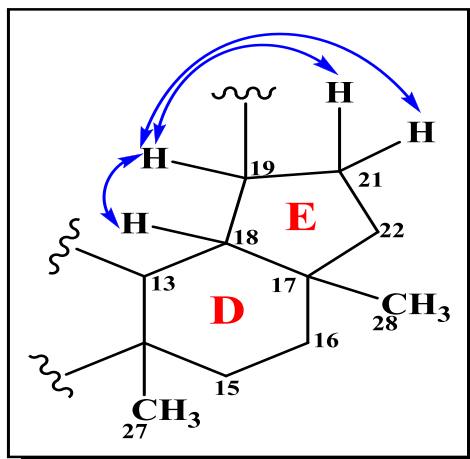


Figure III.120: Corrélations COSY du cycle E.

L'expérience HMBC (Figure III.121) permet de visualiser d'autres corrélations entre :

- ✓ Le proton H-19 et les carbones C-13, C-18, C-21 et C-30 ;
- ✓ Le proton H₃-30 et le carbone C-19.

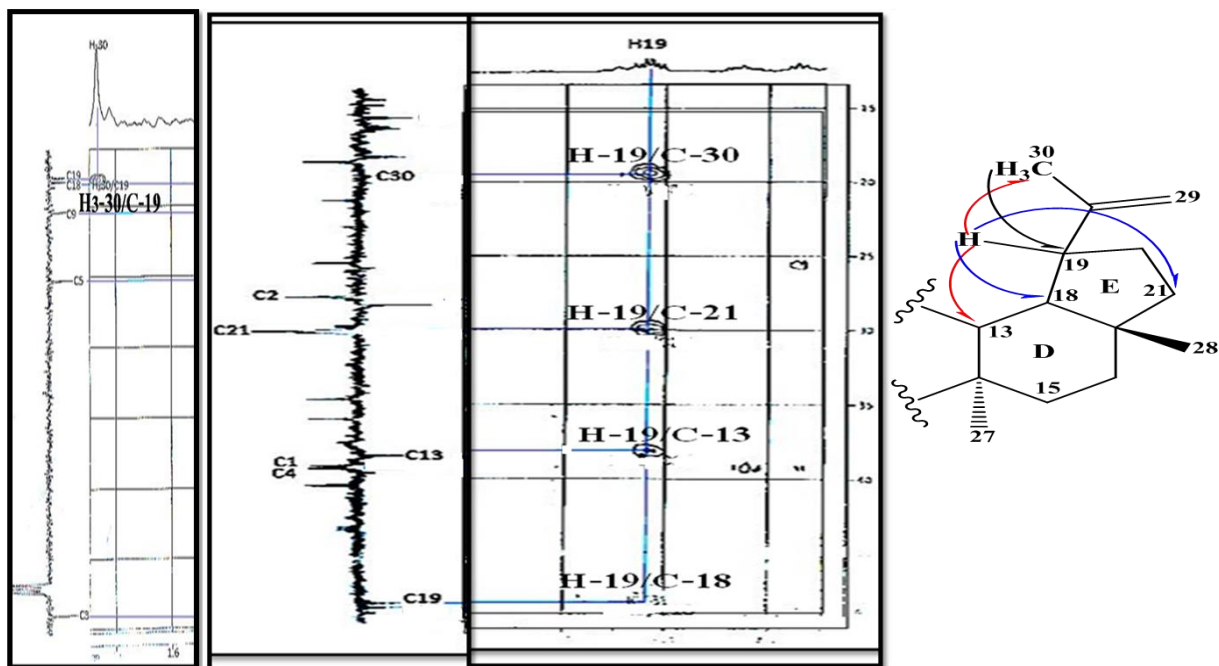
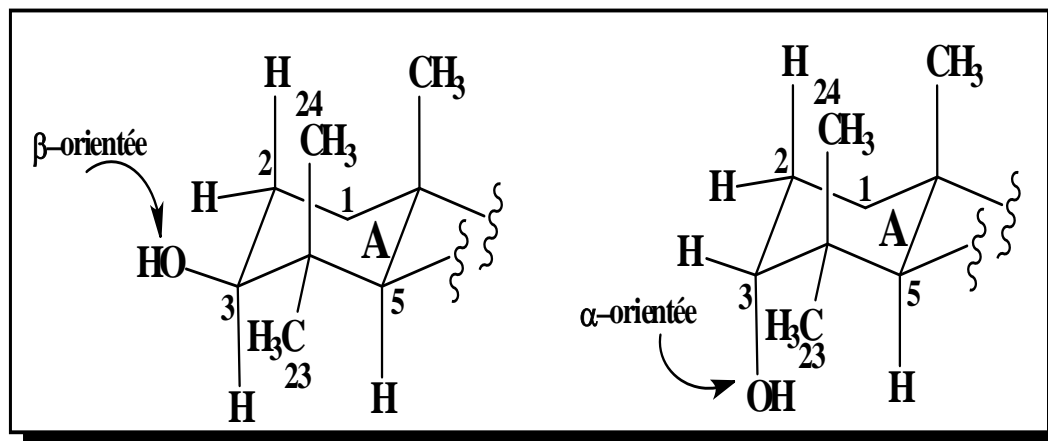


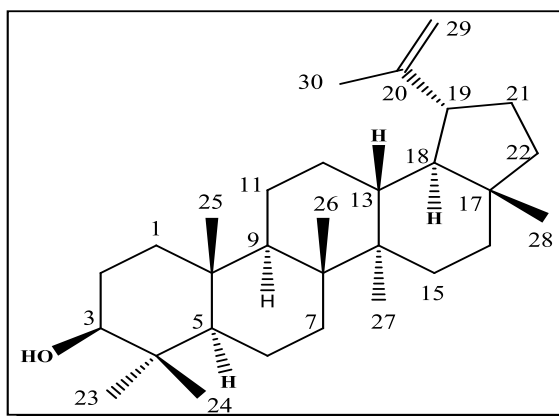
Figure III.121: Partie du spectre HMBC indiquant les corrélations des protons H-19 et H₃-30.

La détermination de la configuration β -orientée du groupement hydroxyle lié au carbone C-3 de ce composé est basée sur le déplacement chimique du C-3 à 79,0 ppm, alors qu'elle serait proche de 76 ppm dans le cas d'une orientation α .



Toute cette analyse spectrale ainsi que la comparaison avec les données de la littérature permettent d'attribuer la structure suivante au composé **DE7**: Lup-20(29)-èn-3-ol connu sous le nom Lupéol [178].

Le lupéol, est un triterpène pentacyclique, il a été isolé antérieurement de l'espèce *Erysimum corinthium* Boiss. (Brassicaceae) et se rencontre dans de nombreuses plantes médicinales. Ce composé est connu principalement pour ses propriétés anti-inflammatoire et anticancéreuse [179-181].



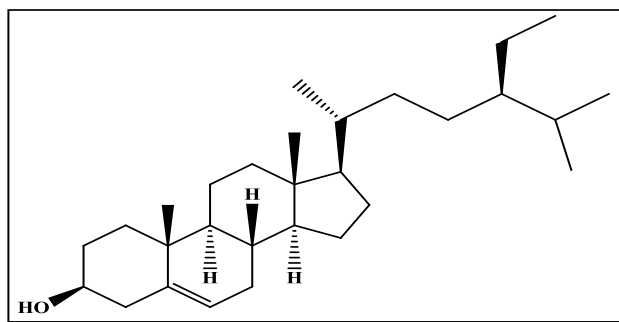
Lupéol

Les déplacements chimiques de ce composé sont regroupés dans le tableau III-17

Tableau III.17: Déplacements chimiques en RMN¹H et ¹³C du composé DE7 (CDCl₃)

Position	δ _C (ppm)	δ _H (m, J en Hz)	Position	δ _C (ppm)	δ _H (m, J en Hz)
1	38,7	1,72 (m, H-a) 0,96 (m, H-b)	16	35,6	1,52 (m, H-a) 1,41 (m, H-b)
2	27,4	1,65 (m, H-a) 1,58 (m, H-b)	17	43	-
3	79	3,20 (m)	18	48,3	1,39 (m)
4	39,9	-	19	48	2,42 (m)
5	55,3	0,69 (m)	20	151,2	-
6	18,3	1,56 (m, H-a) 1,44 (m, H-b)	21	29,8	1,97 (m, H-a) 1,27 (m, H-b)
7	34,2	1,48 (m, H-a) 1,42 (m, H-b)	22	40,2	1,43 (m, H-a) 1,24 (m, H-b)
8	41	-	23	28,2	1,02 (s)
9	50,4	1,30 (sl)	24	15,4	0,82 (s)
10	37,1	-	25	15,9	0,88 (s)
11	20,9	1,47 (m, H-a) 1,28 (m, H-b)	26	16,1	1,08 (s)
12	25,1	1,73 (m, H-a) 1,13 (m, H-b)	27	14,5	0,99 (s)
13	38	1,68 (m)	28	18,1	0,83 (s)
14	42,8	-	29	109,3	4,68 (sl, H-a) 4,58 (sl, H-b)
15	27,9	1,62 (m, H-a) 1,04 (m, H-b)	30	19,5	1,74 (s)

III.3.8 Identification structurale du composé DE8



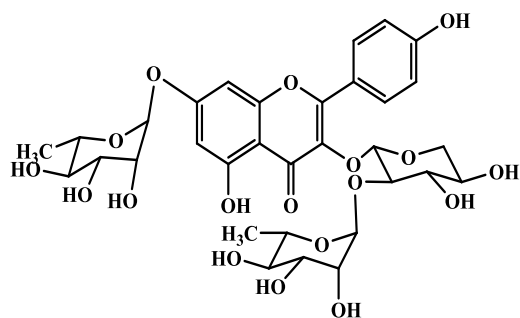
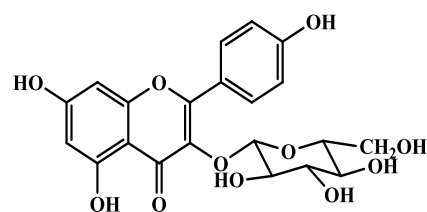
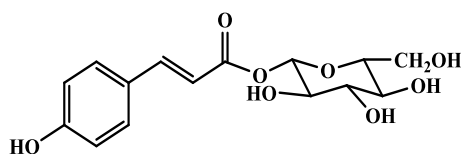
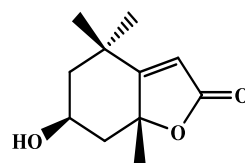
β-sitostérol

Ce composé a été identifié au β -sitostérol (très fréquent dans le règne végétal), par comparaison de sa CCM avec un échantillon témoin, les deux composés présentent les mêmes aspects visuels après pulvérisation à l'acide sulfurique et chauffage à 100°C ainsi que le même Rf (0.5, EP/AcOEt : 8/2). Le β -sitostérol a été isolé des espèces : *Diplotaxis harra* [68], *Brassica oleracea*, *Brassica rapa Chinensis*, *Brassica rapa var. Parachinensis* et *Erysimum corinthium* (Brassicaceae) [182-184].

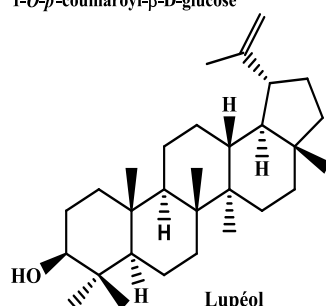
III.4 Conclusion

L'investigation chromatographique et l'analyse spectroscopique de la partie aérienne de *Diplotaxis eruroides* (L.) DC. appartenant à la famille Brassicaceae, effectuée sur les extraits acétate d'éthyle et *n*-butanol ont permis l'isolement et la caractérisation de huit produits naturels dont deux flavonoïdes, un coumaroyle, un monoterpène, deux monoglycérolipides et deux triterpénoïdes. Les métabolites isolés se répartissent comme suit:

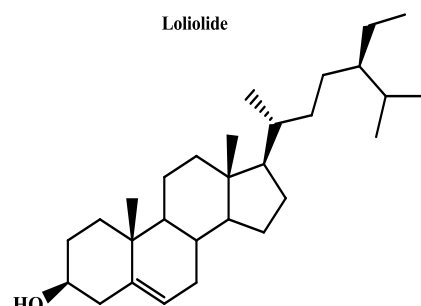
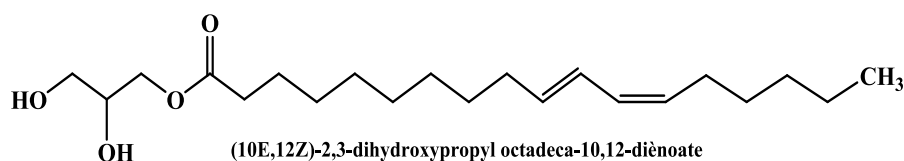
- Deux flavonoïdes :
 - Kaempférol 3-*O*-[α -L-rhamnopyranosyl (1-2)- β -D-xylopyranosyl]-7-*O*- α -L rhamnopyranoside (nouveau).
 - Kaempférol 3-*O*- β -glucoside (Astragaline) ;
- Trois terpènes :
 - Loliolide ;
 - Lupéol ;
 - β -sitostérol.
- Un coumaroyle
 - 1-*O*-*p*-coumaroyl- β -D-glucose.
- Deux monoglycérolipides
 - (10*E*,12*Z*)-2,3-dihydroxypropyl octadeca-10,12-diénoate;
 - (9*Z*,11*E*)-2,3-dihydroxypropyl octadeca-9,11-diénoate.

Kaempférol 3-O-[(α -L-rhamnopyranosyl-(1-2)-O- β -D-xylopyranosyl)-7-O- α -L-rhamnopyranoside]Kaempférol 3-O- β -glucoside (Astragaline)1-O-*p*-coumaroyl- β -D-glucose

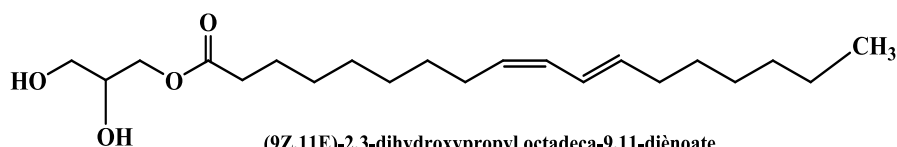
Loliolide



Lupéol

 β -sitostérol

(10E,12Z)-2,3-dihydroxypropyl octadeca-10,12-diénoate



(9Z,11E)-2,3-dihydroxypropyl octadeca-9,11-diénoate

III.5 Etude biologique

III.5.1. Étude biologique de l'espèce *Thymus algeriensis*

III.5.1.1 Teneur totale en phénols et flavonoïdes

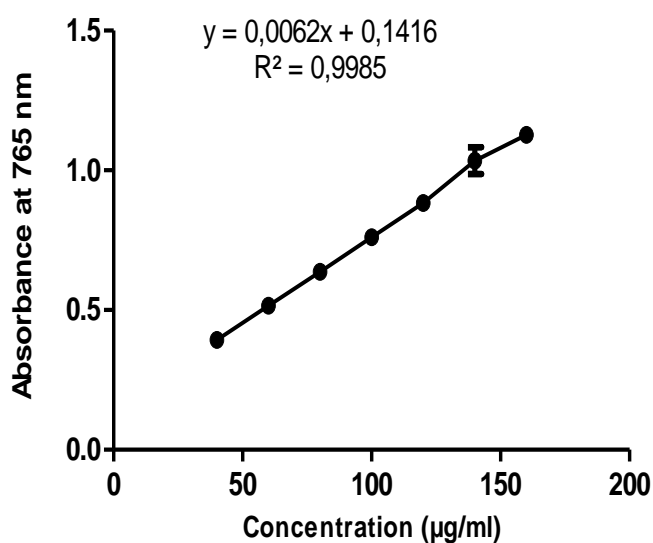
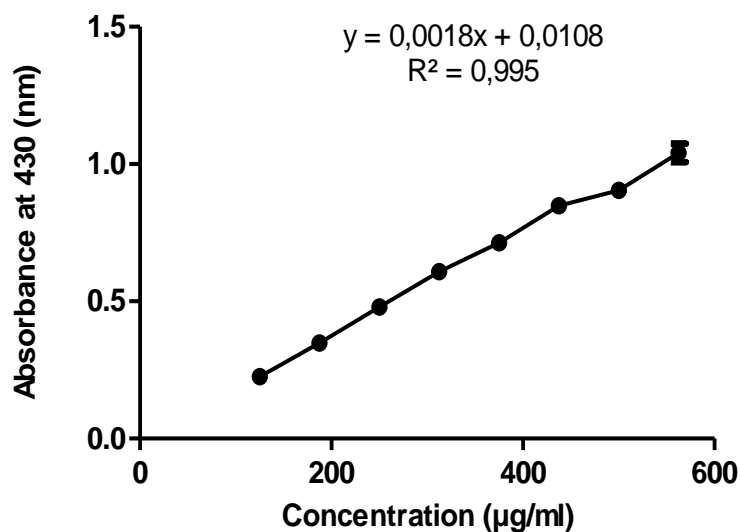
Les résultats des teneurs totales en phénols et en flavonoïdes des extraits EP, CHCl₃ et *n*-BuOH ont été estimés en utilisant les courbes d'étalonnage établies respectivement par l'acide gallique et la quercétine et ils ont été illustrés dans le tableau III.18. Les teneurs en phénols et en flavonoïdes les plus élevées ont été trouvées dans l'extrait *n*-butanol, suivi d'extraits de chloroforme et d'éther de pétrole.

Tableau III.18 : Teneur totale en phénols et flavonoïdes des extraits bruts de *T. algeriensis*

Extraits	Teneur phénolique totale ^a ($\mu\text{g GAE mg}^{-1}$ d'extrait de plante)	Teneur flavonoïdique totale ^b ($\mu\text{g QE mg}^{-1}$ d'extrait de plante)
EP	$62,65 \pm 0,56$	$8,57 \pm 0,27$
CHCl_3	$161,78 \pm 0,09$	$9,77 \pm 0,14$
<i>n</i> -BuOH	$318,07 \pm 0,88$	$198,17 \pm 0,12$

^a La teneur totale en phénols a été exprimée en μg d'équivalents d'acide gallique par mg d'extrait de plante.

^b La teneur en flavonoïdes a été exprimée en μg d'équivalents quercétine par mg d'extrait de plante.

Figure III.118: Droite d'étalonnage de l'acide gallique (moyenne \pm de trois essais SD)Figure III.119: Droite d'étalonnage de la quercétine (moyenne \pm de trois essais SD)

▪ Discussion

La teneur élevée en composés bioactifs observée dans l'extrait *n*-BuOH pourrait être liée à la polarité du solvant d'extraction. En effet, plusieurs études ont rapporté que les procédures d'extraction ont révélé que les composés phénoliques sont plus solubles dans les solvants organiques polaires en raison de la présence de plusieurs groupes hydroxyles [185].

Des recherches antérieures sur les teneurs totales en phénols et en flavonoïdes de la même espèce ont montré des variations dans leurs résultats. En fait, l'extrait méthanolique préparé à partir de la plante *Thymus algeriensis* qui a été récoltée dans trois régions différentes (Gafsa, Tamerza et Kairouane) de Tunisie, présente les niveaux les plus faibles de phénols et de flavonoïdes par rapport aux résultats de la présente étude [186]. De plus, les mêmes espèces poussant dans les environs de Laghouat, en Algérie, révèlent une plus grande teneur en phénols et en flavonoïdes [187]. Les quantités de composés phénoliques et flavonoïdes dans les extraits bruts pourraient varier en fonction de divers facteurs environnementaux tels que la température, l'humidité, l'intensité lumineuse et les minéraux. D'autres facteurs comme la culture, les lieux de culture et le stockage pourraient également affecter ces contenus [188,189].

III.5.1.2 Activités antioxydantes

L'activité antioxydante des extraits EP, CHCl₃ et *n*-BuOH obtenus à partir de l'espèce *Thymus algeriensis* et standards (BHT, BHA, acide ascorbique et quercétine) a été évaluée à l'aide de cinq méthodes différentes à savoir : piégeage du radical libre DPPH, la capacité antioxydante par réduction de cuivre (CUPRAC), pouvoir réducteur du fer (FRAP), teste de phosphomolybdate (PPM) et le dosage du thiocyanate ferrique et les résultats sont présentés dans le tableau III.19.

Tous les extraits testés (EP, CHCl₃ et *n*-BuOH) et les standards ont présenté une activité antioxydante d'une manière dépendante de la concentration. L'extrait *n*-butanol a exhibé la capacité antioxydante la plus élevée dans l'activité d'élimination des radicaux DPPH, CUPRAC et le dosage du pouvoir réducteur, par rapport aux extraits bruts (EP et CHCl₃) et aux molécules de référence (acide ascorbique, BHA et BHT). En outre, cet extrait a révélé une activité puissante en capacité antioxydante totale avec une valeur de $20,79 \pm 0,19 \mu\text{g EAA mg}^{-1}\text{ex}$ par rapport aux résultats des extraits de CHCl₃ et d'éther de pétrole. De plus, les résultats de dosage du thiocyanate ferrique ont montré que l'extrait *n*-BuOH de *Thymus algeriensis* a une forte capacité antioxydante à inhiber la peroxydation lipidique ($47,43 \pm 0,58\%$) que celle de la quercétine ($42,07 \pm 0,25\%$), mais, cette activité est relativement plus faible que l'acide ascorbique ($61,86 \pm 1,27\%$) utilisé comme standard.

Tableau III.19 : Activités antioxydantes des extraits de *T.algeriensis* par les tests DPPH, CUPRAC, PR, TAC et FTC.

Extraits et Standard	Test DPPH ^a IC ₅₀ (µg ml ⁻¹)	Test CUPRAC ^a A _{0.50} (µg ml ⁻¹)	Test du Pouvoir réducteur A _{0.50} (µg ml ⁻¹)	Test de Capacité antioxydante totale ^a µg EAA mg ⁻¹ ex	Test du thiocyanate ferrique ^a % d'inhibition
EP	69,50 ± 0,68	22,28 ± 0,24	25,25 ± 0,08	15,69 ± 0,001	27,80 ± 0,37
CHCl ₃	79,92 ± 0,30	27,81 ± 3,06	24,5 ± 0,52	16,21 ± 0,02	24,25 ± 0,45
<i>n</i> -BuOH	5,05 ± 0,12	0,94 ± 0,06	4,98 ± 0,48	20,79 ± 0,19	47,43 ± 0,58
BHA ^b	6,82 ± 0,49	3,64 ± 0,19	8,41 ± 0,67	NT	NT
BHT ^b	22,32 ± 0,02	9,62 ± 0,87	> 50	NT	NT
Acide ascorbique ^b	3,1 ± 0,002	12,43 ± 0,09	9,01 ± 0,46	NT	61,86 ± 1,27
Quercetine ^b	NT	NT	NT	NT	42,07 ± 0,25

^a Les valeurs exprimées sont les moyennes ± SD de trois mesures ($p < 0,05$), ^b Molécules de référence, NT: non testées. Les valeurs A_{0,5} sont définies comme la concentration à l'absorbance A = 0.5

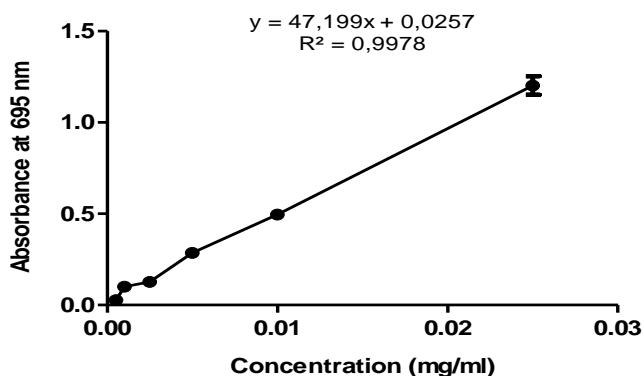


Figure III.120: Droite d'étalonnages de l'acide ascorbique (moyenne ± SD de trois essais)

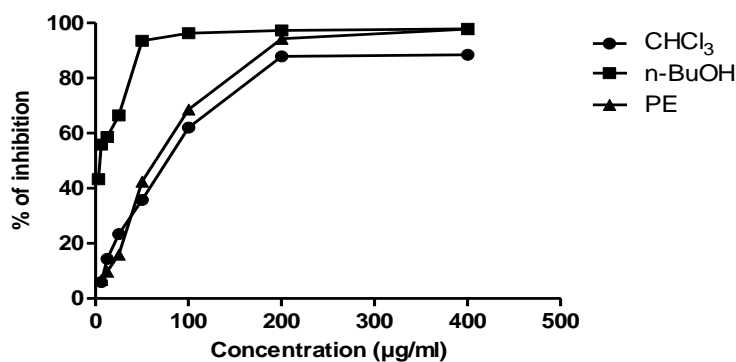


Figure III.121: Activité anti-oxydante par DPPH des extraits EP, CHCl₃ et *n*-BuOH de *Thymus algeriensis* (moyenne ± SD de trois essais)

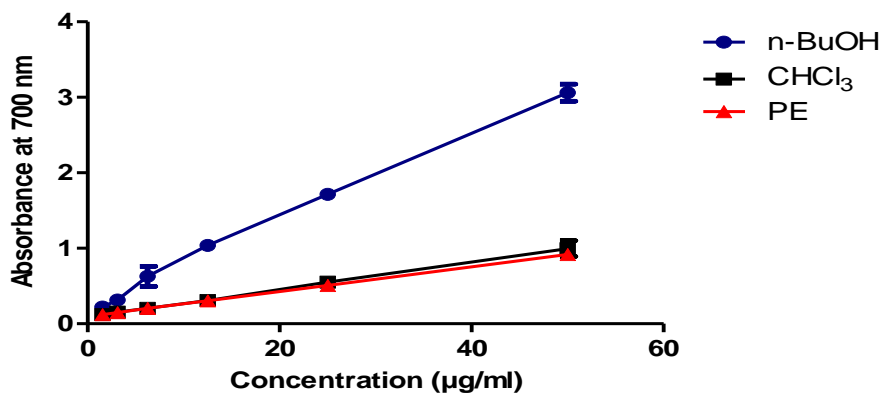


Figure III.122: Activité anti-oxydante par test FRAP des extraits EP, CHCl₃ et n-BuOH de *Thymus algeriensis* (moyenne \pm SD de trois essais)

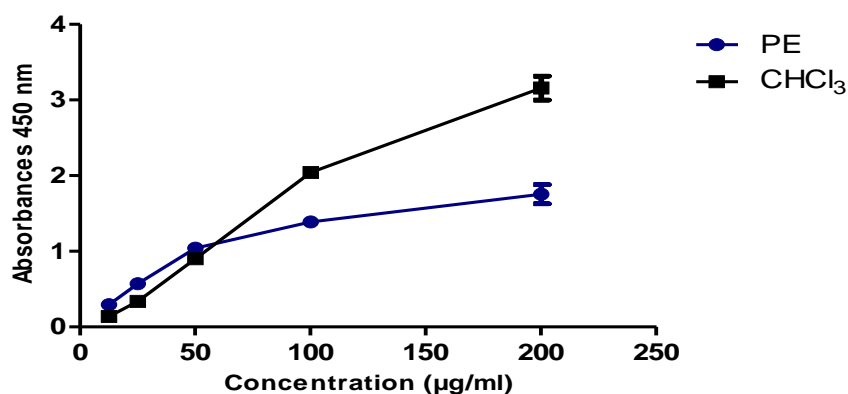


Figure III.123: Activité anti-oxydante par test CUPRAC des extraits EP et CHCl₃ de *Thymus algeriensis* (moyenne \pm SD de trois essais)

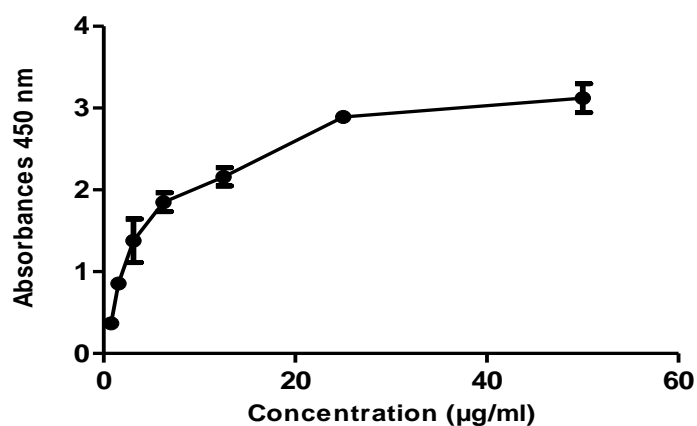


Figure III.124: Activité anti-oxydante par test CUPRAC de l'extrait n-BuOH de *Thymus algeriensis* (moyenne \pm SD de trois essais)

▪ Discussion

Les propriétés antioxydantes des extraits de plantes sont principalement dues à leur richesse en composés phénoliques et flavonoïdes, qui sont capables de donner des atomes d'hydrogène ou des électrons pour inhiber la peroxydation lipidique et pour se protéger des dommages dus aux radicaux libres. Les résultats obtenus pourraient expliquer l'activité antioxydante des extraits de *Thymus algeriensis*. En fait, de nombreux flavonoïdes et polyphénols ont été isolés de cette espèce. Une étude antérieure réalisée sur l'activité antioxydante de l'extrait éthanolique de l'espèce *T. algeriensis* collectée dans la région de Laghouat a montré une faible activité dans le piégeage des radicaux DPPH [187].

En outre, la même espèce de Tunisie a exhibé une faible activité antioxydante par rapport à nos résultats dans le test de piégeage des radicaux DPPH [189]. La différence dans les résultats de l'activité antioxydante de la même espèce peut s'expliquer par les variations des quantités de composés polyphénoliques dans les extraits bruts et leurs interactions synergiques ou antagonistes et la polarité des systèmes [190].

III.5.1.3 Activité anti-inflammatoire *in vitro*

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* des extraits bruts (EP, CHCl₃ et *n*-BuOH) préparés à partir des espèces *T. algeriensis* et diclofénac sodique comme standard a été évaluée par un essai de dénaturation de l'albumine d'œuf. Les données ont indiqué que tous les extraits testés et le médicament standard empêchent la dénaturation des protéines (albumine) de manière dépendante de la concentration (Fig.III.125). Le diclofénac a révélé un pourcentage maximal d'inhibition (99,23%) à la concentration de 800 µg ml⁻¹. De plus, à la même concentration, l'extrait CHCl₃ a présenté l'effet anti-inflammatoire le plus élevé avec un pourcentage d'inhibition à 45,27%, suivi par les extraits EP (30,26%) et *n*-BuOH (26,03%).

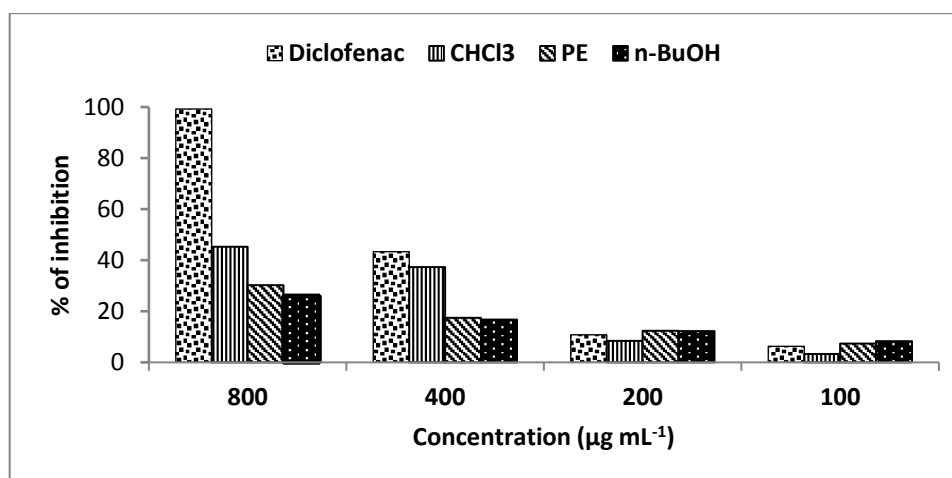


Figure III.125: Dénaturation des protéines des extraits bruts de *T. algeriensis* et Diclofénac

▪ Discussion

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et secondaire par l'application d'agents externes tels que des solutions acides ou basiques, des sels inorganiques, des solvants et de la chaleur. Ces applications induisent des modifications de leur fonction biologique et de leurs propriétés [191]. La dénaturation des protéines est responsable du déclenchement de la polyarthrite rhumatoïde en raison de la production d'auto-antigènes dans certaines maladies rhumatismales [192].

L'activité anti-inflammatoire des extraits de *Thymus algeriensis* peut être attribuée aux interactions entre les différents métabolites secondaires présents dans les extraits bruts et la région aliphatique autour du résidu de lysine sur la protéine d'albumine [193].

III.5.1.4 Activité anti-hémolytique

Les extraits bruts obtenus à partir de *T. algeriensis* ont été testés pour leur capacité à protéger la membrane érythrocytaire contre la lyse induite par l'hypotonie et les résultats ont été représentés sur la figure III.126. Le résultat a révélé que tous les extraits testés présentent un effet anti-hémolytique de manière dépendante de la concentration. L'effet protecteur le plus élevé a été observé dans l'extrait de *n*-BuOH avec une valeur de concentration inhibitrice de l'hémolyse de 50% à $322,85 \pm 0,87 \mu\text{g ml}^{-1}$, suivi de l'extrait de chloroforme à $443,25 \pm 0,52 \mu\text{g ml}^{-1}$. L'extrait EP a présenté l'activité la plus faible avec un pourcentage de $19,51 \pm 0,17\%$ à la concentration de $800 \mu\text{g ml}^{-1}$.

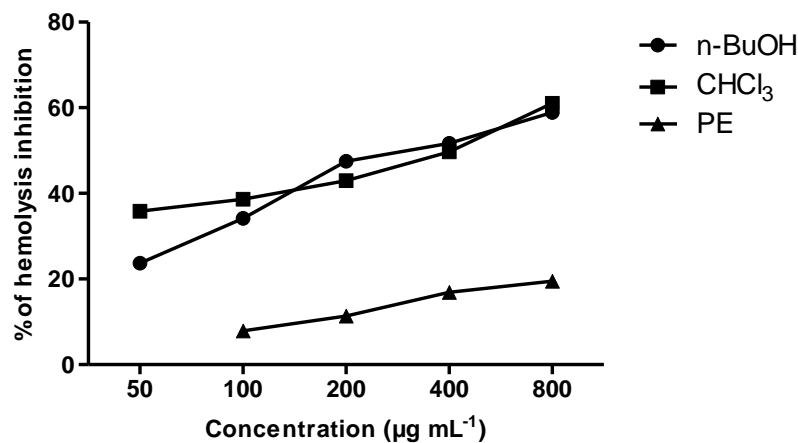


Figure III.126 : Effet anti-hémolytique d'extraits bruts de *Thymus algeriensis*

▪ Discussion

L'activité anti-hémolytique des extraits de *Thymus algeriensis* pourrait être liée à sa composition chimique, en particulier les flavonoïdes et les polyphénols. En effet, de nombreuses recherches antérieures ont montré que la présence de polyphénols et de flavonoïdes dans les extraits bruts améliore la stabilité de la membrane érythrocytaire et

inhibe l'hémolyse [194]. Cependant, le mécanisme d'action exact de la stabilisation de la membrane par l'extrait n'est pas encore élucidé [195]. En outre, de nombreuses études ont attribué l'effet anti-hémolytique des extraits bruts à la présence de métabolites secondaires ayant des activités antioxydantes en raison de leur capacité à piéger les radicaux libres [196].

III.5.1.5 Activité antibactérienne

Les extraits bruts (EP, CHCl₃ et *n*-BuOH) obtenus de l'espèce *T. algeriensis* ont exhibé une activité antibactérienne contre certaines souches bactériennes, par rapport aux antibiotiques de référence (ciprofloxacine et cotrimoxazole) et les résultats sont présentés dans le tableau III.20. Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré la résistance des deux souches *Pseudomonas aeruginosa* DMS 1117 et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 pour tous les extraits testés. Les extraits de *n*-BuOH et de EP présentaient une activité antibactérienne contre les souches *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Escherichia coli* ATCC 25922, mais l'extrait de chloroforme indique une activité seulement contre *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tableau III.20 : Activité antibactérienne d'extraits bruts de *Thymus algeriensis*.

Extraits / antibiotiques	Dilution (µg mL ⁻¹)	Zone d'inhibition (mm)			
		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> DMS 1117
EP	100	12 ± 0,3	-	9,5 ± 0,3	-
	50	10 ± 0,1	-	8 ± 0,1	-
	25	8 ± 0,1	-	-	-
	12,5	-	-	-	-
	6,25	-	-	-	-
MIC (µg mL ⁻¹)		25	NF	25	NF
CHCl ₃	100	-	-	8,0 ± 0,3	-
	50	-	-	-	-
	25	-	-	-	-
	12,5	-	-	-	-
	6,25	-	-	-	-
MIC (µg mL ⁻¹)		0.5	NF	50	NF
<i>n</i> -BuOH	100	15,0 ± 0,1	-	10,0 ± 0,3	-
	50	12,0 ± 0,2	-	8,0 ± 0,3	-
	25	10,0 ± 0,1	-	-	-
	12,5	8,0 ± 0,3	-	-	-
	6,25	-	-	-	-
MIC (µg mL ⁻¹)		12,5	NF	50	NF
Ciprofloxacine		NT	NF	32±1	34,66±2,52
Cotrimoxazole		NT	31,66±2,51	NF	29,33±2,51

Les valeurs exprimées sont des moyennes \pm SD de trois mesures ($p < 0,05$). (-) Pas de zones d'inhibition autour des disques. Antibiotique (Ciprofloxacine et Cotrimoxazole, volume testé égal à $10 \mu\text{g ml}^{-1} \times 10 \mu\text{l}$). NF: introuvable. NT: non testé. MIC: la concentration minimale inhibitrice.

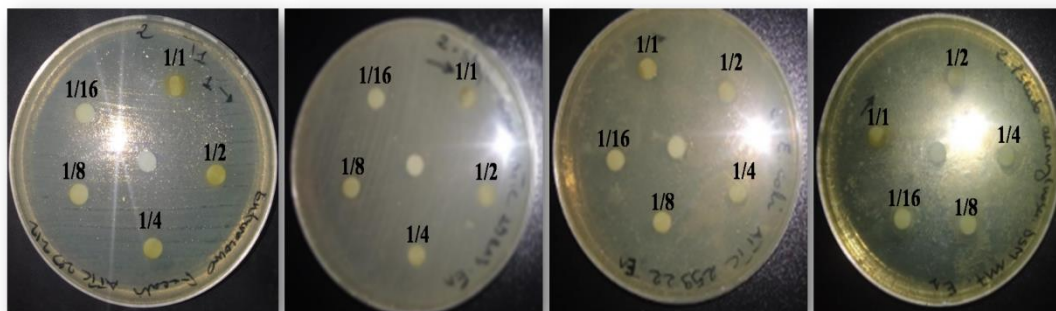


Figure III.127 : Effet de l'extrait EP de la plante *T. algeriensis* sur la croissance bactérienne

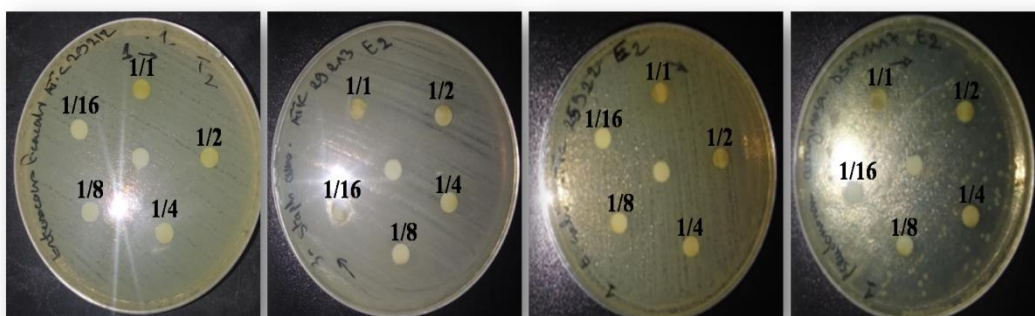


Figure III.128 : Effet de l'extrait CHCl_3 de la plante *T. algeriensis* sur la croissance bactérienne

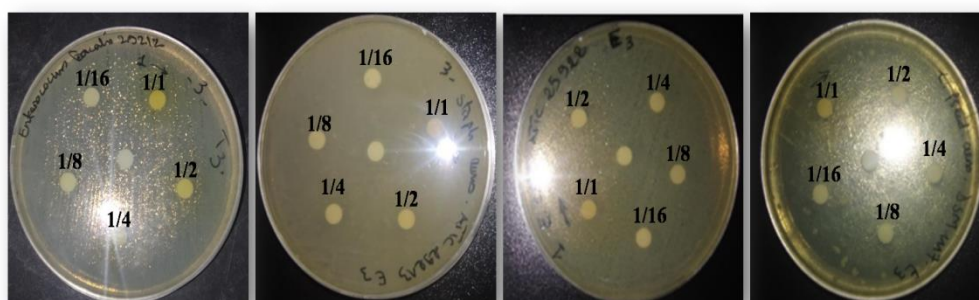


Figure III.129 : Effet de l'extrait *n*-BuOH de la plante *T. algeriensis* sur la croissance bactérienne

▪ Discussion

L'activité des différentes souches bactériennes n'est pas associée à la classification Gram positive ou Gram négative du fait que l'effet n'est pas lié à la paroi cellulaire. De nombreuses études menées sur l'activité antibactérienne de l'espèce *Thymus algeriensis* récoltée dans diverses régions d'Algérie, de Tunisie, de Libye et du Maroc ont rapporté que les huiles essentielles pouvaient être plus actives que les extraits bruts [197-201]. Alors que les extraits éthanoliques et méthanoliques obtenus de *T. algeriensis*, ont été testés contre plusieurs souches bactériennes, et les résultats ont montré une activité modérée par rapport aux résultats de notre étude [187,202]. L'activité antibactérienne des extraits organiques (EP, CHCl₃ et *n*-BuOH) pourrait être due à la présence de différentes classes de composés bioactifs isolés dans ce travail, tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques et les triterpénoïdes qui sont bien connus pour leurs propriétés antimicrobiennes [203,204].

III.5.2 Étude biologique de l'espèce *Diplotaxis eruroides*

III.5.2.1 Activité antibactérienne

Les extraits bruts (EP, AcOEt et *n*-BuOH) obtenus de l'espèce *D. eruroides* ont exhibé une activité antibactérienne contre certaines souches bactériennes, par rapport aux antibiotiques de référence (ciprofloxacine et cotrimoxazole) et les résultats sont présentés dans le tableau III.21.



Figure III.130 : Effet de l'extrait EP de la plante *D. eruroides* sur la croissance bactérienne



Figure III.131 : Effet de l'extrait AcOEt de la plante *D. eruroides* sur la croissance bactérienne

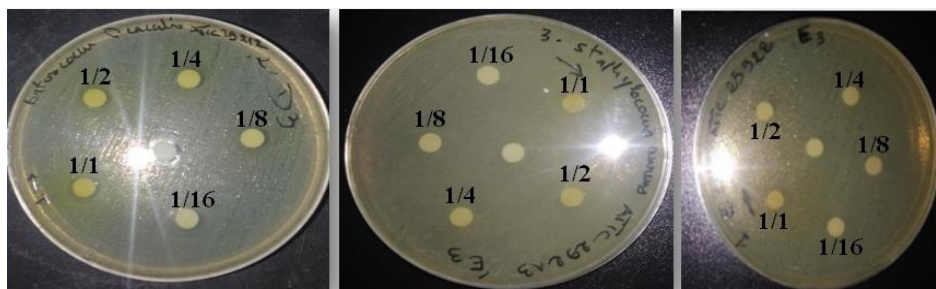


Figure III.132 : Effet de l'extrait *n*-BuOH de la plante *D. erucoides* sur la croissance bactérienne

Tableau III.21 : Activité antibactérienne d'extraits bruts de *Diplotaxis erucoides*.

Extraits / antibiotiques	Dilution ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> DMS 1117
EP	100	$9 \pm 0,2$	$8 \pm 0,2$	-
	50	$9 \pm 0,3$	-	-
	25	$8 \pm 0,5$	-	-
	12,5	$8 \pm 0,3$	-	-
	6,25	-	-	-
MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		6,25	50	NF
AcOEt	100	$9 \pm 0,8$	-	$8 \pm 0,5$
	50	-	-	-
	25	-	-	-
	12,5	-	-	-
	6,25	-	-	-
MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		50	NF	50
<i>n</i> -BuOH	100	-	-	$8 \pm 0,2$
	50	-	-	$8 \pm 0,3$
	25	-	-	$8 \pm 0,5$
	12,5	-	-	-
	6,25	-	-	-
MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		NF	NF	12,5
Ciprofloxacine		NF	32 ± 1	$34,66 \pm 2,52$
Cotrimoxazole		$31,66 \pm 2,51$	NF	$29,33 \pm 2,51$

▪ Discussion

La souche à Gram positif *Staphylococcus aureus* révèle des zones d'inhibition à différentes concentrations pour l'extrait EP et la Cotrimoxazole, mais elle n'a pas montré de zones d'inhibition à l'égard de l'extrait *n*-BuOH. De plus l'extrait AcOEt exerce un effet inhibiteur sur la croissance de cette bactérie.

Les deux extraits acétate d'éthyle et *n*-BuOH de la plante *Diplotaxis erucoïdes* n'ont montré aucun effet inhibiteur envers la croissance de la souche bactérienne à Gram négatif *Escherichia coli*.

L'activité antibactérienne réalisée sur l'extrait *n*-BuOH contre la souche à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa* montre exhibe la sensibilité de cette bactérie à différentes concentrations. Par contre, elle a présenté une résistance contre les extraits éther de pétrole et acétate d'éthyle.

On peut dire que ces résultats sont en accorde avec les travaux réalisés sur des espèces du genre *Diplotaxis*, dans lesquels ils ont montré bien l'activité de leurs extraits vis-à-vis de souches bactériennes à Gram + et Gram-. A titre d'exemple, les deux extraits hexane et AcOEt des feuilles et des fleurs de *Diplotaxis simplex* sont très actifs sur plusieurs souches comme : *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis*. Cependant, les extraits hexane des feuilles et AcOEt des feuilles et des racines de *Diplotaxis harra* ont révélé une inhibition de la croissance des bactéries *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* [73].

III.5.3 Conclusion

L'étude biologique de la plante médicinale *Thymus algeriensis* indique la présence des niveaux élevés de phénols et de flavonoïdes dans l'extrait *n*-butanol. Cet extrait a montré une forte activité antioxydante dans toutes les méthodes testées et a inhibé l'hémolyse de manière dose dépendante avec une valeur de CIH₅₀ à $322,85 \pm 0,87 \mu\text{g ml}^{-1}$. Tous les extraits bruts de cette plante empêchent la dénaturation des protéines de manière dépendante de la concentration. De plus, les extraits testés ont montré une activité antibactérienne contre les souches utilisées. En outre, les extraits (EP, CHCl₃, *n*-BuOH) exhibent un effet anti-hémolytique de manière dose dépendante. Cette activité des extraits de *T. algeriensis* peut être due à leurs puissantes propriétés antioxydantes, qui sont liées à leur richesse en contenus phénoliques et flavonoïdes. On peut conclure que les extraits de *Thymus algeriensis* pourraient être une source importante de composés bioactifs naturels contre les dommages pathologiques dus aux radicaux libres induisant des inflammations et des maladies infectieuses.

Par ailleurs, les résultats de l'activité antibactérienne de la plante *Diplotaxis eruroides* révèlent que l'extrait AcOEt n'a aucun effet inhibiteur envers la croissance de toutes les souches bactériennes testées. L'extrait EP de cette plante manifeste une activité antibactérienne seulement contre la souche *Staphylococcus aureus*, tandis que l'extrait *n*-BuOH présente une activité vis-à-vis de la souche *Pseudomonas aeruginosa*.

CONCLUSION

Conclusion

Le travail présenté dans cette thèse porte particulièrement sur l'investigation chimique et biologique de deux plantes médicinales de la flore des Aurès nommées *Thymus algeriensis* L. et *Diplotaxis eruroides* DC. appartenant aux familles Lamiaceae et Brassicaceae respectivement. En fait, cette étude a pour objectif principal la recherche de nouveaux métabolites secondaires, la détermination de leurs structures chimiques et l'évaluation *in vitro* des activités biologiques telles que antioxydante, anti-inflammatoire, antihémolytique et antibactérienne.

La macération hydroalcolique des parties aériennes des plantes *Thymus algeriensis* et *Diplotaxis eruroides* suivie de l'extraction liquide-liquide par divers solvants à polarité croissante ont conduit à préparer plusieurs extraits organiques à savoir éther de pétrole, chloroforme et *n*-butanol à partir de la plante *T. algeriensis* et éther de pétrole, acétate d'éthyle et *n*-butanol de l'espèce *D. eruroides*.

L'étude chimique réalisée sur les extraits chloroformique et *n*-butanolique de l'espèce *Thymus algeriensis*, a abouti à l'isolement par les méthodes chromatographiques (VLC, CC, CCE) de 10 composés naturels constitués de quatre flavonoïdes, quatre acides phénoliques et deux triterpènes.

L'analyse chromatographique des extraits acétate d'éthyle et *n*-butanolique de *Diplotaxis eruroides*, a mené à l'isolement de 8 métabolites secondaires se répartissant en deux flavonoïdes dont un nouveau, trois terpènes dont un monoterpène et deux triterpènes, un dérivé du coumaroyl et deux monoglycérolipides.

L'identification des métabolites secondaires isolés **1-18** est rendue possible grâce à l'analyse combinatoire des spectres obtenus des différentes méthodes d'analyses spectroscopiques particulièrement la RMN 1D (¹H, ¹³C) et 2D (COSY H-H, HSQC, HMBC), la spectroscopie de masse ESI-MS et la spectrophotométrie UV-Vis, la mesure du pouvoir rotatoire [α]_D et la comparaison avec les données de la littérature.

Le dosage des polyphénols et des flavonoïdes totaux des extraits EP, CHCl₃ et *n*-BuOH obtenus à partir de plante *Thymus algeriensis* par les méthodes de Folin-Ciocalteu et du trichlorure d'aluminium respectivement, montre que l'extrait *n*-BuOH est le plus riche en polyphénols et flavonoïdes totaux par rapport aux autres extraits EP et CHCl₃.

L'étude de l'activité antioxydante des extraits issus de l'espèce *Thymus algeriensis* selon cinq méthodes a révélé que l'extrait *n*-BuOH possède une forte activité antioxydante dans toutes les méthodes testées et inhibe l'hémolyse de manière dose-dépendante avec une valeur de CIH₅₀ à $322,85 \pm 0,87 \mu\text{g} / \text{ml}$. L'activité anti-inflammatoire *in vitro* a été évaluée par le test de dénaturation de l'albumine d'œuf. Tous les extraits bruts empêchent la dénaturation des protéines de manière dépendante de la concentration.

En effet, la bonne activité antihémolytique de *T. algeriensis* peut être due à ses puissantes propriétés antioxydantes, qui sont liées à sa richesse en composés phénoliques et flavonoïdes. Il en résulte que les extraits de *Thymus algeriensis* pourraient être une source importante de composés bioactifs naturels contre les dommages pathologiques dus aux radicaux libres induisant des inflammations et des maladies infectieuses.

L'activité antibactérienne des extraits EP, CHCl₃ et *n*-BuOH obtenus de l'espèce *Thymus algeriensis* et EP, AcOEt et *n*-BuOH issus de la plante *Diplotaxis eruroides* ainsi que la ciprofloxacine et la cotrimoxazole comme contrôles positifs, a été estimée par la méthode de diffusion des disques en milieu gélosé contre quatre bactéries dont 2 Gram- (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) et 2 Gram+ (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*).

Parmi les extraits testés, ceux de l'espèce *T. algeriensis* ont montré une activité antibactérienne contre la plupart des souches employées, avec des zones d'inhibition allant de 8 à 15 mm, par contre les extraits préparés de la plante *D. eruroides* manifestent une activité antibactérienne modérée contre la plupart des souches testées.

Le travail effectué dans cette thèse s'est étendu sur plusieurs axes de recherche, ce qui justifie que certains aspects n'ont pas été traités d'une façon très profonde. Plusieurs recommandations et perspectives peuvent faire l'objet d'un travail futur. Nous citons comme exemple :

- L'évaluation des activités biologiques des métabolites secondaires isolés.
- L'étude de l'activité antioxydante et l'activité anti-inflammatoire des extraits de l'espèce *Diplotaxis eruroides*.
- L'évaluation des activités biologiques *in vivo* (activité antioxydante, activité anti-inflammatoire, activité antiulcéreuse,).

BIBLIOGRAPHIE

1. Zhang, Y., Wang, Z.Z., 2009. Phenolic composition and antioxidant activities of two *Phlomis* species: a correlation study. *Comptes Rendus Biologies*. 332, 816–826. doi: 10.1016/j.crv.2009.05.006.
2. Médail, F. & Quézel, P. 1997. Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean basin. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 84:112-127. doi: 10.2307/2399957.
3. Dobignard A., Chatelain C. 2010-2013. Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord(4 vol.), Genève, C.J.B.G.
4. Baba Aissa F. 1999. Encyclopédie des plantes utiles (Flore d'Algérie et du Maghreb). Substances végétales d'Afrique, d'Orient et d'Occident, Ed. Edas, 178 p.
5. Azzi, R., Djaziri, R., Lahfa, F., Sekkal, F. Z., Benmehdi, H., Belkacem, N., 2012. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6(10) : 2041-2050.
6. Tigrine-Kordjani, N., Meklati, B.Y., Chemat, F., 2006. Analysis by gas chromatography–mass spectrometry of the essential oil of *Zygophyllum album* L., an aromatic and medicinal plant growing in Algeria. *The International Journal of Aromatherapy*.16 : 187–191.
7. Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I., Ricardo, C. C., Fernandes, Â., Marković, T., Marković, D., Giweli, A., Marina Soković, M., 2014. *Industrial Crops and Products*. 52 : 183-190.
8. Sans, F. X., Masalles, R. M., 1994. Life-history variation in the annual arable weed *Diplotaxis eruroides* (Cruciferae). *Journal canadien de botanique*. 72(1): 10-19
9. Bailey, C.D., Marcus A. K., Mayer, M., Klaus Mummenhoff, K., Steve L. O'Kane, S.L., Warwick, S. I., Windham, M.D., Al-Shehbaz. I.A., 2006. Toward a Global Phylogeny of the Brassicaceae. *Molecular Biology and Evolution*. 23 (11) : 2142–2160.
10. Heywood, V.H., Brummitt, R.K., Culham, A., Seberg, O., 2007. *Flowering Plant Families of the World*. Kew: Royal Botanic Gardens. 23-339.
11. Quézel, P., Santa, S., 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Vol. 1–2. CNRS, Paris, France.
12. Ozenda, P., 1991. Flore et végétation du Sahara. In: CNRS (2ème Ed.), Paris, France.
13. Klauđija, C. S., Marko, P., Martina, G., Jasna, P., Dalibor, B., Mirjana, H. Č., Zlatko, S., 2016. Medicinal Plants of the Family Lamiaceae as Functional Foods – a Review *Czech. Journal of Food Sciences*. 34 (5): 377-390.

14. Kokkini, S., Hanlidou, E., 2003. Herbs of the Labiatae. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition) Pages 3082-3090 HERBS.
15. Naghibi, F., Mosaddegh, M., Mohammadi Motamed, S., Ghorbani, A., 2005. Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. Iran, Journal of Pharmacy Research. 2 : 63-79.
16. Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G., 2010. Volatiles from *Thymbra* and *Thymus* species of the western Mediterranean basin, Portugal and Macaronesia. Natural Product Communications. 5 : 1465–1476.
17. Nabavi, S.M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., Nabavi, S.F., 2015. Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: from farm to pharmacy. Food Chemistry. 173 : 339–347.
18. Boutaoui, N., Zaiter, L., Benayache, F., Benayache, S., Carradori, S., Cesa, S., Giusti, A.M., Campestre, C., Menghini, L., Innosa, D., Locatelli, M., 2018. Qualitative and Quantitative Phytochemical Analysis of Different Extracts from *Thymus algeriensis* Aerial Parts. Molecules. 23 (2) : 463-474.
19. El oualilalami, A., El-akhal, F., Ouerhiri, W., Ouazzani, C. F., Guemmouh, R., Grechen, H., 2013. *Thymus* essential oils (*Thymus vulagris* and *Thymus satureioidis*) from center of Morocco: chemical composition and antimicrobial activity. les technologies de laboratoire. 31 (8): 27-33.
20. Benayache S., Benayache F., 2013. Étude phytochimique et biologique de l'espèce *Thymus numidicus* Poiret, Mémoire de magister en chimie organique, Université Constantine1.
21. Hans, W.K., 2007. 1000 plantes aromatiques et médicinales. Terres édition.
22. Petersen, M., Simmonds, M.S.J., 2003. Molecules of Interest, Rosmarinic acid. Phytochemistry. 62 : 121-125.
23. Olívia, R. P., Susana, M. C., 2013. Overview on *Mentha* and *Thymus* Polyphenols. Current Analytical Chemistry. 9 (3) : 382-396
24. Jabri K, I., Bettaiaieb, I., Msaada, K., Hammami, M., Marzouk, B., 2012. Research on the phenolic compounds and antioxidant activities of Tunisian *Thymus capitatus*. Journal of Functional Food. 4 : 661-669.
25. Angela, M., Laur, V., Daniela, H., Dragulescu, C., Iuliana, A., Olah, N.K., 2008. Polyphenolic analyses from *Thymus* species. Production romany academy. 3 : 117-121.

26. Boros, B., Jakabova, S., Dorneyi, A., Horvath, G., Pluhar, Z., Kilar, F., Felinger, A., 2010. Determination of polyphenolic compounds by liquid chromatography-mass spectrometry in *Thymus* species. *Journal of Chromatography A*. 1217 : 7972-7980.
27. Mariana, P., Laurian, V., 2007. Study of polyphenols from the species *Thymus pulegioides* L. (Lamiaceae). *Farmacia-Bucuresti*. 55(3) : 297-302.
28. Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Khalel, K.I., 2013. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and compounds in thym (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*. 43: 827-831.
29. Shahid, A., Muhammad, I., Habib-ur-Rehman., 2014. Isolation of a new antibacterial polyphenol from *Thymus serpyllum*. *Chemistry of Natural Compounds*. 49(6) : 549-623.
30. Kabouche, A., 2005. Etude phytochimique de plantes médicinales appartenant à la famille des Lamiaceae. Thèse de Doctorat en Chimie, Département de Chimie, Université Mentouri-Constantine.
31. Merghem, R., Jay, M., Viricel, M.R., Bayet, C., Voirin, B., 1995. Five 8-C-benzylated flavonoids from *Thymus hirtus* (Labiatae). *Phytochemistry*. 38 (3):637-640
32. Benkiniouar, R., Touil, A., Zaidi, F., Rhouati, S., Chosson, E., Seguin, E., Comteg, F., Bellvert, F., 2010. Isolation and identification of five free flavonoïde aglycones from *Thymus numidicus*. *Journal of the Algerian Chemical Society*. 20 (1):11-15.
33. Ismaili, H., Sosa, S., Brkic, D., Fkih-Tetouani, S., Ildrissi, A., Touat, D., Aquino, R.P., Tubaro, A., 2002. Topical ant-inflammatory activity of extracts and compounds from *Tymus broussonetti*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 54 : 1137-1140.
34. Ismaili, H., Tortora, S., Sosa, S., Fkih-Tetouani, S., Ildrissi, A., Della, L.R., Tubaro, A., Aquino, R., 2001. Topical ant-inflammatory activity of *Tymus willdenowii*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 53:1645-1652.
35. Barberán, F.A.T., Hernández, L., Tomás, F., 1986. A chemotaxonomic study of flavonoids in *Thymbra capitata*. *Phytochemistry*. 25: 561-562.
36. Miura, K., Kikuzaki, H., Nakatani, N., 2002. Antioxidant Activity of Chemical Components from Sage (*Salvia officinalis* L.) and Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Measured by the Oil Stability Index method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (7): 1845-1851.
37. Miura, K., Nakatani, N., 1989. Antioxidant Activity of flavonoids from Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Agricultural and Biological Chemistry*. 53: 3043-3045.

38. Ferreres, F., Tomas, F., Barberan, F.A.T., Hernandez, L., 1985. Free flavones aglcones from *T. membranaceus* Boiss. Subsp. *Membranaceus*. *Plantes Medicinales Phytotherapie*. 19 : 89-97.
39. Regnault-Roger, C., Ribodeau, M., Hamraoui, A., Bareau, I., Blanchard, P., Gil-Munoz, M.I., Thomas, B., 2004. Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientional effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research*. 40 (4): 395–408.
40. Morimitsu, Y., Yoshida, K., Esaki, S., Hirota, A., 1995. Protein glycation inhibitors from thyme (*Thymus vulgaris*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 59 : 2018-2021.
41. Corticchiato, M., Bernardini, A., Costa, J., Bayet, C., Saunois, A., Voirin, B., 1995. Free flavonoid aglycones from *Thymus Herba Barona* and its monoterpenoid chemotypes. *Phytochemistry*. 40 (1) : 115–120.
42. Guillén, M. D., Manzanos, M. J., 1998. Study of the composition of the different parts of a Spanish *Thymus Vulgaris* L. plant. *Food Chemistry*. 63 (3) : 373-383.
43. Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F., Tomas, B., Francisco, A., 1997. Flavonoid Composition of Tunisian Honeys and Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45 (8) : 2824-2829.
44. Benkiniouar, R., Rhouati, S., Touil, A., Seguin, E., Chosson, E., 2007. Flavonoids from *Thymus algeriensis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 43 (3): 321-322.
45. Barberan, F.A.T., Hernandez, L., Ferreres, F., Tomas, F., 1985. Highly Methylated 6-Hydroxyflavones and Other Flavonoids from *Thymus piperella*. *Planta Medica*. 51 (5): 452-454.
46. Takeuchi, H., Lu, Z. G., Fujita, T., 2004. New Monoterpene Glucoside from the Aerial Parts of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 68 (5): 1113- 1134.
47. Shahid, A., HABIB, U.R., 2008. Studies on the Chemical Constituents of *Thymus Serpyllum*. *Turkish Joirnal of Chemistry*. 32: 605 – 614.
48. Miloš, N., Jasmina, G., Isabel, C.F., Ricardo C.C., Ângela, F., Tatjana, M., Dejan, M., Abdulhamed, G., Marina, S., 2014. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*. 52 : 183-190.
49. Giweli, A. A., Džamic, A. M., Sokovic, M. D., Ristić, M. S., Marin, P. D., 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of

- Thymus algeriensis* wild-growing in Libya. Central European Journal of Biology. 815: 504-511.
50. Quezel P., Santa, 1963. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome2.
 51. Elisabeth, S. B., Francisco, S., 2019. Thyme (the genus *Thymus*). Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles.
 52. Ouakouak, H., Benarfa, A., Messaoudi, M., Begaa, S., Sawicka, B., Benchikha, N., Simal-Gandar, J., 2021. Biological Properties of Essential Oils from *Thymus algeriensis* Boiss. Plants. 10: 786-807.
 53. El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Amarti, F., Rahouti, M., Aafi, A., Ismaili M.R., Farah, A., 2010. Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. contre les champignons de pourriture du bois. Acta Botanica Gallica. 157 (2): 285-294.
 54. Boutaoui, N., Zaiter L., Benayache, F., Benayache, S., Carradori, S., Cesa, S., Anna Giusti, M., Campestre, C., Menghini, L., Innosa, D., Locatelli, M., 2018. Qualitative and Quantitative Phytochemical Analysis of Different Extracts from *Thymus algeriensis* Aerial Parts. Molecules. 23: 463-474.
 55. Zhaohai, W., Bie, T., Yanhong, L., James, D., Patricia, M. G., Marta, T., Zhijun, C., Peng, J., 2019. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Essential Oils from Peppermint, Native Spearmint and Scotch Spearmint. Molecules.24:2825-2841.
 56. Fatiha, A., Badr, S., Mohamed, G., Abdellah, F., Abderrahman, A., Lotfi, A., Mustapha, E. A., Abdelaziz, C., 2010. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. du Maroc. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement. 14(1): 141-148.
 57. Toure, D., 2015. Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire. Doctorat des Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY. 9 p.
 58. Kebbi, S., Fadel, H., Chalchat, J.C., Figueredo, G., Chalard, P., Hazmoune, H., Benayache, F., Benayache, S., Seghiri, R., 2020. Chemical Composition of Algerian *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. and *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae) Essential Oils from the Aures Region. Acta Scientifica Naturalis. 7 (2): 1-14.
 59. Giordani, R., Hadeif, Y., Kaloustian, J., 2008. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. Fitoterapia. 79 : 199-203.

60. Tamokou, J. D. D., Mbaveng, A. T., Kuete, V., 2017. Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables. Medicinal Spices and Vegetables from Africa. P : 207– 237.
61. Naser, A. A., Iqbal, A., Eduarda, M. P., Armando, C.D., Shahid, U., Nafees, A. K., 2012. The Plant Family Brassicaceae.
62. Emad, M. A., Ahmed, I. H., Ahmed, M. A., Salah, M. E., Marsyl, J., Eman, R. E.S., 2011. Phytochemical studies on *Diplotaxis harra* growing in Sinai. European Journal of Chemistry. 2 (4): 535-538.
63. Montaut, S., Rollin, P., De Nicola, G.R., Iori, R., Tatibouët, A., 2012. Composés bioactifs des Crucifères : un apport bénéfique dans notre quotidien. Phytothérapie. 10: 342-349.
64. Attaa, E. M., Hashem, A. I., Ahmed, M. A., Salah, M. E., Marsyl, J., El-Sharkawc, E. R., 2011. Phytochemical studies on *Diplotaxis harra* growing in Sinai. European Journal of Chemistry. 2 (4): 535-538.
65. El Hilah, F., Ben Akka, F., Dahmani, J., Belahbib, N., Zidane, L., 2015. Étude ethnobotanique des plantes médicinales utilisées dans le traitement des infections du système respiratoire dans le plateau central marocain. Journal of Animal and Plant Sciences. 25 (2): 3886-3897.
66. Bellakhdar, J., 1997. La pharmacopée marocaine traditionnelle. Médecine arabe ancienne et savoir populaire, Ibis presse. 213-224.
67. Zhen-Huan, L., Shoji, Y., Toshihiro, N., Tai-Bao, S., Jin-Zhe, X., 1998. Cardiacglycosides from *Erysimum cheiranthoides*. Phytochemistry. 49 (6): 1801-1803.
68. Grillo, O., Draper, D., Venora, G., Martinez-Laborde, J.B., 2012. Seed image analysis and taxonomy of *Diplotaxis* DC. (Brassicaceae, Brassicaceae). Systematics and Biodiversity. 10 (1): 57–70.
69. D'Antuono, L. F., Elementi, S., Neri, R., 2008. Glucosinolates in *Diplotaxis* and *Eruca* leaves: Diversity, taxonomic relations and applied aspects. Phytochemistry. 69: 187-199.
70. Ben Salah, N., Casabianca, H., Ben Jannet, H., 2015. Phytochemical and biological investigation of two *Diplotaxis* species growing in Tunisia: *D. virgata* & *D. eruroides*. Molecules. 20 : 18128-18143.
71. Hashem, F.A., Saleh, M.M., 1999. Antimicrobial Components of Some *Cruciferae* Plants (*Diplotaxis harra* Forsk. and *Erucaria microcarpa* Boiss.). Phytotherapy Research. 13: 329-332.

72. Mohammed, M.M.D., El-Sharkawy, E.R., Matloub, A.A., 2011. Cytotoxic flavonoids from *Diploaxis harra* (Forssk.) Boiss. growing in Sinai. *Journal of Medicinal Plant Research*. 7 (1): 19-23.
73. Atta, E. M., Hashem, A. I., Ahmed, A. M., Elqosy. S. M., Jaspars. M., El-Sharkaw. E. R., 2011. Phytochemical studies on *Diploaxis harra* growing in Sinai. *European Journal of Chemistry*. 2 (4) : 535-538.
74. Falleh, H., Msilini, N., Oueslati, S., Ksouri, R., Magne, C., Lachaal, M., Karray-Bouraoui, N., 2013. *Diploaxis harra* and *Diploaxis simplex* organs: Assessment of phenolics and biological activities before and after fractionation. *Industrial Crops and Products Journal*. 45: 141-147.
75. Kassem, M.E.S., Afifi, M.S., Marzouk, M.M., Mostafa, M.A., 2013. Two new flavonol glycosides and biological activities of *Diploaxis harra* (Forssk.) Boiss. *Natural Product Research*. 27 (24): 2272-2280.
76. Nasri, I., Chawech, R., Girardi, C., Mas, E., Ferrand, A., Vergnolle, N., Fabre, N., Mezghani-Jarraya, R., Racaud-Sultan, C., 2017. Anti-inflammatory and anticancer effects of flavonol glycosides from *Diploaxis harra* through GSK 3 β regulation in intestinal cells. *Pharmaceutical Biology*. 55: 124–131.
77. Hussein, S.R., Marzouk, M.M., Kassem, M.E., Abdel Latif, R.R., Mohammed, R.S., 2017. Chemosystematic significance of flavonoids isolated from *Diploaxis acris* (Brassicaceae) and related taxa. *Natural Product Research*. 31: 347–350.
78. Dai, J., Mumper, R. J., 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxydant and Anticancer Propreties. *Molecules*. 15 (10): 7313-52.
79. Rong, T., 2010. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. *Nutrients Journal*. 2 :1231-1246.
80. Cheynier, V., Sarni-Manchado, P., 2006. Les polyphénols en agroalimentaire. Lavoisier Techniques and Documentation, Paris. p : 50-59.
81. Bruneton. J., 1993. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4^{ème} édition, Lavoisier, Paris, France.
82. Beta, T., Nam, S., Dexter, J.E., Sapirstein, H.D., 2005. Phenolic Content and antioxidant activity of Pearled Wheat and Roller-Milled fractions. *Cereal Chemistry*. 82 (4) : 390-393.
83. Hoffmann, L., Besseau, S., Geoffroy, P., Ritzenthaler, C., Meyer, D., Lapierre, C., Pollet, B., Legrand, M., 2004. Silencing of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A

- Shikimate/Quinate Hydroxycinnamoyltransferase Affects Phenylpropanoid Biosynthesis. *The Plant Cell*. 16: 1446-1465.
84. Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H., 2006. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing.
85. Ghedira, K., 2005. Les flavonoïdes: structure, propriétés biologiques, rôle prophylactique et emplois en thérapeutique. *Phytotherapie*. 3 (4): 162-169.
86. Bruneton, J., 1999. *Pharmacognosie : Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3^{ème} édition, Lavoisier Techniques and Documentation, Paris.
87. Tomas-Barberan, F.A., Ferreres, F., Gil, M.L., 2000. Antioxidant phenolic metabolites from fruit and vegetables and changes during postharvest storage and processing. *Studies in Natural Products Chemistry*. 23 : 739-795.
88. Del Rio, D., Stalmach, A., Calani, L., Crozier, A., 2010. Bioavailability of coffee chlorogenic acids and green tea flavan-3-ols. *Nutrients*. 2 (8) : 820-833.
89. Fraga, C.G., 2009. *Plant phenolics and human health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology*. John Wiley & Sons Edition. P: 5-13.
90. Richter, G., 1993. *Métabolisme des végétaux, physiologie et biochimie*. p : 333.
91. Middleton, E., Kandaswami, C., Harborne, J., 1993. *The flavonoids: advances in research since 1986*. Chapman & Hall/CRC, New York.
92. Eckermann, C., Schröder, G., Eckermann, S., Strack, D., Schmidt, J., Schneider, B., Schröder, J., 2003. Stilbenecarboxylate biosynthesis: a new function in the family of chalcone synthase-related proteins. *Phytochemistry*. 62 (3), 271-286.
93. Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., 2006. *Les polyphénols en agroalimentaire*, Lavoisier Techniques and Documentation, Paris. P : 300-398.
94. Seeram, N.P., Henning, S.M., Zhang, Y., Suchard, M., Li, Z., Heber, D. 2006. Pomegranate juice ellagitannin metabolites are present in human plasma and some persist in urine for up to 48 hours. *The Journal of nutrition*. 136 (10) : 2481-2485.
95. Uthurry, C.A., Hevia, D., Gomez-Cordoves, C., 2011. Role of honey polyphenols in health. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 3 (4): 141-159.
96. Sharma, B., Viswanath, G., Salunke, R., Roy, P., 2008. Effects of flavonoid-rich extract from seeds of *Eugenia jambolana* (L.) on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic mice. *Food Chemistry*. 110 (3): 697-705.
97. Mercader, A.G., Duchowicz, P.R., Fernandez, F.M., Castro, E.A., Bennardi, D.O., Autino, J.C., Romanelli, G.P., 2008. QSAR prediction of inhibition of aldose reductase for flavonoids. *Bioorgan and Medicinal Chemistry*. 16 (15) : 7470–7476.

98. Cushine, T.T.P., Lamb, A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26 (5) : 343-356.
99. Hooper, L., Kroon, P.A., Rimm, E.B., Cohn, J.S., Harvey, I., Le Cornu, K.A., Ryder, J.J., Hall, W.L., Cassidy, A., 2008. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 88 (1) : 38-50.
100. Lotito, S.B, Frei, B. 2006. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon. *Free Radical Biology and Medicine*. 41 (12) : 1727-1746.
101. Yochum, L., Kushi, L.H., Meyer, K., Folsom, A.R., 1999. Dietary Flavonoid Intake and Risk of Cardiovascular Disease in Postmenopausal Women. *American Journal of Epidemiology*. 149 (10): 943-949.
102. Arts, I.C., Hollman, P.C., Feskens, E.J., 2001. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 74 (2) : 227-232.
103. González, A.G., Rodríguez, Pérez, E.M., Padrôn, C.H., Bermejo, J., 1997. Phytochemical Investigation of Canary Island lichens. *Virtual activity, and Pharmacology*. P: 49-60.
104. Mitaine-Offer, A.C., Tapondjou, L.A., Djoukeng, J.D., Bouda, H., Lacaille-Dubois, M.A., 2003. Glycoside derivatives of scopoletin and β -sitosterol from *Hymenodictyon floribundum*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 31: 227-228.
105. McGarvey, D.J., Croteau, R., 1995. Terpenoid metabolism. *The Plant Cell*. 7: 1015-1026.
106. Lamrati, A., Badoc, A., Deffieux, G., Carde, J. P., 1994. Biogénèse des monoterpènes II-La chaîne isoprénique. *Bulletin de la Société Pharmacie de Bordeaux*. 133 : 79-99.
107. Seigler, D.S., 1998. *Plant Secondary Metabolism*. P: 427-428.
108. Boiteau, P., 1964. *Les triterpénoïdes en physiologie végétale et animale*. Gauthier Villars, France.
109. Goodwin, T.W., 1971. Biosynthesis of Carotenoides and Plant Triterpenes. *Biochemical Journal*. 123 : 293-329.
110. Eberhard, B., 2006. *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co.KGaA.

111. Ramesh, N.R., Menghani, S., Deweshri, K., Pramod, B.K., 2017. Progress in Synthesis of Monoglycerides for Use in Food and Pharmaceuticals. *Journal of Experimental Food Chemistry*. DOI:10.4172/2472-0542.1000128.
112. Devinat, G., Coustille, J.L., 1983. Re-esterification on a pilot scale of the fatty acids of Colza and soybean. *Revue Francaise des Corps Gras*. 30: 463-468.
113. Swern, D., 1979. *Industrial Oil and Fats Products*. 5th ed. John Wiley and Sons New York. P: 497-601.
114. Sonntag, N.O.V., 1982. Glycerolysis of fats and methylesters-Status, review and critique. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 59: 795-802.
115. Gross, A.T., Feuge, R.O., 1949. Modification of vegetable oils. VIII. Conversion of monoesters of peanut oil fatty acids to triglycerides. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 26: 704.
116. Sagalowicz, L., Leser, M.E., Watzke, H.J., Michel, M., 2006. Monoglyceride selfassembly structures as delivery vehicles. *Trends in Food Science and Technology*. 17: 204-214.
117. Ferreira-Dias, S., Correia, A.C., Fonseca, M.M.R., 2003. Response surface modelling of glycerolysis catalysed by *Candida rugosa* lipase immobilized in different polyurethane foams for the production of partial glycerides. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 21: 71-80.
118. Mouffouk, S., Gómez-Ruiz, S., Benkhaled, M., Carralero, S., Haba, H., 2019. Phytochemical composition, antioxidant and antibacterial activities of crude extracts from the species *Euphorbia atlantica* Coss. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 53(9): 831-837.
119. Mouffouk, C., Hambaba, L., Haba, H., Mouffouk, S., Bensouici, C., Hachemi, M., Khadraoui, H., 2018. Acute toxicity and *in vivo* anti-inflammatory effects and *in vitro* antioxidant and anti-arthritic potential of *Scabiosa stellata*. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*. 18 (4): 335–348.
120. Sunmathi, D., Sivakumar, R., Ravikumar, K., 2016. *In vitro* Anti-inflammatory and antiarthritic activity of ethanolic leaf extract of *Alternanthera sessilis* (L.) R. BR. ex DC and *Alternanthera philoxeroides* (Mart.) Griseb. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biology and Chemistry*. 5 (2):109-115.
121. Avaligbe, C.T., Gbenou, J.D., Kpoviessi, D.S., Accrombessi, G., Moudachirou, M., Gbeassor, M. 2012. Antihemolytic properties of extracts of six plants used in the

- traditional treatment of sickle cell disease in Benin. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2 (3): 8-13.
122. Kolak, U., Hacibekiroglu, I., Ozturk, M., Ozgokce, F., TOPCU, G., Ulubelen, A., 2009. Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocolata*. *Turkish Journal of Chemistry*. 33 : 813 – 823.
123. Chirikova N.K., Olennikov D.N. 2018. Phenolic compounds from siberian species *Thymus baicalensis* and *T. sibiricus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 54 (3): 572-576.
124. Rashid, M.A., Armstrong, J.A., Gray, A.I., Waterman, P.G., 1992. Alkaloids, Flavonoids and Coumarins from *Drummondita hassellii* and *D. calida*. *Phytochemistry*. 31 (4): 1265-1269.
125. Pareek, A., Manish, S., Garvendra, S.R., Vijay, B., 2011. Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review. *Pharmacognosy Review*. 5 (9) : 103-110.
126. Cárdenas, J., Reyes-Pérez, V., Hernández-Navarro, M.D., Dorantes-Barrón, A.M., Almazán, S., Estrada-Reyes, R., 2017. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of an aqueous extract of *Tanacetum parthenium* L. Schultz-Bip (Asteraceae) in mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 200: 22–30.
127. Roy, D.C., Shaik, M.M., 2013. Toxicology, Phytochemistry, Bioactive compounds and Pharmacology of *Parthenium hysterophorus*. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 1 (3): 126-141.
128. Kavtaradze. N., Alaniya. M., Pichette. A., Mshvildadze. V., 2021. Apigenin Glycosides from *Astragalus galegiformis*. *Chemistry of Natural Compounds*. 57: 156-157.
129. Arun, P., Amol, T., Darshan, T., 2015. Preparation, development and validation of uv spectrophotometric method for the estimation of apigenin in apigenin–hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC) complex original article. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 7 (3) : 228-231.
130. Martin, T.S., Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Nakatani, N., 2000. Constituents of *Amomum tsao-ko* and their radical scavenging and antioxidant activities. *Journal of the American Oil Chemist’s Society*. 77 (6) : 667-673.
131. Raveena, D., Patil P.J., Gaikwad, S.G., 2017. A Literature Review on the Synthesis of parahydroxybenzoic Acid. *International Journal for Research & Development in Technology*. 8 (3) : 2349-3585.

132. Tukiran, T., Fitriyatul, M., Nurul, H., Kuniyoshi, S., 2016. A phenolic acid and its antioxidant activity from stem bark of chloroform fraction of *Syzygium littorale* (Blume) Amshoff (Myrtaceae). *Molekul*. 11 (2) : 180-189.
133. Swisłocka, R., Piekut, J., Lewandowski, W., 2013. The relationship between molecular structure and biological activity of alkali metal salts of vanillic acid: Spectroscopic, theoretical and microbiological studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 100: 31-40.
134. Xiao-Peng, C., Wei, L., Xue-Feng, X., Lan-Lan, Z., Chang-Xiao, L., 2013. Phytochemical and pharmacological studies on *Radix Angelica sinensis*. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 11 (6): 577–587.
135. KASSI, A.B.B., Soro, Y., Fante, B., Golly, K.J., Sorho, S., Toure, A.S., Coustard, J.M., 2014. Isolation and identification of bioactive compounds from kernel seed cake of the mango (*Mangifera indica* Lam). *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 8 (4): 1885-1895.
136. Faried, A., Kurnia, D., Faried, L.S., Usman, N., Miyazaki, T., Kato, H., Kuwano, H., 2007. Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *International Journal of Oncology*. 30: 605-613.
137. Al-Musayeb, N., Perveen, S., Fatima, I., Nasir, M., Hussain, A., 2011. Antioxidant, antiglycation and anti-inflammatory activities of phenolic constituents from *Cordiasinensis*. *Molecules*. 16: 10214-10226.
138. Shahi, A., Irshad, M., Habib-ur-Rehman. 2013. Isolation of a new antibacterial polyphenol from *Thymus serpyllum*. *Chemistry of Natural Compounds*. 49 (6) : 1023-1027.
139. Petersen, M., Simmonds, M.S.J., 2003. Rosmarinic acid. *Phytochemistry*. 62 (2) : 121-125.
140. Scarpati, M., Oriente, G., 1958. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *Rosmarinus off*). *Journal of Rice Science*. 28: 2329-2333.
141. Rocha, J., Eduardo-Figueira, M., Barateiro, A., Fernandes, A., Brites, D., Bronze, R., Duarte, C. M., Serra, A. T., Pinto, R., Freitas, M., 2015. Anti-inflammatory Effect of Rosmarinic Acid and an Extract of *Rosmarinus officinalis* in Rat Models of Local and Systemic Inflammation. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 116 : 398–413.

142. Domitrović, R., Škoda, M., Vasiljev Marchesi, V., Cvijanović, O., Pernjak Pugel, E., Štefan, M.B., 2013. Rosmarinic acid ameliorates acute liver damage and fibrogenesis in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Food and Chemical Toxicology*. 51: 370-378.
143. Li, G.-S., Jiang, W.-L., Tian, J.-W., Qu, G.-W., Zhu, H.-B. and Fu, F.-H. (2010). In vitro and in vivo antifibrotic effects of rosmarinic acid on experimental liver fibrosis. *Phytomedicine*. 17 (3-4) : 282–8.
144. Hossain, M.A., Ismail, Z., 2013. Isolation and characterization of triterpenes from the leaves of *Orthosiphon stamineu*. *Arabian Journal of Chemistry*. 6 (3) : 295-298.
145. Pollier, J., Goossens, A., 2012. Oleanolic acid. *Phytochemistry*. 77 : 10-15.
146. Voirin, B., Bayet, C., Faure, O., Jullien, F., 1999. Free flavonoid aglycones as markers of parentage in *Mentha aquatica*, *M. citrata*, *M. spicata* and *M. x piperita*. *Phytochemistry*. 50 (7) :1189-1193.
147. Jing, W., Hui, R., Qiao-Lin, X., Zhong-Yu, Z., Ping, W., Xiao-Yi, W., Yong, C., Xue-Xiang, C., Jian-Wen, T., 2015. Antibacterial oleanane-type triterpenoids from pericarps of *Akebiatrifoliata*. *Food Chemistry*. 168 : 623-629.
148. Jin, K.C., Sung-Wan, K., Duk-Sil, K., Jong, Y.L., Soyoung, L., Hyun-Mee, O., Yeong, S.H., Jeongsoo, Y., Pil-Hoon, P., Tae-Yong, S., Taeg, K.K., 2016. Oleanolic acid acetate inhibits rheumatoid arthritis by modulating T cell immune responses and matrix-degrading enzymes. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 290 : 1-9.
149. Nyigo, V.A., Xolani, P., Mabiki, F., Malebo, H.M., Mdegela, R.H., Fouche, G., 2016. Isolation and identification of euphol and β -sitosterol from the dichloromethane extracts of *Synadenium glaucescens*. *The Journal of Phytopharmacology*. 5 (3): 100-104
150. Ali, M.S., Saleem, M., Ahmad, W., Parvez, M., Yamdagni, R., 2002. A chlorinated monoterpene ketone, acylated β -sitosterol glycosides and a flavanone glycoside from *Mentha longifolia* (Lamiaceae). *Phytochemistry*. 59 (8) : 889-895.
151. Singh, B., Sahuand, P.M., Sharma, M.K., 2002. Anti-inflammatory and antimicrobial activities of triterpenoids from *Strobilanthes callosus* Nees. *Phytomedicine*. 9 (4) : 355-359.
152. Dae-sup, P., Choi, S.Z. Ran, K.K., Mee, L.S., Ro L.K., 2004. Immunomodulatory activity of triterpenes and phenolic compounds from *Viscum album* L. *Journal of Applied Pharmacology*. 11 : 1-4.
153. Serge, L., Isabelle, C., André, P., Charles, G., Michaël, O., Francine, N.L., Vakhtang, M., Jean, L., 2017. Chemical composition and anti-herpes simplex virus type 1 (HSV-1)

- activity of extracts from *Cornus canadensis*. BMC Complementary and Alternative Medicine. BMC Complementary and Alternative Medicine. 17 (1) : 123.
- 154.** Okoye, F.B.C., Sawadogo, W.R., Sendker, J., Aly, A.H., Quandt, B., Wray, V., Hensel, A., Esimone, C. O., Debbab, A., Diederich, M., Proksch, P., 2015. Flavonoid glycosides from *Olaaxmannii*: Structure elucidation and effect on the nuclear factor kappa B pathway. Journal of Ethnopharmacology. 176 : 27-34.
- 155.** Fernanda, M. R., Marcelo, J. P. F., Mads, H. C., Magdalena, R., Claudia, M. F., 2019. Acylated Flavonoid Glycosides are the Main Pigments that Determine the Flower Colour of the Brazilian Native Tree *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn. Molecules. 24 : 718-733.
- 156.** Fawzi, F., Mahdi, M.F., Abaas, I.S., 2019. Isolation of Astragalins from *Cressa cretica* cultivated in Iraq. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 11 (1) : 185-190.
- 157.** Ghavam-Haghi, F., Masoud, S., Dinani, M.S., 2017. Isolation and identification of Astragalins and 2-methoxy tyrosol from the bulbs of *Allium paradoxum*. Journal of Herbmed Pharmacology. 6 (3) : 114-118.
- 158.** Olga, S.T., Diamanto, M.L., Michalis, K.S., Eugene, L.K., 2019. Flavonoids and phenolic acids from the aerial parts of *Alyssum alyssoides* L. (Brassicaceae). Biochemical Systematics and Ecology. 83 : 51-53.
- 159.** Hee-Wook, P., Nam-In, B., Sung-Hoon, K., Byoung-Mog, K., In-Sik, C., Mi-Hyun, P., Sang-Hyun, K., Dae-Keun, K., 2004. Phytochemical Components from the Whole Plants of *Arabis glabra* (L.) Bernh. Korean Journal of Pharmacognosy. 35 (4) : 320-323.
- 160.** Bennett, R.N., FRED A. Mellon, F.A., Foidl, N., Pratt, J.H., Dupont, M.S., Perkins, L., KROON, P.A., 2003. Profiling Glucosinolates and Phenolics in Vegetative and Reproductive Tissues of the Multi-Purpose Trees *Moringa oleifera* L. (Horseradish Tree) and *Moringa stenopetala* L. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51 (12): 3546–3553.
- 161.** Riaz, A., Rasul, A., Ghulam, H., Zahoo, M.K., Jabeen, F., Subhani, Z., Younis, T., Ali, M., Sarfraz, I., Selamoglu, Z., 2018. Astragalins: A Bioactive Phytochemical with Potential Therapeutic Activities. Advances in Pharmacological Sciences. 25 : 1-15.
- 162.** Strack, D., Heilemann, J., Wray, V., Dirks, H., 1989. Structures and accumulation patterns of soluble and insoluble phenolics from Norway spruce needles. Phytochemistry. 28 (8) : 2071-2078.
- 163.** Baderschneider, B., Winterhalter, P., 2001. Isolation and Characterization of Novel Benzoates, Cinnamates, Flavonoids, and Lignans from Riesling Wine and Screening for Antioxidant Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49 (6) : 2788–2798.

164. Xi-Feng, T., Jia-Yue, Y., Chong-Ren, Y., Ying-Jun, Z., 2008. Five New Flavonol Glycosides from the Fresh Flowers of *Camellia reticulata*. *Helvetica Chimica Acta*. 91(7) :1305-1312.
165. Qizhen, D., Yuanjin, X., Lei, L., Yang Z., Gerold J., Winterhalter, P., 2006. Antioxidant Constituents in the Fruits of *Luffa cylindrica* (L.) Roem. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (12): 4186–4190.
166. Liangliang, Y., Suyou, Z., Ziyi, H., Lin, C., Muhammad, F, N., Chunpeng, W. 2020. Anti-Inflammatory Constituents From *Chaenomeles speciosa*. *Natural Product Communications*. 15 (3): 1–5.
167. Qizhen, Du, Yuanjin, X., Lei, L., Yang, Z., Gerold, J., Peter, W., 2006. Antioxidant Constituents in the Fruits of *Luffa cylindrica* (L.) Roem. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54 (12) : 4186–4190.
168. Ghosal, S., Singh, A.K., Chaudhuri, R.K., 1976. Chemical Constituents of Gentianaceae XX: Natural Occurrence of (-)-Loliolide in *Canscora decussata*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 65 (10) : 1549-1551.
169. Aissaoui, H., 2018. Investigation phytochimique de plantes médicinales sahariennes– Activité biologique. p : 127.
170. Reiko, T., Matsunaga, S., 1989. loliolide and olean-12-en-3 β , 9 α -triol from *euphorbia supina*. *Phytochemistry*. 28 (6) : 1699-1702.
171. Hodges, R., Porte, A.L., 1964. The structure of Loliolide: A terpene from *Lolium perenne*. *Tetrahedron*. 20 (6) : 1463-1467.
172. Grabarczyk, M., Wińska, K., Mączka, W., Potaniec, B., Anioł, M., 2015. Loliolide - the most ubiquitous lactone. *Folia Biologica et Oecologica*. 11: 1-8.
173. Percot, A., Yalcin, A., Aysel, V., Erdugan, H., Dural, B., Guven, K. C., 2009. Loliolide in marine algae. *Natural Product Research*. 23 (5) : 460-465.
174. Sunghun, C., Dong, G.L., Yong-Su, J., Ho, B. K., Eun, J.C., Sanghyun, L., 2016. Phytochemical Identification from *Boehmeria nivea* Leaves and Analysis of (-)- Loliolide by HPLC. *Natural Product Sciences*. 22 (2) : 134-139.
175. Ying-ying, S., Hui, W., Gan-lin, G., Yin-fang, P., Bin-lun Y., Chang-hai W., 2016. Isolation, purification, and identification of antialgal substances in green alga *Ulva prolifera* for antialgal activity against the common harmful red tide microalgae. *Environmental Science and Pollution Research*. 23: 1449–1459.

176. Eleni, A., Raheel, A., Hina, S., Muhammad, I. C., Constantinos. G. T., Ioannis. P.G., 2017. High Resolution NMR Spectroscopy as a Structural and Analytical Tool for Unsaturated Lipids in Solution. *Molecules*. 22: 1663-1734.
177. Chin, S.F., Liu, W., Storkson, M.J., Ha, Y.L., Pariza, M.W., 1992. Dietary Sources of Conjugated Dienoic Isomers of Linoleic Acid, a Newly Recognized Class of Anticarcinogens. *Journal of food composition and analysis*. 5: 185-197.
178. Saratha.V, Pillai, S.I., Subramanian, S., 2011. Isolation and characterization of lupeol, a triterpenoid from *calotropis gigantea* latex. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 10 (2) : 54-57.
179. Beserra, F.P., Meilang Xue, M., Maia, G.A., Ariane, L.R., Pellizzon, C.H., Jackson, C.J., 2018. Lupeol, a Pentacyclic Triterpene, Promotes Migration, Wound Closure, and Contractile Effect *In Vitro*: Possible Involvement of PI3K/Akt and p38/ERK/MAPK Pathways. *Molecules*. 23 : 2819.
180. Maciel e Silva, A.T., Magalhães, C.G., Duarte, L.P., Mussel, W.N., Ruiz, A.L., Shiozawa, L., João, E.C., Trindade, I.C., Filho, S.A.V., 2017. Lupeol and its esters: NMR, powder XRD data and *in vitro* evaluation of cancer cell growth. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 53 (3) : 1-10.
181. Jae-Woong, L., Dea-Young, L., Jin-Gyeong, C., Nam-In, B., Youn-Hyung, L., 2010. Isolation and Identification of Sterol Compounds from the Red Kohlarabi (*Brassica oleracea* var. *gengylodes*) Sprouts. *Journal of Applied Biological Chemistry*. 53 (4): 207-211.
182. Consolacion, Y.R., Guardamano, J.D., Tan, M.C.S., Chien-Chang, S., 2016. Chemical Constituents of *Brassica rapa Chinensis* L. and *Brassica rapa* var. *Parachinensis* (Baily) Hanelt. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*. 7 (5) : 316-318.
183. Ateya, A., Al-Gendy, A., Kotob, S., Hafez, A.I., 2016. Chemical Constituents, Antioxidant, Antimicrobial and Anti-inflammatory Activities of *Erysimum corinthium* Boiss. (Brassicaceae). *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 8(10) : 1601-1609.
184. Aryal, S., Baniya, M. K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R.; Koirala, N., 2019. Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from Western Nepal. *Plants*. 8 (4): 96.

185. Fatma, G., Mouna, B.F., Mondher, M., Ahmed, L., 2014. *In-vitro* assessment of antioxidant and antimicrobial activities of methanol extracts and essential oil of *Thymus hirtu* ssp. *algeriensis*. *Lipids in Health and Disease*. 13 (1): 114.
186. Rezzoug, M., Bakchiche, B., Gherib, A., Roberta, A., Kiliñarçslan, Ö., Mammadov, R., Bardaweel, S. K., 2019. Chemical composition and bioactivity of essential oils and Ethanolic extracts of *Ocimum basilicum* L. and *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. from the Algerian Saharan Atlas. *BMC Complementary Altern Med*. 19 (1): 146.
187. Akula, R., Ravishankar, G.A., 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *PlantSignaling and Behavior*. 6 (11): 1720-1731.
188. González-Chavira, M.M., Herrera-Hernández, M.G., Guzmán-Maldonado, H., Pons-Hernández, J.L., 2018. Controlled water deficit as abiotic stress factor for enhancing the phytochemical content and adding-value of crops. *Scientia Horticulturae*. 234: 354–360.
189. Craft, B.D., Kerrihard, A.L., Amarowicz, R., Pegg, R.B., 2012. Phenol-based antioxidants and the *in vitro* methods used for their assessment. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 11 (2): 148-173.
190. Sangeetha, G., Vidhya, R., 2016. *In vitro* anti-inflammatory activity of different parts of *Pedaliium murex* (L.). *International Journal of Herbal Medicine*. 4 (3): 31-36.
191. Ingle, P. V., Patel, D. M., 2011. C-reactive protein in various disease condition-an overview. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 4 (1): 9-13.
192. Williams, L. A. D., O'Connar, A., Latore, L., Dennis, O., Ringer, S., Whittaker, J. A., Kraus, W., 2008. The *in vitro* anti-denaturation effects induced by natural products and non-steroidal compounds in heat treated (immunogenic) bovine serum albumin is proposed as a screening assay for the detection of anti-inflammatory compounds, without the use of animals, in the early stages of the drug discovery process. *West Indian MedicalJournal*. 57(4): 327-331.
193. Awe, E.O., Makinde, J.M., Adeloye, O.A., Banjoko, S.O., 2009. Membrane stabilizing activity of *Russelia equisetiformis* Schlecht & Chan. *Journal of Natural Products*. 2: 3-9.
194. Joujeh, D., Lahdo, R., Ghrewaty, A., 2017. Evaluation of hemolytic and anti-hemolytic activity of the aerial parts of *Sonchus oleraceus* extracts. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*. 3 (10): 3745-3751.
195. Simon, M., Horovská, L Greksak, M., Dušinský, R., Nakano, M., 2000. On red blood cells of Japanese Quails. *General Physiology and Biophysics*. 19: 365-371.

196. Hazzit, M., Baaliouamer, A., Veríssimo, A.R., Faleiro, M.L., Miguel, M.G., 2009. Chemical composition and biological activities of Algerian *Thymus* oils. *Food Chemistry*. 116 (3): 714-721.
197. Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouari, S., Bougatef, A., Karray, A., Neffati, M., Ayadi, M. A., 2011. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae). *Food and Bioproducts Processing Journal*. 89 (4): 257-265.
198. Ali, I.H., Chaouachi, M., Bahri, R., Chaieb, I., Boussaïd, M., Harzallah-Skhiri, F., 2015. Chemical composition and antioxidant, antibacterial, allelopathic and insecticidal activities of essential oil of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Industry Crops and Products*. 77: 631-639.
199. Giweli, A., Džamić, A., Soković, M., Ristić, M., Marin, P., 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Thymus algeriensis* wild-growing in Libya. *Open Life Science*. 8 (5): 504-511.
200. Ait-Ouazzou, A., Lorán, S., Bakkali, M., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., 2011. Conchello, P. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91 (14): 2643–2651.
201. Dob, T., Dahmane, D., Benabdelkader, T., Chelghoum, C., 2006. Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *International Journal of Aromatherapy*. 16 (2): 95-100.
202. Messaoudi, M., Benreguieg, M., Merah, M., Messaoudi, Z.A., 2019. Antibacterial effects of *Thymus algeriensis* extracts on some pathogenic bacteria. *Acta Scientiarum Biological Sciences*. 41: 48548-48559.
203. Nzogong, R.T., Ndjateu, F.T., Ekom, S.E., Fosso, J.M., Awouafack, M.D., Tene, M., Choudhary, M.I., 2018. Antimicrobial and antioxidant activities of triterpenoid and phenolic derivatives from two Cameroonian Melastomataceae plants: *Dissotis senegambiensis* and *Amphiblemma monticola*. *BMC Complementary Medicine and therapies*. 18 (1): 159.
204. Bharat, S., Ram, A.S., 2016. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of flavonoids from *Heliotropium ellipticum* exudate. *Current Bioactive Compounds*. 12: 123–131.

ملخص

ان هذا العمل البحثي يتمحور حول الدراسة الكيميائية وتقييم النشاط البيولوجي لنبتتين جزائريتين صالحتين للأكل هما *Thymus algeriensis* من عائلة Lamiaceae و *Diplotaxis erucoides* من عائلة Brassicaceae. يركز هذا العمل على استخلاص وعزل المركبات الأيضية الثانوية المتواجدة في النبتتين بطرق كروماتوجرافية مختلفة وتحديد بنيتها بالطرق الطيفية المعتادة لها. مما أدى إلى عزل ثمانية عشر مركب طبيعي من عائلات مختلفة مثل البوليفينولات، التربينات، والدهون أحادية الغليسيريدي.

أسفر الفحص الكيميائي لمستخلصات الكلوروفورم والبتانول للجزء الهوائي لنبات *Thymus algeriensis* إلى عزل عشرة مستقلبات ثانوية: 4 فلافونويدات، 4 أحماض فينولية واثنين من ثلاثية التربينات. ومن مستخلصات اثيل الاسيتات والبتانول للجزء الهوائي لنبات *Diplotaxis erucoides*، تم فصل وتحديد ثمانية مركبات طبيعية: 2 فلافونويدات أحدهما ذو هيكل جديد، 2 من الدهون أحادية الغليسيريدي، 1 كوماريل، 2 ثلاثية التربينات و 1 أحادي التربينات. أظهرت نتائج تحديد المحتوى الكلي للمركبات البوليفينولية والفلافونويدات لمستخلصات اثير البترول، الكلوروفورم والبتانول للنبته *Thymus algeriensis* باستخدام كل من الكاشف Folin-Ciocalteu و ثلاثي كلوريد الألومنيوم أن مستخلص البوتانول هو الأغنى في مجموع مركبات البوليفينول و الفلافونويد مقارنة بمستخلصات اثير البترول و الكلوروفورم.

تم تقييم النشاط المضاد للالتهابات عن طريق اختبار تمسخ ألومين البيض. جميع المستخلصات الخامه للنبته *Thymus algeriensis* تمنع تمسخ البروتين اعتمادا على التركيز. بالإضافة إلى ذلك، تم تحديد السعة المضادة للأكسدة من خلال خمس تقنيات مختلفة:

- النشاط الإزاحي للجذر الحر DPPH،
- القدرة المضادة للأكسدة النحاس CUPRAC،
- اختبار القدرة المضادة للأكسدة الحديد، FRAP،
- وإجمالي القدرة المضادة للأكسدة عن طريق الفوسفوموليبيدات PPM.

تم تقييم النشاط المضاد للانحلال بواسطة اختبار هشاشة كريات الدم الحمراء. أظهرت النتائج أن مستخلص البوتانول له أكبر نشاط مضاد للأكسدة في جميع الطرق المختبرة ويمنع انحلال الدم بطريقة تعتمد على الجرعة بقيمة ICH_{50} تبلغ $322,85 \pm 0,87$ ميكروغرام / مل

لقد تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا لمستخلصات اثير البترول، الكلوروفورم والبتانول للنبته *Thymus algeriensis*، ومستخلصات اثير البترول، اثيل الاسيتات والبتانول للنبته *Diplotaxis erucoides* ضد أربع سلالات بكتيرية هي المكورات العنقودية الذهبية، المكورات المعوية البرازية، الاشريكية القولونية والاروجينوزا الزائفة. استخدمنا السيبروفلوكساسين والكوتريموكسازول كمرجع. أظهرت النتائج أن مستخلصات النبته *Thymus algeriensis* لديها فعالية جيدة ضد معظم السلالات التي تم اختبارها، مع مناطق تثبيط تتراوح من 8 إلى 15 ملم، من ناحية أخرى، أظهرت مستخلصات النوع *Diplotaxis erucoides* نشاطاً ضعيفاً ضد معظم السلالات المختبرة.

الكلمات المفتاحية:

Thymus algeriensis، *Diplotaxis erucoides*، البوليفينولات، التربينات، الفلافونويدات، الدهون أحادية الغليسيريول، نشاط مضاد للأكسدة، نشاط مضاد للانحلال ونشاط مضاد للجراثيم.

Résumé

La présente étude phytochimique et l'évaluation de l'activité biologique concerne deux plantes comestibles Algériennes une Lamiaceae (*Thymus algeriensis*) et une Brassicaceae (*Diplotaxis eruroides*). Le travail porte sur l'extraction, l'isolement par diverses méthodes chromatographiques et la détermination structurale par les techniques spectroscopiques usuelles de métabolites secondaires. Dix-huit composés ont été isolés des deux espèces appartenant aux différentes classes de produits naturels comme les polyphénols, les terpènes, et les monoglycérolipides.

L'étude phytochimique des extraits CHCl_3 et *n*-BuOH de la partie aérienne de *Thymus algeriensis* a abouti à l'isolement de dix métabolites secondaires dont 4 flavonoïdes, 4 acides phénoliques et Deux triterpènes. A partir des extraits AcOEt et *n*-BuOH de la partie aérienne de *Diplotaxis eruroides* huit substances naturelles ont été isolées et identifiées, se répartissant en 2 flavonoïdes dont un possède une nouvelle structure, 2 monoglycérolipides, 1 coumaroyl, 2 triterpènes et 1 monoterpène.

Les résultats du dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes des extraits EP, CHCl_3 et *n*-BuOH de la plante *Thymus algeriensis*, estimées respectivement par les méthodes de Folin-Ciocalteu et de trichlorure d'aluminium (AlCl_3), révèlent que l'extraits *n*-BuOH est le plus riche en polyphénols totaux et flavonoïdes par rapport aux extraits EP et CHCl_3 .

L'activité anti-inflammatoire *in vitro* a été évaluée par le test de dénaturation de l'albumine d'œuf. Tous les extraits bruts empêchent la dénaturation des protéines de manière dépendante de la concentration.

De plus, la capacité antioxydante a été déterminée par cinq techniques différentes : le piégeage du radical libre DPPH, la capacité antioxydante réductrice cuivrique CUPRAC, le test de pouvoir réducteur du fer FRAP, le test de phosphomolybdate PPM et le dosage du thiocyanate ferrique. L'activité antihémolytique a été établie par le test de fragilité osmotique des érythrocytes. Les résultats montrent que l'extrait butanolique exhibe la plus grande activité antioxydante dans toutes les méthodes testées et inhibe l'hémolyse de manière dose-dépendante avec une valeur de CIH_{50} à $322,85 \pm 0,87 \mu\text{g} / \text{ml}$.

En outre, l'activité antibactérienne des extraits EP, CHCl_3 et *n*-BuOH de l'espèce *Thymus algeriensis* et les extraits EP, AcOEt et *n*-BuOH de l'espèce *Diplotaxis eruroides* a été testée par la méthode de diffusion sur disque de gélose contre quatre souches bactériennes à savoir *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*. La ciprofloxacine et la cotrimoxazole sont utilisés comme des composés de référence. Les extraits testés de l'espèce *T. algeriensis* ont montré une activité antibactérienne contre la plupart des souches testées, avec des zones d'inhibition allant de 8 à 15 mm, par contre les extraits de l'espèce *D. eruroides* manifestent une faible activité antibactérienne contre la plupart des souches testées.

Mots clés : *Thymus algeriensis*, *Diplotaxis eruroides*, Polyphénols, Terpènes, Flavonoïdes Monoglycérolipides, Activité antioxydante, Activité antihémolytique et Activité antibactérienne.

Abstract

The present phytochemical study and the evaluation of the biological activity report two edible Algerian plants named *Thymus algeriensis* (Lamiaceae) and *Diplotaxis erucoïdes* (Brassicaceae). The work focuses on the extraction, the isolation by various chromatographic methods and the structural determination by different spectroscopic technics of secondary metabolites. Eighteen compounds have been isolated from the two species including different families of natural product such as polyphenols, terpenes, and monoglycerolipids.

The phytochemical study of CHCl_3 and *n*-BuOH extracts from the aerial parts of *Thymus algeriensis* resulted in the isolation of ten secondary metabolites including 4 flavonoids, 4 phenolic acids and two triterpenes. From the EtOAc and *n*-BuOH extracts of the aerial parts of *Diplotaxis erucoïdes* eight natural substances have been isolated and identified. They are divided into 2 flavonoids, one of which has a new structure, 2 monoglycerolipids, 1 coumaroyl, 2 triterpenes and a monoterpene.

The results of the determination of the total polyphenols and flavonoids of the PE, CHCl_3 and *n*-BuOH extracts of *Thymus algeriensis* plant, estimated respectively by the methods of Folin-Ciocalteu and of aluminum trichloride (AlCl_3), reveal that the *n*-BuOH extracts is the richest in total polyphenols and flavonoids compared to PE and CHCl_3 extracts.

The *in vitro* anti-inflammatory activity was assessed by the egg albumin denaturation test. All crude extracts prevent protein denaturation in a concentration dependent manner. In addition, the antioxidant capacity was determined by five different technics: the scavenging of the free radical DPPH, the cupric reducing antioxidant capacity CUPRAC, the FRAP iron reducing power test, the PPM phosphomolybdate test and the ferric thiocyanate assay. Antihemolytic activity was established by the erythrocyte osmotic fragility test. The results show that butanol extract has the greatest antioxidant activity in all the tested assays and inhibits hemolysis in a dose-dependent manner with an ICH_{50} value of $322.85 \pm 0.87 \mu\text{g} / \text{ml}$.

Furthermore, the antibacterial activity of the PE, CHCl_3 and *n*-BuOH extracts of the species *Thymus algeriensis* and the PE, EtOAc and *n*-BuOH extracts of the *Diplotaxis erucoïdes* species was tested by the agar disk diffusion method against four bacterial strains namely *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Ciprofloxacin and cotrimoxazole are used as references. The tested extracts of the species *T. algeriensis* showed antibacterial activity against most of the tested strains, with zones of inhibition ranging from 8 to 15 mm, on the other hand the extracts of the species *D. erucoïdes* displayed a weak antibacterial activity against most strains.

Keywords: *Thymus algeriensis*, *Diplotaxis erucoïdes*, Polyphenols, Terpenes, Flavonoids Monoglycerolipids, Antioxidant activity, Antihemolytic activity and Antibacterial activity.